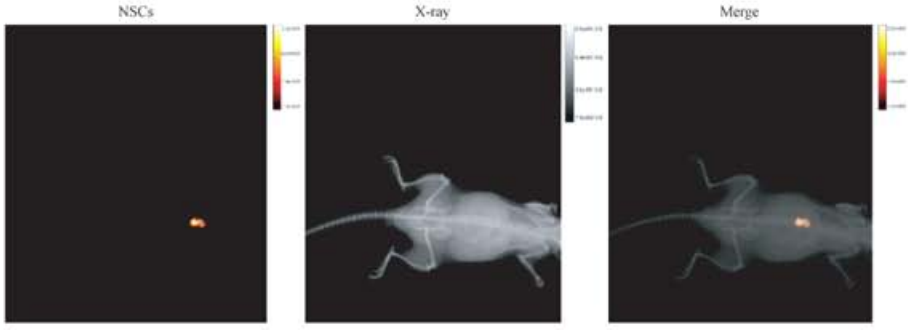
ISSN 1005-4847
CN 11-2986/Q

ACTA LABORATORIUM
ANIMALIS SCIENTIA SINICA

中国实验动物学报

ZHONGGUO SHIYAN DONGWU XUEBAO

第28卷 第 1 期 / Vol.28 No. 1



王菲：tdTomato转基因小鼠的建系及其在细胞示踪方面的应用研究

数据库收录：
中国科学引文数据库CSCD
中文核心期刊要目总览（北大图书馆）
中国科技论文统计源期刊
世界卫生组织西太平洋地区医学索引
中国核心期刊（遴选）数据库
中国学术期刊综合评价数据库
中国生物医学文献数据库
万方数据资源系统中国数字化期刊群
美国化学文摘

主办单位：
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

ISSN 1005-4847
02
9 771005 484140

2020 1

昭衍

JOINN

股票代码：603127

服务药物创新，专注于药物全生命周期的安全性评价和监测

- 近25年的稳定运营
- 完善的国际化资质
- 熟悉各国法规可支持全球申报
- 值得信赖的新药评价经验

昭衍新药
JOINN Laboratories

网站

微信

昭衍新药（股票代码：603127）是中国早期从事药物非临床评价的民营CRO企业，1995年成立至今，拥有超过900人专业技术团队，在北京、苏州、梧州、重庆以及美国设有子公司。昭衍新药建立有符合国际规范的质量管理体系（CNAS/ILAC-MRA认证），具备中国NMPA、美国FDA、世界经合组织OECD、韩国MFDS的GLP资质以及国际AAALAC（动物福利）认证资质。可以向客户提供药物筛选、成药性研究、药效学研究、药代动力学研究、安全性评价、临床试验、药物警戒的一站式的药物评价服务；还可以提供实验动物、食品动物/兽药评价、农药评价，医疗器械评价等服务项目。

info@joinnlaboratories.com

aaalac INTERNATIONAL FDA OECD

ilac-MRA CNAS National Medical Products Administration

中 国 实 验 动 物 学 报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

双月刊　1993 年 6 月创刊　第 28 卷　第 1 期　2020 年 2 月 28 日出版

目　次

研究报告

tdTomato 转基因小鼠的建系及其在细胞示踪方面的应用研究 …… 王菲,原一桐,高渊涛,田峰,田野,李宵,李承罡,杜若琛,李鹏飞,王雅丽,王春芳(1)

诸氏鳙虾虎鱼封闭群遗传质量评价方法的建立* …… 蔡磊,李建军,余露军,黄韧(10)

高尿酸血症鹌鹑肠道菌群结构分析 …… 黄胜男,林志健,张冰,吕锦涛,王如然(17)

斑马鱼功效模型在验证乳制品补钙和促进肠蠕动中的应用* …… 蒋一之,朱晓宇,李露露,俞航萍,荣佳,李春启(23)

诸氏鳙虾虎鱼出血病病原鉴定及传播途径分析* …… 余露军,李建军,蔡磊,黄韧(29)

阿魏酸对高脂血症小鼠肝脂肪变性及肠道菌群的调节作用 …… 饶文婷,罗尚菲,张雅心,江伟豪,陈奕澔,陈嘉慧,任妍,佘楷杰,何盈,曾平,周凤华(36)

电针对糖尿病神经痛大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白的干预作用 …… 邰昭霞,费雪瑜,瞿思颖,王涵芝,陈卢杭,蒋永亮,方剑乔,何晓芬(43)

淋巴细胞活化基因-3 敲除(Lag-3$^{-/-}$)小鼠构建及初步表型分析 …… 万颖寒,慈磊,王珏,龚慧,万志鹏,奚骏,何敏珠,孙瑞林,费俭,沈如凌(49)

糖尿病下肢溃疡小鼠模型的建立与评价 …… 鲁斑,辛永萍,林家彬,陈民利(58)

低氧训练对肥胖小鼠 Ghrelin-GHSR 通路的影响…… 龚丽景,付鹏宇,朱镕鑫,张一民,许春艳(66)

地鳖肽对 CCl_4 诱导的慢性肝损伤小鼠的抗氧化保护作用的研究 …… 刘丹,曹硕,刘阳,刘杰,王朕,张永红,沈红(73)

D-半乳糖与 L-谷氨酸诱导树鼩肝组织损伤 …… 陆姜利,郭玉倩,钱忠义,角建林,梁张,郑红(81)

利用心电植入子遥感技术测定并比较不同全麻药对大鼠心电活动的影响 …… 李慧敏,于玉楼,唐贺,赵冉,董紫姗,王瀚冬,杨晶,王川(89)

还原型谷胱甘肽在 AG129 小鼠生物净化及快速繁殖中的应用…… 张帆,安学芳,赵赫,李丽,肖宇宙(96)

一种产后小鼠束缚应激模型的造模方法以及束缚装置的制作 …… 陈漫漫,高鹏飞(100)

研究进展

鱼类实验动物封闭群和近交系资源培育现状* …… 蔡磊,李建军,余露军,黄韧(108)
实验鱼质量控制标准研制的思考与建议* …… 余露军,李建军,蔡磊,魏远征,苗宗余,黄韧(115)
急性肾损伤模型塑造研究进展 …… 杨婷,林志健,姜卓希,褚梦真,张冰,邹丽娜(123)
啮齿类动物插管技术用于药动学采血的研究进展 …… 杜飞飞,王凤清,贾伟伟,徐方,马越鸣(129)
斑马鱼发育毒性与致畸性相关实验研究进展* …… 戴明珠,黄燕烽,彭逸,张双阳,张立将,李春启(137)
斑马鱼在功能性食品研究中的应用进展* ……
…… 郭胜亚,朱晓宇,周佳丽,张勇,彭逸,荣佳,张立将,李春启(143)
间质性膀胱炎动物模型的研究进展 …… 昂小杰,李淼,周峰,蔡宗强,陈卫国(148)

广告 …… (彩插 1~5)

*:实验鱼质量控制标准化及应用专题

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
《中国实验动物学报》编辑部
出　版
《中国实验动物学报》编辑部
发　行
《中国实验动物学报》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.cnjournals.com/sydwybjyx/ch/index.aspx
本期执行主编　代解杰
本期专题组织　黄　韧
本期责任编辑　李洁蕾　郭梦征
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
2-748
广告发布登记
京朝工商广登字 20170142 号
定　价
每期 50.00 元,全年 300.00 元
中国标准连续出版物号
ISSN 1005-4847
CN 11-2986/Q
2019 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和中国实验动物学会网站等网络文献数据库,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

期刊基本参数:CN11-2986/Q * 1993 * b * A4 * 161 * zh * P * ￥50.00 * 1000 * 22 * 2020-01

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Bimonthly, Established in June 1993 **Volume** 28, **Number** 1, **February** 28, 2020

CONTENTS

Establishment of tdTomato transgenic mouse lineages and their application in cell tracing ..... *WANG Fei*, *YUAN Yitong*, *GAO Yuantao*, *TIAN Feng*, *TIAN Ye*, *LI Xiao*, *LI Chenggang*, *DU Ruochen*, *LI Pengfei*, *WANG Yali*, *WANG Chunfang*(1)

Evaluation methods to establish the genetic quality of closed colony Mugilogobius chulae ..... *CAI Lei*, *LI Jianjun*, *YU Lujun*, *HUANG Ren*(10)

Analysis of the gut microbiota structure in quails with hyperuricemia ..... *HUANG Shengnan*, *LIN Zhijian*, *ZHANG Bing*, *LYU Jintao*, *WANG Ruran*(17)

Dairy products supplement calcium and promote intestinal motility in zebrafish models ..... *JIANG Yizhi*, *ZHU Xiaoyu*, *LI Lulu*, *YU Hangping*, *RONG Jia*, *LI Chunqi*(23)

Identification of the pathogen responsible for causing hemorrhage in Mugilogobius chulae and its transmission routes ..... *YU Lujun*, *LI Jianjun*, *CAI Lei*, *HUANG Ren*(29)

Regulatory effects of ferulic acid on hepatic steatosis and intestinal flora in hyperlipidemic mice ..... *RAO Wenting*, *LUO Shangfei*, *ZHANG Yaxin*, *JIANG Weihao*, *CHEN Yihao*, *CHEN Jiahui*, *REN Yan*, *SHE KaiJie*, *HE Ying*, *ZENG Ping*, *ZHOU Fenghua*(36)

Intervention effect of electroacupuncture on NF-κB p65 at spinal cord dorsal horn in diabetic neuropathic pain rats ..... *TAI Zhaoxia*, *FEI Xueyu*, *QU Siying*, *WANG Hanzhi*, *CHEN Luhang*, *JIANG Yongliang*, *FANG Jianqiao*, *HE Xiaofen*(43)

Construction and preliminary phenotypic analysis of *Lag*-3$^{-/-}$ mice ..... *WAN Yinghan*, *CI Lei*, *WANG Jue*, *GONG Hui*, *WAN Zhipeng*, *XI Jun*, *HE Minzhu*, *SUN Ruilin*, *FEI Jian*, *SHEN Ruling*(49)

Establishment and evaluation of a mouse model of diabetic hindlimb ulcers ..... *LU Ting*, *XIN Yongping*, *LIN Jiabin*, *CHEN Minli*(58)

Effect of hypoxic training on the Ghrelin-GHSR pathway in obese mice ..... *GONG Lijing*, *FU Pengyu*, *ZHU Rongxin*, *ZHANG Yimin*, *XU Chunyan*(66)

Protective effects of ESW peptides on carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in mice ..... *LIU Dan*, *CAO Shuo*, *LIU Yang*, *LIU Jie*, *WANG Zhen*, *ZHANG Yonghong*, *SHEN Hong*(73)

D-galactose and L-glutamic acid induced liver tissue injury in tree shrews ……
…… *LU Jiangli*, *GUO Yuqian*, *QIAN Zhongyi*, *JIAO Jianlin*, *LIANG Zhang*, *ZHENG Hong*(81)
Comparison of different anesthetics on rat heart rates using a cardiac electrical implant ……
LI Huimin, *YU Yulou*, *TANG He*, *ZHAO Ran*, *DONG Zishan*, *WANG Handong*, *YANG Jing*, *WANG Chuan*(89)
Application of reduced glutathione in biological purification and rapid propagation of AG129 mice ……
…… *ZHANG Fan*, *AN Xuefang*, *ZHAO He*, *LI Li*, *XIAO Yuzhou*(96)
Method for constructing a postpartum mouse immobilization stress model and restraint device ……
…… *CHEN Manman*, *GAO Pengfei*(100)
Current situation of the breeding of closed colony and inbred strains of fish as laboratory animals ……
…… *CAI Lei*, *LI Jianjun*, *YU Lujun*, *HUANG Ren*(108)
Suggestions for the development of experimental fish quality control standards ……
…… *YU Lujun*, *LI Jianjun*, *CAI Lei*, *WEI Yuanzheng*, *MIAO Zongyu*, *HUANG Ren*(115)
Research progress on rodent intubation technique for blood sampling in pharmacokinetic studies ……
…… *DU Feifei*, *WANG Fengqing*, *JIA Weiwei*, *XU Fang*, *MA Yueming*(129)
Advances in zebrafish experimental research on developmental toxicity and teratogenicity ……
…… *DAI Mingzhu*, *HUANG Yanfeng*, *PENG Yi*, *ZHANG Shuangyang*, *ZHANG Lijiang*, *LI Chunqi*(137)
Application of zebrafish in functional food research ……
GUO Shengya, *ZHU Xiaoyu*, *ZHOU Jiali*, *ZHANG Yong*, *PENG Yi*, *RONG Jia*, *ZHANG*, *Lijiang*, *LI Chunqi*(143)
Research progress on establishing interstitial cystitis models ……
…… *ANG Xiaojie*, *LI Miao*, *ZHOU Feng*, *CAI Zongqiang*, *CHEN Weiguo*(148)

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
Editor-in-Chief
QIN Chuan(秦川)
Managing Editor
LI Jiping(李继平)
Editing
Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica
Publishing
Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica
Distributor
Editorial Office of Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: 010-67779337
Fax: 010-67770690
E-mail: bjb@ cnilas.org
http://zgsydw.cnjournals.com/sydwybjyx/ch/index.aspx
CSSN
ISSN 1005-4847
CN 11-2986/Q
Copyright 2019 **by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences**

王菲,原一桐,高渊涛,等. tdTomato 转基因小鼠的建系及其在细胞示踪方面的应用研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 1-9.
Wang F, Yuan YT, Gao YT, et al. Establishment of tdTomato transgenic mouse lineages and their application in cell tracing[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 1-9.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.001

tdTomato 转基因小鼠的建系及其在细胞示踪方面的应用研究

王菲[1],原一桐[1],高渊涛[2],田峰[1],田野[3],李宵[1],李承罡[4],杜若琛[1],李鹏飞[1],王雅丽[1],王春芳[1*]

(1. 山西医科大学实验动物中心,太原 030001; 2. 南昌大学玛丽女王学院,南昌 330000;
3. 山西省人民医院,太原 030001; 4. 山西医科大学第二医院骨科,太原 030001)

【摘要】 目的 构建稳定表达的 tdTomato 转基因小鼠并建系,观察其细胞及组织的荧光表达水平以及其干细胞共培养后的荧光表达水平。**方法** 使用 Gateway clone 技术和 DNA 显微注射法构建含有 tdTomato 表达载体的受精卵,移植至假孕母鼠体内,待其自然生产。使用双向鉴定法鉴定并挑取饲养阳性小鼠并建系。另提取 tdTomato 阳性小鼠的神经干细胞分别与 eGFP 小鼠的骨髓间充质干细胞、原代神经干细胞共培养。**结果** 成功构建了 tdTomato 转基因小鼠并建系,与野生型小鼠相比,tdTomato 转基因小鼠生化指标和生长性状无明显差异,其组织切片及脑源神经干细胞均可观察到红色荧光。示踪实验表明注射部位可观察到明显的荧光成像,共培养实验可以清晰的观察到细胞分化后荧光的稳定表达。**结论** tdTomato 转基因小鼠的组织和细胞能稳定表达红色荧光,可以利用荧光鼠的自发荧光特性,研究干细胞共培养后的分化方向。

【关键词】 工具鼠;tdTomato;转基因小鼠;细胞共培养
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0001-09

Establishment of tdTomato transgenic mouse lineages and their application in cell tracing

WANG Fei[1], YUAN Yitong[1], GAO Yuantao[2], TIAN Feng[1], TIAN Ye[3], LI Xiao[1], LI Chenggang[4], DU Ruochen[1], LI Pengfei[1], WANG Yali[1], WANG Chunfang[1*]

(1. Laboratory Animal Research Center of Shanxi Medical, Taiyuan 030001, China.
2. Nanchang University Queen Mary School, Nanchang 330000. 3. Shanxi Provincial People's Hospital, Taiyuan 030001.
4. Department of Orthopaedics, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001)
Corresponding author: WANG Chunfang. E-mail: wangchunfang@sxmu.edu.com

【Abstract】 Objective To establish transgenic mouse lineages that can stably express the tandem-dimer tomato (tdTomato) gene and to observe the level of fluorescence expression in tissue sections and stem cells after co-culturing. **Methods** The gateway clone technique and DNA microinjection were used to construct fertilized ova containing the

[**基金项目**]国家自然科学基金项目(81371384);山西省重点研发项目(201803D31068);山西省应用基础研究计划项目(201801D121212,201901D211319,201901D111384);山西省高等学校科技创新项目(2019L0418,2019L0445)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81371384), Key Research and Development Program of Shanxi Province (201803D31068), Applied Basic Research Programs of Shanxi Province (201801D121212, 201901D211319, 201901D111384) and Scientific and Technological Innovation Programs of Higher Education Institutions in Shanxi (2019L0418, 2019L0445).
[**作者简介**]王菲(1993—),女,硕士研究生,研究方向:神经发育再生。Email:1362598067@qq.com
[**通信作者**]王春芳(1964—),女,教授,博士生导师,研究方向:干细胞与神经发育再生。Email: wangchunfang@sxmu.edu.com

tdTomato expression vector, which were then transferred to pseudopregnant mice for natural delivery. tdTomato-positive mice were identified and picked using a two-way verification method for breeding and establishment. Neural stem cells from tdTomato-positive mice were co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells and primary neural stem cells from eGFP (green fluorescence protein) mice. **Results** The tdTomato transgenic mice were successfully constructed, and their lines were established. The biochemical indexes and growth characteristics of the tdTomato transgenic mice did not significantly differ from those of the wild-type mice. Red fluorescence was observed in the tissue sections and brain-derived neural stem cells under fluorescence microscopy. Significant fluorescence was observed at the injection site in the tracer experiments, and two-color fluorescence was stably expressed in the co-culture experiments. **Conclusions** Stable red fluorescence occurrs in the tissues and cells of the tdTomato transgenic mice, which can be applied to research the direction of differentiation after stem cell co-culturing.

【**Keywords**】 tool mouse; tdTomato; transgenic mouse; cell co-culture

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

自从 1980 年,Gordon 等首次利用原核显微注射法研究动物转基因技术后,对于转基因鼠的研究便不断深入[1-2]。其中,转基因荧光鼠作为一项重大研究成果,现已经变成了生命科学、医学和药学等诸多领域的科研基础,转基因荧光鼠能够在相应激发光下自发荧光的特性,为科学研究提供具有更加简捷、无毒害等优质特点的生物工具以及细胞治疗方面的示踪工具[3-4]。

Tandem-dimer tomato (tdTomato) 是一种来自 Discosoma coral(DsRed)变体红色荧光蛋白,相比绿色荧光蛋白(green fluorescence protein, eGFP)更加稳定,激发波长也更长。且与其他的 DsRed 衍生物相比,tdTomato 也是最亮且最耐光的[5]。在国外,tdTomato 红色荧光蛋白作为稳定的荧光标记物,已经成功构建转基因小鼠品系,同时也在标记表达小白蛋白的神经元实验中以及其他细胞标记实验中进行使用,但在国内尚未展开广泛的应用[6-8]。

干细胞的研究和应用一直都是科研的热门方向,其中干细胞的培养和移植治疗是关键的两个方面[9-10]。目前,神经干细胞(neural stem cells, NSCs)的对于脊髓损伤后的移植治疗已被大量实验证实可以有效减少脊髓损伤后出现的继发组织受损并恢复一定的运动功能,这为临床治疗脊髓损伤疾病带来了新的方向[11-13]。本课题组也一直致力于多种干细胞的研究,其中包括 NSCs 和骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)以及 NSCs 在脊髓损伤方面的应用,所以干细胞的培养观察和移植治疗时的示踪都是极为关键的步骤[14-16]。而在细胞实验中,使用荧光鼠来代替细胞标记术能有效地简化细胞实验的实验过程,现为了保障后续干细胞共培养实验过程及 NSCs 移植示踪实验中能够使用更为快捷、稳定、无影响的荧光模式鼠,拟构建 tdTomato 转基因小鼠。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级 C57/BL6 小鼠 50 只,2 ~ 3 月龄,雌雄 2∶1,体重 24 ~ 28 g;清洁级 eGFP 转基因小鼠 4 只,2 ~ 3 月龄,13 ~ 14 d 孕龄,体重 26 ~ 32 g,购于山西医科大学实验动物中心【SCXK(晋)2015-0001】,饲养于山西医科大学实验动物中心屏障环境中【SYXK(晋)2009-0004】。实验小鼠的饲养过程和其他实验操作均符合实验动物伦理学要求(审批号:IACUC2017-002)以及中华人民共和国《实验动物管理条例》。

1.1.2 仪器与试剂

PCR 仪(Eppendorf AG 22331 Hamburg,德国),荧光显微(OLYMPUS,日本),Impactor M-Ⅲ脊髓击打器(NYU,美国),细胞培养箱(Heal Force,HF240,中国),石蜡切片机(Leica RM 2245,德国),OFK-8000 A 多波段 LED 检查套装(Spectronics,美国)。Gateway® BP Clonase™ II Enzyme Mix (Invitrogen, 11789-020), Gateway™ LR Clonase™ II Plus Enzyme Mix (Invitrogen, 12538 - 120), Anti-Nestin 抗体(BOSTER, BA1289), Anti-CD34 抗体(BOSTER, bs-8996R), Anti-CD44 抗体(BOSTER, bs-4916R), NeuroCult™ Basal Medium(STEMCELL, 18C88583)。

1.2 方法

1.2.1 转基因小鼠的制作

重叠 PCR 技术扩增 attB1-tdTomato-attB2 基因片段,Gateway clone 构建 pDown-tdTomato 转化到 Stabl3 大肠杆菌中,LB 平板上 37℃孵育过夜。提取 pDown-tdTomato 与母载体 PRP.Des2s 在 25℃下进

行 LR 反应 3 h,将最终的表达载体 PRP.Ex2d-EF1A >tdTomato 转化到 Stbl3 中,完成载体构建。制备假孕母鼠和受孕母鼠,取出受孕母鼠的受精卵。将构建好的 tdTomato 表达载体通过 DNA 显微注射注入受精卵原核,转移至假孕母鼠的输卵管内,待其自然产下新生鼠。

1.2.2　转基因小鼠鉴定

双向鉴定法鉴定 dTomato 转基因小鼠,在波长 500 的多波段 LED 手电 OF-500AC 灯头下(绿色激发光)观察皮肤裸露处的荧光情况,同时剪取其尾尖 0.5 cm,提取 DNA 进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性个体。鉴定引物:

Primer I:CTCTGCTGCCTCCTGGCTTCT,

Primer II:CGAGGCGGATCACAAGCAATA,

Primer III:TCAATGGGCGGGGGTCGTT。

灌注阳性转基因小鼠后,取其脑、肝、肺、心脏、脾组织,石蜡包埋制片后,进行 HE 染色,置于荧光显微镜下观察各个组织的荧光表达情况。

1.2.3　转基因小鼠的建系

取 6 只鉴定为阳性的原代小鼠与野生型小鼠进行配种繁殖,并将子代中的阳性小鼠继续交叉配种繁殖。在实验动物中心的屏障环境中进行饲养育种,定期送检微生物和寄生虫。

1.2.4　检测转基因小鼠的生长性状和生化指标

取 tdTomato 转基因小鼠进行眼眶静脉丛采血后,检测生理生化指标检测,测定肝功能、肾功能、血脂等指标,与正常野生小鼠进行统计学分析,检测差异有无显著性。

1.2.5　tdTomato 转基因小鼠 NSCs 的分离与培养

取孕龄为 13 ~ 14 d 的 tdTomato 转基因小鼠处死后常规消毒,取出胎鼠,剔除头骨,剥去蛛网膜及小脑,将脑组织放入有培养基的培养皿中吹打至组织消失,200 目过滤筛过滤后,离心弃上清,加入培养基充分混匀后转移至培养瓶中,放于细胞恒温箱中培养,每 2 天半量换液。待培养至 3 代后,利用免疫荧光术检测神经干标记蛋白 Nestin 的表达,验证培养所得细胞为 NSCs。

1.2.6　tdTomato 转基因小鼠提取细胞移植示踪实验

收集第 3 代的 NSCs,离心后将细胞浓度调至 1×10^7/mL。同时制备仅将胸段 9T-11T 脊髓椎板切除但无任何其他损伤的小鼠模型,使用微量注射泵注入 5 μL 的 NSCs。3 d 后利用 Bruker Xtreme 系统多模式成像系统进行观察拍照。

1.2.7　绿色荧光小鼠 BMSCs 与红色荧光小鼠 NSCs 的共培养

从 eGFP 转基因小鼠的胫、股骨骨髓中分离出 BMSCs,采取贴壁法培养,放于细胞恒温箱中培养,每 2 ~ 3 天换液。传至第 3 代后,利用免疫荧光术检测细胞特异性标志物(CD44/CD34),并结合细胞形态学分析,证明培养所得细胞为 BMSCs。

将上述所得 eGFP 小鼠 3 代的 BMSCs、tdTomato 小鼠的 3 代 NSCs 均以 1×10^6/mL 的细胞密度接种于六孔板中,观察两种干细胞在共培养后能让否稳定的表达自身的荧光。

1.2.8　绿色荧光小鼠 NSCs 与红色荧光小鼠 NSCs 的共培养

按上述方法,分别提取 eGFP、tdTomato 转基因胎鼠的 NSCs,常规操作后,加入统一培养瓶中进行共同培养。培养至 3 代时,将 NSCs 接种于六孔板里,观察其贴壁分化后能否稳定表达自身的荧光特性。

1.3　统计学分析

所得数据用 SPSS 21.0 统计软件处理,检测结果采用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异具有显著性。

2　结果

2.1　tdTomato 转基因小鼠的制作与鉴定

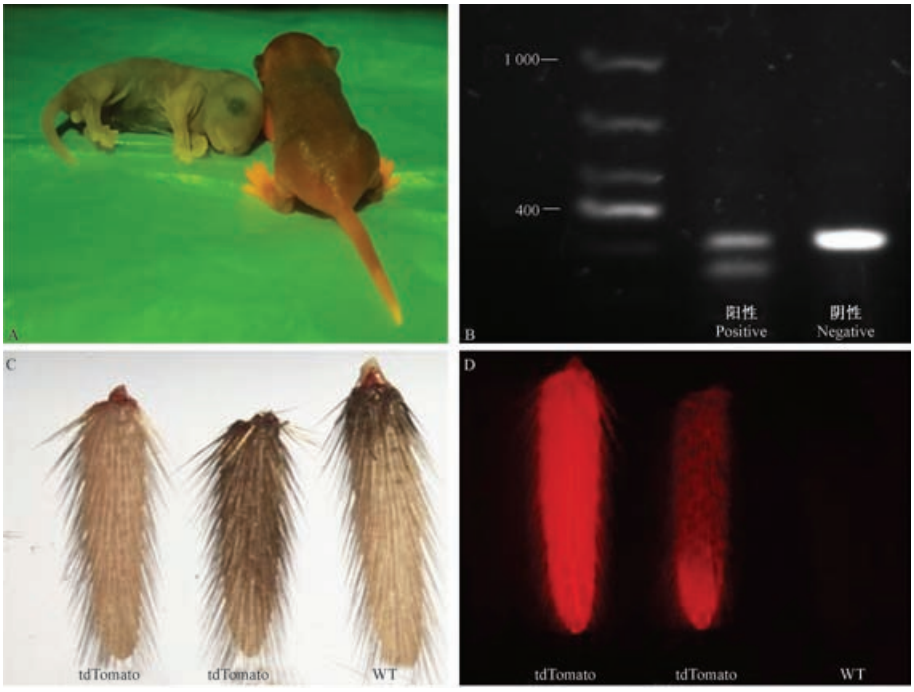
首批构建阳性 tdTomato 转基因小鼠共 9 只,4 雌 5 雄。新生小鼠置于 OF-500AC 灯头下,阳性小鼠自发红色荧光,而阴性小鼠不发荧光(图 1A)。提取阳性和阴性小鼠的 DNA,凝胶电泳分析表明阳性结果可见在 200 ~ 400 bp 之间有双条带,阴性结果仅在 300 ~ 400 bp 之间有单条带(图 1B)。剪取阳性转基因小鼠与野生小鼠 1 cm 鼠尾进行观察,可见在白光源下鼠尾无明显差别,在激发光下转基因小鼠的鼠尾自发红色荧光而正常野生小鼠无荧光表现(图 1C-D)。经双向鉴定结果显示,激发光下能自发荧光的转基因小鼠,其 DNA 鉴定结果亦为阳性。

将 tdTomato 转基因阳性小鼠进行灌注,取其脑、肝、肺、心脏、脾进行石蜡包埋制片,HE 染色后镜下观察(图 2A-E)。再置于荧光显微镜下观察,可见红色荧光的稳定表达,表明灌注固定包埋切片等常规处理不会影响转基因小鼠的荧光表达情况

(图 2a-e)。并且,对比 HE 染色,红色自发荧光更能明显的辨别各个组织切片的形态学特征。

2.2 转基因小鼠的建系以及与正常小鼠生长性状和生化指标的对比

转基因小鼠饲养于山西医科大学实验动物中心的屏障环境中,期间送检微生物和寄生虫,检查结果符合清洁级实验动物要求。转基因小鼠生长状态稳定,经两年繁殖,现有转基因鼠 260 余只,其中阳性鼠有 208 只,总阳性率高达 80%,且已有个别小鼠一胎全为阳性。随机选取 20 只阳性转基因小鼠的外周血检测生理生化指标,与 20 只野生型小鼠进行对比,其差异无显著性($P > 0.05$)。表明 tdTomato 基因不会影响小鼠的正常生长发育,符合正常实验动物的基本指标。(表 1)



注:A:新生小鼠阳性与阴性在激发光下的对比。B:凝胶电泳的鉴定结果。C-D:转基因小鼠与野生小鼠的鼠尾在正常光源下和激发光下的对比。

图 1 转基因小鼠鉴定结果

Note. A, Comparison of positive and negative new born mice under excitation light. B, Identification results of gel electrophoresis. C-D, Comparison of the tails of transgenic and wild mice under normal light (C) and excitation light (D).

Figure 1 Identification results of transgenic mice

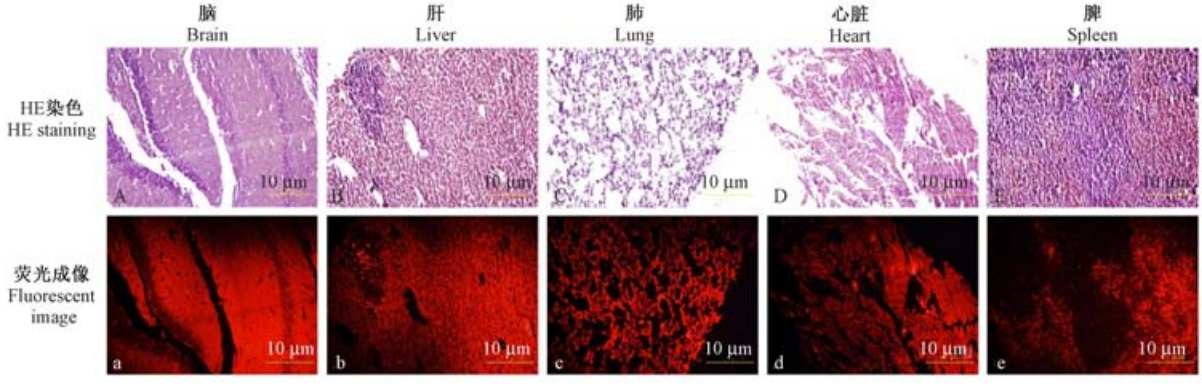


图 2 tdTomato 阳性小鼠组织切片结果

Figure 2 Results of tissue sections from tdTomato-positive mice

表 1　tdTomato 转基因小鼠与野生小鼠生理生化指标的对比($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

Table 1　Comparison of physiological and biochemical indexes between tdTomato transgenic mice and wild-type mice($\bar{x} \pm s$, $n=20$)

指标 Indicator	体长(cm) Length (cm)	体重(g) Weight (g)	白蛋白(g/dL) ALB (g/dL)	血清碱性磷酸酶(U/L) ALP (U/L)	血清谷丙转氨酶活力(U/L) ALT (U/L)	血清谷草转氨酶活力(U/L) AST (U/L)	血浆尿素(mmol/L) BUN (mmol/L)
tdTomato	10.22 ± 1.55	22.12 ± 0.83	35.67 ± 1.76	175.33 ± 44.50	40.33 ±2.08	117.33 ± 25.01	11.72 ± 0.73
WT	9.32 ± 2.11	23.46 ± 1.05	37.47 ± 1.35	168.36 ± 40.00	39.67 ±23.67	114.67 ± 12.66	10.86 ± 0.57

指标 Indicator	肌酐(μmol/L) CREA (μmol/L)	乳酸脱氢酶(U/L) LDH (U/L)	血清胆红素(μmol/L) TBIL (μmol/L)	血清胆固醇(mmol/L) Tcho (mmol/L)	甘油三酯(mmol/L) TG (mmol/L)	总蛋白(g/L) TP (g/L)	尿酸(μmol/L) UA (μmol/L)
tdTomato	32.40 ± 1.70	573.00 ± 86.26	13.48 ± 2.01	2.33 ± 0.13	0.75 ± 0.22	54.53 ± 1.63	89.03 ± 19.61
WT	39.46 ± 0.27	559.35 ± 95.76	13.95 ± 6.44	2.39 ± 0.35	0.68 ± 0.20	53.30 ± 0.72	95.96 ± 15.72

2.3　tdTomato 转基因小鼠 NSCs 的鉴定

图 3A 和 3a 可见细胞球在绿色激发光下自发红色荧光,表明细胞在体外培养至 3 代仍然可以稳定的自发红色荧光;图 3B 和 3b 可见细胞球呈现绿色荧光,即细胞球呈现 Nestin 抗原阳性;图 3C 和 3c 可见明显的蓝色荧光,即 Hochest 对细胞核的染色,以上数据证明所培养的细胞为 NSCs。

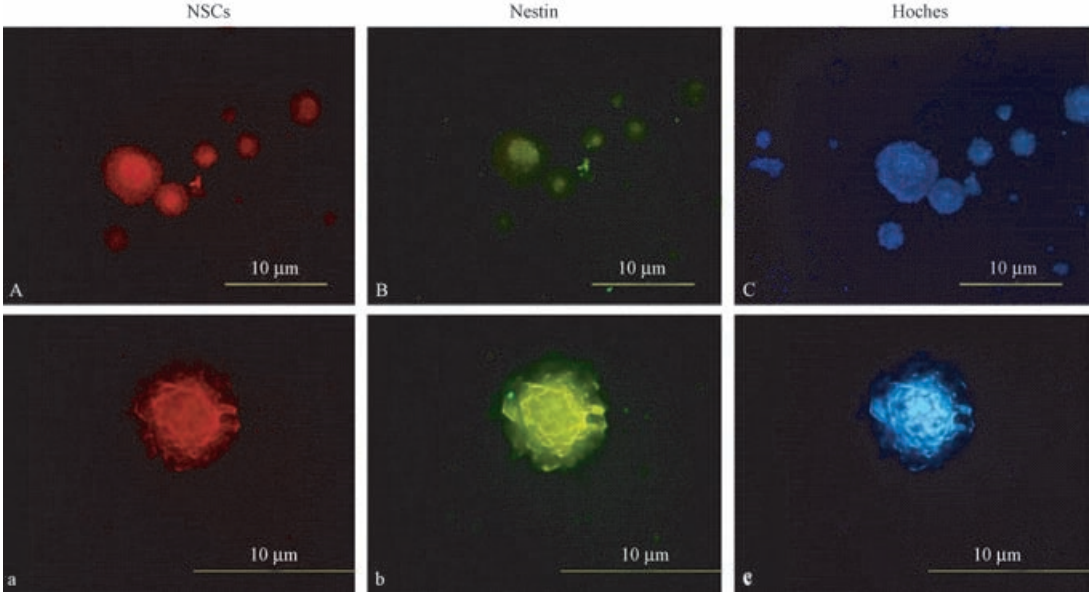


图 3　tdTomato 转基因小鼠 NSCs 的鉴定结果

Figure 3　Identification results of NSCs from tdTomato transgenic mice

2.4　tdTomato 转基因小鼠提取细胞移植示踪实验

收集第 3 代的 NSCs,注入小鼠的胸段脊髓中,3 d后利用 Bruker Xtreme 系统多模式成像系统进行观察,可见小鼠的注射部位有红色荧光信号(图 4)。表明 tdTomato 转基因小鼠的荧光表达稳定,能够支持活体细胞移植示踪实验,可提供实验需要的观察和数据。

2.5　共培养实验结果

将 eGFP 绿色荧光小鼠的 3 代 BMSCs,分别置于 OF-365AUV 灯头下(蓝紫色激发光)及正常光源下观察,视野内可见自发绿色荧光的梭形贴壁细胞,分布均匀且形态纤长,与 BMSCs 的形态学特征相符(图 5A、5a)。经过免疫荧光化学鉴定,可见图 5b 中的红色荧光呈现出与图 5B 中绿色荧光细胞基本相吻合的规则细胞形态,表示 CD44 阳性;图 5c 中可见零散的红色背景噪音,与图 5C 中的绿色荧光细胞相比,无任何细胞形态,表示 CD34 阴性。

将 eGFP 小鼠 3 代 BMSCs 和 tdTomato 小鼠 3 代 NSCs 接种同一盖玻片上共培养,分为 4、12、24、48 h 进行拍摄记录(图 6)。接种4 h后,可见红色 NSCs 与绿色 BMSCs 尚未分化;12 h 后可见红色 NSCs 呈不规则圆形,绿色 BMSCs 也开始分化;24 h 后可见红色 NSCs 和绿色 BMSCs 均有明显的分化,且分化的过程中,两种干细胞的分化末枝会交叠缠绕在一

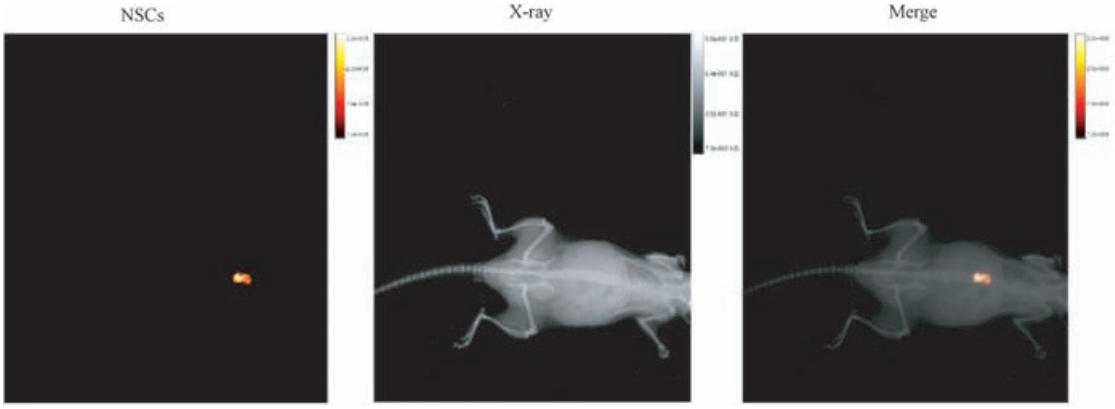
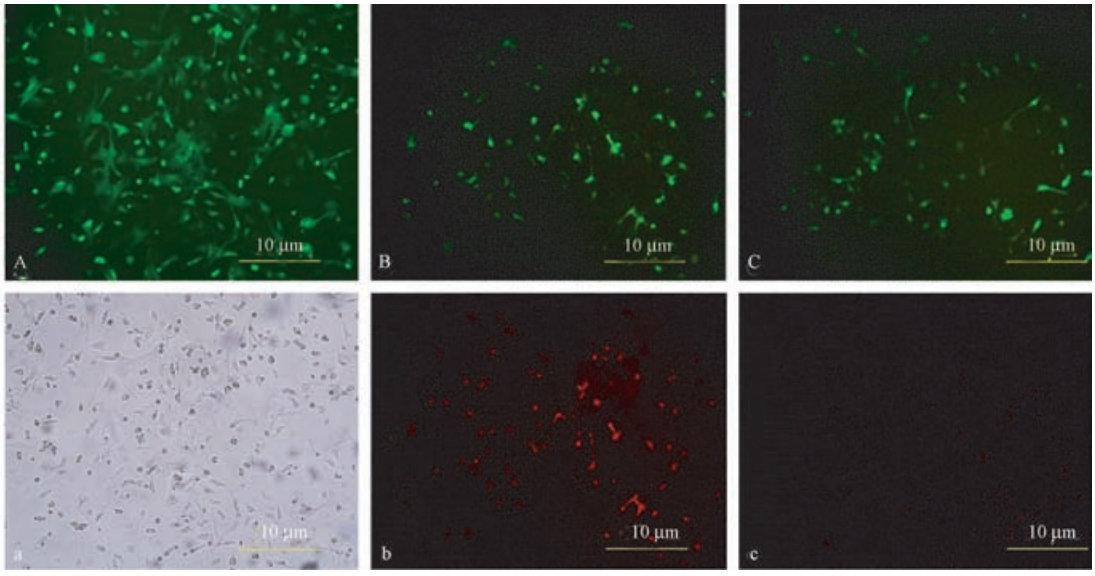


图 4 tdTomato 转基因小鼠 NSCs 移植示踪成像图

Figure 4 Tracer imaging of NSCs transplantation in tdTomato transgenic mice



注:A-C: BMSCs 在荧光显微镜下可见绿色荧光蛋白的表达。a: BMSCs 在正常光源下的观察图。b:BMSCs 的 CD44 阳性鉴定。c:BMSCs 的 CD34 阴性鉴定。

图 5 BMSCs 培养以及鉴定结果

Note. A-C, Expression of green fluorescent protein in BMSCs under fluorescence microscope. a, Image of BMSCs under normal light. b, CD44 positive cells of BMSCs. c, CD34 negative cells of BMSCs.

Figure 5 Culture and identification results of BMSCs

起;48 h 后可看到大片红色 NSCs 和绿色 BMSCs 分化后交叠在一起的细胞培养图,红绿荧光颜色明显,表明 tdTomato 转基因小鼠的红色荧光,在参与两种荧光干细胞共培养实验时,能够稳定表达自身的红色荧光,不会因为干细胞的分化而猝灭也不会受到异色荧光的干扰。

取 tdTomato、eGFP 转基因胎鼠的脑源原代 NSCs,共培养于同一培养瓶中,传至 3 代后接种于多聚赖氨酸处理过的盖玻片上观察(图 7)。接种 4 h后,可见 NSCs 球红绿相间且呈不规则圆形;1 d 后,细胞球可见分化末枝,且红绿均有,表明两种 NSCs 的分化较为同步;2 d 后,可见红绿色 NSCs 均有较多分化末枝,且叠加交织在一起。说明 NSCs 球可由多个异源 NSCs 聚集而成,并非只能由单个 NSCs 增殖而成。

3 讨论

随着现代科研水平的发展和深入,干细胞的培养和应用也是研究者面临的问题。但凡涉及到干

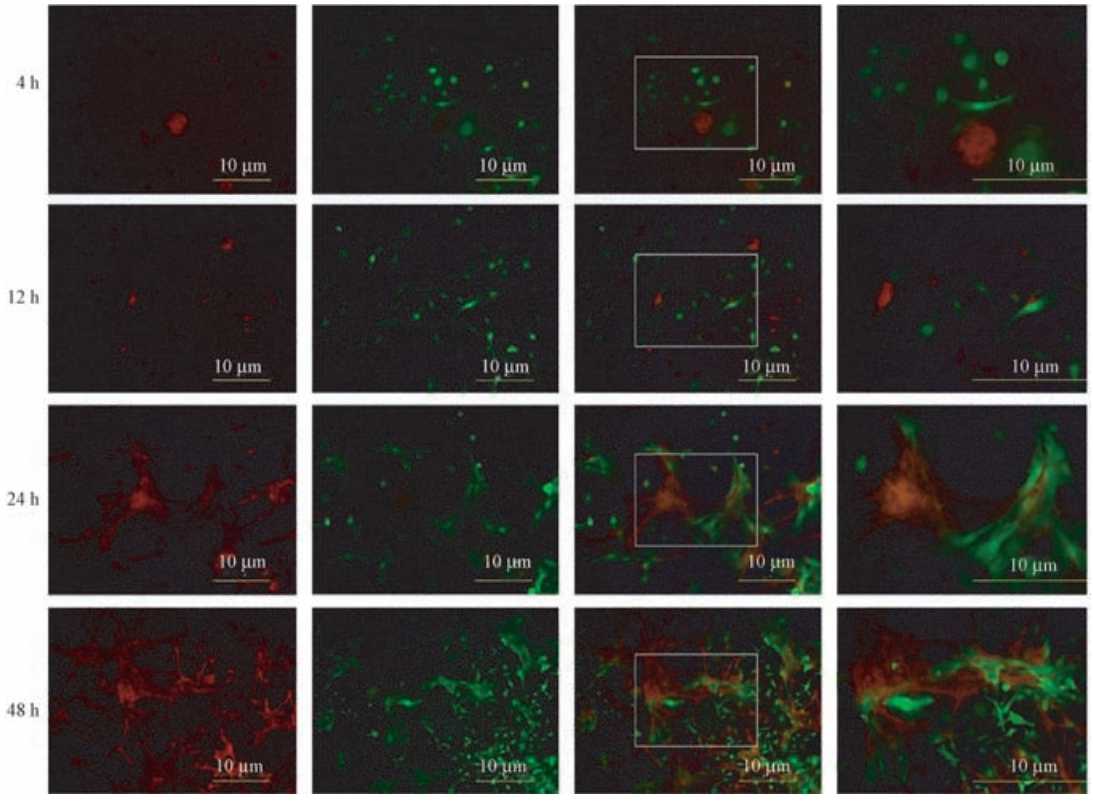


图 6　红色 NSCs 和绿色 BMSCs 共培养 4、12、24、48 h 的分化情况

Figure 6　Differentiation of red NSCs and green BMSCs in co-culture for 4, 12, 24 and 48 h

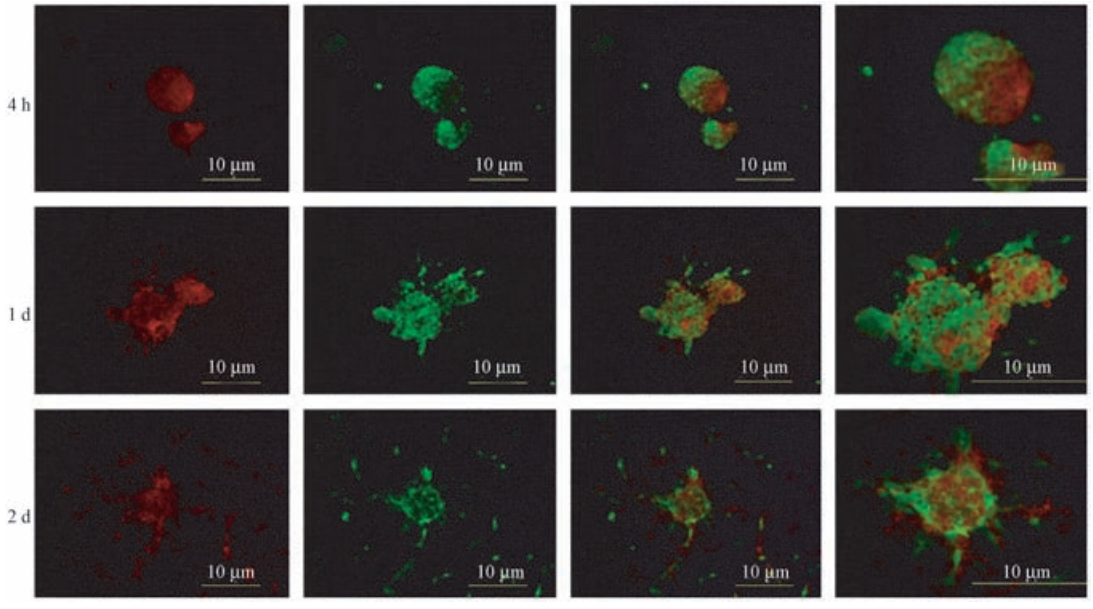


图 7　红色 NSCs 和绿色 NSCs 共培养 4 h、1 d 和 2 d 的分化情况

Figure 7　Differentiation of red NSCs and green NSCs in co-culture for 4 h, 1 d and 2 d

细胞共培养实验或者干细胞移植治疗实验，均会使用细胞标记技术。但是细胞标记术大多存在稳定性差，会被一些物理化学等因素破坏降解，或者随着被标记细胞的增殖分化造成荧光的衰减，使其很难维持长时间的高标记率，从而影响在实验中对时间的掌控等问题[17]。例如使用慢病毒转染来构建表达荧光蛋白的细胞，操作复杂、过程繁琐、耗时较长，对实验人员操作要求较高，并且转染后可能影

响细胞活性。对于大量需要荧光标记细胞且重复率高的实验来说,荧光蛋白转基因小鼠的构建是一劳永逸的解决方法。本课题组在之前的研究中,已经成功构建了 eGFP 转基因小鼠,并完成一系列相关实验,证实了转基因荧光小鼠在各种实验中,其荧光蛋白均能稳定表达,不会因为多聚甲醛固定或者石蜡包埋等常规实验操作而导致荧光强度的减弱或丢失[18-19]。

目前,NSCs 虽然在脊髓损伤后的移植治疗已被证实是有效的,但其在实际中的获取及使用会涉及到伦理学等问题,这也阻碍了在临床应用中的发展[11-13]。而 BMSCs 是一类细胞来源多、分化范围广、免疫原性低的干细胞[20]。因此诱导 BMSCs 使其分化为 NSCs 或神经元从而解决 NSCs 在临床中的伦理问题成为了一种替代解决办法[21]。现本课题组为了研究 NSCs 和 BMSCs 共培养后对 BMSCs 分化的影响,仍需另外一种荧光鼠,进行双色荧光共培养实验。故本研究选取了相比 eGFP 表达更稳定、荧光亮度更强的 tdTomato 红色荧光蛋白,tdTomato 已被证实相比 eGFP 更适合用于转基因动物的细胞迁移以及组织切片的观察,可以作为 eGFP 的最佳替代品[22]。根据文献报道,国内也有实验室完成了红色荧光小鼠的制作,但所使用基因多非 tdTomato 且很少有规范建系的报道[3-4]。在后期的建系中,我们与实验中常用的 C57 近交系实验小鼠相结合成功构建 C57-tdTomato 转基因小鼠,挑选阳性小鼠互交,完善 tdTomato 的近交系转基因小鼠的建设平台。近交系小鼠具有更纯正的谱系,是实验动物标准化的一部分,可减少误差,提高实验结果的可比性。

由上述实验结果可知,tdTomato 转基因小鼠各常用组织可在 OF-500AC 灯头下自发红色荧光,其脑源 NSCs 可在体外培养至 3 代仍保持荧光的稳定表达。后与绿色荧光小鼠的多种干细胞进行共培养实验结果表明,荧光表达的稳定性不会因为自身干细胞的增殖分化或者细胞共培养时两种荧光标记蛋白互相影响而导致荧光表达的衰弱或猝灭,并且实验的时间跨度对荧光的表达水平也没有影响。双色 NSCs 的共培养更是说明了,NSCs 球可以由多个异源 NSCs 的聚合而成。另外,在干细胞共培养的实验结果中,部分置于蓝色激发光下拍摄的细胞图中,隐约可见桔色 NSCs 的淡影,我们认为是由于 tdTomato 的荧光亮度相比 eGFP 强了 3 倍,是荧光蛋白中最亮的一种,且 tdTomato 的激发光波长更长,所以相比较 eGFP 更容易被激发[23],此部分不影响任何实验结果且更易于直观的细胞镜下观察。现今,已将 tdTomato 转基因小鼠投入到实验室的实验工具用鼠中。本课题组,结合之前的实验研究,已经完成了双色转基因荧光鼠的平台构建,后续,本课题组将使用双色荧光鼠来开展对小鼠 BMSCs 与 NSCs 共培养后细胞分化方向的影响以及对脊髓损伤治疗作用的研究。选取不同荧光颜色的 BMSCs 和 NSCs,能更加快捷、直接地观察到神经元和胶质细胞增殖分化的状态,省去了反复进行细胞标记的繁琐步骤,从根本上保障了被研究干细胞的一致性。同时,完善双色转基因荧光鼠平台的构建,确保能够提供高质量、高稳定性、高阳性率的荧光工具鼠。

参 考 文 献(References)

[1] Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1980, 77(12): 7380-7384.

[2] 黄斌, 曾林, 尚玉璞, 等. 转基因动物研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 26(9): 536.
Huang B, Zeng L, Shang YP, et al. Advances in Transgenic Animals [J]. Chin J Comp Med, 2006, 26(9): 536.

[3] 冯娟, 高苒, 全雄志, 等. 红色荧光和绿色荧光转基因小鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(4): 267-270.
Feng J, Gao R, Quan XZ, et al. Establishment of transgenic mouse models expressing red and green fluorescence [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2007, 15(4): 267-270.

[4] 贾俊双, 肖高芳, 林晓琳, 等. 慢病毒载体法制备红色荧光蛋白转基因小鼠 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(2): 12-16,83.
Jia JS, Shao GF, Lin XL, et al. Mrfp transgenic mice generated by lentivirus mediated gene delivery [J]. Chin J Comp Med, 2010, 20(2): 12-16,83.

[5] Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, et al. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from Discosoma sp. red fluorescent protein [J]. Nat Biotechnol, 2004, 22(12): 1567-1572.

[6] Zhang Z, Nam YJ. Generation of MLC - 2v - tdTomato knock - in reporter mouse line [J]. Genesis, 2018, 56(10): e23256.

[7] Kaiser T, Ting JT, Monteiro P, et al. Transgenic labeling of parvalbumin-expressing neurons with tdTomato [J]. Neuroscience, 2016, 321: 236-245.

[8] Chishti AA, Hellweg CE, Berger T, et al. Constitutive expression of tdTomato protein as a cytotoxicity and proliferation marker for space radiation biology [J]. Life Sci Space Res

(Amst), 2015, 4: 35-45.

[9] 吕颖, 白琳, 秦川. 干细胞治疗帕金森病的研究进展 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 142-148.
Lyu Y, Bai L, Qin C. Research progress in stem cell therapy for Parkinson's disease [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 142-148.

[10] 刁波, 刘琴, 王丽萍, 等. 叶酸联合成体神经干细胞治疗创伤性脑损伤大鼠的实验[J].中国比较医学杂志, 2012, 22(7): 48-55.
Diao B, Liu Q, Wang LP, et al. Study on folic acid combined with adult neural stem cells in the treatment of traumatic brain injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2012, 22(7): 48-55.

[11] 张梅, 王跃新, 侯晓华, 等. bcl-2 基因修饰神经干细胞移植修复大鼠脊髓损伤 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(7): 35-41.
Zhang M, Wang YX, Hou XH, et al. Bcl-2 gene-modified neural stem cell transplantation for spinal cord injury in rats [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(7): 35-41.

[12] Tarasenko YI, Gao J, Nie L, et al. Human fetal neural stem cells grafted into contusion-injured rat spinal cords improve behavior [J]. J Neurosci Res, 2010, 85(1): 47-57.

[13] Du C, Yang D, Zhang P, et al. Single neural progenitor cells derived from EGFP expressing mice is useful after spinal cord injury in mice [J]. Artif Cell Blood Substit Immobil Biotechnol, 2007, 35(4): 405-414.

[14] 张振山, 王春芳, 胡风云, 等. 人骨髓间充质干细胞分化为运动神经元过程中 Nestin 与 Hb9 表达的研究 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2014, 23(1): 82-86.
Zhang ZS, Wang CF, Hu FY, et al. Expression of Nestin and Hb9 during the differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells into Motor Neurons [J]. Chin J Histochem Cytochem, 2014, 23(1): 82-86.

[15] 张海滨, 王春芳, 李鹏飞, 等. 小鼠脊髓损伤模型的建立及神经干细胞移植后运动功能恢复情况的研究 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2014, 23(2): 105-110.
Zhang HB, Wang CF, Li PF, et al. Establishment of spinal cord injury model and the study of motor function recovery after neural stem cell transplantation in mice [J]. Chin J Histochem Cytochem, 2014, 23(2): 105-110.

[16] Wang C, Wei H, Zhang C, et al. miR-124 and miR-128 differential expression in bone marrow stromal cells and spinal cord-derived neural stem cells [J]. Neural Regen Res, 2010, 5(11): 820-824.

[17] 牛艳君, 李莹, 白仲添, 等. 干细胞标记及示踪技术的应用研究 [J]. 基础医学与临床, 2015, 35(4): 528-530.
Niu YJ, Li Y, Bai ZT, et al. Application research on stem cell marker and cell tracing [J]. Basic Clin Med, 2015, 35(4): 528-530.

[18] 李宵, 王春芳, 李鹏飞, 等. EGFP 转基因小鼠建系及其脊髓源神经干细胞应用前景的探讨 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2015, 25(2): 113-117.
Li X, Wang CF, Li PF, et al. Construction of EGFP transgenic mouse lineages and discussion on the application prospect of spinal cord derived neural stem cells [J]. Chin J Histochem Cytochem, 2015, 25(2): 113-117.

[19] 王晶, 王春芳, 李宵, 等. 转基因小鼠脊髓源神经干细胞移植于脊髓损伤模型后的成活、分化、迁移 [J]. 中华实验外科杂志, 2017, 34(6): 931-934.
Wang J, Wang CF, Li X, et al. Survival, differentiation and migration of the spinal cord derived neural stem cells from transgenic mouse transplanted into mouse of spinal cord injury [J]. Chin J Exp Surg, 2017, 34(6): 931-934.

[20] 康少平, 刘淑艳, 李永升, 等. 低氧增强骨髓间充质干细胞增殖维持分化潜能 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(7): 70-74.
Kang SP, Liu SM, Li YS, et al. Hypoxia promotes proliferation of bone marrow mesenchymal stem cells and maintains their potential of differentiation [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(7): 70-74.

[21] Ma K, Fox L, Shi G, et al. Generation of neural stem cell-like cells from bone marrow-derived human mesenchymal stem cells [J]. Neurol Res, 2011, 33(10): 1083-1093.

[22] Morris LM, Klanke CA, Lang SA, et al. TdTomato and EGFP identification in histological sections: insight and alternatives [J]. Biotech Histochem, 2010, 85(6): 379-387.

[23] Syverud BC, Gumucio JP, Rodriguez BL, et al. A transgenic tdTomato rat for cell migration and tissue engineering applications [J]. Tissue Eng Part C Methods, 2018, 24(5): 263-271.

[收稿日期] 2019-08-08

蔡磊,李建军,余露军,等. 诸氏鲻虾虎鱼封闭群遗传质量评价方法的建立[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 10-16.
Cai L, Li JJ, Yu LJ, et al. Evaluation methods to establish the genetic quality of closed colony *Mugilogobius chulae* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 10-16.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.002

诸氏鲻虾虎鱼封闭群遗传质量评价方法的建立

蔡磊,李建军,余露军,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】 目的 分析诸氏鲻虾虎鱼封闭群和野生群的遗传差异,建立诸氏鲻虾虎鱼封闭群遗传质量评价方法。**方法** 利用 20 个微卫星标记对诸氏鲻虾虎鱼野生群和封闭群进行 STR 分型,计算群体间遗传杂合度和遗传分化状况,并分析样本量对遗传参数的影响。**结果** 诸氏鲻虾虎鱼封闭群和野生群在 20 个微卫星位点的平均无偏期望杂合度(*He*)分别为 0.6927 和 0.7162。封闭群与野生群间遗传分化较小,且当样本量达到 30 尾以上后,平均等位基因数趋于稳定。**结论** 遗传杂合度是否在 0.5 ~ 0.7 之间可较好将诸氏鲻虾虎鱼封闭群与野生群区分,适于作为诸氏鲻虾虎鱼封闭群遗传质量合格与否的判定指标。

【关键词】 诸氏鲻虾虎鱼;封闭群;微卫星;遗传质量;评价方法
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0010-07

Evaluation methods to establish the genetic quality of closed colony *Mugilogobius chulae*

CAI Lei, LI Jianjun, YU Lujun, HUANG Ren*

(Key Laboratory of Guangdong Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China)
Corresponding author: HUANG Ren. E-mail: 1649405216@qq.com

【Abstract】 Objective To analyze the genetic differences between closed colony and wild population of *Mugilogobius chulae*, and to establish a genetic quality evaluation method of closed colony *M. chulae*. **Methods** Twenty microsatellite markers were selected to detect heterozygosity, genetic differentiation, and the relationship between sample size and the genetic parameters of closed colony and wild population of *M. chulae*. **Results** The unbiased expected heterozygosity (*He*) of closed colony and wild population of *M. chulae* were 0.6927 and 0.7162, respectively. Analysis of genetic differentiation showed little difference between closed colony and wild population. Analysis of the relationship between sample size and genetic parameters showed that the mean number of alleles tended to be stable at a sample size of 30. **Conclusions** Heterozygosity in the range of 0.5 - 0.7 can distinguish closed colony strains of *M. chulae* from wild population, and would be suitable for determining the genetic quality of closed colony *M. chulae*.

【Keywords】 *Mugilogobius chulae*; closed colony; microsatellite marker; genetic quality; evaluation method
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

诸氏鲻虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*)是我国本土一种小型海水鱼类,在繁殖生物学[1]、细胞生物学[2]、遗传学[3]以及毒理学[4]等领域的基础研究均表明,诸氏鲻虾虎鱼是一种比较优良的海水实验鱼

[**基金项目**]国家科技支撑计划项目(2015BAI09B05)。
Funded by National Key Technologies R&D Program of China (2015BAI09B05).
[**作者简介**]蔡磊(1986—),男,副研究员,研究方向:实验动物遗传学。Email: cailei17@163.com
[**通信作者**]黄韧(1959—),男,研究员,研究方向:实验动物学。Email:1649405216@qq.com

类,如个体小、繁殖周期短、繁殖力强、便于实验室内饲养管理以及对污染物毒性敏感等。诸氏鳗虾虎鱼现已初步完成实验动物化研究,封闭群繁殖至第 19 代,近交系培育至第 13 代,且于全国 30 个省市推广应用,广泛用于石油开发污染物、船舶压载水、疏浚泥、重金属等污染物的生物毒性评价以及疾病模型研究等领域[5]。因海水鱼类特殊的生活环境,小型海水鱼标准化质控体系的建立仍是公认难题,尤其在遗传质量评价上,国内外的研究均相对薄弱。而在实验动物研究领域中,遗传背景清晰又是其最基本和最重要的条件要求,建立遗传质量评价技术是实现其标准化、规范化管理的重要手段。诸氏鳗虾虎鱼作为一种潜在的海洋模式鱼类,建立其遗传质量评价方法,对规范今后引种、保种、性状控制和饲养管理等具有重要实用价值,也有利于打造我国特色海洋模式鱼类品牌,促进我国海洋鱼类的资源优势转化为科研优势。

微卫星标记具有分布广、共显性、多态性丰富等优点,在遗传学研究上已经获得广泛应用[6-8],国际实验动物学会(International Council for Laboratory Animal Science, ICLAS)[9]和 Charles River 等[10]均推荐微卫星标记作为实验动物遗传质量监测的工具。近年来利用微卫星标记对实验动物封闭群进行遗传质量检测已有较多报道,如大小鼠[11]、小型猪[12]、树鼩[13]、稀有鮈鲫(*Gobiocypris rarus*)[14]等封闭群动物相继建立了基于微卫星标记技术的遗传质量评价方法。本研究利用微卫星标记分别对诸氏鳗虾虎鱼封闭群和野生群进行了遗传质量评价,以期建立诸氏鳗虾虎鱼封闭群遗传质量评价方法。

1　材料与方法

1.1　实验材料

诸氏鳗虾虎鱼样本分别为实验室繁殖的第 14 代封闭群,平均体重为(0.65 ± 0.16)g;和广东省深圳大鹏湾海域采集的野生群体,平均体重为(0.85 ± 0.36)g。其中,封闭群和野生群样本数量各为 50 尾(雌雄各半)。

1.2　方法

1.2.1　样本基因组 DNA 提取

参照北京天根动物基因组 DNA 抽提试剂盒说明书的方法提取样品基因组 DNA 并检测浓度和纯度,取出部分 DNA 样本将浓度调至 50 ng/uL,保存于-20℃备用。

1.2.2　微卫星引物

参考文献[15]和 Genebank 数据库选取 20 个多态性较好的微卫星位点用于实验鱼遗传检测,所有引物均由上海捷瑞生物工程有限公司合成,引物 5'端用 FAM 或 HEX 荧光素标记,引物信息见表 1。

1.2.3　PCR 扩增及 STR 分型

PCR 总反应体积为 25 μL,其中含 10 × PCR Buffer 2.5 μL(Mg^{2+} Plus), dNTP (2.5 mmol/L) 2 μL,FAM 和 HEX 标记的上下游引物(20 μmol/L)各 0.5 μL,基因组 DNA 50 ng,Taq 酶(5 μmol/L)0.2 μL,双蒸水补齐至 25 μL。PCR 反应程序为 94℃,预变性 4 min;94℃变性 30 s,退火 40 s(退火温度因引物而异),72℃延伸 40 s,30 个循环,最后于 72℃下延伸 10 min。

PCR 产物用 ABI 3730xl 遗传分析仪(Applied Biosystems, 美国)进行分型,原始峰图用 GeneMapper 4.0 基因分型软件(Applied Biosystems, 美国)读取分型结果。

1.3　统计学分析

利用 Popgene32(Version 1.31)软件统计分析微卫星基因座的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)和无偏期望杂合度(H_e)。根据 Botstein 等[16]的方法计算每个微卫星位点的多态信息含量(*PIC*),计算公式如下:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=j+1}^{n} 2P_i^2 P_j^2$$

式中,P_i、P_j 分别为群体中第 i 和第 j 个等位基因频率,n 为某一基因座上等位基因数。

2　结果

2.1　微卫星分型结果

统计各位点的 STR 分型结果,转换成基因型。20 个微卫星标记均能获得清晰稳定的峰图。20 个位点在 100 尾封闭群和野生群样本中共检测到 201 个等位基因,平均每个位点检测到 10.05 个等位基因,最多的为 18 个(位点 171252),最少的为 3 个(位点 2347-2)。部分分型结果见图 1。计算各微卫星位点在各群体中的多态信息含量(*PIC*),封闭群除位点 1135-1 为中度多态外,其余位点均为高度多态;野生群除位点 2347-2 为中度多态外,其余位点均为高度多态。

2.2　遗传多样性检测

20 个位点在封闭群和野生群中检测到平均等位基因数(Na)分别为 7.40 和 9.05;平均观测杂合

度(*Ho*)分别为 0.5790 和 0.5710、平均无偏期望杂合度(*He*)分为 0.6927 和 0.7162。诸氏鰕虎鱼封闭群和野生群遗传多样性均较为丰富,封闭群遗传多样性稍低于野生群。具体遗传参数见表 2。

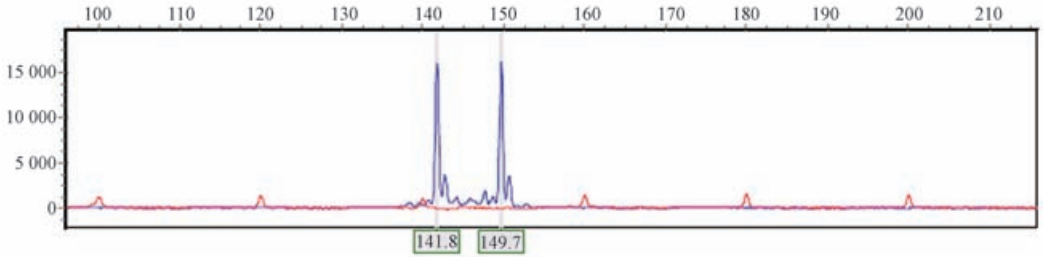
2.3 封闭群与野生群遗传结构分析

诸氏鰕虎鱼封闭群和野生群 F 统计量和基因流分析表明(表 3),仅 Fis 值中有 2 个位点为负值,Fit 和 Fst 值均为正值,Fis 正值范围为 0.0069 ~ 0.6338,Fit 和 Fst 值范围分别 0.0194 ~ 0.6349 和 0.0032 ~ 0.1357,三者均值分别为 0.1757,0.2142 和 0.0467。Fst 和 Fit 均值显示群体内个体间的近交程度较低;Fst 均值结果表明封闭群与野生群间遗传分化较小,封闭群保持较好的遗传杂合度。对群体基因流 Nm 值进行分析,Nm 均值为 5.0993(大于 1),表明基因结构相对稳定。诸氏鰕虎鱼野生群和封闭群遗传相似率和遗传距离分析结果显示,封闭群与野生群保持较高的遗传相似率(0.7835)和遗传距离(0.2439)。

表 1 诸氏鰕虎鱼 20 个微卫星 DNA 位点信息

Table 1 Information of 20 microsatellite DNA loci in *Mugilogobius chulae*

位点 Locus	引物序列(5'-3') Primer sequence	等位基因范围(bp) Allele size range(bp)	退火温度(℃) Fluencent dye(℃)	登录号 Access No.
518-4	ACCTCTTTTCGTGTTTCTTCTCC GTTTAAAATGGGCAACTTCACAG	112 ~ 132	52	KP058571.1
1135-1	AGCCTACATTTTGTTTGTCGTGT TCTGTTGCTAAACTGTCCTACACTG	140 ~ 168	59	KP216677.1
1513-1	GTACCTCTGTGGTCCCAATGAT AAGAGAAATGCACACAAACCAAC	87 ~ 99	58	KP058552.1
1997-5	TGCCTATAGTTTTGAAGACGGAC TTATTTTCTTGGGACAAAATCCA	104 ~ 116	59	KP058567.1
1891-1	GAGTGATGTCTAGTGCAGGGAAC TTGATACTGTCCTGTTCCAAACC	99 ~ 126	50	KP216678.1
2073-5	CACTAAACCCGTTCTGTTCTCTC CAAAGGCCAGATTCTTAATGTTG	142 ~ 170	50	KP058549.1
2152-4	GGAGATCGATGCACAGGTTATT TTCAGAAAACAGAACAACTTCCC	136 ~ 156	50	KP058550.1
2157-5	TGGCTTAATGTAATCTCCCATTC GACGCACGCACACTGAAC	102 ~ 130	59	KP216681.1
2317-1	ACTATCTAGTGTTTGGACGCAGC TGACACGAAACATGAGGTGTAAC	110 ~ 130	57	KP216683.1
2347-2	ACGAGTCCAATCTCCTTCTTGAG GTAGTTTGAACCGAAAGCCATGT	107 ~ 134	59	KP058558.1
2368-4	CGCAGTCAAAAATGTACAGACCT GATCTTAATGCCCATCTCTCCAG	122 ~ 131	58	KP058559.1
2436-1	CACAAGCATGAAGACAGAAGATG GTGCAATACATCAGAGTCCTGGT	121 ~ 145	58	KP216687.1
2489-2	TCCCTAAGCTTTTTCTCACACTG TGCCATTAAAATGGTCACTATCG	100 ~ 113	57	KP058560.1
59803	GGCCGTGTCCGAATACTTT ACTTCCAGAGTTTGTGCCGT	97 ~ 114	57	KU059486.1
82926	ATTCTCCAGCAGCACCAGAG TCTTAGTGCCAGAGTCGTGC	86 ~ 110	59	KU059487.1
87819	CAAGTGTCTGGGGACTGCTC TCCCCTCCTTTTCTGTCTTCT	104 ~ 128	58	KU059488.1
171252	CGGCTCTGCTTATATTCATGC TTGTAGAGGGTTGATCTATCTTTCC	93 ~ 135	58	KU059489.1
183111	CTGTGCACCTGGGTCCTG TTTGTGCTGTGAGTTGCTCC	89 ~ 124	58	KU059490.1
364439	CTCACCCTCCTCCGCATC CCTGCTGTTGCTGTTGTTGT	81 ~ 106	57	KU059492.1
421625	GTGTTCGAGAGCGACGCAT CCCTCTCGTCTGAAGTGTCTC	89 ~ 126	59	KU059493.1



注：蓝色为样品；红色为 Marker，从左到右分别为 100，120，140，160，180 bp 和 200 bp。

图 1　位点 2073-5 在封闭群第 5 号样本的分型结果

Note. Blue represents sample. Red represents marker, 100, 120, 140, 160, 180 bp and 200 bp from left to right, respectively.

Figure 1　Typing results of locus 2073-5 in sample of closed colony No. 5

表 2　诸氏鳗虾虎鱼封闭群和野生群在 20 个微卫星位点上的遗传参数

Table 2　Genetic parameters of *Mugilogobius chulae* from closed colony and wild population at 20 microsatellite loci

位点 Locus	封闭群 Closed colony				野生群 Wild population			
	N_a	*Ho*	*He*	PIC	N_a	*Ho*	*He*	PIC
518-4	7	0.4400	0.6414	0.5903	9	0.7000	0.8242	0.7916
1135-1	7	0.3400	0.3929	0.3674	10	0.6400	0.8061	0.7716
1513-1	12	0.6600	0.8576	0.8342	10	0.6400	0.6865	0.6392
1891-1	11	0.6000	0.8636	0.8440	11	0.5000	0.8323	0.8043
1997-5	4	0.6200	0.5784	0.4805	6	0.1800	0.5972	0.5098
2073-5	5	0.4800	0.5970	0.5541	7	0.5600	0.6489	0.5966
2152-4	10	0.7800	0.8527	0.8255	13	0.8800	0.8358	0.8079
2157-5	7	0.6200	0.5519	0.5195	7	0.6400	0.7335	0.6817
2317-1	6	0.5600	0.6479	0.5854	8	0.4800	0.5846	0.5338
2347-2	3	0.6600	0.6305	0.5457	5	0.5400	0.5271	0.4490
2368-4	4	0.6000	0.6244	0.5520	5	0.3600	0.6073	0.5330
2436-1	8	0.7000	0.7869	0.7471	11	0.8400	0.7812	0.7513
2489-2	9	0.7000	0.7976	0.7617	7	0.5800	0.5523	0.5105
59803	6	0.3400	0.7685	0.7261	11	0.2400	0.8315	0.8013
82926	8	0.4800	0.6812	0.6237	7	0.4000	0.6630	0.5935
87819	5	0.5000	0.6733	0.6076	5	0.6000	0.6034	0.5392
171252	15	0.6800	0.8634	0.8425	18	0.6200	0.9008	0.8822
183111	9	0.4200	0.7244	0.6953	9	0.5200	0.6129	0.5508
364439	6	0.6400	0.5996	0.5440	10	0.6800	0.8404	0.8113
421265	6	0.7600	0.7206	0.6704	12	0.8200	0.8554	0.8303
Mean	7.4	0.5790	0.6927	0.6459	9.05	0.5710	0.7162	0.6694

2.4　样本量对封闭群遗传多样性参数的影响

利用 Excel 自嵌随机抽样方法，分别随机抽取封闭群中 10 尾、20 尾、30 尾、40 尾样本，分别计算 10、20、30、40 和 50 尾样本条件下遗传参数（图 2），平均有效等位基因数（*Ne*）、*Ho* 和 *He* 在 10 ~ 50 尾样本中变化不明显，*Na* 在 30 尾样本后趋于稳定。

3　讨论

实验动物的一个重要特征是遗传背景清晰，我国现行实验动物遗传质量控制标准主要推荐生化标记方法[17]，由于生化位点携带的信息量不多，实验动物群体需要多态性更为丰富的标记来反应其遗传多样性[18]。微卫星标记作为基因组中广泛分布的一种短串联重复序列，其高度的多态性和共显性特征既可完成实验动物表型检测，还可对遗传杂合度进行评估。目前利用微卫星标记对实验动物遗传质量进行评价已有较多报道[19-20]。本研究利用 20 个微卫星标记对诸氏鳗虾虎鱼封闭群和野生群进行了遗传检测，根据 Botstein 等[16]提出的基因变异程度高低的多态信息含量指标：当 $PIC > 0.5$ 时，该位点为高度多态性位点；当 $0.25 < PIC < 0.5$ 时，该位点为中度多态性位点；当 $PIC < 0.25$ 时，该

表 3 诸氏鲻虾虎鱼 20 个微卫星位点的 F 统计量和基因流

Table 3 F statistics and gene flow of 20 microsatellite loci in *Mugilogobius chulae*

位点 Locus	Fis	Fit	Fst	Nm
518-4	0.2143	0.2684	0.0688	3.3839
1135-1	0.1744	0.2651	0.1099	2.0242
1513-1	0.1495	0.1970	0.0558	4.2273
1891-1	0.3466	0.3556	0.0137	17.9872
1997-5	0.3126	0.4059	0.1357	1.5916
2073-5	0.1568	0.1780	0.0251	9.6965
2152-4	0.0069	0.0201	0.0132	18.6563
2157-5	0.0099	0.0653	0.0559	4.2195
2317-1	0.1477	0.1639	0.0191	12.8713
2347-2	-0.0471	0.0838	0.1251	1.7491
2368-4	0.2127	0.2152	0.0032	78.1667
2436-1	0.0080	0.0541	0.0464	5.1336
2489-2	0.0422	0.1076	0.0683	3.4092
59803	0.6338	0.6439	0.0275	8.8393
82926	0.3387	0.3433	0.0069	35.7742
87819	0.1297	0.1438	0.0162	15.1923
171252	0.2557	0.2688	0.0176	13.9505
183111	0.2900	0.3111	0.0296	8.1931
364439	0.0741	0.1488	0.0807	2.8466
421265	-0.0127	0.0194	0.0317	7.6331
Mean	0.1757	0.2142	0.0467	5.0993

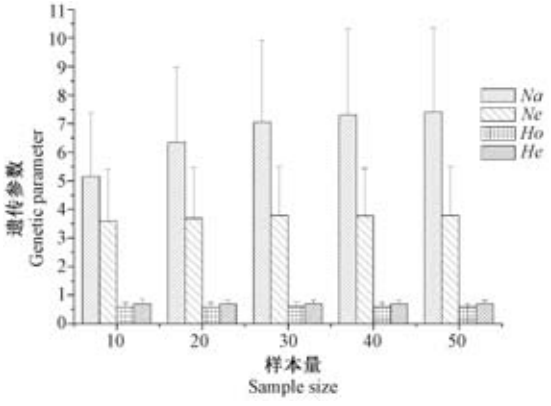


图 2 样本量对封闭群遗传参数的影响

Figure 2 Effect of sample size on genetic parameters of closed colony of *Mugilogobius chulae*

位点为低度多态性位点,本研究所用的 20 个微卫星标记中有 19 个为高度多态($PIC > 0.5$)。一般情况下,多态性高的标记能提供更多的遗传信息,本研究所选用的标记可较好的反应实验鱼的遗传信息,可满足实验鱼遗传质量检测要求。

封闭群动物与野生动物一个重要区别为封闭群在一定范围内保持相对稳定的遗传杂合度[21],而野生群保持了较高杂合度。杂合度为群体遗传结构的重要指标,也是评价群体遗传变异的最直接和有效的方法。一般认为,当一个群体的平均有效杂合度小于 0.5 时,表明该群体遗传多样性偏低,有近交倾向,当平均有效杂合度高于 0.7 时,遗传杂合度偏高,群体间个体差异较大,群体的平均有效杂合度在 0.5 ~ 0.7 之间时才为合格的封闭群动物。目前在基于微卫星标记技术的实验动物封闭群遗传质量检测中,多采用遗传杂合度是否在 0.5 ~ 0.7 范围之间作为判定指标[19-20],如王洪等[11]推荐将平均杂合度在 0.5 ~ 0.7 之间作为合格封闭群大小鼠的评价指标;李薇等[22]利用微卫星标记对 5 个长爪沙鼠封闭群遗传检测发现,平均有效杂合度 0.5 ~ 0.7 区间范围可作为长爪沙鼠封闭群遗传合格与否的量化指标;孙瑞萍等[12]利用微卫星标记对封闭群五指山猪遗传质量进行分析,发现封闭群遗传杂合度为 0.69,符合封闭群动物特征,可用于五指山小型猪遗传多样性评估。

由于国内外在鱼类封闭群培育上起步较晚,目前关于实验鱼封闭群微卫星遗传质量检测的报道相对较少,国内仅见顾党恩等[14]和李慧慧等[23]分别利用微卫星标记对稀有鮈鲫连续代系封闭群(P0,F1 ~ F8)的遗传质量进行评价,发现遗传杂合度均在 0.5 ~ 0.7 之间。本研究中诸氏鲻虾虎封闭群和野生群平均无偏期望杂合度分别为 0.6927 和 0.7162,封闭群平均无偏期望杂合度在 0.5 ~ 0.7 范围之间,而野生群平均期望杂合度在 0.7 以上。

如无发生近交,鱼类野生群体遗传杂合度通常高于 0.7,如鳙(*Aristichthys nobilis*)为 0.882[24]、黄鳍棘鲷(*Acanthopagrus latus*)为 0.741[25]、拟鲤(*Rutilus rutilus*)为 0.9168[26]、鳜(*Siniperca chuatsi*)为 0.71[27]等。可见平均无偏期望遗传杂合度值在 0.5 ~ 0.7 区间范围可作为一种判定诸氏鲻虾虎鱼封闭群遗传质量是否合格的候选指标,同时也发现封闭群与野生群平均遗传杂合度差异较小,封闭群仍保持较高的杂合度,推测可能与以下因素有关:①该封闭群原始建群的 P0 代亲本来自此野生群采样地区,二者存在相似的遗传基础;②该封闭群始终保持较大的群体规模(大于 6000 尾),且自建群起严格按照实验动物要求繁殖和管理,有效保持了群体遗传杂合度。同时对诸氏鲻虾虎鱼封闭群和野生群体进行遗传结构分析发现,封闭群与野生群间遗传分化较小,说明诸氏鲻虾虎鱼封闭群在遗传背景上与此野生群存在关联性,也侧面证明该封闭群在培育过程中未发生近交。

本研究同时发现,当群体数量达到 30 尾以上,平均等位基因数趋于稳定,与稀有鮈鲫封闭群的研究结果类似[23],而对于平均有效等位基因数、平均观测杂合度和平均期望杂合度等指标,各个抽样数量间差异不明显,可能与本研究选用标记多态性较高有关(仅有 1 个标记为中度多态,其余均为高度多态)。

参　考　文　献(References)

[1] 李建军, 陈小曲, 林忠婷, 等. 诸氏鲻虾虎鱼的形态与生长特性分析[J]. 实验动物与比较医学. 2012, 32(4): 334-340.
Li JJ, Chen XQ, Lin ZT, et al. Analysis on morphology and growth characteristics of *Mugilogobius chulae* [J]. Lab Anim Comp Med, 2012, 32(4): 334-340.

[2] 陈小曲, 黄韧, 李建军. 诸氏鲻虾虎鱼染色体组型分析[J]. 热带海洋学报, 2013, 32(6): 88-95.
Chen XQ, Huang R, Li JJ. Study on the karyotype of *Mugilogobius chulae*[J]. J Trop Oceanograph, 2013, 32(6): 334-340.

[3] 蔡磊, 陈小曲, 郑伟强, 等. 诸氏鲻虾虎鱼多态性微卫星标记的开发及评价 [J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 57-62.
Cai L, Chen XQ, Zheng WQ, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Mugilogobius chulae* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(1): 57-62.

[4] 李建军, 林忠婷, 陈小曲, 等. 四种重金属离子对诸氏鲻虾虎鱼的单一和联合毒性 [J]. 海洋环境科学, 2014, 2: 236-241.
Li JJ, Lin ZT, Chen XQ, et al. Single and joint toxicity of four heavy metal ions on *Mugilogobius chulae* [J]. Marin Environ Sci, 2014, 2: 236-241.

[5] 李建军, 余露军, 蔡磊, 等. 诸氏鲻虾虎鱼实验动物化研究进展 [J].中国实验动物学报,2018,26(4): 493-498.
Li JJ, Yu LJ, Cai L, et al. Advances in research on *Mugilogobius chulae*, a laboratory marine fish resource [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 493-498.

[6] Senanan W, Pechsiri J, Sonkaew S, et al. Genetic relatedness and differentiation of hatchery populations of Asian seabass (*Lates calcarifer*) (Bloch, 1790) broodstock in Thailand inferred from microsatellite genetic markers[J]. Aquacult Res, 2015, 46(12): 2897-2912.

[7] Thanh HN, Liu Q, Zhao LJ, et al. Genetic diversity of the cultured giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) in China based on microsatellite[J]. Biochem Syst Ecol, 2015, 59: 144-154.

[8] Liu F, Xia JH, Bai ZY, et al. High genetic diversity and substantial population differentiation in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) revealed by microsatellite analysis [J]. Aquaculture, 2009, 297(1-4): 51-56.

[9] Fahey JR, Katoh H, Malcolm R, et al. The case for genetic monitoring of mice and rats used in biomedical research[J]. Mamm Genome, 2013, 24(3-4): 89-94.

[10] Background strain characterization. [EB/OL]. [2017]. https://www. criver. com/sites/default/files/resources/BackgroundStrainCharacterizationTechnicalSheet.pdf.

[11] 王洪, 魏杰, 冯育芳, 等. 实验小鼠、大鼠微卫星 DNA 检测法标准的编制 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(9): 97-102.
Wang H, Wei J, Feng YF, et al. Establishment of a standard method for detecting microsatellite markers of laboratory mice and rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(9): 97-102.

[12] 孙瑞萍, 魏立民, 晁哲, 等. 封闭群五指山小型猪 33 个微卫星位点的遗传分析 [J]. 江苏农业科学, 2018, 46(21): 172-177.
Sun RP, Wei LM, Chao Z, et al. Genetic analysis of closed colony of Wuzhishan Miniature pig by 33 microsatellites [J]. Jiangsu Agric Sci, 2018, 46(21): 172-177.

[13] 刘城秀, 李娜, 全品芬, 等. 封闭群树鼩的微卫星遗传特性分析 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(1):1-9.
Liu CX, Li N, Tong PF, et al. Analysis of microsatellite genetic characteristics in of closed colony of tree shrews [J]. Lab Anim Comp Med, 2018, 38(1):1-9.

[14] 顾党恩, 王剑伟. 应用微卫星标记对稀有鮈鲫封闭群建群过程中的遗传监测[J]. 水生生物学报, 2012, 36(2): 197-204.
Gu DE, Wang JW. Application of microsatellite marker in genetic monitoring on the foundation of a closed colony of *Gobiocypris rarus*[J]. Acta Hydrobiol Sin, 2012, 36(2): 197-204.

[15] 蔡磊, 余露军, 陈小曲, 等. 诸氏鲻虾虎鱼转录组序列中微卫星标记的初步筛选及特征分析[J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 146-151.

Cai L, Yu LJ, Chen XQ, et al. A Preliminary Screening and Characteristic Analysis of Microsatellite Markers from Transcriptome Sequences in *Mugilogobius chulae*[J]. Biotechnol Bull, 2015, 31(9): 146-151.

[16] Botstein D, White RL, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32(3): 314-331.

[17] 全国实验动物标准化技术委员会. 实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制: GB14923-2010 [S]. 2010.
National Technical Committee 281 on Laboratory Animal of Standardization Administration of China. Laboratory animal-Genetic quality control of mammalian laboratory animals: GB 14923-2010 [S]. 2010.

[18] 朱亮, 蔡月琴, 屠珏, 等. 应用微卫星标记研究 Dunkin Harley 豚鼠封闭群的遗传背景 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(1): 51-55.
Zhu L, Cai YQ, Tu J, et al. Assessment of the genetic background in Dunkin Hartley guinea pig outbred stock using microsatellite DNA markers [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2011, 19(1): 51-55.

[19] 北京市科学技术委员会.实验用小型猪 第 3 部分:遗传质量控制: DB/T 823.3-201 [S]. 2011.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Experimental minipig Part 3: Genetic quality control: DB/T 823.3-2011 [S]. 2011.

[20] 北京市科学技术委员会.实验用鱼 第 3 部分:遗传质量控制: DB/T 1053.3-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 3: Genetic quality control: DB/T 1053.3 - 2013 [S]. 2013.

[21] International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice, Rat Genome and Nomenclature Committee. Guidelines for Nomenclature of Mouse and Rat Strains [EB/OL]. [2016-01]. http://informatics.jax.org/nomen/strains.shtml.

[22] 李薇, 江其辉, 杜小燕, 等. 封闭群长爪沙鼠遗传标准的建立 [J]. 实验动物科学, 2011, 28(2): 31-36.
Li W, Jiang QH, Du XY, et al. Establishment of genetic standards of closed colony gerbil [J]. Lab Anim Sci, 2011, 28(2): 31-36.

[23] 李慧慧, 王春伶, 王剑伟. IHB 系稀有鮈鲃遗传结构研究 [J]. 水生态学杂志, 2018, 39(1): 83-90.
Li HH, Wang CL, Wang JW. Genetic structure of IHB rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. J Hydroecol, 2018, 39(1): 83-90.

[24] 冯晓婷, 杨习文, 杨雪军, 等. 基于微卫星标记对长江江苏段鳙增殖放流效果评估 [J]. 中国水产科学, 2019, 26(6): 1185-1193.
Feng XT, Yang XW, Yang XJ, et al. Microsatellite method assessment of the effects of restocking enhancement of bighead carp (*Aristichthys nobilis*) in Jiangsu reaches of the Yangtse River [J]. J Fish Sci China, 2019, 26(6): 1185-1193.

[25] 吴仁协, 翟云, 肖瑶, 等. 黄鳍棘鲷微卫星标记开发及其在鲷科鱼类中的跨物种扩增 [J]. 应用海洋学报, 2019, 38(3): 356-364.
Wu XR, Zhai Y, Xiao Y, et al. Microsatellite marker development for *Acanthopagrus latus* and cross-species amplification in the family Sparidae [J]. J App Oceangra, 2019, 38(3): 356-364.

[26] 李可, 马徐发, 谢鹏, 等. 基于微卫星标记的拟鲤遗传多样性及群体遗传结构分析 [J]. 华中农业大学学报, 2018, 37(4): 112-120.
Li K, Ma XF, Xie P, et al. Genetic diversity and population genetic structure of *Rutilus rutilus* based on microsatellite genetic markers [J]. J Huazhong Agric Univ, 2018, 37(4): 112-120.

[27] 曾可为, 宋文, 王青云, 等. 基于微卫星标记的鳜种质遗传多样性与群体遗传结构分析 [J]. 华中农业大学学报, 2019, 38(6): 104-115.
Zeng KW, Song W, Wang QY, et al. Genetic diversity and population genetic structure of mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) based on microsatellite marker [J]. J Huazhong Agric Univ, 2019, 38(6): 104-115.

[收稿日期] 2019-11-28

黄胜男,林志健,张冰,等. 高尿酸血症鹌鹑肠道菌群结构分析[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 17-22.
Huang SN, Lin ZJ, Zhang B, et al. Analysis of the gut microbiota structure in quails with hyperuricemia [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 17-22.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.003

高尿酸血症鹌鹑肠道菌群结构分析

黄胜男[1],林志健[2],张冰[2*],吕锦涛[2],王如然[1]

(1. 中国中医科学院广安门医院南区,北京 102618; 2. 北京中医药大学,北京 100029)

【摘要】 目的 探讨高尿酸血症鹌鹑肠道菌群结构变化特点,为高尿酸血症病理机制研究提供参考。**方法** 将迪法克鹌鹑随机分为两组:正常组和模型组,正常组喂饲正常饲料,模型组喂饲高嘌呤饲料;PCR-DGGE 法构建两组鹌鹑盲肠内容物菌群 DNA 指纹图谱,对图谱进行数字化处理,聚类分析法比较两组鹌鹑肠道菌群结构整体差异,logistic 回归法辨别差异条带,克隆和鉴定差异条带序列;HE 染色观察盲肠组织结构变化。**结果** 造模第 28 天,模型组鹌鹑与正常组比较,血尿酸显著升高、肠道菌群整体结构发生变化,DGGE 指纹图谱上 12 条差异条带,序列鉴定归属于拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门;盲肠组织出现炎性变化。**结论** 高嘌呤饮食诱导的高尿酸血症鹌鹑肠道菌群结构发生改变。

【关键词】 高尿酸血症;肠道菌群;PCR-DGGE;鹌鹑
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0017-06

Analysis of the gut microbiota structure in quails with hyperuricemia

HUANG Shengnan[1], LIN Zhijian[2], ZHANG Bing[2*], LYU Jintao[2], WANG Ruran[1]

(1.South of Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 102618, China.
2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029)
Corresponding author: ZHANG Bing.E-mail:zhangbin6@263.net

【Abstract】 Objective To investigate the gut microbiota changes in quails with hyperuricemia and provide a reference for the pathological mechanism of hyperuricemia. **Methods** Difalk quails were randomly divided into the normal and model groups and fed a normal diet or high-purine diet, respectively. DNA fingerprinting of the intestinal flora in the cecal contents of quails was performed using the PCR-DGGE method and digitized to analyze the gut microbiota structure via clustering analysis. Logistic regression was used to discern the different bands, and the genes of the different bands were cloned and identified. The cecal tissue was observed via hematoxylin and eosin staining. **Results** The gut microbiota structure of the model group quails differed from that of the normal group quails on day 28 of the experiment. The DGGE fingerprint contained 12 bands, belonging to *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, and *Proteobacteria*. Inflammatory changes occurred in the cecum. **Conclusions** The gut microbiota structure is altered in quails with high-purine diet-induced hyperuricemia.

【Keywords】 hyperuricemia; gut microbiota; PCR-DGGE; quail
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[**基金项目**]国家自然科学基金资助项目(81673618),国家中医药领军人才支持计划-"岐黄学者"支持项目,中国中医科学院广安门医院(南区)科研基金(Y2017-20)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81673618), Program for Leading Talents in State Administration of Traditional Chinese Medicine of China -"Qihuang scholars" Project, and Science Foundation of South of Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences (Y2017-20).
[**作者简介**]黄胜男(1980—),女,副主任药师,博士研究生,研究方向:代谢性疾病中医药防治研究。Email: huangsn1112@126.com
[**通信作者**]张冰(1959—),女,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:代谢性疾病中医药防治研究。Email: zhangbin6@263.net

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)是尿酸生成过多和/或排泄减少导致的一种代谢紊乱疾病。近年来,研究显示它与肠道菌群结构变化有关,例如,新疆维吾尔族和汉族高尿酸血症患者与尿酸正常人群肠道优势菌属有显著差异,高尿酸血症患者粪便中毛螺旋菌科 *Roseburia* 属、乳酸菌多于正常人群[1]。肠道菌群是人体不可或缺的一部分,参与机体物质代谢和免疫调节,菌群结构改变可引发代谢紊乱疾病[2]。本课题组前期采用高嘌呤饮食诱导鹌鹑高尿酸血症模型(禽类与人类一样缺乏尿酸酶,嘌呤类物质在体内降解后终产物为尿酸),研究发现高尿酸血症鹌鹑伴有肠道菌群结构变化,广谱抗菌药物可抑制该病理过程[3]。在此基础上,本研究采用 PCR-DGGE 技术分析高尿酸血症鹌鹑肠道菌群结构变化,为高尿酸血症病理机制研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

普通级迪法克鹌鹑 20 只,雄性,5 周龄,体重(150 ± 15) g,购自北京市种禽场德岭鹌鹑分厂【SCXK(京) 11011360218082】,检疫合格证号:1100546039。动物饲养于北京中医药大学普通级动物实验室【SYXK(京) 2016-0038】。饲养条件:昼夜各半循环照明,温度 20 ~ 25℃,相对湿度 40% ~ 60%。所有操作均符合北京中医药大学科学实验伦理学要求(伦理审查证号:1100000010039)。

1.1.2 试剂与仪器

酵母干粉(批号:1213550,英国 OXOID 公司生产);QIAamp DNA Stool Mini Kit(货号:51504,德国 Qiagen 公司生产);Poly-Gel DNA Extraction Kit(货号:D2561-02,美国 OMEGA 公司生产)。16 s rRNA V3 区扩增引物(上游 341F: 5′-CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3′;下游 518R: 5′-ATTACCGCGGCTGCTGG-3′)[4]由上海生工生物工程公司合成。变性梯度凝胶电泳仪 (Bio-Rad,美国);全自动生化分析仪(BECKMAN,美国);PCR 仪(Biometra,德国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理

将鹌鹑按体重随机分为正常组和模型组,每组 10 只。正常组给予普通饲料,模型组给予高嘌呤饲料[普通饲料:酵母 = 3:1,每日喂食酵母 15 g/(kg·d)],再补充普通饲料,两组均自由饮水[5]。每 7 天颈静脉取血 1 次,分离血清,-80℃保存,取血前禁食不禁水 12 h;实验第 28 天,取血后自由饮水饮食,次日处死,取盲肠内容物,-80℃保存;取盲肠远端1 cm处小段盲肠组织,置于 4% 多聚甲醛固定。

1.2.2 尿酸含量检测

全自动生化仪检测实验第 0 天、第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天血清尿酸含量。

1.2.3 细菌 DNA 提取

精密称取盲肠内容物 0.2 g,按照 QIAamp DNA Stool Mini Kit 试剂盒说明书提取各样本总 DNA,-20℃保存。

1.2.4 PCR-DGGE 电泳

PCR 扩增:采用细菌通用引物 GC-338F 和 518R 为上、下游引物,扩增样品 16S rRNA 基因 V3 可变区,扩增体系(50 μL)为:10×PCR buffer 5 μL,dNTP(2.5 mmol/L)3.2 μL,上、下游引物(浓度均为 20 mmol/L)各 1 μL,rTaq(5 U/μL)0.4 μL,DNA 模板 1 μL,补 ddH_2O 至 50 μL。扩增条件:预变性 94℃ 5 min;变性 94℃ 1 min,退火 55℃ 45 s;延伸 72℃ 1 min,30 个循环;最终 72℃延伸 10 min。采用 8%的聚丙烯酰胺凝胶配制 35% ~ 55% DGGE 变性梯度凝胶,其中含化学变性剂 100%尿素 7 mol/L、40%(V/V)丙烯酰胺,上样 10 μL PCR 产物,在 1×TAE 缓冲液中 150 V 60℃下电泳 5 h,银染法染色,Gel-Doc2000 凝胶成像系统拍照留图[6]。

1.2.5 差异条带分析

灭菌手术刀切下 DGGE 图谱中两组差异条带,应用 Poly-Gel DNA Extraction Kit 试剂盒回收 DNA 片段,以回收产物为模板进行 PCR 扩增:分别以 338F、518R 为上、下游引物;扩增体系为 10×PCR buffer 5 μL,dNTP(2.5 mmol/L)3.2 μL,上下游引物(20 mmol/L)各 1 μL,rTaq(5 U/μL)0.4 μL,DNA 模板 1 μL,补 ddH_2O 至 50 μL;扩增程序为预变性 94℃ 4 min,变性 94℃ 30 s,退火 55℃ 30 s,延伸 72℃ 30 s,30 个循环,最终 72℃延伸 10 min。再切胶回收 DNA 片段,经纯化后,连接到 Pmd18-T 载体,转化至 DH5α 感受态细胞,筛选阳性克隆进行序列测定,将序列提交 GenBank 数据库,Blast 程序进行同源性比较[7]。

1.2.6 盲肠组织病理

二甲苯常规脱蜡,乙醇梯度回水,苏木精染液染色,流水洗去玻片上多余苏木精液,1%盐酸-乙醇

分色,水洗,氨水返蓝,流水冲洗,0.5%伊红液染色,蒸馏水稍洗;乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树脂封片[8]。

1.3　统计学分析

采用统计软件 SPSS17.0 进行统计,以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,根据方差齐与否,采用独立样本 t 检验或近似 t 检验,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。DGGE 指纹图谱采用 Quantity One 4.6.2(Bio-Rad Laboratory, Hercules, CA, USA)进行处理,采用丰度(条带数)、相似性聚类分析(UPGMA 算法)样品多样性;logistic 回归方法辨别差异条带;克隆测序结果利用 MEGA 4.0 软件对细菌进行系统发育树分析,采用 Neighbor-joining 法构建系统发育树。

2　结果

2.1　鹌鹑血尿酸水平比较

与正常组比较,模型组鹌鹑在实验第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天血尿酸水平显著升高($P<0.05$)。结果见表 1。

2.2　盲肠内容物菌群结构分析

2.2.1　细菌 16S rDNA PCR 扩增

细菌 16S rDNA PCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳,得到约 200 bp 的 DNA 片段(图 1),用于 DGGE 分析。

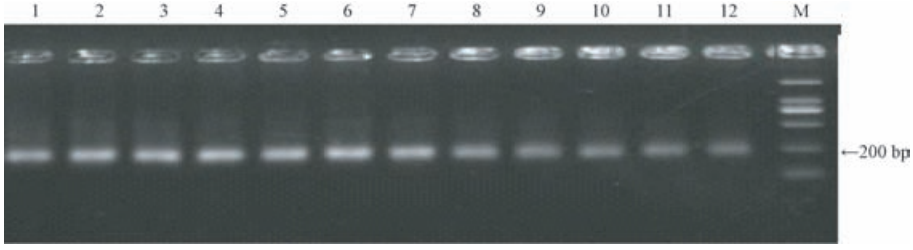
表 1　鹌鹑血尿酸水平比较($\bar{x}\pm s$, μmol/L)

Table 1　Serum uric acid in quails($\bar{x}\pm s$, μmol/L)

组别 Groups	例数 Number of animals	第 0 天 Day 0	第 7 天 Day 7	第 14 天 Day 14	第 21 天 Day 21	第 28 天 Day 28
正常组 Normal group	10	196.54 ± 62.81	182.23 ± 53.37	198.77 ± 75.86	231.90 ± 45.85	217.03 ± 52.33
模型组 Model group	10	195.09 ± 52.68	272.35 ± 106.43*	281.31 ± 69.21*	330.99 ± 124.45*	271.16 ± 53.03*

注:与对照组比较,* $P<0.05$。

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



注:1-6 为正常组;7-12 为模型组;M 为 DNA marker。

图 1　16S rRNA V3 区通用引物 GC-338F/518R 扩增产物电泳图

Note. 1-6, Normal group. 7-12, Model group. M, DNA marker.

Figure 1　Electropherogram of amplification products of universal primers GC-338F/518R in V3 region of 16S rRNA

2.2.2　PCR 产物的 DGGE 电泳分析

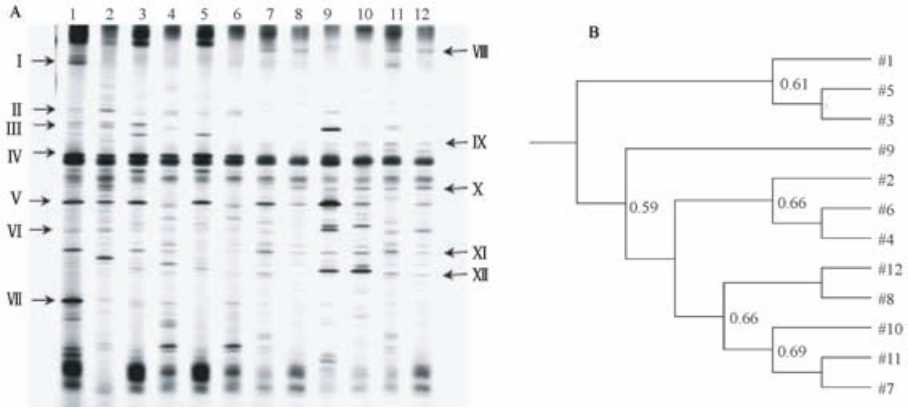
DGGE 电泳图谱见图 2,Quantity One 软件对条带位置和亮度进行数据化处理和 UPGMA 相似性聚类分析。与正常组比较,正常组 1-6 号样品丰度分别为 38、40、36、35、38、34;模型组 7-12 号丰度分别为 34、29、28、31、36、32,模型组丰度小于正常组;UPGMA 相似性聚类分析结果显示,正常组 1、3、5 可以聚为一类,相似系数为 61%,2、4、6 聚为一类,相似系数为 66%;模型组 7、8、10、11、12 可以聚为一类,相似系数为 66%。说明正常组和模型组各样品中菌群结构有较大的差异,除了 9 号样品,其余样品可根据菌群结构相似性区别出正常组和模型组。

2.2.3　差异条带序列分析

采用 logistic 回归分析方法筛选出两组鹌鹑 DGGE 电泳图谱 12 条差异性条带,切胶、回收、克隆测序,测序结果与 GenBank 数据库中微生物同源性进行比对,结果见表 2。利用 MEGA 6.0 软件对差异条带进行系统发育学分析:差异条带归属于拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)三大类,见图 3。有 7 种同源性大于 93%的细菌,分别为厚壁菌门 *Megamonas rupellensis*、*Megamonas hypermegale*、*Faecalibacterium prausnitzii*、*Clostridium populeti*,拟杆菌门 *Bacteroides coprocola*、*Prevotella histicola* 和变形菌门 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*。

2.3　盲肠组织病理分析

40 倍镜下可见模型组鹌鹑盲肠皱襞变平,隐窝结构紊乱,200 倍镜下可见隐窝内炎细胞分布,提示炎性变化(如箭头所示),见图 4。



注:1-6 为正常组;7-12 为模型组。

图 2 细菌 16S rDNA PCR 产物 DGGE 电泳图谱(A)和 UPGMA 相似性聚类分析(B)

Note. 1-6, Normal group. 7-12, Model group.

Figure 2 DGGE electrophoretogram of bacterial 16S rDNA PCR products (A) and UPGMA similarity cluster analysis (B)

表 2 DGGE 图谱中差异条带的序列分析

Table 2 Sequence analysis of differential bands in DGGE diagram

条带编号 Band Number	GenBank 数据库相似菌种名称 GenBank database similar species names	登录号 GenBank ID	相似性(%) Similarity(%)
I	*Megamonas rupellensis* strain FM1025	NR_044473.1	97
II	*Bacteroides coprocola* strain M16	NR_041278.1	98
III	*Bacteroides barnesiae* strain BL2	NR_041446.1	93
IV	*Prevotella maculosa* strain W1609	NR_044270.1	93
V	*Faecalibacterium prausnitzii* strain ATCC 27768	NR_028961.1	96
VI	*Megamonas hypermegale* strain DSM 1672	NR_025514.1	100
VII	*Anaerobiospirillum succiniciproducens* strain S411	NR_026075.1	98
VIII	*Clostridium populeti* strain 743 A	NR_026103.1	100
IX	*Prevotella buccae* strain ATCC 33574	NR_044631.1	91
X	*Prevotella histicola* strain T05-04	NR_044407.1	94
XI	*Dialister succinatiphilus* strain YIT 11850	NR_041666.1	92
XII	*Prevotella stercorea* strain CB35	NR_041364.1	92

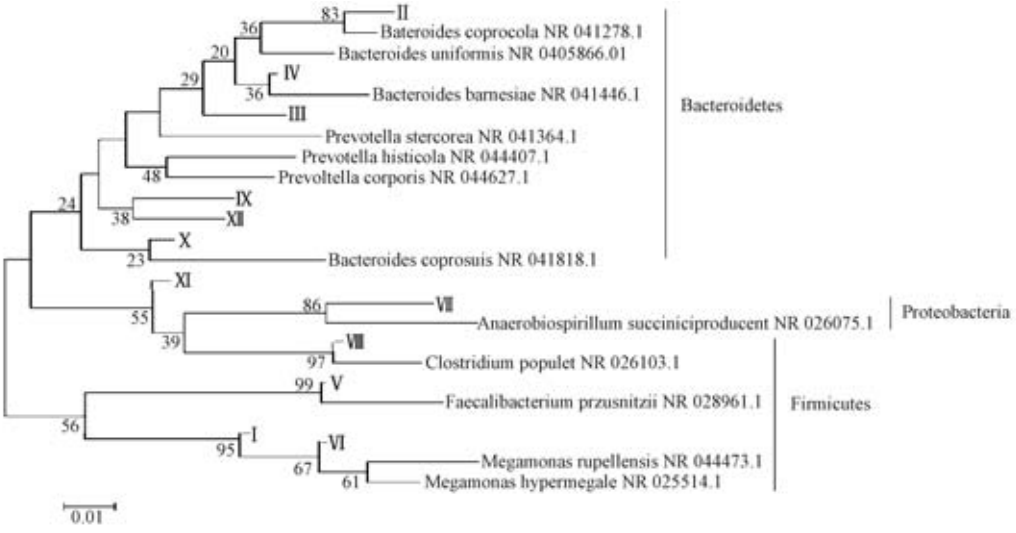
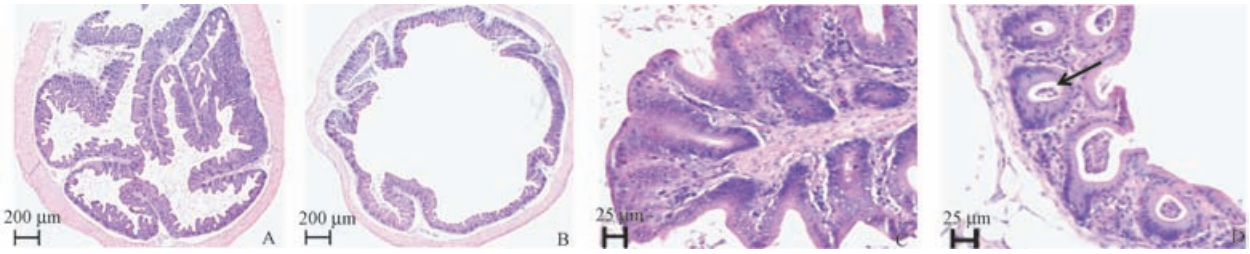


图 3 DGGE 差异条带系统发育树

Figure 3 Phylogentic tree of DGGE differential bands



注：A：正常组（×40）；B：模型组（×40）；C：正常组（×200）；D：模型组（×200）。箭头：隐窝内炎细胞。

图 4　鹌鹑盲肠病理切片

Note. A, Normal Group (×40). B, Model Group (×40). C, Normal Group (×200). D, Model Group (×200). The arrow: Inflammatory cells in the crypt.

Figure 4　Pathological sections of the cecum of quail

3　讨论

肠道菌群是人体不可或缺的一部分，早在上世纪初就有肠道菌群益生作用的记载，它参与人体代谢和免疫调节。近年来研究报道，痛风患者（以血尿酸升高为生化基础）与健康对照人群比较，其肠道菌群组成和分布上存在显著差异[9]；维吾尔族、汉族人群中正常人与高尿酸血症患者肠道优势菌属有显著差异[1]；实验研究显示，外源性补充酪酸梭菌可在一定程度上降低大鼠血尿酸[10]；酿酒酵母菌影响宿主自身免疫促进嘌呤分解，使尿酸生成增多[11]，这些研究提示高尿酸血症的发生可能跟某些肠道菌群有关。本研究采用高嘌呤饮食诱导鹌鹑高尿酸血症，模拟临床上饮食不节导致血尿酸水平升高，探讨该状态下肠道菌群结构变化特点，为从调节肠道菌群视角治疗高尿酸血症提供参考。

研究结果显示，高嘌呤饮食喂饲鹌鹑，在造模第 7 天、第 14 天、第 21 天、第 28 天，其血尿酸水平较正常组鹌鹑显著升高（$P< 0.05$），造模第 28 天，盲肠内容物中菌群丰度降低；从 DGGE 图谱及其差异条带序列分析可以看出，发生改变的菌群主要是拟杆菌门、厚壁菌门、变形菌门，模型组鹌鹑 *Bacteroides coprocola*、*Prevotella maculosa*、*Clostridium populeti*、*Prevotella histicola* 等 12 种细菌优势度改变。*Bacteroides coprocola*、*Prevotella maculosa*、*Prevotella histicola* 归属于拟杆菌门，革兰阴性厌氧杆菌，可参与降解多糖，产生乙酸、丁酸和琥珀酸[12]；*Clostridium populeti* 归属于厚壁菌门，革兰阳性厌氧菌，也是肠道内常见的纤维降解菌，产生乙酸和丁酸[13]。研究表明，菌群代谢产物乙酸、丁酸等短链脂肪酸（short-chain fatty acid，SCFA）参与能量代谢，抑制炎症因子释放，增强黏膜屏障及免疫功能，增加尿酸肠道排泄[14-15]。拟杆菌属对机体也有致病性，其代谢产生内毒素（endotoxin，LPS）可诱导炎症反应，往往伴有尿酸生成关键酶黄嘌呤氧化酶（xanthine oxidase，XO）活性增加，使尿酸产生增多[16-17]。本研究中，观察到模型组鹌鹑盲肠隐窝结构紊乱及炎性改变，肠道屏障受损，该病理过程可能跟肠道菌群结构改变有关，是影响尿酸肠道排泄的因素之一[14]。

研究方法上，由于肠道细菌以厌氧菌为主，传统的细菌培养方法需专门的厌氧培养环境，实验操作繁琐，且传统微生物培养计数技术仅能反映肠道菌群数目变化，不能反映肠道菌群结构的多样性和种群变化。本研究采用 PCR-DGGE 方法可简单快速研究菌群结构及种群变化[18-19]，具有灵敏度高、重复性好等优点。当然，该方法只能鉴别出数量大于 1%的优势菌群的存在，而肠道还存在其他很多微生物，数量占比虽小（如双歧杆菌），但对机体产生了重要作用[20]。因此，在后续的研究中，需采用 16 s 测序或宏基因组测序法对肠道菌群进行深度分析，明确肠道菌群与高尿酸血症之间的关联关系及可能机制。

参　考　文　献（References）

[1] 玛依娜·卡哈尔，孙玉萍，孜来古丽·米吉提，等. 维吾尔族与汉族人群肠道菌群与高尿酸血症关系的研究 [J]. 新疆医科大学学报，2014，37(4)：419-422.
Mzyila Kahaer, Sun YP, Zilaiti Mijit, et al. A research on the relationship between hyperuricemia and fecal microbiota in two ethnic populations [J]. J Xinjiang Med Univ, 2014, 37(4): 419-422.

[2] Patterson E, Ryan PM, Cryan JF, et al. Gut microbiota, obesity and diabetes [J]. Postgrad Med J, 2016; 92(1087): 286-300.

[3] 黄胜男，林志健，张冰，等. 肠道菌群结构变化与高尿酸血症发生的关系 [J]. 北京中医药大学学报，2015，38(7)：452-456.

Huang SN, Lin ZJ, Zhang B, et al. Correlation between structural shifts of gut microbiota and hyperuricemia in quails [J]. J Beijing Univ Trad Chin Med, 2015, 38(7):452-456.

[4] 吴曼曼,王佳,李娜,等. 大蒜素对急性酒精性肝损伤小鼠肠道菌群失调的预防作用[J].中国微生态学杂志,2018,30(4):409-413.
Wu MM, Wang J, Li N, et al. The preventive effects of allicin on the intestinal microflora imbalance in acute alcohol-induced hepatic injury mice [J]. Chin J Microecol, 2018, 30(4): 409-413.

[5] 朱春胜,张冰,林志健,等. 菊苣降尿酸药效验证[J]. 中华中医药杂志,2018,33(11):4933-4936.
Zhu CS, Zhang B, Lin ZJ, et al. Pharmacodynamics authentication research on uric acid-lowering active ingredients of Cichorium intybus L[J]. Chin J Trad Chin Med, 2018, 33(11): 4933-4936.

[6] 高倩,王友明,吴旧生. 肠道菌群变化对实验小鼠肠黏膜免疫的影响 [J].中国实验动物学报,2012,20(5):45-49.
Gao Q, Wang YM, Wu JS. Impact of intestinal flora changes on the intestinal mucosal immunity in laboratory mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2012, 20(5): 45-49.

[7] 于江明,王秋菊,刘勃麟,等. 不同饲养密度对笼养蛋鸡十二指肠肠道菌群的影响 [J]. 动物营养学报,2016,28(3): 899-907.
Yu JM, Wang QJ, Liu BL, et al. Effects of different stocking density on microbial flora of duodenum for caged layer[J]. Chin J Anim Nutr, 2016, 28(3): 899-907.

[8] 付骞卉,柯愈诗,宋铭晶,等. 野罂粟碱对哮喘和溃疡性结肠炎模型大鼠肺及结肠组织相同差异表达基因的干预作用[J]. 中国比较医学杂志,2019,29(3):7-13.
Fu QH, Ke YS, Song MJ, et al. Effect of intervention with Papaver nudicaule L. on the same differentially expressed genes in lung and colon tissues of asthmatic and ulcerative colitis rats [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(3): 7-13.

[9] Guo Z, Zhang J, Wang Z, et al. Intestinal microbiota distinguish gout patients from healthy humans [J]. Sci Rep, 2016, 6: 20602.

[10] 王力,方志荣,沈雅庭等. 酪酸梭菌对高尿酸血症大鼠血尿酸及炎性因子水平的影响[J]. 南方医科大学学报,2017,37(5):678-682.
Wang L, Fang ZR, Shen YT, et al. Effects of Clostridium butyricum on serum uric acid and inflammatory mediators in rats with hyperuricemia[J]. J South Med Univ, 2017, 37(5): 678-682.

[11] Chiaro TR, Soto R, Zac Stephens W, et al. A member of the gut mycobiota modulates host purine metabolism exacerbating colitis in mice [J]. Sci Transl Med, 2017, 9(380): eaaf9044.

[12] 陈婷. 口腔细菌的新种属及其生物学特性[J]. 国际口腔医学杂志,2011,38(2):181-184.
Chen T. Novel genera and its biological characteristics of oral bacteria [J]. Int J Stomatology, 2011, 38(2): 181-184.

[13] Onrust L, Petzoldt D, Eeckhaut V, et al. Caecibacterium sporoformans gen. nov., sp. nov., an anaerobic, butyrate-producing, spore-forming bacterium isolated from chicken caecum [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2017, 67(11):4589 - 4594.

[14] 王雨,林志健,边猛,等. 维药菊苣提取物对高尿酸血症状态下肠道屏障的影响 [J]. 中华中医药杂志,2018,33(5):1718-1723.
Wang Y, Lin ZJ, Bian M, et al. Effects on intervention of intestinal barrier with uyghur medicine Cichorium intybus Linn in hyperuricemia [J]. Chin J Trad Chin Med, 2018, 33(5):1718-1723.

[15] Luo Q, Cheng D, Huang C, et al. Improvement of colonic immune function with soy isoflavones in high-fat diet-induced obese rats [J]. Molecules, 2019, 24(6):E1139.

[16] 黄胜男,林志健,张冰,等. 菊苣干预高尿酸血症鹌鹑尿酸及相关代谢酶活性研究 [J]. 中药新药与临床药理,2015,26(1):9-13.
Huang SN, Lin ZJ, Zhang B, et al. Effect of Chicory on uric acid and uricopoiesis metabolic enzymes activities of hyperuricemia quail [J]. Trad Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2015, 26(1): 9-13.

[17] Xu MX, Wang M, Yang WW, et al.Gold-quercetin nanoparticles prevent metabolic endotoxemia-induced kidney injury by regulating TLR4/NF-κB signaling and Nrf2 pathway in high fat diet fed mice [J]. Int J Nanomedicine. 2017, 14: 327 - 345.

[18] Miragoli F, Federici S, Ferrari S, et al. Impact of cystic fibrosis disease on archaea and bacteria composition of gut microbiota [J]. FEMS Microbiol Ecolo, 2017, 93(2):1-13.

[19] 刘凯,王凡,李祥,等. 利用 PCR-DGGE 分析有机物对厌氧氨氧化菌群的影响[J]. 基因组学与应用生物学,2019,38(1):205-211.
Liu K, Wang F, Li X, et al. Analysis of the Effects of organics on anammox microbial community by PCR-DGGE[J]. Genom Appl Biol, 2019, 38(1): 205-211.

[20] 郑华龙,王胜猛,文志远,等. 双歧杆菌四联活菌联合多烯磷脂酰胆碱对非酒精性脂肪肝患者糖、脂、尿酸代谢的影响[J]. 广西医科大学学报,2018,35(10):1406-1410.
Zheng HL, Wang SM, Wen ZY, et al. Effects of Bifidobacterium tetravaccine tablet combined with polyenylphosphatidy alcholine on blood sugar, blood lipids and uric acid levels in patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. J Guangxi Med Univ, 2018, 35(10): 1406-1410.

[收稿日期] 2019-07-18

蒋一之,朱晓宇,李露露,等. 斑马鱼功效模型在验证乳制品补钙和促进肠蠕动中的应用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 23-28.
Jiang YZ, Zhu XY, Li LL, et al. Dairy products supplement calcium and promote intestinal motility in zebrafish models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 23-28.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.004

斑马鱼功效模型在验证乳制品补钙和促进肠蠕动中的应用

蒋一之[1],朱晓宇[2],李露露[1,2],俞航萍[2],荣佳[1],李春启[1,2,3*]

(1. 南京新环检测科技有限公司,南京 210032; 2. 杭州环特生物科技股份有限公司, 杭州 310051;
3. 浙江省人用物品安全性评价技术研究重点实验室早期评价基地, 杭州 310053)

【摘要】 目的 基于斑马鱼补钙和肠蠕动模型,验证和对比不同牛奶补钙和酸奶促进肠蠕动的作用效果。**方法** 选择发育健康且阶段一致的 3 dpf 野生型斑马鱼,加入不同浓度(2.5、5.0、10.0 mg/mL)的纯牛奶稀释液,同时设置空白对照组。处理至 7 dpf 后,用 2 mg/mL 钙黄绿素染色,在荧光显微镜下观察拍照,计算斑马鱼的椎骨荧光强度。选取 5 dpf 的斑马鱼,用尼罗红染料处理 16 h,加入不同浓度(2.5、5.0、10.0 mg/mL)的酸奶和乳酸菌饮料稀释液,同时设置空白对照组。处理 24 h 后,在荧光显微镜下观察拍照,计算斑马鱼肠道内荧光强度。**结果** 纯牛奶、酸奶和乳酸菌饮料作用效果都随浓度的增加而增强。与空白对照组比较,6 种纯牛奶中 2 种纯牛奶处理的斑马鱼骨骼荧光强度有一定增加;8 种酸奶和乳酸菌饮料都显著引起了肠道荧光强度的减弱,酸奶的效果优于乳酸菌饮料。**结论** 纯牛奶、酸奶和乳酸菌饮料对斑马鱼的最大耐受浓度(MTC)为 10 mg/mL,且对斑马鱼起到补钙和促进肠蠕动的作用。

【关键词】 斑马鱼;乳制品;补钙;促进肠蠕动
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0023-06

Dairy products supplement calcium and promote intestinal motility in zebrafish models

JIANG Yizhi[1], ZHU Xiaoyu[2], LI Lulu[1,2], YU Hangping[2], RONG Jia[1], LI Chunqi[1,2,3*]

(1. NewHunter Testing Technology Company, Nanjing 210032, China. 2. Hunter Biotechnology, Inc., Hangzhou 310051.
3. Early Test Base of Zhejiang Province Key Labrotary of Human Supplier Safety Evaluation, Hangzhou 310053)
Corresponding author: LI Chunqi. E-mail: jackli@zhunter.com

【Abstract】 Objective To validate and compare the functions of calcium supplementation and intestinal peristalsis promotion between two brands of dairy products using zebrafish models. **Methods** Zebrafish embryos at 3 days post fertilization (dpf) were selected and exposed to UHT(ultra heat treated) milk at 0 (blank control), 2.5, 5.0, and 10.0 mg/mL for 96 h. After treatment, zebrafish were stained with calcein and observed under a stereofluorescent microscope to measure the fluorescence intensity of vertebrae. Zebrafish were also fed with Nile red at 5 dpf for 16 h, followed by a 24 h exposure to the same concentrations of yogurt and lactobacillus beverage. Intestinal tract fluorescence was measured to assess the ability of intestinal peristalsis promotion. **Results** UHT milk, yogurt, and lactobacillus beverage all increased the zebrafish vertebrate fluorescent intensity and intestinal motility in a concentration-dependent manner. Compared with the

[**基金项目**]国家"重大新药创制"科技重大专项(2017ZX09031059)。
Funded by National Science and Technology Major Project of "Creation and Manufacture of Major New Drugs" (2017ZX09031059).
[**作者简介**]蒋一之(1992—)女,助理研究员,研究方向:食品安全。Email:yzjiang0415@163.com
[**通信作者**]李春启(1963—)男,博士,教授级高级工程师,研究方向:药理毒理。Email:jackli@zhunter.com

blank control, 2 of the 6 types of UHT milk increased vertebrate fluorescent intensity; and 8 types of yogurt and lactobacillus beverage significantly elevated intestinal motility, although yogurt was better than the lactobacillus beverage. **Conclusions** The maximum tolerable concentration (MTC) of UHT milk, yogurt, and lactobacillus beverage is 10.0 mg/mL in zebrafish. These dairy products have the same functions in zebrafish as in humans in term of calcium supplementation and intestinal peristalsis effect.

【**Keywords**】 zebrafish; dairy products; calcium supplementation; intestinal peristalsis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

随着经济的发展,乳制品市场的逐渐扩大,牛奶和酸奶成为了非常受欢迎的饮品。消费者在选择牛奶和酸奶品质除去口味营养,还会关注牛奶的补钙和酸奶促进肠胃蠕动这两方面。因此评价牛奶和酸奶的品质有必要引入生物学评价,通过生物指标能直观反映产品的营养等品质。

斑马鱼是一种新型的实验动物,与传统小鼠相比,斑马鱼实验速度快、高效、低成本[1]。斑马鱼体积小,发育快,且和人类具有高度同源性,有相似的器官、生理功能和信号通路[2-3]。斑马鱼生物学评价能够完善现有的食品检测技术和品质评价体系方法,为优质产品的筛选和评价提供了一种新方法。

钙黄绿素是一种荧光染料,与体内钙离子结合[4],而骨骼主要是有钙化结构组成[5],可用于检测斑马鱼骨骼钙水平。同样是荧光染料尼罗红在斑马鱼体内不被其他组织干扰,并不会被吸收[6],通过定量斑马鱼胃肠道内的尼罗红可评价促肠蠕动作用。本研究以斑马鱼前 3 根椎骨的荧光强度和肠道内尼罗红的荧光强度为指标,快速评价纯牛奶补钙和酸奶促进肠道蠕动功能,为牛奶和酸奶品质的生物学评价提供科学参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验用斑马鱼为野生型 AB 品系斑马鱼,胚胎的繁殖以自然成对交配的方式进行。胚胎置于标准稀释水中(标准稀释水:294.0 mg/L $CaCl_2 \cdot 2H_2O$、123.3 mg/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、63.0 mg/L $NaHCO_3$ 和 5.5 mg/L KCl),在 28℃ 条件下孵化。本研究实验单位杭州环特生物科技股份有限公司已获得实验动物使用许可证【SYXK(浙)2012-0171】,并通过国际 AAALAC 认证(001458)。

1.1.2 试剂与仪器

甲基纤维素(079K0054 V, Sigma);6 孔板(090119BA01, Nest);尼罗红 Nile Red(N3013-100MG, Sigma);钙黄绿素(MKCH3930, Sigma);DMSO(BCBT0803, Sigma);A、B 两个品牌的纯牛奶(A0、A1、A2、B0、B1 和 B2,其中 A0 和 B0 为普通纯牛奶,A1 和 B1 为高钙牛奶,A2 和 B2 为高端纯牛奶)、酸奶(A3、A5、A6、B3、B5 和 B6)和乳酸菌饮料(A4 和 B4)(购于世纪联华江晖路店,杭州);荧光显微镜(AZ100, Nikon);与显微镜相连的相机(TK-C1481EC, Nikon);精密电子天平(cp214, OHAUS)。

1.2 方法

1.2.1 纯牛奶 LC_{10}、LC_{50} 和最大耐受浓度(maximum tolerable concentration, MTC)测定

随机选取 930 尾发育健康且阶段一致的 3 dpf 斑马鱼于六孔板中,每孔 30 尾。分别加入浓度为 10、14.3、20.1、28.4 和 40 mg/mL 的 6 种牛奶稀释液(标准稀释水稀释),每孔 3 mL,每天换液,处理 96 h,同时设置正常对照组(标准稀释水处理组)。实验结束后,统计各实验组斑马鱼死亡数量,用 OriginPro 8 软件拟合,计算 LC_{10}、LC_{50} 和 MTC。

1.2.2 牛奶补钙效果评价

随机选取 570 尾发育健康且阶段一致的 3 dpf 的野生型斑马鱼于 6 孔微孔板中,每孔 30 尾,分别暴露于 MTC/4、MTC/2 和 MTC 的 6 种纯牛奶稀释液中,同时设置正常对照组;样品处理斑马鱼至 7 dpf,使用 2 mg/mL 钙黄绿素染色。染色后,每实验组随机选择 10 尾斑马鱼,在显微镜下拍照并采集数据,计算斑马鱼前 3 根椎骨的荧光强度(S),补钙作用的计算公式如下:

$$\text{补钙作用}(\%) = \frac{S_{\text{实验组}}}{S_{\text{正常对照组}}} \times 100\%$$

1.2.3 酸奶和乳酸菌饮料 MTC 测定

随机选取 1230 尾发育健康且阶段一致的 6 dpf 斑马鱼于六孔板中,每孔 30 尾。分别加入浓度为 10、14.3、20.1、28.4 和 40 mg/mL 的 8 种酸奶稀释液,每孔 3 mL,处理 24 h,同时设置正常对照组。实验结束后,统计各斑马鱼死亡数,用 OriginPro 8 软件拟合,计算 LC_{10}、LC_{50} 和 MTC。

1.2.4　酸奶和乳酸菌饮料对肠蠕动的促进作用评价

随机选取 750 尾受精后 5 d(5 dpf)的野生型 AB 品系斑马鱼,水溶给予尼罗红 16 h 建立斑马鱼胃肠动力促进剂筛选模型。尼罗红移除后,将斑马鱼随机分配于六孔板中,每孔 30 尾。分别暴露于 MTC/4、MTC/2 和 MTC 的 8 种酸奶稀释液中,同时设置正常对照组。处理 24 h 后,每实验组随机选取 10 尾斑马鱼在荧光显微镜下拍照并采集数据,计算斑马鱼肠道内尼罗红荧光强度(S),肠蠕动的促进作用计算公式如下:

$$肠蠕动促进作用(\%) = \frac{S_{正常对照组} - S_{实验组}}{S_{正常对照组}} \times 100\%$$

1.3　统计学分析

统计学处理结果以平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 GraphPad Prism 5 统计软件进行方差分析和 Dunnetts' t 检验统计学分析,以 $P< 0.05$ 为差异有显著性。

2　结果

2.1　纯牛奶的 LC_{10}、LC_{50}和最大耐受浓度(MTC)测定

6 种纯牛奶的 MTC 均为 10 mg/mL。通过拟合的浓度-致死曲线得到 6 种纯牛奶的相应浓度都很相近,LC_{10} 为 12.9 ~ 14.5 mg/mL,LC_{50} 为 19.9 ~ 21.2 mg/mL。详见表 1。

2.2　纯牛奶补钙功能评价

A0 和 A2 在 10.0 mg/mL 浓度下分别引起斑马鱼骨骼中钙显著增加 1.39 倍($P< 0.05$)和 1.47 倍($P< 0.01$),和空白对照组有显著性差异。其他种类和浓度的纯牛奶未引起骨骼钙的显著增加($P> 0.05$)。详见表 2、图 1、图 2 和图 3。

表 1　6 种纯牛奶的 LC_{10}、LC_{50}和 MTC($n=30$)

Table 1　LC_{10}, LC_{50} and MTC of 6 kinds of UHT milk ($n=30$)

纯牛奶 UHT milk	浓度(mg/mL) Concentrations(mg/mL)			R^2
	MTC	LC_{10}	LC_{50}	
A0	10	14.5	20.5	0.99979
A1	10	14.5	20.6	0.99573
A2	10	13.6	21.2	0.99351
B0	10	14.3	20.5	0.9944
B1	10	13.2	19.9	0.9788
B2	10	12.9	20.2	0.99204

表 2　6 种纯牛奶补钙评价结果($n=30$)

Table 2　Evaluation results of calcium supplementation of 6 kinds of UHT milk ($n=30$)

组别 Groups	MTC 浓度(mg/mL) MTC concentrations(mg/mL)	脊椎骨荧光强度 Fluorescence intensity of vertebrae	骨骼中钙增加倍数 Calcium increase
空白对照 Control	-	57205 ± 7437	1
A0	2.5	60983 ± 3049	1.07
	5.0	72078 ± 2883	1.26
	10.0	79434 ± 3971	1.39*
A1	2.5	60805 ± 3648	1.06
	5.0	62892 ± 4402	1.10
	10.0	63497 ± 3174	1.11
A2	2.5	58349 ± 1166	1.02
	5.0	74626 ± 5970	1.30
	10.0	84091 ± 8409	1.47**
B0	2.5	61605 ± 3696	1.08
	5.0	62977 ± 4408	1.10
	10.0	70934 ± 3546	1.24
B1	2.5	58921 ± 5892	1.03
	5.0	59493 ± 4164	1.04
	10.0	60883 ± 3044	1.06
B2	2.5	57777 ± 2888	1.01
	5.0	63497 ± 5079	1.11
	10.0	60065 ± 3603	1.05

注:与空白对照组比较,* $P< 0.05$,** $P< 0.01$,*** $P< 0.001$。下表/图同。

Note. Compared with the control group, * $P< 0.05$, ** $P< 0.01$, *** $P< 0.001$. The same in the following tables and figures.

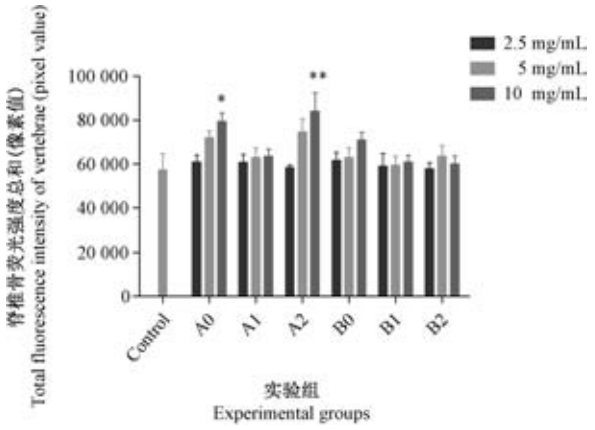


图 1 6 种纯牛奶处理斑马鱼后各组斑马鱼脊椎骨荧光强度总和

Figure 1 Total fluorescence intensity of vertebrae of zebrafish in each group after treatment with 6 kinds of UHT milk

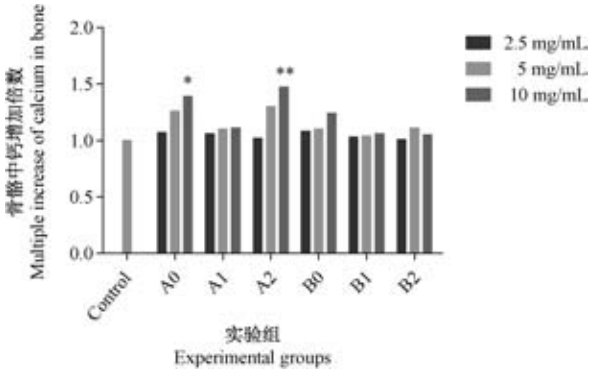


图 2 6 种纯牛奶处理斑马鱼后各组斑马鱼骨骼中钙增加倍数

Figure 2 Increase of calcium in zebrafish bones of each group after 6 UHT milk treatments

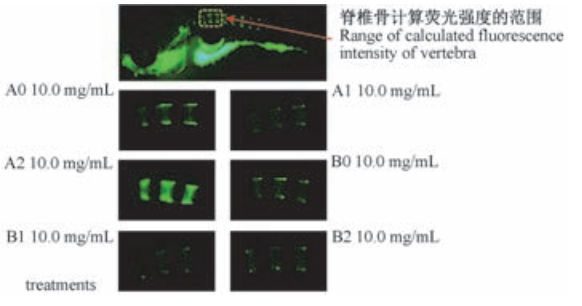


图 3 6 种纯牛奶处理斑马鱼后最高浓度组斑马鱼骨骼中荧光强度对比

Figure 3 Comparison of fluorescence intensity in the bones of zebrafish treated with 6 kinds of UHT milk at the highest concentration

2.3 酸奶和乳酸菌饮料的 LC_{10}、LC_{50}和 MTC 测定

8 种酸奶和乳酸菌饮料的 MTC 均为 10 mg/mL。通过拟合的浓度-致死曲线得到酸奶和乳酸菌饮料的相应浓度都很相近，LC_{10}为 12.7 ~ 15.6 mg/mL，LC_{50}为 18.9 ~ 21.1 mg/mL。详见表 3。

2.4 酸奶和乳酸菌饮料对肠蠕动促进作用评价

实验组斑马鱼的肠道荧光信号强度平均值均显著低于空白对照组($P > 0.05$)，说明酸奶和乳酸菌饮料均促进斑马鱼肠道蠕动。A3 和 B3 为常温酸奶，A4 和 B4 为冷藏乳酸菌饮料，这两组内不同品牌同类酸奶和乳酸菌饮料对肠蠕动的促进作用没有显著性的差异($P > 0.05$)。A5、B5、A6 和 B6 四种冷藏酸奶中，A5、B5 和 B6 三种酸奶间肠蠕动促进作用不存在显著性差异($P > 0.05$)，但是作用都显著优于 A6 酸奶($P < 0.001$)。同品牌内不同酸奶和乳酸菌饮料促进肠蠕动作用存在差异，A5 > A3 > A6 > A4，B5 > B3 > B6 > B4，两款常温酸奶作用都介于同品牌的两种冷藏酸奶中间；两款乳酸菌饮料的作用均显著差于酸奶($P < 0.001$)。(见表 4，图 4、5、6)

表 3 8 种酸奶和乳酸菌饮料的 LC_{10}、LC_{50}和 MTC($n = 30$)

Table 3 LC_{10}, LC_{50} and MTC of 8 kinds of yogurt and lactobacillus beverage ($n = 30$)

酸奶/乳酸菌饮料 Yogurt/ Lactobacillus beverage	浓度(mg/mL) Concentrations(mg/mL)			R^2
	MTC	LC_{10}	LC_{50}	
A3	10	14.9	19.5	0.99949
A4	10	15.6	19.6	0.99878
A5	10	14.3	20.1	0.99977
A6	10	14.9	21.1	0.99952
B3	10	14.7	20.4	0.9991
B4	10	15.9	20.3	0.9992
B5	10	12.9	19.7	0.98847
B6	10	12.7	18.9	0.99636

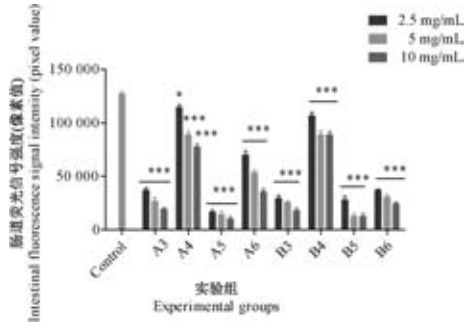


图 4 8 种酸奶和乳酸菌饮料处理斑马鱼后各组斑马鱼肠道荧光信号强度

Figure 4 Intestinal fluorescent signal intensity of zebrafish in each group after treatment with 8 yoghurt and lactobacillus beverage

表 4　8 种酸奶和乳酸菌饮料肠蠕动促进作用评价实验结果($n=30$)

Table 4　Evaluation results of 8 kinds of yogurt and lactobacillus beverage for promoting intestinal peristalsis ($n=30$)

组别 Groups	MTC 浓度(mg/mL) MTC concentrations(mg/mL)	肠道荧光信号强度(像素) Intestinal tract fluorescence(px)	肠蠕动促进作用(%) Function of intestinal motility (%)
空白对照 Control	–	127030 ± 2278	–
A3	2.5	36839 ± 2332	71 ***
	5.0	26676 ± 3157	79 ***
	10.0	19055 ± 1642	85 ***
A4	2.5	114327 ± 2825	10 *
	5.0	88921 ± 3160	30 ***
	10.0	77488 ± 2447	39 ***
A5	2.5	16514 ± 1903	87 ***
	5.0	13973 ± 2947	89 ***
	10.0	10162 ± 2497	92 ***
A6	2.5	69867 ± 3814	45 ***
	5.0	53353 ± 2865	58 ***
	10.0	35568 ± 2784	72 ***
B3	2.5	29217 ± 3182	77 ***
	5.0	25406 ± 1615	80 ***
	10.0	17784 ± 2519	86 ***
B4	2.5	106705 ± 3114	16 ***
	5.0	88921 ± 3505	30 ***
	10.0	88921 ± 3224	30 ***
B5	2.5	27947 ± 3457	78 ***
	5.0	12703 ± 2052	90 ***
	10.0	12703 ± 2580	90 ***
B6	2.5	36839 ± 1107	71 ***
	5.0	30487 ± 2272	76 ***
	10.0	24136 ± 1642	81 ***

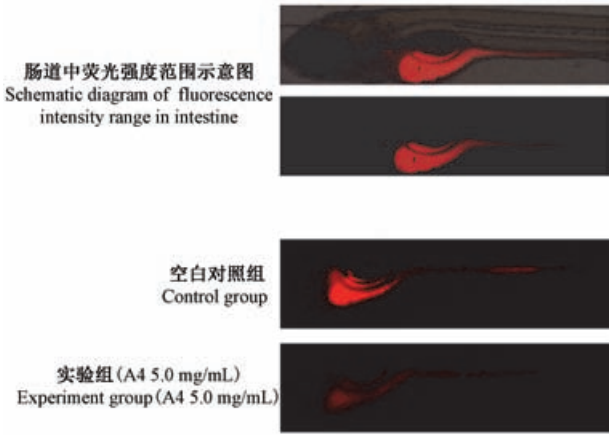


图 5　酸奶和乳酸菌饮料处理后斑马鱼肠道内荧光强度变化

Figure 5　Changes of intestinal fluorescence intensity of zebrafish treated with yoghurt and lactobacillus beverage

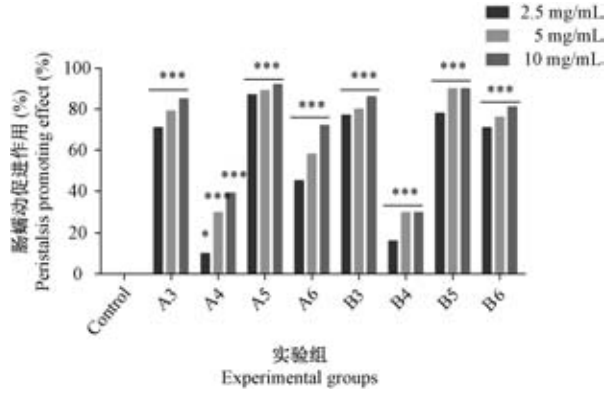


图 6　8 种酸奶和乳酸菌饮料对斑马鱼肠道肠蠕动的促进作用

Figure 6　Effects of 8 kinds of yoghurt and lactobacillus beverage on intestinal peristalsis of zebrafish

3 讨论

牛奶中钙的存在形式主要是乳钙,其主要成分是磷酸钙[7]。乳钙被认为是容易消化吸收并且营养价值最好的钙来源[8-9]。普通纯牛奶和高端纯牛奶在加工过程中没有添加其它物质,钙全部来源于生牛乳,而高钙牛奶中的乳钙因为添加的碳酸钙等破坏了原有的平衡而析出[10-11],虽总体钙含量增加,但吸收利用度高的乳钙减少,可能高钙牛奶的补钙效率并没有优于普通纯牛奶。

研究表明酸奶和乳酸菌饮料具有促进肠道蠕动的作用[12-15],与本次实验的结果相同,所有酸奶和乳酸菌饮料均有促进了肠道蠕动作用,但酸奶明显优于乳酸菌饮料,且活菌数量很少的常温酸奶和冷藏酸奶作用相近。用于酸奶和乳酸菌饮料加工的双歧杆菌、乳酸菌等菌种属于肠道有益菌,有益菌和其代谢产物都能改善肠道功能,促进肠道蠕动[16]。

实验对纯牛奶补钙以及酸奶和乳酸菌饮料促进肠蠕动两方面进行了生物学评价,结果与一般消费者的想法存在差别,但是同时是能够指导消费者进行正确选择。不同纯牛奶、酸奶和乳酸菌饮料作用的差别只进行了简短的讨论,需要后续实验进行更深入的研究。

参 考 文 献(References)

[1] Lieschke GJ, Currie PD. Animal models of human disease: zebrafish swim into view[J]. Nat Rev Genet, 2007, 8(5): 353-367.

[2] Rubinstein AL. Zebrafish: from disease modeling to drug discovery[J]. Curr Opin Drug Discov Devel, 2003, 6(2): 218-223.

[3] Voelker D, Vess C, Tillmann M, et al. Differential gene expression as a toxicant-sensitive endpoint in zebrafish embryos and larvae[J]. Aquat Toxicol, 2007, 81(4): 355-364.

[4] Du SJ, Frenkel V, Kindschi G, et al. Visualizing normal and defective bone development in zebrafish embryos using the fluorescent chromophore calcein[J]. Dev Biol, 2001, 238(2): 239-246.

[5] Ducy P. The Osteoblast: A Sophisticated fibroblast under central surveillance[J]. Science, 2000, 289(5484): 1501-1504.

[6] Fowler SD, Greenspan P. Application of Nile red, a fluorescent hydrophobic probe, for the detection of neutral lipid deposits in tissue sections: comparison with oil red O[J]. J Histochem Cytochem, 1985, 33(8): 833-836.

[7] 邵胜荣,孙俊. 乳矿物盐的研究动态及应用进展[J]. 食品安全导刊, 2013,7(1): 58-59.
Shao SR, Sun J. Research and application progress of milk mineral salts[J]. Chin Food Safety, 2013,7(Z1): 58-59.

[8] Gallaher BW, Kruger MC, Schollum LM. Bioavailability of calcium is equivalent from milk fortified with either calcium carbonate or milk calcium in growing male rats[J]. Nutr Res, 2003, 23(9): 1229-1237.

[9] Lee WTK, Jiang J, Lai XJ, et al. Calcium absorption from calcium fortified soymilk and cow's milk in postmenopausal Chinese women with suboptimal serum 25-hydroxyvitamin D status[J]. Bone, 2008, 43(1): 31-32.

[10] 季万兰,丁美琴. 高钙奶的研究[J]. 食品工业科技, 2006, 28(3): 124-125.
Ji WL, Ding MQ. Development of a calcium-enriched milk[J]. Sci Technol Food Ind, 2006,28(3): 124-125.

[11] 张锋华,张云,孟令洁,等. 高钙牛奶稳定性研究[J]. 乳业科学与技术, 2009, 32(2): 63-66.
Zhang FH, Zhang Y, Meng LJ, et al. Study on the stability of high-calcium milk [J]. J Dairy Sci Tech, 2009, 32(2): 63-66.

[12] 李勇,董翠芳. 酸奶生产过程中的关键控制点及影响酸奶品质的因素[J]. 饮料工业, 2008, 11(3): 30-34.
Li Y, Dong CF. On critical control points in yoghurt production and factors affecting yoghurt quality [J]. Beverage Ind, 2008, 11(3): 30-34.

[13] 安颖,蔡东联,郝林科,等. "畅轻"Pro-ABB 酸奶促进人体肠道健康功效研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2009, 13(5): 583-586.
An Y, Cai AL, Hao LK, et al. Study on evaluating the promote effect of a Pro-ABB yogurt on physical intestinal canal [J]. Chin J Dis Contr Prev, 2009, 13(5): 583-586.

[14] 蔡东联,伍佩英,杨振南,等. 味全乳酸菌饮料促进人体肠道健康功效的临床研究 [J]. 中华疾病控制杂志, 2010, 14(6): 570-574.
Cai DL, Wu PY, Yang ZN, et al. Study on evaluating the promote effect of Wei-Chuan Active Lactobacillus Drinks on physical intestinal canal health [J]. Chin J Dis Contr Prev, 2010, 14(6): 570-574.

[15] 安颖,李艳杰,张海斌,等. "每益添活性乳酸菌饮料"免疫调节和肠道调节功效临床试验 [J]. 中华疾病控制杂志, 2012, 16(7): 629-632.
An Y, Li YJ, Zhang HB, et al. Study on evaluating the promote effect of Mei Yi Tian Active Lactobacillus Drtnks on immunity and physical intestinal canal [J]. Chin J Dis Contr Prev, 2012, 16(7): 629-632.

[16] 崔艳,张亚伟,肖林,等. 肠道有益菌及代谢产物对肠道和人体的影响 [J]. 生物产业技术, 2017,9(1): 91-94.
Cui Y, Zhang YW, Xiao L, et al. Effect of intestinal beneficial bacteria and their metabolites on the intestinal and human body [J]. Biotechnol Bus, 2017,9(1): 91-94.

[收稿日期] 2019-12-04

余露军,李建军,蔡磊,等. 诸氏鳙虾虎鱼出血病病原鉴定及传播途径分析 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 29-35.
Yu LJ, Li JJ, Cai L, et al. Identification of the pathogen responsible for causing hemorrhage in *Mugilogobius chulae* and its transmission routes [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 29-35.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.005

诸氏鳙虾虎鱼出血病病原鉴定及传播途径分析

余露军,李建军,蔡磊,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】 目的 分离鉴定诸氏鳙虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*)出血病病原,并探讨其传播途径,为虾虎鱼微生物质量控制提供技术依据。**方法** 从患出血病虾虎鱼肝脏取样分离病原菌,经菌落形态、生化特性和分子特征鉴定细菌,回归感染确定其致病性,并采用双重 PCR 方法对虾虎鱼、轮虫、卤虫、水进行嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)检测。**结果** 分离到 1 株优势菌 PYMc15-1,该菌株 API 生化反应结果与嗜水气单胞菌一致,*gryB* 序列与 GenBank 上的嗜水气单胞菌相应基因序列同源性最高;根据已知序列构建 *gry*B 分子系统进化树,分离株 PYMc15-1 与嗜水气单胞菌聚类;分离株 PYMc15-1 溶血素基因(*hly*A)和气溶素基因(*aer*A)检测结果阳性,对虾虎鱼半致死剂量(median lethal dose, LD_{50})为每尾 1.2×10^4 cfu。野生虾虎鱼、卤虫和野生轮虫致病性嗜水气单胞菌检测出现阳性结果,虾虎鱼封闭群、室内培育的轮虫以及海水样品致病性嗜水气单胞菌检测均为阴性。**结论** 嗜水气单胞菌可自然感染虾虎鱼;野生虾虎鱼和生物饵料是其潜在传播媒介,引进虾虎鱼和生物饵料时应检测该病原。

【关键词】 诸氏鳙虾虎鱼;嗜水气单胞菌;生物饵料;传播途径
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0029-07

Identification of the pathogen responsible for causing hemorrhage in *Mugilogobius chulae* and its transmission routes

YU Lujun, LI Jianjun, CAI Lei, HUANG Ren*

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

Corresponding author: HUANG Ren. E-mail: 1649405216@qq.com

【Abstract】 Objective To isolate and identify the pathogen responsible for causing hemorrhage in *Mugilogobius chulae*, and to investigate its route of transmission, providing a technical basis for microbial quality control in *M. chulae*. **Methods** The pathogen was isolated from the liver of diseased *M. chulae*. The morphological, biochemical, and molecular characteristics were used to identify the isolated bacteria. An artificial infection experiment was carried out to assess the pathogenicity of isolated strains. Double PCR of *Aeromonas hydrophila* virulence genes was used to screen samples of *M. chulae*, *Brachionus plicatilis*, *Artemia* nauplii, and water. **Results** The dominant strain PYMc15-1 was isolated from diseased *M. chulae*. The characteristics (API ID32E) of PYMc15-1 corresponded to *A. hydrophila*. The gyrase subunit B (*gryB*) gene sequence of the strain possessed high similarity with those of *A. hydrophila* registered in GenBank. Phylogenetic tree analysis of *Aeromonas* based on the *gryB* gene showed that strain PYMc15-1 clustered together with *A. hydrophila*. The hemolysin (*hlyA*) and gas lysin (*aerA*) genes could be amplified from the strain PYMc15-1, and the

[**基金项目**]国家科技支撑计划项目(2015BAI09B05)。
Funded by National Key Technologies R&D Program of China (2015BAI09B05).
[**作者简介**]余露军(1982—),男,硕士,工程师,研究方向:水生实验动物微生物学。Email: ljyu1212@163.com
[**通信作者**]黄韧(1959—),男,博士,研究员,研究方向:实验动物学。Email:1649405216@qq.com

median lethal dose (LD_{50}) of PYMc15-1 to healthy *M. chulae* was 1.2×10^4 cfu/fish. Wild *M. chulae*, *Artemia* nauplii, and wild *B. plicatilis* were positive for pathogenic *A. hydrophila*, while the closed colony of *M. chulae*, indoor cultured *B. plicatilis*, and seawater samples were negative for pathogenic *A. hydrophila*. **Conclusions** *A. hydrophila* can naturally infect *M. chulae*. For wild *M. chulae*, living feeds are potential vectors of *A. hydrophila*. *A. hydrophila* should be tested when introducing *M. chula* and living feeds.

【**Keywords**】 *Mugilogobius chulae*; *Aeromonas hydrophila*; living feeds; transmission routes

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

诸氏鰕虎鱼(*Mugilogobius chulae*)属于鲈形目(Perciformes)、虾虎鱼亚目(Gobioidei)、虾虎鱼科(Gobiidae)、鰕虎鱼属(*Mugilogobius*),在我国南海、东海等西太平洋近海海域广泛分布,是我国实验动物化水平最高的本土海洋实验鱼类,具有体形小、胚胎透明、繁殖量大、繁殖周期短等特点[1]。虾虎鱼已在海洋环境重金属[2]、多环芳烃[3]等多种污染物的毒性评价和疾病模型研究[4]中广泛应用,显示出良好的应用前景。

广东省实验动物监测所先后开展虾虎鱼全人工繁殖、封闭群和近交系培育,以及种质、遗传、微生物和寄生虫、饲料及环境设施等质量控制标准体系研究[1],其中病原项目是虾虎鱼质量控制的重要内容。目前,已有迟缓爱德华菌[5]、创伤弧菌[6]感染引起虾虎鱼"溃烂病"和"败血症"的研究报道,而对虾虎鱼"出血病"的病原研究尚未见报道。石斑鱼、对虾等多种水生经济动物研究表明,外来动物个体、生物饵料、水源是水生动物病原传播的主要途径[7-8]。相对经济鱼类而言,实验鱼的养殖条件相对封闭和可控,病原传播途径和风险也可能有所不同,但相关研究鲜有报道。本文对野外采样的患出血病虾虎鱼进行病原分析,并对不同来源的海水、生物饵料、鱼体等样品进行了病原检测,探讨实验鱼病原传播途径,为虾虎鱼微生物质量控制及病原防控策略提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验鱼

患病诸氏鰕虎鱼体长 2.5 ~ 3.5 cm,取自深圳大鹏湾野生群。回归感染实验用诸氏鰕虎鱼为本实验室封闭群子 14 代,4 ~ 5 月龄,体长 2.5 ~ 3.0 cm,循环水养殖,盐度 20 ~ 22,温度 25 ~ 27℃,光照:黑暗时间为 14 h:10 h。

1.1.2 试剂与仪器

脑心浸液培养基(Brian Heart Infusion Medium, BHI)(广州环凯公司,中国);细菌基因组试剂盒(天根公司,中国);Taq 酶(TaKaRa,日本)。

生物显微镜(Nikon Ci-S,日本);电子天平(常熟双杰测试仪器厂,中国);ATB 全自动细菌鉴定仪(梅里埃公司,法国);PCR 扩增仪(Techne Prime,英国);凝胶电泳仪和成像系统(Bio-Rad,美国)。

1.2 方法

1.2.1 病原菌的分离、纯化

挑选腹部红肿的个体,无菌操作解剖病鱼,并从肝脏部位取样划线接种于 BHI 平板,28℃恒温培养 24 h 后,挑取优势菌落在同样条件下进行纯化培养,用于细菌鉴定。

1.2.2 细菌鉴定

(1)生化鉴定:观察分离纯化的菌落形态,并通过革兰氏染色、氧化酶试验以及 API ID32E 试剂条进行鉴定。

(2)分子生物学鉴定:按细菌基因组试剂盒说明书提取新鲜培养菌液的 DNA,按 Zhang 等[9]的方法对嗜水气单胞菌 *gryB* 基因进行 PCR 扩增,参照饶静静等[10]的方法对嗜水气单胞菌溶血素基因(*hly*A)和气溶素基因(*ear*A)进行双重 PCR 扩增(引物浓度 1:3),引物序列见表 1。*gryB* 基因 PCR 反应条件为:95℃ 4 min,94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 60 s,30 个循环,72℃延伸 10 min。*aer*A 和 *hly*A 基因双重 PCR 反应条件为:95℃ 4 min,94℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 60 s,30 个循环,72℃延伸 10 min。*gry*B 基因 PCR 产物纯化后送上海生工进行序列测定,测序结果在 NCBI 进行 Blast 分析,选取相似序列 MEGA 4 软件构建系统发育树。

1.2.3 回归感染

挑取优势菌纯化后的单菌落接种于 BHI 液体

表 1　试验所用引物序列

Table 1　Sequences of the primers used in the experiment

基因名称 Gene name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	扩增产物(bp) Size of products(bp)
*gyr*B	GCCGAGCCCGACCATCTTCAG AGATCATCTTGTCGAAACGGGC	875
*hly*A	ACCTCAACGTCAACCGCAAGAT GTCTGCGCTTGTCGGTATCCTC	876
*aer*A	GCAGAGCCCGTCTATCCAGA CTCCAGCCTCAGGCCTTGAC	1332

培养基,28℃、180 r/min 震荡培养 24 h,新鲜培养的菌液 6000 r/min 离心 3 min 后,弃上清,无菌生理盐水重悬,用 ATB 比浊仪将菌液等比稀释至 1.8×10^8 ~ 1.8×10^4 cfu/mL。选取健康诸氏鲻虾虎鱼封闭群个体,每组 10 尾,腹腔注射,每尾注射 0.02 mL 菌液,同时设置生理盐水对照组。人工感染期间不投喂,静水养殖,水温 25 ~ 26℃,盐度 20 ~ 22,每天记录死亡数量并及时捞出死鱼,连续观察 10 d。按周一平[11]的方法计算半致死量(median lethal dose, LD_{50})。从感染后症状明显的个体肝脏组织再次进行细菌分离和回归感染。

1.2.4　病原传播途径分析

(1)样品采集

2016 年 3 月 ~ 6 月,先后从深圳大鹏湾、番禺南沙以及惠州大亚湾采集野生虾虎鱼(共 3 批次),3、5、8 月分别取本实验室培育的虾虎鱼封闭群(4 ~ 5 月龄,体长 2.5 ~ 3.0 cm,共 3 批次);从海南琼海、福建漳州、惠州大亚湾购买野生轮虫(各 2 批次),3、5、8 月分别取本室内培育轮虫(共 3 批次);从广州芳村花鸟鱼虫市场购买市售 6 个商品化的卤虫卵;3、5、8 月分别取购买的天然海水和封闭群养殖水样品(各 3 批次)。各批次样品取样方法如下:

鱼:随机取 3 尾虾虎鱼的肝、脾组织混合为一个样品;卤虫:卤虫卵在实验条件下[漂白水消毒处理的洁净海水盐度 28 ± 2,水温(28 ± 1)℃,光照 2000 Lux]孵化 24 h 后,新孵出的卤虫无节幼体经洁净海水清洗 3 次,取 0.1 mg(鲜重)卤虫无节幼体作为一个样品;轮虫:轮虫用 300 目纱绢网收集,并用洁净海水清洗 3 次,取 0.1 mg(鲜重)轮虫作为为一个样品;水:随机取新购天然海水和虾虎鱼封闭群养殖水各 10 mL 为一个样品。

(2)样品处理

无菌条件下,将鱼的肝脾组织、卤虫、轮虫匀浆后,按体积比 1:9加入灭菌碱性蛋白胨水;水样 8000 r/min 离心 3 min 后,弃上清,用 10 mL 灭菌碱性蛋白胨水重悬;28℃、150 r/min 增菌培养 12 h 后,取 2 mL 增菌液 12000 r/min 离心收集细菌,采用细菌基因组试剂盒提取总 DNA。

(3)样品检测

按 1.2.2(2)的方法对嗜水气单胞菌毒力基因 *hly*A 和 *ear*A 进行双重 PCR 扩增,检测致病性嗜水气单胞菌。

2　结果

2.1　诸氏鲻虾虎鱼出血病症状

患病虾虎鱼身体发黑,聚群沉底,活力下降,反应迟钝;腹部(尤其是肛门处)红肿充血;下颌及胸鳍、腹鳍基部出血,鳍条缺损;剖检可见腹腔有积水,肠系膜有出血点,并附着淡红色粘液。

2.2　分离株形态与生化特性

从临床症状典型个体的肝脏部位分离获得优势菌(编号 PYMc15-1),BHI 平板 28℃培养 24 h 后,PYMc15-1 菌落呈圆形凸起、淡黄色、半透明、表面光滑、直径约 1.0 ~ 1.5 mm,有特殊气味。革兰氏染色显示为阴性、杆菌,氧化酶反应为阳性。ATB 全自动细菌鉴定仪鉴定为嗜水气单胞菌,鉴定结果 ID:99.9%,T 值:0.72,详细生化结果见表 2。回归感染后二次分离的优势菌 PYMc15-1'生化特性与 PYMc15-1 一致。

2.3　*gryB* 基因序列分析

菌株 PYMc15-1 经嗜水气单胞菌 *gryB* 基因引物 PCR 扩增获得 800 bp 左右目的片段, *hly*A 和 *aer*A 基因双重 PCR 扩增获得 800 bp 和 1300 bp 左右目的片段(图 1)。*gryB* 产物序列 Blast 分析结果显示,菌株 PYMc15-1 与 GenBank 上登陆的嗜水气单胞菌(登录号 KX822741)同源性最高(98.5%)。菌株 PYMc15-1 *gryB* 序列聚类分析显示,PYMc15-1 与嗜水气单胞菌自然聚类(图 2)。上述结果表明,菌株 PYMc15-1 为嗜水气单胞菌,并具有潜在的致病性。

2.4　人工感染

人工感染健康虾虎鱼后第 2 天开始出现死亡,第 3 天、第 4 天为高峰,死亡个体腹部和肛门红肿充血,腹腔有大量积水。从第 4 天死亡个体肝脏部位分离细菌,获得优势菌 PYMc15-1,再次回归感染健康虾虎鱼,出现相似症状,表明本次试验分离的优势菌 PYMc15-1 为虾虎鱼出血病病原。

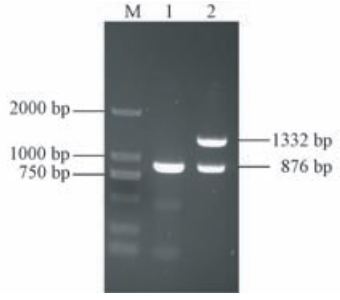
表 2 菌株 PYMc15-1 生化鉴定结果

Table 2 Results of biochemical identification of strain PYMc15-1

生化指标 Biochemical indicator	结果 Result	生化指标 Biochemical indicator	结果 Result
柠檬酸盐利用 Citrate assimilation	+	L-阿拉伯糖 L-Arabinose	+
衣康酸盐同化 Itaconate assimilation	−	肌醇 Inositol	−
2-酮基-葡萄糖 2-Keto-Gluconate glucose	−	5-酮基-葡萄糖 5-Keto-Gluconate	−
组氨酸同化 Histidine assimilation	+	糖原 Glycogen	+
麦芽糖 Maltose	+	L-岩藻糖 L-Fucose	−
甘露醇 d-Mannitol	+	葵酸盐 Kelly	+
丙氨酸同化 Alanine assimilation	+	乙酸盐 Acetate	+
3-羟基-丁酸盐 3-Hydroxy-Butyrate	−	d-葡萄糖 D-Glucose	+
DL-乳酸盐同化 DL-Lactate assimilation	+	辛二酸盐同化 Suberate assimilation	−
鼠李糖 Rahmnose	−	山梨醇 Sorbitol	−
丙酸盐同化 Propionate assimilation	+	丝氨酸同化 Serine assimilation	+
水杨素 Salicin	+	蔗糖 Saccharose	+
戊酸盐同化 Valerate assimilation	+	脯氨酸 Proline	+
4-羟基-苯甲酸盐同化 4-Hydroxy-Benzoate assimilation	−	N-乙酰葡萄糖胺 N-Acetylglucosamine	+
丙二酸 Malonic acid	−	d-核糖 D-ribose	+
d-蜜二糖 D-Honey disaccharide	−	3-羟基-苯甲酸盐同化 3-Hydroxy-Benzoate assimilation	−

注:“+”阳性;“−”阴性。

Note. “+” is positive; “−” is negative.



注:M 为 DL2000 bp Marker; 1 为 *gry*B 基因 PCR 产物;2 为 *aer*A 基因和 *hly*A 基因双重 PCR 产物。

图 1 菌株 PYMc15-1 gryB 基因、*aer*A 基因和 *hly*A 基因 PCR 检测电泳图

Note. M, DNA Marker DL 2000. 1, PCR product of gryB gene. 2, PCR products of *aer*A gene and *hly*A gene.

Figure 1 Electropherogram of strain PYMc15-1 gryB gene, *aer*A gene and *hly*A gene of detected by PCR

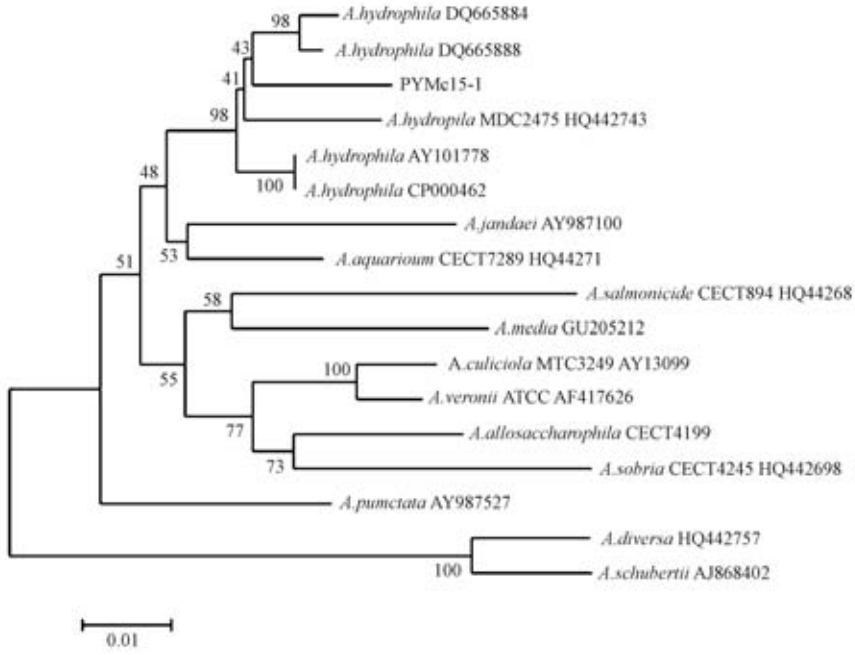
不同浓度的 PYMc15-1 菌液人工感染试验结果显示,2.1×10^8 cfu/mL 浓度组实验鱼全部死亡,生理盐水对照组实验鱼无死亡,菌株 PYMc15-1 对虾虎鱼的 LD_{50}为每尾 1.2×10^4 cfu(表 3)。

2.5 虾虎鱼、生物饵料及水的致病性嗜水气单胞菌检测

PCR 检测结果显示,野生虾虎鱼(1/3)、卤虫无节幼体(1/6)和野生轮虫(2/6)分别检出致病性嗜水气单胞菌,室内培育的轮虫以及天然海水、虾虎鱼封闭群养殖水均未检出致病性嗜水气单胞菌。

3 讨论

本研究从患病虾虎鱼肝脏分离到优势菌株 PYMc15-1,经生物学特性、生化鉴定和 *gry*B 基因序列同源性分析,鉴定为嗜水气单胞菌,并通过回归感染确定为虾虎鱼出血病病原,对虾虎鱼具有较强的致病性(LD_{50}为每尾 1.2×10^4 cfu),为我国海水实验鱼——虾虎鱼感染嗜水气单胞菌的首次报道。嗜水气单胞菌属弧菌科、气单胞菌属,广泛存在于水体、淤泥等环境中,具有广泛的致病性,可引起多种海、淡水水生动物爆发性出血病,常造成水产养殖重大的经济损失[12-13]。嗜水气单胞菌也是我国农业部《一、二、三类动物疫病病种名录》(2008 年)规定的二类疫病病原,需要采取严格控制、扑灭等措施,防止扩散的病原[14]。同时,我国淡水实验鱼斑马鱼和剑尾鱼已有嗜水气单胞菌感染导致细菌性败血症的报道[15-16];国内 19 家斑马鱼实验室调研结果发现,斑马鱼竖鳞、腹水是常见病害症状,虽然其病原尚未研究证实,但由于该症状与嗜水气单胞菌感染鱼类引起的临床症状类似[17-18],因此斑马鱼“竖鳞病”、“腹水病”很可能与嗜水气单胞菌感染有关。上述结果表明,嗜水气单胞菌对虾虎鱼、斑马鱼等海、淡水实验鱼均具有严重危害,在实验鱼生产和实验过程中应引起足够的重视并加以控制。



注：节点处数值为自展重复 1000 次的置信值。

图 2　基于气单胞菌属 *gryB* 基因序列的系统发育树

Note. The degree of confidence for each branch point was determined by bootstrap analysis (1000 repetitions).

Figure 2　Phylogenetic tree based on *gryB* gene sequences of *Aeromonas*

表 3　菌株 PYMc15-1 对虾虎鱼攻毒试验结果

Table 3　Results of of challenge test with strain PYMc15-1 in *M. chulae*

菌液浓度(cfu/mL) Bacterial concentration(cfu/mL)	试验鱼数(尾) Number of test fish	死亡数(尾) Number of deaths	半致死浓度(cfu/fish) LD_{50}(cfu/fish)
2.1×10^8	10	10	1.2×10^4
2.1×10^7	10	7	
2.1×10^6	10	5	
2.1×10^5	10	4	
2.1×10^4	10	3	
生理盐水 Physiological saline	10	0	

*gyr*B 是普遍存在于细菌中编码 DNA 促旋酶亚基 B 蛋白的单拷贝基因，每 100 万年的平均碱基替换率为 0.7% ~ 0.8%，其进化速率较 16S rRNA 快，且不发生水平转移，特别适用于气单胞菌、芽孢杆菌等近缘种的区别和鉴定[19-20]。气单胞菌属中常见的鱼类病原菌多达 20 余种，其中多个菌种亲缘关系接近，通过 16S rRNA 基因序列分析无法有效区分[21]。本研究对生化鉴定为嗜水气单胞菌的分离株 PYMc15-1 进行 *gyr*B 基因测序分析，其序列与已知的嗜水气单胞菌(登录号 KX822741)同源性达 98.5%，与同属不同种的温和气单胞菌(HQ442698)同源性则低于 91.7%，显示出较高的分辨率，可判定分离株 PYMc15-1 为嗜水气单胞菌。值得注意的是，嗜水气单胞菌有致病性菌株和非致病性菌株之分，朱大玲等[22]、王远微等[23]研究发现，只有致病性嗜水气单胞菌 *aer*A 基因呈阳性扩增；饶静静等[10]在致病性嗜水气单胞菌中至少扩增到 *aer*A 或 *hly*A 基因的一种，可见 *aer*A 基因和 *hly*A 基因是致病性嗜水气单胞菌最为关键的毒力基因。本实验对分离株 PYMc15-1 *aer*A 基因和 *hly*A 基因进行检测，结果显示为阳性；回归感染试验也表明该菌株对虾虎鱼具有致病性，表明分离株 PYMc15-1 为致病性嗜水气单胞菌。

PCR 检测方法已成为国外大型实验动物机构在实施实验动物质量监测和病原体诊断中的重要手段，在我国啮齿类实验动物病原检测中已有较多应用[24-25]。病原的传播主要有水平传播和垂直传播两种途径，大多数水生动物病原的传播以水平传播为主[26]。本研究采用嗜水气单胞菌 *hly*A 基因和 *aer*A 基因特异性引物对虾虎鱼养殖过程相关的鱼、

生物饵料、水等样品进行致病性嗜水气单胞菌检测,结果发现,野生虾虎鱼、卤虫和野生轮虫部分样品检出阳性,表明野生鱼体、卤虫和野生轮虫是嗜水气单胞菌潜在的传播媒介,这与 Yan 等[27]、Zhang 等[28]、宋晓玲等[29]研究结果一致。本实验中虾虎鱼封闭群及其养殖水、室内净化培育的轮虫均未检出致病性嗜水气单胞菌,说明通过鱼体隔离净化、水体消毒以及轮虫净化培育能有效控制病原的传播。不同来源、不同批次的 6 个卤虫样品检测中,有 1 个样品检出致病性嗜水气单胞菌,表明通过病原检测筛选合格的卤虫是必要的。鉴于生物饵料可能携带病原的情况,建议使用生物饵料时应采用净化培育、消毒等处理措施,并对各批次生物进行病原检测,以控制其病原微生物质量。

参 考 文 献(References)

[1] 李建军, 余露军, 蔡磊, 等. 诸氏鳗虾虎鱼实验动物化研究进展[J].中国实验动物学报, 2018, 26(4):493-498.
Li JJ, Yu LJ, Cai L, et al. Advances in research on *Mugilogobius chulae*, a laboratory marine fish resource[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 493-498.

[2] Guo Z, Gao N, Wu Y, et al. The simultaneous uptake of dietary and waterborne Cd in gastrointestinal tracts of marine yellow stripe goby *Mugilogobius chulae*[J]. Environ Pollut, 2017, 223(4): 31-41.

[3] Cai L, Li JJ, Yu LJ, et al. De novo transcriptome assembly of the new marine fish model of goby, *Mugilogobius chulae* [J]. Mar Genomics, 2018, 2018: 18-20.

[4] 余露军, 李建军, 魏远征, 等. GFP 标记的迟缓爱德华菌感染诸氏鳗虾虎鱼后组织分布研究 [J]. 海洋科学, 2018, 42(6):57-62.
Yu LJ, Li JJ, Wei YZ, et al. Infection kinetics of GFP-labeled *Edwarsiella tarda* in *Mugilogobius chulae* [J]. Mar Sci, 2018, 42(6):57-62.

[5] 余露军, 苗宗余, 蔡磊, 等. 诸氏鳗虾虎鱼“溃烂病”病原及其致病影响因子分析[J]. 南方水产科学, 2018, 14(5): 45-52.
Yu L, Miao ZY, Cai L, et al. Pathogenicity and impact factors of pathogen causing ulcer disease on *Mugilogobius chulae*[J]. South Chin Fish Sci, 2018, 14(5): 45-52.

[6] 余露军, 蔡磊, 陈小曲, 等. 诸氏鳗虾虎鱼致病性创伤弧菌的分离与鉴定[J]. 动物医学进展, 2015, 36(9): 51-54.
Yu LJ, Cai L, Chen XQ, et al. Isolation and identification of pathogenic *Vibrio vulnificus* from diseased *Mugilogobius chulae* [J]. Prog Vet Med, 2015, 36(9): 51-54.

[7] 林克冰, 方琼珊, 吴建绍, 等. 石斑鱼神经坏死病毒传播途径阻断的初步研究[J]. 福建水产, 2011, 33(5):15-19.
Lin KB, Fang QS, Wu JS, et al. Preliminary study on breaking transmission of NNV *Epinephelus coioides* [J]. Fujian Fish, 2011, 33(5):15-19.

[8] Yan DC, Dong SL, Huang J, et al. White spot syndrome virus (WSSV) transmission from rotifer inoculum to crayfish [J]. J Invertebr Pathol, 2007, 94(2): 144-148.

[9] Zhang D, Zhang Q, Li A, et al. Development of a multiplex PCR assay for rapid and simultaneous detection of four genera of fish pathogenic bacteria [J]. Lett Appl Microbiol, 2014, 59(5): 471-478.

[10] 饶静静, 李寿崧, 黄克和, 等. 致病性嗜水气单胞菌多重 PCR 检测方法的建立 [J].中国水产科学, 2007, 14(5):749-755.
Rao JJ, Li SS, Huang KH, et al. Development of multiplex polymerase chain reaction for detection of pathogenic *aeromonas hydrophil*a and its preliminary application[J]. J Fish Sci Chin, 2007, 14:(5):749-755.

[11] 周一平. 用 SPSS 软件计算新药的 LD_{50}[J]. 药学进展, 2003, 27(5):314-316.
Zhou YP. The calculation of LD50 in new drugs with software SPSS [J]. Prog Pharm Sci, 2003, 27(5):314-316.

[12] 沈锦玉. 嗜水气单胞菌的研究进展[J].浙江海洋学院学报(自然科学版), 2008, 27(1): 78-86.
Shen JY. Reseach progress on *Aeronmonas hydrophila* [J]. J Zhejiang Ocean Univ, Nat Sci, 2008, 27(1): 78-86.

[13] 徐阳, 姚洪, 乔帼, 等. 养殖大菱鲆感染嗜水气单胞菌的分离、毒力分析及 ERIC-PCR 分型 [J]. 大连海洋大学学报, 2018, 33(4): 430-434.
Xu Y, Yao H, Qiao K, et al. Isolation, virulence and ERIC-PCR genotyping of *Aeromonas hydrophila* in farmed turbot *Scophthalmus maximus*[J]. J Dalian Ocean Univ, 2018, 33(4): 430-434.

[14] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 淡水鱼细菌性败血症 [J]. 中国水产, 2011, 38(3):54-55.
Chen AP, Jiang YL, Qian D, et al. Freshwater fish bacteria septicemia [J]. J Fish Chin, 2011, 38(3):54-55.

[15] 杨迟. 实验用斑马鱼常见病原菌的分离检测及其致病性研究[D]. 上海: 东华大学; 2014.
Yang C. Isolation and detection of common pathogenic bacteria and associated pathogenic research in laboratory zebrafish [D]. Shanghai: Donghua University; 2014.

[16] 潘厚军, 吴淑勤, 李凯彬, 等. 剑尾鱼在检测细菌毒力方面的应用 [J]. 水产学报, 2000, 24(5): 467-471.
Pan HJ, Wu SQ, Li KB, et al. Application of *Xiphophorus helleri* to detection of virulence of fish pathogenic bacteria [J]. J Fish Chin, 2000, 24(5): 467-471.

[17] 罗辉, 杨月静, 向梦斌, 等. 齐口裂腹鱼感染嗜水气单胞菌后血液生化指标与组织病理学研究 [J]. 淡水渔业, 2017, 47(4):44-50.
Luo H, Yang YJ, Xiang MB, et al. Blood biochemical indices and histopathology of the *Schizothorax prenanti* during early stage of infection by *Aeromonas hydrophila* [J]. Freshwater Fish, 2017, 47(4):44-50.

[18] 黄钧, 施金谷, 黄艳华, 等. 罗非鱼竖鳞病病原菌的分离鉴

定及药敏试验 [J].南方农业学报, 2012, 43(8):1230-1234.
Huang J, Shi JG, Huang YH, et al. Isolation and identification of lepidorthosis pathogenic bacteria in tilapia and its drug sensitivity test [J]. J South Agric, 2012, 43(8):1230-1234.

[19] 李献梅, 王小芬, 杨洪岩, 等. 促旋酶(gyrase)B 亚单位基因 gyrB 在鉴别细菌近缘种中的应用 [J]. 微生物学报, 2008, 48(5):701-706.
Li XM, Wang XF, Yang HY, et al. Application of gyrB in the identification of closely related bacteria—A review [J]. Acta Microbio Sin, 2008, 48(5):701-706.

[20] Wang L, Lee F, Tai C, et al. Comparison of gyrB gene sequences, 16S rRNA gene sequences and DNA-DNA hybridization in the Bacillus subtilis group [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2007, 57(8): 1846-1850.

[21] 邓国成, 江小燕, 叶星, 等. 草鱼出血病混合感染的嗜水气单胞菌的分离、鉴定与理化特性[J]. 微生物学通报, 2009, 36(8):1170-1177.
Deng GC, Jiang XY, Ye X, et al. Isolation, identification and characterization of *Aeromonas hydrophila* from hemorrhagic grass carp [J]. Microbiol Chin, 2009,36(8):1170-1177.

[22] 朱大玲, 李爱华, 汪建国, 等. 嗜水气单胞菌毒力与毒力基因分布的相关性 [J].中山大学学报(自然科学版), 2006, 45(1): 82-85.
Zhu DL, Li AH, Wang JG, et al. The correlation between the distriobution pattern of virulence genes and the virulence of *Aeromonas hydrophila* strains [J]. Acta Sci Nat Univ Sunyatseni, Nat Sci,2006, 45 (1):82-85.

[23] 王远微, 汤承, 于学辉, 等. 三重 PCR 检测鱼类致病性嗜水气单胞菌 [J].微生物学报, 2008, 48(7): 947-951.
Wang YW, Tang C, Yu XH, et al. Detecting pathogenic *Aeromonas hydrophila* in fish by triplex PCR [J]. Acta Microbiol Sin, 2008, 48(7):947-951.

[24] 戴方伟, 宋晓明, 卢领群, 等. PCR-测序法对啮齿类动物汉坦病毒的检测和基因分型 [J].中国实验动物学报, 2014, 22(3): 44-49.
Dai FW, Song XM, Lu LQ, et al. PCR sequencing for detection and gene typing of hantavirus isolated from rodents [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(3): 44-49.

[25] 范薇, 隋丽华, 刘大伟, 等. 实验动物 CAR 杆菌 16SrRNA 基因 PCR 监测方法的建立[J].中国实验动物学报, 2010, 18(4): 308-311.
Fang W, Sui LH, Liu DW, et al. Establishment of a PCR assay for detection of cilia-associated respiratory bacillus in laboratory animals based on 16SrRNA gene fragment sequence [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2010, 18(4): 308-311.

[26] 刘萍, 孔杰, 孟宪红, 等. 白斑综合症病毒(WSSV)在对虾养殖过程中传播途径的调查[J]. 海洋水产研究, 2000, 21(3):9-12.
Liu P, Kong J, Meng XH, et al. Investigation of the transmission route during the artificial culture of shrimps with the white spot syndrome virus[J]. Prog Fish Sci, 2000, 21(3): 9-12.

[27] Yan DC, Feng SY, Huang J, et al. Rotifer cellular membranes bind to white spot syndrome virus (WSSV) [J]. Aquaculture, 2007, 273(4): 423-426.

[28] Zhang J, Dong S, Dong Y, et al. Assessment of the role of brine shrimp Artemia in white spot syndrome virus (WSSV) transmission [J]. Vet Res Commun, 2010, 34(1): 25-32.

[29] 宋晓玲, 史成银, 黄倢, 等. 用 DNA 斑点杂交法检测对虾及其饵料和环境生物携带白斑综合症病毒状况的调查 [J]. 中国水产科学, 2001, 8(4):36-40.
Song XL, Shi CY, Huang J, et al. Investigation and study on carrying status of White Spot Syndrome Virus (WSSV) in shrimps and other aquatic animals by dot-blot hybridization [J]. J Fish Sci Chin, 2001, 8(4):36-40.

[收稿日期] 2019-12-03

饶文婷,罗尚菲,张雅心,等. 阿魏酸对高脂血症小鼠肝脂肪变性及肠道菌群的调节作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 36-42.

Rao WT, Luo SF, Zhang YX, et al. Regulatory effects of ferulic acid on hepatic steatosis and intestinal flora in hyperlipidemic mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 36-42.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.006

阿魏酸对高脂血症小鼠肝脂肪变性及肠道菌群的调节作用

饶文婷[1#],罗尚菲[1#],张雅心[1],江伟豪[1],陈奕澔[1],陈嘉慧[1],任妍[1],佘楷杰[1],何盈[1],曾平[2*],周凤华[1*]

(1.南方医科大学中医药学院,广州 510515;
2.广东省心血管病研究所,广东省人民医院,广东省医学科学院,广州 510100)

【摘要】 目的 探讨阿魏酸(ferulic acid)对高脂血症小鼠肝脂肪变性及肠道菌群的调节作用。**方法** 将 24 只 6 周龄雄性 ApoE$^{-/-}$小鼠随机分为 4 组($n=6$),即对照组、模型组、阿魏酸组[40 mg/(kg·d)]、辛伐他汀组[5 mg/(kg·d)];另取 6 只同龄 C57BL/6 小鼠为空白组。高脂喂养 12 周后,再给药处理 12 周,采集小鼠粪便进行肠道菌群检测,检测血脂水平,制作肝切片观察病理变化。**结果** 与对照组相比,模型组小鼠体重、血清总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglyceride,TG)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C)明显升高($P<0.05$),肝切片可见小鼠肝细胞质内充满脂滴,大部分肝细胞呈现脂肪变性,模型组厚壁菌门(Firmicutes)和韦荣球菌科(Erysipelotrichaceae)的细菌数量升高,拟杆菌门(Bacteroidetes)、瘤胃菌科(Ruminococcaceae)和 *Odoribacter* 数量减少;与模型组比较,阿魏酸组小鼠体重、血清 TC、TG、LDL-C 显著降低,肝脂肪变性明显减轻,厚壁菌门和韦荣球菌科细菌数量减少,拟杆菌门、瘤胃菌科和 *Odoribacter* 数量升高。**结论** 阿魏酸可以改善小鼠的血脂异常,肝脂肪变性,调节肠道菌群失衡。

【关键词】 阿魏酸;高脂血症;肠道菌群;血脂;肝脂肪变性;16S rRNA

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0036-07

Regulatory effects of ferulic acid on hepatic steatosis and intestinal flora in hyperlipidemic mice

RAO Wenting[1#], LUO Shangfei[1#], ZHANG Yaxin[1], JIANG Weihao[1], CHEN Yihao[1], CHEN Jiahui[1], REN Yan[1], SHE KaiJie[1], HE Ying[1], ZENG Ping[2*], ZHOU Fenghua[1*]

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China.
2. Guangdong Cardiovascular Institute, Guangdong General Hospital, Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510100)
Corresponding author: ZENG Ping. E-mail: 41915049@qq.com; ZHOU Fenghua. E-mail: wendyzhou515@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the regulatory effects of ferulic acid on hepatic steatosis and intestinal flora in hyperlipidemic mice. **Methods** Twenty-four 6-week-old male ApoE$^{-/-}$ mice were randomly divided into the control, model, ferulic acid [40 mg/(kg·d)], and simvastatin groups [5 mg/(kg·d)]; $n=6$ per group. Six 6-week-old male

[**基金项目**]国家自然科学基金项目(81774213);广州市科技计划(201804010064);南方医科大学大学生创新创业训练计划(201812121009,201812121140)。

Funded by National Natural Science Foundation of China (81774213), Guangzhou Science and Technology Plan (201804010064), Southern Medical University Students Innovation and Entrepreneurship Training Program (201812121009, 201812121140).

[**作者简介**]饶文婷(1999—)女,本科。Email:756043931@qq.com;罗尚菲(1997—)男,本科。Email:784652596@qq.com。 #共同第一作者

[**通信作者**]曾平(1971—)女,博士,主任医师,主要从事心血管内科临床及科研工作。Email:41915049@qq.com;
周凤华(1986—)女,博士,副教授,研究方向:缺血性心血管疾病的中医药防治。Email:wendyzhou515@126.com。 * 共同通信作者

C57BL/6 mice constituted the blank group. After 12 weeks of feeding a high-fat diet, the drugs were administered for another 12 weeks. The mouse feces were collected to detect the intestinal flora. Blood lipid levels were detected, and liver sections were prepared to observe the pathological changes. **Results** The body weight, serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG), and low-density lipoprotein-cholesterol (LDL-C) levels were much higher in the model group than in the control group ($P < 0.05$). Liver cells of the model group were full of lipid droplets, and most presented fatty degeneration. The amounts of Firmicutes and Erysipelotrichaceae in the model group were higher than those in the control group. Bacteroidetes, Ruminococcaceae and *Odoribacter* were decreased in the model group. Ferulic acid treatment significantly ameliorated the changes in body weight, serum TC, TG, and LDL-C ($P < 0.05$). Ferulic acid upregulated Firmicutes and Erysipelotrichaceae and downregulated Bacteroidetes, Ruminococcaceae and *Odoribacter*. Ferulic acid also alleviated the liver injury in the high-fat diet-fed ApoE$^{-/-}$ mice. **Conclusions** Ferulic acid improves dyslipidemia and hepatic steatosis, and regulates the intestinal flora imbalance.

【Keywords】 ferulic acid; hyperlipidemia; intestinal flora; blood lipids; hepatic steatosis; 16S rRNA

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肠道菌群是一个极其复杂的微生态系统,参与机体的营养消化吸收、生物拮抗、免疫、抗肿瘤等一系列生命活动并维持机体健康[1]。研究表明,长时间的高脂饮食可以长期而持续地改变肠道微生态,肠道菌群失衡可以引起脂代谢紊乱,导致高脂血症[2-3]。阿魏酸(ferulic acid),是当归、黄连等中药的有效成分之一,能抑制高脂饮食诱导的肥胖、代谢综合征和炎症,改善血脂、脂质和葡萄糖稳态[4-6]。阿魏酸是否对高脂血症小鼠的肠道菌群也有调节作用尚且未知。因此,本文采用高脂喂养 ApoE$^{-/-}$小鼠,观察阿魏酸对其血脂、肝脂肪变性及肠道菌群的调节作用,以期进一步阐明阿魏酸防治高脂血症的作用机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　动物

雄性 ApoE$^{-/-}$小鼠 24 只,雄性 C57BL/6 小鼠 6 只,6 周龄,SPF 级,体重 25 ~ 28 g,购于北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】,饲养于南方医科大学实验动物中心 SPF 级环境中【SYXK(粤)2016-0167】,室温 22℃,相对湿度 55%,12 h 光照/黑暗循环,自由摄食饮水。本实验遵循实验动物的 3R 原则,已通过得中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会(IACUC)批准,批准号:L2018110。

1.1.2　药品与试剂

阿魏酸(纯度:99.32%,成都曼斯特生物科技有限公司,批号:MUST-18032928);辛伐他汀片(默沙东制药公司,批号:H20160429);血清总胆固醇(cholesterol,TC)、甘油三脂(triglyceride,TG)、高密度脂蛋白胆固醇(high-density lipoprotein cholesterol,HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(low-density lipoprotein cholesterol,LDL-C)生化检测试剂盒(南京建成生物工程公司,批号:20190304、20190228);高脂饲料(广东省医学实验动物中心,脂肪含量 21%,胆固醇 0.15%,蛋白质 15.5%)。

1.1.3　主要仪器

酶标仪(Thermo FC,美国);PCR 仪(BioRad,美国);凝胶成像仪(Tanon,中国);电泳仪(北京六一,中国);NanoDrop™ One(Thermo Fisher Scientific,美国);倒置显微镜(Olympus IX53,日本)。

1.2　方法

1.2.1　小鼠造模

24 只 ApoE$^{-/-}$雄性小鼠随机分为对照组、模型组、阿魏酸组[40 mg/(kg·d)]、辛伐他汀组[5 mg/(kg·d)],每组 6 只;6 只 C57BL/6 雄性小鼠为空白组。对照组和空白组给予普通饲料 12 周,其他各组均给予高脂饲料喂养 12 周;再给予药物处理 12 周。阿魏酸组以 DMSO 配制,按40 mg/(kg·d)灌胃给药,辛伐他汀组以生理盐水配制,按5 mg/(kg·d)灌胃给药,其他组给予同体积蒸馏水。

1.2.2　样本采集及处理

给药 12 周后,每组随机选取 5 只小鼠,收集新鲜正常粪便,保存于-80℃恒温冰箱。小鼠称重后禁食 12 h,麻醉后心脏取血,3000 r/min、4℃离心 15 min后分离血清,按照试剂盒说明,分别检测血清中 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C。取小鼠肝,制作石蜡切片,进行 HE 染色;制作冰冻切片,进行油红 O 染色,光学显微镜下观察肝组织病理学形态。

1.2.3　粪便肠道菌群检测

粪便标本解冻以后,用粪便 DNA 分离试剂盒提

取 DNA,以每个样品提取的 DNA 为模板,扩增 16S rRNA 基因的 V4 区,然后对扩增子进行清洁和测序。应用 IlluminaHiSeq 2500 平台对 PCR 产物进行测序,测序类型为 PE250。下机数据滤除低质量的 reads,获得 clean data。序列拼接使用软件 FLASH (Fast Length Adjustment of Short reads, v1.2.11),将双末端测序得到的 reads 拼接成 Tags,将优化好的 Tags 在 97% 的相似度下聚类为分类操作单元 (operational taxonomic units, OTU),得到 OTU 代表序列后,通过核糖体数据计划 (ribosomal database project, RDP) classifer (v2.2) 软件,将 OTU 代表序列与数据库 (Greengene V201305) 已知序列比对进行物种注释,从而得到每个样品的群落组成信息。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 22.0 软件分析,计量资料用平均值±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间均数比较采用 t 检验,多组间数据比较用单因素方差分析,组间比较用图基 (Tukey) 检验,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 阿魏酸对小鼠体重及血脂水平的影响

模型组小鼠体重明显高于对照组 ($P < 0.01$),阿魏酸组体重明显低于模型组 ($P < 0.01$),与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$),表明阿魏酸能有效抑制高脂饲料引起的小鼠体重增加。(表 1)

模型组血清 TC、TG、LDL-C 含量明显高于对照组 ($P < 0.05$),而阿魏酸组血清 TC、TG、LDL-C 含量明显低于模型组 ($P < 0.05$),与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$),阿魏酸组较模型组 HDL 含量增加,但是没有显著性差异 ($P > 0.05$),上述说明阿魏酸能有效改善小鼠的血脂异常。(表 1)

表 1 阿魏酸对小鼠体重及血脂的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 1 Effect of ferulic acid on weight and lipid in mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

分组 Groups	体重 Body weight (g)	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)
空白组 Blank group	32.07 ± 1.37$^{\#\#}$	3.59 ± 0.71$^{\#\#}$	1.86 ± 0.92$^{\#\#}$	1.76 ± 0.77$^{**\#\#}$	2.29 ± 0.87
对照组 Control group	33.12 ± 1.42	11.20 ± 1.49	2.45 ± 1.00	3.97 ± 0.29	2.81 ± 1.18
模型组 Model group	41.25 ± 3.83**	17.64 ± 1.60**	7.36 ± 2.19**	5.85 ± 1.26*	2.18 ± 0.95
阿魏酸组 Ferulic Acid group	33.65 ± 3.06$^{\#\#}$	8.30 ± 1.17$^{*\#\#}$	4.09 ± 2.44$^{\#\#}$	3.46 ± 0.37$^{\#\#}$	3.24 ± 1.42
辛伐他汀组 Simvastatin group	38.80 ± 4.37*	13.05 ± 2.12$^{\#\#}$	4.85 ± 1.95$^{*\#\#}$	2.62 ± 1.56$^{\#\#}$	4.04 ± 1.81

注:与对照组相比,$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$。与模型组相比,$^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$。

Note. Compared with the control group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$. Compared with the model group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$.

2.2 阿魏酸对高脂喂养诱导的小鼠肝脂肪变性的影响

如图 1、2 所示,对照组小鼠肝小叶结构清晰,肝细胞索排列整齐,肝细胞无明显脂肪变,细胞质未见肿胀,无炎症细胞浸润;模型组小鼠肝细胞大泡性脂肪变,肝细胞气球样变,小叶及汇管区可见炎细胞浸润,并有点灶状坏死;阿魏酸组肝小叶结构清晰,肝细胞脂肪变减轻,细胞内脂滴减少,炎症浸润减少,无明显坏死灶,肝组织结构趋于对照组水平。

2.3 阿魏酸对肠道菌群的影响

模型组与对照组肠道菌群结构有显著差异,阿魏酸组与对照组的间距较模型组更近,说明阿魏酸可以使高脂喂养小鼠肠道菌群的结构趋于正常,阿魏酸对小鼠紊乱的肠道菌群有调节作用(图 3A)。

门水平上,各组小鼠肠道菌群均以厚壁菌 (*Firmicutes*) 及拟杆菌 (*Bacteroidetes*) 为主要优势菌。模型组厚壁菌的相对丰度明显高于对照组,而拟杆菌的相对丰度明显低于对照组,阿魏酸可以抑制高脂喂养引起的改变(图 3B)。模型组小鼠肠道菌群 F/B 比值明显高于对照组,阿魏酸组 F/B 比值较模型组显著降低。

科水平上,模型组中韦荣球菌科 (*Erysipelotrichaceae*) 的相对丰度明显高于对照组,瘤胃菌科 (*Ruminococcaceae*)、穆里巴库拉菌科 (*Muribaculaceae*)、普雷沃氏菌科 (*Prevotellaceae*) 的相对丰度明显低于对照组,阿魏酸可以抑制这些改变(图 3C)。

属水平上,模型组 *Ileibacterium* 的相对丰度明显高于对照组,阿魏酸可以降低 *Ileibacterium* 的丰度(图 3D)。阿魏酸组 *Lachnospiraceae_UCG-010*、*Odoribacter* 等显著富集(图 4)。

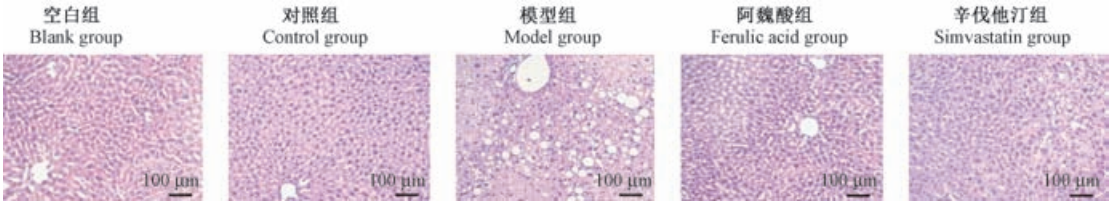


图 1　阿魏酸对肝组织病理形态的影响(HE 染色)

Figure 1　Effect of ferulic acid on pathological morphology of liver (HE staining)

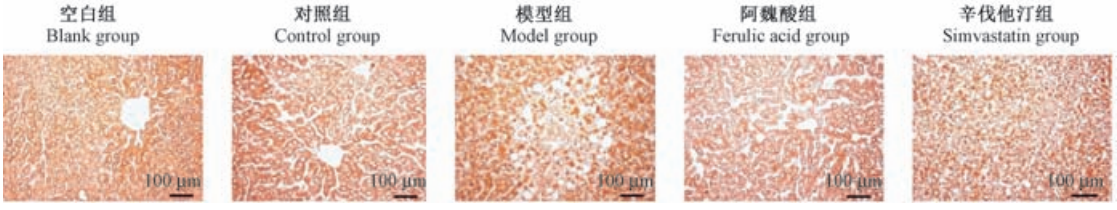


图 2　阿魏酸对肝组织内脂滴的影响(油红 O 染色)

Figure 2　Effect of ferulic acid on lipid droplets in liver (Oil red O staining)

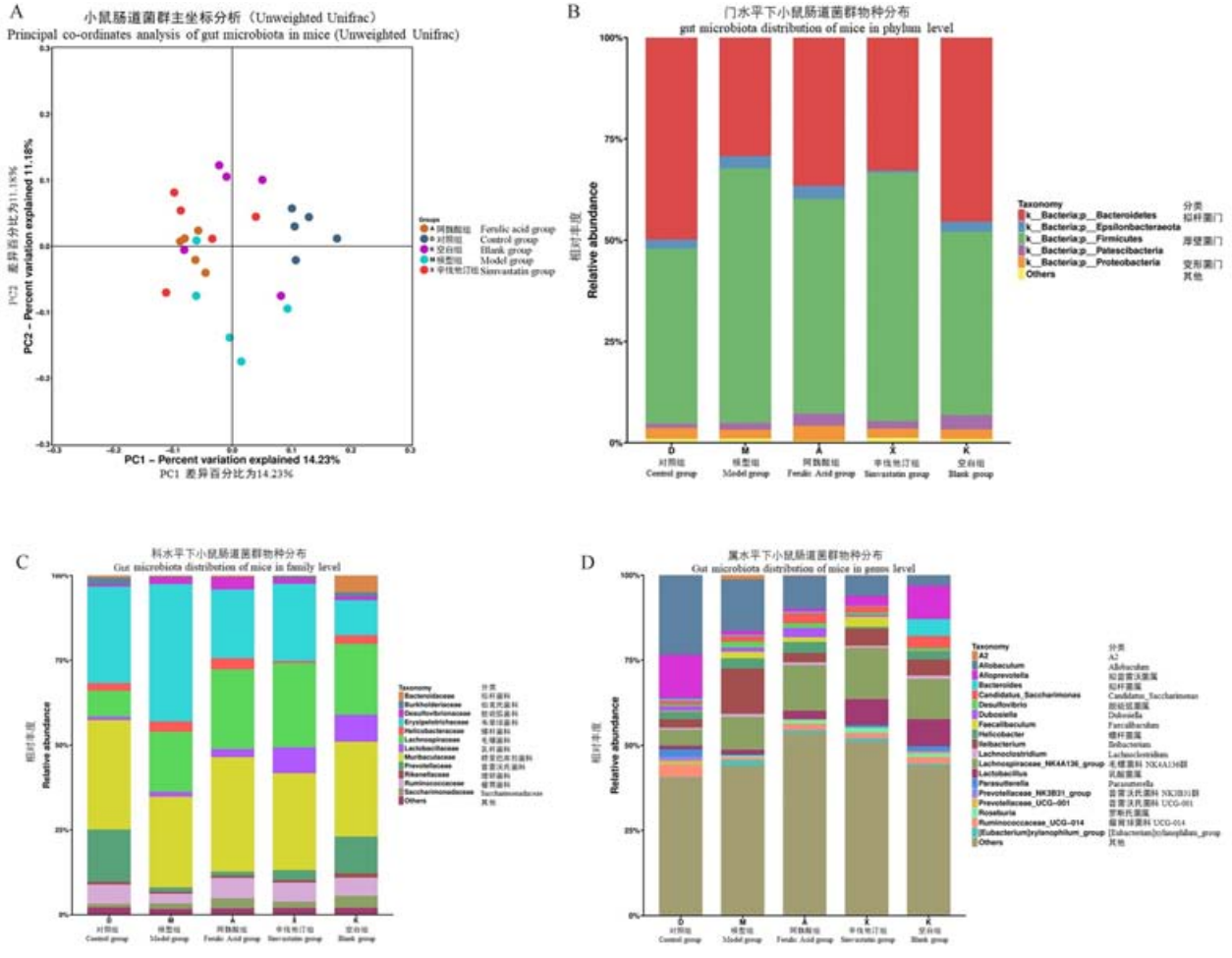


图 3　阿魏酸对肠道菌群的影响

Figure 3　Effect of ferulic acid on intestinal flora

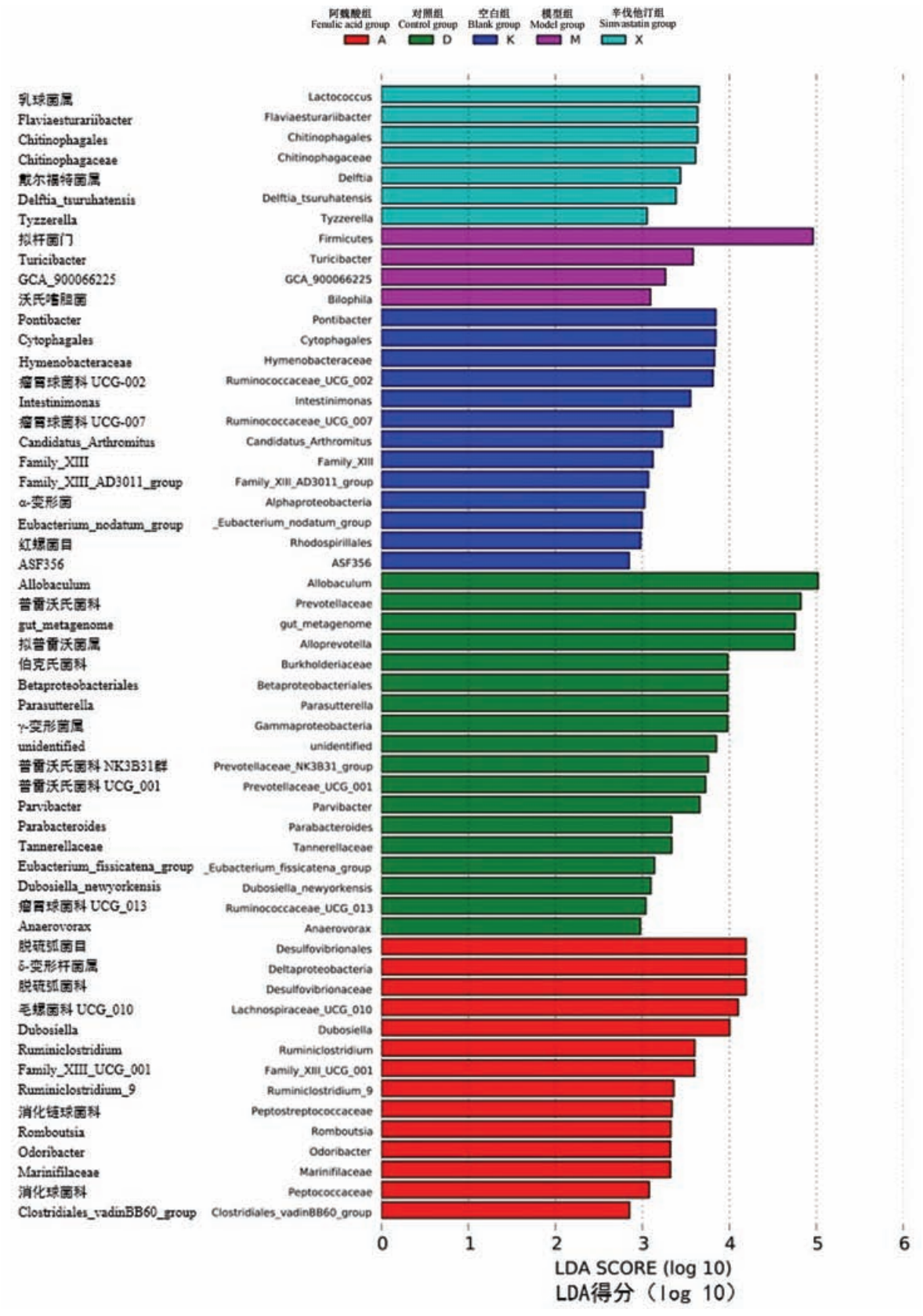


图 4 属水平丰度差异肠道菌 LDA 得分

Figure 4 LDA scores of gut microbiota with different abundance in genus level

3　讨论

高脂血症又称脂质代谢紊乱或异常,是动脉粥样硬化、高血压、冠心病等疾病的危险因素[7]。研究发现,高脂饮食可导致肠道菌群结构的改变,这种改变会进一步促进高脂血症以及肝脏脂代谢紊乱[8]。

本实验中高脂喂养的 ApoE$^{-/-}$小鼠在阿魏酸的干预下,体重及血清 TC、TG、LDL-C 水平都显著降低,肥胖和血脂异常的情况得到明显改善。阿魏酸组小鼠肝细胞脂肪变减轻,胞浆内脂滴减少或消失,无明显炎细胞坏死或浸润,表明阿魏酸对肝组织脂肪变性具有良好的改善作用。上述说明阿魏酸干预不仅可以缓解肥胖的症状,改善肝脂肪变性,同时调节了血脂水平,减轻高脂血症。

肠道菌群在机体能量和物质代谢、营养消化吸收、内分泌代谢等生命活动中发挥重要作用[1]。近年来,研究发现肠道菌群可能通过产生胆固醇氧化酶、抑制肝脂肪合成酶的活性及调节胆固醇在血液与肝中的分布等多种途径来调节血脂[9]。本实验发现,高脂喂养小鼠肠道菌群中厚壁菌数量升高,拟杆菌降低,阿魏酸干预可以使厚壁菌数量降低,拟杆菌升高,F/B(厚壁菌/拟杆菌)比值降低。厚壁菌及拟杆菌在调节宿主的内分泌代谢,包括碳水化合物、脂肪和胆汁酸代谢中起着重要的作用[10],在调节宿主对饮食动态变化的反应方面具有协同作用[11]。肥胖小鼠肠道中 F/B 比值增加,无菌小鼠移植肥胖小鼠肠道菌群后,从食物中获取能量的能力增加,同时出现了肥胖[12]。这说明阿魏酸可能通过调节厚壁菌和拟杆菌的数量,影响脂质代谢和体重。

在科水平上,阿魏酸可以改善高脂喂养小鼠瘤胃菌科数量的降低,抑制高脂喂养小鼠韦荣球菌科数量的增加。瘤胃菌科是一种产短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA)的益生菌,可以降解多种多糖和纤维[13]。此外,瘤胃菌科的丰度与酒精性肝硬化,肝性脑病,非酒精性脂肪性肝病以及肠道通透性增加呈显著负相关[14-17]。韦荣球菌科为条件致病菌,韦荣球菌科的数量受脂肪摄入的影响,可能参与了肥胖导致的代谢紊乱[18]。在属水平上,阿魏酸组改善了高脂喂养小鼠 *Odoribacter* 数量的降低。有研究表明,*Odoribacter* 的丰度与肥胖、收缩压和纤溶酶原激活物抑制剂-1 水平呈负相关,且与心血管风险预防有关[19-20]。阿魏酸组 *Lachnospiraceae_UCG-010* 显著富集。*Lachnospiraceae_UCG-010* 是产丁酸菌,丁酸对抗炎症、调节体内脂肪形成等具有重要意义[21]。

综上所述,阿魏酸可以改善小鼠的血脂水平及肝脂肪变性情况,调节高脂小鼠的肠道菌群,改善高脂血症。研究证实,肠道菌群参与高脂血症发病的机制是复杂的、多因素的,要明确阿魏酸改善高脂血症的具体作用靶点,需要进一步的实验证明。近 30 年来,阿魏酸在心脑血管疾病临床上得到广泛应用,未来可能成为预防或抑制肥胖、糖尿病、高脂血症、非酒精性脂肪肝等一系列疾病的潜在药物。

参　考　文　献(References)

[1] 刘慧. 肠道菌群失调的研究进展[J]. 医学综述, 2014, 20(3): 468-471.
Liu H. Research progress of intestinal dysbacteriosis[J]. Med Recapitul, 2014, 20(3): 468-471.

[2] Backhed F, Ding H, Wang T, et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(44): 15718-15723.

[3] Backhed F, Manchester JK, Semenkovich CF, et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(3): 979-984.

[4] Wang W, Pan Y, Zhou H, et al. Ferulic acid suppresses obesity and obesity-related metabolic syndromes in high fat diet-induced obese C57BL/6J mice[J]. Food Agric Immunol, 2018, 29(1): 1116-1125.

[5] Salazar-Lopez NJ, Astiazaran-Garcia H, Gonzalez-Aguilar GA, et al. Ferulic acid on glucose dysregulation, dyslipidemia, and inflammation in diet-induced obese rats: An integrated study[J]. Nutrients, 2017, 9(7): E675.

[6] Naowaboot J, Piyabhan P, Munkong N, et al. Ferulic acid improves lipid and glucose homeostasis in high-fat diet induced obese mice[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2016, 43(2): 242-250.

[7] Forouzanfar MH, Alexander L, Anderson HR, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks in 188 countries, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013[J]. Lancet, 2015, 386(10010): 2287-2323.

[8] 曹宏芳, 张家超, 王芳, 等. 高脂饮食对雄性 SD 大鼠肠道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(2): 102-108.
Cao HF, Zhang JC, Wang F, et al. Intake of a highfat diet alters intestinal flora in male SD rats[J]. Chin J Microecol, 2012, 24(2): 102-108.

[9] 李超, 崔立红. 高脂血症、高脂饮食与肠道菌群的关系[J].

世界华人消化杂志, 2013, 21(14): 1273-1277.
Li C, Cui LH. Relationship among intestinal flora, high-fat diets, and hyperlipidemia [J]. World Chin J Digestol, 2013, 21(14): 1273-1277.

[10] Tremaroli V, Backhed F. Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism [J]. Nature, 2012, 489(7415): 242-249.

[11] Jumpertz R, Le DS, Turnbaugh PJ, et al. Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans [J]. Am J Clin Nutr, 2011, 94(1): 58-65.

[12] Turnbaugh PJ, Ley RE, Mahowald MA, et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest [J]. Nature, 2006, 444(7122): 1027-1031.

[13] Hooda S, Boler BM, Serao MC, et al. 454 pyrosequencing reveals a shift in fecal microbiota of healthy adult men consuming polydextrose or soluble corn fiber [J]. J Nutr, 2012, 142(7): 1259-1265.

[14] Bajaj JS, Heuman DM, Hylemon PB, et al. Altered profile of human gut microbiome is associated with cirrhosis and its complications [J]. J Hepatol, 2014, 60(5): 940-947.

[15] Bajaj JS. Iylemon PB, Ridlon JM, et al. Colonic mucosal microbiome differs from stool microbiome in cirrhosis and hepatic encephalopathy and is linked to cognition and inflammation [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2012, 303(6): G675-685.

[16] Schnabl B, Brenner DA. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases [J]. Gastroenterology, 2014, 146(6): 1513-1524.

[17] Leclercq S, Matamoros S, Cani PD, et al. Intestinal permeability, gut-bacterial dysbiosis, and behavioral markers of alcohol-dependence severity [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(42): E4485-4493.

[18] Fleissner CK, Huebel N, Abd EM, et al. Absence of intestinal microbiota does not protect mice from diet-induced obesity [J]. Br J Nutr, 2010, 104(6): 919-929.

[19] Etxeberria U, Hijona E, Aguirre L, et al. Pterostilbene-induced changes in gut microbiota composition in relation to obesity [J]. Mol Nutr Food Res, 2017, 61(1): 1500906.

[20] Gomez-Arango LF, Barrett HL, McIntyre HD, et al. Increased systolic and diastolic blood pressure is associated with altered gut microbiota composition and butyrate production in early pregnancy [J]. Hypertension, 2016, 68(4): 974-981.

[21] Sun M, Wu W, Liu Z, et al. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases [J]. J Gastroenterol, 2017, 52(1): 1-8.

[收稿日期] 2019-07-12

邰昭霞,费雪瑜,瞿思颖,等. 电针对糖尿病神经痛大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白的干预作用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 43-48.
Tai ZX, Fei XY, Qu SY, et al. Intervention effect of electroacupuncture on NF-κB p65 at spinal cord dorsal horn in diabetic neuropathic pain rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 43-48.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.007

电针对糖尿病神经痛大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白的干预作用

邰昭霞[1,2,3],费雪瑜[1,2,3],瞿思颖[1],王涵芝[1],陈卢杭[1,2,3],蒋永亮[1,2,3],
方剑乔[1,2,3*],何晓芬[1,2,3*]

(1. 浙江中医药大学第三临床医学院康复医学院,杭州 310053; 2. 浙江省针灸神经病学研究重点实验室,杭州 310053; 3. 浙江中医药大学针灸研究所,杭州 310053)

【摘要】 目的 观察电针对糖尿病神经痛(diabetic neuropathic pain,DNP)大鼠脊髓背角核转录因子 κB(nuclear factor kappa B,NF-κB)p65 蛋白的干预作用,以探讨电针对糖尿病神经痛的部分镇痛机制。**方法** 将 30 只 SD 大鼠用完全随机分组法分为正常组(normal group)和造模型,分别用常规饲料和高脂高糖饲料喂养 5 周,喂养 5 周后造模组大鼠予以单次腹腔注射链脲佐菌素(streptozotocin,STZ)。将造模组中糖尿病神经痛模型成功的大鼠再进一步随机分为模型组(DNP group)和模型+电针组(DNP+EA group)。穴位选取双侧"足三里、昆仑穴",频率为 2 Hz,强度为 1 mA 干预 15 min 后 2 mA 干预 15 min,于第 7 周开始,每天 1 次,干预 7 次。观察各组大鼠的血糖、机械痛阈及热痛阈变化。采用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色观察大鼠坐骨神经形态的变化,采用免疫印记法检测大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白的表达水平。**结果** 高脂高糖喂养 5 周后予以 STZ 单次腹腔注射 2 周后大鼠血糖上升,机械痛阈、热痛阈下降,表明大鼠 DNP 模型造模成功;电针可上调 DNP 大鼠的机械痛阈和热痛阈,但对血糖没有明显的干预作用。HE 染色结果显示 DNP 大鼠坐骨神经有髓神经纤维排列紊乱,轴索肿胀,髓鞘密度不均匀,空泡变性,电针干预对 DNP 大鼠坐骨神经形态无明显的作用。免疫印迹结果显示:DNP 大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白表达明显增多,电针可下调 DNP 大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白表达。**结论** 低频电针对 DNP 模型大鼠有良好的镇痛效果,其作用可能与其抑制糖尿病 DNP 大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白表达有关。

【关键词】 糖尿病神经痛;电针;脊髓背角;核转录因子 κB p65
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0043-06

Intervention effect of electroacupuncture on NF-κB p65 at spinal cord dorsal horn in diabetic neuropathic pain rats

TAI Zhaoxia[1,2,3], FEI Xueyu[1,2,3], QU Siying[1], WANG Hanzhi[1], CHEN Luhang[1,2,3],
JIANG Yongliang[1,2,3], FANG Jianqiao[1,2,3*], HE Xiaofen[1,2,3*]

(1. Third Clinical Medical College and Rehabilitation Medical College of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China. 2. Key Laboratory of Acupuncture and Neurology of Zhejiang Province, Hangzhou 310053. 3. Institute of Acupuncture and Moxibustion, Zhejiang University of Traditional Chinese Medicine, Hangzhou 310053)
Corresponding author: FANG Jianqiao. E-mail: fangjianqiao7532@163.com; HE Xiaofen. E-mail: zjhxf1986@163.com

[**基金项目**]国家自然科学基金(81774389, 81804181),浙江省自然科学基金(LQ17H270003)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81774389, 81804181), and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation of China (LQ17H270003).
[**作者简介**]邰昭霞,女,在读硕士研究生,主要从事针刺镇痛研究。Email:tzx201803@163.com
[**通信作者**]何晓芬,女,硕士,实验师,主要从事针刺镇痛研究。Email:zjhxf1986@163.com;
方剑乔,男,教授,博士生导师。主要从事针刺镇痛及免疫相关性疾病的研究。Email:fangjianqiao7532@163.com。
*共同通信作者

【Abstract】 **Objective** To investigate the effects of electroacupuncture on NF-κB p65 expression in the spinal cord dorsal horn of rats with diabetic neuropathic pain. **Methods** Thirty SD rats were randomly divided into the normal and model groups. The rats in the model group were fed a high-fat and high-sugar diet for 5 weeks, then intraperitoneally injected with streptozotocin (STZ). The model diabetic neuropathic pain rats were further randomly divided into the diabetic neuropathic pain (DNP) model group and the diabetic neuropathic pain model + EA (DNP + EA) group. Two hertz of electroacupuncture was administered at the Zusanli and Kunlun ipsilateral acupoints for 7 consecutive days. Changes occurred in the fasting blood glucose, paw withdrawal threshold and paw withdrawal latency. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes in the sciatic nerve in the rats, and western blotting was used to detect the NF-κB p65 protein expression in the spinal cord dorsal horn in rats. **Results** After 5 weeks on the high-fat and high-sugar diet followed by a single intraperitoneal injection of STZ, the fasting blood glucose increased, and the paw withdrawal threshold and latency decreased, indicating that the DNP model was successfully established. Electroacupuncture increased the paw withdrawal threshold and latency in the DNP rats but did not significantly affect the fasting blood glucose. HE staining result showed disordered arrangement of the myelinated nerve fibers, axonal swelling, uneven density of the myelin sheath and vacuolar degeneration of the sciatic nerve in the DNP rats. Electroacupuncture intervention did not significantly affect the sciatic nerve morphology in the DNP rats. Western blotting showed significantly increased NF-κB p65 protein expression in the spinal cord dorsal horn of the DNP rats, and electroacupuncture downregulated the NF-κB p65 protein expression in the spinal cord dorsal horn of the DNP rats. **Conclusions** Low frequency electroacupuncture has a good analgesic effect on the DNP model rats, possibly related to its inhibiting NF-κB p65 expression in the spinal cord dorsal horn.

【Keywords】 diabetic neuropathic pain; electroacupuncture; spinal cord dorsal horn; NF-κB

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

糖尿病神经痛(diabetic neuropathic pain, DNP)是糖尿病最常见的并发症之一,其发病机制尚不明确,有研究表明其与代谢、细胞信号通路以及相关神经递质的改变等因素有关,严重影响患者生活质量,且缺乏有效的治疗手段[1]。寻找有效治疗糖尿病神经痛的方法,是糖尿病并发症防止领域亟待解决的问题。核转录因子 κB(nuclear factor kappa B, NF-κB)是一种蛋白质复合物,其在炎症反应、氧化应激以及各种疾病的发生发展过程中都发挥着重要作用[2]。NF-κB p65 是 NF-κB 家族最重要的成员,也是最常见的活化形式;有研究表明,NF-κB p65 在大鼠 DNP 的发生过程起着重要作用[3]。目前电针被广泛用于治疗各种慢性疼痛,它能有效控制糖尿病神经痛[4-5],且有研究表明在大脑中动脉闭塞模型中,电针能下调梗死灶周围组织中 NF-κB p65 的表达[6]。但电针干预 DNP 是否通过下调脊髓 NF-κB p65 来起到干预糖尿病神经痛的作用尚有待明确。因此,本实验选取高脂高糖饲养联合链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)腹腔注射诱导的糖尿病神经痛模型,探讨电针对糖尿病神经痛的镇痛作用是否与有效干预 DNP 大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白表达有关。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

选用 6 周龄健康雄性 SPF 级 SD 大鼠 30 只,体重(180 ± 20)g,购自中国科学院上海实验动物中心【SCXK(沪)2013-0016】,由浙江中医药大学动物实验研究中心饲养【SYXK(浙)2013-0184】。自由饮水,昼夜明暗周期 12 h/12 h。所有实验操作均符合实验动物伦理学要求(伦理审批号为:IACUC-20180319-13)。

1.1.2 试剂与仪器

链脲佐菌素(Sigma, S0130),兔抗 NF-κB p65 抗体(CST, 8242),山羊抗兔二抗(CST, 7074),RIPA 裂解液(碧云天, P0013B),BCA 蛋白定量试剂盒(Thermo, 23227),SDS 上样缓冲液(碧云天, P0015B),ECL 发光显色液(碧云天, P0018),足底热辐射测痛仪(意大利 UGO BASILE, 37360),动态足底测痛仪(意大利 UGO BASILE, 37450),罗氏卓越型血糖仪(Roche ACCU-CHEK Performa)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与造模

将 30 只大鼠,随机分为正常组(normal group, *n*

=8)和造模组(n=22)。正常组用啮齿类动物标准颗粒饲料饲养,造模组用高脂高糖饲料喂养(72.5%普通饲料 + 10%猪油 + 10%蔗糖 + 2%胆固醇 + 0.5%胆酸钠 + 5%蛋黄粉;购自浙江省医学科学院实验动物中心),喂养 5 周后禁食 16 h,造模组以小剂量链脲佐菌素(streptozotocin,STZ,35 mg/kg)腹腔注射 1 次,正常组仅腹腔注射相同剂量的柠檬酸缓冲液。于 STZ 注射后 2 周即第 7 周分别测空腹血糖(fasting blood glucose,FBG)、热痛阈(paw withdrawal latency,PWL)、机械痛阈(paw withdrawal threshold,PWT),FBG ≥ 11.1 mmol/L 并且痛阈下降 ≥ 15%[7]的造模组大鼠入选糖尿病神经痛模型。其余未达到此标准者则予以剔除。将造模成功的糖尿病神经痛模型大鼠再随机分为糖尿病神经痛组(DNP group,n=9)和糖尿病神经痛+电针组(DNP+EA group,n=9)。

1.2.2　空腹血糖测定

分别于 0 周(base)、5 周(5 weeks)、7 周(7 weeks)、8 周(8 weeks)这 4 个时间点检测大鼠的 FBG。大鼠禁食 8 h 后尾静脉取血用罗氏卓越型血糖仪及其配套试纸测定各组大鼠的 FBG。

1.2.3　机械痛阈测定

参照寿升芸等[7]测定大鼠机械痛阈方法,采用动态足底触觉仪检测各组大鼠 0 周(base)、5 周(5 weeks)、7 周(7 weeks)、8 周(8 weeks)这 4 个时间点的 PWT,每只大鼠连续测量 5 次,每次测量间隔 5 min,去除最大值和最小值,最终取 3 次的平均值作为大鼠机械痛阈值。

1.2.4　热痛阈测定

参照项璇儿等[8]测定大鼠 PWL 的方法,采用足底热辐射测痛仪检测各组大鼠 0 周(base)、5 周(5 weeks)、7 周(7 weeks)、8 周(8 weeks)这 4 个时间点的热痛阈。连续测量 5 次,每次间隔 5 min,去除最大值和最小值,取 3 次平均值作为大鼠热痛阈。

1.2.5　电针干预

电针干预方法:大鼠固定后,参照华兴邦大鼠穴位图谱,选取双侧足三里(膝关节后外侧,在腓骨小头下 5 mm)、昆仑穴(后肢外踝与跟腱之间的凹陷中),采用 0.25 mm×1 mm 针灸针,进针后用 LH-202H 韩氏穴位暨神经刺激仪连接两穴位,电针频率为 2 Hz、强度为 1 mA 干预 15 min 后 2 mA 干预 15 min,共 30 min。电针干预于第 7 周开始,每天 1 次,共 7 次。Normal 组大鼠和 DNP 组大鼠仅给予和 DNP+EA 组相同的固定。

1.2.6　苏木精-伊红(hematoxylin-eosin,HE)染色观察坐骨神经的变化

大鼠用戊巴比妥腹腔注射麻醉,开胸暴露心脏,先经生理盐水(4℃预冷)快速灌注,再 4%多聚甲醛灌注后取出大鼠坐骨神经中段(距近心端 3 mm,远心端 2 mm)置于 2.5%的戊二醛溶液中固定。再经脱水、透明、石蜡包埋、切片、染色、脱水及封固等步骤后观察。

1.2.7　免疫印迹法检测大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白的表达

大鼠用戊巴比妥腹腔注射麻醉,经生理盐水(4℃预冷)快速灌注后,参照杜俊英等[9]提取脊髓的方法,剪断脊柱两旁的肋骨,剪取第四腰椎节段以上约 5 cm 左右的脊柱,用 50 mL 注射器冲出脊髓。留取腰膨大部分,从正中分开成左右两侧,用刀片切取脊髓背角。用 RIPA 裂解液提取脊髓背角总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度,加入 SDS 上样缓冲液后在 100℃条件下变性 3 min。通过 SDS-PAGE 电泳转印至 PVDF 膜上。5%脱脂奶粉中封闭 1 h 后于兔抗 NF-κB p65 一抗(1∶1000)稀释液中孵育过夜,洗涤后与山羊抗兔二抗(1∶5000)摇床孵育 2 h。与 ECL 发光显色液反应显影,利用 LAS4010 凝胶成像仪采集图像,图片用 Image J 分析。

1.3　统计学分析

实验数据以均数±标准误($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 One-way ANOVA 方差分析;组间两两比较采用 LSD 检验;P< 0.05 表示差异有显著性。

2　结果

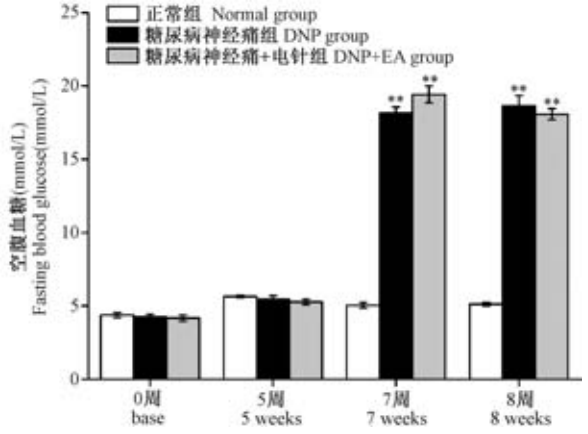
2.1　各组大鼠血糖变化情况

如图 1 所示,各组大鼠基础(base)血糖及高脂高糖喂养 5 周(5 weeks)血糖均无明显差异;高脂高糖喂养 5 周后予以 STZ 单次腹腔注射 2 周后即第 7 周(7 weeks),DNP 组及 DNP+ EA 组大鼠血糖明显上升(P< 0.01;P< 0.01);电针干预 1 周(8 weeks)对 DNP 大鼠血糖无明显作用。

2.2　各组大鼠机械痛阈变化情况

如图 2 所示,各组大鼠基础(base)机械痛阈及高脂高糖喂养 5 周(5 weeks)机械痛阈均无明显差异;高脂高糖喂养 5 周后予以 STZ 单次腹腔注射 2 周后

即第 7 周(7 weeks),DNP 组及 DNP+ EA 组大鼠机械痛阈明显下降($P< 0.01$;$P< 0.01$);电针干预 1 周(8 weeks)能上调 DNP 大鼠的机械痛阈($P< 0.01$)。

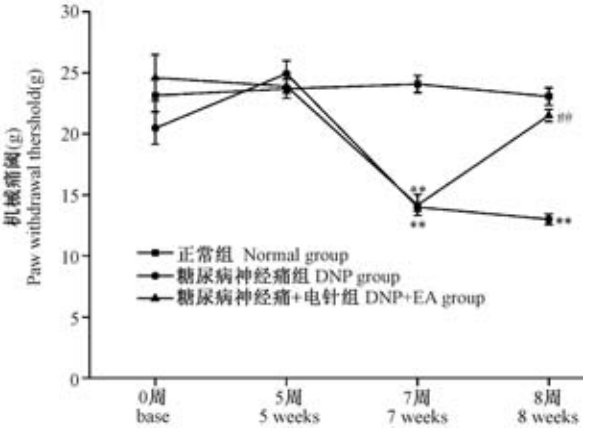


注:与正常组相比,$^{**}P < 0.01$。

图 1 各组大鼠空腹血糖变化情况

Note. $^{**}P< 0.01$, vs the Normal group.

Figure 1 Changes of fasting blood glucose in rats of each group



注:与正常组相比,$^{**}P< 0.01$,与糖尿病神经痛组相比,$^{\#\#}P< 0.01$。

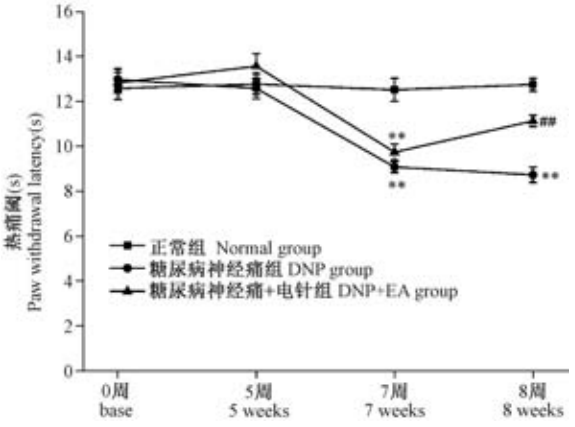
图 2 各组大鼠机械痛阈变化情况

Note. $^{**}P< 0.01$, vs the Normal group. $^{\#\#}P< 0.01$, vs the DNP group.

Figure 2 Changes of paw withdrawal threshold in rats of each group

2.3 各组大鼠热痛阈变化情况

如图 3 所示,各组大鼠基础(base)热痛阈及高脂高糖喂养 5 周(5 weeks)热痛阈均无明显差异;高脂高糖喂养 5 周后予以 STZ 单次腹腔注射 2 周后即第 7 周(7 weeks),DNP 组及 DNP+ EA 组大鼠热痛阈明显下降($P< 0.01$;$P< 0.01$);电针干预 1 周(8 weeks)能上调 DNP 大鼠的热痛阈($P< 0.01$)。



注:与正常组相比,$^{**}P< 0.01$,与糖尿病神经痛组相比,$^{\#\#}P< 0.01$。

图 3 各组大鼠热痛阈变化情况

Note. $^{**}P< 0.01$, vs the Normal group. $^{\#\#}P< 0.01$, vs the DNP group.

Figure 3 Changes of paw withdrawal latency in rats of each group

2.4 各组大鼠坐骨神经变化情况

HE 染色观察各组大鼠坐骨神经的变化情况。如图 4 所示,正常组:坐骨神经有髓神经纤维排列紧密,轴索排列整齐,髓鞘结构完整;DNP 组:坐骨神经有髓神经纤维排列紊乱,轴索肿胀,髓鞘密度不均匀,空泡变性。DNP+EA 组:坐骨神经有髓神经纤维排列紊乱,轴索肿胀。

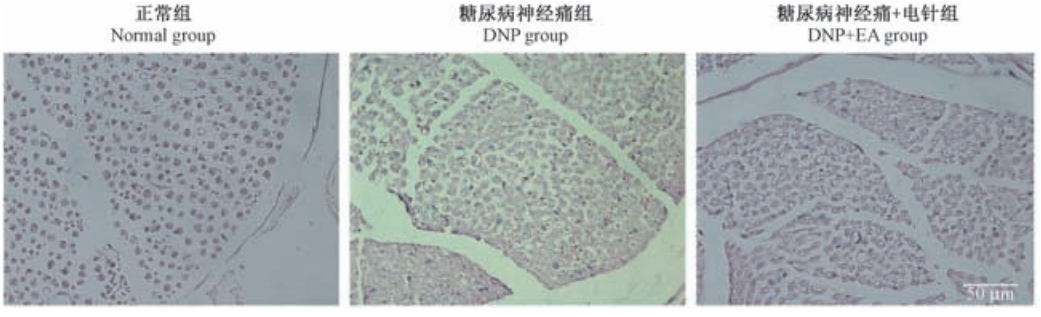
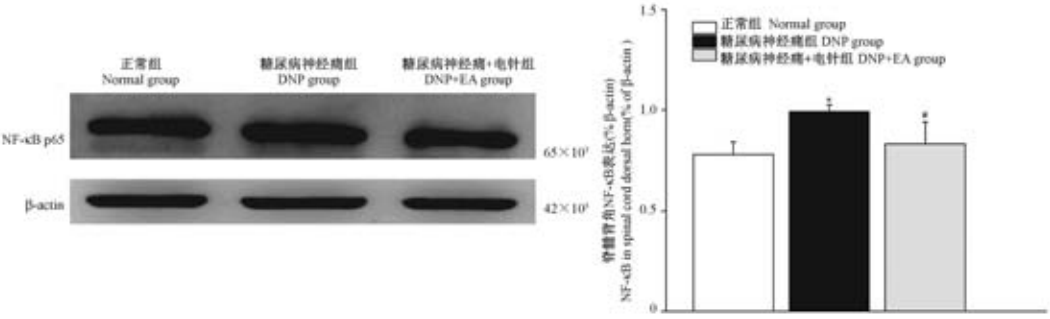


图 4 各组大鼠坐骨神经变化(×40)

Figure 4 Changes of sciatic nerve in rats of each group (×40)

2.5　各组大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白表达的变化

采用免疫印迹法检测大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白的表达。如图 5 所示，与正常组相比，DNP 大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白表达增多（$P< 0.05$），电针干预能下调 DNP 大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白的表达（$P< 0.05$）。



注：与正常组相比，$^{*}P< 0.05$，与糖尿病神经痛组相比，$^{\#}P< 0.05$。

图 5　各组大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白变化

Note. $^{*}P< 0.05$, vs. the Normal group. $^{\#}P<0.05$, vs. the DNP group.

Figure 5　Changes of NF-κB p65 in the spinal cord dorsal horn of rats in each group

3　讨论

糖尿病神经痛是糖尿病常见的并发症[10]，既有痛觉过敏、痛觉超敏、自发痛等神经病理性疼痛的一般表现[11]，也会引起不同程度的抑郁、焦虑、失眠等，严重影响患者的生存质量[12]。链脲佐菌素能针对性的损伤胰岛 β 细胞从而使胰腺减少胰岛素分泌，因此被广泛应用于诱导糖尿病模型[13]。本研究采用高脂高糖饲料喂养 5 周联合单次腹腔注射 STZ 建立糖尿病神经痛大鼠模型，大鼠出现血糖明显上升，机械痛阈和热痛阈下降，坐骨神经有髓神经纤维排列紊乱，轴索肿胀，髓鞘密度不均匀，空泡变性。

大量研究表明，电针对不同类型的疼痛都具有良好的镇痛效果[8,14-15]，但不同频率的电针对不同性质的疼痛的镇痛效应不同。100 Hz 的高频电针对于完全弗氏佐剂所致的炎性痛镇痛效应最好[8]、2/100 Hz 对于骨癌痛大鼠的镇痛效应最佳[14]、而 2 Hz低频电针对于脊神经结扎神经病理痛大鼠镇痛效应最佳[15]。我们前期研究发现，电针干预糖尿病神经痛存在 2 Hz 低频电针优于 100 Hz 高频电针的优势[16]，故本研究采用 2 Hz 低频电针对糖尿病神经痛大鼠进行干预，结果显示低频电针可明显提高 DNP 大鼠的机械痛阈和热痛阈，表明低频电针能有效缓解糖尿病神经痛。

NF-κB 家族主要有 p50/p105（NF-κB1）、p50/p100（NF-κB2）、c-Rel、p65（RelA）、RelB 五种蛋白组成，其中 p65 是 NF-κB 家族中最主要的功能蛋白。NF-κB 在药物引起的神经痛模型大鼠脊髓背角表达上升，说明 NF-κB 参与了神经病理痛[17]。在本研究中免疫印记结果显示，DNP 模型大鼠脊髓背角 NF-κB p65 蛋白较正常组大鼠增多。在高血糖的状态下，NF-κB 活性持续升高，引起神经炎症反应，激活小胶质细胞和神经胶质细胞，这进一步增加了炎性介质的释放，释放的神经介质促进了神经纤维对疼痛刺激敏感的敏感程度[18]。免疫印记结果显示电针能降低糖尿病神经痛大鼠脊髓背角中升高的 NF-κB p65 蛋白，表明低频电针对 DNP 的干预作用可能与其对有效抑制脊髓背角 NF-κB p65 蛋白表达有关。

综上，低频电针能有效改善糖尿病神经痛，与其抑制脊髓背角 NF-κB p65 蛋白的表达有关，表明了低频电针在糖尿病神经痛临床中有较好的应用前景，为电针治疗糖尿病神经痛提供了部分理论依据。

参　考　文　献（References）

[1] Gonçalves NP, Vægter CB, Andersen H, et al. Schwann cell interactions with axons and microvessels in diabetic neuropathy [J]. Nat Rev Neurol, 2017, 13(3): 135-147.

[2] Xia Y, Shen S, Verma IM. Nf-κb, an active player in human cancers [J]. Cancer Immunol Res, 2014, 2(9): 823-830.

[3] Liu P, Yuan HB, Zhao S, et al. Activation of gabab receptor suppresses diabetic neuropathic pain through toll-like receptor 4 signaling pathway in the spinal dorsal horn [J]. Mediators Inflamm, 2018, 2018: 6016272.

[4] Zhou YF, Ying XM, He XF, et al. Suppressing pkc-dependent

membrane P2X3 receptor upregulation in dorsal root ganglia mediated electroacupuncture analgesia in rat painful diabetic neuropathy [J]. Purinergic Signal, 2018, 14(4): 359-369.

[5] Garrow AP, Xing M, Vere J, et al. Role of acupuncture in the management of diabetic painful neuropathy (DPN): A pilot rct [J]. Acupunct Med, 2014, 32(3): 242-249.

[6] Liu W, Wang X, Zheng Y, et al. Electroacupuncture inhibits inflammatory injury by targeting the mir-9-mediated nf-kappab signaling pathway following ischemic stroke [J]. Mol Med Rep, 2016, 13(2): 1618-1626.

[7] 寿升芸, 魏骏骏, 何晓芬, 等. 低频电针对 2 型糖尿病神经痛大鼠 DRG P2X3 受体的抑制作用 [J]. 中国实验动物学报, 2017, 25(1): 54-59.
Shou SY, Wei JJ, He XF, et al. Inhibitory effect of low frequency electroacupuncture on the P2X3 receptor in dorsal root ganglion of rats suffering from type Ⅱ diabetic neuropathic pain [J].Acta Lab Anim Sci Sin, 2017, 25(1): 54-59.

[8] 项璇儿, 杜俊英, 方剑乔, 等. 电针对 CFA 致炎性痛大鼠热痛和机械痛优效频率观察及机制初探 [J]. 浙江中医药大学学报, 2016, 40(12): 891-897,922.
Xiang XE, Du JY, Fang JQ, et al. Frequency-dependent, analgesia effect of electroacupuncture on hyperalgesia and allodynia in a rat of inflammatory pain[J]. J Zhejiang Chin Med Univ, 2016, 40(12): 891-897,922.

[9] 杜俊英, 方剑乔, 梁宜, 等. 大鼠脊髓提取改良法 [J].中华病理学杂志,2011, 40(2): 115-116.
Du JY, Fang JQ, Liang Y, et al. Improved spinal cord extraction in rats [J].Chin J Pathol, 2011, 40(2): 115-116.

[10] Candrilli SD, Davis KL, Kan HJ, et al. Prevalence and the associated burden of illness of symptoms of diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy [J]. J Diabetes Complications, 2007, 21(5): 306-314.

[11] Tavakoli M, Malik RA. Management of painful diabetic neuropathy[J]. Expert Opin Pharmacother, 2008, 9(17): 2969-2978.

[12] Gore M, Brandenburg NA, Dukes E, et al. Pain severity in diabetic peripheral neuropathy is associated with patient functioning, symptom levels of anxiety and depression, and sleep [J]. J Pain Symptom Manage, 2005, 30(4): 374-385.

[13] Goyal SN, Reddy NM, Patil KR, et al. Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes-a clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics [J]. Chem Biol Interact, 2016, 244: 49-63.

[14] 施任怡, 付桃芳, 蔡杨乾, 等. 电针抗骨癌痛大鼠吗啡耐受效应及其对蓝斑核 μ 阿片受体内吞的调控[J]. 针刺研究, 2019, 44(3): 161-169.
Shi RY, Fu TF, Cai YQ, et al. Electroacupuncture intervention relieves pain possibly by promoting MOR endocytosis in locus coeruleus in bone cancer pain rats with morphine tolerance [J]. Acupunct Res, 2019, 44(3): 161-169.

[15] 周杰, 陈贞羽, 龚杰, 等. 不同参数组合电针对 SNL 大鼠镇痛效应观察及对下丘脑内啡肽的影响 [J]. 中国医药导报, 2017, 14(23): 18-21.
Zhou J, Chen ZY, Gong J, et al. Analgesic effect of electroacupuncture with different parameters combinationson SNL and endorphin expression of hypothalamus in rats [J].Chin Med Her, 2017, 14(23): 18-21.

[16] He XF, Wei JJ, Shou SY, et al. Effects of electroacupuncture at 2 and 100 HZ on rat type 2 diabetic neuropathic pain and hyperalgesia-related protein expression in the dorsal root ganglion [J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2017, 18(3): 239-248.

[17] Xu J, Wang W, Zhong XX, et al. Express: Methylcobalamin ameliorates neuropathic pain induced by vincristine in rats: Effect on loss of peripheral nerve fibers and imbalance of cytokines in the spinal dorsal horn [J]. Mol Pain, 2016, 12: pii: 1744806916657089.

[18] Tan Y, Ichikawa T, Li J, et al. Diabetic downregulation of nrf2 activity via erk contributes to oxidative stress-induced insulin resistance in cardiac cells in vitro and in vivo [J]. Diabetes, 2011, 60(2): 625-633.

[收稿日期] 2019-07-30

万颖寒,慈磊,王珏,等. 淋巴细胞活化基因-3 敲除(*Lag*-3$^{-/-}$)小鼠构建及初步表型分析[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 49-57.

Wan YH, Ci L, Wang J, et al. Construction and preliminary phenotypic analysis of *Lag*-3$^{-/-}$ mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 49-57.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.008

淋巴细胞活化基因-3 敲除(*Lag*-3$^{-/-}$)小鼠构建及初步表型分析

万颖寒[1,2#],慈磊[2,3#],王珏[1,2],龚慧[1,2],万志鹏[3,4],奚骏[3],何敏珠[3],孙瑞林[3],费俭[2,3,4],沈如凌[1,2*]

(1. 上海实验动物研究中心,上海 201203; 2. 模式生物技术联合实验室,上海实验动物研究中心,上海 201203/同济大学生命科学与技术学院,上海 200092; 3. 上海南方模式生物科技股份有限公司,上海 201318; 4. 同济大学生命科学与技术学院,上海 200092)

【摘要】 目的 构建淋巴细胞活化基因-3(*Lag*-3)基因敲除小鼠,初步分析 *Lag*-3 基因敲除对小鼠表型影响,为后续 Lag-3 体内功能研究提供动物模型。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 技术结合受精卵显微注射构建敲除小鼠,通过分子鉴定筛选基因敲除阳性小鼠,利用 RT-PCR 和流式检测方法进一步验证 *Lag*-3 基因敲除小鼠体内 *Lag*-3 基因敲除效果;通过建立 ConA 诱导的肝损伤模型研究 *Lag*-3 基因在体内的功能。**结果** PCR 和产物测序结果显示,获得了 exon 2 缺失的 *Lag*-3 基因敲除小鼠;该基因敲除纯合子小鼠(*Lag*-3$^{-/-}$)经刀豆蛋白(ConA)刺激后,小鼠心脏、脾、肺、巨噬细胞和淋巴结中仅能检测到 Lag-3 mRNA 本底表达信号,小鼠巨噬细胞、脾细胞和淋巴结中仅能检测到非常低数量的 Lag-3 阳性细胞。表型分析发现,*Lag*-3 基因的缺失显著减少了 ConA 诱导的小鼠外周血、骨髓和脾 CD3$^+$T 细胞的数量,减轻了 ConA 诱发的急性肝损伤情况。**结论** 成功构建 *Lag*-3 基因敲除小鼠模型,肝损伤过程中的体内功能研究显示,Lag-3 缺失可以显著缓解 ConA 引发的肝损伤的发生。

【关键词】 Lag-3;CRISPR/Cas9;基因敲除;刀豆蛋白

【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2020) 01-0049-09

Construction and preliminary phenotypic analysis of *Lag*-3$^{-/-}$ mice

WAN Yinghan[1,2#], CI Lei[2,3#], WANG Jue[1,2], GONG Hui[1,2], WAN Zhipeng[3,4], XI Jun[3], HE Minzhu[3], SUN Ruilin[3], FEI Jian[2,3,4], SHEN Ruling[1,2*]

(1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China. 2. Joint Lab for Technology of Model Organisms, Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China/School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092. 3. Shanghai Model Organisms Center, Shanghai 201318. 4. School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092)

Corresponding author: SHEN Ruling. E-mail: shenruling@slarc.org.cn

【Abstract】 Objective To construct lymphocyte activation gene-3 (*Lag*-3)-knockout mice and analyze the influence of Lag-3 knockout on mouse phenotypes to provide an animal model for subsequent Lag-3 *in vivo* function

[作者简介]万颖寒(1984—),女,助理研究员。研究方向:模式生物研究。Email: wanyinghan@slarc.org.cn;
慈磊(1990—),男,助理研究员,研究方向:模式生物研究。Email: lei.ci@modelorg.com。
#共同第一作者

[通信作者]沈如凌(1981—),女,副研究员,研究方向:模式生物研究。Email: shenruling@slarc.org.cn

research. **Methods** Knockout mice were constructed via CRISPR/Cas9 technology combined with microinjection of fertilized eggs. The *Lag*-3-knockout mice were screened via molecular identification and further verified via RT-PCR and flow cytometry. *Lag*-3 gene function *in vivo* was studied by establishing a ConA-induced liver injury model. **Results** PCR and product sequencing showed that exon 2-deleted *Lag*-3-knockout mice were obtained. The heart, spleen, lung and macrophages from ConA-induced homozygous mice were evaluated with only Lag-3 mRNA background expression signals detected in phagocytes and lymph nodes and only very low numbers of Lag-3-positive cells detected in mouse macrophages, spleen cells and lymph nodes. Phenotypic analysis revealed that deleting the *Lag*-3 gene significantly reduced the number of ConA-induced $CD3^+$T cells in the peripheral blood, bone marrow and spleen as well as ConA-induced acute liver injury. **Conclusions** A *Lag*-3-knockout mouse model is successfully constructed. *In vivo* functional studies during liver injury show that *Lag*-3 deficiency significantly alleviated ConA-induced liver damage.

【**Keywords**】 Lag-3; CRISPR/Cas9; gene knockout; ConA

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Lag-3 全称淋巴细胞激活基因-3,又称为 CD223 和 Ly66,是一种定位于膜上的糖蛋白,属于免疫球蛋白(lg)超家族成员,含有四个 Ig 样结构域。Lag-3 在活化的 T 细胞、Treg 细胞、浆细胞样树突状细胞(pDC)、天然杀伤性细胞(NK)和 B 细胞上表达[1-2]。T 细胞激活后,白细胞介素 2(IL-2),IL-7 和 IL-12 会上调 Lag-3 的表达,Lag-3 以比 CD4 更高的亲和力与 MHC II 类分子结合,对 CD3T 细胞受体(TCR)复合物信号传导起负调控作用,进而抑制 T 细胞的过度活化和增殖,调控体内的免疫平衡[2-3]。Lag-3 也参与调节肿瘤微环境中的免疫应答,其通过阻断 T 细胞抗肿瘤功能的恢复途径在肿瘤免疫逃避中发挥重要作用[4],因此在免疫治疗中是一个重要的免疫检查点分子,受到广泛关注[5-7]。

鉴于 *Lag*-3 基因在体内的重要功能,早在 1996 年就建立了第一个 *Lag*-3 体内基因敲除小鼠模型,利用该模型首先发现 *Lag*-3 基因缺失显著影响了 NK 细胞的活性[8],在后续的研究中发现,在体内 Lag-3 不但调控活化 T 细胞的扩增[9],还调节浆细胞样树突状细胞稳态[10];在自身免疫疾病研究方面,近年来,利用 *Lag*-3 条件敲除小鼠模型,证明 Lag-3 可通过抑制 Treg 细胞的增殖,促进自身免疫疾病的发生,在 1 型糖尿病小鼠模型中敲除 Lag-3 可显著降低 1 型糖尿病的发生[11];这些研究表明,Lag-3 在体内多种生理、病理过程中扮演了重要角色。

急性肝炎仍然是危害人类生命健康的一类重要疾病。刀豆蛋白 A(ConA)诱导的急性肝损伤模型,通过活化 Th1 细胞,刺激库普弗细胞和肝细胞释放 TNF-α,IFN-γ 等细胞因子,招募淋巴细胞浸润,造成急性肝损伤,是研究人类肝脏自身免疫性肝炎和病毒性肝炎的常用模型。虽已有证据显示Lag-3 在病毒感染,肝炎等疾病过程中发挥作用,但还未有报道对 Lag-3 在体内肝损伤过程中的功能进行研究。

为了便于研究 Lag-3 在急性肝损伤过程中的功能,我们利用 CRISPR/Cas9 技术建立了 *Lag*-3 基因敲除小鼠(*Lag*-$3^{-/-}$),并在该模型上首次利用刀豆蛋白诱发急性肝损伤模型,对 Lag-3 在急性肝损伤过程中的功能进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

Lag-$3^{-/-}$小鼠由上海南方模式生物科技股份有限公司储存(储存编号:PR1-20180509)20 只 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠,4 周龄,体重 10 ~ 12 g;5 只 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠,8 周龄,体重 18 ~ 20 g;20 只 SPF 级雄性 C57BL/6 小鼠,8 周龄,体重 10 ~ 12 g;12 只 SPF 级雌性 ICR 假孕小鼠,8 周龄,体重 28 ~ 30 g;12 只 SPF 级雄性 ICR 结扎小鼠 8 周龄,体重 28 ~ 30 g;由上海南方模式生物科技股份有限公司繁育提供【SCXK(沪)2014-0002】。饲养于上海实验动物研究中心 SPF 级实验动物房【SYXK(沪) 2014-0002】,按照 SPF 级动物饲养要求进行饲养。所有操作均由上海南方模式生物科技股份有限公司实验动物管理和使用委员会(IACUC)审批通过(审批号:IACUC 号 2017-0032)。

1.1.2 主要试剂

pX-T7-sgRNA 质粒、Cas9 表达载体由上海南方模式生物科技股份有限公司构建。质粒小量提试剂盒和琼脂糖胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司,MESSAGE mMACHINE T7 Ultra Kit 试剂盒购自 Ambion 公司;APC 标记大鼠抗小鼠 Lag-3 抗体购自

Biolegend 公司;DH5α 感受态细胞及各种限制性内切酶、DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶和 PCR 相关试剂购自 TaKaRa 公司。

1.2　实验方法

1.2.1　sgRNA 设计和表达载体构建

小鼠 *Lag*-3 基因定位于第 6 条染色体的 19F2-F3 区段(Chromosome 19: 124,904,361-124,911,705,ENSMUSG00000032217.1),全长 2001 bp,有 8 个的外显子,表达蛋白全长 521 aa。针对小鼠 *Lag*-3 基因结构,通过在线 sgRNA 设计软件(http://crispr.mit.edu/),针对敲除区域(exon 2)在 intron 1 和 intron 2 中设计 sgRNA,最终在两个 intron 中各选择 2 个 sgRNA 靶位点,sgRNA 序列信息分别为:sgRNA1: 5′-CATCATGCCTCCCTGTTGAA-3′; sgRNA2: 5′-TGCCTCAGCCTCCCTTCAAC-3′; sgRNA3: 5′-ACTACAGGATGCCGGTGTGT-3′; sgRNA4: 5′-GTGGATTGCTCCCCACACAC-3′。根据 4 个 sgRNA 靶位点合成相应的 oligoDNA 用于 sgRNA 表达载体构建。

设计 4 对针对 *Lag*3 基因的 sgRNA 寡聚核苷酸链:正义链 1: 5′-CACCGCATCATGCCTCCCTGTTGAA-3′,反义链 1: 5′-AAACTTTCAACAGGGAGGCATGATG-3′; 正义链 2: 5′-CACCGTGCCTCAGCCTCCCTTCAAC-3′, 反义链 2: 5′-AAACTGTTGAAGGGAGGCTGAGGCA-3′; 正义链 3: 5′-CACCG ACTACAGGATGCCGGTGTGT-3′,反义链 3: 5′-AAACTACACACCGGCATCCTGTAGT-3′; 正义链 4: 5′-CACCGGTGGATTGCTCCCCACACAC -3′,反义链 4: 5′-AAACTGTGTGTGGGGAGCAATCCAC-3′。

将 *Lag*-3 sgRNA 寡核苷酸单链以逐步降温的方法退火成双链。BbsI 酶切 pX-T7-sgRNA 质粒使其线性化,回收后与 4 个寡核苷酸双链分别进行连接、转化感受态大肠杆菌;挑选抗性单克隆提取质粒 DNA,进行测序鉴定,鉴定正确的阳性克隆保存备用。

1.2.2　sgRNA 和 Cas9 表达载体的体外转录

sgRNA 的表达载体 pX-T7-sgRNA 经酶切线性化后,按照 HiScribe™ T7 High Yield RNA Synthesis Kit 试剂盒说明书进行体外合成;Cas9 表达载体经酶切线性化,按照 mMESSAGEmMACHINE T7 Ultra Transcription Kit 试剂盒说明书进行体外转录。

1.2.3　阳性小鼠品系获得及鉴定

通过显微注射将 Cas9 mRNA 和 sgRNA 注射到 C57BL/6 小鼠受精卵胞质中,注射后受精卵移植到假孕雌鼠子宫中,待出生后获得 F0 代小鼠,PCR 方法筛选阳性基因型的 F0 代小鼠。*Lag*-3 基因敲除 F1 代杂合子小鼠(*Lag*-$3^{-/+}$)由 F0 代阳性小鼠与 C57BL/6 野生型小鼠交配获得,引物对 P1/P2 序列信息为:P1: 5′-GCTTCTGGGACTGCTTTGG-3′; P2: 5′-GGGTTGTCTAGGCGAGGG-3′,PCR 产物测序鉴定。PCR 条件为:94 ℃ 3 min; 35 个循环的 95 ℃ 30 s,56 ℃ 15 s,72 ℃ 2 min; 72 ℃ 5 min。F2 代 *Lag*-3 基因敲除纯合子小鼠(*Lag*-$3^{-/-}$)模型由 F1 代杂合子小鼠自交获得,基因型鉴定策略同 F1 代小鼠。

1.2.4　逆转录实时定量 PCR(RT-PCR)检测

将刀豆蛋白 A(concanavalin A, ConA)通过尾静脉按 12 mg/kg 剂量注射到小鼠体内,18 h 后取材。按照 TRIzol RNA 抽提试剂说明书,分别从脾、腹腔巨噬细胞和淋巴结中分离抽提细胞总 RNA。使用 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix(Transgen)将分别来自 *Lag*-$3^{-/-}$ 和野生型小鼠的 RNA 样品逆转录成 cDNA;TransStart Top Green qPCR SuperMix(Transgen)用于实时 PCR 扩增。反应条件如下:95℃ 3 min; 40 个循环的 95℃ 30 s,60℃ 15 s,72℃ 30 s;95℃ 15 s,60℃ 15 s。*Lag*-3 特异性引物序列信息为:上游序列:5′-CCTGGATCCTAACTTTCTACGAAG-3′,下游序列:5′-CGCTCAGCACCGTGTAG-3′。小鼠 *β-actin* 基因作为 *Lag*-3 基因表达水平的内参。*β-actin* 引物序列信息为:上游序列:5′-ATTGCTGACAGGATGCAGAA-3′,下游序列:5′-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3′。

1.2.5　流式细胞术(FACS)检测 Lag-3 表达

将 ConA 通过尾静脉按 12 mg/kg 剂量注射到小鼠体内,18 h 后取材。异氟烷麻醉小鼠后,取脾淋巴细胞、腹腔巨噬细胞和淋巴结,过筛网后分别获得细胞悬液;经去除红细胞和 PBS 洗涤后,①用荧光抗体 APC anti-mouse Cd223(Lag-3)对细胞进行标记,检测 Lag-3 表达;②用荧光抗体 FITC anti-mouse CD3e 和 APC anti-mouse Cd223(Lag-3)对细胞进行双标,检测 Lag-3 在 T 细胞上的表达,标记后的细胞,在冰上避光孵育 20 min,将细胞重悬于 Stain Buffer 中(含 1%FBS 的 PBS),Stain Buffer 洗涤两次后按常规方法上流式细胞仪 CytoFlex 检测,每个样品检测收集10 000 个细胞,结果用 CellQuest 软件分析。

1.2.6 血生化检测

同窝生 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠和野生型小鼠经 ConA 注射处理(方法同 1.2.5),18 h 后小鼠经异氟烷麻醉进行眼球取血,未经刀豆蛋白注射的同窝 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠和野生型小鼠同样进行眼球取血,使用全自动生化分析仪(日立 7180 型)对血液生化指标进行检测。

1.2.7 组织和病理学检测

同窝生 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠和野生型小鼠经 ConA 注射处理(方法同 1.2.5)后进行各组织器官取材、称重,同窝生未经刀豆蛋白注射的 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠和野生型小鼠同时进行取材。组织拍照后,小鼠各组织器官经过 PBS 清洗后固定于 4%多聚甲醛中,组织包埋切片后 H&E 染色拍照分析。

1.3 统计学分析

数据采用 GraphPad Prism 7.0 进行统计,数据表示为平均数±标准差($\bar{x} \pm s$),One-Way ANOVA 方法分析数据,$P < 0.05$ 为差异有显著性。

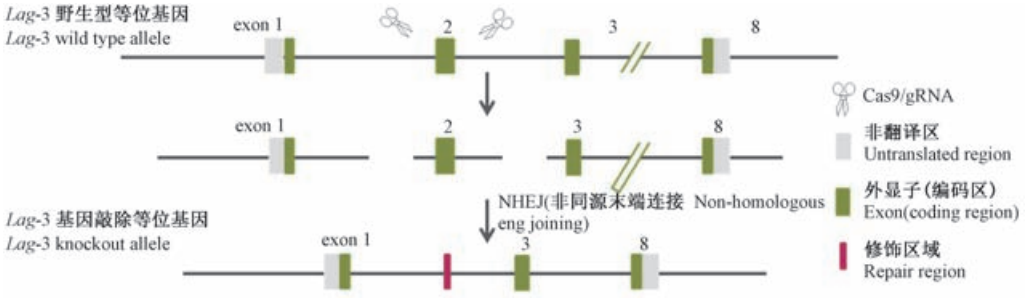
2 结果

2.1 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠的制备

Lag-3$^{-/-}$小鼠的构建策略如图 1 所示,Cas9/sgRNA 将 *Lag*-3 基因 exon 2 敲除,exon 2 区域的缺失将造成蛋白读码框移码,Lag-3 蛋白无法正确翻译,从而造成基因功能性缺失。将转录后的 *Lag*-3 sgRNA 和 Cas9 mRNA 混合物通过显微注射方式注射到 C57BL/6 小鼠受精卵胞质中,180 枚经过显微注射的受精卵移植到 9 只 ICR 假孕鼠输卵管中,共出生 36 只 F0 代小鼠(出生率为 20%),经 PCR 对 F0 代小鼠的基因型进行鉴定,凝胶电泳结果(图 2)显示 29 只小鼠中能检测到 Cas9/gRNA 作用后的变小条带(阳性率 80%),选择其中 2 只雄性小鼠(5 号和 23 号)分别与野生型 C57BL/6 雌鼠交配,PCR 鉴定加产物测序,确定 F1 代突变杂合子小鼠有 2 种基因类型:敲除类型 1 为缺失 421 个碱基对;敲除类型 2 为缺失 405 个并且替换 2 个碱基对。选择敲除类型 1 型的 F1 代 *Lag*-3$^{-/+}$小鼠进行自交,获得 F2 代 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠用于后续实验,阳性小鼠鉴定结果如图 3 所示。

2.2 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠 mRNA 水平和蛋白水平验证

注射 ConA 刺激后采用 Real-time PCR 和流式细胞术(FACS)分别在 mRNA 和蛋白水平检测*Lag*-3 基因敲除小鼠敲除效果。RT-PCR 结果如图 4A 所示:ConA 刺激后,*Lag*-3 敲除纯合子小鼠的心脏、脾、肺、肾、骨髓组织和腹腔巨噬细胞的 Lag-3 mRNA 表达水平均显著低于野生型小鼠($P < 0.001$)。利用流式细胞术(FACS)检测小鼠腹腔巨噬细胞、脾细胞和淋巴细胞的 Lag-3 蛋白表达情况,结果如图 4B-C所示:*Lag*-3$^{-/-}$小鼠的 Lag-3 信号水平非常低,腹腔巨噬细胞、脾细胞和淋巴细胞中可检测到的 Lag-3 信号表达分别占父群的(0.7 ± 0.36)%,(0.66 ± 0.48)%和(0.28 ± 0.09)%;而相应的野生型小鼠的 Lag-3 信号水平分别占父群的(12.39 ± 2.63)%,(24.5 ± 3.56)%和(5.73 ± 0.6)%。该结果从 mRNA 和蛋白水平上证明已成功构建 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠。

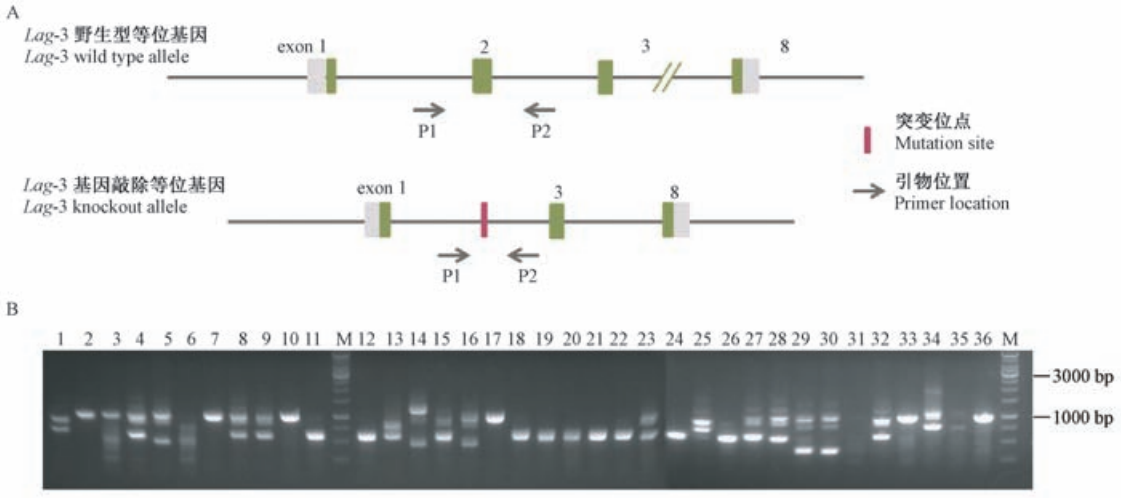


注:针对敲除区域(exon2), Cas9/sgRNA 识别并剪切目标靶序列,将 *Lag*-3 基因 exon 2 敲除。

图 1 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠构建策略

Note. For the knockout region (exon2), the Cas9/sgRNA complex knocks out the *Lag*-3 gene exon 2 by recognizing and cleaving the target sequence.

Figure 1 *Lag*-3$^{-/-}$ mice construction strategy

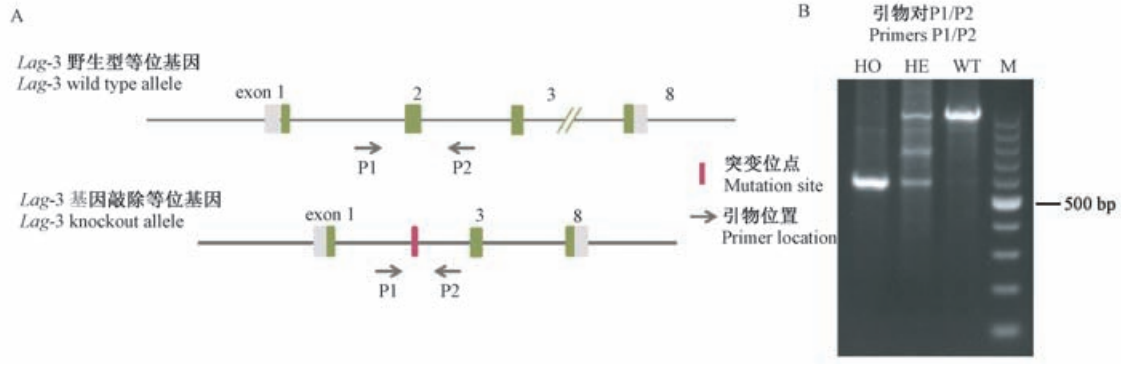


注：A：*Lag*-3 基因 F0 代小鼠敲除小鼠鉴定策略；B：F0 代小鼠基因型鉴定电泳结果。

图 2　F0 代小鼠基因型鉴定

Note. A, Identification strategy of *Lag*-3 gene knockout mice in the F0 generation. B, Electrophoresis results of genotype identification in F0 generation mice.

Figure 2　Genotype identification of F0 generation mice



注：A：*Lag*-$3^{-/-}$小鼠基因型鉴定策略；B：*Lag*-$3^{-/-}$小鼠基因型鉴定电泳结果。野生型小鼠 PCR 产物为一条 990 bp 条带；*Lag*-$3^{-/+}$小鼠 PCR 产物为 990 bp 和 569 bp 两条带；*Lag*-$3^{-/-}$小鼠 PCR 产物为一条 569 bp 条带。WT-野生型小鼠，HE-*Lag*-$3^{-/+}$小鼠，HO-*Lag*-$3^{-/-}$小鼠。

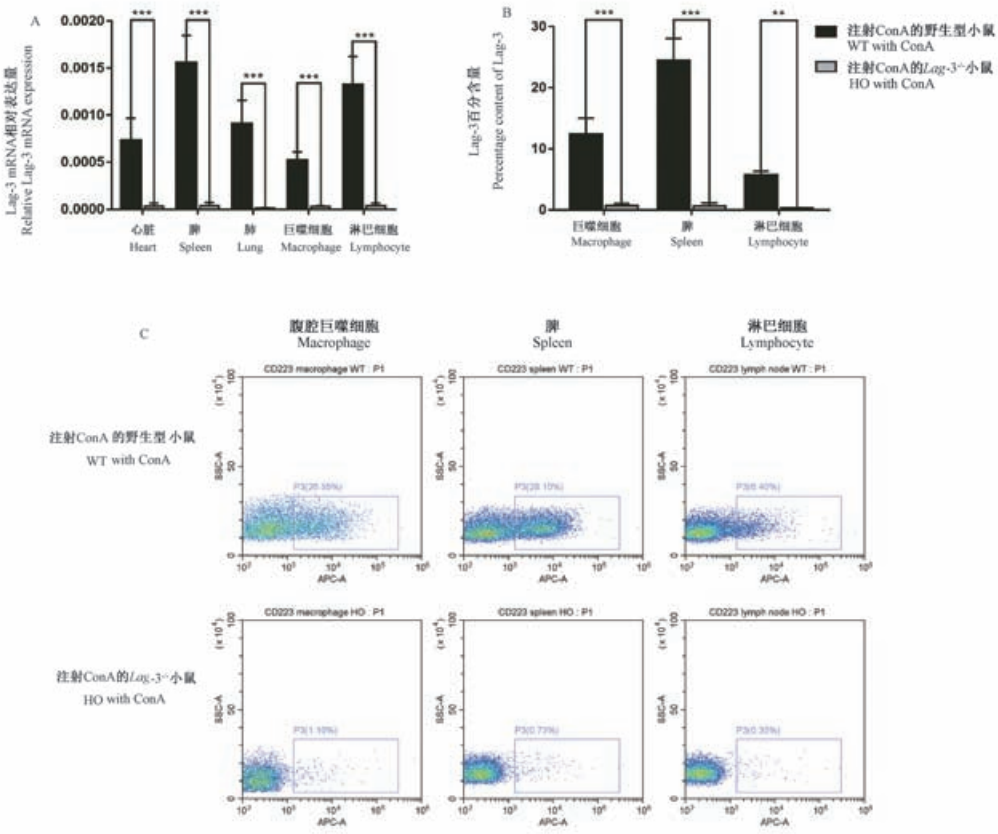
图 3　F2 代小鼠基因型鉴定

Note. A, Genotype identification strategy for *Lag*-$3^{-/-}$ mice. B, Electrophoresis results of genotype identification in *Lag*-$3^{-/-}$ mice. The wild-type mouse PCR product was a 990 bp band; the *Lag*-$3^{-/+}$ mouse PCR product was two bands of 990 bp and 569 bp; and the *Lag*-$3^{-/-}$ mouse PCR product was a 569 bp band. WT-wild type mice, HE-*Lag*-$3^{-/+}$ mice, HO-*Lag*-$3^{-/-}$ mice.

Figure 3　Genotype identification of F2 mice

2.3　ConA 刺激前后 *Lag*-$3^{-/-}$小鼠 $CD3^+T$ 细胞比例变化

利用流式细胞术（FACS）对小鼠血液、骨髓细胞和脾细胞中的 $CD3^+T$ 细胞表达检测，结果如图 5 所示：未注射 ConA 的情况下，和野生型小鼠相比，*Lag*-$3^{-/-}$小鼠的血液和脾细胞中 $CD3^+T$ 细胞比例无显著性差异，但骨髓中的 $CD3^+T$ 细胞比例显著性低于野生型小鼠；ConA 刺激后，野生型小鼠血液中的 $CD3^+T$细胞显著性升高，骨髓和脾中的 $CD3^+T$ 细胞比例略有下降，但没有显著性差异；而在 *Lag*-$3^{-/-}$小鼠中，ConA 刺激后，小鼠血液、骨髓细胞和脾细胞中的 $CD3^+T$ 细胞比例较刺激前均显著性降低。该结果说明 *Lag*-3 基因敲除显著降低了 ConA 刺激后小鼠 $CD3^+T$ 细胞量。



注：A：*Lag*-3 基因敲除野生型和纯合子小鼠组织 Lag-3 mRNA 表达水平检测结果；B：不同基因型小鼠腹腔巨噬细胞、脾细胞和淋巴结中 Lag-3 百分含量柱状图。与注射 ConA 的野生型小鼠组相比，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$；C：不同基因型小鼠腹腔巨噬细胞、脾细胞和淋巴结中 Lag-3 表达情况散点示意图。APC 标记荧光抗体 anti-CD223 检测。

图 4 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠 mRNA 和蛋白相对表达水平检测（$n=3$）

Note. A, Detection of Lag-3 mRNA expression levels in tissues of wild-type and *Lag*-3 gene knockout homozygous mouse tissue. B, Bar chart of Lag-3 percentage content in peritoneal macrophages, spleen cells and lymph nodes of mice with different genotypes. Compared to WT with ConA, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$. C, Scatter plot of Lag-3 positive cell in peritoneal macrophages, spleen cells and lymph nodes of mice with different genotypes. APC labeled fluorescent antibody anti-CD223.

Figure 4 Detection of relative mRNA and protein expression levels in *Lag*-3$^{-/-}$ mice ($n=3$)

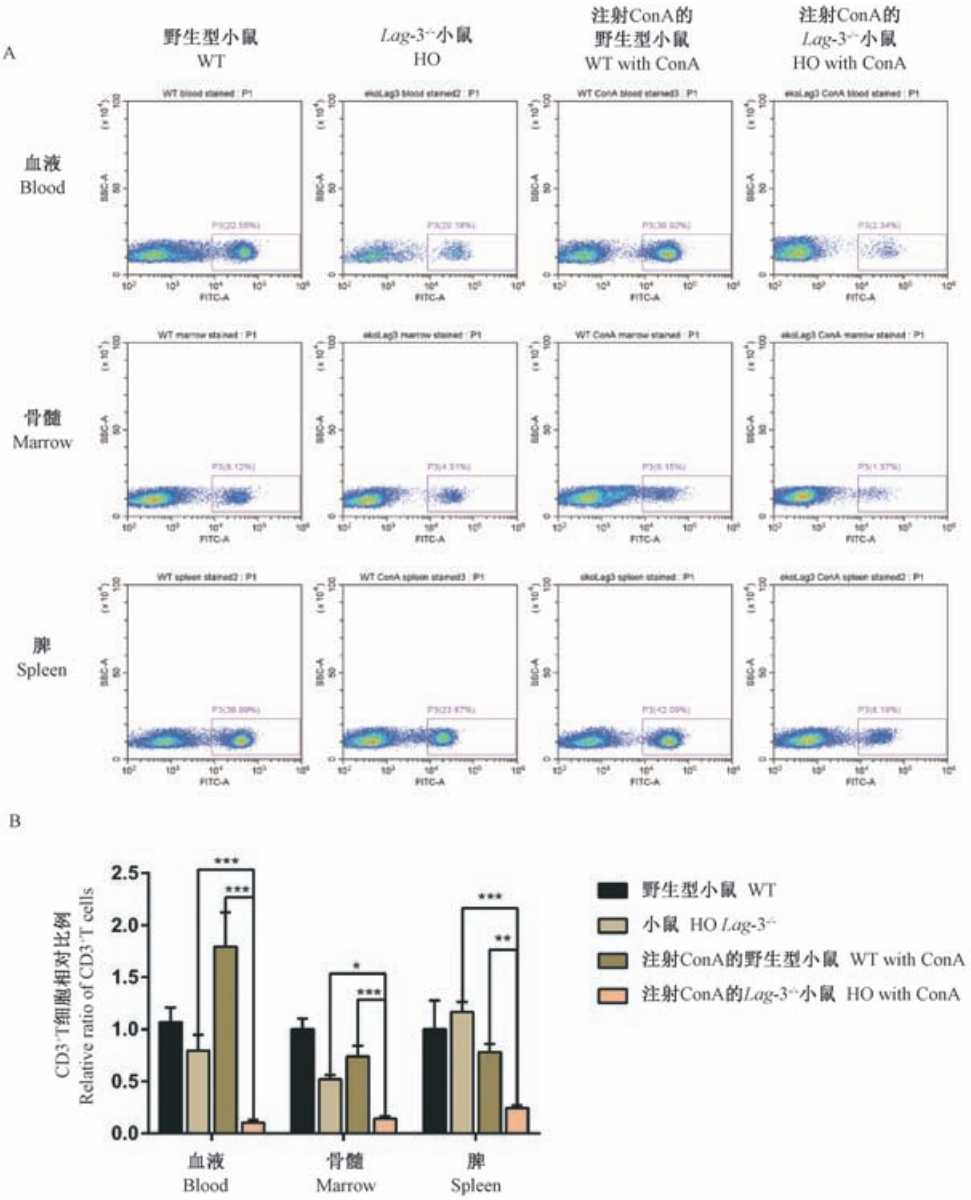
2.4 *Lag*-3 基因敲除减轻 ConA 诱导引起的小鼠肝损伤

分别取 ConA 注射前后的野生型和*Lag*-3$^{-/-}$小鼠血清，进行血生化指标检测，如图 6A 所示：诱导前两组小鼠的肝功能指标谷丙转氨酶（ALT）和谷草转氨酶（AST）水平无差异，注射 ConA 后，两组小鼠的肝功能指标 ALT 和 AST 均有大幅度增加，但野生型小鼠的 ALT 和 AST 增幅比*Lag*-3$^{-/-}$小鼠更大，两组小鼠之间有显著性差异；分别取诱导前后的野生型和 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾和胸腺组织进行称重和病理检测，结果发现：诱导前后各组小鼠的心脏、肝、脾、肺、肾和胸腺按组织/体重比分析，差异无显著性（图 6C）；取组织拍照（图 6B）并进行 H&E 染色后病理学观察（图 6D），发现诱导后野生型小鼠的肝和脾组织充血更明显。该结果说明 *Lag*-3 基因敲除可以减轻 ConA 诱导的肝损伤。

3 讨论

在过去十年中，旨在激活免疫系统以攻击癌细胞的疗法是对抗癌症的重要策略之一。

我们利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术，通过受精卵直接注射 Cas9 mRNA 和 guideRNA，构建了 C57BL/6 背景的 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠模型，获得的 F0 代小鼠 80%都可以检测到 CRISPR/Cas9 介导的基因编



注：A：野生型小鼠和 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠血液、脾细胞和骨髓细胞中 CD3$^+$T 细胞比例散点示意图；FITC 标记荧光抗体 anti-CD3 检测；B：野生型小鼠和 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠血液、脾细胞和骨髓细胞中 CD3$^+$T 细胞统计图；与注射 ConA *Lag*-3$^{-/-}$组相比，$^*P< 0.05$，$^{**}P< 0.01$，$^{***}P< 0.001$。

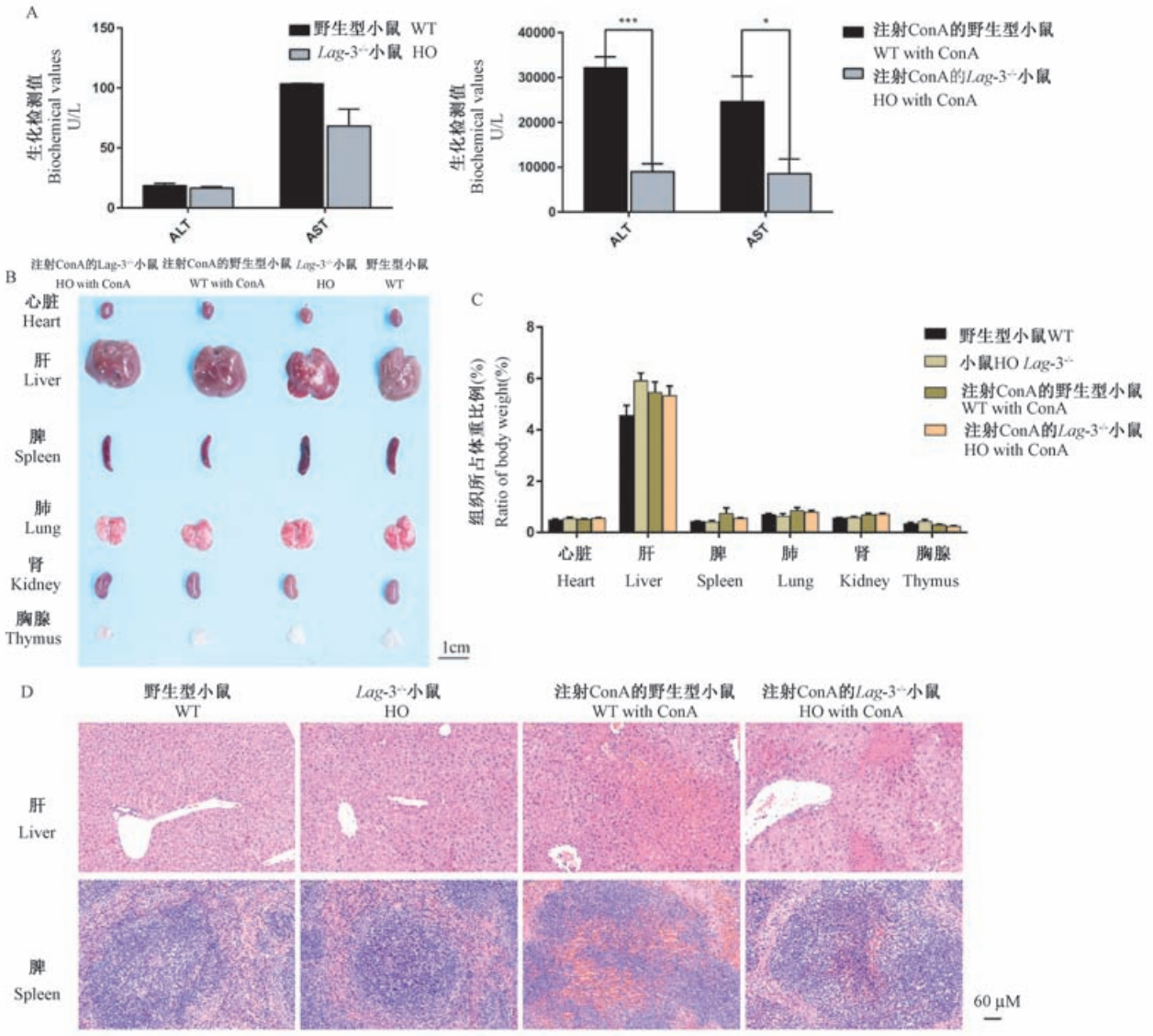
图 5　流式细胞术检测 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠 ConA 刺激前后 CD3$^+$T 细胞比例变化

Note. A, Scatter plot of the ratio of CD3$^+$T cells in blood, spleen cells and bone marrow cells in wild-type and *Lag*-3$^{-/-}$ mice; FITC-labeled fluorescent antibody anti-CD3 assay. B, Statistical map of the ratio of CD3$^+$T cells in blood, spleen cells and bone marrow cells of wild-type and *Lag*-3$^{-/-}$ mice. Compared to WT with ConA, $^*P < 0.05$, $^{**}P< 0.01$, $^{***}P< 0.001$.

Figure 5　Changes in the ratio of CD3$^+$T cells in *Lag*−3$^{-/-}$ mice by flow cytometry before and after ConA stimulation

辑效果，证明我们的设计方案和采用的方法是一个高效快速获得 Lag-3 基因敲除小鼠的方法。

通过对小鼠心脏、脾、肺、巨噬细胞和淋巴结 Lag-3 RNA 水平表达检测发现，基因敲除纯合子小鼠只能检测到本底信号，证明 RNA 水平实现了对 Lag-3 基因的敲除。在随后的蛋白水平验证发现，尽管 Lag-3 具有广泛的表达谱[12]，但根据我们在预实验中采用流式检测的方法发现：正常情况下，小鼠的脾、腹腔巨噬细胞、骨髓和淋巴结的 Lag-3 表达水平很低（数据未显示），而刀豆蛋白 A（concanavalin A, ConA）处理可以显著上调小鼠体内腹腔巨噬细胞、淋巴结和脾 Lag-3 的表达，这与以前的报道，活化的 T 细胞中 Lag-3 表达上调相一致。野生型小鼠和 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠的对比发现，与 ConA 处



注：A：野生型小鼠和 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠经 ConA 给药诱导前后，小鼠的肝功能指标变化：ALT-谷丙转氨酶，AST-谷草转氨酶，每组 3 只小鼠。与 *Lag*-3$^{-/-}$组或注射 ConA *Lag*-3$^{-/-}$组相比，$^{*}P<0.05$，$^{***}P<0.001$；B：ConA 诱导前后小鼠主要组织病理图 C：组织所占体重比；D，野生型小鼠和 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠 ConA 诱导前后，小鼠脏和脾 H&E 染色图（比例尺=60 μm）。

图 6 ConA 诱导前后，野生型小鼠和 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠病理检测

Note. A, Changes in liver function indexes of wild-type and *Lag*-3$^{-/-}$ mice before and after injection with ConA. ALT-alanine aminotransferase, AST-aspartate aminotransferase, 3 mice per group (Compared to *Lag*-3$^{-/-}$ or *Lag*-3$^{-/-}$ with ConA, $^{*}P<0.05$, $^{***}P<0.001$. B, Photograph of main tissues of mice before and after ConA injection. scale bar=1 cm, 3 mice per group. C, Measurement of tissue/body weight ratio of mice before and after ConA injection. D, HE staining of liver and spleen before and after ConA injection in wild type mice and *Lag*-3$^{-/-}$ mice, scale bar=60 μm.

Figure 6 Pathological detection of wild-type mice and *Lag*-3$^{-/-}$mice before and after ConA induction

理前相比，野生型小鼠 Lag-3 表达明显上调，而 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠心脏、脾和腹腔巨噬细胞中 Lag-3 mRNA 处于本底水平，与野生型小鼠相比有显著区别，同样流式检测方法检测腹腔巨噬细胞、脾细胞和淋巴结中 Lag-3 的表达情况，发现其蛋白表达也在本底水平。这些数据表明，我们已成功构建 *Lag*-3 基因敲除小鼠品系。

对 Lag-3 基因敲除小鼠的初步表型分析发现，*Lag*-3$^{-/-}$小鼠骨髓中的 CD3^{+}T 细胞比例显著减少，而外周血和脾中的 CD3^{+}T 细胞比例没有显著性变化；但我们用 T 细胞激活的刺激剂 ConA 处理小鼠后发现，*Lag*-3$^{-/-}$小鼠无论骨髓、外周血还是脾中的 CD3^{+}T 细胞比例较野生型小鼠均有非常显著降低，尤其 *Lag*-3$^{-/-}$小鼠外周血 CD3^{+}T 细胞比例只有野生

型的 1/15,我们推断 Lag-3 的缺失影响了 T 细胞的增殖,造成无法响应 ConA 的刺激。

ConA 作为一种 T 细胞激活剂,在动物实验中,经常用于诱导急性肝损伤,模拟人类肝脏自身免疫性肝炎和病毒性肝炎。ConA 刺激初步表型分析结果显示,基因敲除小鼠可能在肝损伤方面有相应的表型缺陷。另外,根据 2018 年 Wang 等[13]新的研究结果,与原来认为的 MHC-II 是 Lag-3 唯一的配体不同,纤维蛋白原样蛋白 1(FGL1)而非 MHC-II 是 Lag-3 主要的功能配体。FGL1 是一个分泌蛋白,正常情况下,在体内主要在肝中表达,表明 Lag-3 可能在肝生理病理过程中发挥重要功能。基于这两方面的证据,我们用 ConA 诱导的急性肝损伤模型对野生型和 *Lag*-3$^{-/-}$ 小鼠的响应情况进行了比较分析,结果显示 Lag-3 基因敲除可以显著减轻 ConA 诱导的急性肝损伤。目前对 Lag-3 研究的热点,主要集中在其作为一个重要的肿瘤免疫治疗靶点,通过与 PD1 靶点的协同作用进行抗肿瘤研究[5-6]。我们的研究结果显示,Lag-3 也可能是一个治疗急性肝损伤的靶点,目前多家药企已经开发了相应的抗体药物,并且进入临床,这些药物后续也有可能用于自身免疫性或者病毒性急性肝损伤的治疗。

综上所述,我们利用 CRISPR/Cas9 技术,建立了 *Lag*-3 基因敲除小鼠品系,在 RNA 和蛋白水平对该基因的敲除效果进行了验证,并通过 ConA 诱发的肝损伤模型,证明了 Lag-3 在急性肝损伤过程中发挥重要作用,为 Lag-3 体内基因功能研究提供了新的模型,为急性肝损伤的治疗提供了新的线索。

参 考 文 献(References)

[1] Huard B, Gaulard P, Faure F, et al. Cellular expression and tissue distribution of the human LAG-3-encoded protein, an MHC class II ligand [J]. Immunogenetics, 1994, 39 (3): 213-217.

[2] Woo SR, Turnis ME, Goldberg MV, et al. Immune inhibitory molecules LAG-3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape [J]. Cancer Res, 2012, 72 (4): 917-927.

[3] Workman CJ, Rice DS, Dugger KJ, et al. Phenotypic analysis of the murine CD4-related glycoprotein, CD223 (LAG-3) [J]. Eur J Immunol, 2002, 32 (8): 2255-2263.

[4] Sierro S, Romero P, Speiser DE. The CD4-like molecule LAG-3, biology and therapeutic applications [J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15 (1): 91-101.

[5] Andrews LP, Marciscano AE, Drake CG, et al. LAG3 (CD223) as a cancer immunotherapy target [J]. Immunol Rev, 2017, 276 (1): 80-96.

[6] Turnis ME, Andrews LP, Vignali DA. Inhibitory receptors as targets for cancer immunotherapy [J]. Eur J Immunol, 2015, 45 (7): 1892-1905.

[7] Workman CJ, Vignali DA. Negative regulation of T cell homeostasis by lymphocyte activation gene-3 (CD223) [J]. J Immunol, 2005, 174 (2): 688-695.

[8] Li J, Yang F, Wei F, et al. The role of toll-like receptor 4 in tumor microenvironment [J]. Oncotarget, 2017, 8 (39): 66656-66667.

[9] Zou J, Shankar N. Roles of TLR/MyD88/MAPK/NF-κB signaling pathways in the regulation of phagocytosis and proinflammatory cytokine expression in response to E. faecalis infection [J]. PLoS One, 2015, 10 (8): e0136947.

[10] Workman CJ, Wang Y, El Kasmi KC, et al. LAG-3 regulates plasmacytoid dendritic cell homeostasis [J]. J Immunol, 2009, 182 (4): 1885-1891.

[11] Zhang Q, Chikina M, Szymczak-Workman AL, et al. LAG3 limits regulatory T cell proliferation and function in autoimmune diabetes [J]. Sci Immunol, 2017, 2 (9): eaah4569.

[12] Huang CT, Workman CJ, Flies D, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells [J]. Immunity, 2004, 21 (4): 503-513.

[13] Wang J, Sanmamed MF, Datar I, et al. Fibrinogen-like protein 1 is a major immune inhibitory ligand of LAG-3 [J]. Cell, 2019, 176 (1-2): 334-347.

[收稿日期] 2019-07-22

鲁珽,辛永萍,林家彬,等. 糖尿病下肢溃疡小鼠模型的建立与评价[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 58-65.
Lu T, Xin YP, Lin JB, et al. Establishment and evaluation of a mouse model of diabetic hindlimb ulcers [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 58-65.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.009

糖尿病下肢溃疡小鼠模型的建立与评价

鲁珽[1],辛永萍[1],林家彬[1],陈民利[2*]

(1. 浙江大学医学院附属第二医院临床研究中心,杭州 310009;
2. 浙江中医药大学动物实验研究中心,杭州 310053)

【摘要】 目的 建立和评价糖尿病下肢溃疡小鼠模型,揭示糖尿病下肢溃疡小鼠手术肢血流和病理生理的改变,初探其发病机制,为研究糖尿病外周血管病变提供基础和参考。**方法** 小鼠分为下肢缺血组、糖尿病组和糖尿病下肢溃疡组。糖尿病下肢溃疡和糖尿病组腹腔注射链脲佐菌素(STZ)建立 1 型糖尿病模型。糖尿病下肢溃疡和下肢缺血组,采用高位结扎股动脉、股静脉并断离股动脉的方法建立下肢缺血模型;糖尿病组仅做假手术处理。术后第 0、3、7、14、21 天,用激光多普勒监测血流变化,观察肢体缺血坏死。第 21 天后 HE 切片观察组织形态变化,分析血小板-内皮细胞粘附分子-1(PECAM-1/CD31)及抗平滑肌抗体(SMA)表达。**结果** 缺血术后,与下肢缺血组小鼠比较,糖尿病下肢溃疡组体重显著下降,肢体坏死情况更严重。术后,糖尿病下肢溃疡组和下肢缺血组小鼠手术肢血流灌注下降明显;术后第 3、7、14 天,糖尿病下肢溃疡组和下肢缺血组血流灌注逐渐恢复;第 21 天,下肢缺血组接近正常水平,而糖尿病下肢溃疡组略有下降。糖尿病组无肢体坏死情况,血流灌注无明显变化。糖尿病下肢溃疡组和下肢缺血组小鼠手术肢腓肠肌组织有肌肉结构破坏和炎症浸润,CD31 表达明显增加;糖尿病下肢溃疡组和糖尿病组 SMA 有显著表达,而下肢缺血组表达不明显。**结论** 成功建立了糖尿病下肢溃疡小鼠模型,与下肢缺血小鼠模型对比,该模型有明显的肢体坏死症状和血流灌注恢复障碍。该模型可用于研究糖尿病血管病变发病机制的研究以及治疗药物的筛选。

【关键词】 糖尿病;下肢溃疡;下肢缺血;小鼠
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0058-08

Establishment and evaluation of a mouse model of diabetic hindlimb ulcers

LU Ting[1], XIN Yongping[1], LIN Jiabin[1], CHEN Minli[2*]

(1. Clinical Research Center, the Second Affiliated Hospital of Zhejiang University School of Medicine, Hangzhou 310009, China. 2. Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053)
Corresponding author: CHEN Minli. E-mail: cmli991@zcum.edu.cn

【Abstract】 Objective To establish and evaluate a mouse model of diabetic hindlimb ulcers, study the changes in blood flow and pathophysiology in mice with diabetic hindlimb ulcers, and explore the pathogenesis of the ulcers to provide a basis and reference for studying peripheral vascular diseases in diabetes. **Methods** ICR mice were divided into the diabetic hindlimb ulcer, hindlimb ischemia, and diabetic groups. Mice in the diabetic hindlimb ulcer and diabetes groups were intraperitoneally injected with streptozotocin to establish a model of type 1 diabetes. Mice in the diabetic hindlimb ulcer and hindlimb ischemia groups had their femoral arteries and veins ligated and their femoral artery severed. Sham

[基金项目]浙江省科技厅公益技术应用研究(实验动物)项目(2017C37156)。
Funded by Zhejiang Provincial Science and Technology Department Public Welfare Technology Application Research (Laboratory Animal) Project (2017C37156).
[作者简介]鲁珽(1985—),男,实验师,硕士研究生,从事药理学研究。Email:lutinghz@163.com
[通信作者]陈民利(1963—),女,教授,博士生导师,研究方向:实验动物与比较医学。Email: cmli991@zcum.edu.cn

surgery was performed in the diabetic group. Blood flow changes postoperation were detected via laser Doppler, and ischemic necrosis of the limbs was observed. Twenty-one days postoperation, hematoxylin and eosin staining was used to observe morphological changes in the ischemic tissue. Changes in CD31 and SMA expressions were analyzed. **Results** After the operation, the weight of the diabetic hindlimb ulcer group decreased significantly compared with that of the hindlimb ischemia group, and the hindlimb necrosis was more severe. Additionally, the diabetic hindlimb ulcer and hindlimb ischemia groups showed significantly decreased blood perfusion, which recovered gradually on days 3, 7, and 14 postoperation. Blood perfusion in the hindlimb ischemia group was near normal 21 days postoperation, but that of the diabetic hindlimb ulcer group decreased slightly. No significant change occurred in the diabetes group. In the diabetic hindlimb ulcer and hindlimb ischemia groups, muscle structure destruction and inflammatory infiltration occurred in the gastrocnemius tissues, and CD31 expression was increased. SMA expression was increased in the diabetic hindlimb ulcer and diabetes groups but not in the hindlimb ischemia group. **Conclusions** The diabetic hindlimb ulcer mouse model is successfully established. Limb necrosis and impaired recovery of blood perfusion are obvious in the diabetic hindlimb ulcer model compared with those of the hindlimb ischemia model. This model can be used to study the pathogenesis of diabetic vascular diseases and to screen therapeutic drugs.

【**Keywords**】 diabetes; hindlimb ulcer; hindlimb ischemia; mouse

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

糖尿病是继肿瘤、心血管疾病之后,严重威胁人类健康的主要疾病之一。因糖尿病引起的外周血管病变(peripheral arterial disease,PAD)是正常人的 2 ~ 4 倍,可累及全身重要血管,导致多种血管并发症,广泛影响着世界范围内的糖尿病患者[1]。其中,糖尿病下肢血管病变在糖尿病患者中约占 20%,常发展为严重下肢缺血,最终伤口难愈合、坏疽,甚至导致截肢[2]。目前,临床上对于糖尿病下肢血管病变仍面临巨大困难,迄今也未发现特别有效的药物和治疗措施[3],当病人足部发生坏疽时,截肢往往是患者和医生的唯一办法。模拟糖尿病并发外周血管疾病的动物模型,对糖尿病血管疾病研究至关重要。良好的动物模型可以帮助我们探究疾病的发病机制,筛选有效的治疗药物和措施。本实验在糖尿病小鼠模型的基础上建立下肢溃疡模型,用激光多普勒监测血流变化,观察模型足部坏死情况和缺血组织病理改变。并与单纯下肢缺血模型相比较,发现糖尿病下肢溃疡模型的特殊性。为研究糖尿病外周血管病变的发病机制和治疗措施提供依据和基础。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

SPF 级雄性 ICR 小鼠,8 周龄,体重(35 ± 2)g,90 只,来源于上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪) 2017-0005】。饲养于浙江大学医学院附属第二医院实验动物中心屏障环境【SYXK(浙) 2015-0010】,饲喂^{60}Co 辐照全价营养颗粒饲料,温度(22 ± 2)℃,相对湿度 50% ~ 70%,12 h/12 h 明暗交替,实验动物伦理批件号:浙医二院(2019 年度)第(085)号。

1.1.2　试剂及仪器

链脲霉素(STZ,上海生工生物工程股份有限公司);Anti-CD31 抗体(ab28364, abcam);Anti-alpha smooth muscle Actin 抗体(ab124964, abcam);Periscan PIM II 激光多普勒血流成像仪扫描(瑞典帕瑞医学科技有限公司);滨松 NanoZoomer 数字病理切片扫描仪(日本滨松);罗氏卓越型血糖测试仪(德国罗氏)。

1.2　方法

1.2.1　分组与造模

所有 ICR 小鼠适应性饲养 1 周后,随机分成 3 组,每组 30 只,即糖尿病下肢溃疡组、下肢缺血组和糖尿病组。糖尿病下肢溃疡组和糖尿病组小鼠建立糖尿病模型;糖尿病下肢溃疡组和下肢缺血组小鼠建立下肢缺血模型。

1.2.2　小鼠糖尿病模型的建立

造模前,小鼠禁食不禁水 8 h,腹腔注射链脲佐菌素(STZ)溶于 pH = 4.5 的柠檬酸缓冲液,连续给药 3 d,剂量分别为第一次 80 mg/kg、第二次 60 mg/kg、第三次 80 mg/kg。继续饲养 1 周后尾部采血检测血糖(重复 3 次),随机血糖 > 16 mmol/L 或空腹血糖≧11.1 mmol/L 认定为糖尿病小鼠模型成功。

1.2.3 小鼠下肢缺血模型的建立

糖尿病模型建立成功后,糖尿病下肢溃疡组和下肢缺血组小鼠采用高位结扎股动脉、股静脉并断离股动脉的方法建立下肢缺血模型,糖尿病组小鼠仅采用假手术处理,术后无动物死亡。

小鼠使用 0.3%戊巴比妥钠腹腔注射麻醉,剂量为 0.25 mL/10 g,待小鼠肌肉松弛,四肢无活动,触碰胡须无反应时,将小鼠仰卧固定于手术台上,用脱毛膏去除双下肢鼠毛,75%酒精消毒皮肤,右下肢为手术区,在体视显微镜下近卵圆窝处剪开皮肤,暴露股动脉,分离伴行静脉和神经,用 4 ~ 0 丝线结扎股动脉和静脉,在近膝关节处动脉分叉上端也相应结扎血管,剥离血管,用眼科剪离断动脉,无菌棉球按压止血 5 min,然后用 6 ~ 0 线缝合皮肤,75%酒精消毒一遍,俯卧置于 37℃恒温电热毯上保温 30 ~ 60 min 至小鼠苏醒。

1.2.4 指标观察和检测

(一)一般体征观察

动物分别于糖尿病造模前,下肢缺血手术前,术后第 7、14、21 天称量体重。手术后第 14 天,观察小鼠肢体缺血情况,用以下评估参考分值来判断:肤色、皮温未发生明显改变计 0 分;坏死局限于脚趾计 1 分;坏死局限于足背计 2 分;坏死局限于小腿计 3 分;坏死范围波及大腿以上计 4 分。

(二)激光多普勒检测

激光多普勒血流成像仪分别于缺血手术术前,术后第 0、3、7、14、21 天动态监测各组小鼠下肢血流变化情况,取缺血部位平均灌注量/正常部位平均灌注量进行统计分析。

使用激光多普勒血流成像仪扫描,每只小鼠记录约为 20 s。小鼠麻醉后放在 37℃恒温垫上保持体温,并去除下肢新生鼠毛,待小鼠循环呼吸平稳后仰卧固定于检测垫上,未手术左下肢为参照,计算右下肢相对血流灌注情况。检测完成后俯卧置于 37℃恒温电热毯上保温 30 ~ 60 min 至小鼠苏醒。

(三)组织取材

缺血手术第 21 天,过量麻醉处死动物,取腓肠肌,中性福尔马林固定、常规脱水、浸蜡、包埋、切片。进行 HE 染色,CD31 及 SMA 免疫组化染色。

1.3 统计学分析

所有计量数据均用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行 ANOVA 单因素方差分析,组间比较采用 LSD 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 一般体征与体重变化

糖尿病下肢溃疡组和糖尿病组小鼠在造模成功后,能出现典型的"三高一低"糖尿病症状。缺血术后第 21 天,糖尿病下肢溃疡组存活 28 只,下肢缺血组存活 27 只,糖尿病组存活 29 只。如图 1 所示,注射 STZ 后,糖尿病下肢溃疡组和糖尿病组体重略有增加,但不明显;缺血术后 7 d,三组小鼠体重皆有下降,糖尿病下肢溃疡组变化最大;术后第 14 天,三组小鼠体重开始增长,下肢缺血小鼠体重增长最快;术后第 21 天,只有下肢缺血组小鼠体重继续增长,其余两组都有不同程度体重下降,其中糖尿病下肢缺血组下降更明显,甚至较缺血术后仍有很大程度下降。

2.2 缺血下肢坏死评价

下肢缺血手术后第 14 天,小鼠缺血腿会发生不同程度坏死(见图 2),并评价小鼠下肢缺血坏死程度,标准如下:肤色、皮温未发生明显改变计 0 分;坏死局限于脚趾计 1 分;坏死局限于足背计 2 分;坏死局限于小腿计 3 分;坏死范围波及大腿以上计 4 分。

术后第 14 天,各组评分情况如表 1 所示。糖尿病下肢溃疡组平均评分最高,单纯下肢缺血组次之,糖尿病组接近于正常状态(见图 3)。糖尿病下肢溃疡组小鼠多为 1 分和 2 分;单纯下肢缺血小鼠多为 0 分和 1 分(见图 4)。

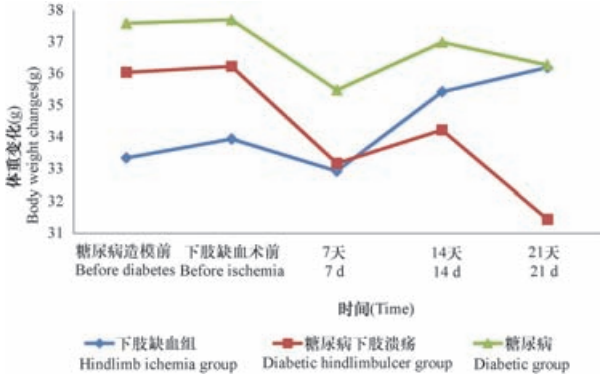


图 1 糖尿病下肢溃疡组、糖尿病组和下肢缺血组小鼠体重变化程度

Figure 1 Changes of body weight in diabetic hindlimb ulcer group, diabetic group and hindlimb ischemia group

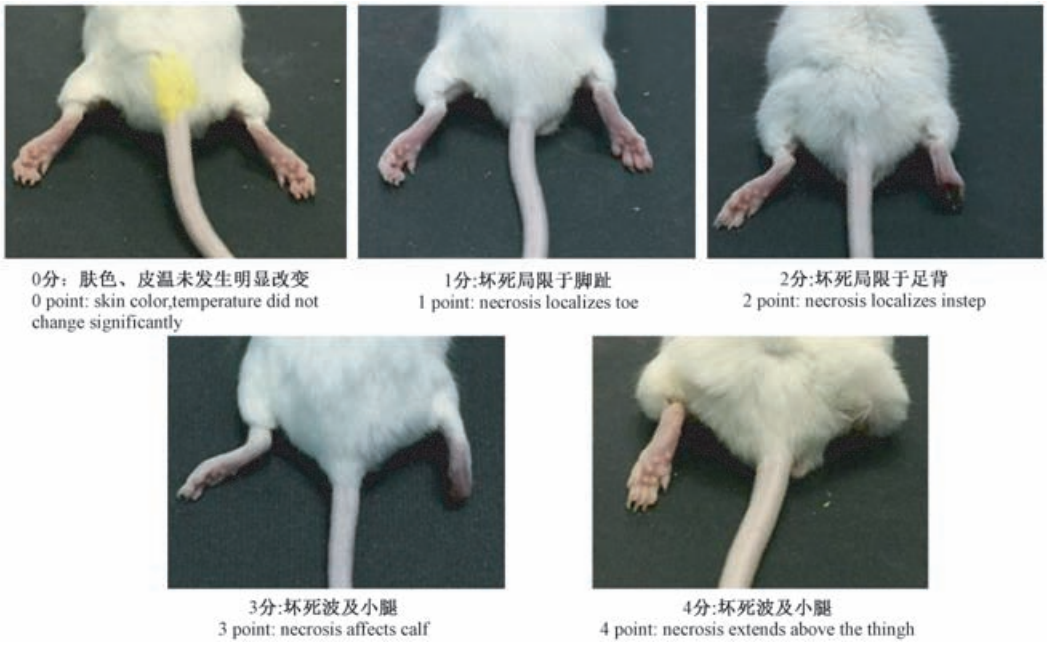


图 2　小鼠缺血下肢坏死程度

Figure 2　Necrosis degree of ischemic hindlimb in mice

表 1　糖尿病下肢溃疡组、糖尿病组和下肢缺血组小鼠坏死评分

Table 1　Necrosis scores of mice in diabetic hindlimb ulcer group, diabetic group and hindlimb ischemia group

组别 Groups	*n*	0 分 0 point	1 分 1 point	2 分 2 point	3 分 3 point	4 分 4 point
糖尿病下肢溃疡组 Diabetic hindlimb ulcer group	28	2	14	7	3	2
下肢缺血组 Hindlimb ischemia group	27	15	8	2	2	0
糖尿病组 Diabetic group	29	27	2	0	0	0

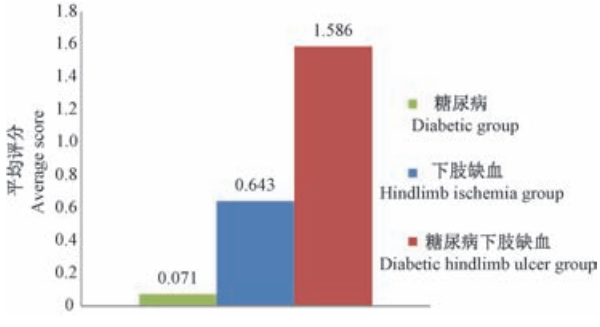


图 3　糖尿病下肢溃疡组、糖尿病组和下肢缺血组小鼠平均评分

Figure 3　Mean scores of mice in diabetic hindlimb ulcer group, diabetic group and hindlimb ischemia group

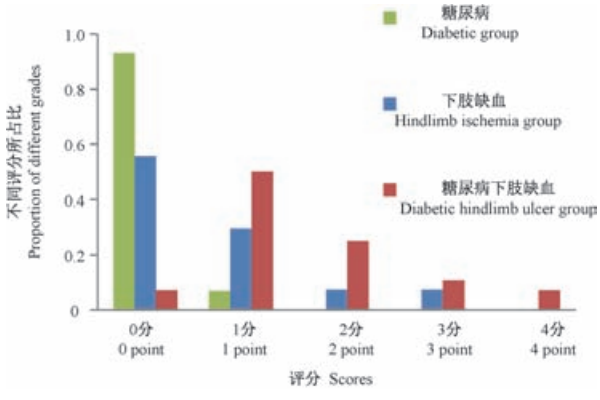


图 4　糖尿病下肢溃疡组、糖尿病组和下肢缺血组小鼠评分分布

Figure 4　Distribution of scores indiabetic hindlimb ulcer group, diabetic group and hindlimb ischemia group

2.3 下肢血流灌注变化监测结果

为了监测糖尿病下肢溃疡组、下肢缺血组和糖尿病组小鼠在缺血手术前后下肢血流灌注变化，用激光多普勒成像仪分别于术前，术后当天，术后第3、7、14、21 天，监测小鼠下肢的血流情况（见图 5）。

由各时间点多普勒血流灌注变化可知，糖尿病组小鼠下肢并未出现明显血流变化；下肢缺血组和糖尿病下肢溃疡组小鼠，术后缺血肢血流明显减弱，说明下肢缺血模型建立成功。术后，缺血肢皆有不同程度的恢复。单纯下肢缺血小鼠组的程度明显优于糖尿病下肢缺血组。如图 5 所示，术后第 14 天，下肢缺血组的血流灌注已比较充分，第 21 天几乎完全恢复。而糖尿病下肢溃疡组，术后第 7、14、21 天，恢复都不显著，甚至有加重趋势。用手术肢（右腿）/健全肢（左腿）的比率表示缺血下肢的血流灌注比，如图 6 所示，术后糖尿病下肢溃疡组和下肢缺血组的灌注比都明显下降，术后灌注比都有显著恢复下肢缺血组略好于糖尿病下肢溃疡组。第 14 天下肢缺血组灌注比继续恢复，第 21 天接近于正常，而糖尿病下肢缺血组灌注比却有明显下降。糖尿病组全程灌注比几乎不发生变化。

2.4 缺血下肢组织病理改变

术后第 21 天，取手术肢（右腿）腓肠肌 HE 染色（图 7A）：下肢缺血造模 21 d 后，糖尿病下肢溃疡组和下肢缺血组肌肉组织结构破坏，肌纤维呈现出明显的间隙，有炎症细胞浸润。其中，糖尿病下肢溃疡组肌肉组织结构破坏更加严重，间隙更明显。而糖尿病组肌肉组织变化不明显，结构未破坏。CD31 存在于内皮细胞内，可用于评估血管新生。如图 7B 所示，糖尿病下肢溃疡组和下肢缺血组肌肉组织中，CD31 表达明显，而糖尿病组几乎没有表达。如图 7C 所示，SMA 在糖尿病下肢溃疡组和糖尿病组的肌肉组织都有显著的表达，而下肢缺血缺血组表达不明显，提示 SMA 的表达可能与糖尿病相关。

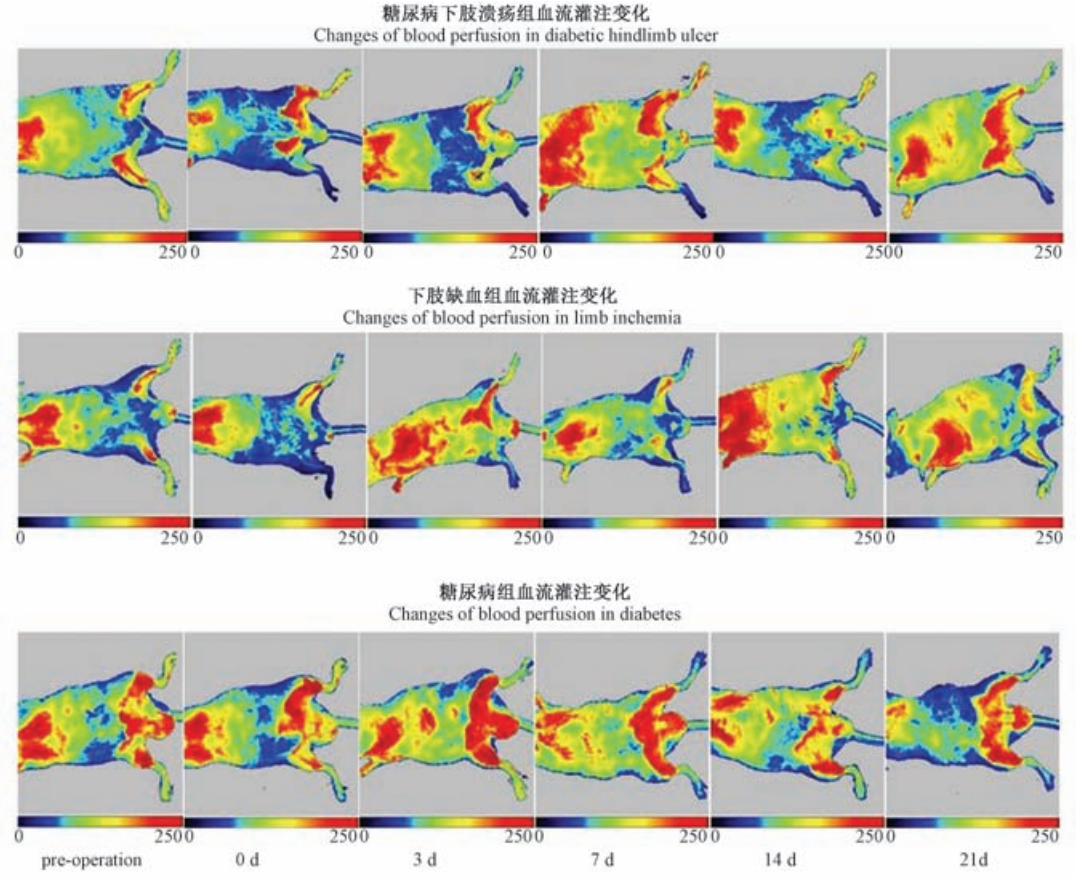


图 5 糖尿病下肢溃疡组、糖尿病组和下肢缺血组小鼠血流变化

Figure 5 Changes of blood flow in diabetic hindlimb ulcer group, diabetic group and hindlimb ischemia group

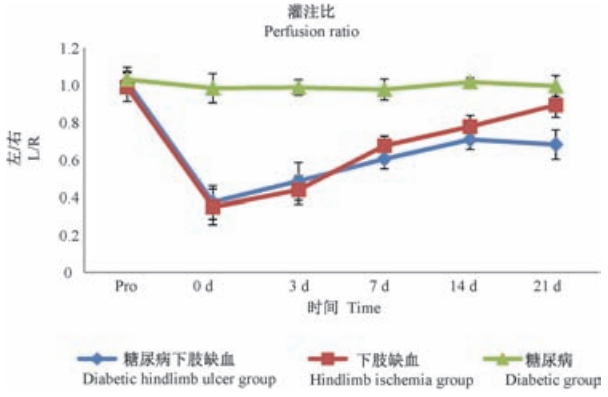


图 6　糖尿病下肢溃疡组、糖尿病组和下肢缺血组小鼠血流灌注比变化

Figure 6　Changes of blood perfusion ratio in diabetic hindlimb ulcer group, diabetic group and hindlimb ischemia group

3　讨论

糖尿病外周血管病变（peripheral arterial disease, PAD）是导致糖尿病足溃疡，下肢截肢的主要原因。糖尿病足作为糖尿病常见的难治性慢性并发症之一，发病率高达 25%[4]。目前，临床上 PAD 的治疗有很大的局限性，外科旁路手术或血管内介入无法处理糖尿病下肢广泛又弥漫性血管狭窄、闭塞。对于缺乏代偿性侧支的患者，采用任何手段都难使血管再通[5]。糖尿病血管病变的发病机理复杂，确切的分子病因和发病机制仍未完全阐明[6]。因此，仍需进一步研究糖尿病外周血管病变的机制，探索新的有效治疗方法。建立可靠的由缺

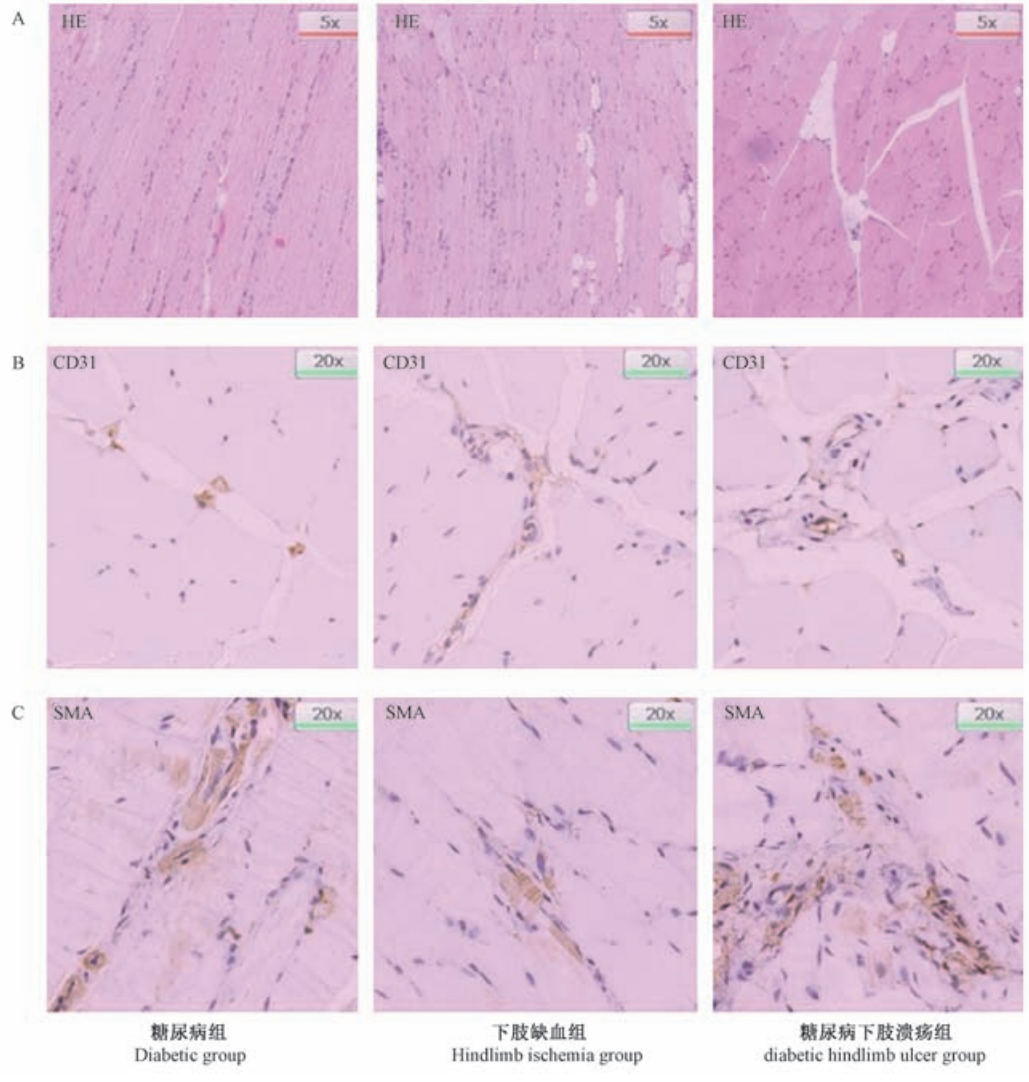


图 7　糖尿病下肢缺血组、糖尿病组和下肢缺血组小鼠手术肢腓肠肌 HE 染色（A），CD31（B）和 SMA（C）表达

Figure 7　HE staining（A）, CD31（B）and SMA（C）expression in the gastrocnemius muscle of operated limbs of mice in diabetic hindlimb ulcer group, diabetic group and hindlimb ischemia group

血引起的下肢溃疡动物模型是研究 PAD 发病机制，评价其治疗方法的基础。目前，常用的动物模型可分为模拟病理因素和模拟临床病征的动物模型两大类[7]。由于糖尿病动物自发病变形成足部溃疡耗时较长，不确定因素大，因此人为的阻断下肢血供从而造成缺血是构建下肢溃疡模型有效而可行的方法之一。小鼠下肢缺血模型造模方法有很多，根据不同的需要，模型可分为暂时性缺血和永久性缺血。永久性缺血模型又可以分为结扎切除法和缩窄栓塞法[8]。本实验在前期的研究中发现采用高位结扎股动脉、股静脉并断离股动脉的方法建立下肢缺血模型，肢体缺血明显、稳定且持久，对小鼠的创伤较小。腹腔注射 STZ 是常用的建立糖尿病模型的方法，给药连续 3 d 后，小鼠便出现“三多一少”的糖尿病典型症状，连续 3 次随机血糖 >16 或空腹血糖 ≥ 11.1 mmol/L 认定为糖尿病小鼠模型成功。

体重的变化可以反应小鼠的生理状况和缺血恢复。实验显示，糖尿病造模成功后，糖尿病小鼠体重变化不明显，增幅略小于正常小鼠。缺血术后，小鼠体重都有显著下降；术后 7 d，各组小鼠体重都有明显的回升；术后第 14 天，糖尿病下肢溃疡组体重却有显著的降低，甚至较术后低值仍有下降，而下肢缺血组体重逐渐恢复到正常水平。显然糖尿病下肢溃疡小鼠受到了糖尿病和下肢缺血的共同影响，恢复较下肢缺血小鼠差。这说明下肢缺血能在短期内对小鼠造成损伤，但机体能在短时间内自我修复；而糖尿病并发下肢缺血对小鼠的损伤更大，短时间无法恢复，甚至可能造成二次损伤。

肢体坏死是缺血的严重病症表现，通常坏死和溃疡也是同时存在的。糖尿病下肢溃疡组小鼠缺血肢基本都有不同程度的坏死，且多数坏死波及脚掌以及脚掌以上；下肢缺血组多数已经复原，坏死也仅限于脚趾。Kant 等[9]发现使用经典的抗炎、抗氧化药物姜黄素能提高抗氧化酶和抗炎因子的水平，在修复糖尿病溃疡上有较大应用前景。我们也在实验中发现，仅限于脚趾的溃疡是可以恢复的，但溃疡坏死波及到脚掌及以上是很难恢复的，甚至可能发生肢体坏死脱落，这可能与小鼠自身的抗炎抗氧化能力有关。

持续肢体缺血的动物模型必须具备以下 4 个条件[10]：(1)出现一定程度的缺血；(2)缺血可以保持一段时间；(3)缺血可以通过实验测得的数值所证实；(4)缺血的肢体和正常的肢体可以进行比较。多普勒血流监测结果显示，糖尿病下肢溃疡和下肢缺血小鼠术后第 0、3、7 天缺血明显；术后第 14、21 天，下肢缺血小鼠血供趋于正常，而糖尿病下肢溃疡小鼠仍明显可见血供不足。这说明糖尿病下肢溃疡小鼠缺血时间长，自体恢复差，该模型缺血明显且稳定。本实验用手术肢(右腿)/健全肢(左腿)的比率显示血流变化，这样可以排除环境和动物个体差异。结果显示，缺血术后，糖尿病下肢溃疡组和下肢缺血小鼠患肢血流都有显著的增加，可能是机体对缺血的反应，是缺血肢侧支循环的重建和再通。术后第 14、21 天，下肢缺血组血流继续恢复，并接近正常状态；糖尿病下肢溃疡组却趋于平台期，甚至有所恶化。手术肢腓肠肌病理切片显示糖尿病下肢溃疡组和下肢缺血组肌肉组织结构破坏，并有炎症细胞浸润，糖尿病下肢溃疡组肌肉组织结构破坏更严重。CD31 存在于内皮细胞内，用于评估血管新生。免疫组化结果显示糖尿病下肢溃疡组和下肢缺血组肌肉组织都有 CD31 表达，下肢缺血组 CD31 表达量高于糖尿病下肢溃疡组，说明糖尿病可能阻碍了血管新生。有研究表示[11]：糖尿病导致的外周血管病变会使局部缺血缺氧，血管内皮生长因子(VEGF)表达量下降，造成伤口久治不愈。SMA 表达体现了平滑肌细胞的增殖，本实验显示，SMA 的表达和下肢缺血无明显相关，但与糖尿病有密切关系，可能在糖尿病导致的外周血管病变中，平滑肌细胞增殖阻碍了血管新生，进而影响侧支循环的恢复，造成患肢继续缺血溃疡坏死。

糖尿病溃疡的发病是由血管病变、神经病变、感染和其他多种致病因素综合作用的结果[12]。本动物模型诱发糖尿病发生并继发下肢缺血，能很好的模拟临床诱导自发性的糖尿病下肢溃疡、糖尿病足，稳定而持久。结合多普勒血流监测和坏死评价，便于定量分析，可信度高，成模率较高，可以用于糖尿病导致的外周血管病变、糖尿病足的发病机制研究和治疗药物的筛选。但本模型建立的是急性下肢缺血，可能与临床糖尿病引起的慢性缺血造成的糖尿病足有所区别，仍需要对模型进行改进使之更贴近于临床。

参 考 文 献(References)

[1] Newton KM, Wagner EH, Ramsey SD, et al. The use of automated data to identify complications and comorbidities of diabetes: a validation study[J]. J Clin Epidermal, 1999, 52(3):199-207.

[2] O'Loughlin A, Mcintosh C, Dinncen SF, et al. Review paler: basic concepts to novel therapies: a review ofthe diabetic foot [J]. Iat J Low Extrem Wounds, 2010, 9(2): 90-102.

[3] Creager MA, Luscher TF, Cosentino F, et al. Diabetes andvascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: Part I. [J] Circulation, 2003, 108(12): 1527-1532.

[4] Hsu I, Parkinson LG, Shen Y, et al. Serpina3n accelerates tissue repair in a diabetic mouse of delayed wound healing[J]. Cell Death Dis, 2014, 5: e1458.

[5] Fleck CA, Chakravarthy D. Newer debridement methods for wound bed preparation [J]. Adv Akin Wound Care, 2010, 23(7): 313-315.

[6] Rathu HM, Boulton AJ. Recent advances in the diagnosis and management of diabetic neuropathy [J]. J Bone Joint Surg Br, 2005, 87(12): 1605-1610.

[7] 王芳,周翔宇. 下肢缺血动物模型研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(15): 2987-2990.
Wang F, Zhou XY. Research progress on hindlimb animal model [J]. Med Recap, 2016, 22(15): 2987-2990.

[8] 高思倩, 沈咏梅, 耿福能, 等. 糖尿病溃疡动物模型的建立及相关治疗研究进展 [J]. 浙江大学学报(医学版), 2017, 46(1): 97-105.
Gao SQ, Shen YM, Geng FN, et al. Research progress onthe animal models and treatment strategies of diabetic foot ulcer [J]. J Zhejiang Univ (Med Sci), 2017, 46(1): 97-105.

[9] Kant V, Gopal A, Pathak NN, et al. Antioxidant and anti-inflammatory potential of curcumin accelerated the cutaneous wound healing in streptozocin-induced diabetic rats [J]. Int Immunopharmacol, 2014, 20 (2): 322-330.

[10] Pu LQ, Jackson S, Lachapelle KJ, et al. A persistent hindlimb ischemia model in the rabbit [J]. J Invest Surg, 1994, 7(1): 49-60.

[11] Biscetti F, Straface G, De Cristofaro R, et al. High-mobility group box - 1 protein promotes angiogenesis after peripheral ischemia in diabetic though a VEGF-dependent mechanism [J]. Diabetes, 2010, 59(6): 1496-1505.

[12] Forsythe RO, Hinchliffe RJ. Management of peripheral arterial disease and the diabetic foot [J]. J Cardiovasc Surg (Torino), 2014, 55(2 Suppl 1):195-206.

[收稿日期] 2019-08-13

龚丽景,付鹏宇,朱镕鑫,等. 低氧训练对肥胖小鼠 Ghrelin-GHSR 通路的影响[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 66-72.
Gong LJ, Fu PY, Zhu RX, et al. Effect of hypoxic training on the Ghrelin-GHSR pathway in obese mice[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 66-72.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.010

低氧训练对肥胖小鼠 Ghrelin-GHSR 通路的影响

龚丽景[1],付鹏宇[2],朱镕鑫[3],张一民[1,4],许春艳[2*]

(1. 北京体育大学中国运动与健康研究院,北京 100084; 2. 北京体育大学运动人体科学学院,北京 100084;
3. 上海体育科学研究所,上海 200030; 4. 运动与体质健康教育部重点实验室,北京 100084)

【摘要】 目的 对肥胖小鼠施加低氧训练,观察胃组织 Ghrelin 和下丘脑 GHSR 水平的变化,以探究低氧训练是否影响 Ghrelin-GHSR 通路改善肥胖体质。**方法** 雄性 C57BL/6J 小鼠,随机分为普通对照组(C,$n=8$)和高脂膳食组(H,$n=52$)。H 组建立肥胖模型后,随机分为肥胖对照组(HC)、肥胖常氧运动组(HE)、肥胖低氧暴露组(HH)和肥胖低氧运动组(HHE)。运动各组进行中等强度跑台训练,低氧各组进行间歇低氧暴露(11.2%氧气含量),记录每周体重和摄食量,共 4 周。测试血清 TC、TG、GLU 和总 Ghrelin 水平,RT-PCR 法检测下丘脑 GHSR 和胃 Ghrelin mRNA 表达水平,WB 检测下丘脑 GHSR 和 NPY 蛋白含量及胃组织 Ghrelin、Goat 和 HIF-2α 蛋白含量。**结果** (1)干预 4 周后,HE、HH 和 HHE 组体重较 HC 组显著降低;低氧干预的最初阶段,HH 和 HHE 组的摄食量出现下降,但随着干预时间的延长,肥胖各组的摄食量逐步趋近;(2)HC 组血液各指标显著高于 C 组,HH 组 TC 水平较 HC 组显著降低,HE、HH 和 HHE 组 GLU 水平较 HC 组显著下降;HH 和 HHE 组血清总 Ghrelin 水平较 HC 组显著降低;(3)HC 组下丘脑 GHSR mRNA 和胃 Ghrelin mRNA 水平较 C 组极显著下降,HH 和 HHE 组下丘脑 GHSR mRNA 及 HHE 组胃 Ghrelin mRNA 水平较 HC 组显著上升;(4)HE、HH 和 HHE 组下丘脑 GHSR 蛋白水平显著高于 HC 组;HE 组和 HHE 组 NPY 蛋白水平显著高于 HC 组;(5)HE、HH 和 HHE 组胃 Ghrelin 蛋白水平显著高于 HC 组;HE 组和 HHE 组 Goat 蛋白水平显著高于 HC 组;HH 组和 HHE 组 HIF-2α 蛋白水平显著高于 HC 组。**结论** 低氧训练可通过调控 Ghrelin-GHSR 信号通路,影响糖脂代谢,从而降低肥胖小鼠的体重。

【关键词】 低氧训练;高脂膳食;胃组织;下丘脑;Ghrelin-GHSR 通路;小鼠
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0066-07

Effect of hypoxic training on the Ghrelin-GHSR pathway in obese mice

GONG Lijing[1], FU Pengyu[2], ZHU Rongxin[3], ZHANG Yimin[1,4], XU Chunyan[2*]

(1. China Institute of Sport and Health Science of Beijing Sport University, Beijing 100084, China.
2. Sport Science College of Beijing Sport University, Beijing 100084.
3. Shanghai Research Institute of Sports Science, Shanghai 200030.
4. Key Laboratory of Physical Fitness and Exercise, Ministry of Education, Beijing 100084)
Corresponding author: XU Chunyan. E-mail: xiaoxu131@126.com

【Abstract】 Objective To explore the mechanism of the ghrelin-GHSR pathway to alleviate obesity in hypoxic-exercise mice by observing ghrelin level changes in the gastric tissue and GHSR levels in the hypothalamic tissue. **Methods** Male C57BL/6J mice were randomly divided into the control group (C, $n=8$) or high-fat diet group (H, $n=52$) to establish the obesity model. After 8 weeks, the H group was further divided into the obese control group (HC), obese

[基金项目]中央高校基本科研业务费专项资金资助课题(2019PT003)。
Funded by Fundamental Research Funds for the Central Universities of China (2019PT003).
[作者简介]龚丽景(1981—),女,助理研究员,博士,主要研究方向为运动与脂肪代谢;低氧与胃肠道、骨骼肌萎缩。
Email:lijing.gong@bsu.edu.cn
[通信作者]许春艳(1978—),女,副教授,博士,主要研究方向为运动与脂肪代谢;运动处方。Email:xiaoxu131@126.com

exercise group (HE), obese hypoxic exposure group (HH) and obese hypoxic exercise group (HHE). The HE and HHE groups were intervened by mid-intensity treadmill training while under intermittent hypoxic exposure (11.2% oxygen). Weight and food intake were recorded weekly. Total cholesterol (TC), triglycerides (TG) and glucose levels in the serum were tested as well as the total ghrelin levels; the expression of GHSR mRNA in the hypothalamic tissue and ghrelin mRNA in the gastric tissue were detected via RT-PCR. GHSR and NPY in the hypothalamic tissue and the ghrelin, Goat and HIF-2α protein expressions in the gastric tissue were detected via western blot after 4 weeks of intervention. **Results** (1) The HE, HH and HHE group weights were significantly lower than those of the HC group after intervention. In the initial stage of hypoxic intervention, the food intake decreased in the HH and HHE groups, and the food intake in the obese groups gradually became nearly the same as the intervention time increased. (2) The serum levels of the HC group were significantly higher than those of the C group; the TC level in the HH group significantly decreased, and the glucose levels in the HE, HH and HHE groups significantly decreased. The serum total ghrelin levels in the HH and HHE groups were significantly lower than those of the HC group. (3) Compared with the C group, the GHSR mRNA level in the hypothalamic tissue and the ghrelin mRNA level in the gastric tissue of the HC group were significantly decreased. The GHSR mRNA levels in the HH and HHE groups were significantly higher than those in the HC group. (4) In the hypothalamic tissue, the GHSR protein levels in the HE, HH and HHE groups and the NPY protein levels in the HE and HHE groups were significantly higher than those of the HC group. (5) In the gastric tissue, the ghrelin protein levels in the HE, HH and HHE groups, the Goat protein levels in the HE and HHE groups and the HIF-2α protein levels in the HH and HHE groups were significantly higher than those in the HC group. **Conclusions** Hypoxic training affects glucose and lipid metabolism by regulating the ghrelin-GHSR signaling pathway in the gastric tissue to control weight in obese mice.

【**Keywords**】 hypoxic training; high-fat diet; gastric tissue; hypothalamus; ghrelin-GHSR pathway; mouse

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

低氧训练是指持续或间歇在低于正常氧气浓度的环境下(高原地区或人工模拟低氧舱)进行训练,利用低氧和训练的双重缺氧刺激以更多地调动机体潜能,是提高运动能力的有效训练方法[1]。随着全民健身观念的普及,低氧训练也逐步被引入大众健康领域。多项研究证明低氧训练具有较好的糖脂代谢的调控功能,低氧环境会减弱食欲,降低消耗吸收功能,从而减少摄食量[2],这些认知使低氧训练被认为是减肥的有效手段。

生长激素(growth hormone, GH)促分泌受体的内源性配体——胃促生长素/胃饥饿素(Ghrelin)发挥作用依赖于下丘脑分泌的生长激素促分泌素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)[3]。Ghrelin 在 Ghrelin-O 乙酰基转移酶(ghrelin O-acyltransferase, GOAT)的作用下酰基化是其与受体 GHSR 结合产生生物学效应的前提[4]。Ghrelin 及相关通路不仅可通过调节神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)发挥促食欲功效[5],还调控能量平衡并参与调控中枢和外周的脂质代谢[6]。低氧环境下低氧诱导因子(hypoxia inducible factor, HIF)被激活参与机体的适应性应答,其中 HIF-2α 与脂代谢密切相关[7]。那么低氧训练发挥减脂控重的作用是否通过调控胃组织 Ghrelin-GHSR 通路发挥作用尚无研究,因此本研究拟通过对肥胖小鼠施加低氧运动干预,观察胃组织 Ghrelin-GHSR 通路相关基因改变,以探究低氧训练发挥减肥作用的机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

60 只 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,3 周龄,体重为(8.2 ± 0.1)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,【SCXK(京)2015-0004】,饲养期间各组小鼠均自由摄食饮水;普通维持饲料由中国军事医学科学院实验动物中心【SCXK(军)2012-0004】提供;高脂饲料购于美国 Research Diet(D12109C,含 40% kcal 脂肪)。小鼠于北京体育大学动物实验室【SYXK(京)2016-0033】饲养:昼夜 12/12 h,湿度恒定,温度控制在 22 ~ 25℃。本研究经北京体育大学运动科学实验伦理委员会批准(批准号:IACUC 2015021)。

1.1.2　实验试剂

Anti-GHSR (Abcam ab95250)、Anti-Ghrelin (Abcam ab129383)、Anti-GOAT(Abcam ab170690)、Anti-NPY(Santa Cruz, sc-14728-R)、HIF-2α(Abcam ab109616)、anti-Tubulin(博奥森 bs-4511R),HRP 标

记的山羊抗兔 IgG(Goat Anti-rabbit IgG/HRP,博奥森 bs-0295G-HRP),SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate(Thermo Scientific,34095),Rat/mouse Ghrelin(Total)ELISA Kits(Merck EZRGRT-91 K),MiniBEST Universal RNA Extraction Kit(TaKaRa 9767),PrimeScript™ Master Mix(TaKaRa RR036A),SYBR Premix Ex Taq II(TaKaRa RR820A)。

1.1.3 仪器

实时荧光定量 PCR 仪(ABI 7500,美国),动物跑台(杭州段氏 DSPT-215,中国),制氮机(北京创文,中国),空气压缩机(英格索兰,美国),全自动生化分析仪(日立 7020,日本),酶标仪(Bio-Rad 680,美国),超微量分光光度仪(NanoDrop 2000,美国),蛋白转印仪(Thermo Scientific iBlot 2,美国),ChemiDoc™ XRS+成像系统(Bio-Rad,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及实验干预

小鼠随机分为普通膳食对照组(C,$n=8$,饲喂普通维持饲料)和高脂膳食组(H,$n=52$,饲喂高脂饲料)。8 周后,选择 H 组大于 C 组平均体重的 20%作为肥胖模型,随机分为:肥胖对照组(HC,$n=8$)、肥胖常氧运动组(HE,$n=8$)、肥胖低氧暴露组(HH,$n=8$)和肥胖低氧运动组(HHE,$n=8$),继续饲喂高脂饲料。HE 和 HHE 组进行跑台训练,速度 12 m/min,1 h/d。HH 和 HHE 组暴露在 11.2%的低氧房中,8 h/d;其中 HHE 组每天固定时间在低氧环境中运动 1 h,6 次/周。干预共 4 周。

1.2.2 形态指标测试及取材

每周记录体重和摄食量。完成训练后禁食 12 h,腹腔麻醉(1%的戊巴比妥钠,40 mg/kg 体重),心脏取血,收集血清,-20℃保存。开腹取胃底部和开颅取下丘脑组织,分别置于 RNA 保存液和-80℃保存,分别用于 RNA 和蛋白含量的测试。

1.2.3 血液生化指标和总 Ghrelin 水平测试

采用全自动生化分析仪测试血液甘油三酯(triglyceride,TG)、总胆固醇(total cholesterol,TC)和血糖(glucose,GLU)水平。酶联免疫吸附法(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)测试血清总 Ghrelin 水平。

1.2.4 下丘脑 GHSR 和胃组织 Ghrelin mRNA 相对含量测定

使用试剂盒提取胃和下丘脑总 RNA,检测总 RNA 浓度,逆转录获取 cDNA 后,按说明书进行 PCR 反应。Ghrelin 和 GHSR 引物参考付鹏宇等[8],由生工生物工程(上海)有限公司合成。18S 为内参基因(德国 QIAGEN QT01036875)。采用比较阈值法(△△Ct 法)对目的基因的相对表达进行分析。

1.2.5 下丘脑 GHSR、NPY 和胃组织 Ghrelin、Goat、HIF-2α 蛋白水平测定

提取下丘脑和胃组织总蛋白质,BCA 法定量总蛋白质浓度,用蛋白免疫印迹法(Western Blot,WB)检测各蛋白的表达情况。电泳分离蛋白,转至 NC 膜,BSA 封闭 1 h,分别 4℃孵育一抗过夜,洗去未结合的一抗,室温孵育二抗 1 h,洗去未结合的二抗,滴加化学发光 HRP 底物,立即用 ChemiDoc™ XRS+成像系统(Bio-Rad)曝光条带,使用 Image Lab 软件进行相对定量分析。

1.3 统计学分析

所得数据用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析。统计方法选用独立样本 t 检验(HC 组与 N 组比较,HH 组与 HC 组比较)。$P<0.05$ 表示差异有显著性,$P<0.01$ 表示差异具有极显著性。

2 结果

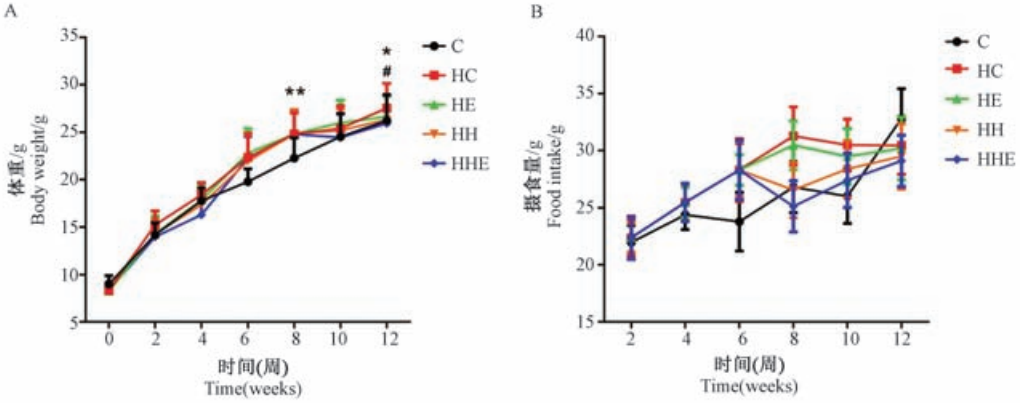
2.1 干预期间小鼠体重和摄食量变化

各组小鼠初始体重平均值为(8.2 ± 0.1)g,饲喂 8 周高脂饲料后,将 H 组体重大于 C 组平均体重 20%的小鼠随机分成 HC 组、HE 组、HH 组和 HHE 组,未达标小鼠弃去。此时,HC 组、HE 组、HH 组和 HHE 组小鼠体重极显著高于 C 组($P<0.01$);干预 4 周(饲喂 12 周),HC 组显著高于 C 组,HH、HE 和 HHE 组较 HC 组显著下降($P<0.05$)。适应性喂养结束后,C 组饲喂普通维持饲料,H 组持续饲喂高脂饲料。建立肥胖模型期间(8 周前),C 组小鼠摄食总量较 H 组少;饲喂第 10 周时(干预 2 周),C 组摄食量仍低于高脂膳食各组,HE、HH 和 HHE 组较 HC 组降低;饲喂第 12 周时(干预 4 周),C 组摄食量高于高脂膳食各组,HE、HH 和 HHE 组与 HC 组摄食量接近,见图 1。

2.2 各组小鼠血清 TG、TC、GLU 和总 Ghrelin 水平

4 周干预完成后,HC 组各项血液指标均显著高于 C 组($P<0.05$);与 HC 组相比,HE 组血清 TG、TC 水平无显著性差异,但 GLU 水平显著性降低

($P<0.05$)；HH 组血清 TC 和 GLU 水平显著低于 HC 组，且 TC 水平显著低于 HE 组($P<0.05$)；HHE 组血清 TG 水平较 HC 组无显著性差异，TC 水平显著低于 HE 组，GLU 水平显著低于 HC 和 HE 组($P<0.05$)。HH 组和 HHE 组小鼠的各项指标无显著差异。4 周干预后，HC 组血清总 Ghrelin 水平较 C 组无显著性差异；HE 组较 HC 组无显著性差异；HH 和 HHE 组小鼠血清总 Ghrelin 含量较 HC 组均出现显著性上升，且 HHE 组较 HE 组显著性上升($P<0.05$)，见表 1。



注：C，普通膳食对照组；HC，肥胖对照组；HE，肥胖常氧运动组；HH，肥胖低氧暴露组；HHE，肥胖低氧运动组。下表/图同。与 C 组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与 HC 组相比，$^{\#}P<0.05$。

图 1　小鼠体重和摄食量变化

Note. C, the control group. HC, obese control group. HE, obese exercise group. HH, obese hypoxic exposure group. HHE, obese hypoxic exercise group. The same in the following table and figures. Compared with C group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$. Compared with HC group, $^{\#}P<0.05$.

Figure 1　Changes in body weight and food intake in mice

表 1　各组小鼠血清 TG、TC、GLU 和总 Ghrelin 水平($n=8$)

Table 1　Levels of serum TG, TC, GLU and total Ghrelin in each group of mice($n=8$)

组别 Groups	TG (mg/dL)	TC (mmol/L)	GLU (mmol/L)	Ghrelin (mmol/L)
C	0.29 ± 0.02	2.03 ± 0.09	8.50 ± 0.78	0.31 ± 0.09
HC	0.34 ± 0.03*	4.54 ± 0.03*	10.22 ± 1.77*	0.30 ± 0.06
HE	0.33 ± 0.04	4.66 ± 0.11	8.25 ± 1.33$^{\#}$	0.32 ± 0.11
HH	0.35 ± 0.07	3.98 ± 0.30$^{\#\triangle}$	8.06 ± 1.29$^{\#}$	0.36 ± 0.15$^{\#}$
HHE	0.33 ± 0.08	4.24 ± 0.26$^{\triangle}$	6.38 ± 1.72$^{\#\triangle}$	0.40 ± 0.21$^{\#\triangle}$

注：与 C 组相比，$^{*}P<0.05$；与 HC 组相比，$^{\#}P<0.05$；与 HE 组相比，$^{\triangle}P<0.05$。

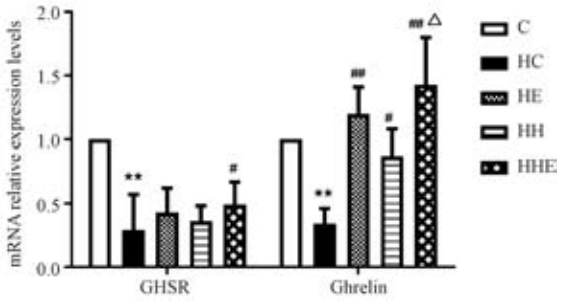
Note. Compared with C group, $^{*}P<0.05$. Compared with HC group, $^{\#}P<0.05$. Compared with HE group, $^{\triangle}P<0.05$.

2.3　下丘脑 GHSR 和胃组织 Ghrelin mRNA 的表达水平

与 C 组相比，12 周高脂喂养后，HC 组下丘脑 GHSR 和胃组织 Ghrelin mRNA 表达水平均极显著降低($P<0.01$)；4 周干预后，HE 和 HH 组下丘脑 GHSR mRNA 表达水平较 HC 组有增加趋势，但无显著差异，但 HE 和 HH 组胃组织 Ghrelin mRNA 表达水平较 HC 组显著性升高($P<0.01$ 或 $P<0.05$)；HHE 组下丘脑 GHSR mRNA 表达水平较 HC 组显著上升，胃组织 Ghrelin mRNA 表达水平较 HC 组极显著性增加，较 HE 组也显著性增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)，见图 2。

2.4　下丘脑和胃组织的蛋白表达水平

12 周高脂饲料喂养后，HC 组下丘脑 GHSR 和 NPY 的蛋白表达水平较 C 组无显著性差异；HE、HH 和 HHE 组下丘脑 GHSR 蛋白表达水平较 HC 组显著增加($P<0.05$)；HE 和 HHE 组下丘脑 NPY 蛋白表达水平较 HC 组显著上调($P<0.05$)(见图 3A，B)。高脂饲喂后，HC 组胃组织 Ghrelin、Goat 和 HIF-2α 的蛋白表达水平与 C 组相比无显著差异；HE 组胃组织 Ghrelin、Goat 较 HC 组显著增加($P<0.05$)；HH 组胃组织 Ghrelin 和 HIF-2α 的蛋白表达水平较 HC 组显著增加($P<0.05$)；HHE 组胃组织 Ghrelin、Goat 和 HIF-2α 的蛋白表达水平较 HC 组显著增加，且 HIF-2α 蛋白表达水平显著高于 HE 组($P<0.05$)(见图 3C，D)。



注:与 C 组相比,$^{**}P < 0.01$;与 HC 组相比,$^{\#}P < 0.05$,$^{\#\#}P < 0.01$;与 HE 组相比,$^{\triangle}P < 0.05$。

图 2 小鼠下丘脑 GHSR 和胃组织 Ghrelin mRNA 表达水平

Note. Compared with C group, $^{**}P < 0.01$. Compared with HC group, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$. Compared with HE group, $^{\triangle}P < 0.05$.

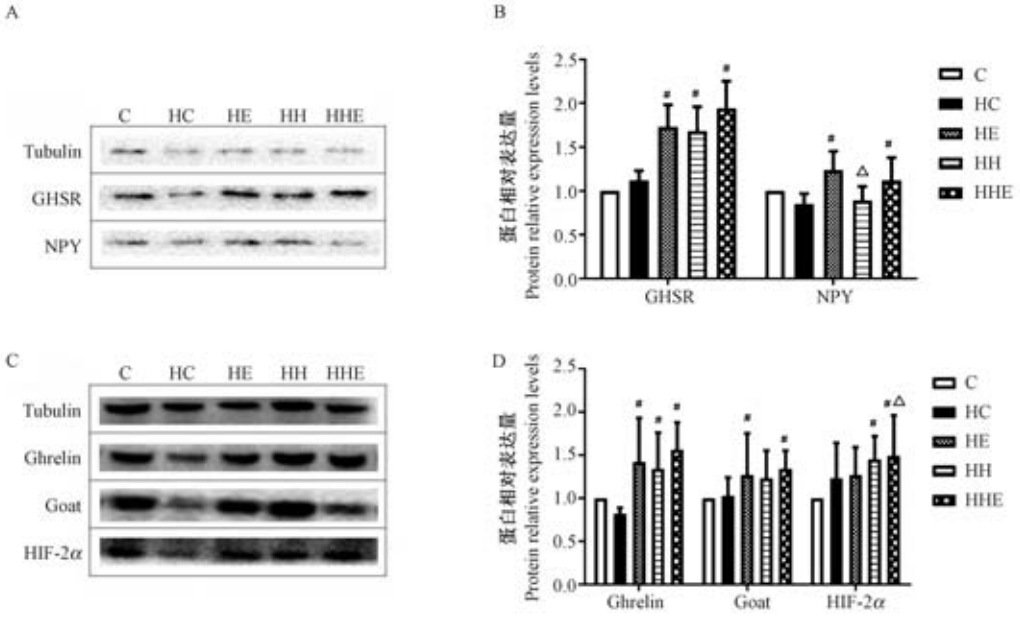
Figure 2 GHSR mRNA expression in hypothalamic tissues and Ghrelin mRNA expression in gastric tissues of mice

3 讨论

Ghrelin 是由胃底粘膜腺中的 X/A 样细胞合成和分泌的 28 个氨基酸的活性肽激素,是调节食欲的重要激素[3]。近年来,Ghrelin 被认为具有对抗肥胖的潜能并开始引起广泛关注[6]。

研究发现循环系统中 Ghrelin 含量与体重成反比[9]。肥胖机体下丘脑和胃组织中的 Ghrelin 水平会出现下降[10-11]。本研究结果发现肥胖小鼠胃组织 Ghrelin 和下丘脑 GHSR mRNA 水平出现显著性下降,血脂和血糖(TG、TC 和 GLU)水平上调。研究发现,Ghrelin 可依赖 GHSR 发挥调节脂代谢的作用,Ghrelin-GHSR 通路可通过促进 5'-磷酸腺苷蛋白激酶(adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)磷酸化,以激活 AMPK,使乙酰辅酶 A 羧化酶(acetyl-CoA carboxylase, ACC)磷酸化失活,减少丙二酰-CoA(malonyl-CoA)的积累,导致肉碱棕榈酰基转移酶 1(carnitine palmitoyl transferase 1, CPT1)活性增加以促进脂肪酸氧化[12]。Ghrelin 刺激 NPY 神经元可阻断黑色素皮质素受体 3 和 4(melanocortin receptor 3/4, MC3/4R),随后通过交感神经调节肝脏、白色脂肪组织、棕色脂肪组织和骨骼肌组织脂代谢相关基因表达以影响外周脂代谢水平[13-14]。此外,Ghrelin 还是葡萄糖代谢的中介物,并可调节胰岛 β 细胞分泌胰岛素[15]。推测 Ghrelin-GHSR 通路在调控糖脂代谢方面发挥着重要的作用,然而肥胖机体组织 Ghrelin-GHSR 通路表达下调,出现糖脂代谢紊乱,血糖血脂水平失调[16],从而加剧对机体的危害[17]。

低氧暴露下体重的丢失常被认为与摄食量下调所致[2, 18]。本研究结果发现,低氧暴露的最初阶段,低氧组(HH 和 HHE 组)小鼠摄食量较常氧组(H 和 HE 组)均出现显著下降,但随着低氧暴露时



注:与 HC 组相比,$^{\#}P < 0.05$;与 HE 组相比,$^{\triangle}P < 0.05$。

图 3 下丘脑和胃组织相关蛋白 WB 条带灰度值(A,C)和相对含量(B,D)

Note. Compared with HC group, $^{\#}P < 0.05$. Compared with HE group, $^{\triangle}P < 0.05$.

Figure 3 WB results (A, C) and relative amounts (B, D) of hypothalamic and gastric tissue-associated proteins of mice

间延长,低氧组小鼠摄食量逐渐回升,在 4 周干预结束时,与常氧组接近。机体摄食功能对长期低氧暴露的适应可能与 Ghrelin-GHSR 的调控有关。Ghrelin 发挥调节食欲的作用是通过生长激素促分泌受体 GHSR 所介导的,GHSR 高表达于下丘脑中调节摄食和体重平衡的细胞群中,如弓状核 NPY 神经元和腹内侧核的脂肪酸合成酶(fatty acid synthase,FAS)神经元[19]。而 NPY 神经元发挥调节食欲的作用由 Ghrelin 特异性介导的,其他促食欲激素如黑色素聚集激素(melanin-concentrating hormone,MCH)和前原食欲素(prepro-orexins)则无此作用[5]。研究发现急性低氧暴露(12 h)会导致大鼠胃组织 Ghrelin mRNA 和蛋白水平极具下调,但随着暴露时间的延长(24 h 和 48 h),Ghrelin 水平逐渐回升,甚至超过常氧水平[8]。本研究中,低氧训练组小鼠血清 Ghrelin 总量、胃组织中 Ghrelin 和 Goat 及下丘脑 GHSR 和 NPY 蛋白表达水平显著上升,这可能与 Ghrelin-GHSR 通路被激活以抵抗低氧的进一步损伤和参与前期胃组织损伤的修复有关[20]。而常氧运动小鼠 Ghrelin 和 NPY 蛋白水平虽增加但其摄食量未明显改变,可能与运动后产热增加导致体温上升,从而抑制了食欲有关[21]。

本研究中低氧训练干预后,肥胖小鼠血清 TC 和 GLU 水平显著下降,并伴随着血液总 Ghrelin 水平的上调和胃组织中 Ghrelin-GHSR 通路相关基因 mRNA 和蛋白水平表达的增加。这可能与运动训练对 Ghrelin-GHSR 通路的调控有关。由于 Ghrelin 和运动均可发挥促进能量代谢平衡的作用,因此两者间的相互影响作用引起了学者们的关注[22]。研究发现,93 d 的骑行运动后,健康成年男性空腹血液 Ghrelin 水平增加 26%,且体重降低 6%[23]。同时,胰岛素抵抗和高胰岛素血症程度与血液 Ghrelin 水平呈负相关,这可能是运动促进糖脂代谢平衡的重要机制[24]。游泳训练可增加胃组织中 Ghrelin 表达,从而降低肥胖大鼠体重和内脏脂肪含量[10]。此外,运动训练提高胃组织 Ghrelin 表达还具有促进胃的排空和肠道的推进力的作用[25],从而有助于代谢废物的排出和营养物质的吸收[26]。运动发挥促进 Ghrelin-GHSR 通路的表达可能与交感神经活动增强有关,运动激活交感神经和循环系统中肾上腺素和去甲肾上腺素(儿茶酚胺)的水平,同时胃组织中产生 Ghrelin 的细胞具有 α1 和 β1 肾上腺素能受体,而肾上腺素和去甲肾上腺素可刺激 β1 以促进胃组织分泌 Ghrelin[27-28]。通过本研究结果还可观察到低氧运动调控肥胖机体糖脂代谢的作用优于常氧训练,这可能与低氧环境所激活的 HIF-2α 调控作用有关。本研究结果中低氧训练后肥胖小鼠下丘脑 HIF-2α 的蛋白表达水平显著增加。HIF 是机体缺氧条件下参与组织细胞低氧应答敏感性转录因子,它的表达是机体适应低氧的起始步骤和关键环节。其中 HIF-2α 在脂代谢中发挥重要的作用,可参与脂滴的形成、脂肪酸的合成和 β-氧化及胆固醇代谢的调节[7]。HIF-2α 缺失会造成机体脂代谢的异常[29]。低氧暴露所致的食欲下降仅发生在低氧暴露初期,随着低氧时间的延长,食欲逐渐恢复至常氧水平,但仍可达到降低体重的效果,这可能与长期低氧暴露通过刺激 HIF-2α 以促进脂代谢有关。

本研究结果提示,低氧暴露和运动训练干预后肥胖小鼠的体重和血脂血糖水平下降,并伴随着 Ghrelin-GHSR 通路的上调,但摄食量并未出现明显下降,提示低氧和运动通过 Ghrelin-GHSR 通路改善高脂膳食所致肥胖主要与胃肠功能增强和糖脂代谢机能促进有关。而低氧训练中,低氧和运动的双重刺激加速了肥胖机体的糖脂代谢能力,从而更有利于控制机体的血糖血脂水平及抵抗高脂膳食对体重的增加。

肥胖小鼠胃组织 Ghrelin 和下丘脑 GHSR 水平降低,伴随着血脂血糖水平的升高和体重的增加;低氧训练通过肥胖小鼠 Ghrelin-GHSR 通路影响糖脂代谢,改善肥胖机体体重和血脂血糖稳态。

参 考 文 献(References)

[1] 张荷, 周越, 张一民, 等. 低氧运动对肥胖大鼠胰岛素抵抗及血脂代谢的影响[J]. 北京体育大学学报, 2016, 39(9): 44-49.
Zhang H, Zhou Y, Zhang YM, et al. Effects of hypoxia and exercise on insulin resistance and blood lipid in obese rats[J]. J Beijing Sport Univ, 2016, 39(9): 44-49.

[2] Kayser B, Verges S. Hypoxia, energy balance and obesity: from pathophysiological mechanisms to new treatment strategies[J]. Obes Rev, 2013, 14(7): 579-592.

[3] Date Y. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach[J]. Nature, 1999, 402(6762): 656-660.

[4] Yang J, Brown MS, Liang G, et al. Identification of the acyltransferase that octanoylates ghrelin, an appetite-stimulating peptide hormone[J]. Cell, 2008, 132(3): 387-396.

[5] Seoane LM, López M, Tovar S, et al. Agouti-related peptide, neuropeptide Y, and somatostatin-producing neurons are targets for ghrelin actions in the rat hypothalamus[J]. Endocrinology, 2003, 144(2): 544-551.

[6] Varela L, Vázquez MJ, Cordido F, et al. Ghrelin and lipid metabolism: key partners in energy balance[J]. J Mol Endocrinol, 2011, 46(2): R43-63.

[7] 赵晓丹. 缺氧诱导因子-2α 对脂代谢的调节作用[J]. 胃肠病学, 2013, 18(10): 629-632.
Zhao XD. Regulatory effect of hypoxia-inducible factor-2α on lipid metabolism[J]. Chin J Gastroenterol, 2013, 18(10): 629-632.

[8] 付鹏宇,龚丽景,朱镕鑫,等. Ghrelin-GHSR 通路在急性低氧暴露大鼠胃炎症反应中的调节作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2018, 34(10): 74-81.
Fu PY, Gong LJ, Zhu RX, et al. Regulatory effects of ghrelin-GHSR pathway on gastric inflammation in rats by acute hypoxic exposure[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2018, 34(10): 74-81.

[9] Tschöp M, Smiley DL, Heiman ML. Ghrelin induces adiposity in rodents[J]. Nature, 2000, 407(6806): 908-913.

[10] 李硕硕, 张荷玲. 四周有氧运动结合节食对大鼠下丘脑 Ghrelin 的影响[J]. 体育科技文献通报, 2018, 26(1): 161-162.
Li SS, Zhang HL. The effect of four-week aerobic exercise combined with diet on ghrelinin the hypothalamus of rats[J]. Bull Sport Sci Technol, 2018, 26(1): 161-162.

[11] 刘文倩, 张建刚, 谢岚, 等. 运动和限食减肥对肥胖大鼠血浆和胃组织 ghrelin 表达的影响[J]. 中国运动医学杂志, 2010, 29(2): 184-187.
Liu WQ, Zhang JG, Xie L, et al. The effects of exercise and food intake restriction-induced weight loss on the expression of ghrelin in plama and stomach of obese rats[J]. Chin J Sports Med, 2010, 29(2): 184-187.

[12] López M, Lage R, Saha AK, et al. Hypothalamic fatty acid metabolism mediates the orexigenic action of ghrelin[J]. Cell Metab, 2008, 7(5): 389-399.

[13] Baatar D, Patel K, Taub DD. The effects of ghrelin on inflammation and the immune system[J]. Mol Cell Endocrinol, 2011, 340(1): 44-58.

[14] Nogueiras R, López M, Diéguez C. Regulation of lipid metabolism by energy availability: a role for the central nervous system[J]. Obes Rev, 2010, 11(3): 185-201.

[15] Heppner KM, Müller TD, Tong J, et al. Ghrelin in the control of energy, lipid, and glucose metabolism[J]. Methods Enzymol, 2012, 514: 249-260.

[16] 刘蜜, 姜萍. 饮食诱导肥胖及肥胖抵抗与脂肪细胞因子[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(6): 62-65.
Liu M, Jiang P. The relation of diet-induced obesity and diet-induced obesity resistance to adipokines[J]. Chin J Comp Med, 2009, 19(6): 62-65.

[17] 王丽娟, 李晓蓉, 李宇航, 等. 高脂饲料对 C57BL/6J 小鼠血脂及转氨酶的动态影响[J]. 中国比较医学杂志, 2007, 17(10): 572-575+623.
Wang LJ, Li XR, Li YH, et al. Dynamic Observation of serum lipid and alt levels in C57BL/6J mouse models of hyperlipidemia induced by high-lipid diet[J]. Chin J Comp Med, 2007, 17(10): 572-575+623.

[18] Westerterp KR, Kayser B. Body mass regulation at altitude[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol, 2006, 18(1): 1-3.

[19] Lage R, Vázquez MJ, Varela L, et al. Ghrelin effects on neuropeptides in the rat hypothalamus depend on fatty acid metabolism actions on BSX but not on gender[J]. FASEB J, 2010, 24(8): 2670-2679.

[20] Pereira J, Da Silva FC, De Moraes-Vieira PMM. The impact of ghrelin in metabolic diseases: an immune perspective[J]. J Diabetes Res, 2017, 2017: 4527980.

[21] Crabtree DR, Blannin AK. Effects of exercise in the cold on Ghrelin, PYY and food intake in overweight adults[J]. Med Sci Sport Exer, 2015, 47(1): 49-57.

[22] King JA, Wasse LK, Stensel DJ, et al. Exercise and ghrelin. A narrative overview of research[J]. Appetite, 2013, 68(9): 83-91.

[23] Ravussin E, Tschöp M, Morales S, et al. Plasma ghrelin concentration and energy balance: overfeeding and negative energy balance studies in twins[J]. J Clin Endocr Metab, 2001, 86(9): 4547-4551.

[24] Garcia JM, Iyer D, Poston WS, et al. Rise of plasma ghrelin with weight loss is not sustained during weight maintenance[J]. Obesity, 2006, 14(10): 1716-1723.

[25] 常保荣, 王小梅. 有氧运动对老年大鼠胃肠动力及血清中胃促生长素、瘦素水平的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2016, 32(4): 331-333.
Chang BR, Wang XM. Effects of aerobic exercise on gastrointestinal motility and serum somatotropin and leptin levels in aged rats[J]. Chin J Appl Physiol, 2016, 32(4): 331-333.

[26] Ohno T, Mochiki E, Kuwano H. The roles of motilin and ghrelin in gastrointestinal motility[J]. Int J Pept, 2010, 2010. pii: 820794.

[27] Hazell TJ, Islam H, Townsend LK, et al. Effects of exercise intensity on plasma concentrations of appetite-regulating hormones: Potential mechanisms[J]. Appetite, 2016, 98: 80-88.

[28] Iwakura H, Kangawa K, Nakao K. The regulation of circulating ghrelin-with recent updates from cell-based assays[J]. Endocr J, 2015, 62(2): 107-122.

[29] Wiesener MS, Jürgensen JS, Rosenberger C, et al. Widespread hypoxia-inducible expression of HIF-2alpha in distinct cell populations of different organs[J]. FASEB J, 2003, 17(2): 271-273.

[收稿日期] 2019-08-01

刘丹,曹硕,刘阳,等. 地鳖肽对 CCl_4 诱导的慢性肝损伤小鼠的抗氧化保护作用的研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 73-80.

Liu D, Cao S, Liu Y, et al. Protective effects of ESW peptides on carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 73-80.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.011

地鳖肽对 CCl_4 诱导的慢性肝损伤小鼠的抗氧化保护作用的研究

刘丹[1],曹硕[1],刘阳[1],刘杰[1],王朕[1],张永红[1,2*],沈红[1,2*]

(1. 北京农学院动物科学技术学院 动物类国家级实验教学示范中心,北京 102206;
2. 北京农学院 兽医学(中医药)北京市重点实验室,北京 102206)

【摘要】 目的 探讨地鳖肽对 CCl_4 致诱导的慢性肝损伤小鼠的抗氧化保护作用。**方法** 小鼠随机分为正常组、模型组、地鳖肽组(50、100、200 mg/kg)及阳性药组,正常组小鼠灌服生理盐水,地鳖肽组小鼠每天灌服不同剂量地鳖肽、阳性药组小鼠每天灌胃水飞蓟素(100 mg/kg),连续 6 周,同时除正常组小鼠腹腔注射花生油溶液外,其余组小鼠腹腔注射 0.1% CCl_4 花生油溶液 10 mL/kg,每周 2 次连续 6 周,末次给药 24 h 后小鼠称重处死取肝组织,HE 染色观察肝组织学变化,分光光度法检测肝功能酶(AST、ALT)、抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)、过氧化物(MDA),荧光定量 PCR 法测定炎症因子、凋亡因子、纤维化因子基因表达,ELISA 测定炎症因子蛋白水平。**结果** 显微镜观察结果正常组小鼠肝细胞未见异常,模型组小鼠肝细胞出现充血、坏死、纤维化现象、肝小叶消失,地鳖肽组小鼠肝细胞形态结构损伤,随地鳖肽剂量增加肝细胞损伤程度明显减弱,小鼠肝脾指数明显低于模型组;与模型组比较,地鳖肽组小鼠血清中 AST、ALT 活力显著降低、肝中 MDA 含量明显降低、抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)活力显著提高,炎症因子(IL-6、TNF-α、iNOS)蛋白与基因表达水平均显著降低,促凋亡因子(Bax、Caspase-3)和纤维化因子(α-SMA、TGF-β)基因水平表达也明显降低。**结论** 地鳖肽可有效改善 CCl_4 致小鼠慢性肝损伤,其保护效应可能与地鳖肽抗氧化作用密切相关。

【关键词】 小鼠;地鳖肽;四氯化碳;抗氧化;肝纤维化

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0073-08

Protective effects of ESW peptides on carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in mice

LIU Dan[1], CAO Shuo[1], LIU Yang[1], LIU Jie[1], WANG Zhen[1], ZHANG Yonghong[1,2*], SHEN Hong[1,2*]

(1. College of Animal Science and Technology / National Demonstration Center for Experimental animal Education, Beijing 102206, China. 2. Beijing Key Laboratory of Traditional Chinese Veterinary Medicine, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206)

Corresponding author: SHEN Hong. E-mail:shenhong912@sina.com; ZHANG Yonghong. E-mail:yhh2266@126.com

【Abstract】 Objective To investigate the antioxidative protective effects of *Eupolyphaga sinensis* Walker (ESW) polypeptides on carbon tetrachloride (CCl_4)-induced chronic liver injury in mice. **Methods** Mice were randomly divided

[基金项目]北京市教委科研计划一般项目(KM201910020006);2019 年北京高等学校高水平人才交叉培养实培计划大学生毕业设计(科研类)项目(PXM2020_014207_000009);北京农学院教学团队项目(BUA2017JG068)。

Funded by Beijing Municipal Education Commission Research Project General Project (KM201910020006), Beijing Agricultural College Undergraduate Education Management Quality Improvement Project in 2019 (PXM2020_014207_000009), Beijing University of Agricultural Teaching Team Project (BUA2017JG068).

[作者简介]刘 丹(1993—),女,在读硕士研究生,研究方向:兽医药理与毒理。Email:vetliudan@163.com

[通信作者]沈 红(1961—),女,教授,研究方向:兽医药理与毒理。Email:shenhong912@sina.com;
张永红(1963—),男,副教授,研究方向:动物疾病诊断与防控。Email:yhh2266@126.com。 *共同通信作者

into the normal, model, ESW peptides (50, 100, 200 mg/kg) or positive drug groups. Mice in control group were intraperitoneally administred physiological salt solution. Mice in the ESW peptides group were intraperitoneally administered different doses of ESW peptides, and the positive drug group was intraperitoneally administered 100 mg/kg silymarin daily for 6 consecutive weeks. All mice except those in the normal group were intraperitoneally injected with 0.1% CCl_4 peanut oil solution (10 mL/kg) twice weekly for 6 consecutive weeks. Twenty-four hours after the final administration, the mice were weighed and sacrificed, and their liver tissues were removed, processed and stained with hematoxylin and eosin to evaluate the changes in liver histology. Liver function enzymes (AST and ALT), antioxidant enzymes and peroxide (MDA) were detected via spectrophotometry. Inflammatory factors, apoptotic factors and fibrosis factor gene expression were determined via quantitative PCR. Enzyme-linked immunosorbent assay was used to assay inflammatory factor protein levels. **Results** No microscopic abnormalities were found in the liver cells of the normal group. In the model group, the hepatocytes showed hyperemia, necrosis and fibrosis, and the hepatic lobules had disappeared. The morphological structures of the hepatocytes in the ESW peptides group were damaged, but increasing the ESW peptide dose significantly lessened the degree of the injury, and the liver and spleen indices of these mice were significantly lower than those of the model group. Compared with the model group, the serum Aspartate aminotransferase (AST) and Alanine aminotransferase (ALT) enzyme activities and the MDA content in the livers of the mice in the ESW peptides group were significantly decreased. Additionally, the antioxidant enzyme (SOD, CAT, GSH-Px) activities were significantly improved, the inflammatory factor (IL-6, TNF-α, iNOS) protein and gene expression levels were significantly decreased, and the pro-apoptotic factor (Bax, Bcl-2, Caspase-3) and fibrosis factor (α-SMA, TGF-β) gene levels were significantly decreased and positively correlated with the ESW polypeptide dose. **Conclusions** ESW peptides attenuates CCl_4-induced chronic liver injury in mice, and these protective effects may be closely related to the peptides' antioxidant effects.

【**Keywords**】 mouse; ESW peptide; carbon tetrachloride; antioxidant; liver fibrosis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝是机体重要代谢器官,对机体内去氧化、肝糖储存、分泌蛋白等起重要作用,其还担负机体解毒、消化等重要的生理功能[1-2]。肝损伤多是由体内产生自由基过多,过氧化导致,临床表现为食欲减退、体重减轻、腹胀等[3]。肝疾病是严重危害机体健康的疾病之一,其最常见致病因素如病毒、细菌、药物、酒精、缺血、肝部分切除等,造成肝细胞的一系列病变,及慢性肝损伤[4-5]。四氯化碳(CCl_4)对动物肝具有强烈的毒性,引起肝组织脂质过氧化和炎症反应,导致肝细胞损伤和坏死,甚至肝纤维化,CCl_4 常用于建立动物慢性肝损伤模型[6]。中医药古籍记载地鳖(*Eupolyphaga sinensis* Walker, ESW)具有活血化瘀、通经活络、接骨续筋等功效[7]。现代技术分析地鳖有多种有效成分,主要有蛋白质、维生素、矿物元素、多糖、生物碱等[8]。研究表明,地鳖有效提取成分之一地鳖肽具有明显清除自由基,抗氧化和抗衰老等作用[9]。研究表明,采用酶解蛋白获得多肽及生物技术提取小分子肽清除自由基能力强[10]。本研究基于前期研究成果地鳖肽抗氧化作用,拟通过四氯化碳诱导小鼠建立慢性肝损伤模型,探讨地鳖肽对肝损伤小鼠的抗氧化保护作用及其机制,为其开发作为抗氧化剂提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

6 ~ 8 周龄健康昆明小鼠,体重 20 ~ 22 g,清洁级,购于中国军事医学科学院实验动物中心【SCXK(京)2016-0002】。饲养和无菌手术均在北京农学院实验动物示范中心屏障动物实验设施进行【SYXK(京)2015-0004】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。小鼠饲养期间自由饮水,饲喂由中国军事医学科学院实验动物中心提供的普通维持饲料,温度和湿度恒定,饲养符合实验动物要求。

1.1.2 试剂与仪器

谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和丙二醛(MDA)试剂盒均购自南京建成生物有限公司,HiFi-MMLV cDNA Kit 购自康为试剂生物科技有限公司,小鼠 TNF-α、IL-6 和 iNOS ELISA 试剂盒购自 Elabscier 公司,四氯化碳(CCl_4)、地鳖肽 ESW peptides 由本实验室制备;所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

UV-3 紫外可见分光光度(上海美普达有限公

司),低温高速离心机(Eppendorf 公司),超低温冰箱(日本 SANYOO 公司),NanoDrop2000 核酸蛋白分析仪(Thermo Fisher Scientific),S1000 Theral Cycler 梯度 PCR 仪(Bio-Rad),CFX Connect 荧光定量 PCR 检测系统。

1.2　方法

1.2.1　动物分组与处理

取小鼠随机分为正常组(Control group,C)、模型组(Model group,M)、阳性药组(Positive group,P)、地鳖肽(50 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg)组。除正常组外其余所有小鼠腹腔注射 0.1%CCl_4 花生油溶液 10 mL/kg,每周 2 次连续 6 周;地鳖肽组小鼠分别灌服不同剂量地鳖肽,阳性药组小鼠灌服水飞蓟素 100 mg/kg,模型组和正常组小鼠灌服生理盐水 10 mL/kg,每天 1 次连续 6 周。

1.2.2　一般指标观察及脏器指数

肉眼观察小鼠的一般情况,每周称重并记录。末次给药 24 h 后,眼球采血,制备血清备用。颈椎脱臼处死小鼠,剖腹取肝脾称重,按公式计算脏器指数=脏器质量(mg)/体重(g)。

1.2.3　小鼠肝组织结构的观察

取小鼠肝右叶、用 4%多聚甲醛溶液浸泡固定、制作肝组织切片、HE 染色,光学显微镜下观察肝组织结构变化,拍照。

1.2.4　肝功能酶和指标抗氧化酶活性和 MDA 含量炎症因子蛋白水平检测

取待测血清,按照试剂盒说明测定肝功能酶(ALT、AST)活性;称取小鼠肝左叶 0.2 g,生理盐水清洗,匀浆制备 10%肝匀浆,按照试剂盒说明书操作测定抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-PX)活性和 MDA 含量,炎症因子(IL-6、TNF-α、iNOS)含量。

1.2.5　肝组织炎症凋亡及纤维化因子基因表达的检测

采用 TRIzon 提取小鼠肝组织总 RNA,逆转录合成 cDNA,荧光定量 PCR 仪实时定量扩增,以 GAPDH 为内参,根据 IL-6、TNF-α、iNOS、Bax、Bcl-2、Caspase-3、α-SMA、TGF-β1 引物,Tm 值进行分析,SDS 软件分析数据,比较 Ct 值分析结果。

1.3　统计学分析

结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。应用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,选择 LSD 法进行组间比较,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2　结果

2.1　小鼠一般情况及肝组织形态结构变化分析

整个试验过程中正常组小鼠生长状况良好;模型组小鼠随着 CCl_4 灌服出现精神萎靡、食量减少、大便稀溏等现象;阳性药组和地鳖肽组小鼠状态较模型组明显有所改善,毛色有光泽。肉眼观察肝组织,结果正常组小鼠肝颜色呈红褐色,表面光滑,质地柔软;模型组小鼠肝颜色发黯,质地松软;阳性药物组和地鳖肽组与模型组比较小鼠肝损伤均有所减轻,高剂量地鳖肽组小鼠肝外观接近对照组(图 1)。

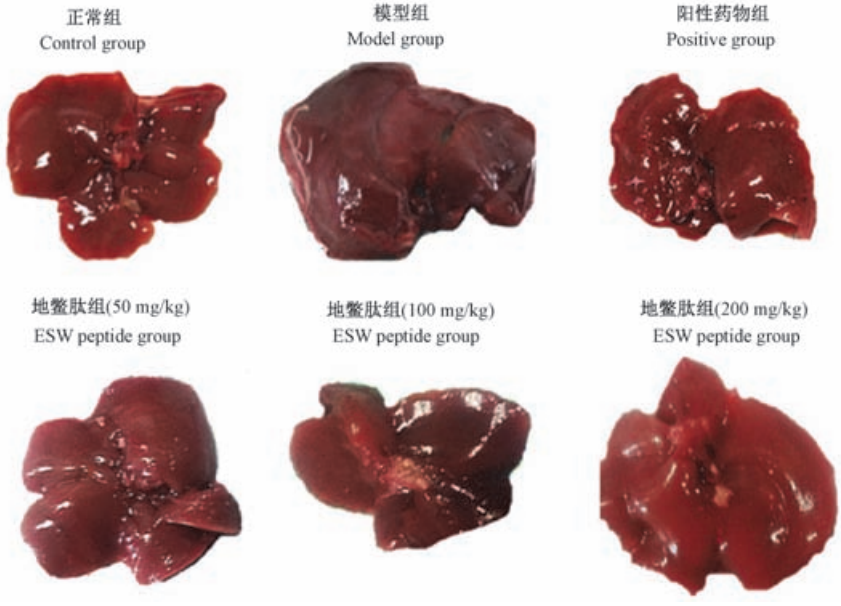


图 1　肉眼观察慢性肝损伤小鼠肝组织变化

Figure 1　Macroscopic observation of liver tissue changes in mice with chronic liver injury

显微镜观察正常组小鼠肝小叶结构正常,肝细胞排列整齐,中央静脉血管壁清晰可见;模型组小鼠肝组织肝细胞索排列紊乱、肿胀变性,中央静脉管腔内有淤血,炎性细胞浸润,纤维增生;地鳖肽组随着地鳖肽剂量增加小鼠肝细胞变性和坏死程度减轻,中高剂量组改善较为明显(图 2)。模型组小鼠的肝脾指数均显著高于正常组,地鳖肽组和阳性药组小鼠肝脾指数均显著低于模型组(图 3)。

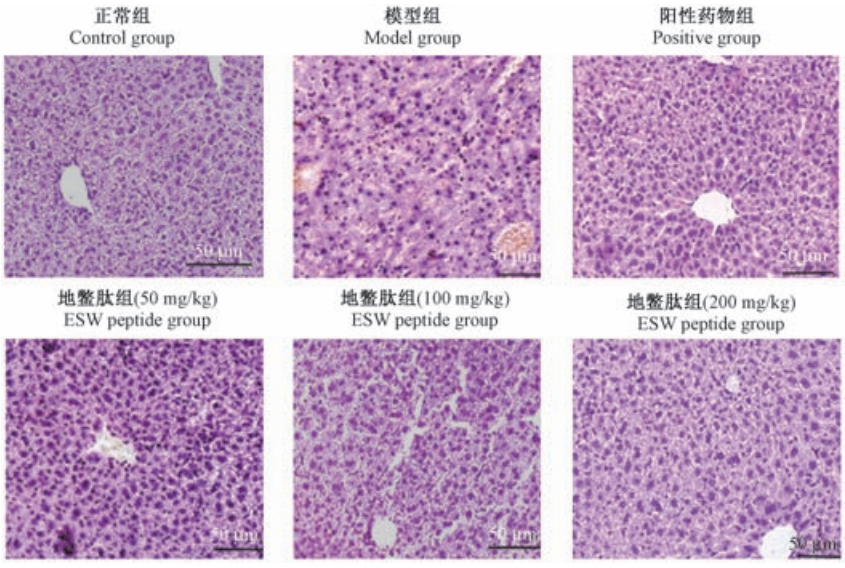
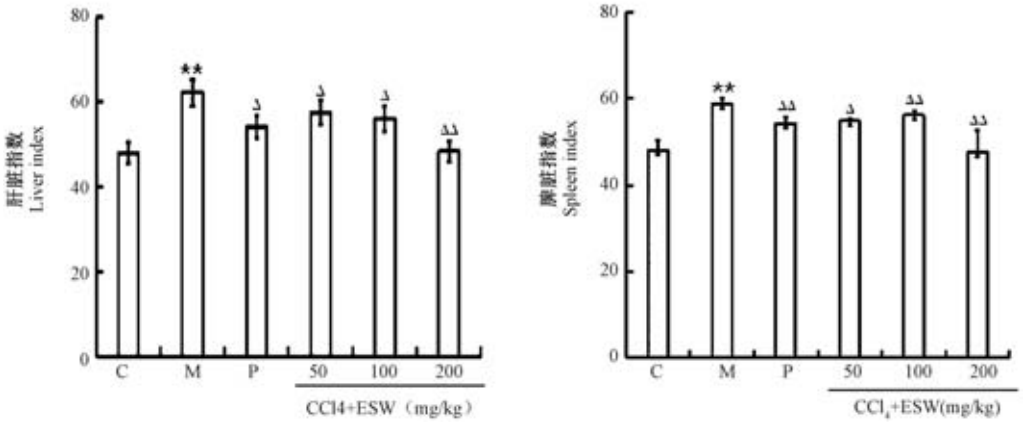


图 2 地鳖肽对慢性肝损伤小鼠肝组织结构的影响(HE 染色, 标尺=50 μm)

Figure 2 Effects of ESW peptides on live histology of the mice with chronic liver injury (HE staining, Bar=50 μm)



注:C,正常组;M,模型组;P,阳性药物组。与正常对照组相比,$^{**}P<0.01$;与模型组相比,$^{\triangle}P<0.05$,$^{\triangle\triangle}P<0.01$。(下图同)

图 3 地鳖肽对慢性肝损伤小鼠脏器指数的影响

Note. C, Control group. M, Model group. P, Positive group. Compared with the control group, $^{**}P<0.01$. Compared with the model group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$. (The same in the following figures)

Figure 3 Effect of ESW peptides on organ index in mice with chronic liver injury

2.2 地鳖肽对 CCl_4 慢性肝损伤小鼠肝功能的影响

模型组小鼠肝功能指标(ALT、AST)酶活力明显高于正常组,地鳖肽组和阳性药组 ALT 和 AST 酶活力较模型组显著下降(图 4);模型组小鼠肝组织抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)活力比正常组显著降低,而过氧化物(MDA)含量显著升高,阳性药组和地鳖肽组抗氧化酶(SOD、CAT、GS H-Px)活力均显著高于模型组,地鳖肽组 MDA 含量均显著降低(图 5)。

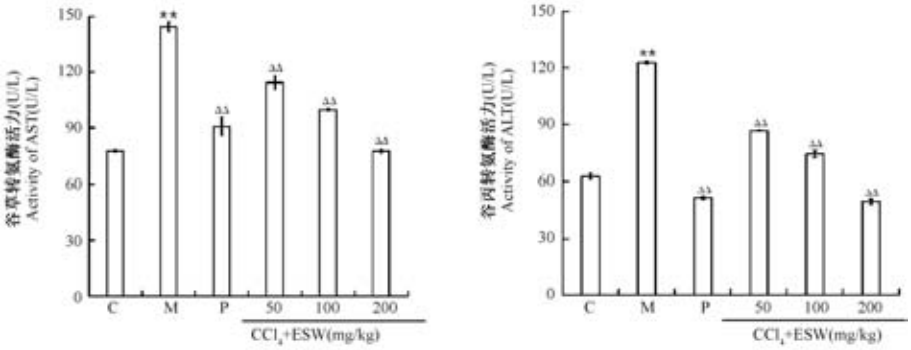


图 4　地鳖肽对慢性肝损伤小鼠肝功能的影响

Figure 4　Effects of ESW peptides on the liver function in mice with chronic liver injury

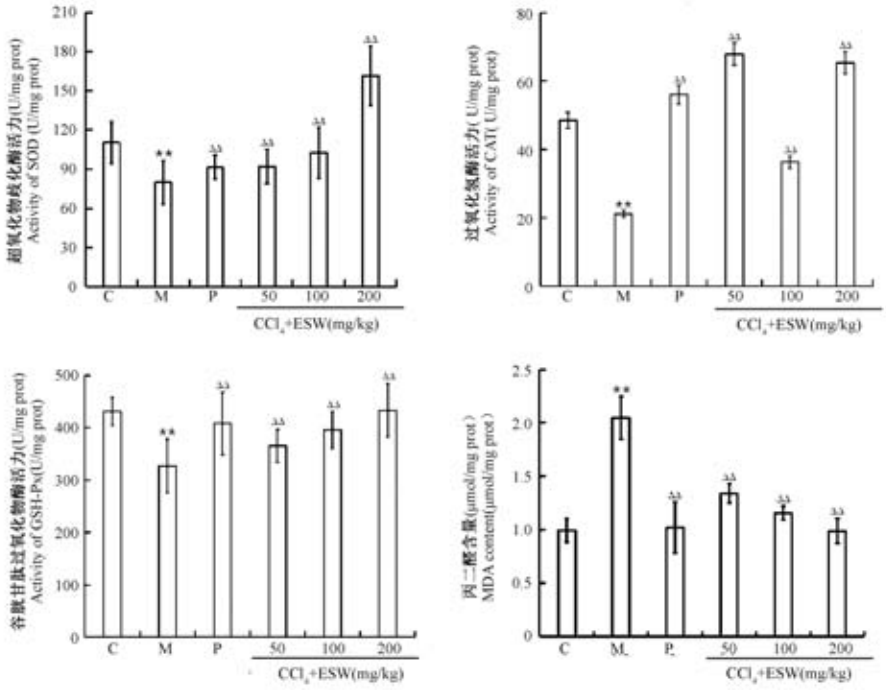


图 5　地鳖肽对慢性肝损伤小鼠肝组织中抗氧化酶活力和 MDA 含量的影响

Figure 5　Effects of ESW peptides on the activities of antioxidant enzymes and MDA content in liver tissue of mice with chronic liver injury

2.3　地鳖肽对慢性肝损伤小鼠肝组织中炎症因子蛋白及基因表达的影响

分析肝损伤小鼠肝组织中炎症细胞水平，结果模型组小鼠肝组织中炎症因子（TNF-α、IL-6、iNOS）蛋白表达量均显著高于正常组，地鳖肽组炎症因子蛋白水平均显著降低且低于模型组，接近阳性药组，表达水平与地鳖肽给药剂量呈正相关（图 6）。采用荧光定量 PCR 分析小鼠肝组织中炎症因子基因表达，结果模型组炎症因子（IL-6、TNF-α、iNOS）基因表达量高于正常组，地鳖肽组和水飞蓟素药物组较模型组下降，中高剂量组下降极显著接近阳性药组（图 7）。

2.4　地鳖肽对慢性肝损伤小鼠肝组织中凋亡及纤维化因子基因表达的影响

与正常组相比，模型组促凋亡因子（Bax、Caspase-3）mRNA 水平均高显著升高，阳性药组和地鳖肽组均显著低于模型组降低，且与地鳖肽剂量呈正相关；与模型组相比较，阳性药组和地鳖肽组抑制凋亡因子 Bcl-2 表达量显著升高而促凋亡因子（Bax、Caspase-3）基因表达显著降低（图 8）。与正常组相比，模型组纤维化因子（α-SMA、TGF-β1）mRNA 表达均明显上调，阳性药组和地鳖肽组纤维化因子均显著低于模型组（图 9）。

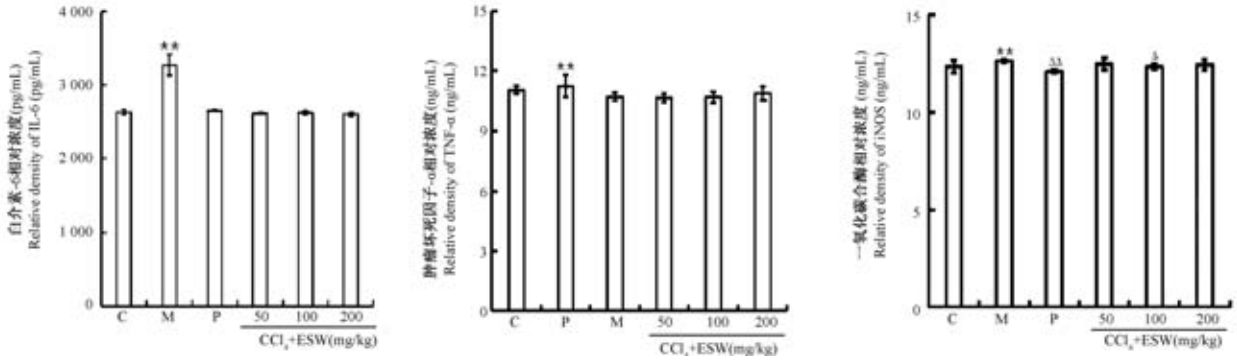


图 6 地鳖肽对慢性肝损伤小鼠肝组织中炎症因子蛋白水平的影响

Figure 6 Effects of ESW peptides on the levels of inflammatory factors in the liver tissues of mice with chronic liver injury

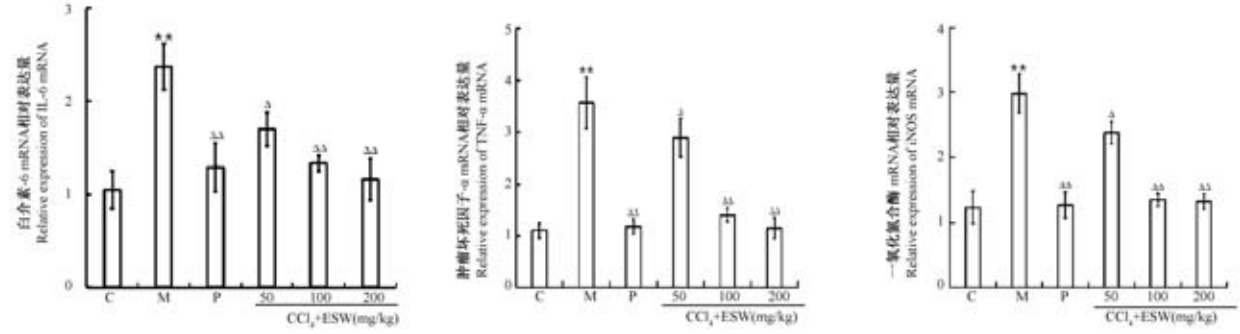


图 7 地鳖肽对慢性肝损伤小鼠肝组织中炎症因子基因表达的影响

Figure 7 Effects of ESW peptides on gene expressions of inflammatory factors in the liver tissues of mice with chronic liver injury

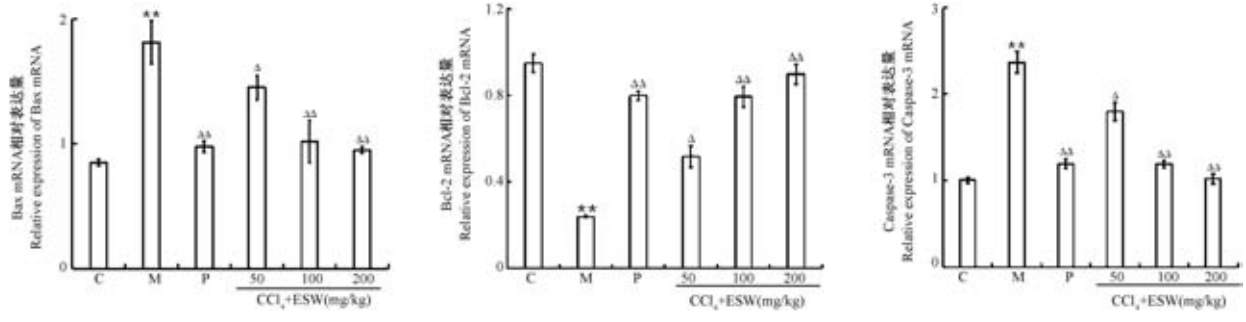


图 8 地鳖肽对慢性肝损伤小鼠的肝组织中凋亡因子基因表达的影响

Figure 8 Effects of ESW peptides on the gene expression of apoptotic factor in the liver tissues of mice with chronic liver injury

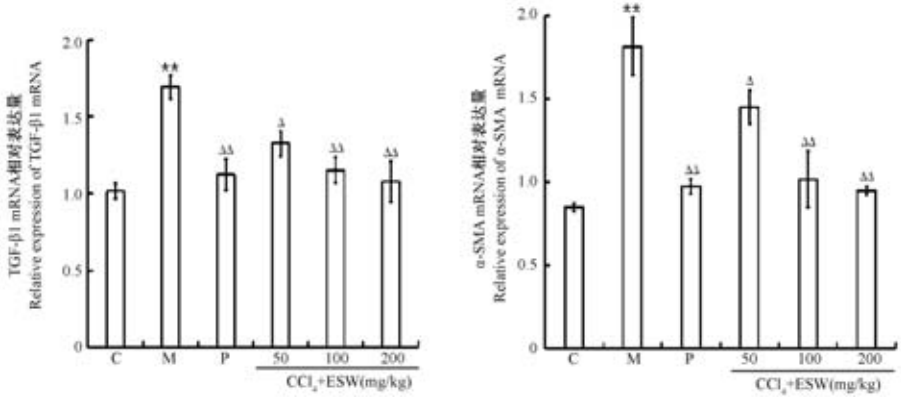


图 9 地鳖肽对慢性肝损伤小鼠肝组织中纤维化因子基因表达的影响

Figure 9 Effects of ESW peptides the gene expression of fibrosis factor in the liver tissues of mice with chronic liver injury

3　讨论

四氯化碳(CCl_4)为肝毒性化学物,临床上人长期反复接触 CCl_4 会有头晕、乏力、失眠、记忆力减退、食欲不振、恶心、腹泻和腹痛等,出现肝肿大和肝功能异常,严重发展成门脉性肝硬化,连续给予 CCl_4 可使肝细胞变性、坏死、产生炎症反应,水飞蓟素为目前公认的抗肝损伤有效药物,动物实验常将该药作为肝损伤保护的阳性对照用药[11-12]。本研究显微镜观察肝组织结构,结果 CCl_4 致小鼠肝组织肝细胞索排列紊乱、肿胀变性,中央静脉管腔内有淤血,炎性细胞浸润及纤维增生,随着地鳖肽剂量增加小鼠肝细胞变性和坏死程度减轻,结果与前人报道一致。CCl_4 进入机体后激活肝药酶 P-450,促进机体生产过量自由基,引起脂质过氧化反应,使细胞膜结构功能遭到破坏,导致肝细胞中 ALT、AST 释放,使血中 ALT、AST 升高[13]。刘竹青等[14]用 D-半乳糖建立致衰老小鼠模型,测定黄粉虫酶解物体内抗氧化能力,结果黄粉虫酶解物可显著提高小鼠血浆、肝中 CAT、GSH-Px、T-SOD 活力,降低 MDA 含量。刘雪姣[15]研究玉米低聚肽对四氯化碳所致小鼠急性肝损伤保护作用,结果玉米低聚肽能降低 AST、ALT 活力和 MDA 含量,在一定程度上提高 SOD 和 GSH-Px 活力等,达到预防四氯化碳所致小鼠急性肝损伤,且明显改善小鼠肝功能状况。李谚语等[16]研究保肝汤对四氯化碳(CCl_4)致慢性化学性肝损伤的保护作用,结果保肝汤高、中、低剂量组 ALT、AST 水平降低,保肝汤中、低剂量组 MDA 含量显著降低。CCl_4 的毒性作用会造成肝组织局灶性的坏死,损伤肝细胞、肝窦内皮细胞,使其释放 α-SMA、TGF-β1、TNF-α、IL-6 等细胞因子引发炎性反应[17]。郭心怡[18]采用芍药苷干预四氯化碳诱导肝损伤,结果芍药苷明显降低四氯化碳诱导的炎性因子 TNF-α、IL-6 表达,肝组织 α-SMA、TGF-β1 蛋白和 mRNA 表达水平均显著下降。Wang 等[19]研究球姜酮通过抑制氧化应激和炎症反应来保护小鼠四氯化碳(CCl_4)诱导的小鼠急性肝损伤,结果球姜酮可以恢复 SOD 和 GSH-Px 的活性,减少 MDA 的产生,并减少促炎细胞因子 IL-6 和 TNF-α 的释放量。袁静等[20]探讨山丹黄参多糖对四氯化碳(CCl_4)小鼠肝损伤的保护作用,结果药物组血浆 ALT、AST、活性明显降低,肝组织 SOD 活力显著升高,MDA 含量明显下降,Caspase-3 及 Bax 蛋白阳性表达明显减少。本研究结果地鳖肽明显降低 CCl_4 致慢性肝损伤小鼠血清中肝功能指标(ALT、AST),显著提高肝组织中抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)活性,明显抑制脂质过氧化反应产物(MDA)生成,降低肝细胞炎症因子(IL-6、TNF-α、iNOS)、促凋亡因子(Bax、Caspase-3)、纤维化因子(α-SMA、TGF-β1)产生,以上试验结果与有关研究报道基本一致。

综上所述,地鳖肽对 CCl_4 导致的小鼠慢性肝损伤有一定的抗氧化保护作用,其保护作用机理可能是通过提高肝抗氧化酶活力,抑制脂质过氧化,降低炎症因子及凋亡因子生成,维持肝细胞结构完整性有关。

参　考　文　献(References)

[1] Yang BY, Zhang XY, Guan SW, et al. Protective effect of procyanidin B2 against CCl4 induced acute liver injury in mice [J]. Molecules, 2015, 20(7): 12250-12265.

[2] Sun B, Karin M. NF-kappaB signaling, liver disease and hepatoprotective agents [J]. Oncogene, 2008, 27(48): 6228-6244.

[3] 谢梦蕊,邱思奇,沈红. 地鳖多糖提取物的体内外抗氧化作用[J].中国实验动物学报, 2016, 24(4): 427-431.
Xie MR, Qiu SQ, Shen H. Antioxidant effects of polysaccharide extraction from *Eupolyphaga sinensis* Walker (ESW) in vitro and in vivo [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(4): 427-431.

[4] 于歆, 李晓冰, 何晓静, 等. 药物性肝损伤的机制[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(10): 895-899.
Yu X, Li XB, He XJ, et al. The mechanisms of drug induced liver injury [J]. Chin J Hosp Pharm, 2017, 37(10): 895-899.

[5] 戈娜. 海兔素改善大鼠酒精性肝损伤的效果及其机制研究[D]. 青岛大学, 2014.
Ge N. The effect and mechanism of Aplysin on improving alcoholic liver injury in rats [D]. Qingdao University, 2014.

[6] 张海燕, 温韬, 卢静, 等. 四氯化碳诱导大鼠慢性肝损伤模型方法的探讨[J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12(3): 161-163.
Zhang HY, Wen T, Lu J, et al. Establishment of CCl4-induced chronic liver injury model in rats [J]. J Clin Hepatol, 2009, 12(3): 161-163.

[7] 罗情, 巫秀美, 郭娜娜, 等. 地鳖虫的化学成分和药理活性研究进展[J].中国医药科学,2015, 17(9): 41-44.
Luo Q, Wu XM, Guo NN, et al. Research progress of chemical constituents and pharmacological activities in eupolyphaga sinensis walker [J]. Chin Med Pharm, 2015,17(9):41-44.

[8] 王凤霞,吉爱国. 药用土鳖虫化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 2009, 30(1): 61-64.
Wang FX, Ji AG. Research progress in chemical constituents and pharmacological activities of earth-turtle [J]. Chin J Biochem Pharm, 2009, 30(1): 61-64.

[9] 谷崇高, 张永红, 白若雨, 等. 地鳖多肽提取物的抗氧化衰

老机制[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 66-74.
Gu CG, Zhang YH, Bai RY, et al. Mechanism of polypeptide extracts of eupolyphaga sinensis walker against oxidative aging in mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(6): 66-74.

[10] 杨莹. 鳖甲中寡肽类化合物治疗慢性肝损伤的实验研究[D]. 北京中医药大学, 2011.
Yang Y. The experimental study on the treatment of chronic liver injury with the Oligonucleotide peptide in Turtle shell [D]. Beijing University of Chinese Medicine, 2011.

[11] Karthikeyan R, Somasundaram ST, Manivasagam T, et al. Hepatoprotective activity of brown alga Padina boergesenii against CCl4-induced oxidative damage in Wistar rats[J]. Asian Pac J Trop Med, 2010, 3(9): 696-701.

[12] 冀润利, 赵青娥.水飞蓟素对四氯化碳致小鼠肝损伤的保护作用[J]. 中国应用生理学杂志, 2012, 28(3): 279-287.
Ji RL, Zhao QE. The protective effect of silymarin on liver injury induced by carbon tetrachloride in mice [J]. Chin J Applied Physiol, 2012, 28(3): 279-287.

[13] 谷大为, 陈志敏, 周明, 等. 果蔬发酵液对小鼠酒精性肝损伤的保护作用及氧化应激机制[J].营养学报, 2015, 37(4): 366-371.
Gu DW, Chen ZM, Zhou M, et al. The protective effect of vegetables and frurits fermentation liquid in mice with alcoholtic liver damage and its antioxidative mechanism [J]. Acta Nutr Sin, 2015, 37(4): 366-371.

[14] 刘竹青, 李岩, 崔旋旋, 等. 黄粉虫酶解物体内外抗氧化及免疫活性研究[J].中国食品学报, 2019, 19(5): 45-50.
Liu ZQ, Li Y, Cui XX, et al. Studies on the Antioxidant Activity and Immune Function of Tenebrio molitor Hydrolysate in vivo and in vitro[J]. J Chin Inst Food Sci Tech, 2019, 19(5): 45-50.

[15] 刘雪姣. 玉米低聚肽保肝作用的研究[D]. 江苏大学, 2016.
Liu XJ. Study of Corn Oligopeptide on hepatoprotective effect [D]. Jiangsu University, 2016.

[16] 李谚语, 刘丽, 范颖, 等. 保肝汤对小鼠四氯化碳致慢性化学性肝损伤的保护作用[J].天津中医药, 2018, 35(12): 935-938.
Li YY, Liu L, Fan Y, et al. The protective effect of Baogan Decoction on chronic chemical liver injury induced by carbon tetrachloride in mice [J].Tianjin J Tradit Chin Med, 2018, 35(12): 935-938.

[17] 朱安妮. 垂盆草对四氯化碳致小鼠急性肝损伤保护作用的研究[D]. 北京中医药大学, 2014.
Zhu AN. The protective effect of Sedum sarmentosum on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice[D]. Beijing University of Chinese Medicine, 2014.

[18] 郭心怡. 芍药苷减轻四氯化碳诱导的急性肝损伤与慢性肝纤维化的实验研究[D]. 重庆医科大学, 2018.
Guo XY. Paeoniflorin attenuates carbon tetrachloride induced acute liver injury and live fibrosis [D]. Chongqing Medical University, 2018.

[19] Wang ML, Niu JL, Ou LN, et al. Zerumbone protects against carbon tetrachloride (CCl_4)-induced acute liver injury in mice via inhibiting oxidative stress and the inflammatory response: involving the TLR4/NF-κB/COX-2 pathway [J]. Molecules (Basel, Switzerland), 2019, 24(10),1964.

[20] 袁静, 俞诗源, 孟茹, 等. 山丹黄参多糖对四氯化碳诱导的慢性肝损伤的保护作用[J].解剖学报, 2015, 46(3): 387-393.
Yuan J, Yu SY, Meng R, et al. Protective effects of Shandan Sphallerocarpus gracilis polysaccharide on chronic hepatic injury in mice induced by CCl_4[J]. Acta Anat Sin, 2015, 46(3): 387-393.

[收稿日期] 2019-07-10

陆姜利,郭玉倩,钱忠义,等. D-半乳糖与 L-谷氨酸诱导树鼩肝组织损伤[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 81-88.
Lu JL, Guo YQ, Qian ZY, et al. D-galactose and L-glutamic acid induced liver tissue injury in tree shrews [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 81-88.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.012

D-半乳糖与 L-谷氨酸诱导树鼩肝组织损伤

陆姜利[1],郭玉倩[1],钱忠义[2],角建林[3],梁张[3*],郑红[1*]

(1. 昆明医科大学实验动物学部,昆明 650500; 2. 昆明医科大学基础医学院实验教学中心,昆明 650500;
3. 昆明医科大学技术转移中心,昆明 650031)

【摘要】 目的 探究 D-半乳糖与 L-谷氨酸对树鼩肝组织损伤及机制。**方法** 雄性树鼩随机分为 4 组:对照组(CT 组)、D-半乳糖组(D 组)、L-谷氨酸组(G 组)、D-半乳糖组+L-谷氨酸组(D+G 组),每周称量体重、计算存活率。给药 8 周后,心脏采血处死树鼩,4%多聚甲醛灌注固定肝,进行 HE 和免疫组织化学染色,检测 TLR2、NF-κB 和 P-gp 表达。**结果** 相对于第 1 周,第 8 周 D+G 组树鼩体重下降。G 组、D 组、D+G 组生存率下降,肝细胞变性、水肿、坏死、炎性细胞浸润、中央静脉、门静脉、分支胆管扩张,其中 D+G 组最严重。相对于 CT 组,D 组、G 组和 D+G 组的 TLR2($P<0.05$)、NF-κB($P<0.01$)和 P-gp($P<0.01$)表达均升高;在 3 个处理组中,D+G 组的 TLR2($P<0.05$)、NF-κB($P<0.01$)和 P-gp($P<0.01$)表达显著高于 D 组和 G 组。**结论** D-半乳糖、L-谷氨酸单独或联合给药均可引起树鼩肝组织损伤,联合给药损伤更严重。其机制可能涉及 TLR2/ NF-κB 通路激活,同时 P-糖蛋白代偿性增加。

【关键词】 肝组织损伤;L-谷氨酸;D-半乳糖;TLR2/NF-κB 信号途径;P-糖蛋白
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2020) 01-0081-08

D-galactose and L-glutamic acid induced liver tissue injury in tree shrews

LU Jiangli[1], GUO Yuqian[1], QIAN Zhongyi[2], JIAO Jianlin[3], LIANG Zhang[3*], ZHENG Hong[1*]

(1. Department of Laboratory Animal Science, Kunming Medical University, Kunming 650500, China.
2. Experimental Teaching Center of Basic Medical College, Kunming Medical University, Kunming 650500.
3. Technology Transfer Centers, Kunming Medical University, Kunming 650031)

Corresponding author: LIANG Zhang. E-mail: ynlml-z@163.com; ZHENG Hong. E-mail: 847255170@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the liver injury mechanism induced by D-galactose and L-glutamic acid in tree shrews. **Methods** Male tree shrews were randomly divided into four groups: the control (CT), D-galactose (D), L-glutamic acid (G) and D-galactose combined with L-glutamic acid (D+G) groups. The weight and survival rates were recorded weekly. Medication was administered for 8 weeks, then the tree shrews were sacrificed. Their livers were perfused with 4% paraformaldehyde for hematoxylin and eosin and immunohistochemical staining to detect TLR2, NF-κB and P-glycoprotein (P-gp) expressions. **Results** The body weights in the D+G group were lower at week 8 than at week 1. The survival rates in the G, D and D+G groups decreased compared with that of the CT group. Hepatocytic degeneration, edema, necrosis and inflammatory cell infiltration occurred in addition to dilatation of the central and portal vein and the

[**基金项目**]云南省应用基础研究计划项目(2017FE468-014,2017FE468-016);云南省教育厅科学研究项目(2018Y048);昆明医科大学创新基金项目(2019S093)。
Funded by the Applied Basic Research Project of Yunnan Province(2017FE468-014, 2017FE468-016), Scientific Research Project of Yunnan Education Department(2018Y048) and Innovation Project of Kunming Medical University(2019S093).
[**作者简介**]陆姜利(1992—),女,在读硕士研究生,研究方向:药理学。Email:1311345248@qq.com
[**通信作者**]郑红(1969—),女,教授,博士,研究方向:比较医学。Email:847255170@qq.com;
梁张(1966—),女,副教授,硕士,研究方向:药学。Email:ynlml-z@163.com。
* 共同通信作者

branch bile duct in the livers of the G, D and D+G groups. Compared with CT group, the expressions of TLR2 ($P < 0.05$), NF-κB ($P < 0.01$) and P-gp ($P < 0.01$) were significantly increased in the D, G and D+G groups and were significantly higher in the D+G group than in the D or G groups. **Conclusions** D-galactose and/or L-glutamic acid induce liver tissue injury in tree shrews, which may be involved in activating TLR2/NF-κB signaling and P-gp.

【**Keywords**】 liver tissue injury; L-glutamic acid; D-galactose; TLR2/NF-κB signal; P-glycoprotein

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝是人体新陈代谢的主要器官,具有十分重要和复杂的生理功能[1]。化学物质是导致临床常见肝损伤的因素。通过胃肠道门静脉或体循环进入肝进行转化,有毒物质使肝组织受到损害,表现为肝细胞变性、坏死,肝功能障碍,进而发展为肝硬化,甚至引起肝衰竭、肝癌、肝性脑病等[2-3]。肝疾病对人类健康危害巨大,目前肝疾病的治疗仍然是世界性难题,建立实验性肝损伤动物模型,有助于肝疾病发病机制的研究、筛选保肝药物。实验性肝损伤动物模型已成为发病机制和药物研发的重要工具。

1968 年,首次报道 D-半乳糖(D-galactose, D-gal)引起肝损伤[4]。目前,D-gal 已被广泛应用于建立实验性衰老、肝损伤等疾病模型[5-8]。D-gal 是动物体内正常的营养成分,机体在正常情况下将 D-gal 转化为葡萄糖-6-磷酸。过量摄入则会引起机体细胞内大量 D-gal 堆积,导致氧化应激-自由基损害,破坏细胞线粒体、DNA 和蛋白质等,进而出现器官损伤[9-10]。L-谷氨酸(glutamate, Glu)是中枢神经系统内最主要的一种兴奋性神经递质,参与机体正常生理活动,但是大量谷氨酸能够引起神经兴奋性毒性,导致神经元的肿胀、凋亡与坏死,谷氨酸诱导肝损伤未见报道[11-12]。因此,D-半乳糖和 L-谷氨酸联合作用是增强或降低肝毒性,值得探索。

Toll 样受体(toll-like receptor, TLR)最早在果蝇体内发现,TLRs 家族是介导炎症反应的关键受体蛋白,其中 TLR2 通过刺激触发骨髓分化因子 88 依赖性信号传导可增强核转录因子 κB(nuclear factor-kappa B, NF-κB)的活化,激活炎性反应[13-17]。研究表明 TLR2/NF-κB 信号通路在肝损伤中起到重要作用,在肝损伤时二者表达均升高[18]。P 糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)是一种药物转运体,在肝中主要介导疏水性阳离子的外排,降低细胞内的药物浓度。有研究发现 P-gp 在肝损伤发生时,表达上调[19-20]。

本研究给予树鼩 D-半乳糖和 L-谷氨酸,探索复合因素的实验性肝损伤动物模型。通过检测 TLR2/NF-κB 和 P 糖蛋白的表达,初步探究树鼩肝损伤的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

28 只雄性 10 月龄树鼩,体重(136 ± 20)g,购自昆明医科大学实验动物学部【SCXK(滇)K2015-0002】,饲养于昆明医科大学普通级实验室【SYXK(滇)K2015-0002】。实验操作符合实验动物伦理学要求【伦理审批号:KMMU2019017】。

1.1.2 主要仪器与试剂

组织包埋机(Leica,美国),切片机(Leica,美国),摊片烤片一体机(Leica,美国),生物显微镜(Leica,美国),L-谷氨酸(Sigma,美国),D-半乳糖(Sigma, 美国), Anti-P Glycoprotein (Abcam, ab170904), Anti-NF-κB p65(Abcam, ab32536), Anti-TLR2(Abcam, ab209216)。

1.2 方法

1.2.1 实验动物的分组、给药及取材

将 28 只健康雄性树鼩随机分为 4 组,每组 7 只。分别为对照组(CT 组,灌胃生理盐水 8 mL/kg)、L-谷氨酸组(G 组,灌胃 2000 mg/kg)、D-半乳糖组(D 组,腹腔注射600 mg/kg)、D-半乳糖联合 L-谷氨酸组(D+G 组,腹腔注射 D-半乳糖600 mg/kg;灌胃 L-谷氨酸 2000 mg/kg),每天给药 1 次,持续 8 周。每周称量动物体重,记录存活数。心脏采血处死树鼩后,4%多聚甲醛灌注固定脏器,取肝组织立刻置于 4%多聚甲醛 48 h,透明,浸蜡,包埋。

1.2.2 组织学染色检测

蜡块切片,脱蜡。HE 染色:苏木素染色,用水冲洗后盐酸酒精分化,伊红染色,脱水封片。免疫组织化学染色:柠檬酸组织抗原修复液于高压锅里煮 2 min,PBS 冲洗 3 次;过氧化氢孵育 15 min,PBS 冲洗 3 次;用一抗孵育于 4 度冰箱过夜,PBS 冲洗 3 次;二抗孵育 15 min,PBS 冲洗 3 次;DAB 显色液孵育 3 min,显微镜观察显色后用 PBS 冲洗终止显色;

苏木素染色 4 min,水冲洗,盐酸酒精分化 6 s,用水返蓝至镜下观察细胞核为蓝色;脱水封片。

1.3　统计学分析

用 Image J 对树鼩肝组织免疫组化染色结果进行处理,计算阳性面积占比及平均光密度值;应用 Graphpad prism 7 对阳性面积占比及平均光密度值作图并进行组间 One-way ANOVA 法分析,$P< 0.05$ 为差异有显著性。

2　结果

2.1　L-谷氨酸与 D-半乳糖处理对树鼩体重和存活率的影响

如图 1A 所示,给药第 1 周,各组树鼩平均体重均有所下降。与第 1 周相比,树鼩第 8 周的平均体重均上升的是 CT 组(13%)、G 组(12%)、D 组(6%),而 D+G 组体重下降 6%。如图 1B 所示,给药 8 周后,CT 组的存活率为 100%,G 组为 87.5%,D 组为 54.55%,D+G 组 70%。

2.2　L-谷氨酸与 D-半乳糖处理对树鼩肝组织的影响

组织病理学的结果显示,CT 组树鼩肝细胞索呈放射状排列,从中央静脉(central vein,CV)辐射并通过血窦(blood sinusoids,S),肝细胞形态良好(图 2A)。门静脉(portal vein,PV)区域有分支胆管(bile ducts, BD)(图 2E);少量炎症细胞浸润(图 2I)。G 组可见肝细胞水样变性,部分细胞坏死,肝细胞水肿(edema,E),中央静脉扩张(图 2B);门静脉、分支胆管扩张(图 2F);炎症细胞浸润较明显(图 2J)。D 组肝细胞排列紊乱,结构较模糊,可见核固缩(#),CV 扩张(图 2C);PV、BD 扩张(图 2G);炎症细胞浸润加重(图 2K)。D+G 组损伤更为严重,可见肝细胞脂肪变性(&),细胞核空泡化(*),细胞索状消失,肝血窦明显增宽,肝细胞呈游离状态、数量减少,CV 扩张(图 2D);PV 和 BD 扩张明显(图 2H);有大量的炎症细胞浸润(inflammatory cell infiltration,ICI)(图 2L)。

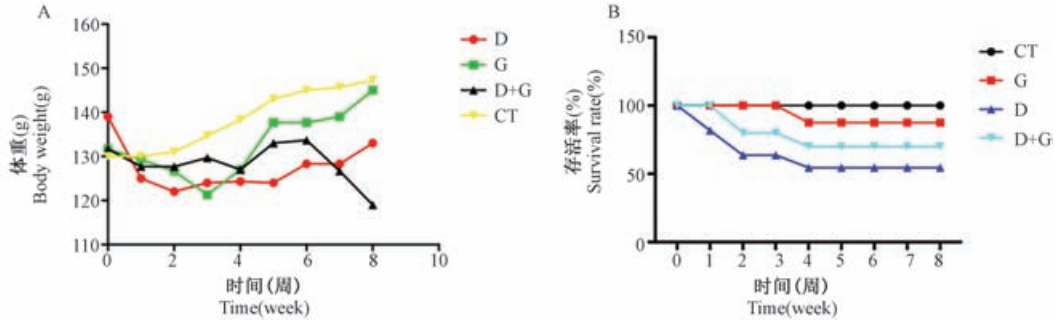


图 1　L-谷氨酸与 D-半乳糖对树鼩体重(A)和存活率(B)的影响

Figure 1　Changes of the body weight(A) and survival rate(B) in tree shrews after intervention

2.3　L-谷氨酸与 D-半乳糖处理增加了树鼩肝 Toll 样受体 2(TLR2)的表达

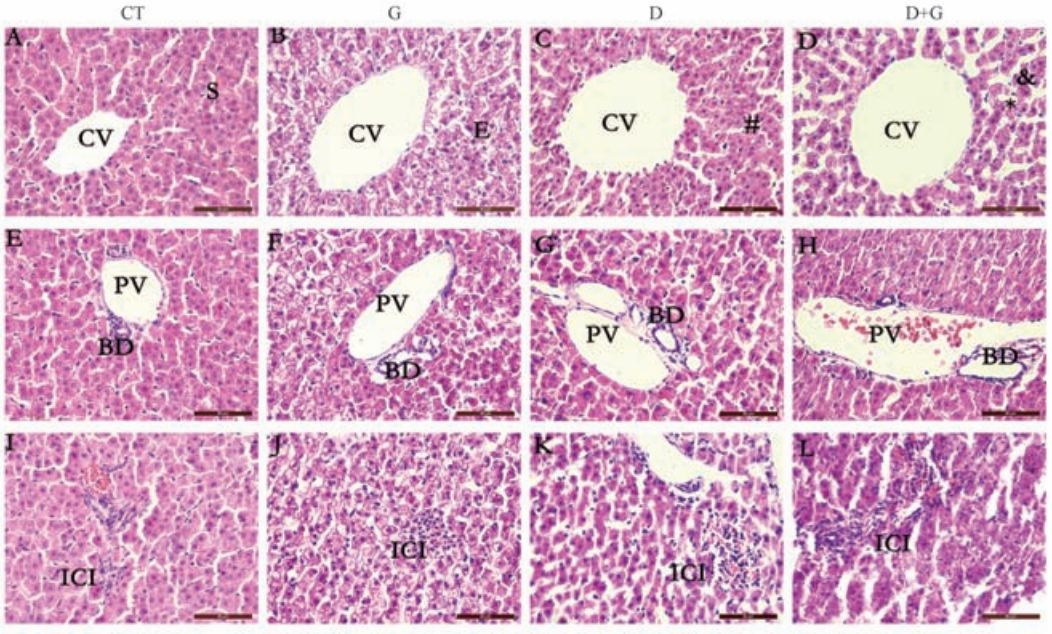
IHC 染色显示,TRL2 主要在肝血窦与细胞膜上表达(图 3A)。G 组($P < 0.05$)、D 组($P< 0.05$)、D+G 组($P< 0.05$)的 TRL2 阳性面积占比(图 3B)、平均光密度值均显著高于对照组(图 3C)。在 3 个处理组中,D+G 组($P< 0.05$)的阳性面积占比、平均光密度值均显著高于 G 组和 D 组。

2.4　L-谷氨酸与 D-半乳糖处理增加了树鼩肝核转录因子 κB(NF-κB)表达

NF-κB 主要表达定位于肝血窦膜上。L-谷氨酸、D-半乳糖及 L-谷氨酸联合 D-半乳糖均能增加肝 NF-κB 表达(图 4A)。G 组、D 组、D+G 组 NF-κB 的阳性面积占比(图 4B)、平均光密度值均极显著高于对照组(图 4C)($P< 0.01$)。相对于 G 组和 D 组,D+G 组的阳性面积占比、平均光密度值均显著升高($P< 0.01$)。

2.5　L-谷氨酸与 D-半乳糖处理增加了树鼩肝 P-糖蛋白(P-gp)的表达

免疫组化表明树鼩肝 P-gp 表达主要在细胞核与细胞膜上(图 5A)。与 CT 组比较,G 组、D 组、D+G 组 P-gp 的阳性面积占比(图 5B)、平均光密度值均及显著升高($P< 0.01$)(图 5C)。D+G 组的阳性面积、平均光密度值极显著高于 G、D 组($P< 0.01$)。提示 L-谷氨酸、D-半乳糖及 L-谷氨酸联合 D-半乳糖均能引起肝 P-糖蛋白表达增加,以介导药物外排,其中 L-谷氨酸联合 D-半乳糖的药物外排作用显著高于单独给药。

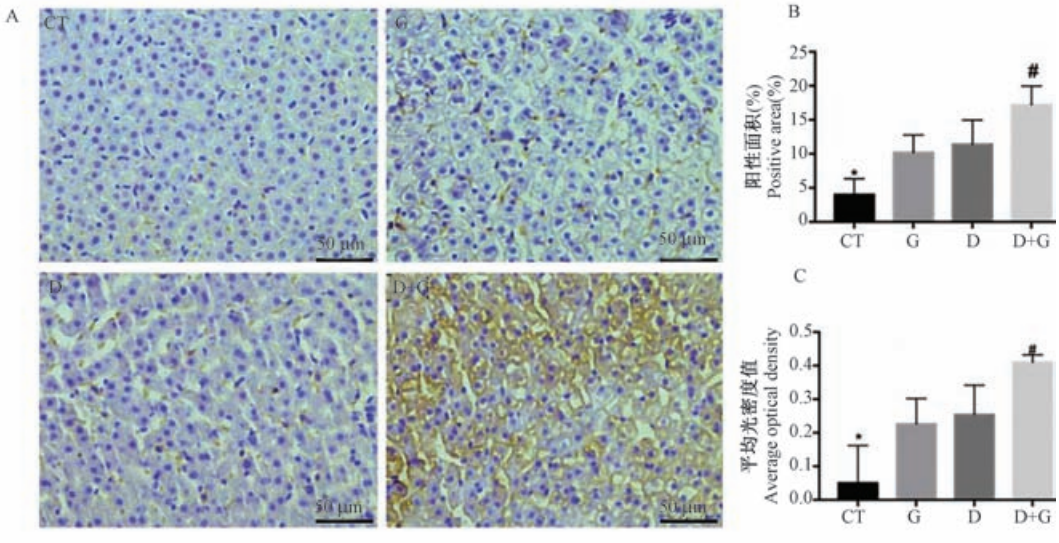


注:CT 组(AEI),G 组(BFJ),D 组(CGK),D+G 组(DHL);A-D 中,CV,S,E,#,&,* 分别表示中央静脉(central vein,CV),血窦(blood sinusoids,S),肝细胞水肿(edema,E),核固缩(#),肝细胞脂肪变性(&),细胞核空泡化(*);E-H 中,PV,BD 分别表示门静脉(portal vein,PV),分支胆管(bile ducts, BD);I-L 中,ICI 表示炎症细胞浸润(inflammatory cell infiltration,ICI)。

图 2 树鼩肝组织形态

Note. CT group (AEI), G group(BFJ), D (CGK), D+G grop(DHL). A-D, CV, S, E, #, &, * represent central vein, blood sinusoids, Hepatoedema, Nuclear pyknosis, Cell steatosis, Cell vacuolation. E-H, PV and BD represent portal vein, bile ducts. I-L ICI represent inflammatory cell infiltration.

Figure 2 Histological structure in liver tissu

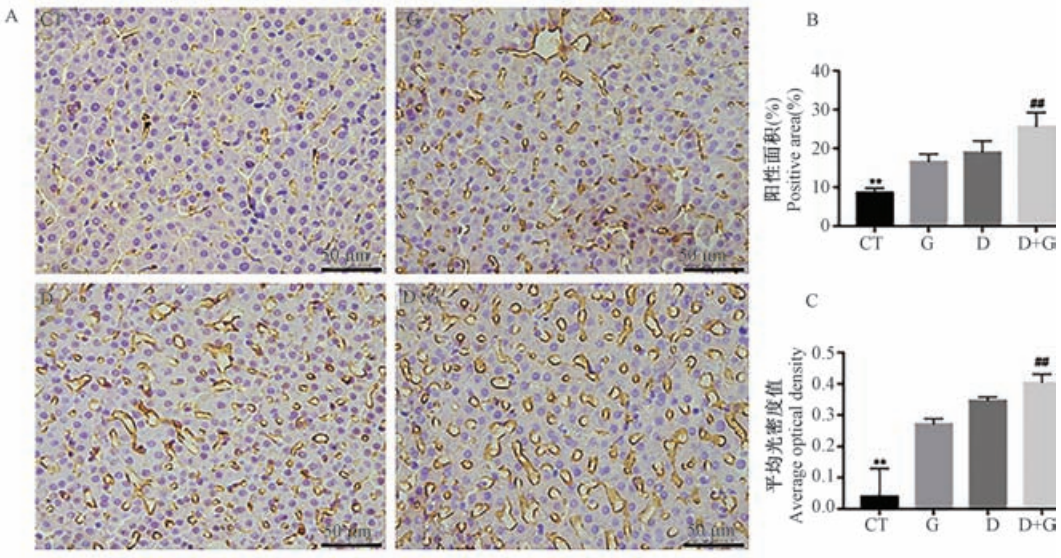


注:A:各组树鼩 TLR2 图片(IHC 染色)。B,C:CT 组与 G,D,D+G 组相比,$^{*}P<0.05$,D+G 组与 G,D 组相比,$^{\#}P<0.05$。

图 3 树鼩肝组织 TLR2 的表达

Note. A, Immunohistochemical staining of TLR2 (IHC staining). B, C, CT group compared with G, D, D+G group, $^{*}P<0.05$. D+G group compared with G, D group, $^{\#}P<0.05$.

Figure 3 Expression of TLR2 in liver tissue

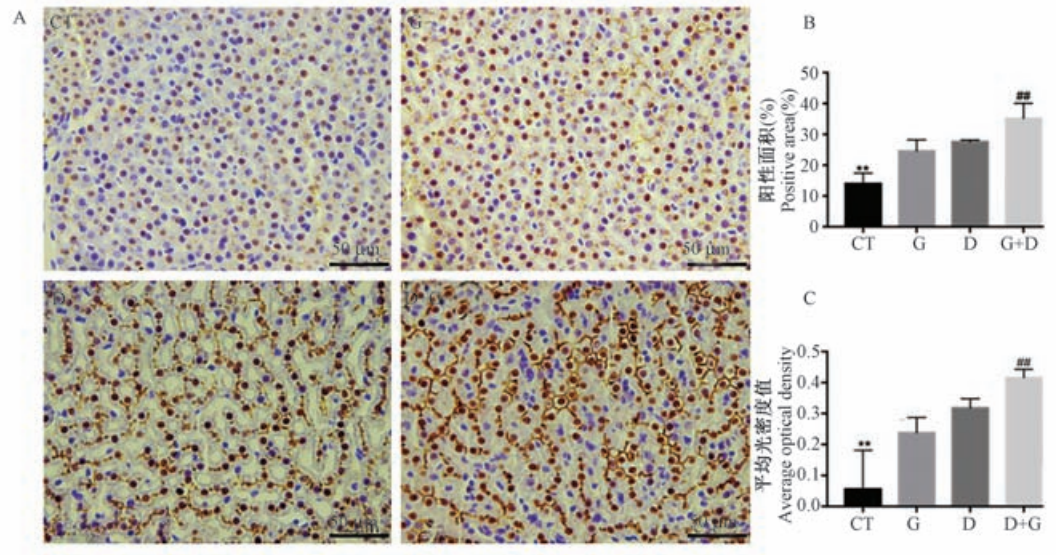


注:A: 各组树鼩 NF-κB 图片(IHC 染色)。B,C: CT 组与 G,D,D+G 组相比,$^{**}P<0.01$;D+G 组与 G,D 组相比,$^{\#\#}P<0.01$。

图 4　树鼩肝组织 NF-κB 的表达

Note. A, Immunohistochemical staining of NF-κB (IHC staining). B, C, CT group compared with G, D, D+G group, $^{*}P<0.01$. D+G group compared with G, D group, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 4　Expression of NF-κB in liver tissue



注:A:各组树鼩 P-gp 图片(IHC 染色)。B,C: CT 组与 G,D,D+G 组相比,$^{**}P<0.01$;D+G 组与 G,D 组相比,$^{\#\#}P<0.01$。

图 5　树鼩肝组织 P-gp 的表达

Note. A, Immunohistochemical staining of P-gp (IHC staining). B, C, CT group compared with G, D, D+G group, $^{**}P<0.01$. D+G group compared with G, D group, $^{\#\#}P<0.01$.

Figure 5　Expression of P-gp in liver tissue

3　讨论

本实验探究 D-半乳糖和 L-谷氨酸对树鼩肝的损伤情况。有研究表明长期大剂量给予 D-半乳糖、谷氨酸均能够对机体产生损伤[21-22]。体重与存活率能反映机体的综合代谢,进而反应药物对机体的治疗和损伤作用。本实验发现,D+G 组树鼩体重减轻,存活率下降,提示 L-谷氨酸与 D-半乳糖联合给药,对树鼩有明显的损伤作用。肝是机体的主要代谢器官,也是化学物质最重要的靶器官,肝损伤是一种多因素疾病。肝损伤的主要靶细胞为肝细胞、胆管上皮细胞和血管内皮细胞,其病理特点复杂多

变。肝活检是临床上判断肝损伤严重程度的重要指标,协助分析病因和判断预后[23]。D-半乳糖能够导致小鼠肝组织细胞排列不整齐,肝细胞坏死,出现明显病变[24-27]。谷氨酸钠导致小鼠肝细胞细胞质肿胀,细胞核空泡化,门静脉区域充血,胆管扩张和炎性细胞浸润[28-30]。本实验显示 L-谷氨酸对树鼩肝细胞损伤与谷氨酸钠类似。此外,D-半乳糖联合 L-谷氨酸给药,肝组织病理损伤更为严重,表现为肝细胞脂肪变性,细胞核空泡化,细胞索状消失,肝血窦明显增宽,中央静脉与门静脉扩张明显,有大量的炎症细胞浸润。提示联合给药导致树鼩肝组织较强炎性反应。

Toll 样受体的胞内段与 IL-1 受体同源,其激活能激发早期抗感染的炎性细胞因子生成,进而启动机体炎性防御机制。TLRS 及其信号途径在炎性反应中发挥重要作用。核转录因子 NF-κB 是具有多种转录调节作用的核转录因子,通过参与炎性细胞因子的表达而参与多种疾病过程。TLRS 的激活引起下游分子活化,导致 NF-κB 的活化及启动子结合蛋白磷酸化,诱导 NF-κB 信号通路的促炎性因子反应,激活炎性因子产生生物学效应。张昭[31]发现急性出血坏死性胰腺炎(AHNP)肝中 TLRs 与 NF-κB 具有正相关性,TLRs 表达上调,进一步激活 NF-κB,炎性介质表达增强,肝损伤加重。TLR2 是 TRLs 家族中研究最早分布最广泛的成员,受到内外源性配体刺激后,通过骨髓分化因子 88 依赖性途径活化 NF-κB。NF-κB 进入细胞核中作为转录因子诱导促炎因子和炎性因子表达[32]。四氯化碳诱导大鼠肝损伤中,TLR2 与 NF-κB 表达显著升高[33]。在 AHNP 肝损伤模型中大鼠,TLR2mRNA 和 TLR2 的表达均显著升高[34-36]。糖尿小鼠病伴有肝损伤时 NF-κB 的表达显著上升[37]。与以上报道相似,本实验显示 D-半乳糖、L-谷氨酸及二者联合给药均使 TLR2、NF-κB 的表达升高。推测 D-半乳糖、L-谷氨酸通过刺激 TLR2/NF-κB 信号通路,促发炎性反应,引起肝组织病理改变。

糖蛋白也称为多耐药基因 1,是 ABC 结合转运蛋白超家族成员,依赖 ATP 供能,介导肝细胞外排药物[38-39]。主要介导疏水性阳离子外排降低肝细胞内药物浓度,产生耐药现象。炎性反应等病理条件下药物转运体的活性和表达改变,进而影响疗效或产生毒性。临床病理条件下,肝药物转运体表达的改变反映病情进程[40]。P-糖蛋白在慢性肝损伤中发挥一定作用[41]。周利婷等[19]在异烟肼致小鼠肝损伤中观察到 P-糖蛋白升高。李春桃[20]在小鼠肝癌模型中发现,肝缺血再灌注损伤时,P-糖蛋白显著升高。本实验中 L-谷氨酸、D-半乳糖单独或联合给药,均引起树鼩肝 P-糖蛋白的高表达,当二者联合给药时 P-糖蛋白的表达最高。提示炎症反应严重性与 P-糖蛋白增加正相关。

综上所述,D-半乳糖、L-谷氨酸单独或联合作用均可引起树鼩肝组织损伤,其中联合给药损伤较严重。其机制可能涉及 TLR2/NF-κB 通路激活而诱发炎性反应;同时树鼩肝组织 P-糖蛋白代偿性增加,以缓解毒性。

参 考 文 献(References)

[1] 张广杰. micro RNA 与常见肝脏疾病的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2011, 32(20): 2371-237.
Zhang GJ. Research progress of MicroRNA and common liver diseases [J]. Int J Lab Med, 2011, 32(20): 2371-237.

[2] Moghe A, Joshi-Barve S, Ghare S, et al. Histone modifications and alcohol-induced liver disease: Are altered nutrients the missing link? [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(20): 2465-2472.

[3] 王玲, 孙妩弋, 姜玲, 等.酒精性肝病动物模型的研究进展[J]. 安徽医药, 2010, 14(7): 745-748.
Wang L, Sun WG, Jiang L, et al. Advances in animal model of alcoholic liver disease [J]. Anhui Med Pharm J, 2010, 14(7): 745-748.

[4] 莫之准. 川芎、当归超临界 CO_2 萃取物改善衰老小鼠肝肾损伤研究 [D]. 广州中医药大学,2016.
Mo ZZ. Ameliorative effect of CO_2 supercritical fluid extract of ligusticum chuanxiong and angelicae sinensis against D-galactose induced Injury in the mouse liver and kidney [D]. Guangzhou University of Chinese Medicine, 2016.

[5] Keppler D, Lesch R, Reutter W, et al. Experimental hepatitis induced by d-galactosamine [J]. Exp Mol Pathol, 1968, 9(2): 279-290.

[6] Gao J, Yu Z, Jing S. Protective effect of Anwulignan against D-galactose-induced hepatic injury through activating p38 MAPK-Nrf2-HO-1 pathway in mice [J]. Clin Interv Aging, 2018, 13: 1859-1869.

[7] 许烈强. 虎杖苷对 D-半乳糖和酒精致肝损伤的保护作用及机制研究 [D]. 广州中医药大学, 2017.
XU LQ. Protective effect and potential mechanisms of polydatin against experimental liver injury [D]. Guangzhou University of Chinese Medicine, 2017.

[8] Zhang X, Wu JZ, Lin ZX. Ameliorative effect of supercritical fluid extract of Chrysanthemum indicum Linnén against D-galactose induced brain and liver injury in senescent mice via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 234: 44-56.

[9] Peng X, Kong B, Yu H, et al. Protective effect of whey protein hydrolysates against oxidative stress in dgalactose-induced ageing rats [J]. Int Dairy J, 2014, 34(1): 80-85.

[10] Zhang ZF, Fan SH, Zheng YL, et al. Purple sweet potato color attenuates oxidative stress and inflammatory response induced by D-galactose in mouse liver [J]. Food Chem Toxicol, 2009, 47(2): 496-501.

[11] Kamel AS, Abdelkader NF, Abd El-Rahman SS, et al. Stimulation of ACE2/ANG (1-7)/Mas axis by diminazene ameliorates Alzheimer's disease in the D-galactose-ovariectomized rat model: role of PI3K/Akt pathway [J]. Mol Neurobiol, 2018, 55(10):8188-8202.

[12] Kim DH, Kim DW, Jung BH, et al. Ginsenoside Rb2 suppresses the glutamate-mediated oxidative stress and neuronal cell death in HT22 cells [J]. J Ginseng Res, 2019, 43(2): 326-334.

[13] Medzhitov R, Preston-Hurlburt, Janeway CA Jr, et al. A human homologue of the drosophila toll protein signals activation of adaptive immunity [J]. Nature, 1997, 388(6640): 394-397.

[14] Szatmary Z. Molecular biology of toll-like receptors [J]. Gen Physiol Biophys, 2012, 31 (4): 357-366.

[15] Toubiana J, Rossi AL, Belaidouni N, et al. Src-family-tyrosine kinase Lyn is critical for TLR2-mediated NF-κB activation through the PI 3-kinase signaling pathway [J]. Innate Immun, 2015, 21(7): 685-697.

[16] Tan Y, Tseng PO, Wang D, et al. Stiffening-induced high pulsatility flow activates endothelial inflammation via a TLR2/NF-κB pathway [J]. PLoS One, 2014, 9(7): e102195.

[17] Aoki K, Nakajima M, Hoshi Y, et al. Effect of aminoguanidine on lipopolysaccharide-induced changes in rat liver transporters and transcription factors [J]. Biol Pharm Bull, 2008, 31(3): 412-420.

[18] 刘晴. 枸杞多糖对 CCl4 诱导的大鼠肝纤维化的保护作用及机制研究 [D]. 南京农业大学, 2016.
Liu Q. The protective effects of Lycium barbarum polysaccharidesagainst CCl4-induced liver fibrosis in ratsand mechanism [D]. Nanjing Agricultural University, 2016.

[19] 周利婷, 周燕, 张国强, 等. 异烟肼对小鼠肝细胞膜转运体 Mrp2, Bsep, P-gp 和 Ntcp 表达的影响 [J]. 中国药学杂志, 2014, 49(4): 298-302.
Zhou LT, Zhou Y, Zhang GQ, et al. Regulation effect of isoniazid on the expression of hepatobiliary membrane transporters Mrp2, Bsep, P-gp and Ntcp in mouse [J]. Chin Pharm J, 2014, 49(4): 298-302.

[20] 李春桃. 缺血再灌注损伤对小鼠肝癌模型多药耐药表型的影响 [D]. 西南医科大学, 2017.
Li CT. Influence of ischemia-reperfusion injury on multidrug resistance related genes in hepatocarcinoma using a mouse liver cancer model [D]. Southwest Medical University, 2017.

[21] 赵凡凡, 周玉枝, 高丽, 等. D-半乳糖致衰老大鼠模型的研究进展 [J]. 药学学报, 2017, 52(03): 347-354.
Zhao FF, Zhou YZ, Gao L, et al. Advances in the study of the rat model of aging induced by D-galactose [J]. Acta Pharm Sin, 017, 52(03): 347-354.

[22] 李娜. 中药抗谷氨酸神经毒性的机制研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2013, 33(14): 3549-3551.
Li N. Research progress on mechanism of anti-glutamate neurotoxicity of traditional Chinese medicine [J]. Chin J Geront, 2013, 33(14): 3549-3551.

[23] 耿文静, 刘晖, 丁惠国. 药物性肝损伤的潜在机制、病理特点及生物标志物 [J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(4): 925-929.
Geng WJ, Liu H, Ding GH. Recent advances in drug-induced liver injury: Potential mechanisms, pathological features, and biomarkers [J]. J Clin Hepatol, 2019, 35(4): 925-929.

[24] Yu Y, Bai F, Liu Y, et al. Fibroblast growth factor (FGF21) protects mouse liver against D-galactose-induced oxidative stress and apoptosis via activating Nrf2 and PI3K/Akt pathways [J]. Mol Cell Biochem, 2015, 403 (1-2): 287-299.

[25] Zhang ZF, Lu J, Zheng YL, et al. Purple sweet potato color protects mouse liver against D-galactose-induced apoptosis via inhibiting caspase-3 activation and enhancing PI3K/Akt pathway [J]. Food Chem Toxicol, 2010, 48(8-9): 2500-2507.

[26] 赵凡凡, 李肖, 高丽, 等. 甘草水提物干预 D-半乳糖致衰老大鼠的肝脏代谢组学研究 [J]. 中草药, 2017, 48(17): 3545-3553.
Zhao FF, Li X, Gao L, et al. Liver metabolomics study of effects of glycyrrhizae radix et Rhizoma extracts on D-galactose-induced rats [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2017, 48 (17): 3545-3553.

[27] Wang PP, Sun HX, Liu CJ, et al. Racemic oleracein E increases the survival rate and attenuates memory impairment in D-galactose/NaNO2-induced senescent mice [J]. Phytomedicine, 2016, 23(5): 460-467.

[28] Alarcon-Aguilar FJ, Zamilpa A, Perez-Garcia MD, et al. Effect of hibiscus sabdariffa on obesity in MSG mice [J]. J Ethnopharmacol, 2007, 114(1): 66-71.

[29] Elbassuoni EA, Ragy MM, Ahmed SM. Evidence of the protective effect of l-arginine and vitamin D against monosodium glutamate-induced liver and kidney dysfunction in rats [J]. Biomed Pharmacother, 2018, 108: 799-808.

[30] Ortiz GG, Bitzer-Quintero OK, Zúrate C, et al. Monosodium glutamate-induced damage in liver and kidney: a morphological and biochemical approach [J]. Biomed Pharmacother, 2006, 60(2): 86-91.

[31] 张昭. TLR 信号通路参与 AHNP 时肝损伤机制及生长抑素调控作用 [D]. 华中科技大学, 2008.
Zhang Z. Effect of Somatostatin on TLR pathway during liver injuries in acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis in rats [D]. Huazhong University Of Science And Technology, 2008.

[32] 简玲, 曹玲, 陈莲. 肺结核患者血清中 TLRs 信号通路表达水平与患者治疗效果及病情预后的关系 [J]. 标记免疫分析与临床, 2018, 25(1): 102-104, 108.
Jian L, Cao L, Chen L. The relationship between the expression level of TLRs signaling pathway in patients with pulmonary

tuberculosis and the effect of treatment and prognosis [J]. Lab Immun Clin Med, 2018, 25(1): 102-104, 108.

[33] Gan F, Liu Q, Liu Y, et al. Lycium barbarum polysaccharides improve CCl4-induced liver fibrosis, inflammatory response and TLRs/NF-κB signaling pathway expression in wistar rats [J]. Life Sci, 2018, 28(192): 205-212.

[34] 席锐, 王丽娟, 李小涛, 等. 急性出血坏死性胰腺炎肝损伤中 TLR2, 4mRNA 和蛋白的表达 [J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(20): 3846-3849.
Xi R, Wang LJ, Li XT, et al. Study on the Expressions of TLR2, 4 mRNA and protein inLiver injury of acute hemorrhagic necrotic pancreatitis [J]. Prog Modern Biomed, 2017, 17(20): 3846-3849.

[35] 刘娟, 谭锋, 欧阳明. 氯喹对 AHNP 肝损伤 Toll 样受体 2/4 表达的影响及作用机制研究 [J]. 中南药学, 2014, 12 (4): 350-353.
Liu J, Tan F, OUYang M. Effect of chloroquine on the expression of liver injury AHNP Toll-like receptor 2/4 and its mechanism [J]. Cent South Pharm, 2014, 12(4): 350-353.

[36] 黄鹏, 吴河水, 张磊, 等. 急性出血坏死性胰腺炎肝损伤中 TLR2/4mRNA 的表达及氯喹的干预效应 [J]. 中国普通外科杂志, 2006, 15(6): 438-441.
Huang P, Wu HS, Zhang L, et al. Toll-like receptor 2 and 4 gene expression in acute injury liver tissue of acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis rats and the efficacy of intervention with chloroquine[J]. Chin J Gen Surg, 2006,15(6): 438-441.

[37] 陆海英, 李志杰, 舒适, 等. 六味地黄丸基于 SIRT6/NF-κB 信号通路对糖尿病伴肝损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(12): 28-34.
Lu HY, Li ZJ, Shu S, et al. Protective effect of liuwei dihuangwan on diabetes mellitus with liver injury based on SIRT6/NF-κB signaling pathway [J]. Chin J Exp Trad Med Form, 2019, 25(12): 28-34.

[38] Fromm MF, Kim RB. Drug Transporters [M]. Erlangen: Springer verlag berlin heidelberg, 2011.

[39] Liu H, Sahi J. Role of hepatic drug transporters in drug development [J]. Clin Pharmacol, 2016, 56 (7): S11-S22.

[40] 邹玉, 岑娟, 韩利文, 等. 药物转运体在药源性肝损伤中的作用[J]. 现代生物医学进展, 2017, 17(36): 7196-7200,7167.
Zou Y, Cen J, Han LW, et al. Effect on drug transporters in drug-induced liver [J]. Prog Modern Biomed, 2017, 17(36): 7196-7200,7167.

[41] 金实, 姚丹, 刘灿, 等. 慢性肝损伤对大鼠脑内 P-GP 及 MRP2 功能和表达的影响[J]. 中国药科大学学报, 2012, 43(1): 64-69.
Jin S, Yao D, Liu C, et al. Effect of chronic liver failure on the function and expression of P-GP and MRP2 in rat brain [J]. J Chin Pharm Univ, 2012, 43(1): 64-69.

[收稿日期] 2019-07-10

李慧敏,于玉楼,唐贺,等. 利用心电植入子遥感技术测定并比较不同全麻药对大鼠心电活动的影响[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 89-95.
Li HM, Yu YL, Tang H, et al. Comparison of different anesthetics on rat heart rates using a cardiac electrical implant [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 89-95.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.013

利用心电植入子遥感技术测定并比较不同全麻药对大鼠心电活动的影响

李慧敏[1#],于玉楼[2#],唐贺[2],赵冉[2],董紫姗[2],王瀚冬[3],杨晶[4],王川[2*]

(1. 河北省圣禄嘉妇产医院麻醉科,石家庄 050000; 2. 河北医科大学药理学教研室,石家庄 050017;
3. 河北医科大学基础医学院,石家庄 050017; 4. 河北医科大学生理学教研室,石家庄 050017)

【摘要】 **目的** 利用心电植入子比较五种全麻药对 SD 大鼠心率的影响。**方法** 利用心电植入子测定五种全麻药对大鼠 120 min 内的麻醉效果、心率及心电图变化情况;腹腔注射异丙肾上腺素(0.025 mg/mL),比较五种全麻药对异丙肾上腺素提高大鼠心电活动的影响。**结果** 异氟醚和丙泊酚起效快,麻醉稳定,心率变化较小;依托咪酯和氯胺酮起效较快,但持续时间较短;戊巴比妥钠起效慢,麻醉时间长,苏醒慢,心脏抑制作用明显。2%异氟醚和氯胺酮对心率影响较小,其余三种麻醉药均可明显降低异丙肾上腺素对心率的加快作用。**结论** 异氟醚和丙泊酚对 SD 大鼠麻醉效果最好,心率影响较小,其中异氟醚对异丙肾上腺素引起的心率加快影响最小,更适用于麻醉操作以及对一些心血管活性药的心率作用研究。

【关键词】 麻醉药;心率;心电植入子遥测技术;大鼠
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0089-07

Comparison of different anesthetics on rat heart rates using a cardiac electrical implant

LI Huimin[1#], YU Yulou[2#], TANG He[2], ZHAO Ran[2], DONG Zishan[2], WANG Handong[3], YANG Jing[4], WANG Chuan[2*]

(1. Department of Anesthesiology, Shenglujia Obstetrics and Gynecology Hospital, Shijiazhuang 050000, China.
2. Department of Pharmacology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017. 3. College of Basic Medicine, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017. 4. Department of Physiology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017)
Corresponding author: WANG Chuan. E-mail: wangchuan@hebmu.edu.cn

【Abstract】 **Objective** To observe the effects of five general anesthetics on cardiac electrical activity using a cardiac electrical implant in rats. **Methods** The anesthetic effect and cardiac electrical activity changes caused by five general anesthetics in rats were measured within 120 min before and after anesthesia using a cardiac electrical implant. Isoproterenol (0.025 mg/mL) was administered to observe and compare the effects of the anesthetics on cardiac electrical

[**基金项目**]国家自然科学基金资助项目(31171097,81770407),河北省自然科学基金资助项目(H2017206262, C2018206277),河北省高等学校科学技术研究项目(ZD2015007, ZD2016002),河北省高层次人才资助项目(A2017005070),河北医科大学大学生创新性实验计划项目(USIP2018048)。
Funded by National Nature Science Foundation of China (31171097, 81770407), Hebei Natural Science Foundation (H2017206262, C2018206277), Science and Technology Research of Hebei Higher Education (ZD2015007, ZD2016002), Hebei High-level Professionals Foundation (A2017005070), College Students Innovative Pilot Projects of Hebei Medical University (USIP2018048).
[**作者简介**]李慧敏(1974—)女,主治医师,硕士,研究方向:麻醉药的选择与应用。Email: yly528408@163.com;
于玉楼(1993—)女,博士研究生,研究方向:心血管药理学。Email: 2418621062@qq.com。
#共同第一作者
[**通信作者**]王川(1971—)男,教授,博士,博士生导师,研究方向:心血管药理学。Email:wangchuan@hebmu.edu.cn

activity in rats. **Results** Isoflurane and propofol acted quickly with stable anesthesia, fast recovery and minimal heart rate variations. Etomidate and ketamine acted quickly, but the anesthesia lasted a shorter time. Pentobarbital sodium acted slowly, and the anesthesia lasted longer, with a slow recovery and obvious inhibition of cardiac function. Propofol, etomidate, and pentobarbital sodium significantly reduced the effect of isoproterenol on the heart rate. **Conclusions** Isoflurane and propofol have the best anesthetic effect on the rats and least affected the heart rate. Isoflurane has the least effect on the isoproterenol-enhanced heart rate, suggesting that isoflurane is better suited for anesthetic operations and studying the effects of some cardiovascular active drugs on the heart rate.

【**Keywords**】 anesthetic; heart rate; dynamic telemetry technique of the cardiac electrical implanter; rat

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

大小鼠是目前基础医学研究中最常用的动物,对这些动物选用合适的全麻药、适当的剂量以及最大可能地降低对动物其它方面的影响,是许多实验成功的关键。根据先前的实验发现多种全麻药对动物实验的心率等心电活动均有不同程度的影响,进而干扰在麻醉动物中所预期观察的效果[1-3]。故根据不同的实验动物选用合适的全麻药,最大限度减小对动物心电活动影响一直是基础医学研究,尤其是心脏电生理领域十分关注的问题,但目前对此问题进行全面系统评价的研究十分缺乏。

由于大鼠心率快、波形不同于人的心电图、清醒状态时肢体活动产生的肌电干扰较多等都可给心电图的稳定描记带来影响,因而探索大鼠心电活动的观察记录方法、相关影响因素及可能的应用一直受到生物医学研究领域的重视。前期报道中麻醉药对动物实验都具有一定的局限性:国内研究报道在传统方法中,清醒状态下大小鼠心电图描记法一般采用橡皮筋捆绑固定四肢,同时将电极分别插入大小鼠四肢皮下,再连接导联线进行心电描记,这样的疼痛刺激难免引发较高水平儿茶酚胺的释放,影响心电图的记录[4-5]。

为了得到更准确、更稳定、更科学的实验结果,需连续长时间的在清醒无束缚的条件下测量大小动物的生理参数,心电植入子遥测系统使其成为可能[6]。植入子是植入在动物体内的微型设备,它担负传感器,放大器,数字转换,无线发射的功能。心电植入子动态遥感监测系统能客观、标准、准确地记录大小鼠在自由无刺激状态下的心电变化,可减少肌电对动物心电活动测定的干扰,更直观地反映出大小鼠在清醒静息、麻醉状态及心血管药物状态下的动态心电指标变化情况[7]。

本实验通过利用心电植入子遥感技术,采用目前国内外基础医学实验中最常用的五种全麻药,分别观测其对 SD 大鼠的有效麻醉剂量、时程,并实时遥测 SD 大鼠在清醒及不同麻药下的心率及心电活动的改变,比较五种全麻药对 SD 大鼠心电活动的影响,明确对 SD 大鼠心电活动影响最小的麻醉药与剂量,从而为不同动物的全麻药选择上提供重要的实验资料和线索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

48 只健康清洁级雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重(220 ± 15) g,来源于河北医科大学实验动物中心【SCXK(冀)2018-004】。饲养于河北医科大学新药安全评价研究中心【SYXK(冀)2018-005】。饲养期间动物自由饮水,饲喂普通维持饲料由北京科澳协力有限公司提供,饲养条件:昼夜各半循环照明,相对湿度 40% ~ 70%,温度 22~26℃。所有动物饲养管理和实验操作均符合动物实验伦理学要求(审批号:LACUC-Hebmu-PD-201720)。

1.1.2 试剂与仪器

异氟醚(Isoflurane,山东科源制药有限公司),丙泊酚(Propofol injection,西安力邦制药有限公司),依托咪酯(Etomidate Fat Emulsion injection,江苏恩华药业),咪达唑仑+氯胺酮(Midazolam + ketamine,江苏恩华药业),戊巴比妥钠(Pentobarbital sodium salt,德国进口分装),盐酸异丙肾上腺素(Isoprenaline,上海禾丰制药有限公司),植入子(TA10EA-F20,DSI 公司,美国),植入式生理信号遥测系统(DSI 公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及给药

将 40 只 SD 大鼠随机各均分为 5 组:异氟醚组(I 组)、异丙酚组(Pr 组)、依托咪酯组(E 组)、咪达唑仑-氯胺酮组(MK 组)和戊巴比妥钠组(PS 组),

每组各 8 只。大鼠异氟醚吸入麻醉,其余全麻药均分别腹腔低、高剂量腹腔注射给药。异氟醚组先将 SD 大鼠置于麻醉诱导箱中诱导麻醉,进气端以纯氧为载体连接异氟醚挥发罐,吸入浓度为 2%,氧气流量 2 L/min,诱导完毕后用自制大鼠面罩持续吸入高低浓度 2%与 1.5%异氟醚进行维持麻醉。丙泊酚组腹腔注射 60 mg/kg 和 70 mg/kg 低高两剂量;依托咪酯组 20 mg/kg、30 mg/kg;咪达唑仑-氯胺酮复合组 70 mg/kg(氯胺酮 75 mg/kg+咪达唑仑 5 mg);1%戊巴比妥钠组 0.06 mL/10 g、0.1 mL/10 g;异丙肾上腺素 0.025 mg/mL 腹腔注射。

1.2.2　心电植入子置入术

预先将手术器械高压灭菌,心电植入子用 2%戊二醛浸泡 12 h 消毒,后用 0.9%生理盐水浸泡处理。SD 大鼠吸入异氟醚诱导麻醉后置于手术台并持续吸入 1.5%异氟醚,大鼠手术区域备皮,消毒铺巾,分层次开腹,将心电植入子植入腹腔并固定,并分别将植入子的红色电极从腹腔穿过埋置大鼠左肋弓下缘皮下,白色电极埋置鼠右第二三肋间皮下固定。接收器与心电植入子一一对应,内置十字形天线,从而接收塑料笼或铁笼内的信号。生理信号被植入子采集到并转换成相应的电信号后用无线电发射出来,由饲养笼下方的接收器接收到并传递给数据转换器,完成数据转换后送入中央处理器进行数据处理。然后逐层关腹术毕,手术完毕动物清醒后正常进水、进食。

1.2.3　心电图记录

各组 SD 大鼠分别给予相应高、低两个剂量不同的全麻药,并开始计时,记录大鼠翻正反射消失进入麻醉期至翻正反射恢复的时间。传感器遥感测定观察大鼠清醒状态下心率及心电活动变化,并以大鼠清醒状态下的心电图作为 0 min 观察值,观测记录给药后 5、10、15、20、30、60、90 和 120 min 时大鼠麻醉诱导期、维持期、恢复期的心率、心电图变化情况,并进行数据统计学分析。

1.3　统计学分析

数据分析与图像处理使用 Adobe Illustrator 10, Origin 7.5 和 SPSS 21.0 软件处理。实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间数据比较采用独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2　结果

2.1　麻醉药对 SD 大鼠麻醉效果观测

各组 SD 大鼠给予相应全麻药后,麻醉起效先后顺序为丙泊酚>异氟醚>依托咪酯>氯胺酮>戊巴比妥钠。给予大鼠 2%异氟醚和丙泊酚 70 mg/kg 进入麻醉期时间分别为(1.80 ± 1.20)、(1.15 ± 0.75) min,麻醉持续时间分别为(45.40 ± 21.25)、(38.10 ± 16.20) min,两组起效最快、麻醉期维持稳定,可根据手术时间灵活调整麻醉期,且苏醒较快,可控性强;给与依托咪酯 30 mg/kg 和咪达唑仑-氯胺酮复合组 70 mg/kg 后大鼠进入麻醉期时间分别为(1.98 ± 1.37)、(2.10 ± 1.05) min,起效时间较快,但麻醉维持时间较短,分别为(32.89 ± 12.25)、(22.33 ± 11.74) min。依托咪酯麻醉维持一般少于 40 min,且偶有肢体抖动现象;而 1%戊巴比妥钠起效最慢,大鼠进入麻醉期所需时间最长(4.18 ± 1.23) min,麻醉较深,且麻醉期持续时间长(165.20 ± 58.30) min,恢复较慢,在手术过程中动物挣扎的情况较多见,难以达到理想麻醉效果且麻醉期超长,可控性较差,死亡率高、副作用大(表 1)。

表 1　五种全麻药对大鼠麻醉时间观测

Table 1　Observation on anesthesia time of five general anesthetics in rats

麻醉药 Anesthetics	麻醉诱导期(min) Anaesthetic induction (min)	麻醉持续期(min) Duration of anesthesia (min)
异氟醚 Isoflurane	1.80 ± 1.20	45.40 ± 21.25
丙泊酚 Propofol	1.15 ± 0.75	38.10 ± 16.20
依托咪酯 Etomidate	1.98 ± 1.37	32.89 ± 12.25
咪达-氯胺酮 Midazolam+ ketamine	2.10 ± 1.05	22.33 ± 11.74
戊巴比妥钠 Pentobarbital sodium salt	4.18 ± 1.23	165.20 ± 58.30

2.2　麻醉药对 SD 大鼠的心率影响监测

为检测五种全麻药对 SD 大鼠心电活动的影响,我们将各组 SD 大鼠给与相应全麻药后,利用心电植入子动态遥感监测各组给药后 0,5,10,15,20 和 30 min 时 SD 大鼠麻醉期的心率和心电图的变化。结果如表 2 所示,先 2%异氟醚麻醉诱导,以 1.5%浓度维持麻醉稳定,在麻醉观测前期 30 min 内大鼠心率变化幅度较小,未见明显的加快或减慢变化,与清醒状态下的心率最为接近,对心电活动无明显影响。腹腔注射丙泊酚 70 mg/kg 后 SD 大鼠在麻醉观测前期

20 min内心率无明显变化,同时也接近于清醒状态下的心率水平,但随着麻醉时间的延长,心率有轻度减慢趋势,呈现轻度心脏抑制作用。给予氯胺酮后大鼠心率明显增快,心率变化波动较大,但与咪达唑仑合用后可以减轻心率增快;给予依托咪酯和戊巴比妥钠后在前 20 min 内心率影响不明显,但随着麻醉时间的延长,心率逐渐出现下降的趋势,呈明显心脏抑制现象,且以 30 min 时抑制作用最明显。

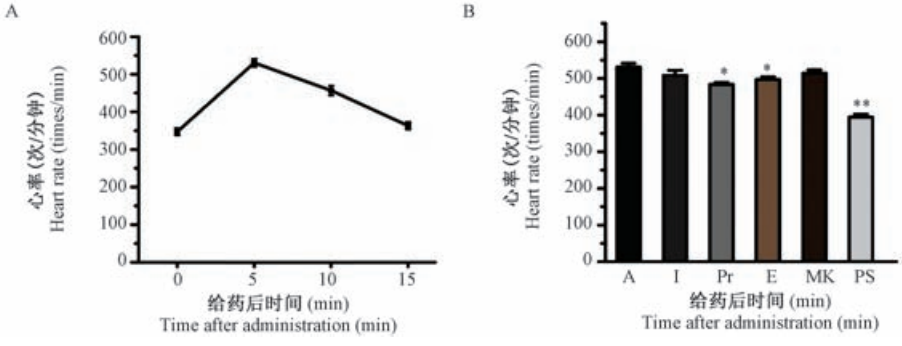
表 2 五种全麻药对大鼠心率的影响

Table 2 Effects of five kinds of anesthetics on heart rate of rat

组别 Groups	给药后时间(min) Time after administration(min)					
	0	5	10	15	20	30
异氟醚 Isoflurane	363.6 ± 23.7	352.9 ± 29.1	361.4 ± 31.5	342.9 ± 27.2	368.2 ± 21.6	359.7 ± 25.3
丙泊酚 Propofol	375.0 ± 25.6	382.5 ± 22.8	378.7 ± 23.6	363.2 ± 29.6	358.8 ± 21.9	352.1 ± 21.4
依托咪酯 Etomidate	389.7 ± 30.2	396.6 ± 34.5	377.8 ± 29.3	392.3 ± 28.6	385.3 ± 33.5	353.6 ± 38.3
咪达氯胺酮 Midazolam+ ketamine	387.9 ± 30.4	442.8 ± 46.3	428.6 ± 40.4	411.7 ± 42.5	456.6 ± 52.0	391.7 ± 44.9
戊巴比妥钠 Pentobarbital sodium salt	386.8 ± 33.9	370.0 ± 44.5	380.6 ± 52.5	372.6 ± 55.9	381.2 ± 50.9	345.9 ± 42.0

2.3 观察五种麻醉药对异丙肾上腺素加快大鼠心率的影响

为进一步检测五种麻醉药对 SD 大鼠心电活动的影响,首先将清醒大鼠腹腔注射异丙肾上腺素(0.025 mg/mL),然后相应给与五种麻醉药,利用心电植入子技术遥感检测五种全麻药对异丙肾上腺素提高 SD 大鼠心率作用的影响。如图 1A 所示,SD 大鼠单纯腹腔注射异丙肾上腺素后可显著兴奋心脏,5 min 内心率明显增快,并于 5 min 时其加快心率的作用达到峰值(530.65 ± 10.61),15 min 左右心率基本恢复正常水平(363.22 ± 9.88)。接下来分别检测了在 5 种不同的麻醉药存在时,异丙肾上腺素对大鼠心率的影响,即预先 10 min 给予不同的麻醉药后,再给予异丙肾上腺素(0.025 mg/mL),分别检测给药后各组 SD 大鼠 5 min 时心率的变化情况,并与清醒大鼠给与异丙肾上腺素后 5 min 时的心率比较。如图 1B 所示,2%异氟醚和 70 mg/kg 咪达唑仑-氯胺酮在腹腔注射异丙肾上腺素后,5 分钟时心率分别为(508.26 ± 13.81)、(513.85 ± 9.37),对异丙肾上腺素提高大鼠心率的影响最小,对 SD 大鼠的心电活动抑制作用较轻($P > 0.05$);丙泊酚和依托咪酯给予异丙肾上腺素后可轻度降低异丙肾上腺素对大鼠心率的兴奋作用,5 min 时心率分别为(483.43 ± 5.74)、(496.64 ± 8.30),表现为轻度的心脏抑制现象($P< 0.05$);而 1%戊巴比妥钠随着麻醉时间的延长可显著降低异丙肾上腺素对心率的影响(394.85 ± 7.57),对心脏的抑制作用最明显,各组心电图记录如图 2 所示。

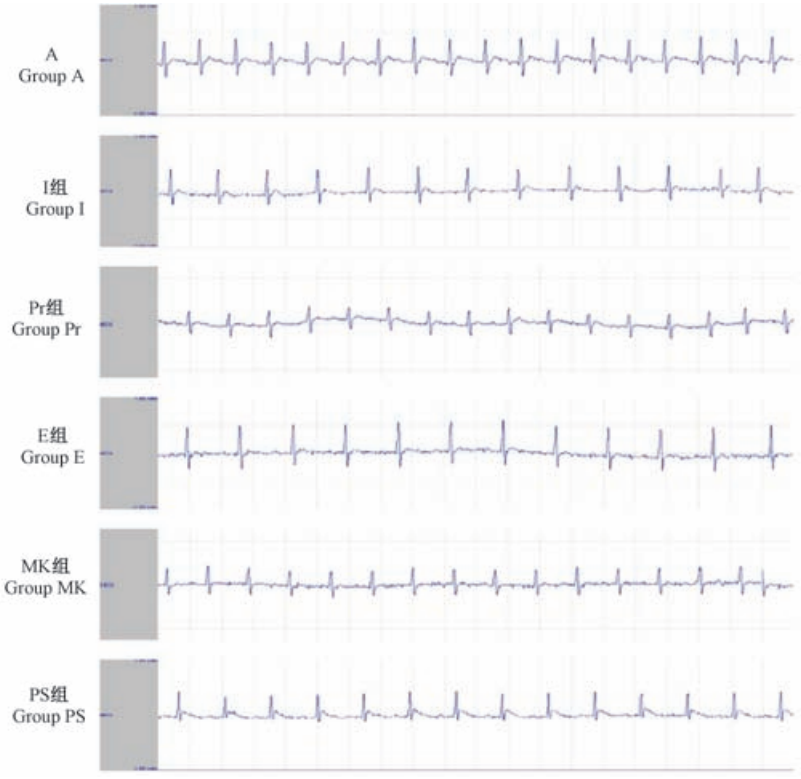


注:A: 清醒;I: 异氟醚;Pr: 异丙酚;E: 依托咪酯;MK: 咪达唑仑-氯胺酮;PS: 戊巴比妥钠。与 A 组相比,$^{*}P< 0.05$, $^{**}P< 0.01$。

图 1 异丙肾上腺素注射 5 min 后 5 种全麻药对大鼠心率的影响

Note. A, Awake; I, Isoflurane; Pr, Propofol; E, Etomidate; MK, Midazolam+Ketamine; PS, Pentobarbital sodium salt. Compared with group A, $^{*}P< 0.05$, $^{**}P< 0.01$.

Figure 1 Effects of five kinds of general anesthetics onheart rate of rats 5 min after isoproterenol injection



注：A：清醒；I：异氟醚；Pr：异丙酚；E：依托咪酯；MK：咪达唑仑-氯胺酮；PS：戊巴比妥钠。

图 2　异丙肾上腺素注射 5 min 后各组心电图记录情况

Note. A, Awake. I, Isoflurane. Pr, Propofol. E, Etomidate. MK, Midazolam+Ketamine. PS, Pentobarbital sodium salt.

Figure 2　ECG recording of each group after 5 mins of isoproterenol injection

3　讨论

麻醉药对动物实验往往具有一定的影响，部分麻醉药的应用可明显干扰心血管兴奋药物的药理效应，但系统评价不同麻醉药对动物心电活动影响的研究少见报道。本实验利用心电植入子遥感技术，预先皮下手术植入传感器，系统性动态遥感测定了五种全麻药对 SD 大鼠心电活动的影响，此法显著优于传统测定动物心电活动的方法[8]。因此，利用动态遥感技术测定不同麻醉药对大鼠心电活动的影响，对心脏电生理研究以及心血管活性药物评测等领域的医学研究具有重要应用价值，同时为动物不同麻醉选择上提供重要参考。

本研究在观察五种全麻药对 SD 大鼠的麻醉效果中，丙泊酚和异氟醚起效最快。异氟醚是一种目前临床广泛使用的氟化挥发性液态吸入全麻药，因其良好的麻醉功能在临床动物实验中备受青睐[9]。李鹏等[10]对异氟醚不同麻醉吸入方法比较结果表明，其吸入麻醉可保证准确平稳的麻醉药吸入浓度，3 h 内面罩吸入简便安全，可减少大鼠术后死亡率。而宋乐等[9]采用腹腔注射方式同样观察到较好的麻醉效果。本实验结果表明先以 2%异氟醚吸入麻醉诱导，后以 1.5%浓度维持麻醉效果良好，起效快，可控性强，苏醒快，其结果与之前报道一致。同时腹腔注射异丙肾上腺素后对心脏兴奋作用无明显影响，表明其对 SD 大鼠心电活动抑制轻，影响较小，利于 SD 大鼠的心脏电生理研究。

丙泊酚、咪达唑仑作为两种不同类型静脉麻醉药，均具有起效快、麻醉效能强、毒性小等优点[11]，二者对心血管的抑制作用一直是近年来研究的热点，但用于 SD 大鼠麻醉对其心电活动影响的研究却很少。丙泊酚麻醉诱导迅速，麻醉深度易控制，安全性高，适合小动物简短手术麻醉[12]。刘立等[13]研究表明丙泊酚对 Wistar 大鼠麻醉效果较好，心率抑制率显著低于乌拉坦。而石福等[14]用丙泊酚和依托咪酯对 SD 大鼠的麻醉效果比较，结果表明丙泊酚麻醉诱导起效快，麻醉稳定，其麻醉持续时间长于依托咪酯。同样在本实验中，丙泊酚 70 mg/kg腹腔注射对 SD 大鼠麻醉诱导起效最快，效果稳定，麻醉维持时间长于依托咪酯，其结果与

文献报道一致。除轻度降低心率外,整体对 SD 大鼠的正常心率以及异丙肾上腺素提高心率作用的影响均较小,安全性较高。

氯胺酮对循环系统具有兴奋作用[15],本实验结果显示氯胺酮对 SD 大鼠心率影响较大,心率明显增快,虽给予异丙肾上腺素后,氯胺酮组心率接近清醒注射异丙肾上腺素时的心率,但并不能表明氯胺酮对心率无影响,从而表明氯胺酮麻醉浅,而不足以抑制异丙肾上腺素兴奋心脏的作用。但也有研究显示氯胺酮在 5、7 min 后麻醉状态较好,并不影响心功能的评测[15-16],其原因可能与咪达唑仑的合用有关。

依托咪酯的血流动力学稳定性与其不影响压力感受器、外周血管舒缩功能和心肌收缩力有关[15]。国外有研究表明 30 mg/kg 依托咪酯麻醉效果好,但影响心功能且小鼠苏醒慢[17]。同样,戊巴比妥钠对心率和心肌收缩力均有一定的抑制作用[18],特别是当静脉注射速度过快时,可明显加快心率,使 ST 段移位,T 波倒置[19]。但也有报道显示 0.4%戊巴比妥钠和对小鼠心率无明显影响[20]。在本研究中,30 mg/kg 依托咪酯和 1%戊巴比妥钠随麻醉时间延长均表现出明显的心脏抑制作用,与上述报道结果一致,不利于麻醉动物心电活动研究。

麻醉方法和麻醉药的选择及用量直接关系到动物麻醉的效果[21],麻醉方式常用腹腔注射、尾静脉注射和吸入麻醉。丙泊酚是一种新型快速、短效静脉麻醉药,可短时间内使动物麻醉。Lu 等[22]表明,与腹腔注射氯胺酮大鼠相比,丙泊酚预处理可显著减少 FST 大鼠不动时间。面罩吸入异氟醚可免除因腹腔注射刺激因素的影响,麻醉效果显著,保证实验动物的安全性。单一麻醉剂均有各自局限性[23],本实验氯胺酮组复合咪达唑仑可减轻对大鼠心脏兴奋,比单一注射氯胺酮心率降低。氯胺酮麻醉大鼠呼吸道分泌物多易窒息,仅适合急性动物实验[24]。

本实验中因实验条件有限,未能对大鼠部分心功能,如血压、心肌酶等指标以及其他常用全麻药做全面检测,以全面评价各组全麻药对大鼠心电功能的影响,可开展进一步实验研究。

参 考 文 献(References)

[1] 孙安会,谷捷,吴涛,等. 四种常用实验麻醉药物对大鼠心血管系统的影响[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2): 120-126.
Sun AH, Gu J, Wu T, et al. Impact of four anesthetic drugs commonly used in animal experiments on the cardiovascular system in rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2016, 24(2): 120-126.

[2] 李靖,王艳丽,刘恩岐. 四种常用实验动物与人的肝组织形态特征比较[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 74-77.
Li J, Wang YL, Liu EQ. Tissue morphological characteristics of liver from four commonly used laboratory animals compared with those of human [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(9): 74-77.

[3] 孟永亮,孙彦. 4 种麻醉药物对家兔手术的麻醉效果比较[J]. 中国现代医学杂志, 2018, 28(23): 12-15.
Meng YL, Sun Y. Comparison of anesthetic effect of Urethane, Sodium pentobarbital, Propofol and Sodium thiopental in rabbits [J]. Chin J Mod Med, 2018, 28(23): 12-15.

[4] 王蕾,赵明镜,杨涛,等. 从心电图和超声心动图相关性分析研究心肌梗死后心衰模型的早期评价和筛选方法[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2017, 15(22): 2816-2820.
Wang L, Zhao MJ, Yang T, et al. Study on the early evaluation and screening method of heart failure model after myocardial infarction from the correlation analysis of electrocardiogram and ultrasonic cardiogram [J]. Chin J Integr Med Card/Cerebrovasc Dis, 2017, 15(22): 2816-2820.

[5] 戴淑芳,孙艺平,傅雷,等. 高压氧对急性一氧化碳中毒大鼠心肌超微结构及心电图的影响[J]. 大连医科大学学报, 2018, 40(1): 22-26.
Dai SF, Sun YP, Fu L, et al. Effects of hyperbaric oxygen therapy on myocardial ultrastructure and electrocardiogram of rats with acute carbon monoxide poisoning [J]. J Dalian Med Univ, 2018, 40(1): 22-26.

[6] 卢祺炯,陈敏华,徐 聪,等. 应用植入遥测技术对恒河猴部分生理指标的观测[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(1): 100-107.
Lu QJ, Chen MH, Xu C, et al. Observation of several physiological indexes of rhesus monkeys by implantable telemetry technology [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(1): 100-107.

[7] 曹开进,李自强,贺英菊,等. 植入式遥测技术偶测血压方法探究[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(11): 2108-2112.
Cao KJ, Li ZQ, He YJ, et al. Measurement of casual blood pressure by implantable telemetry [J]. Chin J Pathophysiol, 2014, 30(11): 2108-2112.

[8] Chu DK, Jordan MC, Kim JK, et al. Comparing isoflurane with tribromoethanol anesthesia for echocardiographic phenotyping of transgenic mice[J]. J Am Assoc Sci, 2006, 45(4): 8-13.

[9] 宋乐,朱正华,张西京,等. 大鼠腹腔内注射异氟醚麻醉效应的初步研究[J]. 临床麻醉杂志, 2007, 23(8): 661-663.
Song L, Zhu ZH, Zhang XJ, et al. Anesthetic effect of intraperitoneal isoflurane in rats[J]. J Clin Anesthesiol, 2007, 23(8): 661-663.

[10] 李鹏,易斌,陶国才. 不同异氟醚全凭吸入法麻醉大鼠安全性与实用性比较[J]. 重庆医学, 2010, 39(20): 2715-2718.
Li P, Yi B, Tao GC. Comparison of security and practicality in rats which accept different means of isoflurane inhalation anesthesia [J]. Chongqing Med, 2010, 39(20): 2715-2718.

[11] 廖新权,刘领汉,谢光平,等. 丙泊酚在小动物麻醉上的应用简介[J]. 广东畜牧兽医科技, 2011, 36(2): 45-46.
Liao XQ, Liu LH, Xie GP, et al. Application of propofol in small animal anesthesia[J]. Guangdong J Anim Veterin Sci, 2011, 36(2): 45-46.

[12] 李培德,孙丽盈,侯凤香,等. 小动物静脉麻醉研究进展[J]. 畜牧与兽医, 2010, 42(1): 90-93.
Li PD, Sun LY, Hou FX, et al. Advances in intravenous anesthesia for small animals[J]. Anim Husband Veterin Med, 2010, 42(1): 90-93.

[13] 刘立,方成,王加谋,等. 丙泊酚、戊巴比妥钠和乌拉坦对肾移植大鼠麻醉效果的比较[J]. 咸宁学院学报, 2012, 26(4): 277-278.
Liu L, Fang C, Wang JM, et al. Comparison on anaesthetic effect between propofol, sodium pentobarbital and urethane in rats with kidney transplantation [J]. J Xianning Univ, 2012, 26(4): 277-278.

[14] 石福, 张益, 喻田. 丙泊酚和依托咪酯用于雄性 SD 大鼠麻醉效果的比较[J]. 天津医药, 2016, 44(12): 1440-1442.
Shi F, Zhang Y, Yu T. Comparison of anesthetic effects between propofol and etomidate in male SD rats[J]. Tianjin Med J, 2016, 44(12): 1440-1442.

[15] Lairez O, Lonjaret L, Ruiz S, et al. Anesthetic regimen for cardiac function evaluation by echocardiography in mice: comparison between ketamine, etomidate and isoflurane versus conscious state[J]. Lab Anim, 2013, 47(4): 284-290.

[16] Hart CY, Burnett JC, Redfield MM. Effect of Avertin versus xylazine-ketamine anesthesia on cardiac function in normal mice [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2001, 281(5): H1938-H1945.

[17] Tan TP, Gao XM, Krawczyszyn M, et al. Assessment of cardiac function by echocardiography in conscious and anesthetized mice: importance of the autonomic nervous system and disease state[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2003, 42(2):182-190.

[18] Mongue-Din H, Salmon A, Fiszman MY, et al. Non-invasive restrained ECG recording in conscious small rodents: a new tool for cardiac electrical activity investigation[J]. Pflugers Arch, 2007, 454(1): 165-171.

[19] 陈金堂,张静,周昆,等. 六种全身麻醉药对豚鼠心电图的影响[J]. 实验动物科学, 2010, 27(6): 23-25.
Chen JT, Zhang J, Zhou K, et al. The Effect of six kinds of anesthetics on guinea pig's ECG[J]. Lab Anim Sci, 2010, 27(6): 23-25.

[20] 刘秋晨,张驰,施春花,等. 不同麻醉药对小鼠缺氧耐受性的影响及机制研究[J]. 中国医药科学, 2013, 9(3): 29-31.
Liu QC, Zhang C, Shi CH, et al. Study on effect of different anaesthetics on hypoxia tolerance and possible mechanisms in mice [J]. Chin Med Pharm, 2013, 9(3): 29-31.

[21] 王育明. 洋金花麻醉剂雾化吸入与异氟醚吸入对大鼠麻醉效果的实验研究[J]. 时珍国医国药, 2013, 24(7): 1625-1626.
Wang YM. The anaesthesia effects of Jonli atomization inhalation and isoflurane inhalation on in rats[J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2013, 24(7): 1625-1626.

[22] Lu GH, Hidenori K. Simulation of propofol anaesthesia for intracranial decompression using brain hypothermia treatment[J]. Theor Biol Med Model, 2007, 4: 46.

[23] 詹红微,邱泽文,李慧玲,等. 三种麻醉药物对小鼠麻醉效果的比较[J]. 实验动物科学,2012, 29(4): 19-24.
Zhan HW, Qiu ZW, Li HL, et al. Comparison of anesthetic effect of three anesthetics on mice[J]. Lab Anim Sci, 2012, 29(4): 19-24.

[24] 宋成伟. 三种常用麻醉药物动物实验中麻醉效果观察[J]. 中国医药导刊, 2010, 12(11): 1959-1962.
Song CW. Observation of anesthetic effect of three general anesthetics in animal experiment[J]. Chin J Med Guide, 2010, 12(11): 1959-1962.

[收稿日期] 2019-07-17

张帆,安学芳,赵赫,等. 还原型谷胱甘肽在 AG129 小鼠生物净化及快速繁殖中的应用[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 96-99.
Zhang F, An XF, Zhao H, et al. Application of reduced glutathione in biological purification and rapid propagation of AG129 mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 96-99.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.014

还原型谷胱甘肽在 AG129 小鼠生物净化及快速繁殖中的应用

张帆,安学芳*,赵赫,李丽,肖宇宙

(中国科学院武汉病毒研究所, 武汉 430071)

【摘要】 **目的** AG129 小鼠自然产仔困难,采用常规体外受精试剂无法获得足够数量用于移植的胚胎。使用还原型谷胱甘肽(GSH)调节小鼠体外受精液成分,完成对 AG129 小鼠体外受精,为体外受精困难品系的基因工程小鼠生物净化及快速扩繁提供思路。**方法** 设计 3 个含不同浓度 GSH 的精子获能及受精液的实验组,浓度分别 0.5、1、2 mmol/L,1 个不含 GSH 的精子获能液及受精液的对照组,每组超排 5 只小鼠,重复 3 次。**结果** 不同 GSH 实验组及对照组间平均受精率差异具有显著性($P < 0.05$),在精子获能及受精液中 GSH 浓度为 1 mmol/L 时,AG129 小鼠体外受精效果最佳,平均受精率为(43.35 ± 1.76)%,胚胎状态良好。将获得胚胎移植受体小鼠,受体动物均妊娠并顺利产仔。**结论** 体外受精液中的 GSH 浓度为 1 mmol/L 时,能够显著提高 AG129 小鼠体外受精效率,为类似体外受精困难品系的小鼠生物净化及快速繁殖提供解决方案。

【关键词】 AG129 小鼠;谷胱甘肽;生物净化;快速繁殖
【中图分类号】Q95-33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1005-4847(2020) 01-0096-04

Application of reduced glutathione in biological purification and rapid propagation of AG129 mice

ZHANG Fan, AN Xuefang*, ZHAO He, LI Li, XIAO Yuzhou

(Wuhan Institute of Virology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430071, China)
Corresponding author: AN Xuefang. E-mail: anxf@wh.iov.cn

【Abstract】 **Objective** AG129 mice have difficulty giving birth naturally, and conventional in vitro fertilization (IVF) reagents do not yield a sufficient number of embryos for transplantation. Reduced glutathione (GSH) was used to regulate a component of the IVF reagent and complete the IVF process in AG129 mice, presenting a potential method for biological purification and rapid reproduction of genetically engineered mouse strains with IVF difficulties. **Methods** Four experimental groups were designed using 0 mmol/L (control group), 0.5 mmol/L, 1 mmol/L and 2 mmol/L of GSH for sperm capacitation and fertilization. Each group contained 5 superovulated mice, and the assay was repeated three times. **Results** The average fertilization rate differed between the GSH experimental groups and the control group ($P< 0.05$). The 1 mmol/L GSH concentration had the best IVF effect on the AG129 mice. The average fertilization rate was (43.35 ± 1.76)%, and the embryo status was good. All recipient mice became pregnant and gave birth successfully after the embryos were transferred. **Conclusions** A GSH concentration of 1 mmol/L significantly improves the IVF efficiency of AG129 mice. This provides a potential solution for the biological purification and rapid propagation of mice with IVF difficulties.

【Keywords】 AG129 mice; glutathione; biological purification; rapid propagation
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[基金项目]湖北省科技支撑计划项目(2017BEC016)。
Funded by Science and Technology of Hubei (2017BEC016).
[作者简介]张帆(1985—),男,实验师,硕士。Email:zhangf@wh.iov.cn
[通信作者]安学芳(1965—),女,高级工程师,主要从事实验动物质量控制与管理工作。Email:anxf@wh.iov.cn

还原型谷胱甘肽(GSH)是一种具有重要生理功能的三肽硫醇,在哺乳动物细胞中发挥十分重要的生物活性作用[1]。这种化合物是许多酶反应的辅基,是机体内重要的抗氧化剂和自由基清除剂,保护细胞膜中含巯基的蛋白质和含巯基酶不被破坏[2]。目前普遍认为,雄性动物的精清中的氧自由基过多会导致不育,削弱精子谷胱甘肽转移酶活性,可直接导致精子质膜损伤,使精子运动能力、顶体反应及受精能力降低甚至消失[3]。

研究表明,在小鼠卵母细胞玻璃化冷冻过程中,在培养液中加入一定量的 GSH,可以一定程度改善卵母细胞活性[4],同时,在精子复苏液中加入一定量 GSH 可以明显提高牛、羊等家畜冻存精子的活力、形态及遗传物质的完整性[5]。

AG129 小鼠是 I 型和 II 型干扰素受体缺失基因敲除动物品系,对寨卡病毒、登革病毒、肠道病毒等多种病毒易感[6-8],是较为理想的病毒易感动物模型。但是,该品系小鼠在饲养过程中,表现出较明显的繁殖障碍,每胎产仔数量低,无法快速获得足够数量动物,成为相关科学研究的瓶颈。在体外受精实验中,使用常规试剂获得可移植的两细胞胚胎效率极低。笔者通过在精子获能液和受精液中加入 GSH,并探索调整 GSH 的最佳浓度,成功对 AG129 小鼠完成体外受精并胚胎移植,为相关体外受精困难品系小鼠的生物净化、快速扩繁提供思路。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物

SPF 级 AG129 小鼠(雌性 4 周龄 80 只、雄性 12 周龄 12 只)由中国科学院武汉病毒研究所实验动物中心保存,品系引自中国科学院上海药物研究所【SCXK(沪)2015-0004】,SPF 级 ICR 小鼠(雌性 8 周龄 9 只)购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2016-0006】。所有动物均饲养在 SPF 级屏障环境 IVC 笼盒中【SYXK(鄂)2019-0034】,所有动物自由采食和饮水。所有操作均符合中国科学院武汉病毒研究所动物实验伦理要求,满足 3R 原则(IACUC 审批号:WIVA30201902)。

1.1.2　主要试剂与仪器

PMSG、HCG 购自宁波三生生物科技有限公司;HTF (Cosmobio CSR-R-B070)、KSOM (Cosmobio CSR-R-B074)购自日本 Cosmo Bio 公司;2,2,2-三溴乙醇(Sigma T48402)、叔戊醇(Sigma 152463)、GSH(Sigma BD8612)、M2 培养基(Sigma M7167)、矿物油(Sigma M5310)购自西格玛奥德里奇贸易有限公司。

体视显微镜(Motic)、二氧化碳培养箱(Thermo)、小动物体温维持仪(瑞沃德)、超净工作台(苏净安泰)。

1.2　方法

1.2.1　麻醉剂的配置与使用

在超净工作台中将 5 g 2,2,2-三溴乙醇用 3.1 mL 叔戊醇溶解,待充分溶解后取 0.5 mL 溶液加入 39.5 mL 生理盐水中,充分混合后过滤待用,配置完成的麻醉剂需避光保存,小鼠麻醉时按照 20 μL/g 腹腔注射使用,实验中所有对活体小鼠的手术操作均在动物麻醉状态下开展。

1.2.2　GSH 溶液的配置

在超净工作台中使用 HTF 将 GSH 粉末溶解,分别配置终浓度为 0、0.5、1、2 mmol/L 的 GSH 溶液。

1.2.3　雌鼠超排及取卵

将每只 AG129 雌鼠腹腔注射 PMSG 10IU,48 h 后腹腔注射 HCG 10 IU,每个 GSH 浓度组超排 5 只 AG129 小鼠,3 次平行。注射 HCG 15 h 后处死超排小鼠,手术取雌鼠输卵管,将输卵管在无菌滤纸上短暂放置去除表面血液后,放入提前在 37℃ 5% CO_2 中平衡好的 HTF 受精滴油相中。用显微镊固定输卵管,用解剖针将输卵管膨大部刺破后,被卵丘细胞包裹的卵细胞溢出,用显微镊将其拖入 HTF 培养液中,放入二氧化碳培养箱内。

1.2.4　雄鼠精子采集

将 AG129 雄鼠处死后,手术取附睾尾,将附睾尾在无菌滤纸上短暂放置去除表面血液,用显微镊将附着的脂肪组织去除后,放入提前在 37℃ 5% CO_2 中平衡好的 HTF 获能滴油相中。用显微镊固定附睾尾,用显微剪切开尾部中央的附睾管,显微镊轻压附睾尾,使精子从切口处流出。迅速用显微镊将流出的精子拖入 HTF 获能滴中,放入二氧化碳培养箱培养 30 min,使精子获能。

1.2.5　体外受精

在体视显微镜下观察精子浓度,使用移液器轻柔沿边缘吸取 4 ~ 6 μL 精子悬浊液注射入含有卵子的 HTF 受精滴中进行受精,将受精滴放入二氧化碳培养箱中进行培养。受精 6 h 后,将卵子移入提前在 37℃ 5% CO_2 中平衡好的 KSOM 液滴中继续培养。

1.2.6　移植受体准备

将受体 ICR 雌鼠与 ICR 结扎雄鼠 1∶1合笼,第 2 日检查阴道栓,有阴道栓的可作为胚胎移植的受体动物。

1.2.7 早期胚胎形态学观察及统计

受精 24 ~ 28 h 后,对受精卵进行镜检,对 2 细胞胚胎、未受精卵、异常卵进行统计。

1.2.8 2 细胞胚胎收集

使用移卵针将形态完好的 2 细胞胚胎移入提前准备好的 M2 培养基中,反复清洗 3 次后放入二氧化碳培养箱内待移植。

1.2.9 胚胎移植

将受体 ICR 小鼠麻醉后剃除背部左右两侧被毛,并用 75%酒精消毒。在卵巢脂肪垫部位皮肤纵向剪开一切口,分离皮肤与肌肉,再将相应部位肌肉剪开,拉出脂肪垫,卵巢、输卵管及子宫可一并牵引出。用脂肪夹夹住脂肪垫,在体视显微镜下调整输卵管位置,找到输卵管膨大部,用滤纸在待移植部位做好标记。用维纳斯剪刀在输卵管伞口与膨大部间剪一小口,将移植针沿开口朝膨大部方向插入,小心将 15 枚每胎移入输卵管内,以输卵管中可见指示气泡作为移植成功标志。移植后将脂肪垫、卵巢及输卵管小心还纳回腹腔,缝合肌肉层和皮肤层,完成单侧移植操作,使用相同方法将 15 枚胚胎移入另外一侧输卵管中。移植完成小鼠放在小动物体温维持仪上 30 min,待苏醒后转入 IVC 笼盒内单独饲养。

1.3 统计学分析

使用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,对所得实验数据进行单因素方差统计分析,定量数据以平均值±标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示。组间比较采用 t 检验,检验水准为 $\alpha = 0.05$,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 AG129 小鼠体外受精添加 GSH 试验结果

由表 1 可见,不同 GSH 浓度组平均受精率差异具有显著性($P < 0.05$)。在精子获能及受精过程中,HTF 中不添加 GSH 时,AG129 小鼠体外受精率为(2.30 ± 0.73)%。添加 0.5 mmol/L GSH 时,两细胞胚胎数量有所增加,受精率为(20.44 ± 0.15)%。添加 1 mmol/L GSH 时,两细胞数量进一步增加,受精率达到(43.35 ± 1.76)%。添加 2 mmol/L GSH 时,两细胞数量有所下降,受精率为(31.77 ± 1.42)%,同时,异常卵数明显增加,主要表现为多个精子头部钻入卵细胞透明带,胚胎呈“毛球”状(见图 1),使卵细胞无法正常完成受精,最终发育为未受精卵、畸形卵或者死亡(见图 2)。

表 1 AG129 小鼠体外受精结果

Table 1 *In vitro* fertilization results of AG129 mice

GSH 浓度(mmol/L) GSH concentration (mmol/L)	卵母细胞数 Number of oocytes	2 细胞胚胎数 Number of 2-cell embryos	未受精卵数 Number of unfertilized oocytes	异常卵数 Number of abnormal oocytes	平均受精率(%) Average fertilization rate(%)
0	216	5	198	13	2.30 ± 0.73[d]
0.5	225	46	163	16	20.44 ± 0.15[c]
1	224	97	110	12	43.35 ± 1.76[a]
2	211	67	81	63	31.77 ± 1.42[b]

注:同一列中数字后字母不同者,差异具有显著性。

Note. Pairwise comparison, the differences are significant.

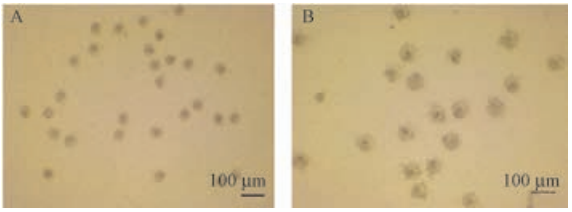
2.2 移植产仔率分析

由表 2 可见,将相同数量的胚胎移植受体,均获得了较理想的产仔量,不同 GSH 浓度组间平均产仔率差异无显著性($P > 0.05$),1 mmol/L 组略高。0.5 mmol/L 组与和 1 mmol/L 组出生的仔鼠均离乳成活,2 mmol/L 组仔鼠离乳前死亡 1 只,平均成活率为(96.30 ± 6.41)%,不同 GSH 浓度组间平均成活率差异无显著性($P > 0.05$)。

3 讨论

目前,AG129 小鼠作为干扰素受体缺失最严重动物,是病毒感染性动物模型的建立、病毒致病机制研究及抗病毒疫苗与药物研究等方面科研工作中重要的实验材料。干扰素受体缺失,可能是导致该品系小鼠繁殖能力下降的原因,采用常规雌雄同笼交配方式,很难快速获得周龄、性别均一足量的动物,成为限制相关科研活动顺利开展的瓶颈。使用激素对 AG129 小鼠进行超排,采用常规体外受精方法很难获得足够数量的胚胎进行后续移植。

精子质膜中含有大量不饱和脂肪酸,为精子与卵子结合提供必要的条件。活性氧(ROS)能够使精子质膜过氧化,从而使精子质膜不可逆的丧失流动性,造成精子损伤,失去受精能力[9]。GSH 作为清除氧自由基的清道夫,在细胞抗氧化系统中发挥着重要的作用[10]。在体外受精试剂中加入一定浓度的 GSH,有利于体外受精的完成。GSH 固体较稳定,但在溶液中极易受外界环境中的温度、光照等条件影响而被氧化为不具生理活性的氧化型谷胱甘肽[11]。因此,为防止含 GSH 的精子获能液氧化,必须在使用前现用现配,不可使用前期配置或使用剩余的试剂。

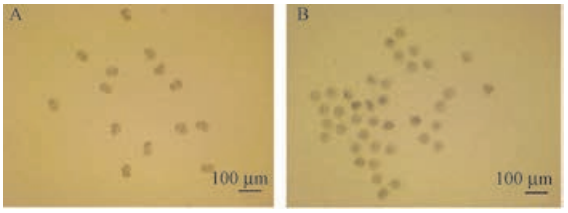


注：A：正常体外受精 6 h 后胚胎。B：异常体外受精 6 h 后“毛球”状胚胎。

图 1　AG129 小鼠体外受精 6 h 后胚胎

Note. A, Normal embryos after 6 h of ivf. B, Abnormal “hairball” embryos after 6 hours of ivf.

Figure 1　Embryos after 6 h of ivf of AG129 mice



注：A：正常体外受精 24 h 后胚胎。B：异常体外受精 24 h 后发育情况。

图 2　AG129 小鼠体外受精 24 h 后胚胎

Note. A, Normal embryos after 24 h of ivf. B, Growth of abnormal embryos after 24 h of ivf.

Figure 2　Embryos after 24 h of ivf of AG129 mice

表 2　移植产仔率与成活率情况

Table 2　Transplant birth rate and survival rate

GSH 浓度(mmol/L) GSH concentration (mmol/L)	移植胚胎数量 Number of embryos transferred	产仔数 Litter size	平均产仔率(%) Average litter rate (%)	离乳数 Number of weaning	平均成活率(%) Average survival rate (%)
0.5	90	22	24.44 ± 1.93	22	100.00 ± 0.00
1	90	25	27.78 ± 1.92	25	100.00 ± 0.00
2	90	24	26.67 ± 3.34	23	96.30 ± 6.41

本实验以 Toru 等[12]前期研究为依据，设计了 3 个含不同浓度 GSH 的精子获能及受精液的实验组，1 个不含 GSH 的精子获能液及受精液的对照组，通过实验发现精子获能液及受精液中加入 GSH 能够显著提高体外受精率，当 GSH 浓度为 0.5 mmol/L 时，受精率有所提高，当 GSH 浓度为 2 mmol/L 时，由于精子活力过强，导致异常受精卵数量明显增多，平均受精率下降，当 GSH 浓度为 1 mmol/L 时，受精率最高，受精效果最好。将不同 GSH 浓度组获得的 2 细胞胚胎分别移植受体动物，均获得了数量较为稳定的仔鼠。

因此，使用还原型谷胱甘肽(GSH)调节小鼠体外受精液成分，显著提高了 AG129 小鼠体外受精率，良好的完成对 AG129 小鼠体外受精，为该品系小鼠生物净化及快速繁殖提供了可靠的技术保障，并为后续类似问题的顺利解决提供了技术思路。

参　考　文　献(References)

[1] Pastore A, Federici G, Bertini E, et al. Analysis of glutathione: inplication in redox and detoxification [J]. Clin Chim Acta, 2003, 333(1):19-39.

[2] 袁平戈, 张大志. 还原型谷胱甘肽的作用机制及临床应用[J]. 药品评价, 2006, 3(5):385-390.
Yuan PG, Zhang DZ. Mechanism and clinical application of reduced glutathione [J]. Drug Eval, 2006, 3(5):385-390.

[3] Gasparrini B, Sayoud H, Neglia G, et al. Glutathione synthesis during in vitro maturation of buffalo (*Bubalus bubalis*) oocytes: effects of cysteamine on embryo development [J]. Theriogenology, 2003, 60(5):943-952.

[4] 付敏, 钱卫平, 林冬霞等. 谷胱甘肽在小鼠卵母细胞玻璃化冷冻中的作用[J]. 现代生物医学进展, 2013, 13(28): 5422-5425.
Fu M, Qian WP, Lin DX, et al. The effect of GSH treatment on viritication mouse oocytes [J]. Prog Mod Biomed, 2013, 13(28): 5422-5425.

[5] Ansari MS, Rakha BA, Andrabi SM, et al. Glutathione-supplemented tris-citric acid extender improves the post-thaw quality and in vivo fertility of buffalo (Bubalus bubalis) bull spermatozoa [J]. Reprod Biol, 2012, 12(3):271-276.

[6] Aliota MT, Caine EA, Walker EC, et al. Characterization of lethal zika virus infection in AG129 mice [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2016, 10(4): e0004682.

[7] Tan GK, Ng JKW, Trasti SL, et al. A non mouse-adapted dengue virus strain as a new model of severe dengue infection in AG129 mice [J]. PLoS Negl Trop Dis, 2010, 4(4): e672.

[8] Too IH, Yeo H, Sessions OM, et al. Enterovirus 71 infection of motor neuron-like NSC-34 cells undergoes a non-lytic exit pathway [J]. Sci Rep, 2016, 6:36983.

[9] Storey BT. Biochemistry of the induction and prevention of lipoperoxidative damage in human spermatozoa [J]. Mol Hum Reprod, 1997, 3(3):203-213.

[10] Tamás Somfai, Ozawa M, Noguchi J, et al. Developmental competence of in vitro-fertilized porcine oocytes after in vitro maturation and solid surface vitrification: effect of cryopreservation on oocyte antioxidative system and cell cycle stage [J]. Cryobiology, 2007, 55(2):0-126.

[11] 朱义福. 还原型谷胱甘肽的稳定性研究 [J]. 现代食品科技, 2011, 27(8):919-923.
Zhu YF. Stability of reduced Glutathione under different conditions [J]. Mod Food Sci Technol, 2011, 27(8):919-923.

[12] Takeo T, Nakagata N. Reduced glutathione enhances fertility of frozen/thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin [J]. Biol Reprod, 2011, 85(5): 1066-1072.

[收稿日期]　2019-07-17

陈漫漫,高鹏飞. 一种产后小鼠束缚应激模型的造模方法以及束缚装置的制作[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 100-107.
Chen MM, Gao PF. Method for constructing a postpartum mouse immobilization stress model and restraint device [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 100-107.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.015

一种产后小鼠束缚应激模型的造模方法以及束缚装置的制作

陈漫漫,高鹏飞*

(复旦大学附属金山医院,上海 201500)

【摘要】 **目的** 自制小鼠束缚装置,建立产后小鼠束缚应激模型供相关应激实验研究。**方法** 选择规格适合小鼠身型的离心管,制备简易小鼠束缚装置。在小鼠产后第 2 天,使用该装置固定产后母鼠于装置内,限制其行动。在母子分离的基础上,每天给予母鼠 3 h 的束缚应激,连续造模 21 d 即可制备产后小鼠束缚应激模型。**结果** 该产后小鼠束缚应激模型,其胃、下丘脑以及血清内 ghrelin 表达量增加,5-HT_2 受体等基因表达量减少,并且具有运动量减少等抑郁样症状和子代生长发育迟缓现象。**结论** 本文介绍产后小鼠束缚应激模型,经过多次实验证明,造模结果具有良好的稳定性和可重复性,可供相关小鼠束缚应激实验研究。

【关键词】 小鼠;束缚装置;束缚应激模型。
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0100-08

Method for constructing a postpartum mouse immobilization stress model and restraint device

CHEN Manman, GAO Pengfei*

(Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201500, China)
Corresponding author: GAO Pengfei. E-mail: 18930819385@hotmail.com

【Abstract】 **Objective** A hand-made mouse restraint device was designed to establish an immobilization stress model for related stress experiments. **Methods** A centrifuge tube with a size suitable for the mouse body was used to prepare a mouse restraint device. The mouse restraint device was applied to maternal mice for 3 hours every day for 21 days starting 2 days after delivery to stimulate repeated immobilization stress. The maternal mice were separated from their offspring after delivery. **Results** In this postpartum mouse immobilization stress model, ghrelin expression was increased in the stomach, hypothalamus and serum, 5-HT_2 receptor expression was decreased, and depression-like symptoms, such as decreased exercise and offspring growth retardation, were observed. **Conclusions** A new device is constructed to establish an immobilization stress model in postpartum mice. Results from repeated experiments show good stability and reproducibility, suggesting that this model can be used to study immobilization stress in mice.

【Keywords】 mouse; restraint device; immobilization stress model
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

[**基金项目**]国家自然科学基金面上项目(81473610,81973785)。
Funded by National Natural Science Foundation of China General Program (81473610, 81973785).
[**作者简介**]陈漫漫(1993—),女,在读医学硕士,从事应激的中医药治疗研究。Email:mmchen17@fudan.edu.cn
[**通信作者**]高鹏飞(1974—),男,医学博士,从事应激的中医药治疗研究。Email: 18930819385@163.com

在医学动物实验研究中,小鼠属于最常用的实验动物之一,常需在非麻醉状态下对小鼠进行保定从而进行采血、注射等操作[1]。由于小鼠挣扎啃咬会对实验人员安全造成威胁,徒手操作不便,必须借助固定装置和辅助手段加以固定,从而保护实验人员安全,缩短实验时间,提高实验效率[2]。目前,运用最多的是使用金属或有机玻璃制成的固定器,利用小鼠本能进洞的思维[3],使得小鼠主动进入固定器中(图 1A)。这些商品化的固定器价格较贵,如果对大批量实验鼠使用固定器,必耗费较多金钱,并且让实验鼠主动进入固定器的过程困难,效率低下。另有其他文献报道的自制新型小鼠固定装置,但是制作过程较为复杂[4]。有研究人员使用矿泉水瓶制作简易小鼠固定装置,但是瓶体质地较软,实验鼠容易挣脱[5]。亦有些装置体积较大不易存放且不易清洗[6]。鉴于上述小鼠固定器的不足,本文提出一种实验鼠固定器的简易制作方法,实验人员自制方便,大批量应用而不需花费过多钱财,有助于节约实验成本,提高动物实验效率。

作者课题组从事应激的中医药治疗研究。产后应激不但威胁产妇的身心健康并且影响婴儿的生命安全。有关研究报道[7]孕期及产后应激会造成子代的下丘脑-垂体-肾上腺轴调节作用紊乱,导致子代出现异常的精神行为。为对产后母鼠应激疾病进行研究,自制简易的小鼠束缚装置,采用束缚应激方式,制造小鼠产后束缚应激模型。该模型在本课题组两项国家自然科学基金面上项目里多次运用,实验证明模型具有稳定性和可重复性,可用于产后应激疾病的相关研究。现对模型以及造模束缚装置进行介绍。

1　材料与方法

1.1　实验动物

从上海西普尔-必凯实验动物【SCXK(沪)2013-0016】有限公司购入 60 只 SPF 级 ICR 小鼠,雌雄各半。6 周龄雌鼠,雌性体重(23.1 ± 1.7)g;7 周龄雄鼠,雄性体重(27.2 ± 1.8)g,全部小鼠安置在上海公共卫生临床中心的动物实验室【SYXK(沪) 2015-0008】。动物房温度(21 ± 1)℃,房内照明从早上 7 点到晚上 7 点,自由饮水与摄食。本研究所有的动物实验根据美国国立健康卫生指导且经复旦大学公共卫生临床中心动物护理与使用委员会认可。

1.2　方法

1.2.1　束缚装置的制作

实验室就地取材,取实验室常规配备耗材 50 mL离心管,自制简易小鼠束缚装置。该装置不仅可以用于束缚应激模型的制备,而且可以用于尾静脉采血、注射,实验室内取材方便,制作简便,操作亦是简单且使用效果良好,可实现较长时间的保定。该装置不仅能用于小鼠保定同样也适用于大鼠。为了说明方便,以小鼠举例。下文将逐步对该小鼠束缚装置的制作、使用方法及注意事项进行介绍:

(1)束缚装置的制备

选择容量规格适合小鼠身型的离心管、剪刀、胶布、橡皮筋共四样(图 1B)。例如 50 mL 离心管可用于产后束缚应激小鼠模型(体重在 30 ~ 40 g 之间)的制备[8](图 1C)。选择合适规格的离心管,取掉离心管的盖子,在离心管盖上用剪刀扎透气孔(图 1D),然后用剪刀在离心管壁任意一侧,纵向竖直向下剪,由离心管开口剪到管底部,横向根据小鼠尾部根部粗细,在离心管一侧剪出宽为 0.5 cm 左右的开口(图 1E),再用胶布在管壁剪开的开口周围贴上胶布(图 1F),防止管壁开口毛刺划伤小鼠。经过以上的操作,一个小鼠简易束缚装置基本制作完成,后续搭配离心管盖、胶布、橡皮筋使用(图 1G)。

(2)使用方法

操作者左手持小鼠束缚装置,装置管口朝外,管底部朝自身,侧壁间隙朝上。右手抓住小鼠尾部,将小鼠放在鼠笼上方或任一平面,用管口对准小鼠臀部,右手施力拖动小鼠尾巴在管壁间隙中滑行,沿着管壁间隙从管口纵行拉向管底,然后用离心管盖抵住洞口,胶布贴于离心管盖及其两侧管壁进行加固,即可把小鼠固定于装置内且小鼠尾部暴露在管壁外(图 1H)。接着用橡皮筋箍紧管壁(图 1I),既可以防止小鼠从管壁间隙中逃走也能限制小鼠在管内的活动空间。亦可不用离心管盖抵住洞口,选用胶布绕 1~2 圈小鼠尾巴根部然后环绕管底周围管壁几圈即可固定小鼠于装置内。该装置只需操作者施力即可迅速把小鼠拖入管内,不需要等待引诱小鼠主动进洞,避免小鼠挣扎紧抓洞口耗费时间,提高实验效率,非常方便。

(3)注意事项

①剪管壁间隙时,要注意间隙的宽度要适合小鼠的尾部粗细,间隙尺度要略大于尾部最粗端的尺

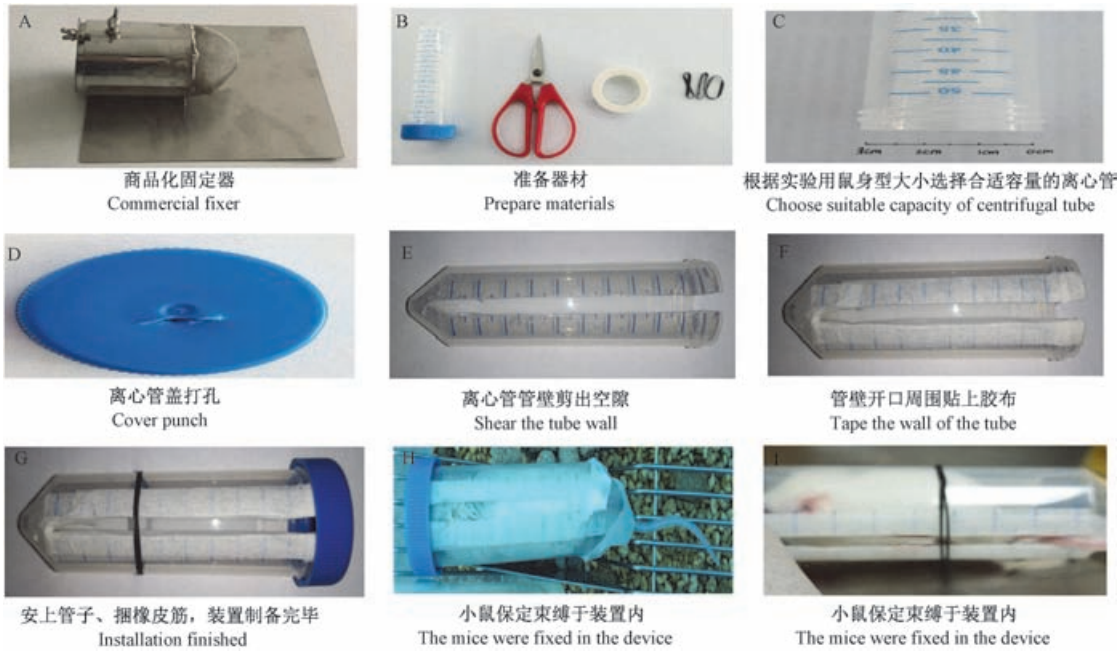


图 1 束缚装置的制作步骤

Figure 1 Manufacturing procedure of the fixing device

度,但是不可以过大而让小鼠钻出。

②选择离心管盖抵住离心管口来固定小鼠时,要注意在离心管盖上用剪刀插上孔。虽然管壁上方有一纵行贯穿的间隙,已经不影响管内空气流通,但是保险起见需在离心管盖上用剪刀插上孔透气,孔不能过大以防小鼠嘴巴伸出啃咬。为了离心管盖能稳固地抵住离心管口,可以用胶布贴于离心管盖和两侧管壁进行加固。

③选择胶布固定小鼠尾部于管壁时,用胶布绕小鼠尾巴根部 1 ~ 2 圈,勿紧,过紧会导致小鼠尾部血液不畅。正确操作是使胶布粘住鼠尾,余下胶布缠绕管底周围管壁几圈,观察鼠尾颜色,确定不影响尾部血循即可,原则是固定而不过紧。

④橡皮筋捆于管壁,不要太靠近小鼠头部处,容易被咬断,最佳位置是捆于小鼠躯干处的管壁。如果没有皮筋,可用胶布替代捆于管壁,胶布绕过管壁间隙接触小鼠毛发处容易粘住动物毛发,所以另撕一小节胶布,反向贴于胶布粘性一侧,使不粘的一侧接触动物毛发,从而保护小鼠安全。

⑤为了加强小鼠保定束缚效果可以既用离心管盖抵住管口又用胶布粘住小鼠尾部固定于管壁,根据操作者需求进行选择。如果只是短暂的保定束缚,可以只选择用离心管盖抵住管口,如果是为了给予长时间束缚应激,可以把两种固定方式结合,加强固定效果。

⑥可以根据小鼠的身长对离心管管壁进行修剪。当离心管管壁过长,可以用剪刀适当裁剪管壁长度来匹配小鼠的身长,尽量缩小小鼠的活动空间。修剪后的管口直径仍然略小于离心管盖的直径,然后用离心管盖罩住管口,并且用胶布加固离心管盖与管壁的连结。

(4)装置适用范围

①尾静脉采血、注射。

小鼠的尾部暴露于离心管外,便于操作者进行尾静脉采血、注射。

②束缚应激模型制作。

例如把产后小鼠固定于装置内限制其行动,每天给予 3 h 的束缚应激,连续造模 21 d 即可制备产后束缚应激小鼠模型[9]。

③其它。

在管壁所需要的部位剪洞,进行腹腔注射或者背部注射。

1.2.2 小鼠产后束缚应激模型建立

(1)造模方法

小鼠适应性喂养一周后,以 1 只雌性搭配 2 只雄性小鼠交配的方式,将小鼠放在同一鼠笼 4 d 进行交配,4 d 后取出雄性小鼠,单独饲养妊娠成功的雌性母鼠直至实验结束。在母鼠产后第 2 天,将母鼠移出鼠笼,母子分离,把母鼠装于于自制的束缚装置(后文详述),每天上午 9 点至中午 12 点,连续束缚 3 h,结束后把母鼠移回原鼠笼,每天 1 次连续 3 周,直到断乳。

(2)分组与干预

将相似体重的产后母鼠分为 2 组,正常组(Control)与产后应激组(immobilization stress, IS),每组 8 只。产后每天记录母鼠体重与摄食量和仔鼠体重。对于产后应激组母鼠,产后第 2 天开始,在母子分离基础上,每天给予 3 h 束缚应激,对正常组母鼠不操作。在产后第 22 天,通过红外线计数器,测算母鼠运动量,之后人道地处死母鼠,摘取胃与下丘脑。

(3)检测指标与方法

①RT-qPCR 法测基因的 mRNA 相对的表达量

采用逆转录实时聚合酶链式反应(RT-qPCR)的方法测定胃内 ghrelin,5-HT_{2b}受体 mRNA 表达水平和下丘脑内 ghrelin, 5-HT_{2c}受体的 mRNA 水平。使用 RN easy Mini Kit(Qiagen, Hilden, Germany)从样本组织中分离出总 RNA,利用 Improm-IITM 逆转录系统(Promega, Madison, WI, USA)合成 cDNA。使用表 1 列出的引物和 QuantiFast SYBR Green RT-PCR(Roche, Swiss)试剂盒进行 qPCR 分析。循环参数设计在 95℃初始化 5 min,然后在 95℃下 10 s 为周期进行连续 40 个循环的变性、延伸、扩增,最后在 60℃退火 30 s。根据其熔解曲线,以 GAPDH 基因作内参基因,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法测定相对 mRNA 表达。

②蛋白质印迹(Western blot)法测蛋白的总量

将样本组织放入 RIPA 缓冲液中裂解。将裂解物进行聚丙烯酰胺电泳(SDS-PAGE)并电转移至聚偏二氟乙烯膜。将该膜放入 1%脱脂奶粉中封闭 1 h,并在 4℃下分别用抗生长素释放肽,抗 5-HT_{2b}受体,抗 5-HT_{2c}受体。抗甘油醛 3-磷酸脱氢酶(GAPDH)孵育过夜,再与过氧化物酶缀合的二抗孵育后,通过增强的化学发光底物检测条带信号信号值,并使用 Image Studio 软件相对定量分析结果。

表 1　实时 PCR 引物序列

Table 1　Primer sequences for Real-time PCR

引物 Primer	引物序列 Primer sequence
Ghrelin	F5'-AAGAAGCCACCAGCTAAAC-3' R5'-ATCGAAGGGAGCATTGAAC-3'
5-HT_{2b} receptor	F5'-GATGCCGATTGCCCTCTTGAC-3' R5'-CTGGGATGGCGATGCCTATTG-3'
5-HT_{2c} receptor	F5'-CATTCTTCATCCCGTTGAC-3' R5'-TTCCTCATCACCCTTCTTG-3'
GAPDH	F5'- CTGCCCAGAACATCATCC -3' R 5'- CTCAGATGCCTGCTTCAC -3'

③免疫组织化学染色法

将组织样品固定在多聚甲醛中,然后石蜡包埋切片。脱蜡和脱水后,将切片浸入 3%过氧化氢中,用来阻断内源性过氧化物酶活性,再用 pH6.0 的柠檬酸盐缓冲液进行抗原的修复。在 4℃下将切片分别与生长素释放肽,5-HT_{2b}受体、5-HT_{2c}受体的抗体孵育过夜,然后于室温下和二抗孵育 1 h。3,3-二氨基联苯胺(DAB)溶液应用于切片,并用苏木精复染细胞核。

1.3　统计学分析

使用 SPSS 19.0 软件进行统计分析,实验结果均采用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较采用独立样本 t 检验,$P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2　结果

2.1　产后束缚应激母鼠运动量的变化

如图 2 所示通过红外线感知计数器测量产后第 22 天母鼠 10 min 的运动量,发现压力组母鼠的运动量少于正常组母鼠($P < 0.01$),两者运动量的差异具有显著性。

2.2　产后束缚应激母鼠体重与摄食的变化

两组母鼠产后记录体重与摄食,如图 3 所示。应激组母鼠的体重与摄食总体上低于正常组母鼠($P < 0.05$;$P < 0.01$;$P < 0.001$),差异具有显著性。产后母鼠在束缚应激压力作用下体重与摄食减少。

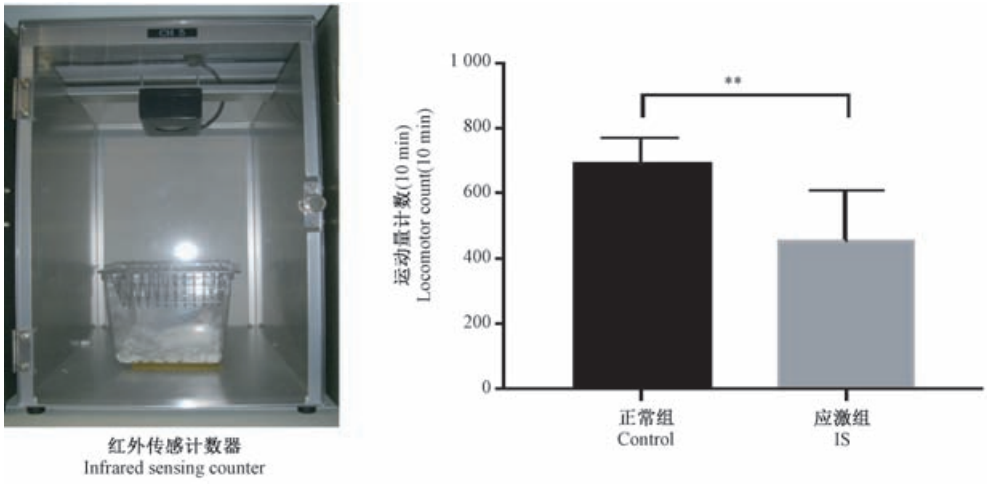
2.3　产后束缚应激母鼠胃与下丘脑内相关基因的变化

图 4 显示在母鼠产后第 22 天,采用 RT-qPCR 方法,检测胃和下丘脑中与情绪以及代谢相关基因的 mRNA 表达水平。可以看到下丘脑中的 5-HT_{2c}受体与胃中 5-HT_{2b}受体在应激组的表达要低于正常组($P < 0.001$),下丘脑中的 ghrelin 和胃中 ghrelin 在应激组的表达要高于正常组($P < 0.001$),差异具有显著性。

图 5 显示免疫组织化学染色法和蛋白质印记法检测母鼠产后第 22 天胃内 ghrelin、5-HT_{2b}受体和下丘脑内 ghrelin 和 5-HT_{2c}受体的表达水平。图表显示胃和下丘脑标本中应激组的 ghrelin 蛋白表达表达高于正常组($P < 0.001$),应激组胃内 5-HT_{2b}受体($P < 0.001$)和下丘脑中 5-HT_{2c}受体($P < 0.05$)的蛋白表达低于正常组,差异具有显著性。

2.4　产后应激母鼠对子代的影响

应激母鼠产后记录仔鼠的体重,如图 6 所示,应

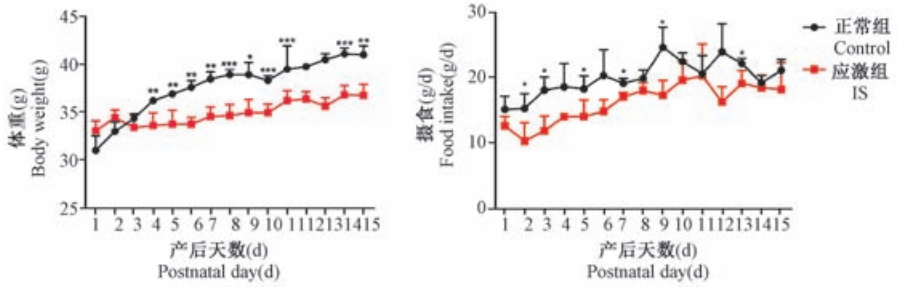


注:与正常组母鼠运动量比较,$^{**}P< 0.01$。

图 2 母鼠运动量的变化

Note. Comparison of exercise amount with maternal mice in control group, $^{**}P < 0.01$.

Figure 2 Changes of exercise amount in maternal mice



注:与正常组母鼠体重与摄食比较,$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P< 0.001$。

图 3 母鼠体重与摄食的变化

Note. Compared with the weight and food intake of maternal mice in control group, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

Figure 3 Changes of body weight and food intake in maternal mice

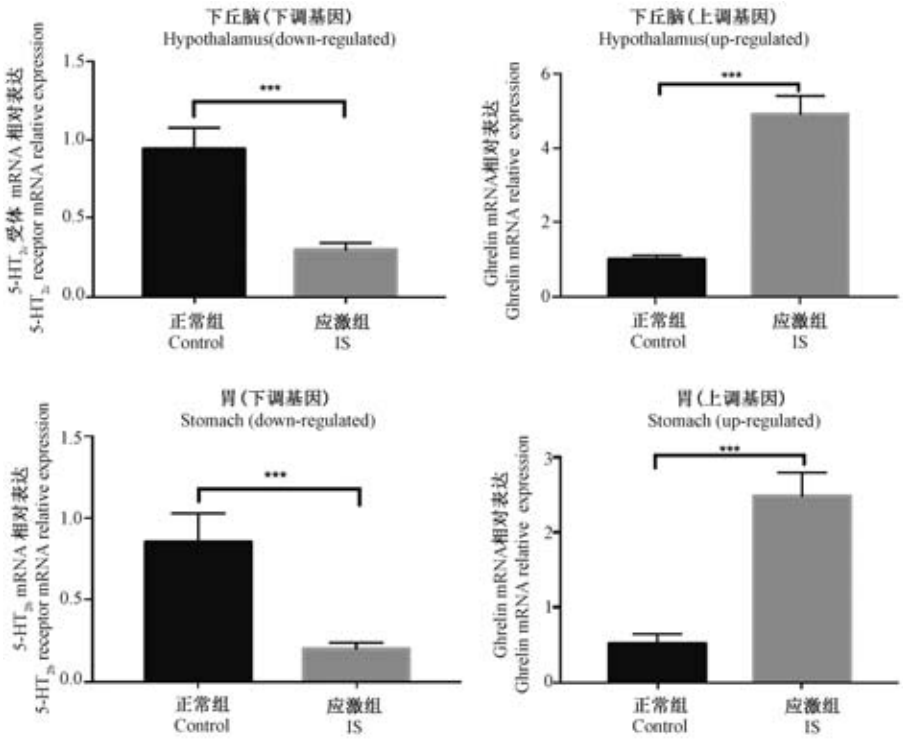
激组母鼠的仔鼠体重和身长低于正常组母鼠仔鼠($P< 0.001$),差异具有显著性。虽然是给予母鼠束缚应激,但是也对小鼠造成了发育不良。体重增长曲线持续观察 10 周,应激组仔鼠体重仍没有追上正常组仔鼠($P < 0.01$)。表明母鼠产后应激会影响子代发育,导致仔鼠持续的生长迟缓,造成子代低体重与营养不良。

另外在第 8 周应激组仔鼠的运动量高于正常组仔鼠($P < 0.01$),差异具有显著性,表明仔鼠长大后有多动的倾向。

3 讨论

使用本文自制的束缚装置制作小鼠产后束缚应激模型,具有低体重低摄食,ghrelin 高表达,5-HT_2 受体低表达的特征,并且能造成子代生长发育迟缓。本课题组之前的实验[10-12],同样采用此束缚装置制作产后束缚应激小鼠模型,与正常组相比,应激母鼠的体重与摄食同样呈现减少趋势,母鼠胃和下丘脑内 ghrelin 表达量升高,下丘脑中的 5-HT_{2c} 受体与胃中 5-HT_{2b} 受体表达下降,并且应激组母鼠的仔鼠体质量同样低于正常组母鼠的仔鼠体质量。以上实验证明该装置制作的产后束缚应激模型具有稳定性和可重复性。

近些年来,一些研究表明 ghrelin 在情绪调节中起着重要作用,例如自杀未遂患者的血清 ghrelin 水平显著增加[13]、侧脑室注射 ghrelin 可增加雄性幼年大鼠抑郁样行为[14]、抑郁症患者血清内高 ghrelin 表达,并且随抑郁的严重程度加重而表达增加[15]。

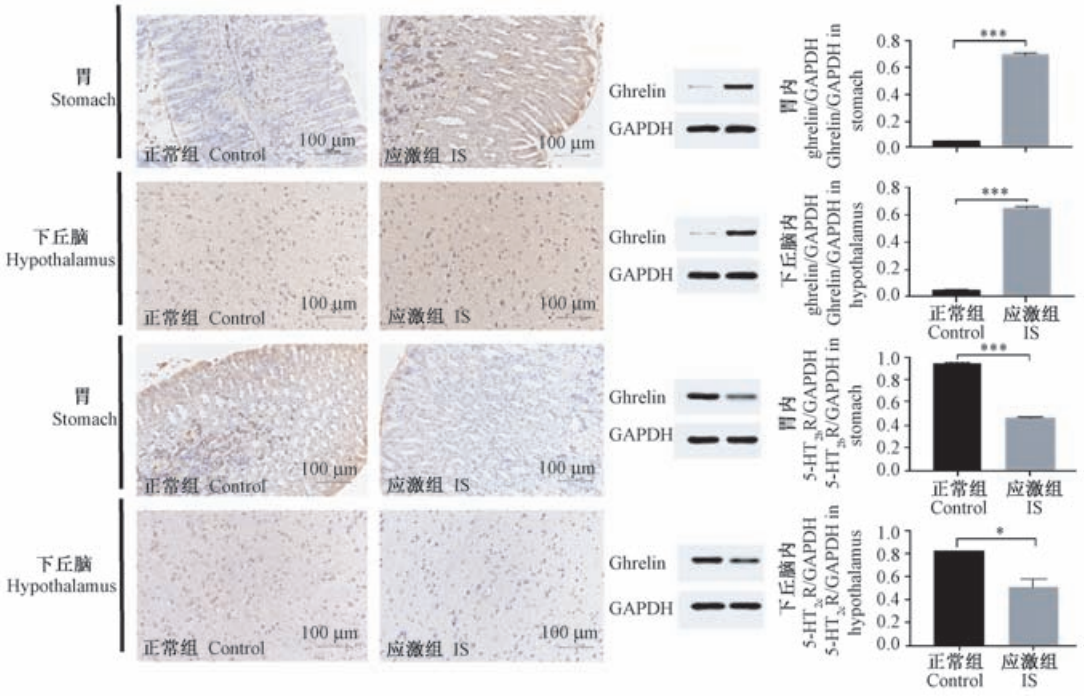


注:与正常组相关基因 mRNA 表达相比, *** $P < 0.001$。

图 4　应激影响母鼠胃与下丘脑内相关基因的变化

Note. Compared with mRNA expression of related genes in control group, *** $P < 0.001$.

Figure 4　Changes of related genes in stomach and hypothalamus

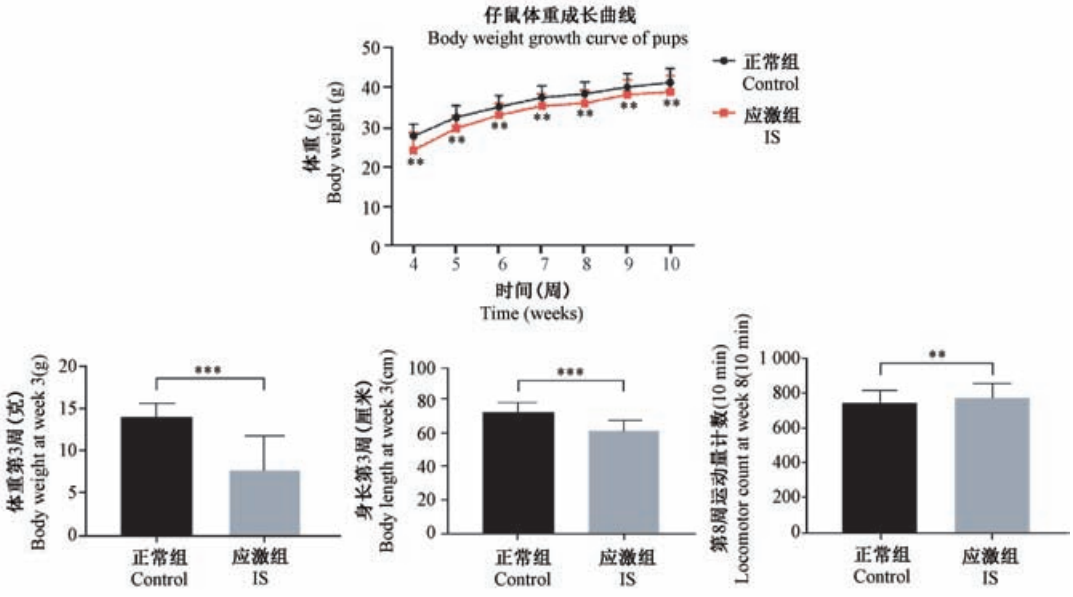


注:通过免疫组织化学染色法和蛋白质印记法检测基因表达, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$。

图 5　应激影响母鼠胃与下丘脑内相关基因的变化(×200)

Note. Detection of gene expression by immunohistochemical staining and Western blot, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

Figure 5　Changes of related genes in stomach and hypothalamus(×200)



注:正常组母鼠的子代与应激组母鼠的子代比较发育状况, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$。

图 6 产后应激母鼠对子代的影响

Note. Comparison of offspring development between normal and stressed maternal mice, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$.

Figure 6 Effect of postpartum stressed maternal mice on the offspring

许多研究已经证实 5-羟色胺(5-HT) 与情绪障碍相关[16],例如恐惧、焦虑、抑郁等不良情绪。据报道,低血清素活性可能导致许多心理障碍,如冲动性,攻击性和自杀意念,并且血清素能系统和生长素释放肽之间存在相互作用[17-19]。

在人类和动物模型中,血清素(又名 5-羟色胺或 5-HT)的摄取与焦虑、抑郁等情绪密切相关,是广泛使用的抗抑郁和抗焦虑药物的作用位点[20]。5-HT的受体具有许多亚型,有研究报道抑郁症患者较正常人脑内 5-HT 受体的数量偏低且敏感性下降[21],其中 5-HT_2 受体与抑郁症密切相关[22]。5-HT_{2b}受体主要分布于周围组织,有研究显示 5HT_{2b} 受体的表达与抑郁症状呈相关性,在帕金森伴抑郁小鼠的脑皮质中 5-HT_{2b}受体表达下降[23]。在慢性应激导致快感缺乏的小鼠中,5-HT_{2b}受体表达显著降低[24]。激活胃内 5-HT_{2b}受体能够抑制 ghrelin 的分泌[25]。5-HT_{2C}受体是 5-HT 受体的另一种亚型,广泛分布于中枢神经,在抑郁症新治疗策略的开发受到重要的关注[26]。5-羟色胺再摄取抑制剂治疗对 5-HT_{2C}受体的间接激活,可能有助于改善厌食和焦虑作用[27]。

本文介绍的产后小鼠束缚应激模型具有低体重低摄食,胃与下丘脑以及血清内 ghrelin 表达量增加,5-HT_2 受体等基因表达量减少,运动量减少等抑郁样症状,能造成子代生长发育迟缓并有多动倾向,可供产后应激疾病等研究。并且多次实验[8,10-11,28]证明此束缚装置对于束缚应激模型的造模是具有可重复性和稳定性。

此文章讲述的自制简易小鼠束缚装置,材料准备方便,制作简便,成本低廉,体积小巧,便于收纳保存。该装置只需选取合适容量规格的离心管,能够对大小不同的实验鼠进行固定限位。只需操作者施力即可迅速把实验鼠拖入管内,不需要等待实验鼠主动进洞,避免实验鼠挣扎紧抓洞口耗费时间,有利于提高实验效率。使用该装置进行尾静脉采血或注射,能保护实验人员不被小鼠咬伤,且透明管壁有助于观察小鼠的情况。

除了运用于小鼠束缚应激模型的制备外,该装置还可以用于尾静脉采血、注射。根据实验鼠身型大小选择合适容量的容器,用上述方法制作简易束缚装置,既能运用于小鼠又能用于大鼠。以上全部内容就是产后束缚小鼠应激模型以及束缚装置的制作方法介绍,供实验人员借鉴与使用。

参 考 文 献(References)

[1] Wilber RF, Zenia BC, Lucca MD, et al. The 1, 2, 3 of laboratory animal experimentation [J]. Rev Peru Med Exp Salud Publica, 2016, 33(2):288-99.

[2] 杨健莉, 刘佳, 郑志红.常用实验大小鼠采血方法及其对实验动物福利的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(1):

90-94.
Yang JL, Liu J, Zheng ZH. Comparison and analysis of blood sampling methods from rats and mice [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(1): 90-94.

[3] 郑培鸿, 陈维荣, 林广荣. 一种用于局部红外线照射的大鼠简易固定装置 [J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(3): 84-86.
Zheng PH, Chen WR, Lin GR. A simple fastening device for local infrared irradiation in rats [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(3): 84-86.

[4] 鲍礼智, 郭志福, 沈明, 等. 新型实验大鼠尾静脉穿刺用途四联固定器的设计及其效用评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(11): 77-79.
Bao LZ, Guo ZF, Shen M, et al. A four combined holder for tail vein puncture in conscious rats: design, construction and feasibility testing [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(11): 77-79.

[5] 孙同柱, 付小兵, 翁立新, 等. 介绍一种简易的大鼠保定方法 [J].实验动物与比较医学, 2004, 24(1): 49.
Sun TZ, Fu XB, Weng LX, et al. Introduce a simple rat fixation method [J]. Lab Anim Comp Med, 2004, 24(1): 49.

[6] 刘辉, 康白. 小鼠固定器的制作与应用 [J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(3): 227-228.
Liu H, Kang B. Production and application of mouse fixator [J]. J Clin Exp Med, 2010, 9(3): 227-228.

[7] Emack J, Kostaki A, Walker CD, et al. Chronic maternal stress affects growth, behaviour and hypothalamo-pituitary-adrenal function in juvenile offspring [J]. Horm Behav, 2008, 54(4): 514-520.

[8] Chen MM, Zhang L, Pan DQ, et al. Effects of 919 syrup and D101 on immobilization stress response in postpartum mice[J]. Int J Clin Exp Med, 2019, 12(1):1217-1225.

[9] Gao P, Ishige A, Murakami Y, et al. Maternal stress affects postnatal growth and the pituitary expression of prolactin in mouse offspring[J]. J Neurosci Res, 2011, 89(3): 329-40.

[10] Li B, Xu Y, Pan D, et al. Effect of immobilization stress on the appetite and stomach ghrelin expression in maternal mice[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2015, 8(12): 15993-15999.

[11] Xu YM, Xiao Q, Gao Q, et al. Effects of the chinese herbal medicine mixture 919 syrup on the isolation stress response in postpartum mice [J]. Int J Clin Exp Med, 2017, 10(4): 6527-6537.

[12] 张岚, 陈漫漫, 蒋淼, 等. 护肝方 919 糖浆干预产后束缚应激小鼠对仔代体质量及血浆 Leptin 的影响 [J]. 上海中医药杂志, 2019, 53(2): 86-90.
Zhang L, Chen MM, Jiang M, et al. Effects on body mass and blood leptin in offspring after intervention of mice under postpartum immobilization stress with Huganfang 919 syrup [J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2019, 53(2): 86-90.

[13] Atmaca M, Tezcan E, Parmaksiz S, et al. Serum ghrelin and cholesterol values in suicide attempters [J]. Neuropsychobiology, 2006, 54(1): 59-63.

[14] Jackson TM, Ostrowski TD, Middlemas DS. Intracerebroventricular ghrelin administration increases depressive-like behavior in male juvenile rats[J]. Front Behav Neurosci, 2019, 13: 77.

[15] Ozsoy S, Besirli A, Abdulrezzak U, et al. Serum ghrelin and leptin levels in patients with depression and the effects of treatment[J]. Psychiatry Investig, 2014, 11(2): 167-172.

[16] Jenkins TA, Nguyen JC, Polglaze KE, et al. Influence of tryptophan and serotonin on mood and cognition with a possible role of the gut-brain axis[J]. Nutrients, 2016,8(1): E56.

[17] Brown GL, Ebert MH, Goyer PF, et al. Aggression, suicide, and serotonin: Relationships to CSF amine metabolites[J]. Am J Psychiatry, 1982,139(6): 741-746.

[18] Brunetti L, Recinella L, Orlando G, et al. Effects of ghrelin and amylin on dopamine, norepinephrine and serotonin release in the hypothalamus[J]. Eur J Pharmacol, 2002, 454(2-3): 189-192.

[19] Roy A, Linnoila M. Suicidal behavior, impulsiveness and serotonin[J]. Acta Psychiatr Scand, 1988, 78(5): 529-535.

[20] Lesch KP, Bengel D, Heils A, et al. Association of anxiety-related traits with a polymorphism in the serotonin transporter gene regulatory region[J]. Science, 1996, 274(5292): 1527-1531.

[21] Yatham LN, Liddle PF, Shiah IS, et al. Brain serotonin2 receptors in major depression: A positron emission tomography study[J]. Arch Gen Psychiatry, 2000, 57(9): 850-858.

[22] Marek GJ, Martin RR, Abo A, et al. The selective 5-HT2A receptor antagonist M100907 enhances antidepressant-like behavioral effects of the SSRI fluoxetine [J]. Neuropsychopharmacology, 2005, 30(12): 2205-2215.

[23] Zhang XQ, Song D, Gu L. Decrease of gene expression of astrocytic 5-HT2B receptors parallels development of depressive phenotype in a mouse model of Parkinson's disease [J]. Frontiers Cell Neurosci, 2015, 9: 388.

[24] Li B, Dong L, Wang B, et al. Cell type-specific gene expression and editing responses to chronic fluoxetine treatment in the in vivo mouse brain and their relevance for stress-induced anhedonia [J]. Neurochem Res, 2012, 37(11): 2480-2495.

[25] Voigt JP, Fink H. Serotonin controlling feeding and satiety[J]. Behav Brain Res, 2015, 277: 14-31.

[26] Cremers TI, Giorgetti M, Bosker FJ, et al. Inactivation of 5-HT2C receptors potentiates consequences of serotonin reuptake blockade [J]. Neuropsychopharmacology, 2004, 29(10): 1782-1789.

[27] Millan MJ. Serotonin 5-HT2C receptors as a target for the treatment of depressive and anxious states: focus on novel therapeutic strategies [J]. Therapie, 2005, 60(5): 441-460.

[28] Nakata H, Watanabe K, Murakami Y, et al. Stress on a postpartum mother inhibits the secretion of growth hormone in the offspring and causes persistent growth impairment [J]. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2009, 31(7): 433-441.

[收稿日期] 2019-08-21

蔡磊,李建军,余露军,等. 鱼类实验动物封闭群和近交系资源培育现状[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 108-114.
Cai L, Li JJ, Yu LJ, et al. Current situation of the breeding of closed colony and inbred strains of fish as laboratory animals [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 108-114.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.016

鱼类实验动物封闭群和近交系资源培育现状

蔡磊,李建军,余露军,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】 鱼类实验动物的应用研究已经深入生命科学的各个领域,取得了许多重大研究成果,因国内外实验鱼在来源、代系、培育和管理方式等背景上均较为复杂,为实验鱼质量控制带来诸多不便。针对鱼类实验动物资源培育现状,本文综述了国内外实验鱼封闭群和近交系的培育、管理和标准化等方面的现状和存在的问题,以期为我国实验鱼培育管理和质量控制标准化提供参考。

【关键词】 鱼类;实验动物;封闭群;近交系;培育
【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2020) 01-0108-07

Current situation of the breeding of closed colony and inbred strains of fish as laboratory animals

CAI Lei, LI Jianjun, YU Lujun, HUANG Ren*

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

Corresponding author: HUANG Ren. E-mail: 1649405216@qq.com

【Abstract】 As an important component of laboratory animals, the applied research of laboratory fish has expanded to all fields of bioscience, making significant contributions to scientific research. The standardization study of quality control of laboratory fish has encountered issues due to complications regarding the source, generation, breeding, and management of laboratory fish. This paper reviews the current situation regarding the breeding, management, and standardization study of closed colony and inbred strains of laboratory fish at home and abroad. The paper also analyzes current problems, aiming at providing references for the breeding, management, and standardization study of quality control of laboratory fish in China.

【Keywords】 fish; laboratory animal; closed colony; inbred strain; breeding
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

鱼类作为水生态系统和低等脊椎动物的典型代表,具有种类多、繁殖力强、遗传容易控制、饲育设施要求简单等诸多优点,在发育生物学、遗传学和生态毒理学等研究领域具有不可替代优势。仅国际斑马鱼模式生物数据库(ZFIN)中注册的斑马鱼实验室已达 1304 个(2019 年 5 月,https://zfin.org),我国利用斑马鱼开展科学研究的实验室超过 250 个[1],目前全球以斑马鱼为代表的实验鱼使用量呈逐年上升趋势[2]。由于我国实验动物学科建设整体起步较晚[3],尤其实验鱼培育管理更滞后于

[基金项目]国家科技支撑计划项目(2015BAI09B05)。
Funded by National Key Technologies R&D Program of China (2015BAI09B05).
[作者简介]蔡磊(1986—),男,副研究员,研究方向:实验动物遗传学。Email:cailei17@163.com
[通信作者]黄韧(1959—),男,研究员,研究方向:实验动物学。Email:1649405216@qq.com

哺乳类实验动物,国内外现有实验鱼品种品系的来源、代系、培育和管理方式等均较复杂。为促进我国实验鱼的规范培育,本文综述了国内外实验鱼的培育管理现状。

1　实验鱼封闭群和近交系定义

1.1　封闭群

封闭群的定义最早出现在 1963 年国际实验动物科学理事会(The International Council on Laboratory Animal Science, ICLAS)会议(ICLAS Bulletin No.14),为:“不从外部进行引种的群体为封闭群”[4],后 ICLAS 于 1972 年发布了封闭群官方定义,为:“不从外部引种,至少封闭培育 4 代以上,每代近交系数上升不超过 1%”[5];1992 年美国大鼠命名委员会发布的大鼠命名规则中对封闭群定义仍沿用 ICLAS 的官方定义[6];我国哺乳类实验动物遗传质量控制国家标准(2001 版和 2010 版)中对封闭群的定义均参考 ICLAS,为:“以非近亲交配方式进行繁殖生产的一个实验动物种群,在不从外部引入新个体的条件下,至少连续繁殖 4 代以上的群体”[7];鼠类国际标准化遗传命名委员会(International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice, ICSGNM)2016 年发布的最新修订《大小鼠命名指南》中对封闭群定义为:“封闭群为保持有限遗传多样性的一个实验动物群体,以无选择的非近亲交配方式繁殖,所有的交配仅限于封闭群内部个体之间,且不从外部引进新的动物”[8]。

以往国内外较多书籍[9]、文献[10]、标准[7]和指南中常将远交群(outbred stock)和封闭群概念等同。参照 ICSGNM 于 2016 年新发布的指南,封闭群和远交群定义存在本质上的区别,封闭群为保持有限的遗传多样性(Contains Limited Genetic Diversity),而远交群则为保持最大的遗传杂合度(Maintain Maximum Heterozygosity)[8]。

封闭群主要特征为在一定范围内保持相对稳定的遗传杂合度,维持这种状态所需的条件包括:①封闭(不由外部引进新基因);②非近交(尽量减少基因丢失);③连续繁殖 4 代以上(前几代遗传杂合度波动较大);④传代亲本数量较多(降低近交机率)。因此,推荐实验鱼封闭群定义:“以非近亲交配方式繁殖生产,不从外部引入新基因,至少连续繁殖 4 代以上的实验鱼种群”。同时结合亲本数量要求,如传代亲本应保持 50 对以上,以满足实验动物封闭群的本质要求。

1.2　近交系

与封闭群定义相比,国内外对近交系的定义较为一致,为:“经过连续 20 代以上的全同胞兄妹交配或亲子交配,品系内所有个体都可以追溯到起源于第 20 代或以后代数的一对共同祖先,近交系数大于 99%,且群体内任何个体基因组中 98.6%以上的等位位点为纯合”[2-3, 6]。因实验鱼与哺乳类遗传规律相似,国际上已按照哺乳类近交系培育方法成功培育出多个实验鱼近交系(表 1)。

2　实验鱼封闭群和近交系培育

2.1　封闭群培育

以大小鼠为代表的哺乳类实验动物封闭群理论体系已获国内外广泛认可。实验鱼与哺乳类同为脊椎动物,生殖方式相似,共同遵守遗传分离、自由组合和连锁定律,且实验鱼封闭群建群过程中基因频率变化规律与哺乳类实验动物相同。因此,哺乳类封闭群理论体系也同样适用于实验鱼,目前国内外已按照哺乳类封闭群的概念和培育管理方法,成功育成多个鱼类封闭群。

目前国际上实验鱼封闭群培育规模最大的为日本青鳉(*Oryzias latipes*),已报道封闭群超过 50 个[11],如 Kunming, Nagoya, Toyohashi 等。斑马鱼(*Danio rerio*)至今报道的封闭群有 AB[12]、TU[13]、TL[13]、IN(India)[14]、EKK[15]、WIK[16]、Darjeeling(DAR)[17]、NHGR-1[18]、IM12m[19]、IM14m[19]、Florida wt line[20],Light-colored[21]等。其中 AB、TU、TL、WIK、IN、Darjeeling 和 NHGR-1 等原始建群方式未严格遵照标准封闭群建群要求,如 AB 系有孤雌生殖背景;TU 为利用近交移除胚胎期致死突变得来;TL 为筛选 leo 和 lof 基因纯合得来;WIK 来源野生群,经挑选单次产卵量最大的一对鱼作为原始群建立;IN 来源于印度东北部野生群,经过 3 代近交后再回交得来;DAR 来源印度 Darjeeling 地区,1987 年后于美国俄勒冈大学保种;NHGR-1 来源于 AB × TU 繁殖的后代 TAB-5,在 TAB-5 近亲繁殖的 F1 代中挑选繁殖量最大的亲本作为 NHGR-1 的第一代,这些群体有人认为是远交群或非近交群(outbred line/ outbred strain/ non-inbred strains),也有人认为是封闭群[22],因此,其不是严格意义上的封闭群动物。但 IM12 m、IM14 m、EKK、Florida wt line 和

Light-colored 等为按照封闭群要求育成。此外,其它实验鱼也有多个封闭群报道,如剑尾鱼属的新月鱼(*Xiphophours maculatus*)2856 品种(1971)、剑尾鱼(*Xiphophours hellerii*)501 品种(1963)、2977 品种(1963)和 3062 品种(1971)等[23],孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)S、S3HR、SC 和 F22 等 16 个封闭群[24-25]。

国内实验鱼封闭群培育方面,广东省实验动物监测所培育了我国第一个海水实验鱼封闭群—诸氏鲻虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*)封闭群,现已达第 19 代[26-27];中国科学院水生生物研究所培育了稀有鮈鲫(*Gobiocypris rarus*)封闭群,现已培育至第 10 代[28-29]。

在鱼类封闭群培育上,总体上,发达国家优于我国,淡水优于海水,一些由于历史原因导致背景较为复杂的实验鱼群,如斑马鱼 AB 系等,繁殖管理方式已接近封闭群,后续如严格控制繁殖方式(避免近亲交配等)、保持群体规模、避免外源基因引入,则可培育成相对规范的封闭群。

2.2 近交系培育

哺乳类实验动物近交系已有上百年培育历史,仅小鼠近交系就达 450 多种[30],最高近交代数超过 210 代[31]。鱼类采用全同胞兄妹交配方式(full-sibling pair)培育近交系也已有 50 年以上的历史。斑马鱼已见报道近交系 6 个,分别为 C32、sjA、sjC、sjD、IM 和 May。其中 C32 和 IM 为高度纯合的近交系。C32[15]来源于封闭群 AB,最初通过雌核发育获得,1991 年后以严格全同胞兄妹交配方式传代;IM 和 May 为利用全同胞兄妹交配方式培育,IM 已达 20 代以上[32],May 已达第 16 代[32];sjA、sjC、sjD 均为 Stephen L. Johnson 实验室培育[33],分别来源于 AB、C32 和 DAR。

日本青鳉 20 代以上的近交系已有 13 个,分别为 HBI-I、HNI-II、HO4C、HO5、HdrR、NCMH、HB32D、HB11 A、Kaga、Hsok、AA2、Cab 和 Hi3,其中 HO4C 品系近交代数已达到 100 代(表 1)。

剑尾鱼属已育成近交系超过 12 个,分别为 *X. alvarezi*, Dolores、*X. couchianus*、*X. helleri*, Cd、*X. helleri* strigatus、*X. helleri* guentheri、*X. helleri* helleri、*X. maculatus*, Jp 163 A、*X. maculatus*, Jp 163 B、*X. montezumae cortezi*、*X. signum*、*X. variatus* 和 *X. xiphidium*。国际剑尾鱼种质资源中心(The *Xiphophorus* Genetic Stock Center)现保藏剑尾鱼属(*Xiphophorus*)近交有 6 个,分别为 *X. maculatus*, Jp 163 A、*X. maculatus*, Jp 163 B、*X. helleri*, Cd、*X. alvarezi*, Dolores、*X. couchianus* 和 *X. signum*,其中 Jp 163 A 近交代数已超过 100 代(表 1)。

孔雀鱼(*P. reticulata*)已报到近交系有 8 个[34],分别为 MAC, BDZW1, BDZW2, Armatus, Guanapo, Quare6, Quare6 family II 215-3 和 Cumaná, 其中 Maculatus, BDZW1, BDZW2 和 Armatus 品系均于实验室内近交繁殖超过 50 年。

孤独拟胎鳉(*Poeciliopsis lucida*)近交系超过 63 代[35];光亮拟胎鳉(*Poeciliopsis monacha*)有 2 个近交系[35],分别为 S68-4 和 S68-5,近交代数分别为 34 和 30。

除此之外,还有通过雌核发育和自体受精产生的纯系鱼类,如亚马逊花鳉(*Poecilia formosa*)和红树林鳉(*Kryptolebias marmoratus* 和 *Kryptolebia shermaproditus*)。亚马逊花鳉野生状态下几乎全为雌性,繁殖时雌鱼通过利用近缘种精子激活卵子,从而完成雌核发育,近缘种精子中遗传物质不参与受精发育[36]。两种红树林鳉[37]为目前在脊椎动物中发现的仅有的 2 种通过自体受精繁殖后代的物种,群体中绝大部分个体同时具有成熟的精巢和卵巢,通过自体受精完成繁殖后代。

国内鱼类近交系培育方面,中国水产科学研究院珠江水产研究所培育了 5 个剑尾鱼(*X. helleri*)近交系,分别为 RR-B、RW-H、RW-K、BW-D 和 BY-F,其中 RR-B 近交系已达 26 代以上[38],中国科学院水生生物研究所培育的稀有鮈鲫近交系 HAN 已达 33 代以上[29],广东省实验动物监测所培育了 4 个诸氏鲻虾虎鱼(*M. chulae*)近交系,最高代数已达到第 13 代[26]。南华大学利用连续雌核发育方法培育了实验红鲫(*Carassius auratus* red variety)纯系[39]。各品系近交系近交代数及参考文献见表 1。

综上所述,国内外在实验鱼近交系培育上均开展了大量工作,已育成多个近交 20 代以上的近交系,但同时也发现个别鱼类近交系在培育过程中存在生命力和生殖力下降等近交衰退现象。针对此问题,国内外采取了诸多用于控制或减轻衰退的措施,如 Shinya 等[19]通过对斑马鱼近交系亲本的繁殖能力进行筛选,将繁殖力最强的斑马鱼作为传代亲本,用于保持近交系群体的繁殖力;吴淑勤等[38]通过创造适宜养殖环境、强化亲鱼营养条件和加强管理等措施克服剑尾鱼近交衰退。由于近交系衰退主要由遗传导致,因此在培育过程中加强人工选育

和饲养管理对控制近交衰退尤为重要,人工选育可有效避免有害基因在群体中的传递,可在源头上排除对生殖力产生危害的基因,加强养殖管理可为实验鱼创造良好的生存环境,避免外界不利因素对实验鱼生长发育产生影响。

表 1　实验鱼近交系统计

Table 1　Statistics of inbred strain of laboratory fish

品系名 Strain name	近交代数 Generation	参考文献 Reference	品系名 Strain name	近交代数 Generation	参考文献 Reference
Danio rerio, C32	/	[15]	*Oryzias latipes*, HO4C	100	[11]
Danio rerio, sjA	/	[33]	*Oryzias latipes*, HO5	93	[11]
Danio rerio, sjC	/	[33]	*Oryzias latipes*, HdrR	68	[40]
Danio rerio, sjD	/	[33]	*Oryzias latipes*, NCMH	47	[41]
Danio rerio, IM	20	[32]	*Oryzias latipes*, HB32D	81	[11]
Danio rerio, May	16	[32]	*Oryzias latipes*, HB11A	92	[11]
X.alvarezi, Dolores	/	[42]	*Oryzias latipes*, Kaga	/	[41]
X.couchianus	72	[42]	*Oryzias latipes*, Hsok	39	[40]
X. helleri, Cd	56	[42]	*Oryzias latipes*, AA2	/	[41]
X. helleri strigatus	35	[43]	*Oryzias latipes*, Cab	/	[41]
X. helleri guentheri	25	[43]	*Oryzias latipes*, Hi3	33	[11]
X. helleri helleri	25	[43]	*Poecilia reticulata*, MAC	/	[34]
X. helleri, RR-B	26	[42]	*Poecilia reticulata*, BDZW1	/	[34]
X. helleri, RW-H	15	[42]	*Poecilia reticulata*, BDZW2	/	[34]
X. helleri, RW-K	/	[42]	*Poecilia reticulata*, Armatus	/	[34]
X. helleri, BW-D	/	[42]	*Poecilia reticulata*, Guanapo	/	[34]
X. helleri, BY-F	/	[42]	*Poecilia reticulata*, Quare6	/	[34]
X.maculatus, Jp 163 A	101	[42]	*Poecilia reticulata*, Quare6 II215-3	/	[34]
X.maculatus, Jp 163 B	94	[42]	*Poecilia reticulata*, Cumaná	/	[34]
X. montezumae cortezi	35	[43]	*Poeciliopsis lucida*	63	[35]
X. signum	/	[42]	*Poeciliopsis monacha*, S68-4	34	[35]
X. variatus	/	[43]	*Poeciliopsis monacha*, S68-5	30	[35]
X. xiphidium	55	[43]	实验红鲫 *Carassius auratus* red variety	/	[39]
Oryzias latipes, HBI-I	64	[40]	稀有鮈鲫 *Gobiocypris rarus*	22	[44]
Oryzias latipes, HNI-II	57	[40]	诸氏鳗虾虎鱼 *Mugilogobius chulae*	13	[26]

3　实验鱼繁殖和管理

3.1　实验鱼的繁殖方法

哺乳动物封闭群繁殖方法通常有最佳避免近亲交配法、循环交配法或随机交配法[7],在繁殖过程中,保持有效群体大小为雌雄各 25 尾,是保证传代过程中近交系数上升不超过 1% 的最小群体规模。由于鱼类个体小、单次繁殖量大,繁育成本低,在封闭群维持过程中,较易维持一个规模超过 100 对以上的群体,因此,实验鱼封闭群繁殖管理中,引种数量可适当提高,如 50 对以上,可选随机交配法传代。近交系常用的繁殖方法有亲子交配(parent-offspring)、全同胞兄妹交配(full-sib)、半同胞兄妹交配(half-sib)、双堂兄妹交配(double first cousin),其中全同胞兄妹交配为最经典和最常采用方式。按照全同胞兄妹交配方式培育实验鱼近交系已经有近 50 年历史,目前多数实验鱼近交系均通过此法获得[38, 40, 42, 44]。由于多数鱼类具有体外受精发育特点,鱼类也可利用雌核发育获得纯合后代,如实验红鲫纯系通过连续 2 代进行雌核发育获得、斑马鱼 C32 近交系的培育同时采用了雌核发育和全同胞兄妹交配。

与陆生实验动物相比,水生实验动物发展相对滞后,水生实验动物培育理论体系及相应方法亦较多参考陆生实验动物。水生和陆生实验动物虽在受精方式上差别巨大,如鱼类多数为体外受精发育(斑马鱼等)、也有体内受精(剑尾鱼等)或自体受精方式(红树林鳉等),但在封闭群培育上,二者遗传结构的变化均同属群体遗传学范畴,规律相似,在近交系培育过程中,二者等位基因纯合规律也一致。因此实验鱼封闭群和近交系培育方法可借鉴陆生实验动物方法,而在具体操作细节上在确保符合要求的前提下可根据鱼类生理特征进行调整。

3.2　实验鱼遗传管理

实验鱼的长期维持是一个非常系统和复杂的工程,培育过程中遗传物质的传递受到诸多因素影

响,如封闭群和近交系培育过程中面临的遗传污染、遗传突变、遗传漂变、近亲繁殖以及人为选择等,良好的实验鱼繁育管理需对影响遗传信息的各种因素进行考虑并建立相应应对措施。

3.2.1 封闭群

在新建封闭群的管理上,需对其原始建群亲本进行严格的种质鉴定,确保种类准确无误,并建立详细的原始引种记录档案,包括种名、来源、数量、雌雄比例、种质鉴定结果、繁殖方法等,原始建群亲本一般不少于 50 对;一旦确立原始建群亲本,立即封闭群体,确保群体的繁殖仅限于群体内部,在封闭的条件下至少连续繁殖 4 代以上,并进行详细的传代谱系记录;在培育过程中,利用分子标记等方法,定期对其遗传杂合度和群体遗传平衡状态进行监测,以确保封闭群实验鱼的基因异质性及多态性[7]。

3.2.2 近交系

近交系必须有完整的繁殖记录,包括来源、品系名称、近交代数及主要生物学特征等;培育过程需严格控制繁殖方法,基础群严格按照全同胞兄妹交配繁育,用于种群的传代,生产群在繁殖代数 4 代以内可采用随机交配,另外,规范的命名方法是保证繁殖谱系可溯源的重要依据,确保每一箱实验鱼都有唯一且可溯源的编号,不同养殖单元的实验鱼应有明确的识别信息,包括品种/品系名称、来源、父母系资料、出生或引入日期、数量等;定期监测遗传纯合度是保证近交系培育遗传纯合度的重要手段。综上所述,实验鱼近交系遗传管理的核心在于保持动物的同基因性以及基因纯和性[7]。

3.3 实验鱼饲养管理标准化

在实验鱼的饲养管理标准化上,因管理理念的差异,国外较偏重于制订指南或准则,如联合国粮农组织[45]、加拿大动物保护协会[46]、英国皇家防止虐待动物协会[47]等均制定了关于鱼类养殖管理的指南,此外还有一些实验鱼饲养管理的经典书籍,如《The laboratory fish》[48]和《The zebrafish book》[49]等。因上述指南和书籍多为原则性要求和建议,在实际操作过程中各实验鱼生产和使用单位较难达到标准化饲养管理,如通过公共网络途径获得的美国 Washington、Southflorida 和 Rosalind Franklin 等大学斑马鱼饲养管理标准作业程序(standard operating procedures, SOP),详尽程度、具体操作指标设置以及管理措施等均差别较大。

与国外相比,我国在实验鱼饲养管理标准化上稍显滞后,通过对我国 19 个代表性实验鱼生产和使用单位实地调研,各实验室的饲养管理 SOP 均是在参考国外书籍、指南或 SOP 等,并结合各自实验室特点上制定。在标准制定上,2009 年国家标准化管理委员会批准广东省实验动物监测所起草《实验动物 鱼类环境与质量控制标准》国家标准(编号 20091329-T-469);2013 年 12 月 20 日北京市质量技术监督局发布了实验用鱼质量控制地方标准(包括实验用鱼微生物学等级及监测、寄生虫学等级及监测、遗传质量控制、配合饲料、环境条件、病理诊断 6 个部分);2016 年 8 月 10 日,稀有鮈鲫质量控制系列标准(微生物、寄生虫、遗传、营养和饲料)获得湖北省地方标准制定立项;2016 年 12 月 29 日湖南省质量技术监督局批准发布了《实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制》。随着实验鱼的应用领域和影响力逐渐增大,虽然我国在实验鱼质量控制上开展了大量研究工作,标准化工作也取得部分进展,但仍与我国较大的实验鱼培育应用规模不匹配,标准化工作急需加强。

4 结语

鱼类实验动物资源经过几十年的快速发展,培育了众多不同生物学特性的品种和品系,建立了丰富的疾病和毒理应用模型,取得了一大批重要的新发现和新进展,有力支撑和推动了生命科学的发展。同时也应注意到,鱼类实验动物培育和应用过程中仍然面临着标准化不足等问题,如我国暂无可用的实验鱼质量控制国家标准,目前绝大部分省份未将实验鱼纳入实验动物质量检测管理体系,导致各实验室在实验鱼培育技术、管理水平以及质量上良莠不齐,因此非常有必要通过加强相关标准的制定,以规范和引导实验鱼培育和管理,对促进实验鱼行业的发展有重要意义。

参 考 文 献(References)

[1] 何嘉玲, 刘静, 王天奇, 等. 斑马鱼的质量标准化[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 99-102.
He JL, Liu J, Wang TQ, et al. Research of zebrafish quality standardization[J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(6): 99-102.

[2] Dietrich MR, Ankeny RA, Chen PM. Publication trends in model organism research[J]. Genetics, 2014, 198(3): 787-794.

[3] 孔琪. 中国实验动物行业发展现状调查研究[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(5): 19-22.

Kong Q. Research on the development and present situation of laboratory animal industry in China [J]. Chin J Comp Med, 2017, 27(5): 19-22.

[4] ICLA. Terms and Definitions [M]. Bulletin No 14. London, 1964.

[5] Festing M, Kondo K, Loosli R, et al. International standardized nomenclature for outbred stocks of laboratory animals [J]. Z Versuchstierkd, 1972, 14(4): 215-224.

[6] Gill III T, Nomura T, Festing M, et al. Definition, nomenclature, and conservation of rat strains [J]. ILAR J, 1992, 34(4)::S3-S26.

[7] 全国实验动物标准化技术委员会. 实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制:GB 14923-2010 [S]. 2010.
National Technical Committee 281 on Laboratory Animal of Standardization Administration of China. Laboratory animal-Genetic quality control of mammalian laboratory animals: GB 14923-2010 [S]. 2010.

[8] International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice, Rat Genome and Nomenclature Committee. Guidelines for nomenclature of mouse and rat strains [EB/OL]. [2016-01]. http://informatics.jax.org/nomen/strains.shtml

[9] Hau J, Schapiro SJ. Handbook of Laboratory Animal Science, Second Edition: Animal Models, Volume II (Handbook of Laboratory Animal Science) [M]. CRC Press; 2002.

[10] Chia R, Achilli F, Festing MFW, et al. The origins and uses of mouse outbred stocks [J]. Nat Genet, 2005, 37(11): 1181-1186.

[11] Kinoshita M, Murata K, Naruse K, et al. Medaka: biology, management, and experimental protocols [M]. John Wiley & Sons; 2009.

[12] Streisinger G, Walker C, Dower N, et al. Production of clones of homozygous diploid zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. Nature, 1981, 291(5813): 293-296.

[13] Haffter P, Granato M, Brand M, et al. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio* [J]. Development, 1996, 123(1): 1-36.

[14] Knapik EW, Goodman A, Atkinson OS, et al. A reference cross DNA panel for zebrafish (*Danio rerio*) anchored with simple sequence length polymorphisms [J]. Development, 1996, 123(1): 451-460.

[15] Nechiporuk A, Finney JE, Keating MT, et al. Assessment of polymorphism in zebrafish mapping strains [J]. Genome Res, 1999, 9(12): 1231-1238.

[16] Rauch GJ, Granato M, Haffter P. A polymorphic zebrafish line for genetic mapping using SSLPs on high-percentage agarose gels [J]. Tech Tips Online, 1997, 2(1): 148-150.

[17] Spence R, Gerlanch G, Lawrence C, et al. The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio* [J]. Biol Rev Camb Philos Soc, 2008, 83(1): 13-34.

[18] Lafave MC, Varshney GK, Vemulapalli M, et al. A defined zebrafish line for high-throughput genetics and genomics: NHGRI-1 [J]. Genetics, 2014, 198(1): 167-170.

[19] Shinya M, Sakai N. Generation of highly homogeneous strains of zebrafish through full sib-pair mating [J]. G3 (Bethesda), 2011, 1(5): 377-386.

[20] Spitsbergen JM, Buhler DR, Peterson TS. Neoplasia and neoplasm-associated lesions in laboratory colonies of zebrafish emphasizing key infl uences of diet and aquaculture system design [J]. ILAR J, 2012, 53(2): 114-125.

[21] Higaki S, Kawakami Y, Eto Y, et al. Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions [J]. Cryobiology, 2013, 67(3): 374-382.

[22] Sanders GE, Batts WN, Winton JR. Susceptibility of zebrafish (*Danio rerio*) to a model pathogen, spring viremia of carp virus [J]. Comp Med, 2003, 53(5): 514-521.

[23] Morizot DC, Wright DA, Siciliano MJ. Three linked enzyme loci in fishes: Implications in the evolution of vertebrate chromosomes [J]. Genetics, 1977, 86(3): 645-656.

[24] Shikano T, Taniguchi N. Using microsatellite and RAPD markers to estimate the amount of heterosis in various strain combinations in the guppy (*Poecilia reticulata*) as a fish model [J]. Aquaculture, 2002, 204(3): 271-281.

[25] Nakajima M, Taniguchi N. Genetics of the guppy as a model for experiment in aquaculture [J]. Genetica, 2001, 111(1-3): 279-289.

[26] 蔡磊, 余露军, 陈小曲, 等. 诸氏鳊虾虎鱼转录组序列中微卫星标记的初步筛选及特征分析 [J]. 生物技术通报, 2015, 31(9): 146-151.
Cai L, Yu LJ, Chen XQ, et al. A preliminary screening and characteristic analysis of microsatellite markers from transcriptome sequences in *Mugilogobius chulae* [J]. Biotechnol Bull, 2015, 31(9): 146-151.

[27] 蔡磊, 陈小曲, 郑伟强, 等. 诸氏鳊虾虎鱼多态性微卫星标记的开发及评价[J]. 中国实验动物学报, 2015, 23(1): 57-62.
Cai L, Chen XQ, Zheng WQ, et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Mugilogobius chulae* [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2015, 23(1): 57-62.

[28] 顾党恩, 王剑伟. 应用微卫星标记对稀有鮈鲫封闭群建群过程的遗传监测[J]. 水生生物学报, 2012, 36(2): 197-204.
Gu DE, Wang JW. Application of microsatellite marker in genetic monitoring on the foundation of a closed colony of *Gobiocypris rarus*[J]. Acta Hydrobiol Sin, 2012, 36(2): 197-204.

[29] 王剑伟, 曹文宣. 中国本土鱼类模式生物稀有鮈鲫研究应用的历史与现状[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 20-33.
Wang JW, Cao WX. *Gobiocypris rarus* as a Chinese native model organism: history and current situation [J]. Asian J Ecotoxicol, 2017, 12(2): 20-33.

[30] 冯书堂, 高倩, 刘岚. 哺乳动物近交系资源创新百年[J]. 遗传, 2016, 38(3): 181-195.

Feng ST, Gao Q, Liu L. 100-year-innovation in resources of mammalian inbred strains [J]. Hereditas, 2016, 38(3): 181-195.

[31] International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice, Rat Genome and Nomenclature Committee. Rules for nomenclature of inbred strains. [EB/OL]. [2010-09]. https://rgd.mcw.edu/nomen/rules-for-nomen.shtml

[32] Orger M, Patton EE, Kawakami K. Zebrafish: Methods and Protocols [M]. Humana Press; 2016.

[33] Bradley KM, Elmore JB, Breyer JP, et al. A major zebrafish polymorphism resource for genetic mapping [J]. Genome Biol, 2007, 8(4): R55.

[34] Kottler VA, Fadeev A, Weigel D, et al. Pigment pattern formation in the guppy, *Poecilia reticulata*, involves the Kita and Csf1ra receptor tyrosine kinases [J]. Genetics, 2013, 194(3): 631-646.

[35] Dawley R, Rupprecht J, Schultz R. Genome size of bisexual and unisexual Poeciliopsis [J]. J Hered, 1997, 88(3): 249-252.

[36] Woodhead AD, Scully PM. A comparative study of the pretumorous thyroid gland of the gynogenetic teleost, *Poecilia formosa*, and that of other poeciliid fishes [J]. Cancer Res, 1977, 37(10): 3751-3755.

[37] Kelley JL, Yee MC, Brown AP, et al. The genome of the self-fertilizing Mangrove rivulus fish, *Kryptolebias marmoratus*: A model for studying phenotypic plasticity and adaptations to extreme environments [J]. Genome Biol Evol, 2016, 8(7): 2145-2154.

[38] 吴淑勤, 黄志斌. 水生实验动物:剑尾鱼 [M]. 中国农业出版社; 2005.
Wu SQ, Huang ZB. Aquatic laboratory fish — swordtail fish (*Xiphophorus hellerii*) [M]. China Agriculture Press; 2005.

[39] 吴端生, 王宗保, 张轩杰, 等. 红鲫近交系的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2001, 9(2): 113-118.
Wu DS, Wang ZB, Zhang XJ, et al. Production of clones of homozygous diploid carrassius aurratus Red Variety [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2001, 9(2): 113-118.

[40] Sakaizumi M, Moriwaki K, Egami N. Allozymic variation in wild populations of the fish, *Oryzias latipes* [J]. Copeia, 1983, 1983(2): 311-318.

[41] Wittbrodt J, Shima A, Schartl M. Medaka—a model organism from the far East [J]. Nat Rev Genet, 2002, 3(1): 53-64.

[42] The Xiphophorus genetic stock center manual [EB/OL]. [2006]. https://gato-docs.its.txstate.edu/xiphophorus-genetic-stock-center/docs/Manual/Production-Copy/Production%20Copy.pdf

[43] Scholl A, Anders F. Biochemical evolution in the genus *Xiphophorus* (Poeciliidae, Teleostei) [M]. Genetics and Mutagenesis of Fish. Springer; 1973.

[44] 邵燕, 王剑伟, 何勇凤, 等. 稀有鮈鲫近交系微卫星多态性分析 [J]. 水生生物学报, 2009, 33(4): 649-655.
Shao Y, Wang JW, He YF, et al. The application of microsatellite markers on genetic quality control of an inbred strain of *Gobiocypris rarus* [J]. Acta Hydrobiol Sin, 2009, 33(4): 649-655.

[45] Tave D. Inbreeding and brood stock management [M]. Food and Agriculture Organization of the UN; 1999.

[46] CCAC guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing [EB/OL]. [2005]. http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf.

[47] Guidance on the housing and care of Zebrafish. [EB/OL]. [2011-05]. https://www.scilifelab.se/wp-content/uploads/2013/10/Guidance-zebrafish.pdf.

[48] Ostrander GK. The laboratory fish [M]. Elsevier; 2000.

[49] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*) [M]. University of Oregon Press; 1994.

[收稿日期] 2019-11-28

余露军,李建军,蔡磊,等. 实验鱼质量控制标准研制的思考与建议[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 115-122.
Yu LJ, Li JJ, Cai L, et al. Suggestions for the development of experimental fish quality control standards [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 115-122.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.017

实验鱼质量控制标准研制的思考与建议

余露军,李建军,蔡磊,魏远征,苗宗余,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】 实验鱼作为重要的实验材料,在生命科学、医学以及水环境安全性评价等研究中发挥着越来越重要的作用。目前,国内实验鱼生产量和研究队伍发展迅速,实验鱼的使用量也逐年上升,但实验鱼质量良莠不齐,可能对科学实验结果造成严重影响,因此迫切需要制定实验鱼质量控制标准对其生产加以规范和引导。本文就实验鱼质量控制及其研究现状进行综述,以期为实验鱼质量控制标准的制定提供建议和参考。

【关键词】 实验鱼;质量控制;建议
【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2020) 01-0115-08

Suggestions for the development of experimental fish quality control standards

YU Lujun, LI Jianjun, CAI Lei, WEI Yuanzheng, MIAO Zongyu, HUANG Ren*

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

Corresponding author: HUANG Ren. E-mail: 1649405216@qq.com

【Abstract】 As an important experimental subject, experimental fish play an increasingly important role in life science, medicine, and water environment safety evaluation. At present, domestic production and research teams of experimental fish are expanding rapidly; the use of experimental fish is increasing yearly. However, the quality of the experimental fish is inconsistent, which may have a serious impact on the result of scientific experiments. Therefore, there is an urgent need to formulate experimental fish quality control standards to regulate and guide their production. This paper reviews the quality control of experimental fish and its research status, and provides suggestions and references for the development of experimental fish quality control standards.

【Keywords】 experimental fish; quality control; suggestion
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

实验动物被国际学界公认为“活的精密仪器”,质量控制及其标准化是实验动物的必然要求。鱼类具有种类多、繁殖力强、遗传容易控制、饲育设施要求简单等诸多优点,实验鱼在遗传学、发育生物学、毒理学、生态学等研究中应用广泛[1-2],全球实验鱼用量仅次于大小鼠,我国仅斑马鱼生产和使用单位已超过 300 家,但实验鱼质量良莠不齐,相关试验结果可靠性难以保障,迫切需要制定质量控制标准加以规范和引导。

国家标准化管理委员会下达的《2009 年第二批国家标准制修订计划的通知》批准制定《实验动物 鱼类环境与质量控制标准》,技术归口单位为全国实验动物标准化技术委员会(SAC/TC281),计划编号为 20091329-T-469,起草单位为广东省实验动物

[基金项目]国家科技支撑计划项目(2015BAI09B05)。
Funded by National Key Technologies R&D Program of China (2015BAI09B05).
[作者简介]余露军(1982—),男,硕士,工程师,研究方向:水生实验动物微生物学。Email: ljyu1212@163.com
[通信作者]黄韧(1959—),男,博士,研究员,研究方向:实验动物学。Email:1649405216@qq.com

监测所(以下简称“动监所”)、中国科学院水生生物研究所国家斑马鱼资源中心(以下简称“CZRC”)、中国水产科学研究院珠江水产研究所(以下简称“珠江所”)、上海实验动物研究中心(以下简称“动物中心”)、中国医学科学院医学实验动物研究所。CZRC 负责斑马鱼(*Danio rerio*)研究资源的收集、保藏和分享,在遗传分析、繁殖技术及病原控制上有良好的工作积累,也是国内斑马鱼品系保存量最多的单位[3]。动物中心长期开展斑马鱼病原、养殖环境等方面的研究工作。珠江所于 1987 年开始剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)实验动物化研究,在剑尾鱼生物学特性、病原、营养和环境要求等方面积累了大量数据,剑尾鱼 RR-B 近交系为我国自主培育的第一个超过 20 代的近交鱼[4]。动监所自 1997 年开始诸氏鲻虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*)实验动物化研究,先后建立了虾虎鱼遗传、微生物、营养和环境需求等质控方法,是目前国际上实验动物化程度最高的海水实验鱼类[2]。本文以上述单位研究工作为基础,综述实验鱼质控标准研究现状,以期为我国实验用斑马鱼、剑尾鱼、虾虎鱼质量控制标准的制定提供建议和参考。

1 研究背景与现状

1.1 我国实验鱼质量控制现状

目前,来自观赏鱼市场或自然水域的实验鱼直接应用于科学研究的现象难以杜绝,不同实验室间相互引种复壮也常有发生,导致实验鱼遗传背景混乱。另外,由于场地和经费的限制,大部分实验鱼房为开放环境,鱼房条件、病原控制措施以及风险防范意识差异较大。对国内 19 个实验鱼代表性实验室的调研结果显示,烈性传染病虽极少发生,但实验鱼病害问题也较为普遍,如斑马鱼常见病害及其在各实验室的发生率为:竖鳞病(67%)、红鳃病(50%)、下颌红鳃(42%)、脊椎弯曲(25%)、烂尾(25%)、游动异常(25%)、白点病(8%);除 CZRC 等少数实验室坚持开展病原监测外,很多实验室对此重视不够,实验鱼疾病发生、传播风险较大。

各实验室对实验鱼养殖设施和水环境控制较为重视,大多具有较好的硬件基础,除红鲫、剑尾鱼采用自制玻璃缸并配套水处理养殖系统外,其他更小个体实验鱼的养殖均为商品化的循环水养殖系统,配套水质过滤、硝化处理、紫外消毒等水处理措施,部分斑马鱼养殖系统还配备了超滤、反渗透、电导率自动调节及监控设备。大部分实验室关注水温、pH、电导率三个水环境指标,而对非离子氨、亚硝酸盐等水质指标检测较少;而鱼房环境指标则主要是通过空调和抽风机进行温度和湿度控制,以满足实验鱼和实验人员的基本需求。

1.2 国内外实验鱼质量控制标准研究现状

欧美等国制订一系列实验鱼使用指南,如《Guidelines on: the care and use of fish in research, teaching and testing》(研究、教学和测试用鱼的使用和管理指南,加拿大动物保护协会,2005)[5]、《Guidelines for the Use of Fishes in Research》(研究用鱼使用指南,美国,2014)[6]、《Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research》(研究用鱼的健康和福利监测指南,挪威,2006)[7]、《A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Brachydanio Rerio*)》(实验室使用斑马鱼指南,美国,2000)[8]、《Guidance on the housing and care of zebrafish》(斑马鱼养殖和管理指南,英国,2013)[9]等。但上述指南多是原则性的(提出一些基本要求)或资料性的(方向性建议、指导),多数指标参数未明确规定,不利于规范执行。

在国内,2009 年《实验动物 鱼类环境与质量控制标准》国家标准(20091329-T-469)获得立项;2013 年 12 月 20 日北京市质量技术监督局发布了实验用鱼质量控制地方标准,包括实验用鱼 微生物学等级及监测、寄生虫学等级及监测、遗传质量控制、病理诊断、配合饲料、环境条件 6 个部分[10-15];2016 年 12 月 29 日湖南省质量技术监督局批准发布了《实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制》(DB43/T 1191-2016)[16]。

2 实验鱼质量控制标准研究的思考

2.1 种质

2.1.1 种质鉴定的必要性

“种”的准确是实验动物的基本要求,也是动物实验结果可信的前提。通过数据库(www.fishbase.org)检索发现斑马鱼、剑尾鱼和诸氏鲻虾虎鱼同属的已定种分别有 20 种、28 种和 31 种,部分近缘种体型、体色极其相似,且部分种间可能无生殖隔离。为了解国内斑马鱼、剑尾鱼和诸氏鲻虾虎鱼种质资源状况,工作组对国内实验鱼使用单位及观赏鱼交易市场进行实地调研和取样,结果表明国内存在大量 *Danio* 属、*Xiphophorus* 属和 *Mugilogobius* 属鱼类。利用形态学和分子生物学方法对采集样本进行种质鉴定,已鉴定出 *Danio* 属鱼类有 6 种(其中 5 种可定种)、*Xiphophorus* 属鱼类 2 种、*Mugilogobius* 属鱼类 2 种。根据采集的样本发现 *Danio* 属其他鱼类与斑

马鱼体型非常相似;采集的 2 种 *Xiphophorus* 属在体色、体型上与剑尾鱼相似,且已证实市场上存在剑尾鱼(*X. helleri*)和月光鱼(*X. maculatus*)的杂交种;2 种 *Mugilogobius* 属鱼类(*M. abei*, *M. myxodermus*)不仅在体型体色上与诸氏鳗虾虎鱼相似,且部分生态位重叠,极易发生混杂。因此,引进实验鱼时有必要进行种质鉴定。

2.1.2　种质鉴定方法

传统形态学鉴定虽为经典的物种分类方法,但由于实验鱼可量性状和一些质量性状在不同养殖条件下可能出现较大差异,本标准仅将形态学中的可数性状作为检测指标。同时,线粒体 DNA 条形码序列是一段位于细胞色素 C 氧化酶亚单位 I(COI)基因 5'端 655 bp 的序列,Hebert 等[17]于 2003 年首次提出 DNA 条形码概念,随后启动了全球动物物种 DNA 条形码测序计划,现在已经建立了以线粒体 COI 基因序列为依据的 DNA 条形码数据库(http://www.boldsystems.org)并广泛应用于物种鉴定,因此建议将 DNA 条形码检测方法作为实验鱼形态鉴别不可检验时的补充方法。

Hebert 等[17]将 DNA 条形码序列歧义度小于 2.7%作为鸟类种内判别阈值;Lambert 等[18]研究结果显示种内 DNA 条形码序列歧义度在 0% ~ 1.24%之间;通常认为 DNA 条形码序列歧义度种内差异小于 1%[19]。本实验室对市场采集的鱼类进行 DNA 条形码检测,*Danio* 属样本与斑马鱼、*Xiphophorus* 属样本与剑尾鱼、*Mugilogobius* 属样本与诸氏鳗虾虎鱼序列歧义度差异均极显著($P < 0.01$),斑马鱼、剑尾鱼、诸氏鳗虾虎鱼种内 DNA 条形码序列歧义度 0% ~ 0.76%(未发表数据),但考虑到样本量有限,且国内实验鱼使用单位较多,来源也较复杂,因此建议实验鱼种内 DNA 条形码序列歧义度阈值定为 1%。

2.2　遗传质量管理

实验鱼培育过程中存在遗传污染、突变、漂变等情况,有必要对实验鱼遗传质量进行管理。国内 19 个代表性实验室调研结果表明,各实验室对实验鱼遗传质量关注度不高,检测方法尚不成熟,均不进行日常遗传质量检测,仅实验鱼基因插入或敲除时才会对特定基因进行检测。文献发现,国外暂无实验鱼遗传质量检测标准,仅少量实验室利用微卫星分子标记开展实验鱼遗传多样性评价。由此可见,遗传质量检测仍为当前实验鱼质量控制中的薄弱环节,鉴于国家标准的通用性、实用性和可操作性,建议通过遗传管理措施,尽可能保证实验鱼遗传质量,具体措施如:①实验鱼种源宜引自行业认可的实验鱼种源单位或实验室;②引种数量和传代方式宜根据实验鱼应用方向确定,如需保持群体较高遗传杂合度,引种数量应不少于 25 对,采用非近亲交配方式繁殖后代;③如需保持群体较高遗传纯合度,引种数量根据需要确定,采用全同胞兄妹、雌核发育等方式繁殖后代;④实验鱼引种、传代过程应建立包括种名、来源、数量、雌雄比例、繁殖生产情况等信息的谱系档案;⑤常用实验鱼最佳繁殖年龄均在 6 ~ 15 月龄,此阶段实验鱼繁殖量大、产卵质量最佳,传代亲本宜选自此阶段的实验鱼。

2.3　微生物和寄生虫

实验鱼疾病直接影响实验鱼的养殖成功与否,同时会引起实验鱼生理生化指标异常,从而影响实验鱼在免疫学、毒理学等领域的应用[20-22],部分病原还可能危及实验人员健康[23]。实验鱼病原控制指标,首先应符合我国动物疫病相关法规规定,不能携带人鱼共患病原,同时需对实验鱼传染性强、致死率高的病原加以控制。

2.3.1　斑马鱼病原控制指标与要求

CZRC 连续多年病原检测服务结果表明,嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)是引起斑马鱼败血症的主要病原;动物中心对上海地区斑马鱼病原检测结果也证实嗜水气单胞菌为实验室内检出率和致死率较高的病原[24]。值得注意的是,嗜水气单胞菌为条件致病菌,广泛栖息于自然水体中,有致病株和无毒株之分[25]。鉴于致病性嗜水气单胞菌对斑马鱼具有较大的危害性,且为 2008 年农业部公告《一、二、三类动物疫病病种名录》(以下简称"疫病名录")规定的二类水生动物疫病(细菌性败血症)的病原,属于可能造成重大经济损失,需要采取严格控制、扑灭等措施,防止扩散的病原,因此建议将致病性嗜水气单胞菌规定为斑马鱼必检指标。

国外学者研究表明,多种分枝杆菌能自然感染斑马鱼,引起斑马鱼内脏器官肉芽肿等病变,但只有海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)对斑马鱼具有高致病性[26-28]。CZRC、珠江所以及国际斑马鱼中心(https://zebrafish.org/wiki/health/disease_manual/bacterial_diseases)检测结果显示,海分枝杆菌是实验室内斑马鱼常见病原,影响斑马鱼正常繁殖,甚至导致斑马鱼死亡。同时,海分支杆菌还属于人鱼共患病原,国外已有感染实验人员的报道[23]。基于海分支杆菌对斑马鱼和实验人员的危害考虑,建议将海分支杆菌规定为斑马鱼必检指标。

迟缓爱德华氏菌(*Edwardsiella tarda*)为我国

“疫病名录”规定的三类水生动物疫病的病原,可通过饮食或创口接触等感染人类,属于人鱼共患病病原[29]。刘春等[30]研究结果表明,迟缓爱德华菌能自然感染野生斑马鱼,引起斑马鱼大量死亡,但实验室内斑马鱼尚无感染该病原的报道。鉴于迟缓爱德华菌对实验室内斑马鱼潜在的传播感染风险,建议将迟缓爱德华菌规定为斑马鱼必要时检测指标。

多子小瓜虫(*Ichthyophthirius multifiliis*)是水产养殖以及观赏鱼行业最为严重的病原之一,为我国“疫病名录”规定的三类水生动物疫病的病原[31]。斑马鱼对该病原敏感,感染会导致大量死亡[32]。调研发现国内个别实验室发生过引种未经隔离的斑马鱼感染多子小瓜虫,造成大量死亡的案例。鉴于多子小瓜虫对斑马鱼危害极大,常造成毁灭性的损失,建议将其规定为斑马鱼必检指标。

微孢子虫(*Pseudoloma neurophilia*)是斑马鱼最常见的病原之一[33-34],CZRC 和珠江所均从斑马鱼检出过该病原。斑马鱼感染初期并无明显症状,只有严重感染时,才会导致斑马鱼脊椎弯曲,影响斑马鱼神经生物学和骨骼发育生物学等方面的研究结果[35]。综合微孢子虫的危害程度和国内检出情况,建议将微孢子虫规定为斑马鱼必要时检测指标。

此外,柱状黄杆菌(*Flavobacterium columnare*)、温和气单胞菌(*Aeromonas sobria*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)等病原感染实验室内斑马鱼的情况也偶有发生(http://www.zfish.cn/inforscan/252.html),但仅水质异常、鱼体受伤等情况下出现,建议根据养殖状况进行适时自查与监测。

2.3.2 剑尾鱼病原控制指标与要求

珠江所对剑尾鱼 20 多年病原研究结果显示,实验室内剑尾鱼病原菌主要有嗜水气单胞菌、柱状黄杆菌、温和气单胞菌等[4,36],其中嗜水气单胞菌感染引起的细菌性败血症危害较大,而其他病原大多在水质异常、鱼体损伤时易发生继发性感染。剑尾鱼寄生虫病原有多子小瓜虫、车轮虫等,但多与水源及外来生物携带病原有关,实验室内管理得当情况下较少发生[4,37]。鉴于致病性嗜水气单胞菌和多子小瓜虫分别为我国“疫病名录”规定的二类和三类水生动物疫病病原,且对剑尾鱼具有较强的致病性,建议将致病性嗜水气单胞菌和多子小瓜虫规定为剑尾鱼必检指标,其他病原根据养殖状况适时检测。

2.3.3 虾虎鱼病原控制指标与要求

动监所对虾虎鱼病原调查结果表明,致病性嗜水气单胞菌、迟缓爱德华菌和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)在野外和驯养环境下能自然感染虾虎鱼,引起虾虎鱼出血、溃烂等病症,其中迟缓爱德华菌对虾虎鱼具有强致病性[38-39],但实验室内虾虎鱼封闭群连续多年监测均未检出上述致病菌[2],表明这些病原可能为野外环境条件下的条件致病菌。鉴于致病性嗜水气单胞菌和迟缓爱德华菌分别为我国“疫病名录”规定的二类和三类水生动物疫病的病原,且考虑到迟缓爱德华菌对虾虎鱼的强致病性,建议将致病性嗜水气单胞菌和迟缓爱德华菌规定为虾虎鱼必检指标,将创伤弧菌规定为虾虎鱼必要时检测指标。此外,在驯养过程中,老龄化虾虎鱼偶有眼点淀粉卵涡鞭虫(*Amyjoodiniurn ocellaturn*)感染的情况,且考虑到刺激隐核虫(*Cryptocaryon irritans*)对海水鱼类危害极大,为我国“疫病名录”规定的二类水生动物疫病的病原,因此建议将刺激隐核虫规定为虾虎鱼必检指标,眼点淀粉卵涡鞭虫为必要时检测指标。

2.4 饲料质量要求

实验动物饲料质量与实验动物质量密切相关。已有不少学者在实验鱼的营养需求和饲料配方等方面开展了研究工作,如魏远征等[40-41]研究了虾虎鱼饲料营养需求,确定了虾虎鱼饲料配方;吴淑勤等[4]研究了剑尾鱼饲料营养需求,并比较了投喂配合饲料与生物饵料对剑尾鱼性腺发育的影响,探讨了配合饲料投喂策略;杭州环特生物科技有限公司对斑马鱼开口饲料营养需求和配方开展了研究;美国 Zeigler 公司生产斑马鱼专用饲料。然而,由于配合饲料仅少量实验室采用,需求量少,商品化生产较为困难,加之大量研究表明投喂生物饵料的实验鱼在生长速度和存活率方面明显优于人工配制的微粒饲料,尤其在开口阶段[42],因此国内现有实验鱼生产和养殖过程中仍以生物饵料为主。生物饵料包括轮虫、卤虫、草履虫以及桡足类和枝角类等,其中轮虫、卤虫、草履虫是最常使用的生物饵料。生物饵料携带病原微生物可能感染实验鱼,影响实验鱼质量和存活。为防止生物饵料引入病原,建议生物饵料应以不携带实验鱼应排除的微生物和寄生虫作为基本要求,且其培育用海水应符合 NY 5052 的规定,淡水应符合 GB 5749 的规定,以免有毒有害物质通过食物链传递至实验鱼。

2.5 环境指标及要求

养殖环境对实验鱼具有重要影响,如水温直接影响鱼类生长、繁殖及免疫能力等各项生理活动,

适宜的水温是鱼类生存和健康的重要保障[43-45]；pH 则会引起鳃组织损伤，降低精子活力，破坏卵膜结构，对鱼类生长发育、繁殖产生重要影响[46-47]；盐度直接影响渗透压调节，与鱼类生长、繁殖、疾病及存活密切相关[48-49]；溶解氧是鱼类生存和生长发育的关键因子，水体溶解氧过低，会导致鱼体缺氧，从而影响其摄食率、消化率、免疫力等，严重时窒息死亡[50]；非离子氨和亚硝酸盐不仅影响鱼类血液指标和免疫机能，严重时还会导致鱼类中毒死亡[51-52]。虽然鱼类生活在水中，但光照强度和光周期对鱼类繁殖和疾病等方面也具有重要影响[53]。基于上述研究结果，建议实验鱼质量控制标准对养殖水温、日水温差、电导率、pH、溶解氧、盐度、非离子氨、亚硝酸盐、水面照度及明暗交替时间等水环境指标进行控制，同时对饲养间温度、最低工作照度、噪声等环境指标进行规定。

2.5.1　饲养间环境指标

（1）室温和日室温差：饲养间温度超出要求的水温范围较多或日室温差较大，则水温难以控制，故需控制饲养间气温和日室温差。考虑到水体比热容较大，水温昼夜温差波动幅度较气温小，为降低能耗，饲养间温度控制范围可略大于水温（±2℃），建议日室温差不超过 6℃。

（2）噪声：大量研究表明，鱼类对长期的噪音具有适应能力[54-56]。Matthews 等[53]、Barney 等[57]研究表明斑马鱼能适应养殖房的水泵、水流等环境噪音，音乐等噪音也不会引起斑马鱼的异常行为反应。斑马鱼在 70 dB 噪声持续刺激下，其行为（运动速度和转次）无明显变化[58]；虹鳟分别在 117 dB 和 149 dB 噪声暴露 5 个月后，平均体重、体长、特定生长速率、肥满度、饲料利用率及成活率均无显著差异[59]。国外实验室对斑马鱼生产和使用过程中环境噪音的管理通常是基于人类的健康和舒适度而定[53]。GB 22337-2008《社会生活环境噪声排放标准》规定社会生活噪声排放昼间限值为 70 dB，实验鱼饲养间实测噪声大多为 60 ~ 67 dB，此噪声下实验鱼的行为、生长及繁殖指标均无异常。因此，建议实验鱼饲养间噪声应 ≤ 70 dB。

（3）最低工作照度：工作照度是满足管理操作人员工作需求的照度，实验鱼与陆生实验动物管理人员的工作照度需求一致，建议参照 GB 14924-2010《实验动物　环境及设施》设定工作照度应≥200 lx。

2.5.2　水环境指标

（1）水温：Spence 等[60]对孟加拉国斑马鱼原产地 9 个不同地区的水温监测结果显示，斑马鱼原产地水温范围为 16.5 ~ 33℃，表明斑马鱼对温度具有广泛性的适应性；Matthews 等[53]研究结果表明斑马鱼养殖水温在 24 ~ 30℃状态最佳，建议斑马鱼养殖水温宜为 24 ~ 30℃。根据吴淑勤等[4]研究结果，建议剑尾鱼水温宜为 20 ~ 30℃。同时，根据动监所近 20 年的养殖实践，建议虾虎鱼水温宜为 22 ~ 30℃。

（2）日水温差：鱼类属于变温动物，体温随着水温的升降而变化，因此水温波动会引起鱼体一系列应激反应，易导致实验鱼发病、甚至死亡。理论上日水温差越小越好，但结合养殖实践和可操作性，建议日水温差控制在 4℃内较合适。

（3）电导率：Avdesh 等[61]推荐斑马鱼电导率适宜范围为 300 ~ 1500 μS/cm；根据国内主要斑马鱼和剑尾鱼养殖鱼房调研结果，其养殖水电导率控制在 500 μS/cm 左右。由于养殖水源的地域性差异，考虑可操作性，建议斑马鱼和剑尾鱼养殖水电导率范围为 300 ~ 1500 μS/cm。

（4）pH：根据 Avdesh 等[61]研究结果，斑马鱼适宜 pH 范围为 6.8 ~ 7.5；《剑尾鱼养殖手册》推荐剑尾鱼适宜 pH 范围为 6.8 ~ 8.3[62]；GB 11607-89《渔业水质标准》规定海水鱼养殖 pH 值范围为 7.0 ~ 8.5，而天然海水的 pH 值常稳定在 7.9 ~ 8.4。根据养殖实践，建议虾虎鱼 pH 值控制在 7.0 ~ 8.5。

（5）溶解氧：GB 11607-89《渔业水质标准》要求海淡水鱼溶解氧每天必须有 16 h 以上大于 5 mg/L，其余任何时候不得低于 3 mg/L。为保障实验鱼质量，建议实验鱼循环养殖系统中养殖水溶解氧大于 5 mg/L。由于实验鱼仔鱼为半静水养殖，生物饵料、残饵和粪便会导致水体溶氧降低，但增氧可能影响实验鱼仔鱼的活动，结合实践情况，建议实验鱼仔鱼静水养殖溶解氧不低于 3 mg/L。

（6）盐度：李建军等[63]研究表明，虾虎鱼繁殖适宜盐度范围为 10.0 ~ 20.0，生长盐度适宜范围为 0.0 ~ 40.0，而世界大洋的平均盐度为 35.0，故建议虾虎鱼养殖盐度宜为 10.0 ~ 35.0。

（7）非离子氨浓度：GB 11607-89《渔业水质标准》规定分子态氨浓度应小于 0.02 mg/L，这是理想、安全的水质氨指标，氨浓度在 0.02 mg/L 以下时一般不会导致鱼类发病。而海水鱼类对氨氮具有一定的耐受性，虾虎鱼氨氮的安全浓度为 0.91 mg/L[64]，可适当提高海水实验鱼的非离子氨浓度限值。因此，建议斑马鱼、剑尾鱼养殖水非离子氨浓度 ≤ 0.02 mg/L，虾虎鱼非离子氨≤0.04 mg/L。

(8)亚硝酸盐浓度:亚硝酸盐是氨转化为硝酸盐过程中的中间产物,亚硝酸盐对鱼类有毒性。水体中亚硝酸盐浓度过高时,可通过渗透与吸收作用进入鱼类血液,将鱼红血球中的血红蛋白转化为高铁血红蛋白,从而使血液丧失载氧能力。一般淡水中亚硝酸盐浓度 ≤ 0.2 mg/L 对鱼类无毒性[61],较高的盐浓度(较高的离子强度)能减低亚硝酸对鱼的毒性,即海水中亚硝酸盐毒性较小,故虾虎鱼推荐亚硝酸盐≤ 0.4 mg/L。

(9)水面照度及昼夜明暗交替时间:斑马鱼适宜的水面照度为 54 ~ 324 lx,明暗交替时间 14 h / 10 h[53];根据国内外研究结果和国内实验鱼房调研情况,昼夜明暗交替时间 14 h / 10 h 是目前最常用的参数。剑尾鱼和虾虎鱼水面照度及昼夜明暗交替时间参照斑马鱼范围,可正常繁殖和生长。因此,建议斑马鱼、剑尾鱼、虾虎鱼水面照度为 54 ~ 324 Lux,明暗交替时间 14 h / 10 h。

3 展望

近年,随着实验鱼在科学研究中的广泛应用,我国实验鱼科研队伍及养殖规模也在逐年扩大。然而,由于无统一的实验鱼质量控制方法加以规范,各实验鱼研究人员的专业背景、研究方向各不相同,其对实验鱼质量控制的理念和认知存在一定差异,导致国内实验鱼的质量良莠不齐,不利于我国实验鱼的开发、应用。目前,斑马鱼、剑尾鱼、虾虎鱼在种质、遗传、微生物和寄生虫、饲料及环境质量控制方面已开展大量前期研究,并在实验鱼养殖过程中得到反复实践验证,建议加快推进实验鱼质控标准制定进度,为规范我国实验鱼的生产和使用提供依据;同时也为提高我国实验鱼质量、促进我国科学研究水平提供保障。

参 考 文 献(References)

[1] 贾顺姬, 孟安明. 中国斑马鱼研究发展历程及现状[J]. 遗传, 2012, 34(9): 1082-1088.
Jia SJ, Meng AM. The development of zebrafish research in China [J]. Hereditas, 2012, 34(9): 1082-1088.

[2] 李建军, 余露军, 蔡磊, 等. 诸氏鳗虾虎鱼实验动物化研究进展[J].中国实验动物学报, 2018, 26(4): 493-498.
Li JJ, Yu LJ, Cai L, et al. Advances in research on *Mugilogobius chulae*, a laboratory marine fish resource [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 493-498.

[3] 李阔宇, 潘鲁溪, 孙永华. 斑马鱼资源的开发保藏与国家斑马鱼资源中心[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6): 93-98.
Li KY, Pan LY, Sun YH. Development and maintenance of zebrafish resources, and the China Zebrafish Resouce Center [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2014, 22(6): 93-98.

[4] 吴淑勤, 黄志斌, 李凯彬, 等. 水生实验动物—剑尾鱼 [M]. 北京: 中国农业出版社; 2005.
Wu SQ, Huang ZB, Li KB, et al. Aquatic laboratory animal—*Xiphophorus helleri* [M]. Beijing: China Agricultural Press; 2005.

[5] CCAC guidelines on the care and use of fish in research, teaching and testing [EB/OL]. [2005]. http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Fish.pdf.

[6] Use of Fishes in Research Committee. Guidelines for the use of fishes in research [M]. American Fisheries Society; 2014.

[7] Johansen R, Needham JR, Colquhoun DJ, et al. Guidelines for health and welfare monitoring of fish used in research [J]. Lab Anim, 2006, 40(4): 323-340.

[8] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*) [M]. University of Oregon Press; 1994.

[9] Guidance on the housing and care of Zebrafish. [EB/OL]. [2011-05]. https://www.scilifelab.se/wp-content/uploads/2013/10/Guidance-zebrafish.pdf.

[10] 北京市科学技术委员会. 实验用鱼 第 1 部分:微生物学等级及监测:DB11/T 1053.1-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 1: Microbiological standards and monitoring: DB11/T 1053.1-2013 [S]. 2013.

[11] 北京市科学技术委员会. 实验用鱼 第 2 部分:寄生虫学等级及监测: DB11/T 1053.2-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 2: Parasitological standards and monitoring: DB11/T 1053.2-2013 [S]. 2013.

[12] 北京市科学技术委员会. 实验用鱼 第 3 部分:遗传质量控制: DB11/T 1053.3-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 3: Genetic quality control: DB11/T 1053.3-2013 [S]. 2013.

[13] 北京市科学技术委员会. 实验用鱼 第 4 部分:病理学诊断规范:DB11/T 1053.4-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 4: Specification of pathological diagnosis: DB11/T 1053.4-2013 [S]. 2013.

[14] 北京市科学技术委员会. 实验用鱼 第 5 部分:配合饲料技术要求:DB11/T 1053.5-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 5: Technical quality standard for formula feeds: DB11/T 1053.5-2013 [S]. 2013.

[15] 北京市科学技术委员会. 实验用鱼 第 6 部分:环境条件: DB11/T 1053.6-2013 [S]. 2013.
Beijing Municipal Science & Technology Commission. Laboratory fish Part 6: Environment and housing facilities: DB11/T 1053.6-2013 [S]. 2013.

[16] 湖南省质量技术监督局. 实验鱼类 实验红鲫 C1HD 系遗传质量控制:DB43/T 1191-2016 [S]. 2016.
Hunan Provincial Bureau of Quality and Technical Supervision.

Laboratory fish　Genetic quality control of laboratory red crucian carp C1HD strain: DB43/T 1191-2016[S]. 2016.

[17] Hebert PD, Cywinska A, Ball SL, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270(1512): 313- 321.

[18] Lambert DM, Baker L, Huynen O, et al. Is a large-scale DNA-based inventory of ancient life possible? [J]. J Hered, 2005, 96(3):279-284.

[19] Avise JC. Phylogeography-the history and formation of species [M]. Cambridge: Harvard University Press; 2000.

[20] Yoon S, Mitra S, Wyse CA, et al. First demonstration of antigen induced cytokine expression by CD4 - 1^+ lymphocytes in a poikilotherm: studies in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. PLoS One, 2015, 10(6): 1-26.

[21] Pressley ME, Phelan PE, Witten PE, et al. Pathogenesis and inflammatory response to *Edwardsiella tarda* infection in the zebrafish [J]. Dev Comp Immunol, 2005, 29(6): 501-513.

[22] 付小哲, 方伟, 林强, 等. 约氏黄杆菌减毒活疫苗对鳜免疫效果评价 [J]. 南方水产科学, 2017, 13(5):33-38.
Fu XZ, Fang W, Lin Q, et al. Immune response of mandarin fish (Siniperca chuatsi) to attenuated *Flavobacterium johnsoniae* vaccine [J]. South Chin Fish Sci, 2017, 13(5):33-38.

[23] Slany M, Jezek P, Bodnarova M, et al. Fish tank granuloma caused by *Mycobacterium marinum* in two aquarists: two case reports [J]. Biomed Res Int, 2013, 2013: 1-4.

[24] 杨迟. 实验用斑马鱼常见病菌的分离检测及其致病性研究 [D]. 上海: 东华大学; 2014.
Yang C. Isolation and detection of common pathogenic bacteria and associated pathogenic research on laboratory zebrafish [D]. Shanghai: Donghua University; 2014.

[25] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 淡水鱼细菌性败血症 [J]. 中国水产, 2011, 38(3): 54-55.
Ceng AP, Jiang YL, Qian D, et al. Freshwater fish bacteria septicemia [J]. J Fish Chin, 2011, 38(3): 54-55.

[26] Watral VG, Kent ML. Pathogenesis of Mycobacterium spp. in zebrafish (*Danio rerio*) from research facilities [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2007, 145(1): 55-60.

[27] Kent ML, Whipps CM, Matthews JL, et al. Mycobacteriosis in zebrafish (*Danio rerio*) research facilities [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2004, 138(3): 383-390.

[28] Chang CT, Whipps CM. Activity of antibiotics against mycobacterium species commonly found in laboratory zebrafish [J]. J Aquat Anim Health, 2015, 27(2): 88-95.

[29] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 迟缓爱德华氏菌病 [J]. 中国水产, 2011, 38(7):49-50.
Ceng AP, Jiang YL, Qian D, et al. Edwardsiellasis[J]. J Fish Chin, 2011, 38(7):49-50.

[30] 刘春, 李凯彬, 王庆,等. 斑马鱼迟缓爱德华氏菌的鉴定、致病性及药物敏感性 [J]. 华中农业大学学报, 2013, 32(3): 105-111.
Liu C, Li LB, Wang KB, et al. Identification, pathogenicity and drug sensitivityof *Edwardsiella tarda* from *Danio rerio* [J]. J Huazhong Agric Univ, 2013, 32(3):105-111.

[31] 陈爱平, 江育林, 钱冬, 等. 小瓜虫病 [J]. 中国水产, 2011, 38(8):37-38.
Ceng AP, Jiang YL, Qian D, et al. Ichthyophthiriasis [J]. J Fish Chin, 2011, 8(8):37-38.

[32] von Gersdorff Jørgensen L. Infection and immunity against *Ichthyophthirius multifiliis* in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Fish Shellfish Immunol, 2016, 57: 335-339.

[33] Kent ML, Bishop-Stewart JK. Transmission and tissue distribution of *Pseudoloma neurophilia* (Microsporidia) of zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton) [J]. J Fish Dis, 2003, 26(7): 423-426.

[34] Ramsay JM, Watral VG, Schreck CB, et al. *Pseudoloma neurophilia* infections in zebrafish *Danio rerio*: effects of stress on survival, growth, and reproduction [J]. Dis Aquat Organ, 2009, 88(1): 69-84.

[35] Kent ML, Harper C, Wolf JC. Documented and potential research impacts of subclinical diseases in zebrafish [J]. ILAR J, 2012, 53(2): 126-134.

[36] 潘厚军, 吴淑勤, 李凯彬, 等. 剑尾鱼在检测细菌毒力方面的应用 [J]. 水产学报, 2000, 24(5): 467-471.
Pan LJ, Wu SQ, Li KB, et al. Application of *Xiphophorus helleri* detection of virulence of fish pathogenic bacteria [J]. J Fish Chin, 2000, 24(5): 467-471.

[37] Garcia F, Fujimoto RY, Martins ML, et al. Protozoan parasites of *Xiphophorus* spp. (Poeciliidae) and their relation with water characteristics [J]. Arq Bras Med Vet Zootecn, 2009, 61(1): 156-162.

[38] 余露军, 苗宗余, 蔡磊, 等. 诸氏鳙虾虎鱼“溃烂病”病原及其致病影响因子分析 [J]. 南方水产科学, 2018, 14(5): 45-52.
Yu LJ, Miao ZY, Cai L, et al. Pathogenicity and impact factors of pathogen causing ulcer disease on *Mugilogobius chulae* [J]. South Chin Fish Sci, 2018, 14(5): 45-52.

[39] 余露军, 蔡磊, 陈小曲, 等. 诸氏鳙虾虎鱼致病性创伤弧菌的分离与鉴定 [J]. 动物医学进展, 2015, 36(9): 51-54.
Yu LJ, Cai L, Chen XQ, et al. Isolation and identification of pathogenic *Vibrio vulnificus* from diseased *Mugilogobius chlae*[J]. Prog Vet Med, 2015, 36(9): 51-54.

[40] 魏远征, 林忠婷, 李建军, 等. 不同饲料对诸氏鳙虾虎鱼生长和利用效果的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(1): 29-36.
Wei YZ, Lin ZT, Li JJ, et al. Effect of dietary nutrient level on the growth and feed utilization of *Mugilogobius chulae* [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26 (1): 29-36.

[41] 魏远征, 林忠婷, 李建军. 诸氏鳙虾虎鱼幼鱼饲料纤维素适宜含量的初步研究 [J]. 广东农业科学, 2017, 44 (1): 149-155+2.
Wei YZ, Lin ZT, Li JJ. Preliminary study on suitable cellulose content in formulated diet for juvenile *Mugilogobius chulae* [J]. Guangdong Agric Sci, 2017, 44 (1): 149-155+2.

[42] 王雪, 刘可春, 王希敏, 等. 斑马鱼仔鱼的人工培育实验 [J]. 山东科学, 2010, 23(4):27-30.
Wang X, Liu KC, Wang XM, et al. Experiments for artificial cultivation of zebrafish larvae[J]. Shandong Sci, 2010, 23(4):

27-30.

[43] 龙华. 温度对鱼类生存的影响 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2005,44(S1):254-257.
Long H. The effect of temperature on fish survival[J]. Acta Sci Nat Univ Sunyatseni, Nat Sci, 2005, 44(S1):254-257.

[44] 彭俊, 王辉, 强俊, 等. 温度和盐度对吉富品系尼罗罗非鱼受精率和孵化率的联合影响 [J]. 中国水产科学, 2011, 18(4):847-856.
Peng J, Wang H, Qiang J, et al. Combined effect of temperature and salinity on the fertilization and hatching rate in the GIFT strain of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. J Fish Sci China, 2011, 18(4):847-856.

[45] 覃川杰, 杨川, 陈昌福. 水温对鱼类免疫活动的影响 [J]. 河南师范大学学报(自然科学版), 2011, 39(5):129-133.
Tan JJ, Yang C, Chen CF. Effect of environmental temperature on lmmune status of fish [J]. J Henan Norm Univ (Nat Sci), 2011,39(5): 129-133.

[46] 吴晗, 白俊杰, 姜鹏. pH 对转红色荧光蛋白基因唐鱼孵化率和仔鱼存活的影响 [J]. 大连海洋大学学报, 2014, 29(1): 27-30.
Wu H, Bai JJ, Jiang P. Effects of pH on hatching rate and larval survival in transgenic white cloud mountain minnow *Tanichthys albonubes* expressing red fluorescent protein gene [J]. J Dalian Ocean Univ, 2014, 29(1):27-30.

[47] 张甫英, 李辛夫. 酸性水对几种主要淡水鱼类的影响 [J]. 水生生物学报, 1997, 21(1): 40-48.
Zhang PY, Li XF. Effect of acid water on several major freshwater fishes [J]. Acta Hydrobiol Sin, 1997, 21 (1): 40-48.

[48] 王云峰, 朱鑫华. 盐度对鱼类生态生理学特征的影响 [J]. 海洋科学集刊, 2002, 10(44):151-158.
Wang YF, Zhu XH, A review on impact of salinity on patterns of fish ecophysiology[J]. Stud Mar Sin, 2002, 10(44):151-158.

[49] 康自强, 邓超淮, 于慧娟, 等.盐度对鱼类的影响 [J]. 福建水产, 2013, 35(5):395-401.
Kang ZQ, Zeng CZ, Yu HJ, et al. Study advances in the effect of salinity change on fish[J]. Fujian Fish, 2013, 35(5): 395-401.

[50] 况新宇. 高溶氧对西伯利亚鲟、杂交鲟生长、氧化应激及免疫功能的影响 [D]. 大连: 大连海洋大学; 2016.
Kiang XY. Effection of high dissolved oxyen on growth, oxidative stress, and immune capactity of Acipenser baerii and Hybird Sturgeon [D]. Dalian: Dalian Ocean University; 2016.

[51] 李波. 氨氮和亚硝酸盐对黄颡鱼的毒性研究 [D]. 武汉: 华中农业大学; 2010.
Li B. Effets of ammonla and nitrite toxicity on Yellow Catfish pelteobagrus fulvidraco [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University; 2010.

[52] 叶俊. 亚硝酸盐急性胁迫对草鱼血液生理生化指标和非特异性免疫性能的影响[D]. 武汉:华中农业大学; 2013.
Ye J. The acute effect of hitrite on blood physiologlical and biochemical parameters and non-spcific immunity in grass carp *Copharyhgodon idellus* [D]. Wuhani: Huazhong Agricultural University; 2013.

[53] Matthews M, Trevarrow B, Matthews J. A virtual tour of the guide for zebrafish users [J]. Lab Anim (NY), 2002, 30(3): 34-40.

[54] Nedelec SL, Campbell J, Radford AN, et al. Particle motion: the missing link in underwater acoustic ecology [J]. Methods Ecol Evol, 2016, 7(7): 836-842.

[55] Radford AN, Lebre L, Lecaillon G, et al. Repeated exposure reduces the response to impulsive noise in European seabass [J]. Global Chang Biol, 2016, 22(10): 3349-3360.

[56] Nedelec SL, Mills SC, Lecchini D, et al. Repeated exposure to noise increases tolerance in a coral reef fish [J]. Environ Pollut, 2016, 216: 428-436.

[57] Barney R, Maggy J. Guidance on the housing and care of zebrafish *Danio rerio* [M]. West Sussex: Research Animals Department, Science Group; 2011.

[58] 凌睿. 物理刺激下斑马鱼运动异常行为及控制对策 [D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学; 2013.
Ling R. Abnormal swimming behavior under physical stimulation in zebrafish (*Danin rerio*) and control measures [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology; 2013.

[59] Davidson J, Bebak J, Mazik P, et al. The effects of aquaculture production noise on the growth, condition factor, feed conversion, and survival of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Aquaculture, 2009, 288(3): 337-343.

[60] Spence R, Fatema MK, Reichard M, et al. The distribution and habitat preferences of the zebrafish in Bangladesh [J]. J Fish Biol, 2006, 69(5): 1435-1448.

[61] Avdesh A, Chen M, Mathew TM, et al. Regular care and maintenance of a zebrafish (*Danio rerio*) laboratory: An introduction [J]. J Vis Exp, 2012, 10(69): 4196-4196.

[62] Tamaru CS, Cole B, Bailey R, et al. A manual for commercial production of the swordtail, *Xiphophorus helleri* [M]. Hawaii: CTSA Publication; 2001.

[63] 李建军, 杨笑波, 魏社林, 等. 盐度对裸项栉鳃虎鱼繁殖和生长的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(3): 40-43.
Li JJ, Yang XB, Wei DL, et al. Effects of salinity on multiplication and growth of *Bareneck goby* [J]. Chin J Comp Med, 2008, 18(3): 40-43.

[64] 林忠婷, 李建军, 陈琳, 等. 非离子氨和亚硝酸氮对虾虎鱼仔鱼的急性毒性及安全浓度评价 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(9): 45-48.
Lin ZT, Li JJ, Chen L, et al. Acute toxicity and safety assessment of non-ion ammonia and nitrite on larvae of *ctenogobius gymnauchen* [J]. Chin J Comp Med, 2011, 21(9): 45-48.

[收稿日期] 2019-12-03

杨婷,林志健,姜卓希,等. 急性肾损伤模型塑造研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 123-128.
Yang T, Lin ZJ, Jiang ZX, et al. Review of the process of modeling acute kidney injury [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 123-128.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.018

急性肾损伤模型塑造研究进展

杨婷,林志健,姜卓希,褚梦真,张冰*,邹丽娜

(北京中医药大学中药学院,北京 102488)

【摘要】 建立稳定、可靠的急性肾损伤模型是研究急性肾病的重要手段。目前该类模型的造模方法多样、适用范围各异、成模标准不一,笔者通过整理近年来相关文献,将急性肾损伤模型进行合理归类,分析其塑造方法、病理机制、应用、成模特点等方面,以期为学者展开相关研究提供思路与参考。

【关键词】 急性肾损伤模型;塑造;进展
【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2020) 01-0123-06

Review of the process of modeling acute kidney injury

YANG Ting, LIN Zhijian, JIANG Zhuoxi, CHU Mengzhen, ZHANG Bing*, ZOU Lina

(College of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China)
Corresponding author: ZHANG Bing. E-mail:zhangbing6@263.net

【Abstract】 Establishing a stable and reliable acute kidney injury model is an important means of researching acute kidney disease. Acute kidney injury models have various modeling method, different application scopes and diverse modeling standards. Acute kidney injury models were classified by reviewing the recent related literature and materials to analyze modeling method, pathological mechanisms, applications, modeling characteristics and other aspects. This work was conducted to provide promising references and considerable guidance for research and practice in treating acute kidney injuries.

【Keywords】 acute kidney injury model; modeling; progress
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

急性肾损伤(acute kidney injury,AKI),又称急性肾功能衰竭,是由各种病因引起肾功能急速下降的一种临床综合征[1]。作为世界难治性疾病之一,其治疗手段仍有限制,建立稳定、可靠的 AKI 模型是促进肾功能不全药物研制的前提。临床上以肾脏缺血、肾毒性药物、病菌感染为高发诱因,故研究者多从这几方面入手,塑造出多种急性肾损伤模型。笔者通过对相关文献的梳理发现,该模型常见实验动物有大鼠、小鼠、家兔、犬等,造模类型以缺血再灌注型、药物诱导型与感染型三者较为集中,现将从这三种造模类型展开论述与分析。

1 缺血再灌注型

实验缺血再灌注型急性肾损伤模型包括双侧肾蒂夹闭法、一侧肾缺血再灌注加对侧肾切除法、部分结扎腹主动脉法、远端脏器缺血诱导法、失血性休克法等,多以外源性手术方式造模,常见动物有大鼠、小鼠、家兔和犬。缺血为急性肾损伤最常

[基金项目]国家自然科学基金(81673618),国家中医药管理局歧黄学者项目(10400633210004)。
Funded by National Natural Science Foundation of China (81673618), Qihuang Scholar Program of the State Administration of Traditional Chinese Medicine (10400633210004).
[作者简介]杨婷(1996—),女,硕士研究生,研究方向:中药防治代谢性疾病。Email: yt12652178@163.com
[通信作者]张冰(1959—),女,教授,主任医师,博士生导师,研究方向:中药防治代谢性疾病、中药药物警戒与合理用药研究。
Email:zhangbing6@263.net

见病因之一,是 AKI 模型的首选造模因素。肾脏遍布丰富的微血管网,其血容量不足是引起肾脏循环障碍、组织损伤的病理基础。随后血液恢复再灌注阶段,通过引发炎症级联反应、活性氧(ROS)氧化损伤、细胞凋亡、细胞内 Ca^{2+} 代谢失衡、能量代谢障碍等造成肾组织再次受损[2]。

1.1 双侧肾蒂夹闭法

双侧肾蒂夹闭法为目前国内外学者常用造模方法。Shen 等[3]对麻醉后大鼠作腹正中线切口,以无创动脉夹夹闭双侧肾蒂 45 min,再灌注 6 h,以大鼠肾组织由紫黑色转为红润时表明造模成功。以往实验多以腹部正中切口,牵扯其胃肠道,易引起动物胃肠感染和功能紊乱,谢慧敏等[4]通过采用背入式切口对模型进行改进,成功塑造出一种损伤小、操作简便且效果稳定的大鼠肾缺血再灌注损伤模型。

该法造模周期短,成功率高达 90%,通过突然暂时性的阻断肾脏血液供应,使细胞线粒体功能障碍,能量生成下降;当血液恢复再灌流时,大量活性氧释放致膜的脂质过氧化,引起肾脏组织的快速损伤[5]。虽然该法有操作简便、快速的优势,但通过夹闭肾动静脉引起的肾脏淤血缺血,易导致机体血压大幅度波动,并发高血压等病症,与临床急性缺血再灌注肾损伤的发病机制不大等同。

1.2 一侧肾缺血再灌注加对侧肾切除法

一侧肾蒂/肾动脉夹闭加对侧肾切除法在双侧肾蒂夹闭法的基础上进行优化,通过肾切除手段模拟临床因创伤、肾移植引起免疫炎症损害。王明秋等[6]对 SD 大鼠作腹正中切口,安全切除右肾后,对左侧肾蒂夹闭 45 min,动态观察以再灌注 24 h 后肾组织、功能损伤最为显著,且证实该模型可用于 AKI 早期诊断、及时干预治疗等方面的研究。Rojas-Morales 等[7]采用该法成功建立急性肾损伤大鼠模型,研究发现禁食处理可减轻肾损伤所伴随的氧化应激、线粒体功能障碍等病理反应。

该法相比于双侧肾蒂夹闭法而言,病理损伤显著、呈更明显的渐进性变化,更趋于临床肾移植状态。但实验过程涉及到一侧肾脏切除过程,要求实验者掌握熟练的操作技术,保证实验环境的无菌无污染,须动态监测动物术后的生理状态等。

1.3 部分结扎腹主动脉法

肾血流量因远端肢体损伤导致持续性低灌流状态,易形成肾前性急性肾损伤。慈红波[8]为探讨远端肢体恢复血流后的损伤作用,采用部分结扎腹主动脉法造模,结果发现内皮素以及氧自由基在肾损伤过程中起主导作用,可对其病理机制展开进一步研究。Eser 等[9]通过对大鼠肾下腹主动脉夹闭 120 min、再灌注 120 min 后成功建立急性肾损伤模型,且应用该模型可评价肾上腺髓质素的干预作用。

通过结扎肾下腹主动脉引起远端肢体缺血缺氧,再灌注时伴随大量的氧自由基流经肾脏,造成肾脏急性损伤。该法可用于评价活性氧族在再灌注损伤中的致病作用,旨在模拟人血液低灌注状态下的肾损伤,与临床患者病情较为贴近。值得注意的是,腹主动脉结扎时应把控好结扎程度及时间,避免血流量大幅度波动。

1.4 远端脏器缺血诱导法

肝、肠等远端脏器的缺血再灌注损伤常累及肾脏,急性肾损伤则是其中的一个重要并发症[10]。崔龙海等[11]采用 Pringle 法制备大鼠肝脏 I/R 损伤模型,主要通过暴露大鼠肝门部,夹闭肝十二指肠韧带使其缺血 30 min,松开后再灌注 2 h 成模,病理组织观察可见肾小球及肾间质水肿,肾小管上皮细胞肿大、变形等。此外,研究表明肠道功能障碍亦与肾脏损伤紧密联系,孙倩等[12]通过夹闭小鼠肠系膜上动脉 1 h、恢复供血 2 h 完成,结果可见肠缺血再灌注后引发肾小管上皮细胞水肿、坏死,与影响 Nrf2/ARE 信号通路相关。

远端脏器缺血损伤诱发急性肾功能障碍,以肝、肠缺血再灌注模型为主。该法模拟了临床手术脏器损伤的病理生理状态,呈递进性变化;目前脏器之间的作用机制还不明确,肝、肠等脏器缺血损伤同时易引发多器官功能障碍综合征、肾损伤程度难以把控,采用该法展开急性肾损伤研究仍存在一定难度。

1.5 失血性休克法

失血性休克是临床手术创伤常见的急重病症,因大量失血导致机体周身循环障碍,肾脏是最易受累的器官之一。实验失血性休克模型致急性肾损伤多采用放血定压法,放血时,常控制动物血压在 4 ~ 6 kPa 范围,Cardoso 等[13]通过该法实现失血性急性肾损伤猪模型的塑造,手术插管放血控制血压 5.33 kPa 内,维持 30 min 后回输血液完成,且研究发现加压素类似物可能有助于预防失血性休克所致的急性肾损伤。

该法与临床失血性休克致 AKI 的病理机制相

似,可用于评价该类药物的疗效及作用机理。急性大量失血可产生大量氧自由基,再回血复苏时流经肾脏,通过氧化损伤其细胞组织结构、不断加重肾脏损伤程度。但该模型手术操作较为复杂、失血量多,宜采用大鼠、家兔、犬等较大型实验动物,存在较多不稳定因素(体温、麻醉程度、插管位置、血液流动性、血压变化等),有待于研究者加强其实验方案。

1.6　其他诱导法

缺血再灌注型急性肾损伤模型还可见去甲肾上腺素滴注法、肌注甘油法、注射油酸法等。去甲肾上腺素滴注法通过使 Beagle 犬等动物的肾血管收缩引发[14];肌注甘油法通过使肌肉溶血、释放肌红蛋白所致;注射油酸法通过自身药物毒性使肾组织结构病变,此三者共性为诱导肾脏微循环障碍构建 AKI 模型。此类方法操作简单,病程稳定,可实行动态观察,模拟人类肾微循环障碍所致的渐进性肾损害;但注射甘油、油酸等物质对机体毒性较大,往往并发其他脏器损害,不利于临床药物筛选研究,后期还需对其注射剂量、注射方式进行调整。

2　药物诱导型

由药物诱导的急性肾损伤模型主要以自身毒性物质与肾脏反应所致,常见造模方法:氨基糖苷类抗生素诱导法、造影剂诱导法、顺铂诱导法、氯化汞诱导法、其他药物诱导法等,给药以注射方式为主,实验动物可见大小鼠、家兔和犬。

2.1　氨基糖苷类抗生素诱导法

氨基糖苷类抗生素存在较强的毒性反应,其中以肾毒性占首位。该类药物主要以原形通过肾脏排泄,积聚于溶酶体内、与磷脂成分结合,使药物大量蓄积在肾皮质,引起肾小管肿胀甚至急性坏死[15]。实验常采用庆大霉素、链霉素、卡那霉素诱导急性肾损伤,或腹腔注射、或静脉注射,成模率高。Salama 等[16]用腹腔注射庆大霉素(50 mg/kg)连续 15 d,可引起大鼠急性肾损伤,并见肾小管扩张及炎性细胞浸润。Rodriguez 等[17]验证得生长激素释放肽-6 (growth hormone releasing peptide-6, GHRP6)与表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)可对过量卡那霉素引发的肾炎起修复保护作用。安玉香等[18]研究发现对豚鼠腹腔注射链霉素 150 mg/kg,连续造模 10 d 后出现肾小球和肾小管坏死。

氨基糖苷类抗生素诱导的急性肾损伤模型均由于药物在肾皮质的不断蓄积而引发免疫清除损伤。此类方法可以用于临床上氨基糖苷类抗生素致 AKI 的病理机制研究,但存在造模周期较长、药物诱导多发其他病症、毒性程度不一、剂量较难把控、实验动物死亡率高等问题,需要实验者仔细考量和监测。

2.2　顺铂诱导法

顺铂(Cisplatin, CP)为抗癌类代表药,超剂量或反复应用该药可使 20% ~ 30% 患者产生肾毒性[19]。唐伟等[20]利用顺铂染毒方式建立 AKI 兔模型,肾损伤程度与染毒剂量相关,以耳缘静脉注射 1.0 mg/kg 体质量连续 5 d 为推荐造模方式,经机体代谢产生的铂离子如何与肾组织作用还有待于进一步研究。

该模型利用顺铂的肾毒性作用可复制出与临床类似的 AKI 模型,有助于研究顺铂及其衍生物对肾损伤的作用机理。顺铂致 AKI 模型多见啮齿类动物,造模方式有腹腔注射与静脉注射,以腹腔注射吸收快为首选方式。虽然顺铂诱导法被广泛应用于 AKI 模型塑造,但同时面临着一系列问题与挑战,Perše 等[21]指出该模型存在肾损伤程度评价的不确定性;动物致死量的不可控性;肾损伤病理相似度的差异性等问题。此外,顺铂的毒性作用较强,还可致慢性肾衰竭乃至全身毒性。

2.3　造影剂诱导法

造影剂的自身毒性、渗透压易使肾功能不全或糖尿病患者发生急性肾功能衰竭[22]。目前以含碘制剂致肾病为主,其高渗与低渗造影剂均可对组织造成不同程度损害。该模型通过先造成基础肾功能不全后给予造影剂使其建模成功。Liu 等[23]对 SD 大鼠先以股静脉注入吲哚美辛(10 mg/kg)和 L-NG-硝基精氨酸甲酯(10 mg/kg)预处理,30 min 后静脉推注低渗非离子造影剂碘己醇,结果显示模型大鼠出现显著肾小管坏死且伴随高水平血肌酐、尿素氮。

造影剂诱导的急性肾病主要与肾缺血、肾小管毒性损伤、氧自由基损伤、炎性反应、肾内血流动力学受损等发病因素有关[24]。实验造影剂肾病模型适用于研究造影剂肾病的病理机制及药物的疗效评价,但该模型注射造影剂前均先以药物或手术诱导肾功能不全状态得以成功,无法完全模拟临床造影剂肾病患者的病变状态,且造影剂注射后观察时

间无准确限定,对实验评价结果存在一定误差。

2.4 氯化汞诱导法

氯化汞是典型的肾毒性试剂,通过氯化汞诱导的肾损伤被广泛应用于 AKI 模型研究。氯化汞毒性较强,造模常选用较大型动物,可见大鼠、家兔、犬。肖玉华等[25]研究发现给比格犬两侧肩部及股部位皮下注射 1% 氯化汞溶液(以每只 2.0 mg/kg 连续注射 7 d)可成功塑造急性肾损伤模型。

氯化汞进入机体后,降解的 Hg^{2+} 可蓄积于近端肾小管上皮细胞导致急性肾小管坏死。该法操作简单,用时较短,可呈现明显的肾组织病理损伤;但该物质的毒性不仅仅限于肾脏,同时影响其他组织器官,使其模型复杂化,不利于 AKI 病理机制的研究。

2.5 其他药物诱导法

由肾毒性引起肾脏急性衰竭的药物较多,实验造模还可见蛇毒诱导法、鱼胆诱导法、氟化钠诱导法、双氧铀诱导法等,由于此类造模剂价格昂贵、不易获取,目前已较少采用。肾毒性药物常有多器官损害表现,给药剂量须严格筛选,实验动物也应考虑其承受能力,推荐选用较大型动物如家兔、犬等。

3 感染型

严重感染和感染性休克是诱发急性肾损伤的最常见病因之一,流行病学研究显示以脓毒症所致的全身性炎症感染是临床感染性 AKI 的最主要诱因[26],目前感染性肾损伤模型主要以脓毒症展开研究,通过外源性手术或毒素致使动物感染,进而损及肾脏,实验动物可见大鼠、小鼠、家兔、犬等。

3.1 内毒素诱导法

内毒素是革兰阴性细菌细胞壁中的结构组分,可激活体内多种炎症因子的释放,进而引起机体的免疫炎症反应。邵俊等[27]以内毒素休克诱导急性肾损伤家兔模型,通过耳缘静脉持续缓慢匀速泵入内毒素(2.5 mL/kg)30 min 左右,观察到平均动脉压(MAP)下降至基础的 40%时认为造模成功。

3.2 盲肠结扎穿孔术诱导法

盲肠结扎穿孔术,是建立感染性肾病模型广泛应用的造模方法。Cai 等[28]对大鼠盲肠末端和回盲瓣之间结扎,以针穿过结扎的中央段,挤出少量盲肠内容物,再将盲肠重新置入腹腔内缝合完成。通过使粪便流入腹腔致多种细菌感染腹腔引起严重的脓毒症,以建立经典脓毒症所致的 AKI 模型。

感染性肾病模型以脓毒症致全身性感染为首要代表,内毒素与盲肠结扎穿孔术是塑造脓毒症致 AKI 模型的经典方法,可为研究感染性肾病的病理机制及探索新的治疗靶点提供思路和线索。但该类模型的脓毒症仅能模拟革兰氏阴性菌脓毒症,其感染程度无法控制,可呈渐进性多器官病变,缺乏评价成模的标准化指标,实验期间存在较高的手术死亡率,亟需研究者对此再行改进与规整。目前感染性急性肾损伤模型还有广阔的发展空间,除脓毒症感染外,免疫缺陷病、细菌性心内膜炎、疟疾等感染性疾病也常易引发急性肾损伤,有待于深入研究。

4 小结

4.1 急性肾损伤模型特点总结

急性肾损伤的各类模型在临床相似性、难易度、稳定性、可行性上均各占优势,同时又存在模型塑造过程中的不足。缺血再灌注型以造模周期短为主要优势,动物选择多样,成模率高,以外源性手术诱导 AKI 模型为主,与临床该病的发病特点尚存差异,常应用于 AKI 发病机制及药物疗效评价研究[29-30];药物诱导型以贴近临床肾毒性药物病理机制为主要优势,可灵活选用造模剂,以静脉注射或腹腔注射完成,难度在于药物剂量及毒性程度的把控,常选用较大型动物,多应用于肾毒性药物的防治研究[31];感染型以高发率脓毒症感染为主,可促进感染性肾病的病理机制、药物治疗研究[32-33],但目前这类模型研究较少,且操作难度、死亡率均较高,有待于进一步拓展。此三类造模方法的共同点均是加剧细胞免疫应激反应以实现肾组织、功能的快速紊乱。

4.2 思考

急性肾损伤,是临床住院及重症患者高发的一类肾病综合征,全球发病率为 2100/100 万[34]。其病死率高、并发症多、病因复杂,开展其药物研究十分迫切。建立合适的急性肾损伤模型有助于挖掘该病的病理机制与开拓新的治疗靶点,目前的急性肾损伤模型还有待于改进:1.常用模型动物的肾组织与人体肾组织结构存在差异(以鼠、兔等为常用模型);2.模型多从某一角度出发(急性肾损伤为复杂的临床综合征);3.感染型 AKI 模型研究较少(仅以脓毒症感染为主);4.模型是否成功无统一标准(肾损伤程度、持续时间)等。就模型动物而言,可加大其他种源动物的研究,如实验用小型猪,该动

物的肾组织构造与人体相似;如斑马鱼,该动物体型小,结构简单、易于操作,可实现整体、细胞、分子的一体化观察,是一种兴起的新型模式动物;就造模而言,急性肾损伤发病机制复杂,往往夹杂多种病因,造模时应尝试几种模型的结合应用;就感染性模型而言,感染病菌类型、感染部位、感染时间、感染程度等均是应投入实验研究的重要内容;就造模成功标准而言,目前对于肾损伤标志物的建立多有不足,应与临床监测指标相结合,还应注意模型后期持久性、稳定性的观察。本文所归纳的 AKI 模型主要为实验常用模型,可能存在遗漏与不足,旨在为研究者提供参考与思路,尽快实现急性肾损伤模型塑造的突破,为促进临床急性肾损伤的药物研究奠定基础。

参 考 文 献(References)

[1] Mehta RL, Kellum JA, Shah AV, et al. Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury[J]. Crit Care, 2007, 11(2): R31.

[2] 陈文,何立群.肾缺血再灌注损伤机制及保护研究进展[J].世界中医药, 2019,14(5):1068-1073.
Chen WH, He LQ. Research Progress on Mechanism and Protection of Renal Ischemia-reperfusion Injury[J]. World Chin Med, 2019, 14(5): 1068-1073.

[3] Shen S, Zhou J, Meng S, et al. The protective effects of ischemic preconditioning on rats with renal ischemia-reperfusion injury and the effects on the expression of Bcl-2 and Bax[J]. Exp Ther Med, 2017, 14(5):4077-4082.

[4] 谢敏慧, 谷翠芝, 李凤霞, 等. 背入式腹膜后双肾蒂夹闭制作肾缺血再灌注损伤模型的技术方法[J].中国比较医学杂志, 2018, 28(6): 106-110.
Xie MH, Gu CZ, Li FX, et al. Establishment method of a rat model of renal ischemia-reperfusion injury by clamping the bilateral renal pedicles through backside and retroperitoneal incision [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(6): 106 -110.

[5] 邹晓彪,罗助荣,黄明方.氧化应激在急性肾损伤中的研究进展[J].临床肾脏病杂志,2019,19(4):287-290.
Zou XB, Luo ZR, Huang MF. Research progress on the role of oxidative stress in acute kidney injury [J]. J Clin Nephrol, 2019, 19 (4): 287-290.

[6] 翟文豪, 朱子豪, 王明秋, 等. 大鼠急性肾损伤模型的建立及意义[J]. 解剖学研究, 2018, 40(2): 114-117.
Zhai WH, Zhu ZH, Wang MQ, et al. The establishment of the rats model of acute renal ischemia reperfusion injury[J]. Anat Res, 2018, 40(2): 114-117.

[7] Rojas-Morales P, LeÓn-Contreras JC, Aparicio-Trejo OE, et al. Fasting reduces oxidative stress, mitochondrial dysfunction and fibrosis induced by renal ischemia-reperfusion injury [J]. Free Radic Biol Med, 2019,135: 60-67.

[8] 慈红波.大鼠肾下腹主动脉阻断后再灌注肾损伤实验研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2008.
Ci HB. Experimental study on kidney reperfusion injury caused by infrarenal abdominal aorta occlusion in rat model [D]. Shihezi: Shihezi University, 2008.

[9] Oyar EÖ, Kiris I, Gülmen S, et al. The protective effect of adrenomedullin on renal injury, in a model of abdominal aorta cross-clamping [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2012, 60(1): 5-10.

[10] Atal SS, Atal S. Ulinastatin-a newer potential therapeutic option for multiple organ dysfunction syndrome [J]. J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2016, 27(2): 91-99.

[11] 崔龙海, 李浩, 韩龙哲, 等. 乌司他丁预处理对肝缺血再灌注大鼠急性肾损伤的预防作用 [J].山东医药, 2018, 58(31):52-55.
Cui LH, Li H, Han LZ, et al. Preventive effect of ulinastatin preconditioning on acute kidney injury in rats with hepatic ischemia-reperfusion [J]. Shandong Med J, 2018, 58(31):52-55.

[12] 孙倩, 夏中元, 江莹, 等. 人参皂苷 Rb1 对肠缺血再灌注致肾损伤的保护作用 [J].武汉大学学报(医学版), 2018, 39(3):385-388,393.
Sun Q, Xia ZY, Jiang Y, et al. Ginsenoside Rb1 attenuates intestinal ischemia-reperfusion induced renal injury [J]. Med J Wuhan Univ, 2018, 39(3): 385-388,393.

[13] Cardoso de Castro LU, Ida KK, Otsuki DA, et al. Vasopressin analog terlipressin attenuates kidney injury in hemorrhagic shock [J]. Trauma Surg Acute Care Open, 2016, 1(1):e000039.

[14] 邓虹珠,金伟军,廖锡麟,等.急性肾功能衰竭病理模型的设计和方法[J].中国中药杂志,1998, 23(,1):48-52,64.
Deng HZ, Jin WJ, Liao XL, et al. Design and method of pathological model of acute renal failure [J]. Chin J Chin Mater Med, 1998, 23(1): 48-52,64.

[15] McWilliam SJ, Antoine DJ, Smyth RL, et al. Aminoglycoside-induced nephrotoxicity in children [J]. Pediatr Nephrol, 2017, 32(11): 2015-2025.

[16] Salama SA, Arab HH, Maghrabi IA. Troxerutin down-regulates KIM-1, modulates p38 MAPK signaling, and enhances renal regenerative capacity in a rat model of gentamycin-induced acute kidney injury[J]. Food Funct, 2018, 9(12): 6632-6642.

[17] Rodriguez Salgueiro S, González Núñez L, García Del Barco Herrera D, et al. Role of epidermal growth factor and growth hormone-releasing peptide-6 in acceleration of renal tissue repair after kanamycin overdosing in rats [J].Iran J Kidney Dis, 2014, 8(5): 382-388.

[18] 安玉香,赵会平,徐昕. 粉防己碱对豚鼠链霉素性肾损伤的干预作用[J].分子细胞生物学报, 2007, 40(2): 113-120.
An YX, Zhao HP, Xu X. The intervention of tetrandrine on streptomycin-induced renal injury in guinea pigs [J]. J Mol Cell Biol, 2007,40(2): 113-120.

[19] Manohar S, Leung N. Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature[J]. J Nephrol, 2017,334(2):115-124.

[20] 唐伟,钟志勇,董明,等.顺铂致新西兰兔急性肾损伤模型[J].中国职业医学,2018,45(6):702-707.
Tang W, Zhong ZY, Dong M, et al. New Zealand rabbit model of cisplatin-induced acute kidney injury [J]. Chin Occup Med, 2018, 45(6): 702-707.

[21] Perše M, Večerić-Haler Ž. Cisplatin-induced rodent model of kidney injury: characteristics and challenges[J]. BioMed Res Int, 2018, 2018: 1-29.

[22] 刘明镇. 糖尿病合并急性冠状动脉综合征患者引发造影剂肾病的相关因素[J].影像研究与医学应用, 2019, 3(3): 232-233.
Liu MZ. Related factors of contrast-induced nephropathy in patients with diabetes mellitus complicated with acute coronary syndrome[J]. J Imaging Res Med Appl, 2019, 3(3): 232-233.

[23] Liu N, Chen J, Gao D, et al. Astaxanthin attenuates contrast agent-induced acute kidney injury in vitro and in vivo via the regulation of SIRT1/FOXO3a expression[J]. Int Urol Nephrol, 2018,50(6):1171-1180.

[24] 任春霞,余自成.造影剂诱导的急性肾损伤研究进展[J].世界临床药物, 2019, 40(2): 123-127.
Ren CX, Yu ZC. Research progress of contrast-induced acute kidney injury [J]. World Clin Drugs, 2019, 40 (2): 123-127.

[25] 肖育华,王宏, 詹纯列,等. 氯化汞诱导比格犬急性肾功能衰竭模型的建立[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015,39(1):172-174, 221.
Xiao YH, Wang H, Zhan CL, et al. Establishment of a model of acute renal failure induced by mercury chloride in Beagle dogs [J]. Heilongjiang Anim Sci and Vet Med, 2015, 39(1):172-174, 221.

[26] Poston JT, Koyner JL. Sepsis associated acute kidney injury[J]. BMJ, 2019, 364: k4891.

[27] 邵俊,方时书,郑瑞强,等. 内毒素休克诱导急性肾损伤家兔模型的建立[J]. 实用临床医药杂志, 2018, 22(15):18-22.
Shao J, Fang SS, Zheng RQ, et al. Establishment of rabbit model with acute renal injury induced by endotoxic shock [J]. J Clin Med in Pract, 2018,22(15):18-22.

[28] Cai ZY, Sheng ZX, Yao H. Pachymic acid ameliorates sepsis-induced acute kidney injury by suppressing inflammation and activating the Nrf2/HO-1 pathway in rats [J]. Eur Rev Med Pharmacol Sci, 2017, 21(8):1924-1931.

[29] 张亚楠. DGKE 在缺血再灌注诱导的急性肾损伤中的作用及机制[D]. 济南:山东大学,2019.
Zhang YN. The role and mechanism of DGKE in acute kidney injury induced by ischemia-reperfusion [D]. Jinan: Shandong University, 2019.

[30] Yang K, Li WF, Yu JF, et al. Diosmetin protects against ischemia/reperfusion-induced acute kidney injury in mice [J]. J Surg Res, 2017, 214:69-78.

[31] 张玲. 蕨麻的化学成分及其皂苷类成分拮抗顺铂肾脏毒性的研究[D]. 苏州:苏州大学, 2018.
Zhang L. Studies on chemical constituents and protective effect of saponins from the tuberous roots of *Potentilla anserine L.* on nephrotoxicity induced by cisplatin [D]. Suzhou: Soochow University, 2018.

[32] Li X, Li Y, Shen K, et al. The protective effect of ticagrelor on renal function in a mouse model of sepsis-induced acute kidney injury [J]. Platelets, 2019, 30(2): 199-205.

[33] 杨蕊, 许华, 王兵, 等. PI3K/AKT 信号通路在大鼠腹腔感染性脓毒症急性肾损伤中的作用[J]. 天津医药, 2018, 46(6): 581-584.
Yang R, Xu H, Wang B, et al. The role of PI3K/AKT in acute kidney injury induced by abdominal sepsis in rats [J]. Tianjin Med J, 2018, 46(6): 581- 584.

[34] 侯凡凡. 中国急性肾损伤的流行病学[J]. 中华医学信息导报, 2017, 32(18):14.
Hou FF. Epidemiology of acute kidney injury in China[J]. Chin Med News, 2017,32(18):14.

[收稿日期] 2019-07-17

杜飞飞,王凤清,贾伟伟,等. 啮齿类动物插管技术用于药动学采血的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 129-136.
Du FF, Wang FQ, Jia WW, et al. Research progress on rodent intubation technique for blood sampling in pharmacokinetic studies [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 129-136.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.019

啮齿类动物插管技术用于药动学采血的研究进展

杜飞飞[1,2*],王凤清[2],贾伟伟[2],徐方[2],马越鸣[1]

(1. 上海中医药大学中药学院,上海 201203; 2. 中国科学院上海药物研究所,上海 201203)

【摘要】 近几十年来,人们持续关注实验动物的福利,并在全球范围的科学研究中整合、协调和监督实验动物的使用。"3R 原则"是被广泛认可接受的标准和规范的核心要义和精髓所在。药代动力学研究中包含了必不可少的动物实验,如何保护实验动物福利是本专业发展到一定阶段和水平需要考虑的问题。国内外科研人员逐渐建立并优化在啮齿类动物(主要为大鼠和小鼠)上进行插管手术的技术,能让实验动物在清醒及自由活动状态下完成采血等实验。本文通过整理相关文献,对药动学研究中使用的插管技术进行梳理和总结,希望对国内该研究领域的实验动物福利保护有所助力。

【关键词】 药动学研究;啮齿类动物;插管手术;采血;自由活动
【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2020) 01-0129-08

Research progress on rodent intubation technique for blood sampling in pharmacokinetic studies

DU Feifei[1,2*], WANG Fengqing[2], JIA Weiwei[2], XU Fang[2], MA Yueming[1]

(1. School of Pharmacy, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China.
2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203)
Corresponding author: DU Feifei. E-mail: dufeifei@simm.ac.cn

【Abstract】 In recent decades, people are paying increasing attention to the welfare of experimental animals, and these animals are being integrated, coordinated and monitored when used in global scientific research. The "3Rs Principle" is the widely recognized and accepted core standard. Pharmacokinetic studies include essential animal experiments. Methods for protecting the welfare of experimental animals must be considered when the research reaches a certain stage and level. Researchers have gradually established and optimized intubation techniques on rodents (rats and mice), which can enable sampling blood from experimental animals while the animals are awake and moving freely. In this review, we searched the relevant literature and summarized the intubation surgical techniques used on rodents in pharmacokinetic studies to help protect the welfare of laboratory animals in China.

【Keywords】 pharmacokinetic studies; rodents; intubation techniques; blood sampling; awakening; free movement
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

近几十年来,跨越国界的科学合作和服务呈现不断增长的趋势,给全球范围的研究合作方提出要求,即以动物福利为核心,在全球范围内整合协调实验动物的使用标准和规范,被业界广泛接受的

[基金项目]国家重点研发计划(2018YFC1704500); 国家自然科学基金(81603380)。
Funded by National Key R&D Program of China (2018YFC1704500) and National Natural Science Foundation of China (81603380).
[通信作者]杜飞飞(1977—),男,在读硕士,高级实验师,研究方向:临床前药动学动物实验技术研究。Email:dufeifei@simm.ac.cn

“3R 原则”便是其中的核心内容。“3R 原则”由 Russell 和 Burch 于 1959 年提出，即替代（replacement）、减少（reduction）和优化（refinement），简言之即通过使用无知觉物质替代有知觉动物、尽量减少实验动物数量及尽量减低非人道方法的使用频率或危害程度，旨在鼓励和提倡从多角度多层面保护实验动物的福利[1-2]。世界动物卫生组织（OIE）、国际医学科学组织（CIOMS）和国际实验动物科学理事会（ICLAS）均发布了国际指导原则[3-4]，将“3R 原则”作为核心标准和准则。美国食品药品监督管理局（FDA）和欧盟强力推荐在有 AAALAC 认证的实验室开展动物实验，该认证采用了包括“OIE 标准”在内的 4 个全球评估标准[5-7]作为参考来源。

我国于 1988 年经国务院批准由国家科学技术委员会发布了《实验动物管理条例》[8]，以加强实验动物的管理工作，并于 2001 年的修订中加入了有关动物福利的内容。2006 年由科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》[9]则是我国首个针对研究用动物的国家法规，进一步细化了善待实验动物的规定。2018 年 2 月由国家正式颁布并于 9 月 1 日实施的《实验动物福利伦理审查指南》（GB/T 35892-2018）则是我国实验动物福利伦理科技和管理领域的里程碑事件。该指南由实验动物福利伦理专业委员会起草，是中国首部实验动物福利伦理审查国家标准，在国际上获得了积极的反响和赞誉[10-11]。

药物代谢动力学研究中包含必不可少的动物实验，在啮齿类动物（如大鼠和小鼠）上采血则是其中常见的实验操作。如何在动物实验中贯彻动物福利及“3R 原则”是本专业发展到一定阶段和水平需要思考和关注的问题。本文对国内外药动学研究中将啮齿类动物插管手术用于采血的技术进展进行综述，希望对国内药动学研究领域的实验动物福利保护有所助力。

1 药代动力学研究中传统的采血方法

药代动力学研究是药物发现过程中的一个重要组成部分。考虑到啮齿类动物体重较小而不需要花费大量的药物且较容易采集多个生物样本，通常选择大鼠或小鼠等啮齿类动物作为临床前药动学研究的主要实验对象[12]。

采集动物血样是药动学研究中最常见的操作之一，关于进行大小鼠采血的方法已有较多报道，包括从眼眶后静脉窦、侧尾静脉、舌下静脉、隐静脉及颌下静脉[13]。长期以来最常用的是眼眶后静脉窦穿刺采血，经验丰富的实验人员可以单次采集较大量的血液（0.2 ~ 0.5 mL）。然而该方法也引起较大争议，除了可能造成动物眼部组织损伤外，非麻醉状态下采血引起的动物疼痛、挣扎及应激也不利于实验动物福利[14-15]，因此部分监管机构已经禁止了该方法，除非该采血过程是动物处于麻醉状态下的临终前步骤[16]。侧尾静脉切开是另一种在过去被频繁使用的方法，优点是不需要麻醉且手术刀沿着血管侧切造成的创伤小，但这种方法也有较多缺点，如采血量较少（0.1 ~ 0.15 mL）、在深色小鼠上较难操作、经常需要对尾部进行预热以确保血管扩张获得足够的血量以及采集单个血点耗时较长，同样非麻醉下操作会给动物带来疼痛及应激。舌下静脉采血的优势是采血量大而组织损伤较少，但操作相对复杂，需要约束动物、更多的练习和多人配合工作，并且有报道采血部位会出现红肿[17]。隐静脉穿刺较为耗时，无法满足在短时间内取血的要求。颌下静脉采血虽然耗时少取血量较大，但需要约束动物自由并且造成较多组织损伤[13]。

以上采血方式在涉及动物福利方面都有缺陷，会造成实验动物的“紧张”，即刺激引起实验动物出现生理、心理状态和行为的变化。实验过程中的温度变化、笼具移动、过度噪音以及约束自由都可能是潜在的刺激源[17]，如采血时捉持动物造成的紧张会改变胃排空时间、加快心率以及改变代谢，均会影响药代动力学研究结果的准确性。实验动物面对刺激时产生反应的个体差异更是药动学研究中的一个不可控因素[12]。

2 运用于药动学采血的插管技术

自上世纪八十年代起，针对大小鼠不同部位血管的插管手术技术相继被开发，最为常见的插管部位包括颈动静脉、股动静脉及腹主动脉等。这些手术模型具备一个显著优点，就是在进行采血过程中，实验动物保持清醒并可以自由活动，从而使它们受到的干扰或刺激降到最小[18-21]，如 Yoburn 等[22]发现大鼠股动脉插管可以增加插管的通畅度，相比其他部位插管手术，动物恢复到术前体重的速度最快。许多研究者都公开了插管手术的具体方法和流程[23-26]，有使用留置型插管以便多次连续的

血样采集[18-21,23,27-29]，也有研究者将血管插管引出并固定在实验动物体外，实验动物在采集血样过程中无需麻醉、可自由活动且没有创伤，显然满足可重复采血且较少限制自由的要求[18,30]。研究表明，与徒手捉持大鼠（30 s）和限制自由的绑定大鼠（5 min）相比，自由活动大鼠（颈静脉插管）血浆内肾上腺素、去甲肾上腺素和多巴胺的基础浓度更低[31]。大鼠血浆中皮质酮水平同样会在其被限制自由时升高，而经历颈静脉插管手术后逐渐恢复稳定[32]。

Jespersen 等[33]用视频及插图的形式展示了大鼠股动脉及股静脉插管的过程。研究者将插管尾端连接到可旋转系统上，术后单笼饲养大鼠可以减少动物间相互干扰，提高动物模型的稳定性。为了保持插管的通畅，需要使用 100 U/mL 肝素化生理盐水作为封管液并对其进行日常保养。研究者认为通过精细的无菌手术过程、合适的手术插管材料和精心保养，是极有可能在较长时间（几周）里保持大鼠健康状态，长时间的采集血样也就更有保证。Feng 等[34]以视频方式发表了大鼠颈动脉和颈静脉插管手术流程，可用于监测血压、输液和给药及连续采集血样。Tsai 等[35]则设计了一种高效且成本低廉的大鼠颈静脉插管装置，术后大鼠可多只饲养，与单笼饲养大鼠相比，具有更好的活力和更多的日均体重增长。Ghali 发表了用于大鼠股动脉及股静脉插管的微创手术过程[36]。

Bardelmeijer 等[37]开发并验证了一种能在自由活动小鼠上连续采集血样的方法。研究者将插管前端经颈静脉直达右心房，尾端经皮下穿刺牵引至小鼠颈后部穿出，用丝线缝合固定在皮肤上，插管体外部分用带有金属弹簧的 PVC 套管保护。单个时间点可采集 250 μL 血样并且小鼠受到的外部干扰很小。对 6 只颈静脉插管小鼠静脉注射10 mg/kg 抗肿瘤药物多西他赛后，将测得的血浆浓度-时间曲线与同样剂量的 50 只非插管小鼠经心脏穿刺取血后所测的结果进行比较，两者无显著差异，证明该方法在多西他赛的药动学研究中可以有效替代传统采血方法，大幅减少小鼠数量。

国内研究者不断学习国外先进技术，摸索和建立符合自身条件的动物实验技术和方法。包伦等[38]建立了在大鼠股动脉和股静脉插管的模型，并应用于促红细胞生成素和白细胞介素 6 的药动学研究，结果证明注射简单准确，采血方便可控，大鼠自由清醒。研究者详细介绍了手术的流程、大鼠术后的维护以及保证实验顺利的重要因素，值得国内同行学习借鉴。王晶晶等[39]为解决药代动力学实验中反复静脉给药和取血的操作问题，建立大鼠颈静脉插管方法。此法简便易行、对动物损伤小且大大提高实验人员的取血效率。代恒等[40]利用临床常见的硬膜外麻醉导管和输液器部件制作简便实用的大鼠颈动脉插管，通过改进皮下留置导管和改变抓取大鼠的用力方式，有效避免操作不当导致的插管模型失败。史宏博等[41]借鉴前人的经验，在不同种系小鼠上成功建立经显微外科手术进行股动脉和股静脉插管的模型，可在小鼠清醒和自由活动状态下进行给药、采血和血压等体征的监测。该文详细介绍了手术流程并附图说明以供同行借鉴。窦全林等[42]则利用自制的动脉插管建立了小鼠颈动脉插管模型，具有操作简便、创伤小、动物存活率高、插管稳定性强和术后不易感染的优点。文科等[43]建立的大鼠股动脉插管手术模型，则通过连接三通阀实现连续采血同时监控血压。宋文煜等[44]发现小鼠右侧颈横静脉与肩胛上静脉汇入点之间为最佳插管前端位置，可大幅度提高小鼠术后存活率和导管通畅率。

3　药动学采血技术的应用

研究者将建立并优化的插管技术，运用到各自药代研究中，在保护动物福利的同时获取更准确合理的实验结果。

（1）Baumann 和 Huestis 的研究团队[45-46]开展 MDMA（常见滥用药，俗称摇头丸，对人类具有神经毒性）在大鼠体内的药动学研究。大鼠经皮下注射不同剂量 MDMA，颈静脉插管采集血样中 MDMA 及其代谢物 MDA 的浓度与剂量呈非线性急剧增加，存在蓄积的可能，该结果与人体药动学数据相似，可在合适的临床剂量使用时作为参考。

（2）Xie 等[47]研究了大鼠单次静脉注射放射性标记的二氢青蒿素（DHA）后的药代动力学、组织分布、消除和质量平衡。大鼠经颈静脉插管后接入自动采血仪。结果显示大鼠脑中[^{14}C]总浓度是血浆中的 2 倍，表明放射性物质可以轻易穿透血脑屏障。红细胞放射活性分布比血浆中高 3 ~ 4 倍，表明 DHA 在治疗血液期疟疾的强大效果可能与此相关。

（3）Minocha 等[48]研究 Sutherlandia（SLD，一种非洲草药补充剂，南非卫生部推荐用于治疗艾滋病）在颈静脉插管大鼠体内短期和长期的暴露对抗

逆转录病毒药物奈韦拉平(NVP)口服生物利用度和药动学研究的影响。短期同服 SLD 后 NVP 的药代动力学相关参数无显著差异,而长期同服后 NVP 的体内暴露则减少 50%。体外诱导实验结果显示 SLD 能导致细胞色素氧化酶 CYP3A4 的 mRNA 表达水平和功能活性的升高。NVP 与 SLD 长期合并使用时可能发生的潜在草药与药物相互作用,需要临床研究结果的进一步证实。

(4) Legette 等[49] 研究啤酒花中膳食类黄酮 Xanthohumol(XN,具有抗氧化、抗菌抗炎、保护心血管和调节免疫系统的潜在作用)的药代动力学。颈静脉插管大鼠灌胃给药不同剂量 XN,其在大鼠血中暴露与剂量有相关性,可用于预测稳态血浆浓度水平,并帮助确定临床研究用药方案。该研究团队还利用颈静脉插管技术开展了雌马酚(Equol)的代谢研究,雌马酚是大豆异黄酮苷元经小肠细菌作用产生的代谢物,对减轻更年期骨质流失有潜在的治疗效果。结果发现雌马酚在卵巢切除模型大鼠体内以葡萄糖醛酸结合物的形式为主(>90%)[50]。

(5) Gong 等[51] 在普通大鼠和易激肠合并症模型大鼠上比较口服给药黄连提取物后小檗碱和巴马汀的药动学。检测颈静脉插管采集血样中小檗碱和巴马汀的浓度后发现,二者在模型大鼠体内的暴露明显高于普通大鼠,均出现双峰现象,可能与模型大鼠的肠功能异常有关。

(6) Shaik 等[52] 开展评价 17-hydroxyprogesterone(17-OHPC,预防早产)替代制剂的使用和替代给药途径的可行性。分别对颈静脉插管的雌性大鼠静注、肌注及灌胃自配溶液或肌注市售油剂。结果显示,静注或肌注自配溶液后,17-OHPC 的平均半衰期约为 11 h,后者生物利用度接近 100%,而灌胃后的生物利用度不到 3%。肌注市售油剂后 17-OHPC 体内浓度虽相对较低,但持续时间较长,生物利用度接近 100%,这跟油剂在给药部位缓慢但持续的吸收有关。该结果侧面证实了目前有早产史妇女预防早产的唯一治疗选择是每周肌注一次市售油剂。

(7) Lee 等[53] 通过使用颈静脉插管大鼠验证了化合物 IDP-73152(韩国已批准临床用于治疗革兰氏阳性菌引起的感染)的定量检测方法,证明其可满足非临床药代研究的需要。

(8) Linnik 等[54] 用颈静脉插管大鼠评估有无同位素标记烟酰胺的大鼠药动学差异,结果显示两者在临床剂量范围内无显著差异,为临床使用同位素标记烟酰胺作为 MRI 试剂提供数据支持。

以上药代研究均采用了大鼠颈静脉插管技术,这也是专业领域内接受度最广的技术方式,但也有研究者采用其他部位插管技术以满足自身科研需要。例如 Kielbasa 和 Fung[55] 研究吸入性亚硝酸异丁酯(ISBN,挥发性有机亚硝酸盐,治疗心血管疾病,易于引起药物滥用)在大鼠体内的浓度-药效关系,同时监测血压和心率。大鼠持续 1 h 吸入浓度范围在 20 ~ 1200 ppm 的 ISBN,股动脉插管采集血中的 ISBN 浓度在吸入期间达到相对稳态且与吸入浓度成线性相关。吸入结束后,血压和心率很快恢复,没有撤药后的反弹效应。该结果对于了解该挥发性药物的性质、治疗特点甚至减少药物滥用都有所帮助。

近年来,有研究者开始关注插管技术中的细节对实验动物的状态乃至药代研究结果造成的影响。Teilmann 等[56] 发现小鼠经颈动脉插管手术并接入自动采血仪器后会引起体内 IL-6 水平的增高,并且会引发心、肝、肾及唾液腺的炎症及器官损害。Gaud 等[57] 发现 logP 值大的化合物可能与插管材料存在非特异性吸附,其研究结果暗示静注给药和采血共用同一根大鼠颈静脉插管可能导致药动学研究结果的偏差,并建议可通过双插管解决问题。Luca 等[58] 证明枸橼酸钠溶液替代肝素钠溶液作为封管溶液时会有挥发现象,从而增加模型失败率。研究者通过使用硝化纤维素防腐涂层增强插管尾端的密闭性,极大提高了模型的稳定性。Chen 等[59] 比较了心内注射和灌胃给药 8 种化合物后,分别经大鼠颈动脉插管和尾静脉取血后测得药物浓度-时间曲线下面积(AUC),结果显示非酸性化合物的 AUC 差别较大,颈动脉插管取血后测得的 AUC 远高于尾静脉取血,且差异程度与该化合物的分布容积(V_D)呈正相关。

4 小结

本人所在实验室经过多年摸索,建立起大鼠股动静脉插管技术平台,并成功运用于多个中药多成分药代课题的研究[60-65],结合本文文献内容及自身使用经验,现将大小鼠不同插管部位的特点进行简要比较和总结。

表 1　不同插管部位的比较

Table 1　Comparison of different intubation sites

项目 Items	颈动脉 Carotid artery	颈静脉 Jugular vein	股动脉 Femoral artery	股静脉 Femoral vein
用途 Application	采血 Blood sampling	采血或给药 Blood sampling or injection	采血 Blood sampling	采血或给药 Blood sampling or injection
解剖位置 Anatomical location	靠近心肺脑等器官 Close to important organs	靠近心肺脑等器官 Close toimportant organs	远离心肺脑等器官 Away from important organs	远离心肺脑等器官 Away from important organs
失败风险及死亡率 Failure risk and mortality	高 Higher	高 Higher	低 Lower	低 Lower
手术视野 Operative vision	血管浅表,视野好 Superficial vessels and good vision	血管浅表,视野好 Superficial vessels and good vision	血管深,视野窄 Deep vessels and narrow vision	血管深,视野窄 Deep vessels and narrow vision
手术中失血 Blood loss	失血少 Less	失血少 Less	失血较多 More	失血较多 More
采血速度 Blood collection	采血慢 Slow	采血慢 Slow	采血快 Fast	采血快 Fast
插管进入的距离 Distance of intubation	近 Near	近 Near	远 Far	远 Far
插管引出的部位 Where the intubation leads out	背部皮下 Back subcutaneous	背部皮下 Back subcutaneous	尾部皮下 Tail subcutaneous	尾部皮下 Tail subcutaneous
固定方式 Fixed mode	缝合或马甲 Suture or vest	缝合或马甲 Suture or vest	尾部套管 Tail cuff	尾部套管 Tail cuff
术后恢复 Postoperative recovery	适应久 Long adaptation time	适应久 Long adaptation time	适应快 Short adaptation time	适应快 Short adaptation time
捉持的影响 Impact of catching on the model	影响较大 Greater	影响较大 Greater	较安全 Safer	较安全 Safer

由上表可知,两类插管方法的最主要区别是插管部位不同,从而形成各自不同的特点。股动静脉插管手术部位在腹股沟附近,远离心、肺和脑等重要组织器官,且血管相对较粗,采血速度也较快,初学者培训后较易上手及熟练掌握。但该处血管位置较深,分离组织多,手术视野较窄,穿刺时出血量较大,失血相对较多。导管前端推进体内较远距离可获得稳定的采血速度和血量。插管尾端可顺势经尾部皮下穿刺引出体外,再经特殊套管固定于尾部,大鼠适应时间短,恢复到术前状态较快。实验中捉持大鼠对插管部位的影响小,模型稳定性高。而颈动静脉插管手术部位在颈部两侧,存在影响心肺和脑部器官的风险,手术失败后实验动物的死亡率相对较高,且血管相对较细,采血速度适中。该处血管较浅表,无需分离太多组织即可暴露手术视野,穿刺时出血量不大。插管前端无需推进太远即可进入心脏以获得稳定的采血速度和血量。插管尾端经皮下至背部引出并缝合至皮肤或由“马甲”装置固定于背部,但大鼠需提前适应佩戴该装置,且术后恢复时间较长。实验中捉持大鼠,尤其是灌胃等操作可能对插管部位的造成影响,模型稳定性不如前者。

综合以上,两类插管手术各有其特点和使用范围,如能结合研究药物的药效作用部位、药理作用机制、给药方式特征以及实验技术人员的特长,选择最适合研究项目的插管技术和方法,也许会对药代课题研究进展起到更积极的推动作用。

参　考　文　献(References)

[1] Bayne K, Ramachandra GS, Rivera EA, et al. The evolution of animal welfare and the 3Rs in brazil, China, and India [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015, 54(2): 181-191.

[2] 李楠, 孙荣泽, 王天奇, 等. “我们”的福音——实验动物福利伦理法规与标准[J].中国比较医学杂志, 2016, 26(3): 89-90.
Li N, Sun RZ, Wang TQ, et al. Our Gospel — Laws and

Standards of laboratory animal welfare ethics [J]. Chin J Comp Med, 2016, 26(3): 89-90.

[3] Terrestrial animal health code, chapter 7.8. World Organization for Animal Health (OIE) [EB/OL]. [2013]. https://www.oie.int/index.php? id=169&L=0&htmfile=chapitre_aw_research_education.htm.

[4] International guiding principles for biomedical research involving animals. Council for International Organizations of Medical Sciences/International Council for Laboratory Animal Science (CIOMS/ICLAS) [EB/OL]. [2012-12]. http://iclas. org/wp-content/uploads/2013/03/CIOMS-ICLAS-Principles-Final.pdf.

[5] Institute for Laboratory Animal Research. Guide for the care and use of laboratory animals [M]. Washington (DC): National Academies Press; 2011.

[6] Guide for the care and use of agricultural animals in research and teaching, 3rd ed. Federation of Animal Science Societies [EB/OL]. [2010]. https://www. fass. org/images/science-policy/FASS_Policy_Farm_Animal_Wellbeing.pdf.

[7] European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes (ETS 123). Council of Europe [EB/OL]. [1986-3-18]. http://conventions.coe.int/Treaty/en/Treaties/html/123.htm.

[8] Regulations for the Administration of Affairs Concerning Experimental Animals. Ministry of Science and Technology (MOST) [EB/OL]. [2013-7-18]. http://www. gov. cn/gongbao/content/2014/content_2692743.htm.

[9] Guideline of humane treatment of laboratory animals. Ministry of Science and Technology (MOST) [EB/OL]. [2006-9-30]. http://www. most. gov. cn/mostinfo/xinxifenlei/fgzc/gfxwj/gfxwj2006/201712/t20171222_137025.htm.

[10] 中国实验动物学会实验动物福利伦理专业委员会. 实验动物福利伦理审查指南. GB/T 35892-2018 [S]. 2018.
Laboratory animal welfare and ethics professional committee, chinese association for laboratory animal sciences. Laboratory animal—Guideline for ethical review of animal welfare. GB/T 35892-2018 [S]. 2018.

[11] 孙德明, 李蔚鸥, 王天奇, 等. 实验动物福利伦理审查的标准化与我国新国标解读 [J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(10): 133-137.
Sun DM, Li WO, Wang TQ, et al. Standardization of ethical review for laboratory animal welfare and interpretation of the new national standards in China [J]. Chin J Comp Med, 2018, 28(10): 133-137.

[12] Deshmukh SV, Durston J, Shomer NH. Validation of the use of nonnaive surgically catheterized rats for pharmacokinetics studies [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2008, 47(6): 41-45.

[13] Shirasaki Y, Ito Y, Kikuchi M, et al. Validation studies on blood collection from the jugular vein of conscious mice [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2012, 51(3): 345-351.

[14] van Herck H, Baumans V, Stafleu FR, et al. A questionnaire-based inventory of the orbital puncture method in The Netherlands [J]. Scand J Lab Anim Sci, 1992, 19: 189-196.

[15] van Herck H, Baumans V, van Lith H, et al. Is orbital puncture justifiable for the collection of non-terminal blood samples from rats? A literature review and making a stand. In: Orbital puncture: a non-terminal blood sampling technique in rats. PhD thesis (van Herck H, ed) [D]. The Netherlands: Utrecht University; 1999.

[16] Evans GO. Removal of blood from laboratory mammals and birds [J]. Lab Anim, 1994, 28(2): 178-179.

[17] Francisco CC, Howarth GS, Whittaker AL. Effects on animal wellbeing and sample quality of 2 techniques for collecting blood from the facial vein of mice [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015, 54(1): 80-84.

[18] Tabata Y, Chang TM. Intermittent vascular access for extracorporeal circulation in conscious rats: a new technique [J]. Artif Organs, 1982, 6(2): 213-215.

[19] Chester JF, Weitzman SA, Malt RA. Implantable device for drug delivery and blood sampling in the rat [J]. J Appl Physiol, 1985, 59(5): 1665-1666.

[20] Koeslag D, Humphreys AS, Russell JC. A technique for long-term venous cannulation in rats [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1984, 57(5): 1594-1596.

[21] Hall RI, Ross LH, Bozovic M, et al. A simple method of obtaining repeated venous blood samples from the conscious rat [J]. J Surg Res, 1984, 36(1): 92-95.

[22] Yoburn BC, Morales R, Inturrisi CE. Chronic vascular catheterization in the rat: comparison of three techniques [J]. Physiol Behav, 1984, 33(1): 89-94.

[23] Burt ME, Arbeit J, Brennan MF. Chronic arterial and venous access in the unrestrained rat [J]. Am J Physiol, 1980, 238(4): H599-H603.

[24] Cocchetto DM, Bjornsson TD. Methods for vascular access and collection of body fluids from the laboratory rat [J]. J Pharm Sci, 1983, 72(5): 465-492.

[25] Rigalli A, DiLoreto VE. Experimental surgical models in the laboratory rat [M]. New York: CRC Press; 2009.

[26] Waynforth HB, Flecknell PA. Experimental and surgical tehcnique in the rat [M]. Burlington: Elsevier Academic Press; 2007.

[27] Steffens AB. A method for frequent sampling of blood and continuous infusion of fluids in the rat without disturbing the animal [J]. Physiol Behav, 1969, 4(5): 833-836.

[28] Thrivikraman KV, Huot RL, Plotsky PM. Jugular vein catheterization for repeated blood sampling in the unrestrained conscious rat [J]. Brain Res Protoc, 2002, 10(2): 84-94.

[29] Vahl TP, Ulrich-Lai YM, Ostrander MM, et al. Comparative analysis of ACTH and corticosterone sampling methods in rats [J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 289(5): E823-E828.

[30] Staub JF, Coutris G. A technique for multiple, high-rate blood samplings via an external cannula in rats [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1979, 46(1): 197-199.

[31] Buhler HU, da Prada M, Haefely W, et al. Plasma adrenaline, noradrenaline and dopamine in man and different animal species [J]. J Physiol, 1978, 276(3): 311-320.

[32] Ling S, Jamali F. Effect of cannulation surgery and restraint stress on the plasma corticosterone concentration in the rat: application of an improved corticosterone HPLC assay [J]. J Pharm Pharm Sci, 2003, 6(2): 246-251.

[33] Jespersen B, Knupp L, Northcott CA. Femoral arterial and venous catheterization for blood sampling, drug administration and conscious blood pressure and heart rate measurements [J]. J Vis Exp, 2012, 59: e3496.

[34] Feng J, Fitz Y, Li Y, et al. Catheterization of the carotid artery and jugular vein to perform hemodynamic measures, infusions and blood sampling in a conscious rat model [J]. J Vis Exp, 2015, 95: e51881.

[35] Tsai HL, Chang JW, Liu CS, et al. A newly designed total implantable venous access device in rats for research with high efficiency and low cost [J]. J Surg Res, 2014, 187(1): 36-42.

[36] Ghali MGZ. Microsurgical technique for femoral vascular access in the rat [J]. MethodsX, 2017, 4: 498-507.

[37] Bardelmeijer HA, Buckle T, Ouwehand M, et al. Cannulation of the jugular vein in mice: a method for serial withdrawal of blood samples [J]. Lab Anim, 2003, 37(3): 181-187.

[38] 包伦, 徐贤坤, 曾宪垠. 大鼠股动静脉插管手术方法的建立及应用 [J]. 中国科技信息, 2005, 17(18): 235-237.
Bao L, Xu XK, Zeng XY. Development for the method of chronic arteriovenous catheterization in rats [J]. Chin Sci Tech Inform, 2005, 17(18): 235-237.

[39] 王晶晶, 焦昆, 李兵, 等. 介绍一种新的大鼠颈外静脉插管方法 [J]. 实验动物科学, 2008, 25(2): 52-53.
Wang JJ, Jiao K, Li B, et al. A new method of the indwelling catheter in the rat external jugular vein [J]. Lab Anim Sci, 2008, 25(2): 52-53.

[40] 代恒, 韩振坤, 李雯琪, 等. 一种简单的大鼠颈动脉插管及插管模型改进[J]. 中国医科大学学报, 2009, 38(10): 798-799.
Dai H, Han ZK, Li WQ, et al. A method to produce simple and practical rat carotid arterial catheter and an improvement on the intubation catheter model [J]. J Chin Med Univ, 2009, 38(10): 798-799.

[41] 史宏博, Ruth M, 王尊,等. 小鼠股动脉及股静脉插管手术模型制备方法[J]. 宁波大学学报, 2012, 25(3): 71-74.
Shi HB, Ruth M, Wang Z, et al. Introduction of a micro-surgery model through femoral arterial and venous catheters in mice [J]. J Ningbo Univ(Nat Sci Eng Edit), 2012, 25(3): 71-74.

[42] 窦全林, Hao F, 莫重辉, 等. 一种简捷安全的小鼠颈动脉插管法[J]. 中国兽医杂志, 2015, 51(4): 94-95.
Dou QL, Hao F, Mo CH, et al. A simple and safe method of carotid artery intubation in mice [J]. Chin J Vet Med, 2015, 51(4): 94-95.

[43] 文科,林哲绚,林文昊, 等. 大鼠股动脉插管——一种有创血压监测及短时连续采血方法[J]. 汕头大学医学院学报, 2016, 29(3): 168-170.
Wen K, Lin ZX, Lin WH, et al. Cannulation of femoral artery in rats——a method for invasive blood pressure monitoring and short-term serial blood sampling [J]. J Shantou Univ Med Coll, 2016, 29(3): 168-170.

[44] 宋文煜,张辰宇,殷冲冲, 等. 小鼠颈静脉插管模型的建立 [J]. 江苏医药, 2018, 44(3): 236-238.
Song WY, Zhang CY, Yin CC, et al. Establishment of jugular vein catheterization model in mice [J]. Jiangsu Med J, 2018, 44(3): 236-238.

[45] Baumann MH, Zolkowska D, Kim I, et al. Effects of dose and route of administration on pharmacokinetics of (±)-3, 4-methylenedioxymethamphetamine in the rat [J]. Drug Metab Dispos, 2009, 37(11): 2163-2170.

[46] Concheiro M, Baumann MH, Scheidweiler KB, et al. Nonlinear pharmacokinetics of (±)3, 4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA) and its pharmacodynamic consequences in the rat [J]. Drug Metab Dispos, 2014, 42(1): 119-125.

[47] Xie LH, Li QG, Zhang J, et al. Pharmacokinetics, tissue distribution and mass balance of radiolabeled dihydroartemisinin in male rats [J]. Malar J, 2009, 8: 112.

[48] Minocha M, Mandava NK, Kwatra D, et al. Effect of short term and chronic administration of *Sutherlandia frutescens* on pharmacokinetics of nevirapine in rats [J]. Int J Pharm, 2011, 413(1-2): 44-50.

[49] Legette L, Ma L, Reed RL, et al. Pharmacokinetics of xanthohumol and metabolites in rats after oral and intravenous administration [J]. Mol Nutr Food Res, 2012, 56(3): 466-474.

[50] Legette LC, Prasain J, King J, et al. Pharmacokinetics of equol, a soy isoflavone metabolite, changes with the form of equol (dietary versus intestinal production) in ovariectomized rats [J]. J Agric Food Chem, 2014, 62(6): 1294-1300.

[51] Gong ZP, Chen Y, Zhang RJ, et al. Pharmacokinetics of two alkaloids after oral administration of *Rhizoma Coptidis* extract in normal rats and irritable bowel syndrome rats [J]. Evid Based Complement Altern Med, 2014, 2014: 845048.

[52] Shaik IH, Bastian JR, Zhao Y, et al. Route of administration and formulation dependent pharmacokinetics of 17-hydroxyprogesterone caproate in rats [J]. Xenobiotica, 2016, 46(2): 169-174.

[53] Lee M, Kim D, Shin J, et al. Quantification of IDP-73152, a novel antibiotic, in plasma from mice, rats and humans using an ultra-high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for use in pharmacokinetic studies [J]. J Pharm Biomed Anal, 2017, 145: 364-371.

[54] Linnik IV, Rayner PJ, Stow RA, et al. Pharmacokinetics of the SABRE agent 4,6-d_2-nicotinamide and also nicotinamide in rats following oral and intravenous administration [J]. Eur J Pharm Sci, 2019, 135: 32-37.

[55] Kielbasa W, Fung HL. Relationship between steady-state pharmacokinetics and hemodynamic effects of inhaled isobutyl

nitrite in conscious rats [J]. AAPS Pharmsci, 2000, 2(2): E11.

[56] Teilmann AC, Rozell B, Kalliokoski O, et al. Carotid catheterization and automated blood sampling induce systemic IL-6 secretion and local tissue damage and inflammation in the heart, kidneys, liver and salivary glands in nmri mice [J]. PLoS One, 2016, 11(11): e0166353.

[57] Gaud N, Kumar A, Matta M, et al. Single jugular vein cannulated rats may not be suitable for intravenous pharmacokinetic screening of high logP compounds [J]. Eur J Pharm Sci, 2017, 99: 272-278.

[58] Luca TD, Szilágyi KL, Hargreaves KA, et al. Improving the patency of jugular vein catheters in Sprague - Dawley rats by using an antiseptic nitrocellulose coating [J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2018, 57(5): 520-528.

[59] Chen WC, Huang PW, Yang WL, et al. Fundamentals of pharmacokinetics to assess the correlation between plasma drug concentrations and different blood sampling methods [J]. Pharm Res, 2019, 36(2): 32.

[60] Li L, Zhao YS, Du FF, et al. Intestinal absorption and presystemic elimination of various chemical constituents present in GBE50 extract, a standardized extract of *Ginkgo biloba* Leaves [J]. Curr Drug Metab, 2012, 13(5): 494-509.

[61] Chen F, Li L, Xu F, et al. Systemic and cerebral exposure to and pharmacokinetics of flavonols and terpene lactones after dosing standardized *Ginkgo biloba* leaf extracts to rats via different routes of administration [J]. Br J Pharmacol, 2013, 170(2): 440-457.

[62] Jia W, Du FF, Liu X, et al. Renal tubular secretion of Tanshinol: molecular mechanisms, impact on its systemic exposure, and propensity for dose-related nephrotoxicity and for herb-drug interactions [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(5): 669-678.

[63] Jiang RR, Dong JJ, Li XX, et al. Molecular mechanisms governing different pharmacokinetics of ginsenosides and potential for ginsenoside-perpetrated herb-drug interactions on OATP1B3 [J]. Br J Pharmacol, 2015, 172(4): 1059-1073.

[64] Li MJ, Wang FQ, Huang YH, et al. Systemic exposure to and disposition of catechols derived from *Salvia miltiorrhiza* roots (danshen) after intravenous dosing Danhong injection in human subjects, rats, and dogs [J]. Drug Metab Dispos, 2015, 43(5): 679-690.

[65] Dong JJ, Olaleye OE, Jiang RR, et al. Glycyrrhizin has a high likelihood to be a victim of drug - drug interactions mediated by hepatic organic anion-transporting polypeptide 1B1/1B3 [J]. Br J Pharmacol, 2018, 175(17): 3486-3503.

[收稿日期] 2019-07-17

戴明珠,黄燕烽,彭逸,等. 斑马鱼发育毒性与致畸性相关实验研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 137-142.
Dai MZ, Huang YF, Peng Y, et al. Advances in zebrafish experimental research on developmental toxicity and teratogenicity [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 137-142.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.020

斑马鱼发育毒性与致畸性相关实验研究进展

戴明珠[1],黄燕烽[1],彭逸[1],张双阳[1],张立将[2],李春启[1,2*]

(1. 杭州环特生物科技股份有限公司,杭州 310051;
2. 浙江省人用物品安全性评价技术研究重点实验室早期评价基地,杭州 310053)

【摘要】 自 1994 年 Science、Nature 等杂志发表专题评述,至 2009 年野生型 AB 品系斑马鱼全基因组测序完成,斑马鱼已经成为一种公认的新型模式生物。斑马鱼模式生物在发育毒性与致畸性研究中引人注目的优势是胚胎发育的透明性,基于高通量的检测体系,以及短时-高效-低费筛选,用于中药毒理和重大疾病中中药活性成分筛选,以及小分子化合物的大规模新药筛选研究。随着"3R 原则"的推行与实施,斑马鱼可能发展成为发育毒性与致畸性试验哺乳动物替代模型。概括介绍了国内外斑马鱼发育毒性与致畸性研究最新进展。

【关键词】 斑马鱼;胚胎;发育毒性与致畸性
【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020) 01-0137-06

Advances in zebrafish experimental research on developmental toxicity and teratogenicity

DAI Mingzhu[1], HUANG Yanfeng[1], PENG Yi[1], ZHANG Shuangyang[1], ZHANG Lijiang[2], LI Chunqi[1,2*]

(1. Hunter Biotechnology, Inc., Hangzhou 310051, China.
2. Early Test Base of Zhejiang Province Key Labrotary of Human Supplier Safety Evaluation, Hangzhou 310053)
Corresponding author: LI Chunqi. E-mail:jackli@zhunter.com

【Abstract】 Since the publication of special reviews and commentaries on zebrafish (*Danio rerio*) in Science, Nature, and other journals in 1994, and completion of the whole genome sequencing of wild type (AB strain) zebrafish in 2009, the zebrafish has become a well-recognized new model organism. The remarkable advantages of zebrafish in the research and assessment of developmental toxicity and teratogenicity includes its transparency, high throughput, and rapid, high-efficiency, and low-cost screening. Zebrafish have been extensively used to screen the active components of traditional Chinese medicine for toxicological and pharmaceutical investigations, as well as for large-scale new drug screening of small molecule compounds. With the implementation of the "3R principle (Reduction, Replacement, Refinement)", the zebrafish has been proposed as an alternative animal model for developmental toxicity and teratogenicity tests. The recent progress of developmental toxicity and teratogenicity assessments in zebrafish is reviewed in this report.

【Keywords】 zebrafish; embryo; developmental toxicity and teratogenicity
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

1996 年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,FDA)规定,药物在获批准许人类使用之前需进行生殖和发育毒性评估[1]。现行的发育毒性指导原则主要包括经济合作与发展组织(Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD)条例 TG414[2]、TG416[3]、

[**基金项目**]国家"重大新药创制"科技重大专项(2017ZX09031059)。
Funded by National Science and Technology Major Project "Major New Drug Creation" (2017ZX09031059).
[**作者简介**]戴明珠(1991—),女,硕士,主要从事中药药理及新产品开发。Email: 465250609@qq.com
[**通信作者**]李春启(1963—),男,博士,教授,主要从事药理学和毒理学研究。Email: jackli@zhunter.com

TG421[4]、TG422[5]和人用药品注册技术要求国际协调会议(International Conference on Harmonization, ICH)准则 S5(R3)[6],其中建议使用的实验动物可以选择常规种属(大鼠、兔、小鼠)、非常规种属(食蟹猴、小型猪)、有限使用种属(豚鼠、仓鼠、犬、雪貂)和其他替代实验动物[7]。为快速、准确推行和实施减少(reduction)、替代(replacement)和优化(refinement)原则,实现保护动物福利和减少哺乳动物等较高级实验动物的使用量,斑马鱼(Zebrafish, *Danio rerio*)发育毒性实验替代哺乳动物模型已广泛应用于药物的发育毒性与致畸性研究[8-9]。本文介绍了国内外斑马鱼发育毒性与致畸性研究最新进展。

1 发育毒性试验替代方法

食品、药品和环境安全问题是当前全人类都必须面临的一个严峻的问题。如,目前人们普遍认为,膳食纤维可分为两种,可溶性膳食纤维(低聚果糖、果胶、菊粉等)和不可溶性膳食纤维(维生素等)。前者易在肠道中被细菌降解,产生短链脂肪酸等一系列益于人体的代谢产物,后者则不容易被消化酶降解,而起到促进肠道蠕动的作用。然而 2018 年 10 月 18 日,《细胞》(*Cell*)杂志发表文章表明,长期喂食水溶性纤维会导致小鼠发生癌症[10]。这里并不宣扬膳食纤维是有害的,相反,应该说经过高度处理的可溶性膳食纤维并不是那么安全,有可能会引起肠道菌群的过度生长和失调,可能会增加罹患肝癌的风险。

2009 年 9 月,欧洲化学品管理局(European Chemicals Agency, ECHA)新闻稿就已报道,有超过 143 835 种已预先注册的化学品会污染食品和环境[11],但其中约 86%的化学品和其他现有化学品的安全性检测数据即时缺失的[12],这些实际数字远远超过了人们的认知。又根据 OECD 指导方针,评估一种化学品的发育毒性需要 5816 只动物,费用为 1 883 200英镑[13]。因此,促使研究和发展发育毒性试验的替代方法是顺势而为的。早期的替代方法大概可分为整体胚胎培养试验、哺乳动物微驴试验、爪蛙试验和胚胎干细胞试验。前两个模型仍然使用完整的哺乳动物作为实验对象,仍属于高费-低效系统,而蛙类专长于神经纤维兴奋传递类实验,胚胎干细胞本身一直是一个具有争议的领域。

因此,斑马鱼发育毒性试验替代方法似乎是适用的。斑马鱼胚胎在母体外发育,从合子期到孵化期仅 72 h,且发育的完整过程均是透明的,利于实时观察和检测(斑马鱼、大鼠和人胚胎发育时期的比较见表 1)。斑马鱼幼鱼长 3 ~ 4 mm,拥有 6-384 孔板的高通量检测体系,可实现低费-高效筛选。斑马鱼与人类基因同源性达到 87%[14-16],用于药物的体内快速评价实验结果可比性强。故可以利用斑马鱼早期各个阶段的发育形态,准确高效的确定药物暴露在胚胎中的毒性,广泛应用于药物的发育毒性与致畸性研究。

表 1 斑马鱼、大鼠和人胚胎发育时期的比较

Table 1 Comparison of embryonic development periods among zebrafish, rat and human

发育时期 Development periods	斑马鱼(小时) Zebrafish (h)	大鼠(天) Rat (d)	人(天) Human (d)
卵裂期 Cleavage stage	0	1 ~ 2	1 ~ 5
8-细胞期 8-cell stage	0.75	-	4
原肠期 Gastrula stage	5.25 ~ 10	6 ~ 8	2 ~ 4
初始神经胚形成 Initial neuroembryogenesis	9	8	22
脑室发生 Ventricularogenesis	30	10	5 ~ 9
心叶形成 Cardiac lobe formation	22	8	16
心脏搏动 Heart beat	30	8	22
器官发生 Organogenesis	24 ~ 48	8 ~ 14	4 ~ 8
颅面发生 Craniofacial development	24	8	22

2 斑马鱼发育毒性国内外最新研究进展

2010 年,Brannen 等[14]利用斑马鱼胚胎评价 31 种已知对体内哺乳动物胚胎致畸/不致畸化合物的致畸性,证实斑马鱼与哺乳动物体内发育毒性与致畸性评价的一致性为 87%。同一年,由阿斯利康(AstraZeneca)牵头的 4 个实验室间[15]利用斑马鱼对 20 种化合物的发育毒性进行盲法评估,并详细规范了斑马鱼发育毒性与致畸性的实验方法、检测指标和结果判定(毒性/畸形分级以及评分标准),最终,4 个实验室的结果与哺乳动物数据的整体一致性范围在 60% ~ 70%。经过进一步的调整,更多因素如 pH、绒毛膜的通透性、胚胎的摄取率等考虑在内。2014 年,阿斯利康又在两个实验室内平行对 38

种化合物的发育毒性与致畸性进行了评估,此次两个实验室间的总一致性达到 62% ~ 82%[16]。近年来国外斑马鱼发育毒性研究报告汇总详见表 2。

2013 年,鲁疆等[17]、夏继刚等[18]先后成功利用斑马鱼胚胎评价氯化铬等重金属离子和全氟辛烷磺酸等有机污染物对水生生态的毒理学效应。2016 年,许冰洁等[19]利用斑马鱼评价 5 种已知对人类胚胎致畸药物的毒性与安全性,证实斑马鱼胚胎模型可用于初步评价药物的发育毒性和安全性。

表 2　斑马鱼发育毒性研究报告汇总

Table 2　Summary of developmental toxicity study reports in zebrafish

时间 Time	实验室 Laboratory	斑马鱼品系 Zebrafish Lines	处理时间 Exposure Period	评价指标 Evaluation Index	预测性/化合物数目 Predictability/ Test compounds	备注 Notes
2011	OECD	—	0 hpf-4 dpf	LC_{50}	—/7	实验平行在 7 个实验室中进行 Experiments were evaluated in 7 laboratories
2011	OECD	—	0 hpf-4 dpf	LC_{50}	—/13	实验平行在 4 个实验室中进行 Experiments were evaluated in 4 laboratories
2011	阿斯利康等 AstraZeneca et al.	野生型 Wild type	6 hpf-5 dpf	形态学分级、LC_{25}、LOAEL、NOAEL Morphological scoring, LC_{25}, LOAEL, NOAEL	60% ~ 70%/20	实验平行在 4 个实验室中进行 Experiments were evaluated in 4 laboratories
2012	佛兰德技术研究所 FITR	野生型 Wild type	2 hpf-6 dpf	TI($=LC_{50}//EC_{50}$)	50% ~ 60%/27	实验重复 3 次 Experiments were conducted for 3 times
2012	赛诺菲等 Phylonix et al.	—	6 hpf-5 dpf	TI($=LC_{50}//EC_{50}$)	92%/12	—
2014	阿斯利康等 AstraZeneca et al.	野生型 Wild type	6 hpf-5 dpf	形态学分级、LOAEL、TI($=LC_{25}$/NOAEL) Morphological scoring, LOAEL, TI ($=LC_{25}$/NOAEL)	62% ~ 82%/38	实验平行在 2 个实验室中进行 Experiments were evaluated blinded in 2 laboratories
2014	FDA	hb9:GFP 转基因 hb9:GFP transgenic	24 hpf-52 hpf	体长和体周长 Body length, fiber length	—/5	—

3　斑马鱼发育毒性与致畸性评价实验室间比对

国外学者利用斑马鱼进行化合物发育毒性与致畸性评价,其化合物一般可归为五类:A 妊娠初 3 个月用药,经临床对照未发现对胎儿有损害;B 动物实验未显示对胎仔有危害,但缺乏临床观察资料;C 动物实验显示对胎仔有危害,但未在妊娠早期临床试验中证实;D 对人类胎儿有危害,但利大于弊;X 妊娠妇女禁用药。实验一般规范选用受精后 6 h (hours post fertilization, 6 hpf) 野生型 AB 系斑马鱼于 24 孔板中,每孔处理 1 个胚胎,每孔药液体积为 1 mL,12 个 1 组,每个化合物均统一给予五个浓度 (0.1、1、10、100 和 1000 μmol/L 浓度,调节 pH 使控制在 6.4 ~ 8.4),在受精后第 5 天 (day post fertilization, 5 dpf) 观察斑马鱼的形态学结构/器官并进行评价。最终实验结果将与哺乳动物数据进行比较,计算斑马鱼与哺乳动物的一致性,由表 2 可知,实验结果的预测性最低为 50%,最高可达 92%。

许冰洁[22]等利用斑马鱼胚胎评价了环磷酰胺、乙酸地塞米松、乙酰水杨酸、盐酸四环素和阿扎胞苷 5 种已知对人类胚胎致畸药物的毒性和安全性。实验选用已知的胚胎致畸性阳性药沙利度胺和阴性药维生素 C 建立斑马鱼胚胎发育毒性模型,并设立格列本脲、头孢噻肟钠两种阴性药对实验方法进行验证。挑选 4 hpf AB 系斑马鱼于 6 孔板中,每孔

处理 30 个胚胎,每孔药液体积为 3 mL,每个化合物均统一给予 4 个浓度:1/10 MNLC、1/3 MNLC、MNLC(maximum non-lethal concentration,最大非致死浓度)和 LC_{10}(10%死亡浓度),并分别以 0.5%二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide,DMSO)和人工海水为溶剂对照组和空白对照组,在 28.5℃条件下发育至 5 dpf,观察斑马鱼的形态学结构/器官和死亡数量并进行评价。结果表明,5 种药物 50%死亡浓度(median lethal concentration,LC_{50})由大到小为环磷酰胺 > 阿扎胞苷 > 盐酸四环素 > 乙酰水杨酸 > 乙酸地塞米松,半最大效应浓度(concentration for 50% of maximal effect,EC_{50})由大到小为环磷酰胺 > 盐酸四环素 > 阿扎胞苷 > 乙酰水杨酸 > 乙酸地塞米松。乙酸地塞米松毒性最强,乙酰水杨酸次之,其次盐酸四环素、阿扎胞苷,环磷酰胺毒性较弱。格列本脲和头孢噻肟钠则均未出现明显的致畸作用。

此外,斑马鱼胚胎还被广泛运用于 Cd^{2+}、Cu^{2+}、Hg^{2+}等重金属离子[23-24]的发育毒性效应研究;农乳 602(苯乙基酚聚氧乙烯醚)、宁乳 33#(苯乙烯基苯酚甲醛树脂聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段聚醚)、农乳 700 号(烷基酚聚氧乙烯醚甲醛缩合物)、OP-10(辛基酚聚氧乙烯醚)、NP-10(壬基酚聚氧乙烯醚),农乳 1602(三苯乙基酚聚氧乙烯聚氧丙烯醚)等多种市售表面活性剂[25]的发育毒性效应研究;甲草胺、乙草胺、丙草胺、丁草胺、异丙甲草胺等多种酰胺类除草剂[26]以及其他农药的毒理研究等。

4 斑马鱼发育毒性与致畸性量化评价指标

2012 年,约翰威立国际出版公司(John Wiley & Sons)联合赛诺菲-安万特(Sanofi-Aventis)出版了书籍《斑马鱼:评估药物安全性和毒性的方法》(《Zebrafish: Methods for Assessing Drug Safety and Toxicity》),书中指出,与其他动物模型相比,斑马鱼胚胎的快速发育和透明性是其作为新型模式生物的重要优势,斑马鱼发育毒性试验是为了绘制毒-效效应曲线,并评估药物的致死性。得出 LC_{50}、EC_{50}、TI(Teratogenic Index,$=LC_{50}/EC_{50}$,致畸指数)和畸胎指数[27]。因此,书中详细描述了 5 dpf 时期斑马鱼发育毒性与致畸性形态学评价指标(表 3),并基于 TI 的截断值"1"来判定药物的发育毒性和致畸性:TI > 1,表明这种化合物是具有致畸性的,提示 50%斑马鱼出现发育异常的浓度低于 50%致死浓度;TI < 1,表明非致畸性的;TI = 1,提示发育毒性与致畸性评估必须在精确的 LC_{50}浓度下进行,以确定斑马鱼是否在这个浓度下表现出畸形。

近年来,有学者[18]应用软件拟合出的 EC_{50}值再回到实验中去进行验证,发现拟合 EC_{50}值多低于实际半最大效应浓度,此外,仅用 TI 评价药物的致畸性不够全面。因此,可以见到有些学者会通过统计死亡率,得到无明显损害作用的最大染毒浓度(No Observed Adverse Effect Level,NOAEL)和产生畸形的最低浓度(Lowest Observed Adverse Effect Level,LOAEL),再通过软件拟合得到 LC_{25}(25%死亡浓度),最终计算 TI(LC_{25}/NOAEL)值。

另外,在前期多以描述的方式进行形态学评估的基础上,有学者们对其进行改进,将形态学进行 0.5 ~ 5 评分进而对毒性/畸形进行分级[28]。一般观察指标为躯干、脊索、尾部、鳍、心脏、面部结构(眼睛、耳石、嗅觉区域)、神经管和下颌(以上指标均进行毒性/畸形分级以及评分),肝脏、卵黄囊、鳔和色素沉着(仅描述)。评分对于的毒性/畸形分级为:"5"正常形态学,"4(=NOAEL)"微变等效,"3(=LOAEL)"轻度异常,"2"中度畸形,"1"重度畸形,"0.5"结构缺失。

2014 年,FDA 发表一篇文章,其中仅仅以斑马鱼胚胎体长(Fiber length)和体周长(Body length))作为毒性的统计量化终点[29]。

5 展望

发育毒理学是指研究出生前暴露于环境有害因子导致的异常发育结局及有关的发病机制、发病原理、影响因素和有毒物质动力学等。人类成功妊娠结局的比率低,且有复发性倾向,发病原因复杂[30]。我国药物毒理学研究起步较晚,化药和中药毒理基础数据较少,如仅 2015 版《中国药典》指出的 83 种有毒中药中,至少 15 种完全不能检索到任何一项基础毒性数据信息,过半主要毒性成分和毒性靶器官不明确[31]。常规发育毒性实验常采用啮齿类动物(鼠、兔等)进行,先将成年的正处于发情期的雌雄鼠合笼,判断雌鼠妊娠,至妊娠中后期,方才收集样本进行检测[32-33]。如此实验操作复杂,过程不可控,药物用量大,费用高,无法批量或规模性缓解目前中药/化合物(发育)毒理学评价存在的问题,且哺乳动物试验无法对胚胎及其发育体系进行时-实监测。用胚胎发育透明的斑马鱼模式生物进行药物发育毒性与致畸性的高通量筛选和机制研

究,其快速-高效-经济体系克服了传统哺乳动物实验的劣势,筛选结果预测性好、可比度高,应用前景广泛。

表 3　发育毒性与致畸性评价指标

Table 3　Evaluation indicators of developmental toxicity and teratogenicity

指标 Indicator	参数 Parameter
心脏 Heart	房/室缺失,血流异常,心律不齐 Atria or ventricles loss, abnormal blood flow, arrhythmia
体循环 Circulation	缺失,减慢,瘀血 Lack of systemic circulation, slowing down, thrombus
水肿 Edema	心包积液水肿,身体积液水肿,脑积液水肿 Pericardial hydrops, body hydrops, cerebral hydrops
出血 Hemorrhage	脑部、肝脏、肠道出血 Brain, liver or bowel bleeding
脑 Head	畸形或变性 Malformation, degeneration
眼 Eye	变小或畸形,色素沉着异常 Abnormal size, malformation, hyperpigmentation
下颌 Mandible	变短或畸形 Shorteror malformation
胸鳍 Pectoral fins	变小或缺失 Smaller or absent
肝 Liver	缺失,变小,变大,变性(黑褐色不透明组织) Absent or abnormal size, degeneration (dark brown, opaque tissue)
肠道 Intestinal tract	缺失,无肠腔褶皱,无延伸,变性 Absent, no or oversized lumen, does not extend to anal pore, degeneration
肌肉 Trunk muscle	肌肉纹理紊乱 Muscle texture disordered or irregular
尾 Tail	变短,弯曲,尾鳍皱缩 Shorter, curved, fins shrivel
体色素积淀 Body pigmentation	黑色素或黄色素异常 Significantly higher or lower amount of melanin or yellow pigment
运动能力 Swimming performance	无针触反应 No needle contact reaction

参　考　文　献(References)

[1] Marathe MR, Thomas GP. Current status of animal testing in reproductive toxicology [J]. Indian J Pharmacol, 1990, 22(4): 192-201.

[2] OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. No. 414: prenatal developmental toxicity study. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development [EB/OL]. 2018. https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264070820-en.pdf?expires=1578213159&id=id&accname=guest&checksum=0C53D3BC424E2DBE5661DBCD1C3DAA86

[3] OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. No. 416: two-generation reproduction toxicity study. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development [EB/OL]. 2018. https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264304741-33-en.pdf?expires=1578213285&id=id&accname=guest&checksum=31DDE7CA84D19D82576363D72A3D7F83

[4] OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. No. 421: reproduction /developmental toxicity screening test. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development [EB/OL]. 2016. https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264380-en.pdf?expires=1578213512&id=id&accname=guest&checksum=72CAF1E2A3ABA2A32763C5D45907EA35

[5] OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. No. 422: combined repeated dose toxicity study with the reproduction/developmental toxicity screening test. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development [EB/OL]. 2016. https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264264403-en.pdf?expires=1578214039&id=id&accname=guest&checksum=B306DAF15756C5A391ADA39910751B0E

[6] ICH. International Conference on Harmonisation S5(R3) (*step* 2): Detection of toxicity to reproduction for human pharmaceuticals [EB/OL]. 2017. https://www.ich.org/news/ich-s5r3-revised-guideline-reaches-step-2b-ich-process.

[7] OECD. OECD guidelines for the zebrafish embryo toxicity test. No. 171: series on testing and assessment. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development [EB/OL]. 2012. https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264221437-en.pdf?expires=1578213809&id=id&accname=guest&checksum=599AD2A6C6C66B9E7AA5A071324FA40E

[8] 韩利文, 袁延强, 何秋霞, 等. 斑马鱼模型在中药活性筛选中的适用性研究 [J]. 中草药,2011, 42(10): 2037-2041.
Han LW, Yuan YQ, He QX, et al. Adaptability of zebrafish model in activity screening of Chinese materia medica [J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2011, 42(10): 2037-2041.

[9] 陈磊, 刘怡, 梁生旺. 模式生物斑马鱼在中药研究中的应用 [J]. 药学学报, 2012, 7(4): 434-439.
Chen L, Liu Y, Liang SW. Application of zebrafish model organism in the research of Chinese materia medica [J]. Acta Pharm Sin, 2012, 7(4): 434-439.

[10] Singh V, Yeoh BS, Chassaing B, et al. Dysregulated microbial fermentation of soluble fiber induces cholestatic liver cancer [J]. Cell, 2018, 175(3): 679-694.

[11] Rovida C, Hartung T. Re-evaluation of animal numbers and costs for in vivo tests to accomplish reach legislation requirements for chemicals-a report by the transatlantic think tank for toxicology t^4 [J]. Altex, 2009, 26(3): 187-208.

[12] Selderslaghs IWT, Blust R, Witters HE. Feasibility study of the zebrafish assay as an alternative method to screen for developmental toxicity and embryotoxicity using a training set of 27 compounds [J]. Reprod Toxicol, 2012, 33(2): 142-154.

[13] Fleischer M. Testing costs and testing capacity according to the

REACH requirements-results of a survey of independent and corporate GLP laboratories in the EU and Switzerland [J]. J Bus Chem, 2007, 4(3): 96-114.

[14] Howe K, Clark MD, Torroja CF, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013, 496(7446): 498-503.

[15] Kettleborough RN, Busch-Nentwich EM, Harvey SA, et al. A systematic genome-wide analysis of zebrafish protein-coding gene function [J].Nature, 2013, 496(7446): 494-497.

[16] 黄春念, 张晶晶. 模式动物斑马鱼在中枢神经系统疾病研究中的应用[J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 392-397.
Huang CN, Zhang JJ. Research progress on the application of zebrafish in central nervous system diseases [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(3): 392-397.

[17] Brannen KC, Panzicakelly JM, Danberry TL, et al. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model[J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2010, 89(1): 66-77.

[18] Gustafson AL, Stedman DB, Ball J, et al. Inter-laboratory assessment of a harmonized zebrafish developmental toxicology assay-progress report on phase I [J]. Reprod Toxicol, 2012, 33(2): 155-164.

[19] Ball JS, Stedman DB, Hillegass JM, et al. Fishing for teratogens: a consortium effort for a harmonized zebrafish developmental toxicology assay [J]. Toxicol Sci, 2014, 139(1): 210-219.

[20] 鲁疆, 王占洋, 袁玉琴, 等. 氯化镉对斑马鱼胚胎的发育毒性[J]. 生态毒理学报, 2013, 3(8): 381-388.
Lu J, Wang ZY, Yuan YQ, et al. Developmental toxicity of cadmium chloride to zebrafish embryo [J]. Asia Ecotoxi, 2013, 3(8): 381-388.

[21] 夏继刚, 牛翠娟, 孙麓垠. PFOS 对斑马鱼胚胎及仔鱼的生态毒理效应[J]. 生态学报, 2013, 33(23): 7408-7416.
Xia JG, Niu CJ, Sun LY. Ecotoxicological effects of exposure to PFOS on embryo and larva of zabrafish *Danio rerio* [J]. Acta Ecologica Sin, 2013, 33(23): 7408-7416.

[22] 许冰洁, 张立将, 李春启, 等. 斑马鱼胚胎评价 5 种药物的发育毒性与模型验证[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(1): 74-79.
Xu BJ, Zhang LJ, Li CQ, et al. Model validation and evaluation of developmental toxicity of five drugs using zebrafish embryos [J]. Chin Pharmacol Bull, 2016, 32(1): 74-79.

[23] 陈玉翠, 陈锦云. 重金属 Cu^{2+}、Cd^{2+}、Hg^{2+} 对斑马鱼胚胎发育的毒性效应[J].南方水产科学, 2016, 12(3): 35-42.
Chen YC, Chen JY. Toxic effect of heavy metal ions of Cu^{2+}, Cd^{2+} and Hg^{2+} on embryo development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. South Chin Fish Sci, 2016, 12(3): 35-42.

[24] 梁秋燕, 谢勇平, 方展强. Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对斑马鱼早期胚胎发育阶段的单一与联合毒性 [J]. 中国水产科学, 2012, 19(2): 283-293.
Liang QY, Xie YP, Fang ZQ. Individual and joint toxicity of Zn^{2+} and Cd^{2+} during the early embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. J Fish Sci Chin, 2012, 19(2): 283-293.

[25] 刘迎, 胡燕, 姜蕾, 等. 6 种表面活性剂对斑马鱼胚胎发育的毒性效应 [J]. 生态毒理学报, 2014, 9(6): 1091-1096.
Liu Y, Hu Y, Jiang L, et al. The Toxicity effects of six pesticide surfactants on embryo development of zebrafish [J]. Asia J Ecotoxi, 2014,9(6): 1091-1096.

[26] 刘迎, 胡燕, 姜蕾, 等. 5 种酰胺类除草剂对斑马鱼胚胎发育的毒性效应 [J]. 农药, 2014, 53(11): 806-808.
Liu Y, Hu Y, Jiang L, et al. The toxicity effects of five amide herbicides on embryo development of zebrafish [J]. Agrochem, 2014, 53(11): 806-808.

[27] Haldi M, Harden M, D'Amico L, et al. Developmental toxicity assessment in zebrafish //. Zebrafish: Methods for assessing drug safety and toxicity[M]. John Wiley & Sons, Inc.; 2012.

[28] Panzica-Kelly JM, Zhang CX, Danberry TL, et al. Morphological score assignment guidelines for the dechorionated zebrafish teratogenicity assay [J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2010, 89(5): 382-395.

[29] Lantz-McPeak S, Guo X, Cuevas E, et al. Developmental toxicity assay using high content screening of zebrafish embryos [J]. J Appl Toxicol, 2015, 35(3): 261-272.

[30] Reis MF, Aniceto P, Aguiar P, et al. Quantification of urinary chorionic gonadotropin in spontaneous abortion of pre-clinically recognized pregnancy: Method development and analytical validation[J]. Int J Hyg Environ Health, 2007, 210(3-4): 419-427.

[31] 夏青, 张晓昕, 徐柯心, 等.《中华人民共和国药典》2015 版收载的有毒中药毒性研究概况[J]. 环球中医药, 2017, 10(3): 377-384.
Xia Q, Zhang XX, Xu KX, et al. Review on toxicity of toxic traditional Chinese medicine recorded in Chinese pharmacopoeia (2015 version) [J]. Global Tradit Chin Med, 2017, 10(3): 377-384.

[32] 郜洁, 罗颂平. 寿胎丸不同提取部位对肾虚流产模型孕鼠补肾安胎的药效学筛选 [J]. 中药材, 2011, 34(8): 1251-1255.
Gao J, Luo SP. Kidney-tonifying and abortion preventing effects of shou tai wan by different extration methods on rats [J]. Chin Med Mater, 2011, 34(8): 1251-1255.

[33] 欧莉, 韩猛, 张艺耀, 等. 茜草治疗功能性子宫出血的止血机制研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2015, 21(21): 152-155.
Ou L, Han M, Zhang YY, et al. Study on hemostatic mechanism of rubiae radix et rhizoma in treating dysfunctional metrorrhagia [J].Chin J Exp Tradit Med Form, 2015, 21(21): 152-155.

[收稿日期] 2019-12-04

郭胜亚,朱晓宇,周佳丽,等. 斑马鱼在功能性食品研究中的应用进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 143-147.
Guo SY, Zhu XY, Zhou JL, et al. Application of zebrafish in functional food research [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(1): 143-147.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.021

斑马鱼在功能性食品研究中的应用进展

郭胜亚[1],朱晓宇[1],周佳丽[1],张勇[1,2],彭逸[1],荣佳[3],张立将[2],李春启[1,2,3*]

(1. 杭州环特生物科技股份有限公司,杭州 310051; 2. 浙江省人用物品安全性评价技术研究重点实验室早期评价基地,杭州 310053; 3. 南京新环检测科技有限公司,南京 210032)

【摘要】 斑马鱼作为一种新型的模式动物,由于其饲养成本低、产卵量大、体外受精、发育周期短、透明易观察等优点,已在基础研究、药物开发、食品安全、环境保护等众多领域有了广泛应用。近年来,斑马鱼作为国际公认适于功效性评价的新型脊椎类模型动物,可为多种食品和功能食品测试功效。本文将介绍近年来斑马鱼作为模式动物在食品,特别是功能性食品在功效研究中的最新进展。

【关键词】 斑马鱼;食品;功能性食品;营养
【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2020) 01-0143-05

Application of zebrafish in functional food research

GUO Shengya[1], ZHU Xiaoyu[1], ZHOU Jiali[1], ZHANG Yong[1,2], PENG Yi[1], RONG Jia[3], ZHANG Lijiang[2], LI Chunqi[1,2,3*]

(1. Hunter Biotechnology, Inc., Hangzhou 310051, China.
2. Early Test Base of Zhejiang Province Key Labrotary of Human Supplier Safety Evaluation, Hangzhou 310053.
3. New Hunter Testing Technology Company, Nanjing 210032)
Corresponding author: LI Chunqi. E-mail:jackli@zhunter.com

【Abstract】 Zebrafish, a novel and well recognized model organism, has been widely used in many scientific fields, such as basic research, drug discovery, and development and environmental toxicology assessments, due to its low cost, high fecundity, external fertilization, short generation time, and transparency at early stages of development. In recent years, the zebrafish has emerged as a new type of vertebrate animal model for assessing nutrition, and biological functions. This article will introduce current uses of zebrafish in food science, including applications of zebrafish in the assessment of general and functional foods.

【Keywords】 zebrafish; food; functional food; nutrition
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

目前,越来越多的生物活性成分在食物中发现,通过一些活性成分的配比形成的功能性食品已渐渐运用于生活,但食品研究领域也存在着不少问题,如如何区分活性化合物、如何推断活性化合物是否具有生物学特性并且其安全性缺乏可靠的实验依据。故研究确认食品的有效活性成分并对其安全性进行评价,是目前食品研究一个重要内容。

斑马鱼(Zebrafish, *Danio rerio*)是一种脊椎动物,与人类基因同源性高达 87%,其信号传导通路与人类基本近似,生物结构和生理功能与哺乳动物高度相似[1-2],具有饲养成本低、体积小、发育周期短、体外受精、透明易观察、单次产卵数较高、给药量小等特点。目前,斑马鱼已被美国国家卫生研究院(National Institutes of Health, NIH)列为继大鼠和

[基金项目]国家"重大新药创制"科技重大专项(2017ZX09031059)。
Funded by National Science and Technology Major Project "Major New Drug Creation" (2017ZX09031059).
[作者简介]郭胜亚(1988—),女,硕士,主要从事药理学和毒理学研究。Email: gsy@zhunter.com
[通信作者]李春启,男,博士,教授,主要从事药理学和毒理学。Email: jackli@zhunter.com

小鼠之后的第三大模式生物。经济合作发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)与中国已公布多个斑马鱼化学品毒性评价标准[3],斑马鱼技术在欧美已经通过监管部门的药物非临床研究质量管理规范(Good Laboratory Practice, GLP)认证,可用于新药临床申报。在我国已被列入科技部"重大新药创制"专项。斑马鱼被广泛应用于药物、医学、生命科学、以及环境安全检测等多个领域。近年来,斑马鱼在食品安全性评价,活性成分筛选及作用机制研究等方面都有着广泛应用。

1 斑马鱼及其胚胎在食品功效评价中的应用

斑马鱼是公认的生态毒理学模型。在上个世纪 70 年代,国外已经开始应用斑马鱼进行重金属和有机物的急性毒性研究。除了毒性,斑马鱼还被用来评估食物成分的生物活性,包括对食品、食品提取物和从食品中分离出来的分子进行功能测试。

1.1 代谢性疾病

斑马鱼具有控制人体代谢的所有关键器官和调控机制,是研究代谢紊乱的良好模型。斑马鱼在能量平衡[4]、胆固醇代谢[5]、食欲调节[6]、胰岛素调节[7]、脂肪细胞分化和脂质储存[8]等关键功能与哺乳动物类似。

斑马鱼通过脂蛋白运输脂肪和胆固醇,并在内脏、皮下和肌肉脂肪细胞库中作为三酰甘油(triglyceride, TG)储存[9-10],脂质代谢网络与哺乳动物相似,相关蛋白如载脂蛋白、脂肪酸转运蛋白、胆固醇转运蛋白、长链酰基辅酶的表达和功能相似,表明斑马鱼是一种适合人类脂质代谢的模型。血液中的高胆固醇水平会诱导其在血管中积累,在血管中它们会氧化并产生炎症,从而引发动脉粥样硬化。利用斑马鱼建立的动脉粥样硬化模型则不需杀死动物就能直接且动态观察到血管硬化的发展情况。Kim 等[11]研究了枇杷叶、葡萄皮和巴西莓果泥对高胆固醇血症斑马鱼抗动脉粥样硬化作用。研究表明饲用巴西莓的鱼血清总胆固醇(serum total cholesterol, TC)和胆固醇酯转移蛋白(cholesteryl-ester transfer protein, CETP)活性最低,而饲用枇杷叶的鱼血清 TC 和 TG 较饲用高胆固醇饲料(high cholesterol diet, HCD)的鱼降低。饲用巴西莓和枇杷叶的组表现出更少的肝脏炎症,以及脂肪肝的减少和氧化物质含量的减少。这些结果表明开发一种新的功能性膳食剂来治疗慢性代谢性疾病,如高脂血症是有潜力的。

此外,由于肥胖可能是研究最多的斑马鱼代谢紊乱,食品提取物和化合物的减脂能力已经过测试。斑马鱼胚胎和幼鱼因本身透明,脂肪染色可直接观察,可以用来快速观察脂肪沉积。通过这种方式,葡萄酒渣提取物和白藜芦醇及其糖苷(多酚类化合物,来源于如葡萄,葡萄酒,花生和可可)被证明可以增加脂肪储备消耗[12-13]。山奈酚(高良姜山奈酚和籼稻山奈酚中存在的一种氟类化合物)具有调节脂质代谢的抗肥胖作用[14]。饮食诱导肥胖(dietary induced obesity, DIO)成年斑马鱼体重指数(body mass index, BMI)升高,血 TG 升高,肝脂肪变性(肝脂堆积)。圣草次苷是柠檬中的一种抗氧化类黄酮,在 DIO 斑马鱼中显示出类似于高脂饮食对大鼠的降脂作用[15]。金巴利番茄可通过调节脂肪生成相关基因的表达,改善饮食诱导的肥胖,尤其是血脂异常和肝脂肪变性[16]。总的来说,DIO 斑马鱼是一个很有吸引力的模型系统,用来评估功能性食品和化合物对肥胖发育和治疗的影响。

总之,斑马鱼可以用来模拟代谢紊乱,因为大多数不平衡和症状在这个模型中被精确地复制。

1.2 抗氧化性能

斑马鱼被广泛用于筛选具有抗氧化潜力的分子,方法有多种,比如直接测定活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生,或者测量其他氧化损伤的生物标志物和相关过程。多糖一般是功能食品成分的重要补充来源。Gao 等[17]和 Lee 等[18]研究了芦荟多糖在偶氮二异丁脒盐酸盐(2,2′-Azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride, AAPH)诱导和岩藻多糖在炎症诱导的斑马鱼中的抗氧化性能。芦荟多糖和岩藻多糖处理组均显著降低了 ROS 的产生。Chen 等[19]人对几种黄酮类化合物进行了筛选,发现虽然大多数测试分子降低了 ROS 的产生,但其中一些分子增加了 ROS 的产生。

氧化应激诱导的细胞凋亡也被研究,以进一步评估化合物的抗氧化能力。与未处理组相比,AAPH 诱导前用芦荟多糖处理斑马鱼、高糖诱导前用墨角藻黄素处理斑马鱼、乙醇诱导前用多酚类化合物处理斑马鱼、紫外线(ultraviolet radiation b, UVB)照射前用槲皮苷和黄酮处理斑马鱼均可使细胞凋亡减少。

最后,其他氧化损伤的生物标志物已经被用来

评估功能分子的抗氧化能力,如脂质过氧化标志物,包括丙二醛(malondialdehyde,MDA)。

1.3　免疫调节

斑马鱼作为脊椎动物,有较成熟的免疫系统,具有先天性和获得性 2 种免疫系统[20],斑马鱼免疫系统与哺乳动物相似,包括各种白细胞种群、炎症介质和信号分子[21]。炎症的主要特征之一是局部炎症介质的释放引起毛细血管床血管扩张和血管通透性增加,从而引起热、肿胀和发红。这种炎症反应的关键功能之一是将中性粒细胞输送到受损或受感染的组织中。对组织损伤或感染的有力反应必须包括通过趋化刺激将先天免疫系统的细胞招募到受影响的部位。利用转基因斑马鱼(中性粒细胞特异性髓过氧化物酶启动子下表达绿色荧光蛋白(green fluorescent protein,GFP)观察中细粒细胞向伤口部位迁移的数量来筛选从天然产物中提取化合物的抗炎活性[22]。抗炎的其他观察指标如炎症因子也常来筛选抗炎物质,结核杆菌素 B(tuberatolide B,TTB)是来源于马尾藻类海草,研究发现 TTB 显著抑制脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)诱导斑马鱼炎症生产的促炎细胞因子如白介素(interleukin-6,IL-6)和 IL-1β(interleukin-1β),表明 TTB 可能被用作功能性抗炎食品和营养保健品[23]。肠道免疫也是近几年来研究比较多的一个方面,Wang 等[24]用嗜水气单胞菌感染斑马鱼,发现两株高黏附性乳酸菌处理后具有肠道粘膜免疫保护作用。

1.4　抗血管新生的活动

肿瘤新生血管的形成是以血管生成的方式发生的,若能够抑制肿瘤组织的血管生成,切断肿瘤的营养供应,势必可以达到抑制肿瘤生长和转移的目的[25]。斑马鱼血管系统的发育和解剖结构与哺乳动物相似。利用转基因血管荧光斑马鱼,即在内皮细胞中表达绿色荧光蛋白(GFP),在显微镜下主动脉及节间血管在清晰可见,这使得在体内观察新血管的形成成为可能,现已成为一种理想的抗血管生成高通量药物筛选的模型,已广泛应用于药物研究,也用于食品研究。

目前在该领域研究最多的主要活性成分是多酚。Lam 等[26]通过斑马鱼胚胎实验测试了诺比列酮(一种从柑橘类水果中提取的多甲氧基类黄酮),发现这种多酚抑制了斑马鱼节间血管的形成。其他多酚类化合物如槲皮素[27]破坏转基因斑马鱼胚胎的节间血管、背主动脉和后主静脉的形成、白藜芦醇衍生物[28]引起斑马鱼节间血管收缩,下调血管内皮细胞生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2,VEGFR2)mRNA 的表达抑制血管生成和 4-甲基伞形花序酮[29]抑制转基因斑马鱼节间血管的形成。除此之外,一些天然提取物,比如肉桂[30]、硫酸多糖[31]和绿原酸[32]均可阻断斑马鱼新生血管的形成。

总之,斑马鱼为测试食物化合物和提取物在血管生成中的有效性提供了理想的环境,不仅提供了有关血管发育的信息,而且还确定了受影响的血管或组织的类型。

1.5　神经保护

近年来,斑马鱼被广泛应用于神经科学研究中,斑马鱼胚胎在 24 hpf(受精后 24 h)原代神经元细胞开始分化,48 hpf 脑室形成,在 6 dpf(受精后 6 d)所有的神经系统形成,可在短时间呈现整个神经系统。斑马鱼神经元的形成及分化等过程与其他脊椎动物相似[33],整个神经递质系统,包括胆碱能,多巴胺能和去甲肾上腺素能通路已经被阐明[34-35]。斑马鱼已被用于测试食品化合物在不同神经科学领域的生物活性。

Richetti 等[36]人研究表明槲皮素和芦丁对东莨菪碱诱导的斑马鱼抑制性回避记忆缺陷也具有潜在的保护作用,这表明这些黄酮类化合物可能是预防和治疗神经退行性疾病的潜在药物。斑马鱼胚胎时期还可以观察到一些运动行为,如逃避反射、游动等[37]。利用红外摄影机连续采集图像可以对斑马鱼运动进行分析,在某一特定时间内采集斑马鱼运动轨迹,可以了解食品处理后斑马鱼运动的次数、持续时间和距离。Kumari 等[38]人研究发现 α-亚麻酸能够治疗戊四唑诱导的斑马鱼癫痫发作,使斑马鱼癫痫发作时总运动距离和平均速度均有明显改善,也能显著减少 c-fos mRNA 水平。斑马鱼在学习,睡眠,药物成瘾及其他神经行为表型与人类相似[39-40]。此外,有人观察到斑马鱼在回避食物等行为上有变化,食欲和食物摄入量的调节与哺乳动物的调节相似[41]。因此,在该模型中研究食物或食物复合物成瘾或厌食症等复杂行为是可能的[42]。

1.6　其他条件

姜辣素是生姜中的主要成分,Chen 等[43]报道了 10-姜辣素对斑马鱼胚胎造血的促进作用高于其他姜辣素。为了研究益生菌保留率与肠道蠕动的

关系,开发抗便秘益生菌,Lu 等[44]根据斑马鱼模型的荧光强度和肠道蠕动促进作用对菌株其进行筛选。结果表明,副干酪 X11 具有较好的肠蠕动促进作用。Cai 等[45]研究了羊肚菌多糖对斑马鱼的美白作用,为羊肚菌多糖在食品和化妆品行业中潜在的美白作用提供了依据。

2 结语

随着消费水平的不断升级,消费者对于高品质的食品、功能性食品等的需求也在日益攀升,但是由于科研投入少,基础研究不够,并且商家肆意夸大产品的功能与疗效,使得消费者产生排斥心理。开发生产的功能性食品大致分为三代,第一代为各类强化食品和滋补产品,未经过严格的实验证明或者科学论证,仅根据食品中的营养成分来推断功能,第二代为经过动物和人体实验证明具有某种生理调节功能的食品,目前我国市场上大多为该类功能性食品,第三代是明确食品中的功能因子以及产生的作用机理,开发出量效与构效明确的新型功能性食品,这是我国功能性食品未来研究和发展的重点[46]。所以建立快速、有效的毒性和功效检测平台,加强食品安全和有效性验证及其机制研究的相关检测,将为人民群众的饮食安全提供更好的保障。

斑马鱼是近年来用于药学领域研究的热门模式生物,其优势在于化合物的高通量活性筛选。在食品研究方面,斑马鱼实验结果不仅可以成为功能性食品配方确定的依据,即通过实验证明最终确定的配方优于其它配方,包括不同原料组方的比较,以及相同原料组方不同配比的比较,甚至同一配方不同制备工艺的比较,还可以研究产品功效机制,为配方的功效在机制上提供支撑。斑马鱼已被证明是食品领域研究中一个有价值的工具。但目前采用斑马鱼进行功效及机制评价的研究多集中于食品提取物,对食品全组分功效学研究筛选的报道较少,缺乏数据支撑。将斑马鱼模型与现有的体外实验与哺乳动物实验及人体试验相结合,将为深入开展食品研究提供更可靠、快速、有效的方法体系,为推动食品、特别是功能性食品研发进程具有重要意义。

参 考 文 献(References)

[1] Clark MD, Hennig S, Herwig R, et al. An oligonucleotide fingerprint normalized and expressed sequence tag characterized zebrafish cDNA library [J]. Genome Res, 2001, 11(9):1594-1602.

[2] Postlethwait JH, Woods IG, Ngo-Hazelett P, et al. Zebrafish comparative genomics and the origins of vertebrate chromosomes [J]. Genome Res, 2000, 10(12): 1890-1902.

[3] Braunbeck T, Kais B, Lammer E, et al. The fish embryo test (FET): origin, applications, and future [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2015, 22(21): 16247-16261.

[4] Den Broeder MJ, Kopylova VA, Kamminga LM, et al. Zebrafish as a model to study the role of peroxisome proliferating-activated receptors in adipogenesis and obesity [J]. PPAR Res, 2015, 2015(2): 1-11.

[5] Schlombs K, Wagner T, Scheel J. Site-1 protease is required for cartilage development in zebrafish [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(24): 14024-14029.

[6] Yokobori E, Azuma M, Nishiguchi R, et al. Neuropeptide y stimulates food intake in the zebrafish, *Danio rerio* [J]. J Neuroendocrinol, 2012, 24(5): 766-773.

[7] Elo B, Villano CM, Govorko D, et al. Larval zebrafish as a model for glucose metabolism: expression of phosphoenolpyruvate carboxykinase as a marker for exposure to anti-diabetic compounds [J]. J Mol Endocrinol, 2007, 38(4): 433-440.

[8] Flynn EJ 3rd, Trent CM, Rawls JF. Ontogeny and nutritional control of adipogenesis in zebrafish (Danio rerio) [J]. J Lipid Res, 2009, 50(8): 1641-1652.

[9] Shimada Y, Kuroyanagi J, Zhang B, et al. Downregulation of Max dimerization protein 3 is involved in decreased visceral adipose tissue by inhibiting adipocyte differentiation in zebrafish and mice [J]. Int J Obes(Lond), 2014, 38(8): 1053-1060.

[10] Stoletov K, Fang L, Choi SH, et al. Vascular lipid accumulation, lipoprotein oxidation, and macrophage lipid uptake in hypercholesterolemic zebrafish [J]. Circ Res, 2009, 104(8): 952 - 960.

[11] Kim JY, Hong JH, Jung HK, et al. Grape skin and loquat leaf extracts and acai puree have potent anti-atherosclerotic and anti-diabetic activity in vitro and in vivo in hypercholesterolemic zebrafish [J]. Int J Mol Med, 2012, 30(3): 606-614.

[12] Caro M, Sansone A, Amezaga J, et al. Wine lees modulate lipid metabolism and induce fatty acid remodelling in zebrafish [J]. Food Funct, 2017, 8(4): 1652-1659.

[13] Pardal D, Caro M, Tueros I, et al. Resveratrol and piceid metabolites and their fat-reduction effects in zebrafish larvae [J]. Zebrafish, 2014, 11(1): 32-40.

[14] Lee YJ, Choi HS, Seo MJ, et al. Kaempferol suppresses lipid accumulation by inhibiting early adipogenesis in 3T3-L1 cells and zebrafish [J]. Food Funct, 2015, 6(8): 2824-2833.

[15] Hiramitsu M, Shimada Y, Kuroyanagi J, et al. Eriocitrin ameliorates diet-induced hepatic steatosis with activation of mitochondrial biogenesis [J]. Sci Rep, 2014, 4(1): 3708-3719.

[16] Tainaka, T, Shimada, Y, Kuroyanagi J, et al. Transcriptome analysis of anti-fatty liver action by Campari tomato using a zebrafish diet-induced obesity model [J]. Nutr Metab (Lond), 2011, 8(1): 88-99.

[17] Gao Y, Kuok KI, Jin Y, et al. Biomedical applications of *Aloe*

vera [J]. Crit Rev Food Sci, 2018, 59(1): S244-256.

[18] Lee SH, Ko CI, Jee Y, et al. Anti-inflammatory effect of fucoidan extracted from Ecklonia cava, in zebrafish model [J]. Carbohydr Polym, 2013, 92(1): 84-89.

[19] Chen YH, Yang ZS, Wen CC, et al. Evaluation of the structure-activity relationship of flavonoids as antioxidants and toxicants of zebrafish larvae [J]. Food Chem, 2012, 134(2): 717-724.

[20] Trede NS, Langenau DM, Traver D, et al. The use of zebrafish to understand immunity [J]. Immunity, 2004, 20(4): 367-379.

[21] Crim MJ, Riley LK. Viral diseases in zebrafish: What is known and unknown [J]. ILAR J, 2012, 53(2): 135-143.

[22] Wang X, Robertson AL, Li J, et al. Inhibitors of neutrophil recruitment identified using transgenic zebrafish to screen a natural product library [J]. Dis Mod Mech, 2014, 7(1): 163-169.

[23] Kim EA, Kim SY, Kim J, et al. Tuberatolide B isolated from Sargassum macrocarpum inhibited LPS-stimulated inflammatory response via MAPKs and NF-κB signaling pathway in RAW264.7 cells and zebrafish model [J]. J Funct Foods, 2019, 52: 109-115.

[24] Wang Y, Ren Z, Fu L, et al. Two highly adhesive lactic acid bacteria strains are protective in zebrafish infected with Aeromonas hydrophila by evocation of gut mucosal immunity[J]. J Appl Microbiol, 2016, 120(2): 441-451.

[25] Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases [J]. Nature, 2000, 407(6801): 249-57.

[26] Lam KH, Alex D, Lam IK, et al. Nobiletin, a polymethoxylated flavonoid from citrus, shows anti-angiogenic activity in a zebrafish in vivo model and HUVEC in vitro model[J]. J Cell Biochem, 2011, 112(11): 3313-3321.

[27] Zhao D, Qin C, Fan X, et al. Inhibitory effects of quercetin on angiogenesis in larval zebrafish and human umbilical vein endothelial cells [J]. Eur J Pharmacol, 2014, 723:360-367.

[28] Alex D, Leong EC, Zhang ZJ, et al. Resveratrol derivative, trans-3, 5, 4′-trimethoxystilbene, exerts antiangiogenic and vascular-disrupting effects in zebrafish through the downregulation of VEGFR2 and cell-cycle modulation [J]. J Cell Biochem, 2010, 109(2):339-346.

[29] García-Vilas JA, Quesada AR, Medina MÁ. 4-Methylumbelliferone inhibits angiogenesis in vitro and in vivo [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(17): 4063-4071.

[30] Bansode RR, Leung TC, Randolph P, et al. Cinnamon extract inhibits angiogenesis in zebrafish and human endothelial cells by suppressing VEGFR1, VEGFR2, and PKC-mediated MAP kinase [J]. Food Sci Nutr, 2013, 1(1):74-82.

[31] Liu Y, Liu C, Tan H, et al. Sulfation of a polysaccharide obtained from Phellinus ribis and potential biological activities of the sulfated derivatives[J]. Carbohyd Polym, 2009, 77(2):370-375.

[32] Lin S, Hu J, Zhou X, et al. Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis by chlorogenic acid, via, targeting the vascular endothelial growth factor receptor 2-mediated signaling pathway [J]. J Funct Foods, 2017, 32: 285-295.

[33] Tropepe V, Sive HL. Can zebrafish be used as a model to study the neurodevelopmental causes of autism? [J]. Genes Brain Behav, 2010, 2(5): 268-281.

[34] Rink E, Wullimann MF. Connections of the ventral telencephalon (subpallium) in the zebrafish (Danio rerio) [J]. Brain Res, 2004, 1011(2):206-220.

[35] Wullimann MF, Mueller T. Teleostean and mammalian forebrains contrasted: Evidence from genes to behavior [J]. J Comp Neurol, 2004, 475(2): 143-162.

[36] Richetti SK, Blank M, Capiotti KM, et al. Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in zebrafish [J]. Behav Brain Res, 2011, 217(1): 10-15.

[37] Saint-Amant L, Drapeau P. Motoneuron activity patterns related to the earliest behavior of the zebrafish embryo [J]. J Neurosci, 2000, 20(11): 3964-3972.

[38] Kumari S, Mazumder AG, Bhardwaj A, et al. Early α-linolenic acid exposure to embryo reduces pentylenetetrazol-inducedseizures in zebrafish larva [J]. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2019, 143: 15-20.

[39] Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: what can we learn from zebrafish? [J]. Genes Brain Behav, 2010, 3(2): 63-74.

[40] Piccinetti CC, Migliarini B, Olivotto I, et al. Melatonin and peripheral circuitries: insights on appetite and metabolism in Danio rerio [J]. Zebrafish, 2013, 10(3):275-282.

[41] Brigitte B, Ernest S, Rosa F. Egr-1 induction provides a genetic response to food aversion in zebrafish [J]. Front Behav Neurosci, 2013, 7: 51-63

[42] Collier AD, Khan KM, Caramillo EM, et al. Zebrafish and conditioned place preference: A translational model of drug reward [J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2014, 55:16-25.

[43] Chen H, Soroka DN, Haider J, et al. [10]-Gingerdiols as the major metabolites of [10]-gingerol in zebrafish embryos and in humans and their hematopoietic effects in zebrafish embryos [J]. J Agric Food Chem, 2013, 61(22): 5353-5360.

[44] Lu Y, Zhang J, Yi H, et al. Screening of intestinal peristalsis-promoting probiotics based on a zebrafish model [J]. Food Funct, 2019, 10(4): 2075-2082.

[45] Cai ZN, Li W, Mehmood S, et al. Effect of polysaccharide FMP-1 from Morchella esculenta on melanogenesis in B16F10 cells and zebrafish [J]. Food Funct, 2018,9(9): 5007-5015.

[46] 黄凯信, 陈树喜, 陈秀丽, 等. 我国功能性食品发展状况分析 [J]. 农产品加工, 2015, 15(7): 53-59.
Huang KX, Chen SX, Chen XL, et al. Development of functional food in China [J]. Farm Prod Proc, 2015, 15(7): 53-59.

[收稿日期] 2019-12-04

昂小杰,李淼,周峰,等. 间质性膀胱炎动物模型的研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(1): 148-152.
Ang XJ, Li M, Zhou F, et al. Research progress on establishing interstitial cystitis models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28 (1): 148-152.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.01.022

间质性膀胱炎动物模型的研究进展

昂小杰,李淼,周峰,蔡宗强,陈卫国*

(苏州大学附属第一医院泌尿外科,江苏 苏州 215006)

【摘要】 间质性膀胱炎(interstitial cystitis,IC),也称膀胱疼痛综合征(bladder pain syndrome,BPS),是泌尿外科常见疾病之一,发病机制复杂,现缺乏标准的 IC 动物模型来进行全面深入的研究。目前,IC 模型包括化学药物膀胱灌注、环磷酰胺腹腔内注射、自身免疫性膀胱炎、神经源性炎症及心理和生理压力/自然模型等,每种模型都有其优缺点。本文就近年来 IC 动物模型的研究进展做一综述。

【关键词】 间质性膀胱炎;膀胱疼痛综合征;动物模型;发病机制;炎症
【中图分类号】Q95-33 【文献标识码】A 【文章编号】1005-4847(2020) 01-0148-05

Research progress on establishing interstitial cystitis models

ANG Xiaojie, LI Miao, ZHOU Feng, CAI Zongqiang, CHEN Weiguo*

(the First Affiliated Hospital Of Soochow University, Suzhou 215006, China)

Corresponding author: CHEN Weiguo. E-mail:urologistchen@163.com

【Abstract】 Interstitial cystitis (IC), also known as bladder pain syndrome, is a common urological disease. As the IC pathogenesis is complex, no standard animal model has been established for the comprehensive and in-depth study of IC. Current IC models include intravesical infusion of chemical drugs, intraperitoneal injection of cyclophosphamide, autoimmune cystitis, neurogenic inflammation and psychological and physiological stressors/natural models. Each model has advantages and disadvantages. This paper reviews the research progress on animal models of IC.

【Keywords】 interstitial cystitis; bladder pain syndrome; animal models; pathogenesis; inflammation
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

间质性膀胱炎(interstitial cystitis,IC),又称为膀胱疼痛综合征(bladder pain syndrome,BPS),是一种慢性炎症性膀胱病变,临床表现为与膀胱充盈相关的疼痛或盆腔不适,伴下尿路症状,如尿频或尿急[1]。其好发于女性,女性发病率大约为男性的 5 倍,甚至更高。通常伴发睡眠功能障碍、焦虑、抑郁和性功能障碍,严重影响患者的生活质量[2]。IC/BPS 的发病机制尚未明确,目前仅提出糖胺聚糖层(glycosaminoglycan,GAG)的损害、肥大细胞活化、神经源性炎及自身免疫性炎等相关假说[3]。基于这些假说,研究人员建立了化学药物膀胱内滴注、腹腔注射环磷酰胺(cyclophosphamide,CYP)、自身免疫性膀胱炎和神经源性炎症及心理和生理压力/自然模型等 IC 动物模型[4]。本文综述了近年来各种 IC 动物模型,并分析了不同动物模型的特点和不足之处。

1 动物模型分类和特点

IC/BPS 的病因未明,目前没有标准的动物模型。基于各类假说,大约 20 多种动物模型已经在过去的几十年制备出来。从 1980 年到 2000 年,IC 模型通常是通过膀胱内滴注化学刺激物(如盐酸、乙酸或丙酮等[5-7])诱导膀胱炎症;2000 年以后,CYP

[基金项目]江苏省重点学科(ZDXKA2016012)。
Funded by Jiangsu Provincial Key Medical Discipline (ZDXKA2016012).
[作者简介]昂小杰(1992—),男,硕士在读。Email:861101051@qq.com
[通信作者]陈卫国,男,副教授,硕士生导师,主要从事女性泌尿疾病及泌尿生殖系肿瘤研究。Email: urologistchen@163.com

的全身给药、自身免疫或全身性诱导的动物模型越来越多。目前常用模型大致分为以下五类,各类模型优缺点归纳如下。见表 1。

1.1　膀胱内药物滴注模型

自发现 IC/BPS 起,研究人员就一直围绕着膀胱区疼痛或不适及下尿路症状来建模。早期通常非选择性的向动物膀胱内滴注酸性刺激物引起膀胱的急性炎症。Song 等[8]向 8 周龄雌性 SD 大鼠膀胱内滴注 0.1 mol/L 盐酸,观察到大鼠排尿间隔缩短、膀胱黏膜腐蚀及肥大细胞浸润。但这些模型一般诱导急性膀胱炎症,表型维持时间短,目前已较少使用。

后来,研究发现通过选择性损伤 GAG 层,改变尿路上皮渗透率,也可以用来建立 IC 模型。Ryu 等[9]通过向 8 周龄雌性 SD 大鼠膀胱灌注 10 mg 硫酸鱼精蛋白,并且每周灌注 2 次 750 μg 脂多糖,5 周后发现大鼠排尿间隔明显缩短,且伴有膀胱尿路上皮剥脱、肥大细胞浸润和细胞凋亡的显着增加。Lv 等[10]每周向两组雌性 SD 大鼠膀胱内分别灌注低剂量透明质酸酶(1 mg/mL)及高剂量透明质酸酶(4 mg/mL)3 次,持续 4 周,观察发现大鼠均呈现膀胱慢性炎症和纤维化、肥大细胞活化及膀胱上皮缺失,而且高剂量透明质酸酶组大鼠膀胱病理改变更显著。

这类模型直接作用于膀胱,机理简单,成本较低,能够很好地还原人类 IC/BPS 的表型。但是,此法需尿道插管,特别是对于小鼠存在一定的技术要求,需反复操作,容易损伤尿道,引起小鼠尿道狭窄及炎症的可能性。总的来说,此类模型符合目前人们对于 IC/BPS 的认知,应用较为广泛。

1.2　腹腔内注射 CYP 模型

CYP 作为一种氮芥类衍生物,可由脱氢酶转变为羧磷酰胺而失活,或以丙烯醛形式排出。丙烯醛是一种刺激性化合物,通过肾脏过滤清除,在膀胱中积聚导致组织损伤。Hu 等[11]将成年雌性 Wistar 大鼠随机分为 CYP-4 h、CYP-48 h 和 CYP-10 d 组,CYP-4 h 和 CYP-48 h 组的大鼠接受单次高剂量给药(150 mg/kg,腹膜内),而 CYP-10 d 第 1、4、7 和 10 天重复接受低剂量 CYP(75 mg/kg,腹膜内)给药,结果显示重复低剂量 CYP 治疗产生了更明显的炎症反应、粘膜侵蚀、溃疡、水肿区域及瘀点出血,而高剂量较低剂量组发生了明显的自身行为改变及活动度的降低。为了观察在小鼠中是否同样如此,Golubeva 等[12]向 8 周龄 C57BL/6J 雌性小鼠第 0、2、4 及 6 天重复低剂量 CYP(80 mg/kg,腹膜内)给药,发现小鼠膀胱组织中炎症因子表达和肥大细胞数量的轻度增加,却没有出现大量炎性浸润、组织出血和尿路上皮损伤的表现,且 CYP 诱导后尿路上皮呈增生改变。

CYP 诱导的动物模型经济且给药方便,通常单次高剂量 CYP 24 h 内就诱发 IC/BPS 的许多典型特征,如疼痛相关行为、膀胱水肿、大量炎性细胞浸润、出血和粘膜破坏。如反复给予低剂量 CYP,可以很好地诱发 IC/BPS 患者的疼痛症状及下尿路症状。通常认为单次高剂量给药诱导出急性出血性膀胱炎,而重复多次低剂量给药诱导出慢性膀胱炎,且小鼠与大鼠不同,长期注射 CYP 后可引起小鼠膀胱尿路上皮增生改变,不符合溃疡型IC/BPS的特征,目前更主张将其应用到非溃疡型IC/BPS中。根据国内外相关报道,此类模型应用最多,是一种经过充分研究的模型,其在稳定性及可操作性上具备独特优势。

1.3　自身免疫模型

尿溶蛋白(uroplakin, UPK)属于异二聚体整合膜蛋白家族,是终末分化的尿路上皮细胞形成的不对称单位膜的一部分,可通过刺激 CD4+促炎性 Th1 样 T 细胞产生自身免疫性炎症[13]。因此,Song 等[8]将 200 μg UPK2 皮下注射到 8 周龄雌性 SD 大鼠的腹侧区域,2 周后大鼠的排尿间隔明显缩短、排尿容量减低且膀胱内肥大细胞活化及炎症因子明显升高,但未表现出骨盆区慢性疼痛。Izgi 等[14]向 6 ~ 8 周龄雌性 BALB/c 小鼠腹部皮下注射200 μg UPK3A 65-84 肽,5 周后发现 UPK3A 65-84 肽可以诱发主要的 IC 表型,包括骨盆区慢性疼痛,并且可以维持此慢性疼痛。另外,Liu 等[15]开发了一种名为 URO-OVA 转基因小鼠,其表达模型抗原卵白蛋白(OVA)的膜形式,作为膀胱上皮细胞上的自身抗原,其在第 7 天自发 IC 样组织学膀胱炎症,包括肥大细胞浸润和炎症因子的增加。

相较于其他模型,自身免疫模型能够很好地诱发 IC/BPS 的典型症状,无需导尿,操作相对简单,避免损伤实验动物的尿道,减少因尿道损伤导致炎症而引起尿道疼痛及炎症,但其制备成本较高,故不宜大面积推广,目前仍作为免疫学说的研究模型。

1.4　神经炎症模型

基于神经炎症理论基础,Yang 等[16]通过向 10 ~ 14 周龄的 BALB/c 雌性小鼠外展肌尾侧肌注射

2.29×10^6 pfu 的伪狂犬病毒(pseudorabies virus, PRV),并注射等量灭活 PRV 作为对照,结果显示 PRV 感染的小鼠的膀胱中炎症因子 TNF 及肥大细胞细胞数量明显升高。通过 PRV 诱导的神经源性膀胱炎是一种特异性骨盆疼痛模型,对模拟内脏疼痛行为有独特优势[17]。

神经炎症模型不直接作用于膀胱,能模拟 IC/BPS 患者主要症状,特别是对于神经源性炎症的研究至关重要。不过,研究发现动物膀胱在注射病毒 5 d 后就会失去张力,因此其稳定性仍需验证。

1.5 心理和生理压力/自然模型

此类模型包括各种压力模型、猫科动物 IC 模型、注射苯肾上腺素和控制环境温度或光线的模型。虽然目前机制尚未阐明,但自主神经系统中交感神经的激活可能起关键作用。

Wang 等[18]将实验组雌性 Wistar-Kyoto 大鼠暴露于避水应激(water avoidance stress, WAS)下 10 d,对照组不施加干涉,发现实验组较对照组膀胱充盈期间内脏发生超敏反应、膀胱收缩增强及排尿次数增加,但实验组大鼠的膀胱容量未发生明显变化。猫科动物 IC 模型虽然与人类疾病最相似,是 IC 的自然发生模型,但由于其未知的病因,以及维持和处理猫的高成本,目前较少使用[19]。Charrua 等[20]连续每日向雌性 Wistar 大鼠皮下注射苯肾上腺素 14 d,剂量为 2.5 mg/kg,发现其诱发了内脏疼痛、膀胱反射活动增加及肥大细胞活化等。

表 1 各种类型 IC 动物模型比较

Table 1 Comparison of different types of IC animal models

动物模型 Animal model	制备药物 Preparation of drugs	膀胱病理改变 Pathological changes of bladder	优缺点 Advantages and disadvantages	参考文献 Reference
膀胱内药物滴注模型 Intravesical drug infusion model	盐酸、乙酸或丙酮等 Hydrochloric acid, acetic acid or acetone, etc.	膀胱黏膜的侵蚀及肥大细胞浸润 Erosion of bladder mucosa and infiltrated of mast cell.	成本低,但一般诱导出急性炎症,表型维持时间短,目前已较少使用。 The cost is low, but it generally induces acute inflammation and the phenotypic maintenance time is short, so it has been rarely used at present.	[5-9]
	透明质酸酶 Hyaluronidase	膀胱慢性炎症和纤维化、肥大细胞活化及膀胱上皮缺失 Chronic inflammation and fibrosis of bladder, activated of mast cells and loss of bladder epithelium	成本低,能很好地还原人类 IC/BPS 的表型。但需行反复导尿,对于小鼠存在一定的技术要求。 It has low cost and can well restore the phenotype of human IC/BPS. However, repeated catheterization is required, and there are certain technical requirements for mice.	[10,22]
腹腔内注射 CYP 模型 Model of intraperitoneal injection of CYP	CYP	尿路上皮增生、肥大细胞浸润 Urothelial hyperplasia and infiltrated of mast cell	经济、给药方便,较为成熟,但小鼠膀胱上皮呈增生改变,不符合人溃疡型 IC 改变。 It is economical, convenient and mature, but the bladder epithelium of mice shows proliferative changes, which does not accord with the changes of human ulcerative IC.	[11-12]
自身免疫模型 Autoimmune model	UPK	IC 样组织学膀胱炎症,肥大细胞浸润和炎症因子升高 IC-like histological cystitis, infiltrated of mast cell and elevated inflammatory factors	模型比较理想,但是制备成本高,不适宜大面积推广。 The model is ideal, but the preparation cost is high, so it is not suitable to be popularized in a large area.	[8,14]
神经炎症模型 Neuroinflammatory model	PRV	肥大细胞浸润、炎症因子升高 Infiltrated of mast cell and elevated inflammatory factors	操作简单,对于模拟骨盆疼痛有独特优势,需大量实验证明其稳定性。 It is easy to operate and has a unique advantage in simulating pelvic pain, and a large number of experiments are needed to prove its stability.	[16-17]
心理和生理压力/自然模型 Psychological and physical stress/ natural model	WAS 或苯肾上腺素 WAS or phenylephrine	肥大细胞活化 Activated of mast cells	较为新颖,反映了人类状况的压力变化,但需证明其稳定性。 It is relatively novel and reflects the pressure change of human condition, but its stability needs to be proved.	[18-20]

WAS 模型反映了人类状况的压力变化,并且表现出患者中出现的许多关键症状,较为新颖,可作为动物模型来阐明导致 IC/BPS 患者的内脏敏感性脑表型的机制。此外,采用多学科的方法,评估了该模型来研究泌尿系统慢性骨盆疼痛综合征的可行性[21]。WAS 模型和苯肾上腺素模型不仅重现了 IC/BPS 膀胱的变化,而且还诱导了可能在 IC/BPS 患者中发现的全身性改变,为 IC/BPS 提供了新的研究方向。

2　模型评估标准

IC/BPS 的主要症状为尿频、尿急及膀胱区疼痛。因此,是否能表达所有表型成为 IC 动物模型评估的标准。

为了观察膀胱活动,徐曦等[22]将 PE-50 导管置入大鼠膀胱,连接多通道生理信号采集处理系统,以速度为 10 mL/h 灌注生理盐水,记录大鼠膀胱收缩间歇及排尿频率。Lai 等[23]将小鼠置于单独的定制排尿笼中,以 12 h 光照和 12 h 黑暗循环 24 h 实时记录排尿习惯。关于疼痛的评估,Governo 等[24]使用一组尺寸为 1.65 ~ 5.07 的 von Frey 细丝,通过垂直于膀胱表面施加 von Frey 细丝并记录动物的反应来评估耻骨上骨盆区域的触觉敏感性。阳性行为是:①腹部急剧收缩,②即时舔和刮擦,③跳跃。从最小的细丝开始,每个细丝总共施加 10 次,持续 3 s,每次刺激之间间隔为 8 s。记录每根单丝的阳性反应百分比(响应频率),通过响应频率对应对数图的线性部分绘制的回归线计算每只小鼠的 von Frey 力。

3　总结与展望

IC/BPS 是一种病因未明的慢性疼痛疾病。为了更好地了解其病理生理学,已经付出许多努力来创建 IC 动物模型。大多数现有的 IC 模型是通过对健康动物施以有害物质,引起膀胱内或全身刺激,来重现人类患者的症状和全身变化。这些模型虽然有助于理解各种机制,但是仅限于证明膀胱和神经系统如何对伤害性刺激做出反应,并不能反映 IC/BPS 复杂的相互作用和病理生理学。

目前,关于构建 IC 模型的所有方法中,任何单一模型都无法模拟人类疾病的所有方面。因此,在后续的研究工作中应着重对以下方面进行改进:①膀胱内药物滴注作为常用方法,能很好地还原人类 IC/BPS 的表型,但需反复灌注,特别对于小鼠有一定的操作难度及尿道狭窄的可能;②腹腔内注射 CYP 作为应用最多的方法,是一种方便且经过充分研究的模型,但针对小鼠造模,其膀胱黏膜呈增生改变,不符合人类溃疡型 IC/BPS 改变,需要联合其他方法共同造模;③自身免疫模型兼顾了 IC/BPS 全身症状,但其制备成本高,需进一步优化剂量;④其他造模方法目前较为新颖,更加关注模拟患者的全身症状,为研究提供可新方向,但需长期观察其其稳定性。

综上所述,IC/BPS 现病因未明,模型多样,各具优缺点,尚没有标准的动物模型,但是可以改良现有的模型适应不同的研究需求。构建理想的 IC 模型将随着对疾病的认识不断加深,相信在不久的将来会实现。

参　考　文　献(References)

[1] Malde S, Palmisani S, Al-Kaisy A, et al. Guideline of guidelines: bladder pain syndrome[J]. BJU Int, 2018, 122(5):729-743.

[2] 王旭, 邓晓敬. 膀胱疼痛综合征/间质性膀胱炎的研究进展[J]. 临床和实验医学杂志, 2018, 17(20):2235-2238.
Wang X, Deng XJ. Research progress of bladder pain syndrome/interstitial cystitis[J]. J Clin Exp Med, 2018, 17(20): 2235-2238.

[3] Rourke W, Khan SA, Ahmed K, et al. Painful bladder syndrome/interstitial cystitis: aetiology, evaluation and management[J]. Arch Ital Urol Androl, 2014, 86(2):126-131.

[4] Westropp JL, Buffington CA. In vivo models of interstitial cystitis[J]. J Urol, 2002, 167(2 Pt 1):694-702.

[5] Kato K, Kitada S, Longhurst PA, et al. Time-course of alterations of bladder function following acetone-induced cystitis[J]. J Urol, 1990, 144(5):1272-1276.

[6] El-Hamamsy D. Bladder wall injection of mesenchymal stem cells ameliorates bladder inflammation, overactivity and nociception in a chemically induced interstitial cystitis-like rat model[J]. Int Urogynecol J, 2019, 30(5):845-846.

[7] Lee YL, Lin KL, Chuang SM, et al. Elucidating mechanisms of bladder repair after hyaluronan instillation in ketamine-induced ulcerative cystitis in animal model[J]. Am J Pathol, 2017, 187(9): 1945-1959.

[8] Song PH, Chun SY, Chung JW, et al. Comparison of 5 different rat models to establish a standard animal model for research into interstitial cystitis[J]. Int Neurourol J, 2017, 21(3): 163-170.

[9] Ryu CM, Yu HY, Lee HY, et al. Longitudinal intravital imaging of transplanted mesenchymal stem cells elucidates their functional integration and therapeutic potency in an animal model of interstitial cystitis/bladder pain syndrome[J]. Theranostics,

2018, 8(20):5610-5624.

[10] Lv YS, Yao YS, Rong L, et al. Intravesical hyaluronidase causes chronic cystitis in a rat model: a potential model of bladder pain syndrome/interstitial cystitis[J]. Int J Urol, 2014, 21(6):601-607.

[11] Hu VY, Malley S, Dattilio A, et al. COX-2 and prostanoid expression in micturition pathways after cyclophosphamide-induced cystitis in the rat [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2003, 284(2):R574-585.

[12] Golubeva AV, Zhdanov AV, Mallel G, et al. The mouse cyclophosphamide model of bladder pain syndrome: tissue characterization, immune profiling, and relationship to metabotropic glutamate receptors [J]. Physiol Rep, 2014, 2(3): e00260.

[13] Lee G. Uroplakins in the lower urinary tract [J]. Int Neurourol J, 2011, 15(1):4-12.

[14] Izgi K, Altuntas CZ, Bicer F, et al. Uroplakin peptide-specific autoimmunity initiates interstitial cystitis/painful bladder syndrome in mice [J]. PLoS One, 2013, 8(8): e72067.

[15] Liu W, Evanoff DP, Chen X, et al. Urinary bladder epithelium antigen induces CD8+T cell tolerance, activation, and autoimmune response [J]. J Immunol, 2007, 178(1): 539-546.

[16] Yang W, Yaggie RE, Jiang MC, et al. Acyloxyacyl hydrolase modulates pelvic pain severity [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2018, 314(3): R353-r365.

[17] Rudick CN, Chen MC, Mongiu AK, et al. Organ cross talk modulates pelvic pain [J]. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, 2007, 293(3): R1191-1198.

[18] Wang Z, Chang HH, Gao Y, et al. Effects of water avoidance stress on peripheral and central responses during bladder filling in the rat: A multidisciplinary approach to the study of urologic chronic pelvic pain syndrome (MAPP) research network study [J]. PLoS One, 2017, 12(9): e0182976.

[19] Buffington CA, Pacak K. Increased plasma norepinephrine concentration in cats with interstitial cystitis [J]. J Urol, 2001, 165(6 Pt 1):2051-2054.

[20] Charrua A, Pinto R, Taylor A, et al. Can the adrenergic system be implicated in the pathophysiology of bladder pain syndrome/interstitial cystitis? A clinical and experimental study [J]. Neurourol Urodyn, 2015, 34(5):489-496.

[21] Clemens JQ, Mullins C, Kusek JW, et al. The MAPP research network: a novel study of urologic chronic pelvic pain syndromes [J]. BMC Urol, 2014, 14:57.

[22] 徐曦, 张嘉鹏, 王健, 等. NALP3 炎症小体在间质性膀胱炎/膀胱疼痛综合征中的表达及作用 [J]. 中华泌尿外科杂志, 2018, 39(8):619-625.
Xu X, Zhang JP, Wang J, et al. Expression and role of NALP3 inflammatory bodies in Interstitial cystitis/bladder pain Syndrome [J]. Chin J Urol, 2018, 39(8): 619-625.

[23] Lai H, Gereau RW 4th, Luo Y, et al. Animal models of urologic chronic pelvic pain syndromes: Findings from the multidisciplinary approach to the study of chronic pelvic pain research Network[J]. Urology, 2015, 85(6):1454-1465.

[24] Governo RJ, Prior MJ, Morris PG, et al. Validation of an automated punctate mechanical stimuli delivery system designed for fMRI studies in rodents [J]. J Neurosci Methods, 2007, 163(1): 31-37.

[收稿日期] 2019-08-22

KAICHUN

创想未来

Create the future

不 忘 初 心

上海开纯洁净室技术工程有限公司

创新 / 卓越 / 达观 / 友善

开纯

为您呈现国际水准实验动物设施解决方案

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