



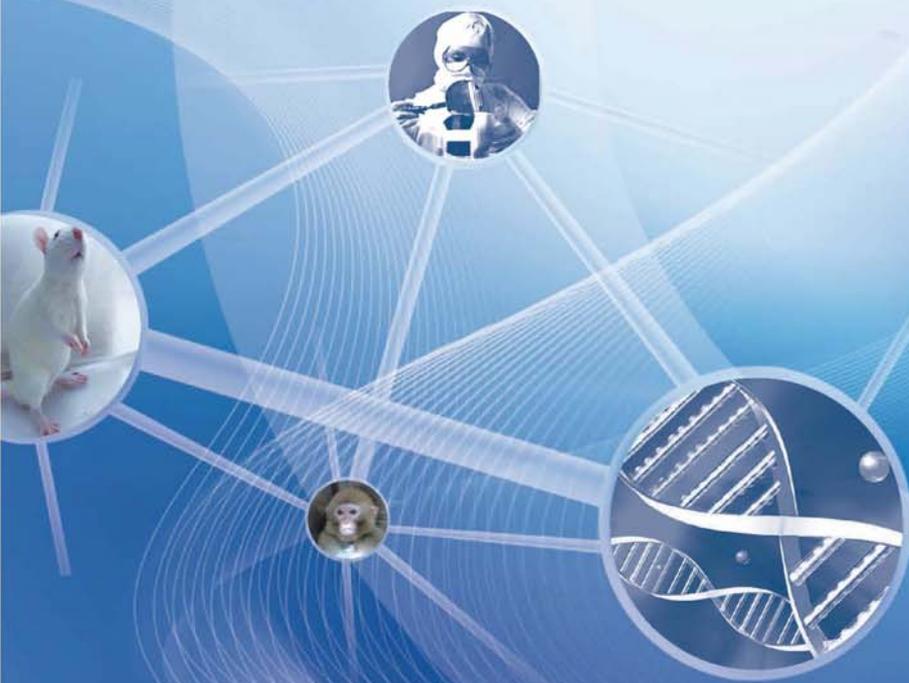
中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)
ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

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 **5**

邮发代号: 82-917

第25卷(第5期) Vol.25 No.5

ISSN 1671-7856



9 771671 785145

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5期 2015年5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://zgswdw.alljournal.ac.cn/
zghjyxzz/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 范永升
本期责任编辑 周文君

目次

研究报告

- 慢性肠道炎症促进肝癌的发展 易宏淦,臧梦雅,吴志远,等(1)
- 糖尿病肾病 E₂F₃ 表达变化与脂毒性关系研究 王华,张浩军,赵婷婷,等(5)
- 探讨姜黄素和茶多酚对不同时间 UVB 致无毛鼠急性光损伤的防御作用 高爱莉,江娜,刘清,等(9)
- 大鼠原发免疫性血小板减少性紫癜热盛模型的建立与评价 聂甜,蒋文明,彭素娟,等(13)
- 三种不同严重程度大鼠重症胰腺炎模型比较研究 袁琳,周秉舵,王晓素,等(20)
- 多巴胺 D₅ 受体通过抑制氧化应激对扩张型心肌病的调节作用 王子皓,胡永艳,王文洁,等(24)
- 雄性生殖细胞特异性表达 GFP 小鼠的繁殖及其表型鉴定 王志茹,李军,刘晓梅,等(29)
- 两个封闭群 NIH 小鼠群体的遗传监测结果的比较分析 魏杰,王洪,李芳芳,等(33)
- 毛蚶提取物辅助 NP 化疗的增效减毒作用 王作军,马玉奎,贾玉萍,等(37)
- 亲代三丁基锡暴露对 F₁ 代 KM 小鼠血常规的影响 尹玉伟,孙平,孙杰,等(42)

技术方法

- 内窥镜在大鼠气管插管中的应用 米睿,杨帆,李彤(47)
- 视网膜血管铺片技术的改进 徐玉环,徐艳峰,刘颖,等(51)
- 两品系小鼠局部淋巴结试验结果比较 胡培丽,张露勇,李波,等(54)
- 光激化学发光免疫分析技术在仙台病毒检测中的应用 常慧,高伟,张江义,等(58)

综述与专论

- P2X₃ 受体在糖尿病神经痛动物模型中的研究进展 魏骏骏,寿升芸,何晓芬,等(62)

调查报告

- 2014 年北京地区啮齿类实验动物质量的病理学评价 李超,董浩迪,徐琳凯,等(67)
- 华北地区埃博拉病毒莱斯顿亚型的流行病学调查 谷松至,许黎黎,鲍琳琳,等(71)
- 野生白化喜马拉雅旱獭体内寄生虫检测与控制 陶元清(74)
- 广告 (封底)

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 25 Number 5 May 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://zggydw.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

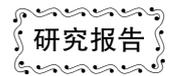
CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2015 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- Chronic colitis induced by irritant dextran sodium sulphate promote hepatoma development in mice *YI Hong-gan, ZANG Meng-ya, WU Zhi-yuan, et al.* (1)
- Study on the expression of ETF β in diabetic nephropathy and its relationship with lipotoxicity *WANG Hua, ZHANG Hao-jun, ZHAO Ting-ting, et al.* (5)
- Protective effect of Curcumin and Tea Polyphenols against different time of UVB-induced acute photodamage in hairless mice skin *GAO Ai-li, JIANG Na, LIU Qing, et al.* (9)
- Establishment and evaluation of heat sheng model of rat primary immune thrombocytopenic purpura *NIE Tian, JIANG Wen-ming, PENG Su-juan, et al.* (13)
- Comparative study of severe acute pancreatitis model in rats with three different severity *YUAN Lin, ZHOU Bing-duo, WANG Xiao-su, et al.* (20)
- The regulation of dilated cardiomyopathy by dopamine D5 receptor through inhibiting oxidative stress *WANG Zi-hao, HU Yong-yan, WANG Wen-jie, et al.* (24)
- Production and phenotype identification of specific expressed green fluorescent protein in male mice germ cells *WANG Zhi-ru, LI Jun, LIU Xiao-mei, et al.* (29)
- Comparative analysis on genetic monitoring of 2 closed colonies NIH mouse *WEI Jie, Wang Hong, LI Fang-fang, et al.* (33)
- Synergism and attenuation effects of *Scapharca Subcrenata* Extraction on NP chemotherapy *WANG Zuo-jun, MA Yu-kui, JIA Yu-ping, et al.* (37)
- Effects of parents exposure to tributyltin (TBT) on blood routine of F1 generation KM mice *YIN Yu-wei, SUN Ping, SUN Jie, et al.* (42)
- Endoscopic assist in rat orotracheal intubation *MI Rui, YANG Fan, LI Tong* (47)
- A modification of retinal vascular preparation *XU Yu-huan, XU Yan-feng, LIU Ying, et al.* (51)
- The comparative study of two strains on results of Local lymph node assays *HU Pei-li, ZHANG Lu-yong, LI Bo, et al.* (54)
- Development of an amplified luminescent proximity homogeneous assay for detecting Sendai virus *CHANG Hui, GAO Wei, ZHANG Jiang-yi, et al.* (58)
- Progress of animal experimental research on P2X3 receptors in diabetes mellitus *WEI Jun-jun, SHOU Sheng-yun, HE Xiao-fen, et al.* (62)
- Assessing the quality of rodent laboratory animals in Beijing area by pathological diagnosis in October 2014 *LI Chao, DONG Hao-di, XU Lin-kai, et al.* (67)
- Epidemiology investigation for reston subtype of ebola virus in north China area *GU Song-zhi, XU Li-li, BAO Lin-lin, et al.* (71)
- Survey on the internal parasites infection and control technique in albinism *Marmota himalayana* *TAO Yuan-qing* (74)



慢性肠道炎症促进肝癌的发展

易宏淦^{1,2}, 臧梦雅², 吴志远², 朱正³, 赵新明³, 王维虎⁴, 曲春枫²

(1. 广州医科大学, 广州 510182; 2. 中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021;
3. 中国医学科学院肿瘤医院影像诊断科, 北京 100021; 4. 中国医学科学院肿瘤医院放射治疗科, 北京 100021)

【摘要】 目的 探讨慢性肠道炎症状态下菌群结构及构成改变对肝癌进展的影响。方法 22只雄性乙型肝炎病毒转基因小鼠在出生后第2周腹腔注射二乙基亚硝胺诱导小鼠原发性肝癌, 随机分为慢性肠炎组(给予含2%葡聚糖硫酸钠的饮用水)和对照组(给予正常饮用水)。上述小鼠观察至22周龄。在此期间定期进行肝功能测定, 收集粪便进行宏基因组测序。另将4只已发生肝癌的小鼠与7只8周龄肉眼及病理学未见肝癌的小鼠同笼(分2笼)饲养16周。结果 DSS所诱导的慢性肠炎小鼠与正常饮用水小鼠相比肝功能无显著改变; DSS诱导的慢性肠炎组小鼠($n=10$)在第22周龄时有9只发生弥漫性肉眼可见的肝癌, 而正常饮用水小鼠($n=12$)仅有2只发生肝癌, 肿瘤发生率($P=0.002$)和肿瘤数量($P=0.028$)有显著差别; 与正常饮用水小鼠相比, 慢性肠炎组小鼠肠道菌群中, 普雷沃氏菌属($P=0.022$)和厌氧支原体属($P=0.014$)显著减少; 与已发生肝癌小鼠进行同笼饲养的小鼠($n=7$)在24周龄时全部发生肉眼可见的肝癌。结论 慢性肠道炎症状态下, 肠道菌群改变可促进肝癌进展。

【关键词】 慢性肠道炎症; 肝癌; 菌群改变

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0001-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.001

Chronic colitis induced by irritant dextran sodium sulphate promote hepatoma development in mice

YI Hong-gan^{1,2}, ZANG Meng-ya², WU Zhi-yuan²,
ZHU Zheng³, ZHAO Xin-ming³, WANG Wei-hu⁴, QU Chun-feng²

(1. Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, China; 2. State Key Lab of Molecular Oncology, Beijing 100021, China;
3. Department of Medical Imaging, Beijing 100021, China; 4. Department of Radiation Oncology, Cancer Institute/Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of gut bacteria under chronic colitis on the progression of hepatoma in mice. **Methods** 22 hepatitis B virus (HBV) - transgenic mice (male, 8 weeks) were randomly divided into two groups, one group ($n=10$) was fed the drinking water containing 2% dextran sodium sulphate (DSS) to induce chronic colitis and the control group ($n=12$) was fed with normal drinking water. In order to investigate the effect of gut microbes, 7 male HBV-transgenic mice (8 weeks, with no detectable hepatoma under microscopy) were cohoused with 4 mice with hepatoma for 16 weeks. **Results** No significant liver cell damage was observed in the group of the mice fed with 2% DSS-containing drinking water. By the 22-week old, 9 of the 10 mice (90.0%) fed with 2% DSS-containing drinking water, 2 of the 12 mice (16.7%) fed with normal drinking had hepatoma. Both the hepatoma incidence and the tumor numbers in

[基金项目] 973 课题“细胞微环境在肿瘤发生发展及侵袭转移中的作用及机制”(2011CB504205)。

[作者简介] 易宏淦(1989-), 男, 硕士生, 研究方向: 慢性炎症与肿瘤免疫。

[通讯作者] 曲春枫, 教授, 博士生导师, E-mail: quCHF@cicams.ac.cn。

the group of mice fed with DSS-containing water were significantly higher than that in the controls ($P = 0.002$ and $P = 0.028$ respectively). Compared to controls, the bacteria family Prevotella ($P = 0.022$) and Anaeroplasmia ($P = 0.014$) reduced significantly in the mice with induced chronic colitis. All the mice ($n = 7$) cohoused with the mice with hepatoma had the liver tumor developed at 24-week-old. **Conclusion** Alterations of gut bacteria under chronic colitis may promote the development of liver cancer.

【Key words】 Chronic colitis; Liver cancer; Gut bacteria

原发性肝癌 (primary carcinoma of the liver, HCC) 是世界范围内第三大恶性肿瘤。在我国, 慢性乙肝病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染是肝癌发生的主要危险因素, 生活环境的多种因素也影响着肝癌的发生发展^[1-2]。近年来, 欧美等国家的肝癌发病呈上升趋势, 然而, 亚洲包括我国的肝癌发病则呈下降趋势^[3], 有些临床的观察流行病学研究指出: 这种肝癌的下降趋势与控制婴幼儿的慢性 HBV 感染相关^[4-6]。毫无疑问, 控制慢性 HBV 感染能够显著降低青少年肝癌以及其它肝病的发生^[7], 然而, 我们以及其他研究者在江苏启东肝癌高发区现场人群中的研究表明, 通过改善慢性 HBV 感染者的饮食结构及饮水水质, 低年龄人群中肝癌发病率显著降低^[8-9]。

饮食结构影响着肠道微生物种类及构成, 由于肝脏与肠道的特殊解剖关系, 肝脏经常接受来自肠道的多种抗原如细菌及其产物的刺激, 在临床研究发现, 肠道的慢性炎症性疾病常伴有多个器官受累的肠外表现, 肝胆系统是肠外病变所主要累及的器官^[10]。肠道炎症常伴随肠道菌群紊乱, 并随门静脉迁移至肝脏引起肝脏病变, 表明肠道微环境中的协同因素将有可能影响着肝癌的发展进程, 然而目前尚无直接的实验依据。

二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, DEN) 是一种基因毒性肝脏致癌剂, 在动物研究中, 常用 DEN 来诱导动物的肝癌, 以模拟人类肝癌发生过程^[11-12]。1985 年, Ohkusa 等^[13]报导了葡聚糖硫酸钠 (dextran sodium sulphate, DSS) 诱导的急性结肠炎, DSS 结肠炎模型与人类炎症性肠病特别是溃疡性结肠炎的病理特征类似。本研究采用腹腔注射 DEN 在 HBV 转基因小鼠中诱导基因毒性以诱发原发性肝癌, 通过给予含 DSS 饮用水造成慢性肠道炎症, 探讨肠道慢性炎症时肠道菌群改变对肝癌发展的作用。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

无特定病原体级雄性 HBV 转基因小鼠, 鼠龄 6~8 周, 体重 18~20 g, 购自北京大学医学部实验动物中心【SCXK(京)2011-0012】, 自行繁殖并饲养于中国医学科学院肿瘤医院实验动物中心【SYXK(京)2008-0025】。

1.1.2 主要试剂

葡聚糖硫酸钠 (DSS) 相对分子量为 36 000~50 000, 购自美国 MP Biomedicals 公司。二乙基亚硝胺 (DEN) 粉末 1 mg, 购自美国 Sigma 公司。乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒 (酶联免疫法) 购自上海科华生物工程股份有限公司。丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 测定试剂盒 (速率法) 购自中生北控生物科技股份有限公司。粪便基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。 λ DNA/Hind III (即用型 0.1 mg DNA/mL) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.2 方法

1.2.1 DEN 诱导小鼠原发性肝癌

在 HBV 转基因小鼠在生后第 2 周按 25 $\mu\text{g/g}$ 体重腹腔注射 DEN, 于小鼠 5 周龄时选择雄性小鼠进行尾静脉采血, 采用乙型肝炎病毒表面抗原诊断试剂盒以确定小鼠体内存在乙型肝炎病毒表面抗原的持续表达。对于具有 HBsAg 持续表达的小鼠分别于小鼠第 8 周龄, 14 周龄和 16 周龄时, 采用小鼠 B 超 (visual sonics vevo770) 进行肝脏扫描, 并选择上述处理的 5 只小鼠, 打开腹腔获取肝脏组织再检查是否存在肉眼可见肝脏结节, 采用 10% 中性福尔马林将肝叶组织固定, 石蜡包埋后进行组织切片, HE 染色后显微镜下检查肝癌发生情况。

1.2.2 DSS 诱导慢性结肠炎

在小鼠第 8 周龄时将 22 只小鼠随机分成慢性结肠炎组 ($n = 10$) 和对照组 ($n = 12$), 对照组给予正常饮用水。慢性结肠炎组在第 8 周龄给予含 2% DSS 的饮用水, 持续 5 d, 随后改用正常饮用水 16 d, 作为 1 个 DSS 周期, 共给予 4 个 DSS 周期。

1.2.3 粪便基因组提取

在第 22 周时, 无菌条件下采集慢性结肠炎组和对

照组小鼠粪便,保存于 -80°C 。按照说明书操作提取粪便基因组 DNA。应用 NanoDrop 2000C (Thermo Scientific) 检测提取的总 DNA 的浓度和纯度,并采用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳鉴定确定 DNA 的完整性。

1.2.4 ALT 测定

在每次给予 DSS 饮用水前后,尾静脉采血,分离血清。按照丙氨酸氨基转移酶测定试剂盒(速率法)说明书检测血清中 ALT 水平。

1.2.5 小鼠肝脏组织学分析

小鼠二氧化碳麻醉后,在肝脏病变最明显处取 $1\text{ cm} \times 1\text{ cm}$ 大小组织,固定于 10% 中性甲醛中,石蜡包埋切片后,进行 HE 染色。

1.2.6 混合饲养(Cohouse)

小鼠在 2 周龄时注射 DEN,将已发生肝癌的 26 周龄小鼠($n=4$)与 8 周龄的雄性鼠($n=7$,)进行混合饲养,共 2 笼:其中 1 笼包含 2 只已发生肝癌的小鼠和 3 只 8 周龄的雄性鼠,另 1 笼包含 2 只已发生肝癌的小鼠和 4 只 8 周龄的雄性鼠,共计 16 周。

1.2.7 粪便微生物基因组测序

粪便基因组 DNA 在博奥生物有限公司扩增 16S V4 区,采用 Ion Torrent 平台进行宏基因组测序,并对测序结果进行生物信息学分析,包括群落结构分析,显著差异性分析等。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。计量资料的比较采用 t 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。计数资料的比较采用 χ^2 检验,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠血清 ALT 的变化

DSS 是一种肠道刺激物可导致小鼠肠炎,但不能进入血液,为排除其对肝细胞的直接损伤作用,通过血清丙氨酸氨基转移酶的测定,对照组和慢性肠炎组小鼠血清中 ALT 水平无统计学差异(图 1),表明 DSS 没有直接引起肝细胞损伤。

2.2 小鼠肝脏肿瘤进展的改变

通过饮用 DSS 导致的慢性肠炎小鼠($n=10$)在 22 周龄时有 9 只发生弥漫性的肉眼可见的肝癌,肝癌发生率为 90.0% (9/10),光镜下可见边界清晰的癌灶,瘤细胞间有丰富的血窦样间隙;对照组($n=12$)小鼠仅有 2 只发生肝癌,发生率为 16.7% (2/12),两组肝癌发生率有显著差别($P=0.002$)。在

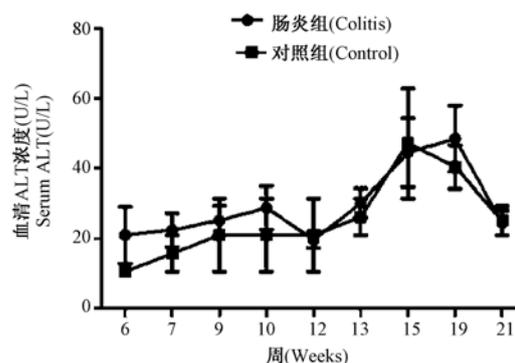


图 1 小鼠血清 ALT

Fig. 1 The level of ALT in serum

已发生肿瘤的小鼠中,计数肿瘤数量,相较于对照组,慢性肠炎组小鼠肝脏肿瘤的数量明显增多($P=0.028$)(封 2 图 2)。该结果表明 DSS 通过诱导慢性结肠炎症的发生促进了肝癌的发展。

2.3 小鼠肠道菌群改变

小鼠粪便微生物宏基因组测序结果显示,与 HBV/DEN 对照组($n=5$)相比较,在 DSS 诱导慢性结肠炎组($n=3$)中肠道菌群发生了明显的改变,其中普雷沃氏菌属($P=0.022$)和厌氧支原体属($P=0.014$)显著减少(彩插 1 图 3),该结果表明 DSS 通过诱导结肠炎症的发生导致了肠道菌群的改变。

2.4 混合饲养(Cohouse)影响肝癌进展

我们将已发生肝癌小鼠($n=4$)与 8 周龄大小 DEN 处理的 HBV 转基因小鼠($n=7$,肉眼及病理学未见肝癌)混合饲养(Cohouse)来改变肠道菌群,在第 24 周龄时全部小鼠发生肉眼可见的肝癌(封 2 图 4)。

3 讨论

肝脏是人体最大的实质性器官,有双重血液供应:肝动脉内是来自心脏的动脉血;门静脉收集消化道的静脉血。肝脏大约 70% 的血液来自门静脉。因此,肝脏经常接受来自肠道的抗原刺激,包括食物源性抗原和细菌相关抗原。肠道细菌在肠-肝轴中发挥重要作用。人体肠道中的细菌数(1×10^{13})大约是人体细胞数(1×10^{12})的 10 倍^[14-15]。肠道细菌参与宿主的正常生理活动,包括营养、行为和应激反应。作为共生菌,这些微生物在人体消化吸收过程中起关键作用,肠道细菌通过活化或竞争机制阻止外来病原菌的入侵,当菌群稳态被打破时,肠道细菌通过影响附近和远端脏器,在疾病发

生中起重要作用,此外,肠道细菌也能促进肠上皮细胞分化增殖,在维持肠道屏障功能中起关键作用^[16]。

持续存在的慢性炎症在肿瘤发生中发挥重要作用,在人群中的研究发现,肠道细菌可以影响肠外肿瘤包括肝癌和乳腺癌的发展^[17],肠道菌群易位能促进肝纤维化发生^[18]。在肝癌的发生和化学剂诱导的炎性肿瘤中,肠道稳态发挥重要作用,Dianne H. Dapito 等^[19]研究表明,肠道微生物可能通过 TLR4 促进肝癌发生。本研究中,我们利用 DEN 诱发小鼠原发性肝癌,同时利用 DSS 诱导小鼠慢性结肠炎,结果发现慢性肠道炎症能促进肝癌的进展。利用宏基因组测序方法检测小鼠粪便细菌,发现在慢性肠道炎症存在下,肠道细菌有明显改变,其中普雷沃氏菌属和厌氧支原体属显著减少。同时,鉴于鼠类是嗜粪动物(coprophaga)^[20],我们将已发生肝癌小鼠与肉眼及病理未见肝癌小鼠同笼饲养(Cohouse),结果发现 Cohouse 能促进肝癌的进展,具体原因还需进一步研究,根据 Damman 等^[21]研究报告,我们推测 Cohouse 可能改变了肠道菌群,但还需进一步的研究证实。

参考文献:

- [1] Poon D. , Anderson B. O. , Chen L. T. , *et al.* Management of hepatocellular carcinoma in Asia; consensus statement from the Asian Oncology Summit 2009 [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10 (11): 1111 - 1118.
- [2] Tanaka M. , Katayama F. , Kato H. , *et al.* Hepatitis B and C virus infection and hepatocellular carcinoma in China; a review of epidemiology and control measures [J]. *J Epidemiol*, 2011, 21 (6): 401 - 416.
- [3] Zhang Y. , Ren J. S. , Shi J. F. , *et al.* International trends in primary liver cancer incidence from 1973 to 2007 [J]. *BMC Cancer*, 2015, 15 (1): 1113.
- [4] Chang M. H. , You S. L. , Chen C. J. , *et al.* Decreased incidence of hepatocellular carcinoma in hepatitis B vaccinees; a 20 - year follow-up study [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2009, 101 (19): 1348 - 1355.
- [5] Chiang C. J. , Yang Y. W. , You S. L. , *et al.* Thirty-year outcomes of the national hepatitis B immunization program in Taiwan [J]. *JAMA*, 2013, 310 (9): 974 - 976.
- [6] Chien Y. C. , Jan C. F. , Chiang C. J. , *et al.* Incomplete hepatitis B immunization, maternal carrier status, and increased risk of liver diseases: A 20 - year cohort study of 3.8 million vaccinees [J]. *Hepatology*, 2014, 60 (1): 125 - 132.
- [7] Qu C. , Chen T. , Fan C. , *et al.* Efficacy of neonatal HBV vaccination on liver cancer and other liver diseases over 30 - year follow-up of the Qidong hepatitis B intervention study: a cluster randomized controlled trial [J]. *PLoS Med*, 2014, 11 (12): e1001774.
- [8] Sun Z. , Chen T. , Thorgeirsson S. S. , *et al.* Dramatic reduction of liver cancer incidence in young adults; 28 year follow-up of etiological interventions in an endemic area of China [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34 (8): 1800 - 1805.
- [9] Chen J. G. , Egner P. A. , Ng D. , *et al.* Reduced aflatoxin exposure presages decline in liver cancer mortality in an endemic region of China [J]. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2013, 6 (10): 1038 - 1045.
- [10] Mendoza J. L. , Lana R. , Taxonera C. , *et al.* Extraintestinal manifestations in inflammatory bowel disease: differences between Crohn ' s disease and ulcerative colitis [J]. *Med Clin (Barc)*, 2005, 125 (8): 297 - 300.
- [11] Vesselinovich S. D. , Mihailovich N. Kinetics of diethylnitrosamine hepatocarcinogenesis in the infant mouse [J]. *Cancer Res*, 1983, 43 (9): 4253 - 4259.
- [12] Druckrey H. , Steinhoff D. , Preussmann R. , *et al.* Induction of Cancer by a Single Dose of Methylnitroso-Urea and Various Dialkylnitrosamines in Rats [J]. *Z Krebsforsch*, 1964, 66 (1 - 10).
- [13] Ohkusa T. Production of experimental ulcerative colitis in hamsters by dextran sulfate sodium and changes in intestinal microflora [J]. *Nihon Shokakibyō Gakkai Zasshi*, 1985, 82 (5): 1327 - 1336.
- [14] Guarner F. , Malagelada J. R. Gut flora in health and disease [J]. *Lancet*, 2003, 361 (9356): 512 - 519.
- [15] O'Keefe S. J. Nutrition and colonic health; the critical role of the microbiota [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2008, 24 (1): 51 - 58.
- [16] Rawls J. F. , Samuel B. S. , Gordon J. I. Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (13): 4596 - 4601.
- [17] Rogers A. B. Distance burning; how gut microbes promote extraintestinal cancers [J]. *Gut Microbes*, 2011, 2 (1): 52 - 57.
- [18] Darnaud M. , Faivre J. , Moniaux N. Targeting gut flora to prevent progression of hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2013, 58 (2): 385 - 387.
- [19] Dapito D. H. , Mencin A. , Gwak G. Y. , *et al.* Promotion of hepatocellular carcinoma by the intestinal microbiota and TLR4 [J]. *Cancer Cell*, 2012, 21 (4): 504 - 516.
- [20] Elinav E. , Thaïss C. A. , Flavell R. A. Analysis of microbiota alterations in inflammasome-deficient mice [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 1040 (185 - 194).
- [21] Damman C. J. , Miller S. I. , Surawicz C. M. , *et al.* The microbiome and inflammatory bowel disease; is there a therapeutic role for fecal microbiota transplantation? [J]. *Am J Gastroenterol*, 2012, 107 (10): 1452 - 1459.

[修回日期] 2015 - 03 - 31



糖尿病肾病 ETF β 表达变化与脂毒性关系研究

王 华^{1,2}, 张浩军², 赵婷婷², 严美花², 董 晔², 孙斯凡^{1,2}, 张并璇², 李 平^{1,2}

(1. 中国医学科学院 & 北京协和医学院研究生院, 北京 100730; 2. 中日友好医院临床医学研究所, 北京 100029)

【摘要】 目的 通过检测 ETF β 在糖尿病肾病中的改变, 探讨其与脂毒性的关系。方法 体内实验采用腹腔注射链脲佐菌素合并单侧肾切除建立糖尿病肾病模型, 并评价肾小管损伤情况, 检测 ETF β 在肾皮质中的表达变化。体外建立脂肪酸诱导肾小管细胞 NRK 52E 凋亡模型, 构建 ETF β 重组质粒, 并将其转染至 NRK 52E 细胞, 观察 ETF β 过表达对脂肪酸诱导细胞凋亡的作用。结果 链脲佐菌素合并单侧肾切除诱导的糖尿病肾病大鼠模型中, 肾小管明显损伤, ETF β mRNA 和蛋白表达均下降。脂肪酸可诱导 NRK 52E 细胞凋亡, 过表达 ETF β 可减少凋亡。结论 糖尿病肾病模型中 ETF β 表达下降, 过表达 ETF β 可降低脂肪酸诱导的肾小管细胞凋亡。

【关键词】 ETF β ; 糖尿病肾病; 脂肪酸; 凋亡

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0005-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.002

Study on the expression of ETF β in diabetic nephropathy and its relationship with lipotoxicity

WANG Hua^{1,2}, ZHANG Hao-jun², ZHAO Ting-ting², YAN Meihua², DONG Xi², SUN Si-fan^{1,2}, ZHANG Bing-xuan², LI Ping^{1,2}

(1. Graduate School of Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China;

2. Institute of Clinical Medical Sciences, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

【Abstract】 **Objective** To detect the expression change of ETF β in diabetic nephropathy rats and study the role of ETF β in fatty acid-induced apoptosis in renal tubules. **Methods** Diabetic nephropathy model was established by intraperitoneal injection of streptozotocin and unilateral nephrectomy. In vivo ETF β expression was detected in renal cortex, as well as tubular injury evaluated. In vitro fatty acid-induced apoptosis in renal tubular cells NRK 52E model was established and ETF β recombinant plasmid was constructed to be transfected into NRK 52E cells and furtherly to observe the effect of ETF β over-expression on the fatty acid-induced apoptosis. **Results** In the rats model of diabetic nephropathy induced by streptozotocin injection and unilateral nephrectomy, ETF β mRNA and protein expression were decreased as obvious tubular damage occurred. Fatty acids could induce apoptosis in NRK 52E, and ETF β over-expression reduced the apoptosis. **Conclusion** The expression of ETF β is decreased in diabetic nephropathy model, and ETF β over-expression can reduce apoptosis induced by fatty acid in renal tubular cells.

【Key words】 ETF β ; Diabetic nephropathy; Fatty acid; Apoptosis

糖尿病肾病发病机制复杂, 具体机制尚未阐明清楚。本课题组前期蛋白组学发现电子转运黄素

蛋白 β 亚单位 (electron transfer flavoprotein β subunit, ETF β) 在 2 型自发性糖尿病肾病 OLETF 大

[基金项目] 国家自然科学基金(81302942); 国际科技合作项目(2011DFA31860); 国家自然科学基金(81173422)。

[作者简介] 王华(1982-), 女, 博士生, 研究方向: 中药防治糖尿病肾病。

[通讯作者] 李平(1956-), 女, 研究员, 研究方向: 中药防治糖尿病肾病。E-mail: lp8675@163.com。

鼠模型中发生了氨基酸突变(未发表),但 *ETFβ* 是否参与糖尿病肾病发生发展目前未见报道。*ETF* 由 α 和 β 亚单位组成,是一种含有黄素核苷酸辅基的电子载体蛋白,存在于生物体细胞线粒体内,接受上游脂肪酸氧化脱氢反应产生的电子,然后在辅基 FAD 的帮助下传递给电子转运黄素蛋白泛醌氧化还原酶 (electron transfer flavoprotein ubiquinone oxidoreductase, *ETF:QO*),通过辅酶 Q10 (Coenzyme Q10, CoQ10) 而进入呼吸链,最终与氧结合生成水^[1-2]。*ETF* 作为脂肪酸氧化第一步反应的电子接受体,其在糖尿病肾病脂代谢紊乱中是否发挥重要作用尚无明确报道。本研究旨在通过检测 *ETFβ* 在糖尿病肾病中的改变,探讨其可能的作用机制,为进一步揭示糖尿病肾病脂毒性的机制及提供药物作用的新靶点打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 Wistar 大鼠 16 只,8 周龄,体重 160 ~ 200 g,分为假手术组 (Sham) 和糖尿病肾病模型组 (DN),每组 8 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2009-0007】,饲养于中日友好医院临床研究所 SPF 级动物室【SYXK(京)2010-0011】。

1.2 试剂

链脲佐菌素(美国 Sigma 公司)。NRK 52E 细胞、绿色荧光蛋白(GFP)为中日友好医院临床医学研究所药理室保存;真核表达载体 pcDNA3.1/V₅-His、新型 pUC-T 快速克隆试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司);大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞(北京鼎国昌盛生物技术有限公司);高保真 PCR 扩增试剂盒(德国 Roche 公司);T4 DNA 连接酶、限制性内切酶 Eco R V、Pst I、Xba I(美国 New England Biolabs 公司);凝胶回收纯化试剂盒、质粒中提试剂盒(德国 QIAGEN 公司)。抗 V5 单克隆抗体(美国 Invitrogen 公司),抗 *ETFβ* 多克隆抗体(中国 Proteintech 公司)。lip2000(美国 Invitrogen 公司),棕榈酸钠 (palmitate, PA)、无脂肪酸-BSA(美国 sigma)。TUNEL 检测试剂盒(德国 Roche 公司)。

1.3 糖尿病肾病大鼠模型的建立

通过腹腔注射链脲佐菌素合并单侧肾切除建立糖尿病肾病大鼠模型^[3-4]。大鼠购入后顺应性喂养一周,测定血糖和尿蛋白等基础状态,将血糖偏高的 1 只大鼠剔除,其余动物按体重随机分为假手术组和模型组。腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉大鼠,

右侧背部术前备皮,常规消毒,背部切口 1 cm 左右以充分暴露右肾,假手术组剥离肾脏包膜,缝合切口。模型组大鼠结扎右肾门血管,切除右肾,缝合伤口。术后 1 周,手术组以 40 mg/kg 的剂量腹腔注射 1% 链脲佐菌素,假手术组注射相同剂量的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液。3 d 后大鼠禁食不禁水 12 h,测空腹血糖,高于 16.7 mmol/L 作为糖尿病模型成功建立的标准,记为“0 周”时间点。连续观察 20 周,检测到大量蛋白尿,视为糖尿病肾病模型建立。

1.4 *ETFβ* 重组质粒的构建和转染

以大鼠 *ETFβ* mRNA 序列设计引物以扩增出该基因的全长,分别在上、下游引物前加上 EcoR V、Xba I 酶切位点,应用高保真酶和 RT-PCR 方法扩增出编码 *ETFβ* 的 cDNA,将 PCR 产物回收纯化并验证其分子量。将 PCR 产物克隆至 pUC-T 载体,转化到感受态细胞,筛选阳性菌落并扩增,进行质粒抽提,经酶切鉴定并进行测序证实为 *ETFβ* 基因序列后,*ETFβ*/pUC-T 和 pcDNA3.1/V₅-His 载体分别用 EcoR V 和 Xba I 进行双酶切,用 T4 DNA 连接酶连接双酶切后的目的片段和载体,构建 *ETFβ*/pcDNA3.1/V₅-His 重组质粒(简称 *ETFβ* 重组质粒)。将 NRK 52E 细胞接种于 6 孔板,细胞贴壁后采用脂质体 lip2000 转染 *ETFβ* 重组质粒,同时转染 GFP 作为转染效率参照物,转染 48 h 后倒置显微镜下观察转染效率。对照组转染 pcDNA3.1/V₅-His 空载体,转染 *ETFβ* 重组质粒 48 h 后收细胞提取蛋白质,用于检测 V5 标签融合蛋白的表达。以 BSA 为载体溶解 PA,储液浓度为 5 mmol/L。转染 24 h 后,PA 组和重组质粒组加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 PA,对照组加入等体积的 BSA,再过 24 h 后用 TUNEL 试剂盒检测细胞凋亡情况。

1.5 统计学方法

数据用均数 + 标准差表示,两样本均数比较用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 视为有统计学差异。

2 结果

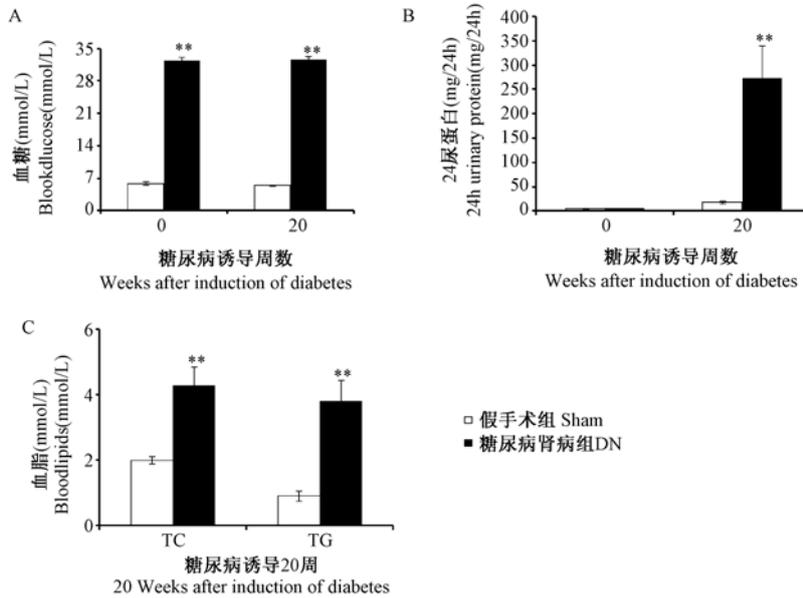
2.1 糖尿病肾病大鼠的脂代谢异常和肾小管损伤评价

腹腔注射链脲佐菌素合并单侧肾切除建立的糖尿病肾病模型组大鼠随着血糖持续性升高,一般情况较差:模型组大鼠出现食量和饮水量增加,毛发散乱、无光泽,尿量增加,活动减少。

在切除单侧肾脏 1 周时,腹腔注射链脲佐菌素 3 d 后,大鼠的血糖明显高于假手术组,且该组大鼠 20 周后仍然维持较高的血糖水平(图 1A)。在糖尿

病模型建立,即 0 周时,糖尿病肾病组大鼠的尿蛋白很低,与假手术组无差异,但血糖持续升高 20 周后,该组大鼠出现大量尿蛋白,糖尿病肾病模型建立成

功(图 1B)。与此同时,发现血糖升高 20 周后糖尿病肾病大鼠出现血甘油三酯和总胆固醇的明显升高(图 1C)。



注:A:血糖;B:24 h 尿蛋白;C:血脂。与假手术组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 1 两组大鼠的血糖、24 h 蛋白尿和血脂情况

Note: A. blood glucose; B. 24 h urinary protein; C. blood lipids. Compared with the sham group, ** $P < 0.01$.

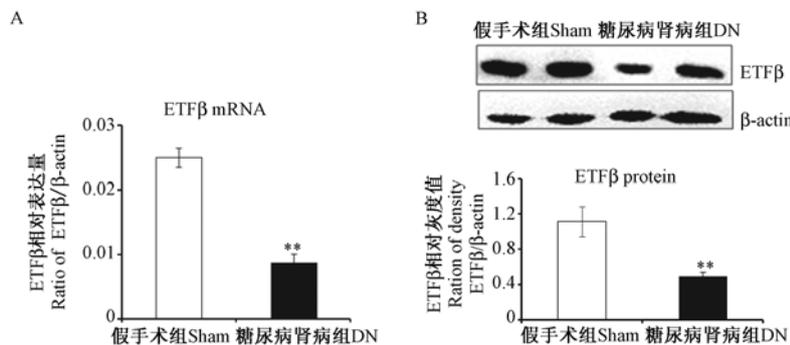
Fig. 1 Comparison of blood glucose, 24 h urinary protein and blood lipids between Sham and DN groups

糖尿病肾病大鼠与假手术组在肾小管 PAS 染色上有明显形态学差异,假手术组肾小管结构正常,排列整齐,间质无炎症和纤维化;DN 组大鼠肾小管上皮细胞出现玻璃滴样变和空泡变性,此外,部分肾小管扩张或萎缩,管腔内可见蛋白样物质或蛋白管型,部分间质可见散在的淋巴细胞和单核细胞浸润及纤维化(彩插 1 图 2A)。半定量^[5]分析结果显示肾小管损

伤指数在两组之间具有统计学差异(彩插 1 图 2B)。

2.2 糖尿病肾病大鼠肾皮质 *ETFβ* 的差异性表达

通过以上方法建立的糖尿病肾病模型,大鼠出现大量蛋白尿时取材,提取肾皮质的 RNA 和蛋白,分别通过 real time PCR 和 western blot 检测发现,糖尿病肾病大鼠肾皮质中的 *ETFβ* 在 mRNA(图 3A)和蛋白水平(图 3B)均出现表达量的下降。



注:A: *ETFβ* mRNA 水平的变化;B: *ETFβ* 蛋白水平的变化。与假手术组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 糖尿病肾病大鼠肾皮质 *ETFβ* 的差异性表达

Note: A. the relative expression of *ETFβ* mRNA; B. the relative expression of *ETFβ* protein. Compared with the sham group, ** $P < 0.01$.

Fig. 3 The expression of *ETFβ* in the kidney cortex of diabetic nephropathy rats compared with control rats

2.3 *ETFβ* 重组质粒转染效率的观察和正确表达的鉴定

为观察 *ETFβ* 重组质粒的转染效率,将绿色荧光蛋白 GFP 的质粒以相同条件转染至 NRK 52E 细

胞,荧光显微镜下发现有较高的转染效率(彩插 2 图 4A)。为进一步验证 *ETFβ* 重组质粒的成功构建,转染 48 h 后收集细胞提取蛋白,用 V_5 抗体通过 western blot 检测融合蛋白的表达,空载体组未见目的蛋白表达,*ETFβ* 重组质粒能在 NRK 52E 细胞中正确表达(彩插 2 图 4B)。

2.4 *ETFβ* 过表达对 PA 诱导 NRK 52E 凋亡的影响

0.5 mmol/L PA 刺激 NRK 52E 细胞 24 h 出现明显凋亡。转染 *ETFβ* 重组质粒 24 h 后,再加入 PA,与对照组比较,TUNEL 法检测发现凋亡率明显下降(彩插 2 图 5A)。半定量分析表明 *ETFβ* 过表达能够明显降低 PA 诱导的 NRK 52E 细胞的凋亡(彩插 2 图 5B)。

3 讨论

大剂量注射 STZ(40 mg/kg)可导致胰腺分泌胰岛素功能严重受损,出现类似临床糖尿病症状,合并单侧肾切除后可以缩短诱发糖尿病肾病的周期。本研究通过该方法建立的糖尿病肾病模型在观察 20 周时即出现大量蛋白尿,且血糖在整个试验周期内均高于 16.7 mmol/L。此外,在该模型中观察到血甘油三酯和总胆固醇的升高,与文献报道^[6]的第四周即开始出现血脂代谢异常的结果一致。糖尿病脂代谢紊乱在并发症中所起的作用越来越受到重视,2001 年第 61 届美国糖尿病学会年会上,Banting 科学成就奖得主 McGarry 教授指出,脂肪酸代谢障碍是糖尿病及其并发症的原发病理生理改变。其中游离脂肪酸(free fatty acid, FFA)增高导致的脂毒性既是糖尿病患者发病的可能病因之一,同时也是脂代谢紊乱的特征之一。主链超过 15 个碳的长链脂肪酸有细胞毒性,不同饱和态的脂肪酸毒性强弱、作用途径和方式不同^[7]。PA 是糖尿病和代谢综合征患者血循环中 FFA 的主要存在形式,已被证明与包括细胞凋亡在内的肾小管细胞损伤等有关^[8]。本研究建立的糖尿病肾病模型在第 20 周时观察到肾小管萎缩等严重受损情况,但其发病机制中是否和脂代谢异常有直接关系尚不清楚。

本研究中观察到脂代谢异常和肾小管损伤的同时,检测到大鼠肾皮质中 *ETFβ* 的基因和蛋白表达均明显降低。目前 *ETFβ* 与疾病相关的研究主要集中在脂质沉积性肌病,如编码 *ETF* 的基因 *ETFa* 和/或 *ETFβ* 突变可引起该疾病发生。有研究表明,2 型糖尿病模型 db/db 小鼠的心脏线粒体蛋白组学发现 *ETFa* 表达量增加 5.9 倍,但综合相关蛋白的

表达情况分析,综合来看,随着糖尿病表型的持续长期存在,*ETFa* 将会下调^[9]。但 *ETFβ* 是否参与糖尿病肾病发生发展,其扮演的角色和作用机制目前尚不清楚。在正常培养的肾小管上皮细胞 NRK 52E 培养基中加入 0.5 mmol/L PA,TUNEL 法检测结果显示细胞出现明显凋亡。转染 *ETFβ* 重组质粒后再加入 PA 刺激细胞,发现 *ETFβ* 过表达能够降低 PA 诱导的肾小管上皮细胞的凋亡,综合体内实验结果糖尿病肾病大鼠肾皮质 *ETFβ* 表达的下降来看,*ETFβ* 在脂毒性诱导的细胞凋亡中可能发挥一定的保护作用。

以上体内外实验结果提示 *ETFβ* 在糖尿病肾病大鼠肾小管损伤时表达下降,过表达 *ETFβ* 能够减少饱和脂肪酸 PA 诱导的肾小管上皮细胞的凋亡。该实验发现为糖尿病肾病的机制研究提供部分证据,但 *ETFβ* 的具体作用机制尚需进一步研究,为开发治疗糖尿病肾病的有效药物提供新的方向。

参考文献:

- [1] Rhein V F, Carroll J, He J, et al. Human METTL20 methylates lysine residues adjacent to the recognition loop of the electron transfer flavoprotein in mitochondria [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(35): 24640–24651.
- [2] Rodrigues J V, Gomes C M. Mechanism of superoxide and hydrogen peroxide generation by human electron-transfer flavoprotein and pathological variants [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2012, 53(1): 12–19.
- [3] Zhao T, Zhang H, Zhao TT, et al. Intrarenal metabolomics reveals the association of local organic toxins with the progression of diabetic kidney disease [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2012, 23(60): 32–43.
- [4] 吴凡,龚超,陈志远,等.肉桂提出物甲基查尔酮对单侧肾切除糖尿病大鼠肾脏损害的保护作用[J].*中华实验外科杂志*,2009,26(11):1515–1518.
- [5] Meng XM, Huang XR, Xiao J, et al. Diverse roles of TGF- β receptor II in renal fibrosis and inflammation in vivo and in vitro [J]. *J Pathol*, 2012, 227: 175–188.
- [6] 张丽芬,吕仁和,黄文政.链脲佐菌素糖尿病肾病大鼠模型的建立及稳定性评价[J].*中国比较医学杂志*,2014,24(4):8–12.
- [7] Maedler K, Spinas GA, Dyrant D, et al. Distinct effects of saturated and monounsaturated fatty acid on β -cell turnover and function [J]. *Diabetes*, 2001, 50: 69–76.
- [8] Soumura M, Kume S, Isshiki K, et al. Oleate and eicosapentaenoic acid attenuate palmitate-induced inflammation and apoptosis in renal proximal tubular cell [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010; 402: 265–271.
- [9] MF ESSOP, WA CHAN, S HATTINGH. Proteomic analysis of mitochondrial proteins in a mouse model of type 2 diabetes[J]. *Cardiovasc J Afr*, 2011, 22: 175–178.

[修回日期]2015-03-31



探讨姜黄素和茶多酚对不同时间 UVB 致无毛鼠急性光损伤的防御作用

高爱莉¹, 江娜^{1,2}, 刘清^{1,2}, 张倩雯^{1,2}, 范君文³, 王鹏³, 邓蕙妍¹,
田歆¹, 梁碧华¹, 李润祥¹, 马少吟¹, 李振洁¹, 龚业青¹, 朱慧兰¹

(1. 广州市皮肤病防治所, 广州 510095; 2. 广州医科大学, 广州 510182; 3. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 探讨姜黄素和茶多酚对不同时间 UVB 致无毛鼠急性光损伤的防御作用。方法 取清洁级无毛鼠 36 只, 随机分为对照组及药物组(0 s, 30 s, 60 s, 120 s, 240 s); 每组各 2 只。于照射前 30 min 在无毛鼠背部涂抹姜黄素或茶多酚, 照射距离为 15 cm, 采用 3 倍最小红斑量(MED)的 UVB 约 200 ~ 540 mJ/cm² 分别照射各组, 取皮肤组织, 制成石蜡切片, 光学显微镜观察。结果 对照组无毛鼠皮肤出现不同程度鳞屑, 胶原间可见散在淋巴细胞, 且 120 s 及 240 s 时出现胶原红染、排列紊乱、均质化等改变。药物组无毛鼠真皮中炎症细胞浸润减少, 胶原受损现象得到改善。结论 外用姜黄素和茶多酚可通过减轻炎症细胞浸润及减轻胶原受损程度而防御 UVB 致无毛鼠皮肤急性光损伤。

【关键词】 UVB; 无毛鼠; 模型; 动物; 光损伤

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0009-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.003

Protective effect of Curcumin and Tea Polyphenols against different time of UVB-induced acute photodamage in hairless mice skin

GAO Ai-li¹, JIANG Na^{1,2}, LIU Qing^{1,2}, ZHANG Qian-weng^{1,2}, FAN Jun-wen³, WANG Peng³,
DENG Hui-yan¹, LI Run-xiang¹, LIANG Bi-hua¹, LI Zhen-jie¹, GONG Ye-qing¹, ZHU Hui-lan¹

(1. Guangzhou Institute of Dermatology, Guangzhou 510095, China; 2. Guangzhou Medical University,

Guangzhou 510182, China;

3. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China)

【Abstract】 Objective To assess the protective of Curcumin and Tea Polyphenols against different time of UVB-induced acute photo damage in hairless mice skin. **Methods** Thirty six BALB/C hairless mice were randomly divided into control groups and treatment groups (all of them were divided into 0 s, 30 s, 60 s, 120 s, 240 s groups with two hairless mice). Curcumin and Tea Polyphenols were applied to the mice's skin before 30min irradiation. The irradiation distance was 15cm. The mice in each group were given three times of UVB MED about 200 ~ 540 mJ/cm² and the irradiation time were 30 s, 60 s, 120 s, 240 s. After irradiation, the skin on the back of the radiation center were taken into

【基金项目】 2013 年广州市医药卫生科技项目(20131A011131); 2013 年广东省科技计划项目(2013B021800044); 2014 年广东省医学科研基金(A2014592); “十二五”专项课题(2011ZXJ09201-031)。

【作者简介】 高爱莉, (1978 -), 女, 主治医师, 硕士, 光线性皮肤病与真菌性皮肤病, E-mail: alicegao197897@163.com; 江娜(1987 -), 女, 研究生, 光线性皮肤病。两者为共同第一作者。

【通讯作者】 朱慧兰, (1966 -), 女, 主任医师, 硕士生导师, 光线性皮肤病与变态反应性皮肤病, E-mail: zhlhulan@126.com。

paraffin section for light microscopy observation. **Results** Different amount of squamae appeared in the control group of hairless rat, and lymphocytes scattered in collagen tissues. In the 120 s and 240 s UVB irradiated group, the collagen was red stained, disorderly arranged, even homogenized. In the treatment group, inflammatory cell infiltration was lessened, and collagen damage weakened. **Conclusion** By weakening inflammatory cell infiltration and collagen damage, topical application of Curcumin and Tea Polyphenols can protect hairless mice from acute photodamage caused by UVB irradiation.

【Key words】 UVB; Hairless mice; Model, animal; Photo damage

过量紫外线 (ultraviolet, UV) 辐射可明显引起皮肤细胞活性氧族 (reactive oxygen species, ROS) 堆积, 损伤细胞内蛋白质、脂质、核酸的生理功能, 引起皮肤细胞氧化应激损伤或凋亡, 因此 UV 诱导皮肤产生 ROS 所致的氧化应激是光线性皮肤病的重要发病机制之一^[1-3]。而中波紫外线 (UVB) 照射与日晒伤、皮肤老化、皮肤癌发生的关系十分密切。核因子 NF-E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 信号通路是目前最重要的抗氧化应激通路, 当氧化应激发生时, Nrf2 激活剂可通过激活 Nrf2 信号通路对皮肤起到保护作用^[4-6]。目前用于研究皮肤光损伤的动物模型多种多样, 但大多都是用有毛小鼠, 无法排除因化学或物理剃毛产生的急性应激作用。

国内外不乏关于急性光损伤的动物模型, 根据相关文献及前期预实验结果^[7], 本实验采用无毛鼠构建 UVB 致皮肤急性光损伤的动物模型, 模拟 UVB 对人皮肤造成的急性光损伤, 探讨 Nrf2 激活剂姜黄素和茶多酚防御不同时间 UVB 致无毛鼠急性光损伤的作用, 通过光学显微镜观察使用 Nrf2 激活剂姜黄素和茶多酚前后无毛鼠皮肤急性光损伤的组织病理学特点, 为光损伤机制的研究奠定一定的基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物及分组、试剂和仪器

清洁级 BALB/C 突变无毛鼠, 军事医学科学院实验动物中心提供【SCXK (京) 2012 - 0004】, 实验在军事医学科学院实验动物中心进行【SYXK (京) 2012 - 0021】。姜黄素 (上海阿拉丁试剂有限公

司), 用 0.5% 羧甲基纤维素钠 (上海阿拉丁试剂有限公司) 作为助溶剂; 茶多酚 (中国农业科学院杭州茶叶研究所), 用双蒸水溶解。UV 光疗仪 (上海 SIGMA 公司), UVB 灯管 (荷兰 PHILIPS 公司), 辐照强度值为 11.4 mW/cm², UVB 波长范围 290 ~ 320 nm, 峰值 297 nm。

姜黄素组分为对照组 (0 s、30 s、60 s、120 s、240 s)、姜黄素 + UVB 急性光损伤 (30 s、60 s、120 s、240 s) 组; 茶多酚组分为对照组 (0 s、30 s、60 s、120 s、240 s)、茶多酚 + UVB 急性光损伤 (30 s、60 s、120 s、240 s) 组, 各对照组分别加入 0.5% 羧甲基纤维素钠、双蒸水; 每组各 2 只。

1.2 预处理—UVB MED 的确定

将无毛鼠固定, 暴露背部皮肤, 置于 UVB 光源正下方 15 cm 处, 分别对无毛鼠背部皮肤照射 30、90、180、300、600 mJ/cm² 剂量的 UVB, 把照射后 24 h 无毛鼠背部皮肤出现肉眼可见红斑所测得的 UVB 剂量定为本次实验的 MED。

1.3 给药及 UVB 照射方法

照射前 30 min, 在各无毛鼠的背部标记面积范围, 将 0.5% 羧甲基纤维素钠、双蒸水、姜黄素和茶多酚分别涂于各实验组无毛鼠背部皮肤的标记范围内, 将各组无毛鼠置于 UVB 光疗仪下 15 cm, 用 3 倍 MED 约 200 ~ 540 mJ/cm², 各对照组无毛鼠分别照射 0 s、30 s、60 s、120 s、240 s, 各实验组无毛鼠亦分别照射 30 s、60 s、120 s、240 s, 每天一次, 连续 3 d。

1.4 大体观察无毛鼠皮肤外观状态变化

在实验过程中, 每天由专人记录无毛鼠照射部位皮肤的外观状态, 其评分标准见表 1。

表 1 皮肤外观状态评分标准
Tab. 1 The score standard of skin appearance

评分等级 Grade	皮肤状态 Skin condition
0	背部皮肤外观呈肉色 The back skin present flesh-color
0.5	背部皮肤呈现少量红斑 The back skin show a small amount of erythema
1.0	背部皮肤呈现部分红斑 The back skin present some of erythema
1.5	背部皮肤呈现大量红斑, 出现皱纹 There were lots of erythema on the back region, and wrinkles
2.0	背部皮肤呈现大量红斑, 出现皱纹, 部分脱屑 There were lots of erythema on the back region, with wrinkles and some scaling
2.5	背部皮肤呈现大量红斑, 出现皱纹, 大量脱屑 There were lots of erythema on the back region, with wrinkles and a lot of scaling
3.0	背部皮肤呈现大量红斑, 出现皮肤松懈、粗糙 There were lots of erythema on the back region, with sagging and rough

1.5 无毛鼠皮肤石蜡切片 HE 染色、光镜观察

末次 UVB 照射实验结束后,颈椎脱臼法将各组动物处死,在其背部照射区中心 $1.5\text{ cm} \times 1.5\text{ cm}$ 的范围内,用锐利刀片取 $0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm}$ 大小的皮肤组织,经固定、洗涤、脱水、透明、透蜡、包埋,制成蜡块,HE 染色并观察记录。

2 结果

2.1 大体观察无毛鼠皮肤外观状态变化

用 30、90、180、300、600 mJ/cm^2 剂量的 UVB 照射无毛鼠背部皮肤后,无毛鼠皮肤从外观正常到出现不同程度脱屑的改变(彩插 3 图 1),把照射后 24 h 出现的肉眼可见红斑所测得的 UVB 剂量定为本次实验的 MED(彩插 3 图 1C),MED 约 $66 \sim 180\text{ mJ}/\text{cm}^2$ 。

2.2 光学显微镜下观察各组毛鼠皮肤组织结构的变化。

经 UVB 照射 30 s 后,可见角质层增厚,毛囊及皮脂腺较正常增多,胶原正常,皮下组织少量炎症细胞浸润。经茶多酚及姜黄素干预后,角质层增厚程度、毛囊及皮脂腺等仍较正常对照组增多,但较 UVB 照射组减轻,胶原正常(彩插 4 图 3);经 UVB 照射 60 s 后,可见胶原轻度红染,炎症细胞浸润程度较 UVB 照射 30 s 组增多。经茶多酚干预后,胶原基本正常,炎症细胞浸润程度较 UVB 照射 60 s 组减轻,但毛囊及皮脂腺等仍较多,经姜黄素干预后,其病理学改变基本同茶多酚干预组,但上皮层仍较多(彩插 4 图 4);经 UVB 照射 120 s 后,其角化程度进一步增加,胶原轻度红染,均质化,炎症细胞浸润减轻。经茶多酚干预后,胶原基本正常,排列规则,炎症细胞浸润减轻,毛囊增生明显,姜黄素干预组其组织病理改变基本同茶多酚干预组,但上皮层仍增厚(彩插 5 图 5)。经 UVB 照射 240 s 后,出现胶原增生,排列紊乱,经茶多酚干预后,胶原基本正常,炎症细胞浸润减轻,毛囊增生仍明显。经姜黄素干预后,其组织病理学改变基本同茶多酚干预组,但上皮层仍增厚(彩插 5 图 6)。

3 讨论

UV 辐射分为长波紫外线(UVA)、UVB 和短波紫外线(UVC),而 UVB 致皮肤红斑能力比 UVA 强 1000 倍,因此日光性红斑主要是由 UVB 所致。UVB 照射皮肤后,表皮细胞结构、功能改变,释放各

种如组胺、前列腺素、细胞因子等炎性介质,真皮血管扩张,血管通透性增加,出现红肿、水疱等症状,组织病理改变见表皮细胞水肿、核固缩,胶原卷曲、溶解,排列紊乱,真皮血管扩张、管周淋巴细胞浸润,附属器萎缩,皮下脂肪减少等^[8]。

近年来,天然抗氧化植物在光损伤防护及治疗方面受到广泛关注,茶多酚、姜黄素等 Nrf2 激活剂一直是国内外研究的热点^[9]。当氧化应激发生时,Nrf2 激活剂可通过激活 Nrf2 信号通路对皮肤起到保护作用。Nrf2 信号通路是迄今为止最为重要的抗氧化应激通路,在机体抵抗外界氧化应激的防御中具有重要作用。正常状况下,Nrf2 与胞浆蛋白 Kelch 样 ECH 联合蛋白 1(kelch like ECH-associated protein 1,Keap1)结合,处于相对抑制的状态并被锚定在胞浆中,氧化应激条件下,Nrf2 从 Keap1 上解离下来,进入胞核与 Maf 蛋白形成异二聚体,然后该异二聚体再与抗氧化反应元件(antioxidant response element,ARE)结合,最终导致 II 相解毒酶基因的转录,对因 ROS 过量产生而导致的一系列疾病有积极的防御作用^[10-11]。姜黄素等 Nrf2 激活剂可激活 Nrf2 - Keap1 系统并能使谷胱甘肽等表达量增加^[4-6],且姜黄素可防御 UV 所致的光老化和光致癌,并且初步证实姜黄素的该功能与减弱 UV 诱导 ROS 的形成有关。我们前期研究发现不同波长的紫外线诱导损伤的 HaCaT 细胞,姜黄素均可降低急性光损伤引起 ROS 水平升幅,具有抗氧化保护作用,并且呈浓度依耐性^[12]。Elmets 等^[13]证实了绿茶提取物对红斑与晒斑细胞、朗格汉斯细胞分布以及 UV 介导的 DNA 损伤有影响。研究表明,使用 EGCG 预处理可抑制 UV 照射引起的炎症白细胞浸润,特别是表皮内被认为是 ROS 主要产物的 CD11b (+) 细胞^[14]。

无毛鼠(hairless mice)是军事医学科学院实验动物中心于 1990 年在 BALB/c 小鼠群中发现的一种被毛稀疏的突变鼠,并命名为 Uncovered,基因标记为 Unev。与裸鼠相比,无毛鼠的胸腺结果无异常,无免疫缺陷。无毛鼠皮肤的组织结构更接近于人的皮肤,且可避免由物理剃毛或化学除毛产生的应激损伤,是研究皮肤急性光损伤及筛选防晒药物的更为理想、更有价值的动物模型。

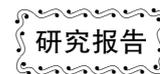
国内外虽不乏关于急性光损伤的损伤,但目前尚未形成统一的动物模型。既往研究表面,急性炎症反应是 UVB 引起的急性光损伤的主要表现之一。

UVB 照射后可诱导生成 ROS 作为第二信使,促进角质形成、细胞增殖及淋巴细胞、中性粒细胞等浸润,甚至促进血管形成。有文献显示中药抗光敏剂可明显减轻 UVB 辐射引起的炎症损伤以发挥其对光损伤的干预保护作用^[15]。另有研究发现日本刺参胶原蛋白多肽可通过有效改善胶原纤维的受损程度而对紫外线诱导的光老化模型小鼠皮肤的保护作用^[16]。本研究采用 3 倍 MED 约 200 ~ 540 mJ/cm² 剂量的 UVB 照射无毛鼠背部皮肤,经 30 s 及 60 s 后照射后,其外观基本正常,而 120 s 或 240 s,无毛鼠皮肤出现少量至大量鳞屑。其组织病理学改变显示,经 UVB 照射后,出现上皮层增厚,毛囊、皮脂腺增生,胶原轻度红染、排列紊乱,甚至均质化,胶原间可见散在较多的淋巴细胞,经茶多酚及姜黄素等药物干预后,在组织病理学上可逆转炎性细胞浸润、胶原增生、排列紊乱、均质化等现象,但对上皮层增厚及毛囊、皮脂腺增多等改变不理想。上述结果提示外用姜黄素或茶多酚可通过减轻炎症细胞浸润及逆转胶原破坏而对 UVB 所致无毛鼠皮肤急性光损伤可能有防御作用。

参考文献:

- [1] Heck DE, Vetrano AM, Mariano TM, *et al.* UVB light stimulates production of reactive oxygen species: unexpected role for catalase. *J Biol Chem*, 2003, 278(25):22432 - 22436.
- [2] Valencia A, Kochevar IE. Nox1 - based NADPH oxidase is the major source of UVA-induced reactive oxygen species in human keratinocytes. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(1):214 - 222.
- [3] Lovatt TJ, Lear JT, Bastrilles J, *et al.* Associations between ultraviolet radiation, basal cell carcinoma site and histology, host characteristics, and rate of development of further tumors. *J Am Acad Dermatol*, 2005, 52(3 Pt 1):468 - 473.
- [4] Jiang H, Tian X, Guo Y, *et al.* Activation of nuclear factor erythroid 2 - related factor 2 cytoprotective signaling by curcumin protect primary spinal cord astrocytes against oxidative toxicity [J]. *Biol Pharm Bull*. 2011,34(8):1194 - 1197.
- [5] Kleszczyński K, Ernst IM, Wagner AE, *et al.* Sulforaphane and phenylethyl isothiocyanate protect human skin against UVR-induced oxidative stress and apoptosis: Role of Nrf2 - dependent gene expression and antioxidant enzymes. *Pharmacol Res*, 2013, 78:28 - 40.
- [6] Tufekci KU, Civi Bayin E, Genç S, *et al.* The Nrf2/ARE Pathway: A Promising Target to Counteract Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease [J]. *Parkinsons Dis*. 2011;314082.
- [7] Jin XJ, Kim EJ, Oh IK, *et al.* Prevention of UV-induced skin damages by 11,14,17 - eicosatrienoic acid in hairless mice in vivo. *J Korean Med Sci*, 2010, 25(6):930 - 937.
- [8] 贾丽丽,李远宏,吴严,等.白藜芦醇对模拟日光照射所致皮肤急性光损伤的保护作用[J].*中国美容医学*,2010,19(9):1036 - 1038.
- [9] Groeger AL, Cipollina C, Cole MP, *et al.* Cyclooxygenase - 2 generates anti-inflammatory mediators from omega - 3 fatty acids [J]. *Nat Chem Biol*, 2010, 6: 433 - 441.
- [10] 高爱莉,朱慧兰. Nrf2 - Keap1 系统防御紫外线所致皮肤光损伤的研究进展[J].*国际皮肤性病杂志*,2011,37(5):61 - 63.
- [11] 江娜,朱慧兰. 核因子 E2 相关因子 2 信号通路及其在紫外线致皮肤蛋白氧化应激损伤中的作用[J].*国际皮肤性病杂志*,2015,41(1):54 - 57.
- [12] 邓惠妍,高爱莉,张倩雯,等. 姜黄素对紫外线诱导损伤的 HaCaT 细胞的保护作用[J].*中国中西医结合皮肤性病杂志*,2014,13(3):137 - 141.
- [13] Rivas M, Araya MC, Caba F, *et al.* Ultraviolet light exposure influences skin cancer in association with latitude [J]. *Oncol Rep*, 2011,25(4):1153 - 1159.
- [14] Tsai PY, Ka SM, Chang JM, *et al.* Epigallocatechin - 3 - gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing theNrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Free Radic Biol Med*. 2011 Aug 1;51(3):744 - 754.
- [15] 孙丽蕴,张广中,李蜀平,等. 抗光敏剂对 BALB/C 小鼠急性光损伤所致表皮细胞炎症损伤干预作用的研究[J].*中国中医基础医学杂志*,2012,18(7):743 - 744.
- [16] 王奕,王静凤,高森,等. 日本刺参胶原蛋白多肽对紫外线诱导的光老化模型小鼠皮肤的保护作用[J].*中国医科大学学报*,2008,39(1):64 - 67.

[修回日期]2015 - 04 - 03



大鼠原发性免疫性血小板减少性紫癜热盛模型的建立与评价

聂甜¹, 蒋文明¹, 彭素娟², 张旻昱³, 杨琳⁴, 李仕能¹, 胡妮¹

(1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 长沙 410005;
3. 湖南省人民医院, 长沙 410005; 4. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007)

【摘要】 目的 建立同时符合中医“热盛证”和原发性免疫性血小板减少性紫癜外周血血小板减少的大鼠模型。方法 采用SD大鼠背部多点注射20%干酵母菌悬液和腹腔注射1:4稀释的兔抗SD大鼠血小板血清(APS)建立原发性免疫性血小板减少性紫癜热盛大鼠模型。并观察受试大鼠的中医证候特点、血象、骨髓象及丘脑体温调节中枢5-羟色胺(5-HT)的水平。结果 模型组大鼠注射后2~6 h体温和日饮水量显著上升,造模第4天出现足趾紫癜和造模第30天出现肠道黏膜出血($P < 0.05$);外周血象中血小板数显著降低,骨髓象巨核细胞数显著减少($P < 0.05$);大脑体温调节中枢5-HT的水平显著增高($P < 0.05$)。结论 原发性免疫性血小板减少性紫癜热盛大鼠病证结合模型基本体现了“热盛”所致原发性免疫性血小板减少性紫癜大鼠发生紫癜的病理特点。

【关键词】 原发性免疫性血小板减少性紫癜;热盛证;大鼠模型

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0013-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.004

Establishment and evaluation of heat sheng model of rat primary immune thrombocytopenic purpura

NIE Tian¹, JIANG Wen-ming¹, PENG Su-juan², ZHANG Min-yu³, YANG Lin⁴, LI Shi-neng¹, HU Ni¹

(1. College of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of TCM, Changsha 410208, China;
2. The Second Affiliated Hospital, Hunan University of TCM, Changsha 410005, China;
3. Hunan People's Hospital, Changsha 410005, China; 4. The First Affiliated Hospital, Hunan University of TCM, Changsha 410007, China)

【Abstract】 Objective To establish a rat model at the same time in accordance with the “hot sheng syndrome” of traditional Chinese medicine and primary immune thrombocytopenic purpura of peripheral blood platelet reduction. **Methods** Using back multi-point injection of 20% dry yeast suspension on SD rats and 1:4 dilution of rabbit anti SD rats platelet serum (APS) by intraperitoneal injection to establish a primary immune thrombocytopenic purpura “heat sheng” rat model. And observing rats of TCM syndrome characteristics, hemogram, myelogram and serotonin (5-HT) level of the temperature regulating center in thalamus. **Results** After injection of 2 h ~ 6 h temperature and daily water of the model group rats increased significantly, toe purper showed in fourth day of modeling and intestinal mucosal bleeding in thirty day of modeling ($P < 0.05$); Platelet count in peripheral blood decreased significantly, bone marrow megakaryocyte number

[基金项目] 湖南省研究生科研创新项目(CX2013B331)。

[作者简介] 聂甜(1983-),男,博士生,专业:中西医结合血液病学。Email:568098977@qq.com。

[通讯作者] 蒋文明(1962-),男,教授,研究方向:难治性血液病的中医药防治。Email:2839040380@qq.com。

reduced significantly ($P < 0.05$); 5-HT level of the temperature regulating center of brain increased significantly ($P < 0.05$). **Conclusions** The study of the primary immune thrombocytopenic purpura heat sheng rat model of combination of disease and syndrome reflected basically the pathological characteristics of purpura caused by "heat sheng" in primary immune thrombocytopenic purpura rat mode.

【Key words】 Primary immune thrombocytopenic purpura; Heat sheng; Heat syndrome; Rat model

原发性免疫性血小板减少性紫癜 (immune thrombocytopenia, ITP) 是一种血小板免疫性破坏的常见出血性疾病^[1]。第七届全国中西医结合血液病学术会议将 ITP 的中医病名定为“紫癜病”。热盛证是 ITP 患者常见的中医证型, 热灼脉络、迫血妄行是 ITP 热盛证的基本病机^[2-3]。对糖皮质激素耐药、难以耐受免疫抑制剂毒副作用、病程长的 ITP 患者采用具有清热作用的复方治疗, 其结果显示了较好的临床疗效^[4]。但是, 目前对这类复方干预 ITP 的效应机制研究仍缺乏符合中医“病证”特点的 ITP 动物模型, 这可能进一步限制 ITP 中药新药开发和中药复方的药效学研究。为此, 本实验在前期研究和文献调查的基础上^[5], 采用 20% 干酵母菌悬液联合抗血小板血清 (APS) 注射 SD 大鼠法建立原发性免疫性血小板减少性紫癜热盛大鼠模型, 并评价该模型的基本病理特点。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物 SPF 级 SD 雄性大鼠 40 只, 体重 160 ~ 200 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司【SCXK(湘)2013-0004】。清洁级新西兰雄性白兔 5 只, 体重 1.7 ~ 2 kg, 购自长沙市天勤生物技术有限公司【SCXK(湘)2009-0012】。实验在湖南中医药大学实验动物中心进行, 使用许可证号【SYXK(湘)2013-0005】。

1.1.2 仪器 TDZ4-WS 低速台式离心机, 长沙湘仪医疗设备厂。XT-4000i 全自动血细胞计数仪, 日本希森美康公司。Leica dm 2500 普通显微镜, 德国徕卡公司。电子体温计, 温州友尚医疗科技有限公司。

1.1.3 试剂 弗氏完全佐剂, 购自武汉博士德生物公司(生产批号: bstzje10bwq)。不完全弗氏佐剂, 购自武汉博士德生物公司(生产批号: bstbzje10bwq)。5-羟色胺免疫检测试剂盒, 购自北京中山生物技术有限公司(生产批号: H9523)。0.01 mol/L pH7.3 磷酸盐缓冲液(PBS), 购自武汉博士德生物公司(生产批号: 09D16B30)。干酵母

菌; 安琪高活性干酵母, 购自安琪酵母股份有限公司(生产批号: 1124686937)。瑞氏-姬姆萨染液, 购自珠海贝索生物技术有限公司(生产批号: 413123)。多聚甲醛, 购自湖北奥生新材料科技有效公司(生产批号: XK13-201-00399)。

1.2 实验方法

1.2.1 兔抗 SD 大鼠血小板血清 (APS) 的制备 腹主动脉取血获取 SD 大鼠外周血 2 mL, 乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝, 1500 r/min 离心 15 min 获取富血小板血浆。3200 r/min, 4℃离心 10 min, 去上清, 获得血小板。用 0.01 mol/L pH7.3 的 PBS 洗涤、离心 3 次并混悬血小板至 $10^9/L$ 。取血小板悬液与 10 mL 弗氏完全佐剂等量混匀形成乳白色黏稠乳剂, 备用。向每只新西兰兔两后肢足垫及背部多点注射致敏。首次注射后第 1、2、3、4 周, 按上述方法再次获得血小板悬液, 取血小板悬液与 10 mL 不完全弗氏佐剂等量混合。向每只新西兰兔两后肢足垫及背部多点注射加强免疫。末次加强免疫后第 3 天心脏采集白兔外周血, 3000 r/min 离心 10 min, 获取富含兔抗 SD 大鼠血小板血清, 贮存在 -80℃ 冰箱中备用(临用时取出, 56℃水浴 30 min 灭活补体)。

1.2.2 20% 干酵母菌悬液的配制 称取 10 g 干酵母菌, 将其溶于 40 mL 蒸馏水, 玻璃棒混匀(临用临配)。

1.2.3 分组与处理 将 40 只 SD 大鼠随机分成模型组、干酵母菌组、APS 组和正常大鼠组, 每组各 10 只。模型组采用干酵母菌联合 APS 注射法造模: 每天均背部多点注射 20% 干酵母菌悬液 (2 mL/200g) 1 次, 连续 30 d。第 1 天、第 2 天、第 3 天腹腔注射 1:4 稀释的兔抗 SD 大鼠血小板血清 (0.7 mL/200g) 1 次, 后每隔一天注射一次兔抗 SD 大鼠血小板血清。干酵母菌组: 每天均背部多点注射 20% 干酵母菌悬液 (2 mL/200g) 1 次, 连续 30 d。APS 组: 第 1 天、第 2 天、第 3 天腹腔注射 1:4 稀释的兔抗 SD 大鼠血小板血清 (0.7 mL/200g) 1 次, 后每隔一天注射一次兔抗 SD 大鼠血小板血清。正常大鼠组: 每天均背部多点注射生理盐水 (2 mL/200g) 1 次, 连续 30 d。第 1 天、第 2 天、第 3 天腹腔注射生理盐水 (0.7 mL/

200g) 1 次,后每隔一天注射一次生理盐水。

1.2.4 标本采集与制备 各组大鼠采用 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉(1 mL/100g),腹主动脉采血 2 mL, EDTA 抗凝。组织剪分离股骨,剪其一端,挑出骨髓置于载玻片上,涂片后待干,做瑞士-姬姆萨染色。断颈法获取大脑,置于 4% 多聚甲醛固定液中。

1.2.5 指标检测

1.2.5.1 外周血血小板数的检测:XT-4000i 全自动血细胞计数仪检测血小板数。

1.2.5.2 骨髓巨核细胞数的检测:显微镜低倍镜下(10×10)计数巨核细胞数。

1.2.5.3 大脑体温调节中枢 5-羟色胺的检测:组织切片脱蜡至水,3% H₂O₂ 室温灭活 10 min, PBS 洗 3 次。抗原修复, PBS 洗 3 次。滴加正常山羊血清封闭,室温 20 min, 甩去多余液体。滴加 I 抗,室温 1 h。PBS 洗 3 次,滴加二抗室温 1 h。PBS 洗 4 次, 5 min, DAB 显色。蒸馏水洗 10 min, 苏木素复染 2 min, 盐酸酒精分化。脱水、透明、封片、镜检。随机挑选 5 个高倍视野,计数阳性细胞。

1.2.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 软件分析数据。计量资料用“ $\pm s$ ”表示,所有资料进行正态性和方差齐性检验;不符合正态性和方差齐性者用 Kruskal-Wallis H 检验,两两比较用 Nemenyi 法检验。计数资料采用 X² 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异有显著意义。

2 结果

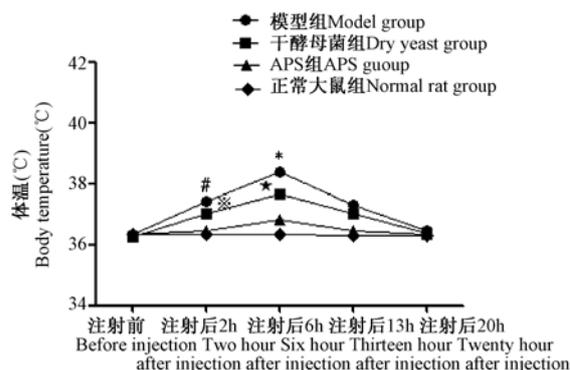
2.1 各组大鼠中医证候出现情况的比较

2.1.1 发热与体温变化情况

采用电子体温计,检测各组大鼠体温(直肠温度)变化。处理期间模型组和干酵母菌组的大鼠出现发热症状,在注射 20% 干酵母菌悬液后 2 h 体温开始上升,注射后 6 h 体温达高峰(图 2)。而 APS 组和正常大鼠组的大鼠在此时间点体温无显著变化,注射 20 h 后各组大鼠体温恢复正常(图 1)。与 APS 组和正常大鼠组相比较,模型组和干酵母菌组大鼠体温升高明显,差异有统计学意义($P < 0.05$, 图 1)。

2.1.2 口渴与饮水量的变化情况

处理期间模型组和干酵母菌组大鼠出现了口渴症状,APS 组和正常大鼠组大鼠未出现口渴症状。与 APS 组和正常大鼠组大鼠相比,饮水量增多,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。



注:模型组与 APS 组相比, # $P < 0.05$;与正常大鼠组相比, * $P < 0.05$ 。干酵母菌组与 APS 组相比, * $P < 0.05$;与正常大鼠组相比, * $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠体温(直肠温度)变化

Note: Compared with model group and APS group, # $P < 0.05$; Compared with normal rat group,

* $P < 0.05$. Compared with dry yeast group and APS group, * $P < 0.05$; Compared with normal rat group, * $P < 0.05$.

Fig. 1 Changes in body temperature (rectal temperature) of rat

2.1.3 便干症状的比较

处理期间模型组和干酵母菌组大鼠出现大便硬结^[6](粪便表面干燥,质地坚硬),而 APS 组和正常大鼠组大鼠大便相对湿润(粪便表面水分多,湿润,质地松软)。模型组、干酵母菌组与 APS 组、正常大鼠组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 4)。

2.1.4 紫癜出现及消退情况

在注射 APS 的第 4 天,模型组和 APS 组的大鼠足趾出现了紫癜,而干酵母菌组和正常大鼠组的大鼠未见紫癜。与干酵母菌组和正常大鼠组相比,模型组和 APS 组的大鼠紫癜症状显著($P < 0.05$,彩插 6 图 5)。处理第 14 天模型组和 APS 组各有 5 只大鼠紫癜开始消退。处理第 19 天 APS 组大鼠紫癜消失,模型组仍有 6 只大鼠存在紫癜,但颜色较前变浅;模型组与 APS 组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 6)。

2.1.5 肠道出血情况

造模 30 d 后处死各组大鼠,模型组有 4 只大鼠发生肠道出血,其余各组未见肠道出血。模型组与其它三组比较,差异有统计学意义($P > 0.05$,彩插 6 图 7)。

2.1.6 耳廓深红与舌色症状的变化比较

处理期间四组大鼠的耳廓和舌质未见深红表

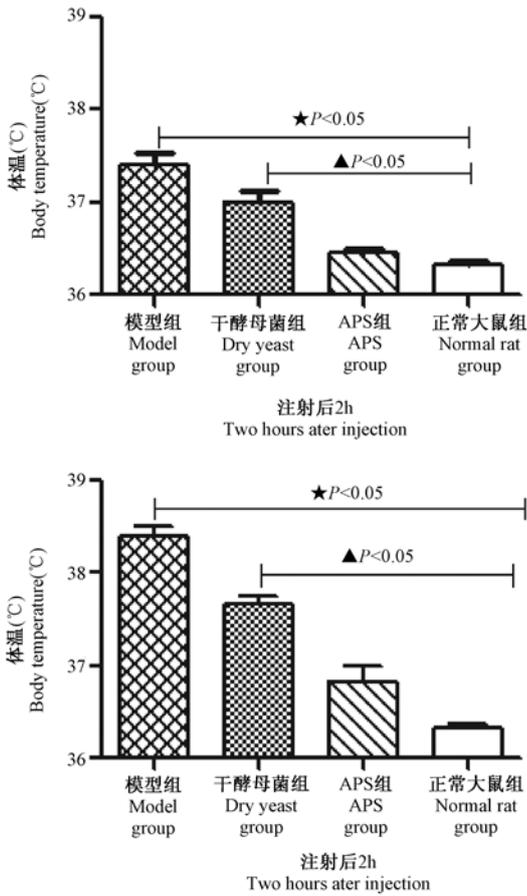


图2 注射后 2 h 和 6 h 各组大鼠体温(直肠温度)情况
Fig. 2 Temperature(rectal temperature) conditions of rat in 2 h and 6 h after injection

现,差异无统计学意义($P > 0.05$,图 8)。

2.2 各组大鼠外周血血小板数的比较

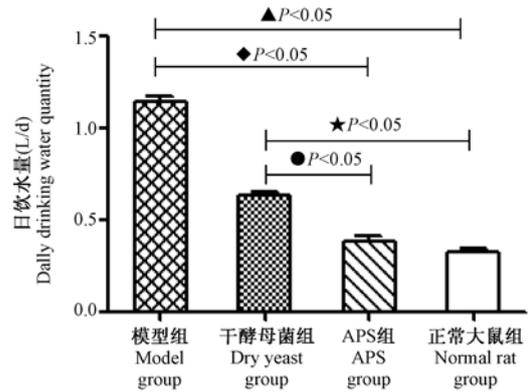
与正常大鼠组相比,模型组大鼠和 APS 组大鼠造模后外周血血小板显著下降($P < 0.05$)。但干酵母菌组大鼠没有出现血小板数下降,与正常大鼠组相比差异无统计学意义($P > 0.05$,图 9)。

2.3 各组大鼠骨髓巨核细胞数的比较

取各组大鼠股骨骨髓液涂片,做瑞士-姬姆萨染色,显微镜低倍镜下计数全片巨核细胞数量。模型组、干酵母菌组、APS 组、正常大鼠组巨核细胞数分别为: 202.40 ± 97.29 、 625.70 ± 180.74 、 234.80 ± 114.54 、 1235.60 ± 177.16 。结果提示:模型组和 APS 组大鼠骨髓组织中巨核细胞数显著低于干酵母菌组和正常大鼠组,差异有统计学意义($P < 0.05$,彩插 7 图 10)。

2.4 各组大鼠大脑体温调节中枢 5-羟色胺水平的比较

5-羟色胺(5-HT)是体温调节中枢重要的发



注:模型组与 APS 组相比,◆ $P < 0.05$;与正常大鼠组相比,▲ $P < 0.05$ 。干酵母菌组与 APS 组相比,● $P < 0.05$;与正常大鼠组相比,★ $P < 0.05$ 。

图3 各组大鼠日饮水量情况

Note: Compared with model group and APS group, ◆ $P < 0.05$; Compared with normal rat group, ▲ $P < 0.05$. Compared with dry yeast group and APS group, ● $P < 0.05$; Compared with normal rat group, ★ $P < 0.05$.

Fig. 3 Daily drinking water quantity of rats

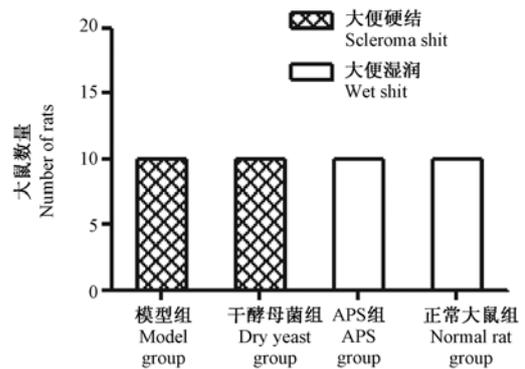


图4 各组大鼠大便情况

Fig. 4 Shit situation of rat

热介质。免疫组化结果显示,模型组和干酵母菌组大鼠丘脑组织中 5-羟色胺含量显著高于 APS 组和正常大鼠组,差异有统计学意义($P < 0.05$,彩插 7 图 11)。模型组大鼠脑组织 5-HT 的光密度值为 0.72 ± 0.19 ,干酵母菌组为 0.70 ± 0.29 ,APS 组为 0.58 ± 0.14 ,正常大鼠组为 0.58 ± 0.14 。模型组和干酵母菌组 5-HT 免疫反应阳性产物平均光密度值高于 APS 组和正常大鼠组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 12)。

3 讨论

建立一种比较理想的大鼠原发免疫性血小板减少性紫癜热盛模型(病证结合模型),对于进一步

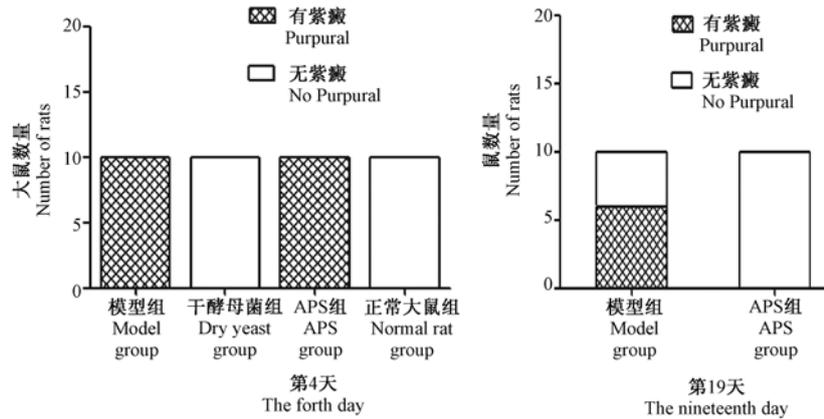


图 6 各组大鼠紫癜变化情况

Fig. 6 Changes of rat purpura

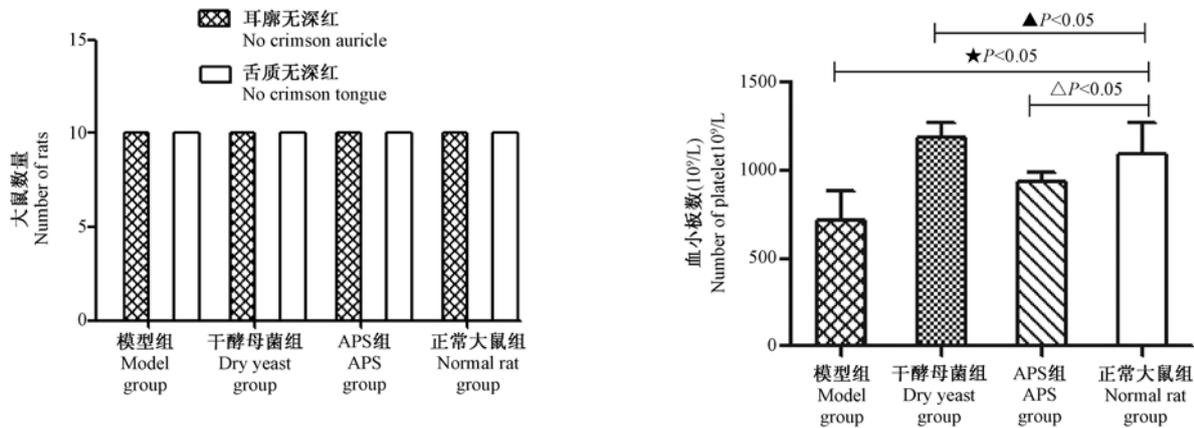


图 8 各组大鼠耳廓及舌质深红情况

Fig. 8 Auricle and tongue crimson condition of rat

注:模型组与正常大鼠组相比,★ $P < 0.05$;
干酵母菌组与与正常大鼠组相比,▲ $P > 0.05$;
APS组与正常大鼠组相比,△ $P < 0.05$ 。

图 9 各处理因素对 SD 大鼠外周血血小板数的影响

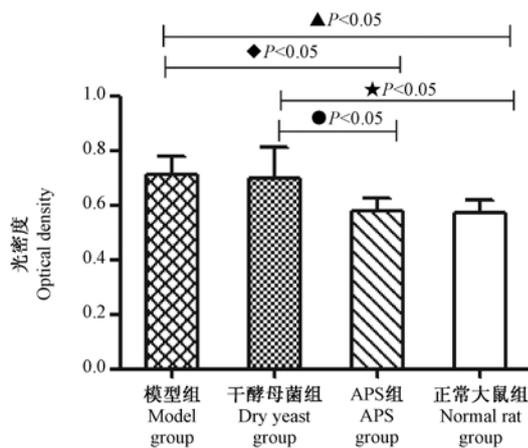
Note: Compared with model group and normal rat group, ★ $P < 0.05$; Compared with dry yeast group and normal rat group, ▲ $P > 0.05$; Compared with APS group and normal rat group, △ $P < 0.05$.

Fig. 9 Effects of various factors on peripheral blood platelet count of SD rat

探索 ITP 中医证型的病理本质, 阐述中药复方干预 ITP 的作用机制, 揭示祖国中医学辨证施治的科学性等方面具有重要意义。目前, 病证结合模型研究仍是中医学科研的瓶颈。其原因为某些病证结合模型很难同时兼顾疾病的病理特点与中医证候特征。因此, 大鼠 ITP 热盛模型(病证结合模型)能否建立主要取决于造模方法能否同时兼顾上述两点, 主要表现为以下两方面: (1) 选用的造模方法能否复制 ITP 的病理特点; (2) 该方法能否同时使 ITP 大鼠表现典型的中医热盛证候, 如发热、口渴、紫癜等; 而这一点显得尤为重要, 因为上述证候是中医学判定证型的辨证要素。

被动免疫法造模是 ITP 动物造模的主要方法。1951 年, William J. Harrington^[7] 输注了 500 mL ITP 患者血液, 诱发了严重的小血小板减少症, 3 d 后出现皮肤出血。此后, 研究者常在被动免疫状态下, 将抗血小板血清(APS)或鼠抗 GPIIb/IIIa 单克隆抗体输入动物体内造成血小板破坏, 形成紫癜。

Domínguez V 等^[8] 用兔抗 BALB/C 小鼠血小板血清免疫 BALB/C 小鼠, 小鼠皮肤出现紫癜, 成功获得 ITP 小鼠模型。Song S 等^[9] 通过向未经过 IVIG 预处理 SCID 小鼠腹腔注射抗 GPIIb 单克隆抗体 (MWR30) 和抗 GPIIIa 单克隆抗体 (2C9. G2) 诱导产生了 ITP 小鼠模型, 而经 IVIG 预处理的小鼠未出现 ITP 相关症状, 说明 IVIG 可保护 SCID 小鼠血小板免受抗血小板单克隆抗体的破坏。被动免疫法造模优点在于反复输入抗血小板抗体, 容易造成体内血小板迅速破坏, 诱发出血; 且不易造成其它血细胞发生破坏和组织损伤。两者优点区别在于:



注:模型组与 APS 组相比,◆ $P < 0.05$;
与正常大鼠组相比,▲ $P < 0.05$;
干酵母菌组与 APS 组相比,● $P < 0.05$;
与正常大鼠组相比,★ $P < 0.05$ 。

图 12 各组大鼠脑组织 5-HT 光密度值比较

Note: Compared with model group and APS group, ◆ $P < 0.05$; Compared with normal rat group, ▲ $P < 0.05$; Compared with dry yeast group and APS group, ● $P < 0.05$; Compared with normal rat group, ★ $P < 0.05$.

Fig. 12 5-HT optical density value comparison in brain tissue of rat

APS 法造模有明显的血小板抗体,造模后出血症状明显,而单克隆抗体造模法主要用于 IVIG 等药物抗 ITP 机制研究。中医证候是判断证型的关键因素,紫癜(出血)对于判定 ITP 大鼠模型是否呈现热盛迫血具有重要意义。因此,基于 APS 造模法易出现紫癜的优点,本课题组未采用特定的单克隆抗体,而是沿用 APS 法造模,希望出血症状明显。

热邪是中医临床出血常见的病因之一。《诸病源候论·热病衄候》曰:“邪热与血气并,故衄也”。《景岳全书·血症》曰:“出血者多由于火,火盛则破血妄行”。因此,良好的致热源是 ITP 大鼠呈现热盛证的关键。左泽平等^[10]建立了不同浓度的大鼠干酵母、2,4-二硝基酚、脂多糖、细菌内毒素模型,研究发现 20% 干酵母菌悬液大鼠模型升温持续时间长,发热稳定。故本课题组采用 20% 干酵母菌悬液联合 APS 法造模建立大鼠 ITP 热盛病证结合模型。实验发现 SD 大鼠经皮下注射 20% 干酵母菌悬液和腹腔注射 1:4 稀释的 APS 后,模型组大鼠出现了发热、口渴、便干、足趾紫癜证候,表现为热盛迫血妄行。同时,模型组大鼠外周血血小板数和骨髓巨核细胞数降低,表现为急性 ITP 血象和骨髓象。其潜

在的机制为酵母致大鼠丘脑体温调节中枢发热介质 5-HT 含量上升,引起 SD 大鼠体温上升(图 11 和图 12);被动免疫状态下,APS 能导致 SD 大鼠外周血血小板数降低,引起出血。这提示该方法可以诱导 ITP 大鼠出现热盛证。仅皮下注射干酵母菌悬液或腹腔注射 APS 均未表现出热盛相关证候。郜新莲等^[11]采用腹腔注射细菌内毒素联合皮下注射酵母菌制作了大鼠血热出血模型,机制主要是由于剧烈炎症引起的发热兼出血。但是,该血热出血模型并没有引起大鼠外周血血小板的减低。

身热烦渴,便干,吐血,衄血是热迫血行的特征证候^[12]。在注射 APS 的第 4 天,模型组和 APS 组的大鼠足趾均出现了紫癜,而另外两组未出现紫癜(图 5)。研究表明^[13],兔抗大鼠血小板血清(APS)与大鼠血小板结合后被大鼠体内的巨噬细胞吞噬破坏,从而引起大鼠外周血血小板数降低,诱发紫癜。模型组和干酵母菌组大鼠注射 20% 干酵母菌悬液后出现发热症状,同时有口渴和便干症状。这是因为干酵母菌是种常用的外源性致热源,其皮下注射后能引起丘脑体温调节中枢发热介质 5-HT 含量上升,诱发体温上升^[14](图 11)。Chander V 等^[15]研究显示酵母致大鼠发热与体温调节中枢发热介质 5-HT 含量变化有关,且下丘脑组织中 5-HT 含量随体温的改变而改变。四组大鼠均未见舌红。而舌质的改变受血供的多少(舌血供丰富,含舌下动脉和舌深动脉多条分支)、微血管的收缩与扩张影响。本实验发现注射后 6 h 模型组大鼠呈现中度发热,干酵母菌组大鼠呈现轻度发热。这种发热的程度可能未引起舌动脉的明显扩张和血供增加,因此,各组大鼠未见舌质改变。

被动免疫状态下,抗血小板抗体引起实验动物外周血血小板数降低是制作急性 ITP 动物模型的常用方法。本研究发现 APS 注射后 SD 大鼠血小板数和骨髓巨核细胞数降低。原因为血小板和骨髓成熟产血小板型巨核细胞表面均表达 GPIIb/IIIa,抗血小板抗体与其结合后,可诱导血小板被大鼠体内巨噬细胞损害和巨核细胞分化障碍^[16]。虽然本实验采用皮下注射 20% 干酵母菌悬液和腹腔注射 APS 法制作了 ITP 血分热盛证模型,初步阐述了该方法的制作机制。但仍需进一步探讨该模型“热性病机”的免疫病理实质。

参考文献:

[1] Heitink - Pollé KM, Haverman L, Annink KV, et al. Health-

- related quality of life in children with newly diagnosed immune thrombocytopenia [J]. *Haematologica*, 2014, 99 (9): 1525 - 1531.
- [2] 张权, 王纓. 中医药治疗特发性血小板减少性紫癜概况及展望[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(4): 247 - 249.
- [3] 全日城, 麻柔. 麻柔辨证施治慢性免疫性血小板减少性紫癜经验[J]. *北京中医药*, 2010, 29(4): 260 - 261.
- [4] 朱影. 清热滋阴凉血止血法治疗慢性特发性血小板减少性紫癜[J]. *江西中医药*, 2008, 39(304): 32 - 33.
- [5] 蒋文明, 邓常青, 陈大舜, 等. 大鼠免疫性血小板减少模型的研究[J]. *中国实验动物学报*, 1996, 4(2): 104 - 107.
- [6] 朱文锋. *中医诊断学*[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002.
- [7] Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, *et al.* Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura [J]. *J Lab Clin Med*, 1951, 38: 1 - 10.
- [8] Domínguez V, Govezensky T, Gevorkian G, *et al.* Low platelet counts alone do not cause bleeding in an experimental immune thrombocytopenic purpura in mice [J]. *Haematologica*, 2003, 88 (6): 679 - 687.
- [9] Song S, Crow AR, Freedman J, *et al.* Monoclonal IgG can ameliorate immune thrombocytopenia in a murine model of ITP: an alternative to IVIG [J]. *Blood*, 2003, 101(9): 3708 - 3713.
- [10] 左泽平, 王志斌, 郭玉东, 等. 常用大鼠发热模型研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(2): 52 - 57.
- [11] 鄯新莲, 段红福, 崔瑛, 等. 血热出血模型大鼠血清中鲜地黄高效液相色谱分析[J]. *中医学报*, 2011, 9(26): 1067 - 1069.
- [12] 付澄洲. 寒热治则浅议[C]. *中华中医药学会中医内科学术论坛*, 2013, 517 - 520.
- [13] Cines DB, Bussell JB, Liebman HA, *et al.* The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity [J]. *Blood*, 2009, 113(26): 6511 - 6521.
- [14] 唐晓峰, 薛漫清, 王晖. 大鼠发热模型及发热机制的研究进展[J]. *广东药学院学报*, 2009, 25(3): 327 - 329.
- [15] Chander V, Tirkey N, Chopra K. Adrenergic receptor subtypes inositol phosphates and sources of cell [J]. *Toxicology*, 2005, 210(1): 55 - 64.
- [16] Chong BH. ITP: Tregs come to the rescue [J]. *Blood*, 2010, 116 (22): 4388 - 4390.

[修回日期]2015-03-31

(下接第 28 页)

- [17] Yang Z, Asico LD, Yu P, *et al.* D5 dopamine receptor regulation of reactive oxygen species production, NADPH oxidase, and blood pressure [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290(1): R96 - R104.
- [18] 张艳荣, 全雄志, 杨志伟, 等. 多巴胺 D5 受体转基因小鼠的建立[J]. *中国比较医学杂志*. 2008; 18(5): 54 - 58.
- [19] 胡永艳, 董伟, 杨志伟, 等. 多巴胺 D5 受体突变基因 F173L 在心脏过表达引起转基因小鼠扩张型心肌病[J]. *中华高血压杂志*, 2011, 5(19): 454 - 458.
- [20] Nirmal PARAJULI, Vaibhav B. PATEL, Wang WANG, Ratnadeep BASU and Gavin Y. OUDIT. Loss of NOX2 (gp91phox) prevents oxidative stress and progression to advanced heart failure [J]. *Clinical Science*, 2014, 127, 331 - 340.
- [21] Turunen, M. Olsson, J. Dallner, G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys [J]. Acta*, 2004; 1660: 171 - 199.
- [22] Packer M, Bristow MR, Cohn JN, *et al.* The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure: US Carvedilol Heart Failure Study Group [J]. *N Engl J Med* 1996; 334: 1349 - 1355.
- [23] Yue TL, Cheng HY, Lysko PG. *et al.* Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger [J]. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 92 - 98.
- [24] Dandona, P. Karne, R. Ghanim, *et al.* Carvedilol inhibits reactive oxygen species generation by leukocytes and oxidative damage to amino acids. *Circulation* 2000; 101: 122 - 124.
- [25] Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure [J]. *J Clin Invest* 2005; 115: 500 - 508.
- [26] Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000; 86: 494 - 501.
- [27] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly [J]. *Am J Physiol*, 1996, 271: C1424 - C1437.
- [28] Ghosh MC, Wang X, Li S, *et al.* Regulation of calcineurin by oxidative stress [J]. *Methods Enzymol*. 2003, 366: 289 - 304.
- [29] G YB, Su B, Sah VP, *et al.* Cardiac Hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun HN2 - terminal kinase in ventricular cells [J]. *J Biol Chem*. 1998, 273(10): 5423.
- [30] Ghosh MC, Wang X, Li S, *et al.* Regulation of calcineurin by oxidative stress [J]. *Methods Enzymol*. 2003, 366: 289 - 304.
- [31] W, Zou Y, Shiojima L, *et al.* Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardio myocyte hypertrophy [J]. *J Biol Chem*. 2000, 275.
- [32] Rdano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(3): 500 - 508.

[修回日期]2015-04-08



三种不同严重程度大鼠重症胰腺炎模型比较研究

袁琳¹,周秉舵²,王晓素²,吴中华¹,孔婧²,徐亭亭²,
王宏伟²,朱生樑²,方盛泉²,周莉²,刘春芳²,张秀莲²,王轶²

(1. 上海中医药大学科技实验中心, 上海 201203; 2. 上海中医药大学附属岳阳中西医结合医院消化科, 上海 200437)

【摘要】 目的 为研究者选择合适的牛磺胆酸钠浓度来制备大鼠重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP) SAP模型提供依据。方法 将60只SD大鼠随机分为假手术组、1.5%浓度组、3.5%浓度组和5%浓度组,造模各组分别用1.5%、3.5%和5%牛磺胆酸钠按逆行胆胰管注射法制备SAP模型。术后统计各组大鼠的死亡率;检测血清淀粉酶、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)水平;观测各组大鼠胰腺组织HE染色病理评分。结果 5%浓度组死亡率较1.5%浓度组显著升高,血清淀粉酶、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6)水平、出血和腺泡组织坏死的病理评分较1.5%浓度组和3.5%浓度组均有显著升高。结论 5%的牛磺胆酸钠逆行胆胰管注射法能更好的制备SAP模型,且更符合SAP的生理、病理表现。

【关键词】 重症胰腺炎;逆行胆胰管注射法;牛磺胆酸钠;模型;动物

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015)05-0020-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.005

Comparative study of severe acute pancreatitis model in rats with three different severity

YUAN Lin¹, ZHOU Bing-duo², WANG Xiao-su², WU Zhong-hua¹, KONG Jing², XU Ting-ting², WANG Hong-wei²,
ZHU Sheng-liang², FANG Sheng-quan², ZHOU Li², LIU Chun-fang², ZHANG Xiu-lian², WANG Yi²

(1. Shanghai University of T. C. M Experiment Center for Science and Technology, Shanghai 201203, China;

2. Department of Gastroenterology, Yueyang Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200437, China)

【Abstract】 **Objective** to provide the evidence for inducing the SAP model in rats with proper concentration of sodium taurocholate. **Methods** 60 SD rats were divided into sham operated group, group of 1.5% in concentration, group of 3.5% in concentration and group of 5% in concentration randomly, while the SAP model was induced by the sodium taurocholate concentration of 1.5%, 3.5% and 5% with the method of retrograde injection into the biliopancreatic duct. To calculate the mortality of different groups, measure the serum amylase, tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6(IL-6), and to observe the pancreatic pathological scores of HE staining in rats. **Results** The mortality in group of 5% in concentration has a significant ascending compared with group of 1.5% in concentration, while the serum amylase, tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6(IL-6), pathological score of hemorrhage and acinar necrosis in group of 5% in concentration have a significant ascending compared with group of 1.5% in concentration and group of 3.5% in concentration. **Conclusions** A better SAP model may be induced by sodium taurocholate with the concentration of 5% by the method of retrograde injection into the biliopancreatic duct, which may accord with the

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金(81302929);上海市教委科研创新项目(14YZ065);上海市杏林新星计划(ZYSNXD011-RC-XLXX-20130019)。

【作者简介】 袁琳(1980-),女,博士生,助理研究员,研究方向:中西医结合实验研究。

【通讯作者】 周秉舵(1978-),男,博士,主治医师,研究方向:胰腺疾病研究。E-mail: tcmzbd@hotmail.com。

physiological and pathological manifestation of SAP.

【Key words】 Severe acute pancreatitis; The method of retrograde injection into the biliopancreatic duct; Sodium taurocholate; Model, animal

重症胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP) 动物模型的制备对于 SAP 的研究至关重要,目前最常用的制备方法为逆行胆胰管注射法。其制备试剂牛磺胆酸钠最常用的浓度为 1.5%、3.5% 和 5%,制备模型时不同浓度的选择常常给研究者带来疑问,基于此,试通过本研究比较了三个不同浓度下逆行胆胰管注射法制备大鼠 SAP,以期为研究者选择合适的牛磺胆酸钠浓度来制备 SAP 大鼠模型提供依据。

1 材料和方法

1.1 动物

60 只清洁级雄性 SD 大鼠,8 周龄,体重 260 ~ 280 g。由中国科学院上海斯莱克实验动物有限公司提供【SCXK(沪)2010-0017】。实验大鼠饲养于上海中医药大学实验动物中心【SYXK(沪)2009-0069】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 药品和试剂

牛磺胆酸钠(美国 Sigma 公司,批号 CAS145-42-6);戊巴比妥钠(国药集团化学试剂有限公司,批号 WS20051129);TNF- α (上海森雄科技实业有限公司,批号 SXB004);IL-6 ELISA 试剂盒(上海森雄科技实业有限公司,批号 SX01165)

1.3 主要仪器

酶标仪(BioRAD, model 680);自动生化检测仪(Olympus, Au560);自动脱水机(Leica, TP1020);自动包埋机(Leica, EG1160);显微镜(OLYMPUS, BX50);全自动显微镜照相装置(Olympus, PM30-35DX2);微量注射泵(浙江医药公司, WZ-50C2)。

1.4 实验方法

1.4.1 造模方法 将 60 只大鼠随机分为假手术组($n=15$),1.5% 浓度组($n=15$),3.5% 浓度组($n=15$),5% 浓度组($n=15$)。参照逆行胆胰管注射法制备重症胰腺炎模型。2% 戊巴比妥 0.2 mL/100g 腹腔麻醉,固定、备皮,消毒。沿腹白线正中切口约 1.5 cm,暴露腹腔,持弯镊子寻找十二指肠(位于右侧腹腔深部,被肝叶覆盖)。双手持镊轻拉肠段,充分暴露胰腺,见胰腺被小肠呈 C 型包绕,胆胰管为乳白色,开口于十二指肠,呈一白色光点。用动脉夹阻断胆胰管入肝门处,左手中指垫纱布,拇指与

食指夹持胰头部,用 5.5 号头皮针沿白色光点处缓慢穿刺胆胰管。用微量泵以 12 mL/h 的速度,1 mL/kg 的剂量,各组分别持续匀速输入 1.5%、3.5% 和 5% 的牛磺胆酸钠,注完后继续维持压力 3 min。去动脉夹,观察胰体和胰尾部情况,可见胰腺有明显出血点和水肿,逐层缝合肌层和皮肤。术后,于所有实验动物左右后肢皮下各注射生理盐水 10 mL/kg,均禁食不禁水。假手术组仅开腹、翻转胰腺后关腹。

1.4.2 检测项目与方法 各组大鼠于术后 24 h 麻醉后开腹,腹主动脉取血 3~5 mL,分离血清,检测淀粉酶(Amy),采用 ELISA 法测定血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6(IL-6);靠近十二指肠壶腹部取 1 cm \times 1 cm 胰腺组织,用 10% 的甲醛固定,脱水、透明与浸蜡、包埋、切片、苏木素-伊红(HE)染色后光镜下观察病理组织形态。

1.5 统计学方法 数据均采用 SPSS 17.0

软件包进行统计学分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间两两比较用单因素方差分析;计数资料用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠死亡率比较

手术各组大鼠术后均出现萎靡不振,皮毛竖立等表现,以 5% 浓度组为甚,假手术组麻醉苏醒后表现无异常。假手术组大鼠死亡 1 只,考虑为麻醉意外。1.5% 浓度组死亡 1 只,3.5% 浓度组死亡 2 只,5% 浓度组死亡 4 只。5% 浓度组死亡率较 1.5% 浓度组显著升高($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 大鼠死亡率比较

Tab. 1 Comparison of mortality between different groups

组别 Group	N	死亡数 Numbers of death	死亡率% Mortality
假手术组 Sham operated group	15	1	6.7
1.5% 浓度组 Group of 1.5% in concentration	15	1	6.7
3.5 浓度组 Group of 3.5% in concentration	15	2	13.3
5% 浓度组 Group of 5% in concentration	15	4	26.7 ^{*#}

注:与假手术组比, * $P < 0.05$; 与 1.5% 浓度组比, # $P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ vs. Sham operated group; # $P < 0.05$ vs. Group of 1.5% in concentration.

表 2 各组血清淀粉酶、TNF- α 、IL-6 水平比较Tab. 2 Comparison of serum amylase, TNF- α and IL-6 between different groups

组别 Group	血清淀粉酶 (U/L) Serum amylase	TNF- α (pg/mL)	IL-6 (pg/mL)
假手术组 Sham operated group	502.2 \pm 38.81	11.5 \pm 0.65	12.9 \pm 0.61
1.5% 浓度组 Group of 1.5% in concentration	1674.3 \pm 101.09*	29.43 \pm 1.98*	49.4 \pm 2.12*
3.5% 浓度组 Group of 3.5% in concentration	1785.0 \pm 98.43*	34.12 \pm 3.01*	56.5 \pm 3.21*
5% 浓度组 Group of 5% in concentration	2315 \pm 112.14* [#] Δ	88.12 \pm 3.09* [#] Δ	119.42 \pm 4.76* [#] Δ

注:与假手术组比,* $P < 0.05$;与 1.5% 浓度组比,[#] $P < 0.05$;与 3.5% 浓度组比, $\Delta P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ vs. Sham operated group; [#] $P < 0.05$ vs. Group of 1.5% in concentration; $\Delta P < 0.05$ vs. Group of 3.5% in concentration.

表 3 各组胰腺组织评分比较

Tab. 3 Comparison of pathological score between different groups

组别 Group	水肿 edema	炎症浸润 Inflammation infiltrate	出血 Hemorrhage	腺泡坏死 Acinar necrosis
假手术组 Sham operated group	0.39 \pm 0.23	0.20 \pm 0.30	0.11 \pm 0.10	0.10 \pm 0.19
1.5% 浓度组 Group of 1.5% in concentration	1.76 \pm 0.29*	1.42 \pm 0.19*	0.76 \pm 0.23*	1.89 \pm 0.34*
3.5% 浓度组 Group of 3.5% in concentration	1.88 \pm 0.56*	1.45 \pm 0.25*	0.87 \pm 0.29*	2.01 \pm 0.45*
5% 浓度组 Group of 5% in concentration	1.90 \pm 0.50*	1.73 \pm 0.31*	1.12 \pm 0.73* [#] Δ	3.01 \pm 0.71* [#] Δ

注:与假手术组比,* $P < 0.05$;与 1.5% 浓度组比,[#] $P < 0.05$;与 3.5% 浓度组比, $\Delta P < 0.05$ 。

Note: * $P < 0.05$ vs. Sham operated group; [#] $P < 0.05$ vs. Group of 1.5% in concentration; $\Delta P < 0.05$ vs. Group of 3.5% in concentration.

2.2 生化指标检测结果

各浓度组血清淀粉酶水平较假手术组显著升高 ($P < 0.05$), 5% 浓度组较 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组均有显著升高 ($P < 0.05$); 各浓度组 TNF- α 水平较假手术组显著升高 ($P < 0.05$), 5% 浓度组较 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组均有显著升高 ($P < 0.05$); 各浓度组 IL-6 水平较假手术组显著升高 ($P < 0.05$), 5% 浓度组较 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组均有显著升高 ($P < 0.05$)。1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组的各实验室检查比较均未见明显差异 ($P > 0.05$) (表 2)。

2.3 组织病理学观察结果

各浓度组胰腺组织水肿、炎症浸润、出血、腺泡坏死的组织评分较假手术组均有明显升高 ($P < 0.05$); 在出血和腺泡组织坏死方面, 5% 浓度组较 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组均有显著升高 ($P < 0.05$); 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组的胰腺组织水肿、炎症浸润、出血、腺泡坏死的组织评分未见明显差异 ($P > 0.05$) (表 3, 彩插 8 图 1)。

3 讨论

SAP 的造模方法分为非侵入型和侵入型两种。常见的非侵入型制备方法包括饲喂法、雨蛙素 (caerulein, CAE) 注射法、L-精氨酸注射法^[1-2]。饲喂法指给造模动物喂食无胆盐乙硫氨酸 (choline deficient methionine supplemental, CDE) 而诱发 SAP。1992 年 Niederau 等^[3] 给雌性小鼠服 CDE 诱发出

SAP。CAE 注射法指给造模动物注射雨蛙素而诱发的胰腺炎。此法有损伤较小, 操作较简便, 可重复性好, 给药方式多样 (皮下注射、肌肉注射、静脉注射、腹腔注射) 等诸多优点, 主要用于水肿型胰腺炎发病机理的研究。L-精氨酸注射法多指腹腔多次注射 L-精氨酸而诱发 SAP。此法操作简便、价钱便宜、感染机会少等, 缺点是成活率偏低。

侵入型制备方法主要有电针刺激法、结扎法和逆行胆胰管注射法。电针刺激法可较好的模拟胆源性胰腺炎, 但操作较复杂, 可重复性较差, 成活率偏低。结扎法有十二指肠闭襻法和胆总管结扎法两种。1975 年 Nevalainen^[4] 报道十二指肠闭襻法, 即结扎胆总管开口远近各 1cm 的十二指肠, 使十二指肠腔内压力增高, 致胆汁返流入胰管引起胰腺炎。此法与临床常见的急性胆源性胰腺炎类似, 虽然操作简单, 但易引起感染, 也影响肠道的正常生理功能。王广义等^[5] 将胆总管结扎法改进为胆总管末端结扎法, 结果呈现典型急性胰腺炎的征象, 缺点是实验动物的死亡率较高, 可重复性较差。1980 年 Aho^[6] 首次采用切开大鼠十二指肠前壁, 经十二指肠乳头插入塑料管, 向胰胆管内逆行注射 5% 牛磺胆酸钠, 制备成急性出血坏死性胰腺炎 (acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis, AHNP) 模型, 称为胆胰管逆行注射法, 或者称为逆行胆胰管注射法 (retrograde injection into the biliopancreatic duct)。Zhang^[7] 等用 0.1 mL/100 g, 3.5% 牛磺胆酸钠逆行注射胆胰管也成功建立小鼠 SAP 模型。此

法效果确切,在病因、致病机制及病变等方面与临床 SAP 相似,且诱发成功率高,有很好的重复性,因此是目前被证明的最有效的 SAP 研究的动物模型。

逆行胆胰管注射法的造模过程需经过麻醉、备皮、消毒、开腹、寻找胰腺、夹闭胆胰管、穿刺及注射、关腹这 8 个步骤。其中关键部分和难点为“寻找胰腺”和“逆行胆胰管穿刺”两方面。对于“寻找胰腺”,首先要明确大鼠胰腺的解剖位置,其胰腺组织被小肠组织包围呈 C 型。故较容易由胃而找到小肠,从而由 C 型小肠包绕的位置找到胰腺组织。对于“逆行胆胰管穿刺”,涉及到选择“穿刺器具”和“穿刺点”两个方面。对于“穿刺器具”,最常用的是头皮针和 BD 套管针。头皮针的优点价格便宜,而 BD 套管针其优点是进针后,可以拔出针芯,继续进针,减少胆胰管的损伤。从课题组的长期实践来看,BD 套管针在拔出针芯再进针的过程中,可能有两个问题。其一,因为动作繁琐而增加了手术时间,增加了大鼠感染机会,增加了胰腺组织额外损伤的可能。其二,再次进针时,因为针芯已退出,此时的进针依靠针芯外侧的塑料套管,因摩擦或者韧性不足,可能加重胆胰管的损伤,甚至因用力进针可能会出现胰腺组织的撕裂等意外情况。因此本次研究,课题组采用了 5.5 号头皮针,从而减少手术时间,简化流程,减少胰腺及大鼠的额外损伤。其次是“穿刺点”的选择,“穿刺点”可以选择的两个地方分别是穿过胰腺组织的胆胰管上和胆胰管入十二指肠处。对于在穿过胰腺组织胆胰管上进针,存在增加胰腺组织额外损伤和难以刺入胆胰管两个问题。因此本课题组穿刺点选在胆胰管入十二指肠处,此处相对容易进入胆胰管,又可减少胰腺的额外损伤。但要注意尽量靠近胰腺组织,减少十二指肠的穿刺。

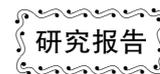
文献记载最多的牛磺胆酸钠注射浓度分别为 1.5%、3.5%、5%^[6-8]。研究结果表明,三种浓度均在不同程度上制备 SAP 模型。从死亡率的角度看,5% 浓度组与临床中死亡率相近。从实验室结果看,

5% 浓度组血淀粉酶、TNF- α 水平、IL-6 水平较 1.5%、浓度组和 3.5% 浓度组均有显著升高,而 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组之间的上述检查比较均未见明显差异。在病理评分的四个方面里,出血和腺泡组织坏死方面,5% 浓度组较 1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组均有显著升高,1.5% 浓度组和 3.5% 浓度组的胰腺组织水肿、炎症浸润、出血、腺泡坏死的组织评分未见明显差异。以上结果说明 5% 的牛磺胆酸钠逆行胆胰管注射法能更好的制备 SAP 模型,且更符合 SAP 的生理、病理表现。

参考文献:

- [1] Liang HY, Chen T, Wang T, *et al.* Time course of intestinal barrier function injury in a sodium taurocholate-induced severe acute pancreatitis in rat model[J]. *J Dig Dis*, 2014, 15(7):386-393.
- [2] 周秉舵,朱生樑,马淑颖,等. 急性胰腺炎动物模型的研究进展[J]. *中国实验动物学志*, 2006, 16(7):442-446.
- [3] Niederau C, Luthen R, Niederau MC, *et al.* Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding acholine-deficient, ethionine-supplemented diet: methodology and standards[J]. *Eur Surg Res*, 1992, 24(1):40-54.
- [4] Nevalainen TJ. Acute pancreatitis caused by closed by closed duodenal loop in the rat[J]. *Scand J Gastroent*, 1975, 10(5):521-527.
- [5] 王广义,刘铜军,尹为民,等. 三种实验型急性胰腺炎动物模型比较[J]. *中华实验外科杂志*, 1995, 12(1):56.
- [6] Aho HJ, Koskensalo SM, Nevalainen TJ. Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis[J]. *Scand J Gastroenterol*, 1980, 15(4):411-416.
- [7] Zhang XP, Ye Q, Jiang XG, *et al.* Preparation method of an ideal model of multiple organ injury of rat with severe acute pancreatitis[J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(34):4566-4573.
- [8] 余夙慧,康牧星,孙洪伟,等. SIRS 发展在胰腺坏死、继发感染致胰腺炎病变加重中的作用[J]. *肝胆外科杂志*, 2014, 26(1):43-47.

[修回日期]2015-04-21



多巴胺 D5 受体通过抑制氧化应激对 扩张型心肌病的调节作用

王子皓, 胡永艳, 王文洁, 董 伟, 姜晓亮, 刘 星, 杨志伟

(中国医学科学院北京协和医学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 目的 探讨多巴胺 D5 受体是否会通过抑制氧化应激来影响扩张型心肌病 (dilated cardiomyopathy) 的发生发展。**方法** 建立心脏特异表达人多巴胺 D5 受体突变基因 F173L (α -MHC-hD5F173L) 和正常基因 (α -MHC-hD5WT) 转基因小鼠。用 3 月龄小鼠, 首先检测比较转基因小鼠心脏内 ROS 的产量和 NOX2 的表达量。然后对 α -MHC-hD5F173L 小鼠通过皮下给 NADPH 氧化酶的抑制剂罗布麻宁 (Apocynin) 4 周, 同时给 PBS 作为对照组, 然后检测各项心肌病相关指标。同时构建人多巴胺 D5 受体突变基因 (hD5F173L) 和正常多巴胺 D5 受体基因 (hD5WT) 的大鼠心肌细胞 (H9C2), 检测两者在基础条件下 ROS 产量的变化。**结果** α -MHC-hD5F173L 转基因小鼠的 NADPH 氧化酶的活性和 NOX2 蛋白的表达量均明显高于野生型 α -MHC-hD5WT 小鼠, 罗布麻宁能显著改善 α -MHC-hD5F173L 转基因小鼠的心脏功能。H9C2-hD5F173L 大鼠细胞系 NOX2 的表达量及 ROS 产量高于 H9C2-hD5WT 对照细胞。**结论** 多巴胺 D5 受体可能通过抑制氧化应激而防止扩张型心肌病的发生发展。

【关键词】 扩张型心肌病; 多巴胺 D5 受体; 活性氧

【中图分类号】R332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2015) 05-0024-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.006

The regulation of dilated cardiomyopathy by dopamine D5 receptor through inhibiting oxidative stress

WANG Zi-hao, HU Yong-yan, WANG Wen-jie, DONG Wei, JIANG Xiao-liang, LIU Xing, YANG Zhi-wei

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences &

Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To determine whether dopamine D5 receptor (D5R) regulates the development of dilated cardiomyopathy (DCM) by inhibiting oxidative stress. **Methods** We developed heart-specific hD5 mutant (α -MHC-hD5F173L) and wild type (α -MHC-hD5WT) transgenic mice. The NOX2 expression and ROS production were tested in the transgenic mice at three month of age. The α -MHC-hD5F173L mice were treated with either NADPH oxidase inhibitor Apocynin (1mmol/kg/day) or phosphate-buffered saline (PBS) as control by intraperitoneal injection for 4 weeks. After then, the indexes of heart function were measured. The hD5WT and hD5F173L were transfected respectively in rat H9C2 cells, in which ROS production and NOX2 expression were detected at basal level. **Results** The ROS production and NOX2 expression were higher in the heart of α -MHC-hD5F173L than α -MHC-hD5WT mice. Apocynin treatment improved the heart function of α -MHC-hD5F173L mice. NOX2 expression and ROS production were higher in hD5F173L

[基金项目] 2009 国家自然科学基金面上项目 (30971186)。

[作者简介] 王子皓 (1988 -), 男, 研究方向: 高血压的发病机制。E-mail: simmons224@sina.com。

[通讯作者] 杨志伟 (1969 -), 男, 博士, 研究员。E-mail: yangzhiwei@cnilas.pumc.edu.cn。

than hD5WT transfected H9C2 cells. **Conclusions** Dopamine D5 receptor may prevent DCM development by inhibiting oxidative stress.

【Key words】 Dilated cardiomyopathy; Dopamine D5 receptor(D5R); Reactive oxygen species(ROS)

扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)是一种以心腔扩大、心肌收缩功能障碍为主要特征的心肌疾病^[1-2]。其发病的原因复杂,包括特发性、家族或遗传性、病毒感染和(或)免疫性、酒精性或中毒性等,但最终的临床表现相似,如出现神经激素的激活及心力衰竭等^[3]。研究证明,许多不同的信号传导通路都和扩张型心肌病有关系^[4-7],而其中的一些信号通路又和活性氧(ROS)的产生有着密切的联系。同时越来越多的研究表明,氧化应激在扩张型心肌病的发生发展中起着重要的作用^[4-9]。

NADPH 氧化酶是心血管系统 ROS 的主要来源^[10]。NADPH 氧化酶由 6 部分组成:细胞膜多肽 p22^{phox}、gp91^{phox}, 细胞浆多肽 P40^{phox}、p47^{phox} 和 p67^{phox}, 小分子 G 蛋白 rac1 或 rac2。多个亚型的 Nox (NAD(P)H oxidase)被发现,包括 Nox 1, Nox 2, Nox 3, Nox 4, Nox 5,其分子量类似 gp91^{phox},为 65×10^3 ^[11]。NOX4 主要在血管平滑肌和肾脏细胞内表达^[12],NOX2 主要在心脏内表达^[13]。

多巴胺受体是一种 G 蛋白偶联受体,包括 D1 类和 D2 类受体。D1 类受体包括 D1 受体和 D5 受体,该类受体增强腺苷酸环化酶(adenylyl cyclase, AC)活性,增加第二信使 cAMP 的产生。D2 类受体包括 D2、D3 和 D4,该类受体抑制 AC 活性^[14]。前期的研究发现,D5 受体基因敲除(D5^{-/-})小鼠血压明显升高,心脏重量增加、心肌肥厚^[15-17]。全身表达 hD5F173L (CMV-hD5F173L) 基因的转基因小鼠与 CMV-hD5WT 对照小鼠相比,CMV-hD5F173L 小鼠肾脏的 NADPH 氧化酶的活性和 ROS 的产生量显著高于野生对照组,同时,3 月龄开始血压升高,4 月龄开始左心室壁厚^[18]。因此,我们建立了心脏特异表达人多巴胺 hD5F173L 基因小鼠,发现该转基因小鼠出现典型扩张型心肌病的表型^[19]。因此,在此基础上,我们对多巴胺 D5 受体通过氧化应激在心脏肥大发生、发展过程中的作用机制进行研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 C57BL/6J 小鼠雌雄各 15 只,体重 16 ~ 25 g,SPF 级雄性 ICR 小鼠 10 只,雌性 ICR 小鼠 20 只,体重 18 ~ 26 g,均购自北京华阜康生物科技股份

有限公司【SCXK(京)2014-0004】;饲养在中国医学科学院医学实验动物研究所【SYXK(京)2014-0029】,实验中涉及动物的操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会的批准【ILAS-PG-2014-005】。

1.2 转基因小鼠构建及动物试验

将 hD5FL173L 或 hD5WT 基因插入心脏特异表达的 α -MHC 启动子下游,构建 α -MHC-hD5FL173L 或 α -MHC-hD5WT 转基因表达载体。用显微注射法将线性化的转基因表达载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,转入受体假孕 ICR 小鼠中,小鼠出生 14 d 提取基因组 DNA,用 PCR 鉴定 α -MHC-hD5FL173L 或 α -MHC-hD5WT 转基因小鼠的基因型。

为了验证 NADPH 氧化酶在转基因小鼠心肌扩张中的作用,我们用 3 月龄小鼠,通过皮下持续给 ANDPH 氧化酶的抑制剂 Apocynin(SIGMA),同时给 PBS 作为对照组。连续皮下注射给药 4 周后(1 mmol/kg/day),对小鼠超声检查,最后处死小鼠,取心脏称重,并取同部分心肌组织用于 ADPH 氧化酶的活性和蛋白表达的测定。

1.3 细胞培养和 D5 受体基因转染

将人 D5 受体正常基因 hD5WT 或突变基因 hD5F173L 的全 cDNA 在 EcoRI 和 XbaI 之间插入到 pcDNA6/V5-His 质粒,然后用 LT1 转染试剂将人 D5 受体 cDNA 转染到 H9C2 细胞(H9C2-hD5WT 和 H9C2-hD5F173L)。用免疫印迹检测转染细胞内 His/V5 的表达确定转染是否成功。

1.4 超声检查

使用 VisualSonics, Vevo770(加拿大),高分辨率小动物超声系统,将 3 月龄的阳性转基因小鼠及同龄野生型对照小鼠腹腔注射三溴乙醇(0.18 mL/10 g 体重,250 mg/kg)麻醉。待小鼠麻醉完成后,用脱毛膏涂于左胸,静待 1 min,用卫生纸将毛擦去。毛脱不净影响超声的清晰度。固定小鼠仰卧位,用医用胶条将四肢固定于导电块上,在 4 个导电块涂上导电胶,用于分析心电图、心率及呼吸等参数。胸部涂上耦合剂,超声检测。

1.5 NADPH 氧化酶活性测定

用二氯荧光素醋酸盐(2', 7'-

dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFDA) 荧光法测定分别转染了人多巴胺 D5 受体突变基因 F173L 和正常人多巴胺 D5 受体基因的大鼠心肌细胞 (H9C2) NADPH 氧化酶的活性。将 H9C2 细胞培养于 96 孔板中, 先使用 NADPH 氧化酶的抑制剂二苯基碘 (DPI, 10 mmol/L/30 min) (Sigma) 处理, 用 Hanks 平衡盐溶液洗涤一次, 然后加入 DCFDA (10 mmol/L), 37°C, 孵育 30 min; 用酶标仪 (Sigma) 在激发光 485 nm 和射出光 530 nm 波长的情况记录荧光强度。小鼠心脏组织的 NADPH 氧化酶的活性是利用光泽精化学发光法 (lucigenin chemiluminescence) 测定^[17]。

1.6 免疫印迹

提取小鼠心脏和转染人 D5 受体大鼠心肌细胞 (H9C2) 全蛋白, 通过免疫印迹的方法检测 Nox2 (1:500, Epitomics)^[20], 并以 GAPDH 作为参照内参。

1.7 统计学方法

数据用 SPSS 统计软件处理, 计量数据以平均值 \pm 标准误 ($X \pm SE$) 的形式表示, 二组样本间的比较用 t 检验, 3 组及以上样本的比较用 One-Way ANOVA 统计分析方法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 α -MHC-hD5F173L 和 α -MHC-hD5WT 转基因小鼠心脏内 NADPH 氧化酶活性和蛋白表达水平

分别利用光泽精化学发光法和免疫印迹方法检测转基因小鼠心脏内 NADPH 氧化酶的活性及其 NOX2 蛋白的表达, 发现心脏特异表达人 D5 受体基因突变 α -MHC-hD5F173L 转基因小鼠的 NADPH 氧化酶的活性和 NOX2 蛋白的表达均明显高于野生型 α -MHC-hD5WT 小鼠 (图 1A, 1B)。

2.2 Apocynin 作用于 α -MHC-hD5FL173L 转基因小鼠后心脏结构和功能的变化

我们以前的研究发现, α -MHC-hD5FL173L 转基因小鼠心脏收缩期和舒张期左室内径均增加, 收缩期和舒张期容积显著增大, 射血分数及短轴缩短率减少。病理学观察显示心腔明显大于野生型, 心室壁明显变薄, 心肌细胞不均匀肥大, 心肌间质纤维增多^[19]。因此, 我们使用 NADPH 氧化酶特异性抑制剂 Apocynin (1 mmol/kg/day), 通过皮下持续给予 α -MHC-hD5FL173L 转基因小鼠 4 周, 发现

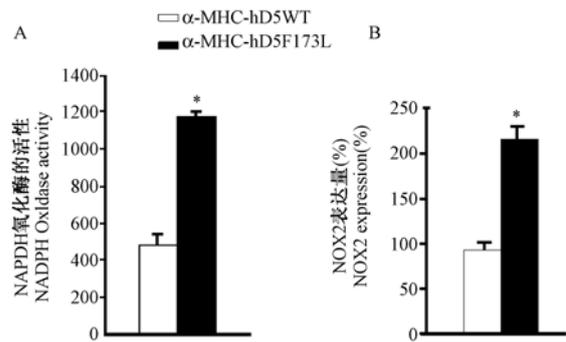


图 1 α -MHC-hD5F173L 和 α -MHC-hD5WT 转基因小鼠心脏 NADPH 氧化酶活性及 NOX2 蛋白的表达水平 (* $P < 0.05$ vs. α -MHC-hD5WT, $n = 12$)

Fig. 1 NADPH oxidase activity and NOX2 expression in the heart of α -MHC-hD5F173L and α -MHC-hD5WT mice (* $P < 0.05$ vs. α -MHC-hD5WT, $n = 12$)

Apocynin 给药组小鼠心脏扩张明显改善 (图 2), 心脏收缩期和舒张期容积减小 (图 3A), 收缩期和舒张期左室内径减小 (图 3B), 心脏体积相对减小 (图 3C), 射血分数及短轴缩短率增加 (图 3D, 3E), 即心脏功能改善。

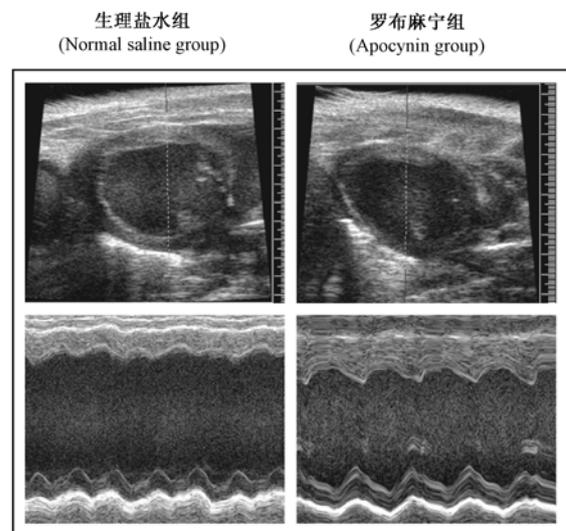


图 2 α -MHC-hD5FL173L 转基因小鼠分别注射生理盐水和罗布麻宁后心脏的 M 超声分析

Fig. 2 M-mode echocardiography of α -MHC-hD5FL173L mice heart injected with saline and Apocynin

2.3 H9C2-hD5F173L 和 H9C2-hD5WT 细胞内 NADPH 氧化酶的活性和蛋白的表达水平

为了进一步验证多巴胺 D5 受体在心脏内对氧化应激的调节作用, 我们将 hD5F173L 和 hD5WT 转染到 H9C2 细胞内。因 D5 受体具有持续活性的特

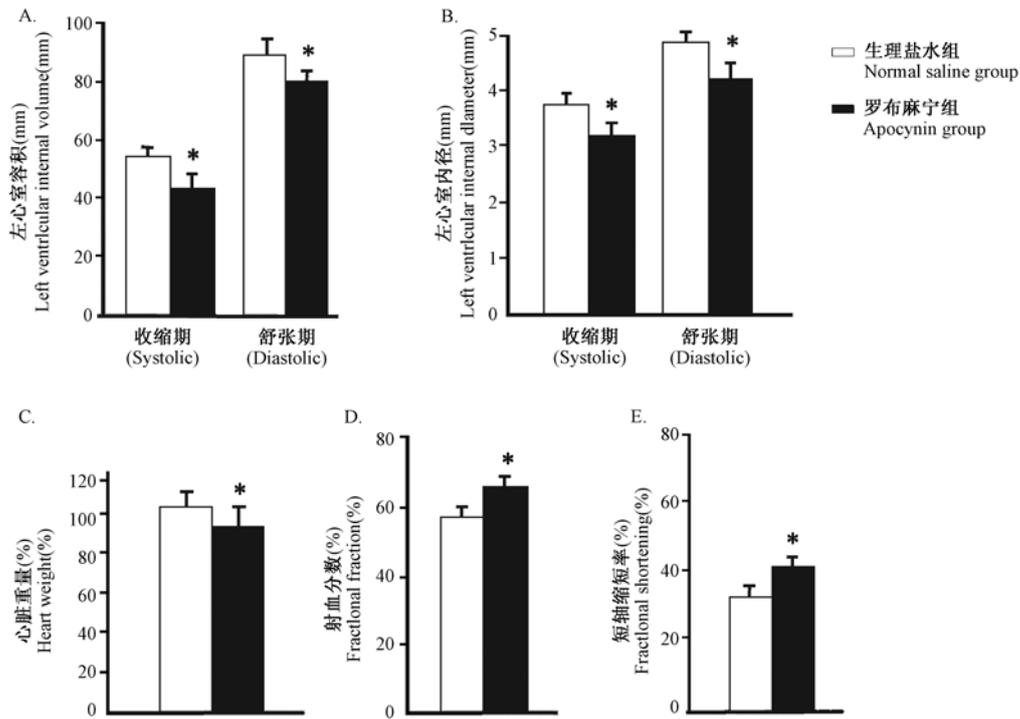


图 3 A-E; α -MHC-hd5FL173L 转基因小鼠心脏功能的超声心电图分析 (* $P < 0.05$ vs. saline treatment, $n = 10$)

Fig. 3 A-E; Echocardiographic analysis of α -MHC-hd5FL173L mice cardiac function (* $P < 0.05$ vs. saline treatment, $n = 10$)

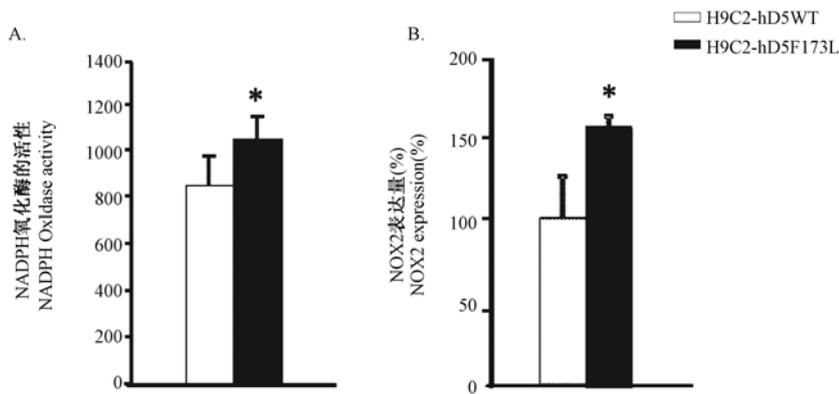


图 4 H9C2-hd5F173L 和 H9C2-hd5WT 细胞内 NADPH 氧化酶的活性和 NOX2 蛋白的表达 (* $P < 0.05$ vs. H9C2-D5WT, $n = 5$)

Fig. 4 NADPH oxidase activity and NOX2 expression in H9C2-hd5F173L and H9C2-hd5WT cells (* $P < 0.05$ vs. H9C2-D5WT, $n = 5$)

点,即 D5 受体在没有多巴胺或激动剂作用的情况下仍具有功能活性^[17]。因此,我们检测了转染细胞基础条件下 NADPH 氧化酶的活性和蛋白表达。研究发现,H9C2-hd5F173L 细胞内 NADPH 氧化酶的活性和 NOX2 蛋白的表达均高于 H9C2-hd5WT 细胞(图 4A,4B)。

3 讨论

研究发现,转人多巴胺 D5 受体突变基因 hd5F175L 心脏特异表达小鼠出现扩张型心肌病表型,心脏功能减弱,同时伴有心脏 NADPH 氧化酶活性和蛋白的表达增加。NADPH 氧化酶抑制剂减轻了该疾病表型,改善了心脏功能。转染 hd5F173L

基因的心肌细胞,在基础状态下,其 NADPH 氧化酶活性和蛋白的表达均显著高于转染正常 hD5WT 基因的细胞。一些临床数据表明抗氧化剂对于扩张型心肌病的治疗是有效的,如辅酶 Q10、洋地黄、卡维地洛等^[21-24]。因此可证明多巴胺 D5 受体通过调节 NADPH 氧化酶的活性及 ROS 的产生来影响心脏的结构和功能。

临床研究表明 ROS 的产生在许多心脏疾病的发生发展中起着重要作用^[25-26]。ROS 包括含氧自由基、氧的非自由基衍生物、对氧化物、氢过氧化物、脂质过氧化物等^[27]。生理情况下,化学及代谢来源的 ROS 对机体起到有益作用,但在电离辐射、紫外线照射或抗氧化能力降低的情况下,机体内将产生大量的 ROS 自由基及脂质过氧化物等,使体内氧化和抗氧化平衡失调,导致 ROS 连锁反应,引起不同程度细胞毒性反应,并造成膜脂质、蛋白质和 DNA 的氧化损伤,进而引起心肌细胞的凋亡、衰老以致心力衰竭的发生。NADPH 氧化酶家族是心血管系统 ROS 的主要来源,NOX2 在小鼠和人的心脏衰竭进展中起到了一定的促进作用,减少 NOX2 的表达能防止氧化应激而保护心肌细胞^[19]。

研究表明,心肌中的 NADPH 氧化酶是产生 ROS 的主要来源,ROS 可激活一系列下游信号,对细胞外因子产生应答。其介导的信号通路包括:1) ROS-MAPKs 信号通路。在哺乳类动物细胞内主要存在三条并行的 MAPKs 信号通路,即 ERK (extracellular signal-regulated kinase)、JNK/SAPK、p38MAPK。MAPK 被双重特异性激酶激活后从胞浆移行至胞核,进而活化调控肥厚基因(ANP、BNP、 α -SKA、 β -MHC)表达的转录因子^[28]。研究发现,ROS 是激活 MAPKs 重要的激活剂,心脏中 ROS 水平被抑制后,包括 ERK1/2、JNK、P38 在内的 MAPKs 磷酸化水平明显下降,心肌肥厚减弱^[29-30]。2) ROS-Ca²⁺ 信号通路。Ca²⁺ 是胞内重要的第二信使,参与下游多条信号通路,在细胞信号传导过程中起到重要的作用。ROS 直接作用于钠钙交换蛋白,使得 Ca²⁺ 大量内流,激活胞核基因进一步增加胞质蛋白的合成,导致心肌肥大^[31-32]。但是,多巴胺 D5 受体并非是影响 ROS 产生的唯一通路,其调节心肌肥大的具体信号通路及作用机制还有待于进一步研究。

参考文献:

[1] Hughes SE, McKenna WJ. New insights into the pathology of

inherited cardiomyopathy[J]. Heart 2005;91:257-264.

- [2] Jefferies JL, Towbin JA. Dilated cardiomyopathy [J]. Lancet 2010;375:752-762.
- [3] Houser SR, Margulies KB, Murphy AM, et al. Animal models of heart failure: a scientific statement from the American Heart Association[J]. Circ Res 2012;111:131-150.
- [4] Baumgartner D, Scholl-Burgi S, Sass JO, et al. 2007. Prolonged QTc intervals and decreased left ventricular contractility in patients with propionic acidemia[J]. J Pediatr. 150:192-197.
- [5] Movahed MR, Saito Y. Lack of association between obesity and left ventricular systolic dysfunction [J]. Echocardiography. 2009. 26:128-132.
- [6] Alameddine, F. M. , Zafari, A. M. Genetic polymorphisms and oxidative stress in heart failure. Congest[J]. Heart Fail. 2002, 8, 157-164.
- [7] Givertz, M. M. Colucci, W. S. New targets for heart-failure therapy: Endothelin, inflammatory cytokines, and oxidative stress[J]. Lancet 1998, 352, SI34-SI38.
- [8] Kinugawa S, Tsutsui H, Hayashidani S, et al. Treatment with dimethylthiourea prevents left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction in mice: role of oxidative stress[J]. Circ Res. 2000;87:392-398.
- [9] Engberding N, Spiekermann S, Schaefer A, et al. Allopurinol attenuates left ventricular remodeling and dysfunction after experimental myocardial infarction: a new action for an old drug [J]. Circulation. 2004;110:2175-2179.
- [10] Cai H, Griendling KK, Harrison DG. The vascular NAD(P)H oxidases as therapeutic targets in cardiovascular diseases [J]. Trends Pharmacol Sci. 2003; 24(9): 471-418.
- [11] Cheng G, Cao Z, Xu X, et al. Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5 [J]. Gene. 2001; 269: 131-140.
- [12] Shiose A, Kuroda J, Tsuruya K, et al. A novel superoxide-producing NAD(P)H oxidase in kidney [J]. J Biol Chem. 2001; 276: 1417-1423.
- [13] Piccoli C, Ria R, Scrima R, et al. Characterization of mitochondrial and extramitochondrial oxygen consuming reaction in human hematopoietic stem cells [J]. Novel evidence of the occurrence of NADPH oxidase activity [J]. J Biol Chem, 2005, 280(28):26467-26476.
- [14] Yang Z, Sibley DR, Jose PA. D5 dopamine receptor knockout mice and hypertension [J]. J Recept Signal Transduct Res, 2004, 24: 149-164.
- [15] Holmes A, Hollon TR, Gleason TC, et al. Behavioral characterization of dopamine D5 receptor null mutant mice [J]. Behav Neurosci. 2001, 115:1129-1144.
- [16] Yang Z, Zheng S, Asico LD, et al. Increased PLD activity and elevated blood pressure in D5 receptor knockout mice [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; 288(1): H55-61.

(上转第 19 页)

- related quality of life in children with newly diagnosed immune thrombocytopenia [J]. *Haematologica*, 2014, 99 (9): 1525 - 1531.
- [2] 张权, 王纓. 中医药治疗特发性血小板减少性紫癜概况及展望[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2014, 16(4): 247 - 249.
- [3] 全日城, 麻柔. 麻柔辨证施治慢性免疫性血小板减少性紫癜经验[J]. *北京中医药*, 2010, 29(4): 260 - 261.
- [4] 朱影. 清热滋阴凉血止血法治疗慢性特发性血小板减少性紫癜[J]. *江西中医药*, 2008, 39(304): 32 - 33.
- [5] 蒋文明, 邓常青, 陈大舜, 等. 大鼠免疫性血小板减少模型的研究[J]. *中国实验动物学报*, 1996, 4(2): 104 - 107.
- [6] 朱文锋. *中医诊断学*[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2002.
- [7] Harrington WJ, Minnich V, Hollingsworth JW, *et al.* Demonstration of a thrombocytopenic factor in the blood of patients with thrombocytopenic purpura [J]. *J Lab Clin Med*, 1951, 38: 1 - 10.
- [8] Domínguez V, Govezensky T, Gevorkian G, *et al.* Low platelet counts alone do not cause bleeding in an experimental immune thrombocytopenic purpura in mice [J]. *Haematologica*, 2003, 88 (6): 679 - 687.
- [9] Song S, Crow AR, Freedman J, *et al.* Monoclonal IgG can ameliorate immune thrombocytopenia in a murine model of ITP: an alternative to IVIG [J]. *Blood*, 2003, 101(9): 3708 - 3713.
- [10] 左泽平, 王志斌, 郭玉东, 等. 常用大鼠发热模型研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(2): 52 - 57.
- [11] 鄯新莲, 段红福, 崔瑛, 等. 血热出血模型大鼠血清中鲜地黄高效液相色谱分析[J]. *中医学报*, 2011, 9(26): 1067 - 1069.
- [12] 付澄洲. 寒热治则浅议[C]. *中华中医药学会中医内科学术论坛*, 2013, 517 - 520.
- [13] Cines DB, Bussell JB, Liebman HA, *et al.* The ITP syndrome: pathogenic and clinical diversity [J]. *Blood*, 2009, 113(26): 6511 - 6521.
- [14] 唐晓峰, 薛漫清, 王晖. 大鼠发热模型及发热机制的研究进展[J]. *广东药学院学报*, 2009, 25(3): 327 - 329.
- [15] Chander V, Tirkey N, Chopra K. Adrenergic receptor subtypes inositol phosphates and sources of cell [J]. *Toxicology*, 2005, 210(1): 55 - 64.
- [16] Chong BH. ITP: Tregs come to the rescue [J]. *Blood*, 2010, 116 (22): 4388 - 4390.

[修回日期]2015-03-31

(下接第 28 页)

- [17] Yang Z, Asico LD, Yu P, *et al.* D5 dopamine receptor regulation of reactive oxygen species production, NADPH oxidase, and blood pressure [J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2006; 290(1): R96 - R104.
- [18] 张艳荣, 全雄志, 杨志伟, 等. 多巴胺 D5 受体转基因小鼠的建立[J]. *中国比较医学杂志*. 2008; 18(5): 54 - 58.
- [19] 胡永艳, 董伟, 杨志伟, 等. 多巴胺 D5 受体突变基因 F173L 在心脏过表达引起转基因小鼠扩张型心肌病[J]. *中华高血压杂志*, 2011, 5(19): 454 - 458.
- [20] Nirmal PARAJULI, Vaibhav B. PATEL, Wang WANG, Ratnadeep BASU and Gavin Y. OUDIT. Loss of NOX2 (gp91phox) prevents oxidative stress and progression to advanced heart failure [J]. *Clinical Science*, 2014, 127, 331 - 340.
- [21] Turunen, M. Olsson, J. Dallner, G. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim. Biophys [J]. Acta*, 2004; 1660: 171 - 199.
- [22] Packer M, Bristow MR, Cohn JN, *et al.* The effect of carvedilol on morbidity and mortality in patients with chronic heart failure: US Carvedilol Heart Failure Study Group [J]. *N Engl J Med* 1996; 334: 1349 - 1355.
- [23] Yue TL, Cheng HY, Lysko PG. *et al.* Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger [J]. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 263: 92 - 98.
- [24] Dandona, P. Karne, R. Ghanim, *et al.* Carvedilol inhibits reactive oxygen species generation by leukocytes and oxidative damage to amino acids. *Circulation* 2000; 101: 122 - 124.
- [25] Giordano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure [J]. *J Clin Invest* 2005; 115: 500 - 508.
- [26] Griending KK, Sorescu D, Ushio-Fukai M. NAD(P)H oxidase: role in cardiovascular biology and disease. *Circ Res*. 2000; 86: 494 - 501.
- [27] Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly [J]. *Am J Physiol*, 1996, 271: C1424 - C1437.
- [28] Ghosh MC, Wang X, Li S, *et al.* Regulation of calcineurin by oxidative stress [J]. *Methods Enzymol*. 2003, 366: 289 - 304.
- [29] G YB, Su B, Sah VP, *et al.* Cardiac Hypertrophy induced by mitogen-activated protein kinase kinase 7, a specific activator for c-Jun HN2 - terminal kinase in ventricular cells [J]. *J Biol Chem*. 1998, 273(10): 5423.
- [30] Ghosh MC, Wang X, Li S, *et al.* Regulation of calcineurin by oxidative stress [J]. *Methods Enzymol*. 2003, 366: 289 - 304.
- [31] W, Zou Y, Shiojima L, *et al.* Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase II and calcineurin play critical roles in endothelin-1-induced cardio myocyte hypertrophy [J]. *J Biol Chem*. 2000, 275.
- [32] Rdano FJ. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(3): 500 - 508.

[修回日期]2015-04-08



雄性生殖细胞特异性表达绿色荧光蛋白小鼠的繁殖及其表型鉴定

王志茹^{1,2}, 李 军², 刘晓梅¹, 吴红联², 朱德生²

(1. 吉林大学公共卫生学院, 长春 130021; 2. 北京大学实验动物中心, 北京 100871)

【摘要】 目的 繁殖雄性生殖细胞特异性表达绿色荧光蛋白 (green fluorescent protein, GFP) 小鼠, 为进行小鼠生殖系统毒性研究提供有效的工具。**方法** 将 Ddx4 - cre 转基因雄鼠与 Rosa26mT/mG 转基因雌鼠交配, 产生子代动物, 利用分子生物学、组织病理学及活体成像等技术, 分别从分子、细胞和组织水平对子代及其亲代小鼠进行表型鉴定。**结果** PCR 结果表明在子代小鼠的睾丸组织中发生了 Cre 酶介导的特异性基因重组; 活体成像可以看到在 F1 代小鼠的睾丸组织中具有 GFP 的表达; 睾丸冰冻切片及精子荧光观察显示 GFP 主要表达于次级精母细胞、精子细胞和精子中。**结论** 雄性生殖细胞特异性表达 GFP 小鼠繁殖成功。

【关键词】 睾丸; 特异性; 基因重组; 绿色荧光蛋白

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0029-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.007

Production and phenotype identification of specific expressed green fluorescent protein in male mice germ cells

WANG Zhi-ru^{1,2}, LI Jun², LIU Xiao-mei¹, WU Hong-lian², ZHU De-sheng²

(1. School of public health, Jilin University, Changchun 130021, China; 2. Peking University Laboratory animal centre, Beijing 100871, China)

【Abstract】 Objective The aim of this study is production of organ specific animal model for studying reproductive toxicity in mice. **Methods** F1 generation was gotten by mating the Ddx4 - cre transgenic male mice with the Rosa26mT/mG transgenic female mice. F1 offspring and its parents phenotype was screened by molecular biological, histopathological and in vivo imaging technology. **Results** At molecular level, specific DNA fragment was only found in testis of F1 offspring; At the organ level, the expression of green fluorescent protein could only be observed in testis of F1 offspring; Testicular frozen sections and sperm fluorescence observation showed that green fluorescent protein were mainly expressed in the germ cell lineage such as secondary spermatocyte and spermatocyte and spermatozoon. **Conclusions** The production of the mice with specific germ cell expressed green fluorescent protein by Cre/loxP recombination system were built successfully.

【Key words】 Testis; Specificity; Gene recombination; Green fluorescent protein

生殖系统的改变是造成不孕不育的重要原因, 如何简易快速的检测生殖系统的损伤是目前研究的一个热点。在绝大多数物种中, Ddx4 基因特异性表达于生殖细胞中^[1], 常被用作分子标记研究配子

发生和原始生殖细胞的起源、迁移、分化等方面。雄性生殖细胞的 DDX4 蛋白表达, 从 12.5dpc 生殖嵴一直持续到减数分裂后的精子细胞^[2]。本研究利用生殖系统特异性启动子 Ddx4 启动的 Cre 酶, 通

[作者简介] 王志茹(1988 -), 女, 硕士生, 研究方向: 纳米毒理学, Email: 843872569@qq.com。

[通讯作者] 朱德生(1960 -), 男, 高级工程师, 研究方向: 转基因动物, Email: deshengz@pku.edu.cn。

过 Cre/loxP 位点特异性重组系统^[3]产生雄性生殖细胞特异性表达 GFP 小鼠模型,为后续进行雄性小鼠生殖系统发育和毒性研究提供理想的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 B6. FVB-Tg(Ddx4 - cre)1Dcas/JnjuDdx4 - cre 小鼠(以下简称为 Ddx4 - cre 小鼠)4 只,雌雄各半,雄性为杂合子(T/W),雌性为纯合子(T/T); SPF 级 B6.129 (Cg) - Gt (ROSA)26Sor^{tm4(ACTB-tdTomato, - GFP)Luo} 小鼠(以下简称 Rosa26mT/mG 小鼠)4 只,雌雄各半,均为纯合子(mut/mut)。小鼠周龄 4~8 周,均购自南京大学南京生物医药研究院【SCXK(苏)2010-0001】。饲养于北京大学实验动物中心【SYXK(京)2011-0003】,饲养条件符合 SPF 级实验动物的饲养标准。

Ddx4 - cre 小鼠在 Ddx4 启动子调控下在生殖系统中特异性表达 Cre 酶的转基因小鼠^[4]。

Rosa26mT/mG 小鼠是全身组织器官表达红色荧光蛋白的转基因小鼠,当其与 Cre 转基因小鼠交配产生的后代将发生 Cre 酶介导的特异性基因重组,将敲除 mT 基因,从而激活 mG 基因的表达,产生绿色荧光蛋白(彩插 10 图 1)^[5]。

1.2 动物交配

Ddx4 - cre 小鼠 4 只,雌雄各半,雄性为杂合子,雌性为纯合子,1:1 交配,扩大种群。

Rosa26 小鼠 4 只,雌雄各半,均为纯合子,1:1 交配,扩大种群。

Ddx4 - cre 小鼠 6 只,雄性,杂合子(T/W);与 Rosa26 小鼠 6 只,雌性,纯合子(mut/mut);1:1 交配,获得 F1 代雄性小鼠,其基因型可分为两种 Ddx4 - cre(T/W);Rosa26mT/mG(mut/wt)与 Ddx4 - cre(W/W);Rosa26mT/mG(mut/wt)。而在表达 Cre 酶的组织,会产生 Cre 酶诱导的基因重组,切除 mT 基因。通过交配产生子代可能的基因型和表型(图 2)。

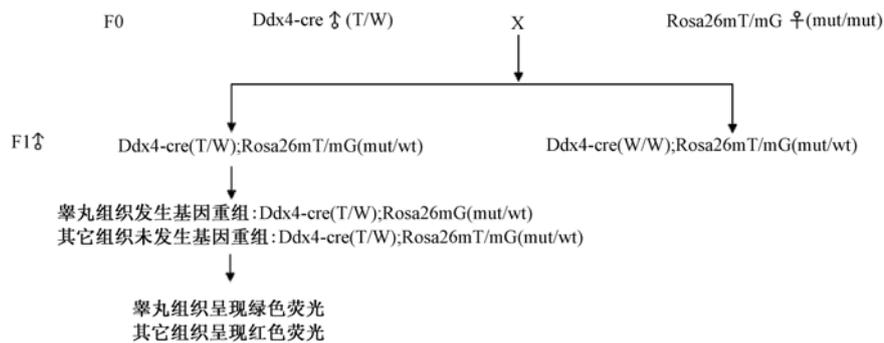


图 2 Ddx4-cre ♂ 小鼠与 Rosa26mT/mG ♀ 小鼠交配可能产生的子代的基因型和表型

Fig. 2 Genotype and phenotype of offspring by mating the Ddx4-cre male mice with the Rosa26mT/mG female mice

1.3 双阳性 F1 代雄性小鼠的筛查

利用 PCR 的方法,对母代和子代雄性小鼠进行基因型鉴定。提取鼠尾 DNA,PCR 扩增检测 Ddx4 - cre 基因和 Rosa26mT/mG 基因,确定小鼠基因型,筛选基因型为 Ddx4 - cre (T/W); Rosa26mT/mG

(mut /wt) 的子代小鼠,为双阳性 F1 代雄性小鼠。Ddx4 - cre 基因扩增条件为 94℃ 30 s,62℃ 35 s,72℃ 45 s,35 个循环;Rosa26mT/mG 基因扩增条件为 94℃ 30 s,61℃ 1 min,72℃ 1 min,35 个循环。所使用的引物及其意义(表 1)。

表 1 PCR 引物、扩增片段及目的

Tab. 1 PCR primer fragment size and purpose

基因 Genes	F(5' - 3')	R(5' - 3')	扩增片段 Fragment size	目的 Purpose
Ddx4 - cre	CACGTGCAGCCGTTT AAGCCGCGT	TTCCCATTTCTAAACA ACACCCTGAA	240bp(T/W)	确定 F1 雄性小鼠是否携带了其父代的 Ddx4 - cre 基因
Rosa26 mT/mG	TTCCCATTTCTAAAC AACACCCTGAA	①CGAGGCGGATCAC AAGCAATA ②TCAATGGGCGGGGTCGTT	250bp(mut/mut); 300bp(wt/wt)	确定 F1 雄性小鼠是否携带了其母代的 Rosa26mT/mG 基因
mT	AGCTGGACATCACCT CCCACAACG	CGTCGCCGTCCA GCTCGACCAG	1262bp	验证实验鼠的睾丸组织是否发生了 cre 酶介导的基因重组

1.4 动物分组

为了研究通过交配产生的动物的基因型和表型,我们选取三组动物。Ddx4 - cre 小鼠 4 只,雄性,周龄 4 ~ 5 周,为阴性对照鼠;Rosa26mT/mG 小鼠 4 只,雄性,周龄 4 ~ 5 周,为红色荧光蛋白对照鼠;双阳性 F1 代小鼠 4 只,雄性,周龄 4 ~ 5 周为实验鼠。

1.5 DNA 提取

利用浓盐法提取组织 DNA^[6],加入 500 μ L (含 5 μ L 蛋白酶 K) 的组织裂解液放到 52 $^{\circ}$ C 恒温水浴箱中消化过夜,加入 5 mol/L NaCl 250 μ L,混匀,冰浴 10 min。12000 r/min,离心 10 min,吸上清 400 μ L 加入 1 mL 预冷的无水乙醇,12000 r/min 离心 10 min 后去上清,干燥沉淀后加入 60 μ L 去离子水 55 $^{\circ}$ C 溶解 DNA。

1.6 PCR 扩增体系

PCR 反应体系为 20 μ L,包括:10 \times Buffer 2 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 1.6 μ L,10 μ m 引物各 0.4 μ L,5U rTaq 酶 0.4 μ L,模板 DNA 1 μ L,去离子水 14.2 μ L。PCR 反应产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.7 组织 mT 基因扩增

利用 3 组动物的睾丸组织(去除被膜组织)及实验鼠的脑、心、肝、脾、肺、肾、肠,提取 DNA,PCR 扩增检测 mT 基因。引物与目的片段(表 1)。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 30 s,61 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环。

1.8 组织荧光观察

颈椎脱臼法处死小鼠,取出脑、心、肝、脾、肺、肾、肠、睾丸,利用小动物成像仪进行离体组织的荧光观察,红色荧光(激发光 536/40 nm;发射光 590/20 nm);绿色荧光(激发光 425/26 nm;发射光 520/35 nm),曝光时间均为 1 s。

1.9 组织冰冻切片的荧光观察

将固定于 4% 甲醛溶液中的组织,转入 6 ~ 10 mL 30% 蔗糖溶液中沉糖过夜,用 OCT 胶包埋,储存于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱中,备用。利用冰冻切片机进行组织切片(10 μ m),无水乙醇固定,DAPI 染色,封片,观察。

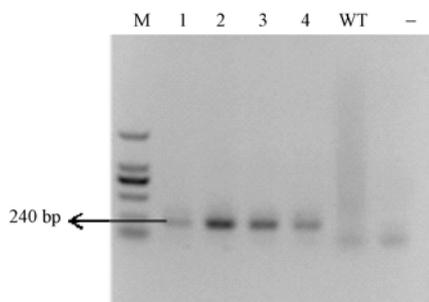
1.10 精子荧光观察

分离附睾置于 1 mL 生理盐水,将附睾横切为若干段,用眼科镊子轻轻挤压附睾组织块,去掉附睾。静止 5 min,荧光显微镜观察精子荧光。

2 结果

2.1 双阳性 F1 代雄性小鼠的筛查

通过 F1 代雄鼠鼠尾 DNA PCR 检测,结果(图 3、图 4)证明 1 - 4 号 F1 代雄性小鼠携带了父代的 Ddx4 - cre 基因和母代的 Rosa26mT/mG 基因。

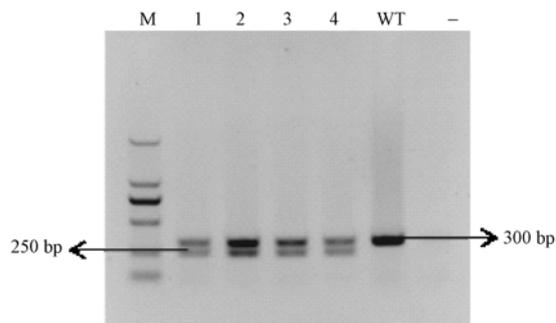


注:M:Marker DL2000;“wt”:野生型。

图 3 Ddx4 - cre 基因 PCR 电泳图

Note:M represents Marker DL2000;“wt” represents wild type.

Fig. 3 PCR electrophoresis of Ddx4-cre



注:M:Marker DL2000;“wt”:野生型。

图 4 Rosa26mT/mG 基因 PCR 电泳图

Note:M represents Marker DL2000;“wt” represents wild type.

Fig. 4 PCR electrophoresis of Rosa26mT/mG

2.2 组织 mT 基因的扩增

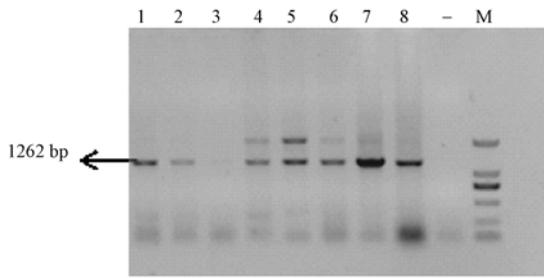
双阳性 F1 小鼠 mT 基因的扩增结果显示只有睾丸组织 DNA 不能扩增出 mT 基因(图 5)。双阳性 F1 代小鼠睾丸组织 mT 基因的扩增结果和其亲代鼠的睾丸组织 DNA 的 PCR 扩增结果见图 6, F1 代小鼠睾丸组织未能扩增出 mT 基因,而其亲代的 Rosa26mT/mG 鼠睾丸组织 DNA 可以扩增出 mT 基因。这表明双阳性 F1 小鼠睾丸组织在基因水平上确实发生了 Cre 酶介导的基因重组。

2.3 整体器官荧光观察

小鼠的离体器官的小动物成像观察,双阳性 F1 代鼠的脑、心、肝、脾、肺、肾、肠、睾丸组织呈现红色荧光,但睾丸组织可观察到绿色荧光而其他组织无绿色荧光(彩插 10 图 7)。

2.4 组织学荧光观察

双阳性 F1 代小鼠和亲代小鼠脑、心、肝、脾、

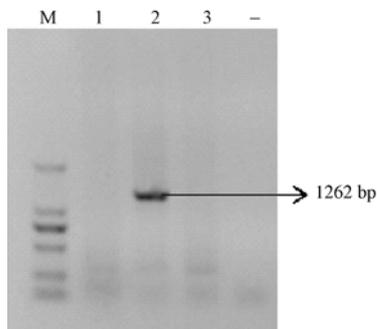


注:1:脑;2:心;3:睾丸;4:肝;5:脾;
6:肺;7:肾;8:肠;M:Marker DL2000。

图 5 F1 子鼠不同组织 mT 基因 PCR 电泳图

Note:1: brain;2: heart;3: testis;4: liver;5: spleen;
6: lung;7: kidney;8: gut;M: Marker DL2000.

Fig. 5 PCR results of mT gene in different tissue in F1 offspring



注:1:F1 睾丸组织 DNA;2:Rosa26mT/mG
鼠睾丸组织 DNA;3:Ddx4-cre 鼠睾丸组织 DNA。

图 6 亲代和子代动物睾丸组织 mT 基因 PCR 电泳图

Note:1: the testis DNA of the F1 mouse;2: the testis DNA of the Rosa26mT/mG mouse;3: the testis DNA of the Ddx4-cre mouse.

Fig. 6 PCR results of testicular tissue mT gene in F1 offspring and its parents

肺、肾、肠、睾丸组织冰冻切片结果观察,发现只有在子代 F1 睾丸组织细胞中具有 GFP 的表达(彩插 11 图 8),GFP 主要表达于生精小管细胞中,且集中于次级精母细胞、精子细胞和精子中。

2.5 精子荧光观察

倒置荧光显微镜观察双阳性 F1 代小鼠精子和 Rosa26mT/mG 鼠精子,结果表明:F1 代子鼠精子具有 GFP 的表达,而其亲代的 Rosa26mT/mG 小鼠的精子呈微弱的红色荧光(彩插 11 图 9)。

3 讨论

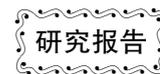
荧光蛋白的发现极大地促进了生物学医药科学的研究。目前研究较广泛的荧光蛋白为红色荧光蛋白(RFP)和 GFP,其中 GFP 享有现代生物学北斗星的美誉,其具有荧光稳定、易于检测、表达调控

简单、生物安全性好等优点^[7]。本研究利用 Cre/loxP 位点特异性重组系统制作雄性生殖细胞特异性表达 GFP 小鼠模型,这为我们后续研究雄性小鼠生殖系统功能与毒性等领域提供理想的动物模型。

本实验将 Ddx4-cre 雄鼠与 Rosa26mT/mG 雌鼠交配筛选体内同时具有 Cre 基因与 Rosa26mT/mG 基因的双阳性 F1 代雄性小鼠,对其进行基因型和表型鉴定。mT 基因的扩增结果表明,仅在睾丸组织产生了 mT 基因的切除。而离体器官的荧光观察结果表明 F1 代子鼠的睾丸组织具有 GFP 的表达,组织学荧光观察结果证明 GFP 主要表达于生精小管细胞中,且集中表达于次级精母细胞、精子细胞和精子中。而大量的文献研究表明 DDX4 蛋白在小鼠精原细胞与初级精母细胞均有表达^[8],即精原细胞与初级精母细胞应均具有 Cre 酶的表达而发生特异的基因重组,但在精原细胞与初级精母细胞却未观察到绿色荧光,这可能是由于次级精母细胞、精子细胞和精子中绿色荧光强度太强,在同等条件下掩盖了精原细胞与初级精母细胞的绿色荧光。

参考文献:

- [1] Kakiuchi K, Tsuda A, Goto Y, *et al.* Cell-Surface DEAD-Box Polypeptide 4 - Immunoreactive Cells and Gonocytes Are Two Distinct Populations in Postnatal Porcine Testes [J]. Biol Reprod. 2014;90.
- [2] Fujiwara Y, Komiya T, Kawabata H, *et al.* Isolation of a Dead-Family Protein Gene That Encodes a Murine Homolog of Drosophila-Vasa and Its Specific Expression in Germ-Cell Lineage[J]. P Natl Acad Sci USA. 1994;91:12258-62.
- [3] Kage-Nakadai E, Imae R, Suehiro Y, *et al.* A Conditional Knockout Tool kit for Caenorhabditis elegans Based on the Cre/loxP Recombination[J]. Plos One. 2014;9.
- [4] Gallardo T, Shirley L, John GB, *et al.* Generation of a germ cell-specific mouse transgenic Cre line, Vasa-Cre[J]. Genesis. 2007;45:413-7.
- [5] Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, *et al.* A global double-fluorescent cre reporter mouse [J]. Genesis. 2007; 45: 593-605.
- [6] Poh JJ, Gan SKE. Comparison of customized spin-column and salt-precipitation finger-prick blood DNA extraction [J]. Bioscience Rep. 2014;34:629-34.
- [7] 张雨丽,张桂征,苏红梅,等. 绿色荧光蛋白在转基因研究中的应用[J]. 生物技术通报,2010(9):16-19.
- [8] Toyooka Y, Tsunekawa N, Akasu R, *et al.* Embryonic stem cells can form germ cells in vitro[J]. P Natl Acad Sci USA. 2003; 100:11457-62.



两个封闭群 NIH 小鼠群体的遗传监测结果的比较分析

魏 杰,王 洪,李芳芳,岳秉飞

(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

【摘要】 目的 对近3年北京地区的两个 NIH 封闭群小鼠群体的遗传质量进行监测分析。方法 利用生化标记基因检测法,2011年测定 A、B 两单位 NIH 小鼠在碱性磷酸酶-1 等 14 个遗传生化标记位点上的多态性。2014 年利用相同方法原则对 B 单位的 NIH 小鼠群体进行抽样检测,比较了该小鼠群体 3 年来的遗传构成变化。结果 2011 年,A、B 两单位 NIH 小鼠群体均呈多态性的生化标记位点有 6 个(Ce2、Car2、Gpi1、Es10、Gpd1、Pgm1),且 B 单位在 Es3 位点也呈多态性;两群 NIH 小鼠在 Car2 位点有差异($P < 0.05$),在 Es3、Gpd1、Pgm1 三个位点有显著差异($P < 0.01$);两群体的群间分化系数为 0.0406,遗传一致性指数为 0.9619,遗传距离为 0.0388。与 2011 年相比,B 单位封闭群 NIH 小鼠在 2014 年出现了 2 个纯合位点(Ce2 和 Gpd1),同时 Es10 和 Gpd1 两位点差异极显著($P < 0.01$),Pgm1 位点差异显著($P < 0.05$);不同代次 NIH 小鼠群间分化系数为 0.1103,遗传一致性指数为 0.8847,遗传距离为 0.1266。结论 群体隔离、选种育种、种群数量和繁育代次等对 NIH 小鼠遗传构成差异影响显著。留种和繁育生产时应加强封闭群 NIH 小鼠的遗传监测,为其遗传质量的稳定性提供保障。

【关键词】 关键词 NIH;封闭群;生化标记基因;遗传监测

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0033-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.008

Comparative analysis on genetic monitoring of 2 closed colonies NIH mouse

WEI Jie, Wang Hong, LI Fang-fang, YUE Bing-fei

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

【Abstract】 Objective To analyse and monitor the genetic quality of closed colony NIH mice in Beijing district for the last 3 years. **Methods** We use biochemical genetic markers (including alkaline phosphatase - 1 and the like 14 biochemical markers), selecting A and B colonies from different facilities for genetic monitoring in 2011 to study the polymorphism. And in 2014, 30 NIH mice just from B colony were monitored using the same testing and sampling methods. **Results** In 2011, NIH mice from both A and B facilities existed 6 polymorphic biochemical markers (Ce2, Car2, Gpi1, Es10, Gpd1, Pgm1); and NIH mice of B company also existed polymorphism in Es3 loci. Between the 2 NIH mice colonies, there were significant difference in Es3, Gpd1, Pgm1 loci ($P < 0.01$), and difference in Car2 locus ($P < 0.05$). FST of the 2 colonies was 0.0406, the genetic identity was 0.9619, and the genetic distance was 0.0388. In B company, NIH mice of 2014 appeared 2 homozygous loci (Ce2 and Gpd1) when compared with NIH mice of 2011. Between the 2 NIH mice colonies, there were significant difference in Es10 and Gpd1 loci ($P < 0.01$), and difference in Pgm1 locus ($P < 0.05$). Fst of the 2 colonies was 0.1103, the genetic identity was 0.8847, and the Genetic distance was 0.1266. **Conclusions** Population isolation, breeding and selection, population quantity and generation significantly affected the genetic architecture of NIH mice. So when breeding and reserving seeds, we should strengthen the

[基金项目] 国家科技支撑计划(2013BAK11B03)。

[作者简介] 魏杰(1982-),女,硕士,助理研究员。研究方向:免疫遗传检测。E-mail: jane3040320@163.com;

王洪(1977-),女,学士,副研究员。研究方向:动物遗传学。E-mail: littstar@163.com。两者为共同第一作者。

[通讯作者] 岳秉飞(1960-),男,研究员,博士。研究方向:动物遗传学。E-mail: y6784@126.com。

genetic monitoring of outbred NIH mice, in order to offer reliable genetic quality protection.

【Key words】 NIH; Closed colony; Biochemical markers; Genetic monitoring

NIH 小鼠为美国国立卫生研究所培育的封闭群小鼠,1980 年引入我国^[1]。其生长繁殖性能良好,饲养管理方便,对环境的适应性和对疾病的抵抗力强,广泛应用于药理学、毒理学、肿瘤学、基因工程等领域研究,同时也是《中国药典》2010 年版第三部规定毒种免疫原性检查以及乙肝、百白破、流感嗜血杆菌疫苗效力测定的推荐用实验动物^[2-3]。加强对 NIH 封闭群小鼠的遗传监测,明确其遗传背景概貌和维持群体遗传质量的稳定性,以为其科学应用提供有力保障。

本研究即利用 GB14923 - 2010 推荐的生化标记基因检测法,选取碱性磷酸酶 - 1 等 14 个遗传生化标记位点,于 2011 年从北京 A、B 两家单位生产的 NIH 小鼠进行了抽样和比较测定;同时于 2014 年对 B 单位 NIH 小鼠进行了连续监测,得到了北京地区近 3 年来 NIH 封闭群小鼠的遗传质量监测信息,为其生产应用提供了科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物: NIH 小鼠,雌雄各半,30 只,8 周。2011 年,在 A、B 两家单位分别取样。2014 年仅在 B 单位取样。两家单位的生产许可证号分别为【SCXK(京)20052010 - 0008】和【SCXK(京)2009 - 0017】。本单位实验动物使用许可证号【SYXK(京)2011 - 0008】。

1.1.2 主要试剂及仪器:小鼠生化标记检测试剂盒(中国食品药品检定研究院研制);乙酸纤维素薄膜(浙江台州路桥四甲生化塑料厂);BIO-RAD Model 3000Xi 电泳仪。

1.2 方法

检测方法参照国家标准 GB/T14927.1 - 2008^[4]。

1.3 结果分析

按照 GB14923 - 2010 和 GB14927.1 - 2008 判定各群体在各位点的等位基因型,利用 Popgen32 软件计算不同群体的位点信息及群体卡方值,比较群体的多态性差异。

2 结果

2.1 两个 NIH 小鼠群体的生化标记测定基因型频率

两个单位 NIH 小鼠的生化标记测定基因型频率(表 1)显示,2011 年 A 单位 NIH 小鼠有 6 个多态性生化标记位点,多态位点比率为 42.86%;B 单位 NIH 小鼠有 7 个多态性生化标记位点,多态位点比率为 50.00%。A、B 两单位共有的多态性位点为 Ce2、Car2、Gpi1、Es10、Gpd1 和 Pgm1,且 B 单位另有 Es3 位点出现了多态性。经 Popgen32 软件计算,两群体在 Car2 位点有差异($P < 0.05$),在 Es3、Gpd1、Pgm1 三个位点有显著差异($P < 0.01$)。

B 单位 2011 年 NIH 小鼠有 7 个多态性生化标记位点,多态位点比率为 50.00%;2014 年时该小鼠群体有 Ce2 和 Gpd1 两个位点发生了纯合,仅有 5 个多态性生化标记位点,多态位点比率为 35.71%。经 Popgen32 软件计算,B 单位不同代次群体在 Es10 和 Gpd1 两位点差异显著($P < 0.01$),在 Pgm1 位点有统计学差异($P < 0.05$)。

2.2 群体遗传参数分析

A、B 两单位 NIH 小鼠群体通过 Popgen32 软件计算分析得出,群间分化系数(F_{st})为 0.0406,遗传一致性指数(Genetic Identity)为 0.9619,遗传距离(Genetic Distance)为 0.0388。

B 单位 2011 年和 2014 年 NIH 小鼠群体的群间分化系数(F_{st})为 0.1103,遗传一致性指数(Genetic Identity)为 0.8847,遗传距离(Genetic Distance)为 0.1266。两组群体遗传参数比较数据详见表 2。

3 讨论

NIH 封闭群小鼠是国际通用的实验动物,在科学研究和药品生物制品检定中有着广泛的应用^[2]。但是封闭群实验动物的遗传性状容易受到环境、饲养方式等因素的影响而发生变化^[5],现有的封闭群繁育制度是否能保证其群体的遗传稳定性尚缺少相应的评估,曾有报道了不同来源的 NIH 小鼠对乙肝疫苗免疫应答的差异^[6],则对于封闭群 NIH 小鼠的遗传监测和标准化将更深刻地影响到其的通用性和结果的可重复性。

3.1 遗传分化系数

遗传分化系数 F_{st} 是测定群体间遗传分化的主要参数^[7], $F_{st} < 0.05$ 时,表示群体间有轻度遗传分化; $0.05 \leq F_{st} < 0.15$ 表示群体间有中度遗传分化; $0.15 \leq F_{st} < 0.25$ 表示群体间有中重度遗传分化;

表 1 不同单位不同年代 NIH 小鼠生化标记位点基因型频率表($n = 30$)
Tab. 1 The genotype frequency of NIH mice from different colonies and different years($n = 30$)

生化标记 位点 Biochemical markers	基因型 Genotype	A 单位 (2011 年) A unit (2011)	B 单位 (2011 年) B unit (2011)	B 单位 (2014 年) B unit (2014)
Es1	BB	1.000	1.000	1.000
Trf	BB	1.000	1.000	1.000
Hbb	SS	1.000	1.000	1.000
Akp1	BB	1.000	1.000	1.000
Pep3	BB	1.000	1.000	1.000
Mod1	AA	1.000	1.000	1.000
Idh1	AA	1.000	1.000	1.000
Es3 **	BB	0.000	0.000	0.033
	BC	0.000	0.367	0.600
	CC	1.000	0.633	0.367
Ce2	AA	0.900	0.967	1.000
	BB	0.100	0.033	0.000
Car2 *	AA	0.200	0.233	0.433
	BB	0.233	0.233	0.133
	AB	0.567	0.534	0.434
Gpi1	AA	0.267	0.167	0.267
	BB	0.400	0.433	0.400
	AB	0.333	0.400	0.333
Es10##	AA	0.967	0.933	0.500
	BB	0.000	0.000	0.200
	AB	0.033	0.067	0.300
Gpd1 **, ##	AA	0.433	0.367	1.000
	BB	0.200	0.633	0.000
	AB	0.367	0.000	0.000
Pgm1 **, #	AA	0.167	0.067	0.133
	BB	0.200	0.667	0.367
	AB	0.633	0.266	0.500

注: * 表示 2011 年 A、B 两单位群体 $P < 0.05$; ** 表示 2011 年 A、B 两单位群体 $P < 0.01$; # 表示 B 单位 2011 年和 2014 年群体 $P < 0.05$; ## 表示 B 单位 2011 年和 2014 年群体 $P < 0.01$ 。

Note: * shows $P < 0.05$ when 2011 between A and B groups NIH mice, while ** show that $P < 0.01$; # shows $P < 0.05$ in B group NIH mice of 2011 and 2014 colonies, while ## show that $P < 0.01$.

表 2 不同单位及同单位不同年代 NIH 小鼠群体遗传参数
Tab. 2 NIH colony genetic parameters of different producers and different years

	群间分化系数 Fst	遗传一致性指数 Genetic Identity	遗传距离 Genetic Distance
2011 年 A、B 单位群	0.0406	0.9619	0.0388
2011 与 2014 年 B 单位群	0.1103	0.8847	0.1266

$F_{st} \geq 0.25$ 表示群体间有重度遗传分化, 群体差异显著。

本研究中, 2011 年 A、B 两单位 NIH 群体的 $F_{st} < 0.05$, 群体间仅有轻度遗传分化。B 单位 2014 年群体和 2011 年群体的群间遗传分化系数 0.1103, 已经处于中度遗传分化状态。不同单位及同单位不同代次的 NIH 封闭群小鼠的遗传构成尚存在差异和变化。

3.2 遗传一致性指数与遗传距离

遗传一致性指数与遗传距离是反映群体遗传

相似性的两个指标, 两者呈负对数关系, 其中, 遗传距离为显性函数, 且当遗传距离大于 0.2 时, 认为两个群体为同属不同种; 在 0.03 ~ 0.2 之间时为同属同种^[8]。

本研究中, 2011 年 A、B 两单位 NIH 群体以及 B 单位 2011 年和 2014 年群体的遗传距离虽然都在 0.03 ~ 0.2 之间, 但群体隔离因素和饲养方式对群体的遗传构成均产生重要影响, 且传代的遗传距离略大于不同单位的遗传距离, 表明在封闭群的保持和繁育过程中, 饲养方式对群体的遗传性状的影响

力更大。

3.3 选育及种群大小对于遗传构成的影响

A、B 两单位均曾经过 q 基因的选育建立 NIH-q 群^[9]。经过选择后,对于疫苗检定的免疫应答反应效果得以提升。B 单位剖腹净化等技术提升了其种群的微生物等级^[10]。特殊性状的培育一方面改变了其应用特性,但另一方面也限制了种群的基因丰度,再加上保种群数量过少等,可能造成遗传的奠基者效应^[11]。

3.4 遗传生化标记检测法与封闭群遗传监测

遗传生化标记是通过同工酶、蛋白质的差异来反映基因的变化,方法成熟、位点明确、简便快速经济、结果易判读,同时也是指导封闭群选种的“二次优选法”中必须测定的生物学特性之一^[12]。本研究的生化标记测定也直观的反映了不同单位和不同代次封闭群 NIH 小鼠的遗传构成差异。在 2011 年不同单位间相差 1 个多态性位点,存在 4 个有差异的多态性位点。至 2014 年,同单位不同代次的群体间存在 3 个有差异的多态性位点且有 2 个位点已经发生纯合。这与计算的遗传参数反映的群体遗传构成一致。当然,目前可选择的遗传生化标记位点比较有限,与微卫星标记等方法相比,也存在着多态性不够丰富的不足,需要筛选更多染色体上多态性丰富的生化标记位点和通过不同评价体系综合分析封闭群的遗传质量,保证封闭群小鼠的遗传质量稳定性,实现对封闭群的遗传质量监测,为其应用提供可靠的保障支撑。

参考文献:

- [1] 孙抗林. NIH 小鼠繁殖性能的观察[J]. 上海实验动物科学, 1985, 5(3):165 - 166.
- [2] 张静旭,刘淑霞,马丹,等. NIH 小鼠生长繁殖性能的观察[J]. 中国实验动物学杂志,2002,12(5):292 - 293.
- [3] 章贤忠. NIH 系小鼠与昆明系小鼠生长繁殖特性及免疫反应比较[J]. 上海实验动物科学,1990,10(3):167 - 169.
- [4] GB/T 14927. 1 - 2008. 实验动物 近交系小鼠、大鼠生化标记检测法[S].
- [5] 杨红宇. 封闭群实验小鼠的生产管理要点[J]. 贵州畜牧兽医,2009,33(5):27.
- [6] 马丽颖,钟曦,贺争鸣,等. 两个 NIH 小鼠种群对不同种类的乙肝疫苗免疫应答效应的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2009,19(4):52 - 55.
- [7] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers[J]. Mol Ecol, 2002, 11:155 - 165.
- [8] Theorpe J P. The molecular clock hypothesis: biochemical evaluation, genetic differentiation and systematics[J]. Am Res Ecol Syst, 1982,13:139 - 168.
- [9] 邢瑞昌,宋珍珠,刘双环,等. 用于乙肝疫苗效力检定的 NIH-q 小鼠种群的建立[J]. 中国比较医学杂志,1991,1:8 - 12.
- [10] 张业斌,王春玲,吴慧英,等. 清洁级 NIH 系小鼠种群的建立与应用[J]. 上海实验动物科学,1992,12(1):28 - 30.
- [11] 周炜. 封闭群实验动物的遗传学质量控制[J]. 上海实验动物科学,1997,17(1):46 - 49.
- [12] Hedrich HJ. Genetic monitoring [M]. Newyork: Academic Press. 1981, Vol. 1:159 - 176.

[修回日期] 2015 - 04 - 21



毛蚶提取物辅助 NP 化疗的增效减毒作用

王作军¹, 马玉奎², 贾玉萍², 高 清¹

(1. 山东省临朐县人民医院, 山东 临朐 262600; 2. 山东省药学科学院, 济南 250033)

【摘要】 目的 研究毛蚶提取物和 NP 方案化疗药物合用后有无增效和减毒作用。方法 采用人肺癌 A549 细胞株制备裸鼠移植瘤模型, 通过检测抑瘤率、体重、摄食量、血液学和血液生化学等指标, 全面评价毛蚶提取物和 NP 化疗方案合用后的增效减毒作用。结果 毛蚶提取物 (125、250、500 mg/kg, i. g) 与 NP 化疗方案合用比单用 NP 化疗方案抑瘤率明显提高, 明显抑制化疗引起的体重减轻、摄食量减少、减轻化疗对血液系统和肝肾功能的毒副作用。结论 毛蚶提取物对 NP 方案化疗具有明显的增效减毒作用。

【关键词】 毛蚶提取物; 增效减毒; 抑瘤率; 化疗

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0037-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 005. 009

Synergism and attenuation effects of Scapharca Subcrenata Extraction on NP chemotherapy

WANG Zuo-jun¹, MA Yu-kui², JIA Yu-ping², GAO Qing¹

(1. People's Hospital of Linqu County, Shandong Linqu 262600, China; 2. Shandong Pharmaceutical Academy, Jinan 250033, China)

【Abstract】 Objective To investigate the synergism and attenuation effects of Scapharca Subcrenata Extraction on NP chemotherapy in model mice. **Methods** The models of nude mice were induced with A549 cell line xenograft. The tumor inhibiting rates, body weight, food intake, hematology and blood biochemistry index were determined to evaluate the synergism and attenuation effects of Scapharca Subcrenata Extraction (125, 250, 500 mg/kg, i. g) on NP chemotherapy. **Results** Compared with NP chemotherapy group, the tumor inhibiting rates, body weight, food intake, white blood cell number were increased and glutamate pyruvate transaminase, glutamic oxalacetic transaminase and urea nitrogen were decreased markedly in NP chemotherapy plus Scapharca Subcrenata Extraction groups. **Conclusion** Scapharca Subcrenata Extraction has a remarkable synergism and attenuation effects on NP chemotherapy.

【Key words】 Scapharca Subcrenata extraction; Synergism and attenuation; Tumor inhibition rate; Chemotherapy

毛蚶(*arca subcrenata lischke*)俗称毛蛤、麻蛤,属双壳软体动物,我国沿海地区资源丰富。毛蚶壳和肉均具有较高的营养与药用价值,《神农本草经》及历代本草中均有记载。毛蚶提取物为毛蚶肉经低温提取纯化加工制成,其主要的活性成份为毛蚶多糖和毛蚶多肽^[1]。以往研究表明,毛蚶提取物具有抗氧化、提高免疫力、体外抗肿瘤等药理活性^[2-4]。尽管有部

分中药体外抗肿瘤活性较高,但药物的体内活性会有较大差异,另外,单味中药一般情况下直接抗肿瘤作用较弱,临床上功效多体现在减轻临床症状、提高生存质量、防止复发转移、延长生存期、预防肿瘤、提高患者免疫力、增强放、化疗敏感性和减轻放、化疗不良反应等方面发挥作用^[5]。故本文采用人肺癌 A549 裸鼠移植瘤模型初步考察了毛蚶提取物对 NP 化疗

[作者简介] 王作军(1969-),男,主管药师,本科,研究方向:药物不良反应检测。

[通讯作者] 马玉奎(1975-),男,副主任药师,博士,研究方向:新药药理毒理评价。E-mail: yukuima@sina.com。

的增效减毒作用,为毛蚶提取物进一步研究和开发利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 动物及瘤株 裸小鼠, BALB/c nu, 雄性, 20 ~ 24 g, 由北京大学医学部实验动物科学部【SCXK(京)2011-0012】, 选取 54 只用于试验。动物饲养于山东省临朐县人民医院独立送风 IVC - II 型隔离笼具中, 实验动物使用许可证号【SYXK(鲁)2010-0004】。室温 20℃ ~ 25℃, 湿度 40% ~ 70%, 人肺癌 A549 细胞系, 济南天长商贸有限公司提供。

1.1.2 药品与试剂 毛蚶提取物(青岛海慈肿瘤医院提供, 批号 100805), 淡黄棕色粉末, 味微咸、微腥, 密封、置阴凉处保存; 酒石酸长春瑞滨注射液(NVB, 江苏豪森药业股份有限公司, 批号: 110301); 注射用顺铂(CDDP, 齐鲁制药有限公司, 批号: 101003200)

1.1.3 仪器 Sysmex XT-2000IV 型全自动血球计数仪(Sysmex Corporation 制造); BS300 型生化分析仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司制造)。BC-J160S 型二氧化碳细胞培养箱(上海博迅实业有限公司医疗设备厂制造)。BDS200 型倒置生物显微镜(重庆奥特光学仪器有限责任公司制造)。JY2001 型电子天平(上海精密科学仪器有限公司制造)。电子数显卡尺(广陆数字测控股份有限公司制造)。

1.2 方法

1.2.1 毛蚶提取物制备

将鲜活的毛蚶软体组织洗净后捣碎进行匀浆, 经低温提取、3000 r/min, 离心 15 min 后去沉淀、生物澄清剂吸附后进行冷冻分离、冻干后得冻干粉, 将冻干粉用硫酸铵分级沉淀、Superdex75 凝胶过滤层析、合并分子量为 3000 × 10³ 以下的洗脱峰, 得肽类化合物洗脱液, 最后冻干洗脱液、再用灭菌注射用水溶解冻干粉、经 Sephadex G-25 脱盐柱脱盐后所得提取液经冻干即得毛蚶提取物。提取物中含总蛋白质 50% ~ 60%, 游离氨基酸 3%, 多糖 2%, 核糖核酸微量及少量的脂肪。

1.2.2 裸鼠移植瘤模型建立及动物分组

将人肺癌 A549 细胞进行常规传代, 增殖培养至所需细胞量后胰酶消化收集细胞, 取细胞悬液置显微镜下计数调整细胞数。在无菌条件下, 接种于

裸小鼠右腋下, 接种量 1.0 ~ 2.0 × 10⁷ 个细胞/0.1 mL/只。裸小鼠接种肿瘤细胞后, 定期用游标卡尺分别测量瘤体积($V = 3.14 \times \text{长径} \times \text{宽径} \times \text{高}^{[6]}$), 测得瘤体积为 100 ~ 300 mm³ 时, 随机分为正常对照组、模型对照组、NP 方案化疗对照组、毛蚶提取物组 500、250、125 mg/kg 三个剂量同时应用 NP 化疗方案组、毛蚶提取物组 500、250、125 mg/kg 三个剂量组, 每组 6 只。

1.2.3 动物给药

毛蚶提取物组给予不同剂量的药物, 分组后每天灌胃给药 1 次, 连续给药 21 d; NP 方案化疗组第 8、16 天各腹腔注射 1 次 NVB, 剂量为 3.4 mg/kg, 第 10、12、14 天各腹腔注射 1 次 CDDP, 剂量为 6.7 mg/kg。毛蚶提取物和 NP 方案化疗合用组在 NP 方案化疗的同时给予不同剂量的毛蚶提取物; 正常对照组和模型对照组灌胃给予等容积的蒸馏水和腹腔注射给予等容积的生理盐水。

1.2.4 指标检测和结果评价^[7]

试验中每 3 d 称量裸小鼠体重和摄食量, 观察裸小鼠的一般状态。末次给药后 2 h 摘眼球采血, 检测白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HB)等血液学指标和丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、尿素氮(BUN)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TB)、白蛋白(ALB)等血液生化学指标。采血后将所有动物脱臼处死后解剖瘤块称瘤重, 计算肿瘤抑制率。

肿瘤抑制率 = $(C-T)/C \times 100\%$, T 为给药组平均瘤重, C 为阴性对照组平均瘤重。得出抑瘤率后, 以 q 值评定两药合用的疗效。

$q \text{ 值} = E(AB)/[EA + (1 - EA) \times EB]$, E(AB) 为两药合用的抑制率, EA、EB 为两药单用的抑制率, $q = 0.85 \sim 1.15$ 表示两药作用相加, $q > 1.15$ 表示两药作用协同, $q < 0.85$ 表示两药作用拮抗。

1.2.5 统计学处理

各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 t 检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 毛蚶提取物对 NP 方案化疗小鼠体重的影响

与模型对照组比较, NP 方案化疗后小鼠体重逐渐减轻, 而同时给予毛蚶提取物后, 随着给药时间延长, 裸小鼠体重逐渐恢复, 给药 21 d 后体重稍低于模型对照组, 而明显高于化疗组(表 1)。

表 1 毛蚶提取物对裸小鼠体重的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 1 The effects of Scapharca Subcrenata extraction on body weight of model nude mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dose /mg/kg	体重 Body weight(g)				
		0 d	6 d	12 d	18 d	21 d
正常对照 Normal	—	22.8 ± 2.2	23.1 ± 2.2	23.5 ± 1.7	24.3 ± 1.2	25.5 ± 2.2
模型对照 Modle	—	23.1 ± 1.4	24.2 ± 2.2	24.5 ± 1.4	24.7 ± 1.8	25.3 ± 2.0
NP 化疗 NP chemotherapy	3.4/6.7	23.8 ± 1.5	23.5 ± 1.9	21.9 ± 1.6*	21.4 ± 1.7*	21.0 ± 1.6*
毛蚶提取物 + NP 化疗 Scapharca Subcrenata Extraction + NP chemotherapy	500 + 3.4/6.7	23.7 ± 1.8	23.2 ± 1.9	22.1 ± 0.9	23.5 ± 2.0#	24.0 ± 1.9#
	250 + 3.4/6.7	22.6 ± 1.2	22.5 ± 1.8	20.2 ± 1.8	21.5 ± 2.2	23.2 ± 1.7#
	125 + 3.4/6.7	23.6 ± 1.2	23.2 ± 1.9	21.5 ± 0.6	22.0 ± 0.9	23.8 ± 1.0#

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs 模型组; # $P < 0.05$, vs NP 化疗组。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs model group; # $P < 0.05$, vs NP chemotherapy group.

2.2 毛蚶提取物对 NP 方案化疗小鼠摄食量的影响

与模型对照组比较, NP 方案化疗后小鼠摄食量明显减少, 而同时给予毛蚶提取物后, 随着给药时间延长, 裸小鼠摄食量逐渐增多, 其中 NP 方案化疗和毛蚶提取物 250、500 mg/kg 合用给药 21 d 后摄食量稍低于模型对照组, 而明显高于化疗组(表 2)。

与模型对照组比较, NP 方案化疗和毛蚶提取物合用后对肿瘤的抑制率明显高于单用 NP 方案化疗或者单用毛蚶提取物, 其中 NP 方案化疗和毛蚶提取物 250、500 mg/kg 合用后 q 值大于 0.85, 具有明显的协同作用, 说明毛蚶提取物在 250 mg/kg 剂量以上对 NP 方案化疗的抗肿瘤作用具有明显的增强作用(表 3)。

2.3 毛蚶提取物对 NP 方案化疗的增效作用

表 2 毛蚶提取物对裸小鼠摄食量的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 2 The effects of Scapharca Subcrenata extraction on food intake of model nude mice($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dosage /mg/kg	摄食量 Food intake(g/只/d)				
		6d	12d	15d	18d	21d
正常对照 Normal	—	5.07	5.36	5.59	5.77	5.97
模型对照 Modle	—	4.88	4.77	4.87	4.94	5.11
NP 化疗 NP chemotherapy	3.4/6.7	4.84	2.82	2.12	2.35	2.01
毛蚶提取物 + NP 化疗 Scapharca Subcrenata Extraction + NP chemotherapy	500 + 3.4/6.7	4.71	3.69	3.95	4.02	4.61
	250 + 3.4/6.7	4.78	3.12	3.35	3.40	4.28
	125 + 3.4/6.7	4.24	2.82	2.18	2.43	3.31

表 3 毛蚶提取物对 NP 方案化疗的增效作用($\bar{x} \pm s, n=6$)

Tab. 3 The synergism effects of Scapharca Subcrenata extraction on NP chemotherapy in model nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dosage /mg/kg	瘤重 Tumor weight(g)	抑瘤率 Rate of tumor inhibition (%)	q 值 q Value
模型对照 Model	—	1.46 ± 0.54	—	—
NP 化疗 NP chemotherapy	3.4/6.7	0.71 ± 0.18*	51.4	—
毛蚶提取物 Scapharca Subcrenata Extraction	500 250 125	0.72 ± 0.26* 0.89 ± 0.06 1.10 ± 0.53	50.7 39.0 24.7	— — —
毛蚶提取物 + NP 化疗 Scapharca Subcrenata Extraction + NP chemotherapy	500 + 3.4/6.7 250 + 3.4/6.7 125 + 3.4/6.7	0.34 ± 0.19** 0.59 ± 0.27** 0.67 ± 0.19*	76.7 59.6 51.4	1.01 0.85 0.84

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs 模型组。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs model group.

表 4 毛蚶提取物对 NP 方案化疗血液学副作用的减毒作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Tab. 4 The attenuation effects of Scapharca Subrenata extraction on hematological toxicity caused by NP chemotherapy in model nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dosage /mg/kg	WBC($10^9/L$)	RBC($10^{12}/L$)	HB(g/L)
正常对照 Normal	—	7.30 ± 0.65	10.92 ± 0.91	15.03 ± 0.81
模型对照 Model	—	7.20 ± 0.83	12.29 ± 1.92	15.77 ± 2.44
NP 化疗 NP chemotherapy	3.4/6.7	4.62 ± 0.54**	10.55 ± 0.85	14.35 ± 1.11
毛蚶提取物 + NP 化疗 Scapharca Subrenata Extraction + NP chemotherapy	500 + 3.4/6.7	6.91 ± 2.06 [#]	11.56 ± 1.52	15.03 ± 3.00
	250 + 3.4/6.7	7.20 ± 1.75 [#]	10.70 ± 1.49	14.72 ± 2.15
	125 + 3.4/6.7	5.70 ± 0.94 ^{#*}	10.59 ± 1.28	14.40 ± 0.75

注: ** $P < 0.01$, vs 模型组; [#] $P < 0.05$, vs NP 化疗组。

Note: ** $P < 0.01$, vs model group; [#] $P < 0.05$, vs NP chemotherapy group.

表 5 毛蚶提取物对 NP 方案化疗血液生化学的减毒作用 ($\bar{x} \pm s, n=6$)
Tab. 5 The attenuation effects of Scapharca Subrenata extraction on blood biochemical toxicity caused by NP chemotherapy in model nude mice ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别 Group	剂量 Dosage /mg/kg	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP (g/L)	ALP (U/L)	BUN (mmol/L)
正常对照 Normal	—	70.3 ± 28.0	177.5 ± 35.4	54.0 ± 3.5	165.0 ± 22.6	8.5 ± 0.8
模型对照 Model	—	72.3 ± 10.3	175.0 ± 26.6	54.3 ± 3.9	163.3 ± 25.0	8.0 ± 1.8
NP 化疗 NP chemotherapy	3.4/6.7	138.8 ± 30.8*	248.5 ± 20.6**	58.2 ± 3.3	161.7 ± 44.0	11.8 ± 1.9*
毛蚶提取物 + NP 化疗 Scapharca Subrenata Extraction + NP chemotherapy	500 + 3.4/6.7	87.8 ± 16.5 [#]	195.2 ± 26.3 [#]	55.5 ± 3.8	161.7 ± 37.6	9.0 ± 1.2 [#]
	250 + 3.4/6.7	90.0 ± 21.5 [#]	195.5 ± 31.2 [#]	55.7 ± 4.1	168.3 ± 47.1	9.4 ± 1.5 [#]
	125 + 3.4/6.7	102.7 ± 27.1	213.0 ± 39.9	58.8 ± 5.3	161.7 ± 28.6	9.5 ± 2.2

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs 模型组; [#] $P < 0.05$, vs NP 化疗组。

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs model group; [#] $P < 0.05$, vs NP chemotherapy group.

2.4 毛蚶提取物对 NP 方案化疗后血液学副作用的减毒作用

与模型对照组比较, NP 方案化疗后小鼠的白细胞数量明显减少, 而和毛蚶提取物合用后白细胞数量明显增多, 与单纯 NP 方案化疗组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明毛蚶提取物可明显抑制 NP 方案化疗引起的白细胞减少。各个剂量组对红细胞和血红蛋白无明显影响 (表 4)。

2.5 毛蚶提取物对 NP 方案化疗后血液生化学副作用的减毒作用

与模型对照组比较, NP 方案化疗后小鼠血清中 ALT、AST 和 BUN 明显升高, 说明 NP 化疗可以引起小鼠肝肾功能的损伤, 而和毛蚶提取物 250、500 mg/kg 合用后以上指标升高幅度减少, 与单纯 NP 方案化疗组比较均有显著性差异 ($P < 0.05$), 说明毛蚶提取物对 NP 方案化疗引起的肝肾功能的损伤

有明显保护作用 (表 5)。

3 讨论

肺癌的发病率和死亡率在恶性肿瘤中占首位, 严重危害人类的生命与健康。非小细胞肺癌属于肺癌的一种, 非小细胞肺癌约占肺癌总数的 80% ~ 85% [8]。目前临床上非小细胞肺癌常采用化疗的方式进行治疗。但是饱经癌症折磨的患者应用化疗药物后, 还要承受很大的毒副作用, 有相当一部分患者特别体质比较差的患者根本无法承受。所以如何提高化疗药物的治疗效果, 降低不良反应是临床上亟待解决的问题, 而中医药在这方面发挥了良好的作用。临床上常会采用中药作为辅助手段通过扶正培本和调节机体免疫功能等在降低毒副作用的同时增强治疗效果, 可以有效地改善患者的不良症状, 提高患者的生活质量, 延长生存期。

以往对中药增效减毒作用的试验研究多集中在中药与单个化疗药物合用后观察其疗效,而目前临床上多采用多种化疗药物联合应用,故研究对单个化疗药物的增效和减毒无法完全模拟临床实际情况。因此在动物模型研究中采用临床标准治疗方案,完全模拟临床治疗情况,才能更有的放矢地评价中药的功效。在非小细胞肺癌的国际治疗指南中,NP 是推荐的标准治疗方案^[9],故本文采用 A549 裸鼠移植瘤模型为实验对象,研究毛蚶提取物对 NP 方案化疗的增效和减毒作用。本实验研究证明,单纯 NP 化疗后,裸小鼠出现了体重减轻、摄食量减少、白细胞降低、肝肾功能损伤等毒副反应,与临床上体现的副作用基本一致,而同时应用毛蚶提取物后,随着给药时间的延长,以上毒副反应逐渐减轻,体重和摄食量等均逐渐恢复,白细胞数量逐渐增多,给药 21 d 时与模型组基本一致,明显高于 NP 化疗组,而血清中 AST、ALT 和 BUN 含量明显低于 NP 化疗组。同时,毛蚶提取物与 NP 方案化疗合用后对 A549 裸鼠移植瘤的抑制效果明显增强。以上研究结果充分证明毛蚶提取物具有明显的增效减毒作用,提示其具有进一步研究和开发利用的价值。

参考文献:

- [1] 徐艳,张秀国,童万平,等. 毛蚶的生物活性成分研究进展 [J]. 中国药房,2014, 25(19): 1805 - 1807.
- [2] Song LY, Li TF, Yu RM, *et al.* Antioxidant activities of hydrolysates of *Arca Subcrenata* prepared with three proteases [J]. *Mar Drugs*, 2008, 6(4): 607 - 619.
- [3] 黄演君,宋丽艳,于荣敏. 毛蚶多肽提取物的体外免疫活性 [J]. 中国生物化学杂志, 2011, 32(4): 273 - 276.
- [4] Song L, Reu S, Yu R, *et al.* Purification, characterization and in vitro anti-tumor activity of proteins from *Arca Sberenata Lischke* [J]. *Mar Drugs*, 2008, 6(3): 418 - 430.
- [5] 木拉提·扎依别克,哈木拉提·吾普尔. 抗肿瘤中药的分类及作用机理 [J]. 新疆医科大学学报, 2006, 29(11): 1102 - 1104.
- [6] 何志军,陈先祥,蔡庆和,等. 移植瘤体积不同计算方法的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(9): 47 - 50.
- [7] 宋高臣,王桂云,刘洪凤,等. 半枝莲多糖对环磷酰胺增效减毒作用的实验研究 [J]. 中医药信息, 2010, 27(4): 107 - 109.
- [8] Kurup A, Hanna NH. Treatment of small cell lung cancer [J]. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2004, 52(2): 117 - 126.
- [9] 徐哲,李殿哲,边森. NP 与 DP 两种方案治疗晚期非小细胞肺癌疗效的比较 [J]. 医学与哲学, 2008, 29(2): 49 - 50.

[修回日期]2015 - 03 - 31



亲代三丁基锡暴露对 F1 代 KM 小鼠血常规的影响

尹玉伟, 孙平, 孙杰, 王书文, 张纪亮, 熊建利

(河南科技大学动物科技学院, 河南 洛阳 471003)

【摘要】 **目的** 探讨亲代三丁基锡暴露对 F1 昆明小鼠血常规的影响。**方法** 将雌、雄各 40 只小鼠随机分别分为空、低、中、高浓度组(0、0.2、2 和 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$), 每天进行染毒, 持续 45 d。在第 60 天时, 将同浓度组的雌:雄鼠按 1:1 进行同笼配种。仔鼠出生 60 d 后取血, 进行血常规的检测。**结果** 与对照组相比, F1 代雄性低浓度和高浓度组的红细胞数量和血红蛋白量显著增加($P < 0.01$); F1 代雄性低浓度组红细胞体积、平均血红蛋白含量($P < 0.01$)和淋巴细胞绝对值($P < 0.05$)显著降低; F1 代雌性高浓度组的红细胞数量显著增加($P < 0.01$), F1 代雌性小鼠的血红蛋白量、红细胞压积、血小板量三项指标随着 TBT 浓度的增加呈剂量依赖性。**结论** 亲代 TBT 暴露影响 F1 代小鼠的血常规, 且低浓度时对 F1 代雄性小鼠的影响最大, 高浓度时对 F1 代雌性小鼠的影响最大。

【关键词】 三丁基锡; 小鼠; 血常规指标

【中图分类号】R332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2015) 05-0042-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.010

Effects of parents exposure to tributyltin (TBT) on blood routine of F1 generation KM mice

YIN Yu-wei, SUN Ping, SUN Jie, WANG Shu-wen, ZHANG Ji-liang, XIONG Jian-li

(Animal Science and Technology College, Henan University of Science and Technology, Henan Luoyang 471003, China)

【Abstract】 **Objective** To explore effects of parents exposure to TBT on blood routine of F1 generation mice. **Methods** 80 mice including 40 males and 40 females, were randomly divided into control groups (CK), low dose groups (LTBT), middle dose groups (MTBT) and high dose groups (HTBT). They were given dose of TBT (0, 0.2, 2, 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$) every day. The experiment lasted 45 days. At 60 days, one female and one male of the same concentration were bred in the same cage according to 1:1. At postnatal day 60, blood was collected for the determination of blood routine. **Results** Compared with control group, the number of red blood cells and hemoglobin of F1 generation male mice in LTBT and HTBT groups were significantly increased ($P < 0.01$); Red blood cell volume, mean corpuscular hemoglobin ($P < 0.01$), and the lymphocyte absolute value in F1 generation male LTBT were significantly reduced ($P < 0.05$); HTBT of female mice were significantly increased about the number of red blood cells ($P < 0.01$). A dose-dependent increase of the hemoglobin, red blood cells, and platelet count of F1 generation female experimental groups was observed. **Conclusion** Parental TBT exposure affects the F1 mice blood routine. There is the greatest influence on LTBT in F1 generation male mice and on HTBT in F1 generation female mice.

【Key words】 Tributyltin; Mice; Blood routine examination

[基金项目] 河南科技大学 SRTP 项目(2014264)。

[作者简介] 尹玉伟(1992-), 男, 本科生, 动物医学。

[通讯作者] 孙平(1975-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 动物生态。E-mail: pingsunny@msn.com。

有机锡因具有良好的杀菌灭藻以及防止软体海洋生物附着于船体的功能而被广泛用于船体和海洋建筑表面,但防污的同时它对海洋环境和海洋动物造成严重的影响^[1],三丁基锡(tributyltin, TBT)被认为是迄今为止由人为因素大量进入海水环境的最毒的化学品之一^[2]。目前在海水^[3-4]、底泥^[5-7]、纺织品^[8-9]和尿样^[10]中均发现有有机锡化合物的存在。海洋生物对 TBT 有很强的富集能力,使 TBT 通过食物链进入人体,对人类的健康构成潜在威胁^[11]。骆焕荣等^[12]的研究表明,人 TBT 急性中毒时表现出严重的胃肠系统毒性、中枢神经系统毒性和肾脏毒性。近年来报道,TBT 不仅具有急性毒性,还具有遗传毒性、免疫毒性和环境内分泌干扰毒性^[13]。D. 阿那尼等^[14]的研究表明,氯化二丁基锡对雌性小鼠有生殖毒性,在剂量 $\geq 0.05 \mu\text{g}/\text{kg}$ 作用下,母鼠食欲不振,体重下降,阴道、子宫萎缩,怀胎数下降等。鉴于 TBT 的广泛地毒性,人们对其致毒机制进行深入的探究。

血液在维持机体内环境稳定上起着重要的作用,具有运输、缓冲、营养和防御等功能^[15]。刘凤军等^[16]研究发现,小鼠钼中毒时,严重影响小鼠的血常规。吕良炬等^[17]研究发现,对家兔分别进行 0.03、0.3、3 mg/kg TBT 和 TBT 的急性注射实验,观察到 TBT 和 TBT 导致家兔的心率和动脉血压产生剂量依赖性的下降。张朝红等^[18]的研究表明,TBT 与牛血清白蛋白有明显的相互作用,且程度和方式与浓度、酸度和有机溶剂等因素有关。然而亲代 TBT 攻毒对子代小鼠血常规的影响尚未知,鉴于此,本实验以不同浓度的 TBT 暴露亲代小鼠,研究对子代小鼠血常规产生的影响。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 试剂与配制方法

TBT(纯度 $\geq 97\%$,Fluka 公司,4℃保存),西王玉米胚芽油(山东西王食品有限公司)。

TBT 母液配制:a. 配 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的母液:用移液枪取 10850 μL 的玉米油装入棕色广口瓶中,在用移液枪取 1.6 μL TBT 注入该瓶中,混匀,即得到母液;b. 用铝箔纸将其全封住,放入 4℃ 冰箱内保存。

1.1.2 主要仪器

电子天平(10200-3-G)(沈阳龙腾电子有限

公司);不同量程的微量移液枪若干(郑州鼎国生物技术有限公司);XF9080A 动物血液自动分析仪(南京皓海仪器)。

1.2 实验动物

清洁级,4~5 周 KM 小鼠,体重 16~18 g,雌、雄各 40 只,饲养期间给予啮齿类动物标准颗粒饲料,购于河南省实验动物中心【SCXK(豫)2010-0002】,饲养于洛阳普莱柯生物实验动物屏障系统【SYXK(豫)2013-0003】。12 h 循环光照,室温(23 ± 2)℃,恒定湿度,自由饮食。并按实验动物的 3R 原则,给予人道关怀。

1.3 实验方法

1.3.1 亲代(F0 代)TBT 暴露

F0 代 TBT 暴露,将 80 只小鼠随机分成 8 组(δ :4 组;♀:4 组),每组 10 只,分别饲喂玉米油对照组(CK 组),0.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TBT 低浓度组(LTBT 组),2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TBT 中浓度组(MTBT 组)和 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ TBT 高浓度组(HTBT 组)。将 TBT 母液稀释注入质量为 2 g 左右的长条状胡萝卜中,每天上午定时饲喂小鼠,对照组饲喂含玉米油的胡萝卜,每天中午进行检查,对已经吃完胡萝卜的小鼠,在料槽中添加全价饲料,没有吃完的等到吃完后再进行添加。每 3 d 称重一次并记录,计算下一次用药量。暴露持续 45 d。

1.3.2 子代(F1 代)小鼠血样采集

F0 代暴露结束后的第 10 天时,将同浓度组的雌、雄鼠按 1:1 进行同笼配种。仔鼠在出生后到达 20 日龄左右,断奶并将雌、雄分笼饲养。F1 代子鼠到达 60 日龄时,F1 代小鼠体重在 40~45 g,每一浓度组随机取出雌、雄小鼠各 6 只进行摘眼球取血,对血样进行常规检查包括以下项目:红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、红细胞平均体积(MCV)、平均血红蛋白量(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞分布宽度标准差(RDW-SD)、红细胞体积分布宽度变异系数(RDW-CV)、白细胞数(WBC)、淋巴细胞百分比(LYM)、淋巴细胞绝对值(LYMPH)、大型血小板比率(P-LCR)、血小板分布宽度(PDW)、平均血小板体积(MPV)、血小板(PLT)。

1.4 数据分析

采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理,对各组数据进行单因素方差分析和两两比较(LSD), $P < 0.05$ 为显著, $P < 0.01$ 为极显著。

2 结果

2.1 亲代 TBT 暴露对 F1 代雄性血常规的影响

如表 1 所示:与对照组相比:LTBT 组在 RBC 数目增多极显著($P < 0.01$)、HGB 含量升高显著($P < 0.05$)、MCV 降低极显著($P < 0.01$)、MCH 降低极显著($P < 0.01$)、RDW-SD 降低极显著($P < 0.01$)、LYMPH 降低显著($P < 0.05$)、P-LCR 降低极显著($P < 0.01$)、PDW 减小极显著($P < 0.01$)、MPV 缩小极显著($P < 0.01$);MTBT 组在 RDW-SD 降低极显著($P < 0.01$)、P-LCR 降低显著($P < 0.05$);HTBT 组在 RBC 数目增多极显著($P < 0.01$)、HGB 含量升高极显著($P < 0.01$)、HCT 升高显著($P < 0.05$)、RDW-SD 降低显著($P < 0.01$)、P-LCR 降低极显著($P < 0.01$)、PDW 减少极显著($P < 0.01$)、MPV 缩小极显著($P < 0.01$)。

2.2 亲代 TBT 攻毒对 F1 代雌性血常规

如表 2 所示:与对照组相比,LTBT 组在 HGB 含量升高极显著($P < 0.01$)、HCT 升高极显著($P <$

0.01)、PLT 数目增加显著($P < 0.05$);MTBT 组在 HGB 含量升高极显著($P < 0.01$)、HCT 升高极显著($P < 0.01$)、RDW-SD 升高极显著($P < 0.01$)、RDW-CV 升高极显著($P < 0.01$)、PLT 数目增多极显著($P < 0.01$)、MCHC 指标显著降低($P < 0.05$);HTBT 组在 RBC 数目增多极显著($P < 0.01$)、HGB 含量升高极显著($P < 0.01$)、HCT 升高极显著($P < 0.01$)、RDW-SD 升高极显著($P < 0.01$)、RDW-CV 升高显著($P < 0.05$)、PLT 数目增多极显著($P < 0.01$)、MCHC 指标显著降低($P < 0.05$)。

在 F1 代雌性血常规中,随着对亲代暴露 TBT 剂量的增高,部分血常规指标存在一定的剂量效应。随着 TBT 浓度的增高:HGB 含量、HCT 含量、PLT 数量呈现剂量依赖性增加;MCHC 指标呈现先降低后增加的趋势,但是 TBT 组都低于 CK 组;RDW-SD 指标、RDW-CV 指标呈现先增加后降低的趋势,但是 TBT 组都高于 CK 组。

表 1 亲代三丁基锡攻毒对子代雄性血常规的影响
Tab. 1 Effects of parents exposure to TBT on blood routine of male mice offspring

项目 Item	组别 Groups			
	CK	LTBT	MTBT	HTBT
RBC/($10^9/L$)	10.85 ± 0.08	12.04 ± 0.28**	11.08 ± 0.17	11.71 ± 0.23**
HGB/(g/L)	153.67 ± 1.48	159.67 ± 3.0*	152.00 ± 1.26	162.67 ± 0.76**
HCT/%	75.03 ± 0.46	76.70 ± 1.50	74.80 ± 0.42	78.33 ± 0.76*
MCV/fl	69.17 ± 0.06	63.80 ± 0.80**	67.53 ± 0.75	67.00 ± 1.21
MCH/pg	14.17 ± 0.06	13.27 ± 0.30**	13.73 ± 0.09	13.90 ± 0.28
MCHC/(g/L)	205.00 ± 0.97	208.33 ± 2.01	203.00 ± 1.32	207.67 ± 0.92
RDW-SD/%	41.23 ± 1.91	34.47 ± 0.50**	36.03 ± 0.48**	36.00 ± 0.58**
RDW-CV/fl	16.37 ± 0.98	15.63 ± 0.15	14.40 ± 0.93	15.07 ± 0.90
WBC/($10^9/L$)	6.83 ± 0.59	5.20 ± 0.40	6.53 ± 0.74	5.37 ± 0.65
LYM/%	87.17 ± 0.13	87.03 ± 0.54	82.93 ± 3.14	89.57 ± 0.28
LYMPH/($10^9/L$)	5.97 ± 0.51	4.40 ± 0.31*	5.43 ± 0.64	4.80 ± 0.57
P-LCR/%	11.23 ± 0.78	4.57 ± 0.27**	9.00 ± 0.84*	6.40 ± 0.35**
PDW/%	9.27 ± 0.31	7.97 ± 0.11**	9.37 ± 0.26	8.40 ± 0.04**
MPV/fl	7.53 ± 0.14	6.60 ± 0.03**	7.57 ± 0.16	7.00 ± 0.04**
PLT/($10^9/L$)	1232.67 ± 24.83	1273.67 ± 58.31	1249.67 ± 49.23	1132.67 ± 107.85

注:同行数据与 CK 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the CK group in the same line data,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$.

表 2 亲代三丁基锡攻毒对子代雌性血常规的影响
 Tab. 2 Effects of parents exposure to TBT on blood routine of female mice offspring

项目 Item	组别 Groups			
	CK	LTBT	MTBT	HTBT
RBC/($10^9/L$)	10.67 ± 0.14	11.35 ± 0.19	10.95 ± 0.38	11.73 ± 0.25**
HGB/(g/L)	153.67 ± 0.21	160.67 ± 2.01**	162.33 ± 1.17**	165.00 ± 1.59**
HCT/%	71.10 ± 0.78	75.47 ± 0.35**	75.90 ± 0.97**	78.37 ± 0.71**
MCV/fl	66.67 ± 0.33	67.07 ± 1.25	67.33 ± 0.95	66.93 ± 1.06
MCH/pg	14.43 ± 0.20	14.17 ± 0.21	14.10 ± 0.17	14.10 ± 0.35
MCHC/(g/L)	216.33 ± 2.79	211.33 ± 1.05	209.67 ± 1.28*	210.67 ± 1.69*
RDW-SD/%	34.40 ± 0.66	35.60 ± 0.47	37.83 ± 0.43**	36.50 ± 0.20**
RDW-CV/fl	13.37 ± 0.72	14.80 ± 0.63	16.00 ± 0.46**	15.30 ± 0.57*
WBC/($10^9/L$)	5.83 ± 0.38	6.87 ± 0.57	6.40 ± 0.42	5.30 ± 0.35
LYM/%	91.00 ± 1.0	88.83 ± 1.08	91.23 ± 0.95	93.17 ± 0.61
LYMPH/($10^9/L$)	5.33 ± 0.34	6.10 ± 0.51	5.87 ± 0.35	5.60 ± 0.72
P-LCR/%	6.27 ± 0.66	6.80 ± 0.54	6.40 ± 0.78	6.70 ± 0.41
PDW/%	7.93 ± 0.13	8.23 ± 0.09	8.00 ± 0.18	8.07 ± 0.14
MPV/fl	6.73 ± 0.08	6.87 ± 0.08	6.73 ± 0.11	6.87 ± 0.04
PLT/($10^9/L$)	868.67 ± 26.23	1100.33 ± 48.84*	1170.33 ± 99.26**	1216.00 ± 48.87**

注:同行数据与 CK 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note. Compared with the CK group in the same line data, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

近期大量研究表明,环境重金属(包括有机锡)能够对动物的血液造成严重影响,而且环境重金属暴露与肥胖有关^[19-20]。Grün F 等^[21]在 2007 年提出“环境致肥因子”的概念,提出的第一批候选致肥因子,有机锡包括在内。Whalen 等^[22]研究发现,人体暴露于 DBT、TBT 和苯基锡后会削弱 NK 细胞杀死肿瘤的功能,导致人体 NK 细胞的功能产生不可逆的抑制作用,从而影响机体的免疫力。孔皓等^[23]研究了二苯基锡对大鼠肥胖发生的影响,结果发现,一定剂量的二苯基锡对大鼠有致肥作用,但是随着浓度的改变,对雄性大鼠的致肥作用减弱,而对雌性大鼠各项指标影响不明显。通过对亲代的体重记录,分析后发现三丁基锡暴露后,对雌雄小鼠的体重的影响不一致,雌性中剂量组小鼠的体重显著抑制,雄性低剂量组小鼠体重显著促进。

胎盘是胎儿发育过程中重要的临时性器官。胎儿发育过程中各种营养物质的运输和代谢废物排出都通过胎盘实现^[15]。研究证实有机铅、有机镉、有机汞等都能通过胎盘屏障,特别是铅,可在整个妊娠时期通过胎盘^[24],而锡作为铅的同族元素,作用机理可能与之相似。TBT 通过胎盘后,会对子代产生一定的影响。

血液是循环系统的重要组成部分,参与机体的新陈代谢,所以血常规的检查不管是在临床还是科研都有很重要的意义。研究表明,各种重金属急性

中毒时,会严重损伤动物的血液系统^[12,15,25],而亲代实验动物慢性攻毒对子代血常规影响的报道甚少。红细胞的各项指标的改变直接影响机体的氧化功能和免疫功能^[15],在本实验中,与对照组相比,尽管 F1 代雄性 TBT 组的 RBC 明显增加,HGB 也明显增加,但 LTBT 组的 MCV 明显缩小,且 MCH 也明显降低,然而 MTBT 组与 HTBT 组的 MCV 和 MCH 指标无显著变化,这些结果都暗示红细胞的运输功能有所降低。与对照组相比,F1 代雌性 TBT 组 HGB 显著增加,但 MCV 与 MCH 都无显著差异这暗示红细胞的运氧能力并未下降。红细胞运氧能力的下降会使得机体的氧化反应速度下降,从而增加脂肪的积累的趋势。除了血常规之外,我们还记录了 F1 代小鼠发育过程中的体重数据,结果和我们预测的一样,雄性 LTBT 组体重增加显著,其他组体重增加不显著,对于其中的一些机制,我们正在做进一步的研究。

白细胞具有渗出、趋化、吞噬和分泌等生理特性主要是执行防御功能。淋巴细胞主要参与机体的特异性免疫反应^[15]。在本实验中,与对照组相比,F1 代雄性 TBT 组的 WBC 和 LYM 差异不显著,而 LTBT 组 LYMPH 指标显著降低,MTBT 组和 HTBT 组的 LYMPH 指标无显著差异,这暗示着 TBT 可能影响小鼠的免疫功能;与对照组相比,F1 代雌性 TBT 组的 WBC、LYM 和 LYMPH 均无显著差异。

血小板是从骨髓中成熟的巨核细胞胞质裂解脱落下来的具有生物活性的细胞质碎块,形状不规则

则,没有细胞核,体积较小,主要功能参与凝血、生理性止血和保持血管内皮的完整性^[15]。本实验中,与对照组相比,F1 代雄性 TBT 组的 P-LCR 显著降低,但是对 PLT 却无显著差异;F1 代雌性 TBT 组的 PLT 指标随着 TBT 浓度的增高呈剂量依赖增加,其他指标无显著差异,所以初步推断,TBT 可能会影响巨核细胞裂解细胞质的大小。

综上所述不同浓度的 TBT 暴露亲代小鼠时,会影响 F1 代小鼠的血常规,且低浓度时对 F1 代雄性影响最大,高浓度时对 F1 代雌性影响最大。

致谢:感谢河南科技大学动物科技学院韩坤、孙伟杰和孙原野同学的大力帮助。感谢洛阳普莱柯生物实验动物中心对实验动物的管理和饲养。

参考文献:

- [1] Jha AN, Hagger JA, Hill SJ, *et al.* Genotoxic, cytotoxic and developmental effects of tributyltin oxide (TBT): an integrated approach to the valuation of the relative sensitivities of two marine species [J]. *Marine Environmental Research*, 2000, 50: 565 - 573.
- [2] 江桂斌. 国内外有机锡污染研究现状 [J]. *卫生研究*, 2001, 30 (1): 1 - 2.
- [3] 袁玲玲,牛增元,叶曦雯,等. GC-MS 法测定青岛海滨海水中的有机锡 [J]. *海洋湖沼通报*, 2007 (1): 62 - 68.
- [4] 崔连艳,刘绍从,吕刚. 固相微萃取 - 气质联用测定海河水中痕量有机锡 [J]. *化学试剂*, 2008, 30 (1): 23 - 25.
- [5] Bravo M, Lespes G, De Gregori I, *et al.* Determination of organotin compounds by headspace solid phase microextraction-gas chromatography pulsed flame photometric detection (HS-SPME-GC-PFP D) [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2005, 383 (7 - 8): 1082 - 1089.
- [6] Julien H, Tea Z, Maite B, *et al.* Analytical advances in butyl-phenyl- and octyltin speciation analysis in soil by GC-PFPD [J]. *Talanta*, 2008, 75 (2): 486 - 493.
- [7] Jiang GB, Ceulemans M, Adams FC. Optimization study for the speciation analysis of organotin and organogermanium compounds by on-column capillary gas chromatography with flame photometric detection using quartz surface-induced luminescence [J]. *Journal of Chromatography A*, 1996, 727 (1): 119 - 129.
- [8] 胡志国. 气相色谱 - 质谱法测定纺织品中的有机锡 [J]. *质谱学报*, 2005, 26 (5): 59 - 61.
- [9] 胡勇杰. 纺织品中有机锡化合物含量的测定 [J]. *中国纤检*, 2007 (3): 19 - 22.
- [10] Zachariadis GA, Rosenberg E. Determination of butyl- and phenyltin compounds in human urine by HS-SPME after derivatization with tetraethylborate and subsequent determination by capillary GC with microwave-induced plasma atomic emission and mass spectrometric detection [J]. *Talanta*, 2009, 78: 570 - 576.
- [11] Graceli JB, Sena GC, Lopes PF, *et al.* Organotins: a review of their reproductive toxicity, biochemistry, and environmental fate [J]. *Reproductive Toxicology*, 2012, 36 (1): 40 - 52.
- [12] 骆焕荣,张雪峰,徐少玲. 有机锡化合物急性中毒 51 例 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2005, 23 (4): 309 - 311.
- [13] Marin MG, Moschino V, Cima F, *et al.* Embryotoxicity of butyltin compounds to the sea urchin *Paracentrotus lividus* [J]. *Marine Environmental Research*, 2000, 50: 231 - 235.
- [14] D. 阿那尼,黄玉瑶. 氯化二丁基锡对雌性小鼠生殖的影响 [J]. *环境科学学报*, 2000, 20 (6): 746 - 749.
- [15] 杨秀平,肖向红. 动物生理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2008.
- [16] 刘凤军,贺加双,杨自军,等. 小鼠铅中毒的毒性试验 [J]. *动物医学进展*, 2009, 30 (2): 56 - 60.
- [17] 吕良炬,赵扬,张纪亮,等. 有机锡化合物急性暴露对家兔血压的影响 [J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2008, 47 (2): 291 - 293.
- [18] 张朝红,董殿波,赵哲,等. 三丁基锡化合物与牛血清蛋白的相互作用 [J]. *光谱学与光谱分析*, 2007, 27 (2): 309 - 311.
- [19] Elobeid MA, Allison DB. Putative environmental-endocrine disruptors and obesity: A review [J]. *Current Opinion in Endocrinology Diabetes and obesity*, 2008, 15 (5): 403 - 408.
- [20] Newbold RR, Padilla-Banks E, Snyder RJ, *et al.* Development exposure to estrogenic compounds and obesity [J]. *Birth Defects Research Parts A: Clinical and Molecular Teratology*, 2005, 73 (7): 478 - 480.
- [21] Grün F, Blumberg B. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factor in the obesity crisis [J]. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2007, 8 (2): 161 - 171.
- [22] Whalen MM, Wilson S, Gleghorn C, *et al.* Brief exposure to triphenyltin products irreversible inhibition of human natural killing cells [J]. *Environment Research*, 2003, 92: 213 - 220.
- [23] 孔皓,蒋淑丽,张纪亮,等. 三苯基锡对大鼠肥胖发生的影响 [J]. *生态毒理学报*, 2012, 7 (4): 429 - 433.
- [24] 马海燕,李红. 几种重金属与胎盘障碍 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2006, 24 (1): 44 - 46.
- [25] 韦耀东,肖裕芳,农嵩. 铅损伤对小鼠部分血液常规的影响 [J]. *右江民族医学院学报*, 2004, 26 (6): 876.

[修回日期] 2015 - 04 - 10



内窥镜在大鼠气管插管中的应用

米睿¹, 杨帆¹, 李彤²

(1. 天津医科大学三中心临床学院, 天津市人工细胞重点实验室, 天津 300170;
2. 天津市第三中心医院心脏中心, 天津市肝病研究所, 天津市人工细胞重点实验室, 天津 300170)

【摘要】 **目的** 探讨内窥镜辅助大鼠气管插管方法。**方法** 将40只大鼠随机分成内镜组和直视组两组, 比较插管操作时间、插管总完成时间、插管次数、插管一次成功率、呕吐反射次数、窒息次数和拔管后24h存活率。**结果** 内镜组的插管操作时间、插管次数、一次插管成功率、呕吐反射次数、窒息次数均优于经口直视组($P < 0.05$), 插管总完成时间、拔管后24h存活率比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。**结论** 采用内窥镜辅助插管法优于传统的经口直视插管法, 值得推广。

【关键词】 大鼠; 内窥镜; 气管插管

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0047-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.011

Endoscopic assist in rat orotracheal intubation

MI Rui¹, YANG Fan¹, LI Tong²

(1. The third center clinical academy of Tianjin medical university, Tianjin Key laboratory of Artificial Cell, The Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China; 2. Tianjin the third center hospital cardiac center, Tianjin Institute of Hepatobiliary Disease, Tianjin Key laboratory of Artificial Cell, The Third Central Hospital of Tianjin, Tianjin 300170, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate endoscopic assist in rat orotracheal intubation. **Methods** 40 rats were randomly divided into two groups. The procedure time, total time, intubation frequency, the success rate of the first intubation and the survival rate in 24h were compared between the conventional group and the endoscopic group. **Results** The total time in two groups were nearly the same. But the procedure time and frequency of intubation were significantly less in the endoscopic group than those in the conventional group. The success rate of the first intubation in the endoscopic group was obviously higher than that of the conventional group. There was no obviously difference between the survival rate after extubation in 24h between groups. **Conclusion** Endoscopic assist is superior to the conventional method and worth promoting.

【Key words】 Rats; Endoscopic assist; Orotracheal intubation

大鼠气管插管技术是进行开胸手术、呼吸功能检测和气管内给药的前提条件。顺利而稳定地完成气管插管、减少插管过程中的损伤能为后续实验

奠定良好基础。目前常用的经口直视气管插管的方法有:盲插法、经口直视插管法和颈部透视插管法等^[1]。内窥镜辅助技术的发展使更加精准和微

[作者简介] 米睿(1988-), 男, 硕士生, 研究方向: 心血管外科。E-mail: d2mysave127@sina.com。

[通讯作者] 李彤(1962-), 男, 教授、博士生导师, 研究方向: 心血管外科。E-mail: litong@163.com。

创的插管操作成为可能。在国外, Fuentes 和 Clary 等首先将内窥镜应用于大鼠气管插管^[2-3]。但由于设备专业性强,在国内一直未能得到广泛开展。本实验组在实践过程中,经过反复比较、总结和改进,摸索出了使用国产 USB 内镜进行气管插管的实验技术,并与传统经口明视插管方法进行比较,现报道如下:

1 材料和方法

1.1 动物

Wistar 大鼠 40 只,雌雄各 20 只,体重 250 ± 20 g,由北京维通利华实验动物有限公司提供【SCXK(京)2012-0001】。插管操作属于外科技术手段、受性别影响小。但操作难度与口腔大小有关,而口腔大小与体重相关,遂将全部动物按照体重分层随机分配的原则,将大鼠分为内镜组和直视组 2 个组,每组 20 只、雌雄不限。实验相关操作在天津医科大学动物实验设施内进行【SYXK(津)2009-0001】。

1.2 仪器和试剂

镊子、棉签、纱布卷、10 mL 注射器、硬膜外麻醉管路、3% 戊巴比妥钠、阿托品

1.2.1 USB 内窥镜

本实验选择的是国产 200 万像素 USB 数码内窥镜(宗源牌)、长×宽 170×8 mm(彩插 9 图 1 C)、自带照明、前端耳腔套筒尖端外径 6 mm(内镜自带配件)、笔记本电脑。

1.2.2 气管插管

不锈钢导丝(距头端 2 cm 处弯折约 5-10 度)、气管插管(由密闭式静脉留置针剪去针头部分, BD)、肝素帽(BD)、三通(BD)(彩插 9 图 1 A、B)。

1.3 麻醉和准备工作

动物经腹腔注射 3% 戊巴比妥钠(0.05 g/kg)和阿托品(1 mg/kg),全身麻醉并抑制气道分泌物。待麻醉稳定后仰面固定于操作台,颈后垫一纱布卷。将内窥镜连接电脑、测试工作状态和照明,将导丝沿插管主孔穿入留置针。

1.4 操作

内镜组:用棉签清理口腔和咽喉内的分泌物,向外牵拉舌尖并经口送入内窥镜。调整焦距探查咽喉内分泌物量、确认开合的气管入口(彩插 8 图 3A)。撤出内窥镜并观察动物一般状态,然后将导丝头端沿一侧送入动物口中 1 cm(彩插 9 图 2 A)。再次插入内窥镜至观察位置并缓慢推送导丝,直至

在图像中可以观察到导丝尖端(彩插 9 图 2B)。旋转导丝尾端和改变导丝方向将头端对准声门,在图像指示下轻压咽后壁、将导丝头端送入气管(彩插 9 图 2C),注意减少与会厌软骨和咽喉其他组织的接触。确认导丝送入气管后,稳定导丝位置并直接撤出内窥镜,继续将插管送入气管。当插管进入气管后动物出现呼吸困难,此时撤出导丝、封闭主孔即完成操作。将插管留置 1 h 后撤除,术后科学饲养。

直视组:用棉签清理口腔和咽喉内的分泌物,向外牵拉舌尖以打开口腔。通过头灯照明暴露咽喉可见开合的气道,将导管导丝直视下插入气管。其余操作同内镜组。

1.5 观察指标

使用秒表计总完成时间(从探查、清理分泌物到撤出导丝的时间)、插管操作时间(从导丝放入口中到撤出导丝的时间)、插管次数、一次插管成功率、呕吐反射次数、窒息发生次数和术后 24 存活率。

1.6 统计学处理

使用 SPSS17.0 统计软件,数据资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义

2 结果

两组动物均全部完成插管操作,操作过程中无死亡。总完成时间两组没有明显的统计学差异($P > 0.05$),但插管操作的时间内镜组明显要快于直视组($P < 0.05$)。此外内镜组的插管次数全部为 1 次,一次插管成功率 100%,也要明显优于直视组($P < 0.05$)。而呕吐反射和窒息等不良反应的发生次数均低于直视组($P < 0.05$),术后存活率两者没有明显区别(表 1)。

3 讨论

3.1 直视下插管的失误和操作并发症分析

直视下经口插管由于创伤较小、安全性高、便于术后恢复等优点,是构建人工气道最常用的方法。在应用过程中有不少学者都对其进行了改良,包括制作特殊的操作台和开口设备^[4],经颈部-深部照明^[5]以及大鼠专用的喉镜^[6]等。这些方法都在提高成功率、缩短操作时间方面发挥出各自的优势。通过内镜观察到的解剖结构和直视插管的操作,我们分析传统直视操作中失误和并发症的产生原因如下。

表 1 内镜组和直视组插管结果比较
Tab. 1 The results compared between endoscopic group and conventional group

	内镜组 Endoscopic group	直视组 Conventional group
总完成时间 Total time of intubation(s)	183.32 ± 13.30	193.81 ± 24.54
插管操作时间 Procedure time of intubation(s)	20.70 ± 4.42*	59.10 ± 17.04
平均插管次数 The frequency of intubation	1 ± 0*	2 ± 0.82
一次插管成功率 The success rate of the first intubation(%)	100(20/20)*	45(9/20)
呕吐反射次数 The frequency of vomit	0.4 ± 0.52*	0.9 ± 0.74
窒息次数 The frequency of apnoea	0*	2
术后 24 h 存活率 The survival rate after 24 h(%)	100	100

注:与直视组比较,* $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the conventional groups, * $P < 0.05$.

①误入食管。从图 3A 中可见食管开口并不是位于气管的后方而是两侧,即咽喉部看似有两个食管开口。在照明不足、暴露不良的情况下,若不能准确观察到开合的声门就容易将插管送入食管。对于经验不足的术者,可能将两开口中的一个误认为气管,通气失败后交替尝试也不能顺利完成。而且我们还发现由于声门上方的隐窝柔软光滑(彩插 8 图 3A),将管路抵住这一区域后并不会进入气管开口而是会向两侧滑脱,最终仍会进入食管。

②分泌物增多和窒息。在动物麻醉后,咽喉部和气道内存有一定分泌物。管路对咽喉部的刺激可使分泌物增加,这样不仅会增加暴露的难度甚至可以直接造成动物窒息死亡(彩插 8 图 3B)。当管路进入气管后,气道内的分泌物依然可以阻塞管路而造成通气失败。

③咽喉损伤。咽喉部损伤主要是由暴力操作引起的,损伤位置主要位于咽后壁(彩插 8 图 3A)和会厌软骨附近。咽后壁的损伤主要发生在插管进入咽喉的过程中,可造成局灶性出血点。会厌的损伤多发生在插管进入气管时,若抵住会厌前的间隙(彩插 8 图 3A),术者会有明显的阻力感,而部分文献将这种阻力感描述为抵住声门。但此时若将该阻力感误认为抵住声门而加大力度或左右移动,便会造成这一间隙的损伤和穿透。该间隙穿透后,插管会进入甲状软骨前方的颈部间隙中。对于部分文献所提及的甲状软骨断裂和气管入口断裂,其实应该是这一间隙的穿透^[7]。而且我们通过实际测试发现,真正抵住声门后几乎没有阻力感便会向食管侧滑脱。

3.2 内镜辅助技术的优势

可视技术应用于气管插管可以提高插管的成功率并减少创伤,在临床上 Airtraq 可视喉镜和 Macintosh 喉镜已经得到广泛地应用^[8]。Fuentes

等^[2-3]首先提出将内镜应用于大鼠气管插管并取得了良好的效果。但由于仪器设备的限制,这一技术在国内并未得到广泛地开展。随着 USB 内镜的应用普及,我们通过实践探索出使用内镜进行大鼠气管插管的方法,并总结其具有如下优势:

(1)在咽喉部探查的过程中,可以观察到咽喉部分泌物的状况、评价阿托品的抑制效果。待药效发挥、分泌物减少后清理咽喉,可以减少呛咳和窒息的发生。(2)内镜可以清晰地暴露声门、直接观察气管、会厌和食管的位置关系。在插管过程中,操作者可以在图像引导下直接将插管送入气管,从而减少对周围组织的刺激,并达到一次性成功的效果。(3)使用内镜辅助后,在确保插管成功的同时还可以缩短插管时间。国内有文献报道^[7]经口直视气管插管的时间大约为 90 s,平均插管 2~3 次;而使用内镜后,我们在保证一次性插管 100% 成功的条件下,平均耗时约 20 s。即使将探查和清理的时间一起计算也仅需大约 3 min。(4)学习时间短,简单易用。由于采用可视技术,操作者仅需将导丝瞄准气管送入即可,无需进行反复练习,也无明显的学习曲线。即使无插管经验的人员,也能成功完成操作。

3.3 自制双接口软质插管的运用

本实验组在气管插管的选择上,使用了双接口的软质留置针(去针)后连接三通作为气管插管(图 1B)。在实际应用中这种插管拥有良好的用途。(1)软质管路刺激小、损伤小,插入和撤除时对周围组织刺激小,且不容易因为体位改变和不当操作造成气管变形和纵膈脏器的牵拉损伤。由于本身具有一定硬度,又不容易因为管路打折造成窒息(2)留置针、三通筒便易得、无需复杂改造、损坏后易于替换,可以顺利支持多个动物同时插管的手术。一次性使用的灭菌物品还可以减少感染的发生(3)我

们将呼吸管路接于边孔,而将导丝穿入主孔。在插管确认后撤除导丝、封闭主孔即可直接开始机械通气。在撤除插管时,打开主孔、关闭边孔三通后评估其自主呼吸能力,在确认动物呼吸顺畅后撤除管路。如果状态不良,仅需改变两孔开放状态即可再次开始通气。由于不存在更换接口的问题,也就减少了插管脱出这类失误的可能性。(4)通过主孔插入硬膜外导管(图 1A1),可以清理气道分泌物,进一步提高了手术过程中的安全性。

总之,我们通过选择合适的内窥镜和操作器械,逐步摸索了使用内窥镜辅助进行大鼠气管插管的操作技术,并将其与双接口软质插管结合起来,提高了建立人工气道的安全性、稳定性和易管理性。希望能够对广大从事动物实验的同行有所帮助。

参考文献:

[1] 卢记明,张炳熙. 大鼠气管插管方法学概述[J]. 中国比较医学杂志,2009,(08):76-80.

[2] Fuentes JM, Hanly EJ, Bachman SL, et al. Videoendoscopic endotracheal intubation in the rat: a comprehensive rodent model of laparoscopic surgery[J]. J Surg Res. 2004, 22(2) : 240 - 248.

[3] Clary EM, O. Hal loran EK, de la Fuente SG, et al. Videoendoscopic endotracheal intubation of the rat[J]. Lab Anim, 2004, 38(2) : 158 - 161.

[4] 叶明霞,孔利佳. 直视下行大鼠气管插管的方法比较[J]. 中国比较医学杂志,2013,(03):50-52.

[5] 李亚辉,何建国,乔木,等. 直视下行大鼠气管插管的改良方法[J]. 中国实验动物学杂志,2002,(02):123-125.

[6] Nicholson JW, Kinkead ER. A simple device for intratracheal injections in rats[J]. Lab Anim Sci, 1982, 32(5) : 509 - 510.

[7] 李娜,王焱林,王成天,等. 3 种大鼠气管插管方法的比较[J]. 医学新知杂志,2005,(04),20-21

[8] 蒋琦亮,张晓峰,徐美英,等. Airtraq 可视喉镜与 Macintosh 喉镜用于双腔支气管插管的临床研究[J]. 临床麻醉学杂志,2011,(09).

[修回日期] 2015 - 04 - 01

(下接第 53 页)

[2] 朱华,徐艳峰,刘颖,等. 链脲佐菌素诱导糖尿病恒河猴胰岛细胞数量的变化[J]. 中国比较医学杂志. 2012, 22(12): 1 - 3.

[3] Kuwabara T, Cogan DG. Studies of retinal vascular patterns. I. Normal architecture [J]. Arch Ophthalmol. 1960, 64(6) : 904 - 911.

[4] Ashton N. Studies of the retinal capillaries in relation to diabetic and other retinopathies [J]. Brit J Ophthalmol. 1963, 47(9) : 521 - 538.

[5] Hammes HP, Lin J, Renner O, et al. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. Diabetes. 2002, 51(10) : 3107 - 3112.

[6] Ruberte J, Ayuso E, Navarro M, et al. Increased ocular levels of IGF - 1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease[J]. J Clin Invest. 2004, 113(8):1149 - 1157.

[7] HuangHuang Q, Wang S, Sorenson CM, et al. PEDF-deficient mice exhibit an enhanced rate of retinal vascular expansion and are more sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration[J]. Exp Eye Res. 2008, 87(3) : 226 - 241.

[9] Zhu Y, Zhang XL, Zhu BF, et al. Effect of antioxidant N-acetylcysteine on diabetic retinopathy and expression of VEGF and ICAM - 1 from retinal blood vessels of diabetic rats[J]. Mol Biol Rep. 2012, 39(4) : 3727 - 3735.

[修回日期]



视网膜血管铺片技术的改进

徐玉环¹, 徐艳峰¹, 刘颖¹, 黄澜¹, 李彦红¹, 韩云林¹, 邓巍¹,
许庆刚², 秦川¹, 朱华¹

1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021;
2. 首都医科大学附属北京同仁医院, 北京 100730)

【摘要】 **目的** 探讨视网膜血管铺片技术的改进及在实验动物小鼠, 大鼠, 狗和猴中的应用。**方法** 应用蛋白酶 K-胰蛋白酶联合消化法制备视网膜血管铺片, 行 HE 及 PAS 染色观察血管形态, 免疫组化方法观察 CD31 及 VEGF 的表达。**结果** 用改进方法制备的视网膜血管铺片, 血管网完整, 无神经组织残留, 可清晰显示血管走向。各级血管形态清晰, 血管分支清楚完整, 无断裂现象。血管内皮细胞形态清晰。CD31 在血管周细胞及内皮细胞均有表达; VEGF 主要在内皮细胞表达。**结论** 改进的视网膜血管铺片技术可成功应用于不同实验动物, 为视网膜血管性疾病的研究提供了重要途径。

【关键词】 视网膜血管铺片; 联合消化法; 抗原修复

【中图分类号】R332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2015) 05-0051-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 005. 012

A modification of retinal vascular preparation

XU Yu-huan¹, XU Yan-feng¹, LIU Ying¹, HUANG Lan¹, LI Yan-hong¹,
HAN Yun-lin¹, DENG Wei¹, XU Qing-gang², QIN Chuan¹, ZHU Hua¹

1. Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of medical Sciences. 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; 2. Beijing Tongren Hospital Capital Medical University, Beijing 100730, China)

【Abstract】 **Objective** To improve the method of retinal vascular preparation and application in experimental animals of mice, rats, dogs and monkeys. **Methods** The retinal vessels were isolated with proteinase K-trypsin digestion technique. The samples were stained by hematoxylin-eosin (HE) and Periodic-Acid Schiff (PAS). The expression of CD31 and VEGF were detected by immunohistochemistry (IHC). **Results** The spread sheets of vascular network are complete, and can clearly show the blood vessels. No nerve tissue residue is left. Different levels of vascular morphology are clear. The vascular branches are clear and complete with no fracture. The cell morphology is intact, and the cell nucleus is clearly displayed. The entire process can be completed in a short time, and has a high success rate. The vascular antigen are successfully retained; Expression of CD31 can be seen in both pericytes and endothelial cells; VEGF is mainly expressed in endothelial cells. **Conclusions** The improved method is successfully applied in different experimental animals. This

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 项目)(2011CB504903)。

[作者简介] 徐玉环(1980-), 女, 初级技师。E-mail: yuhuanxu1109@163.com。

[通讯作者] 朱华(1971-), 女, 主任技师, 研究方向: 病理与病理生理学。E-mail: zhh@cnilas.org。

approach will provide an important contribution to the retinal vascular disease research.

【Key words】 Retinal vascular preparation; Combined digestion; Antigen retrieval

视网膜是由大脑向外延伸的视觉神经末梢组织,其结构复杂、精细、脆弱而代谢旺盛。其血管属于终末血管系统,任何病理性的破坏和血管梗阻等引起的组织缺氧,均能导致组织坏死,使其丧失感受和传导光刺激的功能。因此血管改变是视网膜病变的重要特点。视网膜血管铺片是研究视网膜血管病变的重要技术。但这项技术的消化时间不宜掌握,展片难度大,很难制备出理想的视网膜血管铺片。国内外学者多采用胰蛋白酶直接消化或胃蛋白酶-胰蛋白酶联合消化制备视网膜血管铺片。在本研究中,我们总结前人经验,不断摸索改进,建立了新的视网膜血管铺片技术,现总结如下。

1 材料和方法

1.1 材料

BALB/c 小鼠来源于军事医学科学院实验动物中心【SCXK(军)2012-0004】,SD 大鼠购自中国食品药品检定研究院实验动物资源研究中心【SCXK(京)2012-0001】,SYXK(京)2013-0019。犬购自北京日新科技有限公司【SCXK(京)2011-0007】,恒河猴由中国医学科学院医学实验动物研究所提供【SCXK(京)2014-0011】,SYXK(京)2010-0030。苏木素及伊红 Y 染色液均为国产试剂(益利精细),高碘酸(批号 011108,北京),Schiff(UFG0108,上海),Proteinase K(CALBIOCHEM, cat # 539480),Trypsin 1:250 Porcine Pancreas(AMRESCO, lot # 2861C173),anti-CD31 antibody(ABCAM, ab28364),anti-VEGF antibody(BOSTER, cat#BA0407),兔超敏二步法免疫组化检测试剂(中杉金桥,PV-9001)。正常羊血清工作液(中杉金桥,ZLI-9056),抗体稀释液(中杉金桥,ZLI-9030)。

1.2 方法

1.2.1 大鼠视网膜血管铺片的制备

大鼠脱颈椎法处死,摘取眼球,固定于 10% 中性福尔马林。

沿距齿缘剪开眼球去除晶状体,用蒸馏水漂洗,以视神经乳头为中心将眼球壁均匀地剪成 4 份,剥离眼球壁视网膜层,再用蒸馏水漂洗。

将剥离出的视网膜放在蒸馏水中 37℃ 孵育 1~2 h,蒸馏水漂洗,孵育后的视网膜放入 1 g/L 的蛋

白酶 K 中,56℃ 消化 13~17 min,去除消化掉的感光层细胞,蒸馏水漂洗,再将视网膜层放入 3% 胰蛋白酶消化液中,37℃ 消化 40~60 min。

用吸管将半透明状的血管网移入蒸馏水中漂洗,用吸管轻轻吹打非透明状区域,直到血管网成透明状,再将吹打成透明状的血管网铺到含多聚赖氨酸的载玻片上,展平,自然干燥。

在消化过程中,蛋白酶 k 消化时,每 5 min 轻柔摇动一次,再以最低完成消化时间为观察起点:蛋白酶 K 消化 13 min 时,肉眼观察,轻柔摇动,若见感光层细胞脱落,即完成第一步消化。若消化不完全,每 2 min 轻柔摇动观察一次,直至感光层脱落。胰蛋白酶消化时,每 10 min 轻柔摇动一次,也是以最低完成消化时间为观察起点,若消化不完全,每 5 min 轻柔摇动观察一次。

1.2.2 不同动物的视网膜在消化酶中的消化时间

在大鼠铺片基础上,我们摸索了 BALB/c 小鼠,犬和恒河猴视网膜血管铺片的消化时间表 1。BALB/c 小鼠眼球小,在剥取视网膜层之前,要将眼球壁均匀剪成 2 份。犬和恒河猴眼球较大,结构特殊,取材后需立即固定 4h,再用锋利的刀片在眼球的上下部各切开一个小口,继续固定 24h。将眼球壁均匀地剪成若干等份,每一等份大小约 0.4 cm × 0.4 cm,再剥离视网膜层。

表 1 不同动物的视网膜在消化酶中的消化时间

Tab.1 The digestive time of different animal retina in digestive enzymes

不同动物 Animals	蛋白酶 K (±2min) Proteinase K.	胰蛋白酶 (±10min) Trypsin
小鼠(Mouse)	18min	60min
大鼠(Rat)	15min	50min
比格犬(Beagle)	12min	40min
猴(Monkey)	10min	30min

1.2.3 视网膜血管铺片 HE 染色

将视网膜血管铺片置于自来水中水化 15 min,苏木素染核 1 min,自来水冲洗,伊红复染 2 min,梯度酒精脱水,二甲苯透明,中性树脂封片。

1.2.4 视网膜血管铺片 PAS 染色

PAS 染色方法参照文献^[1]:将视网膜血管铺片置于自来水中水化 15 min,蒸馏水洗 2 次,加入高碘氧化 10 min,蒸馏水速洗 2 次,加入 schiff 试剂反

应 5 min, 自来水流水冲洗 2 min, 苏木素染核 2 min, 自来水返蓝 5 min, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

1.2.5 视网膜血管铺片免疫组化染色

免疫组化染色方法参照文献^[2], 略有改变: ①将视网膜血管铺片置于 PBS 中水化 15 min; ②微波中火修复 5 min; ③3% 双氧水封闭 15 min; ④正常羊血清工作液封闭 20 min; ⑤滴加用抗体稀释液稀释的一抗 (CD31 稀释度为 1:50; VEGF 稀释度为 1:200), 室温孵育 1.5 h; ⑥滴加二抗试剂 1, 室温孵育 10 min; ⑦滴加二抗试剂 2, 室温孵育 10 min; ⑧ DAB 显色; ⑨苏木素复染 4 s; ⑩梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树脂封片。

2 结果

2.1 大鼠视网膜血管铺片

经 HE 及 PAS 染色可见: 铺片完整, 清晰显示血管走向。各级血管形态清晰, 血管分支清楚完整, 无断裂现象。细胞形态清晰, 细胞核可清晰显示 (彩插 12 图 1)。

酶消化会造成部分抗原的丢失, 因此需要对抗原进行修复。修复温度太低造成修复不完全, 温度太高又会脱片。经过摸索, 我们发现, 微波中火 5 min 即可将抗原修复。免疫组化结果显示: CD31 和血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 在正常大鼠铺片均有表达; CD31 在血管周细胞及内皮细胞均有表达; VEGF 主要在内皮细胞表达。

2.2 小鼠、狗、猴视网膜铺片

根据大鼠铺片经验, 我们摸索了 BALB/c 小鼠, 犬和恒河猴的视网膜血管铺片消化时间。经 HE 及 PAS 染色, 可见血管网完整, 无神经组织残留。各级血管结构清楚, 大动物小动脉可显示血管壁的平滑肌。毛细血管网由内皮细胞和周细胞组成, 细胞形态清晰, 细胞核结构清楚 (彩插 12 图 2)。

3 讨论

1960 年 Kuwabara^[3] 用胰蛋白酶对视网膜进行消化制备了视网膜血管铺片, 为视网膜血管的研究提供了一种新的手段。1963 年 Ashton^[4] 改进了 Kuwabara 的方法, 用胃蛋白酶-胰蛋白酶联合消化法, 成功制备了猫的视网膜血管铺片。此后又经过各国学者的不断努力^[5-8], 才有了今天的技术基础。

视网膜血管消化铺片技术难度较大: 消化不完全, 铺片不能充分显示出血管。消化过度, 又会造成血管结构不清晰, 甚至断裂, 直接影响对实验结果的观察和分析。蛋白酶 K 是一种高活性蛋白酶, 能快速、有效地裂解组织细胞, 因此在本研究中, 我们选择先用蛋白酶 K 消化掉视网膜感光层细胞。同时, 蛋白酶 K 能穿透细胞膜, 破坏细胞核, 于是我们将视网膜层漂洗后再移入到 3% 胰蛋白酶中进一步消化。应用蛋白酶 K-胰蛋白酶联合消化法, 成功制备了不同实验动物的视网膜血管铺片。

视网膜血管铺片制备过程中, 应注意以下几点: ①眼球的固定: 大、小鼠眼球取材后直接固定于 10% 中性福尔马林 24 h 以上。狗和猴眼球组织结构特殊, 各部分组织结构的软硬度不同, 因此取材后立即固定 4 h, 再用锋利的刀片在眼球的上下部各切开一个小口, 继续固定 24 h。由于固定液易造成视网膜血管的断裂, 因此固定时间最好不超过 72 h。②视网膜的剥离: 视网膜位于眼球壁的内层, 组织比较薄, 而且附着在色素层上, 剥离过程中很容易破碎。因此去除晶状体后, 以视神经乳头为中心, 将眼球壁剪开成若干等份, 轻轻剥离出视网膜。③血管的消化: 消化过程中, 随时注意观察。蛋白酶 K 消化能力极强, 每 5 min 轻微摇动一次, 再以最低完成消化时间为观察起点, 每 2 min 轻柔摇动一次, 待肉眼可见感光层脱落即可终止消化。换成胰蛋白酶消化时, 每 10 min 轻微摇动一次, 再以最低完成消化时间为观察起点, 每 5 min 轻柔摇动一次, 待可见半透明血管网即终止消化。④铺片: 将消化好的血管网漂洗干净, 平铺于含多聚赖氨酸的载玻片上, 不要将载玻片上的水吸干净, 否则未贴壁的血管网漂移, 影响对血管走向的观察。⑤抗原修复: 常规微波修复石蜡切片需要高火 3 min, 中火 5 min, 再低火 3 min。而视网膜血管铺片只需中火 5 min 即可完成抗原修复。

蛋白酶 K-胰蛋白酶联合消化法制备大鼠视网膜血管铺片成功率高, 稳定性好, 同时也适用于不同实验动物, 为视网膜血管性疾病的研究提供了重要途径。

参考文献:

- [1] 李彦红, 朱华, 徐艳峰, 等. 过敏性紫癜兔模型的免疫学改变及机制初探[J]. 中国实验动物学报. 2013, 21(6): 65-69.

(上转第 50 页)

们将呼吸管路接于边孔,而将导丝穿入主孔。在插管确认后撤除导丝、封闭主孔即可直接开始机械通气。在撤除插管时,打开主孔、关闭边孔三通后评估其自主呼吸能力,在确认动物呼吸顺畅后撤除管路。如果状态不良,仅需改变两孔开放状态即可再次开始通气。由于不存在更换接口的问题,也就减少了插管脱出这类失误的可能性。(4)通过主孔插入硬膜外导管(图 1A1),可以清理气道分泌物,进一步提高了手术过程中的安全性。

总之,我们通过选择合适的内窥镜和操作器械,逐步摸索了使用内窥镜辅助进行大鼠气管插管的操作技术,并将其与双接口软质插管结合起来,提高了建立人工气道的安全性、稳定性和易管理性。希望能够对广大从事动物实验的同行有所帮助。

参考文献:

[1] 卢记明,张炳熙. 大鼠气管插管方法学概述[J]. 中国比较医学杂志,2009,(08):76-80.

[2] Fuentes JM, Hanly EJ, Bachman SL, et al. Videoendoscopic endotracheal intubation in the rat: a comprehensive rodent model of laparoscopic surgery[J]. J Surg Res. 2004, 22(2) : 240 - 248.

[3] Clary EM, O. Hal loran EK, de la Fuente SG, et al. Videoendoscopic endotracheal intubation of the rat[J]. Lab Anim, 2004, 38(2) : 158 - 161.

[4] 叶明霞,孔利佳. 直视下行大鼠气管插管的方法比较[J]. 中国比较医学杂志,2013,(03):50-52.

[5] 李亚辉,何建国,乔木,等. 直视下行大鼠气管插管的改良方法[J]. 中国实验动物学杂志,2002,(02):123-125.

[6] Nicholson JW, Kinkead ER. A simple device for intratracheal injections in rats[J]. Lab Anim Sci, 1982, 32(5) : 509 - 510.

[7] 李娜,王焱林,王成天,等. 3 种大鼠气管插管方法的比较[J]. 医学新知杂志,2005,(04),20-21

[8] 蒋琦亮,张晓峰,徐美英,等. Airtraq 可视喉镜与 Macintosh 喉镜用于双腔支气管插管的临床研究[J]. 临床麻醉学杂志,2011,(09).

[修回日期] 2015 - 04 - 01

(下接第 53 页)

[2] 朱华,徐艳峰,刘颖,等. 链脲佐菌素诱导糖尿病恒河猴胰岛细胞数量的变化[J]. 中国比较医学杂志. 2012, 22(12): 1 - 3.

[3] Kuwabara T, Cogan DG. Studies of retinal vascular patterns. I. Normal architecture [J]. Arch Ophthalmol. 1960, 64(6) : 904 - 911.

[4] Ashton N. Studies of the retinal capillaries in relation to diabetic and other retinopathies [J]. Brit J Ophthal. 1963, 47(9) : 521 - 538.

[5] Hammes HP, Lin J, Renner O, et al. Pericytes and the pathogenesis of diabetic retinopathy [J]. Diabetes. 2002, 51(10) : 3107 - 3112.

[6] Ruberte J, Ayuso E, Navarro M, et al. Increased ocular levels of IGF - 1 in transgenic mice lead to diabetes-like eye disease[J]. J Clin Invest. 2004, 113(8):1149 - 1157.

[7] HuangHuang Q, Wang S, Sorenson CM, et al. PEDF-deficient mice exhibit an enhanced rate of retinal vascular expansion and are more sensitive to hyperoxia-mediated vessel obliteration[J]. Exp Eye Res. 2008, 87(3) : 226 - 241.

[9] Zhu Y, Zhang XL, Zhu BF, et al. Effect of antioxidant N-acetylcysteine on diabetic retinopathy and expression of VEGF and ICAM - 1 from retinal blood vessels of diabetic rats[J]. Mol Biol Rep. 2012, 39(4) : 3727 - 3735.

[修回日期]



两品系小鼠局部淋巴结试验结果比较

胡培丽,张露勇,李波,邢书霞

(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

【摘要】 目的 分析比较 BALB/c 和 CBA 小鼠局部淋巴结试验结果。方法 将已知致敏性的 4 种化学物(2,4-二硝基氯苯、丁子香酚、己基肉桂醛和异丙醇)和未知致敏性的 3 种化妆品对 BALB/c 和 CBA 小鼠连续染毒 3 d,第 5 天腹腔注射示踪剂 BrdU,第 6 天分离颌下淋巴结制取单细胞悬液,用 ELISA 试剂盒检测细胞增殖。结果 2,4-二硝基氯苯、丁子香酚、己基肉桂醛和 3 号烫发剂两品系结果均呈致敏阳性,3 种化学物 EC1.6 值分别为 0.08% (极强)、4.02% (中)、6.68% (中)(BALB/c)和 0.07% (极强)、6.08% (中)、8.89% (中)(CBA);异丙醇、1 和 2 号化妆品两品系结果均为致敏阴性,SI 均小于 1.6。结论 两品系小鼠局部淋巴结试验结果较一致,BALB/c 可替代 CBA 小鼠应用于化学物和化妆品的致敏性评价。

【关键词】 局部淋巴结试验;品系;化妆品

【中图分类号】 R758.22 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015)05-0054-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.013

The comparative study of two strains on results of Local lymph node assays

HU Pei-li, ZHANG Lu-yong, LI Bo, XING Shu-xia

(National Institutes for food and drug control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To analyze and compare results of local lymph node assays (LLNA) between BALB/c and CBA mice. **Methods** 4 chemicals (2,4-dinitrochlorobenzene, eugenol, hexyl cinnamic aldehyde and isopropanol) and 3 cosmetics were applied to the dorsum of both ears of Balb/c and CBA mice for three consecutive days. BrdU solution was injected inter-peritoneally on day 5. On day 6, the bilateral draining auricular lymph nodes were excised and made into single cell suspension, the lymph cell proliferation was measured by BrdU ELISA kit. **Results** 2,4-dinitrochlorobenzene, eugenol, hexyl cinnamic aldehyde and NO. 3 perm agent pretended positive for both strains, EC1.6 values of three chemicals were found to be 0.08% (very strong), 4.02% (moderate), 6.68% (moderate) and 0.07% (very strong), 6.08% (moderate), 8.89% (moderate) for BALB/c and CBA mice respectively. Isopropanol, NO. 1 and NO. 2 cosmetics pretended to be non-sensitizers with SI < 1.6 for both strains. **Conclusion** This study showed that BALB/c mouse was essentially equal to CBA for LLNA; BrdU-ELISA, which suggested that BALB/c mouse was a good alternative for CBA used in chemicals and cosmetics allergenic evaluation.

【Key words】 Local lymph node assay; Strain; Cosmetics

小鼠局部淋巴结试验(local lymph node assay, LLNA)是皮肤致敏性多种替代方法中应用最为广泛

的全球标准方法^[1-3],但该方法需要使用放射性标记物、特定的设备和实验条件,不利于推广;2010年

[基金项目] 中检院中青年基金项目(2013NC3)。

[作者简介] 胡培丽(1981-),女,硕士,助理研究员,研究方向:食品化妆品安全性评价,E-mail: hupeili-1981@163.com。

OECD 指南公布了基于掺入溴脱氧尿嘧啶核苷和酶联免疫吸附测定的改良方法(LLNA: BrdU-ELISA)^[4],用示踪剂替代放射性标记物,较易推广。该指南中推荐使用 CBA 小鼠,由于该品系小鼠在国内供应量较少,价格昂贵,给国内很多学者开展该试验带来了一定的困难。鉴于国内外有使用 BALB/c、NMRI、ICR、DBA/2、C57BL/6、SJL 等品系的报道^[5-10],而 BALB/c 小鼠是国内应用较多的品系,遗传稳定,本实验尝试分析比较国内 BALB/c 和 CBA 两品系小鼠对 LLNA: BrdU-ELISA 实验结果的影响,从而为 LLNA 实验选择合适的动物品系提供参考。

1 材料和方法

1.1 受试物

溶剂由丙酮/橄榄油(AOO)(4:1 v/v)配制而成,2,4-二硝基氯苯(DNCB)(中国医药总公司北京分公司)与异丙醇(IPA,北京化工厂)分别用 AOO 配成 0.1% (w/v)、0.3% (w/v)、1.0% (w/v) 和 25% (v/v)、50% (v/v)、100% (v/v) 3 个浓度;丁子香酚(EUG)与己基肉桂醛(HCA)均购自 Sigma 公司,均用 AOO 配成 25% (v/v)、50% (v/v) 2 个浓度;3 种化妆品原液直接涂抹于小鼠耳背皮肤。

1.2 实验动物

SPF 级 BALB/c 和 CBA 小鼠,雌性,8~10 周龄,分别由中国食品药品检定研究院实验动物资源中心和北京华阜康生物科技股份有限公司提供,合格证号分别为【SCXK(京)2009-0017】、【SCXK(京)2009-0004】。动物试验环境为中国食品药品检定研究院屏障系统动物房【SYXK(京)2011-0008】。温度(22±2)℃,湿度 50%~70%,动物自由饮食,12 h 人工照明。

1.3 试剂和仪器

BrdU 粉剂与 BrdU-ELISA 试剂盒均购自德国 Roche 公司(编号 10280879001、11647229001)。BrdU 标记液用生理盐水配制成 10 mg/mL。SYNERGY HT 型全自动酶标仪(美国 BIO TEK 公司)、CR22G III 型低温离心机(日本 Hitachi 公司)。

1.4 方法

1.4.1 动物分组和染毒^[4,11]

动物随机分为 4 只/组,4 种化学物质(己基肉桂醛、丁子香酚、2,4-二硝基氯苯、异丙醇)分别设为 2~3 个不同剂量组,共用一个 AOO 溶剂对照组;3 种

化妆品(1 号精华霜、2 号防晒霜、3 号烫发剂)分别设一个最高剂量组,共用一个蒸馏水对照组。将受试物 25 μL/耳/d 涂抹于小鼠双耳背部皮肤,连续涂抹 3 d,对照组涂抹 AOO 或蒸馏水,第 4 天不处理,第 5 天腹腔注射 BrdU 标记液 0.5 mL,第 6 天处死动物分离颌下淋巴结。

1.4.2 淋巴细胞制备^[4,11]

BrdU 标记液腹腔注射后 24 h,处死动物,摘取颌下淋巴结,研磨后用不锈钢筛网(200 目)过滤制成单细胞悬液,PBS 洗 2 次(离心 1200 r/min,8 min),每只小鼠的淋巴细胞定容于 14 mL PBS 中。

1.4.3 ELISA 检测细胞增殖

将细胞悬液 100 μL/孔加至 96 孔板中,离心(1400 r/min,10 min),弃上清,吹干细胞。经 ELISA 试剂盒处理后用酶标仪检测 BrdU 值(发射波长和参考波长分别为 370 nm,492 nm),BrdU 标记指数为(A370 - A 空白 370) - (A492 - A 空白 492)。

1.4.4 SI、EC1.6 值计算与致敏性分级

刺激指数(stimulation index, SI) = 受试物组 BrdU 标记指数均值/溶剂对照组 BrdU 标记指数均值;SI ≥ 1.6,并有剂量-效应关系,该受试物为致敏阳性^[4,11]。根据 SI 计算 EC1.6 值和致敏级别,计算公式为^[11]:①EC1.6 = c + [(1.6 - d)/(b - d)] × (a - c)(受试物各浓度组对应 SI 值包括 >1.6 和 <1.6),②EC1.6 = 2^{log₂(c) + [(1.6 - d)/(b - d)] × [log₂(a) - log₂(c)]}(受试物各浓度组对应 SI 值均 >1.6),其中设 a、c 为邻近两点受试物的浓度,b、d 为对应的 SI 值;当 SI = 1.6 时,其对应的受试物浓度即为 EC1.6 值。分级标准为:EC1.6% < 0.1 极强,0.1 ≤ EC1.6% < 1.0 强,1.0 ≤ EC1.6% < 10 中,10 ≤ EC1.6% < 100 弱^[11]。

2 结果

2.1 染毒期间动物状态观察

染毒期间动物正常饮食,体重增长良好。部分组别(1% 2,4-二硝基氯苯)小鼠染毒部位出现水肿、红斑或结痂刺激性或致敏性症状,各脏器未见有任何病变,未观察到明显的其他毒性症状。

2.2 两品系小鼠 BrdU 标记指数和刺激指数 SI 值比较

由表 1 可见,BALB/c 和 CBA 小鼠:AOO 和蒸馏水对照组的 BrdU 标记指数较一致,淋巴结增生

表 1 两品系小鼠对 4 种化学物和 3 种化妆品 LLNA;BrdU-ELISA 测定结果
 Tab. 1 The LLNA; BrdU-ELISA results of 4 chemicals and 3 cosmetics between two strains

品系 Strains	组别 Groups	浓度 Concentration (%)	BrdU 标记指数 BrdU labelling index	刺激指数 Stimulation index	EC1.6 (%)	致敏性分级 Sensitization classification
BALB/c	AOO	0	0.127 ± 0.015	1.0	—	—
	2,4-二硝基氯苯(DNCB)	0.1	0.301 ± 0.045	2.37	0.08	VS
		0.3	0.875 ± 0.127	6.89		
		1.0	1.080 ± 0.154	8.50		
		25	0.573 ± 0.052	4.51	4.02	M
	己基肉桂醛(HCA)	50	0.711 ± 0.084	5.60		
		25	0.428 ± 0.078	3.37	6.68	M
	丁子香酚(EUG)	50	0.546 ± 0.063	4.30		
		25	0.109 ± 0.037	0.86	—	—
	异丙醇(IPA)	50	0.144 ± 0.063	1.13		
		100	0.150 ± 0.043	1.18		
	蒸馏水(Distilled water)	0	0.116 ± 0.027	1.0	—	—
	1号精华霜(NO.1 Essence cream)	100	0.124 ± 0.026	1.07	—	—
	2号防晒霜(No.2 Sunscreen)	100	0.165 ± 0.043	1.42	—	—
	3号烫发剂(No.3 Perm agent)	100	0.389 ± 0.076	3.35	—	—
CBA	AOO	0	0.135 ± 0.016	1.0	—	—
	2,4-二硝基氯苯(DNCB)	0.1	0.406 ± 0.037	3.01	0.07	VS
		0.3	0.991 ± 0.135	7.34		
		1.0	1.322 ± 0.124	9.79		
		25	0.706 ± 0.052	5.23	6.08	M
	己基肉桂醛(HCA)	50	0.946 ± 0.095	7.01		
		25	0.466 ± 0.054	3.45	8.89	M
	丁子香酚(EUG)	50	0.633 ± 0.068	4.69		
		25	0.111 ± 0.045	0.82	—	—
	异丙醇(IPA)	50	0.171 ± 0.081	1.27		
		100	0.161 ± 0.053	1.19		
	蒸馏水(Distilled water)	0	0.123 ± 0.024	1.0	—	—
	1号精华霜(NO.1 Essence cream)	100	0.143 ± 0.023	1.16	—	—
	2号防晒霜(No.2 Sunscreen)	100	0.165 ± 0.051	1.34	—	—
	3号烫发剂(No.3 Perm agent)	100	0.598 ± 0.085	4.86	—	—

注:VS: 极强;M:中。

Note: VS: very strong; M: moderate.

程度均较低;3种已知致敏物(2,4-二硝基氯苯,丁子香酚和己基肉桂醛)各浓度 SI 均大于 1.6,且均有明显的剂量-反应关系;非致敏物异丙醇各浓度 SI 均小于 1.6,与有关文献报道一致^[11]。1、2号化妆品 SI 均小于 1.6,判断为无致敏性,3号染发剂 SI 大于 1.6,为致敏阳性。

2.3 两品系小鼠 EC1.6 值与致敏性分级比较

两品系小鼠;2,4-二硝基氯苯 EC1.6 值较相近,为极强致敏物;丁子香酚和己基肉桂醛 EC1.6 值不是很一致,但均在 1~10 范围内,为中等强度致敏物(表 1)。

3 讨论

由于实验动物的种属、性别、年龄等差异影响

实验结果,因此选择合适的实验动物进行相关实验尤为重要。OECD 指南(TG429、TG442)推荐使用 CBA 雌性小鼠,给国内各毒理实验室推广该 LLNA 方法带来了困难。BALB/c 小鼠是国内应用较多的近交系,遗传背景明确、稳定,国内外已有学者将 BALB/c 小鼠应用于 LLNA 研究^[5-10],但目前国内外关于该两品系小鼠 LLNA;BrdU-ELISA 法评价化学物和化妆品致敏性的比较研究还未见相关报道。

本研究将 BALB/c 和 CBA 小鼠分别对不同致敏强度的 4 种化学物和 3 种化妆品进行评价,结果两品系对 AOO 和蒸馏水溶剂对照反应均较低,对 2,4-二硝基氯苯、丁子香酚和己基肉桂醛和 3 号烫发剂反应均呈致敏阳性(SI > 1.6),且 3 种化学物剂量-反应关系显著;对异丙醇和 1、2 号化妆品反应均

呈致敏阴性(SI < 1.6)。

从表 1 中我们可以发现 CBA 小鼠 BrdU 标记指数和刺激指数 SI 值均偏高于 BALB/c, 推断 CBA 小鼠较 BALB/c 表现出更高程度地 BrdU 摄取, 但两品系对 4 种化学物和 3 种化妆品的致敏性判断一致, 虽然 2,4-二硝基氯苯、丁子香酚和己基肉桂醛的 EC1.6 值存在差异, 但致敏强度分级均一致, 表明该两品系小鼠只是反应程度有一定的差异, 对化学物和化妆品致敏性判断及致敏强度分级并无显著影响。国际上也有学者将不同品系小鼠进行了 LLNA 研究^[5-6,12], 其结果与本研究一致。

综上, BALB/c 和 CBA 小鼠 LLNA: BrdU-ELISA 试验结果较一致, 均可较好地评价化学物和化妆品的致敏性, BALB/c 小鼠可替代 CBA 在国内各毒理实验室推广应用于化妆品皮肤致敏性评价。

参考文献:

- [1] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals skin sensitization; local lymph node assay 429 [S/OL]. 2002. <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llnadocs/OECD429.pdf>.
- [2] Boverhof DR, Gollapudi BB, Hotchkiss JA, *et al.* Evaluation of a toxicogenomic approach to the local lymph node assay (LLNA) [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 107 (2): 427-439.
- [3] Haseman JK, Strickland J, Allen D, *et al.* Safety assessment of allergic contact dermatitis hazards; an analysis supporting reduced animal use for the murine local lymph node assay [J]. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2011, 59 (1):191-196.
- [4] OECD. OECD guideline for the testing of chemicals skin sensitization; local lymph node assay; BrdU-ELISA [S/OL]. 2010. <http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced-tg442b.pdf>.
- [5] Woolhiser MR, Munson AE, Meade BJ. Comparison of mouse strain using the lymph node assay [J]. *Toxicology*, 2000, 146 (2-3): 221-227.
- [6] Ehling G, Hecht M, Heusene A, *et al.* An European inter-laboratory validation of alternative endpoints of the murine local lymph node assay: First round [J]. *Toxicology*, 2005, 212 (1): 60-68.
- [7] 刘协, 吕中明, 施伟庆, 等. BALB/c 和 ICR 小鼠用于局部淋巴结试验的研究[J]. *江苏预防医学*, 2009, 20(1): 4-6.
- [8] 何国群, 杨杏芬, 郑德生, 等. 溴脱氧尿嘧啶核苷掺入法作为皮肤致敏试验替代方法研究[J]. *中国职业医学*, 2011, 38 (5): 377-380.
- [9] 阳晓燕, 赵康峰, 孔建, 等. 局部淋巴结改良法在化妆品皮肤刺激性和致敏性检测中的应用[J]. *环境与健康杂志*, 2013, 30 (4): 312-316.
- [10] 胡培丽, 罗飞亚, 陈志蓉, 等. LLNA: BrdU-ELISA 改良法的建立及其在化妆品安全性评价中的应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24 (9): 23-27.
- [11] ICCVAM. Test Method Evaluation Report: The Murine Local Lymph Node Assay; BrdU-ELISA, a Nonradioactive Alternative Test Method to Assess the Allergic Contact Dermatitis Potential of Chemicals and Products [R]. Research Triangle Park, NC: National Institute of Environmental Health Sciences. NIH Publication, 2010. <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/immunotox/llna-ELISA/TMER.htm>.
- [12] Kimber I, Hilton J, Dearman RJ, *et al.* An international evaluation of the murine local lymph node assay and comparison of modified procedures [J]. *Toxicology*, 1996, 103 (1): 63-73.

[修回日期] 2015-03-31



光激化学发光免疫分析技术在仙台病毒检测中的应用

常 慧¹, 高 伟², 张江义², 向志光¹, 魏 强¹

(1. 中国医学科学院北京协和医学院医学实验动物研究所, 北京 100021; 2. 北京市中关村医院, 北京 100190)

【摘要】 目的 应用光激化学发光免疫分析技术(AlphaLISA)建立仙台病毒检测方法。方法 通过方阵实验筛选仙台病毒 AlphaLISA 检测的最佳抗原浓度以及供体微珠与受体微珠的最佳受试浓度及比例,对大鼠血清进行测试,确立血清检测浓度;对40份大鼠血清分别使用 AlphaLISA 检测方法和 ELISA 检测方法进行检测,并对检测结果进行比较。结果 生物素化标记的仙台病毒多肽类抗原的最佳测试浓度为 250 nmol/L,供体微珠与受体微珠的最佳比例为 1:1,使用浓度为 20 μg/mL,在 AlphaLISA 检测方法中大鼠血清测试最佳使用浓度 1:10000;共检测 40 份大鼠血清,ELISA 方法检出阳性 7 份,阳性率为 17.5%,AlphaLISA 方法检出阳性 8 份,阳性率为 20.0%,ELISA 检测阳性的 7 份血清经 AlphaLISA 方法检测均为阳性,AlphaLISA 检出的另外一份样品经 IFA 方法验证为阳性。结论 初步建立了仙台病毒光激化学发光免疫分析技术(AlphaLISA)的检测方法,该方法敏感性堪比经典 ELISA 方法,且血清样本的用量减少,无需洗涤等步骤,在方法的简并性及准确性上有一定优势。

【关键词】 仙台病毒;AlphaLISA

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0058-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.014

Development of an amplified luminescent proximity homogeneous assay for detecting Sendai virus

CHANG Hui¹, GAO Wei², ZHANG Jiang-yi², XIANG Zhi-guang¹, WEI Qiang¹

(1. Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China; 2. Zhongguancun Hospital, Beijing 100190, China)

【Abstract】 Objective To establish the amplified luminescent proximity homogeneous assay (AlphaLISA) for the detection of Sendai virus. **Methods** The antigen concentration, serum concentration and the donor beads/acceptor beads ratio used in the AlphaLISA method were optimized by the phalanx experiments, then the antibodies of Sendai Virus in 40 rat sera were detected by the established AlphaLISA method and ELISA detection method. The results were compared and the difference between the two methods was confirmed by IFA. **Results** The optimum concentration of SV bio-peptide in AlphaLISA assay was 250 nmol/L, the best proportion of donor beads/acceptor beads ratio was 1:1, using the concentration of 20 μg/mL and the serum dilution was 1:10000. 7 of the 40 rat sera were detected SV positive by ELISA, the positive rate was 17.5%, 8 of the 40 rat sera were determined SV positive by AlphaLISA, and the positive rate was 20.0%, the AlphaLISA positive serum was confirmed by IFA. **Conclusions** We preliminary established the Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay (AlphaLISA) for the detection of Sendai virus. The sensitivity of the method is comparable to classical ELISA method, but this method use less serum samples and without washing steps. The method has

[基金项目] 协和青年基金和中央高校基本科研业务费专项资金资助(3332013042;33320140015)。

[作者简介] 常慧(1988-),女,硕士,E-mail: changhai9012@163.com。

[通讯作者] 向志光,E-mail: xiangzg@cnilas.org;魏强,E-mail: weiqiang0430@sohu.com。

some advantages in degeneracy and accuracy.

【Key words】 Sendai virus; AlphaLISA

仙台病毒(sendai virus, SV)是啮齿类实验动物常见的感染性病原体,对实验动物自身有一定危害^[1],同时干扰动物实验研究^[2]。因此在国内外的实验动物繁殖和使用机构,仙台病毒是啮齿类等实验动物的必需排查的病毒^[3-4]。

目前,国内外对于仙台病毒的检测多采用血清学的检测方法,包括间接免疫荧光(IFA)、酶联免疫吸附试验(ELISA)以及多通道荧光免疫分析(multiplexed flurometric immune assay, MFIA)等方法。然而这些方法仍存在问题:仙台病毒天然抗原存在与其他病原体的交叉抗原,影响了检测技术的特异性^[5];荧光检测受到激发荧光背景值的影响,影响其特异性和敏感性;在现有的固相免疫和MFIA等方法中均存在多次洗涤步骤,增加了检测体系的不确定性。

与仙台病毒全病毒颗粒相比,多肽抗原的敏感性堪比ELISA检测方法,其特异性更好,是仙台病毒检测较好的线性抗原^[8]。

光激化学发光免疫分析技术(amplified luminescent proximity homogeneous assay, AlphaLISA)是近年来新近开发的一种基于增强化学发光的均相免疫检测技术,在其检测体系中存在着4类元件:待检样品B;与待检样品可特异结合的已知纯化制品A;供体微珠,标记识别A分子;受体微珠,标记识别B的分子。A与B的特异性识别将供体微珠和受体微珠的距离拉近,用680 nm的激光激发供体微珠产生大量的单线态氧分子,这些分子将能量传递到受体微珠,从而诱导其波长615 nm的发射峰,光信号的强度在一定范围反映反应体系中A、B的特异结合^[6-7]。

本研究利用前期实验筛选出的多肽抗原^[8]初步建立了仙台病毒的光激化学发光免疫分析技术(AlphaLISA)检测方法,在方法的简并性及准确性上有一定优势,为进一步研究仙台病毒检测提供基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

AlphaLISA 样品稀释液, AlphaLISA Streptavidin Donor beads, AlphaLISA anti-Rat IgG Acceptor beads, 384 孔微孔板均购于美国 PerkinElmer 公司,检测仪

为美国 PerkinElmer 的 Enspire 多标记微孔板检测系统。

生物素化仙台病毒多肽参照之前方法制备,并增加生物素化标记^[8]。大鼠阳性血清为仙台病毒免疫血清,大鼠阴性血清为 SPF 大鼠仙台病毒阴性血清。

1.2 实验方法

1.2.1 预实验初步确定抗原和血清稀释度 将 AlphaLISA buffer 稀释至工作浓度,作为样品稀释液,选总体积为 20 μ L。抗原浓度分别为 100 nmol/L, 500 nmol/L 和血清使用浓度 1:100, 1:1000, 供体微珠和受体微珠比例 1:1 进行预实验。

1.2.2 最佳供体微珠和受体微珠比例的确定 用抗原浓度 100 nmol/L, 血清浓度 1:100, 分别用供体受体微珠比例为 4:1, 1:1, 1:2, 1:4 比例进行检测, 分析检测信号值, 确定最适比例。

1.2.3 AlphaLISA 抗原、血清最佳使用浓度的确定 将 AlphaLISA buffer 稀释至工作浓度,作为样品稀释液,选总体积为 20 μ L。为了确定抗原及血清的最佳使用浓度,将抗原稀释终浓度为 0.75 nmol/L, 7.5 nmol/L, 75 nmol/L, 250 nmol/L, 500 nmol/L; 血清终浓度 1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000 稀释, 抗原和血清各 5 μ L, 并作空白对照, 加入 384 孔板中, 同时加入 5 μ L 浓度为 80 μ g/mL, 终浓度为 20 μ g/mL 的受体微珠, 1000 r/min 离心 1 min 后 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min, 避光加入供体微珠 5 μ L, 终浓度为 20 μ g/mL, 1000 r/min 离心 1 min 后 37 $^{\circ}$ C 孵育 60 min 后置于 Enspire 多标记微孔板检测系统上检测信号值。

1.2.4 ELISA 和 IFA 检测方法 大鼠仙台病毒 ELISA 检测方法参见本实验室制备的仙台病毒 ELISA 抗体检测试剂盒检测方法^[10]。IFA 方法采用实验动物国家标准推荐方法^[3-4]。

2 结果

2.1 预实验初步确定抗原和血清稀释度

用抗原浓度 100 nmol/L, 血清浓度 1:100 时阳性对照血清和阴性对照血清信号值比值最高。

2.2 最佳供体微珠和受体微珠比例的确定

在上述预实验条件下, 分别用供体受体微珠比例为 4:1, 1:1, 1:2, 1:4 进行检测, 在供体受体比例为 1:1 时, 阴性血清信号值最低, 且阳性血清与阴性

血清信号值比值最高,最终确定供体受体比例为 1:1 (20 μg/mL:20 μg/mL) (图 1)。

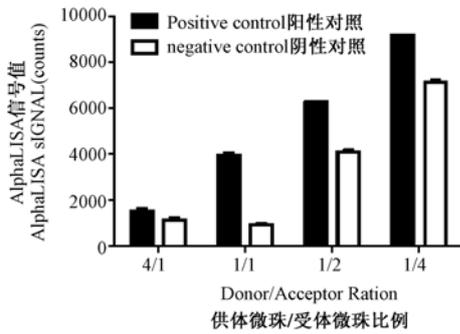
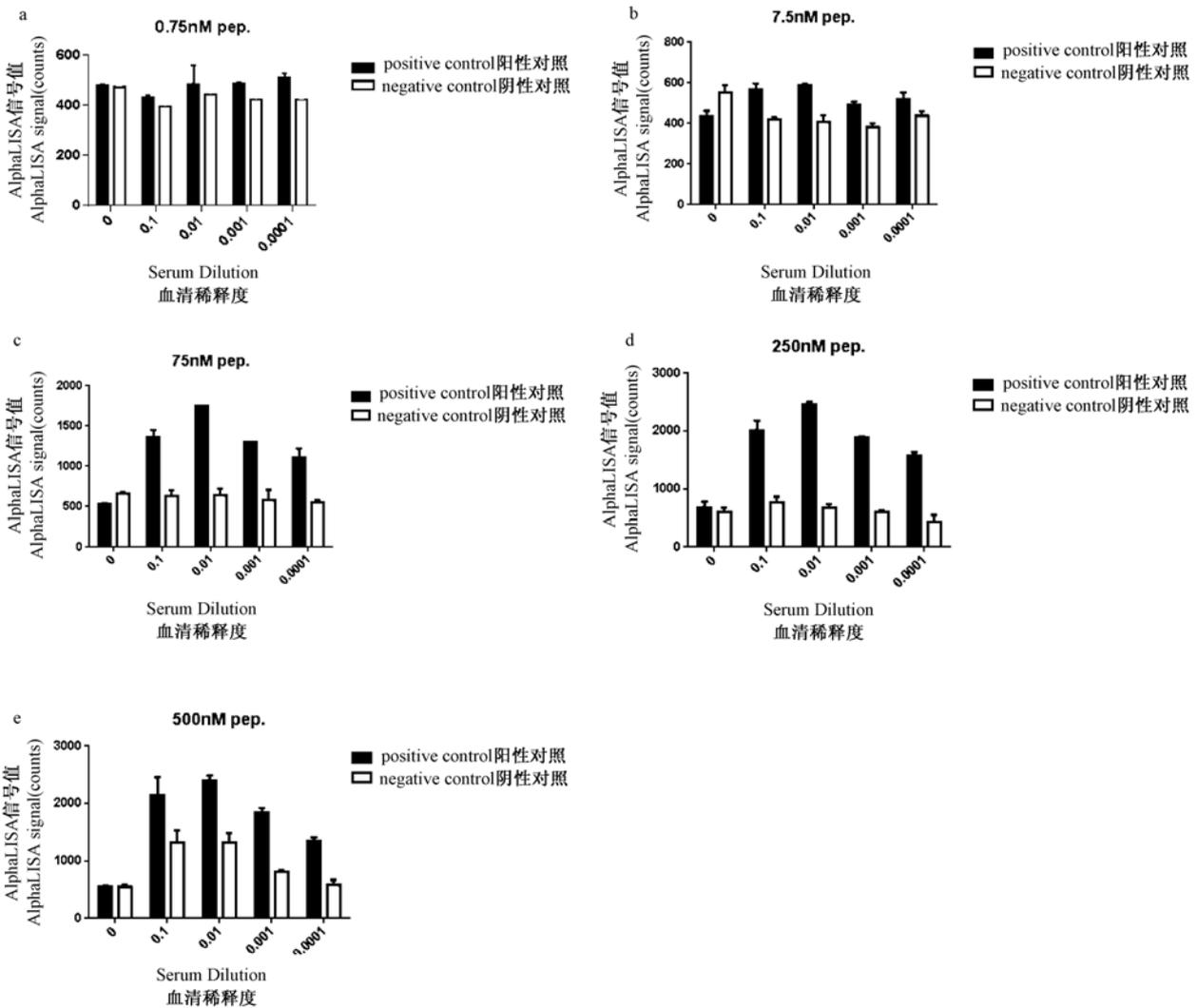


图 1 生物素化仙台病毒多肽 AlphaLISA 供体受体最佳比例的确定

Fig. 1 The optimization of donor/acceptor ratio for SV bio-peptide AlphaLISA assay

2.3 最佳抗原使用浓度和最佳血清使用浓度的确定

将抗原稀释终浓度为 0.75 nmol/L,7.5 nmol/L,75 nmol/L,250 nmol/L,500 nmol/L;血清终浓度 1:10,1:100,1:1000,1:10000 稀释,比较不同浓度时的信号值。结果显示:在抗原浓度为 75 nmol/L 时,抗原与阳性血清具有较好的特异性反应,阴性血清信号值维持在较稳定的水平,且随着抗原终浓度的增加,信号值呈上升趋势,进而优化抗原终浓度为 250 nmol/L,500 nmol/L,在抗原终浓度为 500 nmol/L 时,阴性对照信号值有明显增高,确定抗原用量终浓度为 250 nmol/L,250 nmol/L 时,血清终浓度 1:10,1:100,1:1000,1:10000 稀释时,阳性对照和阴性对照血清信号值比值均在有效范围内,但是为了减少血清用量,选择血清终浓度为 1:10000 进行后续实验。



注:多肽使用浓度为 a. 0.75 nmol/L;b. 7.5 nmol/L;c. 75 nmol/L;d. 250 nmol/L;e. 500 nmol/L。

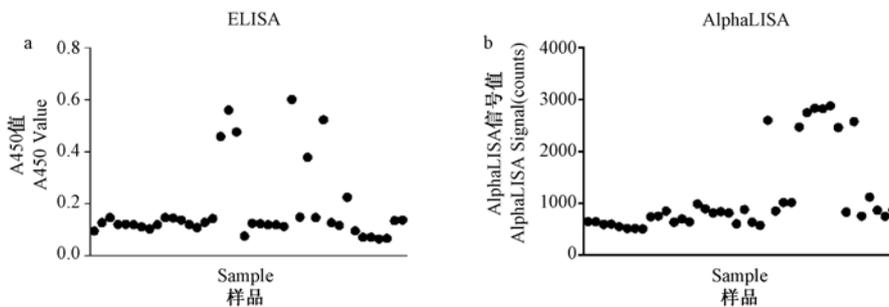
图 2 生物素化仙台病毒多肽 AlphaLISA 最佳抗原和血清使用浓度的确定

Fig. 2 The ptimization of the concentration of antigen and the serum working concentration for SV bio-peptide AlphaLISA assay

2.4 AlphaLISA 方法与 ELISA 检测方法的比较

共检测大鼠血清 40 份, ELISA 检测出阳性血清 7 份, 大鼠样品中检出仙台病毒的阳性率为 17.5%, AlphaLISA 检测中, 以检测值/阴性对照值 ≥ 2.1

判断标准, 检出阳性血清 8 份, 阳性率为 20.0%, ELISA 阳性的 7 份血清经 AlphaLISA 方法检测均为阳性, 如图 3 所示, AlphaLISA 检出的另外一份阳性样品经 IFA 方法验证为阳性。



注: a. ELISA 检测结果; b. AlphaLISA 检测结果。

图 3 ELISA 与 AlphaLISA 检测方法的比较

Fig. 3 The comparison of ELISA and AlphaLISA assay. a. The results of the ELISA assay; b. The results of the AlphaLISA assay

3 讨论

AlphaLISA 技术是一种基于微珠的化学发光的新型均相检测技术, 与目前被广泛使用的传统的 ELISA 技术相比具有更高的精确性、灵敏度、均一性、背景低、无需洗涤、广泛的动态检测范围以及样本需求量极少等优点^[5-7], AlphaLISA 是均相技术, 无洗涤步骤, 操作简单; 长波长激发, 短波长检测, 减低了反应背景; 单体氧信号强, 灵敏度高; 单个微珠可结合 200~300 个抗体, 可进行低亲和力生物分子的检测, 检测动态范围较宽; 反应体系小, 样品用量少。该技术可用于多种组织、细胞来源的生物分子的检测, 如细胞因子、抗原抗体的检测、蛋白相互作用及蛋白质与核酸相互作用的检测以及药物分析等研究。国外已有使用 AlphaLISA 检测炭疽芽胞杆菌的报道^[7]。

与仙台病毒全病毒颗粒相比, 多肽抗原的敏感性堪比 ELISA 检测方法, 其特异性更好, 是仙台病毒检测较好的线性抗原^[8-9,11]。本研究采用生物素化多肽作为抗原, 在对抗原和血清等条件进行优化后, 初步建立了 AlphaLISA 检测技术, 并与 ELISA 检测方法进行了比较研究, 结果显示, 该方法在检测敏感度、简便性上依靠 Alpha 技术特有的均相荧光检测技术较之目前常用的 ELISA 等方法有所提高, 而且减少了血清样本的用量, 不用洗涤等步骤, 和传统方法相比具有一定优势, 为进一步研究仙台病毒检测提供基础。

参考文献:

[1] Brownstein DG, Winkler S. Genetic resistance to lethal Sendai virus pneumonia; virus replication and interferon production in C57BL/6J and DBA/2J mice[J]. Lab Anim Sci. 1986;36(2):

126-9.
 [2] Jakab GJ. Interactions between Sendai virus and bacterial pathogens in the murine lung: a reviews[J]. Lab Anim Sci. 1981;31(2):170-7.
 [3] 国家标准: 实验动物 微生物学等级及监测, GB14922.2-2011.
 [4] 国家标准: 实验动物 仙台病毒检测方法, GB/T14926.23-2001.
 [5] Ito Y, Tsurudome M, Hishiyama M, et al. Immunological interrelationships among human and non-human paramyxoviruses revealed by immunoprecipitation. [J]. J Gen Virol. 1987;68: 1289-97.
 [6] Martina BS. AlphaLISA Immunoassay Platform-The “No-Wash” High-Throughput Alternative to ELISA. Assay and Drug Development Technologies [J]. Assay Drug Dev Technol. 2009; 7: 90-92.
 [7] Adva M, Noam C, Shay W, et al. A novel homogeneous immunoassay for anthrax detection based on the AlphaLISA method; detection of B. anthracis spores and protective antigen (PA) in complex samples. [J]. Anal Bioanal Chem. 2013; 405:3965-3972.
 [8] Xiang Z, Tong W, Li Y, et al. Three unique Sendai virus antigenic peptides screened from nucleocapsid protein by overlapping peptide array[J]. J Virol Methods. 2013;193(2): 348-52.
 [9] Blüthner M, Mahler M, Müller DB. Identification of an alpha-helical epitope region on the PM/Scl-100 autoantigen with structural homology to a region on the heterochromatin p25beta autoantigen using immobilized overlapping synthetic peptides [J]. J Mol Med (Berl). 2000; 78(1): 47-54.
 [10] 向志光, 佟巍, 李雨函, 等. 大鼠仙台病毒 ELISA、间接免疫荧光和免疫印迹三种检测方法的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2013;23(1):23-26.
 [11] Asano A, Torigoe D, Sasaki N. Identification of antigenic peptides derived from B-cell epitopes of nucleocapsid protein of mouse hepatitis virus for serological diagnosis [J]. J Virol Methods. 2011;177:107-11.

[修回日期] 2015-04-08



P2X3 受体在糖尿病神经痛动物模型中的研究进展

魏骏骏, 寿升芸, 何晓芬, 蒋永亮, 方剑乔

(浙江中医药大学第三临床医学院, 杭州 310053)

【摘要】 糖尿病神经痛(diabetic neuropathic pain, DNP)作为临床上最常见的并发症之一,极大地影响了患者的生活质量,目前发病机制尚不明确,缺少有效的治疗方法。DNP与周围感觉神经兴奋性增强有关,涉及多种离子通道、受体表达、功能上调,已有研究表明P2X3受体参与DNP等多种神经病理痛的痛觉形成、传导和调节,本文将围绕DNP模型的建立及P2X3受体在DNP模型中的作用予以综述。

【关键词】 P2X3受体;糖尿病;神经痛;糖尿病神经痛

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015)05-0062-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.015

Progress of animal experimental research on P2X3 receptors in diabetes mellitus

WEI Jun-jun, SHOU Sheng-yun, HE Xiao-fen, JIANG Yong-liang, FANG Jian-qiao

(The Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 Diabetic neuropathic pain(DNP) is one of the most common complications in clinical, which influenced patients' daily functions greatly, without clear mechanisms and effective methods. P2X3 receptors play a pivotal role in the formation, transmission and conduction of pain under neuropathic pain models, associated with peripheral sensory nerve excitability enhancement. This paper focuses on the establishment of DNP models, and the effects of P2X3 receptors in diabetes mellitus.

【Key words】 P2X3 receptors; Diabetes; Neuropathic pain; Diabetic neuropathic pain

据WHO统计,全球目前共有3.47亿人患有糖尿病^[1],糖尿病已是继肿瘤、心脑血管疾病之后第三位威胁人类健康的慢性非传染性疾病。糖尿病神经痛(diabetic neuropathic pain, DNP)是糖尿病最常见的并发症之一,发病率高达32.7%^[2],严重影响患者生存质量。DNP与周围感觉神经兴奋性增强有关,涉及多种离子通道、受体表达、功能上调^[3]。嘌呤受体P2X(purinergic P2X)家族是当前

生物医学研究领域的一个热点。近年来研究表明P2X3受体参与包括DNP多种神经病理痛过程。本文将就P2X3受体在DNP模型中介导疼痛的研究进展予以综述。

1 DNP动物模型

糖尿病神经痛的发病机制尚不明确,目前的治疗方案非常有限并且疗效欠佳。为了探讨DNP的

【基金项目】 国家自然科学基金(81303039);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20133322120001);浙江省博士后基金(BSH1302083);浙江省高校重中之重一级学科(中医学)建设经费(浙教高科[2012]80号)。

【作者简介】 魏骏骏(1990-),女,硕士生,研究方向:针灸镇痛与免疫调节的相关性研究,E-mail: 476275735@qq.com。

【通讯作者】 方剑乔(1961-),男,博士生导师,研究方向:针灸镇痛与免疫调节的相关性研究,E-mail: fangjianqiao7532@163.com。蒋永亮(1981-),男,助理研究员、博士,研究方向:针灸镇痛与免疫调节的相关性研究,E-mail: jy12182@126.com。

发病机制以便于更好指导临床治疗,动物模型已成为研究该疾病重要手段。目前,国内外主要通过 Alloxan 注射法、STZ 注射法、单独高脂高糖饮食法以及高脂高糖饮食联合小剂量 STZ 注射法建立 DNP 模型。DNP 模型分为 1 型 DNP 模型(胰岛素依赖型)和 2 型 DNP 模型(非胰岛素依赖型)。

1.1 1 型 DNP 动物模型建立及其病理变化

1.1.1 Alloxan 诱导模型

四氧嘧啶(alloxan, ALX)是一种核酸及其衍生物,其原理是选择性地损伤胰岛素 β 细胞,使 β 细胞分泌胰岛素的功能减弱,因此 ALX 诱导的动物糖尿病模型近似于人类的 1 型糖尿病。其造模方式一般为腹腔或尾静脉注射。

研究发现单次^[4]注射 ALX 或多次^[5]注射 ALX,模型组分别于第 8 周、第 6 周痛阈下降;Jianbo L 等^[6]使用 ALX 发现 2 月后感觉神经传导速度(sensory nerve conduction velocity, SNCV)降低,皆表示 DNP 模型造模成功。而杨明华等^[7]使用尾静脉注射 ALX,发现 ALX 诱导模型血糖波动起伏较大,会增加实验结果假阴性或假阳性的几率。同时,由于 ALX 对胰岛细胞有很强的选择性杀伤作用^[8],因此目前使用 ALX 制备的 DNP 模型较少。

1.1.2 STZ 诱导模型

链脲佐菌素(streptozotocin, STZ)是一种氨基葡萄糖-亚硝基脲,其作用原理是通过破坏 β 细胞 DNA 从而使胰腺减少胰岛素分泌^[9]。STZ 诱导的糖尿病模型相对简单,通过腹腔或尾静脉一次性注射 STZ 即可。因此,STZ 诱导的糖尿病大鼠模型广泛用于研究糖尿病神经病理痛的机制与治疗方法。

不同剂量的 STZ 引起胰腺中 β 细胞不同程度的损伤。文献中报道 STZ 注射量从 35 mg/kg 到 200 mg/kg 不等^[10]。目前认为小剂量(40 mg/kg 以下)STZ 引发胰岛 β 细胞凋亡,大剂量(50 mg/kg 以上)则引起胰岛 β 细胞坏死^[11]。单用 STZ 注射的动物模型与人类 1 型糖尿病(胰岛素依赖性)相似。已有研究表明 STZ 注射 72 h 后,大多数大鼠出现高血糖,胰岛素分泌下降以及葡萄糖耐受下降^[12]。研究发现 STZ 注射后 4.5 周,大鼠痛阈下降, DNP 模型建立成功^[13]。

糖尿病周围神经病变(diabetic peripheral neuropathy, DPN)具有多灶性轴突缺失的特征^[14]。光镜观察 1 型 DNP 大鼠坐骨神经纤维排列异常,多处变性及断裂,有髓神经纤维密度分布不均匀且显

著减少,髓鞘细胞肿胀坏死,有脱髓鞘现象^[15]。这些形态学改变伴随着神经内膜微血管病变,血栓形成、血管周围基底膜增厚以及外周细胞退化。

1.2 2 型 DNP 动物模型建立及其病理变化

1.2.1 高脂饮食模型

在饮食引起的糖尿病模型中,大鼠或小鼠引起的糖尿病均与肥胖密切相关。因为营养过盛,其表现与人类代谢综合症相似。其中沙鼠、栉鼠、非洲刺毛鼠是其中 2 型糖尿病模型的常用鼠种^[16]。C57BL/6 J 小鼠只用简单的喂养高脂饮食(热量为 45%~60%^[17-18])即可,此型的特点为持续肥胖,胰岛素抵抗,高胰岛素血症及血清总胆固醇水平增高。嗜沙肥鼠需喂养高能量饮食^[19],此型的特点为食欲过盛,肥胖,葡萄糖耐受不良及高胰岛素血症,最终引起 β 细胞退化甚至坏死,胰岛素减少;缺点为过度的高热量饮食及酮症的产生而引起死亡。

饮食导致的糖尿病动物模型也用于研究糖尿病神经病理痛。已有研究表明,高脂饮食小鼠表现为神经传导速度降低,小感觉神经纤维神经病变^[18]。这种方法主要局限于制备需要长期的喂养(16 周^[17]、34 周^[18])。

1.2.2 高脂高糖饮食结合 STZ 诱导模型

用高脂高糖喂养结合 STZ 建立的实验性 2 型糖尿病大鼠模型,具有超重、糖耐量减退、血脂升高、血清胰岛素水平升高及胰岛素受体结合力降低的特点,与临床上 2 型糖尿病的特征十分相似。一般采用高热量饮食 1 个月可诱导出胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)^[11]。大量的文献表明高脂饮食联合运用 STZ 注射建立糖尿病模型的方法具有明显优势,通过这种方法,可以更快速地建立糖尿病模型。目前有许多高脂饮食和 STZ 剂量的联合方案。

研究发现使用高脂饮食结合低剂量 STZ 注射(30%、15 mg/kg)^[20],需大量时间才能建立糖尿病模型;而低热量饮食喂养及高剂量 STZ 注射(7%、65 mg/kg),只需相对较少的的时间^[21]。Dang JK 等^[22]成功建立大鼠糖尿病模型后,于第 2 周检测机械痛阈及热痛阈皆下降,表明 DNP 模型成功;而胡明财等^[23]以坐骨神经病变作为 DNP 模型成功标准。

文献报道 STZ 诱导的大鼠末梢轴突变性与人类 DPN 病变相符^[24]。目前发现在 STZ 注射后不久,2 型 DNP 模型在病理上表现为轴突萎缩,退化

及缺失^[24];电镜下 DPN 组神经纤维髓鞘高度增厚,板层厚薄不一,呈波浪状或梅花状,毛细血管内皮肿胀增生^[25]。但这些病理改变在所有模型中并不保持一致。

2 P2X3 受体在实验性 DNP 中的作用

2.1 P2X3 受体

P2X3 受体为非选择性配体门控阳离子通道,在 CCI (chronic constriction injury)^[26]、炎性痛^[27]等模型的痛信号生成、传播中起重要作用,已成为疼痛领域中新的研究方向。

P2X3 受体主要分布于一些交感神经元、感觉神经元和孤束核^[28],以中、小型神经节细胞为主^[29],在细胞核上无明显表达,较少在大神经元与外周神经纤维上表达^[30]。P2X3 受体选择性表达于伤害感受器^[31],30%~40% P2X3 受体表达于皮肤和内脏的 DRG 神经元,只有 2% 表达于骨骼肌的 DRG 神经元^[32]。同时,P2X3 受体也表达于中枢神经系统,特别是背外侧 PAG^[33]。文献报道 P2X3 受体与凝集素 IB4、TRPV1、GDNF 或 SP 等都有共同表达^[34],并且 P2X3 受体表达上调或者活性增强时疼痛加重,表达下降或者脱敏时疼痛会相应减轻^[35],证明它是进行性疼痛的重要受体。

已有研究发现 P2X3 受体在疼痛信号传导,调节神经元兴奋性,引起伤害感觉神经元病理痛^[36]中起重要作用,P2X3 受体能够与胞外 ATP(一种主要的疼痛信号传递器^[37])选择性结合^[38],被 ATP 激活后可允许 Na⁺、K⁺、Ca²⁺ 离子通过^[39]。研究证实组织损伤后 ATP 从多种细胞中释放,作用于临近细胞的嘌呤受体^[40]。ATP 诱发 P2X3 受体去极化^[41],感觉信息从外周传导到脊髓背角^[42]。炎症或神经损伤时,P2X3 受体对 ATP 或其激动剂 α 、 β -methylene ATP (α 、 β -meATP) 起反应,产生剧烈的疼痛反应行为^[43]。P2X3 受体在机体疼痛时显著表达于 DRG 神经元^[3],并选择性地表达于初级传入感觉神经元如三叉神经节 (trigeminal ganglion) 和结状神经节上^[28]。研究证明在炎性或神经损伤的大鼠分离出的 DRG 神经元中,P2X3 受体介导的 ATP 电流增强^[44]。而敲除小鼠的 P2X3 受体后,小鼠丧失了对甲醛或 ATP 的疼痛反应,证明 ATP 激活 P2X3 受体参与组织的伤害性反应^[45]。

2.2 P2X3 受体在 DNP 中的作用

糖尿病大鼠的外周信号传导通路包括 ATP 和

嘌呤受体^[3,46]。研究发现 DNP 模型中,P2X3 受体在 DRG 神经元、脊髓背角和皮肤中都表达增多^[47]。Xing J 等^[48]发现在 STZ 诱导的糖尿病模型中,PAG P2X3 受体膜蛋白表达的下调可能损伤痛觉调控系统的下行抑制通路从而产生 DNP。P2X3 受体 mRNA 和蛋白水平在外周传入神经表达上调,并且 P2X3 受体拮抗剂抑制其机械痛超敏现象^[3,46]。Xiao Z 等^[33]发现大鼠背外侧 PAG 显微镜下注射 α 、 β -meATP 后,对照组和 STZ 组机械痛皆上升,STZ 组上升幅度、背外侧 PAG 上 P2X3 受体膜蛋白表达皆较对照组少,表明在 PAG 侧面注入 α 、 β -meATP 可引起镇痛效应。Migita K 等^[46]证明在 DNP 中,DRG 神经元中 P2X3 受体 mRNA 表达上升,而 P2X3 受体抑制剂阻滞了 STZ 诱导模型的触觉痛,表明 P2X3 受体在 DNP 中起了关键作用。Shi L 等^[49]发现在大鼠 DRG 神经元 P2X3 受体总蛋白表达虽未改变,但膜蛋白表达显著增高,表明 P2X3 受体在糖尿病神经病变情况下从胞质向胞膜转移。虽然在糖尿病模型中,DRG 神经元 P2X3 受体转移机制仍不明确,但 Xu GY^[50]发现电刺激钙/钙调素依赖性蛋白激酶 II (calcium/calmodulin-dependent protein kinase II, CaMKII) 可促使 P2X3 受体膜蛋白的表达。以上研究表明 P2X3 受体在 DNP 中外周 DRG 神经元表达增加,发挥致痛效应;在中枢 PAG 表达却减少,起镇痛作用。

3 总结

DNP 模型的制备成功率取决于动物对 STZ 的敏感性^[17],因此制备 DNP 模型需根据动物种属、年龄、体重及成模时间等不同情况而定。P2X3 受体在介导 DNP 中起着重要作用,进一步了解 P2X3 受体在 DNP 模型中发挥的作用与机制,有助于 P2X3 受体信号传导通路成为治疗 DNP 新的潜在靶点。

参考文献:

- [1] World Health Organization. Fact sheet N° 312. Available from <http://www.who.int>. Accessed 13 January 2013.
- [2] Candrilli SD, Davis KL, Kan HJ, *et al.* Prevalence and the associated burden of illness of symptoms of diabetic peripheral neuropathy and diabetic retinopathy [J]. J Diabetes Complications, 2007, 21(5): 306-314.
- [3] Xu GY, Li G, Liu N, *et al.* Mechanisms underlying purinergic P2X3 receptor-mediated mechanical allodynia induced in diabetic rats[J]. Mol Pain, 2011, 7: 60.
- [4] RaafatK, Aboul-ElaM, El-LakanyaA. Alloxan-induced diabetic

- thermal hyperalgesia, prophylaxis and phytotherapeutic effects of *Rheum ribes* L. in mouse model[J]. Arch Pharm Res, 2014.
- [5] RaafatK, SamyW. Amelioration of Diabetes and Painful Diabetic Neuropathy by Punicagranatum L. Extract and Its Spray Dried BiopolymericDispersions[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2014, 2014:180495.
- [6] Jianbo L, Chengya W, Jiawei C, *et al.* The role of IGF-1 gene expression abnormality in pathogenesis of diabetic peripheral neuropathy[J]. Chin Med Sci J, 2002, 17(4): 204-209.
- [7] 杨明华,柴可夫,杨苏蓓. 四氧嘧啶致糖尿病大鼠模型血糖稳定性考察[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 08:482-484.
- [8] KangJ, Dai XS, Yu TB, *et al.* Glycogen accumulation in renal tubules, a key morphological change in the diabetic rat kidney [J]. ActaDiabetol, 2005, 42(2): 110-116.
- [9] Lenzen S. The mechanisms of allxan- and streptozotcin-induced diabetes[J]. Diabetologia, 2008, 51: 216-226.
- [10] Jafarnejad A, Bathaie SZ, Nakhjavani M, *et al.* Effect of spermine on lipid profile and HDL functionality in the streptozotocin-induced diabetic rat mode [J]. Life Sci 2008, 82, 301-307.
- [11] 胡玉焕,宁亚功,肖燕. 高热量饮食联合链脲佐菌素建立 2 型糖尿病大鼠模型的影响因素[J]. 江西中医学院学报, 2013, 01:70-73.
- [12] 党江坤,吴艳,曹红,等. II 型糖尿病神经病理性痛大鼠模型的建立[J]. 中国疼痛医学杂志, 2012, 04:234-237.
- [13] Gao F, Zheng ZM. Animal models of diabetic neuropathic pain [J]. Exp Clin Endocrinol Diabetes, 2014, 122(2): 100-106.
- [14] Jolivald CG, Jiang Y, Freshwater JD, *et al.* Dynorphin A, kappa opioid receptors and the antinociceptive efficacy of asimadoline in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Diabetologia, 2006, 49(11): 2775-2785.
- [15] Hernandez - Fonseca JP, Rincon J, Pedreanez A, *et al.* Structural and ultrastructural analysis of cerebral cortex, cerebellum, and hypothalamus from diabetic rats. Exp Diabetes Res, 2009, 2009: 329632.
- [16] Shafirir E. Diabetes in animals: Contribution to the understanding of diabetes by study of its etiopathology in animal models[J]. Diabetes mellitus, 2003, 231-255.
- [17] ObrosovaIG, Ilnytska O, Lyzogubov VV, *et al.* High-fat diet induced neuropathy of pre-diabetes and obesity: effects of "healthy" diet and aldose reductaseinhibition [J]. Diabetes, 2007, 56(10): 2598-1608.
- [18] VincentAM, Hayes JM, McLean LL, *et al.* Dyslipidemia-induced neuropathy in mice: the role of oxLDL/LOX-1 [J]. Diabetes, 2009, 58(10): 2376-2385.
- [19] Shafirir E, Ziv E, Mosthaf L. Nutritionally induced insulin resistance and receptor defect leading to beta-cell failure in animal models[J]. Ann NY AcadSci, 1999, 892:223-246.
- [20] Zhang F, Ye C, Li G, *et al.* The rat model of type 2 diabetic mellitus and its glycometabolismcharacters[J]. ExpAnim, 2003, 52:401-407.
- [21] Islam MS, Choi H. Nongenetic model of type 2 diabetes: a comparative study[J]. Pharmacology, 2007, 79: 243-249.
- [22] Dang JK, Wu Y, Cao H, *et al.* Establishment of a rat model of type II diabetic neuropathic pain[J]. Pain Med, 2014, 15(4): 637-646.
- [23] 胡明财,何建华,章卓,等. 六味地黄丸对 2 型糖尿病大鼠周围神经病变的影响[J]. Chinese Journal of New Drug, 2014, 23(3): 351-354.
- [24] Hoke A. Animal models of peripheral neuropathies [J]. Neurotherapeutics, 2012, 9(2): 262-269.
- [25] 殷娟,张明红,杨红英. 2 型糖尿病大鼠周围神经病变模型的建立及相关指标检测[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 01:1-2+5.
- [26] 许锦秀,马克涛,李思源. P2X 受体在 CCI 模型中介导疼痛的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2010, 14:2778-2780.
- [27] Di VirgilioF. P2X Receptors and Inflammation [J]. Curr Med Chem, 2015, 22(7): 866-877.
- [28] 赵聪,余剑波. P2X3 受体在神经病理性疼痛中的作用[J]. 中华临床医师杂志, 2011, 5:7056-7070.
- [29] Burnstock G. Acupuncture: a novel hypothesis for the involvement of purinergic signalling[J]. Med Hypotheses, 2009, 73(4): 470-472.
- [30] Tu WZ, Cheng RD, Cheng B, *et al.* Analgesic effect of electroacupuncture on chronic neuropathic pain mediated by P2X3 receptors in rat dorsal root ganglion neurons [J]. NeurochemInt, 2012, 60(4): 379-386.
- [31] Kobayashi K, Fukuoka T, Yamanaka H, *et al.* Differential expression patterns of mRNAs for P2X receptor subunits in neurochemically characterized dorsal root ganglion neurons in the rat[J]. J. Comp. Neurol, 2005, 481: 377-390.
- [32] Aoki Y, Takahashi Y, Ohtori S, *et al.* Distribution and immunocytochemical characterization of dorsal root ganglion neurons innervating the lumbar intervertebral disc in rats: a review[J]. Life Sci, 2004, 74(21): 2627-2642.
- [33] Xiao Z, Ou S, He WJ, *et al.* Role of midbrain periaqueductal gray P2X3 receptors in electroacupuncture-mediated endogenous pain modulatory systems[J]. Brain Res, 2010, 1330:31-44.
- [34] 赵浩,余庆,刘曾旭. P2X 受体介导的神经病理痛的研究进展 [J]. 南昌大学学报(医学版), 2013, 04:90-91+95.
- [35] Mo G, Peleshok JC, Cao CQ, *et al.* Control of P2X3 channel function by metabotropic P2Y2 utp receptors in primary sensory neurons[J]. MolPharmacol, 2013, 83(3): 640-647.
- [36] North RA, Verkhratsky A. Purinergic transmission in the central nervous system[J]. Pflugers Arch, 2006, 452:479-485.
- [37] North RA. The P2X3 subunit: a molecular target in pain therapeutics[J]. Curr Opin Investig Drugs, 2003, 4:833-840.
- [38] Fabbretti E, D'Arco M, Fabbro A, *et al.* Delayed upregulation of ATP P2X3 receptors of trigeminal sensory neurons by calcitonin gene-related peptide [J]. J Neurosci, 2006, 26(23): 6163-6171.
- [39] 张琪,谭颖颖. 低频电针刺对慢性痛大鼠背根神经节 P2X3 受体表达的影响[J]. 陕西中医学院学报, 2011, 34:74-75.

- [40] Wang S, Dai Y, Kobayashi K, *et al.* Potentiation of the P2X3 ATP receptor by PAR - 2 in rat dorsal root ganglia neurons, through protein kinase-dependent mechanisms, contributes to inflammatory pain[J]. *Eur J Neurosci*, 2012, 36 (3): 2293 - 2301.
- [41] Mo G, Grant R, O'Donnell D, *et al.* Neuropathic Nav1.3 - mediated sensitization to P2X activation is regulated by protein kinase C[J]. *Mol Pain*, 2011, 7:14.
- [42] Engelman HS, MacDermott AB. Presynaptic ionotropic receptors and control of transmitter release[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2004, 5:135 - 145.
- [43] Chen Y, Li GW, Wang C, *et al.* Mechanisms underlying enhanced P2X receptor-mediated responses in the neuropathic pain state[J]. *Pain*, 2005, 119: 38 - 48.
- [44] Wang C, Gu Y, Li GW, *et al.* A critical role of the cAMP sensor Epac in switching protein kinase signalling in prostaglandin E2 - induced potentiation of P2X3 receptor currents in inflamed rats [J]. *J Physiol*, 2007, 584(Pt 1):191 - 203.
- [45] 刘安东,雷洁,王元银,等. 三叉神经痛和 P₂X 受体的研究进展[J]. *国际口腔医学杂志*, 2010, 02:174 - 177.
- [46] Migita K, Moriyam T, Koguchi M, *et al.* Modulation of P2X receptors in dorsal root ganglion neurons of streptozotocin-induced diabetic neuropathy[J]. *NeurosciLett*, 2009, 452:200 - 203.
- [47] 崔媛媛,吴黄辉,王兰,等. 糖尿病机械性痛模型大鼠 P2X3 受体的时空表达[J]. *解剖学报*, 2014, 04:540 - 544.
- [48] Xing J, Lu J, Li J. Purinergic P2X receptors presynaptically increase glutamatergic synaptic transmission in dorsolateral periaqueductal gray[J]. *Brain Res*, 2008, 1208:46 - 55.
- [49] Shi L, Zhang HH, Hu J, *et al.* Purinergic P2X receptors and diabetic neuropathic pain[J]. *Sheng Li XueBao*, 2012, 64(5): 531 - 542.
- [50] Xu GY, Huang LY. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase ii potentiates ATP responses by promoting trafficking of P2X receptors [J]. *ProcNatlAcadSci*, 2004, 101 (32): 11868 - 11873.

[修回日期]2015 - 04 - 03



2014年北京地区啮齿类实验动物质量的病理学评价

李超,董浩迪,徐琳凯,王春雨,宋志琦,刘春法,李超斯,岳瑞超,程广宇,
赵化佳,赵德明,尹晓敏,周向梅,杨利峰

(中国农业大学动物医学院/国家动物海绵状脑病实验室,北京 100193)

【摘要】目的 从病理学角度评价啮齿类实验动物的健康情况,为实验动物标准化饲养提供建议,确保相关科研结果的准确性。**方法** 本文主要对2014年10月北京市15家实验动物单位的啮齿类实验动物病理学抽检情况进行统计分析。采集啮齿类实验动物的心、肝、脾、肺、肾、大肠和小肠后经甲醛钙液固定,通过石蜡切片HE染色、PAS染色、冰冻切片油红O染色后于显微镜下观察。**结果** 实验动物总体合格,但个别单位仍然存在问题。检出病变器官主要是肝脏和肺脏,肝脏病变检出率小鼠为6%,大鼠为2.5%,豚鼠为8.2%,地鼠未检出,肝脏病变表现为细胞肿胀,且经特殊染色确证部分为脂肪变性;肺脏病变检出率豚鼠为15.5%,其余未检出,肺脏病变表现为淤血、渗出及间质性肺炎。**结论** 实验动物病理学检测基本健康,肝脏出现损伤可能与饲料有关;而肺脏病变可能与垫料及空气有关,而秋冬季雾霾及低温可能对实验动物健康有所影响。

【关键词】 啮齿类实验动物;病理学诊断;器官病变;油红-O染色;PAS染色

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015)05-0067-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.016

Assessing the quality of rodent laboratory animals in Beijing area by pathological diagnosis in October 2014

LI Chao, DONG Hao-di, XU Lin-kai, WANG Chun-yu, SONG Zhi-qi, LIU Chun-fa, LI Chao-si, YUE Rui-chao,
CHENG Guang-yu, ZHAO Hua-jia, ZAO De-ming, YIN Xiao-min, ZHOU Xiang-mei, YANG Li-feng
(Veterinary Medicine, China Agricultural University / National Animal TSE Laboratory, Beijing 100193, China)

【Abstract】 Objective To assess the health status of rodent laboratory animals by pathological diagnosis, our lab has been taking part in investigating the quality of laboratory animals in Beijing area for years and offer some advices for standardized breeding to ensure accurate results of scientific research. This paper focuses on the analysis of laboratory rodent samples that collected in October 2014. **Methods** We collected the heart, liver, spleen, lung, kidney, large intestine and small intestine, and put these organs into 10% Calcium formaldehyde solution for fixation, and then prepared into two different sections for optical microscopy observation including all paraffin specimens stained with H&E and the frozen sections stained with Oil Red-O and PAS. **Results** The vast majority of laboratory rodents were up to standard, but there still a problem in individual units. The main problem is liver and lung disease. The rate of Hepatocyte swelling is 6% (mouse), 2.5% (rat), 8.2% (guinea pig), moreover part of them were lipodosis, according to Oil Red-O stain. The mainly problem of lung is congestion, edema and Interstitial pneumonia, the detectable rate of pulmonary diseases is 15.5% (guinea pig). **Conclusions** The vast majority of laboratory rodents were pathologically diagnosed as healthy animals. The

【基金项目】 国家科技支撑计划(2011BAI15B01)。

【作者简介】 李超(1990-),女,硕士生,研究方向:动物医学病理诊断方面研究,Email:924313054@qq.com。

【通讯作者】 杨利峰,副教授,研究方向:动物病理学及 Prion 疾病致病机制研究,Email:yanglf@cau.edu.cn。

liver disease may be caused by improper feeding. And disease of lung may led by haze, unqualified bedding and low temperature.

【Key words】 Laboratory rodents; Pathological diagnosis; Organ diseases; Oil red-ostain; PAS stain

实验动物的标准化对动物实验研究结果的敏感性、准确性及可重复性具有重要影响。北京市实验动物管理条例规定从事实验动物繁育工作的单位,应当根据相关标准,定期进行质量检测。

本实验室历年承担北京市实验动物质量抽查中的病理学检查任务,本文就 2014 年 10 月北京市 15 家实验动物单位的啮齿类实验动物健康状况进行统计分析。结果显示啮齿类实验动物质量总体合格,但个别单位仍然存在问题,主要病变器官是肝脏和肺脏。分析肝脏出现损伤可能与饲料和垫料有关,而肺脏病变反映饲养环境有待改善。环境条件可影响实验动物的质量,环境控制程度越高,在该环境中的实验动物标准化越高,实验结果就更趋于稳定一致^[4]。

1 材料和方法

1.1 实验动物

由中国食品药品检定研究院从北京市 15 家实验动物单位包括北京沙河通利实验动物养殖场【SCXK(京)2013-0007】、斯贝福(北京)实验动物科技有限公司【SCXK(京)2014-0006】、北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2014-0008】、北京天坛生物制品股份有限公司【SCXK(京)2014-0005】、中国食品药品检定研究院【SCXK(京)2014-0013】、北京昌扬西山动物养殖场【SCXK(京)2011-0010】、北大医学部实验动物部【SCXK(京)2011-0001】、北京科宇动物养殖中心【SCXK(京)2012-0004】、北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司【SCXK(京)2010-0001】、北京市海淀区兴隆实验动物养殖厂【SCXK(京)2011-0006】、维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-0001】、北京芳元缘养殖场【SCXK(京)2014-0012】、北京海科祥瑞实验动物养殖场【SCXK(京)2011-0009】、北京隆安实验动物养殖中心【SCXK(京)2014-0003】及北京富龙腾飞养殖中心【SCXK(京)2013-0004】抽取不同品系的小鼠(BALB/c、KM、C57、裸鼠、NIH、ICR)、大鼠(Wistar、SD、Lewis)和豚鼠三种啮齿类实验动物进行检测,实验动物均为 4~6 周龄(表 1)。采样工作在中国食品药品检定研究院【SYXK(京)2011-0037】动物

实验设施内进行,制片及诊断在中国农业大学【SYXK(京)2013-0013】国家动物性海绵状脑病实验室进行,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

表 1 2014 年 10 月啮齿类实验动物采样情况

Tab. 1 Classification of samples of laboratory rodents in October 2014

种类 Species	SPF 级/只 SPF	清洁级/只 Clean grade	普通级/只 Conventional grade	总数/只 Sum
小鼠 Mice	30	60	0	90
大鼠 Rats	20	20	0	40
豚鼠 Guinea pigs	0	20	90	110
地鼠 Hamsters	0	10	0	10
合计 Sum	50	110	90	250

1.2 实验方法

1.2.1 组织切片的制备和观察

CO₂ 窒息处死动物,采集动物的心脏、肺脏、肝脏、脾脏、肾脏、小肠和大肠,用甲醛钙液(10% 甲醛 + 1% 氯化钙)固定。按照常规方法制作石蜡切片,HE 染色,OLYMPAS U-SRG 数码显微镜采图并观察。

1.2.2 肝脏油红 O 染色

对于在 HE 染色下观察疑似为脂肪变性的样品肝脏,抽取部分进行脂肪的油红 O 染色。具体步骤为:

- 1) 组织块用甲醛钙液(10% 甲醛 + 1% 氯化钙)固定一周,并于采样后第二天换液;
- 2) 制作肝组织冰冻切片,厚约 10 μm;
- 3) 用油红 O(5%) 乙醇溶液染色约 8 min;
- 4) 用 50% 乙醇分化约 30 s,自来水终止分化;
- 5) 苏木素复染核约 1 min,自来水轻柔冲洗返蓝约 10 min;
- 6) 甘油明胶封片,最后显微镜观察。

1.2.3 肝脏 PAS 染色

同时取做油红 O 染色相同病例的肝组织做糖原的 PAS 染色。具体步骤为:

- 1) 甲醛钙液固定组织块一周,并于采样后第 2 天换液;
- 2) 制作组织石蜡切片;
- 3) 切片于梯度酒精中下行脱腊至水;
- 4) 高碘酸液氧化 5 min,蒸馏水洗 2 次;
- 5) 切片置于密封 Schiff 氏试剂中于 37℃ 温箱里

染色 30 min;

6) 蒸馏水洗 2 次后, 苏木素复染 10 min;

7) 0.5% 盐酸酒精分化约 10 s, 自来水冲洗;

8) 经 95% 酒精及无水乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片观察。

2 结果(彩图见封 3)

2.1 实验鼠的肝脏病理学变化及统计

2.1.1 镜下病变

本次调查表明, 肝脏以细胞肿胀变性为主, 与正常对照(图 1A) 比较, 病变样本镜下可见肝索结构紊乱, 肝细胞体积变大, 内有大小不等、数量不等的空泡, 肝细胞核深蓝染, 大小不一, 可清楚地观察到枯否氏细胞和少量的新生细胞, 肝血窦内有大量红细胞(图 1B)。对肝细胞肿胀样本进行油红 O 染色, 阳性可见蓝染肝细胞轮廓及细胞核, 胞质中可见大量大小不一的圆形红色脂滴(图 1C)。病变肝脏同时进行 PAS 染色可见阳性样本肝细胞胞浆部分呈紫红色即是糖原物质沉着的区域, 与未着色部分的淡粉色形成明显对比, 胞核呈深红着色(图 1D)。

2.1.2 病变样本统计

结果显示 100 例小鼠样本中, HE 染色肝细胞肿胀有 11 例, 其中轻度变性 5 例, 中度 6 例, 病变率为 6%。油红 O 染色未检出脂肪变性, PAS 染色确证其中 4 例为糖元沉积, 特殊染色均呈阴性的细胞肿胀病例, 可能是动物死后血管渗透性增大, 血管中血浆成分渗入细胞中所造成; 大鼠肝细胞肿胀变性程度总体轻微, 40 例大鼠样本中, HE 染色肝细胞肿胀有 1 例, 病变率 2.5%。并由 PAS 染色确证为糖原沉积; 豚鼠肝细胞肿胀变性病例相对较多, 程度较严重, 110 例豚鼠样本中, HE 染色细胞肿胀有 21 例, 轻度 12 例, 中度 9 例, 病变率为 8.2%。其中确证 7 例为脂肪变性, 8 例为糖元沉积, 剩余 6 例可能由于死后血管通透性增大, 血液成分渗出所致; 10 例地鼠样本肝脏均未见明显病变。

2.2 实验鼠的肺脏病理学变化及统计

2.2.1 镜下变化

肺脏病变主要以淤血、渗出及间质性肺炎为主, 与正常对照(图 1E) 比较, 病变样本低倍镜下可见肺组织密度增大, 不见特征性肺泡结构, 肺静脉、肺间隔以及肺泡腔内可见大量红细胞, 有的静脉内有大量蛋白样液体, 细支气管上皮脱落, 细支气管

周围间质有深染细胞聚集, 肺泡隔增厚(图 1F); 高倍镜下, 细支气管周深染细胞为淋巴样细胞, 肺间隔内有增生的肺泡上皮细胞、淋巴样细胞, 红细胞位于毛细血管内, 肺泡中有少量红细胞、淋巴样细胞、尘细胞及脱落上皮细胞, 有的红细胞崩解成均质红染团块。

2.2.2 病变样本统计

统计结果显示, 小鼠、地鼠肺脏未见明显异常; 大鼠肺脏以淤血、间质增厚、肺泡腔浆液渗出为主, 但无炎性细胞浸润, 判断为由于处死窒息造成的肺组织结构异常。其中肺脏充血、淤血、肺泡腔浆液渗出可能为窒息处死造成的组织学反应, 而血管淤血可导致轻度的间质增厚; 110 例豚鼠肺脏样本中, 出现 31 例异常病例, 其中 17 例为严重的淤血、间质增厚、肺泡腔浆液渗出, 病变率为 15.5%。

2.3 实验鼠其他器官的病理学变化及统计

2.3.1 心脏病变

豚鼠心脏检出 1 例出血性心肌炎, 表现为急性心外膜出血、心肌出血, 低倍镜下, 心外膜充血、出血, 心外膜增厚, 心肌纤维之间血管破裂出血(图 1G); 高倍镜下, 心肌纤维之间充满红细胞, 同时有少量炎性细胞浸润。可能与死前挣扎有关, 由于窒息缺氧使血管通透性增加; 肾上腺素分泌增多, 使小血管、毛细血管内压升高发生破裂。

2.3.2 脾病变

此外大鼠新发现 1 例脾组织含铁血黄素沉着, 镜下可见脾脏红髓内少量出血和含铁血黄素沉着(图 1H), 说明可能存在陈旧性出血, 可能是窒息死亡较慢, 缺氧导致血管通透性增大、脾脏红细胞增多, 血管中红细胞进入组织后被吞噬细胞分解导致。

2.3.3 肾脏病变

大鼠肾脏以肾小管, 集合管官腔中出现均质粉染渗出为主要病变, 但未见炎性细胞浸润, 很可能是由于死后血管通透性升高, 血浆成分渗出而形成(图 1I)。豚鼠肾脏检出 3 例肾淤血、出血及蛋白管型, 可能是由于处死应激造成。

3 讨论

3.1 结论

肝脏病变主要出现于小鼠和豚鼠, 小鼠肝细胞肿胀主要由于糖元沉积造成, 而豚鼠肝细胞脂肪变性和糖元沉积参半。

肺脏病变主要发生于豚鼠, 表现为肺脏淤血、

渗出及间质性肺炎。

全部鼠的小肠、大肠等脏器在镜下无明显病理变化。

综上所述,绝大多数实验用啮齿动物为健康状态,排除由于处死过程造成的组织学病理变化,非健康动物主要以肝脏,肺脏病变为主。但整体上看,各送检单位的实验用鼠各器官病变发生率均在合格范围内,病理学检测基本健康。

3.2 分析

此次检测发现主要病变发生于肝脏和肺脏。

3.2.1 肝脏病变反映的问题

结合实验动物饲养环境级别来看,肝脏病变在所有 100 例普通级实验动物中有 7 例,占 7%,所有 110 清洁级实验动物中有 6 例,占 5.5%,全部 50 例 SPF 级实验动物中有 3 例,占 6%,肝脏病变在三个级别均有发生,且发生率差别极小(均值 6.2%,极差 1%,标准差 0.6)。

通常肝脏病变反映进食情况,而数据显示不论动物级别如何,肝脏均有一定程度病变,说明肝脏损伤可能与饲料有关,而各受检单位均使用目前市场上的成品饲料商品,可见其原料质量及配方有待规范。而饮水来源则根据级别要求使用自来水或高压灭菌自来水,故不排除自来水水质如微生物含量,重金属、消毒剂及农药残留和硬度等对实验动物健康的影响。秋冬季低温同样不容忽视,在低温环境下动物能量代谢加强,需要通过增加采食量来维持热平衡,如果饲料供应不足,同样会引起营养不良和抗病力下降,饲料充足又易造成脂肪沉积,动物患肥胖病,故应注意固定饲喂次数及进食量。

3.2.2 肺脏病变反映的问题

结合实验动物饲养环境级别分析,肺脏病变在全部 100 例普通级有 15 例,占比例较高(15%),在全部 110 例清洁级有 2 例,所占比例较低(1.8%),全部 50 例 SPF 级中无检出病例(0%),可见各级别肺脏病变发生率差异显著(极差 15%,标准差 6),且动物级别越低,肺脏病变越明显。

肺脏病变主要反映饲养环境空气情况。可见普通级动物的空气及垫料有待改善,原因可能有垫料不合格、饲养密度过大、秋冬季雾霾天气及低温影响等。劣质的垫料碎屑及尘埃较多,极易造成异物刺激引发肺部炎症。秋饲养间密度过大、通风不

和饲养员清理不及时,室内的气味(臭味、氨味)浓度就大,空气不洁可诱发气管炎、肺炎等。开放系统很大程度依赖于自然环境空气质量,而北京地区秋季的雾霾严重,空气欠佳,对实验动物肺脏也有所影响。而秋冬季的低温也是动物冻伤、感冒、支气管炎和肺炎等疾病的直接诱因。

对比历年肺脏病变检出率可见(图 2),历年发生率呈波动趋势,且秋季较为高发,几次肺脏病变检出率高峰(2011 年、2013 年)均发生于秋季,更加说明秋冬季雾霾天,空气中可吸入颗粒物密度大,对实验动物肺部病变有不可忽视的影响^[1-2]。

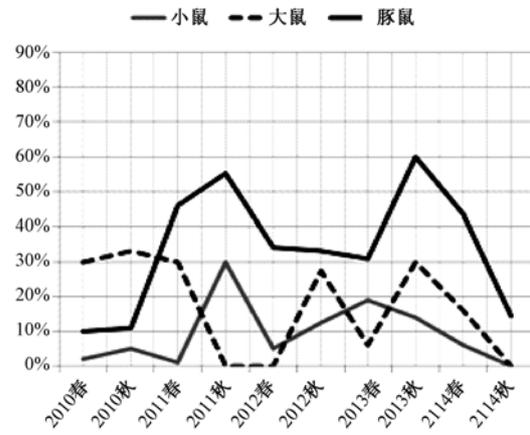


图 2 2010 年春季至 2014 年秋季北京市啮齿类实验动物肺脏病变检出率

Fig. 2 The detectable rate of pulmonary diseases of rodent laboratory animal from 2010 to 2014

参考文献:

- [1] 付永瑶,吕悦,王继宏,等. 北京市大鼠、小鼠、豚鼠的病理学调查[J]. 中国比较医学杂志,2014,24(7):54-56.
- [2] 吕悦,付永瑶,王继宏,等. 2014 年春季北京地区啮齿类实验动物健康状况的病理学调查和分析[J]. 实验动物科学,2014,4:6-10.
- [3] 赵德明,兽医病理学[M]. 第 3 版. 北京:中国农业大学出版社,2013.
- [4] 刘艳,王珑. 浅述实验动物质量控制[J]. 中国公共卫生管理,2011,01:25-27.
- [5] McGavin, M. Donald/Zachary, James F., Ph. D., Pathologic Basis of Veterinary Disease. fourth edition, Elsevier Science Health Science div, 2006-2008.

[修回日期]2015-04-07



华北地区埃博拉病毒莱斯顿亚型的流行病学调查

谷松至, 许黎黎, 鲍琳琳, 姚艳丰, 秦川

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室,
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** 了解华北地区埃博拉病毒莱斯顿亚型的分布和流行情况, 为埃博拉病毒病的防控提供理论依据。**方法** 采集华北地区动物园及养殖场的多种哺乳动物血清, 对其进行埃博拉病毒莱斯顿亚型的检测。**结果** 采集各种哺乳动物血清共 109 份, 经 Real-time PCR 方法检测未检出阳性样品。**结论** 埃博拉病毒尚未在华北地区流行, 应加强对埃博拉病毒病的知识宣传, 并做好安全防护工作。

【关键词】 埃博拉; 埃博拉病毒; 莱斯顿亚型; 流行病学

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0071-03

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 005. 017

Epidemiology investigation for reston subtype of ebola virus in north China area

GU Song-zhi, XU Li-li, BAO Lin-lin, YAO Yan-feng, QIN Chuan

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

【Abstract】 **Objective** To provide a theoretical basis for the prevention of Ebola virus disease, this survey aims to understand the distribution and prevalence status of Reston subtype of Ebola virus in north china area. **Methods** Collecting a variety of mammalian serums from zoos and farms in north china area, and detecting Ebola virus of Reston subtype. **Results** 109 kinds of collected mammalian serums, there were no positive samples detected by the Real-time PCR method. **Conclusion** Ebola virus has not been found in north china area, we should strengthen the publicity of Ebola virus disease, and do well security work.

【Key words】 Ebola; Ebola virus; Reston subtype; Epidemiology

埃博拉病毒病 (ebola virus disease) 又称埃博拉出血热 (ebola hemorrhagic fever), 是由埃博拉病毒 (ebola virus) 引起的一种急性的、高致死率的烈性传染病, 病死率可高达 90%^[1]。埃博拉病毒属丝状病

毒科, 为不分节段的单股负链 RNA 病毒^[2], 被 WHO 列为“生物危害四级”病原。2013 年 3 月, 几内亚首次爆发了有记录以来最严重的一次埃博拉疫情, 并迅速蔓延至利比里亚、塞拉利昂等西非国家^[3]。截

【基金项目】 [基金项目] 国家自然科学基金(31370203); 科技重大专项—艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治(2012ZX10004501-004); 北京市自然科学基金(7142106)。

【作者简介】 谷松至(1988-), 女, 技师, E-mail: gusongzhi123@126.com。

【通讯作者】 秦川, 教授, 博士生导师。E-mail: qinchuan@cnilas.org。

至 2015 年 1 月 4 日,世界卫生组织(WHO)发表数据显示埃博拉出血热疫情肆虐的利比里亚、塞拉利昂和几内亚等西非国家的感染病例(包括疑似病例)已达 20747 人,其中死亡人数达到 8235 人^[4]。

根据埃博拉病毒基因的位置、顺序和数量的不同,可将埃博拉病毒分为 5 个基因型,即扎伊尔型(EBOV)、苏丹型(SUDV)、本迪布焦型(BDBV)、塔伊森林型(TAFV)和莱斯顿型(RESTV)^[5]。埃博拉病毒莱斯顿型虽不对人致病,但可对非人灵长类有致死性,在美国和菲律宾有过猴子感染的报道^[6]。而我国在 2011 年首次报道了从猪体内也检测到埃博拉病毒莱斯顿型^[7]。目前我国虽尚未发现有感染埃博拉病毒病的患者,但不排除有埃博拉病毒随着病毒携带者或引进动物(如猴子、黑猩猩等)而进入我国的风险。为监测华北地区埃博拉病毒莱斯顿型的分布和流行情况,进一步确定是否存在埃博拉病毒的风险。本研究通过采集华北地区动物园及养殖场的哺乳动物血清,对埃博拉病毒莱斯顿型进行核酸检测,以期对埃博拉病毒的防控提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 样品采集

2014 年 9 月,从华北地区的动物园或养殖场采集猴、猪、雪貂、狗、猫等哺乳动物的血清。置于 -20℃ 冻存备用。

1.1.2 引物合成

埃博拉病毒莱斯顿亚型的引物序列为本实验室设计,引物序列已申请专利保护(专利号:201510014997.0)。

1.1.3 主要试剂和仪器

RNeasy Mini Kit 提取试剂盒购自 QIAGEN 公司,Superscript III First Strand Synthesis Kit 试剂盒购自 Invitrogen 公司,Taq DNA 聚合酶,10 × buffer、dNTP、Mg²⁺ 均购自 TaKaRa 公司,荧光染料 Power SYBR Green PCR Master Mix,96 孔 0.2 mL PCR 反应管 Fast Optical 96 - well RXN Plate,光学反应盖膜 96 - Well Optical Adhesive Film 25PK 均购自 ABI 公司,实时荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司 StepOne 系列产品。

1.2 方法

1.2.1 病毒 RNA 提取及反转录

采用 RNeasy Mini Kit 提取试剂盒提取采集到的哺乳动物血清的 RNA,采用 Superscript III First Strand Synthesis Kit 试剂盒对病毒 RNA 进行反转录成 cDNA,具体实验操作步骤参见说明书。合成的 cDNA 置于 -20℃ 冻存备用。

1.2.2 埃博拉病毒莱斯顿亚型的 Real-time PCR 检测

反应体系为:模板 2 μL, dNTP 0.5 μL,上、下游引物各 1 μL (10 pmol/μL), 10 × buffer 1 μL, Mg²⁺ 1 μL, Ex Taq 酶 0.1 μL, DEPC 水 8.4 μL, Power SYBR Green 荧光染料 5 μL。反应条件:94℃ 3 min, 94℃ 30 s, 64℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 35 个循环,每个循环结束后读取荧光值。

将连有埃博拉病毒莱斯顿亚型的 NP gene 的全长质粒作为阳性对照。

2 结果

2.1 采样情况

2014 年 9 月,我们从华北地区的动物园或养殖场共采集 109 份血清样品。其中恒河猴 51 份,猪 40 份,食蟹猴 4 份,雪貂 4 份,狗 3 份,猫 2 份,金丝猴 2 份,大熊猫 1 份,黑猩猩 1 份,环尾狐猴 1 份。

2.2 检测情况

对采集到的 109 份哺乳动物血清样品,进行埃博拉病毒莱斯顿亚型的 Real-time PCR 检测,结果显示,109 份血清样本全部呈阴性。

3 讨论

埃博拉病毒病一直被认为是动物源性传染病,而埃博拉病毒的自然宿主及其在自然界的循环和传播方式尚不明确。有研究显示,果蝠可能是埃博拉病毒的自然宿主之一。但从自然宿主直接到人类的感染很罕见,目前认为是果蝠将埃博拉病毒直接传染给非人类灵长类动物或人,感染病毒的非人类灵长类动物再直接传染给人^[8]。感染者可通过多种途径传播埃博拉病毒,而接触传播是最主要的传播途径。通过接触患者和被感染动物的各种体液、分泌物、排泄物及其污染物感染即可感染埃博拉病毒^[9]。在埃博拉疫情中,都有患者曾密切接触过非人类灵长类(大猩猩、黑猩猩等)和其他哺乳动物(小羚羊、猪等)的尸体而被感染^[10-14]。埃博拉病毒莱斯顿型不使人致病,但对非人类灵长类有致死性,且使人隐性感染^[15]。在美国和菲律宾就曾在

接触过猕猴和猪的人血清中检测出莱斯顿型埃博拉病毒抗体,并且中国和菲律宾都有猪感染莱斯顿型的报道^[5,16-18]。是否存在莱斯顿型在猪体内变异,其使人感染的潜在危险值得关注。

目前中国尚未发现感染埃博拉病毒的病例,但随着我国与世界各国之间的贸易、经济、旅游和人员往来的日益频繁,埃博拉病毒通过各种途径侵入我国不无可能。尤其是外来动物(黑猩猩、猴子等)的引进,更是提高了埃博拉病毒进入我国的风险。并且我国的人群无免疫力,对埃博拉病毒普遍易感。而当前尚无有效预防和治疗埃博拉病毒病的疫苗和药物^[19]。因此,在加速研发疫苗和药物的同时,密切的对埃博拉病毒的监测及流行病学调查显得尤为重要。确诊埃博拉病毒病的最主要方式是病原学检测,而传统的 RT-PCR 检测方法灵敏度不高、容易出现假阳性且不适用于大批量样本的筛查。Real-time PCR 检测方法敏感性高、特异性强、重复性好,在疾病暴发时可快速诊断,现已成为病原体检测的重要方法。本调查对华北地区动物园及养殖场的各种哺乳动物进行采样,并对埃博拉病毒莱斯顿型进行检测。集中采集易感染埃博拉病毒的哺乳动物血清样本 109 份,利用本实验室针对埃博拉病毒莱斯顿型建立的 Real-time PCR 检测方法对埃博拉病毒莱斯顿型进行核酸检测。结果显示,所采集的血清样本全部检测呈阴性,表明该地尚无埃博拉病毒莱斯顿型的流行。为埃博拉病毒莱斯顿型的防控提供理论依据。虽然并未在采集到的各类哺乳动物中检测到埃博拉病毒莱斯顿型,但考虑到采样量和采样次数的局限,尚需进一步研究。

总之,在对华北地区的哺乳动物进行埃博拉病毒病的监测过程中并未检测到埃博拉病毒莱斯顿型。但我们仍需继续开展对埃博拉病毒莱斯顿型的流行病学研究,监测埃博拉病毒莱斯顿型在人类和非人灵长类动物及其他哺乳动物中的传播流行规律,做到及时预警、及时控制、彻底杜绝埃博拉病毒病在人间传播。

参考文献:

[1] Pourrut X, Kumulungui B, Wittmann T, *et al.* The natural history of Ebola virus in Africa[J]. *Microbes Infect*, 2005. 7(7

- 8): 1005 - 1014.
- [2] Feldmann H, Geisbert TW. Ebola haemorrhagic fever [J]. *Lancet*, 2011, 377(9768): 849 - 864.
- [3] World Health Organization. Ebola virus disease in Guinea. http://www.who.int/csr/don/2014_03_23 Ebola/en.
- [4] World Health Organization. Ebola Situation report. <http://www.who.int/csr/disease/ebola/situation-reports/en/>.
- [5] LI YH, CHEN SP. Evolutionary history of Ebola virus [J]. *Epidemiol Infect*, 2014, 142(6): 1138 - 1145.
- [6] Lefebvre A, Fiet C, Belpois-Duchamp C, *et al.* Case fatality rates of Ebola virus disease: a meta-analysis of World Health organization data [J]. *Med Mal Infect*, 2014, 44(9): 412 - 416.
- [7] Pan Y, Zhang W, Cui L, *et al.* Reston virus in domestic pigs in China [J]. *Arch Virol*, 2014, 159(5): 1129 - 1132.
- [8] Feldmann H, Geisbert TW. Ebola haemorrhagic fever [J]. *Lancet*, 2011, 377(9768): 849 - 862.
- [9] Breman JG, Johnson KM. Ebola then and now [J]. *New England Journal of Medicine*, 2014, 371(18): 1663 - 1666.
- [10] Peterson AT, Bauer JT, Mills JN. Ecologic and geographic distribution of filovirus Disease [J]. *Emerging Infectious Diseases*, 2004, 10(1): 40 - 47.
- [11] Vogel G. Are bats spreading Ebola across sub-Saharan Africa? [J]. *Science*, 2014, 344(6180): 140.
- [12] Mitman G. Ebola in a Stew of Fear [J]. *New England Journal of Medicine*, 2014, 371(19): 1763 - 1765.
- [13] Barrette RW, Metwally SA, Rowland JM, *et al.* Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus [J]. *Science*, 2009, 325(5937): 204 - 206.
- [14] Towner JS, Sealy TK, Khristova ML, *et al.* Newly discovered ebola virus associated with hemorrhagic fever outbreak in Uganda [J]. *PLoS Pathog*, 2008, 4(11): e1000212.
- [15] Bray M, Geisbert TW. Ebola virus: the role of macrophages and dendritic cells in the pathogenesis of Ebola hemorrhagic fever [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005. 37(8): 1560 - 1566.
- [16] Barrette RW, Metwally SA, Rowland JM, *et al.* Discovery of swine as a host for the Reston ebolavirus [J]. *Science*, 2009, 325(5937): 204 - 206.
- [17] Miranda ME, White ME, Dayrit MM, *et al.* Seroepidemiological study of filovirus related to Ebola in the Philippines [J]. *The Lancet*, 1991, 337(8738): 425 - 426.
- [18] Centers for Disease Control (CDC). Update: Filovirus infection in animal handlers [J]. *Morbidity Mortality Weekly Report*, 1990, 39(13): 221.
- [19] Cohen J. Infectious disease. Ebola vaccine: little and late [J]. *Science*, 2014, 345(6203): 1441 - 1442.

[修回日期] 2015 - 03 - 30



野生白化喜马拉雅旱獭体内寄生虫检测与控制

陶元清

(青海省地方病防治研究所, 西宁 811602)

【摘要】 目的 调查白化旱獭重要病原体的自然感染状况, 为建立白化旱獭寄生虫学质量控制标准提供依据。方法 对21只野生的白化旱獭和30只正常毛色旱獭采用粪便检查法和血清学方法检测了蠕虫、弓形体、棘球蚴等体内寄生虫感染情况。结果 51只野生白化喜马拉雅旱獭和正常毛色旱獭检出蠕虫1种, 弓形体和棘球蚴抗体检测结果均为阴性。应用阿苯达唑片剂和伊维菌素注射液进行了旱獭体内寄生虫驱虫和净化, 效果良好。结论 监测结果初步表明白化旱獭寄生虫学质量符合种群动物的寄生虫要求。

【关键词】 喜马拉雅旱獭; 白化; 蛔虫; 弓形虫; 棘球蚴; 控制

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 05-0074-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.005.018

Survey on the internal parasites infection and control technique in albinism *Marmota himalayana*

TAO Yuan-qing

(Qinghai Institute for Endemic Disease Prevention and Control, Xi'ning 811602, China)

【Abstract】 Objective To investigate the internal parasites infection in albino *Marmota himalayana*, and to provide a basis for setting up the quality standard of *Marmota himalayana*. **Methods** 21 wild albinism and 30 wild normal *Marmota himalayana* from the same origin were detected by method as intestinal parasites in stool examination and serological testing, toxoplasma gondii and echinococcosis parasite infections of each animal, then detected the internal parasites and eggs under platoscope and microscope. **Results** The natural infectious rate of the roundworm in wild albinism and normal *Marmota Himalayana* were respectively 71.4% (15/21) and 66.7% (20/30), using the exact probability method of inspection, there was no significant difference in the roundworm infection rate between two groups marmota; antibody test results of Serum toxoplasma gondii and Echinococcosis were negative. Application of albendazole and Ivermectin injection drug expelling and purification, effect to be trusted. **Conclusions** Monitoring results and the cure method can be used as an albino Himalayan marmot displacement experiment of animal parasite quality monitoring index and purification method.

【Key words】 *Marmota himalayana*; Albinism; Roundworm; Toxoplasma gondii; Echinococcosis; Control

喜马拉雅旱獭(*Marmota himalayana*)属啮齿目(Rodentia)松鼠科(Sciuridae)旱獭属(*Marmota*)的大型地栖性啮齿动物,为青藏高原特有种。近年来

该动物在生物医学研究中应用制作人类疾病的动物模型的研究越来越深入^[1]。2014年5月在青海海北门源县发现了白化旱獭家族,活套法共捕捉21

[基金项目] 国家自然科学基金地区基金(31160436)。

[作者简介] 陶元清(1971-),男,副研究员,学士。研究方向:实验动物管理和动物质量控制及野生动物实验动物化。E-mail: tyq001@126.com。

只白化旱獭和 30 只正常毛色旱獭,作者开始了白化旱獭的实验动物化研究工作。根据野生动物实验动物化的质量控制要求^[2],对该地区的白化和正常毛色旱獭进行了一系列的检疫、质量检测和控制在实验动物的寄生虫学质量作为实验动物质量控制的重要内容^[3],为建立白化旱獭寄生虫学质量控制标准提供依据,作者根据《实验动物 寄生虫学等级及监测》(GB14922.1-2001)、《实验动物 蠕虫检测方法》(GB/T18448.6-2001)、《实验动物 弓形体检测方法》(GB/T18448.7-2008)规定,参照家畜寄生虫检查和防治方法^[4]以及旱獭感染寄生虫的相关文献^[5-6],进行了寄生虫检测和控制工作,报道如下。

1 材料和方法

1.1 研究地点

研究地点位于青海省海北自治州门源县仙米林区(东径 102°05' ~ 102°12', 北纬 37°03' ~ 37°10'),属大陆性寒湿、半湿润气候带。海拔 2500 ~ 3400 m。主要河流是讨拉河。年平均气温 0℃ 以上,其中七月份最热,平均气温 2℃,一月份最冷,平均气温在 -12.6℃ 左右,0℃ 以下有五个月。年降雨量 570 mm,约 90% 集中在 4 ~ 9 月份,其中七月份最多,占年降雨量 30% 左右。夏秋湿润,平均相对湿度 70% 以上,冬季较干燥,平均相对湿度为 52%。6 月中旬至 8 月中旬为无霜期。该地区土壤阴坡以山地淋溶褐色土、山地型褐色土及山地碳酸盐褐色土为主。植被有藓类、草莓、寥类、蕨类等;阳坡以山地森林草原土、山地草甸草原土和山地典型褐色土为主,植被主要是苔草、寥科类和禾本科植物。

1.2 研究对象

本研究所有动物圈套法活体捕自研究地点 - 青海省海北州门源县仙米地区讨拉大沟内,数量总计 51 只,由白化旱獭 21 只(12 雌 9 雄)和白化旱獭原产地混合居住的正常毛色旱獭 30 只(14 雌 16 雄)组成,旱獭年龄为 1 ~ 4 周岁。

1.3 试验药物和试剂

伊维菌素注射液,西乡长江动物药品有限责任公司生产,[批号]兽药字(2007)270151126,生产批号 120301,主要成分为伊维菌素 B₁(B_{1a} + B_{1b});阿苯达唑片剂,宁夏启元国药有限公司生产,国药准字:H64020110,产品批号 120829,每片含阿苯达唑 0.2 g。

弓形虫特异性 IgM 抗体检测试剂盒为北京贝尔生物工程有限公司生产,批号为 20130901;弓形虫特异性 IgG 抗体检测试剂盒为北京贝尔生物工程有限公司生产,批号为 20130901;包虫 IgG 抗体诊断试剂盒,深圳康百得生物科技有限公司生产,批号为 20130501。

酶标仪为华东电子集团医疗装备有限责任公司生产,型号为 DG5031。

1.4 调查方法

于 2014 年 5 月 1 日至 5 月 27 日,在调查地区圈套法捕捉白化旱獭 21 只,正常毛色旱獭 30 只。对每只旱獭施以氯氨酮麻醉剂量为 0.6 mg/kg 体重后,采集直肠粪便 100 mg;后肢静脉采集促凝血 5 mL 分离血清。采用改良加藤法检测肠道寄生虫、ELISA 法检测弓形虫 IgM 和 IgG 抗体;参照《包虫病诊断标准》(WS257-2006)ELISA 法检测包虫 IgG 抗体。

1.5 驱虫试验方法

捕获的野生喜马拉雅旱獭现场麻醉后,每只旱獭后肢皮下按体重 0.02 mL/kg 注射伊维菌素注射液;动物饲养于饲养笼具中,在 24 h 内,供给混有阿苯达唑片剂的饮水 20 mL(阿苯达唑片剂研磨成粉状按 100 mg/100 mL 浓度混入饮水),在动物将水饮完前不另外供给水,确保动物通过饮水摄入足量的阿苯达唑。然后于第 14 天、第 21 天和第 35 天重复驱虫 3 次,方法同第一次驱虫方法,检查收集虫体和虫卵,分类计数。同时观察动物饮食、饮水情况和其它异常行为。在动物捕捉、检疫隔离、转运、人工饲养等各个环节,采取综合防虫措施,如消灭设施周围环境的野鼠、昆虫,特别做好运输工具、饲养笼具、饲料、饮水和垫料的管理,旱獭和设备实行全进全出制,避免交叉污染。

1.6 数据分析

检测结果按照毛色分组,确切概率法检验法进行独立样本的差异性分析。

2 检测结果和驱虫效果

本次研究中,改良加藤法共检测 51 只野生喜马拉雅旱獭(21 只白化旱獭,30 只正常旱獭)直肠粪便,15 只白化旱獭粪便检出旱獭蛔虫(*A. tarbagan*)虫卵,自然感染率为 71.4% (15/21),平均感染强度为 3047 ± 210 枚/g;20 只正常毛色旱獭检出旱獭蛔虫卵,自然感染率为 66.7% (20/30),平均感染强度

为 2870 ± 170 枚/g;确切概率法检验两者的感染率,无显著性差异;据文献报道^[7-8]旱獭能被矛形双腔吸虫(*D. lanceatum*)、兰尼毛首线虫(*T. lani*)、瞪羚毛首线虫(*T. gazellae*)和蛲虫(*C. schulzi*)等感染,本次检测吸虫、线虫和蛲虫的过程中,均没有检出;51只旱獭血清检查弓形虫和包虫病抗体,检测结果均为阴性。

在研究期间先后进行了4次驱虫,每次驱虫前对动物施以麻醉后,活体采集直肠粪便检测动物肠道寄生虫虫体和虫卵,分类计数,计算阳性检出率,并对每次驱虫前后的阳性检出率进行了比较;结合寄生虫综合防治技术,第35天后,51只旱獭粪便中均未检出蛔虫成虫和虫卵,动物的健康状况良好,采食和饮水正常,体征、精神状态和行为均正常,表明药物控制措施得当有效。

3 讨论

本次21只野生白化和30只正常毛色旱獭体内寄生虫检测,因样本来源困难,特别是野生白化旱獭数量稀少,本次检测没有采用全身蠕虫学剖检法,粪便检查法只检出旱獭蛔虫1种蠕虫,感染率为65%以上,感染情况与青海省其它报道一致^[8-9],说明旱獭蛔虫是引起喜马拉雅旱獭的主要寄生虫源疾病之一。白化旱獭在目前尚未掌握旱獭剖腹产等生物净化技术的情况下,按照感染虫种的寄生方式、流行病学、季节动态和生活史等特点,应用广谱、高效、低毒、低残留的驱虫剂阿苯达唑片和伊维菌素注射液进行了多次联合药物驱治、预防和净化,同时强化对旱獭环境和饲养设备的灭虫、灭鼠管理,对旱獭蛔虫控制效果良好。

本次包虫抗体血清学检测阴性,这与赵玉敏和邱加闽等报道的检测结果一致^[10-11]。旱獭对包虫病不敏感的机制有待深入探讨。同时也提示旱獭可作为抗包虫病模型动物进行包虫病相关研究。

据报道青海省喜马拉雅旱獭弓形虫抗体阳性率为11%以上^[12-13],本次51份旱獭血清样本采用ELISA法检测弓形虫IgM和IgG抗体,结果均为阴性。本次检测弓形虫IgM试剂盒包被物为鼠抗人-IgM(μ 链),酶标物分别为辣根过氧化物酶标记的

鼠抗人TOX-抗原;弓形虫IgG试剂中包被物为纯化TOX-抗原,酶标物为辣根过氧化物酶标记的鼠抗人IgG抗体。不同动物对弓形虫免疫应答机理不同,因此该检测试剂对喜马拉雅旱獭弓形虫抗体检测的特异性和敏感性有待验证。弓形虫病是严重的人兽共患病,必须高度重视。我们将采用分子生物学技术和实验感染法进一步检测和排查弓形虫^[14],保证生物安全和白化旱獭种群的寄生虫学质量。

参考文献:

- [1] 陶元清,王忠东. 提高人工饲养条件下喜马拉雅旱獭成活率的几点体会[J]. 四川动物, 2006,25(2):889-890.
- [2] 李厚达. 实验动物学[M]. 北京:农业出版社,1992:222-225.
- [3] 苏卫. 实验动物寄生虫质量控制[J]. 中国实验动物学杂志, 1996,6(1):60.
- [4] 北京农业大学,主编. 家畜寄生虫学[M]. 北京:农业出版社, 1989:441-542.
- [5] 朱锦沁,袁生馨. 高原人兽共患病[M]. 西安:陕西人民出版社,1994:269-339.
- [6] 蔡进忠,李春花. 青海省畜禽寄生虫种资源与分布[J]. 中国动物传染病学报,2010,18(1):64-67.
- [7] 金志宏,杨小昂,职慧军,等. 青海喜马拉雅旱獭感染矛形双腔吸虫的观察[J]. 中国比较医学杂志,1992,2(2):156-156.
- [8] 周家骊,官洛,卢光珍,等. 青海省果洛地区哺乳类、啮齿类、禽类动物寄生虫的调查[J]. 中国兽医科技,1987,18(11):24-25.
- [9] 范微,王忠东. 人工饲养条件下喜马拉雅旱獭寄生虫病综合防治[J]. 四川动物, 2009,28(5):750-752.
- [10] 赵玉敏,种世桂,史大中,等. 甘南藏族自治州啮齿类动物棘球蚴感染状况调查[J]. 中国病原生物学杂志,2009,4(8):637-617.
- [11] 邱加闽,刘大伦. 青藏高原泡球蚴病流行病学研究[J]. 实用寄生虫病杂志,1995,3(3):106-107.
- [12] 马国壁. 青海省部分地区藏獭及草地鼠类弓形虫抗体间接血凝试验检测[J]. 动物医学进展,2012,33(7):132-134.
- [13] 马国壁,马利青,王戈平,等. 青海省动物弓形虫病的血清学检测[J]. 青海畜牧兽医杂志,2011,41(3):26-26.
- [14] 全品芬,王文广,匡德宣,等. 不同来源树鼩的弓形虫感染调查[J]. 中国比较医学杂志,2014,24(8):28-30.

[修回日期]2015-03-30