中国科技论文统计源期刊
中文核心期刊要目总览（北大图书馆）

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

原名《中国实验动物学杂志》

2018 9

邮发代号：82-917
第28卷（第9期）Vol.28 No.9
ISSN 1671-7856

主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

中 国 比 较 医 学 杂 志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

月刊　1991 年 3 月创刊　第 28 卷　第 9 期　2018 年 9 月 30 日出版

主　管
中国科学技术协会
主　办
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所
主　编
秦　川
编辑部主任
李继平
编　辑
《中国比较医学杂志》编辑部
出　版
中国实验动物学会
发　行
《中国比较医学杂志》编辑部
100021,北京市朝阳区潘家园南里 5 号
电话:010 - 67779337
传真:010 - 67770690
E-mail: bjb@ cnilas. org
http://zgsydw. alljournal. ac. cn/zgbjyxzz/ch/index. aspx
广告发布登记
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:中邮阅读网:www. 183read. com
本期执行主编　顾为望
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

咪喹莫特对BALB/c 和 C57BL/6 小鼠银屑病样皮损诱导作用的比较 …… 吴剑平,谢倩,陈林,等(01)
树鼩大肠内容物细菌的群落多样性分析 …… 郭玉倩,角建林,袁鑫,等(07)
长爪沙鼠糖尿病近交系培育过程中血液生理生化指标的动态变化 …… 王迎,李迎,王东平,等(14)
五指山小型猪 *PPARγ2* 基因启动子多态性分析 …… 潘金春,闵凡贵,王希龙(21)
复方阿胶浆对小鼠子宫内膜作用研究 …… 丁桂清,魏华芳,王立群,等(27)
多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞中 DR5、DcR2 的表达变化 …… 张娟,王立群,周月希,等(33)
树鼩胆石模型与消化道 P 物质相关的研究 …… 吕龙宝,陈丽雄,王俊斌,等(40)
建立高尿酸血症性肾损害小鼠模型的实验研究 … 裴忆雪,刘永杰,张笛,等(46)
基于肝门静脉注射肿瘤细胞的新型进展期肝脏肿瘤动物模型的建立 …… 柴燕涛,姜棋予,冯帆,等(55)
沉默 Blimp-1 促进 IFN-γ 表达抑制肝癌细胞的作用研究 …… 邓浩,彭启旺,李伟(61)
周龄对非肥胖型糖尿病背景小鼠体外受精效果的影响 …… 阎涛,胡萍,徐晨,等(66)

技术方法

“互联网 +”实验动物资源共享服务平台模式研究 …… 李会萍,王晓明,杨锦淳,等(69)

经验交流

四种常用实验动物与人的肝组织形态特征比较 …… 李靖,王艳丽,刘恩岐(74)
品管圈在降低动物实验不规范行为发生率中的应用 …… 梁磊,尤金炜,胡文娟,等(78)

设施设备

动物鼻式气溶胶暴露装置的运行效果评价 …… 郝新彦,向志光,高虹(83)
生物安全型禽负压隔离器的研制 …… 张宗兴,祁建城,吴金辉,等(90)

研究进展

环状非编码 RNA 在口腔鳞癌中的研究进展 …… 卫佳宁,续国强,高继萍,等(96)
情绪异常大鼠模型的旷场行为实验在中医药领域的研究进展 …… 张鹏横,阮璐薇,卓泽伟,等(100)
树鼩在人类代谢性疾病中的应用与展望 …… 夏巍,赖永静,杜龙,等(104)
成纤维细胞向运动神经元的分化研究进展 …… 施玉婷,李峰(110)
大鼠星状神经节阻滞方法的综述 …… 胡可,张炳东(115)

调查报告

抗菌药物合理使用对临床手术感染率影响的比较医学分析 …… 黄小燕,赵喜荣,曹瑞丽(120)

快　讯

Animal Models and Experimental Medicine 被国际数据库 DOAJ 收录 …… (60)
第十四届中国实验动物科学年会通知 …… (109)

广　告　(封二,封三,封底,126)

期刊基本参数:CN11 - 4822/R * 1991 * m * 大 16 * 128 * zh * p * ￥50. 00 * 2000 * 22 * 2018 - 09

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly **Established in March** 1991 **Volume** 28 **Number** 9 **September** 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://zgsydw. alljournal. ac. cn/zgbjyxzz/ch/index. aspx

Editor-in-Chief
QIN Chuan(秦川)

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

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

Mail-order
Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

CSSN
ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2018 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

Comparison of imiquimod-induced psoriatic lesions in BALB/c and C57BL/6 mice ····· *WU Jianping*, *XIE Qian*, *CHEN Lin*, *et al.* (01)
Diversity analysis of the tree shrew hindgut microbiota by Illumina PE250 sequencing technology ····· *GUO Yuqian*, *JIAO Jianlin*, *YUAN Xin*, *et al.* (07)
Dynamic changes of biochemical and physiological indexes in breeding a diabetic inbred Mongolian gerbil line ····· *WANG Ying*, *LI Ying*, *WANG Dongping*, *et al.* (14)
Analysis of polymorphisms in the promoter region of the *PPARγ2* gene in Wuzhishan minipigs ····· *PAN Jinchun*, *MIN Fangui*, *WANG Xilong*(21)
Effect of compound Ejiao slurry on the mouse endometrium ····· *DING Guiqing*, *WEI Huafang*, *WANG Liqun*, *et al.* (27)
DR5 and DcR2 protein expression in granulosa cells of ovaries of polycystic ovary syndrome rats ····· *ZHANG Juan*, *WANG Liqun*, *ZHOU Yuexi*, *et al.* (33)
Substance P in the digestive tract of a tree shrew cholesterol-induced gallstone model ····· *LYU Longbao*, *CHEN Lixiong*, *WANG Junbin*, *et al.* (40)
Establishment of a hyperuricemia mouse model with renal damage ····· *PEI Yixue*, *LIU Yongjie*, *ZHANG Di*, *et al.* (46)
Constructing an intrahepatic model of advanced liver cancer by injecting cancer cells through the hepatic portal vein ····· *CHAI Yantao*, *JIANG Qiyu*, *FENG Fan*, *et al.* (55)
Silencing Blimp-1 inhibits hepatoma cells by promoting IFN-γ expression ····· *DENG Hao*, *PENG Qiwang*, *LI Wei*(61)
Effects of age on efficacy of *in vitro* fertilization in non-obese diabetic mice ····· *YAN Tao*, *HU Ping*, *XU Chen*, *et al.* (66)
Research on sharing service patterns of "Internet +" laboratory animal resources ····· *LI Huiping*, *WANG Xiaoming*, *YANG Jinchun*, *et al.* (69)
Tissue morphological characteristics of liver from four commonly used laboratory animals compared with those of human ····· *LI Jing*, *WANG Yanli*, *LIU Enqi*(74)
Application of a quality control circle for reducing the rate of non-standardized behaviors in animal experiments ····· *LIANG Lei*, *YOU Jinwei*, *HU Wenjuan*, *et al.* (78)
Evaluation of the operational effect of the animal nose-only inhalation exposure device ····· *HAO Xinyan*, *XIANG Zhiguang*, *GAO Hong*(83)
Development of a biosafety negative-pressure poultry isolator ····· *ZHANG Zongxing*, *QI Jiancheng*, *WU Jinhui*, *et al.* (90)
Research progress on cyclic noncoding RNA in oral squamous cell carcinoma ····· *WEI Jianing*, *XU Guoqiang*, *GAO Jiping*, *et al.* (96)
A review of experimental studies on the behavior of rat models with abnormal emotion in Traditional Chinese Medicine ····· *ZHANG Pengheng*, *RUAN Luwei*, *ZHUO Zewei*, *et al.* (100)
Application of tree shrews in human metabolic diseases and prospects ····· *XIA Wei*, *LAI Yongjing*, *DU Long*, *et al.* (104)
Research progress on conversion of fibroblasts into motor neurons ····· *SHI Yuting*, *LI Feng*(110)
A review of rat stellate ganglion block ····· *HU Ke*, *ZHANG Bingdong*(115)
Comparative medical analysis of the effect of rational use of antibacterial drugs on clinical surgical infection rate ····· *HUANG Xiaoyan*, *ZHAO Xirong*, *CAO Ruili*(120)

研究报告

咪喹莫特对 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠银屑病样皮损诱导作用的比较

吴剑平,谢　倩,陈　林,张军峰,史丽云,詹　臻*

(南京中医药大学,南京　210023)

【摘要】 **目的**　观察咪喹莫特对不同品系小鼠银屑病样皮损诱导作用的差异及其作用机理。**方法**　选用 BALB/c 和 C57BL/6 两种小鼠品系,分别在其背部涂抹 62.5 mg 含 5% 咪喹莫特的明欣利迪乳膏,在涂抹 2,4,6 d 后,采用 PAIS 评分观察小鼠背部皮肤形态学变化;HE 染色观察涂药局部皮肤病理组织学变化,显微镜下测量表皮厚度;实时荧光定量 PCR 法测定 IL-23/IL-17 轴相关细胞因子的相对表达量。**结果**　随咪喹莫特涂抹天数的增加,BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠背部皮肤均逐渐出现鳞屑、红斑、表皮增厚等银屑病样表现。与同时间段 C57BL/6 小鼠银屑病样皮损比较,BALB/c 小鼠皮损 PAIS 评分更高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),病理组织学改变及表皮增厚均更显著($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。涂抹咪喹莫特 2 d 后,两种小鼠 IL-23、IL-17A 和 IL-17F mRNA 相对表达量均显著升高,且均呈现先高后低的动态变化。其中 BALB/c 小鼠表达峰值出现于涂药后 2 d,C57BL/6 小鼠表达峰值出现于涂药后 4 d。**结论**　咪喹莫特均可诱导 BALB/c 和 C57BL/6 小鼠出现人类银屑病样皮损,其中 BALB/c 小鼠银屑病样皮损更典型,可能更适用于人类银屑病研究,IL-23/IL-17 轴的激活是皮损出现的重要诱导因素之一。

【关键词】 银屑病小鼠模型;咪喹莫特;BALB/c 小鼠;C57BL/6 小鼠;IL-23/IL-17 轴

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 09-0001-06

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.001

Comparison of imiquimod-induced psoriatic lesions in BALB/c and C57BL/6 mice

WU Jianping, XIE Qian, CHEN Lin, ZHANG Junfeng, SHI Liyun, ZHAN Zhen*

(Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To determine the effect of imiquimod on psoriasis-like lesions in different strains of mice and the mechanism involved. **Methods**　Two mouse strains, BALB/c and C57BL/6, were chosen, onto the back of which 62.5 mg of 5% imiquimod cream was applied. PAIS score was used to determine the morphological changes of mouse back skin. The histopathological changes of skin were observed by HE staining, the thickness of the epidermis was measured under a microscope, and the relative expression of cytokines related to the IL-23/IL-17Axis was measured by real-time PCR. **Results**　With the passage of time, psoriasis-like skin lesions gradually formed on the back skin of both BALB/c and C57BL/6 mice. Compared with those in C57BL/6 mice, the PAIS score of BALB/c mice was higher, and histopathological changes and epidermal thickening ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) were also more significant. Two days after the application of imiquimod, the relative expression of IL-23, IL-17A, and IL-17F mRNA in the two mouse groups all

[**基金项目**]国家自然科学基金项目(编号:81473593,81473458)。

[**作者简介**]吴剑平(1986—　),女,实验师,博士研究生在读,研究方向:实验动物与比较医学。E-mail: wjp4411544@163.com

[**通信作者**]詹臻,教授,博导,研究方向:中西医结合基础。E-mail: zhanzhan5607@163.com

increased significantly, and both groups showed a dynamic change of an initial increase and then a decrease. The peak of expression in BALB/c mice appeared 2 days after the application, and in C57BL/6 mice it appeared at 4 days. **Conclusions** Imiquimod can induce psoriasis-like lesions in both BALB/c mice and C57BL/6 mice, but the lesions in BALB/c mice appeared to be more typical, potentially making them more suitable for human psoriasis research. The activation of the IL-23/IL-17Axis is one of the most important inducers of skin lesions.

【**Keywords**】 psoriasis mouse model; imiquimod; BALB/c mice; C57BL/6 mice; IL-23/IL-17 Axis

银屑病是以皮肤反复出现炎性增生为典型表现的自身免疫性疾病,目前其发病机制尚未完全阐明[1-2]。咪喹莫特作为 Toll 样受体激动剂,可通过与 TLR-7/8 结合,诱导皮肤出现表皮增厚、棘层肥厚、角化不全、嗜中性粒细胞聚集等银屑病样表现,目前常被用于银屑病动物模型的诱导剂[3]。BALB/c 和 C57BL/6 小鼠是目前最常用于该类动物模型研究的两种小鼠品系,但这两种模型有无差异,哪种模型更适用于人类银屑病研究则鲜见报道。本研究即采用 BALB/c 和 C57BL/6 两种小鼠品系,比较不同时间点咪喹莫特诱导的两种模型小鼠皮肤形态学、病理组织学等方面的差异,并探讨 IL-23/IL-17 炎症轴在模型进展中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠各 24 只,均为雌性,体重 20 ~ 22 g, 7 ~ 8 周龄,由北京维通利华实验动物技术有限公司南京分公司提供[SCXK(苏) 2016 - 0003]。实验期间小鼠均饲养在屏障环境[SYXK (苏) 2014 - 0001]中,按照国标 GB 14925 - 2010[4]的有关要求控制环境参数。实验前先给予 3 d 健康适应期,饲养和实验期间动物自由饮食。

1.2 主要试剂与仪器

明欣利迪乳膏(5% 咪喹莫特)购自四川明欣药业有限责任公司; SuperScript™ III First-Strand Synthesis SuperMix 购自 Invitrogen 公司;实时荧光定量 PCR 引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司; Power SYBR® Green PCR Master Mix 购自 Applied Biosystems 公司。Olympus 显微镜购自日本;CFX384 多重实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 分组处理

咪喹莫特诱导的小鼠银屑病模型观察期多为 4 ~ 6 d[3,5-6],故本研究选择 6 d 作为模型观察终点。BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠均随机分为 4 组,每组 6 只,分别为涂药 0 d 组(即正常对照组)、涂药 2 d 组、涂药 4 d 组和涂药 6 d 组。

各组处理如下:动物于涂药前一天背部剃毛,形成约 2 cm × 3 cm 大小的皮肤暴露区。涂药组小鼠每天涂抹 5% 咪喹莫特乳膏 62.5 mg,并分别于涂药后 2 d(涂药 2 d 组)、4 d(涂药 4 d 组)、6 d(涂药 6 d 组)采样。涂药 0 d 组小鼠背部剃毛后,不做任何处理,第 2 天直接采样。采样时小鼠先颈椎脱臼处死,剪下背部涂药部位皮肤,分成两块,一块放入 10% 甲醛中固定,另一块放入 - 80℃ 冻存。本实验研究的 IACUC 号为 ACU170704,实验过程中严格按照实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.3.2 皮损严重程度(psoriasis area and severity index, PASI)评分

PAIS 评分标准如下:0,无;1,轻度;2,中度;3,重度;4,极重度。采用相机每天拍照记录小鼠皮损情况,同时按 PAIS 标准对皮肤红斑(erythema)、鳞屑(scales)及浸润增厚程度(thickness)进行 0 ~ 4 的评分,将 3 种积分累计得到总积分。绘制各组小鼠积分变化趋势图,观察各组小鼠皮损的变化情况。

1.3.3 皮损病理组织学检测

HE 染色观察小鼠皮肤有无变性、坏死、溃疡、痂皮形成,上皮层有无增厚、表面角化不全或角化过度、真皮或皮下组织内有无充血、水肿、炎细胞浸润等病变。之后在 200 倍光镜下,采用计算机图像分析系统(DP2-BSW)测量每只动物的表皮层厚度。

1.3.4 实时荧光定量 PCR 检测

采用实时荧光定量 PCR(RT-PCR)法测定各组小鼠皮肤组织 IL-23/IL-17 轴相关免疫因子 IL-23、IL-17A 和 IL-17F mRNA 的相对表达量。以 β-actin 为内参,实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量。各引物序列如下: IL-23 (上游): 5'-AACAACAGCTCGGATTTGGTAT-3'; IL-23 (下游): 5'-ATGACCAGGACATTCAGCAGT-3'; IL-17A (上游): 5'-TCAGCGTGTCCAAACACTGAG-3'; IL-17A (下游): 5'-CGCCAAGGGAGTTAAAGACTT-3'; IL-

17F（上游）：5’-TGCTACTGTTGATGTTGGGAC-3’；IL-17F（下游）：5’-CAGAAATGCCCTGGTTTTGGT-3’；β-actin（上游）：5’-CTGAGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3’；β-actin（下游）：5’-GAACCGCTCGTTGCCAATAGTGAT-3’。

1.4　统计学方法

应用统计学软件 SPSS 15.0 进行数据处理，计量资料以平均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，两组之间比较均采用 t 检验，$P < 0.05$ 为差异有显著性。

2　结果

2.1　各组背部皮肤形态学变化

如图 1 可见，正常对照组（0 d 组）小鼠皮肤均光滑，无鳞屑、皱褶、红斑等。涂药 2 d 后，BALB/c 小鼠背部即开始出现细小鳞屑和点状红斑。第 3 天开始出现少量皱褶。涂药 4 d 后，背部皮肤明显增厚，鳞屑变为小块状、红斑连成片状，皱褶呈条状隆起。涂药 6 d 后，鳞屑开始部分脱落，脱落部位可见点状出血。与 BALB/c 小鼠比较，C57BL/6 小鼠于涂药 3 d 后才出现少量鳞屑及点状红斑，之后症状缓慢加重。同一时间段比较，C57BL/6 小鼠鳞屑、皱褶、红斑、皮肤增厚等症状均较轻，至涂药第 6 天鳞屑未见脱落。见图 1。

2.2　各组背部皮损 PAIS 评分变化

按 PAIS 评分标准绘制病变积分趋势线，随涂药天数增加，病变积分逐渐增高，与形态学观察结果一致，且同一时间段 BALB/c 小鼠的积分均高于 C57BL/6 小鼠，差异有显著性（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。见图 2。

2.3　背部皮损病理组织学变化

HE 染色结果可见，正常组皮肤较薄，表面有少量角化，无充血、出血及炎症细胞浸润。涂药 2 d 后表皮开始出现增厚，皮肤表面出现痂皮及少量角化。真皮可见轻度充血及少量炎细胞浸润，以中性粒细胞和单核巨噬细胞浸润为主。与同时间段 C57BL/6 小鼠比较，BALB/c 小鼠皮肤增厚及角化不全较重。涂药 4 d 后，BALB/c 小鼠鳞状上皮和表皮增厚、角化不全、炎症浸润等情况均较 C57BL/6 小鼠严重。涂药 6 d 后，BALB/c 小鼠被覆厚层鳞状上皮，表皮进一步增厚，角化不全严重，真皮层有轻度充血、出血，炎症细胞浸润增多。与 BALB/c 小鼠比较，C57BL/6 小鼠表皮增厚、角化不全等病变程度明显较轻。通过表皮厚度测量可见，2 d 组、4 d 组和 6 d 组 BALB/c 小鼠表皮厚度均大于同时间段 C57BL/6 小鼠，差异均有显著性（$P < 0.05$ 或 $P < 0.01$）。见图 3。

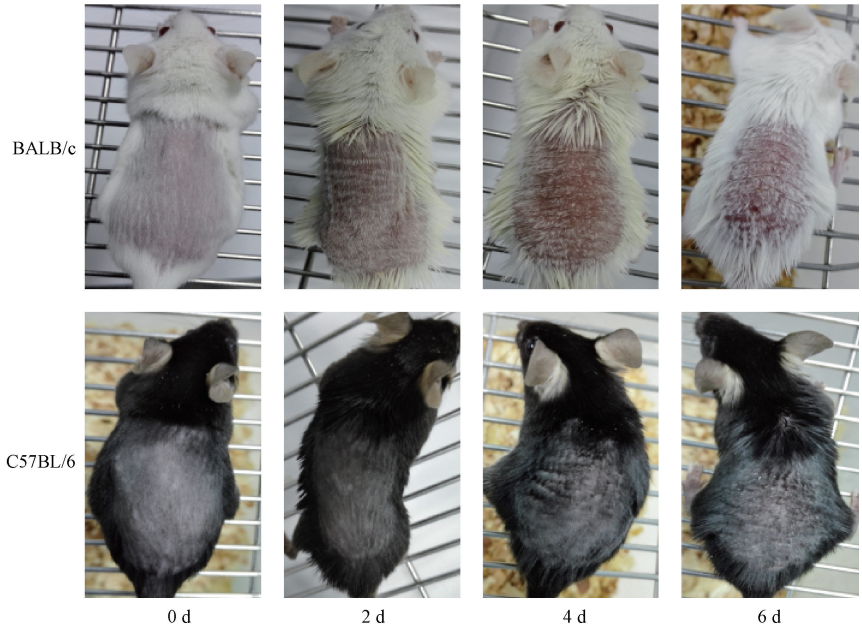
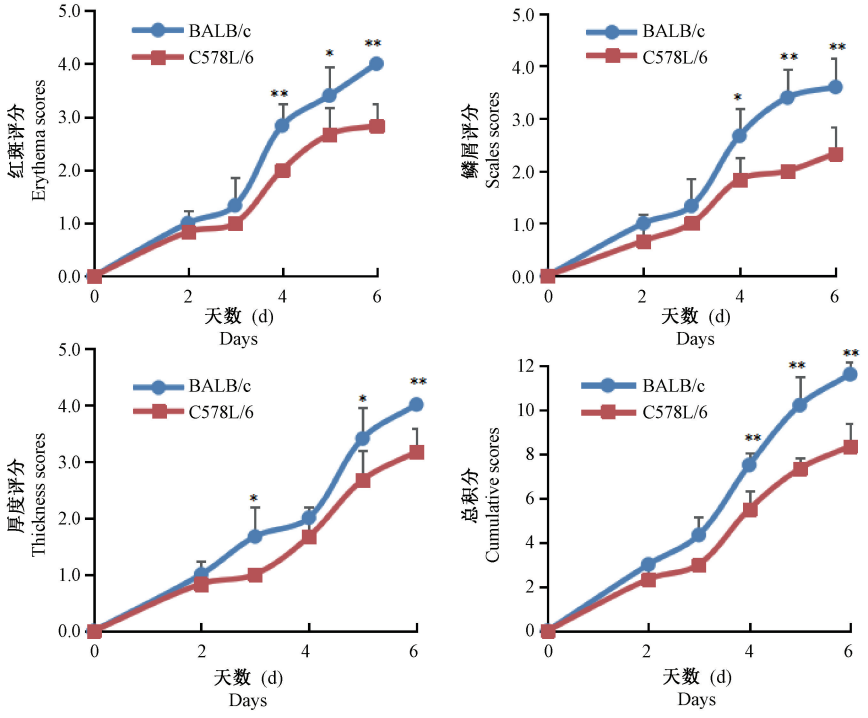


图 1　不同品系小鼠背部皮肤形态学变化

Figure 1　Morphological changes of mouse back skin in different strains



注:同一时间点,BALB/c 小鼠与 C57BL/6 小鼠比较,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$。

图 2 小鼠背部皮损 PASI 评分变化趋势图

Note. BALB/c mice compared with C57BL/6 mice at the same time, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Figure 2 The PASI scores of skin lesions in the mouse

2.4 IL-23/IL-17 轴相关细胞因子 mRNA 的表达

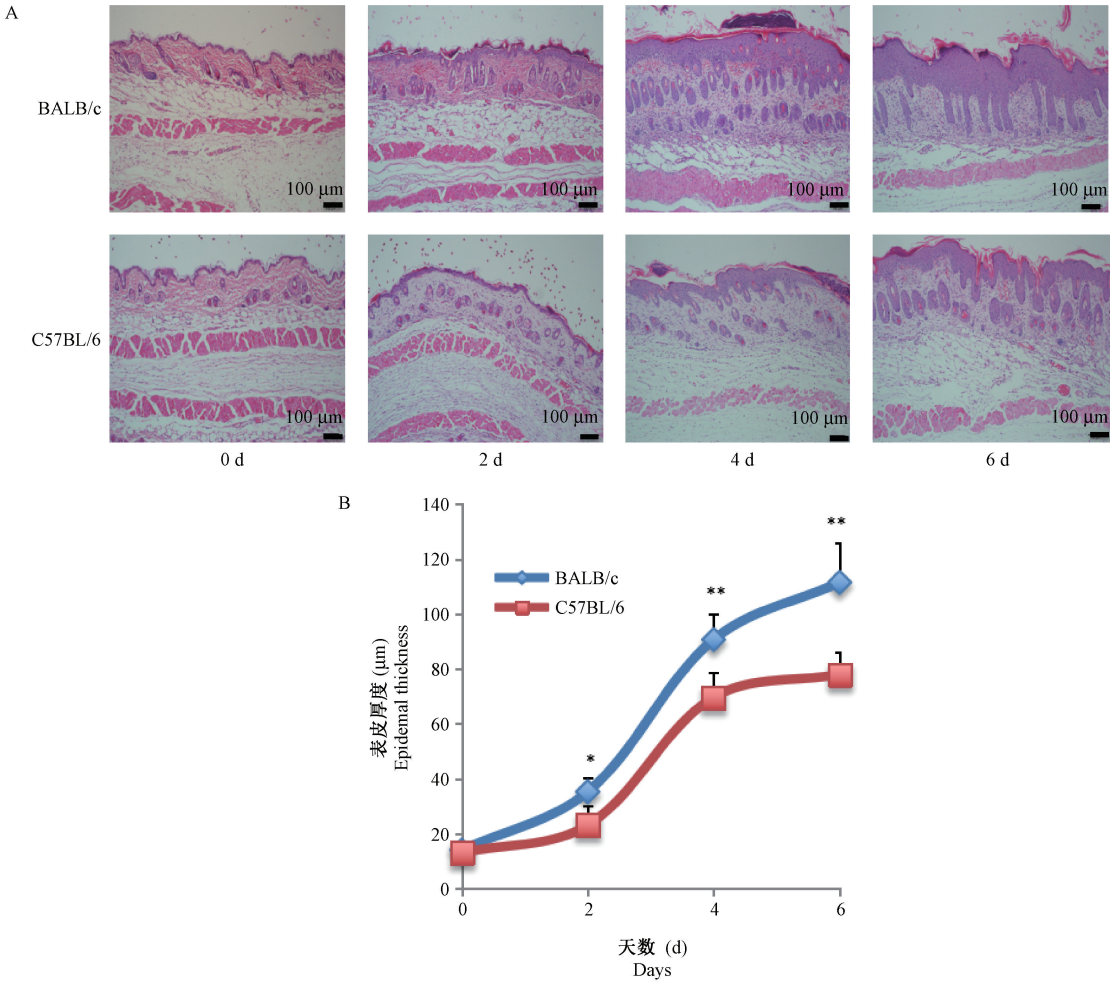
BALB/c 和 C57BL/6 小鼠在造模后,其 IL-23、IL-17A、IL-17F 的 mRNA 相对表达量均呈抛物线样变化。与 0 d 组比较,两种小鼠在造模 2,4,6 d 后,IL-23、IL-17A、IL-17F 均有明显升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。其中,BALB/c 小鼠 IL-23、IL-17A、IL-17F的 mRNA 表达水平在用药 2 d 后即达到峰值,之后逐渐降低。C57BL/6 小鼠 IL-23、IL-17A、IL-17F 的 mRNA 表达水平在用药 4 d 后达到峰值,之后逐渐降低。见图 4。

3 讨论

银屑病是目前最常见的自身免疫性疾病之一,发病率高达 2% 左右[7-8]。其病因及发病机制尚未完全阐明,且尚无有效的治愈方法[9]。银屑病的临床特点主要为反复发作的皮肤过度角化、鳞屑、红斑形成,并伴有炎细胞浸润、新生血管形成、IL-6、TNF-α 等细胞因子的分泌。银屑病的动物模型有多种,如药物诱导型模型、阴道上皮模型、基因突变及转基因模型等[10-12]。咪喹莫特诱导的小鼠模型,因其制作方法简单、致病机制与人类银屑病类似等原因,近年来被广泛用于人类银屑病研究[3, 13-14]。据文献报道及本实验室以往的研究经验发现,该方法诱导的模型,一般于造模第 6 天银屑病样症状达高峰,之后症状逐渐减弱直至完全缓解,因此模型观察期一般以 6 d 为宜[3, 15-16]。

本研究显示,通过背部连续 6 d 涂抹 62.5 mg 的 5% 咪喹莫特乳膏(明欣利迪)后,可诱导 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠逐渐出现鳞屑、红斑、皮肤增厚及皱褶等典型银屑病样皮损,病理组织学鳞状上皮与表皮增厚、角化不全、角化过度、真皮充血、出血、炎症细胞浸润等改变均类似人类银屑病表现。但同时间段两种模型动物比较,BALB/c 小鼠银屑病样症状出现更早、进展更迅速,且症状更严重,银屑病样皮损更典型。于涂药 2 ~ 3 d 后,BALB/c 小鼠即开始出现细小鳞屑、红斑等症状,4 d 后鳞屑、皮肤增厚、红斑等症状逐渐加重,到第 6 天达高峰。PAIS 评分各项指标比较,BALB/c 小鼠也均高于 C57BL/6 小鼠。HE 染色发现,随着涂药天数的增加,两种动物模型表皮增厚、皮肤表面痂皮、角化不全、真皮充血、出血、炎症细胞浸润等表现均逐渐加重。但与形态学改变一致,BALB/c 小鼠的各项病理指标变化均更显著且典型。

相关文献报道,咪喹莫特作为 Toll 样受体

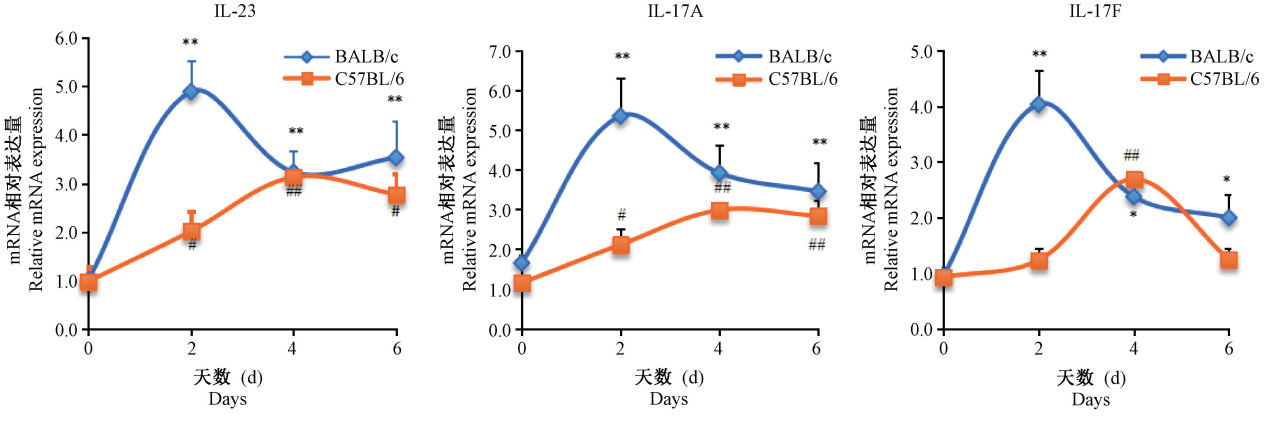


注：A：涂药局部皮肤病理组织学变化（HE 染色，× 100）；B：表皮厚度变化。同一时间点，BALB/c 小鼠与 C57BL/6 小鼠比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$。

图 3　各组小鼠皮损病理组织学的变化

Note. A: Histopathological changes of the local skin after drug was applied. HE staining (× 100). B: Changes of epidermal thickness. BALB/c mice compared with C57BL/6 mice at the same time, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

Figure 3　The histological changes of mouse skin lesions



注：与 BALB/c 小鼠 0 d 组比较，$^{*}P < 0.05$，$^{**}P < 0.01$；与 C57BL/6 小鼠 0 d 组比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

图 4　不同品系小鼠皮损组织 IL-23、IL-17A、IL-17F mRNA 的相对表达量

Note. Compared with BALB/c mice of the 0 d group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. Compared with C57BL/6 mice of the 0 d group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

Figure 4　The relative expression of IL-23, IL-17A, and IL-17F mRNA in skin lesions of different strains of mice

(TLR-7/8)激动剂,其诱导小鼠银屑病样皮损的机制与 IL-23/IL-17 轴的激活有关[3, 17]。本研究同时测定了 IL-23/IL-17 轴相关细胞因子的表达。结果发现,BALB/c 小鼠的 IL-23、IL-17A 和 IL-17F 等细胞因子的表达在涂药 2 d 后即达高峰,之后逐渐回落,而 C57BL/6 小鼠在涂药 4 d 后各项细胞因子才达高峰,之后逐渐回落,该结果与 van der Fits 等人[3]的结果趋势一致,提示在咪喹莫特诱导的银屑病模型中,IL-23/IL-17 轴的激活要先于银屑病样皮损的出现,也进一步揭示 IL-23/IL-17 轴的激活是皮损出现的诱导因素。同时 BALB/c 小鼠 IL-23/IL-17 轴的激活要先于 C57BL/6 小鼠,提示 IL-23/IL-17 轴的优先激活是 BALB/c 小鼠模型进展更加迅速的主要原因之一。

综上可见,咪喹莫特可诱导 BALB/c 小鼠和 C57BL/6 小鼠皮肤均出现银屑病样皮损表现,其中 BALB/c 小鼠症状出现更早,进展更迅速,鳞屑、皮肤增厚、角化过度及不全、炎症细胞浸润等皮损改变更典型。鉴于该模型病程短,且具有自限性等特点,BALB/c 小鼠可能更适合用于人类银屑病研究。此外,本研究表明 IL-23/IL-17 轴的激活可能是诱发小鼠银屑病样皮损的关键因素之一。

参考文献:

[1] Griffiths CE, Barker JN. Pathogenesis and clinical features of psoriasis [J]. Lancet, 2007, 370(9583): 263 – 271.

[2] 王明星, 王燕, 赵京霞, 等. 银屑病发病机制研究进展 [J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(6): 1334 – 1338.

[3] van der Fits L, Mourits S, Voerman JS, et al. Imiquimod-induced psoriasis-like skin inflammation in mice is mediated via the IL-23/IL-17Axis [J]. J Immunol, 2009, 182(9): 5836 – 5845.

[4] GB 14925 – 2010, 实验动物设施与环境 [S]. 2010.

[5] Ueyama A, Yamamoto M, Tsujii K, et al. Mechanism of pathogenesis of imiquimod-induced skin inflammation in the mouse: a role for interferon-alpha in dendritic cell activation by imiquimod [J]. J Dermatol, 2014, 41(2): 135 – 143.

[6] Klebow S, Hahn M, Nikoalev A, et al. IL-6 signaling in myelomonocytic cells is not crucial for the development of IMQ-induced psoriasis [J]. PLoS One, 2016, 11(3): e0151913.

[7] National Psoriasis Foundation. Psoriasis overview and psoriasis statistics [Z]. 2015. https://www.psoriasis.org/

[8] Declercq SD, Pouliot R. Promising new treatments for psoriasis [J]. Scientific World J, 2013, 2013: 980419.

[9] 王凯, 曾嘉琦, 王笑然, 等. 银屑病的临床治疗进展 [J]. 医学综述, 2017, 23(23): 4659 – 4664.

[10] 底婷婷, 赵京霞, 李萍. 银屑病样模型的研究进展 [J]. 首都医科大学学报, 2012, 33(2): 275 – 279.

[11] 王莲, 夏登梅, 李薇. 银屑病样动物模型的研究进展 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2015, 29(9): 970 – 973.

[12] 杨素清, 李东东, 闫景东. 银屑病动物模型的研究进展 [J]. 长春中医药大学学报, 2017, 33(6): 1029 – 1032.

[13] 赵京霞, 王燕, 底婷婷, 等. IL-23/IL-17 轴在银屑病免疫发病机制中的作用 [J]. 基础医学与临床, 2012, 32(4): 453 – 456.

[14] 吴丽兴, 陈长镜, 罗军敏. Th17 细胞及其相关因子在银屑病发病中的作用及其分子机制 [J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2015, 31(2): 282 – 284.

[15] Hau CS, Kanda N, Noda S, et al. Visfatin enhances the production of cathelicidin antimicrobial peptide, human β-defensin-2, human β-defensin-3, and S100A7 in human keratinocytes and their orthologs in murine imiquimod-induced psoriatic skin [J]. Am J Pathol, 2013, 182(5): 1705 – 1717.

[16] Hau CS, Kanda N, Tada Y, et al. Prolactin induces the production of Th17 and Th1 cytokines/chemokines in murine Imiquimod-induced psoriasiform skin [J]. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2014, 28(10): 1370 – 1379.

[17] Flutter B, Nestle FO. TLRs to cytokines: mechanistic insights from the imiquimod mouse model of psoriasis [J]. Eur J Immunol, 2013, 43(12): 3138 – 3146.

〔收稿日期〕2018 – 04 – 12

研究报告

树鼩大肠内容物细菌的群落多样性分析

郭玉倩[1],角建林[2],袁　鑫[3],吴　超[1],王利梅[1],郑　红[1*]

(1. 昆明医科大学实验动物学部,昆明　650500; 2. 昆明医科大学技术转移中心,昆明　650031; 3. 昆明医科大学第一附属医院,昆明　650032)

【摘要】　目的　应用高通量测序技术分析树鼩大肠细菌的结构与组成。**方法**　采集 3 只雄性树鼩大肠内容物,用细菌 16SrDNA 通用引物扩增 V3 ~ V4 区,采用 Illumina PE250 平台测序。**结果**　共获得 160 157 条有效序列,聚类后得 437 个运算分类单位(operational taxonomic units,OTUs)。树鼩大肠中的细菌有 9 个门、19 个纲、37 个目、68 个科、137 个属和 194 个种。其中,①厚壁菌门和变形菌门的丰度最高,分别为 63.30% 和 28.52%;②优势纲是芽孢杆菌纲和 γ-变形菌纲(51.46%、28.02%);③乳杆菌目和肠杆菌目的丰度最高,为 45.33% 和 27.51%;④优势科是乳杆菌科(35.30%)和肠杆菌科(27.51%);⑤乳杆菌属和埃希氏菌属为优势属(35.30%、27.49%);⑥在种的水平,可培养细菌的丰度为 37.10%,未分类细菌 27.69%,不可培养细菌 35.21%。可培养细菌中,唾液链球菌的丰度最高(26.66%)。在丰度最高的 20 个种中,8 种细菌(40%)未分类,为以往未被发现的新种。个体间细菌群落存在一定差异。**结论**　树鼩大肠内容物中的细菌组成具有丰富的多样性,其中还有许多未被分类鉴定且相对丰度较高的细菌,需要进一步研究。

【关键词】　树鼩;大肠细菌;Illumina PE250;多样性

【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 09-0007-07

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.002

Diversity analysis of the tree shrew hindgut microbiota by Illumina PE250 sequencing technology

GUO Yuqian[1], JIAO Jianlin[2], YUAN Xin[3], WU Chao[1], WANG Limei[1], ZHENG Hong[1*]

(1. Department of Laboratory Animal Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China.
2. Technology Transfer Centers, Kunming Medical University, Kunming 650031.
3. The First Affiliated Hospital, Kunming Medical University, Kunming 650032)

【Abstract】　Objective　To analyze the structure and composition of the tree shrew hindgut microbiota by Illumina PE250 sequencing technology. **Methods**　Three male 10-month-old tree shrews were selected. The V3 – V4 region was amplified with universal primers of bacteria 16SrDNA and sequenced with the Illumina PE250 platform after the extraction of total DNA. **Results**　A total of 160 157 valid sequences and 437 operational taxonomic units (OTUs) were obtained. The bacteria in the tree shrew hindgut are from 9 phyla, 19 classes, 37 orders, 68 families, 137 genera, and 194 species. Among them, (i) Firmicutes and Proteobacteria had the highest abundance, at 63.30% and 28.52%, respectively. (ii) The dominant classes were Bacilli and Gammaproteobacteria (51.46%, 28.02%). (iii) The abundances of Lactobacillales and Enterobacteriales were high, at 45.33% and 27.51%. (iv) Dominant families were Lactobacillaceae

[**基金项目**]国家自然科学基金资助项目(编号:81460647);云南省应用基础研究计划项目(编号:2017FE468-014,2017FE468016);云南省教育厅科学研究基金项目(编号:2018Y048)。

[**作者简介**]郭玉倩(1995—　),女,在读硕士研究生,研究方向:药理学。E-mail: 1461553155@qq.com

[**通信作者**]郑红(1969—　),女,副教授,博士,研究方向:疾病动物模型。E-mail: 847255170@qq.com

(35.30%) and Enterobacteriaceae (27.51%). (v) *Lactobacillus* and *Escherichia-Shigella* were the dominant genera (35.30%, 27.49%). (vi) At the species level, the abundance of cultured bacteria was 37.10%, that of unclassified bacteria was 27.69%, and that of uncultured bacteria was 35.21%. *Lactobacillus salivarius* was the most abundant species (26.66%) among the cultured bacteria. Of the 20 species with the highest abundance, eight (40%) were unclassified and new species. Some differences among individuals in terms of bacterial communities were identified. **Conclusions** The tree shrew hindgut microbiota has rich diversity, and there are many bacteria that have not been identified and have relatively high abundance, which needs further study.

【**Keywords**】 tree shrew; hindgut microbiota; Illumina PE250; diversity

动物大肠中栖息着种类繁多、数量巨大的细菌,与宿主形成了稳定的互利共生关系,在肠道中长期稳定存在。这些菌群影响宿主的营养代谢、生物拮抗、免疫刺激及生长发育等功能。因此,大肠微生态的稳定,对树鼩的健康有重要作用。微生物培养技术仅能研究体外可生长的微生物[1],这部分细菌仅占胃肠道微生物的 1% 左右[2]。那些能在培养基上生长的微生物,其重要性会被过高估,且克隆/测序技术费时费力分辨率低[3]。高通量测序技术是一种研究微生物生态学的全新技术手段,能全面地反应样品微生物的结构与组成[4],具有准确性高、检测范围广、快速、结果可靠等优点,普遍应用于细菌多样性分析[5]。

树鼩(*Tupaia belangeri*, tree shrew)是生活在热带和亚热带地区的哺乳纲攀鼩类的小型动物,在我国云南、贵州、广西、广东等地广泛分布。树鼩具有体型小,繁殖能力强,易驯养,经济易得等优点。树鼩的新陈代谢与解剖结构比啮齿类更接近于非人灵长类动物,常用于替代或减少一些非人灵长类动物的使用。由于其与人类在细胞与分子层面的相似性,在作为人类疾病动物模型方面具有很大的前景。树鼩已在肿瘤学、内分泌学、神经生物学、生殖生物学、免疫学及感染性疾病等方面有广泛和深入的应用,是价值极高的新型实验动物[6]。

目前,有关树鼩肠道细菌的报道较少[7-10]。这些研究主要采用的是传统的培养技术,以及以克隆/测序为主要手段的分子生物学技术。已有的报道缺乏有关树鼩肠道细菌的高通量测序研究。因此,本试验旨在应用高通量测序技术研究树鼩大肠细菌结构与组成,为进一步开发利用这一新型实验动物奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

3 只雄性 10 月龄树鼩,体重 130 ~ 150 g,编号 A、B、C,由昆明医科大学实验动物学部提供[SCXK(滇) K2013 - 0002]。饲养于昆明医科大学普通级实验室[SYXK (滇) K2015 - 0002],树鼩单笼饲养,自由饮水,每日定时饲喂全价颗粒饲料 2 次(8:00 和 14:00),动物饲养温度 22℃ ~ 25℃,湿度 40% ~ 60%,每日明暗交替照明 12 h。实验程序符合昆明医科大学动物实验伦理委员会要求(KMMU2017016),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

动物全价颗粒饲料配方为:玉米 40%、大麦 17%、大米 10%、豆粕 17%、鱼粉 8%、苜蓿粉 2.0%、蔗糖 1.0%、果糖 0.5%、牛油 1.5%、猪油 1.0%、鸡蛋粉 1.2% 以及氨基酸、维生素和微量元素等添加剂 0.8%。DNA 提取试剂盒(Omega Bio-tek, Norcross, GA, U.S.)。荧光定量系统 QuantiFluor™-ST (Promega, U.S.);PCR 仪(ABI GeneAmp® 9700 型)。采用 Hiseq2500 测序仪(Illumina 公司)的 PE150 测序策略完成测序。

1.3 实验方法

1.3.1 动物处理

树鼩稳定饲喂 60 d,在 61 d 禁食 8 h,心脏采血处死动物。取大肠,用 0.5 mL 生理盐水冲洗大肠内容物,收集冲洗液至离心管,迅速投入液氮中保存,样品立即带回实验室转移至 -80℃ 冰箱,备用。

1.3.2 基因组 DNA 提取

使用 DNA 提取试剂盒,按照说明书进行细菌基因组抽提。利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳,检测抽提的树鼩大肠内容物细菌基因组 DNA。

1.3.3 PCR 扩增

测序是区域 341F ~ 806R。使用 341F:5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3' 和 806R:5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3' 细菌特异性引物进行细菌 16SrDNA 基因部分序列的 PCR 扩增。

1.3.4 荧光定量

参照电泳初步定量结果,将 PCR 产物用

QuantiFluor™-ST 蓝色荧光定量系统进行检测定量，之后按照每个样本的测序要求，进行相应比例的混合。

1.3.5　Illumina PE250 文库构建

连接“Y”字形接头。使用磁珠筛选去除接头自连片段，利用 PCR 扩增进行文库模板的富集。经氢氧化钠变形，产生单链 DNA 片段。

1.3.6　Illumina PE250 测序

DNA 片段的一端与引物碱基互补，固定在芯片上。另一端随机与附近的另外一个引物互补，也被固定住，形成“桥(bridge)”。PCR 扩增，产生 DNA 簇。DNA 扩增子线性化成为单链。加入改造过的 DNA 聚合酶和带有 4 种荧光标记的 dNTP，每次循环只合成一个碱基。用激光扫描反应板表面，读取每条模板序列第一轮反应所聚合上去的核苷酸种类。将“荧光基团”和“终止基团”化学切割，恢复 3’端粘性，继续聚合第二个核苷酸。统计每轮收集到的荧光信号结果，得到模板 DNA 片段的序列。

1.3.7　生物信息学分析

Illumina PE250 测序得到的 PE reads，首先根据 overlap 关系进行拼接[11]，同时对序列质量进行质控和过滤。优化样本序列后，将序列按 97% 相似性进行运算分类单位(operational taxonomic unit，OTU)聚类[12]，并进行 α 多样性指数分析，计算 Chao 指数、Shannon 指数、Simpson 指数和覆盖(Coverage)指数。每个样本都做了稀释性曲线和 Shannon 指数曲线。用 UniFrac 对 β 多样性进行评估，利用基于 UniFrac 的主坐标分析(principal coordinate analysis，PCoA)，将 UniFrac 距离映射到一组正交轴上。采用 RDP classifier 贝叶斯算法，对 OTU 代表序列进行分类学分析[13]。统计在门、纲、目、科、属、种水平上的物种组成和丰度。

1.4　统计学方法

利用 GraphPad PRISM 软件(GraphPad software，CA，USA)计算出样本序列和 α 多样性的平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)。

2　结果

2.1　样本序列分析和多样性分析

将本实验得到的样本序列进行优化(表 1)，共获得 160 157 条有效序列，平均每个样本有(53 386 ±2807)条序列。基于序列 97% 的相似性进行 OTU 聚类，共得到 437 个 OTU。样本稀释性曲线(图 1)显示，每个样本的曲线都趋于平缓，说明本研究的测序量能够覆盖各样本的大多数微生物。

表 1　样本序列统计表

Table 1　Statistics of sample sequences

个体 Individual	序列数 Number of sequences	运算分类单位数 Number of operational taxonomic units
A	52 567	234
B	56 512	89
C	51 078	114
$\bar{x} \pm s$	53 386 ±2807	145 ±77

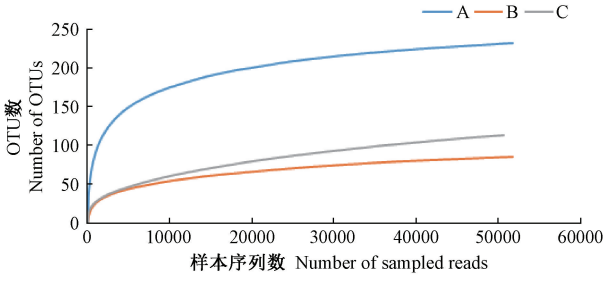


图 1　稀释性曲线

Figure 1　Rarefaction curves

基于 OTU 聚类分析结果，对 OTU 进行 α 多样性分析(表 2)，树鼩大肠细菌的 Chao 指数是 181，Shannon 指数是 2.5，Simpson 指数为 0.21。覆盖指数为 0.999，即包含了树鼩大肠内容物中 99.9% 的细菌多样性状况，反映了测序结果代表了样本中微生物的真实情况。Shannon 指数曲线(图 2)显示，样本 A 的微生物群比 B 和 C 更多样化。

未加权 PCoA(图 3B)显示，第一个主坐标(PC1)捕获了 43.42% 的变异，第二个主坐标(PC2)捕获了 16.84% 的变异，A 与 B、C 分离开，而 B、C 聚合在一起；加权 PCoA(图 3A)显示，第一个主坐标(PC1)捕获了 52.69% 的变异，第二个主坐标(PC2)捕获了 29.43% 的变异。加权以后三个样本仍没有聚合起来，样本间存在一定差异。

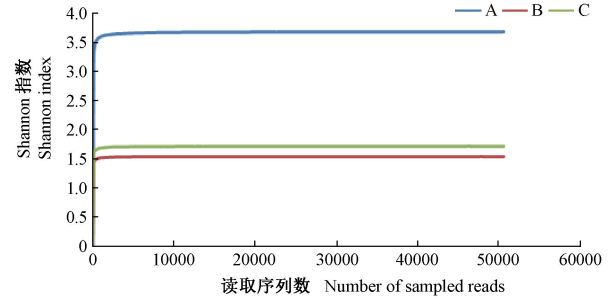


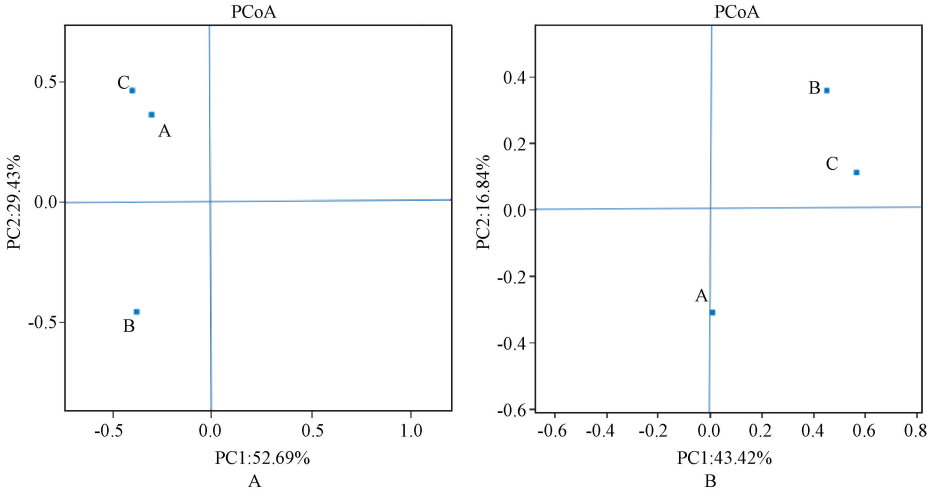
图 2　菌群多样性分析

Figure 2　Flora diversity analysis

表 2 α 多样性指数

Table 2 α diversity indices

	丰度指数 Chao index	菌群多样性指数 Flora diversity indices		覆盖指数 Coverage index
		Shannon 指数 Shannon index	Simpson 指数 Simpson index	
$\bar{x} \pm s$	181 ± 53	2.5 ± 0.58	0.21 ± 0.06	0.999 ± 0.0002



注：A：加权；B：未加权。

图 3 β 多样性的主坐标分析

Note. A: Weighted; B: Unweighted.

Figure 3 β-diversity patterns were explored using principal coordinate analysis

2.2 不同分类水平上的物种组成分析

本研究发现，树鼩大肠中的细菌有 9 个门、19 个纲、37 个目、68 个科、137 个属和 194 个种。

在鉴定出的 9 个门中，厚壁菌门（Firmicutes）和变形菌门（Proteobacteria）的丰度最高（91.82%），分别为 63.30% 和 28.52%。其次是放线菌门（Actinobacteria）和拟杆菌门（Bacteroidetes），丰度分别是 5.49%、2.56%。以上 4 个门的丰度和为 99.84%。其他 5 个门，包括梭杆菌门（Fusobacteria）、蓝细菌门（Cyanobacteria）、脱铁杆菌门（Deferribacteres）、酸杆菌门（Acidobacteria）、Saccharibacteria 门，丰度之和仅为 0.14%（图 4）。

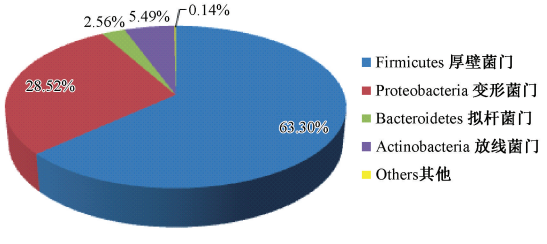


图 4 门水平上菌群组成

Figure 4 Composition of microbial community at the phylum level

在检出的 19 个纲中，丰度最高的是芽孢杆菌纲（Bacilli）和 γ-变形菌纲（Gammaproteobacteria），分别是 51.46%、28.02%。其次是梭菌纲（Clostridia）：6.98%，丹毒丝菌纲（Erysipelotrichia）：4.53%，放线菌纲（Actinobacteria）：3.58%，拟杆菌纲（Bacteroidia）：2.46% 和 Coriobacteriia 纲：1.91%。以上 7 个纲的丰度和为 98.94%。其他 12 个纲的丰度和仅为 1.0%，包括严格厌氧菌纲（Negativicutes）、ε-变形菌纲（Epsilonproteobacteria）、δ-变形菌纲（Deltaproteobacteria）、梭杆菌纲（Fusobacteria）、黄杆菌纲（Flavobacteriia）、α-变形菌纲（Alphaproteobacteria）、β-变形菌纲（Betaproteobacteria）、Chloroplast 纲、Saccharibacteria_norank 纲、酸杆菌纲（Acidimicrobiia）、脱铁杆菌纲（Deferribacteres）和全噬菌纲（Holophagae）。

在鉴定出的 37 个目中，乳杆菌目（Lactobacillales）和肠杆菌目（Enterobacteriales）的丰度最高，为 45.33% 和 27.51%。其次是梭菌目（Clostridiales）、芽孢杆菌目（Bacillales）、丹毒丝菌目（Erysipelotrichales）、双歧杆菌目（Bifidobacteriales）、拟杆菌目（Bacteroidales）和 Coriobacteriales 目，6 个目的丰度依此降低，分别为 6.98%、6.13%、4.53%、

3.35%、1.91%、1.81%（图 5）。其他 29 个目，如 Selenomonadales 目、海洋螺菌目（Oceanospirillales）、弯曲菌目（Campylobacterales）、脱硫弧菌目（Desulfovibrionales）、棒杆菌目（Corynebacteriales）、假单胞菌目（Pseudomonadales）、梭杆菌目（Fusobacteriales）和黄杆菌目（Flavobacteriales）等，丰度之和仅为 1.81%。

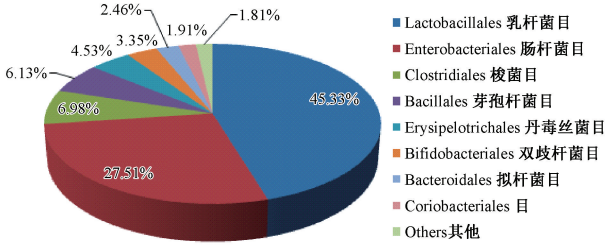


图 5　目水平上菌群组成

Figure 5　Composition of microbial community at the order level

68 个科中，11 个科的丰度和超过 90%。其中乳杆菌科（Lactobacillaceae）和肠杆菌科（Enterobacteriaceae）的丰度和超过 60%，分别为 35.30% 和 27.51%。丰度在 1% ~10% 之间的有 9 个科，由高到低依次为链球菌科（Streptococcaceae）、毛螺菌科（Lachnospiraceae）、丹毒丝菌科（Erysipelotrichaceae）、双歧杆菌科（Bifidobacteriaceae）、肠球菌科（Enterococcaceae）、葡萄球菌科（Staphylococcaceae）、芽孢杆菌科（Bacillaceae）、普雷沃氏菌科（Prevotellaceae）和红蝽杆菌科（Coriobacteriaceae）。这 9 个科的丰度分别是 6.72%、4.88%、4.52%、3.35%、2.95%、2.66%、2.24%、2.03%、1.91%。其他 57 个科的丰度均低于 1%，包括瘤胃菌科（Ruminococcaceae）、拟杆菌科（Bacteroidaceae）、韦荣氏球菌科（Veillonellaceae）、梭菌科（Clostridiaceae）、海洋螺菌科（Oceanospirillaceae）、消化链球菌科（Peptostreptococcaceae）、揉杆菌科（Carnobacteriaceae）、螺杆菌科（Helicobacteraceae）和脱硫弧菌科（Desulfovibrionaceae）等。这 56 个科的丰度和仅为 4.52%。

137 个属中，乳杆菌属（*Lactobacillus*）和埃希氏菌（*Escherichia-Shigella*）属占主导，丰度和为 62.79%（35.30%、27.49%）。其次是链球菌属（*Peptostreptococcus*）、*Erysipelatoclostridium* 属、双歧杆菌属（*Bifidobacterium*）、肠球菌属（*Enterococcus*）、葡萄球菌属（*Staphylococcus*）、*Lachnoclostridium* 属、芽孢杆菌属（*Bacillus*）、乳球菌属（*Lactococcus*）、普雷沃菌属（*Prevotella* 9）、瘤胃球菌属（*Ruminococcus*）和柯林斯氏菌属（*Collinsella*）。这 11 个属的丰度和为 28.83%，各属的丰度依此分别为 4.62%、4.19%、3.35%、2.95%、2.65%、2.31%、2.23%、2.11%、2.03%、1.3% 和 1.09%（图 6）。其余的 126 个属的丰度极低，总占比仅 8.37%。

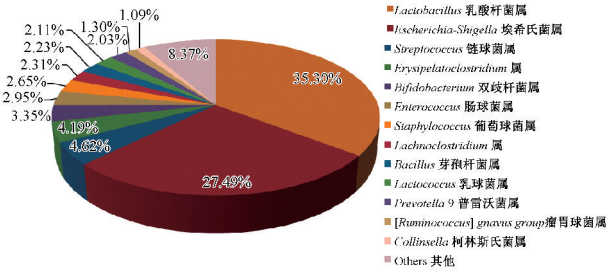


图 6　属水平上群落组成

Figure 6　Composition of microbial community at the genus level

194 个种中，可培养细菌的丰度和为 37.10%，未分类细菌为 27.69%，不可培养细菌 35.21%（图 7）。可培养细菌中，唾液链球菌（*salivarius*）的丰度最高（26.66%）。丰度在 0.38% ~2.91% 之间的有 5 个种，从高到低依次为 *treptococcus porcorum* 种（2.91%）、*Enterococcus faecali* 种（1.57%）、金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus subsp. aureus COL*，1.56%）、*Slackia piriformis* 种（0.42%）和 *Bifidobacterium kashiwanohense* 种（0.38%）。

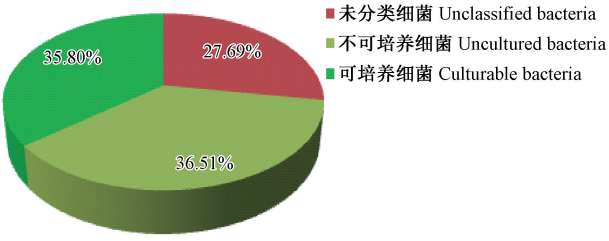


图 7　种水平上细菌分类

Figure 7　Bacterial classification at the species level

丰度最高的 20 个种，归类为 10 个科、7 个纲。即双歧杆菌科、芽孢杆菌科、乳杆菌科、葡萄球菌科、链球菌科、普雷沃氏菌科、毛螺菌科、红蝽杆菌科、丹毒丝菌科和肠杆菌科。这 20 个种，隶属于芽孢菌纲、梭菌纲、放线菌纲、丹毒丝菌纲、Bacteroidia 纲、Coriobacteriia 纲和 γ-变形菌纲 7 个纲。在丰度最高的 20 个种中，8 种细菌（40%）未分类，为以往未被发现的新种。7 种（35%）不能培养，能培养的已知细菌（25%）仅为 5 种（表 3）。

表 3 种水平上丰度较高的 20 个种及其在纲和科水平上的归类

Table 3 The 20 most abundant species and their classification at class and family levels

纲 Class	科 Family	种 Species	丰度(%) Abundance
γ-变形菌纲 Gammaproteobacteria	肠杆菌科 Enterobacteriaceae	不可培养的大肠志贺氏菌属 *Escherichia-Shigella_uncultured bacterium*	15.79
		未分类的大肠志贺氏菌属 *Escherichia-Shigella_unclassified*	11.70
芽孢菌纲 Bacilli	乳杆菌科 Lactobacillaceae	唾液链球菌 *Lactobacillus salivarius*	26.66
		未分类的乳杆菌属 *Lactobacillus_unclassified*	4.63
		不可培养的乳杆菌属 *Lactobacillus_uncultured*	3.72
	芽孢杆菌科 Bacillaceae	苏云金杆菌 *Bacillus thuringiensis*	2.07
	肠球菌科 Enterococcaceae	肠球菌 *Enterococcus faecalis*	1.57
		未分类的肠球菌属 *Enterococcus_unclassified*	1.38
	葡萄球菌科 Staphylococcaceae	金黄色葡萄球菌 *Staphylococcus aureus subsp. aureus COL*	1.56
		未分类的葡萄球菌属 *Staphylococcus_unclassified*	1.09
	链球菌科 Streptococcaceae	*Streptococcus porcorum* 种	2.91
		未分类的乳球菌属 *Lactococcus_unclassified*	1.98
		不可培养的链球菌属 *Streptococcus_uncultured*	1.43
Bacteroidia 纲	普雷沃氏菌科 Prevotellaceae	不可培养的普氏菌属 *Prevotella 9_uncultured*	2.03
梭菌纲 Clostridia	毛螺菌科 Lachnospiraceae	*Lachnoclostridium_uncultured* 种	1.33
		不可培养的瘤胃球菌属 [*Ruminococcus*] *gnavus group_uncultured bacterium*	1.30
Coriobacteriia 纲	红蝽杆菌科 Coriobacteriaceae	不可培养的菌属 *Collinsella_uncultured bacterium*	1.03
丹毒丝菌纲 Erysipelotrichia	丹毒丝菌科 Erysipelotrichaceae	不可培养的丹毒丝菌属 *Erysipelatoclostridium_uncultured bacterium*	2.98
		未分类的丹毒丝菌属 *Erysipelatoclostridium_unclassified*	1.21
放线菌纲 Actinobacteria	双歧杆菌科 Bifidobacteriaceae	未分类的双歧杆菌属 *Bifidobacterium_unclassified*	2.80

2.3 不同个体之间的物种组成比较

在门层面,三个样本共享的 5 个门分别是厚壁菌门、变形菌门、拟杆菌门、放线菌门和梭杆菌门。蓝藻菌门、脱铁杆菌门、Saccharibacteria 门和酸杆菌门为 A 特有,这 4 个门的丰度和仅占 A 样本总肠道微生物的 0.11%。B 样本中的厚壁菌门和变形菌门与 A、C 样本相比有较大差异,厚壁菌门在样本 A、B、C 中的丰度比是 3.8∶1∶3.6,变形菌门在样本 A、B、C 中的丰度比是 1∶9.1∶0.92。而放线菌门在三个样本中的丰度没有太大变化,丰度比为 1∶1.39∶1.12。

检测到的 137 个属中,65 个属为样本 A 独有,3 个属仅见于样本 B,C 为 4 个属。A 独有的 65 个属的丰度和是 11.56%,其中只有两个属的丰度和大于 1%,分别是乳球菌属(6.32%)和 *Subdoligranulum* 属(1.19%)。B 组特有的属是魏斯

氏菌属、*Senegalimassilia* 属和 *Faecalitalea* 属,丰度均低于 0.1%。样本 C 独有的属分别是链霉菌属(0.01%)、*Eggerthella* 属(0.007%)、*Alloprevotella* 属(0.003%)和黄杆菌属(0.003%)。乳杆菌属的丰度较高,但三个样本中的差异也较大,C 为 75.26%,B 中 20.15%,A 为 10.50%。

3 讨论

目前,有关树鼩肠道菌群的报道较少[7-10],并且都是基于对菌株进行培养后,进行鉴定的检测方法。这些研究不能系统且全面地阐述树鼩肠道细菌多样性。本实验通过 Illumina PE250 高通量测序,研究树鼩大肠微生物群的物种组成及其丰度。其中,Coverage 指数表示各文库的覆盖率,本实验中覆盖率为 0.999,说明树鼩大肠细菌 99.9% 多样性情况得到反映。每个样本的稀释曲线都趋于平缓,表明本实验的测序量能够覆盖各样本的大多数微生物。Shannon 指数曲线曲线表示样本 A 比 B 和 C 的微生物菌群更加多样化。PCoA 分析表明三个样本间菌群组成存在差异。邢进等[8]采集 61 只树鼩回盲部内容物分离培养,仅得到 6 科、15 属、29 种树鼩肠道菌。本研究共鉴定出树鼩大肠菌的 68 个科、137 个属、194 个种,较全面地反映树鼩肠道细菌多样性。

通过 OTU 分类,本实验共鉴定出树鼩肠道菌的 9 个门。其中,厚壁菌门(63.30%)和变形菌门(28.52%)是优势门;其次是放线菌门和拟杆菌门。刘丽君等[7]对树鼩粪便细菌进行分离培养,发现变形菌门的埃希氏菌和变形杆菌以及厚壁菌门的粪肠球菌是树鼩的主要寄生菌群,与本实验检测到的优势门相同,但在种属层面有较大差异。Hildebrandt 等[14]使用高脂肪食物饲喂野生小鼠,发现小鼠肠道菌群中厚壁菌门和变形菌门的数量增加,而拟杆菌门含量降低。本研究发现树鼩肠道菌中变形菌门丰度较高,推测树鼩具有较强的脂肪消化功能。

在属的层次,本研究发现树鼩肠道乳杆菌属和埃希氏菌属丰度最高。乳杆菌属和埃希氏菌属是人和动物肠道的正常菌群[15]。乳杆菌属重要的益生菌,有改善胃肠道动力、调节肠道微生态平衡、抑制抑制肠道炎性反应和抑菌等作用,保护机体肠道健康[16-17]。乳杆菌属在肠道内将多糖降解成短链脂肪酸[18],能合成维生素 B1、B2、B6、B12、叶酸、维生素 K 等多种维生素和蛋白质,促进机体的消化吸收。乳杆菌属还具有抗氧化和调节神经内分泌系统作用。埃希氏菌属归类于肠杆菌科,能帮助机体合成维生素 B、K 等。一般不致病,偶尔会引起皮肤、黏膜和脏器等自身感染[19]。

唾液链球菌在健康人体口腔微生物菌群中占主要地位[20],是口腔益生菌的重要候选者[21]。唾液链球菌能产生细菌素样抑菌物质(BLISs),具有抑制其他多种微生物的活性,能够减少病原菌在口腔、呼吸道等部位的定植[22]。Cosseau 等[23]研究发现,唾液链球菌 K12 株能调节人体上皮细胞中参与固有免疫防御机制、上皮细胞功能与内稳态、细胞骨架修饰、细胞发育与转移及信号通路的相关基因。本实验发现唾液链球菌是树鼩可培养肠道菌中丰度最高的物种(26.66%),其功能及机制有待进一步研究。在丰度最高的 20 个种中,8 种细菌(40%)未分类,为以往未被发现的新种,需要进一步研究。

本研究使用高通量测序的方法,第一次较全面地检测了树鼩肠道菌群。但高通量测序技术也存在不足,虽然会得到大量数据,但后续数据处理费时费力[24];对于小范围测序所用的费用相对较高[25]。另外,样本量较少,需要进一步开展系统研究,建立树鼩肠道菌群谱,为建立人类肠道微生物树鼩模型奠定基础。

参考文献:

[1] Xu J, Bjursell MK, Himrod J, et al. A genomic view of the human-Bacteroides thetaiotaomicron symbiosis [J]. Science, 2003, 299(5615): 2074-2076.

[2] Edwards JE, Huws SA, Kim EJ, et al. Characterization of the dynamics of initial bacterial colonizationof nonconserved forage in the bovine rumen [J]. FEMS Microbiology Ecology, 2007, 62(3): 323-335.

[3] Highlander SK. High throughput sequencing methods for microbiome profiling: application to food animal systems [J]. Anim Health Res Rev, 2012, 13(1): 40-53.

[4] Ley RE, Peterson DA, Gordon JI. Ecological and evolutionary forces shaping microbial diversity in the human intestine [J]. Cell, 2006, 124(4): 837-848.

[5] 徐爱蕾, 黄毅, 王为. 16SrRNA 基因序列分析技术在肠道菌群检测中的应用进展 [J]. 临床消化病杂志, 2015, 27(3): 186-189.

[6] 沈培清, 郑红, 刘汝文, 等. 中国树鼩实验动物化研究进展和展望 [J]. 动物学研究, 2011, 32(1): 109-114.

[7] 刘丽君, 余柄廷, 胡凝珠, 等. 树鼩粪便细菌分离培养与鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(10): 64-68.

(下转第 32 页)

研究报告

长爪沙鼠糖尿病近交系培育过程中血液生理生化指标的动态变化

王　迎[1],李　迎[2,3],王东平[2],郭　萌[1],霍学云[4],李长龙[4],陈振文[4],杜小燕[1*]

(1. 首都医科大学实验动物科学部,北京　100069; 2. 军事医学科学院实验动物中心,北京　100071;
3. 吉林农业大学动物科学技术学院,长春　130118; 4. 首都医科大学基础医学院,北京　100069)

【摘要】　目的　探讨长爪沙鼠糖尿病近交系培育过程中血液生理生化指标动态变化及其规律。**方法**　参考前期的研究方法,应用生化分析仪、血细胞分析仪,检测糖尿病长爪沙鼠近交系 F9 ~ F14 代繁殖动物 17 项血液生化和 22 项血常规指标,并绘制其动态曲线。**结果**　从检测结果和动态曲线变化看,F9 ~ F14 代动物的尿酸(URIC)、乳酸脱氢酶(LD)、肌酸激酶(CK)、淀粉酶(AMY)、血糖(GLU)、单核细胞百分数(MON%)、平均血红蛋白含量(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC)、平均血小板体积(MPV)随代数增加呈现上升趋势;总胆固醇(CHOL)、嗜酸性粒细胞直接计数(EOS)、嗜酸性粒细胞百分数(EOS%)、红细胞(RBC)、红细胞压积(HCT)、血红蛋白(HGB)呈现下降趋势;白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)、尿素氮(BUN)、总胆红素(TBIL)、肌酐(CRE)、碱性磷酸酶(ALP)、谷草转氨酶(AST)等其余指标总体趋势比较平稳。**结论**　糖尿病近交系动物培育中血液生理生化随着近交代数的增加会发生变化,尤其是糖代谢和脂代谢相关指标高于其他动物,提示其糖尿病动物的疾病特征,也说明定向的近亲繁殖和培育对其血液生理生化指标具有一定的影响。

【关键词】　长爪沙鼠;近交系;糖尿病模型;血液生化指标;血液生理指标
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 09-0014-07
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.003

Dynamic changes of biochemical and physiological indexes in breeding a diabetic inbred Mongolian gerbil line

WANG Ying[1], LI Ying[2,3], WANG Dongping[2], GUO Meng[1], HUO Xueyun[4], LI Changlong[4], CHEN Zhenwen[4], DU Xiaoyan[1*]

(1. Department of Laboratory Animal Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China.
2. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071.
3. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118.
4. School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069)

【Abstract】　Objective　To investigate the variations of blood biochemical and physiological characteristics in the process of breeding inbred diabetic Mongolian gerbils. **Methods**　A total of 17 blood biochemical and 22 physiological indexes of blood samples from F_9 to F_{14} progenies were tested using an automatic biochemical analyzer and automatic blood cell analyzer. **Results**　The results showed that uric acid (URIC), lactate dehydrogenase (LD), creatine kinase (CK), amylase (AMY), glucose (GLU), percentage of mononuclear cells (MON%), mean corpuscular hemoglobin content

[基金项目]国家科技支撑计划课题(编号:2015BAI09B01-04);国家自然科学基金(编号:31572341)。
[作者简介]王迎(1982—　),男,本科,研究方向:实验动物遗传发育。E-mail: 123864945@qq.com
[通信作者]杜小燕(1971—　),女,副教授,研究方向:实验动物遗传发育。E-mail: duduyan@ccmu.edu.cn

(MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), and mean platelet volume (MPV) increased with an increasing number of generations. Meanwhile, cholesterol (CHOL), eosinophil direct count (EOS), percentage of eosinophils (EOS%), red blood cells (RBC), hematocrit (HCT), and hemoglobin (HGB) decreased with the generations. The levels of albumin (ALB), total protein (TP), triglyceride (TG), high-density lipoprotein (HDL), urea nitrogen (BUN), total bilirubin (TBIL), creatinine (CRE), alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), and the other indexes remained stable. **Conclusions** The blood biochemical and physiological indexes vary across the generations in the process of inbreeding diabetic gerbils, especially for those indexes related to glucose and lipid metabolism, which are indicators of the pathogenic characteristics of diabetes. The findings also imply that selective inbreeding exerts an influence on the animals' biological characteristics.

【Keywords】 Mongolian gerbil; inbred line; diabetic model; blood biochemical index; blood physiological index

长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus* 或 Mongolian gerbil)是啮齿目、仓鼠科、沙鼠亚科、沙鼠属的动物,国内主要分布于内蒙古及河北、甘肃、宁夏等草原地带[1],自上世纪60年代开始作为实验动物应用于医学实验之中。长爪沙鼠是多功能实验动物,在病毒学、细菌学、寄生虫学等领域都有很广泛的应用[2-4]。早在1972年,Boquist[5]发现在长爪沙鼠群体中有肥胖伴随血糖较高的动物,虽然比例较低(3/42,7.14%),但其病理特征和人的糖尿病较相似。近年来,研究者又发现由于繁殖期的长爪沙鼠伴有高血糖和动脉硬化等症状,其体内类脂质比大鼠高3倍,可能是研究糖尿病、肥胖病的优良实验动物[6]。本团队在进行长爪沙鼠近交系的培育中发现一个分支的动物血糖较高,高血糖比例达到21.33%,因此开始定向培育这一分支,并在培育过程中对动物血液生理生化指标进行了监测。本研究用近亲繁殖兄妹交配的方法定向培育糖尿病长爪沙鼠近交系,对培育过程中从第9到第14代的动物血液生理生化指标进行了动态检测。本课题组通过研究长爪沙鼠糖尿病动物模型近交系品系培育过程中的这些指标,有效掌握了培育过程中沙鼠特性的变化规律,为这一模型群体的建立和今后的应用提供了基础数据和背景资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级成年糖尿病近交系长爪沙鼠165只(6~12月龄),体重在50~80 g之间。F9代10只(雌6,雄4);F10代30只(雌18,雄15);F11代50只(雌25,雄25);F12代42只(雌21,雄21);F13代20只(雌12,雄8),F14代13只(雌7,雄6)。首都医科大学实验动物中心自行培育,环境控制如下:温度为18℃~26℃,相对湿度30%~60%,日常饲喂^{60}Co照射消毒饲料及饮用无菌水,自然光照。本实验通过首都医科大学实验动物和动物实验伦理委员会批准(No.:AEEI-1417-032),在研究过程中按照实验动物使用的3R原则给予动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

各项检测和试剂参考前期的研究方法和文献进行,包括检测生理生化指标的各项配套试剂[7-8]。仪器和器械均和前期的研究相同[7-8]。

1.3 实验方法

1.3.1 标本采集

采集方法参考相关文献[7-9],在实验前动物空腹12~16 h,分两组采集血液,经眼眶静脉取血后生化指标测定组血样静置30 min后5000 r/min离心10 min,分离血清备用;生理指标测定组血样用1%的肝素抗凝,采血后快速混匀,静置备用。

1.3.2 各项测定指标

17项血液生化指标以及22项血液学指标均和前期研究相同[7-8]。

1.4 统计学方法

实验数据采用SPSS 23.0统计软件进行统计分析。多组均数比较进行多重比较。$P < 0.05$为差异有显著性。

2 结果

2.1 血清生化动态变化

2.1.1 血清蛋白的动态变化

糖尿病长爪沙鼠近交系培育过程中F9~F14代动物的白蛋白(ALB)、总蛋白(TP)趋势平稳(见图1),但多重比较发现,白蛋白在F10、F11、F12代与F13和F14代差异有显著性($P < 0.01$);总蛋白在F11代与F10、F13代差异有显著性($P < 0.01$),在F11代与F9、F12、F14代差异有显著性($P < 0.05$)。

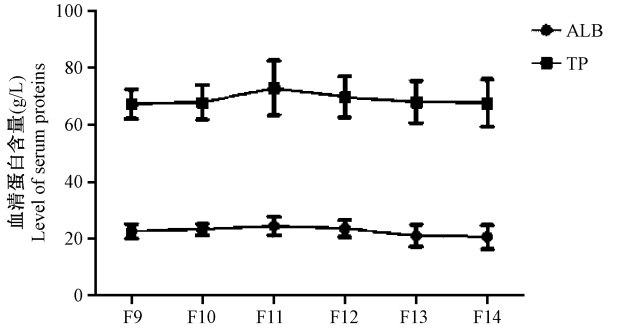


图 1 血清蛋白的动态曲线

Figure 1 The dynamic curves of serum proteins

2.1.2 血清血脂的动态变化

糖尿病模型长爪沙鼠近交系培育过程中 F9 ~ F14 代动物的甘油三酯(TG)含量从 F11 代之后趋势平稳,高密度脂蛋白(HDL)含量趋势平稳,总胆固醇(CHOL)含量呈下降趋势。多重比较结果显示,高密度脂蛋白的含量在 F10 代与 F14 代差异有显著性($P < 0.05$),与 F13 代差异亦有显著性($P < 0.01$),在 F11 代与 F13 代差异有显著性($P < 0.05$)。甘油三酯的含量在 F11 代与 F10 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$),与 F9、F14 代差异亦有显著性($P < 0.05$)(图 2)。

2.1.3 血清代谢产物的动态变化

长爪沙鼠糖尿病近交系培育 F9 ~ F14 代过程中动物血清中尿素氮(BUN)、总胆红素(TBIL)、肌酐(CRE)含量比较稳定,变化较小。但是尿酸(URIC)含量随代数呈下降趋势,F11 代后呈上升趋势。多重比较发现(图 3),尿酸含量 F13、F14 代与 F10 ~ F12 代差异有显著性($P < 0.01$),F9 代与 F11 代差异有显著性($P < 0.05$);肌酐含量 F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$)。

2.1.4 血清酶的动态变化

糖尿病模型长爪沙鼠近交系动物碱性磷酸酶(ALP)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)含量 F9 ~ F14 代趋势平稳;乳酸脱氢酶(LD)、肌酸激酶(CK)、淀粉酶(AMY)含量的趋势呈上升趋势。多重比较结果显示,碱性磷酸酶含量在 F11 代与 F9、F12 代差异有显著性($P < 0.05$),与 F13、F14 代差异亦有显著性($P < 0.01$),在 F13 代与 F10、F12 代差异有显著性($P < 0.05$);谷丙转氨酶含量在 F10 代与 F11、F14 代差异有显著性($P < 0.05$),F11 代与 F13 代差异有显著性($P < 0.05$);乳酸脱氢酶含量在 F13、F14 代与 F9 ~ F12 代差异有显著性($P < 0.01$),F11 代与 F12 代差异有显著性($P < 0.05$);肌酸激酶含量在 F9 代与 F10、F11 代差异有显著性($P < 0.05$),F13、F14 代与 F10 ~ F12 代差异有显著性($P < 0.01$);淀粉酶含量在 F14 代与 F10、F12 代差异有显著性($P < 0.05$)(图 4)。

2.1.5 血清葡萄糖和镁离子的动态变化

糖尿病模型长爪沙鼠近交系培育中 F9 ~ F14 代动物的血糖(GLU)含量呈上升趋势,均值从 F9 代的(5.7 ± 2.54) mmol/L 到 F14 代为(6.63 ± 2.15) mmol/L;镁离子(MG)含量趋势平稳,镁离子含量 F11 代与 F9、F13、F14 代差异有显著性($P < 0.05$),F13 代与 F10、F12 代差异有显著性($P < 0.05$)(见图 5)。

2.2 血细胞动态变化

2.2.1 白细胞及分类的动态变化

长爪沙鼠糖尿病近交系培育过程中 F9 ~ F14 代的白细胞(WBC)、中性粒细胞(NEUT)、中性粒细胞百分数(NEUT%)、淋巴细胞(LYM)、淋巴细胞百分数(LYM%)、单核细胞(MON)、嗜碱性粒细胞(BAS)、嗜碱性粒细胞百分数(BAS%)趋势平稳,单核细胞百分数(MON%)呈上升趋势,嗜酸性粒细胞(EOS)、嗜酸性粒细胞百分数(EOS%)呈下降趋势。多重比较发现,白细胞计数在 F13 代与 F10 ~ F12 代差异有显著性($P < 0.05$);单核细胞计数在 F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$);中性粒细胞计数在 F11 代与 F12 代差异有显著性($P < 0.05$),F13 代与 F10、F12 代差异有显著性($P < 0.05$);嗜酸性粒细胞计数在 F11 代与 F10、F14 代差异有显著性($P < 0.05$);嗜碱性粒细胞计数在 F13 代与 F10、F12 代差异有显著性($P < 0.05$);淋巴细胞百分数在 F11 代与 F12 代差异有显著性($P < 0.05$);单核细胞百分数在 F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$);中性粒细胞百分数在 F12 代与 F11、F13 代差异有显著性($P < 0.05$);嗜酸性粒细胞百分数在 F11 代与 F14 代差异有显著性($P < 0.05$)(图 6 和图 7)。

2.2.2 红细胞及相关指标的动态变化

糖尿病模型长爪沙鼠近交系培育过程中动物的红细胞(RBC)、红细胞压积(HCT)、血红蛋白(HGB)含量呈下降趋势,平均血红蛋白含量(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC)呈上升趋势,平均红细胞体积(MCV)、红细胞分布宽度(RDW)趋势平稳。多重比较结果显示,红细胞计数、血红蛋白含量、红细胞压积在 F11 代与 F10、F12、F13 代

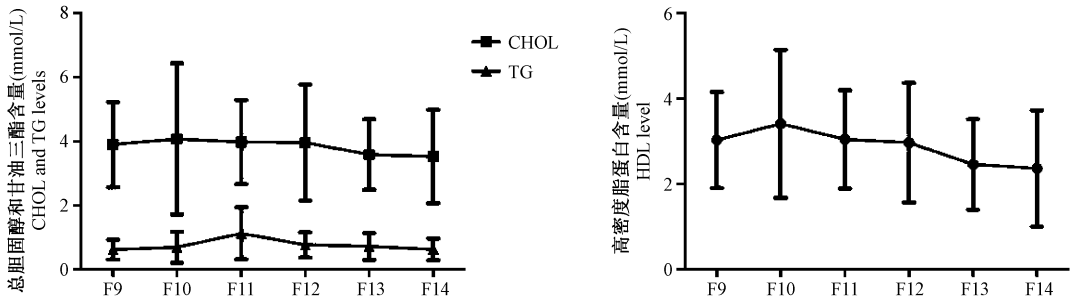


图 2 血清脂类的动态曲线

Figure 2 The dynamic curves of serum lipids

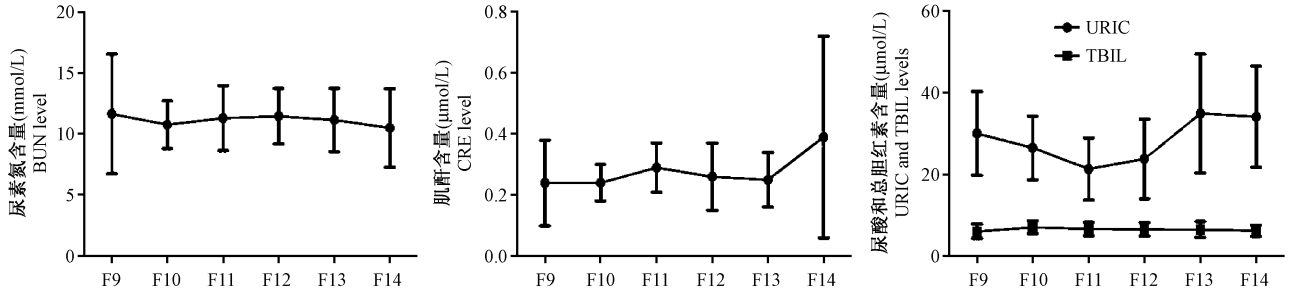


图 3 血清代谢产物的动态曲线

Figure 3 The dynamic curves of serum metabolites

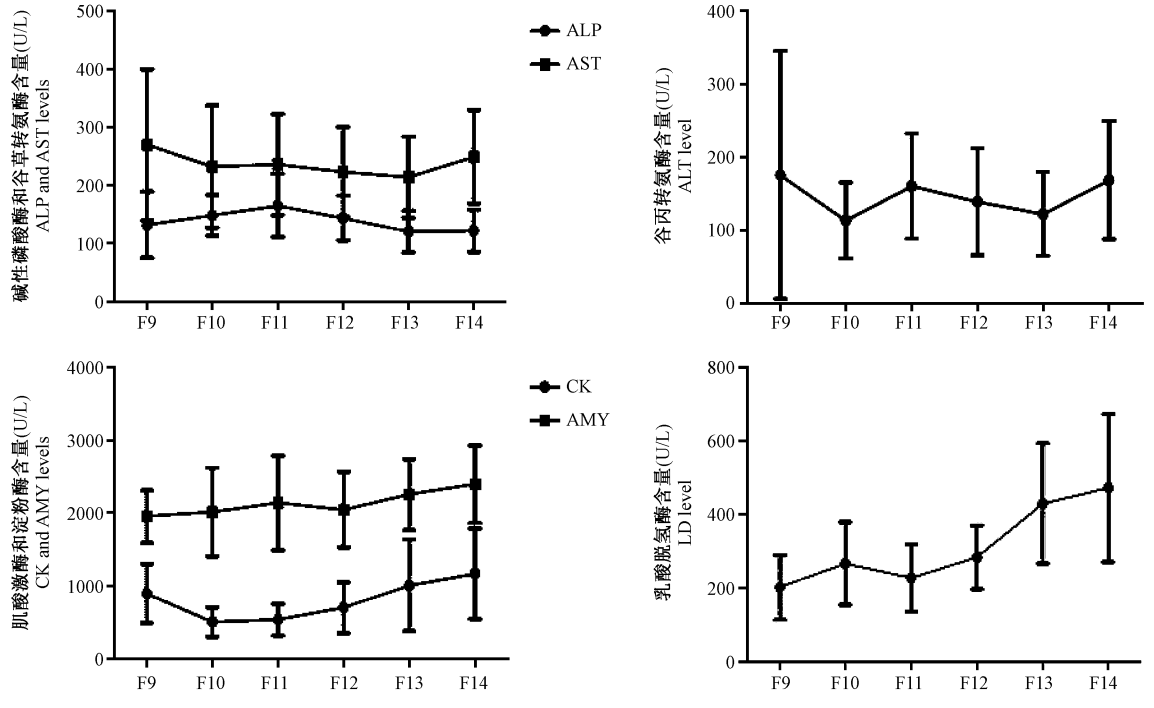


图 4 血清酶的动态曲线

Figure 4 The dynamic curves of serum enzymes

差异有显著性($P < 0.01$),F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$);平均红细胞体积在 F10 代与 F11 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.05$),F14 代与 F11 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$);平均血红蛋白含量在 F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$);平均血红蛋白浓度在 F11 代与 F12 代差异有显著性($P < 0.05$),F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$);红细胞分布宽度在 F9 代与 F13 代差异有显著性($P < 0.05$),F14 代与 F9 ~ F11 代差异有显著性($P < 0.05$)(见图 8)。

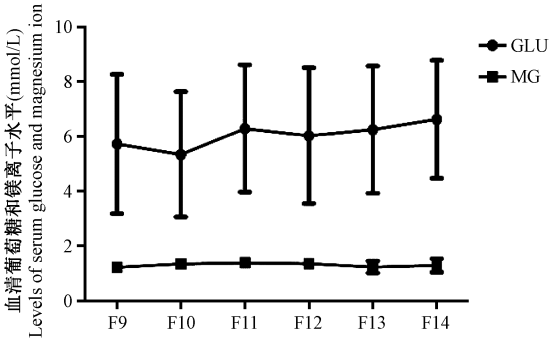


图 5 血清葡萄糖和镁离子动态曲线

Figure 5 The dynamic curves of serum glucose and magnesium ions

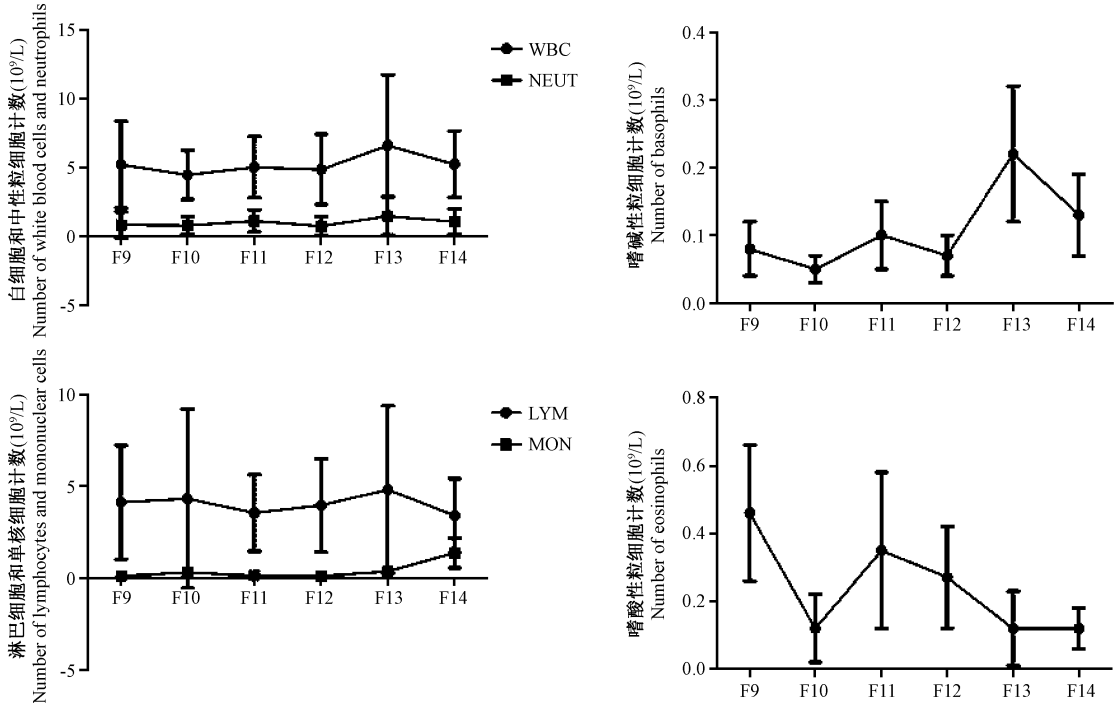


图 6 白细胞相关指标动态曲线

Figure 6 The dynamic curves of white blood cell-related indicators

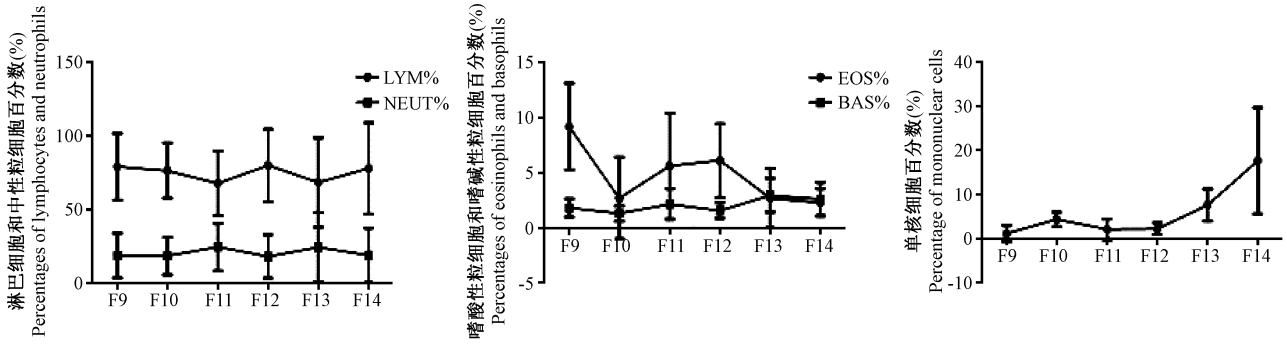


图 7 白细胞分类百分比的动态曲线

Figure 7 The dynamic curves of leukocyte classification percentages

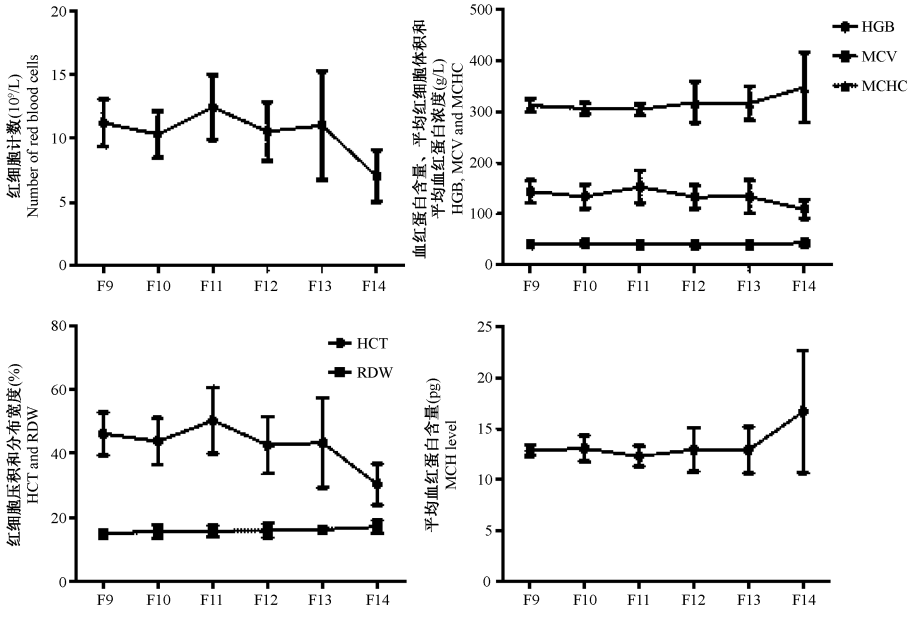


图 8　红细胞相关指标动态曲线

Figure 8　The dynamic curves of red blood cell-related indicators

2.2.3　血小板及相关指标的动态变化

糖尿病模型长爪沙鼠近交系培育过程中动物的平均血小板体积(MPV)呈上升趋势,血小板分布宽度(PDW)趋势平稳,血小板(PLT)含量、血小板压积(PCT)上升到 F11 代之后趋于平稳。多重比较发现,血小板含量、血小板压积在 F9 代与 F11、F13 代差异有显著性($P < 0.05$);平均血小板体积在 F14 代与 F9 ~ F13 代差异有显著性($P < 0.01$)(见图 9)。

3　讨论

血液生理生化指标是实验动物重要的生物学特性指标,在近交系动物的培育过程中开展血液生理生化监测和研究,不但能了解该过程中动物生物学特性的变化,还可比较每项生理生化指标的变化规律,及其如何在随着近交繁殖代数的增加趋于一致和稳定。因此,本课题组在长爪沙鼠糖尿病近交系的培育过程中进行生理生化指标的检测具有重要意义。

影响动物的血液生理参数的因素包括两个方面:自身的遗传因素与环境因素[7]。本研究的结果显示,在 17 项血液生化指标中,白蛋白、总蛋白、甘油三酯、高密度脂蛋白、尿素氮、总胆红素、肌酐、碱性磷酸酶、谷草转氨酶、谷丙转氨酶、镁离子含量在 F9 ~ F14 代中均趋于平稳,而尿酸、乳酸脱氢酶、肌酸激酶、淀粉酶、血糖含量趋势随着代数上升而上升;总胆固醇含量趋势随着代数上升而下降。各项指标在 F9 ~ F14 代之间进行多重比较,血糖、总胆固醇、尿素氮、总胆红素、谷草转氨酶这五项血液生化指标差异无显著性,而淀粉酶、高密度脂蛋白、碱性磷酸酶、谷丙转氨酶、镁离子含量差异有显著性($P < 0.05$),尿酸、乳酸脱氢酶、肌酸激酶、白蛋白、总蛋白、甘油三酯、肌酐含量差异亦有显著性($P < 0.01$)。这些数据说明在近交系的培育中不同的代数对大多数生化指标显现出较大影响,而总体而言到 F14 代时,各项指标均趋于平稳,从本课题组对后面 F16 代的初步统计结果(本文未展示数据)来看,从 F14 代后,生理生化指标基本稳定。这也间接反映出接近完成 F20 代近交系培育后,动物的生物学特性也相对更稳定了。

糖尿病模型长爪沙鼠近交系培育过程 F9 ~ F14 代的血细胞指标中,单核细胞百分数、平均血红蛋白含量、平均血红蛋白浓度、平均血小板体积呈上升趋势,嗜酸性粒细胞计数、嗜酸性粒细胞百分数、红细胞计数、血红蛋白、红细胞压积呈下降趋势,白细胞计数、中性粒细胞计数、中性粒细胞百分数、淋巴细胞计数、淋巴细胞百分数、单核细胞计数、嗜碱性粒细胞计数、嗜碱性粒细胞百分数、平均红细胞体积、红细胞分布宽度、血小板分布宽度、血小板含量、血小板压积指标趋势平稳。各项指标在 F9 ~ F14 代之间进行多重比较显示,生理指标嗜酸性粒细胞、嗜酸性粒细胞百分数、中性粒细胞、中性粒细胞百分数、淋巴细胞百分数、嗜碱性粒细胞计数、平均红细胞体积、红细胞分布宽度、血小板含量、血小

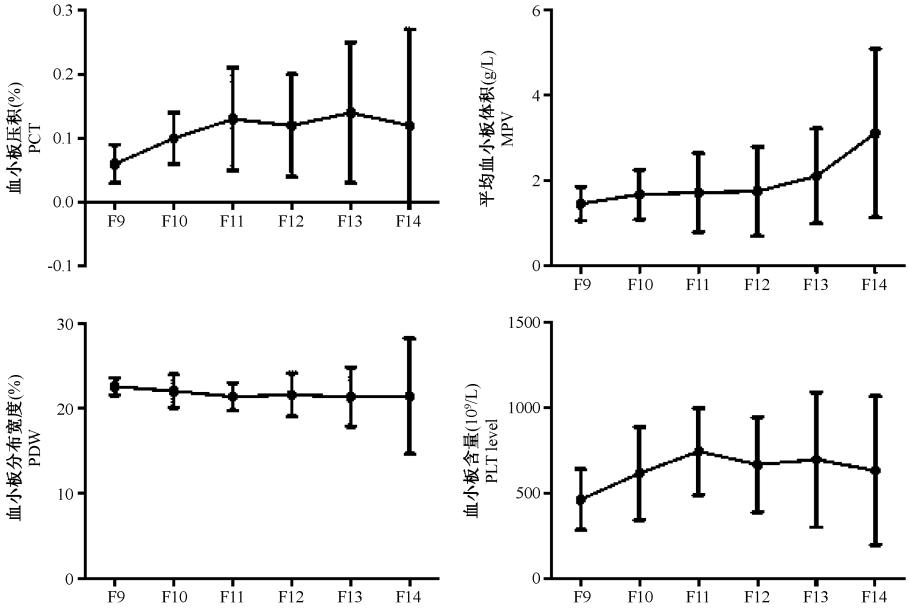


图 9 血小板相关指标动态曲线

Figure 9 The dynamic curves of platelet-related indicators

板压积差异有显著性($P < 0.05$);单核细胞百分数、平均血红蛋白含量、平均血红蛋白浓度、平均血小板体积、红细胞计数、血红蛋白、红细胞压积、白细胞计数差异有显著性($P < 0.01$),其他指标差异无显著性。糖尿病模型动物具有一定的疾病特征,因此其生理生化指标相比本团队培育的长爪沙鼠近交系,在多项指标如总蛋白、高密度脂蛋白、总胆固醇、血糖、甘油三酯、淀粉酶、中性粒细胞计数、淋巴细胞计数等都显著升高,而碱性磷酸酶、谷草转氨酶、乳酸脱氢酶、血小板含量等有所降低[7-8],其中总蛋白、高密度脂蛋白、总胆固醇等指标与代谢相关,说明在定向进行高血糖筛选的过程中,该模型动物脂代谢和糖代谢受损,符合糖尿病模型动物特征。但是碱性磷酸酶、谷草转氨酶等肝功能相关指标较普通长爪沙鼠近交系较低,其原因有待进一步研究。这些都说明虽然同为新培育的长爪沙鼠近交系,但是本研究中的糖尿病模型群体因其为一个自发性的疾病模型群体,其血液生化和生理指标特征受其内在遗传因素的影响,与其他近交系有显著不同。

本研究针对糖尿病近交系长爪沙鼠这一实验动物资源进行血液生理生化指标的研究,对描绘该模型群体的生物学特征有重要意义。

参考文献:

[1] 李厚达. 实验动物学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003.

[2] Segatelli TM, França LR, Pinheiro PF, et al. Spermatogenic cycle length and spermatogenic efficiency in the gerbil (*Meriones unguiculatus*) [J]. J Androl, 2004, 25(6): 872 - 880.

[3] Gleich O, Weiss M, Strutz J. Age-dependent changes in the lateral superior olive of the gerbil (*Meriones unguiculatus*) [J]. Hearing Res, 2004, 194(1 - 2): 47 - 59.

[4] Matsubara S, Shibata H, Takahashi M, et al. Cloning of Mongolian gerbil cDNAs encoding inflammatory proteins, and their expression in glandular stomach during *H. pylori* infection [J]. Cancer Sci, 2004, 95(10): 798 - 802.

[5] Boquist L. Obesity and pancreatic islet hyperplasia in the Mongolian gerbil [J]. Diabetologia, 1972, 8(4): 274 - 282.

[6] 王钜, 卢静, 陈振文, 等. 长爪沙鼠血液生理生化正常参考值的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(2): 108 - 111.

[7] 李迎, 崔晓霞, 杜小燕, 等. 近交系 CMU/1 和 CMU/2 长爪沙鼠 Willis 环缺失与生理生化参数比较 [J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(6): 470 - 474.

[8] 李迎, 崔晓霞, 杜小燕, 等. 长爪沙鼠脑缺血模型近交系培育中血液生理生化指标的变化 [A]. 2017 年第十五届中国北方实验动物科技年会论文集 [C]. 2017: 154 - 160.

[9] 王洪, 魏杰, 王吉星, 等. 两种抗凝剂对实验用小型猪血液生理指标的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(4): 28 - 32.

[10] 何建平, 李金钢, 王智, 等. 棕色田鼠血液生理生化指标的测定 [J]. 动物学杂志, 2001, 36(6): 50 - 53.

〔收稿日期〕2018 - 01 - 26

研究报告

五指山小型猪 *PPARγ2* 基因启动子多态性分析

潘金春[1,2],闵凡贵[1,2],王希龙[1,2*]

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

【摘要】　目的　对五指山小型猪 *PPARγ2* 基因启动子调控区域多态性进行分析。**方法**　根据猪 *PPARγ2* 启动子调控区域 2200 bp 设计 5 对引物,对 57 头封闭群五指山小型猪的多态性进行检测,并用多种生物信息学软件对调控区域的启动子、转录因子结合位点、RNA 二级结构、CpG 岛进行预测分析。**结果**　筛选到 9 个单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms,SNPs)位点,分别是:－1595T/C、－1534G/A、－1262C/A、－1220C/A、－1017A/G、－963A/G、－955G/A、－866A/G、－333G/A。SNPs 都没有处在软件识别的启动子区域中,但－333G/A 突变位于核心启动子(－656 ~ －23 bp)区域。突变的 SNP 位点附近转录因子结合位点会发生改变,突变前后 RNA 二级结构最小自由能发生变化,其结构也发生显著变化。目标序列未找到 CpG 岛。**结论**　筛选到的五指山小型猪 *PPARγ2* 启动子调控区域 SNPs 可能对该基因的表达调控产生影响,为进一步研究其功能奠定基础。

【关键词】　五指山小型猪;*PPARγ2*;启动子;单核苷酸多态性;生物信息学

【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 09-0021-06

doi: 10.3969/j.issn.1671－7856. 2018.09.004

Analysis of polymorphisms in the promoter region of the *PPARγ2* gene in Wuzhishan minipigs

PAN Jinchun[1,2], MIN Fangui[1,2], WANG Xilong[1,2*]

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

【Abstract】　Objective　To screen the polymorphisms of the promoter regulatory region of the *PPARγ2* gene in Wuzhishan minipigs. **Methods**　Five pairs of primers were designed based on the promoter regulatory region of the *PPARγ2* gene in pigs. Then, the polymorphisms of 57 outbred Wuzhishan minipigs were detected; moreover, the promoters, transcription factor-binding sites, and secondary structures of RNA and CpG islands of the regulatory region were predicted and analyzed by various types of bioinformatic software. **Results**　Nine single-nucleotide polymorphisms (SNPs) were found, which were －1595T/C, －1534G/A, －1262C/A, －1220C/A, －1017A/G, －963A/G, －955G/A, －866A/G, and －333G/A. SNPs were not located in the region of promoters that were identified by the software, but the －333G/A mutation was located in the core promoter region (－656 to －23 bp). Transcription factor-binding sites were altered near the mutational locus. The minimum free energy of secondary structures of RNA was changed and the structure of RNA was significantly altered. CpG islands were not found in the target sequence. **Conclusions**　The screened SNPs of the promoter region of the *PPARγ2* gene in Wuzhishan minipigs may affect regulation of the expression of this gene, which lays the foundation for further study of its function.

【Keywords】　Wuzhishan minipig(WZSP); *PPARγ2*; promoter; single-nucleotide polymorphism(SNP); bioinformatics

---

[基金项目]广东省科技计划项目(编号:2017B030314171,2017A070702001);广州市科技计划项目(编号:201707010376)。

[作者简介]潘金春(1979—　),男,副研究员,研究方向:实验动物质量监督和比较医学研究。E-mail: jcpan@sina.com

[通信作者]王希龙(1963—　),男,研究员,研究方向:小型猪实验动物标准化和比较医学研究。E-mail: hnxsswxl@yahoo.com.cn

过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferator-activated receptor, PPAR)基因是 1990 年 Issemann 等[1]首先发现的能被过氧化物酶体增殖剂(PP)激活的物质,因此命名为 PP 激活受体(PPAR)。PPAR 属于核激素受体超家族,有 3 个亚型分别为 α、β、γ,其中 PPARγ 是最重要的 PPAR。人的 *PPARγ* 位于 3 号染色体,而猪位于 13 号染色体上。*PPARγ* 可产生 4 种 mRNA 异构体,编码 2 种蛋白,其中 *PPARγ*1、*PPARγ*3、*PPARγ*4 编码相同的蛋白,*PPARγ*2 编码蛋白比 *PPARγ*1 编码蛋白在 N 末端多了 28 ~ 30 个氨基酸,而激活效率则高 5 ~ 6 倍[2-3],因此 *PPARγ*2 基因是现在研究的热点。*PPARγ* 基因的多态性与疾病密切相关,现已发现多种单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs),包括 C1431T、Pro12Ala、rs1801282 等,这些 SNPs 可能与糖尿病、肥胖、心血管等疾病相关[4-6]。

五指山小型猪(Wuzhishan minipigs, WZSP)是目前国内应用最为广泛的小型猪之一,具有体型矮小、性成熟早、适应性强、遗传稳定、代谢率低等诸多优点。有研究证明,五指山小型猪对高糖高脂饲料敏感,可建立 2 型糖尿病模型[7];本研究前期对封闭群五指山小型猪的糖耐量和血脂进行筛查,发现有部分小型猪糖代谢和脂代谢异常[8];五指山小型猪的 *PPARγ* 基因存在多态性[9]。五指山小型猪具有独特的脂肪吸收和代谢能力,可用于建立高血脂、糖尿病等模型。本研究对 WZSP 猪群的 *PPARγ*2 基因启动子调控区域 SNPs 进行扫描,结合生物信息学方法对 SNPs 进行预测,分析 SNPs 对该基因的调控作用,为进一步研究其功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级封闭群五指山小型猪 57 头,雌雄不限,体重 16.2 ~ 33.8 kg,为 6 月龄以上的成年猪,来源于广东省实验动物监测所和广东大华农动物保健品股份有限公司合作建立的实验用 WZSP 繁育基地[SCXK(粤)2013 - 0022]。动物饲养于普通级实验设施内[SYXK(粤)2018 - 0087]。实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀,动物抓取、采血等过程中尽量减少对其应激,动物置于吊床上保定后采血。

1.2 主要试剂与仪器

血液 DNA 抽提试剂盒,Omega 公司;Premix Ex Taq Hot Start 试剂,Takara;DL2000 DNA marker,Takara;引物,由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成;TBE 缓冲液、超纯水为本实验室提供。PCR 仪,Biometra 公司,型号 TProfessional Standard Gradient;电泳仪,北京六一仪器厂,型号 DYY-6C;全自动凝胶成像系统,美国 Bio-Rad 公司,型号 PowerPac Basic 164-5050;漩涡振荡器,江苏海门麒麟医用仪器厂,型号 QL861;高速离心机,Sigma 公司,型号 3k18;干式恒温器,杭州奥盛仪器有限公司,型号 K20-B。

1.3 实验方法

1.3.1 基因组 DNA 抽提

从前肢皮下头静脉或后肢隐静脉采取五指山小型猪抗凝血 3 mL,用试剂盒抽提血液基因组 DNA。

1.3.2 引物设计及 PCR

在 UCSC 基因组数据库中查找猪 *PPARγ* 基因序列(http://genome.ucsc.edu/,基因位置 chr13: 75455897 - 75663489),结合猪 *PPARγ*2 基因启动子(GeneBank 登录号:AY044238.1)和 mRNA(GeneBank 登录号:DQ437885.1)序列确定猪 *PPARγ*2 基因转录起始点前后共 2200 bp 左右的调控序列,用 Primer 5.0 软件设计 5 对引物,以该基因 mRNA 第 1 位碱基为 +1 位,引物信息及产物大小见表 1,产物总长度为 2068 bp(-2011 ~ 57 bp)。PCR 反应体系为 80 μL,其中 DNA 模板 8 μL,Premix Ex Taq Hot Start 试剂 40 μL,上下游混合引物(浓度 10 μmol/L)4 μL,超纯水 28 μL。采用 PCR 仪扩增,PCR 条件为:94℃预变性 5 min;94℃变性 1 min,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,40 个循环;72℃延伸 10 min。PCR 产物 1% 琼脂糖凝胶电泳,再用凝胶成像系统检测条带情况。

1.3.3 PCR 产物测序及序列分析

将有目的条带的 PCR 产物直接送英潍捷基(上海)贸易有限公司测序。测序结果用 Contig Express 9.1 软件拼接,结合 DNAstar 7.1 软件对测序结果进行修正、比较,再用 Variant reporter 软件分析确定 SNPs。

1.3.4 生物信息学分析

利用多种生物信息学软件对启动子、转录因子结合位点、RNA 二级结构、CpG 岛进行预测分析,可以提高预测的准确性。各种软件方法参见表 2。

表 1 引物序列、位置及产物长度

Table 1 Primer sequences, position, and length of the PCR products

引物 Primers	引物序列(5' → 3') Primer sequences (5' → 3')	产物位置(bp) Position of the products	产物长度(bp) Length of the products
P1	F: 5'-CTCACGGCAACACCGAATC-3' R: 5'-CAGCAACTTGTGGCTTT-3'	-2011 ~ -1444	568
P2	F: 5'-CTTTTGCTGGTTCCTTGC-3' R: 5'-GGGCTTGATACAGTTTAGAT-3'	-1606 ~ -1071	536
P3	F: 5'-CAATGTTCAGGCATCAGC-3' R: 5'-ATAGACAAAGGGAGTGG-3'	-1186 ~ -596	591
P4	F: 5'-TGCAAGTTGGTTTATCCGGT-3' R: 5'-TTCAGTGTCTTGTGAGG-3'	-856 ~ -276	581
P5	F: 5'-CCCACTCCCTTTGTCTAT-3' R: 5'-CTCCCAGAGTTTCACCCAT-3'	-613 ~ 57	670

表 2 生物信息学分析软件

Table 2 Bioinformatic analysis software

预测内容 Predicted contents	软件 Software	网址 Websites
启动子 Promoters	WWW Promoter SCAN	http://www-bimas.cit.nih.gov/molbio/proscan/
	Neural Network Promoter Prediction	http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html
	Promoter 2.0	http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/
	Softberry	http://linux1.softberry.com/berry.phtml
转录因子结合位点 Transcription factor-binding sites	Tfsitescan	http://www.ifti.org/
	TFSEARCH	http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html
	GeneBuilder	http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/genebuilder.html
	AliBaba 2.1	http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html
RNA 二级结构 Secondary structures of RNA	Genebee	http://www.genebee.msu.su/services/rna2_reduced.html
CpG 岛 CpG islands	Bio-soft	http://www.bio-soft.net/sms/cpg_island.html
	MethPrimer	http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi
	Webgene	http://zeus2.itb.cnr.it/cgi-bin/wwwcpg.pl
	Softberry	http://linux1.softberry.com/berry.phtml? topic = cpgfinder&group = programs&subgroup = promoter
	CpG Island Searcher	http://www.uscnorris.com/cpgislands2/cpg.aspx

2 结果

2.1 PCR 产物测序

PCR 产物分为 5 段条带,大小为 536 ~ 670 bp 之间,产物电泳结果见图 1。测序分析结果发现 9 个 SNPs,其在 DNA 序列上的位置参见图 2,各 SNPs 基因型频率及突变类型见表 3。

2.2 五指山小型猪 *PPARγ2* 基因启动子预测

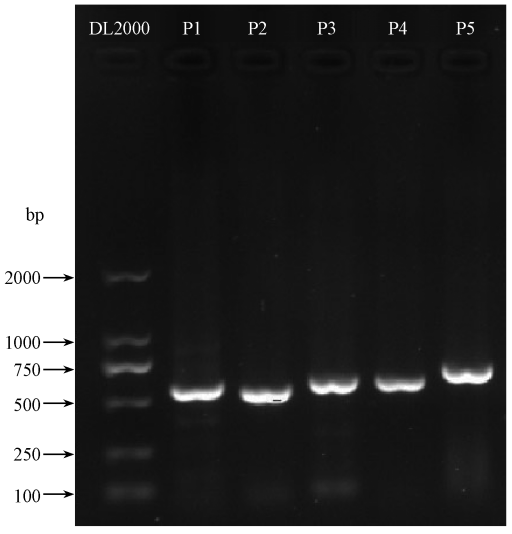
根据 4 种不同软件对启动子进行预测,上述 SNPs 都没有处在软件识别的启动子区域中,结果参见表 4。

2.3 五指山小型猪 *PPARγ2* 基因转录因子结合位点预测

利用 4 种不同软件对五指山小型猪的 *PPARγ2* 基因转录因子结合位点进行预测,可以发现该基因包含 TATA box、Pu box、NF-κB、GATA-1 等多种对 *PPARγ2* 基因转录起重要作用的结合位点。突变后的序列提交分析后可见转录因子结合位点的数量发生了改变(表 5),并且改变都发生在突变的 SNP 位点附近。

2.4 五指山小型猪 *PPARγ2* 基因 RNA 二级结构预测

将突变前后的 *PPARγ2* 基因 DNA 提交软件预测 RNA 二级结构的变化,结果表明,突变引起 RNA 二级结构最小自由能发生变化,由 -1.580×10^6 J/mol 变为 -1.566×10^6 J/mol。RNA 二级结构也发生明显改变,多处茎环结构发生较大变化(图 3)。



注:从左向右各孔道分别为:DL2000 marker,100 ~ 2000 bp;引物 P1 的 PCR 产物,568 bp;引物 P2 的 PCR 产物,536 bp;引物 P3 的 PCR 产物,591 bp;引物 P4 的 PCR 产物,581 bp;引物 P5 的 PCR 产物,670 bp。

图 1 PCR 产物凝胶电泳结果

Note. From left to right, the lanes are: DL2000 marker, 100 – 2000 bp; PCR products of primers P1, 568 bp; PCR products of primers P2, 536 bp; PCR products of primers P3, 591 bp; PCR products of primers P4, 581 bp; PCR products of primers P5, 670 bp.

Figure 1 Results of gel electrophoresis of PCR products

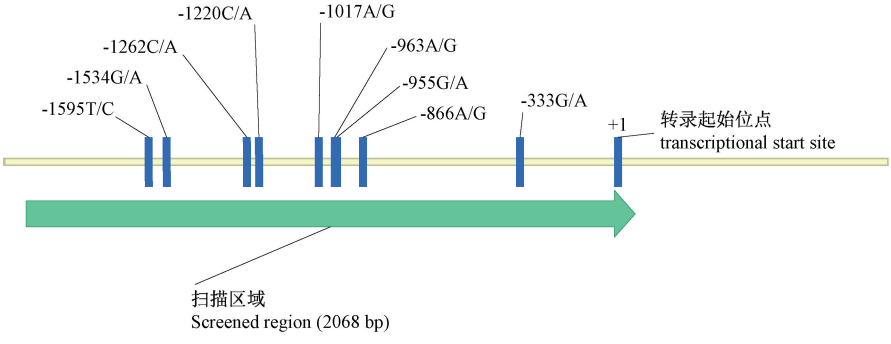


图 2 五指山小型猪 *PPARγ2* 基因 SNPs 在 DNA 序列上的位置

Figure 2 The locations of *PPARγ2* SNPs of Wuzhishan minipigs in the DNA sequence

表 3 五指山小型猪 *PPARγ2* 基因 SNPs 基因型频率

Table 3 Genotype frequencies of *PPARγ2* SNPs of Wuzhishan minipigs

SNPs	动物数量 Number of animals	基因型 Genotype			突变类型 Mutation types
		TT/AA	TC/AG/AC	CC/GG	
-1595T/C	56	0	18(0.32)	38(0.68)	转换 Transition
-1534G/A	57	0	15(0.26)	42(0.74)	转换 Transition
-1262C/A	57	19(0.33)	22(0.39)	16(0.28)	颠换 Transversion
-1220C/A	57	37(0.65)	18(0.32)	2(0.04)	颠换 Transversion
-1017A/G	57	41(0.72)	16(0.28)	0	转换 Transition
-963A/G	57	18(0.32)	22(0.39)	17(0.30)	转换 Transition
-955G/A	57	35(0.61)	22(0.39)	0	转换 Transition
-866A/G	57	16(0.28)	22(0.39)	19(0.33)	插入 Insertion
-333G/A	57	37(0.65)	20(0.35)	0	转换 Transition

表 4 五指山小型猪 *PPARγ2* 基因启动子预测结果

Table 4 Results of *PPARγ2* promoter prediction in Wuzhishan minipigs

软件 Software	起始位点 Start site	结束位点 End site	评分 Score
WWW Promoter SCAN	—	—	—
Neural Network Promoter Prediction	-1473	-1423	0.82
Promoter 2.0	-184	—	0.685
Softberry	—	—	—

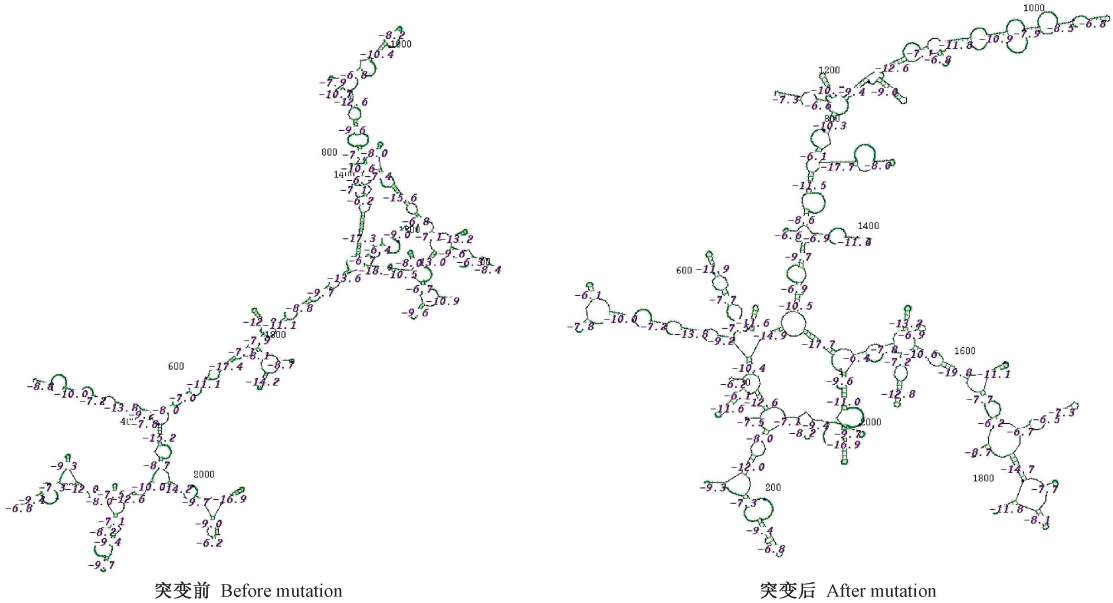
表 5 不同软件预测五指山小型猪 *PPARγ2* 基因转录因子结合位点数量

Table 5 Numbers of transcriptional factor-binding sites of *PPARγ2* gene predicted by different software in Wuzhishan minipigs

软件 Software	转录因子结合位点数量 Numbers of transcriptional factor-binding sites		高评分结合位点数量 Numbers of binding sites with high scores	
	原序列 Referenced sequences	突变序列 Mutated sequences	原序列 Referenced sequences	突变序列 Mutated sequences
Tfsitescan	534	560	27	28
TFSEARCH	497	493	30	32
GeneBuilder	723	725	4	4
AliBaba 2. 1	168	172	—	—

注:Tfsitescan 软件:高分为 10 分;TFSEARCH 软件:高分为 100 分,最低分为 85 分;GeneBuilder 软件:核心相似度 1. 0,矩阵相似度 0. 85;AliBaba 2. 1 软件参数:配对已知位点数 = 50,矩阵宽度 = 10 bp,位点最小数量 = 4,最小矩阵保守度 = 75%,与矩阵序列相似度 = 1%,因子水平 = 4(例如:RAR-b')。

Note. Software Tfsitescan: 10 is the high score. Software TFSEARCH: 100 is the high score; 85 is the threshold score. Software GeneBuilder: Core similarity is 1. 0; Matrix similarity is 0. 85. Software AliBaba 2. 1 parameters: Pairsim to known site = 50; Matrix width = 10 bp; Minimum number of sites = 4; Minimum matrix conservation = 75%; Similarity of sequence to matrix = 1%; Factor class level = 4 (e. g.: RAR-b').



注:红色数字为茎环结构的自由能;黑色数字为碱基的位置(从提交的第一个碱基计算);绿色线条表示 RNA 碱基链。

图 3 *PPARγ2* 基因 RNA 二级结构预测

Note. Red numbers indicate the free energy of the stem ring structures. Black numbers indicate the positions of the base (calculated from the first base submitted). Green lines indicate RNA base chains.

Figure 3 RNA secondary structure prediction of the *PPARγ2* gene

2.5 *PPARγ2* 基因 CpG 岛预测

用 5 种不同的软件预测 *PPARγ2* 基因 CpG 岛,参数设为:Obs/Exp 值大于 0. 6,GC 含量大于 50%,范围大于 200 bp。结果未发现 CpG 岛的存在。

3 讨论

现已发现多个与疾病相关的 *PPARγ* 基因多态位点,Yen 等人[10]首次报道了 *PPARγ2* 基因的两个常见多态位点 C1431T 和 Pro12Ala 可能与糖尿病、肥胖等疾病有关。启动子区域的突变位点 -1279G/A突变体在 Pro12Ala 突变体 Pro/Pro 基因型存在的情况下,可提高对 2 型糖尿病的易感性;而在 12Ala 等位基因存在时,则表现对 2 型糖尿病的保护作用[11]。Chan 等人[12]发现 rs6809631、rs9817428、rs10510411、rs12629293 和 rs12636454 这 5 个启动子区域 SNPs 与 2 型糖尿病显著相关。*PPARγ2* 的启动子区域突变 C-2821T 可能通过调节 *PPARγ2* 基因的表达来影响其激活[13]。

本研究一共筛选到 9 个 SNPs,包括 -1595T/C、-1534G/A、-1262C/A、-1220C/A、-1017A/G、-963A/G、-955G/A、-866A/G、-333G/A。用 4 个启动子预测软件预测五指山小型猪的 *PPARγ2* 基

因在 -1473 bp 和 -184 bp 位置可能存在两个启动子,这 9 个 SNPs 都没有处于预测的启动子区域,可能作用于其他调控区域而影响基因的表达。其中 -333G/A 突变位于核心启动子(-656 ~ -23 bp)区域,可能对 *PPARγ2* 基因的表达发挥重要调控作用。

利用 4 种不同软件对五指山小型猪的 *PPARγ2* 基因转录因子结合位点进行预测,发现突变前后的转录因子结合位点数量都发生了改变,这些改变都发生在突变的 SNPs 位点附近。说明这 9 个 SNPs 都可导致 *PPARγ2* 基因转录因子结合位点发生改变,从而可能影响该基因的转录表达。通过软件预测该基因 RNA 二级结构发现其最小自由能发生变化,二级结构也有显著变化,可能影响 RNA 二级结构的稳定性,进一步说明突变位点可能对该基因的转录表达产生影响。通过 5 种软件均未能预测出五指山小型猪的 *PPARγ2* 基因有 CpG 岛的存在,说明通过改变甲基化水平调节该基因表达的可能性较小。

人的 *PPARγ2* 基因存在一些突变位点与本研究获得的突变位点位置接近,如 -1279G/A 突变体可能与 2 型糖尿病的易感性有关[11],这个位点与本研究中 -1262C/A 突变体位置靠近,且该突变三种基因型频率接近(0.33∶0.39∶0.28)。此外, -963A/G (0.32∶0.39∶0.30)和 -866A/G(0.28∶0.39∶0.33)突变的基因型频率也比较接近,均衡的基因型有利于筛选需要的突变体。有研究者在二花脸猪 *PPARγ* 基因转录调控区域鉴定出两个 SNPs, -1633C > T和 -1572G > A,并进一步证实 T-A 单体型可能与更高的肌内脂肪含量有关[14],这两个位点与本研究中 -1595T/C 突变位置接近。另外, -333G/A突变位于核心启动子可能对该基因的表达产生重要影响。这几个 SNPs 都可以引起转录因子结合位点的变化,有必要进一步研究其功能。

参考文献:

[1] Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators [J]. Nature, 1990, 347(6294): 645 -650.

[2] Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism [J]. Endocr Rev, 1999, 20(5): 649 -688.

[3] Werman A, Hollenberg A, Solanes G, et al. Ligand-independent activation domain in the N terminus of peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPARγ). Differential activity of PPARγ1 and-2 isoforms and influence of insulin [J]. J Biol Chem, 1997, 272(32): 20230 -20235.

[4] Butt H, Shabana, Hasnain S. The C1431T polymorphism of peroxisome proliferator activated receptor γ (PPARγ) is associated with low risk of diabetes in a Pakistani cohort [J]. Diabetol Metab Syndr, 2016, 8(1): 67.

[5] Zaki M, Hassan N, El-Bassyouni HT, et al. Association of the Pro12Ala polymorphism with the metabolic parameters in women with polycystic ovary syndrome [J]. Open Access Maced J Med Sci, 2017, 5(3): 275 -280.

[6] Szkup M, Owczarek AJ, Schneider-Matyka D, et al. Associations between the components of metabolic syndrome and the polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPAR-γ*), the fat mass and obesity-associated (*FTO*), and the melanocortin-4 receptor (*MC4R*) genes [J]. Aging (Albany NY), 2018, 10(1): 72 -82.

[7] 陈华, 刘亚千, 李春, 等. 三个品系小型猪Ⅱ型糖尿病模型的比较研究 [J]. 实验动物科学, 2007, 24(6): 49 -55, 32.

[8] 潘金春, 闵凡贵, 袁文, 等. 五指山小型猪糖耐量试验及血脂分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(5): 356 -359.

[9] 赵玉琼, 姚春涛, 赵权, 等. 三个品系小型猪 PPAR-γ 基因外显子 1 的多态性分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(5): 289 -292.

[10] Yen CJ, Beamer BA, Negri C, et al. Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor γ (hPPARγ) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPARγ2 missense mutation [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 241(2): 270 -274.

[11] Vimaleswaran KS, Radha V, Jayapriya MG, et al. Evidence for an association with type 2 diabetes mellitus at the PPARG locus in a South Indian population [J]. Metabolism, 2010, 59(4): 457 -462.

[12] Chan KH, Niu T, Ma Y, et al. Common genetic variants in peroxisome proliferator-activated receptor-γ (PPARG) and type 2 diabetes risk among Womens Health Initiative postmenopausal women [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2013, 98(3): E600 -E604.

[13] Muller YL, Bogardus C, Beamer BA, et al. A functional variant in the peroxisome proliferator-activated receptor γ2 promoter is associated with predictors of obesity and type 2 diabetes in Pima Indians [J]. Diabetes, 2003, 52(7): 1864 -1871.

[14] Wang H, Xiong K, Sun W, et al. Two completely linked polymorphisms in the PPARG transcriptional regulatory region significantly affect gene expression and intramuscular fat deposition in the longissimus dorsi muscle of Erhualian pigs [J]. Anim Genet, 2013, 44(4): 458 -462.

〔收稿日期〕2018 -03 -30

研究报告

复方阿胶浆对小鼠子宫内膜作用研究

丁桂清[1],魏华芳[2],王立群[1],朱楚超[2],王　晶[2*]

(1. 湖北中医药大学,武汉　430070; 2. 中国人民解放军武汉总医院妇产科,武汉　430070)

【摘要】 **目的**　探讨复方阿胶浆对小鼠子宫内膜的作用。**方法**　将雌鼠随机分为 4 组,分别为假手术组、假手术中药组、去势组及去势中药组,假手术中药组及去势中药组予复方阿胶浆灌胃处理。分别采用 HE 染色、免疫组化、免疫印迹实验法来分析复方阿胶浆对小鼠子宫内膜的作用。**结果**　与假手术组相比,假手术中药组小鼠子宫增大,内膜增厚,腺体数量增多,子宫内膜血管内皮生长因子 A(vascular endothelial growth factor-A,VEGF-A)表达量增多($P < 0.05$);去势中药组与去势组相比差异无显著性。**结论**　复方阿胶浆可促进假手术组小鼠子宫内膜的生长,并可改善子宫内膜容受性,其作用机制可能是通过调节卵巢功能而间接作用于子宫。

【关键词】 复方阿胶浆;子宫内膜;血管内皮生长因子 A

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 09-0027-06

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.005

Effect of compound Ejiao slurry on the mouse endometrium

DING Guiqing[1], WEI Huafang[2], WANG Liqun[1], ZHU Chuchao[2], WANG Jing[2*]

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430070, China. 2. Department of Gynaecology and Obstetrics, Wuhan General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Wuhan 430070)

【**Abstract**】 **Objective**　To explore the effect of compound Ejiao slurry on mouse uterus. **Methods**　Female mice were randomly divided into four groups: sham operation group, sham operation with Chinese medicine group, ovariectomized group, and ovariectomized with Chinese medicine group. The sham operation with Chinese medicine group and ovariectomized with Chinese medicine group were treated with compound Ejiao slurry gavage. HE staining, immunohistochemical staining, and Western blot were used to observe and compare the endometrium among the groups. **Results**　Compared with that of the sham operation group, the endometrium of the sham operation with Chinese medicine group was thicker. In addition, the number of glands and the expression of vascular endothelial growth factor-A (VEGF-A) in endometrium slightly increased ($P < 0.05$). However, the differences between the ovariectomized group and ovariectomized with Chinese medicine group were not significant. **Conclusions**　The compound Ejiao slurry can affect the growth of reproductive organs in female mice. It may regulate the endometrium by acting on the ovary.

【**Keywords**】 compound Ejiao slurry; endometrium; vascular endothelial growth factor-A(VEGF-A)

复方阿胶浆是由阿胶、红参、熟地黄、党参、山楂所组成的中药复方制剂,具有补气养血之功效。近年来,由于该药服用方便且口感较好,已被广大患者所接受,并在贫血以及化疗后骨髓抑制、免疫力低下等疾病的治疗上取得了较好疗效[1-2]。同时,该药物在妇科疾病中的应用也逐渐增多,临床研究发现,其不但可以用于治疗女性月经不调[3-4],而且可改善卵巢功能[5],辅助促排卵治疗,并增加

[基金项目]湖北省卫计委基金项目(编号:WJ2017M162)。

[作者简介]丁桂清(1992—　),女,硕士研究生,研究方向:妇产科。E-mail: 245964355@qq.com

[通信作者]王晶(1964—　),女,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:妇产科。E-mail: jingwang198723@163.com

患者子宫内膜厚度,提高子宫内膜容受性[6]。然而,目前关于复方阿胶浆对子宫内膜功能方面影响的研究仍较少,我们仍然不清楚复方阿胶浆是否对子宫内膜有作用。本研究通过观察去势及假手术小鼠在复方阿胶浆灌胃后的子宫变化情况,探讨其对子宫内膜的作用及其可能的作用机制,旨在为临床用药提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 C57 雌性小鼠 50 只,8 ~ 9 周龄,体质量 18 ~ 20 g,来源于湖北省疾控中心[SCXK (鄂) 2015 - 0018]。所有动物饲养于中国人民解放军武汉总医院医学实验科[SYXK (鄂) 2017 - 0065],光照周期为 12 h,室温(20 ± 1)℃,自由饮食。通过阴道图片连续观察两个动情周期,取动情周期正常小鼠 40 只用于实验。

1.2 主要试剂与仪器

药物:复方阿胶浆,主要成分为:阿胶、红参、熟地黄、党参、山楂,规格:20 mL/支,山东东阿阿胶股份有限公司生产,国字准号:Z20083345。

VEGF-A 抗体购自 Abcam(ab1316);β-actin 抗体购自 Proteintech(20536-1-AP);小鼠 IgG-免疫组化试剂盒购自武汉博士德;HRT 标记羊抗鼠二抗购自 Biosharp;DAB 显色试剂盒购自北京索莱宝;BCA 蛋白浓度定量试剂盒购自碧云天;PVDF 膜购自美国 Millipore。RM2016 石蜡切片机:上海徕卡仪器有限公司;YD-6L 生物组织包埋机:金华市益迪医疗设备有限公司;恒温培育箱:上海市跃进医疗器械厂;Olympus BX51 光学显微镜照相系统:日本 Olympus;RT-6500 型酶标仪:美国 Rayto 公司;DYCZ-24DN 型垂直电泳槽:北京六一仪器厂;DYCZ-40 型电转仪:北京六一仪器厂;TS-1 型水平摇床:江苏海门其林贝尔公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组

实验动物随机分为 4 组:假手术组、假手术中药组、去势组及去势中药组,每组 10 只。

1.3.2 动物造模

去势小鼠予完整摘除双侧卵巢,首先用 10% 水合氯醛麻醉小鼠(0.4 mL/100 g)。使小鼠左侧卧位,消毒后自小鼠背部肋骨下靠脊柱处开口进入腹腔,用眼科镊找出卵巢并将其完整摘除后缝合皮肤,右侧同理,待小鼠自然苏醒。假手术组操作步骤同两去势组,但只剪去卵巢周围部分脂肪组织,不损伤卵巢。术后小鼠恢复 3 d 后行阴道涂片 5 d,若两去势组小鼠动情周期消失,两假手术组动情周期正常即为造模成功。本实验已经由实验动物使用与管理委员会批准[伦理证号:20170239 号],动物饲养及处理按照实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

1.3.3 给药方法

假手术中药组及去势中药组每天上午予复方阿胶浆灌胃,根据人和动物体表面积等效剂量换算[7],以许文生氏公式计算人的体表面积,再以 Meeh-Rubner 氏公式计算小鼠体表面积,将 168 cm/55 kg 女性用药剂量换算为 20 g 小鼠得到 0.25 mL/只,假手术组及去势组给予等量生理盐水,共计 15 d。于第 15 天灌胃后,断颈处死小鼠,取出子宫,一部分用多聚甲醛固定后石蜡包埋,另一部分 - 80℃ 冻存。

1.3.4 HE 染色

将厚度为 4 μm 的石蜡切片常规脱蜡至水,苏木素染色 1.5 min,水洗,1% 盐酸酒精分色 10 s,自来水返蓝 5 min,伊红染色 10 s,无水乙醇终止反应,中性树胶封片,显微镜下观察各组子宫内膜形态学变化。

1.3.5 免疫组化

切片常规脱蜡至水,3% H_2O_2 10 min,柠檬酸抗原热修复 5 min,自然冷却后重复一次,10% 山羊血清 37℃封闭 30 min,一抗 VEGF-A(1∶200)4℃过夜,二抗(1∶150)、SABC(1∶150)37℃,30 min,DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封片。PBS 代替一抗为阴性对照。显微镜拍照,采用图像分析系统分析实验结果。

1.3.6 Western blot

子宫组织提取蛋白后行蛋白浓度测定,统一蛋白浓度为 6 μg/μL。使用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白,每组上样量为 6 μL。150 mA 恒流转移至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h,一抗 VEGF-A(1∶200)室温孵育 1.5 h,HRT 标记二抗(1∶2000)室温孵育 2 h,洗膜后 ECL 发光液显色曝光。并以 β-actin 作为内参。测量各组 VEGF-A 的灰度值与 β-actin 比值后作为相对表达量进行对比。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 t 检验。定义 $P < 0.05$ 为差异有显著

性。统计过程应用 SPSS 22.0 软件进行;绘图应用 GraphPad Prism 6.0 软件进行。

2　结果

2.1　HE 染色观察子宫内膜形态学变化

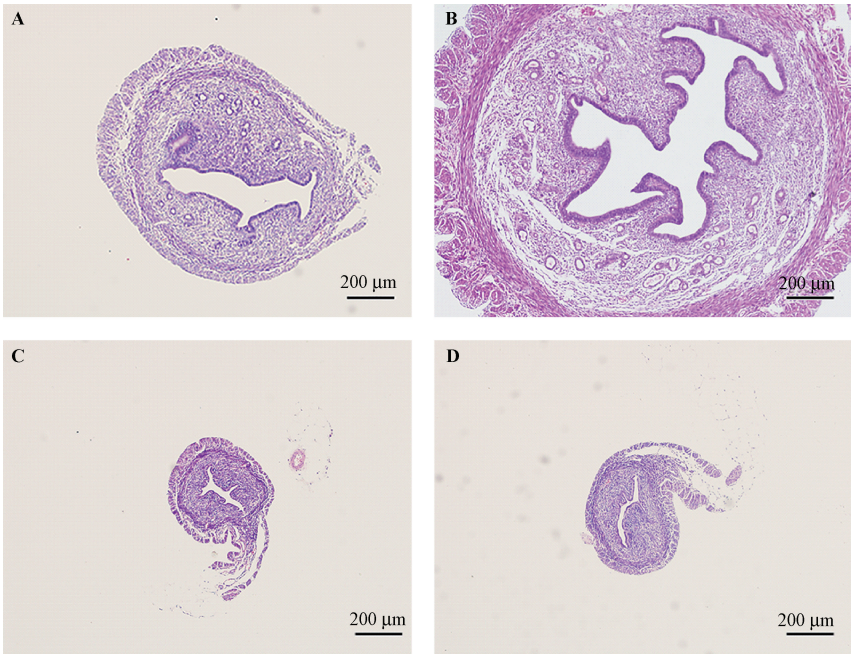
与假手术组相比,假手术中药组子宫增大,内膜增厚,子宫腺体数目多,腺腔大,间质水肿(图 1A、1B);去势组和去势中药组子宫结构完整,但均出现萎缩,与去势组相比,去势中药组子宫内膜略厚,腺体结构清楚,但差异不明显(图 1C、1D)。

2.2　免疫组化观察复方阿胶浆对 VEGF-A 表达的影响

VEGF-A 在子宫中主要表达于子宫内膜腔上皮和腺上皮细胞,间质细胞中表达较少。假手术中药组中 VEGF-A 的表达量显著高于假手术组($P < 0.05$);雌鼠去势后子宫内膜中 VEGF-A 的表达明显减少;去势中药组中 VEGF-A 的表达高于去势组,但差异无显著性。见图 2、表 1。

2.3　Western blot 检测子宫 VEGF-A 蛋白表达量差异

将假手术组及假手术中药组子宫组织进行 Western blot 检测,以 β-actin 蛋白作为内参,比较两组间 VEGF-A 的蛋白表达量,结果如图 3。结果显示:复方阿胶浆灌胃可显著上调假手术组子宫内膜 VEGF-A 的表达。



注:A:假手术组;B:假手术中药组;C:去势组;D:去势中药组。

图 1　各组子宫组织形态(HE 染色,× 100)

Note. A: Sham operation group; B: sham operation with Chinese medicine group; C: ovariectomized group; D: ovariectomized with Chinese medicine group.

Figure 1　Uterine tissue morphology in each group. HE staining

表 1　各组小鼠子宫组织中 VEGF-A 的表达($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 1　The expression of VEGF-A in the uterine tissues in each group

组别 Groups	子宫内膜 VEGF-A 表达(OD 值) VEGF-A expression in endometrium (OD value)
假手术组 Sham operation group	0.30 ± 0.03
假手术中药组 Sham operation with Chinese medicine group	0.51 ± 0.03 *
去势组 Ovariectomized group	0.20 ± 0.01
去势中药组 Ovariectomized with Chinese medicine group	0.21 ± 0.02

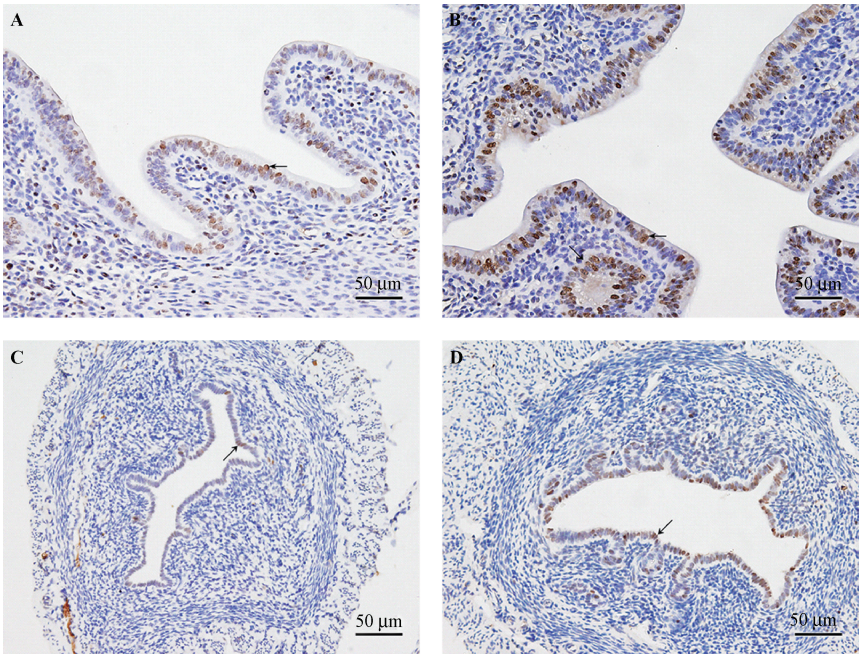
注:与假手术组相比,* $P < 0.05$。

Note. Compared with the sham operation group, * $P < 0.05$.

3 讨论

复方阿胶浆主要由阿胶、红参、熟地、党参、山楂等中药组成,为补益气血之良品。方中君药阿胶属“血肉有情之品”,与熟地配伍起补血滋阴之功效;红参大补元气,能益气生津,根据“气能生血”理论,气足则血亦旺。中医认为“肝主藏血”,而肝与肾“乙癸同源”,故气足血旺,则肾精充沛,冲任有养。因此,中医学者认为复方阿胶浆可用于治疗气血不足、肾气亏虚、冲任不调等一系列病症,推测其可用于调节“肾-天癸-冲任-胞宫”生殖轴的功能。现代研究亦发现补肾调冲任类中药能够起到调节生殖轴的作用[8],例如改善卵巢功能、增加卵巢及子宫动脉血流、改善子宫内膜微环境等。

姚丽雯等[9]研究发现单用复方阿胶浆对患者体内激素水平的影响与单用克罗米芬无明显差异,

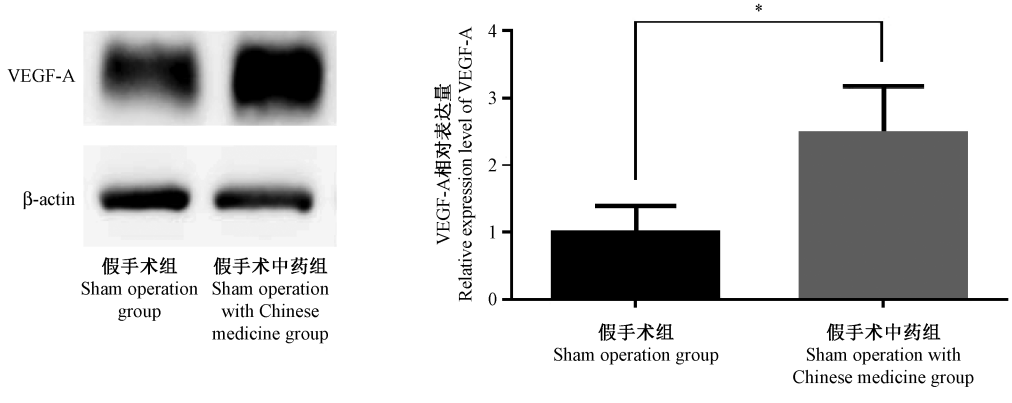


注:A:假手术组;B:假手术中药组;C:去势组;D:去势中药组。

图 2 各组小鼠子宫组织中 VEGF-A 的表达(× 400)

Note. A: Sham operation group; B: sham operation with Chinese medicine group; C: ovariectomized group; D: ovariectomized with Chinese medicine group.

Figure 2 The expression of VEGF-A in the uterine tissues in each group



注:与假手术组相比,* $P < 0.05$。

图 3 子宫 VEGF-A 蛋白表达量 Western blot 检测结果

Note. Compared with the sham operation group, * $P < 0.05$.

Figure 3 Western blot results of VEGF-A protein expression in uterus

且当二者合用时,可更有效地调节患者体内性激素水平,促进卵巢排卵。此外,有临床研究表明,复方阿胶浆可用于调节女性月经、治疗卵巢早衰[3-5],说明复方阿胶浆可调节女性体内性激素的分泌,调节卵巢功能。本实验结果显示:复方阿胶浆对雌鼠子宫内膜形态有一定影响,其可促进假手术组雌鼠子宫内膜生长及腺体发育。而当雌鼠去势后卵巢缺失时,子宫出现萎缩,复方阿胶浆促进子宫内膜生长及腺体发育的作用效果并不显著。因此,我们推测复方阿胶浆可能是通过调节卵巢的内分泌功能从而间接影响子宫内膜的生长及腺体发育。

血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)家族是一系列参与血管再生的糖蛋白,目前人们在哺乳动物中发现的主要包括 VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C、VEGF-D 以及胎盘生长因子。其中 VEGF-A 为一种特异性的促血管内皮细胞丝裂原,具有促进血管内皮细胞分裂、增生、诱导血管产生及改善血管通透性等作用[10]。VEGF-A 的表达异常常导致许多与血管新生相关疾病的发生,如肿瘤、视网膜病变、肾脏病变、子宫内膜异位症等[11-12]。同时,VEGF-A 与女性生殖系统关系密切,其表达于女性子宫内膜,并随月经周期发生周期性变化。国内外实验均发现在实验动物行卵巢切除术后,子宫内膜中 VEGF-A 的表达量明显减少[13-14]。此次实验中,我们亦发现小鼠去势后,子宫出现萎缩,且子宫内膜中 VEGF-A 的表达量也明显减少,这与之前的研究结果相一致[13-14],证明卵巢可调节子宫内膜中 VEGF-A 的表达水平。由于雌、孕激素可以使子宫内膜细胞分泌的 VEGF-A 水平增加[15],Huang 等[16]亦通过实验证明了雌激素能够诱导子宫内膜中 VEGF-A 的迁移及表达,说明 VEGF-A 的表达受雌、孕激素的调节。此次实验中我们发现复方阿胶浆灌胃使假手术组小鼠子宫内膜中 VEGF-A 的表达上升,但并未对去势小鼠子宫内膜中 VEGF-A 的表达量产生明显影响,因此,我们猜想:复方阿胶浆可能通过调节卵巢雌、孕激素的分泌,进而影响子宫内膜中 VEGF-A 的表达,影响子宫内膜的功能。

在女性妊娠过程中 VEGF-A 起着至关重要的作用[17],当处于种植窗口期时,子宫内膜中的 VEGF-A 表达量明显增多,其可通过调节子宫内膜微环境而促进胚胎植入[18],而当其缺失时,胚胎无法完成成功植入。在辅助生殖的相关研究中发现,促排卵后子宫内膜中 VEGF-A 表达较正常子宫明显减少,VEGF-A 表达的减少也被认为是影响胚胎植入的因素之一[19],近年来 VEGF-A 已被许多学者视为评价子宫内膜容受性的指标之一。因此次研究中我们发现复方阿胶浆可增加子宫内膜厚度及子宫内膜中 VEGF-A 的表达量,故推测其可通过调节子宫内膜环境而改善子宫内膜容受性。近年来,辅助生殖技术虽在不断发展,但临床妊娠率仍未满足患者期望,许多育龄期妇女因排卵障碍、卵巢早衰、子宫内膜容受性差等原因而不能成功妊娠,复方阿胶浆作为一种中药复方之剂,其无明显副作用,且可调节女性生殖内分泌轴,调节卵巢功能,改善子宫内膜容受性,或可成为临床辅助不孕症治疗的新选择。

总之,通过此次实验,我们发现复方阿胶浆对子宫内膜形态学及微环境确实存在一定影响,其可能是通过调节卵巢功能而间接作用于子宫,但有关其对卵巢的作用及作用机制,是否能够直接影响卵巢雌、孕激素的分泌,还有待进一步研究。

参考文献:

[1] Shen L, Chen H, Zhu Q, et al. Identification of bioactive ingredients with immuno-enhancement and anti-oxidative effects from Fufang-Ejiao-Syrup by LC-MSn combined with bioassays [J]. J Pharm Biomed Anal, 2016, 117: 363-371.

[2] Liu M, Tan H, Zhang X, et al. Hematopoietic effects and mechanisms of *Fufang E' jiao Jiang* on radiotherapy and chemotherapy-induced myelosuppressed mice [J]. J Ethnopharmacol, 2014, 152(3): 575-584.

[3] 李真, 张利宏, 吴晓华. 复方阿胶浆治疗围绝经期综合征 103 例疗效观察 [J]. 国际中医中药杂志, 2012, 34(11): 插 3-插 4.

[4] 顾建军, 王令仪. 复方阿胶浆用于女大学生月经失调及痛经的疗效调查分析 [J]. 西部中医药, 2013, 26(11): 86-88.

[5] 刘红姣, 喻芬, 梁世昌. 复方阿胶浆联合人工周期疗法治疗卵巢早衰 43 例效果观察 [J]. 临床合理用药杂志, 2012, 5(2): 71-72.

[6] 况华进, 陈琳. 复方阿胶浆联合克罗米芬治疗排卵障碍性不孕患者临床研究 [J]. 中国性科学, 2017, 26(2): 122-125.

[7] 苗明三. 实验动物和动物实验技术 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003: 143-144.

[8] 温勤坚, 王芳, 李英勇. 补肾中药对不孕症治疗机制的研究进展 [J]. 生殖与避孕, 2008, 28(5): 304-307.

[9] 姚丽雯, 付卫星, 张云, 等. 复方阿胶浆提高排卵障碍性不孕患者妊娠率的疗效和机理研究 [J]. 广州医学院学报, 2015, 43(3): 65-68.

[10] Peach CJ, Mignone VW, Arruda MA, et al. Molecular pharmacology of VEGF-A isoforms: binding and signalling at

VEGFR2 [J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(4): E1264.
[11] Keir LS, Firth R, Aponik L, et al. VEGF regulates local inhibitory complement proteins in the eye and kidney [J]. J Clin Invest, 2017, 127(1): 199 - 214.
[12] Liu XJ, Bai XG, Teng YL, et al. miRNA-15a-5p regulates VEGFA in endometrial mesenchymal stem cells and contributes to the pathogenesis of endometriosis [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2016, 20(16): 3319 - 3326.
[13] Niklaus AL, Babischkin JS, Aberdeen GW, et al. Expression of vascular endothelial growth/permeability factor by endometrial glandular epithelial and stromal cells in baboons during the menstrual cycle and after ovariectomy [J]. Endocrinology, 2002, 143(10): 4007 - 4017.
[14] 杨丽娜, 段颖, 张英福, 等. 雌激素及植物雌激素对去卵巢大鼠子宫组织 VEGF 表达和形态的影响 [J]. 中国药理学通报, 2009, 25(8): 1041 - 1044.
[15] 任琼珍, 钱志红, 胡敏, 等. 缺氧、雌激素、孕激素对子宫内膜间质细胞 VEGF 表达的调节 [J]. 现代妇产科进展, 2011, 20(8): 621 - 623.
[16] Huang TS, Chen YJ, Chou TY, et al. Oestrogen-induced angiogenesis promotes adenomyosis by activating the Slug-VEGF axis in endometrial epithelial cells [J]. J Cell Mol Med, 2014, 18(7): 1358 - 1371.
[17] Kim M, Park HJ, Seol JW, et al. VEGF-A regulated by progesterone governs uterine angiogenesis and vascular remodelling during pregnancy [J]. EMBO Mol Med, 2013, 5(9): 1415 - 1430.
[18] Jeong W, Kim J, Bazer FW, et al. Stimulatory effect of vascular endothelial growth factor on proliferation and migration of porcine trophectoderm cells and their regulation by the phosphatidylinositol-3-kinase-AKT and mitogen-activated protein kinase cell signaling pathways [J]. Biol Reprod, 2014, 90(3): 50.
[19] Danastas K, Whittington CM, Dowland SN, et al. Ovarian hyperstimulation reduces vascular endothelial growth factor-A during uterine receptivity [J]. Reprod Sci, 2018: 1933719118768703.

〔收稿日期〕2018 - 05 - 28

(上接第 13 页)

[8] 邢进, 冯育芳, 付瑞, 等. 野生树鼩可培养细菌和真菌携带情况的调查 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(3): 34 - 38.
[9] 高家红, 江勤芳, 罗志武, 等. 树鼩正常肠道细菌的培养分离鉴定及其药敏试验研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(12): 24 - 26, 34.
[10] Li G, Lai R, Duan G, et al. Isolation and identification of symbiotic bacteria from the skin, mouth, and rectum of wild and captive tree shrews [J]. Zoological Research, 2014, 35(6): 492 - 499.
[11] Magoč T, Salzberg SL. Flash: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies [J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957.
[12] Edgar RC. UPARSE: highly accurate OTU sequences from microbial amplicon reads [J]. Nature Methods, 2013, 10(10): 996 - 998.
[13] Abarenkov K, Nilsson RH, Larsson KH, et al. The UNITE database for molecular identification of fungi—recent updates and future perspectives [J]. New Phytologist, 2010, 186(2): 281 - 285.
[14] Hildebrandt MA, Hoffmann C, Sherrill-Mix SA, et al. High-fat diet determines the composition of the murine gut microbiome independently of obesity [J]. Gastroenterology, 2009, 137(5): 1716 - 1724.
[15] 梁庆红, 张琳, 段恕诚. 肠道正常菌群对机体免疫调节和造血功能影响的研究进展 [J]. 临床儿科杂志, 2005, 2(7): 489 - 491.
[16] 陆佳, 方秀才. 乳杆菌属治疗肠易激综合征的机制 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2017, 26(2): 218 - 221.
[17] 任大勇. 益生乳酸杆菌的黏附及免疫调节作用研究 [D]. 吉林大学, 2013.
[18] 陈燕, 曹郁生, 刘晓华. 短链脂肪酸与肠道菌群 [J]. 江西科学, 2006, 24(1): 38 - 40, 69.
[19] 李成云. 聚焦高中生物学教材中的“菌类”[J]. 生物学教学, 2012, 54(7): 66 - 69.
[20] Favier CF, Vaughan EE, De Vos WM, et al. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates [J]. Appl Environ Microbiol, 2002, 68(1): 219 - 226.
[21] 潘云, 陈向东, 汪辉. 唾液链球菌 K12 防治口腔及相关疾病的研究进展 [J]. 药学与临床研究, 2017, 24(3): 243 - 247.
[22] Wescombe PA, Heng NC, Burton JP, et al. Streptococcal bacteriocins and the case for Streptococcus salivarius as model oral probiotics [J]. Future Microbiol, 2009, 4(7): 819 - 835.
[23] Cosseau C, Devine DA, Dullaghan E, et al. The commensal Streptococcus salivarius K12 downregulates the innate immune responses of human epithelial cells and promotes host-microbe homeostasis [J]. Infect Immun, 2008, 76(9): 4163 - 4175.
[24] Gilad Y, Pritchard JK, Thornton K. Characterizing natural variation using next-generation sequencing technologies [J]. Trends Genet, 2009, 25(10): 463 - 471.
[25] 王林, 李冰, 朱健. 高通量测序技术在人工湿地微生物多样性研究中的研究进展 [J]. 中国农学通报, 2016, 32(5): 10 - 15.

〔收稿日期〕2018 - 05 - 23

研究报告

多囊卵巢综合征大鼠卵巢颗粒细胞中 DR5、DcR2 的表达变化

张　娟[1],王立群[1,2],周月希[1,2],刁　波[3],周　蓉[1],解　迪[1]

(1. 中国人民解放军武汉总医院妇产科生殖中心,武汉　430070; 2. 湖北中医药大学,武汉　430070;
3. 中国人民解放军武汉总医院医学实验科,武汉　430070)

【摘要】　目的　观察 DR5、DcR2 在多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome,PCOS)大鼠卵巢颗粒细胞中的表达变化,探讨 PCOS 大鼠卵泡发育障碍的可能发生机制。**方法**　大鼠皮下注射硫酸普拉睾酮钠,以构建 PCOS 模型,分别用免疫组织化学法、RT-qPCR 分析观察并比较 DR5、DcR2 在 PCOS 组和对照组大鼠卵巢颗粒细胞的表达情况。**结果**　免疫组织化学结果显示,在 PCOS 组大鼠卵巢各级卵泡颗粒细胞中,DR5 的表达较对照组均显著增强($P < 0.05$),在 PCOS 组大鼠卵巢窦前卵泡和窦状卵泡颗粒细胞中,DcR2 的表达较对照组同级别卵泡显著增强($P < 0.05$),在始基卵泡颗粒细胞的表达差异无显著性($P > 0.05$)。RT-qPCR 分析显示,DR5 mRNA 和 DcR2 mRNA 在两组中都有表达,且二者在 PCOS 组大鼠卵巢颗粒细胞中的表达较正常对照组均明显增强($P < 0.05$)。**结论**　DR5 和 DcR2在颗粒细胞中的异常表达可能对 PCOS 大鼠卵泡的异常发育起到了一定作用,它们可能是通过参与颗粒细胞凋亡过程而对卵泡的发育造成了一定影响。

【关键词】　多囊卵巢综合征;大鼠;颗粒细胞;DR5;DcR2
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 09-0033-07
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.006

DR5 and DcR2 protein expression in granulosa cells of ovaries of polycystic ovary syndrome rats

ZHANG Juan[1], WANG Liqun[1,2], ZHOU Yuexi[1,2], DIAO Bo[3], ZHOU Rong[1], XIE Di[1]

(1. Reproductive Center, Wuhan General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Wuhan 430070, China.
2. Hubei University of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430070. 3. Department of Medical Laboratory, Wuhan General Hospital of Chinese People's Liberation Army, Wuhan 430070)

【Abstract】　Objective　To observe the changes of DR5 and DcR2 expression in ovarian granulosa cells of polycystic ovary syndrome (PCOS) rats, and to explore the possible mechanism of follicular development disorder in these rats. **Methods**　Rats were subcutaneously injected with sodium prasterone sulfate to establish the PCOS model. Immunohistochemical and RT-qPCR analyses were used to observe and compare the expression of DR5 and DcR2 in ovarian granulosa cells of the rats in the PCOS group and a control group. **Results**　Immunohistochemical results showed that, in PCOS rats, in ovarian granulosa cells at each level, the expression of DR5 was significantly higher than that in the control group ($P < 0.05$). In ovarian preantral and antral follicular granulosa cells of the rats in the PCOS group, the expression

[基金项目]武汉市科技局应用基础研究项目(编号:2016060101010030)。
[作者简介]张娟(1971—　),女,博士,硕士研究生导师,研究方向:生殖医学。E-mail: 1264298243@qq.com

of DcR2 was significantly increased compared with that in the same follicle level of the control group ($P < 0.05$), while there was no significant difference in DcR2 expression in primordial follicle granulosa cells ($P > 0.05$). RT-qPCR analysis showed that DR5 mRNA and DcR2 mRNA were expressed in the two groups, and their expression in the rat ovarian granulosa cells of the PCOS group was significantly higher than that in the normal control group ($P < 0.05$). **Conclusions** The abnormal expression of DR5 and DcR2 in granulosa cells may play a role in the abnormal development of follicles in PCOS rats. They may affect the development of follicles by participating in the process of granulosa cell apoptosis.

【Keywords】 polycystic ovary syndrome(PCOS); rat; granulosa cell; DR5; DcR2

多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome, PCOS)是育龄妇女中最常见的内分泌失调性疾病之一,临床上主要以以下三种表现为特征:稀发排卵或者无排卵、高雄激素的临床或生化表现以及卵巢多囊改变。PCOS 是引起无排卵性不孕的主要原因,其发病机制目前尚未完全阐明。在 PCOS 患者双侧卵巢中,可见多个囊性扩张的卵泡,而少有优势卵泡形成,这说明在 PCOS 患者的卵巢中,卵泡的发育过程存在着障碍。

大量研究表明,颗粒细胞在卵母细胞的成熟和卵泡的发育过程中起到重要作用,在卵泡选择闭锁的过程中,颗粒细胞是最早经历凋亡的细胞群[1],目前已知的细胞凋亡途径主要为两种,一种是由死亡受体介导的凋亡途径,一种是由线粒体介导的凋亡途径,许多学者认为,在卵泡颗粒细胞选择性凋亡的过程中,死亡受体介导的凋亡途径发挥了重要作用[2],其中,肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体(TNF-related apoptosis inducing ligand, TRAIL)及其受体系统已经被证实在颗粒细胞的凋亡过程中发挥了重要作用[8-11],但它们在 PCOS 卵泡发育中的作用鲜有报道。本课题组前期的研究表明 TRAIL 及其受体——死亡受体-4(death receptor-4, DR4)和诱骗受体-1(decoy receptor-1, DcR1)在 PCOS 大鼠窦状卵泡颗粒细胞中有异常表达[3],提示 TRAIL、DR4 和 DcR1 的表达变化可能对 PCOS 卵泡的异常发育起到了一定作用,但是 TRAIL 另外两个受体——死亡受体-5(death receptor-5, DR5)、诱骗受体-2(decoy receptor-2, DcR2)的表达变化及其表达意义尚不清楚。

因此,笔者在本次研究中先采用皮下注射硫酸普拉睾酮钠(脱氢表雄酮硫酸钠盐制剂)来构建 PCOS 大鼠模型,然后分别用免疫组织化学染色、RT-qPCR 分析观察并比较 DR5、DcR2 在 PCOS 组和对照组大鼠卵巢颗粒细胞的表达情况,综合前期的研究结果,来全面探讨 TRAIL 及其受体系统在 PCOS 大鼠卵泡发育中可能发挥的作用,从而更深入地了解 PCOS 卵泡发育障碍的可能机制,为 PCOS 卵泡发育障碍的治疗提供一个新的想法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雌性 SD 大鼠 20 只,SPF 级,体重 50 ~ 60 g,21 日龄,由湖北省实验动物研究中心提供[SCXX(鄂)2015 - 0018],在湖北省疾病预防控制中心 SPF 级屏障环境[SYXK(鄂)2017 - 0065]中饲养,温度控制在(22 ± 2)℃,相对湿度为 50% ~ 60%,自由饮食,光照周期为日夜各 12 h。所有动物均为麻醉后处死。本次动物实验得到广州军区武汉总医院医学实验动物福利伦理委员会的许可(编号:20170238),在实验过程中,遵循实验动物使用的 3R 原则给予动物人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

硫酸普拉睾酮钠,青岛捷世康生物科技有限公司;注射用水,浙江瑞新药厂;TRIzol 试剂盒,美国 Invitrogene 公司;逆转录试剂盒,美国 Invitrogene 公司;SYBR Green PCR 试剂盒,美国 Thermo Fisher 公司;兔抗大鼠 DR5、DcR2 多克隆抗体,Abcam 公司。PL303 型电子天平,梅特勒-托利多仪器有限公司;L600 型离心机,湘仪仪器厂;YD6L 生物组织包埋机,金华市益迪医疗设备有限公司;RM2016 轮转型切片机,上海徕卡仪器有限公司;BX51 奥林巴斯荧光显微镜,日本 Olympus 公司;PTC-100TM 全自动 PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;752-P 紫外分光光度计,上海现科仪器有限公司;LC96 荧光定量 PCR 仪,美国 Roche 公司;AJC-0501-P 纯水蒸馏器,重庆艾科普;东方 A 型恒温烤箱,上海博讯实业有限公司;各种微量移液器,上海安亭科学仪器厂;医用手术器械,上海博讯实业有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型的建立[4]

21 日龄雌性 SD 大鼠,断乳,适应性喂养两天,23 日龄时随机分为两组,每组 10 只。其中一组大

鼠每日按硫酸普拉睾酮钠 90 mg/g 行皮下注射,相当于 DHEA(脱氢表雄酮)60 mg/g,0.4 mL 注射用水溶解,连续注射 20 d,用来建立 PCOS 大鼠模型,该组设为 PCOS 组。另一组设为对照组,每日皮下注射 0.4 mL 注射用水,连续注射 20 d。所有大鼠于注射后第 21 天的早晨用 4% 水合氯醛麻醉,解剖取卵巢,分离表面多余组织,固定(4% 多聚甲醛),石蜡包埋,制备 4 μm 厚切片,行 HE 染色和免疫组化染色。

1.3.2 卵泡发育级别判断

始基卵泡:初级卵母细胞停留于减数分裂双线期,其周围围绕了一层梭形前颗粒细胞。

窦前卵泡:初级卵母细胞增大,其周围围绕了数层立方形颗粒细胞。

窦状卵泡:卵泡内形成卵泡腔,由增加的卵泡液融合而成,卵母细胞被卵泡腔所围绕,颗粒细胞被分为围绕在卵母细胞周围的卵丘颗粒细胞和位于卵泡外周的基底膜颗粒细胞。此时卵泡直径可增大至 500 μm。

1.3.3 卵巢 HE 染色

卵巢石蜡切片(4 μm)脱蜡至水,苏木素染色 1.5 min,自来水洗返蓝,显微镜下观察核蓝紫色,100% 乙醇浸泡 3 min,伊红染色 10 s,100% 乙醇浸泡 10 s,观察细胞质红色,晾干,中性树脂封片。

1.3.4 免疫组织化学染色检测 DR5、DcR2 蛋白的表达

采用免疫组织化学技术 SABC(链霉亲和素-生物素-过氧化物酶复合物)法:大鼠卵巢石蜡切片,脱蜡至水,3% H_2O_2 封闭内源性过氧化物酶,微波抗原修复,山羊血清封闭,加一抗(用 PBS 按 1∶200 稀释的兔抗大鼠 DR5 抗体和按 1∶100 稀释的兔抗大鼠 DcR2 抗体),以 PBS 替代一抗作阴性对照,4℃过夜;加二抗(生物素标记羊抗兔 IgG,用 PBS 按1∶200 稀释),37℃孵育 35 min;加 SABC(用 PBS 按1∶200 稀释),37℃孵育 30 min;DAB 显色,显微镜下控制显色时间(5 ~ 10 min);自来水洗后苏木素复染,晾干,中性树胶封片。采用日本奥林巴斯 BX51 荧光显微镜成像,高倍视野(× 400)下,观察各级卵泡颗粒细胞 DR5、DcR2 蛋白的表达,阳性细胞被染成棕黄色,由 Image-Pro Plus 计算颗粒细胞内棕黄色区域面积(Area)及光密度值(IOD),平均光密度值(OD)为两者之比(IOD/Area),棕黄色着色越深,对应的 OD 值越大,蛋白表达越强,反之则反。

1.3.5 RT-qPCR 法检测卵巢颗粒细胞的 *DR5* 和 *DcR2* 基因的表达

将上述摘取的卵巢,置于培养皿中,分离掉表面多余的脂肪组织,用 1 mL 注射器针头划破卵巢,用 0.01 mol/L PBS 反复冲洗卵泡,以充分释放颗粒细胞,将含颗粒细胞的 PBS 吸取至离心管中,2000 r/min 离心 10 min,丢弃上清,用 PBS 将颗粒细胞重悬,再将悬液移至 45% Percoll 液之上,2000 r/min 离心 10 min,颗粒细胞位于上层[3],将颗粒细胞移至 TRIzol 液中,按照试剂盒说明书提取细胞总 RNA,逆转录合成 cDNA(反应体系为 20 μL。反应条件为 42℃ 60 min,70℃ 5 min),然后按照 SYBR Green PCR 试剂盒说明书要求进行 RT-qPCR(反应体系为 20 μL。反应条件为 95℃预处理 3 min;95℃ 3 s,60℃ 10 s,共 40 个循环;最后 95℃ 10 s,65℃ 10 s,97℃ 1 s。反应系统为 Light Cycler 96 系统)。各种引物序列见表 1。

1.4 统计学方法

SPSS 19.0 统计软件包对数据进行分析,采用平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)来表示计量资料,经 t 检验,$P < 0.05$ 为差异有显著性。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Genes	基因 ID Gene ID	引物序列 Primer Sequences	产物大小(bp) Size of products
GAPDH	2597	上游 Forward:5'-TCAAGGCTGAGAACGGGAAG-3' 下游 Reverse:5'-TGGACTCCACGACGTACTCA-3'	117
DcR2	8793	上游 Forward:5'-CGTGTAGAACAGGGTGTCCC-3' 下游 Reverse:5'-TGGGGTTTTCCCAGTGGAAC-3'	110
DR5	8795	上游 Forward:5'-AAGACCCTTGTGCTCGTTGT-3' 下游 Reverse:5'-CCAGGTGGACACAATCCCTC-3'	146

2 结果

2.1 卵巢光镜 HE 染色检查

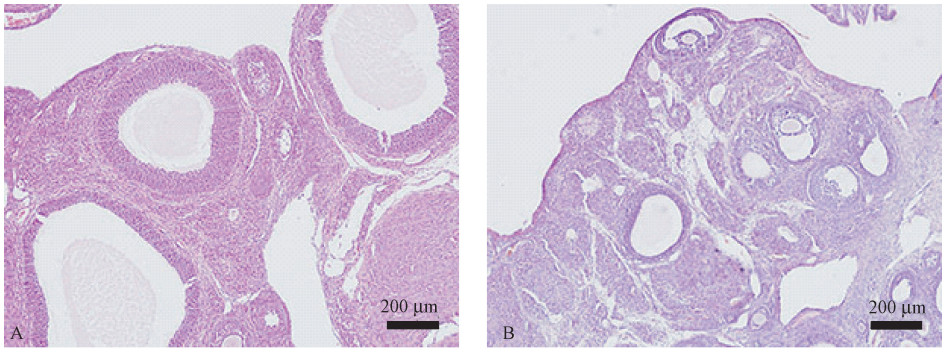
如图所示,PCOS 组大鼠卵巢切面沿包膜下可见多个卵泡呈囊性扩张,黄体形成明显减少,囊性扩张的卵泡内不见卵母细胞或放射冠,卵泡周围颗粒细胞排列松散,层数变薄甚至消失,而卵泡膜细胞有增生(图 1A)。而对照组大鼠卵巢切面可以看见许多处于不同发育时期的卵泡,并有多个黄体形成,成熟的卵泡内可见卵母细胞及放射冠,其周围颗粒细胞排列整齐,层数较厚,可达 8 ~ 9 层(图 1B)。

2.2 DR5 在卵巢各级卵泡的颗粒细胞中的表达

DR5 的阳性表达主要表现为细胞胞质和胞膜的棕黄色染色。DR5 在 PCOS 组和对照组大鼠各级卵泡的卵母细胞和颗粒细胞中均有阳性表达。经统计分析,DR5 在 PCOS 组大鼠卵巢各级卵泡颗粒细胞的表达较对照组同级卵泡均明显增强,且多表达于 PCOS 组窦状卵泡的卵泡壁内层颗粒细胞(表 2,图 2)。

2.3 DcR2 在卵巢各级卵泡的颗粒细胞中的表达

DcR2 阳性表达主要表现为细胞胞质和胞膜的棕黄色染色。DcR2 在 PCOS 组和对照组大鼠各级卵泡的卵母细胞和颗粒细胞均有阳性表达。经统计分析,DcR2 在两组大鼠始基卵泡颗粒细胞的表达差异无显著性,而在 PCOS 组窦前卵泡和窦状卵泡颗粒细胞的表达较对照组同级别卵泡明显增强,且多表达于 PCOS 组窦状卵泡的卵泡壁内层颗粒细胞(表 3,图 3)。



注:A:PCOS 组;B:对照组。

图 1 大鼠卵巢(HE 染色,× 100)

Note. A: PCOS group; B: Control group.

Figure 1 Rat ovary. HE staining

表 2 DR5 在两组大鼠各级卵泡的颗粒细胞中的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 2 DR5 protein expression in granulosa cells of follicles at all levels in two groups of rats

组别 Groups	始基卵泡 Primordial follicles	窦前卵泡 Preantral follicles	窦状卵泡 Antral follicles
对照组 Control group	0.1035 ± 0.0036 (30)	0.1177 ± 0.0125 (29)	0.1267 ± 0.0115 (27)
PCOS 组 PCOS group	0.1466 ± 0.0038 * (29)	0.1768 ± 0.0160 * (28)	0.1944 ± 0.0148 * (26)

注:括号内为卵泡个数。与对照组同级别卵泡相比,* $P < 0.05$。

Note. The number of follicles is shown in parentheses. Compared with follicles at the same level in the control group, * $P < 0.05$.

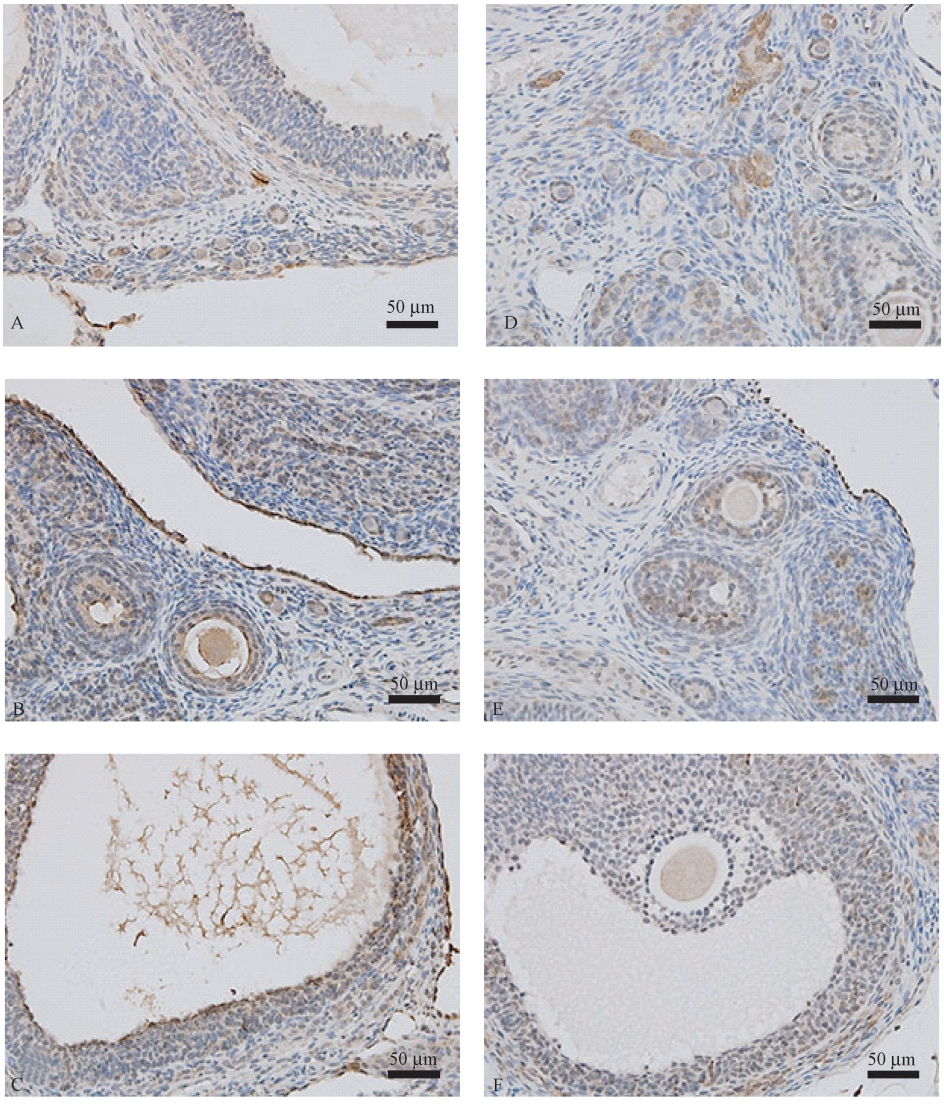
表 3 DcR2 在两组大鼠各级卵泡的颗粒细胞中的表达($\bar{x} \pm s$)

Table 3 DcR2 protein expression in granulosa cells of follicles at all levels in two groups of rats

组别 Groups	始基卵泡 Primordial follicles	窦前卵泡 Preantral follicles	窦状卵泡 Antral follicles
对照组 Control group	0.0570 ± 0.0051 (30)	0.0543 ± 0.0025 (29)	0.0620 ± 0.0057 (27)
PCOS 组 PCOS group	0.0579 ± 0.0039 (29)	0.0829 ± 0.0023 * (28)	0.1569 ± 0.0124 * (26)

注:括号内为卵泡个数。与对照组同级别卵泡比较,* $P < 0.05$。

Note. The number of follicles is shown in parentheses. Compared with follicles at the same level in the control group, * $P < 0.05$.



注：A～C：分别为 PCOS 组大鼠卵巢始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡；D～F：分别为对照组大鼠卵巢始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡。

图 2　DR5 在大鼠卵巢各级别卵泡颗粒细胞的表达(SABC 法，× 400)

Note. A－C: The primordial follicle, preantral follicle, and antral follicle in rat ovary of the PCOS group, respectively. D－F: The primordial follicle, preantral follicle, and antral follicle in rat ovary of the control group, respectively.

Figure 2　DR5 expression in different levels of follicle granulosa cells in rat ovary. SABC method

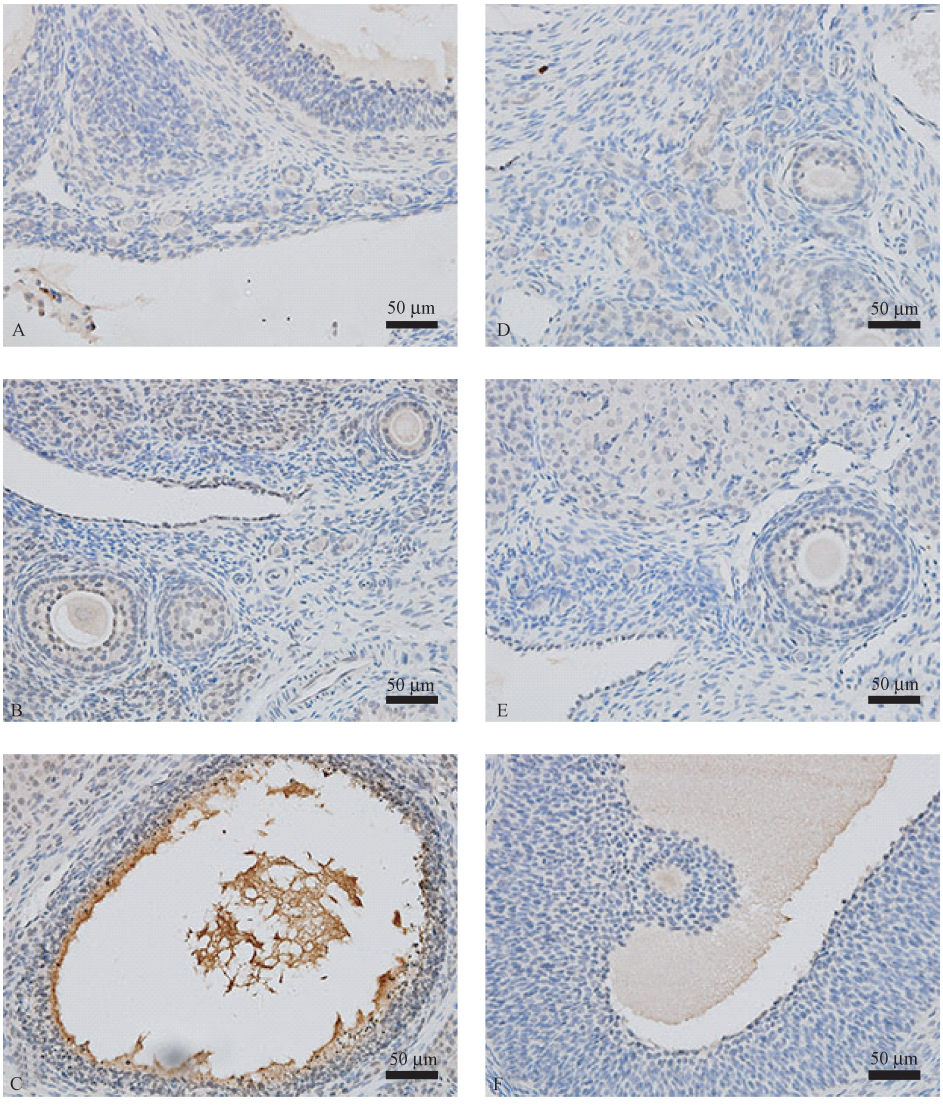
2.5　颗粒细胞中 DR5 mRNA 及 DcR2 mRNA 的表达

RT-qPCR 显示，DR5 mRNA 和 DcR2 mRNA 在两组大鼠卵巢颗粒细胞中均有表达，经统计学分析，二者在 PCOS 组大鼠卵巢颗粒细胞中的表达较正常对照组均明显增强($P < 0.05$)。详见图 4。

3　讨论

在 PCOS 患者双侧卵巢中，可见多个囊性扩张的卵泡，它们既不闭锁也无法形成优势卵泡，这提示在 PCOS 患者卵巢中，卵泡的发育存在着障碍。卵泡中卵母细胞的正常发育不仅与促性腺激素的调节有关，还与颗粒细胞及膜细胞之间的联系密切相关[5]。颗粒细胞是卵泡里最大的细胞群，是最靠近卵母细胞的体细胞，大量研究表明，颗粒细胞在卵泡的发育过程中起到重要作用，在卵泡选择闭锁的过程中，颗粒细胞是最早经历凋亡的细胞群[1]。

目前已知细胞的凋亡途径主要为两种，一种是由死亡受体介导的凋亡途径，一种是由线粒体介导的凋亡途径。许多学者认为，由死亡受体介导的凋亡途径在卵泡颗粒细胞选择性凋亡过程中发挥着重要作用[2]。Wada 等[8-10]研究表明 TRAIL 及其受

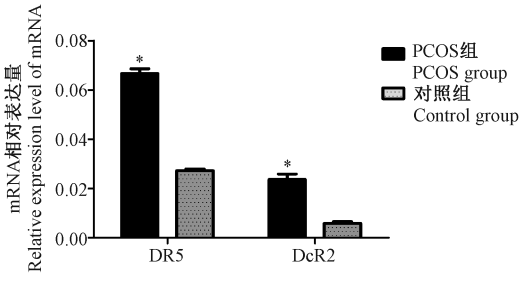


注:A ~ C:分别为 PCOS 组大鼠卵巢始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡;D ~ F:分别为对照组大鼠卵巢始基卵泡、窦前卵泡、窦状卵泡。

图 3 大鼠卵巢各级别卵泡颗粒细胞 DcR2 表达(SABC 法, × 400)

Note. A – C: The primordial follicle, preantral follicle, and antral follicle in rat ovary of the PCOS group, respectively. D – F: The primordial follicle, preantral follicle, and antral follicle in rat ovary of the control group.

Figure 3 DcR2 expression in different levels of follicle granulosa cells in rat ovary. SABC method



注:与对照组相比,* $P < 0.05$。

图 4 PCOS 组和对照组颗粒细胞 DR5 mRNA 和 DcR2 mRNA 相对表达量

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

Figure 4 Relative expression of DR5 mRNA and DcR2 mRNA in granulosa cells of PCOS group and control group

体系统在猪卵巢颗粒细胞的凋亡过程中发挥了重要作用。Jääskeläinen 等[11]研究了人不同时期卵巢 TRAIL 及其受体表达情况,发现 DcR1 在成人期卵巢颗粒细胞中有表达而不表达于胎儿期卵巢颗粒细胞,TRAIL、DR5、DcR2 在成人期卵巢颗粒细胞的表达较胎儿期是明显增强的,而从胎儿期到成人期这个过程中,卵泡的数量是通过闭锁、退化而不断减少的,提示 TRAIL 及其受体系统可能协同调控着人卵巢颗粒细胞的凋亡过程。但是 TRAIL 及其受体系统在 PCOS 卵泡发育过程中的作用却鲜有报道。

Mikaeili 等[6]通过对比 PCOS 患者和输卵管堵塞育龄期妇女卵巢颗粒细胞凋亡情况发现,PCOS 患者颗

粒细胞凋亡是明显增加的,本课题组前期的研究也表明,在 PCOS 大鼠卵泡发育过程中,窦状卵泡颗粒细胞凋亡发生率较对照组明显升高[7],同时本课题组还发现 TRAIL 及其受体 DR4 和 DcR1 在 PCOS 各级卵泡颗粒细胞中表达是有异常的[3]。本次研究结果发现,与对照组相比较,PCOS 组各级卵泡颗粒细胞中 DR5 和 DcR2 表达是有异常的:在始基卵泡中,DR5 表达增强,DcR2 表达无明显差异,在窦前卵泡和窦状卵泡中,DR5、DcR2 的表达均明显增强。在这三个级别的卵泡中,只有窦状卵泡颗粒细胞凋亡发生率明显升高[7],由于 TRAIL 与死亡受体结合会诱导细胞凋亡,与诱骗受体结合无法将凋亡信号传递至细胞内而无法诱导细胞凋亡[12],因此本课题组推测:在正常卵泡颗粒细胞中,TRAIL 与不同受体结合后在诱导和抑制细胞凋亡之间可能存在着一种精妙的平衡,但是在 PCOS 窦状卵泡颗粒细胞中,由于 TRAIL 及其受体系统的表达均发生了比较大的变化,这种精妙的平衡被打破,由 TRAIL 参与的颗粒细胞自我稳定环境消失,这可能是 PCOS 窦状卵泡颗粒细胞凋亡发生率升高的原因之一。

在 PCOS 窦状卵泡颗粒细胞凋亡发生率升高的同时,DcR2 的表达也是明显增强的,但是由于 DcR2 缺少完整的死亡结构域,它与 TRAIL 结合不仅不诱导靶细胞凋亡,还可与死亡受体竞争结合 TRAIL,从而起到保护靶细胞的作用,这提示在 PCOS 大鼠窦状卵泡中,DcR2 阳性的颗粒细胞可能发挥着凋亡抵抗的作用。有研究表明,DcR2 在衰老的肿瘤细胞和成纤维细胞中有高表达[14],它在缺血再灌注后大鼠肾组织的表达量明显升高,与肾功能及肾组织损伤程度明显正相关[15],那么 PCOS 大鼠卵泡颗粒细胞上 DcR2 的表达量与颗粒细胞凋亡程度是否也有一定的相关性,目前未见报道,这有待于本课题组进一步的研究。本次研究结果还表明 DR5 和 DcR2 多表达于 PCOS 组大鼠卵巢窦状卵泡的内层颗粒细胞,本课题组之前的研究发现凋亡也多发生于 PCOS 组大鼠卵巢窦状卵泡的内层颗粒细胞[7],提示 PCOS 组窦状卵泡内层颗粒细胞中 DR5 和 DcR2 的异常表达,可能是导致卵泡内层颗粒细胞凋亡增多的原因之一,而 Okutsu 等[13]提出,处于发育后期卵泡的卵泡壁内层颗粒细胞的凋亡增加,可能是导致卵泡囊性扩张的主要原因,提示 PCOS 组窦状卵泡内层颗粒细胞中 DR5 和 DcR2 的异常表达,可能对 PCOS 卵泡的异常发育起到了一定作用。

综上所述,DR5 和 DcR2 在颗粒细胞中的异常表达可能对 PCOS 大鼠卵泡的异常发育起到了一定作用,它们可能是通过参与颗粒细胞的凋亡过程而对 PCOS 卵泡的发育造成了一定影响,这为日后 PCOS 卵泡发育障碍的治疗提供了一个新思路。

参考文献:

[1] Matsuda F, Inoue N, Manabe N, et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells [J]. J Reprod Dev, 2012, 58(1): 44 - 50.

[2] Inoue N, Matsuda F, Goto Y, et al. Role of cell-death ligand-receptor system of granulosa cells in selective follicular atresia in porcine ovary [J]. J Reprod Dev, 2011, 57(2): 169 - 175.

[3] 张娟, 朱桂金, 王昕荣, 等. TRAIL 及其受体 DR4、DcR1 在多囊卵巢综合征大鼠卵泡发育中的作用 [J]. 生殖与避孕, 2010, 30(2): 73 - 80.

[4] 张娟, 朱桂金, 王昕荣, 等. 硫酸普拉睾酮钠诱导大鼠多囊卵巢综合征动物模型的实验研究 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2007, 15(2): 83 - 84.

[5] Arcos A, Paola M, Gianetti D, et al. α-SNAP is expressed in mouse ovarian granulosa cells and plays a key role in folliculogenesis and female fertility [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 11765.

[6] Mikaeili S, Rashidi BH, Safa M, et al. Altered FoxO3 expression and apoptosis in granulosa cells of women with polycystic ovary syndrome [J]. Arch Gynecol Obstet, 2016, 294(1): 185 - 192.

[7] Zhang J, Zhu G, Wang X, et al. Apoptosis and expression of protein TRAIL in granulosa cells of rats with polycystic ovarian syndrome [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2007, 27(3): 311 - 314.

[8] Inoue N, Manabe N, Matsui T, et al. Roles of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand signaling pathway in granulosa cell apoptosis during atresia in pig ovaries [J]. J Reprod Dev, 2003, 49(4): 313 - 321.

[9] Wada S, Manabe N, Inoue N, et al. TRAIL-decoy receptor-1 disappears in granulosa cells of atretic follicles in porcine ovaries [J]. J Reprod Dev, 2002, 48(2): 167 - 173.

[10] Wada S, Manabe N, Nakayama M, et al. TRAIL-decoy receptor 1 plays inhibitory role in apoptosis of granulosa cells from pig ovarian follicles [J]. J Vet Med Sci, 2002, 64(5): 435 - 439.

[11] Jääskeläinen M, Kyrönlahti A, Anttonen M, et al. TRAIL pathway components and their putative role in granulosa cell apoptosis in the human ovary [J]. Differentiation, 2009, 77(4): 369 - 376.

[12] Woo JK, Kang JH, Jang YS, et al. Evaluation of preventive and therapeutic activity of novel non-steroidal anti-inflammatory drug, CG100649, in colon cancer: Increased expression of TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors enhance the apoptotic response to combination treatment with TRAIL [J]. Oncol Rep, 2015, 33(4): 1947 - 1955.

[13] Okutsu Y, Itoh MT, Takahashi N, et al. Exogenous androstenedione induces formation of follicular cysts and premature luteinization of granulosa cells in the ovary [J]. Fertil Steril, 2010, 93(3): 927 - 935.

[14] Muñozespín D, Serrano M. Cellular senescence: from physiology to pathology [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2014, 15(7): 482 - 496.

[15] 刘佳睿, 陈佳, 陈客宏, 等. 缺血再灌注大鼠肾组织及尿液 DcR2 表达变化与肾损伤的关系 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(4): 342 - 348.

〔收稿日期〕2018 - 03 - 25

研究报告

树鼩胆石模型与消化道 P 物质相关的研究

吕龙宝[1],陈丽雄[2],王俊斌[2],刘汝文[3],陈丽玲[4*]

(1. 中国科学院昆明动物所,昆明　650032; 2. 中国医学科学院医学生物学研究所,昆明　650118;
3. 昆明医科大学实验动物学部,昆明　650500; 4. 昆明医科大学临床技能中心,昆明　650500)

【摘要】　目的　探讨高胆固醇饲料饲喂树鼩建立树鼩胆石模型与 P 物质(substance P,SP)的关系。**方法**　通过建立树鼩胆石模型,检测消化道 SP 免疫组化的表达,模型组与对照组进行比较分析。**结果**　模型组与对照相比,树鼩消化道 SP 免疫组化表达含量比对照组低($P < 0.05$),树鼩胆石模型与 SP 表达水平呈负相关。**结论**　树鼩胆囊结石与消化道分泌激素调节机制有关。

【关键词】　P 物质;树鼩;胆石模型
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 09-0040-06
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.007

Substance P in the digestive tract of a tree shrew cholesterol-induced gallstone model

LYU Longbao[1], CHEN Lixiong[2], WANG Junbin[2], LIU Ruwen[3], CHEN Liling[4*]

(1. Kunming Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650032, China. 2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650118. 3. Department of Experimental Animal, Kunming Medical University, Kunming 650500. 4. Clinical Skills Center, Kunming Medical University, Kunming 650500)

【Abstract】　Objective　To investigate the possibility of establishing the high-cholesterol forage-feeding tree shrew as a cholesterol-induced gallstone model and to determine the association of substance P (SP) with this model. **Methods**　Upon establishment of the tree shrew cholesterol-induced gallstone model, the SP expression of the digestive tract was detected with immunohistochemistry method and compared among the model groups and the control group. **Results**　In the model groups, immunohistochemistry showed that gastrointestinal SP expression was lower than that in the control group ($P < 0.05$). The tree shrew gallstone model was negatively correlated with SP expression level. **Conclusions**　Tree shrew gallstones are associated with the regulation mechanisms of hormone secretion in the digestive tract.

【Keywords】　substance P; tree shrew; gallstone model

随着经济的发展,人们生活水平的提高、生活方式和饮食结构的改变,肉食增加导致脂肪肝、胆囊结石的发病率逐年升高,已经成为临床中的常见病、多发病。胆囊结石形成的机制尚不十分清楚[1]。胆囊结石动物模型建立方法简单、效果确切,可以为研究胆结石成因及其防治提供巨大方便。树鼩在众多的人类疾病替代模型中,很少有人用其研究胆囊结石。饮食诱导树鼩胆囊胆固醇结石形成过程中,消化道屏障功能可能存在异常,虽然树鼩食物排空比其它动物快,但成模周期相对快

[**基金项目**]云南省应用基础研究面上基金资助项目(编号:2015FB020)。
[**作者简介**]吕龙宝(1973—　),男,教授,硕士,研究方向:兽医临床与实验动物管理。E-mail: lvlb2006@163.com
[**通信作者**]陈丽玲(1974—　),高级实验师,博士,研究方向:动物内科性疾病。E-mail: kmyxy18@sina.com

速。本文从消化道 P 物质(substance P,SP)的免疫组织含量分析研究树鼩胆石症的相关性及其胆石模型的建立方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物

据 3R 原则尽量减少动物使用量,从中国科学院昆明动物研究所动物实验中心购买 36 只普通级成年树鼩Ⅰ级(F3 代),规格:雌:雄(1∶1),体重 121 ~140 g[SCXK (滇) K2017 - 003]。分组:对照组 6 只,胆固醇低、中、高剂量组各 10 只树鼩。所有动物在实验前预适应饲养在中国科学院昆明动物研究所动物实验中心的普通环境 2 周后再进行实验;树鼩采用单笼饲养,人工光照 12 h(时间 07:00 ~ 19:00)拟黑夜、白天交叉光照,饲养房中室温控制在(21 ± 3)℃,相对湿度 40% ~ 60% [SYXK (滇) K2017 - 008],让树鼩自由饮水和采食。每天打扫清理饲养笼具一次,预饲养后正常开始实验喂养。本实验方案研究经由实验动物使用与管理委员会审批,通过中国科学院昆明动物研究所实验动物伦理委员会批准(批准号:KPRC-2017006)。

1.2 主要试剂与仪器

饲料及处理:基础树鼩饲料来自昆明医科大学实验动物中心,按照美国营养学会啮齿类 AIN-93 标准配方改制[2]:含粗蛋白 23.1%,粗脂肪 6%。制石饲料为基础饲料加 10% 猪油,0.5、1.0、1.5% 胆固醇分 A、B、C 三个剂量组合成小颗粒饲料。

戊巴比妥钠(上海化学试剂公司,进口分装,批号:F20140915);Bouins 液(自制:苦味酸饱和水溶液 75 mL,甲醛 25 mL,冰醋酸 5 mL);tween-20(济宁中坚科技有限公司,批号:9005645);低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)(批号:1E31-20 2016923);高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)(批号:3K33-21 2016923);甘油三酯(TG)(批号:7D74-21 2016423);总胆固醇(TC)(批号:7D62-21 2016423)。雅培 Ci16200 全自动生化分析仪;徕卡 RM2235 型切片机;Olympus 显微镜。

1.3 实验方法

1.3.1 指标采集

所有树鼩在造模后测量每周的空腹体重。测量时必须空腹 12 h,装入保定袋称净体重;另外,分别于造模前空腹采股静脉血 1 mL、造模中每 4 周采股静脉血 1 mL,检测空腹状态下低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、甘油三酯(TG)及总胆固醇(TC)等生化指标。所有指标检测在云南省第一人民医院进行(雅培全自动生化分析仪 Ci16200)。

1.3.2 取材

从第 4、8 周部分树鼩采用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射安乐死,然后取材按消化道从上至下各段:先用生理盐水冲洗干净,再依次切下从食管取到直肠。将所有样本用 Bouins 液改良后固定,固定液覆盖样本超出 3 cm 高,固定 24 h,用 80%、95%、100% 的乙醇脱水、用二甲苯渐续透明,浸蜡(恒温 55℃)3 h 包埋,取出蜡块放冰箱固定,修蜡块切片,按 5 μm 厚切,用毛笔挑起切片放于 43℃ 水中展片,用铬矾明胶贴在干净的载玻片上,放于温箱调于 37℃ 烘片备用。取胆囊和胆汁常规病理切片检测结石情况。

1.3.3 免疫组织化学方法

常规石蜡切片脱蜡复染。先消除内源性过氧化物酶的活性,切片放入 37℃ 3% H_2O_2 甲醇溶液孵育 15 min,然后滴加山羊血清封闭液,置于室温孵育 20 min,意在封闭非特异性反应区。甩去多余液体,滴上一滴一抗 50 μL(稀释倍数为 1∶50 SP 抗血清),置载玻片于室温静置 1 h 或 4℃ 过夜。如在 4℃ 过夜需要在 37℃ 复温 45 min,PBS 液冲洗 3 次,再滴加二抗 45 ~50 μL(稀释倍数 1∶100 羊抗兔 IgG ·抗血清),静置于 37℃ 恒温水浴锅 1 h。滴加 0.05% tween-20。滴加显色液 DAB-H_2O_2 5 ~ 10 min,显微镜下观察染色深浅,PBS 液冲洗 3 次 10 min,用苏木精复染 2 min,盐酸酒精分化,自来水冲洗 10 ~ 15 min,脱水、透明、封片、镜检。

1.4 统计学方法

统计学分析方法是采用 SPSS 17.0 版软件,以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,数据资料统计后,组间比较用 t 检验。$P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 各组血脂测定结果

对照组与模型组树鼩不同时间段血脂指标变化见表 1。各组血脂测定结果显示:模型组与对照组比较,第 4 周和第 8 周 TC 浓度升高差异有显著性($P < 0.01$);模型组第 8 周与第 4 周比较差异无显著性($P > 0.05$),说明模型组在第 4 周时血液总胆固醇含量已处于较高水平,继续喂含高胆固醇的饲料并不能进一步增高血液总胆固醇浓度。模型组与对照组比较,第 4 周和第 8 周 TG 浓度升高差异

有显著性($P < 0.05$);模型组与对照组比较,第 4 周和第 8 周 HDL-C 降低差异有显著性($P < 0.01$),LDL-C 升高差异有显著性($P < 0.01$)。

2.2 树鼩成活、成石情况

比较发现饲料含 1.0% 胆固醇饲养树鼩成模较好,死亡率较低,结果见表 2。

2.3 模型组与对照组胆囊的 SP 含量比较结果

用 ABC 免疫组织化学法,根据着色深浅,区别组织中 SP 含量;胆囊组织切片中细胞胞质内出现明显的黄色颗粒,属于 SP 蛋白阳性表达,无黄色颗粒是阴性。使用计算机图像分析技术半定量检测其阴、阳性蛋白表达的强弱,用平均光密度值大小表达强弱,密度值越大反映细胞内 SP 蛋白表达量越多;平均光密度值越低,胆囊组织 SP 蛋白表达结果越弱。结果见表 3。

2.4 树鼩胆囊胆固醇结石 4~8 周组织变化

经比较,选择较好的组织图片,如图 1 所示。组织图片显示:对照组胆囊组织 P 物质表达出现较多;4 周模型 B 组胆囊内膜结构紊乱,有絮状网形成,胆汁浑浊;8 周模型 B 组胆固醇晶体沉积,有积聚状态即可行成核团框架石头;模型 B 组胆囊组织 P 物质表达出现减少,结石形成。结果如图 1。

表 1 树鼩不同时间段血脂指标变化($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Table 1 Changes of blood lipid index in tree shrews in different time periods

指标 Indices	组别 Groups	n	0 周 0 week	4 周 4 weeks	8 周 8 weeks
甘油三酯 (mmol/L) Triglyceride (TG)	对照组 Control group	6	0.38 ± 0.16	0.54 ± 0.16	0.52 ± 0.20
	模型 A 组 Model group A	10	0.48 ± 0.26	0.89 ± 0.33 *	0.64 ± 0.19
	模型 B 组 Model group B	10	0.44 ± 0.10	0.75 ± 0.24 *	0.55 ± 0.20
	模型 C 组 Model group C	10	0.42 ± 0.21	0.69 ± 0.18	0.81 ± 0.36 *
总胆固醇 (mmol/L) Total cholesterol (TC)	对照组 Control group	6	1.90 ± 0.45	1.99 ± 0.40	2.0 ± 0.35
	模型 A 组 Model group A	10	2.15 ± 0.56	2.05 ± 0.46	2.15 ± 0.46
	模型 B 组 Model group B	10	2.10 ± 0.26	2.54 ± 0.55 *	2.20 ± 0.57
	模型 C 组 Model group C	10	1.98 ± 0.20	2.18 ± 0.18 *	2.26 ± 0.37
高密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L) High density lipoprotein cholesterol (HDL-C)	对照组 Control group	6	1.56 ± 0.25	1.54 ± 0.33	1.49 ± 0.37
	模型 A 组 Model group A	10	1.62 ± 0.51	0.88 ± 0.21 *	0.97 ± 0.26 *
	模型 B 组 Model group B	10	1.60 ± 0.26	0.91 ± 0.36 *	1.12 ± 0.26
	模型 C 组 Model group C	10	1.57 ± 0.20	0.86 ± 0.20 *	0.94 ± 0.23 *
低密度脂蛋白胆固醇 (mmol/L) Low density lipoprotein cholesterol (LDL-C)	对照组 Control group	6	1.09 ± 0.15	1.12 ± 0.18	1.08 ± 0.22
	模型 A 组 Model group A	10	1.0 ± 0.51	2.01 ± 0.43 **	1.99 ± 0.31 *
	模型 B 组 Model group B	10	1.21 ± 0.22	2.20 ± 0.29 **	2.05 ± 0.43 *
	模型 C 组 Model group C	10	1.12 ± 0.19	2.09 ± 0.19 **	2.10 ± 0.26 **

注:与对照组相比,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$。

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

表 2　不同剂量胆固醇饲养 8 周各组动物成模率、死亡率比较

Table 2　Comparison of model success rates and mortality rates of tree shrews in each group after feeding for 8 weeks with different doses of cholesterol

组别 Groups	总数 Total number	成模率(%) Success rate	死亡率(%) Mortality rate
对照组 Control group	6	0	0 (0.0%)
模型 A 组 Model group A	10	7(70%)	1 (10%)
模型 B 组 Model group B	10	8(80%)	1 (10%)
模型 C 组 Model group C	10	7(70%)	3 (30%)

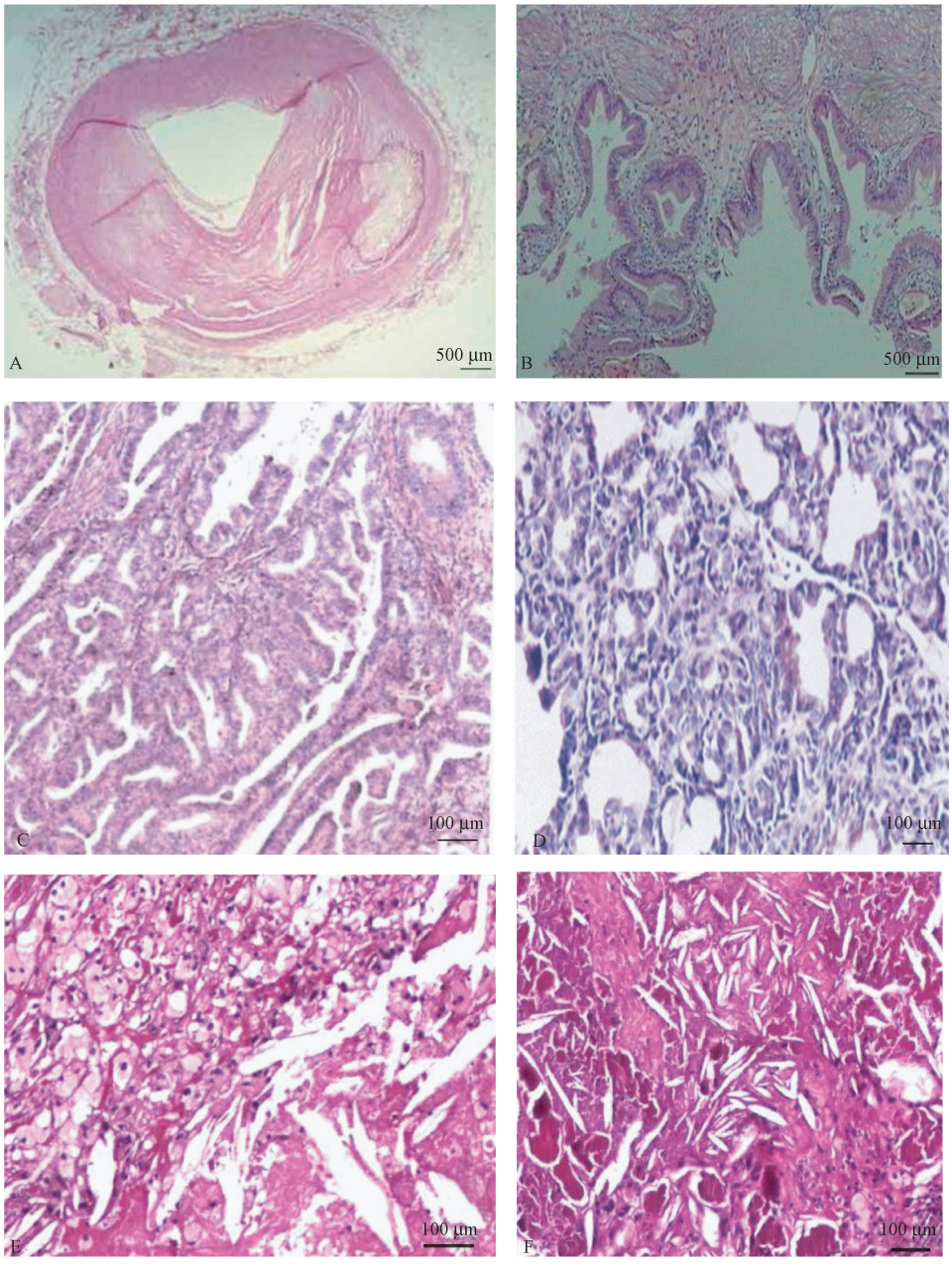
表 3　模型组与对照组胆囊的 SP 含量比较($\bar{x} \pm s$)

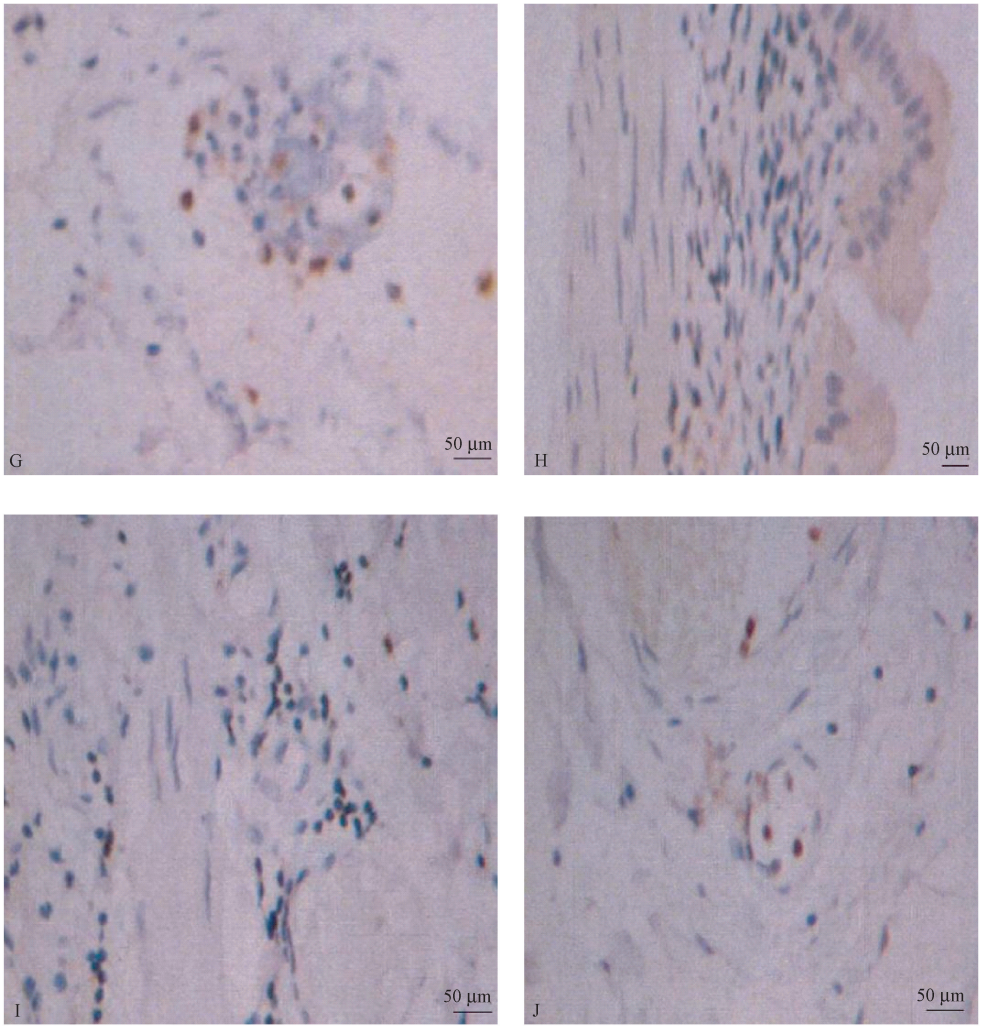
Table 3　Comparison of SP content in gallbladder between model groups and control group

组别 Groups	n	平均光密度值 Average optical density	
		4 周 4 weeks	8 周 8 weeks
对照组 Control group	6	0.47 ± 0.07	0.51 ± 0.10
模型 A 组 Model group A	10	0.31 ± 0.12 *	0.42 ± 0.15 *
模型 B 组 Model group B	10	0.26 ± 0.14 *	0.28 ± 0.09 **
模型 C 组 Model group C	10	0.24 ± 0.16 **	0.22 ± 0.11 **

注：与对照组相比，* $P < 0.05$，** $P < 0.01$。

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





注:A: 4 周模型 B 组胆囊(HE 染色, × 40);B:8 周模型 B 组胆囊内膜(HE 染色, × 40);C:4 周对照组胆囊内膜(HE 染色, × 200);D:8 周模型 B 组胆囊内膜(HE 染色, × 200);E:4 周模型 B 组晶体(HE 染色, × 200);F:8 周模型 B 组晶体(HE 染色, × 200);G:4 周对照组 SP 表达;H:4 周模型 C 组 SP 表达;I:8 周对照组 SP 表达;J:8 周模型 B 组 SP 表达。

图 1 不同时间胆囊内结构变化

Note. A: Gallbladder at 4 weeks in model group B (HE staining, × 40); B: gallbladder endometrium at 8 weeks in model group B (HE staining, × 40); C: intima at 4 weeks in the control group (HE staining, × 200); D: endometrium at 8 weeks in model group B (HE staining, × 200); E: crystal at 4 weeks in model group B (HE staining, × 200); F: crystal at 8 weeks in model group B (HE staining, × 200). G: SP expression at 4 weeks in the control group; H: SP expression at 4 weeks in model group C; I: SP expression at 8 weeks in the control group; J: SP expression at 8 weeks in model group B.

Figure 1 Changes in the structure of the gallbladder at different time

3 讨论

高胆固醇饲料饲养树鼩,经称重观察树鼩体重增重并不明显(数据未显示);第 4 周血清脂肪代谢指标与对照组比较差异有显著性($P < 0.05$);采血后部分树鼩出现精神萎靡,快速取材发现形成脂肪肝,胆囊内已形成晶体絮状物。实验表明含 1.0% 胆固醇的饲料饲喂树鼩易制作胆石疾病模型。采用树鼩建此模型比豚鼠、兔子与人类同源性更近,据资料通过基因组分析发现树鼩在神经及免疫系统的分子信号通路与人类具有较高的同源性,在很多方面具有可用来替代灵长类实验动物的遗传基础[3-4]。经实验分析:树鼩肠道 P 物质随着胆固醇含量的增高出现了低表达。可能是因小肠蠕动传输速率减缓,十二指肠、空肠内 P 物质的含量明显减少[5]。表明高胆固醇饲料对消化道平滑肌有强

烈刺激作用,P 物质的表达也随刺激而产生变化,其受体可直接作用于纵行肌、环行肌引起收缩,增强结肠袋推进性运动;P 物质表达降低时,胆囊收缩减慢,胃肠功能紊乱,胃肠运动功能障碍[6]。消化道黏膜缺血致缺氧损伤,缺血使炎性因子黏附肠道粘膜,产生内毒素和二胺氧化酶进入血液,导致部分靶器官感染,测定肠组织 P 物质表达出现减少,继而也出现胆道感染,胆囊炎是促成脂肪肝、胆囊结石原因之一[7]。说明 P 物质的变化与胃肠消化道动力及脂肪肝之间有一定的相关性。

P 物质是在分子水平上已测得的作用最强的内源性血管扩张肽,其消化道十二指肠表达减少,门脉高压增加,P 物质可能参与失代偿性肝硬化患者血液动力学改变的发病机制[8]。树鼩内环境的改变是导致门静脉高压和胆囊内胆汁淤积、胆固醇浓缩形成结石的主要原因。树鼩采食高胆固醇食物导致磷脂、胆汁酸、胆固醇形成平衡的比例被打破,低密度脂蛋白(LDL)增多,胆固醇含量升高,胆固醇也随之增加,导致胆汁中磷脂、胆盐、胆固醇三者比例失调,中性脂肪在肝细胞内沉积,肝细胞功能受到影响,不能产生足够多的胆汁酸,促使胆囊结石形成[6]。从而造成胆汁中的胆固醇也相应增加。正常情况下机体胆固醇能够在胆汁中“溶解”。在体内可以形成“磷脂胆固醇泡”,也叫“转运泡”,这是一种由胆固醇和磷脂一起组成的复合物[9]。当胆固醇含量相对增多,肝脏中的磷脂合成较少时,复合物的合成平衡被打破,多余的胆固醇就形成絮状物或结晶,在胆汁中游离与“糖蛋白”凝聚在一起构建成结石的框架,结石的核心是磷酸钙、胆红素钙聚集一起形成的,这样逐渐形成胆固醇胆囊结石[10]。

参考文献:

[1] Bedogni G, Miglioli L, Masutti F, et al. Prevalence of and risk factors for nonalcoholic fatty liver disease: the Dionysos nutrition and liver study [J]. Hepatology, 2005, 42(1): 44 – 52.

[2] Reeves PG, Nielsen FH, Fahey GC Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet [J]. J Nutr, 1993, 123(11): 1939 – 1951.

[3] Xu L, Chen SY, Nie WH, et al. Evaluating the phylogenetic position of Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) based on complete mitochondrial genome: implication for using tree shrew as an alternative experimental animal to primates in biomedical research [J]. J Genet Genomics, 2012, 39(3): 131 – 137.

[4] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1426.

[5] 崔莉红. 胃肠激素对结肠运动的调节作用 [J]. 医学综述, 2008, 14(3): 380 – 382.

[6] Nguyen KT, Kitisin K, Steel J, et al. Cirrhosis is not a contraindication to laparoscopic cholecystectomy: results and practical recommendations [J]. HPB (Oxford), 2011, 13(3): 192 – 197.

[7] 杜立峰, 展淑琴, 郭新奎. P 物质、血管活性肠肽与异常胃肠通过的关系 [J]. 西安交通大学学报(医学版), 2003, 24(4): 63 – 65.

[8] 金玲, 黄惠团, 刘东升, 等. 脂肪肝与胆囊结石的相关性 [J]. 海军医学杂志, 2006, 27(3): 224.

[9] 蒋兆彦, 韩天权, 张圣道. 从胆石成因研究谈胆石病预防的新策略 [J]. 中华肝胆外科杂志, 2011, 17(9): 697 – 700.

[10] Smelt AH. Triglycerides and gallstone formation [J]. Clin Chim Acta, 2010, 411(21 – 22): 1625 – 1631.

〔**收稿日期**〕2018 – 01 – 17

勘误

王敏、陈荣昌等作者在《中国比较医学杂志》2018 年(第 28 卷)第 8 期刊登的文章《小儿热速清糖浆抗流感病毒和抗菌作用研究》一文中:第 84 页“1.3 主要试剂与仪器”部分:第一行“小儿热速清糖浆(批号:z19980095)”应为“小儿热速清糖浆(批号:C20150401)”,特此更正。

研究报告

建立高尿酸血症性肾损害小鼠模型的实验研究

裴忆雪,刘永杰,张　笛,刘德俊,徐凌云*

(武汉轻工大学生物与制药工程学院,武汉　430023)

【摘要】 **目的**　建立合理、稳定的高尿酸血症肾损害小鼠模型,为筛选及研究治疗高尿酸血症肾病的药物提供病理模型。**方法**　将氧嗪酸钾、次黄嘌呤、腺嘌呤、乙胺丁醇和酵母膏 5 种造模剂单用、两药合用或三药联用,观察不同造模时间、造模剂量和造模方式所建立的小鼠高尿酸血症肾损害模型的血清尿酸、尿素氮以及肌酐水平、肝脏黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase,XOD)和腺苷脱氨酶(adenosine deaminase,ADA)活性的变化、肾脏的病理学改变以及各组体重变化情况。**结果**　与正常组比较,次黄嘌呤和氧嗪酸钾联用单次造模组小鼠血清尿酸水平及尿素氮明显升高($P < 0.01$),肾皮质可见肾小管管型,肾髓质可见盐类结晶;次黄嘌呤、乙胺丁醇和氧嗪酸钾三药联用 7 d 组小鼠血清尿酸水平及尿素氮明显升高($P < 0.01$),肝脏 XOD 活性明显降低($P < 0.05$),肾近曲小管内可见嗜酸性不溶性蛋白;酵母膏和氧嗪酸钾联用 14 d 组以及酵母膏、腺嘌呤和氧嗪酸钾联用 14 d 组,与正常组相比,小鼠血清尿酸、尿素氮以及肌酐值均显著升高($P < 0.01$),酵母膏和氧嗪酸钾联用组可见肾小管上皮细胞脱落,肾近曲小管内可见嗜酸性不溶性蛋白,酵母膏、腺嘌呤和氧嗪酸钾联用组小鼠肾髓质可见盐类结晶。酵母膏和氧嗪酸钾联用组比酵母膏、腺嘌呤和氧嗪酸钾联用组小鼠体重增长更快,两组差异有显著性($P < 0.05$)。**结论**　与其他造模方式比较,由于酵母膏和氧嗪酸钾联用所建立的高尿酸血症肾损害小鼠模型更加稳定,对小鼠体重无明显影响,同时该造模方式更符合临床特点,因此采用酵母膏和氧嗪酸钾联用 14 d 建立高尿酸血症肾损害小鼠模型更为合适。

【关键词】 高尿酸血症;肾损害;动物模型;小鼠
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 09-0046-09
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.008

Establishment of a hyperuricemia mouse model with renal damage

PEI Yixue, LIU Yongjie, ZHANG Di, LIU Dejun, XU Lingyun*
(School of Biology and Pharmaceutical Engineering, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To provide a pathological model for the screening and study of drugs for the treatment of hyperuricemic nephropathy by establishing a reasonable and stable mouse model with hyperuricemic kidney injury. **Methods**　By administering one, two, or three of five drugs, oteracil potassium, hypoxanthine, adenine, ethambutol, and yeast extract, a model was established with hyperuricemia renal injury in KM mice, at different modeling times by using different modeling doses and modeling methods. The changes in serum uric acid, urea nitrogen, creatinine, liver xanthine oxidase (XOD), and adenosine deaminase (ADA) activity were determined, and the variations in weight of each group were analyzed. **Results**　Compared with the normal group, the serum uric acid level and urea nitrogen level in the mice significantly increased ($P < 0.01$) in the group with 1-day combination medication of hypoxanthine and oteracil potassium, the renal tubular type was abundantly observed in renal cortex, and salt crystals were abundantly observed in renal medulla. The serum uric acid level and urea nitrogen level in the mice increased significantly ($P < 0.01$), and liver XOD activity

[作者简介]裴忆雪(1993—　),女,硕士研究生,专业:药学。E-mail: 172109078@qq.com
[通信作者]徐凌云(1967—　),女,博士,教授,研究方向:抗炎与免疫药理学。E-mail: doctorxly9898@163.com

decreased ($P < 0.05$) in the group with 7-day combination medication of hypoxanthine, ethambutol, and oteracil potassium, and eosinophilic insoluble proteins were found in some of the proximal tubules of the renal cortex. The serum uric acid level, urea nitrogen level, and creatinine level in the mice significantly increased ($P < 0.01$) in the group with 14-day combined medication of yeast extract and oteracil potassium and the group with 14-day combined medication of yeast extract, adenine, and oteracil potassium. Renal tubular epithelial cells fell off in the renal cortex, and eosinophilic insoluble proteins were visible in some of the proximal tubules of the mice in the group with combined medication of yeast extract and oteracil potassium. Salt crystals were abundantly observed in the renal medulla of the mice in the group with combined medication of yeast extract, adenine, and oteracil potassium. The body weight of the yeast extract and oteracil potassium group increased faster than that of the yeast extract, adenine, and oteracil potassium group, with a significant difference between their body weights ($P < 0.05$). **Conclusions** Compared with other modeling method , the mouse model with hyperuricemic renal damage induced by the combined medication of yeast extract and oteracil potassium was more stable and its establishment had no significant effect on the body weight of the mice. Therefore, it is more suitable to use yeast extract combined with oteracil potassium once a day for 14 days to establish a mouse model of hyperuricemia renal damage.

【**Keywords**】 hyperuricemia; renal injury; animal modeling; mouse

尿酸主要由肾脏排泄,长期高尿酸血症可导致肾脏病理性损害,可能比蛋白尿所致的肾损害更严重,约有三分之一的原发性高尿酸血症患者出现肾损害的临床表现,主要为痛风性肾病、尿酸结石或尿酸性肾病[1-2]。建立合理稳定的高尿酸血症肾损害动物模型是研究该病的病理机制及筛选治疗药物的关键。已有学者建立了多种高尿酸血症肾损害动物模型,主要采用增加尿酸前体物质、抑制尿酸酶活性及抑制尿酸排泄等方法,多采用大鼠进行造模[3-4]。这些方法有的关注于高尿酸血症、模型制作时间偏短、并未出现明显肾损害,有的是药物自身导致的肾损害、不符合高尿酸血症肾损害临床发病机制,大多数造模方法未对动物的一般情况和体重进行观察。本研究在文献调研的基础上,对多种造模剂单用、合用、不同时间不同剂量建立的小鼠病理模型进行平行比较,除观察小鼠尿酸和肾功能指标、肝脏黄嘌呤氧化酶(xanthine oxidase, XOD)和腺苷脱氨酶(adenosine deaminase, ADA)活性之外,还观察了小鼠一般情况和体重变化,为建立合理的符合临床特点的高尿酸血症肾损害动物模型提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 KM 小鼠,100 只,体重 25 ~ 30 g,华中科技大学实验动物中心提供[SCXK (鄂) 2016 - 0009],实验动物饲养于湖北省医药工业研究院有限公司动物实验中心[SYXK (鄂) 2016 - 0057],实验方案通过实验动物使用与管理委员会(IACUC)审批,IACUC 号:20171125006,本研究过程符合实验动物使用的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

酵母膏,批号:20160628,北京奥博星生物技术责任公司;氧嗪酸钾盐,批号:P137112,次黄嘌呤,批号:G1725018,均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;盐酸乙胺丁醇,杭州民生药业有限公司,每粒 0.25 g,批号:T17A002;腺嘌呤,批号:Y26J8C40561,上海源叶生物科技有限公司;尿酸测定试剂盒(尿酸酶比色法),批号:20171201,黄嘌呤氧化酶(XOD)测试盒,批号:20180122,尿素氮试剂盒(脲酶法),批号:20171103,肌酐试剂盒,批号:20171102,考马斯亮蓝试剂盒,批号:20171219,腺苷脱氨酶(ADA)试剂盒,批号:20180122,均购自南京建成生物工程研究所。

AL204 电子分析天平(梅特勒-托利多公司);SPS2001F 电子天平(奥豪斯公司);TGL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂);UV-2000 紫外分光光度计(尤尼柯);FSH-2A 可调高速匀浆机(金坛市医疗仪器厂);Eclipse Ci 光学显微镜(尼康公司);ASP 200S 全自动脱水机,5300 全自动染封一体机,RM2016 轮转式切片机(德国徕卡公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 试剂的配制

用 0.5% 羧甲基纤维素钠(CMC-Na)做溶媒,分别配制 20 mg/mL 氧嗪酸钾混悬液、33.33 mg/mL 次黄嘌呤混悬液、30 mg/mL 次黄嘌呤和 12.5 mg/mL 乙胺丁醇混合溶液、12.5 mg/mL 乙胺丁醇和 5

mg/mL 腺嘌呤混合溶液、1.5 g/mL 酵母膏混悬液、1.5 g/mL 酵母膏和 5 mg/mL 腺嘌呤混合溶液。

1.3.2 动物分组与造模

将小鼠随机分为正常组Ⅰ、正常组Ⅱ、正常组Ⅲ、模型 A 组(氧嗪酸钾)、模型 B 组(氧嗪酸钾)、模型 C 组(次黄嘌呤 + 氧嗪酸钾)、模型 D 组(次黄嘌呤 + 乙胺丁醇 + 氧嗪酸钾)、模型 E 组(乙胺丁醇 + 腺嘌呤)、模型 F 组(酵母膏 + 氧嗪酸钾)、模型 G 组(酵母膏 + 腺嘌呤 + 氧嗪酸钾),每组 10 只,正常组给予 0.5% CMC-Na 灌胃,模型组具体造模方法见表 1。造模期间,各组小鼠自由饮水,喂饲相同质量的饲料。

1.3.3 检测指标

每天观察小鼠的一般情况并称重,计算每只小鼠的体重相对变化率(%) = (每次称量体重/实验开始时体重) × 100。

各组小鼠分别在末次造模后 1 h 或 2 h 眼球取血,室温静置 1 ~ 2 h 后 3500 r/min 离心 10 min,取血清,冻存于 -20℃备用,按照试剂盒的操作说明测定血清中尿酸、尿素氮、肌酐水平。颈椎脱臼处死小鼠,取肝脏,进行匀浆,3500 r/min 离心 10 min,取上清液,按照试剂盒操作说明测定上清液肝脏黄嘌呤氧化酶(XOD)、腺苷脱氨酶(ADA)活性。

1.3.4 肾脏病理组织学检查

实验结束后,摘取全肾组织,用 10% 福尔马林溶液固定。选取血尿酸、肾功能异常的造模组小鼠以及正常组肾组织进行脱水、石蜡包埋、制片(4 μm 厚)、HE 染色、光学显微镜观察并拍照。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 24.0 统计软件进行数据统计,数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组小鼠体重变化

造模 7 d 过程中,模型 D、E 组小鼠体重均呈上升趋势,但与正常组Ⅱ相比,差异均无显著性($P > 0.05$),结果见图 1。

造模 14 d 过程中,模型 F、G 组小鼠体重均呈上升趋势,但与正常组Ⅲ相比,差异均无显著性($P > 0.05$);在造模第 14 天,模型 F 组与模型 G 组相比体重显著增加($P < 0.05$)。结果见图 2。

表 1 动物分组与造模($n = 10$)

Table 1 Test groups and the different schemes of animal modeling

造模时间 Days of modeling	组别 Groups	造模剂的造模方式和剂量[mg/(kg·d)] Modeling methods and doses of modeling agents					末次造模后取血时间(h) Time of taking blood after making the last model
		氧嗪酸钾 Oteracil potassium	次黄嘌呤 Hypoxanthine	乙胺丁醇 Ethambutol	腺嘌呤 Adenine	酵母膏 Yeast extract	
单天给药 Single-day administration	正常组Ⅰ Normal group Ⅰ	—	—	—	—	—	1
	模型 A 组 Model group A	400 (ip)	—	—	—	—	1
	模型 B 组 Model group B	400 (ip)	—	—	—	—	2
	模型 C 组 Model group C	300 (ip)	500 (sc)	—	—	—	1
持续 7 d 7-day consecutive modeling	正常组Ⅱ Normal group Ⅱ	—	—	—	—	—	1
	模型 D 组 Model group D	200 (sc)	600 (ig)	250 (ig)	—	—	1
	模型 E 组 Model group E	—	—	250 (ig)	100 (ig)	—	1
持续 14 d 14-day consecutive modeling	正常组Ⅲ Normal group Ⅲ	—	—	—	—	—	1
	模型 F 组 Model group F	300 (ip)	—	—	—	30 000 (ig)	1
	模型 G 组 Model group G	300 (ip)	—	—	100 (ig)	30 000 (ig)	1

注:“ig”表示灌胃;“ip”表示腹腔注射;“sc”表示皮下注射。

Note. “ig” means intragastric administration; “ip” means intraperitoneal injection; and “sc” means hypodermic injection.

2.2　各组小鼠血清尿酸、尿素氮及肌酐水平的变化

由表 2 可知，采用单次造模，与正常组Ⅰ相比，模型 C 组小鼠血清尿酸水平及尿素氮显著增高（$P < 0.01$），模型 A 组与模型 B 组小鼠血清尿酸、尿素氮及肌酐变化均不明显，差异无显著性（$P > 0.05$）。模型 A 组与模型 B 组比较，两者血清尿酸、尿素氮、肌酐水平差异均无显著性（$P > 0.05$），说明取血时间不影响氧嗪酸钾单次造模结果。

由表 3 可知，采用连续 7 d 造模方法，与正常组Ⅱ相比，模型 D 组血清尿酸水平显著升高（$P < 0.01$），模型 E 组血清尿酸水平有所降低，但差异无显著性（$P > 0.05$）；模型 D 组和模型 E 组血清尿素氮值均显著增高（$P < 0.01$），但两组血清肌酐值差异均无显著性（$P > 0.05$）。

由表 4 可知，采用连续 14 d 造模方法，与正常组Ⅲ相比，模型 F 组和模型 G 组小鼠血清尿酸、尿素氮以及肌酐值均显著升高（$P < 0.01$）。

2.3　各组小鼠肝脏黄嘌呤氧化酶（XOD）、腺苷脱氨酶（ADA）活性的变化

由表 5 可知，与正常组Ⅰ比较，模型 A、B、C 组肝脏的 XOD 和 ADA 活性升高不明显，差异均无显著性（$P > 0.05$）。模型 A 组与模型 B 组比较，差异亦无显著性（$P > 0.05$）。

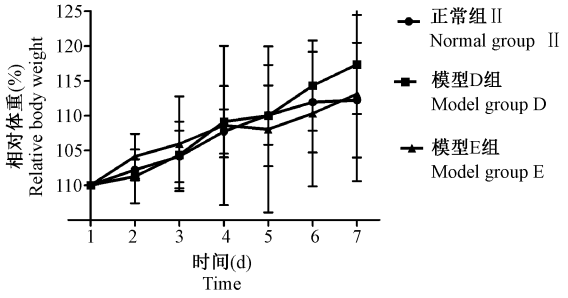
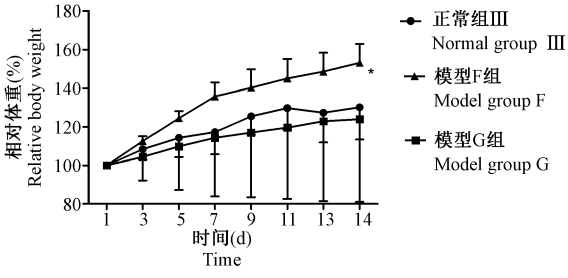


图 1　连续 7 d 造模各组小鼠体重变化情况

Figure 1　Changes in the relative mouse body weight of each group after 7-day consecutive modeling



注：与模型 G 组比较，$^{*}P < 0.05$。

图 2　连续 14 d 造模各组小鼠体重变化情况

Note. Compared with the model group G, $^{*}P < 0.05$.

Figure 2　Changes in the relative mouse body weight of each group after 14-day consecutive modeling

表 2　单次造模各组小鼠血清尿酸、尿素氮及肌酐水平变化情况（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 2　Changes in serum uric acid, urea nitrogen, and creatinine of the mice in each group after single modeling

组别 Groups	血清尿酸（mg/L） Serum uric acid	尿素氮（mmol/L） Urea nitrogen	肌酐（μmol/L） Creatinine
正常组Ⅰ Normal group Ⅰ	32.26 ± 3.67	7.69 ± 1.22	125.53 ± 22.04
模型 A 组 Model group A	37.40 ± 5.86	7.62 ± 1.34	120.56 ± 22.66
模型 B 组 Model group B	44.79 ± 9.64	6.97 ± 1.08	115.51 ± 24.43
模型 C 组 Model group C	104.20 ± 38.00$^{\#\#}$	9.46 ± 1.65$^{\#\#}$	127.78 ± 34.38

注：与正常组Ⅰ比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note. Compared with the normal group Ⅰ, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

表 3　连续 7 d 造模各组小鼠血清尿酸、尿素氮及肌酐水平变化情况（$\bar{x} \pm s$，$n = 10$）

Table 3　Changes in serum uric acid, urea nitrogen, and creatinine of the mice in each group after 7-day consecutive modeling

组别 Groups	血清尿酸（mg/L） Serum uric acid	尿素氮（mmol/L） Urea nitrogen	肌酐（μmol/L） Creatinine
正常组Ⅱ Normal group Ⅱ	29.17 ± 3.76	5.80 ± 1.11	123.32 ± 8.23
模型 D 组 Model group D	100.89 ± 8.30$^{\#\#}$	9.95 ± 1.53$^{\#\#}$	107.26 ± 7.58
模型 E 组 Model group E	25.19 ± 3.02	10.58 ± 2.29$^{\#\#}$	115.56 ± 23.38

注：与正常组Ⅱ比较，$^{\#}P < 0.05$，$^{\#\#}P < 0.01$。

Note. Compared with the normal group Ⅱ, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

由表 6 可知,采用连续 7 d 造模方法,与正常组Ⅱ比较,模型 D 组小鼠肝脏 XOD 活性明显降低($P < 0.05$),但 ADA 活性升高不明显,差异无显著性($P > 0.05$);模型 E 组的肝脏 XOD 和 ADA 活性差异均无显著性($P > 0.05$)。

由表 7 可知,采用连续 14 d 造模方法,与正常组Ⅲ比较,模型 F 组、模型 G 组小鼠肝脏 XOD 和 ADA 活性差异均无显著性($P > 0.05$)。

表 4 连续 14 d 造模各组小鼠血清尿酸、尿素氮及肌酐水平变化情况($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 4 Changes in serum uric acid, urea nitrogen, and creatinine of the mice in each group after 14-day consecutive modeling

组别 Groups	血清尿酸(mg/L) Serum uric acid	尿素氮(mmol/L) Urea nitrogen	肌酐(μmol/L) Creatinine
正常组Ⅲ Normal group Ⅲ	26.64 ± 3.37	5.63 ± 0.82	101.25 ± 14.82
模型 F 组 Model group F	87.06 ± 17.00$^{\#\#}$	13.00 ± 1.87$^{\#\#}$	131.50 ± 14.92$^{\#\#}$
模型 G 组 Model group G	81.70 ± 10.06$^{\#\#}$	11.84 ± 1.57$^{\#\#}$	120.63 ± 10.50$^{\#\#}$

注:与正常组Ⅲ比较,$^{\#}P < 0.05$,$^{\#\#}P < 0.01$。

Note. Compared with the normal group Ⅲ, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

表 5 单次造模各组小鼠肝脏黄嘌呤氧化酶、腺苷脱氨酶活性变化情况($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 5 Changes in liver xanthine oxidase activity and adenosine deaminase activity of the mice in each group after single modeling

组别 Groups	XOD 活性(U/g prot) XOD activity	ADA 活性(U/mg prot) ADA activity
正常组Ⅰ Normal group Ⅰ	23.14 ± 3.01	29.24 ± 9.41
模型 A 组 Model group A	26.20 ± 4.82	28.10 ± 8.25
模型 B 组 Model group B	27.36 ± 4.63	31.51 ± 10.42
模型 C 组 Model group C	25.26 ± 4.89	32.38 ± 7.35

表 6 连续 7 d 造模各组小鼠肝脏黄嘌呤氧化酶、腺苷脱氨酶活性变化情况($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 6 Changes in liver xanthine oxidase activity and adenosine deaminase activity of the mice in each group after 7-day consecutive modeling

组别 Groups	XOD 活性(U/g prot) XOD activity	ADA 活性(U/mg prot) ADA activity
正常组Ⅱ Normal group Ⅱ	33.47 ± 3.72	33.25 ± 8.66
模型 D 组 Model group D	21.58 ± 3.62$^{\#}$	33.49 ± 13.33
模型 E 组 Model group E	30.91 ± 12.59	36.41 ± 12.33

注:与正常组Ⅱ比较,$^{\#}P < 0.05$。

Note. Compared with the normal group Ⅱ, $^{\#}P < 0.05$.

表 7 连续 14 d 造模各组小鼠肝脏黄嘌呤氧化酶、腺苷脱氨酶活性变化情况($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

Table 7 Changes in liver xanthine oxidase activity and adenosine deaminase activity of the mice in each group after 14-day consecutive modeling

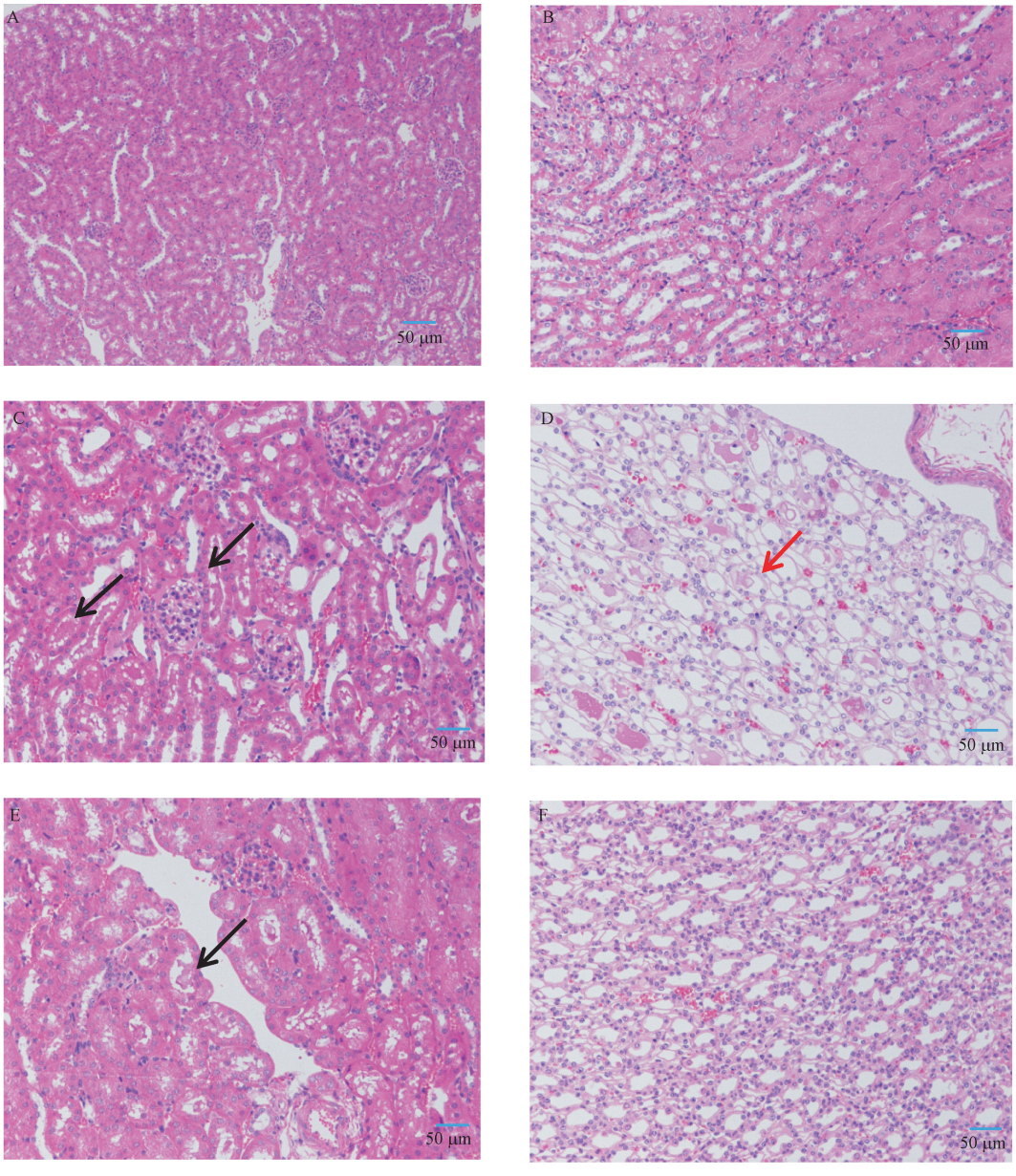
组别 Groups	XOD 活性(U/g prot) XOD activity	ADA 活性(U/mg prot) ADA activity
正常组Ⅲ Normal group Ⅲ	20.39 ± 5.67	46.01 ± 10.27
模型 F 组 Model group F	20.53 ± 1.71	37.99 ± 7.86
模型 G 组 Model group G	23.22 ± 3.30	40.78 ± 5.64

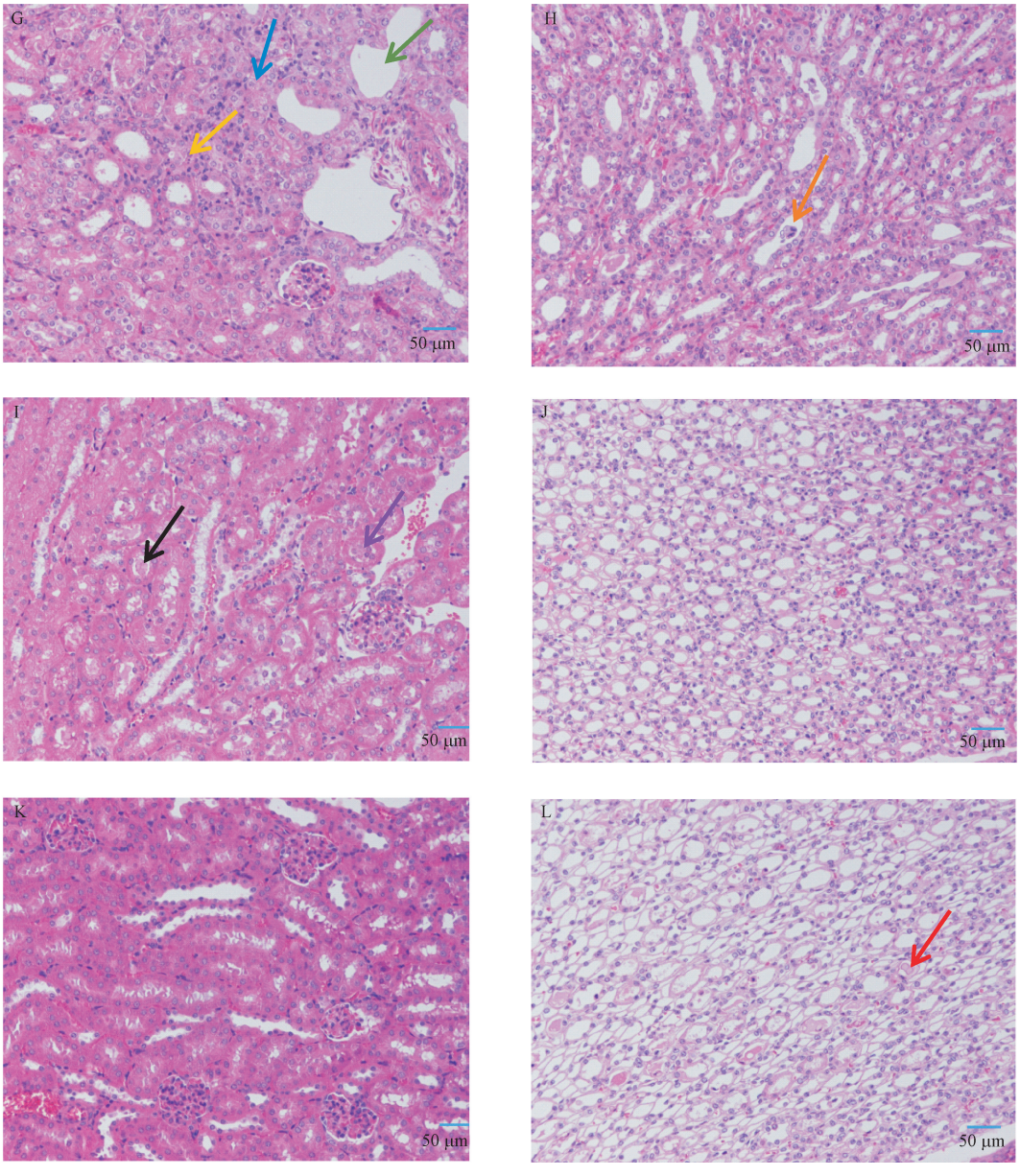
2.4　肾脏组织病理学检测

选取正常组及模型 C、D、E、F、G 组的肾组织进行病理组织学检查，结果表明，正常组肾髓质皮质分界清晰，肾小球毛细血管襻结构清晰，肾小管上皮细胞结构正常，肾小管刷状缘排列整齐规则，未见明显炎症反应；模型 C 组肾皮质中肾小球毛细血管襻结构清晰，多见肾小管管型，近曲小管内可见嗜酸性不溶性蛋白，肾髓质中小管中少见嗜酸性不溶性蛋白，多见盐类结晶；模型 D 组肾皮质中部分近曲小管内可见嗜酸性不溶性蛋白，肾髓质中未见明显盐类结晶；模型 E 组肾皮质中多见肾小管上皮细胞水肿，少见肾小管上皮细胞坏死、核固缩、碎裂，少量肾小管扩张，肾髓质中少量小管中可见核碎裂状的细胞；模型 F 组肾皮质中部分肾小管上皮细胞脱落，部分近曲小管内可见嗜酸性不溶性蛋白，肾髓质中未见明显盐类结晶；模型 G 组肾皮质中肾小球毛细血管襻结构清晰，肾小管无明显异常，肾髓质小管中多见盐类结晶，结果见图 3。

3　讨论

人体产生的尿酸约有 2/3 经肾脏随尿液排出，因此，高尿酸血症可导致肾功能的减退[5]。高尿酸血症引起的肾实质损害有三种类型[2]：①痛风性肾病，是由于长期轻中度高尿酸血症所致的肾脏损害，主要表现为痛风石沉积于皮髓质交界处及髓质深部呈慢性间质性炎症，导致肾脏缩小、瘢痕化；②尿酸性肾病，是大量尿酸盐结晶短时间沉积于肾脏集合管、肾盂及输尿管并堵塞肾小管，引起肾小管





注:a:正常组肾髓质;b:正常组肾小管;c:模型 C 组肾皮质;d:模型 C 组肾髓质;e:模型 D 组肾皮质;f:模型 D 组肾髓质;g:模型 E 组肾皮质;h:模型 E 组肾髓质;i:模型 F 组肾皮质;j:模型 F 组肾髓质;k:模型 G 组肾皮质;l:模型 G 组肾髓质。黑色箭头指示嗜酸性不溶性蛋白;红色箭头指示盐类结晶;蓝色箭头指示肾小管上皮细胞水肿;黄色箭头指示肾小管上皮细胞坏死;绿色箭头指示核固缩、碎裂,肾小管扩张;橙色箭头指示肾小管核碎裂状的细胞;紫色箭头指示肾小管上皮细胞脱落。标尺 =50 μm。

图 3 各组小鼠肾脏组织病理改变(HE 染色, × 200)

Note. a: Renal medulla in normal group. b: Renal tubule in normal group. c: Renal cortex in model group C. d: Renal medulla in model group C. e: Renal cortex in model group D. f: Renal medulla in model group D. g: Renal cortex in model group E. h: Renal medulla in model group E. i: Renal cortex in model group F. j: Renal medulla in model group F. k: Renal cortex in model group G. l: Renal medulla in model group G. Black arrow indicates eosinophilic insoluble protein. Red arrow indicates salt crystal. Blue arrow indicates renal tubular epithelial cell edema. Yellow arrow indicates renal tubular epithelial cell necrosis. Green arrow indicates nuclear pyknosis and fragmentation, and tubular dilation. Orange arrow indicates renal tubular cells with nuclear fragmentation. Purple arrow indicates renal tubular epithelial cell shedding. Bars = 50 μm.

Figure 3 Pathological changes of the renal tissues of the mice in each group. HE staining

近端扩张,导致肾功能急性、严重损伤,引发急性肾功能衰竭;③尿酸结石,是由尿酸盐结晶形成的结石沉积于肾乳头和集合管内引起结石性梗阻。

尿酸是大多数动物体内嘌呤代谢的终产物,主要由黄嘌呤氧化酶(XOD)催化次黄嘌呤与黄嘌呤而产生,文献中常用以下方法建立高尿酸血症肾损害小鼠模型[6]:①抑制尿酸分解,尿酸酶为嘌呤代谢酶,可以将尿酸转化成尿囊素排出体外。氧嗪酸钾是尿酸酶抑制剂,通过抑制尿酸酶活性,使小鼠血尿酸水平升高。大鼠、小鼠等啮齿类动物体内存在尿酸酶,但人体内没有此酶,故采用氧嗪酸钾制备高尿酸血症肾损害模型,即使造模成功此方法也与人类高尿酸血症发病机制不尽相符。②增加尿酸的前体物质,如腺嘌呤、酵母膏、次黄嘌呤等。给予大剂量的腺嘌呤可以增强体内黄嘌呤氧化酶活性以及促进谷酰胺磷酸核糖焦磷酸转移酶的合成,加快尿酸的生成,同时异常高浓度的腺嘌呤在黄嘌呤氧化酶的作用下转变为极难溶于水的 2, 8-二羟基腺嘌呤,沉积于肾小管,引起肾小管阻塞,进而导致血清尿酸、肌酐、尿素氮显著上升[7]。给予酵母膏,正常的嘌呤代谢受到大量含丰富蛋白质类的酵母的影响,致使嘌呤代谢开始紊乱,从而诱发高尿酸血症,由于血尿酸浓度的升高出现肾小管功能异常,渐至肾小球的损害而造成肾功能受损[8-9];给予次黄嘌呤,它在黄嘌呤氧化酶的作用下生成尿酸前体物质黄嘌呤,进而形成尿酸。③抑制尿酸排泄,乙胺丁醇其代谢产物吡嗪酸可抑制肾小管对尿酸的分泌,从而抑制肾脏对尿酸的排泄使血尿酸升高[10]。

本研究使用氧嗪酸钾、次黄嘌呤、腺嘌呤、乙胺丁醇、酵母膏 5 种造模剂,单用或联用这些造模剂,即单用尿酸酶抑制剂氧嗪酸钾;联用尿酸前体物质(次黄嘌呤、酵母膏或腺嘌呤)和尿酸酶抑制剂(氧嗪酸钾);联用尿酸前体物质(腺嘌呤)和抑制尿酸排泄药(乙胺丁醇);联用尿酸前体物质(次黄嘌)、尿酸酶抑制剂(氧嗪酸钾)以及抑制尿酸排泄药(乙胺丁醇)。观察不同造模机制、造模时间、造模剂量对病理模型的影响,从而设定了 7 个造模组。

本研究用氧嗪酸钾 400 mg/kg 单次腹腔注射,造模后 1 h 和 2 h 取血,其尿酸水平与正常组相比无明显差异,造模不成功,文献也报道此种造模方法不稳定,重复性不好[11-12]。本研究采用 500 mg/kg 次黄嘌呤与 300 mg/kg 氧嗪酸钾联合单次给药造模,小鼠血清尿酸及尿素氮水平显著升高,肾脏组织病理学检查也发现其肾小管受损伴有尿酸盐结晶沉积,说明此造模方式可诱导高尿酸血症并对肾功能有一定损害,与文献报道相符[13],但此方法为单次造模,可观察预防性给药的疗效,对治疗性用药的疗效无法观察。

本研究采用 250 mg/kg 乙胺丁醇与 100 mg/kg 腺嘌呤连续 7 d 造模,血清尿酸水平与正常组相比没有明显变化,但尿素氮水平显著升高,组织病理学检测发现其肾皮质中可见肾小管上皮细胞水肿,少量肾小管上皮细胞坏死,核固缩、碎裂,少量肾小管扩张,肾髓质中少量小管中可见核碎裂状的细胞,此种造模方法可造成显著的肾功能损害,考虑是由造模剂直接引起肾功能损伤,与高尿酸血症导致肾损害病理机制不符。

施琬等[14]采用 25 g/kg 次黄嘌呤饲料喂养联合 250 mg/kg 乙胺丁醇灌胃,同时皮下注射 200 mg/kg 氧嗪酸钾制备高尿酸血症大鼠模型,Han 等[15]采用 100 mg/kg 次黄嘌呤联合 250 mg/kg 乙胺丁醇灌胃,同时皮下注射 200 mg/kg 氧嗪酸钾,连续 17 d,制备大鼠高尿酸血症肾损害模型,其血清尿酸、尿素氮、肌酐水平均显著升高,组织病理学检查发现明显的肾功能损害。由于饲料中加用次黄嘌呤,其造模剂量不可控,且本研究采用小鼠进行造模,因此将次黄嘌呤改为用 600 mg/kg 直接灌胃,并与乙胺丁醇和氧嗪酸钾联合造模 7 d,结果表明小鼠血清尿酸、尿素氮水平均明显升高,组织病理学检查发现肾脏近曲小管内可见嗜酸性不溶性蛋白,此造模方法能够造成小鼠高尿酸血症性肾损害,但该模型中小鼠肝脏 XOD 活性显著降低,有文献报道肝脏中 XOD 活性降低时伴随血清中 XOD 活性升高[16],因此考虑其血清中 XOD 有变化,这提示应同时测定血清中 XOD 活性。此种造模方式小鼠精神状态不佳,体重无明显降低,同时乙胺丁醇竞争性抑制肾小管分泌尿酸,导致肾脏受损,因此采用乙胺丁醇造模不符合高尿酸血症肾损害临床发病机制[17]。

本研究采用 30 g/kg 酵母膏 + 300 mg/kg 氧嗪酸钾联合和 30 g/kg 酵母膏 + 100 mg/kg 腺嘌呤 + 300 mg/kg 氧嗪酸钾联用连续 14 d 造模,结果表明小鼠血清尿酸、尿素氮、肌酐水平均明显升高,肾脏组织病理观察发现酵母膏 + 氧嗪酸钾联用组肾小管上皮细胞脱落,部分近曲小管内可见嗜酸性不溶性蛋白,酵母膏 + 腺嘌呤 + 氧嗪酸钾联用组小鼠肾

髓质小管中多见盐类结晶,两种造模方法均可造成显著的肾功能损害,但是酵母膏 + 氧嗪酸钾组小鼠体重较酵母膏 + 腺嘌呤 + 氧嗪酸钾组显著增加,而且腺嘌呤可导致大鼠慢性肾功能疾病[18-19],其造模引起的肾脏病变也并非全因高尿酸血症引发,故采用酵母膏和氧嗪酸钾联用长期造模方式更为合适。

综上所述,单次造模对小鼠肾脏损伤不大,而长期造模均能够导致小鼠肾脏损害,因此笔者建议采用酵母膏和氧嗪酸钾联合连续 14 d 造模建立小鼠高尿酸血症肾损害模型更合适。

参考文献:

[1] Vargas-Santos AB, Neogi T. Management of gout and hyperuricemia in CKD [J]. Am J Kidney Dis, 2017, 70(3): 422-439.

[2] 雷三霞, 于长国, 曾春艳. 高尿酸血症与肾损害相关性研究进展 [J]. 医学综述, 2014, 20(10): 1775-1777.

[3] 王莉, 徐柳青, 施映枫, 等. 高尿酸血症肾损害动物模型建立及发生机制研究 [J]. 中华肾脏病杂志, 2015, 31(3): 203-207.

[4] 熊湘明, 曲竹秋, 贾锡莲. 大鼠高尿酸血症肾损害模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(4): 206-209.

[5] Chung W, Kim AJ, Ro H, et al. Hyperuricemia is an independent risk factor for mortality only if chronic kidney disease is present [J]. Am J Nephrol, 2013, 37(5): 452-461.

[6] 吴燕升, 万强, 史丽强, 等. 高尿酸血症肾纤维化动物模型研究进展 [J]. 成都医学院学报, 2016, 11(6): 747-750.

[7] Runolfsdottir HL, Palsson R, Agustsdottir IM, et al. Kidney disease in adenine phosphoribosyltransferase deficiency [J]. Am J Kidney Dis, 2015, 67(3): 431-438.

[8] 蓝伦礼, 江滨, 刘梦楚, 等. 不同剂量酵母和腺嘌呤诱导大鼠痛风性肾病模型的建立比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(2): 33-43.

[9] 邢儒伶, 孟冬梅, 任伟, 等. 建立痛风性肾病并发慢性肾功能衰竭动物模型方法的探讨 [J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(10): 1409-1413.

[10] 沈桂芹, 于世家. 尿酸排泄不良型高尿酸血症动物模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(8): 55-59.

[11] 孟笑玮, 樊克涛, 代向东, 等. 高尿酸血症动物模型的实验研究 [J]. 天津中医药, 2015, 32(10): 614-617.

[12] 曾金祥, 毕莹, 许兵兵, 等. 车前子提取物部位群抗痛风的作用 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(8): 132-135.

[13] 徐立, 时乐. 小鼠代谢性高尿酸血症模型的复制方法初探 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(1): 1-4.

[14] 施琬, 黄惠珠, 李钟, 等. 建立高尿酸血症动物模型实验研究 [J]. 新中医, 2015, 47(6): 273-276.

[15] Han B, Zhu CX, Shi W, et al. Effect of *Rhizoma Polygoni Cuspidati* and *Ramulus Cinnamomi* compatibility on uric acid metabolism and urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury molecule-1 in rats with hyperuricemia [J]. Chin J Integr Med, 2017, 23(7): 535-542.

[16] 黄敬群, 朱妙章, 王四旺. 染料木素、芹菜素、槲皮素、芦丁和落新妇苷对高尿酸血症小鼠黄嘌呤氧化酶活性及血清尿酸水平的影响 [J]. 中国药理学通报, 2011, 27(4): 561-565.

[17] Louthrenoo W, Hongsongkiat S, Kasitanon N, et al. Effect of antituberculous drugs on serum uric acid and urine uric acid excretion [J]. J Clin Rheumatol, 2015, 21(7): 346-348.

[18] Claramunt D, Gil-Peña H, Fuente R, et al. Chronic kidney disease induced by adenine: a suitable model of growth retardation in uremia [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2015, 309(1): F57-F62.

[19] 孟彦, 张豪, 贺宁, 等. 腺嘌呤诱导慢性肾脏病大鼠模型的骨与矿物质代谢异常 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(1): 8-15.

〔**收稿日期**〕2018-03-30

研究报告

基于肝门静脉注射肿瘤细胞的新型进展期肝脏肿瘤动物模型的建立

柴燕涛,姜棋予,冯　帆,孙慧伟,李晓娟,杨锐创,王志杰,
李瑞生*,侯　俊*

(解放军第三〇二医院临床研究管理中心,北京　100039)

【摘要】　目的　利用肝门静脉注射肿瘤细胞的方法,建立新型进展期肝脏肿瘤(肝细胞癌、结直肠癌肝转移、乳腺癌肝转移以及非小细胞肺癌肝转移)的动物模型。**方法**　培养获得人肝细胞癌 MHCC97-H、人结直肠癌 SW480、人非小细胞肺癌 A549 以及人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 等细胞系,将这些恶性肿瘤细胞经由 BALB/c 裸小鼠肝门静脉注入肝脏,经 3 ~ 4 周生长后进行 PET/CT 检测:尾静脉注射约 200 μCi 核素探针^{18}F-FDG,30 ~ 40 min 后对 BALB/c 裸小鼠进行 PET/CT 检测。在此基础上,收集动物获取肝脏进行拍照,确定 BALB/c 裸小鼠肝脏上的肿瘤病灶。**结果**　MHCC97-H、SW480、A549 以及 MDA-MB-231 等细胞均能够在 BALB/c 裸小鼠肝脏形成多发、弥散的肿瘤病灶。肿瘤细胞在裸小鼠肝脏原位的生长可以使用 PET/CT 检测。SW480、MDA-MB-231 以及 A549 细胞形成的病灶,其 PET/CT 检测信号弱于 MHCC97-H 细胞。**结论**　成功获得了新型进展期肝脏肿瘤动物模型,为进展期肝脏肿瘤相关药物筛选奠定了坚实基础。

【关键词】　进展期肝脏肿瘤;动物模型;结直肠癌肝转移;非小细胞肺癌肝转移;乳腺癌肝转移;BALB/c 裸小鼠

【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 09-0055-06

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.009

Constructing an intrahepatic model of advanced liver cancer by injecting cancer cells through the hepatic portal vein

CHAI Yantao, JIANG Qiyu, FENG Fan, SUN Huiwei, LI Xiaojuan, YANG Ruichuang, WANG Zhijie,
LI Ruisheng*, HOU Jun*

(Research Center for Clinical and Translational Medicine, 302 Military Hospital of China, Beijing 100039, China)

【Abstract】　Objective　To construct an intrahepatic model of advanced liver cancer (hepatocellular carcinoma, colorectal cancer liver metastasis, breast cancer liver metastasis, non-small cell lung cancer liver metastasis) by injecting cancer cells through the hepatic portal vein. **Methods**　MHCC97-H, a highly aggressive cell line of hepatocellular carcinoma; SW480, a metastatic colorectal cancer cell line; MDA-MB-231, a human triple-negative breast cancer cell line; or A549, a non-small cell lung cancer cell line, was cultured and seeded into the liver of BALB/c nude mice by injecting cancer cells through the hepatic portal vein. After 3 – 4 weeks of growth, mice were analyzed by PET/CT

[作者简介]柴燕涛(1987—　),女,学士,技师,研究方向:肿瘤动物模型。E-mail: chaiyantao434@163.com
[通信作者]侯俊(1973—　),女,博士,副主任技师,硕士生导师,研究方向:分子肿瘤学与抗肿瘤药物研究。E-mail: houj302@163.com
李瑞生(1969—　),男,博士,副研究员,主要从事人类疾病动物模型研究。E-mail: lrsheng@sohu.com　*共同通信作者

screening. Mice were injected with approximately 200 μCi nuclide probe ^{18}F-FDG through the tail vein. The BALB/c nude mice were analyzed by PET/CT screening after 30 – 40 min. The mice were then collected, and their livers were obtained and photographed to determine the presence of tumor nodules on the liver of BALB/c nude mice. **Results** MHCC97-H, A549, SW480, or MDA-MB-231 cells grew and multiple diffuse tumor nodules formed in the nude mouse livers. Nodules in the nude mouse livers formed by cancer cells could be identified by PET/CT screening; the PET/CT intensity of nodules formed after A549, SW480, or MDA-MB-231 cell injection was weaker than that of MHCC97-H cells. **Conclusions** An intrahepatic tumor animal model of advanced liver cancer has been successfully constructed by injecting cancer cells through the hepatic portal vein. This is a promising model for research on liver cancer or antitumor drugs.

【**Keywords**】 advanced liver cancer; animal model; colorectal cancer liver metastasis; non-small cell lung cancer metastasis; breast cancer liver metastasis; BALB/c nude mouse

肝脏肿瘤(liver cancer)主要分为原发性肝脏肿瘤和转移性肝脏肿瘤[1-2],其中原发性肝脏肿瘤主要是来源于肝细胞的肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)[3-4];而转移性肝脏肿瘤则是其他脏器来源的肿瘤细胞经由胆道、血道或淋巴道迁移至肝脏内部行成的肿瘤组织,具体包括肝内胆管细胞癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, IHC)[5]、结直肠癌肝转移(colorectal cancer liver metastases)[6]、肺癌肝转移(liver metastases of lung cancer)[7]以及乳腺癌肝转移(breast cancer liver metastases)[8]等。由于目前临床诊疗技术的限制,大多数肝脏肿瘤患者初诊即为进展期,其主要特征是肿瘤多发或弥散的肿瘤病灶[9-10]。现有的肝脏肿瘤抗肿瘤药物的研究模型主要是裸鼠皮下成瘤(subcutaneous tumor),但存在不足之处,难以直观反映与模拟进展期肝脏肿瘤的特性[11-12]。因此迫切需要新的和有效的动物模型以更好地模拟与反映出进展期肝脏肿瘤的特点。本研究通过肝门静脉注射人肝细胞癌 MHCC97-H、人结直肠癌 SW480、人非小细胞肺癌 A549 以及人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 等细胞,在免疫缺陷小鼠肝脏原位形成了多发与弥散肿瘤病灶,成功获得了进展期肝细胞癌、结直肠癌肝转移、乳腺癌肝转移以及非小细胞肺癌肝转移的动物模型,为进展期肝脏肿瘤抗肿瘤药物研究奠定了坚实基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞系

MHCC97-H(高侵袭性的人 HCC 细胞系)[13-14]、SW480(结直肠癌细胞系)[15]、A549(非小细胞肺癌细胞系)[16]以及 MDA-MB-231(高侵袭性三阴性乳腺癌细胞)[17]等为本实验室保存。

1.1.2 实验动物

选取 SPF 级 BALB/c 裸小鼠 25 只,雌性,4 ~ 5 周龄,体重 18 ~ 20 g(误差不得大于 10%),购于北京斯贝福生物技术有限公司[SCXK (京) 2016 - 0002]。其中 16 只用于 MHCC97-H 细胞接种实验:分为四个不同浓度组:A:5 × 10^5 个细胞/只、B:1 × 10^5 个细胞/只、C:5 × 10^4 个细胞/只以及 D:1 × 10^4 个细胞/只,每组 4 只,每只动物注射细胞悬液的体积为 500 ~ 600 μL;其余 9 只分为三组,用于 MDA-MB0231、SW480 和 A549 细胞接种实验,浓度选择 5 × 10^5 个细胞/只,每组 3 只,每只动物注射细胞悬液的体积为 500 ~ 600 μL。饲养及无菌手术在解放军第三〇二医院临床研究管理中心实验动物中心屏障动物实验设施中进行[SYXK (军) 2017 - 0010]。饲养室温度 22℃ ~ 23℃,环境湿度 50%,自由进食和饮水,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。本实验通过医院伦理委员会审查(项目伦理审查批准号:IACUC-2017-005)。

1.2 主要试剂与仪器

细胞实验的 DMEM 培养基、胎牛血清以及胰蛋白酶等购买自美国 Hyclone 公司;异氟烷(isoflurane)购买自深圳瑞沃德公司;小动物 PET/CT 实验使用的核素探针 ^{18}F-FDG 等为北京大学肿瘤医院核医学科提供。细胞培养瓶为美国 Corning 公司产品;细胞培养用恒温培养箱、相差倒置显微镜等由本实验室提供;全套解剖用手术器械由本实验室保存;吸入式小动物麻醉剂机、盖革计数器和 PET/CT 系统由北京大学肿瘤医院科医学科提供。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养实验

MHCC97-H、SW480、MDA-MB-231 以及 A549 等细胞使用添加 10% FBS 的 DMEM,37℃,5% CO_2

条件培养。待细胞状态良好,使用胰蛋白酶消化细胞后,对细胞悬液进行计数,备用。

1.3.2　门静脉注射肿瘤细胞实验

BALB/c 裸小鼠使用异氟烷吸入麻醉。在超净台中进行实验,小动物手术,术式为开放性手术。小鼠胸骨下缘正中处,开一个 1.5 cm 的开口。将肝叶轻轻挤出,剥离得到肝门静脉,使用注射器将不同数量的不同细胞经由肝门静脉注射入小鼠肝脏中,在这一过程中,将细胞重悬于较大体积(500 ~ 600 μL)的生理盐水中,缓慢推注入肝门静脉。手术过程中,主要进行钝性分离以严格避免小鼠出血;严密观察小鼠心率等生理状况。

1.3.3　小动物 PET/CT 检测

BALB/c 裸小鼠经由尾静脉注射约 200 μCi 核素探针^{18}F-FDG,30 ~ 40 min 后对 BALB/c 裸小鼠进行 PET/CT 检测,按照^{18}F-FDG 核素扫描模式,进行 12 min 扫描采像[18-19]。在此基础上,收集动物获得肝脏组织,利用盖革计数器确定动物肝脏于血液的核素强度,同时收集动物肝脏组织拍照。

1.4　统计学方法

结果显示为平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$),使用 SPSS 17.0 软件,采用单因素方差分析比较方法计算 P 值。

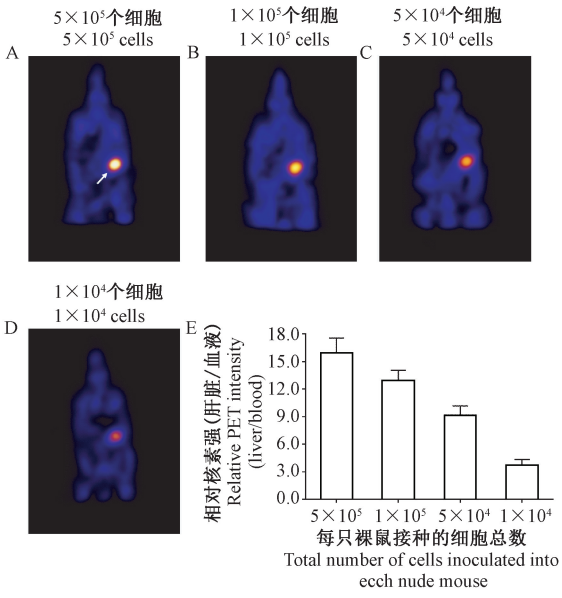
2　结果

2.1　肝细胞癌在裸鼠肝脏形成多发与弥散的病灶

结果显示:将不同浓度(A:5 × 10^5 个细胞、B:1 × 10^5 个细胞、C:5 × 10^4 个细胞以及 D:1 × 10^4 个细胞)人肝细胞癌细胞系 MHCC97-H 经由肝门静脉注射接种入裸鼠肝脏,经过 4 ~ 6 周生长后,使用 PET/CT 进行活体成像能够检测小鼠肝脏部位有明确的核素信号。核素强度、信号与细胞接种量有量效关系(见图 1)。在此基础上,对动物进行解剖,剥离肝脏可见其表面已形成明确的多发、弥散肿瘤病灶,病灶形成的数量或肝脏病变的程度与肝脏接种 MHCC97-H 细胞的数量具有量效关系(见图 2)。这表明,经由肝门静脉接种 MHCC97-H 细胞能够在裸鼠肝脏形成多发与弥散的肿瘤病灶;肿瘤细胞在肝脏的生长过程中,可以使用 PET/CT 活体成像进行追踪与判别。

2.2　MDA-MB-231、A549 以及 SW480 以及细胞癌在裸鼠肝脏形成多发与弥散的病灶

结果显示:在裸鼠肝脏中经由肝门静脉注射 5 × 10^5 个高侵袭性的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞、非小细胞肺癌 A549 细胞或转移性结直肠癌 SW480 细胞系,经 4 ~ 6 周生长后进行 PET/CT 检测,能够发现小鼠肝脏部位有明确的核素信号(见图 3)。在此基础上,对动物进行解剖,剥取肝脏可见其表面有明确的多发、弥散肿瘤病灶(见图 4)。这表明,经由肝门静脉接种 A549、MDA-MB-231 以及 SW480 细胞,细胞能够在裸鼠肝脏形成多发与弥散的肿瘤病灶;肿瘤细胞在肝脏的生长过程中,可以使用 PET/CT 活体成像进行追踪与判别。



注:A ~ D:分别为经门静脉注入肝脏不同浓度 MHCC97-H 细胞后检测到明确的核素信号(A:5 × 10^5 个细胞,B:1 × 10^5 个细胞,C:5 × 10^4 个细胞,D:1 × 10^4 个细胞),白色箭头所示为动物肝脏部位的核素信号与病变情况;E:盖革计数器对核素信号进行定量展示。

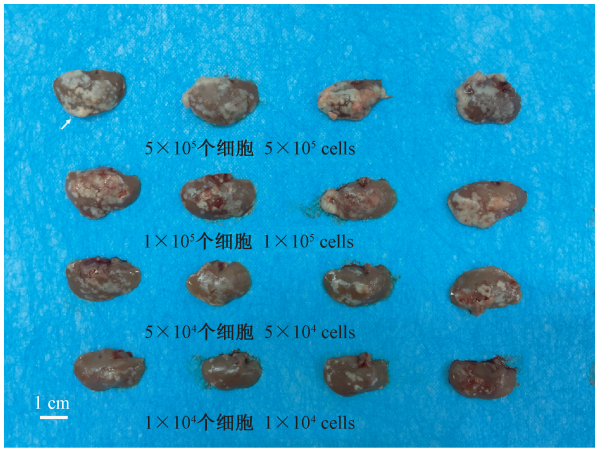
图 1　裸鼠肝脏接种 MHCC97-H 细胞后 PET/CT 检测

Note. A – D: Clear nuclide signals detected after injecting different concentrations of MHCC97-H cells into the liver via the portal vein (A: 5 × 10^5 cells; B: 1 × 10^5 cells; C: 5 × 10^4 cells; D: 1 × 10^4 cells). White arrow indicates the PET intensity of mouse liver. E: Quantitative display of the nuclide signal from a Geiger counter.

Figure 1　Identification of intrahepatic growth of MHCC97-H cells via PET/CT screening in nude mouse liver

3　讨论

目前,受限于临床诊疗技术,大多数肝脏肿瘤患者初诊即为进展期,失去外科手术或肝移植等根治性治疗的机会[20]。进展期肝脏肿瘤的主要特征是肿瘤细胞形成多发或弥散的肿瘤病灶,并可能伴随有血管侵犯等[9-10]。药物治疗在进展期肝脏肿瘤综合治疗中具有重要意义,但现有的肝脏肿瘤抗肿瘤药物的研究模型不足,难以直观反映与模拟进

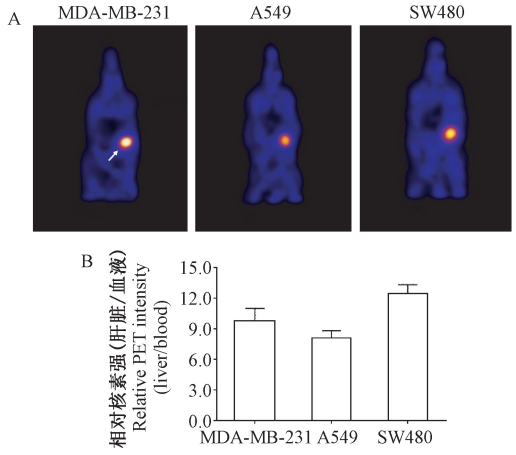


注:第一排:5 × 10^5 个细胞;第二排:1 × 10^5 个细胞;第三排:5 × 10^4 个细胞;第四排:1 × 10^4 个细胞。白色箭头指示动物肝脏部位多发与弥散的肿瘤病灶。

图 2 MHCC97-H 细胞在裸鼠肝脏形成多发与弥散的肿瘤病灶

Note. The first row: 5 × 10^5 cells; the second row: 1 × 10^5 cells; the third row: 5 × 10^4 cells; the fourth row: 1 × 10^4 cells. White arrow indicates multiple and diffuse nodules in nude mouse liver formed by the intrahepatic growth of MHCC97-H cells.

Figure 2 Multiple and diffuse nodules in nude mouse liver formed by the intrahepatic growth of MHCC97-H cells



注:A:从左向右分别为经门静脉注入肝脏 MDA-MB-231、A549、SW480 细胞后检测到明确的核素信号(5 × 10^5 个细胞),白色箭头指示动物肝脏部位的核素信号与病变情况;B:盖革计数器对核素信号进行定量展示。

图 3 裸鼠肝脏接种 MDA-MB-231、A549 以及 SW480 细胞后 PET/CT 检测

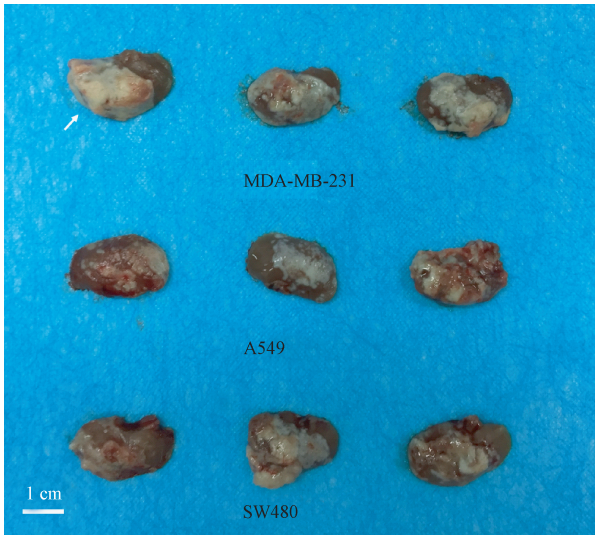
Note. A: From left to right, the clear nuclide signals detected after injecting MDA-MB-231, A549, and SW480 cells into the liver through the portal vein (5 × 10^5 cells). White arrow indicates the PET intensity of mouse liver. B: Quantitative display of the nuclide signal from a Geiger counter.

Figure 3 Identification of intrahepatic growth of MDA-MB-231, A549, or SW480 cells via PET/CT screening in nude mouse liver

展期肝脏肿瘤的特性。这体现在:①裸鼠皮下成瘤实验虽然是体内实验模型,但其与肝脏原位的肿瘤病灶有较大差别;②在肝脏接种组织微块或定点注射肿瘤细胞仅能够形成单一病灶,难以形成多发和弥散的肿瘤病灶;③现有常用的肿瘤转移或侵袭模型,主要是通过尾静脉注射肿瘤细胞悬液,以此在裸鼠中接种肿瘤细胞,但此时细胞迅速经由尾静脉 – 下腔静脉回心,进而通过肺动脉主要分布于肺部。为解决这些问题,本研究利用肝门静脉注射的方法,将肿瘤细胞经由肝门静脉接种于裸鼠肝脏,最终在肝脏形成多发与弥散的肿瘤病灶。这不仅实现了利用高侵袭性的 MHCC97-H 细胞形成多发与弥散的肿瘤病灶以模拟进展期肝细胞癌,也通过 SW480、A549 与 MDA-MB-231 细胞实现了结直肠癌、非小细胞肺癌与乳腺癌肝转移。

尾静脉注射肿瘤细胞后,细胞经由下腔静脉回心进而留驻于肺脏的组织间隙。与之类似的,经由肝门静脉将肿瘤细胞注射进入肝脏,肿瘤细胞也能够留驻在肝脏组织间隙。受到毛细血管分布、血流等因素的影响,加之小鼠肝脏较薄,肿瘤细胞主要是在小鼠肝脏的表面或浅表部位形成多发与弥散的肿瘤组织。此外,肝脏血流充沛,有肝门静脉与肝动脉双重供血,与肺脏相比肿瘤细胞不易形成肝脏组织局部栓塞,因此尤其适合于肿瘤细胞的生长与形成病灶。在手术中,本课题组对全套手术器械进行高压灭菌,全程在超净工作台中进行手术操作,能够有效避免感染;同时在消化细胞时(收集与获得培养的肿瘤细胞)尽可能充分消化细胞以避免细胞团块的存在带来栓塞的风险;利用较大体积的生理盐水重悬细胞后,缓慢推注进入肝门静脉,同时不断观察小鼠心率变化;在手术后,将小鼠分笼饲养以避免缝合后的创口的抓伤或撕咬。这些措施可使得动物存活率与造模成功率维持在较高水平。

小动物 PET 是前沿与先进的活体成像、分子影像技术,能够通过检测肿瘤组织、细胞对 ^{18}F 核素取代葡萄糖分子探针(^{18}F-FDG)的摄取,对裸鼠肝脏肿瘤组织进行活体成像[21]。恶性肿瘤细胞具有旺盛的增殖能力,其对葡萄糖的摄取远强于正常组织或器官。在此基础上,肝脏是人体物质与能量代谢的中心器官,来源于肝细胞的肝细胞癌具有比其他恶性肿瘤或正常组织器官更为强烈的对葡萄糖的摄取作用,这使得采用 PET 扫描能够特异性与有效



注：第一排：MDA-MB-231 细胞；第二排：A549 细胞；第三排：SW480 细胞。白色箭头指示动物肝脏部位多发与弥散的肿瘤病灶。

图 4　MDA-MB-231、A549 以及 SW480 细胞在裸鼠肝脏形成多发与弥散的肿瘤病灶

Note. The first row: MDA-MB-231 cells; the second row: A549 cells; the third row: SW480 cells. White arrow indicates the multiple diffuse nodules in nude mouse liver formed by the intrahepatic growth of MDA-MB-231, A549, or SW480 cells.

Figure 4　Multiple diffuse nodules in nude mouse liver formed by the intrahepatic growth of MDA-MB-231, A549, or SW480 cells

地识别和确证肿瘤组织。在实验中，本课题组在肝门静脉注射肿瘤细胞后能够利用小动物 PET 实现对裸鼠的活体成像，对细胞在肝脏中的生长进行无创与活体检测。裸鼠经过 PET 活体成像后收集动物肝脏发现，MHCC97-H 细胞能够在裸鼠肝脏形成多发与弥散的的病灶（nodules），为利用动物模型模拟进展期肝细胞癌以及相关抗肿瘤、抗肿瘤药物研究奠定了坚实基础。

除 MHCC97-H 细胞外，本课题组还通过肝门静脉注射人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231、人非小细胞肺癌 A549 以及人结直肠癌 SW480 细胞，也在免疫缺陷小鼠肝脏原位形成了多发与弥散肿瘤病灶。肝脏是恶性肿瘤细胞转移与侵袭的重要器官，包括乳腺癌、结直肠癌以及肺癌等都能够肝转移[22-24]。在研究中，A549 是非小细胞肺癌中腺癌亚型的细胞系，代表了肺癌最为主要的病理类型；SW480 细胞是一种结直肠癌转移病灶来源的细胞系，是研究结直肠癌转移的理想模型；MDA-MB-231 细胞是三阴性乳腺癌细胞系，具有强烈的转移与侵袭能力。MDA-MB-231、A549 以及 SW480 细胞都能够在裸鼠肝脏形成多发与弥散的肿瘤病灶。在实验中对上述动物模型进行活体成像，接种 MDA-MB-231、A549 以及 SW480 细胞的裸鼠，其肝脏部位能够为 ^{18}F-FDG 核素探针所识别。这表明，本研究不仅建立了结直肠癌、乳腺癌与非小细胞肺癌的肝转移动物模型，也能够利用小动物 PET 等分子影像技术进行活体成像，动态跟踪肿瘤细胞在裸鼠肝脏的生长。

参考文献：

[1] Das M. Individualised adaptive radiotherapy in liver cancer [J]. Lancet Oncol, 2017, 18(9): e520.

[2] Reiss KA, Yu S, Mamtani R, et al. Starting dose of sorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma: a retrospective, multi-institutional study [J]. J Clin Oncol, 2017, 35(31): 3575-3581.

[3] Jia H, Yang Q, Wang T, et al. Rhamnetin induces sensitization of hepatocellular carcinoma cells to a small molecular kinase inhibitor or chemotherapeutic agents [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1860(7): 1417-1430.

[4] Rajyaguru DJ, Borgert AJ, Smith AL, et al. Radiofrequency ablation versus stereotactic body radiotherapy for localized hepatocellular carcinoma in nonsurgically managed patients: analysis of the National Cancer Database [J]. J Clin Oncol, 2018, 36(6): 600-608.

[5] Zhang Z, Li FF, Lu MD, et al. Anti-NY-ESO-1 autoantibody may be a tumor marker for intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(61): 103283-103289.

[6] Sabbagh C, Chatelain D, Attencourt C, et al. Impact of homogeneous pathologic response to preoperative chemotherapy in patients with multiple colorectal liver metastases [J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(45): 8027-8034.

[7] Zhou X, Zhou R, Zhou H, et al. ETS-1 induces endothelial-like differentiation and promotes metastasis in non-small cell lung cancer [J]. Cell Physiol Biochem, 45(5): 1827-1839.

[8] Chen X, Zheng Z, Chen L, et al. MAPK, NFκB, and VEGF signaling pathways regulate breast cancer liver metastasis [J]. Oncotarget, 2017, 8(60): 101452-101460.

[9] Xie H, Yu H, Tian S, et al. What is the best combination treatment with transarterial chemoembolization of unresectable hepatocellular carcinoma? A systematic review and network meta-analysis [J]. Oncotarget, 2017, 8(59): 100508-100523.

[10] Dong J, Zhai B, Sun W, et al. Activation of phosphatidylinositol 3-kinase/AKT/snail signaling pathway contributes to epithelial-mesenchymal transition-induced multi-drug resistance to sorafenib in hepatocellular carcinoma cells [J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0185088.

[11] Kraśko JA, Žilionytė K, Darinskas A, et al. Post-operative unadjuvanted therapeutic xenovaccination with chicken whole embryo vaccine suppresses distant micrometastases and prolongs

survival in a murine Lewis lung carcinoma model [J]. Oncol Lett, 2018, 15(4): 5098 - 5104.

[12] Wu JY, Wang ZX, Zhang G, et al. Targeted co-delivery of Beclin 1 siRNA and FTY720 to hepatocellular carcinoma by calcium phosphate nanoparticles for enhanced anticancer efficacy [J]. Int J Nanomedicine, 2018, 13: 1265 - 1280.

[13] Chen Y, Feng F, Gao X, et al. MiRNA153 reduces effects of chemotherapeutic agents or small molecular kinase inhibitor in HCC cells [J]. Curr Cancer Drug Targets, 2015, 15(3): 176 - 187.

[14] Xie H, Yu H, Tian S, et al. MEIS-1 level in unresectable hepatocellular carcinoma can predict the post-treatment outcomes of radiofrequency ablation [J]. Oncotarget, 2018, 9(20): 15252 - 15265.

[15] Zhu M, Li M, Zhang F, et al. FBI-1 enhances ETS-1 signaling activity and promotes proliferation of human colorectal carcinoma cells [J]. PLoS One, 2014, 9(5): e98041.

[16] Ma D, Jia H, Qin M, et al. MiR-122 induces radiosensitization in non-small cell lung cancer cell line [J]. Int J Mol Sci, 2015, 16(9): 22137 - 22150.

[17] Yang Q, Feng F, Zhang F, et al. LINE-1 ORF-1p functions as a novel HGF/ETS-1 signaling pathway co-activator and promotes the growth of MDA-MB-231 cell [J]. Cell Signal, 2013, 25(12): 2652 - 2660.

[18] Feng F, Jiang Q, Cao S, et al. Pregnane X receptor mediates sorafenib resistance in advanced hepatocellular carcinoma [J]. Biochim Biophys Acta, 2018, 1862(4): 1017 - 1030.

[19] Xu X, Fan Z, Liang C, et al. A signature motif in LIM proteins mediates binding to checkpoint proteins and increases tumour radiosensitivity [J]. Nat Commun, 2017, 8: 14059.

[20] Wang C, Wang H, Yang W, et al. Multicenter randomized controlled trial of percutaneous cryoablation versus radiofrequency ablation in hepatocellular carcinoma [J]. Hepatology, 61(5): 1579 - 1590.

[21] Gallamini A, Tarella C, Viviani S, et al. Early chemotherapy intensification with escalated BEACOPP in patients with advanced-stage Hodgkin lymphoma with a positive interim positron emission tomography/computed tomography scan after two ABVD cycles: long-term results of the GITIL/FIL HD 0607 trial [J]. J Clin Oncol, 2018, 36(5): 454 - 462.

[22] 李日飞, 袁娜, 冶冬阳, 等. 乳腺癌实验动物模型的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 113 - 118.

[23] 罗桂芳, 张娟娟, 邓青, 等. 小鼠循环肝癌细胞模型的建立与评价 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(3): 301 - 305, 315.

[24] 陈愉生, 陈正伟, 俞梅娥, 等. 肺腺癌脑转移动物模型的生物发光成像和 SPECT/CT 的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 36 - 42.

〔收稿日期〕2018 - 03 - 31

快 讯

Animal Models and Experimental Medicine 被国际数据库 DOAJ 收录

2018 年 7 月 26 日，Animal Models and Experimental Medicine——AMEM 正式被国际著名开放存取期刊目录数据库 DOAJ(Directory of Open Access Journals)收录，这意味着 AMEM 的期刊质量以及开放获取的出版政策得到了认可。AMEM 被 DOAJ 数据库收录，标志着 AMEM 向国际化又迈出了重要的一步，不仅可以扩大期刊传播范围，而且有助于提升国际学术影响力、增加期刊网络可见度。

DOAJ 由瑞典的隆德大学图书馆(Lund University Libraries)于 2003 年 5 月创建，是与 PubMed、SCI、Scopus 和 EI 齐名的世界五大文献检索系统之一，其目的是尽可能广泛地涵盖所有经过质量控制的 OA 期刊，提升开放存取期刊的可见度和易用性，从而提高期刊的使用率和影响力，属于目前最好的的 OA 期刊目录网站。该数据库收录的均为学术性、研究性期刊，具有免费、全文、高质量的特点，对学术研究具有很高的参考价值。

AMEM 围绕实验动物科学基础和应用研究，聚焦实验动物物种资源、人类疾病动物模型资源、比较医学资源等，展示实验动物科学及实验医学的最新学术、理论、技术、应用成果，以及实验动物在生命科学、医学、生物学、药学、兽医学等交叉学科中的实验研究，拓展实验动物相关设备材料的研发、实验动物管理与法律标准、实验动物福利伦理等新思路，是一本注重学科交叉、注重成果转化、引领实验动物科学及实验医学发展的英文专业期刊。

AMEM 采用 ScholarOne 在线稿件处理系统、同行评审机制(Single-Blind Peer Review)，作者可随时随地投递并查看文章动态。此外，目前期刊不收取任何形式的版面费、稿件投递和处理费用。

欢迎业界专家、学者踊跃投稿！

研究报告

沉默 Blimp-1 促进 IFN-γ 表达抑制肝癌细胞的作用研究

邓　浩,彭启旺,李　伟

(武汉市红十字会医院普通外科,武汉　430021)

【摘要】 **目的**　探究 B 淋巴细胞诱导成熟蛋白-1(B-lymphocyte-induced maturation protein-1,Blimp-1)与肝癌细胞 SMMC-7721 增殖、凋亡、侵袭的关系以及作用机制。**方法**　实验分为对照组、shRNA-NC 组、shRNA-Blimp1 组;沉默肝癌细胞中 Blimp-1 基因的表达,实时荧光定量 PCR(RT-PCR)和蛋白质印迹法(Western blot)检测 Blimp-1 mRNA 和蛋白表达,CCK-8 法观察细胞的增殖,流式细胞仪检测细胞的凋亡,Transwell 法观察细胞的侵袭能力,酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 γ-干扰素(IFN-γ)、白细胞介素-2(IL-2)的蛋白水平。**结果**　与对照组相比,shRNA-Blimp1 组细胞中 Blimp-1 mRNA 和蛋白的表达量均显著降低($P < 0.05$)。沉默 Blimp-1 表达显著抑制 SMMC-7721 细胞增殖($P < 0.05$),促进其凋亡($P < 0.05$),显著降低细胞的侵袭能力($P < 0.05$),显著上调 IFN-γ 蛋白水平($P < 0.05$),但对 IL-2 蛋白水平无明显影响。**结论**　沉默 Blimp-1 可促进 IFN-γ 蛋白表达,从而抑制肝癌细胞增殖、侵袭及促进凋亡。

【关键词】 Blimp-1;IFN-γ;肝癌;增殖
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 09-0061-05
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.010

Silencing Blimp-1 inhibits hepatoma cells by promoting IFN-γ expression

Deng Hao, Peng Qiwang, Li Wei
(Department of General Surgery, Wuhan Red Cross Hospital, Wuhan 430021, China)

【**Abstract**】 **Objective**　To investigate the relationship between B-lymphocyte-induced maturation protein-1 (Blimp-1) and the proliferation, apoptosis, and invasion of the hepatocellular carcinoma cell line SMMC-7721. **Methods** The experiment included a control group, shRNA-NC group, and shRNA-Blimp1 group. The expression of the Blimp-1 gene was silenced in hepatocellular carcinoma cells. Real-time quantitative PCR (RT-PCR) and Western blotting were used to detect Blimp-1 mRNA and protein expression. Proliferation and apoptosis were measured by the CCK-8 method and flow cytometry. The Transwell method was used to observe the invasion ability of cells. The protein levels of IFN-γ and IL-2 were analyzed by ELISA. **Results**　Compared with the levels in the control group, the expression of Blimp-1 mRNA and protein in the shRNA-Blimp1 group was significantly decreased ($P < 0.05$). Silencing Blimp-1 had significant effects on inhibiting SMMC-7721 cell proliferation ($P < 0.05$), promoting cell apoptosis ($P < 0.05$), significantly reducing the invasive ability of cells ($P < 0.05$), and significantly increasing the level of IFN-γ protein ($P < 0.05$), but had no significant effect on IL-2 protein level. **Conclusions**　Silencing Blimp-1 can promote the expression of IFN-γ protein and inhibit the proliferation, invasion, and apoptosis of hepatoma cells.

【**Keywords**】 Blimp-1; IFN-γ; liver cancer; proliferation

[作者简介]邓浩(1973—　),男,学士学位,普通外科,副主任医师。E-mail: cdm197001@163.com

肝癌是严重威胁人类健康的常见肿瘤,发病率逐年上升[1-3]。肝癌具有初期症状不明显、潜伏期长的特点,多数患者确诊时已是晚期,病情发展迅速,而且预后较差。目前,肝癌的主要治疗方式是手术、肝移植、化疗、分子靶向治疗等,但治疗效果均不理想,预后复发和转移是导致患者死亡率居高不下的主要原因。近年来,通过免疫治疗的方式逐渐应用于临床,其可通过刺激机体免疫系统靶向识别并特异性杀伤肝癌细胞,但对机体自身成分不具有危害性,而且可以产生免疫记忆细胞,防止复发,因此免疫治疗成为肝癌临床治疗的研究热点和重点[4-5]。B 淋巴细胞诱导成熟蛋白-1(B-lymphocyte-induced maturation protein-1, Blimp-1),又称为 PR 结构域蛋白 1(positive regulatory domain zinc finger protein 1, PRDM1),在 B 细胞分化过程中发挥关键作用,其表达量增加可促进细胞产生大量免疫因子,从而调控机体的免疫状态[6-7]。近年来的研究表明,Blimp-1 在肿瘤组织的表达量异常,参与肿瘤的发生、发展过程[8-9]。因此本实验通过研究 Blimp-1 在肝癌细胞中的作用以及作用机制,为肝癌的临床治疗提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

肝癌 SMMC-7721 细胞系由本实验室传代、保存,最初购自中科院上海细胞库。

1.2 主要试剂与仪器

RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司;实时荧光定量 PCR(RT-PCR)试剂盒购自瑞士 Roche 公司;TRIzol 试剂购自美国 Invitrogen 公司;CCK-8 试剂盒、膜联蛋白 V-FITC(annexin V-FITC)/碘化丙啶(propidium iodide, PI)细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Sigma 公司;Blimp-1 单克隆抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)单克隆抗体购自美国 Cellular Signaling Technology 公司;γ-干扰素(interferon-γ, IFN-γ)、白细胞介素-2(interleukin-2, IL-2)酶联免疫吸附测定法(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)检测试剂盒购自上海森雄生物有限公司;shRNA-NC、shRNA-Blimp1、空载体慢病毒由上海吉玛生物公司合成。酶标仪购自美国赛默飞世尔公司;荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司;流式细胞仪购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的培养和转染

肝癌 SMMC-7721 细胞置于 37℃、5% CO_2 细胞培养箱,加入 RPMI 1640 培养基(含 1% 双抗和 10% 胎牛血清),倒置显微镜中观察细胞生长状况,隔天更换一次培养基,对数期细胞用于后续实验。细胞转染前一天,更换培养液,以每孔 4×10^5 个细胞接种于 96 孔板中。将细胞分为对照组、shRNA-NC 组、shRNA-Blimp1(5'-GATCTGACCCGAATCAATG-3')组,对照组为正常培养的细胞,shRNA-NC 组和 shRNA-Blimp1 组细胞分别转染携带无义序列和 Blimp-1 序列病毒(10 μL 1×10^{11} TU/L),置于细胞培养箱中培养 48 h。

1.3.2 实时荧光定量 PCR 检测细胞中 Blimp-1 mRNA 的表达量

TRIzol 法提取各组细胞中总 RNA,采用反转录酶合成 cDNA。根据 Genebank 中 Blimp-1 mRNA 的序列,使用 Primer 5.0 软件设计引物,由上海生工合成,引物序列为:Blimp-1 上游序列为 5'-TGGACATGGAGGATGCGGATATG-3',下游序列为 5'-AGGTCCTTTCCTTTGGAGGAGTTG-3';GAPDH 上游序列为 5'-GGGCGCCTGGTCACCAGGGCTG-3',下游序列为 5'-GGGGCCATCCACAGTCTTCTG-3'。反应条件为 95℃ 5 min;95℃ 30 s,59℃ 30 s,72℃ 1 min,35 个循环;72℃ 5 min。实验重复 3 次,每组设置 5 个复孔,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算基因相对转录水平。

1.3.3 蛋白质印迹法(Western blot)检测细胞中 Blimp-1 蛋白的表达量

收集各组细胞,BCA 法定量、稀释,100℃ 煮沸变性,吸取 50 μg 蛋白样品进行聚丙烯酰胺凝胶电泳后,将蛋白质转移至 PVDF 膜中,封闭液封闭 1 h,分别加入一抗稀释液,清洗,加入二抗孵育 2 h,ECL 显色,曝光,显影,与 GAPDH 灰度值的比值即为目的蛋白的相对量。

1.3.4 CCK-8 检测细胞的增殖

以每孔 4×10^4 个细胞接种于 96 孔板中,加入培养基至 100 μL,放入 37℃、5% CO_2 细胞培养箱培养 46 h,每孔加入 5 μL CCK-8 溶液,振荡混匀,37℃孵育 2 h,酶标仪检测波长 450 nm 下细胞的吸光值(OD 值)。

1.3.5 流式细胞仪检测细胞的凋亡

收集各组 1×10^6 个细胞,采用 annexin V-

FITC/PI 双染法细胞凋亡检测试剂盒，根据其说明书的指示进行下操作，置于流式细胞仪中计算细胞的凋亡率。实验重复 3 次，每组设置 5 个复孔。

1.3.6　Transwell 法检测细胞的侵袭能力

将已融化的 Matrigel 胶加入 Transwell 上室，37℃培养箱中干燥。收集各组细胞，调整为 1×10^6/mL，下室加入 600 μL 完全培养基，37℃培养 24 h；PBS 液清洗上室，擦去剩余细胞，酒精固定 20 min，染色，100 倍显微镜计数，取 5 个视野的平均值，实验重复 3 次。

1.3.7　ELISA 检测细胞培养液上清中 IFN-γ、IL-2 的表达量

收集各组培养 72 h 的细胞上清液，采用 IFN-γ、IL-2 ELISA 检测试剂盒检测 IFN-γ、IL-2 的水平。

1.4　统计学方法

SPSS 22.0 软件进行统计处理，结果以平均数 ± 标准差表示（$\bar{x} \pm s$），多组数据间的比较采用单因素方差分析，组间两两比较使用 SNK-q 检验，$P < 0.05$ 认为差异有显著性。

2　结果

2.1　各组细胞中 Blimp-1 的表达量

SMMC-7721 细胞感染 shRNA-NC、shRNA-Blimp1 后，RT-PCR 和 Western blot 检测各组细胞中 Blimp-1 的表达量，结果如表 1、图 1 所示，与对照组相比，shRNA-NC 组细胞中 Blimp-1 mRNA 的表达量无明显变化，shRNA-Blimp1 组细胞中 Blimp-1 mRNA 的表达量较对照组显著降低（$P < 0.05$）；Western blot 结果同样显示，与对照组相比，shRNA-NC 组细胞中 Blimp-1 蛋白水平无明显变化，shRNA-Blimp1 组细胞中 Blimp-1 蛋白水平显著降低（$P < 0.05$）。

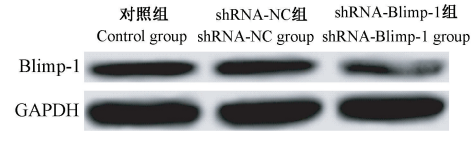


图 1　Western blot 检测各组细胞中 Blimp-1 蛋白的表达量

Figure 1　Protein expression of Blimp-1 in each group of cells detected by Western blot

2.2　沉默 Blimp-1 对细胞增殖的影响

采用 CCK-8 法观察各组细胞的增殖状况，结果如表 2 所示，与对照组相比，shRNA-NC 组细胞的增殖能力无明显变化，shRNA-Blimp1 组细胞的增殖能力显著下降，差异有显著性（$P < 0.05$）。

表 1　各组细胞中 Blimp-1 的表达量（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 1　The expression of Blimp-1 in each group of cells

组别 Groups	Blimp-1 mRNA 水平 Blimp-1 mRNA level	Blimp-1 蛋白水平 Blimp-1 protein level
对照组 Control group	1.000 ± 0.026	0.423 ± 0.041
shRNA-NC 组 shRNA-NC group	1.005 ± 0.021	0.436 ± 0.038
shRNA-Blimp1 组 shRNA-Blimp1 group	0.367 ± 0.015 *	0.189 ± 0.012 *
F 值 *F*-value	902.859	53.197

注：与对照组相比，* $P < 0.05$。

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

表 2　沉默 Blimp-1 对肝癌细胞增殖的影响（$\bar{x} \pm s$，$n = 3$）

Table 2　Effect of silencing Blimp-1 on the proliferation of hepatoma cells

组别 Groups	OD_{450} 值 OD_{450} value
对照组 Control group	0.896 ± 0.085
shRNA-NC 组 shRNA-NC group	0.868 ± 0.082
shRNA-Blimp1 组 shRNA-Blimp1 group	0.421 ± 0.039 *
F 值 *F*-value	41.327

注：与对照组相比，* $P < 0.05$。

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

2.3　沉默 Blimp-1 对细胞凋亡的影响

采用流式细胞仪观察各组细胞的凋亡状况，结果如表 3、图 2 所示，与对照组相比，shRNA-NC 组细胞的凋亡率无明显变化，shRNA-Blimp1 组细胞的凋亡率显著增加，差异有显著性（$P < 0.05$）。

2.4　沉默 Blimp-1 对细胞侵袭能力的影响

采用 Transwell 法分析各组细胞的侵袭能力变化，结果如表 4 所示，与对照组相比，shRNA-NC 组细胞的侵袭数无明显变化，shRNA-Blimp1 组细胞的侵袭数显著降低，差异有显著性（$P < 0.05$）。

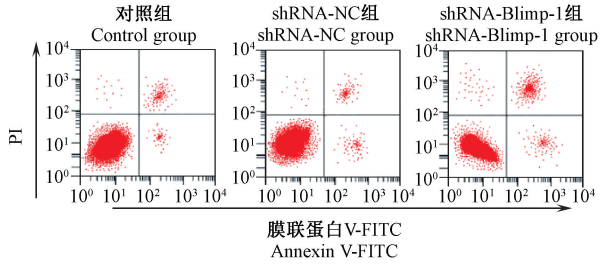


图 2　沉默 Blimp-1 对肝癌细胞凋亡的影响

Figure 2　Effect of silencing Blimp-1 on the apoptosis of hepatoma cells

表 3 沉默 Blimp-1 对肝癌细胞凋亡的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$,%)
Table 3 Effect of silencing Blimp-1 on the apoptosis of hepatoma cells

组别 Groups	凋亡率 Apoptosis rate
对照组 Control group	4.215 ± 0.563
shRNA-NC 组 shRNA-NC group	4.874 ± 0.521
shRNA-Blimp1 组 shRNA-Blimp1 group	13.452 ± 1.415 *
F 值 *F*-value	92.258

注:与对照组相比,* $P < 0.05$。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

表 4 沉默 Blimp-1 对细胞侵袭能力的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)
Table 4 Effect of silencing Blimp-1 on cell invasion

组别 Groups	侵袭细胞数目 Number of invasive cells
对照组 Control group	125.784 ± 11.436
shRNA-NC 组 shRNA-NC group	136.528 ± 12.658
shRNA-Blimp1 组 shRNA-Blimp1 group	68.597 ± 6.257 *
F 值 *F-value*	36.353

注:与对照组相比,* $P < 0.05$。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

2.5 沉默 Blimp-1 对细胞培养液上清中 IFN-γ、IL-2表达量的影响

采用 ELISA 法分析各组细胞上清液中 IFN-γ、IL-2 水平的变化,结果如表 5 所示,IL-2 在各组间的变化差异不明显;与对照组相比,shRNA-NC 组 IFN-γ蛋白水平无明显变化,shRNA-Blimp1 组 IFN-γ蛋白水平显著上调,差异有显著性($P < 0.05$)。

表 5 沉默 Blimp-1 对细胞培养液上清中 IFN-γ、IL-2 表达量的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$, pg/mL)
Table 5 Effect of silencing Blimp-1 on the expression of IFN-γ and IL-2 in cell culture supernatant

组别 Groups	IFN-γ	IL-2
对照组 Control group	23.451 ± 2.623	16.587 ± 1.234
shRNA-NC 组 shRNA-NC group	24.685 ± 3.152	17.425 ± 1.326
shRNA-Blimp1 组 shRNA-Blimp1 group	39.587 ± 4.163 *	18.742 ± 2.123
F 值 *F*-value	21.260	1.364

注:与对照组相比,* $P < 0.05$。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

3 讨论

Blimp-1 最初被发现在大 B 细胞淋巴瘤中表达缺失,可能起抑制肿瘤发展的作用[10]。Blimp-1 基因位于人常染色体上,具有 7 个外显子,促进免疫 B 细胞向浆细胞分化的过程,抑制 B 细胞增殖相关基因的表达。研究表明,Blimp-1 发生突变、转录翻译异常等均可促进大 B 细胞淋巴瘤的产生,因此推断 Blimp-1 基因可能具有抑癌基因的作用[11-12]。近年来的研究显示,Blimp-1 在肿瘤细胞的生长、分化、以及侵袭、迁移过程中发挥重要作用[13-15]。在肺癌中,采用免疫组织学的方法检测 Blimp-1 在肺癌组织中的表达量,结果显示,Blimp-1 在鳞状细胞肺癌中阳性表达率显著增加,可作为临床诊断的新的标志物和研究治疗靶点[16]。在喉癌组织中,Blimp-1 的表达量显著上调,并与患者临床分期和淋巴结转移密切相关,提示 Blimp-1 基因可作为喉癌早期诊断以及预后判断的重要靶基因[17]。

为探究 Blimp-1 在肝癌细胞中的作用,本文通过沉默 Blimp-1 在肝癌 SMMC-7721 细胞中的表达量,RT-PCR 和 Western blot 检测结果显示,在 shRNA-Blimp1 组细胞中 Blimp-1 mRNA 和蛋白较对照组显著降低;CCK-8 和流式细胞仪检测细胞的增殖和凋亡,结果显示,与对照组相比,shRNA-Blimp1 组细胞的增殖显著降低,凋亡率显著增加;Transwell 小室法结果显示,沉默 Blimp-1 基因显著抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的侵袭能力,表明下调 Blimp-1 可明显抑制肝癌细胞的增殖,促进其凋亡,抑制细胞的侵袭,从而抑制肝癌进一步的发展,在肝癌中发挥抑癌作用,与上述研究结果相一致。

研究发现,Blimp-1 不仅对免疫细胞的终末分化以及细胞内稳态具有调控作用,而且对免疫因子的水平具有重要作用[18-20]。在免疫细胞发育、分化和稳定过程中,Blimp-1 可与细胞因子 IL-2 相互作用从而发挥重要的作用[21]。在癌症的发生、发展中,IL-2 的表达量具有重要意义[22]。IFN-γ 是机体中重要的免疫调节因子,其表达量的增加可以增强细胞的免疫原性,促进细胞凋亡。为了进一步探究 Blimp-1 在肝癌细胞中的作用,本研究通过 ELISA 检测各组细胞中 IL-2、IFN-γ 的表达量,结果发现,沉默 Blimp-1 基因对肝癌细胞上清中 IL-2 的表达量无明显影响,但可明显增加 IFN-γ 的水平,提示 Blimp-1 可能通过促进 IFN-γ 的分泌从而抑制肝癌

细胞的增殖,诱导其凋亡。

综上所述,沉默 Blimp-1 促进 IFN-γ 的表达,显著抑制肝癌细胞的增殖,促进其凋亡,降低细胞的侵袭能力,从而阻碍肝癌的进一步恶化,为肝癌的临床治疗和诊断提供了实验基础。

参考文献:

[1] Xu P, Oosterveer MH, Stein S, et al. LRH-1-dependent programming of mitochondrial glutamine processing drives liver cancer [J]. Genes Dev, 2016, 30(11): 1255 – 1260.

[2] Woo HG, Choi JH, Cho EJ, et al. Integrated analysis of genomic and epigenomic regulation of transcriptome identifies molecular subtypes of liver cancer [J]. J Hepatol, 2017, 66(1): S639 – S640.

[3] 李飞, 李德新, 周广朋. miR-634 在肝癌中的表达及对肝癌细胞生物学行为的影响 [J]. 中国免疫学杂志, 2016, 32(8): 1160 – 1164.

[4] Zheng C, Zheng L, Yoo JK, et al. Landscape of infiltrating T cells in liver cancer revealed by single-cell sequencing [J]. Cell, 2017, 169(7): 1342 – 1356.

[5] Greten TF, Sangro B. Targets for immunotherapy of liver cancer [J]. J hepatol, 2018, 68(1): 157 – 166.

[6] Petrakis G, Kostopoulos I, Venizelos I, et al. Expression of the activation markers Blimp1, Foxp1 and pStat3 in extranodal diffuse large B-cell lymphomas [J]. Histol histopathol, 2017, 32(8): 825 – 834.

[7] Tanaka H, Muto A, Shima H, et al. Epigenetic regulation of the Blimp-1 gene (*Prdm*1) in B cells involves Bach2 and histone deacetylase 3 [J]. J Biol Chem, 2016, 291(12): 6316 – 6330.

[8] 王璐. PRDM1 在桥本甲状腺炎和甲状腺乳头状癌发生中的分子机理研究 [D]. 第四军医大学, 2015.

[9] Kang HB, Lee HR, Jee DJ, et al. PRDM1, a tumor-suppressor gene, is induced by Genkwadaphnin in human colon cancer SW620 cells [J]. J Cell Biochem, 2016, 117(1): 172 – 179.

[10] Xia Y, Xu-Monette ZY, Tzankov A, et al. Loss of PRDM1/BLIMP-1 function contributes to poor prognosis of activated B-cell-like diffuse large B-cell lymphoma [J]. Leukemia, 2017, 31(3): 625.

[11] Solé C, Martínez D, Giné E, et al. Expression of a truncated B lymphocyte-induced maturation protein-1 isoform is associated with an incomplete plasmacytic differentiation program in chronic lymphocytic leukemia [J]. Leuk Lymphoma, 2018, 59(2): 482 – 485.

[12] Zhang Z, Liang L, Li D, et al. Hypermethylation of PRDM1/Blimp-1 promoter in extranodal NK/T-cell lymphoma, nasal type: an evidence of predominant role in its downregulation [J]. Hematol Oncol, 2017, 35(4): 645 – 654.

[13] Sciortino M, del Pilar Camacho-Leal M, Orso F, et al. Dysregulation of Blimp1 transcriptional repressor unleashes p130Cas/ErbB2 breast cancer invasion [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 1145.

[14] Zhu Z, Wang H, Wei Y, et al. Downregulation of PRDM1 promotes cellular invasion and lung cancer metastasis [J]. Tumour Biol, 2017, 39(4): 1010428317695929.

[15] 孙莉, 牛涵波, 徐义英, 等. miR-3691-3p 靶向调控 E2F3/PRDM1 对前列腺癌细胞增殖, 迁移和侵袭的影响 [J]. 江苏大学学报(医学版), 2018, 28(1): 22 – 27.

[16] 关婷, 胡瑞成, 戴爱国. PRDM 基因与非小细胞肺癌关系的研究现状 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(15): 2997 – 3000.

[17] 王洪江, 李培华, 刘稳, 等. PRDM1 基因在喉癌组织中表达的研究及临床意义 [J]. 徐州医学院学报, 2009, 29(2): 77 – 79.

[18] Kim SJ, Schätzle S, Ahmed SS, et al. Increased Cathepsin S in *Prdm*1 $^{-/-}$ dendritic cells alters T_{FH} repertoire and contributes to lupus [J]. Nat immunol, 2017, 18(9): 1016 – 1024.

[19] 宋旭光, 陈翀, 徐开林. Blimp-1 调控免疫系统的研究进展 [J]. 国际输血及血液学杂志, 2012, 35(5): 470 – 473.

[20] Montes de Oca M, Kumar R, de Labastida Rivera F, et al. Blimp-1-dependent IL-10 production by Tr1 cells regulates TNF-mediated tissue pathology [J]. PLoS Pathog, 2016, 12(1): e1005398.

[21] Gong D, Malek TR. Cytokine-dependent Blimp-1 expression in activated T cells inhibits IL-2 production [J]. J Immunol, 2007, 178(1): 242 – 252.

[22] 徐小娟, 周志涵, 毛宇, 等. 山慈菇多糖对 H22 肝癌小鼠 IL-2 及 p53 蛋白表达的影响 [J]. 食品研究与开发, 2016, 37(18): 6 – 10.

〔收稿日期〕2018 – 03 – 16

研究报告

周龄对非肥胖型糖尿病背景小鼠体外受精效果的影响

阎　涛,胡　萍,徐　晨,王　琪,史丹丹,赵　静,王宏宇*

(南京大学 - 南京生物医药研究院,南京　211800)

【摘要】　目的　提高非肥胖型糖尿病(non-obese diabetic,NOD)背景小鼠体外受精(*in vitro* fertilization,IVF)效果。**方法**　使用不同周龄的 NOD 背景雌鼠进行实验,实验分为四组,分别为 4、6、8 和 10 周龄雌鼠,与 3 ~ 6 月龄 NOD 雄鼠进行体外受精,第二天统计每只雌鼠可用胚胎数量,重复两次实验。收集 2016—2018 年 NOD 小鼠移植生仔数据进行比较。**结果**　第一次实验 4、6、8 和 10 周龄四组每只雌鼠体外受精后可用二细胞胚胎数以平均数 ± 标准差表示,分别为(13.4 ± 2.5)枚、(22.7 ± 2.9)枚、(22.0 ± 7.0)枚、(30.5 ± 10.9)枚。第二次实验 4、6、8 和 10 周龄四组每只雌鼠可用二细胞胚胎数以平均数 ± 标准差表示,分别为(7.8 ± 2.6)枚、(16.5 ± 4.5)枚、(14.2 ± 6.5)枚、(24.5 ± 5.9)枚。4、8、10 周龄雌鼠体外受精后胚胎移植平均生仔率 ± 标准差分别为(35.32 ± 9.9)%、(36.19 ± 6.2)%、(43.15 ± 6.9)%。**结论**　10 周龄的 NOD 背景雌鼠进行体外受精效果最好,建议使用 10 周龄雌鼠进行体外受精。

【关键词】　体外受精;NOD 小鼠;胚胎
【中图分类号】R-33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2018) 09-0066-03
doi: 10.3969/j.issn.1671 - 7856. 2018.09.011

Effects of age on efficacy of *in vitro* fertilization in non-obese diabetic mice

Yan Tao, Hu Ping, Xu Chen, Wang Qi, Shi Dandan, Zhao Jing, Wang Hongyu*
(Nanjing Biomedical Research Institute of Nanjing University, Nanjing 211800, China)

【Abstract】　Objective　To improve the results of *in vitro* fertilization (IVF) for non-obese diabetic (NOD) mice. **Methods**　NOD female mice were divided into four age groups: 4, 6, 8, and 10 weeks old. Sperm from 3 - 6-month-old male NOD mice were used for *in vitro* fertilization. The next day, the number of usable embryos per female mouse was counted and the experiment was repeated twice. NOD mouse embryo transfer data collected from 2016 - 2018 were used for the comparison of pup rates. **Results**　Twenty-four hours after the first experiment, the means ± SD of the number of two-cell-stage embryos per group were 13.4 ± 2.5, 22.7 ± 2.9, 22 ± 7.0, and 30.5 ± 10.9, respectively. Twenty-four hours after the second experiment, the numbers of two-cell-stage embryos per group were 7.8 ± 2.6, 16.5 ± 4.5, 14.2 ± 6.5, and 24.5 ± 5.9, respectively. The mean ± SD rates of pups born from transferred embryos after *in vitro* fertilization in 4, 8, and 10 weeks were (35.32 ± 9.9)%, (36.19 ± 6.2)%, and (43.15 ± 6.9)%, respectively. **Conclusions**　Ten-week-old NOD mice respond better to IVF than 4-, 6-, or 8-week-old ones. Therefore, we suggest the selection of 10-week-old NOD female mice for *in vitro* fertilization.

【Keywords】　*in vitro* fertilization(IVF); NOD mouse; embryo

[作者简介]阎涛(1989—　),男,硕士研究生,研究方向:小鼠生殖技术。E-mail: yantao@nbri-nju.com
[通信作者]王宏宇,女,教授,研究方向:糖脂代谢调控以及代谢综合症。E-mail: wanghy@nbri-nju.com

非肥胖型糖尿病(non-obese diabetic, NOD)小鼠是 Makino 及其同事繁育出的一种小鼠品系[1-2],在自身免疫性Ⅰ型糖尿病研究中具有重要作用。分析目前已有的实验结果,发现 NOD 背景小鼠体外受精效率低,每只雌鼠平均可用的二细胞数量少,而且有资料显示 NOD 背景小鼠在体外受精过程中存在发育迟缓的现象[3],因此本课题组对现有的实验操作进行改进,通过对不同周龄鼠体外受精效率的比较以及增加一次二细胞期受精率的统计,发现 10 周龄的 NOD 背景雌鼠进行体外受精效率明显高于其他周龄鼠,这一发现对 NOD 背景小鼠体外受精操作具有重要的指导作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

体外受精实验:4 周龄(15 ~ 18 g),6 周龄、8 周龄、10 周龄(20 ~ 25 g)的 NOD 背景雌鼠(数量见表 1、表 2);3 ~ 6 月龄(30 ~ 35 g)NOD 背景雄鼠,每次实验 2 只共 4 只。胚胎移植生仔率统计:受体全部采用 3 月龄(体重为 25 ~ 35 g)的 ICR 雌鼠,4 周龄、8 周龄、10 周龄实验组分别移植 55 只、40 只、30 只,共 125 只。实验动物(SPF 级)全部由南京大学 - 南京生物医药研究院提供[SCXK(苏)2015 - 0001]。饲养于南京大学 - 南京生物医药研究院屏障环境动物房(SPF 级)[SYXK(苏)2015 - 0001]。所有实验动物的操作程序均在南京大学 - 南京生物医药研究院实验动物管理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)批准下进行(AP 号:NRCMM05)。所有实验动物操作均符合实验动物的福利伦理,并给予实验动物人道主义关怀,符合实验动物使用的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

PMSG(孕马血清雌激素,宁波三生公司);hCG(人绒毛膜促性腺激素,宁波三生公司);M16 培养液(Sigma 公司)用来胚胎培养;HTF 培养液用以精子获能和精卵结合[配制 100 mL 需要 0.5938 g NaCl, 0.0350 g KCl, 0.0049 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.0054 g KH_2PO_4, 0.0755 g $CaCl_2$, 0.210 g $NaHCO_3$, 0.050 g 葡萄糖, 0.34 mL 乳酸钠, 0.0037 g 丙酮酸钠, 0.0075 g 青霉素, 0.0050 g 链霉素, 0.40 g BSA, 0.04 mL 酚红(0.5%)]。解剖剪;显微镊子;Motic 体式显微镜;热台(DB-B1,国华)。

1.3 实验方法

1.3.1 超排

下午 5:30 雌鼠经腹腔注射 PMSG,4 周龄雌鼠每只注射 5 IU,6 周龄雌鼠注射 7.5 IU,8、10 周龄雌鼠均注射 10 IU,48 h 后雌鼠经腹腔注射 hCG,hCG 注射剂量同 PMSG。

1.3.2 精子获能

雄鼠脱颈处死,打开腹腔,取出睾丸,分离剪取附睾尾部,用 1 mL 注射器扎破附睾使精液溢出,将精子转移到预平衡过的 HTF 获能滴中获能 1 h。

1.3.3 取卵

注射 hCG 14 h 后将雌鼠脱颈处死,分离取出输卵管,体视显微镜在覆盖矿物油的 HTF 受精滴中撕开膨大部,使卵团流出,将流出的卵团转移到受精滴中。

1.3.4 受精

用移液器吸取 5 ~ 10 μL 精子加入含有卵团的受精滴中受精培养,放入培养箱培养过夜。

1.3.5 统计受精率

24 h 后统计一细胞、二细胞和异形胚胎数量,48 h 后再统计一次。

1.3.6 移植生仔率

选取本单位日常生产项目中 2016—2018 年的 NOD 品系移植生仔数据进行比较,观察不同周龄 NOD 雌鼠获得胚胎后移植到 ICR 雌鼠受体中的生仔率。ICR 受体为假孕 0.5 d,移植方式为输卵管移植。

1.4 统计学方法

实验数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 软件以 one-way ANOVA 分析法进行检验分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 不同周龄 NOD 雌鼠获得的体外受精二细胞胚胎数量

两次实验,分别统计了 24 h 和 48 h 后的实验结果,结果显示随着周龄增加每只小鼠获得的二细胞胚胎数呈递增趋势,8 周龄每只雌鼠获得二细胞胚胎数高于 4 周龄($P < 0.05$),但是略低于 6 周龄($P > 0.05$)。受精后 48 h 与 24 h 相比,二细胞胚胎数量增多,具体数据见表 1、表 2。

2.2 2016—2018 年的 NOD 品系移植生仔数据

不同周龄 NOD 雌鼠进行体外受精,将得到的胚

胎进行移植,4 周龄雌鼠获得的胚胎移植生仔率最低,8 周龄雌鼠胚胎移植生仔率高于 4 周龄,10 周龄最高。具体胚胎移植生仔数据见表 3。

3 讨论

由实验数据可以看出 NOD 背景的小鼠,在 4 周龄到 10 周龄范围内随着雌鼠周龄的增大,每只小鼠获得的二细胞胚胎数量先增多,8 周龄雌鼠出现降低,10 周龄左右的雌鼠进行体外受精(IVF)效果最好。国内有研究使用 4、8、16 周雌鼠进行体外受精实验,发现 8 周龄雌鼠超排效果最差[4]。国外的类似研究也发现 8 周龄左右的雌鼠超排量会降低[5]。可能的原因是 NOD 雌鼠相比其他品系雌鼠性成熟周龄大,7 ~ 8 周龄才性成熟,性成熟后生殖器官发育完全,对于超排激素的耐受性增强,由于机体抵抗外源物质的作用使得排卵量不如 6 周龄,但是 8 周龄雌鼠由于自身器官机能不如 10 周龄雌鼠,所以排卵量要低于 10 周龄雌鼠。

统计历史移植生仔数据,结果显示随着雌鼠周龄增加体外受精生产的胚胎移植生仔率升高。移植生仔率是一项波动较大的数据,后续还需要继续积累不同周龄雌鼠生产的胚胎移植生仔数据,以便通过大数据的积累,提供更为有力的证据。在利用显微注射方法生产转基因小鼠时也发现使用 4 周龄雌鼠进行体外受精实验产生的可用胚胎数量也要少于 6 ~ 10 周龄的雌鼠[6]。

受精后 48 h 再次统计数据的时候可用胚胎数量增加,但是该观察结果是否具有研究价值还需要进一步研究,因为 48 h 的数据相比于 24 h 增加的胚胎数量不明显,在实际生产中推广的意义也不大。对于实际生产,每只雌鼠可用的二细胞胚胎数量比受精率更有实际意义,所以本文中并未体现受精率的数据。目前并未进行 48 h 后转化为二细胞胚胎的移植实验,今后需要增加该种胚胎移植生仔效果实验,该实验还可以为是否有必要将胚胎培养至受精后 48 h 提供重要参考价值。

表 1 第一次实验受精效果数据

Table 1 *In vitro* fertilization results of the first experiment

NOD 雌鼠周龄(周) Age of female NOD mice (weeks)	NOD 雌鼠只数 Number of female NOD mice	24 h 后二细胞胚胎总数 Total number of two-cell embryos after 24 h	24 h 后每只雌鼠获得的二细胞胚胎数量 Number of two-cell embryos obtained after 24 h per female mouse	48 h 后每只雌鼠获得的二细胞胚胎数量 Number of two-cell embryos obtained after 48 h per female mouse
4	10	135	13.4 ± 2.5^a	15.1 ± 3.4^a
6	7	159	22.7 ± 2.9^b	24.0 ± 3.0^b
8	10	220	22.0 ± 7.0^b	23.2 ± 7.8^b
10	10	299	30.5 ± 10.9^c	31.2 ± 9.4^c

注:4 组组间比较:4 周龄组和其他三组比较,$P < 0.05$;10 周龄组和其他三组比较,$P < 0.05$;6 周龄组和 8 周龄组相比,$P > 0.05$。表 2 同。

Note. Comparison among four groups: 4-week-old compared with the other three groups, $P < 0.05$; 10-week-old compared with the other three groups, $P < 0.05$; and 6-week-old group compared with the 8-week-old group, $P > 0.05$. The same as in Figure 2.

表 2 第二次实验受精效果数据

Table 2 *In vitro* fertilization results of the second experiment

NOD 雌鼠周龄(周) Age of female NOD mice (weeks)	NOD 雌鼠只数 Number of female NOD mice	24 h 后二细胞胚胎总数 Total number of two-cell embryos after 24 h	24 h 后每只雌鼠获得的二细胞胚胎数量 Number of two-cell embryos obtained after 24 h per female mouse	48 h 后每只雌鼠获得的二细胞胚胎数量 Number of two-cell embryos obtained after 48 h per female mouse
4	10	78	7.8 ± 2.6^a	9.9 ± 3.1^a
6	11	181	16.5 ± 4.5^b	17.2 ± 5.0^b
8	10	152	14.2 ± 6.5^b	13.7 ± 6.4^b
10	6	147	24.5 ± 5.9^c	25.1 ± 9.2^c

表 3 2016—2018 年的 NOD 品系移植生仔数据

Table 3 Pup birth rate of *in vitro*-fertilized embryos of NOD mice after transferred into ICR female mice as recipients during 2016 – 2018

NOD 雌鼠周龄(周) Age of female NOD mice (weeks)	移植枚数 Number of embryos transferred	ICR 雌鼠受体数 Number of ICR female mice as recipients	生仔率(%) Pup birth rate	实验次数 Number of experiments
4	1043	55	35.32 ± 9.9	8
8	800	40	36.19 ± 6.2	3
10	592	30	43.15 ± 6.9	4

(下转第 82 页)

技术方法

“互联网 +”实验动物资源共享服务平台模式研究

李会萍,王晓明,杨锦淳,温金银,陈梅丽*,黄　韧

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州　510663)

【摘要】 本文是在调查和梳理当前我国实验动物行业资源以及实验动物资源供销现状的基础上,分析实验动物行业用户群体对实验动物资源信息化服务的应用需求,探索研究在“互联网 +”环境下我国实验动物资源共享服务平台模式,充分发挥“互联网 +”在社会资源配置中的优化和集成作用,助力实验动物行业资源的共建共享。文章重点以一站式实验动物资源共享服务平台为例,介绍了平台的设计思路和功能模块的实现。

【关键词】 互联网;实验动物资源;共享;服务平台;服务模式
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 09-0069-05
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.012

Research on sharing service patterns of “Internet +” laboratory animal resources

LI Huiping, WANG Xiaoming, YANG Jinchun, WEN Jinyin, CHEN Meili*, HUANG Ren
(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute; Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 On the basis of investigating and combing the current situation of laboratory animal resources and their supply and marketing in China, this article analyzes the application needs of user groups in laboratory animal industry for information services on laboratory animal resources, and explores the service platform mode for sharing laboratory animal resources in China under the “Internet +” environment, fully utilizing the optimization and integration role of “Internet +” in the allocation of social resources, and contributing to the construction and sharing of resources in the laboratory animal industry. This article focuses on the one-stop laboratory animal resource-sharing service platform as an example, and introduces ideas for the design and functional module realization of the platform.

【Keywords】 Internet; laboratory animal resource; sharing; service platform; service mode

近年来,随着实验动物学科的发展,实验动物资源的规模化生产和产业化供应局面已经形成,但实验动物资源的开放共享程度仍不高,实验动物资源网络化共享服务平台缺失。本文针对当前我国实验动物资源现状和行业用户群体的需求,在当前互联网新形势下,探讨如何借助“互联网 +”有效优化配置实验动物资源,提出实验动物资源共享服务平台模式的对策和建议,以期为实验动物资源平台建设和共享服务提供参考。

1　调查及资料收集

1.1　在线问卷调查

2016—2017 年期间,先后通过中国实验动物信息网平台的“在线调查”和微信社交网络渠道面向

[基金项目]广东省实验动物重点实验室(编号:2017B030314171);广东省科技计划项目(编号:2017A070702001)。
[作者简介]李会萍(1980—　),女,副研究员,研究方向:实验动物信息管理。E-mail: 84178102@qq.com
[通信作者]陈梅丽(1971—　),女,高级兽医师,研究方向:实验动物科技管理。E-mail: lab_king@263.net.cn

实验动物行业用户群体开展了关于“实验动物资源需求”、“实验动物资源购销方式需求”、“实验动物电商平台应用需求”等的调查,总共回收 400 份调查问卷,对调查数据进行了整理、统计分析。

1.2 资料收集

2017 年期间,收集行业领域相关资料中的数据进行梳理分析。数据来源包括:《2017 年国家实验动物种子中心(资源库)和数据资源中心资源保存与共享服务工作》(http://www.lascn.net/Item/70232.aspx)、《中国实验动物资源调查与发展趋势》(2017 年 国家科技基础条件平台中心著)、《实验动物科学技术与产业发展战略研究报告》(2016 年版)、全国实验动物许可证查询管理系统(http://www.lascn.net/Category_1377/Index.aspx)等。

2 现状

2.1 实验动物机构

据全国实验动物许可证查询管理系统(截止 2018 年 5 月)数据显示,目前我国持有实验动物生产和使用许可证资质的机构约 2129 家,其中实验动物生产单位 425 家,实验动物使用单位 1704 家[1]。除此之外,还有一大批实验动物配套资源的生产机构(仪器设备、笼器具、饲料垫料、实验试剂、实验耗材等)。据中国工程院重点咨询项目《实验动物科学技术与产业发展战略研究报告》(2016 年版)分析,未来我国将建立 2500 家实验动物机构[2]。

2.2 实验动物资源

本文所述实验动物行业资源包括实验动物资源本身、动物模型资源以及整个产业链的动物实验配套资源,其中配套资源又包括仪器设备、笼器具、动物玩具、饲料/垫料、实验试剂、实验耗材等。

2.2.1 种质资源

目前国家已建立 8 个实验动物资源种子中心,据《2017 年国家实验动物种子中心资源保存与服务工作》报道的数据显示,在 7 个国家级实验动物种子资源中心保种的实验动物品种、品系达 2835 个,为 471 家单位提供了供种服务,供种数量达 12 268 只,供种实验用鸡及鸡胚达 68 万枚[3]。

2.2.2 实验动物常规资源

据《我国实验动物资源调查与发展趋势》(2017 年 国家科技基础条件平台中心著)数据显示,在 2015 年,我国具有生产许可证的实验动物种类共计 13 种,实验动物资源年生产量达 2617.77 万只;我国具有使用许可证的实验动物共计 21 种,年使用量为 1159.54 万只[4]。生产与使用实验动物资源的比例为 5∶2,实验动物资源没有实现最大限度的共享。

2.2.3 动物模型资源

国外拥有动物模型近 5000 种,目前,我国动物模型有近千种。据《我国实验动物资源调查与发展趋势》(2017 年 国家科技基础条件平台中心著)数据显示,从 2013 年初到 2015 年底,我国新开发的动物模型种类共计 791 种,其中 44 种为糖尿病相关模型、35 种涉及高血压和高血脂模型、62 种涉及肿瘤和癌症模型,26 种炎症相关的模型[4]。这些疾病动物模型资源研发单位共享服务意识淡薄,没有统一的资源查询路径或渠道。

2.2.4 设施资源

据《我国实验动物资源调查与发展趋势》数据显示,2015 年我国实验动物生产单位和使用单位的仪器设备总数为 238 156 台/套[4]。随着实验动物科技事业发展,实验动物设施资源需求也逐年增加。但在调查中也发现部分单位实验动物设施资源利用率低甚至闲置的现象,而有些单位实验动物设施资源不足,不能满足实验科研的需求[5]。

2.2.5 其他配套资源

据《我国实验动物资源调查与发展趋势》数据显示,我国实验动物笼器具生产产业化已经形成,国内实验动物笼具等产品的年生产总值约 10 亿元;实验动物的常规饲料和定制各种动物模型饲料,全国的市场需求量在 35 000 多吨,年生产总值约 2 亿元;全国实验动物垫料产量大约为 30 000 吨,年产值约为 8000 万元;实验试剂耗材类资源与各行业开展实验所应用材料具有交叉性、通用性,作为开展动物实验所必需的材料,涉及范围广,日常使用量也非常大[4]。各种配套资源存在参差不齐的现象,缺乏公开、透明的信用评价机制,影响了资源共享服务质量。

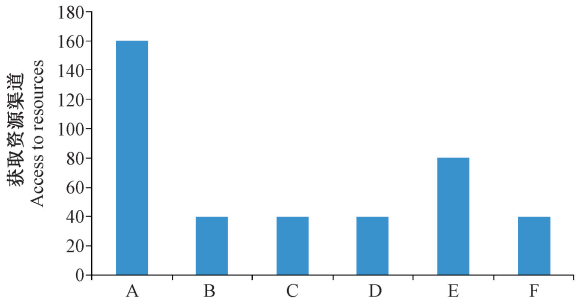
2.3 实验动物资源供销现状

2.3.1 获取实验动物资源信息

从本课题组调查数据显示,业内科技工作者获取实验动物资源及配套资源信息时,主要通过咨询同行、根据以往经验、浏览行业网站、网上搜索、行业会议推介等方式获取,其中通过咨询同行获取资源信息的占多数,可见对同行的粘度比较高。见图 1。

2.3.2 实验动物资源的购销途径

从本课题组调查数据显示,业内科技工作者在



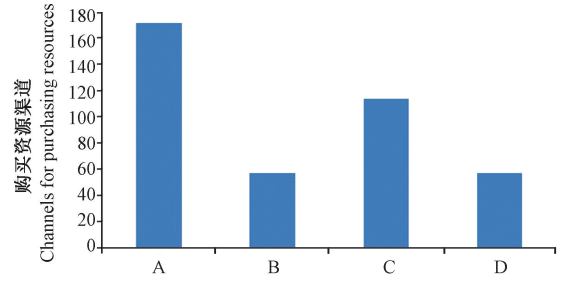
注：A：咨询同行；B：浏览行业网站；C：网上搜索；D：行业会议推介；E：以往经验；F：其他。

图 1　获取实验动物资源信息渠道

Note. A: Consulting colleagues. B: Visiting industry websites. C: Internet searching. D: Industry conference promotion. E: Experience. F: Others.

Figure 1　Access to laboratory animal resource information channels

购买实验动物资源和配套资源时，主要是找熟悉商家、网上查找商家线下购买、网上订购以及其他方式。其中咨询熟悉的商家购买排第一位，可见同行间对熟悉商家的资源购买率比较高，相互信任度更高。同时，通过网络购买或网络查找商家购买资源也占不少数。从购买资源类型方面，通过网上购买的主要是动物玩具、试剂、耗材、实验动物等居多。见图 2。



注：A：找商家购买；B：网上订购；C：线下购买；D：其他。

图 2　购买实验动物资源的渠道

Note. A: Purchase from suppliers. B: Online purchase. C: Offline purchase. D: Others.

Figure 2　Channels for purchasing laboratory animal resources

从以上数据可见，我国实验动物资源及配套资源非常丰富且需求量大，当前实验动物资源流通主要以传统线下交易模式为主。而随着互联网技术的发展，行业用户对于网络化应用接受程度非常高。对于当前互联网新形势下的网上支付、物流配送持乐观的态度，互联网形式的实验动物资源共享服务平台应用大势所趋。

3　资源共享存在的问题

随着信息技术的发展，行业内实验动物资源服务平台层出不穷，但应用率不高。原因在于缺乏顶层的整体规划和统一布局，各省部门、各级机构各自独立，平台以“局部化、碎片化”方式构建，导致应用功能不全、综合服务能力不到位；平台收集的资源数据缺失，资源提供者共享服务意识淡薄，造成资源开放共享不足，信息不对称，直接影响实验动物资源共享程度；平台互动性不强，协同服务不通畅，共享机制和监督评价机制缺失，不利于网络环境下实验动物资源的共享。

4　对策与建议

通过以上实验动物资源现状及存在问题分析，在“互联网 +”环境下，应充分利用信息通信以及互联网技术打造资源共享服务平台，让互联网与实验动物行业进行深度融合，发挥“互联网 +”的实时、交互、开放、共享、连接、智能等特点在实验动物领域催生出新形态，提升实验动物产业的创新力和生产力。本文以一站式实验动物资源共享平台构建模式为例，为行业资源共享服务平台建设提供策略和理论支撑。

4.1　平台建设思路

一站式实验动物资源共享平台按照“资源整合，互联互通，共建共享”的原则，以实现资源集成式服务、个性化定制服务和协同管理服务为目标[6]，整合业内主管部门、科研机构、高等院校、企业等的资源、技术、成果，形成全国实验动物资源与服务的大数据资源中心，打造一个开放式的实验动物资源对接平台。并构建“互联网 +”的实验动物服务体系，帮助传统实验动物服务机构向互联网服务模式转型，培育一批在“互联网 +”新形势下的实验动物服务机构和行业用户群体，改变思维方式和共同达成业内相互之间的资源聚合、提升服务、开放合作的意识，带动实验动物行业新型服务模式的应用。

4.2　平台总体设计

以 php、MySQL 数据库为开发工具，基于 B2C 模式在 PC 端开发一站式实验动物资源共享平台，平台同步与移动智能手机端（iOS 系统和安卓系统）数据接口对接，通过智能手机端布署 APP 和微信端应用，打造实验动物资源共享平台的多元化应用渠

道。平台包括:实验动物资源查询与在线交易、实验动物在线检测服务、动物实验在线竞价服务、实验室仪器设施共享 4 个功能版块,每个功能版块实现不同的服务业务。见图 3。

4.3 平台功能实现

4.3.1 实验动物资源查询与在线交易

利用互联网的开放性,聚合实验动物行业机构入驻平台,并凝聚各机构的实验动物产业链资源及配套资源,平台实现资源分类管理以及区域性资源管理,其中资源类型涵盖实验动物、成品模型、仪器设备、笼器具、饲料/垫料、实验试剂、实验耗材、动物玩具等。平台为资源供应方和需求方提供时实查询、在线交易,实现资源的连接、共享。功能包括:资源商家入驻、商家管理、多商店管理、资源管理、订单管理、配送管理、交易监管、客服管理、信息管理、统计管理等。平台的这种集成式服务模式即“一站式”服务,使用户通过简单的操作步骤就能实现所需要的多种分散服务,提高了用户查询和资源利用效率。

4.3.2 实验动物在线检测服务

实验动物在线检测服务功能是由各省实验动物检测机构入驻平台,平台接受用户的委托检测服务订单。其中检测服务包括实验动物病原菌、病毒、寄生虫、遗传、病理以及实验动物设施、饲料等。功能包括:委托检测下单、检测机构查询、检测进度跟进、检测报告接收等。

4.3.3 动物实验在线竞价服务

动物实验在线竞价服务功能包括:需求发布、方案征集、方案选型、竞价交易、服务商管理等。具体来说就是需求方在平台上发布动物实验的需求和征集方案,服务商上传实验方案参与征集和竞标,需求方在多个方案中筛选出服务商,最终完成方案选型,达成合作意向,从而实现动物实验委托服务的摄合和竞价交易,为需求方和服务商之间搭建一种个性化定制的精准服务渠道。

4.3.4 实验室仪器设施共享服务

实验室仪器设施共享服务功能包括:实验室机构入驻、仪器设施分类管理、在线预约、预约审核等。即通过业内各级机构的实验室入驻平台,共享实验室仪器设施,用户需要开展实验时在平台上直接找到就近的实验室预约下单,一方面充分发挥各机构的实验室仪器设施资源的利用率,另一方面为相当大一部分科研单位节省高额购置、维护成本,提高科研效率。

4.4 平台共享保障机制

平台有效的共享机制是规范实验动物资源共享行为和确保资源共享安全的重要保障。在一站式实验动物资源共享平台在运行过程中,建立平台共享机制、监督管理机制至关重要。

4.4.1 资源机构入驻平台机制

以开放形式由实验动物资源机构入驻平台,入驻平台时填写真实、完整的机构信息,提供必要的

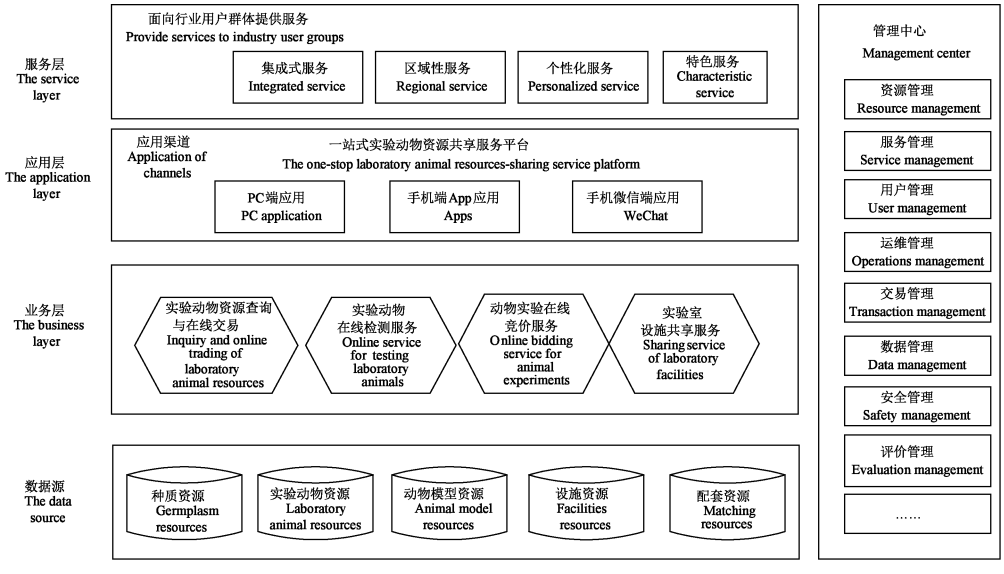


图 3 平台总体框架

Figure 3 Overall framework of the platform

资质认证和接受入驻平台协议,明确资源共享职责义务,经平台方严格审核后才可入驻,并签订正式的平台资源共享服务协议。实验动物资源机构在入驻平台期间发布的所有资源、服务的信息、交易行为均接受用户群体的信誉评价和监督以及平台方的监管,如有不符或出现问题、投诉则平台方责令资源入驻机构整改、下架所有资源内容或冻结该机构入平台。

4.4.2 区域性共享与监管机制

平台依托全国实验动物行业管理机构,在各省设立平台服务站,并由该省管理机构人员担任本区域的平台管理员。围绕本省区域特色资源和实验动物行业发展情况,重点推荐本区域资源与服务的共享,并通过平台对本区域实验动物资源入驻机构和资源数据进行监督管理。

4.4.3 平台保障机制

从实验动物业内选择专家或技术专员成立平台监督管理队伍,对平台所有资源、服务以及资源交易行为等进行日常监督,保障资源共享、资源流通过程的安全,同时,专家或技术专员队伍为平台提供意见和建议,确保为行业提供更科学、合理、便捷的资源共享服务平台。

4.5 平台运维

一站式实验动物资源共享平台目前由作者单位运行和管理,后续平台将进一步完善,实现规范化、精细化运营。同时,引入业内单位共同参与平台运营,加强平台的宣传推广,运营过程中收取资源机构的平台使用费、服务费等模式获取收益,以确保平台的可持续运营,助力行业资源的共建共享。

5 展望

本文在调查分析实验动物资源现状、行业特点、资源共享与服务需求基础上,开发建立了一站式实验动物资源共享平台,并以该平台为例,详细介绍了基于“互联网 +”时期平台构建的思路、设计理念和实现的功能模块。目前,平台已上线并正式运行,入驻一站式实验动物资源共享平台的资源与服务机构 81 家,共享实验动物资源与服务 565 项,其中实验动物资源 82 项、动物模型资源 26 项、仪器设备 143 项、饲料/垫料 87 项、实验试剂 24 项、实验耗材 41 项、笼器具 23 项、检测服务 80 项、实验室仪器设施资源 8 项。下一步平台还有待在行业内扩大宣传推广,以期通过“互联网 + 实验动物”的跨界融合,通过一站式实验动物资源共享平台,形成实验动物行业资源的大数据中心,实现实验动物资源共享最大化和行业资源的协同管理,提升实验动物产业的社会经济效益,为生物医药、生命科学等领域的研究提供资源和技术支撑。

参考文献:

[1] 中国实验动物信息网. 全国实验动物许可证查询管理系统[DB]. 2018. http://www.lascn.net/Category_1377/Index.aspx

[2] 夏咸柱, 秦川, 钱军, 等. 实验动物科学技术与产业发展战略研究报告[M]. 北京: 科学出版社, 2016.

[3] 中国实验动物信息网. 2017 年国家实验动物种子中心(资源库)和数据资源中心资源保存与共享服务工作. 2018. http://www.lascn.net/Item/70232.aspx

[4] 叶玉江, 包献华, 王瑞丹, 等. 中国实验动物资源调查与发展趋势[M]. 北京: 科学出版社, 2017.

[5] 林丹荣, 何坚, 李文德, 等. 广东省实验动物资源现状调查及分析[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(2): 119 - 123.

[6] 叶苗, 薛蓓. “互联网 +”模式下的科技创新服务平台模式研究[J]. 电脑知识与技术, 2016, 12(33): 281 - 282.

〔收稿日期〕2018 - 06 - 05

经验交流

四种常用实验动物与人的肝组织形态特征比较

李　靖[1],王艳丽[2],刘恩岐[3*]

(1. 西藏民族大学医学部高原相关疾病分子遗传机制与干预研究重点实验室,陕西 咸阳　712000;
2. 西安医学院病理教研室,西安　710021; 3. 西安交通大学医学部实验动物中心,西安　710061)

【摘要】　目的　通过比较四种常用实验动物小鼠、大鼠、豚鼠、家兔的肝与人的肝在组织形态上的相似性,为肝研究中实验动物的选择提供参考。**方法**　分别取正常小鼠、大鼠、豚鼠、家兔的肝,从形态特征、分叶、脏器系数、肝细胞核浆比等方面与人的肝进行比较。**结果**　家兔肝的形态与人的最接近,为不规则楔形及楔形,二者的核浆比亦最相近,分别为 0.158 和 0.149。豚鼠与人的肝均为五叶,且脏器系数最接近,分别为 3.096% 和 2.35%。**结论**　家兔和豚鼠在组织形态特征上与人更接近,可能更适合进行肝相关研究。

【关键词】　实验动物;肝;组织形态特征;比较;实验动物选择
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 09-0074-04
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.013

Tissue morphological characteristics of liver from four commonly used laboratory animals compared with those of human

LI Jing[1], WANG Yanli[2], LIU Enqi[3*]

(1. Key Laboratory for Molecular Genetic Mechanisms and Intervention Research on High Altitude Disease of Tibet Autonomous Region, School of Medicine, Xizang Minzu University, Xianyang 712000, China.
2. Department of Pathology, Xi'an Medical University, Xi'an 710021. 3. Laboratory Animal Center, Xi'an Jiaotong University Health Science Center, Xi'an 710061)

【Abstract】　Objective　To compare the livers of four commonly used laboratory animals (mouse, rat, guinea pig, and rabbit) with the human liver regarding tissue morphology, in order to provide a reference for study of the liver and the choice of laboratory animal. **Methods**　Livers of normal mice, rats, guinea pigs, and rabbits were obtained. The morphology, hepatic lobules, organ coefficient, and nucleoplasm ratio of the livers of the four animals were investigated and compared with those of human. **Results**　The results showed that the morphological characteristics of rabbit liver were the most similar to those of human liver, and the shapes of rabbit liver and human liver were irregular wedge and wedge, respectively. The nucleoplasm ratio of rabbit was also the closest to that of human, at 0.158 and 0.149, respectively. The hepatic lobules of guinea pig were the closest to those of human, with both five lobules. The liver coefficient of guinea pig was also the closest to that of human, at 3.096% and 2.35%, respectively. **Conclusions**　The organization and morphological characteristics of the liver of rabbit and guinea pig are closest to human, so these two animals may be more suitable for liver-related research.

【Keywords】　laboratory animal; liver; tissue morphological characteristics; comparison; laboratory animal choice

[基金项目]西藏民族大学基金(编号:17MDQ05);西藏自治区青年基金(编号:XZ2017ZRG-52(Z))。
[作者简介]李靖(1989—　),女,助教,研究方向:高原病分子机制研究。E-mail: 13193312868@163.com
[通信作者]刘恩岐(1965—　),男,教授,研究方向:动脉粥样硬化。E-mail: liuenqi@mail.xjtu.edu.cn

实验动物是生命科学研究的基础和重要支撑条件。目前,几乎所有生命科学领域的科研、教学、生产、鉴定、安全评价和成果评定都离不开实验动物。动物实验为现代医学的发展与进步作出了巨大贡献[1-2]。在动物实验中,选择适当的实验动物对于实验的成败至关重要。实验动物的选择通常要遵循标准原则、相似性原则、差异性原则、相从或相匹配原则、易化性原则、可行性原则、规格化原则等诸多原则[3],其中相似性原则是保证实验结果有意义的首要前提。基于此,本研究从形态特征和组织学特点入手比较了小鼠、大鼠、豚鼠、家兔这四种常用实验动物的肝与人肝的相似性,以期对肝研究中实验动物的选择提供理论参考。

1　材料和方法

1.1　实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠 10 只,体重 27 ~ 38 g,2.5 月龄;SPF 级 SD 大鼠 6 只,体重 370 ~ 445 g,5 月龄[SCXK (陕) 2014 - 003]。普通级短毛豚鼠 5 只,体重 287 ~ 327 g,2.5 月龄;普通级日本大耳白兔 4 只,体质量 3020 ~ 3140 g,6.5 月龄[SCXK (陕) 2015 - 003]。以上实验动物均为雄性,由西安交通大学实验动物中心提供。小鼠、大鼠、豚鼠、家兔的无菌手术在西安交通大学实验动物中心屏障动物实验设施进行[SYXK (陕) 2015 - 002]。实验过程中按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀,本实验研究 IACUC 号:XJTU2011041。

1.2　主要试剂与仪器

任氏液、酒精伊红染色剂、苏木素染色剂(北京雷根生物技术有限公司);中性树胶(广州凯秀贸易有限公司,SJ-604)。电脑生物组织包埋机(北京 Kedee,KD-BM II);切片机(德国 Leica,RM2235);摊片机(西安瑞丰仪器设备有限公司,GTK2001);显微拍照系统(日本 Olympus,DP27);图像分析系统(Image-Pro Plus 6.0);恒温箱(武汉市武昌实互仪器厂,JP-600);电子天平(Mettler Toledo 公司,AB104-S)。

1.3　实验方法

1.3.1　取材

处死小鼠、大鼠、豚鼠、家兔,处死后分别置于电子天平上称量体重并记录数据。固定、消毒、轻轻提起腹部皮肤,沿腹中线向上剪开至喉部,用解剖钳固定两边,露出胸腔及腹腔,用骨剪剪开胸骨及膈肌,露出肝,观察肝在体内的自然形态。取完整肝,称量肝重量并记录,用任氏液冲洗后,以自然状态置于干净的白瓷盘内,观察其形态,颜色,分叶,并拍照记录。

1.3.2　制作石蜡切片苏木素-伊红染色

从每个肝样本上切取 1 cm × 1 cm × 0.5 cm 大小的肝组织,用 10% 的甲醛固定,脱水、透明与浸蜡、包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色、封固后光镜下观察组织形态[4]。

1.3.4　显微照片分析

将 HE 染色切片置于显微镜下观察,选取 40 倍物镜下的两个不同视野拍摄显微照片,每张照片中选 20 个成像清晰的细胞,利用图片分析软件测量其细胞面积,细胞核面积,进而计算出胞浆面积和核浆比。

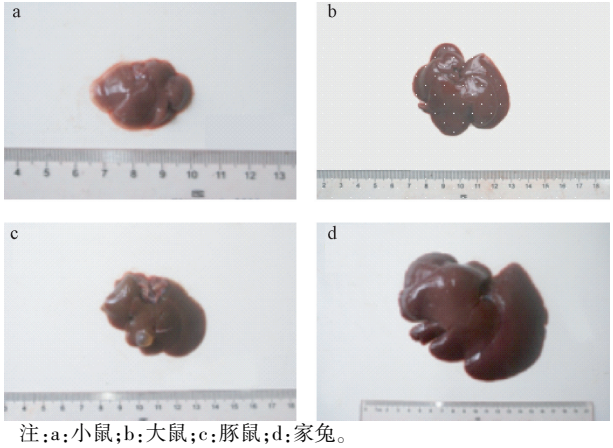
1.4　统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。组间比较采用 Mann-Whitney 非参数检验。实验数据以平均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2　结果

2.1　肝形态特征及分叶比较

解剖取材后,主要观察肝的外部形态特征,具体记录颜色、质地、边缘、形状、分叶等等。通过典型的形态特征与人类肝进行比较,小鼠、大鼠、豚鼠、家兔的肝(图 1)在颜色、质地和边缘上与人类肝均相似,但在形状和分叶上,家兔肝的形状与人的最接近,而豚鼠肝的分叶与人一致,均为五叶[5](表 1)。



注:a:小鼠;b:大鼠;c:豚鼠;d:家兔。

图 1　四种常用实验动物的肝

Note. a: Mouse; b: Rat; c: Guinea pig; d: Rabbit.

Figure 1　Livers of four commonly used laboratory animals

2.2 肝脏器系数的比较

实验动物的脏器系数(脏器重量/体重 × 100%)是其主要的生物学特性之一,是实验动物选择的一个重要指标[6]。将实验动物处死后称量其体重,解剖取材后称量其肝重,计算脏器系数,与人的脏器系数进行比较,中国男性肝平均重量为 1410 g,占体重 2.35%[7]。统计结果显示豚鼠肝的脏器系数与人的最接近,大鼠肝次之,小鼠肝的脏器系数与人的差别最大(表 2)。

2.3 肝细胞核浆比的比较

实验动物肝细胞的核浆比(细胞核截面积/细胞截面积)是肝细胞的主要特性之一,也是肝实验中经常用到的一个指标[8]。整理放大倍数为 400 倍的显微照片,从中挑选成像清晰的照片(图 2),每张照片中选 20 个细胞,利用图片分析软件测量其细胞面积,细胞核面积,进而计算出胞浆面积和核浆比,与章宗籍等人[9]测得的正常人肝的相关数据进行比较。统计结果显示家兔肝细胞的核浆比与人的最接近,大鼠次之,豚鼠肝细胞的核浆比与人的差异最大(表 3)。

3 讨论

在生物科学实验中经常需要使用动物,尤其是医学、药学、生物学、兽医学各领域内,许多试验工作,必须借助于动物。因为动物有许多种生物学反应与人相似,虽不能完全一样,但可作依据或参考[1]。以实验动物作为研究对象的研究方法也越来越多,所以,尽量选择与人类相似的动物作为实验对象已成为决定实验成败的一个关键环节,也是医学实验动物学兴起的一个重要原因。实验动物的选择主要遵循以下几点:一是尽量选择研究对象

表 1 四种常见实验动物与人的肝形态特征比较

Table 1 Morphological characteristics of the liver from four commonly used laboratory animals compared with those of human

	颜色、质地、边缘 Color, texture, edge	形状 Shape	分叶 Hepatic lobule
小鼠 Mouse	暗红色,质软,边缘光滑 Kermesinus, soft texture, smooth edge	不规则钝圆 Irregular circle	六叶 Six lobules
大鼠 Rat	暗红色,质软,边缘光滑 Kermesinus, soft texture, smooth edge	不规则钝圆 Irregular circle	六叶 Six lobules
豚鼠 Guinea pig	暗红色,质软,边缘光滑 Kermesinus, soft texture, smooth edge	不规则钝圆 Irregular circle	五叶 Five lobules
家兔 Rabbit	暗红色,质软,边缘光滑 Kermesinus, soft texture, smooth edge	不规则楔形 Irregular wedge	六叶 Six lobules
人 Human	暗红色,质软,边缘光滑 Kermesinus, soft texture, smooth edge	楔形 Wedge	五叶[5] Five lobules[5]

表 2 四种常用实验动物与人肝脏器系数的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Liver coefficient in four commonly used laboratory animals compared with that of human

	体重(g) Body weight	肝重(g) Liver weight	肝重/体重 Liver weight/Body weight
小鼠 Mice	33.54 ± 5.521	1.7512 ± 0.329	0.052 156 ± 0.005
大鼠 Rats	407.166 ± 37.791	16.473 33 ± 2.056	0.040 564 ± 0.005
豚鼠 Guinea pigs	307.6 ± 18.929	9.524 ± 0.503	0.030 962 ± 0.001
家兔 Rabbits	3080 ± 58.878	139.75 ± 2.5	0.045 373 ± 0.001
人 Human	60 000[7]	1410 ± 200[7]	0.0235[7]

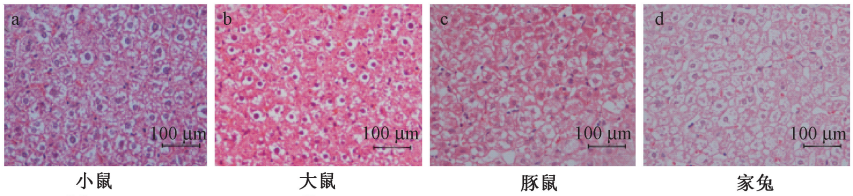


图 2 四种常用实验动物肝组织的 HE 染色切片(× 400)

Figure 2 HE staining of liver tissues of four commonly used laboratory animals

表 3 四种常用实验动物与人肝细胞核浆比的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Nucleoplasm ratio of the liver from four commonly used laboratory animals compared with that of human

	细胞面积(μm²) Area of cell	细胞半径(μm) Cell radius	核面积(μm²) Area of nucleus	核半径(μm) Nuclear radius	胞浆面积(μm²) Area of cytoplasm	核浆比 Nucleoplasm ratio
小鼠 Mice	1493.499 ±472.555	21.567 ±3.242	221.390 ±58.730	8.325 ±1.096	1272.109 ±449.080	0.187 ±0.061
大鼠 Rats	1579.711 ±444.995	22.208 ±3.145	168.773 ±31.515	7.300 ±0.661	1410.937 ±442.223	0.132 ±0.048
豚鼠 Guinea pigs	1062.603 ±251.833	18.256 ±2.25	171.108 ±19.338	7.367 ±0.444	891.495 ±243.791	0.192 ±0.063
家兔 Rabbits	1430.838 ±464.940	21.063 ±3.480	176.237 ±30.904	7.461 ±0.667	1254.601 ±453.868	0.158 ±0.061
人 Human	1154.157 ±310.827[9]	19.001 ±2.550[9]	139.460 ±41.607[9]	6.602 ±0.912[9]	1014.697 ±299.662[9]	0.149 ±0.060[9]

的功能、代谢、结构及疾病性质与人类相似的实验动物;二是选择解剖、生理特点符合实验目的要求的实验动物;三是根据实验动物不同品种、品系的特点选择实验动物;四是根据对实验质量的要求选择标准化的实验动物;五是符合实验动物选择的一般原则(性别、年龄、体重、生理状况与健康状况、实验条件等);六是经济性原则[10]。

本实验所选的四种实验动物分别为:小鼠,哺乳纲、啮齿目、鼠科、小鼠属;大鼠,哺乳纲,啮齿目,鼠科,大鼠属;豚鼠,哺乳纲、啮齿目、豚鼠科、豚鼠属;家兔,哺乳纲、兔形目、兔科、穴兔属。以上四种动物均为生命科学研究中常用的实验动物。从亲缘关系来看,小鼠、大鼠、豚鼠为哺乳纲、啮齿目,家兔为兔形目,与人类的亲缘关系均相似。但有实验通过研究耳蜗中存在的 *PDE* 基因在不同组织的表达情况得到结论:与小鼠和家兔相比豚鼠与人 *PDE* 基因序列同源性更高,提示豚鼠与人可能有着更近的亲缘关系,此研究从另外一个角度上增强了豚鼠作为疾病研究模式的可行性[11]。小鼠作为常用的实验动物,其在肝研究方面的应用非常广泛,不仅可作为肝癌等肝疾病模型动物[12],还有研究使用人源化小鼠和人肝嵌合体小鼠进行肝疾病的研究[13],这也为肝疾病研究提供了新的思路。有研究也使用大鼠作为高脂高铁诱导肝纤维化的动物模型[14]。近年来,家兔也被用作动脉粥样硬化及肝脂代谢相关疾病的动物模型[15-16]。从肝组织形态特征来看,大鼠的肝缺少胆囊,不能选作胆囊方面及与胆囊相关方面的研究。家兔的肝外形与人类相似,而豚鼠的分叶情况和脏器系数均与人类最接近。从肝细胞核浆比来看,家兔的肝细胞核浆比与人类最接近。此结果提示在肝相关研究中使用豚鼠和家兔作为实验动物可能更为合理。

参考文献:

[1] 张永江, 陈洪岩, 夏长友. 实验研究中实验动物的选择及其相关干扰因素 [J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(5): 316-319.

[2] 李雪梅, 周雪, 迟成涛, 等. 在中医药学中动物实验与实验动物的选择 [J]. 长春中医药大学学报, 2011, 27(2): 305-308.

[3] 于远望, 于莉莉, 张淑珍. 中医药科研实验动物的选择原则 [J]. 陕西中医学院学报, 2002, 25(4): 50-52.

[4] 蔡晓雯, 沈武成. 石蜡切片 HE 染色的体会 [J]. 医药论坛杂志, 2011, 32(1): 167-170.

[5] 林威刚. 肝脏影像学分叶和实际解剖分叶之间的差异性研究 [D]. 大连医科大学, 2012.

[6] 孙建新, 安娟, 连军. 影响实验动物脏器重量及脏器系数因素分析 [J]. 实验动物科学, 2009, 26(1): 49-51.

[7] 王继先, 李本孝, 陈如松, 等. 中国人主要脏器重量参考值 [J]. 中华放射医学与防护杂志, 1995, 15(4): 248-254.

[8] Baak JP. The principles and advances of quantitative pathology [J]. Anal Quant Cytol Histol, 1987, 9(2): 89-95.

[9] 章宗籍, 申丽娟, 欧阳明, 等. 人体慢性肝病和肝癌的定量病理诊断研究:慢性肝病及肝癌的形态定量分析 [J]. 昆明医学院学报, 2001, 22(1): 5-8.

[10] 邵义祥. 医学实验动物学教程 [M]. 南京: 东南大学出版社, 2008: 105-108.

[11] 黄敏齐. 豚鼠磷酸二酯酶基因 cDNA 的鉴定与分析 [D]. 广州医学院, 2009.

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

[13] 任晓楠, 周晓辉. 用于肝脏疾病研究的人源化小鼠模型概述 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(5): 95-99.

[14] 何宏星, 陈洁, 黄芳, 等. 高脂高铁致大鼠肝纤维化模型的初探 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(6): 648-653.

[15] 高守翠, 成大欣, 赵四海, 等. 胆固醇酯转移蛋白转基因家兔制作及生物学特性分析 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(4): 331-335.

[16] 沈晓京, 赖炳森, 吴红梅, 等. 天然配比油对家兔肝组织中脂肪酸的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2002, 10(1): 39-42.

〔收稿日期〕2018-02-06

经验交流

品管圈在降低动物实验不规范行为发生率中的应用

梁　磊,尤金炜,胡文娟,陈　莉,卢　阳,赵志刚,田小芸,祁树宝,
恽时锋*

(解放军南京总医院比较医学科,全军实验动物科普与伦理教育基地,全国科普教育基地,南京　210002)

【摘要】　目的　探讨品质管理圈(quality control circle,QCC)活动在降低动物实验不规范行为发生率中的应用效果。**方法**　成立品管圈小组"爱心福利圈",按照品管圈活动步骤,分析本院研究人员动物实验中不规范行为的发生原因,针对性地拟定对策并实施。**结果**　通过品管圈活动,本院动物实验中不规范行为的发生率由每周 82.5 次降低至每周 22.33 次。**结论**　品管圈活动可以有效降低动物实验中不规范行为的发生率,提高实验动物管理工作质量。

【关键词】　品管圈;动物实验;管理
【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 09-0078-05
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.014

Application of a quality control circle for reducing the rate of non-standardized behaviors in animal experiments

LIANG Lei, YOU Jinwei, HU Wenjuan, CHEN Li, LU Yang, ZHAO Zhigang, TIAN Xiaoyun, QI Shubao, YUN Shifeng*

(Department of Comparative Medicine, Nanjing General Hospital; Army Education Base of Science and Ethics of Experimental Animals; National Science Education Base, Nanjing 210002, China)

【Abstract】　Objective　To explore the application of a quality control circle (QCC) for reducing the rate of non-standardized behaviors in animal experiments. **Methods**　A QCC team named "Love and Welfare" was set up. According to the steps of QCC activity, the causes of non-standardized behaviors during animal experiments of the researchers in our hospital were analyzed, and the related countermeasures were formulated and implemented. **Results**　Through this QCC activity, the rate of non-standardized behaviors occurred during animal experiments in our hospital was reduced from 82.5 times to 22.33 times per week. **Conclusions**　QCC activity has significant effects on reducing the rate of non-standardized behaviors and can be used for enhancing the quality of animal experiment management.

【Keywords】　quality control circle(QCC); animal experiments; management

近年来,随着生命科学的飞速发展,实验动物行业也在不断发展,对动物实验需求的增加使许多医药企业、大专院校和医疗机构等都建设了自己的实验动物设施,同时所使用的实验动物的数量和品种都在逐年提升。快速的发展使越来越多的人员接触、加入到实验动物行业中来,同时大量科研院所学生的加入使得实验动物行业内部人员的流动性进一步增加。由于各种各样

[作者简介]梁磊(1982—　),男,兽医硕士,实验师,主要从事实验动物福利伦理、人类疾病动物模型研究。E-mail: STONEL29@163.com
[通信作者]恽时锋(1965—　),男,主任技师,博士,硕士生导师,主要从事实验动物与比较医学研究。E-mail: yunshifeng1@163.com

的原因,部分实验者甚至从业人员本身都并未具备完善的实验动物方面的知识和技能[1-3]。正是由于专业知识和素养的欠缺,在实际工作中往往出现一些不规范的行为和表现。本文以本院比较医学科为对象,利用品质管理圈(quality control circle,QCC)的思路和方法,开展了减少动物实验中不规范行为的实践研究。品质管理圈简称品管圈,是指相近或相关联的工作岗位上的人自发组成一个团体,大家分工合作,应用品管工具发现问题、分析问题、解决问题,以达到工作质量控制提升的目标[4]。现将本次品管圈活动的情况汇报如下。

1　资料和方法

1.1　对象

选取 2017 年 2 月 20 日至 2017 年 3 月 31 日(共计 6 周)和 2017 年 7 月 24 日至 2017 年 9 月 1 日(共计 6 周)所有在本科室实验室进行的动物实验为观察对象,其中 2017 年 2 月 20 日至 2017 年 3 月 31 日为改善前阶段,2017 年 7 月 24 日至 2017 年 9 月 1 日为改善后阶段。

1.2　品管圈组建

根据自愿原则由 8 名科室人员组成品管圈,并由科室主任担任辅导员。投票选出圈长,并确定圈名为“爱心福利圈”。

1.3　主题选定

采用头脑风暴的方法,全体圈员围绕科室实际工作,共提出 4 个圈主题,并从重要性、迫切性、圈能力以及上级政策符合度四个方面,采用“5、3、1”评分法对 4 个圈主题进行评价,汇总得分,最终选定“降低动物实验不规范行为发生率”为本次品管圈活动主题。

1.4　计划拟定

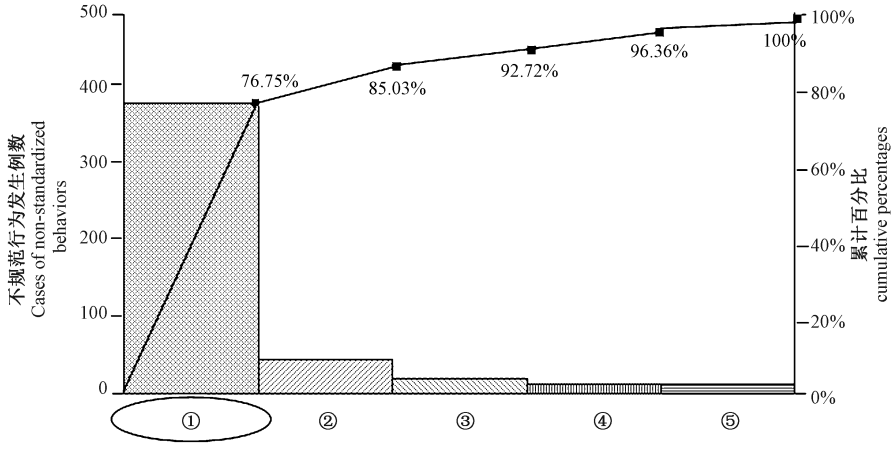
根据品管圈活动十大步骤,遵循 PDCA(plan、do、check、action,即计划、实施、效果确认、处置)循环法,拟定活动计划甘特图,确定每一步的具体时间,并且责任到人。

1.5　现状把握

参照现有的动物实验流程图和动物实验守则规范制作查检表,对 2017 年 2 月 20 日至 2017 年 3 月 31 日间在本科室实验室进行的所有动物实验进行查检和记录,共记录到不规范行为 495 次,平均每周 82.5 次。圈员将所有记录进行归纳、统计,绘制柏拉图(图 1)。根据 80/20 原则,确定“人员、物品等进入实验环境的不规范”为本次改善重点。

1.6　目标设定

依照公式:目标值 = 现况值 - 改善值 = 现况值 -(现况值 × 改善重点 × 圈能力)进行计算并设定目标。其中,圈能力 =(评价圈员对主题完成能力的得分)/(满分,即完美完成)× 100%,该主题中



注:①进入实验环境程序不规范;②私自取走公共物品;③废弃物处理不当;④实验后动物未按要求返回;⑤其他。

图 1　改善前不规范行为分析柏拉图

Note. ①Non-standardized procedures of entering the experimental environment; ②taking public goods away; ③non-standardized garbage disposal; ④animals not returned as required after experiments; ⑤others.

Figure 1　Pareto analysis of non-standardized behaviors before improvement

圈能力得分为 75%。经计算得:目标值 = 82.5 次/周 - (82.5 次/周 × 76.75% × 75%) = 35.01 次/周,即改善目标为将不规范行为由每周发生 82.5 次减少至每周发生 35.01 次,改善幅度需达到 57.56%。

1.7 解析

1.7.1 全面分析

全体圈员使用头脑风暴的方法,从"人员、环境、方法"几个方面进行全面分析,找出所有可能导致不规范行为发生的原因,经归纳、总结后发现不规范行为的发生主要有"人员、环境、方法、其他"这四个方面的原因,绘制鱼骨图(图 2)。

1.7.2 要因分析

全体圈员对所有的小原因按重要程度进行打分(重要 5 分、次重要 3 分、再次 1 分),统计得分,根据 80/20 法则,得分 32 分以上为要因,共确定要因 8 项。

1.7.3 真因验证

全体圈员根据 8 条要因制作查检表,对 2017 年 2 月 20 日至 2017 年 3 月 31 日期间的所有动物实验记录进行重新查检,所得结果绘制柏拉图(图 3),确定"实验管理制度执行不力,科研人员规范意识差,动物实验前培训不到位,动物实验室笼位空间不足,动物实验室缺少明显的流程标识"这 5 条真因。

1.8 对策拟定

全体圈员使用头脑风暴的方法,针对真因积极寻找解决方法,并对所有方法按可行性、经济性和圈能力进行 5、3、1 评分,按照 80/20 原则,共确定 5 条对策。

1.9 对策实施与检讨

对策 1:加强科室工作人员的培训,强化业务能力。定期组织科室工作人员进行学习,加强对实验规章制度的理解,落实对制度的执行。

对策 2:加强科研人员的动物实验前培训。到本科室进行实验的科研人员人数多,且实验动物方面的技能、知识水平参差不齐。加强对他们的实验前培训,帮助他们了解动物实验的基本流程、基本技术以及实验的规章制度,以减少其后实验中不规范行为的发生。

对策 3:帮助科研人员制定合理的实验安排并定期监督。许多科研人员对自己的实验安排计划性差,存在拖拉现象,实验处理不及时,废弃动物也不及时淘汰,造成实验室笼位空间浪费。由本科室工作人员帮助安排实验并监督,可以缩短实际实验时间,节约实验室笼位空间。

对策 4:及时提醒。本科室工作人员,无论任何岗位,只要发现有不规范行为的发生,都应及时提醒,制止不规范行为。

对策 5:设立醒目标识。在实验场所设立醒目的标识,可以帮助科研人员了解实验场所和实验流程,提醒科研人员注意实验规范。

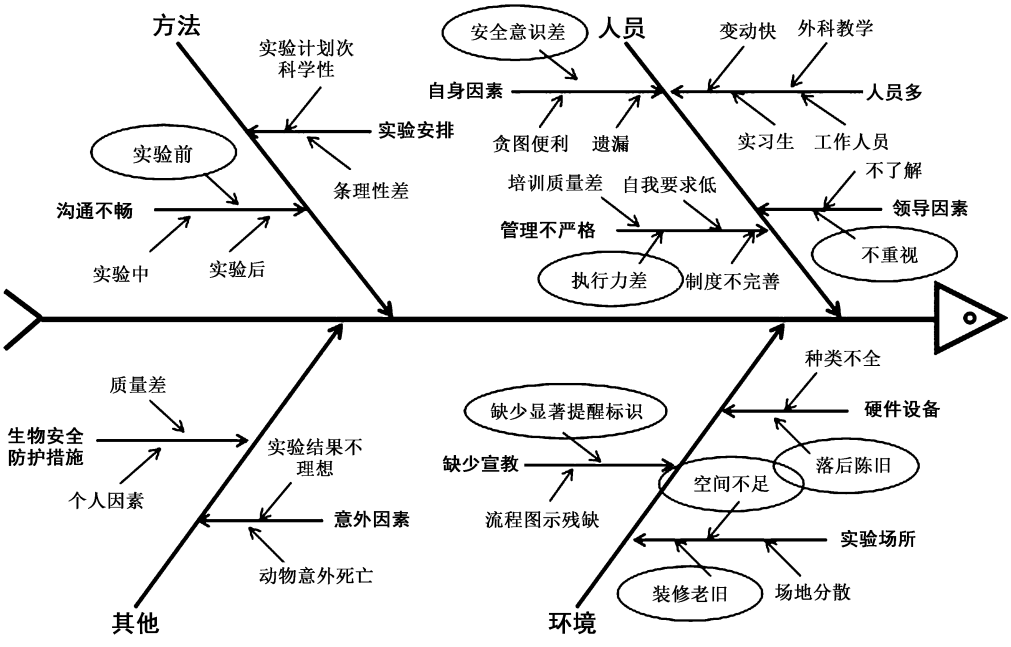


图 2 进入实验场所不规范原因分析鱼骨图

Figure 2 Fishbone diagram of the causes of non-standardized entry procedures into labs

2　结果

2.1　效果确认

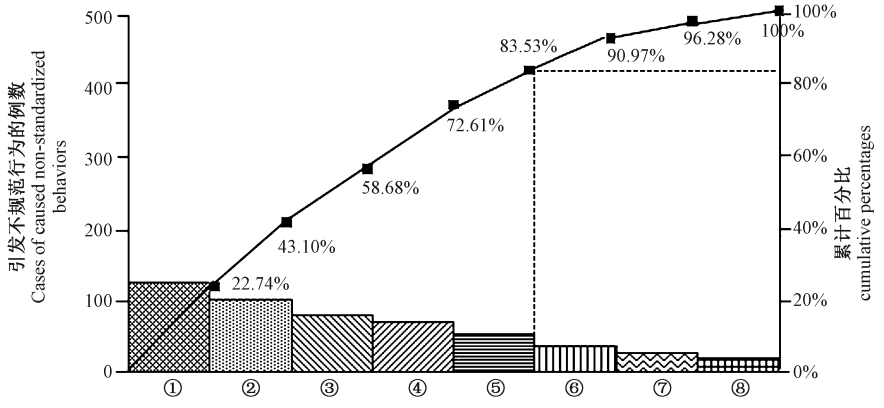
所有 5 条对策,经后期确认,均为有效对策。对策实施后,全体圈员对 2017 年 7 月 24 日至 2017 年 9 月 1 日期间在本科室所进行的所有动物实验再次进行了现场查检,共记录到不规范行为 134 起,平均每周 22.33 次。相比于改善前每周 82.5 次的不规范行为发生率,改善后为每周 22.33 次,改善幅度为 72.93%,目标值为 57.56%,目标达成。

2.2　无形成果

效果达成后,全体圈员自制评分表,从“合作能力、自信心、沟通与协调能力、面对问题的勇气、责任心、积极性、团队凝聚力、品管圈手法认识”这 8 个方面进行自我评价。结果如图 4 所示,全体圈员的各项能力均得到了提升。

2.3　标准化

全体圈员结合本次圈活动的具体情况,对原有的动物实验流程和动物实验规章制度条款进行了修改,形成了新的动物实验流程和动物实验规范,并标准化。



注:①规范意识差;②实验前培训不到位;③笼位空间不足;④缺少显著流程标识;⑤实验管理制度执行不力;⑥实验设备落后;⑦科室不重视;⑧装修老化。

图 3　引发动物实验中不规范行为的真因验证柏拉图

Note. ① Lack of standardization; ② insufficient training before experiments; ③ insufficient cage space for laboratory animals; ④lack of obvious signs for process identification; ⑤ineffective enforcement of experimental management rules; ⑥ poor equipment; ⑦ignored by department leaders; ⑧poor fitments.

Figure 3　Pareto analysis of the true causes of non-standardized behaviors in animal experiments

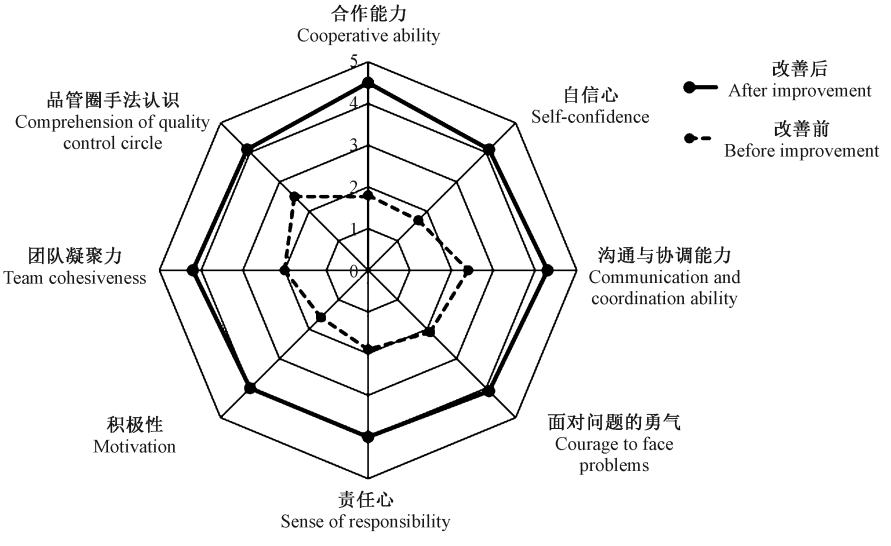


图 4　本次品管圈活动无形成果雷达图

Figure 4　Radar chart of intangible benefits of this QCC activity

3 讨论

品管圈,全称品质管理圈(quality control circle, QCC),最先起源于美国,后由日本学者吸收、改进并广泛使用而得以流行,20 世纪 80 年代初进入中国大陆地区,近年来被广泛地用于企业和医院管理领域,特别是质量控制方面,成效显著[5-6]。查阅品管圈文献,当中并未见到有关实验动物方面的报道,可以说,品管圈活动在实验动物领域的实践尚处于空白阶段。

本文从规范本院实验动物管理的目的出发,应用品管圈活动,寻找管理工作中的漏洞与缺陷,集思广益,群策群力,成功地减少了动物实验过程中不规范行为的发生次数,管理工作质量得到了有效的提升。同时,经过品管圈活动,增强了全科同志的凝聚力、协调性以及工作积极性,个人价值与能力得到提升,从而使实验动物管理流程更加清晰、更加科学,也得到了科研人员的一致好评。由此可见,品管圈是一个好的质量管理工具,在此将本科室的活动过程进行了汇报,以期给行业内机构作为借鉴和参考。本科室仍处于刚刚接触品管圈的阶段,在讨论分析、工具应用等方面还有许多欠缺,将在后续的工作中进行持续改进,同时也希望行业内更多的机构能够参加进来,以便进行更好的推广。

参考文献:

[1] 王关嵩, 钱桂生, 杨晓静, 等. 我国临床科研论文中应用实验动物的现状 [J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(2): 163-165.

[2] 孔琪. 全国实验动物行业现状调查和发展对策研究 [D]. 中国协和医科大学, 2008.

[3] 张国伟, 康雪涛, 彭涛, 等. 实验动物替代技术在中国实验动物部分调查初步报告 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10-11): 144-149.

[4] 张兴国. 医院品管圈活动实践与技巧 [M]. 杭州: 浙江大学出版社, 2010: 1-2.

[5] 张春燕, 吕苏梅. 品管圈在降低神经外科责任护士床边交接班缺陷率中的应用 [J]. 护理实践与研究, 2016, 13(6): 133-135.

[6] 梁铭会, 刘庭芳, 董四平. 品管圈在医疗质量持续改进中的研究 [J]. 中国医院管理, 2012, 32(2): 37-39.

〔收稿日期〕2018-02-04

(上接第 68 页)

目前针对 NOD 小鼠体外受精的文献较少,通过实验发现有些 NOD 背景小鼠的胚胎存在发育相对迟缓的情况,受精 24 h 后的观察结果与受精后 48 h 的观察结果不同,主要是一部分畸形的胚胎又转变为二细胞胚胎,这其中的机制有待于进一步研究。NOD 背景小鼠受精卵的原核相对于 C57BL/6J 小鼠发育迟缓很多,有研究显示在体外受精实验结束后 8 h 进行显微注射大部分的受精卵无法发育到正常形态的二细胞胚胎,很多都处于形态异常状态,在体外受精 15 h 后注射后的胚胎才能发育到不存在形态异常的二细胞阶段[5]。这一研究成果还可以应用到通过显微注射方法生产转基因小鼠领域,为了获得更为高效的注射效果,在通过显微注射方法生产转基因小鼠的时候最好延迟注射时间。

目前广泛应用的小鼠品系如 C57BL/6J 进行超排的周龄一般为 4 周龄左右,但是 NOD 背景小鼠使用 4 周龄雌鼠进行超排后再进行体外受精实验的效果很差,受精率低,每只雌鼠可用二细胞胚胎数量明显低于平均水平。针对目前 NOD 背景小鼠可用二细胞胚胎数量低的情况,本实验进行了相关研究,并得到了有意义的结果,为今后实际生产提供了有效的指导,在降低生产成本的同时还保证了实验效率。结果证实 10 周龄 NOD 雌鼠进行体外受精效果最好。

参考文献:

[1] Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, et al. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice [J]. Jikken Dobutsu, 1980, 29(1): 1-13.

[2] Kikutani H, Makino S. The murine autoimmune diabetes model: NOD and related strains [J]. Adv Immunol, 1992, 51: 285-322.

[3] Kumagai K, Kubota N, Saito TI, et al. Generation of transgenic mice on an NOD/SCID background using the conventional microinjection technique [J]. Biol Reprod, 2011, 84(4): 682-688.

[4] 徐平. 不同日龄和品系小鼠超排卵、体外受精及受孕率的比较研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2001, 11(2): 78-81.

[5] Songsasen N, Leibo SP. Cryopreservation of mouse spermatozoa. II. Relationship between survival after cryopreservation and osmotic tolerance of spermatozoa from three strains of mice [J]. Cryobiology, 1997, 35(3): 255-269.

[6] Li F, Cowley DO, Banner D, et al. Efficient genetic manipulation of the NOD-*Rag*1 -/- *IL2RgammaC-null* mouse by combining *in vitro* fertilization and CRISPR/Cas9 technology [J]. Sci Rep, 2014, 4: 5290.

〔收稿日期〕2018-05-23

设施设备

动物鼻式气溶胶暴露装置的运行效果评价

郝新彦,向志光,高　虹*

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,北京　100021)

【摘要】 **目的**　本研究旨在探讨动物鼻式气溶胶暴露装置能否正常运行并产生特定粒径大小的气溶胶颗粒,探究运行过程中装置气溶胶气密性、分布均匀性及消毒剂对系统的消毒效果。**方法**　使用动物鼻式气溶胶暴露装置产生大肠杆菌(*Escherichia coli*,*E. coli*)气溶胶、鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus)MHV-JHM 气溶胶,分别用 75% 乙醇、3% 过氧化氢对系统进行消毒,分别采集暴露舱内、易泄露处及消毒后的 *E. coli*、MHV-JHM。对采集的 *E. coli* 进行微生物培养;对采集的 MHV-JHM 提取 RNA,一步法 RT-PCR 检测样本中病毒 RNA。**结果**　装置产生的 *E. coli* 气溶胶颗粒中值直径为(1.27 ± 0.61) μm,暴露舱内采样液涂板有菌落生成,置于暴露舱不同端口的 NC 膜上菌落数一致,易泄露处的沉降平皿上无菌落生长,消毒后采样平皿上无菌落生长;暴露舱内采样液中的 MHV-JHM 病毒 RNA 为阳性,易发生泄露处采样液中病毒 RNA 为阴性,消毒后采样液中病毒 RNA 为阴性。**结论**　动物鼻式气溶胶暴露装置能正常运行产生气溶胶;在运行过程中,暴露舱各端口有气溶胶通过并分布均匀,气密性好;使用相应的消毒剂可对系统进行有效消毒,消毒效果完全。

【关键词】 动物鼻式气溶胶暴露装置;气密性;分布均匀性;大肠杆菌;鼠肝炎病毒 MHV-JHM
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 09-0083-07
doi: 10.3969/j.issn.1671 – 7856. 2018.09.015

Evaluation of the operational effect of the animal nose-only inhalation exposure device

HAO Xinyan, XIANG Zhiguang, GAO Hong*
(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 **Objective**　To investigate whether the animal nose-only inhalation exposure device can operate normally and produce aerosol particles of a specific size, to explore the air tightness and uniform distribution of the aerosol during operation, and to examine the disinfection effect of disinfectant on the system. **Methods**　*Escherichia coli* (*E. coli*) aerosol and mouse hepatitis virus MHV-JHM aerosol were developed by the nose-only inhalation exposure device, and a solution of 75% ethanol and 3% hydrogen peroxide was run through the nebulizer to disinfect the system. *E. coli* and MHV-JHM were collected respectively in the exposure chamber, at sites where leaking easily occurred, including after disinfection. The sampled *E. coli* was cultured. In addition, RNA from the sampled MHV-JHM was extracted and one-step RT-PCR was then used to test the presence of viral RNA from the samples. **Results**　The result showed that the mass median aerodynamic diameter of the *E. coli* aerosol was 1.27 ± 0.61 μm, that colonies grew after coating of a plate with sample liquid collected in the exposure chamber, that the numbers of cultured colonies by NC membrane sampling of

[基金项目]"十三五"国家科技重大专项(编号:2018ZX10734401-011);国家重点研发计划(编号:2016YFD0501003)。
[作者简介]郝新彦(1993—　),女,硕士研究生,研究方向:感染性疾病动物模型制作。E-mail: 1905133927@qq.com
[通信作者]高虹(1968—　),女,研究员,研究方向:药物临床前安全性评价。E-mail: gaoh@cnilas.org

different ports were similar, and that no colony growth was found on the sedimentation plate at sites where leaking readily occurred or on the sampling plates after disinfection. There was a positive result for MHV-JHM virus RNA of the sampling solution from the liquid impinger, while there were negative results for MHV-JHM virus RNA of the sampling solutions from the sites where leaking easily occurred and after disinfection. **Conclusions** The results show that the animal nose-only inhalation exposure device can operate normally and develop an aerosol that is passed through and distributed evenly in each port of the exposure chamber during operation; moreover, the device was shown to have good air tightness. The system can be effectively disinfected by using the corresponding disinfectant, and the disinfection effect is comprehensive.

【**Keywords**】 animal nose-only aerosol exposure device; air tightness; uniformity of distribution; *Escherichia coli*; mouse hepatitis virus MHV-JHM

动物鼻式气溶胶暴露装置(nose-only inhalation exposure device)是可模拟产生药物、毒物等化学物质及病毒、细菌等病原微生物气溶胶、气体或蒸汽的设备,仅将动物鼻部暴露于设定环境中,使动物吸入含有受试物的空气而达到定量攻毒感染[1-3]。鼻式气溶胶暴露装置可通过装有细菌、病毒等病原微生物悬浮液的雾化器雾化产生微生物气溶胶,实验动物吸入气溶胶后,在感染过程中避免了消化道、皮肤等其他暴露途径感染,感染方式与自然环境极为相似[1-9]。为使用动物鼻式气溶胶暴露装置进行安全有效的病原微生物气溶胶感染,本实验选择大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. coli*)、鼠肝炎病毒(mouse hepatitis virus)MHV-JHM 作为模式微生物,分别代表细菌和病毒,使用此暴露装置发生细菌、病毒气溶胶,探究装置能否正常运行,同时探讨装置运行过程中产生的气溶胶粒径大小、装置气密性、气溶胶在暴露舱内的分布均匀性及消毒剂对装置的消毒效果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

菌种、病毒:大肠杆菌(有氨苄抗性,Amp^+)、鼠肝炎病毒毒株 MHV-JHM 毒株均引自中国医学科学院医学实验动物研究所。

1.2 主要试剂与仪器

LB 固体培养基(Amp^+),LB 液体培养基(Amp^+),DMEM 无血清高糖培养基,RNA 提取试剂盒(TaKaRa,9766,北京宝日医生物技术有限公司),一步法 RT-PCR 试剂盒(TaKaRa,RR064A,北京宝日医生物技术有限公司),硝酸纤维素(NC)膜(Millipore,0.45 μm)。ABI 7500 Real-time PCR 扩增仪(USA),动物鼻式气溶胶暴露装置(美国 In-TOX P.O.BOX2070,NM505-832-5107):动物鼻式气溶胶暴露装置主要由洁净压缩空气系统、气溶胶输送管路、净化装置(真空泵、高效过滤器)、气溶胶发生装置(Lovelace 喷雾器、稀释器、混合器)、48 孔鼻式暴露舱、测试动物安置装置(动物固定管)、采样装置(ZR-A02 型安德森六级采样器、In-TOX 液体撞击采样器)和暴露系统控制柜组成(如图 1 所示)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物鼻式气溶胶暴露装置产生大肠杆菌气溶胶

(1)气溶胶粒径大小评价:将 6.5 mL 2×10^9 CFU/mL 大肠杆菌菌液倒入喷雾器小管内,稀释流量为 18.3 L/min,排气流量为 20 L/min,维持暴露舱微负压。设置装置在雾化压力为 5, 10, 15, 20, 25 PSI 下发生气溶胶,安德森六级采样器在总排气管路分别采样 20 min。采样平皿于 37℃下培养 12 h,评价在不同压力下采样气溶胶的粒谱分布。将各级采样平皿采集的气溶胶颗粒按级别分为 6 组数据,依据偏态分布 50% 中值直径计算公式算出发生气溶胶总粒子的中值直径。

(2)气溶胶到达暴露舱端口评价:将 6.5 mL 2×10^9 CFU/mL 大肠杆菌菌液倒入喷雾器小管内,稀释流量为 18.3 L/min,排气流量为 20 L/min,雾化压力为 20 PSI,采样流量为 2.2 L/min,维持暴露舱微负压,以 LB 液体培养基作为采样液,液体撞击采样器采样 20 min。分别取采样液 1 mL 涂于两个 LB 固体培养基上,于 37℃下培养 12 h,观察采样平皿上是否有菌落生长,评价暴露舱端口是否有气溶胶通过。

(3)气溶胶分布均匀性评价:48 孔动物鼻式暴露舱共 4 层,每层间隔 3 个端口放置一个固定管(如图 2 所示),NC 膜(1 cm × 1 cm)置于小鼠固定器前端端口处采样 20 min。将 NC 膜放于 LB 固体培养基上,于 37℃下培养 12 h,观察 NC 膜上是否有菌落生长并计数,评价暴露舱各端口是否都有气溶胶到达,气溶胶分布是否均匀。其他参数设置同 1.3.1 中的(2)。

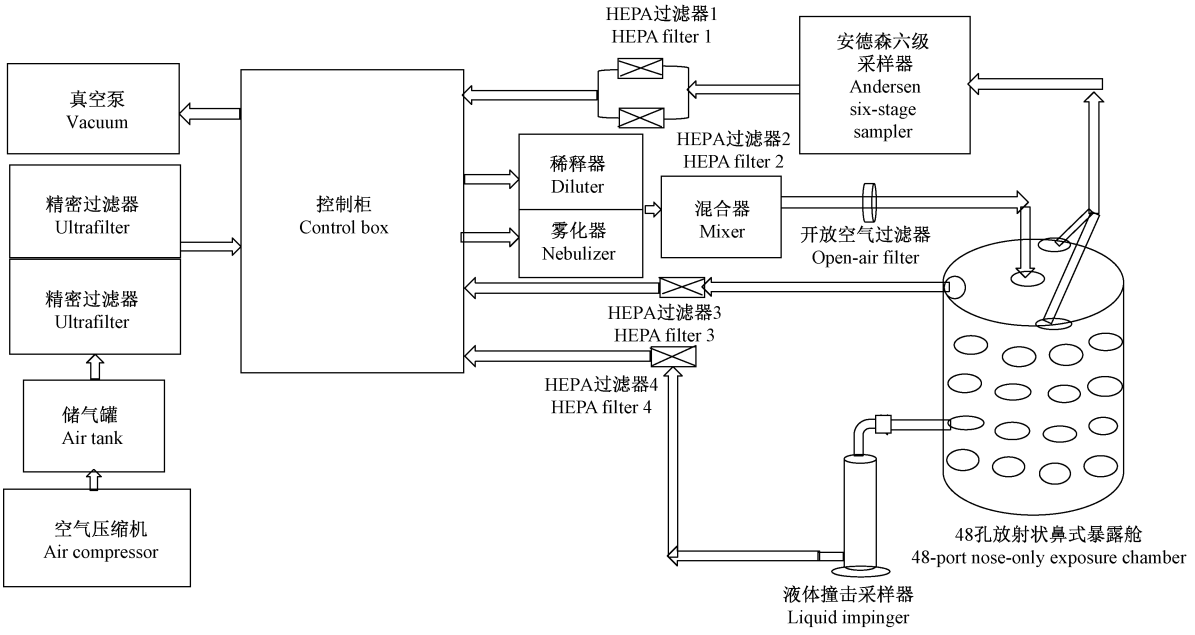
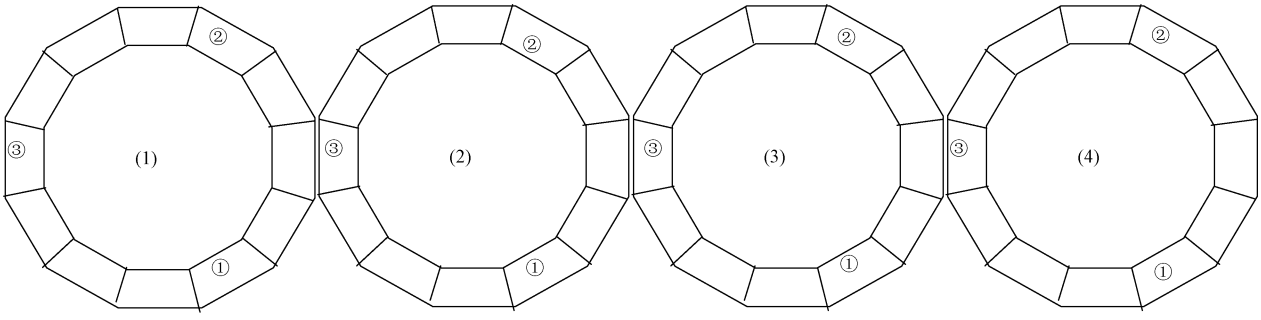


图 1　In-TOX 鼻式气溶胶暴露系统示意图

Figure 1　Schematic figure of the In-TOX nose-only inhalation exposure device



注：图中(1)～(4)分别为暴露舱的从上至下 1～4 层，在各层①、②、③暴露口放置小鼠固定器，并用 NC 膜进行采样。

图 2　48 孔鼻式暴露舱各层各端口分布图

Note. Figures (1) – (4) are representative of layers 1 – 4 of the exposure chamber from top to bottom. Animal tubes were placed on port ①, port ②, and port ③ of each layer. The NC membrane placed at the nozzle of animal tubes was used for sampling.

Figure 2　Each port of each layer in the 48-port nose-only exposure chamber

(4)装置气密性评价：在进行 1.3.1 中的(1)、(2)、(3)发生 *E. coli* 气溶胶操作时，在暴露装置易发生泄露的 6 处(雾化器旁、暴露舱上端排气处、安德森六级采样器旁、液体撞击采样器旁、高效过滤器旁、真空泵旁)摆放沉降平皿，沉降 20 min。将沉降平皿于 37℃下培养 12 h，观察沉降平皿上是否有菌落生长，评价暴露装置是否发生气溶胶泄露。

(5)装置消毒效果评价：大肠杆菌气溶胶停止运行后，空运行系统 10 min，以排出含有大肠杆菌气溶胶的气体；将 8 mL 75% 乙醇加入喷雾器小管内，系统运行 30 min 进行消毒；消毒后空运行系统 30 min，以排出含有乙醇的空气。消毒结束后，空运行系统并使用安德森六级采样器采样 20 min。采样平皿于 37℃下培养 12 h，观察平皿上是否有菌落生长，评价在装置产生大肠杆菌气溶胶后，75% 乙醇对装置的消毒效果。其他参数设置同 1.3.1 中的(2)。

1.3.2　动物鼻式气溶胶暴露系统产生 MHV-JHM 气溶胶

(1)发生 MHV-JHM 气溶胶：取 6.5 mL 备好的 1.5×10^8 拷贝数/mL 的 MHV-JHM 病毒液倒入喷雾器小管内，雾化流量为 0.6 L/min，稀释流量为 18.3 L/min，排气流量为 20 L/min，雾化压力为 20 PSI，采样流量为 2.2 L/min，维持暴露舱微负压，以

DMEM 无血清高糖培养基为采样液,液体撞击采样器在暴露舱单个端口采样 20 min。收集采样液进行后续 RNA 提取[1.3.2 中的(3)]及一步法 RT-PCR 检测病毒 RNA 扩增的荧光值[1.3.2 中的(4)]。评价系统是否发生病毒气溶胶,及单个暴露舱端口是否有气溶胶气流通过。

(2)装置气密性评价:待系统停止气溶胶发生后,灭菌棉签采集易泄露的 5 处(开放空气过滤器处、雾化器小管处、液体撞击采样器处、暴露舱端口处、暴露舱上端进气管路处)MHV-JHM 气溶胶。将采样棉签放于 DMEM 无血清高糖培养基中,对培养基进行后续 RNA 提取[1.3.2 中的(3)]及一步法 RT-PCR 检测病毒 RNA 扩增的荧光值[1.3.2 中的(4)]。评价装置在运行过程中是否发生气溶胶泄露。

(3)提取 RNA:以 DMEM 无血清高糖培养基作为阴性对照,使用 RNA 提取试剂盒,按照试剂盒说明书提取气溶胶发生液、采样器采样液及 1.3.2 第(2)条中所采集样本的 RNA,并于 -30℃保存备用。

(4)一步法 RT-PCR 扩增:病毒 MHV-JHM 一步法 RT-PCR 的引物、探针由赛默飞世尔科技(中国)有限公司设计并合成,其序列见表 1。其中,荧光探针 5'端标记为 FAM,3'端标记为 BQ1。

以 1.3.2 第(3)条中提取的 RNA 为模板,以 ddH_2O 设置阴性对照,使用一步法 RT-PCR 试剂盒,应用 ABI 7500 Real-time PCR 系统进行荧光定量 PCR 扩增。反应体系如表 2 所示,共 20.0 μL。RT-PCR 反应程序为:反转录反应(42℃,5 min;95℃,10 s),1 个循环;PCR 反应(95℃,5 s;60℃,34 s),共 40 个循环。进行病毒 RNA 检测。

(5)装置消毒效果评价:病毒气溶胶停止运行后,空运行系统 10 min,以排出含有病毒气溶胶的气体;将 6.5 mL 3% 过氧化氢溶液加入喷雾器小管内,系统运行 30 min 进行消毒;消毒后空运行系统 30 min,以排出含有过氧化氢的空气。消毒结束后,空运行系统,以 DMEM 无血清高糖培养基为采样液,液体撞击采样器在暴露舱单个端口采样 20 min。收集采样液进行后续 RNA 提取[1.3.2 中的(3)]及一步法 RT-PCR 检测病毒 RNA 扩增的荧光值[1.3.2 中的(4)],评价在装置产生 MHV-JHM 病毒气溶胶后,3% 过氧化氢溶液对装置的消毒效果。其他参数设置同 1.3.2 中的(1)。

2 结果

2.1 气溶胶粒径大小评价结果

由表 3 和图 3 可知,在雾化压力为 5 ~ 25 PSI 条件下,安德森六级采样器所采集的气溶胶颗粒主要集中分布在 5 级(1.1 ~ 2.1 μm)、6 级(0.65 ~ 1.1 μm),中值直径在(1.27 ± 0.61) μm。提示鼻式气溶胶暴露装置能正常运行,产生中值直径为(1.27 ± 0.61) μm 气溶胶颗粒。

2.2 气溶胶到达暴露舱端口评价结果

液体撞击采样器采样 *E. coli* 气溶胶,取采样液 1 mL 分别涂两平板,培养后两平板上均有菌落生长,菌落数分别为 64、84。ABI 7500 Real-time PCR 系统检测到液体撞击器采样样本中的 MHV-JHM RNA 为阳性(如图 4 所示)。提示装置能正常运行发生细菌、病毒气溶胶,且产生的气溶胶可以到达暴露舱端口。

2.3 气溶胶分布均匀性评价结果

NC 膜上有菌落生长,菌落数均在 10 左右,计数结果如表 4 所示,暴露舱各端口菌落数一致。提示产生的气溶胶均到达暴露舱各端口,且气溶胶分布均匀。

表 1 MHV-JHM 病毒 RT-PCR 扩增引物及荧光探针
Table 1 Primers and fluorescent probes for RT-PCR of MHV-JHM

探针/引物名称 Probe/Primer names	序列(5' → 3') Sequences (5' → 3')
MHV-JHM F	GGAACTTCTCGTTGGGCATTATACT
MHV-JHM R	ACCACAAGATTATCATTTTCACAACATA
探针 Probe	ACATGCTACGGCTCGTGTAACCGAACTGT

表 2 一步法 RT-PCR 反应体系
Table 2 Reaction system of one-step RT-PCR

试剂 Reagents	使用量(μL) Reaction volumes
One step RT-PCR buffer III (2 ×)	10.0
无 RNA 酶的 ddH_2O RNase-free ddH_2O	5.2
正向 PCR 引物(10 μmol/L) PCR forward primer (10 μmol/L)	0.4
反向 PCR 引物(10 μmol/L) PCR reverse primer (10 μmol/L)	0.4
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/μL)	0.4
PrimeScript RT enzyme mix II	0.4
ROX reference dye II (50 ×)	0.4
探针 Probe	0.8
总 RNA Total RNA	2.0

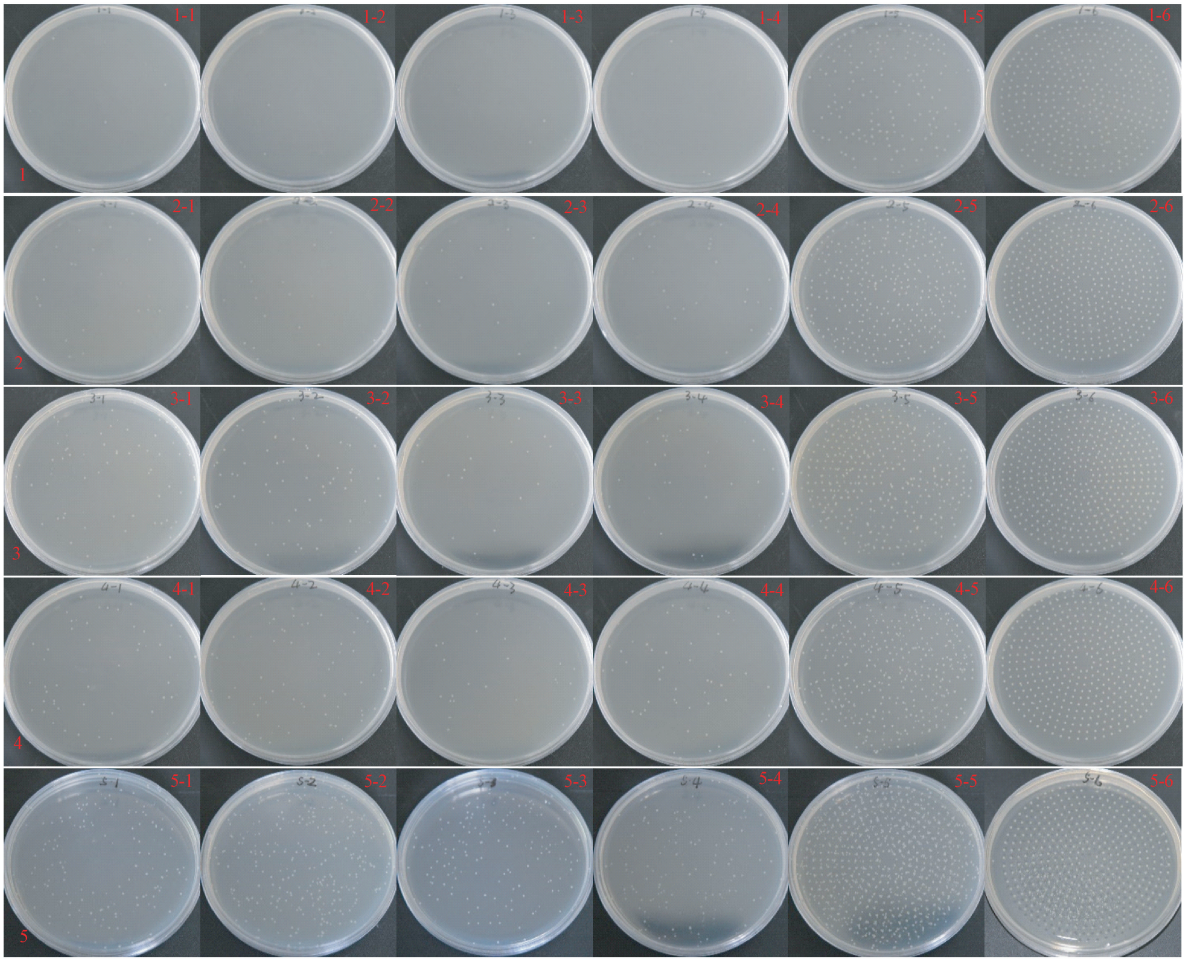
表 3　安德森六级采样器捕获粒径分布情况及中值直径结果

Table 3　Particle size distribution and mass median aerodynamic diameter of aerosol sampled by Andersen six-stage sampler

分级 Stage	粒径大小分布(μm) Particle size distribution	雾化压力(PSI) Nebulizer pressure 5 菌落数/皿 Colony number/ Petri dish	5 累积频数 Cumulative frequency	10 菌落数/皿 Colony number/ Petri dish	10 累积频数 Cumulative frequency	15 菌落数/皿 Colony number/ Petri dish	15 累积频数 Cumulative frequency	20 菌落数/皿 Colony number/ Petri dish	20 累积频数 Cumulative frequency	25 菌落数/皿 Colony number/ Petri dish	25 累积频数 Cumulative frequency
1 级 Stage 1	> 7.0	3	3	26	26	81	81	57	57	159	159
2 级 Stage 2	4.7 ~ 7.0	2	5	19	45	77	158	76	133	324	483
3 级 Stage 3	3.3 ~ 4.7	2	7	16	61	22	180	26	159	176	659
4 级 Stage 4	2.1 ~ 3.3	4	11	26	87	34	214	53	212	151	810
5 级 Stage 5	1.1 ~ 2.1	150	161	303	390	346	560	353	565	487	1297
6 级 Stage 6	0.65 ~ 1.1	336	497	402	792	401	961	407	972	405	1702
P_{50}		0.77		0.66		1.87		1.88		1.18	

注：中值直径：$P_{50} = L + i/f(50\% n - c)$，其中，L 为中位数所在组段的下限；i 为该组段的组距；f 为中位数所在组段的频数；n 为总的累积频数；c 为小于 L 各组段的累积频数。

Note. Mass median aerodynamic diameter (MMAD): $P_{50} = L + i/f(50\% n - c)$. In the formula, L: lower limit of group segment with median; i: the group range of the group segment with median; f: frequency of the group segment with median; n: total cumulative frequency; c: cumulative frequency of each group less than L.

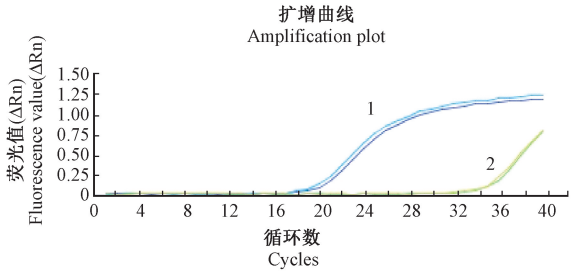


注：标号 1 ~ 5：分别是 In-TOX 动物鼻式气溶胶暴露系统在雾化压力为 5，10，15，20，25 PSI 条件下所产生的 *E. coli* 气溶胶结果图。第一行(标号 1)：1-1 至 1-6 分别是雾化压力为 5 PSI 条件下，安德森六级采样器从 1 级到 6 级采样平皿的菌落数；第二行至第五行(标号 2 ~ 5)：每行内各标号与第一行同理，分别是雾化压力为 10，15，20，25 PSI 条件下，安德森六级采样器从 1 级到 6 级采样平皿的菌落数。

图 3　安德森六级采样器采样气溶胶分布结果

Note. Labels 1 – 5: The distribution of *E. coli* aerosol sampled by the In-TOX animal nose-only inhalation exposure system under the conditions of 5, 10, 15, 20, and 25 PSI nebulizer pressure. In the first row (label 1), 1-1 to 1-6 represent the numbers of colonies from stage 1 to stage 6 of the Anderson six-class sampler under the condition of 5 PSI nebulizer pressure. For the second to the fifth rows (labels 2 – 5), equivalent values are presented for nebulizer pressures of 10, 15, 20, and 25 PSI, respectively.

Figure 3　The distribution result of aerosol sampled by the Andersen six-stage sampler



注:1:MHV-JHM 病毒发生液;2:液体撞击器采集 MHV-JHM 病毒气溶胶。

图 4 实时荧光定量 PCR 实验

Note. 1: MHV-JHM virus liquid; 2: MHV-JHM aerosol sampled by liquid impinger.

Figure 4 Test of real-time fluorescence quantitative PCR

表 4 NC 膜上的菌落数

Table 4 Number of colonies on NC membrane

暴露舱层数 The layer of the exposure chamber	暴露舱各层端口 The port of each layer			均值 Mean
	①	②	③	
1	10	9	10	9.7
2	11	10	10	10.3
3	10	10	11	10.3
4	10	9	9	9.3

2.4 装置气密性评价结果

放置在暴露装置易发生泄露部位的 6 个沉降平板上大肠杆菌菌落计数为 0;一步法 RT-PCR 检测易泄露处(开放空气过滤器处、雾化器小管处、液体撞击采样器处、暴露舱端口处、暴露舱上端进气管路处)采样样本中的病毒 RNA 为阴性。提示鼻式气溶胶暴露装置在发生气溶胶过程中未发生气溶胶泄露,气密性良好。

2.5 装置消毒效果评价结果

对系统进行消毒后,放置在安德森六级采样器上的 6 个采样平皿上大肠杆菌菌落计数为 0;一步法 RT-PCR 检测装置进行消毒后的采样样本中的病毒 RNA 为阴性。表明 *E. coli* 气溶胶、MHV-JHM 气溶胶分别在 75% 乙醇、3% 过氧化氢运行后可被彻底杀灭,提示使用相应的消毒剂可对系统进行有效的消毒,消毒效果完全。

3 讨论

本实验选择大肠杆菌和鼠肝炎病毒分别代表细菌和病毒发生气溶胶,使用安德森六级采样器、液体撞击采样器、NC 膜进行采样。安德森六级采样器采集粒谱范围广、采样效率高、微生物失活率低、敏感性高[10-11],故采样平皿培养后的菌落计数结果明显;液体撞击采样器采样时间通常为 1 ~ 10 min 时采样效率较高[12-13],之前研究表明,采样流量多设置为 10 L/min 左右[11];但在此鼻式气溶胶暴露装置中,液体撞击采样器所在采样管路本身采样流量小,最大为 2.2 L/min,为增加采样量,实验中采样时间长,为 20 min,存在微生物粒子撞击时的损伤、微生物粒子逃逸和再次气溶胶化、收集介质蒸发等问题,采样效率低,故采集到的细菌气溶胶经培养后活菌菌落数较少[11, 14]。对液体撞击采样器采集到的病毒气溶胶,使用灵敏度高、高效快速的实时荧光定量 RT-PCR 法进行检测。本次实验因 NC 膜易于裁剪、使用方便,故使用 NC 膜进行采样;LB 液体培养基浸润的 NC 膜(1 cm × 1 cm)放在动物固定管喷嘴处,面积较小,且不宜长时间采样、采样效率低[11],故菌落计数较少。

对于安德森六级采样器 1 级(> 7.0 μm)、2 级(4.7 ~ 7.0 μm)相当于人体的鼻、咽、喉等上呼吸道;3 ~ 6 级相当于人体的下呼吸道;3 级(3.3 ~ 4.7 μm)相当于人体的气管、支气管,4 级(2.1 ~ 3.3 μm)相当于人体的二级支气管,5 级(1.1 ~ 2.1 μm)相当于人体的终末细支气管,6 级(0.65 ~ 1.1 μm)相当于人体的肺泡[15]。研究表明,气溶胶粒子在人体呼吸器官的沉积分节与其粒子大小有关,5 ~ 10 μm 的易沉着于气管和支气管,而 1 ~ 5 μm 的粒子可直接侵入肺泡[16-20]。现已评价 In-TOX 鼻式气溶胶暴露装置能正常运行,产生中值直径为(1.27 ±0.61) μm 的气溶胶颗粒,颗粒大小可直接侵入肺泡,所发生的气溶胶满足气溶胶吸入感染实验的要求;产生的气溶胶可以到达且均匀分布到暴露舱各个端口,运行过程中未发生气溶胶泄露,暴露装置气密性良好,使用相应的消毒剂可对系统进行有效的消毒,消毒效果完全。在实验过程中,用以发生气溶胶的悬浮液用量较少;鼻式暴露舱能同时感染多只动物,安全性、准确性提高,动物鼻式气溶胶暴露装置在微生物气溶胶感染中受到越来越多的关注。本研究为动物鼻式气溶胶暴露装置安全有效地用于实验动物高致病性病原微生物气溶胶的吸入感染研究提供依据。

参考文献:

[1] Belser JA, Gustin KM, Katz JM, et al. Influenza virus infectivity and virulence following ocular-only aerosol inoculation of ferrets [J]. J Virol, 2014, 88(17): 9647 - 9654.

[2] Bowen LE, Katie R, Trombley JE, et al. Development of a

murine nose-only inhalation model of influenza: comparison of disease caused by instilled and inhaled A/PR/8/34 [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012, 2: 74.

[3] 郝新彦, 张元慧, 高虹. 动物气溶胶暴露装置的特点及其应用 [J]. 中国医学装备, 2018, 15(1): 127 - 130.

[4] 杨玉琴, 徐春华, 朱召芹, 等. 三个品系小鼠流感病毒气溶胶感染模型的比较 [J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 145 - 149.

[5] Tuttle RS, Sosna WA, Daniels DE, et al. Design, assembly, and validation of a nose-only inhalation exposure system for studies of aerosolized viable influenza H5N1 virus in ferrets [J]. Virol J, 2010, 7: 135.

[6] Wong BA. Inhalation exposure systems: design, methods and operation [J]. Toxicol Pathol, 2007, 35(1): 3 - 14.

[7] McDonald RS, Sambol AR, Heimbuch BK, et al. Proportional mouse model for aerosol infection by influenza [J]. J Appl Microbiol, 2012, 113(4): 767 - 778.

[8] Lednicky JA, Hamilton SB, Tuttle RS, et al. Ferrets develop fatal influenza after inhaling small particle aerosols of highly pathogenic avian influenza virus A/Vietnam/1203/2004 (H5N1) [J]. Virol J, 2010, 7: 231.

[9] Stone BR, Heimbuch BK, Wu CY, et al. Design, construction and validation of a nose-only inhalation exposure system to measure infectivity of filtered bioaerosols in mice [J]. J Appl Microbiol, 2012, 113(4): 757 - 766.

[10] ElHansy MHE, Boules ME, Farid H, et al. *In vitro* aerodynamic characteristics of aerosol delivered from different inhalation methods in mechanical ventilation [J]. Pharm Dev Technol, 2017, 22(6): 844 - 849.

[11] 王彦杰, 李琳, 许光素, 等. 微生物气溶胶采集技术的特点及应用 [J]. 微生物学通报, 2017, 44(3): 701 - 709.

[12] Paul D, Kristin B, Brandi D, et al. Recovery efficiencies for *Burkholderia thailandensis* from various aerosol sampling media [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2012, 2: 78.

[13] Zhen H, Han T, Fennell DE, et al. Release of free DNA by membrane-impaired bacterial aerosols due to aerosolization and air sampling [J]. Appl Environ Microbiol, 2013, 79(24): 7780 - 7789.

[14] Haddrell AE, Thomas RJ. Aerobiology: experimental considerations, observations, and future tools [J]. Appl Environ Microbiol, 2017, 83(17): e00809-17.

[15] 张松乐, 童咏仪, 姜黎, 等. 国产六级安德森空气微生物采样品的简化使用效果观察 [J]. 中国公共卫生, 1994, 10(10): 454 - 455.

[16] Nave R, Mueller H. From inhaler to lung: clinical implications of the formulations of ciclesonide and other inhaled corticosteroids [J]. Int J Gen Med, 2013, 6: 99 - 107.

[17] Lewis DA, O'Shea H, Church TK, et al. Exploring the impact of sample flowrate on *in vitro* measurements of metered dose inhaler performance [J]. Int J Pharm, 2016, 514(2): 420 - 427.

[18] Alonso C, Raynor PC, Davies PR, et al. Concentration, size distribution, and infectivity of airborne particles carrying swine viruses [J]. PLoS One, 2015, 10(8): e0135675.

[19] Gustin KM, Belser JA, Wadford DA, et al. Influenza virus aerosol exposure and analytical system for ferrets [J]. Proc Nat Acad Sci U S A, 2011, 108(20): 8432 - 8437.

[20] Bohannon JK, Lackemeyer MG, Kuhn JH, et al. Generation and characterization of large-particle aerosols using a center flow tangential aerosol generator with a non-human-primate, head-only aerosol chamber [J]. Inhal Toxicol, 2015, 27(5): 247 - 253.

〔**收稿日期**〕2018 - 05 - 17

设施设备

生物安全型禽负压隔离器的研制

张宗兴[1,2],祁建城[1,2*],吴金辉[1,2],张恩雷[1,2],张金明[1,2],衣　颖[1,2]

(1. 军事科学院卫勤保障技术研究所,天津　300161; 2. 国家生物防护装备工程技术研究中心,天津　300161)

【摘要】　目的　研制一种生物安全型禽负压隔离器。**方法**　依据国家标准对动物隔离设备的要求,综合考虑气密传递和消毒功能的实际需求,对隔离器的结构进行设计。**结果**　隔离器综合集成通风过滤系统、物品传递系统、自控系统、消毒连接系统、污水收集处理系统,经过第三方检测,其技术指标达到国家标准要求。**结论**　该隔离器适用于高致病性感染禽类饲养与实验研究,可满足我国生物安全实验室开展相关研究的现实需求。

【关键词】　生物安全;禽负压隔离器;气密传递;消毒

【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 09-0090-06

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.016

Development of a biosafety negative-pressure poultry isolator

ZHANG Zongxing[1,2], QI Jiancheng[1,2*], WU Jinhui[1,2], ZHANG Enlei[1,2], ZHANG Jinming[1,2], YI Ying[1,2]

(1. Institute of Medical Support Technology, Academy of Military Sciences, Tianjin 300161, China.
2. National Bio-Protection Engineering Center, Tianjin 300161)

【Abstract】　Objective　To develop a biosafety negative-pressure poultry isolator. **Methods**　In accordance with national standards for animal isolation equipment, taking into account the actual needs of airtight transfer and disinfection functions, the structure of an isolator was designed. **Results**　The isolator was integrated with an operating system, ventilation and filtration system, transfer system, automatic control system, sterilization connection system, and sewage collection and treatment system. Upon testing by a third party, it was confirmed that its technical indicators meet the national standards. **Conclusions**　The isolator is suitable for feeding and experimental research of animals with highly pathogenic infections, meeting the practical needs of biosafety laboratories in China.

【Keywords】　biosafety; negative-pressure poultry isolator; airtight transfer; disinfection

近年来,在全球范围内高致病性禽流感疫情频发,而我国部分地区成为疫情重灾区,已造成严重的经济损失。同时,全球各地不断出现人感染禽流感疫情,截止到 2013 年底,仅我国(包括香港与台湾地区)就有 48 人死于高致病性禽流感[1],且仍处于进一步扩散态势,已对我国的公共卫生安全构成严重威胁。高致病性禽流感已被世界动物卫生组织列为法定必须上报的 A 类传染病,在我国也被列为《国家中长期动物疫病防治规划(2012—2020 年)》优先防治一类动物疫病[2]。因此,世界各国开始加大投入开展与禽流感相关的科学实验研究。由于高致病性禽流感的危险性,为降低感染风险,开展高致病性禽流感感染动物的饲养、实验以及检验检疫等操作需要在高等级生物安全动物隔离器内进行。

目前,国内从事禽流感科学研究的实验室大多

[基金项目]国家重点研发计划课题(编号:2016YFC1201401)。

[作者简介]张宗兴(1985—　),男,博士,研究方向:生物防护技术与装备。E-mail: zhangzx@npec.org.cn

[通信作者]祁建城(1971—　),男,研究员,研究方向:生物防护技术与装备。E-mail: qijch@npec.org.cn

数使用的是国产隔离器,多由饲养 SPF 级动物的笼具改造而成[3],在关键的生物安全指标方面,难以达到 CNAS-CL53《实验室生物安全认可准则对关键防护设备评价的应用说明》[4] 的技术要求,无法满足高致病性感染动物实验的生物安全要求,存在较大的生物安全隐患。因此,使用此类国产隔离器的实验室,均存在无法通过 CNAS 评审而不能继续开展相关实验研究的问题。而国外进口设备价格昂贵,且存在后期维护依赖外方、有保密安全隐患等严峻问题,难以满足我国广泛开展相关研究的现实需求,严重制约了我国高致病性病原微生物防控的能力和水平,亟需研发技术性能指标满足标准要求的隔离操作设备。

1 禽负压隔离器简介

禽负压隔离器是动物隔离器的一种。动物隔离器作为一种实验动物专用设施,可通过采用多种有效隔离方法维持隔离器内部环境(实验动物所处环境)与外界环境处于有效隔离状态(无菌或无外来污染),如空气经过高效过滤器后送入,并经过高效过滤器处理后排出,物品经过无菌处理后方能进出饲养空间,该设备既能保证动物与外界隔离,又能满足动物所需要的特定环境;同时,避免操作者穿着过多的防护服,改善操作人员工作的舒适度、灵活性,降低误操作,提高安全水平;感染物质完全受控,使污染区域最小化[5]。

根据压力可将隔离器分为正压隔离器和负压隔离器。正压隔离器是指隔离器内压力高于外部大气压力,多用于清洁动物饲养(防止外部环境感染内部环境);负压隔离器则指隔离器内压力低于外部大气压力,多用于感染动物实验(防止内部环境有害物质污染外部环境),通常高等级生物安全实验室安装负压动物隔离器进行感染动物的饲养和实验。根据负压隔离器的机械密封性能,又可将隔离器分成非气密式隔离器和气密式隔离器。两者主要区别在于设备结构、消毒方式、气密性要求等方面。非气密式隔离器多用于饲养中型动物,由于非气密式隔离器无法有效防止病原微生物泄漏至其所在室内环境,若开展携有或感染了高致病病原微生物的动物实验时,必须有效提高实验室基础隔离设施的防护水平和人员个体防护水平,这极大地提高了开展此类实验活动的门槛;而气密式动物隔离器则可以保证在开展同类实验活动时起到有效安全隔离的作用,有效降低了对实验室基础隔离设施和人员个体防护的要求,更加适用于我国目前的大多数 ABSL-3 实验室。

我国实验室生物安全装备起步较晚,且由于国产禽负压隔离器多数是通过对用于 SPF 级动物饲养的正压隔离器改造而来,其箱体结构气密性、高效过滤器安装可靠性、过滤器原位检测、物品气密传递、气(汽)体消毒、手套的连接方式、操作方便性等方面与进口产品均存在较大差距。目前,国内引进的进口禽负压隔离器主要来自美国与法国的两家公司,两者的结构形式存在较大差异,箱体主体结构分别采用了不锈钢材质与 HDPE(高密度聚乙烯)材质,传递装置则分别采用了液体密封传递与快速传递接口(rapid transfer ports, RTP)双门传递系统。引进上述进口隔离器除存在前文提到的问题之外,在隔离器本身技术层面,仍存在一些问题,比如:①压差控制多采用手动调节方式,无法实时对压差进行自动调节;②手套口中心风速普遍偏低,无法在操作手套脱落情况下自动增大隔离器排风量以提高手套口风速;③某些型号隔离器无法安全更换手套,即手套更换过程中无法保证隔离器整体气密性;④某些型号隔离器本身缺少高效过滤器原位检漏的条件;⑤密闭阀均为手动操作,操作不便。

2 生物安全型禽负压隔离器设计原则

生物安全型禽负压隔离器不仅需要具备高可靠性的高效空气过滤装置以有效防止隔离器内部有毒有害微粒未经过滤而泄漏到外部,而且需要具备良好的箱体严密性和稳定的负压控制以实现机械密封和负压双重隔离防护,其所有操作均需要通过手套来实现且物品传递过程中不能破坏隔离器箱体的严密性,同时,还需具备对隔离器进行整体消毒的技术措施以满足生物安全要求。因此,生物安全型禽负压隔离器(以下简称“隔离器”)的设计主要遵循三个原则:一是可满足我国相关标准的要求;二是建立方便快捷的气密传递链条;三是建立完整的消毒链条。

我国关于动物饲养环境的标准主要有 GB 14925 – 2010《实验动物 环境及设施》[6],关于生物安全性能评价标准主要为 RB/T 199 – 2015《实验室设备生物安全性能评价技术规范》[7] 与 GB 50346 – 2011《生物安全实验室建筑技术规范》[8];同时,本文所研究的隔离器为气密式隔离器,其结构与Ⅲ级

生物安全柜类似,因此可参考采用 JG 170 – 2005《生物安全柜》[9]。在本产品设计过程中,充分参考了上述标准的相关要求。

隔离器的物品传递系统主要用于实验前与实验过程中清洁物品的传入,实验过程中血液唾液等样本、实验废弃物、粪便等物品的传出。实验前,需要将实验鸡、饲料、实验装置等提前放入隔离器;实验过程中,需要向隔离器内定期添加饲料与放入实验器材,同时需要不定期从隔离器内取出采集的样本、已使用的器材(不可重复使用的)、死亡的鸡等,并定期取出收集的粪便。其中,动物粪便的处理有干法和湿法两种处理手段:干法通常是在隔离器的底部铺设塑料布,定期或实验结束后将落满粪便的塑料布卷起,打包传出;湿法通常是定期使用冲洗水枪冲洗隔离器底部的粪便,并将污水排放至污水收集装置。

隔离器的消毒链条主要包括隔离器(含高效过滤器)本身以及所有在实验过程中从隔离器内传出物品的消毒,包括污染废弃物、采集样本、动物粪便、污水(湿法)等。隔离器在整个实验周期结束后,需要进行整体气体消毒;实验过程中污染废弃物的传出,需要进行无害化处理,如高温或气体消毒;对于采集的样本,由于需要进行进一步的实验或样本保留,只能对其所收集的容器表面进行气体消毒;采用干法收集的动物粪便,可采用高温消毒或液体浸泡消毒方式,而采用湿法收集的动物粪便则主要采用液体消毒方法。

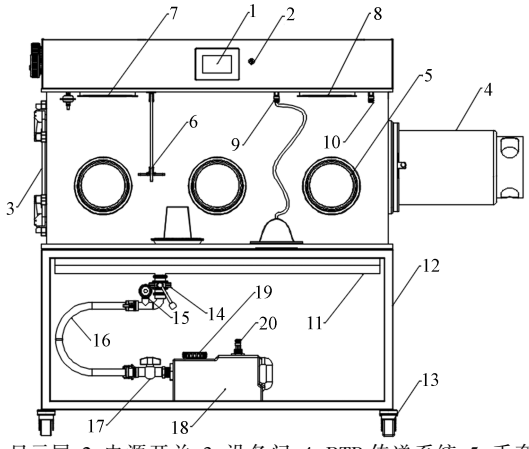
3 隔离器结构设计

禽负压隔离器主要由隔离箱体、通风过滤系统、传递系统、自控系统、污水收集处理系统组成,如图 1 所示。

3.1 箱体

隔离器箱体四周均采用硬质透明材料密闭焊接制作,具有良好的可视性,同时箱体上的所有接口均采用密闭方式穿板连接以有效保证隔离器的密封性。隔离器的顶部为通风过滤系统和自控系统。隔离器箱体顶部面板设置禽饮用水接口和冲洗用水接口,工作台面由多块格栅板组成,用于禽类栖息以及放置饲料和饮水,金属网架的底部为排水槽,用于收集粪便和污水。隔离器箱体底部安装不锈钢支架,支架底部四角均设置移动脚轮。

隔离器两侧操作面板上均安装有长手套,长手套通过弹性橡胶圈固定于箱体法兰凹槽上。用于固定手套的法兰上设置有两条凹槽,可方便在线安全更换手套[10]。长手套为氯丁橡胶(neoprene)材质,具有良好的操作手感,同时对臭氧、紫外线、浓酸、浓碱和强氧化剂都有很好的耐性,适用于生物安全操作环境。隔离器箱体两端分别设置设备门和 RTP 传递系统。隔离器箱体内顶部设置可折叠式置物台,需要时可将台架放下用于临时摆放实验器材。



注:1:显示屏;2:电源开关;3:设备门;4:RTP 传递系统;5:手套口;6:可折叠式置物台;7:送风口;8:排风口;9:饮用水接口;10:液体冲洗接口;11:底部水槽;12:支架;13:脚轮;14:排水截止阀;15:过滤器;16:排水管;17:污水收集桶截止阀;18:污水收集桶;19:污水收集桶盖;20:消毒接口。

图 1 隔离器正视图

Note. 1: Display screen; 2: power switch; 3: equipment door; 4: RTP transfer system; 5: glove port; 6: folding shelving unit; 7: air supply outlet; 8: air exhaust outlet; 9: drinking water port; 10: liquid wash port; 11: bottom water channel; 12: trestle; 13: trundles; 14: drainage globe valve; 15: filter; 16: drain-pipe; 17: globe valve of sewage collection bucket; 18: sewage collection bucket; 19: bung of sewage collection bucket; 20: sterilization port.

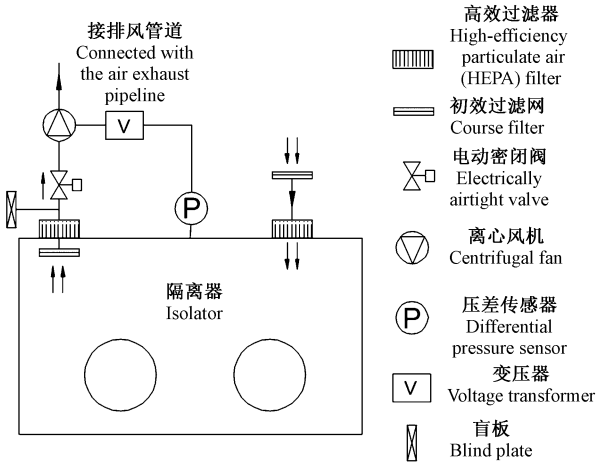
Figure 1 Front view of isolator

3.2 通风过滤系统

通风过滤系统由送风高效过滤器、排风高效过滤器、通风管路、生物密闭阀、排风机等组成,如图 2 所示。进风口设置有初效过滤器,送、排风高效过滤器均为 H14 级高效过滤器,其最低穿透粒径(most penetration particle size, MPPS)过滤效率 ≥ 99.995%。

禽负压隔离器的送排风高效过滤器均应具备原位检漏条件以检测过滤器的完整性和安装的可靠性,从而有效防止病原微生物扩散至外环境。由于送风高效过滤器的出风面紧邻隔离器进风口,因

此采用在隔离器内通过手动扫描检漏方式对其进行原位检漏。排风高效过滤器则采用效率法进行原位检漏,在排风高效过滤器的下游管路的气溶胶混匀处设置有下游气溶胶采样口。为了防止禽类啄击与羽毛堵塞高效过滤器,在送风高效过滤器出风面和排风高效过滤器进风面均设置有金属滤网和初效过滤器。在排风高效过滤装置的下游设置有生物密闭阀,密闭阀的下游安装有变频离心风机。



注:箭头表示气流方向。

图 2　隔离器通风过滤系统原理图

Note. Arrows indicate the direction of airflow.

Figure 2　Diagram showing principle of isolator ventilation filtration system

3.3　传递系统

传递系统位于隔离器箱体两端,由设备门和 RTP 传递系统组成。设备门可用于在实验准备阶段,可通过设备门将实验用禽类、饲料、实验装置等提前放入隔离器,同时,为了避免在实验过程中人员误操作而打开设备门,在设备门上设置了锁具。RTP 传递系统主要用于实验过程中物品的传入和传出,主要包括饲料、实验器材、采集的样本、已使用的器材(不可重复使用的)、死鸡、粪便等。RTP 传递系统由安装在隔离器上 RTP 传递门和 RTP 传递桶组成,RTP 传递门通常称为 α 门,而 RTP 传递桶上的门称为 β 门。将传递桶安装到 α 门之后,传递桶与隔离器形成密封,同时,α 门与 β 门结合在一起并形成密封,打开 α 门与 β 门的合体门之后,隔离器与传递桶相连通。根据传递桶的材质,可分为不锈钢材质和 HDPE(高密度聚乙烯)材质,不锈钢传递桶采用高温高压方式对其内部物品及内腔进行消毒,传递桶上安装有用于泄压的高效过滤器;而 HDPE 传递桶则采用气(汽)体熏蒸消毒,其桶底外部安装有 2 个消毒接口用于连接消毒机,桶底内部安装有 2 只高效过滤器,分别与消毒接口连通。HDPE 传递桶可用于传递需要保存的样本,采用气体熏蒸消毒可对样本外包装进行消毒而不破坏样本本身。

3.4　自控系统

自控系统主要由 PLC 控制模块、显示屏、压差传感器、密闭阀执行器、变频器、照明、加热模块、温湿度传感器、报警模块、开关、电源等组成。自控系统可控制排风机的启停、密闭阀开关、压差、温度、照明、报警等,并可实时记录隔离器内环境参数。由压差传感器、变频器、风机与隔离器内压差构成闭环控制回路,可根据隔离器内实时压差自动调节风量时刻保持压差恒定在设定值。由加热模块、温湿度传感器与隔离器排风温度构成闭环控制回路,可根据隔离器排风温度实时调节加热模块,可满足不同日龄的禽类对环境温度的要求。温湿度传感器安装在生物密闭阀和风机之间的管路上,可有效避免在隔离器消毒过程中消毒剂对传感器的化学腐蚀。照明由 LED 光源组成,可手动控制开关。报警系统可在压差、温度超出设定范围后进行声光报警。

3.5　消毒连接系统

消毒连接系统主要由消毒连接口、消毒循环管路组成。在排风管上设有消毒循环旁路,隔离器正常运行模式下,消毒循环旁路出口端是密闭的。在消毒模式下,隔离器进风口则转换为消毒剂注入口,将消毒循环旁路的接口打开,作为消毒剂排出口,分别连接消毒机的进出口,同时生物密闭阀关闭。

3.6　污水收集系统

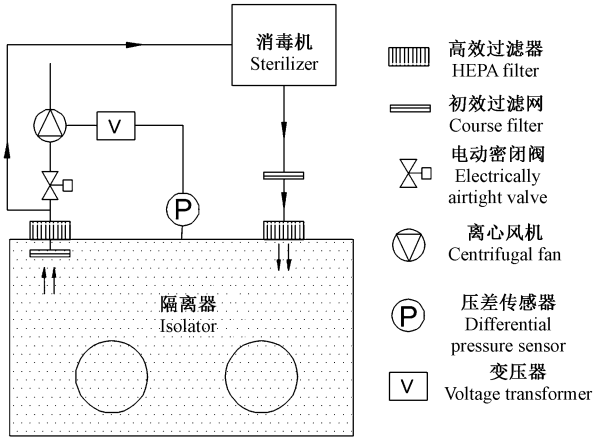
污水收集处理系统主要由排水槽、截止阀、污水排放管路、污水收集桶组成。污水排放管路靠近截止阀一端设置有消毒接口,消毒接口安装有高效过滤器,高效过滤器另一端作为消毒剂的排出口。污水收集桶由桶身、桶盖、消毒剂注入接口、污水注入口(兼作污水排放口)、截止阀组成。

4　隔离器消毒流程

对隔离器进行消毒是防止隔离器内病原微生物存活、增殖及向外扩散的有效手段和关键一环,主要包括隔离器箱体、高效过滤器、RTP 传递桶以及污水收集桶的消毒。

4.1 隔离器整体消毒

隔离器整体消毒是在整个实验周期结束后进行的,可对隔离器箱体内部及送排风高效过滤器进行整体消毒,通常采用气(汽)体循环消毒方式。采用气(汽)体循环消毒方式进行消毒时,将气体消毒机消毒剂的输出口通过管路连接至消毒剂注入口(隔离器进风口),打开隔离器消毒接口,将消毒机的消毒剂回收口连接至气体消毒剂排出口形成闭环消毒环路,然后开启消毒机发生气体消毒剂,对隔离器箱体内部及送、排风高效过滤器进行原位消毒;采用气体一过式消毒方式时,则需将气体消毒剂排出口通过消毒管路连接至所在实验室排风系统或外环境,其他步骤同上;消毒结束后,取下隔离器的消毒管路,打开生物密闭阀,开启隔离器通风系统对残余消毒剂进行吹扫,吹扫结束后,取出生物指示剂进行培养验证消毒效果,则整个消毒流程完成。见图 3。



注:箭头表示气流方向。

图 3 隔离器气体消毒原理图

Note. Arrows indicate the direction of airflow.

Figure 3 Diagram showing principle of isolator gaseous disinfection

4.2 RTP 传递桶消毒

4.2.1 不锈钢传递桶

将污染物品放置在传递桶内,关闭传递门,并将传递桶从隔离器摘下后,需将传递桶直接放置在高压灭菌器内进行整体高温高压消毒。

4.2.2 HDPE 传递桶

将污染物品放置在传递桶内,关闭传递门,将传递桶从隔离器摘下后,将气体消毒机的注入口和回收口分别连接至传递桶底部的消毒接口,进行气体熏蒸消毒。

4.3 污水收集桶消毒

收集污水前,可先将消毒剂提前放置在污水收集桶内,然后将污水收集桶通过排水管连接至隔离器底部的排水口,打开排水口上部的截止阀,将隔离器内的污水排放至污水收集桶,但要控制水量避免将污水收集桶灌满,以免污水外溢;污水排放结束后,关闭排水截止阀,将消毒机的气体注入口连接至污水收集桶上的消毒接口,而气体回收口则连接至污水排放段上的过滤器入口,构成消毒循环环路,进行气体熏蒸消毒;消毒结束后,关闭污水收集桶上的截止阀,将排水管拆下,将污水收集桶的污水排放至特定的污水处理系统。

5 性能验证

根据相关标准要求,隔离器的检测项目主要包括:气密性、换气次数、静压差、空气洁净度、手套口风速、高效过滤器检漏、噪声、照度。目前,认可标准 RB/T 199 – 2015《实验室设备生物安全性能评价技术规范》[7] 规定了气密式动物隔离器的工作区气密性要求,而对于安装类似 RTP 传递桶这种脱卸式传递装置其气密性则没有规定。GB/T 25915.7 – 2010《洁净室及相关受控环境 第 7 部分:隔离装置(洁净风罩、手套箱、隔离器、微环境)》[10] 要求传递装置不应降低隔离装置的性能,同时,对于可单独使用的传递装置其小时泄漏率不得大于其所服务的隔离装置的小时泄漏率,换言之,传递装置的气密性不应降低隔离装置的气密性。且由于 RTP 传递装置在传递高致病性病原微生物过程中存在泄漏风险,因此,RTP 传递装置本身的气密性以及其安装到隔离器并与隔离器构成一体后的气密性均应满足隔离器工作区的气密性要求。

2016 年 10 月,委托国家建筑工程质量监督检验中心对该型隔离器的整体性能进行了检测。检测结果如下:

(1)气密性:在 +1000 Pa 下,隔离器工作区小时泄漏率为 0.09%;在 +1000 Pa 下,隔离器与 RTP 传递桶构成一体后小时泄漏率为 0.07%;在 +1000 Pa 下,隔离器与 RTP 传递桶构成一体后小时泄漏率为 0.07%;在 +1000 Pa 下,RTP 传递桶的小时泄漏率为 0.07%;上述测试结果均远高于 RB/T 199 – 2015《实验室设备生物安全性能评价技术规范》[7] 中在 250 Pa 下小时泄漏率不超过 0.25% 的气密性要求;

(2)换气次数:不小于每小时 30 次;

(3)空气洁净度:达到 5 级;

(4)静压差:在负压运行状态下,隔离器内与房间的相对负压符合安全柜标准中不小于 120 Pa 的要求;

(5)手套口风速:达到 1.1 m/s,符合安全柜标准中不小于 0.7 m/s 的要求,可保证在手套意外脱落或破损时手套口的气流流向明显向内,无外逸;

(6)送风高效过滤器检漏:采用扫描法对送风高效过滤器进行检漏测试,边框及滤芯均未见泄漏;

(7)排风高效过滤器检漏:采用效率法对其进行检漏检测,并对结果进行 95% 置信度计算,对粒径为 0.3 ~0.5 μm 粒子的过滤效率大于 99.99%;

(8)噪声:隔离器内部与外部噪声均低于 50 dB(A),有效保证实验动物福利要求和工作人员环境舒适性要求;

(9)平均工作照度:正常运行状态下,平均工作照度符合安全柜标准中不低于 650 lx 的要求。

由此可见,所研制的该型禽负压隔离器相关性能指标可满足标准 GB 14925 – 2010《实验动物 环境及设施》[6]、RB/T 199 – 2015《实验室设备生物安全性能评价技术规范》[7]、GB 50346 – 2011《生物安全实验室建筑技术规范》[8]以及 JG 170 – 2005《生物安全柜》[9]的相关要求,达到了设计要求。目前,该型禽负压隔离器已在我国多家高等级生物安全实验室示范应用,且均通过了国家建筑工程质量监督检验中心的检验,达到相关标准的要求。

6 结论

动物隔离装置是高等级动物生物安全实验室的硬件基础,是保护工作人员与外环境的重要初级防护屏障之一。本文介绍了国产生物安全型禽负压隔离器的研制概况,在国家重点研发计划项目的资助下,有效解决了气密防护、气密传递、微环境控制、过滤器检漏和消毒、废弃物收集处理等关键技术问题。具有国家检测资助的第三方机构检测结果表明,所研制的禽负压隔离器相关性能指标均可满足相关标准及设计要求,可满足生物安全实验室开展高致病性感染禽类隔离饲养和实验的重大需求;同时,与进口同类产品相比,自动化程度更高,安全性更好。该型隔离器的研制成功,打破了发达国家对高等级生物安全隔离装备的技术垄断,进一步提高了我国生物安全关键防护装备的保障水平,将为我国实现实验室生物安全装备自主可控奠定更加坚实的基础。

参考文献:

[1] 陈桂珍, 郭叙林. 基于 CNKI 的我国禽流感研究现状与热点分析[J]. 中国家禽, 2015, 37(8): 1 – 5.

[2] 韦平, 秦爱建. 重要动物病毒分子生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2008.

[3] 吴福林, 樊宝仁, 翟君生, 等. 正负压不锈钢隔离器的研制与使用[J]. 中国兽药杂志, 2002, 36(3): 52 – 55.

[4] 中国合格评定国家认可中心. CNAS-CL53: 2016, 实验室生物安全认可准则对关键防护设备评价的应用说明[S]. https://www.cnas.org.cn/rkgf/sysrk/rkyyzz/2016/12/879912.shtml

[5] Sawyer J, Bennett A, Haines V, et al. The effect of microbiological containment systems on dexterity[J]. J Occup Environ Hyg, 2007, 4(3): 166 – 173.

[6] 全国实验动物标准化技术委员会. GB 14925 – 2010, 实验动物 环境及设施[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.

[7] 中国国家认证认可监督管理委员会. RB/T 199 – 2015, 实验室设备生物安全性能评价技术规范[S]. 北京: 中国标准出版社, 2016.

[8] 中华人民共和国住房和城乡建设部. GB 50346 – 2011, 生物安全实验室建筑技术规范[S]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2011.

[9] 中华人民共和国建设部. JG 170 – 2005, 生物安全柜[S]. 北京: 中国标准出版社, 2005.

[10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T 25915.7 – 2010, 洁净室及相关受控环境 第 7 部分:隔离装置(洁净风罩、手套箱、隔离器、微环境)[S]. 北京: 中国标准出版社, 2010.

〔收稿日期〕2017 – 12 – 20

研究进展

环状非编码 RNA 在口腔鳞癌中的研究进展

卫佳宁,续国强,高继萍,宋国华*

(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)

【摘要】 环状 RNA 是一类新发现的不同于 miRNA 和 lncRNA 的共价闭合环状内源性非编码 RNA。目前,已有许多报道关于 circRNA 在疾病发生发展机制的研究,为肿瘤的预防、诊断和精准治疗提供一种全新的理论依据。本文主要对 circRNA 的生物学特征和作用机制及其在口腔鳞癌中发生发展的作用进行综述。

【关键词】 circRNA;口腔鳞状细胞癌;miRNA 海绵作用;生物标志物
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 09-0096-04
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.017

Research progress on cyclic noncoding RNA in oral squamous cell carcinoma

WEI Jianing, XU Guoqiang, GAO Jiping, SONG Guohua*
(Laboratory Animal Center, Shanxi Medical University; Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Human Disease Animal Model, Taiyuan 030001, China)

【Abstract】 Circular RNAs (circRNAs) are a newly discovered class of covalently closed circular endogenous noncoding RNAs that differ from miRNAs and lncRNAs. Many reports have recently been published on the involvement of circRNAs in the mechanism of disease development, providing a new theoretical basis for tumor prevention, diagnosis, and precise treatment. This article reviews the biological characteristics and mechanisms of circRNAs and their role in the development of several common oral squamous cell carcinomas.

【Keywords】 circRNA; oral squamous cell carcinoma; miRNA spongy; biomarker

口腔癌是世界上最常见的第十一种恶性肿瘤,尤其是在发展中国家,在发病总数中排名第九[1]。虽然随着医学技术的发展,口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma,OSCC)的死亡率保持相对不变。但统计发现口腔癌患者趋于年轻化,该癌症的总体预后较差,生存率约 55% ~65%[2]。这可能是由于延迟诊断,早期诊断是降低口腔癌死亡率的关键,目前寻找一种新的生物标志物和治疗目标是至关重要的。环状 RNA(circular RNA,circRNA)在哺乳动物中广泛存在[3],通过共价键连接 3' 和 5' 末端形成闭合环状结构的内源性非编码 RNA[4],因其闭环结构能够抗核糖核酸酶的降解,在细胞和组织的发育阶段能够稳定的表达[5]。一些研究发现,circRNA 可参与 RNA 蛋白复合物的形成和 RNA-RNA 调控网络[6],可作为一个病毒或病毒复制的模板,在 RNA 加工反应中作为顺式作用元件起作用,如 snoRNA 基因和 miRNA 海绵[7]。研究表明,circRNA 参与一些疾病的发生发展[8],尤其在肿瘤方面。因此,从 circRNA 角度研究口腔鳞癌致病机理及治疗方案具有重要意义。

[基金项目]国家自然科学基金(编号:31772551);山西省自然科学基金(编号:201701D121087);山西省研究生教育创新项目(编号:2017SY037)。
[作者简介]卫佳宁(1994—),女,硕士研究生,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: 823952957@qq.com
[通信作者]宋国华(1973—),女,教授,研究方向:人类疾病动物模型。E-mail: ghsongg@hotmail.com

1 CircRNA 的生物合成、分类及作用机制

1.1 CircRNA 的生物合成

CircRNA 是前体 mRNA(pre-mRNA)通过可变剪切加工产生,广泛且稳定地存在于所有的真核生物中的一类非编码 RNA[9-10]。大部分的 circRNA 是由外显子序列构成,在不同的物种中具有保守性,同时存在组织及不同发育阶段的表达特异性。CircRNA 也可以通过非经典剪接方式进行反向剪接形成。2013 年,Jeck 等[5]在《RNA》中提出 circRNA 产生的两种模型:套索驱动环化和内含子驱动环化。套索驱动环化模型认为 pre-mRNA 的转录过程中由于 RNA 发生了部分折叠,拉近了原本非相邻的外显子,从而发生了外显子跳跃,使得被跨越的区域形成了环形 RNA 中间体,进一步通过套索剪接形成由外显子构成的环形 RNA 分子。另一种模型认为,内含子区域的反向互补序列导致内含子区域配对,介导反向剪接,从而形成环形 RNA 分子[11]。

1.2 CircRNA 的分类

环状 RNA 的产生多种多样,可来源于不同的基因,也可由同一基因产生。根据来源可以分为 3 类:存在于细胞质中仅由外显子构成的环状 RNA(exonic circRNA);置于细胞核中仅由内含子构成的环状 RNA(intronic circRNA)[12];包含外显子之间的内含子的 circRNA(exon-intro circRNA)[13]。

1.3 CircRNA 的作用机制

CircRNA 最初被认为是 mRNA 拼接错误的副产品,具有稳定、多样化和保守的特点。近期研究显示,circRNA 在不同物种中起到 miRNA“分子海绵”的作用,称之为竞争性内源 RNA(competitive endogenous RNA,ceRNA),能竞争性结合疾病相关的 miRNA,解除 miRNA 对其靶基因的抑制作用,上调靶基因的表达水平,从而在疾病调控中发挥重要作用。CircDOCK1 通过作为 ceRNA 调节 BIRC3 表达并参与 OSCC 细胞凋亡的过程[14]。Circ_100290 通过充当 miR-29 的“分子海绵”在口腔癌中发挥作用[15]。CircHIPK3 作为 miR-124 海绵,调节靶标水通道蛋白 3(AQP-3)表达,AQP-3 进而促进细胞增殖和迁移[16]。CircRNA 也可与 lncRNA 竞争性结合 miRNA。Li 等[17]通过 GO 分析和 KEGG 分析发现,在生殖干细胞中 lncRNA Meg3 和 cirRNA Igf1r 可以与 miRNA-15a-5p 竞争结合增加靶基因 *InhA*、*ACSL3*、*KIF21B* 和 *IGFBP2* 的表达。这些发现为 lncRNAs 和 circRNAs 提供了新的视角,为将来对生殖干细胞中 lncRNAs 和 circRNAs 调控机制的研究奠定了基础。

2 CircRNA 与口腔鳞癌

2.1 口腔鳞癌中充当 miRNA 海绵作用

CircRNA 可以与 miRNA 结合,从而阻止 miRNA 沉默,因此 circRNA 也称 miRNA 海绵[18-19]。有研究表明[3, 7, 14-15],circRNA_100290、circDOCK1、circRNA BANP 和 circRNA ITCH 在口腔癌中通过 miRNA 的海绵参与发病机制。

2.1.1 CircRNA_100290

Chen 等[15]使用微阵列分析对 OSCC 中的 circRNA 进行了全面研究,鉴定出在 OSCC 组织和非癌组织之间差异表达的 circRNAs,发现circ_100290在 OSCC 发展中起着重要的调节作用。CircRNA_100290在口腔癌组织中表达上调,通过充当 miR-29 家族成员的“分子海绵”来调节基因表达。CircRNA_100290与 OSCC 细胞在体外和体内的增殖相关。他们还发现 circRNA_100290在 OSCC 组织中上调并与 CDK6 共表达。通过使用 circRNA_100290 特异性小干扰 RNA(small interference RNA, siRNA)敲低 circRNA_100290的表达水平,检测 OSCC 细胞系中 G1/S 期阻滞,抑制细胞增殖并降低 CDK6 的表达。通过荧光素酶报告基因检测,观察到 circRNA_100290直接与 miR-29 家族成员结合,包括 miR-29a、miR-29b 和 miR-29c。进一步 EGFP/RFP 报告分析显示 CDK6 是 miR-29b 的直接靶标。总之,circRNA_100290可能作为 ceRNA 通过抑制 miR-29b 家族成员来调节 CDK6 表达。这表明 circRNA 可能在 OSCC 中发挥调节功能,可作为 OSCC 治疗的潜在靶点。进一步的研究显示circRNA_100290通过携带 miR-29 家族成员来发挥其调控功能,以减少 CDK6 的表达,CDK6 也直接被 miR-29 家族靶向。它表明circRNA_100290和 CDK6 mRNA 是由 miR29 家族连接的一对 ceRNA。

2.1.2 CircDOCK1

CircDOCK1 为环状 RNA 鸟苷酸交换因子,先前有研究显示[20]通过 TGF-β 处理,circDOCK1 的表达降低,而 circDOCK1 的靶基因 mRNA 表达增加 2 倍。此外 TGF-β 处理可以诱导上皮间质转化(epithelial mesenchymal transformation,EMT),表明 circDOCK1 的

功能之一可以诱导上皮细胞 mRNA 下调,从而保持细胞稳定性。Wang 等[14] 通过用 TNF-α 刺激 CAL-27 细胞建立凋亡模型,使用高通量微阵列从细胞凋亡模型和正常 CAL-27 细胞中获得差异表达的 circRNA 谱,发现 has_circ_100721(circDOCK1)过表达并且敲低 circDOCK1 表达水平可导致细胞凋亡率的增加。他们利用多种生物信息学方法,预测了 circRNA、miRNA 和基因之间的相互作用,并构建了 circDOCK1/miR-196a-5p/BIRC3 网络,确定 circDOCK1 与 miR-196a-5p 通过与 BIRC3 竞争,最终调节细胞凋亡而相互作用。用 siRNA 沉默 circDOCK1 和模拟物上调 miR-196a-5p 的表达,导致 OSCC 细胞中细胞凋亡增加并减少 BIRC3 形成,并通过 qRT-PCR 方法比较口腔鳞状细胞癌组织及癌旁组织中的 circDOCK1,miR-196a-5p 和 BIRC3 的表达进一步证实了此结果。最后得出结论,circDOCK1 通过在 OSCC 中靶向 BIRC3 抑制 miR-196a-5p 来抑制细胞凋亡。

2.1.3 CircRNA BANP 和 circRNA ITCH

研究人员一直在探索控制牙周膜干细胞(periodontal ligament stem cells,PDLSC)成骨分化的分子机制。研究表明,circRNA 参与成骨分化[3,7]。CircRNA BANP 和 circRNA ITCH 分别为环状 RNA 酸性神经肽和环状 RNA 泛素连接蛋白。CircRNA BANP 和 circRNA ITCH 可能与 miRNA-34a 和 miRNA-146a 相互作用以通过 MAPK 途径调节 PDLSC 成骨分化。虽然有数种 lncRNAs、circRNAs 和 miRNAs 被认为参与了 PDLSC 成骨分化,但是关于它们潜在的网络和功能的数据并不多。为了充分了解 ceRNA 对 PDLSC 成骨分化的影响,整合 lncRNA/circRNA-miRNA-mRNA 竞争性调控网络至关重要。利用 Illumina HiSeq2000 开发 RNA 测序(RNA-seq),以全面鉴定正常和成骨诱导性 PDLSCs 中差异表达的 lncRNA 和 circRNA。使用 qRT-PCR 进一步证实了代表性的 lncRNA 和 circRNA。最后,基于 miRanda 预测了 lncRNA、circRNA、miRNA 和 mRNA 的 ceRNA 网络,并通过 GO 分析和 KEGG 分析研究了它们的潜在调控作用。CeRNA 网络表明,TCONS_00212979、TCONS_00212984、circRNA BANP 和 circRNA ITCH 可能与 miRNA-34a 和 miRNA-146a 相互作用以通过 MAPK 途径调节 PDLSC 成骨分化[21]。研究结果可能为探索 PDLSC 成骨分化的分子机制提供新的证据。

2.2 转录调节作用

Li 等[22] 研究发现,在人类 HeLa 细胞中存在与 RNA 聚合酶 II 相关的 circRNAs。在这些 circRNA 中,外显子被环化,内含子在外显子之间“保留”,可称它们为外显子-内含子 circRNA 或 EIciRNA(exon-intron circRNA)。EIciRNA 主要定位于核内,与 U1 snRNP 相互作用并促进其亲本基因的转录。他们的研究结果揭示了 circRNA 在调节细胞核中基因表达中的新作用,其中 EIciRNAs 增强其顺式的亲本基因表达,并突出了通过 U1 snRNA 和 EIciRNAs 之间的特定 RNA-RNA 相互作用进行转录控制的调控策略[22]。

2.3 生物标志物

据报道,circRNA BANP 和 circRNA ITCH 有助于致癌并可能作为癌症生物标志物[23-24]。CircRNA_100290 作为 miR-29 家族成员的海绵起作用,在口腔癌中起到 CDK6 的 ceRNA 的作用[15],circDOCK1 通过作为 ceRNA 调节 BIRC3 表达并参与 OSCC 细胞凋亡的过程[13]。因此,circRNA_100290 和 circDOCK1 可能成为 OSCC 的新型潜在生物标志物和治疗靶点。CircRNA 参与多种病理状态,包括神经系统疾病[25-26]、血液病[27]、软骨退化[28]、先天性巨结肠病[29]和多种癌症,这可以作为有前途的诊断生物标志物和治疗靶点。与 miRNA 和 lncRNA 相比,circRNA 具有序列保守性,生物学稳定性和组织特异性特点,因此 circRNA 被认为是有希望的生物标志物和治疗靶点,并且可能在基因表达的调节中发挥潜在的功能。

3 展望

近几年来,circRNA 具有充当 miRNA 分子“分子海绵”、调控基因转录、与蛋白质相互作用、吸附蛋白质以及参与蛋白质的翻译等功能,且能稳定存在于血清等特性。虽然目前对 circRNA 的研究并不是很多,但随着 RNA 测序技术的迅速发展,circRNA 这个未来之星在口腔鳞癌的诊断和预后治疗方面有很大的发展前景。从 circRNA 入手挖掘新的生物标志物及 circRNA 在口腔中的潜在功能有助于口腔癌的早发现、早治疗。目前部分 circRNA 已被证实与肿瘤的发生、侵袭、转移和患者的预后相关。随着生物信息学方法及实验技术手段不断成熟,大数据分析的广泛应用,挖掘新数据、筛选具有生物标记的 circRNA、结合 circRNA-miRNA-mRNA 机制及

circRNA-lncRNA-mRNA 机制分析疾病通路对于研究口腔鳞癌发生发展进程具有广阔的发展前景。

参考文献：

[1] Global Burden of Disease Cancer Collaboration. The Global Burden of Cancer 2013 [J]. JAMA Oncol, 2015, 1(4): 505 - 527.

[2] Ghantous Y, Yaffi V, Abu-Elnaaj I. Oral cavity cancer: epidemiology and early diagnosis [J]. Refuat Hapeh Vehashinayim (1993), 2015, 32(3): 55 - 63, 71.

[3] Barrett SP, Salzman J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions [J]. Development, 2016, 143(11): 1838 - 1847.

[4] Hentze MW, Preiss T. Circular RNAs: splicing's enigma variations [J]. EMBO J, 2013, 32(7): 923 - 925.

[5] Jeck WR, Sorrentino JA, Wang K, et al. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats [J]. RNA, 2013, 19(2): 141 - 157.

[6] Meng X, Li X, Zhang P, et al. Circular RNA: an emerging key player in RNA world [J]. Brief Bioinform, 2017, 18(4): 547 - 557.

[7] Lasda E, Parker R. Circular RNAs: diversity of form and function [J]. RNA, 2014, 20(12): 1829 - 1842.

[8] You X, Vlatkovic I, Babic A, et al. Neural circular RNAs are derived from synaptic genes and regulated by development and plasticity [J]. Nat Neurosci, 2015, 18(4): 603 - 610.

[9] Huang Z, Su R, Deng Z, et al. Identification of differentially expressed circular RNAs in human monocyte derived macrophages response to mycobacterium tuberculosis infection [J]. Sci Rep, 2017, 7(1): 13673.

[10] 罗清, 姚芳苡, 邓桢, 等. LPS 诱导的小鼠腹腔巨噬细胞炎症反应中环状 RNA 表达谱变化分析 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, 37(6): 405 - 411.

[11] 战昊, 朱凯, 胡志强, 等. 环状 RNA:非编码 RNA 研究新方向 [J]. 中国临床医学, 2016, 23(5): 651 - 655.

[12] Westholm JO, Miura P, Olson S, et al. Genome-wide analysis of dmsophila circular RNAs reveals their structural and sequence properties and age-dependent neural accumulation [J]. Cell Rep, 2014, 9(5): 1966 - 1980.

[13] Chen I, Chen CY, Chuang TJ. Biogenesis, identification, and function of exonic circular RNAs [J]. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2015, 6(5): 563 - 579.

[14] Wang L, Wei Y, Yan Y, et al. CircDOCK1 suppresses cell apoptosis via inhibition of miR-196a-5p by targeting BIRC3 in OSCC [J]. Oncol Rep, 2018, 39(3): 951 - 966.

[15] Chen L, Zhang S, Wu J, et al. circRNA_100290 plays a role in oral cancer by functioning as a sponge of the miR-29 family [J]. Oncogene, 2017, 36(32): 4551 - 4561.

[16] Chen G, Shi Y, Liu M, et al. circHIPK3 regulates cell proliferation and migration by sponging miR-124 and regulating AQP-3 expression in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Death Dis, 2018, 9(2): 175.

[17] Li X, Ao J, Wu J. Systematic identification and comparison of expressed profiles of lncRNAs and circRNAs with associated co-expression and ceRNA networks in mouse germline stem cells [J]. Oncotarget, 2017, 8(16): 26573 - 26590.

[18] Momen-Heravi F, Bala S. Emerging role of non-coding RNA in oral cancer [J]. Cell Signal, 2018, 42: 134 - 143.

[19] Jeck WR, Sharpless NE. Detecting and characterizing circular RNAs [J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(5): 453 - 461.

[20] Conn SJ, Pillman KA, Toubia J, et al. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs [J]. Cell, 2015, 160(6): 1125 - 1134.

[21] Gu X, Li M, Jin Y, et al. Identification and integrated analysis of differentially expressed lncRNAs and circRNAs reveal the potential ceRNA networks during PDLSC osteogenic differentiation [J]. BMC Genet, 2017, 18(1): 100.

[22] Li Z, Huang C, Bao C, et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus [J]. Nat Struct Mol Biol, 2015, 22(3): 256 - 264.

[23] Zhu M, Xu Y, Chen Y, et al. Circular BANP, an upregulated circular RNA that modulates cell proliferation in colorectal cancer [J]. Biomed Pharmacother, 2017, 88: 138 - 144.

[24] Guo W, Zhang J, Zhang D, et al. Polymorphisms and expression pattern of circular RNA circ-ITCH contributes to the carcinogenesis of hepatocellular carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(29): 48169 - 48177.

[25] Kumar L, Shamsuzzama, Haque R, et al. Circular RNAs: the emerging class of non-coding RNAs and their potential role in human neurodegenerative diseases [J]. Mol Neurobiol, 2017, 54(9): 7224 - 7234.

[26] Nan A, Chen L, Zhang N, et al. A novel regulatory network among LncRpa, CircRar1, miR-671 and apoptotic genes promotes lead-induced neuronal cell apoptosis [J]. Arch Toxicol, 2017, 91(4): 1671 - 1684.

[27] Bonizzato A, Gaffo E, Te Kronnie G, et al. CircRNAs in hematopoiesis and hematological malignancies [J]. Blood Cancer J, 2016, 6(10): e483.

[28] Liu Q, Zhang X, Hu X, et al. Circular RNA related to the chondrocyte ECM regulates MMP13 expression by functioning as a MiR-136 'sponge' in human cartilage degradation [J]. Sci Rep, 2016, 6: 22572.

[29] Peng L, Chen G, Zhu Z, et al. Circular RNA ZNF609 functions as a competitive endogenous RNA to regulate AKT3 expression by sponging miR-150-5p in Hirschsprung's disease [J]. Oncotarget, 2017, 8(1): 808 - 818.

〔收稿日期〕2018 - 05 - 10

研究进展

情绪异常大鼠模型的旷场行为实验在中医药领域的研究进展

张鹏横[1,2,3],阮璐薇[1,2,3],卓泽伟[1,2,3],胡　柳[1,2,3],梁文娜[1,2,3]*

(1. 福建中医药大学中医证研究基地,福州　350122; 2. 福建省 2011 中医健康管理协同创新中心,福州　350122;
3. 福建省中医健康状态辨识重点实验室,福州　350122)

【摘要】 大鼠是较为常用的实验动物,旷场行为实验是检测动物情绪行为的一种常用的经典实验方法。涉及大鼠旷场行为实验的研究是这些年的热点,并呈上升趋势。旷场行为实验的条件会引起大鼠生理心理状态改变,影响大鼠行为的解读,从而影响疾病模型的判定。文章通过梳理近 5 年涉及大鼠旷场行为实验的研究文献,为选择较为合适大鼠旷场行为实验的条件以及合理的行为解读和模型判定作一综述。

【关键词】 大鼠;旷场;行为实验;焦虑;抑郁
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 09-0100-04
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.018

A review of experimental studies on the behavior of rat models with abnormal emotion in Traditional Chinese Medicine

ZHANG Pengheng[1,2,3], RUAN Luwei[1,2,3], ZHUO Zewei[1,2,3], HU Liu[1,2,3], LIANG Wenna[1,2,3]*

(1. Research Center of TCM Syndrome, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China.
2. Collaborative Innovation Center of TCM Health Management, Fujian Province, Fuzhou 350122.
3. Key Laboratory of TCM Health Status Identification in Fujian Province, Fuzhou 350122)

【Abstract】 Rat is a commonly used experimental animal. The open-field behavior test is one of the most commonly used methods to detect emotional behavior in animals, particularly for rats in recent years. The conditions of the open-field behavior test can cause changes in the physiological and psychological state of rats, affecting the interpretation of rat behavior, and thus affecting the determination of the rat model of diseases. To select suitable experimental conditions and achieve reasonable interpretation of behavior and an appropriate model, this article presents a review of the research literature on the open-field behavior test of rats published in the last 5 years.

【Keywords】 rat; open field; behavioral experiment; anxiety; depression

大鼠是较为常用的实验动物,旷场行为实验是检测动物情绪行为的一种常用的经典实验方法[1]。大鼠旷场行为实验是指将大鼠放置在一个封闭的平面区域中,该区域被分割成方块,观察并记录大鼠一定时间内的活动情况。旷场行为实验是判断大鼠疾病模型的重要指标之一,旷场行为实验的条件会引起大鼠生理心理状态改变,影响大鼠行为的解读,从而影响疾病模型的判定。选择较适合大鼠

[基金项目]国家自然科学基金项目(编号:81774209,81673882);福建中医药大学校管课题(编号:X2016019)。
[作者简介]张鹏横(1987—),男,在读硕士研究生,研究方向:内分泌及代谢疾病的中医证研究。E-mail: 251786294@qq.com
[通信作者]梁文娜(1979—),女,硕士生导师,研究方向:内分泌及代谢疾病的中医证研究。E-mail: 105265301@qq.com

旷场实验条件,合理的行为解读,能为后续疾病动物模型的病理机制研究提供更为可靠的支持。

1 大鼠旷场行为实验的现状

大鼠旷场行为实验是近年的研究热点。通过检索主题为"大鼠与旷场"的近 5 年的文献,发现各类文献(包括学位论文、期刊论文、会议论文)总量 474 篇。其中,期刊文献 254 篇,发表于核心期刊的文献达 136 篇。通过知网可视化分析发于核心期刊的文献,发现涉及旷场实验的学科前四的有中药学、基础医学、精神病学、中医学;受到各种类基金支持,其中受到国家自然科学基金支持的文献达 80 篇;年度发表文献数量呈上升趋势。提示运用中医药对精神疾病在基础医学方面的研究越来越热门。这也间接证明了随着社会进步,经济发展,生活节奏加快,工作、家庭等各方面的压力增加,会产生身体不适感和疾病,容易使情绪发生变化,会导致原有的疾病加重或发生新的疾病。随着人民生活、收入水平的提高,对于精神健康越来越重视,渴望安全有效的治疗,也越来越迫切。

2 大鼠旷场行为实验的条件

大鼠旷场行为实验的条件包括:旷场箱的规格尺寸、实验时间、实验环境、人员操作这几方面。

2.1 旷场箱的规格尺寸

旷场箱的规格尺寸是指箱底长宽和边墙高度,影响旷场行为信息量的主要是箱底长宽。易丽莎等[2]所用的旷场箱底边长为 40 cm × 40 cm;欧阳俊彦等[3]、余庆等[4]所用的旷场箱底边长为 50 cm × 50 cm 的规格;郑伟男等[5]所用的旷场箱底边长为 80 cm × 80 cm;刘莹等[6]所用的旷场箱底边长为 105 cm × 105 cm 的规格;多数所用的旷场箱底边长为 100 cm × 100 cm 的规格[7-16]。成年大鼠的体长为 18 ~ 20 cm,旷场箱规格太小不能从大鼠的旷场行为上获得足够可靠的信息;旷场箱过大,实验拍摄和操作难度增加,困难因素增多,可能使大鼠产生急性应激。结合国内学者在国外杂志上发表的文献[17-18],笔者认为,可以采用底边规格为 100 cm × 100 cm 的旷场箱对大鼠进行旷场行为学实验。

2.2 旷场行为的实验时间

旷场行为的实验时间是指大鼠在进行旷场行为实验检测所持续的时间。王慧霞等[19]、胡海燕等[20]选取的时间是 3 min,沙中玮等[21]选取的时间是 10 min,多数人选取的检测时间为 5 min[2-3,5-16,22-23]。实验时间方面,因不同实验的需要可以从几分钟到几小时不等,不能硬性规定。在实际操作中,一个研究项目使用到大鼠的量至少有几十只。因此,单只大鼠行为实验所用的时间越长,整个大鼠旷场行为实验的时间就越长。过长的实验时间对实验人员的考验和要求就更高;前后进行实验的大鼠产生时间间隔,可能导致一定影响或差异。而且大鼠具有较强的适应能力,结合文献中常选择使用的时间,可以根据实验需求,选择适合实验的时间。

2.3 实验环境与操作

实验环境与操作是指大鼠在进行旷场行为实验时灯光、噪音,以及实验人员操作的注意事项。这些在文献中提及较少,如欧阳俊彦等[3]在旷场实验中提到灯光的瓦数 40 W;蒲蜀湘等[9]在旷场实验中提到灯照天花板反射试验区,实验人员远离旷场箱,操作角度以看不到箱中的实验动物为准。实验常用的大鼠属白化大鼠,对光和噪声敏感,能使其神经内分泌系统发生变化。因此,实验操作时应当避免光和噪声的影响。

3 大鼠旷场行为解读

大鼠旷场行为解读是通过大鼠旷场行为实验单位获得的,如水平穿越格数或水平路程、垂直或站立次数、修饰或理毛次数、中央区停留时间、中央区穿越格数、平均速度等方面的数据进行整理、归纳、分析,判定大鼠疾病模型的一个过程。

3.1 大鼠焦虑抑郁的情绪模型

大鼠旷场行为实验涉及的疾病多以精神类疾病或症状为主,其中又以焦虑和抑郁较为多。通过不同的模型建立方法模拟人类不同疾病,最终都会涉及到焦虑和抑郁,说明疾病所产生的症状和不适,可对人的精神和神经内分泌造成不同程度的影响。

在焦虑模型方面,大鼠的旷场行为结果有升高或个别项目升高,有降低或个别项目降低,从而产生不同的行为学解释。如欧阳俊彦等[3]的旷场实验结果中央区域的停留时间明显减少,总运动距离和直立次数差异均无显著性,作者认为焦虑水平高的动物倾向于停留在周边区域,反之,中央区域的探究次数和时间越多,焦虑水平则越低;而沙中玮等[21]的旷场实验结果总路程减少,中央活动路程升高。宗绍波等[22]、刘莹等[6]各自实验中旷场行为总路程的升高,表明大鼠模型较好模拟了病证患者精神亢奋、急躁易怒样临床表现,具有明显的焦虑样

行为;魏盛等[24]认为,旷场行为得分上升,是一种“怒”的表现,其中包括愤怒和郁怒。肝主疏泄,其志在怒。中医理论认为,怒是肝失疏泄、气机不畅的肝郁表现。因此,肝郁与焦虑存在一定的联系。方锦颖等[14]、余庆等[4]的旷场实验结果显示模型组较正常组相比,旷场行为均降低,认为焦虑模型成功。笔者较为同意易丽莎等[2]的观点,焦虑的旷场行为可能受造模时间的影响,短时间应激刺激可使大鼠出现焦虑样症状,并认为焦虑与怒之间存在密切联系。随着应激天数的增加,逐渐出现兴奋性下降,从而出现抑郁样的行为。

在抑郁模型方面,大鼠的旷场行为结果较为一致,均呈现下降趋势。水平穿越格总数、总平均速度减少反映了动物的活动度降低,中央区时间和中央区格数减少反映了大鼠对新鲜环境的好奇程度降低。胡海燕等[20]在其结果中表明慢性应激时间越长对大鼠造成的损害越发增加。这一点也印证了易丽莎等[2]的实验。但也有实验结果显示模型组大鼠旷场实验水平得分、垂直得分及总分下降,中央格停留时间增加,并认为该模型方法降低大鼠的兴奋性和探究趋势及认知功能[19]。在认知功能方面,中央格停留时间增加或减少具有一定的讨论价值。

3.2 大鼠肝郁脾虚的证模型

在中医病证研究中,大鼠旷场行为实验常应用于肝郁证、脾虚证和肝郁脾虚证等大鼠模型。刘旭东等[23]的脾气虚证大鼠旷场实验结果显示运动距离、速度和垂直次数都降低,中心活动时间增加。作者认为是大鼠对外界关注度、好奇度降低,反应迟钝,提示脾气虚证的“神疲乏力”主要是中枢结构损伤,肌肉失养。赵荣华等[16]的大鼠旷场实验结果再次说明旷场行为受造模时间的影响。作者发现,造模 2 周时,在水平穿越格数、总路程数及垂直站立次数上,肝郁证和脾虚证大鼠均明显升高,而肝郁脾虚证大鼠降低;在中央区时间上,肝郁证和肝郁脾虚证大鼠升高,脾虚证大鼠降低;在修饰上,肝郁证和肝郁脾虚证大鼠减少,脾虚证大鼠增加。造模 4 周时,在水平穿越格数和总路程数上,三个不同证模型的大鼠均减少;在垂直站立次数和修饰上,肝郁证和肝郁脾虚证模型大鼠均降低,脾虚证大鼠升高;在中央区时间上,肝郁证和肝郁脾虚证模型大鼠升高,脾虚证大鼠减少。作者认为,从 2 周和 4 周的旷场行为的前后变化分别来看,肝郁证和脾虚模型的大鼠早期存在一定的活动探究性的加强,呈现一种应激后焦虑的状态;而肝郁脾虚证模型的大鼠活动减少,开始表现出抑郁状态。但随着造模时间的增加,三个不同证模型的大鼠均出现降低,肝郁证和脾虚证模型的大鼠呈现出兴奋性由强转弱的特点,最终表现为抑郁的状态;肝郁脾虚证早期活动度降低,并随着建立模型的时间延长从而进一步降低,呈现出抑郁状态渐进加重的趋势。

中医的肝郁证包含焦虑或抑郁样症状。建立肝郁证模型的方法多以慢性不可预见性刺激和慢性束缚应激,这两种造模方式常用于抑郁模型的建立。陈锦锋等[25]认为在临床上,肝郁证的诊断必有情绪低落症状和肝经循行部位症状,而情绪低落症状对应抑郁状态。而从旷场行为实验的结果来看,抑郁模型较焦虑模型更为一致、稳定。因此,抑郁模型建立方法建立肝郁证模型可以更好更明显地体现大鼠肝郁状态。

根据中医学理论,肝为将军之官,谋虑出焉,喜调达,调畅气机,在体合筋;脾主思,思者,神识之妙用也,又为后天之本,主运化,在体合肉。对于事物的认识与肝脾有着密切的关系,并所产生的反应行为有赖于筋肉的协调运动。气机调畅,有助于脾之运化,水谷精微有源,人体四肢百骸、肌肉筋骨、脏腑经络、精髓元神皆受所养。肝脾功能皆正常,则神识清灵,动作矫健;单一肝郁证,程度未伤及脾,或单一脾虚证,未使气机受阻,则可以通过相应的调理,得到神识恢复;肝脾功能皆失常,神识受损则神识混沌,反应迟钝,即使经过调理,活动度得到恢复,但神识不易恢复。因此,对于赵荣华等[16]的旷场实验中肝郁脾虚组和肝郁脾虚干预组的中央停留时间一直居高不下,可以从肝脾病理状态对脑功能影响来解释。

综合文献,笔者认为,旷场行为水平格数或总路程可以反应大鼠的活动度,垂直站立次数可以反应大鼠探究行为,中央区时间可以反应大鼠认知行为,修饰可反应大鼠的警觉性。而焦虑样行为和抑郁样行为存在着应激程度和应激时间上的差异,是一个前后过程,并不存在矛盾。

4 大鼠旷场行为实验的不足与展望

旷场行为实验是检测动物情绪行为的一种常用的经典实验方法[1]。当前,大鼠旷场行为实验在医学基础研究上的应用十分频繁,但也存在一些混乱的现象。首先,用于大鼠行为实验的旷场箱没有一个统一的规格。其次,在大鼠旷场行为实验的检测持续时间没有统一的标准。第三,未明确实验条件和实验操作规范。虽然大鼠旷场行为实验已经

进入使用自动化仪器和软件时代,减少人为因素带来的影响,但未达到无人化的全自动程度,仍需实验人员参与整个过程,一些影响因素需要注意避免。最后,对于大鼠疾病模型的应用和行为解读,有着不同的理解和看法。尤其是焦虑模型在判读上,其原因可能是模型建立的方法多且不同,导致旷场行为实验不能很好的准确的反应出大鼠肝郁状态的情绪行为;或者是大鼠焦虑行为的稳定性存在一定探讨空间。

西医的疾病名称和中医的病证名称存在着不同,原因是对疾病症状认识、分析的理论体系不同,导致最终的治疗、防治的方法和措施也存在差异。但对于客观存在的症状体征是不会因理论、认识的不同而改变的。因此,西医和中医存在一定的桥梁和联系。可以通过对西医疾病症状的还原,获取中医的病证;运用西医建立和判定动物疾病模型的方法,确定中医病证动物模型的建立和判定。中医病证的动物模型建立,有利于中医理论在情绪与脑功能等方面研究的应用和开展;可以验证中医药的有效性,通过疾病机理的阐释,证明中医药防治情绪方面疾病的科学性;有助于中医药的发展进步和走出国门,为世界所接受,为治疗、预防疾病贡献出中医的力量。

参考文献:

[1] Paré WP. Open field, learned helplessness, conditioned defensive burying, and forced-swim tests in WKY rats [J]. Physiol Behav, 1994, 55(3): 433 - 439.

[2] 易丽莎, 陈莹, 孙会会, 等. 精神应激致内脏高敏感大鼠的心理行为学变化 [J]. 中国现代医学杂志, 2013, 23(35): 1 - 6.

[3] 欧阳俊彦, 胡卓炎, 褚玥, 等. γ-氨基丁酸对情绪应激大鼠额叶皮质一氧化氮合酶和一氧化氮水平的影响 [J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(5): 385 - 389.

[4] 余庆, 蒋雪, 李琴. 焦虑模型大鼠下丘脑-垂体-肾上腺轴高反应性与糖皮质激素受体蛋白表达降低相关 [J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(14): 1464 - 1468.

[5] 郑伟男, 赵建军, 胡志英, 等. 创伤后应激障碍海马 Beclin-1/Bcl-2 自噬标记变化 [J]. 解剖学杂志, 2015, 38(5): 560 - 563.

[6] 刘莹, 赵宏艳, 于峥, 等. 补肝益肾法对更年期模型大鼠行为变化的调节作用 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2013, 19(4): 397 - 399.

[7] 吴天添, 朱江, 毛翔宇, 等. 亮氨酸对肠道术后大鼠中枢神经递质和外周炎性因子的影响 [J]. 肠外与肠内营养, 2014, 21(3): 167 - 171.

[8] 王雯龙, 唐启盛, 赵瑞珍, 等. 丹栀逍遥散对饮水冲突天敌暴露模型大鼠行为学影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(7): 486 - 489.

[9] 蒲蜀湘, 吴培基, 饶从磊, 等. 丰富环境对局灶性脑梗死大鼠旷场和水迷宫行为学及 Nogo-A 蛋白表达的影响 [J]. 广东医学, 2013, 34(16): 2437 - 2440.

[10] 杨丽萍, 李改, 万海娇, 等. 恐伤孕鼠对其 21 日龄子代情绪的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(1): 62 - 64.

[11] 李力卓, 何松柏. 大鼠创伤性脑损伤后精神障碍的精神行为学改变 [J]. 中国医科大学学报, 2016, 45(8): 708 - 710, 714.

[12] 朱孝苍, 黄荟杰, 韩秋琴, 等. 电针不同穴位对慢性应激抑郁大鼠的抗抑郁作用及对血浆胃饥饿素的影响 [J]. 针刺研究, 2015, 40(4): 283 - 289.

[13] 吴媛媛, 蒋永亮, 邵晓梅, 等. 痛抑郁二联征模型大鼠中缝背核不同水平 5 羟色胺表达差异 [J]. 解剖学报, 2015, 46(2): 170 - 174.

[14] 方锦颖, 陈光耀, 李龙梅, 等. 孤养对单次延长应激建立的创伤后应激障碍模型大鼠行为学的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(3): 32 - 35.

[15] 费鹏鸽, 赵琳, 任慧聪, 等. 重复经颅磁刺激对抑郁模型大鼠行为学及海马 BDNF 表达的影响 [J]. 中国神经精神疾病杂志, 2016, 42(10): 591 - 595.

[16] 赵荣华, 谢鸣, 刘进娜, 等. 肝郁、脾虚和肝郁脾虚证模型大鼠行为学变化及柴疏四君子汤对其作用的比较 [J]. 北京中医药大学学报, 2015, 38(8): 515 - 518, 528.

[17] Luo J, Wang T, Liang S, et al. Experimental gastritis leads to anxiety- and depression-like behaviors in female but not male rats [J]. Behav Brain Funct, 2013, 9: 46.

[18] Bai M, Zhu X, Zhang Y, et al. Abnormal hippocampal BDNF and miR-16 expression is associated with depression-like behaviors induced by stress during early life [J]. PLoS One, 2012, 7(10): e46921.

[19] 王慧霞, 詹向红, 李伟, 等. 负性情绪应激大鼠模型的建立与评价 [J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(15): 4140 - 4142.

[20] 胡海燕, 徐志伟, 敖海清, 等. 四逆散影响慢性应激抑郁模型大鼠行为学研究 [J]. 中华中医药杂志, 2016, 31(1): 271 - 274.

[21] 沙中玮, 王国华, 李志敏, 等. 香萱解郁方对焦虑大鼠血清单胺类神经递质及 BDNF 水平的影响 [J]. 中成药, 2018, 40(1): 191 - 194.

[22] 宗绍波, 朱德豪, 魏盛. 白香丹胶囊对经前期综合征肝气逆证模型大鼠学习记忆功能的影响 [J]. 中国药理学通报, 2015, 31(2): 284 - 289.

[23] 刘旭东, 刘文俊, 孙大宇, 等. 脾气虚证模型大鼠神疲乏力的客观化评价 [J]. 中华中医药杂志, 2015, 30(3): 699 - 701.

[24] 魏盛, 宗绍波, 乔明琦. 愤怒、郁怒反应模型大鼠不同脑区 5-羟色胺含量分析 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28(5): 1423 - 1426.

[25] 陈锦锋, 王爱成, 王玉来, 等. 肝气郁结证诊断的必备症状以及与抑郁状态的关系探讨 [J]. 辽宁中医杂志, 2005, 32(1): 19 - 22.

〔收稿日期〕2018 - 05 - 20

研究进展

树鼩在人类代谢性疾病中的应用与展望

夏　巍,赖永静,杜　龙,王梦琳,王　红,戢克铜,冯清源,唐安洲*

(广西医科大学第一附属医院,南宁　530000)

【摘要】 随着人类物质生活水平的提高和生活方式的改变,代谢相关性疾病已成为国内外影响人群健康的重要问题。构建合适的动物模型是研究这类疾病发生、发展、转归和防治方法的重要手段,与目前广泛使用的啮齿类动物模型相比,攀鼩目动物树鼩与灵长类动物的亲缘关系更近,能够更好地从整体水平模拟疾病的发生,应用前景十分广阔。目前国内外利用树鼩初步建立了包括糖尿病、动脉粥样硬化、非酒精性脂肪肝、胆结石及骨质疏松症等代谢性疾病的动物模型,并对其机制及相关影响因素进行了研究。本文概述了树鼩在人类代谢性疾病中应用的研究进展。

【关键词】 树鼩;代谢性疾病;动物模型

【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 09-0104-06

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.019

Application of tree shrews in human metabolic diseases and prospects

XIA Wei, LAI Yongjing, DU Long, WANG Menglin, WANG Hong, JI Ketong, FENG Qingyuan, TANG Anzhou*

(First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530000, China)

【Abstract】 With the improvement of human material living standards and the change of lifestyle associated with modern living, metabolic-related diseases, which affect the health of people globally, have become an important issue. To study the occurrence, development, transformation, and prevention of this kind of disease, it is vital to construct an appropriate animal model. Tree shrews (Scandentia animals) have a closer phylogenetic relationship with primates, which makes the former a useful animal model, compared with the widely used rodent models, for the simulation of disease. At present, animal models including for diabetes, atherosclerosis, nonalcoholic fatty liver, gallstones, and osteoporosis have been established using tree shrews, and their mechanisms and related factors have been studied. This article outlines the progress of research on tree shrews for insights into human metabolic diseases.

【Keywords】 tree shrew; metabolic disease; animal model

代谢是指生物体内各种物质所发生的用于维持生命的一系列有序的化学反应的总称,这些反应进程使得生物体能够顺利生长和繁殖、保持它们的结构以及对外界环境做出反应[1]。代谢通常被分为两类:分解代谢可以对大的分子进行分解以获得能量(如细胞呼吸);合成代谢则可以利用能量来合成细胞中的各个组分,如蛋白质和核酸等。而一旦物质的代谢出现问题,生物体就会表现出相关疾病,如:糖尿病、脂肪肝、动脉粥样硬化、痛风、营养不良症、维生素缺乏病、骨质疏松症等等。步入二十一世纪以来,随着工业化和现代化的迅猛发展,人们的生活条件得到了极大的提高,而与此同时人

[基金项目]国家自然科学基金项目(编号:81560486);广西科技攻关项目(编号:桂科攻 14124003-2)。

[作者简介]夏巍(1993—),男,硕士研究生,专业:树鼩在人类疾病动物模型的研究。E-mail: 1627045611@qq.com

[通信作者]唐安洲(1962—),男,教授,研究方向:鼻咽癌病因学研究。E-mail: anzhoutang@126.com

们的饮食结构及生活方式也发生了改变。为了适应生活节奏的加快,人们锻炼的时间被大大压缩,饮食和作息变得不规律,社会心理压力也越来越大等等,使得代谢相关性疾病出现普遍化、年轻化,不仅损害了患者的自身健康,还为家庭和社会带来沉重负担。因此,世界各国对代谢性疾病研究的投入只增不减,而由于临床的诸多限制,动物模型成为了各国科研工作者的主战场。

树鼩是一种新兴的实验动物,不仅具有来源广、体型小、繁殖周期短、方便饲养的特点,更重要的是全基因组结果证实树鼩是灵长类动物的近亲[2],其无论是在基因水平还是生理水平,相较于目前常用于动物模型研究的非灵长类动物都有明显优势[3],同时不必像灵长类动物那样受到严格资源和伦理的限制,故而受到各国科研工作者的青睐。目前树鼩动物模型在病毒感染、视觉传导、心理应激、抑郁、神经及脑功能、肿瘤等诸多领域[4-14]的研究已经取得一定进展,而在代谢性疾病中的应用还处于探索阶段,也尚未见有系统性报道,本文就树鼩在人类代谢性疾病中的研究做一综述。

1 糖代谢

树鼩喜食甜食,在进食后的 30 min 内是血糖上升的高峰期,餐后 1 h 血糖为空腹血糖的两倍,6 h 后血糖依然维持较高水平,在糖耐量测试中,树鼩较大鼠对糖更加敏感,但是其对糖的代谢能力较差[15-16],而且树鼩的糖代谢紊乱同人类一样,与体重、年龄、性别关系密切[17],说明树鼩是一种良好的糖尿病动物模型,可用于糖尿病的机理研究。

早在 1997 年 Ishiko 等人[18]就通过给树鼩注射链脲佐菌素(sreptozotocin,STZ)诱发了树鼩糖尿病,并以此模型来研究糖尿病的早期眼部损伤。在那之后一些研究者[19]对 STZ 诱发树鼩的糖尿病的剂量关系进行了探究,发现多次小剂量 STZ 注射可诱导树鼩出现类似 2 型糖尿病(diabetes mellitus type 2,T2DM)症状和糖尿病肾损伤,而单次较大剂量的 STZ 注射诱导树鼩出现的糖尿病症状更类似 1 型糖尿病(diabetes mellitus type 1,T1DM)。其中值得一提的是,冼苏等人[20]在研究 STZ 诱导树鼩糖尿病模型时,树鼩不仅有不同程度的多饮、多食、消瘦等糖尿病表现及胰岛数明显减少,体积变小,β 细胞数量减少、脱颗粒、空泡样改变等糖尿病病理改变,而且胰岛淀粉染色也呈阳性。胰岛淀粉化在 90% 的人类 2 型糖尿病患者中都存在,目前许多研究者认为非人灵长类动物与人类 T2DM 临床病理特征最相似的地方就是胰岛淀粉样沉积,并且淀粉样沉积的严重程度与所需的外源治疗胰岛素的量成正比,而啮齿类动物糖尿病模型中未见有此现象,这也是啮齿类动物模型与人类 T2DM 的一个显著区别[21]。除此之外,对树鼩的诱导糖尿病并发症的研究也时有报导,如蒙碧辉等人[22]研究树鼩 1 型糖尿病的骨骼肌病变发现骨骼肌纤维普遍性萎缩、灶性肌丝溶解、肌质膜异常突起和线粒体损伤是 T1DM 树鼩骨骼肌病变的主要特征,推测骨骼肌组织中细胞凋亡通路激活可能是糖尿病肌病的重要原因,并在后续的实验中发现了骨骼肌组织对葡萄糖转运体-4(glucose transporter-4,GLUT4)、磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)的表达明显受损[23];Wu 等人[24]研究糖尿病与肝改变的联系发现在 STZ 诱导树鼩 1 型糖尿病的早期阶段,是由高血糖引起的氧化应激导致肝组织中醛糖还原酶的高表达而诱发炎症反应最终使肝脏细胞损伤甚至死亡。除了有有关树鼩糖尿病建模及其机制的研究,令人鼓舞的是近几年也出现了一些在糖尿病树鼩上尝试新型糖尿病疗法的探索。Pan 等人[25]在 2016 年首次证实了使用分化自树鼩脐带血间充质干细胞(tree shrews umbilical cord blood mesenchymal stem cells,TS-UC-MSCs)的功能性胰岛样细胞治疗树鼩糖尿病的可行性,TS-UC-MSCs 移植显著降低了血糖和脂质含量,改善胰岛素抵抗和调节胰岛素分泌,并减少促炎因子白细胞介素 1(interleukin-1,IL-1)和白细胞介素 6(interleukin-6,IL-6)的表达,同时还能减轻胰腺及肝肾细胞的变性坏死。2017 年,该团队又进一步发现在树鼩 T2DM 的治疗中,UC-MSCs 移植可降低血糖水平,增加胰岛素分泌,降低胰岛素抵抗,并促进糖尿病树鼩的岛组织修复,这些变化可能通过调节影响胰岛素信号通路的症因子来实现;Notch 信号通路可能参与了 UC-MSCs 向分泌胰岛素细胞的分化;*SOCS*3 基因可能是参与 T2DM 发生发展的关键分子,进一步证实了 UC-MSCs 移植可能是治疗糖尿病的一种潜在的新型治疗方法[26]。

2 脂代谢

随着新一代的基因测序技术的出现和生物信息学的发展,越来越多树鼩脂类代谢相关基因和蛋白被发现,相较于其它实验动物其与人类对应的基因、蛋白一致性更高,例如:在胆固醇的逆转运过程中起到重要作用的血浆胆固醇酯转运蛋白(cholesterolester transfer protein,CETP),在不同动物

与人类的一致性分别为树鼩 81%、猴 80%、兔 74%[27-29],此外,树鼩血中高密度脂蛋白(high-density lipoprotein,HDL)约占血脂总量的 70% 且长期摄食高胆固醇后含量并未出现显著变化[30-31],这些都是树鼩可以成为人类脂代谢相关疾病动物模型的基础。

2.1 非酒精性脂肪肝

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease,NAFLD)是一种除外酒精和其它明确损肝因素所致的,以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变为主要特征的临床病理综合征[32]。由于临床的诸多限制,动物模型成为了研究 NAFLD 的发病机制和治疗不可缺少的工具,其中树鼩担当了重要角色。2015 年,Zhang 等人[33]利用高脂肪胆固醇和胆酸脂饮食(high fat cholesterol and high bile acid diet,HFHC)诱发了树鼩 NAFLD。具体表现为血脂异常,血浆丙氨酸转氨酶和天冬氨酸转氨酶、胆固醇及甘油三酯水平下降;肝组织病理检查显示,HFHC 饮食在 10 周内逐渐成功诱导肝脂肪变性,发炎和纤维化;此外,HFHC 诱导肝中脂蛋白脂肪酶的转录表达,但抑制低密度脂蛋白受体的表达,以及内源性合成途径。该研究还发现,如果利用泊洛沙姆 407(poloxamer 407,P-407)对脂蛋白脂肪酶进行抑制,则可以改善脂肪变性的严重程度并减轻炎症反应,这些结果不仅说明脂蛋白脂肪酶在 NAFLD 中的重要作用,也为树鼩在 NAFLD 中的进一步研究奠定了基础。2016 年该团队进一步利用不同的饮食配比诱发了非肥胖型树鼩 NAFLD[34],表现为肝损伤和高胆固醇血症,但对体重和脂肪组织生成或血糖无影响,该模型的出现填补了目前非肥胖型 NAFLD 动物模型缺乏的空白,为日后人类非肥胖型 NAFLD 的研究打开了新的大门。

2.2 动脉粥样硬化

动脉粥样硬化(atherosclerosis,AS)病变的主要特征是血管内皮的脂质浸润和沉积,脂质代谢异常是动脉粥样硬化始动因素。有意思的是,目前的研究表明树鼩具有较强的抗 AS 能力,其具体机制也一直是研究的热点。近年来随着对 AS 研究的深入,对于树鼩抗动 AS 机制的研究也从血清脂谱构成异常转向了树鼩体内与抗 AS 相关的蛋白及基因研究[29]。2010 年 Liu 等人[35]测定了人类、树鼩和北京鸭血浆脂质谱及 CETP 和磷脂转运蛋白(phospholipid transporter protein,PLTP)的活性,发现了低血浆 CETP 和 PLTP 活性可能是导致树鼩血液 HDL-C/LDL-C 比值高和对 AS 的高抗性的原因。另有研究表明调节胃肠及肝对胆固醇吸收的 Niemann-PickC1-L1(NPC1LD),在 AS 的树鼩模型中因为小肠组织的脂肪代谢而出现了高表达,并提出 NPC1LD 可能参与了血脂紊乱的病理生理过程[36]。

3 铁代谢

铁是人体最容易缺乏的必需微量元素之一,铁缺乏可导致缺铁性贫血,它被世界卫生组织确定为世界性营养缺乏病之一,也是我国主要公共营养问题。我国 7 个月 ~ 7 岁儿童缺铁总患病率为 40.3%,其中婴幼儿缺铁率高达 44.7%[37]。胎儿在母体内发育每天都需要 5 mg 左右的铁,而分娩时也要失掉一部分血,因此孕期对铁的需要量很大,如果此时铁的供应量不足,孕妇就会贫血,继而影响胎儿的发育,使新生儿贫血[38-39]。因此利用动物模型了解人类孕期的铁代谢情况适时适量补铁,及研究铁代谢相关疾病是十分必要的。Zeller 等人[40]利用怀孕树鼩,通过电子能谱和组织化学技术发现了在树鼩分娩期间和分离胎盘后流出的血液进入了子宫内膜,并且其中的红细胞被子宫内膜巨噬细胞吞噬,而被吞噬的红细胞的血红蛋白释放的铁在巨噬细胞中暂时储存为铁蛋白,并在随后的怀孕期间释放到子宫内膜腺细胞中。在哺乳动物中,红细胞的吞噬作用似乎是提供胚胎的铁的重要来源,通过从树鼩和狗等动物模型的研究表明,子宫内膜巨噬细胞吞噬红细胞和将铁转移到子宫内膜腺是胚胎早期发育阶段中主要的铁来源,故在妊娠晚期和第一次怀孕期间,需要额外的铁供应来维持胚胎发育[40]。

4 胆结石

胆结石的病因十分复杂,是多因素综合作用的结果,其中代谢相关因素主要与胆汁中的胆盐、卵磷脂和胆固醇的代谢紊乱有关。Schwaier 等人[41-42]测定了从树鼩胆囊和肝获得胆汁的组成成分,其胆汁酸谱的种类和含量都与人类具有高度相似性。将 20% 的黄油,20% 的蔗糖和 1% 的胆固醇添加到树鼩日常标准饮食中,可以迅速诱导出胆结石,而相同条件下的啮齿类动物胆汁中含有胆固醇结晶或少量结石,液晶和脂肪滴。随后通过将树鼩分组,分别向各组日常标准饮食中加入黄油、胆固醇、黄油加胆固醇和蔗糖,以分析各饮食成分对结石形成的影响。得出的结论是,这三种成分的饮食对胆结石的形成均有一定贡献,其中高脂饮食显著利于胆结石的形成。之后该团队利用上述树鼩胆

结石模型又进一步研究了增加摄入胆固醇(cholesterol,CH)后的代谢反应。在喂食含有 20% 脂肪和 2% 胆固醇的高脂饮食 4 个月后与标准饮食的动物相比,血清胆固醇值高出约 2 倍,肝胆汁中胆固醇值高出约 14 倍,而胆固醇在空肠、回肠和肝内的合成率分别只有对照组的 44%、15% 和 7%,这说明高胆固醇饮食存在诱导反馈机制,其降低肝和小肠中胆固醇的产生,但是这种机制并不能阻止血清和肝脏胆汁中胆固醇的升高而最终引发胆囊内胆结石的形成。树鼩体内胆固醇的代谢在肌肉、皮肤、肾、心脏和小肠存在不同于血清和肝的一套自我平衡机制,通过饮食增加的胆固醇从胃肠道吸收并传送到肝后一部分沉积,一部分分泌到胆汁和血清中,并通过减少内部合成成功地抵消了部分过量的胆固醇摄取[43]。

5 骨质疏松症

WHO 将骨质疏松症(osteoporosis,OP)定义为是一种以骨量减低和骨微结构破坏为特征,导致骨脆性增加和易发生骨折的代谢性骨病[44]。我国约有 1.5 亿 60 岁以上老人,占总人口的 11%,OP 发生率约为 60%,其中并发骨折者高达 12%[45]。目前用于 OP 研究的仍以啮齿类动物为主,但是由于种属限制,无法对其病变机制及治疗进行更深层次的研究和探索,而树鼩作为灵长类动物的近亲开始慢慢引起科研工作者的重视。2015 年首次有文献报道采用手术双侧卵巢去势法在树鼩上复制了人类 OP,并且成模率高,模型稳定性好[46];2017 年又有研究表明不同饲养空间会引起骨钙素、I 型胶原氨基前肽、血抗酒石酸酸性磷酸酶、血 I 型胶原羧基交联肽等骨代谢指标的改变;树鼩在骨折后恢复期的骨吸收和骨形成都较为活跃,部分说明了此时骨转化较为活跃[47]。值得注意的是,目前许多研究表明,AS 与 OP 存在一定关系,骨质丧失的越多,血管钙化的严重程度也会增加[38, 48],同时有文献报道具有降血脂作用的他汀类药物也能抗骨质疏松,而治疗骨质疏松的双膦酸盐也能够抑制 AS,他汀类药物能通过刺激骨基质蛋白的表达和血管内皮生长因子的产生来使成骨增加以补充骨密度[44, 49],这些都说明 AS 与 OP 关系密切,利用树鼩进行两者关系的探究将会是一件十分有意义的事情。

6 总结与展望

就人类代谢相关性疾病的动物模型研究而言,目前较为常见的是利用基因工程技术或饮食诱导大、小鼠各类代谢性疾病;基因工程技术最大的优点是可以揭示一个或少数基因在疾病中的作用,甚至可以在没有环境因素的作用下致病,但是人类代谢性疾病的发生往往涉及多基因、多因素的交互作用,所以此类模型仅能能模拟疾病的的部分表型,难免管中窥豹,并且模型建立技术复杂、饲养条件高、易出现变异,成本高也是需要考虑的问题;饮食诱导模型具有简便、成本低、成模率高的优点,缺点是由于种属间差异,啮齿类动物的物质代谢过程与人类相去甚远,较难准确揭示疾病的病理生理过程。树鼩作为人类疾病动物模型出现在人们的视野虽然还只有三十多年的时间,但是因为其与灵长类动物独特的亲缘关系以及体型小、繁殖快、易饲养的优点而广受科研工作者的青睐,在各种人类疾病的研究中呈现遍地开花的景象,就代谢性疾病研究方面,树鼩自身对各物质代谢的特点也为模型的建立提供了极大的方便,同时随着对树鼩代谢基因挖掘的深入,越来越多在人类代谢过程中起重要作用的基因在树鼩中亦被找到,这不仅为树鼩在人类代谢性疾病中的应用奠定了基础,更是为利用模式动物研究人类代谢性疾病打开了新的大门。目前在糖尿病、动脉粥样硬化、非酒精性脂肪肝、胆结石及骨质疏松症等代谢性疾病中已经造模成功,并对其机制和相关影响因素有了一定研究。但是,作为新兴的实验动物,目前实验来源的树鼩缺乏明确的遗传背景和纯化品系,这对树鼩的规范化和规模化使用造成了一定困难;并且对树鼩基础生理指标的研究仍然相对较少,加上树鼩易受激的特性使得各项指标的测量存在一定的偏差,这些都限制了对树鼩代谢机制及其病理生理过程的进一步揭示,日后若能消除这些壁垒,树鼩在人类代谢性疾病中的应用将会大大提升。

参考文献:

[1] Link H, Weuster-Botz D. Steady-state analysis of metabolic pathways: comparing the double modulation method and the lin-log approach [J]. Metab Eng, 2007, 9(5-6): 433-441.

[2] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nat Commun, 2013, 4: 1426.

[3] Cao J, Yang EB, Su JJ, et al. The tree shrews: adjuncts and alternatives to primates as models for biomedical research [J]. J Med Primatol, 2003, 32(3): 123-130.

[4] 王静, 周启心, 吕龙宝, 等. 社会竞争失败病因学的抑郁症树鼩模型 [J]. 动物学研究, 2012, 33(1): 92-98.

[5] Walter E, Keist R, Niederöst B, et al. Hepatitis B virus infection of tupaia hepatocytes *in vitro* and *in vivo* [J]. Hepatology, 1996, 24(1): 1-5.

[6] Tian ZF, Shen H, Fu XH, et al. Interaction of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 with the large extracellular loop of tupaia CD81 [J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(2): 240 - 244.

[7] Fuchs E, Kramer M, Hermes B, et al. Psychosocial stress in tree shrews: clomipramine counteracts behavioral and endocrine changes [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1996, 54(1): 219 - 228.

[8] Xia HJ, Wang CY, Zhang HL, et al. Characterization of spontaneous breast tumor in tree shrews (*Tupaia belangeri chinenesis*) [J]. Zoological Research, 2012, 33(1): 55 - 59.

[9] Fuchs E, Flugge G. Social stress in tree shrews: effects on physiology, brain function, and behavior of subordinate individuals [J]. Pharmacol Biochem Behav, 2002, 73(1): 247 - 258.

[10] 祁可可, 冯敏, 孟肖路, 等. 树鼩的社会挫败抑郁模型 [J]. 心理科学进展, 2012, 20(11): 1787 - 1793.

[11] Ohl F, Fuchs E. Memory performance in tree shrews: effects of stressful experiences [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1998, 23(2): 319 - 323.

[12] 周广龙, 朱勤, 李振宇, 等. 树鼩在眼科学的基础研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 652 - 655.

[13] 殷安国, 匡德宣, 李晓飞, 等. 树鼩模型在人类病毒性疾病研究中的应用进展 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 86 - 89.

[14] 吴婷婷, 屈会化, 王雪茜, 等. 非人灵长类局部脑缺血动物模型研究现状 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(3): 263 - 268.

[15] Zhang L, Zhang H, Zhu W, et al. Energy metabolism, thermogenesis and body mass regulation in tree shrew (*Tupaia belangeri*) during subsequent cold and warm acclimation [J]. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, 2012, 162(4): 437 - 442.

[16] Wang J, Xu XL, Ding ZY, et al. Basal physiological parameters in domesticated tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Zoological Research, 2013, 34(E2): E69 - E74.

[17] Wu X, Chang Q, Zhang Y, et al. Relationships between body weight, fasting blood glucose concentration, sex and age in tree shrews (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl), 2013, 97(6): 1179 - 1188.

[18] Ishiko S, Yoshida A, Mori F, et al. Early ocular changes in a tree shrew model of diabetes [J]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi, 1997, 101(1): 19 - 23.

[19] 吴晓云, 李昀海, 常青, 等. 链脲佐菌素诱导树鼩 2 型糖尿病 [J]. 动物学研究, 2013, 34(2): 108 - 115.

[20] 冼苏, 黄松, 秦映芬, 等. 链脲佐菌素诱导树鼩糖尿病动物模型研究 [J]. 广西医科大学学报, 2000, 17(6): 945 - 948.

[21] Tisch R, Yang XD, Singer SM, et al. Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulitis in non-obese diabetic mice [J]. Nature, 1993, 366(6450): 72 - 75.

[22] 莫肖敏, 蒙碧辉, 梁莹, 等. 糖尿病树鼩与人类糖尿病骨骼肌微血管超微病变的比较 [J]. 广西医科大学学报, 2003, 20(4): 479 - 482.

[23] 蒙碧辉, 刘红, 梁莹, 等. 实验性 1 型糖尿病树鼩肌组织对 GLUT4、PI3K 和 UCP3 的表达 [J]. 广西医科大学学报, 2005, 22(2): 189 - 191.

[24] Wu X, Xu H, Zhang Z, et al. Transcriptome profiles using next-generation sequencing reveal liver changes in the early stage of diabetes in tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. J Diabetes Res, 2016, 2016: 6238526.

[25] Pan XH, Zhu L, Yao X, et al. Development of a tree shrew metabolic syndrome model and use of umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation for treatment [J]. Cytotechnology, 2016, 68(6): 2449 - 2467.

[26] Pan XH, Huang X, Ruan GP, et al. Umbilical cord mesenchymal stem cells are able to undergo differentiation into functional islet-like cells in type 2 diabetic tree shrews [J]. Mol Cell Probes, 2017, 34: 1 - 12.

[27] Zeng W, Zhang J, Chen B, et al. Cloning and characterization of cholesteryl ester transfer transfer protein isolated from the tree shrew [J]. Chin Med J (Engl), 2003, 116(6): 928 - 931.

[28] 曾武威, 张坚, 陈保生, 等. 树鼩胆固醇酯转运蛋白的 cDNA 和蛋白质结构分析 [J]. 中华医学杂志, 2001, 81(21): 1316 - 1320.

[29] Liu H, Wu G, Zhou B, et al. Structure and function of cholesteryl ester transfer protein in the tree shrew [J]. Lipids, 2011, 46(7): 607 - 616.

[30] 佘铬鹏, 夏人仪, 王宗立, 等. 树鼩高密度脂蛋白(HDL)抗动脉粥样硬化的研究——一种新的动物模型 [J]. 医学研究通讯, 1985, 14(3): 89 - 90.

[31] 梁平, 谷素敏, 王宗立, 等. 树鼩高密度脂蛋白亚类及其载脂蛋白构成与抗动脉粥样硬化的关系 [J]. 中国循环杂志, 1993, 8(2): 95 - 97.

[32] 展玉涛. 重视非酒精性脂肪性肝病的防治 [J]. 现代医药卫生, 2006, 22(4): 475 - 476.

[33] Zhang L, Zhang Z, Li Y, et al. Cholesterol induces lipoprotein lipase expression in a tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) model of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Sci Rep, 2015, 5: 15970.

[34] Zhang L, Wu X, Liao S, et al. Tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*), a novel non-obese animal model of non-alcoholic fatty liver disease [J]. Biol Open, 2016, 5(10): 1545 - 1552.

[35] Liu HR, Wu G, Zhou B, et al. Low cholesteryl ester transfer protein and phospholipid transfer protein activities are the factors making tree shrew and beijing duck resistant to atherosclerosis [J]. Lipids Health Dis, 2010, 9: 114.

[36] 陈丽玲, 吴晓云, 张林强, 等. NPC1L1 在树鼩 AS 造模中小肠和肝的表达及意义 [J]. 昆明医科大学学报, 2013, 19(3): 18 - 21.

[37] 中国儿童铁缺乏症流行病学调查协作组. 中国 7 个月 ~ 7 岁儿童铁缺乏症流行病学的调查研究 [J]. 中华儿科杂志, 2004, 42(12): 886 - 891.

[38] Chen JS, Hogan C, Lyubomirsky G, et al. Women with cardiovascular disease have increased risk of osteoporotic fracture [J]. Calcif Tissue Int, 2011, 88(1): 9 - 15.

[39] 陈素梅. 孕妇的饮食与母子健康 [J]. 中国农村小康科技, 1998, 8(8): 22.
[40] Zeller U, Kuhn HJ. Postpartum erythrophagocytosis, iron storage and iron secretion in the endometrium of the tree shrew (Tupaia) during pregnancy [J]. J Anat, 1994, 184(Pt 3): 597 - 606.
[41] Schwaier A, Weis HJ, van der Linden J. Tupaias (tree shrews)—a new animal model for gallstone research. II. Influence of fat, sugar, and cholesterol on bile composition [J]. Res Exp Med (Berl), 1979, 176(2): 157 - 172.
[42] Schwaier A. Tupaias (tree shrews)—a new animal model for gallstone research; first observations of gallstones [J]. Res Exp Med (Berl), 1979, 176(1): 15 - 24.
[43] van der Linden J Jr, Schwaier A, Weis HJ. Tupaias (tree shrews)—a new animal model for gallstone research. III. Cholesterol metabolism under different diets and CDCA [J]. Res Exp Med (Berl), 1980, 178(1): 21 - 28.
[44] Meeta, Harinarayan CV, Marwah R, et al. Clinical practice guidelines on postmenopausal osteoporosis: an executive summary and recommendations [J]. J Midlife Health, 2013, 4(2): 107 - 126.
[45] 乔芳, 常静. 骨质疏松流行病学调查分析 [J]. 中国实用医药, 2012, 7(30): 271 - 272.
[46] 王运林, 匡德宣, 马朝霞, 等. 去卵巢法骨质疏松树鼩模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(6): 562 - 566.
[47] 李进涛, 郑红, 唐薇, 等. 不同饲养空间对骨质疏松树鼩雌二醇和骨代谢指标的影响 [J]. 昆明医科大学学报, 2017, 38(9): 1 - 6.
[48] Lewis JR, Zhu K, Thompson PL, et al. The effects of 3 years of calcium supplementation on common carotid artery intimal medial thickness and carotid atherosclerosis in older women: an ancillary study of the CAIFOS randomized controlled trial [J]. J Bone Miner Res, 2014, 29(3): 534 - 541.
[49] Mcfarlane SI, Muniyappa R, Shin JJ, et al. Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle bones and boned arteries, is there a link? [J]. Endocrine, 2004, 23(1): 1 - 10.

〔收稿日期〕2018 - 04 - 13

快 讯

第十四届中国实验动物科学年会通知

——主题“实验动物科技创新 助力健康中国战略”

由中国实验动物学会主办、山东省实验动物学会承办的“第十四届中国实验动物科学年会(2018 - 青岛)”将于 2018 年 10 月 9 - 12 日在山东省青岛市香格里拉大酒店举行。

会议形式与内容

1. 大会报告:邀请国内外顶尖的专家、学者就实验动物科学及其相关学科的发展与展望、前沿与热点、理论与技术等方面做特邀报告。

2. 专题报告:以实验动物各专业领域的研究内容进行学术交流。

3. 学术沙龙:就实验动物科学发展中的关键问题进行学术研讨。

4. 科普讲座:邀请实验动物科普专家举办实验动物科普知识讲座等。

5. 技术培训:举办“实验动物福利操作技术规范培训班”、“实验动物标准宣贯培训班”(选择性参加,另见通知,参加者将授予中国实验动物学会继续教育学分)。

6. 墙报交流:会议期间同时进行墙报论文交流。

7. 表彰奖励:“ICLAS-CALAS 国际青年奖”、“中国实验动物学会科学技术奖”等奖项的颁发。

8. 产品展示:同期举办“实验动物设备及动物实验相关产品展示会”。

有关信息请关注:中国实验动物学会网站:http://www.calas.org.cn

研究进展

成纤维细胞向运动神经元的分化研究进展

施玉婷[1],李　峰[2*]

(1. 首都医科大学 2013 级长学制临床医学(儿科医学方向),首都医科大学附属北京儿童医院,北京　100013;
2. 首都医科大学神经生物学系,北京脑重大疾病研究院,北京神经再生修复研究重点实验室,北京　100069)

【摘要】 脊髓性肌萎缩症、肌萎缩性侧索硬化症等运动神经元损伤性疾病,目前尚无有效的治疗手段。随着多能诱导干细胞的出现和细胞重编程技术的发展,将患者来源的成熟体细胞体外分化得到运动神经元进行自体移植成为一种充满希望的治疗途径。此外,分化得到的运动神经元还可作为细胞模型,用于疾病的机制研究和药物筛选。目前由成纤维细胞体外分化得到运动神经元的实验研究较多,就经多能诱导干细胞或神经干细胞中间状态及直接转化这三类方法进行综述。

【关键词】 运动神经元;成纤维细胞;分化;细胞重编程;多能诱导干细胞
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 09-0110-05
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.020

Research progress on conversion of fibroblasts into motor neurons

SHI Yuting[1], LI Feng[2*]

(1. 2013 undergraduate, major in Long-term-system Clinical Medicine (Paediatric Medicine), Capital Medical University; Beijing Children Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100013, China.
2. Neurobiology Department of Capital Medical University; Beijing Institute for Brain Disorders; Beijing Center of Neural Regeneration and Repair, Beijing 100069)

【Abstract】 There is currently no effective treatment for some motor neuron diseases, such as spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis. With the development of induced pluripotent stem cells and cell reprogramming technology, it is possible to induce the production of motor neurons from a patient's somatic cells *in vitro* for autologous transplantation. The differentiated motor neurons can also be used as cell models for studying disease mechanisms and for drug screening. Many researchers are now focusing on the differentiation of motor neurons from fibroblasts *in vitro*; here, we summarize three different methods for this, namely, differentiation through induced pluripotent stem cells, neural stem cells, and direct conversion.

【Keywords】 motor neuron; fibroblast; differentiation; cell reprogramming; induced pluripotent stem cell

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy,SMA)和肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis,ALS)等是一类不明原因的以运动神经元(motor neurons,MNs)进行性变性为主要特征的疾病,会引起肌萎缩无力、运动障碍,甚至瘫痪、死亡。对此尚无有效的治疗方法,细胞替代治疗是当前研究的主要手段,移植细胞主要包括 MNs、神经干细胞(neural stem cells,NSCs)、胚胎干细胞(embryonic

[基金项目]北京市教育委员会科技发展计划一般项目(编号:KM201510025001)。
[作者简介]施玉婷(1995—　),女,本科生,专业:长学制临床医学(儿科医学方向)。E-mail: 13260186607@163.com
[通信作者]李峰(1973—　),女,中级,博士,研究方向:神经发育和神经分化及神经退行性疾病。E-mail: gylfsd@126.com

stem cells, ESCs) 等。如何在体外获得大量上述细胞是问题的关键。

1998 年 11 月,威斯康星大学的科学家[1]培育出了具有分化潜能的人 ESCs,可利用其得到靶细胞甚至靶器官用以移植。但在对 ESCs 的研究中发现,该细胞具有致瘤性,异体移植存在免疫排斥,同时还存在伦理学争议,很大程度上限制了其应用。2006 年日本京都大学的 Yamanaka 等人[2]将 4 个基因(*OCT*4, *SOX*2, *C-MYC*, *KLF*4)导入小鼠胚胎成纤维细胞(mouse embryonic fibroblasts, MEFs)内,转化得到形态和功能都和 ESCs 很相似的多能诱导干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs),开创了细胞重编程技术的新时代。这种细胞来源于自身已成熟的体细胞,能避免免疫排斥。随后研究者们开始探索如何将已分化的细胞在特定条件下逆转为 iPSCs,或是直接得到靶细胞,如 MNs。本文就体外分化得到 MNs 的研究方法进行归纳和总结。

多种细胞均可用于体外分化,如间充质干细胞[3]、骨髓细胞[4]、成熟 B 淋巴细胞[5],但因成纤维细胞易于获得,目前研究最多。本文探讨以下三种由成纤维细胞获得 MNs 的方法,即经 iPSCs 中间状态、直接转化和经 NSCs 中间状态。

1 成纤维细胞经 iPSCs 中间状态转化成 MNs

1.1 成纤维细胞转化成 iPSCs

迄今已有很多方法可将体细胞诱导为 iPSCs,包括体细胞核移植、细胞融合、细胞提取物重编程和直接重编程。其中,直接重编程是向体细胞内转入特定的转录因子或基因来诱导,如,*SOX*2、*OCT*4、*C-MYC*和 *KLF*4,它们都与细胞全能性或多能性的维持有关。细胞的转化效率和速度与体细胞的来源、转录因子、转入途径和培养条件等因素息息相关。有些体细胞在重编程的过程中易于获得较高的转化效率,这是由于不同分化程度和种类细胞的蛋白质和 DNA 结合紧密程度不同,导致外源性转录因子结合到细胞 DNA 中的难易程度不同。Yamanaka 等人[2]所用的四因子是细胞重编程实验中的标准转录因子,用其他因子替换原本的一种或几种转录因子,也能实现细胞重编程,但转化时效可发生改变。比如有些体细胞自身可内源性表达一种或几种特定 Yamanaka 因子,不需要外源添加,如成纤维细胞可表达 *C-MYC* 和 *KLF*4,在重编程过程中就可不用添加 KLF4 因子,但会减小转化效率并延长转化时间。2006 年 Yamanaka 等人[2]成功得到 iPSCs 后,由 Takahashi 等[6]、Brambrink 等[7]、Kim 等[8]、Ban 等[9]、Mandal 和 Rossi[10]等进行的多项重编程实验陆续开展,他们通过把以 Yamanaka 因子为主的不同转录因子导入到逆转录病毒、慢病毒、仙台病毒、改良后的 mRNA 这几种载体中,将人成纤维细胞或脐带血细胞转化为 iPSCs,转化时间由 12 d 到 40 d 不等,转化效率由 0.001% ~4.4% 不等,进一步证实了重编程方法的可行性。

此外,利用一些小分子物质部分或者完全替代重编程因子可提高转化效率,由此得到的 iPSCs 被称为化学诱导多能诱导干细胞(chemically induced pluripotent stem cells, ciPSCs)。这些小分子物质通过调节细胞的表观遗传学、细胞信号通路、细胞凋亡、细胞衰老和代谢等机制来发挥作用[11]。Hou 等人[12]利用 7 种小分子完全替代外源性转录因子,成功地由 MEFs 得到 iPSCs,转化效率达到 0.2%,相比于 Yamanaka 等[2]的转化方法(0.01% ~0.1%)效率提高将近 200 倍,这 7 种分子分别是 forskolin (FSK)、2-甲基-5 羟色胺(2-Me-5HT)、D4476、VPA、CHIR99021(CHIR)、616452 和 tranylcypromine,前三种可以代替 OCT4,后四种可联合 OCT4 完成细胞重编程。不过迄今仍未有人源 ciPSCs 体外获得的报道。

1.2 iPSCs 转化为 MNs

iPSCs 转化成 MNs 的过程可以分成两个阶段,第一阶段通过向 iPSCs 培养基内添加不同的小分子得到拟胚体(embryoidbody, EB)或神经玫瑰花样结构(neural rosette),即神经前体细胞(neural precursor cells, NPCs);第二阶段通过添加特定因子可将 NPCs 分化成为 MNs,这一过程主要依赖于 RA 的尾端化和 SHH 的腹侧化。

Santos 等人[13]在 EB 培养阶段的第 1 ~7 天添加了 SB431542 和 DM,随后在培养的第 5 ~24 天添加 RA 和 SAG1.3(分别促进神经元的尾侧化和腹侧化),第 24 天选出单个细胞并将其置于 MNs 培养基中培养,2 d 后可得到有丝分裂后的 MNs,转化效率为 15% ~25%。

Shimojo 等人[14]在分化早期应用 GSK-3β 抑制剂和 SMAD 抑制剂,用以抑制细胞凋亡和促进细胞的分化增殖,一周内诱导得到表达 *PAX*6 和 *SOX*1 基因的 NPCs,随后应用 RA 和 purmorphamine 活化 SHH 信号通路以促进 NPCs 的分化和增殖,两周内

可得到表达 *HB*9 和 *ISL*-1 的 MNs,之后在促进 MNs 成熟的培养基中培养 4 周,可以得到成熟的 MNs。

iPSCs 技术在应用上的局限性主要体现在三个方面:一是诱导过程复杂,耗时较长(一般为 3 ~ 4 周);二是转化效率较低(一般为 0.001% ~ 0.01%);三是临床应用的安全性欠缺。在向供体细胞中引入外源基因时,病毒载体可能将外源基因整合到细胞基因组中,导致供体细胞发生基因突变,此外,*C-MYC* 和 *KLF*4 是致癌基因,因此 iPSCs 技术的安全性有待提高,转入因子及载体的选择需进一步改进。

2 成纤维细胞体外直接转化为 MNs

细胞直接转化的第一个证据来源于 *PAX*6,这个基因的缺失会影响前脑发育过程中神经元的形成,而单个此基因能使从大脑皮层分离的神经胶质细胞转化成神经元[15]。由此发现成熟细胞的分化状态是可逆的,采用过表达转录因子或添加小分子等方法可改变细胞类型,这种方法即为细胞直接转化。

2.1 单纯利用转录因子进行直接转化

20 世纪 80 年代,Davis 等人[16]首次利用单一转录因子 MYOD(在内源性肌细胞分化过程中起重要作用的因子)成功将 MEFs 转化为肌细胞,给细胞直接转化技术的发展带来了希望,随后研究者们陆续发现了一些新的转录因子。

Vierbuchen 等人[17]首先找出了 19 种在神经发育过程中起重要作用的基因,转入小鼠成纤维细胞,成功得到诱导性神经元(induced neuronal cells, iNs)。随后,为减少转录因子数量,他们利用 BRN2、MYTLl、ZIC1、OLIG2 和 ASCL1 五因子成功得到了有高度复杂形态的 iNs;进一步实验证实 BAM(BRN2、ASCL1、MYTLl)或 BAZ(BRN2、ASCL1、ZIC1)三因子得到神经元的效率比五因子高 2 ~ 3 倍,其中 BAM 三因子得到的神经元比 BAZ 三因子具有更复杂的生物学形态和功能特性。但该实验得到的神经元并不特异,要得到 MNs 还需要添加额外的转录因子,需要进一步的实验研究。

Son 等人[18]首先挑选出 MNs 分化过程中起重要作用的 8 种转录因子(SOX1、PAX6、NKX6.1、OLIG2、NGN2、LHX3、ISL1、HB9),以及上述 BAM 三因子,先后单独利用 BAM 三因子和 8 种 MNs 分化因子,结果均未由 MEFs 直接得到 MNs,而联合应用这 11 种因子能够获得 MNs。通过逐一排除,最终确定 7 因子转化体系(BAM 三因子加上 LHX3、ISL1、NGN2 和 HB9 四种转录因子),转化效率可达 5% ~ 10%。在此基础上若添加 NEUROD1,就可将人成纤维细胞转化成 MNs。

Zhang 等人[19]将上述 8 种转录因子(包括 NEUROD1)转入 SMA 患者的成纤维细胞可得到患者特异性的 MNs,转染后第 43 天,部分细胞可表达 MNs 标志物 ISL1、CHAT 和 HB9。在此实验中,正常对照组和 SMA 组的转化效率分别是 5.5% 和 5.8%,相差不大。但与对照组相比,SMA 组得到的诱导性 MNs(iMNs)在第 45 ~ 48 天神经突起的生长速率显著减慢,60 d 后神经元明显退化,数量显著减少。这一结果与 SMA 患者的临床表现相一致,证实了 SMA 的发生机制的确与运动神经元损害相关,因此 iMNs 可作为 SMA 发病机制研究和药物筛选的细胞模型。

2.2 联合应用小分子和转录因子进行直接转化

由于单纯利用转录因子的转化效率较低,研究者们开始寻找有效的小分子物质来提高转化效率。Liu 等人[20]首先选出 7 种与神经元发育和存活相关的小分子,尝试联合转录因子 NGN2 将人胚肺成纤维细胞(human fetal lung fibroblasts, HFLFs)转化成神经元,结果证实 FSK 和 DM 能使 NGN2 将 HFLFs 成功转化成 MNs。但应用于出生后和成人的皮肤成纤维细胞,获得神经元的效率很低,添加转录因子 SOX11 和小分子 FGF2,并将培养时间由 4 d 延长至 10 d,能显著提高神经元的转化效率(第 21 天 20.3% ~57.2% 表达 TUJ1),与单独应用转录因子相比增高 4 ~ 10 倍。但此方法培养时间相对较长,得到的胆碱能神经元不表达 ISL1 和 LHX3 这两种对于 MNs 发育非常重要的蛋白,Liu 等人[21]在此基础上又用携有 NGN2、SOX11、ISL1 和 LHX3 的慢病毒载体感染 ALS 患者的皮肤成纤维细胞,并添加小分子 FSK、DM 和 FGF2,成功得到 ALS 患者的 iMNs。这种 iMNs 虽然具备一般 MNs 的细胞和电生理特性,但存活困难、胞体缩小、活动度降低,无法形成神经肌肉接头,用于药物筛选实验,结果发现小分子物质 kenpaullone 可以显著促进其树突向外生长,恢复胞体大小,并能使神经元的兴奋性趋于正常,帮助提高其形成神经肌肉接头和控制肌肉运动的能力。

2.3 单纯利用小分子进行直接转化

应用载体携带外源基因进行细胞转染存在基

因整合突变的安全隐患,既然小分子物质部分替代转录因子能够提高细胞转化效率,有必要研究单纯利用小分子能否实现细胞直接转化。

Li 等[22]首次单纯利用小分子物质 forskolin、ISX9、CHIR99021 和 I-BET151 进行小鼠成纤维细胞的转化,成功得到有原始神经元形态并能表达 TUJ1 的细胞,转化效率大于 90%,这种单纯应用化学物质转化得到的神经元被命名为化学诱导神经元(chemical-induced neurons)。此方法便于操作和标准化,可避免病毒载体带来的免疫原性和基因整合等安全性问题,是一种新的体外细胞直接转化的研究思路。

既往将小鼠成纤维细胞体外直接转化成 iNs 或 iMNs 的实验多采用 BAM 这三种转录因子,而人成纤维细胞需要额外添加 NGN2,并且联合应用小分子物质的转化效率要显著高于单纯利用转录因子。成纤维细胞直接分化为 iMNs 的方法相比于经过 iPSCs 这一中间状态来说转化时间更短,效率更高,但临床应用上存在缺陷,因为通常移植细胞的需求量大,而成熟 iMNs 无法进行分裂增殖,所以患者能应用的体细胞数量有限,因此有必要考虑将成纤维细胞转变成可以大量增殖且具有多能性的 NSCs,再将其进一步分化为 MNs。

3 成纤维细胞经 NSCs 这一中间状态分化为 MNs

目前获得 iNSCs 的方法主要有两种:直接诱导法和间接诱导法。直接诱导法就是在体细胞内转入 NSCs 表达的特定基因,或者利用 microRNA 等其他小分子直接得到 iNSCs;间接诱导法就是在体细胞重编程为 iPSCs 的过程中改变诱导环境,使其成为 iNSCs。

3.1 直接诱导法

Zhu 等人[23]用 *OCT*4 单个基因联合 A83-01、CHIR99021、NAB、LPA、rolipram 和 SP600125 成功将人成纤维细胞诱导成能表达 PAX6、NESTIN 和 SOX1 等泛神经化标志物的 iNSCs,4 周后可分化出成熟神经元,移植到小鼠脑内,无肿瘤形成。

Zhao 等和 Capetian 等[24-25]将转录因子 OCT3/4、SOX2、KLF4、L-MYC、LIN28 和抑制 *p*53 基因表达的干扰 RNA 转入健康人的皮肤成纤维细胞内,在含有神经营养因子 bFGF、EGF 和 FGF4 的特定神经元培养基中培养,30 d 后得到 iNSCs。

3.2 间接诱导法

在 iPSCs 的诱导早期改变诱导环境,使其向 NSCs 方向发展即可间接获得 iNSCs。Lu 等人[26]用携有 Yamanaka 四因子的仙台 RNA 病毒感染人成纤维细胞,再将其置于含有重组人白血病抑制因子(leukemia inhibitory factor, LIF)(一种与多种细胞的增殖分化相关的多功能细胞因子)、SB431542 和 CHIR99021 小分子的条件培养基中培养,可得到 LIF 依赖性 iNSCs(LIF dependent-iNSCs, LD-iNSCs)。但此细胞的神经分化潜能需要外源性转录因子持续存在才可维持,否则长期传代(> 20 代)会逐渐丧失其潜能。

Miura 等人[27]利用携有 *OCT*4、*KLF*4、*SOX*2、*L-MYC* 和 *NANOG* 这五种基因的慢病毒转染人子宫内膜的纤维化基质细胞(endometrial fibrotic stromal cells),并将其置于含有 LIF 和 2i(MEK1/MEK2 抑制剂 PD0325901 和 GSK-3β 抑制剂 CHIR99021)的培养基中继续培养,可得到人 LD-iNSCs,转化效率大概是 0.01% ~0.03%。得到的 LD-iNSCs 可继续分化为 MNs、多巴胺能神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞,并能在体外扩增 100 代以上。

尽管通过直接或间接诱导将成纤维细胞转化为 iNSCs 的方法能增加 MNs 数量,弥补直接转化的缺陷,但是实验过程比较复杂,转化效率相对较低,应用病毒载体存在安全性问题,因此此类方法仍有待完善。细胞分化中所用小分子物质及其作用的汇总见表 1。

4 存在问题及应用前景

自 2006 年 Yamanaka 等人[2]首次利用 MEFs 得到 iPSCs 以来,细胞重编程技术逐渐兴起,各国学者从体细胞来源、转录因子、转入途径和培养条件等各个方面寻求突破,本文主要介绍了成纤维细胞体外转化得到 MNs 的三类方法,其中由成纤维细胞体外得到胆碱能神经元的转化效率最高可达 95%[20]。这些体外得到的 MNs 不仅能用于运动神经元病的替代治疗,还可用于疾病发病机制的研究和药物筛选。

目前仍然有一些问题需要继续研究。一是载体的选择:尽管非基因整合载体没有基因整合过程,相对安全,但其转化效率相比于基因整合载体更低(除 mRNA 外),需要关注如何提高非基因整合

表 1 细胞分化中所用小分子物质及其作用

Table 1 Small molecules and their functions during cell differentiation

小分子物质 Small molecules	功能 Functions
Forskolin (FSK)	活化 cAMP 和 PKA 通路 Activating cAMP and PKA pathways
视黄酸 Retinoic acid (RA)	活化 RA 信号通路 Activating RA signal pathway
丙戊酸 Valproic acid (VPA)	抑制 HDAC 和 GSK3β,活化 Notch-1 Inhibiting HDAC and GSK3β, and activating Notch-1
曲古柳菌素 A Trichostatin A (TSA)	抑制 HDAC Inhibiting HDAC
SB431542 (SB)	抑制 TGF-βR 和 Activin/TGF-β/SMAD 信号通路 Inhibiting TGF-βR and Activin/TGF-β/SMAD signal pathways
Dorsomorphin (DM)	抑制 BMP 和 BMP/SMAD 信号通路 Inhibiting BMP and BMP/SMAD signal pathways
Isoxazole 9 (ISX9)	促进神经前体细胞分化 Promoting differentiation of neural precursor cells
CHIR99021 (CHIR)	GSK3β 受体的选择性抑制剂 A selective inhibitor of GSK3β receptor
I-BET151	BET 蛋白家族的新型选择性抑制物 A new type of selective inhibitor of BET protein family
A83-01	TGF-β 抑制物 An inhibitor of TGF-β
丁酸钠 Sodium butyrate (NaB)	HDAC 抑制物 An inhibitor of HDAC
溶血磷脂酸 Lysophosphatidic acid (LPA)	磷脂衍生物,可促进细胞分裂 Phospholipid derivative to promote cell division
Rolipram	PDE4 抑制物 An inhibitor of PDE4
SP600125	JNK 抑制物 An inhibitor of JNK

载体的转化效率问题;二是小分子物质的选择,虽然小分子物质应用于重编程技术能提高转化效率,但大多数小分子在重编程过程中的特定影响和作用机制并不清楚,不同的小分子可能会相互影响或者对人体产生毒性,因此在临床应用上受到限制,应用的最适浓度、暴露时间、协同效应等方面都需要更多的研究。总之,利用已成熟的体细胞体外分化得到运动神经元的工作意义重大且仍需深入。

参考文献:

[1] Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts [J]. Science, 1998, 282(5391): 1145 - 1147.

[2] Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors [J]. Cell, 2006, 126(4): 663 - 676.

[3] Yousefi B, Sanooghi D, Faghihi F, et al. Evaluation of motor neuron differentiation potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells, *in vitro* [J]. J Chem Neuroanat, 2017, 81: 18 - 26.

[4] Abdullah RH, Yaseen NY, Salih SM, et al. Induction of mice adult bone marrow mesenchymal stem cells into functional motor neuron-like cells [J]. J Chem Neuroanat, 2016, 77: 129 - 142.

[5] Hanna J, Markoulaki S, Schorderet P, et al. Direct reprogramming of terminally differentiated mature B lymphocytes to pluripotency [J]. Cell, 2008, 133(2): 250 - 264.

[6] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors [J]. Cell, 2007, 131(5): 861 - 872.

[7] Brambrink T, Foreman R, Welstead GG, et al. Sequential expression of pluripotency markers during direct reprogramming of mouse somatic cells [J]. Cell Stem Cell, 2008, 2(2): 151 - 159.

[8] Kim D, Kim CH, Moon JI, et al. Generation of human induced pluripotent stem cells by direct delivery of reprogramming proteins [J]. Cell Stem Cell, 2009, 4(6): 472 - 476.

[9] Ban H, Nishishita N, Fusaki N, et al. Efficient generation of transgene-free human induced pluripotent stem cells (iPSCs) by temperature-sensitive Sendai virus vectors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(34): 14234 - 14239.

(下转第 125 页)

研究进展

大鼠星状神经节阻滞方法的综述

胡　可,张炳东*

(广西医科大学第一附属医院,南宁　530000)

【摘要】 星状神经节(stellate ganglion,SG)在功能上属于交感神经节,星状神经节阻滞(stellate ganglion block,SGB)是指通过各种方法使星状神经节所支配区域——头、面、颈、上肢及上胸部交感神经阻滞的方法,且已证实其在全身多个系统产生治疗或保护作用,但具体机制尚未阐明;大鼠 SG 的解剖和功能与人类类似,是模仿人类 SGB 的理想模型,大鼠 SGB 模型的建立将为研究 SGB 的分子生物学种种机制提供基础。当前对大鼠星状神经节阻滞的方法鲜有描述,大多作为实验操作部分简单带过,尚未有文献对其进行相关总结,故在此就大鼠 SGB 模型建立方法进行综述。

【关键词】 星状神经节;交感神经系统;神经阻滞;大鼠
【中图分类号】R-33　【文献标识码】A　【文章编号】1671-7856(2018) 09-0115-05
doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.021

A review of rat stellate ganglion block

HU Ke, ZHANG Bingdong*
(First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530000, China)

【Abstract】 The stellate ganglion (SG) is functionally a sympathetic ganglion. Stellate ganglion block (SGB) refers to a variety of methods for sympathetic blockade of the head, face, neck, upper limbs, and upper chest, which are innervated by stellate ganglia. SGB has been demonstrated to produce therapeutic or protective effects in multiple systems throughout the body, but the exact mechanism involved has not yet been elucidated. Rat SG resembles the anatomy and function of the equivalent system in human, so rat is an ideal model for mimicking human SGB and can provide a basis for researching the molecular biological mechanism behind the effects of SGB. At present, the methods of rat SGB have rarely been described and mostly have been simply mentioned as part of the experimental operation, and there is no literature to summarize the approaches used. Therefore, the method for establishing the rat SGB model is reviewed here.

【Keywords】 stellate ganglion; sympathetic nervous system; nerve block; rat

几乎所有(99.6% ~100%)的颈部交感神经节后神经元都存在于星状神经节(stellate ganglion, SG)中[1],所以星状神经节阻滞(stellate ganglion block,SGB)能很好地产生支配区域的交感神经抑制效应。目前,对于 SGB 的实验研究已涉及各个系统,颈胸区、同侧上肢/头面部的慢性疼痛、创伤后应激障碍、中枢神经系统、心血管系统,消化系统、潮热的治疗、内分泌系统等,并有报道在皮炎、乳腺癌淋巴水肿、破伤风、痛经的治疗方面有所疗效。SGB 作为一项越来越常用的医疗手段,对于交感神经活动过度或者研究调节自主神经系统稳态的作用、疼痛治疗等相关方向的研究有着很大的前景,

[基金项目]广西重点研发计划(桂科 AB16380240)。
[作者简介]胡可(1992—),女,硕士研究生,研究方向:心胸麻醉及体外循环。E-mail: Shirehu@163.com
[通信作者]张炳东(1962—),男,主任医师,硕士研究生,研究方向:心胸麻醉及体外循环。E-mail: Zbdong2007@126.com

其适应症逐渐增多,涉及全身系统。现在关于 SGB 的动物模型虽也有犬、兔等[2-3],但绝大多数还是大鼠模型。大鼠 SG 的解剖学与人类非常类似。在人体,颈下神经节位于第七颈椎椎骨的横突上,第一胸神经节位于第一肋骨颈部的前方。在约 80% 的人中,它们融合在一起形成 SG(C6 ~ T1)[4]。它为一个椭圆形结构,与脊髓长轴平行,通常位于 C7 ~ T1 水平椎骨骨性结构前方 0.5 cm。其前方是锁骨下动脉和椎动脉,后方是 C7 横突基底部、第一肋骨颈和椎前筋膜,内后侧为颈长肌,外侧是斜角肌群,前下方是胸膜顶和肺尖[5];在大鼠中,SG 多由颈下神经节和前 3 个胸交感神经节(C6 ~ T3)融合在一起,位于颈总动脉的背侧,前 2 个胸椎的水平[6]。以第七颈椎为标志,位于横突的外上方[7];以胸锁关节为标志,位于锁骨后方,胸锁关节外侧约 0.3 cm 处,其下为粗大的臂丛神经[8]。功能方面,人类和大鼠 SG 的神经支配类似。SGB 在人体的效应能在大鼠身上得到同样的验证。SG 可调节所支配区域的功能与感觉传导以及通过去甲肾上腺素能通路调节血流、出汗、毛发直立和内脏动态平衡[9]。SGB 在心血管系统应用广泛,由于正常的生理反馈与其他自主神经的共同调节,SGB 对正常人和大鼠的血流动力学均无明显影响[10-11]。但可控制高血压患者的血压,并能适度扩张局部狭窄血管[12-13],对于高血压大鼠亦是如此,并延缓心室重塑[14],扩张冠脉减少大鼠心梗面积[15]。SGB 常常被用于治疗各类疼痛[16],但是对于大鼠疼痛模型痛阈的影响研究尚未见报道,考虑与痛觉具有一定的主观性有关,有较好的研究前景;SG 与下丘脑、杏仁核、岛叶和腹内侧颞叶皮层区域有广泛的神经元连接[17],对于正常人与正常大鼠 SGB 均表现出相对镇静的效果[18-19];SGB 已被证明可维持自主神经系统的稳定性并影响神经内分泌系统,在临床用于抑郁症的辅助治疗[20];近期的研究结果显示 SGB 可以减轻慢性压力引起的大鼠抑郁样行为,并且这些保护作用机制与 HPA 轴的作用有关[21],而这又与 SGB 能降低人体儿茶酚胺含量的结果相一致[22],从而得以探究 SGB 抗抑郁的分子学机制。以上,在解剖与功能上,大鼠 SGB 都能很好地映射人类 SGB。因此,大鼠是模拟人类 SGB 的合适模型,而且操作方便、价格相对低廉。当前相应的动物实验则主要在研究神经系统[21,23]、心血管系统[24-25],还有更多的系统尚未涉及。为了揭示 SGB 更多的机制,使其更安全、成熟地应用于临床,动物实验需要持续跟进。当前对于大鼠 SGB 造模方法的报道鲜有几篇,作为实验操作步骤的描述也在相关文献中几句带过,笔者在此总结了文献中 SGB 的各类方法,并探究更多的 SGB 可行方案。

1 有创法

SGB 是指通过各种方法,可逆或者不可逆性阻滞 SG 节前节后纤维的神经传导,使其所支配区域产生交感抑制状态。目前的方法主要有:手术暴露法和经皮注射法。手术暴露法:颈正中做切口,手术暴露 SG,行神经干离断或者注入局麻药;经皮注射法:根据 SG 的体表解剖标志,将局部麻醉药经皮注射在包绕 SG 的疏松结缔组织内,局麻药对神经细胞膜上电压门控钠通道的阻断作用,使神经膜电位难以达到动作电位阈值,产生完全和可逆性的神经冲动和传导的阻断效应[26]。相关实验的局麻药选择多为 0.25% 布比卡因,单次 0.12 ~ 0.2 mL。布比卡因属于长效局麻药,局部浸润效果好、价格便宜。Malmqvist 等[27]建议成功的颈部交感神经阻滞应满足五个标准,包括 300 s 内霍纳综合征、皮肤温度升高、血流量增加、阻滞侧皮肤阻力反应消失等。可使用激光多普勒血流计测量头面部血流量,热成像测量头面部温度[28]。但是往往受限于仪器,更方便的判断指标是观察体征——霍纳综合征:眼睑下垂、瞳孔缩小等[7,29]。以不知情的第三者评价效果。

1.1 手术暴露法

常规麻醉大鼠后,沿颈正中线切开皮肤,钝性分离皮下肌肉及胸锁乳突肌,于食管气管旁暴露颈动脉鞘,可见颈总动脉及其伴行神经。于食管往头端寻找,在颈总动脉分叉处的背侧,可见一较大的团状神经节,为颈上神经节(superior cervical ganglion, SCG)[30];沿神经往尾端寻找,在椎动脉及锁骨下动脉起始处找到 1 ~ 2 mm 梭形或星形的黄色神经团即 SG。两神经节之间为颈交感神经干(cervical sympathetic trunk, CST)。

1.1.1 颈交感神经干离断

颈交感神经干离断(transection of cervical sympathetic trunk, TCST)后出现的持续眼裂狭小与 SGB 后的眼睑下垂相一致,长期反复的 SGB 与颈交感神经干离断为同样的效果[31]。无菌操作下暴露颈上神经节后,在距其下 3 mm 处离断颈交感神经干,并将断端结扎,缝合切口。

1.1.2 SG 旁置管

无菌操作下暴露 SG,选择粗细适宜的导管(如 PE10、PE20 或 PE50 管),一端开口置于 SG 处,另一端从颈部背后皮肤穿出以便连续推药,用丝线将导管分别固定在肌肉上与皮肤上[14]。这种方法可产生长期反复的 SGB 效果,避免多次有创操作;而且以后是清醒状态下 SGB 而非常规麻醉,接近于临床患者的局麻下 SGB。但置管后有发生管道移位与脱落、污染的风险,影响实验结果的准确性[8]。

1.1.3 直视下注药

无菌操作下暴露 SG,于 SG 处注射适量局麻药。在颈交感神经干处注入局麻药[32],也能产生 SGB 的效果。然后缝合切口。该法为直视下 SG 阻滞,效果确切,但也仅为单次阻滞,不易重复。

1.2 经皮注射法

给予常规麻醉剂量约 2/3 的麻醉药腹腔注射,或给予低浓度异氟烷,使大鼠轻度麻醉,便于观察眼睑下垂[21]。对照组可注入等量的生理盐水。Abdi 等[7]的实验显示生理盐水注射对照并不会产生眼睑下垂等 SGB 体征。该法操作简单,低痛苦,可重复,但是因为是盲打,成功率因人而异。实验者需要清楚了解大鼠 SG 的解剖位置,并多次练习。注射时建议先提起穿刺部位的皮肤,待针尖穿刺至皮下肌层,固定皮肤再次定位后继续向下穿刺,避免用力过大导致穿刺损伤,或针尖位置在皮下的改变。

1.2.1 后入路法

大鼠俯卧位。以 C7 棘突的软骨作为标识,它位于两个肩胛骨之间,距离周围组织高约 0.5 cm。依靠这个解剖标志找到第六、七颈椎横突,SG 在横突之间紧贴脊柱的位置[33]。触摸该结构,将 1 mL 注射器插入到 C7 棘突旁开 2 mm,从 C6 ~ C7 横突间穿过,沿着 C7 椎体侧缘矢状位向前推进。当针尖失去与椎体的接触(表明它已经到达椎体的前面),后退约 0.5 mm,回抽无血和脑脊液,将局部麻醉药注入。

1.2.2 外侧入路法

大鼠侧卧位,左手第一和第三手指用来固定住大鼠颈椎,同时用第二手指触摸 C7,右手持胰岛素注射器从大鼠侧面横向插向锥体前端表面,碰到椎体后回抽无血无脑脊液,注入麻醉药。由于两个手指对脊椎的固定与控制,与其他法相比,该法可更快出现上睑下垂[34]。亦可从 C7 横突的方向略向前朝脊髓方向进针,遇骨质后不动,回抽无血、无脑脊液后注入麻醉药[33]。

1.2.3 前入路法

大鼠仰卧位。以胸锁关节为体表标识,使用 4.5 号注射器(1 mL)针头以胸锁关节外侧方 0.3 cm 处作为穿刺点垂直进针穿刺(穿刺时紧贴锁骨下缘)。SG 下约 0.3 cm 为粗大的臂丛神经,穿刺针尖触及臂丛神经后大鼠可表现为对应侧的上肢颤动,此可作为穿刺成功的标志,但不一定都会出现。注入适量麻醉药。穿刺时针头尽量不要偏向外侧和尾侧,并且针尖斜面朝上有利于增加阻滞成功的概率[8]。

当前大鼠 SGB 的方法绝大部分为上述的有创法。其中手术法的优点是直视下操作,准确率得以保证;缺点是操作较为复杂,创伤较大,术后有感染的风险。神经离断法、单次给药、置管后连续给药的阻滞效果是否在程度上有统计学差异未经考证,比如与需要间歇性局部给药的 SGB 相比,颈上交感神经节切除持续阻断了交感神经系统,导致下颌角血流持续增加,颈上神经节阻滞(superior cervical ganglion block, SCGB)对神经再生的影响要大于 SGB[28],同时该法也是临床上星状神经节阻滞无法模拟的操作。经皮注射法创伤轻微,其中:后路注射法以大鼠 C7 的棘突为定位点,针尖紧贴椎骨侧缘、从 C6 ~ C7 横突间穿过,但在实际操作中大鼠的横突很难触及到,若穿刺位点错位有可能引起椎旁阻滞[8, 34],因此较前路法有稍高的死亡率;侧路注射法药物更容易到达 SG,其针尖穿过区域多为肌肉,并发症更少;前入路法中,胸锁关节容易定位,操作简单,成功率大,并发症少,可能引起臂丛神经阻滞,穿刺到锁骨下静脉会引起大小约为(0.4 ± 0.1) cm 的局部小血肿,对实验进展一般无影响[8]。

2 物理模式方法

除了以上方法外,微创或无创技术的发展也为大鼠 SGB 提供了启发。物理替代模式(physical agent modalities)进行的无创性 SGB 在临床上可以作为常规侵入性 SGB 的替代方法。没有潜在的并发症,方便实施,患者耐受性好。

2.1 超声

超声(ultrasound, US)技术在动物模型中的应用已屡见不鲜,大鼠体型较小,超声应用相对困难,相关报道多在如血流量、肿瘤[35-36]等方面。de Lange 等[37]用超声来引导大鼠右颈动脉插管;除了超声引导外,治疗性超声通过直接刺激神经可达到神经阻滞效果。高强度聚焦超声(high-intensity focused ultrasound, HIFU)引导下神经传导阻滞已经在正常

大鼠模型中应用[38],Lee 等[39]证实其在低强度(390 W/cm^2,5 s,5.7 MHz)下,可安全可逆地抑制糖尿病大鼠的坐骨神经传导。该法主要是对超声探头有更高的要求。

2.2 光照法/光疗法

研究证明,光照法照射星状神经节,能在疼痛缓解、周围血流量和皮肤温度的增加、正常心率变异性的恢复以及维持神经性疼痛综合征患者体内平衡方面表现出临床疗效,是交感神经阻滞方面的临床证据[40],因此被认为是有注射禁忌症患者的替代方案。低强度激光治疗(low-level light therapy, LLLT)照射 SG 区域,会产生类似于常规 SGB 的有益效果,眼动脉和视网膜中央动脉的血流量显著增加,是传统 SGB 法增加球后血流的有效替代方法[41],但还没有报道会导致 Horner 综合征的表现[42]。Momota 等[43]曾用直线偏振近红外光(0.6 ~1.6 μm)的高功率脉冲照射 SG 来治疗交感神经活动过度的灼口综合征,并能缓解各种慢性疼痛[44]。疝气光疗装置产生的疝光,波长接近红外区域。它的优点是通过使用脉冲宽度短于热扩散所需时间的脉冲波,在抑制热能的聚集同时提高光能量,增强治疗效果,极少产生灼伤;同时被水、黑色素和血红蛋白吸收率很小,具有优良的穿透性[45]。大鼠体积较小,光疗照射范围、强度、深度相对更难控制,需要更小的光疗装置。同时合适的光疗参数也需实验重新探索。

2.3 光遗传学

光遗传学方法[46]的发展,为神经阻滞模型建立的精准化和可控化提供了更为有力的方案。建立在前述基础上,向特定神经节注射载体病毒、转染含激动子或者抑制子的光敏蛋白(视蛋白);同时置入发光二极管,固定于体外;再用相应的激光通过发光二极管照射该部位,从而沉默或增强该基因靶向神经元的活性[47]。Yu 等[48]通过在犬的 SG 神经元注射含抑制性光敏视蛋白 ArchT 载体的病毒,4 周后用瞬时发光二极管照明该处,产生了 SGB 的效应。其机制为诱发了神经元的超极化[49]。该法可以按照实验要求随时控制 SG 的活性,但技术操作复杂,需要制备光敏蛋白重组病毒、转染至相应神经元,并且在相应部位植入光纤,耗时较长。

当前的实验技术基本能满足大鼠 SGB 模型的建立,需要在了解解剖的基础上,多加练习。随着未来无创技术的发展,大鼠等小型动物的 SGB 会更加方便、精确、可控。

参考文献:

[1] Baron R, Jänig W, With H. Sympathetic and afferent neurones projecting into forelimb and trunk nerves and the anatomical organization of the thoracic sympathetic outflow of the rat [J]. J Auton Nerv Syst, 1995, 53(2-3): 205-214.

[2] Liu Y, Tao T, Li W, et al. Regulating autonomic nervous system homeostasis improves pulmonary function in rabbits with acute lung injury [J]. BMC Pulm Med, 2017, 17(1): 98.

[3] 周祁娜, 姜涛, 季萌, 等. 星状神经节电刺激建立交感神经介导的急性房颤犬模型 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(1): 5-10.

[4] Elias M. Cervical sympathetic and stellate ganglion blocks [J]. Pain Physician, 2000, 3(3): 294-304.

[5] 卢光, 易晓斌, 陶蔚, 等. 星状神经节阻滞技术的临床应用 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2015, 21(1): 56-59.

[6] Hedger JH, Webber RH. Anatomical study of the cervical sympathetic trunk and ganglia in the albino rat (Mus norvegicus albinus) [J]. Acta Anat (Basel), 1976, 96(2): 206-217.

[7] Abdi S, Yang Z. A novel technique for experimental stellate ganglion block in rats [J]. Anesth Analg, 2005, 101(2): 561-565, table of contents.

[8] 董林林. 大鼠星状神经节位置解剖与新型阻滞途径 [J]. 新乡医学院学报, 2015, 32(12): 1078-1080.

[9] Maki PM, Rubin LH, Savarese A, et al. Stellate ganglion blockade and verbal memory in midlife women: evidence from a randomized trial [J]. Maturitas, 2016, 92: 123-129.

[10] Puente de la Vega Costa K, Gómez Perez MA, Roqueta C, et al. Effects on hemodynamic variables and echocardiographic parameters after a stellate ganglion block in 15 healthy volunteers [J]. Auton Neurosci, 2016, 197: 46-55.

[11] Yoshimoto M, Wehrwein EA, Novotny M, et al. Effect of stellate ganglionectomy on basal cardiovascular function and responses to β1-adrenoceptor blockade in the rat [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2008, 295(6): H2447-H2454.

[12] 刘维刚, 王利, 关怀, 等. 星状神经节阻滞治疗原发高血压效果的临床研究 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2006, 12(6): 368-369.

[13] 梁佩玲, 魏爱生, 古柱亮. 针刺星状神经节对早期糖尿病下肢动脉粥样硬化的影响 [J]. 中国针灸, 2016, 36(5): 476-480.

[14] 陈永权, 胡光祥, 付群, 等. 星状神经节阻滞对自发性高血压大鼠血压的影响 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2012, 41(1): 65-68.

[15] Gulcu-Bulut N, Gonca E, Kocoglu H, et al. Pretreatment with stellate ganglion blockade before ischemia reduces infarct size in rat hearts [J]. Saudi Med J, 2010, 31(2): 148-152.

[16] Sinofsky A, Sharma T, Wright T. Stellate ganglion block for debilitating photophobia secondary to trigeminal, postherpetic neuralgia [J]. Pain Pract, 2016, 16(7): E99-E102.

[17] Westerhaus MJ, Loewy AD. Central representation of the sympathetic nervous system in the cerebral cortex [J]. Brain Res, 2001, 903(1-2): 117-127.

[18] Yeo J, Jeon Y. Effects of stellate ganglion block on sedation as assessed by bispectral index in normal healthy volunteers [J]. Pain Physician, 2015, 18(2): 173 - 178.

[19] Jeong S, Jeon Y, Yeo J, et al. The effects of stellate ganglion block on the electroencephalogram in rats [J]. J Anesth, 2014, 28(4): 601 - 605.

[20] 史继红, 张敬悬. 抗抑郁药物联合星状神经节阻滞治疗躯体形式障碍临床评价 [J]. 精神医学杂志, 2015, 28(5): 354 - 357.

[21] Wang W, Shi W, Qian H, et al. Stellate ganglion block attenuates chronic stress induced depression in rats [J]. PLoS One, 2017, 12(8): e0183995.

[22] Chen YQ, Xie YY, Wang B, et al. Effect of stellate ganglion block on hemodynamics and stress responses during CO_2-pneumoperitoneum in elderly patients [J]. J Clin Anesth, 2017, 37: 149 - 153.

[23] 毕燕琳, 王彬, 尹曾, 等. 星状神经节阻滞对老龄大鼠术后海马神经元腺苷酸活化蛋白激酶和星形胶质细胞的影响 [J]. 中华医学杂志, 2014, 94(28): 2222 - 2226.

[24] Hao W, Yang R, Yang Y, et al. Stellate ganglion block ameliorates vascular calcification by inhibiting endoplasmic reticulum stress [J]. Life Sci, 2018, 193: 1 - 8.

[25] Wei N, Chi M, Deng L, et al. Antioxidation role of different lateral stellate ganglion block in isoproterenol-induced acute myocardial ischemia in rats [J]. Reg Anesth Pain Med, 2017, 42(5): 588 - 599.

[26] 顾永伟, 王晞, 唐艳红, 等. 星状神经节阻滞对家兔心肌梗死后心室肌电生理特性的影响 [J]. 中华心律失常学杂志, 2009, 13(6): 454 - 457.

[27] Malmqvist EL, Bengtsson M, Sörensen J. Efficacy of stellate ganglion block: a clinical study with bupivacaine [J]. Reg Anesth, 1992, 17(6): 340 - 347.

[28] Kubota K, Sunada K. Changes in blood flow at the mandibular angle and Horner syndrome in a rat model of superior cervical ganglion block [J]. J Dent Anesth Pain Med, 2018, 18(2): 105 - 110.

[29] Cavallotti C, Frati A, Sagnelli P, et al. Re-evaluation and quantification of the different sources of nerve fibres supplying the rat eye [J]. J Anat, 2010, 206(3): 217 - 224.

[30] 郎海丽, 胡小兰, 陈勇, 等. 星状神经节阻滞对糖尿病大鼠细胞免疫功能的影响 [J]. 中华麻醉学杂志, 2016, 36(5): 584 - 587.

[31] Iwama H. Can superior cervical ganglionectomy be an experimental model of stellate ganglion block? [J]. Masui, 1997, 46(4): 565 - 567.

[32] 陈勇, 杜晓红, 金夏, 等. 星状神经节阻滞对老龄大鼠血清 S100β 蛋白、NSE 及术后认知功能的影响 [J]. 临床麻醉学杂志, 2013, 29(10): 1020 - 1023.

[33] 龚兴瑞, 张炳东, 陈燕桦, 等. 局部注射法建立大鼠星状神经节阻滞模型的探讨 [J]. 微创医学, 2010, 5(1): 4 - 5.

[34] Gulcu N, Gonca E, Kocoglu H. A lateral percutaneous technique for stellate ganglion blockade in rats [J]. Anesth Analg, 2009, 108(5): 1701 - 1704.

[35] Faustino-Rocha AI, Gama A, Oliveira PA, et al. A contrast-enhanced ultrasonographic study about the impact of long-term exercise training on mammary tumor vascularization [J]. J Ultrasound Med, 2017, 36(12): 2459 - 2466.

[36] Liang Y, Chen J, Zheng X, et al. Ultrasound-mediated kallidinogenase-loaded microbubble targeted therapy for acute cerebral infarction [J]. J Stroke Cerebrovasc Dis, 2018, 27(3): 686 - 696.

[37] de Lange F, Yoshitani K, Podgoreanu MV, et al. A novel survival model of cardioplegic arrest and cardiopulmonary bypass in rats: a methodology paper [J]. J Cardiothorac Surg, 2008, 3: 51.

[38] Foley JL, Little JW, Vaezy S. Effects of high-intensity focused ultrasound on nerve conduction [J]. Muscle Nerve, 2008, 37(2): 241 - 250.

[39] Lee YF, Lin CC, Cheng JS, et al. Nerve conduction block in diabetic rats using high-intensity focused ultrasound for analgesic applications [J]. Br J Anaesth, 2015, 114(5): 840 - 846.

[40] Liao CD, Tsauo JY, Chen HC, et al. Efficacy of stellate ganglion blockade applied with light irradiation: a systemic review and meta-analysis [J]. Am J Phys Med Rehabil, 2017, 96(6): e97 - e110.

[41] Saeki S. Equipment for low reactive level laser therapy including that for light therapy [J]. Masui, 2006, 55(9): 1104 - 1111.

[42] Mii S, Kim C, Matsui H, et al. Increases in central retinal artery blood flow in humans following carotid artery and stellate ganglion irradiation with 0.6 to 1.6 microm irradiation [J]. J Nippon Med Sch, 2007, 74(1): 23 - 29.

[43] Momota Y, Kani K, Takano H, et al. High-wattage pulsed irradiation of linearly polarized near-infrared light to stellate ganglion area for burning mouth syndrome [J]. Case Rep Dent, 2014, 2014: 171657.

[44] Liao CD, Rau CL, Liou TH, et al. Effects of linearly polarized near-infrared irradiation near the stellate ganglion region on pain and heart rate variability in patients with neuropathic pain [J]. Pain Med, 2017, 18(3): 488 - 503.

[45] Nakajima F, Komoda A, Aratani S, et al. Effects of xenon irradiation of the stellate ganglion region on fibromyalgia [J]. J Phys Ther Sci, 2015, 27(1): 209 - 212.

[46] Boyden ES, Zhang F, Bamberg E, et al. Millisecond-timescale, genetically targeted optical control of neural activity [J]. Nat Neurosci, 2005, 8(9): 1263 - 1268.

[47] Deisseroth K. Optogenetics [J]. Nat Methods, 2011, 8(1): 26 - 29.

[48] Yu L, Zhou L, Cao G, et al. Optogenetic modulation of cardiac sympathetic nerve activity to prevent ventricular arrhythmias [J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70(22): 2778 - 2790.

[49] Tsunematsu T, Tabuchi S, Tanaka KF, et al. Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice [J]. Behav Brain Res, 2013, 255: 64 - 74.

〔收稿日期〕2018 - 06 - 08

调查报告

抗菌药物合理使用对临床手术感染率影响的比较医学分析

黄小燕[1],赵喜荣[1],曹瑞丽[2]

(1. 解放军 264 医院感染控制科,太原　030001; 2. 解放军 264 医院药剂科,太原　030001)

【摘要】　目的　了解我院清洁切口感染与抗菌药物合理使用的相关性,比较分析抗菌药物合理使用对临床手术感染率影响,为规范围手术期合理用药和临床干预提供科学依据。**方法**　通过查阅出院病历,结合应用电子信息平台,采用回顾性调查和实时查阅方法,收录并跟踪清洁切口手术患者。将住院手术患者的姓名、年龄、性别、住院天数、手术名称、手术方式、手术时间、出血量、预防用抗菌药物品种、用药时机、用药天数、使用方法、疗程、联合用药和院内感染及切口愈合等情况录入 Excel 表,建立数据库。并根据国家卫生部《医院感染诊断标准(试行)》和《外科手术部位感染预防与控制技术指南》对切口感染进行诊断。通过统计学分析,比较抗菌药物合理使用对临床手术率的影响。**结果**　970 例清洁切口手术病例中有 317 例未使用抗菌药物,预防性使用抗菌药物有 653 例,总使用率为 67.32%。653 例清洁切口手术患者围手术期预防使用抗菌药物时间分布为:术前 0.5 ~ 2 h 用药为 437 例,占 66.92%;术前未使用,术后使用的 190 例,占 29.10%,其中急诊手术有 123 例;术前提前 1 d 使用的有 26 例,占 3.98%,其中,围手术期用药 < 24 h 者有 194 例,占 29.71%;术后 24 ~ 48 h 者有 164 例,占 25.11%;术后 48 ~ 72 h 者有 101 例,占 15.47%;术后超过 72 h 者有 194 例,占 29.71%;用药指征合理的有 516 例,用药指征合理性占 79.02%。970 例清洁切口手术患者中,甲级愈合例数为 945 例,甲级愈合率为 97.42%;切口感染发生 5 例,为 0.52%,符合国家有关清洁切口医院感染率≤ 1.5% 的规定。**结论**　通过对 563 例围手术期病例使用抗菌药物的合理性比较分析得出,79.02% 的病例在手术期间使用抗菌药物合理,清洁切口感染率小于 1.5%,符合有关规定。但是围手术期抗菌药物使用与国家卫生部有关要求有一定差距,应进一步加强抗菌药物临床合理使用管理与监督。

【关键词】　清洁切口;抗菌药物;围手术期;医院感染

【中图分类号】R-33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2018) 09-0120-06

doi: 10.3969/j.issn.1671 -7856. 2018.09.022

Comparative medical analysis of the effect of rational use of antibacterial drugs on clinical surgical infection rate

HUANG Xiaoyan[1], ZHAO Xirong[1], CAO Ruili[2]

(1. Department of Infection Control, 264 Hospital of Chinese PLA, Taiyuan 030001, China.
2. Department of Pharmacy, 264 Hospital of Chinese PLA, Taiyuan 030001)

【Abstract】　Objective　The rational use of antibiotics is critical for the prevention of surgical site infection. Therefore, revealing its relationship with the infection of clean incisions and its impact on the clinical surgical infection rate

[作者简介]黄小燕(1970—　),女,主管护师,专业:部队疾病预防、感染控制和卫生健康管理。E-mail: 675421272@qq.com

would provide a scientific basis for the rational use of drugs and clinical interventions during the surgical period. **Methods** Patients who had undergone cleaning of infected incisions were registered and tracked according to the medical records from an electronic information platform, which allows retrospective and real-time investigation. The following information was recorded and analyzed in an Excal form: name, age, sex, length of hospital stay, operation, amount of bleeding, information on antibacterial drug use, combination drug therapy, nosocomial infection and incision healing, and the database was built. Wound infection was diagnosed based on Hospital Infection Diagnostic Criteria (Trial) and Surgical Site Hospital Infection Prevention and Control Technical Guidelines issued by the Ministry of Health. Finally, the effect of rational use of antibiotics on clinical operation was evaluated according to the results of statistical analysis. **Results** There were a total of 970 cases registered with incision cleaning in this study. Prophylactic antibiotics were used in 653 cases, with a use rate of 67.32%. The cases with antibiotics usage in the perioperative period were divided into three groups based on the time distribution of antibiotic treatment: there were 437 cases (66.92%) with the usage of antibiotics 0.5 – 2 h before the operation, 190 cases (29.10%) with the usage after the operation, of which emergency operation accounted for 123 cases, and 26 cases (3.98%) with the usage 1 day before the surgery. Among the 653 cases, 194 cases (29.71%) were recorded with antibiotic usage in the perioperative period < 24 h, 164 cases (25.11%) 24 – 48 h after the operation, 101 cases (15.47%) 48 – 72 h after the operation, and 194 cases (29.71%) > 72 h after the operation. There were 516 cases with reasonable indications, at a rate of 79.02%. Among the total of 970 patients included in the study with incision cleaning in surgery, the number of grade A healing cases was 945, with the grade A healing rate being 97.42%, leaving 5 cases (0.52%) suffering from incision infection. Therefore, the infection rate met the national regulations on nosocomial infection rate of clean incisions of ≤ 1.5%. **Conclusions** Through a comparative analysis of the rationality of 563 cases with perioperative use of antibacterial drugs, 79.02% of the cases were reasonable in terms of antibiotic usage during the operation, and the clean incision infection rate was less than 1.5%, in line with national regulations. However, there is a certain gap between the use of antibiotics in the perioperative period and the requirements of the Ministry of Health. The management and supervision of the rational use of antimicrobial drugs should be further strengthened.

【**Keywords**】 clean incision; antibiotic; perioperative period; nosocomial infection

手术部位感染是指继发于手术操作形成的伤口中的感染[1],是外科患者最常见的医院感染之一,与多种因素有关,其中预防应用抗菌药物是否规范合理、预防用药时机及术后用药时间等是直接影响手术切口感染的重要因素之一[2-3],了解我院清洁切口感染与抗菌药物合理使用的相关性,比较分析抗菌药物合理使用对临床手术感染率的影响,为规范围手术期合理用药和临床干预提供科学依据。我们参照《抗菌药物临床应用指导原则》和《医院感染监测规范》等,从 2015 年 3 月份起,通过查阅出院病历,结合应用电子信息平台,采用回顾性调查和实时查阅方法,收录并跟踪清洁切口手术患者。对患者院内感染情况、切口愈合情况及围手术期抗菌药物合理使用情况进行比较分析,对出现清洁切口感染和不合理使用抗菌药物的现象及时进行干预。

1 材料和方法

1.1 一般资料

我们从 2015 年 3 月起,通过查阅出院病历,结合应用电子信息平台,采用回顾性调查和实时查阅方法,收录并跟踪 970 例清洁切口手术患者,将所收集的 970 例清洁切口手术住院患者的姓名、年龄、性别、住院天数、手术名称、手术方式、手术时间、出血量、预防用抗菌药物品种、用药时机、用药天数、使用方法、疗程、联合用药和院内感染及切口愈合等情况录入 Excel 表,建立数据库。

1.2 病例纳入标准

(1)年龄、性别不限。

(2)符合清洁切口手术条件。

(3)无严重心肺疾病,无严重肝肾功能不全者。

1.3 病例剔除标准

(1)II 型糖尿病血糖控制不满意或合并糖尿病皮肤损害患者。

(2)其它部位存在伤口感染或其它系统感染需要抗菌药物治疗者。

(3)病例资料不全者。

(4)住院天数 <4 d 者。

1.4 预防用抗菌药物使用标准

抗菌药物使用率、使用时机和疗程参照《2011 年抗菌药物临床应用专项整治活动方案(56

号)》[4]及《关于继续深入开展全国抗菌药物临床应用专项整治活动的通知》(卫办医政发〔2012〕32号)要求,清洁切口预防性抗菌药物使用比例 < 30%;预防用药疗程 < 24 h;住院患者手术预防使用抗菌药物时间控制在术前 30 min ~ 2 h;无联合使用抗菌药物。其中,腹股沟疝修补术(包括补片修补术)、甲状腺疾病手术、乳腺疾病手术、关节镜检查手术、颈动脉内膜剥脱手术、颅骨肿物切除手术和经血管途径介入特殊诊疗手术患者原则上不预防使用抗菌药物。预防使用抗菌药物品种参照《卫生部关于抗菌药物临床应用管理有关问题通知(38 号文)》[5],根据常见手术预防用抗菌药物要求标准,计算抗菌药物使用合理率[4-6]。

1.5 手术切口感染诊断标准和切口愈合判断

根据国家卫生部《医院感染诊断标准(试行)》和《外科手术部位感染预防与控制技术指南》[7]对切口感染进行诊断。手术切开愈合等级参考病例记录信息。

2 结果

2.1 一般资料

2015 年 3 月 9 日—2015 年 12 月 9 日,共收录和追踪符合要求的清洁切口病例 970 例,其中男性 640 例,女性 330 例,详细情况见表 1。

2.2 围手术期抗菌药物使用情况

970 例清洁切口手术患者中有 317 例未使用抗菌药物,预防性使用抗菌药物有 653 例,总使用率为 67.32%,远远高于国家卫生部关于三级甲等医院清洁手术切口预防使用抗菌药物比例应控制在 30% 以下的要求。

2.3 抗菌药物用药时机

653 例清洁切口手术患者围手术期预防使用抗菌药物时间分布为:术前 0.5 ~ 2 h 用药为 437 例,占 66.92%;术前未使用,术后使用的 190 例,占 29.10%,其中急诊手术有 123 例;术前提前 1 d 使用的有 26 例,占 3.98%。"56 号文"和"32 号文"要求,住院患者手术预防使用抗菌药物时间控制在术前 30 min ~ 2 h,由此可以看出,我院在围手术期预防使用抗菌药物时间上相对合理,合理率达 66.92%。

2.4 抗菌药物持续使用时间

预防使用抗菌药物的 653 例清洁切口手术患者中,围手术期用药 < 24 h 者有 194 例,占 29.71%;术后 24 ~ 48 h 者 164 例,占 25.11%;48 ~ 72 h 者 101 例,占 15.47%;超过 72 h 者 194 例,占 29.71%。国家卫生部相关要求的预防用药疗程 < 24 h,我院用药持续时间 < 24 h 者,仅为 29.71%,大部分用药时间超过 24 h,用药时间不合理。

2.5 用药指征与抗菌药物种类选择

653 例清洁切口手术患者预防使用抗菌药物,用药指征合理的有 516 例,用药指征合理性占 79.02%。558 例患者预防使用抗菌药物品种选择合理,用药品种选择合理性占 85.45%。96 例患者预防使用抗菌药物品种选择不合理,占 14.70%。预防应用抗菌药物合理性评价分别见表 2[3]和表 3。

表 1 切口手术类型构成及其预防用抗菌药物使用情况

Table 1 Incision surgery type composition and the usage of preventive antibacterials

手术名称 Surgical name	手术例数 Number of cases	构成比(%) Proportion	使用抗菌药物例数 Number of cases using antibacterial drugs	使用率(%) Usage rate
骨折切开复位内固定	193	19.90	177	91.71
冠脉造影及支架植入和起搏器安置术	111	11.24	4	3.60
骨折内固定取出	97	10.00	74	76.29
颅骨缺损修补、脑内血肿清除、去骨瓣减压术及脑内肿物切除术	51	5.26	46	90.20
脑血管造影术	25	2.58	1	4.00
皮肤肿物切除术	69	7.11	42	60.87
腹股沟疝修补术(包括补片修补术)	55	5.67	23	41.82
甲状腺疾病手术	44	4.54	28	63.64
乳腺疾病手术	41	4.23	22	53.66
人工股骨头及关节置换术	32	3.30	32	100
精索静脉高位结扎术	29	3.00	8	27.58
关节镜探查术	25	2.58	19	76.00
大隐静脉结扎术	28	2.89	9	32.14
白内障超声乳化、晶体植入术	15	1.55	15	100
其他	155	15.98	153	98.11
合计	970	100	653	67.32

2.6 围手术期预防用抗菌药物选择使用情况

清洁手术围手术期预防用药指征及品种选择情况进一步比较分析表明(表 3),我院清洁切口手术围手术期用抗菌药物中一代头孢菌素头孢唑啉钠占 6.13%,属于合理选择范围;第二代头孢菌素中的头孢孟多脂使用比例较大,占总的 48.55%,其次是头孢呋辛和头孢替安等,比较合理;有 34 例使用三代头孢类抗菌药物,其中 10 例清洁手术使用头孢甲肟,为不合理,24 例颅脑手术使用头孢曲松比较合理;41 例使用阿莫西林、氟氯西林钠等青霉素类抗菌药物和 8 例联合用药的为不合理用药。详情见表 3。

2.7 手术切口感染和愈合情况

970 例清洁切口手术患者中,甲级愈合例数为 945 例,甲级愈合率为 97.42%;切口感染发生 5 例,为 0.52%;围手术期未预防使用抗菌药物的 317 例手术患者未出现切口感染。5 例切口感染患者均切口浅部组织感染,都是骨折切开复位内固定手术,手术时间最短的为 105 min,最长的为 215 min,患者术后出现伤口部位疼痛、有红肿、渗出或脓性分泌物,有 2 例患者切口分泌物经病原学检测为多耐药的表皮葡萄球菌,且术前均预防使用抗菌药物。

3 讨论

3.1 预防性使用抗菌药物指征

本次调查结果显示(见表 1),970 例清洁切口手术患者有 317 例未使用抗菌药物,预防性使用抗菌药物的手术患者有 653 例,总使用率为 67.32%,远远超过卫生部规定 30% 的要求。预防使用率均超过规范要求,这与临床医生认识观念和现在医患关系紧张有关,大多数医生认为,此类手术多有异物植入,一旦感染后果比较严重,有时会带来不必要的医疗纠纷。因此,无论术前准备是多么完善,医生都要预防使用抗菌药物。

表 2 清洁切口围手术期预防用抗菌药物合理性评价标准[3]

Table 2 Criteria for evaluating rationality of antibacterial drugs in clean incisions in the perioperative period[3]

给药方案 Drug regimen	合理 Reasonable	不合理 Unreasonable
适应症	存在感染高危险因素	无感染高危险因素
药品品种选择	符合卫生部 2009 年 38 号文件[5] 要求	不符合卫生部 2009 年 38 号文件[5] 要求
给药剂量	根据药品说明书规定选择	不符合药品说明书
溶媒	符合药品说明书	不符合药品说明书
给药次数	符合药品说明书	不符合药品说明书
给药途径	静脉给药	口服或其他
用药时机	术前:0.5 ~ 2 h 内或麻醉开始时首次给药	术前:大于 2 h 或小于 0.5 h,术前未用,术后开始给药
术中用药	术中:手术时间大于 3 h 或失血量大于 1500 mL,术中给药第二剂	术中:未按规定给予第二剂
术后用药	术后:预防用药时间小于 48 h	术后:预防用药时间大于 48 h

表 3 清洁切口预防用抗菌药物选择情况

Table 3 Selection of antibiotics for the prevention of infection of clean incisions

抗菌药物 Antibacterial drugs		药品名称 Drug name	使用例次 Cases	使用率(%) Usage rate	合理性 Rationality
头孢菌素类	第一代头孢	头孢唑啉	40	6.13	合理
	第二代头孢	头孢孟多脂	317	48.55	合理
		头孢呋辛	62	9.49	合理
		头孢替安	48	7.35	合理
		头孢西丁	52(34 /18)	7.96	合理
		头孢替唑	20	3.06	合理
	第三代头孢	头孢曲松	24	3.68	合理
		头孢甲肟	10	1.53	不合理
青霉素类		阿莫西林、氟氯西林	41	6.28	不合理
		青霉素	10	1.53	不合理
喹诺酮类		左氧氟沙星	8	1.23	不合理
克林霉素类		克林霉素	1	0.15	合理
大环内酯类		阿奇霉素	1	0.15	不合理
联合用药		头孢孟多脂 + 左氧氟沙星、头孢替安 + 左氧氟沙星、头孢呋辛 + 替硝唑,等	19(11/8)	2.91	合理性 1.68%

本次调查我们还发现,神经外科 25 例全脑血管造影术患者中只有 1 例年龄较大患者预防使用头孢呋辛;心血管内科冠脉造影、支架植入及起搏器安置术 111 例患者中只有 2 例支架植入和 9 例起搏器安置的患者预防使用头孢呋辛和头孢唑啉,而且为糖尿病、高血压等基础疾病较多和年龄较大的患者,其中有 41 例单纯冠脉造影术患者未预防使用抗菌药物。以上所有患者均未出现医院感染。由此可见我院在血管造影及支架植入等特殊诊疗操作手术中,预防使用抗菌药物比较规范,且符合国家有关规定。

3.2 抗菌药物用药时机和持续时间

3.2.1 抗菌药物用药时机

国内外许多临床资料显示,抗菌药物在外科领域进行预防性应用已经越来越广泛,手术患者通过术前预防性应用抗菌药物,可以在可能发生切口污染之前使机体组织内的药物达到一定的浓度,从而有效抑制细菌的繁殖[8]。根据卫生部发布的"56 号文"和 2015 版《抗菌药物临床应用指导原则》要求,清洁切口预防用抗菌药物最佳时机是术前 0.5 ~ 2 h,如果手术时间大于 3 h,或失血量大于 1500 mL,手术中应给予第二剂,抗菌药物的有效覆盖时间应包括整个手术过程和手术结束后 4 h;总的预防时间不超过 24 h,个别情况可延长至 48 h[9]。但是也有研究发现,手术后抗菌药物的应用时间与切口发生感染的概率并无明显的关系[3, 10]。在过量应用抗菌药物的情况下,细菌的耐药性反而会增加,容易发生感染[3]。

本调查结果显示:653 例清洁切口手术患者围手术期预防使用抗菌药物时机不合理率占 33.08%,其中术前提前 1 d 使用和术前未使用术后使用的有 216 例,用药时机不合理的主要因素为急诊手术患者病情重,时间急,导致术前未使用。因此,规范急诊手术患者围手术期预防使用抗菌药物,有效提高抗菌药物使用合理性,监督督导主治医师及手术室护士把握好首次抗菌药物用药时机是我们要密切关注的问题。

3.2.2 持续时间

部分医生预防应用抗菌药物时间大于 48 h,有的甚至用到 7 d。有研究显示预防用药时间过长,容易产生耐药菌株和肠菌群紊乱,还容易导致由耐药菌引起的严重合并感染[3, 11]。由此可见虽然我们以往对清洁切口围术期预防性应用抗感染药物进行了有效干预[3, 12],但是,临床医生特别是新聘医生对抗菌药物使用的合理性认知度与国家有关规定要求相比有较大差距,还需进一步加强培训和督导。

3.3 抗菌药物品种的选择

根据《抗菌药物临床应用指导原则》等相关要求,预防性抗菌药物建议选择有循证医学证据的第一代头孢菌素头孢唑啉,第二代头孢菌素头孢呋辛。头孢菌素过敏者,针对革兰阳性菌可用克林霉素,针对革兰阴性菌可用氨曲南或氨基糖苷类药物。

3.4 手术切口愈合、院内感染情况

970 例清洁切口手术患者中,切口感染发生 5 例,占 0.52%,5 例切口感染患者均为切口浅部组织感染,有 2 例患者切口分泌物经病原学检测为多耐药的表皮葡萄球菌,且术前均预防使用抗菌药物。围手术期未预防使用抗菌药物的 317 例手术患者未出现切口感染。由此可见,即使术前预防使用抗菌药物,如果不能做到严格消毒、灭菌和遵循无菌操作技术,也会发生切口感染。我们认为在患者不存在高危因素时,充分做好术前准备工作、严格遵守手术中的无菌操作技术原则,可以不预防使用抗菌药物。对手术切口感染高危患者可以给予第一代头孢菌素类药物进行预防,这样既降低了用药费用,也达到了预期目的[13]。

本次调查结果显示:多数医生,选择使用头孢唑啉、头孢呋辛和克林霉素等,还有医师在初次给药时即选择广谱、新、贵的抗菌药物或者两种抗菌药物联合应用,对于抗菌药物预防性应用的原则不能正确掌握,盲目给药。因此,我们在以往要求的基础上,应进一步加强清洁手术围手术期抗菌药物的合理使用监督和督导,这不仅能够有效地预防手术切口感染,也能够更加规范抗菌药物临床合理使用。

参考文献:

[1] 胡必杰, 葛茂军, 关素敏, 等. 手术部位感染预防与控制最佳实践 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2012: 2 - 15.

[2] 黄丽平, 严书华, 孙德林. 356 例清洁切口手术部位感染目标性监测分析 [J]. 河南外科学杂志, 2012, 18(6): 156 - 157.

[3] 赵喜荣,张文玲,王瑞. 清洁切口围术期预防用抗菌药物合理性分析[J]. 中国医院用药评价与分析,2015,15(11):1468 - 1471.

[4] 卫生部医政司. 2011 年抗菌药物临床应用专项整治活动方

案［S］. 卫办医政发(2011)56 号.
［5］ 卫生部. 卫生部办公厅关于抗菌药物临床应用管理有关问题通知［S］. 卫办医政发【2009】38 号.
［6］ 卫生部, 国家中医药管理局总后卫生部. 抗菌药物临床应用指导原则［S］. 卫医发［2004］285 号.
［7］ 中华人民共和国卫生部. 外科手术部位感染预防与控制技术指南(试行)［S］. 北京: 中华人民共和国卫生部, 2010: 23.
［8］ 赵振寰, 马霖, 曹玉, 等. Ⅰ类手术切口感染率与围手术期预防使用抗菌药物关系探讨［J］. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(16): 3459 - 3461.
［9］ 王芳, 马荣惠. 剖宫产围术期应用抗菌药物预防感染的调查［J］. 中国妇幼保健杂志, 2006, 21(9): 1192 - 1194.
［10］ Stefánsdóttir A, Robertsson O, W-Dahl A, et al. Inadequate timing of prophylactic antibiotics in orthopedic surgery. We can do better［J］. Acta Orthop, 2009, 80(6): 633 - 638.
［11］ 闫赋琴, 吕娟丽, 孙慧萍, 等. 228 例Ⅰ类切口手术抗菌药物预防性应用的调查分析［J］. 中华医院感染学杂志, 2011, 21(4): 3012 - 3013.
［12］ 赵喜荣, 郝晓菁, 王种德, 等. Ⅰ类切口围术期预防性应用抗感染药物临床干预效果评价［J］. 中国医药, 2013, 8(3): 410 - 411.
［13］ 李雅, 杨小力. Ⅰ、Ⅱ类切口围手术期抗菌药物预防性应用的合理性分析［J］. 中国处方药, 2013, 11(6): 50 - 52.

〔收稿日期〕2018 - 05 - 29

(上接第 114 页)

［10］ Mandal PK, Rossi DJ. Reprogramming human fibroblasts to pluripotency using modified mRNA［J］. Nat Protoc, 2013, 8(3): 568 - 582.
［11］ Biswas D, Jiang P. Chemically induced reprogramming of somatic cells to pluripotent stem cells and neural cells［J］. Int J Mol Sci, 2016, 17(2): 226.
［12］ Hou P, Li Y, Zhang X, et al. Pluripotent stem cells induced from mouse somatic cells by small-molecule compounds［J］. Science, 2013, 341(6146): 651 - 654.
［13］ Santos DP, Kiskinis E. Generation of spinal motor neurons from human pluripotent stem cells［J］. Methods Mol Biol, 2017, 1538: 53 - 66.
［14］ Shimojo D, Onodera K, Doi-Torii Y, et al. Rapid, efficient, and simple motor neuron differentiation from human pluripotent stem cells［J］. Mol Brain, 2015, 8(1): 79.
［15］ Masserdotti G, Gascon S, Gotz M. Direct neuronal reprogramming: learning from and for development［J］. Development, 2016, 143(14): 2494 - 2510.
［16］ Davis RL, Weintraub H, Lassar AB. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts［J］. Cell, 1987, 51(6): 987 - 1000.
［17］ Vierbuchen T, Ostermeier A, Pang ZP, et al. Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors［J］. Nature, 2010, 463(7284): 1035 - 1041.
［18］ Son EY, Ichida JK, Wainger BJ, et al. Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons［J］. Cell Stem Cell, 2011, 9(3): 205 - 218.
［19］ Zhang QJ, Li JJ, Lin X, et al. Modeling the phenotype of spinal muscular atrophy by the direct conversion of human fibroblasts to motor neurons［J］. Oncotarget, 2017, 8(7): 10945 - 10953.
［20］ Liu ML, Zang T, Zou Y, et al. Small molecules enable neurogenin 2 to efficiently convert human fibroblasts into cholinergic neurons［J］. Nat Commun, 2013, 4: 2183.
［21］ Liu ML, Zang T, Zhang CL. Direct lineage reprogramming reveals disease-specific phenotypes of motor neurons from human ALS patients［J］. Cell Rep, 2016, 14(1): 115 - 128.
［22］ Li X, Zuo X, Jing J, et al. Small-molecule-driven direct reprogramming of mouse fibroblasts into functional neurons［J］. Cell Stem Cell, 2015, 17(2): 195 - 203.
［23］ Zhu S, Ambasudhan R, Sun W, et al. Small molecules enable OCT4-mediated direct reprogramming into expandable human neural stem cells［J］. Cell Res, 2014, 24(1): 126 - 129.
［24］ Zhao Z, Xu M, Wu M, et al. Transdifferentiation of fibroblasts by defined factors［J］. Cell Reprogram, 2015, 17(3): 151 - 159.
［25］ Capetian P, Azmitia L, Pauly MG, et al. Plasmid-based generation of induced neural stem cells from adult human fibroblasts［J］. Front Cell Neurosci, 2016, 10: 245.
［26］ Lu J, Liu H, Huang CT, et al. Generation of integration-free and region-specific neural progenitors from primate fibroblasts［J］. Cell Rep, 2013, 3(5): 1580 - 1591.
［27］ Miura T, Sugawara T, Fukuda A, et al. Generation of primitive neural stem cells from human fibroblasts using a defined set of factors［J］. Biol Open, 2015, 4(11): 1595 - 1607.

〔收稿日期〕2017 - 12 - 18

未名集团
SINOBIOWAY

为新药高效研发体系
提供临床前动物实验完善服务

实景图（2016年11月5日航拍图）

合肥半汤生物经济实验区是未名集团投资建设的生物药研发和制造基地，位于安徽省合肥市，占地31平方公里；整个建筑群工程浩大，带状绵延犹如一条巨龙，每栋单个建筑都是一个字母，组合起来看，从左到右8栋建筑组成英文“抗体”即ANTIBODY，将成为世界一流水平的抗体药生产基地；右侧ATCG为基因的四个碱基，作为国家大基因中心；未名实验动物中心位于实验区内（龙尾处），也是中国实验动物联盟的核心基地，占地100亩，中心建筑面积6万平方米，为新药高效研发体系提供临床前动物实验完善服务，建立新药研发临床期前实验的“巴拿马运河”。

北大未名生物工程集团有限公司
SINOBIOWAY GROUP CO., LTD.

地址：中国北京市海淀区上地西路39号北大生物城　邮编 100085
Add: PKU Biocity, 39 Shangdi West Rd., Haidian, Beijing, 100085, China
电话 / Tel: (8610)82890905　　传真 / Fax: (8610)82890908
网址 / Web：http://www.sinobioway.com.cn