

主管
中国科学技术协会
主办
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所
主编
秦川

编辑部主任

李继平

编辑

《中国比较医学杂志》编辑部

出版

中国实验动物学会

发行

《中国比较医学杂志》编辑部

100021,北京市朝阳区潘家园南里5号

电话:010-67779337

传真:010-67770690

E-mail:bjb@cnilas.org

http://zgsgydw.alljournal.ac.cn/

zghjyxzz/ch/index.aspx

广告发布登记

京朝工商广字第8131号

照排

同方知网(北京)技术有限公司

印刷

北京博海升彩色印刷有限公司

邮发代号

82-917

定价

每期50.00元,全年600元

中国标准连续出版物号

ISSN 1671-7856

CN 11-4822/R

2018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:中国邮阅读网:www.183read.com

本期执行主编 贺争鸣

本期责任编辑 崔韶 李洁蕾

目次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

研究报告

- 1,25(OH)₂VD₃对Zucker糖尿病肥胖大鼠肝线粒体损伤的保护作用 李艳艳,冯里茹,张红敏,等(01)
- 大黄素对ApoE基因敲除小鼠脂肪棕色化的影响 程龙,董世芬,袁悦莹,等(08)
- miR-34c在口腔鳞状细胞癌的表达及对Tca8113细胞生物学行为的影响 常凯,高继萍,宋晓娜,等(15)
- 4T1炎性乳腺癌细胞接种联合皮质酮注射诱导乳腺癌并发抑郁症小鼠模型的研究 杨蕊,孟盼,杨琴,等(21)
- 自发性2型糖尿病db/db小鼠肝病理损伤特点 康佳丽,梁伟时,孟徐兵,等(27)
- 胶原诱导与抗原诱导C57BL/6小鼠类风湿关节炎造模的比较研究 范凯健,吴菁,王婷玉(31)
- 用于四种常用品系大鼠鉴定的单核苷酸多态性标记筛查和应用研究 曾玉琳,蒙裕欢,张钰,等(36)
- 醒脑再造胶囊对甲醛致小鼠记忆损害的影响 盛志豪,陈颖,马瑞,等(42)
- 姜黄素预处理对干热环境下不同程度中暑大鼠病理损伤及氧化应激的影响 李建瑛,肇寅辉,康燕,等(48)
- 肺腺瘤小鼠模型的建立及其血生化、血常规、尿常规、病理检测 张修彦,高亚奇,陈伟盛,等(53)
- 广州驯化藏鸡与五黑鸡蛋品质及营养成分比较分析 袁进,吴清洪,陈傍柱,等(60)
- GnRH-a反加雌激素对大鼠子宫内膜异位症模型的疗效及复发的研究 张玲玉,刘颖蕾,乔海风,等(67)
- 裸鼠原位肝癌动态影像检查与病理对照研究 沈智勇,陈瑜凤,邵晶晶,等(74)
- 三个远交系豚鼠微卫星遗传结构分析 刘迪文,谭海明,陈雁虹,等(81)
- GFP/Luc双标食管癌细胞动物模型建立及其活体成像观察 柏文,彭晓清,王佩文,等(89)
- 栀子苷对乳腺炎动物模型IL-6、TNF-α和IL-1β表达的影响 黄永周,李漪,丛竹军(95)

技术方法

- SD大鼠肢体缺血-再灌注损伤模型的建立 申震,朱付平,潘成熙,等(100)
- 应用新型超声诊断仪检测大鼠心功能 陈婷婷,廖献杉,曾兰,等(106)

教学管理

- “双一流”模式下高校研究生实验动物学课程教学模式探索 吴艳玲,张先,崔振宇,等(111)
- 医学生实验动物福利与伦理实践教学的思考 高建峰,汤宏斌,杨四军,等(115)
- 基于成果导向教育理念的实验动物科研项目在大学生综合素质培养中的实践 鞠吉雨,徐玉梅,刘琳琳,等(119)
- 中医院校本科生阶段开设“实验动物学”选修课的探索 刘建卫,章明星,潘建明,等(123)

会讯

- 《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》第四届编委会换届大会隆重召开 (66)

广告

(封二,封三,封底,126)

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 28 Number 11 November 30 2018

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

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

Editing

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

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Publishing

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

Distributor

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

Mail-order

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2018 by the Chinese Association
for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- Protective effect of 1,25(OH)₂VD₃ on liver mitochondrial injury in ZDF rats
..... *LI Yanyan, FENG Liru, ZHANG Hongmin, et al.* (01)
- Effect of emodin on adipose browning in ApoE knockout mice
..... *CHENG Long, DONG Shifen, YUAN Yueying, et al.* (08)
- Expression of miR-34c in oral squamous cell carcinoma and its influence on biological behaviors of Tca8113 cells
..... *CHANG Kai, GAO Jiping, SONG Xiaona, et al.* (15)
- 4T1 inflammatory breast cancer cell inoculation combined with corticosterone injection to establish a mouse model of breast cancer complicated with depression
..... *YANG Hui, MENG Pan, YANG Qin, et al.* (21)
- Pathological characteristics of liver injury in spontaneous type 2 diabetic db/db mice
..... *KANG Jiali, LIANG Weishi, MENG Xubing, et al.* (27)
- Comparison of collagen-induced and antigen-induced C57BL/6 mouse models of rheumatoid arthritis
..... *FAN Kaijian, WU Jing, WANG Tingyu* (31)
- Screening of single nucleotide polymorphism markers and their application to identification of four common strains of rats
..... *ZENG Yulin, MENG Yuhuan, ZHANG Yu, et al.* (36)
- Ameliorating effect of Xingnaozaizao capsule on formaldehyde-induced memory impairment in mice
..... *SHENG Zhihao, CHEN Ying, MA Rui, et al.* (42)
- Effect of curcumin pretreatment on renal pathological changes and the level of oxidative stress in rats with various degrees of heat stroke in a dry heat environment
..... *LI Jianying, ZHAO Yinhui, KANG Yan, et al.* (48)
- Establishment of a mouse model of pulmonary adenoma and its routine examination of blood and urine, blood biochemistry and pathology
..... *ZHANG Xiuyan, GAO Yaqi, CHEN Weisheng, et al.* (53)
- Comparative analysis of egg quality and nutritional components between domesticated Tibetan chicken in Guangzhou and Wuhei chicken
..... *YUAN Jin, WU Qinghong, CHEN Bangzhu, et al.* (60)
- Effect of GnRH-a combined with estrogen on endometriosis in a rat model and its recurrence
..... *ZHANG Lingyu, LIU Yinglei, QIAO Haifeng, et al.* (67)
- Scheduled imaging and pathological analysis of an orthotopic hepatic carcinoma model in nude mice
..... *SHEN Zhiyong, CHEN Yufeng, SHAO Jingjing, et al.* (74)
- Analysis of microsatellite genetic structures of three outbred strains of guinea pig
..... *LIU Diwen, TAN Haiming, CHEN Yanhong, et al.* (81)
- Establishment of luciferase and green fluorescent protein-labeled esophageal cancer cells for application in a mouse model and *in vivo* imaging
..... *BAI Wen, PENG Xiaoqing, WANG Peiwen, et al.* (89)
- Effect of geniposide on expression of IL-6, TNF- α , and IL-1 β in an animal model of mastitis
..... *HUANG Yongzhou, LI Yi, CONG Zhujun* (95)
- Establishment of a Sprague-Dawley rat model of limb ischemia-reperfusion injury
..... *SHEN Zhen, ZHU Fuping, PAN Chengxi, et al.* (100)
- Detection of cardiac functions in rats using a new ultrasonic diagnostic apparatus
..... *CHEN Tingting, LIAO Xianshan, ZENG Lan, et al.* (106)
- Exploration of a teaching model of laboratory animal science for postgraduates under the "Double First Class"
..... *WU Yanling, ZHANG Xian, CUI Zhenyu, et al.* (111)
- Reflections on the practical teaching of animal welfare and ethics to medical students
..... *GAO Jianfeng, TANG Hongbin, YANG Sijun, et al.* (115)
- The practice of experimental animal research projects for comprehensive quality cultivation of college students under the concept of outcome-based education
..... *JU Jiyu, XU Yumei, LIU Linlin, et al.* (119)
- Exploration of offering an elective course of laboratory animal science for undergraduate students in traditional Chinese medical universities and colleges
..... *LIU Jianwei, ZHANG Mingxing, PAN Jianming, et al.* (123)

1,25(OH)₂VD₃ 对 Zucker 糖尿病肥胖大鼠肝 线粒体损伤的保护作用

李艳艳,冯里茹,张红敏,谭洪兴,朱李佳,王 俊*

(深圳市慢性病防治中心,广东 深圳 518020)

【摘要】 目的 探讨 1,25(OH)₂VD₃ 对 Zucker 糖尿病肥胖(Zucker diabetic fatty,ZDF)大鼠肝线粒体损伤的保护作用及相关机制。**方法** 雄性 5~6 周龄 Zucker 瘦型(Zucker lean,ZL)大鼠(对照鼠)及 ZDF 大鼠(模型鼠)按照体重随机分为 3 组,即对照组(ZL)、模型组(ZDF)及维生素 D(vitamin D,VD)干预组(ZDF + VD)。各组大鼠喂养至 12 周龄后,检测肝损伤、线粒体损伤相关指标及潜在信号通路蛋白的变化。**结果** 与 ZL 组相比,ZDF 组大鼠肝出现严重的脂质沉积,氧化损伤[活性氧簇(ROS)生成增加,丙二醛(MDA)水平明显升高,而谷胱甘肽(GSH)水平明显降低],线粒体肿胀、变性、膜电位显著下降,线粒体生物合成关键蛋白过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α ,PGC-1 α)、核呼吸因子-1(nuclear respiratory factor 1,NRF1)和线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A,TFAM)及上游调控蛋白沉默信息调节因子 2 相关酶 1(sirtuin 1,SIRT1)表达均明显下降,1,25(OH)₂VD₃ 干预减轻了 ZDF 大鼠肝氧化损伤、线粒体损伤,上调了 SIRT1、PGC-1 α 、NRF1 和 TFAM 的水平,增强了线粒体生物合成。**结论** 1,25(OH)₂VD₃ 可能通过 SIRT1/PGC-1 α 介导的线粒体保护机制减轻 ZDF 大鼠肝损伤。

【关键词】 1,25(OH)₂VD₃;ZDF 大鼠;肝氧化损伤;线粒体生物合成

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0001-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.001

Protective effect of 1,25(OH)₂VD₃ on liver mitochondrial injury in ZDF rats

LI Yanyan, FENG Liru, ZHANG Hongmin, TAN Hongxing, ZHU Lijia, WANG Jun*

(Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen 518020, China)

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of 1,25(OH)₂VD₃ on hepatic mitochondrial injury in ZDF rats and the potential mechanism. **Methods** Male Zucker rats (5-6 weeks old) were randomly divided into three groups according to their weight: control (ZL), model (ZDF), and 1,25(OH)₂VD₃ supplementation (ZDF + VD) groups. All rats were treated to 12 weeks of age, and then the related parameters were analyzed. **Results** ZDF rats treated with 1,25(OH)₂VD₃ showed a significant decrease in serum ALT/AST and liver lipid droplet deposition. Treatment with 1,25(OH)₂VD₃ ameliorated mitochondrial injury and increased the expression of mitochondrial biogenesis-related factors SIRT1, PGC-1 α , NRF1, and TFAM. **Conclusions** These findings suggest that 1,25(OH)₂VD₃ alleviates diabetic liver

【基金项目】 国家自然科学基金(81703226);广东省医学基金(A2016130);深圳市科技计划项目(JCYJ20160428145633098, JCYJ20170307144652484);深圳市卫生计生系统科研项目(201605016);深圳市医疗卫生三名工程项目(SZSM201611017)。

【作者简介】 李艳艳(1987—),女,博士研究生,专业:营养与食品卫生学。E-mail: lyhust@126.com

【通信作者】 王俊(1978—),男,主任技师,研究方向:分子营养学。E-mail: junwangwh@hotmail.com

injury by improving mitochondrial biogenesis through upregulating SIRT1, PGC-1 α , NRF1, and TFAM expression.

【Keywords】 1, 25(OH) $_2$ VD $_3$; ZDF rat; liver oxidative damage; mitochondrial biogenesis

糖尿病(diabetes mellitus, DM)是当前严重威胁人类健康的代谢性疾病,长期的代谢紊乱可引起全身多器官病变。肝是糖脂代谢的主要场所,也是胰岛素作用的重要靶器官,肝损伤在 DM 发生发展进程中发挥重要作用^[1]。

糖尿病肝损伤机制复杂,其中活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)介导的氧化应激被认为是肝损伤的关键机制并贯穿始终^[2]。线粒体是细胞内的能量供应中心,参与多种生理活动,然而,线粒体也是内源性 ROS 产生的主要部位^[3]。糖尿病状态下,高糖高脂加重了线粒体负荷,在呼吸链电子传递中产生的过量 ROS 将自身作为首要靶标导致线粒体结构破坏和功能障碍,进一步加剧 ROS 的积聚导致肝严重损伤,从而加重糖脂代谢的紊乱,形成恶性循环^[4-5]。因此,减轻线粒体损伤、修复线粒体结构和功能对于防治糖尿病肝损伤具有重要意义。

线粒体生物合成(mitochondrial biogenesis)是核基因及线粒体基因协同调控下的重要生理活动,在线粒体结构修复及功能维持过程中发挥关键作用^[6]。在糖尿病肝线粒体损伤情况下,增加线粒体生物合成对于恢复肝细胞正常糖脂代谢尤为重要。维生素 D(vitamin D, VD)是一种脂溶性维生素,经肝、肾转化成活性形式 1,25(OH) $_2$ VD $_3$ 后与维生素 D 受体(vitamin D receptor, VDR)结合发挥多种生物学效应,在糖脂代谢过程中亦发挥重要的调节作用^[7]。然而,维生素 D 能否通过线粒体生物合成改善糖尿病肝损伤及相关机制目前鲜有研究。因此,本研究以维生素 D 缺乏状态下的 Zucker 糖尿病肥胖(Zucker diabetic fatty, ZDF)大鼠为对象,探讨 1,25(OH) $_2$ VD $_3$ 对糖尿病肝线粒体损伤的保护作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性自发性肥胖型 2 型糖尿病大鼠(ZDF 大鼠)20 只,体重(127.1 $\pm$ 13.7) g,5~6 周龄;SPF 级雄性 Zucker 瘦型(Zucker lean, ZL)大鼠 10 只,体重(114.3 $\pm$ 7.2) g,5~6 周龄,购于维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0011],动物饲养于华中科技大学实验动物中心

[SYXK(鄂)2016-0057]。本研究通过华中科技大学同济医学院实验动物医学伦理委员会审批(IACUC Number:432)。

1.2 主要试剂与仪器

1,25(OH) $_2$ VD $_3$ (Cayman);2.5%戊二醛固定液(谷歌生物);血清 ALT、AST 检测试剂盒(南京建成);MDA、GSH 测定试剂盒(南京建成);DHE 荧光探针(南京碧云天);线粒体提取试剂盒(碧云天);四甲基罗丹明甲酯(tetramethylrhodamine methyl ester, TMRM)(Sigma-Aldrich);RIPA 裂解液(碧云天);总蛋白提取试剂盒(南京碧云天);蛋白定量试剂盒(Bio-Rad);SIRT1 抗体、PGC-1 α 抗体、TFAM 抗体、NRF1 抗体(Abcam);HRP 标记抗小鼠 IgG 抗体、HRP 标记抗兔 IgG 抗体(CST);ECL 化学发光剂(Millipore)。倒置显微镜(奥林巴斯);透射电子显微镜(Hitachi);化学发光成像仪(Bio-Rad);荧光分光光度计(Thermo)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

所有大鼠在喂养过程中均按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。适应性喂养 1 周后,瘦型鼠为对照组(ZL),胖型鼠按照体重随机分为 2 组:模型组(ZDF)和维生素 D 干预组(ZDF + VD),胖型鼠体重为 105~152 g,分为 105~110 g、111~120 g、121~130 g、130~140 g、141~152 g 五个等级,然后将每个等级的大鼠随机分为 2 组。喂养 Zucker 大鼠专用饲料 Purina #5008(北京科奥协力饲料有限公司提供),在原饲料配方基础上去除添加的维生素 D;1,25(OH) $_2$ VD $_3$ 溶于玉米油中根据体重每两天灌胃 1 次,剂量为每千克体重 5 μ g(剂量根据预实验确定);ZL 组与 ZDF 组大鼠灌胃等体积的玉米油。各组大鼠喂养至 12 周龄,喂养结束后,眼眶取血,迅速剥离肝,进行电镜及病理观察的固定,其他肝组织分装于 -80℃ 保存。

1.3.2 肝损伤指标检测

按照血清 ALT、AST 检测试剂盒操作步骤检测各组大鼠血清中谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)水平;HE 染色观察肝病理改变;硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定心脏丙二醛(MDA)水平,二硫代二硝基苯甲酸(DTNB)比色法测定心脏谷胱甘肽(GSH)水平;肝 ROS 检测:肝组织冰冻切片孵育

DHE 荧光探针, 荧光显微镜观察红色荧光强度并拍照。

1.3.3 肝超微结构观察

动物处死 1 min 内迅速切取截面积为 1 mm² 的 5 mm 肝组织长条, 用 2.5% 的戊二醛缓冲液固定, 经过处理后的切片用透射电子显微镜观察肝超微结构, 尤其是线粒体的损伤。

1.3.4 线粒体膜电位测定

取 100 mg 新鲜肝组织用线粒体提取试剂盒提取线粒体, 使用 100 nmol/L TMRM 荧光染料孵育 (37℃, 30 min) 后, 用荧光分光光度计读取荧光强度。

1.3.5 线粒体生成相关蛋白的检测

Western blot 检测肝线粒体生成相关蛋白 NRF1、TFAM 表达量及上游调节蛋白 SIRT1、PGC-1α 的表达。称取 100 mg 左右肝组织, 加入 10 倍体积的 RIPA 裂解液提取总蛋白。蛋白浓度用 BCA 试剂盒测定。利用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白后, 通过湿转法将蛋白转移到 PVDF 膜上。根据抗体说明书进行一抗和经 HRP 标记的二抗孵育。最后, 加入 ECL 化学发光试剂进行显色, 利用化学发光成像系统进行拍照和灰度统计。

1.4 统计学方法

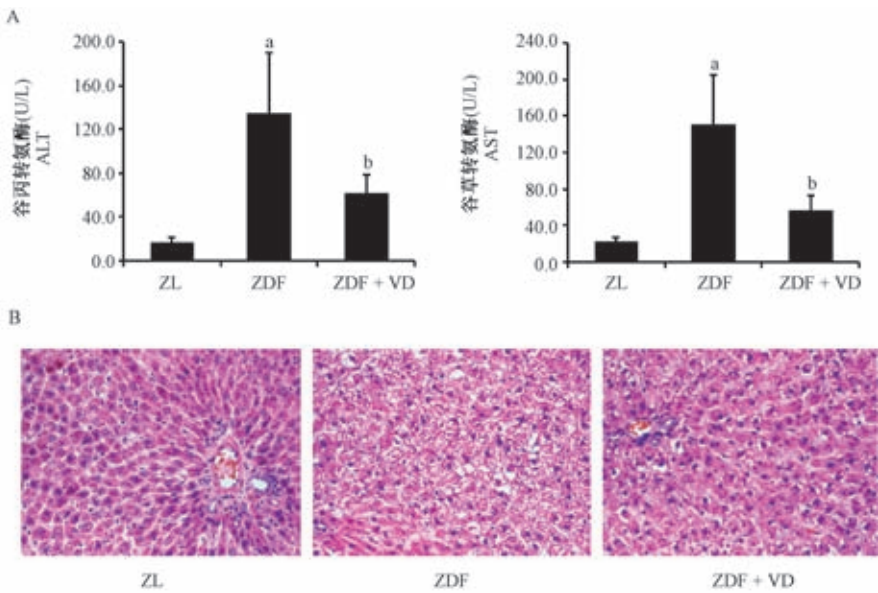
利用 SPSS 18.0 统计软件包进行数据分析, 数据用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用单因素方差中的 LSD-*t* 两两比较方法检验, 以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 1,25(OH)₂VD₃ 改善 ZDF 大鼠肝损伤

血清 ALT、AST 是反映肝损伤的敏感指标。如图 1A 所示: 与 ZL 组相比, ZDF 组大鼠肝细胞 ALT、AST 释放水平显著升高, 血清 ALT、AST 水平约分别增加了 8.3 倍和 6.8 倍。1,25(OH)₂VD₃ 干预后明显减轻了 ZDF 大鼠肝细胞 ALT、AST 的释放。

喂养结束后, 较 ZL 组相比, ZDF 组大鼠肝出现明显的病理改变, 肝体积明显增大, 颜色变浅偏黄, HE 染色结果显示, ZL 组大鼠肝小叶清晰, 肝细胞索以小叶中央静脉为中心呈放射状排列, 没有出现脂滴以及脂肪变性, 细胞核为圆形, 位于细胞中央; 而 ZDF 组大鼠肝出现明显的脂肪病变, 弥漫性小泡脂滴几乎占满整个肝细胞; 1,25(OH)₂VD₃ 干预有效缓解了 ZDF 大鼠肝病变。如图 1B 所示。



注: A: 大鼠血清转氨酶水平。与 ZL 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 ZDF 组比较, ^b $P < 0.05$ 。B: 大鼠肝组织 HE 染色 ($\times 200$)。

图 1 1,25(OH)₂VD₃ 对大鼠血清 ALT、AST 及肝病理损伤的影响

Note. A: Serum transaminases of Zucker rats. Compared with the ZL group, ^a $P < 0.05$. Compared with the ZDF group, ^b $P < 0.05$. B: Liver histology. HE staining ($\times 200$).

Figure 1 Effect of 1,25(OH)₂VD₃ on serum transaminases and liver histology in the Zucker rats

2.2 1,25(OH)₂VD₃ 改善 ZDF 大鼠肝氧化损伤

图 2A 展现的是肝 ROS 水平,较 ZL 组,ZDF 组大鼠肝组织孵育 DHE 探针后红色荧光显著增强,ROS 的产生明显升高。脂质过氧化产物——丙二醛(MDA)的水平能够反映脂质氧化损伤程度,谷胱甘肽(GSH)则反映机体抗氧化水平,如图 2B 所示,与 ZL 组相比,ZDF 组大鼠肝 MDA 水平显著上升而 GSH 水平明显降低,1,25(OH)₂VD₃ 干预后,MDA 水平降低了约 25%,GSH 水平升高了约 41%,显著缓解了 ZDF 大鼠肝氧化损伤。

2.3 1,25(OH)₂VD₃ 对 ZDF 大鼠肝线粒体结构及功能的影响

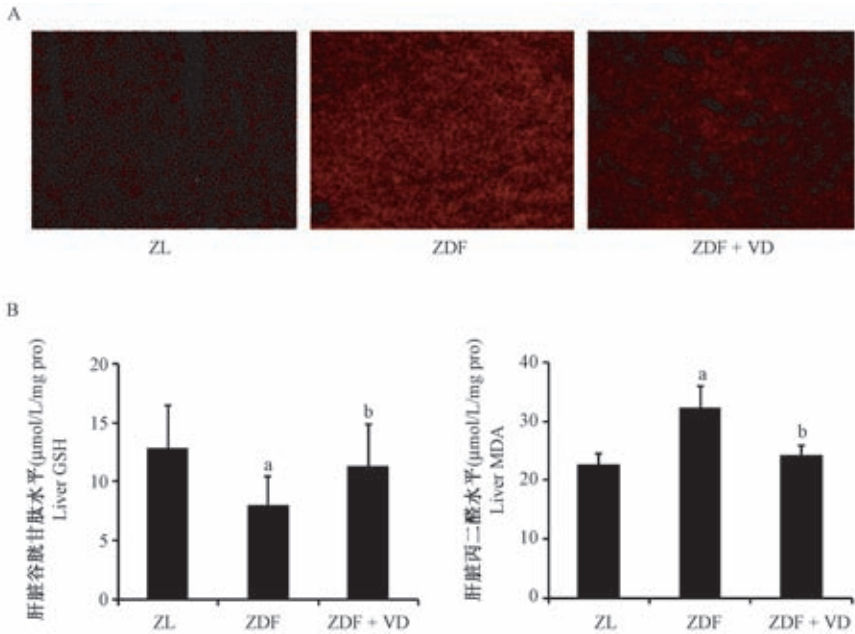
图 3A 电镜结果显示:ZL 组大鼠肝线粒体呈椭圆形、短棒状或者圆形,大小均一;ZDF 组大鼠肝细胞胞浆中出现大小不一的脂滴,线粒体肿胀、形态异常并伴有空泡化;1,25(OH)₂VD₃ 干预后线粒体形态基本恢复正常。线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential,MMP)是反映线粒体膜损伤及功能的重要指标,与 ZL 组相比,ZDF 组大鼠肝 MMP 下降了约 43%,1,25(OH)₂VD₃ 逆转了线粒体膜通透性的改变,减轻了线粒体损伤(图 3B)。

2.4 1,25(OH)₂VD₃ 改善 ZDF 大鼠肝线粒体生物合成

线粒体生物合成对于机体维持和修复线粒体结构和功能具有重要意义。介导线粒体生物合成最重要的是 PGC-1α 及其下游转录因子 NRF1 和 TFAM。如图 4 所示,ZDF 组大鼠肝组织中 PGC-1α、NRF1 及 TFAM 的表达比 ZL 组约分别降低了 58%、38% 及 62%,此外,PGC-1α 上游调节蛋白 SIRT1 的表达也显著降低;1,25(OH)₂VD₃ 能够上调线粒体生成相关调控蛋白 SIRT1、PGC-1α 及其下游 NRF1 和 TFAM 的表达,缓解 ZDF 大鼠肝线粒体稳态失衡。

3 讨论

糖尿病是以高血糖为特征的代谢性疾病,可导致全身多个器官损害,肝损伤就是其中主要的损伤之一。研究发现,约 50% 的糖尿病患者合并肝病变,肝损伤在糖尿病的发生发展进程中发挥着重要作用^[8]。ZDF 大鼠是从出现糖尿病表型的 Zucker 大鼠中筛选并近亲杂交培育出的一种自发性糖尿病模型鼠^[9],ZDF 大鼠经高血脂高血糖、糖耐量异

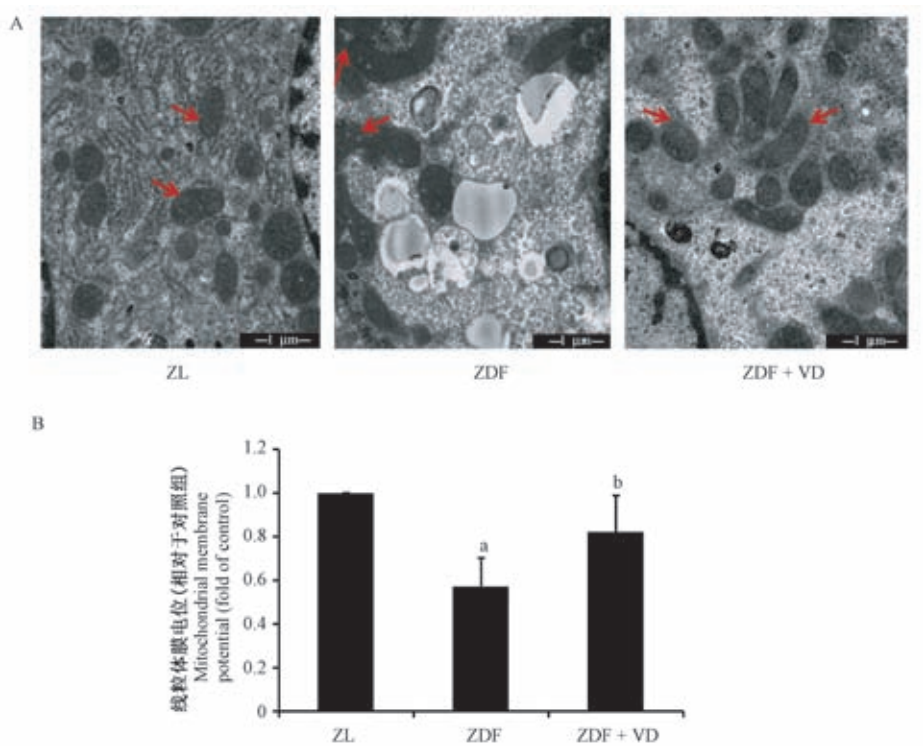


注:A:大鼠肝组织 ROS 水平(×200)。B:大鼠肝谷胱甘肽及丙二醛水平。与 ZL 组比较,^a*P* < 0.05;与 ZDF 组比较,^b*P* < 0.05。

图 2 1,25(OH)₂VD₃ 对大鼠肝氧化损伤的影响

A: Liver ROS detected under a fluorescence microscope (×200). B: Liver GSH and MDA detected by spectrophotometry. Compared with the ZL group, ^a*P* < 0.05. Compared with the ZDF group, ^b*P* < 0.05.

Figure 2 Effect of 1,25(OH)₂VD₃ on oxidative damage in the ZDF rat liver



注:A:大鼠肝超微结构(×3500),红色箭头指示线粒体。B:大鼠肝线粒体膜电位水平。与ZL组比较,^a $P < 0.05$;与ZDF组比较,^b $P < 0.05$ 。

图3 1,25(OH)₂VD₃对ZDF大鼠肝线粒体损伤的保护作用

Note. A: Liver ultrastructure of Zucker rats observed by transmission electron microscopy (×3500). Red arrows indicate mitochondria. B: Liver mitochondrial membrane potential. Compared with the ZL group, ^a $P < 0.05$. Compared with the ZDF group, ^b $P < 0.05$.

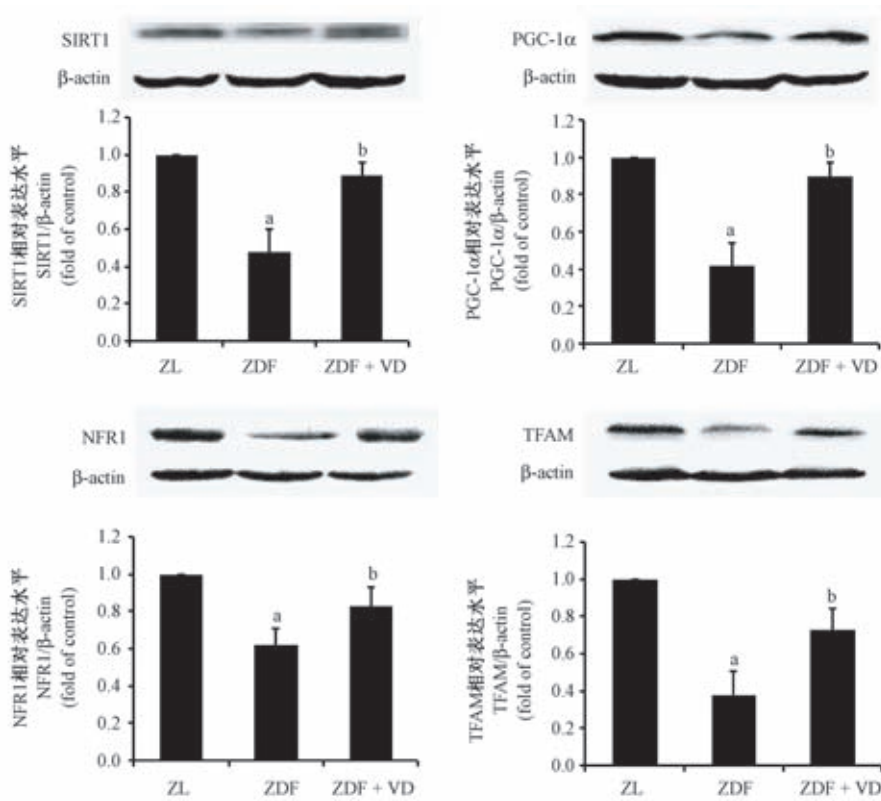
Figure 3 Protective effect of 1,25(OH)₂VD₃ on hepatic mitochondrial injury in the ZDF rats

常、胰岛素抵抗等程序化发展为2型糖尿病,被认为是2型糖尿病及并发症研究的理想动物模型^[10-11]。本研究发现,ZDF大鼠血清ALT、AST水平异常升高,肝出现损伤,组织病理切片显示,ZDF大鼠肝细胞出现严重的脂肪变性。

糖尿病肝损伤机制复杂,ROS介导的氧化应激备受关注。在高糖高脂状态下,过量的ROS会攻击蛋白质、脂质和核酸等生物大分子,导致肝细胞脂质过氧化,引起肝的病变^[12]。研究认为,线粒体是细胞内ROS产生的主要场所,病理状态下,呼吸链电子传递过程中大量产生的ROS将线粒体自身作为首要靶标,造成线粒体结构与功能的异常,加速ROS的生成,导致细胞严重的氧化损伤^[13]。本研究电镜结果显示,ZDF大鼠线粒体出现肿胀、变性、空泡化,线粒体膜电位也随之降低。与此同时,ZDF大鼠肝ROS产生显著增多、脂质过氧化产物MDA含量升高,最严重的是肝的抗氧化能力却逐渐下降,表现为GSH耗竭,这些结果提示ZDF大鼠肝出

现明显的氧化损伤。与以往研究结果相似,在STZ诱导的糖尿病大鼠肝细胞出现线粒体功能障碍及氧化损伤^[14],这些结果提示,线粒体结构及功能障碍可能在糖尿病肝损伤中起着关键作用。

线粒体生物合成是线粒体结构和功能修复的重要生理活动。介导线粒体生成最重要的调控因子为PGC-1 α ^[15],对机体线粒体生物合成及氧化应激的调控具有重要意义。此外,PGC-1 α 下游转录因子NRF1和TFAM也是调控线粒体合成与功能的关键分子,参与线粒体DNA的复制与转录^[16]。研究显示,在糖尿病大鼠视网膜病变中,线粒体损伤及ROS的增加与PGC-1 α 下降密切相关^[17]。2型糖尿病ob/ob小鼠心肌细胞PGC-1 α 、NRF1及TFAM表达显著降低并伴随线粒体mtRNA拷贝数的减少与ROS产生的增加^[18]。研究发现,SIRT1可通过乙酰化作用激活PGC-1 α 从而促进线粒体生物合成^[19]。然而,在STZ诱导的糖尿病及db/db糖尿病小鼠模型肾组织中SIRT1表达与活性均显著降



注:与 ZL 组比较,^a $P < 0.05$;与 ZDF 组比较,^b $P < 0.05$ 。

图 4 1,25(OH)₂VD₃ 对 ZDF 大鼠肝线粒体合成的影响

Note. Compared with the ZL group, ^a $P < 0.05$. Compared with the ZDF group, ^b $P < 0.05$.

figure 4 Protective effect of 1,25(OH)₂VD₃ on hepatic mitochondrial biogenesis in the ZDF rats

低,上调能够缓解氧化损伤、凋亡等病理改变^[20]。本研究发现,伴随着氧化应激及线粒体功能损害,ZDF 大鼠肝线粒体生物合成关键分子 PGC-1α 及其下游 NRF1 及 TFAM 的表达明显下降,PGC-1α 的上游调控因子 SIRT1 的表达也显著降低,提示 ZDF 大鼠肝损伤与线粒体生物合成受阻相关。

近年来,维生素 D 已成为糖尿病发生发展的重要影响因素。维生素 D 经肝、肾转化成活性形式 1,25(OH)₂VD₃后与维生素 D 受体(VDR)结合,参与糖脂代谢,调节胰岛素敏感性,在糖尿病及其并发症的防治中具有重要意义^[7]。此外,研究显示,1,25(OH)₂VD₃可通过抗氧化、抗炎等多种机制缓解非酒精性肝损伤。我们前期研究发现,维生素 D 缺乏会加速和加重 ZDF 大鼠的病情^[21],本实验结果显示,维生素 D 缺乏状态下的 ZDF 大鼠肝出现了严重的氧化损伤及线粒体损害,1,25(OH)₂VD₃ 干预后肝损伤明显缓解,ROS 产生减少,线粒体结构及功能趋于正常。其他研究也发现,1,25(OH)₂VD₃能够调节骨骼肌线粒体功能及其酶活性^[22]。然而,目前关于

1,25(OH)₂VD₃改善线粒体功能的相关机制鲜有报道。本研究显示,1,25(OH)₂VD₃能够上调线粒体生物合成关键蛋白 SIRT1、PGC-1α 及下游 NRF1 和 TFAM 的表达,修复 ZDF 大鼠肝由于高糖高脂引起的线粒体结构和功能损伤,同时缓解了肝氧化损伤。

综上所述,1,25(OH)₂VD₃可通过上调 SIRT1/PGC-1α 通路增强线粒体生物合成,修复线粒体结构与功能,从而缓解了 ZDF 大鼠肝氧化损伤。本实验为 1,25(OH)₂VD₃ 防治糖尿病及肝损伤提供了新的理论基础,1,25(OH)₂VD₃ 是如何调控 SIRT1 及更深入的机制需进一步实验研究。

参考文献:

- [1] Bhatt HB, Smith RJ. Fatty liver disease in diabetes mellitus [J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2015, 4(2): 101 – 108.
- [2] Lucchesi AN, Freitas NT, Cassettari LL, et al. Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease [J]. Acta Cir Bras, 2013, 28(7): 502 – 508.
- [3] Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, et al. Mitochondria and reactive oxygen species [J]. Free Radical Biol

- Med, 2009, 47(4): 333 – 343.
- [4] Salgueiro AC, Folmer V, da Silva MP, et al. Effects of *Bauhinia forficata* tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice [J]. Oxid Med Cell Longev, 2016, 2016: 8902954.
- [5] Maritim AC, Sanders RA, Watkins JB 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review [J]. J Biochem Mol Toxicol, 2003, 17(1): 24 – 38.
- [6] Cao MM, Lu X, Liu GD, et al. Resveratrol attenuates type 2 diabetes mellitus by mediating mitochondrial biogenesis and lipid metabolism via Sirtuin type 1 [J]. Exp Ther Med, 2018, 15(1): 576 – 584.
- [7] Mitri J, Pittas AG. Vitamin D and diabetes [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2014, 43(1): 205 – 232.
- [8] Tolman KG, Fonseca V, Dalpiaz A, et al. Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease [J]. Diabetes Care, 2007, 30(3): 734 – 743.
- [9] Shiota M, Printz RL. Diabetes in Zucker diabetic fatty rat [J]. Methods Mol Biol, 2012, 933: 103 – 123.
- [10] 高秀莹, 周迎生. 2 型糖尿病鼠类模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(4): 71 – 76.
- [11] 宋丹, 冉丽媛, 姜如娇, 等. 糖尿病研究中的动物模型进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(9): 83 – 87.
- [12] Rochette L, Zeller M, Cottin Y, et al. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies [J]. Biochim Biophys Acta, 2014, 1840(9): 2709 – 2729.
- [13] Avery SV. Molecular targets of oxidative stress [J]. Biochem J, 2011, 434(2): 201 – 210.
- [14] Chen N, Leng YP, Xu WJ, et al. Contribution of endogenous inhibitor of nitric oxide synthase to hepatic mitochondrial dysfunction in streptozotocin-induced diabetic rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2011, 27(3 – 4): 341 – 352.
- [15] Puigserver P, Spiegelman BM. Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator 1 alpha (PGC-1 alpha): transcriptional coactivator and metabolic regulator [J]. Endocr Rev, 2003, 24(1): 78 – 90.
- [16] Campbell CT, Kolesar JE, Kaufman BA. Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1819(9 – 10): 921 – 929.
- [17] Zheng Z, Chen H, Wang H, et al. Improvement of retinal vascular injury in diabetic rats by statins is associated with the inhibition of mitochondrial reactive oxygen species pathway mediated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha [J]. Diabetes, 2010, 59(9): 2315 – 2325.
- [18] Zhang L, Huang D, Shen D, et al. Inhibition of protein kinase C β II isoform ameliorates methylglyoxal advanced glycation endproduct-induced cardiomyocyte contractile dysfunction [J]. Life Sci, 2014, 94(1): 83 – 91.
- [19] Rodgers JT, Lerin C, Haas W, et al. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 alpha and SIRT1 [J]. Nature, 2005, 434(7029): 113 – 118.
- [20] Kume S, Kitada M, Kanasaki K, et al. Anti-aging molecule, Sirt1: a novel therapeutic target for diabetic nephropathy [J]. Arch Pharm Res, 2013, 36(2): 230 – 236.
- [21] 李艳艳, 王宁, 刘妍妍, 等. 维生素 D 缺乏对自发性糖尿病大鼠发病的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 20 – 25.
- [22] Ryan ZC, Craig TA, Folmes CD, et al. $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 regulates mitochondrial oxygen consumption and dynamics in human skeletal muscle cells [J]. J Biol Chem, 2016, 291(3): 1514 – 1528.

[收稿日期] 2018 – 04 – 03

大黄素对 ApoE 基因敲除小鼠脂肪棕色化的影响

程 龙,董世芬,袁悦莹,马 丹,宋敬怡,孙建宁,张硕峰*

(北京中医药大学中药学院中药药理系,北京 100029)

【摘要】 目的 观察大黄素(emodin)对载脂蛋白 E 基因敲除(apolipoprotein E knockout, ApoE^{-/-})小鼠脂肪棕色化的影响,从而探讨其改善高脂血等血瘀状态的作用机制。**方法** 雄性 8 周龄 ApoE^{-/-} 小鼠高脂饮食 12 周后,随机分为 3 组,模型组、辛伐他汀 5.7 mg/kg 组、大黄素 80 mg/kg 组;同周龄雄性 C57BL/6J 小鼠为正常对照组,给予基础饲料喂养。各组小鼠按剂量分别灌胃相应药物或者饮用水干预 18 周。检测指标包括体重(body weight, BW)、腹股沟白色脂肪组织(inguinal white adipose tissue, iWAT)重量、棕色脂肪组织(brown adipose tissue, BAT)重量、血脂、心功能、iWAT 病理特征,以及解偶联蛋白 1(uncoupling protein 1, UCP1)的 iWAT 原位表达。**结果** 大黄素可显著降低小鼠体重($P < 0.05$)、iWAT 重量/体重比值($P < 0.05$)及血清中 TC、TG 含量($P < 0.05$),增加 BAT 重量/体重比值($P < 0.05$)及心脏的射血分数(ejection fraction, EF)、短轴缩短率(fractional shortening, FS) ($P < 0.01$);HE 染色结果显示, iWAT 细胞出现多室,细胞变小、变圆,组织更加致密;免疫组化结果显示, iWAT 中 UCP1 蛋白阳性表达的平均光密度(average optical density, AOD)显著增加($P < 0.01$)。**结论** 大黄素能促进 ApoE^{-/-} 小鼠腹股沟白色脂肪组织棕色化及减少白色脂肪堆积改善高脂血症症状,可能与其逐瘀作用有关。

【关键词】 大黄素;载脂蛋白 E 基因敲除小鼠;白色脂肪;棕色脂肪

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0008-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.002

Effect of emodin on adipose browning in ApoE knockout mice

CHENG Long, DONG Shifen, YUAN Yueying, MA Dan, SONG Jingyi, SUN Jianning, ZHANG Shuofeng*

(Department of Pharmacology of Traditional Chinese Medicine, School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

【Abstract】 Objective To observe the effect of emodin (1,3,8-trihydroxy-6-methyl anthraquinone) on adipose browning in ApoE knockout mice and explore its potential mechanism to improve the blood stasis status such as hyperlipemia. **Methods** Male 8-week-old ApoE knockout mice were randomly divided into three groups, model, 5.7 mg/kg simvastatin, and 80 mg/kg emodin groups, and fed a high fat diet. C57BL/6J control mice were fed a normal diet. The mice in each group were intragastrically administered with drugs or drinking water for 18 consecutive weeks. Parameters, including body weight, inguinal white adipose tissue (iWAT) mass, brown adipose tissue (BAT) mass, blood lipids, pathological features of iWAT histology, and in situ uncoupling protein 1 (UCP1) expression in iWAT, were observed. **Results** Compared with the model group, the body weight, ratio of inguinal white adipose tissue weight/body weight ($P < 0.05$), and blood TC and TG were decreased significantly ($P < 0.05$), while the ratio of brown adipose tissue weight/body weight, EF, and FS ($P < 0.01$) were increased significantly in the emodin group ($P < 0.05$). Histological examination using HE staining of iWAT showed that the cells had multiple compartments and became smaller and round,

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81503287,81430094)。

【作者简介】 程龙(1992—),男,硕士研究生,研究方向:中药防治心脑血管疾病的研究。E-mail: tenacious@bucm.edu.cn

【通信作者】 张硕峰(1969—),副教授,男,硕士生导师,研究方向:中药防治心脑血管疾病的研究。E-mail: shuofengzhang@sina.com

and the tissue became more dense with morphological characteristics of brown adipose tissue. Immunohistochemistry showed that the AOD of UCPI in iWAT was increased significantly ($P < 0.01$). **Conclusions** Emodin may improve the symptoms of hyperlipemia by promoting browning of inguinal white adipose tissue and reducing white fat accumulation in ApoE knockout mice, which may be related to the effect of zhuyu.

[Keywords] emodin; ApoE knockout mice; white adipose tissue; brown adipose tissue

肥胖是一种多因素引起的慢性代谢疾病,是引发糖尿病、动脉粥样硬化、高脂血症等相关疾病的主要因素,肥胖的发生与血瘀相关,活血化瘀方药在治疗肥胖过程中取得良好疗效^[1-3]。哺乳动物的脂肪组织主要由储脂为主的白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 与产热为主的棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT) 组成。肥胖发生时,体内白色脂肪组织与棕色脂肪组织比例失衡,白色脂肪组织过度堆积或分布异常。中医学认为肥胖是由于多种因素导致体内膏脂堆积过多,进而引发脾虚气亏、瘀血、气滞、痰湿等证候特征。研究表明,白色脂肪棕色化及活化棕色脂肪能增加机体产热,调节能量代谢,是肥胖治疗的有效环节之一^[4-5]。

大黄来源于蓼科植物掌叶大黄 (*Rheum palmatum* L)、唐古特大黄 (*Rheum tanguticum* Maxim. ex Balf) 或药用大黄 (*Rheum officinale* Baill) 的干燥根及根茎,性苦、寒,具有泻下攻积、清热泻火、凉血解毒、逐瘀通经、利湿退黄之功效^[6],具有降血脂、抗氧化、抗炎等作用^[7-8]。大黄素 (emodin), 学名 1,3,8-三羟基-6-甲基蒽醌 (1,3,8-trihydroxy-6-methylantraquinone), 是大黄的主要有效成分之一,为蒽醌类衍生物,具有降血糖及降血脂^[9]、抗衰老^[10]、抗炎^[11] 等药理作用。研究发现,大黄素可以降低高脂饮食诱导的肥胖模型大鼠体重、血脂水平、动脉粥样硬化指数,减少白色脂肪中脂质聚集和减小白色脂肪细胞直径,改善能量代谢紊乱^[12]。ApoE 基因敲除小鼠因载脂蛋白 E 基因缺失,易出现脂质代谢异常和白色脂肪堆积,是研究肥胖及相关代谢疾病的较佳模型^[13-14]。因此,本研究以 ApoE 基因敲除小鼠为研究对象,观察大黄素对 ApoE 基因敲除小鼠脂肪棕色化的影响,探讨其治疗肥胖等血瘀状态的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 ApoE^{-/-} 小鼠 24 只,具有相同遗传背景且同周龄的 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 8 只,体重 (20 ± 2) g,由南京大学模式动物研究所

提供 [SCXK (苏) 2015 - 0001], 合格证号: 201606277。所有小鼠饲养于北京中医药大学屏障环境动物实验室 [SYXK (京) 2016 - 0038], 室温 (25 ± 2) °C、45% 相对湿度,12 h/12 h 光暗周期,饲养期间小鼠自由进食及饮水,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀,本研究由北京中医药大学医学与实验动物伦理委员会审批准,编号: BUCM-4-2016121001-4020。

1.2 主要试剂与仪器

大黄素 (emodin), 购于北京华威锐科化工有限公司,纯度为 98%, 批号 16HC0215-2; 辛伐他汀, 购于杭州默沙东制药有限公司, 批号 M029946; 基础饲料及高脂饲料, 购于北京科澳协力有限公司 [SCXK (京) 2014 - 0010]; 总胆固醇 (total cholesterol, TC)、甘油三酯 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒均由贝克曼库尔特实验系统实验系统 (苏州) 有限公司提供, 批号分别为 AUZ4678、AUZ3692、AUZ4573、AUZ4289; UCPI 抗体购于 Abcam 公司, 批号 GR3188478-6; 山羊抗兔二抗购于无锡傲锐东源生物科技有限公司, 批号 K172414D。半自动轮转式切片机 (RM2245, 德国徕卡 (Leica) 仪器有限公司); 全自动真空脱水机 (ASP3005, 德国徕卡 (Leica) 仪器有限公司); 分体式包埋机 (EG1150, 德国徕卡 (Leica) 仪器有限公司); 多功能染色盖片工作站 (ST5020/CV5030, 德国徕卡 (Leica) 仪器有限公司); 正置智能型显微镜 (BX53, 奥林巴斯 (中国) 有限公司); 全自动生化分析仪 (CX4 Pro, 美国贝克曼公司); 小动物超声影像系统 (Vevo TM 2100, 加拿大 Visual Sonics 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物造模、分组及给药

ApoE^{-/-} 小鼠小鼠喂食高脂饲料 (77.5% 的基础饲料, 1.5% 胆固醇, 21% 猪油) 12 周, 之后随机分为 3 组, 即 ApoE^{-/-} 模型组、辛伐他汀 5.7 mg/kg 组、大黄素 80 mg/kg 组, 每组 8 只。C57BL/6J 小鼠为正常对照组, 全程喂食普通饲料。模型组和给药

组小鼠持续喂食高脂饲料至实验结束。小鼠至 13 周开始给药,模型组和正常对照组每日给予相同溶媒(饮用水)灌胃,辛伐他汀和大黄素分别按照 5.7 mg/kg、80 mg/kg 剂量^[15]灌胃给药,给药体积为 0.1 mL/10 g,连续干预 18 周,每周记录各组小鼠体重。

1.3.2 心功能指标检测

将小鼠气体麻醉、剃毛,用小动物超声影像系统检测小鼠心脏的射血分数(EF)、短轴缩短率(FS)。

1.3.3 取材

干预 18 周后,禁食 12 h,称取小鼠体重,取血约 1.5 mL,3500 r/min,离心 10 min,分离血清。取血后,解剖分离皮下腹股沟白色脂肪及肩胛区棕色脂肪,并称重,腹股沟白色脂肪组织放在 10% 中性福尔马林固定液中固定。

1.3.4 脂肪重量/体重的测定

精确称重小鼠皮下腹股沟白色脂肪重量、肩胛部棕色脂肪重量,计算腹股沟白色脂肪重量(iWAT)/体重(WB)和肩胛区棕色脂肪重量(BAT)/体重(WB)的比值。

1.3.5 血脂的检测

按照说明,采用生化试剂盒测定血清中 TC、TG、LDL-C 及 HDL-C 的含量。

1.3.6 腹股沟白色脂肪 HE 染色

将固定在 10% 中性福尔马林固定液中的腹股沟白色脂肪取出,常规石蜡包埋;切片;切片用二甲苯脱蜡,经各级乙醇至水洗;苏木素液染色;水洗;盐酸乙醇分色;自来水浸泡;伊红染色;自来水冲洗;常规脱水;透明;封片;正置智能显微镜观察脂肪细胞形态学变化。

1.3.7 腹股沟白色脂肪免疫组织化学染色

组织切片常规脱蜡、脱水;抗原修复;阻断内源性过氧化物酶;封闭;加 UCP1 一抗 4℃ 过夜;过夜后,PBS 清洗,滴加二抗;DAB 显色;终止显色后苏木素复染,流水返蓝;常规脱水;透明;中性树胶封片。棕黄色着色即为阳性细胞抗原存在位置。

1.3.8 腹股沟白色脂肪组织 UCP1 蛋白表达的影响

使用图像分析软件(Image-Pro Plus 6.0),选取棕黄色处为阳性着色,对阳性表达处进行 AOD 分析。

1.4 统计学方法

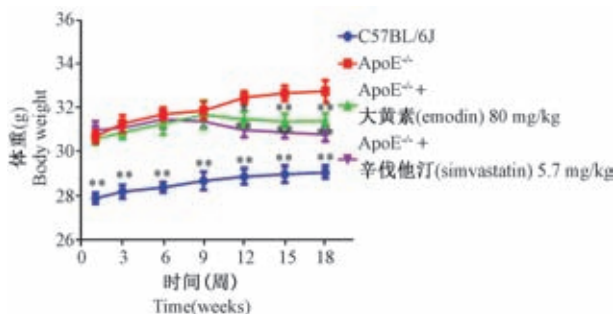
实验数据采用 SAS 8.2 软件进行统计,结果用平

均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间数据比较采用单因素方差分析法(one-way ANOVA),两组间比较采用独立样本 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 大黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠体重的影响

如图 1 所示,在整个实验期间,与正常对照组比较,ApoE^{-/-} 小鼠体重显著增加($P < 0.01$);与 ApoE^{-/-} 模型组比较,自给药第 12 周开始至实验结束,大黄素组、辛伐他汀组小鼠体重显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。



注:与 ApoE^{-/-} 模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 1 大黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠体重的影响

Note. Compared with the ApoE^{-/-} model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

Figure 1 Effect of emodin on body weight of the ApoE^{-/-} mice

2.2 大黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠脂肪重量/体重比值的影响

如图 2A、2B 所示,与正常对照组比较,ApoE^{-/-} 模型组小鼠皮下腹股沟白色脂肪组织(iWAT)重量/体重(BW)的比值显著降低($P < 0.01$),棕色脂肪组织(BAT)重量/体重(BW)的比值显著降低($P < 0.01$);与 ApoE^{-/-} 模型组相比,大黄素组、辛伐他汀组小鼠 iWAT/BW 显著降低($P < 0.05$),BAT/BW 的比值显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 大黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠血清 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 水平的影响

如图 3 所示,与正常对照组比较,ApoE^{-/-} 模型组小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 含量显著升高($P < 0.01$),HDL-C 含量差异无显著性($P > 0.05$);与 ApoE^{-/-} 模型组比较,大黄素组小鼠血清中 TG、TC 含量显著降低($P < 0.05$);LDL-C 含量具有降低趋势,HDL-C 含量增加,但差异均无显著性($P > 0.05$);辛伐他汀组小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 含量显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),HDL-C 含量显

著增加($P < 0.05$)。

2.4 大黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠心脏的射血分数、短轴缩短率的影响

如图 4A、4B 所示,与正常对照组比较,ApoE^{-/-} 模型组小鼠心脏的 EF、FS 百分率显著降低($P < 0.05$),提示心功能损伤;与 ApoE^{-/-} 模型组比较,大黄素组、辛伐他汀组小鼠心脏的 EF、FS 百分率显著增加($P < 0.01$)。

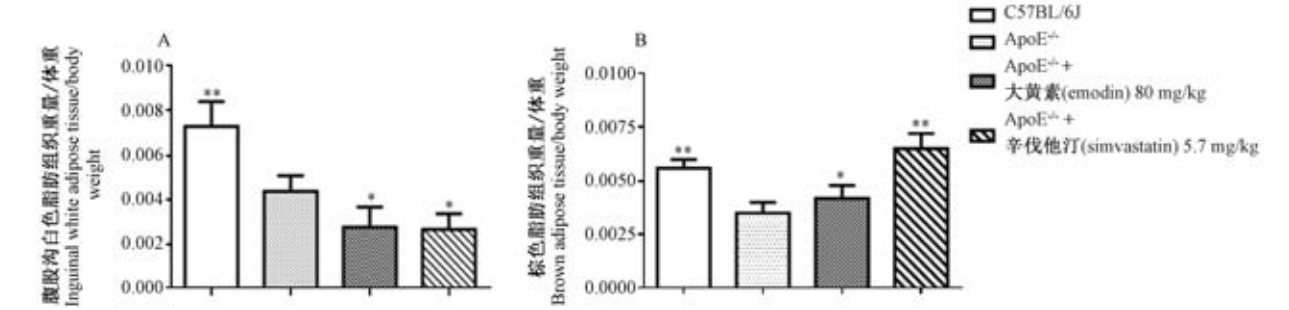
2.5 大黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠皮下腹股沟白色脂肪组织形态的影响

如图 5 所示,正常对照组小鼠腹股沟白色脂肪呈现出较大空泡状,形状近似圆形,组织比较致密

(图 5A);ApoE^{-/-} 模型组小鼠皮下腹股沟白色脂肪呈现出大空泡的脂肪室,且形状不规则,细胞核、细胞器及胞浆被挤到一侧呈薄环,白色脂肪特征明显(图 5B);与模型组相比,大黄素组(图 5C)、辛伐他汀组(图 5D)小鼠皮下腹股沟白色脂肪细胞出现多室,细胞变小、变圆,组织变的更加致密,具有棕色化趋势。

2.6 大黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠 iWAT 部位 UCP1 蛋白表达的影响

观察小鼠腹股沟白色脂肪组织免疫组织化学染色切片,棕黄色着色即为阳性细胞抗原存在位置。与 ApoE^{-/-} 模型组比较(图 6B),大黄素组(图

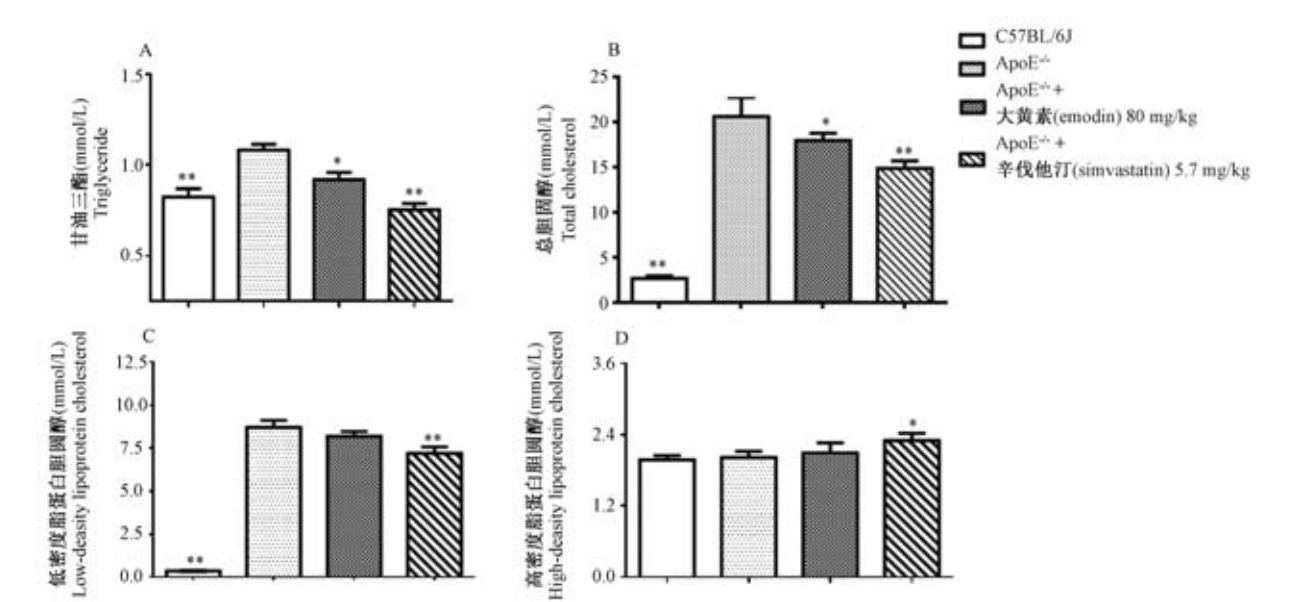


注:与 ApoE^{-/-} 模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 大黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠脂肪重量/体重比值的影响

Note. Compared with the ApoE^{-/-} model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 2 Effect of emodin on fat weight/body weight ratio in the ApoE^{-/-} mice

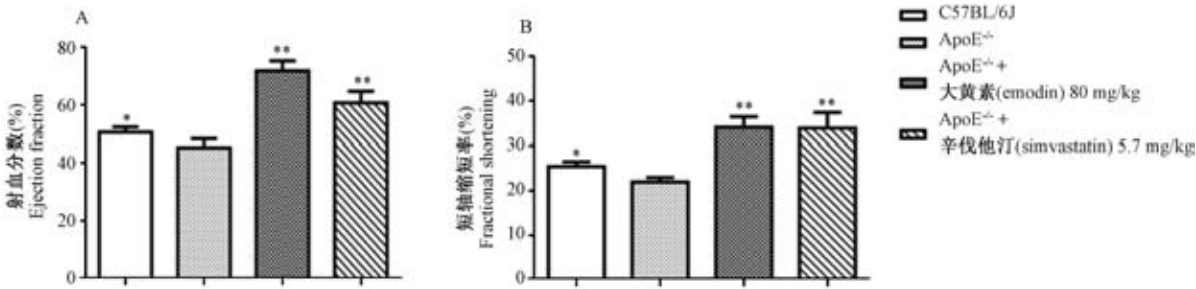


注:与 ApoE^{-/-} 模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 3 大黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠血清 TG、TC、LDL-C、HDL-C 水平的影响

Note. Compared with the ApoE^{-/-} model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Effects of emodin on the levels of serum TG, TC, LDL-C, and HDL-C in the ApoE^{-/-} mice

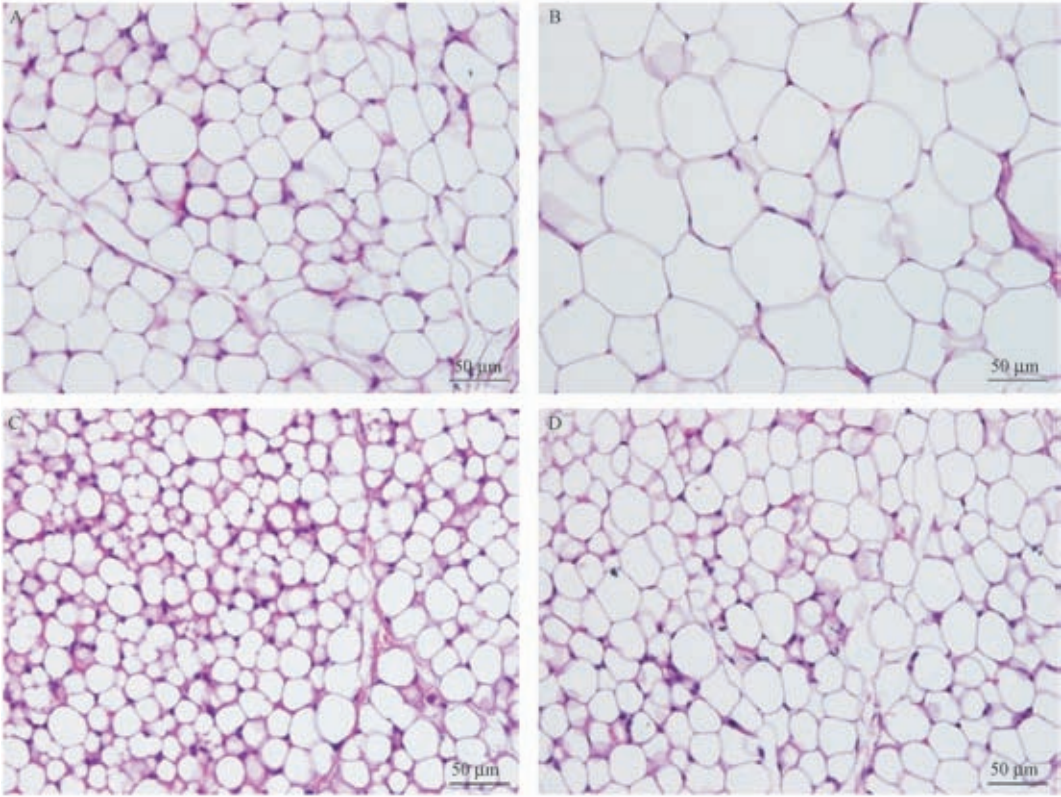


注:与 ApoE^{-/-} 模型组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 4 大黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠心脏 EF、FS 的影响

Note. Compared with the ApoE^{-/-} model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Effect of emodin on changes of heart EF and FS in the ApoE^{-/-} mice



注:A:正常对照组;B:ApoE^{-/-} 模型组;C:大黄素 80 mg/kg 组;D:辛伐他汀 5.7 mg/kg 组。

图 5 大黄素对 ApoE^{-/-} 小鼠腹股沟白色脂肪组织形态的影响(HE 染色, $\times 400$)

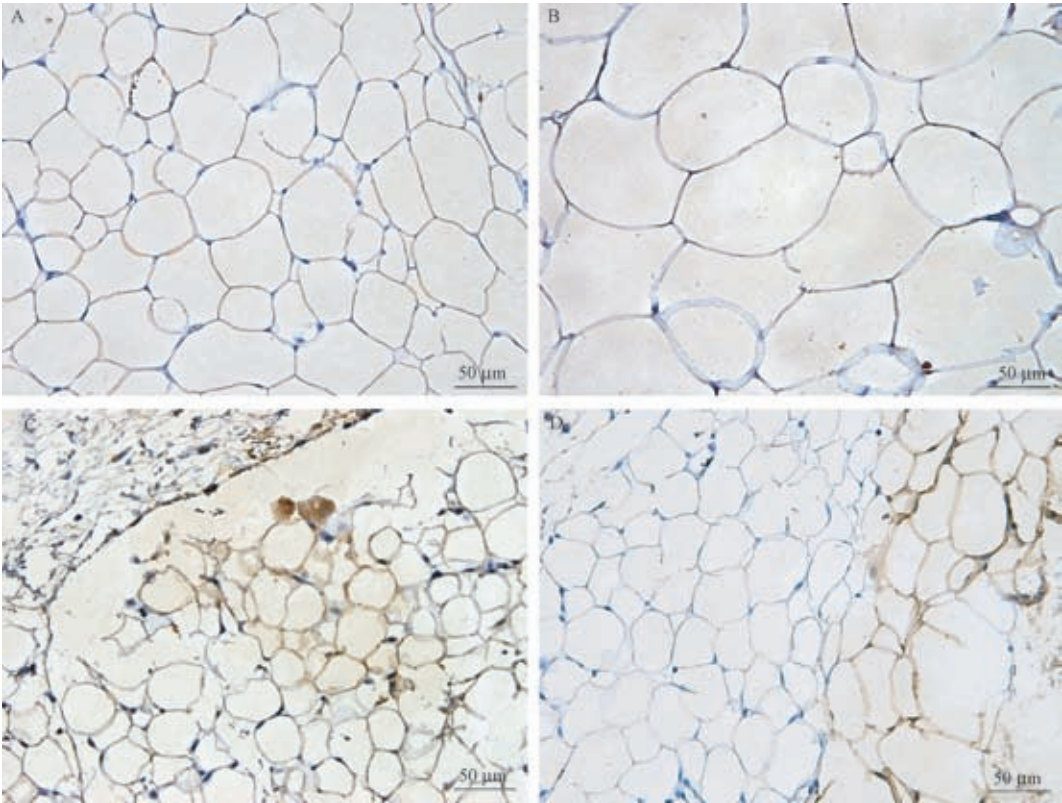
Note. A: Control group; B: ApoE^{-/-} model group; C: 80 mg/kg emodin group; D: 5.7 mg/kg simvastatin group.

Figure 5 Effect of emodin on the histology of white adipose tissue in the inguinal region of ApoE^{-/-} mice. HE staining

6C)、辛伐他汀组(图 6D) iWAT 中 UCP-1 阳性表达显著。利用 Image-Pro Plus 6.0 对其 AOD 进行分析。图 7 结果显示,与正常对照组比较,ApoE^{-/-} 模型组小鼠皮下腹股沟脂肪组织 AOD 的值降低,但差异无显著性($P > 0.05$);与 ApoE^{-/-} 模型组比较,大黄素组、辛伐他汀小鼠皮下腹股沟脂肪组织 AOD 的值显著增加($P < 0.01$),进一步提示其增加 iWAT 脂肪细胞棕色化特征。

3 讨论

哺乳动物的脂肪组织主要由白色脂肪组织 (white adipose tissue, WAT) 与棕色脂肪组织 (brown adipose tissue, BAT) 组成。WAT 不仅是能量储存的器官,同时也是重要的内分泌器官,可通过内分泌及旁分泌众多细胞因子或脂肪因子影响机体的糖脂代谢平衡、血压水平、炎症反应等,与血瘀证包括高血

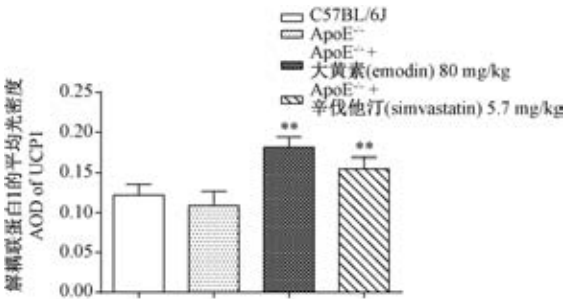


注:A:正常对照组;B:ApoE^{-/-}模型组;C:大黄素 80 mg/kg 组;D:辛伐他汀 5.7 mg/kg 组。

图 6 大黄素对 ApoE^{-/-}小鼠皮下腹股沟白色脂肪组织 UCP1 免疫组织化学染色的影响(× 400)

Note. A: Control group; B: ApoE^{-/-} model group; C: 80 mg/kg emodin group; D: 5.7 mg/kg simvastatin group.

Figure 6 Effect of emodin on immunohistochemical staining of UCP-1 in white adipose tissue of the ApoE^{-/-} mice



注:与 ApoE^{-/-}模型组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01。

图 7 大黄素对 ApoE^{-/-}小鼠皮下腹股沟白色脂肪组织 UCP1 蛋白表达 AOD 的影响

Note. Compared with the ApoE^{-/-} model group,**P* < 0.05,***P* < 0.01.

Figure 7 Effect of emodin on the protein expression of UCP1 in the inguinal white adipose tissue of ApoE^{-/-} mice

糖、高血压、高脂血症、动脉粥样硬化等的发生、发展密切相关。BAT 的细胞主要由多泡脂肪构成,其细胞内含有大量线粒体,主要功能是消耗脂肪并发挥非颤抖产热作用^[16]。BAT 的线粒体中含有特异性载体蛋白即 UCP1。UCP1 可以将 H⁺ 从线粒体内膜渗漏到

线粒体基质中,减少 ADP 磷酸化形成 ATP,将能量以热能的形式散失^[17]。研究证实,当机体交感神经兴奋时(如冷刺激^[18]、β-肾上腺素受体激动^[19]),皮下白色脂肪组织中 UCP1 表达显著增加,出现 BAT 的典型特征,如许多散在的小脂滴、线粒体数目增多、棕色脂肪的标志基因[如诱导细胞死亡 DNA 片段化因子 α 样效应因子(cell death-inducing DNA fragmentation factor alpha like effector,CIDE)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅助激活因子-1α(peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1α,PGC-1α)、PR 结构域蛋白 16(positive regulatory domain-containing 16,PRDM16)等]表达增多等,与血糖、血脂调控和体重减轻有关。

大黄素能降低高脂饮食诱导小鼠的体重及血脂,减少白色脂肪组织的堆积,增强胰岛素敏感性,抑制高脂饮食诱导的肥胖和改善相关代谢疾病的紊乱^[20-22]。本研究发现大黄素能显著降低高脂饮食 ApoE 基因敲除小鼠体重(*P* < 0.05)、白色脂肪重量/体重比值(*P* < 0.05)以及血清中 TG 和 TC 含量(*P* < 0.05),同时其能显著增加棕色脂肪重

量/体重比值($P < 0.05$)及左心室的射血分数和短轴缩短率($P < 0.01$),具有减少白色脂肪堆积、改善脂质代谢和心功能的作用此外,在脂肪棕色化过程中,小鼠腹股沟白色脂肪比附睾脂肪更加容易转化^[23]。通过对各组小鼠皮下腹股沟白色脂肪组织 HE 染色发现,与 ApoE^{-/-} 模型组比较,大黄素组小鼠腹股沟白色脂肪出现典型的棕色脂肪细胞表型(如细胞出现多室,细胞变小、变圆等)。已有报道证实大黄素可通过增强腺嘌呤核糖核苷酸活化蛋白激酶的磷酸化及其主要下游靶向乙酰辅酶 A 羧化酶,上调肉毒碱棕榈酰转移酶 1 的基因表达,下调甾醇调节元件结合蛋白 1,进而减少白色脂肪组织中的脂质积累^[12]。本研究结果显示,大黄素可显著增加 ApoE^{-/-} 小鼠腹股沟白色脂肪组织 UCP1 蛋白表达,进一步明确其促进白色脂肪棕色化的作用。

综上所述,大黄素可通过降低 ApoE 基因敲除小鼠体重、血清中甘油三酯、总胆固醇及低密度脂蛋白胆固醇含量和白色脂肪重量/体重比值,减少白色脂肪堆积,同时增加棕色脂肪重量/体重比值、左心室的射血分数和短轴缩短率和皮下腹股沟白色脂肪组织 UCP1 蛋白的表达,促进 ApoE 基因敲除小鼠皮下腹股沟白色脂肪棕色化,从而有效抑制肥胖,可能与其逐瘀作用有关。

参考文献:

- [1] Kim SH, Park HS, Hong MJ, et al. Tongqiaohuoxue decoction ameliorates obesity-induced inflammation and the prothrombotic state by regulating adiponectin and plasminogen activator inhibitor-1 [J]. J Ethnopharmacol, 2016, 4(192): 201–209.
- [2] Hong M, Jung J, Park HS, et al. Shaofu Zhuyu decoction ameliorates obesity-mediated hepatic steatosis and systemic inflammation by regulating metabolic pathways [J]. PLoS One, 2017, 12(6): e0178514.
- [3] 陈贵海, 杨仕权, 邓巍, 等. 活血化瘀方药对肥胖大鼠脂肪组织内脂素等 mRNA 表达与血清浓度的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2014, 29(2): 625–628.
- [4] Vargas-Castillo A, Fuentes-Romero R, Rodriguez-Lopez LA, et al. Understanding the biology of thermogenic fat: Is browning a new approach to the treatment of obesity? [J]. Arch Med Res, 2017, 48(5): 401–413.
- [5] Morimoto H, Mori J, Nakajima H, et al. Angiotensin 1-7 stimulates brown adipose tissue and reduces diet-induced obesity [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2018, 314(2): E131–E138.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 22.
- [7] 王志旺, 郭玫, 马丹, 等. 不同产地大黄对高脂血症大鼠血脂及抗氧化作用的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2015, 31(3): 278–281.

- [8] 王志旺, 郭玫, 马丹, 等. 甘南栽培唐古特大黄抗炎作用及机制分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(1): 158–161.
- [9] Zhao XY, Qiao GF, Li BX, et al. Hypoglycaemic and hypolipidaemic effects of emodin and its effect on L-type calcium channels in dyslipidaemic-diabetic rats [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2009, 36(1): 29–34.
- [10] Zhao X, Lu L, Qi Y, et al. Emodin extends lifespan of *Caenorhabditis elegans* through insulin/IGF-1 signaling pathway depending on DAF-16 and SIR-2.1 [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2017, 81(10): 1908–1916.
- [11] Park SY, Jin ML, Ko MJ, et al. Anti-neuroinflammatory effect of emodin in LPS-stimulated microglia: involvement of AMPK/Nrf2 activation [J]. Neurochem Res, 2016, 41(11): 2981–2992.
- [12] Tzeng TF, Lu HJ, Liou SS, et al. Emodin protects against high-fat diet-induced obesity via regulation of AMP-activated protein kinase pathways in white adipose tissue [J]. Planta Med, 2012, 78(10): 943–950.
- [13] 康爱君, 田枫, 张阔, 等. 载脂蛋白 E 基因缺陷 (C57BL/6J-ApoE) 小鼠血脂及病理组织学观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(2): 85–88.
- [14] Wagner T, Bartelt A, Schlein C, et al. Genetic dissection of tissue-specific apolipoprotein E function for hypercholesterolemia and diet-induced obesity [J]. PLoS One, 2015, 10(12): e0145102.
- [15] Li J, Ding L, Song B, et al. Emodin improves lipid and glucose metabolism in high fat diet-induced obese mice through regulating SREBP pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 770: 99–109.
- [16] Bartelt A, Bruns OT, Reimer R, et al. Brown adipose tissue activity controls triglyceride clearance [J]. Nat Med, 2011, 17(2): 200–205.
- [17] Oelkrug R, Polymeropoulos ET, Jastroch M. Brown adipose tissue: physiological function and evolutionary significance [J]. J Comp Physiol, 2015, 185(6): 587–606.
- [18] Vargovic P, Manz G, Kvetnansky R. Continuous cold exposure induces an anti-inflammatory response in mesenteric adipose tissue associated with catecholamine production and thermogenin expression in rats [J]. Endocr Regul, 2016, 50(3): 137–144.
- [19] 郑宗基. β_3 肾上腺素受体激动剂对小鼠脂肪组织棕色化相关基因和 microRNAs 的影响 [D]. 南方医科大学, 2013.
- [20] 周丽嫦, 徐艳燕, 陈伟标, 等. 大黄素改善肥胖型 2 型糖尿病小鼠糖脂代谢的实验研究 [J]. 中药材, 2012, 35(9): 1487–1490.
- [21] Wang YJ, Huang SL, Feng Y, et al. Emodin, an 11β -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 inhibitor, regulates adipocyte function *in vitro* and exerts anti-diabetic effect in ob/ob mice [J]. Acta Pharmacol Sin, 2012, 33(9): 1195–1203.
- [22] 宋冰, 刘学政. 大黄素对 KK α y 糖尿病小鼠脂肪组织 PPAR- α 及 PPAR- γ 表达影响的实验研究 [J]. 北京中医药大学学报, 2012, 35(10): 692–695.
- [23] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, et al. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis [J]. Nature, 2012, 481(7382): 463–468.

miR-34c 在口腔鳞状细胞癌的表达及对 Tca8113 细胞生物学行为的影响

常 凯¹,高继萍¹,宋晓娜²,续国强¹,卫佳宁¹,田晓琳¹,宋国华^{1*}

(1. 山西医科大学实验动物中心,实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室,太原 030001;
2. 晋中学院生物科学与技术学院,山西 晋中 030600)

【摘要】 目的 探讨 miR-34c 在口腔鳞状细胞癌(OSCC)组织及细胞中的表达及其对口腔癌细胞生物学行为的影响。**方法** qPCR 检测中国地鼠口腔癌组织中 miR-34c 的表达水平,脂质体 RNAiMAX 介导 miR-34c 模拟物组(miRNA-34c mimics)和 miR-34c 抑制物组(miRNA-34c inhibitor)转染 Tca8113 细胞,并通过 CCK-8 和划痕实验检测调控 miRNA-34c 表达对 Tca8113 细胞活力及迁移能力的影响。**结果** 与正常组相比,中国地鼠口腔癌组 miRNA-34c 表达水平显著升高。miR-34c 模拟物组 Tca8113 细胞增殖能力显著减弱($P < 0.01$),迁移能力降低不明显。miRNA-34c 抑制组 miRNA-34c 的表达显著下调,细胞的增殖能力和迁移能力显著增强($P < 0.05$)。**结论** 上调 miRNA-34c 表达能有效抑制口腔癌细胞增殖,迁移能力降低不显著,但有降低迁移能力的趋势,下调 miRNA-34c 表达可促进口腔癌细胞的增殖,提高细胞迁移能力。

【关键词】 miR-34c;口腔鳞状细胞癌;细胞增殖;细胞迁移

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0015-06

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 11. 003

Expression of miR-34c in oral squamous cell carcinoma and its influence on biological behaviors of Tca8113 cells

CHANG Kai¹, GAO Jiping¹, SONG Xiaona², XU Guoqiang¹, WEI Jianing¹, TIAN Xiaolin¹, SONG Guohua^{1*}

(1. Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University; Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Model, Taiyuan 030001, China. 2. Department of Biology & Technology, Jinzhong College, Jinzhong 030600)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of miR-34c in oral squamous cell carcinoma (OSCC) and its effect on the biological behaviors of OSCC cells. **Methods** MiR-34c was detected in the Chinese hamster oral cancer tissue by quantitative real-time PCR. MiR-34c mimics and inhibitor were transfected into Tca8113 cells by Lipofectamine RNAiMAX. Cell viability was measured by CCK-8 assay. Cell migration was determined by a scratch test. **Results** Compared with the normal group, miRNA-34c expression in the Chinese hamster oral carcinoma group was increased significantly. Upregulation of the miR-34c inhibited the viability of Tca8113 cells ($P < 0.01$), but there was no significant change in migration of the Tca8113 cells. Downregulation of miR-34c promoted the viability and migration of Tca8113 cells ($P < 0.05$). **Conclusions** Upregulation of miR-34c effectively suppresses oral cancer cell growth, while non-significantly

【基金项目】 国家自然科学基金(31772551);山西省自然科学基金(201701D121087)。

【作者简介】 常凯(1993—),女,硕士研究生,主要研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: 932719380@qq.com

【通信作者】 宋国华(1973—),女,教授,主要研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: ykdsgh@163.com

inhibits the cancer cell migration. Downregulation of miRNA-34c expression promotes proliferation and migration of oral cancer cells.

【Keywords】 miR-34c; oral squamous cell carcinoma(OSCC); proliferation; migration

口腔癌是常见的恶性肿瘤,在全球常见癌症中居第 6 位,其中 90% 属口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma,OSCC),口腔癌发病率高且预后生存率低。microRNA(miRNA)的异常表达与口腔癌的发生、转移和预后密切相关^[1]。miR-34 是一类在进化上非常保守的 miRNA,miR-34 家族(miR-34s)包括三个同源基因:miR-34a、miR-34b 及 miR-34c。研究发现:miR-34c 参与肺癌、结直肠癌、胃癌、鼻咽癌、前列腺癌、乳腺癌等常见癌症的发生,主要通过促进肿瘤细胞凋亡;抑制肿瘤细胞增殖与分化;抑制肿瘤细胞的侵袭和迁移等生物学效应发挥抑制肿瘤的作用。但是并没有关于 miR-34c 在口腔癌的功能的报道,我们课题组进行 miRNA 测序,结果发现 miR-34c 在口腔黏膜癌组织特异性表达,提示我们 miR-34c 对于口腔黏膜癌的临床价值,为进一步明确 miR-34c 在口腔癌中的作用,我们利用脂质体转染调节 miR-34c 在口腔癌中的表达,探讨 miR-34c 对口腔癌细胞生物学行为的影响。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

实验选用清洁级雄性 8~10 周龄的中国地鼠 60 只,体重 25~35 g,由山西医科大学实验动物中心提供[SCXK(晋)2015-0001]。屏障环境[SYXK(晋)2015-0001]中饲养,温度为 25℃ 左右,相对湿度 40%~70%。动物实验严格按照山西医科大学实验动物管理委员会制定的操作规程(IACUC 号:2015011),符合 3R 原则。

1.1.2 细胞株

体外实验选用人舌鳞癌细胞株 Tca8113 购自 Boster(博士德)。

1.2 主要试剂与仪器

TriPure Isolation Reagent 试剂购于 Roche;All-in-One™ miRNA qRT-PCR Detection Kit,All-in-One™ qPCR Mix 和 All-in-One™ qPCR Primer 均购于 GeneCopoeia;脂质体 RNAiMAX 试剂购于 Invitrogen;Opti-MEM 培养基购于 Gibco;miRNA-34c mimics 和 miRNA-34c inhibitor 均由 Gene Pharma 合成;Express miRNA Extraction 试剂盒,HG Taq Man

miRNA cDNA Synthesis 试剂盒和 HG Taq Man miRNA qPCR 试剂盒均购自 Hai Gene;RPMI 1640 培养基购自 Hyclone;胰酶、胎牛血清和 Cell-Counting Kit-8 试剂盒购自 Boster;100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素购自 Solarbio。普通 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);Step one plus 荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);酶标仪(美国 Bio-Rad 公司);CO₂ 细胞培养箱(Sanyo 公司);倒置相差显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 组织 miR-34c 表达水平的检测

0.5% DMBA 丙酮液涂擦中国地鼠双侧颊囊制备口腔黏膜癌模型。本实验选取中国地鼠口腔癌组织和正常组织(保存于 -80℃ 冰箱)进行 qPCR 验证实验。用 TriPure 提取中国地鼠口腔癌和正常组织总 RNA(各取 3 只中国地鼠),用分光光度计测定 RNA 浓度和纯度,A260/A280 均在 2.0 左右。然后按照 miRNA qRT-PCR Detection Kit 试剂盒说明书逆转录成 cDNA,以大鼠 5s RNA 作参照进行相对定量分析,根据 All-in-One™ qPCR Mix 说明书进行。qRT-PCR 采用 3 步法:Stage 1(预变性):95℃,10 min,1 个循环;Stage 2(PCR 反应)95℃,10 s,60℃,20 s,然后 72℃,10 s,40 个循环;Stage 3(溶解曲线分析)72℃~95℃,温度间隔 0.5℃,10 s/each。结果以 2^{-ΔΔCt} 法表示 miRNA-34c 的相对表达量。

1.3.2 细胞的培养

Tca8113 于含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100 mg/mL 链霉素的 RPMI 1640 培养基,37℃、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。

1.3.3 细胞的转染

将细胞接种于培养板,待细胞融和度达到 60%~80% 按照 Lipofectamine RNAiMAX Reagent 说明书进行脂质体转染,实验分为 miR-34c 模拟物组(miR-34c mimics,终浓度为 50 nmol/L)、miR-34c 抑制物组(miR-34c inhibitor,终浓度为 50 nmol/L)和空白对照组(control)。hsa-miR-34c mimics 序列为:AAUCACUAACCACACGGCCAGG,UGGCCGUGUGGUUAGUGAUUU;hsa-miR-34c inhibitor 序列为:CCUGGCCGUGGUUAGUGAUU。

1.3.4 细胞中 miR-34c 表达水平的检测

按照 Express miRNA Extraction 试剂盒说明书提取转染 48 h 处于生长对数期细胞的 miRNA,使用酶标仪测定提取的浓度及纯度(A260/A280)。按照 HG Taq Man miRNA cDNA Synthesis 试剂盒说明书逆转录成 cDNA,采用加 A 法进行反转录。qRT-PCR 按照 HG Taq Man miRNA qPCR 试剂盒说明书配制反应体系(20 μ L 体系)。以 RNU6B 作为内参,采用 2 步法: Stage 1 (Holding stage) 95 $^{\circ}$ C, 10 s, 1 个循环; Stage 2 (Cycling stage) 95 $^{\circ}$ C, 10 s, 然后 60 $^{\circ}$ C, 60 s, 40 个循环。结果以 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}法表示 miRNA-34c 的相对表达量。

1.3.5 细胞增殖能力的检测

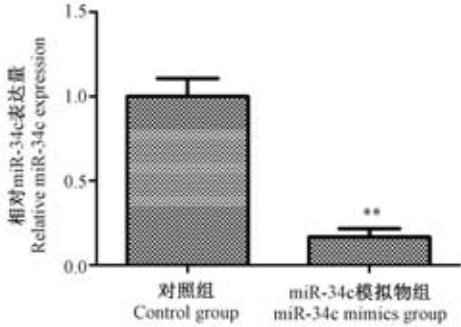
按每孔 1.0 $\times 10^3$ 的密度将细胞接种于 96 孔培养板上,每孔加含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液 100 μ L,待细胞贴壁融和度达到 60% ~ 80% 后,加入转染试剂,按照 CCK-8 试剂说明书,于加入转染试剂之前和加入转染试剂 24 h、48 h、72 h 后在酶标仪 450 nm 波长处检测每孔吸光度 (optical density, OD) 值,以 OD 值反映细胞增殖情况。

1.3.6 细胞迁移能力的检测

将生长状态良好的细胞接种于六孔板,待细胞贴壁后加入转染试剂,待细胞生长密度达到 90% 以上,用 200 μ L 无菌枪头在 6 孔板内以“1”字形划痕,然后立即用 PBS 漂洗悬浮细胞,加入 RPMI 1640 培养基继续培养,分别于划痕后 0 h、24 h、48 h 和 72 h 在荧光倒置显微镜下观察细胞愈合情况,用 Image Pro Plus 6.0 处理图片并记录相对迁移距离。

1.4 统计学方法

应用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,结果以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有显著性。



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

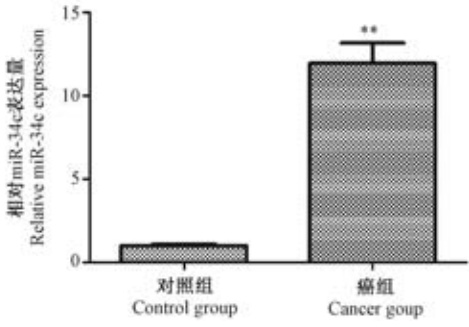
图 2 miR-34c 在口腔癌细胞中的表达

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

2 结果

2.1 口腔癌中 miR-34c 的表达

课题组在前期已成功构建中国地鼠口腔颊囊黏膜癌和鳞癌模型,并对口腔黏膜癌组织和正常组织进行高通量测序技术测序及生物信息分析,发现 miR-34c 在中国地鼠口腔黏膜癌组织中表达显著上调,对其进行 qPCR 验证,结果表明:与正常组织相比,口腔癌组织中 miR-34c 表达明显升高,其表达量是正常组的 11.95 倍。结果见图 1 所示。



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

图 1 口腔癌组织中 miR-34c 表达量

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

Figure 1 Expression of miR-34c in the oral squamous cell carcinoma tissues

2.2 miR-34c 转染效率的检测

转染 miR-34c inhibitor 后,miR-34c 表达量是对照组的 0.166 倍,miR-34c 表达量明显下调,差异有显著性(*P* < 0.01)。转染 miR-34c mimics 后,miR-34c 表达量是对照组的 280.917 倍,miR-34c 表达量明显上调,差异有显著性(*P* < 0.01)。结果见图 2。

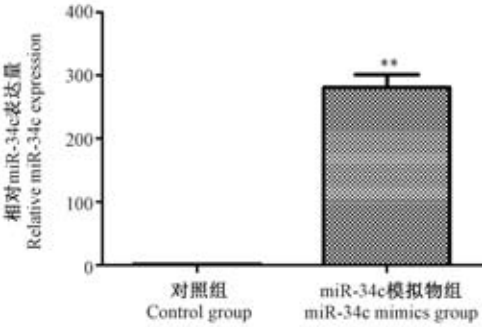
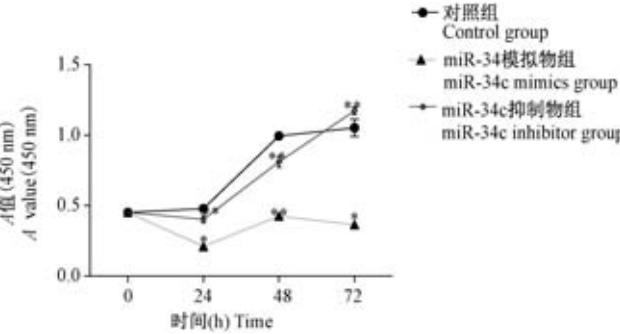


Figure 2 Expression of miR-34c in the Tca8113 cells

2.3 miR-34c 对 Tca8113 细胞增殖能力的影响

72 h 的 CCK-8 实验结果显示,与对照组相比,miR-34c mimics 组的增殖能力显著减弱 ($P < 0.01$),miR-34c inhibitor 组的增殖能力显著增强 ($P < 0.05$),说明上调 miR-34c 表达可抑制细胞增殖,降低细胞活力。结果见图 3。



注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图3 调节 miR-34c 表达水平对 Tca8113 细胞活力的影响

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

Figure 3 Effect of miR-34c on the proliferation of tongue cancer cell line Tca8113 cells

2.4 miR-34c 对 Tca8113 细胞迁移能力的影响

划痕实验显示,随着时间的推移,各组迁移距离都逐渐增加。与对照组 72 h 迁移扩张距离相比,miR-34c mimics 组的迁移能力与对照组差异无显著性,miR-34c inhibitor 组的迁移能力显著增强,说明下调 miR-34c 表达可促进细胞迁移。结果如表 1 和图 4 所示。

3 讨论

多种 miRNA 在口腔癌中异常表达,其与口腔鳞状细胞癌(OSCC)的发生、诊断及预后密切相关^[2]。miRNA 可作为癌基因或抑癌基因,对肿瘤的生物学

行为有重要的调控作用^[3-5]。miR-34a/375/195/26a/29b 等 miRNA 可通过多种转录因子和靶基因来调控舌鳞癌细胞的增殖、周期、迁移、侵袭和凋亡,并与肿瘤大小、转移、复发以及预后等临床病理特点相关,为舌鳞癌患者的预后判断以及手术和靶向治疗方案提供了参考^[6]。

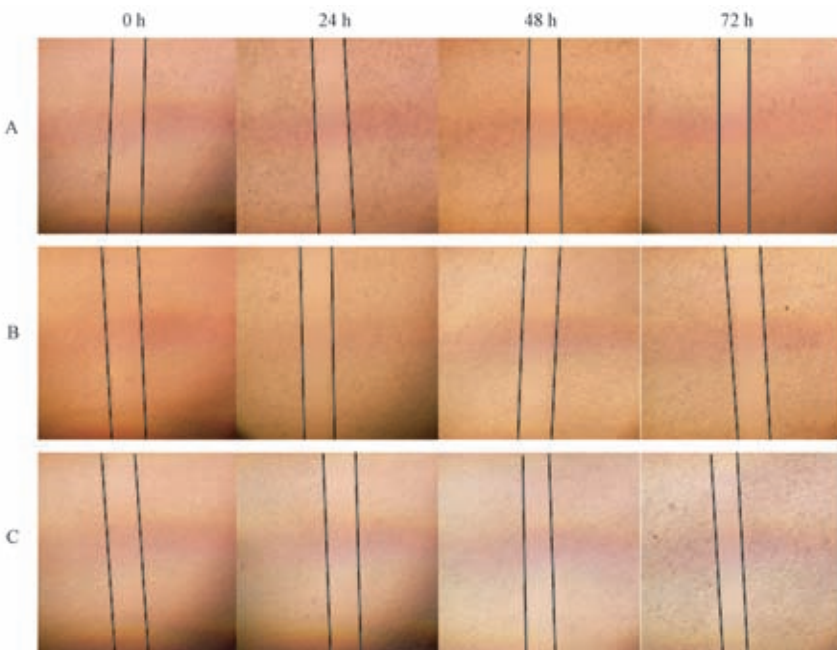
本课题组前期利用高通量测序成功构建中国地鼠口腔癌组织和正常组织差异表达的 miRNA 表达谱,发现 11 个表达差异有显著性的 miRNA。我们挑选了与肿瘤密切相关的 miR-34c,对其进行 qPCR 验证,结果表明 miR-34c 在口腔癌组织中表达显著上调^[7]。人类 miR-34 家族包括 miR-34a、miR-34b 和 miR-34c。在正常细胞中 miR-34a 发挥促进细胞衰老、使细胞周期阻滞在 G1 期和诱导细胞凋亡等作用^[8]。miR-34a 也参与乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、恶性胶质瘤、胰腺癌和肺癌等多种疾病的发生^[9-10],Jia 等^[11]的研究表明 miR-34a 靶向调控 MMP-9 和 MMP-14,从而抑制舌鳞状癌细胞的转移和侵袭。miR-34a 在 TSCC 淋巴结转移患者的预后和基因治疗中也具有潜在的应用价值。miR-34b 和 miR-34c 也具有潜在的抑癌作用^[12]。miR-34c 在乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、结肠癌、脑胶质瘤、鼻咽癌、喉癌、胃癌和肺癌等多种肿瘤中表达下调^[13]。武震东^[14]转染 miR-34c-3p mimics 和 miR-34c-5p mimics 于胶质瘤细胞,结果表明 miR-34c 可抑制胶质瘤细胞增殖、迁移和侵袭,使细胞周期停滞在 S 期及 G2/M 期的,诱导细胞凋亡。miR-34 家族与 p53 形成抗肿瘤正反馈环路:p53 由于 DNA 损伤被激活,活化的 p53 促使 miR-34s 表达,从而抑制 c-myc、E2F3、Cyclin E2、CDK6、MET、BCL-2 等相关蛋白,导致细胞凋亡。同样 miR-34s 也可通过抑制组蛋白去乙酰酶 SIRT1,从而促进 p53 因乙酰化而活化^[15]。

为了进一步研究 miR-34c 在口腔癌中的作用机

表 1 调节 miR-34c 表达水平对 Tca8113 细胞迁移的影响			
Table 1 Effect of miR-34c on the migration of tongue cancer cell line Tca8113 cells			
组别 Groups	24 h 迁移扩张距离 24-h migration expansion distance	48 h 迁移扩张距离 48-h migration expansion distance	72 h 迁移扩张距离 72-h migration expansion distance
对照组 Control group	13.789 ± 1.212	30.991 ± 3.012	37.215 ± 3.531
miR-34c 模拟物组 miR-34c mimics group	16.669 ± 1.362	37.746 ± 3.693	39.958 ± 3.706
miR-34c 抑制物组 miR-34c inhibitor group	19.889 ± 1.509	41.684 ± 3.156	67.136 ± 2.923 **

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

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



注:A:对照组;B:miR-34c 模拟物组;C:miR-34c 抑制物组。

图 4 调节 miR-34c 表达水平对 Tca8113 细胞迁移的影响(× 40)

Note. A: Control group; B: miR-34c mimics group; C: miR-34c inhibitor group.

Figure 4 Effect of miR-34c on the migration of tongue cancer cell line Tca8113 cells

制,本研究通过体外转染 miR-34c mimics 和 miR-34c inhibitor,探讨 miR-34c 对口腔癌 Tca8113 细胞中的生物学行为的影响。于转染 48 h 后利用 qPCR 检测转染效率,miR-34c 模拟物组和抑制物组 miR-34c 的表达量较对照组都差异有显著性,提示转染成功。脂质体转染的转染效率高,但也存在会对细胞产生毒性的问题,于转染 24 h 后 CCK-8 和划痕实验结果表明,细胞活力和迁移距离都有降低的趋势,转染条件还需进一步优化。我们的实验结果表明,细胞转染 72 h 后 miR-34c 对细胞具有抑制增殖和迁移的作用,在高宁^[16]、王萌^[17]、李甫钊^[18]和张金霞^[19]的实验中都得到了类似的结论,高表达 miR-34c 可抑制细胞增殖和迁移,促进细胞凋亡。转染 miR-34c 在不同细胞中发挥作用的时间不同,武震东^[14]的实验结果表明:上调 miR-34c 48 h 后,可抑制胶质瘤的增殖、迁移和侵袭能力,这可能是由于肿瘤异质性造成的。miR-34c 在多种肿瘤中表达下调,提示 miR-34c 有潜在的抑癌作用,这与我们的实验结果一致,但我们的高通量测序结果表明 miR-34c 在癌组较正常组高表达,这需要我们进一步明确其机制来作出判断。肿瘤的发生是多基因协同作用的结果^[20],miRNA 存在个体差异^[15],口腔癌的组织学表型和染色体分析的结果表明口腔癌

中存在不同表型的肿瘤细胞^[21-22]。miR-34c 作为口腔癌的标志物投入临床使用仍需进一步的探究和验证。

介于 miRNA 的特性,通过调控其表达抑制肿瘤是目前肿瘤治疗的新策略。以 miRNA 为基础的基因治疗进入了一个新的阶段,有很大的应用前景^[23]。在 miR-34 的表达受到抑制或下调的情况下,可通过合成 miR-34 类似物,增加 miR-34 的表达;或在 miR-34 异常表达导致病变时,可利用反义寡核苷酸直接结合 miR-34 阻断其活性,从而发挥治疗作用^[24]。

注:中国地鼠(*Cricetulus barabensis griseus*)是仓鼠科仓鼠亚科动物,在公开出版物中使用仓鼠作为名称更为科学。但鉴于目前我国实验动物国家标准中提到的动物的种类都是地鼠,作为专业人员能够清楚该物种在动物分类中地位,并不妨碍科学研究的成果和使用。中文名称后面的拉丁文不会对该研究的主体产生歧义,故本文在发表时仍沿用“中国地鼠”,待国标修订后再统一命名为“仓鼠”。

参考文献:

[1] Cervigne NK, Reis PP, Machado J, et al. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma [J]. Hum Mol Genet, 2009, 18 (24): 4818-4829.

- [2] 高岭, 任文豪, 鄧克谦, 等. microRNA 与口腔鳞状细胞癌的研究进展 [J]. 口腔医学研究, 2013, 29(6): 586–589.
- [3] Tian X, Chen Z, Shi S, et al. Clinical diagnostic implications of body fluid miRNA in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis [J]. Medicine (Baltimore), 2015, 94(37): e1324.
- [4] Hou B, Ishinaga H, Midorikawa K, et al. Circulating microRNAs as novel prognosis biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma [J]. Cancer Biol Ther, 2015, 16(7): 1042–1046.
- [5] Huang Y, Shen XJ, Zou Q, et al. Biological functions of microRNAs: a review [J]. J Physiol Biochem, 2011, 67(1): 129–139.
- [6] 贾凌飞, 甘业华, 俞光岩. MicroRNA 表达与舌鳞癌患者预后的关系及其调控舌鳞癌生物学行为的机制 [J]. 北京大学学报(医学版), 2016, 48(1): 5–9.
- [7] 李莉红, 庞文彪, 常凯, 等. 中国地鼠口腔颊黏膜癌中 miRNA 与 mRNA 表达谱的关联分析 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(2): 158–164.
- [8] 娄文加, 陈青, 刘立, 等. miR-34 家族——肿瘤抑制蛋白 p53 高度相关的 microRNA [J]. 遗传, 2010, 32(5): 423–430.
- [9] Li XJ, Ren ZJ, Tang JH. MicroRNA-34a: a potential therapeutic target in human cancer [J]. Cell Death Dis, 2014, 5(7): e1327.
- [10] Misso G, Di Martino MT, De Rosa G, et al. Mir-34: a new weapon against cancer? [J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2014, 3(9): e194.
- [11] Jia L, Wei S, Mitchelson K, et al. miR-34a inhibits migration and invasion of tongue squamous cell carcinoma via targeting MMP9 and MMP14 [J]. PLoS One, 2014, 9(9): e108435.
- [12] Toyota M, Suzuki H, Sasaki Y, et al. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer [J]. Cancer Res, 2008, 68(11): 4123–4132.
- [13] 苏菊. MiR-34c-3p 和 Notch2 在肺腺癌中的表达及其临床意义 [D]. 南华大学, 2016.
- [14] 武震东. MicroRNA-34c 在人脑胶质瘤中的表达及其对胶质瘤细胞生物学特性的影响和机制研究 [D]. 河北医科大学, 2013.
- [15] Hermeking H. p53 enters the microRNA world [J]. Cancer Cell, 2007, 12(5): 414–418.
- [16] 高宁, 夏鹰, 金虎, 等. miR-34c-3p 调控脑胶质瘤细胞增殖、分化、凋亡的机制研究 [J]. 中国地方病防治杂志, 2016, 31(12): 1386–1387.
- [17] 王萌. miR-34c 通过 YY1 调控骨骼肌细胞增殖及分化的机制研究 [D]. 中国农业大学, 2017.
- [18] 李甫钊, 薛纪森, 黄亦波, 等. miR-34c 对 II 型子宫内膜癌 HEC-1-B 细胞生长和凋亡的影响 [J]. 温州医科大学学报, 2014, 44(2): 86–90.
- [19] 张金霞, 林明燕, 林亚. miR-34c 抑制人子宫内膜癌的机制分析 [J]. 中华全科医学, 2016, 14(8): 1282–1285.
- [20] 李莉红, 皇甫冰, 高继萍, 等. EGFR, PDCD4, TGF- β 1, Smad3, Smad7 在中国地鼠口腔颊黏膜癌变过程中的表达研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 64–70.
- [21] Tremmel SC, Götte K, Popp S, et al. Intratumoral genomic heterogeneity in advanced head and neck cancer detected by comparative genomic hybridization [J]. Cancer Genet Cytogenet, 2003, 144(2): 165–174.
- [22] Mackenzie IC. Growth of malignant oral epithelial stem cells after seeding into organotypical cultures of normal mucosa [J]. J Oral Pathol Med, 2004, 33(2): 71–78.
- [23] 马东青, 崔红. miRNA 体内转染的研究进展 [J]. 临床和实验医学杂志, 2014, 13(21): 1825–1829.
- [24] 陈晨, 王欣, 沈兴家. miR-34 家族抑制肿瘤作用的研究进展 [J]. 温州医科大学学报, 2016, 46(3): 231–234.

[收稿日期]2018-04-02

4T1 炎性乳腺癌细胞接种联合皮质酮注射诱导 乳腺癌并发抑郁症小鼠模型的研究

杨 蕙¹, 孟 盼², 杨 琴², 韩远山¹, 凌 佳², 杜 青³, 赵洪庆², 王宇红^{2*}

(1. 湖南中医药大学第一附属医院中心实验室, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学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; 3. 湖南省中医药研究院, 长沙 410006)

【摘要】 目的 研究 4T1 炎性乳腺癌细胞接种联合皮质酮注射所致 BALB/c 小鼠病理行为和核心标志物的变化。**方法** 采用 4T1 炎性乳腺癌细胞接种的方法建立乳腺癌小鼠模型, 并随机分为 2 组, 乳腺癌组和乳腺癌皮质酮组; 另将未接种乳腺癌细胞的小鼠也随机分为 2 组, 正常对照组和抑郁症组。随后给予抑郁症组和乳腺癌皮质酮组 21 d 皮质酮注射 (30 mg/kg)。实验结束后, 采用糖水消耗实验、旷场实验、新奇摄食实验观察各组小鼠的抑郁样行为。小鼠断头处死后, 测量各组小鼠乳腺肿瘤瘤重和瘤体积, 采用 ELISA 法检测小鼠肿瘤标志物肿瘤抗原 CA153、糖类抗原 CA125、癌胚抗原 (CEA)、5-羟色胺 (5-HT)、多巴胺 (DA)、去甲肾上腺素 (NE) 的含量。**结果** 乳腺癌皮质酮组小鼠瘤重和瘤体积明显增大, 血浆 CA153、CA125 和 CEA 水平显著升高, 糖水偏嗜度明显降低, 对环境的好奇探索欲望减弱, 体内 5-HT、DA、NE 含量显著降低。**结论** 乳腺癌小鼠在接受慢性皮质酮注射后, 可表现出明显的抑郁样行为、神经递质和乳腺癌标志物以及肿瘤瘤体变化, 可为乳腺癌并发抑郁症动物实验提供模型参考。

【关键词】 乳腺癌并发抑郁症; 肿瘤标志物; 单胺神经递质; 动物行为学; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0021-06

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 11. 004

4T1 inflammatory breast cancer cell inoculation combined with corticosterone injection to establish a mouse model of breast cancer complicated with depression

YANG Hui¹, MENG Pan², YANG Qin², HAN Yuanshan¹, LING Jia², DU Qing³, ZHAO Hongqing², WANG Yuhong^{2*}

(1. Central Laboratory, the First Affiliated Hospital, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China. 2. National Key Laboratory of Chinese Materia Medica Powder and Innovation Drugs Established by Province and Ministry, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208. 3. The Hunan Provincial Institute of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410006)

【Abstract】 Objective To investigate changes of the pathological behaviors and core markers in BALB/c mice treated by 4T1 inflammatory breast cancer cells inoculation and corticosterone injection. **Methods** Breast cancer mouse models were established by inoculation of 4T1 inflammatory breast cancer cells and randomly divided into two groups: breast cancer and breast cancer with corticosterone groups. Healthy mice were randomly divided into two groups: normal control and depression groups. Subsequently, corticosterone injections (30 mg/kg, 21 days) were administered to the

【基金项目】 湖南省教育厅优秀青年项目 (17B201); 湖南省自然科学基金 (2018JJ3388); 国家自然科学基金 (81403379)。

【作者简介】 杨蕙 (1987—), 女, 助理研究员, 硕士, 研究方向: 中药药理学。E-mail: philomena_yh@sina.com

【通信作者】 王宇红 (1965—), 女, 研究员, 研究方向: 中药新药研究与开发。E-mail: wyh_107@163.com

depression and breast cancer with corticosterone groups. At the end of the experiment, depression-like behaviors of mice in each group were assessed by sugared water consumption, open field, and novel feeding tests. Then, all the mice were sacrificed by decapitation, and the tumor weight and volume in each mouse were measured. The levels of tumor antigens carbohydrate antigen (CA) 153, CA125, carcinoembryonic antigen (CEA), and 5-hydroxytryptamine (5-HT), dopamine (DA), norepinephrine (NE) were detected by ELISA. **Results** In the breast cancer with corticosterone group, the tumor weight and volume were increased significantly, and the levels of CA153, CA125, and CEA were increased significantly. Furthermore, the degree of sugar-water bias was reduced significantly, and the desire to explore the environment was weakened in the breast cancer mouse with corticosterone group. The concentrations of 5-HT, DA, and NE were reduced significantly. **Conclusions** After corticosterone treatment, breast cancer-bearing mice exhibit obvious depression-like behaviors. Neurotransmitters, breast cancer markers, and tumors are also changed. Based on the above indicators, this method of 4T1 inflammatory breast cancer cell inoculation combined with corticosterone injection can generate mouse model of breast cancer complicated with depression, which provides a reference for animal depression experiments.

【Keywords】 breast cancer complicated with depression; tumor marker; monoamine neurotransmitter; animal behavior; mouse

乳腺癌是世界范围内最常见的女性恶性肿瘤^[1],且比其他类型的癌症更加能影响患者的精神与情绪^[2]。Shakeri 等^[3]对乳腺癌患者测评后发现,高达有 69.4% 的患者表现出了重度抑郁症。而在中国,调查显示乳腺癌术后发生抑郁症的比例为 23.4%,其中重度抑郁症比例达 25%^[4]。抑郁症可严重影响乳腺癌的治疗及预后^[5],开展乳腺癌并发抑郁症(breast cancer related depression,BCRD)的防治研究已迫在眉睫。但是文献调研后发现,目前有关 BCRD 的研究主要集中在临床,而动物实验研究少见,严重阻碍了 BCRD 相关研究的进展。本实验拟采用 4T1 炎性乳腺癌细胞接种联合 21 d 皮质酮注射,建立乳腺癌并发抑郁症小鼠模型。并通过对比抑郁症小鼠和乳腺癌小鼠,从行为学、瘤形态和标记物含量等角度,对该模型进行初步评价,以期对乳腺癌并发抑郁症实验研究提供可靠的动物模型参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 雌性小鼠 40 只,4~6 周龄,18~22 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(湘)2013-0004,合格证号:43004700025656。动物自购买之日起即饲养于湖南中医药大学第一附属医院 SPF 动物房内[SYXK(湘)2015-0003],并在光暗周期为 12 h/12 h 环境中适应性喂养 5 d,温度为 20℃~26℃,湿度为 40%~70%,自由获取食物与水。

1.2 主要试剂与仪器

皮质酮购自索莱宝生物公司;RPMI 培养基、胰酶

购自 HyClone;胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司;DMSO 购自上海蓝润化学有限公司;肿瘤抗原 CA153、糖类抗原 CA125、癌胚抗原(CEA)、5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)、去甲肾上腺素(NE)的 ELISA 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。自动双重水蒸馏器购自上海健强玻璃仪器有限公司;MK3 型酶标仪购自美国 Thermo 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 4T1 炎性乳腺癌细胞的培养

4T1 炎性乳腺癌元代细胞株购买于上海科学院细胞库,在显微镜下观察细胞生长状态,用 0.22 μm 过滤器过滤细胞,弃掉培养液,加入适量 PBS 轻轻吹打细胞,1500 r/min,8 min 离心,加入含有 RPMI 培养液(内含 10% 胎牛血清,1% 双抗)10 mL,转移至 25 cm^2 培养瓶中,放入 37℃ 恒温培养箱中,培养 2 d 后,观察细胞生长状态,若长至 80%~90%,弃去培养液,用适量 PBS 洗 1 次,弃 PBS,加入 2 mL 胰酶,使其与培养板细胞充分接触,培养箱中消化 2 min 后,显微镜下观察细胞消化情况,若大部分细胞未变圆,用移液枪轻轻吹打细胞,使 80%~90% 细胞消化,加入 2 倍胰酶体积的培养液终止消化,将细胞转移至 5 mL 离心管中,1500 r/min,8 min,4℃ 离心,弃去培养液,加入适量 PBS 轻轻吹打细胞,使其完全成细胞悬浮状态,1500 r/min,8 min,4℃ 离心,弃 PBS,加入培养液,将细胞浓度调整为 10^6 个/mL,置于培养箱中培养,待细胞生长至对数期时,将细胞消化收集,用 PBS 将细胞吹打成单个悬浮状态,并将其浓度调整为 10^7 个/mL。

1.3.2 动物模型制备

以 BALB/c 小鼠为造模对象,在其腋下接种 0.1

mL 的 10^7 个/mL 4T1 炎性乳腺癌细胞,用以建立乳腺癌小鼠模型。采用背部皮下注射皮质酮混悬液 30 mg/kg(每 300 mg 皮质酮用 5 mL DMSO 预溶解,随后加入 95 mL 生理盐水),连续注射 21 d,用以制备抑郁症小鼠模型。而乳腺癌并发抑郁症小鼠模型则是在接种 4T1 炎性乳腺癌细胞 7 d 后,在其背部皮下注射皮质酮混悬液,连续注射 21 d。实验中全程按照实验动物使用 3R 原则给予人道主义关怀,IACUC 号:HN-LL-KY-2016-004-01。

1.3.3 动物分组

小鼠适应性喂养 5 d 后,将动物按体重随机分为 2 组:一组腋下接种 4T1 炎性乳腺癌细胞,成模的小鼠按糖水消耗随机分为 2 组:乳腺癌组和乳腺癌并发抑郁症组,未注射 4T1 炎性乳腺癌细胞的小鼠按糖水消耗分为 2 组:空白组和抑郁症组,每组 10 只。

1.3.4 瘤重、瘤体积指标检测

小鼠禁食禁水 24 h 后处死,将乳腺肿瘤剥离下来,并去除多余的毛发,称量其瘤重,抑瘤率 = (对照组平均质量 - 实验组平均质量) / 对照组平均质量 $\times 100\%$ 。并用游标卡尺量取其长、宽、高三径,计算体积 $V = (\text{长} \times \text{宽}^2) / 2$ 。

1.3.5 行为学检测

(1)糖水偏好:糖水偏好度反应了抑郁动物快感缺失的症状。将小鼠饲养于单笼内,禁食禁水 12 h 后,给予事先称好质量的 1% 蔗糖水和蒸馏水各一瓶,1 h 后取出水瓶,称量出剩余的蔗糖水与蒸馏水的重量。糖水消耗总共测量 4 次,时间分别为抑郁造模前,造模后 1、2、3 周。糖水消耗度 = 糖水消耗量 / (蒸馏 + 糖水消耗量) $\times 100\%$ 。

(2)旷场实验:小鼠禁食不禁水 24 h 后,将动物放入箱内底面中心,实验箱规格为 50 cm $\times$ 50 cm $\times$ 40 cm。适应 30 s 后,观察并记录动物在 3 min 内双后肢跨越方格的个数(水平运动)与前肢腾空或攀爬墙壁的次数(垂直运动)。实验在无光源的环境中进行,观察完毕擦拭箱内壁及底面,以免上次动物余留的信息影响下次测试结果。

(3)新奇摄食实验:小鼠禁食不禁水 24 h 后,将动物面向箱壁从同一位置放入实验箱中,实验箱规格为 50 cm $\times$ 50 cm $\times$ 40 cm,箱中心放入适量等体积食物,适应 30 s 后,观察并记录小鼠 5 min 内首次咀嚼食物的时间。实验在无光源的环境中进行,观察完毕擦拭箱内壁及底面,以免上次动物

余留的信息影响下次测试结果。

1.3.6 肿瘤标志物、单胺类神经递质含量的检测

小鼠禁食禁水 24 h 后取血,4℃ 静置 2 h 后,3000 r/min,10 min 离心,取上清液,置于液氮中速冻,后转移至超低温保存箱备用。将保存备用的血清或血浆样本在室温下解冻,严格按 CA153、CA125、CEA、5-HT、DA、NE 的 ELISA 试剂盒操作检测血中各指标的含量。

1.4 统计学方法

使用 SPSS 17.0 软件对数据进行统计,计量数据使用平均数 $\pm$ 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。

2 结果

2.1 乳腺肿瘤瘤重和瘤体积的变化

肿瘤离体后可见,乳腺肿瘤呈不规则的长椭圆形、球形或结节形,外表有完整的包膜包被,颜色为肉红色,有丰富的血管包裹,部分肿瘤分化生长成多个瘤体,或者有黑色的坏死区,质硬。肉眼观看可见,乳腺癌皮质酮组小鼠的肿瘤大于或基本等于乳腺癌组小鼠的肿瘤。结果见图 1。通过数据统计分析可知,与乳腺癌组比较,乳腺癌皮质酮组瘤重、瘤体积均升高,差异有显著性($P < 0.05$)。结果见表 1。

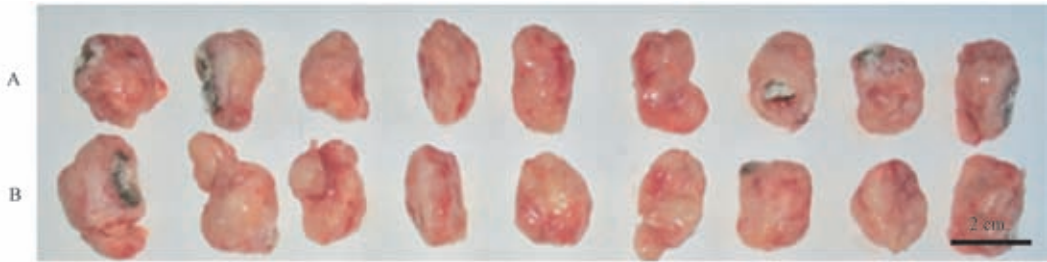
2.2 肿瘤标志物含量变化

与正常对照组比较,抑郁症组肿瘤标志物 CA153、乳腺癌组 CA153 和 CA125、乳腺癌皮质酮组小鼠肿瘤标志物 CA153、CA125 和 CEA 均明显上升($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与抑郁症组比较,乳腺癌皮质酮组 CA153、CA125 和 CEA 明显升高($P < 0.01$)。与乳腺癌组比较,乳腺癌皮质酮组 CA153、CA125 和 CEA 表达差异无显著性。结果见表 2。

2.3 行为学变化

2.3.1 小鼠快感缺乏的变化

与正常对照组比较,造模第二周抑郁症组和乳腺癌皮质酮组糖水消耗明显降低,差异有显著性($P < 0.05$);第三周时,抑郁症组、乳腺癌组和乳腺癌皮质酮组糖水消耗明显下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与乳腺癌组比较,乳腺癌皮质酮组造模第三周的糖水消耗显著减少($P < 0.05$)。结果提示,乳腺癌小鼠在接受了 21 d 皮质酮注射后,明显存在快感缺乏症状。结果见表 3。



注:A:乳腺癌组;B:乳腺癌皮质酮组。

图 1 各组小鼠乳腺肿瘤肉眼形态特征

Note. A: Breast cancer group; B: Breast cancer with corticosterone group.

Figure 1 Morphological characteristics of mammary gland tumors in each group of mice

表 1 各组小鼠乳腺肿瘤重、瘤体积的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1 Changes in tumor weight and volume of the mice in each group

组别 Groups	瘤重(g) Tumor weight	瘤体积(mm ³) Tumor volume
正常对照组 Control group	0	0
乳腺癌组 Breast cancer group	0. 919 ± 0. 43	96. 93 ± 479. 64
乳腺癌皮质酮组 Breast cancer with corticosterone group	1. 12 ± 0. 38 [#]	1204. 16 ± 619. 60 [#]

注:与乳腺癌组比较,[#] $P < 0. 05$ 。

Note. Compared with the breast cancer group, [#] $P < 0. 05$.

表 2 各组小鼠血浆乳腺癌相关标志物的含量($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 2 Plasma levels of breast cancer-associated markers in each group of mice

组别 Groups	CA153(U/mL)	CA125(U/mL)	CEA(pg/mL)
回归方程 Regression equation	$y = 0. 0043x + 0. 503$	$y = 0. 0027x + 0. 2047$	$y = 0. 001x + 0. 3229$
正常对照组 Control group	40. 49 ± 5. 51	181. 37 ± 108. 35	482. 76 ± 44. 83
抑郁症组 Depression group	41. 74 ± 14. 01 [*]	218. 35 ± 56. 48	513. 50 ± 39. 03
乳腺癌组 Breast cancer group	63. 71 ± 3. 35 ^{**}	248. 07 ± 69. 73 ^{**}	1059. 29 ± 44. 65
乳腺癌皮质酮组 Breast cancer with corticosterone group	112. 59 ± 10. 55 ^{**##}	335. 73 ± 70. 84 ^{**##}	1141. 65 ± 83. 73 ^{**##}

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0. 05$,^{**} $P < 0. 01$;与抑郁症组比较,^{##} $P < 0. 01$ 。

Note. Compared with the control group, ^{*} $P < 0. 05$, ^{**} $P < 0. 01$. Compared with the depression group, ^{##} $P < 0. 01$.

表 3 乳腺癌并发抑郁症小鼠糖水消耗的变化($\bar{x} \pm s$, $n = 10, \%$)

Table 3 Changes in sugar consumption of the mice with breast cancer complicated with depression

组别 Groups	造模前 Before modeling	造模第一周 First week after modeling	造模第二周 Second week after modeling	造模第三周 Third week after modeling
正常对照组 Control group	55. 31 ± 6. 63	66. 77 ± 11. 11	67. 34 ± 7. 42	70. 43 ± 9. 40
抑郁症组 Depression group	53. 87 ± 5. 85	52. 96 ± 18. 50	53. 85 ± 16. 84 [*]	52. 89 ± 7. 17 ^{**}
乳腺癌组 Breast cancer group	54. 76 ± 5. 55	55. 24 ± 17. 38	54. 76 ± 19. 20	54. 63 ± 16. 50 [*]
乳腺癌皮质酮组 Breast cancer with corticosterone group	55. 68 ± 5. 79	55. 19 ± 17. 42	52. 58 ± 19. 07 [*]	47. 48 ± 14. 44 ^{**▲}

注:与正常对照组比较,^{*} $P < 0. 05$,^{**} $P < 0. 01$;与乳腺癌组比较,[▲] $P < 0. 05$ 。

Note. Compared with the control group, ^{*} $P < 0. 05$, ^{**} $P < 0. 01$. Compared with the breast cancer group, [▲] $P < 0. 05$.

2.3.2 小鼠自主行为、探究和环境恐惧意识的变化
与正常对照组比较,抑郁组、乳腺癌皮质酮组小鼠经过格子数、直立次数明显下降($P < 0.05$),乳腺癌组仅经过格子数明显下降,差异有显著性($P < 0.05$);抑郁组、乳腺癌组、乳腺癌皮质酮组小鼠首次摄食所耗时间明显上升,差异有显著性($P < 0.05$)。与抑郁组比较,乳腺癌皮质酮组小鼠旷场实验经过格子数和直立次数均下降,差异有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。与乳腺癌组比较,给予皮质酮后癌症小鼠经过格子数、直立次数明显降低,首次摄食所耗时间明显上升,差异有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。提示,乳腺癌小鼠在接受皮质酮造模后,缺乏在新奇环境中的自主行为、探索与摄食欲望,存在饥饿与对新环境恐惧的矛盾冲突。结果见表4。

2.4 单胺类神经递质含量的变化

与正常对照组比较,抑郁组和乳腺癌皮质酮组小鼠血液中单胺类神经递质 NE、DA 和 5-HT 均明显下降,差异有显著性($P < 0.01$),乳腺癌组单胺类神经递质无明显变化;与抑郁组比较,乳腺癌皮质酮组 NE、DA 和 5-HT 明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$);与乳腺癌组比较,乳腺

癌皮质酮组仅 NE、DA 明显降低($P < 0.01$)。结果见表5。

3 讨论

2015 年中国 30 ~ 59 岁女性的乳腺癌患病率位居癌症首位^[6]。抑郁是乳腺癌病人普遍存在的一种心理状态,手术方式、家庭支持、收入水平、婚姻状况和受教育程度等因素均会影响乳腺癌患者抑郁的发生^[7]。但是,目前乳腺癌并发抑郁症的针对性治疗明显不足,其并发机制也尚未见阐明。因此,建立一种乳腺癌并发抑郁症小鼠模型将有利于疾病防治的开展。

首先,本实验选用了经典的 BABL/c 小鼠 4T1 炎性乳腺癌细胞接种的方式建立了乳腺癌模型,该模型被认为与人类乳腺癌具有相似的生物学特性,是研究乳腺癌的理想模型^[8]。其次,经典的抑郁症造模方法有应激造模、手术造模以及遗传性造模等,由于本实验已经选定了 BABL/c 小鼠,并进行了乳腺癌细胞接种,为了避免造模过程中物理性损伤乳腺癌瘤体,并减少动物的死亡率,故实验选用慢性注射皮质酮进行抑郁造模^[9]。

表4 乳腺癌并发抑郁症小鼠旷场实验、新奇摄食实验的变化($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 4 Changes in open field and novel feeding tests of the mice with breast cancer complicated with depression			
组别 Groups	旷场实验 Open field experiment		新奇摄食实验(s) Novel feeding experiment
	水平运动(次) Horizontal movement (times)	垂直运动(次) Vertical movement (times)	
正常对照组 Control group	120.67 ± 23.47	39.83 ± 18.85	136.92 ± 22.40
抑郁组 Depression group	65.06 ± 8.85 *	23.83 ± 7.74 *	216.50 ± 69.27 *
乳腺癌组 Breast cancer group	81.50 ± 20.17 *	28.50 ± 9.77	199.33 ± 53.08 *
乳腺癌皮质酮组 Breast cancer with corticosterone group	59.50 ± 8.85 * ^{###}	17.50 ± 4.55 * ^{###}	217.50 ± 51.57 * [▲]

注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$;与抑郁组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与乳腺癌组比较,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group,* $P < 0.05$,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$. Compared with the breast cancer group,[▲] $P < 0.05$,^{▲▲} $P < 0.01$.

表5 各组小鼠血清中单胺类神经递质的含量($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 5 Contents of monoamine neurotransmitters in serum of the mice in each group			
组别 Groups	NE(pg/mL)	DA(pg/mL)	5-HT(pg/mL)
回归方程 Regression equation	y = 0.009x + 0.456	y = 0.0054x + 0.3935	y = 0.001x + 0.4289
正常对照组 Control group	167.49 ± 28.49	458.41 ± 45.94	238.31 ± 13.73
抑郁组 Depression group	116.26 ± 17.74 **	314.90 ± 19.67 **	188.23 ± 17.52 **
乳腺癌组 Breast cancer group	164.58 ± 28.02	433.36 ± 32.59	225.73 ± 14.34
乳腺癌皮质酮组 Breast cancer with corticosterone group	85.57 ± 2.56 ** ^{###}	178.09 ± 28.22 ** ^{###}	63.18 ± 15.49 ** [#]

注:与正常对照组比较,** $P < 0.01$;与抑郁组比较,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$;与乳腺癌组比较,[▲] $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group,** $P < 0.01$. Compared with the depression group,[#] $P < 0.05$,^{##} $P < 0.01$. Compared with the breast cancer group,[▲] $P < 0.01$.

CA153 是临床上应用于乳腺癌的特异血清肿瘤标志物,在乳腺癌的诊断、疗效检测及预后判断等方面应用比较广泛。CA153 作为一种糖抗原,可在乳腺癌发生时,从癌细胞膜上分离出来,并释放到血液中。而 CA125 作为一种跨膜糖蛋白,在机体正常的情况下,是无法进入到血清中的,只有当浸润性肿瘤细胞破坏组织结构时,其才会释放入血。皮亚平等^[10]认为,CA125 和 CA153 的联合检查在乳腺癌的确诊过程中具有重要的角色,可大大提高疾病诊断的准确率。此外,CEA 是一种具有人类胚胎抗原决定簇的酸性糖蛋白,其在晚期乳腺癌和发生转移的患者中阳性率较高。刘珍等^[11]通过临床研究发现,IV 期乳腺癌患者血清中 CEA 和 CA153 水平明显高于 III 期,且以上两者表达阴性组化疗有效率和存活率均明显高于阳性组。由此可见,CA125、CA153、CEA 在乳腺癌的诊断、治疗效果、预后评估等方面均可作为重要参考依据。因此,本实验采用以上三者作为乳腺癌并发抑郁症小鼠模型的评价指标,结果可见,给予乳腺癌小鼠皮质酮后,小鼠血浆中 CA125、CA153、CEA 均显著增加。此外,通过对乳腺肿瘤的瘤重和瘤体积分分析可知,乳腺癌皮质酮组小鼠的瘤重和瘤体积比乳腺癌小鼠显著增加,故推测抑郁可能会加重乳腺癌的发生发展。

目前,针对啮齿类动物的行为学研究已经发展的比较成熟,常见的行为学检测方法也是围绕奖赏、探索、绝望等多个角度展开。其中,奖赏方面主要包括糖水偏好行为检测、颅内自我刺激实验等,而探索方面主要包括新奇摄食实验、旷场实验、高架十字迷宫实验等,绝望方面则是强迫游泳实验和悬尾实验等^[12]。由于模型小鼠腋下靠近背部有一个明显的瘤体,且每个小鼠瘤的大小并不一致,对小鼠的游泳和悬尾等行为有明显干扰,会导致相应的实验结果误差较大。故本实验主要针对模型小鼠奖赏和探索两个方面进行了研究,选择了糖水消耗实验、旷场实验和新奇摄食实验。与此同时,本实验还选取了抑郁症发生的典型指标,单胺类神经递质 5-HT、NE、DA,与行为学指标一些,协同评价各组大鼠的抑郁状态。结果发现,乳腺癌小鼠在造模第 3 周开始表现出快感缺失,其对于环境的探索欲望下降,但体内单胺神经递质含量没有显著下降,即抑郁程度弱于抑郁症组小鼠。而乳腺癌小鼠在接受了慢性皮质酮注射后,其奖赏行为和探索行为均表现出明显变化,体内单胺神经递质显著减少,抑郁程度较抑郁组小鼠更为严重。故实验推

测,乳腺癌小鼠在没有接受抑郁造模时,虽然表现出了部分抑郁样行为,但此时个体差异较大,很难开展乳腺癌并发抑郁症的研究工作。只有对其施加一定的应激措施,诱使其发展为乳腺癌并发抑郁症小鼠后,其有关抑郁的行为学表现和神经递质水平才会比较稳定,更适合进行下一步的研究工作。

4T1 炎性乳腺癌细胞接种联合皮质酮注射诱导的乳腺癌并发抑郁症小鼠不仅具备了典型的抑郁样症状和明显的神经递质变化,而且在乳腺癌标志物方面表现出明显异常,可作为一种乳腺癌并发抑郁症动物模型,被用于该疾病的发病机制研究或是药物防治研究,具有较好的参考价值。

参考文献:

- [1] Harbeck N, Gnant M. Breast cancer [J]. Lancet, 2017, 389 (10074): 1134 - 1150.
- [2] Sharif Nia H, Pahlevan Sharif S, Lehto RH, et al. Development and psychometric evaluation of a Persian version of the death depression scale-revised; a cross-cultural adaptation for patients with advanced cancer [J]. Jpn J Clin Oncol, 2017, 47 (8): 713 - 719.
- [3] Shakeri J, Golshani S, Jalilian E, et al. Studying the amount of depression and its role in predicting the quality of life of women with breast cancer [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2015, 17 (2): 643 - 646.
- [4] 许楠, 张鹏彦, 周冬仙, 等. 乳腺癌病人术后抑郁状况调查及危险因素分析 [J]. 中国现代医学杂志, 2015, 25 (34): 68 - 72.
- [5] Zong JC, Wang X, Zhou X, et al. Gut-derived serotonin induced by depression promotes breast cancer bone metastasis through the RUNX2/PTHrP/RANKL pathway in mice [J]. Oncol Rep, 2016, 35 (2): 739 - 748.
- [6] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66 (2): 115 - 132.
- [7] 谢亚兰, 何彩云. 乳腺癌病人合并抑郁症的发病率及影响因素 [J]. 全科护理, 2017, 15 (3): 279 - 281.
- [8] Welch DR. Technical considerations for studying cancer metastasis *in vivo* [J]. Clin Exp Metastasis, 1997, 15 (3): 272 - 306.
- [9] Bai Y, Song L, Dai G, et al. Antidepressant effects of magnolol in a mouse model of depression induced by chronic corticosterone injection [J]. Steroids, 2018, 135: 73 - 78.
- [10] 皮亚平, 田柳. 肿瘤标志物 CA153、CA125 联合检查对乳腺癌诊断的价值分析 [J]. 实用癌症杂志, 2017, 32 (8): 1351 - 1353.
- [11] 刘珍, 胡科. 血清 CEA 和 CA153 水平对乳腺癌化疗疗效及预后评估的价值分析 [J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38 (18): 2537 - 2539.
- [12] 牛晨旭, 郝瀚, 张海林. 啮齿类动物抑郁症模型的行为学检测方法 [J]. 河北医科大学学报, 2015, 36 (3): 370 - 372.

自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠肝病理损伤特点

康佳丽¹, 梁伟时¹, 孟徐兵¹, 张丹丹¹, 高庆瑶¹, 薛 宁¹, 韩淑英¹,
王建行^{2*}, 曹福源³

(华北理工大学 1. 临床医学院; 2. 冀唐学院; 3. 实验动物中心, 河北 唐山 063200)

【摘要】 目的 动态观察自发性 2 型糖尿病 db/db 小鼠肝产生的病理变化及特点, 为将 db/db 小鼠肝作为 2 型糖尿病肝损伤模型的实验研究提供基础理论和实验依据。**方法** 7~8 周龄, 雄性, SPF 级 db/m 小鼠作为对照组, 糖尿病 db/db 小鼠作为模型组, 各 16 只。动态观察其体重、空腹血糖 (fasting blood glucose, FBG)、血清丙氨酸氨基转移酶 (alanine aminotransferase, ALT) 和天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST) 活性, 计算肝指数, 光镜与电镜下观察肝的病理学改变。**结果** db/db 小鼠空腹血糖、血清 ALT、AST 活性均明显高于 db/m 小鼠, 组织学检查发现 db/db 小鼠肝在 16 周龄时就出现严重损害, 主要表现为肝细胞脂肪变性、炎细胞浸润等; 到 32 周龄时病变加剧, 镜下可见肝组织内有大量的胶原纤维; 电镜下可见线粒体、内质网等结构被破坏甚至消失, 出现明显的脂滴、炎细胞, 组织内含有大量的胶原纤维。**结论** db/db 小鼠 16 周龄时肝出现明显的脂肪变性以及炎细胞浸润等, 32 周龄时表现为明显的纤维化, 因此 db/db 小鼠的肝可作为实验研究时良好的 2 型糖尿病肝损伤模型。

【关键词】 2 型糖尿病; db/db 小鼠; 肝损伤; 电子显微镜

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0027-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.005

Pathological characteristics of liver injury in spontaneous type 2 diabetic db/db mice

KANG Jiali¹, LIANG Weishi¹, MENG Xubing¹, ZHANG Dandan¹, GAO Qingyao¹, XUE Ning¹, HAN Shuying¹,
WANG Jianxing^{2*}, CAO Fuyuan³

(1. Clinical Medical College; 2. Jitang College; 3. Experimental Animal Center, North China University of Science and Technology, Tangshan 063200, China)

【Abstract】 Objective To dynamically observe the pathological changes and characteristics of the liver injury in spontaneous type 2 diabetic db/db mice, and to provide a theoretical and experimental basis for studies taking the liver of db/db mice as a model of type 2 diabetic liver injury. **Methods** db/m mice were used as the control group and diabetic db/db mice were used as the model group (male, 7-8 weeks old, SPF grade) with 16 mice in each group. Weight, fasting blood glucose (FBG), serum alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activity were dynamically observed, and the liver index was calculated. Pathological changes in the liver tissues were observed by light and electron microscopies. **Results** FBG, serum ALT and AST activity in the db/db mice were significantly higher than those in the db/m mice. Histological examination revealed that the liver of db/db mice was damaged severely at 16 weeks

【基金项目】 2017 年国家级大学生创新创业训练计划项目 (201710081009); 河北省中医药管理局科研计划项目 (2017083)。

【作者简介】 康佳丽 (1997—), 女, 本科在读学生, 研究方向: 糖尿病药物防治。E-mail: jialikang95@126.com

【通信作者】 王建行 (1983—), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 中药防治糖尿病和心血管疾病。E-mail: wangjianxing83@163.com

of age, including mainly hepatocyte steatosis and infiltration of inflammatory cells. By 32 weeks of age, the disease was intensified and there were massive deposit of collagen fibers in the liver tissue. Electron microscopy showed that mitochondria, endoplasmic reticulum, and other structures were destructed or even absent, and there were significant infiltration of inflammatory cells as well as fat droplets and massive deposit of collagen fibers in liver tissue. **Conclusions** The liver of db/db mice can be used as a good liver injury model of type 2 diabetes, displaying obvious steatosis and infiltration of inflammatory cells in 16-week-old mice and obvious fibrosis in 32-week-old mice.

【Keywords】 type 2 diabetes; db/db mice; liver injury; electron microscopy

2 型糖尿病可对肝造成慢性进行性损伤,其肝并发症已成为研究热度较高的一类糖尿病并发症^[1]。但糖尿病肝病机制、具体病理改变等方面的研究还不够完善,防治仍有欠缺。db/db 小鼠具有早期血糖升高、肝肾病变、胰岛功能缺陷等特点^[2],本文主要将不同时期 db/db 小鼠的肝与同源 db/m 小鼠的进行比较,为进一步以 db/db 小鼠肝作为 2 型糖尿病肝损伤模型的实验研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 db/db 小鼠,体重 33 ~ 38 g,7 ~ 8 周龄,雄性;SPF 级 db/m 小鼠,体重 18 ~ 22 g,7 ~ 8 周龄,雄性,购自常州卡文斯实验动物有限公司[SCXK(苏)2016-0010],于华北理工大学动物实验中心 SPF 级屏障实验室[SYXK(冀)2015-0038]进行饲养,饲喂 SPF 级实验动物饲料(常州卡文斯实验动物有限公司),并按照实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。该实验已通过华北理工大学动物实验伦理审查(编号:2017062)。

1.2 主要试剂与仪器

丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)测定试剂盒(南京建成生物工程研究所);Masson 三色法染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);苏木精染色剂(南京奥多福尼生物科技有限公司);伊红生物染色剂(上海展云化工有限公司);罗氏血糖仪及试纸(德国罗氏诊断有限公司);真彩病理图像分析系统(高腾科技有限公司);高倍显微镜(日本奥林巴斯有限公司);透射电镜(日本日立公司)。

1.3 实验方法

将购来的小鼠适应性饲养一周,剔除不合格小鼠,随机选取 16 只 db/m 小鼠作为对照组,16 只 db/db 小鼠作为模型组,观察小鼠一般状态,饲养至

32 周龄。

1.3.1 体重及空腹血糖的测定

分别在实验开始第一周(小鼠 8 周龄)、小鼠 16 周龄、32 周龄时检测体重,并在禁食 8 h 后尾静脉取血测血糖。

1.3.2 血液肝功指标以及肝指数测定

在小鼠 16、32 周龄时禁食 12 h,麻醉后腹主动脉取血,全自动生化分析仪测定血清 ALT、AST 活性。于小鼠 16、32 周龄时,将 db/m 和 db/db 小鼠各处死 8 只,并分离肝组织。肝指数(liver index, LI) = [肝重量(g)/体重(g)] × 100%。

1.3.3 光镜下观察肝组织学结构

将称重后的肝迅速固定,常规石蜡包埋、切片、烤片,然后分别进行 HE 染色和 Masson 染色。所有染片在光镜下观察并拍片。

1.3.4 电镜下观察肝组织超微结构

小鼠肝组织切块,常规双重固定,梯度酒精脱水,100% 酒精:丙酮(1:1)浸透,纯丙酮浸透,丙酮:树脂(1:1)混合液 37℃ 温箱过夜,纯树脂(815/812 混合液)浸透,Epon 812 包埋,半薄切片甲苯胺蓝染色,超薄切片厚度为 50 nm,经醋酸铀和柠檬酸铅电子染色后,电镜下观察并拍片。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计软件,各组数据均用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析,两两对比, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 db/db 小鼠体重及空腹血糖动态变化

如表 1 所示,饲养期间 db/db 小鼠体重一直高于 db/m 小鼠($P < 0.01$)。db/db 小鼠的空腹血糖从 8 周龄时开始,便显著高于 db/m 小鼠($P < 0.01$),而且一直保持较高的水平。随着饲养时间的延长,db/db 小鼠的体重及空腹血糖也逐渐升高。

2.2 db/db 小鼠血清 ALT、AST 活性的动态变化

如表 2 所示,16 周龄时 db/db 小鼠血清 ALT、AST 活性均明显高于 db/m 小鼠($P < 0.01$, $P < 0.05$)。32 周龄时 db/db 小鼠血清 ALT、AST 活性均有降低,相较 db/m 小鼠差异无显著性($P > 0.05$),但与 16 周龄的 db/db 小鼠相比,血清 ALT 活性降低且差异有显著性($P < 0.05$)。

2.3 db/db 小鼠肝指数动态变化

如表 3 所示,db/db 小鼠的肝指数(LI)在 16 和 32 周龄时均高于 db/m 小鼠($P < 0.01$),16 周龄时升高更为显著,到 32 周龄时 db/db 小鼠的肝指数较 16 周龄时有所降低($P < 0.05$)。

2.4 肝组织在光镜下观察到的组织学结构改变

HE 染色(图 1):光镜下 db/m 小鼠(图 A1、B1) 16 周龄和 32 周龄时均表现正常,肝板围绕着中央静脉规则排列,细胞边界清晰,胞质内含细胞核一个或两个;db/db 小鼠 16 周龄时(图 A2)肝组织中细胞排列紊乱,胞核消失,细胞坏死,炎症细胞浸润,可见大小不等的脂滴空泡,肝细胞体积增大,细胞核大小不一;32 周龄时(图 B2)脂滴空泡明显减少,炎细胞浸润明显,肝细胞大量坏死,肝板、肝血窦等结构已无法辨认。

Masson 染色(图 2):db/m 小鼠(图 A1、B1)仅

在中央静脉周围可见极少量的蓝染胶原纤维;db/db 小鼠 16 周龄时(图 A2)可见大量脂滴空泡,中央静脉周围和组织内均有少量蓝染的胶原纤维,纤维化程度较正常组严重;32 周龄时(图 B2)大量的胶原纤维分布于肝组织内,纤维化明显。

2.5 肝组织在电镜下观察到的超微结构改变

电镜(图 3):db/m 小鼠(图 A1、B1)肝细胞内细胞核边界明显、核仁清晰,胞浆中线粒体数量多且形状规则,可见内质网等结构;db/db 小鼠胞质内线粒体、内质网等结构被破坏,16 周龄时(图 A2)胞浆中出现大量脂滴空泡;32 周龄时(图 B2)肝细胞正常结构几乎消失,肝组织内代之以大量的胶原纤维。

3 讨论

本实验动态观察了 db/db 小鼠肝功能及其组织病理形态结构的变化。结果表明,随着时间的推移,db/db 小鼠体重、空腹血糖逐渐升高,并显著高于 db/m 小鼠;解剖见腹腔有大量脂肪蓄积,表明 db/db 小鼠糖脂代谢明显紊乱,这点与文献报道一致^[3];db/db 小鼠 16 周龄时,血清 ALT、AST 水平均高于 db/m 小鼠($P < 0.05$);db/db 小鼠 32 周龄时仍相对 db/m 小鼠较高,但差异无显著性,而与 db/db 小鼠 16 周龄时相比较,ALT 活性降低且差异有

表 1 db/db 与 db/m 小鼠体重与空腹血糖($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
Table 1 Body weight and fasting blood glucose of the db/db and db/m mice

组别 Groups	体重(g) Body weight			空腹血糖(mmol/L) Fasting blood glucose (FBG)		
	8 周龄 8-week-old	16 周龄 16-week-old	32 周龄 32-week-old	8 周龄 8-week-old	16 周龄 16-week-old	32 周龄 32-week-old
db/m 小鼠 db/m mice	18.81 ± 0.84	24.34 ± 1.43 *	28.22 ± 1.74 ** #	4.55 ± 0.47	4.78 ± 0.58	4.88 ± 0.62
db/db 小鼠 db/db mice	41.26 ± 1.37 △△	59.37 ± 2.28 △△ *	70.51 ± 5.16 △△ ** #	10.53 ± 2.58 △△	11.36 ± 2.64 △△	12.85 ± 2.73 △△

注:与 db/m 小鼠比较,△△ $P < 0.01$;与 8 周龄小鼠比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与 16 周龄小鼠比较,# $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the db/m mice,△△ $P < 0.01$. Compared with the 8-week-old mice,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$. Compared with the 16-week-old mice,# $P < 0.05$.

表 2 db/db 与 db/m 小鼠血清 ALT、AST 活性($\bar{x} \pm s$, $n = 8$, U/L)
Table 2 Serum ALT and AST activities of db/db and db/m mice

组别 Groups	16 周龄 16-week-old		32 周龄 32-week-old	
	ALT	AST	ALT	AST
db/m 小鼠 db/m mice	74.53 ± 26.24	121.27 ± 23.74	85.37 ± 30.12	129.62 ± 21.64
db/db 小鼠 db/db mice	125.74 ± 35.25 △△	158.69 ± 30.48 △	97.73 ± 34.25 *	134.47 ± 25.48

注:与 db/m 小鼠比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与 16 周龄小鼠比较,* $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the db/m mice,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$. Compared with the 16-week-old mice,* $P < 0.05$.

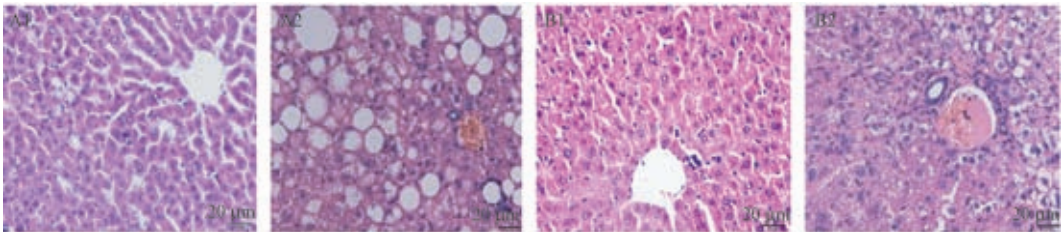
表 3 db/db 与 db/m 小鼠的肝指数($\bar{x} \pm s, n = 8, \%$)

Table 3 Liver indexes of the db/db and db/m mice		
组别 Groups	16 周龄 16-week-old	32 周龄 32-week-old
db/m 小鼠 db/m mice	4.66 ± 0.53	4.75 ± 0.68
db/db 小鼠 db/db mice	7.63 ± 0.70 ^{△△}	6.57 ± 0.64 ^{△△*}

注:与 db/m 小鼠比较, ^{△△} $P < 0.01$; 与 16 周龄小鼠比较, ^{*} $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the db/m mice, ^{△△} $P < 0.01$. Compared with the 16-week-old mice, ^{*} $P < 0.05$.

显著性($P < 0.05$)。ALT 大多存在于肝细胞浆内,AST 则多在肝细胞线粒体中,肝细胞坏死使 ALT、AST 进入血清^[4-5],血清中 ALT 与 AST 水平

的升高提示肝具有明显病变。db/db 小鼠的肝指数均高于对照组($P < 0.01$),而 32 周龄时 db/db 小鼠的肝指数小于 16 周龄($P < 0.05$),这可能是随着实验的进展 db/db 小鼠体重增加所致。肝的病理学观察发现,db/db 小鼠在 16 周龄时的明显病变为脂肪病变,伴有小部分细胞坏死,炎细胞浸润等,与相关报道相符^[6],这提示我们在实验研究中获取糖尿病脂肪肝模型时,应在小鼠成长至 16 周龄左右时较为合适;而到 32 周龄时肝脂肪变性已不明显而代之以肝纤维化和肝硬化,此病理变化过程与糖尿病患者的肝损伤的发展过程基本一致。



注:A1:16 周龄 db/m 小鼠肝组织;A2:16 周龄 db/db 小鼠肝组织;B1:32 周龄 db/m 小鼠肝组织;B2:32 周龄 db/db 小鼠肝组织。下同。

图 1 肝组织在小鼠 16 周龄和 32 周龄时的 HE 染色光镜图片(× 400)

Note. A1: Liver tissue of a 16-week-old db/m mouse; A2: Liver tissue of a 16-week-old db/db mouse; B1: Liver tissue of a 32-week-old db/m mouse; B2: Liver tissue of a 32-week-old db/db mouse. The same in the following figures.

Figure 1 Representative images of liver tissue stained with hematoxylin and eosin in the mice at 16 and 32 weeks of age

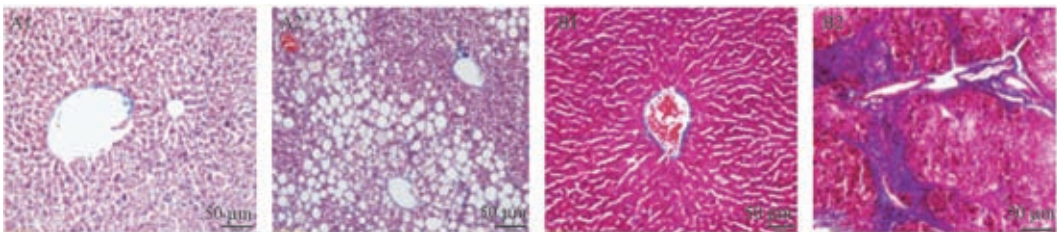


图 2 肝组织在小鼠 16 周龄和 32 周龄时的 Masson 染色光镜图片(× 200)

Figure 2 Representative images of liver tissue stained with Masson's trichrome staining in the mice at 16 and 32 weeks of age

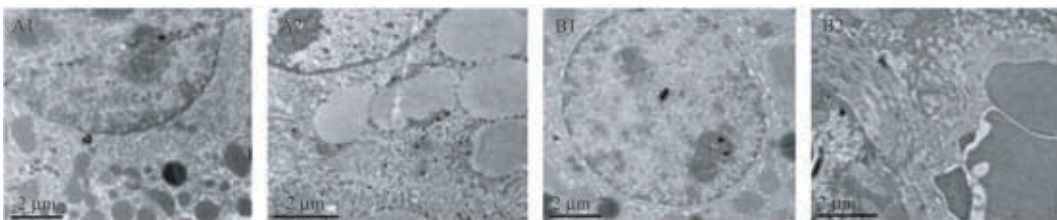


图 3 肝组织在小鼠 16 周龄和 32 周龄的电镜图片(× 6000)

Figure 3 Representative transmission electron micrographs of liver tissue in the mice at 16 and 32 weeks of age

胶原诱导与抗原诱导 C57BL/6 小鼠类风湿关节炎造模的比较研究

范凯健^{1,2}, 吴菁¹, 王婷玉^{1*}

(1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院药剂科, 上海 200011;
2. 上海市宝山区中西医结合医院药剂科, 上海 201901)

【摘要】 目的 通过对 C57BL/6 小鼠背景下胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 和抗原诱导的关节炎 (antigen-induced arthritis, AIA) 造模情况的分析, 来比较其造模成功率和关节炎进展的差异性。**方法** 将 42 只小鼠分成两组, 一组为 CIA, 一组为 AIA。每组 3 只作为正常组, 18 只作为模型组。最后一次造模后定期监测小鼠的体重、膝关节和踝关节直径。**结果** 在 C57BL/6 背景下, CIA 造模成功率不高且严重程度差异大, AIA 造模成功率高但维持时间短。**结论** 为了更全面地研究类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 的致病机制, 可能更适合在后续的转基因小鼠身上造 CIA 模型。

【关键词】 类风湿性关节炎; 抗原诱导的关节炎; 胶原诱导性关节炎; 动物模型; C57BL/6 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0031-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.006

Comparison of collagen-induced and antigen-induced C57BL/6 mouse models of rheumatoid arthritis

FAN Kaijian^{1,2}, WU Jing¹, WANG Tingyu^{1*}

(1. Department of Pharmacy, Shanghai Ninth People's Hospital, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200011, China. 2. Department of Pharmacy, Shanghai Baoshan District Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai 201901)

【Abstract】 Objective To analyze and compare the success rate of establishment and arthritis progression of collagen-induced (CIA) and antigen-induced (AIA) C57BL/6 mouse models of rheumatoid arthritis. **Methods** Forty-two C57BL/6 mice were divided into CIA and AIA groups. Three rats served as the normal group and 18 rats were used in each model group. After the last modeling, body weight and diameters of the knee joint and ankle of mice were monitored regularly. **Results** Under the C57BL/6 background, the success rate of establishment of CIA model was 41%, and the arthritis was maintained longer but less severe than that of AIA-induced models. The success rate of AIA modeling was 100%, and the arthritis was more severe but maintained for a shorter time. **Conclusions** To study RA pathogenesis more comprehensively, it may be more suitable to establish a CIA model in transgenic mice.

【Keywords】 rheumatoid arthritis (RA); antigen-induced arthritis (AIA); collagen-induced arthritis (CIA); animal model; C57BL/6 mouse

[基金项目] 国家自然科学基金(81301531, 81572104); 上海市科委科研项目(18140903502)。

[作者简介] 范凯健(1988—), 男, 硕士生, 研究方向: 药理学。E-mail: fankaijian2017@163.com

[通信作者] 王婷玉(1982—), 女, 博士, 副主任药师, 硕士生导师, 研究方向: 药理学、临床药学。E-mail: drtywang@163.com

类风湿性关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种慢性、进行性的自身免疫系统疾病,其特征主要是滑膜的长期慢性炎症,从而造成软骨以及骨关节结构的逐渐破坏。RA 影响超过 1% 的人群,并导致患者的生活质量明显下降^[1]。RA 具有多样的临床症状,因此许多实验动物模型试图模仿这种疾病的多种临床特征。目前,研究者已经开发了许多关节炎模型,并且这些模型成为阐明 RA 疾病发展过程和开发新药的非常有用的工具^[2-4]。许多转基因小鼠需要在 C57BL/6 小鼠背景下繁殖,因此在此小鼠背景下的疾病造模研究就显得尤为重要。转基因小鼠的研究将更广泛地揭示疾病的分子机制,并且能为可能的治疗方法提供验证。本实验将研究 C57 小鼠背景下,胶原诱导性关节炎 (collagen-induced arthritis, CIA) 和抗原诱导的关节炎 (antigen-induced arthritis, AIA) 的造模情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物

AIA 组 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 (体重:20 ~ 25 g) 21 只, CIA 组 10 ~ 14 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠 (体重:25 ~ 30 g) 21 只,由上海交通大学医学院附属第九人民医院动物房所提供 [SCXK (沪) 2013 - 0016]。常规饲养于拥有独立通气笼盒 (individual ventilated cages, IVC) 的动物房,12 h 光照和夜循环,温度 (22 ± 2) °C,湿度 50%

~60% [SYXK (沪) 2016 - 0016]。实验期间,遵循 3R 原则给予实验动物人道主义关怀。动物实验的开展取得了上海交通大学医学院附属第九人民医院实验动物伦理委员会批准 (编号:HKDL [2017] 207)。

1.2 主要试剂与仪器

4 mg/mL 鸡 II 型胶原, Chondrex 公司, 批号 170376; 5 mg/mL (Chondrex 公司, 批号 170670) 和 10 mg/mL (Chondrex 公司, 批号 170666) 的完全弗氏佐剂 (Complete Freund's Adjuvant, CFA); 冰醋酸溶液; 甲基化的牛血清白蛋白 (methylated bovine serum albumin, mBSA); 磷酸盐缓冲盐水 (phosphate buffer saline, PBS)。游标卡尺 (无锡锡丰有限公司), 电子天平 (上海浦春计量仪器有限公司), 微量进样器 (上海高鸽工贸有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 AIA 造模方法

选用 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠在第 0 天时, 将 100 mg mBSA 溶解于 50 μL PBS 中, 再与 50 μL CFA 混合乳化, 最后在两侧股骨头对应的外部皮肤皮内注射 (图 1A)。在第 7 天时, 同样的剂量在尾根部皮内多点注射。在第 21 天时, 将 10 μg mBSA 溶于 5 μL PBS 中后注射于左侧膝关节腔内, 右侧膝关节腔内则注射同等剂量的 PBS (图 1B)。



注:A:两侧股骨头对应的外部皮肤皮内注射;B:膝关节腔内注射。

图 1 AIA 模型造模注射部位

Note. A: Intradermal injection to the external skin corresponding to the femoral head on both sides. B: Intra-articular injection of the knee joint.

Figure 1 Injection sites for modeling of the AIA model

1.3.2 CIA 造模方法

选用 10~14 周龄雄性 C57BL/6 小鼠,将 4 mg/mL 鸡的 II 型胶原冰醋酸溶液,与 6.67 mg/mL 的 CFA 按照 1:1 混合乳化后分别在第 0 天和第 14 天于小鼠尾根部皮内多点注射 0.1 mL。

1.3.3 膝关节、踝关节的肿胀度和体重的监测

对于 CIA 模型,从第 0 天开始,用电子称对小鼠进行称重,用游标卡尺测量踝关节和膝关节的直径,每周测量两次,一共测量四周。对于 AIA 模型,从第 0 天开始,用电子称对小鼠进行称重,用游标卡尺测量膝关节的直径,连续测量一周。

1.4 统计学方法

实验数据采用 GraphPad Prism 7.0a 软件中的 Grouped 进行统计,实验结果用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。正常组与模型组之间的比较采用 *t* 检验分析。以 *P* < 0.05 为差异有显著性。

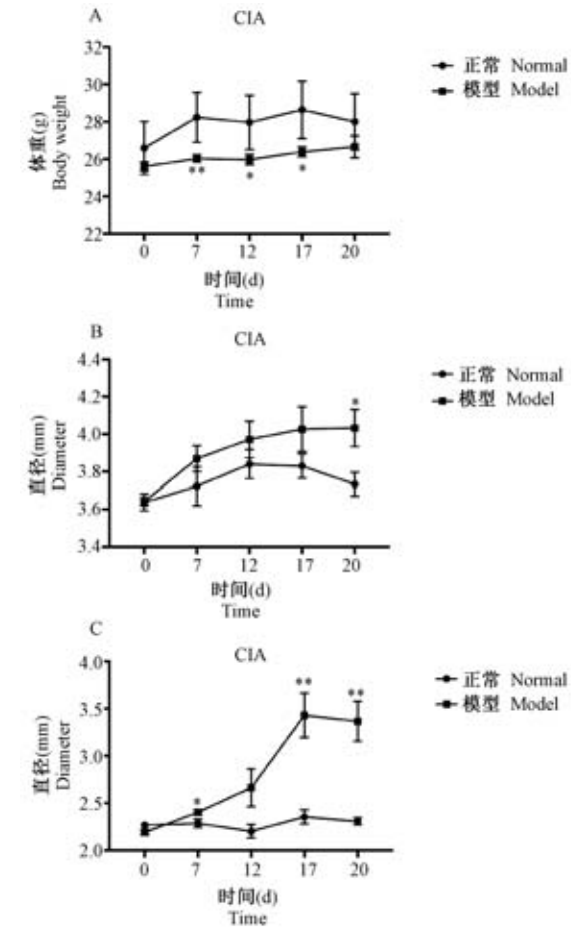
2 结果

2.1 CIA 模型

从图 2A 可以看出,模型组相对于正常组,体重会明显减轻,且在第 7、12 和 17 这三天的结果差异有显著性。在此次实验中,正常组 3 只,模型组 18 只(表 1)。模型组中 5 只出现严重关节炎症状,2 只出现轻微关节炎症状,1 只第一次造模后死亡。5 只出现严重关节炎症状的小鼠中,只有 1 只四肢都出现严重的关节炎症状。从图 2C 可以看出,第 7 天开始,模型组小鼠踝关节开始出现关节炎症状,且在第 17 天达到高峰后慢慢减轻。从图 2B 可以看出,模型组与正常组膝关节的差异不明显,只有在第 20 天才出现明显差异。综上,CIA 模型关节炎症状最先累及踝关节(图 3),后迁延至膝关节,且症状持续时间较久。

2.2 AIA 模型

从图 4A 可以看出,模型组与正常组体重差异无显著性。在此次实验中,正常组 3 只,模型组 18 只(表 1)。其中模型组 10 只出现严重的关节炎症



注:A:体重;B:膝关节肿胀度;C:踝关节肿胀度。与正常组比较,**P* < 0.05,***P* < 0.01。

图 2 CIA 模型组与正常组比较

Note. A: Body weight. B: Swelling degree of the knee joint. C: Swelling degree of the ankle joint. Compared with the normal group, * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01.

Figure 2 Comparison of the CIA model and normal groups

状,7 只出现轻微的关节炎症状,1 只加强造模前死亡。图 4B 可以看出,模型组从第 1 天开始出现严重的关节炎症状,直至第 3 天开始慢慢消退。从图 4C 可以看出,模型组注射 PBS 的右膝关节与正常组无明显差别。综上,AIA 模型关节炎症状主要是在膝关节(图 5),且维持较短。

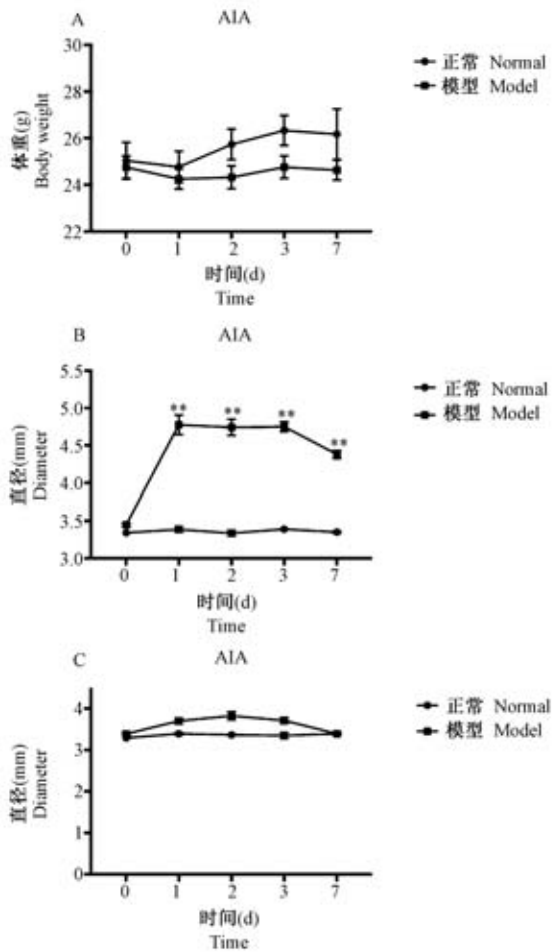
表 1 CIA 与 AIA 模型造模比较
Table 1 Comparison of the CIA and AIA models

组别 Groups	总数 Total number	造模数量 Number of models	造模成功数量 Number of successful models	死亡数量 Number of deaths	死亡率 Mortality rate	造模成功率 Successful rate of modeling
CIA	21	18	7	1	4.7%	41%
AIA	21	18	18	1	4.7%	100%



图 3 CIA 模型造模成功后小鼠后爪

Figure 3 Mouse hind paw after successful CIA model establishment



注:A:体重;B:膝关节肿胀度(左);C:膝关节肿胀度(右)。与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图 4 AIA 模型组与正常组比较

Note. A: Body weight. B: Swelling degree of the knee joint (left). C: Swelling degree of the knee joint (right). Compared with the normal group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Comparison of the AIA model and normal groups



图 5 AIA 模型造模成功后膝关节

Figure 5 Knee joint after successful AIA model establishment

3 讨论

CIA 是在 1980 年首次由 CII 诱导的小鼠模型^[5],从此成为关节炎中使用最广泛的关节炎模型之一。通过免疫接种,在遗传易感性小鼠品系中极易引发 CIA。在 CIA 模型中,小鼠会出现与 RA 相似的慢性骨侵蚀和滑膜炎^[5]。但该模型与 RA 之间最显著的差异在于 CIA 中不存在类风湿因子,且

实验性疾病一般是单相的。CIA 经典模型是 DBA/1(H-2q)小鼠品系,在我们团队以前的实验中此品系小鼠造模成功率 100%。本实验中,我们是在 C57BL/6 背景下造 CIA 模型。由于 B6 小鼠的主要组织相容性(major histocompatibility, MHC)的特异性,导致较低的发病率和较高的差异性^[6]。对于在 B6 背景下 CIA 造模的研究,国外已经有多支团队研究过。在 Ikic^[7]等人的实验中,是选用的 8~10 周龄小鼠且加强注射选在第 21 天,加强时选用不完全弗氏佐剂(complete Freund's adjuvant, IFA)而非 CFA。他们通过对大约 200 只小鼠造模,研究发现,造模成功率在 50% 左右。在我们团队的实验中,B6 小鼠的造模成功率是 41%,与国外团队成功率差不多,但还是远低于 DBA 小鼠的造模成功率。且 B6 小鼠的关节炎严重程度差异性大,一般只有后爪肿胀,而在 DBA 背景下造模,基本都会出现四肢严重的关节炎症状。由此可见,B6 背景下的 CIA 造模差异性较大,无法出现比较一致的关节炎症状。

AIA 是通过 mBSA 免疫动物并局部诱发关节炎的产生。它是一种由 T 细胞介导的关节炎症,其受累关节的组织病理学与 RA 有许多相似之处。但由于炎症局限在膝关节周围,AIA 并不是 RA 的一个完整模型。由于组织学的差异性,AIA 引起的炎症相对于 RA 引起的滑膜炎,炎症过程更加快速但结缔组织也更快速的分解^[8]。在本次实验中,膝关节从第一天开始就出现严重的关节炎症状,并持续三天,后症状逐渐减轻。在此次实验中,AIA 的造模成功率为 100%,明显高于 CIA 的造模成功率。mBSA 是一种高密度阳离子蛋白质,能被软骨表面所吸附,因此可以延长其关节炎症状^[9]。此外,膝关节腔内有限的空间也能导致 mBSA 诱发严重的关节炎。综上,B6 背景下的 AIA 造模成功率高,严重程度高,但关节炎症状维持时间短,不利于研究 RA 的慢性关节炎机制。虽然 AIA 模型不是 RA 的完整模型,但对研究关节炎局部细胞之间的相互作用还是很有价值的^[10]。

在 B6 背景下,CIA 的造模成功率低,且差异性较大,但后爪关节炎症状严重且维持时间久。CIA 模型在免疫学和病理学上更类似于 RA,因此适合

研究 RA 对机体整体的影响。而 AIA 作为单侧关节炎。优点是关节炎的确切起点,100% 的发生率和重现性好。因此 AIA 模型适合于关节疼痛的研究。两种模型之间各有优缺点,适合不同的实验需求。通过对 B6 背景下两种模型的相互比较,为了更全面的研究 RA 的致病机制,可能更适合在后续的转基因小鼠身上造 CIA 模型。

参考文献:

- [1] Klareskog L, Catrina AI, Paget S. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2009, 373(9664): 659–672.
- [2] Bevaart L, Vervoordeldonk MJ, Tak PP. Evaluation of therapeutic targets in animal models of arthritis: How does it relate to rheumatoid arthritis? [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(8): 2192–2205.
- [3] McNamee K, Williams R, Seed M. Animal models of rheumatoid arthritis: How informative are they? [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 759: 278–286.
- [4] Kollias G, Papadaki P, Apparailly F, et al. Animal models for arthritis: innovative tools for prevention and treatment [J]. *Ann Rheum Dis*, 2011, 70(8): 1357–1362.
- [5] Courtenay JS, Dallman MJ, Dayan AD, et al. Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice [J]. *Nature*, 1980, 283(5748): 666–668.
- [6] Tengvall S, Eneljung T, Jirholt P, et al. Gene therapy induces antigen-specific tolerance in experimental collagen-induced arthritis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(5): e0154630.
- [7] Ikic Matijasevic M, Flegar D, Kovacic N, et al. Increased chemotaxis and activity of circulatory myeloid progenitor cells may contribute to enhanced osteoclastogenesis and bone loss in the C57BL/6 mouse model of collagen-induced arthritis [J]. *Clin Exp Immunol*, 2016, 186(3): 321–335.
- [8] Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice [J]. *Arthritis Rheum*, 1977, 20(3): 841–850.
- [9] van den Berg WB, van de Putte LB. Electrical charge of the antigen determines its localization in the mouse knee joint. Deep penetration of cationic BSA in hyaline articular cartilage [J]. *Am J Pathol*, 1985, 121(2): 224–234.
- [10] Uster S, Coelho FM, Aeberli D, et al. TNF α blockade mediates bone protection in antigen-induced arthritis by reducing osteoclast precursor supply [J]. *Bone*, 2018, 107: 56–65.

[收稿日期]2018-06-15

用于四种常用品系大鼠鉴定的单核苷酸多态性标记 筛查和应用研究

曾玉琳¹, 蒙裕欢¹, 张 钰², 杜红丽^{1*}

(1. 华南理工大学生物科学与工程学院, 广州 510006; 2. 广东省实验动物监测所, 广州 510663)

【摘要】 目的 筛选出能快速鉴定四种常用品系大鼠[Wistar大鼠、Goto-Kakizaki(GK)大鼠、Brown-Norway(BN)大鼠、Sprague-Dawley(SD)大鼠]的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)位点并验证其可靠性。**方法** 首先对Wistar大鼠和GK大鼠进行全基因组重测序,利用生物信息学技术将重测序结果比对到BN大鼠参考基因组,筛查到Wistar大鼠和GK大鼠基因组范围内的特异性SNP,并从中进一步筛选出一组候选SNP位点,再利用一代测序和DNA混合池法对以上候选SNP位点在Wistar、GK、BN、SD四种大鼠群体中进一步筛查与验证。**结果** Wistar和GK大鼠通过比对分别得到94 800和106 019个纯合特异性SNP,其中有56 216个SNP为Wistar和GK大鼠所共有,且发现BN大鼠参考基因组、Wistar大鼠和GK大鼠三者基因型互不相同的位点仅有38个,从中挑选了15个作为候选SNP位点,最终在Wistar、GK、BN、SD四种大鼠群体验证中得到13个可以区分四个品系大鼠的SNP标记及其在各个品系中的基因型。**结论** 筛查并验证了能区分Wistar、GK、BN和SD四种大鼠的13个SNP标记,这些SNP标记可快速区分出Wistar、GK、BN和SD大鼠。

【关键词】 单核苷酸多态性;大鼠;测序;DNA混合池

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0036-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.007

Screening of single nucleotide polymorphism markers and their application to identification of four common strains of rats

ZENG Yulin¹, MENG Yuhuan¹, ZHANG Yu², DU Hongli^{1*}

(1. School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China.

2. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663)

【Abstract】 Objective To screen out single nucleotide polymorphisms (SNPs) that can be used to rapidly identify four common strains (Wistar, GK, BN, and SD) of rats and verify their reliability. **Methods** First, whole genome resequencing was performed on Wistar and GK rats. Using bioinformatic techniques to align the resequencing reads to the BN rat reference genome to detect specific SNPs within the genome of Wistar and GK rats, we selected a group of candidate SNPs. Then, we used Sanger sequencing and the DNA pooling method to screen and validate the candidate SNPs in four strains of rats. **Results** 94 800 and 106 019 homozygous-specific SNPs were detected in the Wistar and GK rats, respectively, of which 56 216 were shared by Wistar and GK rats. Only 38 SNPs were found to show different genotypes among BN, Wistar, and GK rat reference genomes, of which 15 were selected as candidate SNPs. Finally, 13 SNPs were

【基金项目】 国家科技支撑项目(2015BAI07B01)。

【作者简介】 曾玉琳(1992—),女,硕士研究生,专业:生物工程。E-mail: zeulin@163.com

【通信作者】 杜红丽(1975—),女,教授,博士,研究方向:分子生物学。E-mail: hldu@scut.edu.cn

screened, and the genotype of each locus in the four strains of rats was identified. **Conclusions** Thirteen SNP markers were identified and validated. These SNP markers can be used to rapidly distinguish Wistar, GK, BN, and SD rats.

【Keywords】 single nucleotide polymorphism(SNP); rat; sequencing; DNA pooling

大鼠具有体型较大、易于研究以及在某些生理特性方面更接近人类等优点,是多种生物医学实验的首选动物模型。其中,Wistar、GK、BN 及 SD 大鼠作为常用的实验大鼠模型广泛应用于多种药物和疾病机制等研究中。Wistar 大鼠于 1907 年由 Wistar 研究所培育而来,其引进时间较早,遍布范围较广,广泛应用于世界各国实验室中^[1]; Goto-Kakizaki (GK)大鼠是 1975 年由日本东北大学的 Goto 和 Kakizaki 等^[2]从 Wistar 大鼠中筛选高血糖个体近交繁殖数代而来,具有高血糖、高胰岛素血症、胰岛素抵抗等特性,常用于 II 型糖尿病的发病机制研究; Brown-Norway (BN)大鼠是 Silvers 和 Billingham 于 1958 年运用此前由野生大鼠培育而成的棕色突变型大鼠近交繁殖而来,其对实验过敏性脑脊髓炎及自身免疫性复合型肾小球肾炎有抗性,可作为致敏等动物模型^[3-4]; SD 大鼠是 1925 年由美国的 Sprague Dawley 农场用 Wistar 大鼠培育而成,其具有较强的适应能力和抗病能力,广泛用于营养学及病理学等研究中^[5]。

实验动物的遗传稳定性对实验的准确性和可靠性有着一定影响,因此在实验动物的饲养过程中,对其进行定期的遗传检测是必不可少的环节^[6]。生化标记基因检测^[7]、免疫标记基因检测^[8]以及毛色基因检测^[9]等传统的遗传质量检测方法存在着精确度不高以及检测位点少等局限性,这些检测方法已不再满足科学发展的需要^[10]。随着基因组学研究的不断进步,SNP 标记开始逐渐被应用于各种实验动物的鉴定及遗传检测中,相比于传统的遗传质量检测方法,利用 SNP 标记具有操作简单快速、能鉴别出同源品系以及能进行大规模高通量检测等显著优点^[11]。然而,在国内外的研究中,应用于大鼠遗传检测的 SNP 标记的研究却并不多。Saar 等^[12]利用 3×10^6 个 SNPs 对一系列大鼠进行了基因型分析,共发掘了 20 238 个有效的 SNPs; Guichoux 等^[13]通过对 33 305 个已知的候选 SNPs 进行验证,结果显示其中 66% 的 SNPs 能通用于不同大鼠品系中,并另外发掘了 287 个新的 SNPs;蔡月花等^[14]对 MIJ 和 HFJ 两个品系的大鼠进行了 SNP 分析研究,确定了这两个品系大鼠在 9 个位点的基因型。

目前,筛查到国内外广泛认可的有效遗传标记依然是实现实验动物遗传质量监测技术突破的有途径之一。因此,开发出能用于大鼠遗传检测的 SNP 标记具有重要意义。本文旨在利用高通量基因组测序、生物信息技术及一代测序等方法开发出能用于快速鉴定 Wistar、GK、BN 和 SD 这四种常用品系大鼠的 SNP 位点,以补充大鼠遗传质量检测方法,并进一步完善常用品系大鼠等位基因信息。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 53 只,体重 170 ~ 240 g,1.5 月龄;SPF 级 GK 大鼠 53 只,体重 150 ~ 220 g,1.5 月龄。均购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2017-0005]。SPF 级 BN 大鼠 50 只,体重 70 ~ 150 g,1 月龄;SPF 级 SD 大鼠 50 只,体重 80 ~ 150 g,1 月龄。均购于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0011]。以上大鼠均雌雄各半。大鼠饲养在符合《中华人民共和国卫生部实验动物环境设施标准》二级标准的动物房中,恒温室内金属鼠笼,进食标准饲料,可自由饮水,大鼠的鼠尾组织取材坚持实验动物使用的 3R 原则,于广东省实验动物监测所动物实验设施内进行[SYXK(粤)2016-0122],伦理审查编号为 IACUC2014029。

1.2 主要试剂与仪器

组织基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;引物由上海生工生物工程有限公司合成;DNA 聚合酶 Taq Mix 购自 TaKaRa 宝生物工程有限公司;PCR 扩增产物送于华大基因测序。PCR 扩增仪和凝胶成像仪购自美国 Bio-Rad 公司;DNA 电泳仪及电泳槽购自北京六一仪器厂;紫外-可见微量分光光度计购自美国赛默飞世尔科技公司;高速离心机购自德国 Eppendorf 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 全基因组重测序

提取 3 只 Wistar 大鼠和 3 只 GK 大鼠的基因组 DNA 于华大基因 Illumina HiSeq 2500 平台进行全基因组重测序。

1.3.2 候选 SNP 的筛查

首先对测序的原始数据(raw reads)进行截短和过滤得到待分析数据(clean reads),然后使用 Bowtie 2 软件^[15]将 clean reads 比对到 BN 大鼠参考基因组(www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Rat)并生成 SAM 文件,利用 Picard 软件^[16]去除 PCR 重复,将 SAM 文件用 SAMtools 软件^[17]转换成 BAM 文件并进行排序。在 Linux 系统上,使用 SAMtools 软件对上述准备好的 BAM 文件及参考基因组建索引,使用 GATK 软件^[18]的 Haplotype Caller 工具进行 SNP 检测并得到相应的 VCF 文件,最后通过阈值筛选得到最终的 VCF 文件。

经过整理统计,Wistar 大鼠比对参考序列检测出 94 800 个纯合 SNP,GK 大鼠比对参考序列检测出 106 019 个纯合 SNP,其中有 56 216 个 SNP 为 Wistar 和 GK 大鼠所共有,又对这些共有的 SNP 进行筛查,发现 BN 大鼠参考基因组、Wistar 大鼠和 GK 大鼠三者基因型互不相同的位点仅有 38 个,从中随机挑选了 15 个作为候选 SNP 位点(如表 1 所示)进行后续实验。

1.3.3 基因组 DNA 提取与混合池构建

使用组织基因组 DNA 提取试剂盒提取大鼠鼠尾的基因组 DNA。在每种大鼠的 DNA 样品中挑 10 个用于后续单个个体的 PCR 扩增(分别编号为:BN1 ~ BN10、W1 ~ W10、GK1 ~ GK10、SD1 ~ SD10),而其余 40 个则用于合成 DNA 混合池。对于合成 DNA 混合

池的样品,先用紫外分光光度计分别对每个 DNA 样品的浓度测量 3 次,取平均值作为样品浓度值,然后用 TE 缓冲液稀释并定量至 50 ng/μL,体积为 20 μL,每 10 个同品系大鼠的 DNA 混合为一个 DNA 池(例如 Wistar 大鼠,将编号为 W11 ~ W20 的 DNA 样品混合为 W-A,将编号为 W21 ~ W30 的 DNA 样品混合为 W-B,将编号为 W31 ~ W40 的 DNA 样品混合为 W-C,将编号为 W41 ~ W50 的 DNA 样品混合为 W-D),混合好的 16 个池用于后续 DNA 混合池实验。

1.3.4 引物设计与 PCR 反应

提取候选 SNP 位点上下 600 bp 序列为模板,使用 Primer 6.0 分别设计 15 对引物(如表 2 所示)。PCR 反应程序:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 30 s,55℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 1 min,循环 35 次后于 72℃ 充分延伸 10 min,最后于 4℃ 保存。

1.3.5 单个个体测序及比对

对于每个品系 10 只大鼠的 PCR 扩增产物,分别取 15 μL 进行一代测序,然后利用 Lasergene 软件包中的 SeqMan 对测序结果进行整理与比对。根据四个品系大鼠序列的比对结果对 SNP 位点进行进一步的筛选:①若同品系的 10 只大鼠在某一 SNP 位点的基因型不一致,则不采用该 SNP;②若 GK 大鼠和 Wistar 大鼠在某一 SNP 位点的基因型与表 1 不一致,则不采用该 SNP;③对于候选 SNP 位点上下游序列,若出现能鉴别出某种大鼠的 SNP 位点,则挑选采用。

表 1 15 个候选 SNP 位点在 Wistar 大鼠和 GK 大鼠中的基因型
Table 1 Genotypes of the 15 candidate SNPs in Wistar and GK rats

SNP 名称 SNP name	参考 SNP 编号 Reference SNP ID	染色体 Chromosome	位置 Position	参考基因型 Reference genotype	品系基因型 Strains' genotypes		
					Wistar 大鼠 Wistar rats	Wistar 大鼠 Wistar rats	GK 大鼠 GK rats
SNP1	rs197937932	chr1	273725611	A	GG		CC
SNP2		chr2	187980811	C	TT		AA
SNP3		chr3	11683894	G	TT		AA
SNP4		chr9	79596853	A	GG		TT
SNP5	rs105671378	chr10	43630340	C	GG		AA
SNP6	rs198912299	chr10	81829459	C	AA		GG
SNP7		chr12	36619820	T	CC		GG
SNP8	rs106967277	chr12	25151274	G	TT		AA
SNP9	rs106950708	chr14	105079331	G	CC		TT
SNP10	rs105462642	chr16	6615750	A	TT		CC
SNP11		chr18	16636986	A	GG		TT
SNP12	rs198385767	chr19	9593506	T	AA		CC
SNP13	rs106875860	chr19	44050282	C	TT		AA
SNP14	rs106902820	chr20	4425034	T	CC		GG
SNP15	rs197980280	chr20	5081792	C	AA		GG

注:“AA”、“GG”、“TT”、“CC”为基因型。
Note. “AA”, “GG”, “TT”, and “CC” refer to genotypes.

表 2 候选 SNP 位点对应的引物信息
Table 2 Corresponding primers of the candidate SNPs

编号 Number	SNP 名称 SNP name	引物名称 Primer name	引物序列(5' → 3') Primer sequences	产物长度(bp) Length of products
1	SNP1	SNP1-F	AAAAGTCATAACCAGTGTC	872
		SNP1-R	TATCTCCAGCTTCTCCAT	
2	SNP2	SNP2-F	CTCTTTGCCATAGTGTITG	878
		SNP2-R	TCTGTCCCAGCCTGTCTC	
3	SNP3	SNP3-F	ATGAGCCAAGAACTGCG	836
		SNP3-R	GAAACGAGGGGACCAAA	
4	SNP4	SNP4-F	CACTGGAGGATAAACCG	731
		SNP4-R	CTGTCATGTGACTAGGTGC	
5	SNP5	SNP5-F	CAGCATAGACACCAAGAAAG	841
		SNP5-R	CTACTCCTTGGGGCTTTT	
6	SNP6	SNP6-F	AGGGTTGTTCTCTGCTTT	778
		SNP6-R	TTCTTTCGTTCTGGGTC	
7	SNP7	SNP7-F	CCCAGTGTTAGCCTCCA	800
		SNP7-R	AGGACACGGGTAACGAC	
8	SNP8	SNP8-F	CACAAGCCCTCTACCCA	757
		SNP8-R	GAGCCACTCTAAACATCCT	
9	SNP9	SNP9-F	CCAAATCTCATAAGGTGCTA	871
		SNP9-R	ATGGATGGTCTGGGAATA	
10	SNP10	SNP10-F	TTCCGAGGACCCTGACA	795
		SNP10-R	TGACCTAGCCTTTCCAG	
11	SNP11	SNP11-F	GATCTTTCTGCCCTCACC	752
		SNP11-R	GCGTGTACTGCTTCTCCC	
12	SNP12	SNP12-F	GCCATACTTGCTTTCCA	718
		SNP12-R	TGCTCTTCTTCCCTCTAT	
13	SNP13	SNP13-F	TGGTTGCTGGGAATTGTA	710
		SNP13-R	GTGCTCCTTCTGGACTGC	
14	SNP14	SNP14-F	ACTACTGTTGAGGGAGTGAGA	668
		SNP14-R	AAAGAGGTCCAGTTTGAGTT	
15	SNP15	SNP15-F	TACCCTTGGGACCGTCTG	739
		SNP15-R	CGTTGGGAACCCTTTGG	

1. 3. 6 DNA 混合池实验

对最终筛选的位点进行扩大样本的 DNA 混合池实验,以上述准备好的 16 个混合池为模板进行 PCR 扩增目的片段,反应体系与反应程序同上。对 PCR 产物进行测序,利用 SeqMan 对序列结果进行整理与比对,并查看测序情况。

2 结果

2.1 扩增结果

以 W1 ~ W10,GK1 ~ GK10,BN1 ~ BN10 和 SD1 ~ SD10 为模板,用设计的 15 对引物扩增目的片段。结果显示,第 7 对和第 11 对引物扩增失败,其余产物均扩增成功且可用于测序。

2.2 单个个体测序及比对结果

扩增成功的产物测序结果显示,满足上述筛选要求的位点有 SNP4、SNP5、SNP6、SNP9、SNP12、SNP13、SNP14。除此之外,在这些序列中还发掘了

其他可以用于快速鉴定的 6 个位点,分别命名为 SNP16、SNP17、SNP18、SNP19、SNP20、SNP21。这 13 个位点在四种大鼠中的等位基因型如表 3 所示。

2.3 DNA 混合池实验结果

对于上述 13 个 SNP 位点,DNA 混合池的 PCR 产物测序结果显示,除 SNP13 和 SNP16 在 SD 大鼠中出现套峰外(如图 1 所示),其他位点均未出现套峰。SNP13 在 SD 大鼠单个个体测序结果中 10 个个体都是杂合子,因此在混合池测序时出现套峰属于正常现象,而 SNP16 在 SD 大鼠中出现轻微 G 峰,说明 SD 大鼠群体中存在少数 AG 杂合子或 GG 纯合子的个体。

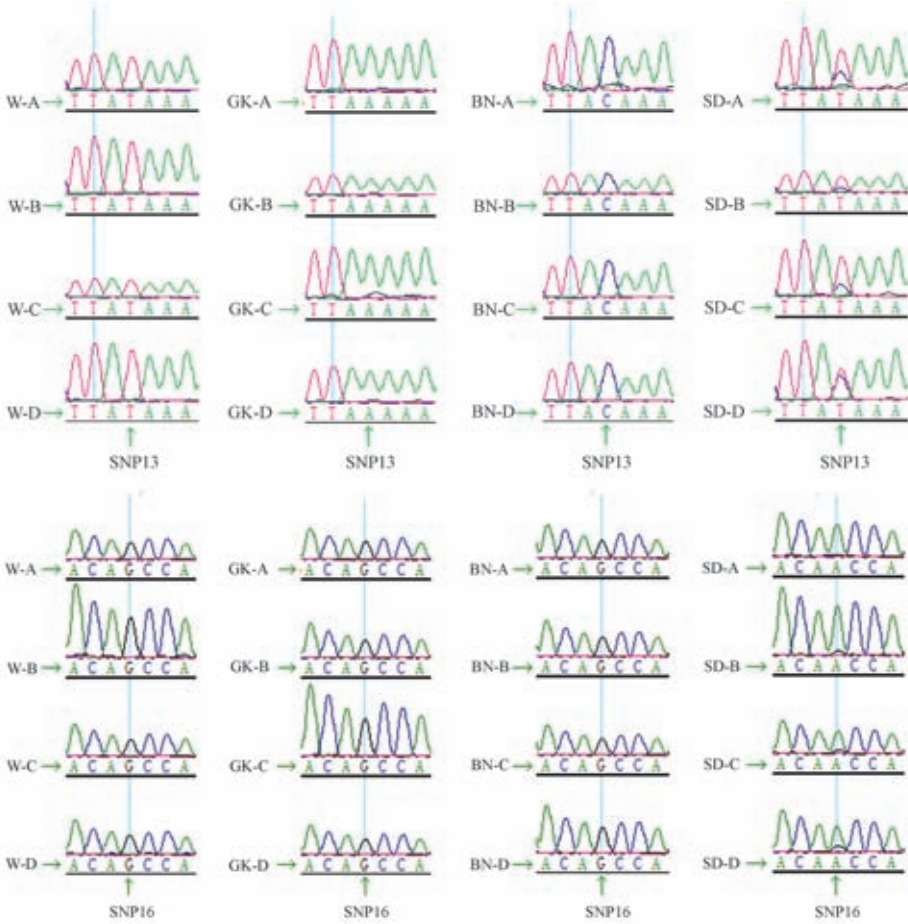
3 讨论

本研究首先利用高通量基因组测序和生物信息技术筛选了一组候选 SNP 位点,并继续扩大样本量以及增加大鼠种类进行测序分型,利用了一代测

表 3 13 个 SNP 位点在四种大鼠中的基因型
Table 3 Genotypes of the 13 SNPs in the four rat strains

SNP 名称 SNP name	染色体 Chromosome	位置 Position	参考基因型 Reference genotype	品系基因型 Strains' genotypes			
				Wistar 大鼠 Wistar rats	GK 大鼠 GK rats	BN 大鼠 BN rats	SD 大鼠 SD rats
SNP4	chr9	79596853	A	GG	TT	AA	GG
SNP5	chr10	43630340	C	GG	AA	CC	GG
SNP6	chr10	81829459	C	AA	GG	CC	AA
SNP9	chr14	105079331	G	CC	TT	GG	CC
SNP12	chr19	9593506	T	AA	CC	TT	AA
SNP13	chr19	44050282	C	TT	AA	CC	CT
SNP14	chr20	4425034	T	CC	GG	TT	CC
SNP16	chr20	4424915	G	GG	GG	GG	AA
SNP17	chr20	5081921	—	—	—	—	GG
SNP18	chr9	79597226	G	GG	AA	GG	GG
SNP19	chr19	9593810	A	AA	GG	AA	AA
SNP20	chr10	81829597	A	GG	GG	AA	GG
SNP21	chr20	5082157	G	AA	AA	GG	AA

注：“AA”、“GG”、“TT”、“CC”为基因型；“—”为碱基缺失。
Note. “AA”, “GG”, “TT”, and “CC” refer to genotypes; “—” refers to base deletion.



注：“W”、“GK”、“BN”、“SD”分别代表 Wistar 大鼠、GK 大鼠、BN 大鼠和 SD 大鼠；A ~ D 分别代表四个 DNA 混合池。

图 1 混合池扩增产物的测序峰图

Note. “W”, “GK”, “BN”, and “SD” refer to Wistar, GK, BN, and SD rats, respectively; A-D refer to the four DNA pools, respectively.

Figure 1 Sequencing peak maps of DNA pooling amplification products

序对四种大鼠(Wistar、GK、BN、SD 大鼠)的候选 SNP 位点进行进一步筛查与验证,最终得到了 13 个 SNP 位点以用于四种大鼠的快速鉴定,最后利用 DNA 混合池法验证了这些位点在群体中的稳定性和用于鉴定的可靠性。

从这 13 个 SNP 位点在四种大鼠中的基因型可以发现,SNP13 可鉴别出 Wistar、GK、BN 和 SD 四种大鼠,SNP16 和 SNP17 可鉴别出 SD 大鼠,SNP18 和 SNP19 可鉴别出 GK 大鼠,SNP20 和 SNP21 可鉴别出 BN 大鼠,而 SNP4、SNP5、SNP6、SNP9、SNP12 和 SNP14 虽然可鉴别出 GK 和 BN 大鼠,但区分不出 Wistar 和 SD 大鼠,主要是 Wistar 大鼠和 SD 大鼠这两个品系亲缘关系较近的缘故,因此可以利用多个位点配合进行鉴别,例如,SNP4 和 SNP17 结合也可快速鉴别出四种大鼠。此外,增加检测的 SNP 位点个数会大大提高鉴别的准确性和可靠性。

混合池实验显示,SNP13 和 SNP16 在 SD 大鼠中出现了套峰。SNP13 在 SD 大鼠单个体测序结果中 10 个个体都是杂合子,而 SNP16 在 SD 大鼠中出现轻微 G 峰,说明在 SD 大鼠群体中存在少数 AG 杂合子或 GG 纯合子的个体,这些现象是由于 SD 大鼠作为封闭群在这些位点保持着一定的杂合性。鉴于以上结果,SNP13 和 SNP16 还可以作为 SD 大鼠封闭群遗传评估的 SNP 标记,其他未出现套峰的位点说明了在四个大鼠群体中已趋于稳定,用于鉴定物种具有可靠性。

实验动物的遗传质量是衡量其品质好坏的重要因素,使用遗传特性稳定的实验动物才能保证实验结果更加具有可靠性和可重复性^[19]。在生物医学研究中,使用具有明确遗传背景的实验动物是非常重要的^[20],因此,筛查到能监测实验动物遗传背景的标记至关重要。SNP 是基因组中最为丰富且最为常见的可遗传变异,SNP 标记也将成为用于大鼠遗传质量监测的理想遗传标记^[21]。目前应用于大鼠遗传检测的 SNP 标记的研究较少,对其展开研究并筛选能快速鉴定四种常见品系大鼠的 SNP 位点,以补充大鼠遗传质量检测手段,具有进一步丰富大鼠 SNP 数据库的重要意义。

参考文献:

[1] 张全胜. 啮齿类实验动物品系介绍[J]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4(2): 121-127.

[2] Goto Y, Kakizaki M, Masaki N. Spontaneous diabetes produced by selective breeding of normal Wistar rats[J]. Proc Japan Acad, 2006, 51(1): 161-162.

[3] 孙娜, 周催, 蒲乾坤, 等. 挪威棕色大鼠和 Wistar 大鼠经口暴露卵白蛋白后机体过敏反应的比较[J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(12): 1546-1546.

[4] 贾旭东, 李宁, 王伟, 等. 蛋白过敏性研究——BN 大鼠动物模型[J]. 卫生研究, 2004, 33(1): 63-65.

[5] 杨宏辉, 高传玉, 徐予, 等. 动脉粥样硬化 SD 大鼠模型的建立[J]. 医药论坛杂志, 2009(2): 18-19.

[6] GB/T 14927.1-2008, 实验动物近交系小鼠、大鼠生化标记检测法[S]. 2008.

[7] 梁红, 唐卫东, 林炳水. TMU 小鼠遗传纯度的生化标记基因检测[J]. 天津医科大学学报, 1997, 3(3): 4-5.

[8] 陈芷沅. 皮肤移植对近交品系小白鼠及其杂交子一代的遗传鉴定[J]. 遗传学报, 1981, 8(4): 327-334, 396.

[9] 孙靖. 白化小鼠毛色基因测试法[J]. 上海畜牧兽医通讯, 1982, 2(4): 221-224.

[10] 刘荣宗, 康梦松. 近交系实验动物遗传质量监测之遗传标记类型的探讨[J]. 遗传, 1995, 17(S1): 60-62.

[11] 孙芳园, 王越甲, 杨炜峰, 等. 大小鼠微卫星和 SNP 遗传检测的研究进展[J]. 实验动物科学, 2014, 31(3): 60-65.

[12] STAR Consortium, Saar K, Beck A, et al. SNP and haplotype mapping for genetic analysis in the rat[J]. Nat Genet, 2008, 40(5): 560-566.

[13] Guichoux E, Lagache L, Wagner S, et al. Current trends in microsatellite genotyping[J]. Mol Ecol Resour, 2011, 11(4): 591-611.

[14] 蔡月花, 李建辉, 郑龙, 等. HFJ 和 MIJ 近交系大鼠 RAPD 特征与比较研究[J]. 实验动物科学, 2011, 28(5): 7-11.

[15] Langmead B, Salzberg SL. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2[J]. Nat Methods, 2012, 9(4): 357-359.

[16] <http://picard.sourceforge.net>. Accessed June 2012.

[17] Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools[J]. Bioinformatics, 2009, 25(16): 2078-2079.

[18] McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data[J]. Genome Res, 2010, 20(9): 1297-1303.

[19] 李芳芳, 岳乘飞. 豚鼠遗传检测方法研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(8): 62-66.

[20] Hoffman HA. 实验动物遗传质量的控制重点在遗传监测[J]. 上海实验动物科学, 1987, 7(1): 55-57.

[21] 高秀丽, 景奉香, 杨剑波, 等. 单核苷酸多态性检测分析技术[J]. 遗传, 2005, 27(1): 110-122.

[收稿日期]2018-02-26

醒脑再造胶囊对甲醛致小鼠记忆损害的影响

盛志豪¹, 陈颖¹, 马瑞¹, 陈秋冲¹, 李雅静¹, 王丹^{2*}

(1. 徐州医科大学麻醉学院, 江苏 徐州 221004; 2. 徐州医科大学麻醉药理学教研室, 江苏 徐州 221004)

【摘要】 目的 探讨醒脑再造胶囊对甲醛所致小鼠记忆损害的影响及其作用机制。**方法** 将 SPF 级 KM 小鼠随机分为空白对照组、溶剂对照组和低、中、高剂量组 5 组, 每组 14 只, 将除空白对照组以外的 4 组小鼠分别置于甲醛染毒装置中进行染毒, 持续 14 d。通过避暗实验检测各组小鼠的学习记忆能力; 采用生化方法测定脑组织中一氧化氮合酶(NOS)、超氧化物歧化酶(SOD)活力以及丙二醛(MDA)水平; 采用苏木素-伊红染色法观察小鼠海马 CA1 区锥体细胞的数目及形态结构变化。**结果** 与空白对照组比较, 溶剂对照组小鼠避暗潜伏期缩短($P < 0.01$), 错误次数增加($P < 0.01$), 脑组织中 NOS 和 SOD 活力降低($P < 0.05$), MDA 水平升高($P < 0.01$), 海马 CA1 区锥体细胞数目减少, 排列稀疏紊乱, 形态不规则。与溶剂对照组比较, 中、高剂量组小鼠潜伏期均延长($P < 0.05$), NOS 和 SOD 活力均升高($P < 0.01$), 低、中、高剂量组小鼠错误次数均减少($P < 0.05$), MDA 水平均降低($P < 0.01$)。低、中剂量组小鼠海马 CA1 区锥体细胞层数略有增多, 高剂量组海马 CA1 区锥体细胞层次清楚, 排列紧密, 数量明显增多。**结论** 醒脑再造胶囊可改善甲醛所致的小鼠记忆损害, 其机制可能与其抗氧化损伤作用及增加海马 CA1 区锥体细胞的数目有关。

【关键词】 醒脑再造胶囊; 甲醛; 一氧化氮合酶; 超氧化物歧化酶; 丙二醛; 海马; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0042-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.008

Ameliorating effect of Xingnaozai capsule on formaldehyde-induced memory impairment in mice

SHENG Zhihao¹, CHEN Ying¹, MA Rui¹, CHEN Qiuchong¹, LI Yajing¹, WANG Dan^{2*}

(1. School of Anesthesiology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004, China.

2. Department of Anesthetic Pharmacology, Xuzhou Medical University, Xuzhou 221004)

【Abstract】 Objective To observe the effects of Xingnaozai capsule on formaldehyde-induced impairment of memory and preliminarily explore the mechanisms in mice. **Methods** Specific pathogen-free healthy KM mice were randomly divided into blank control, solvent control, and low-, medium- and high-dose groups with 14 mice in each group. The groups of mice, except the blank control group, were placed in a formaldehyde poisoning device for 14 days. The latency and number of errors in a step-through test were observed. The activities of nitric oxide synthase (NOS) and superoxide dismutase (SOD), and the content of malonaldehyde (MDA) in brain tissue were measured biochemically. The number and morphology of pyramidal neurons in the mouse hippocampal CA1 area were observed after HE staining. **Results** Compared with the blank control group, the latency was shortened ($P < 0.01$), the number of errors was increased ($P < 0.01$), NOS and SOD activities in brain tissue were decreased ($P < 0.05$), and the content of MDA was increased ($P <$

【基金项目】 国家级大学生创新创业训练计划项目(201710313025); 江苏省高等学校大学生创新创业训练计划重点项目(201710313025Z); 江苏高校品牌专业建设工程资助项目(PPZY2015A066)。

【作者简介】 盛志豪(1995—), 男, 本科生, 研究方向: 神经药理学。E-mail: Zhihao_Sheng@hotmail.com

【通信作者】 王丹(1973—), 女, 副教授, 研究方向: 神经药理学和神经毒理学。E-mail: wdmingtiangenghao@126.com

0.01) in the solvent control group. The numbers of piramidal cells were reduced, cell arrangement was sparse and disordered, and the cell shape was irregular in the CA1 area of the hippocampus in the solvent control group. Compared with the solvent control group, the latencies of medium- and high-dose groups were lengthened ($P < 0.05$) and the numbers of errors in low-, medium- and high-dose groups were decreased ($P < 0.05$). The activities of NOS and SOD were increased in brain tissues of medium- and high-dose groups ($P < 0.01$). The contents of MDA were decreased in brain tissues of low-, medium- and high-dose groups ($P < 0.01$). The layers of pyramidal neurons in the mouse hippocampal CA1 area were increased slightly in the low- and medium-dose groups. The layers of pyramidal neurons were clear, cell arrangement was compact, and the numbers of cells were increased in the CA1 area of the hippocampus in the high-dose group. **Conclusions** Xingnaozaizao capsule improves formaldehyde-induced impairment of memory in mice. Its mechanisms may be associated with the effects of antioxidant injury and an increased number of pyramidal neurons in the CA1 area of the hippocampus.

[Keywords] Xingnaozaizao capsule; formaldehyde; nitric oxide synthase; superoxide dismutase; malonaldehyde; hippocampus; mouse

甲醛是一种广泛存在的空气污染物,主要来源除了化工业生产外,还有不合格的装修材料和室内燃气等^[1]。有研究显示,1990—2012 年我国各个城市住宅进行装饰装修时室内甲醛污染情况较为严重^[2]。甲醛不仅具有神经毒性、遗传毒性和致癌作用,还可对免疫系统和生殖系统产生毒性^[3],亦可导致哮喘^[4]。其可降低 DNA 甲基转移酶的活力,从而损害健康成年大鼠的空间记忆^[5]。长时间暴露于甲醛环境中可对神经化学物质的产生、释放、突触结合等环节造成直接干扰或伤害,使人或动物的认知、记忆和行为发生异常改变^[6]。醒脑再造胶囊主要由石菖蒲、胆南星、僵蚕等组成,具有化痰醒脑、祛风活络、醒脑益智的功能,临床上主要用于患者神志不清、语言蹇涩、口角流涎、肾虚痿痹、筋骨酸痛、手足拘挛、半身不遂以及脑血栓的恢复期和后遗症等治疗^[7]。关于醒脑再造胶囊能否改善甲醛所致小鼠记忆损害尚未见报道。本研究首先通过避暗实验观察醒脑再造胶囊是否对甲醛所致小鼠记忆损害具有保护作用,再进一步采用生物化学方法检测小鼠脑组织匀浆中的一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活力以及丙二醛(malondialdehyde, MDA)水平,并观察小鼠海马 CA1 区锥体细胞的数量和形态结构的变化,以初步探讨醒脑再造胶囊对甲醛致小鼠记忆损害的作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠 70 只,由济南朋悦实验动物繁育有限公司提供[SCXK(鲁)2014-0007],雌雄各半,体质量 16~18 g,4 周龄。小鼠饲养于徐州医科

大学麻醉学院机能学实验室屏障设施中[SYXK(苏)2016-0028],分笼饲养,每笼 5 只,自由摄食及饮水。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。本研究经徐州医科大学实验动物伦理委员会审查批准(IACUC 审查号:2017062502)。

1.2 主要试剂与仪器

醒脑再造胶囊(西安大唐制药集团有限公司),用 0.9% 氯化钠溶液配制成混悬液,每次用毕于 4℃ 条件下保存;质量分数为 37.0%~40.0% 甲醛溶液(分析纯,上海中泰化学试剂有限公司);NOS、SOD、MDA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白浓度检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。ZH-600 型避暗仪(安徽正华生物仪器设备有限公司);Multiskan™ GO 全波长酶标仪(美国赛默飞世尔科技公司);752 紫外光栅分光光度计(上海精密科学仪器有限公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组与处理

小鼠经适应性饲养 1 周后,按性别将其 1:1 随机分为空白对照组、溶剂对照组和低、中、高剂量组,每组 14 只。低、中、高剂量组分别予剂量为 1.0、1.5、2.0 g/kg 体质量的醒脑再造胶囊混悬液灌胃,每次灌胃前将混悬液震荡摇匀,灌胃容积均为 20 mL/kg,空白对照组和溶剂对照组小鼠予等体积 0.9% 氯化钠溶液灌胃。建立甲醛染毒装置:制作 4 个 60 cm×40 cm×50 cm 的纸箱,于每个纸箱的 4 个角落各放置 1 个直径 6 cm、高 5 cm 的杯子,每个杯子每天均加入 10 mL 质量分数为 37.0%~40.0% 的甲醛溶液,造成一个甲醛超标的环境,将除空白对照组以外的 4 组小鼠分别置于上述装置中进行甲醛染毒,并将纸箱封口,2 h 后将小鼠取出^[8]。

每天上午 8:30 ~ 9:30 进行灌胃,9:30 ~ 11:30 进行
甲醛染毒,持续 14 d。在染毒时段内,小鼠禁食禁
水,其余时间自由进食和饮水。

1.3.2 避暗实验

于实验第 13 天甲醛染毒结束后,从每组小鼠中
各随机选取 10 只进行避暗实验。训练时先将小鼠
放入避暗反应箱中适应 3 min,再在暗室底部铜栅通
以 0.2 mA、50 Hz 交流电,将小鼠背对洞口放入明
室,小鼠进入暗室即受电击,立即取出小鼠;24 h 后
将小鼠再次放入明室,记录其第 1 次进入暗室所需
的时间(即避暗潜伏期)和 5 min 内进入暗室的次数
(即错误次数)。若 5 min 内小鼠未进入暗室,错误
次数记为 0,潜伏期记为 300 s。

1.3.3 脑组织匀浆中 NOS、SOD、MDA 检测

避暗实验结束后,将小鼠迅速断头处死,剥离
脑组织,取双侧大脑半球,分离除去嗅球、脑干,准
确称质量,在冰上按质量体积比加 0.9% 氯化钠溶
液制成 10.0% 的脑组织匀浆,在 4℃ 下以 2500 r/min
离心 15 min,取上清液置于 -20℃ 冰箱中保存。根
据试剂盒说明书,在波长 530 nm,1 cm 光径下测定
吸光度值,检测每只小鼠脑组织匀浆中 NOS、SOD
活力以及 MDA 水平。

1.3.4 海马 CA1 区病理组织学检查

将各组其余的 4 只小鼠断头处死,分离脑组织
放置于质量分数为 10.0% 甲醛溶液中固定,选取双
侧海马进行石蜡包埋、切片(厚度为 5 μm)、苏木素-
伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色,光学显微镜下观
察海马 CA1 区锥体细胞的数目及形态结构的变化。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行统计分析。实验结果
均以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组组间比较

采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检
验, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 避暗实验结果

与空白对照组比较,溶剂对照组小鼠潜伏期缩
短($P < 0.01$),错误次数增加($P < 0.01$),表明甲
醛可对小鼠的记忆造成损害。与溶剂对照组比较,
中、高剂量组小鼠潜伏期均延长($P < 0.05$),低、
中、高剂量组小鼠错误次数均减少($P < 0.05$)。见
表 1。

2.2 脑组织匀浆中 NOS、SOD、MDA 检测结果

与空白对照组比较,溶剂对照组小鼠 NOS 和
SOD 活力均降低($P < 0.05$),MDA 水平升高($P < 0.01$)。与溶剂对照组比较,中、高剂量组小鼠 NOS
和 SOD 活力均升高($P < 0.01$),低、中、高剂量组
小鼠 MDA 水平均降低($P < 0.01$)。见表 2。

表 1 小鼠避暗实验结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Table 1 Results of the step-through test		
组别 Groups	潜伏期(s) Latency	错误次数 Times of errors
空白对照组 Blank control group	175.50 ± 113.81	0.80 ± 0.63
溶剂对照组 Solvent control group	33.80 ± 33.03 **	5.10 ± 3.63 **
低剂量组 Low-dose group	101.90 ± 83.10	2.80 ± 2.25 #
中剂量组 Medium-dose group	125.90 ± 121.32 #	1.80 ± 2.25 ##
高剂量组 High-dose group	171.60 ± 121.31 ##	0.60 ± 0.52 ##

注:与空白对照组比较, ** $P < 0.01$; 与溶剂对照组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the blank control group, ** $P < 0.01$. Compared with the solvent control group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

表 2 小鼠脑组织匀浆中 NOS、SOD、MDA 检测结果($\bar{x} \pm s, n = 10$)
Table 2 NOS, SOD, and MDA activities in the brain tissues of mice

组别 Groups	NOS(U/mg prot)	SOD(U/mg prot)	MDA(nmol/mg prot)
空白对照组 Blank control group	3.59 ± 1.58	13.26 ± 2.03	3.69 ± 0.74
溶剂对照组 Solvent control group	1.02 ± 0.44 **	2.84 ± 1.99 *	7.37 ± 4.54 **
低剂量组 Low-dose group	1.86 ± 0.84	12.55 ± 4.29	4.69 ± 1.47 ##
中剂量组 Medium-dose group	4.01 ± 2.51 ##	24.43 ± 18.50 ##	2.51 ± 0.72 ##
高剂量组 High-dose group	5.50 ± 3.20 ##	30.10 ± 15.45 ##	2.63 ± 0.38 ##

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与溶剂对照组比较, ## $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared with the solvent control group, ## $P < 0.01$.

2.3 海马 CA1 区病理组织学检查结果

空白对照组海马 CA1 区锥体细胞有 3~5 层,层次清楚,排列整齐紧密,染色均匀;细胞呈圆形或椭圆形,形态结构完整,核仁清晰(图 1A)。溶剂对照组 CA1 区锥体细胞层次变薄,为 1~3 层;细胞排列稀疏紊乱,数量减少,部分细胞形态不规则,胞体有不同程度的缩小,胞质深染,可见核碎裂、核溶解现象,灶性区域可见炎细胞浸润(图 1B)。低、中剂量组海马 CA1 区锥体细胞层数减少,细胞疏松,胞质浓染,但较溶剂对照组排列整齐,且细胞层数较溶剂对照组增多,达 3~4 层,但依旧可见核溶解以及炎细胞浸润(图 1C、1D)。高剂量组海马 CA1 区锥体细胞排列为 3~5 层,层次清楚,细胞数量较溶剂对照组和低、中剂量组增多,排列较紧密,着色均匀,胞浆深染的神经细胞少见(图 1E)。

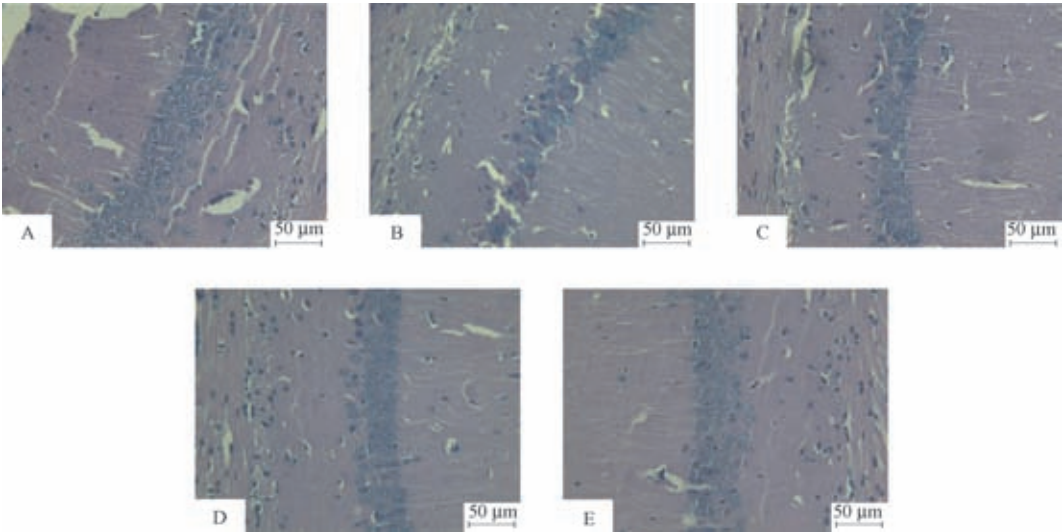
3 讨论

甲醛是一种常见的环境污染物,甲醛暴露可引起多种病理表现^[9],其在机体认知障碍的发生发展过程中亦起重要作用。有研究发现,甲醛引起的脑代谢和氧化应激改变,可能与神经退行性疾病的病理进展有关^[10]。大鼠经侧脑室注射甲醛染毒可损伤其在 Morris 水迷宫中的学习记忆能力和对新物体识别能力,并促进海马细胞凋亡和脂质过氧化的形成^[11]。而吸入甲醛可导致动物记忆丧失和人类认

知衰退^[12]。既往本实验室研究发现,在避暗实验中,甲醛染毒可使小鼠的潜伏期缩短,错误次数增多,表明对小鼠的学习记忆能力造成了一定程度的损害^[8]。避暗实验是根据啮齿类动物趋暗避明的习性设计,一半是暗室,一半是明室,中间有一小门相连;暗室底部铺有通电的铜栅,动物进入暗室即受到电击。以潜伏期和错误次数作为指标,动物间差异较小,该实验简单易行,敏感性较高,是检测学习记忆能力的经典方法之一^[13-14]。因此,本研究采用避暗实验观察小鼠的记忆能力。

本研究结果证实,与空白对照组比较,溶剂对照组小鼠避暗潜伏期缩短,错误次数增加,差异有显著性,其表现主要体现为学习记忆功能的损害,为下一步的实验奠定了可靠的模型基础。而与溶剂对照组比较,中、高剂量组潜伏期均延长,低、中、高剂量组错误次数均减少,差异有显著性,说明预先给予醒脑再造胶囊对甲醛所致小鼠记忆损害有保护作用。

SOD 是体内天然存在的氧自由基清除剂,具有清除并阻止由氧自由基引发的自由基连锁反应的作用,其活力高低可作为评价机体清除氧自由基能力的指标^[15];MDA 则是体内脂质过氧化的主要代谢产物,其水平高低可作为机体细胞受自由基攻击程度的指标^[16]。有研究证实,小鼠若长时间吸入甲醛,会导致脑组织中 SOD 活力降低,MDA 水平升



注:A:空白对照组;B:溶剂对照组;C:低剂量组;D:中剂量组;E:高剂量组。
图1 小鼠海马 CA1 区病理组织学检查结果(HE 染色,× 400)
Note. A: Blank control group; B: Solvent control group; C: Low-dose group; D: Medium-dose group; E: High-dose group.

Figure 1 Histopathology of the CA1 area in the hippocampus of mice. HE staining

高^[17]。适量的一氧化氮可清除自由基,调节脑血流量,加强学习记忆能力^[18],且对长时程增强作用(long-term potentiation, LTP)的形成和建立有重要作用。NOS 是催化生成一氧化氮的关键酶^[19],当 NOS 活力降低,一氧化氮生成不足,机体清除自由基的作用即减弱, LTP 的形成和突触可塑性的建立亦受到影响,从而影响学习记忆能力。本研究发现,与空白对照组比较,溶剂对照组小鼠 NOS 和 SOD 活力均降低,MDA 水平升高,差异有显著性,说明甲醛可促进脂质过氧化物的形成。与溶剂对照组比较,中、高剂量组小鼠 NOS 和 SOD 活力均升高,低、中、高剂量组小鼠 MDA 水平均降低,差异有显著性,因此我们推测预先给予醒脑再造胶囊对小鼠记忆损害的保护作用可能与其抗氧化损伤作用有关。

醒脑再造胶囊的主要成分为石菖蒲^[20],石菖蒲为天南星科多年生草本植物石菖蒲的干燥根茎,具有抗痴呆、改善记忆、抗抑郁、抗惊厥和抗癫痫的药理作用^[21]。有研究发现,石菖蒲水提取物可增强小鼠的学习记忆能力,提高脑组织 SOD 活力,降低 MDA 水平^[22]。Mao 等^[23]研究表明,石菖蒲及其活性成分细辛醚可通过调控细胞外调节蛋白激酶的级联反应,直接促进神经干细胞增殖和神经发生。本研究中预先给予醒脑再造胶囊对甲醛所致小鼠记忆损害具有保护作用,可能与其主要成分石菖蒲密切相关,与其他成分的关系尚有待进一步研究。

海马不仅与多种神经性和精神性疾病相关,且与空间学习记忆密切相关^[24],其结构中学习与记忆关系最为密切的是 CA1 功能区^[25]。本研究中,溶剂对照组小鼠海马 CA1 功能区锥体细胞层次变薄,细胞排列稀疏紊乱,可见核碎裂、核溶解现象,可能是甲醛致小鼠记忆损害的病理学基础。预先给予醒脑再造胶囊可显著增加甲醛小鼠海马 CA1 区锥体细胞数量,减少锥体细胞凋亡。可见,醒脑再造胶囊通过有效保护海马 CA1 区的神经锥体细胞,从而对甲醛致小鼠记忆损害有改善作用。

综上所述,醒脑再造胶囊可改善甲醛所致的小鼠记忆损害,其机制可能与其抗氧化损伤作用及增加海马 CA1 区锥体细胞数目有关。本研究可为临床工作中选择防治甲醛所致记忆损害的药物提供实验依据。有研究表明,甲醛可通过降低小鼠脑内脑源性神经营养因子水平引起小鼠学习记忆障碍^[26],还可影响未发育成熟大鼠海马 CA3 区钙调蛋白依赖性蛋白激酶 II 表达,降低其空间学习记忆

能力^[27]。醒脑再造胶囊对甲醛所致小鼠记忆损害的保护作用是否与这两项指标有关,尚待进一步研究。

参考文献:

- [1] 宋静,李金泉,王晗,等. 甲醛暴露时间延长加剧小鼠哮喘模型肺氧化损伤并促进 IL-17 表达 [J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 251–259.
- [2] 刘晓途,闫美霖,段恒轶,等. 我国城市住宅室内空气挥发性有机物污染特征 [J]. 环境科学研究, 2012, 25(10): 1077–1084.
- [3] 曹风华,李慧,张玉超,等. 甲醛对小鼠器官组织内 cAMP 含量的影响及其机理探讨 [J]. 华中师范大学学报(自然科学版), 2015, 49(1): 98–101, 107.
- [4] 颜彩虹,易继湖. 甲醛致哮喘机制研究进展 [J]. 中国职业医学, 2015, 42(6): 682–684.
- [5] Tong Z, Han C, Qiang M, et al. Age-related formaldehyde interferes with DNA methyltransferase function, causing memory loss in Alzheimer's disease [J]. Neurobiol Aging, 2015, 36(1): 100–110.
- [6] 郝智慧,李文杰,崔志杰,等. 甲醛与阿尔茨海默病的基础与临床研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(10): 2466–2468.
- [7] 温志芳,黄北雄,莫明权. 醒脑再造胶囊化痰及对体内阻塞性血栓形成影响试验 [J]. 中国当代医药, 2012, 19(15): 19, 21.
- [8] 周晗,许祥影,吴风,等. 天舒胶囊对甲醛致小鼠记忆损害的影响 [J]. 徐州医学院学报, 2017, 37(6): 369–371.
- [9] Guo J, Zhao Y, Jiang X, et al. Exposure to formaldehyde perturbs the mouse gut microbiome [J]. Genes (Basel), 2018, 9(4): E192.
- [10] Tulpule K, Dringen R. Formaldehyde in brain: an overlooked player in neurodegeneration? [J]. J Neurochem, 2013, 127(1): 7–21.
- [11] Tang XQ, Zhuang YY, Zhang P, et al. Formaldehyde impairs learning and memory involving the disturbance of hydrogen sulfide generation in the hippocampus of rats [J]. J Mol Neurosci, 2013, 49(1): 140–149.
- [12] Tong Z, Han C, Luo W, et al. Accumulated hippocampal formaldehyde induces age-dependent memory decline [J]. Age (Dordr), 2013, 35(3): 583–596.
- [13] 薛丹,陈善广,徐淑萍,等. 构建自动、智能及敏感度高的避暗实验检测系统 [J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(15): 2778–2782.
- [14] 卜兰兰,石哲,武宏伟,等. 达玛烷苷元对睡眠干扰所致小鼠学习记忆障碍的改善作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(10): 48–53, 66.
- [15] 王忆杭,肖培根,刘新民. 连翘酯苷对拟 AD 复合动物模型小鼠学习记忆的改善作用及其机制研究 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(5): 423–427, 445.
- [16] 董海影,张昊,帅智峰,等. β -细辛醚 + 远志皂苷对 APP/

- PS1 双转基因小鼠 SOD、GSH-PX、CAT、MDA 和 HO-1 表达的影响 [J]. 天然产物研究与开发, 2017, 29 (9): 1551 - 1557.
- [17] 张黎, 梁明辉, 刘特, 等. 甲醛对小鼠记忆力的影响及其机制 [J]. 现代预防医学, 2013, 40(3): 416 - 417, 422.
- [18] 孙彦辉, 梁玉磊, 张闯, 等. 不同时间电针对血管性痴呆小鼠学习记忆能力与海马氧自由基的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(7): 1549 - 1551.
- [19] 陈雅慧, 兰忠平, 符兆英, 等. 复方酸枣仁栀子油对去卵巢大鼠学习记忆的影响 [J]. 中国应用生理学杂志, 2013, 29 (5): 406 - 409.
- [20] 苗明三, 张桂兰, 张玉林, 等. 醒脑再造胶囊对大鼠血瘀性脑缺血模型脑组织的影响 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23 (3): 69 - 70.
- [21] 林晨, 安红梅. 石菖蒲的中枢神经系统药理作用研究 [J]. 长春中医药大学学报, 2014, 30(2): 230 - 233.
- [22] 徐德军, 王丹, 张红英, 等. 石菖蒲水提取物对小鼠学习记忆及血液学指标的影响 [J]. 中国实验诊断学, 2012, 16 (2): 226 - 228.
- [23] Mao J, Huang S, Liu S, et al. A herbal medicine for Alzheimer's disease and its active constituents promote neural progenitor proliferation [J]. Aging Cell, 2015, 14 (5): 784 - 796.
- [24] 史晴晴, 黄宁, 郭洋洋. 白芍总苷对脑缺血大鼠学习记忆能力及海马 CA1 区神经元的保护作用 [J]. 中国现代中药, 2018, 20(4): 415 - 420, 431.
- [25] 李弋, 马凤巧. 黄精对阿尔茨海默病大鼠海马组织形态学的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(9): 2099 - 2100.
- [26] 甘世明, 陈雪莹, 张礼茜, 等. 甲醛通过调节 BDNF 通路降低 ICR 小鼠学习记忆功能 [J]. 中国公共卫生, 2018, 34 (2): 246 - 248.
- [27] 廖双, 蒋莉, 张晓萍. 脑发育不同阶段甲醛暴露对大鼠学习记忆能力及海马 CA3 区 CaMK II 表达的影响 [J]. 重庆医科大学学报, 2010, 35(3): 342 - 345.

[收稿日期]2018 - 07 - 16

(上接第 30 页)

2 型糖尿病与肝病之间有着复杂的牵连, 研究发现其引起的肝损伤以非酒精性脂肪性肝病最常见^[7]。目前临床用于治疗糖尿病的药物如二甲双胍、磺脲类药物、TZDs、DPP-4 等多禁用于肝功能不全的患者或会对一般患者的肝造成一定程度上的损伤^[8], 这就限制了糖尿病降糖药物的应用。因此, 观察糖尿病慢性肝损伤的病理特点和肝功能变化在研究糖尿病肝病的病程发生发展规律及降糖药物对肝损伤的治疗作用时具有非常重要的意义。

目前已发表文献中用 db/db 小鼠作 2 型糖尿病模型时, 以它作自身对照、饲养至 20 周以上的相对较少, 本实验通过对比 db/db 小鼠 16 周龄时和 32 周龄时的肝的病理变化特点, 为 db/db 小鼠作为 2 型糖尿病肝损伤模型以及不同时期的肝损伤模型的选择提供了依据。

参考文献:

- [1] Chen G, Wang R, Chen H, et al. Gossypol ameliorates liver fibrosis in diabetic rats induced by high-fat diet and streptozotocin [J]. Life Sci, 2016, 149: 58 - 64.
- [2] 李娜, 张周. 两种自发性 2 型糖尿病小鼠生物学特性比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(1): 16 - 22.
- [3] 邢玮, 王政霖, 吕甜甜, 等. 2 型糖尿病 db/db 小鼠的生物学特性 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 12 - 15.
- [4] Hamada H, Tagawa Y, Fujita T, et al. Cut-off values for AST and ALT as criteria for performing abdominal enhanced computed tomography (CT) in the diagnosis of blunt liver injury [J]. Nihon Kyokyu Igakukai Zasshi, 2012, 23(4): 142 - 150.
- [5] Koyama T, Hamada H, Nishida M, et al. Defining the optimal cut-off values for liver enzymes in diagnosing blunt liver injury [J]. BMC Res Notes, 2016, 9: 41.
- [6] 栾海艳, 隋洪玉, 张雪松, 等. 桔梗总皂苷对 2 型糖尿病肝病大鼠的干预作用 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(5): 1094 - 1095.
- [7] 赵旭敏, 李社莉. 胰岛素抵抗与 2 型糖尿病肝损伤的研究进展 [J]. 心血管康复医学杂志, 2015, 24(1): 113 - 116.
- [8] 中华医学会糖尿病学分会. 中国 2 型糖尿病防治指南 (2013 年版) [J]. 中国糖尿病杂志, 2014, 22(8): 2 - 42.

[收稿日期]2018 - 04 - 08

姜黄素预处理对干热环境下不同程度中暑大鼠 肾病理损伤及氧化应激的影响

李建瑛¹, 肇寅辉¹, 康 燕², 张东辉¹, 许 琴¹, 董 翔¹, 李佳佳¹,
是文辉¹, 马 娜¹, 沈才福¹, 刘江伟^{1*}

(1. 新疆军区总医院新疆特殊环境医学重点实验室, 乌鲁木齐 830000;
2. 解放军 69240 部队医院, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 目的 观察姜黄素预处理对不同程度中暑大鼠肾病理变化以及肾组织氧化应激水平的影响。**方法** 雄性健康 SD 大鼠 80 只, 随机分为 2 组 ($n=40$): 盐水对照组以及姜黄素预处理组。每组再分为 4 个亚组 ($n=10$): 干热 0 min 组 (即常温组), 干热 50 min 组 (轻度中暑组), 干热 100 min 组 (中度中暑组), 干热 150 min 组 (重度中暑组)。盐水组大鼠给予 0.9% 生理盐水灌胃, 姜黄素组大鼠给予剂量为 200 mg/kg 姜黄素灌胃; 各组大鼠均连续灌胃 7 d。0 min 组置于常温环境中, 其余组放置在西北特殊环境人工实验舱内, 设置干热环境温度: (41 ± 0.5) °C, 湿度 (10 ± 1) %, 并在相应时间点麻醉大鼠, 取血液以及肾组织。检测血液中肌酐及尿素氮含量; 肾组织制成匀浆进行超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase)、过氧化氢酶 (catalase) 以及丙二醛 (malondialdehyde) 活性的检测; 将肾组织制片, HE 染色, 观察病理变化。**结果** 病理学检测发现, 肾组织病理变化及评分随着干热环境时间的延长而加重, 在同一时间点姜黄素预处理组大鼠肾病理损伤评分明显低于盐水组 ($P < 0.05$, $P < 0.01$); 血清肌酐、尿素以及肾组织中 MDA 含量在三个中暑阶段中, 姜黄素组均明显低于盐水组 ($P < 0.05$); 肾组织中抗氧化酶 SOD、CAT 的活性姜黄素组均明显高于盐水组 ($P < 0.05$), 经相关性分析提示, MDA 与病理损伤评分密切相关 ($r = 0.75$, $P < 0.01$)。**结论** 姜黄素预处理对干热环境下不同程度中暑大鼠肾损伤均具有保护作用, 其可能部分通过抗氧化应激反应来实现。

【关键词】 干热环境; 氧化应激; 姜黄素; 肾损伤; 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0048-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.009

Effect of curcumin pretreatment on renal pathological changes and the level of oxidative stress in rats with various degrees of heat stroke in a dry heat environment

LI Jianying¹, ZHAO Yinwei¹, KANG Yan², ZHANG Donghui¹, XU Qin¹, DONG Xiang¹, LI Jiajia¹, SHI Wenhui¹,
MA Na¹, SHEN Caifu¹, LIU Jiangwei^{1*}

(1. Key Laboratory of the Special Environmental Medicine of Xinjiang, General Hospital of Xinjiang Military Command, Urumqi 830000, China. 2. The No. 69240 Army Hospital, Urumqi 830000)

【基金项目】 军队临床高新技术重大项目 (2010gxjs016)。

【作者简介】 李建瑛 (1977—), 女, 主管技师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: 1610801584@qq.com

【通信作者】 刘江伟 (1970—), 男, 博士后, 教授, 主任医师, 博士生导师, 主要研究方向: 特殊环境战创伤研究。E-mail: ljw273273@

【Abstract】 Objective To observe the effects of curcumin pretreatment on renal pathological changes and the level of oxidative stress in rats with various degrees of heat stroke. **Methods** Eighty male healthy SD rats were randomly divided into two groups ($n=40$): saline control and curcumin pretreatment groups. Each group was divided into four subgroups ($n=10$): 0 min (normal temperature), 50 min, 100 min, and 150 min groups in dry heat environment. Rats of the saline group were administered 0.9% normal saline, and the curcumin group was administered 200 mg/kg curcumin. The rats were treated continuously for 7 days. Rats of the 0 min group were subjected to room temperature, while the other groups were transferred to a climate cabin (The Simulated Climate Cabin for Special Environment of Northwest of China) under the conditions of $40.5 \pm 0.5^\circ\text{C}$ and $10 \pm 1\%$ relative humidity to establish the rat heat stroke model by a dry heat environment. The rats were anesthetized at the corresponding time points, and blood and kidney tissue were collected. The contents of creatinine and urea nitrogen in serum and superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and malondialdehyde (MDA) activities in homogenates of kidney tissue were detected. Renal tissue was stained with HE, and pathological changes were observed. **Results** Pathological changes of renal tissue were aggravated by prolonged exposure to the dry heat environment. Pathological renal injury scores were higher in the saline group compared with curcumin pretreatment groups at the same time points ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The contents of serum creatinine, urea, and MDA were decreased in the curcumin groups compared with the saline group at the three heatstroke periods ($P < 0.05$). The activities of renal tissue antioxidant enzymes SOD and CAT were increased in the curcumin group compared with the saline group ($P < 0.05$). Correlation analysis indicated that renal injury scores were correlated with MDA ($r = 0.75$, $P < 0.01$). **Conclusions** Curcumin pretreatment has a protective effect on rat renal injury induced by various degrees of heat stroke in a dry heat environment, and its mechanism may be mediated partly by antioxidant effects.

【Keywords】 dry heat environment; oxidative stress; curcumin; renal injury; rat

中暑是以核心体温升高的并伴有一系列症状的致命性疾病,主要表现为核心体温升高($\geq 41^\circ\text{C}$),中枢神经症状,肝肾功能受损等,严重者可表现为多器官衰竭综合征(multiple organ dysfunction syndrome)^[1-2]。中暑在南方多发生于湿热环境,而我国西北部夏季炎热干燥且分布大面积沙漠,在干热环境下中暑具有体液大量丢失,循环衰竭,器官缺血缺氧严重等特点。干热环境下机体体液丢失,循环血流重新分布,肾血流减少,肾细胞缺血缺氧以及高热对细胞的直接损伤,造成细胞内氧自由基大量堆积,氧化应激失衡^[3]。

姜黄素作为一种细胞抗氧化剂,对脑、心、肝、肾等重要脏器均能起到保护作用。有实验表明,姜黄素可使异丙肾上腺素诱导的大鼠心电图缺血性改变减轻,抑制血清肌酸磷酸激酶、乳酸脱氢酶、谷草转氨酶活性的升高以及血清游离脂肪酸升高,同时还可以降低缺血心肌丙二醛的含量^[4]。我们前期实验也发现姜黄素能提高沙漠干热环境大鼠的生存时间^[5],因此我们推测,姜黄素对于干热环境下大鼠肾损伤具有保护作用。本研究通过复制干热环境大鼠中暑模型,观察姜黄素预处理对于不同程度大鼠中暑模型肾病理变化以及氧化应激水平的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

80只6~8周龄的SPF级雄性SD大鼠(190~220 g),购自新疆医科大学实验动物中心[SCXK(新)2016-0003]。饲养于温度($25 \pm 2^\circ\text{C}$)的SPF级动物实验室中,12 h白天与黑夜循环,饲料与水充足供应[SYXK(新)2016-0003]。随机分为2组($n=40$):盐水对照组以及姜黄素预处理组。每组下分为4个亚组($n=10$):干热0 min组(即常温组),干热50 min组(轻度中暑组),干热100 min组(中度中暑组),干热150 min组(重度中暑组)。盐水组大鼠给予0.9%生理盐水灌胃,姜黄素组大鼠给予200 mg/kg姜黄素+5%羧甲基纤维素钠溶液配置成混悬液灌胃;各组大鼠均连续灌胃7 d。0 min组置于常温环境中[温度($25 \pm 2^\circ\text{C}$),相对湿度($35 \pm 5\%$)],其余组在西北特殊环境人工实验舱(新疆军区总医院研制)设置的干热环境[($41 \pm 0.5^\circ\text{C}$),湿度($10 \pm 1\%$)]中复制不同程度的大鼠中暑模型^[6]。在相应时间麻醉大鼠并处死大鼠,下腔静脉采血,取一部分肾组织于10%甲醛溶液,另一部分于液氮中冻存。动物实验方案符合新疆军区总医院动物伦理委员会管理要求,按3R原则给予人道关怀,批准文号为DWLL2018001。

1.2 主要试剂与仪器

姜黄素由东京化成工业株式会社生产,溶解于 0.5% 羧甲基纤维素钠 (CMCNa) 中使用;超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 以及丙二醛 (MDA) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;BCA 试剂盒购自 Thermo Fisher 公司。全自动生化检测仪 (BS-180) (中国迈瑞公司);光学显微镜 CKX41 (日本 Olympus);TS-12U 生物组织脱水机 (中国亚鹏);LEICA RM213 型组织切片机 (德国);BI-2000 医学图像分析系统 (成都泰盟科技公司);YB-6D 型生物组织石蜡包埋机 (湖北孝感亚光电子技术公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 血清肌酐、尿素氮检测

在相应时间点 3% 戊巴比妥麻醉大鼠,下腔静脉收集血液,3000 r/min 离心 10 min,取血清,全自动生化分析仪进行肌酐及尿素氮含量检测。

1.3.2 肾病理学检测

取大鼠肾组织于 10% 中性甲醛中固定,脱水、石蜡包埋,切片,脱蜡,HE 染色,并在双盲的条件下阅片,光镜下观察肾组织形态学改变,在 400 倍视野下连续观察 100 个不同视野,进行 Paller's 评分^[7]:每个高倍镜视野随机选择 10 个有病变的肾小管,按 100 个肾小管记分,标准:肾小管明显扩张、细胞扁平为 (1) 分;刷状缘损伤 (1) 分,脱落为 (2) 分;管型 (2) 分,肾小管管腔内有脱落的、坏死的细胞 (未成管型或细胞碎片) 计 (1) 分。

1.3.3 肾组织中 SOD、CAT 及 MDA 活性的检测

取 0.1 g 冻存肾组织,置于玻璃匀浆器中研磨至无块状,加入 900 μ L PBS 溶液,12 000 r/min 离心

10 min 取上清,分装进行 SOD、CAT 及 MDA 含量检测。SOD 由黄嘌呤氧化酶法检测,单位为 U/mg pro;CAT 由可见光法检测,单位为 U/mg pro;MDA 由硫代巴比妥法检测,单位为 mmol/mg pro。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件进行分析。计量资料用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组内比较采用独立样本 *t* 检验,MDA 与 Paller's 评分相关性采用 Spearman 等级相关分析,以 *P* < 0.05 为差异有显著性。

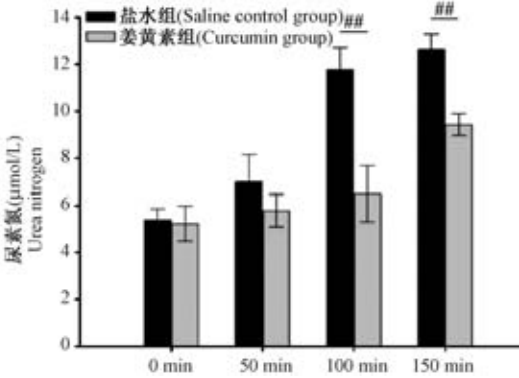
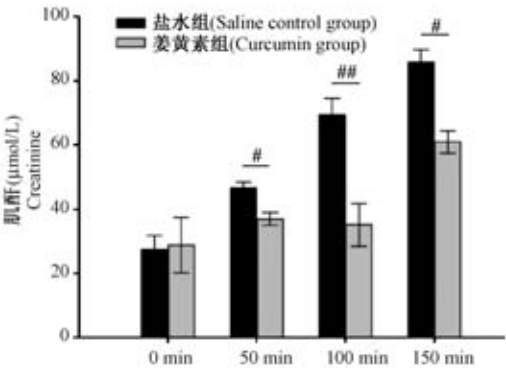
2 结果

2.1 血清中肌酐、尿素氮含量

如图 1 所示,在持续干热环境下 50 min、100 min 以及 150 min 经姜黄素预处理的大鼠血清肌酐含量明显低于盐水组,差异有显著性 (*P* < 0.05, *P* < 0.01),血清尿素氮含量呈现相同趋势,但在干热环境 50 min 时,姜黄素组尿素氮含量较盐水组也有所下降,但差异无显著性 (*P* > 0.05),在 100 min 和 150 min 时,姜黄素组尿素氮明显低于盐水组,差异有显著性 (*P* < 0.01)。

2.2 肾组织病理学变化

干热环境 50 min 时盐水组肾病理变化表现为肾小球囊腔变窄,轻微充血,肾小管上皮细胞水肿,部分细胞脱落;姜黄素预处理组可见肾病理变化较盐水组减轻。干热 100 min 时盐水组病理变化进一步加重,可见肾小球囊腔消失,肾小管上皮细胞颗粒样变,水肿,胞质淡染,细胞脱落;姜黄素预处理组肾小球囊腔狭窄但未消失,肾小管上皮细胞肿胀,管腔内少量脱落细胞碎片。150 min 时可见肾小



注:与盐水组相同时间点比较,[#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01。

图 1 各时间点血清肌酐、尿素氮的变化

Note. Compared with the saline control group at the same time, [#]*P* < 0.05, ^{##}*P* < 0.01.

Figure 1 Changes in the serum creatinine and urea at various time points

球充血、水肿,肾小管内可见管型形成;姜黄素预处理组,可见肾小球充血,肾小管内大量脱落细胞但未形成管型。经姜黄素预处理肾组织病理变化呈现不同程度的减轻,见图 2。病理损伤 Paller's 评分结果:在同一时间点,姜黄素预处理组肾损伤病理评分明显低于盐水组,差异有显著性(其中 50 min 和 100 min 组 $P < 0.05$, 150 min 组 $P < 0.01$),见图 3。

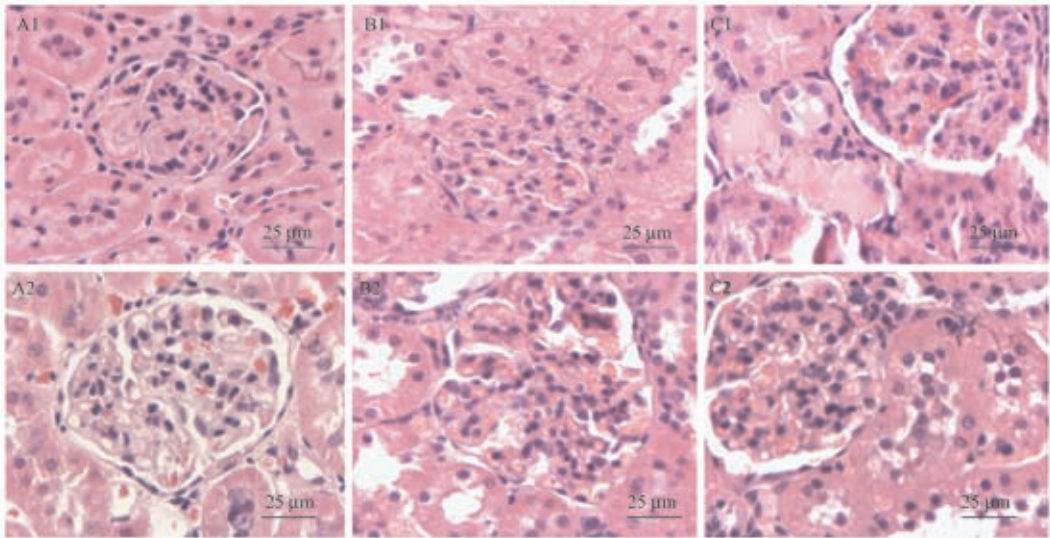
2.3 肾组织中 SOD、CAT、MDA 活性

盐水组以及姜黄素组中肾组织匀浆中 SOD 以及 CAT 的活性随着干热环境持续时间的延长均呈现下降趋势,相反 MDA 呈现上升趋势。在同一时间点经姜黄素预处理大鼠的肾组织中 SOD、CAT 活性较盐水组升高,除了 CAT 在 100 min 组外,其余各组差异均有显著性($P < 0.05$)。而 MDA 的含量经姜黄素预处理后在各个时间点均较盐水组明显下降($P < 0.05$)。见图 4。Spearman 相关性分析提示,MDA 与肾小管损伤的 Paller's 评分呈正相关($r = 0.75, P < 0.01$)。

3 讨论

肾是中暑时的常见受累器官之一,前期研究表明干热环境下肾呈现充血,管型形成等病理变

化^[6]。本实验通过复制干热环境下不同程度大鼠中暑模型,观察姜黄素预处理与相应盐水对照组之间肾病理学变化以及肾组织氧化应激水平的变化。本研究发现干热环境下,肾呈现相似病理变化,并且随着干热环境持续时间的延长而加重。中暑被认为是剧烈的失控性炎症反应^[8],中暑损伤主要是由于核心体温过高对细胞产生热损伤作用,引起细胞膜损伤、线粒体功能障碍和有氧代谢途径中断,被激活的中性粒细胞和巨噬细胞甚至内皮细胞均可产生大量的氧自由基^[9]。氧化应激是机体正常的氧化和抗氧化失衡所致^[10],氧化应激与人类多种疾病的发生、发展密切相关^[11],热应激引起的大量氧自由基释放可造成细胞内氧化以及抗氧化失衡,引起细胞损伤。SOD 与 CAT 是机体细胞内的重要抗氧化酶,在本实验中可发现随着干热环境的延长肾组织中 SOD 与 CAT 的活性逐渐下降,而细胞脂质过氧化的产物 MDA 初步上升,且 MDA 与肾小管损伤的 Paller's 评分呈正相关($r = 0.75, P < 0.01$)。由此可见,肾组织的氧化应激水平升高可能是干热环境下肾损伤的机制之一。在本研究中,在干热环境 50 min、100 min 以及 150 min 姜黄素组的肌酐与尿素氮值均较盐水组有所下降,说明姜黄素对于干热环境下大鼠的肾功能具有一定的保护

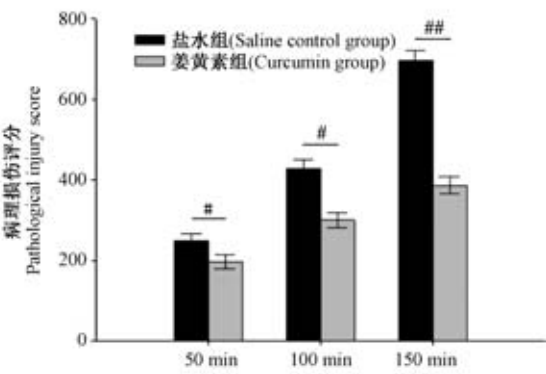


注:A1: 50 min 盐水组; A2: 50 min 姜黄素预处理组; B1: 100 min 盐水组; B2: 100 min 姜黄素预处理组; C1: 150 min 盐水组; C2: 150 min 姜黄素组。

图 2 肾病理组织学变化(HE 染色, × 200)

Note. A1: 50 min saline group; A2: 50 min curcumin pretreatment group; B1: 100 min saline group; B2: 100 min curcumin pretreatment group; C1: 150 min saline group; C2: 150 min curcumin pretreatment group.

Figure 2 Renal histopathological changes. HE staining



注:与盐水组相同时间点比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

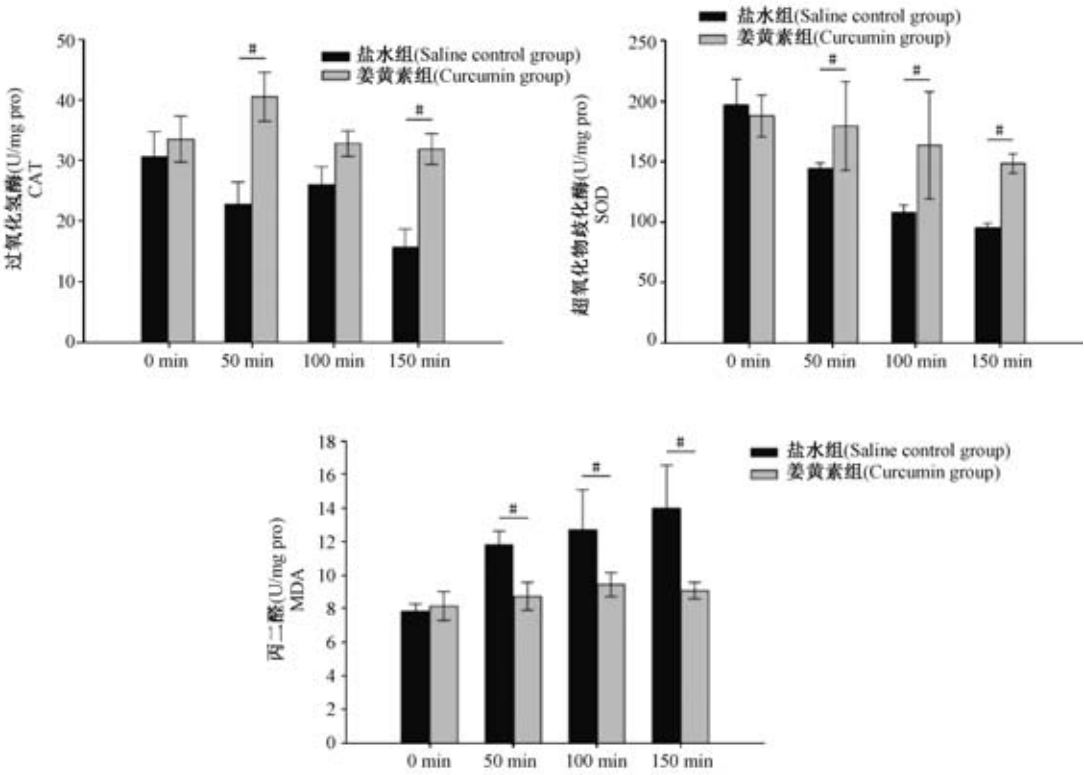
图 3 肾损伤 Paller's 评分的变化

Note. Compared with the saline control group at the same time, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$.

Figure 3 Changes in Paller's scores of the renal injury 作用。同时我们也发现,姜黄素预处理组肾组织中的 SOD、CAT 活性较盐水组明显提高,而肾组织 MDA 含量较盐水组下降,表明姜黄素在沙漠干热环境中对肾组织发挥抗氧化作用。

姜黄素是从姜科植物姜黄中提取出的一种天然药物,呈黄色,是姜黄的主要活性成分。目前研究普遍认为姜黄素具有抗炎、抗氧化、抗肿瘤等药理作用,并且具有安全高效等特点,是近年来国内外的研究热点。姜黄素还可以通过清除自由基和增强抗氧化酶活性来实现其抗氧化功能^[12]。一些动物实验研究发现姜黄素可以对糖尿病肾病以及人为诱导的急性肾损伤具有保护作用,其中均发现,姜黄素可提高肾组织内 CAT、SOD 的活性,同时降低 MDA 的活性,说明姜黄素抗氧化的机制可能与提高组织内抗氧化酶的活性有关^[13-16]。

本实验将姜黄素预处理大鼠,进行干热环境下不同程度中暑大鼠肾损伤的保护作用的研究,实验结果发现,姜黄素预处理对于干热环境下不同程度中暑的大鼠模型肾损伤均具有预防保护作用,其机制可能部分通过姜黄素的抗氧化作用而发挥肾保护作用。姜黄素作为传统药物,具有高效、副作用小等特点,在沙漠干热环境下预防肾损伤具有潜在的临床应用价值。



注:与盐水组相同时间点比较, # $P < 0.05$ 。

图 4 肾组织中 SOD、CAT 以及 MDA 在不同时间的变化

Note. Compared with the saline control group at the same time, # $P < 0.05$.

Figure 4 Changes of SOD, CAT, and MDA in the renal tissues at various time points

肺腺瘤小鼠模型的建立及其血生化、血常规、尿常规、病理检测

张修彦, 高亚奇, 陈伟盛, 梁 宁, 詹纯列*

(广州军区广州总医院动物实验中心, 广州 510010)

【摘要】 目的 建立小鼠肺腺瘤模型并进行血生化、血常规、尿常规、病理检测。**方法** PCR 鉴定获得 B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} 阳性鼠 7 只, 4 只实验组, 3 只对照组, 另外设置 3 只野生型对照组, 实验组和野生型对照组鼻腔滴入 Cre 腺病毒, 每周一次, 共 4 次。第 5 周取血、尿进行血生化、血常规检查, 取肺组织进行病理学检测以及荧光定量 PCR 检测 Cre 表达。**结果** 4 只阳性鼠均产生多处肺腺瘤, 平均个数 4.25 个, 体积 $(10.81 \pm 6.38) \text{ mm}^3$, 对照组均未发现肿瘤。肿瘤膨胀性生长、边界清晰, 瘤细胞呈立方上皮样、排列呈不规则腺管状, 未见核分裂像。肺腺瘤小鼠与对照组相比低密度脂蛋白胆固醇、平均血小板体积升高, 且差异有显著性; 直接胆红素与对照组相比升高, 高密度脂蛋白胆固醇与对照组相比降低, 且差异有显著性。**结论** 成功建立了肺腺瘤小鼠模型, 并对其血生化、血常规、尿常规、病理学进行了测量。

【关键词】 肺腺瘤; 小鼠; Cre 腺病毒; Kras

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0053-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.010

Establishment of a mouse model of pulmonary adenoma and its routine examination of blood and urine, blood biochemistry and pathology

ZHANG Xiuyan, GAO Yaqi, CHEN Weisheng, LIANG Ning, ZHAN Chunlie*

(Animal Experiment Center of General Hospital of Guangzhou Military Command, Guangzhou 510010, China)

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of pulmonary adenoma, detect its blood biochemistry, and routinely examine its blood, urine, and pathology. **Methods** PCR confirmed seven B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J-positive} mice. Four of them were used as the experimental group, and three as the control group. Three wild-type mice were used as the control group. Cre adenovirus was applied to the nasal cavity once a week for four times in both the experimental and control groups. After 5 weeks, blood and urine were collected for biochemical examination and routine blood examination. Lung tissue was analyzed for pathology, and quantitative PCR was used to detect Cre expression. **Results** Four positive mice produced multiple lung adenomas at an average of 4.25 with a volume of $10.81 \pm 6.38 \text{ mm}^3$. No tumors were found in the control group. Multiple tumors, expansive growth, and clear borders were seen in the lung. The tumor cells were cubic epidermoid and arranged in irregular glandular tubes. No pathological mitosis was seen. Compared with the control group, low-density lipoprotein and average platelet volume were increased significantly. Direct bilirubin in the pulmonary adenoma

[基金项目] 广东省科技计划项目(2013B060300036); 广东省科技计划项目(2017A030303058)。

[作者简介] 张修彦(1986—), 女, 主管技师, 硕士, 研究方向: 疾病动物模型。E-mail: 449183654@qq.com

[通信作者] 詹纯列(1963—), 主任医师, 学士, 研究方向: 实验动物标准化研究与疾病动物模型。E-mail: zyh200521@qq.com

mice was higher than that in the control group, and high-density lipoprotein was lower than in the control group. These results had high statistical significance. **Conclusions** A mouse model of pulmonary adenoma is successfully established, and its routine examination of blood and urine, blood biochemistry parameters are determined, and its pathological features are characterized.

[Keywords] pulmonary adenoma; mice; Cre adenovirus; Kras

肺癌是世界各国常见的恶性肿瘤之一,它严重威胁人类健康,近 20 年发病率逐年上升。估计到 2030 年,全球将有 830 万人死于吸烟有关的疾病,其中肺癌占 3.1%^[1]。非小细胞肺癌占肺癌的 80% 以上。在非小细胞肺癌中,RAS 是最常突变的基因,约 25% 的肿瘤可检测到^[2]。B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J}携带 KRAS^{G12D}点突变和 Loxp-Stop-Loxp 序列,KRAS^{G12D}不表达,从鼻腔滴入 Cre 腺病毒,可以启动 KRAS^{G12D}的表达,从而诱导肺癌且肺癌发生率很高^[3,4]。本研究利用此方法诱发肺腺瘤,对其进行血生化、血常规、尿液、病理检测,得到一些基础数据,供有需要的人员参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J}小鼠及 SPF 级野生型小鼠从南京模式动物中心冷冻复苏获得。体重 18~22 g,1.5 月龄,B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J}小鼠 7 只(雌 3 只,雄 4 只),野生型 3 只(雌 1 只,雄 2 只)。实验分组为 B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} Cre 处理组 4 只(2 只雌,2 只雄),B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} 对照组 3 只(1 只雌,2 只雄),野生型对照组 3 只(1 雌,2 只雄)。实验动物生产许可证号:SCXK(苏)2015-0001。实验动物饲养于广州军区广州总医院动物实验中心屏障环境中,使用许可证号:SYXK(粤)2014-0100,饲喂购自广东省医学实验动物中心的无菌鼠料。饮用水为经消毒过滤的自来水,饲料和水自由摄取。每周更换两次垫料和笼具,进出屏障环境的物品进行严格消毒,严格遵守屏障系统 SOP。小鼠取材、建模在超净工作台中进行。实验过程中,根据实验动物 3R 原则,给予实验动物关怀。实验设计符合福利伦理要求,实验动物福利伦理批准号:201801203。

1.2 主要试剂与仪器

Cre 腺病毒(5×10^{10} ,100 μ L 购自百恩维生物技术有限公司)。One Step Mouse Genotyping Kit(厂商 Vazyme)、URIT 尿试纸条(桂林优利特医疗电子有限公司生产)、ALT、AST、ALP、TP、ALB、GLU、TC、

TG、HDL-C、LDL-C、BUN、CRE、T-BIL、D-BIL、CK、UA 试剂盒(上海科华生物工程股份有限公司)、Trizol(TAKARA 公司)、Bestar qPCR RT kit(DBI 公司)、Bestar qPCR MasterMix(DBI 公司)、DEPC(MACKLIN 公司)、异氟烷(深圳瑞沃德生命科技有限公司)MEM 培养基(广州威佳科技有限公司)、石蜡(广东大川特种蜡有限公司)、环保透明剂(武汉宏兹生物技术有限公司)、曙红(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、苏木素(上海阿拉丁生化科技股份有限公司)、环保封片胶(武汉宏兹生物技术有限公司)。

超净工作台(苏州净化设备公司)、紫外分光光度计 UV-1206(日本 Shimadzu 公司产品)、冷冻离心机 SCR20B(日本 Hitachi 公司产品)、台式低温高速离心机 Z323K(德国 Hermle 公司产品台式)、高速离心机 TGL-16G(上海安亭科学仪器厂产品)、水平式电泳仪(北京东方仪器厂产品 GDS7600)、空气恒温振荡器(江苏大仓医疗仪器厂产品)、ABI Real time PCR 仪(ABI 公司)、Stratagene Real time PCR 仪(Agilent 公司)、PCR 扩增仪(杭州晶格科学仪器有限公司)、电子天平 BS210S(日本 Satorius 公司产品)、尿液分析仪 URIT-330(桂林优利特医疗电子有限公司)、全自动血液细胞分析仪 BC-5000(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司)、全自动生化分析仪日立 7020(日本柱式会社日立高新技术)、RWD510 小动物麻醉机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)、全自动脱水机 ASP300S 型(Leica[®])、生物组织包埋机 EG1150 型(Leica[®])、轮转切片机 RM2235 型(Leica[®])、摊片机 HI1210 型(Leica[®])、烘片机 HI1220 型(Leica[®])、自动染色机 AutoStainer-XL 型(Leica[®])、Olympus[®] 生物显微镜 BX43 型、Olympus[®] 显微图像软件 CellSens Dimension。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠基因型鉴定

取 3~5 mm 小鼠尾尖,根据需要裂解样品数量配制适量 $1 \times$ 裂解液(4 μ L Proteinase K + 200 μ L $1 \times$ mouse tissue lysis buffer),在灭菌 1.5 mL

EP 管中,添加 200 μL $1\times$ 裂解液至所需裂解组织(确保组织全部浸末至裂解液中),涡旋震荡后在 55℃ 水浴中孵育 30 min,孵育完成后,将样品置于沸水浴中加热 5 min 灭活 Proteinase K,将裂解产物涡旋震荡充分混匀后,12 000 r/min 离心 5 min,将上清转移至另一灭菌 EP 管中,取适量做 PCR 扩增,剩余上清保存于 -20°C 。引物信息见表 1,PCR 反应体系见表 2,反应条件:94℃ 5 min;94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 30 s,35 个循环;72℃ 10 min,4℃ 保存。

1.3.2 小鼠肺腺瘤动物模型的建立

用小动物气体麻醉机对小鼠进行麻醉,再以 AdCre 100 μL (1×10^9) 分别滴入 B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} Cre 组及野生型对照组两边鼻孔。AdCre 滴液构成为 2×10^9 AdCre 50 μL 加 45 μL MEM 培养基和 6 μL 2.5 mol/L 的氯化钙^[4]。每 7 d 重复一次,共四次。在第 30 天处死小鼠取肺组织进行石蜡包埋、切片、HE 染色。

1.3.3 尿常规、血常规、血生化检测

利用小鼠代谢笼采集 12 h 尿液用于尿常规检测。EDTA 采血管眼眶采血用于血常规检测。干燥管眼眶采血用于血生化检测。

1.3.4 肺腺瘤荧光定量 PCR 检测 Cre 表达

以 Cre 序列为模版设计引物 Cre F:5'-TTAA TCCATATTGGCAGAACG-3',Cre R:5'-AGACGGAA

ATCCATCGCTC-3',内参 β -actin F:5'-CATTGCT GACAGGATGCAGA-3', β -actin R:5'-CTGCTGGA AGGTGGACACTGA-3'。提取 B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} Cre 处理组、野生型对照组肺组织 RNA,拟转录 cDNA,荧光定量 PCR 检测 Cre 表达情况。

1.3.5 肺腺瘤病理学检查

肺组织标本经取材、固定、修块、流水冲洗、脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋后,石蜡切片、HE 染色、封片。显微镜观察组织结构及细胞形态。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据分析,数据用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间数据对比应用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 基因鉴定结果

基因鉴定结果表明 2、13、14、16、18、19、20 基因型为 Kras^{+/+},为实验所需阳性鼠。21、22、23 为野生型对照。见图 1。

2.2 肺腺瘤小鼠血生化、血常规、尿常规指标

测定结果表明:肺腺瘤小鼠与对照组相比低密度脂蛋白胆固醇、平均血小板体积升高,且差异有显著性($P<0.01$);直接胆红素与对照组相比升高、高密度脂蛋白胆固醇与对照组相比降低,且差异有显著性($P<0.05$)。见表 3~5。

表 1 引物信息
Table 1 Primer information

引物编号 Primer number	引物序列 Primer sequence	条带大小 Strip size	引物说明 Primer description
1	GTCTGACAAGCTCATGCGGG	转基因阳性鼠:~ 600 bp	野生型 Wild type
2	CGCAGACTGTAGAGCAGCG	Transgenic positive mice:~600 bp	通用型 Common type
3	CCATGGCTTGAGTAAGTCTGC	野生型小鼠:~ 507 bp Wild type mice:~507 bp	转基因型 Transgenic type

表 2 PCR 反应体系
Table 2 PCR reaction system

试剂 Reagent	体积 Volume
2 $\times$ Taq Plus MasterMix	25 μL
ddH ₂ O	15 μL
裂解产物 Pyrolysis	4 μL
引物 2 + 引物 1 或引物 2 + 引物 3 Primer 2 + Primer 1 or Primer 2 + Primer 3	各 2 μL
合计 Total	50 μL

2.3 荧光定量 PCR 结果

荧光定量 PCR 结果显示,B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} Cre 组及野生型对照组鼻腔滴入 Cre 腺病毒的小鼠,肺组织能够表达 Cre。见图 2。

肺部腺瘤:肺部见多处肿瘤、膨胀性生长、边界清晰,瘤细胞呈立方上皮样、排列呈不规则腺管状,未见核分裂像。见图 3。

2.4 肺腺瘤造模结果

解剖取材发现 4 只阳性鼠均发现肿瘤,对照组未发现肿瘤,肿瘤数量见表 6。

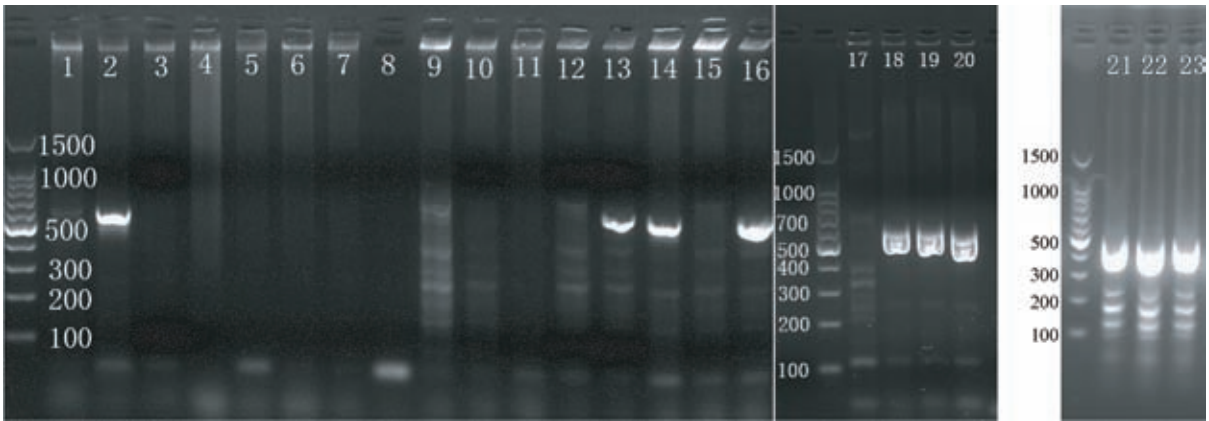


图 1 Kras 基因鉴定

Figure 1 Identification of the Kras gene

表 3 肺腺瘤小鼠血生化指标 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Blood biochemical indexes of the mouse pulmonary adenoma

测定项目 Item	肺腺瘤 Pulmonary adenoma	对照组 Control	P 值 P-value
谷丙转氨酶 Alanine aminotransferase (ALT)	26.75 ± 2.50	75.00 ± 32.79	0.13
谷草转氨酶 Aspartate aminotransferase (AST)	147.25 ± 32.90	232.00 ± 65.78	0.07
碱性磷酸酶 Alkaline phosphatase (ALP)	24.25 ± 16.84	24.67 ± 2.52	0.26
总蛋白 Total protein (TP)	64.50 ± 2.55	62.05 ± 1.57	0.29
白蛋白 Albumin (ALB)	33.33 ± 1.62	33.87 ± 0.55	0.57
球蛋白 Globulin (GLOB)	31.18 ± 1.56	28.63 ± 1.05	0.06
白蛋白/球蛋白 Albumin/Globulin (A/G)	1.07 ± 0.06	1.18 ± 0.03	0.04
葡萄糖 Glucose (GLU)	4.93 ± 1.90	5.27 ± 2.76	0.85
总胆固醇 Total cholesterol (TC)	1.95 ± 0.27	2.29 ± 0.18	0.10
甘油三酯 Triglycerides (TG)	1.00 ± 0.22	0.95 ± 0.11	0.76
高密度脂蛋白胆固醇 High density lipoprotein cholesterol (HDL-C)	0.97 ± 0.11	1.34 ± 0.188	0.02
低密度脂蛋白胆固醇 Low density lipoprotein cholesterol (LDL-C)	0.11 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.00
尿素氮 Urea nitrogen (BUN)	8.62 ± 0.95	9.10 ± 3.13	0.82
肌酐 Creatinine (CRE)	11.70 ± 2.62	10.70 ± 0.40	0.28
总胆红素 Total bilirubin (T-BIL)	1.38 ± 0.40	0.73 ± 0.10	0.05
直接胆红素 Direct bilirubin (D-BIL)	0.68 ± 0.15	0.37 ± 0.07	0.02
直接胆红素/总胆红素 Direct bilirubin/Total bilirubin (D/T)	0.50 ± 0.04	0.51 ± 0.06	0.81
间接胆红素 Indirect bilirubin (I-BIL)	0.70 ± 0.25	0.51 ± 0.06	0.07
肌酸激酶 Creatine kinase (CK)	1363.25 ± 711.44	1610.67 ± 499.42	0.62
尿酸 Uric acid (UA)	31.25 ± 1.26	39.00 ± 4.36	0.08

表 4 肺腺瘤血常规指标($\bar{x} \pm s$)

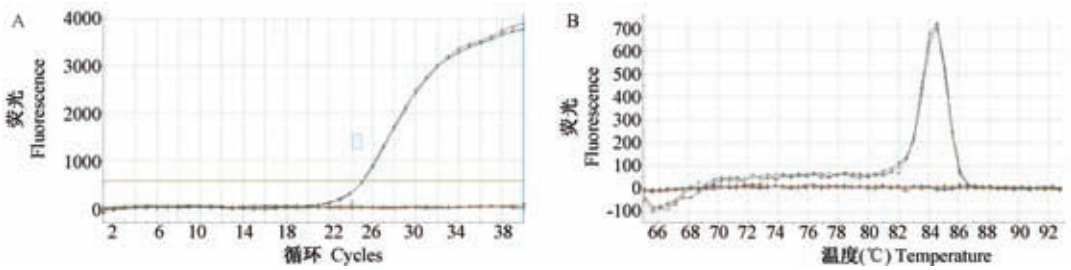
Table 4 Routine blood indexes of the mouse pulmonary adenoma

测定项目 Item	肺腺瘤 Pulmonary adenoma	对照组 Control	P 值 P-value
白细胞(10 ⁹ /L) White blood cells (WBC)	3. 48 ± 1. 28	2. 56 ± 1. 00	0. 36
中性粒细胞(10 ⁹ /L) Neutrophils (Neu)	1. 03 ± 0. 43	1. 29 ± 1. 03	0. 66
淋巴细胞(10 ⁹ /L) Lymphocytes (Lymph)	2. 43 ± 0. 89	1. 27 ± 0. 39	0. 09
单核细胞(10 ⁹ /L) Monocytes (Mon)	0. 00	0. 00	
嗜酸性粒细胞(10 ⁹ /L) Eosinophils (Eos)	0. 01 ± 0. 025	0. 00	0. 44
嗜碱性粒细胞(10 ⁹ /L) Basophils (Bas)	0. 00	0. 00	0. 44
中性粒细胞% Neutrophil% (Neu%)	29. 7 ± 4. 67	45 ± 23. 25	0. 37
淋巴细胞% Lymphocyte% (Lymph%)	69. 7 ± 4. 08	54. 83 ± 23. 29	0. 38
单核细胞% Monocyte% (Mon%)	0. 00	0. 00	
嗜酸性粒细胞% Eosinophil% (Eos%)	0. 00	0. 00	
嗜碱性粒细胞% Basophil% (Bas%)	0. 30 ± 0. 13	0. 17 ± 0. 06	0. 35
红细胞(10 ¹² /L) Red blood cells (RBC)	9. 60 ± 0. 64	9. 55 ± 0. 64	0. 86
血红蛋白(g/L) Hemoglobin (HGB)	138. 50 ± 9. 33	137. 67 ± 8. 14	0. 91
红细胞压积(%) Hematocrit (HCT)	44. 75 ± 3. 30	43. 97 ± 3. 07	0. 76
平均红细胞体积(fL) Mean corpuscular volume (MCV)	46. 40 ± 0. 81	46. 03 ± 0. 47	0. 49
平均红细胞血红蛋白量(pg) Mean corpuscular hemoglobin (MCH)	14. 40 ± 0. 18	14. 40 ± 0. 17	1. 00
平均红细胞血红蛋白浓度(g/L) Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	310. 25 ± 2. 21	313. 33 ± 2. 89	0. 17
红细胞分布宽度(%) Erythrocyte distribution width (RDW-CV)	14. 23 ± 0. 34	14. 03 ± 0. 35	0. 50
血小板(10 ⁹ /L) Platelet (PLT)	1311. 25 ± 262. 55	1049. 33 ± 59. 41	0. 16
平均血小板体积(fL) Mean platlet volume (MPV)	5. 73 ± 0. 13	5. 37 ± 0. 06	0. 01
血小板分布宽度 Platelet distribution width (PDW)	15. 10 ± 0. 06	15. 00 ± 0. 10	0. 44
血小板比容 Thrombocytocrit (PCT)	0. 75 ± 0. 15	0. 57 ± 0. 03	0. 10

表 5 肺腺癌小鼠尿常规指标($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Routine urine indexes of pulmonary adenoma mice in each mouse

测定项目 Item	肺腺瘤 Pulmonary adenoma	对照组 Control	P 值 P-value
比重 Specific gravity (SG)	1.02 ± 0.01	1.02 ± 0.01	0.52
酸碱度 pH	6.75 ± 1.19	7.5 ± 0.5	0.36
白细胞 White blood cell (WBC)	0.50 ± 0.58	0.67 ± 0.58	0.72
亚硝酸盐 Nitrite (NIT)	0.50 ± 0.58	0.67 ± 0.58	0.72
蛋白质 Protein (PRO)	0.75 ± 0.96	1.33 ± 1.53	0.56
葡萄糖 Glucose (GLU)	0.25 ± 0.50	0.00 ± 0.00	0.44
酮体 Ketone (KET)	1.25 ± 0.50	0.33 ± 0.58	0.07
尿胆原 Urobilinogen (URO)	0.50 ± 0.58	1.00 ± 1.00	0.44
胆红素 Bilirubin (BIL)	0.50 ± 0.58	1.00 ± 1.00	0.44
隐血 Occult blood (BLD)	0.00	0.00	



注:A:扩增曲线;B:溶解曲线。

图 2 Cre mRNA 的荧光定量 PCR 鉴定

Note. A: Amplification curve. B: Dissolution curve.

Figure 2 Quantitative PCR analysis of Cre mRNA

表 6 肺腺瘤数量($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Number of pulmonary adenomas in each mouse

小鼠序号 Serial number of mice	肿瘤数量(个) Number of tumors	肿瘤体积(mm ³) Tumor volume
1	3	7.40 ± 2.52
2	5	9.92 ± 8.27
3	5	15.07 ± 6.12
4	4	13.61 ± 5.99
平均值 Average value	4.25	10.81 ± 6.38

3 讨论

利用 B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} 小鼠鼻腔滴注 Cre 腺病毒诱导产生肺肿瘤的方式非常方便也很高效,4 只阳性鼠均产生多处肺腺瘤,平均个数 4.25 个,体

积(10.81 ± 6.38) mm³,B6.129S4-Kras^{tm4Tyj/J} 对照组及野生型对照组均未发现肿瘤。如果延长实验周期,预计可获得肺腺癌模型。低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇负责胆固醇运输,低密度脂蛋白胆固醇负责将胆固醇转运到肝外组织细胞,高

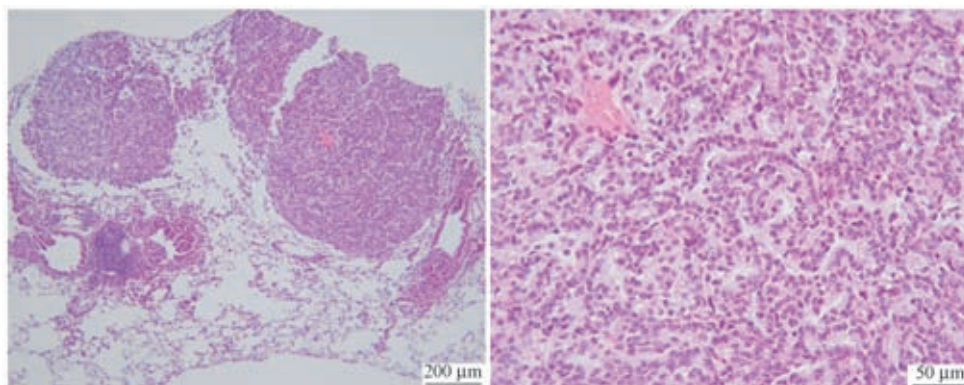


图3 肺肿瘤(HE 染色, $\times 100$ 、 $\times 400$)

Figure 3 Histology of the mouse lungs. HE staining ($\times 100$, $\times 400$)

密度脂蛋白胆固醇则相反^[5]。已经有研究报道在多个部位 HDL-C 与癌的反比例关系,其中包括肺部^[6-8]。本研究中肺腺瘤小鼠的高密度脂蛋白胆固醇比对照组低,与之前研究结果一致。Catarina Rodrigues dos Santos 等^[9]统计了 244 个乳腺癌患者,发现低密度脂蛋白胆固醇含量高的病人肿瘤更大、有更高的分化等级、更高的增生比率。本研究发现肺腺瘤小鼠低密度脂蛋白胆固醇比对照组高。胆红素主要在肝脏代谢,包括肝细胞对血液内胆红素的摄取、运载、未结合胆红素转化为结合胆红素、结合胆红素胆汁排泄等一系列相互影响的生理过程。有研究表明胆红素在肺癌中表现出抗氧化和抗肿瘤的作用^[10-11]。Song 等^[12]的研究表明低水平直接胆红素与晚期非小细胞肺癌和预后差相关,血清胆红素是非小细胞肺癌的独立预后指标。而我们的实验结果显示肺腺瘤小鼠的直接胆红素指标高于对照组,这可能是由于肺腺瘤小鼠肝脏疾病引起,具体原因有待进一步验证。

参考文献:

[1] Thun MJ, DeLancey JO, Center MM, et al. The global burden of cancer: priorities for prevention [J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31 (1): 100 - 110.

[2] Mitsudomi T, Viallet J, Mulshine JL, et al. Mutations of ras genes distinguish a subset of non-small-cell lung cancer cell lines from small-cell lung cancer cell lines [J]. *Oncogene*, 1991, 6 (8): 1353 - 1362.

[3] Jackson EI, Willis N, Mercer K, et al. Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras [J]. *Genes Dev*, 2001, 15 (24): 3243 - 3248.

[4] Fasbender A, Lee JH, Walters RW, et al. Incorporation of adenovirus in calcium phosphate precipitates enhances gene transfer to airway epithelia *in vitro* and *in vivo* [J]. *J Clin Invest*, 1998, 102(1): 184 - 193.

[5] Hegele RA. Plasma lipoproteins: genetic influences and clinical implications [J]. *Nat Rev Genet*, 2009, 10(2): 109 - 121.

[6] Llaverias G, Danilo C, Mercier I, et al. Role of cholesterol in the development and progression of breast cancer [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(1): 402 - 412.

[7] Ahn J, Lim U, Weinstein SJ, et al. Prediagnostic total and high-density lipoprotein and risk of cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*, 2009, 18(11): 2814 - 2821.

[8] Jafri H, Alsheikh-Ali AA, Karas RH. Baseline and on-treatment high-density lipoprotein cholesterol and the risk of cancer in randomized controlled trials of lipid-altering therapy [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2010, 55(25): 2846 - 2854.

[9] Catarina Rodrigues dos Santos, Isabel Fonseca Sergio Dias, et al. Plasma level of LDL-cholesterol at diagnosis is a predictor factor of breast tumor progression [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 132 - 141.

[10] O'Malley SS, Wu R, Mayne ST, et al. Smoking cessation is followed by increases in serum bilirubin, an endogenous antioxidant associated with lower risk of lung cancer and cardiovascular disease [J]. *Nicotine Tob Res*, 2014, 16(8): 1145 - 1149.

[11] Temme EH, Zhang J, Schouten EG, et al. Serum bilirubin and 10-year mortality risk in a Belgian population [J]. *Cancer Causes Control*, 2001, 12(10): 887 - 894.

[12] Song YJ, Gao XH, Hong YQ, et al. Direct bilirubin levels are prognostic in non-small cell lung cancer [J]. *Oncotarget*, 2018, 9(1): 892 - 900.

广州驯化藏鸡与五黑鸡蛋品质及营养成分比较分析

袁 进, 吴清洪, 陈傍柱, 田雨光, 刘 闻, 顾为望

(南方医科大学实验动物中心, 广州 510515)

【摘要】 目的 本实验旨在研究广州地区驯化藏鸡的蛋品质及营养成分, 并与五黑鸡蛋的相关指标进行比较分析。**方法** 实验依据禽类蛋品质及营养成分相关测定方法, 分别测定广州驯化藏鸡和五黑鸡蛋品质及营养成分指标。**结果** (1) 广州驯化藏鸡蛋的各项品质指标与五黑鸡蛋之间差异无显著性 ($P > 0.05$); (2) 广州驯化藏鸡蛋的粗蛋白、粗脂肪、粗灰分和碳水化合物的测定值与五黑鸡蛋之间差异无显著性 ($P > 0.05$); (3) 广州驯化藏鸡蛋的硒、铁和锌的测定值显著高于五黑鸡蛋的相应指标 ($P < 0.05$); (4) 广州驯化藏鸡蛋中吡啶 ($P < 0.01$)、吡啶硼烷 ($P < 0.05$) 和十二烷 ($P < 0.05$) 的测定值显著低于五黑鸡蛋的相应指标, 而1-十六烯、14-甲基十五烷酸甲酯、亚油酸甲酯、油酸甲酯和硬脂酸甲酯的测定值则显著高于五黑鸡蛋 ($P < 0.05$)。**结论** 广州驯化藏鸡蛋中的粗蛋白、粗脂肪、硒、铁和锌, 以及多种油酸甲酯含量均高于五黑鸡蛋。

【关键词】 广州驯化藏鸡; 五黑鸡; 蛋品质; 营养成分

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0060-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.011

Comparative analysis of egg quality and nutritional components between domesticated Tibetan chicken in Guangzhou and Wuhei chicken

YUAN Jin, WU Qinghong, CHEN Bangzhu, TIAN Yuguang, LIU Wen, GU Weiwang
(Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective This study aimed to investigate the egg quality and nutritional components of domesticated Tibetan chicken in Guangzhou and compare them with those of with Wuhei chicken. **Methods** Various detection methods were employed to analyze the egg quality and nutritional components of domesticated Tibetan chicken in Guangzhou and Wuhei chicken. **Results** There was no significant difference in physical quality indicators of the eggs from those two chickens ($P > 0.05$). There was no notable difference in the content of crude protein, crude fat, crude ash, and carbohydrate of those two kinds of eggs ($P > 0.05$). The contents of selenium, iron, and zinc of domesticated Tibetan chicken eggs in Guangzhou were significantly higher than those of Wuhei chicken eggs ($P < 0.05$). The concentrations of pyridine ($P < 0.01$), pyridine borane ($P < 0.05$), and dodecane ($P < 0.05$) in the domesticated Tibetan chicken eggs in Guangzhou were markedly lower than those in Wuhei chicken eggs, whereas the contents of 1-hexadecene, 14-methylpentadecanoate, methyl linoleate, methyl oleate, and methyl stearate in the domesticated Tibetan chicken eggs in

Guangzhou were significantly higher than those in Wuhei chicken eggs ($P < 0.05$). **Conclusions** The contents of crude protein, crude fat, selenium, iron, and zinc and methylolate in domesticated Tibetan chicken eggs in Guangzhou are higher than those in Wuhei chicken eggs.

【Keywords】 domesticated Tibetan chicken; Wuhei chicken; egg quality; nutritional components

鸡蛋是一种营养价值较高的方便食品,含有丰富的营养。藏鸡是长期生活在我国青藏高原特殊环境、人工选择较低的高原鸡种,为国家级特色畜禽保护品种之一,具有抗病力和适应恶劣环境能力较强的特点,其肉、蛋营养丰富、风味独特,被誉为“雪域美食”^[1],广州驯化藏鸡血液生理指标测定结果与原产地藏鸡具有较好的一致性^[2]。而五黑鸡作为平原优质鸡种,其肌肉内含有大量人体必需氨基酸、微量元素等营养物质,具有滋补肝肾、气血等功效,被誉为“药鸡”,并对其血液生理指标进行了测定^[3]。这两个鸡品种均是我国特有鸡种,被农业部列为“全国特种资源保护项目”。2015 年,从西藏林芝地区引入 50 只藏鸡到广州进行驯化饲养,采用自然交配繁殖的方法至今繁殖已有近 5 代,种群规模达 300 只。因此,开展驯化后藏鸡蛋与五黑鸡蛋品质及营养成分比较研究具有重要意义。目前,对藏鸡蛋的营养成分研究仅限于原产地,而对广州亚热带地区驯化饲养后的藏鸡蛋营养成分研究在国内尚属首次。为了探寻驯化后的藏鸡蛋的品质特性和营养成分,本实验测定了广州驯化藏鸡蛋的品质、营养成分及风味物指标,并与五黑鸡蛋进行比较分析,旨在获得驯化后藏鸡蛋的品质特性和营养成分指标,为开发具有独特品质和较高营养价值的藏鸡蛋产品提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级藏鸡和五黑鸡(300 日龄母鸡各 40 只,体重 1.5 ~ 1.8 kg)均由南方医科大学实验动物中心提供[SCXK(粤)2016-0041],两种实验鸡采用相同饲养条件饲养:普通开放式鸡舍内平养[SYXK(粤)2016-0167],不限量自由采食和饮水,公、母鸡按 1:10 ~ 2:10 的比例自然交配繁殖;饲喂相同营养成分的全价配合饲料:粗蛋白质 17%、粗纤维 6%、粗灰分 8%、钙 0.8% ~ 1.2%、总磷 0.4%、蛋氨酸 0.3% ~ 0.9%、氯化钠 0.3% ~ 0.8%。按常规免疫程序进行免疫。鸡蛋选用同批 300 日龄母鸡所产 1 周内的新鲜鸡蛋,所有鸡蛋均保存在温度为 15℃,湿度为 75% 的储藏室

内;鸡蛋数量:藏鸡蛋 30 枚,五黑鸡蛋 30 枚。本研究伦理审查号:L2017168,实验方案严格遵循实验动物使用的 3R 原则。

1.2 主要仪器

电子天平(型号:CP114,上海奥豪斯,0.01 ~ 110 g);游标卡尺(型号:I 型,杭州杭工量具制造有限公司,0 ~ 125 mm);蛋壳强度测定仪(型号:EFR-01,ORKA,0 ~ 50 kg);蛋白高度/蛋黄颜色测定仪(型号:EA-01,ORKA,0 ~ 50 mm);密度计(型号:FK-300,福布斯,比重精度 0.001 g/cm³,称重范围 0.005 ~ 300 g);蛋黄分离器(Meky,广东阳江);K8400 蛋白质分析仪(型号:FOSS Analyticaab,瑞典,0.1 ~ 200 mg 氮);脂肪测定仪(型号:SOX416,德国 Gerhardt 公司,0.1 ~ 5 g);气相色谱-质谱联用仪[型号:6890N-5975B,美国 Agilent 公司,技术指标:检测器:FID 检测限 < 5 pg 碳/s,柱箱温控范围:室温 + 4℃ ~ 450℃,分流/不分流毛细管柱进样口压力设定范围:0 ~ 100 psi(可选 0 ~ 150 psi)];灰分测定仪(型号: SX2-4-10,上海锦屏公司,精密密度:U = 1℃,k = 2(校正温度点:280℃);原子吸收分光光度计(型号:WFX-810,北京瑞利公司与广州分析测试中心联合研制,基线稳定性 0.004)。以上仪器及设备由广东省农业科学院农业部功能食品重点开放实验室提供。

1.3 实验方法

1.3.1 常规蛋品质测定

鸡蛋常规蛋品质测定主要按照《家禽生产性能名词术语及其度量统计方法(NY/T 823-2004)》^[4]中规定的方法进行。

(1)蛋重、蛋壳重的测定:用电子天平逐个称量鸡蛋重;用电子天平称量蛋壳总重,以 g 为单位,计算其占全鲜鸡蛋的百分比,可得蛋壳相对重。

(2)蛋形指数的测定:用游标卡尺分别测量鸡蛋的长径和短径,以 mm 为单位,蛋形指数 = 长径/短径。

(3)蛋壳强度的测定:采用蛋壳强度仪测定,将蛋垂直放于蛋壳强度仪的测定区域之间,钝端朝上,测定蛋壳表面单位面积上承受的压力,单位为 kg/cm²。

(4)蛋壳厚度的测定:将鸡蛋打在洁净、干燥的平底白瓷盘内,清理出蛋壳,分别取蛋的大头、小头、中间部分的蛋壳,用镊子剔除内壳膜,再用游标卡尺分别测其厚度,取其 3 点平均值作为蛋壳厚度,单位为 mm。

(5)蛋比重的测定:蛋比重即蛋密度,采用盐水漂浮法测量。在烧杯中加入足以浸没一个鸡蛋的去离子水,将鸡蛋放入其中,逐步加入盐,搅拌溶解,直至鸡蛋在其中悬浮。此时,蛋比重等于盐水密度,然后用密度计测量盐水密度。

(6)蛋白高度、哈夫单位的测定:将鸡蛋打破在水平放置的平面玻璃板上,取蛋黄边缘与浓蛋白边缘的中点之间的均匀分布的三个等距离点(避开蛋白系带)用蛋白高度测定仪测量蛋白高度,计算平均值。哈夫单位的计算方法:哈夫单位 = $1001 \times (H - 1.7W^{0.37} + 7.57)$, 其中: H = 浓蛋白高度(mm), W = 蛋重(g)。

(7)蛋清、蛋黄重量与含水量的测定:用蛋黄分离器将蛋清和蛋黄完全分离,收集蛋黄称取重量,以 g 为单位,计算蛋黄重占全鲜鸡蛋的百分比,可得蛋黄相对重(蛋黄比例);收集蛋清称取重量,以 g 为单位,计算蛋清重占全鲜鸡蛋的百分比,可得蛋清相对重(蛋白比例);将分离后的鸡蛋清和蛋黄置于恒温干燥箱中 $60^{\circ}\text{C} \sim 65^{\circ}\text{C}$ 条件下烘干 12 h 后分别称重,可计算蛋清和蛋黄的含水量。

(8)蛋黄颜色的测定:用蛋黄颜色测定仪测定蛋黄颜色,求其平均值,即得该样品蛋黄颜色的测定值。

1.3.2 营养成分的测定

粗蛋白采用 K8400 蛋白质分析仪进行测定^[5];粗脂肪采用 SOX416 脂肪测定仪进行测定^[6];粗灰分采用灰分测定仪进行测定^[7];碳水化合物根据国标测定,减法:食品总质量分别减去蛋白质、脂肪、水分、灰分和膳食纤维的质量,即是碳水化合物的量。硒、钙、铁、磷、锌等微量元素采用 WFX-810 原子吸收分光光度计分别进行测定^[8-9]。

1.3.3 风味物质的测定

用气相色谱-质谱联用仪测定鸡蛋中风味物质的含量。测定方法:固相微萃取(SPME 萃取)法。

(1)样品前处理:去掉蛋壳后在匀浆机制成匀

浆,取 25 mL 匀浆样品加入到 50 mL 锥形瓶中,然后加入 10 mL 饱和氯化钠溶液,加转子,锡箔纸密封待测。将装有样品的锥形瓶置于集热式恒温加热磁力搅拌器上, 75°C 加热 40 min, 45°C 加热 20 min。

(2)萃取条件:50/30 μm DVB/CAR/PDMS 萃取头, 75°C , 40 min; 45°C , 20 min。

(3)SPME 萃取操作:萃取头在气相色谱进样口老化 30 min,老化温度为 270°C 。将老化好的萃取头插入顶空瓶上部,推出萃取头,顶空吸附 1 h 后,然后在 GC 进样口解吸 5 min,进行 GC-MS 分析。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件对各项指标的实验数据进行统计分析,实验数据以平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并进行独立样本 t 检验,进行差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 广州驯化藏鸡与五黑鸡蛋品质指标结果比较

由表 1 可知,广州驯化藏鸡蛋的各项品质指标与五黑鸡蛋之间差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 广州驯化藏鸡和五黑鸡蛋主要营养成分测定结果比较

由表 2 可知,广州驯化藏鸡蛋的粗蛋白、粗脂肪、粗灰分和碳水化合物等主要营养成分指标的测定值与五黑鸡蛋之间差异无显著性($P > 0.05$)。

2.3 广州驯化藏鸡和五黑鸡蛋主要微量元素测定结果比较

由表 3 可知,广州驯化藏鸡蛋的硒、铁和锌等主要微量元素指标的测定值显著高于五黑鸡蛋的相应指标($P < 0.05$),而钙和磷两种主要微量元素的含量二者差异无显著性($P > 0.05$)。

2.4 广州驯化藏鸡和五黑鸡蛋风味物指标测定结果比较

由表 4 可知,广州驯化藏鸡蛋中的吡啶($P < 0.01$)、吡啶硼烷($P < 0.05$)和十二烷($P < 0.05$)三种主要风味物指标测定值显著低于五黑鸡蛋的相应指标;藏鸡蛋中的 1-十六烯、14-甲基十五烷酸甲酯、亚油酸甲酯、油酸甲酯和硬脂酸甲酯的含量则显著高于五黑鸡蛋的相应指标($P < 0.05$);其他风味物指标二者之间差异无显著性($P > 0.05$)。

表 1 广州驯化藏鸡与五黑鸡蛋品质测定结果比较($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Table 1	Comparison of the egg qualities between the domesticated Tibetan chicken in Guangzhou and Wuhei chicken			
项目 Items	藏鸡 Tibetan chicken	五黑鸡 Wuhei chicken	P 值 P-value	
蛋重(g) Egg weight	50.280 ± 3.833	51.530 ± 7.488	0.314	
蛋形指数 Egg-shape index	1.298 ± 1.473	1.319 ± 1.358	0.085	
蛋壳强度(kg/cm ²) Strength of eggshell	4.563 ± 0.481	2.991 ± 0.584	0.062	
蛋壳厚度(mm) Thickness of eggshell	0.388 ± 0.019	0.335 ± 0.029	0.576	
蛋壳重(g) Eggshell weight	3.772 ± 0.598	4.208 ± 0.369	0.490	
蛋比重 Egg specific gravity	1.610 ± 0.087	1.818 ± 0.047	0.380	
蛋白高度(mm) Egg albumen height	3.490 ± 1.178	4.410 ± 0.651	0.064	
蛋白重(g) Egg albumen weight	25.300 ± 2.659	28.590 ± 3.806	0.699	
蛋白含水量(%) Egg albumen water content	86.386 ± 1.349	86.470 ± 3.122	0.242	
蛋黄颜色(Col) Yolk color	9.390 ± 0.642	9.410 ± 0.647	0.649	
蛋黄重(g) Yolk weight	13.458 ± 2.071	18.694 ± 1.168	0.202	
蛋黄含水量(%) Yolk water content	46.336 ± 4.341	47.978 ± 8.245	0.209	
哈夫单位 Haugh unit	81.430 ± 10.202	83.960 ± 7.340	0.300	

表 2 广州驯化藏鸡与五黑鸡蛋主要营养成分测定结果比较($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Table 2	Comparison of the main nutritional components between the domesticated Tibetan chicken in Guangzhou and Wuhei chicken			
项目 Items	藏鸡 Tibetan chicken	五黑鸡 Wuhei chicken	P 值 P-value	
粗蛋白(g/100 g) Crude protein	25.924 ± 1.020	22.144 ± 1.242	0.206	
粗脂肪(g/100 g) Crude fat	12.328 ± 0.956	10.002 ± 1.371	0.280	
粗灰分(g/100 g) Coarse ash	0.806 ± 0.084	1.200 ± 0.076	0.842	
碳水化合物(g/100 g) Carbohydrate	10.902 ± 0.390	8.102 ± 0.566	0.653	

表 3 广州驯化藏鸡和五黑鸡蛋主要微量元素测定结果比较($\bar{x} \pm s$, $n = 30$)

Table 3	Comparison of the main microelements between the eggs of domesticated Tibetan chicken in Guangzhou and Wuhei chicken			
项目 Items	藏鸡 Tibetan chicken	五黑鸡 Wuhei chicken	P 值 P-value	
硒(mg/kg) Se	0.697 ± 0.041	0.272 ± 0.037	0.048	
钙(mg/kg) Ca	505.400 ± 11.718	490.200 ± 13.590	0.202	
铁(mg/kg) Fe	21.080 ± 0.559	16.780 ± 0.760	0.034	
磷(mg/kg) P	2210.400 ± 76.081	2011.600 ± 116.059	0.167	
锌(mg/kg) Zn	16.580 ± 1.434	10.540 ± 1.736	0.050	

表 4 广州驯化藏鸡和五黑鸡蛋风味物指标测定结果比较($\bar{x} \pm s, n = 30$)

Table 4 Comparison of the egg flavor compound indexes between the domesticated Tibetan chicken in Guangzhou and Wuhei chicken

项目 Items	藏鸡 Tibetan chicken	五黑鸡 Wuhei chicken	P 值 P-value
三氯甲烷(%) Trichloromethane	9. 318 ± 4. 319	13. 462 ± 7. 828	0. 206
吡啶(%) Pyridine	23. 710 ± 16. 326	34. 284 ± 5. 393	0. 009
吡啶硼烷(%) Pyridine borane	0. 132 ± 0. 295	0. 422 ± 0. 586	0. 022
正辛烷(%) Normal octane	0. 166 ± 0. 247	0. 168 ± 0. 239	0. 968
正己醛(%) Hexanal	16. 922 ± 9. 759	14. 278 ± 4. 377	0. 237
乙基苯(%) Ethylbenzene	0. 424 ± 0. 427	0. 396 ± 0. 387	0. 847
庚醛(%) Heptanal	1. 698 ± 1. 087	1. 440 ± 0. 535	0. 315
1-辛烯-3-醇(%) 1-Octen-3-alcohol	4. 060 ± 2. 469	3. 062 ± 2. 144	0. 956
正辛醛(%) n-Octanal	2. 434 ± 1. 493	2. 096 ± 0. 894	0. 459
双戊烯(%) Dipentene	2. 716 ± 2. 454	8. 132 ± 9. 430	0. 092
2-乙基己醇(%) 2-Ethyl hexanol	0. 928 ± 2. 075	1. 236 ± 1. 943	0. 998
壬醛(%) Nonanal	6. 636 ± 5. 384	6. 466 ± 4. 915	0. 877
十二烷(%) Dodecane	0. 128 ± 0. 286	0. 442 ± 0. 632	0. 030
癸醛(%) Decanal	0. 864 ± 0. 887	0. 182 ± 0. 407	0. 110
十四烷(%) Tetradecane	0. 806 ± 0. 867	0. 574 ± 0. 335	0. 116
正十五烷(%) n-Pentdecene	0. 988 ± 1. 013	0. 676 ± 0. 170	0. 078
酞酸二乙酯(%) Diethyl phthalate	0. 508 ± 1. 136	0. 152 ± 0. 340	0. 111
1-十六烯(%) 1-Hexadecene	0. 974 ± 0. 922	0. 458 ± 0. 159	0. 045
14-甲基十五烷酸甲酯(%) 14-Methyl-pentadecanoate	9. 626 ± 16. 726	3. 848 ± 0. 995	0. 037
十六酸乙酯(%) Ethyl palmitate	0. 566 ± 1. 028	0. 552 ± 0. 116	0. 057
亚油酸甲酯(%) Methyl linoleate	0. 928 ± 2. 075	0. 254 ± 0. 244	0. 050
油酸甲酯(%) Methyl oleate	7. 174 ± 11. 983	3. 078 ± 0. 911	0. 040
硬脂酸甲酯(%) Methyl stearate	2. 556 ± 4. 176	1. 150 ± 0. 327	0. 041

3 讨论

3.1 广州驯化藏鸡与五黑鸡蛋品质指标结果比较

共测定了藏鸡与五黑鸡蛋的蛋重、蛋形指数、蛋壳强度、蛋壳厚度、蛋壳重、蛋比重、蛋白高度、蛋白重、蛋白含水量、蛋黄颜色、蛋黄重、蛋黄含水量十三项指标,结果显示:广州驯化藏鸡蛋的上述各项品质指标略低于五黑鸡蛋的相应指标,但二者差异无显著性($P > 0.05$)。

3.2 广州驯化藏鸡和五黑鸡蛋主要营养成分测定结果比较

测定结果显示,虽然广州驯化藏鸡蛋的粗蛋白、粗脂肪、粗灰分和碳水化合物等主要营养成分指标的测定值与五黑鸡蛋之间差异无显著性($P > 0.05$),但是,除了粗灰分指标略低于五黑鸡之外,其余指标均高于五黑鸡。与原产地藏鸡蛋主要营养成分相比,广州地区驯化后藏鸡蛋中的粗蛋白与原产地藏鸡蛋的基本一致,而粗脂肪含量则低于原产地藏鸡蛋^[10];而与平原地区的五黑鸡蛋相比要略优一些。由此可见:藏鸡虽经广州地区驯化后,其鸡蛋的蛋白质等主要营养成分仍然保持相对稳定,这说明受其遗传因素的影响较大,是藏鸡长期适应高原缺氧的恶劣环境条件所形成的遗传特性之一。

3.3 广州驯化藏鸡和五黑鸡蛋主要微量元素测定结果比较

微量元素广泛分布于生物体的各个组织中,虽然其在生物体体内含量很少,但对生物体来说既是必需的,同时又具有非常重要的生理意义。鸡蛋是人们生活中必不可少的食品,鸡蛋中除了蛋白质、脂肪等有机成分对人体有益之外,微量元素也是必不可少的。有些微量元素是人体必需,且是有益的,如硒、钙、铁、锌^[11]。广州驯化藏鸡和五黑鸡蛋中微量元素的含量测定结果显示:广州驯化藏鸡蛋的硒、铁和锌等主要微量元素的测定值显著高于五黑鸡蛋的相应指标($P < 0.05$),而钙和磷的含量二者差异无显著性($P > 0.05$),这与巴桑等人^[12]的研究结果基本一致,这进一步说明藏鸡蛋中较高的微量元素含量与藏鸡长期适应高寒缺氧环境所形成的遗传特性有关。

3.4 广州驯化藏鸡和五黑鸡蛋风味物指标测定结果比较

鸡蛋的风味物质,主要包括滋味物质和气味物质,具有种类繁多、相互影响、含量极微且效果显著、稳定性较差、风味与风味物质的分子结构缺乏普遍规律性等特点,风味物质易受浓度、介质等外界条件影响^[13]。目前已检测到鸡蛋中的风味物质有醇、脂肪烃、醛、酮、芳香族、呋喃、硫化物、萜类等 8 类物质^[14]。有学者从生鸡蛋蛋黄和蛋清中仅分别检测出了 8 种和 18 种风味物质^[15]。为了解广州驯化藏鸡蛋是否具有独特的风味,并与五黑鸡蛋的相应指标进行比较。实验测定了两种鸡蛋中的 23 种风味物,结果显示:广州驯化藏鸡蛋中的吡啶(P

< 0.01)、吡啶硼烷($P < 0.05$)和十二烷($P < 0.05$)三种主要风味物指标测定值显著低于五黑鸡蛋的相应指标;而藏鸡蛋中的 1-十六烯、14-甲基十五烷酸甲酯、亚油酸甲酯、油酸甲酯和硬脂酸甲酯的含量则显著高于五黑鸡蛋的相应指标($P < 0.05$);蛋的其他风味物指标含量二者之间差异无显著性($P > 0.05$)。由此可见:藏鸡引入广州进行驯化饲养后,其蛋中所含的主要风味物含量显著高于五黑鸡蛋,这提示:广州驯化藏鸡蛋的风味物含量因受其遗传特性的影响与原产地藏鸡蛋变化不大,这与龙城等人^[16]的报道一致。

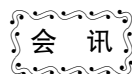
综上,(1)广州驯化藏鸡蛋除了蛋壳强度、蛋壳厚度高于五黑鸡外,其余蛋品质指标均低于五黑鸡;(2)广州驯化藏鸡蛋的主要营养成分除了粗灰分低于五黑鸡外,粗蛋白、粗脂肪和碳水化合物均高于五黑鸡;(3)广州驯化藏鸡蛋中的硒、钙、铁、磷和锌均高于五黑鸡;(4)广州驯化藏鸡蛋中的吡啶、吡啶硼烷和十二烷三种主要风味物含量低于五黑鸡,而藏鸡蛋中的 1-十六烯、14-甲基十五烷酸甲酯、亚油酸甲酯、油酸甲酯和硬脂酸甲酯的含量则高于五黑鸡。

参考文献:

- [1] 强巴央宗,张浩,商鹏,等.藏鸡屠宰性能及肉质特性[J].中国农业大学学报,2008,13(1):47-50.
- [2] 袁进,吴清洪,徐名村,等.广州地区藏鸡血液生理和生化指标测定分析[J].中国比较医学杂志,2018,28(4):69-72.
- [3] 袁进,吴清洪,罗烘权,等.五黑鸡血液学和血清生化指标测定分析[J].实验动物与比较医学,2018,38(2):1-3.
- [4] 中华人民共和国农业部. NY/T 823-2004 家禽生产性能名词术语和度量统计方法[S].北京:中国标准出版社,2004.
- [5] 中华人民共和国卫生部,中国标准化管理委员会. GB 5009.5-2010 食品安全国家标准 食品中蛋白质的测定[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [6] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会,中华人民共和国食品药品监督管理总局. GB 5009.6-2016 食品安全国家标准 食品中脂肪的测定[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [7] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. GB 5009.4-2016 食品安全国家标准 食品中灰分的测定[S].北京:中国标准出版社,2017.
- [8] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会. GB 5009.93-2010 食品安全国家标准 食品中硒的测定[S].北京:中国标准出版社,2010.
- [9] 中华人民共和国卫生和计划生育委员会,中华人民共和国食品药品监督管理总局. GB 5009.268-2016 食品安全国家标

- 准食品中多元素的测定 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017.
- [10] 陈烽烽, 杨孔, 赵晓刚, 等. 藏鸡蛋与普通鸡蛋的营养成分比较研究 [J]. 西南民族大学学报(自然科学版), 2009, 35(5): 1013-1016.
- [11] 李景超, 白爱英, 包京华, 等. 鸡蛋和乌鸡蛋中 12 种金属元素含量的研究 [J]. 分析试验室, 2009, 28(S1): 165-167.
- [12] 巴桑, 强巴央宗, 申晓东. 西藏地区藏鸡蛋的营养成份分析 [J]. 畜禽业, 2003(10): 18-19.
- [13] 曹特, 蒋小松, 徐亚欧. 影响鸡肉风味的主要因素 [J]. 西
- 南民族大学学报(自然科学版), 2005(S1): 24-28.
- [14] Brewer MS, Vega JD. Detectable odor thresholds of selected lipid oxidation compounds in a meat model system [J]. J Food Sci, 1995, 60(3): 592-595.
- [15] 冯月超, 刘美玉, 任发政, 等. 不同蛋黄组分对蛋黄风味的影响 [J]. 食品科学, 2006, 27(12): 58-62.
- [16] 龙城, 王晶, 武书庚, 等. 饲料因素对鸡蛋风味的影响及其改善措施 [J]. 动物营养学报, 2015, 27(2): 352-358.

[收稿日期]2018-06-14



《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》 第四届编委会换届大会隆重召开

金秋十月,碧水阳春。2018 年 10 月 10 日 13:30,《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》(以下简称“两刊”)第四届编委会换届大会在美丽的帆船之都——青岛隆重召开。来自全国各地的一百余位第四届编委会成员齐聚一堂,共同见证两刊在第三届编委的努力下所取得的丰硕果实,并为两刊日后的进一步发展保驾护航。

此次换届会,由来自军事科学院军事医学研究院微生物流行病学研究所的孙岩松研究员主持并致开幕词。会议首先由编辑部李继平主任就两刊换届工作的筹备情况进行汇报。本着既有利于科技创新,又能推进期刊发展的换届工作指导原则,为打造一支具有前瞻性学术视野、严谨求实、有科研素养的年轻化编委队伍,编辑部采取自荐和推荐的方式,遴选并产生了以秦川教授为主编、代解杰等 20 位教授为副主编、学报及杂志各 100 位为编委、210 位通讯编委为后备力量的第四届编委会,形成一个架构合理且符合国际规则的金字塔结构。

两刊主编秦川教授对第三届编委会工作进行总结报告,并对新一届编委会进行展望。在过去的四年中,两刊在第三届编委的努力下,取得了傲人的成绩:在各位执行主编的带领下,两刊积极组织系列专题,引领学科发展;期刊影响力和复合影响因子不断提高,各项评价指标呈现飞跃式前进,被更多国内外权威数据库收录;凝聚力量用心办刊,打造科技精品期刊,《中国实验动物学报》首次获得精品期刊及国际影响力项目资助;充分强化互联网思维,逐步增强媒体融合力度,开启两刊学术论文网络首发新模式。这些成果为两刊后续的发展奠定了坚实基础,未来四年,两刊将重塑定位,相辅相成、相得益彰,满足国内实验动物科研工作者不同层次的需求,打造旗舰型科技期刊,全面引领学科发展;与此同时,两刊将进一步推进传统出版与数字出版的融合发展,充分利用网络首发模式对录用定稿进行在线优先出版,维护作者的科研成果首发权,全面提高学术论文的传播效率和利用价值。两刊将采取特色办刊模式,实现编委队伍建设、编辑队伍建设、期刊评价与质量控制的协同发展,全面助力科技创新。

此外,此次创刊会邀请了科技导报社史永超社长就编委会的职责及审稿注意事项进行经验分享,并邀请昆明理工大学陈永昌教授作为编委代表分享审稿经验,为今后各位编委开展工作提供了参考和借鉴。最后,各位编委领取了聘书,并合影留念。

两刊编辑部 供稿

GnRH-a 反加雌激素对大鼠子宫内膜异位症模型的疗效及复发的研究

张玲玉^{1,2}, 刘颖蕾¹, 乔海凤¹, 开海丽¹, 刘曼华^{1*}, 吴刘成³

(1. 南通大学第二附属医院, 江苏 南通 226001; 2. 南通市妇幼保健院, 江苏 南通 226001;
3. 南通大学实验动物中心, 江苏 南通 226001)

【摘要】 目的 探讨 GnRH-a 反加不同剂量雌激素对子宫内膜异位症的治疗效果及对复发的影响。**方法** 将建成子宫内膜异位症模型的 51 只大鼠分为五组: 对照组 ($n = 10$), 予生理盐水 1 mg/kg 皮下注射, 共 1 次; 研究组: 反加组 I (低剂量雌激素组 $n = 10$)、反加组 II (中剂量雌激素组 $n = 10$)、反加组 III (高剂量雌激素组 $n = 10$)、GnRH-a 组 ($n = 11$)。研究组先予亮丙瑞林 1 mg/kg 皮下注射, 共 1 次, 反加组 I、II、III 分别在给药第 2 周开始予不同剂量的戊酸雌二醇 (25 $\mu\text{g/kg}$, 50 $\mu\text{g/kg}$, 100 $\mu\text{g/kg}$) 灌胃, 同时 GnRH-a 组予生理盐水灌胃, 3 mL/只, 各研究组每天 1 次, 共 14 d。用药后第 4 周和 7 周开腹探查, 测量内异灶体积, 取其内异灶组织, 免疫组化法检测内异灶内的 TNF- α 、StAR 的表达, 眼眶内眦静脉丛的采血法采血, 酶联免疫吸附法检测血清 CA125 的水平。**结果** 用药前, 各组大鼠异位病灶体积比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。第 4 周, 研究组较对照组明显减小, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 第 7 周, 反加组 II、III 较反加组 I 和 GnRH-a 组体积增大明显, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。②用药前, 各组大鼠异位病灶组织中 TNF- α 、StAR 表达, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。第 4 周, 研究组内异灶 TNF- α 、StAR 表达较对照组明显降低, 差异有显著性 ($P < 0.05$); 反加组 II、III 较反加组 I 和 GnRH-a 组 TNF- α 、StAR 表达高, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。③用药前, 各组大鼠血清 CA125 水平比较, 差异无显著性 ($P > 0.05$)。第 4 周, 研究组血清 CA125 较对照组降低, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。第 7 周, 反加组 II、III 较反加组 I 和 GnRH-a 组血清 CA125 水平高, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。**结论** GnRH-a 反加低剂量雌激素对大鼠内异症模型有较好疗效, 反向添加中、高剂量雌激素可能通过诱导 TNF- α 、StAR 而促进大鼠子宫内膜异位症的复发。

【关键词】 大鼠子宫内膜异位症模型; 促性腺激素释放激素受体激动剂; 雌激素; 反添加; 复发

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0067-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.012

Effect of GnRH-a combined with estrogen on endometriosis in a rat model and its recurrence

ZHANG Lingyu^{1,2}, LIU Yinglei¹, QIAO Haifeng¹, KAI Haili¹, LIU Manhua^{1*}, WU Liucheng³

(1. The Second Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China. 2. Nantong Maternal and Child Health Hospital, Nantong 226001. 3. Experimental Animal Center of Nantong University, Nantong 226001)

【Abstract】 Objective To observe the therapeutic effect of a gonadotropin-releasing hormone agonist combined with various doses of estrogen in a rat model of endometriosis and the recurrence of endometriosis. **Methods** Fifty-one rats

【基金项目】 南通市科技局重点病种的规范化临床诊疗研究 (HS2014074); 南通市科技计划项目 (MS12017013-4)。

【作者简介】 张玲玉, 女, 住院医师, 硕士研究生, 妇产科。E-mail: luqingyu15502@163.com

【通信作者】 刘曼华, 女, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 妇产科。E-mail: liumanhua2010@hotmail.com

with endometriosis were established by autologous transplantation of the uterus and then randomly divided into five groups: control group ($n = 10$), 1 mg/kg NS subcutaneous injection once; treatment groups, add-back group I (low-dose estrogen group, $n = 10$), add-back group II (medium-dose estrogen group, $n = 10$), add-back group III (high-dose estrogen group, $n = 10$), GnRH-a group ($n = 11$), 1 mg/kg leuprolide subcutaneous injection once. Add-back groups I – III were administered various doses of estradiol valerate at week 2 (25, 50, and 100 $\mu\text{g/kg}$) and the GnRH-a group was administered 3 mL NS per rat once a day by gavage at week 2. At weeks 3 and 6 after intragastric administration of estradiol valerate, a laparotomy was performed to measure the volume of endometriosis. The protein levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and steroidogenic acute regulatory (StAR) protein were detected by immunohistochemistry. The levels of serum CA125 were detected by an enzyme-linked immunosorbent assay. **Results** Before the treatments, there was no significant difference in the volume of ectopic lesions in each group ($P > 0.05$). At week 4, the mean volumes of ectopic lesions in the treatment groups were significantly reduced compared with that of the control group ($P < 0.05$). At week 7, the volumes of ectopic lesions in add-back II and III groups were significantly higher than those in the add-back I and GnRH-a groups ($P < 0.05$). Before the treatments, there was no significant difference in the expression of TNF- α and StAR in ectopic lesions of each group ($P > 0.05$). At week 4 of the treatments, the TNF- α and StAR expression in ectopic lesions of treatment groups was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). At week 7, TNF- α and StAR expression in add-back II and III groups was significantly higher than that in the add-back group I and GnRH-a groups ($P < 0.05$). Before the treatments, there was no significant difference in the serum level of CA125 in the each group ($P > 0.05$). At week 4, the serum level of CA125 in the treatment groups was significantly lower than that in the control group ($P < 0.05$). At week 7, the serum levels of CA125 in the add-back II and III groups were significantly higher than those in the add-back group I and GnRH-a groups ($P < 0.05$). **Conclusions** GnRH-a combined with low-dose estrogen causes marked suppression of endometriosis in the rat. Replacement therapy by medium and high doses of estrogen may stimulate rapid recurrence of endometriotic implant growth induced by TNF- α and StAR.

[Keywords] endometriosis; rat model; gonadotropin-releasing hormone agonist; estrogen; replacement therapy; recurrence

子宫内膜异位症(endometriosis)是一种妇科常见疾病,在育龄期妇女中的发病率在2%~10%,在不孕妇女中发病率高达50%^[1]。临床主要表现为痛经、慢性盆腔痛及不孕,严重影响了妇女的健康和生活质量。子宫内膜异位症在治疗后5年复发率为45%~50%^[2]。这个数据在被手术确诊的年龄小于21岁的妇女中甚至可达到56%^[3]。子宫内膜异位症需要长期、个体化治疗。作为一种雌激素相关性疾病,抑制内源性雌激素是延缓内异症复发的关键。促性腺激素释放激素受体激动剂(gonadotropin-releasing hormone agonist, GnRH-a)有药物去势的作用,可以迅速将血清雌二醇降低至绝经期水平,但随之而来的潮热、盗汗、情绪波动等低雌激素症状限制了GnRH-a的长期用药。为缓解低雌激素症状,近年来提出来反添加疗法,但目前反添加疗法开始时间和如何用药临床上尚无统一标准^[4]。本研究通过自体移植建立大鼠子宫内膜异位症模型,建模成功后,给予亮丙瑞林反加不同剂量的雌激素治疗,比较治疗前后大鼠子宫内膜异位灶体积大小、子宫内膜异位灶组织肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、类固醇激素合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory

protein, StAR)以及血清糖类抗原125(carbohydrate antigen 125, CA125)的表达水平,评估子宫内膜异位症的治疗效果以及治疗后复发情况。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠60只,每只体重180~200 g,2月龄,雌性,购自南通大学实验动物中心[SCXK(苏)2014-0001],动物从业人员上岗证号:220180114,饲养环境:南通大学实验动物中心[SYXK(苏)2017-0046],温度:22℃~24℃,湿度:45%~70%,12 h明暗交替,自然饲养。一切进入屏障系统的人、物、饲料、水、空气、铺垫物及各种用品均须经过严格的微生物控制。在常规条件下适应性饲养1周。实验方案经过南通大学实验动物中心动物伦理委员会批准,编号为:20161202-001。无菌手术在南通大学实验动物中心实验室进行[SYXK(苏)2017-0046]。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

多克隆抗体TNF- α 及StAR一抗(Abcam),

DAB 染色试剂盒 (V9000, 中杉金桥), CA125 ELISA 试剂盒 (ml6024076); 注射用醋酸亮丙瑞林微球 (天津武田药品有限公司)。光学显微镜, 石蜡切片机, 游标卡尺, 微波炉, 移液器, 冷冻离心机。

1.3 实验方法

1.3.1 建模

60 只 SD 大鼠术前 1 d 皮下注射苯甲酸雌二醇 (0.1 mg/kg), 使所有实验动物处于同一动情周期。手术当天禁食禁饮。SD 大鼠予水合氯醛 (7%) 麻醉后, 取大鼠下腹正中、尿道口上端 1 cm 做一长约 2~3 cm 纵行切口, 结扎子宫系膜血管, 再结扎需切除的子宫段的两端, 其左侧子宫角切下约 1.5 cm 长片段, 置于 37℃ 无菌 PBS 缓冲液中, 分离子宫内膜, 取其 0.5 cm × 0.5 cm 一段, 于腹壁切口两侧从腹肌与皮下筋膜层之间打隧道, 将分离的子宫内膜展平置于隧道内, 内膜紧贴肌层, 缝合切口, 整个手术控制在 15 min 左右^[5], 将手术完毕的大鼠置于干净的饲养笼中, 保温至苏醒。术后予庆大霉素 0.1 mL/d 肌注 3 d 预防感染。

1.3.2 分组与给药

建模 4 周后开腹探查, 51 只大鼠建模成功。休息 3 d, 将建模成功的 51 只大鼠按随机数字表法分为五组: 对照组: 予生理盐水 1 mg/kg 皮下注射, 共 1 次; 研究组: 反加组 I (10 只)、反加组 II (10 只)、反加组 III (10 只)、GnRH-a 组 (11 只)。研究组先予亮丙瑞林 1 mg/kg 皮下注射^[6], 共 1 次, 其中反加组 I、II、III 分别在给药第 2 周开始予不同剂量的戊酸雌二醇灌胃反加^[7], 反加组 I (低剂量雌激素组): 25 μg/(kg·d), 反加组 II (中剂量雌激素组): 50 μg/(kg·d), 反加组 III (高剂量雌激素组): 100 μg/(kg·d), 每天 1 次, 共 14 d, GnRH-a 组在给药第 2 周予生理盐水灌胃反加, 3 mL/(只·d), 每天 1 次, 共 14 d。在治疗过程中对照组有 1 只大鼠因切口感染死亡; 反加组 I 有 1 只大鼠因切口感染死亡, 2 只大鼠因灌胃食道损伤死亡; 反加组 II 组有 2 只大鼠因切口感染死亡; 反加组 III 有 2 只大鼠因灌胃食道损伤死亡; GnRH-a 组有 2 只大鼠因切口感染死亡, 1 只大鼠因灌胃食道损伤死亡。

1.3.3 取材

分别在亮丙瑞林给药后第 4 周及第 7 周, 开腹探查, 测量内异灶大小, 取内异灶组织, 置于 4% 多聚甲醛溶液中保存, 石蜡包埋, 用于免疫组化检测; 用眼眶内眦静脉丛的采血法采血, 4℃ 1000 r/min 离

心 20 min, 收集上清, -80℃ 保存, 用于 ELISA 检测。

1.3.4 免疫组化

组织经中性福尔马林固定后, 取材, 常规脱水, 石蜡包埋, 切片, 采用 LSAB 法, 染色步骤按照说明书进行, 用 DAB (二氨基联苯胺) 显色后, 复染、脱水、透明、封片。以 PBS (磷酸盐缓冲液) 代替一抗作阴性对照。每批实验均同时设立阴性对照。

1.3.5 ELISA 法

用于测定血清中 CA125 的含量, 严格按试剂盒说明的实验步骤检测。

1.3.6 结果判定

显微镜下观察, 每张免疫组化切片随机选择 3 个不同的视野 (×400) 观察, 并判读阳性表达强度和阳性率。染色结果采用半定量分析方法: 以染色强度结合阳性细胞数百分比进行评分。染色强度计分: 无明显着色为 0 分, 淡黄色或轻微黄色为 1 分, 深黄或棕黄色为 2 分, 棕褐色或黑褐色为 3 分。阳性细胞百分比即每张免疫组化切片选择 3 个不同的视野 (×400) 观察, 每个视野计数 100 个细胞中阳性细胞数, 计算阳性细胞平均数: ≤5% 为评为 0 分, 6%~25% 评 1 分, 26%~50% 评 2 分, 51%~75% 评 3 分, >75% 均评为 4 分。对每个视野均进行染色强度计分与阳性细胞百分比乘积评分, 评分以阳性细胞百分比与染色强度的乘积: 0 分为阴性, 1~6 分为弱阳性, 7~12 分为强阳性。

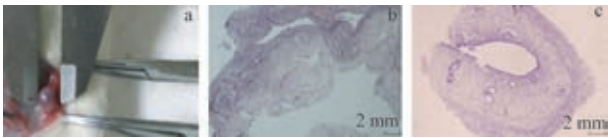
1.4 统计学方法

利用 SPSS 20.0 统计软件包, 计量资料以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 计量资料比较采用配对 *t* 检验; 同一时间点各组间比较采用方差分析, 以 *P* < 0.05 为差异有显著性。

2 结果

2.1 大鼠内异症模型建立

建模 28 d 后开腹探查, 60 只大鼠中 51 只建模成功。建模成功的大鼠腹壁, 肉眼可见异位病灶呈囊泡样, 内充满透亮液体, 表面被覆丰富脂肪组织, 移植物表明可见新生血管爬行生长, 周围结缔组织丰富。HE 染色镜下观察异位囊壁由内向外分别为上皮细胞层、间质细胞层及少量纤维结缔组织。上皮细胞呈柱状排列, 大部分上皮细胞有分泌现象可见核下空泡, 间质层薄, 少数可见腺体分布。见图 1。



注:a:治疗前大鼠内异灶肉眼观察;b:异位内膜(HE染色,×10);c:在位内膜(HE染色,×10)。

图1 大鼠子宫内膜异位灶及组织学观察

Note. a: Endometriosis in a rat model (gross appearance). b: Histology of the ectopic endometrium in a rat (HE staining, × 10). c: Eutopic endometrium in a rat (HE staining, × 10).

Figure 1 Endometriosis in a rat model and histological observation

2.2 大鼠内异症模型用药前后各组内异灶体积

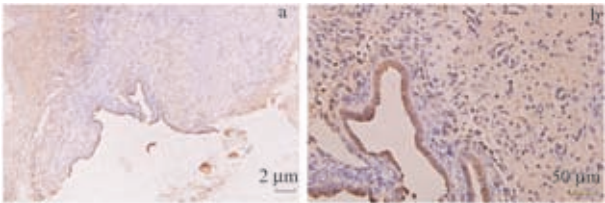
用药前,各组内异症的体积间差异无显著性($P > 0.05$)。第4周,反加组I、反加组II、反加组III、GnRH-a组大鼠腹壁异位病灶体积较用药前明显缩小,对照组的体积较用药前增大,差异均有显著性($P < 0.05$)。第7周,反加组I、反加组II、反加组III、GnRH-a组大鼠腹壁异位病灶体积较第4周均有增大,反加组I、反加组II、GnRH-a组较用药前明显减小,差异均有显著性($P < 0.05$),反加组III较用药前相比差异无显著性,对照组与第4周相比,差异无显著性($P > 0.05$);第7周时,反加应用中、高剂量雌激素组(反加组II、反加组III)较低剂量雌激素组和单纯应用GnRH-a组(反加组I、GnRH-a组)体积增大明显,差异有显著性($P < 0.05$)。见表1。

2.3 免疫组化表达

2.3.1 TNF-α在大鼠内异症病灶组织中的表达

TNF-α蛋白主要表达在子宫内膜异位症异位

内膜组织腺上皮细胞的细胞浆中,间质细胞浆中少量表达。阳性呈棕黄色至褐色(图2)。用药前,各组内异症病灶组织中TNF-α表达差异无显著性($P > 0.05$)。第4周,反加组I、反加组II、反加组III、GnRH-a组大鼠腹壁异位病灶TNF-α表达均较用药前缩小,且均较对照组明显缩小,差异均有显著性($P < 0.05$),而对照组的TNF-α表达与用药前相比差异无显著性($P > 0.05$)。第7周,反加组II、反加组III大鼠腹壁异位病灶TNF-α表达较第4周增加,差异有显著性($P < 0.05$);对照组、反加组I、GnRH-a组表达与第4周相比差异无显著性($P > 0.05$);反加组I、反加组II、GnRH-a组TNF-α表达较用药前明显减小,差异均有显著性($P < 0.05$),反加组III较用药前相比差异无显著性;第7周时反加应用中、高剂量雌激素组(反加组II、反加组III)较低剂量雌激素组和单纯应用GnRH-a组(反加组I、GnRH-a组)TNF-α表达高,差异有显著性($P < 0.05$)。见表2。



注:a:免疫组化(×10);b:免疫组化(×40)。

图2 TNF-α在大鼠内异症组织的表达

Note. a: Immunohistochemical staining (× 10). b: Immunohistochemical staining (× 40).

Figure 2 TNF-α expression in the ectopic endometrium

表1 GnRH-a用药后反加不同剂量雌激素大鼠异症病灶体积变化($\bar{x} \pm s, \text{mm}^3$)

Table 1 Mean volume of endometriotic lesions in rats of the five groups before and after treatments

组别 Groups	<i>n</i>	用药前 Before treatment	第4周 At the 4th week	第7周 At the 7th week
对照组 Control group	9	62.05 ± 13.64	81.04 ± 18.97 ^a	80.80 ± 20.21 ^a
GnRH-a组 GnRH-a group	8	61.07 ± 22.95	10.38 ± 2.39 ^{ac}	13.74 ± 3.31 ^{abc}
反加组I Add-back group I	7	66.61 ± 33.31	11.41 ± 4.45 ^{ac}	18.11 ± 4.38 ^{abc}
反加组II Add-back group II	8	71.22 ± 22.73	11.38 ± 2.94 ^{ac}	25.64 ± 6.01 ^{abc}
反加组III Add-back group III	8	60.89 ± 16.80	11.81 ± 4.28 ^{ac}	52.58 ± 12.70 ^{bc}
<i>F</i>		0.398	92.156	48.372

注:反加组I:低剂量雌激素组;25 μg/(kg·d);反加组II:中剂量雌激素组;50 μg/(kg·d);反加组III:高剂量雌激素组;100 μg/(kg·d)。与同组用药前比较,^a $P < 0.05$;与同组第4周比较,^b $P < 0.05$;与对照组比较,^c $P < 0.05$ 。

Note. Add-back group I: low-dose estrogen group; 25 μg/(kg·d); Add-back group II: medium-dose estrogen group; 50 μg/(kg·d); Add-back group III: high-dose estrogen group; 100 μg/(kg·d). Compared with the same group before treatment, ^a $P < 0.05$; compared with the same group at the 4th week, ^b $P < 0.05$; compared with the control group, ^c $P < 0.05$.

表 2 GnRH-a 用药后反加不同剂量雌激素大鼠子宫内膜异位病灶组织中 TNF-α 和 StAR 的表达 ($\bar{x} \pm s$)
Table 2 TNF-α and StAR protein levels in the ectopic endometrium of rats in the five groups before and after treatments

组别 Groups	n	用药前 Before treatment		第 4 周 At the 4th week		第 7 周 At the 7th week	
		TNF-α	StAR	TNF-α	StAR	TNF-α	StAR
对照组 Control group	9	6.33 ± 1.41	5.78 ± 1.64	7.22 ± 1.20	5.89 ± 1.45	5.89 ± 1.76	3.78 ± 0.44 ^a
GnRH-a 组 GnRH-a group	8	7.63 ± 1.77	6.75 ± 2.05	1.63 ± 1.41 ^{ac}	1.25 ± 1.16 ^{ac}	2.00 ± 1.17 ^{ac}	1.63 ± 1.30 ^{ac}
反加组 I Add-back group I	7	7.14 ± 1.86	7.00 ± 1.29	1.86 ± 1.35 ^{ac}	1.29 ± 1.38 ^{ac}	2.57 ± 0.79 ^{ac}	1.86 ± 1.21 ^{ac}
反加组 II Add-back group II	8	7.00 ± 2.07	7.13 ± 2.17	1.75 ± 1.17 ^{ac}	1.63 ± 1.06 ^{ac}	3.38 ± 0.74 ^{abcd}	3.25 ± 0.71 ^{abd}
反加组 III Add-back group III	8	6.75 ± 1.04	6.88 ± 1.64	1.88 ± 1.25 ^{ac}	1.75 ± 1.28 ^{ac}	5.25 ± 1.17 ^{bd}	5.50 ± 1.85 ^{bcd}
F		0.697	0.7773	32.018	20.927	11.706	13.658

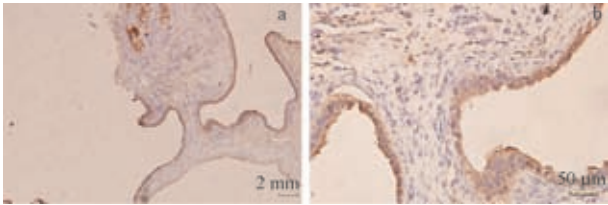
注:反加组 I:低剂量雌激素组;25 μg/(kg·d);反加组 II:中剂量雌激素组;50 μg/(kg·d);反加组 III:高剂量雌激素组;100 μg/(kg·d)。与同组治疗前比较,^a*P* < 0.05;与同组治疗 4 周比较,^b*P* < 0.05;与对照组同一时间点比较,^c*P* < 0.05;与 GnRH-a 组同一时间点比较,^d*P* < 0.05。
Note. Add-back group I: low-dose estrogen group; 25 μg/(kg·d); Add-back group II: medium-dose estrogen group; 50 μg/(kg·d); Add-back group III: high-dose estrogen group; 100 μg/(kg·d). Compared with the same group before treatment, ^a*P* < 0.05; compared with the same group at the 4th week, ^b*P* < 0.05; compared with the control group at the same time, ^c*P* < 0.05; compared with the GnRH-a group at the same time, ^d*P* < 0.05.

2.3.2 StAR 在大鼠内异症病灶组织中的表达

StAR 主要表达于异位内膜组织腺上皮细胞的细胞浆中,在位内膜中很少表达。阳性呈棕黄色至褐色(图 3)。用药前,各组内异症病灶组织中 StAR 表达差异无显著性(*P* > 0.05)。第 4 周,反加组 I、反加组 II、反加组 III、GnRH-a 组大鼠腹壁异位病灶 StAR 均较用药前减小,差异有显著性(*P* < 0.05),且均较对照组明显降低,差异有显著性(*P* < 0.05),而对照组的大鼠腹壁异位病灶 StAR 表达与用药前相比差异无显著性(*P* > 0.05)。第 7 周,对照组大鼠腹壁异位病灶 StAR 表达较用药前减小,差异有显著性(*P* < 0.05);反加组 II、反加组 III StAR 表达较第 4 周增加,差异有显著性(*P* < 0.05);反加组 I、反加组 II、GnRH-a 组 StAR 表达较用药前明显减小,差异均有显著性(*P* < 0.05);反加组 III 较用药前相比差异无显著性;第 7 周时反加应用中、高剂量雌激素组(反加组 II、反加组 III)较低剂量雌激素组和单纯应用 GnRH-α 组(反加组 I、GnRH-a 组)StAR 表达高,差异有显著性(*P* < 0.05)。见表 2。

2.4 血清 CA125 在大鼠内异症模型中的表达

用药前,各组血清 CA125 浓度差异无显著性(*P* > 0.05),第 4 周,反加组 I、反加组 II、反加组 III、GnRH-a 组大鼠血清 CA125 浓度平均数均减小,与



注:a:免疫组化(×10);b:免疫组化(×40)。
图 3 StAR 在大鼠内异症组织的表达

Note. a: Immunohistochemical staining (×10). b: Immunohistochemical staining (×40).

Figure 3 StAR expression in the ectopic endometrium

用药前相比差异有显著性(*P* < 0.05),与对照组相比,差异有显著性(*P* < 0.05),而对照组的评分与用药前相比差异无显著性(*P* > 0.05)。第 7 周,反加组 II、反加组 III 大鼠血清 CA125 浓度较第 4 周增加,差异有显著性(*P* < 0.05);GnRH-a 组大鼠血清 CA125 浓度较 4 周同组减小,差异有显著性(*P* < 0.05);对照组、反加组 I 与第 4 周相比差异无显著性(*P* > 0.05);反加组 I、反加组 II、反加组 III、GnRH-a 组大鼠血清 CA125 浓度较用药前明显减小,差异均有显著性(*P* < 0.05);第 7 周时反加应用中、高剂量雌激素组(反加组 II、反加组 III)较低剂量雌激素组和单纯应用 GnRH-a 组(反加组 I、GnRH-a 组)血清 CA125 浓度高,差异有显著性(*P* < 0.05)。见表 3。

表 3 GnRH-a 用药后反加不同剂量雌激素大鼠血清 CA125 浓度的变化($\bar{x} \pm s$, U/mL)

Table 3 Serum level of CA125 in rats of the five groups before and after treatments

组别 Groups	<i>n</i>	用药前 Before treatment	第 4 周 At the 4th week	第 7 周 At the 7th week
对照组 Control group	9	9.06 ± 1.25	9.19 ± 1.61	9.24 ± 1.12
GnRH-a 组 GnRH-a group	8	8.91 ± 1.96	5.47 ± 0.72 ^{ac}	3.60 ± 0.28 ^{abc}
反加组 I Add-back group I	7	8.86 ± 2.21	4.00 ± 0.77 ^{acd}	3.46 ± 0.35 ^{ac}
反加组 II Add-back group II	8	9.13 ± 2.07	4.34 ± 0.65 ^{acd}	6.24 ± 2.04 ^{abcd}
反加组 III Add-back group III	8	8.86 ± 1.29	4.38 ± 0.70 ^{acd}	6.47 ± 1.12 ^{abcd}
<i>F</i>		0.040	40.330	33.20

注:反加组 I:低剂量雌激素组;25 μg/(kg·d);反加组 II:中剂量雌激素组;50 μg/(kg·d);反加组 III:高剂量雌激素组;100 μg/(kg·d)。与同组治疗前比较,^a*P* < 0.05;与同组治疗 4 周比较,^b*P* < 0.05;与对照组同一时间点比较,^c*P* < 0.05;与 GnRH-a 组同一时间点比较,^d*P* < 0.05。

Note. Add-back group I: low-dose estrogen group; 25 μg/(kg·d); Add-back group II: medium-dose estrogen group; 50 μg/(kg·d); Add-back group III: high-dose estrogen group; 100 μg/(kg·d). Compared with the same group before treatment, ^a*P* < 0.05; compared with the same group at the 4th week, ^b*P* < 0.05; compared with the control group at the same time, ^c*P* < 0.05; compared with the GnRH-a group at the same time, ^d*P* < 0.05.

3 讨论

子宫内膜异位症是一种雌激素依赖性疾病,治疗后易复发,其机制尚不清楚。临床上评估子宫内膜异位症复发的依据为:(1)症状:以盆腔疼痛为主诉,达到甚至超过术前水平;(2)盆腔检查:再次出现包块,直肠陷窝触痛结节等;(3)B 超示卵巢囊肿,囊肿为中低回声,甚至出现点状强回声;(4)血清 CA125 降低后再次升高。但确诊,仍需使用腹腔镜检查通过组织学证实。考虑到反复使用腹腔镜的伦理及实际应用问题,本实验采用大鼠子宫内膜异位症模型进行研究。

GnRH-a 现已广泛应用于治疗子宫内膜异位症,本研究应用亮丙瑞林治疗大鼠子宫内膜异位症模型发现,第 4 周,研究组较对照组体积明显缩小,血清 CA125 水平下降,而对照期内异症模型体积增大,提示亮丙瑞林对大鼠子宫内膜异位症模型疗效肯定。GnRH-a 治疗过程中机体血清雌二醇迅速降低至绝经期水平,若机体长期处于低雌激素血症状态,可出现潮热、盗汗、阴道干燥、头痛等血管舒缩症状及不可逆的骨丢失等不良反应^[8,14]。长期低雌激素血症,会引起原始卵泡减少,卵泡闭锁,导致卵巢功能受损^[9]。为缓解低雌激素血症症状,保护卵巢功能,近年来提出“反添加”疗法,即 GnRH-a 与类固醇激素联合应用。如何调节 GnRH-a 和类固醇激素的用量和应用时间的长短仍是值得我们研究的问题,脉冲式加用性激素是否会激惹隐伏的雌激素敏感组织,从而导致疾病提前复发的的问题值得我们进一步探讨。

本研究采用不同剂量雌激素进行反添加,在第 7 周时,研究组大鼠腹壁异位病灶体积较第 4 周均有不同程度增大,提示停药后可能出现了子宫内膜异位症的复发倾向,反加应用中、高剂量雌激素组较低剂量雌激素组和单纯应用 GnRH-a 组体积增大明显,且反加应用中、高剂量雌激素组血清 CA125 较治疗第 4 周升高,提示反加应用中、高剂量雌激素可能加速了内异症的复发。进一步说明内异症是一种雌激素依赖性疾病,对内异症的反加治疗应注意雌激素的应用剂量,与 Barbieri^[10]的研究结论一致。

TNF-α 是一类具有多种生物活性的细胞因子,由激活的单核细胞、淋巴细胞和巨噬细胞等产生,在生理状态下,TNF-α 参与调节胚胎着床、卵泡发育、免疫监视、抗肿瘤等环节^[11];在病理状态下,TNF-α 可介导炎症反应和免疫反应。TNF-α 在子宫内膜异位症发生发展过程中炎症浸润、新生血管形成、粘连的形成等环节发挥了巨大作用。TNF-α 不仅可以诱导 IL-6、IL-8 等炎症因子释放,诱导新生血管生成,还可以促进间质细胞和间皮之间的粘附,刺激子宫内膜间质细胞的生成^[12],可能在子宫内膜异位症的形成和发展中发挥了重要作用。本研究发现,用药前,TNF-α 在子宫内膜异位组织中高表达,提示高水平的 TNF-α 可能促进了内异症的发生、发展的过程;第 4 周,研究组子宫内膜异位灶组织中 TNF-α 表达降低,提示 GnRH-a 对子宫内膜异位症大鼠模型有较好的治疗作用;在停药观察 3 周后,反加中、高剂量雌激素组较反加低剂量雌激素组和单纯应用 GnRH-a 组大鼠子宫内膜异位症组织

TNF- α 表达高,提示中、高剂量雌激素可能通过提高 TNF- α 表达促进子宫内膜异位症的复发,其可能机制为中、高剂量雌激素刺激单核细胞、淋巴细胞和巨噬细胞再次分泌 TNF- α ,增高的 TNF- α 促进异位内膜炎症细胞因子 IL-6、IL-8 等的释放,进而诱发异位内膜及基质细胞增殖、血管再生、刺激成纤维细胞增殖及胶原合成,从而再次形成异位病灶。

Attar^[13]等发现子宫内膜异位细胞含有类固醇生成的完整基因,能将胆固醇从头合成雌二醇。StAR 是类固醇激素合成的重要限速酶,可将胆固醇从线粒体的外膜转运至内膜,在其它类固醇激素合成酶如 P450_{scc}、芳香化酶等的作用下,合成雌二醇^[15]。子宫内膜异位组织可以通过 StAR 从头合成雌激素,造成局部高雌激素状态,加速子宫内膜异位症进展。激活的巨噬细胞能够产生各种类型的细胞因子和 PGs, PGE₂ 能诱导 StAR 表达^[16],促进局部雌激素的合成,为子宫内膜异位症的形成与发展打下基础。本研究发现,用药前,StAR 在大鼠子宫内膜异位病灶组织中表达增高,提示 StAR 可能参与了大鼠内异症的发生发展,用药第 4 周,研究组 StAR 表达降低,再次说明 GnRH-a 对子宫内膜异位症大鼠模型有较好的治疗作用,在停药观察 3 周后,反加中、高剂量雌激素组较低剂量雌激素组和单纯应用 GnRH-a 组大鼠子宫内膜异位症组织 StAR 表达高,提示中、高剂量雌激素可能通过诱导 StAR 的高表达促进子宫内膜异位症的复发,其机制可能为中、高剂量的雌激素作用下,异位内膜组织中巨噬细胞的数量增加,激活的巨噬细胞分泌 PGE₂,上调了 StAR 的表达,外周组织中胆固醇芳香构化,局部合成雌激素,雌激素与雌激素受体结合,启动雌激素介导的信号通路,诱导相关细胞因子参与并促进子宫内膜异位病灶的再次形成。

综上所述,GnRH-a 反加低剂量雌激素治疗大鼠内异症模型可有效缩小病灶,降低 TNF- α 、StAR 及 CA125 的表达,疗效确切。但反向添加中、高剂量雌激素可能加速了大鼠子宫内膜异位症的复发,TNF- α 、StAR 表达的再次升高可能是子宫内膜异位症复发的机制。但本实验样本量较小,随访时间较短,尚需大样本、长时期随访进一步研究证实。另本实验为动物实验,在对人的临床应用中尚存在一定差距,还需循证医学证据。

参考文献:

[1] Dunselman GA, Vermeulen N, Becker C, et al. ESHRE guideline: management of women with endometriosis [J]. Hum Reprod, 2014, 29(3): 400-412.
[2] Guo SW. Recurrence of endometriosis and its control [J].

Human Reprod Update, 2009, 15(4): 441-461.
[3] Tandoi I, Somigliana E, Riparini J, et al. High rate of endometriosis recurrence in young women [J]. Pediatr Adolesc Gynecol, 2011, 24: 376-379.
[4] Granese R, Perino A, et al. Gonadotrophin-releasing hormone analogue or dienogest plus estradiol valerate to prevent pain recurrence after laparoscopic surgery for endometriosis: a multicenter randomized trial [J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2015, 94(6): 637-645.
[5] 李龙卫, 王艳云, 陈琦, 等. 提高大鼠子宫内膜异位症建模成功率的新方法 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(3): 81-85.
[6] Ercan CM, Kayaalp O, Cengiz M, et al. Comparison of efficacy of bromocriptine and cabergoline to GnRH agonist in a rat endometriosis model [J]. Arch Gynecol Obstet, 2015, 291(5): 1103-1111.
[7] Hurst BS, Gardner SC, Tucker KE, et al. Delayed oral estradiol combined with leuprolide increases endometriosis-related pain [J]. JSLS, 2000, 4: 97-101.
[8] Strowitzki T, Marr J, Gerlinger C, et al. Dienogest is as effective as leuprolide acetate in treating the painful symptoms of endometriosis: a 24-week, randomized, multicenter, open-label trial [J]. Hum Reprod, 2010, 25: 633-641.
[9] 杨群爱, 伊碧霞. GnRH-a 联合反向添加疗法在卵巢恶性生殖细胞肿瘤患者保留生育功能手术后化疗中的临床观察 [J]. 浙江医学, 2013, 35(21): 1893-1896.
[10] Barbieri RL. Hormone treatment of endometriosis: the estrogen threshold hypothesis [J]. Am J Obstet Gynecol, 1992, 166(2): 740-745.
[11] Salomon BL, Leclerc M, Tosello J, et al. Tumor necrosis factor α and regulatory T cells in oncoimmunology [J]. Front Immunol, 2018, 9(2): 444.
[12] Burns KA, Thomas SY, Hamilton KJ, et al. Endometriosis in females is directed by immune-mediated estrogen receptor α and IL-6 cross-talk [J]. Endocrinology, 2018, 159(1): 103-118.
[13] Attar E, Tokunaga H, Imir G, et al. Prostaglandin E2 via steroidogenic factor-1 coordinately regulates transcription of steroidogenic genes necessary for estrogen synthesis in endometriosis [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2009, 94(2): 623-631.
[14] Agarwal SK, Daniels A, Imir G, et al. Treatment of endometriosis with the GnRH-a deslorelin and add-back estradiol and supplementary testosterone [J]. Biomed Res Int, 2015, 2015: 934164.
[15] Xu JN, Zeng C, et al. Metformin inhibits StAR expression in human endometrial stromal cells via AMPK-mediated disruption of CREB-CRTC2 complex formation [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2014, 99(8): 2795-2803.
[16] Tian Y, Kong B, Su S, et al. Expression of steroidogenic factor 1 (SF-1) and steroidogenic acute regulatory protein (StAR) in endometriosis is associated with endometriosis severity [J]. J Int Med Res, 2009, 37(5): 1389-1395.

裸鼠原位肝癌动态影像检查与病理对照研究

沈智勇, 陈瑜凤, 邵晶晶, 沈爱军, 丁勇生, 李 君

(南通市肿瘤医院影像科, 江苏 南通 226361)

【摘要】 目的 影像学动态监测裸鼠原位肝癌建模后肿瘤生长并与病理对照, 判断干预治疗的合适时期。**方法** HepG2 细胞注射裸鼠皮下, 成瘤后切成 1 mm^3 组织块, 植入 15 只裸鼠肝内。建模后第 4、6、8 周分别对 5 只裸鼠进行超声、磁共振成像 (magnetic resonance imaging, MRI) 检查, 测量肿瘤长径, 完毕麻醉处死裸鼠, 解剖观察肝成瘤状况, 测量肿瘤长径, 标本送病理。**结果** 裸鼠肝癌成瘤率 80%, 肿瘤均为单个, 边界清晰。超声检出率 75%, MRI 检出率 100%。4 周时肿瘤平均长径 4 mm, 6 周时平均长径 7 mm, 8 周时平均长径 11 mm。Wilcoxon 秩和检验, 超声与解剖比较, $P=0.0059$, MRI 与解剖比较, $P=0.208$ 。4、6 周时监测, 肝癌超声表现均匀低回声; T2WI 表现为边界清晰、均匀一致高信号; 病理表现瘤细胞致密、核大、异型性明显。8 周时监测, 超声表现为不均匀低回声; T2WI 为形态不规则高信号, 中心杂乱、分布不均; 病理表现为肿瘤内部坏死。**结论** 组织块建模裸鼠原位肝癌成瘤率高。影像学特征与病理表现相关。MRI 是全程监测肿瘤生长的有效影像学方法。 1 mm^3 瘤块接种裸鼠肝, 4~6 周可能是进行干预治疗的最佳时期。

【关键词】 裸鼠; 肝; 原位癌; 模型; 超声; 磁共振成像

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0074-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.013

Scheduled imaging and pathological analysis of an orthotopic hepatic carcinoma model in nude mice

SHEN Zhiyong, CHEN Yufeng, SHAO Jingjing, SHEN Aijun, DING Yongsheng, LI Jun

(Department of Imaging, Nantong Tumor Hospital, Nantong 226361, China)

【Abstract】 Objective Periodical imaging to monitor tumor growth in nude mice by pathology after establishment of an orthotopic liver cancer model to determine the appropriate treatment time. **Methods** HepG2 hepatoma cell line was injected into nude mice subcutaneously. The subcutaneous tumors were then cut into 1 mm^3 pieces and implanted into the livers of 15 nude mice. After model establishment, five nude mice in each group were examined by ultrasound (US) and magnetic resonance imaging (MRI), and the longitudinal diameter of the tumors was calculated at weeks 4, 6 and 8. Then, the nude mice were sacrificed and anatomized by an anesthetic overdose for observation of liver tumor formation, longitudinal diameter calculation, and pathological examination. **Results** An 80% tumor formation rate was observed in the nude mouse liver with uniform, focal, and solitary tumors. The detection rates of US and MRI were 75% and 100% respectively. The average longitudinal diameter of the tumors at 4, 6, and 8 weeks were 4, 7, and 11 mm, respectively. The Wilcoxon rank sum test revealed a significant difference between US and anatomical calculation ($P=0.0059$), and no significant difference between MRI and anatomical calculation ($P=0.208$). At 4 and 6 weeks, the liver tumors in nude mice manifested with a homogeneous hypoecho in US, regular morphology and uniform strong signals with a clear boundary

【基金项目】 江苏省六大人才高峰项目(2015-WSW-081); 南通市科技计划项目(MS12016033)。

【作者简介】 沈智勇(1971—), 男, 主任医师, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 实验动物学、超声诊断与治疗肿瘤。E-mail: ntszy1426@

in T2WI, and compact atypical tumor cells with a large nucleus in pathological observation. At 8 weeks, the tumors presented with a heterogeneous echo in US, irregular shape and heterogeneous strong signals in T2WI, and obvious central necrosis in pathological observation. **Conclusions** Intrahepatic tissue implantation is effective for mouse model establishment of orthotopic hepatic carcinoma. The imaging features are correlated with the pathological findings. MRI is an effective imaging method to monitor the tumor growth throughout the entire course. Between 4 and 6 weeks after 1 mm^3 tumor tissue inoculation into the nude mouse liver may be the optimum period for initial tumor treatment.

[Keywords] nude mice; liver; orthotopic tumor; model; ultrasound; magnetic resonance imaging (MRI)

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤,疗效差,死亡率高^[1]。加强肝癌的防治研究,必要且迫切。建立一个合适的动物肝癌模型对于探索人类肝癌治疗新方法有重要价值。常用的肝癌模型有皮下肿瘤模型及原位肿瘤模型^[2-3]。皮下肿瘤模型方法简便、可以直观肿瘤生长。而原位肿瘤模型体现了人原发瘤浸润的恶性行为和生长状态,更接近人肝癌的生物学行为^[4-6]。目前肝原位癌模型使用日益增多,但肿瘤接种后,判断肿瘤生长状况,动态观察模型与病理的相关性,报道较少。故本研究使用瘤块接种裸鼠肝,形成原位肿瘤后,使用超声、MRI 检查,并与大体解剖、病理对比,以了解影像学诊断在监测肿瘤生长中的价值,评估进行干预治疗的合适时期。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

BALB/c 裸鼠 17 只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2017-0005],鼠龄为 5~6 周,体重 20~22 g,均为雄性(雄裸鼠较雌裸鼠成瘤率高^[7],且避免激素依赖性干扰实验结果^[8]),分笼饲养于南通大学动物实验中心 SPF 级动物房[SYXK(苏)2017-0046],灭菌水和饲料供动物自由摄入。实验动物饲养及实验处理均严格遵循南通大学动物中心实验动物福利与伦理委员会相关指南要求(IACUC 20170303-002)。研究过程中做到按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.1.2 细胞株

人肝癌细胞株 HepG2(南通市肿瘤医院中心实验室提供)。

1.2 主要试剂与仪器

细胞培养基(DMEM)、BI 血清、胰酶购自 Hyclone 公司;戊巴比妥钠购自 Sigma 公司。倒置显微镜购自日本 Olympus 公司;超声检查仪购自美国 Philips 公司;MRI 检查仪购自德国 Siemens 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 肝癌细胞复苏及培养

液氮罐中取出 HepG2,37℃ 水浴解冻。细胞移至离心管,滴加 10% DMEM 培养基。离心 600 r/min 7 min。弃上清液,再加 DMEM 培养。待细胞长到密度约 90% 时,弃上清液,PBS 两次、加胰酶 2 mL,消化 3~5 min,待细胞变成圆形,呈漂浮状态,再离心 600 r/min 7 min,弃上清,滴加 DMEM。共培养两瓶,每瓶长满约 1×10^7 个细胞。

1.3.2 裸鼠皮下肿瘤建模

收集已培养细胞,计数后调整浓度为每 0.2 mL 里包含 1×10^7 个细胞。取裸鼠 2 只,每只裸鼠右背部皮下注射细胞悬浮液 0.2 mL。

1.3.3 裸鼠原位肝癌建模

待皮下移植瘤长到直径约 0.8 cm 时,进行原位肿瘤建模。建模在 SPF 屏障环境内进行。四位实验医师,分成两组,每组两人,同时进行,对 15 只裸鼠进行建模。无菌条件下分别切取 2 只裸鼠的皮下肿瘤,去除坏死组织后切成 1 mm^3 瘤块,麻醉裸鼠(戊巴比妥钠,腹腔注射 70 mg/kg),以 0.2% 碘伏消毒裸鼠腹部,行右肋缘下斜切口,长约 2 cm,打开腹腔、暴露肝,以 10 mL 注射器的针头与肝右叶成 15° 角刺入肝被膜,深度约 0.6 cm,无菌棉签压迫 8 s 止血,取上述一块 1 mm^3 瘤组织,用 5 mL 注射器针头经创口植入裸鼠肝右叶被膜下隧道内,立即采用 α -氰基丙烯酸酯快速医用胶(OB 医用吻合胶)(广州白云医用胶有限公司,1 mL/支,广东,中国)滴注隧道口,确保瘤块无溢出,创面无出血,逐层关腹。每只裸鼠平均手术时间 5~7 min。动物维持麻醉状态 30~40 min 后清醒,送回笼中 SPF 条件饲养。

1.3.4 影像学监测肿瘤生长

15 只裸鼠建模后,于第 4 周随机选择 5 只裸鼠、第 6 周剩余 10 只中随机选择 5 只裸鼠、第 8 周最后剩余 5 只裸鼠分别进行影像学检查,每次影像检查后,处死裸鼠,不再送回屏障环境饲养。影像检查包括超声、MRI。超声采用临床用检查病人的

美国飞利浦公司 Philips iu-22 彩色多普勒超声诊断仪,探头频率 12 MHz。裸鼠麻醉(戊巴比妥钠 70 mg/kg)后上腹部扫查,观察肝声像图,仔细寻找肝内异常回声。MRI 采用临床用检查病人的德国西门子公司 Siemens Espree 3.0 T MRI,行常规平扫。裸鼠麻醉(戊巴比妥钠 70 mg/kg)后放置在动物专用特殊线圈内(图 1),进行 T1WI、T2WI 相检查,发现 T2WI 较 T1WI 更加清晰显示肿瘤,且扫查时间更短,故均以 T2WI 进行扫查。T2WI: TR3140 ms、TE81 ms、横轴位层厚 6 mm、层间距 1 mm。FOV:64 mm×64 mm,base resolution:256。



图 1 裸鼠 MRI 线圈

Figure 1 MRI coils for the nude mice

1.3.5 病理检查

超声、MRI 检查结束后,过量戊巴比妥钠(腹腔注射 100 mg/kg)处死裸鼠,解剖尸体,查看肝,仔细寻找是否有肿瘤存在,明确肿瘤数目、形态、包膜、腹腔有无转移结节等。如有肿瘤,测量长径。后取肿瘤,4% 甲醛浸泡,送病理。石蜡包埋、HE 染色。

1.4 统计学方法

建模后对裸鼠肝肿瘤进行影像学、解剖测量。15 只裸鼠分成三个不同时期,每期 5 只。每只裸鼠影像、解剖分别进行一次准确测量。先运用超声、MRI 测量肿瘤长径(肿瘤最长径的长度代替面积来代表肿瘤大小的一维测量法,或称单径测量法,可简化测量步骤、提高准确性、减少误差^[9])。未见肿瘤显示,数据以“0”表示。然后,处死裸鼠,大体标本测量肿瘤长径,没有成瘤的,肝肿瘤数据以“0”表示。解剖测量与超声、MRI 结果进行比较。计量资料,非正态分布,采用 Wilcoxon 秩和检验。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 建模过程

使用 1 mm³ 肿瘤组织块通过肝创面进入隧道后,立即滴注微量(约 0.05 mL)OB 医用胶,迅速形成淡淡的薄膜,封闭隧道口,2~3 s 后胶体干燥。每只裸鼠的接种肿瘤的时间平均为 6 min。术中平均出血量 0.2~0.3 mL。通常鼠肝血供丰富,组织脆而易破,普通针眼易出血不止,种植的瘤块易脱落、异位^[10]。OB 胶透明、粘接强度大^[11],迅速粘固鼠肝创面、无需缝合肝被膜,节约实验时间。还可彻底止血、覆盖肿瘤组织、避免瘤块脱出^[10]。

2.2 建模成瘤率

采用瘤块接种 15 只裸鼠肝后,12 只形成肿瘤,3 只未成瘤。成瘤率 80%。成瘤肝肿瘤均呈单发结节、边界清晰、包膜完整。至第 8 周,肝内未见转移、腹腔未见转移灶。

2.3 影像学结果

2.3.1 超声结果

超声检出率为 75% (9/12)。建模后第 4 周进行超声检查,4 例成瘤肝超声仅发现 1 例肿瘤,超声显示鼠肝见低回声,边界清,内部回声均匀(图 2)。其余 3 只未见明显占位病变。6 周时,鼠肝见边界清晰的低回声,圆形或椭圆形,内部回声均匀(图 3)。8 周时,鼠肝见形态欠规则低回声,内部回声不均匀,中心散在点状强回声、高回声(图 4)。不同时期超声测量结果见表 1。

2.3.2 MRI 结果

MRI 检出率为 100% (12/12)。肿瘤接种 4 周后 MRI 监测,T2WI 显示正常裸鼠肝为均匀低信号,肿瘤为高信号,边界清晰,信号均匀(图 2)。6 周时,T2WI 右肝异常高信号,边界清晰,其内信号均匀(图 3)。8 周时,T2WI 示形态不规则的高信号,中心杂乱,分布不均,可见斑片状低信号(图 4)。肿瘤压迫周围脏器组织。不同时期 MRI 测量结果见表 1。

2.4 病理结果

大体形态学观察:裸鼠解剖后,探查 15 只裸鼠肝,12 只发现瘤结节,3 只未发现结节。成瘤结节边界清晰,形态圆形、椭圆形或分叶状,包膜完整。肝内未见子灶、转移灶。腹腔及其他脏器未见转移灶,未见腹水。4 周时肝癌结节平均长径 4 mm、6 周时平均长径 7 mm、8 周时平均长径 11 mm。见表 1。

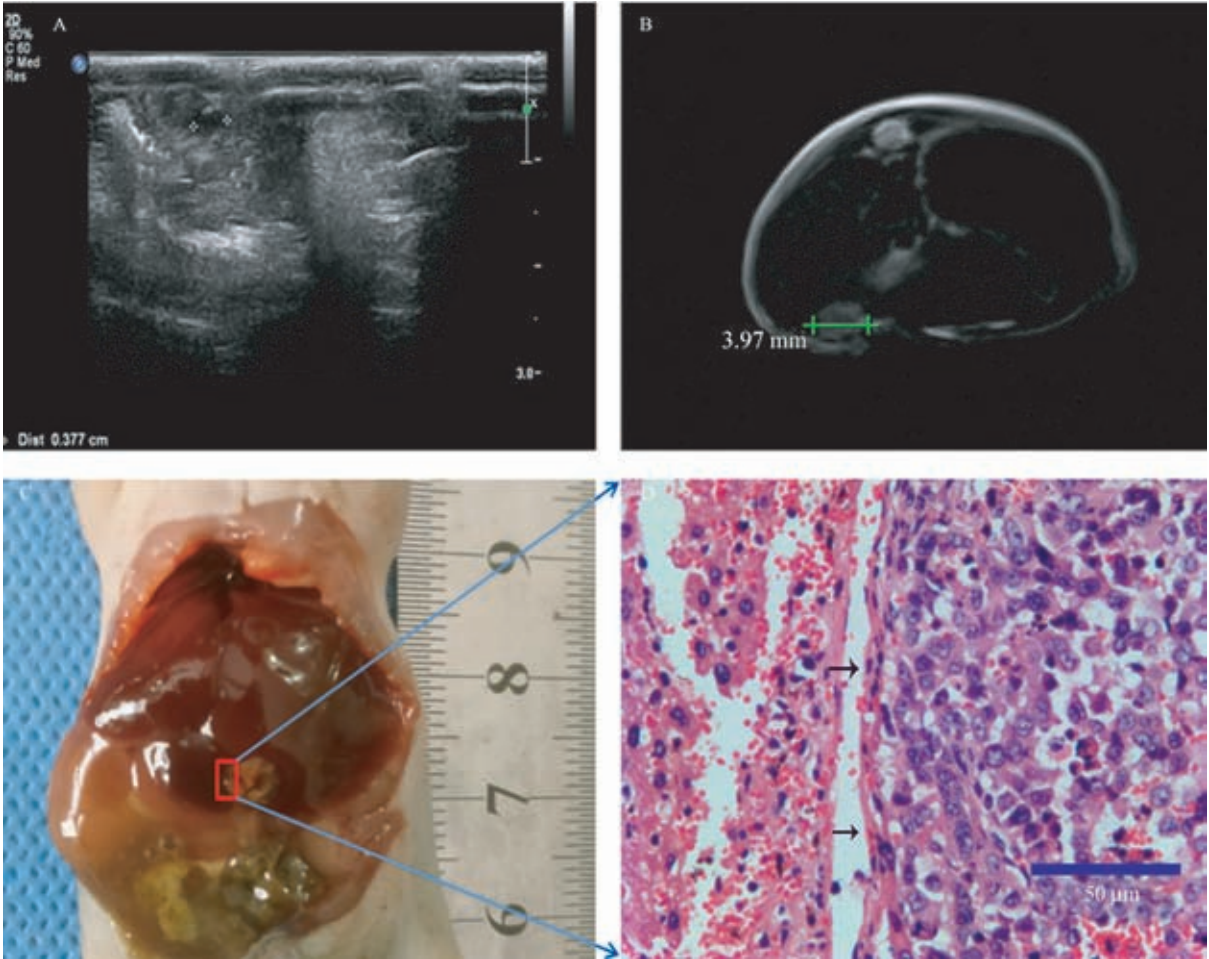
HE 染色:4 周时,瘤结节与正常肝分界清晰(箭头示)。正常肝细胞清晰、排列整齐,无核分裂相,而肿瘤细胞排列成实性、片状、异型性明显,细胞核不规则,核仁易见,分裂相多见(图 2)。6 周时 HE

染色显示瘤细胞核大、排列致密、分布不均匀,未见坏死(图 3)。8 周时示瘤细胞排列不齐、稀疏、分布不均,中心坏死明显(图 4)。

表 1 建模后裸鼠肝癌影像、解剖测量比较表(mm)

Table 1 Comparison of the tumor calculation between imaging and anatomy after model establishment in the nude mice																
分类 Classification		第 4 周检查 5 只裸鼠 Detection of five mice at the fourth week					第 6 周检查其他 5 只裸鼠 Detection of the other five mice at the sixth week					第 8 周检查剩余 5 只裸鼠 Detection of the remaining five mice at the eighth week				
Magnetic resonance imaging (MRI)	超声* Ultrasound (US)	3.8	0	0	0	0	6.9	7.9	0	6.1	7.2	12.6	10.2	9.2	0	11.9
	磁共振成像▲ Magnetic resonance imaging (MRI)	4.0	4.8	4.3	4.9	0	6.8	8.1	0	6.4	7.1	13.3	10.8	9.8	0	12.4
	解剖 Anatomy	3.9	4.4	4.4	4.8	0	6.7	8.2	0	6.2	7.1	13.2	10.9	10.1	0	12.2

注: * 超声与解剖比较, $P < 0.05$,差异有显著性;▲磁共振成像与解剖比较, $P > 0.05$,差异无显著性。
Note. * There was a significant difference between US and anatomy measurement, with $P < 0.05$. ▲ There was no significant difference between MRI and anatomical measurement, with $P > 0.05$.



注:A、B、C、D 分别为超声、T2WI、解剖、HE 染色($\times 200$,箭头左侧为正常肝细胞、右侧为癌细胞)结果。
图 2 建模后 4 周影像学与大体测量及病理对比
Note. A - D: Results of ultrasound, T2WI, anatomical measurement, and HE staining ($\times 200$, normal liver cells are on the left side of the arrows, carcinoma cells are on the right side), respectively.
Figure 2 Imaging calculation, gross measurement, and pathological comparison at 4 weeks after model establishment

2.5 统计学结果

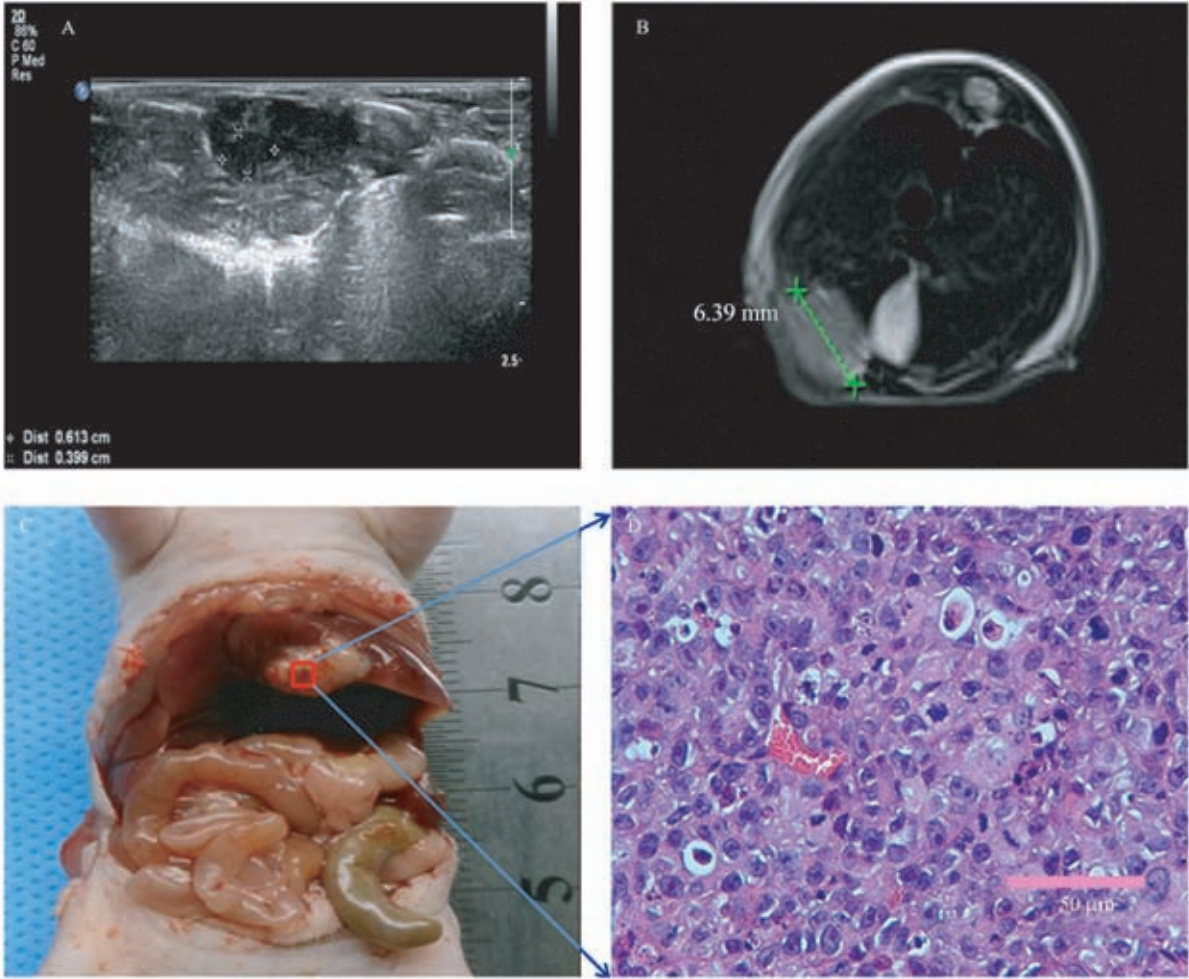
超声检查第 4 周漏诊 3 例,测量结果以“0”表示,超声全程测量的 15 个数据呈非正态分布,故统计采用秩和检验,超声测量与解剖测量比较, $P=0.0059$ 。MRI 未见漏诊,MRI 测量与解剖测量比较, $P=0.208$,差异无显著性,表明 MRI 是全程监测肿瘤生长的有效影像方法。

3 讨论

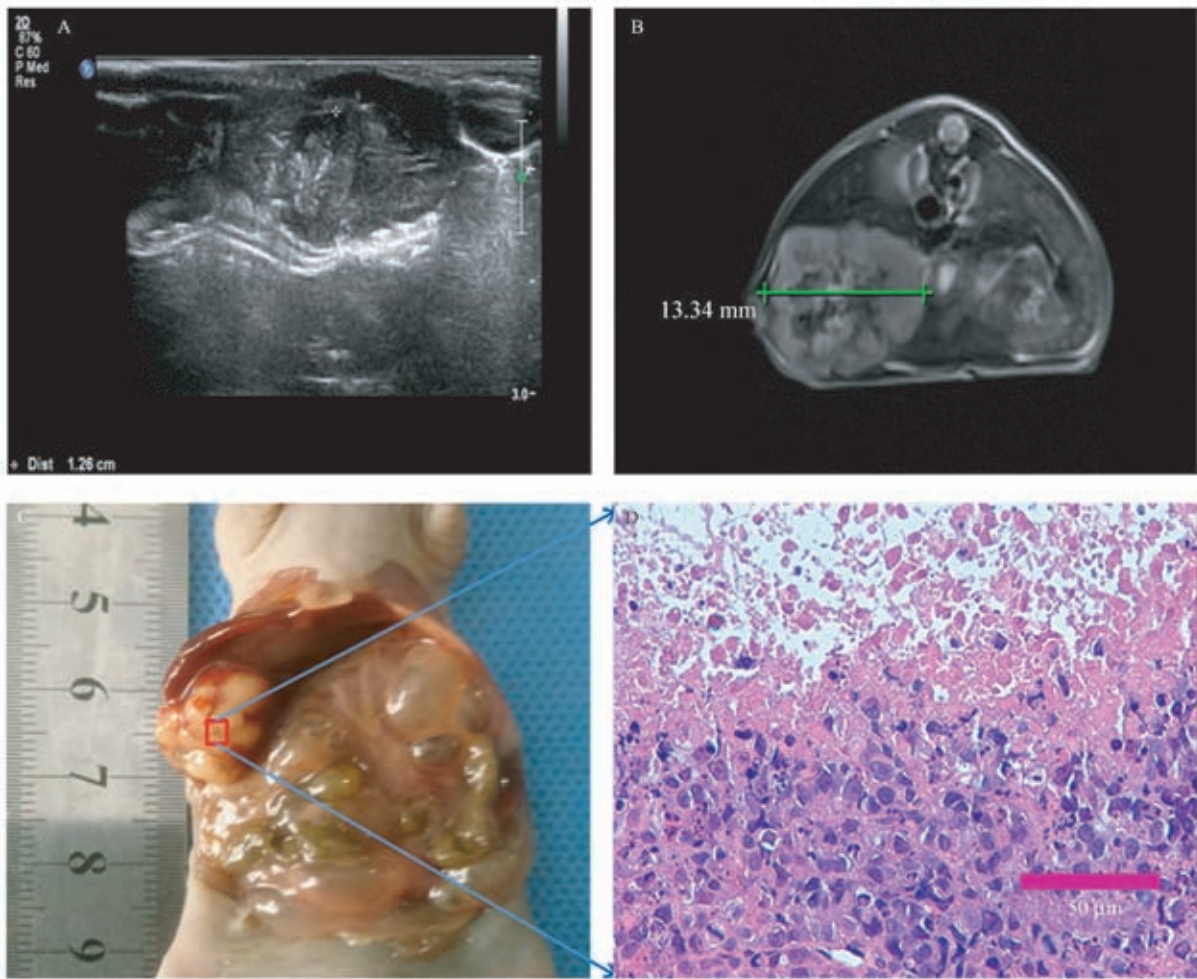
本研究显示:瘤块接种裸鼠肝,成瘤率 80%,肿瘤均为单发结节、边界清晰、包膜完整。肝原位癌建模方法有:肝、脾(瘤细胞通过脾静脉、门静脉入肝)瘤细胞注射接种法、瘤组织块肝接种法等^[12]。后者与前两者比较,操作稍复杂,耗时多,但重复性好^[10],潜伏期短、成瘤快。有报道^[13]瘤块接种肝 2

周后,形成 0.5 cm 肿瘤。而使用肝癌细胞(2×10^6)接种肝 2 周后,瘤结节仅 0.1 cm。脾内瘤细胞(2×10^6)注射 4 周后,肝内肿瘤也仅 0.1 cm。Rao 等^[13]一次使用 2~3 个 1 mm³ 的瘤块植入裸鼠肝,2 周后建模成功,直径达 0.5 cm。我们接种 4 周后,肿瘤直径 4 mm。他们成瘤比我们的快而大,考虑是因为一次植入了更多瘤组织。我们实验中有 3 例未成瘤,可能原因是接种肿瘤时,瘤块离体时间过长(最长时间 48 min),瘤块缺血、癌细胞活性下降所致。

肿瘤影像学结果显示:超声 4 周时发现 1 例肿瘤,漏诊 3 例,漏诊原因分析:鼠肝为中等回声,而肿瘤为稍低回声(图 2~3),肿瘤与正常肝回声差别低,不易区分。其次,肿瘤直径小,又受肝旁腹腔气体干扰,故易漏诊。本研究使用临床检查超声仪,探头频率 12 MHz,分辨率在 mm 级别。高分辨率小



注:A、B、C、D 分别为超声、T2WI、解剖、HE 染色($\times 200$)结果。
图 3 建模后 6 周,影像学与大体测量及病理对比
Note. A-D: Results of ultrasound, T2WI, anatomical measurement, and HE staining ($\times 200$), respectively.
Figure 3 Imaging calculation, gross measurement, and pathological comparison of a tumor at 6 weeks after model establishment



注：A、B、C、D 分别为超声、T2WI、解剖、HE 染色 (× 200) 结果。

图 4 建模后 8 周,影像学与大体测量及病理对比

Note. A – D: Results of ultrasound, T2WI, anatomical measurement, and H-E staining (× 200), respectively.

Figure 4 Imaging calculation, gross measurement, and pathological comparison of a tumor at 8 weeks after model establishment

动物超声成像系统探头频率 30 ~ 60 MHz,分辨率达 30 μm^[14],可更清晰显示肝实质回声及更细微结构,更准确评价肿瘤接种效果。我们未来也可使用该种仪器,进行更精细的研究。

T2 相 MRI 检查,肿瘤与正常肝组织信号强度差别明显。T2WI (Philips 1.5 T) 显示,大鼠肝为低信号,原位肝癌结节呈高信号^[9]。T2WI (Philips 1.5 T) 裸鼠皮下肝癌模型为高信号,有轻微-中等强化^[15]。我们研究发现,T2WI (Siemens 3.0 T 临床用仪器) 配以特殊线圈 (图 1),裸鼠原位肝癌高信号 (图 2 ~ 3),正常鼠肝低信号,差别大,对比度高,肿瘤检出率高,达 100%。虽然 7.0 T MRI 较 3.0 T MRI 能够提供更高图像对比度和分辨率。但在更高的磁场强度扫描,受检者需要忍受更多的不适感,如更大分贝噪音干扰、头晕、眩晕、恶心、金属味

感等^[16]。本研究使用临床用 MRI 配以小动物线圈,获得足够图像分辨率;且 MRI 测量肿瘤长径与病理测量长径比较,差异无显著性。3.0 T 临床用 MRI 配以动物线圈是全程监测裸鼠肿瘤生长的有效影像方法。

通过动态影像学监测,发现鼠肝癌不断生长,影像表现也不断变化。瘤块接种后 4 ~ 6 周,肝癌超声表现为境界清晰的低回声占位,内部回声均匀,无钙化。同期 MRI 均匀高信号。病理显示,癌细胞致密、实性、片状、异型明显。8 周时超声表现为实性不均质低回声,中心回声增高,分布不均。同期 MRI 内部信号杂乱,强弱不均。HE 染色肝癌中心大片坏死。研究结果显示:不同时期肿瘤的影像表现可以准确反映不同时期肿瘤的病理变化。4 ~ 6 周时,肝肿瘤生长旺盛,是开始对肿瘤干预处理、进

行治疗的最佳时期。到第 8 周后,肿瘤中心有坏死,干预治疗选择时期可能太晚。

本研究局限性:影像学研究没有在第 5、7 周进行,主要原因是 MRI 价格昂贵、费时费力,只是在间断时期进行。其次,研究仅进行了超声、MRI 的常规检查,没有运用造影剂对肿瘤的血供状况进行检查,以后可以使用对比剂对肿瘤微血管进行更详细研究。

总之,采用瘤块接种法,裸鼠原位肝癌成瘤率高。MRI 是全程监测肿瘤生长的良好的影像学方法,影像学表现与病理存在相关性。1 mm³ 的肿瘤组织块接种后 4 ~ 6 周,裸鼠肝原位癌肿瘤生长旺盛,是进行干预治疗的最佳时期。

参考文献:

[1] 黄昊,李宝亮,杨星九,等. 肝癌人源肿瘤异种移植模型构建及初步应用 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 60 – 65.

[2] 唐恩奇,李滨,蒋欢欢,等. 构造肝癌动物模型的研究进展 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2016, 25(8): 857 – 859.

[3] Reiberger T, Chen Y, Ramjiawan RR, et al. An orthotopic mouse model of hepatocellular carcinoma with underlying liver cirrhosis [J]. Nat Protoc, 2015, 10(8): 1264 – 1274.

[4] Lee TK, Na KS, Kim J, et al. Establishment of animal models with orthotopic hepatocellular carcinoma [J]. Nucl Med Mol Imaging, 2014, 48(3): 173 – 179.

[5] An J, Zhao N, Zhang C, et al. Heptamethine carbocyanine DZ-1 dye for near-infrared fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(34): 56880 – 56892.

[6] He L, Tian DA, Li PY, et al. Mouse models of liver cancer: progress and recommendations [J]. Oncotarget, 2015, 6(27): 23306 – 23322.

[7] 张丽娜,林美桂,刘桃丽,等. 人肝癌细胞 HepG2 接种于 BALB/C 裸小鼠移植瘤的性别差异 [J]. 海南医学, 2017, 28(9): 1380 – 1382.

[8] 韩克起,顾伟,张亚妮,等. 裸鼠人肝癌原位移植模型的建立 [J]. 第四军医大学学报, 2004, 25(17): 封 2.

[9] 沈俊杰,李鹤平,张冰,等. Wistar 大鼠移植性肝癌模型的建立 [J]. 临床放射学杂志, 2011, 30(1): 112 – 114.

[10] 白俊文,苏秀兰,杨成旺. 人肝癌裸鼠皮下 – 肝原位移植瘤模型的建立 [J]. 内蒙古医学杂志, 2009, 41(3): 257 – 259.

[11] Zhuang A, Yang L, Liao R, et al. A facile method of preparing transparent superhydrophobic film based on ethyl alpha-cyanoacrylate and polydimethylsiloxane [J]. J Nanosci Nanotechnol, 2016, 16(2): 1531 – 1536.

[12] Ahmed SU, Zair M, Chen K, et al. Generation of subcutaneous and intrahepatic human hepatocellular carcinoma xenografts in immunodeficient mice [J]. J Vis Exp, 2013, 25(79): e50544.

[13] Rao Q, You A, Guo Z, et al. Intrahepatic tissue implantation represents a favorable approach for establishing orthotopic transplantation hepatocellular carcinoma mouse models [J]. PLoS One, 2016, 11(1): e0148263.

[14] 杨康敏,杨柳,朱海波. 超声影像分析在高脂血症金黄地鼠模型构建中的动态监测 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(4): 5 – 9.

[15] 魏光全,宦怡,赵海涛,等. 荷人肝细胞肝癌裸鼠模型的建立及其 MRI 研究 [J]. 临床放射学杂志, 2005, 24(1): 81 – 83.

[16] Chou IJ, Tench CR, Gowland P, et al. Subjective discomfort in children receiving 3 T MRI and experienced adults' perspective on children's tolerability of 7 T: a cross-sectional questionnaire survey [J]. BMJ Open, 2014, 4(10): e006094.

[收稿日期] 2018 – 04 – 08

三个远交系豚鼠微卫星遗传结构分析

刘迪文, 谭海明, 陈雁虹, 卫 振

(浙江大学实验动物中心, 杭州 310058)

【摘要】 目的 评估我校培育的三个远交系豚鼠种群的微卫星遗传结构, 筛选不同种群间呈现差异等位基因的微卫星位点, 为今后豚鼠遗传育种及应用提供资料。**方法** 使用45对引物通过PCR及电泳技术, 对我校三个豚鼠种群的微卫星DNA进行扩增分析, 计算各位点等位基因多态性等参数, 并筛选出种群间等位基因呈差异变化的微卫星位点。**结果** 所有微卫星位点在豚鼠种群中呈多态性变化, 各位点等位基因数2~7不等, 平均位点基因数2.29, 平均有效基因数1.74; 平均期望杂合度为0.39, 平均观测杂合度为0.21, 多态信息含量的可信范围为0.0739~0.6443, 平均PIC为0.32, 68.9%的位点呈中度多态性; 总Hardy-Weinberg平衡P值平均为0.1734, 各种群均为 $P > 0.05$, 但对每个位点的基因平衡状态来讲, 共有20个位点极显著偏离Hardy-Weinberg平衡, 种群平均偏离指数D为-0.407; 平均分化指数Fst为0.136, 平均基因流Nm为5.835, 还阐明了种群间的Nei遗传距离及遗传相似度。**结论** 三个豚鼠种群遗传呈中度多态性变化, 种群间平均遗传差异无显著性, 遗传相似度较高。群体遗传偏离Hardy-Weinberg平衡较突出, 出现严重的近交现象, 群体处于中等遗传变异水平, 但较高的基因流动阻止了遗传分化发生。分析这些问题的原因, 主要是本群体繁殖数量偏小, 种子选择范围不广泛等, 今后在培育过程中要引起重视。本课题还筛选到与不同种群或毛色豚鼠相关的微卫星位点12个, 种群特征性微卫星位点7个, 可能用于性状基因定位。

【关键词】 豚鼠; 远交系; 微卫星标记; 遗传多态性; 种群差异位点

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0081-08

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.014

Analysis of microsatellite genetic structures of three outbred strains of guinea pig

LIU Diwen, TAN Haiming, CHEN Yanhong, WEI Zhen

(Laboratory Animal Centre, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

【Abstract】 Objective To assess the genetical structures of three outbred strains of guinea pig and screen the microsatellite loci related to different groups of guinea pigs. **Methods** Using 45 primers, DNA of three groups of guinea pigs was analyzed by PCR and electrophoresis for genetic markers. Then, the polymorphism of these markers was calculated. In addition, the microsatellite locus related to different hair colors was screened in the three groups of guinea pig. **Results** All microsatellites loci showed polymorphism. The average number of allelic genes was 2.29 per locus and the average value of effective genes was 1.74 per locus. The average expected heterozygosity in total was 0.39. The average observed heterozygosity was 0.21. The average PIC was 0.32, and 68.9% of the loci showed moderate polymorphism. The average P-value of HW was 0.1734, but the inheritance in 20 loci of the total locus diverged extremely significantly from the HW balance. The average deviation index D was -0.407. The differentiation index Fst was 0.136. The gene flow Nm was 5.835. Nie genetic similarity of the three groups was low. **Conclusions** The genetic structures of the three guinea pig

groups show a moderate polymorphism. The genetic differences between the groups are not significant. Inheritance of groups diverged from the HW balance and inbreeding within the groups of guinea pigs is obvious. The main reason for these problems is that the number of guinea pigs used for reproduction is low and there are limitations to the approaches of choosing guinea pig seeds. In addition, 12 polymorphic microsatellite loci related to different groups of hair color of guinea pigs and seven specific loci are identified.

[Keywords] guinea pig; outbred strain; microsatellite marker; genetic polymorphism; diversity locus

豚鼠由于其特有的生物学性状,成为药理学、毒理学、免疫学、眼耳科疾病研究及疫苗研发等领域常用的实验动物,目前我国用于实验的豚鼠主要是英国种花色豚鼠及哈脱莱 DHP 远交系白色豚鼠^[1]。本课题组用上述两种豚鼠为亲本,培育出白色 Zmu-1: DHP 及黑色 Zmu-2: DHP 远交系豚鼠^[2-3],其特征是融合了英国种豚鼠遗传杂合性和 DHP 豚鼠遗传稳定性的特点。由于育种过程中采取了近交及选择措施,则同一位点的等位基因进行分离,重组到不同品系中,也可能某些性状与毛色基因连锁的缘故,因此,Zmu-1: DHP、Zmu-2: DHP 品系及英国种三种不同毛色的豚鼠,遗传及承载了不同的遗传特性^[4-6],成为研究某些正常生物学或疾病发生机理较理想的动物模型资源。

远交系动物遗传质量常需要借助于遗传标记,通过计算群体遗传结构的数量遗传指标来评估。微卫星是一种稳定可靠的第二代 DNA 分子遗传标记,其序列长度的变化引起群体或个体遗传标记出现差异,表现为同一微卫星位点上,远交系动物基因呈现遗传多态性,而近交系动物则呈现一致性。优良品质的远交系动物应具备基因多态性及遗传稳定性,利用多个微卫星标记可以评价动物遗传质量,另外,筛选出与性状连锁的微卫星位点能够通过遗传定位分析,辅助定位目的性状基因。相对大小鼠,将微卫星技术用于豚鼠遗传结构分析的文章较少,目前仅见朱亮^[7]、李芳芳^[8]、刘迪文^[9]及 Burgos-Paz^[10]等人报道。本文拟用 45 对多态性引物,分析本中心三个远交系豚鼠种群遗传结构的多态性,并从中筛选出与豚鼠特征性状连锁的微卫星位点,为评估豚鼠遗传质量,豚鼠品质资源维持及应用选择提供相关的遗传背景依据,同时为豚鼠优势性状基因定位及其机理研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

英国种花色豚鼠,于 70 年代引自浙江农村,引进后长期封闭远交繁殖;Zmu-1: DHP 白色豚鼠,

2000 年由英国种与 HDP 远交系白色豚鼠(1987 年引自中检所)通过杂交-近交-远交方式育成的远交系;Zmu-2: DHP 黑色豚鼠,Zmu-1: DHP 豚鼠培育同时分离出的另一远交系。三个种群豚鼠年龄约为 30 日龄,体重约 350 g,均为普通级,性别不论,使用数量分别为 15 只、20 只及 15 只[SCXK(浙)2012-0052]。豚鼠采用屏障设施开放饲养[SYXK(浙)2012-0178],0.9 m × 0.6 m × 0.25 m 塑料笼盒加铺灭菌木片及稻草作为垫料,饲喂颗粒饲料及自来水,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

DNA 提取试剂盒(Takara)、PCR 试剂盒(Promega)、聚丙烯酰胺(Sigma)、硝酸银(国产);冷冻离心机(Eppendorf)、Nanodrop-one(Thermo)、PCR 仪(ABI)、电泳仪(Bio-Rad)、凝胶成像仪(Bio-Rad),等等。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 模板提取

取三个种群豚鼠,每只心脏取血 1 mL,肝素抗凝。用试剂盒提取豚鼠 DNA,定量,ddH₂O 浓度调整至 30 ng/μL。

1.3.2 模板 PCR 扩增

选取文献^[11]介绍的其中 45 对引物,由 Invitrogen 公司合成。PCR 配方成分:10 × PCR Buffer(Mg²⁺) 2 μL,dNTP(2.5 mmol/L) 1 μL,rTaq(5 U/μL,Takara)0.2 μL,Primer F(10 mmol/L)0.5 μL,Primer R(10 mmol/L)0.5 μL,Template DNA(约 50 ng)1 μL,ddH₂O 补足至 20 μL。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min;然后进入 45 个循环,每循环包括 95℃ 变性 30 s,退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,各引物退火温度见文献^[11];最后 72℃ 延伸 5 min,4℃ 维持扩增产物。

1.3.3 PCR 产物电泳及条带分析

将 PCR 产物用 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳条件:电压 120 V,电泳时间 2 ~ 3 h,0.1% AgNO₃ 溶液染色,对电泳凝胶照像。按照小鼠电泳条带标

记法,标记豚鼠微卫星 PCR 产物电泳条带,从快到慢条带分别标记为 a、b、c、d 等。

1.4 统计学方法

根据每对引物对三个豚鼠种群扩增产物电泳条带的不同位置确定基因型,利用 POPGENE 3.2 软件统计三个群体在 45 个微卫星位点上的平均等位基因数 (Number of alleles)、平均有效等位基因数 (Number of effective alleles)、平均观测杂合度 (Observed heterozygosity)、平均期望杂合度 (Expected heterozygosity)、平均多态信息含量 (Polymorphism information content) 和平均 Hardy-Weinberg 平衡指数 (Hardy-Weinberg Equilibrium index)。同时,采用 Nei 方法计算群体间的遗传距离和遗传分化指数 F_{st} 。使用 MEGA 3.0 软件,采取 UPGMA 方法根据三个群体的遗传距离进行聚类。

2 结果

2.1 微卫星位点 PCR 产物电泳条带

45 对引物中两对引物扩增的 PCR 产物电泳图谱见图 1。可见三个豚鼠种群的微卫星位点 DNA 条带清晰、分辨率较高,在种群及个体间呈现遗传多态性,说明这些位点可作为豚鼠遗传结构分析及遗传质量检测的标记。

2.2 豚鼠微卫星位点基因型频率及数量统计

根据引物扩增产物作为电泳标记,统计豚鼠等位基因型频率、等位基因数及有效等位基因数,见表 1。从表中可见,三个豚鼠种群的大部分微卫星位点呈多态性变化,所有位点电泳条带在 2~7 条之间,其中 1 个位点有 7 个等位基因,1 个位点有 4 个等位基因,6 个位点有 3 个等位基因,37 个位点有 2 个等位基因。45 个微卫星位点共有等位基因 103

个,平均等位基因数 N_a 为 2.29,平均有效等位基因数 N_e 为 1.74。

2.3 三个豚鼠种群遗传多样性分析

计算得到的观测杂合度、期望杂合度及 PIC 见表 2。从中可见,三个种群的总平均期望杂合度 H_e 为 0.394,总平均观测杂合度 H_o 为 0.212。另外,三个豚鼠种群之间的期望杂合度及观测杂合度差异无显著性 ($P > 0.05$)。所有位点的多态信息含量 PIC 的可信度范围为 0.0739 ~ 0.6443,平均为 0.319,其中可信度 > 0.5 的高度多态性位点有 2 个,占 4.44%, $0.5 \sim 0.25$ 的中度多态性位点有 31 个,占 68.89%, < 0.25 的低度多态性位点有 12 个,占 26.67%。

2.4 豚鼠种群的哈代-温伯格遗传平衡分析、豚鼠群体间遗传分化

Hardy-Weinberg (HW) 平衡卡方显著性分析、群体间遗传分化分析结果见表 3。从表中可见,三个豚鼠种群总的 HW 平衡 P 值为 0.1734,三个种群各自的平均 P 值均 > 0.05 ,群体偏离遗传平衡程度不显著。但对每个位点的基因平衡状态进行分析,三个种群共至少有 20 个位点极显著偏离 HW 平衡,其中种群 1 有 16 个,种群 2 有 13 个,种群 3 有 14 个。平均偏离指数 D 为 -0.407,表明群体存在 HW 遗传平衡偏离,同时又存在杂合子缺失现象。

三个种群的平均分化指数 F_{st} 为 0.136,提示由遗传分化引起种群差异的因素是 13.6%,86.4% 的差异是种群内遗传不同引起,种群间属于中度分化;种群近交程度 F_{is} 为 0.318,且大多数位点呈正值,说明这些种群内部的近交现象较严重;基因流 N_m 平均为 5.835,表明育种过程中种群间存在基因交流,也说明基因交流是形成不同种群的主要原因,而遗传分化引起的因素较小。



注:A;L74 引物;B;D86 引物。M:250 bp 分子标记;泳道 1 ~ 20;Zmu-1; DHP 远交系;泳道 21 ~ 35;英国种;36 ~ 50;Zmu-2; DHP 远交系。

图 1 三个品系豚鼠微卫星 PCR 产物的电泳图谱

Note. A: L74 Primer. B: D86 Primer. M: 250 bp Marker; Lane 1 ~ 20; Zmu-1; DHP outbred strain; Lane 21 ~ 35; England species; Lane 36 ~ 50; Zmu-2; DHP outbred strain.

Figure 1 Electrophoretogram of PCR analysis of microsatellites in the three guinea pig groups

表 1 三个豚鼠种群微卫星位点的基因型频率、等位基因数、有效等位基因数
Table 1 Genotypic frequencies, number of alleles, and number of effective alleles of the microsatellite loci of the three guinea pig groups

序号 No.	位点 Locus	豚鼠种群 Guinea pig groups			等位基因数 Number of alleles	有效等位基因数 Number of effective alleles
		Zmu-1: DHP (n = 20)	英国种 England species (n = 15)	Zmu-2: DHP (n = 15)		
1	L70 *	11 aa,9 bb	3 aa,12 bb	15 bb	2	1. 6756
2	L53 **	4 aa,10 bb,6 cc	10 bb,5 cc	7 bb,8 cc	3	2. 2604
3	L148 *	1 aa,10 bb,9 ab	7 aa,3 bb,5 ab	5 aa,3 bb,7 ab	2	1. 9802
4	L74 *, **	10 aa,1 bb,7 ab,2 ac	9 bb,6 ab	10 bb,5 ab	3	2. 0129
5	L45	1 aa,16 bb,3 ab	2 aa,5 bb,8 ab	13 bb,2 ab	2	1. 4447
6	D77	2 bb,18 ab	2 aa,13 ab	4 aa,11 ab	2	1. 9873
7	L56	1 aa,16 bb,3 ab	3 aa,4 bb,8 ab	13 bb,2 ab	2	1. 4966
8	L57 **	3 aa,3 bb,14 cc	10 cc,2 dd,3 cd	1aa,5cc,2dd,7cd	4	1. 9810
9	L85 *	17 aa,3 bb	10 aa,5 bb	5 aa,10 bb	2	1. 8546
10	D93	1 aa,11 bb,8 ab	9 bb,6 ab	13 bb,2 ab	2	1. 4188
11	D86 *	16 aa,4 bb	5 aa,10 bb	8 aa,7 bb	2	1. 9501
12	D117	8 aa,10 bb,2 cc	5 aa,5 bb,5 cc	1 aa,10 bb,4 cc	3	2. 6539
13	D128	7 aa,13 bb	15 bb	15 bb	2	1. 3172
14	D149	16 aa,4 ab	15 aa	15 aa	2	1. 0832
15	D130	11 aa,1 bb,8 ab	10 aa,5 ab	9 aa,6 ab	2	1. 4966
16	L34	4 aa,9 bb,7 ab	1 aa,8 bb,6 ab	3 aa,3 bb,9 ab	2	1. 8911
17	L117	20 bb	12 bb,3 ab	2 aa,12 bb,1 ab	2	1. 1726
18	L130	19 bb,1 ab	10 bb,5 ab	2 aa,11 bb,2 ab	2	1. 2677
19	L160	17 aa,3 ab	11 aa,1 bb,3 ab	12 aa,1 bb,2 ab	2	1. 2677
20	L165	17 bb,3 ab	3 aa,6 bb,6 ab	3 aa,4 bb,8 ab	2	1. 7001
21	L166	19 aa,1 ab	11 aa,4 ab	11 aa,4 ab	2	1. 1959
22	L360	17 aa,3 bb	11 aa,4 bb	9 aa,6 bb	2	1. 6255
23	L388 *	17 aa,1 bb,2 cc	14 bb,1 cc	8 aa,6 bb,1 cc	3	2. 3105
24	D18	11 aa,9 bb	12 aa,3 bb	10 aa,5 bb	2	1. 8142
25	D41 **	8 aa,4 bb,8 bc	8 aa,3 bb,4 ab	10 aa,5 ab	2	1. 7476
26	D50	6 aa,14 bb	15 bb	15 bb	2	1. 2677
27	D107 *	13 bb,7 ab	4 aa,11 ab	9 aa,6 ab	2	2. 0000
28	D113 *	18 bb,2 ab	15 aa	15 aa	2	1. 8911
29	L25 **	1 aa,12 bb,7 ab	10 bb,5 dd	1 aa,5 bb,9 dd	3	2. 1617
30	L149	15 aa,5 ab	15 aa	15 aa	2	1. 1050
31	D76 **	11 aa,1 bb,1 cc, 1 dd,2 ee,4 af	6 aa,2 cc,1 dd, 4 ee,1 gg,1 af	6 aa,3 ff,4 gg, 2 af	7	3. 0506
32	D122 *	5 aa,15 bb	11 aa,4 bb	10 aa,5 bb	2	1. 9968
33	D140 *	15 aa,5 bb	1 aa,10 bb,4 ab	4 aa,10 bb,1 ab	2	1. 9802
34	L8	3 aa,4 bb,13 ab	6 aa,4 bb,5 ab	2 aa,2 bb,11 ab	2	1. 9992
35	L10 *	11 aa,2 bb,7 ab	2 aa,8 bb,5 ab	10 bb,5 ab	2	1. 9616
36	L26 **	1 aa,12 bb,7 ab	10 bb,5 cc	1 aa,5 bb,9 cc	3	2. 1617
37	J	1 aa,13 bb,6 ab	1 aa,9 bb,5 ab	4 aa,4 bb,7 ab	2	1. 7241
38	D3	20 bb	1 aa,7 bb,7 ab	1 aa,8 bb,6 ab	2	1. 3931
39	D49	8 aa,4 bb,8 ab	6 aa,6 bb,3 ab	9 aa,2 bb,4 ab	2	1. 9077
40	L17	1 aa,13 bb,6 ab	8 bb,7 ab	6 bb,9 ab	2	1. 5743
41	L63	1 aa,19 bb	3 aa,10 bb,2 ab	15 bb	2	1. 2195
42	L108	13 aa,1 bb,6 ab	13 aa,2 ab	14 aa,1 ab	2	1. 2435
43	L21 *	7 aa,3 bb,10 ab	3 aa,2 bb,10 ab	9 bb,6 ab	2	1. 9873
44	L1	2 aa,9 bb,9 ab	3 aa,7 bb,5 ab	12 bb,3 ab	2	1. 6507
45	L107	15 bb,5 ab	13 bb,2 ab	11 bb,4 ab	2	1. 2435
平均值 Average value					2. 29	1. 74

注: * 表示种群间有差异的微卫星位点; ** 表示有特殊等位基因的位点。
Note. * Differential locus between guinea pig groups; ** Specific locus.

表 2 三个品系豚鼠的观测杂合度、期望杂合度及 PIC
Table 2 Observed heterozygosity, expected heterozygosity, and PIC of the three strains of guinea pig

序号 No.	位点 Locus	期望杂合度 Expected heterozygosity				观测杂合度 Observed heterozygosity				多态信息含量 Polymorphism information content
		种群 1 Group 1	种群 2 Group 2	种群 3 Group 3	总体 Totality	种群 1 Group 1	种群 2 Group 2	种群 3 Group 3	总体 Totality	
1	L70	0.5077	0.331	0	0.41	0	0	0	0	0.3219149
2	L53	0.6359	0.4598	0.5149	0.56	0	0	0	0	0.4678051
3	L148	0.409	0.508	0.508	0.50	0.45	0.2	0.4667	0.38	0.3724875
4	L74	0.4321	0.331	0.2874	0.51	0.45	0.4	0.3333	0.4	0.3951549
5	L45	0.2244	0.4966	0.1287	0.31	0.15	0.5333	0.1333	0.26	0.2604296
6	D77	0.5077	0.508	0.4805	0.50	0.9	0.8667	0.7333	0.84	0.3733949
7	L56	0.2244	0.5149	0.1287	0.34	0.15	0.5333	0.1333	0.26	0.2767544
8	L57	0.4769	0.3701	0.5586	0.50	0	0.2	0.4667	0.2	0.4552944
9	L85	0.2615	0.4598	0.4598	0.47	0	0	0	0	0.3546317
10	D93	0.3846	0.331	0.1287	0.30	0.4	0.4	0.1333	0.32	0.2516285
11	D86	0.3282	0.4598	0.5149	0.49	0	0	0	0	0.3685181
12	D117	0.5949	0.6897	0.4966	0.63	0	0	0	0	0.5522109 *
13	D128	0.4667	0	0	0.24	0	0	0	0	0.2118077 **
14	D149	0.1846	0	0	0.08	0.2	0	0	0.08	0.0738509 **
15	D130	0.3846	0.2874	0.331	0.34	0.4	0.3333	0.4	0.38	0.2767544
16	L34	0.4808	0.4046	0.5172	0.48	0.35	0.4	0.6	0.44	0.3601853
17	L117	0	0.1862	0.2874	0.15	0	0.2	0.0667	0.08	0.1363661 **
18	L130	0.05	0.2874	0.331	0.21	0.05	0.3333	0.1333	0.16	0.1888973 **
19	L160	0.1423	0.2874	0.2391	0.21	0.15	0.2	0.1333	0.16	0.1888973 **
20	L165	0.1423	0.4966	0.5149	0.42	0.15	0.4	0.5333	0.34	0.3270104
21	L166	0.05	0.2391	0.2391	0.17	0.05	0.2667	0.2667	0.18	0.1503848 **
22	L360	0.2615	0.4046	0.4966	0.39	0	0	0	0	0.3107645
23	L388	0.2718	0.1287	0.5701	0.57	0	0	0	0	0.4735421
24	D18	0.5077	0.331	0.4598	0.45	0	0	0	0	0.3480893
25	D41	0.4923	0.4598	0.2874	0.43	0.4	0.2667	0.3333	0.34	0.3362936
26	D50	0.4308	0	0	0.21	0	0	0	0	0.1888973 **
27	D107	0.2962	0.4805	0.331	0.51	0.35	0.7333	0.4	0.48	0.375
28	D113	0.0974	0	0	0.48	0.1	0	0	0.04	0.3601853
29	L25	0.3577	0.4598	0.5425	0.54	0.35	0	0	0.14	0.4681526
30	L149	0.2244	0	0	0.10	0.25	0	0	0.1	0.0904875 **
31	D76	0.5641	0.7379	0.6621	0.68	0.2	0.0667	0.1333	0.14	0.6442606 *
32	D122	0.3846	0.4046	0.4598	0.50	0	0	0	0	0.3745997
33	D140	0.3846	0.331	0.4345	0.50	0	0.2667	0.0667	0.1	0.3724875
34	L8	0.5115	0.508	0.5172	0.51	0.65	0.3333	0.7333	0.58	0.3749
35	L10	0.409	0.4345	0.2874	0.50	0.35	0.3333	0.3333	0.34	0.370052
36	L26	0.3577	0.4598	0.5425	0.54	0.35	0	0	0.14	0.4681526
37	J	0.3282	0.3701	0.5172	0.42	0.3	0.3333	0.4667	0.36	0.3318
38	D3	0	0.4345	0.4046	0.29	0	0.4667	0.4	0.26	0.2423816 **
39	D49	0.4923	0.5172	0.4046	0.48	0.4	0.2	0.2667	0.3	0.3626072
40	L17	0.3282	0.3701	0.4345	0.37	0.3	0.4667	0.6	0.44	0.2982605
41	L63	0.0974	0.4046	0	0.18	0	0.1333	0	0.04	0.1638 **
42	L108	0.3282	0.1287	0.0667	0.20	0.3	0.1333	0.0667	0.18	0.1766312 **
43	L21	0.4923	0.5149	0.331	0.50	0.5	0.6667	0.4	0.52	0.3733949
44	L1	0.45	0.4805	0.1862	0.40	0.45	0.3333	0.2	0.34	0.3165032
45	L107	0.2244	0.1287	0.2391	0.20	0.25	0.1333	0.2667	0.22	0.1766312 **
平均值 Average value		0.3374	0.3586	0.3298	0.394	0.208	0.225	0.204	0.212	0.319

注：种群 1：Zmu-1；DHP 豚鼠；种群 2：英国种豚鼠；种群 3：Zmu-2；DHP 豚鼠。* 高度多态性位点；** 低度多态性位点；不标注：中度多态性位点。
Note. Group 1: Zmu-1; DHP; Group 2: England species; Group 3: Zmu-2; DHP. * High polymorphic locus; ** Low polymorphic locus; No mark indicates a moderate polymorphic locus.

表 3 豚鼠群体哈代-温伯格遗传平衡、Fis、Fst、基因流
Table 3 Hardy-Weinberg genetic balance, Fis, and gene flow of the guinea pig groups

序号 No.	位点 Locus	P(Chi-square test)				偏离指数 D			
		种群 1 Group 1	种群 2 Group 2	种群 3 Group 3	总体 Totality	Deviation index D	Fis	Fst	基因流 Gene flow
1	L70	0.000004	0.000028	单态位点 Monomorphic locus	0	-1	1	0.2756	0.6573
2	L53	0	0.000052	0.000061	0	-1	1	0.0496	4.7932
3	L148	0.640703	0.014933	0.743701	0.086411	-0.24	0.1914	0.0759	3.0438
4	L74	0.87303	0.383057	0.494525	0.143218	-0.2131	-0.1612	0.2976	0.5900
5	L45	0.101262	0.765797	0.84739	0.236039	-0.1637	0.0079	0.1334	1.6235
6	D77	0.000389	0.004602	0.033837	0.000001	0.6740	-0.7235	0.0232	10.5282
7	L56	0.101262	0.886114	0.84739	0.105521	-0.2243	0.0289	0.1817	1.1257
8	L57	0	0.057524	0.000002	0	-0.6002	0.5108	0.0784	2.9389
9	L85	0.000001	0.000052	0.000052	0	-1	1	0.1935	1.0420
10	D93	0.851716	0.383057	0.84739	0.595912	0.0731	-0.1390	0.0420	5.7023
11	D86	0.000002	0.000052	0.000061	0	-1	1	0.1480	1.4392
12	D117	0	0	0	0	-1	1	0.0783	2.9432
13	D128	0.000004	单态位点 Monomorphic locus	单态位点 Monomorphic locus	0	-1	1	0.2642	0.6964
14	D149	0.670556	单态位点 Monomorphic locus	单态位点 Monomorphic locus	0	0.0309	-0.1111	0.0690	3.3750
15	D130	0.851716	0.494525	0.383057	0.334057	0.1337	-0.1650	0.0072	34.5592
16	L34	0.210373	0.962892	0.521245	0.588965	-0.0756	0.0073	0.0386	6.2337
17	L117	单态位点 Monomorphic locus	0.729406	0.001042	0.000509	-0.4620	0.4175	0.0579	4.0658
18	L130	1	0.494525	0.012401	0.06602	-0.2499	0.2009	0.0507	4.6800
19	L160	0.769866	0.194306	0.051315	0.06602	-0.24989	0.2537	0.0131	18.8024
20	L165	0.769866	0.434258	0.886114	0.190136	-0.1827	0.0297	0.1359	1.5892
21	L166	1	0.611179	0.611179	0.511612	0.0876	-0.1416	0.0297	8.1635
22	L360	0.000001	0.000042	0.000058	0	-1	1	0.0527	4.4978
23	L388	0	0	0	0	-1	1	0.4487	0.3071
24	D18	0.000004	0.000028	0.000052	0	-1	1	0.0473	5.0303
25	D41	0.388549	0.089218	0.494525	0.126496	-0.2131	0.1682	0.0459	5.2019
26	D50	0.000004	单态位点 Monomorphic locus	0.383057	0	-1	1	0.2222	0.8750
27	D107	0.384683	0.033837	0	0.723125	-0.0497	-0.3822	0.2808	0.6404
28	D113	0.869417	单态位点 Monomorphic locus	单态位点 Monomorphic locus	0	-0.9160	-0.0526	0.9268	0.0197
29	L25	0.919495	0.000052	0	0	-0.7421	0.7344	0.1922	1.0510
30	L149	0.572012	单态位点 Monomorphic locus	单态位点 Monomorphic locus	0.740438	0.0417	-0.1429	0.0870	2.6250
31	D76	0	0	0.000033	0	-0.7938	0.7898	0.0704	3.3027
32	D122	0.000003	0.000042	0.000052	0	-1	1	0.1848	1.1027
33	D140	0.000003	0.415572	0.000576	0	-0.8	0.7010	0.2354	0.8119
34	L8	0.214193	0.167438	0.093966	0.28765	0.1490	-0.1522	0.0060	41.4704
35	L10	0.502282	0.343777	0.494525	0.025151	-0.3134	0.0728	0.2367	0.8061
36	L26	0.919495	0.000052	0	0	-0.7421	0.7344	0.1922	1.0510
37	J	0.684108	0.681321	0.695071	0.277521	-0.1513	0.0660	0.0841	2.7226
38	D3	单态位点 Monomorphic locus	0.763238	0.962892	0.523504	-0.0880	-0.0685	0.1176	1.8750
39	D49	0.388549	0.01394	0.162797	0.007209	-0.3758	0.3679	0.0384	6.2534
40	L17	0.684108	0.28104	0.121335	0.162416	0.1940	-0.2449	0.0094	26.4643
41	L63	0	0.006052	单态位点 Monomorphic locus	0	-0.7800	0.7257	0.1419	1.5121
42	L108	0.684108	0.84739	1	0.506906	-0.0900	0.0175	0.0576	4.0893
43	L21	0.942718	0.237369	0.383057	0.795764	0.0363	-0.2072	0.1240	1.7661
44	L1	1	0.216971	0.729406	0.293935	-0.1462	0.0922	0.0706	3.2898
45	L107	0.572012	0.84739	0.611179	0.406777	0.1122	-0.1318	0.0091	27.2039
平均值 Average value		0.408523	0.284028	0.318291	0.173362	-0.4073	0.3177	0.1361	5.8347

2.5 遗传相似度及遗传距离

三个种群间的 Nei 遗传距离及遗传相似度见表 4,图 2 是三个种群的聚类图。从表图可见 Zmu-1: DHP 的遗传结构与英国种较近,与 Zmu-2: DHP 较远,英国种与 Zmu-2: DHP 两者最近。

3 讨论

实验动物的遗传类型决定了动物的用途及实验效果。从遗传学角度来说,近交系动物基因位点上所具有的基因单一,质量检测评定比较简单,而远交系动物遗传呈多样性,不同个体的同一位点上存在多种基因,使得其遗传质量评定变得比较复杂。远交系动物的遗传质量一般通过位点各等位基因的发生频率来评价,质量较好的远交系动物其基因位点杂合性较高,但群体同一位点多次测定的基因频率基本能够保持稳定。微卫星 DNA 通常是插入性状基因,与性状基因连锁的基因片段,可作为性状基因的遗传标记,通过检测微卫星的遗传信息,一般就能获知某些性状基因的遗传信息,或阐明个体及群体的遗传构成。本文探讨了我校三个远交系豚鼠种群的数量遗传特性,从表 1、2 可见,各微卫星位点平均基因数、总杂合度及多态信息量等指标判断,这些种群的遗传多态性较低,处于中等偏下水平。查其原因可能与种群数量较小、初期曾采用近亲繁殖及选种呈局限性等因素有关。朱亮等曾报道,他们的豚鼠群体处于中度遗传多态性水平。事实上,实验动物远交系动物不同于其他动

物,群体较小,长期封闭繁殖,容易形成近亲繁殖。但本结果中多数微卫星位点的 PIC 较高,这些位点可用于远交系豚鼠遗传检测。

通过比较远交系动物种群间遗传结构,及鉴定其多态性变化是由群体内个体变异,还是群体间遗传分化引起的差异,对判断种群是同种还是异种很有必要。我校三个豚鼠种群中,Zmu-1: DHP(白色)及 Zmu-2: DHP(黑色)种群都源自英国种豚鼠(花色),从表 3 中 Fst、Fis、基因流值及表 4 遗传距离可见,三个种群的遗传相似度较高,并且纯合子个体较多,缺少杂合子个体,虽然种群间遗传处于中等分化水平,但通过基因交流阻止了遗传分化的影响,说明三个群体豚鼠属于一个种属下的不同亚群。相对来讲,英国种与 Zmu-2: DHP 遗传距离最近,与 Zmu-1: DHP 较近,而 Zmu-1: DHP 及 Zmu-2: DHP 相对较远。这种情况似乎与毛色相似度有关,说明花色和黑色都是有色豚鼠,遗传结构较近;白色与有色豚鼠属于完全不同的毛色,其群体间遗传结构则较远。从表 3 三个种群的具体位点看,少数位点极显著偏离遗传平衡,多数位点遗传偏离平衡不显著,但结合偏离指数看,整个种群仍处于不平衡水平。Klötting 等^[12]曾指出,实验动物封闭群 Hardy-Weinberg 平衡偏离是常见的问题。因此,为了提高本远交系豚鼠种群的遗传质量,今后必须扩大每个种群的个体数量,原先每个种群为 30 盒,现起码要扩充至 50 盒以上;要尽量遍布所有笼盒内选择豚鼠种子,每个笼盒只选择单一性别的个体留

表 4 三个品系豚鼠种群间的 Nei 遗传距离及遗传相似性系数
Table 4 Nei genetic distance and genetic similarity coefficient of the three guinea pig strains

种群 Groups	Zmu-1: DHP	英国种 England species	Zmu-2: DHP
Zmu-1: DHP	***	0.8463	0.8306
英国种 England species	0.1668	***	0.9403
Zmu-2: DHP	0.1857	0.0616	***

注:星号以下为遗传距离,星号以上为遗传相似性系数。
Note. Under the asterisk: genetic distance; Above the asterisk: genetic similarity coefficient.

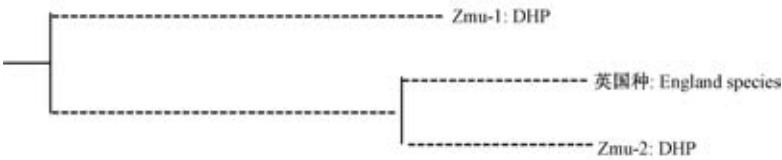


图 2 基于遗传距离的三个种群的 UPGMA 聚类图
Figure 2 UPGMA cluster graph of genetic distance

种,避免同胞兄妹繁殖;如有必要可引入其他远交系豚鼠,与现有豚鼠杂交后再采取远交封闭 4 代以上育种,以渗入其他基因,丰富种群的遗传多样性。

除了评价群体遗传结构外,某些微卫星位点还可作为性状基因的风向标,用于性状基因定位。课题组曾发现不同种群豚鼠在多个性状方面呈显著差异性^[4,6],例如白色豚鼠多为近视及对某些病毒敏感,而有色尤其是黑色豚鼠多为远视,并对某些病毒呈现抗性,说明这些性状差异与豚鼠品系遗传间存在相关性。微卫星是性状基因内含子中的重复序列,多态性微卫星位点的不同等位基因,常与某些相对性状或基因,如近视及远视性状及基因分别连锁。如果已知该微卫星的染色体位置,通过进一步种群间连锁分析,就可以定位性状基因,已有多篇文献报道了微卫星基因定位的研究结果^[13-14]。

因此,筛选到符合基因定位要求,即与相对性状连锁的多态性微卫星标记是关键。本文根据表 1 的豚鼠微卫星位点基因型频率,筛选出 12 个呈种群差异的位点(带*标记),可能作为基因定位的分子标记。另外,还筛选出 7 个白色豚鼠或有色豚鼠种群的特征性微卫星标记(带**标记),例如 L26 位点上两个有色豚鼠携带 c 基因,而白色豚鼠则缺少 c 基因,有可能作为特征性状基因的指示标记。

总之,本文报道了我校三个远交系豚鼠种群的遗传多态性,评估了这些豚鼠种群的遗传质量,同时报道了与不同种群或毛色性状相关的多态性微卫星位点,为今后豚鼠育种及遗传鉴定,优势性状基因定位及其遗传机理研究等提供基础资料。

参考文献:

- [1] 钟品仁. 哺乳类实验动物 [M]. 北京:人民卫生出版社, 1983; 251 - 265.
- [2] 郭汉身, 刘迪文, 傅军, 等. DHP 白化豚鼠杂交后的生长与

繁育性能 [J]. 上海实验动物科学, 1994, 14(1): 34 - 36.

- [3] 刘迪文, 谢敏, 陈雁虹, 等. Zmu-1: DHP 近交系豚鼠的培育及其分子遗传结构初步鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 90 - 96.
- [4] 刘迪文. Zmu-1: DHP 豚鼠部分生物学特性研究 [J]. 畜牧兽医学报, 2005, 37(5): 492 - 495.
- [5] 刘迪文, 郭汉身. 两个品系豚鼠对化学介质诱导产生气道反应的差异性研究 [J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(2): 91 - 95.
- [6] 卫振, 张森, 蒋丽琴, 等. 两品系豚鼠屈光状态和眼球径的发展和比较 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(1): 92 - 96.
- [7] 朱亮, 蔡月琴, 屠珏, 等. 应用微卫星标记研究 Dunkin Hartley 豚鼠封闭群的遗传背景 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(1): 50 - 55.
- [8] 李芳芳, 魏杰, 王洪, 等. 应用微卫星标记对两个豚鼠封闭群的遗传研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 33 - 38.
- [9] 刘迪文, 谢敏, 陈雁虹, 等. Zmu-1: DHP 近交系豚鼠的培育及其分支遗传结构初步鉴定 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 90 - 96.
- [10] Burgos-Paz W, Cerón-Muñoz M, Solarte-Portilla C. Genetic diversity and population structure of the Guinea pig (*Cavia porcellus*, Rodentia, Caviidae) in Colombia [J]. Genet Mol Biol, 2011, 34(4): 711 - 718.
- [11] 卫振, 洪胜辉, 刘迪文. 豚鼠个体及品系间多态性微卫星位点筛选 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(11): 32 - 37.
- [12] Klötting I, Nitschke C, van den Brandt J. Impact of genetic profiles on experimental studies: outbred versus wild rats [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2003, 189(1): 68 - 71.
- [13] 吴宝金, 茅慧华, 邵义祥, 等. ENU 诱导获得 4 种白班小鼠及对突变基因的染色体定位 [J]. 科学通报, 2003, 48(22): 2301 - 2307.
- [14] 吴宝金, 茅慧华, 曾永梅, 等. snthr^{-1Bao} 稀毛小鼠突变基因的精确定位及克隆鉴定 [J]. 动物学研究, 2009, 30(3): 267 - 275.

[收稿日期] 2018-06-18

GFP/Luc 双标食管癌细胞动物模型建立及其活体成像观察

柏文^{1,2}, 彭晓清¹, 王佩文², 鞠前前¹, 史辉³, 蒋茂荣^{1*}

(南通大学 1. 实验动物中心; 2. 医学院; 3. 附属医院心胸外科, 江苏 南通 226001)

【摘要】 目的 建立绿色荧光蛋白(GFP)/荧光素酶(Luc)双标的人食管癌 ECA109 细胞系(ECA109-Luc-GFP),采用一种非侵入性的生物活体成像方法监测食管癌裸鼠肿瘤模型。**方法** MTT、流式细胞仪、划痕实验分析法检测 ECA109-Luc-GFP 细胞系与正常 ECA109 细胞的生物学特性差异。利用活体成像系统示踪肿瘤。**结果** 与正常 ECA109 相比, ECA109-Luc-GFP 细胞在细胞活力、增殖和迁移能力方面差异均无显著性($P > 0.05$)。利用小动物活体成像实验技术观察了肿瘤生长、转移等生物学特性。**结论** 成功构建了 GFP/Luc 双标的人食管癌 ECA109 细胞系(ECA109-Luc-GFP),应用小动物活体成像应用技术并活体观察食管癌动物模型的生长、转移。

【关键词】 荧光素酶;食管癌;移植瘤;肿瘤小鼠模型;活体成像

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-00089-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.015

Establishment of luciferase and green fluorescent protein-labeled esophageal cancer cells for application in a mouse model and *in vivo* imaging

BAI Wen^{1,2}, PENG Xiaqing¹, WANG Peiwen², JU qianqian¹, SHI Hui³, JIANG Maorong^{1*}

(1. Laboratory Animal Center; 2. Medical School; 3. Department of Thoracic Surgery of Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong 226001, China)

【Abstract】 Objective To establish a green fluorescent protein (GFP)/firefly luciferase (Luc) double-labeled ECA109 human esophageal cancer cells (ECA109-Luc-GFP) and apply them to a mouse model of esophageal cancer for non-invasive bioimaging. **Methods** MTT, flow cytometry (FCM), and wound healing assays were used to analyze biological differences between ECA109-Luc-GFP cells and parental ECA109 cells. Esophageal cancer xenografts were established by subcutaneous or tail vein injections of ECA109-Luc-GFP cells into nude mice. An *in vivo* imaging system was used to observe the growth of xenografts. **Results** MTT, FCM, and wound healing assays showed no differences between ECA109-Luc-GFP and parental cells in terms of cell viability, proliferation, and metastasis ($P > 0.05$). The growth and metastasis of xenografts established by ECA109-Luc-GFP cells were observed using the *in vivo* imaging system. **Conclusions** A GFP/Luc double-labeled human esophageal cancer cell line is established, and the growth and metastasis of xenografts can be observed by an *in vivo* imaging system. This study provides the experimental basis for an esophageal cancer mouse model and clinical study.

【Keywords】 firefly luciferase; esophageal cancer; xenograft; tumor mouse model; *in vivo* imaging

【基金项目】 国家自然科学基金(81101159);江苏省自然科学基金(BK20151268)。

【作者简介】 柏文(1996—),男,本科,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: 731608949@qq.com

【通信作者】 蒋茂荣(1977—),男,博士,副教授,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: jiangmr@ntu.edu.cn

中国是食管癌的高发地区,发病率位居世界第一。随着以手术切除为主的系列治疗的开展,食管癌的控制率有了显著提高,但是食管癌的预后仍然很差。动物肿瘤模型是介于体外细胞实验和临床试验之间的重要环节,弥补了实验室与临床的差距。其中,利用免疫缺陷动物建立皮下、原位和转移肿瘤模型是阐明食管癌的分子机制以及抗癌药物开发的重要工具。然而,传统的动物实验研究无法实时监测肿瘤的生长状况和治疗效果,特别是对于从外部看不到的肿瘤。

活体发光成像技术是非侵入性监测体内肿瘤生长的一种方法,实时连续动态监测体内的各种生物学过程,可以直接在活体动物体内观察肿瘤的发生、发展和转移等一系列生物学特性变化,以及抗肿瘤药物在动物体内的分布、代谢及疗效。主要采用生物发光和荧光发光两种技术。生物发光是将编码萤火虫荧光素酶(luciferase, Luc)基因标记的肿瘤细胞移植到相应动物体内,并将酶底物注入动物体内。借助小动物活体成像系统,研究人员可以观测活体动物体内肿瘤的生长及转移等生物学过程^[1]。由于硬件的进步,尤其是高灵敏冷却 CCD 相机,可以灵敏地检测活体肿瘤模型动物体内微小病灶的生物发光,保证动物的安全和测量结果的准确可靠,使得该技术成为临床前肿瘤学研究极有价值的工具^[2]。

本研究采用慢病毒转染方法,构建了稳定表达绿色荧光蛋白(GFP)和 Luc 的人食管癌细胞系(ECA109-Luc-GFP),并分析比较该细胞与正常 ECA109 细胞生物学特性的差异。通过小动物活体成像系统观察了利用该细胞建立的食管癌动物模型的生长、转移,为肿瘤动物模型的推广应用和临床食管癌防治研究提供了实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 人食管癌细胞系

人食管癌细胞系 ECA109,购自中国科学院细胞库。

1.1.2 实验动物

5 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 裸鼠 10 只,体重 18 ~ 22 g,购自中国科学院上海实验动物中心(SLACCAS)[SCXK(沪)2017-0005]。实验和饲养于南通大学实验动物中心 SPF 屏障环境内

[SYXK(苏)2017-0046],实验和饲养条件严格遵守标准化操作规程的规范要求(南通大学实验动物使用与管理委员会批准号:20170303-004)。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.3 质粒构建、质粒提取和细胞转染相关试剂

重组慢病毒载体 pCDH-CMV-*fluc*-EF1 α -CopGFP 由江苏大学于峰惠赠。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI-1640 培养基、胎牛血清及 0.25% 胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司;DH5 α 感受态细胞、质粒提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司;DNA 电泳标记物(Marker)购自日本 Takara 公司;Lipofectamine 2000 购自美国 Invitrogen 公司;聚凝胺(polybrene)和 MTT 购自美国 Sigma 公司;Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒和碘化丙啶(PI)均购自上海碧云天生物技术有限公司;D-荧光素(D-Luciferin)购自上海翊圣生物科技有限公司;复合麻醉剂(10 mg/kg 甲苯噻嗪,95 mg/kg 氯胺酮,0.7 mg/kg 乙酰丙嗪)。小动物活体成像系统(IVIS Lumina XR Series III)购自美国珀金埃尔默(PerkinElmer)公司;酶标仪(ELX-800)购自美国 Bio-Tek 公司;倒置荧光显微镜(Eclipse TS100)购自日本尼康公司。

1.3 实验方法

1.3.1 GFP/Luc 双标的人食管癌 ECA109 细胞系(ECA109-Luc-GFP)的建立

载体构建和慢病毒包装:重组慢病毒载体 pCDH-CMV-*fluc*-EF1 α -CopGFP 转化 DH5 α 感受态细胞,根据试剂盒说明书,提取重组 DNA。将 293T 细胞提前一天接种于 6 孔板的培养孔中,将慢病毒载体 pCDH-CMV-*fluc*-EF1 α -CopGFP、pMD2G 和 pSPAX2 与 Lipofectamine2000 脂质体混合,室温静置 20 min,加入培养基中,6 h 后更换新鲜培养基,继续培养。

慢病毒感染:转染 4 d 后,收集细胞培养上清,并进行病毒滴度测定。将正常 ECA109 接种于 6 孔板中,第二天每孔加入 6×10^6 单位病毒颗粒。病毒感染后 48 h,荧光倒置显微镜下直接观察各孔中 GFP 的表达。

活体成像系统体外检测 Luc 的表达:稳定转染细胞(ECA109-Luc-GFP)培养至对数生长期,直接在荧光显微镜下进行观察和检测。同时胰酶消化计数,每孔 2×10^4 个 ECA109-*fluc*-GFP 细胞和正常 ECA109 细胞接种于 96 孔板,正常 ECA109 细胞作

为对照,每孔加入终浓度 150 $\mu\text{g/mL}$ 的荧光素酶底物(D-荧光素),2~3 min 后,置于活体成像系统内成像,检测细胞在体外的 Luc 的表达情况。

1.3.2 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞生物学特性的比较

MTT 分析法检测两种细胞活力的差异:每孔 1×10^4 个 ECA109-Luc-GFP 细胞和正常 ECA109 细胞接种于 96 孔板,置于 5% CO_2 培养箱孵育 48 h,弃上清液,每孔加入 MTT(终浓度 5 mg/mL)10 μL ,置于 5% CO_2 培养箱继续孵育 4 h 后,每孔加入 DMSO 100 μL 。酶标仪(吸收波长 570 nm)上检测各孔 OD 值。实验重复 3 次。

流式细胞仪分析法检测两种细胞增殖和凋亡的差异:每孔 5×10^5 个 ECA109-Luc-GFP 细胞和正常 ECA109 细胞接种于 6 孔板,置于 5% CO_2 培养箱孵育 48 h 后。胰酶消化细胞,并用 PBS 洗两遍,加入 5 μL Annexin V-FITC 和 10 μL PI,室温避光放置 20 min,用流式细胞仪进行细胞凋亡检测。同样的方法,只用 10 μL PI 染色,进行细胞周期分析。

划痕实验检测两种细胞迁移能力的差异:每孔 1×10^5 个 ECA109-Luc-GFP 细胞和正常 ECA109 细胞接种于 24 孔板,置于 5% CO_2 培养箱培养至融合度达 90%,用 100 μL 移液器枪头在培养孔中央划一条直线,继续培养 48 h 后,置于倒置显微镜下观察拍照。实验重复三次。

1.3.3 肿瘤模型的构建及活体成像观察

食管癌皮下移植瘤构建和活体成像观察:消化 ECA109-Luc-GFP 细胞,计数,用无菌 PBS 悬浮,制成单细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。每只裸鼠右侧腋背部皮下接种 0.2 mL 细胞(约 2×10^6)。待皮下移植瘤体积达到约 100 mm^3 时,每只裸鼠经腹腔注射复合麻醉剂麻醉后,再按照 150 mg/kg 的 D-荧光素/体重浓度进行腹腔注射。10 min 后,放入活体成像仪暗箱内观察。

食管癌转移瘤构建和活体成像观察:消化 ECA109-Luc-GFP 细胞,计数,用无菌 PBS 悬浮,制成单细胞悬液,调整细胞密度为 $1 \times 10^7/\text{mL}$ 。每只裸鼠尾静脉接种 0.2 mL 细胞(约 2×10^6)。接种 10 d 后,每只裸鼠经腹腔注射复合麻醉剂麻醉后,再按照 150 mg/kg 的 D-荧光素/体重浓度进行腹腔注射。10 min 后,放入活体成像仪暗箱内观察。

1.4 统计学方法

实验结果测量均重复三次,SPSS 17.0 统计学

软件进行数据分析,实验结果用平均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, t 检验进行差异显著性分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 GFP/Luc 双标的人食管癌 ECA109 细胞系(ECA109-Luc-GFP)的建立

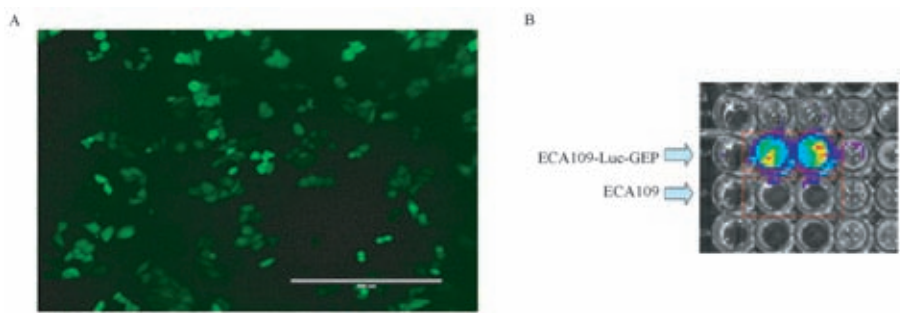
利用编码 GFP 和 Luc 慢病毒感染人食管癌细胞 ECA109,来建立 GFP/Luc 双标的 ECA109 细胞系(ECA109-Luc-GFP)。GFP/Luc 双标的 ECA109-Luc-GFP 细胞生长较快,倒置荧光显微镜下观察可见细胞内绿色荧光信号较强,绿色荧光均匀分布于整个细胞内,GFP 表达率高于 90%,如图 1A 所示。通过活体成像系统体外检测 ECA109-Luc-GFP 细胞内 Luc 的表达,检测结果显示:ECA109-Luc-GFP 细胞内可观察到明显的 Luc 表达,正常 ECA109 细胞内观察不到 Luc 表达信号,具体如图 1B 所示。

2.2 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞生物学特性的比较

首先通过 MTT 分析法比较 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞活力的差异。统计结果显示:与正常 ECA109 相比,ECA109-Luc-GFP 细胞的细胞活力差异无显著性($P > 0.05$),结果见图 2A。其次通过流式细胞仪分析法比较两种细胞细胞周期和凋亡的差异。细胞周期分析结果显示:ECA109 和 ECA109-Luc-GFP 细胞的 G1 期、S 期和 G2 期所占比例分别约为 39%、48% 和 13%,两者相比差异无显著性($P > 0.05$),结果见图 2B。细胞凋亡分析结果显示:两种细胞的凋亡率均为 4% 左右,两者相比差异无显著性($P > 0.05$),结果见图 2C。最后,通过划痕实验分析两种迁移能力的差异。划伤 48 h 后,分析结果显示:两种细胞的愈合率均为 45% 左右,两者相比差异无显著性($P > 0.05$),结果见图 2D。以上分析结果均显示,GFP/Luc 双标的 ECA109-Luc-GFP 细胞与正常 ECA109 细胞相比,细胞生物学特性无差异,说明 GFP/Luc 双标没有改变 ECA109 细胞的生物学特性。

2.3 肿瘤模型的构建及活体成像观察

食管癌皮下移植瘤构建后活体成像观察结果显示:裸鼠皮下种植 ECA109-Luc-GFP 细胞后,当皮下移植瘤体积达到约 100 mm^3 时,可以明显地观察到强烈荧光,而移植正常 ECA109 细胞的裸鼠未见荧光信号。具体见图 3A。食管癌转移瘤构建

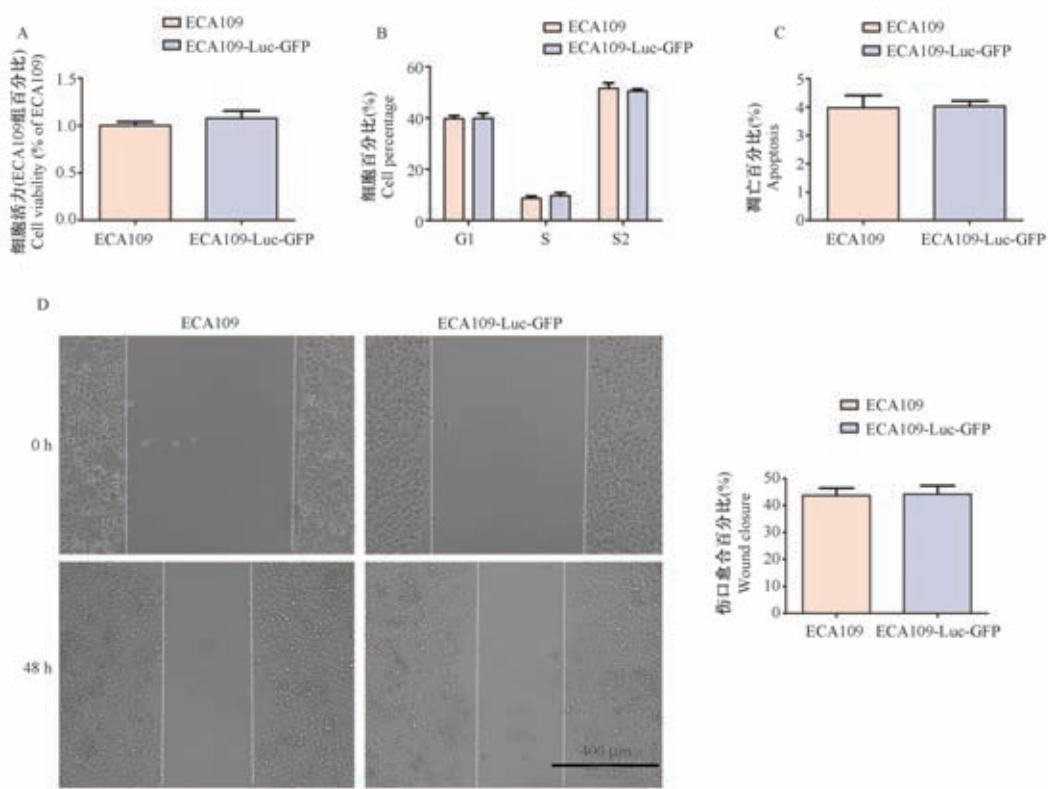


注:A:倒置荧光显微镜下 ECA109-Luc-GFP 细胞观察 GFP 的表达,标尺为 400 μm。B:活体成像系统体外检测 ECA109-Luc-GFP 细胞内 Luc 的表达。

图 1 GFP/Luc 双标的人食管癌 ECA109 细胞系(ECA109-Luc-GFP)的建立

Note. A: GFP expression in ECA109-Luc-GFP cells was observed under an inverted fluorescence microscope. Bar = 400 μm. B: Luc expression in ECA109-Luc-GFP cells was observed by *in vivo* imaging.

Figure 1 Establishment of a GFP/Luc double-labeled esophageal cancer cell line (ECA109-Luc-GFP)



注:A:MTT 分析法比较 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞活力的差异。B:流式细胞仪分析法比较 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞周期的差异。C:流式细胞仪分析法比较 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞凋亡的差异。D:划痕实验比较 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞迁移能力的差异。标尺为 400 μm。

图 2 ECA109-Luc-GFP 和正常 ECA109 细胞生物学特性的比较

Note. A: MTT assay was used to analyze the difference in cell viability of ECA109-Luc-GFP and parental cells. B: Flow cytometry was used to analyze the difference in the cell cycle of ECA109-Luc-GFP and parental cells. C: Flow cytometry was used to analyze the difference in apoptosis of ECA109-Luc-GFP and parental cells. D: Wound healing assay was used to analyze ECA109-Luc-GFP and parental cells. Bar = 400 μm.

Figure 2 Comparison of the biological characteristics of ECA109-Luc-GFP and parental cells

后活体成像观察结果显示:裸鼠经尾静脉注射 ECA109-Luc-GFP 细胞后 10 d,可以观察到小鼠肺部出现强烈荧光信号,而注射正常 ECA109 细胞的裸鼠未观察到荧光信号,结果见图 3B。结果提示,

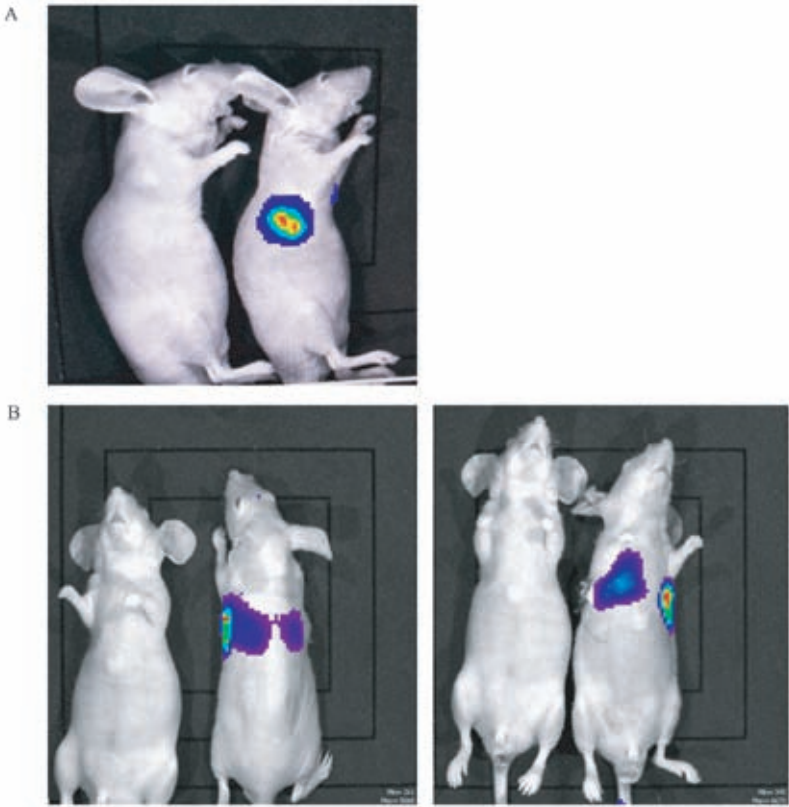
食管癌细胞经尾静脉注射后,主要转移集中生长于小鼠肺部。

3 讨论

我们通过慢病毒转导构建了稳定表达 Luc 和 GFP 的人食管癌 ECA109 细胞系,用于皮下肿瘤模型以及肿瘤转移模型的构建。实际上,原位肿瘤模型与人类肿瘤微环境相近,与人类疾病进展密切相关,是最理想的动物模型。但由于小鼠食管的解剖位置以及建立原位模型的技术难度,往往难以实现^[3]。绿色荧光蛋白基因(GFP)和荧光素酶基因(Luc)作为常用的报告基因(即其表达产物非常容易鉴定),可在异源组织中表达并发光,是理想的标记物^[4]。由于自身发光特性的缺陷,其应用往往具有一定的局限性。其中,GFP 单标需要光的激发才能发出波长较长的可见光,并且由于生物体内发光

的干扰,不能保证特异性,仅可用于浅表组织的检测。同时,除了荧光素酶及其底物之外,还需要氧和 ATP,因此仅能标记代谢活性肿瘤细胞。通过将 GFP 标记技术与 Luc 标记技术相结合,一定程度上弥补了其局限性。

在本研究中,我们用携带 Luc-GFP 的慢病毒感染人食管癌细胞,48 h 后观察 GFP 表达情况,GFP 感染效率可达 80% 以上,我们挑选表达 GFP 的单克隆株进行培养增殖,并通过体外活体成像实验检测到生物发光信号,证明用慢病毒转染方法,能够构建稳定表达 GFP 和 Luc 的人食管癌细胞系(ECA109-Luc-GFP)。实验所采取的 ECA109-Luc-GFP 细胞均为感染后传 5 代以上的细胞,GFP/Luc 双标的 ECA109-Luc-GFP 细胞系非常稳定,并且显微镜下观察传代后 2 种发光信号的强度没有发生变化。



注:A:食管癌皮下移植瘤构建后活体成像观察结果。B:食管癌转移瘤构建后活体成像观察结果。左侧裸鼠为注射正常 ECA109 细胞,右侧裸鼠为注射 ECA109-Luc-GFP 细胞。

图 3 肿瘤模型的构建及活体成像观察

Note. A: Observation by *in vivo* imaging of esophageal cancer xenografts established by subcutaneous injection. B: Observation by *in vivo* imaging of esophageal cancer xenografts established by tail vein injection. The left nude mouse was injected with parental ECA109 cells. The right nude mouse was injected with ECA109-Luc-GFP cells.

Figure 3 Cancer xenograft establishment and observation by *in vivo* imaging

本研究中,活体成像技术准确直观的反映了肿瘤的生长和转移,为肿瘤负荷的测量提供了快速而有效的方法。在体内食管癌模型研究中,活体成像与传统方法相比具有明显优势,首先,作为一种非侵入性成像技术,活体成像技术可以采集同一动物的动态数据,减少了实验动物数量。其次,三只甚至五只小鼠可以同时成像。但是在整个身体仅出现微弱荧光信号时,为了提高灵敏度,每次只能成像一个或两个动物,并且将动物放置在靠近相机的位置^[5]。第三,与其他检测手段相比,提供了治疗效果的相对评估,因为它仅代表代谢活性肿瘤细胞,而不是肿瘤体积^[6]。第四,可以作为肿瘤细胞是否成功植入的指标,从而排除了可能由于异种移植不成功所导致药物的不良反应。

活体成像技术为肿瘤的早期发展,治疗反应,肿瘤复发,转移性肿瘤和自发性肿瘤等动态生物学过程提供了一种良好的研究平台,并且是监测体内抗肿瘤药物治疗效果的理想方法。活体成像技术应用潜力很大,本实验中所提供的方法,有待进一步完善。活体成像技术仅在二维平面上以表面加权的方式收集肿瘤信号,这意味着靠近表面的较弱的光源与深层组织中较强的光源将具有相同的光强度^[7]。因此,可以尝试配合生物发光断层扫描(BLT),重建三维生物发光分布,监测肿瘤进展期间的立体形态和发光信号变化^[8]。由于生物组织具有强散射和低吸收的特性,从而表现出各种光学行为,包括吸收、散射、反射和传播等,导致图像分辨率较低。通过改进现有的成像系统和降噪方法可以帮助获得更高分辨率的图像^[9]。底物荧光素可通过腹腔、静脉或皮下注射。每一种方法都有其优点和缺点,应针对不同情况,采用不同的注射方法^[10]。静脉注射可以使生物发光快速产生,因为底物能立即达到最大的血液浓度。然而,在处理动物时,静脉注射在技术上具有一定难度。腹腔内注射操作简单,在大多数肿瘤模型中,在 5~10 min 内可以获得生物发光峰值。皮下注射也可用于全身传递,但生物发光缓慢。Genevois 等人提出了 iRFP/Luc 双标技术用于活体成像监测,同样结合了两报告基因的优势,扩大了活体成像的应用范围^[11]。

本文将 GFP/Luc 双标技术与活体成像技术相结合,对食管癌裸鼠肿瘤模型进行活体的动态示踪,清晰了解食管癌的生物行为及特性,快速准确、简便灵敏,为抗食管癌药物研发、基因治疗效果验证提供了新思路。

参考文献:

- [1] O'Neill K, Lyons SK, Gallagher WM, et al. Bioluminescent imaging: a critical tool in pre-clinical oncology research [J]. J Pathol, 2010, 220(3): 317-327.
- [2] Ando Y, Niwa K, Yamada N, et al. Firefly bioluminescence quantum yield and colour change by pH-sensitive green emission [J]. Nat Photonics, 2007, 2(1): 44-47.
- [3] Tetreault MP. Esophageal cancer: insights from mouse models [J]. Cancer Growth Metastasis, 2015, 8(Suppl 1): 37-46.
- [4] Ruijter NCA, Verhees J, Leeuwen W, et al. Evaluation and comparison of the GUS, LUC and GFP reporter system for gene expression studies in plants [J]. Plant Biology, 2003, 5: 103-115.
- [5] Saha D, Dunn H, Zhou H, et al. *In vivo* bioluminescence imaging of tumor hypoxia dynamics of breast cancer brain metastasis in a mouse model [J]. J Vis Exp, 2011, 3(56): 3175.
- [6] Jenkins DE, Oei Y, Hornig YS, et al. Bioluminescent imaging (BLI) to improve and refine traditional murine models of tumor growth and metastasis [J]. Clin Exp Metastasis, 2003, 20(8): 733-744.
- [7] Doubrovina M, Serganova I, Mayer-Kuckuk P, et al. Multimodality *in vivo* molecular-genetic imaging [J]. Bioconjug Chem, 2004, 15(6): 1376-1388.
- [8] Luker GD, Luker KE. Optical imaging: current applications and future directions [J]. J Nucl Med, 2008, 49(1): 1-4.
- [9] Chen ZY, Wang YX, Yang F, et al. New researches and application progress of commonly used optical molecular imaging technology [J]. Biomed Res Int, 2014, 2014: 429198.
- [10] Tseng JC, Kung AL. Quantitative bioluminescence imaging of mouse tumor models [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2015, 2015(1): pdb.prot078261.
- [11] Genevois C, Loiseau H, Couillaud F. *In vivo* follow-up of brain tumor growth via bioluminescence imaging and fluorescence tomography [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(11): E1815.

[收稿日期] 2018-06-11

栀子苷对乳腺炎动物模型 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响

黄永周, 李 漪, 丛竹军

(石河子大学医学院第一附属医院, 新疆 石河子 832000)

【摘要】 目的 探讨栀子苷对乳腺炎小鼠乳腺组织及乳腺上皮细胞中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响。**方法** 将 40 只分娩后雌性小鼠随机分为空白对照组、模型组、L 组、M 组和 H 组。建模后 12 h, L 组给予低剂量栀子苷治疗, M 组给予中剂量栀子苷治疗, H 组给予高剂量栀子苷治疗, 空白对照组和模型组给予等量磷酸缓冲盐溶液。建模后 24 h 观察干预效果。**结果** 模型组、L 组、M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著高于空白对照组 ($P < 0.05$); L 组、M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著低于模型组 ($P < 0.05$); M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著低于 L 组 ($P < 0.05$); H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著低于 M 组和 L 组 ($P < 0.05$)。L 组、M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 蛋白水平显著低于模型组 ($P < 0.05$); M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 蛋白水平显著低于 L 组 ($P < 0.05$); H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 蛋白水平显著低于 M 组和 L 组 ($P < 0.05$)。**结论** 栀子苷可抑制脂多糖诱导的乳腺炎症损伤, 有降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 炎症因子水平的作用。

【关键词】 乳腺炎; 栀子苷; 脂多糖; 小鼠; 白细胞介素-6; 肿瘤坏死因子- α ; 白介素-1 β

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0095-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.016

Effect of geniposide on expression of IL-6, TNF- α , and IL-1 β in an animal model of mastitis

HUANG Yongzhou, LI Yi, CONG Zhujun

(First Affiliated Hospital of Medical College of Shihezi University, Shihezi 832000, China)

【Abstract】 Objective To study the effect of geniposide on expression of IL-6, TNF- α , and IL-1 β in mammary glands and mammary epithelial cells of mastitic mice. **Methods** Forty female mice after childbirth were randomly divided into blank control, model, L, M, and H groups. At 12 h after modeling, the L group was treated with low-dose geniposide, the M group was administered intermediate-dose geniposide, the H group was treated with high-dose geniposide, and blank control and model groups were administered an equal amount of phosphate-buffered saline. At 24 h after modeling, the treatment effects were observed. **Results** mRNA expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in model, L, M, and H groups were significantly higher than that in the blank control group ($P < 0.05$). Expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNAs in the L, M, and H groups were significantly lower than that in the model group ($P < 0.05$). Expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNAs in M and H groups were significantly lower than that in the L group ($P < 0.05$). mRNA expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the M group were significantly lower than that in M and L groups ($P < 0.05$). The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in L, M, and H groups were significantly lower than those in the model group ($P < 0.05$). The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in M and H groups were significantly lower than those in

the L group ($P < 0.05$). The levels of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 in the H group were significantly lower than those in M and L groups ($P < 0.05$). **Conclusions** Geniposide inhibits lipopolysaccharide-induced mammary gland inflammation and reduces the levels of proinflammatory factors TNF- α , IL-1 β , and IL-6.

【Keywords】 mastitis; geniposide; lipopolysaccharide; mice; interleukin-6; tumor necrosis factor- α ; interleukin-1 β

乳腺炎是急性、化脓性感染导致乳腺管及周围结缔组织发生炎症的疾病,以乳腺组织炎性细胞浸润、内皮功能受损、大量促炎细胞因子分泌为主要特点,是哺乳动物泌乳期常见疾病,临床症状以局部疼痛和肿块为主,病情加重才出现发热等全身症状,严重者可出现败血症,威胁患者生命安全^[1]。急性乳腺炎临床多由金黄色葡萄球菌和链球菌等致病菌导致,临床采用抗生素治疗,近年来,随着抗生素的广泛应用,细菌耐药现象时有发生,降低了临床治疗^[2]。栀子是一种常见的中药,具有泻火除烦、清热利尿、凉血解毒之功效,具有明确的抗炎和抗内毒素作用,但对乳腺炎是否有治疗效果尚需要进一步研究探讨^[3]。本研究建立脂多糖诱导的小鼠乳腺炎模型,观察栀子苷对模型乳腺组织及乳腺上皮细胞中 IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 表达的影响,进一步探讨栀子苷在乳腺炎治疗中的临床价值。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级的 ICR 雌性小鼠 40 只和雄性小鼠 20 只,8~10 周龄,体重 22~25 g,均购自石河子大学医学院实验动物中心[SCXK(新)2017-118],饲养于石河子大学医学院实验动物中心[SYXK(新)2017-142],按照 2:1 比例将雌性小鼠和雄性小鼠随机合笼饲养,恒温、恒湿条件下饲喂,全价日粮,自由采食和饮水,饲养至母鼠分娩,分娩后 5~7 d 开始实验,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。新疆石河子大学医学院实验伦理委员会批号:2017-0032。

1.2 主要试剂与仪器

栀子苷(纯度 > 99%)购自上海融禾医药科技发展有限公司;脂多糖购自北京寰宇科创生物科技发展有限公司;IL-6、TNF- α 和 IL-1 β ELISA 试剂盒购自北京奥维亚生物技术有限公司;TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司;DHEA 购于 Fluka 公司;RevertAID™ First Strand cDNA Synthesis 试剂盒购于 Fermentas 公司;聚合酶链反应试剂盒购于北京全式金生物技术有限公司;IL-6、TNF- α 和 IL-1 β 引物序

列由大连宝公司合成。紫外分光光度计购自济南海能仪器股份有限公司;DM3000 生物显微镜购自德国徕卡公司;荧光定量 PCR 系统购自上海生物科技仪器厂;电泳仪 DYY-6C 购自南京莱步仪器厂;SpectraMax iD5-多功能酶标仪购自美谷分子仪器(上海)有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物造模

小鼠分娩后 5~7 d,将 40 只 ICR 雌性小鼠随机分为空白对照组、模型组、脂多糖低剂量组(L 组)、脂多糖中剂量组(M 组)和脂多糖高剂量组(H 组),每组 8 只。模型组、L 组、M 组、H 组四组参照文献^[4]的方法,取第四对乳头消毒后乳导管灌注 50 μ g 浓度为 0.2 mg/mL 的脂多糖,空白对照组注射等量的磷酸缓冲盐溶液。L 组、M 组、H 组分别注射 25 mg/kg、50 mg/kg、100 mg/kg 的栀子苷,模型组和空白对照组注射等量的磷酸缓冲盐溶液,建模后 24 h 处死小鼠。

1.3.2 标本采集

采用颈椎脱臼处死小鼠,常规消毒小鼠皮肤,解剖剪开腹部皮肤,剥离开皮肤,充分暴露第四对乳腺组织,剥离乳腺组织并储存于 -80℃ 条件。

1.3.3 HE 染色

每组取一份乳腺组织采用 4% 甲醛溶液固定 48 h,流水冲洗固定好的组织采用梯度酒精脱水,放入二甲苯 I 和二甲苯 II 中直至组织呈透明状态,随后以石蜡包埋组织进行切片、烘干、脱蜡,最后行苏木精-伊红染色和封片,显微镜下观察组织形态。

1.3.4 乳腺组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 mRNA 水平检测

收集 100 mg 乳腺组织,TRIzol 提取 RNA,并采用反转录试剂盒反转录成 cDNA,利用 Primer Premier 5.0 设计 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 和 β -actin 内参基因的引物序列:TNF- α :上游:5'-GTCTCAGCCTCTTCTCATTC-3',下游:5'-CATAGAACTGATGAGAGGGA-3',产物长度:128 bp;IL-1 β :上游:5'-AAATACCTGTGGCCTTGGGC-3',下游:5'-CTTGGGATCCACACTCTCCAG-3',产物长度:101 bp;IL-6:

上游 5'-GAGTCCTTCAGAGAGATACAG-3',下游: 5'-CTGTGACTCCAGCTTATCTG-3',产物长度:125 bp; β -actin: 上游: 5'-CTTCATTGACCTCAACTAC ATGG-3', 下游: 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGGT GAT-3',产物长度:134 bp。

1.3.5 乳腺组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 蛋白水平检测

收集 100 mg 乳腺组织,按 1:9 比例加入磷酸缓冲盐溶液,碎冰上匀浆,3000 r/min 离心 15 min,移液枪去除上层乳白色脂肪组织,收集上清液,采用 ELISA 法检测 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平,严格按照说明操作。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学数据分析,计量资料采用平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD- t 法, $P < 0.05$ 为差异有显著性。

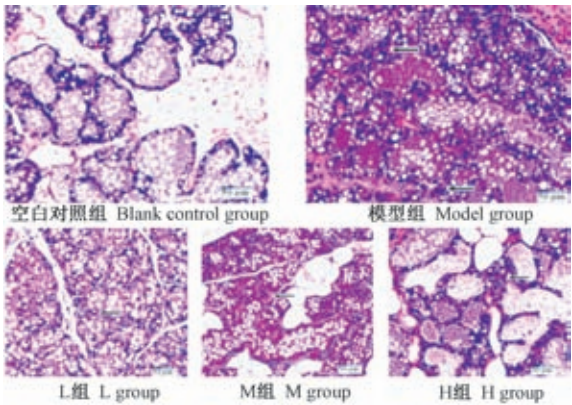
2 结果

2.1 小鼠乳腺组织 HE 染色结果

空白对照组乳腺组织腺泡上皮排列整齐,模型组乳腺腺泡结构崩塌,乳腺上皮脱落或坏死,乳腺小叶间隔变宽度;L 组、M 组、H 组给药后炎性细胞浸润明显减少,间质水肿缓解。见图 1。

2.2 乳腺组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 mRNA 水平检测结果比较

模型组、L 组、M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著高于空白对照组 ($P < 0.05$);L 组、M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著低于模型组 ($P < 0.05$);M 组和 H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著低于 L 组 ($P < 0.05$);H 组 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平显著低于 M 组和 L 组 ($P < 0.05$)。见表 1。



注:图中箭头处为乳腺炎症浸润病变。标尺 = 50 μ m。
图 1 小鼠乳腺组织 HE 染色结果 ($\times 200$)
Note. Arrowheads indicate the infiltrative lesion of mastitis. Bars = 50 μ m.
Figure 1 Histological changes in the mouse mammary gland tissues. HE staining

表 1 乳腺组织 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 mRNA 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)
Table 1 Expressions of TNF- α , IL-1 β , and IL-6 mRNA in the mouse breast tissues

组别 Groups	TNF- α	IL-6	IL-1 β
空白对照组 Blank control group	1.05 $\pm$ 0.02	0.94 $\pm$ 0.09	0.92 $\pm$ 0.11
模型组 Model group	3.47 $\pm$ 0.34 *	11.89 $\pm$ 0.92 *	14.05 $\pm$ 2.97 *
L 组 L group	2.24 $\pm$ 0.18 *#	8.27 $\pm$ 0.49 *#	7.42 $\pm$ 0.72 *#
M 组 M group	1.82 $\pm$ 0.14 *# Δ	5.74 $\pm$ 0.74 *# Δ	4.08 $\pm$ 0.80 *# Δ
H 组 H group	1.51 $\pm$ 0.10 *# Δ &	2.38 $\pm$ 0.25 *# Δ &	2.14 $\pm$ 0.37 *# Δ &
F 值 F-value	54.054	82.470	93.758
P 值 P-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与空白对照组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$;与 L 组相比, Δ $P < 0.05$;与 M 组相比, & $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. Compared with the L group, Δ $P < 0.05$. Compared with the M group, & $P < 0.05$.

2.3 乳腺组织 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 蛋白水平

模型组、L 组、M 组和 H 组 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白水平显著高于空白对照组 ($P < 0.05$); L 组、M 组和 H 组 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白水平显著低于模型组 ($P < 0.05$); M 组和 H 组 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白水平显著低于 L 组 ($P < 0.05$); H 组 TNF-α、IL-1β、IL-6 蛋白水平显著低于 M 组和 L 组 ($P < 0.05$)。见表 2。

3 讨论

研究乳腺炎需要规范化和标准化的动物模型,有报道显示奶牛、奶山羊、兔、小鼠、大鼠等动物均可用于制作乳腺炎病理模型^[5-6]。小鼠价格低廉,成本低,重复性好,国内外乳腺炎模型多采用小鼠建立乳腺炎模型^[7]。金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌常用作乳腺炎模型的诱导细菌,但菌体结构复杂,缺乏一致性和重复性^[8]。脂多糖是大肠埃希菌细胞壁外膜主要成分,可通过细胞信号转导系统激活单核巨噬细胞、内皮细胞、上皮细胞等合成和释放多种细胞因子和炎性介质,诱导乳腺炎,具有良好的一致性和重复性^[4]。本研究采用小鼠作为乳腺炎病理模型研究实验动物,用脂多糖诱导乳腺炎动物模型,解颖颖等^[4]研究显示,10、20、40、50 μg 脂多糖注射后 24 h 均可诱导不同程度乳腺炎病理模型,本研究参考其结果,取 50 μg 脂多糖注射后 24 h 进行观察。

细胞因子在免疫和炎症反应中发挥重要作用,脂多糖可诱导乳腺局部炎症组织浸润,导致 TNF-α、IL-6、IL-1β 等炎症因子释放增加,炎症因子释放增加一方面可趋化免疫细胞清除病原体,但炎症反应进展可引起乳腺微循环障碍,导致乳腺组织坏死、化脓,控制乳腺炎患者炎症反应对治疗具有重要作用^[9]。此外,研究表明,脂多糖作用下 TNF-α、IL-6、IL-1β 等细胞因子含量增加,导致单核吞噬细胞、中性粒细胞集聚,诱导并促进前列腺素、溶酶体酶和过氧化氢类物质等的释放,引起或加重炎症^[10],所以 TNF-α、IL-6、IL-1β 不仅可作为诊断炎症反应的重要实验室指标,也可作为反映治疗效果与炎性状态的重要参考指标。本研究结果显示,与空白对照组比较,脂多糖诱导的小鼠乳腺炎模型乳腺组织中 IL-6、TNF-α、IL-1β mRNA 水平和蛋白水平显著增加。

因为抗生素的毒副作用和耐药性,治疗乳腺炎临床应用受到一定限制,传统中药具有多靶点作用,在炎症治疗中发挥积极作用。中医无急性乳腺炎之病名,多根据临床症状将其归于“乳痈”范畴,病机主要为乳汁淤积,乳络阻塞成块,郁久化热酿脓而成痈肿,早期红肿热痛表现明显,热毒与炎症在病理、病机、治则方面具有密切联系,治疗以清热解毒、散结消肿为主^[11]。栀子临床常用清热解毒中药,栀子苷是栀子的有效成分,体外培养脂多糖诱导损伤的大鼠巨噬细胞,应用栀子苷治疗可降低

表 2 乳腺组织 TNF-α、IL-1β 和 IL-6 蛋白水平 ($\bar{x} \pm s, n=7$)
Table 2 TNF-α, IL-1β, and IL-6 levels in the mouse breast tissues

组别 Groups	TNF-α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)	IL-1β (pg/mL)
空白对照组 Blank control group	105.42 ± 15.86	31.25 ± 5.28	452.37 ± 44.18
模型组 Model group	692.70 ± 52.16 *	94.37 ± 8.25 *	1485.72 ± 123.74 *
L 组 L group	454.23 ± 37.69 *#	65.14 ± 7.83 *#	1042.89 ± 105.47 *#
M 组 M group	324.05 ± 26.94 *#Δ	53.42 ± 6.13 *#Δ	832.54 ± 97.85 *#Δ
H 组 H group	187.73 ± 24.52 *#Δ&	41.59 ± 5.43 *#Δ&	630.32 ± 84.62 *#Δ&
F 值 F-value	63.589	73.518	97.923
P 值 P-value	< 0.001	< 0.001	< 0.001

注:与空白对照组相比,* $P < 0.05$;与模型组相比,# $P < 0.05$;与 L 组相比,Δ $P < 0.05$;与 M 组相比,& $P < 0.05$ 。
Note. Compared with the blank control group, * $P < 0.05$. Compared with the model group, # $P < 0.05$. Compared with the L group, Δ $P < 0.05$. Compared with the M group, & $P < 0.05$.

TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等炎症因子释放^[12]。Yang 等^[13]采用脂多糖诱导制造肺炎小鼠模型,采用栀子苷进行治疗,结果显示,栀子苷治疗可显著降低 IL-4、IL-5、IL-13 和细胞黏附分子表达。Shi 等^[14]研究则显示,栀子苷的抗炎机制可能与其抑制 NF- κ B、TLR4、MMP9 表达和减少前炎症细胞因子有关。本研究结果显示,L 组、M 组和 H 组小鼠炎性细胞浸润明显减少,间质水肿缓解,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平和蛋白水平显著低于模型组,且随着剂量增加,TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 mRNA 水平和蛋白水平逐渐降低,呈负相关关系,结果提示,栀子苷可抑制脂多糖诱导的乳腺炎症损伤,有降低 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 炎症因子水平的作用。

本研究的不足之处在于:①初步阐明了栀子苷可抑制乳腺炎动物模型乳腺组织炎症因子表达,栀子苷通过何种机制发挥抑制炎症因子表达的作用尚需要进一步研究探讨;②本研究设计前,经查询相关文献,未查找到良好的在临床或实验室具有同样或类似药理作用机制的阳性药物,本研究实验中未设置阳性对照组,在下一步阐明栀子苷抑制炎症因子作用机制的研究中,将设置阳性对照组进一步研究探讨。

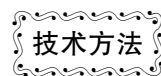
参考文献:

- [1] 曹博,朱晓萍,江琴,等. 哺乳期化脓性乳腺炎患者感染病原菌分布及耐药性分析 [J]. 中华医院感染学杂志, 2017, 27(1): 4975 - 4977.
- [2] 李玉凤. 乳痈消联合芒硝外敷对急性乳腺炎患者血清 Wbc、ESR 及 hs-CRP 水平的影响 [J]. 北方药学, 2017, 14(11): 109, 108.
- [3] 刘益华,李晶,林曼婷,等. 栀子有效成分栀子苷的现代研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2012, 47(6): 406 - 409.
- [4] 解颖颖,胡学权,崔京春,等. 脂多糖诱导哺乳期 SD 大鼠乳腺炎模型的建立 [J]. 动物医学进展, 2017, 38(2): 46

- 50.

- [5] 武瑞仙,楼丽华,赵虹,等. 实验性乳腺炎动物模型研究进展 [J]. 浙江中西医结合杂志, 2010, 20(2): 126 - 128.
- [6] Gao X, Guo MY, Zhang ZC, et al. Bergenin plays an anti-inflammatory role via the modulation of MAPK and NF- κ B signaling pathways in a mouse model of LPS-induced mastitis [J]. Inflammation, 2014, 38(3): 1 - 9.
- [7] 郭健,严秋芳,沈利华. SrtA 基因在金黄色葡萄球菌诱发的小鼠乳腺炎致病过程中的作用研究 [J]. 临床和实验医学杂志, 2017, 16(10): 950 - 954.
- [8] 张大松,张源淑,邹思湘,等. 两种病原菌联合诱导大鼠实验性乳腺炎研究 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007, 35(7): 11 - 14.
- [9] 王波,张彤. 骨髓间充质干细胞和抗生素对乳腺炎模型大鼠血清中急性期蛋白水平的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(11): 3049 - 3051.
- [10] 秦小惠,古再丽·努尔·艾麦提,邵伟,等. 乳腺炎模型大鼠注射骨髓间充质干细胞和抗生素后血清中促炎因子浓度变化的规律探索 [J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(5): 643 - 648.
- [11] 米海霞,朱雪琼,林希,等. 消肿解毒软膏联合乳腺治疗仪外治早期哺乳期急性乳腺炎疗效观察 [J]. 山东中医药大学学报, 2017, 41(1): 48 - 50.
- [12] Fu Y, Liu B, Liu J, et al. Geniposide, from *Gardenia jasminoides* Ellis, inhibits the inflammatory response in the primary mouse macrophages and mouse models [J]. Int Immunopharmacol, 2012, 14(4): 792 - 798.
- [13] Yang X, Cai Q, He J, et al. Geniposide an iridoid glucoside derived from *Gardenia jasminoides*, protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice [J]. Planta Med, 2012, 78(6): 557 - 564.
- [14] Shi Q, Cao J, Fang L, et al. Geniposide suppresses LPS-induced nitric oxide, PGE2 and inflammatory cytokine by downregulating NF- κ B, MAPK and AP-1 signaling pathways in macrophages [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 20(2): 298 - 306.

[收稿日期] 2018 - 03 - 12



SD大鼠肢体缺血-再灌注损伤模型的建立

申震,朱付平*,潘成熙,罗伟业,周富强,李武平

(湖南中医药大学第一附属医院,长沙 410007)

【摘要】 目的 介绍一种改良的体外闭合阻断股动脉血流的方法,建立简便可控、质量可靠的肢体缺血-再灌注损伤(limb ischemia-reperfusion injury, LIRI)大鼠模型。**方法** 15只2月龄SPF级SD雄性大鼠随机分为5个组:正常组,缺血再灌注0 h组、2 h组、4 h组和8 h组。正常组不阻断血流,其余4组构建缺血-再灌注损伤模型,采用HE染色法观察骨骼肌细胞形态学变化,DAPI法检测细胞凋亡。**结果** 除正常组外,各组均出现不同程度肌纤维肿胀、排列不规则、肌纤维间隙增宽等情况,4 h和8 h两组损伤程度较之0 h和2 h两组显著加重,8 h组损伤程度最重,且四组骨骼肌细胞表现出典型的凋亡形态学特征。**结论** 此方法能反映LIRI过程中骨骼肌的病理变化特点,与LIRI临床特征相似,操作简便、高效,可用于肢体缺血-再灌注动物模型的构建。

【关键词】 肢体缺血-再灌注损伤;动物模型;SD大鼠;骨骼肌

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0100-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.017

Establishment of a Sprague-Dawley rat model of limb ischemia-reperfusion injury

SHEN Zhen, ZHU Fuping*, PAN Chengxi, LUO Weiye, ZHOU Fuqiang, LI Wuping

(The First Affiliated Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China)

【Abstract】 Objective To describe an improved method of blocking blood flow in the femoral artery on the body surface and establish a simple and controllable rat model of limb ischemia-reperfusion injury with reliable quality. **Methods** A total of 15 SD rats were randomly divided into five groups including the normal control group, and 0, 2, 4, and 8 h reperfusion groups after ischemia. After establishing the limb ischemia-reperfusion injury model, skeletal muscle morphology and apoptosis of skeletal muscle cells were observed by HE and DAPI staining, respectively. **Results** Except in the normal group, each group showed various degrees of muscle fiber swelling and irregular arrangements as well as widened inter-myofiber space. Compared with 0 and 2 h groups, muscle fiber swelling, rupture, inflammatory cell infiltration, and other damages in the 4 and 8 h groups were more serious, and the 8 h group had the most serious symptoms. Moreover, skeletal muscle cells of the four groups showed typical apoptotic morphological characteristics. **Conclusions** This method can reflect the pathological changes of skeletal muscle during LIRI, which are similar to the clinical features of LIRI. It is simple to perform and can be used to establish a limb ischemia-reperfusion animal model.

【Keywords】 limb ischemia-reperfusion injury; animal model; Sprague-Dawley rats; skeletal muscle

【基金项目】 国家自然科学基金(81674008)。

【作者简介】 申震(1989—),男,博士研究生,研究方向:中医药防治骨与关节损伤。E-mail: Overseaing7052@163.com

【通信作者】 朱付平(1968—),男,副教授,博士,研究方向:中医药防治骨与关节损伤。E-mail: zhufp120@163.com

缺血-再灌注 (ischemia-reperfusion, IR) 损伤是临床中一种常见的复杂的病理过程,是指缺血一段时间后,重新恢复血流,组织损伤程度反而进一步加重,器官功能进一步恶化的综合征^[1]。IR 主要影响 O₂ 依赖性器官,如肝脏、肾脏、心脏、脑、肠道以及骨骼肌等^[2],多见于器官移植术、冠状动脉成形术、溶栓治疗以及挤压伤、四肢血管损伤、断肢再植、骨筋膜间室综合症等骨科疾病^[3-4]。相较于其他器官,骨骼肌研究较少,但骨骼肌对缺血却十分敏感^[5],文献报道^[6],缺血时间超过 2.5 h 血流再通就会导致肢体缺血-再灌注损伤 (limb ischemia-reperfusion injury, LIRI),尤其是线粒体等重要代谢细胞器会发生不可逆转的病理改变。近年来,由骨骼肌缺血复灌导致的 LIRI 的发病率、致残率乃至病死率呈逐年上升的趋势,若没有进行及时有效的治疗,对患者的损害程度极大,严重者引发远隔脏器损伤^[7-8],甚至诱发全身炎症反应综合征或多器官功能不全综合征,给患者个人及社会带来沉重的负担^[9]。故而,构建 LIRI 模型并研究 LIRI 发病机制以及防治要点具有重要的现实意义。

然而,当前 LIRI 模型的构建方法主要是通用无创血管夹夹闭或无创缝合线结扎股动脉进行缺血再灌注操作^[10]。这种方式对动物损伤较大,无菌条件要求高,操作精细复杂,耗时较长,且易出现切口感染,误伤神经血管等问题,成功率较低。鉴于以上因素,本研究改良而成一种应用于 SD 大鼠 LIRI 模型的构建方法,并进行骨骼肌组织形态学等相关检测,以评价模型的可靠性,现介绍如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验选用 15 只 2 月龄 SPF 级 SD 雄性大鼠,体重(232.50 ± 6.00) g,各组间比较差异无显著性($P > 0.05$),购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2013-0004],饲养及实验操作在湖南中医药大学动物实验研究中心[SYXK(湘)2013-0005],实验室温度 20℃ ~ 24℃,相对湿度 60% ~ 70%。实验动物予以常规饲料喂养,自由饮水。本实验严格遵守国家实验动物福利伦理相关规定,科研项目伦理审查意见号:HN-LL-GZR-201609,实验中对动物处置符合科技部颁行的《关于善待实验动物的指导性意见》,满足动物保护、动物福利以及伦理原则的相关要求,严格遵守动物使用的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

苏木素-伊红染色(HE)液(广州,凯秀贸易有限公司);4,6-联脒-2-苯基吡啶(DAPI,美国,Sigma 公司);戊巴比妥钠(美国,Sigma 公司)。市售统一规格橡皮圈,尼龙扎带,50 mL 注射器;BX51 型正置荧光显微镜(日本,Olympus 公司)。

1.3 实验方法

SD 大鼠按照随机数字表法随机分为正常组,缺血再灌注 0 h 组、2 h 组、4 h 组以及 8 h 组 5 个组,每组 3 只。所有 SD 大鼠术前禁食禁饮 12 h,3% 戊巴比妥钠(1.5 mL/kg)腹腔注射麻醉。正常组大鼠不阻断血流,缺血再灌注 0 h 组、2 h 组、4 h 组以及 8 h 组各组大鼠采用 50 mL 注射器自制成套管及市售统一规格橡皮圈复制 SD 大鼠右后肢缺血-再灌注损伤模型。既要达到阻断血流目的,又要避免橡皮圈对骨骼肌的直接损伤,经摸索实验选取直径 0.8 cm 和 1.0 cm 橡皮圈各一个,并将橡皮圈套在大鼠大腿根部,并用尼龙扎带系在橡皮圈下阻挡橡皮圈向下滑动,尼龙扎带不对骨骼肌产生压力,当大鼠趾掌变得苍白青紫、发凉,即是股动脉血流被成功阻断,大鼠趾掌由暗紫色又转为粉红色则为恢复血流灌注。具体步骤如下:

①制备长度为 2 cm,内径为 2 cm 的塑料套管,外覆软布圈(以防压力集中使肌肉断裂),将直径 0.8 cm 和 1.0 cm 橡皮圈各一个紧密套在塑料管上;

②由助手将大鼠固定牢靠,将大鼠右后肢充分套入上述制备完毕的塑料管内(使橡皮圈能从大腿根部阻断血流),然后拉动软布圈使其带动其上的多个橡皮圈一起退至大鼠右后肢大腿根部,橡皮圈因弹性回缩压迫股动脉而阻断右后肢的血流(阻断大鼠后肢血流的标志是趾掌变得苍白青紫、发凉);

③大鼠右后肢阻断血流的时间为 4 h 以实现肢体处于缺血状态,然后依次于缺血后 0 h、2 h、4 h 和 8 h 用手术刀片分别切断橡皮圈,恢复血流灌注,构建缺血-再灌注损伤模型,并可轻柔按摩橡皮圈固定处以利于恢复血液的灌注(见图 1),并依次于缺血后再灌注 0 h、2 h、4 h 和 8 h 四个时间点,在大鼠处于麻醉状态下采用颈椎脱臼法将其处死,收集腓肠肌,经 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋切片等操作后行 HE 染色和 DAPI 染色,光镜下观察腓肠肌组织结构的病理学变化。



注:a:造模所需元件及组装;b:阻断右后肢股动脉血流侧位图;c:阻断右后肢股动脉血运前后位图;d:维持缺血状态 4 h,右侧趾掌变得苍白青紫、发凉。

图 1 大鼠肢体缺血-再灌注损伤模型操作示意图

Note. a: Materials and assembly for the model; b: Blocking blood flow of the right femoral artery in the lateral position; c: Blocking blood flow of the right femoral artery in the anteroposterior position; d: Pale and cool paw on the right hind limb during the ischemic state for 4 hours.

Figure 1 Operational diagram of the establishment of the rat LIRI model

2 结果

2.1 肢体骨骼肌大体形态观察

依次于缺血后再灌注 0 h、2 h、4 h 和 8 h 四个时间点处死大鼠,然后沿大鼠右后肢纵轴方向剪开皮肤,钝性分离皮肤软组织等浅筋膜,切掉深筋膜,暴露腓肠肌。正常组 3 只大鼠腓肠肌鲜活红润,肌组织结构轮廓清晰;与正常组比较,再灌注 0 h 组、2 h 组、4 h 组及 8 h 组共计 12 只大鼠(每组 3 只,没有未纳入分析的大鼠)右后肢腓肠肌均有不同程度肿胀、瘀青,肌组织结构模糊、暗淡,组织液化坏死等表现,而且随着时间的进展损伤逐渐加重(见图 2)。

2.2 HE 染色结果

光镜下对各组腓肠肌进行形态学观察,正常组 3 只大鼠腓肠肌细胞轮廓正常,胞膜完整,肌纤维排列整齐,结构清晰(见图 3a);与正常组相比,0 h、2 h、4 h 和 8 h 组所有大鼠(每组 3 只,共计 12 只)右后肢腓肠肌肌纤维结构均出现异常,肌纤维排列紊乱、增粗、肿胀或部分肌纤维完整性、连续性遭到破坏,肌纤维变细、断裂或肌纤维间缝隙增宽,肌纤维间炎性浸润,但各组损伤程度不一,其中 0 h 组和 2

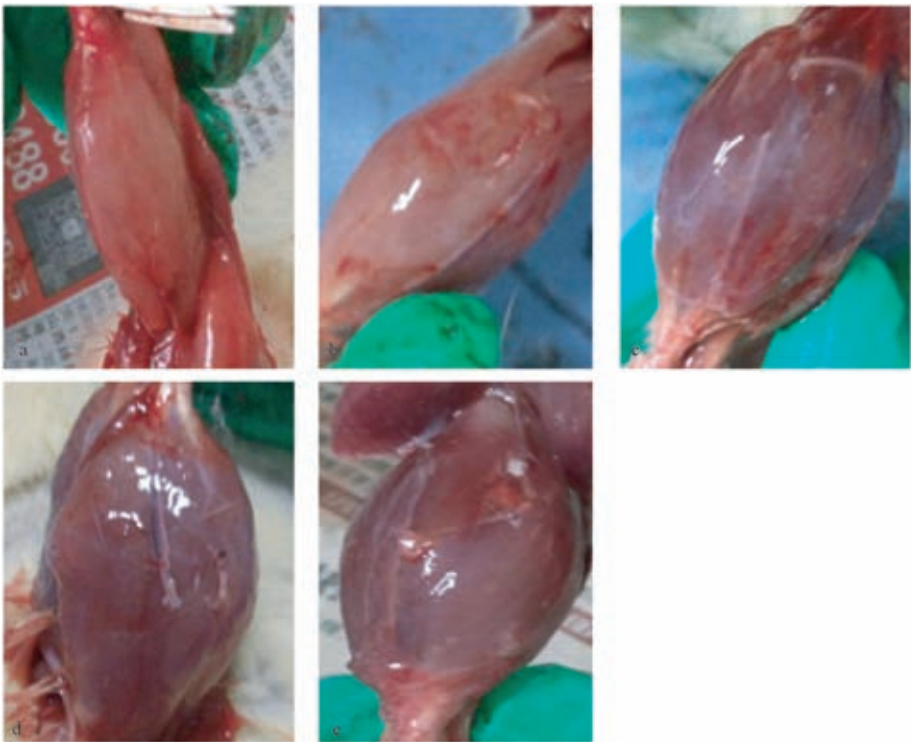
h 组损伤程度较轻,而 4 h 组和 8 h 组较严重;4 h 与 8 h 两组正常骨骼肌细胞明显减少,变性或坏死的骨骼肌细胞明显增多(见图 3b~3e)。

2.3 DAPI 染色结果

正常组 3 只大鼠腓肠肌细胞核呈圆形或椭圆形形状,边缘轮廓清晰,染色均匀(见图 4a);除正常组外,其余 4 组所有大鼠(共计 12 只)右后肢腓肠肌细胞内均可见凋亡小体,即核碎裂成大小不等的圆形小体,并被细胞膜所包绕,细胞核边缘不规则(见图 4b~4e),其中尤以 4 h 和 8 h 两组最为明显;此外,4 h 组中 3 只大鼠和 8 h 组中 3 只大鼠的腓肠肌细胞着色较重,核出现浓缩、呈新月形聚集于核膜一边(见图 4c~4d)。

3 讨论

Jennings 等^[11]于 1960 年在心肌的研究中最早提出了缺血-再灌注损伤概念。之后诸多实验证实缺血再灌注损伤也可在心、脑、肝、肾、骨骼肌等其他器官组织中发生。近些年,有关缺血-再灌注损伤模型的构建方法,在大鼠、小鼠、兔、猪等实验动物上均有报道,然而,无论是在常见的心、脑、肝、肾、

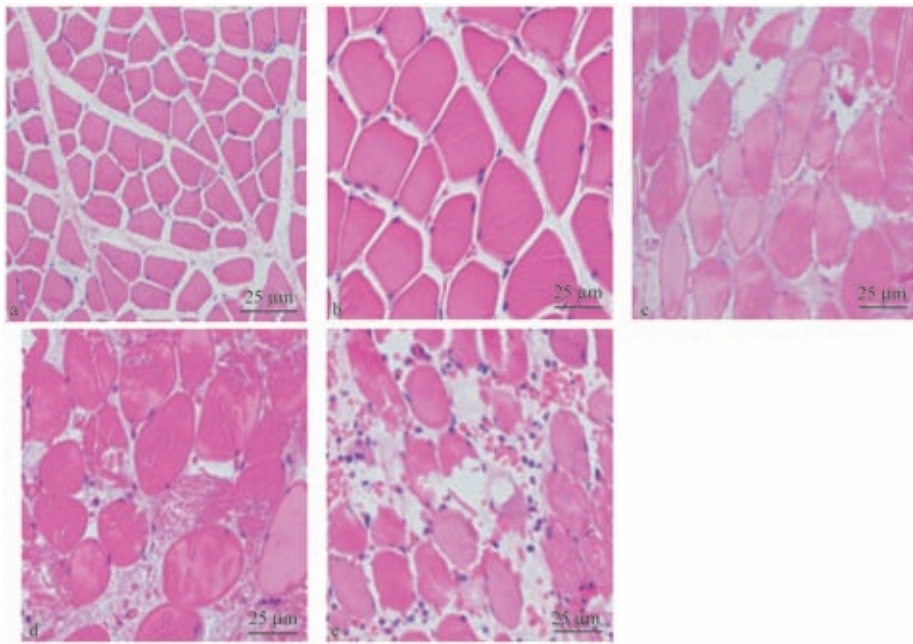


注:a;正常组;b:0 h 组;c:2 h 组;d:4 h 组;e:8 h 组。

图 2 后肢大体解剖形态观察图

Note. a; Normal group; b; 0 h group; c; 2 h group; d;4 h group; e;8 h group.

Figure 2 Gross appearance of the mouse hind limbs

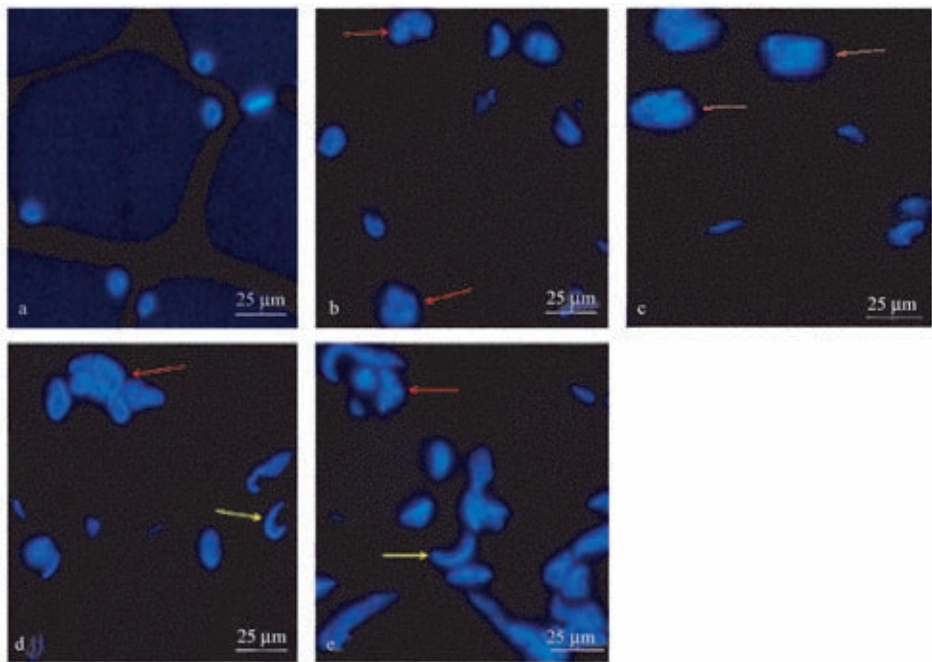


注:a;正常组;b:0 h 组;c:2 h 组;d:4 h 组;e:8 h 组。

图 3 腓肠肌染色形态光镜图(HE 染色, × 200)

Note. a; Normal group; b; 0 h group; c; 2 h group; d;4 h group; e;8 h group.

Figure 3 Histology of the mouse gastrocnemius muscle. HE staining



注:a:正常组;b:0 h 组;c:2 h 组;d:4 h 组;e:8 h 组。红色箭头指示凋亡小体,黄色箭头指示核浓缩和新月形细胞核。

图 4 腓肠肌细胞核荧光染色图(DAPI 染色, × 400)

Note. a: Normal group; b: 0 h group; c: 2 h group; d: 4 h group; e: 8 h group. Red arrowhead: apoptotic body; Yellow arrowhead: nuclear enrichment and crescent nucleus.

Figure 4 Fluorescence images of cell nuclei of the gastrocnemius muscle. DAPI staining

肠道缺血-再灌注损伤模型^[12-17]中,还是在骨骼肌缺血-再灌注损伤模型^[18]中,大都均采用较为复杂的、开放有创的造模方法,即依次切开皮肤、皮下组织,显露动脉、静脉和神经,用显微器械分离动脉,通过无创血管夹夹闭或无创缝合线结扎相应的营养动脉造成器官缺血,然后放开血管夹或剪断缝合线,恢复阻断区血供诱发再灌注损伤。然而,这种切开皮肤软组织,游离营养血管再结扎的开放造模方法,操作精细复杂,耗时较长,不仅对实验人员造模技术要求较高,而且对实验动物损伤较大。此外,在造模过程中对无菌条件要求高,易出现切口感染,误伤神经血管等问题,造模成功率较低。

而本实验中所描述的 LIRI 模型是在张连元等^[19]介绍的方法基础上,加入自制注射器套筒,精简步骤,细化操作,在大鼠体外闭合阻断股动脉血流诱发肢体缺血-再灌注损伤的一种方法。本造模方法血流阻断部位在股骨近端,而取材部位是胫腓骨后面的腓肠肌,故而避免橡皮圈对腓肠肌的直接损伤,腓肠肌结构形态上的异常变化应是由阻断股动脉血流再复灌血流而诱发骨骼肌发生缺血-再灌注损伤所导致。与当前采用较多的开放有创的造

模方法相比,本方法具有简便、快捷、安全、可靠等优点。本方法在体外阻断股动脉,一方面实验人员无需进行系统、精细的外科操作培训,另一方面对无菌条件要求相对较低,且对大鼠本身损伤较小,避免了因切开皮肤软组织造模而产生的出血、感染、误伤血管和神经等问题,不仅可以降低风险,而且在保障造模质量的前提下,通过改进实验方法尽可能地减轻了对实验动物的损害,这正是善待实验动物、提高动物福利,遵循“减少、替代、优化”3R 原则的具体体现。在本实验中,再灌注 0 h、2 h、4 h 和 8 h 四组骨骼肌均出现了不同程度肌纤维肿胀、炎症浸润、肌纤维排列不规则、变细、间隙增宽,甚至肌纤维断裂等异常情况,表明在缺血-再灌注过程中骨骼肌结构形态表现异常,骨骼肌出现不同程度损伤,其中 4 h 和 8 h 两组损伤程度较之 0 h 和 2 h 两组显著加重,且 8 h 组损伤程度最为严重,说明骨骼肌损伤随时间进展性加重,缺血时间拖延越久,骨骼肌损伤越严重,LIRI 危害也就越大,这或许就是 LIRI“早期、及时、全程”治疗思路的实验依据。此外,四组的骨骼肌细胞表现出典型的凋亡形态学特征,这与在 LIRI 过程中有细胞凋亡机制参与的论述

相一致^[20-21],表明在一定的病理条件下,如骨骼肌处于缺血缺氧环境中,骨骼肌细胞可以发生细胞凋亡现象,在 LIRI 过程中长时间的缺血缺氧状态导致了核细胞自身启动细胞内特定的程序诱发细胞自然死亡。凋亡的细胞体积则会整体缩小,细胞膜变得皱缩,或形成许多突起分割包裹胞质,亦或核体皱缩,染色体致密,形成凋亡小体,细胞核最终破裂、解体。

综合上述,本造模方法构建的模型符合 LIRI 损伤过程中骨骼肌的病理变化特点,与 LIRI 临床特征相似。且该模型操作简便、快捷、模型结果质量可靠,从而为系统研究 LIRI 的病因、发病机制及其预防和治疗,提供了一种接近临床、简便可控的动物建模方法。

参考文献:

- [1] Ansari J, Kaur G. Therapeutic potential of Annexin A1 in ischemia reperfusion injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(4): 1211-1230.
- [2] Papadopoulos D, Siempis T, Theodorakou E. Hepatic ischemia and reperfusion injury and trauma: current concepts [J]. *Arch Trauma Res*, 2013, 2(2): 63-70.
- [3] Akbari G, Ali Mard S. A comprehensive review on regulatory effects of crocin on ischemia/reperfusion injury in multiple organs [J]. *Biomed pharmacother*, 2018, 99: 664-670.
- [4] 申震,朱付平,刘天举,等. 桃红四物液对大鼠肢缺血-再灌注损伤炎症因子表达的影响研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(2): 374-377.
- [5] Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome; a review [J]. *Cardiovasc Surg*, 2002, 10(6): 620-630.
- [6] Eckert P, Schnackerz K. Ischemic tolerance of human skeletal muscle [J]. *Ann Plast Surg*, 1991, 26(1): 77-84.
- [7] Junior NE, Montero EF, Sannomiya P, et al. Local and remote ischemic preconditioning protect against intestinal ischemic/reperfusion injury after supraceliac aortic clamping [J]. *Clinics (Sao Paulo)*, 2013, 68(12): 1548-1554.
- [8] Ulus AT, Yavas S, Sapmaz A, et al. Effect of conditioning on visceral organs during indirect ischemia/reperfusion injury [J]. *Ann Vasc Surg*, 2014, 28(2): 437-444.
- [9] Guo WA. The search for a magic bullet to fight multiple organ failure secondary to ischemia/reperfusion injury and abdominal compartment syndrome [J]. *J Surg Res*, 2013, 184(2): 792-793.
- [10] 阮思杰,阳富春,阳茂春,等. 骨骼肌缺血后调适动态 pH 测量及模拟酸灌注减轻缺血再灌注损伤 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(16): 2558-2564.
- [11] Jennings RB, Sommers HM, Smyth GA, et al. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog [J]. *Arch Pathol*, 1960, 70: 68-78.
- [12] 白宁,王栋,欧阳锡武,等. 苦参碱对大鼠肝缺血再灌注损伤的抑制作用及机制 [J]. *中国普通外科杂志*, 2018, 27(1): 81-86.
- [13] 吴建魏,刘洁,谭利斌,等. 姜黄素预处理对肺缺血再灌注损伤大鼠的影响 [J]. *新中医*, 2018, 50(1): 7-10.
- [14] 胡飞,戎亦骊,朱科燕,等. 冠心宁片对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(5): 76-82.
- [15] 孙倩,夏中元,江莹,等. 人参皂苷 Rb1 对肠缺血再灌注致肾损伤的保护作用 [J]. *武汉大学学报(医学版)*, 2018, 39(3): 385-388, 393.
- [16] 石巧娟,郭红刚,楼琦,等. 半胱氨酰白三烯受体拮抗剂通过下调自噬减轻长爪沙鼠的全脑缺血再灌注损伤 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(1): 57-64.
- [17] 陈克研,董婉维. 富氢液通过 PI3K 通路减轻大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. *中国比较医学杂志*, 2017, 27(7): 13-16, 33.
- [18] 彭龙龙,阳富春,薄占东,等. 不同缺血后调适方案对大鼠模型肢体骨骼肌缺血再灌注损伤的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(5): 739-744.
- [19] 张连元,杨林. 生理科学实验教程 [M]. 北京:人民军医出版社, 2001: 29-30.
- [20] Men X, Han S, Gao J, et al. Taurine protects against lung damage following limb ischemia reperfusion in the rat by attenuating endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *Acta Orthop*, 2010, 81(2): 265-269.
- [21] Iwata A, Morgan-Stevenson V, Schwartz B, et al. Extracellular BCL2 proteins are danger-associated molecular patterns that reduce tissue damage in marine models of ischemia-reperfusion injury [J]. *PLoS One*, 2010, 5(2): e9103.

[收稿日期]2018-05-23

应用新型超声诊断仪检测大鼠心功能

陈婷婷¹, 廖献杉², 曾 兰¹, 梁榜辉¹, 杨楚仪¹, 吴 莹¹, 李 璇¹,
欧阳轶强³, 何 萍³, 黄 勤^{1*}

(1. 广西医科大学基础医学院, 南宁 530021; 2. 广西医科大学第一附属医院超声科, 南宁 530021;
3. 广西医科大学实验动物中心, 南宁 530021)

【摘要】 目的 应用一种新型超声诊断仪,通过二维和M型超声心动图评估大鼠心功能,了解该方法的可行性及准确性。**方法** 应用该新型超声诊断仪,探头频率为6 MHz~19 MHz,对6只正常雄性SD大鼠麻醉后经胸超声检测左室结构及各项指标。**结果** 经胸超声心动图能够清楚地显示大鼠心脏大体结构,并且可以准确稳定地获得大鼠左心室各项心功能参数,可用于评价大鼠心功能。**结论** 使用该新型超声诊断仪可获得高质量的大鼠心脏大体结构图像和稳定可靠的心功能数据,是一种可以连续地、准确地检查大鼠心脏大体结构和评价心功能的无创方法。

【关键词】 超声心动图;新型超声仪;大鼠;心功能

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0106-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.018

Detection of cardiac functions in rats using a new ultrasonic diagnostic apparatus

CHEN Tingting¹, LIAO Xianshan², ZENG Lan¹, LIANG Banghui¹, YANG Chuyi¹, WU Ying¹, LI Xuan¹,
OUYANG Yiqiang³, HE Ping³, HUANG Qin^{1*}

(1. Basic Medical School, Guangxi Medical University, Nanning 530021, China. 2. Department of Ultrasound, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021. 3. Experimental Animal Center of Guangxi Medical University, Nanning 530021)

【Abstract】 Objective A new type of ultrasonic diagnostic apparatus was used to evaluate the cardiac functions of rats by two-dimensional and M-mode echocardiography, and the feasibility and accuracy of this method were assessed. **Methods** A new type of ultrasonic diagnostic apparatus with a probe frequency of 6 MHz–19 MHz was applied. The left ventricular structure and various indexes were detected by transthoracic ultrasound after anesthesia in six normal male SD rats. **Results** Transthoracic echocardiography clearly showed the general structure of the rat heart, and accurately and stably obtained the cardiac function parameters of the left ventricle of rats, which can be used to evaluate the cardiac functions of rats. **Conclusions** High-quality rat cardiac gross structural images, and stable and reliable cardiac function data can be obtained using this new ultrasonic diagnostic apparatus. It is a non-invasive method for continuously and accurately examining the gross structure of the rat heart and evaluating the cardiac functions.

【Keywords】 echocardiography; a new ultrasound system; rat; cardiac function

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金项目(81660360)。

[作者简介] 陈婷婷(1991—),女,硕士研究生,研究方向:心脏保护作用机制及糖尿病遗传机制。E-mail: 384330116@qq.com

[通信作者] 黄勤(1969—),女,副教授,硕士生导师,研究方向:心脏保护作用机制及糖尿病遗传机制。E-mail: hqgxmu@163.com

大鼠被广泛应用于多种疾病研究的模型,包括心血管领域的研究模型。超声技术作为一种无创的检查方法大量应用于临床,而随着科学技术的不断发展,技术日趋精细成熟,目前已经广泛使用于动物实验的观察研究,可精细到检查小动物的内脏器官。本研究介绍使用一种新型彩色多普勒超声诊断仪检测大鼠心功能的方法,并探讨其可行性和准确性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 8 周龄 SD 大鼠 6 只,购自广西医科大学实验动物中心[SCXK(桂)2014-0002],洁净级别为 SPF 级,体重 210~240 g,饲养于广西医科大学实验动物中心[SYXK(桂)2014-0003],实验操作在动物中心影像操作室进行,动物实验经由实验动物管理委员会批准(201710012),实验动物使用按照 3R 原则给予人道的关怀照顾。

1.2 主要仪器

小动物麻醉呼吸机,型号为 R510IP;意大利百胜 MyLab™Six 型彩色多普勒超声诊断仪,配置有三个探头,分别为线阵探头、心脏探头和腹部(微凸)探头。

1.3 实验方法

1.3.1 超声心动图检查

实验动物称重后,将大鼠放于麻醉诱导盒中,打开挥发罐注入一定量的异氟烷,并调整氧气流量计,大鼠一般调整为 500~700 mL/min,诱导麻醉时,可将浓度调至 3%~3.5%,待动物完全麻醉(动物身体翻倒为侧姿且并未试着恢复其卧姿状态)后(约 2~3 min),调维持麻醉浓度为 2%~2.5%,并将气体流量阀拨向“Mask”,使气体流向麻醉面罩,并将大鼠口鼻对准麻醉面罩,放置于手术操作台上,用电动剃须刀剃掉胸毛^[1-4],未剃干净的毛发可用脱毛膏进行二次脱毛,使之摆好左侧卧位,大鼠左侧上下肢均用固定器固定于手术台面,右侧上下肢则用固定绳固定于手术台架上。打开超声诊断仪电源,新建病例,根据需要在 LED 屏上选择合适的探头(被选择的探头指示灯亮),本研究选用的是高频线阵浅表探头 Biosound SL 2325,探头频率为 6 MHz~19 MHz,并且注意探头指示灯在超声图上的位置显示,开始检查,涂适量耦合剂于探头上,并将探头置于左胸前乳头肌水平,并指向右上(指示灯

在下方),角度为 45°,使探头指示灯与屏幕上的“e”(左)指示一致,并调整二维超声图深度为 1.5~2.0 cm,当获得满意的左心室长轴切面图时,由二维图像引导取 M 型曲线,将 M 型取样线置于乳头肌及心尖等位置,可获得相应的 M 型曲线,保存图片,并进行测量左室收缩末期和舒张末期内径、室间隔舒厚度、左室后壁厚度,并计算左室收缩功能指标:搏出量、心输出量、短轴缩短率、射血分数。一般测量 3 个连续心动周期取其平均值。检查结束后可选择静态存储和动态存储进行图像的保存,将信息导出到电子设备作为数据储备。所有实验操作均经过广西医科大学实验动物中心批准,并严格按照实验动物使用的 3R 原则给予特定的人道关怀和照顾。

1.3.2 超声检测指标

①左心室舒张末期内径(LVDd)及左心室收缩末期内径(LVDs);②根据左室内径(D)数据,用容量公式 $V = 1.04 \times D^3$ 计算出左心室收缩末期容积(LVESV)和左心室舒张末期容积(LVEDV)^[5];③每搏输出量(SV) = LVEDV - LVESV;④左室短轴缩短分数(FS) = (LVDd - LVDs)/LVDd × 100%;⑤射血分数(EF) = SV/LVEDV × 100%;⑥心率(HR);⑦室间隔厚度(IVSTh)。超声的测量是根据美国超声心动图学会制定的标准^[6]来执行。

1.4 统计学方法

实验数据用 SPSS 20.0 统计软件进行描述性分析,结果均用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 正常大鼠心脏超声心动图表现

由左室长轴切面图可以清晰地显示出左室腔近似椭圆形,可以清楚地显示出左室前后壁、心内膜、心外膜以及主动脉和主动脉瓣,二维图像引导的 M 型图像,见图 1。通过此图像可以测定大鼠各项参数,并计算心脏的收缩功能,见表 1。

3 讨论

已有研究^[7-8]表明,二维超声及 M 型超声心动图是公认无创检查心脏结构和功能的比较理想的方法。由于鼠科动物的胸壁隆起,心脏体积小,传统的低频(3.5 MHz~5 MHz)超声是不能获得较清晰的图像的,而如今随着超声技术的不断发展,7.5 MHz~12 MHz 的高频探头的应用^[9-10],可以使得图像清晰度升高,并且分辨率也得到提升,这为超声

的诊断提供了更多的机会。由于科研的发展需要,目前已有多种专门应用于动物研究的超声诊断仪,进一步表明超声诊断在动物研究中的重要性,近年已大量应用于心衰^[11]、高血压^[12]及糖尿病心肌病等^[13-14]的辅助诊断。

表 1 正常大鼠超声仪测定心功能参数(n=6)

Table 1 Determination of the cardiac function parameters by ultrasound in the normal rats		
指标 Indices	均值±标准差 Mean ± standard deviation	95% 可信区间 95% confidence interval
LVDd(mm)	5.522 ± 0.226	5.284 ~ 5.759
LVDs(mm)	2.775 ± 0.316	2.443 ~ 3.107
LVEDV(mL)	0.177 ± 0.022	0.154 ~ 0.199
LVESV(mL)	0.023 ± 0.010	0.013 ~ 0.034
SV(mL)	0.154 ± 0.019	0.134 ~ 0.174
CO(mL)	0.047 ± 0.007	0.040 ~ 0.054
EF(%)	86.940 ± 4.033	82.710 ~ 91.180
FS(%)	49.710 ± 5.200	44.260 ~ 55.160
IVSTh(mm)	1.377 ± 0.137	1.233 ~ 1.521
HR(bpm)	318.934 ± 39.475	269.920 ~ 367.948

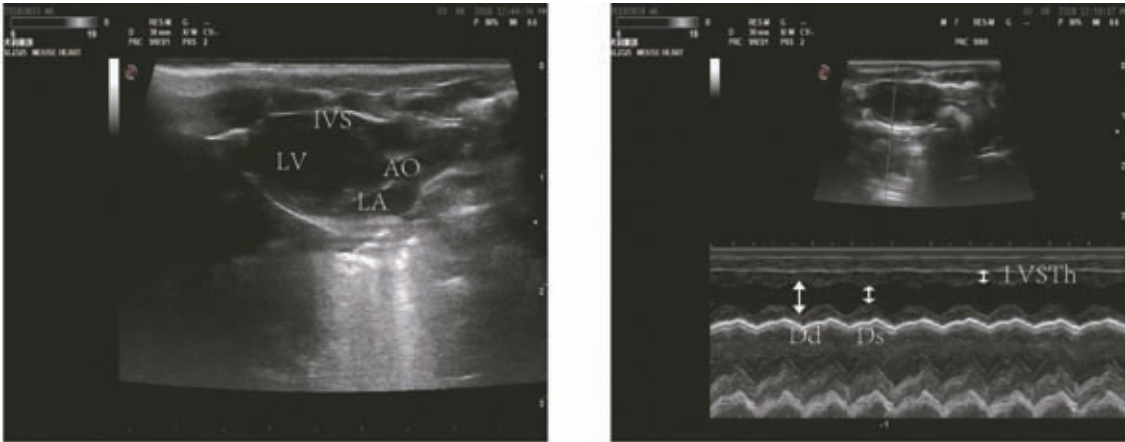
注:LVDd:左室舒张末期内径,LVDs:左室收缩末期内径,LVEDV:左室舒张末容积,LVESV:左室收缩末容积,SV:每搏输出量,CO:心排量,EF:射血分数,FS:短轴缩短率,IVSTh:室间隔厚度,HR:心率。
Note. LVDd: left ventricular end diastolic diameter, LVDs: left ventricular end systolic diameter, LVEDV: left ventricular end diastolic volume, LVESV: left ventricular end systolic volume, SV: stroke volume; CO: cardiac output, EF: ejection fraction, FS: short axis shortening rate, IVSTh: septal thickness, HR: heart rate.

本实验中,本课题组应用一种新型的彩色多普勒超声诊断仪。该仪器最适用于检测中型动物的内脏器官,具有快速精确、高度灵活的增强型超声系统,由于它可提供各式各样的换能器(二维和三

维),因此可使用在心血管及其它各系统常规成像,包括从腹部小器官和乳腺影像到肌肉骨骼、心脏及妇科和产科应用。目前应用于心功能检测的超声类型主要包括 M 型超声心动图^[15-16]、二维超声心动图^[17-19]、三维超声心动图^[20]及组织多普勒超声心动图^[21-24]几种类型,已经大量用于临床及科研研究。

大鼠是常用的科研动物模型,本研究使用了一种新型超声诊断仪来探究大鼠的心功能测定。由于大鼠心脏体积小、心率快(人心率的 4 倍)及胸壁突起的特点,若使用凸阵探头,不能清楚地显示出心脏四腔切面和组织多普勒图。文献报道,高频线性探头可用于大鼠心脏结构的检查^[4, 25],获得清晰的图像和参数。因此,本课题组选择尝试用新型超声仪的线阵探头检测大鼠的心脏,获得了高清的大鼠心脏结构图(见图 1)。检测过程中,保证每一次大鼠所摆的体位和探头位置一致,将大鼠四肢均固定在操作台上,操作者手法稳定,保证探头的位置和角度保持一致,可获得多项稳定的心功能数据(表 1)。结果证明,它能够满足科研实验中检测大鼠心脏大体结构和功能评价的需要,且操作方便快捷。

根据本研究结果总结经验,实验检测中要注意如下几点:①麻醉要适度。麻醉过浅会导致大鼠乱动,心率波动大,并且体位改变,不能快速获得测量结果,并且大鼠受刺激使得心功能变化,结果误差



注:图中 IVS 所示为室间隔,LV 表示左心室,LA 表示左心房,AO 表示主动脉图;图中 Dd 箭头所示为左室舒张末期内径,Ds 箭头所示为左室收缩末期内径,IVSTh 箭头所示为室间隔厚度。

图 1 正常大鼠心脏二维及 M 型超声心动图

Note. In the figure, IVS is the ventricular septum, LV is the left ventricle, LA is the left atrium, AO is the aortic view; the Dd arrow indicates the left ventricular end diastolic diameter, the Ds arrow indicates the left ventricular end systolic diameter, and the IVSTh arrow indicates the septal thickness.

Figure 1 Two-dimensional and M-mode echocardiography of the normal rats

大;麻醉过深可造成大鼠心率过低,影响实验结果,严重的可造成大鼠死亡,本课题组使用小动物麻醉呼吸机严格控制诱导麻醉浓度及维持麻醉浓度,选用的是麻醉并发症少、死亡率低,适用于各种动物的国际认可麻醉剂异氟烷^[26-27],以避免大鼠因麻醉造成的对实验的不利因素。注意用异氟烷麻醉若需长时间麻醉,则需将大鼠放置于保温垫上维持体温。麻醉前空腹 8 h 以免食物引起窒息及影响药效。②大鼠胸部的毛必须剔除干净,否则毛发会影响观察,本研究尝试过脱毛膏、剪毛及电动剃须刀三种方法,电动剃须刀效果最好,注意不要剃伤大鼠。麻醉使大鼠安静下来之后,再进行剃毛和超声检查。③体位摆放、探头的位置和方向均要保持固定一致,才能获得稳定和精确的数据,避免人为因素造成的误差。④为获得更清晰的图像和更精确的数据,尽量选择频率大的探头进行检测。⑤操作者手法要稳定柔和,要有足够的耐心。

总的来说,使用该新型超声诊断仪可无创、连续和准确检测大鼠心脏功能各项功能参数,并得到心室大体结构的清晰图像。与其它有创性心功能检查(包括心血管造影检查、在体心脏插管血流动力学、离体心脏灌流检测等)相比,本实验方法的优势在于无创伤、无痛苦,操作简单快捷,大鼠死亡率低,并且其数据导出功能强大,可导出到 PC (Windows®、MAC®)和各种移动设备(平板电脑、智能手机),为研究者提供方便。此外,与其他无创性心功能检查(心电图、颈动脉搏动图等)相比,本实验应用的新型超声诊断仪可以获得更直观的心脏结构图像结果,得到的数据更多,可更全面判断心功能情况。

该仪器也有一定的局限性。使用超声诊断仪的凸阵探头时,频率较低,而大鼠体积偏小,不能获得满意的心脏四腔切面,需要选择浅表探头,在左室长轴切面及 M 型曲线上测量,才能得到满意的精确数据。另一方面,因为大鼠心率很快,而多普勒超声扫描速度有限, E 峰和 A 峰融合,无法准确判断出舒张期血流速度 E 峰和 A 峰的位置,即不能准确记录心脏舒张期血流情况,说明这台仪器在检测大鼠心脏舒张功能时需要注意选择合适的检测指标,应使用其它指标综合分析舒张功能。此外,该仪器可用于大鼠及更大的动物,如果想要检测小鼠的心功能,则需要使用更灵敏和更精确的小型动物超声仪。目前现有的经典小动物超声仪,如

Vivo2100 彩色多普勒超声仪,与本实验超声诊断仪相比,具有更高频率(40 MHz),它采用的是 256 振元电子线阵探头技术,并且实时心脏图像采集频率最高可达 1000 帧/s,能实时连续显示心动周期内心脏各部位的形态学改变。已有研究表明^[28],Vivo2100 彩色多普勒超声仪可用于诊断大小鼠心血管疾病密切相关的血流速度和方向等的测量,可清晰获得心脏四腔及五腔切面图,获得准确的冠脉血流参数,为临床诊断心血管疾病提供一定的参考。因此,相比之下本实验所应用的超声诊断仪是具有有一定局限性的,实验者需根据实验条件及需求选择合适的仪器。

参考文献:

- [1] 曹丽,王佩显,林美光,等. 大鼠超声心动图检测方法学的实验研究[J]. 临床超声医学杂志, 2009, 11(11): 721-725.
- [2] 闫军,郑敏,朱芳芳,等. 超声心动图评价早期 ACM 大鼠心脏结构和功能的研究[J]. 医学影像学杂志, 2010, 20(7): 1057-1059.
- [3] 闫军,郑敏,朱芳芳. 超声心动图评价酒精性心肌病大鼠心脏结构和功能的实验研究[J]. 临床超声医学杂志, 2012, 14(2): 73-76.
- [4] 厉乔,陈斌,郑磊,等. 线粒体辅酶 Q 对高脂饮食大鼠心肌功能的作用[J]. 浙江医学, 2016, 38(23): 1861-1863.
- [5] Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determination of left ventricular mass in man. Anatomic validation of the method[J]. Circulation, 1977, 55(4): 613-618.
- [6] Sahn DJ, Demaria A, Kisslo J, et al. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements[J]. Circulation, 1978, 58(6): 1072-1083.
- [7] Watson LE, Sheth M, Denyer RF, et al. Baseline echocardiographic values for adult male rats[J]. J Am Soc Echocardiogr, 2004, 17(2): 161-167.
- [8] Cury AF, Bonilha A, Saraiva R, et al. Myocardial performance index in female rats with myocardial infarction: relationship with ventricular function parameters by Doppler echocardiography[J]. J Am Soc Echocardiogr, 2005, 18(5): 454-460.
- [9] Derumeaux G, Mulder P, Richard V, et al. Tissue Doppler imaging differentiates physiological from pathological pressure-overload left ventricular hypertrophy in rats[J]. Circulation, 2002, 105(13): 1602-1608.
- [10] Plante E, Lachance D, Drolet MC, et al. Dobutamine stress echocardiography in healthy adult male rats[J]. Cardiovasc Ultrasound, 2005, 3: 34-40.
- [11] 谭淑娜,冯津萍,冯超,等. 曲美他嗪对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌自噬水平的影响[J]. 天津医药, 2018, 46(2): 152-156, 225.

- [12] 张宇虹, 夏稻子, 张文华, 等. 高血压 SD 大鼠心脏结构及功能的超声评价 [J]. 中国超声医学杂志, 2000, 16(11): 815-818.
- [13] Chandramouli C, Reichelt ME, Curl CL, et al. Diastolic dysfunction is more apparent in STZ-induced diabetic female mice, despite less pronounced hyperglycemia [J]. Sci Rep, 2018, 8(1): 2346-2358.
- [14] Malfitano C, Junior ALDS, Carbonaro M, et al. Glucose and fatty acid metabolism in infarcted heart from streptozotocin-induced diabetic rats after 2 weeks of tissue remodeling [J]. Cardiovasc Diabetol, 2015, 14: 149-158.
- [15] Ghandi Y, Habibi D, Nasri K, et al. Effect of well-controlled gestational diabetes on left ventricular diastolic dysfunction in neonates [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2018, 17: 1-6.
- [16] Sano Y, Ito S, Yoneda M, et al. Effects of various types of anesthesia on hemodynamics, cardiac function, and glucose and lipid metabolism in rats [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2016, 311(6): H1360-H1366.
- [17] Tong J, Lai Y, Yao YA, et al. Qiliqiangxin rescues mouse cardiac function by regulating ACOT1/TRPV1-mediated autophagy in STZ-induced diabetes mellitus [J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(4): 1365-1376.
- [18] Yu L, Guo Y, Wang Y, et al. Determination of fetal left ventricular volume based on two-dimensional echocardiography [J]. J Health Eng, 2017, 2017(1): 1-9.
- [19] 徐晓霞, 周祁娜, 姜涛, 等. 同一滴度不同方法转染 AAV9-SERCA2a 基因对大鼠的有效性和毒副作用评价 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(3): 1-6.
- [20] 李谦, 魏亚娟, 乞艳华, 等. 实时三维超声心动图联合 Tei 指数评价川崎病恢复期左心功能 [J]. 山西医科大学学报, 2017, 48(6): 611-614.
- [21] Almeida VT, Uscategui R, Camacho AA, et al. Influence of estrous cycle and gestation on cardiovascular system of bitches [J]. Anim Reprod Sci, 2018, 192: 35-43.
- [22] Ersoy B, Eroğlu N, Çetin M, et al. Asymmetric dimethylarginine levels and diabetes duration: relationship with measures of subclinical atherosclerosis and cardiac function in children and adolescents with Type 1 diabetes [J]. Diab Vasc Dis Res, 2018, 15(3): 196-203.
- [23] 朱善良, 陈树宝, 孙锐, 等. 组织多普勒超声检测单心室心功能 [J]. 中华超声影像学杂志, 2006, 15(4): 273-276.
- [24] 雷佳瑞, 郭瑞强. 超声心动图评价心脏瓣膜病患者心功能与心肌受损的研究进展 [J]. 临床超声医学杂志, 2018, 20(2): 114-117.
- [25] 符珉, 龙静, 徐智垚, 等. 高频超声心动图评价 5/6 肾切除大鼠心脏结构和功能的变化 [J]. 西南医科大学学报, 2018, 41(1): 32-36.
- [26] Riha H, Papoušek F, Neckář J, et al. Effects of isoflurane concentration on basic echocardiographic parameters of the left ventricle in rats [J]. Physiol Res, 2012, 61(4): 419-423.
- [27] Wasmeier GH, Melnychenko I, Voigt JU, et al. Reproducibility of transthoracic echocardiography in small animals using clinical equipment [J]. Coron Artery Dis, 2007, 18(4): 283-291.
- [28] 周宁, Haines PF, 段云友, 等. 经胸彩色多普勒超声无创性评估心脏肥大和纤维化小鼠模型的冠状动脉血流储备 [J]. 转化医学电子杂志, 2018, 5(6): 16-19.

[收稿日期]2018-07-15

“双一流”模式下高校研究生实验动物学课程 教学模式探索

吴艳玲¹, 张 先², 崔振宇³, 廉丽花¹, 南极星¹

(1. 延边大学药学院长白山生物资源与功能分子教育部重点实验室, 吉林 延吉 133002; 2. 延边大学农学院, 吉林 延吉 133002; 3. 延边大学体育学院, 吉林 延吉 133002)

【摘要】 实验动物学课程作为研究生专业基础课程之一, 课程设置为后期专业课服务, 同时肩负培养动物实验操作的技能型人才, 对于提升医药学研究生动手操作能力至关重要。本文从实验动物学课程存在的问题出发, 研究教学过程中“教-学-评”三者之间的关系; 并基于三者关系分析问题的症结所在, 结合国家建设一流学科的总体思路, 更新教育理念, 遵循教育规律, 以强化供给侧改革为导向, 深化课程体系改革和创新教学方式, 形成适合我国高校研究生实验动物学课程的教学模式, 提高培养研究生创新能力和应用能力, 以适应社会发展对人才的需求。

【关键词】 双一流建设; 实验动物学课程; 研究生; 教学模式; “教-学-评”

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0111-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.019

Exploration of a teaching model of laboratory animal science for postgraduates under the “Double First Class”

WU Yanling¹, ZHANG Xian², CUI Zhenyu³, LIAN Lihua¹, NAN Jixing¹

(1. Provincial and Ministerial Key Laboratory of Natural Resources of Changbai Mountain & Functional Molecules, College of Pharmacy, Yanbian University, Yanji 133002, China. 2. College of Agriculture, Yanbian University, Yanji 133002. 3. College of Physical Education, Yanbian University, Yanji 133002)

【Abstract】 Laboratory animal science is a compulsory course for postgraduates in medicine and aids later professional courses. In addition, it is responsible for training students in animal experiments. It is of great significance for the training of scientific research by students and their practical abilities. The current study focused on the existing problems in laboratory animal science for postgraduates and explored the relationship between teaching, learning, and evaluation in the teaching process. Based on these relationships, the crux of the problems was analyzed. Reformation in laboratory animal science should be combined with the general idea of the national initiative of the “Double First Class”, renew educational concepts, follow educational laws, and deepen the reform of the curriculum system and innovating teaching method with the guidance of strengthening supply-side reform. These measures could form a teaching model suitable for laboratory animal science of postgraduates in our country and improve the ability to cultivate the innovative ability and applications of postgraduates to meet the needs of the social development of students.

【Keywords】 “Double First Class”; laboratory animal science; postgraduate; teaching model; teaching-learning-evaluation

实验动物学课程作为一门基础课程,对于培养医药学研究生的科学素养,提升实验设计与管理能力,提高实践操作技能至关重要,也是医药学科培养拔尖创新人才的必要载体之一^[1]。因此,服务人才培养需求,创新课程教学模式,优化课程体系设计,提升课程教育效果,是医药学科“双一流”建设亟待解决的问题。

1 实验动物学课程存在的问题

在“双一流”建设的教育背景下,研究生实验动物学课程的主要矛盾是:计划经济教育模式与市场教育模式之间的冲突。主要表现在以教师为核心的“供给方”和以研究生(所在科研团队)为核心的“需求方”之间的矛盾。实验动物学课程教学供给侧问题主要体现在各教学要素联系得不够紧密,“教”、“学”、“评”、“用”没有形成相互支撑的闭合循环,教学效果满足不了学生研究工作的需要。

1.1 教学理念滞后,没有及时向培养创新拔尖人才的方向转变

实验动物学课程教学定位比较模糊,没有弄清楚为谁培养人的教学目的,笼统地归纳成为社会培养人才^[2]。可是对社会的用人需求不了解,对培养什么样的人的教学目标不清晰,导致了教学方式与手段针对性不强,课程的含金量不高。另外,缺乏教、学、用相互融合相互促进的一体化思维,教学行为与应用方联系不紧密,供需双方相互对接的程度不高,实验动物学课程与研究生所在科研团队对研究生实验素质能力的需要联系不紧密,画地为牢,各做各的事。

1.2 教学模式不适应拔尖创新人才培养的需要

“双一流”建设背景下,人才培养不再是学科的一家之事,拔尖创新人才的培养不能依靠任课教师的单兵作战,需要多个教育资源的协同创新^[3]。实验动物学课程的传统教学模式是任课教师独自完成备课、授课、出题考试、阅卷统计等全部教学过程。从课程准备到课程结束既没有一个帮手,更没有教学团队的支持,全凭任课教师单打独斗,缺少与学生所在科研团队的协同创新、合同化作战、联合培养的机制。

1.3 课程设计(体系)不够科学,缺乏学科间的相互支撑

教学设计多以任课教师为中心,没有考虑研究生所在科研团队对实验动物学课程的个性化需求。

实验动物学在课程设计时,与研究生所在学科,尤其是与研究生所在科研团队缺乏沟通,不了解也不熟悉授课对象的工作环境、研究条件、研究方向、实验项目、实验技术指标与实验技能要求等等学习背景,不清楚研究生在开展研究工作过程中的现实需求,导致了任课教师按照“通识教育”的模式,对医学和药学研究生开展无差别的教学。

1.4 教学方式陈旧、教学方法单一、因循守旧

目前实验动物学课程教学多为灌输式教学,缺乏“学”的互动^[4]。整堂课以老师系统、细致讲解为主,辅助以多媒体教学,课件多为知识点罗列^[5]。而实验动物学是一门视觉性很强的课程,如不同品系小鼠的特征,仅用语言讲解比较枯燥,无法做到形象化。虽强调以学生为中心,然而在教学实施过程中常忽视学生的主体性,片面强调灌输方式,学生不易接受,客观上阻碍了学生个性发展。教学模式上照本宣科,结构特点体现为“讲-听-读-记-练”,形成供需方不交流,自说自话,最终造成供给侧失衡。

1.5 教与学联系不够紧密,“教”与“用”缺乏有效衔接

“双一流”建设对人才培养工作提出了更高、更精细的要求,但实验动物学课程的教学目标、教学任务、课程设计、教学手段、教学评价等等教育理念还停留在“科普”和“学分”教学的阶段,学生为了学分选课,教师为了完成学时而上课。教学内容与学生实际研究工作联系不够紧密^[6],针对性不强,宏观有余,微观不足,不接研究团队实际工作的“地气”。

1.6 教学评价不够科学,无法正确评价学生的学习效果

考核是教学的一个重要环节,可以反映学生对课程的掌握效果。但多数实验动物学课程的考试依旧是考试成绩加上实验成绩和平时成绩。由于考核评价结构不够科学,理论考核比重过大,实践能力考核过少,客观上造成学生重理论,轻实践。加之教学过程没有外在教育资源的介入,导致了课程教学行为成为以任课教师为原点的闭合行为,课程教学效果是否与拔尖创新人才的素质要求相匹配,是否与研究生的实际研究工作相适应,没有第三方评价的介入而无法确定教学效果的时效性。现有的以考试成绩评判学习质量的模式,很难反映出学生的综合素质及应用能力。

2 实验动物学课程教学模式改革建议

鉴于以上存在的问题,根据国务院《统筹推进世界一流大学和一流学科建设总体方案》(2015 年),按照习近平新时代教育发展理念,坚持四个自信,更新教育理念,以强化供给侧改革为导向,大胆先行先试。开展以研究生所在科研团队需求为核心的“实验动物学课程供给侧改革”,将教学与一线科研团队的实践需要相结合,从事物认知规律出发,从学生学习新知识、掌握新技能的“学习规律”出发,在教学方法上按照“先见森林、再见树木、回归森林”的逻辑,培养懂实验运作、会实验操作、可参与实验管理、能指导实验室运行的综合性复合人才。

借鉴“校企合作”的方式联合培养研究生。课程团队教师+各学科课题组(项目组)导师或博士生组建研究生联合培养教师团队,可以将通识教育+专业教育紧密结合在一起。其优势体现在研究生培养过程中,可以根据客户(市场)需求的变化,动态调整教学计划。各高校研究生教育的课程设置的目的是明确的,就是为研究生进实验室开展研究工作,为研究生顺利进入研究工作,进行理论和技能的储备。可以说,属于研究生进入研究状态前的职业技能培训,也可以说是研究生的始业教育。

2.1 更新教育理念,全面贴近“双一流”建设人才培养标准

首先,课程建设要聚焦拔尖创新人才的培养,将其作为课程的中心任务。课程设计、教学的方式、方法和手段要紧紧围绕中心任务去规划、实施、考核。其次,要明确课程的服务实体与个体的关系。研究生所在研究团队是培养拔尖创新人才的实体,所有研究生课程建设必须要紧密结合研究团队的工作实际,主动对接科研团队对研究生专业技能的需求,将实验动物学课程转化成为拔尖创新人才培养体系中的重要组成部分,达到你中有我,我中有你,通过协同培养,实现协同创新。

2.2 创新教学模式,建立团队协同培养机制

围绕培养拔尖创新人才的教育任务,建立“研究生实验动物学课程”联合培养机制。积极吸纳研究生所在科研团队人力资源,组建课程教师与导师课题组联合培养团队。可按照“课程任课教师+”的模式,组建“课程教学协同创新教师团队”,如“课程任课教

师+研究生导师”、“课程任课教师+研究生所在科研团队教师”、“课程任课教师+研究生所在科研团队博士生”等等。由于请“买方”担任教育工程质量监理,还有利于时时调整课程进度与教育措施。

2.3 明确教学目标,深化课程体系改革

确立以培养具有动物实验理论素养、熟悉实验动物管理规程(实验室运行、具体实验项目程序)、熟悉实验动物标准(各类实验环境条件标准、各类实验动物操作标准)、掌握实验动物技术技法(各类动物实验的设备使用技术、手术技法)的应用型、实践性人才^[7]。

2.4 课程设计原则

建立“课程与学科”、“任课教师与研究生导师科研团队”的双联系机制,根据人才使用方的“市场”需求,制定“适销对路”的研究生实验动物学课程体系。按照分类教学的原则,从研究生学科背景差异实际出发,结合本学校学科建设、各科研团队、各实验室的实际需求,进行“课程供给侧改革”。市场(各科研团队)需要什么,课程就提供什么。也可以采取订单式培训,根据不同需求,开设不同教学模块。总之,要结合拔尖创新人才应具备的知识和技能结构,建立理论教学、实践教学、考核评价相互支撑、相互协调的课程建设指标体系。

2.5 传统教学模式与现代教学方法的融合

现代化教学模式,如翻转课堂、慕课以及微课等,通过运用“互联网+”模式有效构筑学生间、学生与老师间互动交流的空间。还可以利用各种教学软件,扩大学习资源,大幅活跃课堂教学氛围,增加学生与老师之间的交流。通过现代化教学模式的改革,学生独立学习教材的积极主动性增强,课堂上探讨内容也更加深入,课堂互动研讨成为教学的主流。

基于实验动物学课程实践性较强,教学方法可采用多种方法,如多媒体教学、PBL(problem-based learning)教学、案例分析、以及实践参观教学等。多媒体教学中采用图片、视频教学资料,更好地将教学内容具体化,有助于学生认知、理解和掌握,同时调动学习积极性。PBL 教学或案例分析,以具体的问题,吸引学生的兴趣;甚至通过角色转化,发挥学生的主观能动性。另外,实践参观教学也是常用方法之一,可以更为直观地展现实验动物生活环境和习性。如动物实验室的通风净化系统、空调控制系统等,实地参观可以为学生提供直观的认知。实验技术操作中

除通过多媒体或视频结合讲解外,指导教师也可通过示范操作,让学生直接观看到操作的方法,如动物抓取、灌胃或腹腔注射等给药方法、采血采集脏器,以及原位灌注分离原代细胞等操作技术,观摩后研究生分小组独立完成以上实验内容。另外可通过开放动物实验中心,研究生课外可随时来进行相关动物实验,指导教师为研究生动物实验提供帮助和疑难解答,提高研究生动物实验的动手能力。

2.6 创新考评机制,建立课程考核评价指标体系

研究生基本知识学得实不实,基本技能学得好不好,关键还在“用”。按照谁用谁考的原则,组建课程考核评价小组。考评工作由任课教师和兼职教师组成的“课程教学协同创新教师团队”共同设计考题、共同组织考试、共同进行评价,建立一套科学完备的课程考核评价指标体系和有利于发现拔尖创新人才的考核评价机制。

3 小结

实验动物学课程是针对医学、药学以及生物学等生命科学相关学科在读研究生而开设的专业基础课程,是 80 年代初引入国内的一门综合性新兴学科。实验动物是生命科学研究的重要基础 and 支撑条件,在众多的生命科学研究过程中起着越来越重要的作用。实验动物学课程旨在把握生命科学研究有关动物实验全过程,帮助学生掌握实验动物学的基础理论和基本技能。

除教学模式改革建议外,还要更加关注研究生

学习的主观能动性,通过“寓教于乐”、“层层深入”的教学理念调动学习兴趣;引导研究生课外小组共学习,即时消化互解疑;授课内容紧跟最新研究动态和科技前沿;优化课程设计,发现并及时解决共性问题;实验设计多样化,重在开拓创新、解决问题,激发潜能。通过以上措施,拓展优质、灵活、个性化新型教育模式,助力我校自然科学学科的“双一流”建设,最终促进生命科学领域创新人才的培养。

参考文献:

- [1] 罗满林,顾为望. 实验动物学[M]. 北京:中国农业出版社, 2002.
- [2] 朱裕华,陈全刚,胡安康,等. 浅谈医学研究生实验动物教学[J]. 科教文汇, 2016, 31(11): 65-66.
- [3] 孔桂美,董小耘,钱峰,等. 医学研究生实验动物与动物实验技术教学改革[J]. 基础医学教育, 2016, 18(3): 209-211.
- [4] 张爱华,曾文滔. 医学院校实验动物学教学改革实践与探讨[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(3): 93-95.
- [5] 王讯,黎德兵,宋薇,等. 谈执业兽医资格考试与动物生理学课程教学改革[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012, 16(3): 40-41.
- [6] 王媛,陈恩伦. 制度缺失视域下研究生培养的质量问题检视[J]. 国家教育行政学院学报, 2016(2): 36-40.
- [7] 刘殿峰,高妍,袁宝,等. 研究生“实验动物学”课程建设探讨[J]. 长春师范学院学报(自然科学版), 2012, 31(3): 145-146.

[收稿日期] 2018-06-13

医学生实验动物福利与伦理实践教学的思考

高建峰¹, 汤宏斌¹, 杨四军¹, 周立¹, 郭铭¹, 滕利^{2*}

(1. 武汉大学动物实验中心, 武汉 430071; 2. 武汉市妇女儿童医疗保健中心病理科, 武汉 430016)

【摘要】 医学生是我国医疗卫生事业的生力军, 是构建“健康中国”的骨干力量。动物实验是医学生教育教学过程的重要组成部分, 但教学动物实验对实验动物造成的伤害与医学理念不符。加强医学生实验动物福利与伦理实践教育, 不仅是培养医学生良好伦理素养的重要途径, 而且有助于培养医学生较好的科研素质, 更好地了解 and 尊重生命, 促进医学研究与生命伦理观的良性互动, 最终达到医学研究可持续性发展之目的。

【关键词】 医学生; 动物实验; 实验动物福利与伦理

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0115-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.020

Reflections on the practical teaching of animal welfare and ethics to medical students

GAO Jianfeng¹, TANG Hongbin¹, YANG Sijun¹, ZHOU Li¹, GUO Ming¹, TENG Li^{2*}

(1. Center for Animal Experiment, Wuhan University, Wuhan 430071, China. 2. Department of Pathology, Wuhan Medical Care Center for Women and Children, Wuhan 430016)

【Abstract】 Medical students are the new force in China's medical and health undertakings and the backbone of building a healthy China. Animal experiments are an important part of the medical education process, but the damage caused to experimental animals during the teaching of animal experiments does not match the concepts of medical science. Strengthening medical animal welfare and ethical practice education is not only an important way to cultivate good ethical quality of medical students, but also facilitates training better scientific research quality of medical students, better understanding and respect for life, and promoting medical research.

【Keywords】 medical student; animal experiment; animal welfare and ethics

动物实验是医学生教育教学过程的重要组成部分^[1], 但教学动物实验对实验动物造成的伤害与医学理念不符。随着我国医药卫生事业广泛深入的发展以及与国外教学科研机构交流的不断增加, 我国实验动物在福利和伦理方面的状况愈加引起国外同行的关注^[2]。医学生的实践教学与实验动物息息相关, 从最基础的解剖学与组织胚胎学、生

理学、病理学和药理学到后期综合性在体实验, 在很大程度上都依赖于动物实验^[3]。因此, 加强医学生实验动物福利与伦理实践教育, 不仅是培养医学生良好伦理素养的重要途径, 而且有助于培养医学生较好的人文素养和科研素质, 更好地了解 and 尊重生命, 促进医学研究与生命伦理观的良性互动, 最终达到医学研究可持续性发展之目的。

【基金项目】 武汉大学医学部教学改革研究项目(2017062)。

【作者简介】 高建峰(1981—), 男, 讲师, 研究方向: 基础医学与比较医学。E-mail: jfgao@whu.edu.cn

【通信作者】 滕利(1985—), 女, 主治医师, 研究方向: 病理学与病理生理学。E-mail: jieya2017@126.com

1 医学生实验动物福利与伦理实践教学现状与存在的问题

1.1 实验动物福利与伦理的含义

实验动物福利与伦理(laboratory animal welfare and ethics)这一表述最早是国外学者提出。1989 年 Fraser 将这一概念进一步明确,并逐步得到科学界广泛的认同,他认为实验动物福利与伦理的关键就是在动物的福利与人的利益之间寻求一个平衡点^[4-5],进而正确处理人类权利与动物权利间的关系。我国学者认为,“实验动物福利与伦理”就是让动物在康乐的状态下生存,其主要内容包括无疾病、无异常行为、无应激压抑和痛苦等^[4]。当前世界上广泛接受的实验动物福利与伦理是指动物享有“五大自由”,即动物应享有免受伤害、疼痛和疾病的自由;免受恐惧或不安的自由;免受饥渴的自由;生活舒适自在的自由;表达种属天性及自然行为的自由^[5-7]。概括之,实验动物福利与伦理就是要让动物在康乐(well-being)的状态下生存,或在无痛苦的状态下死亡^[5,7-8]。Russell 和 Burch 于 1959 年首次系统提出了“3R”原则,即减少(Reduction)、替代(Replacement)和优化(Refinement)^[9]。“减少”是指在科学实验中,使用较少的实验动物获取同样多的研究数据,或使用一定数量的实验动物而获得尽可能多的实验数据的方法^[5,7,10-12],比如在已经死亡的动物身上进行外科手术的练习^[12]。“替代”指使用没有知觉的实验材料代替活体动物,或使用低等动物替代高等动物进行实验,亦或使用物理学或机械学系统代替实验动物等,并获得相同实验效果的科学方法^[5,7,11-13],如用离体培养细胞、组织或器官等代替活体动物^[12]。“优化”原则主要是指通过改进和完善动物实验技术路线和程序,避免、减少或减轻给动物造成的不安和疼痛,或为动物提供舒适的生活环境,以保证动物健康和康乐,保证动物实验结果可靠性和提高实验动物福利的方法^[2,5,7,11],如及时合理地使用镇痛剂、麻醉剂或镇静剂,以降低动物在实验过程中的疼痛、不适或不安^[12]。

1.2 实验动物福利与伦理实践教学现状与存在的问题

1.2.1 实验动物福利与伦理教育法制化建设有待加强

目前我国尚未颁布实验动物福利保护法律。在国家层面上关于实验动物福利与伦理的指导性文件仅有《关于善待实验动物的指导性意见》和《实验动物管理条例》,一些省市在此基础上出台了一些具体文件,但全国各相关单位执行实验动物福利与伦理工作的现状并不令人满意,现实中的实验动物福利与伦理教育更多的是靠自觉,是基于施教者自身重视程度或自有知识基础上的一种自发行为,个别地方甚至流于形式,教育效果难以保证,也无法有效评估。在监管层面上,对外交流多的单位大多成立有实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC),但还有相当一部分单位没有设置该机构,甚至很多人没听说过 IACUC,实验动物福利与伦理保障与监管也就无从谈起。

1.2.2 医学生实验动物福利与伦理实践教育有待加强

医学生实验教学与实验动物密不可分。动物实验是医学生培养过程中最基础的教学实验,而且具有不可替代性。全国各教学和科研单位每年使用的实验动物数量非常之大。据中山大学 2014 年报道^[14],仅中山医学院每年常规实验教学就需用小鼠 6000 余只,大鼠 700 余只,兔子 1400 余只,猫 220 余只。由此可见,实验动物使用量放在全国数量是非常惊人的。因此,加强实验动物福利与伦理教育和宣传工作具有重要的理论价值和现实意义。然而,基于现阶段中国国情和历史文化原因,目前动物福利与伦理观念还未能以理性思维的方式深入人心,因而在社会和实验过程中屡有伤害甚至虐待动物的报道^[15-16],更为糟糕的是对待虐待动物的行为还只是停留在道德层面的谴责,刑法对这种行为目前尚没有约束力。2010 年一项针对医学生实验动物福利与伦理意识的研究显示^[17],在大学教学过程中,有相当一部分学生会专业实践和实验动物福利与伦理之间感到困惑和痛苦,甚至还有个别学生未能人道地对待实验动物,实验中出现戏弄和伤害实验动物的行为。

1.2.3 加强医学生实验动物福利与伦理教学的必要性和重要意义

关注和提升实验动物福利与伦理状况已成为国内外医学研究人员的共识。然而,基于历史文化原因,我国实验动物福利与伦理状况无论是从

国家立法层面还是基层实践中都与西方发达国家存在着较大的差距,而且这种差距已经成为相关领域与国际同行开展合作与交流的障碍。作为医学院校,我们有责任、有义务全面加强医学生有关实验动物福利与伦理的教育教学工作,通过课堂理论讲解、现场实践操作及教学论文公开发表等形式,多层次、多维度、多方面进行实验动物福利与伦理教育宣传工作,最终达到培养医学生应有的人文素养和科研素质之目的,甚至引领全社会都关注、关爱实验动物,这本身就是高等院校应当承担的社会责任,这也是社会文明进步的具体体现。

2 加强医学生实验动物福利与伦理实践教学的对策

2.1 加大立法力度,明确相关规章制度法律地位

动物保护立法不仅仅是一个观念、道德问题,它是一个国家法制文明和精神文明的必然要求,是社会进步和经济发展到一定阶段的必然产物,体现了一个国家社会文明进步的程度^[11,18]。英国被公认是世界上最早进行动物福利专门立法的国家。早在 18 世纪,英国早期的动物福利立法活动就已经出现;英国下议院在 1822 年通过了禁止残酷对待家畜的《马丁法案》,这个法案是世界上第一部专门针对动物福利保护而制定的法律^[19-20]。目前我国涉及动物保护的法律法规仅有《中华人民共和国野生动物保护法》。但这部法律主要针对反走私、反盗杀等违法行为^[21],且被列入保护范围的动物种类有限。2009 年 9 月,我国首部《中华人民共和国动物保护法(专家建议稿)》已完成公示征集意见,但基于我国现阶段国情,《动物保护法》在法律界还没有达成广泛共识,到目前为止,尚无实质性进展。动物福利保护的底线,应该是反虐待。中国五千多年文化,历来是尊重生命的,现阶段需要将现有规章制度法制化和可操作化,用法制来推动和规范有关实验动物福利与伦理的各项工作。

2.2 加强实验动物福利与伦理相关文件的学习教育

医学生作为我国医药卫生事业的生力军,理应重视和加强实验动物福利与伦理教育,实验动物福利与伦理教育的缺失势必会导致学生对于生命的

漠视和麻木。加强实验动物福利与伦理相关文件的学习,并结合医学生实践教学实际,建立健全切实可行的动物实验教学操作规程等制度,实行规范化管理,从规章制度的层面对实验动物福利与伦理实践教学进行制度化管理,以此来增强学生对生和死意义的理解,增加对生命的敬畏,从而能够自觉地善待和爱护实验动物。教育学生像严肃认真对待人体标本一样,给予实验动物应有的保护和尊重,有助于培养医学生良好的伦理素质和较好的人文和科研素养,最终形成正确的生命伦理观和价值观。

笔者以在新加坡某公立大学留学期间的亲身经历,就相关实验动物福利与伦理情况作一介绍。在该大学所有涉及动物实验的工作人员均需参加实验动物福利与伦理培训,该工作具体由 IACUC 负责组织实施。拟参加培训人员首先通过电子邮件向 IACUC 提出书面申请,IACUC 接到申请后会根据申请人拟使用实验动物种类安排网上学习教程,学员需自行学习并通过相关考试,在此期间,申请人要去学校医疗中心接受疫苗免疫,破伤风疫苗是必选计划免疫,根据申请人拟从事课题的性质还会要求接受相关疫苗的免疫。待以上项目完成后,IACUC 安排申请人现场培训,通常两人一组,培训开始前会再次进行理论和注意事项讲解,然后由 IACUC 工作人员示范讲解,操作过程强调动物福利与人的安全同等重要,演示结束后要求学员自己操作,通过现场考核方能取得动物实验准入资格。与国内相比,新加坡国立大学在保障实验动物福利和人员安全方面更注重培训和预防,理论学习考核通过后方能进行现场操作,现场操作前需进行疫苗接种,通过现场考核才有资格进行动物实验,该管理制度值得国内同行借鉴。

2.3 提高学生运用实验动物福利与伦理有关理论解决实际问题的能力

2.3.1 加强实验动物福利与伦理理论教学

主动适应国际社会对我国实验动物福利与伦理现状的关注,采用多媒体教学,重点讲述实验动物福利与伦理实践中需要遵从的基本原则、基本知识和基本技能,以培养学生良好的人文素养和科研素质,更好地理解和敬畏生命。

2.3.2 注重培养医学生实践操作能力

采用实践教学,通过理论讲解、视频等多媒体

辅助教学手段,教师现场示范,学生自己动手操作,熟悉并掌握大小鼠、豚鼠、兔子、犬等实验动物的抓取与固定、雌雄鉴别、常用给药方法、血液采集方法、实验动物的麻醉镇痛及安死术等实验技能,尽可能减少因实验操作失误或实验技能不熟练给动物带来的痛苦和伤害。要求学生在实践教学中掌握涉及实验动物福利与伦理的基本理论知识和实验操作的基本技能,能够在充分保障实验动物福利与伦理的基础上正确选择和应用实验动物进行课题研究。

2.3.3 科学设计动物实验方案

采用多媒体教学,重点讲解动物实验设计与优化工作中需要掌握的基本思路、动物实验设计的一般原则和方法、动物实验设计过程、动物实验设计的优化、动物实验的设计评价等内容,运用图片、视频等多媒体辅助教学手段,让学生更好地掌握动物实验设计与优化的具体内容,同时要将实验动物福利与伦理的基本理念体现在具体的课题研究中。

2.4 建立健全 IACUC 监管机制,全面推广实行动物实验人员资格准入制度

对涉及动物实验的单位,要按规定将 IACUC 作为一个常设机构,同时结合所在单位实际,制订切实可行的管理条例,规范和监督与实验动物福利与伦理相关的各项工作。在此基础上,主动与国际接轨,与国外同行开展经常性的互访互学,及时回应动物保护组织关切,努力使实验动物福利与伦理的理念与医学进步有机统一起来,使两者相互促进,共同进步。

参考文献:

- [1] 梅志强,王琼,邓莉. 动物福利在研究生实验动物学教学中的应用初探[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(3): 76 - 78.
- [2] 高建峰,谢莉萍,陈健东,等. 非人灵长类实验动物福利与 AAALAC 认证[J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(6): 465 - 467.
- [3] 汤球,孙伟,崔淑芳,等. 实验动物科学的教学改革与效果[J]. 实验动物与比较医学, 2007, 27(1): 60 - 62.
- [4] Fraser AF. Welfare and well-being[J]. Vet Rec, 1989, 125

(12): 332 - 333.

- [5] 余琛琳,汤球,江鹏亮,等. 基于 3R 理论的实验动物福利设计性实验教学初探[J]. 医学教育探索, 2010, 9(10): 1349 - 1351.
- [6] 顾为望,于娟. 国内外动物福利的比较与伦理学思考[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(4): 199 - 203.
- [7] 余琛琳,崔淑芳,汤球,等. 医药院校中加强培养实验动物福利理念的重要性[J]. 实验动物科学, 2008, 25(6): 65 - 67.
- [8] 张鹏飞,章莲保,赵天保. 实验动物福利与人的保护[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(10): 68 - 71.
- [9] Tannenbaum J, Bennett BT. Russell and Burch's 3Rs then and now: the need for clarity in definition and purpose[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015, 54(2): 120 - 132.
- [10] 汤宏斌. 实验动物学[M]. 湖北:湖北省人民出版社, 2016: 271 - 274.
- [11] 贺争鸣,邢瑞昌,方喜业,等. 论实验动物福利、动物实验与动物实验替代方法[J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(1): 61 - 64.
- [12] 李小媚,舒安利,肖素军,等. 关于实验教学中实验动物的伦理学研究[J]. 中国医学伦理学, 2014, 27(6): 876 - 878.
- [13] 汤宏斌. 实验动物福利[M]. 湖北:湖北科学技术出版社, 2014: 96 - 99.
- [14] 李红宇,谭红梅,陈省平,等. 医学教学实验动物的计划与管理[J]. 实验室研究与探索, 2014, 33(7): 244 - 246.
- [15] 柴浩放. 虐待动物视频的网络舆情及社会分析[J]. 管理观察, 2017(1): 186 - 188.
- [16] 越英杰. 动物园野生动物福利评价研究[D]. 东北林业大学, 2009.
- [17] 王强芬. 医学生眼中的动物实验生命伦理意识调查及分析[J]. 医学与哲学(人文社会医学版), 2010, 31(10): 73 - 74.
- [18] 谢军安,田森. 中国动物保护立法问题探析[J]. 石家庄经济学院学报, 2010, 33(1): 103 - 106.
- [19] 冯丽萍,李焱冬,林金杏,等. 欧美实验动物福利立法浅析[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(12): 52 - 55.
- [20] 秦万功. 要通过立法来保护动物[J]. 中国畜牧业, 2014(24): 74.
- [21] 李思颖. 论动物保护法是否该立[J]. 山西青年, 2013(11): 137.

[收稿日期]2018 - 04 - 13

基于成果导向教育理念的实验动物科研项目在大学生综合素质培养中的实践

鞠吉雨¹, 徐玉梅², 刘琳琳³, 杜鸿斌³, 赵春玲^{3*}

(1. 潍坊医学院山东省高校免疫学重点实验室, 山东 潍坊 261053; 2. 潍坊医学院医学伦理学研究室, 山东 潍坊 261053; 3. 潍坊医学院山东省高校生物药物重点实验室, 山东 潍坊 261053)

【摘要】 高等教育要重视培养学生的创新能力、实践能力和创业精神, 普遍提高学生的人文素质和科学素养。我们以成果导向教育理念(outcome-based education, OBE)为指导, 以实验动物科研项目为抓手, 在大学生创新训练项目中制定预期学习产出, 突出能力培养, 在项目实施中强化学生学习的主体地位。实践结果表明, 学生自主学习能力、创新和实践能力获得了提升; 学生科研思路、科研设计得到系统提高; 学生实验动物福利观念得到了加强; 学生在标准化实验动物的选择、实验操作技术的标准化等方面有了素质养成; 对实验动物和动物实验理论知识和关键技术等方面具有正确的认识和科学的应用。

【关键词】 成果导向教育理念; 实验动物; 创新能力; 动物福利

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0119-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.11.021

The practice of experimental animal research projects for comprehensive quality cultivation of college students under the concept of outcome-based education

JU Jiyu¹, XU Yumei², LIU Linlin³, DU Hongbin³, ZHAO Chunling^{3*}

(1. Key Laboratory of Immunology in Universities of Shangdong Province, Weifang Medical University, Weifang 261053, China. 2. Department of Medical Ethics, Weifang Medical University, Weifang 261053. 3. Key Laboratory of Biological Drug in Universities of Shangdong Province, Weifang Medical University, Weifang 261053)

【Abstract】 Higher education must cultivate a college student's innovative ability, practical ability, and entrepreneurial spirit and generally enhance their humanistic quality and scientific literacy. Guided by outcome-based education, we used scientific research projects related to experimental animals and formulated the expected learning output of innovative training projects for college students. We highlighted ability training and strengthened the main status of the students in the project implementation. The results showed that students had an improved self-learning ability, innovation, and practical ability. Scientific research ideas and design of students were systematically enhanced. The concept of experimental animal welfare was also strengthened. Students had quality development in the selection of standardized experimental animals and standardization of experimental operation techniques. In addition, they had the correct understanding and scientific application in theoretical knowledge and key techniques for experimental animals and animal experiments.

【Keywords】 outcome-based education(OBE); experimental animal; innovative ability; animal welfare

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81572578); 山东省自然科学基金项目(ZR2015HM028, ZR2018MH014); 山东省教育科学“十二五”规划“高等教育思想政治教学专项”(ZBX15005)。

【作者简介】 鞠吉雨(1972—), 男, 博士, 研究方向: 自身免疫疾病动物模型。E-mail: jujiyu@163.com

【通信作者】 赵春玲(1974—), 女, 博士, 研究方向: 肿瘤生物学。E-mail: zhaochunlingbj@163.com

高等教育深化改革的目标重点是要重视培养大学生创新能力、实践能力和创业精神,普遍提高大学生的人文素养和科学素质^[1]。因此,如何培养大学生的综合素质特别是创新能力,已成为我国高等教育工作者所面临的一个重要研究课题。在实验动物学教学方面,尽管在理论及实验课程中进行了一些教学改革,取得了一定的成效^[2-4],但学生较多、一对多的批量指导模式并不能满足学生创新意识、综合实践能力培养的需求。近年来,我们从我校实际情况出发,以成果导向教育理念(outcome-based education, OBE)为指导,以实验动物科研项目为重要抓手,突出学生主动学习的主体地位,通过本科生导师引领,对学生进行针对性指导,取得了良好成效,学生在实验动物的实践能力及素质养成方面更是受益匪浅。

1 OBE 理念内涵

OBE 理念是 1994 年美国学者 Spady 提出的一种以学生学习产出为导向的先进教育模式,该模式密切围绕学生需要获得的能力组织、实施和评估教学。学生的能力产出为整个教学过程的重点,成果导向即产出导向^[5-6]。传统教学模式以教师为主导、以知识体系为导向、“重教轻学”、“重知轻行”,OBE 则突出学生的主体地位,学生是主动的学习者,为自己的学习负责。遵循“以学定教”的原则,即以学生知识、能力和素质需求为目标确定教学内容、教学设计、教学过程和教学评价等,注重学生创新、实践等能力的培养^[7]。作为美国、英国、澳大利亚等国家教育改革的主流理念,OBE 对高素质的人才培养具有十分重要的作用,但在我国尚没有得到重视和推广,这方面的研究尤其是与之相关的实证性研究并不多见。

2 OBE 理念下实验动物科研项目在大学生综合素质培养中的实践

2.1 预期学习成果的确定

本实验室导师承担着国家级、省部级科研项目,课题的主要研究对象为实验动物,如裸鼠、转基因小鼠和基因敲除小鼠等。参与的学生主要来自临床医学专业、药学专业和生物技术专业,大多缺乏必要的实验动物学相关知识和基本的操作技能。而 OBE 理念强调的学习成果包括:学生应掌握的理论知识和实验技能,自我学习的能力、提出问题、分析问题、解决问题的能力等^[8]。基于此,我们调研

了学生的学习需求(访谈形式)、科研工作者的素质要求以及专业培养目标、专业培养方案,凸显本科生导师的实验动物科研项目的特色,密切理论与实践的内在联系,而有针对性地将学生在实验动物方面的实践及素质养成确定为项目学习产出,拓展学生的知识体系和培养学生的综合素质。预期学习成果明确后,我们会在项目实施前展示给学生,让学生明确自己的任务和目标,激发学生学习兴趣和内在动力。

2.2 项目实践

在 OBE 的教育理念指导下,依托实验动物相关的科研项目,我们强化学生主动学习与实践的中心地位,将实验动物学相关知识网站,以及涉及实验动物基本操作的视频网站提供给学生,让学生自学。学生还要主动查阅课题相关资料、设计动物实验、动手实践。学生如有疑问可直接与同学、导师交流讨论。整个实践过程,导师只是给予学生针对性、个性化地必要指导。

3 OBE 理念下实验动物相关的科研项目实施效果

既往在对本科生进行科研训练指导过程中,发现学生被动地听从老师的指挥,缺乏独立思考,影响了学习积极性和学习效果。而将 OBE 理念引入实验动物相关的科研项目的训练后,学生自主学习能力、创新和实践能力获得了提升;学生科研思路、科研设计得到系统提高;尤其在实验动物方面更是得到了深入学习和提高。

3.1 充分理解实验动物福利,培养学生人文素质

实验动物福利教育作为提高学生人文素质的重要途径,能培养学生尊重生命、仁慈博爱的道德情怀。我们以实验动物相关的科研项目为教育契机,在 OBE 教育理念指导下,引导学生自主学习《实验动物福利与法规》和《实验动物福利伦理审查指南》,并定期开展实验动物福利伦理审查培训,增强了学生对实验动物福利伦理的理解。通过项目实践,学生能充分认识到实验动物福利伦理的重要性。尤其在实验动物的饲养管理、运输过程管理、实验设计、实验过程及实验结束后动物安乐死处理等诸多方面。善待动物不单单是人道主义的需要,也是科学研究的需要。福利的核心是充分保障动物的健康、快乐及舒适自然,得到的研究结果才能可靠和真实。科研人员的专业能力、研究方法、技术操作的选择及熟练程度等因素均会直接或间接

影响实验动物的精神和生理反应,从而影响到实验结果的准确性、可靠性及可重复性。在实验过程中科学地对待动物的福利伦理问题,不仅影响到科研人员在社会中的形象和地位,也会影响着社会对科学研究的认可程度。从对动物人道关怀方面出发,实验动物在人类生命健康、医学事业等方面做出了无私的奉献,就应该享受一定的福利,应该得到善待。在研究成果投稿时如违背动物福利伦理,可能会被拒稿甚至在发表后会撤稿处理。如,2011 年 7 月,Raj 等^[9]发表在《Nature》杂志题为《Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS》的论文,该论文使用一种小分子的茛菪酰胺(piperlongumine)选择性杀死小鼠体内的癌细胞。论文发表后,因该研究中部分小鼠体内的肿瘤体积超出允许的最大直径 1.5 cm,违反了动物福利相关要求于 2015 年 10 月撤销了论文中的相关数据,论文作者发表道歉声明,杂志社声明涉及动物实验的论文需作者列出实验动物管理和使用委员会所允许的最大肿瘤尺寸,并声明这一尺寸不能在试验期间被超过^[10]。该论文研究人员就是严重违反了动物福利而遭到部分数据撤销,随着肿瘤的生长,肿瘤越大,给动物造成的伤害越大,动物出现的应急反应就越大,精神上 and 肉体上均会产生严重的痛苦和不适,对动物的活动及心理就会造成严重影响,不能真实反应实验数据。2018 年 7 月,该论文最终因原始数据问题被《Nature》撤稿^[11]。因此,在实验设计、实验过程中时要充分考虑荷瘤对动物带来的痛苦。通过典型实例学习、讨论和分析,引导学生对实验动物福利的重视并强化训练。

3.2 充分认识标准化实验动物选择的重要性

科学研究的实验结果要具有很好的重复性,实验动物的遗传稳定性、一致性直接影响到实验结果的重复性。因此,实验动物饲养及管理的标准化一直是实验动物工作者追求和研究的目标。通过项目实践,学生充分认识到要尽量选用经遗传学、微生物学、营养学、环境卫生学的控制而培育的标准化实验动物,才能排除因实验动物携带细菌、病毒、寄生虫等微生物和潜在疾病对实验结果的影响;同时排除因实验动物杂交造成的遗传上不稳定、个体差异大、反应不一致等对实验结果造成的影响。其次,动物的性别、年龄、体重、生理、体质状况、环境因素(温度、湿度、光照、噪声、气流次数、换气次数、

氨浓度、洁净度等)、动物营养、动物照料等因素都会影响到实验结果及其结果的重复性。

3.3 充分认识熟练的动物实验操作技术的重要性

动物实验操作技术已成为医学、生物学等专业不可或缺的技术手段。通过项目实践,学生充分认识到根据不同的研究目的,动物实验技术多种多样,但基本操作技术比较一致,操作技术的使用及熟练程度直接影响实验结果的稳定性,尤其是在药代动力学、生物等效性、毒理学评价等方面。随着精准医疗的发展,对实验动物的精准技术尤其是精准给药也越来越受到重视,如门静脉给药、舌下给药、睾丸给药等可直接将药物注射到位,避免因其它途径给药带来的药物吸收、药效损失等影响。熟练的操作技术也会对实验结果带来不可估量的影响,如手术操作时间的长短影响动物的应急反应、手术部位选择影响动物的术后恢复、手术无菌控制影响动物的炎症反应等,这些都会对实验结果产生影响。因此,有必要训练学生的动物实验操作技术,使学生能熟练掌握,同时尽可能形成标准化并制定标准操作程序(standard operation procedure, SOP),使实验操作技术不因学生个体操作差异对实验结果带来影响。

正是通过 OBE 理念下实验动物相关科研项目的训练,我们指导的学生获得以上三个充分认识,所以能够在饲养管理和使用实验动物过程中,以实验动物福利思想为指导,为实验动物提供清洁、舒适的生活环境,提供充足、健康的饮水和食物,自觉采取保障动物福利的有效措施,使实验动物免遭不必要的饥渴、不适、惊恐、伤害、折磨、疾病和疼痛,保证动物能够实现自然行为;能根据自身课题需要,慎重选择合适的标准化实验动物;能严格要求自己,按 SOP 进行规范训练,熟练掌握动物实验操作技术。这些良好素质的培养和实践能力的训练,使得学生在设计或进行动物实验时更加规范,获得的实验结果更加真实、可靠,实验结果的一致性得到提高。因此,教学改革后,近 5 年在本实验室训练的学生有 26 人争取到国家级大学生创新创业训练项目,有 20 人考入国内知名大学或研究所,如北京协和医学院、北京大学、浙江大学、中国科学院生化与细胞所等读研,有 5 人在山东省大学生生物科技创新大赛中获奖。

4 结语

我们以 OBE 理念为指导,以实验动物相关的科

研项目训练为抓手,引导学生确立自己的学习目标,突出学习的主体地位,学生的创新能力、综合实践能力得到了培养和提升;学生科研思路、科研设计得到系统提高;学生实验动物福利观念得到了加强;学生在标准化实验动物的选择、实验操作技术的标准化等方面有了素质养成;对实验动物和动物实验理论知识和关键技术等方面具有正确的认识和科学的应用。我们的实施成效显著,OBE 理念指导下以科研项目促进本科人才培养质量,这种教学改革方式值得进一步推广和应用。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国教育部. 中共中央国务院关于深化教育改革,全面推进素质教育的决定 [EB/OL]. http://old.moe.gov.cn/publicfiles/business/htmlfiles/moe/moe_177/200407/2478.html, 1999-06-13.
- [2] 张爱华,曾文滔. 医学院校实验动物学教学改革实践与探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(3): 93-95.
- [3] 罗红,沈祥春,智妍,等. 突出“趣味”教学理念的实验动物学课程教学改革 [J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(4): 334-336.

- [4] 李维国,师长宏,赵勇. 高等院校实验动物教学中动物实验体系的改革和构建 [J]. 继续医学教育, 2015, 29(8): 22-23.
- [5] Spady WG. Outcome-based education: Critical issues and answers [M]. Arlington, VA: American Association of School Administrators, 1994.
- [6] Spady WG. Choosing outcomes of significance [J]. Educational leadership, 1994, 51(6): 18-22.
- [7] 王金旭,朱正伟,李茂国. 成果导向:从认证理念到教学模式 [J]. 中国大学教学, 2017(6): 77-82.
- [8] 杨定泉. 基于成果导向的教学设计路径 [J]. 郑州航空工业管理学院学报, 2018, 37(3): 123-128.
- [9] Raj L, Ide T, Gurkar AU, et al. Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS [J]. Nature, 2011, 475(7355): 231-234.
- [10] Raj L, Ide T, Gurkar AU, et al. Corrigendum: Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS [J]. Nature, 2015, 526(7574): 596.
- [11] Raj L, Ide T, Gurkar AU, et al. Retraction Note: Selective killing of cancer cells by a small molecule targeting the stress response to ROS [J]. Nature, 2018, 561(7723): 420.

[收稿日期]2018-07-19

(上接第 52 页)

参考文献:

- [1] Abookasis D, Zafrir E, Nesher E, et al. Diffuse near-infrared reflectance spectroscopy during heatstroke in a mouse model: pilot study [J]. J Biomed Opt, 2012, 17(10): 105009.
- [2] Yan YE, Zhao YQ, Wang H, et al. Pathophysiological factors underlying heatstroke [J]. Med Hypotheses, 2006, 67(3): 609-617.
- [3] Heled Y, Fleischmann C, Epstein Y. Cytokines and their role in hyperthermia and heatstroke [J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2013, 24(2): 85-96.
- [4] 刘红艳,王海燕,叶松. 姜黄素药理作用及其机制研究进展 [J]. 中国现代医学杂志, 2012, 2(6): 49-51.
- [5] 李佳佳,刘江伟,姚刚,等. 姜黄素对沙漠干热环境大鼠生存率影响的实验 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(10): 24-28.
- [6] 周仁鸥,刘江伟,张东,等. 沙漠干热环境中暑大鼠肾脏损伤性变化的研究 [J]. 中华急诊医学杂志, 2014, 23(11): 1228-1233.
- [7] Paller MS, Hoidal JR, Ferris TF. Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat [J]. J Clin Invest, 1984, 74(4): 1156-1164.
- [8] Salvemini D, Cuzzocrea S. Oxidative stress in septic shock and disseminated intravascular coagulation [J]. Free Radic Biol Med, 2002, 33(9): 1173-1185.
- [9] 杨茜雯,王冠宇,顾栩栩,等. 高温环境下军事训练所致中暑

的研究进展 [J]. 华南国防医学杂志, 2014, 28(10): 1056-1057.

- [10] Lykkesfeldt J, Svendsen O. Oxidants and antioxidants in disease: oxidative stress in farm animals [J]. Vet J, 2007, 173(3): 502-511.
- [11] Kehrler JP. Free radicals as mediators of tissue injury and disease [J]. Crit Rev Toxicol, 1993, 23(1): 21-48.
- [12] Sarkar FH, Li Y. Cell signaling pathways altered by natural chemopreventive agents [J]. Mutat Res, 2004, 555(1-2): 53-64.
- [13] 田华,胡灵,张玉霞,等. 姜黄素对糖尿病肾病大鼠肾脏的抗氧化应激作用及保护机制 [J]. 中国临床药理学杂志, 2013, 29(6): 457-459.
- [14] He LY, Peng XF, Zhu JF, et al. Protective effects of curcumin on acute gentamicin-induced nephrotoxicity in rats [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2015, 93(4): 275-282.
- [15] Abdel-Moneim AM, El-Toweissy MY, Ali AM, et al. Curcumin ameliorates lead (Pb^{2+})-induced hemato-biochemical alterations and renal oxidative damage in a rat model [J]. Biol Trace Elem Res, 2015, 168(1): 206-220.
- [16] Hismiogullari AA, Hismiogullari SE, Karaca O, et al. The protective effect of curcumin administration on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced nephrotoxicity in rats [J]. Pharmacol Rep, 2015, 67(3): 410-416.

[收稿日期]2018-04-04

中医院校本科生阶段开设“实验动物学”选修课的探索

刘建卫,章明星,潘建明,王 虹*

(天津中医药大学,天津 300193)

【摘要】 实验动物学以实验动物和动物实验为主要研究对象,是医学科学研究中不可或缺的部分。为适应高等教育本科阶段培养创新型人才的需要,教育部在“十二五”期间实施国家级大学生创新创业训练计划,更多的本科生得以直接参与到科学研究中,鉴于此,在中医院校本科阶段开始实验动物学相关选修课,提高本科生科研能力,较以往更为重要。课程采用课上、课下多种教学模式,对实验动物概念、常用实验动物解剖生理特点、动物实验设计、动物疾病模型制备方法、基因工程动物模型制备原理等进行介绍,加强学生学习的过程性评价,优化成绩评定方法,提高学生学习主动性,为本科生顺利完成科学研究工作奠定基础。

【关键词】 实验动物学;动物实验;本科教学;动物解剖;大学生创新

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018) 11-0123-03

doi: 10. 3969/j. issn. 1671 - 7856. 2018. 11. 022

Exploration of offering an elective course of laboratory animal science for undergraduate students in traditional Chinese medical universities and colleges

LIU Jianwei, ZHANG Mingxing, PAN Jianming, WANG Hong*

(Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

【Abstract】 Laboratory animal science mainly consists of experimental animals and animal experiments. It is an indispensable part of medical science research. To meet the needs of cultivating innovative talent at the undergraduate stage of higher education, the Ministry of Education has implemented the innovation and entrepreneurship training program for national college students during the “12th Five-Year” period, and more undergraduate students are able to participate in scientific research directly. Therefore, experimental zoology courses start at the undergraduate stage of Chinese medicine colleges and universities to improve undergraduate students. The ability to perform scientific research is more important than ever. The curriculum adopts a variety of teaching modes in class. It introduces the concept of experimental animals, the anatomical and physiological characteristics of common experimental animals, animal experiment design, methods of animal disease model establishment, and the principles of genetic engineering for animal model establishment. It strengthens the process of evaluating student learning, optimizes the method of evaluation, and improves the ability of students. This learning initiative lays the foundation for successful completion of scientific research by undergraduates.

【Keywords】 laboratory animal science; animal experiment; undergraduate teaching; animal anatomy; innovation of college students

【基金项目】 天津市高校本科教学质量与教学改革计划项目(171006301C)。

【作者简介】 刘建卫(1979—),男,讲师,主要从事中西医结合基础研究。E-mail: stoneliu7890@126.com

【通信作者】 王虹(1974—),女,研究员,主要从事中药药理研究。E-mail: 1929740549@qq.com

实验动物学以研究实验动物及动物实验为主要内容,是涉及动物科学、生物学、医学、遗传学等生命科学多学科交叉的基础和技术性科学。在中医院校中医、针灸、中西医结合、中药、制剂、药学等专业的课程中,都需要使用到实验动物。完善中医院校实验动物学教学体系,对培养基础知识扎实、创新能力强的高层次中医药人才,具有不可替代的作用。

1 适应高等学校教学质量改革,助力培养创新人才,在本科生中开设实验动物学选修课程

适应高等教育本科阶段培养创新型人才的需要,根据《教育部 财政部关于“十二五”期间实施“高等学校本科教学质量与教学改革工程”的意见》(教高[2011]6号)和《教育部关于批准实施“十二五”期间“高等学校本科教学质量与教学改革工程”2012年建设项目的通知》(教高函[2012]2号),教育部在“十二五”期间实施国家级大学生创新创业训练计划,使本科生有机会广泛参与到较前沿的科学研究中来^[1]。

在大学生创新研究训练项目实施的过程中,动物实验部分往往对学生造成困扰。原因在于,以往我校只在研究生中开设“实验动物学”选修课程,本科生虽在生理学、药理学、整合课程等实验课中使用到实验动物,但仅限于任课教师在课前为顺利完成实验,简单介绍动物抓取、固定等操作,并未对实验动物的解剖、生理特点等做更深入的介绍,国内大多数中医院校存在类似情况^[2-3]。同时,教学与科研中动物实验有很大的区别,教学实验为验证性实验,有成熟的实验大纲,实验中使用单只动物操作及现象观察,且动物在课前由教师采购及准备,不需要学生进行实验设计、动物品系选择、随机分组等前期工作;而科学研究中的动物实验,需要学生独立完成以上一系列的准备工作。由此,在本科生中开设实验动物学相关选修课程,为希望参加大学生创新项目的学生提供学习的途径,必要性较以往更为突出,为满足这一需求,面向中医、针灸推拿、中西医结合、护理、中药、药学等专业学生开设了18学时的“实验动物解剖及模型制备”选修课。

2 教学内容按需设计,以学生为中心,精益求精,不盲目追求大而全

“实验动物解剖及模型制备”选修课的教学内容以满足本科生参加科研中动物实验的基本需求

为原则^[4],课程内容设置为四个专题:①常用实验动物(大小鼠、家兔、犬、猪)的解剖、生理特点(共6学时);②动物实验设计及基本操作(共4学时),包括实验方案、动物品系、性别、数量等的确定,实验前动物标记、编号、随机分组方法,实验中动物状态观察、记录、饲养管理要点、动物福利要求,另外介绍动物抓取、固定、麻醉、给药、取血、处死等动物实验基本操作方法;③结合学校学科优势,讲授常用疾病动物模型的制备(共6学时),如大鼠大脑中动脉栓塞模型、大小鼠心肌缺血模型、化学诱导糖尿病模型、代谢性肥胖模型等;④转基因动物模型(共2学时),介绍基因工程动物模型制备原理、技术要点、研究进展等。四个专题涵盖了医学科学研究中动物实验的基本内容,结合我校的优势科研方向,从动物实验的实际需求出发,利用有限的教学时间,尽可能地满足学生的学习需求。

3 教学形式多样化,突破课堂限制

采用课上讲授注重知识深度,课下网络拓展知识广度相结合的教学方式^[5-7]。通过设立课程微信公众号,将与课上讲授内容相关的知识推送给学生,弥补课上教学时间的不足。如“基因工程动物模型制备方法”专题,课上主要讲授基因动物制备的基本原理,当前热门的CRISPR/Cas9等技术的详细实验步骤等由公众号推送,学生课下浏览;课上没有资源、时间向学生演示的一些动物实验的基本操作,如抓取、标记、采血、麻醉、静脉注射等,也制作为图文、视频由课程公众号向学生推送。公众号后台强大的数据统计功能,还能够监测学生浏览图文的情况,包括图文阅读总数、阅读的途径、有没有分享转发、有多少同学收藏了图文,不仅掌握了学生学习情况,还为学生形成性评价提供依据,更重要的是能够通过学生的阅读、转发次数,了解图文质量,改进图文内容,提高教学效果。

4 目前限于实验条件,为节约动物资源,实验动物学选修课未设置实验操作内容,将在后续教学实践中逐步完善

目前选修课中未设置实验操作内容,原因有①“实验动物解剖及模型制备”选修人数较多,以本校2016及2017年课程开设情况看,选修学生数均达到了80人的上限,如果平行开展实验课,师资及实验室等配套资源不足,课程安排有很大困难;②开设实验操作课程需要使用大量实验动物,但课

程针对非实验技术专业本科生开设,课后能够参加大学生创新项目、参与科学研究的同学占比约 10% 左右,不能充分体现实验动物的价值,造成很大的浪费,也不符合实验动物福利伦理 3R 原则^[8]。但是,“实验动物学”属于较强的专业学科,应配备实验课的内容才能更好地掌握所学知识,因此,在以后的教学实践中,逐步设置实验课内容,从常规啮齿类动物的解剖结构、生理特点、遗传规律等进行介绍讲述,应该能得到更好的效果。另外,一般来说,各种动物实验的基本操作,如动物标记、分组、抓取、固定、麻醉、给药、处置等,虽在生理学、药理学、中药学、实验针灸学等课程的实验课中有所涉及,但都不具体、不系统,如果能够开设一门针对科研项目动物实验部分的实验课,从实验设计到具体实施都由学生自主完成,有了这样的训练,将使学生更容易地参与到后期的科研活动中。

实验动物选修课的教学重点,是将学生带入实验动物科学的大门,对整个实验动物科学有一个轮廓上的认识,从专业学科的角度,认识常用实验动物的解剖、生理、遗传规律,教会学生获取实验动物科学相关知识的方法,提高学生设计动物实验的能力,实验课也是重要的教学手段。

5 选修课成绩考核突出过程评价,结课以撰写论文综述、实验设计代替结课考试

成绩考核以课堂出勤、课上互动、课程公众号浏览次数、交互活跃度为参考,整体测评,不设结课考试,学生可结合感兴趣的科研内容,在下列两个结课作业中选择一个:①撰写一篇关于动物疾病模型制作方法的综述;②设计一个完整的动物实验方案,包括动物选择、分组、处置、取材、伦理审查等内容。总成绩由过程评价及结课作业各占 40%、60%。

6 结语

实验动物作为医学科学发展的重要平台和工具,被广泛应用于人类或动物疾病机制研究、疾病

模型制备、药物安全评价等研究领域,因此其作用和地位越来越受到重视,同时,为适应高等教育本科阶段培养创新型人才的需要,愈来愈多的本科生参加到科学研究中,并且取得了一批成果,但大部分中医院校在本科阶段教学中未安排“实验动物学”相关课程,在指导本科生创新项目过程中,认识到此问题,遂于 2016 年申报为中医、中药、针推、护理、药学等专业本科生开设了“实验动物解剖及模型制备”选修课,分四个专题介绍常用动物的解剖生理特点、动物实验方法、我校优势研究方向所用动物模型制备方法、基因工程动物模型制备原理等内容,随着课程的不断完善,将为培养具有较好动物实验能力的医学本科人才奠定一定基础。由此,在本科生中开设“实验动物学”课程是各大医科院校,包括中医院校在内的大势所趋。

参考文献:

- [1] 崔亚利,耿梅英,徐瑞涛,等. “实验动物学”教学中培养本科生专业能力的实践与思考 [J]. 河北农业大学学报(农林教育版), 2017, 19(1): 92-95.
- [2] 刘璐崧,刘鸿,王春田. 中医院校实验动物教学的思考与实践 [J]. 黑龙江教育(理论与实践), 2017, 5(12): 51-52.
- [3] 白剑,刘鸿. 中医院校本科层次实验动物学教学方法的改革与探索 [J]. 时代教育, 2015, 12(15): 4.
- [4] 韩志刚,张倩,韩文莉,等. 医药院校实验动物生物安全危害及防控 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(10): 120-122.
- [5] 田枫,康爱君,郑振辉. 不同层次需求的实验动物学教学特点 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(9): 78-82.
- [6] 张爱华,曾文滔. 医学院校实验动物学教学改革实践与探讨 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(3): 93-95.
- [7] 舒畅,张延英,张艳霞,等. 中医院校实验动物学本科教学改革探讨 [J]. 甘肃中医学院学报, 2013, 30(2): 88-89.
- [8] 谭冬梅,谭毅,韩志刚. 医药院校实验教学中存在的动物福利问题及对策 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(12): 91-94.

[收稿日期]2018-04-13

为新药高效研发体系 提供临床前动物实验完善服务



实景图（2016年11月5日航拍图）

合肥半汤生物经济实验区是未名集团投资建设的生物药研发和制造基地，位于安徽省合肥市，占地31平方公里；整个建筑群工程浩大，带状绵延犹如一条巨龙，每栋单个建筑都是一个字母，组合起来看，从左到右8栋建筑组成英文“抗体”即ANTIBODY，将成为世界一流水平的抗体药生产基地；右侧ATCG为基因的四个碱基，作为国家大基因中心；未名实验动物中心位于实验区内（龙尾处），也是中国实验动物联盟的核心基地，占地100亩，中心建筑面积6万平方米，为新药高效研发体系提供临床前动物实验完善服务，建立新药研发临床期前实验的“巴拿马运河”。