



多药耐药基因 1(*Abcb1*) 敲除和人源化大鼠模型的建立

马 婧, 陈 炜, 张 旭, 马元武, 吕 丹, 高 虹, 张连峰

(中国医学科学院 & 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 敲除大鼠多药耐药基因 1(*Abcb1*), 并在基因敲除大鼠的基础上建立 *Abcb1* 人源化大鼠模型, 为 *Abcb1* 相关药物代谢和药物评价研究提供更接近人类的动物模型。**方法** 利用大片段转基因技术和 CRISPR/Cas9 技术相结合, 建立人源化大鼠模型, 利用 PCR, RT-PCR 和 Real-time PCR 的方法进行鉴定及分析。**结果** 将包含人源 *Abcb1* 启动子和 cDNA 的 153 kb BAC 片段转入到大鼠基因组, 获得稳定表达 *h-Abcb1* 基因的大鼠, 同时建立了 *Abcb1* 基因敲除大鼠。通过将两者杂交建立了 *Abcb1* 人源化大鼠模型。人源大鼠与大鼠内源 *Abcb1* 表达谱有明显的区别, 人源化大鼠不仅表达 *h-Abcb1* 基因, 在组织表达谱方面也与人类更接近。**结论** 建立了 *Abcb1* 基因敲除大鼠和人源化大鼠模型, *Abcb1* 人源化模型可作为 *Abcb1* 基因相关药物代谢研究更接近人类的动物模型。

【关键词】 *Abcb1*; 人源化; BAC; 基因敲除大鼠

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0001-08

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.01

Establishment of *Abcb1* knock out rat and *Abcb1* humanized rat models

MA Jing, CHEN Wei, ZHANG Xu, MA Yuan-wu, LV Dan, GAO Hong, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences(CAMS) & Peking Union Medical College(PUMC), Beijing 100021, China,)

【Abstract】 Objective To knock out the *Abcb1* gene of rat, and establish the *Abcb1* humanized rat model based on the *Abcb1* knock out rat. **Methods** The animal model was established using BAC and CRISPR/Cas9 technology, and was analyzed by PCR, RT-PCR and real-time PCR. **Results** Establishing a rat model expressing human *Abcb1* stably by transfer the 153 kb BAC containing human *Abcb1* promoter and cDNA into rat genome, and establishing the *Abcb1* knock out rat at the same time. Establishing the *Abcb1* humanized model by crossing these two strains together. The expression pattern of *Abcb1* in *Abcb1* humanized rat is different from the wild type rat. The *Abcb1* humanized model express not only the human *Abcb1* gene but also has similar expression pattern as human. **Conclusions** The *Abcb1* knock out rat and the *Abcb1* humanized rat were successfully established, and this model is close to human concerning about the drug metabolism related to *Abcb1*.

【Key words】 *Abcb1*; Humanized; BAC; Gene knock out rat

P-糖蛋白是一种相对分子量为 170×10^3 的单链跨膜糖蛋白, 由多药耐药基因 *Abcb1* (又称 *Mdr1*) 编码, 参与药物吸收、分布、代谢及排泄等过程^[1]。

在生理状态下, P-糖蛋白的存在可保护机体安全, 而在病理情况下, P-糖蛋白于血脑屏障的表达使得药物不能进入中枢神经系统^[2], 于肿瘤细胞中的表

【基金项目】 国家“重大新药创制”科技重大专项课题基于人源化模型和肝脏生物功能网络的药物肝毒性预测关键新技术(2012ZX09301001-006)。

【作者简介】 马婧(1991-), 女, 硕士生, 研究方向: 比较医学。E-mail: alanyingtao519@163.com。

【通讯作者】 张连峰, E-mail: zhanglf@cnilas.org; 高虹, E-mail: gaohongdws@aliyun.com。

达^[3]导致机体产生多药耐药现象^[4-5],所以控制 P-糖蛋白表达的 *Abcb1* 基因与多种药物有效性和安全性相关。

大鼠不仅是生理、代谢、神经及行为等研究广泛使用的动物^[6],也是药典规定的用于药物安全性评价的指定动物之一。由于物种差异,大鼠的 P-糖蛋白与人体 P-糖蛋白的表达图谱和蛋白结构都有一定差异^[7],所以,利用动物进行药物有效性和安全性评价的结果与临床试验结果不一致的情况时有发生^[8]。

采用 BAC^[9](细菌人工染色体)的方法可以将 *h-Abcb1* 基因导入到大鼠的受精卵中,建立基因结构、表达谱和调节方式与人类相似的模型^[10],能够更好的模拟人类 *h-Abcb1* 的表达图谱,从而更加客观的评价药物。同时采取基因敲除的技术^[11-12]剔除大鼠该内源基因的表达,建立人源化大鼠模型,为 *Abcb1* 相关药物筛选、毒理评价提供良好的人源化大鼠模型。

1 材料和方法

1.1 表达 *Abcb1* 的细菌人工染色体及其转基因大鼠的制作

利用同源重组的方法在 *Abcb1*-BAC 克隆(RP11-42N21)距 5' 上游 65 kb 的位置插入 *h-Abcb1* 基因的最长剪接体 cDNA(4718 bp), (构建好的载体起始密码子 ATG 上游长度为 66 kbp, ATG 下游长度为 87 kbp), 构建表达 *Abcb1* 的 BAC 表达载体(中科院动物所提供)。将构建好的载体经过酚氯仿抽提后,调整浓度至 1~2 ng/ μ L, 利用显微注射技术将 BAC 注射到 SD 大鼠的受精卵中(大鼠购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-001】), 用 SD 大鼠作为假孕受体大鼠(大鼠购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-001】), 制备转基因大鼠(TE2000U 纤维注射仪)。实验相关动物在本所卫生部人类疾病比较医学重点实验室繁育【SYXK(京)2013-002】。实验中设计动物操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所动物使用与管理委员会批准, 批准号为 ILAS-GC-2012-001。

1.2 *Abcb1b* 基因敲除大鼠的制作

主要包括以下几个部分:1)用于 *Abcb1b* 基因打靶的 gRNA 质粒构建 2)体外转录 3)Cas9/sgRNA 的原核注射。

用于 *Abcb1b* 基因打靶的 gRNA 质粒构建:针对 *Abcb1b* 基因设计两个靶点 GGAGACAAATACA CAAGATT 以及 GG TTTGACGTGAATGACGCT, 合成两对寡聚核苷酸链 (RAT-ABCB1-E1 (1)-gRNA: TAGGAGACAAATACACAAGATT 和 AAACAATCTTG TGTATTTGTCT; RAT-ABCB1-E1 (2)-gRNA: TAGGT TTGACGTGAATGACGCT 和 AAACAGCGTCATTCAC GTCAA) 用于制备 sgRNA 合成的寡聚核苷酸经退火(97℃ 6 min 后自然冷却至室温), 连入经 *Bsa* I 酶切回收的 pUC57-sgRNA 表达载体(南京大学黄兴许老师惠赠), 构建 sgRNA 表达载体。测序验证后, 选择正确克隆。

体外转录:Cas9 表达质粒(Addgene No. 44858, 南京大学黄兴许老师惠赠), 经 *Age* I 酶切线性化, 经酚氯仿抽纯化后, 溶于无核酸酶的水中作为模板, 用于体外转录。Cas9 mRNA 的合成由试剂盒 T7Ultra Kit(Ambion, AM1345) 在体外作用 T7 RNA 聚合酶完成。sgRNA 的表达载体经 *Dra* I 酶切线性化后, 经酚氯仿纯化, 溶于无核酸酶的水中作为模板, 用于体外转录。sgRNA 的体外合成由试剂盒 MEGAshortscript Kit(Ambion, AM1354) 在体外利用 T7 RNA 聚合酶完成。

Cas9/sgRNA 的原核注射:转录好的 Cas9 mRNA 和 sgRNA 混合并且调整浓度至 20 ng/ μ L 和 10 ng/ μ L /sgRNA, 显微注射法将 RNA 混合物注射到 SD 大鼠的受精卵的雄性核和细胞质中制备转基因大鼠。

1.3 *Abcb1*-BAC 转基因大鼠及 *Abcb1b* 基因敲除大鼠的基因型鉴定

首建鼠于出生 7~14 d 时, 剪趾标记, 收集剪下的组织, 选用酚氯仿提取基因组 DNA, 溶于 0.1 $\times$ TE 中, 使用 PCR 法对首建鼠进行筛选。对于 *Abcb1*-BAC 转基因大鼠, 使用三对 PCR 引物分别对插入 BAC 的上中下游进行完整性检测, 分别为: *Abcb1*-BAC-F1: 5'-CACCAGTTGAAGAGCGTTGA-3' 下游 *Abcb1*-BAC-R1: 5'-GCTGCTGATGTGCTGATTGT-3' *Abcb1*-BAC-F2: 5'-CCAATGATGCTGCTCAAG-3' 下游 *Abcb1*-BAC-R2: 5'-GAGTTTATGTGCCACCAAGTAG-3' *Abcb1*-BAC-F3: 5'-AGTGGTGTTCAGAATG GC-3' 下游 *Abcb1*-BAC-R3: 5'-GTCAGTTACAGTCC AAATGGG-3' (Life Technologies, 中国)。PCR 反应体系 20 μ L (PCR 反应相关试剂购自宝生物工程有 限公司, 中国)。反应条件: 95℃ 5 min; (95℃ 30 s,

58℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环); 72℃ 10 min; 4℃ 保温。扩增片段大小分别为 316 bp, 449 bp, 410 bp。对于 *Abcb1b* 基因敲除大鼠, 设计一对引物包含作用靶点, 上游引物为 *Abcb1-check-F1*: GCTACAATGACATGTCCTACCCAAT 下游引物为 *Abcb1-check-R1*: AGTCTTGATTCTGCCAGCCTAGTC (上海英俊生物技术技术有限公司合成, 中国)。PCR 反应体系 50 μ L (PCR 反应相关试剂购自宝生物工程(中国)有限公司, 中国)。反应条件: 95℃ 5 min; (95℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 30 s) $\times$ 30 循环; 72℃ 10 min; 4℃ 保存。扩增片段大小为 737 bp。并通过 TA 克隆、测序进一步检测确定突变。

1.4 *Abcb1* 人源化大鼠的培育

通过将得到的 *rAbcb1b* 基因敲除大鼠进行杂交, 获得 *rAbcb1b* 基因敲除纯合子大鼠, 将 *hAbcb1-BAC* 阳性大鼠与 *rAbcb1b* 基因敲除大鼠杂交, 得到 BAC 阳性且 *rAbcb1b* 基因敲除杂合子大鼠, 将此大鼠与 *rAbcb1b* 基因敲除纯合子大鼠杂交, 即可获得 *hAbcb1-BAC* 阳性且 *rAbcb1b* 基因敲除纯合子大鼠。这种大鼠缺乏 *r-Abcb1b* 基因的表达, 同时携带通过 BAC 技术得到的 *h-Abcb1* 基因。

1.5 RT-PCR 检测 *hAbcb1* 组织表达情况

Abcb1 人源化大鼠与野生型大鼠交配, 对其子代的基因表达情况进行分析。颈椎脱臼法牺牲大鼠, 提取 F1 代大鼠及野生对照大鼠心脏、肝脏、肾脏、肺、脑组织的总 RNA。制备 cDNA, 利用引物 RT-*Abcb1-F*: 5'-GGCTATCATTACTCTTTACCTGTGAAG-3' 和 RT-*Abcb1-R*: 5'-CCGGATTGACTGAATGCTG-3', 扩增大小为 225 bp 的目的片段, PCR 反应体系 20 μ L (PCR 反应相关试剂购自宝生物工程(中国)有限公司, 中国)。反应条件: 95℃ 5 min; (95℃ 30 s, 62℃ 30 s, 72℃ 30 s, 24 个循环); 72℃ 10 min; 4℃ 保存。GAPDH 作为内参。

1.6 Real-time PCR 检测组织内 *Abcb1*mRNA 表达情况

颈椎脱臼法牺牲大鼠, 提取心、肝、脾、肾、脑、胸腺等组织总 RNA, 制备 cDNA。

标准曲线的建立: 使用引物 *Abcb1-wt-standard-F1*: 5'-CAGGAGATAGGCTGGTTTGACG-3'; *Abcb1-wt-standard-R1*: 5'-GGCCCTTCAAGATCTTAACCTTCA C-3' 以及 *Abcb1-human-standard-F1*: 5'-CAGTGG AATTGGTGCTGG-3'; *Abcb1-human-standard-R1*: 5'-AACACTAAAAGCCCCAATTAATACAG-3' 分别扩增

野生型大鼠体内的 *rAbcb1b* 基因以及人源化大鼠体内的 *hAbcb1* 基因, 片段长度分别为 766 bp 及 682 bp。将携带有 *rAbcb1* 基因及 *hAbcb1* 基因的质粒作为模板, 稀释范围为 $1 \times 10^{10} \sim 1 \times 10^3$ 拷贝/ μ L, 使用 Power SYBR Green Master Mix 体系, 反应条件为: 95℃ 预变性 5 min 进入循环: 95℃ 30 s, 59℃ (*rAbcb1*) 或 61℃ (*hAbcb1*) 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环 40 次, 在每个循环结束后测定吸光值。建立标准曲线时使用的引物为 *Abcb1-wt-F1*: 5'-GAATGTTCTTTTCAGTCCATAACGA-3' 和 *Abcb1-wt-R1*: 5'-GTTCTGATGGCTGCTAAGACTTC-3' 以及 *Abcb1-human-F1*: 5'-TGTTGCTGCTTACATTCAGG-3' 和 *Abcb1-human-R1* 5'-CAGCTGACAGTCCAAG AACAGG-3'。

使用 *Abcb1-wt-F1/R1* 和 *Abcb1-human-F1/R1* 分别对野生型大鼠及人源化大鼠的 *Abcb1* 基因进行扩增, 根据标准曲线, 计算不同组织拷贝数, 重复 3 次。GraphPad Prism 5 软件分析。

2 结果

2.1 *hAbcb1* - BAC 转基因大鼠的制备与分析

利用同源重组的方法在 *Abcb1-BAC* 克隆 (RP11-42N21) 5' 上游 65 kb 的位置插入 *h-Abcb1* 基因的最长剪接体 cDNA (4718 bp), (构建好的载体起始密码子 ATG 上游长度为 66 kbp, ATG 下游长度为 87 kbp) 完成了表达 *Abcb1* 的 BAC 表达载体 (图 1)。获得 15 只 F0 代大鼠, 提取其基因组 DNA, PCR 鉴定, 共获得 4 只表达全长 *h-Abcb1* 的首建鼠 (图 2)。但只有 3 只首建鼠能稳定传代。提取大鼠的心脏、肝脏、肾脏、肺、脑的 RNA^[13], RT-PCR 方法分析 *Abcb1* 的 RNA 水平表达情况, 结果表明 3 个转基因大鼠系 (2 号, 5 号和 8 号) 的脑组织均有 *Abcb1* 基因的表达, 但是只有 5 号转基因大鼠系的心脏组织有 *Abcb1* 基因的表达, 并且在肝脏, 肺和脑组织中 *Abcb1* 的表达量最高 (图 3)

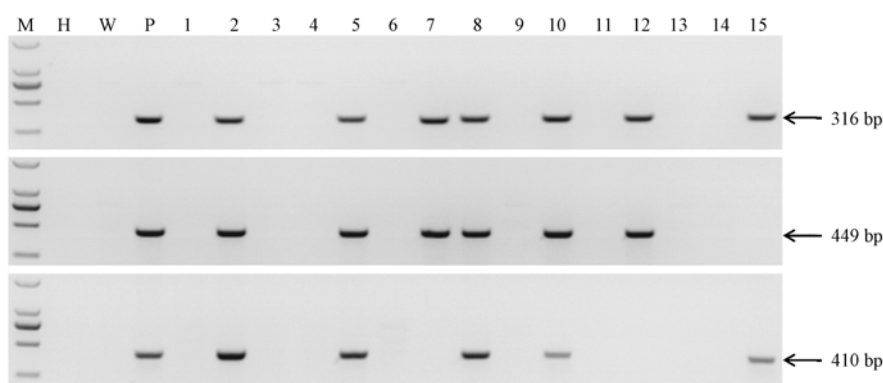


图 1 BAC-*Abcb1* 细菌人工染色体结构图

Fig. 1 The structure of BAC-*Abcb1*

2.2 *Abcb1b* 基因敲除大鼠的制备

经显微注射, 得到 12 只首建鼠, 经基因型鉴定, 筛选获得三只 (1 号, 5 号和 9 号) 首建鼠系 (图 4A), 并对这三只首建鼠系的扩增产物进行测序分



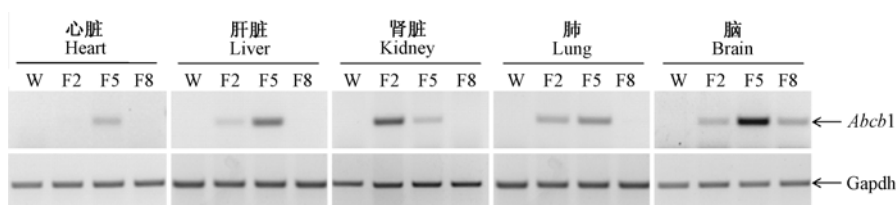
注: M: Marker DL2000; H: 水; W: 阴性对照; P: 阳性对照; 1-15 为 F0 代大鼠编号。2, 5, 8, 10 为阳性首建鼠。

图 2 PCR 鉴定 BAC-Abcb1 大鼠基因型

Note: M: DNA molecular weight marker DL2000; H: H₂O; W: Negative control; P: Positive control;

1-15: rats were generated by microinjection, 2, 5, 8, 10 were four positive founders.

Fig. 2 Identify the genotype of the BAC-Abcb1 rats by PCR



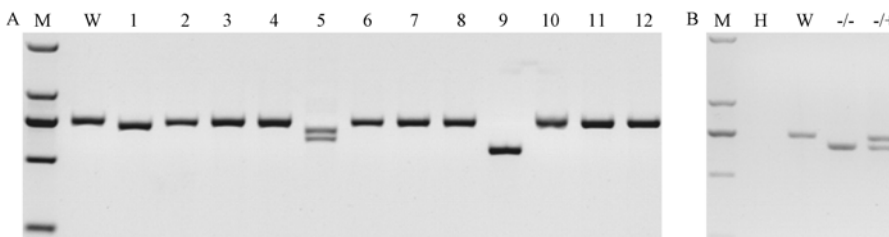
注: W: 阴性对照; F2, F5, F8 为 2, 5, 8 号首建鼠的子代鼠。F5 在心脏、肝脏、肾脏、肺和脑均有 Abcb1 基因的表达。

图 3 RT-PCR 分析 Abcb1 在 F1 代大鼠中的基因表达情况

Note: W: Negative control; F2, F5 and F8 are generated by crossing founder 2, 5, 8 with wild type rats.

F5 has human Abcb1 expression in heart, liver, kidney, lung and brain.

Fig. 3 Abcb1 gene expression in F1 rats were analyzed by RT-PCR



注: M: Marker DL2000; H: 水; W: 阴性对照; A: 1-12 为通过显微注射产生的 F0 代大鼠编号。

B: 5 号首建鼠子代鉴定, 缺失突变可以传代。-/+ : Abcb1 杂合子大鼠; -/- : Abcb1 基因敲除纯合子大鼠。

图 4 Abcb1b 基因敲除大鼠的基因型鉴定

Note: M: DNA molecular weight marker DL2000; H: H₂O; W: Negative control; A: 1-12: Rats generated by microinjection.

B: The off springs of founder 5 were identified by PCR, The mutation can be transmitted.

-/+ : Abcb1 heterogeneous rat. -/- : Abcb1 homozygous rat.

Fig. 4 Identify the genotype of the Abcb1b knockout rats by PCR

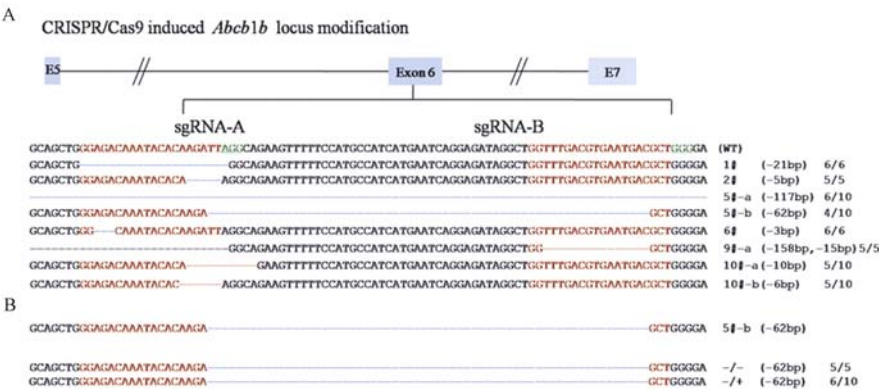
析, 确定了 CRISPR/Cas9 对 Abcb1b 的基因修饰情况 (图 5A)。

分析发现 5 号首建鼠系含有 62 bp 的 DNA 片段缺失, 该缺失造成了 Abcb1b 基因的移码突变, 并提前产生了终止密码子。我们将 5 号首建鼠系与野生型大鼠交配, 对子代大鼠进行基因型鉴定 (图 4B),

测序结果表明该缺失能够稳定遗传 (图 5B)。

2.3 Abcb1 人源化大鼠的培育

将 Abcb1b 基因敲除大鼠和 hAbcb1-BAC 转基因大鼠杂交, 最终获得 rAbcb1b 基因敲除和表达 hAbcb1 的大鼠, 即为人源化 Abcb1 大鼠。6 号为 Abcb1 人源化大鼠 (图 6A、B)。



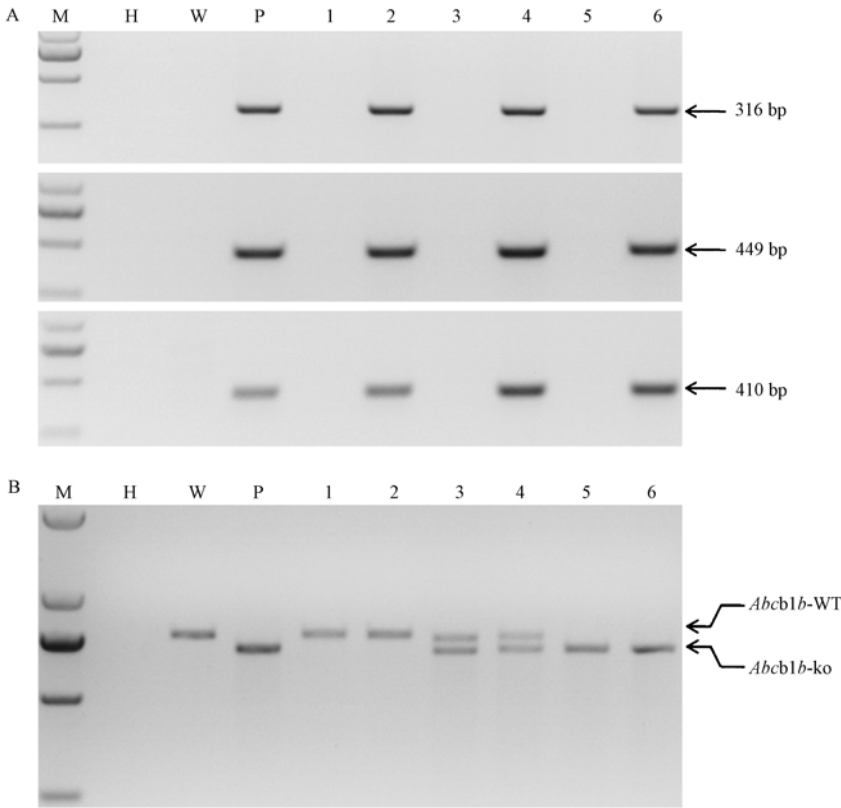
注：PAM 基序表示为绿色加下划线；靶点用红色表示；突变蓝色表示；插入（+），缺失（-）。
N/N 表示检测的克隆数和阳性数。A：首建鼠测序结果。D：子代大鼠测序结果。

图 5 *Abcb1b* 基因敲除大鼠的测序结果分析

Note: The PAM sequence is underlined and highlighted in green; the targeting site are red; the mutations are blue; deletions (-) are shown to the right of each allele. N/N Indicates positive colonies out of total sequenced.

A: The sequence result of founder rats. D: Sequencing result of offspring rat.

Fig. 5 The sequence result analysis of *Abcb1b* knockout rat model

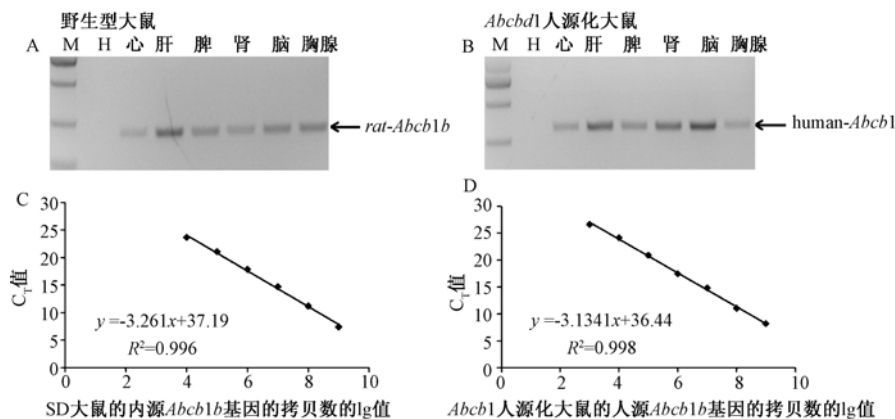


注：M；Marker DL2000；H；水；W；阴性对照；P；阳性对照。1-6；由 BAC-*Abcb1* 大鼠与 *Abcb1b* 敲除大鼠杂交产生的子代。
A；2、4、6 为转基因阳性鼠；1、3、5 号为转基因阴性鼠。B；1、2 号为野生型大鼠；3、4 号为 *Abcb1b* 基因敲除杂合子大鼠；
5、6 号为 *Abcb1b* 基因敲除纯合子大鼠。6 号为 *Abcb1* 人源化大鼠。

图 6 *Abcb1* 人源化大鼠的鉴定

Note: M; DNA molecular weight marker DL2000; H; H₂O; W; Negative control. P; Positive control. 1-6; Rats were got by crossing BAC-*Abcb1* rat with *Abcb1b* knock out rat. A; 2, 4, 6 are transgenic positive rats; 1, 3, 5 are transgenic negative rat
B; 1, 2 are wild type rat; 3, 4 are *Abcb1b* heterogeneous rat; 5, 6 are *Abcb1b* homozygous rats. 6 is the humanized *Abcb1* rat.

Fig. 6 Generation of humanized *Abcb1* rat



注:A:琼脂糖电泳检测 RT-PCR 产物,检测野生型大鼠的 *Abcb1b* 表达情况。B:琼脂糖电泳检测 RT-PCR 产物,检测 *Abcb1* 人源化大鼠的 *Abcb1* 表达 C: *Abcb1*-human 质粒 10 倍系列稀释的标准曲线。D: *Abcb1b*-rat 质粒 10 倍系列稀释的标准曲线。

图 7 RT-PCR 检测野生型大鼠和人源化大鼠组织中 *Abcb1* mRNA 表达水平及 *Abcb1*-human 和 *Abcb1b*-rat 质粒 10 倍系列稀释的标准曲线

Note: A: The wild type rat RT-PCR products detected by agarose gel, analyzing the *Abcb1b* expression level in tissues.

B: The *Abcb1* humanized rat RT-PCR products detected by agarose gel, analyzing *Abcb1* expression level in tissues

C: The standard curve of 10-fold serial dilutions of *Abcb1b*-rat plasmid D: The standard curve of 10-fold serial dilutions of *Abcb1*-human plasmid.

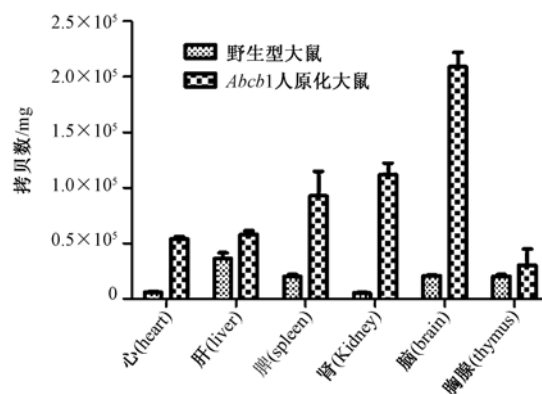
Fig. 7 The *Abcb1* mRNA expression level of wild type rat and *Abcb1* humanized rat in different tissues detected by RT-PCR and the standard curve of 10-fold serial dilution of *Abcb1*-human and *Abcb1b*-rat plasmid

2.4 *Abcb1* 人源化大鼠和野生型大鼠 *Abcb1b* 表达情况对比分析

以心、肝、脾、肾、脑、胸腺等组织的 cDNA 为模板,扩增 *Abcb1*,发现野生型大鼠体内肝脏和脑 *Abcb1b* 表达量高,心脏和肾脏表达量相对较低(图 7A、B)。人源化大鼠体内肝脏、肾脏和脑内 *Abcb1* 表达量高,心脏表达量较低。将携带有 *rAbcb1b* 基因及 *hAbcb1* 基因的质粒以 10 倍梯度系列稀释作为模板扩增得到的标准曲线 $R^2 > 0.99$,符合曲线要求(图 7C、D)。*Abcb1* 基因拷贝数经统计分析可以看出 *Abcb1* 人源化大鼠心脏的拷贝数达到 5×10^4 拷贝/mg,在肝脏为 5×10^4 拷贝/mg,脾脏为 8×10^4 拷贝/mg,肾脏为 1.2×10^5 拷贝/mg,脑为 2×10^5 拷贝/mg,心脏、脾脏、肾脏和脑中 *h-Abcb1* 的拷贝远高于 *r-Abcb1*,结果与琼脂糖凝胶电泳结果一致(图 8)。

3 讨论

制作人源化动物模型是研究人类基因功能的重要方法,人源化实验动物模型主要包括基因水平上的人源化动物模型以及细胞组织水平的人源化动物模型^[14]。基因水平的人源化动物模型制作主要有两种方法,一种为基因敲入的方法^[15-16],另一种是将动物的内源基因敲除后转入 BAC。与前者相



注:野生型大鼠和 *Abcb1* 人源化大鼠的 *Abcb1* 在心脏、肝脏、脾脏、肾脏、脑和胸腺每毫克拷贝数。

图 8 Real-time PCR 检测野生型大鼠和人源化大鼠组织中 *Abcb1* mRNA 表达水平

Note: The copy numbers of *Abcb1*-human and *Abcb1b*-rat in heart, liver, spleen, kidney, brain, thymus per milligram.

Fig. 8 The *Abcb1* mRNA expression level of wild type rat and *Abcb1* humanized rat in different tissues detected by Real-time PCR

比,BAC 法^[17]不仅将待研究的目的基因转入到动物体中,而且其启动子及上下游的调控序列也同时被转入动物体中,更好模拟人类基因功能。

P-糖蛋白最早于 1976 年由 Juliao 和 Ling 等^[18]在秋水仙碱耐药的中国仓鼠卵巢细胞中发现,但随

后的研究表明其广泛存在于机体的各个组织^[19], P-糖蛋白是第一个被发现的人类 ABC 转运蛋白, 之后在啮齿类动物中也发现了此类蛋白, 它是一种能量性依赖的跨膜输出泵, 可将抗肿瘤药物逆浓度从细胞内转运至细胞外, 降低胞内浓度并导致多药耐药现象的产生。人体中 P-糖蛋白首先在肿瘤细胞中发现, 之后的研究表明它在人体正常组织中也广泛表达, 例如肠道上皮细胞, 肝细胞毛细胆管膜, 肾近曲小管上皮细胞, 血脑屏障毛细血管内皮细胞等。它能防止机体对有害物质的吸收和介导物质的输出, 保护大脑, 睾丸, 胎儿等重要器官, 人体中 *Abcb1* 基因控制表达的 P-糖蛋白与药物分布和转运密切相关^[20]。P-糖蛋白能利用机体中的 ATP 将已进入细胞的外源性的药物毒物转运出来, 降低细胞内药物毒物浓度^[21]。

种属差异是造成药物在临床试验后被淘汰的原因之一^[22-24], 制备稳定可靠的实验动物模型是关系到实验结果真实可靠的重要影响因素^[25]。

大鼠基因组中, 有两个同源基因 *Abcb1a* 及 *Abcb1b* 编码 P-糖蛋白, 二者氨基酸序列相似性为 85%, 与同源的人类 *Abcb1* 的氨基酸相似性 > 80%, 大鼠的 *Abcb1a* 及 *Abcb1b* 基因与人类的 *Abcb1* 基因同样对抗抗癌药物, 阻止其进入靶器官。*Abcb1a* 与 *Abcb1b* 基因在组织器官的分布不同但总体情况与人类的 *Abcb1* 基因是一致的, 它们与人类的 *Abcb1* 基因承担着相同的功能。*Abcb1a* 主要分布在大脑, 小肠, 肝脏, 肾脏, 而 *Abcb1b* 主要分布在肾上腺, 子宫内膜, 子宫, 卵巢, 胎盘, 肝脏, 肾脏及脑实质^[1]。本研究用人源的 *Abcb1* 基因替换了大鼠的 *Abcb1b* 基因, 为 *Abcb1* 相关药物提供实验动物模型, 而用人源的 *Abcb1* 基因替代 *Abcb1a* 及 *Abcb1b* 双基因的模式我们将在接下来的工作中进行研究。

本研究制作出的 *Abcb1* 人源化实验动物模型, 其内源的 *Abcb1b* 基因采用 CRISPR/Cas9^[26-27] 的方法敲除, 与锌指核酶 (ZFNs) 技术^[28]、转录激活样效应因子 (Talens) 技术^[29] 相比, 设计和构建过程相对简单。

根据从 Expression Atlas (<http://www.ebi.ac.uk/gxa/home>) 得到的基于微阵列和 RNA 序列分析的信息, 人体中主要组织 *Abcb1* 表达水平从高到低依次为肾 (29), 肝 (17), 胸腺 (1), 心 (0.7), 在人体大脑组织中也有 *Abcb1* 基因表达^[30-31]。从本研究中可以看出在野生型大鼠体内各组织 *Abcb1b* 表达

水平从高到低为肝, 脑, 心, 肾。本研究培育出的 *Abcb1* 人源化大鼠体内转入的 *Abcb1*-BAC 片段是完整的, 经过 Real-time PCR 的方法定量分析显示 *h-Abcb1* 在大鼠体内按表达量高低排序为脑, 肾, 肝, 心, 这与人体中 *Abcb1* 在各组织表达趋势是一致的。

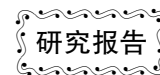
因此, 本研究建立的 *Abcb1* 人源化动物模型组织表达谱更接近人类, 为相关药物分析及评价提供了有价值的实验动物模型。

参考文献:

- [1] E. M. Leslie, R. G. Deeley, S. P. Cole. Multidrug resistance proteins; role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2005, 204 (3): 216-237.
- [2] E. Choong, M. Dobrin, P. A. Carrupt, et al. The permeability P-glycoprotein; a focus on enantioselectivity and brain distribution [J]. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2010, 6 (8): 953-965.
- [3] J. Ferte. Analysis of the tangled relationships between P-glycoprotein-mediated multidrug resistance and the lipid phase of the cell membrane [J]. *Eur J Biochem*, 2000, 267 (2): 277-294.
- [4] P. Kwan and M. J. Brodie. Potential role of drug transporters in the pathogenesis of medically intractable epilepsy [J]. *Epilepsia*, 2005, 46 (2): 224-235.
- [5] Y. Romsicki and F. J. Sharom. The ATPase and ATP-binding functions of P-glycoprotein—modulation by interaction with defined phospholipids [J]. *Eur J Biochem*, 1998, 256 (1): 170-178.
- [6] A. Abbott. Laboratory animals; the Renaissance rat [J]. *Nature*, 2004, 428 (6982): 464-466.
- [7] L. Su, P. Jenardhanan, D. D. Mruk, et al. Role of P-glycoprotein at the blood-testis barrier on adjuvant distribution in the testis; a revisit of recent data [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2012, 763: 318-333.
- [8] A. E. Hudson and H. C. Hemmings, Jr. Are anaesthetics toxic to the brain? [J]. *Br J Anaesth*, 2011, 107 (1): 30-37.
- [9] J. J. Harrington, G. Van Bokkelen, R. W. Mays, et al. Formation of de novo centromeres and construction of first-generation human artificial microchromosomes [J]. *Nat Genet*, 1997, 15 (4): 345-355.
- [10] H. Shizuya, B. Birren, U. J. Kim, et al. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992, 89 (18): 8794-8797.
- [11] L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339 (6121): 819-823.
- [12] P. Mali, L. Yang, K. M. Esvelt, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. *Science*, 2013, 339 (6121)

- ;823–826.
- [13] A. Peinnequin, C. Mouret, O. Birot, *et al.* Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green[J]. BMC Immunol, 2004, 5 :3.
- [14] K. Yoshizato and C. Taten. A mouse with humanized liver as an animal model for predicting drug effects and for studying hepatic viral infection; where to next? [J]. Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2013, 9 (11) :1419–1435.
- [15] M. D. Swain, K. L. Orzechowski, H. L. Swaim, *et al.* P-gp substrate-induced neurotoxicity in an Abcb1a knock-in/Abcb1b knock-out mouse model with a mutated canine ABCB1 targeted insertion[J]. Res Vet Scil, 2013, 94 (3) :656–661.
- [16] Y. Ma, J. Ma, X. Zhang, *et al.* Generation of eGFP and Cre knockin rats by CRISPR/Cas9[J]. FEBS J, 2014, 281 (17) :3779–3790.
- [17] Y. Kazuki and M. Oshimura. Human artificial chromosomes for gene delivery and the development of animal models[J]. Mol Therl, 2011, 19 (9) :1591–1601.
- [18] S. F. Zhou. Structure, function and regulation of P-glycoprotein and its clinical relevance in drug disposition[J]. Xenobiotical, 2008, 38 (7–8) :802–832.
- [19] F. Thiebaut, T. Tsuruo, H. Hamada, *et al.* Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987, 84 (21) :7735–7738.
- [20] R. Silva, V. Vilas-Boas, H. Carmo, *et al.* Modulation of P-glycoprotein efflux pump: induction and activation as a therapeutic strategy[J]. Pharmacol Therl, 2014,
- [21] S. Fellner, B. Bauer, D. S. Miller, *et al.* Transport of paclitaxel (Taxol) across the blood-brain barrier in vitro and in vivo[J]. J Clin Investl, 2002, 110 (9) :1309–1318.
- [22] H. Y. Kay, H. Wu, S. I. Lee, *et al.* Applications of genetically modified tools to safety assessment in drug development[J]. Toxicol Resl, 2010, 26 (1) :1–8.
- [23] 宋书元. 新药临床前药理毒理研究与临床试验的关系[J]. 中国临床药理学杂志, 1991, (02) :80–84.
- [24] 袁伯俊, 顾长虹. 临床药理评价不可忽视的问题—比较药理学研究[J]. 中药新药与临床药理, 1996, (01) :45–47.
- [25] 杜冠华. 药物临床前研究与转化医学—实验动物的应用与动物实验[J]. 中国比较医学杂志, 2011, (Z1) :24–26.
- [26] Y. Ma, L. Zhang and X. Huang. Genome modification by CRISPR/Cas9[J]. FEBS J, 2014, 281 (23) :5186–5193.
- [27] 马元武, 马婧, 路迎冬, 等. 利用 CRISPR/Cas9 敲除大鼠胰岛素受体底物 1(Irs1) 基因[J]. 中国比较医学杂志, 2014, (03) :55–60.
- [28] A. M. Geurts, G. J. Cost, Y. Freyvert, *et al.* Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases[J]. Sciencel, 2009, 325 (5939) :433.
- [29] Y. H. Sung, I. J. Baek, D. H. Kim, *et al.* Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting[J]. Nat Biotechnoll, 2013, 31 (1) :23–24.
- [30] D. S. Miller. Regulation of P-glycoprotein and other ABC drug transporters at the blood-brain barrier [J]. Trends Pharmacol Scil, 2010, 31 (6) :246–254.
- [31] S. Gazzin, N. Strazielle, C. Schmitt, *et al.* Differential expression of the multidrug resistance-related proteins ABCB1 and ABCG1 between blood-brain interfaces [J]. J Comp Neurol, 2008, 510 (5) :497–507.

[修回日期]2015-02-04



慢性束缚应激模型对小鼠社交行为的影响

高 杰¹, 张 楠¹, 宋铭晶¹, 孙秀萍¹

(北京协和医学院比较医学中心, 中国医学科学院北京协和医学院实验动物研究所,
卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 探讨慢性束缚应激模型对小鼠社交行为的影响, 为应激所致抑郁模型的社会行为学评价方法提供数据支撑。**方法** 采用慢性束缚加孤养方法建立应激所致抑郁模型, 模型组每日束缚 4 h (10:00 ~ 14:00), 连续进行 35 d, 单笼饲养。应用糖水偏爱测试确定模型成功, 应用社会趋避实验评价慢性束缚应激所致抑郁模型对小鼠社交行为的影响。**结果** 糖水偏爱实验结果显示, 慢性束缚组糖水偏爱指数明显下降, 与正常组比较具有显著性差异 ($P < 0.01$)。社会趋避实验结果显示, 正常组对刺激鼠笼的嗅闻时间及频次多于空鼠笼, 并具有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$); 慢性束缚组对刺激鼠笼和空鼠笼的嗅闻时间及频次相比, 无显著性差异。慢性束缚组嗅闻刺激鼠笼时间及频次明显少于正常组, 二者相比具有显著性差异 ($P < 0.05, P < 0.01$)。慢性束缚组动物第一次嗅闻刺激鼠笼的潜伏期明显比正常组长, 二者相比具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。慢性束缚组对刺激鼠笼的偏好指数明显小于正常组, 二者具有极显著性差异 ($P < 0.01$)。**结论** 慢性束缚应激小鼠社交回避的行为学表现, 为应激所致抑郁模型社会行为学评价体系的建立提供数据支撑。

【关键词】 慢性束缚; 应激; 社交行为, 小鼠

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0009-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.02

Effect of chronic restraint stress on sociability in mice

GAO Jie¹, ZHANG Nan¹, SONG Ming-jing¹, SUN Xiu-ping¹

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), and Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Disease Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of chronic restraint stress on sociability in mice. **Method** Chronic restraint stress was applied to establish stress depression model. The mice were individually housing and restrained for 4 h per day in a 50 mL polypropylene conical tube with ventilation holes. This daily restraint was repeated for 35 consecutive days. The sucrose preference test was applied to evaluate the model. The social approach-avoidance test was used to assess the effect of chronic restraint stress on sociability. **Results** The sucrose intake was significantly reduced in chronic restraint stress model compared with the control mice ($P < 0.01$). The control group investigated the social stimulus (stranger cage) significantly longer than the object stimulus (empty cage), thereby demonstrating normal social preference. The model group showed a decrease (sniffing time and frequency) in social investigation ($P < 0.05, P < 0.01$, vs the control group). The chronic restraint stress group did not demonstrate social preference. The preference index in chronic restraint stress model (ratio time sniffing stranger vs. empty cage) was significantly lower compared with

【基金项目】 北京市自然科学基金资助项目(7142105)。

【作者简介】 高杰(1986-), 男, 硕士, 研究方向: 实验动物学。

【通讯作者】 孙秀萍(1974-), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 神经精神疾病药理及方法学。

the control mice ($P < 0.01$). **Conclusion** The chronic restraint stress showed social avoidance in sociability test.

【Key words】 Chronic restraint; Stress; Sociability; Mice

抑郁症是一种以显著而持久的兴趣缺失、心境低落为主要特征的慢性、反复发作性精神障碍^[1]。应激生活事件是抑郁症发生的重要始动因素,因此应激动物模型在抑郁症的病理生理机制研究及抗抑郁药物筛选等方面发挥着重要作用^[2]。表观效度,即应激动物模型症状学(或行为学)表现和抑郁症临床表现的相似性是抑郁症动物模型的必备要素之一^[3]。目前,虽有兴趣缺失和行为绝望等经典行为学评价指标,但并未形成应激抑郁症动物模型行为学评价的标准体系。抑郁症临床表现的多样性,使应激抑郁症动物模型的行为学评价方法正逐渐多样化,并开始形成二维化评价方法^[4]。近些年来,人们发现应激抑郁症动物模型的社会能力尤其是社交能力下降,如社会失败等抑郁模型出现动物社交回避或缺乏,抗抑郁药物可以逆转应激所致的社会行为改变^[5]。本文采用慢性束缚加孤养方法制成应激抑郁模型,观察其对小鼠社交行为的影响,以期应激抑郁模型的社会行为学评价方法提供数据支撑。

1 材料和方法

1.1 动物

C57BL/6J 雄性小鼠,SPF 级,体重 25 g。由北京华阜康生物科技股份有限公司提供【SCXK(京)2014-0004】。实验在中国医学科学院医学实验动物研究所行为学实验室进行【SYXK(京)2014-0029】。动物自由进食进水,室内温度:23℃~25℃,相对湿度:(55±10)%。维持 12 h 光照/12 h 黑暗的昼夜节律。动物适应环境一周进行实验。

1.2 仪器

动物行为学视频跟踪系统(Noldus Information Technology, EthoVision XT, The Netherlands)

1.3 实验方法

动物随机分为正常组和慢性束缚加孤养组,每组 10 只。模型组动物单笼饲养,慢性束缚方法参考文献^[6],将动物置于 50 mL 离心管(离心管上烙制直径 2 mm 小孔数十个,用于通风),每日束缚 4 h (10:00~14:00),连续进行 35 d。正常组动物 5 只/笼,不给予任何干预,放置在另一房间。造模结束,进行糖水偏爱测试和社会趋避实验。

1.3.1 糖水偏爱测试

根据文献报道^[7],糖水偏爱测试方法分为训练期和测试期。训练期内,使动物适应蔗糖饮水,第一个 24 h,给予动物两瓶 1% 蔗糖水,第二个 24 h,给予动物一瓶 1% 蔗糖水,一瓶纯水。测试前不禁食禁水,测试期,同样给予动物一瓶 1% 蔗糖水,一瓶纯水,测试时间为 15 h。为避免位置偏爱影响因素,测试中间,将两瓶位置互换。测试结束,计算糖水偏爱指数(糖水偏爱指数 = 糖水消耗/总液体消耗 × 100%)。

1.3.2 社会趋避实验

动物在测试房间适应 1 h 后,进行社会趋避实验。根据文献^[8],首先将动物置于 50 × 50 × 50 cm 的方形敞箱中,自由适应 5 min。测试时,在敞箱的一个角落放置一空鼠笼,其对角角落放置一相同鼠笼,鼠笼内放置一只刺激鼠(stranger)。鼠笼上有圆孔,实验鼠和刺激鼠可以通过嗅觉接触。将实验鼠放入敞箱,应用 EthoVision XT 行为轨迹跟踪系统,记录 10 min 内实验鼠接触空鼠笼和刺激鼠笼的时间、频次及第一次接触鼠笼的潜伏期。实验结束,将实验鼠取出,归笼。偏好指数(preference index) = 实验鼠接触刺激鼠笼时间/接触空鼠笼时间。接触行为表现为主动嗅闻(sniffing),定义为实验鼠的鼻尖距离鼠笼 2 cm 以内范围。

1.4 统计学处理

实验结果以均数 ± 标准误(mean ± SEM)表示。采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析。采用单样本 K-S 检验进行正态分布检验,正态分布数据采用独立样本 T 检。 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

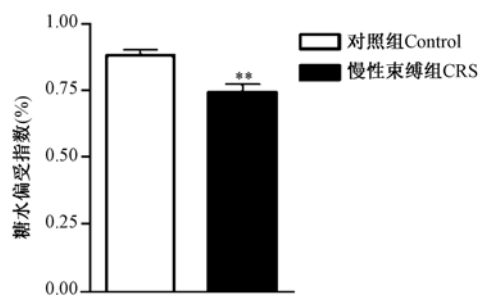
2 结果

2.1 慢性束缚模型对小鼠糖水偏爱测试的影响

如图 1 所示,慢性束缚模型组糖水偏爱指数下降,与正常组比较,具有极显著性差异($P < 0.01$)。

2.2 慢性束缚模型对小鼠社交行为的影响

如图 2A 和 2B 所示,慢性束缚组和正常组动物的运动路程和运动速度无显著性差异,即慢性束缚加孤养的应激因素对动物的运动能力未产生影响。如图 2C 和 2D 所示,正常组对刺激鼠笼的嗅闻时间及频次多于空鼠笼,并具有显著性差异;而慢性束缚组对刺激鼠笼和空鼠笼的嗅闻时间及频次相比,无显著性差异。慢性束缚组动物嗅闻刺激鼠笼时



注: ** $P < 0.01$, 与正常组比较。

图1 慢性束缚模型对糖水偏爱指数的影响

Note: ** $P < 0.01$, compared with the control group.

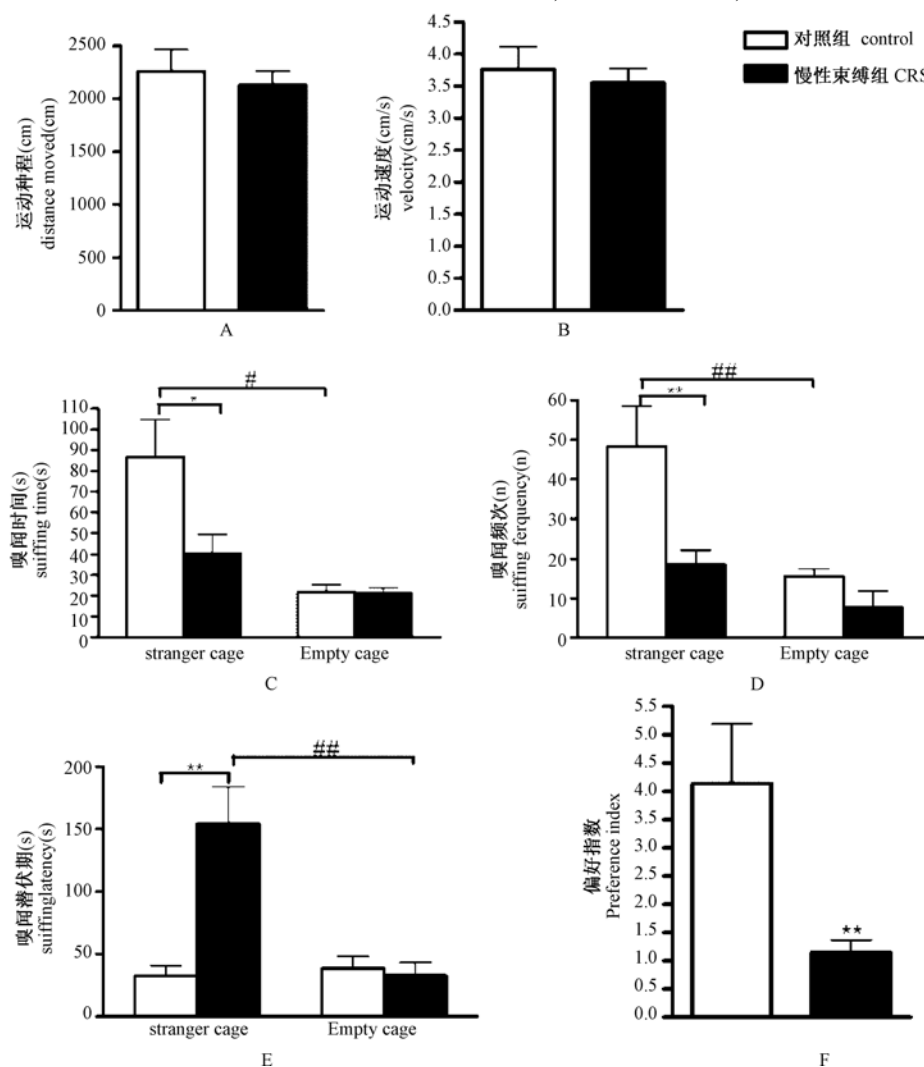
Fig.1 Effect of chronic restraint stress on sucrose preference test

间及频次明显少于正常组,二者相比具有显著性差

异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。如图 2E 所示,慢性束缚组动物第一次嗅闻刺激鼠笼的潜伏期明显比正常组长,二者相比具有极显著性差异($P < 0.01$)。如图 2F 所示,慢性束缚组对刺激鼠笼的偏好指数明显小于正常组,二者具有极显著性差异($P < 0.01$)。

3 讨论

慢性束缚是抑郁症常用的应激模型,可操作性强,重复性好,并能够模拟抑郁症的核心症状-兴趣缺失^[9]。本研究从社会应激角度出发,又加入孤养的应激方法,使模型更符合抑郁症发病的理论基础。糖水偏爱实验是评价兴趣缺失的经典实验。本研究结果显示慢性束缚模型组糖水偏爱指数下降,与正常组比较,具有极显著性差异,显示抑郁模



注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 与正常组比较; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, 与正常组空笼比较。

图2 慢性束缚模型对社会趋避实验的影响

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, compared with empty cage.

Fig.2 Effect of chronic restraint stress on sociability test

型成功。

社会趋避实验(social approach-avoidance test)是一种可操作性强的啮齿类动物社交行为学评价方法,比较经典的是三箱社会趋避实验方法,用两个挡板将长方形箱体分为三箱结构,挡板上有机孔,供动物自由穿梭。该实验允许受试动物对刺激鼠做出接近或逃避选择,具有较高的敏感性。动物自由适应三箱环境后,在两端的箱体内各放入一个鼠笼,其中一个鼠笼放入刺激鼠,另一个为空鼠笼。将受试动物放入中间箱体,两侧门打开,采集动物接触刺激鼠和空鼠笼的时间、频次及潜伏期等,以及动物在两端箱体的运动路程、时间、进入频次等,并据此描述动物的社会偏好行为。动物行为轨迹分析软件采用头-体-尾三点跟踪方式,其精确程度与摄像头和受试动物的距离有关,距离越短,跟踪越准确。本研究根据三箱方法,略有改动。在一个方形箱体的对角角落放入两个鼠笼,方形箱体长度是三箱结构的 1/2,因此可降低摄像头的高度,从而使动物行为轨迹分析软件更为精确的跟踪动物的头-体-尾三点。

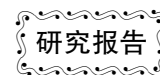
抑郁症的临床表现多种多样,涉及情绪、认知及躯体症状等。社会能力下降是其经常伴发的症状之一,患者职业功能受损,不能融入社会,进一步影响其人格发展^[10]。针对抑郁症临床表现的多样性,应激抑郁动物模型行为学评价正逐渐趋向多样化,并结合经典的评价方法,开始形成二维化评价体系。社会能力尤其是社交能力在应激抑郁动物模型的行为学评价正引起重视,社会趋避实验可能与强迫游泳和悬尾实验一样,在应激抑郁动物模型行为学评价中具有同等重要的价值^[4]。已有研究表明社会趋避实验与悬尾实验具有很好的相关性^[5]。另一方面,丙咪嗪、地昔帕明等抗抑郁药物可以明显改善动物模型的社交能力,提示其具有良好的预测效度^[11]。本研究将环境应激和社会应激因素相结合,建立慢性束缚加孤养模型,通过社会趋避实验观察其对社交行为的影响。结果表明,慢性束缚模型组对刺激鼠的探索时间及频次明显减少,探索潜伏期明显延长,社交偏好指数明显下降,显示一定程度的社交回避。这与 Van 等人报道的单纯慢性束缚即可引起小鼠社交回避的结果一致^[12]。

综上,本研究通过社会趋避实验,发现慢性束缚加孤养应激模型出现社交回避和缺乏,为将社会趋避实验纳入应激抑郁动物模型行为学评价方法体

系提供数据支撑,为应激抑郁模型标准行为学评价体系的建立奠定基础。

参考文献:

- [1] 孙秀萍,李腾飞,石哲,等. 人参总皂苷和远志总苷配伍对小鼠抗抑郁作用[J]. 中国比较医学杂志, 2012, (06): 30-36.
- [2] Yan H, Cao X, Das M, *et al.* Behavioral animal models of depression[J]. *Neurosci Bull.* 2010, (4): 327-337.
- [3] Belzung C, Lemoine M. Criteria of validity for animal models of psychiatric disorders: focus on anxiety disorders and depression [J]. *Biol Mood Anxiety Disord.* 2011, (1): 9.
- [4] Park JY, Kim TK, Choi J, *et al.* Implementation of a Two-dimensional Behavior Matrix to Distinguish Individuals with Differential Depression States in a Rodent Model of Depression [J]. *Exp Neurol.* 2014, (3): 215-223.
- [5] Leem YH, Yoon SS, Kim YH, *et al.* Disrupted MEK/ERK signaling in the medial orbital cortex and dorsal endopiriform nuclei of the prefrontal cortex in a chronic restraint stress mouse model of depression [J]. *Neurosci Lett.* 2014, (580): 163-168.
- [6] Han A, Sung Y-B, Chung S-Y, *et al.* Possible additional antidepressant-like mechanism of sodium butyrate: Targeting the hippocampus. *Neuropharmacology*[J]. 2014, (0): 292-302.
- [7] Garcia - Garcia AL, Elizalde N, Matrov D, *et al.* Increased Vulnerability to Depressive-Like Behavior of Mice with Decreased Expression of VGLUT1. *Biological Psychiatry* [J]. 2009, (3): 275-282.
- [8] Lukas M, Toth I, Reber SO, *et al.* The neuropeptide oxytocin facilitates pro-social behavior and prevents social avoidance in rats and mice. *Neuropsychopharmacology.* 2011;36(11): 2159-2168.
- [9] Cheng Y, Rodriguiz RM, Murthy SR, *et al.* Neurotrophic factor- α 1 prevents stress-induced depression through enhancement of neurogenesis and is activated by rosiglitazone [J] *e. Mol Psychiatry.* 2014.
- [10] Kessler RC, Berglund P, Demler O, *et al.* The epidemiology of major depressive disorder: results from the National Comorbidity Survey Replication (NCS-R) [J]. *JAMA.* 2003, (23): 3095-3105.
- [11] Brielmaier J, Senerth JM, Silverman JL, *et al.* Chronic desipramine treatment rescues depression-related, social and cognitive deficits in *Engrailed-2* knockout mice [J]. *Genes Brain Behav.* 2014, (3): 286-298.
- [12] Van der Kooij, M. A., M. Fantin, *et al.* Impaired hippocampal neuroligin-2 function by chronic stress of synthetic peptide treatment is linked to social deficits and increased aggression [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2014(5): 1148-1158.



中老年食蟹猴血液生理和生化指标测定与比较

田朝阳¹, 刘守桃², 荆 韬², 张 欣², 杨颖珊¹

(1. 海南金港生物技术股份有限公司, 海口 571100; 2. 苏州药明康德新药开发有限公司, 江苏 苏州 215104)

【摘要】 目的 提供中老年实验食蟹猴的一般生理指标、血液生理生化指标的参考值。**方法** 选取 119 只 11~16 岁食蟹猴, 雄性 80 只, 雌性 39 只, 分别检测其一般生理指标(体重、体长和腰围)、血液学指标和血液生化指标, 并进行性别间比较。**结果** 雌雄动物相比, 一般生理指标包括体重、体长和腰围差异有显著性($P < 0.01$); 血常规指标中 NEUT#、LYMPH#、EO#、BASO#、NEUT%、LYMPH%、EO%、BASO%、MCV、MCH、RDW-CV、PCT、MONO%、HGB、HCT、MCHC、RDW-SD、MPV 差异有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 其余差异无显著性($P > 0.05$); 血生化指标中 TBIL、ALB、GLO、A/G、ALP、GLU、UREA、CREA、TCH、TG、CK、ALT、GGT 差异有显著性($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), 其余差异无显著性($P > 0.05$)。**结论** 本研究提供了中老年食蟹猴一般生理指标、血液学和血液生化背景数据, 为其在生物医学领域的应用提供参考资料。

【关键词】 食蟹猴; 体重; 体长; 腰围; 血液学; 血液生化

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0013-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.03

Comparative study on values of blood physiological and biochemical for middle and old-aged cynomolgus monkey

TIAN Chao-yang¹, LIU Shou-tao², JING Tao², ZHANG Xin², YANG Ying-shan¹

(1. Hainan Jingang Biotech Co., Ltd, Haikou 571100, China; 2. Wuxi AppTec (Suzhou) Co., Ltd, Jiangsu Suzhou 215104, China)

【Abstract】 Objective To provide reference of the general physiological index, blood physiology and biochemistry for middle and old-aged cynomolgus monkey. **Methods** 119 cynomolgus monkey aged from 11~16 (80 were males and 39 were females) were involved in the study. We detected the general physiological index (body weight, the crown-rump length and waist circumference), hematology and blood biochemistry parameters respectively and compared these parameters between males and females. **Results** Between males and females, there were significant differences in Body weight, the crown-rump length and Waist circumference of the general physiological index ($P < 0.01$), NEUT#, LYMPH#, EO#, BASO#, NEUT%, LYMPH%, EO%, BASO%, MCV, MCH, RDW-CV, PCT, MONO%, HGB, HCT, MCHC, RDW-SD, MPV of hematology ($P < 0.01$ or $P < 0.05$) and TBIL, ALB, GLO, A/G, ALP, GLU, UREA, CREA, TCH, TG, CK, ALT, GGT of blood biochemistry ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). There were no significant differences in other parameters ($P > 0.05$). **Conclusion** It provides reference of general physiological index, blood physiology and biochemistry parameters of cynomolgus monkey and basis for their application in biomedical domain.

【Key words】 Cynomolgus monkey; Body weight; Crown-rump length; Waist circumference; Hematology;

[基金项目] 2012 年海南省重点科技计划项目 (ZDXM20120041)。

[作者简介] 田朝阳 (1981-), 男, 硕士, 从事灵长类实验动物科研工作。E-mail: chaoyangtian@163.com。

Blood biochemistry

非人灵长类动物在亲缘关系上和人最接近,与人类的遗传物质有 75% ~ 98.5% 的同源性^[1],在组织结构、免疫、生理和代谢等方面与人类高度近似,是极其珍贵的实验动物,其应用价值远超过其他种属的实验动物^[2]。近年来,国外对非人灵长类实验动物的需求量逐年增加,国内非人灵长类实验动物养殖企业每年出口实验猴约 2 万只,约占美国市场份额的 62% 以上,欧洲市场份额的 100%。此外,每年面向国内销售约 1 万只。与此同时,我国的实验猴养殖事业有了长足的发展,据中国实验灵长类养殖开发协会(CLPA)2012 年底统计显示全国实验猕猴和食蟹猴的总存栏量已超过 29 万只,其中食蟹猴高达 25 万多只^[3]。伴随着时间的推移,必将有大量的食蟹猴迈入中老年阶段(年龄 ≥ 10 岁为中年猴;年龄 > 15 岁为老年猴)^[4],这就为人类慢性疾病研究所亟需的自发性灵长类动物疾病模型的筛选提供了丰富的资源基础。

因而,建立中老年食蟹猴常规的临床血液生理和生化指标不仅对其应用提供重要的参考意义,也为标准化的生产管理和日常疾病的诊断发挥着日益重要的作用。本研究对 119 只 11 ~ 16 岁的食蟹猴的一般生理指标(体重、体长和腰围)、血液学和血液生化学指标进行了全面系统的测定,并进行了性别间的比较,为食蟹猴在生物医学领域的应用提供参考信息。

1 材料和方法

1.1 实验动物

食蟹猴 119 只,雄性 80 只,雌性 39 只。级别:普通级;年龄:11 ~ 16 岁;动物生产单位:海南金港生物技术股份有限公司【SCXK(琼)2010-0001】。实验于海南金港生物技术股份有限公司的普通级非人灵长类动物实验室进行【SYXK(琼)2014-0017】。饲养条件:单笼饲料,饲喂膨化饲料,动物自由饮水。

1.2 测定方法

1.2.1 一般生理指标(体重/body weight、体长/crown-rump length 和腰围/waist circumference)测定:动物空腹时间 > 16 h,上午 8:00 ~ 11:00 称重,称重前肌注舒泰 50(0.1 mL/kg BW)进行麻醉,采用婴儿秤进行称量;体长和腰围测定均采用皮尺,测定

时把已麻醉好的动物侧躺,自然伸直,体长测量是自头顶部顺着背部中线自然延伸至尾根部,腰围测量是皮尺自肚脐处环绕一周,松紧适中即可。

1.2.2 血液生理指标测定:如 1.2.1 所述进行动物的空腹、麻醉和采集静脉血 2 mL。应用迈瑞 BC-5500 全自动血细胞分析仪及配套试剂进行血细胞计数检测,检测项目为:白细胞数(WBC)、中性粒细胞数目(NEUT#)、淋巴细胞数目(LYMPH#)、单核细胞数目(MONO#)、嗜酸性粒细胞数目(EO#)、嗜碱性粒细胞数目(BASO#)、中性粒细胞百分比(NEUT%)、淋巴细胞百分比(LYMPH%)、单核细胞百分比(MONO%)、嗜酸性粒细胞百分比(EO%)、嗜碱性粒细胞百分比(BASO%)、红细胞数(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、RBC 平均体积(MCV)、RBC 平均血红蛋白含量(MCH)、RBC 平均血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞分布宽度变异系数(RDW-CV)、红细胞分布宽度标准差(RDW-SD)、血小板总数(PLT)、平均血小板体积(MPV)、血小板分布宽度(PDW)、血小板压积(PCT)。

1.2.3 血液生化指标测定:如 1.2.1 所述进行动物的空腹、麻醉和采集静脉血 3 mL,离心取血清,应用东芝 120 全自动生化仪及上海科华检测试剂盒进行血液生化学检测,检测项目为:谷丙转氨酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、总胆红素(TBIL)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLO)、白球比(A/G)、碱性磷酸酶(ALP)、谷氨酰转氨酶(GGT)、葡萄糖(GLU)、尿素(UREA)、肌酐(CREA)、总胆固醇(TCH)、甘油三酯(TG)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)。

1.3 结果处理

应用 SPSS 统计软件对实验数据进行分析,结果以 Mean $\pm$ SD 表示,采用 t 检验统计方法,比较各测定指标雌雄间差异,显著性差异水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 一般生理指标

雌、雄性动物的体重、体长和腰围指标差异极显著($P < 0.01$),雄性高于雌性(表 1)。

表 1 中老年食蟹猴一般生理指标
Tab.1 The general physiological index of middle and old-aged cynomolgus monkey

项目 Item	平均 Average	雄性 Male	雌性 Female
体重 Body weight(kg)	7. 79 ± 2. 34	9. 08 ± 1. 56 **	5. 07 ± 0. 99
体长 Crown-rump length(cm)	48. 11 ± 4. 08	50. 30 ± 2. 55 **	43. 51 ± 2. 59
腰围 Waist circumference(cm)	44. 53 ± 7. 30	45. 87 ± 6. 43 **	41. 78 ± 8. 24

注:雄性动物 80 只,雌性动物 39 只;*,与雌性动物相比 $P < 0.05$;**,与雌性动物相比 $P < 0.01$ 。
Note: Number of male monkey is 80 and female monkey is 39; *, $P < 0.05$ (compared with the female); **, $P < 0.01$ (compared with the female).

2.2 血液学指标

雄性动物的 NEUT#、LYMPH#、EO#、BASO#、NEUT%、LYMPH%、EO%、BASO%、MCV、MCH、RDW-CV、PCT 与雌性动物相比差异极显著 ($P <$

0.01), MONO%、HGB、HCT、MCHC、RDW-SD、MPV 与雌性动物相比差异极显著 ($P < 0.05$), 仅有 WBC、MONO#、RBC、PLT、PDW 与雌性动物相比差异不显著 ($P > 0.05$) (表 2)。

表 2 中老年食蟹猴血液常规指标
Tab.2 The hematology value of middle and old-aged cynomolgus monkey

项目 Item	平均 Average	雄性 Male	雌性 Female
WBC $10^9/L$	8. 22 ± 2. 93	8. 59 ± 2. 94	7. 48 ± 2. 79
NEUT# $10^9/L$	5. 16 ± 2. 70	5. 80 ± 2. 73 **	3. 84 ± 2. 09
LYMPH# $10^9/L$	2. 44 ± 0. 84	2. 28 ± 0. 72 **	2. 75 ± 0. 98
MONO# $10^9/L$	0. 35 ± 0. 19	0. 35 ± 0. 20	0. 36 ± 0. 18
EO# $10^9/L$	0. 07 ± 0. 07	0. 06 ± 0. 05 **	0. 11 ± 0. 07
BASO# $10^9/L$	0. 02 ± 0. 02	0. 02 ± 0. 02 **	0. 01 ± 0. 01
NEUT%	61. 46 ± 14. 66	65. 94 ± 12. 10 **	52. 27 ± 15. 29
LYMPH%	32. 52 ± 13. 18	28. 57 ± 10. 51 **	40. 53 ± 14. 48
MONO%	4. 42 ± 2. 22	4. 07 ± 2. 19 *	5. 15 ± 2. 12
EO%	0. 97 ± 0. 96	0. 68 ± 0. 57 **	1. 58 ± 1. 28
BASO%	0. 19 ± 0. 14	0. 23 ± 0. 16 **	0. 12 ± 0. 06
RBC $10^{12}/L$	5. 35 ± 0. 57	5. 32 ± 0. 41	5. 40 ± 0. 80
HGB g/L	126. 01 ± 14. 24	128. 74 ± 11. 35 *	120. 41 ± 17. 71
HCT %	42. 43 ± 4. 41	43. 20 ± 3. 54 *	40. 86 ± 5. 53
MCV fL	79. 52 ± 4. 97	81. 21 ± 3. 44 **	76. 03 ± 5. 79
MCH pg	23. 60 ± 1. 70	24. 20 ± 1. 14 **	22. 38 ± 2. 00
MCHC g/L	296. 85 ± 7. 69	298. 08 ± 6. 77 *	294. 33 ± 8. 87
RDW-CV %	13. 27 ± 1. 21	12. 78 ± 0. 77 **	14. 26 ± 1. 34
RDW-SD fL	39. 28 ± 3. 48	39. 77 ± 3. 52 *	38. 29 ± 3. 22
PLT $10^9/L$	371. 23 ± 72. 33	362. 84 ± 72. 11	388. 68 ± 70. 53
MPV fL	10. 06 ± 1. 22	9. 88 ± 1. 19 *	10. 43 ± 1. 23
PDW %	15. 34 ± 0. 31	15. 33 ± 0. 31	15. 36 ± 0. 31
PCT %	0. 37 ± 0. 07	0. 36 ± 0. 06 **	0. 41 ± 0. 07

注:雄性动物 80 只,雌性动物 39 只;*,与雌性动物相比 $P < 0.05$;**,与雌性动物相比 $P < 0.01$ 。
Note: Number of male monkey is 80 and female monkey is 39; *, $P < 0.05$ (compared with the female); **, $P < 0.01$ (compared with the female).

2.3 血液生化学指标

雄性动物的 TBIL、ALB、GLO、A/G、ALP、GLU、UREA、CREA、TCH、TG、CK 与雌性动物相比差异极显著 ($P < 0.01$), ALT、GGT 与雌性动物相比差异极显著 ($P < 0.05$), 仅有 AST、TP、LDH 与雌性动物相比差异不显著 ($P > 0.05$) (表 3)。

3 讨论

药物的药效学研究、临床前安全性评价研究是新药研发的核心内容。积累动物的背景资料诸如体重及常规血液生理生化指标等就显得尤为重要,5 岁以下的研究结果已发表^[5],但有关中老年食蟹猴 (>10 岁以上)的相关背景资料却鲜见报道。

表 3 中老年食蟹猴血液生化指标
Tab. 3 The blood biochemistry parameters of middle and old-aged cynomolgus monkey

项目 Item	平均 Average	雄性 Male	雌性 Female
ALT U/L	46.76 ± 16.77	44.18 ± 14.39 *	52.27 ± 20.09
AST U/L	39.20 ± 14.65	40.47 ± 15.79	36.55 ± 11.68
TBIL μmol/L	3.61 ± 1.46	3.84 ± 1.55 **	3.14 ± 1.11
TP g/L	70.32 ± 3.92	69.84 ± 3.86	71.29 ± 3.92
ALB g/L	39.59 ± 3.55	40.38 ± 2.79 **	37.97 ± 4.36
GLO g/L	30.72 ± 4.45	29.46 ± 4.05 **	33.32 ± 4.13
A/G	1.32 ± 0.25	1.40 ± 0.23 **	1.16 ± 0.23
ALP U/L	94.26 ± 40.27	78.38 ± 24.35 **	126.84 ± 46.75
GGT U/L	44.56 ± 18.59	47.01 ± 20.21 *	39.38 ± 13.45
GLU mmol/L	3.61 ± 0.87	3.42 ± 0.84 **	3.99 ± 0.81
UREA mmol/L	5.63 ± 1.51	5.96 ± 1.38 **	4.98 ± 1.58
CREA μmol/L	92.19 ± 26.77	107.54 ± 16.22 **	60.72 ± 12.90
TCH mmol/L	2.39 ± 0.61	2.18 ± 0.48 **	2.81 ± 0.63
TG mmol/L	0.52 ± 0.28	0.42 ± 0.15 **	0.72 ± 0.36
CK U/L	286.52 ± 302.51	331.25 ± 353.19 **	192.34 ± 98.05
LDH U/L	693.01 ± 259.73	685.55 ± 239.61	708.31 ± 299.60

注:雄性动物 80 只,雌性动物 39 只;*,与雌性动物相比 $P < 0.05$;**,与雌性动物相比 $P < 0.01$ 。

Note: Number of male monkey is 80 and female monkey is 39; *, $P < 0.05$ (compared with the female); **, $P < 0.01$ (compared with the female).

本研究测得的中老年食蟹猴(11~16岁)一般生理指标(体重、腰围、体长)表现出极显著的性别差异。结合李冰^[6]的研究结果,我们可以得出,随着年龄的增长食蟹猴雌雄间体重的差异性会越来越显著。这就要求我们在做实验方案制定时注意不同年龄段雌雄间一般生理指标的差异。

本研究测得的中老年食蟹猴血液学以及血液生化指标结果表明雌雄间在 NEUT#、LYMPH#、EO#、BASO#、NEUT%、LYMPH%、EO%、BASO%、MCV、MCH、RDW-CV、PCT、MONO%、HGB、HCT、MCHC、RDW-SD、MPV 和 TBIL、ALB、GLO、A/G、ALP、GLU、UREA、CREA、TCH、TG、CK、ALT、GGT 等指标方面存在显著性差异。李岩^[7]等研究显示 4~7 岁食蟹猴在 WBC、ALP、CHO、CRE 和 GLU 指标上有性别差异,唐贤丽^[8]等研究显示 3~5 岁食蟹猴仅有 GLU 存在性别差异,石巧娟^[5]等研究结果显示 UREA、CK 值与性别有密切关系,结合本研究可以得出伴随着年龄的增长这种性别差异依然存在,并且存在着如上所述更多血液生理生化指标的性别差异。说明随着食蟹猴年龄的增长,雌雄个体间血液生理生化指标的差异更多且显著。

通过与已有报道相比较,发现在 RBC、PLT、GLU 和 TP 等重要血液生理生化指标上没有年龄相关性,各年龄结果基本一致,而 WBC、HGB 和 TC 等指标则出现中老年动物比青壮年的偏低,而中老年雌性动物 TG 高于其他年龄段的动物。

进一步与中老年人相关血液生理生化的关键指标比较可知,人类的 GLU、TCH 和 TG 比中老年食蟹猴的偏高,WBC、RBC 和 PLT 则偏低,而 HGB 则基本一致^[9-11]。

已有研究表明,伴随着年龄的增长,猴自发性动物疾病模型的发生率就会增加^[12],并且自发性动物模型在研究人类疾病时具有重要价值^[13],尤其是自然衰老灵长类动物模型在特征和发生机制方面能较全面的反映人类衰老基本情况^[14],这就为中老年食蟹猴动物疾病模型的筛选和开发利用提供了较为基础的研究背景资料。

参考文献:

- [1] 季维智,邹如金,商恩缘,等. 非人灵长类在生物医学研究中的应用及其保护[J]. 动物学研究,1996,17(4):509-519.
- [2] 田朝阳,杨守凯. 非人灵长类动物在医学科学实验中的应用[J]. 中国比较医学杂志,2009,19(6):74-77.
- [3] 马广鹏. 我国非人灵长类实验动物产业发展的现状、问题及对策[J]. 中国农村科技,2013,8:74-75.
- [4] 花秀春,时彦胜,孙兆增,等. 人工饲养恒河猴、食蟹猴的繁殖性能初报[J]. 中国实验动物学报,2009,17(3):219-221.
- [5] 石巧娟,初明明,田朝阳,等. 人工饲养食蟹猴血液常规和生化指标测定[J]. 实验动物与比较医学,2012,32(4):344-347.
- [6] 李冰. 食蟹猴生长曲线[J]. 实验动物科学与管理,2006,23(3):61-62.
- [7] 李岩,何君,孙井江,等. 实验用食蟹猴生物学指标的研究[J]. 现代预防医学,2010,37(13):2503-2505.
- [8] 唐贤丽,徐龙建,久田,等. 实验用食蟹猴的生物学指标[J].

- 中国比较医学杂志,2007,17(6):325-328.
- [9] 李秀和. 老年人血糖参考值探讨[J]. 中华临床新医学, 2004,4(1):69-70.
- [10] 吕晓平,荣墨克,张静春,等. 老年人血常规参考值范围的调查研究[J]. 中国实验诊断学,2007,11(12):1670-1672.
- [11] 李娟. 体育舞蹈对女性中老年人生理生化指标影响的实验研究[D]. 西安:陕西师范大学,2008;14-15.
- [12] 王艳静,叶华虎,邵军石. 猕猴自发性糖尿病动物模型的初步探讨[J]. 中国比较医学杂志,2004,14(1):13-15.
- [13] 孙德明,李根平,陈振文,等. 实验动物从业人员上岗培训教材[M]. 北京:中国农业大学出版社,2011. 182-183.
- [14] 王喆,李瑞生. 衰老动物模型的研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2013,23(3):67-70.
- [修回日期]2014-12-01

审理费和版面费调整通知

根据中央有关报刊出版单位体制改革的总体部署和要求,落实报刊编辑部体制改革的精神,实现报刊业转型和升级,增强报刊出版传播能力,推动报刊业又好又快发展。同时也为了方便作者快捷的实现投稿,《中国比较医学杂志》将从 2015 年起免去作者在投稿同时缴纳的 100 元审理费,但授权书仍需下载我刊模板,扫描或拍照后上传。版面费将调整为文字、表格 400 元/版,彩图仍为 1000 元/版。支付方式仍然采用以下两种方式:

一、邮局汇款

汇款地址:北京市朝阳区潘家园南里 5 号 邮 编:100021
收款人姓名:《中国比较医学杂志》编辑部 收(不要写编辑姓名)
附 言:稿件编号

二、银行汇款或网银转账

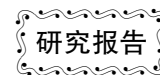
开户银行:中国农业银行潘家园分理处
帐 号:11220201040003764
开 户 名:中国实验动物学会
附 言:稿件编号

当您向邮局汇款后,请您登陆我们的网站,把您的汇款时间、汇款单号(通过网银转账务必将转账成功流水号)发票单位、收发票地址等信息登记提交。

发票说明:《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》是由中国实验动物学会主办,并使用中国实验动物学会发票专用章开具发票。

自 2015 年 1 月 1 日以后新投稿件的审理费和版面费将按新标准执行。
望广大作者周知!

《中国比较医学杂志》编辑部



西藏小型猪 MSTN 基因分子克隆及序列分析

吴清洪¹, 岳 敏¹, 田雨光^{1,2}, 王玉珏¹, 徐名衬¹, 顾为望^{1,2}

(1. 南方医科大学实验动物中心比较医学研究所, 广州 510515; 2. 东莞松山湖明珠实验动物科技有限公司, 广东 东莞 523808)

【摘要】 目的 扩增西藏小型猪的肌肉生长抑制素 (MSTN) 基因编码区全长序列, 并对序列进行生物信息学分析。**方法** 提取西藏小型猪肝脏组织的 RNA, 反转录成为 cDNA, 利用 RT-PCR 方法扩增 MSTN 基因编码区全长序列, 将纯化的片段与 pMD19-T 载体连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选阳性克隆并测定其序列, 利用生物信息学方法分析其序列特征, 并与其他 12 种物种构建系统进化树。**结果** 西藏小型猪 MSTN 基因编码区全长 1128 bp, 编码 375 个氨基酸, 氨基酸序列同源性分析表明, 与版纳微型猪 MSTN 氨基酸序列相似性最高, 为 99%。**结论** MSTN 基因西藏小型猪除了与鸡和斑马鱼亲缘关系较远外, 与人、犬、版纳微型猪、绵羊、山羊、牛、马、黑猩猩、大鼠、小鼠的关系都较为接近, 其中与版纳微型猪的亲缘关系最为接近。

【关键词】 西藏小型猪; MSTN 基因; 克隆测序

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0018-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.04

Cloning and sequence analysis of Tibet mini-pig's MSTN gene

WU Qing-hong¹, YUE Min¹, TIAN Yu-guang^{1,2}, WANG Yu-jue¹, XU Ming-chen¹, GU Wei-wang^{1,2}

(1. Laboratory Animal Center and Institute of Comparative Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Songshan Lake Pearl Laboratory Animal Sci. & Tech. Co., Ltd., Guangdong Dongguan 523808, China)

【Abstract】 Objective To amplify the encoding full-length sequence of Tibet mini-pigs myostatin (MSTN) gene and analysis the sequence by bioinformatics software. **Method** The RNA of liver tissues from Tibet mini-pig was extracted, and reversely transcribed into cDNA. The gene coding region sequence of myostatin gene was amplified through RT-PCR, and then the purified product of PCR was ligated with a pMD19-T and transferred into the bacterium DH5 α for replication. The positive clones were screened and sequenced. The sequence characters were analyzed by using bioinformatics method and phylogeny evolution tree was constructed with other twelve species. **Results** The coding region of MSTN gene was 1128bp, and coded 375 amino acids. The amino acid homology analysis showed that the homology rate of amino acid sequence was 99%. **Conclusions** Molecular phylogeny evolution indicated that it had a close relation with human, dog, banna minipig, sheep, goat, cattle, horse, chimpanzee, rat, mouse except chick and zebrafish, and the most closely related with banna minipig.

【Key words】 Tibet mini-pig; MSTN gene; Cloning and sequence

肌肉生长抑制素 (myostatin, MSTN) 又称 GDF- β (growth differentiation factor β), 是生长转化因子

【基金项目】 广东省科技计划项目 (2012B011000004、2012B010300001); 广东省科技厅科技基础条件建设项目 (2010B060500001); 国家科技部国际合作项目 (2011DFA33290)。

【作者简介】 吴清洪 (1975 -), 男, 本科, 高级实验师, 研究方向: 实验动物学。Email: wuqhvip@126.com;

【通讯作者】 顾为望 (1956 -), 男, 教授, 博士生导师, 研究生方向: 实验动物与比较医学。Email: guww100@163.com。

β (transforming growth factor beta, TGF- β) 超家族的新成员^[1-4]。MSTN 在骨骼肌中特异性表达,对肌肉生长有负调控作用,研究表明,该基因的突变在肉牛中会造成骨骼肌异常肥大^[5]。通过抑制 MSTN 活性而增加肌肉量,在猪的分子育种具有潜在的应用价值。因此,该基因被发现后短短几年之内很多物种的 MSTN 基因得到克隆、测序和定位^[6-8]。

乔宪凤等^[9]在 2010 年就以湖北白猪背最长肌肌细胞总 RNA 为模版,利用 RT-PCR 技术,扩增出湖北白猪的 MSTN 基因的 cDNA 片段,其测序结果与报道的一致。西藏小型猪是 2004 年南方医科大学实验动物中心从西藏工布江达县引入纯种的 45 头西藏小型猪,作为实验动物进行封闭群管理^[10]。目前已完成风土驯化及实验动物化研究,并开展了相关动物模型、药物实验及转基因克隆等研究。从免疫学、遗传学研究发现,该品系具有独特的免疫相关指标和遗传特征,加上其独特的外形,是一种优良的实验用小型猪品种^[11-13]。研究西藏小型猪的 MSTN 基因,可为进一步开展西藏小型猪分子育种技术研究等提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:西藏小型猪 6 月龄 1 头,来源于南方医科大学实验动物中心【SCXK(粤)2011-0074】,取其肝脏,液氮速冻, -80℃ 冰箱保存。

1.1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒(No. DP419)、质粒小提试剂盒(No. DP103)、DH5 α 感受态细胞(No. CB101)购自天根生化科技(北京)有限公司; PrimeScript RT reagent Kit(No. DRR037A)、EX Taq(No. DR001A)、pMD19-T Vector(No. D102A)、HindIII 内切酶、EcoRI 内切酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自广东省东盛生物科技有限公司;DM2000 购自北京康为世纪生物科技有限公司,其他试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取

使用天根公司的 RNA 提取试剂盒提取肝脏组织的总 RNA。组织从 -80℃ 冰箱中取出来,用液氮冷却研磨成粉末,倒入去 RNA 酶的 1.5 mL EP 管中,加入 1 mL Trizol,反复吹打室温静置 5 min,按照

试剂盒说明按步骤提取。利用核酸蛋白浓度测定仪 Nano Drop 2000 测 RNA 浓度及纯度(OD260/OD280),余下样品 -20℃ 保存。

1.2.2 cDNA 合成

使用宝生物公司的 PrimeScript RT reagent Kit 进行逆转录反应。cDNA 合成按下列组份配制 RT 反应液(反应液配制在冰上进行)。5 $\times$ PrimeScript Buffer 4 μ L, PrimeScript RT Enzyme Mix 1 μ L, Oligo Dt Primer (50 μ mol/L) 1 μ L, Random 6 mers (100 μ mol/L) 1 μ L, Total RNA 1 μ g, RNase Free dH₂O 加至 20 μ L。反转录反应条件为:37℃ 15 min (反转录反应), 85℃ 5 s (反转录酶的失活反应)。-20℃ 保存备用。

1.2.3 PCR 引物的设计和合成

根据 GenBank 中猪 MSTN 基因的序列(Gene Accession No.: NM_214435),运用引物设计软件 Primer5.0 设计特异性引物,由 Invitrogen 公司合成。引物为:Up (P1): 5'-ATGCAAAAAGTGCATCTATGTTTATATTTAC-3', Down (P2): 5'-TCATGAGCA CCCACAGCGATCTAC-3'。

1.2.4 PCR 扩增

在 PCR 反应管中配置 25 μ L 的反应体系,模板量为 0.5 μ L 猪 cDNA 扩增 MSTN。25 μ L 的反应体系为 2.5 mmol/L dNTP mixture 2 μ L, 10 $\times$ Ex Taq buffer 2.5 μ L, 模板 cDNA 0.5 μ L, 引物 P1 2.5 μ L, 引物 P2 2.5 μ L, ExTaq 0.3 μ L, ddH₂O 14.6 μ L。扩增条件为:94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min 20 s, 32 个循环; 72℃ 5 min; 16℃ 保存。

1.2.5 PCR 产物的回收纯化

PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳后,在紫外条件下,手术刀切取含目的片段的凝胶条带至干净 1.5 mL EP 管中,利用广东东盛生物科技有限公司的 DNA 凝胶回收试剂盒纯化目的片段,纯化产物中一部分直接测序,一部分进行克隆测序。

1.2.6 目的片段与载体连接

将纯化的目的片段与 pMD19-T 载体进行连接,反应体系 10 μ L: 1 μ L pMD19-T Vector, 2 μ L 回收的 PCR 产物, 5 μ L Solution I, 2 μ L ddH₂O。恒温循环水浴 16℃ 连接 2 h。

1.2.7 连接产物的转化、复苏和培养

冰浴中将 6 μ L 连接产物加入至 30 μ L DH5 α 感受态细胞中,混匀,冰浴 30 min, 42℃ 水浴热休克 90 s, 再冰浴 2 min。分别加入 200 μ L LB 培养基

(Amp⁻), 混匀, 37℃、200 r/min 振荡培养 1 h, 将菌液涂布与含氨苄青霉素 (Amp⁺ 100 μg/mL) 的 LB 平板表面, 室温下放置, 至液体吸收。倒置平板, 转移至 37℃ 生化培养箱中, 正置培养 1 h 后, 倒置过夜培养。

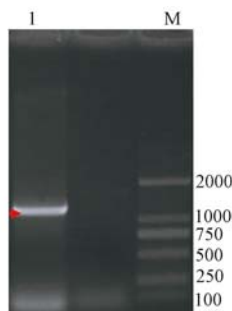
1.2.8 质粒的酶切鉴定阳性克隆

从平板上面各接种若干菌落于 3 mL LB 液体培养基 (Amp⁺) 的 15 mL 离心管中 200 r/min, 37℃ 摇床过夜培养。使用天根的质粒小提试剂盒提取质粒, 进行酶切鉴定, 反应体系为 10 μL: 4 μL 的提取质粒, 10 × M Buffer 1 μL, HindIII 0.4 μL, EcoRI 0.4 μL。37℃ 酶切 2 h。酶切产物以含溴化乙锭 (EB) 的 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 凝胶成像系统成像。阳性菌液送金唯智基因公司测序。

2 结果

2.1 RT-PCR 结果

从西藏小型猪肝脏组织中提取总 RNA, 逆转录后, 以 cDNA 为模板, 以特异性引物扩增到了 1152 bp 长的片段, 与预期相符 (图 1)。



注: M: DL2000, I: RT-PCR 的结果。

图 1 RT-PCR 扩增结果

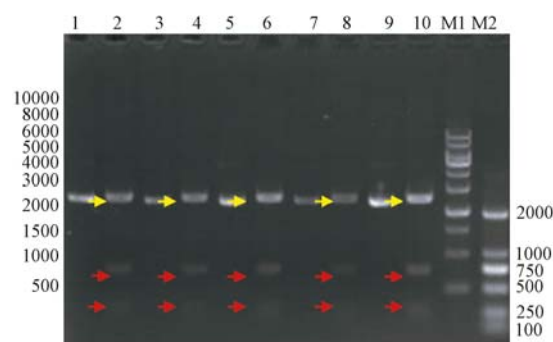
Note: M: DL2000, I: the result of RT-PCR.

Fig. 1 The electrophoresis of RT-PCR amplification

2.2 重组质粒酶切电泳结果

将西藏小型猪的 RT-PCR 产物经纯化回收后,

插入到 pMD19-T 载体的外源基因插入位点, 构建重组质粒, 重组质粒经 HindIII 内切酶、EcoRI 内切酶双酶切 (图 2)。



注: 1, 3, 5, 7, 9: 重组质粒电泳图, 2, 4, 6, 8, 10: HindIII 和 EcoRI 双酶切电泳图。

图 2 重组质粒和酶切鉴定图

Note: 1, 3, 5, 7, 9: the electrophoresis of recombinant plasmid, 2, 4, 6, 8, 10: the electrophoresis of recombinant plasmid by restriction enzyme digestion (HindIII + EcoRI), M1: 1 kb DNA Ladder, M2: 2 kb DNA Ladder.

Fig. 2 Identification of recombinant plasmid by digested (HindIII + EcoRI) and plasmid

2.3 西藏小型猪 MSTN 基因序列分析和比对

利用 DNAMAN、Lasergene 等多个生物信息学软件由西藏小型猪 MSTN cDNA 序列可以获得编码的 375 氨基酸 (图 3)。与 NCBI 网站 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) BLAST 后下载的人 (NM005259.2)、小鼠 (NM010834)、大鼠 (NM019151)、山羊 (HM462261)、黑猩猩 (NM001079919)、牛 (GQ184147)、绵羊 (NM001009428.1)、犬 (NM001002959)、版纳微型猪 (JN630464)、马 (NM001081817)、鸡 (NM001001461) 11 个物种的氨基酸序列进行比对, 相似性分别为 95%、92%、91%、95%、95%、94%、94%、93%、99%、97%、85%。

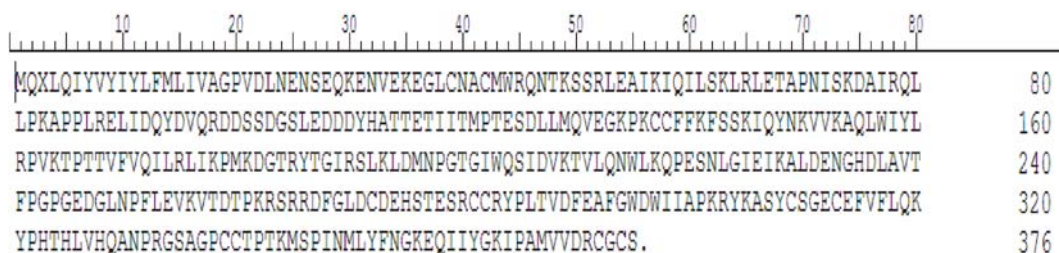


图 3 西藏小型猪 MSTN 基因推导蛋白氨基酸序列

Fig. 3 The putative amino acid sequence of MSTN gene of Tibet mini-pigs

2.4 西藏小型猪 MSTN 进化树

利用 Mega6.0 软件将西藏小型猪的 MSTN 氨基酸序列与人、小鼠、大鼠、山羊、黑猩猩、牛、绵羊、犬、版纳微型猪、马、鸡、斑马鱼 12 个物种的 MSTN 氨基酸序列构建进化树(图 4)。结果显示,西藏小型猪 MSTN 基因除了与鸡和斑马鱼亲缘关系较远外,与其他 10 个物种较为接近,其中与版纳微型猪的亲缘关系最为接近。

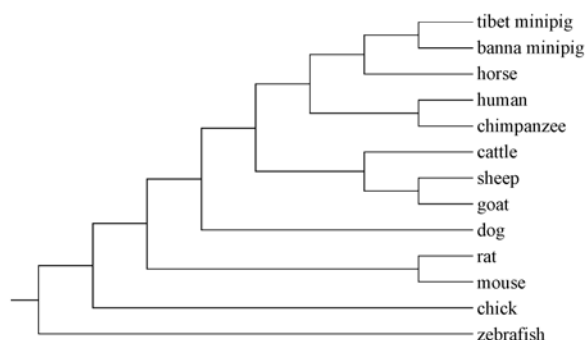


图 4 MSTN 分子系统进化树

Fig.4 The phylogenetic tree of MSTN protein

3 讨论

1997 年,McPherron 等通过筛选小鼠的骨骼肌 cDNA 文库而得到全长的 cDNA 序列。分析表明,小鼠 Myostatin cDNA 序列中只有一个开放阅读框架(opening reading frame, ORF),编码 376 个氨基酸,具有 TGF- β 超家族的典型结构,但与其它 TGF- β 家族成员的同源性很低,因而被为新一类:GDF-8 (growth-differentiation factor 8)。研究表明,GDF-8 前肽 C-末端区域对其功能的稳定性具有重要的作用,抑制性区域位于氨基酸 42~115 之间^[14-16]。国外 Lee 及其同事 Daneau 等^[17]都报道了猪肌生成抑制素基因的 cDNA 序列,综合两者的结果,已得到 1756 bp 的猪肌生成抑制素 cDNA 序列,其中 1~1125 bp 编码氨基酸序列,表明猪肌生成抑制素前体由 375 个氨基酸组成。本研究通过对西藏小型猪的 MSTN 基因的 cDNA 序列进行了克隆测序,发现 MSTN 基因编码区全长 1128 bp,利用 DNAMAN、Lasergene 等多个生物信息学软件由西藏小型猪 MSTN cDNA 序列可以获得编码的 375 氨基酸。与版纳微型猪进行比对分析发现在 307 位的氨基酸由 N→S。

在与人、小鼠、大鼠、山羊、黑猩猩、牛、绵羊、犬、版纳微型猪、马、鸡 11 个物种的氨基酸序列进行比对,相似性分别为 95%、92%、91%、95%、95%、

94%、94%、93%、99%、97%、85%,发现西藏小型猪与版纳微型猪的相似性最高,达 99%。与人、山羊、黑猩猩、马相应序列同源性都超过了 94%。表明西藏小型猪与 11 个物种间在该基因编码区核苷酸序列间具有较高的保守性。

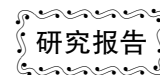
分子系统进化树表明 MSTN 基因西藏小型猪除了与鸡和斑马鱼亲缘关系较远外,与人、犬、版纳微型猪、绵羊、山羊、牛、马、黑猩猩、大鼠、小鼠的关系都较为接近,其中与版纳微型猪的亲缘关系最为接近,这也更进一步说明了西藏小型猪与版纳微型猪是亲缘关系较近的两个猪种,只是在该基因核苷酸和氨基酸水平上有很小差异,说明了西藏小型猪与版纳小型猪起源及进化程度有所不同,它们在 DNA 水平上有极小的差异,这也为进一步开展西藏小型猪分子育种技术研究等提供了理论依据。

参考文献:

- [1] McPherron A C, Lee S J. Double muscling in cattle due to mutations in the Myostatin gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(23):12457-12461.
- [2] 岳敏,顾冬生,李洪涛,等. 西藏小型猪 MSTN 基因 5' 调控区的酶切多态性分析[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(3): 155-159.
- [3] 王伟,连林生,李继中,等. 猪 MSTN 基因生物信息学分析[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(10): 5943-5945.
- [4] 刘晓琴,马喜山,唐中林,等. 猪 MSTN 基因的多态性和生长性状关联分析[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(7): 1063-1069.
- [5] Holmes J H G, Ashmore C P. A histochemical study of mutable site fiber type and size in normal and double muscled cattle[J]. Growth, 1972, 36: 351-352.
- [6] Kollias H D, McDermott C. Transforming growth factor- β and myostatin signaling in skeletal muscle[J]. J Appl Physiol, 2008, 104: 579-587.
- [7] Hill J J, Davies M V, Pearson A A, et al. The myostatin propeptide and the follistatin-related gene are inhibitory binding proteins of myostatin in normal serum[J]. J Biol Chem, 2002, 277(43): 40735-40741.
- [8] Ji S, Losinski R L, Cornelius S G, et al. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation[J]. American Journal of Physiology, 1998, 275: 1265-1273.
- [9] 乔宪凤,刘西梅,华文君,等. 猪肌肉生成抑制素(MSTN)基因 cDNA 克隆及序列分析[J]. 江西农业学报, 2010, 22(10): 130-132.
- [10] 李洪涛,顾为望,袁进,等. 实验用西藏小型猪原代和第一代间部分血液指标比较[J]. 郑州大学学报(医学版), 2008, 43(1): 63-65.
- [11] 王玉珏,郭凯,陈驰,等. 不同辐射剂量对西藏小型猪小肠线

- 粒体的影响[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(10): 1445-1450.
- [12] 黄威, 毛莹莹, 刘薇, 等. 3 种腺相关病毒介导的绿色荧光蛋白对西藏小型猪胚胎成纤维细胞的转染效率[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(6): 857-861.
- [13] 李洪涛, 吴清洪, 袁进, 等. 实验用西藏小型猪线粒体 DNA 控制区变异类型及其血液指标比较研究[J]. 南方医科大学学报, 2009, 29(8): 1626-1628.
- [14] McPherron A C. *et al.* Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member[J]. Nature, 1997, (387): 83-90.
- [15] McPherron A C, Lee S J. The transforming growth factor β -super family [A]. In: B. D. Lefter and C. Bondy, editors. Growth factors and cytokines in health and disease. (Volume 1) [M]. JAI Press Inc. Greenwich, Connecticut, USA, 1996. 357-393.
- [16] Bogdanovich S, Krag TO, Barton ER, *et al.* Functional improvement of dystrophic muscle by myostatin blockade[J]. Nature, 2002 Nov 28; 420(6914): 418-421.
- [17] 张利媛, 岳文斌. MSTN 基因的研究进展[J]. 草食家畜, 2006(132): 1-4.

[修回日期] 2015-02-27



融水小型猪 F1 代生长研究

施赫赫^{1,2}, 陈 淦², 刘运忠³, 刘 科¹, 邝少松¹, 任海涛^{1,4}, 余细勇⁵, 唐小江¹

(1. 广东省医学实验动物中心, 广东佛山 528248; 2. 广东贝格生物科技有限公司, 广东佛山 528100;
3. 广州医药工业研究总院, 广州 510240; 4. 佛山泰尔健生物科技有限公司, 广东佛山 528225;
5. 广东省医学科学院, 广州 510060)

【摘要】 目的 测定融水小型猪 F1 代体重和体尺。**方法** 选取 F1 代融水小型猪 83 头(雌性 48 头, 雄性 35 头), 测定初生至 12 月龄的体重、体长、体高、胸围、胸宽、胸深、管围、腿围、嘴裂长度共 9 个生长发育指标, 并应用 SPSS 统计软件和 Logistic 非线性生长模型进行分析。**结果** 融水小型猪 F1 代的初生体重雌雄分别为 0.61 ± 0.14 kg 和 0.55 ± 0.13 kg, 6 月龄体重雌雄分别为 17.21 ± 5.20 kg 和 16.35 ± 5.23 kg, 12 月龄体重雌雄分别为 26.97 ± 6.49 kg 和 26.53 ± 5.65 kg。雌雄比较, 9 项指标所测结果接近, 除了初生体重和体长、10 月龄胸宽有差异 ($P < 0.05$), 其余指标同月龄雌雄之间均无明显差异。应用 Logistic 模型分析, 体重生长拐点在 5~6 月龄间, 体长和腿围生长拐点在 2~3 月龄间, 体高、胸围、胸宽、胸深、管围和嘴裂长度的生长拐点在 1~2 月龄间。**结论** 融水小型猪 F1 代成年体重轻, 性情温顺, 具备培养成实验用小型猪基本条件。

【关键词】 融水小型猪; 生长发育; 生长曲线

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0023-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.05

Measurement of growth curve in F1 generation of Rongshui miniature pig

SHI He-he^{1,2}, CHEN Gan², LIU Yun-zhong³, LIU Ke¹, KUANG Shao-song¹, REN Hai-tao^{1,4}, TANG Xiao-jiang¹

(1. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Guangdong Foshan 528248, China;
2. Beige BioTec Co., Ltd., Guangdong Foshan 528100, China; 3. Guangzhou Pharmaceutical Industry Research Institute, Guangzhou 510240, China; 4. Foshan Tailgen Biotec Co., Ltd., Guangdong Foshan 528225, China;
5. Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

【Abstract】 Objective To measure the body weight and body size of the F1 generation in Rongshui miniature pig (RMP). **Methods** 83 F1 generations of RMPs (48 females and 35 males) were selected randomly. 9 traits included body-weight, body-length, body-height, chest-circumference, chest-breadth, chest-depth, circum of pastern, girth of leg and rictus were measured, and analyzed statistically by SPSS statistical software and Logistic nonlinear growth analysis model. **Results** In the F1 generations of RMP, the weights of birth day, 6th month and 12th month of female and male were 0.61 ± 0.14 kg and 0.55 ± 0.13 kg, 17.21 ± 5.20 kg and 16.35 ± 5.23 kg, 26.97 ± 6.49 kg and 26.53 ± 5.65 kg respectively. There was no difference significantly between the genders of the 9 measured traits except for born-weight, born-length and chest-breadth in 10th month ($P < 0.05$). According to the analysis in Logistic model, body-weight inflection point was between 5th - 6th month, body length and girth of leg inflection points were 2nd ~ 3th month, while inflection points of other traits were 1st ~ 2nd month. **Conclusion** The F1 generations of RMP showed low mature body

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(81120108003; 81330007)。

[作者简介] 施赫赫(1985-), 男, 硕士, 研究方向: 实验用小型猪。

[通讯作者] 唐小江(1967-), 男, 博士, 研究方向: 实验动物与疾病动物模型。E-mail: river-t@126.com。

weight and sweet temper. It should be breed as good laboratory miniature pig.

【Key words】 Rongshui miniature pigs (RMPs); Growth and development; Growth curve model

生长曲线是实验动物标准化研究的重要内容,是动物实验设计、饲养、检测等不可或缺的依据^[1]。融水小型猪是源自广西壮族自治区融水县杆洞乡苗寨的“大苗山香猪”,但缺少科学、系统的观测数据。绘制生长曲线成为融水小型猪实验动物化的首要任务。我们于 2012 年 5 月将融水小型猪种源引到广东三水基地,驯化适应约 8 个月后进行繁殖,对 F1 生长相关数据进行测定,以探明融水小型猪的生长发育情况,建立起背景数据,并为相关研究提供参考。

1 材料和方法

1.1 动物来源

普通级融水小型猪 F1 代 83 头,其中雌性 48 头、雄性 35 头,由广东贝格生物科技有限公司(广东省医学实验动物中心小型猪研究基地)提供。

1.2 动物饲养条件

饲养环境为普通级,湿帘通风系统和局部保温灯控制舍内温湿度,夏天温度控制在 30℃ 以下,冬天温度控制在 16℃ 以上,每天定时定量饲喂全价颗粒料,上下午各一次,自由饮水。

1.3 测定方法

测定融水小型猪从初生至 12 月龄体重和体尺值,体尺指标包括:体长、体高、胸围、管围、腿围、胸深、胸宽^[2]、嘴裂长度。其中,体重在早晨喂料前空腹称重,体长为枕骨脊至尾根的距离,体高为髻甲至地面的垂直距离,胸围为切于肩胛后角的胸部垂直周径,胸宽为切于肩胛后角胸部左右侧之间的水平距离,胸深为切于肩胛后角的背至胸部下缘的垂直距离,管围为左前肢管部最细处的周径,腿围为自左侧膝关节前缘,经肛门,绕至右侧膝关节前缘的距离,嘴裂长度为自鼻吻端至嘴角的距离。

1.4 统计方法

实验数据应用 SPSS 21.0 统计软件进行处理。两样本均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 作为差异显著性界值。生长曲线拟合应用 SPSS 21.0 统计软件进行处理,以 Logistic 非线性生长模型对生长曲线进行拟合。模型方程: $Y_t = A/[1 + B \cdot \exp(-k \cdot t)]$ 。拐点体重(体尺)值为 $A/2$,拐点月龄为 $(\ln B)/k$ 。其中: Y_t 表示 t 月龄时的体重(体尺)值, A 表示测定期内成熟体重(体尺)值, B 表示常数尺度, k 表示瞬时

相对生长率, t 表示月龄^[3-4]。

2 结果

2.1 体重与体尺

对初生至 12 月龄、不同性别的融水小型猪体重与体尺进行连续跟踪测量,体重、体长、体高、胸围、胸宽、胸深、管围、腿围和嘴裂测量结果见图 1A~I,9 项指标雌雄之间所测结果相当接近,除了初生体重和体长,10 月龄胸宽有差异($P < 0.05$),其余指标和月龄雌雄之间均无明显差异($P > 0.05$)。F1 代的初生体重雌雄分别为 0.61 ± 0.14 kg 和 0.55 ± 0.13 kg,6 月龄体重雌雄分别为 17.21 ± 5.20 kg 和 16.35 ± 5.23 kg,12 月龄体重雌雄分别为 26.97 ± 6.49 kg 和 26.53 ± 5.65 kg(图 1A)。初生体长雌雄分别为 18.2 ± 1.43 cm 和 17.4 ± 1.13 cm,6 月龄体长雌雄分别为 64.9 ± 6.69 cm 和 62.6 ± 7.14 cm,12 月龄体长雌雄分别为 81.9 ± 7.11 cm 和 81.3 ± 6.98 cm(图 1B)。

2.2 生长曲线拟合及估计参数

初生至 12 月龄雌性和雄性融水小型猪各生长发育指标的 Logistic 生长曲线及相关参数计算见表 1。由表 1 可见,各指标的拟合度(R^2)有微小差异,但都介于 0.980~0.994 之间,拟合度高。体重生长拐点在 5~6 月龄间,体长和腿围生长拐点在 2~3 月龄间,体高、胸围、胸宽、胸深、管围和嘴裂长度的生长拐点在 1~2 月龄间。

3 讨论

体型小是小型猪的基本要求,据医学实验用小型猪北京地方标准,成年体重不超过 35 kg^[5]。在满足基本营养需求的情况下,融水小型猪 6 月龄体成熟,雌雄性体重分别仅为 17.21 kg 和 16.35 kg,12 月龄分别为 26.97 kg 和 26.53 kg,说明融水小型猪能满足实验用小型猪的基本要求。

融水小型猪属于天然的小体型类型,与国内的巴马香猪、中国实验用小型猪、版纳香猪、五指山小型猪和蕨麻小型猪,以及国外的 Claw 猪和 Gottingen 猪在成年体重上相当^[6-18](表 2),比国外的 Hanford, Munich, Sinclair, Westran, Yucatan, Micro-Yucatan, Minnesota-Hormel 小型猪体型更小,说明未经选育的贝格小型猪 F1 代可能具有体重小的优势,如能连续系统的选育,有望获得更小的成年体

型。另外,融水小型猪性情温驯,可以由一个人贴身抱住来保定,是理想的实验用小型猪动物模型。

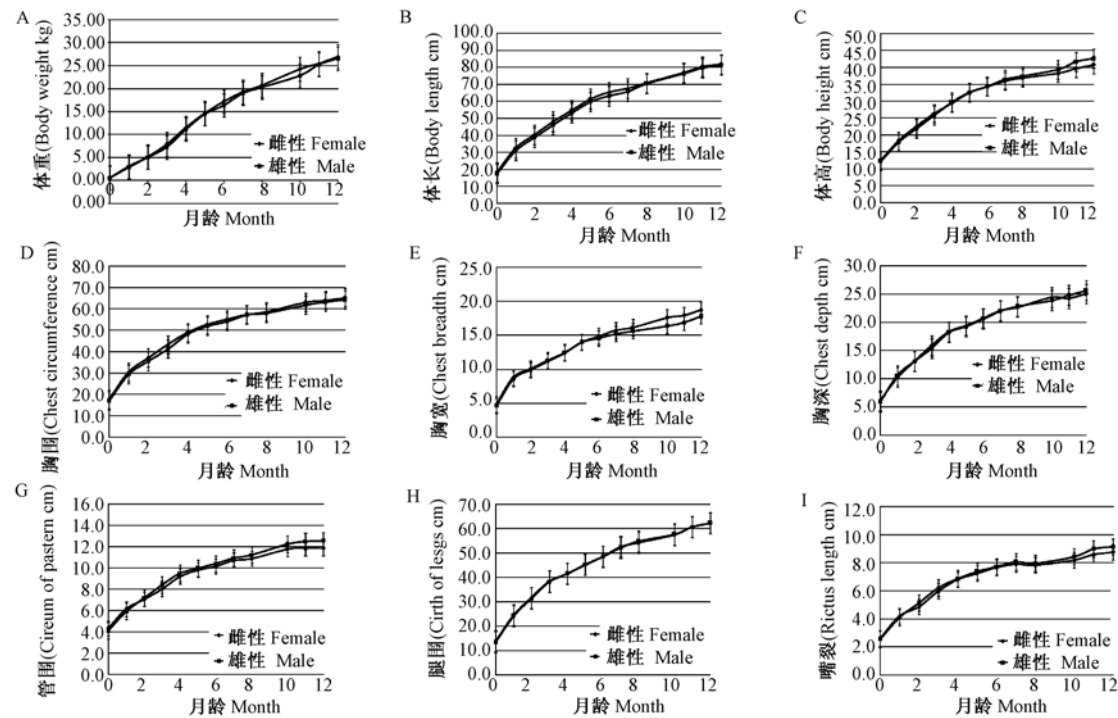


图1 融水小型猪0~12月体重、体长、体长、胸围、胸宽、胸深、管围、腿围和嘴裂变化曲线

Fig.1 The growth curve of body weight, body length, body height, chest circumference, chest breadth, chest depth, circumof pastern, girth of legs and rictus in Rongshuiminiature pig of 0~12 month old

表1 融水小型猪 F1 代生长曲线及估计参数

Tab.1 Growth curves and parameter estimates of F1 Rongshui miniature pig

性状 Traits	性别 Gender	生长曲线 Growth curves	R ²	拐点值 Inflection point value	拐点月龄 Inflection point month
体重 Body weight	♂	$Y_t = 26.960/[1 + 9.973\exp(-0.429t)]$	0.980	13.480	5.36
	♀	$Y_t = 27.212/[1 + 10.122\exp(-0.449t)]$	0.985	13.606	5.16
体长 Body length	♂	$Y_t = 81.473/[1 + 2.597\exp(-0.374t)]$	0.986	40.737	2.55
	♀	$Y_t = 81.462/[1 + 2.495\exp(-0.390t)]$	0.986	40.731	2.34
体高 Body height	♂	$Y_t = 42.231/[1 + 2.085\exp(-0.379t)]$	0.992	21.116	1.94
	♀	$Y_t = 40.131/[1 + 1.898\exp(-0.410t)]$	0.994	20.066	1.56
胸围 Chest circumference	♂	$Y_t = 63.087/[1 + 2.079\exp(-0.447t)]$	0.986	31.544	1.63
	♀	$Y_t = 63.897/[1 + 2.007\exp(-0.450t)]$	0.986	31.949	1.55
胸宽 Chest breadth	♂	$Y_t = 17.221/[1 + 1.897\exp(-0.402t)]$	0.974	8.611	1.59
	♀	$Y_t = 18.749/[1 + 1.993\exp(-0.345t)]$	0.980	9.375	2.00
胸深 Chest depth	♂	$Y_t = 24.964/[1 + 2.319\exp(-0.419t)]$	0.982	12.482	1.68
	♀	$Y_t = 24.691/[1 + 2.369\exp(-0.451t)]$	0.991	12.346	1.91
管围 Circum of pastern	♂	$Y_t = 12.539/[1 + 1.719\exp(-0.385t)]$	0.986	6.268	1.41
	♀	$Y_t = 12.022/[1 + 1.535\exp(-0.381t)]$	0.993	6.011	1.12
腿围 Girth of legs	♂	$Y_t = 61.368/[1 + 2.459\exp(-0.397t)]$	0.981	30.684	2.27
	♀	$Y_t = 61.328/[1 + 2.405\exp(-0.396t)]$	0.982	30.664	2.22
嘴裂长度 Rictus length	♂	$Y_t = 8.776/[1 + 1.957\exp(-0.475t)]$	0.981	4.388	1.41
	♀	$Y_t = 8.476/[1 + 2.075\exp(-0.507t)]$	0.990	4.238	1.44

表 2 融水小型猪与其他小型猪的比较
Tab.2 Comparison among Rongshui miniature pig and other miniature pigs

种群 Population	初生体重(g) Birth body-weight (g)	6 月龄体重(Kg) Body-weight in 6 th month (Kg)	12 月龄体重(Kg) Body-weight in 12 th month (Kg)	参考文献
融水小型猪 Rongshui miniature pig	570(初产) (Primiparity)	16. 35 ± 5. 23(♂) 17. 21 ± 5. 20(♀)	26. 53 ± 5. 65(♂) 26. 97 ± 6. 49(♀)	/
巴马小型猪 Bama minipig	560 ± 150(四世代) (4 th generation)	20. 26 ± 3. 52(四世代) (4 th generation)	29. 47(十八世代) (18 th generation)	[6 - 7]
中国实验小型猪 Chinese experimental minipig	145 - 160	24 - 26	35 - 40(成年) (Adult)	[8]
版纳微型猪 Banna minipig	490 ± 90	10. 66 ± 0. 89(♂) 17. 94 ± 1. 27(♀)	19. 22 ± 1. 68(♂) 33. 90 ± 2. 67(♀)	[9]
西藏小型猪 Tibet minipig	650(初产) (Primiparity) ; 700(二产) (Multiparity)	12. 61 ± 1. 68(♂) 10. 89 ± 0. 76(♀)	24. 00 ± 0. 70(♂) 21. 87 ± 2. 40(♀)	[10]
五指山小型猪 Wuzhishan minipig	330 ± 8. 3	13. 43 ± 3. 27	35(成年) (Adult)	[11]
贵州小型猪 Guizhou miniature pig	560(♂) 580(♀)	12. 86(♂) 13. 76(♀)	30. 6 ± 0. 25(12 - 18 月龄) (12 th - 18 th month)	[12 - 13]
藏麻小型猪 Juema minipig	790 ± 160(♂) 670 ± 190(♀)	17. 47 ± 3. 88(♂) 16. 93 ± 3. 95(♀)	21. 98 ± 2. 47(♂) 22. 93 ± 2. 59(♀)	[14]
克劳恩小型猪 Clawn	500	/	40(成年) (Adult)	[15]
哥廷根小型猪 Gottingen	460(♂ , ♀)	13. 80(♂) 13. 67(♀)	24. 84(♂) 26. 09(♀)	[16]
汉福德系 Hanford	730	/	80 - 95(成年) (Adult)	[15]
慕尼黑小型猪 Munich	600 - 900	/	60 - 100(成年) (Adult)	[15]
Panepinto 小型猪 Panepinto	500 - 800	/	25 - 30(成年) (Adult)	[15]
辛克莱小型猪 Sinclair	590	/	55 - 70(成年) (Adult)	[15]
Westran 小型猪 Westran	930	/	80 - 93(成年) (Adult)	[15]
尤卡坦小型猪 Yucatan	500 - 900	/	70 - 83(成年) (Adult)	[15]
尤卡坦微型猪 Micro-Yucatan	600 - 700	/	55 - 70(成年) (Adult)	[15]
明尼苏达霍麦尔系 Minnesota-Hormel	760	22	48	[17]
科西嘉系 Corsica	/	/	45(成年) (Adult)	[17]
阿米尼种 Oh mini	/	/	40 - 50(成年) (Adult)	[17]
会津系 Huei-Jin	650	/	25 - 35	[18]

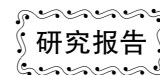
对于猪体重生长曲线的研究, Logistic 模型已有报道^[19 - 20], 而其它体尺性状的研究尚未见相关模型的报道。生长曲线模型又是研究动物体重和体尺等指标变化的一种模型^[1], 本实验将 Logistic 模型应用于融水小型猪的体重及体尺性状的研究。研究发现各性状指标的拟合度达到了较高的水平

(R² 介于 0. 980 ~ 0. 986 之间), 表明 Logistic 模型适宜描述融水小型猪体重和体尺的生长过程。从各性状生长拐点月龄可看出, 融水小型猪生长发育规律先骨骼, 生长拐点出现于 1 ~ 3 月龄 (表现为各体尺指标); 后肌肉和脂肪, 生长拐点出现于 5 ~ 6 月龄 (表现为体重指标)。

参考文献:

- [1] 李少斌, 胡江, 王继卿, 等. 应用 CurveExpert 软件拟合生长曲线模型[J]. 畜牧兽医杂志, 2012, 31(5): 57-59.
- [2] 国家标准总局. GB 3038—82 种猪档案记录[S]. 1982-10-01.
- [3] 戴国俊, 王金玉, 杨建生, 等. 应用统计软件 SPSS 拟合生长曲线方程[J]. 畜牧与兽医, 2006, 38(9): 28-30.
- [4] 刘湖, 马大君, 王林, 等. 德国牧羊犬幼犬断奶后生长曲线拟合发育阶段划分研究[J]. 家畜生态学报, 2009, 30(5): 46-51.
- [5] 北京市质量技术监督局. DB/11/T 828.3-2011 实验用小型猪第 3 部分: 遗传质量控制[S]. 2011-11-10 发布, 2012-03-01 实施.
- [6] 王爱德, 兰干球, 郭亚芬. 巴马小型猪的选育[J]. 中国实验动物学杂志, 1995, 5(03): 148-151.
- [7] 王爱德, 兰干球, 郭亚芬. 广西巴马小型猪的培育[J]. 实验动物科学, 2010, 27(1): 60-63.
- [8] 于书敏, 王传武, 赵德明, 等. 中国实验小型猪培育和病原净化[J]. 实验动物科学与管理, 2003, 20(2): 44-46.
- [9] 连林生, 徐家珍, 徐宝明, 等. 版纳微型猪实验动物化的研究(初报)[J]. 上海实验动物科学, 1990, 10(1): 12-14.
- [10] 任丽华. 西藏小型猪实验动物化的初步研究[D]. 第一军医大学硕士学位论文, 2006, 19-20.
- [11] 张青峰, 冯书堂. 小型猪品系五指山猪(WZSP)的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(14): 161-162.
- [12] 吴曙光, 邓红勇, 王明镇, 等. 贵州小型猪早期生长曲线拟合初步分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013, 15: 63-65.
- [13] 王平, 田维毅, 王文佳, 等. 成年贵州小型猪脾脏的组织形态学观察及免疫组化研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012, 8: 8-10.
- [14] 闵凡贵, 潘金春, 王希龙, 等. 蕨麻小型猪在广东地区的适应性观察[J]. 家畜生态学报, 2014, 35(7): 72-77.
- [15] Peter A. McNulty, Anthony D. Dayan, Niels-Christian Ganderup, et al. The MINIPIG in BIOMEDICAL RESEARCH[M]. Boca Raton London New York, CRC Press, 2011, 8.
- [16] <http://minipigs.dk>.
- [17] 冯书堂. 我国小型猪资源实验化培育及开发利用[J]. 实验动物科学, 2007, 24(6): 111-118.
- [18] 詹纯烈. 小型猪及医学实验应用概述[J]. 华南国防医学杂志, 2001, 15(2): 24-28.
- [19] 关红民, 刘孟洲, 滚双宝. 舍饲型合作猪生长曲线拟合研究[J]. 家畜生态学报, 2010, 31(1): 46-49.
- [20] 吴曙光, 邓红勇, 王明镇, 等. 贵州小型猪早期生长曲线拟合初步分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2013, 08: 63-65.

[修回日期]2015-03-02



融水小型猪线粒体 DNA 结构和系统进化的分析

徐嘉悦¹, 施赫赫^{2,3}, 王绪敏¹, 高翔⁴, 余细勇⁵, 于军¹, 唐小江²

(1. 中国科学院北京基因研究所, 北京 100101; 2. 广东省医学实验动物中心, 广东 佛山 528248;

3. 广东贝格生物科技有限公司, 广东 佛山 528100; 4. 南京大学模式动物研究所, 南京 210061;

5. 广东省医学科学院, 广州 510060)

【摘要】 目的 研究融水小型猪的线粒体 DNA 结构和系统进化关系。**方法** 选取了全基因组鸟枪法的测序策略对融水小型猪的外周血液样本进行测序, 使用 Illumina 基因组分析测序技术构建 paired-end 文库进行末端测序, 最后进行拼接及分析。**结果** 融水小型猪的完整线粒体序列呈环形, 总长为 16888 bp, 由 13 个编码蛋白基因、22 个转运 RNA 和两个核糖体 RNA 构成。线粒体 DNA 的 GC 含量约为 44 %。系统进化分析、遗传多样性分析和中性检验证明了, 在融水小型猪、兰屿猪、海南野猪和滇南 7 号这一类群中, 发生了种群扩张。**结论** 融水小型猪是中国传统猪种中比兰屿猪更为古老的小型猪。

【关键词】 融水小型猪; 线粒体 DNA; 系统进化分析; 遗传多样性

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0028-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 003. 06

Genomic and phylogenetic analysis of porcine mitochondrial genomes of Rongshui miniature pig

XU Jia-yue¹, SHI He-he^{2, 3}, WANG Xu-min¹, GAO Xiang⁴, YU Xi-yong⁵, YU Jun¹, TANG Xiao-jiang²

(1. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

2. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Guangdong Foshan 528248, China;

3. Beige BioTec Co., Ltd., Guangdong Foshan 528100, China; 4. Model Animal Research Center of Nanjing University, Nanjing 210061, China; 5. Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China)

【Abstract】 Objective Assembly whole mitochondrial genome sequence of Rongshui miniature pig (RMP) breed and analysis the structure of mitochondrion based on the next-generation sequencing method. Comparison of phylogenetic relationship and genetic diversity among different pig breeds. **Methods** We collected peripheral venous blood sample from RMP and constructed two paired-end sequencing libraries. A whole-genome shotgun sequencing strategy and Illumina Genome Analyser sequencing technology were used in our study. **Results** The mitochondrial genome of RMP consists of 13 protein coding genes, 2 ribosomal RNA genes, 22 transfer RNA genes and the length of pig is 16888 bp. The GC content of this pig mitochondrial genome is about 44 %. Based on phlogenetic analysis, population genetic analysis, our findings confirmed that the ancestral cluster in East Asia mainly occurred among Diannan 7# pig, Hainan wild boar, Lanyu

【基金项目】 国家重大研究计划项目(2011CB944101); 国家自然科学基金重点项目(81120108003; 81330007)。

【作者简介】 徐嘉悦(1988 -), 女, 博士生, 研究方向: 医用小型猪和小鼠系统组学数据整合, 基因组学, 生物信息学; 施赫赫(1985 -), 男, 硕士, 技术员, 研究方向: 实验用小型猪。两者为共同第一作者。

【通讯作者】 唐小江(1967 -), 男, 博士, 研究方向: 实验动物与疾病动物模型、毒理学。E-mail: river-t@126.com。共同通讯作者: 王绪敏(1977 -), 男, 博士, 研究方向: 猪基因组学, wangxm@big.ac.cn。

and RMP. **Conclusion** RMP, a typical miniature pig breed in China, is an earlier ancestor than Lanyu pig breed.

【Key words】 Rongshui miniature pig (RMP); Mitochondrial genome; Phylogenetic analysis; Genetic diversity

融水小型猪是源自广西苗寨的小黑猪,具有体型微小、性情温驯、产仔力强、母性较好等特点,具备培育成标准化实验用小型猪的有利特点。我们于 2012 年将该猪种源引到广东三水繁育,建立了基础种群和的系谱档案,已繁殖出 F1 代和 F2 代,参照北京市地方标准^[1]初步建立了融水小型猪的质量控制标准。为了进一步掌握其遗传背景,本文对线粒体 DNA 进行了分析。

1 材料和方法

1.1 样本的收集和 DNA 的提取

融水小型猪由广东贝格生物科技有限公司(广东省医学实验动物中心小型猪基地)提供。用无菌肝素钠抗凝采血管取融水小型猪外周静脉血 10 mL,用 Qiagen 公司的 QIAamp DNA 试剂盒按操作说明书提取 DNA。

1.2 序列的测序和组装

采用全基因组鸟枪法的测序策略,使用 Illumina 基因组分析测序技术进行测序研究。为了提高组装的质量,对融水小型猪选取了插入片段大小为 300 bp 和 500 bp 的 paired-end 文库进行末端测序,用基于 Bruijn 图算法^[2]的 SOAPdenovo 软件(<http://soap.genomeics.org.cn>)对测序得到的短片进行拼接组装^[3-4],得到融水小型猪的完整线粒体 DNA 序列。

1.3 线粒体 DNA 的注释和分析

为了确定融水小型猪的线粒体结构,首先以 *Sus scrofa* 的线粒体序列为参考序列,采用 BLAST 软件^[4]完成了 *Sus scrofa* 与融水小型猪的比对,确定线粒体的编码蛋白基因、rRNA 和 tRNA,用软件 CodonW 对编码蛋白基因的密码子使用情况进行统计。另外用 tRNAscan-SE v. 1.21 软件^[5]对线粒体 tRNA 的二级结构及各个 tRNA 的反义密码子进行预测。用 clustal W^[6]软件将融水小型猪的编码蛋白区序列与 GenBank 中的 15 头国内外的猪线粒体编码蛋白区序列(表 1)进行比对。

用 DnaSP5.10^[7]软件计算实验材料的单倍型、遗传多样性和遗传分化的相关数值^[8]。基于以上的单倍型聚类的分类,采用 Tajima's D^[9]和 Fu's s^[10]两个中性检验模型对 16 个猪的单倍型分布进行中性检验,其中种群遗传格局及变异的检测在

Arkequin3.11^[11]中实施。使用分子变异分析(AMOVA)的方法以 10000 次重复随机抽样单倍型重排后进行显著性检验,以此来评价种群遗传变异水平与种群地理位置的相关性,使用统计量将遗传差异分为 3 个不同层次的地理等级。用 Network 4.6 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>)对 16 个猪种进行聚类,并用 MEGA 5.0^[12]的最大似然法和邻接法对 16 个猪种的编码蛋白区进行系统进化分析。

2 结果

2.1 融水小型猪线粒体结构

融水小型猪与其他猪的结构框架相同,都是由 13 个编码蛋白,22 个 tRNA 和 2 个 rRNA 组成(表 2)。线粒体全长为 16888 bp。线粒体 DNA 的核苷酸组成为 A > C > T > G。线粒体的 GC 含量总是低于 AT 含量。

2.2 编码蛋白基因

融水小型猪由 13 个基因构成,除基因 ND6 位于线粒体的轻链上之外,其余 12 个基因包括 ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5、COX1、COX2、COX3、CYTB、ATP6、ATP8 都在线粒体的重链(表 2)。这 13 个基因的总长为 11255 bp,其中基因 ATP6 和基因 ATP8 有 42 bp 的重叠区域,基因 ND4L 和基因 ND4 有 7 bp 的重叠区域,基因 ND5 和基因 ND6 有 17 bp 的重叠区域。位于融水小型猪重链的 12 个编码蛋白基因的碱基组分为 A > C > T > G,其中 ND1、ATP6、COX3、ND3、ND4、ND5、ND2、CYTB 8 个基因的碱基组份是一致的:A > C > T > G,而基因 COX1、COX2、ATP8、ND4L 的碱基组份为 A > T > C > G;另外,位于融水小型猪轻链的 ND6 基因的碱基组份为 C > A > T > G。

2.3 非编码蛋白区域:D-loop 控制区和基因间区

在拼接的融水小型猪线粒体中,D-loop 区的长度为 1254 bp, tRNA-Pro 和 tRNA-Phe 排布于 D-loop 区的两端。在 D-loop 区碱基组份为 A > C > T > G,与线粒体 DNA 一致,AT 的含量高于 GC 含量。此外,融水小型猪线粒体 DNA 中非编码的基因间区长度为 654 bp,这些基因间区的主要原因是线粒体中 tRNA 簇的重排。其中最长的基因间区是位于 ND1 和 tRNA 之间的区域,长为 139 bp。基因间区为高级别的系统进化研究提供了可能。

表 1 15 个猪种线粒体 DNA 的基本信息及其在 NCBI 数据库中的检索号

Tab.1 List of mitochondrial genome sequences of Swine breeds and their accession numbers as retrieved from NCBI database

物种名称 Species	线粒体长度 (bp) Mitochondrial length	物种所在地区 Species area	检索号 Number of retrieval
欧洲伯克希尔猪 (European Berkshire pig)	16,876	英国,伯克希尔	AY574045
杜洛克猪 (Duroc pig)	16,905	英国	AY337045
汉普郡猪 (Hampshire pig)	16,865	英国,约克郡	AY74046
意大利野猪 (Italy wild boar)	16,302	意大利	AF304201
济州 10#猪 (Jeju 10# pig)	17,014	韩国,济州	AY574048
济州 8#猪 (Jeju 8# pig)	17,014	韩国,济州	NC000845
韩国野猪 (South Korean wild boar)	16,973	韩国	DQ334860
长白猪 (Landrace pig)	16,921	英国	DQ334861
兰屿猪 (Lanyu pig)	17,071	中国,台湾地区	AY574047
苏塞克斯家养猪 (Sussex domestic pig)	17,095	欧洲	DQ518915
台湾地区野猪 (Taiwan wild boar)	16,802	中国,台湾地区	NC012095
苏塞克斯猪 (Sussex pig)	16,923	欧洲	NC014692
梅山猪 (Meishan pig)	16,998	中国,江苏	AF486855
海南野猪 (Hainan wild boar)	16,690	中国,海南	EF545572
滇南 7 号 (Diannan 7# pig)	16,690	中国,云南	EF545576

表 2 融水小型猪线粒体 DNA 的结构特征

Tab.2 Location of feature in the mitochondrial DNA of Rongshui miniature pig

基因/区域 Gene/ Region	区域位置 regional location		长度 (bp) Length (bp)	密码子 Codon		反义密码子 Antisense codon	所在链 Chain
	起始位置 Starting location	终止位置 Termination location		起始密码子 Start codon	终止密码子 Termination codon		
tRNA-Pro	746	809	63			ACC	L
tRNA-Thr	810	877	67			ACA	H
CYTB	878	2017	1139	ATG	GAG		H
tRNA-Glu	2022	2090	68			AAC	L
ND6	2091	2618	528	ATG	TAA		L
ND5	2602	4422	1820	ATA	TAA		H
tRNA-Leu2	4423	4492	69			AUU	H
tRNA-Ser	4493	4551	58			UGA	H
tRNA-His	4552	4620	68			CAC	H
ND4	4621	5998	1377	ATG	T –		H
ND4L	5992	6288	296	GTG	TAA		H
tRNA-Arg	6289	6357	68			AAG	H
ND3	6359	6704	345	ATA	TA –		H
tRNA-Gly	6705	6773	68			AGG	H
COX3	6774	7557	783	ATG	TA –		L
ATP6	7557	8237	680	ATG	TAA		H
ATP8	8195	8398	203	ATG	TAA		H
tRNA-Lys	8400	8466	66			AAA	H
COX2	8467	9154	687	ATG	T –		H
tRNA-Asp	9155	9222	67			CAG	H
tRNA-Sec	9228	9298	70			UCN	L
COX1	9302	10846	1544	ATG	TAA		H
tRNA-Tyr	10848	10913	65			CAU	L
tRNA-Cys	10913	10978	65			CGU	L
tRNA-Asn	11011	11085	74			CAA	L
tRNA-Ala	11087	11154	67			ACG	L
tRNA-Trp	11161	11228	67			AGU	H
tRNA-Gln	11227	11297	70			AAC	L
ND2	11348	12267	919	ATT	TAG		H
tRNA-Met	12271	12340	69			GUA	H
ND1	12479	13435	956	ATG	TAG		H
tRNA-Leu	13438	13512	74			AUC	H
16S-rRNA	13513	15025	1512				H
tRNA-Val	15083	15150	67			AUG	H
12s-rRNA	15151	16110	959				H
tRNA-Phe	16111	16180	69			CUU	H

2.4 核糖体 RNA

线粒体中包括两个核糖体 RNA, 分别为 12S rRNA and 16S rRNA(表 1), 12S rRNA 的长度为 959 bp, 16S rRNA 的长度为 1512 bp。16S rRNA 编码于缬氨酸和亮氨酸之间, 其碱基组份为 A > T > C > G; 12S rRNA 编码于丙氨酸和缬氨酸之间, 其碱基组份为 A > C > T > G。12S rRNA 和 16S rRNA 的 GC 含量均在 40 % 左右, 同样保持了 GC 含量低于 AT 含量这一特点。

2.5 转运 RNA

对融水小型猪线粒体, 我们预测了其 22 个转运 RNA 的二级结构, 并确定了各转运 RNA 的反义密码子(如表 2 所示)。这 22 个转运 RNA 的 GC 含量都低于 AT 含量, 其中精氨酸的 GC 含量最低, 约 21 %; 甲硫氨酸的 GC 含量最高, 约 47 %。

融水小型猪线粒体 DNA 的密码子使用情况(表 3)。包括终止密码子在内, 共有 3772 个密码子, 其中使用密码子 CUA 的数目最多, 为 306 个, 而 AGG 和 CGG 两个密码子没有被使用。在密码子的统计中, 密码子第一位核苷酸使用的频率为 A > C > T > G; 而在密码子第二位置, 碱基使用频率为 T > C > A > G; 在密码子的第三个位置, 碱基使用频率为 A > C > U > G。众所周知, 密码子在不同位置使用频率的差异是由于密码子使用的偏好性造成的, 上述的密码子使用情况也为研究线粒体 DNA 的进化提供了有用的信息^[13]。

2.6 同义突变和非同义突变

同义突变和非同义突变之间的比例(Ka/Ks 值)可用于分析不同物种之间的系统进化关系^[14]。通过对 16 个猪 13 个编码蛋白区的所有序列进行比对, 构建了一个参考序列(Ref), 分别计算每头猪的各个编码蛋白基因序列与 Ref 的 Ka/Ks 比值。结果如封 2 图 1 所示, 16 个猪种在编码蛋白区的 Ka/Ks 值均小于 1, 说明所有 13 个编码蛋白基因都在承受着正选择, 其中基因 COX1 的选择压力最大, 这意味着该基因正在承受着很强的纯化选择; 而 ND5 的选择压力相对较小, 说明该基因是在进化中舍弃一些较为不利的突变。

2.7 系统进化分析

使用 MEGA 软件中的 Kimura's two-parameter 模型(K2P)计算 16 个猪种的编码蛋白区的遗传距离。融水小型猪与其他猪的遗传距离最远, 碱基的平均遗传距离为 1.141。而对总体的遗传距离统计

中, 物种间以恒定速率进行核苷酸替换的标准差仅为 0.0015。基于上述遗传距离矩阵, 通过 MEGA 软件中的最大似然法和邻接法对 16 头猪的编码蛋白区构建系统进化树(图 2), 从图 2 可以看出, 16 个猪种可以分成四个类群, 即欧洲群(E 群)、亚洲 1 群(A1 群)、亚洲 2 群(A2 群)、亚洲 3 群(A3 群)。其中, E 群主要是由欧洲猪种组成, 其中意大利的野猪是相对古老的猪种; A1 群是由中国、日本、韩国等亚洲猪种及 Berkshire 猪共同组成, 在这一分支中, 也可以证明猪的进化是由亚洲起源后分化到欧洲的^[15]; A2 群是由滇南 7 号、海南野猪和兰屿猪构成, 这一结论也验证了之前的研究, 即云南猪种和台湾地区兰屿猪是古老的猪种^[15]。在系统进化分析中最值得关注的是融水小型猪, 可以看出他比兰屿猪更为古老。

2.8 线粒体序列的单倍型分析及中性检验

系统进化分析是对过去已经发生的进化时间的模拟分析, 为了验证系统进化分析结果的准确性, 用单倍型的方法, 对 16 个猪种的进化关系做了进一步分析。用 Dnasp5.10^[7] 分析 16 个猪种的线粒体 DNA 的编码区序列, 共得到 14 个单倍型, 但单倍型的多样性指数为 0.596。将分析后的单倍型数据利用 Network 软件作图(封 2 图 3)。14 个单倍型可以分成 3 大类: 汉普郡猪、苏塞克斯家养猪、长白猪、苏塞克斯猪、杜洛克猪、意大利野猪、欧洲伯克希尔猪、聚为一类(类群 1); 济州 8#猪、济州 10#猪、韩国野猪、梅山猪和台湾地区野猪聚为一类(类群 2); 兰屿猪、滇南 7 号猪、海南野猪、融水小型猪聚为一类(类群 3; 其中类群 1 主要是欧洲猪种, 类群 2 主要以亚洲的韩国和台湾地区猪种为主, 类群 3 主要是中国 4 头古老的猪种。可以看出 Network 作图结果与系统进化分析的结果大致是一致的, 这也进一步验证了融水小型猪是一个非常古老的猪种。

基于单倍型的分析结果, 分别对 3 个类群进行了中性检验(如表 4)。类群 3 不但具有较高的单倍型多样性($h=0.899$), 也具有较高的核苷酸多样性($Pi=0.03417$), 表明类群 3 中的猪种仍具有丰富的遗传多样性, 存在着较高的进化潜力。对于类群 1 和类群 2, 单倍型多样性较高, 但是核苷酸多样性很低。说明这两个类群的猪种经历过近期扩张或者进化历史很短^[17]。本研究中类群 1 和类群 3 的 Tajima's D 与 F_s 值为负值且差异显著, 这表明类群 1 和类群 3 中的猪种在历史上都发生了种群扩张。

表 3 融水小型猪密码子
Tab.3 Codon usage for Rongshui miniature pig

密码子类型 Codon types	个数 Number	密码子类型 Codon types	个数 Number	密码子类型 Codon types	个数 Number	密码子类型 Codon types	个数 Number
UUU(F)	84	UCU(S)	31	GCA(A)	117	UGU(C)	9
UUC(F)	142	UCC(S)	75	GCG(A)	3	UGC(C)	17
UUA(L)	89	UCA(S)	119	UAU(Y)	62	UGA(W)	99
UUG(L)	15	UCG(S)	1	UAC(Y)	78	UGG(W)	4
CUU(L)	50	AGU(S)	11	CAU(H)	24	CGU(R)	6
CUC(L)	68	AGC(S)	45	CAC(H)	78	CGA(R)	48
CUA(L)	306	CCU(P)	37	CAA(Q)	83	CGC(R)	11
CUG(L)	39	CCC(P)	59	CAG(Q)	2	CGG(R)	0
AUU(I)	153	CCA(P)	94	AAU(N)	48	GGU(G)	32
AUC(I)	182	CCG(P)	2	AAC(N)	111	GGA(G)	107
AUA(M)	218	ACU(T)	54	AAA(K)	90	GGG(G)	20
AUG(M)	40	ACC(T)	88	AAG(K)	8	GGC(G)	50
GUU(V)	30	ACA(T)	172	GAU(D)	20	UAA(*)	7
GUC(V)	20	ACG(T)	6	GAC(D)	46	UAG(*)	1
GUA(V)	111	GCU(A)	45	GAA(E)	86	AGA(*)	1
GUG(V)	13	GCC(A)	91	GAG(E)	14	AGG(*)	0

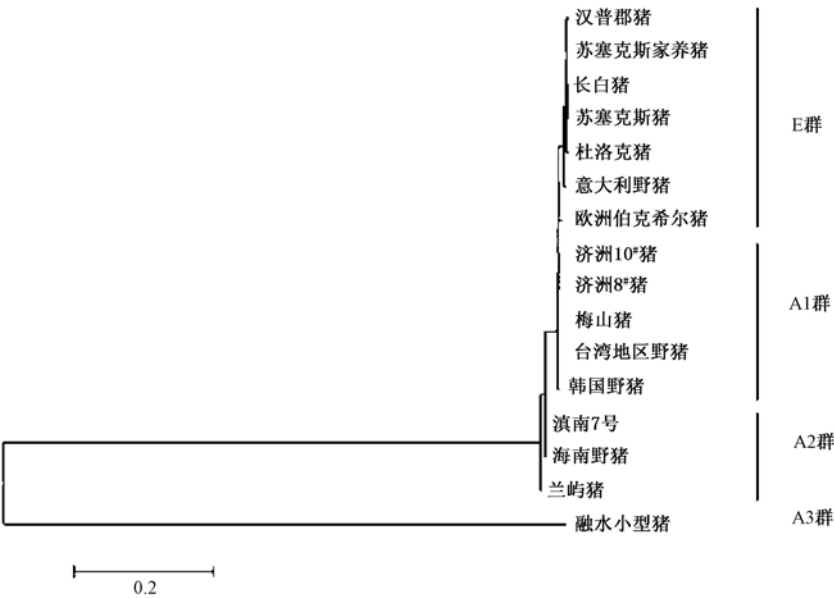


图 2 16 个猪种的系统进化分析(最大似然法和邻接法)
Fig.2 The phylogenetic analysis of 16 pig breeds(NJ, ML analyses)

表 4 对 16 个猪种编码蛋白基因的中性检验和遗传多样性分析

Tab.4 Neutrality test and genetic diversity for main haplogroups in coding region for 16 swine mitochondrial genomes

类群 Group	类群 1 Group 1	类群 2 Group 2	类群 3 Group 3
单倍型数目 Number of Haplotype	7	4	4
样本数目 Number of samples	7	5	4
多态性位点个数(S)Number of polymorphic loci (S)	277	311	192
核苷酸差异均值(k)Nucleotide difference in mean (k)	39.7	62.2	84
单倍型多样性(h)Haplotype diversity (h)	1 ± 0.00251	0.913 ± 0.01287	0.899 ± 0.0002
核苷酸多样性(Pi)Nucleotide diversity (Pi)	0.00273 ± 0.00013	0.00496 ± 0.01481	0.03417 ± 0.0002
Tajima's D 检验值 Tajima's D test value	-0.794	-1.2111	-0.566293
显著性统计 Significant Statistics	*, P < 0.05	Not significant, P>0.1	*, P < 0.05
Fu's Fs 检验值 Fu's Fs test value	-1.6544	2.211	-1.29789
显著性统计 Significant Statistics	*, P < 0.05	Not significant, P>0.1	*, P < 0.05

3 讨论

线粒体 DNA 存在于细胞质线粒体基质中的闭合环状双链超螺旋 DNA 分子,是独立于细胞核染色体外的基因组,具有自我复制、转录和编码功能,是母系遗传,但同时受核 DNA 的控制^[2]。与核 DNA 相比,线粒体 DNA 具有分子结构简单,以母性方式遗传,核苷酸歧义大,进化速度快等特点。因此,使用线粒体研究哺乳动物群体遗传多样性和种内、种间亲缘关系等,一直受到很多学者的关注^[15,18-20]。本研究采用新一代测序技术,对融水小型猪进行测序分析,拼接成完整的线粒体 DNA 序列,从分子遗传学角度评估了融水小型猪的结构质特性、系统进化关系及其遗传多样性。为融水小型猪的实验动物化提供科学依据。

随着新一代测序技术的发展,越来越多的学者对哺乳动物遗传机制的研究不再仅仅停留在核 DNA 水平上,而是更多的综合细胞质 DNA 进行分析。线粒体 DNA 结构简单、稳定,是母系遗传方式,在遗传过程中未曾发生重组。

本文使用新一代测序技术,用 Illumina 测序平台对融水小型猪进行从头测序,使用 SOAPdenovo 拼接成完整线粒体序列并进行注释。融水小型猪的线粒体 DNA 成环形,总长为 16888 bp,由 13 个基因,22 个 tRNA 和 2 个 rRNA 组成。其中 GC 的平均含量约为 44 %。线粒体的 GC 含量总是低于 AT 含量,这一结论与其他物种一致,如人的 GC 含量为 44.4 %^[21],小鼠的 GC 含量为 26.6 %^[22]。本文结合公共数据库发布的 15 个猪种线粒体序列,以线粒体的编码蛋白区为研究对象,对猪种的遗传多样性进行了研究,进而对猪种的起源和进化进行探讨。从系统进化分析中我们可以得出,融水小型猪在系统进化树中成为一个新的独立外群,我们认为融水小型猪是一个古老于兰屿猪的传统中国猪种。为了进一步验证这个结论,我们对系统进化树中的三个类群进行了遗传多样性分析,Network 的结果与系统进化分析的结果是吻合的。由滇南 7 号、海南野猪、兰屿猪和融水小型猪构成的类群 3 中有 4 个单倍型,其具有较高的单倍型多样性和核苷酸多样性显示出类群 3 具有丰富的遗传多样性。

Tajin a's D 与 Fu's Fs 中性检验常用以推测种群扩张的历史事件。如果 Tajin a's D 与 Fs 值呈负值,且在统计学上达到显著标准,则说明序列中含

有比中性进化模型中更多的核苷位点变化,可能预示着该种群曾经有过扩张的历史。融水小型猪的 Tajin a's D 与 Fs 值为负值且差异显著,说明了类群 3 的古老猪种在长期进化过程中还在与其他的猪种还在发生基因交流和种群扩张。

另外,在系统进化分析时,兰屿猪、滇南 7 号猪、海南野猪与融水小型猪分成了不同的分支,而在 Network 分析中成为一个类群,出现这种现象的原因可能是融水小型猪在长期的进化过程中,发生了基因交流。中性检验的结果不但从统计水平上验证了融水小型猪在猪线粒体发展中的祖先地位,而且还解释了融水小型猪作为祖先猪种是如何与其他猪种发生基因流和种群扩张的。遗传多样性分析进一步提示融水小型猪是中国传统猪种中一种古老的小型猪。

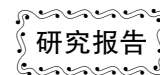
本文对融水小型猪 DNA 进行了初步的分析,限于篇幅和 GenBank 的数据,未与哥廷根小型猪、西藏小型猪、巴马小型猪等其他实验用小型猪的线粒体 DNA 进行比较,有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 北京市质量技术监督局. 实验用小型猪:微生物学等级及监测 DB11T 828.1 - 2011 [S]; 寄生虫学等级及监测 DB11T 828.2 - 2011 [S]; 遗传质量控制 DB11T 828.3 - 2011 [S]; 病理学诊断规范 DB11T 828.4 - 2011 [S]; 配合饲料 DB11T 828.5 - 2011 [S]; 环境及设施 DB11T 828.6 - 2011 [S], 2011 - 11 - 10 发布, 2012 - 03 - 01 实施。
- [2] Pevzner, P. A., H. Tang, M. S. Waterman, An Eulerian path approach to DNA fragment assembly [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001, 98(17): 74 - 85.
- [3] Angiero and Natalie. , Pigs Prove to Be Smart, if Not Vain. The New York Times, 2009.
- [4] Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., et al., Basic local alignment search tool [J]. J Mol Biol, 1990, 215(3): 403 - 410.
- [5] Lowe, T. M. S. R. Eddy, tRNAscan-SE: a program for improved detection of transfer RNA genes in genomic sequence [J]. Nucleic Acids Res, 1997, 25(5): 95 - 98.
- [6] Thompson, J. D., D. G. Higgins, T. J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice [J]. Nucleic Acids Res, 1994, 22(22): 73 - 80.
- [7] Rozas, J., Sanchez-DelBarrio, J. C., Messeguer, X., et al., DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods [J]. Bioinformatics, 2003, 19(18): 49 - 67.
- [8] Kimura, M., Molecular evolutionary clock and the neutral theory [J]. J Mol Evol, 1987, 26(1-2): 24 - 33.

- [9] Tajima, F., Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genetics*, 1989, 123 (3): 58–63.
- [10] Fu, Y. X., Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genetics*, 1997, 147(2): 91–105.
- [11] Excoffier L., L. L., Schneider S., Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1: 47–50.
- [12] Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., *et al.*, *MEGA5*: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods [J]. *Mol Biol Evol.* 28(10): 73–91.
- [13] Dubey, B., Meganathan P. R., Haque I., DNA mini-barcoding: an approach for forensic identification of some endangered Indian snake species [J]. *Forensic Sci Int Genet*, 5 (3): 18–24.
- [14] Yang, Z. R. Nielsen, Estimating synonymous and nonsynonymous substitution rates under realistic evolutionary models [J]. *Mol Biol Evol*, 2000, 17(1): 32–43.
- [15] Chen, Huang, H. L., Yang H. Y., *et al.* Mitochondrial genome of Taiwan pig (*Sus scrofa*) [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(13): 2556–2561.
- [16] Wu, G. S., Yao, Y. G., Qu, K. X., *et al.*, Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia [J]. *Genome Biol*, 2007, 8(11): 245–253.
- [17] Fernandez, A. I., Alves, E., Ovilo, C., *et al.*, Divergence time estimates of East Asian and European pigs based on multiple near complete mitochondrial DNA sequences [J]. *Anim Genet*, 42(1): 86–88.
- [18] Kijas, J. M. Andersson L., A phylogenetic study of the origin of the domestic pig estimated from the near-complete mtDNA genome [J]. *J Mol Evol*, 2001, 52(3): 302–8.
- [19] Fernandez, A. I., Alves, E., Ovilo, C., *et al.*, Divergence time estimates of East Asian and European pigs based on multiple near complete mitochondrial DNA sequences [J]. *Anim Genet*, 42(1): 86–89.
- [20] Yang, S., Zhang, H., Mao, H., *et al.*, The local origin of the Tibetan pig and additional insights into the origin of Asian pigs [J]. *PLoS One*, 6(12): 218–215.
- [21] Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., *et al.*, Sequence and organization of the human mitochondrial genome [J]. *Nature*, 1981, 290(5806): 45–65.
- [22] Bibb, M. J., Van Etten, R. A., Wright, C. T., *et al.*, Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA [J]. *Cell*, 1981, 26(2 Pt 2): 67–80.

[修回日期]2015-03-03



融水小型猪 F1 代的血常规、血生化与电解质指标

刘 科¹, 施赫赫^{1,2}, 陈 淦², 邝少松¹, 刘盛来¹, 刘运忠³, 钟志勇¹,
郭金彪⁴, 耿庆山⁵, 唐小江¹

(1. 广东省医学实验动物中心, 佛山 528248; 2. 广东贝格生物科技有限公司, 佛山 510642;
3. 广州医药工业研究总院, 广州 510240; 4. 佛山科技学院, 佛山 528231;
5. 广东省医学科学院, 广州 510060)

【摘要】 目的 测定融水小型猪(rongshui miniature pig, RMP) F1 代血常规、血生化与电解质指标。**方法** 选取 4 月龄 F1 代 RMP 85 头, 雌性 43 头、雄性 42 头; 12 月龄 36 头, 雌雄各半。颈静脉采血, 分析血常规、血生化与电解质等 22 项指标。**结果** 融水小型猪相同月龄时, 两性别的血常规指标、血生化和电解质的大部分指标差异不大, 但同性别在不同月龄之间的部分指标差异明显。12 月龄比 4 月龄融水小型猪, 血常规指标中的白细胞数、血小板数下降, 血红蛋白含量升高($P < 0.05$), 而红细胞数变化不大($P > 0.05$); 血清 ALT、AST、ALP、CK(雄性)、LDH(雄性)A/G、BUN、GLU(雌性)、CHOL(雄性)和 K^+ 下降($P < 0.05$); 血清总蛋白、TBIL、CR、 Ca^{2+} 升高($P < 0.05$), 而血清 CHOL(雌性)、TG、HDL-C、LDL-C 变化不大。有 19 项生化、电解质指标在或接近人类正常值范围, 占 86.4% (19/22)。**结论** 融水小型猪的部分血常规、大部分血生化与电解质指标与人类正常值接近。

【关键词】 融水小型猪; 血常规; 血生化; 电解质

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0035-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.07

Detection and analysis of blood parameter, blood biochemical and electrolyte indices in F1 generation of Rongshui miniature pig

LIU Ke¹, SHI He-he^{1,2}, CHEN Gan², KUANG Shao-song¹, LIU Sheng-lai¹, LIU Yun-zhong³,
ZHONG Zhi-yong¹, GUO Jin-biao⁴, GENG Qing-shan⁵, TANG Xiao-jiang¹

(1. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Guangdong Foshan 528248, China; 2. Beige BioTec Co., Ltd., Guangdong Foshan 510642, China; 3. Guangzhou Pharmaceutical Industry Research Institute, Guangzhou 510240, China;
4. Foshan University, Guangdong Foshan 528231, China;
5. Guangdong Academy Medical Science, Guangzhou 510060, China)

【Abstract】 Objective To detect the blood parameter, blood biochemical and electrolyte indices of the F1 generation of Rongshui miniature pig (RMP). **Methods** The blood of 43 female and 42 male RMPs of 4th month old, and 36 RMPs of 12th month old (half male and female) were extracted from jugular vein. And the blood parameter, blood biochemical and electrolyte indices were detected by blood analyzer and automatic biochemical analyzer. **Results** In the same month-old RMP, no significant difference between male and female were found in most indices of blood parameter,

【基金项目】 国家自然科学基金重点项目(81120108003; 81330007)。

【作者简介】 刘科(1981-), 男, 硕士, 畜牧师。研究方向: 实验动物生产、繁育研究; 施赫赫(1985-), 男, 硕士, 技术员, 方向: 小型猪生产、繁育。两者为共同第一作者。

【通讯作者】 唐小江(1967-), 男, 博士, 研究方向: 实验动物与疾病动物模型、毒理学。E-mail: river-t@126.com。

blood biochemical and electrolyte indices. On the other hand, many indices were difference between 4th month old and 12th month old RMPs of same gender. Compared with the 4th month old RMP, the 12th month old RMP decreased significantly in WBC and PLT, increased in HGB ($P < 0.05$) while RBC was the same ($P > 0.05$). Serum ALT, AST, ALP, CK (male), LDH(male), A/G, BUN, GLU (female), CHOL (male) and K^+ decreased significantly ($P < 0.05$), while serum TP, TBIL, CR and Ca^{2+} increased significantly ($P < 0.05$), but serum CHOL, TG, HDL-C and LDL-C were not different. 86.4% (19/22) biochemical and electrolyte indices in RMP were in/or close to the range of normal value of human. **Conclusion** Most of the blood parameter, blood biochemical and electrolyte indices of RMP were close to human's normal value.

[Key words] Rongshui miniature pig; Blood parameters; Blood biochemical; Electrolyte indices

1 材料和方法

1.1 动物来源

F1 代普通级融水小型猪 85 头, 其中 4 月龄测定 85 头, 雌性 43 头、雄性 42 头; 12 月龄猪测定 36 头, 雌雄各半。由广东贝格生物科技有限公司(广东省医学实验动物中心小型猪研究基地)提供, 实验动物及实验操作经过广东省医学实验动物中心伦理委员会批准。

1.2 动物饲养条件

饲养环境为普通级, 湿帘通风系统和局部保温灯控制舍内温湿度, 夏天温度控制在 $28^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$, 冬天温度控制在 $16^{\circ}\text{C} \sim 20^{\circ}\text{C}$ 。每天定时定量饲喂全价颗粒料, 上下午各一次, 自由饮水。

1.3 主要仪器

德国赛多利斯电子分析天平(BS223S), 上海安亭科学仪器厂生产的低速大容量离心机(TDL-5-A), 日本光电公司生产的全自动血球计数仪(CelltacE MEK-7222K)和意大利爱康公司生产的全自动血液生化分析仪(ECHO), 用激光计数法检验。

1.4 方法

1.4.1 血样采集

采血前禁食 12 h, 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 前腔静脉取血, 每只动物采血量为 5 mL, 用于血液生理生化指标的测定。

1.4.2 血常规、血生化与电解质指标的检测

使用真空采血管(EDTA_{K_2} 抗凝剂)取 4 mL 全血, 以全自动血球计数仪测定白细胞数(WBC)、中性粒细胞数(NE)、淋巴细胞数(LY)、单核细胞数(MO)、嗜酸粒细胞数(EO)、嗜碱粒细胞数(BA)、中性粒细胞比例(NE%)、淋巴细胞比例(LY%)、单核细胞比例(MO%)、嗜酸性粒细胞比例(EO%)、嗜碱性粒细胞比例(BA%)、红细胞数(RBC)、血红

蛋白(HGB)、红细胞比积(HCT)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞容积分布宽度(RDW)、血小板数(PLT)、血小板压积(PCT)、平均血小板体积(MPV)、血小板分布宽度(PDW)22 项血常规指标。

使用真空采血管(促凝剂)取 1 mL 非抗凝血, 离心分离血清, 以全自动生化分析仪检测丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、血清球蛋白(GLOB)、白蛋白/球蛋白(A/G)、总胆红素(TBIL)、葡萄糖(GLU)、尿素氮(BUN)、肌酐(CR)、胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL-C)、低密度脂蛋白(LDL-C)、磷(P^{5+})、钙(Ca^{2+})、钾(K^+)、钠(Na^+)、氯(Cl^-)等 22 项血生化、电解质指标。

1.4.3 统计方法

实验数据采用 SPSS 21.0 统计软件进行处理。所有测定值均以平均数($\bar{x}$)和标准差(SD)表示, 采用 t 检验, $P < 0.05$ 作为差异显著性界值, $P < 0.01$ 作为差异极显著性界值。

2 结果

2.1 血常规

融水小型猪血常规指标测定结果见表 1。同月龄雄性与雌性相比, 血常规指标仅 RDW 有显著性差异($P < 0.05$)。同性别 12 月龄与 4 月龄比较, 雌性和雄性血常规 WBC、LY、MO、LY%、MO%、RDW、PLT 指标均显著降低($P < 0.05$), NE、EO、NE%、EO%、MCV、MCH、MPV、HCT 指标均显著升高($P < 0.05$); 雌性的 HGB、RBC 指标显著升高($P < 0.05$), 其他指标差异不显著($P > 0.05$)。

表 1 融水小型猪 4 月龄、12 月龄血常规指标

Tab. 1 The blood parameters of Rongshui miniature pigs in the 4th month-old and 12th month-old

检测项目 Test items	4 月龄 4 th month-old		12 月龄 12 th month-old	
	♀ (n=43)	♂ (n=42)	♀ (n=18)	♂ (n=18)
WBC(10 ⁹ /L)	19.7 ± 5.68	18.4 ± 4.45	13.3 ± 2.75 ^{△△}	12.5 ± 3.21 ^{△△}
NE(10 ⁹ /L)	0.8 ± 2.38	0.5 ± 0.48	2.9 ± 1.96 ^{△△}	2.2 ± 0.77 ^{△△}
LY(10 ⁹ /L)	18.7 ± 4.80	17.7 ± 4.41	10.2 ± 2.61 ^{△△}	10.7 ± 3.04 ^{△△}
MO(10 ⁹ /L)	0.16 ± 0.09	0.18 ± 0.10	0 ^{△△}	0.01 ± 0.03 ^{△△}
EO(10 ⁹ /L)	0.04 ± 0.09	0.02 ± 0.05	0.2 ± 0.21 ^{△△}	0.1 ± 0.09 ^{△△}
BA(10 ⁹ /L)	0	0	0	0
NE% (%)	3.2 ± 6.19	2.9 ± 3.09	21.2 ± 13.01 ^{△△}	17.8 ± 7.54 ^{△△}
LY% (%)	95.7 ± 6.38	96.0 ± 3.30	77.2 ± 14.06 ^{△△}	81.0 ± 7.58 ^{△△}
MO% (%)	0.9 ± 0.39	1.0 ± 0.52	0.1 ± 0.10 ^{△△}	0.2 ± 0.16 ^{△△}
EO% (%)	0.2 ± 0.24	0.2 ± 0.25	1.5 ± 1.79 ^{△△}	1.0 ± 0.53 ^{△△}
BA% (%)	0	0.002 ± 0.015	0	0 ± 0.02
RBC(10 ¹² /L)	7.02 ± 1.16	7.23 ± 1.16	7.60 ± 0.55 [△]	7.66 ± 0.60
HGB(g/L)	119 ± 14.24	123 ± 21.92	137 ± 13.00 ^{△△}	130 ± 34.49
HCT(%)	34.1 ± 5.04	35.2 ± 5.90	39.2 ± 3.75 ^{△△}	39.1 ± 3.72 [△]
MCV(fL)	48.7 ± 3.08	48.7 ± 3.01	51.1 ± 1.71 ^{△△}	51.1 ± 2.41 ^{△△}
MCH(pg)	17.0 ± 1.10	17.0 ± 1.13	17.4 ± 2.56	17.9 ± 0.87 ^{△△}
MCHC(g/L)	349 ± 5.18	349 ± 6.56	352 ± 6.54	350 ± 5.34
RDW(%)	15.7 ± 1.05	16.6 ± 2.27 [*]	14.5 ± 0.64 ^{△△}	13.8 ± 0.43 ^{** △△}
PLT(10 ⁹ /L)	522 ± 122.93	529 ± 142.03	437 ± 126.95 [△]	422 ± 129.01 ^{△△}
PCT(%)	0.30 ± 0.09	0.30 ± 0.081	0.31 ± 0.07	0.31 ± 0.09
MPV(fL)	5.9 ± 0.91	5.6 ± 0.85	7.3 ± 1.30 ^{△△}	7.6 ± 0.99 ^{△△}
PDW(fL)	15.8 ± 0.89	15.6 ± 1.03	15.9 ± 0.88	15.8 ± 0.77

注:与同月龄雌性比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 4 月龄同性别比较 $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。Note: Compared with female in same month old * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the 4th month in same gender.

表 2 4 月龄、12 月龄融水小型猪血生化、电解质指标

Tab. 2 The blood biochemical and electrolyte indices of Rongshui miniature pigs in the 4th month and 12th month

检测项目 Test items	4 月龄 the 4 th month		12 月龄 the 4 th month old	
	♀ (n=43)	♂ (n=42)	♀ (n=18)	♂ (n=18)
ALT(U/L)	53 ± 12.87	65 ± 17.22	35 ± 7.51 ^{△△}	36 ± 7.94 ^{△△}
AST(U/L)	138 ± 13.33	138 ± 14.60	32 ± 9.86 ^{△△}	36 ± 24.65 ^{△△}
ALP(U/L)	202 ± 65.40	206 ± 76.89	158 ± 77.56 [△]	155 ± 69.15 [△]
CK(U/L)	495 ± 177.75	499 ± 150.88	394 ± 242.82	310 ± 159.63 ^{△△}
LDH(IU/L)	552.26 ± 144.46	635.21 ± 148.00	474.11 ± 97.53	497.78 ± 65.64 ^{△△}
TP(g/L)	58.4 ± 6.46	60.2 ± 4.89	68.5 ± 3.35 ^{△△}	66.7 ± 7.83 ^{△△}
ALB(g/L)	31.4 ± 4.94	35.7 ± 4.70	34.0 ± 2.39 ^{△△}	33.6 ± 4.60
GLOB(g/L)	27.0 ± 5.55	24.5 ± 4.35	34.4 ± 2.72 ^{△△}	33.0 ± 5.98 ^{△△}
A/G	1.22 ± 0.37	1.52 ± 0.45	0.99 ± 0.11 ^{△△}	1.05 ± 0.23 ^{△△}
TBIL(μmol/L)	0.59 ± 0.26	0.70 ± 0.31	0.09 ± 0.04 ^{△△}	0.09 ± 0.03 ^{△△}
GLU(mmol/L)	4.39 ± 1.06	4.26 ± 1.21	2.70 ± 0.72 ^{△△}	3.57 ± 0.99 ^{**}
BUN(mmol/L)	5.06 ± 0.63	4.87 ± 0.53	3.61 ± 0.82 ^{△△}	4.12 ± 1.53
CR(μmol/L)	90.6 ± 18.81	86.4 ± 17.05	150.9 ± 34.04 ^{△△}	151.7 ± 24.41 ^{△△}
CHOL(mmol/L)	2.19 ± 0.33	2.03 ± 0.31	2.06 ± 0.38	1.73 ± 0.24 ^{** △△}
TG(mmol/L)	0.56 ± 0.12	0.50 ± 0.16	0.64 ± 0.20	0.50 ± 0.16 [*]
HDL-C(mmol/L)	0.72 ± 0.15	0.71 ± 0.16	0.80 ± 0.08 [△]	0.76 ± 0.06
LDL-C(mmol/L)	0.96 ± 0.17	0.80 ± 0.24	0.98 ± 0.17	0.77 ± 0.15 ^{**}
P ⁵⁺ (mmol/L)	2.86 ± 0.65	3.21 ± 0.37	3.17 ± 0.10 ^{△△}	3.14 ± 0.19
Ca ²⁺ (mmol/L)	2.42 ± 0.39	2.61 ± 0.17 ^{**}	2.88 ± 0.08 ^{△△}	2.85 ± 0.11 ^{△△}
K ⁺ (mmol/L)	4.86 ± 0.70	4.79 ± 0.82	4.11 ± 0.17 ^{△△}	4.01 ± 0.04 ^{* △△}
Na ⁺ (mmol/L)	141.96 ± 4.63	140.55 ± 4.71	141.26 ± 2.56	142.29 ± 2.43
Cl ⁻ (mmol/L)	102.23 ± 4.89	101.91 ± 3.28	100.71 ± 1.50	99.79 ± 1.75

注:与同月龄雌性比较 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与 4 月龄同性别比较 $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ 。Note: Compared with female in same month old * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the 4th month in same gender.

2.2 血生化与电解质

相同月龄的不同性别之间大部分指标差异较小,且大部分差别均在 1 个标准差之内(表 2)。但是,相同性别不同月龄之间的差异非常明显;在 ALT、AST、ALP、CK、LDH 等 5 个酶学指标中,除雌性的 CK、LDH 差异无显著性外,12 月龄雌性和雄性均显著低于 4 月龄($P < 0.05$);在蛋白质代谢的 4 项指标,12 月龄的总蛋白增加而白蛋白下降($P < 0.01$);在脂质代谢的 CHOL、TG、HDL-C、LDL-C 等 4 个指标中,除雄性 CHOL 下降一个标准差,其他指标均变化不大。12 月龄的 TBIL、BUN 均下降,而 CR 上升最为显著($P < 0.01$),雌性 GLU 下降显著($P < 0.01$)。电解质表现为血 Ca^{2+} 上升,而血 K^{+} 下降。

3 讨论

血常规、血清生化和电解质指标是病理学、生理学等研究中的重要参考依据^[2]。本研究对 4 月龄及 12 月龄融水小型猪的血常规、血生化和电解质指标的测定,反映了幼年与成年融水小型猪的生理生化状态。由于影响动物实验效果的因素包括动物因素、饲养环境和营养因素、动物实验技术环节因素^[3],本研究在同一环境下、使用相同的饲料,采用同一种进行采血方法,并使用相同的检测仪器进行分析。

结果表明,相同月龄时,两性的血常规指标、血生化和电解质的大部分指标差异不大,但不同月龄之间的部分指标差异明显。随着月龄的增加,融水小型猪的血常规指标中,白细胞数、淋巴细胞比例、血小板数下降,血红蛋白含量升高,而红细胞数变化不大。吴曙光等^[4]对贵州小型猪研究也表明,在不同月龄段多数血液生化指标有显著差异($P < 0.05$)。血生化指标中的 5 个酶(ALT、AST、ALP、CK、LDH)12 月龄均下降;反应蛋白代谢功能的总蛋白上升,而白蛋白下降,提示细胞免疫增强;反应脂质代谢的 4 个指标差异很小,提示融水小型猪可能适合用于复制脂质代谢紊乱如高血脂症疾病模型。肌酐(CR)是反应肾功能的指标,总胆红素(TBIL)是反应胆汁代谢的指标,融水小型猪不同性别之间的差异很小,但 12 月龄的 BUN 和 TBIL 显著低于 4 月龄,这与人的情况非常相似。血清电解质

的性别差异很小,12 月龄的血钙升高而血钾下降,但变化均在 1 个标准差范围内。

融水小型猪是否适合作为人类疾病动物模型呢?为便于比较,我们参考国内外文献^[5-10],制作了表 3 和表 4。表 3 可见,成年融水小型猪的白细胞数与哥廷根猪类似,比较接近人类,而 4 月龄融水小型猪的白细胞较高,与中国农大小型猪、西藏小型猪、五指山小型猪接近;在红细胞数方面,融水小型猪比另外 4 种小型猪均小,更接近人类。血红蛋白和血小板则与其他小型猪、比格犬和大鼠接近,在人类正常值范围内。

从表 4 可见,成年融水小型猪的绝大部分生化与电解质指标与人类正常值范围非常接近。其中 22 项生化、电解质指标中,有 11.5 项(ALT、AST、TP、ALB、A/G、BUN、CHOL、TG、雄性的 GLU、 K^{+} 、 Na^{+} 、 Cl^{-})在人类正常值范围,占 52.3%;另外 7.5 项指标(ALP、GLOB、TBIL、CR、HDL-C、LDH-C、雌性的 GLU、 Ca^{2+})非常接近人类正常值范围,占 34.1%;两者合计达 86.4%(19/22)。另外 3 项指标(CK、LDH、 P^{5+})也在人类正常值范围最大值的 2.5 倍以内。而哥廷根小型猪虽然大部分指标也在或接近人类正常值范围,占 64.7%(11/17),3 项指标(ALT、LDH、 P^{5+})在人类正常值范围最大值的 2.5 倍以内,但有三项指标 CK、TBIL、CR 分别超过人类正常值范围最大值 10 倍、20 倍、500 倍以上,且其标准差特别大,不适合作为涉及心(CK)、肝(TBIL)、肾(CR)等相关指标的疾病模型。中国农大小型猪的大部分指标也在或接近人类正常值范围,占 66.7%(12/18),5 项指标(ALT、ALP、 P^{5+} 、 K^{+} 、雌性的 AST、LDH-C)在人类正常值范围限值 2 倍以内,但 CK 超过人类正常值范围限值 5 倍以上,且检测除了雄性 AST 外,4 个心肌酶均不在人类正常值范围。我们获得的西藏小型猪和五指山小型猪检测项目较少,大部分指标也在或接近人类正常值范围,但反映 CK、GLU 远低于人类。

总之,从本文获得的资料看,融水小型猪的血常规、血生化和电解质指标多数接近人类,数据标准差小,且月龄变化与人类相似,部分指标显著优于哥廷根等小型猪,提示融水小型猪具备培育成实验用小型猪的优越条件。

表 3 融水小型猪与其他小型猪、犬、大鼠、人的血常规指标比较

Tab. 3 Comparison of blood parameters among Rongshui miniature pigs, dog, rat, human and other minipigs

检测 项目 Test items	融水小型猪 (12 月龄) Rongshui miniature pig (12 month-old)		Gottingen 小型猪 ^[5] (6 月龄) Gottingen minipig (6 month-old)		中国农大 小型猪 ^[6] (12 月龄) Chinese experimental minipig (12 month-old)		西藏小型猪 ^[7] (6~12 月龄) Tibet minipig (6~12 month- old)		五指山 小型猪 ^[7] (6~12 月龄) Wuzhishan minipig (6~12 month-old)		比格犬 ^[8] (8 月龄) Beagle dog (8 month-old)		清洁级 SD 大鼠 ^[9] (6~8 周龄) Clean grade SD rats		人类 ^[10] Human
	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	
WBC (10 ⁹ /L)	13.3 ± 2.75	12.5 ± 3.21	9.46 ± 2.66	9.84 ± 2.05	19.53 ± 2.93	21.62 ± 6.46	17.27 ± 5.45	22.73 ± 6.14	14.92 ± 2.91	13.65 ± 2.42	6.27 ± 1.68	7.47 ± 2.50			3.9~9.7
NE (10 ⁹ /L)	2.9 ± 1.96	2.2 ± 0.77	2.56 ± 1.30	3.16 ± 1.56	/	/	33.06 ± 11.28	19.10 ± 0.74	/	/	/	/			*
LY (10 ⁹ /L)	10.2 ± 2.61	10.7 ± 3.04	6.59 ± 1.84	6.37 ± 1.42	/	/	61.36 ± 12.63	73.10 ± 2.71	/	/	4.87 ± 1.58	5.34 ± 1.84			1.0~3.3
MO (10 ⁹ /L)	0	0.01 ± 0.03	0.07 ± 0.05	0.08 ± 0.05	/	/	2.72 ± 2.21	2.66 ± 1.96	/	/	0.25 ± 0.20	0.36 ± 0.21			0.12~0.8
EO (10 ⁹ /L)	0.2 ± 0.21	0.1 ± 0.09	0.19 ± 0.09	0.19 ± 0.09	/	/	2.75 ± 2.71	4.99 ± 2.49	/	/	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.03			0.02~0.5
BA (10 ⁹ /L)	0	0	0.05 ± 0.02	0.05 ± 0.02	/	/	0.12 ± 0.14	0.15 ± 0.10	/	/	/	/			0~1
NE% (%)	21.2 ± 13.01	17.8 ± 7.54	26.21 ± 8.68	31.39 ± 10.58	/	/	/	/	64.80 ± 5.36	71.00 ± 8.38	/	/			**
LY% (%)	77.2 ± 14.06	81.0 ± 7.58	70.42 ± 8.71	65.23 ± 10.18	/	/	/	/	31.37 ± 5.82	25.05 ± 8.26	80.01 ± 8.24	82.03 ± 3.61			18.7~47
MO% (%)	0.1 ± 0.10	0.2 ± 0.16	0.75 ± 0.46	0.82 ± 0.36	/	/	/	/	1.03 ± 1.27	0.77 ± 1.69	4.39 ± 2.20	4.34 ± 1.93			3~8
EO% (%)	1.5 ± 1.79	1.0 ± 0.53	2.02 ± 1.08	2.00 ± 0.97	/	/	/	/	2.80 ± 2.02	3.18 ± 2.22	1.03 ± 0.69	0.66 ± 0.41			0.5~5
BA% (%)	0	0 ± 0.02	0.60 ± 0.19	0.56 ± 0.25	/	/	/	/	/	/	/	/			0~1
RBC (10 ¹² /L)	7.60 ± 0.55	7.66 ± 0.60	8.89 ± 0.74	8.33 ± 0.95	8.28 ± 0.62	8.29 ± 0.53	7.93 ± 0.83	7.92 ± 0.51	5.93 ± 2.23	5.48 ± 1.10	7.58 ± 0.35	7.36 ± 0.27			4.3~5.9
HGB (g/L)	137 ± 13.00	130 ± 34.49	140.32 ± 8.86	134.04 ± 10.79	155.85 ± 18.50	152.30 ± 9.72	156.11 ± 15.21	142.00 ± 13.10	154.40 ± 14.76	137.13 ± 11.30	145.20 ± 7.24	140.70 ± 3.86			137~179
HCT (%)	39.2 ± 3.75	39.1 ± 3.72	/	/	0.55 ± 0.05	0.54 ± 0.04	67.16 ± 6.27	62.37 ± 5.39	39.91 ± 14.81	25.84 ± 7.25	0.42 ± 0.12	0.41 ± 0.01			0.40~0.54
MCV (fL)	51.1 ± 1.71	51.1 ± 2.41	/	/	65.75 ± 4.32	65.73 ± 3.97	84.93 ± 5.19	78.73 ± 4.42	67.27 ± 3.15	65.27 ± 2.84	55.39 ± 1.88	56.06 ± 1.58			83~101
MCH (pg)	17.4 ± 2.56	17.9 ± 0.87	/	/	18.54 ± 1.05	24.26 ± 29.62	19.73 ± 1.07	17.85 ± 0.92	27.70 ± 5.21	25.72 ± 4.34	19.17 ± 0.69	19.13 ± 0.53			27.2~34.7
MCHC (g/L)	352 ± 6.54	350 ± 5.34	330.58 ± 4.51	329.77 ± 4.35	279.73 ± 19.08	276.04 ± 22.01	232.79 ± 7.41	227.17 ± 8.35	412.43 ± 77.16	388.23 ± 8.86	346.00 ± 4.06	341.20 ± 3.49			329~360
RDW (%)	14.5 ± 0.64	13.8 ^B ± 0.43	/	/	19.51 ± 1.96	22.01 ± 2.5	21.79 ± 1.83	21.58 ± 0.94	/	/	/	/			<14.5
PLT (10 ⁹ /L)	437 ± 126.95	422 ± 129.01	381.47 ± 112.02	437.76 ± 62.64	300.56 ± 74.38	310.00 ± 88.22	285.84 ± 101.73	272.83 ± 125.05	346.67 ± 78.73	301.45 ± 114.74	1154.90 ± 175.38	1223.30 ± 154.22			98.7~302.9
PCT	0.31 ± 0.07	0.31 ± 0.09	/	/	/	/	/	/	/	/	0.95 ± 0.13	1.00 ± 0.13			0.108~0.272
MPV (fL)	7.3 ± 1.30	7.6 ± 0.99	/	/	/	/	/	/	/	/	8.25 ± 0.36	8.14 ± 0.27			7.6~13.2
PDW (fL)	15.9 ± 0.88	15.8 ± 0.77	/	/	/	/	/	/	/	/	8.08 ± 0.67	7.84 ± 0.41			14.8~17.2

注: * 中性粒细胞(NE)包括杆状核 $0.04 \sim 0.6 \times 10^9/L$ 与分叶核 $2 \sim 7 \times 10^9/L$; * * 中性粒细胞百分数包括(NE%) 包括杆状核百分数 $1 \sim 5 \times 10^9/L$ 与分叶核百分数 $50 \sim 70 \times 10^9/L$ 。

Note: * neutrophil (NE) includes a rod-shaped nuclear $0.04 \sim 0.6 \times 10^9/L$ and polymorpho nuclear $2 \sim 7 \times 10^9/L$. * * neutrophil percentage includes (NE%) includes a rod-shaped nuclear fraction of $1 \sim 5 \times 10^9/L$ and polymorpho nuclear reached $50 \sim 70 \times 10^9/L$.

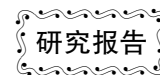
Tab.4 Comparison of blood biochemical indices among Beige miniature pigs, dog, rat, human and other minipigs

检测项目 Test items	融水小型猪 (12 月龄) Rongshui miniature pig (12 month-old)		Gottingen 小型猪 ^[5] (6 月龄) Gottingen minipig (6 month-old)		中国农大 小型猪 ^[6] (12 月龄) Chinese experimental minipig (12 month-old)		西藏小型猪 ^[7] (6 ~ 12 月龄) Tibet minipig (6 ~ 12 month- old)		五指山 小型猪 ^[7] (6 ~ 12 月龄) Wuzhishan minipig (6 ~ 12 month-old)		比格犬 ^[8] (8 月龄) Beagle dog (8 month-old)		清洁级 SD 大鼠 ^[9] (6 ~ 8 周龄) Clean grade SD rats		人类 ^[10] Human
	♀	♂	♀	♂	♀	♂			♀	♂	♀	♂			
ALT (U/L)	35 ± 7.51	36 ± 7.94	63.6 ± 39	78 ± 82.2	67.04 ± 14.44	78.16 ± 20.40	71.70 ± 46.35	49.75 ± 4.92	25.67 ± 2.40	40.90 ± 6.24	25.67 ± 2.40	40.90 ± 6.24	0.0 ~ 40.0		
AST (U/L)	32 ± 9.86	36 ± 24.65	30 ± 27	38.4 ± 44.4	76.39 ± 153.57	38.60 ± 16.60	101.33 ± 56.03	92.75 ± 20.71	132.20 ± 24.69	141.20 ± 29.98	132.20 ± 24.69	141.20 ± 29.98	0.0 ~ 45.0		
ALP (U/L)	158 ± 77.56	155 ± 69.15	138 ± 54	153 ± 40.8	330.63 ± 385.3	287.80 ± 164.90	/	/	112.30 ± 36.04	194.00 ± 42.01	112.30 ± 36.04	194.00 ± 42.01	40.0 ~ 150		
CK (U/L)	394 ± 242.82	310 ± 159.63	1963.2 ± 3984	1720.2 ± 3903	959.90 ± 125.90	937.10 ± 11.00	15.40 ± 13.61	18.63 ± 9.35	169.70 ± 64.19	107.63 ± 35.37	/	/	38 ~ 174		
LDH (IU/L)	474.11 ± 97.53	497.78 ± 65.64	402.6 ± 195.6	402.6 ± 210.6	/	/	/	/	/	/	/	/	109 ~ 205		
TP (g/L)	68.5 ± 3.35	66.7 ± 7.83	60.17 ± 12.95	53.01 ± 11.76	73.11 ± 12.04	76.13 ± 5.67	86.88 ± 5.28	83.89 ± 4.90	72.00 ± 9.27	66.93 ± 5.55	55.19 ± 6.55	48.43 ± 2.52	60 ~ 82		
ALB (g/L)	34.0 ± 2.39	33.6 ± 4.60	/	/	45.51 ± 5.28	43.01 ± 6.86	46.11 ± 4.04	42.20 ± 4.22	41.03 ± 3.32	39.47 ± 3.91	19.68 ± 2.96	15.97 ± 0.77	35 ~ 52		
GLOB (g/L)	34.4 ± 2.72	33.0 ± 5.98	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	20 ~ 30		
A/G	0.99 ± 0.11	1.05 ± 0.23	1.26 ± 0.23	1.34 ± 0.20	/	/	/	/	/	/	/	/	1.0 ~ 2.0		
TBIL (μmol/L)	0.09 ± 0.04	0.09 ± 0.03	1440 ± 1240	400 ± 900	/	/	/	/	0.12 ± 0.06	0.09 ± 0.05	/	/	1.7 ~ 20		
GLU (mmol/L)	2.70 ± 0.72	3.57 ^B ± 0.99	4.75 ± 1.19	4.48 ± 0.91	4.82 ± 0.99	4.52 ± 0.66	2.45 ± 1.27	1.06 ± 1.03	5.0180 ± 0.8634	5.19 ± 0.61	9.62 ± 1.85	7.15 ± 1.56	3.61 ~ 6.11		
BUN (mmol/L)	3.61 ± 0.82	4.12 ± 1.53	/	/	6.35 ± 1.55	7.14 ± 2.11	6.68 ± 1.35	4.30 ± 0.97	4.7032 ± 1.1078	4.98 ± 0.89	3.80 ± 0.70	4.03 ± 0.72	1.8 ~ 7.1		
CR (μmol/L)	150.9 ± 34.04	151.7 ± 24.41	74180 ± 20630	76650 ± 13200	115.01 ± 34.65	112.36 ± 29.80	156.67 ± 19.08	125.13 ± 15.32	42.9 ± 10.62	58.77 ± 15.02	45.30 ± 14.21	31.40 ± 4.06	44 ~ 133		
CHOL (mmol/L)	2.06 ± 0.38	1.73 ^B ± 0.24	2.09 ± 0.48	1.32 ± 0.35	2.64 ± 0.59	2.56 ± 0.41	2.04 ± 0.41	2.01 ± 0.16	4.11 ± 0.61	4.34 ± 0.58	0.62 ± 0.10	0.80 ± 0.17	2.4 ~ 5.7		
TG (mmol/L)	0.64 ± 0.20	0.50 ^b ± 0.16	0.48 ± 0.15	0.31 ± 0.10	0.77 ± 0.26	0.68 ± 0.22	0.67 ± 0.46	0.52 ± 0.17	0.54 ± 0.12	0.54 ± 0.1	0.48 ± 0.23	0.28 ± 0.09	0 ~ 1.69		
HDL-C (mmol/L)	0.80 ± 0.08	0.76 ± 0.06	/	/	1.03 ± 0.21	1.04 ± 0.14	/	/	/	/	/	/	1.063 ~ 1.21		
LDL-C (mmol/L)	0.98 ± 0.17	0.77 ^B ± 0.15	/	/	0.77 ± 0.26	1.39 ± 0.34	/	/	/	/	/	/	1.019 ~ 1.063		
P ⁵⁺ (mmol/L)	3.17 ± 0.10	3.14 ± 0.19	2.35 ± 0.54	2.20 ± 0.48	2.60 ± 0.35	2.63 ± 0.25	/	/	8.30 ± 1.66	6.87 ± 1.11	/	/	0.81 ~ 1.45		
Ca ²⁺ (mmol/L)	2.88 ± 0.08	2.85 ± 0.11	2.41 ± 0.43	2.32 ± 0.45	2.72 ± 0.18	2.75 ± 0.16	/	/	2.94 ± 0.27	2.67 ± 0.14	/	/	2.25 ~ 2.75		
K ⁺ (mmol/L)	4.11 ± 0.17	4.01 ^b ± 0.04	4.45 ± 0.98	4.54 ± 0.83	7.34 ± 1.05	7.68 ± 0.89	/	/	5.77 ± 0.59	4.42 ± 1.35	/	/	3.5 ~ 5.5		
Na ⁺ (mmol/L)	141.26 ± 2.56	142.29 ± 2.43	133.27 ± 17.48	131.05 ± 16.56	149.08 ± 0.14	148.51 ± 4.90	/	/	188.17 ± 35.72	147.10 ± 23.41	/	/	130 ~ 150		
Cl ⁻ (mmol/L)	100.71 ± 1.50	99.79 ± 1.75	91.48 ± 12.45	91.35 ± 12.05	103.91 ± 4.11	103.51 ± 3.40	/	/	119.9 ± 7.63	113.4 ± 6.25	/	/	120 ~ 140		

参考文献:

- [1] 袁进,顾为望. 小型猪作为人类疾病动物模型在生物医学研究中的应用[J]. 动物医学进展,2011,32(2):108-111.
- [2] 潘金春,闵凡贵,王希龙,等. 实验用蕨麻小型猪血液生理生化指标测定及分析[J]. 畜牧与兽医,2012,44(6):81-83.
- [3] 施新猷,王四旺,顾为望,等. 比较医学,第1版[M],陕西:陕西科学技术出版社,2003年,62.
- [4] 吴曙光,董小君,郭柯男,等. 贵州小型猪血液生化指标检测[J]. 黑龙江畜牧兽医,2011,(2):44-45.
- [5] <http://minipigs.dk>.
- [6] 冯媛媛,白雪源,贺津,等. 中国实验用小型猪血液指标正常参考值分析[J]. 中国畜牧兽医,2013,40(6):139-142.
- [7] 岳敏,范沛,吴丽红,等. 广州地区三种小型猪血液生理生化指标的比较[J]. 中国比较医学杂志,2011,28(8):24-26.
- [8] 王东平,吴娜,隋丽华,等. 成年比格犬血液生理生化指标的测定[J]. 实验动物科学与管理,2005,22(2):12-15.
- [9] 樊林花,李丹,刘茂林,等. 清洁级SD大鼠血液生理及生化指标正常参考值的观察[J]. 2011,6(19):33-34.
- [10] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程,第三版[M]. 南京:东南大学出版社,2006年.

〔修回日期〕2015-03-02



融水小型猪剖检程序以及主要脏器 自发性病变组织学观察

施赫赫^{1,2}, 孙 侠¹, 刘 科¹, 任海涛¹, 陈 淦², 黄 威¹,
钟志勇¹, 刘运忠³, 林秋雄⁴, 唐小江¹

(1. 广东省医学实验动物中心, 广东 佛山 528248; 2. 广东贝格生物科技有限公司, 广东 佛山 510642;
3. 广州医药工业研究总院, 广州 510240; 4. 广东省医学科学院, 广州 510060)

【摘要】 目的 掌握融水小型猪主要器官解剖学及组织学数据。**方法** 选择 6 月龄 F1 代小型猪雌雄各两头, 麻醉后测体重, 进行大体解剖, 颈动脉取血测定全身血量、血浆量, 记录脊柱数量和恒齿齿式, 取出主要脏器进行拍照、称重及测量, 切取脏器的部分组织, 用福尔马林固定后做组织切片, 在显微镜下观察并拍照。**结果** 获得了融水小型猪的主要脏器形态图片、组织学显微图片、主要脏器重量、脏器系数及其他基础数据。**结论** 初步掌握了融水小型猪的器官解剖学和组织学基础数据。

【关键词】 融水小型猪; 解剖; 组织学; 脏器重量; 脏器系数

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0042-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 003. 08

Autopsy procedures and pathological observation of spontaneous main organ lesions in Rongshui miniature pig

SHI He-he^{1,2}, SUN xia¹, LIU Ke¹, REN Hai-tao¹, CHEN gan², HUANG wei¹,
ZHONG Zhi-yong¹, LIU Yun-zhong³, Lin Qiu-xiong⁴, TANG Xiao-jiang¹

(1. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China; 2. Beige Biological Technology Co., Ltd., Foshan 510642, China; 3. Guangzhou Pharmaceutical Industry Research Institute, Guangzhou 510240, China;
4. Guangdong Academy Medical Science, Guangzhou 510060, China)

【Abstract】 Objective To establish the data including anatomy and histology of main organs in Rongshui miniature pig (RMP). **Methods** F1 Rongshui miniature pigs with male and female (2 in each group) in 6 month old were used in this experiment. We measured body weights, dissected these pigs after anaesthesia, recorded total blood volume, total plasma volume, number of spine and dental formula, took main organs for photographs, and made histological sections observed and took photographs by microscope. **Results** We gained the photographs of main organs and histological sections, organ weights, organic coefficients and other basic data. **Conclusion** Basic anatomy and histology data of main organs in RMP were collected.

【Key words】 Rongshui miniature pig (RMP); Anatomy; Histology; Organ weight; Organ coefficient

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目 (81120108003, 81330007)。

[作者简介] 施赫赫 (1985 -), 男, 硕士, 研究方向: 实验用小型猪。

[通讯作者] 唐小江 (1967 -), 男, 博士, 研究方向: 实验动物与疾病动物模型、毒理学。E-mail: river-t@126.com。

猪在解剖学、生理学、疾病发生机制等方面与人极其相似,小型猪作为实验动物应用十分广泛,包括肿瘤、心血管病、糖尿病、外科、牙科、皮肤烧伤、血液病、遗传病、营养代谢病和新药评价等多个方面^[1]。小型猪因体型小,便于实验研究,许多个国家的研究机构对小型猪已经进行深入研究和应用。脏器解剖学和组织学数据是衡量动物遗传品质的重要生物学特性,在遗传品质鉴定、衡量和动物功能状态以及药物、生物制品非临床安全性评价中起到重要的作用^[2],这些指标的测定及评价对小型猪的研究应用具有重要意义和价值。融水小型猪(rongshui miniature pig, RMP)是一种体型小、性情温驯的小黑猪。2009 年本课题组在广西壮族自治区融水县杆洞村苗寨发现并将该品种引种到广东佛山三水乐平镇的小型猪基地进行实验动物化研究。该猪种缺少科学、系统的观测数据,测定和分析各种生物学数据是融水小型猪实验动物化的基础。为此,我们初步对 F1 代融水小型猪进行了主要器官解剖学和组织学观察,制作组织切片进行观察拍照,同时测定了全身血量及血浆量、记录脊椎数量和恒齿齿式。

1 材料和方法

1.1 动物来源

6 月龄普通级融水小型猪 4 头,雌雄各半,由广东贝格生物科技有限公司(广东省医学实验动物中心小型猪研发基地)提供。实验动物及实验操作经过广东省医学实验动物中心伦理委员会批准。

1.2 动物饲养条件

饲养环境为普通级,湿帘通风系统和局部保温灯控制舍内温湿度,夏天温度可控制在 28℃ ~ 30℃,冬天温度可控制在 16℃ ~ 20℃;每天定时定量饲喂全价颗粒料,上午各一次;自由饮水。

1.3 主要仪器及试剂

1.3.1 主要仪器:轮转切片机(德国 LEICA 公司 RM2135),生物组织全自动脱水机(湖北孝感医用仪器有限公司 TS-12C),生物组织包埋机及冷冻机(湖北孝感医用仪器有限公司 BM-VII),摊片烤片机(湖北孝感医用仪器有限公司 CS-VI),生物组织全自动染色机(湖北孝感医用仪器有限公司 RS-18),病理图像分析系统(日本奥林巴斯 BX41)。

1.3.2 主要试剂:福尔马林、石蜡、二甲苯、酒精、伊红、苏木素、中性树胶。

1.4 方法

1.4.1 解剖、组织学检查项目

心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肾上腺、脑、脊髓、胃、十二指肠、空肠、回肠、结肠、直肠、睾丸、附睾、前列腺、精囊腺、子宫、卵巢、胸腺、胰腺、淋巴结、肌肉、坐骨神经、甲状腺、膀胱、胆囊。

1.4.2 解剖

解剖前禁食 12 h,麻醉后颈动脉放血,处死后立即分离主要脏器,剔除脏器表面的脂肪和筋膜,用滤纸吸净表面的血液,使用电子天平称量实质器官重量,并用 NICON D4000 单反相机拍照。软尺测量大小肠长度并记录颈椎、胸椎、腰椎、骶椎、尾椎、乳头数量及齿式。

1.4.3 制片

组织标本经取材、固定、修块、流水冲洗、脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋后,石蜡切片,HE 染色、封片;

1.4.4 读片

将制作好的 HE 染色切片置于显微镜下,从低倍到高倍观察组织有无病理变化,并用奥林巴斯 BX41 显微镜拍照。

2 结果(彩图见彩插 1-7)

2.1 大体解剖流程及解剖图

对 4 头融水小型猪进行大体解剖,过程如下:沿气管旁剪开皮肤,钝性分离皮下结缔组织和肌肉,找到颈动脉钝性分离,使用血管夹夹住近心端,在远心端作一斜面切口插入导管并用棉线扎紧,放开血管夹放血用于测定全身血量和血浆量。切开腹部中部纵向皮肤,在腹白线处分离皮下结缔组织,肌肉与腹膜;暴露腹腔取出各个器官并称重拍照;分离胸骨暴露胸腔,取出器官称重拍照。切开头颅皮肤,分离皮下结缔组织与肌肉;锯开颅骨暴露脑组织并取出称重拍照。取完各脏器后,分别分离出后腿侧的坐骨神经;分离出脊椎,记录各段数量;观察恒齿,并记录数量。大体解剖见图 1。

2.2 脏器重量、脏器系数、脊椎数量及恒齿齿式

对 4 头融水小型猪测定了脏器重量及脏器系数,记录了脊椎数量等数据。脏器重量及脏器系数见表 1,数据以平均数($\bar{x}$)和标准差(SD)表示,未进行统计分析。从表 1 可知,雄性体重小于雌性,除了肾上腺平均重量相同外,其各主要脏器平均重量都是雄性小于雌性。脏器系数除了胸腺的脏器系数是雄性大于雌性外,其他主要脏器系数均是雄性小于雌性。脊椎个数等其他基础数据(表 2)。

表 1 融水小型猪体重、脏器重量和脏器系数的测定结果

Tab.1 The body weight, organ weight and organ coefficient in Rongshui miniature pigs

项目 Items	雌性 (n = 2) Female (n = 2)		雄性 (n = 2) Male (n = 2)	
	脏器重 (g) Organ weight	脏器系数 (%) Organ coefficient	脏器重 (g) Organ weight	脏器系数 (%) Organ coefficient
心脏 Heart	82.35 ± 6.29	4.29 ± 0.22	73.95 ± 11.53	4.88 ± 0.52
肺 Lung	148.85 ± 9.69	7.76 ± 0.71	148.85 ± 42.64	9.79 ± 2.33
肝 Liver	265.15 ± 14.35	13.82 ± 1.10	268.20 ± 30.69	17.72 ± 1.34
脾 Spleen	26.50 ± 0.57	1.38 ± 0	24.95 ± 0.35	1.65 ± 0.06
肾 Kidney	62.30 ± 2.4	3.24 ± 0.04	55.05 ± 6.15	3.64 ± 0.23
脑 Brain	75.60 ± 3.39	3.94 ± 0.08	73.55 ± 8.56	4.86 ± 0.33
甲状腺 Thyroid gland	1.45 ± 0.21	0.075 ± 0.01	1.25 ± 0.07	0.08 ± 0
肾上腺 Adrenal gland	1.65 ± 0.35	0.085 ± 0.02	1.65 ± 0.21	0.11 ± 0.01
睾丸 Testis	/	/	22.20 ± 2.97	1.47 ± 0.12
卵巢 Ovary	5.75 ± 0.49	0.30 ± 0.01	/	/
胸腺 Thymus gland	7.15 ± 0.64	0.38 ± 0.02	5.00 ± 0.85	0.33 ± 0.04
体重 (kg) Body weight	19.20 ± 0.49	/	15.12 ± 0.76	/

表 2 融水小型猪脊椎个数、肠长度等基础数据

Tab.2 The basic data such as number of vertebration and length of intestine in Rongshui miniature pigs

项目 Items	雌性 (n = 2) Female (n = 2)	雄性 (n = 2) Male (n = 2)
全血 (mL) Whole blood (mL)	843 ± 53	1000 ± 14
血浆 (mL) Plasma (mL)	425 ± 71	538 ± 4
颈椎 (个) Cervical vertebra (Number)	7	7
胸椎 (个) Thoracic vertebra (Number)	14	14
腰椎 (个) Lumbar vertebra (Number)	7	7
骶椎 (个) Sacral vertebrae (Number)	3	3
尾椎 (个) Caudal vertebra (Number)	21	21
十二指肠 (cm) Duodenum (cm)	33 ± 1	26 ± 3
空肠 (cm) Jejunum (cm)	302 ± 89	472 ± 27
回肠 (cm) Ileum (cm)	396 ± 30	459 ± 98
盲肠 (cm) Cecum (cm)	10 ± 0	15 ± 1
结肠 (cm) Colon (cm)	163 ± 1	206 ± 27
直肠 (cm) Rectum (cm)	30 ± 3	28 ± 4
乳头 (对) Papilla (Pairs)	6	6
齿式 (前臼齿与臼齿合并统计) Dental formula (Molars and premolars were aggregated)	$2\left(\frac{3}{3}\frac{1}{1}\frac{4}{5}\right)$	$2\left(\frac{3}{3}\frac{1}{1}\frac{4}{5}\right)$

2.3 主要脏器观察与组织学检查

对融水小型猪脏器组织进行了脏器观察,拍照,各脏器组织外观未见明显病理异常,脏器组织(图2)。并对各组织器官进行了病理切片,各组织检查结果如下:

心脏:心肌纤维束排列整齐,未见萎缩、肥大、空泡变性、坏死,未见心肌纤维化,间质未见水肿、充血、出血及炎细胞浸润(图3-A)。

肝脏:肝小叶结构清晰,肝细胞索状排列,肝细胞未见变性、坏死,窦内皮细胞及枯否氏细胞未见增生,未见胆管增生、胆汁瘀滞、纤维化及炎细胞浸润(图3-B)。

脾脏:红、白髓结构清晰,动脉周围淋巴鞘清晰可见,中央动脉未见病变,脾小体分布、形态正常,部分生发中心清晰,脾窦未见出血(图4-A)。

肺脏:细、小支气管周淋巴细胞浸润;肺泡管及肺泡结构清晰,肺泡未见扩张、萎陷,肺泡壁毛细血管未见扩张、充血,肺泡间隔未见增厚,肺泡腔清晰,未见肺水肿和肺出血,肺泡内未见巨噬细胞聚集(图4-B)。

肾脏:皮、髓结构清晰,肾小球未见明显增大、萎缩、空泡化、玻璃样变、硬化,肾小管未见萎缩、肥大、增生、再生、空泡化、嗜碱性变、色素沉着、凝固性坏死,肾小管管腔未见扩张,未见透明管型、矿物质沉积,间质未见炎细胞浸润、纤维组织增生,肾乳头未见坏死,肾盂未见扩张积水及炎细胞浸润(图5-A)。

肾上腺:皮、髓质结构清晰,皮质球状带、束状带、网状带细胞排列及形态正常,髓质细胞形态及分布正常,各区细胞未见增生、萎缩,未见出血、坏死及炎症反应(图5-B)。

大脑:大脑皮质各层神经元、神经胶质细胞形态正常,未见萎缩、变性、坏死、增生等改变,间质未见水肿、充血、出血,未见炎症细胞浸润及血管浸润套形成。白质未见脱髓鞘,室管膜及脉络膜未见异常,未见脑室积水(图6-A)。

小脑:皮质中浦肯野细胞及各种神经元细胞形态正常,各层组织结构清晰,脑膜未见充血,蛛网膜下腔未见水肿及渗出物,小脑组织神经元未见肿胀,胞浆未见空泡形成,未见核偏位;未见神经细胞坏死、胶质细胞增生,未见软化灶形成;脑组织间质未见水肿、血管扩张充血、瘀血及炎症细胞浸润,白质未见脱髓鞘(图6-B)。

脑干:脑干各神经核团形态清晰、正常,神经元细胞较大、神经突起明显,神经核大、核仁清晰。神经纤维束分布正常。脑干内未见出血、坏死灶(图6-C)。

脊髓:白质和灰质结构完整,灰质呈H型,脊髓灰质前角运动神经元细胞形态排列正常,未见变性、坏死表现,脊髓侧角和后角神经元及中央管结构亦正常,未见神经细胞坏死及嗜神经细胞现象;未见血管扩张充血、出血;白质有髓神经纤维结构清晰、未见脱髓鞘(图7-A)。

胃:粘膜上皮完整,腺体排列整齐,未见糜烂、出血、坏死或溃疡形成。胃壁细胞及主细胞形态正常,未见萎缩、变性或坏死,未见化生或异型增生。肌层未见肥厚、萎缩或出血、坏死。浆膜未见充血、水肿及炎症细胞渗出(图8A)。

十二指肠:粘膜上皮组织部分自溶,考虑未及时固定(图8-B)。

空肠:粘膜上皮组织部分自溶,考虑未及时固定(图9-A)。

回肠:绒毛间质充血、少量炎细胞浸润(图9-C)。

结肠:粘膜层见粘膜相关淋巴组织(图9-B)。

睾丸:生精小管结构清晰,各级生精细胞形态正常,精子细胞清晰可见,支持细胞未见异常,未见曲细精管萎缩、多核巨细胞生成改变;间质细胞未见增生;间质未见水肿、充血、出血及炎症细胞浸润(图10-A)。

附睾:附睾管上皮细胞未见空泡化,管腔内可见大量精子,未见精子肉芽肿,间质未见水肿、充血、出血及炎细胞浸润(图10-B)。

前列腺:腺体松散分布,腺腔内可见分泌物,间质疏松、量少,未见腺上皮增生、间质纤维组织增生、间质充血、水肿、炎细胞浸润等病理改变(图10-C)。

子宫:子宫壁各层结构清晰,子宫内膜粘膜上皮呈单层柱状排列,粘膜下固有膜结缔组织内有子宫腺,子宫肌层和子宫外膜未见明显病理异常(图11-B)。

卵巢:各级卵泡、黄体,数量正常,未见滤泡囊肿、血肿及肿物形成(图11-A)。

胸腺:胸腺皮、髓质形态正常,分界清晰,皮质未见萎缩,皮质淋巴细胞形态及分布正常,髓质细胞形态及分布未见异常(图12-B)。

胰腺:胰腺组织结构未见异常,可见外分泌部和胰岛,胰岛细胞排列正常,外分泌部腺泡上皮细胞未见细胞萎缩、变性、坏死,未见炎细胞浸润(图 14-B)。

淋巴结:皮质区淋巴小结形态正常,帽区、明区和暗区清晰可见,副皮质区淋巴细胞形态及分布正常,髓窦及被膜下淋巴窦形态未见异常(图 13-B)。

甲状腺:甲状腺组织结构未见异常,甲状腺滤泡结构正常,滤泡上皮细胞未见变性、坏死,滤泡旁细胞未见增生,未见炎症细胞浸润(图 12-A)。

膀胱:粘膜(变移上皮)由三层至数层移行上皮细胞组成,结构完整,上皮细胞未见变性、坏死、脱落,固有膜内胶原纤维、弹力纤维未见变性、增生等改变,肌层内平滑肌纤维形态排列正常,各层组织中未见炎细胞浸润(图 13-B)。

胆囊:粘膜固有层见炎细胞浸润(图 14-A)。

皮肤:表皮结构完整,真皮层的胶原纤维、皮肤附件结构清晰,未见坏死、水肿、充血、出血及炎细胞浸润(图 15-A)。

肌肉:肌浆红染,横纹清晰,细胞核位于肌纤维周边部。未见肌纤维凝固性坏死,间质水肿、充血、出血及炎细胞浸润(图 15-B)。

坐骨神经:神经纤维平行排列,未见神经纤维变性、脱髓鞘(图 7-B)。

3 讨论

本研究对融水小型猪的 29 个器官进行外观和组织切片观察及拍照,保存了大体解剖和组织学的资料,充实了融水小型猪的生物学数据。各脏器组织外观未见明显病理异常,仅肺颜色有点暗红;组织学检查中发现,肺脏细小支气管周围淋巴细胞浸润,其他器官均为正常,未发现病理性变化。

将融水小型猪的组织切片结果与《西藏小型猪组织胚胎学研究》^[3]和《贵州小型猪组织学图谱》^[4]进行比对,骨骼肌横断面组织切片的比较中,融水小型猪的骨骼肌肌束之间结缔组织和肌间脂肪比西藏小型猪与贵州小型猪少,骨骼肌更致密,这与大体解剖观察到的一致。

猪淋巴结的组织结构并不完全与人类的相同,皮质和髓质可以分别出现于外周区域和中央区域,西藏小型猪淋巴结皮质和髓质交替存在^[3]。但贵州小型猪的髓质成分分布在外周,皮质则位于淋巴结的中央部分^[4]。从融水小型猪淋巴结组织切片

来看,其皮质区同样可以出现在外周区域,而髓质分布于中央区域,说明融水小型猪与西藏小型猪在淋巴结结构上与人更加接近。

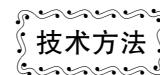
实验动物的自发性病变存在于普通级、SPF 级动物,如大鼠、比格犬、食蟹猴、树鼩等都有相关报导^[5-10]。引起自发性病变的因素很多,如遗传、营养、用药、中毒及环境因素等,也包括原因未明的传染因子^[8]。有的还与年龄增长相关^[11-12]。徐永华等^[13]的研究认为,人类和其他动物在支气管、小支气管周围有不同程度炎细胞浸润,而且肺内尘细胞较多,是与生存环境空气受污染有关。西藏小型猪由于长期生存在很少受污染的高原寒冷环境,呼吸系统是清洁的。同样地,由于融水小型猪在普通级环境下饲养,而呼吸系统各器官属于管腔器官,容易与空气中物理性、化学性物质如粉尘、氨气等接触,刺激引起小支气管、细支气管的病理性变化。另外,小支气管、细支气管黏膜细胞浸润,存在病原体影响的可能性。在融水小型猪的肺脏组织切片中,只发现小支气管、细支气管周围淋巴细胞浸润,肺内未发现尘细胞,其他结构未发现病理性变化,这也说明了饲养环境中的刺激因素比较小,或者病原体对肺脏的影响较小。

本研究使用的融水小型猪总体健康状况良好,其组织器官外观正常,组织切片检查基本正常,可以作为融水小型猪病理性检查的正常组织切片参考依据。同时,从本次研究的结果也可以从侧面反映出,在融水小型猪饲养管理过程中,较好的控制了环境、饲料和微生物等环节。融水小型猪在医学实验相关方面是一种具有潜力的实验动物。由于实验动物的自发性病变会影响动物质量和干扰动物实验结果,提示在融水小型猪的整个饲养管理过程中,必须严格执行各方面质量控制体系,尽量减少外部诱因对融水小型猪自发性病变的影响。

参考文献:

- [1] 张德福,刘东. 国内外小型猪实验动物化研究[J]. 生物学通报,2004,39(10):14-16.
- [2] 闵凡贵,潘金春,王希龙,等. 影响五指山小型猪主要脏器重量及脏器系数的因素分析[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(10):218-222.
- [3] 那顺巴雅尔. 西藏小型猪组织胚胎学研究[D]. 广州:南方医科大学,2009.
- [4] 甘世祥,钱宁,冯济凤,等. 贵州小型猪组织学图谱[M]. 贵州:贵州科技出版社,2001.
- [5] 乔俊文,陆姐磊,孙景军,等. 药物临床前安全性评价中食蟹

- 猴常见自发性病变[J]. 中国药理与毒理学杂志, 2013, 27(3):548.
- [6] 徐文滢, 李霞, 李涛, 等. 恒河猴、比格犬、树鼯、兔、大鼠及小鼠消化管的比较组织学[J]. 临床与实验病理学杂志, 2013, 29(11):1211-1217.
- [7] 苏晓鸥, 戴益民, 弓雪莲, 等. 毒性试验中 SD 大鼠常见自发性病变[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3):518.
- [8] 王辉, 陆姐磊, 盛焯, 等. SPF 级 F344 大鼠的脏器重量和自发性病变的研究[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4):291-292.
- [9] 罗灼玲, 张立群, 李文, 等. 实验动物比格(Beagle)犬自发性病变的研究[J]. 广州中医药大学学报, 1999, 16(2):151-154.
- [10] 程树军, 黄韧, 秦瑶. 比格犬肝脏自发性病变的组织学研究[J]. 上海实验动物科学, 2003, 23(4):200-202.
- [11] 徐艳峰, 马春梅, 黄澜, 等. Wistar 大鼠心脏自发性病变的病理学观察[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(2):6-8.
- [12] 胡建延, 英永, 邱波, 等. 不同周龄 SPF 级 SD 大鼠胰腺自发性病变的组织学观察[J]. 2012, 33(8):65-68.
- [13] 徐永华, 张东辉, 许琴, 等. 西藏小型猪心脏、呼吸系统组织学观察[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(8):61-62.
- [修回日期]2015-03-02



螺旋涂布法评价联合诱导制备大鼠肝 S9 的活性大小

单纯, 张凤兰, 崔生辉

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 目的 建立螺旋涂布法, 评价本实验室用联合诱导法制备大鼠肝匀浆 S9 活性优劣, 以期大大降低实验成本, 并用 Ames 实验法评价所建立的 S9 低温保存方法的可行性, 提高 S9 利用率。**方法** 采用螺旋涂布法和 Ames 试验方法对市售和自制两种来源 S9 活化的阳性结果进行比较, 并加入甘油保护剂, 建立 S9 酶系统低温储存方法, 使其以液态保存于 -20°C 冰箱中。**结果** Ames 实验中市售和自制两种 S9 在阳性组中都显示出明显活化作用, 同一条件下, Ames 试验中使用两种 S9 所得阳性结果并无较大差异, 变率间差异无统计学意义。螺旋涂布法中, 同一条件下, 使用两种 S9 所得阳性结果也无较大差异, 突变率间差异无统计学意义, S9 (浓度为 38%) 加入量在 $1.48 \sim 6.62 \mu\text{L}/\mu\text{L}$ 菌液剂量下, 对 TA100 菌有明显诱导作用, 回复突变率均为对照组的 3 倍以上。**结论** 可以用螺旋涂布法成功评价大鼠肝 S9 活性大小, 联合诱导法可以替代多氯联苯诱导法制备肝匀浆 S9。

【关键词】 螺旋涂布; Ames; 联合诱导; S9; 酶保护剂

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0048-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.09

Using spiral coating technique to evaluate the activity of rat liver S9 prepared by combination inducing method

SHAN Chun, ZHANG Feng-lan, CUI Sheng-hui

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To reduce experimental costs and improve the utilization of S9, we use spiral coating technique to evaluate the activity of rat liver S9 prepared by combination inducing method as well as to establish cryopreservation method. **Methods** Using spiral coating technique and Ames test to evaluate the activity of self-made rat liver S9 and commercially available S9 separately. We use glycerinum as protective agent to establish cryogenic storage method, so that S9 can be in liquid form stored at -20°C in the refrigerator. **Results** In the Ames assay as well as using spiral coating technique, the number of revertant colonies had dose-response relationship among the dose of S9. When conditions were the same, the number of revertant colonies in positive control was at the approximate level in presense of self-made rat liver S9 and commercially available S9 respectively. When S9 (concentration of 38%) was added to the amount at $1.48 \sim 6.62 \mu\text{L}/\mu\text{L}$ broth dose of bacteria, it can significantly induced *Salmonella typhimurium* histidine strains TA100, reverse mutation rates were three times more than the control group. **Conclusions** Spiral coating technique can successfully evaluate the activity of rat liver S9. The inducing method of combination of PB and BF can take the place of the unducing method of PCB_s in the preparation of Liver homogenate S9.

【Key words】 Spiral coating; Ames; Combination inducing; S9; Enzyme protecting agent

[基金项目] 中国食品药品检定研究院中青年基金(1010030112110)。

[作者简介] 单纯(1986-), 女, 硕士生, 研究方向: 毒理学。

[通讯作者] 崔生辉(1972-), 男, 博士, 研究方向: 食品微生物。Email: shengchj112@163.com。

沙门氏菌致突变 (Ames) 试验现广泛应用于检测食品添加剂、化妆品等的致突变性,在其标准操作中,需将细菌测试菌株与受试物以及可选外源性代谢活化系统 (S9) 三者混合进行融化琼脂覆盖培养。但实验周期较长、需用仪器设备多、方法要求严格、操作步骤复杂、实验成本高,在筛选、抽检大量样品时有一定难度。沙门氏菌螺旋涂布致突变检测技术是新开发、低成本、自动化高、试验周期短的一种微生物检测技术,目前国内外实验室认知并使用该技术较少^[1]。本实验室建立该法目的主要是以期最终替代经典回复突变试验对大量未知样品的快速筛选和食品化妆品大量抽检工作改善 Ames 试验梯度稀释的低效率问题。体外代谢活化剂 (S9) 常使用“多氯联苯”(PCBs) 作为诱导剂。PCBs 已被国际上定为致癌剂、长久不宜消除的有机污染物,已禁止生产使用。目前常采用的如 3-甲基胆蒎等单独诱导制备诱导剂,存在活化程度不稳定、敏感性低、无指标进行有效控制等缺陷,试验结果出现几十到上百倍的误差^[2]。故本实验室采用苯巴比妥和 β -苯黄酮 (BF) 联合诱导大鼠肝 S9 以替代 PCBs,并比较不同来源 S9 活性优劣^[3]。目前国内外保存 S9 均保存于液氮或 -80°C 冰箱中,反复冻融造成酶活大大降低,故本实验室在酶保护剂作用下将 S9 呈液态长期置 -20°C 冰箱中,替代传统酶保存方法。

1 材料和方法

1.1 实验动物及饲养条件

SPF 级 SD 大鼠 24 只,雄性,体重 $180 \sim 200 \text{ g}$,由中国食品药品检定研究院实验动物资源中心提供【SCXK(京)2009-0017】,实验在中国食品药品检定研究院三级实验动物室进行【SYXK(京)2011-0008】,温度 $22^{\circ}\text{C} \sim 24^{\circ}\text{C}$,相对湿度 $40\% \sim 45\%$,日光灯 12 h 照明。大鼠繁殖颗粒饲料和去离子水,自由饮水。

1.2 主要试剂及仪器

β -苯黄酮,苯巴比妥钠,2-氨基苄,冷冻离心机,比浊仪, CO_2 培养箱,螺旋涂布仪,市售 S9(多氯联苯诱导制得)。

1.3 分组和剂量设定

联合诱导组为苯巴比妥钠 + 苯黄酮 $80 \text{ mg} + 100 \text{ mg/kg}$,另设溶剂对照组(玉米油)每组大鼠 12 只。

1.4 动物处理及 S9 制备

联合诱导:给药组于处理 1、2、3 d 大鼠灌胃给予苯巴比妥钠 + 苯黄酮,每天 1 次,剂量为 $80 \text{ mg} + 100 \text{ mg/kg}$,给药体积为 2 mL/kg 。大鼠在首次注射后 4 d 处死,处死前 12 h 禁食不禁水;对照组给予玉米油 2 mL/kg ,余下步骤同一般肝 S9 制备方法。S9 分装于冻存管中,速冻后,部分保存于超低温冰箱中用于实验验证活性^[4-5]。

1.5 Ames 试验

增菌:将来自 MH 主板的单个菌落接种至 TSB 营养肉汤的 20 mL 无菌锥形瓶中。接种后的锥形瓶在 37°C 、 125 r/min 的旋转培养箱中孵育 16 h。将培养物于 5080 r/min 、 4°C ,离心 10 min,弃去上清,用 0.15 mol/L PBS 洗涤,连续离心 3 次。后将培养物用比浊仪测浊度值在 $0.8 \sim 1$ 之间,即约每毫升 1×10^9 至 2×10^9 个细胞的密度,存放于冰箱直到需要进行生物检验^[6]。采用平板掺入法,选阳性对照物为 2-氨基苄 (2-AF, $100 \mu\text{g/mL}$),阳性组每皿加 2-AF 溶液 0.1 mL ,每组 3 个平行平板,三种 S9(联合诱导、对照、市售)分别设加 S9 混合液(浓度 10%) 0.5 mL 的阳性组,菌株 TA98、TA100 通过鉴定都符合试验要求。经其余同一般 Ames 试验。试验重复 1 次^[7-9]。

1.6 螺旋涂布评价 S9 活性方法的建立

TA100 比浊浓度为 10^9 数量级后用于实验(比浊值: $0.8 \sim 1$)。

螺旋涂布仪每皿匀速涂布 TA100 原菌液 $20 \mu\text{L}$ (Unif, $20 \mu\text{L}$),待干后 ($<1 \text{ min}$) 均速涂布 $20 \mu\text{L}$ 阳性剂 2-AF ($100 \mu\text{g/mL}$),静置 $<1 \text{ min}$,最后以对数递减 ($\log$, $50 \mu\text{L}$) 分别涂布 $50 \mu\text{L}$ 三种肝 S9(市售、联合诱导、对照)。实验保证每次涂布平皿起点相同,依次覆盖从而形成一个阿基米德螺旋。涂布完毕待干后倒扣于 37°C 培养箱培养 48 h 后,接种受试物的营养最低需求培养板上将选择性地生长突变菌种。突变体菌落采用细菌菌落计数仪计数^[1, 10-11]。

1.7 肝 S9 低温保存法的建立

20 mmol/L Tris-HCl ($\text{pH} = 7.4$)、 1 mmol/L CaCl_2 、50% 丙三醇、47% S9 原液制备低温储存液。制备后的低温储存液将呈液态保存于 -20°C 冰箱中。用 Ames 实验方法,选择菌株 TA98、TA100,分别于配制后 1 周、1 个月、3 个月验证该储存液活性^[12-13]。

2 结果

2.1 Ames 试验菌株回变数结果

TA98、TA100 两种菌株分别采用联合诱导法制备和市售 S9 活化的阳性组回变数无较大差异,采用联合诱导法制备、市售 S9 阳性组的回变数均超过相同条件下对照组大鼠制备 S9 回变数的 2 倍以上,出现阳性结果。两种 S9 活性间无显著性差异,且均高于对照组大鼠 S9 活性($P < 0.05$,表 1)。

2.2 螺旋涂布实验结果

涂布用 S9 浓度选择较合理(38%),能做出比较好的浓度梯度,线性关系明显。涂布平皿阿基米德螺旋清晰可见,菌落回变数随螺旋由内向外依次递减。回变数 S9 涂布量在 1.48 ~ 6.62 $\mu\text{L}/\mu\text{L}$ 菌液浓度下,有较好的致突变活性,检测组菌落数均达到自发回变组及阳性对照组相应菌落数的 2 倍以上,可以判定结果阳性($P < 0.05$,表 2,图 1)。

2.3 Ames 实验验证肝 S9 低温保存法的可行性

Ames 验证活性结果表明:在 3 个月内,S9 储存液活性与原液活性相当,加入的离子及甘油保护剂

不会对其活性造成影响($P < 0.05$,表 3,4)。

3 讨论

在体外致突变试验中体外代谢活化剂是实验中必不可少的重要环节。目前国内实验室多使用市售 S9 上清液,一般 300 元/2mL/支,价格昂贵,使实验成本大大增加;实验结果表明,实验室自制 S9 活性与市售 S9 活性相当,无显著性差异。选择联合诱导制备大鼠肝匀浆 S9,不仅试剂方便够得,减少污染,且可以大大降低实验成本,在某些条件下可以替代市售 S9 用于实验。沙门氏菌螺旋涂布法的原理与 Ames 及其同事发明的标准平板插入法的原理一致;即,在存在或不存在外源性代谢活化系统的情况下,暴露于一定剂量范围的受试物后突变细菌受试菌株出现选择性生长。不同的是,在螺旋涂布法中,这些步骤是自动化的,使用特定机器依次将细菌、受试物和 S9 混合物加入到旋转琼脂培养板上,依次覆盖从而形成一个阿基米德螺旋,最终密度均匀的细菌将暴露于一系列连续浓度梯度的受试物中。在 37 物加孵育 48 ~ 72h 后,接种受试物

表 1 两种诱导方法制备的 S9 阳性诱变剂 Ames 试验回变数结果($\bar{x} \pm \text{SD}$)

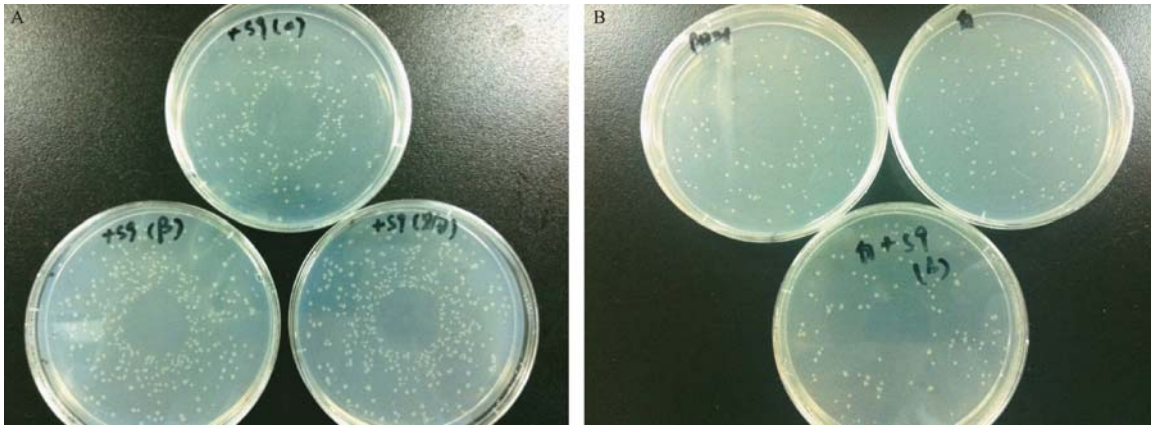
Tab.1 Results of the Ames assay using S9 from 2 sources

组别 Group	S9 混合液(mL) S9 mixture (mL)	菌落回复突变数 The number of revertant colonies	
		TA98	TA100
自发回变 Spontaneous revertant colonies	0	62 ± 11	144 ± 7
+ S9(市售) + S9(Commercially available)	0.5	1199 ± 211	1378 ± 185
+ S9(联合诱导) + S9(Induction combined with PB and BF)	0.5	1327 ± 148	1662 ± 124
+ S9(对照组) + S9(Control group)	0.5	812 ± 102	951 ± 68

表 2 螺旋涂布法验证 S9 致突变活性

Tab.2 Results of the activation of S9 using spiral coating technique

自发回变 Spontaneous revertant - S9					检测组 Test groups		
					+ S9(市售) (Commercially available)	+ S9(联合诱导) (Induction combined with PB and BF)	+ S9(对照组) (Control group)
螺旋 Spiral	加菌量(μL) Bacteria Count	平均菌落数 Colony count	+ S9 量(μL) Volume of S9	S9 量/ μL 菌液 Volume of S9/Bacterium solution(μL)	平均菌落数 Colony count	平均菌落数 Colony count	平均菌落数 Colony count
4a	2.9	17 ± 2	19.2	6.62	95 ± 8	108 ± 9	61 ± 5
4b	2.5	18 ± 2	11.72	4.69	90 ± 5	88 ± 7	40 ± 5
4c	2.96	15 ± 3	7.72	2.61	60 ± 3	81 ± 7	37 ± 4
3a	3.44	23 ± 3	5.08	1.48	59 ± 6	62 ± 5	33 ± 5
3b	3.88	27 ± 3	3.32	0.86	48 ± 4	47 ± 6	26 ± 4
3c	4.36	40 ± 6	2.16	0.50	34 ± 4	33 ± 4	21 ± 3
菌落总数 Total bacterial count		140 ± 9			385 ± 25	419 ± 30	218 ± 25



注：A:螺旋涂布法对三种 S9 活性验证;B:用螺旋涂布验证细菌自发回变。

图 1 螺旋涂布法验证 S9 致突变活性 TA100 菌回复突变数情况

Note: A:Results of the activation of S9 using using spiral coating technique;B:Results of the Spontaneous revertant.

Fig. 1 The reverse mutation number of Salmonellatyphimurium histidine strains TA100 using spiral coating technique

表 3 Ames 法验证 S9 低温储存液致突变活性(TA98、TA100, $\bar{x} \pm SD$)

Tab. 3 Results of the activation of S9 stored in -20℃ refrigerator using the Ames assay

组别 Group		1 周 1 week	1 个月 1 month		3 个月 3 month		
		自发回变数 Spontaneous revertant	+ S9 回变数 Revertant colonies (+ S9)	自发回变数 Spontaneous revertant	+ S9 回变数 Revertant colonies (+ S9)	自发回变数 Spontaneous revertant	+ S9 回变数 Revertant colonies (+ S9)
TA98	S9(市售) S9(Commercially available)	53 ± 12	973 ± 50	54 ± 8	873 ± 50	53 ± 4	860 ± 61
	S9(储存液) S9(Stored in -20℃ as liquid form)	1001 ± 18		955 ± 49		947 ± 52	
TA100	S9(市售) S9(Commercially available)	149 ± 14	1055 ± 62	158 ± 4	1108 ± 91	126 ± 10	1039 ± 54
	S9(储存液) S9(Stored in -20℃ as liquid form)		1106 ± 102		1116 ± 95		1090 ± 104

的营养最低需求培养板上将选择性地生长突变菌种。突变体菌落采用细菌菌落计数仪计数,该计数仪可对螺旋路径上的菌落进行计数。计数仪与装有特别设计的用于螺旋涂布培养板分析程序的个体计算机相连。经分析可得出突变体的数目、大小和位置,通过这些信息,可得出每块螺旋涂布培养板的剂量-反应曲线^[14-15]。

螺旋涂布法可将一系列浓度梯度的受试物涂布在单个琼脂板上,促进了其在致突变性研究领域的使用。沙门氏菌螺旋涂布致突变检测技术自 Houk^[16]发明此法自今,已成为国外实验室致突变检测技术中多项研究的选择。其被国际公职分析化学工作者协会(AOAC)批准,是 APHA 推荐的致突变检测替代方法。国内实验室建立和应用该实验方法十分罕见,查阅国内、外文献报导,各实验室还没有一整套规范的操作方法及结果评价体系。本

实验室已对涂布用培养基的配制、受试物的前处理及平皿涂布方式、细菌接种数量及操作顺序、稳定自发回变数范围、确定细菌回复突变数等逐一成功建立。研究结果表明,在进行与标准法相同剂量范围的检测时,螺旋涂布法仅需要约 1/10 的纯化合物样本量以及 1/40 ~ 1/80 的复杂混合物样本量,剂量-反应分析数据来源于单个琼脂培养板而非一系列培养板。证实了其方法的突出特点“敏感”、“广谱”、“快速”、“低廉”。

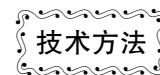
国内外实验室 S9 肝匀浆系统多保存在液氮罐或 -80℃ 冰箱中,每次使用前需室温融化,大大降低酶的活性和利用率。本实验室将制成品 S9 经酶保护剂作用,在液态下长期于 -20℃ 冰箱储存。结果表明,通过 3 个月时间的验证,加入甘油保护剂不会对 S9 活性造成影响,避免了反复冻融使酶活性降低。最终确定一套实验室制备规范,达到诱导剂易

购买、对环境、人类危害轻微、成本低廉、制得的代谢活化剂酶生物活性高且稳定的目的。为本实验室今后大量、快速、准确筛检食品、保健食品和化妆品打下物质基础。

参考文献:

- [1] Claxton, L. D., V. S. Houk, S. Warren. Methods for the spiral Salmonella mutagenicity assay including specialized applications [J]. *Mutat Res*, 2001. 488(3): 241–257.
- [2] 王亚其, 肖凯, 刘玉清, 等. 两种诱导方法制备大鼠肝 S9 在两种遗传毒性试验中活性比较. *现代预防医学* [J], 2006. 33(4): 4.
- [3] Garcia Franco, S., G. Dominguez, J. C. Pico. Alternatives in the induction and preparation of phenobarbital/naphthoflavone-induced S9 and their activation profiles [M]. *Mutagenesis*, 1999. 14(3): 323–326.
- [4] Woodall, G. M., Jr., W. C. Dauterman, D. M. DeMarini. Effect of dietary casein levels on activation of promutagens in the spiral Salmonella mutagenicity assay. II. Studies with induced rat liver S9 [J]. *Mutat Res*, 1996. 360(2): 127–143.
- [5] Atsushi Hakura, S. S., Shigeki Sawada, *et al.* An improvement of the Ames test using a modified human liver S9 preparation [J]. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 2002. 169: 4.
- [6] Maron, D. M. and B. N. Ames. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test [J]. *Mutat Res*, 1983. 113(3–4): 173–215.
- [7] Aubrecht. Bioluminescent Salmonella reverse mutation assay: a screen for detecting mutagenicity with high throughput attributes [J]. *Mutagenesis*, 2007. 22(5): 335–342.
- [8] Jemnitz, K. Comparative study in the Ames test of benzo[a]pyrene and 2-aminoanthracene metabolic activation using rat hepatic S9 and hepatocytes following in vivo or in vitro induction [J]. *Mutagenesis*, 2004. 19(3): 245–250.
- [9] Claxton, L. D., A. Umbuzeiro Gde, D. M. DeMarini. The Salmonella mutagenicity assay: the stethoscope of genetic toxicology for the 21st century [J]. *Environ Health Perspect*, 2010. 118(11): 1515–1522.
- [10] Houk, V. S., S. Schalkowsky, L. D. Claxton. Development and validation of the spiral Salmonella assay: an automated approach to bacterial mutagenicity testing [J]. *Mutat Res*, 1989. 223(1): p. 49–64.
- [11] Claxton, L. D. Evaluating the relationship of metabolic activation system concentrations and chemical dose concentrations for the Salmonella spiral and plate assays [J]. *Mutat Res*, 1991. 253(2): 127–136.
- [12] Yang, Z. Rapid purification of truncated Taq DNA polymerase Stoffel fragment by boiling lysis of bacterial expression cultures [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 2008. 50(Pt 2): 71–75.
- [13] Youngblom, J. Extended stability of Taq DNA polymerase and T4 DNA ligase at various temperatures [J]. *Biotechniques*, 2003. 34(2): 264–266, 268.
- [14] B. N. Ames, J. M., E. Yamasaki. Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian microsome mutagenicity test [J]. *Mutat* 1975. 31: 17.
- [15] Ames, B. N. Identifying environmental chemicals causing mutations and cancer [J]. *Science*, 1979. : p. 6.
- [16] Association of Official Analytical Chemists. General referee reports [S]. *J Assoc Off Anal Chem*, 1989. 72(1): 62–137.

[修回日期]2015-01-26



流式细胞仪筛选环磷酰胺诱导骨髓嗜多染红细胞微核的技术方法

刘仕杰, 方展强

(华南师范大学生命科学学院, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广州 510631)

【摘要】 目的 利用单一荧光试剂吖啶橙(acridine orange, AO)和简单的单激光流式细胞仪(FCM)计数骨髓嗜多染红细胞的微核率,达到了解化合物诱导微核作用的目的。**方法** 分别以环磷酰胺(CP)处理雄性 KM 小鼠和 SD 大鼠,采用 AO 荧光染色和单激光流式细胞仪检测小鼠和大鼠骨髓含微核的嗜多染红细胞(MNPCE)及含微核的成熟红细胞(MNCE)的微核率,并对结果进行比较分析。**结果** 随着 CP 浓度的增高,骨髓中 MNPCE 和 MNCE 也相应增多,呈良好的量效关系。实验结果同时和手工计数比较,没有显著差异。**结论** AO_FCM 自动化检测方法完全适用于小鼠和大鼠骨髓 MNPCE 及 MNCE 微核率的检测。

【关键词】 微核;嗜多染红细胞;单激光流式细胞仪;小鼠;大鼠

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0053-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 003. 10

Technical methods on screening cyclophosphamide induced bone marrow micronucleus polychromatic erythrocytes by flow cytometer

LIU Shi-jie, FANG Zhan-qiang

(Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education,
College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

【Abstract】 Objective To discriminate whether chemical compounds are micronuclei-inducing by counting the ratio of bone marrow micronucleus polychromatic erythrocytes (MNPCE) dyed with a single fluorescence reagent (acridine orange, AO) by single-laser flow cytometry. **Methods** Treating male KM mice and SD rat with cyclophosphamide (CP) respectively, and counting their frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) as well as frequencies of micronucleated normochromatic erythrocytes (MNCE) in bone marrow by AO and a single-laser flow cytometer (FCM), comparing and analyzing the results from different methods. **Results** The results showed that, along with increasing dose of CP, the ratio of MNPCE also corresponding increase, suggesting significant quantitative-efficiency correlation. MNPCE were also counted manually by fluorescence microscopy, and the results showed no significant difference with that by flow cytometry. **Conclusions** AO_FCM fully automated detection method for the detection of MNPCE and MNCE in mice and rat bone marrow micronucleus rate is reliable.

【Key words】 Micronuclei; Polychromatic erythrocytes; Single-flow cytometry; Mice; Rat

[基金项目] 广东省科技计划项目(20098030600006)。

[作者简介] 刘仕杰(1975-),男,硕士,专业:动物学。E-mail: 2077257@qq.com。

[通讯作者] 方展强(1953-),男,教授,专业:动物学。E-mail: fangzhq@sclnu.edu.cn。

微核实验作为一种检测遗传毒物的短期测试法,已在细胞遗传学中得到广泛应用。但长期以来,微核检测一直是由人工完成。由于微核在骨髓细胞以及外周血细胞中含量极少,一般要求计数数千个细胞,才能得到一个比较准确的微核率,这样导致人工阅片工作量太大且敏感性较低,并能导致一些样本的漏检或出现一些假阳性。80 年代, Hutter 和 Stohr^[1] 最先应用流式细胞仪检测了小鼠外周血中的红细胞微核率。流式细胞仪在短时间内能检测大量的嗜多染红细胞 (polychromatic erythrocytes, PCE), 与传统的人工显微镜计数法相比,将其用于微核实验,可使检测更加快速、简单,结果更加客观可靠^[2-3]。本实验利用环磷酰胺腹腔注射小鼠和大鼠,染毒 24 h 后取骨髓细胞,经过吖啶橙 (acridine orange, AO) 荧光染色,采用单激光流式细胞仪检测骨髓细胞的含微核的嗜多染红细胞 (micronucleated PCE, MNPCE) 和含微核的成熟红细胞 (micronucleated NCE, MNCE), 比较两者的量效关系,力图建立一种基于单激光流式细胞仪的微核自动化检测方法,初筛化合物诱导微核作用的毒性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 KM 小鼠 16 只,体重 18 ~ 22 g, 1.5 月龄; SPF 级雄性 SD 大鼠 16 只,体重 150 ~ 250 g, 1.5 月龄。均购于南方医科大学实验动物中心【SCXK 粤 2006-0015】。小鼠和大鼠的组织取材于南方医科大学实验动物科学部动物实验设施内进行【SYXK 粤 2006-0015】。实验小鼠和大鼠分别称重,编号,随机分为 4 组,每组 4 只动物。实验动物的使用及实验过程“参照实验动物使用的 3R 原则进行”^[4]。

1.2 主要试剂及配置方法

环磷酰胺 (cyclophosphamide, CP); 吖啶橙 (acridine orange, AO) (北京索莱宝科技有限公司); TritonX-100 (美国 Sigma 公司); 固定液: 含 SDS 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 1% (v/v) 戊二醛的 Sorensen's 缓冲液 (0.05 mol/L, pH6.8); 溶液 A: 0.1 mL Triton X-100 + 8 mL 1.0 mol/L HCl + 0.877 g NaCl, 加蒸馏水至 100 mL; 溶液 B: 37 mL 0.1 mol/L 无水柠檬酸 + 63 mL 0.2 mol/L 磷酸氢二钠 + 0.877 g NaCl + 34 mg EDTA- Na_2 + 0.6 mL 1mg/mL AO 水溶液; 0.067 mol/L, pH7.2 Sorensen's 缓冲液。

1.3 主要仪器

离心机、流式细胞仪、荧光显微镜。

1.4 药物处理

环磷酰胺用生理盐水配制。设置 4 个剂量组: 0、10、20 及 40 mg/kg。注射体积为 0.25 mL/100g 体重。单次腹腔注射。给药后 24 h 后取样。

1.5 骨髓悬液的制备

小鼠骨髓悬液的制备: 断颈处死小鼠, 分离双侧股骨, 用 1 mL 注射器吸取 400 μL 小牛血清将骨髓冲出, 反复吹打过滤制成悬液。大鼠骨髓悬液的制备: 断颈处死大鼠, 分离双侧股骨, 用 1 mL 注射器吸取 400 μL 小牛血清将骨髓冲出, 反复吹打过滤制成悬液。

1.6 细胞固定与染色

取 5 mL 固定液, 一边剧烈振荡, 一边加入 200 μL 细胞悬液, 固定 5 min, 1650 r/min 离心 5 min, 去上清, 细胞沉淀重新混悬于 0.2 mL 0.067 mol/L, pH7.2 Sorensen's 缓冲液中。溶液 A 与溶液 B 在使用前置于冰上暗处, 加入 400 μL 溶液 A 与 1.2 mL 溶液 B, 轻轻混匀, 细胞于冰上暗处染色 30 min。1650 r/min 离心 5 min, 去上清, 细胞沉淀重新混悬于 0.5 mL 0.067 mol/L, pH7.2 Sorensen's 缓冲液中。

1.7 流式细胞仪分析

仪器设置的参数包括: 前置角散射光 (forward angle scatter, FSC), 刻度设置为线性; DNA 荧光 (FL1, 525 nm), 刻度设置为对数。分析速度为大约 1000 个细胞/秒。每个样本检测不少于 200,000 个细胞。采用流式细胞仪分析软件 WinMDI 进行分析。

1.8 人工显微镜检测

同时采用显微镜进行人工镜检。

2 结果

2.1 流式细胞仪检测对小鼠骨髓各细胞群的区分效果

联合使用前置角散射光 (forward angle scatter, FSC) 和 DNA 荧光 (DNA fluorescence, FL1) 作图, 可以明显地区分小鼠骨髓样本中 5 个细胞群的分布区域: 嗜多染红细胞 (polychromatic erythrocytes, PCE) (R1), 含微核的嗜多染红细胞 (micronucleated polychromatic erythrocytes, MNPCE) (R2), 成熟红细胞 (normochromatic erythrocytes, NCE) (R3), 含微

核的成熟红细胞 (micronucleated normochromatic erythrocytes, MNCE) (R4) 和有核细胞 (nucleated cells, NC) (R5) (图 1A ~ D)。图 1 所示,有核细胞和红细胞区分界清楚,嗜多染红细胞和成熟红细胞分界也较为清楚,含微核的红细胞和不含微核的红细胞分界虽有一定形态,但不是特别明显,一方面流式细胞仪的分界本来就带有一定主观性,另一方面也提示我们是否可以改进试验方法,使图形更为明了。

2.2 不同剂量环磷酰胺染毒对小鼠 24 h 后的影响

彩插 8 图 1A ~ D 显示 0, 10, 20 和 40 mg/kg 不同剂量环磷酰胺 (cyclophosphamide, CP) 处理 24 h 后,小鼠骨髓样本各细胞群的分布及流式细胞仪检测的结果。经吖啶橙 (acriding organe, AO) 染色后,细胞形态完好,嗜多染红细胞发出桔红色荧光,所含微核为圆形,发出黄绿色荧光,易于分辨;成熟红细胞无荧光,显示为暗影。可见,在 488 nm 激发光下,AO 荧光和 DNA 结合,发出黄绿色荧光,通过 FL1 通道检测,以 FL1 为纵轴,有核细胞 DNA 含量最多,在最上方,嗜多染红细胞其次,在纵轴的中间,成熟红细胞在最下方;因 CP 毒性作用阻碍了 DNA 合成,导致细胞生长不平衡。而 RNA 的复制不受影响,因此,细胞分裂的延迟导致胞浆成分,尤

其是血红蛋白的生成增加,从而使含微核的细胞较正常细胞略大^[5],前置散射光 FSC 作为横轴,指示了细胞的大小,含微核的细胞较大在横轴的右边,不含微核的细胞其左边。图 1 所示,有核细胞的 DNA 荧光强度最强,其细胞大小跨度也最大,而嗜多染红细胞的 DNA 光强度则介于有核细胞与成熟红细胞之间。镜检结果发现,含有微核的红细胞比正常红细胞要略大些,在二维等高图上位于相应正常红细胞的右侧;与对照组 (彩插 8 图 1A) 相比,经不同浓度 CP 处理后的各试验组 (彩插 8 图 1B ~ D) 中,含微核的嗜多染红细胞以及含微核的成熟红细胞所在区域的细胞密度都有不同程度的增加。

根据分界进行窗口 GATE 设置,利用 WinMDI 软件计算各细胞群的比例,结果如表 1 所示,随着 CP 浓度的增高,含微核的嗜多染红细胞也逐步增多,在 CP 到达 40 mg/kg 的时候,出现了细胞抑制 (PCE/NCE < 1)。经不同剂量 CP 处理 24 h 后,流式细胞仪检测的小鼠骨髓样本 fMNPCE 与 fMNCE 随着处理剂量由 0 mg/kg 增至 40 mg/kg, fMNPCE 平均值由 5.79% 增至 20.19%, 而 fMNCE 平均值则由 2.62% 增至 3.36%。图 2 显示了含微核的嗜多染红细胞随着 CP 浓度增高而增多,一元回归方程显示量效存在的关系 ($R=0.917$)。

表 1 环磷酰胺处理 24 h 后流式细胞仪检测 KM 小鼠的骨髓 fMNPCE 与 fMNCE (%)
Tab.1 The fMNPCE and fMNCE (%) of KM mice bone marrow collected 24h after injection of cyclophosphamide by flow cytometry

环磷酰胺 浓度 CP Concentration (mg/kg)	编号 No	嗜多染 红细胞 PCE	含微核 的嗜多染 红细胞 MNPCE	成熟红 细胞 NCE	含微核的 成熟 红细胞 MNCE	含微核的 嗜多染红细胞/ 嗜多染红细胞 MNPCE/ PCE (%)	嗜多染红 细胞微核率 平均数 Average fMNPCE (%)	含微核的 成熟红细胞/ 成熟红细胞 MNCE/ NCE (%)	成熟红 细胞微核 率平均数 Average fMNCE (%)
0	1	63.50	0.41	36.50	0.09	6.38	5.79 ± 0.84	2.56	2.62 ± 0.72
	2	54.59	0.27	45.41	0.09	4.87		1.95	
	3	56.48	0.37	43.52	0.10	6.61		2.34	
	4	65.33	0.35	34.67	0.13	5.29		3.63	
10	5	52.74	0.54	47.26	0.15	10.18	8.63 ± 2.01	3.19	3.19 ± 1.47
	6	67.86	0.71	32.14	0.10	10.51		3.06	
	7	54.93	0.40	45.07	0.23	7.25		5.05	
	8	74.77	0.49	25.23	0.04	6.57		1.44	
20	9	67.02	1.31	32.98	0.16	19.51	16.57 ± 2.81	4.76	3.15 ± 1.07
	10	51.82	0.71	48.18	0.13	13.61		2.60	
	11	60.65	1.11	39.35	0.10	18.35		2.57	
	12	70.44	1.04	29.56	0.08	14.81		2.66	
40	13	35.45	0.70	64.55	0.16	19.88	20.19 ± 6.03	2.43	3.36 ± 0.86
	14	23.35	0.32	76.65	0.29	13.81		3.74	
	15	39.39	0.74	60.61	0.18	18.75		2.89	
	16	28.25	0.80	71.75	0.31	28.33		4.36	

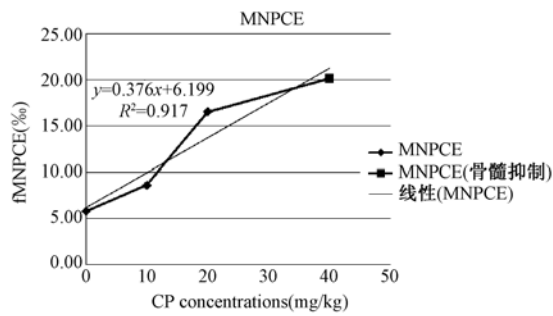


图2 环磷酰胺处理 KM 小鼠 24 h 后 fMNPCE 和环磷酰胺浓度的量效关系

Fig.2 Dose-effect relationship of Cyclophosphamide (CP) concentrations and fMNPCE in KM mice exposed to CP after 24 h

2.3 流式细胞仪检测对大鼠骨髓各细胞群的区分效果

与 2.1 相同,联合使用 FSC 和 FL1 作图,也可以明显地区分大鼠骨髓样本中 5 个细胞群的分布区域:嗜多染红细胞(PCE)(R1),含微核的嗜多染红细胞(MNPCE)(R2),成熟红细胞(NCE)(R3),含微核的成熟红细胞(MNNE)(R4)和有核细胞(NC)(R5)(图 3 A~D)。彩插 9 图 3 所示,有核细胞和红细胞区分界清楚,嗜多染红细胞和成熟红

胞分界也较为清楚,含微核的红细胞和不含微核的红细胞分界虽有一定形态,但不是特别明显。

2.4 不同剂量环磷酰胺染毒对大鼠 24h 后的影响

图 3A~D 显示使用 0~40 mg/kg CP 剂量处理 24 h 后,大鼠骨髓样本各细胞群的分布及流式细胞仪检测的结果。经 AO 染色后,细胞形态完好,嗜多染红细胞发出桔红色荧光,所含微核为圆形,发出黄绿色荧光;成熟红细胞无荧光,显示为暗影。在 488 nm 激发光下,AO 荧光和 DNA 结合,发出黄绿色荧光,通过 FL1 通道检测,以 FL1 为纵轴,有核细胞在最上方,嗜多染红细胞在纵轴的中间,成熟红细胞在最下方;前置散射光 FSC 作为横轴,指示了细胞的大小,含微核的细胞较大在横轴的右边,不含微核的细胞其左边。彩插 9 图 3 所示,有核细胞的 DNA 荧光强度最强,其细胞大小跨度也最大,而嗜多染红细胞的 DNA 光强度则介于有核细胞与成熟红细胞之间。镜检结果发现,含有微核的红细胞比正常红细胞要略大些,在二维等高图上位于相应正常红细胞的右侧;与对照组(图 3A)相比,经 5~40 mg/kg 不同浓度 CP 处理后的各试验组(图 3B~D)中,含微核的嗜多染红细胞以及含微核的成熟红细胞所在区域的细胞密度都有不同程度的增加。

表 2 环磷酰胺处理 24 h 后流式细胞仪检测 SD 大鼠的骨髓 fMNPCE 与 fMNNE(%)
Tab.2 The fMNPCE and fMNNE(%) of SD rat bone marrow collected 24 h after injection of cyclophosphamide by flow cytometry

环磷酰胺 浓度 CP Concentration (mg/kg)	编号 No	嗜多染红 细胞 PCE	含微核 的嗜多染 红细胞 MNPCE	成熟 红细胞 NCE	含微核 的成熟红 细胞 MNNE	含微核的 嗜多染红细胞/ 嗜多染红细胞 MNPCE/ PCE(%)	嗜多染红 细胞微核率 平均数 Average fMNPCE (%)	含微核的 成熟红细胞/ 成熟红细胞 MNNE/ NCE(%)	成熟红 细胞微核率 平均数 Average fMNNE(%)
0	1	68.29	0.03	31.71	0.01	0.44	1.23 ± 0.71	0.32	2.44 ± 2.58
	2	70.81	0.06	29.19	0.01	0.85		0.34	
	3	71.37	0.14	28.63	0.16	1.96		5.59	
	4	65.73	0.11	34.27	0.12	1.67		3.50	
	5	61.56	0.20	38.44	0.06	3.25		1.56	
10	6	56.44	0.20	43.56	0.14	3.54	3.26 ± 0.86	3.21	2.35 ± 0.77
	7	57.15	0.12	42.85	0.08	2.10		1.87	
	8	53.16	0.22	46.84	0.13	4.14		2.78	
	9	90.96	0.51	9.04	0.06	5.61		6.64	
20	10	84.39	0.37	15.61	0.10	4.38	5.07 ± 0.51	6.41	6.83 ± 0.82
	11	67.68	0.35	32.32	0.26	5.17		8.04	
	12	84.00	0.43	16.00	0.10	5.12		6.25	
	13	74.90	0.59	25.10	0.44	7.88		17.53	
40	14	78.79	0.55	21.21	0.23	6.98	7.33 ± 0.43	10.84	10.58 ± 5.37
	15	87.26	0.61	12.74	0.12	6.99		9.42	
	16	53.42	0.40	46.58	0.21	7.49		4.51	

根据分界进行窗口 GATE 设置,利用 WinMDI 软件计算各细胞群的比例,结果如表 2 所示,随着 CP 浓度的增高,含微核的嗜多染红细胞也逐步增多,在 CP 到达 40 mg/kg 的时候,出现了细胞抑制 ($PCE/NCE < 1$)。经不同剂量 CP 处理 24 h 后,流式细胞仪检测的大鼠骨髓样本 fMNPCE 与 fMNNCE 随着处理剂量由 0 mg/kg 增至 40 mg/kg, fMNPCE 平均值由 1.23‰ 增至 7.33‰,而 fMNNCE 平均值则由 2.44‰ 增至 10.58‰。图 4 显示了含微核的嗜多染红细胞随着 CP 浓度增高而增高,明显存在量效关系 ($R = 0.977$)。

图 4 显示了 MNPCE 随着 CP 浓度增高而增多的量效关系,而且一元回归方程显示量效的存在一定的关系,这有待进一步研究。

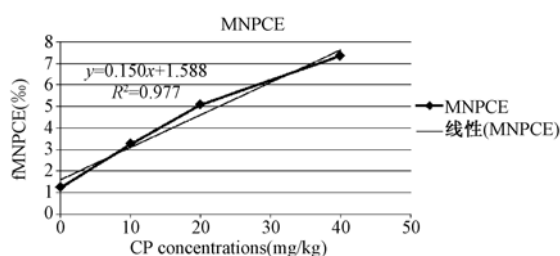


图 4 环磷酰胺 (CP) 染毒 SD 大鼠
24 h 后 fMNPCE 和 CP 浓度的量效关系

Fig. 4 Dose-effect relationship of
Cyclophosphamide (CP) concentrations and
fMNPCE in SD rat exposed to CP after 24 h

3 讨论

Hutter 和 Stohr^[1]利用单激光流式细胞仪成功地检测了小骨髓红细胞微核,但这一方法尚不能区分嗜多染红细胞 (PCE) 和成熟红细胞 (NCE)。Grawe 等^[6]则用噻唑橙染 RNA, Hoechst 33342 染 DNA,成功地用双激光流式仪将去除有核细胞后的小鼠外周血区分为 4 个细胞群:嗜多染红细胞 (PCE),含微核的嗜多染红细胞 (MNPCE),成熟红细胞 (NCE) 以及含微核的成熟红细胞 (MNNCE)。Cao 等^[7-8]随后发展了该技术,使小鼠外周血嗜多染红细胞微核流式仪自动化检测技术达到实用化水平。孙立平等^[3]又进一步建立了吖啶橙 AO 染色结合单激光流式细胞仪的大鼠骨髓嗜多染红细胞微核率自动化检测的方法,由于操作更为简单,应用更为普及,使其较基于双激光流式细胞仪的微核自动化检测方法具有更为广阔的应用前景。

吖啶橙 (AO) 是一种异染性荧光染料,它对 DNA

和 RNA 均有很强亲和力。当 AO 以插入方式与双链核酸结合后,经 488 nm 激发,530 nm 处发黄绿色荧光,指示 DNA;当与单链核酸结合后,640 nm 处发橘红色荧光,指示 RNA。应用乙二胺四乙酸 (EDTA) 能选择性变性 RNA,从而保证双链 RNA 不会干扰 DNA。酸性条件能够促进核蛋白从 DNA 解离,从而使 AO 更加容易与 DNA 结合,进一步提升 AO 染 DNA 的能力^[9-10]。理论上,可利用 FL1 (黄绿色荧光,指示 DNA) 或者 FL4 (红色荧光,指示 RNA) 区分嗜多染红细胞 (PCE) 与成熟红细胞 (NCE),然而,本实验中发现,FL4 根本不能区分 PCE 与 NCE,而用 FL1 则能很好地对其区分,但 FL1 不能区分含微核的细胞和不含微核的细胞,如果利用 FL1 并结合 FSC (指示细胞大小),则能区分 PCE、含微核的嗜多染红细胞 (MNPCE)、NCE、含微核的成熟红细胞 (MNNCE) 以及有核细胞 (nucleated cell)。我们认为,可能因为 PCE 含有较多的残留细胞器—核糖体及线粒体,而 RNA 含量极少,所以利用 FL4 反而不能区分 PCE 和 NCE,而利用 FL1 则更为合适区分 PCE 和 NCE,同时,也正因为线粒体 DNA 干扰了 FL1 对含微核的细胞与不含微核的细胞的区分。

环磷酰胺 (CP) 是经典染色体断裂剂,在微核实验中经常被用作阳性对照试剂。在本实验中,无论是 CP 诱导的小鼠骨髓 fMNPCE 还是大鼠骨髓 fMNPCE 都呈现良好的剂量-效应关系,其中 CP 诱导小鼠骨髓 MNPCE 在高浓度组 (40 mg/kg) 出现了骨髓抑制 ($PCE/NCE < 1$)。正常情况下,红血球的有丝分裂是一个同步化过程,从骨髓有规律地释放大小均一的红细胞进入外周血。微核,在血液学中又被称为 Howell-Jolly 小体,常见于巨幼细胞贫血^[11]。可见,一般含有微核的红细胞体积都较正常细胞大,这是因为 CP 毒性作用阻碍了 DNA 合成,导致细胞生长不平衡。由于 RNA 的复制不受影响,因此,细胞分裂的延迟导致胞浆成分,尤其是血红蛋白的生成增加。从而使含微核的细胞较正常细胞略大^[5]。本实验正是利用这个特点,采用前置散射光 FSC 为横坐标,标示细胞的大小,以区分含微核和不含微核的红细胞,这同时要求我们寻找良好的细胞固定方法,以保证红细胞的形态稳定。长期以来,应用流式细胞仪检测微核往往包括较长时间的细胞固定,导致细胞发生萎缩,以至细胞间大小的这种细微改变不能被检出。本文参考了胡冰冰

的实验研究^[12], 确定固定细胞的优化条件为: 戊二醛 pH4.0 ~ 5.0; 缓冲液为 0.06 mol/L, pH7.2 的索伦森缓冲液, 并加入 30 ug/mL SDS 以防止红细胞聚集成团。该实验仅对细胞进行 5 min 固定, 固定后的细胞形态非常规则, 有利于流式细胞仪检出细胞间在大小上的细微区别。

关于利用流式细胞仪自动化检测外周血红细胞 MNPCE 的方法, Dertinger^[13] 提出利用 CD71-FITC 标记 PCE 的方法, 并称此方法简单可信。他们采用 -70℃ 至 -90℃ 的甲醇固定红细胞, 再用重碳酸盐缓冲液冲洗, 细胞可以在 4℃ 环境中保存至少 1 个星期。在染色上, 因为 PCE 细胞膜表面上都有 CD71 受体(转铁蛋白), 他们采用 CD71-FITC 标记 PCE, 再经核糖核酸酶处理细胞, 消化 RNA 后, 加入 PI 荧光试剂, 标记微核, 利用单激光流式细胞仪在 488 nm 激发光, 2500 个细胞/秒速度检测, 很清楚将红细胞区分为 PCE, MNPCE, NCE 和 MNNCE 4 个群。他们同时利用 AO 荧光染色, 在显微镜下进行手工计数以作比较, 发现两种方法数值相近, 统计学上没有显著差异, 流式细胞仪因为可以计数整个样本的细胞数, 结果更为灵敏, 而且重复试验比较, 流式细胞仪自动化方法比手工计数方法变异性更小。

骨髓细胞相对于外周血细胞有其特殊性, 骨髓悬浮液含有数量更大的有核细胞和相当量的细胞碎片, 这些都会干扰 MN 的正确计数, 传统的方法是利用 Percoll 离心或者纤维素柱分馏除去有核细胞、凋亡细胞或者细胞碎片^[14-16], 即使这样, 运用流式细胞仪自动化检测 MNPCE 还需加入更多条件来补偿实验方法的缺陷才得以更加准确计数 MNPCE^[15]。Dertinger^[17] 使用和检测小鼠外周血同样的方法对小鼠骨髓细胞进行检测分析, 验证此方法是否能够同样简单有效地分析小鼠骨髓 MNPCE。他们对实验进行了 2 处略微地调整: 1) 延长 RNase 处理细胞时间, 2) 增加 PI 的浓度。结果表明, 实验能很好地将红细胞分开 PCE, MNPCE, NCE, MNNCE 4 个群, 和 AO 染色的手工计数比较, 具有很高的直线相关性 ($r = 0.954$), 他们得出流式细胞仪自动化检测 MNPCE 起码具有 3 个方面的优势: 1) 处理样本比较容易, 不需要特殊纯化过程, 2) 分析效率高, 可以达到 8000 cells/s, 1 个样本, 流式细胞仪只需数小时分析, 而手工方法需要 1 天时间, 3) 提高灵敏度, 每个样本可计数成千上万个 PCE, 而不是手工方法只计数 1000 ~ 2000 个 PCE。

Dertinger^[18] 并利用单激光流式细胞仪成功检测了人外周血的 MNPCE。

Criswell^[5] 利用更简单的吖啶橙(AO)荧光染色, 单激光流式细胞仪成功检测了大鼠骨髓的 MNPCE。AO 是一种异染性荧光染料, 它对 DNA 和 RNA 均有很强的亲和力。当 AO 以插入方式与双链核酸结合后, 经 488 nm 激发, 530 nm 处发黄绿色荧光, 指示 DNA; 当与单链核酸结合后, 640nm 处发橘红色荧光, 指示 RNA。环磷酰胺(CP)是经典染色体断裂剂, CP 毒性作用阻碍了 DNA 合成, 导致细胞生长不平衡。由于 RNA 的复制不受影响, 因此, 细胞分裂的延迟导致胞浆成分, 尤其是血红蛋白的生成增加。从而使含微核的细胞较正常细胞略大。实验采用了加入 SDS 和戊二醛的索伦式缓冲液固定细胞, 固定时间仅 5 min, 而且保全了红细胞的完整形态, 固定后的细胞经 AO 染色后, 单激光流式细胞仪的 FL1 通道(绿光, 指示 DNA)区分 PCE 和 NCE, 利用 FSC(指示细胞大小)区分含微核和不含微核的红细胞, 成功检测了大鼠骨髓的 MNPCE, 结果和赖特吉姆萨染色手工计数相比, 线性关系良好, 没有统计学上的差别。另外, 他们同时还检测了脾脏血的 MNPCE 发现, 尽管用本实验的方法检测大鼠脾脏血的 MNPCE 有良好的量效和关系, 但是 MNPCE 的本底数较手工计数要明显增高, 建议还是采用骨髓检测。

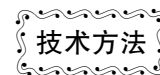
为了能快速而简单初筛化合物诱导微核的作用, 本实验采用了 AO 染色的单激光流式细胞仪方法检测微核, 实验证明, 此方法速度较快, 仅用一种染料染色, 不需要任何抗体标记, 细胞固定时间 5 min 即可; 实验灵敏度高, 用很简单的单激光流式细胞仪对整个样本进行细胞技术。但是, 实验也存在不稳定性, 部分个体的 MNPCE 变化较大, 甚至导致实验组的标准差很高, 这一方面说明体内实验的变异性较大, 更能反应个体差异, 另外也提示应用流式细胞仪界定细胞群的阈值是带有一定主观性, 细胞群分界不一定十分明显。这也提示我们实验方法还存在一定的缺陷, 从其他学者的实验来分析, 是否应该使用虐原虫感染的红细胞做标准^[19], 是否在固定液和染色方法上能进一步改善以使结果更为稳定。总之, 通过本实验可为进一步研究快速自动化检测化合物诱导微核作用的研究提供参考。

参考文献:

- [1] Hutter KJ, Stohr M. Rapid detection of mutagen induced

- micronucleated erythrocytes by flow cytometry [J]. *Histochemistry*, 1982, 75:353-362.
- [2] Abramsson-Zetterberg L, Zetterberg G, Bergqvist M, *et al.* Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferrin-positive immature peripheral blood reticulocytes [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2000; 36 (1): 22-31.
- [3] 孙立平, 李德志, 刘志谋, 等. 人外周血网织红细胞的流式细胞仪自动化检测 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2004, 16 (3): 159-162.
- [4] 贺争鸣, 李冠民, 邢瑞昌. 3R 理论的形成、发展及在生命科学中的应用 [J]. *实验动物科学与管理*, 2000, 17 (3): 43-47.
- [5] Criswell KA, Krishna G, Zielinski D, *et al.* Use of acridine orange in: flow cytometric assessment of micronuclei induction [J]. *Mutat Res*, 1998, 414:63-75.
- [6] Grawe J, Zetterberg G, Amneus H, *et al.* Flow_cytometric enumeration of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood [J]. *Cytometry*, 1992, 13:750-758.
- [7] Cao J, Beisker W, Nusse M, *et al.* Flow cytometric detection of micronuclei induced by chemicals in poly_and normochromatic erythrocytes of mouse peripheral blood [J]. *Mutagenesis*, 1993, 8:533-541.
- [8] 曹佳, Nusse M, Beisker W, 等. 流式细胞术对小鼠外周血红细胞微核自动化检测的研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 1994, 6 (6):11-17.
- [9] Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, *et al.* Conformation of RNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorometry [J]. *Exp Cell Res*, 1975, 95 (1):143-153.
- [10] Darzynkiewicz Z, Traganos F, Sharpless T, *et al.* Lymphocyte stimulation, a rapid multiparameter analysis [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1976, 73 (8): 2881-2884.
- [11] Hoagland HC, Gastineau DA. Hematologic complications of cancer chemotherapy [D], in: M. C. Perry (Ed.), *The Chemotherapy Source Book*. Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 1992, pp. 559-569.
- [12] 胡冰冰, 杨录军, 周燕虹, 等. 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核单激光流式细胞仪自动化检测 [J]. *癌变·畸变·突变*, 2006, 18 (1):19-22.
- [13] Dertinger SD, Dorothea K Torous, Kenneth Tometsko R. Simple and reliable enumeration of micronucleated reticulocytes with a single-laser flow cytometer [J]. *Mutat Res*, 1996, 371: 283-292.
- [14] Romagna F, Staniforth CD. The automated bone marrow micronucleus test [J]. *Mutation Res*, 1989, 213: 91-104.
- [15] Grawe J, Zetterberg G, Amneus H. Effects of extended low-dose-rate exposure to 137Cs detected by flowcytometric enumeration of micronucleated erythrocytes in mouse peripheral blood [J]. *Int J Radiat Biol*, 1993, 63:339-347.
- [16] Krishna GD, Urda BG, McKeel M, *et al.* Comparative micronucleus quantitation in pre- and post-column fractionated mouse bone marrow by manual and flow methods [J]. *Mutation Res*, 1993, 302: 119-127.
- [17] Dertinger SD, Dorothea K, Torous NE, *et al.* Flow cytometric analysis of micronucleated reticulocytes in mouse bone marrow [J]. *Mutat Res*, 1997, 390: 257-262.
- [18] Dertinger SD, Dorothea K Torous, Nikki E Hall, *et al.* Enumeration of micronucleated CD71-positive human reticulocytes with a single-laser flow cytometer [J]. *Mutat Res*, 2002, 515: 3-14.
- [19] Tometsko A, Torous D, Dertinger S. Analysis of micronucleated cells by flow cytometry: 1. Achieving high resolution with a malaria model [J]. *Mutat Res*, 1993, 292:129-135.

[修回日期]2015-03-02



新型封堵器应用于小型猪房间隔缺损的修复实验

曹 苹¹, 李安宁², 张德元², 刘香东², 施小立², 徐名衬³, 顾为望^{3,4}

(1. 深圳市医疗器械检测中心, 广东 深圳 518057; 2. 先健科技(深圳)有限公司, 广东 深圳 518057;
3. 南方医科大学比较医学研究所, 广州 510515; 4. 东莞松山湖明珠实验动物科技有限公司, 广东 东莞 523808)

【摘要】 目的 在猪房间隔缺损动物模型上评价改良的封堵器有效性、安全性和相容性。**方法** 选用西藏小型猪 5 头, 利用房间隔穿刺结合囊扩张的方法建立房间隔缺损 (atrial septal defect, ASD) 猪, 用改良的封堵器进行房间隔封堵术, 术后进行超声心动图、大体解剖、电镜扫描和光镜观察。**结果** 5 只猪均成功建立了 ASD 模型并进行封堵术成功, 超声心动图观察显示封堵器良好, 位置固定, 心腔和心肺功能正常。3 个月后封堵器与房间隔组织紧密嵌合, 表面覆盖一层较厚的光滑的白色组织, 电镜下观察到大量心肌纤维, 未发现内皮细胞。**结论** 改良的 ASD 封堵器操作简便、安全性好, 具有良好的生物相容性。

【关键词】 房间隔缺损; 小型猪; 封堵器

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0060-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.11

A new type occluder applied in atrial septal defect of mini-pigs

CAO Ping¹, LI An-ning¹, ZHANG De-yuan², LIU Xiang-dong², SHI Xiao-li, XU Ming-chen³, GU Wei-wang^{3,4}

(1. Shenzhen Testing Center of Medical Devices, Guangdong Shenzhen 518057, China; 2. LifeTech Scientific (Shenzhen) Co., LTD, Guangdong Shenzhen 518057, China; 3. Laboratory Animal Center and Institute of Comparative Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China; 4. Songshan Lake Pearl Laboratory Animal Sci. & Tech. Co., Ltd., Guangdong Dongguan 523808, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the efficacy, safety and compatibility of a new type of atrial septal defect (ASD) occluder in atrial septal defect mini-pigs model. **Methods** Five Tibet mini-pigs were selected as the ASD models which were established by the combination of atrial septal puncture and balloon dilation. Then the new type occluder was implanted for the therapy of ASD. Transthoracic echocardiography with color Doppler was used in all animals during closure and in follow up examinations. The animals were killed at 3 months after occlusion for electron microscopical observation and microscopic examination. **Result** The ASD models had been created in five piglets successfully without complication, all of whom were implanted successfully with the new device without shunts. Postmortem and microscopic examination of the 5 specimens 3 months after placement showed complete. **Conclusion** Transcatheter ASD occlusion with new type ASD occluder is safe, feasible and effective. This occlusion can repair the atrial septal defect successfully.

【Key words】 Atrial septal defect; Piglets; Occlude

【基金项目】 国家重点基础研究发展计划(2011CBA01006); 国家国际合作专项(2011DFA33290); 广东省科技厅科技基础条件建设项目(2010B060500001); 广东省科技计划项目(2012B011000004)。

【作者简介】 曹苹(1964-), 女, 大学, 主任药师, 研究方向: 介入医疗器械安全性评价动物实验, E-mail: szjczxcp@163.com。

【通讯作者】 顾为望(1956-), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 实验动物学, E-mail: guww100@163.com。

自从 1976 年 King 和 Mills^[1]等首次经导管用双伞型装置关闭房间隔缺损(ASD)成功以来,人们一直对房间隔缺损封堵器进行有关改良研究,以求使这一技术能在更大范围内安全关闭单纯继发孔型 ASD。1997 年 Amplatzer 发明了双盘状的镍钛合金封堵器,自此以后房间隔的介入治疗才得以真正进入临床。目前国内许多厂家对 Amplatzer 封堵器进行了改良并极大地促进了 ASD 介入治疗在我国的发展^[2]。

本研究通过国产陶瓷镀膜房间隔缺损封堵器的基础上,对 ASD 封堵器的连接装置进行改良(图 1),通过外科手术创建 ASD 动物模型对改良后的封堵器进行有效性、安全性和相容性的初步评价,为该封堵器最终用于临床提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:体重 15 ~ 20 kg 的西藏小型猪 5 只,雄性 3 只,雌性 2 只,由南方医科大学实验动物中心提供【SCXK(粤)2011-0015】【SYXK(粤)2011-0074】。

1.1.2 实验仪器:新型封堵器及输送装置、Philips 大 C 臂心导管机、Hp5500 彩色多普勒超声心动图仪、HITACHI S-3000N 扫描电镜、新型陶瓷镀膜 ASD 封堵器及输送系统。

1.2 方法

1.2.1 ASD 动物模型的建立:应用房隔穿刺和球囊房造口术建立房间隔缺损的动物模型^[3-5]。取体重 15 ~ 20 kg 的小型猪 5 只,用氯胺酮 5 ~ 10 mg/kg,咪唑安定 2 ~ 3 mg/kg,肌肉注射麻醉,异丙酚静脉注射维持。取猪的耳廓背面外缘静脉留置管穿刺后点滴输液。用专用木架将小型猪固定在心导管操作台上,接心电监护,常规消毒铺巾,穿刺右股静脉,成功后送入 6F 静脉鞘,肝素化(100 u/kg)。行常规右心导管术,将端孔导管经静脉鞘管送入,导管探查有无卵圆孔未闭。随后行房间隔穿刺术,如未探到未闭的卵圆孔,则行房隔穿刺术。将导引钢丝及端孔导管送至上腔静脉,并沿导引钢丝插入房间隔套管至上腔静脉下部,撤出导引钢丝,插入房间隔穿刺针(图 2)。X 线右前斜 75°透视下,转动穿刺针套管及穿刺针,使其弯曲的尖端朝向上腔静脉左侧缘,缓慢下拉,直至穿刺针前端出现“弹跳动作”,将穿刺点定位于“弹跳动作”的下方,轻轻旋转

穿刺针及套管,顶住卵圆窝,迅速推进穿刺针,将造影剂沿穿刺针注入,左房显影即为穿刺成功的标志。将套管送入左房(图 3)。撤出穿刺针,将交换导丝沿穿刺套管送入左房及左上肺静脉,拔出套管。沿交换导丝送入 10 mm 球囊至左房,来回拉送球囊,扩张房间隔穿刺孔,制备人工房间隔动物模型(图 4)。超声心动图检查,了解房间隔缺损大小等。



图 1 改良的 ASD 封堵器
Fig.1 A new type of ASD Occluder

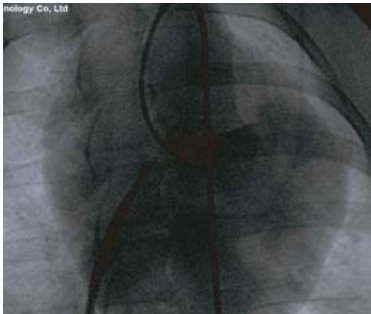


图 2 房间隔穿刺
Fig.2 Atrial septal puncture

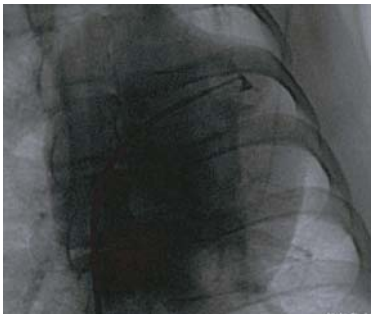


图 3 导管从右房经卵圆孔至左房
Fig.3 The catheter through the foramen ovale from the right atrium to the left atrium

1.2.2 房间隔封堵术:选择腰部直径比房间隔缺损大 2 ~ 3 mm 的新型陶瓷镀膜 ASD 封堵器关闭人造房间隔缺损^[6](图 5 和图 6)。

表 1 ASD 模型及封堵器植入情况
Tab.1 The situation of ASD models and ASD Occluder

编号	ASD/PFO 大小(mm)	ASD 封堵器型号
1	6	8
2	5	8
3	7	10
4	6	8
5	5	8



图 4 鞘管送入左房后造影

Fig. 4 The radiography situation of sheath in left atrial

1.2.3 术后处理过程:术后第 1 天应用头孢唑林钠,术后应用阿司匹林。术后小型猪单笼饲养饲养。饲养 3 个月。观察小型猪的生长发育,应用彩色多普勒超声心动图仪进行经胸超声探查。观察关闭器的位置和猪的心腔大小和心功能。术后 3 个月将实验猪处死,取出心脏观察,并将房间隔封堵器取出,缓冲液冲洗后,放入固定液中保存备用。电镜扫描:应用临界点干燥法对样本进行干燥和脱水处理。将样本装台粘胶,要求粘贴牢固平整。用离子镀膜仪,在高真空状态下,白金喷镀 5~10 min,应用日立型扫描电镜抽气 30 min,然后开始镜下观察和拍照。

2 结果

有一只猪有卵圆孔未闭,未行房间隔穿刺,其他四只小型猪均穿刺成功;五只小型猪成功制备成了 ASD 模型并封堵成功。

新型封堵器封住房间隔缺损后,输送装置与封堵器的松脱均顺利。封堵过程中,无心率变慢、气体栓塞等并发症发生。随访过程中,经导管介入法关闭人造房间隔缺损的 5 只猪,生长发育正常。超声心动图观察发现关闭器位置固定(彩插 10 图 7),猪心腔大小和心肺功能正常。

封堵器置入 3 个月后,封堵器周边与房间隔组织紧密镶嵌,封堵器表面一层较厚的表面光滑的白色组织(彩插 10 图 8)。电镜下封堵器上已爬满大量心肌纤维,未观察到内皮细胞

3 讨论

陶瓷镀膜封堵器是在原镍钛合金房间隔缺损封堵器表面包裹一层陶瓷膜(氮化钛 TiN),这种陶瓷膜能提高封堵器的耐腐蚀性和生物组织和血液相容性。相关研究显示,由于氮化钛(TiN)是生物相

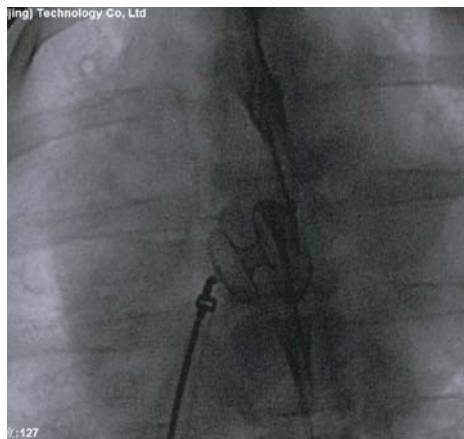


图 5 封堵器封住人造 ASD

Fig. 5 The situation of occlusion for plugging atrial septal defect

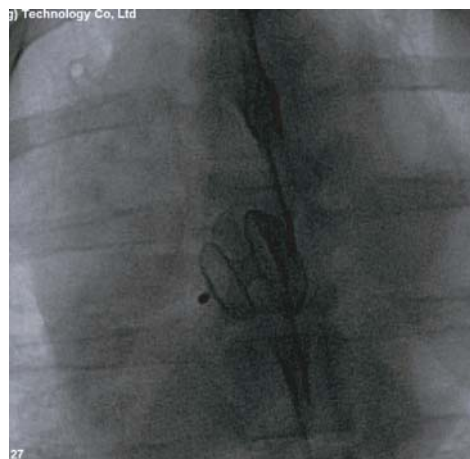


图 6 封堵器完全释放

Fig. 6 Occluder released completely

容性较好的材料,其血栓源性要远低于镍钛本身。既往研究表明:Cera 陶瓷膜封堵器促进细胞爬覆生长性能要远优于普通镍钛封堵器,从而在提高使先心病缺损的修复的同时,显著降低了血栓的风险;Cera 陶瓷膜封堵器的血小板黏附及溶血率要远低于普通镍钛封堵器。

与其他学者选用狗、羊或家猪进行实验研究比较,本研究选用的西藏小型猪抗逆性强,手术耐受性好,不易感染;小型猪房间隔的弹性和牵拉性都很强,比狗或羊更接近人的组织结构。用小型猪做房间隔缺损动物模型切实可行,本实验所用小型猪体重在 15~20 kg 之间,体重接近 2~3 岁小儿病例,股静脉可以容纳 10F 的输送长鞘管,是制备房间隔缺损封堵模型的理想动物。

在动物实验的过程中,最为关键的步骤之一是正确掌握房隔穿刺术。穿刺时定位一定要准确,正

位时穿刺针指向左上方,侧位时指向右上方。如果不正确或操作鲁莽,易造成心脏穿孔引起心包填塞、心律失常等。新型房间隔封堵器及其输送系统操作方便,手术过程顺利,5 例动物实验房间隔缺损封堵器均一次到位,均一次释放成功,封堵器与输送装置松脱简便。动物实验过程中未出现气栓、心动过缓、心包填塞等并发症。封堵器 3 月后大体解剖见表面基本已被组织覆盖。光镜下见封堵器表面有纤维细胞增生。电镜观察见封堵器表面布满致密的纤维组织。初步研究结果证实,该新型房间隔缺损封堵器操作简便,封堵后 3 个月封堵器表面可见纤维组织几乎完全覆盖整个封堵器伞面,改良的 ASD 封堵器操作简便、安全性好,具有良好的生物相容性。

参考文献:

[1] King TD, Mills NL. Nonoperative closure of atrial septal defects

[J]. Surgery, 1974, 75: 383 - 388.

[2] Latson LA. Percatheter ASD closure [J]. Pediatric cardiology, 1998, 19:86 - 93.

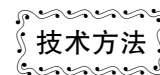
[3] Ruiz CE, AllenJW, Lau FYK. Percutaneous double balloon valvotomy for severe rheumatic mitral stenosis [J]. Am J Cardiol, 1990, 65 (2) : 473 - 477.

[4] 周爱卿. 心导管术先天性心脏病诊断与治疗 [M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1997 : 507 - 560.

[5] 陈名武,李奋,高伟,等. 房隔穿刺和球囊房隔造口术建立房间隔缺损动物模型 [J]. 临床儿科杂志, 2002, 20 (2) : 101 - 102.

[6] 谢育梅,曾国洪,张智伟,等. 国产房间隔缺损封堵器的实验研究 [J]. 中国介入心脏病学杂志, 2004, 12 (2) : 103 - 106

[修回日期] 2015-03-03



一种高效转染西藏小型猪胚胎成纤维细胞的方法

刘 薇, 陈 燕, 岳 敏, 袁 进, 邱添武, 肖 东, 顾为望

(南方医科大学比较医学研究所实验动物中心, 广州 510515)

【摘要】 目的 应用 Nucleofector II 核转染仪将外源基因 EGFP 导入西藏小型猪胚胎成纤维细胞 (PEFs), 并与脂质体转染的方法进行比较, 寻求一种高效转染猪胚胎成纤维细胞的方法。**方法** 使用 Lonza 公司的 Nucleofector II 核转染仪, 参考已报道的转染程序与相应的转染试剂, 将绿色荧光蛋白 (GFP) 基因导入西藏小型猪 PEFs, 并与脂质体转染的方法进行对比研究, 比较两种方法的转染效率。**结果** 转染 5 h 后, 核转染仪组镜下即可见绿色荧光, 转染效率高达 80%, 远远高于脂质体转染的方法。**结论** 用 Nucleofector II 核转染仪能实现西藏小型猪 PEFs 的高效转染, 为高效制备转基因克隆西藏小型猪提供了可靠的方法。

【关键词】 西藏小型猪; 胚胎成纤维细胞; 转染; 核转染; 脂质体转染

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0064-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.12

An efficient method which can be used to transfect Tibetan minipig embryonic fibroblasts

LIU Wei, CHEN Yan, YUE Min, YUAN Jin, QIU Tian-wu, XIAO Dong, GU Wei-wang

(Institute of Comparative Medicine & Laboratory Animal Center, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

【Abstract】 Objective To transfect EGFP gene to porcine embryonic fibroblasts (PEFs) of Tibetan miniature pigs by Lonza Nucleofector II machine and compare the transfection efficiency between this method and the lipofection method. **Method** A plasmid carrying green fluorescent protein (GFP) was transfected into PEFs of Tibetan miniature pigs via the Lonza Nucleofector II machine (program U020) and by Lipofectamine 2000. **Results** 5 hours after nucleofection, green fluorescence was observed, indicating 80% transfecting efficiency in the nucleofection group, which is significantly higher than the lipofection group. **Conclusion** Nucleofector II machine can efficiently transfect PEFs, provides a reliable method for efficiently generate transgenic Tibetan minipigs.

【Key words】 Tibetan miniature pigs; Embryonic fibroblasts; Transfection; Nucleofection; Lipofection

小型猪因其体型大小、解剖结构、代谢特点、生理生化等方面与人有较大的相似性, 近年来越来越广泛地被用于生物医学研究, 而各种转基因猪更大扩展了小型猪在生物医学研究中的应用范围。

西藏小型猪是本单位 2004 年由西藏自治区引种至广州培育而成的实验小型猪品种, 近年来, 应用其建立了数种转基因动物模型^[1-2]。

制备转基因克隆猪常用的猪胚胎成纤维细胞

【基金项目】 国家“973”项目(2011CBA01006); 国家自然科学基金项目(31271042); 国家科技部国际合作项目(2011DFA33290); 广东省科技计划项目(2013B060300013); 广东省科技基础条件建设项目(2012B061700099); 广东省科技计划项目(2012B011000004)。

【作者简介】 刘薇, 女, 博士生, 研究方向: 基于小型猪研发人类疾病动物模型。

【通讯作者】 肖东, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 干细胞与发育生物学及人类疾病动物模型研发, E-mail: Xiao_d@hotmail.com; 顾为望, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物学与比较医学, E-mail: Guwwl00@163.com。

(porcine embryonic fibroblasts, PEFs) 是取自猪 35 日龄胚胎的原代成纤维细胞, 将外源基因导入 PEFs 是制备转基因克隆猪的第一步^[3]。目前常用的将外源基因导入 PEFs 的方法有脂质体转染法与慢病毒介导的方法。但是脂质体法转染 PEFs 的转染效率很低, 通过较长时间的药物筛选才能获得少量的稳定表达转基因的细胞用于后期的核移植; 而慢病毒法能解决转染效率低的问题, 但是慢病毒生产存在一定的技术难度且操作较直接的质粒转染要复杂, 而且对于片段较大的质粒, 慢病毒感染的效率会下降。

Nucleofection 核转染技术是一种可以针对不同细胞类型, 选择最佳的转染程序与转染试剂的电转染技术, 利用这种方法可以高效转染难转染的细胞系和原代细胞(如神经元、免疫细胞、干细胞等)^[4], 且转染效率较高, 因其操作便利性与较高的转染效率, 目前已经有一些实验室将此技术应用到转基因克隆猪制备的上游工作(将目的基因转入 PEFs)。本实验室参照已报道的实验条件, 将此技术用于转染西藏小型猪 PEFs, 并比较其与传统脂质体转染方法在转染效率上的差别。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 核转染用试剂与仪器

核转染试剂: Human Dermal Fibroblasts Nucleofector Kit (VPD-1001) (包含 pmaxGFP 质粒) (德国 Lonza 公司); Nucleofector II 核转染仪(德国 Lonza 公司)。

1.1.2 主要试剂

胎牛血清、高糖 DMEM、非必需氨基酸、L-谷氨酰胺购自 Hyclone 公司、LipofectamineTM 2000、Opti-MEM、青霉素-链霉素溶液、胰蛋白酶和 DMSO 等购自 Invitrogen 公司, 培养瓶及培养板等购自 Corning 公司。其余试剂为国产或进口化学纯或分析纯。

1.2 方法

1.2.1 借助 Nucleofector 核转染仪将 pmaxGFP 质粒转染入 PEFs

实验采用本实验室冻存的西藏小型猪 PEFs, 将冷冻保存的细胞复苏后传代 2 次, 胰酶消化收集细胞, 并计数, 用 VPI-1001 试剂盒中的核转染液重悬细胞 (Basic Nucleofector Solution + Supplement 4.5: 1), 按 10^6 细胞加 5 μ g 的量加入 pmaxGFP 质粒, 将

混合液加入电转杯, 使用 U020 程序进行电转染, 完成电转染后, 尽快用吸管向电转杯中加入 500 μ L 预热的培养基, 用吸管将细胞混合液转移到含足量预热培养液的培养瓶中, 放入 CO₂ 培养箱培养一段时间后, 观察细胞的绿色荧光蛋白 (GFP) 表达情况。

1.2.2 借助脂质体将 pmaxGFP 质粒转染入 PEFs

同期培养的 PEFs, 按照 Invitrogen 推荐的实验方法, 按每六孔板一个孔加 2.1 μ g 质粒, 5.4 μ L 脂质体的量进行转染。

2 结果

核转染 5 h 后, 倒置荧光显微镜下可见 GFP 表达, 转染效率在 80% 以上, 转染 3 d 后可见绿色荧光强度明显升高, 转染效率也保持在 80% 以上(彩插 11 图 1), 细胞生长迅速, 活力良好。经过传代培养, 发现转染 6 d 后, GFP 阳性的细胞明显减少 (50% 以下), 伴随荧光亮度减弱。转染 11 d 与 21 d 后, GFP 阳性的细胞进一步减少, 但直到第 21 天, 可以看到 P5 代细胞仍有少量细胞表达绿色荧光(彩插 11 图 1)。说明通过核转染可以获得少量稳定整合外源基因的细胞; 而用脂质体转染的 PEFs, 在 12 h 才可看到 GFP 表达, 且转染效率很低(彩插 11 图 2), 在传代培养至第 7 天时, 已经不可见绿色荧光。使用本实验中的核转染方法转染 PEFs, 所获得的转染效率明显高于脂质体法。

3 讨论

脂质体法只能介导外源基因的瞬时表达, 仅有非常少量的细胞稳定整合了外源基因, 需要通过新霉素 (NEO)、潮霉素 (HYG) 等抗性基因来筛选稳定整合的细胞, 而对于 PEFs 这种原代细胞来说, 本身脂质体转染的效率就很低 (10% 以下), 再加上长达一周的抗生素筛选, 使细胞活力大大下降, 用这种方法筛选稳定整合目的基因的细胞株耗时很长, 且获得转基因细胞的成功率低。

Lonza 公司研发的核转染技术是一种非病毒介导的新型转染技术, 该技术在传统电穿孔技术的基础上进行改良, 设计出包含针对不同类型细胞的优化转染程序和细胞特异性核转染试剂。核转染法就是采用对特定类型细胞配套的核转染试剂和转染程序, 直接把外源基因导入细胞核中, 以达到最佳转染效率。与脂质体法相比, Nucleofection 核转染的方法可以将质粒 DNA 直接转入细胞核内, 从而

大大增加了质粒 DNA 整合到宿主基因组的几率,因此能大大提高稳定整合的效率。

Nucleofector 核转染仪需要针对不同细胞制定最佳的转染试剂和转染程序,从生产厂家 Lonza 的网站上可以查到不断更新的用户更新的数据,包含近 1000 种细胞的转染试剂、转染程序、优化实验方法、转染效率、细胞活性等信息。但是对于 PEFs 我们在其网站没有查到相关信息。而国内崔茂盛^[5]、李松^[6]等分别对羊和牛的胚胎成纤维细胞进行了核转染,他们通过筛选多种转染程序发现针对羊胚胎成纤维细胞的最佳转染程序是 T016,获得的转染效率为 86%;针对牛胚胎成纤维细胞的最佳转染程序是 V013,获得的转染效率为 96%。国外 Maurisse 等^[7]发现,针对 PEFs 的最优转染程序为 U020(猪种未提及),获得的转染效率是 90%,他们使用的转染试剂是 Human Dermal Fibroblasts Nucleofector Kit (VPD-1001)。Nakayama 等^[8]转染 Clawn 小型猪 PEFs 时对推荐的 10 个转染程序进行筛选得出最优程序 U023,获得了 79% 的转染效率,使用的转染试剂是 Basic Primary Fibroblasts Nucleofector Kit (VPI-1002)。本实验我们采用 Maurisse 的经验,使用 VPD-1001 转染试剂和 U020 程序,参考成纤维细胞的推荐实验方法对西藏小型猪 PEFs 进行核转染。

利用 Nucleofection 核转染技术转染西藏小型猪 PEFs 后,目的基因 GFP 能在 PEFs 中表达,获得了较高的转染效率,转染效率明显高于脂质体法转染 PEFs,且传代 21 d 后,仍有部分细胞表达 GFP,说明通过 Nucleofection 核转染能获得一定比例的稳定整合外源基因的细胞,预示可以通过此方法,再进行抗性筛选,获得稳定整合目的基因的细胞株,进而为制备转基因克隆猪提供核供体。

Nucleofection 核转染技术操作简单,转染时无需更换无血清培养基,细胞在进行转染 5 h 后即可看到荧光表达;而脂质体转染法,转染时需要更换无

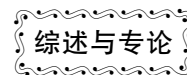
血清培养基,转染后 4 ~ 8 h 需要换液,以去除其对细胞的毒性,且一般于 12 h 后才能看到荧光表达,可见,用核转染的方法,能大大减少实验操作,缩短实验周期,适合高通量的细胞转染实验。

综上所述,Nucleofection 核转染的方法具有很多脂质体法不可比拟的优点,是一种高效转染猪 PEFs 的方法,值得推广应用。

参考文献:

- [1] Deng W, Yang D, Zhao B, *et al.* Use of the 2A peptide for generation of multi-transgenic pigs through a single round of nuclear transfer[J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19986.
- [2] Yang D, Wang CE, Zhao B, *et al.* Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(20): 3983 - 3994.
- [3] 刘薇,贾俊双,唐华,等. 慢病毒载体法制备遗传工程猴和小型猪的现状及应用前景展望[J]. *中国实验动物学报*, 2012, 05: 84 - 89.
- [4] Martinet W, Schrijvers D, Kockx M. Nucleofection as an efficient nonviral transfection method for human monocyte cells[J]. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(13): 1025 - 1029.
- [5] 崔茂盛,冯冲,张金龙,等. 不同体细胞类型和基因转染方式对绵羊克隆胚胎体外发育的影响[J]. *畜牧与兽医*, 2012, 44(1): 57 - 60.
- [6] 李松,丁方荣,戴蕴平,等. 不同转染方法转染牛体细胞效率的比较[J]. *农业生物技术学报*, 2011, 19(6): 1027 - 1033.
- [7] Maurisse R, De Semir D, Enamekhoo H, *et al.* Comparative transfection of DNA into primary and transformed mammalian cells from different lineages[J]. *BMC Biotechnology*, 2010, 10(1): 9.
- [8] Nakayama A, Sato M, Shinohara M, Matsubara S, *et al.* Efficient transfection of primarily cultured porcine embryonic fibroblasts using the amaxa nucleofection system TM[J]. *Cloning and Stem Cells*, 2007, 9(4): 523 - 534.

[修回日期] 2015-02-06



模式生物线虫在药物复杂体系活性评价中的应用

王欣佩, 余 煊, 雷 帆, 邢东明, 杜力军

(清华大学蛋白质科学教育部重点实验室, 生命科学学院医学院药物药理实验室, 北京 100084)

【摘要】 虽然线虫只是代表了一类简单的生物体, 但是线虫在现代生物医学研究, 尤其是药物靶点研究方面具有巨大的潜在应用价值。其功能完善的细胞结构、与其他高级生物的保守性使得线虫成为一个操作简单、经济有效的高通量体内研究模型。本文总结了模式生物线虫在药物活性评价中的应用。初步探讨了线虫在药物复杂体系活性评价的可行性, 以及线虫为从整体水平观察和研究中药复方的药效及机制的前景。

【关键词】 线虫; 模式生物; 药物研究; 中药

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0067-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 003. 13

Model organism *C. elegans* applications in the complex-system drug activity evaluation

WANG Xin-pei, YU Xuan, LEI Fan, XING Dong-ming, DU Li-jun

(MOE Key Laboratory of Protein Sciences, Laboratory of Molecular Pharmacology and Pharmaceutical Sciences, School of Life Sciences and School of Medicine, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

【Abstract】 *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), has developed into an useful model for biomedical research, particularly in the targets of novel drugs and the related mechanism. *C. elegans*, combining with cost-effective cultivation, simple biological structure, make for high-throughput screenings in vivo model. In this review, we explore the feasibility of *C. elegans* in drug activity evaluation of complex systems. Because of the body independence of *C. elegans*, it provided good platform for the efficacy and mechanism of research on new drugs as well as Chinese herbal extract in vivo, showing a good prospect.

【Key words】 *Caenorhabditis elegans*; Model organism; Drug innovation; Chinese herb

秀丽隐杆线虫, *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*), 属于线形动物门、线虫纲。线虫广泛的分布在土壤中, 以细菌为食, 能够感知气味、光线、温度以及机械刺激。早在 20 世纪 60 年代初期, 科学家 Sydney Brenner 就将线虫(*C. elegans*)引入到发育生物学和神经生物学的研究中^[1]。随后, 在 90 年代

中期, 科学家 John E. Sulston^[2-4]利用微分干涉显微镜(DIC)绘制线虫的细胞谱系, 揭示了雌雄同体线虫全部细胞的命运, 促进线虫在单细胞水平上的深入研究。1998 年, Craig Mello 和 Andrew Fire^[5]在线虫上发现了 dsRNA 介导的 RNA 干扰(RNAi)现象, 为线虫基因功能的研究奠定了重要基础。1998 年

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81374006;81073092);“重大新药创制”科技重大专项“十二五”计划资助项目(2012ZX09103-201-041;2012ZX09102-201-008)。

【作者简介】 王欣佩, 女, 博士生。研究方向: 分子生物学。E-mail: xinpeiwang@gmail.com。

【通讯作者】 杜力军。E-mail: lijundu@mail.tsinghua.edu.cn。

底,线虫的全基因组序列在 Science 上发表,线虫成为了第一个完成全基因组测序的多细胞真核生物^[6]。目前,线虫作为模式生物,已经被广泛用于多个领域的生物学研究,包括遗传学、发育生物学、神经生物学、细胞生物学、衰老调控机制、性别决定、药物作用等^[7]。本文从药物作用角度讨论了线虫作为模式生物特点,以及利用线虫作为模式生物在药物研究方面的应用。

1 线虫的构成特点

线虫是一类多细胞生物,其幼虫含有 556 个体细胞和 2 个原始生殖细胞。发育成熟的雌雄同体线虫含有 959 个体细胞和 2000 个生殖细胞,而发育成熟的雄性成虫仅有 1031 个体细胞和 1000 个生殖细胞。尽管线虫是一种简单的模式生物,但是它具有精密的结构器官,包括肌肉、表皮、肠、生殖系统、腺体以及由 302 个(雌雄同体成虫)或 391 个(雄虫)神经元组成的神经系统。

2 线虫作为模式生物的优势

线虫以大肠杆菌(*Escherichia coli*, *E. Coli*) OP50 为食,既可以养于琼脂培养板,还可以养于液体培养基^[8]。线虫成虫体长仅 1.3 mm 左右,对成长空间的需求较小,96 孔板的一个孔内即可培养 100 条线虫^[9]。在实验室条件下易于大量培养、繁殖。此外,与细菌、细胞一样,线虫可以在液氮或 -80℃ 冰箱中长期冷冻保存^[1]。线虫身体透明,在普通显微镜下易于观察其体内结构及生长发育过程。此外,还可以通过体内荧光标记,利用荧光显微镜直观地追踪某些生物过程,如轴突生长、胚胎发生、脂肪代谢等^[10]。线虫的生长和繁殖速度很快,其生长发育速度受生长环境温度的调控。在 25℃ 培养条件下,从虫卵长至成虫需要 2.5 d。20℃ 培养条件下,需要 3.5 d 发育为成虫。15℃ 培养条件下,则需要 6 d 才能发育为成虫。在最适培养温度(20℃)下,成虫的繁殖能力最强,通过自体受精,一次可以产生 300 多个后代^[11]。线虫具有 5 对常染色体和 1 对性染色体,遗传背景简单。线虫的全基因组测序早在 1998 年业已完成。目前,已建成多个数据平台,如 worm base、worm book 实现了遗传信息的共享。2000 年,Arhinger 实验室完成了线虫全基因组的 RNAi 文库,使得线虫成了第一个在全基因组范围内进行功能缺失分析的多细胞生物。

3 人类基因和线虫基因间的保守性

在线虫中建立人类疾病的模型的一个重要依据是药物靶点在两个物种之间是否具有一定的保守性。通过生物信息学研究,我们发现 60% ~ 80% 的人类基因在线虫体内都具有同源直系物^[12]。除了同源基因外,目前还发现许多重要的信号通路在线虫和人类中也具有一定的保守性,如细胞增殖相关的 RAS 信号^[13]、Wnt 信号^[14],免疫相关的 TGF- β 信号、Toll 信号、MAPK 信号^[15-17]。

根据 Ortho Disease 数据库的分析结果显示,在 2,466 个人类疾病相关基因中,小鼠中有 1,354 个同源基因,果蝇有 724 个,线虫有 533 个,大肠杆菌中有 153 个^[18]。在众多模式生物中,选择大鼠、小鼠、灵长类等作为实验动物往往导致实验效率低下、实验成本昂贵、可操作性有限的局面。选择细菌、酵母、体外细胞进行实验又可能造成实验结果与人类疾病相关性差的结果。相比之下,利用线虫进行实验是一个快速的、有效的、经济的、高通量技术。我们可以基于一个完整生命体进行系统研究,而非仅仅局限于药物对某个细胞系或某个受体蛋白的作用。

4 线虫在药物发现中的应用

4.1 人类疾病在线虫中的模型建立

利用线虫进行药物筛选的第一步就是建立人类疾病的线虫模型,包括确定疾病相关基因在线虫体内的同源基因,了解同源基因在线虫体内的相关功能。一般来说,有三种方式可以建立人类疾病的线虫模型:1) 敲除(突变体)、敲低(RNAi)或增强线虫中人类疾病相关基因的同源直系基因并考察该基因对表型的影响,即建立突变体模型。2) 通过药物或化合物诱导,线虫中建立一个与疾病相关或相似的生物过程,即化学诱导模型。3) 在线虫中表达人类基因并产生一些疾病相关的表型,即建立转基因动物模型。

4.2 人类疾病的线虫模型

糖尿病模型:线虫体内 *daf-2* 基因与哺乳动物体内的胰岛素样生长因子 IGFs 受体家族同源,该基因调控了线虫的代谢、生长及寿命^[19]。DevGen 公司通过 *daf-2* 基因突变株建立了 2 型糖尿病药物高通量筛选的线虫模型。目前已从 insulin 信号通路对相关药物进行筛选研究^[20]。

衰老模型:常用的线虫衰老模型有 *daf-2* 突变株、*daf-16* 突变株以及原始野生型 N2^[21]。*daf-2* 基因突变导致 DAF-2 受体酪氨酸激酶结构变异,相比野生型该突变株的寿命更长。*daf-16* 作为一个重要的转录因子,促进体内寿命相关基因的表达,*daf-16* 的突变导致线虫的寿命比 N2 野生株短。利用线虫模型,高通量的筛选抗衰老药物已经有近 30 年的历史,并取得了丰硕的研究成果。

阿尔兹海默症(AD)模型:将人源 β -淀粉样蛋白转入线虫中异源表达,建立 AD 的转基因线虫模型。结果表明,在转基因模型中可以诱导产生淀粉样蛋白沉淀物,并引起线虫麻痹。该转基因模型可以有用于 β -淀粉样蛋白抑制剂的高通量筛选^[22]。

帕金森病模型:包括通过异源过表达人 α -突触核蛋白建立转基因模型^[23]和通过神经毒素 1-甲基-4-苯基吡啶(MPP)建立药物诱导模型^[24],两种模型分别导致线虫神经元的损伤和多巴胺能神经元的选择性凋亡。此外还有氧化应激及其金属离子失态相关模型^[25]。

亨廷顿病模型:通过注射人源亨廷顿蛋白 N 末端基因建立转基因模型,导致线虫的神经细胞凋亡,并且,随着时间的延长,神经细胞蛋白沉积增多^[26]。目前,使用此模型筛选到的光辉霉素和氯化锂已经经过 FDA 批准,成为治疗该疾病的有效药物^[12]。

线虫的抑郁模型:MOD-5 是哺乳动物中血清素重吸收转运体(SERT)的同源直系物,通过抗抑郁药物氟西汀阻断 MOD-5 可以建立线虫的化学诱变模型。氟西汀作用于 MOD-5 后,可以增加突触前 5-羟色胺的浓度,刺激线虫进食行为,并增加排卵量。而在 MOD-5 突变体中,氟西汀的这种作用消失。通过该模型,确定了抗抑郁药物氟西汀的作用靶点就

是 SERT,并且证明线虫模型也能够用于抗抑郁药物的筛选^[27]。

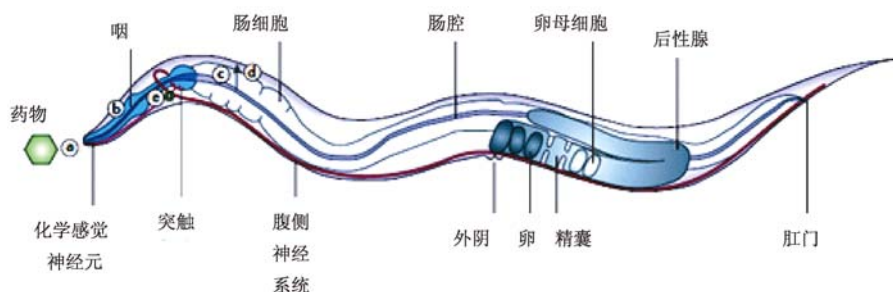
抗菌模型:线虫还经常被用于宿主-病原体的研究中。线虫可以被一些病原体杀死,如假单胞菌、粘质沙雷菌、肠炎沙门菌亚属、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌等。由于,宿主-编码的防御系统在进化上是保守的,因此涉及其中的有害机制可以用于研究涉及这些病原体的人类疾病^[28]。

除此之外,近年来线虫还被应用到多个生理系统疾病的研究中,例如:癌症及其抗癌药物,空间障碍及衰老,酒精成瘾,空气微粒体毒性等^[29-32]。

5 线虫在药物作用研究中的应用

尽管线虫是一个简单的模式生物,但是它具有精密完善的系统结构。如图 1^[38]所示,药物作用于线虫时,首先,药物需要进入线虫体内(通过皮肤扩散,或通过摄取进入肠腔)。药物需要为生物体可用的,才能够穿过肠细胞膜并到达靶组织。到达靶向位置后,药物需要作用于其初始靶点,并克服胞内和组织内的自身调节,发挥药效。换句话说,只有在体内具有活性的物质才能在线虫体内引发反应。因此,利用线虫进行整体动物实验,可以用于药物对其作用靶点机制的研究,以及增加对药物对多个靶点协同作用的研究。目前,基于线虫的药物作用靶点研究方法主要有以下两类:

正向遗传学(forward genetics):正向遗传学是一个从表型到基因型的基本研究策略。正向遗传学的基础是通过诱变剂诱导线虫 DNA 的随机突变,筛选预期表型的突变体,通过单核苷酸多态性(SNP)等方法对突变基因的染色体进行定位,并获得突变基因的序列,从而确定表型和基因型的关系。这种研究方法可以检测突变体对某个药物/化



注:a:化学感觉神经元;b:咽;c:肠腔;d:体腔;e:靶组织。

图 1 药物进入线虫体内的路径

Note: a: Chemosensory neurons. b: Pharynx. c: intestinal lumen. d: Body cavity. e: target tissue.

Fig. 1 Drug entry route into *C. elegans*

合物的是否有超敏或脱敏的现象,从而探索药物的作用机制以及作用靶点。抗抑郁药物氟西汀的作用靶点就是利用 MOD-5(人类血清素重吸收转运体的同源基因)突变体对氟西汀作用脱敏的现象,确定 MOD-5 是氟西汀的一个作用靶点,并由此推断人类 SERT 基因可能是氟西汀治疗抑郁的重要靶点。

反向遗传学(reverse genetics):与正向遗传学相反,反向遗传学是从基因型到表型的研究策略。反向遗传学的基础是观察某个基因失活后生物体表型的变化。常用的反向遗传学方法有:一是根据研究需求,建立不同基因的突变体^[33]。根据 Caenorhabditis Genetics Center (CGC)的记录,目前 CGC 已经保存并可以提供 1 万多种线虫的突变体,包括有人类疾病基因同源基因的突变体线虫,以及同一基因的多种突变体。根据研究的需要,选择不同的突变体,即可考察该突变基因的功能以及确定药物的作用靶点。另一类反向遗传学的研究方法是 RNA 干扰(RNAi),RNAi 是一个在线虫体内发现的现象,用于降低目标基因的表达。RNAi 介导的基因敲除操作简单,可以通过直接将线虫浸润在含有 dsRNA 的溶液或者用可以产生 dsDNA 的细菌喂养线虫。在线虫中导入 RNAi 需要至少 100 bp 长的 dsRNA。在哺乳动物系统中,只有短于 22 个核苷酸的 dsRNA(通常成为 small interfering RNA, siRNA)分子可以使用,以免引起干扰素反应或非特异性的抑制蛋白质生成。这两种副反应在线虫体内都是不存在的。线虫对长链 dsRNA 的兼容性可以通过作用于靶基因的多个位点来提高 RNAi 的效率。当线虫暴露于 dsRNA 后,靶基因的表达很快被降低,导致线虫出现新的表型。这一过程的发生需要多少时间,取决于不同的靶基因以及编码蛋白的周转率。RNAi 可以在线虫的任意生命周期中被导入,并且可以通过持续的使用可以产生相关 dsRNA 的细菌喂养线虫来将 RNAi 诱导的表型维持很多代。由于在线虫上做 RNAi 实验操作简单,并且已经有丰富基因组数据做支持,这促进了一个新的高通量的方法,即全基因组 RNA 干扰(genome-wide RNAi)。在药物作用机制的研究中,我们可以使用线虫,在完整生命体中进行药物靶点的自动化/半自动化高效筛选。

6 线虫在中药提取物药理作用研究中的应用

中药及其中药复方制剂以其成分复杂、作用全

面等特点而不同于西药,以“多成分、多靶点”而凸显自己的优势。同时也正是由于复方提取物的复杂性且只能口服给药,并进行整体动物实验,制约了对其作用机制的研究。分子机制研究须依赖于细胞水平的实验,但中药提取物体外给药难以排除非特异性成分的影响,由此而使研究进入到两难境地。

“血清药理学”方法就是为了使中药提取物进行体外实验而产生的。旨在利用胃肠作为过滤屏障,直接采集口服中药提取物后的血清进行体外实验,以此来探讨其药物的作用机制。但是这一技术有两个不足:一是对血清含药量不易控制;二是对所含药物成分不清。如此影响了其后续机制的深入探讨和对研究结果的准确判定。线虫是独立的个体,且体内结构简单,易于观察。因此,在施以中药提取物的同时,就可以直接检测体内的分子水平的变化。即保证了中药提取物的复杂特性,同时又利于对其作用的观察和研究,是一个较为理想的模式生物。例如,我们可以利用分子生物技术构建相关靶标蛋白荧光表达的转基因线虫模型,通过其荧光蛋白表达与否可以直接观察到受试中药的靶标作用。这是一种较为理想的研究中药的技术。目前,国内以线虫来观察研究中药提取物的工作开展得还十分有限,大多集中在对中药安全性及其抗衰老延长线虫寿命等方面^[34-36],关于线虫在中药研究中的优势也有一定的探讨^[37]。未来,关于线虫在中药提取物中的研究方法学的考察及其对该技术的特点和规律的研究等有待于加强。

7 小结

在生物医学研究领域,我们对模式生物线虫的研究已经积累了丰富的研究经验,并取得了卓越的科研成果。然而我们也必须认识到线虫作为实验动物模型也有一定局限性:首先,线虫作为一个无脊椎低等生物,我们很难保证在药物在线虫模型和人体中具有一致的安全性和有效性。其次,线虫的身体结构简单,没有心脏、呼吸系统、特异免疫系统,因此有一些人类疾病很难在线虫中建立疾病模型。由于线虫和人类的种间差距较大,线虫模型不适用于药物安全性评价或某些特定疾病的相关研究,但是,这并不代表线虫模型不能用于药物研究。事实上,在药物的早期研究中,线虫迅速提供一些基础机制的线索,如某个特定基因的功能或药物的

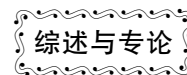
某个靶点。特别是当确定了某个疾病的分子基础后,可以针对某一靶点利用线虫进行药物的高通量快速筛查。线虫模型最重要的意义在于,线虫搭起了体内(in vivo)实验和体外(in vitro)实验中间的桥梁,在整体动物水平实现了高通量的、可靠的实验研究。这一点也是中药提取物研究的最理想之处。

参考文献:

- [1] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*[J]. Genetics, 1974, 77(1): 71-94.
- [2] Sulston J. E. Neuronal Cell Lineages in the Nematode *Caenorhabditis-Elegans*[C]. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 1983, 48: 443-452.
- [3] Sulston J. E., H. R. Horvitz. Post-Embryonic Cell Lineages of Nematode, *Caenorhabditis-Elegans*[J]. Developmental Biology, 1977, 56(1): 110-156.
- [4] Sulston J. E., E. Schierenberg, J. G. White, et al. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Dev Biol, 1983, 100(1): 64-119.
- [5] Fire A., Xu S. Q., Montgomery M. K., et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391 (6669): 806-811.
- [6] Consortium C. e. S. Genome sequence of the nematode *C. elegans*; a platform for investigating biology[J]. Science, 1998, 282(5396): 2012-2018.
- [7] Riddle D. L., Blumenthal T., Meyer B. J., et al. *C. elegans* II [J]. Trends in Cell Biology, 1998, 8(2): 92.
- [8] T. Stiernagle, Maintenance of *C. elegans*. *C. elegans*: A practical approach[M]. UK: Oxford University Press, 1999. 51-67.
- [9] Simonetta S. H., Golombek D. A. An automated tracking system for *Caenorhabditis elegans* locomotor behavior and circadian studies application[J]. Journal of neuroscience methods, 2007, 161(2): 273-280.
- [10] Burns A. R., Kwok T. C. Y., Howard A., et al. High-throughput screening of small molecules for bioactivity and target identification in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature Protocols, 2006, 1(4): 1906-1914.
- [11] Silverman G. A., Luke C. J., Bhatia S. R., et al. Modeling Molecular and Cellular Aspects of Human Disease Using the Nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Pediatric Research, 2009, 65(1): 10-18.
- [12] Voisine C., Varma H., Walker N., et al. Identification of potential therapeutic drugs for huntington's disease using *Caenorhabditis elegans*[J]. PLoS One, 2007, 2(6): e504.
- [13] Blume-Jensen P., Hunter T. Oncogenic kinase signalling[J]. Nature, 2001, 411(6835): 355-365.
- [14] Janssens N., Janicot M., Perera T. The Wnt-dependent signaling pathways as target in oncology drug discovery [J]. Investigational New Drugs, 2006, 24(4): 263-280.
- [15] Millet A. C. M., Ewbank J. J. Immunity in *Caenorhabditis elegans*[J]. Current Opinion in Immunology, 2004, 16(1): 4-9.
- [16] Nicholas H. R., Hodgkin J. Responses to infection and possible recognition strategies in the innate immune system of *Caenorhabditis elegans* [J]. Molecular Immunology, 2004, 41(5): 479-493.
- [17] Kurz C. L., Ewbank J. J. *Caenorhabditis elegans*: An emerging genetic model for the study of innate immunity [J]. Nature Reviews Genetics, 2003, 4(5): 380-390.
- [18] O'Brien K. P., Westerlund I., E. L. L. Sonnenhammer, OrthoDisease: A database of human disease orthologs [J]. Human Mutation, 2004, 24(2): 112-119.
- [19] Kimura K. D., Tissenbaum H. A., Liu Y. X., et al. daf-2, an insulin receptor-like gene that regulates longevity and diapause in *Caenorhabditis elegans* [J]. Science, 1997, 277 (5328): 942-946.
- [20] O'Reilly L. P., Benson J. A., Cummings E. E., et al. Worming our way to novel drug discovery with the *Caenorhabditis elegans* proteostasis network, stress response and insulin-signaling pathways[J]. Expert Opinion on Drug Discovery, 2014, 9(9): 1021-1032.
- [21] Olsen A., Vantipalli M. C., Lithgow G. J. Using *Caenorhabditis elegans* as a Model for Aging and Age-Related Diseases [J]. Understanding and Modulating Aging, 2006, 1067: 120-128.
- [22] Link C. D., *C. elegans* models of age-associated neurodegenerative diseases: Lessons from transgenic worm models of Alzheimer's disease[J]. Experimental gerontology, 2006, 41(10): 1007-1013.
- [23] Lakso M., Vartiainen S., Moilanen A. M., et al. Dopaminergic neuronal loss and motor deficits in *Caenorhabditis elegans* overexpressing human alpha-synuclein [J]. Journal of Neurochemistry, 2003, 86(1): 165-172.
- [24] Braungart E., Gerlach M., Riederer P., et al. *Caenorhabditis elegans* MPP+ model of Parkinson's disease for high-throughput drug screenings[J]. Neurodegenerative diseases, 2004, 1(4-5): 175-183.
- [25] Chege P. M., McColl G. *Caenorhabditis elegans*: a model to investigate oxidative stress and metal dyshomeostasis in Parkinson's disease[J]. Frontiers in Aging Neuroscience, 2014, 6.
- [26] Faber P. W., Alter J. R., MacDonald M. E., et al. Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1999, 96(1): 179-184.
- [27] Ranganathan R., Sawin E. R., Trent C., et al. Mutations in the *Caenorhabditis elegans* serotonin reuptake transporter MOD-5 reveal serotonin-dependent and -independent activities of fluoxetine[J]. Journal of Neuroscience, 2001, 21(16): 5871-5884.
- [28] Sifri C. D., Begun J., F. M. Ausubel. The worm has turned - microbial virulence modeled in *Caenorhabditis elegans* [J].

- Trends in Microbiology, 2005, 13(3): 119–127.
- [29] Kobetl R. A., Pan X. P., Zhang B. H., et al. *Caenorhabditis elegans*: A Model System for Anti-Cancer Drug Discovery and Therapeutic Target Identification [J]. Biomolecules & Therapeutics, 2014, 22(5): 371–383.
- [30] Honda Y., Honda S., Narici M., et al. Spaceflight and Ageing: Reflecting on *Caenorhabditis elegans* in Space [J]. Gerontology, 2014, 60(2): 138–142.
- [31] Zhu G., Zhang F., W. Li. Nematodes feel a craving - Using *Caenorhabditis elegans* as a model to study alcohol addiction[J]. Neuroscience Bulletin, 2014, 30(4): 595–600.
- [32] Choi J., Tsyusko O. V., Unrine J. M., et al. A micro-sized model for the in vivo study of nanoparticle toxicity: what has *Caenorhabditis elegans* taught us? [J]. Environmental Chemistry, 2014, 11(3): 227–246.
- [33] Liu L. X., Spoerke J. M., Mulligan E. L., et al. High-throughput isolation of *Caenorhabditis elegans* deletion mutants [J]. Genome Research, 1999, 9(9): 859–867.
- [34] 李贞景,张金阳,王昌禄,等. 4 种有毒中药对秀丽隐杆线虫致死率和产卵数的影响[J]. 毒理学杂志, 2013, 4: 017.
- [35] 肖家军,陆媚,马胜利,等. 西藏红景天提取物延长线虫寿命和抗氧化活性探索[J]. 天然产物研究与开发, 2013, 25(8): 1033–1036.
- [36] 陈中孚,顾惠娟,王玲华,等. 三种中药制剂对大肠杆菌 SOS 应答的抑制作用及对线虫寿命的影响[J]. 癌变. 畸变. 突变, 1991, 3: 5.
- [37] 王香明,汪晓燕,高会丽,等. 从分子机制研究抗帕金森病中药的线虫模型[J]. 中国中药杂志, 2010(5): 661–663.
- [38] Kaletta T., Hengartner M. O. Finding function in novel targets: c. elegans as a model organism [J]. Nature Reviews Drug Discovery. 2006, 5(5): 387–399.

[修回日期]2015-01-16



大鼠出生后发育过程中脑细胞外间隙的 解剖及生理特性的变化

杨双凤¹, 韩鸿宾^{2,3}, 彭 芸¹

(1. 首都医科大学附属北京儿童医院影像中心, 北京 100045; 2. 北京大学第三医院放射科, 北京 100191;
3. 磁共振成像设备与技术北京市重点实验室, 北京 100191)

【摘要】 大鼠脑发育是一个复杂的过程, 胎儿期及生后的脑发育过程经历了组织学、细胞学和分子学的显著变化。大鼠脑的基本结构在胚胎期已形成, 而不同部位之间的联系和脑功能的完善却在出生后发展, 其间的许多变异是许多神经系统疾病的基础, 因此生后脑发育过程仍然十分关键。尽管脑细胞微环境的概念已于 150 多年前被提出, 但是对于在生后发育过程中发生显著变化的脑细胞外间隙的研究仍未获得显著进展。本文通过综述大鼠生后发育过程中脑细胞外间隙的解剖及生理特性的变化规律特点, 阐述脑细胞外间隙在个体发育中的重要作用, 有望为儿科发育相关的神经系统疾病的发生机制及有效治疗途径的探索提供相关依据。

【关键词】 细胞外间隙; 迂曲度; 细胞外基质; 脑发育; 扩散

【中图分类号】 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0073-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 003. 14

The anatomical and physiological changes of rat brain extracellular space during postnatal development

YANG Shuang-feng¹, HAN Hong-bin^{2,3}, PENG Yun¹

(1. Imaging Center, Beijing Children's Hospital, Capital Medical University, Beijing 100045, China;
2. Department of Radiology, Peking University Third Hospital, Beijing 100191, China;
3. Beijing Key Lab of Magnetic Resonance Imaging Device and Technique, Beijing 100191, China)

【Abstract】 Rat brain development is a complicated process. There are significant changes of histology, cytology and molecular biology in the process of fetal and postnatal brain development. The basic structure of brain has formed in the prenatal period. While the formation of connections between different parts and the improvement of the function of the brain occur after birth, during which many of the variations are bases of the nervous system diseases, so the postnatal brain development is still very important. Although the concept of brain microenvironment has been proposed more than 150 years ago, the research about the changing extracellular space (ECS) during the postnatal brain development has yet to gain significant progress. The author reviewed the anatomical and physiological characteristics of ECS in the process of postnatal development of the rat, stating the important role of ECS in the individual development, which is expected to provide reliable evidences for the explore of mechanisms and effective treatment approaches of pediatric development related nervous system diseases.

[基金项目] 国家自然科学基金(31271161;81171080)。

[作者简介] 杨双凤(1986-), 女, 硕士。主要研究方向: 脑细胞外间隙的发育, E-mail: feier169@126.com。

[通讯作者] 彭芸, E-mail: ppengyun@hotmail.com。

【Key words】 Extracellular space; Tortuosity; Extracellular matrix; Brain development; Diffusion

脑细胞外间隙 (extracellular space, ECS) 是存在于细胞之间不规则的, 且相互连通的狭窄空隙, 有学者称之为组织通道^[1-2]。ECS 之间填充着细胞间液 (interstitial fluid, ISF), 其与脑脊液 (cerebrospinal fluid, CSF) 成分类似, 但存在不同, ISF 中还含有由长链大分子组成的细胞外基质 (extracellular matrix, ECM), 它们浮在 ECS 中, 可以与细胞膜附着或完全游离。ECS、ISF 和 ECM 共同构成了脑细胞微环境 (brain extracellular microenvironment, BEM), 其中 ECS 更被强调是 BEM 最重要的组成部分, 在保证脑细胞间电信号传导的稳定性, 形成细胞与血液之间物质转运通道, 以及神经突触重塑过程中发挥关键作用。

神经元之间的相互作用通过突触传递和 ECS 中神经活性物质的扩散来实现。而神经胶质细胞没有突触, 其与神经元的交流只能通过 ECS 中离子和神经活性物质的扩散来实现。神经元和神经胶质细胞均可释放离子、递质和其他各种神经活性物质, 它们的扩散常超过一个突触, 到达离释放点更远的距离。物质通过 ECS 扩散并结合到突触外通常是高度联系的, 结合点位于神经元、轴突和神经胶质细胞。这种类型的非突触传递也称为突触外传递或容量传递 (神经活性物质在 ECS 空间内运动)^[3]。突触传递是传统的一对一联系, 而突触外传递是一对多的联系。因此, 细胞外间隙是神经元、轴突和胶质细胞之间突触外传递的信息通道。此外, ECS 中的扩散对于突触传递和神经元兴奋性也同样重要。

ECS 扩散参数是不稳定的, 在生理状态如发育、老化、神经元活动或特定生理条件下如哺乳, 可以发生显著的变化, 这与结构的改变如胶质增生、星形胶质细胞的重排过程和细胞外基质的缺失有关。ECS 也是不均匀的, 扩散性能在微观水平如不同类型细胞周围, 以及宏观水平如不同脑区之间是不同的。

1 脑 ECS 测量方法及其基本参数的定义与意义

1.1 脑 ECS 测量方法

目前, 针对神经元生存的微环境的测量技术可分为三类, 脑 ECS 局部测量技术, 脑 ISF 分析技术, 脑 ECS 与 ISF 成像测量技术。

1.1.1 脑 ECS 局部测量技术: 针对脑 ECS 的测量

方法主要包括选择性微电极法 (ion-selective microelectrodes, ISMs)^[4], 集成光学成像法 (integrative optical imaging, IOI)^[5-6], 最常用的是实时离子导入法 (real time iontophoresis, RTI), 用来监测四甲基铵离子 (tetramethyl-ammonium, TMA⁺) 浓度的变化, 即 RTI-TMA⁺ 技术。

1.1.2 脑 ISF 分析技术: 针对 ISF 内容物进行分析主要集中在脑 ISF 溶质成分、含量及其理化性状^[7], 如组织间液压力、pH 值、流动速率等; 另外一个重要的方向就是 ISF 引流途径。

1.1.3 脑 ECS 与 ISF 成像分析技术: 放射性示踪法^[3], 免疫组织化学染色^[8], 激光扫描共聚焦显微成像技术^[9-10] 在研究脑 ISF 引流途径中的应用越来越广泛, 如在体双光子成像技术、多光子激光扫描系统。磁共振成像分子示踪技术实现了对脑 ECS、ISF 的同时定量分析与测量, 并实现了包括脑深部的三维可视化在活体的测量技术^[11-13]。

1.2 脑 ECS 基本参数的定义及其在发育中的变化

中枢神经系统 ECS 中许多神经活性物质的扩散效能取决于各种物质的大小、电荷、形状、结构以及 ECS 的物理-化学性能, 后者随着某一特定脑区的组织结构不同而不同, 如在不同脑区、中枢神经系统发育过程、神经活动、激素释放、年龄增长和许多病理状态下^[14]。而且, 在同一条件下, ECS 内分子的迁移受扩散屏障引导, 因此扩散被限制在某一特定方向, 这就是说, 某一脑区的扩散是各向异性的^[15]。物质在 ECS 扩散的基本限制因素是 ECS 容积分数 (α : 神经组织允许物质扩散的有限容积) 和 ECS 迂曲度 (λ : 扩散物质在两个点间由于各种障碍而增加的路径, 如细胞膜及可能的长链糖蛋白和混合的物质)^[4]。除了容积分数和迂曲度, 物质向其他细胞的扩散可以被非特异性的浓度依赖性的细胞摄取 (k^+) 所影响^[4], k^+ 反映了物质从 ECS 进入细胞、穿过血脑屏障或经过其它过程的清除或丢失。

ECS 容积、迂曲度和各向异性的改变可以显著影响中枢神经系统内神经活性物质的聚集和扩散, 从而影响神经-胶质的信息交流、胶质细胞突起与突触的空间关系、谷氨酸盐或 γ -氨基丁酸“溢出”的效能和突触的串连、细胞移动、激素的作用和神经活性物质的毒性效应, 并且对于诊断、药物传递和新的治疗方法的建立非常重要^[16]。

1.2.1 ECS 容积分数

ECS 容积分数 α 定义为 ECS 容积/总脑组织容积。早期使用冷冻置换固定方法试图保留 ECS 的电镜技术显示, 生后 10 d 鼠皮层的 α 值为 41% 并随着发育成熟而下降, 成年时为 22%^[16]。传统的鼠下丘固定提示生后 1 d 鼠的 α 值为 15%, 在成年时降至 8%^[17]。这项研究中报道的 ECS 的下降是由传统的电镜技术观察到的, 其随发育成熟逐渐变小的趋势是很明显的。由于很难用电镜技术保留 ECS, 所以现在常利用扩散技术来重新观察其大小。

Lehmenkuhler 等^[18] 运用 RTI-TMA⁺ 方法在鼠脑皮层进行一项广泛的研究, 证实生后 2~4 d α 值为 40%, 但是在生后 10~11 d, α 值为 27%, 这与 Bondareff 和 Pysh^[16-17] 发现的值相反, 并且之后 α 值稳定减小, 至生后 23 d 达 20%, 相当于成年水平, 这与皮层的伸展和神经胶质形成过程相一致。

此外, 生后发育过程中个体皮层灰质的不同层面和白质内扩散参数的改变是不一致的^[18]。生后 2~3 d 的动物, 皮层 III 和 IV 的 α 值(平均值 $\pm$ 标准差)是 0.36 ± 0.04 , 皮层 V 是 0.38 ± 0.02 , 皮层 VI 是 0.41 ± 0.01 , 白质是 0.46 ± 0.01 。 α 值最早降低是在生后 6~7 d 时出现在皮层 V 和 VI, 在生后 8~9 d 皮层 III 和 IV 降低, 在生后 10~11 d 白质降低。 α 值的进一步显著减少出现在生后 10~21 d 之间, 全脑皮层特别是白质的 α 值迅速减小。生后 21 d 至成年时期(90~120 d) α 值再无进一步降低。成年后 α 值在皮层 II - VI 及白质分别为: 0.19 ± 0.002 、 0.20 ± 0.004 、 0.21 ± 0.003 、 0.22 ± 0.003 、 0.23 ± 0.007 和 0.20 ± 0.008 。相似的, 通过 DWI 方法发现水的表观扩散系数(ADC_w) 在生后皮层及白质发育中显著降低^[19], 可以提示, ADC_w 的降低与 ECS 大小的改变有关。

ECS 容积分数在脑发育过程中的上述改变有其特定的生理基础。较大细胞外间隙的出现伴随着大量树突和轴突的生长而细胞外间隙的变小则伴随着复杂细胞联系的发展^[20]。灰质的总厚度在生后第一个 15 d 几乎是翻倍的, 这是神经元大量生长和迁移的阶段, 其间胶质纤维酸性蛋白 mRNA 经历两次发育表达, 灰质内出现大量胶质。而 ECS 容积从出生至生后 15 d(星形细胞增殖期)增加, 随后开始下降直至生后 55 d(星形细胞变形分化期)^[21]。因此, 星形细胞增殖期与生后灰质 ECS 容积分数降低的时间进程相一致。然而, 白质的厚度从生后 15~21 d 开始增加, 相应的, 其 α 值的第一次显著降

低的时间也晚于皮层, 生后 10~11 d 白质的 α 值几乎是生后 20 d 及以上鼠脑白质的两倍, 这提示 α 值在广泛髓鞘化阶段迅速下降, 这发生在生后第 2~3 周尤其是第 3 周。在生后 21 d 以后, 灰质和白质 α 值保持不变。因此, 细胞内和细胞外容积的比值在脑发育成熟过程中是发生变化的, 总脑容积的增加是由细胞密度的增加、细胞移行、轴突生长、树突萌芽和神经胶质细胞成熟引起的。皮层灰质及皮层下白质的生长和成熟与 ECS 容积分数的减小呈负相关。

1.2.2 迂曲度

ECS 的迂曲度 λ 定义为 $(D/D^*)^{1/2}$, D 表示自由扩散系数, D^* 表示物质在神经组织中的扩散系数。迂曲度代表扩散屏障的大小和数量, 健康成年动物脑组织的 λ 约为 1.6, 这表示物质在大脑内的扩散比在自由介质慢 2.6 倍^[22]。这只在分子或离子远小于 ECS 的宽度时适用, 对于大分子, λ 是增大的, 一部分原因是大分子在通过 ECS 时与其狭窄通道壁的接触频率增加^[23]。

迂曲度的主要影响因素有两个: 几何构型和细胞外基质。要讨论 ECS 的几何构型需要意识到 ECS 在某种意义上是一个连接良好的区域, 在任何两个相隔几十微米的位置之间, 有多条路径可以通过 ECS。当分子在两点之间的运动被迫通过更迂曲的路径时, 运动时间将会增加, 导致 D^* 减小, 而 λ 增大。关于生后发育过程中迂曲度的变化趋势尚不明确, 有研究显示从生后 2~4 d 至成年, λ 值保持在 1.5~1.6 范围内^[4], 而对于这一结果产生的机制却缺乏充分的依据。在某些病理状态下, 迂曲度可能发生改变, 如发育不良皮层区域的扩散由于扩散屏障的增加而受影响, 导致迂曲度的增加, 可能是由于以下几种原因: 皮层层化的消失, 细胞外基质分子的蓄积如肌腱蛋白和星形细胞化过程的增加, 已有研究证实肌腱蛋白 R 或肌腱蛋白 C 缺陷的鼠具有较低的迂曲度^[15]。

1.2.3 各向异性扩散

迂曲度是一个张量, 具有方向依赖性^[24], 迂曲度的方向依赖性导致扩散在各个方向是不一致的, 即所谓的各向异性扩散, 其通常是 ECS 内物质和水分子沿一个方向上的直捷通道运动(如, 沿着胼胝体轴突)并因此可能是某一程度的突触外传递特异性的一个因素。

白质内各向异性扩散在发育过程中是增加的:

鼠在生后 4~9 d, 未完全髓鞘化的胼胝体的扩散是各向同性的, 但是随着髓鞘化进展, 扩散越来越趋向于各向异性, 在生后 21~23 d 髓鞘阻碍垂直于轴突走行方向的扩散, 即在横过神经纤维的方向测量鼠胼胝体的迂曲度, 发现其明显增加^[25], 但是对于沿着轴突方向的扩散只有轻微的影响。也有研究提示鼠从出生至生后 12 d 胼胝体的扩散为各向同性, 但是从生后 13~17 d 各向异性逐渐增加, 除了髓鞘化过程, 发生这一变化的另一个可能原因是鼠脑神经胶质的产生及伸展^[15]。在胼胝体观察到的这种趋势在鼠脊髓也同样出现, 但是不太显著。ADC_w 在髓鞘化过程中下降, 这种下降在垂直轴突的方向尤为显著^[15]。此外, 神经胶质细胞能够通过产生不同的细胞外基质分子及以其自身的过度生长或增殖形成扩散屏障来影响各向异性扩散。

1.2.4 非特异性摄取

非特异性摄取 k^* , 在生后脑发育过程中在不同的皮层和白质内也均没有显著差异, 波动在 $3.3 \times 10^{-3}/s$ 到 $6.3 \times 10^{-3}/s$ 之间, 提示未成熟组织的非特异性细胞摄取与成熟组织相似^[18]。已有多项动物和人体实验均表明^[26-28], ISF 及其内溶质存在于毛细血管和动脉壁中膜与外膜之间的血管周围间隙中, 并沿血管周围间隙从脑内引流至颈部淋巴结^[29]。不同脑区 ECS 中物质的清除途径和方式也不尽相同, 起自尾状核深部灰质的 ISF 沿各级动脉血管周围间隙 (perivascular space, PVS), 于软脑膜动脉穿越软脑膜时, 经软脑膜的淋巴孔进入蛛网膜下腔 (subarachnoid space, SAS), 随后一部分随 CSF 通过神经周围的毛细淋巴管, 穿过筛板至鼻粘膜等处的毛细淋巴管, 进入颈淋巴结等颅外淋巴系统^[27]; 另一部分被 SAS 绒毛吸收, 通过颅内静脉系统^[28] 进入血循环。而白质区 ECS 中物质的引流则多经过扩散方式, 沿神经纤维束流动, 通过室管膜上皮转运入脑室, 然后进入 SAS^[27]。

2 脑 ECS 在生后发育过程中发生变化的影响因素

2.1 神经胶质细胞

胶质细胞在神经组织内的功能是多方面的, 包括血脑屏障形成、营养支持、发育功能、细胞外间隙 pH 值和离子稳态的控制, 以及轴突的电绝缘^[3]。星形细胞在发育中的作用是指导神经元的迁移, 影响神经元形态学的表型表达并参与突触重塑^[30]。生后 ECS 容积分数减小的时间进程与生后离子内

环境稳态的改变相一致。在生后早期, 离子和容量的稳态是易受损的, 可能是由于神经胶质的产生未完成。在未成熟脑自发性活动的某一水平常伴随着可以导致胶质细胞严重肿胀的细胞外离子改变, 也与胶质增生过程中 ECS 容积降低相一致^[18]。因此, 我们可以假设神经胶质细胞的形态学和功能上的成熟对生后发育过程中 ECS 容积分数的减小起到很重要的作用。

水通道蛋白 4 (Aquaporin 4, AQP4) 是在脑血管周围星形细胞足突高度表达的水分子选择通道家族的一员^[31]。水通道蛋白参与水稳态及中心血浆渗透压调节, 并且有研究证实 AQP4 在急性脑损伤后引起脑水肿形成中具有重要作用^[32]。AQP4 表达水平在未成熟脑是低的, 在出生后随个体发育逐渐增加^[33], 而关于 AQP4 表达水平的高低对扩散和迂曲度的影响则尚未有一致的结果。

Badaut 等^[34] 运用 MRI 方法测量的表观扩散系数 (apparent diffusion coefficient, ADC) 值代表水分子在组织内的运动。水分子扩散可以是细胞外的, 细胞内的和跨越细胞膜的, 而 ADC 值反映这三种成分。有研究证实病理状态下, 如低氧缺血和脑积水, ADC 值与 AQP4 表达水平直接相关^[35-36]。相继地, 有研究^[34] 采用 RNA 干预敲除 AQP4 表达, 证实消除 AQP4 表达导致正常脑组织水分子运动的降低, 在 MRI 上表现为 ADC 值的降低, 由此得知, 星形细胞, 特别是他们的水通道, 在水分子运动中起到重要作用。ADC 值的降低在神经影像中通常被解释为细胞毒性水肿的反映, 可能是由于 AQP4 表达的降低。而 Xiao 等^[37] 运用 IOI 方法发现 AQP4 缺失导致容积分数增加, 而迂曲度不变, 即说明扩散系数是不随 AQP4 表达量的多少而变化的。Yao 等^[38] 也表明离体和在体状态下通过小的四甲铵阳离子 (MW 74) 测量 AQP4 缺失的鼠新皮层的迂曲度仍保持不变。但是, Devin K 等^[39] 通过光漂白方法发现 AQP4 缺失的鼠 ECS 增大, 大分子的扩散增强。上述方法提出的 AQP4 表达降低引起细胞外间隙扩散系数的变化各不相同, 甚至相互矛盾。

2.2 细胞外基质

ECS 内的溶液不是单一的氯化钠溶液, 其包含大量葡萄糖胺聚糖 (如透明质酸盐)、糖蛋白和蛋白聚糖, 它们构成细胞外基质。目前已经报道多种 ECS 分子和粘附分子, 如纤维结合蛋白, 肌腱蛋白, 层粘连蛋白等^[29], 其含量在发育、老化、损伤恢复和

许多病理过程中会发生动态变化。肌腱蛋白 R 和肌腱蛋白 C 缺乏的鼠四甲铵的表现扩散系数 (ADC_{TMA}) 和水的表现扩散系数 (ADC_w) 表现出显著的变化,提示细胞外基质分子在 ECS 扩散中具有重要作用。肌腱蛋白 C 主要在神经和非神经组织发育的早期阶段表达^[40],相反,肌腱蛋白 R 在个体发育中表达较晚,并且其表达一直持续到成年。Sykova 等^[41]对鼠皮层和海马的研究均表明肌腱蛋白 R 缺失导致 α 和 λ 的显著降低,而研究表明发育早期阶段 α 值较成年时大,由此可知幼年时较大的 α 值可能受其他因素影响。

ECM 分子是由神经元和胶质细胞产生的。前面提到迂曲度的两个主要影响因素是几何构型和细胞外基质,后者可以减慢各种神经活性物质在 ECS 的扩散。细胞外基质与扩散分子的相互作用通过以下几种可能机制:粘性或 ECS 内多聚分子的高密度产生位阻现象,基质内带负电荷的成分与运动分子阳性成分的静电相互作用,和特异性结合(空间吸引)^[22]。肌腱蛋白 R 或 C 缺陷的鼠不仅具有较低的迂曲度,而且具有更小的 ECS 容积分数^[42]。上述发现可以提示这些分子对于保持细胞结构分离,如保持 ECS 在其最佳大小是很重要的。

透明质酸酶和软骨素硫酸盐蛋白聚糖是 ECM 的必要成分,形成海马和皮层内围绕神经元的神经元周围网络(perineuronal net, PN)。发育过程中 PN 形成围绕在细胞体和中间神经元邻近树突突触的晶格状结构,并影响突触发育和稳定性。虽然 PN 的确切功能尚不清楚,但是其很有可能与维持现有突触的稳定性、阻止成熟神经元的新突触形成以及维持 ECM 与细胞骨架的连接有关,并可能影响神经元-星形细胞的相互作用^[43],PN 在中间神经元的突触周围定位可能提示其在维持突触稳定性中的作用。

发育过程中,细胞外环境是可溶的,一部分原因是透明质酸表达量较高,透明质酸可以与水相互作用并组织协调水的分布,为轴突移行和细胞运动性提供了较大的含水空间。在成年,透明质酸表达水平较低,并且可溶性更低。这些相互作用形成细胞外间隙的不溶性系统。这些不溶性系统似乎也在成熟神经系统可塑性和运动性的降低中起到重要作用。

综上可知,ECM 在 CNS 的发育中起重要作用,通过协调组织这一空间,使间隙内其他分子和细胞

处于最佳状态。ECM 有助于神经元功能的多样性,包括增殖、移行、形态分化、突触形成、突触稳定性和细胞信号级联^[44]。

3 脑 ECS 在发育中的意义

ECS 起信息通道作用的观点受到越来越多人的支持。发育中鼠脑内相对较大的 ECS 空间可能影响 ECS 内离子和神经活性物质的聚集和代谢。当 ECS 容积分数减小的时候,任何存在于或释放到 ECS 的物质浓度则相应的增加。

发育中相对较大的 ECS 容积分数会对由细胞释放的物质产生强烈的稀释作用,这对机体来说是一种保护性机制。在一些病理事件如缺氧、痉挛或扩散性抑制过程中出现的较大的活性相关的离子可能会减少,并且兴奋性氨基酸、抑制性递质以及与那些病理状态有关的代谢物质会过度聚集。未成熟脑对于低氧、缺血和癫痫的相对敏感性比成年脑小^[45],如在未成熟的海马,较大的细胞外间隙代表未成熟组织对于兴奋性刺激具有更强的抵抗性。

我们已经知道未成熟的中枢神经系统与成熟的不同,因为其血管化未完成,并且神经胶质细胞(其被假定为溶质和小分子的跨细胞转移路径)发育不完全,外部的神经胶质限制性膜也还没有完全建立。鼠大脑皮层内血管的生长在生后第一个 10 d 内同时出现。鼠在生后第一个 10 d, ECS 较大但是开放的血管很少,但是,在生后第二个 10 d,大多数血管出现开放的管腔以及由星形细胞终足形成的血管周围鞘,且 ECS 变小^[20]。因此, ECS 的大小与血管化的程度可能存在反相关,而且 ECS 可能在血管贯穿入脑之前为代谢产物运输提供主要的路径。从另一方面,扩散可能对传递可溶性物质进入细胞有效,并且扩散可能是神经元、树突、胶质细胞广泛生长之前的有效的传递形式,且先于血管化的发育^[18]。

发育过程的其它一些方面(如迁移过程的调控)也有可能依赖于 ECS 内扩散梯度的存在。多肽、激素和生长因子,以及不易透过细胞膜的药物的扩散在更大的 ECS 内会更加容易,但是在较小的 ECS 内扩散会减慢。

4 总结与展望

脑细胞外间隙是神经元生存的微环境,其正常功能对维持细胞间电信号传导、物质转运和神经突

触重塑等都具有重要意义,在生后脑发育过程中,ECS 的解剖结构及生理性能均发生变化,这一变化与多种因素有关。但是目前为止神经科学的主要进展基本都是基于 1930 年代西班牙卡哈尔的神经元学说,而对于神经元所生存的微环境一直以来都是关注的盲区^[46]。以往对于 ECS 的研究比较零散,结果有时互相矛盾,一个原因是其只能局部测量,缺少整体的宏观的解剖生理学结果支持,另一个问题是关于研究方法的模型选择与简化,参数拟合中一个尚未解决的问题是脑 ECS 与扩散分子之间电荷的相互作用,该项在扩散方程中的存在仍无定论。近年来,由 Han H^[47] 等人提出的 Gd-DTPA 介导的磁共振示踪成像法可以实现对全脑的实时、动态和可视化的定量研究,目前已完成成年鼠全脑 11 个脑区的组织通道生理特性的研究,对于发育中鼠脑的研究也在进行。

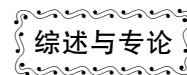
脑发育是一个复杂的过程,其中的变异是许多神经系统疾病的基础,美国的“通过推动创新型神经技术开展大脑研究”计划也将脑发育放在重要位置。脑细胞外间隙研究在脑发育中的应用是认识发育中神经活动规律及脑病发生发展机制的重要课题。此外,脑细胞外间隙在脑病治疗和认知科学发展中具有广阔的研究前景和学术价值,脑科学研究也将进入神经细胞与神经细胞生存的微环境并行发展的新时代。

参考文献:

- [1] 王国卿,封丽芳,夏作理. 脑内物质的淋巴引流与脑细胞微环境[J]. 中国微循环,2005,9(3):215-218.
- [2] 田牛,李玉珍,刘凤英. 脑微循环的特点[J]. 微循环学杂志,1999,9(3):40-44.
- [3] Sykova E, Nicholson C. Diffusion in brain extracellular space[J]. *Physiol Rev*, 2008,88(4):1277-1340.
- [4] Kilb W, Dierkes PW, Sykova E, *et al*. Hypoosmolar conditions reduce extracellular volume fraction and enhance epileptiform activity in the CA3 region of the immature rat hippocampus[J]. *J Neurosci Res*. 2006,84(1):119-129.
- [5] Wolak DJ, Pizzo ME, Thorne RG. Probing the extracellular diffusion of antibodies in brain using in vivo integrative optical imaging and ex vivo fluorescence imaging[J]. *J Control Release*. 2015,10;197:78-86.
- [6] Thorne RG, Hrabetova S, Nicholson C. Diffusion of epidermal growth factor in rat brain extracellular space measured by integrative optical imaging[J]. *J Neurophysiol*, 2004,92(6):3471-3481.
- [7] Birngruber T, Ghosh A, Perez-Yarza V, *et al*. Cerebral open flow microperfusion: a new in vivo technique for continuous measurement of substance transport across the intact blood-brain barrier[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2013,40(12):864-871.
- [8] Syková E, Mazel T, Simonová Z. Diffusion constraints and neuron-glia interaction during aging[J]. *Exp Gerontol*. 1998,33(7-8):837-851.
- [9] Thorne RG, Nicholson C. In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006,103(14):5567-5572.
- [10] Carare RO, Bernardes-Silva M, Newman TA, *et al*. Solutes, but not cells, drain from the brain parenchyma along basement membranes of capillaries and arteries: significance for cerebral amyloid angiopathy and neuroimmunology[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2008,34(2):131-144.
- [11] Han H, Li K, Yan J, *et al*. An in vivo study with an MRI tracer method reveals the biophysical properties of interstitial fluid in the rat brain[J]. *Sci China Life Sci*, 2012,55(9):782-787.
- [12] Xu F, Han H, Zhang H, *et al*. Quantification of Gd-DTPA concentration in neuroimaging using T(1)3D MP-RAGE sequence at 3.0 T[J]. *Magn Reson Imaging*, 2011,29(6):827-834.
- [13] Han H, Xia Z, Chen H, *et al*. Simple diffusion delivery via brain interstitial route for the treatment of cerebral ischemia[J]. *Sci China Life Sci*, 2011,54(3):235-239.
- [14] Nicholson C, Sykova E. Extracellular space structure revealed by diffusion analysis[J]. *Trends Neurosci*, 1998,21(5):207-215.
- [15] Vargova L, Sykova E. Extracellular space diffusion and extrasynaptic transmission[J]. *Physiol Res*, 2008,57 Suppl 3: S89-S99.
- [16] Bondareff W, Pysh JJ. Distribution of the extracellular space during postnatal maturation of rat cerebral cortex[J]. *Anat Rec*, 1968,160(4):773-780.
- [17] Pysh JJ. The development of the extracellular space in neonatal rat inferior colliculus: an electron microscopic study[J]. *Am J Anat*, 1969,124(4):411-429.
- [18] Lehmenkuhler A, Sykova E, Svoboda J, *et al*. Extracellular space parameters in the rat neocortex and subcortical white matter during postnatal development determined by diffusion analysis[J]. *Neuroscience*, 1993,55(2):339-351.
- [19] Sizonenko SV, Camm EJ, Garbow JR, *et al*. Developmental changes and injury induced disruption of the radial organization of the cortex in the immature rat brain revealed by in vivo diffusion tensor MRI[J]. *Cereb Cortex*, 2007,17(11):2609-2617.
- [20] Edgar LT, Underwood CJ, Guilkey JE, *et al*. Extracellular matrix density regulates the rate of neovessel growth and branching in sprouting angiogenesis[J]. *PLoS One*. 2014,22;9(1):e85178.
- [21] Riol H, Fages C, Tardy M. Transcriptional regulation of glial fibrillary acidic protein (GFAP)-mRNA expression during postnatal development of mouse brain[J]. *J Neurosci Res*, 1992,32(1):79-85.

- [22] Nicholson C, Kamali-Zare P, Tao L. Brain Extracellular Space as a Diffusion Barrier[J]. *Comput Vis Sci*, 2011,14(7):309–325.
- [23] Thorne RG, Nicholson C. In vivo diffusion analysis with quantum dots and dextrans predicts the width of brain extracellular space [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006,103(14):5567–5572.
- [24] Vorisek I, Sykova E. Measuring diffusion parameters in the brain: comparing the real-time iontophoretic method and diffusion-weighted magnetic resonance[J]. *Acta Physiol (Oxf)*, 2009,195(1):101–110.
- [25] Vorisek I, Sykova E. Evolution of anisotropic diffusion in the developing rat corpus callosum [J]. *J Neurophysiol*, 1997,78(2):912–919.
- [26] Polfliet MM, Zwiijnenburg PJ, van Furth AM, *et al.* Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis [J]. *J Immunol*, 2001,167(8):4644–4650.
- [27] Clapham R, O'Sullivan E, Weller RO, *et al.* Cervical lymph nodes are found in direct relationship with the internal carotid artery: significance for the lymphatic drainage of the brain[J]. *Clin Anat*. 2010,23(1):43–47.
- [28] Dickstein JB, Moldofsky H, Lue FA, *et al.* Intracerebroventricular injection of TNF-alpha promotes sleep and is recovered in cervical lymph[J]. *Am J Physiol*, 1999,276(4 Pt 2):R1018–R1022.
- [29] Kida S, Steart PV, Zhang ET, *et al.* Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages [J]. *Acta Neuropathol*, 1993,85(6):646–652.
- [30] Macaulay N, Zeuthen T. Glial K(+) clearance and cell swelling: key roles for cotransporters and pumps[J]. *Neurochem Res*, 2012,37(11):2299–2309.
- [31] Venero JL, Burguillos MA, Brundin P, *et al.* The executioners sing a new song: killer caspases activate microglia[J]. *Cell Death Differ*, 2011,18(11):1679–1691.
- [32] Tait MJ, Saadoun S, Bell BA, *et al.* Water movements in the brain: role of aquaporins[J]. *Trends Neurosci*, 2008,31(1):37–43.
- [33] Nico B, Frigeri A, Nicchia GP, *et al.* Role of aquaporin-4 water channel in the development and integrity of the blood-brain barrier[J]. *J Cell Sci*, 2001,114(Pt 7):1297–1307.
- [34] Badaut J, Ashwal S, Adami A, *et al.* Brain water mobility decreases after astrocytic aquaporin-4 inhibition using RNA interference[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2011,31(3):819–831.
- [35] Meng S, Qiao M, Lin L, *et al.* Correspondence of AQP4 expression and hypoxic-ischaemic brain oedema monitored by magnetic resonance imaging in the immature and juvenile rat[J]. *Eur J Neurosci*, 2004,19(8):2261–2269.
- [36] Tourdias T, Brochet B, Petry KG, *et al.* [Magnetic resonance imaging of central nervous system inflammation][J]. *Rev Neurol (Paris)*, 2009,165 Suppl 3:S77–S87.
- [37] Xiao F, Hrabetova S. Enlarged extracellular space of aquaporin-4-deficient mice does not enhance diffusion of Alexa Fluor 488 or dextran polymers[J]. *Neuroscience*, 2009,161(1):39–45.
- [38] Yao X, Hrabetova S, Nicholson C, *et al.* Aquaporin-4-deficient mice have increased extracellular space without tortuosity change [J]. *J Neurosci*, 2008,28(21):5460–5464.
- [39] Binder DK, Papadopoulos M C, Haggie P M, *et al.* In vivo measurement of brain extracellular space diffusion by cortical surface photobleaching [J]. *J Neurosci*, 2004,24(37):8049–8056.
- [40] Jones PL, Jones FS. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function [J]. *Matrix Biol*, 2000,19(7):581–596.
- [41] Sykova E, Vorisek I, Mazel T, *et al.* Reduced extracellular space in the brain of tenascin-R- and HNK-1-sulphotransferase deficient mice[J]. *Eur J Neurosci*, 2005,22(8):1873–1880.
- [42] Evers MR, Salmen B, Bukalo O, *et al.* Impairment of L-type Ca²⁺ + channel-dependent forms of hippocampal synaptic plasticity in mice deficient in the extracellular matrix glycoprotein tenascin-C[J]. *J Neurosci*, 2002,22(16):7177–7194.
- [43] Mcrae PA, Baranov E, Sarode S, *et al.* Aggrecan expression, a component of the inhibitory interneuron perineuronal net, is altered following an early-life seizure[J]. *Neurobiol Dis*, 2010,39(3):439–448.
- [44] Kwok JC, Dick G, Wang D, *et al.* Extracellular matrix and perineuronal nets in CNS repair[J]. *Dev Neurobiol*, 2011,71(11):1073–1089.
- [45] Kilb W, Dierkes PW, Sykova E, *et al.* Hypoosmolar conditions reduce extracellular volume fraction and enhance epileptiform activity in the CA3 region of the immature rat hippocampus[J]. *J Neurosci Res*, 2006,84(1):119–129.
- [46] 韩鸿宾. 神经元学说的补丁—脑细胞生存的微环境[J]. *科技导报*, 2012(26):71–74.
- [47] Han H, Li K, Yan J, *et al.* An in vivo study with an MRI tracer method reveals the biophysical properties of interstitial fluid in the rat brain[J]. *Sci China Life Sci*, 2012,55(9):782–787.

[修回日期]2015-01-16



中药治疗人与犬乳腺癌的临床和实验研究概况

林珈好,何敬荣,范开,林德贵

(中国农业大学动物医学院,北京 100193)

【摘要】 综合近年来文献可知,中药治疗乳腺癌取得了一定进展,本文对中药治疗人乳腺癌、犬乳腺癌的临床应用和实验研究进展进行对比和总结,从中药成方加减、中药提取物、中药有效成分等几个方面总结中药治疗乳腺癌的途径和方法,揭示中药治疗乳腺癌的作用机制。通过人、犬乳腺癌的中药临床和实验研究对比,使二者互为借鉴,为犬乳腺癌的中药临床治疗提供思路,为人乳腺癌的中药研发提供研究基础和重要模型。

【关键词】 中药;人;犬;乳腺癌

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0080-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 003. 15

Clinical and experimental research survey of human and canine mammary tumors which are treated by traditional Chinese medicine

LIN Jia-hao, HE Jing-rong, Fan Kai, Lin De-gui

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

【Abstract】 In recent years many reports on the progress of mammary tumors treated by traditional Chinese medicine (TCM) have appeared in the literature. In this article, progress of clinical and experimental study between human and canine mammary tumors was compared. Ways and methods of how TCM treat mammary tumors were exhibited such as Chinese medicinal formulae, herbal extracts and active ingredients. Meanwhile, mechanisms of TCM treating mammary tumors were pointed out. The purpose of this article is to provide idea about TCM clinical therapy methods for canine mammary tumors, and to provide research foundation and important models for study of human mammary tumors.

【Key words】 Traditional Chinese medicine; Human; canine; Mammary tumors

乳腺癌是人类和犬高发的重要恶性肿瘤疾病,且发病率呈逐年上升的趋势。2014 年美国国立癌症研究所(National Cancer Institute)的最新癌症统计数据显示,乳腺癌居于美国女性恶性肿瘤发病率第一位,死亡率占 16%^[1]。在我国,特别是京、津、沪等大城市乳腺癌发病率已上升为女性恶性肿瘤的第一位,成为妇女健康的最大威胁。犬作为人类的伴侣动物,所处生活环境和接触的致癌诱因与人

类极其相近,故犬乳腺肿瘤在兽医临床中也属常发病,母犬乳腺肿瘤发病率约占全部肿瘤性疾病的 25% ~ 42%,其中恶性乳腺肿瘤发病率为 50%,是人类乳腺肿瘤恶性率的 3 倍^[2]。同样的诱因也导致人与犬乳腺癌的发病机制具有相似之处。从分子层面看,犬乳腺癌具有和人家族遗传性乳腺癌相同的易感基因 *BRCA1* 和 *BRCA2*。犬的基因序列图和单核苷酸阵列相关研究表明,控制犬乳腺肿瘤的

[作者简介] 林珈好,女,讲师,从事中兽药新剂型与新技术研究。E-mail: jiahao_lin@cau.edu.cn。

[通讯作者] 林德贵,男,教授,研究方向:小动物皮肤病、真菌病和肿瘤疾病。E-mail: csama@sina.com。

形态、生物学行为、临床发展进程的基因序列和与之相对应人的基因序列具有高度的同源性^[3]。另外,与肿瘤细胞侵袭和转移相关的 *CD44* 和 *VEGF* 是人、犬乳腺癌研究的重要生物标志物^[4]。而 *P53*、*Bcl-2* 等基因及产物在人、犬乳腺肿瘤中的表达,是评价患者/畜预后的重要标志物^[5]。从激素调节相关研究来看,人、犬的乳腺肿瘤均具有雌激素依赖性。临床研究发现早年母犬子宫卵巢摘除术后可使发病率降低,该病诱发因素可能与孕激素、雌激素联合应用前列腺素和生长激素有关^[6]。另有研究发现 50%~80% 的犬恶性上皮瘤表达雌激素受体感受器,表明犬的乳腺肿瘤与女性乳腺肿瘤相似,具有激素相关性^[7]。

虽然对犬乳腺癌发病机制有一定的研究基础和认识,但其临床治疗手段仍较单一,多以手术为主,包括简单的肿块摘除、区域性乳房切除术和乳房彻底切除术。而人乳腺癌已由单纯手术治疗开始转向加强全身治疗,即包括外科手术、放射线疗法、化学疗法、免疫疗法、激素疗法以及靶向疗法在内的综合治疗。由于人对于肿瘤临床实践的开展比动物早十年,期间积累了大量经验,近年国内外也有将人乳腺癌治疗方案探索性应用于犬乳腺癌临床辅助治疗的案例,但其效果未进行系统评价。例如:跟踪调查显示,犬在乳腺肿瘤切除的同时进行卵巢子宫切除术后,存活时间要比单纯肿瘤切除治疗的犬显著延长,提示激素疗法可能对犬乳腺肿瘤同样有效^[7]。5-氟尿嘧啶、环磷酰胺、多柔比星等人乳腺癌临床常用的辅助化疗药物也有作为辅助性治疗手段用于犬乳腺癌转移的临床和基础研究案例^[8-10],提示在手术切除为主的同时,化疗不失为一种有效的辅助手段。

现代医学对乳腺癌的临床效果值得肯定,但其不良反应也不容忽视。例如犬乳腺癌在手术过程中,浸润性癌症易发微转移^[11]。并且临床研究表明,区域性肿瘤切除后,77% 的犬复发^[12]。常规化疗药物顺铂、阿霉素等易引发恶心呕吐、骨髓抑制、体质量下降等严重不良反应,且长时间用药易引发多药耐药。中药以其辨证施治、多靶点、绿色低毒的优势综合作用于乳腺癌,日益受到国内外肿瘤临床界的重视。有些学者转而从中药成方、提取物以及活性单体中寻找高效、低毒的乳腺癌治疗药物。

1 中医对乳腺癌的认识

乳腺癌中医文献中称为“乳核”、“石痈”、“乳岩”、“苟抄乳”等,其发病是由多因素诱发的,但多归于积聚范畴。正气不足,气血两虚是发病的前提及决定因素;肝肾不足,冲任失调是发病的内因和根本;情志内伤,肝脾郁结是发生发展的重要因素;癖血凝滞,痰凝湿聚,热蕴毒结是发病的重要条件;六淫外侵,邪毒留滞是发病的外因。正如《医宗必读》所言“积之成者,正气不足,而后邪气踞之”。

2 中药治疗人乳腺癌

乳腺癌治疗分为围手术期、放化疗期、术后巩固期 3 个阶段,不同阶段的病机特点各不相同,经中医辨证施治后都可获得较好的临床疗效。中药治疗乳腺癌的临床应用和科学研究主要体现在以下几个方面:抑制乳腺癌进展、缓解病情;增强机体免疫和抗病力;治疗乳腺癌术后患侧上肢水肿、皮瓣坏死、皮下积水等并发症,促进术后体质恢复;减少乳腺癌放化疗后的放射性肺炎、血液毒性、消化道不良反应等毒副反应;抗乳腺癌复发及其晚期肺、肾、肝复发转移。

2.1 成方加减

乳腺癌的病情复杂,证型各异,虚实夹杂,错综复杂,大致可以分为脾胃虚弱证、阴虚津伤证、气血两虚证、肝肾亏虚证、肝气郁结证、痰湿蕴结证、癖血内阻证和热毒壅盛证八个证型^[13]。然而临床之复杂远非八个证型能概括的,临床证候常可相互交叉,变生出更多的证型。例如,整体是气血两虚证,局部是热毒壅盛证,可以是肝肾亏虚证与肝气郁结或肝郁脾虚痰湿蕴结证并见。中药成方在治疗乳腺癌时发挥辨证施治的特点,其优势在于不同的治疗阶段针对不同病证可灵活变换组方(表 1)。一般情况乳腺癌早期应以祛邪为主,中期攻补兼施,晚期重在扶正。研究表明乳腺癌的中药处方中大量用药体现在白术、薏苡仁、茯苓等 10 种益气补血,活血化瘀类中药^[14]。例如在化疗期间,随着化疗药物的密集使用,癌细胞在被杀灭的同时,人身之气血和脾胃也随之受到损伤,而脾失健运,生化无源,更致气血亏损使血象下降。因此可选用黄芪、太子参、当归等益气补血,炒白术、生薏仁、茯苓等健脾和胃中药以保护骨髓造血功能,减轻化疗药物毒副反应^[15]。临床研究表明大多数肿瘤患者存在以血

小板与血粘度增高为病理基础的血瘀现象,与肿瘤转移密切相关,研究表明,此时采用芎龙汤等活血化瘀瘀类方剂,可明显改善患者的高粘血液状态,进一步与补气类中药配合,有效率达 91.8%,恶化率仅为 6.2%^[16]。

表 1 中药方剂治疗乳腺癌的临床研究例证
Tab.1 Clinical research examples of Chinese medicinal formulae for mammary cancer

治疗阶段	病证	方剂组成	功效	临床症状
围手术期	血瘀湿聚	双柏散(侧柏叶、大黄、黄柏等) ^[17] ;内服兼外用 ^[18]	消炎止痛 活血化瘀 软坚散结	术后上肢淋巴水肿
	正气不足 脾气亏虚	六君子汤加味	扶正培本	免疫功能低下 ^[19]
	脾虚湿滞	自拟方(生黄芪、太子参、茯苓等)	健脾利湿	术后上肢水肿 ^[20]
	脾肾阴虚	八珍汤加减	益气养阴 疏肝解郁	化疗白细胞减少症 ^[21]
放化疗期	脾胃虚弱 湿浊内蕴	四君子汤加减	益气养阴 和胃降逆	化疗恶心呕吐证 ^[22]
	气血两虚	金衡灵方	气血双补 心肝肾三脏同调 安神固脾	化疗恶心呕吐,腹泻, 口腔炎,感染,过敏, 粒缺性发热症 ^[23]
	痰淤毒热	立体疗法(郁金、赤芍、当归等中药配合针灸)	活血化瘀	生活质量下降 ^[24]
术后巩固期	肝郁气滞	逍遥散加减	疏肝解郁 养血健脾	转移性乳腺癌 ^[25]
	肝郁血热	自拟方(柴胡、牡丹皮、白薇等)	疏肝解郁 凉血清热	内分泌治疗后潮热 ^[26]

2.2 中药提取物

根据乳腺肿瘤临床治疗经验,选择有潜在抗乳腺癌作用的中药,用其提取物进行体外实验,已发现一些作用较强的乳腺癌抑制剂。如莪术提取物^[27]、土贝母提取物^[28]、蛇六谷提取物^[29]等。莪术的挥发油类成分和姜黄素类成分都具有抗肿瘤活性^[30-31],其石油醚萃取物和乙酸乙酯萃取物通过将细胞阻滞在 G₁ 期,使得细胞无法进入有丝分裂期,发挥对人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的抑制作用。土贝母的二氯甲烷提取物作用于绿色荧光蛋白基因转染的 MDAMB-231 乳腺癌裸鼠模型,其中高剂量组和阳性对照组肿瘤较阴性对照组明显缩小。蛇六谷石油醚萃取物、高浓度乙酸乙酯萃取物对人三阴性乳腺癌生长同样有明显的抑制作用,其中石油醚萃取部位抑制作用最强,可将乳腺癌细胞阻滞于 S 期。另外,中药提取物能够通过逆转乳腺肿瘤化疗药物的多药耐药而产生协同增效的癌症治疗效果。研究表明中药功劳木提取物可提高阿霉素对耐药细胞 562/ADM、CF7/ADM 细胞的抑制率,增加耐药细胞内药物浓度,且呈剂量依赖性^[32]。在非细胞毒性范围内,冬凌草乙酸乙酯和氯仿部位能够通过增加 MCF-7/ADM 细胞内罗丹明

123 的蓄积,下调 MCF-7/ADM 细胞内多药耐药基因 MDR1 及 P-gp 表达,增加耐药乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性,达到逆转多药耐药的作用^[33]。

2.3 中药有效成分

从中药有效成分中发掘抗乳腺癌活性药物并对其作用机理进行深入研究是中药抗乳腺癌研究的热点。中药有效成分干预乳腺癌的作用机制包括诱导乳腺癌细胞凋亡、抑制乳腺癌细胞增殖、干预乳腺癌细胞转移、改善乳腺癌细胞多药耐药等方面^[34]。研究^[35]显示,白黎芦醇可通过下调 MCF-7 细胞抗凋亡蛋白 Bcl-2 过表达而诱导凋亡,同时能降低线粒体膜电位、增加活性氧簇和氧化亚氮的产生,抑制 Bcl-2 调节器和其钙蛋白酶活性,从而发挥抑制肿瘤细胞增殖的作用。Wang^[36]等对大黄素体外抗乳腺癌作用与雌激素受体 ER α 信号通路之间的关系进行了系统的研究,结果表明大黄素能够抑制 MCF-7 细胞中 ER α 靶基因蛋白 Cyclin D1 和 Bcl-2 表达,同时能抑制雌激素诱导的 Akt 和 MAPK 蛋白磷酸化,且对 ER α 阳性 MCF-7 细胞增殖抑制呈明显的剂量和时间依赖关系。天然产物紫杉醇不仅具有诱导微管蛋白聚集的强细胞毒作用,也具有较

强的抑制肿瘤细胞黏附、侵袭和转移的功能^[37-38],

其前体化合物多西紫杉醇具有高度的抗癌活性和可以耐受的毒性反应,多西紫杉醇联合化疗药物治疗转移性乳腺癌有高效低毒的治疗效果^[39]。另外,冬凌草甲素^[40-41]、粉防己碱^[42]、姜黄素^[43]、苦参碱^[44]等中药活性单体均表现出较强的抗乳腺癌活性,从中药中发掘强效低毒的抗乳腺癌活性单体有着良好的应用前景。

3 中药治疗犬乳腺癌

目前中药应用于肿瘤疾病的相关研究多集中于人用,动物肿瘤疾病的相关研究则很少,尤其在犬乳腺肿瘤的研究方面报道不多。但随着犬与人类亲密程度的增强以及犬乳腺癌模型作为人乳腺癌临床前研究的价值体现,越来越多的科研工作者开始探索中药在犬乳腺肿瘤方面的应用。目前关注较多的是萜类抗癌天然药物紫杉醇和生物碱类抗癌天然药物长春新碱。紫杉醇是从红豆杉树皮中提取出的一种四环二萜类化合物,于 1992 年被 FDA 批准用于治疗人卵巢癌和转移性乳腺癌^[45]。国外兽医界有应用 Paclitaxel(他克唑:紫杉醇制剂的商品名)来治疗猫转移性乳腺癌的报道,发现 Paclitaxel 在猫和部分犬转移性乳腺癌的治疗方面疗效显著^[46]。研究表明,紫杉醇能够诱导犬乳腺肿瘤原发病灶和转移病灶细胞产生凋亡^[47-48]。进一步发现紫杉醇能够促使细胞 G₂/M 期阻滞和抑制细胞有丝分裂,并能降低犬乳腺肿瘤细胞 CHMm 中 Bcl-2 表达,促进 p53、p27 表达^[49-50]。在另一个调节细胞凋亡的重要因素—细胞氧化还原方面,紫杉醇也发挥着重要作用。徐永伟^[51]等研究发现在紫杉醇作用下,犬乳腺肿瘤 CHMm 细胞内活性氧(ROS)和丙二醛(MDA)含量增加,超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)酶活性降低,细胞内出现氧化还原失衡。表明紫杉醇能够抑制 CHMm 细胞生长,打破氧化还原平衡,诱导细胞凋亡并呈浓度和时间依赖性。长春新碱是从夹竹桃科植物长春花中分离出的生物碱,长春新碱具有诱导犬乳腺癌细胞凋亡的作用,且此作用与药物的浓度和作用时间有关^[52]。研究表明长春新碱主要是通过抑制细胞微管蛋白聚集和干扰细胞蛋白质、脂类、氨基酸及核酸代谢而起抗癌作用,一定剂量的长春新碱可能通过阻滞肿瘤细胞于 G₂/M 期而抑制其增殖^[53]。

从文献和临床应用情况看,中药治疗犬乳腺癌

的特点主要体现在:1、用药单一,临床应用主要集中于活性单体,且研究多着眼于单一层面,如细胞毒性、基因研究等。2、剂型单一,局限于注射剂,适用范围较窄。与之相比,在人乳腺癌治疗领域,中医中药以其独特的优势和悠久的历史,积累了许多有效的治疗方法,特别是针对乳腺癌术后辅助治疗和乳腺癌晚期治疗方面,中医药具有无可比拟的优势和重要作用。人用中药在抗乳腺癌验方基础上,展开成方加减、提取物和活性成分多层次研究,结合抗乳腺癌药效物质基础和机制的深入发掘,对犬乳腺癌的中药治疗具有宝贵的借鉴意义。另外,近年来中药制剂新技术和新剂型领域的快速发展也有效提高了中药的生物利用度和体内药效,为中药治疗乳腺癌开辟了新的发展空间。提示犬乳腺癌的中药治疗可从方剂配伍、提取物优化、有效部位筛选等多个层面的研究和应用入手,充分发挥中药多途径多靶点的整体优势和潜力,还可根据临床需要结合中药现代制剂技术设计开发口服制剂、外用制剂、长效缓释制剂等新剂型和给药系统,以增加中药治疗犬乳腺癌的功效。

4 前景

随着现代肿瘤诊疗技术的不断提升,乳腺癌的发现越来越早。现代医学对乳腺癌认识的不断深入以及人们对于乳房审美的提高,均可能使乳腺癌保乳治疗得到广泛推广,这就必须以全身辅助治疗为支撑。而乳腺癌的形成和发展机制非常复杂,同一肿瘤细胞可能由多机制介导,单纯化药往往靶点单一,杀灭肿瘤细胞的同时存在不可避免的全身毒性。中药可以针对乳腺癌多种机制进行治疗,并且在本身具有抗癌作用的同时,可有效逆转多药耐药,显著提高化疗药物对肿瘤细胞的细胞毒性,充分体现了中药的多靶点优势。大量临床研究也证实,乳腺癌患者配合中药辨证论治,可调整机体阴阳、气血、脏腑和经络功能,改善机体物质代谢,增强机体免疫功能和抗病力,减轻放化疗毒副反应,提高手术切除率及放化疗成功率。随着更多高效、低毒、多靶点的中药抗乳腺癌药物的发现和现代药剂学技术的应用,中药将大有用武之地。

人与犬乳腺癌发病机制的相似性,一方面提示人用中药可以尝试应用于犬乳腺肿瘤的治疗,填补犬乳腺肿瘤治疗方式单一的空白,辅助提高患畜术后存活率。另一方面,犬乳腺癌肿瘤病例可以成为

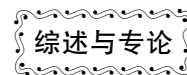
研究人乳腺肿瘤疾病的最好模型,为人乳腺肿瘤疾病治疗用中药的筛选、药代动力学、药效学等临床前研究提供良好载体,对抗肿瘤中药作用机制的研究也有着重要意义。另外,中药作为我国传统宝贵资源,以其多靶点、绿色低毒的特色,已成为人用抗肿瘤药物的天然宝库,而中药针对犬乳腺肿瘤的研究相对较少,提示中药在犬乳腺肿瘤的基础研究与临床治疗方面有十分广阔的发展前景和重要意义。

参考文献:

- [1] Siegel R, Ma J, Zou Z, *et al.* Cancer statistics, 2014[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2014,64(1):9-29.
- [2] Brunelle M, Sartin E A, Wolfe L G, *et al.* Cyclooxygenase-2 expression in normal and neoplastic canine mammary cell lines[J]. Vet Pathol, 2006,43(5):656-666.
- [3] Rivera P, von Euler H. Molecular Biological Aspects on Canine and Human Mammary Tumors [J]. VETERINARY PATHOLOGY, 2011,48(1):132-146.
- [4] 崔文,肖建华,范宏刚,等. CD44、VEGF、p53 在犬乳腺肿瘤细胞系中的表达[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(11):39-41.
- [5] Haga S, Nakayama M, Tatsumi K, *et al.* Overexpression of the p53 gene product in canine mammary tumors[J]. Oncol Rep, 2001,8(6):1215-1219.
- [6] 闫妮娜,冯士彬,杨雪艳,等. 犬乳腺肿瘤的病理分析和标志物测定[J]. 畜牧与兽医, 2013(10):82-85.
- [7] 郑家三,王玉珠,刘云. 犬乳腺肿瘤治疗的研究进展[J]. 畜牧兽医杂志, 2005(06):23-25.
- [8] Karayannopoulou M, Kaldrymidou E, Constantinidis T C, *et al.* Adjuvant post-operative chemotherapy in bitches with mammary cancer[J]. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med, 2001,48(2):85-96.
- [9] Sobral R A, Honda S T, Katayama M L, *et al.* Tumor slices as a model to evaluate doxorubicin in vitro treatment and expression of trios of genes PRSS11, MTSS1, CLPTM1 and PRSS11, MTSS1, SMYD2 in canine mammary gland cancer[J]. Acta Vet Scand, 2008,50:27.
- [10] Ustun A F, Bakirel T, Ustuner O, *et al.* In vitro effects of doxorubicin and deracoxib on oxidative-stress-related parameters in canine mammary carcinoma cells[J]. Acta Vet Hung, 2014, 62(3):372-385.
- [11] Pawlowski K M, Mucha J, Majchrzak K, *et al.* Expression and role of PGP, BCRP, MRP1 and MRP3 in multidrug resistance of canine mammary cancer cells [J]. BMC VETERINARY RESEARCH, 2013,9(119).
- [12] Stratmann N, Failing K, Richter A, *et al.* Mammary tumor recurrence in bitches after regional mastectomy[J]. Vet Surg, 2008,37(1):82-86.
- [13] 谢丹. 乳腺癌中医证候分类与预后因素的相关性研究[D]. 广州中医药大学, 2006.
- [14] 吴学瑾. 乳腺癌 50 例中药处方的临床研究[J]. 中国药业, 2010(04):55-57.
- [15] 陈长怀. 中西医结合治疗乳腺癌 42 例临床观察[J]. 浙江中西医结合杂志, 2001(02):18-19.
- [16] 陈健民. 癌症患者血液高粘状态与活血化瘀治疗[J]. 中西医结合杂志, 1985(02):89-91.
- [17] 李珍,刘永存,钟小玲. 双柏散外敷治疗乳腺癌术后上肢淋巴水肿临床观察[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009(01):86-87.
- [18] 崔芳园,贾立群. 中医治疗乳腺癌术后上肢淋巴水肿 1 例[J]. 吉林中医药, 2011(08):790-791.
- [19] 杨丽萍,孙士玲. 中药配合术前化疗治疗乳腺癌临床研究[J]. 河南中医学院学报, 2004(04):40-41.
- [20] 梅洪萍. 健脾利湿中药治疗乳腺癌术后上肢水肿的疗效观察[D]. 浙江中医药大学, 2013.
- [21] 王国霞,崔志民. 八珍汤加减治疗 I ~ III 期乳腺癌术后化疗白细胞减少症疗效观察[J]. 河北中医, 2003(01):10-12.
- [22] 罗雪冰. 补气降逆法治疗乳腺癌化疗恶心呕吐证临床观察[J]. 中国中医急症, 2007(09):1073-1116.
- [23] 王一荃,王祝鸣,李芸茜,等. 中药复方金衡灵减轻乳腺癌术后化疗毒副反应的临床观察[J]. 世界中医药, 2012(05):387-389.
- [24] 周利生. 探讨中医立体疗法对术后乳腺癌患者生存质量的影响[J]. 中医临床研究, 2013(01):76-77.
- [25] 夏慧敏. 用中药汤剂治疗术后转移性乳腺癌的临床疗效观察[J]. 求医问药(下半月), 2012(11):814.
- [26] 孙红,薛冬,高非,等. 中药舒肝凉血方改善乳腺癌患者潮热的临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2009(01):30-33.
- [27] 李海龙,刘培,高秀飞. 中药莪术提取物对人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014(10):2416-2418.
- [28] 安超,杨萌,胡明昕,等. 土贝母提取物对人乳腺癌 MDA-MB-231-GFP 裸鼠模型的抗肿瘤作用评价[J]. 中华中医药杂志, 2013(02):390-393.
- [29] 高秀飞,李海龙,刘培,等. 中药蛇六谷提取物对人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014(04):801-804.
- [30] 唐德才,臧文华,冯海红. 莪术不同品种含药血清对人胃癌细胞 BGC823 增殖、凋亡及核质比的影响[J]. 北京中医药大学学报, 2013(04):254-257.
- [31] 汤欣,韩凤娟,李威,等. 莪术醇对人卵巢癌 SKOV3 细胞株 JAK2/STAT3 信号通路影响的研究[J]. 中国妇产科临床杂志, 2013(01):43-46.
- [32] 田春艳,张凤春,林玉梅,等. 中药功劳木逆转 K562/ADM, MCF7/ADM 细胞的作用[J]. 第四军医大学学报, 2004(03):236-239.
- [33] Li F, Fan J, Wu Z, *et al.* Reversal effects of Rabdosia rubescens extract on multidrug resistance of MCF-7/Adr cells in vitro[J]. Pharm Biol, 2013,51(9):1196-1203.
- [34] 张士勇. 中药活性成分对乳腺癌细胞干预的研究进展[J]. 安徽医药, 2009(12):1456-1458.
- [35] Pozo-Guisado E, Merino J M, Mulero-Navarro S, *et al.*

- Resveratrol-induced apoptosis in MCF-7 human breast cancer cells involves a caspase-independent mechanism with downregulation of Bcl-2 and NF-kappaB [J]. *Int J Cancer*, 2005,115(1):74-84.
- [36] Wang L M, Xie K P, Huo H N, *et al.* Luteolin inhibits proliferation induced by IGF-1 pathway dependent ERalpha in human breast cancer MCF-7 cells[J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2012,13(4):1431-1437.
- [37] 周龙恩, 刘红岩, 徐少锋, 等. 紫杉醇对 MDA-MB-435 人乳腺癌高转移细胞粘附, 侵袭及迁移能力的影响[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2001(01):51-55.
- [38] Yao H J, Ju R J, Wang X X, *et al.* The antitumor efficacy of functional paclitaxel nanomicelles in treating resistant breast cancers by oral delivery[J]. *Biomaterials*, 2011,32(12):3285-3302.
- [39] 陈占红, 王晓稼. 多西紫杉醇为主的联合治疗方案治疗 62 例晚期乳腺癌[J]. *肿瘤学杂志*, 2008(03):223-225.
- [40] Hsieh T C, Wijeratne E K, Liang J Y, *et al.* Differential control of growth, cell cycle progression, and expression of NF-kappaB in human breast cancer cells MCF-7, MCF-10A, and MDA-MB-231 by ponocidin and oridonin, diterpenoids from the chinese herb *Rabdosia rubescens*[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005,337(1):224-231.
- [41] Cui Q, Tashiro S, Onodera S, *et al.* Autophagy preceded apoptosis in oridonin-treated human breast cancer MCF-7 cells [J]. *Biol Pharm Bull*, 2007,30(5):859-864.
- [42] Jin J, Wang F P, Wei H, *et al.* Reversal of multidrug resistance of cancer through inhibition of P-glycoprotein by 5-bromotetrandrine[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2005,55(2):179-188.
- [43] 磨娜, 曹友德, 蒋金, 等. 姜黄素对转化生长因子- β 1 诱导的乳腺癌 MDA-MB-231 细胞基质金属蛋白酶-9 表达及其侵袭能力的影响[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012(10):1329-1335.
- [44] 任莉莉, 蓝天, 王晓稼. 苦参碱诱导人乳腺癌 Bcap-37 细胞自噬及凋亡作用研究[J]. *中华中医药学刊*, 2014(11):2756-2759.
- [45] 何颖, 谈锋, 谢建平. 红豆杉内生真菌产紫杉醇研究进展[J]. *天然产物研究与开发*, 2006(03):519-523.
- [46] 李大磊, 霍清秀. 犬猫乳腺癌的诊断与治疗[J]. *黑龙江动物繁殖*, 2009(05):27-30.
- [47] 陈萌, 李华涛, 李响, 等. AO/EB 双重染色法检测紫杉醇体外诱导犬乳腺肿瘤细胞凋亡[J]. *广东畜牧兽医科技*, 2011(01):39-42.
- [48] 李华涛, 张蓉蓉, 任晓丽, 等. 不同浓度紫杉醇诱导犬乳腺肿瘤细胞凋亡的形态学观察[J]. *中国兽医科学*, 2011(04):413-417.
- [49] 张力国, 李情, 陈萌, 等. 紫杉醇对犬乳腺肿瘤细胞 bcl-2 和 p53 的 mRNA 表达的影响[J]. *中国预防兽医学报*, 2014(07):538-541.
- [50] 李情, 姚微, 杨超, 等. 紫杉醇对 CHMm 细胞 G₂/M 期的阻滞及对周期相关因子的影响[J]. *中国兽医科学*, 2013(12):1306-1312.
- [51] 徐永伟, 李华涛, 李响, 等. 紫杉醇诱导犬乳腺肿瘤细胞凋亡和细胞 ROS 及 SOD 失衡的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2011(08):606-610.
- [52] 李成叶, 邱昌伟, 王金秋, 等. 长春新碱对犬乳腺癌细胞增殖和凋亡的影响[J]. *中国兽医杂志*, 2010(04):54-55.
- [53] 唐旭东, 周克元, 丁航. 长春新碱对鼻咽癌细胞增殖和周期的影响[J]. *中国肿瘤*, 2003(02):55-56.

[修回日期]2015-02-26



融水小型猪的实验动物化系列研究概述

施赫赫^{1,2}, 陈 淦², 刘 科¹, 刘运忠³, 王绪敏⁴, 高 翔⁵,
贺争鸣⁶, 余细勇⁷, 赖良学⁸, 唐小江¹

(1. 广东省医学实验动物中心, 广东 佛山 528248; 2. 广东贝格生物科技有限公司, 广东 佛山 528100;
3. 广州医药工业研究总院, 广州 510240; 4. 中国科学院北京基因研究所, 北京 100101;
5. 南京大学模式动物研究所, 南京 210061; 6. 中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所, 北京 100050;
7. 广东省医学科学院, 广州 510060; 8. 中国科学院广州生物医药与健康研究院, 广州 510530)

【摘要】 融水小型猪的种源来自广西融水县, 2012 年被引到广东繁育并测定了基础数据, 包括种质特性、繁殖性能、生长曲线、血液学指标、血生化指标、脏器系数、染色体分析。参照国家和地方有关实验动物标准, 初步建立了融水小型猪微生物与寄生虫、环境与设施、饲料、病理学、遗传学等质量控制标准。融水小型猪能适应当地气候, 繁殖良好, 自然受孕率为 88.3%, 妊娠期平均 112 d, 初产平均胎产仔 6.1 头, 经产平均产仔 7.9 头。融水小型猪体型小, 雌雄成年体重(6 月龄)分别为 17.21 ± 5.20 kg 和 16.35 ± 5.23 kg, 性情温顺, 线粒体 DNA 分析表明融水小型猪比兰屿猪更为古老。通过标准化的饲养管理与质量控制, 具有培育成实验用小型猪的基本条件。

【关键词】 融水小型猪; 种质特性; 实验动物化; 质量控制

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 03-0086-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.003.016

Brief report of series study on Rongshui miniature pig as laboratory animal

SHI He-he^{1,2}, CHEN Gan², LIU Ke¹, LIU Yun-zhong³, WANG Xu-min⁴,
GAO Xiang⁵, HE Zheng-ming⁶, YU Xi-yong⁷, LAI Liang-xue⁸, TANG Xiao-jiang¹

(1. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Guangdong Foshan, 528248, China;
2. Beige BioTec Co., Ltd., Guangdong Foshan 528100, China; 3. Guangzhou Pharmaceutical Industry Research Institute, Guangzhou, 510240, China; 4. Beijing Institute of Genomics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;
5. Model Animal Research Center of Nanjing University, Nanjing 210061, China; 6. Chinese Experimental Animal Resources Research Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China;
7. Guangdong Academy of Medical Sciences, Guangzhou 510060, China;
8. Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510530, China)

【Abstract】 The provenances of Rongshui miniature pigs (RMPs) were purchased from Rongshui, Guangxi, in 2012. 130 RMPs were transported to Sanshui, Guangdong, China, which were breed according to the laboratory animal standards. 83 RMPs were selected randomly from the first filial generations (F1). The basic data were collected including breed characteristics, reproductive performance, grow curve, hematology, biochemical markers of serum and urine, organ coefficient, Chromosome analysis. According to the national and local standards, the quality control standards of RMP were

[基金项目] 国家重大研究计划项目(2011CB944101); 国家自然科学基金重点项目(81120108003; 81330007)。

[作者简介] 施赫赫(1985-), 男, 硕士, 研究方向: 实验用小型猪。

[通讯作者] 唐小江(1967-), 男, 博士, 研究方向: 实验动物与疾病动物模型、毒理学。E-mail: river-t@126.com。

set up including microbiological, parasitic, environment and facilities, fodder, pathology, genetic. The results showed that RMPs adapt to the climate of Guangdong. The natural mating and conceive rate was 88.3% with the pregnancy of 112 days. The average number of firstborn and still-born was 6.1 and 7.9 respectively. RMP was small body size with the adult body weight of 17.21 ± 5.20 kg and 16.35 ± 5.23 kg in female and male respectively. RMP was very tame. The mitochondrial genome analysis suggested RMP belonged a typical miniature pig breed in China, which is ancient than Lanyu pig. RMP could be breed as a new kind of laboratory animal.

【Key words】 Rongshui miniature pig(RMP); Characteristic; Experimental animalization; Quality control

我国具有丰富的小型猪资源,数十家机构对近 10 种小型猪开展了实验动物化研究,培育出五指山小型猪、版纳微型猪、贵州小型猪、巴马小型猪、中国农大小型猪、西藏小型猪、蕨麻小型猪等实验用小型猪^[1-7],但我国至今尚未建立可稳定供应的实验动物用小型猪品种。与国外知名的小型猪如哥廷根小型猪等^[8]相比,我国实验用小型猪的标准化研究和繁育、规模化生产与供应都存在巨大的差距,难以满足日益增长的动物实验需求。与国外采取杂交选育的培育方法不同,我国实验用小型猪大多采取自然形成的封闭群选育,因此,良好的种源成为实验动物化的基础,而“体型小、体重轻、性情温驯、表型一致”是关键。本课题组在广西融水县苗寨发现了一种体型小、性情温驯的小黑猪。在广东贝格生物科技有限公司和广东省医学实验动物中心的支持下,我们于 2012 年 5 月将该品种引种到广东佛山三水乐平镇的小型猪基地进行实验动物化研究,现将系列研究情况作一概述。

1 融水小型猪的种源

融水小型猪的种源来自广西壮族自治区融水县杆洞乡百秀村苗寨。该猪在当地被称为“香猪”、“大苗山香猪”、“苗猪”、“融水黑香猪”等。该苗寨地处崇山峻岭之中,交通十分不便,因此该猪是近亲繁殖,基本没有引入外来基因,经过数千年繁育,遗传性状稳定,属于自然形成的典型封闭群,目前尚无该猪种质资源特性的研究报道。

2 保种区选址与硬件设施建设

融水小型猪研究基地(广东省医学实验动物中心小型猪基地)位于佛山市三水区乐平镇所辖林地,占地约 200 亩,四面树林环绕,自成天然防疫屏障,空气质量良好,远离居民点。地理位置满足卫生防疫安全、生产物资的运输需要。基地设生产区、行政办公区与后勤生活区三个功能区。生产区与行政办公区、后勤生活区隔离分开,处于下风向,

生产区内设置种猪配种怀孕舍、分娩舍、保育舍,采用高床养殖(彩插 12 图 1)。

猪舍设计为砖墙全封闭式,隔热瓦封顶,安装抽风机;冬季保暖采用保温灯、保温垫板;门窗采用铝合金,加装防蚊纱窗、纱门和挡鼠板;排污采用环保处理,设计为雨水与粪尿污水分流;每一栋猪舍配备一个三级化粪池或沼气池,将粪尿进行无害化处理和资源化利用。

3 融水小型猪种质特性

3.1 体型外貌

融水小型猪体型外貌见彩插 12 图 2。该猪体躯矮小,被毛全黑,少量有唇白和肢端白。头较大,面平直,额面有纵行皱纹,耳较小薄,略向前伸,稍下垂或两侧平伸。颈部短而细,背腰平直或微凹,腹较大下垂但不拖地,尾巴细长。母猪乳头多为 5~6 对,少量能达到 7 对。后躯丰满,四肢短细紧凑,肢端常见为卧系。

3.2 生长性能

融水小型猪生长缓慢,F1 代雌雄仔猪 6 月龄、12 月龄平均体重分别为 17.21 ± 5.20 Kg 和 16.35 ± 5.23 Kg, 26.97 ± 6.49 Kg 和 26.53 ± 5.65 kg,详见另文报道。3 年龄的空怀母猪平均体重 44.60 kg。

3.3 繁殖性能

母猪发情症状明显,一个情期的自然交配受孕率较高,约 88.3%;引进母猪配种后妊娠期平均 112 d,初产平均胎产仔 6.1 头,活仔数 5.9 头;经产平均产仔 7.9 头,活仔数 5.9 头。仔猪 45~60 d 龄断奶。

4 实验动物化系列研究

4.1 常规指标的测定

按照《实验动物哺乳类实验动物的遗传质量控制》的要求^[9],开展了实验动物化系列研究,包括 4 月龄和 12 月龄融水小型猪的血液学、血清生化指标分析,对 F1 代从初生至 12 月龄进行连续跟踪测量

体重及体尺值,测定指标包括:体重、体长、体高、胸围、管围、腿臀围、胸深、胸宽、嘴裂长度^[10]。采用淋巴细胞培养法进行染色体分析,测得常染色体 18 对,性染色体 1 对。测定了脏器重量及脏器系数、尿液生化及其他基础数据。以上研究详见另文报道。

4.2 质量控制研究

参考实验用小型猪北京地方标准^[11],对保种群进行质量控制研究,包括微生物学、寄生虫学、病理学、配合饲料、环境设施和遗传质量控制六方面。

4.2.1 微生物学:随机选择 23 头融水小型猪,经常规免疫程序免疫后的,检测猪瘟抗体、蓝耳抗体,结果均呈阳性反应,说明猪群获得免疫性保护。随机选择 61 头融水小型猪进行圆环病毒抗体检测,结果均为阴性,说明该猪群没有受圆环病毒感染。

4.2.2 寄生虫学:经过定期(3 个月一次)给予体内外驱虫药后,进行体表寄生虫检测,未发现体外寄生虫,弓形虫未检测。

4.2.3 饲料:生长料,哺乳料及维持料与饲料厂家合作,根据北京地方标准制作,开食料采用厂家提供的教槽料。

4.2.4 组织病理学:对 4 头健康的融水小型猪(4 月龄,雌雄各半)进行解剖,做组织病理切片,作为融水小型猪在疾病诊断时的正常对照,详见另文报道。

4.2.5 环境及设施:饲养环境为普通级,猪舍为全封闭建造,门窗加装防蚊纱窗,防鼠挡板。湿帘通风系统和局部保温灯控制舍内温湿度,夏天温度最高控制在 28℃~30℃,冬天温度最低控制在 16℃~20℃,新生仔猪局部小环境通过使用保温电热板和保温箱,温度 32℃~35℃,减少仔猪的寒冷应激。

4.2.6 遗传质量控制:对融水小型猪线粒体 DNA 测定分析,并与国内外多个猪种比较发现,融水小型猪比已知的兰屿猪更为古老,详见另文报道。另外,融水小型猪的全基因组测序工作已经完成,目前正在进行分析工作,将进一步阐明其与贵州香猪等其他猪种遗传关系。

5 讨论

小型猪是一种理想的实验动物,在解剖学、生理学、疾病发生机理等方面与人极为相似,在生命科学研究领域中具有重要的实际应用价值。未来发展中可以成为在基因组学、高密度生物学、转基因技术、体外毒理学和相关技术方面有发展前景的平

台^[12]。美国明尼苏达大学于 1949 年开始了小型猪方面的研究,其后德国、日本、法国也先后培育出小型猪品系。美国培育的小型猪品系有明尼苏达-荷曼系(Minnesota-Hormel)、皮特曼-摩尔系(Pitman-Moore)、亨浮额德系(Hanford)、尤卡坦(Yucatan)种;德国培育的哥廷根(Gottingen)小型猪;日本培育的小型猪品系有阿米尼种(Oh mini)、克劳恩咪尼系(Clawn mini)和、会津系(Huei-Jin)和微型迷你猪(Microminipig),法国培育的小型猪品系有科西嘉系(Corsica),并广泛应用于生物医学研究^[13-20]。目前哥廷根小型猪是国际公认的最佳医用模式动物之一,获得全世界医药管理机构认可。目前,哥廷根小型猪种群保种在三个国家,形成了 3 个丹麦种,1 个美国种和 1 个德国种^[21]。

我国小型猪的培育工作起步晚,80 年代初才开始对小型猪资源进行调查和实验动物化研究,与国外先进国家相比落后了几十年。但我国具有丰富而又独特的小型猪资源,经过选育及实验动物化研究,可适应生命科学研究多种需求,为生命科学研究提供完善及丰富的动物模型。北京农业大学畜牧系教研室与实验动物所从 1985 年开始研究选育我国自己的小型猪^[22]。后来中国农业科学院引入五指山猪,云南农业大学从西双版纳引入版纳微型猪,贵阳中医学院从贵州黔东南苗族侗族自治州引入香猪,广西农业大学从巴马瑶族自治县引入巴马香猪^[23]。南方医科大学从青藏高原地区引入藏猪^[24]。

为了便于比较,我们绘制了国内外主要 9 种小型猪^[7,25-28]的体重变化曲线(封 3 图 3)。融水小型猪的体重较轻,雌雄 12 月龄的体重分别仅为 26.97 kg 和 26.53 kg,与哥廷根小型猪相当,体现了该品种“小”的特点。在繁殖性能方面,贝格猪初产仔数 6.0 头,活仔数 5.8 头,经产平均产仔 7.9 头,活仔数 5.9 头,远高于广州地区西藏小型猪初产仔数 2.3 头,活仔 2.2 头,经产 5.7 头,活仔 4.9 头^[29],高于蕨麻小型猪产仔数 5.97 头,活仔数 5.59 头^[30];稍低于五指山小型猪初产仔数 6.67 头,活仔数 6.56 头^[31];接近国外杂交繁育的 Gottingen 小型猪平均产仔数 6.5 头^[8],说明融水小型猪繁育性能良好,可稳定繁育、保种。

国外小型猪品种都是改良猪与未改良地方品种或野猪杂交育成的,而我国小型猪均产于偏远山区,无外来猪种与之杂交,当地人习惯于将猪进行

采用亲子交配、兄妹交配等高度近交的自繁自养方式,外来猪种极难与之杂交,由此形成了封闭的小型猪群体,具有遗传、表型更加稳定、性成熟早、繁殖性能强、生长慢、体型矮小、性成熟早、抗逆性强等生物学特性,是理想的生物学研究模型^[32]。融水小型猪具有上述特点,尤其是性情温顺的特点,在体重较轻时不仅可以抱起保定,成年后也容易固定。可以预测,如果对融水小型猪进行定向选育,可能得到体型更小、性格温驯的优质实验用小型猪。

参考文献:

- [1] 张贺,王承利,王洋,等. 小型猪动物模型在医学领域中的应用[J]. 中国畜牧兽医,2012,39(7):263-266.
- [2] 庞琳琳,张会永,杨关林. 巴马小型猪在医学研究中的应用进展[J]. 中国实验动物学报,2014,22(1):94-98.
- [3] 胡鹏飞,李向臣,关伟军. 五指山小型猪诱导多能干细胞的前景分析[J]. 中国畜牧兽医,2014,41(7):174-177.
- [4] 王淑燕,霍金龙,潘伟荣,等. 版纳微型猪近交系 GHR 基因克隆及生物信息学分析[J]. 中国实验动物学报,2014,22(1):48-56.
- [5] 吴曙光,邓红勇,王明镇,等. 贵州小型猪早期生长曲线拟合初步分析[J]. 黑龙江畜牧兽医,2013,8(上):63-65.
- [6] 曾昭智,江涛,张锦红,等. 西藏小型猪实验动物化初期生长繁殖性能研究[J]. 黑龙江畜牧兽医科技版,2011,2(上):48-49.
- [7] 闵凡贵,潘金春,王希龙,等. 藏麻小型猪在广东地区的适应性观察[J]. 家畜生态学报,2014,35(7):72-77.
- [8] Peter A. McAnulty, Anthony D. Dayan, Niels-Christian Ganderup, *et al.* The MINIPIG in BIOMEDICAL RESEARCH [M]. Boca Raton London New York, CRC Press, 2011: 7.
- [9] 全国实验动物标准化委员会. 实验动物哺乳类实验动物的遗传质量控制 GB14923-2010[S],北京,2011.
- [10] 国家标准总局. GB 3038-82 种猪档案记录[S]. 1982-10-01.
- [11] 北京市质量技术监督局. 实验用小型猪:微生物学等级及监测 DB11T 828.1-2011[S];寄生虫学等级及监测 DB11T 828.2-2011[S];遗传质量控制 DB11T 828.3-2011[S];病理学诊断规范 DB11T 828.4-2011[S];配合饲料 DB11T 828.5-2011[S];环境及设施 DB11T828.6-2011[S],2011-11-10 发布,2012-03-01 实施.
- [12] Roy Forster, Philippe Ancian, Merete Fredholm, *et al.* The minipig as a platform for new technologies in toxicology [J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods. 2010,62: 227-235.
- [13] 冯书堂. 我国小型猪资源实验化培育及开发利用[J]. 实验动物科学,2007,24(6):111-118.
- [14] <http://snsfarms.com/>.
- [15] <http://www.criver.com/about-us/news-events/featured-stories/2014/minipig-strains-and-the-emergence-of-the-göttingen>.
- [16] Jan R Linkenhoker, Tanya H Burkholder, CG Garry Linton, *et al.* Effective and Safe Anesthesia for Yorkshire and Yucatan Swine with and without Cardiovascular Injury and Intervention [J]. Journal of the American Association for Laboratory Animal Science, 2010, 49(3): 344-351.
- [17] Chak-Sum Ho, Gregory W. Martens, Max S. Amoss Jr, *et al.* Swine leukocyte antigen (SLA) diversity in Sinclair and Hanford swine [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2010, 34: 250-257.
- [18] Naoki Kaneko, Katuhiko Itoh, Atsushi Sugiyama, *et al.* Microminipig, a Non-rodent Experimental Animal Optimized for Life Science Research: Preface [J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2011, 115: 112-114.
- [19] Hiroaki Kawaguchi, Noriaki Miyoshi, Naoki Miura, *et al.* Microminipig, a Non-rodent Experimental Animal Optimized for Life Science Research: Novel Atherosclerosis Model Induced by High Fat and Cholesterol Diet [J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2011, 115: 115-121.
- [20] Atsushi Sugiyama, Yuji Nakamura, Yasuki Akie, *et al.* Microminipig, a Non-rodent Experimental Animal Optimized for Life Science Research: In Vivo Proarrhythmia Models of Drug-Induced Long QT Syndrome: Development of Chronic Atrioventricular Block Model of Microminipig [J]. Journal of Pharmacological Sciences, 2011, 115: 122-126.
- [21] Henner Simianer, Friederike Köhn. Genetic management of the Göttingen Minipig population [J]. Journal of Pharmacological and Toxicological Methods, 2010, 62: 221-226.
- [22] 李俊佑. 小型猪 [J]. 延边农学院学报, 1990, 1: 91-93.
- [23] 魏泓. 我国小型猪研究现状 [J]. 中国实验动物学, 1997, 7(4): 252-255.
- [24] 顾为望, 曾昭智, 刘运忠, 等. F1 代西藏小型猪早期生长发育特点 [J], 中国实验动物学报, 2006, 14(4): 307-310.
- [25] http://www.lasdr.cn/pages/resdata_dataview.jsp?id=10059100.
- [26] http://www.lasdr.cn/pages/resdata_dataview.jsp?id=10054195.
- [27] <http://www.sinclairresearch.com>.
- [28] <http://minipigs.dk>.
- [29] 龚宝勇, 刘运忠, 曾昭智, 等. 广州地区西藏小型猪的繁殖行为学表现 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 41(4): 315-317.
- [30] 闵凡贵, 潘金春, 王希龙, 等. 藏麻小型猪在广东地区的适应性观察 [J]. 家畜生态学报, 2014, 35(7): 72-77.
- [31] 闵凡贵, 潘金春, 袁文, 等. 封闭群五指山小型猪主要繁殖性状的多重回归与通径分析 [J]. 中国畜牧兽医, 2011, 38(12): 145-148.
- [32] 王桂花, 尹晓敏, 赵德明, 等. 国内外小型猪资源概况. 中国比较医学杂志, 2009, 19(2): 71-73.

[修回日期]2015-03-04