

黄树武,王静,陈梅玲,等. 恒河猴与食蟹猴血清多重细胞因子检测及分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1): 60–63.
Huang SW, Wang J, Chen ML, et al. Measurement and comparative analysis of multiple serum cytokines in Rhesus and Cynomolgus monkeys [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 60–63.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856. 2019.01.010

恒河猴与食蟹猴血清多重细胞因子检测及分析

黄树武,王 静,陈梅玲,罗银珠,潘金春,吴瑞可,何丽芳,闵凡贵*

(广东省实验动物监测所,广东省实验动物重点实验室,广州 510663)

【摘要】 目的 测定和比较健康恒河猴与食蟹猴基础血清细胞因子水平。方法 分别采集 15 只健康恒河猴和 15 只健康食蟹猴血清,采用 luminex xMap 技术测定血清 43 种细胞因子的浓度,根据正态性检验(W 检验)结果选择随机 t 检验或非参数检验(Mann-Whitney test)比较群体间差异。结果 测定的 43 种细胞因子中,1 种促炎症因子(IL-15)、3 种抑炎症因子(IL-1RA、IL-6R α 和 sCD27)和 1 种趋化因子(CCL5/RNATES)存在显著性群体间差异。结论 研究结果表明,恒河猴与食蟹猴基础血清细胞因子水平差异不显著,用于生物医学研究中具有一定的可比性。同时,本研究结果可为相关研究提供基础数据。

【关键词】 恒河猴;食蟹猴;xMap 技术;细胞因子;趋化因子

【中图分类号】 R-33 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2019) 01-0060-04

Measurement and comparative analysis of multiple serum cytokines in Rhesus and Cynomolgus monkeys

HUANG Shuwu, WANG Jing, CHEN Meiling, LUO Yinzhu, PAN Jinchun, WU Ruike, HE Lifang, MIN Fangui*

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

【Abstract】 **Objective** To detect and compare the clinical outcomes of multiple serum cytokines in healthy Rhesus and Cynomolgus monkeys. **Methods** Fifteen healthy Rhesus and 15 healthy Cynomolgus monkeys were chosen for sample collection. Serum concentrations of 43 cytokines were measured using xMap technologies. The results were analyzed by t -test or non-parametric Mann-Whitney U -test according to the W -test for normality. **Results** Among 43 cytokines, one pro-inflammatory cytokine (IL-15), three anti-inflammatory cytokines (IL-1RA, IL-6R α , and sCD27) and one chemokine (CCL5/RANTES) were significantly different between Rhesus and Cynomolgus monkeys. **Conclusions** There is no significant difference in basic serum cytokine levels between Rhesus and Cynomolgus monkeys, which is comparable in biomedical research. The results of this study provide basic data for related studies.

【Keywords】 Rhesus monkeys; Cynomolgus monkeys; xMap technologies; cytokines; chemokines

非人灵长类(non-human primates)实验动物是生物医学研究中不可替代的重要资源,被广泛应用于人类疾病的模型研究、疫苗与药物的临床前评价^[1-3],是研究 HIV 感染、免疫和病理的首选动物模型^[4-7]。随着非人灵长类实验动物饲养繁育规范化程度提高及动物福利的不断加强,非人灵长类实验

【基金项目】广东省科技计划项目(2016A030303023,2016A030303024,2017A070702001,2017B030314171,2018B070714012)。
【作者简介】黄树武(1990—),男,学士,研究方向:实验动物质量监测和微生物学研究。E-mail: hsw2015@gdlami.com
【通信作者】闵凡贵(1980—),男,硕士,副研究员,研究方向:实验动物与比较医学研究。E-mail: minfangui@aliyun.com

动物的标准化程度也越来越高。

在生物医学研究工作中,使用量最多的非人灵长类实验动物是旧大陆猴,其中以恒河猴和食蟹猴为主。早期研究报告分别对恒河猴和食蟹猴之间关于血液生理和生化指标^[8-9]、红细胞免疫黏附功能^[10]、血液蛋白遗传多样性^[11]、生产繁殖性能^[12-13]等生物学特性进行测定和分析,获得了重要的基础数据,证实恒河猴与食蟹猴虽然存在某些参数的差异,但总体种属差异性不大。然而,目前国内尚无关于正常食蟹猴与恒河猴细胞因子比较的报道,国外也鲜有报道。本研究将采用高通量 xMap 技术测定恒河猴与食蟹猴血清多重细胞因子的浓度,并分析恒河猴与食蟹猴间差异,为生物医学研究提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级恒河猴 15 只,年龄 3.0~4.0 岁,其中雄性 7 只,体重 5.0~6.0 kg,雌性 8 只,体重 4.3~5.5 kg,由从化华珍实验动物养殖场提供[SCXK(粤)2015-0028],结核菌素试验阴性,排除猴 B 病毒、猴免疫缺陷病毒、猴逆转录 D 型病毒和猴 T 淋巴细胞趋向性病毒 I 型。该机构获得了国际 AAALAC 完全认证,其动物饲养和实验操作在从化华珍实验动物养殖场实验设施[SYXK(粤)2015-0151],符合动物福利和伦理要求,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。

普通级食蟹猴 15 只,年龄 3.0~4.0 岁,其中雄性 7 只,体重 3.5~4.5 kg,雌性 8 只,体重 2.5~3.5 kg,由广东春盛生物科技有限公司提供[SCXK(粤)2014-0027],结核菌素试验阴性,排除猴 B 病毒、猴免疫缺陷病毒、猴逆转录 D 型病毒和猴 T 淋巴细胞趋向性病毒 I 型。该机构获得了国际 AAALAC 完全认证,其动物饲养和实验操作在广东春盛生物科技有限公司实验设施[SYXK(粤)2015-0152],符

合动物福利和伦理要求,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

液相芯片,由 R&D Systems 生产,包括 2 个反应体系,体系 1 同时测定 37 种细胞因子(Lot Number: L122018),体系 2 同时测定 6 种细胞因子(Lot Number: L122016),具体信息见表 1。流式细胞仪(BD/FACSCanto 2,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 血清采集

采用非抗凝真空采血管自后肢小隐静脉或前肢皮下头静脉采集血液 1~2 mL,4℃ 冰箱过夜,3000 r/min 离心 15 min,取上清液,-80℃ 条件保存。

1.3.2 细胞因子检测

利用流式细胞仪(BD/FACSCanto 2,美国),采用 xMap 技术测定血清中 43 种细胞因子的浓度。

1.4 统计学方法

细胞因子浓度服从正态分布,选用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)进行描述;若不服从正态分布,选用中位数与四分位数进行描述。当两群体的细胞因子浓度服从正态分布且满足方差齐性时,群体间的差异采用随机 *t* 检验;当服从正态分布,但不满足方差齐性时,选用矫正 *t* 检验(Unpaired *t* test with Welch's correction);当不服从正态分布时,采用非参数检验(Mann-Whitney test)。正态性检验采用 *W* 检验(Shapiro-Wilk test),方差齐性检验采用 *F* 检验。

2 结果

2.1 细胞因子检测分析

所测 29 种细胞因子按其在感染免疫中的作用,可分为促炎症因子、抑炎症因子、多能细胞因子和其他功能细胞因子,测定结果见表 2。其中,19 种细胞因子测定结果呈正态分布,*F* 检验结果显示有 2 种细胞因子方差不齐;10 种细胞因子测定结果呈偏态分布。

表 1 选择的因子信息
Table 1 Information of the selected cytokines

分类 Classification	数量 Number	因子名称 Cytokines
组合 1 Panel 1	37	IFN-γ, TNF-α, TNF-R I, GM-CSF, IL-1β, IL-1ra, IL-1 RII, IL-2, IL-2 Rα, IL-4, IL-5, IL-6, IL-6Rα, CXCL8/IL-8, IL-10, IL-15, IL-17 A, IL-22, CCL2/MCP-1, CCL4/MIP-1β, CCL7/MCP-3, CCL11/Eotaxin, CCL13/MCP-4, CCL18/PARC, CCL22/MDC, CCL27/CTACK, CXCL1/GROα, CXCL4/PF4, CXCL10/IP10, CXCL12/SDF-1α, CXCL13/BLC/BCA-1, sCD14, sCD27, sCD30, sCD40, NCAM-1/sCD56, B7-H1/PD-L1/sCD274
组合 2 Panel 2	6	TNF-R II, IL-19, CCL5/RANTES, MIF, MPO, Galectin-3 bp

恒河猴与食蟹猴比较,11 种促炎症因子中,仅 IL-15 存在显著性差异($P < 0.05$);12 种抑炎症因子中,3 种细胞因子(IL-1RA、IL-6R α 和 sCD27)存在显著性群体间差异($P < 0.05$);其他细胞因子无群体间差异($P > 0.05$)。

2.2 趋化因子检测分析

14 种趋化因子的测定结果见表 3,其中,11 种趋化因子呈正态分布,1 种趋化因子 F 检验结果显示方差不齐;3 种趋化因子呈偏态分布。

恒河猴与食蟹猴比较,仅 CCL5/RNATES 存在群体间差异($P < 0.05$)。

3 讨论

细胞因子具有极强的生物学活性,在生物医学研究中具有重要的意义^[14-16],一方面,可作为药物用于临床许多疾病的治疗,另一方面,细胞因子

在体内具有重要的病理作用。在感染、炎症、自身免疫病、免疫缺陷疾病等状态下,部分细胞因子明显变化,通过检测血清、血浆或组织液中细胞因子含量,可以对疾病诊断和治疗做出相应评价,具有重要的临床应用价值。而基础血清、血浆和组织液中细胞因子的水平成为衡量病理状态下细胞因子变化的重要的参考值,是首当其冲要解决的问题。

尽管实验猴的使用数量越来越多,应用范围越来越广,但是其基础生物学特性数据的研究却相对滞后,作为实验猴生产和出口大国,目前,我国尚无关于恒河猴与食蟹猴基础细胞因子水平的研究。本研究采用高通量 luminex xMap 技术测定了恒河猴与食蟹猴 43 种血清细胞因子的水平,并进行了群体间比较。结果显示,恒河猴与食蟹猴间仅 5 种细胞因子存在显著性群体间差异,表明两种猴群体间差

表 2 细胞因子浓度测定结果及比较分析

Table 2 Concentrations of detected cytokines and analysis of inter-group differences				
分类 Classification	细胞因子 Cytokines	恒河猴 (n=15) Rhesus monkey	食蟹猴 (n=15) Cynomolgus monkey	P 值 P-value
促炎症因子 Proinflammatory cytokines	TNF- α	8.05 $\pm$ 2.08	8.64 $\pm$ 2.16	0.4502
	GM-CSF	3.96 $\pm$ 1.99	4.26 $\pm$ 1.37	0.6374
	IFN- γ	67.21 $\pm$ 40.05	86.23 $\pm$ 37.52	0.1903
	IL-1 β	15.97(14.04,30.49)	18.96(16.30,22.95)	0.3946 *
	IL-2	41.12(30.47,70.74)	41.72(28.45,94.14)	0.5598 *
	CXCL8/IL-8	1177 $\pm$ 388	996 $\pm$ 253	0.1415
	IL-15	19.71 $\pm$ 7.62	14.41 $\pm$ 4.67	0.0309 Δ
	IL-17 A	29.43(24.21,35.40)	26.83(18.90,39.60)	0.5875 *
	IL-22	5.94(4.73,10.57)	7.91(4.88,9.94)	0.5058 *
	sCD14	52709(52664,52759)	52628(52331,52670)	0.0599 *
	sCD40	29.00(27.10,39.39)	35.50(26.25,58.89)	0.3505 *
	IL-1RA	1014 $\pm$ 292.9	3363 $\pm$ 1967	0.0004 Δ
	IL-4	115.08 $\pm$ 16.32	125.72 $\pm$ 19.00	0.1111
	IL-5	20.57 $\pm$ 2.44	20.93 $\pm$ 2.57	0.6977
抑炎症因子 Anti-inflammatory cytokines	IL-10	8.94 $\pm$ 1.98	8.80 $\pm$ 1.53	0.8226
	TNF R I	4072 $\pm$ 1307	3849 $\pm$ 827	0.5811
	TNF R II	2117 $\pm$ 1157	1829 $\pm$ 790	0.4317
	IL-1R II	18582 $\pm$ 4418	18968 $\pm$ 3176	0.7854
	IL-2 R α	301.97 $\pm$ 139.02	360.22 $\pm$ 106.20	0.2078
	IL-6 R α	21999 $\pm$ 5306	14874 $\pm$ 5068	0.0008
	IL-19	2488(2177,2894)	2518(2002,2775)	0.7829 *
	sCD27	480.3(373.8,653.2)	780.7(592.7,1492)	0.0032 *
	sCD30	98.19 $\pm$ 25.74	113.93 $\pm$ 19.39	0.0690
	IL-6	11.76(10.56,17.23)	11.04(9.15,13.60)	0.2365 *
多能细胞因子 Pleiotropic cytokine	MIF	7265 $\pm$ 4238	6574 $\pm$ 2583	0.5938
其他细胞因子 Other cytokines	NCAM-1/sCD56	173142 $\pm$ 29442	151383 $\pm$ 31988	0.0627
	MPO	7158 $\pm$ 1410	6989 $\pm$ 1595	0.7600
	Galectin-3 bp	201563 $\pm$ 62942	211573 $\pm$ 42894	0.6148
	B7-H1/PD-L1	2213(1929,2464)	2184(1906,3199)	0.8280 *

备注: * 采用 Mann-Whitney test, Δ 采用矫正 t 检验,其他参数采用随机 t 检验。
Note. * Mann-Whitney U -test. Δ Adjusted t -test. Other parameters used the random t -test.

表 3 趋化因子浓度测定结果及比较分析
Table 3 Concentrations of detected chemokines and analysis of inter-group differences

趋化因子 Chemokines	恒河猴 (n=15) Rhesus monkey	食蟹猴 (n=15) Cynomolgus monkey	P 值 P-value
CCL2/MCP-1	88. 22 ± 62. 60	150. 9 ± 105. 9	0. 0607 [△]
CCL4/MIP-1β	275. 12 ± 20. 31	279. 42 ± 19. 04	0. 555
CCL5/RNATES	2884 ± 1443	1396 ± 928	0. 0023
CCL7/MCP-3	1147 ± 335	1251 ± 286	0. 3687
CCL11/Eotaxin	269. 47(178. 0,393. 4)	170. 56(143. 6,347. 2)	0. 1135 *
CCL13/MCP-4	65. 95 ± 32. 17	59. 89 ± 25. 97	0. 5749
CCL18/PARC	1247 ± 376	1013 ± 447	0. 1309
CCL22/MDC	340. 31 ± 93. 32	312. 25 ± 125. 28	0. 4923
CCL27/CTACK	1220 ±277	1315 ± 247	0. 3264
CXCL1/GROα	311. 87(264. 8,391. 3)	341. 83(308. 5,417. 4)	0. 5599 *
CXCL4/PF4	2989 ± 154	2958 ± 199	0. 6404
CXCL10/IP10	524. 31 ± 125. 19	570. 48 ± 125. 89	0. 3224
CXCL12/ SDF-1α	110. 11(110. 0,110. 7)	110. 25(110. 1,110. 6)	0. 8139 *
CXCL13/BLC/BCA-1	79. 43 ± 20. 10	83. 76 ± 30. 43	0. 6490

备注: * 采用 Mann-Whitney test, [△]采用校正 t 检验,其他参数采用随机 t 检验。
Note. * Mann-Whitney U-test. [△] Adjusted t-test. Other parameters used the random t-test.

异不大。本研究选择的 43 种细胞因子与感染免疫、肿瘤免疫及自身免疫性疾病相关,提示恒河猴与食蟹猴具有相似的免疫基础,基于两种实验猴开展免疫研究具备较高的可比性。

综上,本研究探讨了恒河猴与食蟹猴血清多重细胞因子水平,证实两种猴基础细胞因子水平差异小,可为生物医学研究提供基础数据,弥补现有资料的不足。

参考文献:

[1] 刘雪萍,李振明,邓信宁,等. 食蟹猴肌肉萎缩模型的建立 [J].中国实验动物学报, 2018, 26(1): 79-85.

[2] 胡新天,仇子龙,顾勇,等. 非人灵长类模型 [J]. 中国科学院院刊, 2016, 31(7): 773-782.

[3] 卢耀增,苏树芸,吴小闲,等. 猴免疫缺陷病毒(SIV)猴模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 1994, 2(2): 94-101.

[4] 李丹丹,王绥家,陈平亚,等. 猴免疫缺陷病毒抗体免疫梳检测方法的建立及应用 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(2): 217-223.

[5] Putkonen P, Bottiger B, Warstedt K, et al. Experimental infection of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with HIV-2 [J]. J Acquir Immune Defic Syndr, 1989, 2(4): 366-373.

[6] Biberfeld G, Thorstensson R, Putkonen P. HIV-2 vaccine trials in cynomolgus monkeys [J]. Antibiot Chemother (1971), 1996, 48: 113-120.

[7] Barouch DH, Tomaka FL, Wegmann F, et al. Evaluation of a mosaic HIV-1 vaccine in a multicentre, randomised, double-

blind, placebo-controlled, phase 1/2a clinical trial (APPROACH) and in rhesus monkeys (NHP 13-19) [J]. Lancet, 2018, 392(10143): 232-243.

[8] 冬平,隋丽华,洪宝庆,等. 食蟹猴与猕猴血液生理和生化指标的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(7): 400-402, 434.

[9] Matsuzawa T, Nagai Y. Comparative haematological and plasma chemistry values in purpose-bred squirrel, cynomolgus and rhesus monkeys [J]. Comp Haematol Int, 1994, 4(1): 43-44.

[10] 程树军,黄韧,秦瑶. 恒河猴和食蟹猴红细胞免疫黏附功能的比较 [J]. 中国兽医科技, 2003, 33(3): 59-61.

[11] 金宇娟,杨文婷,董娟,等. 恒河猴和食蟹猴血液蛋白遗传多样性分析 [J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2009, 30(3): 31-34, 44.

[12] 王宏,付学魏,陈智岗,等. 昆明地区恒河猴、食蟹猴种群繁殖规律和繁殖性能研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(7): 34-39.

[13] 花秀春,时彦胜,孙兆增,等. 人工饲养恒河猴、食蟹猴的繁殖性能初报 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(3): 219-221.

[14] Van der Meide PH, Schellekens H. Cytokines and the immune response [J]. Biotherapy, 1996, 8(3-4): 243-249.

[15] Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system [J]. Science, 2010, 327(5963): 291-295.

[16] Stow JL, Low PC, Offenhäuser C, et al. Cytokine secretion in macrophages and other cells: pathways and mediators [J]. Immunobiology, 2009, 214(7): 601-612.