中国科技论文统计源期刊（中国科技核心期刊）
ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

原名《中国实验动物学杂志》

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

2015 4
邮发代号：82-917
第25卷（第4期）Vol.25 No.4
ISSN 1671-7856

主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

中 国 比 较 医 学 杂 志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

月刊　1991 年 3 月创刊　第 25 卷　第 4 期　2015 年 4 月 30 日出版

主　管
中国科学技术协会
主　办
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所
主　编
秦　川
编　辑
《中国比较医学杂志》编辑部
出　版
中国实验动物学会
发　行
《中国比较医学杂志》编辑部
100021,北京市朝阳区潘家园南里 5 号
电话:(010)67779337
传真:(010)67763674
E-mail: b67761337@126.com
http://zgsydw.alljournal.ac.cn/zgbjyxzz/ch/index.aspx
广告经营许可证
京朝工商广字第 8131 号
照　排
同方知网(北京)技术有限公司
印　刷
北京市百善印刷厂
邮发代号
82-917
定　价
每期 20.00 元,全年 240 元
中国标准连续出版物号
ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

2015 年版权归中国实验动物学会所有
本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网、中国实验动物学会网站和世界卫生组织西太平洋地区医学索引等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述网站著作权使用费。
本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www.183read.com

本期执行主编　高　诚
本期责任编辑　吴漪丽

目　次

研究报告

应用 TALEN 技术敲除 *gata*4 基因建立斑马鱼先天性心脏病模型 …… 刘静,何嘉玲,暴国,等(1)

脑卒中后抑郁大鼠行为学的动态变化及中药补阳还五汤的干预作用 …… 罗琳,邓叔华,易健,等(8)

急性血液稀释技术在动物实验围手术期中的应用 …… 朱泽兴,张树明,赵永军,等(14)

C57-*ras* 转基因小鼠模型杂交 1 代 CB6F1 的生长发育特性 …… 刘甦苏,吴曦,周舒雅,等(18)

17β 雌二醇对大鼠创伤性脑损伤的保护作用 …… 王迅,冷晓磊,矫永庆,等(23)

人参皂苷水解产物 DS-1227 改善东莨菪碱致小鼠的学习记忆障碍 …… 武宏伟,王克柱,冯利,等(27)

蕨麻小型猪与巴马小型猪高原多脏器功能障碍综合征模型的比较研究 …… 牛廷献,郭晓宇,申健,等(33)

高脂饮食对长爪沙鼠生化及主要脏器组织病理学的影响 …… 俞建顺,严茂祥,王德军,等(38)

加味二陈汤对 ApoE-/-小鼠脂质代谢及肝细胞形态的影响 …… 谢雪姣,徐佳,李亚梅,等(44)

中药藤莓汤对Ⅱ型胶原诱导性大鼠关节炎性病理损伤的影响 …… 陆妍,王亚南,刘慧,等(48)

救脑益智方剂水提液对人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞的保护作用…… 张景燕,张静爽,曹子青,等(58)

大鼠羊膜细胞体外培养及其干细胞标记物的表达 …… 曲春辉,张玲,武杰,等(61)

技术方法

食蟹猴脐带间充质干细胞的分离与鉴定 …… 庞荣清,何洁,李瑞生,等(66)

综述与专论

不同剂量酒精干预脑缺血动物模型的研究进展 …… 李锦程,赵海苹,罗玉敏 (70)

联体共生动物模型对医学的贡献 …… 冯楠,罗建民 (74)

管理科学

实验动物品系数据库的建立 …… 孔琪,夏霞宇,秦川 (78)

继续教育

打造国家精品课程在医学生培养中的作用 …… 张建(84)

浅谈研究生教育中的能力培养 …… 王蓉(85)

期刊基本参数:CN11-4822/R * 1991 * m * 大 16 * 80 * zh * p * ￥20.00 * 2000 * 18 * 2015-4

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly **Established in March** 1991 **Volume** 25 **Number** 4 **April** 30 2015

Responsible Institution
China Association for Science and Technology

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

Editing
Editorial Board of Chinese Journal of Comparative Medicine
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: (010)67779337
Fax: (010)67763674
E-mail: b67761337@126.com
http://zgsydw.alljournal.ac.cn/zgbjyxzz/ch/index.aspx

Editor-in-Chief
QIN Chuan(秦川)

Publishing
Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: (010)67779337
Fax: (010)67763674
E-mail: b67761337@126.com

Printing
The Baishan Printing House of Changping, Beijing

Distributor
Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: (010)67779337
Fax: (010)67763674
E-mail: b67761337@126.com

Mail-order
Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

CSSN
ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2015 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

Knockout *gata*4 gene and establish ment of a zebrafish model of congenital heart disease by TALEN ····· *LIU Jing* , *HE Jia-ling*, *Bao Guo*, *et al*(1)

Dynamic changes of ethology and interventional effect of a traditional Chinese medicine, BuyangHuanwu Decoction, in rats with post-stroke depression ····· *LUO Lin*, *DEN Shu-hua*, *YI Jian*, *et al*(8)

Acute normovolemic hemodilution in cryopreserved dog limb replantation ····· *ZHU Ze-Xing*, *ZHANG Shu-Ming*, *ZHAO Yong-Jun*, *et al*(14)

Characterization of growth performance of F1 hybrid CB6F1 C57-ras transgenic mouse model ····· *LIU Su-su*, *WU Xi*, *ZHOU Shu-ya*, *et al*(18)

Protective effect of 17β-estradiol on traumatic brain injury in rats ····· *WANG Xun*, *LENG Xiao-lei*, *JIAO Yong-qing*, *et al*(23)

Improving effect of the ginsenoside hydrolysis product DS-1227 on scopolamine-induced learning and memory impairment in mice ····· *WU Hong-wei*, *WANG Ke-zhu*, *FENG Li*, *et al*(27)

Comparison of the Bama minipig and Juema minipig models of high altitude multi-organ dysfunction syndrome ····· *NIU Ting-xian*, *GUO Xiao-yu*, *SHEN Jian*, *et al*(33)

Effect of high fat diet on the serum biochemical parameters and histopathology of main organs in Mongolian gerbils ····· *YU Jian-shun*, *YAN Mao-xiang*, *WANG De-jun*, *et al*(38)

Effects of the Chinese medicine, modified Erchen decoction, on the lipid metabolism and hepatocyte morphology in ApoE-/- mice ····· *XIE Xue-jiao*, *XU Jia*, *LI Ya-mei*, *WU Ruo-xia*, *et al*(44)

Effects of the Chinese herbal compound, Tengmei decoction, on inflammatory injury in joints of rat models of type II collagen-induced arthritis ····· *LU Yan*, *WANG Ya-nan*, *LIU Hui*, *et al*(48)

Protective effect of the traditional Chinese medicine prescription, Jiu Nao Yi Zhi water extract, on human neuroblastoma SH-SY5Y cell line *ZHANG Jing-yan*, *ZHANG Jing-shuang*, *CAO Zi-qing*, *et al*(58)

Isolation, culture and identification of rat amniotic cells in vitro and their expression of stem cell markers ····· *QU Chun-hui*, *ZHANG Ling*, *WU Jie*, *et al*(61)

Isolation and identification of cynomolgus monkey umbilical cord mesenchymal stem cells ····· *PANG Rong-qing*, *HE Jie*, *LI Rui-sheng*, *et al*(66)

Research progress of alcohol intervention in cerebral ischemia animal models ····· *LI Jin-cheng*, *ZHAO Hai-ping*, *LUO Yu-min*(70)

Contribution of parabiosi animal models In medicine ····· *FENG Nan*, *LUO Jian-min*(74)

Establishment of the laboratory animal strain database ····· *KONG Qi*, *XIA Xia-yu*, *QIN Chuan*(78)

研究报告

应用 TALEN 技术敲除 *gata*4 基因建立斑马鱼先天性心脏病模型

刘　静[1,2],何嘉玲[2],暴　国[2],李　楠[2],王天奇[2],张长勇[2],孙德明[2]

(1. 北京协和医学院研究生院,北京　100730;2. 国家卫生计生委科学技术研究所,北京　100081)

【摘要】　目的　人工构建 TALEN 靶向敲除载体敲除 *gata*4 基因,建立斑马鱼先天性心脏病动物模型。**方法**　采用单元组装法构建靶向敲除 *gata*4 基因的载体,将其体外转录成 TALEN mRNAs,通过显微注射的方式注入单细胞期受精卵中,胚胎检测 TALEN 的敲除效率,再通过剪尾、酶切、测序筛选发生基因突变的斑马鱼及突变的类型。　**结果**　酶切、测序结果证实成功构建出正确的 *gata*4 靶向敲除载体,注入斑马鱼受精卵中,发生基因敲除的效率为 35.18%,通过剪尾、PCR、酶切检测成功地筛选出了发生基因突变的斑马鱼,测序结果显示出不同种类的 *gata*4 基因突变。　**结论**　成功构建 *gata*4 基因敲除的斑马鱼动物模型,为进一步研究人类 *gata*4 基因突变引起先天性心脏病的发病机制提供了良好的动物模型。

【关键词】　TALEN;*gata*4 基因;斑马鱼;模型,动物;先天性心脏病

【中图分类号】R33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0001-07

doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.001

Knockout *gata*4 gene and establish ment of a zebrafish model of congenital heart disease by TALEN

LIU Jing [1,2], HE Jia-ling[2], BAO Guo[2], LI Nan[2], WANG Tian-qi[2], ZHANG Chang-yong[2], SUN De-ming[2]

(1. Graduate School of Peking Union Medical College, Beijing 100730, China;
2. National Research Institute for Family Planning, Beijing 100081, China)

【Abstract】　Objective　To establish a *gata*4 gene knockout zebrafish model of congenital heart disease, and construct transcription activator-like effector nuclease (TALEN) vectors targeting *gata*4 gene. **Method**　We construct TALEN vectors targeting zabrafish *gata*4 gene using unit assembly method and the in vitro-transcribed TALEN mRNAs were microinjected into one-cell stage zebrafish embryos. The efficiency of TALEN was identified by injected embryos, and mutations of zebrafish were screened and confirmed the different types through PCR and enzyme digestion. **Results**　We successfully constructed correct targeting vectors by enzyme digestion and sequencing, and the gene knockout efficiency was 35.18%. We screened the mutant zebrafish and confirmed different types of *gata*4 gene mutations. **Conclusions**　A *gata*4 knockout zebrafish model is successfully established, it can provide a good animal model for further research of congenital heart diseases.

【Key words】　TALEN; *gata*4 gene; Zebrafish; Model, animal; Congenital heart disease

---

[**基金项目**]中央级公益性科研院所基本科研业务专项资金项目-优秀青年科技人才创业基金项目(编号:2012GJSSJKC02);国家十二五科技支撑计划 计划生育技术安全性评价标准化实验动物培育关键性共享技术研究项目(编号:2012BA131B06)。

[**作者简介**]刘静(1988 -),女,硕士研究生,研究方向:动物学。Email:864913436@qq.com。

[**通讯作者**]孙德明(1958 -) , 男, 研究员, 博士, 研究方向: 比较生殖医学。Email : sundemingnet@ 163. com。

先天性心脏病(congenital heart disease,CHD)是由于胚胎发育过程中心脏、血管发育异常而导致心脏、血管在形态、结构、功能和代谢方面发生异常的一大类疾病,是人类极为普遍和具有破坏性的出生缺陷,发病率约占活产婴儿的 0.8%[1],严重危害胎儿、新生儿、婴幼儿及儿童健康。目前认为该病的病因包括环境和遗传两个主要因素,约 120 种单基因被鉴定与先天性心脏病的发生有关。作为一种多因素疾病,其病因和发病机制尚未完全阐明。因此通过反向遗传学手段,建立先天性心脏病的基因敲除动物模型,探索该病的致病机制具有重要意义。斑马鱼的基因组与人类基因组相似度达 87%,结构上具有与人类相似的心房、心室、心脏瓣膜结构以及心脏传导系统[2,3],且斑马鱼体积小、易于饲养、胚胎透明易于观察、体外受精、产卵能力强、有利于进行遗传操作,是构建先天性心脏病的理想动物模型。

基因敲除技术的传统方法是基于胚胎干细胞技术和同源重组技术,但是这种方法效率极低、过程繁琐,且对于像斑马鱼这种无法建立胚胎干细胞系的物种无法实施[4]。TALEN (transcription activator-like effector nuclease)技术是类转录激活因子效应物核酸酶介导的靶向修饰技术,通过组装蛋白模块识别靶序列,每两个氨基酸即可识别一个碱基,实现了对基因组的任意编辑,是先进的基因编辑技术。目前缺乏 TALEN 技术用于斑马鱼研究先天性心脏病的相关基因的功能。

锌指转录因子 4(*gata*4)是 *gata* 转录因子家族的一员,具有与特定 DNA 结合的锌指结构域,在进化过程中高度保守,同时在心脏发育过程中起重要作用。研究表明,*gata*4 与其他的转录因子一起调控心肌中一些特异基因的表达,对心肌细胞的形成以及心前细胞的迁移和分化、心瓣膜及间隔发育等具有重要作用。*gata*4 基因突变会导致动物和人出现心脏发育异常,形态学上以瓣膜缺损为主要表现[5]。目前尚无较好的动物模型适用于机制研究,因此本研究采用 TALEN 技术对斑马鱼的 *gata*4 基因进行敲除,建立斑马鱼先天性心脏病动物模型,为先天性心脏病的遗传基础研究提供重要的动物模型。

1 材料

1.1 实验动物

本实验选取 AB 系野生型斑马鱼,为实验室常用的近交系品种[6]。

1.2 质粒

TALE 基本单元模块载体质粒及 pCS2-Fok I 表达载体质粒:均为氨苄青霉素(Amp)抗性,而表达载体质粒需成对使用(pCS2-PEAS 系列和 pCS2-PERR 系列配对),由本实验室保存。质粒由北京大学生命科学院细胞增殖与分化实验室构建并馈赠[7]。

1.3 引物

实验过程中需要使用的引物见表 1,包括扩增 *gata*4 基因和构建和检测 TALEN 载体时所需的引物。引物由北京诺塞基因组研究中心有限公司合成。

1.4 主要试剂

Takara 限制性内切酶:Spe I、Nhe I、Hind III、Sac II、Hae II。

试剂盒:质粒小提试剂盒、普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、普通 DNA 产物纯化试剂盒、DNA 连接试剂盒、T 载体试剂盒、SP6 mMESSAGE mMACHINE Kit、2 × Taq Master Mix(不含染料)、碱性磷酸酶(CIAP)、50 mM NaOH、1 M Tris-HCl(pH 8.0)、70% 乙醇、超纯水(双蒸水,18 MΩ)

2 方法

2.1 斑马鱼饲养与繁殖

野生型斑马鱼饲养于自动水循环系统中,温度稳定在 28.5 ± 0.5℃,pH 7.2 ~ 7.5,每日固定光照时间 14 h[8],喂食新鲜孵化的丰年虾。刚刚孵化的斑马鱼不需喂食,第 5 天后开始喂食草履虫,两周后开始喂食丰年虾,3 个月左右可性成熟。繁殖时,交配前一晚放入配鱼缸内,雌鱼与雄鱼之间用挡板隔开;第二天早上,将中间的挡板抽出,可观察到追尾现象,大约 30 min 后可以开始收集斑马鱼受精卵。

2.2 TALEN 敲除载体的构建

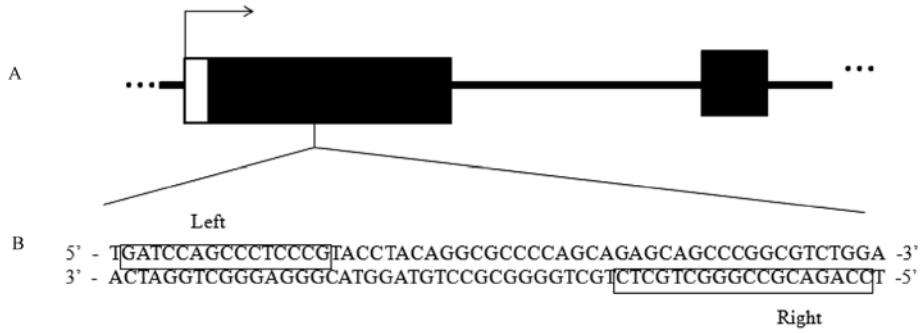
2.2.1 斑马鱼 *gata*4 基因的提取与靶点选择:采用简易 DNA 提取法提取斑马鱼鱼尾或胚胎的基因组 DNA。过程如下:将鱼尾或胚胎(20 条鱼尾或 20 个胚胎)吸到 PCR 管中,每管加入 20 μL 50 mM NaOH 溶液;使用 PCR 仪加热裂解,程序:95℃ 10 min,4℃ 10 min,取出后 vortex 振荡均匀,重复一次;加入 2 μL体积 1M Tris(pH 8.0)混匀即为提取的基因组 DNA。

斑马鱼 *gata*4 基因定位于第 20 号染色体上,结

表 1　实验过程中需要使用的引物

Tab. 1　Primers used in this experiment

引物 Primers	序列（5′→3′） Sequences（5′→3′）	用途 Application
G4-F	GAGAAGCCGAGCAGAAAATG	扩增 *gata*4 基因的正向引物
G4-R	CTGTGCAGTACGGAGCTGTC	扩增 *gata*4 基因的反向引物
*M*13-47	CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC	检测 TALE 重复序列单元数和序列的引物
RV-M	AGCGGATAACAATTTCACACAGGA	检测 TALE 重复序列单元数和序列的引物
C-For	TAGCGATTGCTAGTCATGAC	检测 TALE 重复序列连接方向的上游引物
T-For	TAGCGATTGCTAGTAATGGG	检测 TALE 重复序列连接方向的上游引物
63*dn*	CGGCAACGCGATGGGATGTG	检测 TALE 重复序列连接方向的下游引物
*SP*6	ATTTAGGTGACACTATAG	检测 TALE 重复序列连接方向的测序引物



注：A. *gata*4 基因结构模式图　B. 本研究设计的敲除靶点，Left：左半位点，Right：右半位点

图 1　基因敲除靶点图

Note. A. Genomic organization of *gata*4 gene; B. The sequences for our designed TALENs; Left: Left binding sequence; Right: Right binding sequence.

Fig. 1　The recognition sequences of the target genes

构基因由 6 个外显子和 5 个内含子组成。根据 TALEN 靶点选择的原则[7]和文献的报道[1,5]，本研究针对 *gata*4 基因的第一外显子设计了一对靶点，如图 1 所示，提取鱼尾 DNA 后测序确认靶点的唯一性。测序均由北京诺塞基因组研究中心有限公司完成。

2.2.2　TALEN 表达载体的构建：根据设计的靶点，按照“单元组装法”构建 TALEN 质粒[7]。将 TALE 基本单元模块载体质粒转化至感受态细胞 TOP 菌种中；大量摇活含有质粒的大肠杆菌后，采用天根的质粒小提试剂盒提取质粒；将质粒经酶切后（Spe I、Nhe I、Hind III）进行回收、转化、连接反应，通过菌液 PCR 筛选出连接成功的质粒后，进入下一轮反应；经过几轮酶切、切胶回收及连接反应，直至完成所需要的两侧半位点的 TALE 重复序列，其中每轮的连接后都需要进行测序确认；再将 TALE 重复序列与 pCS2 载体连接，构建出最终的 pCS2-TALEN 表达载体质粒，酶切检测片段连接情况后，采用 SP6 测序确认。

2.2.3　TALENs 质粒体外转录：先用 Sac II 将获得的 TALENs 质粒线性化，电泳确定线性化完全后，采用快速 DNA 回收试剂盒直接回收线性化 DNA；采用 SP6 体外转录试剂盒进行 TALENs 体外转录反应；将体外转录后得到的 mRNA 采用氯化锂沉淀的方式回收，利用 NanoDrop 检测 mRNA 浓度和质量，冻于 -80℃ 备用。

2.3　构建斑马鱼先天性心脏病动物模型

2.3.1　TALEN 体内活性检测：注射前，按照 200 pg/nL、300 pg/nL、400 pg/nL 的不同浓度将左、右半位点的一对 mRNA 混合，加入酚红指示剂和双蒸水配制成 4 μL 体系后注入斑马鱼单细胞受精卵中[8]；不同浓度 mRNAs 作为实验组，每个浓度注射 100 枚胚胎，同时将含有相同浓度的酚红指示剂和双蒸水配制成的 4 μL 体系作为对照组，将未注射的胚胎作为空白组，对照组和空白组各 20 枚胚胎，得到 F0 胚胎；24 h 后显微镜下取出表型正常的胚胎，5 个胚胎为一组，共取 8 组胚胎，总共 40 个胚胎，提取其基因组 DNA。以 G4-F 和 G4-R 引物扩增胚胎 *gata*4 基

因,并使用 Hae II 酶切检测 PCR 产物。如果未注射胚胎的 PCR 产物能够全部被切开,注射胚胎的 PCR 产物中有完整的、未切开的 PCR 条带,则说明靶点可能发生了突变。将未切开的条带回收,连入 T 载体,测序鉴定靶点的突变情况。未切开条带占所有条带的荧光亮度的百分比可大致反映 TALEN 的突变效率。

2.3.2 斑马鱼 TALEN 突变体筛选:将注射后的斑马鱼饲养至 3 个月后,逐条进行剪尾检测突变情况,酶切、测序分析其发生敲除的基因型的变化。

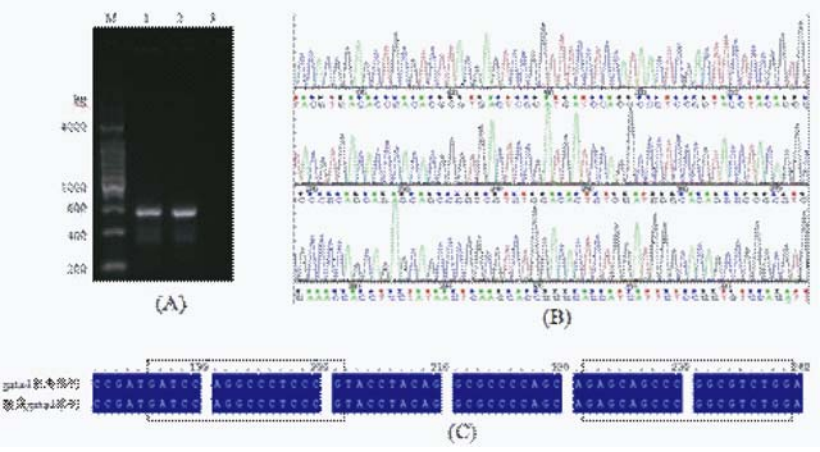
3 结果与分析

3.1 *gata*4 基因扩增与敲除靶点比对

以提取的斑马鱼鱼尾 DNA 为模板,G4-F 和 G4-R 为引物,PCR 法扩增 *gata*4 基因后,进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳,结果如图 2(A)所示,b 和 c 泳道中可见扩增出明亮且较特异的条带,分子量约为 550 bp,为扩增出的 *gata*4 基因。图中稍微存在一点非特异性条带,在后续的测序中可以通过回收去除非特异性条带。将 PCR 产物送测序,结果如图 2(B)所示,从测序图上可以看出,测序底峰低,说明样品条带单一、结果真实可信;再将此测序结果与网站上的 *gata*4 参考序列进行比对分析,结果如图 2(C)所示,黑色方框内显示的是设计敲除靶点的左、右半位点,敲除靶点单一且不存在 SNP 位点,符合敲除靶点的要求。

3.2 TALEN 载体构建与鉴定

根据设计的靶点,需要构建出两个 TALEN 表达载体。先要分别构建出识别左、右半位点的 TALE 重复序列载体,再与 pCS2 载体连接,形成最终的表达载体。TALE 重复序列载体需要通过菌液 PCR 鉴定和测序确认。菌液 PCR 采用 M13-47、RV-M 引物。左半位点的 TALE 重复序列为 16 单元体,产物分子量约为 1800 bp,右半位点的 TALE 重复序列为 18 单元体,产物分子量约为 2000 bp,见图 3(A)。测序结果显示载体 TALE 重复序列连接正确。TALEN 终表达载体需要通过菌液 PCR 和酶切检测 TALE 重复序列的连入情况。菌液 PCR 的上游引物:左半位点为 C-For,右半位点为 T-For,下游引物为 63 dn,进行菌液 PCR 后观察条带扩增情况。连接方向正确能扩增出条带,否则无法扩增出条带。电泳结果如图 3(C)所示,1 和 2 为左半位点连接正确的菌落,扩增出四个条带;3、4、7 为右半位点连接正确的菌落,扩增出两个条带。酶切(Nhe I、Kpn I)检测结果如图 3(B)所示,酶切产物为 2 kb、5 kb 两条带,说明 TALE 重复序列连接正确。测序结果显示左、右半位点的 TALEN 终表达载体构建完成。

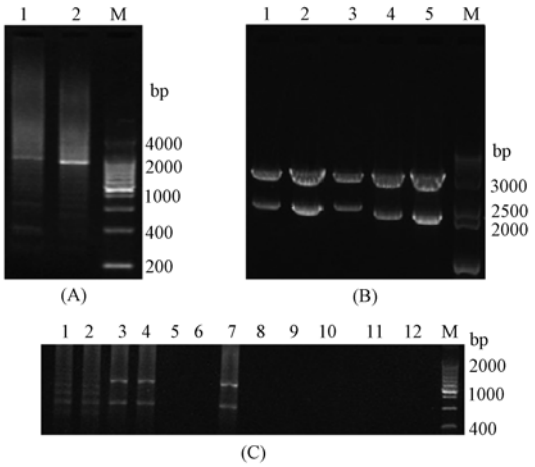


注:(A) PCR 扩增 *gata*4 基因; M:DNA marker;
1~2:扩增的 PCR 产物;3:对照; (B) *gata*4 基因测序图;
(C)扩增斑马鱼 *gata*4 基因与网站 *gata*4 参考序列比对图

图 2 靶点确认与比对图

Note. (A) The PCR-amplified *gata*4; M: DNA marker, 1-2: PCR amplification products; 3: Control
(B) *gata*4 sequenced diagram; (C). The PCR amplification products compared with reference sequences

Fig. 2 Confirmation and comparison of the target genes



注：(A). 菌落 PCR 的鉴定结果，1：右半位点，2：左半位点，M：DNA marker；(B). 酶切 TALEN 终载体鉴定结果，1～5：构建的表达载体，M：DNA marker；(C). TALEN 终载体菌落 PCR 的鉴定结果，1～4、7：阳性结果，5、6、8～12：阴性结果，M：DNA marker

图 3　TALE 重复片段及终载体鉴定图

Note. (A) Identification of TALEs by colony PCR; 1: Right binding site; 2: Left binding site; (B) Identification of TALENs by restriction enzyme; 1 – 5: The constructed TALEN vectors; M: DNA marker; (C) Identification of the TALEN vectors constructed by colony PCR; 1 – 4, 7: Positive results; 5, 6, 8 – 12: Negative results; M: DNA marker

Fig. 3　Identification of TALEs and TALENs

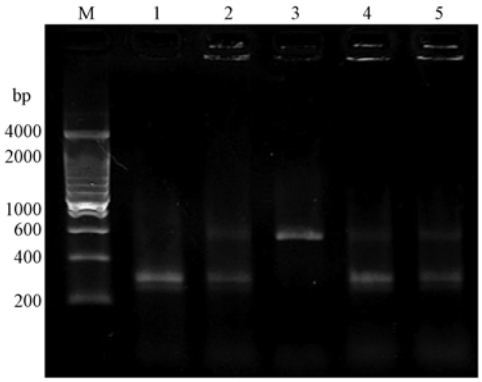
3.3　构建斑马鱼先天性心脏病动物模型

3.3.1　TALEN 体内活性检测：酶切检测 TALEN 突变效率的结果如图 4 所示，对照组胚胎的 PCR 产物能够完全被切开，产生两条带；2 为 mRNAs 注射剂量为 200 pg/nL 组，PCR 产物能完全被切开产生两条带；4、5 为 mRNAs 注射剂量为 300 pg/nL、400 pg/nL 组，存在分子量与 *gata*4 基因 PCR 扩增片段大小相似的未切开条带，说明靶点可能发生了突变。通过软件分析电泳条带的灰度可以大致反映 TALEN 的突变效率，结果如表 2。从表中结果可以看出，TALEN 的敲除效率随着注射 mRNAs 的浓度升高而增加。

表 2　不同 TALEN mRNA 注射浓度酶切检测的效率

Tab. 2　The efficiency of TALENs by different injection concentrations

注射浓度(pg/nL)	TALEN 的突变效率(%)
250	21.23
300	32.62
400	35.89



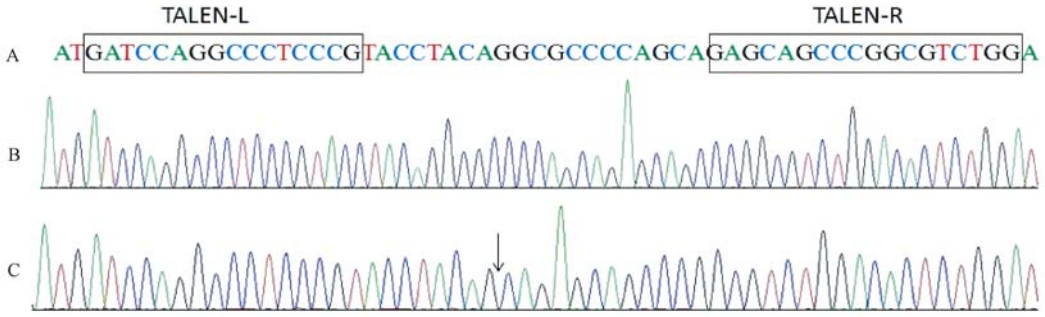
注：M：DNA marker；1：对照组；2，4，5：注射 mRNAs 组；3：PCR 产物

图 4　酶切检测 PCR 产物电泳图

Note. M: DNA marker; 1: Control; 2, 4, 5: Injection groups; 3: PCR products

Fig. 4　Identification of PCR products by enzyme digestion

将未切开条带回收，连入 T 载体，测序检测靶点突变情况。测序结果如图 5 所示，A 为本实验中设计的敲除靶点，B 为野生型 *gata*4 基因测序图，C 为注射 mRNAs 后两个靶点之间基因敲除 8 bp 的测



注：A. 实验设计的 TALEN 序列；B. WT 测序峰；C. 敲除 8 bp 测序图

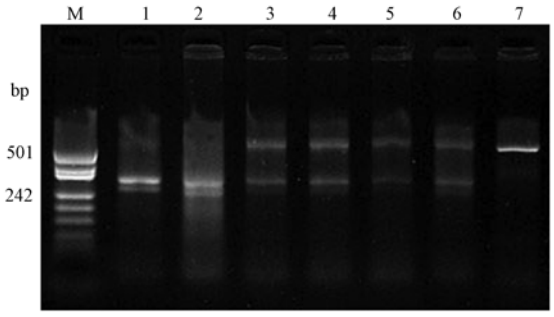
图 5　TALEN 体内活性检测

Note. A. Our designed TALEN sequences; B. The sequenced diagram of wild-type (WT); C. The sequenced diagram of 8 bp deletion

Fig. 5　Identification of the in vivo activity of TALENs

序图,图中黑色箭头指示的是发生基因突变的位点。通过与野生型测序图比较可以看出 TALEN 对靶点的基因修饰情况。

3.3.2 斑马鱼 TALEN 突变体筛选:斑马鱼 TALEN 突变体筛选采用酶切法。总共剪取 F0 斑马鱼成鱼尾鳍 54 条,提取基因组 DNA 进行酶切检测,结果显示其中有 19 条斑马鱼发生了基因敲除,敲除效率约为 35.18%。图 6 为酶切检测 *gata*4 基因的电泳图,图中只显示出了部分斑马鱼的酶切结果。将酶切检测中的未切开条带回收,连入 T 载体,测序分析发生敲除斑马鱼的基因型变化,测序结果见图 7。



注:M:DNA marker; 1:对照组; 2~6:酶切的不同鱼尾 DNA; 7:未酶切的 PCR 产物

图 6 酶切检测成鱼中 *gata*4 位点的基因型

Note. M:DNA marker; 1:Control; 2-6:The different DNA by enzyme digestion; 7:The undigested PCR products

Fig. 6 Identification of different genotypes of *gata*4 loci in the adult zebrafish by enzyme digestion

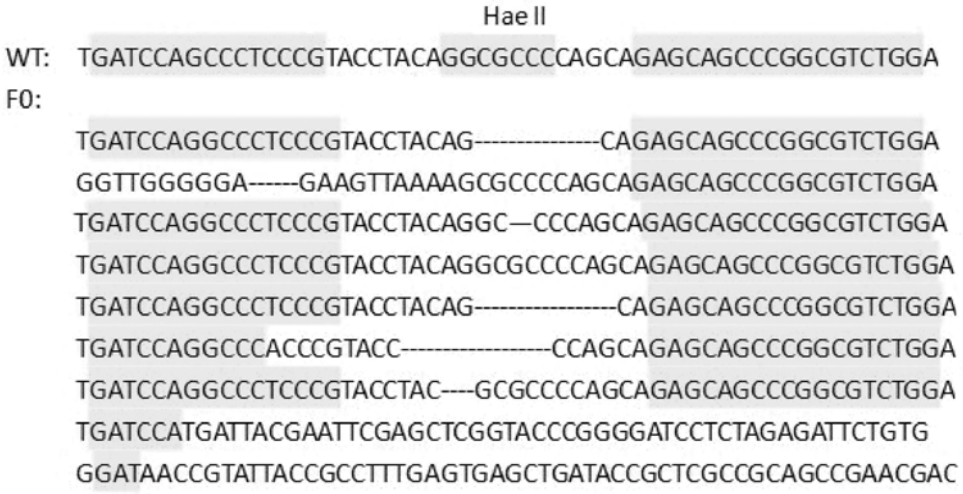


图 7 *gata*4 基因敲除斑马鱼测序结果

Fig. 7 The sequencing results of *gata*4 knockout zebrafish

4 讨论

类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)介导的靶向修饰技术是目前广泛使用的基因敲除技术,其已经成功应用于斑马鱼[9]、大鼠[10]、猪[11]等多个物种的研究中。转录激活子样效应因子(TALE)最初是在植物致病菌黄单胞杆菌属(*Xanthomonas*)中发现的,其本质是一个转录调控因子,主要有两个重要的结构域:特异性识别核酸的靶点识别域和切断 DNA 序列的核酸酶功能结构域。[12-14]。TAL 蛋白的核酸结合域的氨基酸序列能够特异性地识别和结合靶位点的核酸序列,利用 TAL 的序列模块,组装成特异结合任意 DNA 序列的模块化蛋白,通过与核酸酶 Fok I 连接,构建针对任意特定核酸靶序列的重组核酸酶 TALEN,达到在任意位点打断 DNA 的目的。TALEN 中 Fok I 核酸内切酶形成二聚体时才发挥活性,对双链 DNA 进行切割[15]。细胞 DNA 损伤后会启动两种修复机制过程,其中一种是非同源末端连接修复机制(non-homologous end joining, NHEJ),另一种是同源重组修复机制(homology-directed repair, HDR)[16]。当没有外源的同源序列加入,细胞就会启动 NHEJ 修复机制,往往就会引起突变,从而达到基因敲除的目的。本研究中将 TALEN mRNAs 注射到斑马鱼受精卵中后,细胞就采用 NHEJ 方式修复损伤的 DNA,这种修复是随机的,所以要对斑马鱼的突变进行筛选。通过分子克隆途径人工构建 TALE 重复序列的方法主要包括四类:基于 Goldern Gate(GG)克隆的方法、基于连续克隆组装的方法、基于固相合成的高通量方法、基于长末端的 LIC 组装方法等[17]。本研究中构建敲除

载体采用的是单元组装法,是北京大学细胞增殖与分化教育部重点实验室建立的一种合成 TALE 重复单元的方法[9],这种方法简单、技术难度低、精确度高、保真性好、成本较低、便于操作。但是,与最新的 CRISPER/Cas9 技术相比,构建载体的过程繁琐、费时、费力。今后构建其他基因敲除动物模型时,可以考虑使用 CRISPER/Cas9 技术。

有研究表明,先天性心脏病的发生与 *gata*4 基因突变有关[18]。目前尚无较好的动物模型用于先天性心脏病的机制研究。相比于其他动物,斑马鱼有着独特的优势:斑马鱼发育早期可以不完全依赖于有功能的心血管系统,甚至在最为严重的心血管系统缺失情况下,仍能通过对氧的被动运输能短时间存活[19],这一特点为研究者获得发育早期胚胎突变体,观察心脏发育相关基因缺陷型胚胎,研究心血管发育严重缺陷的活体提供可能;斑马鱼胚胎透明,可以动态地观察到整个心脏发育过程及血液循环情况,使得斑马鱼成为先天性心脏病研究的理想动物模型。

本研究发现,基因敲除的效率随着 TALEN mRNAs 的注射浓度的增加而升高。当 TALEN mRNAs 的注射浓度为 200 pg/nL 时,胚胎基因组电泳图中并没有发现明显的未切开条带,推测原因可能是 mRNAs 的浓度太低,细胞内存在大量降解外源 mRNA 的核酸酶,注射的 TALEN mRNAs 进入细胞后还没有来得及发挥识别、切断基因组 DNA 的作用就被细胞内的 RNA 核酶降解了;当注射浓度为 300 pg/nL 时,胚胎基因组鉴定发现明显的未切开条带并对其进行测序分析后,证实了 TALEN mRNAs 确实发挥了作用,改变了 *gata*4 基因的序列,发生基因敲除的效率为 32.65%;当注射浓度为 400 pg/nL 时,24 dpf 后发现注射后的胚胎大部分死亡,少数存活的胚胎出现发育畸形、甚至不能脱膜孵化成幼鱼,孵化率较低,推测原因可能是注射 mRNAs 的浓度越高,发挥敲除作用的效率越高,对细胞的毒性就越高,使胚胎无法存活。所以在注射时应该提高 TALEN 突变效率的同时兼顾胚胎的存活率。筛选斑马鱼 TALEN 突变体时,总共剪取 54 条注射过的斑马鱼,其中 *gata*4 基因发生改变的斑马鱼有 19 条,敲除效率为 35.18%,这与注射后胚胎检测 TALEN 的效率大致相同。对发生基因敲除的斑马鱼 *gata*4 基因进行测序分析,发现 TALEN 敲除后产生了不同的基因型,说明细胞 DNA 损伤后采用的是随机的 NHEJ 修复,这符合文献中的报道[16]。胚胎及鱼尾基因组 PCR、酶切、测序分析均证明了 TALEN 在斑马鱼体内发挥了作用,实现了对斑马鱼 *gata*4 基因结构的改变。这说明本研究中针对 *gata*4 基因第一外显子构建的 TALEN 敲除载体是可行的且构建出了 *gata*4 基因敲除的斑马鱼动物模型。本研究只是初步构建出了针对 *gata*4 基因第一外显子的靶向敲除载体,并确认了其在体内的活性及造成的基因敲除效果,并筛选出了 19 条含有突变的斑马鱼,但是还需要大量的外交、内交来筛选含有靶点突变的纯合子斑马鱼、对不同突变基因型的斑马鱼进行表型分析、*gata*4 基因标志物检测、病理切片检查等。本研究中构建出的 *gata*4 基因敲除斑马鱼模型可以用于先天性心脏病的发病机制研究、进一步为疾病的治疗奠定基础。

参考文献:

[1] Pierpont ME, Craig T, Basson D, et al. Genetic basis for congenital heart defects: Current knowledge. A scientific statement from the American Heart Association Congenital Cardiac Defects Committee, Council on Cardiovascular Disease in the Young: Endorsed by the American Academy of Pediatrics [J]. Circulation, 2007, 115(23): 3015 - 3038.

[2] Beis D, Bartman T, Jin SW, et al. Genetic and cellular analyses of zebrafish atrioventricular cushion and valve development [J]. Development. 2005, 132(18): 4193 - 4204.

[3] Chi NC, Shaw RM, Junqblut B, et al. Genetic and physiologic dissection of the vertebrate cardiac conduction system [J]. Plos Biol, 2008, 6(5): 1006 - 1019.

[4] Pierpont ME, Basson CT, Benson DW, et al. Genetic basis for congenital heart defects: current knowledge [J]. Pediatrics, 2007. 120(2): 447.

[5] Sarkozy A, Conti E, Neri C, et al. Spectrum of atrial septal defects associated with mutations of NKX2.5 and GATA4 transcription factors [J]. J Med Genet, 2005, 42(2):16.

[6] 孙德明, 王天奇, 朱晓红, 等. 实验用鱼遗传控制及标准化 [J]. 遗传, 2012, 34(9): 1202 - 1207.

[7] 沈延, 黄鹏, 张博. TALEN 构建与斑马鱼基因组定点突变的实验方法与流程 [J]. 遗传, 2013, 3(54): 553 - 544.

[8] 杨红波, 梁巍, 刘新星, 等. 应用双荧光报告系统检测斑马鱼 microRNA 的动态表达 [J]. 遗传, 2012, 34(9): 1181 - 1192.

[9] Huang P, Xiao A, Zhou MG, et al. Heritable gene targeting in zebrafish using customized TALENs [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 699 - 700.

[10] Tesson L, Usal C, Ménoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 695 - 696.

(下转第 13 页)

研究报告

脑卒中后抑郁大鼠行为学的动态变化及中药补阳还五汤的干预作用

罗　琳[1],邓叔华[1],易　健[1],周赛男[1],佘　颜[1],刘柏炎[1,2]

(1. 湖南中医药大学,长沙　410208;2. 益阳医学高等专科学校,益阳　413000)

【摘要】 目的　观察补阳还五汤对脑卒中后抑郁大鼠行为学的影响。**方法**　选择雄性 SD 大鼠,根据旷场试验基线值,选择评分相近的 60 只大鼠随机分为假手术组、卒中组、PSD 组、补阳还五汤组、氟西汀组,共 5 组,每组 12 只。采用大脑中动脉线栓法建立永久性局灶性脑缺血模型结合 CUMS 及孤养的方法复制 PSD 模型。通过体重测量、神经功能评分、糖水消耗实验、旷场实验等指标观察各组大鼠行为学变化。**结果**　与假手术组、卒中组比较,PSD 组大鼠体重和糖水消耗量降低、旷场实验自发活动下降、神经功能缺损加重($P<0.05$ 或 $P<0.01$);与 PSD 组比较,补阳还五汤组和氟西汀组均能增加大鼠体重、糖水消耗量及自发行为,改善其神经功能缺损($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论**　PSD 大鼠出现行为学异常,补阳还五汤可以明显改善其行为学症状,具有一定抗抑郁作用,其疗效与氟西汀相当。

【关键词】 补阳还五汤;卒中后抑郁;行为学;大鼠

【中图分类号】R33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0008-06

doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.002

Dynamic changes of ethology and interventional effect of a traditional Chinese medicine, BuyangHuanwu Decoction, in rats with post-stroke depression

LUO Lin[1], DEN Shu-hua[1], YI Jian[1], ZHOU Sai-nan[1], SHE Yan[1], LIU Bai-yan[1,2]

(1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. Yiyang Medical College, Yiyang 413000)

【Abstract】 Objective　To observe the effect of a traditional Chinese medicine, BuyangHuanwu Decoction, on the ethology in rat models of post-stroke depression (PSD). **Methods**　Sixty male SD rats, after open-field ethology scoring, were randomly divided into five groups (12 rats in each group): sham operation group, cerebral ischemic stroke group, post-stroke depression (PSD) group, BuyangHuanwu Decoction group, and fluoxetine group. The rat PSD models were established with separately breeding and chronic unpredictable moderate stress (CUMS) after middle cerebral artery occlusion. Behavior changes of the rats were detected by body weight measurement, neurological scoring, sugar consumption test and open-field test. **Results**　Compared with the sham operation group and cerebral ischemic stroke group, the body weight, sugar consumption and open-field spontaneous activity in the PSD model group were decreased, and the neurological function deficits became more severe ($P<0.01$ or $P<0.05$). Compared with the PSD group, Both

[**基金项目**]国家自然科学基金(编号:81273989);湖南省高校创新平台开放基金项目(12K089);湖南中医药大学病理学与病理生理学重点学科(2012)。

[**作者简介**]罗琳(1979 -),女,研究方向:中西医结合防治脑血管疾病。Email: 79linzi@163.com。

[**通讯作者**]刘柏炎(1970 -),男,研究方向:中西医结合防治脑血管疾病及神经干细胞。Email: Liubaiyan@126.com。

BuyangHuanwu Decoction group and fluoxetine group got significantly higher scores of body weight, sugar consumption and spontaneous activity, and improved neurological function deficits ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusions** PSD rats exhibit abnormal behavior. BuyangHuanwu Decoction can significantly improve the behavioral impairment of PSD rats. The antidepressant effect of BuyangHuanwu Decoction is comparable to that of fluoxetine in the treatment of PSD rats.

【**Key words**】 BuyangHuanwu decoction; Post-stroke depression; Behavior; Rats

脑卒中是一种对人类健康和生命安全造成极大威胁的难治性疾病,具有高发病率、高致残率和高死亡率的特点。卒中不仅导致患者运动功能障碍出现偏瘫,同时患者也出现不同程度的心理、认知和语言功能的障碍,产生一系列情感行为学方面的变化,称为脑卒中后抑郁(post-stroke depression, PSD)。PSD 是卒中后最常见和最严重的神经精神并发症之一,约有 1/3 的脑卒中患者出现抑郁症状[1],不但严重影响患者神经功能的康复,显著降低患者的生活质量,而且死亡率高达非 PSD 患者的 3 ~ 4 倍[2]。因此,对 PSD 患者进行早期而有效的防治具有非常重要的现实和社会意义。抑郁症的显著特征之一是行为学的改变,其也是检测实验中抑郁动物模型成功与否的重要指标,本研究采用复合法制备脑卒中后抑郁大鼠模型,通过中药补阳还五汤的干预,并用氟西汀作对照,分别在应激前和应激后 7 d、14 d 和 21 d 进行行为学测试,以期动态观察补阳还五汤对脑卒中后大鼠行为学的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只,体重(220 ~ 250)g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号[SCXK(湘)2011-0005]。饲养于湖南中医药大学动物实验中心 SPF 级饲养间内,使用许可证号:[SYXK(湘)2008-0003]。

1.2 药物与仪器

补阳还五汤处方组成:黄芪 120 g,归尾 6 g,赤芍 4.5 g,红花 3 g,川芎 3 g,桃仁 3 g,干地龙 3 g。药材均购自湖南中医药大学附属一医院门诊药房,药剂水煎滤出药渣浓缩成每毫升含生药 2 g,冷藏待用;盐酸氟西汀胶囊:礼来苏州制药有限公司,药品批号:国药准字 J20080016。SMART2.5 系统及立柱体旷场箱设备(深圳市瑞沃德生命科技有限公司),WD-9405B 型水平摇床(北京市六一仪器厂),穿梭箱(西班牙 Panlab 公司)。

1.3 分组与给药

大鼠适应性饲养 1 周,1 周后测旷场试验(open-field test, OFT)基线值,选择评分相近的大鼠 60 只随机分为:假手术组、卒中组、PSD 组、补阳还五汤组、氟西汀组,共 5 组,每组 12 只。假手术组、卒中组每笼饲养 6 只,其余各组每笼饲养 1 只。给药时间为 21 d,从应激后第 1 天开始,每天灌胃 1 次,每周测体重 1 次,根据体重变化更新剂量。补阳还五汤组每日灌胃 1 次,用量为 13.26 mg/kg 补阳还五汤药液(按体表面积计算相当 60 kg 成人用量的 3 倍);氟西汀组予氟西汀溶液每日等容积混悬液灌胃 1 次,用量为 1.54 mg/kg;余下各组均每日等容积灌胃蒸馏水 10 mL/kg 灌胃。

1.4 模型制备

采用大脑中动脉栓塞法(middle cerebral artery occlusion, MCAO)制备脑缺血大鼠模型,并在此基础上,给予孤养和慢性不可预知的温和应激法(chronic unpredictable mild stress, CUMS)联合制备 PSD 模型。脑缺血大鼠模型:参照 Zea-Longa 文献[3]制备右侧大脑中动脉栓塞(MCAO)大鼠模型,动物术后参照 Bederson[4]的 5 分制法对术后清醒大鼠进行神经功能评分,分值在 1 ~ 3 分者入组,死亡不足动物再随机补充。假手术组动物,除在手术过程中不插入钱栓以外,其他的过程相同。⑵CUMS 模型:术后参照文献[5]方法略加改进:①禁食禁水 21 h;②行为限制 30 min;③45°倾斜鼠笼 24 h;④昼夜颠倒 24 h;⑤水平摇晃 5 min;⑥湿笼(100 g 锯屑加 200 mL 水)24 h;⑦声电刺激(电压 0.9mA)8 次/只等 7 种。每天随机选取一种应激,相同应激不连续出现,每种应激出现 3 次共 21 d。假手术组除每天抓取 1 次外,不做其他处理。⑶孤养:大鼠单笼饲养。

1.5 行为学检测

1.5.1 体重检测:在术前 1d 和 CUMS 后第 7、14、21 天对各组大鼠进行体重测量。

1.5.2 神经功能评分:除假性手术组外,其余各组于 CUMS 后第 7、14、21 天运用 Ayelet Levy 评分法[6]评价各组大鼠不同时间点神经功能恢复情况。评分:(1)提住尾巴将小鼠逐渐提高:前肢屈曲 1 分,后肢屈曲 1 分,30s 内头移动与纵轴形成角度 >

10°1 分;(2)将小鼠置于地面:正常爬行 0 分,无法直线爬行 1 分,沿患侧转圈 2 分,患侧跌倒 3 分;(3)梁平衡测试:静态姿势下可平衡 0 分,抓握梁边 1 分,抱住梁,有一肢体掉落 2 分,抱住梁,有两肢体掉落,或在梁上旋转(>60s)3 分,试图在梁上保持平衡,但跌落(>40 s)4 分,试图在梁上保持平衡,但跌落(>20s)5 分,跌落,但没有试图保持平衡或抓握梁(<20s)6 分;(4)反射缺失或异常动作:耳廓反射(当触耳道时摇头)1 分,角膜反射(用棉花丝轻触角膜时眨眼)1 分。因此,分数越高,损伤程度越重。

1.5.3 蔗糖水消耗实验[7]:于术前 1 d 和 CUMS 后第 7、14、21 天对各组大鼠进行糖水消耗试验。实验前训练大鼠饮用 l% 蔗糖水,即在每个鼠笼放置 2 个水瓶,在开始的 24 h 内两瓶均装有 1% 蔗糖水,随后第 2 个 24 h 内 1 个瓶装纯净水,另 1 个瓶装 1% 蔗糖水。进行试验测定时大鼠禁食禁水 20 h, 然后给予每只测试大鼠一瓶 1% 蔗糖水和一瓶纯净水,1 h 后取瓶测量计算动物的糖水饮用比率(糖水消耗量/总液体消耗量 ×100%)。

1.5.4 旷场实验[8]:于术前 1 d 和 CUMS 后第 21 天进行旷场实验。采用立柱体旷场箱,规格(100 × 100 ×40)cm,周壁、底面为黑色。将大鼠置于旷场箱底面的中心,用 SMART 实时视频图像跟踪分析系统记录大鼠在 3 min 内的移动距离(travelled distance,Dist)、平均速度(不包含休息时间)(speed-average(without resting time),V. Avge)。测试时在光线昏暗、安静的环境下进行,每次测定结束后清除干净动物的排泄物,每只只测定 1 次,实验时间结束后通过录像分析软件统计结果。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计学分析。计量资料数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析。所有统计均以 $P < 0.05$ 作为差异有显著性。

2 结果

2.1 各组大鼠不同时期体重比较

由表 1 结果可见,术后应激第 7 天起 PSD 组、卒中组较假手术组体重增幅减慢($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),且 PSD 组体重降低更明显;应激第 14 d、21 d 卒中组体重增长逐渐恢复正常,而 PSD 组体重增幅明显减慢($P < 0.01$);补阳还五汤干预后在应激第 7 天与 PSD 组相比体重增加($P < 0.05$),第 14、21 天体重增加明显高于 PSD 组($P < 0.01$),氟西汀和补阳还五汤组之间差异无统计学意义,说明补阳还五汤及氟西汀能改善卒中后抑郁大鼠模型的抑郁状态,增加大鼠体重。

2.2 神经功能评分比较

由表 2 结果可见,通过 Ayelet Levy 评分法检测,各组大鼠在术后均出现了程度不等的神经功能缺损,术后应激第 7 天神经功能评分比较各组差异无统计学意义($P > 0.05$);随后 PSD 组大鼠神经功能评分逐渐增加,第 14、21 天与卒中组比较有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);治疗组氟西汀和补阳还五汤组其神经功能评分逐渐降低,且与 PSD 组比较差异具有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),表明其均促进其神经功能恢复,但氟西汀组和补阳还五汤组比较差异无统计学($P > 0.05$)。

表 1 各组大鼠不同时间点体重比较($n = 10, \bar{x} \pm s$, g)

Tab. 1 Comparison of the body weight of rats in each group at different time-points($n = 10, \bar{x} \pm s$, g)

组别 Groups	应激前 Before stress	应激第 7 天 Stress, 7 days	应激第 14 天 Stress, 14 days	应激第 21 天 Stress, 21 days
假性手术组 Sham operation group	250.90 ± 18.30	285.55 ± 18.04	310.58 ± 22.77	333.66 ± 25.05
卒中组 Stroke group	258.63 ± 16.33	266.35 ± 17.19$^{\#}$	288.58 ± 20.05	309.69 ± 21.28
PSD 组 PSD group	260.82 ± 17.90	250.44 ± 16.82$^{\#\#}$	263.80 ± 14.87$^{\#\#\triangle}$	277.09 ± 14.77$^{\#\#\triangle}$
氟西汀组 Fluoxetine group	257.07 ± 17.75	267.03 ± 18.60	288.00 ± 23.29*	309.81 ± 22.50*
补阳还五汤组 Chinese medicine group	260.66 ± 20.02	278.81 ± 18.09*	308.38 ± 19.27**	329.09 ± 20.69**

注:与假性手术组比较,$^{\#}P < 0.05$,$^{\#\#}P < 0.01$;与卒中组比较,$^{\triangle}P < 0.05$,$^{\triangle\triangle}P < 0.01$;与 *PSD* 比较,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$。

Note. Compared with the sham operation group,$^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$; Compared with the cerebral ischemic stroke group, $^{\triangle}P < 0.05$, $^{\triangle\triangle}P < 0.01$; Compared with the PSD group,$^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$.

表 2 各组大鼠神经功能评分比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparisons of neurological score in the rats of each group($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别 Group	应激第 7 天 Stress, 7 days	应激第 14 天 Stress, 14 days	应激第 21 天 Stress, 21 days
假性手术组 Sham operation group	7.83 ± 1.66	6.40 ± 1.50	5.10 ± 1.62
卒中组 Stroke group	8.27 ± 1.45	8.98 ± 1.76$^{\triangle}$	9.22 ± 1.59$^{\triangle\triangle}$
PSD 组 PSD group	6.73 ± 1.70	5.44 ± 1.51*	3.86 ± 1.73**
氟西汀组 Fluoxetine group	6.55 ± 1.83	4.30 ± 1.80$^{\triangle **}$	2.91 ± 1.63$^{\triangle **}$
补阳还五汤组 Chinese medicine group			

注:与卒中组比较,$^{\triangle}P<0.05$,$^{\triangle\triangle}P<0.01$;与 PSD 比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

Note. Compared with the cerebral ischemic stroke group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$; Compared with the PSD group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

2.3 蔗糖水消耗实验

由表 3 结果可见,造模前各组大鼠饮用糖水消耗比例无明显差异($P>0.05$);从术后应激第 7 天起 PSD 模型组糖水消耗率呈下降趋势,且与假手术组、卒中组有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);给予药物干预后,氟西汀组在应激 14 d、21 d 糖水消耗率有所上升,与 PSD 组比较差异有统计学意义($P<0.01$),而补阳还五汤组在应激第 7 天与 PSD 模型组比较就明显增加了糖水消耗率($P<0.05$),说明在一定阶段其疗效优于氟西汀,补阳还五汤组在应激 14 d、21 d 与 PSD 组比较均可明显增加糖水消耗率($P<0.01$)。

2.4 旷场实验

由表 4 结果可见,术后应激 21 d 后,PSD 组大鼠运动总路程显著缩短,运动平均速度明显减低,与卒中组、假性手术组比较有统计学差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$);通过补阳还五汤干预治疗后运动总路程明显增加、运动平均速度也明显加快,与 PSD 组比较差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$);而补阳还五汤组与氟西汀组在运动总路程和平均速度上差异均无统计学($P>0.05$)。说明补阳还五汤和氟西汀均可增加卒中后抑郁大鼠移动距离和平均速度。

表 3 各组大鼠不同时间点糖水消耗率比较($n=10, \bar{x} \pm s$,%)

Tab. 3 Comparisons of sugar consumption in the rats of each group at different time-points($n=10, \bar{x} \pm s$, %)

组别 Group	应激前 Before stress	应激第 7 天 Stress, 7 days	应激第 14 天 Stress, 14 days	应激第 21 天 Stress, 21 days
假性手术组 Sham operation group	81.62 ± 8.02	77.05 ± 5.63	81.44 ± 9.04	83.28 ± 7.40
卒中组 Stroke group	80.06 ± 6.22	78.87 ± 8.04	80.62 ± 6.64	82.63 ± 5.55
PSD 组 PSD group	80.93 ± 5.58	68.04 ± 5.46$^{\#\triangle}$	54.33 ± 8.22$^{\#\#\triangle\triangle}$	42.70 ± 7.71$^{\#\#\triangle\triangle}$
氟西汀组 Fluoxetine group	78.80 ± 7.25	69.22 ± 5.80$^{\#\triangle}$	76.62 ± 5.08**	79.33 ± 4.66**
补阳还五汤组 Chinese medicine group	77.75 ± 7.80	76.94 ± 4.48**	79.01 ± 6.62**	81.71 ± 7.04**

注:与假性手术组比较,$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$;与卒中组比较,$^{\triangle}P<0.05$,$^{\triangle\triangle}P<0.01$;与 PSD 比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与氟西汀比较:$^{\star}P<0.05$。

Note. Compared with the sham operation group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$; Compared with the cerebral ischemic stroke group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$; Compared with the PSD group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$; Compared with the fluoxetine group, $^{\star}P<0.05$.

表 4 各组大鼠旷场实验测定结果比较($n=10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison of open-field test results in the rats of each group($n=10, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	移动距离 Dist(cm)		平均速度 V. Avge(cm/s)	
	造模前 Before modeling	应激后 After stress	造模前 Before modeling	应激后 After stress
假性手术组 Sham operation group	1246.20 ± 145.78	1503.08 ± 282.60	13.08 ± 3.65	12.77 ± 2.28
卒中组 Stroke group	1333.09 ± 212.62	1498.24 ± 352.64	12.69 ± 4.24	10.46 ± 3.83
PSD 组 PSD group	1378.75 ± 268.08	838.57 ± 265.50$^{\#\#\triangle\triangle}$	12.04 ± 2.66	6.05 ± 4.09$^{\#\triangle}$
氟西汀组 Fluoxetine group	1447.78 ± 303.66	1315.66 ± 312.21**	10.91 ± 4.09	10.88 ± 2.45*
补阳还五汤组 Chinese medicinegroup	1293.34 ± 255.07	1499.32 ± 277.42**	11.57 ± 2.88	12.63 ± 2.66*

注:与假性手术组比较,$^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$;与卒中组比较,$^{\triangle}P<0.05$,$^{\triangle\triangle}P<0.01$;与 PSD 比较,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$。

Note. Compared with the sham operation group, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#}P<0.01$; Compared with the cerebral ischemic stroke group, $^{\triangle}P<0.05$, $^{\triangle\triangle}P<0.01$; Compared with the PSD group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$.

3 讨论

现代医学认为,PSD 是以精神和躯体症状相结合的复杂的神经精神情感障碍性疾病,它是各种神经生物学和社会心理因素综合作用的结果,其发病符合生物-心理-社会医学模式,即 PSD 的发生既是卒中后出现了颅内特定部位损伤的直接结果,又是卒中这一突发应激事件给患者带来各种心理反应及社会因素影响的结果[9]。中医学辨证认为,PSD 属于“郁证”范畴,因其发生在中风之后,又将其归为中风与郁证之合病,属于“因病致郁”;卒中后气虚血瘀、血瘀阻络为其病机核心,又因肢体偏瘫等因素思虑过度,情志不舒,伤及肝脾二脏为其发病的最重要原因[10]。因此目前多数医家认为本病病位在脑,涉及肝、脾、肾等,其证属本虚标实或虚实夹杂,病之本属精气血亏虚,病之标则为痰瘀互结[11],故治疗上基于急则治标、缓则治本的原则,在辨证论治原有疾病的基础上,以补气活血通络为治其本。本实验所选补阳还五汤是补气行瘀、疏通经络的代表方剂 ,是治疗中风后遗症的经典名方,方中当归、川芎、赤芍、桃仁、红花活血化瘀,地龙通经活络,并重用黄芪大补元气,使全方具有补气而不留邪,活血而不伤正之功效[12]。

本实验首先通过线栓法制备脑缺血卒中模型造成大鼠脑血管急性病理损伤,再运用孤养法及慢性不可预知的温和应激法联合模拟恢复期负性压力环境制备 PSD 模型大鼠,目前该模型广泛应用于 PSD 形成机制和药物疗效评价的研究[13]。对于 PSD 大鼠的显著特征之一—行为学的观察,其体重变化、糖水消耗实验和旷场实验是反映动物抑郁症状和躯体症状的关键指标,因此本研究用以上三个重要指标来综合评价补阳还五汤对 PSD 大鼠的干预作用。

临床上抑郁症病人通常会出现食欲下降、体重减轻现象,所以体重的变化是衡量 PSD 大鼠的量化指标之一。本实验研究发现,在应激刺激第 7d、14d、21dPSD 组大鼠体重增幅明显减慢,与假手术组比较有显著性差异,而卒中组在第 14d 后体重增幅逐渐恢复正常,提示应激事件影响到了动物体重的增长;给予药物干预的氟西汀组和补阳还五汤组,均能明显改善 PSD 大鼠体重增长情况,提示中药补阳还五汤干预对促进食物的吸收有一定促进作用,可以缓解动物因应激事件引起的体重增幅减慢的现象。

兴趣缺乏、快感缺失是 CUMS 模型动物抑郁行为中最为核心的症状之一,啮齿类动物快感缺失的定量评价方法主要为糖水消耗实验[14]。本实验研究结果显示,基于啮齿类动物喜好糖水的天性,经过应激处理的 PSD 组大鼠的糖水消耗量明显较假手术组和卒中组大鼠下降,表明 PSD 大鼠对奖赏机制的敏感性减低,出现了明显的抑郁症状。而通过氟西汀、补阳还五汤药物干预的大鼠糖水消耗量明显增加,且补阳还五汤组在应激第 7 天与 PSD 组比较就明显增加了糖水消耗率,说明在一定阶段其疗效优于氟西汀,提示补阳还五汤能增加 PSD 大鼠对奖赏机制的敏感性,减轻其抑郁症状。

旷场实验由 Hall 在 1934 年提出,用于观察动物在特定陌生环境一定时间内中的自发活动行为,是反应大鼠对未知环境的探索能力及情绪反应的经典实验。本实验采用小动物视频图像跟踪分析系统,动态分析大鼠在旷场箱中的活动轨迹,

以运动总路程和平均速度等为观察指标,能更直接地反应动物的抑郁程度,从而避免了传统的人为观察记录动物的跨格次数所造成标准不一致性、主观性程度大以及费时费力等缺点,取得更加真实准确的实验数据[15]。实验结果显示,通过 21d 的应激刺激后,PSD 组大鼠总路程显著缩短,运动平均速度明显减低,与卒中组、假性手术组比较有统计学差异,说明动物对未知环境出现了兴奋性和探索能力降低等症状,与抑郁症状具有一定相似性。而给予干预治疗后运动总路程明显增加、运动平均速度也明显加快,提示补阳还五汤干预可以改善 PSD 大鼠的探索性活动,缓解抑郁症状。

以往研究表明脑卒中后抑郁的发生与脑卒中的亚型无关,而与脑卒中后的神经功能损伤程度有关,神经功能的恢复有助于脑卒中后抑郁症状的缓解[16-17]。本实验结果也显示,应激 14d、21d 后 PSD 组大鼠神经功能评分逐渐增加,神经功能损伤加剧,与卒中组比较有统计学差异。而给与药物干预后,神经功能恢复良好。

综上所述,本文对卒中后抑郁大鼠的行为学变化进行了初步探讨,显示补阳还五汤具有一定的治疗 PSD 的效果,不但减轻了 PSD 大鼠的抑郁程度,而且对卒中引起的神经功能缺损有良好的恢复作用,充分发挥了中药多靶点、多效应的作用,但其具体的作用机制还有待今后从显微形态学、分子生物

学等方面进行深入的探究。

参考文献：

[1] Brown C, Hasson H, Thyselius V, et al. Post-stroke depression and functional independence: a conundrum [J]. Acta Neurol Scand, 2012, 126: 45 – 51

[2] Piber D, Hinkelmann K, Gold SM, et al. Depression and neurological diseases[J]. Nervenarzt, 2012, 83: 1423 – 1433.

[3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84 – 91.

[4] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. Stroke, 1986, 17: 472 – 476.

[5] 代沐华,李德强, 韩阳. 文拉法辛对卒中后抑郁大鼠学习记忆及海马脑源性神经营养因子的影响[J]. 浙江大学学报医学版 2011, 40(5): 527 – 534.

[6] Ayelet Levy, AdiBercovich-Kinori, Alexander G, et al. CD38 facilitates recovery from traumatic brain injury [J]. J Neurotrauma, 2009, 26(9): 1521 – 1533.

[7] LI DQ, LI XJ, CAI Wet al. Wuling Capsule promotes hippocampal neurogenesis by improving expression of connexin 43 in rats exposed to chronic unpredictable mild stress[J]. Journal of Chinese Integrative Medicine, 2010, 8(7): 662 – 669.

[8] 李娜, 刘群, 李晓娟, 等. 2 型糖尿病兼抑郁症大鼠模型的建立与评价[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(4): 16 – 19.

[9] 王惠婷, 温清秀, 卢玮旎, 等. 卒中后抑郁发病机制的中西医研究进展[J]. 贵阳中医学院学报, 2014, 36(6): 132 – 135.

[10] 黄晶晶,陈宁勇. 脑卒中后抑郁症发病机制研究进展[J]. 上海中医药大学学报, 2014, 28(3): 104 – 107.

[11] 刘健红, 许幸仪, 苏宁, 等. 百会穴针刺加灯盏花穴位注射对卒中后抑郁大鼠行为学的影响[J]. 今日药学, 2012, 22(11): 641 – 644.

[12] 周新强. 补阳还五消食汤加减治疗脑卒中后抑郁症 65 例临床疗效观[J]. 中医临床研究, 2012, 4(23): 91 – 92.

[13] 何晓山, 林青, 周宁娜, 等. 脑卒中后抑郁常用动物模型[J]. 医学信息, 2011, 24(3): 1459 – 1461.

[14] 白晓宇, 杜冠华. 抑郁症动物模型的转换研究[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(10): 121 – 126.

[15] 周波, 文敏, 李宏伟, 等. Matlab 在旷场实验行为视频分析中的运用[J]. 贵阳医学院报. 2013, 38(2): 164 – 168.

[16] 李海华, 汪毅, 张琴, 等. 脑卒中后抑郁与神经功能缺损的关系研究[J]. 重庆医学, 2012, 41(3): 241 – 243.

[17] 王昭闻. 帕罗西汀改善脑卒中后抑郁和神经功能缺损的临床研究[J]. 中国民康医学, 2011, 23(3): 294 – 295.

〔修回日期〕2015-02-03

(上接第 7 页)

[11] Xin JG, Yang HQ, Fan NN, et al. Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs [J]. PloS ONE, 2013, 8(12): e84250.

[12] Kay S, Hahn S, Marois E, et al. A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator [J]. Science, 2007, 318(5850): 648 – 651.

[13] Romer P, Hahn S, Jordan T, et al. Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene [J]. Science, 2007, 318(5850): 645 – 648.

[14] Kay S, Bonas U. How Xanthomonas type III effectors manipulate the host plant [J]. Curr Opin Microbiol, 2009, 12(1): 37 – 43.

[15] 肖安, 胡莹莹, 王唯晔, 等. 人工锌指核酸酶介导的基因组定点修饰技术 [J]. 遗传, 2011, 33(7): 665 – 683.

[16] Urnov FD, Rebar EJ, Holmes MC, et al. Genome editing with engineered zinc finger nucleases [J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(19): 636 – 646.

[17] 沈延, 肖安, 黄鹏, 等. 类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)介导的基因组定点修饰技术 [J]. 遗传, 2013, 35(4): 395 – 407.

[18] 陈恒余, 邓青春, 李梦婷, 等. 先天性心脏病与 GATA4 基因的关系 [J]. 中国优生与遗传杂志, 2013, 21(6): 6 – 8.

[19] Stainier DY. Zebrafish genetics and vertebrate heart formation [J]. Nat Rev Genet, 2001, 2(1): 39 – 48.

〔修回日期〕2015-02-15

研究报告

急性血液稀释技术在动物实验围手术期中的应用

朱泽兴[1],张树明[1],赵永军[2],樊凯彬[3],乔　林[1]

(1. 解放军第二炮兵总医院骨科,北京　100088; 2. 武警医学院附属医院骨科,天津　300160;
3. 邯郸市中心医院骨科,邯郸 河北　056001)

【摘要】 目的　观察急性血液稀释技术(ANH)在狗断肢冷冻再植实验中对改善术中、术后动物全身状态的作用。**方法**　在狗后肢深低温冷冻再植实验中,对照组(A 组)采用静脉补充等量乳酸钠林格氏液,实验组(B 组)采用急性血液稀释技术,对比两组各时点循环动力学指标、血常规、术后动物苏醒时间、抬头时间、站立时间、术后进食、进水时间。**结果**　①术中两组 PaO_2、PCO_2 值均在正常范围,呼吸频率正常,B 组心率明显低于 A 组,术中血红蛋白、红细胞压积输血前 A 组与 B 组无统计学差异,术后 B 组明显高于 A 组,差异存在显著性。②术后动物苏醒时间、抬头时间、站立时间、术后进食量、进水量 B 组均明显优于 A 组,存在显著差异。**结论**　在狗断肢深低温冷冻再植实验中,急性血液稀释技术(ANH)能明显改善动物术中的全身状态,加快术后恢复速度。

【关键词】 自体输血;急性血液稀释技术(ANH);断肢再植;冷冻保存;外科手术
【中图分类号】R33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0014-03
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.003

Acute normovolemic hemodilution in cryopreserved dog limb replantation

ZHU Ze-Xing[1], ZHANG Shu-Ming[1], ZHAO Yong-Jun[2], FAN Kai-Bin[3], QIAO Lin[1]
(1. Department of Orthopaedics, the Second Artillery General Hospital, BeiJing 100088, China;
2. Department of Orthopaedics, Armed Police Medical School affiliated Hospital, Tianjin 300160;
3. Department of Orthopaedics, Handan Central Hospital, Handan, Hebei 056001)

【Abstract】 Objective　To observe the contribution of acute normovolemic hemodilution (ANH) in experiment of cryopreserved dog limb replantation. **Methods**　Sixteen healthy Beagle dogs (male:female = 1:1) were divided into two groups. Dogs in the experiment group (Group B) received ANH in the limb replantation, and dogs in the control group (Group A) received the same amount of lactate Ringer's solution intravenously during the surgical operation. We recorded and compared the hemodynamic indexes, HB, HCT, the resuscitation time, the first rising head time, the first standing time and the first eating and drinking time between the two groups. **Results**　(1) During the operation, both PaO_2 and PCO_2 in the two groups were normal, as well as the breathing rate. The heart rate in the group B was lower than that in the group A. Before blood transfusion, there was no statistically significant difference in HB and HCT between the two groups, but after transfusion they were significantly higher in the group B than in the group A. (2) The resuscitation time, the first rising head time, the first standing time and the first eating and drinking time of the group B were all better than those in the group A. **Conclusions**　In cryopreserved dog limb replantation experiments, acute normovolemic hemodilution is helpful to improve the general condition and facilitate the recovery of animals after limb replantation.

【Key words】 Dog; Limb replantation; Cryopreservation; Acute normovolemic hemodilution; Surgery

[基金项目]军队"十二五"课题基金《冷冻肢体再植的研究》(编号:08G051)。
[作者简介]朱泽兴(1981 -),男,研究方向:创伤骨科、显微外科。E-mail: zzxzxcvbn@163.com。
[通讯作者]乔林(1971 -),男,研究方向:创伤骨科。qiaolindoc@sohu.com。

复杂手术动物实验往往手术时间长、创伤大、出血多,容易造成术中、术后动物休克死亡而使实验失败。由于目前尚无实验动物异体血库,无法进行异体输血,所以我们在狗后肢深低温冷冻再植实验中,引入了急性血液稀释技术(ANH),对比术中、术后动物血液循环动力学指标及全身状态,报告如下:

1　材料和方法

1.1　一般资料

选择成年实验用比格犬 16 只,实验动物由北京维通利华实验动物技术有限责任公司提供。动物许可证号:SCXK(京)2011-0006。雌雄各半,体重(15 ±0.5)kg,随机分为 A、B 两组,对照组(A 组)采用静脉补充等量乳酸钠林格氏液,实验组(B 组)采用急性血液稀释技术。在解放军军事医学科学院实验室操作,实验动物使用合格证号:SYXK-(军)2012-0021。实验过程中对动物处置方法符合《关于善待实验动物的指导性意见》。

1.2　手术过程

术前 40 min B 组采犬静脉血 150 mL,同时输注乳酸钠林格氏液 250 mL,A 组不采血,直接输注乳酸钠林格氏液 100 mL;术前 10 min 检测 A、B 两组血压、心率、呼吸、血红蛋白、红细胞压积。经口腔插管全身麻醉成功后,常规消毒铺巾,自犬胫腓骨中远 1/3 处离断,将肢体远端灌注后阶梯式降温至-196 摄氏度,存放 1 h 后再阶梯式复温至常温,行断肢再植手术,A、B 两组手术操作相同,手术结束前 30 min 检测 A、B 两组血压、心率、血红蛋白、红细胞压积,心电图(EKG),氧饱和度(SpO_2),而后将 B 组术前所采自体血回输;同时 A 组输注乳酸钠林格氏液 150 mL,手术历时约 7 h,全部实验组均由同一组手术人员执行,术后 60 min 复测上述指标(图 1)。

左下:术前铺巾;右侧:术后输血

图 1　左上:实验动物及血袋;

(upper left), preoperative preparation (lower left), and post-operation blood transfusion (right)

Fig. 1　The experimental animal and blood bag

1.3　观察指标

1.3.1　术前:术前 10 min、检测 A、B 两组血压、心率、呼吸、血红蛋白、红细胞压积。

1.3.2　术中:手术结束前 30 min,检测 A、B 两组血压、心率、血红蛋白、红细胞压积,心电图(EKG),氧饱和度(SpO_2)。

1.3.3　术后:术后 60 min,检测 A、B 两组血压、心率、呼吸、血红蛋白、红细胞压积,同时观察记录 A、B 组动物术后苏醒时间,抬头时间,站立时间,术后首日进食量(实验动物饲料 克)、进水量(mL)。

1.4　统计学方法

所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 17.0 统计软件处理,采用两组独立样本的 t 检验,$P<0.05$ 表示差异有显著性,$P<0.01$ 表示差异有非常显著性。

表 1　术前 10 min 监测指标($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1　Monitoring indicators at 10 min before operation($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	犬臂血压 BP of upper limb (mmHg)	心率 HR (次/分)	呼吸频率 BR (次/分)	血红蛋白 Hgb(g/L)	红细胞压积 HCT (%)
对照组 Control group(A 组)	155.6 ±4.1/ 68.6 ±7.9	102.8 ±6.4	38.3 ±3.7	177.3 ±4.2	48.4 ±0.87
实验组 Experiment group(B 组)	155.9 ±3.4/ 71.6 ±8.5	103.4 ±4.6	39.6 ±4.4	174.4 ±2.9	47.5 ±0.89
p 值	0.895	0.825	0.508	0.138	0.63

注:A、B 两组血压、心率、呼吸、血红蛋白、红细胞压积 p 值均大于 0.05,差异无显著性,认为 ANH 技术对犬术前状态无明显影响。

Note. There was no significant difference in BP, HR, BR, Hgb and HCT between the two groups ($P>0.05$). ANH had no obvious effect on the dog preoperative status.

表 2 手术完成前 30 min 监测指标($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Monitoring indicators at 30 mins before the completion of operation ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	犬臂血压 BP of upper limb (mmHg)	心率 HR (次/分)	血红蛋白 Hgb (g/L)	红细胞压积 HCT (%)	氧饱和度 SaO_2 (%)	心电图 ECG
对照组 Control group(A 组)	124.4 ±3.5/ 58.6 ±5.9	140.9 ±4.2	104.6 ±4.0	34.0 ±2.50	98.5 ±1.20	Normal 正常
实验组 Experiment group(B 组)	123.6 ±3.7/ 56.6 ±6.5	140.3 ±5.4	104.1 ±3.1	32.9 ±2.99	98.3 ±1.28	Normal 正常
p 值	0.419	0.799	0.784	0.332	0.693	Normal 正常

注:A、B 两组血压、心率、血红蛋白、红细胞压积、氧饱和度 p 值均大于 0.05,差异无显著性,认为术前用 ANH 处理对犬术中状态无明显影响。

Note. There was no significant difference in BP, HR, BR, Hgb, HCT and SaO2 between the two groups($P > 0.05$). ANH had no obvious effect on the dog during the operation.

表 3 术后 60 min 监测指标($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Monitoring indicators at 60 min after the complation of operation($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	犬臂血压 BP of upper limb (mmHg)	心率 HR (次/分)	呼吸频率 BR (次/分)	血红蛋白 Hgb (g/L)	红细胞压积 HCT (%)	氧饱和度 SaO_2 (%)
对照组 Control group(A 组)	141.4 ±3.6/ 73.6 ±8.9	129.1 ±26.4	33.9 ±3.0	116.0 ±4.2	30.1 ±1.70	96.4 ±0.9
实验组 Experiment group(B 组)	143.1 ±2.23/ 74.6 ±9.5	116.1 ±3.14	35.0 ±2.9	144.4 ±3.1	40.8 ±1.64	96.8 ±1.0
p 值	0.261	0.000	0.467	0.000	0.000	0.456

注:A、B 两组血压、呼吸、氧饱和度 p 值均大于 0.05,差异无显著性;两组心率、血红蛋白、红细胞压积 p 值均小于 0.05,差异存在显著性,认为应用 ANH 技术,血液回输后实验犬术后心率明显降低,同时可明显提高术后血红蛋白及红细胞压积。

Note. There was no significant difference in BP, HR and SaO_2 between two groups($P > 0.05$), but HR, Hgb, HCT in the experiment group were different from those in control group($P < 0.05$). It suggested that dogs in the experiment group had lower HR and higher Hgb and HCT than the control group after operation.

表 4 手术时间和术后动物状态($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 The conditions of during operation and post-operation ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	手术时间 Operation time(h)	苏醒时间 Resuscitation time (min)	抬头时间 First rising head time(min)	站立时间 First standing time (h)	进食量 Eating (g)
对照组 Control group(A 组)	6.9 ±0.20	13.87 ±0.99	68.5 ±13.36	3.55 ±0.38	269.38 ±25.4
实验组 Experiment group(B 组)	6.9 ±0.24	13.1 ±1.36	52.9 ±5.13	2.49 ±0.22	393.8 ±38.9
p 值	1.000	0.136	0.008	0.000	0.000

注:A、B 两组手术时间、苏醒时间 p 值均大于 0.05,差异无显著性;两组抬头时间、站立时间、术后 24h 进食、水量 p 值均小于 0.05,差异存在显著性,认为应用 ANH 技术,能够明显改善实验犬的术后状态,使其尽快抬头、站立、进食水,但进水量较对照组减少。

Note. There was no significant difference in operation time and resuscitation time between the two groups($P > 0.05$), but first rising head time, first standing time and eating and drinking intake in the experiment group were different from those in of the control group($P < 0.05$). It suggested that dogs in the experiment group restored earlier than the control group.

2 结果

2.1 术前

术前 10 min(备血后)、检测 A、B 两组血压、心率、呼吸、血红蛋白、红细胞压积,各组数据应用 SPSS17.0 统计软件处理,采用两独立样本的 t 检验(表 1)。

2.2 术中

两组麻醉机设置相同的呼吸频率、潮气量及氧浓度,手术结束前 30 min,检测 A、B 两组血压、心率、血红蛋白、红细胞压积,心电图(EKG),氧饱和度(SpO_2),各组数据应用 SPSS17.0 统计软件处理,采用两独立样本的 t 检验(表 2)。

2.3 术后

手术结束前 30 min 将 B 组术前所采自体血回输,同时 A 组输注乳酸钠林格氏液 150 mL;术后实验犬均顺利拔管、苏醒,术后 60 min,检测 A、B 两组血压、心率、呼吸、血红蛋白、红细胞压积,同时观察记录 A、B 组动物手术时间、术后苏醒时间,抬头时间,站立时间,术后首日进食量(实验动物饲料 克)、

进水量(mL)。各组数据应用 SPSS 17.0 统计软件处理,采用两独立样本的 t 检验(表 3、4)。

由上述结果可见,急性血液稀释技术可以有效降低术中实际出血,改善动物术后贫血,缩短动物复苏时间,使动物快速恢复到术前状态,进而保证实验的顺利进行,同时减轻了实验动物的痛苦。

3 讨论

一种创新技术、创新手术在进入临床前必须进行大量的严格的活体动物实验,而其中需要复杂手术操作的活体动物实验失败的主要原因除了手术操作失误以外,很大一部分因素是因为手术时间长、创伤大、出血多,造成动物术中、术后休克死亡,所以输血对需要复杂手术操作的活体动物实验就显得尤为重要[1-3]。但对动物输血目前只有美国、澳大利亚等发达国家以中央血库的形式建立了动物血库,目的是治疗宠物和拯救濒危动物,而非动物实验用血库[4-7];国内因为成本太高目前尚无动物血库,仅少量宠物医院采用临时同种异体输血方式对救治的宠物进行输血,但宠物品种繁多,血型也多种多样,如犬的血型至少有 8 种,猫有 6 种,羊有 9 种,而牛的血型多达 40 种以上,且无统一的检测标准,存在巨大的安全问题,更无法在动物实验中广泛应用[8-11]。

人类探索安全输血经历了长达 400 年的历程,随着对异体输血弊端认识的深入,人们已逐渐接受并提倡自体输血,并出现了术前自体采血贮存技术(preoperative active blood donation, PABD)、急性血液稀释技术(acute normovolemic hemodilution)、术中及术后术区血液回收技术(intraoperative and postoperative blood salvage)等自体输血技术。但目前术前自体采血贮存技术和术中及术后血液回收技术都需要专业的血液采集、储存、净化等设备,费用昂贵,难以普及。而对于难以实现异体输血的动物实验,急性血液稀释技术就成为一条重要的解决方法。

急性血液稀释技术(ANH)是 1946 年发明的术中自体输血的一种方式,现已广泛应用于临床[12,17]。ANH 一般是在麻醉后和手术主要步骤开始之前,短时间内快速抽取患者预定量的自体血液贮存于手术间,同时补充等效容量的晶体或胶体液,快速稀释血液,有输血指征或手术结束前再将采集的新鲜自体血回输给患者[12,13,17]。其优点有:(1)ANH 可使术中血液稀释,降低在手术操作过程中循环中的红细胞浓度,减少术中红细胞流失,使手术中的实际出血量减少,以达到不输异体血或少输异体血的目的[13];(2)ANH 是唯一提供新鲜自体血液的方法,血小板及凝血因子功能基本不受影响,红细胞损失少;(3)自身输血,无抗原性及过敏反应的风险,对术后免疫学检查影响小[14,15,16]。

断肢冷冻再植实验手术创伤大,手术时间长,出血多,我们将 ANH 应用到此实验中,研究结果显示,ANH 可以有效降低术中实际出血,纠正术后贫血,同时缩短动物术后抬头、站立时间,改善术后动物全身状态。

综上所述,对于需要复杂手术操作的活体动物实验,急性血液稀释技术可以有效降低术中实际出血,改善动物术后贫血,缩短动物复苏时间,使动物快速恢复到术前状态,进而保证实验的顺利进行;同时 ANH 减轻了实验动物的痛苦,符合动物实验伦理学的要求,操作简单,费用低廉,值得进一步推广。

参考文献:

[1] Tremper KK. 48th Ann Reference Course Lectures and Clin Update Program Am Soc Ansthesiologists [M]. 1997, 7: 113.

[2] Klövekorn WP, Pichlmaier H, Ott E, et al. Akute praeoperative Haemodilution eine Moeglichkeit zu autologen Bluttransfusion [J]. Chirurg, 1974, 45: 452-458.

[3] Matot I, Scheinin O, Jurim O, et al. Effectiveness of acute normovolemic hemodilution to minimize allogeneic blood transfusion in major liver resections [J]. Anesthesiology, 2002, 97(4): 974-800.

[4] Gross JB. Estimating allowable blood loss: corrected for dilution [J]. Anesthesiology, 1983, 58: 277-280.

[5] Estafanous FG, Mekhail N, Yared JP. Advantages limitations of hemodilution [J]. Semin Thorac Surg, 1994, 6: 87-89.

[6] Habler OP, Kleen MS, Podtschaske AH. et al. The dffect of acute normovolemic hemodilution on myocardial contractility in anesthetized dogs [J]. Analg, 1996; 83(2): 451-458.

[7] Leung JM, Weiskopf RB, Feiner J. et al. Electrocardiographic ST-segment change during acute severe isovolemic hemodilution in humans [J]. Anesthesiology, 2000, 93(4): 1004-1010.

[8] Weiskopf RB. Hemodilution and candles [J]. Anesthesiology, 2002, 97(4): 773-775.

(下转第 37 页)

研究报告

C57-*ras* 转基因小鼠模型杂交 1 代 CB6F1 的生长发育特性

刘甦苏,吴　曦,周舒雅,王辰飞,彭泽旭,左　琴,李保文,贺争鸣,范昌发

(中国食品药品检定研究院,国家啮齿类实验动物种子中心,北京　100050)

【摘要】　目的　测定自主建立的转基因致癌性模型 C57-ras 小鼠与 BALB/c 小鼠杂交 1 代的生长发育特性参数,为该模型的商业化供应提供基础数据。**方法**　将雄性转基因阳性 C57-*ras* 小鼠与野生型雌性 BALB/c 小鼠交配,获得杂交 1 代(CB6F1 c-Ha-ras$^{+/-}$)并测定平均产仔数、离乳率、阳性鼠生长发育情况、转基因阳性率等参数。**结果**　在生长发育方面,雌鼠平均每窝产子数为 8 只,离乳率为 90%,雄雌性别比符合预期。CB6F1 的平均出生重为(1.73 ± 0.05)g,10 周龄时阳性鼠平均体重雌性(24.38 ± 1.74)g , 雄性(29.42 ± 1.72)g。雄性鼠体重明显高于雌性,差异存在极显著性(P < 0.01);基因型检测阳性率为 46.9%,符合遗传规律。**结论**　转基因致癌性模型 C57-*ras* 小鼠与 BALB/c 小鼠杂交 1 代的生长发育特性正常,可实现规模化商业供应。

【关键词】 C57-*ras* 转基因小鼠;人原癌基因 *c-Ha-ras*;CB6F1;生长发育特性;
【中图分类号】R33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0018-05
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.004

Characterization of growth performance of F1 hybrid CB6F1 C57-ras transgenic mouse model

LIU Su-su, WU Xi, ZHOU Shu-ya, WANG Chen-fei, PENG Ze-xu, ZUO Qin,
LI Bao-wen, HE Zheng-ming, FAN Chang-fa
(National Rodent Laboratory Animal Center, National Institute of Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】　Objective　To obtain the basic growth parameters of a self-established F1 hybrid CB6F1 C57-ras transgenic mouse model, and to provide basic information for commercialization of this mouse model. **Methods**　F1 hybrid mice (CB6F1) were produced by crossing C57-ras heterozygous transgenic (*c-Ha-ras*$^{+/-}$) male mice and wild-type BALB/cJ female mice. The average litter size, weaning rate, sex ratio, growth performance and C57-ras transgenic positive rate were recorded and analyzed. **Results**　The average litter size was eight, weaning rate was 90%, and sex ratio was approximately in accordance with prediction. The average body weight of newborn mice was 1.73 ± 0.05 g. The average body weight of 10-week old *c-Ha-ras* transgenic female and male mice in CB6F1 background was 24.38 ± 1.74 g and 29.42 ± 1.72g, respectively, which had a significant difference (P < 0.01). The *c-Ha-ras* transgenic positive rate was 46.9%. which was in accordance with genetic rules. **Conclusions**　The F1 hybrid mice (CB6F1) produced by crossing C57-ras heterozygous transgenic (c-Ha-ras +/−) male mice and wild-type BALB/cJ female mice show normal growth performance and development characteristics, and it can be used for large-scale commercial supply.

[**基金项目**]中国食品药品检定研究院中青年发展研究基金(批准号: 2010C4)资助的课题。
[**作者简介**]刘甦苏(1981 −),女,助理研究员,主要从事模式动物相关工作。
[**通讯作者**]范昌发(1970 −),男,博士,研究员,主要从事模式动物研究。Email: fancf@ nifdc. org. cn。

【Key words】 C57-ras transgenic mice, Human *c-Ha-ras* gene, CB6F1, Growth performance

小鼠的生长发育特性是其生理学数据的组成部分也是动物饲养管理和健康状况的重要指标,对建立该品系的商业化供应体系具有指导意义[1],尤其对于新建立的转基因品系而言,是该品系不可或缺的背景数据。

C57-*ras* 转基因致癌性小鼠模型是通过原核注射方法,将人原癌基因 *c-Ha-ras* 导入 C57BL/6 小鼠基因组中自主建立[2,3],旨在建立新一代基因修饰动物模型以用于我国临床前药物致癌性实验,促进我国建立符合 ICH 规范的新评价替代方法体系[4-5]。由于 *C57-ras* 转基因小鼠纯合致死[6],以转基因杂合子(*c-Ha-ras*$^{+/-}$)与 C57BL/6 野生型小鼠交配的方式进行传代繁殖。通过观察,发现 C57-*ras* 转基因小鼠繁殖能力及仔鼠成活率低,而之前文献报道其自发肿瘤的发生率较高[5,7],故此类临床前致癌性安全评价实验所用动物为 C57-*ras* 阳性小鼠和 BALB / cJ 的杂交 1 代阳性鼠(CB6F1 c-Ha-ras$^{+/-}$),以降低背景肿瘤对实验准确性的影响[7]。目前,我们已经完成部分该模型的阳性致癌物验证工作[10],也开始向部分临床前药物评价中心提供。而该模型的平均产仔数、离乳率、生产曲线等基本参数尚未测定,给建立商业化供应体系带来一定难度。本文在测定 *c-Ha-ras* 转基因阳性小鼠在 CB6F1 背景上生长发育性能参数的同时计算该基因检测阳性率,旨在为其生产供应及应用于药物安全评价提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

9 ~ 10 周龄的雄性转基因阳性 C57-*ras* 小鼠 42 只及 8 周龄野生型 BALB/cJ 雌鼠 45 只均饲养于国家啮齿类实验动物种子中心[SCXK(京)2009-0017],屏障环境,温度(18 ~ 26)℃,相对湿度 50% ~70%,自动光控(12 h 明/12 h 暗)。饲料购自北京维通利华,经^{60}Co 辐照灭菌。饮用水为经高压灭菌的自来水。

本实验在中国食品药品检定研究院实验动物伦理委员会监督下进行。实验人员均持有北京市实验动物从业人员上岗证。实验设计符合“3R”原则,动物饲养管理及实验操作符合《北京市实验动物管理条例》法规的要求,实验结束后实验动物处死方法为安乐死。

1.2 仪器及试剂

TaqDNA 聚合酶、DNA marker、dNTP、PCR 缓冲液、蛋白酶 K 均购置于由宝生物工程大连有限公司(TaKaRa)。1.5 mL 离心管和 PCR 管及盖购自于 Axygen。美国 Sartorius 公司 BSA220ZS 型电子天平、Thermo Nanodrop 2 000 微量紫外分光光度计。引物由诺赛基因研究公司合成。

1.3 动物交配方式

雄性转基因阳性 C57-*ras* 小鼠与雌性野生型 BALB/cJ 小鼠 1∶1 交配获得 F1 代,交配采用隔天交配并记录阴道栓的方式,每天 17 点合笼(标记为 0 d),次日(标记为 0 +1 d)上午 9 点开始检查雌鼠阴道栓,未成功检栓的雌鼠与雄鼠 0 +1 d 的 17 点合笼,成功检栓的雌鼠 2 只一笼饲养待产,雄鼠则于 0 +2 d 下午 17 点合笼,以此类推。并于见栓 14 d 后挑选待产雌鼠,确认怀孕率。共进行 3 次繁殖交配实验,每次实验选用的繁殖亲本为前一次未成功交配的雌雄鼠。

1.4 生长发育测定指标

分别记录交配雌鼠的阴道栓见栓率以及后期怀孕率、雌鼠产仔数,小仔的性别比及离乳数。随机选取 4 窝仔鼠,分别称量其初生、7 d、14 d 和 21 d 时窝重并计算单只仔鼠重量;小鼠离乳后经 PCR 方法检测 CB6F1 基因型,分别称量雌雄各 20 只 CB6F1(*c-Ha-ras* $^{+/-}$)转基因阳性鼠在 4、5、6、7、8、9 和 10 周龄时体重。

1.5 PCR 反应扩增检测杂合 CB6F1 小鼠基因型

检测 194 只离乳小鼠,剪尾后进行蛋白酶 K 消化并提取基因组 DNA。每只小鼠取 100 ng 基因组 DNA,PCR 检测基因型,引物设计针对转基因的编码序列,上游引物为 Pri. PFT,下游引物为 Pri. PRN1735(序列见表 1),目的片段 408 bp。PCR 条件为:95℃ 5 min 变性;95℃ 30 s;62℃ 30 s,72℃ 30 s,30 个循环。采用内参基因 *Gapdh* 复检阴性样本,确认样本 DNA 提取正常,上下游引物序列及 Tm 值见表 1。产物取 5 μL 用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

表 1 PCR 反应引物序列及退火温度

Tab. 1 The primer sequences and annealing temperature of PCR reaction

引物 Primers	引物序列(5′ - >3′) Primer sequences	片段长度(bp) Fragment size	退火温度(℃) Annealing temperature
Pri. PFT	ACACGGGCCGTAGCTGAGTCGAGAGCT	408	62
Pri. PRN1735	CACTTGCAGCTCATGCAGCCGGGGCCAC		
GAPDH-F	GCTCTCAATGACAACTTTG	117	60
GAPDH-R	GTCCAGGGTTTCTTACTC		

表 2 野生型 BALB/cJ 雌鼠见栓率、雌鼠受孕率及检栓成功率

Tab. 2 The rate of vaginal plug, pregnancy rate and success rate of vaginal plug check in the wild-type BALB/cJ female mice

实验次数 Number of experiments	交配雌鼠数量(只) Number of females used for mating	见栓雌鼠数量(只) Number of the females with vaginal plug	妊娠雌鼠数量(只) Number of pregnant females	见栓率(%) Rate of vaginal plug(%)	受孕率(%) Pregnancy rate (%)
No. 1	42	10	6	23. 8	14. 3
No. 2	35	7	4	20. 0	11. 5
No. 3	28	25	17	89. 3	60. 1
$\bar{x} \pm s$ (%)	-	-	-	44. 4 ± 38. 9	28. 6 ± 22. 3

注:见栓率:见栓雌鼠数量与交配雌鼠数量的比值;怀孕率:怀孕雌鼠数量与交配雌鼠数量的比值;检栓成功率:怀孕雌鼠数量与见栓雌鼠数量的比值。

Note. Rate of vaginal plug refers to the ratio of the number of female mice with vaginal plug and number of mating female mice. Pregnancy rate refers to the ratio of the number of pregnant and mating female mice. Success rate of vaginal plug check refers to the ratio of the number of pregnant females and female mice with vaginal plug.

表 3 雌鼠窝产子数,仔鼠的性别比及离乳数

Tab. 3 The number of newborn mice, weaned mice and sex ratio of the newborn mice

实验次数 Number of experiments	雌鼠数(只) Number of females	仔鼠数(只) Number of newborn mice	离乳数(只) Number of weaned mice	平均产子数 Average litter size	离乳率(%) Weaning rate	性别比(♂:♀) Sex rate
No. 1	6	53	50	8. 8	94. 3	24:26(1:1. 1)
No. 2	4	33	30	8. 3	90. 9	16:14(1. 2:1)
No. 3	17	124	102	7. 3	82. 3	57:45(1. 3:1)
$\bar{x} \pm s$	-	-	-	8. 1 ± 0. 8	89. 2 ± 6. 2	-

1. 6 数据处理

用 Excel 统计实验所得数据,CB6F1 (*c-Ha-ras*$^{+/-}$)转基因鼠生长体重数据进行 ANOVA 检验,性别比及转基因阳性率进行卡方检验, P 值小于 0. 05 作为具有显著性差异,P 值小于 0. 01 作为极显著性差异。统计结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2. 1 野生型 BALB/cJ 雌鼠见栓率、受孕率及检栓成功率

一共进行了 3 次平行的繁殖交配实验,交配雌鼠见栓率、雌鼠受孕率及检栓成功率见(表 2)。3 次实验雌鼠见栓率及怀孕率差别比较明显,1 和 2 次实验结果较为接近,见栓率及怀孕率在 20% 和 14% 左右,第 3 次为 89. 3% 和 60. 1%。三次实验的检栓成功率相差不大,均值为 61. 6%。

2. 2 BALB / cJ 雌鼠窝产子数,仔鼠的性别比及离乳数

BALB/cJ 雌鼠窝产子数,杂合 CB6F1 仔鼠的性别比及离乳数见(表 3)。三批次平均窝产子数及离乳率的差异不明显,平均窝产子数为 8 只,离乳率为 90%。仔鼠性别比为 1. 2∶1 与理论值 1∶1 进行卡方检验(P >0. 05),性别比符合预期。

2. 3 CB6F1 仔鼠的哺乳期窝重及单只仔鼠重

随机抽取 4 窝哺乳期仔鼠分别测定初生 0 d、7 d、14 d 和 21 d 时的总重量并进一步计算每窝的单只仔鼠重量(表 4),发现初生 0 d、7 d、14 d 时单只仔鼠重量与雌鼠哺乳期的喂养仔鼠个数不存在相关作用,但 21 d 时第 2 窝单只仔鼠重量明显高于其他窝的仔鼠重量。通过计算单只仔鼠平均出生重为(1. 73 ± 0. 05) g,21 d 离乳时平均出生重量为(11. 36 ± 2. 26) g。

表 4　CB6F1 仔鼠哺乳期窝重及离乳前单只仔鼠重量

Tab. 4　The litter weight of CB6F1 puppy mice in feeding period and individual body weight of the little mice before weaning

窝编号 No. of litters	窝重（仔鼠数）Litter weight (no. of puppies)	单只仔鼠重 Individual body weight	窝重（小仔数）Litter weight (no. of puppies)	单只仔鼠重 Individual body weight	窝重（小仔数）Litter weight (no. of puppies)	单只仔鼠重 Individual body weight	窝重（小仔数）Litter weight (no. of puppies)	单只仔鼠重 Individual body weight
	0 d	=0 d	7 d	7 d	14 d	14 d	21 d	21 d
No. 1	16.8(10)	1.68	38.5(9)	4.28	58.4(9)	6.49	93.6(9)	10.4
No. 2	10.3(6)	1.72	19.9(5)	3.98	36.6(5)	7.32	73.4(5)	14.68
No. 3	16.1(9)	1.79	36.9(9)	4.1	60.4(9)	6.71	86.9(9)	9.66
No. 4	12.2(7)	1.74	29.4(7)	3.27	55.6(7)	6.18	74.7(7)	10.67
$\bar{x} \pm s$		1.73 ± 0.05		3.91 ± 0.44		6.68 ± 0.48		11.36 ± 2.26

表 5　杂合 CB6F1 小鼠基因型检测阳性率

Tab. 5　Transgenic positive rate in the CB6F1 ($c\text{-}Ha\text{-}ras^{+/-}$) mice

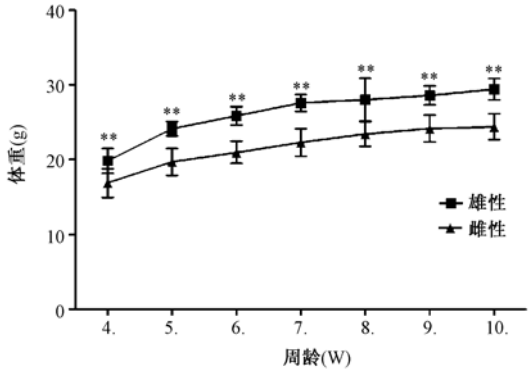
小鼠总数(只) Mice number	阳性小鼠(只) Positive mouse number	阴性小鼠(只) Negative mouse number	阳性率(%) Transgenic positive rate
194	91(97)	103(97)	46.9(50)

注：( )内数字为理论数据

Note. The numbers in parentheses are theoretical data.

2.4　生长鼠的生长发育情况测定

小鼠离乳后，随机挑选基因型检测为阳性的转基因 *CB6F1*($c\text{-}Ha\text{-}ras^{+/-}$)生长鼠雌雄各 10 只测定其生长体重情况(图 1)。从实验结果看，生长鼠雄性体重明显高于雌性，差异存在极显著性($P < 0.01$)。



注：横坐标是测定小鼠周龄，纵坐标是小鼠体重。雄性与雌性小鼠体重采用 ANOVA 检验，** $P < 0.01$ 表示差异极显著。

图 1　4 周龄后 CB6F1 生长鼠生长发育情况

Note. Abscissa is the age in weeks of mice, ordinate is the body weight of mice. Difference in the growth curves of male and female mice is analyzed using ANOVA method, ** $P < 0.01$ shows an extremely significant difference.

Fig. 1　The body weight of 4-week old CB6F1 mice

2.5　基因型检测阳性率

通过检测 194 只离乳小鼠，91 只扩增出目的条带且重复实验后结果一致，判定为转基因阳性；剩余 103 只阴性样本 PCR 反应均扩增出内参基因，部分实验结果见(图 2)。该批实验转基因型检测阳性率为 46.9% 与理论值 50% 进行卡方检验($P > 0.05$)，符合预期(表 5)。

3　讨论

近几年来，采用为期 6 个月的基于转基因动物模型的致癌性评价替代实验在国内部分临床前药物安全评价中心逐步开展起来，以逐步建立符合 ICH S1B 的评价体系[8]。为适应此需求，周舒雅等从正常人血液中克隆得到的 6.5 kb 的 *c-Ha-ras* 基因并添加启动子和 polyA 后通过原核注射方法自主构建转基因小鼠模型 C57-*ras*[3]。继获得此模型后，开展了部分生物学特性分析，明确了各脏器中转基因表达谱[9]。同时联合国内的药物临床前安全评价机构开展了致癌性评价研究[10]，有望获得可用于药物致癌性安全评价的快速、稳定、有效的动物模型。

在药物临床前安全性评价中，为降低自发肿瘤发生率，需采用 C57-*ras* 和 BALB / cJ 的 F1 代杂交阳性动物，而该动物的出生率、离乳率等参数尚未

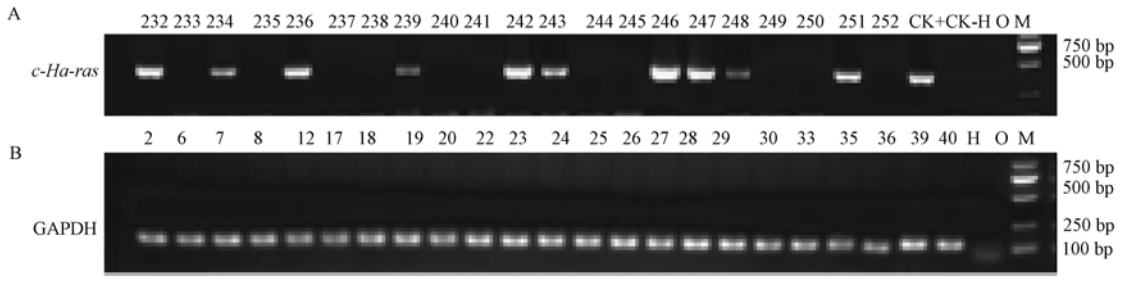


图 2 PCR 检测 CB6F1 小鼠 *c-Ha-ras* 基因及内参基因 GAPDH 表达

Fig. 2 Identification of *c-Ha-ras* and internal GAPDH gene expression determined by PCR in the CB6F1 mice

测定。此次实验中 3 次实验的受孕率及见栓率均低于文献报道的 BALB/cJ 小鼠[11],表明在繁育时小鼠性周期的鉴定是确保小鼠按计划时间受孕的关键。对比 3 次实验结果,第 1、2 次受孕率及见栓率明显低于第 3 次,可能与所用 C57-*ras* 公鼠(*c-Ha-ras*$^{+/-}$)有关,其均为首次交配,而第 3 次实验则为二次交配,表明今后实验时应尽量选择交配后的雄鼠用于提高受孕率及见栓率。通过 3 次实验,发现野生型 BALB/cJ 雌鼠平均产仔数及离乳率与文献报道一致[12],这表明 CB6F1 小鼠生长发育正常。

通过测定 CB6F1 窝重,发现哺乳期内单只仔鼠的体重与雌鼠代乳的仔鼠的数量关系不明显,平均初生体重为 1.73 ±0.05g,14 d 到 21 d 生长速度最快,离乳时体重达到(11.36 ±2.26)g。分析 4 周龄后 CB6F1 阳性鼠的生长发育情况(图 1),3 – 5 周生长较快,10 周左右生长进入平台期,且雌性小鼠较雄性小鼠生长缓慢,二者体重差异存在极显著性(P <0.01)。由于目前暂无该阳性小鼠的相关文献数据,参考 C57BL/6 与 BALB/c 小鼠数据后[12],发现 CB6F1 背景的转基因阳性小鼠(*c-Ha-ras*$^{+/-}$)的体重介于二者之间。进一步与相关文献[12-14]实验结果比较,小鼠生长发育性能正常,有利于该模型将来在临床前安全评价中的应用。

通过离乳小鼠基因分型检测,统计出该基因检测阳性率为 46.9%,符合经典遗传学中的孟德尔定律。

本文测定了繁殖 CB6F1(c-Ha-ras$^{+/-}$)小鼠的母鼠平均产仔数、离乳率、阳性生长鼠生长体重,转基因阳性率等参数,对于建立该癌症动物模型的商业化供应体系,推动我国基于转基因动物模型致癌性替代方法的建立有积极意义。

参考文献:

[1] 田小芸, 恽时锋, 郭联庆, 等. Nrf2 基因敲除小鼠的繁育及生长发育的生物学特性 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(2): 50 – 52.

[2] 范昌发, 岳秉飞, 王军志, 等. 含有人源原癌基因 c-Ha-ras 的转基因小鼠的制作方法及其用途 [P]. ZL 2008 1 0101666.0, 2013.9.4.

[3] 周舒雅, 左琴, 刘甦苏, 等. C57 – *ras* 转基因小鼠模型的建立 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(11): 1928 – 1934.

[4] 范昌发, 李波, 王军志, 等. 遗传修饰致癌性动物模型与药物临床前安全性评价 [D]. 北方实验动物科技年会, 2009, 66 – 68.

[5] Nielsen LL, Gurnani M, Tyler RD. Evaluation of the wap-ras transgenic mouse as a model system for testing anticancer drugs [J]. Cancer Res, 1992, 52: 733 – 3738.

[6] Saitoh A, Kimura M, Takahashi R, et al. Most tumors in transgenic mice with human c-Ha-ras gene contained somatically activated transgenes [J]. Oncogene, 1990, 5(8): 1195 – 1197.

[7] Urano1 K, Tamaoki N, Nomura T. Establishing a laboratory animal model from a transgenic animal: RasH2 mice as a model for carcinogenicity studies in regulatory science [J]. Vet Pathol, 2012, 49(1): 16 – 23.

[8] ICH Sl B. International conference on harmonization ICH S1B. (1997) [M/OL]. Guidance for industry S1B testing for carcinogenicity of pharmaceuticals. http:///www.fda.gov/cder/guidance/index.htm.

[9] 刘甦苏, 周舒雅, 高正琴, 等. *c-Ha-ras* 在转基因小鼠模型 C57-ras 各组织中的表达谱分析 [J]. 生物技术通讯, 2013, 24(5): 636 – 640.

[10] 吕建军, 刘甦苏, 左琴, 等. C57 – *ras* 转基因小鼠模型的 MNU 验证实验 [J]. 药物分析杂志, 2013, 33(11): 1935 – 1940.

[11] 张俭, 黄星群, 刘建军. BALB/c 小鼠繁殖性能的观察及分析 [J]. 四川动物, 2006,25(1): 179 – 181.

[12] 席晓霞, 秦天达, 吴润, 等. SPF 级 BALB /c C57BL /6 小鼠繁殖性能及生长发育的比较研究 [J]. 畜牧兽医杂志, 2009, 28(6): 11 – 12.

[13] 吴清洪, 顾为望, 张嘉宁, 等. SPF 级 C57BLP6J 小鼠生长发育和繁殖性能指标的测定[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(10): 606 – 607.

[14] 张洪, 鲍波. 浅谈国内 BALB /c 小鼠及 KM 小鼠的基本生物学特性 [J]. 中国实用医药, 2010, 5(3): 252 – 254.

〔**修回日期**〕2015-01-21

研究报告

17β 雌二醇对大鼠创伤性脑损伤的保护作用

王　迅[1],冷晓磊[1],矫永庆[1],崔　鹏[2]

(1. 大连市第三人民医院神经外科,辽宁,大连　116033; 2. 大连医科大学附属三院神经外科,辽宁,大连　116000)

【摘要】　目的　探讨大鼠创伤性脑损伤后 17β 雌二醇对脑组织的保护作用。**方法**　选择雄性成年 SD 大鼠 45 只,按随机数字表法分为三组,每组 15 只:对照组仅开骨窗,不损伤脑组织;致伤组制大鼠自由落体脑撞击伤模型;处理组在致伤组的基础上,伤前 1 周腹腔注射 17β 雌二醇溶液(1 mg/kg),1 次/d。余两组仅注射同体积的蓖麻油。在伤后 6 h、24 h 及 48 h 测量各组脑组织含水量、丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)活性。**结果**　致伤组和处理组在伤后 6 h、24 h、48 h 三个时间点脑组织含水量均高于对照组($P<0.05$)。在伤后 6 h,致伤组和处理组脑组织含水量比较差异无统计学意义[(58.39±0.29)%比(57.03±0.27)%]($P>0.05$),而在伤后 24 h、48 h 致伤组脑组织含水量明显高于处理组,差异有统计学意义[(67.41±0.37)%比(64.77±0.33)%,(81.95±0.47)%比(75.26±0.41)%]($P<0.05$)。在伤后 6 h 致伤组、处理组 MDA 含量明显增加,并且一直维持在较高水平,而 SOD 活性则明显下降,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。处理组在伤后 6 h MDA 含量和 SOD 活性与致伤组比较差异无统计学意义($P>0.05$),而在伤后 24 h、48 h MDA 含量显著降低[(130.39±7.02) μmol/g 比(149.41±8.25) μmol/g,(125.41±6.59) μmol/g 比(157.72±8.93) μmol/g],SOD 活性则明显增高[(88.46±7.17)U/g 比(80.10±4.87)U/g,(97.31±7.89)U/g 比(84.29±6.13) U/g],差异均有统计学意义($P<0.05$)。**结论**　17β 雌二醇对创伤性脑损伤有保护作用。

【关键词】　雌二醇;脑损伤;丙二醛;超氧化物歧化酶;脑组织含水量;大鼠
【中图分类号】R33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0023-04
doi: 10.3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 004. 005

Protective effect of 17β-estradiol on traumatic brain injury in rats

WANG Xun[1], LENG Xiao-lei[1], JIAO Yong-qing[1], CUI Peng[2]
(1. Department of Neurosurgery, the Third People's Hospital of Dalian City, Dalian 116033, China;
2. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116000)

【Abstract】　Objective　To explore the protective effect of 17β-estradiol on traumatic brain injury in rats. **Methods**　A total of 45 adult male SD rats were divided into 3 groups using the random digit table, 15 rats in each group: the control group only exposed but not injured the brain, the injury group received traumatic brain injury (TBI) by Feeney's method, and the treatment group received the same handling with injury group, and pretreatment with 17β-estradiol peritoneal injection, 1 mg/kg per day for one week. The other two groups were given the same volume of castor oil. At 6 h, 24 h and 48 h after injury, the brain tissue water content, malondialdehyde (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity were measured. **Results**　At 6 h, 24 h and 48 h after injury, the levels of brain tissue water content in the injury group and treatment group were significantly higher than those in the control group ($P<0.05$). At 6 h after injury, the brain tissue water contents in the injury group and treatment group were (99.83±0.40)% and (99.53±0.41)%,

[作者简介]王迅(1980－),男,研究方向:神经外科基础 Email: fyw52512@sina.com。
[通讯作者]崔鹏(1978－),男,研究方向:神经外科基础 Email: wx626626@sina.com。

respectively, with a non-significant difference between the two groups ($P>0.05$). At 24 h and 48 h after injury, the brain tissue water contents in the injury group was (105.17 ± 0.43)% and (107.54 ± 0.39)%, in the treatment group was (103.26 ± 0.42)% and (105.89 ± 0.43)%, respectively, showing a significant difference between the two groups ($P<0.05$). At 6 h after injury, the levels of MDA in the injury group and treatment group increased and maintained at a higher level, and the levels of SOD decreased. Compared with the control group, there had a significant difference ($P<0.05$). The levels of MDA and SOD in the injury group and treatment group at 6 h after injury had a non-significant difference ($P>0.05$). But at 24 h and 48 h after injury, the levels of MDA in the treatment group were significantly lower than those in the injury group [(130.39 ± 7.02) μmol/g vs. (149.41 ± 8.25) μmol/g, (125.41 ± 6.59) μmol/g vs. (157.72 ± 8.93) μmol/L], and the levels of SOD in the treatment group were significantly higher than thoset in the injury group [(88.46 ± 7.17) U/g vs. (80.10 ± 4.87) U/mg, (97.31 ± 7.89) U/g vs. (84.29 ± 6.13) U/g], with a significant difference ($P<0.05$) between the two groups. **Conclusions** 17β-estradiol has a protective effect on traumatic brain injury.

【Key words】 Estradiol; Brain injury, traumatic; Malondialdehyde; Superoxide dismutase; Brain water content; Rats

颅脑损伤是当今威胁人类生命的主要疾患之一,其发生率和病死率仅次于癌症和心血管疾病而居第三位,在暴力性死亡中颅脑损伤的病死率居首位。雌激素作为一种内源性激素在全身多个系统中发挥重要作用,其中神经系统也是其靶器官[1]。本研究旨在探讨 17β 雌二醇对创伤性脑损伤的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取健康雄性 SD 大鼠 45 只,7 ~ 8 周龄,体重 220 g ~ 250 g,由辽宁医学院动物实验中心提供(生产许可证号 SCXK(辽)2013-0007)。按随机数字表法分为对照组、致伤组和处理组,每组 15 只。使用许可证号:(SYXK(辽)2003-0019)。

1.2 仪器与试剂

17β 雌二醇粉剂(美国 Sigma 公司)。TA1300 电子天平(精确到 0.01,上海皓庄仪器有限公司),用于脑含水量测量;超声波细胞粉碎机(北京中科科尔仪器有限公司)、离心机(北京京立离心机有限公司)、红外线干燥箱(北京卓川电子科技有限公司),用于制成组织匀浆液及提取上清液,待用于 SOD 及 MDA 测定。SOD 试剂盒、MDA 试剂盒(购于南京建成生化有限公司)。

1.3 动物实验方法

1.3.1 动物模型制作:致伤组及处理组均采用改进的 Feeney 自由落体硬膜外撞击方法[2]:将 SD 大鼠称重后经 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3 mL/100 g 体重),俯卧固定于脑立体定位仪上。矢状中线切开头皮后分离骨膜,暴露前囟、冠状缝、矢状缝及顶骨。以前囟后 3.0 mm,向右旁开矢状缝 3.0 mm 为中心作一直径约为 4 ~ 5 mm 颅骨钻孔。保持硬脑膜不受损伤。将自由落体装置底座置于右顶骨窗部的硬脑膜表面,以 25 g 重物自 40 cm 高沿套管下落打击致伤底座,其直径 3.5 mm,最大下陷距离 3.0 mm,硬膜保持完整,造成右顶局限性损伤。对照组仅开骨窗,不损伤脑组织。用牙托粉封闭骨窗,缝合头皮,置鼠笼喂养。

1.3.2 给药途径及方法:处理组于伤前 1 周腹腔注射 17β 雌二醇溶液(1 mg/kg),1 次/d,余两组仅注射同体积的蓖麻油。

1.3.3 标本处理及采集:各组在伤后 6 h、24 h 及 48 h 相应时间点分别取 5 只大鼠进行处理。采用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(0.3 mL/100 g),断头处死,在冰盘上快速取全脑,0^0C PBS 缓冲液清洗,滤纸吸干备用。

1.4 观察指标

1.4.1 脑组织含水量测定:致伤组及处理组均取伤灶周围脑组织,对照组取对应部位脑组织,使用电子分析天平分别称取脑湿重 100 mg,然后将标本置于 90℃ 红外线干燥箱中 24 ~ 48 h 至恒重,称取值为干重。脑组织含水量用湿重的百分比表示,采用 Eliot 公式计算即脑组织含水量(%) = (湿重 - 干重)/湿重 × 100%。

1.4.2 脑组织超氧化物歧化酶(SOD)活性及丙二醛(MDA)含量测定:将采集的全脑标本于冰浴中迅速分离脑组织,取损伤侧半球脑组织称重,按 1∶10 比例(每 1 g 组织加 10 mL 生理盐水)加入冰生理盐水,用组织匀浆机分别制成 10% 组织匀浆,离心 10 min,并用生理盐水将上清液稀释成 1% 组织匀

浆。根据 SOD 试剂盒说明、MDA 试剂盒说明进行测定 SOD 活性及 MDA 含量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 14.0 统计软件进行分析,正态分布的计量资料用均数 ± 标准差表示,多组比较采用方差分析,两两比较采用 LSD-t 检验。$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 三组伤后不同时间点脑组织含水量比较

致伤组和处理组在伤后 6 h、24 h、48 h 三个时间点脑组织含水量均高于对照组($P<0.05$)。在伤后 6 h,致伤组和处理组脑组织含水量比较差异无统计学意义($P>0.05$),而在伤后 24 h、48 h 致伤组脑组织含水量明显高于处理组,差异有统计学意义($P<0.05$)(表 1)。

2.2 三组伤后不同时间点 MDA 含量及 SOD 活性变化

在伤后 6 h 致伤组、处理组 MDA 含量明显增加,并且一直维持在较高水平,而 SOD 活性则明显下降,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。处理组在伤后 6 h MDA 含量和 SOD 活性与致伤组比较差异无统计学意义($P>0.05$),而在伤后 24 h、48 h MDA 含量显著降低,差异均有统计学意义($P<0.05$)(表 2)。

表 1 三组 SD 大鼠伤后不同时间点脑组织含水量比较(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Comparison of the brain tissue water content in the rats of three groups at different time points after injury (%, $\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	例数 Cases	伤后 6 h(5 例) 6 h after injury (5 cases)	伤后 24h(5 例) 24 h after injury (5 cases)	伤后 48h(5 例) 48 h after injury (5 cases)
对照组 Control	15	53.67 ± 0.21	53.28 ± 0.22	53.89 ± 0.24
致伤组 Injury	15	58.39 ± 0.29[a]	67.41 ± 0.37[a]	81.95 ± 0.47[a]
处理组 Treatment	15	57.03 ± 0.27[a]	64.77 ± 0.33[ab]	75.26 ± 0.41[ab]

注:与对照组比较,[a]$P<0.05$;与致伤组比较,[b]$P<0.05$

Note. [a] $P<0.05$ compared with the control group; [b] $P<0.05$ compared with the injury group.

表 2 三组伤后不同时间点 MDA 含量及 SOD 活性变化($\bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Changes of MDA content and SOD activity in the brain tissue in the rats of three groups at different time points($\bar{x}\pm s$)

组别 Groups	例数 Cases	丙二醛(MDA)含量(μmol/g) MDA content (μmol/g)	超氧化物歧化酶(SOD)活性(U/g) SOD activity (U/g)
对照组 Control	15		
伤后 6 h 6 h after injury	5	116.55 ± 5.92	120.35 ± 4.43
伤后 24 h 24 h after injury	5	118.31 ± 5.25	119.89 ± 4.68
伤后 48 h 48 h after injury	5	117.47 ± 6.17	121.44 ± 5.04
致伤组 Injury group	15		
伤后 6 h 6 h after injury	5	145.38 ± 7.71[a]	79.99 ± 5.21[a]
伤后 24 h 24 h after injury	5	149.41 ± 8.25[a]	80.10 ± 4.87[a]
伤后 48 h 48h after injury	5	157.72 ± 8.93[a]	84.29 ± 6.13[a]
处理组 Treatment group	15		
伤后 6 h 6h after injury	5	144.42 ± 7.49[a]	81.95 ± 6.62[a]
伤后 24 h 24h after injury	5	130.39 ± 7.02[ab]	88.46 ± 7.17[ab]
伤后 48 h 48h after injury	5	125.41 ± 6.59[ab]	97.31 ± 7.89[ab]

注:与对照组相同时间点比较,[a]$P<0.05$,与致伤组相同时间点比较,[b]$P<0.05$

Note. Compared with the control group at the same time point, [a]$P<0.05$; compared with the injury group at the same time point, [b] $P<0.05$.

3 讨论

创伤性脑损伤后引起的出血、缺血及缺血再灌注等均伴有大量的氧自由基产生,由于细胞膜脂质内含有大量的胆固醇及多不饱和脂肪酸,易遭受自由基的侵害,发生脂质过氧化反应,致细胞膜通透性改变,细胞水肿坏死[3]。SOD 是一种金属酶,此酶可催化超氧自由基发生歧化反应,能够清除氧自由基,保护生物膜免受自由基的伤害。自由基可使脑组织 MDA 含量升高,SOD 活性下降。通过研究脑组织线粒体 MDA 和 SOD 水平的变化,可以反映药物治疗的效果是否通过对抗自由基而发挥其治疗作用[4]。

雌激素是由雌激素合成酶催化雄激素转化而来的,主要由卵巢分泌产生,胎盘、肾上腺皮质和男性的睾丸也能产生少量的雌激素。本实验选用的 17β 雌二醇是体内含量最多、活性最强的,在临床及实验研究中大多都采用 17β 雌二醇,具有一定的代表性。

雌激素作为内源性激素主要是通过作用于表达雌激素受体(estradiol receptor, ER)的靶器官来发挥其生理及药理作用的[5]。ER 在体内分布广泛,神经系统也是雌激素的靶器官,在中枢神经系统,ER 存在于中间、感觉神经元,胶质细胞等。近来,国内外研究发现[6],在多种脑损伤(缺血、兴奋性氨基酸刺激、低糖)模型和多种培养细胞(初级神经元、肿瘤源性的神经细胞系、混合培养的神经元和星形胶质细胞)上,都观察到不同浓度的 17β 雌二醇能缓解神经元的凋亡,发挥保护作用。其作用机理包括经典的受体依赖机制和新的受体非依赖机制。而受体非依赖途径包括改善血液循环、降低白细胞黏附、减少过氧化反应、抑制 Ca^{2+} 内流、减少一氧化氮的产生、减少谷氨酸的神经毒性等[7]。本实验结果表明,致伤组和处理组在伤后 6、24、48 h 三个时间点脑组织含水量均高于对照组($P<0.05$)。在伤后 6 h,致伤组和处理组脑组织含水量比较差异无统计学意义($P>0.05$),而在伤后 24 h、48 h 致伤组脑组织含水量明显高于处理组,差异有统计学意义($P<0.05$)。在伤后 6 h 致伤组、处理组 MDA 含量明显增加,并且一直维持在较高水平,而 SOD 活性则明显下降,与对照组比较差异有统计学意义($P<0.05$)。处理组在伤后 6 h MDA 含量和 SOD 活性的变化与致伤组比较差异无统计学意义($P>0.05$),而在伤后 24 h、48 h MDA 含量显著降低,SOD 活性则明显增高,差异均有统计学意义($P<0.05$)。由此可见,17β 雌二醇对大鼠脑创伤有保护作用,其作用机制可能通过减少脂质过氧化,抑制自由基生成来发挥其保护作用。

参考文献:

[1] Asl SZ, Khaksari M, Khachki AS, et al. Contribution of estrogen receptors alpha and beta in the brain response to traumatic brain injury [J]. J Neurosurg, 2013, 119(2): 353 - 361.

[2] 陈梅花, 陈贵菊, 贾万钧, 等. 改良大鼠弥漫性脑损伤模型[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 7(1): 42 - 46.

[3] 王蓉, 唐玉, 张丽, 等. 大鼠海马神经元突触超微结构的增龄变化[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 4(1): 115 - 117.

[4] 刘井波, 彭双清. 脂质过氧化作用与线粒体损伤[J]. 中国预防医学杂志, 2005, 6(2): 167 - 170.

[5] Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptors and human disease [J]. J Clin Invest, 2006, 116 (3):561 - 570.

[6] Oesterreich S, Davidson NE. The search for ESR1 mutations in breast cancer [J]. Nature Genetics, 2013, 45 (12): 1415 - 1416.

[7] Fuente-Maritin E, Garcia-Caceres C, Morselli E, et al. Estrogen, astrocytes and the neuroendocrine control of metabolism [J]. Rev Endocr Metab Disord. 2013, 14 (4): 331 - 338.

〔修回日期〕2015-02-02

研究报告

人参皂苷水解产物 DS-1227 改善东莨菪碱致小鼠的学习记忆障碍

武宏伟[1],王克柱[1],冯　利[1],卢　聪[1],徐　攀[1],廖永红[1],
曲丽娜[2],李莹辉[2],刘新民

(1. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所,北京　100193;
2. 中国航天员科研训练中心航天医学基础与应用国家重点实验室,北京　100094)

【摘要】 目的　研究人参皂苷水解产物 DS-1227(Dammarane Sapogenins-1227)对东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的改善作用,为老年痴呆等疾病的药物研究提供科学数据。**方法**　将 60 只 ICR 小鼠随机分为空白对照组、模型组、阳性对照组、DS-1227 低、中、高剂量组共 6 组,每组 10 只。连续灌胃给药 2 周后,检测自主活动,第 15 天开始除空白对照组腹腔注射生理盐水,其他各组均腹腔注射东莨菪碱(0.75 mg/kg),阳性对照组在注射东莨菪碱 5 min 后另腹腔注射毒扁豆碱(0.3 mg/kg),给药完成 20 min 后进行物体认知实验和 Morris 水迷宫实验检测动物的学习记忆能力。**结果**　DS-1227 对小鼠的自主活动无显著性影响。腹腔注射东莨菪碱后,小鼠的相对辨别指数降低,水迷宫定位航行实验中 d1、d2、d3、d4 和 d5 潜伏期均明显延长。DS-1227 低、中、高剂量和给予 M 受体激动剂毒扁豆碱均能不同程度增加东莨菪碱致学习记忆障碍模型小鼠的相对辨别指数,缩短水迷宫定位航行潜伏期。**结论**　DS-1227 有改善东莨菪碱致小鼠学习记忆障碍的作用。

【关键词】 DS-1227;东莨菪碱;学习记忆障碍
【中图分类号】R33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0027-06
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.006

Improving effect of the ginsenoside hydrolysis product DS-1227 on scopolamine-induced learning and memory impairment in mice

WU Hong-wei[1], WANG Ke-zhu[1], FENG Li[1], LU Cong[1],
XU Pan[1], LIAO Yong-hong[1], QU Li-na[2], LI Ying-hui[2], LIU Xin-min[1]
(1. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences &
Peking Union Medical College, Beijing 100193, China;
2. China Astronaut Research and Training Center, State Key Lab of Space Medicine
Fundamentals and Application, Beijing 100094)

【Abstract】 Objective　The aim of this experiment was to study the improving effects of a ginsenoside hydrolysis product DS-1227 on scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. **Methods**　Sixty healthy 5-6-week old male ICR mice (body weight 22 ± 2 g) were randomly divided into control group, model group, three DS-1227 groups (25

[**基金项目**]重大新药创制(编号:2012ZX09J12110-04C);国际科技合作专项(编号:2011DFA32730);全军医学科技“十二五”科研项目(编号:BWS11J052)。

[**作者简介**]武宏伟(1979 -),女,研究方向:中药药理。E-mail: wuhongwei-2004@163.com。
[**通讯作者**]刘新民(1962 -),男,研究方向:神经药理,E-mail: liuxinmin@hotmail.com。

mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg), and positive control group (0.3 mg/kg). Fourteen days after oral administration of DS-1227, an open-field test was conduct to determine the mouse locomotor activity. Fifteen days after oral administration of DS-1227, all experimental animals were intraperitoneally administered scopolamine (0.75 mg/kg) and the mice of control group received the same volume of saline. In addition to scopolamine, the mice of positive control group received intraperitoneal injection of physostigmine in a dose of 0.3 mg/kg. Twenty minutes after completion of all the drug administration, object recognition test and Morris water maze test were conducted to evaluate the learning and memory abilities of the mice. **Results** DS-1227 had no significant effect on locomotor activity of the mice. Scopolamine obviously decreased the discrimination indexes in object recognition test, and prolonged the escape latency of water maze place navigation test. While 25 mg/kg, 50 mg/kg, 100 mg/kg of DS-1227 increased the discrimination indexes and decreased the escape latency of place navigation in the mice. **Conclusion** DS-1227 can improve the learning and memory impairment induced by scopolamine in mice.

【**Key words**】 Ginsenoside hydrolysis product DS-1227; Scopolamine; Learning and memory impairment; Mice

随着老龄化社会的到来,阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)的发病率逐年升高,严重威胁着人类健康,给社会和家庭带来沉重负担。国内外虽投入大量人力物力财力研究防治 AD 的药物,但目前收效甚微,因此研究防治 AD、改善学习记忆的药物十分必要。AD 是一种以进行性认知障碍和记忆力损害为主的中枢神经系统退行性疾病[1],早期主要表现为短时记忆损害、空间辨别能力障碍等。研究表明,AD 患者认知功能损伤与脑内神经递质乙酰胆碱(acetylcholine, Ach)水平下降密切相关,针对 AD 患者脑内 Ach 水平下降这个特异性神经化学变化,研究人员采用给予 M 胆碱受体阻断剂东莨菪碱(scopolamine, SCOP),使脑内 Ach 水平显著下降,复制 AD 动物模型,可稳定诱导动物的学习记忆障碍,该方法操作简便,是筛选防治 AD 药物的较好动物模型。

人参作为传统中药,是现代药理研究最多和最充分的传统中药之一,长期临床实践证明,人参有确定的益智作用,人参皂苷为人参的主要益智活性成分,人参皂苷对神经系统有多种调节作用,如抗抑郁、改善学习记忆障碍、镇静安神、兴奋中枢等。人参皂苷不易被吸收,并且生物利用度较低[2-3],然而人参皂苷去糖代谢后形成的苷元或次苷比皂苷本身更容易被机体吸收,而且活性增强,毒性降低[4-10]。因此,本研究采用东莨菪碱模型,通过动物行为学对人参皂苷水解产物 DS-1227 改善学习记忆的作用进行研究,为研制 AD 等的防治药物提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

60 只 SPF 级雄性 ICR 小鼠,5 ~ 6 周龄,体重(22 ± 2)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号[SCXK(京)2012-0001]。实验在中国医学科学院药用植物研究所进行,饲养于本实验室的屏障环境[SYXK(京)2008-0019],温度(20 ~ 26)℃,12 h 照明/12 h 黑暗环境(8:00 - 20:00 亮灯),饲养期间给予标准饲料及纯净水。本实验遵循实验动物伦理原则。

1.2 仪器与试剂

小鼠行为学检测仪器包括自主活动实验计算机图像实时检测分析处理系统、物体认知检测装置、小鼠 Morris 水迷宫计算机自动控制和图像分析处理系统均由中国医学科学院药用植物研究所和中国航天员科研训练中心联合研发。

DS-1227,人参皂苷水解产物:原人参二醇[20(S)-aglycone protopanaxadiol, PPD] 9.18%,原人参三醇[20(S)-aglycone protopanaxatriol, PPT] 20.55%,人参皂苷 Rh1(ginsenoside Rh1)18.8%,人参皂苷 Rh2(ginsenoside Rh2)10.1%。由加拿大天马药业集团惠赠。东莨菪碱(Sigma 公司产品,批号:4A96820);毒扁豆碱(Sigma 公司产品,批号:BCBF8289)

1.3 动物实验

1.3.1 实验动物分组及给药:ICR 小鼠适应性饲养 3 d 后,随机分为 6 组,每组 10 只,分组如下:空白对照组、模型组(东莨菪碱,0.75 mg/kg/d)、阳性对照组(毒扁豆碱,0.3 mg/kg)、DS-1227 低剂量组(25 mg/kg)、DS-1227 中剂量组(50 mg/kg)、DS-1227 高剂量组(100 mg/kg)。空白对照组、模型组和阳性对照组灌胃给予蒸馏水,灌胃体积均为 0.2 mL/10 g 体重,每天 1 次。行为学实验前连续灌胃给药 2 周,于第 14 天检测自主活动,第 15 天开始给予东莨菪碱造模并进行物体认知实验和水迷宫实验等行为

学检测。行为学检测期间,每只动物检测前 1 h 给药,给药持续至行为学检测完成。

行为学实验当天,小鼠灌胃给药 40 min 后,除对照组腹腔注射生理盐水外,其余各组均腹腔注射东莨菪碱(0.75 mg/kg)。阳性对照组在腹腔注射东莨菪碱 5min 后再腹腔注射毒扁豆碱(0.3 mg/kg)。腹腔注射东莨菪碱 20 min 后进行行为学检测。

1.3.2　自主活动实验:采用王琼等[11]研制的小鼠自主活动实验计算机图像实时检测分析处理系统,将小鼠放入桶内,设定实验参数后开始测试。系统自动记录分析 10 min 动物的自发活动,如总路程、运动时间、静止时间等。

1.3.3　新物体识别实验:利用宋广青等[12]研制的物体认知检测装置,参照王逸等[13]的实验方法进行实验,实验过程分为 3 个阶段:适应期、熟悉期和测试期。适应期为 3 d,每天将动物依次放入没有任何物体的实验箱内,适应环境 10 min。第 4 天开始熟悉期和测试期。熟悉期实验,将两个完全相同的物体放入实验箱内对称的位置处,此两物体距离侧箱壁、箱后壁的距离均为 10 cm。记录小鼠 5 min 内对两物体的总探索时间(s)。熟悉期后将动物取出放入饲养笼,间隔 20 min 进入测试期实验。测试期时,将其中一个熟悉期使用的物体换为另一个大小相近但形状和颜色不同的新物体,分别记录小鼠对新物体和已熟悉物体的探索时间(s),用相对辨别指数(relative discrimination index)来评价动物的学习记忆能力。相对辨别指数的计算为(N-F)/(N + F) × 100%,其中 N(new)为新物体探索时间,F(familiar)为熟悉物体探索时间。

1.3.4　物体位置识别实验:实验方法和操作过程与新物体识别实验相似,只是在测试期时将熟悉期过程中的两个完全相同物体中的一个移到另外新的位置,由原来两物体相邻变成相对,其他过程完全相同。

1.3.5　Morris 水迷宫实验:小鼠 Morris 水迷宫由一个不锈钢喷塑圆柱形水池(直径 100 cm,高 38 cm)和配有数码摄像机的图像实时采集分析系统组成。平台直径 6 cm,高 14 cm。按东西南北将水池划分为 4 个象限(NE,SE,SW,NW),象限池壁圆弧中点为动物入水点。向池中注水并用墨汁调黑,水温控制在(25 ± 2)℃。图像采集系统记录动物游泳轨迹,用于后续指标提取和分析。

该实验历时 5 天,第 1 ~ 5 天:平台固定于 NE 象限中心,水面下 1.5 cm。实验室物品及人员位置固定作为小鼠空间参照物。每天训练 2 次,随机选取两个不同入水点(SE、SW、NW)将小鼠面向池壁放入水中。检测时间 90 s,小鼠在台上停留超过 2 s 视为寻台成功,每次测试前将小鼠放在台上适应 10 s(前适应),测试完毕无论寻台是否成功均将其放在台上适应 10 s(后适应)。将小鼠入水到寻台成功所需时间记作潜伏期,寻台失败潜伏期记 90 s。记录小鼠在 90s 内的潜伏期。

1.3.6　统计学方法:采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析,各组间比较采用单因素方差分析。实验结果以均值 ± 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,显著性水平设置为 0.05。

2　结果

2.1　DS-1227 对小鼠自主活动的影响

实验结果表明,与空白对照组比较,DS-1227 各给药组的总路程、运动时间、静止时间、中央区运动路程比率、中央区运动时间比率、外周区运动路程比率和外周区运动时间比率等指标均无显著性差异。结果见表 1。

表 1　DS-1227 对小鼠自主活动的影响($n = 10, \bar{x} \pm s$)

Tab. 1　Effect of DS-1227 on locomotor activity in the mice of different groups ($n = 10, \bar{x} \pm s$)

组别 Groups	剂量 Doses (mg/kg)	总路程/cm Total distance of movement	运动时间/s Total duration of movement	静止时间/s Resting time	中央区运动路程比率 Ratio of movement distance in central area	中央区运动时间比率 Ratio of movement time in central area	外周区运动路程比率 Ratio of movement distance in peripheral area	外周区运动时间比率 Ratio of movement time in peripheral area
对照组 Control	–	4563 ± 236	254.9 ± 16.3	345.2 ± 16.3	63.9 ± 1.0	24.6 ± 1.5	0.77 ± 0.18	0.56 ± 0.15
DS-1227	25	4747 ± 169	267.7 ± 9.7	332.4 ± 9.7	61.5 ± 0.8	24.6 ± 1.1	0.76 ± 0.18	0.58 ± 0.14
DS-1227	50	4489 ± 155	251.1 ± 12.7	349.0 ± 12.7	62.9 ± 1.7	24.1 ± 1.6	0.66 ± 0.21	0.44 ± 0.14
DS-1227	100	4754 ± 274	260.6 ± 17.4	339.5 ± 17.4	63.6 ± 1.1	24.8 ± 1.5	0.81 ± 0.21	0.62 ± 0.17

2.2 DS-1227 对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠物体辨别记忆能力的影响

表 2 实验结果显示,在熟悉期前 20 min 注射东莨菪碱,与空白对照组比较,模型组探索总时间没有明显差异;与模型组比较,各给药组探索总时间没有明显差异。

图 1 实验结果表明,与空白对照组比较,模型组小鼠相对辨别指数降低($P<0.05$);与模型组比较,DS-1227 低剂量和中剂量均可增加东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠相对辨别指数($P<0.05$),毒扁豆碱也增加东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠相对辨别指数,但与模型组相比差异无显著性。

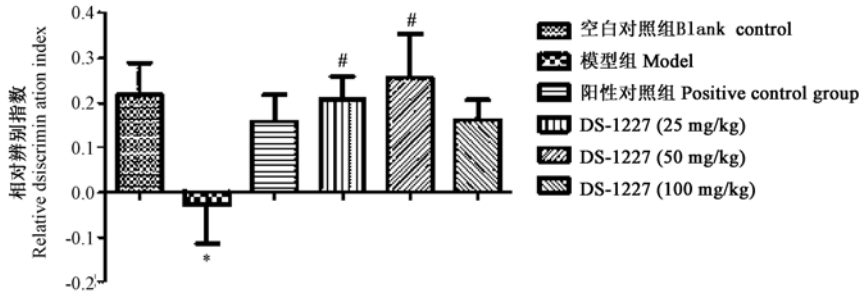
2.3 DS-1227 对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠物体位置辨别记忆能力的影响

图 2 实验结果表明,与空白对照组比较,模型组小鼠相对辨别指数降低($P<0.05$);与模型组比较,

表 2 DS-1227 对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠探索总时间的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

Tab. 2 Effects of DS-1227 on total exploration time of scopolamine-induced learning and memory impairment in the mice ($n=10, \bar{x}\pm s$)

组别 Groups	剂量 Doses (mg/kg)	探索总时间/s Total exploration time
空白对照组 Control	–	55.42 ± 5.74
模型组 Model	0.75	53.82 ± 5.92
阳性对照组 Positive control	0.3	48.33 ± 9.31
DS-1227	25	42.78 ± 6.64
DS-1227	50	54.10 ± 6.91
DS-1227	100	60.70 ± 7.77



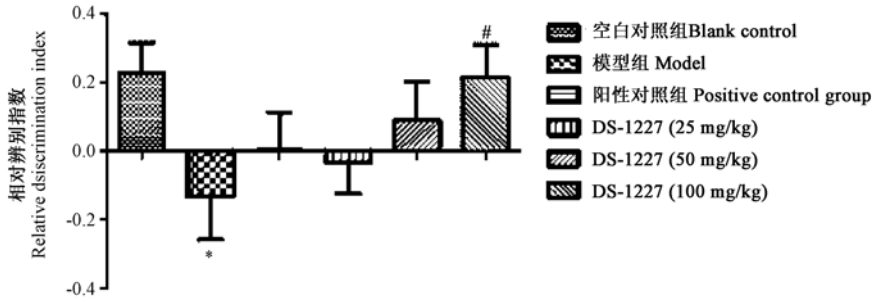
注:与对照组比较,$^{*}P<0.05$;与模型组比较,$^{\#}P<0.05$。

图 1 DS-1227 对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠物体辨别记忆能力的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

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

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

Fig. 1 Effects of DS-1227 on object discrimination recognition ability of the mice with scopolamine-induced learning and memory impairment ($n=10, \bar{x}\pm s$)



注:与对照组比较,$^{*}P<0.05$;与模型组比较,$^{\#}P<0.05$。

图 2 DS-1227 对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠物体位置辨别记忆能力的影响($n=10, \bar{x}\pm s$)

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

Fig. 2 Effects of DS-1227 on object location recognition ability of the mice with scopolamine-induced learning and memory impairment ($n=10, \bar{x}\pm s$)

DS-1227 高剂量可增加东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠相对辨别指数($P < 0.05$),毒扁豆碱也增加东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠相对辨别指数,但与模型组相比差异无显著性。

2.4 DS-1227 对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠水迷宫定位航行潜伏期的影响

表 3 实验结果表明,与空白对照组比较,模型组小鼠定位航行 Day1、Day2、Day3、Day4 和 Day5 潜伏期均明显延长($P < 0.01$);与模型组比较,DS-1227 低剂量组 Day4 和 Day5 定位航行潜伏期均缩短($P < 0.05$),DS-1227 中剂量组 Day4 定位航行潜伏期缩短($P < 0.05$),毒扁豆碱在 Day1、Day2、Day3 和 Day5 也缩短东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠定位航行潜伏期($P < 0.05$)。

3 讨论

乙酰胆碱广泛分布在脑内,是参与学习记忆的重要神经递质,中枢胆碱能系统可调节多种学习记忆能力[14]。研究表明,老年痴呆患者脑内 Ach 合成分泌减少,其合成酶活性下降,且与痴呆严重程度密切相关[15-17]。SCOP 为 M 受体阻断剂,可以拮抗 Ach 与 M 受体的结合,阻断大脑信息的传递,干扰短期记忆能力,引起记忆获得障碍[18-19]。因此,在痴呆药物的筛选和评价中得到了广泛应用。本课题组前期研究发现,ICR 小鼠腹腔注射 SCOP 0.375、0.75 和 1.5 mg/kg 均能显著增加 ICR 小鼠水迷宫定位航行潜伏期,诱导小鼠空间学习记忆能力障碍,而在物体位置识别实验中,只有 0.75 和 1.5 mg/kg 两个剂量显著降低了 ICR 小鼠的辨别指数,导致小鼠短时空间记忆能力障碍。因此,本实验研究采用 ICR 小鼠腹腔注射 SCOP 0.75 mg/kg 复制小鼠学习记忆障碍模型。

自主活动实验用于观察动物一定时间内在特定陌生环境中的自主活动行为。动物由于对陌生环境的恐惧,主要在周边区域活动,在中央区域活动较少,表现出焦虑行为。同时,动物对陌生环境的好奇,又产生在中央区域活动的动机,显示其探究特性。本研究结果显示,与空白对照组比较,DS-1227 各给药组的运动总路程、运动时间、静止时间、中央区运动路程比率、中央区运动时间比率、外周区运动路程比率和外周区运动时间比率等指标均无显著性差异,说明 DS-1227 对小鼠自主活动并没有影响。

新物体识别试验显示,DS-1227 给药组能改善对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠的相对辨别指数。新物体识别实验是一种应用较为广泛的认知行为学检测方法,用于检测啮齿类动物非空间、短期对物体的辨别记忆能力。本研究结果显示,与对照组比较,模型组探索总时间没有明显差异,说明东莨菪碱对 ICR 小鼠的运动能力没有影响。与空白对照组比较,东莨菪碱所致学习记忆障碍小鼠相对辨别指数降低($P < 0.05$);与模型组比较,DS-1227 低剂量和中剂量均可增加东莨菪碱所致学习记忆障碍小鼠相对辨别指数($P < 0.05$),毒扁豆碱也增加东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠相对辨别指数,但无显著性差异。

物体位置识别实验显示,高剂量 DS-1227 可增加东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠相对辨别指数。

表 3 DS-1227 对东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠定位航行潜伏期的影响($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Effects of DS-1227 on the latency of water maze (place navigation) test in the mice with scopolamine-induced learning and memory impairment ($n = 10$, $\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	剂量 Doses (mg/kg)	时间(Days)				
		Day 1	Day 2	Day 3	Day 4	Day 5
空白对照组 Control	–	68.54 ± 5.99	56.42 ± 7.12	42.81 ± 5.71	42.02 ± 6.80	43.47 ± 7.18
模型组 Model	0.75	89.58 ± 0.02 **	82.67 ± 4.38 **	71.22 ± 6.40 **	70.44 ± 7.91 **	77.40 ± 4.98 **
阳性对照组 Positive control	0.3	75.37 ± 6.92 #	48.44 ± 8.20 ##	50.22 ± 9.04 #	65.35 ± 10.06	53.46 ± 3.69 #
DS-1227	25	81.33 ± 4.57	73.20 ± 8.21	75.25 ± 5.85	44.19 ± 9.60 #	49.65 ± 9.61 ##
DS-1227	50	83.36 ± 3.46	77.70 ± 5.36	70.76 ± 8.25	47.86 ± 8.01 #	59.22 ± 3.34
DS-1227	100	79.40 ± 6.49	77.78 ± 7.92	71.70 ± 6.80	61.52 ± 6.78	48.85 ± 11.62

注:与对照组比较,**$P < 0.01$;与模型组比较,#$P < 0.05$,##$P < 0.01$。

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

物体位置识别实验是在新物体识别实验的基础上建立的一种方法,主要用于检测啮齿类动物对物体位置的辨别记忆能力。本研究结果显示,与空白对照组比较,模型组小鼠相对辨别指数降低($P < 0.05$);与模型组比较,DS-1227 高剂量可增加东莨菪碱所致学习记忆障碍小鼠相对辨别指数($P < 0.05$),毒扁豆碱也增加东莨菪碱所致学习记忆障碍小鼠相对辨别指数,但无显著性差异。

Morris 水迷宫试验结果表明,DS-1227 低、中剂量可使东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠定位航行潜伏期显著性缩短。Morris 水迷宫主要用于检测东莨菪碱对小鼠海马依赖性空间学习记忆能力的影响。结果显示东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠定位航行 Day1、Day2、Day3、Day4 和 Day5 潜伏期与空白对照组比较均明显增加($P < 0.01$);与模型组比较,DS-1227 低剂量组和 DS-1227 中剂量组的定位航行潜伏期显著性缩短($P < 0.05, P < 0.05$),毒扁豆碱在 Day1、Day2、Day3 和 Day5 也缩短东莨菪碱致学习记忆障碍小鼠定位航行潜伏期($P < 0.05$)。

以上结果表明,DS-1227 口服给药可以改善东莨菪碱致小鼠的学习记忆障碍,是开发防治 AD 的有希望的药物。

参考文献:

[1] Ferri CP, Prince M, Brayne C, et al. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study [J]. Lancet, 2005, 366 (9503): 2112 - 2117.

[2] OdaniT, Tanizawa H, Takino Y. Studies on the absorption, distribution, excretion and metabolism of ginseng saponins. Ⅲ. The absorption, distribution and excretion of ginsenoside Rb1 in the rat [J]. Chem Pharm Bull (Tokyo), 1983, 31 (3):1059 - 1066.

[3] Xu QF, Fang XL, Chen DF. Pharmacokinetics and bioavailability of ginsenoside Rb1 and Rg1 from Panax notoginseng in rats [J]. J Ethnopharmacol, 2003, 84(2 - 3): 187 - 192.

[4] Hasegawa H, Lee KS, Nagaoka T, et al. Pharmacokinetics of ginsenoside deglycosylated by intestinal bacteria and its transformation to biologically active fatty acid esters [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23 (3):298 - 304.

[5] Bae EA, Park SY, Kim DH. Constitutive beta-glucosidases hydrolyzing ginsenoside Rb1 and Rb2 from human intestinal bacteria [J]. Biol Pharm Bull, 2000, 23 (12): 1481 - 1485.

[6] Popovich DG, Kitts DD. Structure-function relationship exists for ginsenosides in reducing cell proliferation and inducing apoptosis in the human leukemia (THP-1) cell line [J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 406(1): 1 - 8.

[7] Bae EA, Hyun YJ, Choo MK, et al. Protective effect of fermented red ginseng on a transient focal ischemic rats [J]. Arch Pharm Res, 2004, 27 (11): 1136 - 1140.

[8] Hasegawa H. Proof of the mysterious efficacy of ginseng: basic and clinical trials: metabolic activation of ginsenoside: deglycosylation by intestinal bacteria and esterification with fatty acid [J]. J Pharmacol Sci, 2004, 95(2): 153 - 157.

[9] Sun J, Wang G, Haitang X, et al. Simultaneous rapid quantification of ginsenoside Rg1 and its secondary glycoside Rh1 and aglycone protopanaxatriol in rat plasma by liquid chromatography-mass spectrometry after solid-phase extraction [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 38(1): 126 - 132.

[10] Lee J, Lee E, Kim D, et al. Studies on absorption, distribution and metabolism of ginseng in humans after oral administration [J]. J Ethnopharmacol, 2009, 122(1): 143 - 148.

[11] 王琼, 买文丽, 李翊华, 等. 自主活动实时测试分析系统的建立与开心散安神镇静作用验证 [J]. 中草药, 2009, 40 (11): 1773 - 1779.

[12] 宋广青, 高莉, 孙秀萍, 等. 大鼠物体识别实验装置的研制 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(8): 80 - 86.

[13] 王逸, 卢聪, 宋广青, 等. 慢性束缚应激对 SD 和 Wistar 大鼠学习记忆能力的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22 (2): 40 - 44.

[14] Gold PE. Acetylcholine modulation of neural systems involved in learning and memory [J]. Neurobiol Learn Mem. 2003, 80 (3): 194 - 210.

[15] Crossberg GT, Desai AK. Management of Alzheimer's disease [J]. J Gerontol A Biol Sci Med Sci, 2003, 58(4): 331 - 353.

[16] Tiraboschi P, Hansen LA, Alford M, et al. Cholinergic dysfunction in disease with Lewy bodies [J]. Neurology, 2000, 54(2): 407 - 411.

[17] 仲崇波, 徐向华, 王晓良. 阿尔采末病胆碱能学说研究进展 [J]. 中国药理学通报, 2003, 19(7): 727 - 731.

[18] Beatty WW, Butters N, Janowsky DS. Patterns of memory failure after scopolamine treatment: Implications for the cholinergic hypothesis of dementia [J]. Behav Neural Biol, 1986, 45(2): 196 - 211.

[19] 叶翠飞, 张兰, 张丽, 等. 牛磺酸对东莨菪碱所致记忆获得性障碍模型小鼠的改善作用 [J]. 中国药理学通报, 2005, 21(6): 715 - 717.

〔修回日期〕2014-12-29

研究报告

蕨麻小型猪与巴马小型猪高原多脏器功能障碍综合征模型的比较研究

牛廷献,郭晓宇,申　健,王红义,陆　璐,肖　攀,冯小明

(兰州军区兰州总医院,兰州　730050)

【摘要】　目的　比较不同海拔地区两种小型猪高原多脏器功能障碍综合征(H-MODS)模型存在的差异,探讨建立 H-MODS 模型的理想动物。**方法**　利用高原土生蕨麻小型猪与平原巴马小型猪,以内毒素(LPS)建立 H-MODS 模型。检测不同时点血液生理生化指标的变化,并观察肺脏组织病理学变化。**结果**　巴马小型猪模型的死亡率明显高于蕨麻小型猪;生理生化各指标的变化基本相同,但蕨麻小型猪的变化较平缓。在 24 h 与 48 h 肺脏均出现严重病理改变,但巴马小型猪较蕨麻小型猪更严重。**结论**　不同海拔地区的两种小型猪均可成功建立 H-MODS 模型,同时蕨麻小型猪由于自身高原生物特性对 H-MODS 模型的复制更加准确安全,避免高原环境的外在因素的影响。

【关键词】　高原多脏器功能障碍综合征模型;蕨麻小型猪;巴马小型猪;比较
【中图分类号】R33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0033-05
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.007

Comparison of the Bama minipig and Juema minipig models of high altitude multi-organ dysfunction syndrome

NIU Ting-xian, GUO Xiao-yu, SHEN Jian, WANG Hong-yi,
LU Lu, XIAO Pan, FENG Xiao-ming
(Department of Animal Experiment, Lanzhou General Hospital of
PLA Lanzhou Military Command, Lanzhou 730050, China)

【Abstract】　Objective　To compare the Bama minipig and Juema minipig models of high altitude multi-organ dysfunction syndrome. **Methods**　Six plateau-origin Juema minipigs and plain-origin Bama minpigs in each group received intravenous infusion of 0.35 mg/kg lipopolysaccharide (LPS), respectively. Blood samples were taken at 0 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h and 72 h after LPS infusion. Routine blood test was performed, blood CK, AST, ALT, TBIL, CRE were assayed, and histopathological examination of the lung tissues was performed at 24 h, 48 h after LPS infusion. **Results**　The mortality of Bama minipigs was 33.3%, higher than that of 16.7% of Juema minipigs. The trend of physiological and biochemical changes was similar, but was milder in the Juema minipigs than in Bama minipigs. The lung injuries of the Bama minipigs at 24 h and 48 h were more severe than those in the Juema minipigs. **Conclusions**　Both Bama and Juema minipig models of high altitude multi-organ dysfunction syndrome can be successfully established. Juema minipig models can be more closely and safely established, due to its own plateau biological properties, and avoid the influence by extrinsic

[**基金项目**] 甘肃省技术研究与开发专项计划(1205TCYA010)。
[**作者简介**]牛廷献(1966 -),男,主任技师,主要研究方向:人类疾病动物模型的建立及相关研究。E-mail: niutx10000@163.com。
[**通讯作者**]冯小明(1980 -),男,主管技师,主要研究方向:实验动物质量控制及开发研究。Email: fxm8006@163.com。

injurious effects of plateau environment.

【Key words】 High altitude multi-organ dysfunction syndrome; Juema minipig; Bama minipig; Animal model

我国高原地区急性重型高原病并发多脏器功能障碍综合征(multiorgan dysfunction syndrome, MODS)的发病率较高[1,2]。高原地区发生 MODS(H-MODS)后虽然在本质上与平原 MODS 没有差别,但从平原进驻高原后随着海拔高度的上升,以缺氧的环境因素逐渐成为主要影响因素。从而不同程度地改变了 MODS 的发病过程、临床特征和预后,使其治疗方案也随之发生了显著变化[3]。而 H-MODS 在治疗中的不确定因素比平原地区更多、变数更大,使得难以全面细致观察 H-MODS 患者病情变化的全过程。H-MODS 动物模型是研究其发病机制和临床防治的基础,但目前研究所使用的实验动物均为低海拔或中度海拔生长培育的[4-7],不具有高原生物学特性。在建立高原疾病模型时,不同海拔地区的动物对所建模型的质量是否存在差异未见报道。而在研究中低海拔地区生长的实验动物自身会出现不同程度的高原反应,受高原环境的外在因素的影响很大,这就难免使得实验结果出现一些误差。对此,本研究采用高原蕨麻小型猪和巴马小型猪建立 H-MODS 模型,以研究二者对模型质量存在的差异,寻求建立 H-MODS 模型理想的实验动物。

1 材料和方法

1.1 动物与试剂

蕨麻小型猪与巴马小型猪各 6 只,雌雄各半,体重 15 kg 左右,分为蕨麻小型猪(JM)组和巴马小型猪(BM)组。蕨麻小型猪为兰州军区总医院动物实验科培育,巴马小型猪购自第四军医大学动物实验中心(生产许可证:SCXK(军)2012-006)。氯胺酮(国药准字:H35020148,福建古田药业有限公司),地西泮注射液(国药准字:H12020957,天津金耀氨基酸有限公司),LPS (血清型为:O127:B8,批号为 64H4010,美国 Sigma 公司)。生化分析仪:Beckman 公司,Coulter LX20。

1.2 模型建立

制模方法参照文献[4,8],本实验在海拔 3500 m 的甘南桑科草原进行,将猪运输到目的地之后,休整 3 d 待动物的状态稳定之后再进行实验。JM 和 BM 均采用氯胺酮(6 mg / kg)联合安定(0.5 mg / kg)进行肌内注射麻醉,同时肌内注射阿托品(0.05 mg / kg)。两组猪麻醉后经耳静脉泵入脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(0.35 mg / kg, 30 min 内泵完)。

1.3 血常规和血清生化指标的测定

血常规及各项生化指标的检测均由本院检验科完成。分别于 0、3、6、12、24、48 和 72 h 经颈静脉采血,测定血液血常规:红细胞计数(RBC)、白细胞计数(WBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞积压(HCT)、红细胞平均体积(MCV)、红细胞平均血红蛋白含量(MCH)、血小板(PLT)等和血清生化指标:肌酸激酶(CK)、天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转移酶(ALT)、总胆红素(TBIL)和肌酐(CRE)。

1.4 MODS 的诊断标准

参照胡森等[8,9]提出的动物发生 MODS 时各个器官功能障碍分期诊断标准和评分标准。在注射 LPS 后出现 2 个或 2 个以上器官或系统功能障碍判定为 MODS。

1.5 统计学方法

数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,利用 SPSS 17.0 统计分析软件对数据进行处理,两组之间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 体征表现

JM 组猪麻醉后由耳静脉泵入 LPS, 30 min 内输完,1 h 后 JM 猪开始转醒但是倒卧不起,呼吸及心率增快,并出现腹胀、发热、尿频;苏醒后四肢无力倒卧,无食欲,精神萎靡,呼吸急促;8 ~ 10 h 后 JM 组猪站立行走,开始采食,精神状态良好,基本恢复正常;其中 1 头 JM 组猪在 4 h 因呼吸窘迫、心律、继之心衰死亡。BM 组猪的体征表现与 JM 组相比出同样症状但更严重;BM 组猪麻醉并在 30 min 内输完 LPS,1 h 后还处于昏迷状态,2 h 后开始转醒但倒卧不起,呼吸及心率增快,并出现腹胀、发热、尿频,无食欲,精神萎靡;5 h 与 14 h 分别有 1 只猪出现死亡;12 ~ 16 h 后 JM 组猪站立行走,开始采食,精神状态良好,基本恢复正常。JM 组与 BM 组猪死亡率分别为 16.7 % 和 33.3 %。

2.2 生化水平比较

蕨麻小型猪与巴马小型猪生化水平比较结果见图 1。其 CK、AST 变化趋势两者是相同的,0 h ~ 6 h 急剧上升,12 h ~ 24 h 达到最大,之后又开始下降至

72 h 基本恢复正常,两者的表达水平也是非常的相近(见图 1 -1,1 -2)。JM 组 ALT 在 48h 后略呈下降趋势,BM 组变化趋与水平(见图 1 -3);BM 组 TBIL 水平在 0h 高于 JM 组并一直上升,24 h 达到最大,24 ~48 h 急剧下降;JM 组水平低于 BM 组,0 h ~12 h 其变化基本趋于水平,12 h ~48 h 与 BM 组相同具有先升高后降低的趋势,但是变化幅度很小(见图 1 -4)。BM 组 CRE 水平高于 JM 组,且在 0 h ~3 h 略有降低,在 3 h ~12 h 开始上升,之后缓慢降低;JM 组水平变化平缓并趋于水平(见图 1 -5)。

2.3　血常规水平比较

蕨麻小型猪与巴马小型猪血常规水平比较结果见图 2。两者 WBC、RBC、PLT 变化趋势是相同的,WBC 在 0 h ~3h 急剧下降,6 h ~24h 急剧上升,24 h ~72h 又开始下降(见图 2 -1);RBC 在 0 h ~3 h 基本没有变化,在 3 h ~6h 上升,6 h ~24 h 下降,24 h ~72 h 又开始上升(见图 2 -2);PLT 水平变化趋势是先下降后升高(见图 2 -3)。尽管两者 WBC、RBC、PLT 变化趋势是相同,但是 JM 组变化幅度较 BM 组相对平缓,此外 WBC 与 RBC 水平 JM 组在 0 h 要高于 BM 组,但是 0 h PLT 水平 BM 组高于 JM 组。其余血常规指标两者之间没有明显的区别。

2.4　肺组织病理变化比较

巴马小型猪与蕨麻小型猪 24 h(A、B)、48 h(C、D)及正常对照(E、F)肺组织病理切片如图 3 所示。A 肺泡腔无渗出,均匀一致,支气管腔完整,肺泡上皮细胞排列整齐,毛细血管扩张充血,有少量红细胞渗出;B 肺泡结构基本完整,毛细血管无扩张,无水肿,无红细胞拥堵现象,肺泡间隔增宽,部分肺泡上皮细胞排列杂乱。C 肺泡腔内弥散性淤血,有大量红细胞渗出及少量中性粒细胞浸润,巨噬细胞增多,肺泡间隔增宽,毛细血管扩张充血;D 肺泡腔内

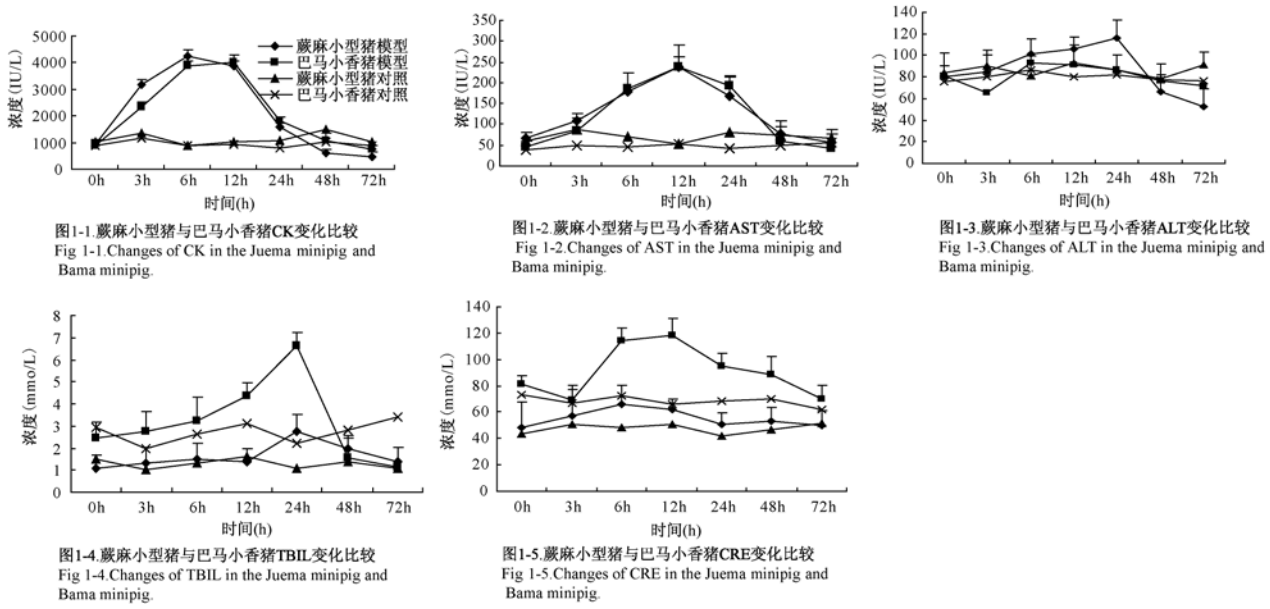


图1-1.蕨麻小型猪与巴马小香猪CK变化比较
Fig 1-1.Changes of CK in the Juema minipig and Bama minipig.

图1-2.蕨麻小型猪与巴马小香猪AST变化比较
Fig 1-2.Changes of AST in the Juema minipig and Bama minipig.

图1-3.蕨麻小型猪与巴马小香猪ALT变化比较
Fig 1-3.Changes of ALT in the Juema minipig and Bama minipig.

图1-4.蕨麻小型猪与巴马小香猪TBIL变化比较
Fig 1-4.Changes of TBIL in the Juema minipig and Bama minipig.

图1-5.蕨麻小型猪与巴马小香猪CRE变化比较
Fig 1-5.Changes of CRE in the Juema minipig and Bama minipig.

图 1　蕨麻小型猪与巴马小型猪生化指标变化比较

Fig. 1　Changes of biochemistry in the Juema minipig and Bama minipig.

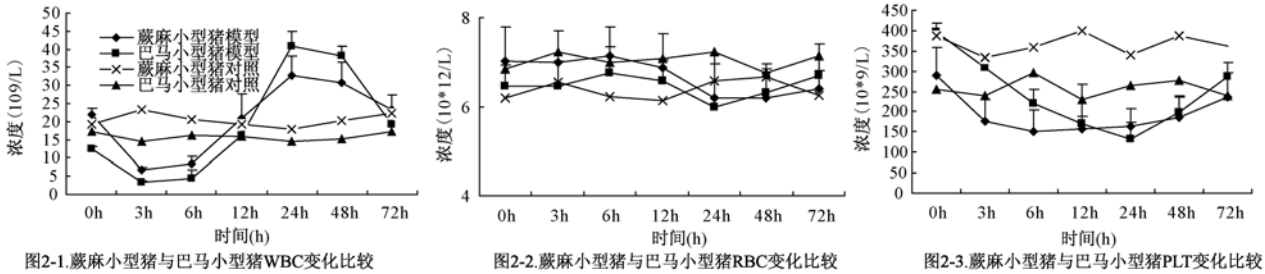


图2-1.蕨麻小型猪与巴马小型猪WBC变化比较
Fig 2-1.Changes of WBC in the Juema minipig and Bama minipig.

图2-2.蕨麻小型猪与巴马小型猪RBC变化比较
Fig 2-2.Changes of RBC in the Juema minipig and Bama minipig.

图2-3.蕨麻小型猪与巴马小型猪PLT变化比较
Fig 2-3.Changes of PLT in the Juema minipig and Bama minipig.

图 2　蕨麻小型猪与巴马小型猪生化指标变化比较

Fig. 2　Changes of blood WBC, RBC and PLT in the Juema minipig and Bama minipig.

有轻微出血,肺泡壁模糊,有少量红细胞渗出,肺泡间隔略有增厚。E 和 F 肺组织结构未见异常改变(图 3 封二)。

3 讨论

高原蕨麻小型猪生长于我国青藏高原甘南藏族自治州合作地区。由于生存在恶劣高寒气候和低劣的饲养条件下,使其具有适应高原环境的独特的生物学特性。并且长期以来在封闭环境中自繁自养免受外来血缘的杂交影响,从而它形成了一个稳定的原始的地方小型猪种。它生长缓慢、体形矮小、繁殖能力强,是典型的高原小型猪种之一[10]。在高原地区,伴随着海拔的增高,低氧、低压环境等影响因素也在加强,促使 MODS 发生发展也急骤加快,因而选择合适的动物建立模型,可以更准确的了解高海拔地区 MODS 的演变规律,病理变化特点,对高海拔地区 MODS 早期诊断、早期治疗提供重要的参考依据。本研究采用高原土生蕨麻小型猪和巴马小型猪建立 H-MODS 模型进行对比分析,研究高原医学与实验动物的高原特性之间关系。

在 MODS 的研究中,采用大小鼠、兔及大型动物如绵羊和犬等均可用于建立 MODS 模型[11-13],大、小鼠对内毒素敏感性较差,解剖结构与人差别较大,不是理想的模型动物;兔虽然对内毒素敏感性好,但死亡率很高;而小型猪在疾病发病机理、生理学、解剖学等方面与人相似度很高,从而成为研究人类疾病理想的实验动物[14-18],利用小型猪建立 MODS 模型能够更加真实地模拟病理变化和临床特征。

本研究选择具有高原特性的蕨麻小型猪与巴马小型猪在相同条件下建立高原 MODS 动物模型,两者均可以在小剂量 LPS 作用下就能形成全身性炎症反应(SIRS),继而诱发 MODS[19]。两者建模后 CK、AST 变化趋势两者是相同的,先急剧增高然后再下降至 72h 基本恢复正常,两者 ALT、TBIL 及 CRE 变化基本相同,并且两者的表达水平也是非常的相近,但是 TBIL 和 CRE 的变化趋势蕨麻猪较小型猪平缓一点。WBC 在 0 ~ 3 h 急剧下降,6 h ~ 24h 急剧上升,24 h ~ 72 h 又开始下降,与绵羊高原 MODS 模型的变化规律完全吻合[20],虽然两者 WBC、RBC、PLT 变化趋势相同,但是 JM 组变化幅度较 BM 组相对平缓。

研究发现,内毒素继发的全身炎症在高海拔地区反应明显比低海拔地区严重,同时高原地区 MODS 所引起的死亡率[21]、肺部损伤病理改变也比亚高原地区明显严重[5]。本研究采用平原动物与高原地区动物分别建立高原 MODS 模型都引起严重的肺部损伤,在 48 h 肺部病理变化最为严重,肺脏均出现不同程度的充血水肿,肺泡腔内淤血,红细胞渗出,肺泡间隔略有增厚等明显的病理特征,但是蕨麻小型猪的病理变化较巴马小型猪略微小,而且两组死亡率蕨麻小型猪明显低于巴马小型猪。这可能与高原 MODS 中性粒细胞在低氧环境暴露下功能改变密切相关,研究发现在急性缺氧环境下中性粒细胞趋化能力加剧,体现在常氧对照组中性粒细胞伪足长度小于急慢性缺氧组[22]。同时,在高海拔地区,由于低氧应激因素的存在,MODS 模型表现出病理损伤较中度海拔地区严重,然而在主要的损伤器官中,肺损伤尤其明显,可能是在 LPS 诱导的 MODS 发生发展中,伴随着早期炎症介质大量释放而引起肺泡毛细管膜过渡炎症反应。有研究报道,在相同内毒素剂量诱导下,高海拔地区建立动物模型时所引起机体的病理损伤比中度海拔地区严重,这就反应了外在的低氧环境可能会推动病情的发展[5]。

因此,在建立高原疾病模型实验动物的选择中,由于不同的实验动物具有不同的生物学特性,对于高原低氧环境的适应能力不同,所以在建立疾病模型时,非高原性实验动物受高原低氧环境的影响更大。这也就提示在高原疾病的研究中选用高原特性实验动物将更准确的模拟疾病发生发展特点的同时可避免外在的打击因素而引起的死亡。

参考文献:

[1] 周其全, 刘福玉, 郑必海, 等. 3184 例重型急性高原病患者并发多器官功能障碍综合征的结果分析 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(1): 362-401.

[2] 周其全, 刘福玉, 郑必海, 等. 白细胞与白细胞介素增高在急性高原病并发多器官功能障碍中的作用及临床意义 [J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(10): 5882-5921.

[3] 张世范, 刘毅, 高炜, 等. 高海拔地区多脏器功能障碍评分系统诊断的标准 [J]. 中华急诊医学杂志. 2006, 15(4): 366-369.

[4] 牛廷献, 万东君, 陆璐, 等. 高原地区多脏器功能障碍综合症绵羊模型的建立 [J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(4): 285-289.

[5] 万东君, 牛廷献, 王春雨, 等. 高海拔地区内毒素致绵羊多脏器功能障碍综合征的病理学改变 [J]. 中国比较医学杂志, 2012,22(8): 40-43.

[6] 王红义, 冯小明, 史智勇, 等. 亚高原与高原地区绵羊多脏器功能障碍综合征血清生化指标的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2012,22(7): 56 -59.
[7] 牛廷献, 万东君, 罗晓红, 等. 血必净对高原绵羊多脏器功能障碍综合征的治疗研究[J]. 中华老年多器官疾病杂志, 2013, 12(8):625 -628.
[8] 胡森, 盛志勇, 周宝桐, 等. 双相迟发多器官功能不全综合征(MODS)动物模型的研究[J]. 中华创伤杂志, 1996, 12(2): 102 -106.
[9] 胡森, 盛志勇, 周宝桐. MODS 动物模型研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 504 -507.
[10] 景致忠, 张永兴, 王自强, 等. 甘肃蕨麻猪实验动物化应用前景[J]. 实验动物科学与管理, 1997, 14(4): 64 -65.
[11] 段绍斌, 李学雄, 姚华, 等. 多器官功能障碍综合征时血管内皮细胞损伤的研究[J]. 新疆医科大学学报, 2010, 33(3): 271 -274.
[12] 卢瑗瑗, 尹文, 虎晓岷. 家兔失血性休克并内毒素诱发多器官功能障碍综合征模型制备[J]. 江苏医药, 2005, 31(6): 448 -450.
[13] 任添华, 牛驰, 任爱民, 等. 动物模型组织氧代谢的变化特征[J]. 首都医科大学学报, 2008, 29(3): 308 -310.
[14] Wei HJ, Qing YB, Pan WR, et al. Comparison of the efficiency of Banna miniature inbred pig somatic cell nuclear transfer among different donor cells[J]. Plos ONE, 2013, 8(2): 57728.
[15] Kim YK, Lee GS, Jung EM, et al. Generation of fibroblasts overexpressing liver-specific PEPCK in a miniature pig model of human type 2 diabetes mellitus[J]. Mol Med Report, 2012, 6(1): 45 -50.
[16] Christoffersen B, Golozoubova V, Pacini G, et al. The young Gottingen minipig as a model of childhood and adolescent obesity: influence of diet and gender[J]. Obesity, 2013, 21(1): 149 -158.
[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] 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.
[19] 胡森, 盛志勇, 周宝桐. MODS 动物模型研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 1999, 11(8): 504 -507.
[20] 牛廷献, 万东君, 陆璐, 等. 高原地区多脏器功能障碍综合症绵羊模型的建立[J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(4): 285 -289.
[21] 王红义, 冯小明, 史智勇, 等. 亚高原与高原地区绵羊多脏器功能障碍综合征血清生化指标的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2012,22(7): 56 -59.
[22] 周其全, 张世范. 中性粒细胞过渡激活在急性高原病伴多脏器功能障碍中的作用及其机制[J]. 临床军医杂志, 2009, 37(2): 308 -311.

〔修回日期〕2015-02-09

(上接第 17 页)

[9] Van Der Linden P, Wathieu M, Gilbart E, et al. Cardiovascular effects of moderate normovolaemic haemodilution during enflurane-nitrous oxide anaesthesia in man [J]. Acta Anaesthesiol Scand, 1994, 38: 490 -498.
[10] Ickx BE, Rigolet M, Van der Linden PJ. Cardiovascular and metabolic response to acute normovolemic anemia [J]. Anesthesiology, 2000, 93: 1001 -1016.
[11] Jones, SB, Whitten, CW, Monk, TG. Influence of crystalloid and colloid replacement solutions on hemodynamic variables during acute normovolemic hemodilution [J]. J Clin Anesth, 2004, 16(1): 11 -7.
[12] 牛新环, 田玉科, 张咸伟, 等. 急性等容性血液稀释与自体血回输对病人血电解质和血浆蛋白的影响[J]. 临床麻醉学杂志, 2004, 20(2): 109 -110.
[13] Stehling LC. A Report by the American Society of Anesthesiologists Task Force on Blood Component Therapy. Practice Guidelines for Blood Component Therapy [J]. Anesthesiology, 1996, 84: 732 -747.
[14] Miller RD. Coagulation and packed red cell transfusion [J]. Anesth Analg, 1995, 80: 215 -216.
[15] Hobisch-Hagen P, Wirleitner B, Mair J, et al. Consequences of acute normovolaemic haemodilution on haemostasis during major orthopaedic surgery [J]. Br J Anaesth, 1999, 82(4): 505 -509.
[16] Bourke DL, Smith TC. Estimating allowable hemodilution [J]. Anesthesiology, 1974, 41: 609 -612.
[17] 效小莉, 钱桂兰, 刘岚. 围产期急性等容稀释性自体输血安全性研究[J]. 中国输血杂志, 2013, (1): 63 -64.

〔修回日期〕2015-02-15

研究报告

高脂饮食对长爪沙鼠生化及主要脏器组织病理学的影响

俞建顺[1],严茂祥[1],王德军[2],何蓓晖[1],陈芝芸[1]

(1. 浙江中医药大学附属第一医院,杭州 310006;2. 浙江中医药大学动物实验研究中心,杭州 310053)

【摘要】 目的 研究长期高脂饮食对长爪沙鼠生化及主要脏器组织病理学的影响。**方法** 48 只长爪沙鼠随机分为模型组和正常组,每组 24 只,模型组予高脂饮食喂养,正常组予基础饲料喂养,两组分别于 4 周、8 周及 16 周时各处理沙鼠 8 只,比较两组体重、血糖(Glu)、甘油三酯(TG)、胆固醇(CHOL)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、尿酸(UA)、肌酐(CREA)、尿素氮(BUN)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬酸氨基转移酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBil)、淀粉酶(AMS)水平及主要脏器组织病理学的变化。**结果** 和正常组比较,模型组沙鼠血脂明显升高,肝功能受损,血尿酸升高,16 周时血糖明显降低,AMS 升高,肾功能则无明显变化。肝组织逐渐出现脂肪变、炎症、肝纤维化及肝硬化,并伴有脾大,肺组织和心肌在后期均出现脂肪变性,损伤明显,胰岛增大伴内分泌细胞增多,小肠和肾脏无明显变化。**结论** 高脂饮食喂养的沙鼠可复制良好的高脂血症、非酒精性脂肪性肝炎肝硬化模型,并且有可能是高脂血症相关的高尿酸血症、肺损伤及心肌损伤等疾病的良好模型。

【关键词】 长爪沙鼠;高脂饮食;非酒精性脂肪性肝病;高脂血症;高尿酸血症。

【中图分类号】R33 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0038-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 004. 008

Effect of high fat diet on the serum biochemical parameters and histopathology of main organs in Mongolian gerbils

YU Jian-shun[1], YAN Mao-xiang[1], WANG De-jun[2], HE Bei-hui[1], CHEN Zhi-yun[1]

(1. the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China;
2. Zhejiang Chinese Medical University Laboratory Animal Research Center, Hangzhou 310053)

【Abstract】 Objective To explore the effect of high fat diet on serum biochemical parameters and histopathology of main organs in Mongolian gerbils. **Methods** Forty-eight healthy adult male Mongolian gerbils were randomly and equally divided into model and normal groups. The gerbils in the model group were fed with high fat diet while the normal group with standard diet. Eight gerbils in each group were killed at the end of 4th, 8th and 16th week, respectively, and the body weight, serum levels of Glu, TG, CHOL, HDL-C, LDL-C, UA, CREA, BUN, TBil, TP, ALB, ALT, AST and AMS were determined. The histopathological changes of main organs were observed. **Results** Compared with the normal group, the blood lipid of the model gerbils was significantly increased, the liver function was impaired, the blood uric acid level was higher, and the blood glucose was decreased at the end of 16th week. The AMS was increased at the end of 16th week, but

[基金项目]浙江省省级公益性技术应用研究计划项目(NO. 2012C37088)。

[作者简介]俞建顺(1989 -),男,硕士生,研究方向 : 消化系统疾病。

[通讯作者]陈芝芸(1963 -),女,医学硕士,研究员,博士生导师,主要研究方向:消化系统疾病。

the renal function showed no significant changes. The liver tissue of the model group gradually showed steatosis, inflammation, fibrosis and cirrhosis, accompanied by splenomegalia. The lung tissue and myocardium showed fatty degeneration and obvious damages in the later period, the pancreatic islets were enlarged and the amount of endocrine cells was increased, and the small intestine and kidney didn't show any distinct changes. **Conclusions** A gerbil models of hyperlipidemia and nonalcoholic steatohepatitis and cirrhosis can be well established by high fat diet feeding, and may serve as good models for research of hyperlipidemia-related hyperuricemia, and lung and myocardial damages.

【**Key words**】 Mongolian gerbil; High fat diet; Nonalcoholic fatty liver disease; Hyperlipidemia; Hyperuricemia

近年来,随着我国经济水平的快速发展和人民生活水平提高,我国居民粮谷类食物摄入量逐年减少,脂肪供能比明显增加,并有向西方国家膳食结构转化的趋势[1],由此带来一系列健康问题,如高脂血症、脂肪肝、心脑血管疾病等。因此,研究高脂饮食对机体的影响具有极其重要的意义。长爪沙鼠(以下简称沙鼠)亦称蒙古沙鼠或黑爪蒙古沙土鼠、黄耗子、砂耗子等,属哺乳纲,啮齿目,仓鼠科,沙鼠亚科,沙鼠属,其肝内类脂质含量高,能保持高血脂和高胆固醇水平,血清胆固醇含量极易受饲料胆固醇含量影响,且高胆固醇饮食可导致肝脏脂沉积,对研究高血脂、胆固醇吸收和食源性胆固醇代谢等很具价值。本次实验旨在研究高脂饮食对沙鼠的病理生理学影响,为脂质代谢紊乱相关疾病的造模提供新思路。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级成年雄性 Z:ZCLA 长爪沙鼠 48 只,体重(50 ± 10)g,浙江省医学科学院实验动物中心提供,许可证:【SCXK(浙)2008 - 0033】,饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心屏障动物实验设施中【SYXK(浙)2008 - 0115】。

1.2 主要试剂

胆固醇由上海思吉生物制品有限公司提供,3 号胆盐由杭州微生物试剂有限公司提供,蛋黄粉由浙江省长兴县艾格生物制品有限公司提供,血糖(Glu)、甘油三酯(TG)、胆固醇(CHOL)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、尿酸(UA)、肌酐(CREA)、尿素氮(BUN)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天冬酸氨基转移酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBil)、淀粉酶(AMS)等诊断试剂盒均由上海申能-德赛诊断技术有限公司提供;低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)诊断试剂盒由上海复星长征医学有限公司提供;苏木素和伊红染料为 Sigma 进口分装,Masson 染色试剂合由中国福州迈新生物技术有限公司提供。

1.3 主要仪器设备

日立 7020 全自动生化分析仪,德国 Becrman Allegra X-15R centrifuge 离心机,德国 Microm STR120 自动组织脱水机,德国 Microm HM335E 半自动石腊包埋机,德国 LeicaRM 2025 病理切片机,德国 Leica DMLB2 显微镜。

1.4 高脂饲料配制

由 80.5% 的普通饲料、10% 的蛋黄粉、7% 的猪油胆、2% 的胆固醇及 0.5% 的 3 号胆盐组成。普通饲料和高脂饲料均经浙江省医学科学院实验动物中心加工生产。

1.5 分组及处理

48 只沙鼠适应性饲养 1 周后,随机分为正常组及模型组,每组 24 只,每组又分 4 周、8 周及 16 周 3 个时相点。正常组予普通饲料喂养,模型组予高脂饲料喂养,自由饮水,两组分别在第 4、8、16 周末 3 个时相点各随机处理沙鼠 8 只。处理前晚起禁食不禁水 18 h,次日上午空腹麻醉下采血,分离血清待用;取部分肝组织立即进行冰冻切片,油红 O 染色;收集心、肺、肝、胰、肾、脾、小肠(近回盲部)等脏器标本,于 10% 中性甲醛溶液中固定,经脱水、透明、浸蜡、包埋制成组织蜡块待用。

1.6 检测指标

动态观察两组沙鼠 3 个时相点体重,全自动生化仪检测 3 个时相点血清 Glu、TG、CHOL、HDL-C、LDL-C、UA、Cr、BUN、TBil、TP、ALB、ALT、AST、AMS 水平,冰冻切片肝组织油红 O 染色观察肝脏脂质沉积情况,各脏器石蜡组织切片后常规 HE 染色光学显微镜观察组织病理学变化,Mossan 染色观察肝组织纤维化程度。

1.7 统计学方法

计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 SPSS17.0 统计软件进行分析,两组之间比较采用独立标本的 t 检验,当 $P < 0.05$ 时表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高脂饮食对沙鼠体重的影响

高脂饮食喂养 4 周后,模型组沙鼠体重增加稍快于正常组,但差异无统计学意义($P>0.05$),至 8 周时较正常组明显增加($P<0.05$),而 16 周时正常组体重略有增加,而模型组基本维持与 8 周同一水平,见表 1。

2.2 高脂饮食对沙鼠血糖及血脂的影响

模型组沙鼠血糖水平随高脂饲料喂养时间增加而降低,模型组 16 周时相点较 4 周、8 周时相点显著降低($P<0.05$),模型组 16 周时也较正常组 16 周时明显降低($P<0.01$)。

血脂方面,除模型组 4 周时 TG 水平与正常组差异无统计学意义外,模型组 8 周、16 周时的 TG 水平及 3 个时相点的 CHOL、HDL、LDL 水平均较同期正常组显著增高($P<0.01$);高脂喂养 4 周时和 8 周时的血脂水平总体持平,而至 16 周时则较 4 周、8 周显著增高($P<0.01$)。见表 2。

2.3 高脂饮食对长爪沙鼠肝功能的影响

模型组沙鼠血清 ALT、AST 水平在 4 周时即较同一时相点正常组显著增高($P<0.01$),8 周时达到高峰,16 周时 ALT 有所降低、AST 则维持在高水平,均较同一时相点正常组明显增高($P<0.01$)。模型组 TP 水平 8 周时较同一时相点正常组明显增高($P<0.01$),4 周、16 周时则与正常组差异无统计学意义($P>0.05$);随高脂饮食时间增加模型组沙鼠血清 ALB 水平 8 周时较 4 周时显著增高,而 16 周时则较 4 周、8 周显著降低;模型组球蛋白(GLB)、TBil 水平则随造模时间延长而逐渐增高,而 ALB/GLB 则逐渐降低,见表 3。

2.4 高脂饮食对沙鼠肾功能及血清淀粉酶的影响

高脂喂养 4 周、8 周及 16 周 3 个时相点沙鼠血清 BUN、CREA 水平均与同一时相点正常组差异无统计学($P>0.05$);模型组沙鼠血清 UA 水平在 4 周、8 周时与正常组差异无统计学,在 16 周时则较同一时相点正常组及模型组 4 周、8 周时相点均显著增高($P<0.01$);模型组沙鼠血清 AMS 水平在 4 周、8 周时与正常组无统计学差异,在 16 周时则较同一时相点正常组明显增高($P<0.01$)。见表 4。

表 1 高脂饮食对沙鼠体重的影响($\bar{x}\pm s$,g)

Tab. 1 Effect of high fat diet on the body weight of gerbils($\bar{x}\pm s$,g)

分组 Groups	造模型前($n=24$) Before modeling($n=24$)	4 周($n=8$) 4 weeks ($n=8$)	8 周($n=8$) 8 weeks ($n=8$)	16 周($n=8$) 16 weeks ($n=8$)
正常组 Normal	60.53±5.85	69.53±6.56	74.69±5.28	78.62±5.32
模型组 Model	60.50±6.09	74.95±3.79	83.52±8.96*	82.57±8.35

与同一时相点正常组比,$^{*}P<0.05$。

Note. $^{*}P<0.05$ compared with the normal group at the same time point.

表 2 高脂饮食对沙鼠血糖及血脂的影响($\bar{x}\pm s$,$n=8$,mmol/L)

Tab. 2 Effect of high fat diet on the blood glucose and lipid in the gerbils($\bar{x}\pm s$,$n=8$,mmol/L)

分组 Groups		血糖 (Glu)	甘油三酯 (TG)	胆固醇 (CHOL)	高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)	低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)
4 周 4weeks	正常组 Normal	5.56±0.82	0.33±0.10	1.76±0.48	0.94±0.20	0.25±0.25
	模型组 Model	5.91±1.15$^{\Delta}$	0.39±0.15$^{\Delta\Delta\#}$	22.05±9.55$^{**\Delta\Delta}$	3.00±0.89**	3.90±1.70$^{**\Delta\Delta}$
8 周 8 weeks	正常组 Normal	6.07±0.99	0.40±0.12	1.80±0.50	0.89±0.16	0.49±0.34
	模型组 Model	5.74±0.78$^{\Delta}$	0.58±0.20$^{*\Delta}$	19.10±5.14$^{**\Delta\Delta}$	3.74±0.61**	4.62±1.55$^{**\Delta\Delta}$
16 周 16 weeks	正常组 Normal	6.56±0.62	0.43±0.03	1.48±0.67	0.79±0.17	0.22±0.09
	模型组 Model	4.35±1.08**	1.25±0.67*	38.63±7.43**	3.52±0.37**	24.27±13.22**

注:与同一时相点正常组比$^{*}P<0.05$、$^{**}P<0.01$;与 8 周模型组比$^{\#}P<0.05$、$^{\#\#}P<0.01$;与 16 周模型组比$^{\Delta}P<0.05$、$^{\Delta\Delta}P<0.01$。

Note. $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$ compared with the normal group at the same time point; $^{\#}P<0.05$、$^{\#\#}P<0.01$ compared with the model group at 8 weeks; $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta}P<0.01$ compared with the model group at 16 weeks.

表 3 高脂饮食对沙鼠肝功能的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 3 Effect of high fat diet on the liver function in the gerbils($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组 Groups		丙氨酸氨基转移酶(ALT)(IU/L)	天冬酸氨基转移酶(AST)(IU/L)	总蛋白(TP)(g/L)	白蛋白(ALB)(g/L)	球蛋白 GLB(g/L)	A/G	总胆红素(TBil)(μmol/L)
4 周 4weeks	正常组 Normal	64.84 ± 25.16	186.69 ± 58.26	45.35 ± 3.27	31.36 ± 1.06	13.99 ± 3.03	2.32 ± 0.43	5.51 ± 0.52
	模型组 Model	110.29 ± 31.12$^{**\#\#\Delta\Delta}$	222.86 ± 48.52$^{\#\#\Delta\Delta}$	44.89 ± 2.37$^{\#\#\Delta}$	32.72 ± 2.22$^{\#\#\Delta\Delta}$	12.15 ± 2.16$^{\#\#\Delta\Delta}$	2.79 ± 0.68$^{\Delta\Delta}$	4.45 ± 1.43$^{\#\Delta\Delta}$
8 周 8weeks	正常组 Normal	66.56 ± 13.74	193.88 ± 92.27	44.18 ± 4.79	29.9 ± 3.67	14.27 ± 2.95	2.17 ± 0.47	4.89 ± 0.38
	模型组 Model	286.76 ± 114.54$^{**\Delta}$	343.50 ± 98.16**	55.28 ± 5.29**	38.59 ± 3.62$^{**\Delta\Delta}$	16.69 ± 2.93$^{\Delta}$	2.37 ± 0.44$^{\Delta\Delta}$	10.34 ± 6.00$^{*\Delta\Delta}$
16 周 16weeks	正常组 Normal	63.34 ± 32.57	160.81 ± 55.50	47.42 ± 3.06	32.95 ± 2.54	14.67 ± 1.71	2.31 ± 0.34	5.24 ± 0.42
	模型组 (Model)	189.32 ± 21.17**	355.30 ± 61.02**	52.55 ± 8.41	26.21 ± 3.73**	26.34 ± 9.41**	1.15 ± 0.56**	56.75 ± 7.91**

注:与同一时相点正常组比 $^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$;与 8 周模型组比 $^{\#}P < 0.05$、$^{\#\#}P < 0.01$;与 16 周模型组比 $^{\Delta}P < 0.05$、$^{\Delta\Delta}P < 0.01$

Note. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ compared with the normal group at the same time point; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ compared with the model group at 8 weeks; $^{\Delta}P < 0.05$、$^{\Delta\Delta}P < 0.01$ compared with the model group at 16 weeks.

表 4 高脂饮食对沙鼠肾功能及血清淀粉酶的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Tab. 4 Effect of high fat diet on the renal function and serum AMS in the gerbils($\bar{x} \pm s, n = 8$)

分组 Groups		尿素氮(BUN)(mmol/L)	肌酐(CREA)(μmol/L)	尿酸(UA)(μmol/L)	淀粉酶(AMS)(U/L)
4 周 4weeks	正常组 Normal	11.67 ± 1.78	44.24 ± 4.93	19.87 ± 5.51	455.57 ± 71.96
	模型组 Model	10.15 ± 3.16	40.70 ± 3.11	15.46 ± 13.56$^{\Delta\Delta}$	488.25 ± 153.84
8 周 8weeks	正常组 Normal	10.69 ± 1.68	42.29 ± 4.29	20.43 ± 11.52	489.62 ± 100.44
	模型组 Model	12.46 ± 2.68	45.09 ± 6.22	28.52 ± 14.59$^{\Delta\Delta}$	573.62 ± 175.20
16 周 16weeks	正常组 Normal	13.16 ± 2.27	45.86 ± 5.47	22.17 ± 6.38	492.37 ± 61.72
	模型组 (Model)	11.34 ± 3.60	47.77 ± 24.57	108.06 ± 51.03**	588.00 ± 98.39*

注:与同一时相点正常组比 $^{*}P < 0.05$、$^{**}P < 0.01$;与 8 周模型组比 $^{\#}P < 0.05$、$^{\#\#}P < 0.01$;与 16 周模型组比 $^{\Delta} < 0.05$、$^{\Delta}P < 0.01$。

Note. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ compared with the normal group at the same time point, $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ compared with the model group at 8 weeks; $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ compared with the model group at 16 weeks.

2.5 高脂饮食对沙鼠心、肺、肝、胰腺、脾、肾、小肠等的组织病理学影响

HE 染色光镜下观察发现正常组沙鼠心肌纤维排列整齐,高倍镜下显示有横纹,细胞间质较少,内见少量血管及结缔组织。模型组 4 周心肌纤维排列仍整齐,胞浆内少量的细小脂肪空泡;至 8 周心肌纤维变性,横纹不清,模糊,胞浆内可见数量不等脂肪小空泡,间质水肿、血管扩张,少量炎性细胞渗出;16 周间质水肿更明显,炎性细胞渗出有增加,胞浆内脂肪空泡增多,间质内脂肪细胞明显增加;模型组各时相点间质纤维化不明显(图 1)。

HE 染色光镜下观察沙鼠正常组肺结构清楚,未见肺泡膈增厚,未见炎细胞浸润。模型组 4 周时肺结构清楚,肺泡毛细血管充血,肺胞膈略有增厚,伴少量炎症细胞渗出;至 8 周时肺胞膈增厚较 4 周时明显;16 周时肺泡结构欠完整,肺泡腔逐渐消失,内可见大量泡沫细胞代替,部分见脂肪肉芽肿(图 2)。

沙鼠正常组肝脏大体观察颜色鲜红,边缘锐利,表面光滑,质软而韧;模型组 4 周及 8 周时肝脏体积增大,边缘变钝,颜色呈奶油黄,质地较正常组软且韧性差,触之似泥块并有油腻感;至 16 周时肝脏色泽晦暗淡黄色,表面粗糙,质地较正常组稍硬。油红 O 染色发现正常组各组沙鼠肝细胞胞浆见少量细小的红染物质,模型组 4、8 周肝细胞内沉积大量被染成红色的脂肪,至 16 周时染成红色脂肪的范围有所减少。HE 染色正常组肝组织结构完整,肝细

胞以中央静脉为中心,向四周放射状排列,汇管区结缔组织略多,其内见小叶间静脉、小叶间动脉和小叶间胆管断面。模型组 4 周肝细胞内弥漫脂肪空泡,肝小叶内见少量点状坏死,无肝细胞气球样变,Masson 染色显示无明显的窦周纤维化;至 8 周时肝细胞内脂肪空泡增多,肝小叶内散在的坏死灶,肝细胞气球样变,窦周纤维化,部分合并门脉周围纤维化;16 周时肝小叶内坏死灶较 8 周时略有减少,但肝细胞气球样变仍明显,Masson 染色显示间质纤维化明显,见桥接纤维化,部分可见假小叶形成(图 3 ~5)(图 1 ~5 见文后彩插 1)。

HE 染色光镜下观察沙鼠胰腺结构正常,外分泌腺腺泡结构清晰,未见炎症细胞渗出和纤维组织增生,胰岛散在分布,内结构清楚。模型组 4 周、8 周时未见明显异常,16 周时可见部分胰岛增大,胰岛内内分泌细胞增多(图 6)。

模型组沙鼠大体观察脾脏体积较正常组明显肿大,且随造模时间的延长而增大明显。HE 染色光镜下观察正常组沙鼠脾脏皮髓分界清楚,脾小体清晰可见。模型组 4 周、8 周皮髓分界清楚,脾小体缩小,红髓扩大,内可见散在泡沫样细胞;至 16 周脾小体明显缩小,红髓内被大量泡沫样细胞所代替而扩大(图 7)。

正常组及模型组沙鼠双肾大体观察大小均匀一致。HE 染色显微镜下观察发现皮髓分界清楚,皮质内肾小球清晰可见,内未见毛细血管内皮细胞、系膜细胞增生,未见基质增生,未见肾小管基底膜增生,略有毛细血管充血,肾小管可见少量浊肿变性(由于本实验未采用灌注固定,故处死取组织过程中可能会出现轻微的缺血缺氧变化,而肾小管对缺血缺氧特别敏感),间质内未见炎症细胞浸润,未见纤维细胞增多;模型组各时相点镜下未见明显改变(图 8)。

HE 染色光镜下观察正常组沙鼠小肠结构正常,粘膜与粘膜下层向管腔内凸起形成皱襞,粘膜表面大量突起的肠绒毛,绒毛表面可见单层柱状上皮,间有杯状细胞,绒毛间的上皮向固有层凹陷形成肠腺,肌层由内环行和外纵行二层平滑肌组成,外膜为一层纤维膜。模型组各时相点小肠粘膜镜下未见明显改变(图 9)(图 6 ~9 见文后彩插 2)。

3 讨论

高脂饮食给机体带来的损伤一直是诸多学者关注的热点,大量研究证明,高脂饮食可导致血脂紊乱和肥胖,从而诱导机体免疫功能紊乱、血清炎症介质、细胞因子失衡以及细胞表面受体表达异常,而这些与机体炎症反应密切相关。它产生危害主要通过 2 条途径:一是脂质在组织内蓄积所导致的细胞毒性;二是高脂饮食引发血脂紊乱介导的炎症反应和自身免疫反应[2]。本次研究发现高脂饮食可对沙鼠产生多种病理生理学影响。

高脂饮食对沙鼠血脂的影响十分明显,随造模时间的增加,沙鼠高脂血症逐渐严重,TG、CHOL、HDL、LDL 水平均越来越高,尤其是 LDL 水平在 16 周时是 4 周、8 周时的 4 ~5 倍。本研究还观察到,随造模时间延长,血清 TG 的水平也逐渐增高,同时出现高 CHOL 血症和高 TG 血症,这与我们以往观察到给大鼠高脂饮食早期(4 周)血清 TG 有增高而长期喂养(8 周、12 周)后血清 TG 往往不高甚至降低[3]的表现不同;提示沙鼠对膳食脂质的血脂变化模式可能与人类的反应模式更接近,可能更适用于高脂血症研究的模型选择。

高脂饮食可造成沙鼠肝组织大量脂质沉积,本研究显示造模 4 周时肝细胞脂肪变已超过 66% 达到重度;8 周时在脂肪变的基础上,肝组织炎症、坏死,肝细胞气球样变及间质纤维化明显,16 周时间质纤维化加重,出现早期肝硬化表现,部分沙鼠肝组织有假小叶形成;同时这些变化伴随着肝功能的改变,高脂喂养使沙鼠 ALT、AST 及 TBil 或早或晚较正常组均显著升高,且 16 周时模型组 ALB 及 A/G 较前期(4 周与 8 周)出现了明显下降,ALB 全部由肝脏合成,这提示肝脏的合成功能受到了影响,可见高脂饮食沙鼠肝细胞损伤的发生,是非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的典型表现。NAFLD 被认为是代谢综合征在肝脏的一种表现[4],大多数 NAFLD 患者不表现出任何症状,随着疾病的进展可出现肝脏脂肪变性、非酒精性脂肪性肝炎(non-alcoholic steatohepatitis, NASH)、肝硬化、肝细胞肝癌等[5]。本研究的沙鼠模型涵盖了 NAFLD 疾病谱从非酒精性脂肪肝到肝硬化的各个阶段,是 NAFLD 研究的良好模型。根据中华医学会肝脏病学分会的“非酒精性脂肪性肝病诊疗指南”中病理学诊断标准[6],本模型 16 周时肝纤维化分期为 S4(高度可疑或确诊肝硬化)的有 5 例,S3(桥接纤维化)3 例,Masson 染色可明显显示部分沙鼠肝脏出现了假小叶,且均伴

有脾大,为肝硬化的典型表现,而我们在以往的研究采用单纯高脂饮食喂养大鼠仅可诱导明显的肝纤维化表现,且实验周期达 24 周[7],文献报道也尚未见单纯高脂饮食诱导的大、小鼠肝硬化模型,这说明沙鼠用于非酒精性脂肪性肝炎肝硬化的研究有着广泛的前景。另外,本实验还发现 16 周时沙鼠血尿酸水平明显升高,已有研究证明高尿酸血症和 NAFLD 之间存在关系[8],因此沙鼠可能还是研究高脂饮食诱导的 NAFLD 与高尿酸血症的相关性的良好模型。高尿酸血症是嘌呤代谢障碍引起的代谢性疾病,和高脂血症具有相关性,目前已有酵母膏 + 乙胺丁醇灌胃建立的小鼠高尿酸血症模型[9]、高酵母饲料加腺嘌呤灌胃并适时给予氧嗪酸钾乳悬液皮下注射所复制的大鼠慢性高尿酸血症模型[10]、次黄嘌呤腹腔注射联合尿酸氧化酶抑制剂皮下注射复制的小鼠高尿酸血症模型[11]等,本研究单用高脂饮食喂养即使沙鼠血尿酸显著升高,这为高尿酸血症的动物模型复制提供了新方法,或许能为高尿酸血症的发病机制提供新的思路。

本实验还观察到模型组沙鼠在 16 周时血糖较正常组且显著降低,这和大鼠截然不同,长期高脂饮食喂养的大鼠会产生胰岛素抵抗,进一步导致血糖升高[12, 13]。但同样有研究观察到高脂饮食喂养 12 周可使沙鼠血糖明显升高[14],因此高脂饮食对沙鼠血糖的影响尚待进一步研究。本研究观察到 16 周时模型组沙鼠胰腺组织可见部分胰岛增大,胰岛内内分泌细胞增多,这表明沙鼠可能存在胰腺分泌胰岛素的异常,但血糖却反而降低,同时体重也未见明显增加,如果今后进一步实验能验证上述这一特点,或许说明沙鼠体内存在某一种机制能够防止长期高脂饮食诱导的糖尿病的发生,进一步研究这一现象或许能为以后糖尿病的治疗提供新的思路。

本研究通过 HE 染色光镜下未观察到胰腺明显的充血、水肿、坏死等病理改变,但血清淀粉酶水平在 16 周时较正常组显著增高。高脂血症是急性胰腺炎的常见病因之一,其机制目前尚未完全清楚,可能与其激活胰蛋白酶,消化胰腺腺泡引起胰腺的自身消化;或造成胰腺的微循环障碍,胰液分泌受阻等有关[15]。进一步研究可以通过电镜观察胰腺超微结构,探讨单纯高脂饮食与血清淀粉酶升高及高脂血症性急性胰腺炎之间的关系,也可以通过延长高脂饮食喂养时间观察是否可以诱导出高脂血症性急性胰腺炎模型。

高脂饮食的喂养使模型组沙鼠逐渐出现肺胞膈增厚,炎症细胞渗出,肺泡腔消失,代以大量泡沫细胞及脂肪肉芽肿形成,说明高脂饮食会导致肺损伤,并介导炎症反应的发生。高脂饮食喂养的小鼠肺组织亦可观察到和本实验类似的病理学改变[2],已有学者在高脂饮食喂养的大鼠模型中观察到肺纤维化[16],但本模型未观察到明显的肺纤维化的发生。高脂饮食喂养的沙鼠在 16 周还出现了明显的心肌脂肪变性和心肌损伤,这说明该模型可能可以用于高脂血症相关的心肌损伤的研究。但本研究 HE 染色光镜下未观察到肾组织和肠粘膜的病理改变,血清肌酐、尿素氮也未见异常。

本研究提示,高脂饮食可诱导良好高脂血症、非酒精性脂肪性肝炎肝硬化沙鼠模型,并且高脂饮食喂养的沙鼠可能是高脂血症相关的高尿酸血症、肺损伤及心肌损伤等的良好模型。

参考文献:

[1] 陈春明, 赵文华, 杨正雄, 等. 中国慢性病控制中膳食关键因素的研究[J]. 中华流行病学杂志, 2006,27(09): 739 -743.

[2] 龚雪, 沈炼桔, 刘丹, 等. 细胞凋亡抑制因子 6(Api6)在高脂肺损伤中的作用研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2011,33(02): 40 -45.

[3] 温秀梅, 陈芝芸, 严茂祥, 等. 大鼠非酒精性脂肪性肝炎形成中脂质代谢的变化[J]. 中华中医药学刊, 2008,26(09): 1987 -1989.

[4] Dietrich P, Hellerbrand C. Non-alcoholic fatty liver disease, obesity and the metabolic syndrome[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2014, 28(4): 637 -653.

[5] Federico A, Zulli C, De Sio I, et al. Focus on emerging drugs for the treatment of patients with non-alcoholic fatty liver disease [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(45): 16841 -16857.

[6] 中华医学会肝脏病学分会脂肪肝和酒精性肝病学组. 非酒精性脂肪性肝病诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2006,14(03): 161 -163.

[7] 娄国强, 万虎, 施军平,等. 高脂饮食诱导的脂肪性肝纤维化大鼠肝组织 TGFβ_1 和 CTGFmRNA 表达及其意义[J]. 医学研究杂志, 2006,35 (12): 13 -17.

[8] 郭彩云, 聂秀玲, 孙丽荣, 等. 高尿酸血症/痛风与非酒精性脂肪肝严重程度的相关研究[J]. 天津医科大学学报, 2013, 19 (06): 499 -501.

[9] 董静, 朱平, 程康鹏, 等. 小鼠高尿酸血症模型探讨[J]. 中国心血管杂志, 2009,14(03): 237 -239.

[10] 张培, 苗志敏, 李长贵, 等. 慢性高尿酸血症大鼠模型建立

(下转第 47 页)

研究报告

加味二陈汤对 ApoE$^{-/-}$ 小鼠脂质代谢及肝细胞形态的影响

谢雪姣,徐　佳,李亚梅,吴若霞,廖端芳,陈聪伶,尹栋梁

(湖南中医药大学,长沙　410208)

【摘要】 目的　观察加味二陈汤对 ApoE$^{-/-}$ 小鼠血脂的影响。**方法**　44 只 ApoE$^{-/-}$ 小鼠以高脂饲喂养 4 周构建 AS 小鼠模型,分别用辛伐他汀、加味二陈汤对小鼠灌胃给药,8 周后处死小鼠,酶法检测血清血脂;每周称取并记录小鼠体重;油红 O 染色观察小鼠主动脉管腔内粥样斑块;HE 染色观察小鼠主动脉管腔内粥样斑块沉积及肝细胞形态。**结果**　加味二陈汤可显著降低小鼠血清中 TCHOL、LDL-C 水平($P<0.01$);各组小鼠体重均有所增加,但模型组小鼠体重略高于空白对照组和加味二陈汤组;油红 O 染色结果显示加味二陈汤可显著减少 ApoE$^{-/-}$ 小鼠主动脉管腔内粥样斑块的面积;小鼠主动脉 HE 染色示加味二陈汤组小鼠主动脉内有脂质沉积斑块较模型组明显减少;肝细胞切片 HE 染色发现加味二陈汤组小鼠肝细胞的病变程度较轻,肝小叶结构较清晰。**结论**　加味二陈汤能有效降低 ApoE$^{-/-}$ 小鼠血清中有关脂质的含量,调节小鼠脂质代谢,缓解动脉粥样硬化进程。

【关键词】 加味二陈汤;动脉粥样硬化;血脂;HE 染色
【中图分类号】R33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0044-04
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.009

Effects of the Chinese medicine, modified Erchen decoction, on the lipid metabolism and hepatocyte morphology in ApoE$^{-/-}$ mice

XIE Xue-jiao,　XU Jia, LI Ya-mei, WU Ruo-xia, LIAO Duan-fang,
CHENG Cong-ling, YIN Dong-liang
(Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

【Abstract】 Objective　To explore the effects of the Chinese medicine, modified Erchen decoction, on the serum lipid spectrum of ApoE$^{-/-}$ mice, and to explore its possible anti-atherosclerotic mechanism. **Methods**　Forty-four male 7-8-week old ApoE$^{-/-}$ mice were used in this experiment. ApoE$^{-/-}$ mouse models of atherosclerosis were generated by high-cholesterol diet for 4 weeks. And then, they were given simvastatin or modified Erchen decoction by gavage. The body weight of mice was recorded every week, The mice were sacrificed after treated with the drugs for 8 weeks continuously, and the plasma lipid was determined by enzymatic method. The aortic valves and arches were stained with oil red O to depict atherosclerotic plaques and liver structural changes of the mice were examined by pathology. **Results**　Modified Erchen decoction lowered plasma lipid (including TCHOL and LDL-C) significantly ($P<0.01$). The body weight was

[**基金项目**] 全国第五批老中医药专家学术经验继承项目,湖南省教育厅科研青年项目(编号 11B092);2011 湖南省大学生研究性学习和创新性实验计划项目(编号 481);湖南省中医药科研计划项目(编号 201236);湖南省中药粉体与创新药物省部共建国家重点实验室培育基地资助。

[**作者简介**]谢雪姣,女,医学博士,副教授,硕士生导师,全国第五批老中医药专家学术经验继承人,主要从事心脑血管疾病中医药防治研究与中医人才培养研究,E-mail: 99511298@qq.com。

[**通讯作者**]廖端芳,男,医学博士,教授,博士生导师 ,主要从事动脉粥样硬化研究,E-mail: dfliao66@aliyun.com。

increased in the mice of all groups, but it was more pronounced in the mice of model group than in the blank and modified Erchen decoction groups. The serum CHOL and LDL-C levels were significantly lowered in the modified Erchen decoction group ($P<0.01$). The area of atherosclerotic plaques in the aortic wall was significantly reduced in the mice of modified Erchen decoction group as shown by oil red O staining. The pathological changes of hepatocytes were less severe and the structure of hepatic lobules was better preserved in the mice of modified Erchen decoction group. **Conclusions** The Chinese medicin modified Erchen decoction can effectively reduce serum lipids, regulate lipid metabolism, and ameliorate the process of atherosclerosis in ApoE$^{-/-}$ mice.

【**Key words**】 Modified Erchen decoction; Atherosclerosis; Serum lipid; Aorta; Pathology; ApoE$^{-/-}$ mice

二陈汤始见于宋·《太平惠民和剂局方·卷四》，方用半夏(汤洗 7 次)、橘红各五两、白茯苓三两、甘草(炙)一两半，生姜七片，乌梅 1 个。主治“痰饮为患，或呕吐恶心，或头眩心悸，或中脘不快，或发为寒热，或因食生冷，脾胃不和”。现代二陈汤多用于代谢性疾病、肺系疾病、心血管疾病等[1-3]。本研究旨在探索加味二陈汤(陈皮、茯苓、半夏、甘草、荷叶、山楂、刺五加)对 ApoE$^{-/-}$ 小鼠血脂的影响，为其治疗动脉粥样硬化提供依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物：7 ~ 8 周龄雄性 ApoE$^{-/-}$ 基因敲除小鼠 44 只，体重(19 ~ 21)g，品系为 C57BL/6J，由北京大学医学部实验动物中心从美国 Jackson 实验室引进【SCXK(京)2011-0012】，繁育动物饲养及无菌手术均在湖南中医药大学实验动物中心屏障动物实验设施进行，使用许可证号【SYXK(湘)：2013-0005】，并按实验动物使用的“3R”原则给予人道的关怀。

1.1.2 实验药物及饲料：茯苓 15 g、陈皮 10 g、法半夏 10 g、甘草 6 g、荷叶 10 g、山楂 15 g、刺五加 10 g 加水煎煮 30 min 后趁热过滤，浓缩至生药 0.5 g 生药/mL，制得煎液。高脂饲料(胆固醇 1%，猪油 5%，普通饲料 94%)由湖南中医药大学实验动物中心加工制作。小鼠用垫料购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。

1.2 实验方法

将 44 只 ApoE$^{-/-}$ 小鼠适应性喂养 1 周后，随机抽取小鼠 12 只，普通饲料喂养，作为空白对照组；其余 32 只，高脂饲料喂养，予自由饮水。4 周后，随机抽取小鼠 4 只(空白对照组 2 只，模型组 2 只)，检测小鼠血脂，对小鼠心脏主动脉和主动脉瓣行油红 O 染色，证实 AS 模型已制备成功。按小鼠体重，采用随机区组方法将动物分为 3 组，模型组($n=10$)，辛伐他汀组($n=10$)，加味二陈汤组($n=10$)。

空白对照组与模型组小鼠均给予同用药组等体积的生理盐水灌胃，辛伐他汀组小鼠给予辛伐他汀 3 mg/(Kg·d)[4] 灌胃，加味二陈汤小鼠给予其浸膏按生药量 2.2 g/Kg·d)灌胃。灌胃体积均为 20 mL/Kg·d)，配制药液的溶剂均为生理盐水。各组动物灌胃 8 周后，禁食不禁水 12 h，经眼眶静脉丛取血，备用。用 4% 多聚甲醛溶液从小鼠左心室灌流 30 min 后，剥离主动脉后，常温保存在 4% 多聚甲醛溶液中，备用。

1.3 检测指标

应用全自动生化仪，检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白-胆固醇(LDL-C)高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)。剥离的主动脉行油红 O 染色，观察主动脉内脂质染色情况，HE 染色观察主动脉瓣脂质沉积及肝细胞形态，双目显微镜采集图片。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计，数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素方差分析，LSD 方法进行检验。因动物在饲养过程中有死亡以及个别小鼠采血不足，在数据统计分析时，每组取 8 只小鼠的数据。

2 实验结果

2.1 加味二陈汤对 ApoE$^{-/-}$ 小鼠血清血脂水平的影响

由表 1 可见，与空白对照组相比，模型组血清 TG、TCHOL、HDL-C、LDL-C 均明显升高($P<0.01$)，表明模型组出现脂质代谢紊乱。与模型组相比，辛伐他汀组血清 TG、TCHOL、LDL-C 均降低($P<0.01$)；加味二陈汤组血清 TCHOL、LDL-C 均明显降低($P<0.05$)。说明加味二陈汤同辛伐他汀一样，具有明显的降脂功效。

表 1 加味二陈汤对 ApoE$^{-/-}$小鼠血脂水平的影响($n=8$, $\bar{x}\pm s$,mmoL/mL)

Tab. 1 Effects of modified Erchen decoction on serum lipid level in the ApoE$^{-/-}$mice ($n=8$, $\bar{x}\pm s$, mmoL/mL)

组别 Groups	剂量 Dose	甘油三酯 TG	总胆固醇 TCHDL	高密度脂蛋白 HDL-C	低密度脂蛋白 LDL-C
空白组 Normal	0.2 mL/Kg·d	0.48 ±0.09$^{\#\#}$	8.18 ±1.01$^{\#\#}$	3.76 ±0.44$^{\#\#}$	5.45 ±0.87$^{\#\#}$
模型组 Model	0.2 mL/Kg·d	0.74 ±0.22**	10.97 ±0.78**	4.96 ±0.66**	7.35 ±0.91**
辛伐他汀组 Simvastatin	3 mg/Kg·d	0.58 ±0.17	8.16 ±0.84$^{\#\#}$	3.85 ±0.46$^{\#\#}$	5.58 ±0.85$^{\#\#}$
加味二陈汤 Modified Erchen decoction	1.16 mg/Kg^{-}·d	0.72 ±0.23**	9.26 ±1.07$^{*\#\#}$	4.22 ±0.66$^{\#\#}$	6.27 ±0.83$^{\#}$

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

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

2.2 加味二陈汤对 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉脂质沉积斑块的影响

油红 O 能特异性结合脂质而产生肉眼可见的红色,对小鼠主动脉行油红 O 大体染色,能对整条主动脉做全局观察。由图 1 可知,模型组小鼠主动脉弓和主动脉干管腔内均可见大量脂质堆积,而辛伐他汀、加味二陈汤组小鼠主动脉弓和主动脉干管腔内脂质沉积斑块均明显少于模型组(图 1 见文后彩插 3)。

2.3 加味二陈汤对 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉管腔内斑块沉积的影响

对小鼠主动脉行 HE 染色,观察主动脉管腔内脂质斑块沉积,结果如图 2 所示(图 2 见文后彩插 3)。对小鼠的主动脉石蜡切片行 HE 染色,细胞核呈蓝色,细胞浆、结缔组织等呈不同程度的红色,结果如图 2 所示,空白对照组小鼠主动脉内膜完整、光滑,未见明显增厚的现象,无泡沫细胞浸润;而模型组小鼠主动脉内可见大量脂质堆积形成的斑块,且有斑块破裂增生的迹象,有炎症细胞浸润;辛伐他汀组小鼠主动脉内膜有增厚迹象,但没有明显的斑块形成;加味二陈汤组小鼠主动脉内有脂质沉积斑块形成,但与模型组相比,斑块明显减少,且未见明显炎症细胞浸润。

2.4 加味二陈汤对 ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏脂质沉积的影响

对小鼠肝脏切片行 HE 染色,观察肝脏形态,结果如图 3 所示(图 3 见彩插)。在光学显微镜下显示空白对照组小鼠的肝细胞大小较正常,肝小叶结构清晰,细胞质分布均匀,肝细胞内仅未见明显的空泡。模型组小鼠肝细胞出现肿胀现象,肝细胞脂肪变性明显,肝小叶结构破坏,有局灶性炎性细胞浸润。与模型组相比,辛伐他他汀组小鼠肝细胞的病变程度明显减轻,细胞形态趋于正常,细胞内脂肪空泡和脂变细胞数减少,细胞肿胀程度也有所减轻。与模型组相比,加味二陈汤组小鼠肝细胞的病变程度明显减轻,细胞内的脂肪空泡少于模型组,肝小叶结构较清晰。

3 讨论

二陈汤出自《太平惠民和剂局方》,因方中半夏、橘红以陈久者良而命名为“二陈”,为祛痰的通用方剂。加味二陈汤乃二陈汤去乌梅、生姜,加荷叶、山楂、刺五加组成,方中以法夏为君,取其辛温性燥,善能燥湿化痰,且又降逆和胃;以陈皮为臣,理气燥湿祛痰,燥湿以助半夏化痰之力,理气可使气顺则痰消;痰由湿生,湿自脾来,故佐以茯苓健脾渗湿,使湿去脾旺,痰无由生;去掉降逆之生姜、酸收之乌梅,加自古奉为瘦身的良药荷叶加以山楂健脾消食,化滞消积;刺五加益气健脾;荷叶健脾升阳,消暑利湿,共助痰湿从下而解且不伤脾阳;以甘草为使药,调和药性而兼润肺和中。诸药合用,标本兼顾,燥湿化痰,行气消脂,活血通脉。笔者临床将其辨证论治用之于单纯性肥胖、高脂血症、冠状动脉粥样硬化性心脏病等疾病,屡收奇效。

实验研究表明二陈汤能显著降低高脂饮食大鼠的血脂水平,改善胰岛素抵抗,并减轻其体重[4]。张晗等[5]通过临床观察发现二陈汤合大柴胡汤能明显改善代谢综合征患者的高血糖、高血脂、高血压和肥胖等症状。李刚等[6]发现山楂黄酮类中的表儿茶素、多酚类缩合黄烷聚合物及有机酸中的总三萜酸等不饱和酸是降血脂的活性成分。荷叶有较好的调节血脂功效,其主要活性组分是生物碱和黄酮类化合物。且实验证明荷叶煎剂可有效降低 TC、TG、LDL-C 水平,并能改善血液粘稠度[7];睢大员等[8]通过大鼠实验发现刺五加叶皂苷 (ASS)可能通过调节体内血脂代谢提高 PGIz/TXAz 比值及纠正自由基代谢紊乱,发挥抗动脉粥样硬化作用。

本研究结果也表明加味二陈汤组血清 TCHOL、LDL-C 均明显降低($P<0.05$);小鼠主动脉弓和主动脉干管腔内脂质沉积斑块均明显少于模型组;小

鼠主动脉内有脂质沉积斑块形成,但与模型组相比,斑块明显减少,且未见明显炎症细胞浸润;与模型组相比,小鼠肝细胞的病变程度明显减轻,细胞内的脂肪空泡少于模型组,肝小叶结构较清晰。初步证明加味二陈汤对脂质代谢紊乱有较好的调节效果,可显著降低 ApoE$^{-/-}$小鼠 TCHOL、LDL-C 水平,减少 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉管腔内粥样斑块的面积,为临床使用加味二陈汤治疗动脉粥样硬化等代谢性疾病提供了依据[9],同时也为加味二陈汤的组方提供科学依据。

参考文献:

[1] 杨超. 二陈汤加减治疗慢性咳嗽 120 例临床观察[J]. 临床医药文献电子杂志,2014,12:2082 -2083..

[2] 吴同玉, 林山, 郑良普. 二陈汤对高脂饮食 Wistar 大鼠体重及其血脂代谢的影响[J]. 浙江中医药大学学报, 2012, 36(11): 1218 -1238.

[3] 李文生. 二陈汤加味治疗非酒精性脂肪肝 29 例临床观察[J]. 湖南中医杂志,2014,01:44 -45

[4] 丁珊珊, 康洁, 张凌媛, 等. 二陈汤对高脂饮食大鼠血脂及胰岛素抵抗的影响[J]. 中国医学创新, 2014, 11(15): 22 -24.

[5] 张晗, 刘金苓. 痰湿瘀论治代谢综合征的临床研究[J]. 中外医疗, 2014 (6): 131 -133.

[6] 李刚, 梁新红, 葛晓虹. 山楂化学成分及其保健功能特性[J]. 江苏调味副食品, 2009, 26(6): 25 -27.

[7] 周健鹏. 荷叶化学成分和药理作用研究进展[J]. 天津药学, 2014, 26(2): 65 -68.

[8] 睢大员, 韩丛成, 于晓风, 等. 刺五加叶皂苷对高脂血症大鼠血脂代谢的影响及其抗氧化作用[J]. 吉林大学学报, 2004, 30(1): 56 -59.

[9] 薛欣,李海玉,李玉梅,张立石. 从痰论治脂肪肝机制探讨[J]. 中国中医基础医学杂志,2014,11:1472 -1475.

〔修回日期〕2015-02-15

(上接第 43 页)

方法的探讨[J]. 青岛大学医学院学报, 2010, 46(03): 219 -221.

[11] 徐立, 时乐. 小鼠代谢性高尿酸血症模型的复制方法初探[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(01): 1 -4.

[12] Yang SJ, Shoi JM, Park SE, et al. Preventive effects of bitter melon (Momordica charantia) against insulin resistance and diabetes are associated with the inhibition of NF-kappaB and JNK pathways in high-fat-fed OLETF rats[J]. J Nutr Biochem, 2015,26(3):234 -240.

[13] Brahmanaidu P, Nemani H, Meriga B, et al. Mitigating efficacy of piperine in the physiological derangements of high fat diet induced obesity in Sprague Dawley rats[J]. Chem Biol Interact, 2014,221: 42 -51.

[14] 徐黎明, 石巧娟, 徐磊, 等. 蒙古沙鼠非酒精性脂肪性肝病模型的建立与评价[J]. 浙江预防医学, 2007,19 (11): 1 -7.

[15] Wang Y, Sternfeld L, Yang F, et al. Enhanced susceptibility to pancreatitis in severe hypertriglyceridaemic lipoprotein lipase-deficient mice and agonist-like function of pancreatic lipase in pancreatic cells[J]. Gut, 2009, 58(3): 422 -430.

[16] 于洪志. 高脂饮食对大鼠肺组织 CTGF 的影响[J]. 西南军医, 2013,15(05): 487 -489.

〔修回日期〕2015-02-08

研究报告

中药藤莓汤对Ⅱ型胶原诱导性大鼠关节炎性病理损伤的影响

陆　妍[1],王亚南[1],刘　慧[1],马卫国[1],张继胜[1],谭　玲[2],李慧慧[3],林子超[1],沈志明[1],王　洁[1],孟凤仙[1]

(1. 北京中医药大学东方医院风湿科,北京　100078; 2. 昌平区中西医结合医院脑病科,北京　102208;
3. 密云县中医院风湿科,北京　101500)

【摘要】 目的　探讨中药藤莓汤对Ⅱ型胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis,CIA)大鼠关节滑膜炎症指数、四肢肿胀程度、关节组织炎性浸润的改善情况,以及免疫炎性相关因子影响。**方法**　建立 CIA 模型,将造模成功的 SD 大鼠随机分为模型组、阳性药组、中药大、小剂量组,设正常对照组,每组 6 只,干预治疗 12 周。每周使用游标卡尺测量四肢踝腕部前后径、左右径,爪掌足垫厚度,以及双后肢的跖关节肿胀最高点宽度,评价其关节积分和四肢肿胀程度。**结果**　①与正常组比较,模型组大鼠关节炎总 AI 评分及双后肢 AI 评分显著增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$);左前肢 AI 评分在 10－12 周时升高($P<0.05$);左后肢前后径、左右径、足垫厚度及左后肢跖骨最高点测量值在 1－12 w 不同时间段增加($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,中药大、小剂量组总 AI 评分及左后肢关节 AI 评分在 6 w 后降低($P<0.05$);阳性药组 10－12 w 时左前肢 AI 评分下降($P<0.05$)。②与正常组比较,模型组 IL-6、TNF-α mRNA 转录及蛋白表达水平显著上调($P<0.01$)。与模型组比较,阳性药组、中药大、小剂量组 IL-6、TNF-α mRNA 转录及蛋白表达水平显著下调($P<0.01$)。③光镜检测结果显示:中药小剂量组明显改善了 CIA 模型大鼠关节滑膜增生、炎性细胞浸润情况。**结论**　中药藤莓汤改善 CIA 模型大鼠关节病理损伤的分子机制可能与其抑制滑膜组织免疫炎性因子高表达相关。

【关键词】 中药藤莓汤;CIA 模型;AI 积分;病理改变;免疫炎性机制
【中图分类号】R33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0048-10
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.010

Effects of the Chinese herbal compound, Tengmei decoction, on inflammatory injury in joints of rat models of type Ⅱ collagen-induced arthritis

LU Yan[1], WANG Ya-nan[1], LIU Hui[1], MA Wei-guo[1], ZHANG Ji-sheng[1], TAN Ling[2],
LI Hui-hui[3], LIN Zi-chao[1], SHEN Zhi-ming[1], WANG Jie[1], MENG Feng-xian[1]
(1. Department of Rheumatology, Dongfang Hospital, the Second Clinical Medical College of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;
2. Department of Encephalopathy, Integrative Medicine Hospital in Changping District, Beijing 102208;
3. Department of Rheumatology, Traditional Chinese Medicine Hospital in Miyun County, Beijing 101500)

【Abstract】 Objective　To explore the effects of Chinese herbal compound, Tengmei decoction, on type Ⅱ

[作者简介]陆妍(1986－),女,研究方向:风湿免疫及代谢性疾病的临床治疗及机制研究。E-mail: tracyloo@163.com。
[通讯作者]孟凤仙(1955－),女,研究方向:风湿免疫及代谢性疾病的临床治疗及机制研究。Emai: mfx0823@163.com。

collagen-induced arthritis (CIA) in rats, and to examine the changes of arthritis index (AI), limb swelling, joint tissue inflammatory infiltration, and the effects on immune-inflammatory factors. **Methods** Sprague-Dawley rat models of arthritis were successfully established by intradermal injection of type II collagen and Freund's complete adjuvant. The model rats were randomly divided into model group, positive drug group, and high- and low-dose Chinese medicine groups, 6 rats in each group. The intervention and treatment period was 12 weeks. To measure weekly the anteroposterior and transverse diameters of the rear ankles and wrists, the transverse diameter of the claw foot palm pad, the thickness and the highest point width of hind limb plantar joint swelling, and to evaluate the integrated scores of joints and limbs swelling using a vernier caliper. **Results** ① Compared with the normal group, the total arthritis scores and hind limbs AI scores of the model group were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The left forelimb AI scores were significantly increased during 10 – 12 weeks ($P < 0.05$). The anteroposterior and transverse diameters of the left hind limb, the thickness of the highest point measurement of the left hind foot pad metatarsal were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$) in different time periods between 1 – 12 weeks. Compared with the model group, the total scores and the left hind limb joints AI scores of the high- and low-dose drug groups were decreased after 6 weeks ($P < 0.05$). ② Compared with the normal control group, levels of mRNA transcription and protein expression of IL-6 and TNF-α were significantly up-regulated ($P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, the levels of mRNA transcription and the expression of IL-6 and TNF-α proteins were significantly down-regulated in the positive group and Chinese medicine groups ($P < 0.01$). ③ Histological examination showed that the low-dose TCM significantly improved the CIA synovial hyperplasia and inflammatory cell infiltration. **Conclusions** The molecular mechanism of Chinese herbal compound Tengmei decotion in improving joint pathological injury of CIA rat models may be related to its inhibitory effect on the high expression of immune-inflammatory factors in the synovial tissue of CIA rats.

【**Key words**】 Chinese herbal compound, Tengmei decoction; Rat models; Arthritis, collagen II-induced; Arthritis index, AI; Pathological changes; Immune-inflammatory mechanism

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis,RA)是以关节滑膜慢性炎症为主要表现的高致残性、炎症性自身免疫性疾病,最终导致关节畸形和功能丧失。因此,寻找靶向治疗对策,是目前国际医学领域研究的热点。本实验采用牛Ⅱ型胶原和完全弗氏佐剂联合应用建立 CIA 大鼠模型,通过对大鼠一般情况观察、体重分析、四肢关节 AI 积分评价、四肢肿胀程度的分析、关节组织病理学检测,以及相关炎性因子的检测,讨论有良好临床疗效基础的中药藤莓汤对 CIA 模型大鼠的关节滑膜免疫炎性病理损伤的改善及分子机制,探讨中医药治疗 RA 的作用环节。

1 材料和方法

1.1 实验动物和实验环境

SPF 级雄性 SD 大鼠 90 只,体重(200 ~220)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司(实验动物生产许可证号:SCXK(京)2012 – 0001)。北京中医药大学动物实验室实验动物使用许可证号:SYXK(京)2011 – 0024。

1.2 仪器与试剂

试剂:牛源性Ⅱ型胶原蛋白(bovine type II collagen,CII),购自 Chondre 公司(Lot130087);完全弗氏佐剂(Freund's complete adjuvant,FCA),购自 Sigma 公司(CAS 9007-81-2);大鼠 IL-6、TNF-α ELISA 试剂盒购自 eBioscience 公司;Trizol 提取总 RNA 试剂为 Invitrogen 公司产品,批号:66007;One Step SYBR RT-PCR Kit 为 Takara 公司产品,批号:BK1401;GAPDH、目标基因上下游引物均为美国 invitrogen(上海)英骏生物技术有限公司合成。仪器:Applied Biosystems 7500 型定量 PCR 仪,美国应用生物系统(ABI)公司;TC-96/G/H(b) 梯度 PCR 仪,博日科技有限公司;HC-3018R 高速冷冻离心机,中科中佳公司;RT-6000 型酶标仪,深圳雷杜公司产品;超净工作台(SW-CJ-IFD)。

1.3 实验药物

中药藤莓汤(忍冬藤 30 g,蛇莓 15 g,乌蛇 10 g,白芥子 10 g,乳香 10 g,没药 10 g,桑枝 30 g,穿山龙 30 g 等),由北京中医药大学东方医院药剂科制剂室提供。来氟米特片(苏州长征-欣凯制药有限公司,国药准字 H20000550)。

1.4 造模及分组

1.4.1 牛Ⅱ型胶原与完全弗氏佐剂混合乳剂的配制(浓度为 1 mg/mL):取 114 μL 冰醋酸放置于 50 mL 离心管,加 20 mL 灭菌注射用水,配成 0.1 mol/L

冰醋酸溶液,4℃冰箱降温。将 15 mL 醋酸加入 30 mg C II 冻粉中使胶原完全溶解,4℃避光过夜。次日取已配制好的牛 C II 冰醋酸溶液及 FCA 各 15 mL,用自制乳化器(输液器胶管连接 2 个注射器)在冰浴条件下将其完全乳化。4℃避光储存备用。

1.4.2 造模方法:初次免疫时(0 d),于造模组大鼠尾根部皮内注射 200 μL C 和 FCA 的混合乳剂(含 C II 200 μg)。加强免疫时(初次免疫后第 9 天),于大鼠尾根部皮内注射 100 μL C II 和 FCA 的混合乳剂(含 C II 100 μg),正常对照组注射等体积的生理盐水。16 d(初次免疫后 1 周)时对 CIA 大鼠模型进行评价,用游标卡尺测量肿胀部位具体数值以平价四肢肿胀程度,进行关节 AI 评分。

1.4.3 模型评价标准[1,2]及成模数量:关节炎模型评价标准:0 分,正常。1 分,明显可见的腕/踝关节轻度肿胀或局限于单个关节肿胀或少数几个关节受累。2 分,中度的腕/踝关节肿胀,仅局限于单个腕/踝关节,不累及其他指间关节。3 分,严重的腕/踝关节肿胀,累及足爪(足背及掌指/跖趾关节)。4 分,整个肢体肿胀累及多个关节。AI 评分≥4 分者视为模型成功。本实验 84 只造模组大鼠中 70 只模型成功,成模率为 83.3%。

1.4.4 实验分组:随机抽取造模成功大鼠 30 只,分为模型组,阳性药物组,中药大剂量组,中药小剂量组,每组各 6 只,另设正常对照组 6 只。

1.5 干预方法

正常组与模型组予蒸馏水 10 mL/kg . d 灌胃。阳性药组予来氟米特灌胃,剂量为 1.87 mL/kg . d。中药大剂量组按照生药量 31.8 mL/kg . d 灌胃给药。中药小剂量组按照生药量 15.9 mL/kg . d 灌胃给药。各药物组中药量相当于临床常人等公斤体重用量的 5.6 倍。干预治疗 12 周。

1.6 观察指标

1.6.1 CIA 模型大鼠关节炎指数(Arthritis index, AI)变化:干预治疗后每周进行 AI 评分,观察关节炎指数变化情况。

1.6.2 CIA 模型大鼠四肢肿胀程度的改善情况:使用游标卡尺测量大鼠双前肢足垫厚度,腕横纹部与掌面垂直的厚度(前后径),腕横纹部尺桡外点的厚度(左右径),双后肢的足垫厚度,踝的背部横纹到足跟处的厚度(前后径),踝部内外侧高点的厚度(左右径)。为了更好地评估关节肿胀程度,加设了跖骨肿胀最高的部分垂直足垫的厚度(跖骨高点)。

1.6.3 CIA 模型大鼠滑膜组织相关炎性因子的检测:1.6.3.1 RT-PCR 技术检测 CIA 模型大鼠滑膜组织 IL-6、TNF-αmRNA 转录水平:取 CIA 模型大鼠关节滑膜组织,使用 Trizol 试剂提取 RNA 后,进行一步法 RT-PCR 反应,检测 TNF-α、IL-6 水平。反应体积为 25 μL,反应体系含样本 RNA 2 μL,10 pmol 引物各 0.8 μL。TNF-α、IL-6 基因序列:针对 TNF-α 基因序列的上下游引物分别是:5-GGATCTCAAAGACAACCAAC-3 和 5-ACAGAGCAATGACTCCAAAG-3;针对 IL-6 基因序列的上下游引物分别是:5-CCCTGACTGGCTAAAGGACA-3 和 5-CAGTACAGCCGCCTTCT AGG-3;针对看家基因 GAPDH 基因序列的引物分别是:5- CCCATCTATGAGGGTTACGC-3 和 5-TTTA ATGTCACGCACGATTTC-3。扩增条件为:42℃灭活 5 min,95℃变性 10 s,95℃ 退火 5 s,60℃延伸 34 s,共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析,以鉴定 PCR 产物的特异性。使用 SDS 软件分析 RT-PCR 过程各检测样本的 Ct(threshold of cycle)值。

1.6.3.2 ELISA 技术检测 CIA 模型大鼠关节滑膜组织 IL-6、TNF-α 蛋白表达水平:取出试剂盒,按 按试剂盒说明操作。用酶标仪测定 450 nm 处各孔的吸光值,阳性反应的最大稀释度为待测样品的效价。

1.6.4 CIA 模型大鼠右踝关节组织病理学变化:干预治疗 12 周后,观察各组大鼠右踝关节的病理学变化。将固定好的右踝关节取材、脱钙后,流水冲洗数小时,经梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后,4 μm 切片,进行 HE 染色,光镜观察关节滑膜被覆上皮有无变性、增生,间质有无炎细胞浸润及肉芽组织形成;关节周围软组织有无炎细胞浸润或纤维化。

1.7 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对不同组间同一时间段关节积分,四肢肿胀程度和体重的测量数据比较用单因素方差分析。同一指标不同时间段变化采用重复测量方差分析。应用 SPSS 18.0 统计软件。

2 结果

2.1 中药藤莓汤对 CIA 模型大鼠关节 AI 积分的影响

2.1.1 大鼠关节总 AI 积分变化:与正常组比较,模型组大鼠关节总 AI 积分在 0 ~ 12 周显著增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,阳性药组在 10

周时关节总 AI 积分明显降低,具有显著差异($P<0.01$);中药大剂量组在 6 周~11 周时 AI 分值明显下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);中药小剂量组在 6 周、8 周、9 周、10 周时关节总 AI 积分降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)(表 1)。

2.1.2 大鼠左前肢及左后肢 AI 积分变化:与正常组比较,模型组左前肢 AI 积分 10 周-12 周时明显升高($P<0.05$)。左后肢 AI 积分在 1 周~11 周时升高,有显著性差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较,阳性药组左前肢 AI 积分 10 周-12 周显著降低($P<0.05$);左后肢 AI 积分在 10 周时明显下降($P<0.01$)。中药大剂量组左前肢 AI 积分在 10 周~12 周显著降低($P<0.05$);左后肢 AI 积分 6 周~11 周时下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$);中药小剂量组左后肢 AI 积分 6 周、8 周~11 周时降低($P<0.01$)(表 2,3)。

表 1 各组大鼠关节总 AI 变化($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 1 Changes of arthritis indexes in the rats of all groups ($\bar{x}\pm s$ $n=6$)

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±
Normal group	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
模型组	7.17±	8.33±	8.50±	8.67±	8.50±	5.17±	8.50±	9.33±	9.17±	9.17±	9.33±	9.83±	7.17±
Model group	1.33##	0.82##	0.84##	1.21##	0.84##	4.31#	1.76##	2.07##	2.04##	2.40##	2.07##	3.49#	3.37#
阳性药组	7.67±	7.50±	7.50±	7.50±	8.00±	3.00±	6.33±	4.67±	6.50±	5.67±	3.67±	4.50±	3.67±
Positive group	1.97	2.17	2.67	1.76	1.79	3.35	2.07	2.73	1.98	2.34	1.51**	3.02	1.51
中药大剂量组	7.50±	8.33±	8.33±	7.17±	7.00±	5.00±	3.00±	2.67±	1.00±	1.50±	2.33±	1.67±	1.83±
High-dose group	2.35	1.51	1.97	2.23	1.67	3.29	1.10**	2.07**	1.67**△△	1.98**	0.82**	0.82*	2.23
中药中剂量组	7.00±	9.00±	8.00±	5.67±	6.00±	3.33±	2.67±	3.00±	1.67±	1.83±	2.67±	3.17±	2.00±
Low-dose group	1.67	3.52	4.20	4.08	3.10	5.32	1.63**	3.52	2.25**△	2.23**	2.73*	2.56	3.03

注:与正常组比较,#$P<0.05$,##$P<0.01$;与模型组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$

Note. Compared with the normal group, #$P<0.05$, ##$P<0.01$; Compared with the model group, *$P<0.05$, **$P<0.01$

表 2 各组大鼠左前肢 AI 变化($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 1 Changes of arthritis indexes of the left forelimb of rats in all groups($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±
Normal group	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
模型组	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.67±	0.67±	0.67±	0.50±	0.50±	1.00±	1.33±	1.00±
Model group	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.63	1.63	1.63	0.84	0.84	1.67#	2.07#	1.67#
阳性药组	0.00±	0.00±	0.17±	0.17±	0.33±	0.00±	0.17±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±
Positive group	0.00	0.00	0.41	0.41	0.52	0.00	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00*	0.00*	0.00*
中药大剂量组	0.50±	0.67±	0.83±	0.67±	0.33±	0.17±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±
High-dose group	1.23	1.03	1.33	1.03	0.82	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00*	0.00*	0.00*
中药小剂量组	0.00±	0.67±	0.67±	0.50±	0.33±	0.83±	0.00±	0.00±	0.33±	0.33±	0.33±	0.33±	0.33±
Low-dose group	0.00	1.63	1.63	1.23	0.82	1.33	0.00	0.00	0.82	0.82	0.82	0.82	0.82

注:与正常组比较,#$P<0.05$,##$P<0.01$;与模型组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$

Note. Compared with the normal group, #$P<0.05$, ##$P<0.01$; Compared with the model group, *$P<0.05$, **$P<0.01$

表 3 各组大鼠左后肢 AI 变化($\bar{x}\pm s, n=6$)

Tab. 3 Changes of arthritis indexes of the left hind limb in rats of all groups($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±	0.00±
Normal group	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
模型组	3.17±	4.00±	4.00±	4.00±	4.00±	2.17±	3.83±	4.00±	4.00±	4.00±	4.00±	3.83±	2.83±
Model group	1.33	0.00##	0.00##	0.00##	0.00##	1.72#	0.41##	0.00##	0.00##	0.00##	0.00##	0.41##	0.75
阳性药组	4.00±	3.83±	3.67±	3.50±	3.83±	1.33±	3.33±	2.33±	3.33±	3.00±	2.00±	2.17±	2.00±
Positive group	0.00	0.41	0.52	0.55	0.41	1.75	0.52	1.37	0.82	0.89	0.63**	1.47	0.63
中药大剂量组	3.17±	3.83±	3.83±	3.33±	3.33±	2.33±	1.50±	1.33±	0.50±	0.83±	1.17±	0.83±	0.83±
High-dose group	1.60	0.41	0.41	0.82	0.52	1.51	0.55**△△	1.03*	0.84**△△	0.98**△	0.41**	0.41**	0.75
中药小剂量组	3.50±	3.83±	3.33±	2.33±	2.67±	1.00±	1.33±	1.50±	0.33±	0.50±	1.00±	1.17±	0.67±
Low-dose group	0.84	0.41	0.82	0.82	0.82	1.55	0.82**△	1.76	0.52**△△	0.55**△△	0.63**	0.75**	0.82

注:与正常组比较,#$P<0.05$,##$P<0.01$;与模型组比较,*$P<0.05$,**$P<0.01$

Note: Compared with the normal group, #$P<0.05$, ##$P<0.01$; Compared with the model group, *$P<0.05$, **$P<0.01$

2.1.3 大鼠右前肢及右后肢 AI 积分变化： 与正常组比较,模型组大鼠右前肢 AI 积分在 0 ~ 12 周时无明显统计学意义($P > 0.05$)右后肢 AI 积分在 0 ~ 12 周显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,阳性药组右后肢 AI 评分在 10 周时明显下降($P < 0.05$);中药大剂量组在 6 ~ 12 周时右后肢 AI 积分下降($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);中药小剂量组 6 周、8 ~ 12 周右后肢 AI 积分降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)(表 4,5)。

2.2 中药藤莓汤对 CIA 模型大鼠双后肢肿胀程度的改善

2.2.1 左后肢前后径、左右径变化情况:与正常组比较,模型组大鼠左后肢前后径测量值在 2 周、3 周、6 周、8 周、10 ~ 12 周时明显增加($P < 0.05$);左后肢左右径测量值在 1 ~ 4 周,6 ~ 12 周时显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。与模型组比较,中药大剂量组 12 周时左后肢前后径测量值下降($P < 0.05$);中药小组 12 周时左后肢前后径、左右径测量值降低($P < 0.05$)。见表 6,7。

表 4 各组大鼠右前肢 AI 变化($\bar{x} \pm s$,n = 6)

Tab. 4 Changes of arthritis indexes of the right forelimb in rats of all groups($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组 Normal group(6)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组 Model group(6)	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.82	0.50 ± 0.84	0.67 ± 1.21	0.50 ± 0.84	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.67 ± 1.63	0.67 ± 1.63	0.67 ± 1.63	0.33 ± 0.82	0.67 ± 1.63	0.33 ± 0.82
阳性药组 Positive groupgroup(6)	0.33 ± 0.82	0.50 ± 0.84	0.50 ± 0.84	0.83 ± 0.98	0.50 ± 0.84	0.17 ± 0.41	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
中药大剂量组 High-dose group(6)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.17 ± 0.41	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.82
中药小剂量组 Low-dose group(6)	0.00 ± 0.00	0.67 ± 1.63	0.67 ± 1.63	0.50 ± 1.23	0.33 ± 0.82	0.50 ± 1.23	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.33 ± 0.82	0.33 ± 0.82	0.33 ± 0.82	0.33 ± 0.82	0.33 ± 0.82

注:与正常组比较,$^{\#}P < 0.05$,$^{\#\#}P < 0.01$;与模型组比较,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$

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

表 5 各组大鼠右后肢 AI 变化($\bar{x} \pm s$,n = 6)

Tab. 5 Changes of arthritis indexes of the right hind limb in rats of all groups($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组 Normal group	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型组 Model group	4.00 ± 0.00$^{\#\#}$	4.00 ± 0.00$^{\#\#}$	4.00 ± 0.00$^{\#\#}$	4.00 ± 0.00$^{\#\#}$	4.00 ± 0.00$^{\#\#}$	2.33 ± 1.51$^{\#}$	4.00 ± 0.00$^{\#\#}$	4.00 ± 0.00$^{\#\#}$	4.00 ± 0.00$^{\#\#}$	4.00 ± 0.00$^{\#\#}$	4.00 ± 0.00$^{\#\#}$	4.00 ± 0.00$^{\#\#}$	3.00 ± 0.63$^{\#\#}$
阳性药组 Positive group	3.33 ± 1.63	3.17 ± 1.60	3.17 ± 1.60	3.00 ± 1.55	3.33 ± 1.21	1.50 ± 1.64	2.83 ± 1.47	2.33 ± 1.37	3.00 ± 1.55	2.67 ± 1.51	1.67 ± 1.03*	2.33 ± 1.63	1.67 ± 1.03
中药大剂量组 High-dose group(6)	3.83 ± 0.41	3.83 ± 0.41	3.50 ± 0.55	3.17 ± 0.98	3.33 ± 0.52	2.50 ± 1.64	1.50 ± 0.55**	1.33 ± 1.03*	0.50 ± 0.84**	0.67 ± 1.03**	1.17 ± 0.41**	0.83 ± 0.41**	0.67 ± 0.82**
中药小剂量组 Low-dose group(6)	3.50 ± 0.84	3.83 ± 0.41	3.33 ± 0.82	2.33 ± 0.82	2.67 ± 0.82	1.00 ± 1.55**	1.33 ± 0.82**	1.50 ± 1.76	0.67 ± 0.52**	0.67 ± 0.82**	1.00 ± 0.63**	1.33 ± 0.52**	0.67 ± 0.82**

注:与正常组比较,$^{\#}P < 0.05$,$^{\#\#}P < 0.01$;与模型组比较,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$

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

2.2.2　左后肢足垫厚及跖骨最高点改善情况：与正常组比较，模型组大鼠足垫厚测量值在 3 周、5 周、11 周时升高，有统计学意义（$P<0.01$）；左后肢跖骨最高点测量值在 1～6 周、8～12 周时显著增加（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。与模型组比较，各治疗组间左后肢足垫厚及左后肢跖关节肿胀程度的改善无显著统计学意义（$P>0.05$）。见表 8，9。

表 6　各组大鼠左后肢前后径（mm）变化（$\bar{x}\pm s, n=6$）

Tab. 6　Changes of the anteroposterior diameters of the left hind limbs of rats in all groups（$\bar{x}\pm s, n=6$）

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组 Normal group	7.61±0.63	7.23±0.48	8.00±0.73	8.21±0.45	8.38±0.64	7.47±1.87	8.05±0.65	8.44±0.87	8.55±0.29	7.68±2.36	7.78±0.74	7.94±0.68	7.78±0.78
模型组 Model group	10.87±2.53	11.96±1.23$^{\#\#}$	11.77±1.12$^{\#\#}$	11.75±0.67$^{\#\#}$	9.87±3.72	10.86±1.11	10.63±1.01$^{\#\#}$	9.87±1.11	10.33±0.50$^{\#\#}$	10.60±1.06	10.27±1.00$^{\#}$	10.24±0.88$^{\#\#}$	10.48±0.66$^{\#\#}$
阳性药组 Positive group	12.23±1.22	12.21±0.78	11.51±0.78	11.16±0.73	10.67±0.61	10.76±0.76	10.27±0.90	9.72±0.93	10.28±0.58	9.98±0.58	10.26±0.67	10.31±0.51	10.27±0.68
中药大剂量组 High-dose group	11.91±1.16	12.45±0.70	11.57±0.93	10.74±0.87	10.25±1.21	11.17±0.73	10.22±0.79	10.14±0.67	10.64±0.83	10.35±0.72	10.11±0.44	10.18±0.70	9.71±1.02*
中药小剂量组 Low-dose group	12.50±0.98	11.93±1.00	11.21±1.08	10.56±1.00	9.80±0.90	10.69±0.71	9.73±0.66	9.25±1.48	9.92±0.93	9.72±0.98	9.51±0.99	9.51±0.80	9.02±0.63*

注：与正常组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

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

表 7　各组大鼠左后肢左右径（mm）变化（$\bar{x}\pm s, n=6$）

Tab. 7　Changes of the transverse diameters of the left hind limbs of rats in all groups（$\bar{x}\pm s, n=6$）

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组 Normal group	5.98±0.33	6.60±0.52	6.12±0.44	6.69±0.45	6.51±0.30	6.89±1.02	6.53±0.59	6.51±0.50	6.59±0.46	6.64±0.44	6.49±0.48	6.33±0.35	5.92±1.40
模型组 Model group	8.98±1.89	10.19±1.13$^{\#\#}$	9.70±0.62$^{\#\#}$	9.77±0.68$^{\#\#}$	9.30±0.69$^{\#\#}$	7.95±1.18	8.91±0.58$^{\#\#}$	8.66±0.54$^{\#\#}$	9.34±0.49$^{\#\#}$	8.75±0.58$^{\#\#}$	8.66±0.49$^{\#\#}$	8.95±0.64$^{\#\#}$	8.61±0.70$^{\#\#}$
阳性药组 Positive group	9.51±0.60	9.77±0.61	9.61±0.94	9.14±0.58	9.28±0.49	8.24±1.01	8.28±0.27	8.91±0.46	8.32±0.45	8.28±0.58	8.09±0.48	8.20±0.49	8.10±0.44
中药大剂量组 High-dose group	9.34±1.05	10.05±1.05	9.28±0.52	8.85±0.54	8.32±0.62	8.50±0.33	8.27±0.64	8.66±0.82	8.65±0.55	8.36±0.61	8.38±0.70	8.27±0.66	7.85±0.97
中药小剂量组 Low-dose group	9.75±0.86	10.21±0.64	9.27±0.89	8.59±0.63	8.20±0.77	8.42±1.11	8.21±0.49	8.58±0.92	8.43±0.81	7.62±1.05	7.46±1.03	7.98±0.56	7.87±0.90*

注：与正常组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

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

表 8　各组大鼠左后肢足垫厚（mm）变化（$\bar{x}\pm s, n=6$）

Tab. 8　Changes of the Left hind limb foot pad thicknessin of the rats in all groups（$\bar{x}\pm s, n=6$）

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组 Normal group	3.74±0.39	4.19±0.54	4.28±0.58	3.87±0.29	3.97±0.24	4.23±0.75	3.85±0.41	3.70±0.37	3.63±0.28	3.51±0.30	3.33±0.41	3.43±0.42	3.67±0.99
模型组 Model group	6.33±1.57	5.81±0.85	5.05±0.97	5.64±0.54$^{\#\#}$	6.72±1.59	6.23±1.57$^{\#\#}$	5.64±1.51	5.31±1.17	5.27±1.01	5.37±1.06	5.19±1.19	5.02±1.05$^{\#\#}$	4.56±0.90
阳性药组 Positive group	6.27±0.56	6.42±1.86	5.82±1.69	5.60±1.68	5.56±1.30	5.35±1.60	5.22±0.77	4.72±0.35	5.05±0.90	4.89±0.77	4.66±0.75	4.33±1.23	4.66±0.58
中药大剂量组 High-dose group	6.15±0.49	6.10±0.93	5.92±1.20	5.84±1.15	5.68±1.23	5.54±0.98	5.03±0.36	5.33±0.82	4.87±0.54	4.45±0.65	4.97±0.99	4.66±0.37	4.57±0.80
中药小剂量组 Low-dose group	6.80±0.78	5.98±1.45	6.10±1.67	4.91±0.60	5.25±1.23	5.11±0.87	4.88±0.41	4.70±0.42	5.21±0.33	4.49±0.86	4.58±0.89	4.37±0.80	4.62±0.54

注：与正常组比较，$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$；与模型组比较，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

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

2.2.3 右后肢前后径及左右径变化情况:与正常组比较,模型组大鼠右后肢前后径在 0 ~ 4 周、6 周、8 ~ 12 周时测量值显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);右后肢左右径测量值在 1 ~ 4 周、6 ~ 12 周时增加,有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,各治疗组右后肢肿胀程度改善情况无明显差异($P > 0.05$)。见表 10,11。

表 9 各组大鼠左后肢跖骨最高点(mm)变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 9 Changes of the highest points of left hind limb metatarsal of the rats in all groups($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组 Normal group	5.36 ± 0.38	5.92 ± 0.38	4.94 ± 0.73	5.36 ± 0.51	5.56 ± 0.48	5.64 ± 0.28	5.81 ± 0.52	5.54 ± 0.34	5.67 ± 0.36	5.26 ± 0.55	5.58 ± 0.36	5.46 ± 0.32	5.41 ± 0.47
模型组 Model group	8.76 ± 1.52	9.68 ± 0.88$^{\#\#}$	9.39 ± 0.69$^{\#\#}$	8.61 ± 0.20$^{\#\#}$	8.51 ± 0.56$^{\#\#}$	9.78 ± 1.15$^{\#\#}$	8.42 ± 0.13$^{\#\#}$	7.02 ± 1.35	8.05 ± 0.93$^{\#}$	8.81 ± 0.41$^{\#\#}$	8.37 ± 0.52$^{\#\#}$	8.58 ± 0.58$^{\#\#}$	8.50 ± 0.31$^{\#\#}$
阳性药组 Positive group	9.30 ± 0.51	9.91 ± 0.67	9.05 ± 0.64	8.51 ± 0.44	8.63 ± 0.42	9.19 ± 0.81	8.22 ± 0.42	7.77 ± 0.50	8.00 ± 0.53	8.68 ± 0.95	7.77 ± 0.43	8.09 ± 0.53	7.95 ± 0.41
中药大剂量组 High-dose group	8.94 ± 0.87	9.03 ± 0.82	8.83 ± 0.76	7.87 ± 0.63	8.51 ± 0.51	8.90 ± 0.59	8.43 ± 0.45	8.28 ± 0.77	8.29 ± 0.36	8.20 ± 0.34	8.10 ± 0.46	8.35 ± 0.31	8.10 ± 0.59
中药小剂量组 Low-dose group	9.35 ± 0.58	9.23 ± 0.55	8.47 ± 0.70	8.23 ± 0.88	8.45 ± 0.31	8.89 ± 0.88	8.22 ± 0.33	8.63 ± 0.58	8.00 ± 0.26	8.13 ± 0.35	8.37 ± 0.37	7.78 ± 0.56	7.95 ± 0.61

注:与正常组比较,$^{\#}P < 0.05$,$^{\#\#}P < 0.01$;与模型组比较,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$

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

表 10 各组大鼠右后肢前后径(mm)变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 10 Changes of the anteroposterior diameters of the right hind limbs of the rats in all groups($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组 Normal group	7.64 ± 1.06	6.86 ± 0.34	7.55 ± 0.42	7.81 ± 0.35	7.77 ± 0.45	8.41 ± 1.10	8.35 ± 0.37	7.78 ± 0.55	8.39 ± 0.56	7.80 ± 0.68	7.83 ± 0.70	8.24 ± 0.86	8.04 ± 0.44
模型组 Model group	12.16 ± 1.33$^{\#\#}$	12.45 ± 1.08$^{\#\#}$	11.19 ± 1.17$^{\#\#}$	11.20 ± 0.77$^{\#\#}$	10.89 ± 0.59$^{\#\#}$	10.53 ± 1.27	10.19 ± 0.65$^{\#\#}$	9.42 ± 0.99	10.38 ± 0.58$^{\#\#}$	10.19 ± 1.16$^{\#}$	10.21 ± 0.94$^{\#}$	10.22 ± 0.92$^{\#}$	10.29 ± 0.55$^{\#\#}$
阳性药组 Positive group	11.71 ± 2.01	11.58 ± 2.05	10.40 ± 1.65	10.73 ± 1.52	10.57 ± 1.50	10.38 ± 1.26	10.00 ± 1.16	8.71 ± 0.56	10.12 ± 0.71	10.21 ± 0.96	10.24 ± 0.76	10.05 ± 1.45	10.15 ± 0.61
中药大剂量组 High-dose group	11.73 ± 1.39	11.39 ± 1.55	11.34 ± 0.33	10.74 ± 0.86	10.15 ± 0.60	10.92 ± 0.96	9.93 ± 0.77	9.21 ± 0.45	9.62 ± 0.83	9.72 ± 0.86	9.37 ± 0.63	9.77 ± 0.68	9.53 ± 0.76
中药小剂量组 Low-dose group	12.44 ± 1.14	11.67 ± 0.97	10.66 ± 1.20	10.57 ± 1.15	10.05 ± 0.74	10.94 ± 0.59	9.92 ± 0.72	9.08 ± 0.78	9.48 ± 1.08	9.16 ± 0.83	9.55 ± 0.87	9.79 ± 0.60	9.27 ± 0.68

注:与正常组比较,$^{\#}P < 0.05$,$^{\#\#}P < 0.01$;与模型组比较,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$

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

表 11 各组大鼠右后肢左右径(mm)变化($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 11 Changes of the transverse diameters of the right hind limbs of the rats in all groups($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组 Normal group	6.22 ± 0.55	6.26 ± 0.34	6.07 ± 0.36	6.45 ± 0.76	6.80 ± 0.49	6.99 ± 0.71	6.65 ± 0.55	6.55 ± 0.64	6.61 ± 0.52	6.89 ± 0.58	6.80 ± 0.45	6.73 ± 0.31	6.91 ± 0.36
模型组 Model group	9.10 ± 1.90	10.11 ± 0.72$^{\#\#}$	9.44 ± 0.50$^{\#\#}$	9.48 ± 0.75$^{\#\#}$	9.34 ± 0.80$^{\#\#}$	8.83 ± 0.97	9.07 ± 0.49$^{\#\#}$	8.70 ± 0.73$^{\#\#}$	8.94 ± 0.55$^{\#\#}$	8.92 ± 0.72$^{\#\#}$	8.98 ± 0.55$^{\#\#}$	9.10 ± 0.93$^{\#}$	9.04 ± 0.82$^{\#}$
阳性药组 Positive group	9.22 ± 1.70	9.31 ± 1.84	8.90 ± 1.57	8.94 ± 1.09	8.77 ± 1.20	8.20 ± 1.40	8.24 ± 0.80	8.58 ± 0.80	8.07 ± 1.07	8.40 ± 1.13	8.26 ± 0.97	8.12 ± 0.92	8.31 ± 0.91
中药大剂量组 High-dose group	9.70 ± 0.95	10.08 ± 0.95	9.46 ± 0.38	9.08 ± 0.45	8.72 ± 0.58	8.78 ± 0.95	8.35 ± 0.48	9.26 ± 1.30	8.50 ± 0.54	8.58 ± 0.44	8.26 ± 0.37	8.58 ± 0.39	8.31 ± 0.36
中药小剂量组 Low-dose group	9.97 ± 1.46	10.31 ± 0.54	9.44 ± 0.65	8.64 ± 0.99	8.76 ± 0.83	8.79 ± 1.05	8.66 ± 0.67	8.38 ± 0.78	8.52 ± 0.75	8.32 ± 0.98	8.47 ± 0.57	8.16 ± 0.58	8.04 ± 0.86

注:与正常组比较,$^{\#}P < 0.05$,$^{\#\#}P < 0.01$;与模型组比较,$^{*}P < 0.05$,$^{**}P < 0.01$

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

2.2.4　右后肢足垫厚及跖骨最高点改善情况：与正常组比较，模型组大鼠右后肢足垫厚测量值在 0 周～5 周、8 周、10 周、11 周时明显升高（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；右后肢跖骨最高点测量值在 0 周～6 周、8 周～12 周时显著升高，差异有统计学意义（$P<0.01$）。与模型组比较，各治疗组右后肢肿胀程度改善情况无明显差异（$P>0.05$）。见表 12，13。

2.3　中药藤莓汤对 CIA 模型大鼠关节滑膜 IL-6、TNF-αmRNA 转录及蛋白表达水平的影响

与正常组比较，模型组大鼠关节滑膜 IL-6、TNF-α mRNA 转录及蛋白表达水平显著上调（$P<0.01$）。与模型组比较，阳性药组、中药大、小剂量组 IL-6、TNF-α mRNA 转录及蛋白表达水平显著下调，差异有统计学意义（$P<0.01$）（表 14）。

表 12　各组大鼠右后肢足垫厚（mm）变化（$\bar{x}\pm s, n=6$）

Tab. 12　Changes of the right hind limb foot pad thickness of the rats in all groups（$\bar{x}\pm s, n=6$）

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组 Normal group	4.05±0.26	4.44±0.28	3.96±0.23	3.89±0.22	4.01±0.47	4.31±0.73	3.68±0.33	3.56±0.28	3.47±0.41	3.42±0.26	3.33±0.54	3.33±0.47	3.46±0.25
模型组 Model group	6.51±0.81#	5.91±0.71#	5.50±0.72#	5.28±0.89#	6.83±1.16#	6.36±1.42##	5.30±1.17	4.50±0.95	4.94±0.55##	4.98±1.08	5.04±0.80#	4.72±0.68##	4.49±0.59
阳性药组 Positive group	6.21±0.83	6.22±1.82	5.61±1.72	5.07±1.31	5.40±1.24	6.18±2.14	5.07±1.33	4.67±0.75	4.39±0.86	5.23±1.14	4.99±0.93	4.52±1.31	4.55±1.10
中药大剂量组 High-dose group	6.23±0.68	6.39±1.17	5.27±0.68	5.11±0.97	5.29±0.82	6.08±0.95	4.66±0.48	5.13±0.73	4.73±0.73	4.36±0.44	4.74±0.54	4.45±0.77	4.41±0.63
中药小剂量组 Low-dose group	6.82±1.36	5.91±1.20	5.55±1.36	5.28±1.48	5.33±0.79	5.75±0.95	4.52±0.50	4.86±1.16	4.49±0.95	4.45±0.58	4.43±1.21	4.33±0.65	4.84±0.77

注：与正常组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$；与模型组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$

Note. Compared with the normal group, #$P<0.05$, ##$P<0.01$; Compared with the model group, *$P<0.05$, **$P<0.01$.

表 13　各组大鼠右后肢跖骨最高点（mm）变化（$\bar{x}\pm s, n=6$）

Tab. 13　Changes of the right hind limb metatarsal highest point of the rats in all groups（$\bar{x}\pm s, n=6$）

组别 Groups	0 周	1 周	2 周	3 周	4 周	5 周	6 周	7 周	8 周	9 周	10 周	11 周	12 周
正常组 Normal group	5.72±0.15	5.71±0.24	5.24±0.73	5.22±0.77	5.83±0.22	5.66±0.37	5.72±0.38	5.67±0.43	5.50±0.39	5.62±0.42	5.67±0.44	5.52±0.36	5.62±0.37
模型组 Model group	9.76±0.76##	9.76±0.84##	9.30±0.82##	8.79±0.22##	9.07±0.80##	8.97±0.59##	8.85±0.56##	7.43±1.63	8.23±0.57##	8.66±0.76##	8.25±0.38##	9.06±0.90##	8.46±0.45##
阳性药组 Positive group	9.09±1.35	9.21±1.78	8.70±1.46	8.09±1.45	8.59±1.44	8.42±1.27	7.99±1.19	7.69±0.87	7.39±1.28	7.93±1.15	7.79±0.98	7.84±1.18	7.95±1.21
中药大剂量组 High-dose group	9.08±0.61	9.01±0.53	8.76±0.92	8.48±0.32	8.31±0.61	8.68±0.60	8.11±0.74	7.91±1.02	8.14±0.81	8.26±0.59	8.04±0.54	7.92±0.57	8.08±0.27
中药小剂量组 Low-dose group	9.40±0.83	9.53±0.67	9.05±0.35	8.64±0.57	8.61±0.32	8.42±0.79	7.89±0.51	8.53±0.52	7.99±0.65	8.10±0.51	8.70±0.54	8.25±0.53	8.11±0.69

注：与正常组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$；与模型组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$

Note. Compared with the normal group, #$P<0.05$, ##$P<0.01$; Compared with the model group, *$P<0.05$, **$P<0.01$.

表 14　各组大鼠滑膜组织 IL-6、TNF-αmRNA 转录及蛋白表达水平（$n=6$）

Tab. 14　Levels of mRNA transcription and protein expression of IL-6 and TNF-α in the synovial tissue of the rats in all groups（$n=6$）

组别 Groups	IL-6		TNFα	
	mRNA 转录水平 mRNA transcription levels	蛋白表达水平 Protein expression levels	mRNA 转录水平 mRNA transcription levels	蛋白表达水平 Protein expression levels
正常对照组 Normal group	119.57±13.52	36.110±3.590	107.46±17.01	96.972±15.930
模型对照组 Model group	514.38±22.73 ##	51.948±7.225##	704.33±48.39 ##	380.640±62.273##
阳性药组 Positive group	193.29±22.70 **	38.427±3.300 **	272.68±25.89 **	119.579±9.157 **
中药大剂量组 High-dose group	284.53±21.76 **△△	41.056±3.642 **	353.24±11.60 **△△	80.230±24.073 **
中药小剂量组 Low-dose group	328.16±27.96 **△△	43.184±4.085 **	417.88±20.20 **△△	120.966±110.279 **

注：与正常组比较，#$P<0.05$，##$P<0.01$；与模型组比较，*$P<0.05$，**$P<0.01$；与阳性药组比较，△$P<0.05$，△△$P<0.01$

Note. Compared with the normal group, #$P<0.05$, ##$P<0.01$; Compared with the model group, *$P<0.05$, **$P<0.01$; Compared with the positive drug group, △$P<0.05$, △△$P<0.01$.

2.4 中药藤莓汤对 CIA 模型大鼠右踝关节组织病理的影响

正常组大鼠右踝关节面光滑,软骨细胞排列整齐,关节周围组织未见炎性细胞浸润。模型组大鼠右踝关节软骨滑膜被覆上皮细胞轻度增生,关节腔缩小,周围软组织见轻度纤维增生,轻度炎性细胞浸润,以淋巴细胞为主。藤莓汤大剂量组右踝关节滑膜增生,有少量淋巴细胞浸润,关节软骨纤维化,周围软组织有轻度纤维组织增生,较模型组无明显差异;藤莓汤小剂量组关节周围软组织见少量炎性细胞浸润,关节腔略缩小,软骨、滑膜未见明显病变,关节病变较模型组有所减轻(图 1,见文后彩插 4)。

3 讨论

RA 是一种以慢性、对称性、多滑膜关节炎及关节外病变为主要临床表现的自身免疫性疾病。急性活动期以关节红肿热痛为主,中晚期可见关节肿痛,变形,功能障碍。病理特征为血管翳形成,滑膜组织肥厚,骨及软骨破坏[3]。随着人类对 RA 发病机制深入研究,治疗对策及靶向性药物不断问世。然而,由于本病病因不明,病机复杂,病程漫长,后果严重,而且部分病人因肝肾功能损害或药物过敏,严重影响疗效[4-6]。因此,针对不同病理环节的治疗方法及手段乃是国际风湿免疫学界迫切需要解决的难点。RA 属中医学“痹证”范畴,中医认为本病发生发展与外因风寒湿热不同致病因素的影响,内因机体先天禀赋或后天失调有关,邪正相搏,浊毒瘀闭肢体经络、骨节而致。RA 急性活动期多以湿热瘀毒痹阻,关节红肿热痛为特点[7],当浊毒不化,交阻骨节,病深入络,渐见关节活动不利,肿大变形的中晚期病理特征,而且瘀浊蕴久化热成毒,作为伏邪,诱发急性发作过程,其恶性循环的病理机制导致了本病最终结局。藤莓汤为治疗 RA 经验方,可明显改善 RA 急性期关节晨僵、灼热肿胀、疼痛剧烈等症状,而且对相关炎性指标 ESR、CRP 及免疫指标 RF、CCP 有良好的纠正作用。方中忍冬藤味甘,性寒,为君,蛇莓甘苦,性寒,穿山龙、桑枝性平,味苦,为臣,四药配伍清热解毒,除湿通络。乳香、没药、乌蛇祛瘀止痛,白芥子化痰降浊散结,诸药共用,解热毒、化瘀浊、通经络、止痹痛,切中活动期 RA 的病理机制。为了进一步验证该方的疗效,本实验制备了 RA 动物体内试验的经典模型-CIA 模型,通过上述研究,证明中药藤莓汤能有效改善 CIA 模型大鼠关节滑膜病理损伤,其作用机制可能与其下调介导免疫炎性反应的核心细胞因子高表达相关。关于 RA 发病机制的探索,国际医学领域经过几代人的不懈努力,取得了突破性进展,多项研究围绕在自身抗体和免疫复合物、T 细胞介导的抗原特异性反应,T 细胞独立的细胞因子网络,RA 滑膜的肿瘤样侵蚀性生长行为等方面展开[8]。其共识为入侵或变异的抗原激活体内免疫活性细胞,产生包括 RF 在内的多种多克隆抗体,激活滑膜细胞,释放相关炎性介质,同时激活免疫复合物,激活补体系统而造成关节局部炎症损伤。随着认识的进一步深入,特别是 T 辅助细胞亚群 Th17 的发现,免疫-炎性反应-凋亡异常作为 RA 发病的核心环节被揭示。研究证明,炎性因子在 RA 病理改变中发挥重要作用。其中,NF-κB、TNF-α、IL-6、IL-17 等为介导关节滑膜免疫炎性损伤的核心因素。IL-17A 是 IL-17 家族的原型,也是 Th-17 细胞主要的效应分子,在抗胞外细菌、真菌感染的宿主防御中发挥重要作用。然而,过量的 Th-17 细胞反应或 IL-17 表达则容易导致慢性炎症和自身免疫疾病。IL-17 不仅是 T 细胞源性促炎因子,也是炎症反应的微调因子。已证明[9] RA 患者血清、滑膜、关节滑液中 IL-17 高表达。IL-17 单独或与 IL-1β、TNF-α 联合刺激滑膜细胞、软骨细胞/成骨细胞及单核巨噬细胞分泌多种促炎因子,并与其发挥协同效应,放大靶器官免疫反应及炎症性破坏[10]。而且能诱导滑膜细胞、多形细胞产生金属蛋白酶,抑制软骨基质形成,刺激破骨细胞增生,介导骨质破坏。IL-6 是由 T 淋巴细胞、单核细胞和成纤维细胞产生,在调节免疫应答,促进骨髓造血等方面均有重要作用。IL-6 作为炎性介质对 RA 致病作用主要在于增加 IL-1、TNF-α 效应,是 TNF-α 的某些生物学效应的放大因子。IL-6 具有前炎症功能,促进 RA 产生自身抗体及促进骨吸收的作用,参与 RA 的骨破坏及局部骨侵蚀。IL-6 是第一个被认识的 IL-17 的靶基因,同时作为 Th-17 细胞分化过程中的必须因子正反馈调节 IL-17 的产生及功能[11,12],同时,IL-17 又通过诱导 IL-6 维持 Th-17 细胞数量,以正反馈形式维持一种慢性炎症状态[13]。TNF-α 参与 RA 多种致病机制,TNF-α 诱导内皮细胞表达粘附分子,促进白细胞与血管内皮细胞进行粘附渗透引起局部炎症。通过 NF-κB 途径诱导纤溶酶原激活物、血管内皮生长

因子等,促进滑膜的炎症和血管翳生成及发展,以及浸入滑膜下组织,促进软骨细胞及成纤维细胞分泌地诺前列酮,促进胶原降解及软骨损害[14]。由此可知,炎性因子参与 RA 的发病及病理损伤过程。炎性因子相互作用,相互促进,级联反应形成一个复杂的网络链,持续性、进行性损伤关节滑膜,乃至残损性骨破坏。本实验同时检测了 NF-κB、P53 等相关信号分子(相关文章在发表中),结果与文献报道相符[8,15],证明 CIA 模型成模 12 周内,能更确切的反映出活动期 RA 的病理特征及其机制。可能为丰富 RA 靶向治疗提供有价值的参考。

参考文献:

[1] Baharav E, Mor F, Halpern M, et al. Lactobacillus GG bacteria ameliorate arthritis in Lewis rats [J]. J Nutr, 2004, 134: 1964 -1969.

[2] Holmdahl R, Jansson L, Andersson M, et al. Immunogenetics of type II collagen autoimmunity and susceptibility to collagen arthritis [J]. Immunology. 1988, 65(2): 305 -310.

[3] Ikeda M, Hosoda Y, Hirose S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor isoforms and their receptors Flt-1, KDR, and neuropilin-1 in synovial tissues of rheumatoid arthritis [J]. J Pathol, 2000, 191(4): 426 -33.

[4] 陈小军, 顾立刚, 赵慧, 等. 桂枝芍药知汤对Ⅱ型胶原诱导性关节炎大鼠 IFN-γ 及 IL-4 水平的影响 [J]. 北京中医药大学学报, 2007, 30 (9): 618 -620.

[5] 董宏生, 李春红, 胡荫奇, 等. 中药痹愈汤对类风湿关节炎骨破坏和修复的实验研究 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2009, 15(8): 80 -82.

[6] 庞学丰, 李玉玲, 刘欢, 等. 热痹康汤对胶原诱导性关节炎大鼠血清基质金属蛋白酶-3 的影响 [J]. 风湿病与关节炎, 2013, 2(4): 32 -34.

[7] 姜泉, 曹炜. 475 例类风湿关节炎患者中医临床证候分析研究 [J]. 中医杂志, 2007, 48(3): 253 -255.

[8] 龙欣, 唐福林. 类风湿关节炎临床和基础研究进展 [J]. 武警医学, 2010, 21(3): 185 -188.

[9] 段发兰, 李亚新, 胡筱梅, 等. 活动期类风湿关节炎患者血清及关节液白细胞介素-17 水平变化及与有关实验室指标的关系 [J]. 微循环学杂志, 2011, 21(1): 42 -43, 46.

[10] Weaver CT, Hatton RD, Mangan PR, et al. IL-17 family cytokines and the expanding diversity of effector T cell line ages [J]. Annu Rev Immunol. 2007, 25: 821 -852.

[11] 苗平, 陆梅生, 张冬青. 受体与类风湿关节炎关联性研究新进展 [J]. 免疫学杂志, 2011, 27(4): 355 -360.

[12] Liu X, Leung S, Wang C, Crucial role of interleukin-7 in T helper type 17 survival and expansion in autoimmune disease [J]. Nat Med. 2010,16(2): 191 -197.

[13] 郭小芹, 韩根成, 黎燕. IL-17/IL-17R 信号转导机制及功能的研究进展 [J]. 国际免疫学杂志, 2012, 35 (6): 416 -421.

[14] 王飙, 王立群, 杨建琼. 炎性因子与类风湿性关节炎相关性的研究 [J]. 中国医疗前沿, 2013, 8(17): 33.

[15] 曲世晶, 李小峰, 王彩虹, 等. 甲氨蝶呤联合环磷酰胺对胶原诱导性关节炎大鼠滑膜细胞 p53 表达的研究 [J]. 中华风湿病学杂志, 2009, 13(1): 42 -44.

〔修回日期〕2015-02-03

研究报告

救脑益智方剂水提液对人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞的保护作用

张景燕[1],张静爽[1],曹子青[2],赵志炜[1],张　旭[1],吴燕川[1],王玉兰[1],王　蓉[1]

(1. 首都医科大学宣武医院中心实验室,北京脑重大疾病研究院阿尔茨海默病研究所,
神经变性病教育部重点实验室,北京　100053;2. 北京京师中医医院,北京　100026)

【摘要】　目的　通过观察复方中药救脑益智方剂水提液对人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞生长以及胰岛素信号通路的影响,探讨其对神经细胞保护作用的机制。**方法**　体外培养 SH-SY5Y 细胞,分为对照组(C 组)、救脑益智 1 号方组和 3 号方组,每组药物剂量分别为 0.0625 mg/mL、0.125 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL 和 1 mg/mL,测定各组细胞的噻唑蓝(MTT)代谢率,选定 0.125 mg/mL 进行细胞免疫荧光染色,观察细胞形态和胰岛素受体底物-1(IRS-1)、cAMP 反应元件结合蛋白(CREB)表达的变化。**结果**　与对照组相比,救脑益智组 MTT 代谢率升高($P<0.05$),细胞形态好,表现为细胞胞体饱满、贴壁良好、突起延长,IRS-1 和 CREB 表达增加。**结论**　复方中药救脑益智水提液能促进神经细胞生长,提高神经元胰岛素信号通路相关因子 IRS-1 和 CREB 表达,推测其神经保护作用机制与胰岛素信号通路有关。

【关键词】　阿尔茨海默病;复方中药, 救脑益智方剂;人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y
【中图分类号】R33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0058-03
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.011

Protective effect of the traditional Chinese medicine prescription, Jiu Nao Yi Zhi water extract, on human neuroblastoma SH-SY5Y cell line

ZHANG Jing-yan[1], ZHANG Jing-shuang[1], CAO Zi-qing[2], ZHAO Zhi-wei[1],
ZHANG Xu[1], WU Yan-chuan,[1] WANG Yu-lan[1], WANG Rong[1]
(1. Central Laboratory, Xuanwu Hospital of Capital Medical University, Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education, Center of Alzheimer's Disease, Beijing Institute for Brain Disorders, Beijing 100053, China; 2. Beijing Municipal Chinese Medicine Hospital, Beijing 100026, China)

【Abstract】　Objective　To observe the protective effect of the traditional Chinese medicine prescription, Jiu Nao Yi Zhi water extract, on human neuroblastoma SH-SY5Y cell line, its effect on expression of insulin signal transduction pathway, and to explore the related mechanisms. **Methods**　SH-SY5Y cells cultured in vitro, were divided into control group, Jiu Nao Yi Zhi No. 1 prescription group and No. 3 prescription group. The doses were 0.0625 mg/mL, 0.125 mg/mL, 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL and 1 mg/mL. The thiazolyl blue (MTT) metabolic rate of each group was determined.

[**基金项目**]北京市自然科学基金(7132044);首都卫生发展科研专项项目(2011-1001-02);北京市卫生系统高层次卫生技术人才计划资助项目(2009-3-64)。

[**作者简介**]张景燕,女,主管技师,研究方向:细胞生物学,E-mail: 908436005@qq.com。
[**通讯作者**]王蓉,女,研究员,博士研究生导师,研究方向:神经元退行性变的发生机制和防治策略。E-mail: rong_wang72@aliyun.com。

The dose of 0.125 mg/mL was chosen for cell immunofluorescence analysis, and to observe the expression of insulin receptor substrates-1 (IRS-1), cAMP response element binding protein (CREB), and the factors of insulin signal transduction pathway. **Results** Compared with the control group, MTT metabolic rates of the Jiu Nao Yi Zhi groups were significantly increased ($P<0.05$), and the cell morphology was much better in those groups, cell body more plump, well-adherent and neurite extensions were observed. The expressions of IRS-1 and CREB were higher than that in the control group. **Conclusions** The traditional Chinese medicine prescription Jiu Nao Yi Zhi water extract can protect neurons by promoting nerve cell growth, and improving the expression of IRS-1 and CREB, the factors of insulin signal transduction pathway.

【**Key words**】 Alzheimer's disease; Traditional Chinese medicine prescription, Jiu Nao Yi Zhi; Human neuroblastoma, cell line SH-SY5Y; Neuroprotection

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD,又称老年性痴呆)是以认知功能障碍为主要表现的、渐进性加重的神经系统变性病,临床上 80% 以上的患者属于病因不清、发病机制不明的散发性 AD,由于缺乏有效的早期诊断和治疗措施,AD 已经成为继心脑血管疾病和恶性肿瘤之后威胁人类健康的第四大杀手[1-3]。AD 的发病机制十分复杂,近年来,脑内神经元胰岛素信号通路障碍在 AD 发生发展中的作用越来越引起学者们的关注[4-6]。

救脑益智胶囊的主要成分有生黄芪、党参、白术、龟甲、穿山甲、肉苁蓉等,具有益气养血、滋补肝肾、化痰祛痕、健脑益智功效,在临床上对一些脑萎缩病人有较好的治疗作用[7]。以往研究发现救脑益智胶囊能促进神经元胞体增大和突起延长[8],并能促进 SY5Y 神经母细胞存活信号通路中 Akt/PKB,P-CREB 的表达[9]。本研究拟通过观察救脑益智胶囊的改良配方(1 号方和 3 号方)方剂水提液对人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞生长以及胰岛素信号通路的影响,探讨其对神经细胞保护作用的机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株:人神经母细胞瘤株 SH-SY5Y 细胞来自瑞典卡罗琳斯卡医学院。

1.1.2 药品与试剂:救脑益智水提液由救脑益智胶囊制成(胶囊主要成分包括黄芪、党参、肉苁蓉、龟板、当归、白芍等 20 余味中草药,形态为粉剂,使用前用电子天平称重,然后加蒸馏水煮沸 15 min,离心取出上清液,再向沉淀物中加入蒸馏水煮沸 15 min,离心取上清液,将两次取出的上清液混合,浓度调整为 1 g 生药/3 mL,即若蒸馏 100 g 生药将得到 300 mL 水提液)。MTT(噻唑蓝, 3-[4, 5-dimethylthylthiazol-2-yl]-2,5diphenyltetrazolium broide)系 Sigma 产品。二甲基亚砜(DMSO)系北京亚太精细化工公司产品。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养:使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基,置于 37℃、5% CO_2 培养箱中培养,3 d 换液 1 次,6 d 传代 1 次。

1.2.2 测定 MTT 代谢率:将生长状态良好、传代稳定的 SH-SY5Y 细胞以 1×10^4/mL 的密度接种于 96 孔板(Nunc 产品)中,每孔各加 200 μL,培养 48 h 后分为 3 组:对照组、救脑益智 1 号方组(主要成分包括黄芪、党参、补骨脂等)和 3 号方组(主要成分包括人参、益智仁、鹿角等),进行后续实验。各药物组所加相应药物的浓度分别为 0.0625 mg/mL、0.125 mg/mL、0.25 mg/mL、0.5 mg/mL 和 1 mg/mL,各组培养液体积和接种细胞数相等。继续培养 24 h 后加 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL/孔,于 37℃孵育 4 h 后吸出培养液,再加 DMSO 溶液 200 μL/孔,振摇 10 min 后用全波长酶标仪(Multiskan Spectrum)测定 550 nm 处吸光度值(A)。

1.2.3 细胞免疫荧光染色:将 SH-SY5Y 细胞以 1×10^4/mL 的密度接种于 24 孔板中,每孔各加 1 mL,于培养箱中培养 48 h 后分为以上 3 组进行后续实验,根据 MTT 结果选用 0.125 mg/mL 药物剂量作用细胞 24 h,然后吸弃培养液,用 PBS 漂洗 1 次,加入 4% 多聚甲醛固定 30 min,10% 山羊血清封闭 1 h,加入一抗(IRS-1 抗体、CREB 抗体,1∶100)于 4℃孵育过夜,用 PBS 漂洗后加相应二抗(1∶200)孵育 1 h,PBS 漂洗后于荧光倒置显微镜下观察并采集影像。

1.3 统计学方法

使用 SPSS 17.0 软件进行统计,计量资料采用均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,$P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT 代谢率测定

MTT 检测结果显示,救脑益智 1 号方组和 3 号方组的 SH-SY5Y 细胞 MTT 代谢率升高,线粒体活性增强,与对照组相比,$P < 0.05$,差异有统计学意义(表 1)。

表 1 救脑益智 1 号方组和 3 号方组对 SH-SY5Y 细胞 MTT 代谢率的影响

Tab. 1 Effect of Jiu Nao Yi Zhi No. 1 or No. 3 prescription on the metabolic rate in SH-SY5Y cells

组别	噻唑蓝 MTT	
Groups(mg/mL)▲	救脑益智 1 号方组	救脑益智 3 号方组
对照组 Control	0.517 ± 0.005	0.738 ± 0.025
0.0625 剂量组	0.505 ± 0.008**	0.771 ± 0.012**
0.125 剂量组	0.484 ± 0.006**	0.770 ± 0.014**
0.25 剂量组	0.475 ± 0.005**	0.779 ± 0.015**
0.5 剂量组	0.472 ± 0.006**	0.774 ± 0.016**
1.0 剂量组	0.443 ± 0.007**	0.772 ± 0.014**

$n = 30$ for each group; ** $P < 0.01$ vs. control group.

2.2 细胞免疫荧光染色

从细胞形态上看,救脑益智 1 号方和 3 号方的细胞形态相对好,细胞胞体饱满、贴壁良好、突起延长;另外,与对照组相比,1 号方和 3 号方的细胞中 IRS-1 和 CREB 表达增加。各组 SH-SY5Y 细胞的形态及 CREB、IRS-1 的表达情况分别见图 1、图 2(图 1,2 见文后彩插 5)。

3 讨论

救脑益智胶囊的主要成分有生黄芪、党参、白术、肉苁蓉等,具有益气养血、滋补肝肾、化痰祛痕、健脑益智功效,可用于气血肝肾亏虚、痰瘀阻滞引起的健忘不寐,神情呆滞,眩晕耳鸣,言语蹇涩,肢体痿软,步履艰难等症候者[7]。我们曾经研究发现,救脑益智提取液能促进体外培养的人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)生长,推测其机理可能与其促进神经元信号通路中有关蛋白质的表达有关[9],此后我们一直在研究与之相关的蛋白质及其作用途径。

本研究结果表明,救脑益智水提液能促进 SH-SY5Y 细胞胞体体积的增大和突起的延长,并能提高 MTT 代谢率。MTT 是琥珀酸脱氢酶的作用底物,活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使其还原为不溶于水的蓝紫色结晶甲瓒并沉积在细胞中,而死细胞无此功能。DMSO 溶解细胞中的甲瓒,用全波长酶标仪在 550 nm 波长处测定其光吸收值,可间接反映活细胞数量。MTT 值越大,代表活细胞数目越多。

众所周知,神经元可通过多条途径使自身存活,而 IRS-PI3K/Akt-BAD-CREB 途径即是其主要途径之一,IRS 磷酸化后激活 PI3K/Akt,最终使 CREB 磷酸化,从而使神经元存活。本室以往的研究结果表明救脑益智胶囊水提液能提高使 SH-SY5Y 细胞存活的 PI3K 信号通路中 Akt 和 p-CREB 的表达水平,而 Akt 表达增加可促进 CREB 磷酸化增加,即与本室得出的研究结果 p-CREB 表达增加一致,而 SY5Y 细胞的存活一方面依赖于 p-CREB 表达水平的提高[9]。本研究结果表明,救脑益智方剂水提液也可使 IRS-1、CREB 表达增加,由此可以推断救脑益智方剂水提液中含有某些神经营养成分,而且可以通过影响胰岛素信号通路中蛋白的表达水平,而发挥保护神经细胞并促进其生长的作用。但是体外实验有效不等同于药物在体内也有效,因此仍需进行充分的体内试验。

参考文献:

[1] Kalaria RN, Maestre GE, Arizaga R, et al. Alzheimer's disease and vascular dementia in developing countries: prevalence, management, and risk factors [J]. Lancet Neurol, 2008, 7(9):812 - 826.

[2] Miller G. Epigenetics. A role for epigenetics in cognition [J]. Science, 2010, 329(5987): 27 - 31.

[3] Guo M, Gao L, Zhang G, et al. Prevalence of dementia and mild cognitive impairment in the elderly living in nursing and veteran care homes in Xi'an, China [J]. J Neurosci, 2012, 312(1): 39 - 44.

[4] De Felice FG. Alzheimer's disease and insulin resistance: translating basic science into clinical applications [J]. J Clin Invest, 2013, 123(2): 531 - 539.

[5] Candeias E, Duarte AI, Carvalho C, et al. The impairment of insulin signaling in Alzheimer's disease [J]. IUBMB Life, 2012, 64(12): 951 - 957.

[6] Giuffrida ML, Tomasello F, Caraci F, et al. Beta-amyloid monomer and insulin/IGF-1 signaling in Alzheimer's disease [J]. Mol Neurobiol, 2012, 46(3): 605 - 613.

[7] 曹润敏, 王仁, 曹子青. 救脑益智胶囊治疗脑萎缩临床观察[J]. 北京中医,2000, 5: 61.

[8] 张景燕, 孟艳, 赵志炜, 等. 救脑益智胶囊对人神经母细胞瘤株 SYSY 生长的影响 [J]. 中国中西医结合杂志,2002, 22: 82 - 83.

[9] 孟艳, 张景燕, 王蓉, 等. 救脑益智胶囊水提物对人神经母细胞瘤株 SY5Y 信号转导的影响 [J]. 中国中药杂志, 2003, 28(11): 1076 - 1077.

〔修回日期〕2015-02-10

研究报告

大鼠羊膜细胞体外培养及其干细胞标记物的表达

曲春辉,张　玲,武　杰,巨荣凯,朱　华,黄　澜,徐艳峰,白　琳,秦　川

(北京协和医学院 中国医学科学院医学实验动物研究所病理室,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疾病动物模型三级实验室,北京　100021)

【摘要】 目的　分离并鉴定大鼠羊膜细胞,探索羊膜细胞分化潜能,为干细胞移植治疗探寻新的细胞来源。**方法**　机械分离羊膜组织并采用 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶消化,应用高糖-DMEM 培养基(添加 10 μg/L 人表皮生长因子)培养,采用流式细胞术检测间充质干细胞表面标志物,通过细胞免疫荧光染色检测神经干细胞表面标记物。**结果**　大鼠羊膜组织可分离并培养,细胞呈梭型,贴壁生长,短期内可以稳定增殖。细胞表达干细胞表面标记物八聚体结合转录因子 4(octamer-binding transcription factor,Oct-4)和性别决定区 Y 框蛋白(sex determining region Y box 2,Sox-2),间充质干细胞表面标志物 vimentin,胚胎干细胞标记物阶段特异性胚胎表面标记物(stage specific embryonic antigen-4,SSEA-4),并表达神经干细胞表面标志物 nestin,可表达脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor,BDNF)和神经生长因子(nerve growth factor,NGF)。**结论**　大鼠羊膜细胞可表达间充质干细胞和神经干细胞标记物,并有神经营养因子表达,为大鼠羊膜细胞的研究和应用提供实验依据。

【关键词】 羊膜细胞;体外培养;间充质干细胞标志物;神经干细胞标志物;神经生长因子;大鼠
【中图分类号】R33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0061-05
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.012

Isolation, culture and identification of rat amniotic cells in vitro and their expression of stem cell markers

QU Chun-hui, ZHANG Ling, WU Jie, JU Rong-kai, ZHU Hua,
HUANG Lan, XU Yang-feng, BAI Lin, QIN Chuan
(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); 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 Model, State Administration of
Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective　To isolate and identify the rat amniotic cells and to explore their stem cell characteristics, so as to find a new cell source for stem cell transplantation. **Methods**　Rat amnion tissue was mechanically separated from 18-18.5-day old SPF pregnant rats and 0.25% trysin-EDTA digestion was used to obtain amniotic cells. The isolated cells were cultured with DMEM D-glucose added with 10 μg/L EGF. Flow cytometry was used to detect the mesenchyme stem cellsurface markers. Neural stem cell surface markers of the rat amniotic cells were detected using immunofluorescence staining. **Results**　The rat amniotic membrane tissue was separated and mesenchymal stem cells were cultured successfully. The cells were ameboid-shaped and showed adherent growth, and can stably proliferate in short term. After

[**基金项目**]国家高技术研究发展计划(863 计划)课题实施方案 SS2012AA022613。
[**作者简介**]曲春辉, 女, 硕士研究生, E-mail: quchunhui626@163.com。
[**通讯作者**]秦川, 教授, 博士生导师, E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn。

culture, the cells expressed stem cell markers e. g. Oct-4 and Sox-2, mesenchymal stem cell markers e. g. vimentin, embryonic stem cell markers e. g. SSEA-4, neural stem cell marker e. g. nestin, and could also express neurotrophic factors, such as BDNF and NGF. **Conclusions** Rat amniotic cells express mesenchymal stem cells markers, neural stem cell markers and neurotrophic factors, therefore, provide an experiment basis for further research and application of rat amniotic cells in stem cell transplantation.

【Key words】 Amniotic cells; Culture in vitro; Mesenchymal stem cells, marker; Neural stem cell, marker; Neutrophic factor; Rat

羊膜位于胎盘绒毛膜内侧,是一层无血管、神经、淋巴和肌肉的透明薄膜,可起到对胎儿的保护作用,与发育中的胎儿联系紧密。人源羊膜细胞在受精后第 8 天开始形成,具有多项分化的潜能,可向三个胚层细胞进行分化,近年来研究表明,羊膜上皮细胞能够分化为成熟的神经细胞,并合成释放多巴胺、乙酰胆碱、去甲肾上腺素等神经递质[1]。人羊膜细胞具有低免疫原性和有效的免疫抑制力,细胞移植后不会发生急性排斥反应[2]。本实验从大鼠羊膜分离获取羊膜细胞,建立稳定培养的条件,并对其生物学特性进行了探讨,为其将来在细胞移植治疗方面的应用提供实验依据。

1 材料和方法:

1.1 材料

1.1.1 主要仪器:CO_2 培养箱、净化工作台、倒置显微镜、倒置荧光显微镜、共聚焦荧光显微镜、流式细胞仪。

1.1.2 主要试剂:DMEM 高糖培养基(Dulbecco's modified Eagle's medium,DMEM)、人表皮生长因子(EGF)、0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶(0.25% trysin-EDTA)、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、抗生素(penicillin, streptomycin)、PBS 缓冲液购自于 Gibco 公司。Oct-4、Sox-2、SSEA-4、nestin、vimentin、BDNF、NGF、CD90 购自与 Abcam 公司。CD29、CD44 购自于 eBioscience 公司、CD45、CD11b 购自于 BD 公司。

1.1.3 实验动物:SPF 级孕 18 ~ 18.5 d 的 SD 大鼠,购自中国军科院实验动物中心,许可证号:[SCXK-(军)2014-0004],实验动物使用批准号:ILAS-PL-2014-001。在无菌条件下进行实验操作分离羊膜组织。

1.2 方法

1.2.1 羊膜细胞分离及培养:SD 孕鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(0.01 mL/g),麻醉后,无菌条件下开腹,机械性分离子宫层,剥离胎盘,分离羊膜组织置于含有 500 U/mL 双抗的 PBS 溶液中冲洗。将羊膜组织放置在含有 500 U/mL 双抗的 DMEM 基础培养基中,无菌眼科剪将其剪至 1 mm^3 左右的小块。将组织悬液移至 50 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。加入 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶 10 mL,37℃,5% CO_2 条件下消化 20 ~ 30 min。用含有 10% 胎牛血清的完全培养基终止消化。200 目不锈钢滤网过滤单细胞悬液,接种至 25 cm^2 培养瓶,含 10% FBS、10 μg/LEGF 和 500 U/mL 双抗的 DMEM 完全培养基培养,隔天细胞换液,2 ~ 3 d 后细胞长满培养瓶 85% ~90% 时,进行细胞传代。

1.2.2 流式细胞术检测:取培养 2 ~ 4 代细胞,用 0.25% 含 EDTA 的胰蛋白酶消化,含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基终止消化。细胞计数将其稀释成 1 × 10^6 个,每个流式管 1 mL 细胞悬液。每流式管加 2 mL PBS 使细胞混匀,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。重复加 2 mL PBS 重悬细胞,2 000 r/min 离心 5 min,弃上清液。每管加 50 μL PBS 重悬细胞,加抗体 CD29-PE-Cy7、CD44-PE、CD90-FITC、CD45-PE-CY7、CD11b-APC,避光室温孵育 30 min。每管加 2 mL PBS 重悬细胞 2000 r/min 离心 5 min,弃上清液。各管加 300 μL PBS 重悬细胞上机检测。

1.2.3 免疫荧光细胞染色:取 2 ~ 4 代细胞,0.25% 含 EDTA 胰蛋白酶消化,含 10% FBS 的 DMEM 完全培养基终止消化。加入完全培养基重悬,至 24 孔板中培养。待细胞增殖至 70% 作用时,PBS 冲洗,4% 多聚甲醛(预冷)固定 10 min。PBS 冲洗 2 次,每次 5 mim。1% Tuiton-100 × 孵育 10 min。PBS 冲洗 2 次,每次 5 mim。山羊血清工作液每孔 100 μL 室温下封闭 30 min。吸去山羊血清工作液,抗体稀释液稀释抗体 Oct-4(1∶200)、Sox-2(1∶200)、SSEA-4(1∶200)、nestin(1∶100)、vimentin(1∶100),每孔 100 μL,4℃过夜孵育。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。避光条件下,PBS 稀释 FITC 标记的羊抗鼠二抗(1∶200),37℃避光孵育 30 min。PBS 冲洗 3 次,每次 5 min。DAPI 封片剂封片。共聚焦荧光显微镜观察。

1.3　统计学方法

实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，使用 SPSS 15.0 统计软件进行统计处理，对其进行单因素方差分析和 LSD 检验，$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　分离细胞培养

分离培养大鼠羊膜细胞，镜下，细胞呈变形虫样生长（图 1a），生长速度快（图 1b），需隔天换液传代。本实验中大鼠羊膜细胞可传至 6～7 代。

2.2　流式细胞术鉴定细胞表面抗原结果

经流式细胞术鉴定大鼠羊膜细胞间充质细胞表面标记物 CD29、CD44 分别为 97.6% 和 95.8%。细胞表面抗原 CD90、CD45 几乎不表达，CD11b 有少量表达（图 2 见文后彩插 6）。

2.3　细胞免疫荧光鉴定细胞表面标记物结果

本实验通过细胞免疫荧光方法检测大鼠羊膜细胞表达干细胞标记物 Oct-4 和 Sox-2（如图 3），神经干细胞标记物 nestin 和间充质干细胞标记物 vimentin（如图 4），（图 3～4 见文后彩插 7）并表达胚胎干细胞标记物 SSEA-4（如图 5）。可表达神经营养因子 BDNF 和 NGF（如图 6）（图 5～6 见文后彩插 8）。

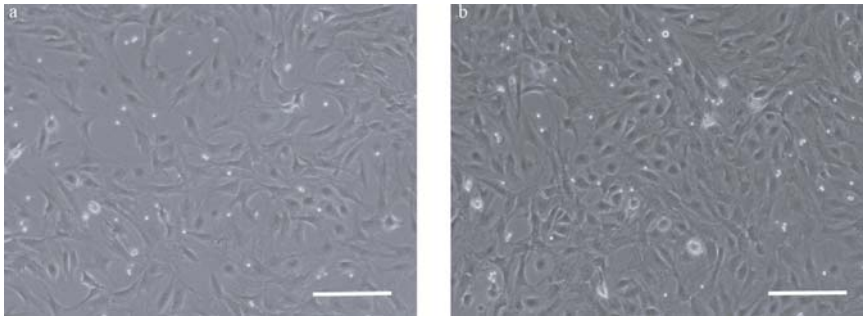
3　讨论

通过细胞免疫荧光实验发现大鼠羊膜细胞表达干细胞表面标记物 Oct-4 和 Sox-2，间充质细胞标记物 vimentin 和神经细胞标记物 nestin，表达 SSEA-4。可表达神经营养因子标记物 BDNF 和 NGF，这些神经营养因子是神经元生长与存活所必需的蛋白质分子[3]。羊膜细胞表达间充质干细胞标记物 CD29 和 CD44，其表达量均在 95% 以上，CD45、CD90 几乎不表达，CD11-b 有少量表达。

Oct-4 可参与胚胎干细胞的自我更新[4, 5]，调节胚胎干细胞的多分化潜能[6]。有研究指出 Oct-4 在羊膜细胞核内及细胞质均可表达[7]。Miki 等人研究结果表明人羊膜上皮细胞和间充质细胞都可表达 Sox-2、Oct-4 等干细胞标志物[1]。本实验结果显示在大鼠羊膜细胞中 Oct-4 在胞核和胞质中均有表达。

Nestin 被认为是在胚胎和成体组织中的多能性神经干细胞的标记物[8-10]。在有丝分裂活跃的中枢神经系统和周围神经系统细胞中表达，现作为神经干细胞的标记物被广泛应用[11]。人羊膜来源的间充质干细胞经体外诱导分化，可分化为神经样细胞并表达 nestin、Oct-4 和 Sox-2 [12]。Vimentin 起到维持细胞形态，胞质完整性和稳定细胞骨架的作用。有研究发现在妊娠 15 d 的大鼠胚胎中检测有 nestin 和 vimentin 的表达，人羊膜细胞未分化的前体细胞中也存在 nestin、vimentin 表达[13, 14]。有研究发现大鼠羊膜细胞和人羊膜细胞中都表达 nestin 和 vimentin 因子[15-19]。SSEA-4 被认为是特异性人胚胎干细胞和卵泡期胚胎早期卵裂的标记物，也被视为成体间充质干细胞的标记物[20]。Ilancheran 等与他的同事 MIKI 等分别通过实验证明了人羊膜上皮细胞表达胚胎干细胞表面标记物 SSEA-4[1, 21]。本实验通过细胞免疫荧光方法检测出大鼠羊膜细胞表达 nestin、vimentin 和 SSEA-4。

NGF 和 BDNF 都是神经营养因子家族中成员。NGF 同时也是一种信号分子[22]，缺乏 NGF 对神经元的营养作用，神经元会出现凋亡[23]。BDNF 可促进神经元的存活并能支持神经元和突触的生长和



注：（a）培养大鼠羊膜细胞第 2 天，（b）培养大鼠羊膜细胞第 3 天

图 1　分离并培养大鼠羊膜细胞，细胞呈变形虫样生长（标尺 = 100 μm）。

Note. (a) Rat amniotic cells cultured for 2 days, (b) Rat amniotic cells cultured for 3 days.

Fig. 1　Ameboid-shaped rat amniotic cells can be seen at 2 days (a) and 3 days (b) after isolation and culture. (Scale bar = 100 μm)

分化[3]。BDNF 可减少突触丧失、矫正部分异常基因表达、阻止神经元萎缩且改善与年龄相关的认知障碍,提高学习记忆能力[24, 25]。研究人员发现人羊膜上皮细胞和人羊膜间充质细胞可合成释放神经营养因子 BDNF、NGF 和 NT-3,其他的神经营养因子通过细胞培养后检测没有表达[2, 12, 26, 27]。多个实验证实通过移植人羊膜细胞到损伤部位能修复受损伤的神经元,BDNF 的表达水平同时增加[28-30],说明人羊膜细胞很可能通过释放 BDNF 来修复损伤神经元的功能。本实验中通过细胞免疫荧光方法也发现大鼠羊膜细胞表达神经营养因子 BDNF 和 NGF。

人羊膜间充质细胞可表达间充质细胞标记物 CD29、CD44、CD73、CD90、CD166 和 CD105,不表达骨髓造血标记物 CD34 和 CD45、单核细胞标记物 CD114 和巨噬细胞标记物 CD11b[1, 31, 32]。Murphy 等在研究人羊膜上皮细胞特点时发现,人羊膜上皮细胞表达上皮粘附分子 EpCAM,几乎不表达 CD90 和 CD105[33]。而人羊膜间充质细胞表达 CD90、CD73 和 CD105,其表达量都在 95% 以上,CD45、CD34 表达量少于 2%[34]。Bailo 等发现人羊膜细胞表达 CD105、CD73、CD90 和 CD29,不表达 CD34、CD45、CD14 和 CD3[18]。本实验中通过流式细胞术方法检测到大鼠羊膜细胞表达 CD29 和 CD44,不表达 CD90、CD45,少量表达 CD11b。

羊膜细胞易于分离培养,细胞生长速度快,免疫原性低,并有向三个胚层分化的潜能,在相关疾病的治疗中具有很好的前景。本实验较为系统地检测了大鼠羊膜细胞的四类干细胞标记物,发现大鼠羊膜细胞可表达干细胞表面标记物 Oct-4 和 Sox-2、胚胎干细胞标记物 SSEA-4、间充质干细胞标记物 vimentin 和神经干细胞标记物 nestin,并同时还表达神经生长因子 BDNF 和 NGF。由此,我们推测大鼠羊膜细胞很可能具有某些间充质干细胞和神经干细胞的特性,为相关基础研究和神经系统疾病的治疗提供了一些线索。

参考文献:

[1] Miki T, Lehmann T, Cai H, et al. Stem cell characteristics of amniotic epithelial cells [J]. Stem Cells, 2005, 23(10): 1549-1559.

[2] Fairbairn NG, Randolph MA, Redmond RW. The clinical applications of human amnion in plastic surgery [J]. J Plast Reconstr Aesthet Surg, 2014, 67(5): 662-675.

[3] Huang EJ, Reichardt LF. Neurotrophins: roles in neuronal development and function [J]. Annu Rev Neurosci, 2001, 24: 677-736.

[4] Takeda J, S Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues [J]. Nucleic Acids Res, 1992, 20(17): 4613-4620.

[5] Boyer LA, Lee TI, Cole MF, et al. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells [J]. Cell, 2005, 122(6): 947-956.

[6] Pesce M, Scholer HR. Oct-4: gatekeeper in the beginnings of mammalian development [J]. Stem Cells, 2001, 19(4): 271-278.

[7] Miki T. Amnion-derived stem cells: in quest of clinical applications [J]. Stem Cell Res Ther, 2011, 2(3): 25.

[8] Kim JS, Kim J, Kim Y, et al. Differential patterns of nestin and glial fibrillary acidic protein expression in mouse hippocampus during postnatal development [J]. J Vet Sci, 2011, 12(1): 1-6.

[9] Messam CA, Hou J, Berman JW, et al. Analysis of the temporal expression of nestin in human fetal brain derived neuronal and glial progenitor cells [J]. Brain Res Dev Brain Res, 2002, 134(1-2): 87-92.

[10] Wong A, Ghassemi E, Yellowley CE. Nestin expression in mesenchymal stromal cells: regulation by hypoxia and osteogenesis [J]. BMC Vet Res, 2014, 10(1): 173.

[11] Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation [J]. Histol Histopathol, 2005, 20(2): 665-671.

[12] Yan ZJ, Zhang P, Hu YQ, et al. Neural stem-like cells derived from human amnion tissue are effective in treating traumatic brain injury in rat [J]. Neurochem Res, 2013, 38(5): 1022-1033.

[13] Shinya M, Komuro H, Saihara R, et al. Neural differentiation potential of rat amniotic epithelial cells [J]. Fetal Pediatr Pathol, 2010, 29(3): 133-143.

[14] Sakuragawa N, Thangavel R, Mizuguchi M, et al. Expression of markers for both neuronal and glial cells in human amniotic epithelial cells [J]. Neurosci Lett, 1996, 209(1): 9-12.

[15] Marcus AJ, Coyne TM, Rauch J, et al. Isolation, characterization, and differentiation of stem cells derived from the rat amniotic membrane [J]. Differentiation, 2008, 76(2): 130-144.

[16] Marcus AJ, Coyne TM, Black IB, et al. Fate of amnion-derived stem cells transplanted to the fetal rat brain: migration, survival and differentiation [J]. J Cell Mol Med, 2008, 12(4): 1256-1264.

[17] Mamede AC, Carvalho MJ, Abrantes AM, et al. Amniotic membrane: from structure and functions to clinical applications [J]. Cell Tissue Res, 2012, 349(2): 447-458.

[18] Bailo M, Soncini M, Vertua E, et al. Engraftment potential of human amnion and chorion cells derived from term placenta [J]. Transplantation, 2004, 78(10): 1439-1448.

[19] 陈宥艺, 陆琰, 王科, 等. 羊膜上皮细胞体外培养条件的优化及其干细胞标志的表达 [J]. 中国实验血液学杂志, 2011, 19(2): 464 - 468.

[20] Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, et al. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow [J]. Blood, 2007, 109(4): 1743 - 1751.

[21] Ilancheran S, Michalska A, Peh G, et al. Stem cells derived from human fetal membranes display multilineage differentiation potential [J]. Biol Reprod, 2007, 77(3): 577 - 588.

[22] Fiore M, Chaldakov GN, Aloe L. Nerve growth factor as a signaling molecule for nerve cells and also for the neuroendocrine-immune systems [J]. Rev Neurosci, 2009, 20(2): 133 - 145.

[23] Freeman RS, Burch RL, Crowder RJ, et al. NGF deprivation-induced gene expression: after ten years, where do we stand? [J] Prog Brain Res, 2004, 146: 111 - 126.

[24] Yamada K, Nabeshima T. Brain-derived neurotrophic factor/TrkB signaling in memory processes [J]. J Pharmacol Sci, 2003, 91(4): 267 - 270.

[25] Nagahara AH, Merrill DA, Coppola G, et al. Neuroprotective effects of brain-derived neurotrophic factor in rodent and primate models of Alzheimer's disease [J]. Nat Med, 2009, 15(3): 331 - 337.

[26] Uchida S, Inanaga Y, Kobayashi M, et al. Neurotrophic function of conditioned medium from human amniotic epithelial cells [J]. J Neurosci Res, 2000, 62(4): 585 - 590.

[27] Castillo-Melendez M, Yawno T, Jenkin G, et al. Stem cell therapy to protect and repair the developing brain: a review of mechanisms of action of cord blood and amnion epithelial derived cells [J]. Front Neurosci, 2013, 7: 194.

[28] Wu ZY, Hui GZ, Lu Y, et al. Transplantation of human amniotic epithelial cells improves hindlimb function in rats with spinal cord injury [J]. Chin Med J (Engl), 2006, 119(24): 2101 - 2107.

[29] Uchida S, Suzuki Y, Araie M, et al. Factors secreted by human amniotic epithelial cells promote the survival of rat retinal ganglion cells [J]. Neurosci Lett, 2003, 341(1): 1 - 4.

[30] Xue SR, Chen CF, Dong WL, et al. Intracerebroventricular transplantation of human amniotic epithelial cells ameliorates spatial memory deficit in the doubly transgenic mice coexpressing APPswe and PS1DeltaE9-deleted genes [J]. Chin Med J (Engl), 2011, 124(17): 2642 - 2648.

[31] Diaz-Prado S, Muinos-Lopez E, Hermida-Gomez T, et al. Human amniotic membrane as an alternative source of stem cells for regenerative medicine [J]. Differentiation, 2011, 81(3): 162 - 171.

[32] 方宁, 宋秀军, 张路, 等. 人羊膜上皮细胞的分离培养及鉴定 [J]. 遵义医学院学报, 2009, 32(2): 121 - 124.

[33] Murphy S, Rosli S, Acharya R, et al. Amnion epithelial cell isolation and characterization for clinical use [J]. Curr Protoc Stem Cell Biol, 2010, Chapter 1: Unit 1E 6.

[34] Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, et al. Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells [J]. Stem Cells, 2008, 26(2): 300 - 311.

〔修回日期〕2015-02-02

技术方法

食蟹猴脐带间充质干细胞的分离与鉴定

庞荣清[1],何　洁[1],李瑞生[2],赵　晶[1],朱　慧[1,3],朱向情[1],阮光萍[1],潘兴华[1]

(1. 成都军区昆明总医院云南省干细胞工程实验室,昆明　650032;
2. 解放军第 302 医院实验技术研究保障中心,北京　100039;
3. 昆明医科大学昆明总医院临床学院,昆明　650031)

【摘要】 目的　建立食蟹猴脐带间充质干细胞的分离培养方法。**方法**　新鲜食蟹猴脐带剪碎为糊状,用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液培养,观察细胞形态特征,流式细胞技术分析细胞抗原标志的表达,并检测其体外多向分化潜能。**结果**　运用组织贴块法可以从新鲜脐带中分离到贴壁生长、阳性表达 CD29、CD44、CD90 的成纤维细胞样细胞。这些细胞在体外诱导培养后可分别检测到脂滴、骨和软骨细胞。**结论**　运用组织贴块培养法可用含 10% 胎牛血清的 DMEM/F12 培养液从食蟹猴脐带中分离到间充质干细胞。

【关键词】 脐带间充质干细胞;食蟹猴;培养方法
【中图分类号】R33　**【文献标识码】**A　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0066-04
doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 004. 013

Isolation and identification of cynomolgus monkey umbilical cord mesenchymal stem cells

PANG Rong-qing[1], HE Jie[1], LI Rui-sheng[2], ZHAO Jing[1], ZHU Hui[1,3],
ZHU Xiang-qing[1], RUAN Guang-ping[1], PAN Xing-hua[1]

(1. Stem Cell Engineering Laboratory of Yunnan Province, Kunming General Hospital of PLA Chengdu Military Command, Kunming 650032, China; 2. Experimental Research Support Center, 302 Hospital of PLA, Beijing 100039;
3. Clinical Institute of Kunming Medical University, Kunming 650031)

【Abstract】 Objective　To establish a method for isolation of cynomolgus monkey umbilical cord mesenchymal stem cells. **Methods**　Fresh cynomolgus monkey umbilical cord was directly minced into pasty fine pieces, and the pieces were cultured in tissue flask with DMEM/F12 medium supplemented with 10% fetal bovine serum. The morphological characteristics of the resulting cells were examined, and their expression of mesenchymal cell surface markers were analyzed by flow cytometry. The multidifferentiation potential was examined in vitro, too. **Results**　The fibroblast-like cells were successfully isolated from the fresh umbilical cord by an adherent culture procedure. These adherent cells expressed mesenchymal markers including CD29, CD44, and CD90, and also could be induced to differentiate into adipocytes, osteoblasts and chondrocytes. **Conclusion**　Mesenchymal stem cells can be isolated from fresh cynomolgus monkey umbilical cord by using an adherent culture procedure.

【Key words】 Umbilical cord; Mesenchymal stem cells; Cynomolgus monkey; Cell culture

---

[**基金项目**]云南省自然基金项目(2011HB050,2013DA004)。

[**作者简介**]庞荣清(1971 -),男,E-mail: pangrq2000@ aliyun. com。
[**通讯作者**]李瑞生(1969 -),男,博士,副研究员,E-mail: lrsheng@ sohu. com; 潘兴华(1963 -),男,博士,主任医师,E-mail: xinghuapang@ aliyun. com。

脐带间充质干细胞是目前研究最多的种子细胞之一,在再生医学和组织工程研究方面具有广阔的应用前景[1]。食蟹猴是医学研究常用的非人灵长类实验动物[2],虽然国内已建立了食蟹猴骨髓间充质干细胞(cynomolgus monkey bone marrow mesenchymal stem cells, cBMMSC)的分离培养方法[3],推动了食蟹猴在再生医学研究中的广泛应用[4],但骨髓采集数量较少,短期内很难大量扩增 cBMMSC,且 cBMMSC 活性容易受到供体年龄的限制[3,5]。目前尚未见食蟹猴脐带间充质干细胞(cynomolgus monkey umbilical cord mesenchymal stem cells, cUCMSC)分离培养的报道,因此本实验室在前期工作[6]的基础上,试图建立 cUCMSC 的分离培养方法,以满足以食蟹猴为实验动物大规模开展再生医学和组织工程研究的需要。

1 材料和方法

1.1 主要试剂和设备

DMEM/F12 培养液、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)和 trypsin-EDTA 均购自 Invitrogen 公司;FITC 标记的抗猴流式单抗 CD29、CD34、CD44、CD90 购自 NeoMarkers 公司;成脂、成骨、成软骨诱导分化试剂盒购自 Invitrogen 公司;显微镜为 Nikon 公司产品,流式细胞仪为 BD 公司产品。

1.2 细胞培养

手术环境条件下,剖宫产取足月食蟹猴胎猴脐带,送至无菌实验条件下参照我们建立的方法[6]分离培养 cUCMSC。即用双抗液冲洗脐带,然后将其在离心管内剪碎为糊状,加入少许含有 10% FBS 的 DMEM/F12 并转移至培养瓶中,于 5% CO_2、37℃的条件下静置培养,适时换液。观察细胞生长特性及形态特征。待细胞生长至融合状态时,用 trypsin-EDTA 消化传代细胞。

1.3 流式细胞分析

参照我们建立的方法[6]收集生长良好的第三代细胞,加入流式抗体 CD29、CD34、CD44、CD90 室温条件下避光孵育 30 min,漂洗弃除未结合抗体后,用流式细胞仪检测抗原标志的表达。

1.4 细胞分化潜能的鉴定

参照本实验室的实验数据,依据试剂盒说明书推荐的方法和实验浓度进行,即收集生长良好的第三代细胞完成体外诱导实验[6]。成脂分化:接种细胞(4×10^4/孔)于 12 孔板中培养 6 h 后,更换培养液为成脂诱导分化培养液,3 至 4 天换液 1 次,连续培养 14 d 后,4% 多聚甲醛固定后加入油红 O 染色;成骨分化:按照上述成脂分化培养细胞,成骨诱导分化培养 21 天后,固定并加入茜素红染色;成软骨分化:收集细胞并调整细胞密度为 1.6×10^7/mL,每孔加 5 μL 到 12 孔板的中心,形成一个细胞滴,2 h 后再缓慢加入成软骨诱导分化培养液,2 至 3 天换液一次,随着培养细胞会形成一个细胞团漂浮起来,连续培养 14 d 后,4% 多聚甲醛固定后石蜡包埋作病理切片,脱蜡后加入阿新蓝染色。

2 结果

2.1 UCMSC 的形态特征

从健康足月的剖宫产胎猴,可以一次获得约 5 cm 长的脐带,将其剪碎后采用贴壁培养的方法,在少许含 10% FBS 的 DMEM/F12 培养液中静置培养 5 d,即可在倒置相差显微镜下观察到少数梭形贴壁生长的细胞,或见到组织块周围长出的贴壁生长细胞。这些细胞传代后可快速密集排列呈漩涡状生长,显示与 cBMMSC 类似的生长特征(图 1,见彩插),初步判断这些贴壁生长的成纤维细胞样细胞就是 cUCMSC。

2.2 细胞免疫表型分析

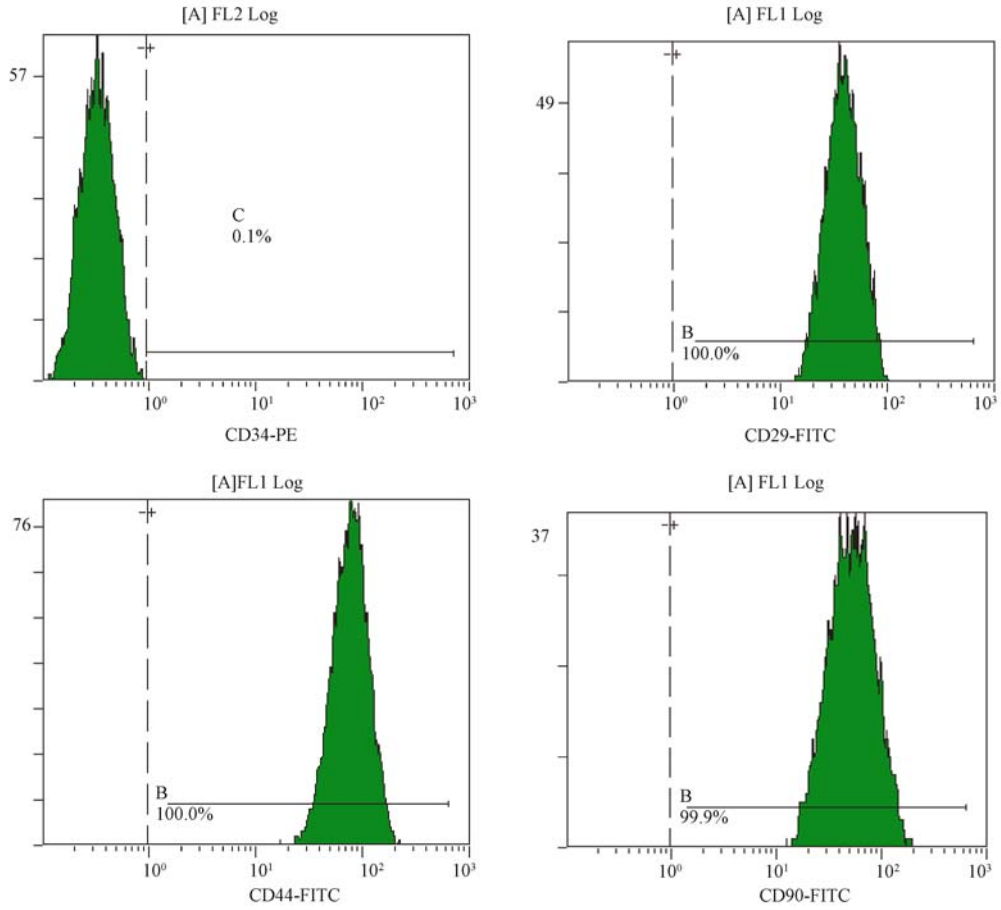
生长良好的第三代细胞经流式细胞仪检测,结果显示 cUCMSC 表达间充质细胞特异性抗原标志而不表达造血干细胞特异性标志。造血干细胞阳性标记 CD34 为阴性(图 2A),而 CD29, CD90, CD44 均阳性表达,阳性率均在 95% 以上(图 2B、2C、2D)。

2.3 分化潜能鉴定

体外诱导分化实验显示:第三代细胞经成软骨分化诱导培养 14 d 后,固定并行病理切片检测,可观察到大量氨基葡聚糖被阿新兰染成蓝色(图 3A, A1),即成软骨分化阳性。同样,成脂分化诱导培养 14 d 后,可观察到大量脂滴的出现,油红 O 染色后,可见脂滴被染成红色(图 3B, B1),即成脂分化阳性;成骨分化诱导培养 21 d 后,可观察到白色结节,茜素红染色后,可见钙质结节被染成红色(图 3C, C1),即成骨分化阳性(图 3 见封三)。

3 讨论

猴与人类基因组相似程度高达 95%,是开展人类临床前研究的珍贵实验动物。食蟹猴具有体型



注:A. CD34 阴性表达; B. CD29 阳性表达; C. CD44 阳性表达; D. CD90 阳性表达.

图 2 cUCMSC 的免疫表型分析

Note: A. Negative expression of CD34; B. Positive expression of CD29; C. Positive expression of CD44; D. Positive expression of CD90.

Fig. 2 Immunophenotype analysis of the cUCMSC

小,饲养成本低,性情温顺,便于实验操作等优点,近年来被越来越多地用于药物安全性评价等生物医学实验研究[2]。随着干细胞应用基础研究不断取得进展,迫切需要使用非人灵长类实验动物广泛开展干细胞临床应用安全性评价实验研究。脐带是连接胎儿与胎盘的索状结构组织,是胎儿与母体物质交换的主要通道。利用脐带来分离扩增间充质干细胞,取材十分方便,可一次性获得较多组织而在短时间内扩增出足够数量的细胞;其次,脐带属于胎儿组织的一部分,含有胚胎发育过程中遗留的大量原始细胞,从脐带组织中可以分离获得增殖分化能力强的原始干细胞,不像 BMMSC 那样容易受到供体年龄的限制[5,7];此外,由于胎盘屏障的存在,使得脐带受到各种病原微生物感染的机会较低。因此,脐带是获取间充质干细胞的重要组织来源。

本研究结果表明:一只健康足月剖宫产胎猴,一次可以获得 5 cm 长的脐带,剪碎后采用贴壁培养方法,可以分离到大量贴壁生长的成纤维细胞样细胞,流式分析结果显示这些细胞高表达 CD29、CD44、CD90,体外诱导分化实验证实这些细胞可以分化为脂肪、骨和软骨细胞,这些结果与任振华等报道的结果[3]一致。根据间充质干细胞的鉴定标准[8],可以判定这些贴壁生长的细胞就是 cUCMSC。从这些实验结果可以看出:一次获得 5 cm 长的食蟹猴脐带组织,远远超过骨髓采集途径获得的组织数量,在短期内可以扩增获得足够数量的干细胞,相对于 cBMMSC 而言,这是 cUCMSC 最大的优势所在。比如在干细胞静脉输注治疗安全评价等实验研究[9]中,需要在 5 周之内为 1 只体重 5 kg 的食蟹猴准备 5×10^7 的干细胞,这对干细胞安全评价试验提出了很高的要求,如果采用本研究建立的 cUCMSC 分离培养方法,很容易达到实验要求。其次,cUCMSC 不像 cBMMSC 那样容易受到供体年龄

的限制[3,5]，脐带组织含有胚胎发育过程中遗留的大量原始干细胞、通过分离扩增可以获得 Oct-4、Nanog 等抗原标志阳性的多潜能干细胞已经得到研究证实[10-12]，这些 Oct-4、Nanog 阳性的干细胞具有更大的分化潜能，被认为是组织修复治疗真正的干细胞[13]。

综上所述，本研究证明了 cUCMSC 是开展再生医学和组织工程研究更理想种子细胞，同时本研究建立的 cUCMSC 分离培养方法容易规模化生产，我们已经成功建立了 cUCMSC 资源库，可供国内外开展以食蟹猴为研究背景的科技工作者使用研究。

参考文献：

[1] McElreavey KD, Irvine AI, Ennis KT, et al. Isolation, culture and characterization of fibroblast-like cells derived from the Wharton's jelly portion of human umbilical cord [J]. Biochem Soc Trans, 1991, 19(1): 29-33.

[2] 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.

[3] 任振华, 王佳茵, 邹春林, 等. 对比不同年龄段食蟹猴骨髓间充质干细胞的生物学特征 [J]. 中国科学: 生命科学, 2010, 40(4): 321-331.

[4] 任振华, 王佳茵, 王淑艳, 等. 菲立磁标记食蟹猴骨髓间充质干细胞的脑内移植示踪研究 [J]. 生物物理学报, 2012, 28(3): 224-231.

[5] Baksh D, Yao R, Tuan RS. Comparison of proliferative and multilineage differentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from umbilical cord and bone marrow [J]. Stem Cells, 2007, 25(6): 1384-1392.

[6] 庞荣清, 何洁, 李福兵, 等. 一种简单的人脐带间充质干细胞分离培养方法 [J]. 中华细胞与干细胞杂志, 2011, 1(2): 162-167.

[7] Kim DW, Staples M, Shinozuka K, et al. Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells: phenotypic characterization and optimizing their therapeutic potential for clinical applications [J]. Int J Mol Sci, 2013, 14(6): 11692-11712.

[8] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement [J]. Cytotherapy, 2006, 8(4): 315-317.

[9] 孙丽, 杜杰, 刘玥, 等. 异种和同种异体脐带间充质干细胞给予食蟹猴的安全性比较 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 506-507.

[10] Carlin R, Davis D, Weiss M, et al. Expression of early transcription factors Oct4, Sox2 and Nanog by porcine umbilical cord (PUC) matrix cells [J]. Reprod Biol Endocrinol, 2006, 4(1): 8.

[11] Jo CH, Kim OS, Park EY, et al. Fetal mesenchymal stem cells derived from human umbilical cord sustain primitive characteristics during extensive expansion [J]. Cell Tissue Res, 2008, 334(3): 423-433.

[12] Fong CY, Chak LL, Biswas A, et al. Human Wharton's jelly stem cells have unique transcriptome profiles compared to human embryonic stem cells and other mesenchymal stem cells [J]. Stem Cell Rev, 2011, 7(1): 1-16.

[13] Bhartiya D, Shaikh A, Nagvenkar P, et al. Very small embryonic-like stem cells with maximum regenerative potential get discarded during cord blood banking and bone marrow processing for autologous stem cell therapy [J]. Stem Cells Dev, 2012, 21(1): 1-6.

〔修回日期〕2015-02-05

综述与专论

不同剂量酒精干预脑缺血动物模型的研究进展

李锦程,赵海苹,罗玉敏

(首都医科大学宣武医院,脑血管病研究室,北京 100053)

【摘要】 酒精与脑缺血发生和预后都密切相关,用不同动物模型研究酒精与脑缺血的关系得出的结果不尽相同。本文总结了目前常用的酒精干预脑缺血动物模型的制作方法,并对模型的优缺点进行评价,为酒精干预脑缺血研究中动物模型的选择提供参考。

【关键词】 酒精;脑缺血;脑卒中;模型,动物

【中图分类号】R33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2015) 04-0070-04

doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.014

Research progress of alcohol intervention in cerebral ischemia animal models

LI Jin-cheng, ZHAO Hai-ping, LUO Yu-min

(Cerebrovascular Diseases Research Institute, Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100053, China)

【Abstract】 Alcohol is closely related to the occurrence and prognosis of cerebral ischemia. Researches on the relationship between alcohol and cerebral ischemia using different animal models draw different conclusions. This paper summarizes the common alcohol intervention methods in making animal models of cerebral ischemia, and evaluates the advantages and disadvantages of these models to provide reference for the future research.

【Key words】 Alcohol; Cerebral ischemia; Stroke; Models, animal

有研究表明:饮酒与脑缺血相关[1,2]。Patra 等分析发现:与不饮酒的男性相比,每天饮酒 35 g 以下能降低男性缺血性卒中的死亡风险,每天饮酒 12 g 时死亡风险最低;对于女性,每天饮酒 44 g 以下能降低缺血性脑卒中的死亡风险,死亡风险最低的女性每天饮酒少于 12 g;男性每天饮酒少于 37 g 或女性每天饮酒少于 46 g,缺血性脑卒中的发病风险下降;每天饮酒 12 杯(每杯约含酒精 12 g),缺血性脑卒中的发病风险最高(以上酒的克数指纯酒精含量)[1]。动物模型研究也表明酒精与脑缺血关系密切[3,5,19]。由于实际操作中伦理等方面的各种限制,研究酒精对脑缺血的作用不能在人体进行,动物模型便成为研究替代工具。目前酒精干预脑缺血主要使用大鼠、小鼠、沙鼠制作动物模型,研究者根据实验目的采用不同的酒精给予方式、剂量、给予时间、持续时间,采用不同的脑缺血方法。本文综述了以往研究使用过的酒精干预脑缺血模型,并对模型的优缺点进行评价。

1 大鼠模型

使用大鼠造模的实验中,主要应用的是 Wistar 和 Sprague-Dawley 雄性大鼠,Wistar 大鼠体重大多

[基金项目]国家自然科学基金项目(81471340,81401090)。

[作者简介]李锦程(1991 -),女,硕士生在读,神经病学专业。Email: lijinchengsmile@163.com。

[通讯作者]罗玉敏,女,研究员,博士生导师,研究方向:脑血管病。Email: yumin111@ccmu.edu.cn。

在(180 ~ 320)g, Sprague-Dawley 大鼠体重范围大多在(230 ~ 300)g。

1.1 Wistar 大鼠

应用 Wistar 大鼠的研究,酒精干预均在脑缺血之前。Favalli 等[3]把 10% v/v 的酒精作为唯一的饮品,持续给予大鼠 28 d。为研究不同时期酒精的作用,分别在给予酒精 28d 时或停止给酒精后 24 h 用光化学诱导血栓形成的方法造成大脑额顶叶皮质缺血,观察缺血的额顶叶皮质区谷氨酸的释放。采用 Montalbetti[4]等使用过的光化学联合微透析的方法,发现饮酒 28 d 能轻微减少缺血后谷氨酸的释放,但并不减轻脑损伤;而停止饮酒 24 h 的大鼠缺血后脑损伤更重,同时谷氨酸和天门冬氨酸释放增加。用类似方法,研究[5]发现缺血前 1.5 h 腹腔注射 1.5、3.0 g/kg 酒精能显著减少局灶性脑缺血后谷氨酸的释放,但不能显著减轻脑损伤。

这种模型适于研究酒精对血小板、血栓形成的影响,而且此模型不需要开颅,动物存活时间长,适于慢性酒精联合脑缺血研究;此外,皮层梗塞部位可任意选择,为研究酒精对特定部位皮层缺血的影响提供了条件。但它与人类常见的脑栓塞存在差异,是动脉永久性闭塞,不能观察酒精对脑血管再通后的影响。

吴光、金鲜花等[6,7]研究长期饮酒大鼠脑缺血后血浆降钙素基因相关肽(calcitonin gene related peptide, CGRP)、神经肽 Y(neuropeptide Y, NPY)、内皮素(endothelin, ET)水平的变化。把 95% 的医用酒精配制成 7.2% 的酒精,供大鼠代水自由饮用 100 d。线栓法制作局灶性脑缺血模型,缺血前、缺血后 1、3、6 h 左心室取血测定血浆 CGRP、NPY、ET,发现长期饮酒可使脑梗死超早期血浆 CGRP 降低、NPY 和 ET 升高。他们研究长期饮酒大鼠缺血脑组织中 Fas-L 抗原表达[8]时,使用(250 ~ 320) g 大鼠,造模方法与以上大致相同,不同之处为酒精代水自由饮用时间为 12 周,结果发现长期饮酒使缺血后 Fas-L 阳性表达高峰提前。

以上实验均用酒精代水使动物自由摄入,有可能造成摄入酒精量之间的差别,从而影响实验结果。

1.2 Sprague-Dawley 大鼠

1.2.1 脑缺血前酒精干预:用未禁食或禁食一夜的大鼠研究酒精对局部脑缺血的急性作用,包括对大脑水肿和脑内钠、钾离子含量的影响。用 5% 的葡萄糖配制成 20% 或 30% 的酒精,左侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)前 1 h 腹腔注射酒精 2 g/kg 或 3 g/kg,缺血持续 4 h 后取脑测定水和离子含量。研究表明 2 g/kg 酒精增加未禁食大鼠脑水肿和脑内钠离子含量,酒精的这种神经毒性作用可能与升高血糖有关[9]。在禁食一夜的大鼠,腹腔注射酒精联合脑缺血后没有出现血糖升高,3 g/kg 剂量的酒精加重大鼠脑水肿,2 g/kg 剂量的酒精不加重脑水肿,且 3 g/kg 酒精的神经毒性作用与血糖浓度无关[10]。

也有学者使用大鼠全脑缺血模型研究酒精对脑缺血-再灌注损伤后的影响[11,12]。单边侧脑室注射 0、2.0、8.0、12.0、16.0、18.0 或 20.0 mg/kg 的酒精(100%,溶于水,40% v/v)。缺血前 20 min 第一次注入酒精,间隔 24 h,共注射 3 次。使用立体定位注射器以 0.5 μL/min 的速度注入酒精,注入 10 min 后,以 1 mm/min 的速度拔出注射器,缝合切口。缺血 15 min 再灌注 3 或 5d。发现 8.0 – 12.0 mg/kg 酒精能激活红藻氨酸(kainate, KA)受体中的 Gluk1,促进依赖 Ca^{2+} 的 γ-氨基丁酸(gamma-aminobutyric acid, GABA)释放,激活突触后 $GABA_A$ 受体,抑制 c-Jun 氨基端激酶 3 (c-Jun N-terminal kinase 3, JNK3)凋亡通路,发挥神经保护作用。

Zhao 等[13]发现尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NAD(P)H)氧化酶在长期饮酒加重缺血脑损伤中有重要作用。他们使用(200 ~220) g 大鼠,流质酒精饮食(Dyets, Bethlehem, PA)8 周。流食中乙醇含量为 6.4% v/v,食物热量为 1.0 kcal/mL,其中 35% 来自脂肪,11% 来自碳水化合物,18% 来自蛋白质,36% 来自乙醇;有数据表明,这种饮食时大鼠血液中酒精浓度大约为 20 mmol/L[14]。8 周后阻塞大脑中动脉 2 h、再灌注 24 h 引起脑损伤。也有学者用同样的模型研究过长期饮酒对短暂性脑缺血后脑损伤的影响[15],发现酒精减弱缺血过程中局部脑血流的反弹性增加。研究长期饮酒对大脑缺血/再灌注损伤影响的剂量依赖性时,Zhao 等同样使用此模型,1.0 kcal/mL 的流质饮食中含 1、3、5 或 6.4% (v/v)酒精,给予非酒精饮食组、1、3 或 5% (v/v)酒精饮食组的每日饮食量以 6.4% (v/v)酒精饮食为基准[16],1% 酒精减小梗塞体积,6.4% 酒精增大梗塞体积,3% 或 5% 酒精对梗塞体积无明显影响。以上模型酒精的干预均在脑缺血之前,模拟了长期饮酒的脑血管病的发生状况,可以选择此类模型研

究临床中不能完成的机制研究。

1.2.2 脑缺血之后酒精干预：Wang 等[17]用管腔内线栓阻断模型研究脑缺血后急性酒精干预的神经保护作用,使用(280～300) g 大鼠。为研究不同剂量酒精的作用,把 0.5、1.0 或 1.5 g/kg 剂量的酒精用生理盐水稀释成 3 mL,于灌注开始时腹腔注射,再灌注 48 h 后测定脑梗死体积,发现:与给予生理盐水相比,1.5 g/kg 酒精能把梗塞体积减小 47%,1.0 g/kg 能减小 23%,0.5 g/kg 没有减小梗塞体积;为探究治疗时间窗,于 MCAO 后 2、3、4 h 腹腔注射 1.5 g/kg 剂量的酒精,再灌注 48 h 后测定脑梗塞体积,发现 MCAO 后 4 h 给予酒精仍能减小梗塞,改善神经功能;为研究酒精与低体温是否有协同叠加的神经保护作用,MCAO 后 90 min 向大鼠全身喷洒酒精将大鼠核心体度降至(32～33)℃,MCAO 2 h 后停止喷酒精且大鼠自动恢复体温与此同时腹腔注射 1.5 g/kg 酒精,发现酒精与低体温没有叠加的神经保护作用;酒精没有促进缺血性中风时的脑出血,另外,在缺血性中风时,酒精不增加重组组织型纤溶酶原激活剂(recombinant tissue-type plasminogen activator, rtPA)或尿激酶(urokinase, UK)应用后的脑出血;缺血后 2 h 给予 1.5 g/kg 酒精,再灌注 3 h 测定低氧诱导因子-1α(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1α),发现 HIF-1α 增加。有研究还表明[18],常压氧(normobaric oxygenation, NBO)联合酒精对脑缺血有协同神经保护作用,MCAO 2 h 后,于再灌注开始时腹腔注射 1.0 g/kg 酒精(用生理盐水稀释成 3ml),然后给予 2 h 常压氧(95% O_2),这种保护效应可能与 ADP/ATP 比例、活性氧、NADPH 氧化酶活性降低,丙酮酸脱氢酶活性增强有关。Zeng 等[19]在 MCAO 2 h 后,于灌注开始时腹腔注射 1.5 g/kg 酒精,再灌注 24 h 测脑水肿、再灌注 48 h 观察血脑屏障(blood-brain barrier, BBB)的完整性,发现酒精能减轻脑缺血-再灌注后的脑水肿和 BBB 破坏,可能与酒精减少基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMP)和水通道蛋白(aquaporin, AQP)有关。

总之,在制备酒精干预脑缺血模型中,脑缺血 2 h MCAO/24 h、48 h 再灌注模型使用较多。Sprague-Dawley 大鼠是制备酒精干预脑缺血模型中最常用的动物。长期饮酒后脑缺血最符合人类发病顺序的模型。

2 小鼠(C57BL/6 和 C57BL/6J)模型

在小鼠模型的研究中,研究者多使用 2 月龄小鼠,且酒精均在脑缺血之前给予。Wang 等[20]研究酒精预处理(ethanol preconditioning, EtOH-PC)减轻脑缺血-再灌注后白细胞-内皮细胞粘附和迟发性神经元死亡与 Ca^+ 激活的 K^+ (calcium-activated potassium, BK_{Ca})通道激活有关。用[体重(g) × 0.6 + 0.3]计算 95% 酒精给予量(μL),用无菌蒸馏水把酒精稀释成 0.3 mL,在缺血前 24 h 灌胃。因为 EtOH-PC 的早期(1～2 h 后)脑保护作用弱于晚期(24 h 后),所以选择在酒精预处理后 24 h 进行脑缺血-再灌注。夹闭双侧颈总动脉(common carotid arteries, CCA)20 min 造成脑缺血。再灌注 2 h 和 3 h 后测定软膜小静脉中滚动的白细胞和粘附的白细胞的数量,再灌注 4 d 后观察海马区 DND、凋亡和胶质细胞激活。

Sun 等[21]研究低剂量饮酒可能通过上调过氧化物酶体增殖物激活受体 γ(peroxisome proliferator-activated receptor gamma, PPARγ)减轻小鼠短暂性局灶脑缺血损伤。采用的也是流质 1%(v/v)酒精(Dyets, Bethlehem, PA)饮食 8 周,饮食所含能量为 1.0 kcal/mL,其中 35% 来自脂肪,18% 来自蛋白质,42% 来自碳水化合物,5% 来自乙醇。酒精饮食后 0.5、1、2、4 h 血液酒精浓度分别为 0.8、1.0、0.5、0 mM。线栓法制备 MCAO,缺血 90 min 再灌注 24 h 后观察脑梗死、DNA 断裂和核 PPARγ 蛋白/活性。

目前,使用小鼠(C57BL/6 和 C57BL/6J)研究酒精和脑缺血的关系,优势在于多数转基因为小鼠(C57BL/6 和 C57BL/6J),可以用于特定基因功能方面的研究。但缺血性脑卒中在老年人中较为常见,这些实验使用的小鼠年龄偏小。

3 沙鼠模型

在沙鼠模型的研究中,酒精干预也在脑缺血之前,沙鼠体重大多在(50～80) g,且研究者基本采用阻塞双侧 CCA 5 min 制备短暂全脑缺血模型。Xia 等将酒精以 22.5%(w/v)的浓度混合于奶粉中,用 4 g/kg 灌胃 35d。35 d 后,夹闭双侧 CCA 5 min,再灌注 48 h。发现酒精没改变海马 CA1 区缺血后 1,4,5-三磷酸肌醇受体(inositol 1,4,5-triphosphate receptor, IP_3 R1)mRNA、肌质网或内质网 Ca^{2+}-ATP 酶(sarcoplasmic or endoplasmic Ca^{2+}-ATPase,

SERCA2b) mRNA 的下降[22]。

McCrea 等把 1 g/kg 或 4 g/kg 酒精与生理盐水混合成 1 mL,皮下注射,持续 21 d。停止注射酒精 9 d,使动物恢复体重。之后阻塞双侧 CCA 5 min 造成脑缺血,发现酒精减少谷氨酸释放,而再灌注 1 月后发现酒精没改变沙鼠脑缺血后的组织学和神经行为学结局[23]。该团队同样采用皮下注射 1 g/kg 或 4 g/kg 酒精,酒精注射后 1 h 后阻塞双侧 CCA 5 min 造成脑缺血,通过水迷宫实验和观察术后 1 月纹状体、海马、丘脑等的病理改变,发现急性酒精干预不能改变短暂性脑缺血-再灌注后的结构和功能变化[24]。Phillis 等在缺血前 30 min 给予沙鼠腹腔注射 1.02 g/kg(即 22 mmol/kg)乙醇(与盐水以 6:5 混合),后阻塞双侧 CCA 造成全脑缺血 5 min,再灌注 5d 后发现海马 CA1 锥体神经元损失减少[25]。

酒精干预全脑缺血模型时,沙鼠比大鼠死亡率低[26],为避免高死亡率使用沙鼠造模更合适。但是,由于沙鼠脑部血管发育存在个体差异,阻断双侧 CCA 半小时以上,仅 30% 左右的沙鼠会出现脑缺血,因此,如果进行更长时间的脑缺血研究,模型可靠性大大降低[27]。

4 小结

由于种属差异的存在,酒精干预脑缺血动物模型不能完全模拟人类的发病状况。有实验表明 Sprague-Dawley 大鼠每千克体重能够比人耐受更多酒精,所以动物模型的酒精剂量-效应关系不能直接应用于人[10]。除种属差异外,脑缺血在人群发病与年龄和性别有很大关系,而大多数实验使用雄性、青壮年动物,忽略了性别、年龄的影响。而且,人类饮酒不可能像实验动物一样有规律,缺血性脑卒中发作后的缺血持续时间也不相等,相应模型难以准确模拟人类发病。另外,麻醉也影响动物生命体征。同时,人类脑缺血发病与遗传、环境、生活习惯、疾病状况等多种因素有关,这些因素都很难在动物身上得到再现。

综上所述,应用于酒精干预脑缺血研究的啮齿类动物模型有很多,不同的动物模型各具特点,理想的动物模型是研究疾病发生机制和药物开发的关键,所以应综合考虑种属差异、个体差异以及研究目的等因素建立合适的酒精干预脑缺血动物模型。

参考文献:

[1] Patra J, Taylor B, Irving H, et al. Alcohol consumption and the risk of morbidity and mortality for different stroke types—a systematic review and meta-analysis [J]. BMC Public Health, 2010, 10: 258.

[2] Reynolds K, Lewis B, Nolen JD, et al. Alcohol consumption and risk of stroke: a meta-analysis [J]. JAMA, 2003, 289(5): 579 - 588.

[3] Favalli L, Rozza A, Frattini P, et al. Ischemia-induced glutamate release in rat frontoparietal cortex after chronic alcohol and withdrawal [J]. Neurosci Lett, 2002, 326(3): 183 - 186.

[4] Montalbetti L, Rozza A, Rizzo V, et al. Amino acid recovery via microdialysis and photoinduced focal cerebral ischemia in brain cortex of rats [J]. Neurosci Lett, 1995, 192(3): 153 - 156.

[5] Masoero E , Frattini P, Favalli L, et al. Effect of acute alcohol on ischemia-induced glutamate release and brain damage [J]. Alcohol, 2000, 22: 173 - 177.

[6] 金鲜花,刘超,赵和荣,等. 长期饮酒大鼠脑缺血模型血浆 CGRP 的测定 [J]. 神经疾病与精神卫生, 2003,3(5): 387 - 388.

[7] 吴光, 金鲜花, 刘超, 等. 长期饮酒脑缺血大鼠血浆 NPY、CGRP、ET 含量的测定[J]. 中风与神经疾病杂志, 2004, 21(4): 323 - 325.

[8] 吴光, 刘超, 金鲜花, 等. 长期饮酒大鼠缺血脑组织 Fas-L 抗原表达的动态研究 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2003, 20(2): 163 - 165.

[9] Zhao YJ, Yang GY, Domino EF. Acute ethanol effects on focal cerebral ischemia in nonfasted rats [J]. Alcohol Clin Exp Res, 1997, 21(4): 745 - 748.

[10] Zhao YJ, Yang GY, Ben-Joseph O, et al. Acute ethanol effects on focal cerebral ischemia in fasted rats [J]. Alcohol Clin Exp Res, 1998, 22(3): 717 - 722.

[11] Qi SH, Liu Y, Hao LY, et al. Neuroprotection of ethanol against ischemia/reperfusion-induced brain injury through decreasing c-Jun N-terminal kinase 3 (JNK3) activation by enhancing GABA release [J]. Neuroscience, 2010, 167(4): 1125 - 1137.

[12] Qi SH, Liu Y, Wang WW, et al. Neuroprotection of ethanol against cerebral ischemia/reperfusion induced brain injury through GABA receptor activation [J]. Brain Res, 2009, 1276: 151 - 158.

[13] Zhao H, Mayhan W G, Arrick DM, et al. Alcohol-induced exacerbation of ischemic brain injury: role of NAD(P)H oxidase [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2010, 34(11): 1948 - 1955.

[14] Sun H, Molacek E, Zheng H, et al. Alcohol-induced impairment of neuronal nitric oxide synthase (nNOS)-dependent dilation of cerebral arterioles: role of NAD(P)H oxidase [J]. J Mol Cell Cardiol, 2006, 40(2): 321 - 328.

[15] Sun H, Zhao H, Sharpe GM, et al. Effect of chronic alcohol consumption on brain damage following transient focal ischemia [J]. Brain Res, 2008, 1194: 73 - 80.

[16] Zhao H, Mayhan WG, Arrick DM, et al. Dose-related influence of chronic alcohol consumption on cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. Alcohol Clin Exp Res, 2011, 35(7): 1265 - 1269.

(下转第 83 页)

综述与专论

联体共生动物模型对医学的贡献

冯　楠,罗建民

(河北医科大学第二医院血液科,河北　050000)

【摘要】　联体共生(parabiosis)是医学实验中的一种造模方法,此动物模型可很好的体现两只动物经联体手术后形成血液、体液交互,达到共生目的,观察联体动物之间从血液到免疫等各个层面对机体的影响。近几年联体实验在联体共生的基础上,多采用异时共生(Heterochronic　parabiosis)模型,为肿瘤、内分泌、移植、神经病学、口腔科等领域的研究提供实验基础。

【关键词】　联体共生;异时共生;血液交互
【中图分类号】R33　　【文献标识码】A　　【文章编号】1671-7856(2015) 04-0074-04
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.015

Contribution of parabiosis animal models In medicine

FENG Nan, LUO Jian-min
(Department of Hematology, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050000, China)

【Abstract】　Parabiosis is an experimental animal model in medical studies. This kind of animal models can realize the exchange of blood and body fluid between the two united animals very well, and makes it possible to observe all influences of these exchange in different aspects, ranging from blood to immunity. Over the past few years, based on parabiosis studies, heterochronic parabiosis animals are preferred to be used as conjoint models and to provide experimental basis for researches in cancer, endocrine, transplantation, neurology and stomatology and so on.

【Key words】　Parabiosis; Heterochronic parabiosis; Blood exchange

联体共生(parabiosis)一词起源于希腊语,‘para’指旁边,紧挨着。‘bios’指生命,中文翻译为联体共生或异种共生。是指以实验手段将两只动物连接在一起,使它们共用一套血液循环系统,形成体液、血液交互,类似于人类的联体婴儿[1]。联体共生动物常以小鼠作为模型动物,在医学实验研究中应用超过了 150 年,其中以美国、英国、瑞士及日本应用联体共生动物模型的研究较多,我国对这一实验方法应用较少。2013 年,Francesco 等[2]应用联体共生小鼠模型在 cell 杂志上发表了一篇循环因子 GDF11 逆转年龄相关性心肌肥厚的文章,引起轰动,随后 Science 杂志在 2014 年相继发表两篇文章佐证这一观点,证实 GDF11 有改善衰老小鼠的大脑和骨骼肌的功能[3,4],使这一实验造模方法再次引发关注。目前,小鼠联体共生动物模型在肿瘤、内分泌、移植、神经病学、口腔科均展开应用,现将世界范围内的小鼠联体共生动物模型的发展史综述如下。

1　概述

小鼠联体共生模型最早应用于医学实验是在 1860 年,法国的生理学家 Paul Bert 利用白鼠做成联体共生动物模型,以期了解日后器官移植的可行性[5]。在其后的 100 多年的医学研究中,联体共生

[作者简介]冯楠(1981 -),住院医师,博士研究生,主要研究方向:恶性血液病的诊断与治疗,E-mail: fengnan630@126.com。
[通讯作者]罗建民(1960 -),主任医师,主要研究方向:恶性血液病诊断与的治疗,E-mail: Luojm315@163.com。

动物模型的造模方法基本均沿用了 Paul Bert 的手术方法,将两只小鼠的侧边皮肤纵向切开,切口对位缝合,形成联体。术后可检测到两只小鼠毛细血管已经连通,有血液循环交互。基于他的开创性工作,Paul Bert 在 1866 年获得了法国科学院实验生理学奖。1908 年,德国医生 Sauerbruch 和 Heyde 成功的重复了这一动物模型[6]。2013 年 Conboy 对 Bert 联体共生动物模型手术方法进行改良,将两只小鼠的紧挨的前腿和后腿对应进行缝合,以增加其稳定性[1]。

早期的联体共生模型均选取同一性别、年龄、种属且最好是同窝出生的小鼠。这是因为早期实验多为生理学、病理生理学实验,关注的焦点是在联体之后小鼠的死亡率、生存状态、体液、免疫因子等变化情况。这些实验证实联体共生模型小鼠的死亡率与一般外科手术的死亡率相似,存活率在 70% ~80%,Molpurgo[7] 报道联体共生模型小鼠可共生超过 3 个月。张富祥等[8] 报道术后联体小鼠出现兴奋、焦虑等特征性运动失常,随后数周小鼠活动逐渐适应联体状态;术后 3 d 出现体重下降,但术后 1 个月体重又恢复至正常;术后粪便中皮质酮代谢物水平快速升高,至第 75 天降至正常;检测术后其中 3 对联体小鼠之间的血液交换率,结果基本正常,第 12 周血液完全交换率分别为 63、46 和 107 min;其联体共生模型 120 d 内无一对死亡。

从 20 世纪 70 年代开始,研究人员不再局限于选取同一种属、性别、年龄的联体共生模型进行研究,而是将年长的小鼠与年轻的小鼠制造成联体共生模型,也称异时共生(Heterochronic parabiosis)模型。1972 年,Ludwig[9] 应用小鼠联体共生动物模型探讨老化的生命体暴露在年轻的生存环境中后的机体变化情况,以寻找机体细胞重新恢复活力的办法,实验证实异时共生模型的年长小鼠生存状态优于同时共生模型。近些年,利用联体共生模型研究的焦点由观察共生小鼠生理学、病理生理学变化,转移到如何利用联体共生模型为与机体细胞老化有关的人类慢性病如心脑血管疾病、糖尿病、阿尔茨海默病、慢性肿瘤等寻找治愈的办法。

2 联体共生模型在肿瘤学中的应用

Rous[10] 应用 Sauerbruch 和 Heyde 的手术方法,缝合 4 对小鼠,联体共生模型中的 1 只为荷腺瘤小鼠,另 1 只为反复荷瘤均不成功的肿瘤耐受小鼠,每只小鼠缝合前都腹腔注射硫酸吗啡麻醉。成对小鼠胸腹部侧边缝合,术后 10 d 给其中 1 只小鼠皮下注射亚甲蓝,在两只小鼠尿液中均检出亚甲蓝,证明两只小鼠建立了微循环。Rous 的实验中联体共生小鼠最长生存 34 d,1 对中的 1 只死亡后,另 1 只也迅速死亡。Rous 观察到荷瘤小鼠肿瘤体积有所缩小,但是他指出希冀联体共生模型彻底消灭肿瘤不太可能实现。以此实验为基础,后期 Rous 发现了诱导肿瘤病毒,命名为罗氏病毒(Rous's sarcoma virus, RSV),并因此获得 1966 年的诺贝尔医学奖。

3 联体共生模型应用于内分泌研究

Coleman[11] 将缺失 *db* 基因Ⅱ型糖尿病模型小鼠与非肥胖小鼠组成联体共生模型,观察到Ⅱ型糖尿病模型小鼠体重仍上长,未受到正常小鼠的体液影响。由此推断,某些生物因素在Ⅱ型糖尿病模型小鼠身上未起作用,如饱腹感。30 年后 Friedman 在此实验的基础上,发现了确定饱腹感出现的关键因素——瘦素。瘦素作用于下丘脑的代谢调节中枢,发挥抑制食欲,减少能量摄取,增加能量消耗,抑制脂肪的合成。缺失 *db* 基因的大鼠,食欲旺盛,体重增加,导致病态肥胖。目前瘦素已应用于临床治疗病态肥胖的病人。

4 联体共生模型应用于心血管系统的研究

Dahl[12] 的团队建立了具有潜在高血压风险的野生型小鼠联体共生模型,给予高钠饮食,发现两只联体小鼠发生肾功能不全性高血压的机率均等,考虑某些体液因素与高血压的发生有关。将其中 1 只具有潜在高血压风险的小鼠去除肾脏后,与之联体共生的另 1 只小鼠未出现高血压。1993, Lewanczuk[13] 依据这一理论,最终发现了循环高血压因子-甲状旁腺高血压因子(Parathyroid hypertensive factor, PHF),并指出低肾素型高血压动物模型中 PHF 较高。

2013 年 Francesco 选取 6 对 C57 小鼠,每对含年长小鼠 C57 1 只(23 月龄),年轻 C57 小鼠 1 只(2 月龄),缝合成异种共生的小鼠实验模型,观察循环因子对异种共生小鼠的影响,试图阐明心脏肥大老化的机制。Francesco 在小鼠联体 4 周时观察发现联体共生小鼠中年老的老鼠肥大的心肌细胞体积明显缩小,细胞功能也明显恢复。其利用蛋白质组学实验,发现并确认 GDF-11 蛋白属于调节细胞生长和分化的转化生长因子-β(transforming growth factor-β, TGF-β)家族中的一员,可逆转心肌细胞老

年性肥大,指出未来医学有治愈心脏衰老的可能[2]。2014 年 Wagers 提出 GDF-11 在年轻小鼠体内的自然浓度较高,通过提高老年小鼠体内 GDF-11 的浓度水平有可能改善其器官系统的功能[3,4]。GDF11 或许是舒张性心力衰竭——一种不可逆的老年致命疾病的可行性治疗方法。

5 联体共生模型应用于移植科学的研究

1996 年, Starzl[14] 提出成年鼠联体共生可作为研究嵌合体与移植耐受之间关系的一个理想模型。2000 年,史其新等 [15] 选取 DA、LEW 大鼠各 28 只,10 ~ 12 周龄,将异基因成年大鼠联体共生以诱导相互特异的移植耐受, 探讨嵌合体与耐受的关系。实验组联体前后均给予低剂量环磷酰胺(CP, l00 mg/ kg) 腹腔注射, 以减轻主要组织相容性抗原复合物(major histocompatibility complex, MHC) 的产生,避免因移植后的免疫排斥反应导致联体失败。因为 MHC 不仅控制着同种移植排斥反应,也与机体免疫应答、免疫调控等关系密切。因为联体共生模型的存活时间直接代表了移植耐受的程度,史其新等研究人员在异基因成年大鼠联体后第 5、15、45 天时将联体大鼠分开,并相互植皮,观察其皮肤存活时间及免疫耐受等情况。DA、LEW 大鼠于联体 15 d 可诱导较稳定的皮肤移植耐受,并通过流式细胞仪检测联体后再分开的大鼠的脾脏、胸腺供体细胞嵌合程度发现,在联体 5 ~ 15 d 内,耐受的诱导与嵌合状态有明显相关性。

吕艳等[16] 利用联体共生模型讨论移植后免疫耐受情况,将 BALB/c 小鼠及 C57BL/6(B6) 小鼠的脾细胞分别经尾静脉注射给对方,再腹腔注射环磷酰胺 (CP, l50 mg/ kg) ,为了降低移植后的免疫排斥反应对实验的影响。手术联体后 1 周分开,并进行相互间的植皮。发现 BALB/c 小鼠对 B6 小鼠的皮肤耐受期明显延长,但是 B6 小鼠对 BALB/c 小鼠的皮肤耐受期无明显延长。在联体小鼠分开后的第 1 天及第 30 天应用流式分析仪进行胸腺及脾脏嵌合程度的检查,发现皮肤耐受时限与嵌合程度不呈正相关。对联体后耐受的 BALB/c 小鼠进行体内和体外细胞转移实验,均未发现耐受小鼠的脾细胞中存在抑制细胞活性。在耐受 BALB/c→B6 小鼠的单向混合淋巴细胞反应 (MLR) 体系中加入外源 IL-2 可以部分反转耐受 BALB/c 小鼠脾细胞的增殖反应 ,表明本实验诱导耐受的机制可能与克隆不应答有关。

6 联体共生模型应用于神经病学的研究

Morpurgo[7] 早在 1923 年就利用联体共生模型希望寻找到神经细胞再生的可行性。直到 2011 年 Villeda[17] 利用联体共生模型发表在 NATURE 上一篇老化系统环境负性调节神经和认知功能文章,引起广泛关注。Villeda 将一个年轻的老鼠与年长老鼠联体,年轻的老鼠会从年老的老鼠的血浆或者交互的血液环境内获得负性调节因子,实验观察到年轻老鼠的脑神经细胞突触的变形可塑性明显下降,皮层认知功能和空间学习记忆功能亦受到损害。研究证实其负性调节因子为嗜酸粒细胞趋化蛋白 CCL11,增加年轻小鼠体内 CCL11 趋化因子浓度水平可导致其脑内神经细胞数量减少,学习和记忆功能下降[18]。Villeda 指出在中枢神经系统中,机体功能老化是导致成人神经干/祖细胞和神经细胞数量较少及认知功能障碍的重要原因,使用异种共生动物模型研究血源性因素的变化进一步证实了这一观点。

另外,Wagers 及 Rubin 从联体共生小鼠模型的心血管系统研究中获得灵感,将 GDF11 应用于神经系统研究,通过实验证实了 GDF11 具有促进老年小鼠的神经干细胞增生及大脑中血管发育的作用,可帮助老年小鼠从肌肉损伤中恢复,从而提高它们的跑动速度和抓握力量。小鼠 3D 大脑重建和磁共振成像(MRI)结果表明,老年小鼠的新生血管数量和血流量较前明显增多。基于 GDF11 对于大脑还有更广泛的影响,有可能逆转衰老损伤[3,4],研究人员可考虑将来 GDF11 会在治疗阿尔茨海默病中凸显价值。

7 小鼠联体共生模型在口腔科学中的研究

Frozoni[19] 应用联体共生小鼠模型分析非始祖细胞和造血细胞在牙质修复中的作用,他选取的是 12 ~ 16 周龄的野生型 C57BL/6 小鼠及转基因 C57BL/6 自带荧光小鼠,共 6 对,平均体重 20 g。联体共生小鼠模型中 1 只自带 GFP 荧光,即 GFP + ,另 1 只 GFP-,暴露上颌骨第一磨牙牙髓,并从臀部至下颌角做皮肤切口,切口对齐缝合,术后给予盐酸丁丙诺啡(0. 2 ~ 0. 5) mg/kg 注射。分别在联体后 4 周和 8 周用免疫荧光显微镜观察 GFP-小鼠牙髓,均发现 GFP + 细胞通过根尖孔扩散至其牙髓。实验进一步指出,牙本质样细胞高表达 3. 6-GFP,其参与牙本质发育及修复过程。

8 联体共生模型抗衰老的研究

现代医学对于由衰老所引起的疾病,往往没有治愈的办法,如随着年龄增长导致的心肌、骨骼等细胞的衰老、肥大[20]。1972 研究人员发现年老的老鼠与年轻的老鼠联体后,其生存时间比两只年老的老鼠联体的生存时间延长[1]。2000 年,Wagers 等[21]利用小鼠联体共生模型展开研究,她观察到年轻小鼠的血液在老年小鼠体内循环,对老年小鼠损伤后的肌肉修复可产生再生效应。

9 联体共生模型的前景

联体共生模型目前仍存在一些问题,如伦理学家认为联体会增加实验动物的痛苦。但 Alexander Eggela 指出联体共生的造模手术仅有 1% 的死亡率,而且联体共生模型能在手术后存活 2 年之久,与未联体小鼠相比,联体共生对实验动物的寿命影响微乎其微[22]。该实验模型的耐受性好,可在医学研究的多个试验领域应用。并且,联体共生小鼠模型从体液免疫、分子生物、血液交互、移植耐受等各个方面的影响,为今后治疗甚至治愈慢性病奠定了良好实验基础[23-25]。在研究人类的慢性疾病等方面,联体共生动物模型具有其独特的应用价值。

参考文献:

[1] Conboy MJ, Conboy IM, Rando TA et al. Heterochronic parabiosis: historical perspective and methodological considerations for studies of aging and longevity [J]. Aging Cell, 2013, 12(3): 525 - 530.

[2] Loffredo FS, Steinhauser ML, Steven M, et al. Growth differentiation factor 11 is a circulating factor that reverses age-related cardiac hypertrophy [J]. Cell, 2013, 153(4): 828 - 839.

[3] Katsimpardi L, Litterman NK, Pamela A, et al. Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors [J]. Science, 2014, 344(6184): 630 - 634.

[4] Sinha M, Jang YC, Oh J, et al. Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle [J]. Science, 2014 ,344(6184): 649 - 652.

[5] Zhang Y, Proenca R, Maffei M, et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue[J]. Nature,1994, 372(6505):425 - 432.

[6] Deacon RM. Assessing nest building in mice [J]. Nature protocols,2006,1(3):1117 - 1119.

[7] Cryan JF, Dinan TG. Mind-altering microorganisms: the impact of the gut microbiota on brain and behaviour [J]. Nat Rev Neurosci, 2012,13(10):701 - 712.

[8] 张富祥, 杨亦彬, 柯贵宝, 等. 联体小鼠在联体状态下的生理变化 [J]. 动物学研究, 2012, 33 (5): 493 - 497.

[9] Ludwig FC, Elashoff RM. Mortality in syngeneic rat parabionts of different chronological age [J]. Trans N Y Acad Sci, 1972, 34 (7): 582 - 587.

[10] Rous P. Parabiosis as a test for circulating anti-bodies in cancer: first paper [J]. J Exp Med,1909, 11(6):810 - 814.

[11] Coleman DL. A historical perspective on leptin [J]. Nat Med, 2010, 16(10):1097 - 1099.

[12] Knudsen KD, Iwai J, Heine M, et al. Genetic influence on the development of renal hypertension in parabiotic rats: evidence for a humoral factor [J]. J Exp Med,1969,130(6):1353 - 65.

[13] Lewanczuk RZ, Pang PK. The occurrence of parathyroid hypertensive factor (PHF) in Dahl rats[J]. Am J Hypertens, 1993, 6(9): 758 - 762.

[14] Starzl TE, Demet ris AJ, Murase N, et al. The lost chord: microchimerism and allograft survival [J]. Immunol Today, 1996, 17: 577 - 584.

[15] 史其新, 谢蜀生, 俞莉章, 等. 成年大鼠联体诱导的移植耐受与嵌合状态相关性的研究[J]. 中华医学杂志, 2000, 80 (8): 602 - 605.

[16] 吕艳, 谢蜀生, 张庆殷, 等. 供体脾细胞输注诱导小鼠移植耐受及其机理的研究 [J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2001, 21(2): 146 - 150.

[17] Villeda SA, Luo J, Mosher KI, et al. The ageing systemic milieu negatively regulates neurogenesis and cognitive function [J]. Nature, 2011, 477(7362): 90 - 94.

[18] Ruckh JM, Zhao JW, Shadrach JL, et al. Rejuvenation of regeneration in the aging central nervous system [J]. Stem Cell, 2012, 10(1): 96 - 103.

[19] Frozoni M, Zaia AA, Line SR, et al. Analysis of the contribution of nonresident progenitor cells and hematopoietic cells to reparative dentinogenesis using parabiosis model in mice [J]. J Endod, 2012, 38(9): 1214 - 1219.

[20] 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(3): 67 - 70.

[21] Wagers AJ, Sherwood RI, Christensen JL, et al. Little evidence for developmental plasticity of adult hematopoietic stem cells [J]. Science, 2002, 297(5590): 2256 - 2259.

[22] Eggela A, Wyss-Coray T. A revival of parabiosis in biomedical research [J]. Swiss Med Wkly, 2014, 4(144): 13914.

[23] Salpeter SJ, Khalaileh A, Weinberg-Corem N, et al. Systemic regulation of the age-related decline of pancreatic β-cell replication [J]. Diabetes, 2013, 62(8): 2843 - 2848.

[24] Czirr E, Wyss-Coray T. The immunology of neurodegeneration [J]. J Clin Invest, 2012, 122(4): 1156 - 1163.

[25] Demy DL, Ranta Z, Giorgi J-M, et al. Generating parabiotic zebrafish embryos for cell migration and homing studies [J]. Nat Meth, 2013, 10(3):256 - 258.

〔修回日期〕2015-01-16

管理科学

实验动物品系数据库的建立

孔　琪,夏霞宇,秦　川

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心;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疾病动物模型三级实验室;北京　100021)

【摘要】 目的　基于国内外部分实验动物数据库和文献,收集整理世界上现有的 200 多种共计 26 000 多个品系的实验动物数据,建立关系型检索数据库,使其成为世界上最大最全的实验动物品系数据库。**方法**　构建基于 MySQL 数据库软件的中小型数据库,建立检索界面、录入界面和数据库接口。**结果**　本文建立了实验动物品系数据库,已经收录小鼠品系数据 21 596 条;大鼠品系数据 2062 条;猴品系数据 13 条;地鼠品系数据 2 条;犬品系数据 5 条;兔品系数据 5 条。以后会逐步完善数据,实现实验动物品系数据库的定期更新。**讨论**　该数据库的建立方便我国科研人员查阅和使用国内外实验动物品系资源,为引进欧美日等发达国家的实验动物品系资源提供链接。

【关键词】 实验动物;品系;数据库;小鼠;资源
【中图分类号】R33　　**【文献标识码】**A　　**【文章编号】**1671-7856(2015) 04-0078-06
doi: 10.3969.j.issn.1671.7856. 2015.004.016

Establishment of the laboratory animal strain database

KONG Qi, XIA Xia-yu, QIN Chuan
(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medical Center,
Peking Union Medical College, Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health;
Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of
Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective　To collect more than 200 kinds of species totaling more than 26,000 existing laboratory animals data worldwide to establish a largest and most comprehensive database of laboratory animal strains, based on the existing laboratory animal strain databases and related publications or references. **Methods**　Based on MySQL database software to set up medium sized databases, and build search interface, input interface and database interface. **Results**　In this work, a laboratory animal strain database was established, including data of 21596 mouse strains, 2062 rat strains, 13 monkey strains, 2 hamster strains, 5 dog strains, and 5 rabbit strains. We will gradually further improve the data to achieve regularly updated database of animal strains in the future. **Discussions**　The establishment of this database will facilitate scientific researchers in our country to access and use domestic and foreign resources of laboratory animal strains, and provide links to introduce laboratory animal strain resources from European, American and other developed countries.

【Key words】 Laboratory animals; Strains; Database; Laboratory animal resource

实验动物是“活的试剂”,是生命科学、医学和　　药学等诸多领域的科技支撑条件。实验动物科学

[**基金项目**]中央科研院所基本业务费(DWS200502,DWS200709,DWS201208)和传染病科技重大专项资助(编号 2009ZX10004-503)。
[**作者简介**]孔琪(1978 –),助理研究员,博士,研究方向为实验动物学。E-mail: infor@ cnilas.org。
[**通讯作者**]秦川,研究员,博士生导师,研究方向为实验病理学。E-mail: qinchuan@ pumc.edu.cn。

为生命科学和现代生物学的发展提供技术平台,生命科学和现代生物学把实验动物科学带进分子水平时代并将它推到现代科学技术的前沿。推动实验动物资源自主研发和品系数据库建设对有效支撑生物医学科学研究和生物医药产业发展意义重大[1]。

实验动物按照动物物种来分,可以分为小鼠、大鼠、仓鼠、地鼠、沙鼠、豚鼠、土拨鼠、兔、犬、猫、猪、猴、猩猩、牛、羊、马、树鼩、鸡、鸭、鹅、鱼、蟾蜍、雪貂等。世界上用于实验动物研究的动物物种已经达到 200 多种,26000 多个品系。这个数据每年还在不断增长。我国实验动物国家标准中涉及的七种实验动物包括小鼠、大鼠、地鼠、豚鼠、兔、犬、猴,也是最常用的实验动物[2,3]。实验动物品系数据库建设的目标是收集整理国内外所有的实验动物品系数据,建立世界上最全最大的实验动物品系数据库,供国内的实验动物科学、生物学、医学、农业等相关领域科研人员使用。数据来源主要是国内外实验动物数据库、期刊论文和相关机构网站。

1 方法

1.1 数据来源

1.1.1 问卷调查:设计实验动物品系资源调查问卷,面向国内 2000 多家实验动物生产使用单位发放调查问卷。

1.1.2 网站检索:使用百度检索中文网站信息;访问各机构网站:实验动物生产机构、使用机构、管理机构、社团组织。

1.1.3 数据库检索:检索美国、欧洲、日本等国实验动物品系相关数据库,获取实验动物品系名称及相关信息,整理后录入数据库。

1.1.4 文献检索:检索中国知网(CNKI)、万方数据库、维普数据库,检索文献发表中提及的实验动物品系及来源。

1.1.5 单位积累:作者单位长期从事实验动物研究工作,最早引进实验动物品系近百种,建立了 700 多种基因工程品系,具有全国最多的实验动物品系资源。

1.1.6 同行提供:数据库为开放式数据库,对国内外同行提供数据录入窗口,可以在线填报或以邮件的形式提供数据,经过专家审核后录入数据库。

1.2 建立数据库

依托专业公司,构建基于 MySQL 数据库软件的中小型数据库,建立检索界面、录入界面和数据库接口;并预备与今后建立的数据库接口,逐渐形成数据库集群。

1.3 数据库检索

分为简单检索、专业检索和数据浏览三种方式。

1.3.1 简单检索:关键词检索(keyword search)。

1.3.2 专业检索:品系编号(accession number)、品系名称(strain name)、其他名称(common name)、品系来源(origin)、传代方法(generation)、遗传特征(genetics status)、应用领域(research area)、保存单位(institution)。

1.3.3 数据浏览:以实验动物品系编号为序,按照种属分类,浏览实验动物品系。

1.4 联网运行

接入中国医学科学院医学实验动物研究所网站和中国实验动物学会网站,提供免费的检索服务;

1.5 数据更新

数据库实行外源运行,使用者可以上传数据库未收录的实验动物品种品系,经过审核和查实后,可以作为正式数据发布,可以不断扩展数据规模,实现数据实时更新。

2 结果

2.1 制定元数据表

根据调查结果制定了元数据表(表 1),包括数据格式,内容等。

2.2 确定实验动物品系编码规则

本数据库实验动物品系编号为:31 - 11 - 001 - 0 - 000001。其中 31 代表实验材料大类;11 代表实验动物小类;001:实验动物品种编号;0,A-Z:实验动物品系名称编号(0 为品种号,A 为首字母为 A 的品系);000001:数据条编码(表 2)[4-26]。国家自然科技资源平台实验动物资源库对根据实验材料对实验动物品系编码做了描述[27],本数据库的编码方式跟其做了衔接,方便共享。

2.3 数据库建立

2.3.1 数据库名称:实验动物品系数据库。

2.3.2 数据库网址:http://www.cnilas.org/plus/list.php?tid=158。

2.3.3 数据量:现在已经收录小鼠品系数据 21 596 条;大鼠品系数据 2 062 条;猴品系数据 13 条;地鼠品系数据 2 条;犬品系数据 5 条;兔品系数据 5 条(图 1)。

表 1 实验动物品系数据库元数据表

序号	字段名称	字段内容	表头	可否为空
1	动物品系序列号 Serial Number of Animal Strains, SN_AS	该品系在数据库中的编号,按照数据录入顺序自动形成。	SN_AS	否
2	动物品系查询号 Accession Number of Animal Strains, AC_ AS)	该品系在整个实验动物品系中,按照物种分类方法,制定的固定编号,可供查询使用。	AC_ AS	否
3	品系名称 Uniform Identification, UID	实验动物品系中文名称,根据命名规则制定的正规名称。	UID	空
4	英文名称 English Name, EN	实验动物品系英文名称,根据国际命名规则制定,跟国际接轨。	EN	空
5	其它名称 Name,_Other, NO	其他常用名、别名、通用名或曾用名。	NO	空
6	物种描述 Description of Species,DS	按照物种分类原则,对该品系的物种类别进行描述	DS	空
7	传代 Generation	培育传代背景	Generation	空
8	外观特征 Appearance	毛色等外观特征,可配图片	Appearance	空
9	遗传特征 Genetic Status, GS	该品系的遗传背景	GS	空
10	品系来源 Origin	是国外引进,还是国内培育	Origin	空
11	相关亚系 Other Related Substrains, ORS	该品系的近亲或分支	ORS	空
12	生物学特征 Biological Status, BS)	生理、生化、血液、免疫、解剖学、平均寿命等与众不同的生物学特性。	BS	空
13	寿命与疾病 Life-span and Diseases	自然寿命和自发疾病,病理改变、肿瘤患病率等。	LD	空
14	研究应用 Research Applications, RA	应用领域或使用范围	RA	空
15	饲养与繁殖 Breeding and Reproduction, BR	饲育特征和注意事项,繁殖情况、饲料、生活习性等。	BR	空
16	保种单位(Institution of Colony Maintenance, ICM	可以提供种源或出售的单位	Inst_CM	空
17	参考资料 References, RE	使用该品系所发表的文献	REF	空
18	录入/更新时间 Input Time, IT	该数据在数据库中录入或更新时间,可自动生成	Input_Time	否
19	备注 Remarks, RM	其他事项说明	RM	空

2.4 数据库检索

按照国际通用的数据库检索模式,分为模糊查询和精确查询两种界面。模糊查询,也叫快速查询,是指使用关键词(key word)查询,数据中有相关内容就会出现在查询结果中,每页 20 条,点击显示详细数据。精确查询会按照逻辑检索式,设置 3 ~ 5 个查询条件,包括查询号、品系名称、英文名称、研究应用和保种单位,显示界面每页 20 条数据,点击可显示详细数据。

3 讨论

实验动物资源也成为生命科学研究“大军”的必备“粮草”,然而在我国,这部分科研“粮草”的供应形势却不容乐观。所以,构建一个实验动物品系数据库,调查分析整理以我国实验动物品系资源为主,引进欧美日等发达国家实验动物品系资源数据,供生物医药相关科技人员检索使用,对于推动我国第六次科技革命,以及国务院颁发的生物产业发展规划意义重大。

国内外已经建立了一些的实验动物信息数据库以及信息资源平台,实现了信息资源共享。例如美国 Jackson 研究所的“小鼠品系数据库”“小鼠基因组”、“基因表达数据库”、“小鼠基因组百科全书”、“小鼠位点及遗传标记目录”、“小鼠突变资源库”等[5]。美国 NIH 的心肺血液研究所建立了大鼠基因组数据库(RGD)[6]。英国有“啮齿类基因组数据库”、“小鼠细胞遗传图谱”、“畸形人鼠同源性数据库”等[11]。以小鼠品系为主,已经形成了几个主要以信息共享为主的非营利性的实验动物资源联盟,包括国际小鼠种质资源库(IMSR)、国际小鼠资源联盟(FIMRe)、国际基因敲除小鼠资源联盟(IKMC)等。这些数据库收录品系较全,但仅限于小鼠或大鼠品系。

我国实验动物相关数据库建设严重滞后。作者单位曾经在 2001 – 2003 年构建过模式动物数据库,收录数据近 100 条。2008 年国家自然科技资源平台中设立了实验动物资源库,收录 8 个物种 188 个品系的生物学特性数据。南京大学模式动物研究所等单位联合成立中国遗传工程小鼠资源共享联盟,收录基因工程小鼠品系 717 条。其他还有个别单位建立的小规模数据库。这些数据库特点是小而散,缺乏数据更新。

世界上而尚无一个数据库,能够包括所有的实验动物品系资源。建立世界范围现有的实验动物品系库,对于国内科研人员充分利用现有实验动物

资源有积极意义。实验动物资源的共享与合作是全球性的发展趋势,主要目标在打破国与国之间的贸易壁垒,增进实验动物资源的分享、利用和保存,避免资源的重复生产与浪费。本文数据库的建立,将为用户免费提供实验动物品系资源的“一站式”查询和交流共享,有利于国内外实验动物资源的共享和利用。

本文建立的实验动物品系数据库已经开通并提供查询服务,数据量规模也达到 2.4 万条,但是距离完善还有很大的差距。许多条目还需要补充完善,内容上还存在一些瑕疵。检索方式、动物图片和配套数据库还有待增加。引用数据与相关数据库建立链接,用户可以通过链接查阅更详细的信息及资源拥有单位的联系方式。数据更新是一个数据库的生命线,本数据库建立后将有作者单位信息中心维护,定期收集整理公开发表的品系数据以更新,同时也接受国内外同行提交的品系数据。希望能在各位实验动物同行和前辈的指导和支持下,该数据库茁壮成长,健康发展,为实验动物信息化建设添砖加瓦。

表 2 实验动物品种编号

动物编号	动物名称	收录品系	品系总数	动物编号	动物名称	收录品系	品系总数
001	小鼠	21800	26000	040	鸡	1	5
002	大鼠	2200	2300	041	鸭	1	2
003	地鼠	6	38	042	鹅	1	1
004	豚鼠	3	12	043	鸽	1	1
005	兔	3	8	044	鹌鹑	1	20
006	犬	1	5	045	鼠兔	1	1
007	恒河猴	1	1	046	鼬(袋鼬)	1	1
008	食蟹猴	1	1	047	鼢鼠	1	1
009	狨猴	1	1	048	鹿	1	1
010	松鼠猴	1	1	049	牛	1	10
011	绿猴	1	1	050	羊	2	10
012	绢毛猴	1	1	051	马	1	1
013	南美伶猴	1	1	052	驴	1	1
014	日本雪猴	1	1	053	骡	1	1
015	黑颚猴	1	1	054	果蝇	1	5
016	台湾猴	1	1	055	线虫	1	11
017	白眉猴	1	5	056	海兔	1	1
018	赤猴	1	1	057	嗜热四膜虫	1	1
019	豚尾猴	1	1	058	蚕	1	1
020	红面猴	1	1	059	袋鼠	1	1
021	平顶猴	1	1	060	刺猬	1	1
022	藏酋猴	1	1	061	犰狳	1	1
023	卷尾猴	1	1	062	蝙蝠	1	1
024	熊猴	1	1	063	蟾蜍	1	1
025	叶猴	1	1	064	青蛙	1	1
026	狒狒	1	5	065	蚯蚓	1	1
027	长臂猿	1	5	066	鼩鼱	1	1
028	猩猩	1	10	067	江豚	1	1
029	树鼩	1	20(8)	068	海犬	1	1
030	仓鼠	1	3	069	斑马鱼	1	20
031	田鼠	2	2	070	剑尾鱼	1	3
032	沙鼠	2	2	071	青鳉	1	1
033	土拨鼠	1	1	072	稀有鮈鲫	1	1
034	鹿鼠	1	1	073	红鲫	1	1
035	棉鼠	1	2	074	电鳗	1	1
036	猫	1	2	075	鲫鱼	1	1
037	猪	5	12	076	金鱼	1	1
038	貂	1	5	077	虹鳟	1	1
039	毛丝鼠	1	2	…	其他	0	130

注:品系数量为数据库已经收录或拟收录的数据条,以后会逐步增加。

致谢:小鼠的品系名称主要参考国际小鼠种质资源库(IMSR),大鼠的品系名称主要参考 Rat

NO	品系编号	品系名称	英文名称	其它名称	物种描述	备注
1	31-11-001-1-0000001	小鼠	Mouse, Mus musculus	小白鼠,老鼠	由小家鼠演变而来，是经长期人工饲养选择培育而成的一种实验动物。	详细介绍
2	31-11-001-1-0000002	129小鼠	129 Mouse, 129 Mus musculus	两小鼠。	一种常用的小鼠品系，由Jackson实验室的L. C. Stevens培育而成。	详细介绍
3	31-11-001-6-0000001	615小鼠	615 Mouse, 615 Mus musculus		一种我国科学家自主培育的小鼠品系。已被国际小鼠命名委员会公认。	详细介绍
4	31-11-001-A-0000435	A/He小鼠	A/He Mouse, A/He Mus musculus		一种常用的小鼠品系。	详细介绍
5	31-11-001-B-0000182	BALB/c小鼠	BALB/c Mouse, BALB/c Mus musculus		一种常用的小鼠品系。	详细介绍
6	31-11-001-A-0000435	A/Wy小鼠	A/Wy mouse	无	SPF级近交系小鼠。	详细介绍
7	31-11-001-T-0000002	T739小鼠	T739 mouse	无	SPF级近交系小鼠。	详细介绍
8	31-11-001-6-0000002	615小鼠	615 mouse	615	SPF级近交系小鼠。	详细介绍
9	31-11-001-1-0000002	129小鼠	129 mouse	129	SPF级近交系小鼠。	详细介绍
10	31-11-001-C-0000002	C3H小鼠	C3H mouse	C3H	SPF级近交系小鼠。	详细介绍
11	31-11-001-N-000087	NOD/LtJ小鼠	NOD/LtJ mouse	NOD/LtJ	SPF级近交系小鼠，非肥胖糖尿病小鼠。。	详细介绍
12	31-11-001-D-000002	DBA/2J小鼠	DBA/2J mouse	DBA/2J	SPF级近交系小鼠。	详细介绍
13	31-11-001-D-000001	DBA/1小鼠	DBA/1 mouse	DBA/1	SPF级近交系小鼠。	详细介绍
14	31-11-001-C-00005T	C57BL/6J小鼠	C57BL/6J mouse	C57BL/6J	清洁级近交系小鼠。	详细介绍
15	31-11-001-C-000003	CBA/J小鼠	CBA/J mouse	CBA/J	SPF级近交系小鼠。	详细介绍
16	31-11-001-K-000002	昆明小鼠	KM mouse	KM	清洁级封闭群小鼠。	详细介绍
17	31-11-001-I-000002	ICR	ICR	ICR	清洁级封闭群小鼠。已成为全世界最广泛使用的动物。	详细介绍
18	31-11-001-K-000002	KK/Upj-Ay/J小鼠	KK/Upj-Ay/J mouse	KK/Upj-Ay/J	SPF级突变系小鼠。	详细介绍
19	31-11-001-B-000087	BALB/cA-nu裸小鼠	BALB/cA-nu mouse	BALB/cA-nu	SPF级突变系小鼠。	详细介绍
20	31-11-001-M-0000002	MRL/MpJ小鼠	MRL/MpJ mouse	MRL/MpJ		详细介绍

图 1 实验动物品系数据库查询结果截图

Genome Database (RGD),其他品系数据参考国内外发表的文献,在此一并致谢。

参考文献:

[1] 秦川,主编,医学实验动物学 [M]. 人民卫生出版社. 2008:11.

[2] 秦川,主编,实验动物学学科发展报告 [M]. 中国科学技术出版社. 2009:4.

[3] 秦川,主编,实验动物学 [M]. 人民卫生出版社. 2010:8.

[4] International Mouse Strain Resources (IMSR) [OL]. 2014[2014-11-26]http://www.informatics.jax.org/imsr/

[5] The Jackson Laboratory (TJL) [OL]. 2014[2014-11-26] http://jaxmice.jax.org/query/

[6] Rat Genome Database (RGD) [OL]. 2014[2014-11-26] http://rgd.mcw.edu/

[7] 突变小鼠资源联盟 Mutant Mouse Regional Resource Center (MMRRC) [OL]. 2014[2014-11-26] http://www.mmrrc.org/catalog/StrainCatalogSearchForm.jsp

[8] 人类癌症模式小鼠联盟 Mouse Models of Human Cancer Consortium, Frederick, MD (MMHCC)[OL]. 2014[2014-11-26] http://mouse.ncifcrf.gov/

[9] 加拿大小鼠联盟 Canadian Mouse Consortium (CMC) [OL]. 2014[2014-11-26] http://www.mousecanada.ca/ps/catalogue.htm

[10] 加拿大突变小鼠数据库 Canadian Mouse Mutant Repository, Toronto, Ontario (CMMR) [OL]. 2014[2014-11-26] http://www.phenogenomics.ca/databases/mutants_samples.html

[11] European Mouse Mutant Archive (EMMA)[OL]. 2014[2014-11-26] http://www.emmanet.org/mutant_types.php

[12] 日本实验动物中央研究所 RIKEN BioResource Center (RBRC) Laboratory Animals Division[OL]. 2014[2014-11-26] http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/search.php

[13] 日本熊本大学动物资源发展中心 Center for Animal Resources and Development (CARD) [OL]. 2014[2014-11-26] http://cardb.cc.kumamoto-u.ac.jp/transgenic/strains.jsp

[14] Charles River Laboratories, Inc [OL]. 2014[2014-11-26]

http://www.criver.com/
[15] Taconic, Inc [OL]. 2014 [2014-11-26] http://www.taconic.com/wmspage.cfm? parm1=16
[16] Harlan, Inc [OL]. 2014 [2014-11-26] http://www.harlan.com/
[17] Mouse Genome Database [OL]. 2014 [2014-11-26] http://www.informatics.jax.org
[18] ILAR [OL]. 2014 [2014-11-26] http://www2.nas.edu/ilarhome
[19] Kong Q, Qin C. Analysis of current laboratory animal science policies and administration in China [J]. ILAR J. 2009; 51(1):e1-e11.
[20] Kong Q, Qin C. Laboratory animal science in China: current status and potential for the adoption of alternatives [J]. Altern Lab Anim. 2010, 38(1): 53-69.
[21] NRC (National Research Council), Institute of Laboratory Animal Resources, Committee on Rat Nomenclature. 1992. Definition, nomenclature, and conservation of rat strains [J]. ILAR News 34(4): S1-S26
[22] NRC (National Research Council), Institute of Laboratory Animal Resources, Committee on Transgenic Nomenclature. 1992. Standardized nomenclature for transgenic animals [J]. ILAR News 34(4): 45-52.
[23] Davisson MT. Rules and guidelines for nomenclature of mouse genes. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice [J]. Gene. 1994, 147(2): 157-160.
[24] Maltais LJ, Blake JA, Eppig JT, et al. Rules and guidelines for mouse gene nomenclature: a condensed version. International Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice [J]. Genomics. 1997, 45(2): 471-476.
[25] Davisson MT. Rules and guidelines for genetic nomenclature in mice: excerpted version. Committee on Standardized Genetic Nomenclature for Mice [J]. Transgenic Res. 1997, 6(5): 309-319.
[26] Montoliu L, Whitelaw CB. Using standard nomenclature to adequately name transgenes, knockout gene alleles and any mutation associated to a genetically modified mouse strain [J]. Transgenic Res. 2011, 20(2): 435-440. Epub 2010 Jul 15.
[27] 国家自然科技资源平台实验动物资源库[OL]. 2014 [2014-12-30] http://www.lasdr.cn/UploadFile/local/2008/12/22/307754936260266141612299411967l8.pdf.

〔修回日期〕2015-01-21

(上接第 73 页)

[17] Wang F, Wang Y, Geng X, et al. Neuroprotective effect of acute ethanol administration in a rat with transient cerebral ischemia [J]. Stroke, 2012, 43(1): 205-210
[18] Geng X, Fu P, Ji X, et al. Synergetic neuroprotection of normobaric oxygenation and ethanol in ischemic stroke through improved oxidative mechanism [J]. Stroke, 2013, 44(5): 1418-1425.
[19] Zeng X, Asmaro K, Ren C, et al. Acute ethanol treatment reduces blood-brain barrier dysfunction following ischemia/reperfusion injury [J]. Brain Res, 2012, 1437: 127-133.
[20] Wang Q, Kalogeris TJ, Wang M, et al. Antecedent ethanol attenuates cerebral ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelial adhesive interactions and delayed neuronal death: role of large conductance, $Ca2^{+}$-activated K^{+} channels [J]. Microcirculation, 2010, 17(6): 427-438
[21] Sun H, Xiong W, Arrick DM, et al. Low-dose alcohol consumption protects against transient focal cerebral ischemia in mice: possible role of PPARγ [J]. PLoS ONE, 2012, 7(7): e41716.
[22] Xia J, Simonyi A, Sun GY. Changes in IP3R1 and SERCA2b mRNA levels in the gerbil brain after chronic ethanol administration and transient cerebral ischemia-reperfusion [J]. Brain Res Mol Brain Res, 1998, 56(1-2): 22-28.
[23] McCrea S, Wishart T, Miyashita H, et al. Attenuated glutamate release during ischemia in ethanol-administered gerbils [J]. Neuroreport, 1997, 8(15): 3385-3388.
[24] McCrea S, Miyashita H, Wishart T, et al. Acute ethanol administration and transient ischemia: a behavioral and neuropathological study [J]. Life Sci, 2000, 66(14): 1337-1343.
[25] Phillis JW, Estevez AY, O'Regan MH. Protective effects of the free radical scavengers, dimethyl sulfoxide and ethanol, in cerebral ischemia in gerbils [J]. Neurosci Lett, 1998, 244(2): 109-111.
[26] Crews FT, Steck JC, Chandler LJ, et al. Ethanol, stroke, brain damage, and excitotoxicity [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1998, 59(4): 981-991.
[27] 刘胜敏, 杨志宏, 孙晓波. 沙鼠脑缺血模型特点及应用的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(6): 79-83.

〔修回日期〕2015-02-10

继续教育

打造国家精品课程在医学生培养中的作用

张 建

(首都医科大学宣武医院,首都医科大学第一临床医学院,首都医科大学血管外科学系 ,北京 100053)

国家精品课程是指具有鲜明教学特色和一流教学水平的优秀示范性课程,一流的教学水平包括五个方面,即具有一流的教师团队、一流的教学内容、一流的教学方法、一流的教材和一流的教学管理。打造精品课程的目的是更有利于人才培养,所以精品课程的设置要根据人才培养的目标,充分体现现代的教育理念,既要符合教育的科学性、先进性和教育教学的普遍规律,又要具有鲜明的特色,并能适当运用现代教育技术与方法,使得教学效果显著,具有示范性、影响力和推广作用。

早在 2003 年 4 月,教育部就下发了《教育部关于启动高等学校教学质量与教学改革工程精品课程建设工作的通知》(教高[2003] 1 号)。首都医科大学第一临床医学院(宣武医院)作为医学本专科教育和研究生培养的重要基地,高度重视国家精品课程平台的建设,成功申报《神经病学》和《外科学》两门国家级精品课程。

下面以 2013 年申报的国家级精品课程《外科学》为例,对精品课程建设在培养医学生中的意义和作用做一简要论述。

1 申报的国家级精品课程《外科学》的背景

首都医科大学第一临床学院创建于 1958 年,是新中国神经科学的初创基地和培育神经科学人才的摇篮之一, 1963 年成为北京第二医学院教学医院,1972 年成为首都医科大学附属医院,在首都医科大学最早成立了外科学教研室。目前外科教研室由普通外科、泌尿外科、骨科、神经外科、胸心血管外科、麻醉科等科室组成,具有博士学位培养点和博士后流动站。外科教研室建立了教学干事脱产轮转制度、集体备课制度、新教师培训、试讲及教学准入制度、教学档案管理制度等一系列行之有效的教学管理模式,承担的教学任务涵盖五年制、七年制医学生、研究生、住院医师培训和继续医学教育。每年承担国家级继续医学教育项目十余项,在全国均有一定的影响力。正是首都医科大学第一临床医学院在外科教育教学方面的雄厚实力,为申报国家级精品课程《外科学》奠定了基础,也使得申报获得成功。

2 国家级精品课程《外科学》及其优秀教学团队在医学生培养中的作用

2.1 强化医学生德育教育和医学人文素质培养

医学是一门实践性科学,医生面对的首先是具有社会属性的人,今日的医学生就是明天的医学实践者,医学生的人文素质不仅影响着我国医学事业的发展,而且能折射出我们整个民族的文明程度。所以,我们始终强调“敬畏生命、珍重健康”的医学终极价值观,坚持“育人为本”、“德育为先”的教育理念,在完成学生专业教育的同时,培养学生“健康所系、性命相托”的医学道德水准,培养学生“扶伤济世、敬德修业”的首医主人翁精神。

2.2 坚持师资队伍的内涵建设

在国家精品课程(外科学)、国家级教学团队(外科学)基础上,定期开展教育教学改革与发展的研讨会,认真查找教学中的薄弱环节,制定切实可行的改进措施。

连续 5 年承办教育部《高校临床技能教学青年骨干教师高级研修班》,搭建全国外科临床教师交流学系的平台。连续 17 年牵头承办首都医科大学《外科学总论》、《青年教师理论教学和实践带教》师资培训班,统一首都医科大学教学方法、手段和标准,规范培训班的组织管理,已经成为首都医科大学师资培训的品牌项目。坚持对青年教师的培养和培训,支持青年教师参加国内外进修、培训和学术会议等,提高青年教师的综合素质和水平。

(下转第 86 页)

继续教育

浅谈研究生教育中的能力培养

王 蓉

（首都医科大学宣武医院，北京市老年病医疗研究中心，教育部神经变性病重点实验室，北京 100053）

我国自 20 世纪 80 年代以后建立了硕士和博士学位制，并于 1983 年 5 月 27 日授予了首批博士学位。虽然仅有短短的三十年时间，我国高校及科研单位已经为中国乃至世界培养了大批优秀人才，其中相当一部分在世界一流大学和研究室从事学术研究和学术管理工作。当然，由于我们研究生教育历程短，也由于教育水平和教育理念的差距，具体到每一位导师所培养的研究生，难免存在良莠不齐，研究生教育的具体过程还有许多值得探讨之处。但无论如何，提高研究生教育水平的关键是提高导师的水平，首先要使导师理解和认识研究生教育的内涵和意义，才能培养出真正合格的研究生。

从研究生的定义上不难看出，研究生教育的目的是培养具有独立学习某种专业知识能力的学生。研究生教育的过程不同于大学本科教育，大学课程多需要在老师的讲解下完成，而研究生培养的是独立学习能力，具体到每个学生的专业背景、学习能力、特长和兴趣点都是不一样的。如何让每个学生充分发挥自己的能力，扬其所长，避其所短，成为合格的毕业生，考验的是导师的科研思路、学术水平、道德水准和是否拥有开阔的心胸。在此，个人在研究生培养过程中有些感想和体会和大家分享。

1 研究生培养的目的是使学生具备独立进行科学研究的能力

“具备独立进行科学研究的能力”这句话，经常出现在研究生的毕业答辩决议上。那么，如何使其真正具有这种能力，达到研究生毕业水平，绝不是一朝一夕的事情，而是贯穿于整个培养过程的始终。

首先，在学生进入研究生培养阶段的初始，师生双方都应该非常清楚地知道毕业的最终标准，比如必须完成的开题报告、中期考核、毕业答辩、发表论文的层次、署名等，以免最后出现无可弥补的疏漏，影响学生毕业。在清楚最终目标的基础上，将能力培养放在首位，包括独立进行科学研究的能力和在社会环境中的生存能力。

在基础课学习期间，我要求学生大量阅读导师及其课题组发表的文献，熟悉导师课题组的前期工作和科研方向，以便迅速进入工作状态；同时要检索阅读相关的最新进展，此阶段，迅速提高专业英文阅读能力和文献检索能力非常重要！在阅读的同时，时刻要捕捉自己感兴趣的亮点，即使只有小小的一点，也要动笔记下来，这样大概到一学期结束的时候，应该积累了几十篇甚至上百篇的文献。这时候，可以让他们试着动笔写一篇小综述，这篇综述的着眼点尽量要具体，不要宏观，最好就某一个具体问题论述清楚，比如，不要写“某某的发病机制、治疗方法”，而是写“某一个发病机制、某一种治疗方法”；不要写“某某的信号通路研究”，而是写“某一条信号通路甚至某一个信号因子”。

基础课程完成以后，进入开题阶段。此时学生对于课题组的研究方向有了初步了解，要进行研究方法的学习摸索和预实验。此阶段，我经常告诫学生的是几个“勤”字：手勤——多动手，眼耳勤——多接收，嘴勤——多提问，腿勤——多跑去看看其他人在做什么，这几个勤字，也是在锻炼学生们的社交能力和生存能力，争取在有限的时间内，尽量多、尽量快的掌握研究方法，完成预实验和开题报告。

课题进行的过程从来就不会是一帆风顺的，也很少有人能按照开题报告一丝不差地完成实验。在此阶段出现的大部分问题，都应该在导师的预料之中，而且导师也应该有能力去和学生共同探讨、分析各种各样的实验结果，以调整实验的细节，最终完成课题。这时候，不仅需要学生具有百折不挠、屡败屡战的精神，更需要导师具有广博的知识、睿智的眼光和敏锐的洞察力。越是在实验出现问题的时候、出现不可思议的结果的时候，越是在考

验导师的知识水平和指导能力。最忌讳的是,导师总是依据自己的假设引导学生,而不去分析学生实际的实验结果,这样很容易出现不真实的结论。

在课题结束后,撰写论文、准备答辩的过程实际上是又一次学习、总结、提高的过程,因为这时候与刚刚开题时相比,肯定会出现很多新的研究进展。师生双方都需要再次阅读相关领域文献,甚至有时要补充部分实验。在不断学习新东西、总结实验结果的同时,撰写出符合毕业标准的合格论文。

2 因材施教,加强研究生的个性化培养

研究生的来源与本科生不同,有些是医学院毕业直接考入的,还有些是工作后重新深造的,学生的背景、经历不同,决定了他们的学习能力和专业特长也不同,在此举例说明。在本人所带过的研究生中,有两位是医学院的老师,还有两位是临床医生,对于他们的指导,明显与本科毕业直接考研的学生不同。他们有一定的临床经验和相当牢固的专业基础知识,给他们的课题要求肯定要高一些,并且最好和他们以前的工作能有些关系。比如本人的研究方向是神经系统退行性变,那么对于呼吸科的医生,我希望她能关注呼吸系统疾病对神经系统退行性变的影响;对于老年科的医生,我希望她能关注老年常见疾病与神经系统退行性变的关系;对于医学院校的老师,我希望他们能关注某条信号通路在老年性痴呆发病中的作用;这样既顾及了他们的兴趣点和专业特长,对于他们今后的工作有所帮助,也延续了本课题组的大方向。事实证明,因材施教的做法取得了非常出色的效果,他们不但可以顺利毕业,而且在以后的工作中都可以继续进行相关的研究。

在研究生个性化培养的问题上,作为导师应该具有“甘当人梯”的精神,以学生的发展为重,在课题组总的研究方向之下,尽量考虑学生的能力、利益和兴趣点,为他们以后的道路多做一些铺垫。

3 教学相长,师生共同进步

研究生的教育绝不仅仅是老师对学生的教育,一个好的老师也会不断从学生那里学到各种各样的知识,不断更新自己,适应迅速发展的社会环境;一个成熟的课题组也会因为众多研究生们的工作而不断进步,不断获得新的成果。

总之,研究生教育应该是“一对一”或“一对几”的个性化教育,在培养过程中,充分考虑到学生独立进行科学研究的能力,充分发挥学生的自我培养能力,为国家输送更多的合格毕业生和优秀的专门人才。

(上接第 84 页)

2.3 不断完善教学资源

2.3.1 根据教材更新的内容、学时安排、教学效果及学生反馈意见,适当增加见习学时,特别强调临床实践能力的培养,提高医学生的岗位胜任力。开设《医学生临床能力综合课程》,以病例为中心,从接诊病人、查体、医疗文书书写,到医患沟通、诊治思维,提高综合实践能力。

2.3.2 根据本学科的研究进展和临床需求,及时优化教案、课件,增加国内外最新的理念和发现。

2.3.3 不断完善和更新首都医科大学外科学精品课程网站、教学大纲、课件、教案、录像、试题库、参考文献等等,供学生网上学习、复习和自测。不断更新自编的《试题集》,增加新的临床病例库,做到每节课、每个知识点,均有可学习的病例供学生自学,以巩固学习内容。

2.3.4 不断更新《外科学》的讲授内容,丰富知识面;授课录像在 2103 年已经全部制作完毕。《外科学》是一门实践操作技能很强的学科,我们将外科的基本操作,如刷手、消毒铺巾、穿手术衣戴手套、换药、切开缝合、穿刺活检、清创术、隔离技术、肠切除肠吻合等,全部拍摄成录像,供医学生自我学习。

2.3.5 开设系列讲座,不断介绍本学科研究进展及前沿动态,开拓学生的视野,提高学生临床与科研的结合能力;

2.3.6 开展第二课堂活动,如学生创新项目、社区义诊、疾病调查、健康宣教等活动,以提高学生的社会实践能力。

在悉心打造国家精品课程的过程中,我们锻炼了教师队伍,凝练了教学方向,改进了教学方法,完善了教学资源,加强了教学管理,使得整个医院的教育教学水平上升了一个高度。所以,国家精品课程对于医学生的培养有着不可忽视的作用和十分重要的意义,我们将以继续建设国家精品课程平台为契机,深化医学教育教学改革,全面实施素质教育,构建完善的医学教育培养体系,为全面提高教育教学水平和医学人才的培养质量做出我们的贡献。