



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 **6**

邮发代号: 82-917

第25卷(第6期) Vol.25 No.6

ISSN 1671-7856



主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

月刊 1991 年 3 月创刊

第 25 卷 第 6 期 2015 年 6 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, 如不同意自己论文上网, 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 秦 川
本期责任编辑 吴漪丽

目 次

研究报告

- 清醒挪威褐鼠过敏性哮喘发作全程记录模型 陶婧婧, 徐燕锋, 韩云林, 等(1)
- 利用 TALEN 技术高效制备 TXNIP 基因敲除小鼠模型 张欢欢, 刘楚新, 马月, 等(9)
- 不同品系小型猪对高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的敏感性筛选 潘金春, 任柏桦, 闵凡贵, 等(14)
- 慢性束缚应激模型致焦虑和抑郁共病的行为学研究 孙秀萍, 张楠, 高杰, 等(18)
- 维生素 C 对紫外线诱导的光老化大鼠皮肤结构的影响 楼彩霞, 高擎, 孙侠, 等(23)
- 猕猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 基因真核细胞表达载体的构建与表达 王新, 易思萌, 刘慧芳, 等(28)
- 靶向脐带间充质干细胞的构建及其在小鼠脾脏内的定位 秦力维, 张宁坤, 路平, 等(32)
- 滇西亚种树鼩微卫星分子标记的筛选 张媛, 李晓飞, 李振宇, 等(36)
- PSGL-1 缺失导致 MDSCs 上调 周泽启, 李江超, 张潇涵, 等(42)

技术方法

- 大鼠细小病毒 H-1 株和 KRV 株双重 PCR 检测方法的建立及应用 李晓波, 付瑞, 王吉, 等(46)
- 实时荧光定量 TaqMan-PCR 检测小鼠多瘤病毒方法的建立 尹雪琴, 袁文, 王静, 等(53)
- 鼠痘病毒荧光定量 Taqman-PCR 检测方法的建立与应用 杜江涛, 戴方伟, 周莎桑, 等(59)

综述与专论

- 预测肿瘤药物临床试验效果的动物模型新进展 余飞, 丁慧(65)
- 浅谈乳鼠在儿童药药理毒理学研究中的应用 朴成玉, 于敏, 刘永武, 等(71)

管理科学

- 动物实验中的生物安全问题 魏强(75)

教育与科普

- 实验动物的 10 个“不愿意”(二) 魏强(封三)

简讯

- (70, 78)

广告

- (封底)

期刊基本参数: CN11-4822/R * 1991 * m * 大 16 * 80 * zh * p * ¥20.00 * 2000 * 15 * 2015-6

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 25 Number 6 June 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://zgswdw.alljournal.ac.cn/zgbjyxxz/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

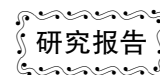
CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2015 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- Evaluation of asthma exacerbation in an ovalbumin-sensitized conscious Brown Norway rat model TAO Jing-jing, XU Yan-feng, HAN Yun-lin, et al. (1)
- Efficient preparation of a TXNIP knockout mouse model by transcription activator-like effector nucleases (TALEN) ZHANG Huan-huan, LIU Chu-xin, MA Yue, et al. (9)
- Susceptibility screening of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in several strains of minipigs PAN Jin-chun, REN Bo-hua, MIN Fan-gui, et al. (14)
- Chronic restraint stress produces comorbidity behavior of anxiety and depression disorders in mice SUN Xiu-ping, ZHANG Nan, GAO Jie, et al. (18)
- Effects of vitamin C on UV-induced photoaged skin in rats LOU Cai-xia, GAO Qing, SUN Xia, et al. (23)
- Construction of eukaryotic vector of monkey B virus glycoprotein D gene and the gD gene expression WANG Xin, YI Si-meng, LIU Hui-fang, et al. (28)
- Construction of targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their distribution in the mouse spleen QIN Li-wei, ZHANG Ning-kun, LU Ping, et al. (32)
- Isolation and characterization of microsatellite markers in *Tupaia belangeri chinensis* ZHANG Yuan, LI Xiao-fei, LI Zhen-yu, et al. (36)
- MDSCs are upregulated in PSGL-1-deficient mice ZHOU Ze-qi, LI Jiang-chao, ZHANG Xiao-han, et al. (42)
- Development and application of duplex PCR for detection of H-1 and KRV strains LI Xiao-bo, FU Rui, WANG Ji, et al. (46)
- Establishment of a TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR for detection of murine polyomavirus YIN Xue-qin, YUAN Wen, WANG Jing, et al. (53)
- Establishment and application of a fluorescence quantitative Taqman-PCR detection method of mouse poxvirus Du Jiang-tao, DAI Fang-wei, ZHOU Sha-sang, et al. (59)
- Progress in animal models for predicting the results of clinical trials of cancer drugs YU Fei, DING Hui (65)
- Application of suckling mice in pediatric pharmacological and toxicological studies PIAO Cheng-yu, YU Min, LIU Yong-wu, et al. (71)
- Biosafety issues on animal experiments in China WEI Qiang (75)



清醒挪威褐鼠过敏性哮喘发作全程记录模型

陶婧婧, 徐燕锋, 韩云林, 徐玉环, 秦 川, 高 虹, 张星东

(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,
中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立卵蛋白(OVA)致敏激发后,在挪威褐鼠无创且清醒的状态下,可观察和记录到过敏性哮喘发作全过程(速发相和迟发相)的动物模型。**方法** 66只挪威褐鼠按致敏液[OVA和Al(OH)₃]不同平均分为11组,单纯注射OVA的4组(0.01、0.1、1.0和10.0 mg/只);OVA混合Al(OH)₃干粉的5组(0.1+100、1.0+100、10.0+100、1.0+52和1.0+4 mg/只);OVA混合Al(OH)₃胶体的1组(10.0+4 mg/只);正常对照组1组。10个致敏组分别于第0天和第5天背部皮下2点注射相应致敏液,每点注射0.2 mL,正常对照组注射等量生理盐水。在第37天雾化吸入5% OVA激发10 min。然后立即放入体积描记器中连续记录16 h呼气相延长参数(penh)值。采集第0、7、14、21、28、35、38天血清,ELISA法检测特异性IgE含量。HE染色观察肺病理变化。**结果** 除单纯注射OVA 0.01 mg组外,其他各组大鼠血清特异性IgE含量均比正常对照组显著升高($P < 0.05$),且在致敏1周后IgE开始大量产生,直到第5周均呈持续增长趋势。观察到了哮喘发作的速发和迟发双相气道反应,其特点表现在Penh值的显著增高,且与正常对照组相比,模型组(以OVA 10.0 & Al(OH)₃100、OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4组为例)的速发相/迟发相峰值、面积均显著增大($P < 0.05$)。模型组(以OVA 10.0 & Al(OH)₃100组为例)有以气道周围嗜酸性粒细胞浸润为主的炎症表现。**结论** 成功建立了无创、清醒状态下挪威褐鼠过敏性哮喘发作全程记录模型。

【关键词】 过敏性哮喘;挪威褐鼠;呼气相延长参数;速发相反应;迟发相反应

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0001-08

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.001

Evaluation of asthma exacerbation in an ovalbumin-sensitized conscious Brown Norway rat model

TAO Jing-jing, XU Yan-feng, HAN Yun-lin, XU Yu-huan, QIN Chuan, GAO Hong, ZHANG Xing-dong

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

【Abstract】 Objective To establish an animal model in which both early-phase asthmatic response (EAR) and late-phase asthmatic response (LAR) can be observed after sensitization and subsequent inhalation challenge with ovalbumin (OVA). Animals were conscious with no narcotic used, unrestricted, and fed ad libitum. **Methods** Sixty-six SPF 6-8-week old male Brown Norway rats were divided into eleven equal groups. All groups of rats except normal control group were injected subcutaneously with 0.4 mL (sc in back, 2 sites, 0.2 mL/site) OVA or OVA + Al(OH)₃ solution on day 0

【基金项目】 中国医学科学院医学实验动物研究所人才引进基金(编号: DWS201202); 973 计划(2011CB504903); 863 计划(2013AA020106)。

【作者简介】 陶婧婧,女,硕士研究生,研究方向:过敏性哮喘治疗研究。

【通讯作者】 张星东,教授,Email: zhangxd@cnilas.org; 高虹,教授,硕士生导师, E-mail: gaohongdws@aliyun.com。

and day 5. Four groups were given OVA only at the dose of 0.01, 0.1, 1.0 or 10.0 mg/rat, five groups were given OVA + Al(OH)₃ powder at the dose of 0.1 + 100, 1.0 + 100, 10.0 + 100, 1.0 + 52 and 1.0 + 4 mg/rat, one group was given OVA + Al(OH)₃ gel at the dose of 10.0 + 4 mg/rat. Normal control group was injected subcutaneously with the same volume of saline. All the groups were challenged for 10 minutes with 5 mL 5% OVA aerosol on day 37. Enhanced pause (Penh) was recorded for 16 hours in a whole-body plethysmography system after challenge. Specific IgE of the serum samples on day 0, 7, 14, 21, 28, 35, 38 were measured by ELISA. Pulmonary pathological changes were observed using HE staining. **Results**

Compared with the normal control group, immunized rats except the group given 0.01 mg OVA produced specific IgE ($P < 0.05$), and the content of IgE grew sharply after 7 days, and always kept growing until 5 weeks. The whole course of asthma exacerbation was recorded successfully. The rats developed EAR and/or LAR within 16 hours following OVA challenge. Especially the groups injected with 10 mg OVA and 100 mg Al(OH)₃ or 4 mg Al(OH)₃ gel showed steady pattern of biphasic airway responses and their EAR or LAR peak, and the area under the curve were increased significantly compared with those of the normal control group ($P < 0.05$). Inflammation characterized by eosinophil infiltration was observed in the rat lung of model group (OVA 10.0 & Al(OH)₃ 100 group as a representative case). **Conclusions** In this work we successfully developed a new model using conscious rats, and the whole time course of asthma exacerbation in this model can be observed after OVA challenge. This model may become a useful tool for further asthma research.

【Key words】 Allergic asthma; Brown Norway rats; Enhanced pause; Early-phase asthmatic response; Late-phase asthmatic response

过敏性哮喘(以下简称哮喘),是一种以可逆性支气管痉挛和气道高反应性为特点的气道慢性炎症。临床表现为反复发作性喘息、带有哮鸣音的呼气性呼吸困难、胸闷、咳嗽等。临床上给患者做特异性抗原激发试验时发现哮喘发作时可出现速发相(early-phase asthmatic response, EAR)和迟发相(late-phase asthmatic response, LAR)。EAR 发生在接触抗原数分钟内,一般持续 1~2 h,肥大细胞释放预合成的活性介质从而导致支气管痉挛和气道黏膜水肿及血管通透性增加进而引起喘息症状;LAR 时喘息症状加重,持续时间比 EAR 长,可达 10 h 甚至更久,主要是 EAR 时期趋化、募集来的以嗜酸性粒细胞为主的炎症细胞浸润而形成的炎症反应过程^[1]。

目前对哮喘的研究日益增多,但无论是机理研究还是药物筛选,都需要先选择合适的模型才能获得有意义的研究成果。目前用于哮喘研究的模型有麻醉模型和清醒模型。麻醉模型的动物需要在麻醉状态下进行气管插管,接呼吸机后进行气道阻力的检测,主要分为麻醉哮喘模型和麻醉气道高反应性模型 2 种。二者的区别在于麻醉哮喘模型是用致敏时的抗原特异激发后进行气道阻力的检测,麻醉气道高反应性模型在抗原特异激发时不作检测,乙酰胆碱等非特异激发时检测^[2]。清醒模型中的动物在检测时为清醒状态,气道无机械损伤,主要以清醒气道高反应性模型为主。清醒气道高反应性模型在特异激发时亦不作检测,乙酰胆碱等非特

异激发后检测^[3],与麻醉气道高反应性模型原理相同。气道高反应性模型关注的是哮喘发作后气道过度敏感的状态,而不是哮喘发作时的状态,所以无法真正说明喘息的变化。而且气道高反应性不是哮喘独有的特异性的反应,在慢性阻塞性肺疾病等疾病中也可能发生,所以在未排除上述干扰因素的情况下,检测精确度会降低。麻醉模型虽然观察了哮喘发作时的变化,但动物处于麻醉状态,可持续记录时间短,主要用于 EAR 阶段的研究,不易观察到几小时后的 LAR^[4-6]。而 LAR 持续时间长,喘息更剧烈,是哮喘发作过程中的重要部分,对 LAR 的研究有利于进一步探索哮喘发病机理和开发有效治疗措施。

本工作正是基于 LAR 的研究需要,拟建立一个能连续观察 EAR 和 LAR 的动物模型。采用挪威褐鼠为模型动物,卵蛋白(ovalbumin, OVA)为变应原,记录并分析 OVA 特异性激发后哮喘发作全过程(EAR 和 LAR),评价不同造模方法的特点,确立挪威褐鼠过敏性哮喘发作全程记录模型构建方案。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雄性 SPF 级挪威褐鼠 66 只,6~8 周,体重 140~150 g。购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】,在本实验室屏障环境的饲养间【SYXK(京)2013-0014】饲养。饲喂无 OVA 的普通灭菌饲料。动物购入后,在屏障设施内

适应 1 周后开始实验。本实验涉及的动物饲养及动物实验方案已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-PL-2013-001】。

1.2 主要试剂和仪器

OVA、牛血清蛋白(albumin from bovine serum, BSA)、氢氧化铝($\text{Al}(\text{OH})_3$)、吐温-20 均购自美国 Sigma 公司。氢氧化铝胶体购自美国 Invivogen 公司。辣根过氧化物酶偶联的羊抗大鼠 IgE 抗体购自美国 Novus Biologicals 公司。TMB 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。PBS 缓冲液购自北京中杉金桥生物技术有限公司。PARI Turbo BOY N 压缩雾化吸入机购自德国百瑞公司。Buxco WBP 大鼠体积描记器购自美国 DSI 公司。FLUOstar Omega 酶标仪购自德国 BMG Labtech 公司。

1.3 动物分组及致敏方法

66 只挪威褐鼠按致敏液(OVA 和 $\text{Al}(\text{OH})_3$)不同平均分为 11 组,单纯注射 OVA 的 4 组(0.01、0.1、1.0 和 10.0 mg/只);OVA 混合 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 干粉的 5 组(0.1 + 100、1.0 + 100、10.0 + 100、1.0 + 52 和 1.0 + 4 mg/只);OVA 混合 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 胶体的 1 组(10.0 + 4 mg/只);正常对照组 1 组。且于第 0 天和第 5 天,在每只挪威褐鼠背部皮下 2 点注射相应致敏液,每点注射 0.2 mL,正常对照组注射等量生理盐水。

1.4 血液采集

正常对照组和 OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 组于第 0、7、14、21、28、35、38 天 7 个时间点,其余组于第 35 天,使用 0.1 mL/只(10 mg)盐酸氯胺酮麻醉后,剪尾采血 200 μL /只,4℃,3 000 r/min 离心 10 min 得血清。

1.5 激发及取材

所有组于第 37 天,给予 5 mL 5% OVA 雾化吸入 10 min。激发后立即放入体积描记器中,每 30 s 记录一个呼气相延长参数(enhanced pause, Penh)值,连续不间断记录 16 h^[7]。动物于第 38 天记录结束后,用 0.5 mL/只(10%)戊巴比妥钠过量麻醉处死,摘取左肺放入 4% 中性甲醛溶液中固定。

1.6 ELISA 法检测 IgE 抗体

先用 OVA 包被 96 孔板,再用 BSA 封闭抗原,然后结合 1.4 血清样本(第 35 天样本稀释比例:正常对照组为 1:100,其余组为 1:4 000;7 个时间点样本稀释比例:正常对照组为 1:100, OVA 10.0 &

$\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 组为 1:16 000),再结合辣根过氧化物酶偶联的羊抗大鼠 IgE 抗体(1:25 000),然后用 TMB 显色,最后用 2 mol/L 硫酸终止反应,用酶标仪检测 450 nm 波长时的吸光度(absorbance, A),A 值与板中结合的 IgE 含量成正比^[8]。

1.7 HE 染色观察肺病理变化

使用 1.5 中 4% 中性甲醛固定 24 h 后的左肺,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片(5 μm)。HE 染色后在光镜下观察肺组织嗜酸性粒细胞浸润情况及其他病理变化。

1.8 数据处理及统计分析方法

将激发后记录的 Penh 结果导出 Excel 格式数据。模型组 Penh 值高于正常对照组 Penh 限值($\bar{x} + 3s$)为 Penh 升高。使用 Microsoft Excel 2011 软件计算基线(正常对照组的 16 h Penh $\bar{x} + 3s$),作 16 h Penh 曲线(每 10 个数据的移动平均曲线),读取 LAR(1 h 后至曲线与基线交叉时止)持续时间,计算 EAR(1 h 内)峰值(区间内 Penh 最大值)和 LAR 峰值。使用 Graphpad Prism 6.0 软件,计算 EAR 部分的 Penh 曲线下高于基线的面积(Penh area under the curve and above the baseline, AUC)和 LAR 部分的 AUC。采用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,各组数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 特异性 IgE

由表 1 可以看出,除 OVA 0.01 组, OVA 0.1、OVA 1.0、OVA 10.0、OVA 0.1 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100、OVA 1.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100、OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100、OVA 1.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 52、OVA 1.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 4、OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ gel 4 组血清 IgE 含量与正常对照组相比均显著升高($P < 0.05$),且随 OVA 剂量增大,IgE 含量升高,加入佐剂组比单一 OVA 组抗体含量高。OVA 10.0 组与相当于其 1% OVA 含量但加入了一定佐剂的 OVA 0.1 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 组产生的抗体含量相当,差异无统计学意义。OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 组与 OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ gel 4 组的 IgE 含量差异无显著性,均较其他组高,以 OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 组为最高。以 OVA 10.0 & $\text{Al}(\text{OH})_3$ 100 组为例,从图 1 IgE 含量随时间变化曲线可以看出,致敏后 IgE 水平呈现时间依赖性增长,在

第 1 周内与正常对照组无明显差异,1 周后 IgE 水平开始快速升高,在第 2 周内剧烈增长,2 周后涨幅变缓慢呈现稳定的持续增长,在第 5 周达峰值,第 38 天时略有下降。

表 1 不同致敏方法对第 35 天 IgE 含量的影响

Tab. 1 The influence of different sensitization methods on day35 IgE content

组别 Groups	IgE 含量 IgE content
正常对照组 Normal control group	0.05 ± 0.01
OVA 0.01	0.05 ± 0.03
OVA 0.1	0.13 ± 0.06 *
OVA 1.0	0.39 ± 0.17 *
OVA 10.0	1.66 ± 0.42 *
OVA 0.1 & Al(OH) ₃ 100	1.78 ± 0.35 *
OVA 1.0 & Al(OH) ₃ 100	2.08 ± 0.32 *
OVA 10.0 & Al(OH) ₃ 100	2.80 ± 0.33 *
OVA 1.0 & Al(OH) ₃ 52	2.29 ± 0.14 *
OVA 1.0 & Al(OH) ₃ 4	2.31 ± 0.13 *
OVA 10.0 & Al(OH) ₃ gel 4	2.61 ± 0.17 *

注:与正常对照组比, * $P < 0.05$ 。血清稀释比例:正常对照组为 1:100,其他组为 1:4 000。 $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ 。

Note. Compared with the normal control group, * $P < 0.05$. Serum dilution: 1:100 (normal control group) and 1:4000 (other groups). $\bar{x} \pm s$, $n = 6$.

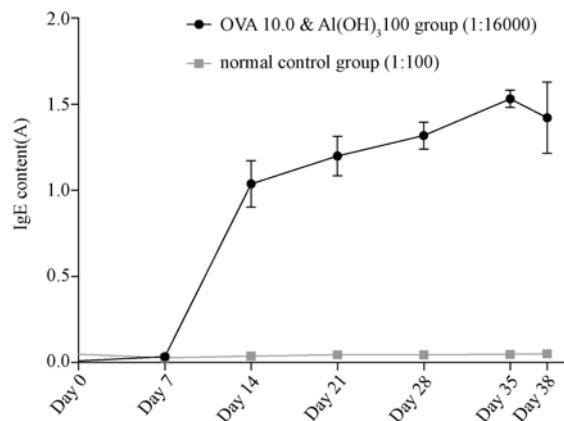
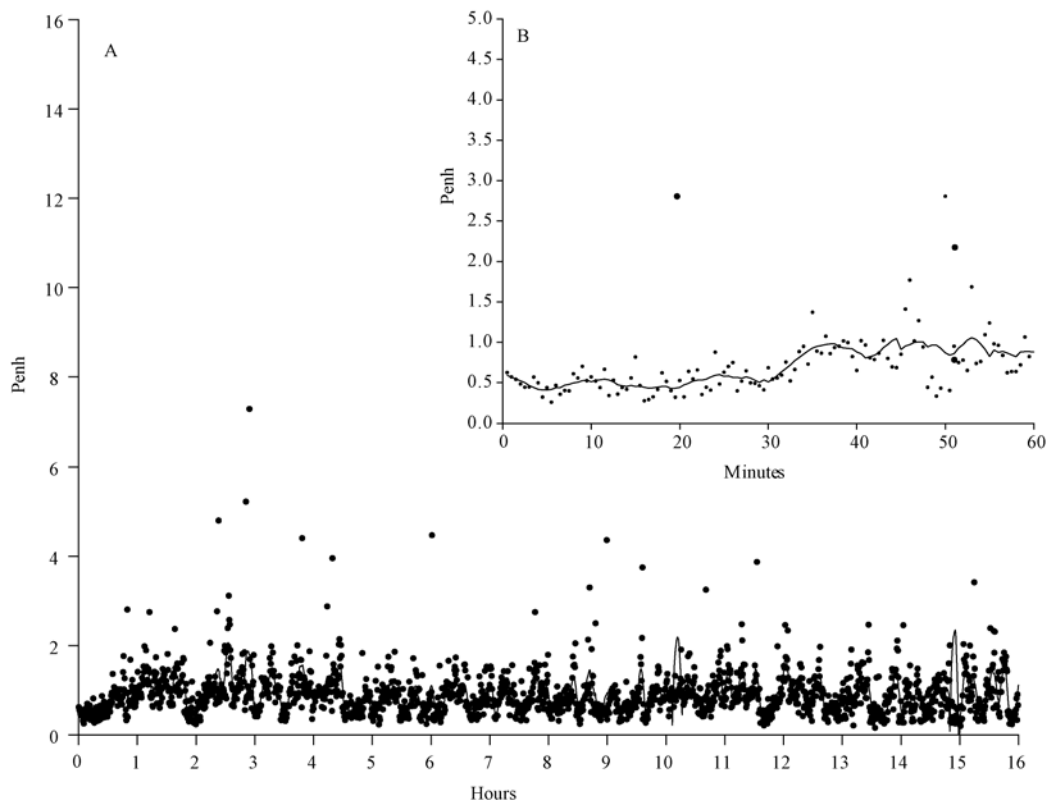


图 1 OVA 注射后血清特异 IgE 水平变化

Fig. 1 Time course of serum specific IgE levels after OVA immunization

2.2 哮喘发作速发相和迟发相

正常对照组激发后的 Penh 曲线在 16 h 内较稳定,没有明显波动(图 2A)。其 Penh 限值为 1.14 ($0.90 + 3 \times 0.08$),大于 1.14 即为 Penh 值升高。与正常对照组相比(图 2B),致敏组(OVA 10.0 & Al



注:前 60 min Penh 曲线(图 2B),16 h Penh 曲线(图 2A)。

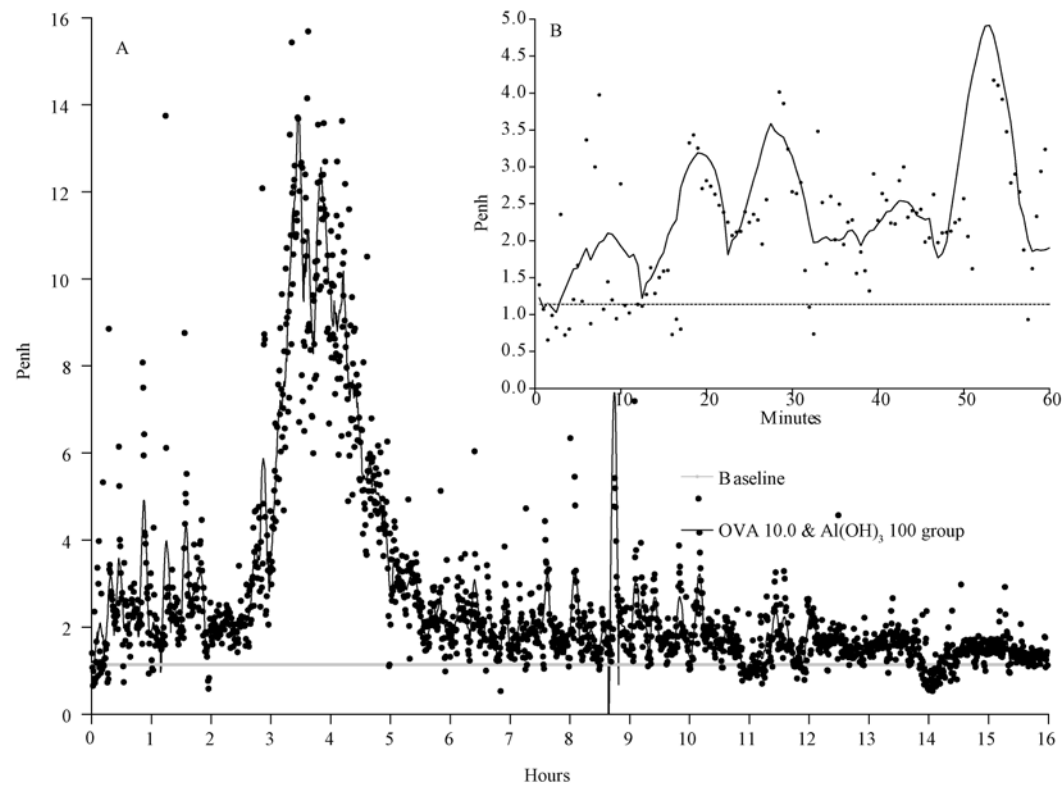
图 2 正常对照组 Penh 移动平均曲线

Note. 2A: 16 hours Penh curve, 2B: The first 60 minutes of Penh curve.

Fig. 2 The Penh running average curve of the normal control group

(OH)₃100 组为代表)激发后 Penh 值立即升高,其 Penh 曲线在前 1 h 内有明显上升(图 3B)。之后曲线有轻度下降,再开始剧烈上升达峰值后剧烈下降再缓慢下降至基线水平(图 3A)。如表 2 所示,单一 OVA 0.1 mg 至 10 mg 致敏,激发后均出现气道反应。低剂量时仅有 EAR,随剂量增加,反应加重,LAR 发生的比例增加。加入 Al(OH)₃ 佐剂致敏后反应进一步加强,EAR 和 LAR 都出现的动物可达半

数以上。如表 3 所示,正常对照组和 OVA 10.0 & Al(OH)₃100、OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 组的 EAR 峰值和 LAR 峰值都有差异,两个模型组没有差异。两个模型组的 EAR 面积、LAR 持续时间、LAR 面积也无明显差异。OVA 10.0 & Al(OH)₃100 组连续出现 EAR 和 LAR 的动物数为整组 6 只,OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 组为 5 只,另 1 只仅有 EAR。



注:前 60 min Penh 曲线(图 3B),16 h Penh 曲线(图 3A)。
图 3 OVA 10.0 & Al(OH)₃100 组 Penh 移动平均曲线
Note: 3A: The 16 hours Penh curve, 3B: The first 60 minutes of Penh curve.
Fig. 3 The Penh running average curve of the OVA 10.0 & Al(OH)₃100 group

表 2 速发、迟发反应次数统计
Tab. 2 The count of EAR and LAR

组别 Groups	仅速发相 Only EAR	仅迟发相 Only LAR	速发相、迟发相都有 Both EAR and LAR
正常对照组 Normal control group	0/6	0/6	0/6
OVA 0.01	0/6	0/6	0/6
OVA 0.1	1/6	0/6	0/6
OVA 1.0	1/6	0/6	2/6
OVA 10.0	1/6	0/6	2/6
OVA 0.1 & Al(OH) ₃ 100	1/6	0/6	5/6
OVA 1.0 & Al(OH) ₃ 100	0/6	0/6	4/6
OVA 10.0 & Al(OH) ₃ 100	0/6	0/6	6/6
OVA 1.0 & Al(OH) ₃ 52	1/6	0/6	4/6
OVA 1.0 & Al(OH) ₃ 4	1/6	0/6	4/6
OVA 10.0 & Al(OH) ₃ gel 4	1/6	0/6	5/6

表 3 OVA 10.0 & Al(OH)₃100、OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 组速发相和迟发相
Tab.3 The EAR and LAR of OVA 10.0 & Al(OH)₃100 and OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 groups

组别 Groups	速发相 峰值 EAR Peak	速发相 面积 EAR AUC	迟发相 峰值 LAR Peak	迟发相 时间/h LAR Duration/h	迟发相 面积 LAR AUC	速发相和迟 发相都有 Both EAR and LAR
正常对照组 Normal control group	1.34 ± 0.14	—	2.00 ± 0.22	—	—	0/6
OVA 10.0 & Al(OH) ₃ 100	7.54 ± 1.25 *	170.50 ± 76.11	20.78 ± 10.87 *	7.58 ± 2.18	2656.00 ± 590.36	6/6
OVA 10.0 & Al(OH) ₃ gel 4	13.26 ± 7.10 *	227.50 ± 167.92	15.19 ± 2.53 *	7.83 ± 4.18	1787.20 ± 1110.75	5/6

注:峰值是最大 Penh 值;面积是 Penh 曲线下高于基线的面积;迟发相时间是 1 h 后到 Penh 曲线与基线(正常对照组的 16 h Penh 的 $\bar{x} \pm 3s$)交叉截止的时间;与对照组相比, * $P < 0.05$ 。 $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ 。
Note. Peak: The maximum value of Penh; AUC: Penh area under the curve (running average of 10 data points) and above the baseline; LAR duration: the time from the start point (1 hour after challenge) to the end point (LAR Penh crossing the baseline (mean 16 h Penh value of the normal control group plus 3 standard deviations)). Compared with the normal control group, * $P < 0.05$. $\bar{x} \pm s$, $n = 6$.

2.3 肺组织病理检测结果

如图 4,与正常对照组相比(图 4C、D),OVA 10.0 & Al(OH)₃100 组(图 4A、B)显示血管充血,肺组织有灶性出血,肺泡间隔增宽,肺泡腔内有渗出,分泌物增多(箭头所示),且以嗜酸性粒细胞为主的炎细胞也增多(图 4 见封二)。

3 讨论

哮喘造模动物有大鼠、小鼠、豚鼠、羊和狗等^[9],以啮齿类动物最为常用,大鼠与豚鼠相比不易在哮喘发作中死亡,与小鼠相比更容易出现喘息症状,更利于进行喘息的研究。近交系挪威褐鼠是哮喘研究中常用的大鼠品系,挪威褐鼠与人类在哮喘发作时具有很多类似的特点,如 EAR 和 LAR 状态、对乙酰胆碱非特异激发的反应、IgE 的产生和炎症细胞浸润等方面^[10-11],符合本研究关注哮喘发作全过程的特点,适合作为本研究的模型动物。

OVA 致敏激发引起动物哮喘是现在哮喘动物模型造模最常用的方法^[12],使用“通用变应原”OVA 造模符合本研究拟建立普适性哮喘动物模型的要求。文献中报道的致敏方式多样,有腹腔注射、足底注射、皮下注射等不同注射部位^[13]、OVA 多种不同浓度、Al(OH)₃ 佐剂^[14]和弗氏佐剂^[15]等不同佐剂,致敏的次数也有不同。本研究以观察到典型的 EAR 和 LAR 为目的,参考文献资料,初步确立了采用 OVA 和 Al(OH)₃ 佐剂混合作为致敏液在第 0 天首次皮下注射,第 5 天再次强化致敏,第 37 天雾化激发的实验方案,探索最佳造模方法。

LAR 时期是哮喘炎症反应的主要阶段^[16]。可稳定观察 LAR 的动物模型对哮喘机理研究和治疗

药物研究的意义重大。鉴于目前没有合适的稳定观察 LAR 的 OVA 致敏哮喘动物模型,本研究建立了国内首个 OVA 作为变应原的无创、清醒挪威褐鼠过敏性哮喘发作全程记录模型,可记录和分析哮喘发作时 EAR 和 LAR 的变化,其主要指标 Penh 的升高和气道阻力的增加有很好的相关性^[17-18],可以间接反映支气管的狭窄程度,而且和哮喘发作时呼气相延长也有一致性,本研究发现, Penh 值的变化能很好的反映哮喘发作两相的强弱,可将其作为呼气相延长参数,用于喘息状态判定。

本研究对激发后哮喘发作状态的相关数据进行了 16 h 连续记录,每只动物获得 1920 个 Penh 数值。根据哮喘发作时人类 EAR 的特点为变应原吸入后 10 min 内发生,持续 1 至 2 h,和对挪威褐鼠激发后 Penh 曲线的分析,将本模型的 EAR 定义为激发后前 1 h。在 EAR 结束后立即进入 LAR 时期,可持续十几小时,此时的 Penh 值开始剧烈升高,动物喘息增加,达峰值后开始下降,喘息缓解,最后下降到基线或接近基线水平,降至基线水平以下为哮喘发作状态完全缓解。本模型的 LAR 部分定义为 EAR 结束后至 Penh 曲线与基线交叉时止。基线定义为正常对照组 16 h 的 Penh 均值加上 3 倍标准差,EAR 和 LAR 的有效 Penh 值为高于基线的部分。

IgE 在哮喘激发中起重要作用,是致敏成功的关键,本研究发现加入 Al(OH)₃ 佐剂的致敏液比单纯 OVA 致敏产生的 IgE 更多,在一定剂量范围,IgE 含量均随 OVA 浓度增加而增加,与文献报道相同^[19-20];还发现致敏液中加入等量 Al(OH)₃ 佐剂后,IgE 含量亦均随 OVA 浓度增加而增加。本研究发现,致敏后 IgE 含量在一定时间范围内,有时间依

赖性增长的趋势,在 1 周后 IgE 水平开始快速升高,2 周后涨幅变缓慢呈现稳定的持续增长,第 5 周达到高峰后开始下降。所以在 d 0 致敏后,二次强化致敏的时间应选择在 7 d 以内,此时 IgE 抗体水平较低,机体再次接触 OVA 时仍属于致敏阶段,而不会激发哮喘发作。鉴于已有文献证实高 IgE 含量对哮喘发作有促进作用^[21],所以根据本模型观察哮喘发作的特点,造模的激发时间应控制在第 5 周左右,可在较高 IgE 水平下激发,以获得较好的 EAR 和 LAR 反应图像。在第 38 天时 IgE 含量略有下降,可能是由于第 37 天激发时消耗了一些抗体,也可能是抗体在 5 周后就会出现下降的趋势,其具体原因还需要进一步研究。

本研究发现在低 IgE 含量时,很难观察到哮喘 EAR 和 LAR,高 IgE 含量时,更易观察到哮喘发作,且 EAR 和 LAR 更易连续出现,表明在一定范围内,随 IgE 含量增长,哮喘发作增强,与文献报道的 IgE 含量对哮喘发作有促进作用相符。但 IgE 并不是唯一影响因素,致敏除了产生 IgE 对哮喘发作造成影响外,致敏条件本身也会影响哮喘发作。本研究发现 IgE 含量相当的两组,其中添加 Al(OH)₃ 佐剂的组比未添加组更能促进 EAR 和 LAR 的出现,本研究还发现添加了 Al(OH)₃ 佐剂致敏的 6 组中,每组有超过一半的动物可连续观察到 EAR 和 LAR,未添加组则很难观察到,说明 Al(OH)₃ 佐剂除了促进 IgE 生成,加强致敏反应外,也能促进哮喘发作。与文献报道的 Al(OH)₃ 能促进 Th2 反应增强,即 Al(OH)₃ 有利于哮喘发展^[22]相一致。所以本模型适宜选择能产生较高 IgE 且添加 Al(OH)₃ 佐剂的方法来致敏。

在最佳造模方法的确立方面,本研究发现 OVA 0.01 组显示出低 IgE 水平,与正常对照组没有明显差异,提示单纯使用 0.01 mg OVA 致敏效果欠佳,且激发后无法观察到 EAR 和 LAR,该方法不适合进行造模。IgE 含量高且添加 Al(OH)₃ 佐剂的 OVA 10.0 & Al(OH)₃100 和 OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 组相比其他组更易连续观察到 EAR 和 LAR,两组均能产生较好的 EAR,但 LAR 部分,使用 Al(OH)₃ 胶体时有的动物不能出现 LAR,而使用干粉组全部出现 LAR。二组虽然 IgE 水平相近,但使用的佐剂剂型和含量不同,胶体与 OVA 需按照一定体积比混合才能保证稳定性,其最大使用量即为 OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 组的用量(含 Al(OH)₃ 4 mg),干粉

只能配成混悬液不受稳定性限制可以按需使用,所以干粉组能全部出现 LAR 可能与其使用的 Al(OH)₃ 含量高,而使 Th2 反应增强有关。同时,在其他组中,OVA 剂量相同佐剂剂量不同时,高剂量佐剂组更易连续观察到 EAR 和 LAR,也从一定程度上说明 Al(OH)₃ 佐剂含量高时更利于促进哮喘发作。对于本研究的模型,想要观察到好的 EAR 和 LAR 图像,不仅要选择较高的 IgE 含量同时还要选择合适的佐剂。当研究主要关注 LAR,特别是关注炎症反应部分的研究时,推荐使用本研究中 OVA 10.0 & Al(OH)₃100 组的造模方法。主要关注 EAR 时,也可将 Al(OH)₃ 干粉换成 Al(OH)₃ 胶体,使用 OVA 10.0 & Al(OH)₃ gel 4 组的造模方法,相比使用干粉,胶体使用量少,且易与 OVA 混合,方便注射,但某些动物有无法产生 LAR 的风险,对 EAR 无影响,所以需根据实际情况选择。

本研究发现,OVA 混合 Al(OH)₃ 联合致敏,其注射点处会形成持久性结节,一直到第 38 天处死时,仍不消退,透过皮肤触摸时结节质硬,不能移动。切开皮肤后看到结节薄膜完整,剪开后内部为湿润粉状,可能是聚集在一起的 Al(OH)₃,起到对 OVA 缓释的作用,减少注射后 OVA 扩散,达到持久致敏的效果(图 5,见封二),此现象也可能与文献报道的铝佐剂能吸附抗原,形成抗原贮存库,增强抗原免疫原性^[23]相关。

本研究遵循哮喘发病机制即 I 型超敏反应,变应原致敏激发后观察到了哮喘发作全过程,和嗜酸性粒细胞浸润为主的炎症反应,成功建立了 OVA 致敏的,在挪威褐鼠无创且清醒的状态下,可观察和记录到过敏性哮喘发作全过程的动物模型。确立了最佳致敏液配比为 OVA10 mg/只混合 Al(OH)₃100 mg/只,第 2 次致敏强化时间为 7 d 以内,激发时间为第 35 天左右。

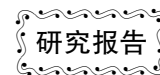
本模型作为国内首个以 OVA 作为抗原,在动物清醒状态下记录哮喘发作全过程的挪威褐鼠模型,弥补了以往哮喘动物模型需要麻醉的不足,更加贴近人类患者进行哮喘激发试验的情况,能完整模拟哮喘患者发病到缓解的全过程,可连续观察 EAR 和 LAR 反应,进行长达 16 h 或更长的记录,其数值和图像也可同步展示出来,方便进行实时观测。而且,应用该方法可对同一动物进行多次无创伤的检测,可进行手术、药物等干预因素施加前后的自身对比。本模型不仅可用于哮喘机理研究,也为哮喘

治疗药物研究提供了一种新的工具和方法。有望在将来的哮喘研究中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Twentyman OP, Finnerty JP, Holgate ST. The inhibitory effect of nebulized albuterol on the early and late asthmatic reactions and increase in airway responsiveness provoked by inhaled allergen in asthma [J]. *Am Rev Respir Dis*, 1991, 144(4): 782-787.
- [2] 莫碧文, 王昌明, 张珍祥, 等. 雷公藤对哮喘大鼠气道重构及磷脂酰肌醇 3 激酶表达的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2007, (3): 359-364.
- [3] Chen CG, Wang HY, Dai Y, et al. Tripterygium polyglycosid attenuates the established airway inflammation in asthmatic mice [J]. *Chin J Integr Med*, 2013, 19(4): 282-288.
- [4] Zhao H, Zhang XD, Welinder H, et al. Anaphylactic bronchoconstriction in immunized guinea pigs provoked by inhalation and intravenous administration of hexahydrophthalic anhydride and methyltetrahydrophthalic anhydride [J]. *Allergy*, 1997, 52(1): 18-26.
- [5] Zhang XD, Lötvall J, Arakawa H, et al. Relationship between IgG1 levels and airway responses in guinea pigs actively and passively sensitized to hexahydrophthalic anhydride [J]. *Allergy*, 1998, 53(1): 20-27.
- [6] Moy LY, Jia Y, Caniga M, et al. Inhibition of spleen tyrosine kinase attenuates allergen-mediated airway constriction [J]. *Am J Resp Cell Molecular Biol*, 2013, 49(6): 1085-1092.
- [7] Zhang XD, Fedan JS, Lewis DM, et al. Asthma-like biphasic airway responses in Brown Norway rats sensitized by dermal exposure to dry trimellitic anhydride powder [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2004, 113(2): 320-326.
- [8] ZhangXD, Murray DK, Lewis DM, et al. Dose-response and time course of specific IgE and IgG after single and repeated topical skin exposure to dry trimellitic anhydride powder in a Brown Norway rat model [J]. *Allergy*, 2002, 57(7): 620-626.
- [9] Zosky GR, Sly PD. Animal models of asthma [J]. *Clin Exp Allergy*, 2007, 37(7): 973-988.
- [10] Haczku A, Chung KF, Sun J, et al. Airway hyperresponsiveness, elevation of serum-specific IgE and activation of T cells following allergen exposure in sensitized Brown-Norway rats [J]. *Immunology*, 1995, 85(4): 598-603.
- [11] Martin JG, Tamaoka M. Rat models of asthma and chronic obstructive lung disease [J]. *Pulm Pharmacol Ther*, 2006, 19(6): 377-385.
- [12] Hylkema MN, Hoekstra MO, Luinge M, et al. The strength of the OVA-induced airway inflammation in rats is strain dependent [J]. *Clin Exp Immunol*, 2002, 129(3): 390-396.
- [13] Wu CJ, Chou HW, Liou CJ, et al. Prophylactic vaccination with adjuvant monophosphoryl lipid A prevents Th2-mediated murine asthmatic responses [J]. *J Asthma*, 2013, 50(4): 327-333.
- [14] Spiess PC, Kasahara D, Habibovic A, et al. Acrolein exposure suppresses antigen-induced pulmonary inflammation [J]. *Respir Res*, 2013, 14(1): 107.
- [15] Noviello MLM, Batista NV, Dourado LPA, et al. Prolonged ingestion of ovalbumin diet by OVA sensitized mice suppresses mBSA-induced arthritis [J]. *Cell Immunol*, 2013, 284(1): 20-28.
- [16] Taher YA, Henricks PAJ, van Oosterhout AJM. Allergen-specific subcutaneous immunotherapy in allergic asthma: immunologic mechanisms and improvement [J]. *Libyan J Med*, 2010, 5: 5303 - DOI: 10.3402/ljm.v5i0.5303
- [17] Hamelmann E, Schwarze J, Takeda K, et al. Noninvasive measurement of airway responsiveness in allergic mice using barometric plethysmography [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 1997; 156(3): 766-775.
- [18] 谢敏, 刘先胜, 徐永健, 等. 一种无创性检测哮喘大鼠气道高反应性的方法 [J]. *华中科技大学学报:医学版*, 2007, 36(1): 138-140.
- [19] Pauwels R, Bazin H, Platteau B, et al. The influence of different adjuvants on the production of IgD and IgE antibodies [C]. *Ann Immunol (Paris)*. 1979, 130(1): 49-58.
- [20] 崔红花, 郭娇, 杨超燕, 等. 不同剂量卵蛋白对豚鼠血清中 IgE 的影响 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(6): 141-143.
- [21] Tanaka A, Jinno M, Hirai K, et al. Longitudinal increase in total IgE levels in patients with adult asthma; an association with poor asthma control [J]. *Respir Res*, 2014, 15(1): 144.
- [22] Brewer JM, Conacher M, Hunter CA, et al. Aluminium hydroxide adjuvant initiates strong antigen-specific Th2 responses in the absence of IL-4-or IL-13-mediated signaling [J]. *J Immunol*, 1999, 163(12): 6448-6454.
- [23] 湛琳丽, 温昊, 祝明, 等. 铝佐剂的特性及影响因素 [J]. *畜牧市场*, 2009, 5: 13-15.

[修回日期]2015-04-25



利用 TALEN 技术高效制备 TXNIP 基因敲除小鼠模型

张欢欢¹, 刘楚新², 马 月¹, 肖丽萍², 李飞达², 应华忠¹, 刘 欢²

(1. 浙江省医学科学院浙江省实验动物中心, 杭州 310013; 2. 深圳华大基因研究院, 深圳 518083)

【摘要】 目的 利用显微注射技术注射敲除 *Txnip* 基因的 TALEN mRNA 获得 TXNIP 敲除小鼠。**方法** 在线设计 *Txnip* 敲除位点, 构建 TALEN 载体并在细胞水平验证剪切活性, 体外转录 TALENs 成 mRNA 并通过显微注射技术注射到 C57BL/6J 小鼠受精卵, 对 F0 代小鼠进行 DNA 水平鉴定获得 TXNIP 敲除小鼠。**结果** 在 *Txnip* 第一外显子上设计了 TALEN 识别剪切位点, 并在细胞水平验证具有剪切活性, 注射 mRNA 到受精卵获得了 4 只敲除小鼠, 其中 2 只 *Txnip* 发生移码突变, 成功制备了 TXNIP 敲除小鼠。**结论** 通过注射 TALENs mRNA 可以高效制备 TXNIP 敲除小鼠。

【关键词】 TALEN; 显微注射; TXNIP; 基因敲除; 模型; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0009-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.002

Efficient preparation of a TXNIP knockout mouse model by transcription activator-like effector nucleases (TALEN)

ZHANG Huan-huan¹, LIU Chu-xin², MA Yue¹, XIAO Li-ping², LI Fei-da², YING Hua-zhong¹, LIU Huan²

(1. Zhejiang Laboratory Animal Center, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;

2. BGI-Shenzhen, Shenzhen 518083)

【Abstract】 Objective To knockout the murine *Txnip* gene using microinjection of transcription activator-like effector nuclease (TALEN) mRNAs. **Methods** TALEN knockout site recognizing *Txnip* was designed by tools on line, then constructed the vectors and assayed its cleavage activity at cellular level. TALEN mRNA was transcribed *in vitro* and microinjected into C57BL/6J mouse zygotes. F0 mice were verified at DNA level with *Bam*HI and TXNIP-knockout mice were obtained. **Results** We designed and constructed TALENs which recognized and cut the first exon of *Txnip*, and got four TXNIP knockout mice, among which two were frameshift mutation, demonstrating that the TXNIP-knockout mice were generated by TALEN technique. **Conclusions** Microinjection of *in vitro* transcribed TALEN mRNAs into murine zygotes is a highly effective and convenient way to develop TXNIP-knockout mouse model.

【Key words】 TALEN; Microinjection; TXNIP; Gene knockout; Model, mouse

基因敲除小鼠模型是研究基因功能的重要工具之一, 最早科学家利用同源重组技术制备基因敲除小鼠 ES 细胞系, 然后通过囊胚注射制备基因敲

除小鼠^[1,2], 近年来兴起的基因组编辑工具, 例如锌指核酸酶 ZFN^[3], 转录激活因子样效应物核酸酶 TALEN^[4], 规律成簇间隔短回文重复序列 CRISPR 以及 CRISPR 相关蛋白系统 CRISPR/Cas 系统^[5], 都

[基金项目] 浙江省卫生高层次创新人才项目, 浙江省科技厅院所专项(2014F10033)。

[作者简介] 张欢欢(1985-), 女, 研究实习员, 研究方向: 动物疾病模型。E-mail: zhanghuanhuan2014@126.com。

[通讯作者] 刘欢(1984-), 男, 助理研究员, 研究方向: 转基因动物开发。E-mail: liuhuan@genomics.cn。

大大提高了基因敲除小鼠制备效率。TALEN (transcription activator-like effector nucleases) 通过类转录激活因子效应物 (TALE) 识别 DNA 序列,并在特定位点对 DNA 进行切割,形成双链断裂 (DSB),随后在非同源末端连接 (NHEJ) 修复机制下形成随机的多个碱基的插入或删除,从而实现基因敲除^[6]。

硫氧还蛋白结合蛋白 (thioredoxin-interacting protein, *Txnip*) 通过与硫氧还蛋白 (thioredoxin, Trx) 结合抑制其活性,从而发挥调节氧化还原的作用^[7]。*TXNIP* 不仅通过调节 NLRP3 参与 2 型糖尿病的发生^[8],而且是肿瘤抑制相关基因,与黑色素瘤、肝细胞癌、乳腺癌、白血病等联系密切^[9]。本研究采用 TALEN 技术敲除 C57BL/6J 小鼠 *Txnip* 基因,为进一步研究 *Txnip* 的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 TALENs 位点设计

根据 NCBI 上 *Txnip* 基因序列,利用 TALEN 在线设计工具 (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx>) 设计基因敲除位点。TALENs 敲除靶序列如下: TALEN-L 靶向 5'-TGTGAAGTTACCCGAGTC-3', TALEN-R 靶向 5'-TGGCCACGCCGCAAGCCA-3'。中间的 spacer 序列为 AAAGCCGTCAGGATCC,其中 GGATCC 为 *Bam*HI 酶切位点。

1.2 TALENs 载体构建

采用 Golden gate TALEN and TAL Effector kit^[10] 将识别靶序列的 RVD 模块构建到 pTAL3 载体上。然后将 TALEN 片段通过 *Afl*III 和 *Xho*I 双酶切构建到 pcDNA3.1 载体上,使得 TALEN 表达由 CMV 或者 T7 启动子启动,其中 CMV 启动 TALENs 在动物细胞中表达,T7 启动 TALENs 体外转录成 mRNA。将测序正确的 TALENs 表达载体采用无内毒素质粒提取试剂盒 (OMEGA) 提取质粒备用。

1.3 TALENs 载体活性验证

复苏小鼠 Hepa1-2 细胞系,用含 10% FBS 的 DMEM 培养基在 6 孔板上进行培养,培养条件为 5% 37℃, CO₂。采用 lipofectamine (Invitrogen) 将 TALEN-F 和 TALEN-R 共转染细胞,并且以 EGFP 转染作为阴性对照,转染后继续培养。48 h 后用 0.25% 胰酶 (Life technologies) 消化收集细胞,提取 DNA。设计活性鉴定引物,引物序列如下:TXNIP-F

为 5'-TCGGCTCAATCATGGTGATGT-3', TXNIP-R 为 5'-TAGGGGGGTGAAGGCTAGTGA-3'。以细胞 DNA 为模板进行 PCR 扩增,并采用 *Bam*HI 进行酶切鉴定,其中扩增片段大小为 421 bp,酶切片段为 146 bp + 275 bp。

1.4 体外转录

*Afl*III 和 *Xho*I 双酶切 TALENs 无内毒素质粒,电泳回收片段,并用 cycle-purekit (OMEGA) 进行纯化。以纯化片段为模板,采用 mMESSAGE mMACHINE T7 Kit (Life Technologies) 进行体外转录合成加帽 mRNA,再用 Poly (A) Tailing Kit (Life Technologies) 对 mRNA 进行加尾。将转录的稳定 mRNA 纯化回收并用显微注射缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl/0.1 mmol/L EDTA, pH 7.4) 稀释到 100 ng/μL, -80℃ 保存备用。

1.5 显微注射

C57BL/6J 品系小鼠由上海市西普尔必凯实验动物有限公司提供,实验动物生产许可证号 SCXK (沪)2013-0016; ICR 小鼠由浙江省医学科学院提供,实验动物生产许可证号 SZXK (浙)2014-0001。实验动物使用许可证号:SYXK (浙)2014-0008。将 *Txnip* 的 TALEN-L 和 TALEN-R mRNA 混合在一起后在显微镜 (Nikon) 下利用显微操作系统 (Eppendorf) 注射到 C57BL/6J 的受精卵中,并移植到 ICR 受体雌鼠,具体实验方法参考小鼠胚胎操作实验手册^[11]。

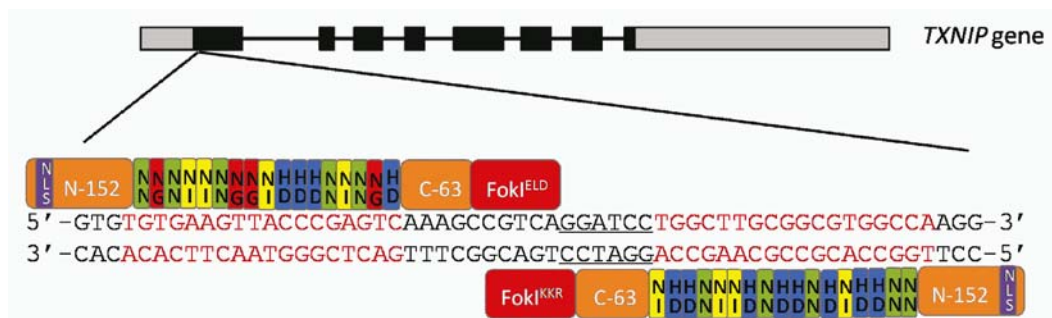
1.6 突变检测及基因型分析

取出生 1 周龄小鼠鼠尾提取基因组 DNA,按照活性鉴定方法对 F0 代小鼠进行鉴定。并将 *Bam*HI 酶切鉴定为阳性的小鼠的 PCR 扩增产物连接到 T 载体上,进行 Sanger 测序 (Invitrogen),进行突变基因型分析。

2 结果

2.1 TALEN 载体构建及活性鉴定

小鼠 *Txnip* 基因有两个已知转录本,为了高效敲除 TXNIP 蛋白表达,本研究选择的敲除位点为 *Txnip* 基因的第一外显子区域两个转录本重叠的部分,如图 1。TAL-effector 识别模块 HD、NG、NI、NN 分别识别碱基 C、T、A、G^[12],因此本研究中识别 *Txnip* 的模块序列分别为 5'-NN-NG-NI-NI-NN-NG-NG-NI-HD-HD-HD-NN-NI-NN-NG-HD-3' 和 5'-NN-NN-HD-HD-NI-HD-NN-HD-HD-NN-HD-NI-NI-NN-

图 1 *Txnip* 基因敲除 TALENs 位点Fig. 1 The TALENs binding site in the mouse *Txnip* gene

HD-HD-NI-3'。为了便于活性鉴定及后期小鼠阳性鉴定,本研究识别序列中间的 spacer 含有 *Bam*HI 酶切位点,如图 1 所示。

将构建的好的 TALENs 质粒转染小鼠 Hepa1-2 细胞系,进行活性鉴定。如图 2 所示,与阴性对照相比,*Bam*HI 酶切后,*Txnip* TALENs 转染的细胞 DNA 有未切开片段,说明其部分 DNA 样品 *Bam*HI 酶切位点被破坏,进而验证了本研究采用的 TALENs 有剪切活性。

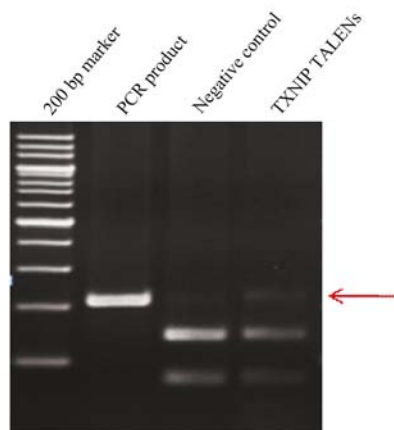
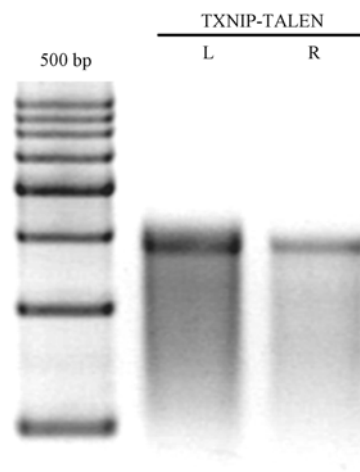
图 2 *Txnip* TALENs 剪切活性验证酶切电泳图

Fig. 2 Cleavage activity of TALENs by restriction fragment length polymorphism analysis

2.2 TXNIP 基因敲除小鼠构建及鉴定

体外转录分别得到 TALEN-L 和 TALEN-R 的 mRNA,如图 3。将 mRNA 分别稀释到 100 ng/ μ L 后等量混合进行胞质注射,共注射 400 枚受精卵,移植 383 枚到 14 只 ICR 受体母鼠,其中 8 只怀孕,出生 26 只 F0 代小鼠。对出生的 26 只 F0 代小鼠进行 PCR 酶切鉴定,从图 4A 可以看出,跟阴性对照(N)相比,11#,20#,22#,26#都有 *Bam*HI 未切开片段。经 Sanger 测序验证,11#小鼠属于嵌合体,有 3 种基因型,包括 WT、缺失 21 bp、缺失 4 bp,20#、22#、26#

小鼠属于基因单敲除,分别缺失 15 bp、10 bp、19 bp (图 4B)。鉴定结果显示,26 只 F0 代小鼠有 4 只敲除阳性小鼠,敲除效率为 15.4%,其中 22#和 26#小鼠 *Txnip* 发生移码突变,可作为 F0 代阳性小鼠继续繁育获得 TXNIP 双敲除模型。本研究获得了 *Txnip* 基因敲除小鼠 founder,可作为基因功能研究工具深入探讨 *Txnip* 基因的生物学活性。

图 3 *Txnip* TALENs 体外转录 mRNAFig. 3 *Txnip* TALEN mRNAs transcribed *in vitro*

3 讨论

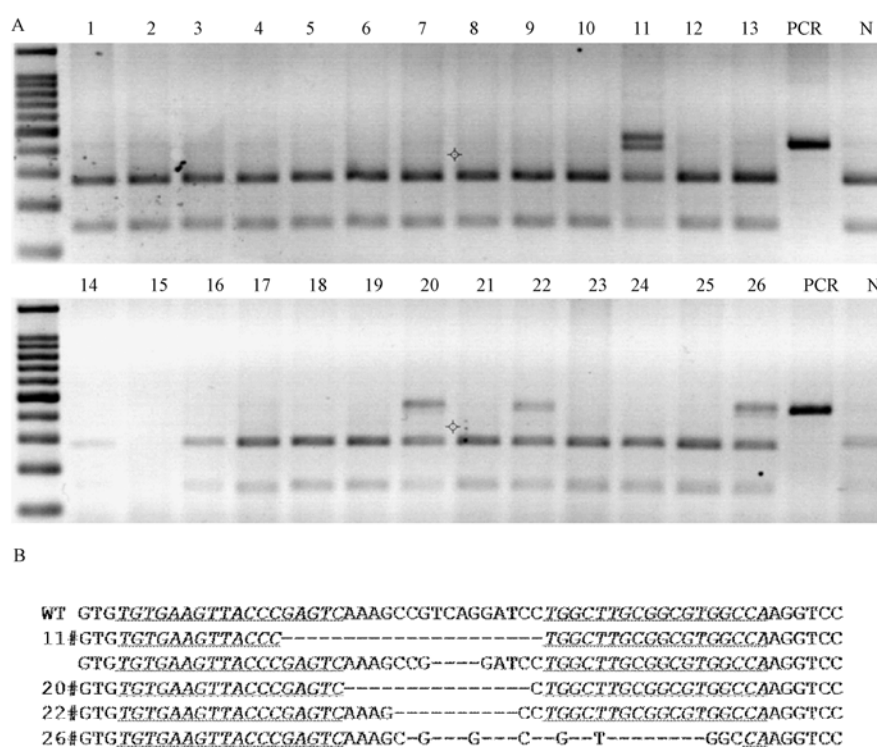
相对于传统打靶同源重组 10^{-6} 概率,基因组编辑工具大大提升了基因敲除的效率,因而在基因功能研究领域快速推广。TALEN 技术 2012 年被 Science 杂志评为十大科学突破之一,具有操作简单,特异性高等特点,广泛应用于动物、植物、微生物等多个物种^[13]。通过截短 TALE 蛋白的 N-端和 C-端并连接异源 FokI (ELD/KKR) 实现的 TALEN 系统优化可以有效提高剪切效率并降低脱靶效率^[14], Xin 等^[15] 采用该优化系统获得 89.5% 的敲除细胞系。本研究实验结果显示 *Txnip* 敲除阳性率为

15.4%, 远低于该系统在其他基因敲除动物制备的效率^[16,17], 可能原因有两种, 第一本研究构建的 TALEN 活性低于其他研究者选择的 TALEN 的活性, 因而造成显微注射获得的阳性受精卵较少; 第二 *Txnip* 基因本身参与细胞的凋亡^[9], 对细胞的生长发育有一定的影响, 造成出生小鼠阳性率较低。

通过胞质注射 TALEN mRNA 的方法制备的基因敲除动物模型, 其部分 F0 代基因型为嵌合体^[18], 这跟注射的 mRNA 量有一定的关系, 当受精卵发育到二细胞期或者四细胞期时, 仍然有表达 TALEN 的 mRNA 进行翻译并对基因组进行剪切, 因此发育的囊胚存在多种基因型^[4]。本研究获得的 11# *Txnip* 敲除小鼠表现为 3 种基因型, 属于嵌合体。多数嵌合体小鼠繁育的 F1 代小鼠能够将不同的基因型分离出来, 并保持稳定遗传。因此 TALEN 技术虽然能够快速制备基因敲除动物模型, 获得纯合的敲除模型则需要更长的时间进行繁育和筛选。

TXNIP (thioredoxin-interacting protein) 具有多种

生物学功能, 尤其在氧化还原平衡中起着重要作用^[19]。TXNIP 既可以通过 ASK1-Trx-TXNIP 信号通路调节细胞凋亡^[20]、抑制 DNA 转录^[21], 还可以与 NLRP3 结合激活炎症反应^[22], 因而 TXNIP 可能发挥抑制肿瘤的功能, 尤其是在肝癌^[23]、乳腺癌^[24]、膀胱癌^[25]、白血病^[26]等癌症中表达量均显著下降。本研究通过注射敲除 *Txnip* 的 TALEN mRNA 构建的 TXNIP 敲除小鼠, 除了 *Txnip* 基因序列发生改变, 没有引入任何外源片段, 相对于传统方法更加“干净”。除此之外, TALEN 技术敲除基因表达的原理是识别特异序列并进行剪切形成双链断裂 (double strand break, DSB), 通过非同源末端修复引入序列改变。有报道表明, 切割位点越靠近 5' 端基因表达起始位点, 对其形成的蛋白功能影响越大, 从而基因敲除的效应越明显^[27]。本研究设计的识别序列在 *Txnip* 基因的第一外显子, 而且是两个转录本重叠的部分, 因而本研究获得的 TXNIP 敲除小鼠是研究 TXNIP 功能的良好模型。



A: 出生小鼠 *Txnip* 基因 PCR 产物 *Bam*HI 酶切鉴定电泳结果; B: 酶切鉴定阳性小鼠测序结果。

图 4 *Txnip* 小鼠鉴定结果

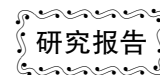
: Genotyping of all newborn mice by gel electrophoresis of *Bam*HI digested PCR products spanning the *Txnip* gene target site; B: Sanger sequencing of positive founder mice which were identified by *Bam*HI digestion.

Fig. 4 Identification of TALEN-induced *Txnip* mutants in the founder mice.

参考文献:

- [1] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells [J]. *Cell*, 1987, 51(3): 503–512.
- [2] Mansour SL, Thomas KR, Capecchi MR. Disruption of the proto-oncogene int-2 in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes [J]. *Nature*, 1988, 6197(336): 348–352.
- [3] Carbery ID, Ji D, Harrington A et al. Targeted genome modification in mice using zinc-finger nucleases [J]. *Genetics*, 2010, 186(2): 451–459.
- [4] Sung YH, Baek IJ, Kim DH, et al. Knockout mice created by TALEN-mediated gene targeting [J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(1): 23–24.
- [5] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918.
- [6] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148.
- [7] Nishiyama A, Matsui M, Iwata S, et al. Identification of thioredoxin-binding protein-2/vitamin D(3) up-regulated protein 1 as a negative regulator of thioredoxin function and expression [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(31): 21645–21650.
- [8] 王定坤, 陈广, 陆付耳. NLRP3 炎症小体与 2 型糖尿病的研究进展 [J]. *生理科学进展*, 2014, 45(2): 111–114.
- [9] 李立夫, 梁莉. TXNIP 基因与肿瘤发生及转移 [J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, 28(3): 222–226.
- [10] Cermak T, Doyle EL, Christian M, et al. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting [J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(12): e82.
- [11] 孙青原, 陈大元. 小鼠胚胎操作实验手册(第 3 版) [M]. 化学工业出版社. 2006: 235–241.
- [12] Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31(7): 397–405.
- [13] 沈延, 黄鹏, 张博. TALEN 构建与斑马鱼基因组定点突变的实验方法与流程 [J]. *遗传*, 2013, 35(4): 533–544.
- [14] Bedell VM, Wang Y, et al. In vivo genome editing using a high-efficiency TALEN system [J]. *Nature*, 2012, 7422(491): 114–118.
- [15] Xin J, Yang H, Fan N, et al. Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs [J]. *PLoS ONE*. 2013, 12(8): e84250.
- [16] 李飞达, 李勇, 刘欢, 等. 利用 TALENs 和手工克隆技术高效获得 GHR 基因敲除巴马猪 [J]. *遗传*, 2014, 36(9): 903–911.
- [17] Davies B, Davies G, Preece C, et al. Site specific mutation of the Zic2 locus by microinjection of TALEN mRNA in mouse CD1, C3H and C57BL/6J oocytes [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(3): e60216.
- [18] Tesson L, Usal C, Ménoret S, et al. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(8): 695–696.
- [19] Spindel ON, World C, Berk BC. Thioredoxin interacting protein: redox dependent and independent regulatory mechanisms [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 16(6): 587–596.
- [20] Lu J, Holmgren A. Thioredoxin system in cell death progression [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(12): 1738–1747.
- [21] Minn AH, Pise-Masison CA, Radonovich M, et al. Gene expression profiling in INS-1 cells overexpressing thioredoxin-interacting protein [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 336(3): 770–778.
- [22] Zhou R, Tardivel A, Thorens B, et al. Thioredoxin-interacting protein links oxidative stress to inflammasome activation [J]. *Nat Immunol*, 2010, 11(2): 136–140.
- [23] Kwon HJ, Won YS, Suh HW, et al. Vitamin D3 upregulated protein 1 suppresses TNF- α -induced NF- κ B activation in hepatocarcinogenesis [J]. *J Immunol*, 2010, 185(7): 3980–3989.
- [24] Butler LM, Zhou X, Xu WS, et al. The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002, 99(18): 11700–11705.
- [25] Nishizawa K, Nishiyama H, Matsui Y, et al. Thioredoxin-interacting protein suppresses bladder carcinogenesis [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(10): 1459–1466.
- [26] Zhou J, Bi C, Cheong LL, et al. The histone methyltransferase inhibitor, DZNep, up-regulates TXNIP, increases ROS production, and targets leukemia cells in AML [J]. *Blood*, 2011, 118(10): 2830–2839.
- [27] Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, et al. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Science*, 2014, 6166(343): 80–84.

[修回日期]2015-04-20



不同品系小型猪对高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒的敏感性筛选

潘金春^{1,2}, 任柏桦^{3,4}, 闵凡贵^{1,2}, 陈瑞爱^{3,4}, 王希龙^{1,2},
王林川^{3,4}, 王凤国³, 罗书明³, 叶健聪³, 刘 玲³, 黄鹏华³

(1. 广东省实验动物监测所, 广东 广州 510663; 2. 广东省实验动物重点实验室, 广东 广州 510663;
3. 广东大华农动物保健品股份有限公司, 广东 新兴 527400; 4. 华南农业大学兽医学院, 广东 广州 510642)

【摘要】 目的 筛选对高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒 (HP-PRRSV) 敏感的小型猪品系, 以用于 HP-PRRS 活疫苗的评价。**方法** 本研究选择蓝塘猪、蕨麻小型猪、巴马小型猪、五指山小型猪 (白系) 接种 PRRSV NVDC-JXA1 株强毒, 并以本地二元杂猪作为对照。攻毒后每天观察动物精神、食欲、死亡等情况, 死亡动物进行剖检, 并采取肺组织做 RT-PCR 检测病毒, 连续观察 5 周, 试验结束时采取存活动物血清分别检测 PRRSV 抗体。**结果** 攻毒后各组都有动物出现精神沉郁、食欲下降、死亡等现象, 死亡动物 RT-PCR 检测都显示为阳性, 存活动物 PRRSV 抗体检测阳性。从死亡率看, 巴马小型猪和五指山小型猪白系对 PRRSV NVDC-JXA1 株强毒的敏感性最高, 并且敏感性超过了对照组二元杂猪。**结论** 巴马小型猪和五指山小型猪白系对 HP-PRRSV 敏感, 可用于 HP-PRRS 活疫苗的检验。

【关键词】 小型猪; 高致病性猪繁殖与呼吸综合征病毒; 敏感性筛选

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2015) 06-0014-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.003

Susceptibility screening of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in several strains of minipigs

PAN Jin-chun^{1,2}, REN Bo-hua^{3,4}, MIN Fan-gui^{1,2}, CHEN Rui-ai^{3,4}, WANG Xi-long^{1,2}, WANG Lin-chuan^{3,4},
WANG Feng-guo³, LUO Shu-ming³, YE Jian-cong³, LIU Ling³, HUANG Peng-hua³

(1. Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663;

3. Guangdong Dahuanong Animal Health products Stock Co., Ltd., Xinxing 527400;

4. South China Agricultural University, College of Veterinary Medicine, Guangzhou 510642)

【Abstract】 Objective To screen strains of minipigs sensitive to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus (HP-PRRSV) for evaluation of HP-PRRS live vaccine. **Methods** Lantang pigs, Juema, Bama and Wuzhishan (white) minipigs were inoculated with virulent strain NVDC-JXA1 of PRRSV, and local binary hybrid pigs

【基金项目】 广东省科技计划项目 (2012B060300001), 广东省教育部产学研结合项目 (2012B091100466)。

【作者简介】 潘金春 (1979 -), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 比较医学、实验动物标准化和实验动物质量监测。Email: jcpa@sina.com; 任柏桦 (1988 -), 男, 研究方向: 预防兽医学。Email: 764684361@qq.com。

【通讯作者】 王希龙 (1963 -), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 小型猪遗传育种与实验动物化。Email: wangxilonggd@163.com; 王林川, 男, 博士, 教授, Email: lcwang65@163.com。

were used as control. The animals were continuously observed for 5 weeks on mental status, appetite, survival, etc. after inoculation of virus. The dead pigs were autopsied and the lung tissue samples were collected for detecting virus by RT-PCR. By the end of the experiment, serum of survival animals were collected for detecting PRRSV antibody by ELISA assay. **Result** The animals showed depression, anorexia, and other clinical signs and death in each group after inoculation. Meanwhile, the testing results were all positive in the RT-PCR and ELISA detection. Bama and Wuzhishan (white) minipigs were the most sensitive to virulent strain NVDC-JXA1 of PRRSV regarding mortality rate. **Conclusions** Bama and Wuzhishan (white) minipigs are sensitive to HP-PRRSV, and can be used for the inspection of HP-PRRS live vaccine.

【Key words】 Minipigs; Porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS; Highly pathogenic PRRS virus, HP-PRRSV; Susceptibility screening

猪繁殖与呼吸道综合征 (porcine reproductive and respiratory syndrome, PRRS) 又称为蓝耳病, 是目前全球养猪业面临的最重要的传染病之一, 并给养猪业造成了巨大的损失, 据估计 2004 年给美国养猪业造成约 5.6 亿美元的损失, 高于猪瘟的 3.64 亿美元和伪狂犬病的 0.36 亿美元^[1], 而到 2011 年 PRRS 造成的损失金额上升到了 6.44 亿美元^[2]。我国是世界上最大的养猪与猪肉消费大国, PRRS 也严重威胁着我国养猪业的安全, 特别是 2006 年我国南方部分省市发现的高致病性 PRRS (highly pathogenic PRRS, HP-PRRS) 给养猪业造成了巨大的经济损失, 该病是由于高致病性的 PRRSV 变异株 (NVDC—JXA1 株) 引起的^[3]。

目前 PRRS 没有特异的治疗方法, 疫苗免疫仍是最主要的防控措施^[4], 有临床应用证实^[5], HP-PRRS 活疫苗可以大幅度降低猪的 PRRS 疫病发病率及死亡率, 免疫效果十分理想。根据农业部第 1548 号公告^[6], HP-PRRS 活疫苗需要进行安全检验和效力检验, 而这两项都要用健康易感猪来进行检验。目前 HP-PRRS 疫苗检验用的易感猪主要为从本地收购的二元杂猪。

研究证明, 猪不但在解剖学、生理学、代谢和疾病发生机理等方面与人体十分接近, 还有易于饲养和捕捉, 繁殖周期短, 多产等特性, 是理想的实验动物。与普通家猪相比, 小型猪体型较小便于实验处理和饲养管理, 成本较低, 遗传选择、遗传控制也更符合实验动物的要求^[7]。目前小型猪已经在生命科学领域中得到了广泛的应用, 标准化程度较高。而从本地收购的二元杂猪标准化程度较低, 背景不清, 也有可能存在由于疫病流行等原因造成供应不足威胁。

为选择合适的敏感小型猪种, 本研究对蓝塘猪、蕨麻小型猪、巴马小型猪、五指山小型猪这几种

小型猪种进行了 HP-PRRSV 攻毒试验, 以便筛选出合适的小型猪种用于 HP-PRRS 活疫苗的检验。

1 材料和方法

1.1 实验动物

蓝塘猪来源于连平县深连生态农牧发展有限公司, 数量为 10 头; 蕨麻小型猪、巴马小型猪、五指山小型猪来源于广东省实验动物监测所和大华农公司合作建立的小型猪繁育基地, 其中五指山小型猪为近交群白系, 数量分别为 10 头、8 头和 3 头; 二元杂猪从本地购得, 数量为 5 头, 作为对照组。各猪种 4 周龄左右, 雌雄不限。实验动物生产许可证号为: SCXK (粤) 2013-0022, 设施使用许可证号为: SYXK (粤) 2013-0087。各猪种试验前采血清检测 PRRSV 抗体都呈阴性。

1.2 毒株

HP-PRRSV NVDC-JXA1 强毒株由中国动物疫病预防控制中心提供, 用 Marc-145 细胞进行培养, 测得 TCID₅₀ 为 $10^{5.0}$ /mL, 1:5 稀释备用。

1.3 试剂及仪器

PRRSV 抗体 ELISA 检测试剂盒由 IDEXX 公司提供, PRRSV RT-PCR 检测试剂盒由世纪元亨提供, PCR 仪为 Eppendorf 5333。

1.4 接种

每头猪的攻毒量为 2 mL, 其中病毒含量为 $6 \times 10^{4.0}$ TCID₅₀, 接种方法为肌肉注射。

1.5 观察内容

接种后每天观察动物精神、食欲、死亡等情况, 死亡动物进行剖检, 连续观察 5 周。

1.6 病毒检测

试验中死亡动物采取肺组织, 采用 RT-PCR 方法检测 PRRSV, 主要步骤如下: 病毒 RNA 抽提 → RT-PCR 扩增 (42℃ 45 min, 95℃ 3 min; 循环 94℃

30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 共 35 次;再 72℃ 延伸 7 min)→电泳;试验结束时存活动物前腔静脉丛采血 3 mL, 分离血清检测 PRRSV 抗体。

1.7 统计学方法

动物死亡情况用 SPSS 16.0 软件制作成生存曲线。

2 结果

2.1 一般观察

攻毒后从第 4 天开始各组陆续有动物出现精神沉郁、食欲下降现象,部分猪表现气喘、呼吸困难,并都有动物出现死亡,具体发病时间及发病率参见表 1。

表 1 各组动物发病时间及发病率
Tab.1 The onset time and incidence of the disease in animals of each group

品系 Strains	数量(头) Number	发病时间(d) Onset time	发病率 (发病数/总数) Incidence (case quantity/total)
蓝塘猪 Lantang pigs	10	6~10	5/10
蕨麻小型猪 Juema minipigs	10	6~9	4/10
巴马小型猪 Bama minipigs	8	4~9	8/8
五指山小型猪 Wuzhishan minipigs	3	5~8	3/3
二元杂猪 Binary hybrid pigs	5	5~10	5/5

2.2 死亡情况

攻毒后各组动物生存曲线见图 1, 动物死亡时间在接种后 15 d~21 d 之间。从死亡率来看,巴马小型猪和五指山小型猪白系最高,都达到了 100%,蓝塘猪、蕨麻小型猪都为 40%,对照组二元杂猪为 60%。

2.3 病理剖检

死亡动物剖检可见肺局部有灶性实变以及充血、出血变化,病变主要出现在肺心叶和尖叶。此外还有腹股沟淋巴结、扁桃体出现肿大、出血,皮下、肝脏、肾脏可见出血点或出血斑等病变。

2.4 病毒检测

2.4.1 RT-PCR:所有死亡动物都出现 436 bp 的特征性电泳条带(图 2),可判断结果为阳性。

2.4.2 PRRSV 抗体:未死亡动物抗体检测全为阳性。

3 讨论

PRRS 可以引起猪呼吸障碍、免疫抑制、生长缓慢、生产性能下降、繁殖性能下降,甚至死亡,可通过接触感染、空气传播、精液传播和垂直传播等多种途径传播,是一种高度接触性传染病,并可持续性感染,是养猪业的一个重大威胁^[8]。根据流行病学调查,目前我国所流行的 PRRSV 基本上均属于 HP-PRRSV,临床样品的阳性率达到 35.9%~60.8%^[9]。因此 HP-PRRS 的防控尤为重要。

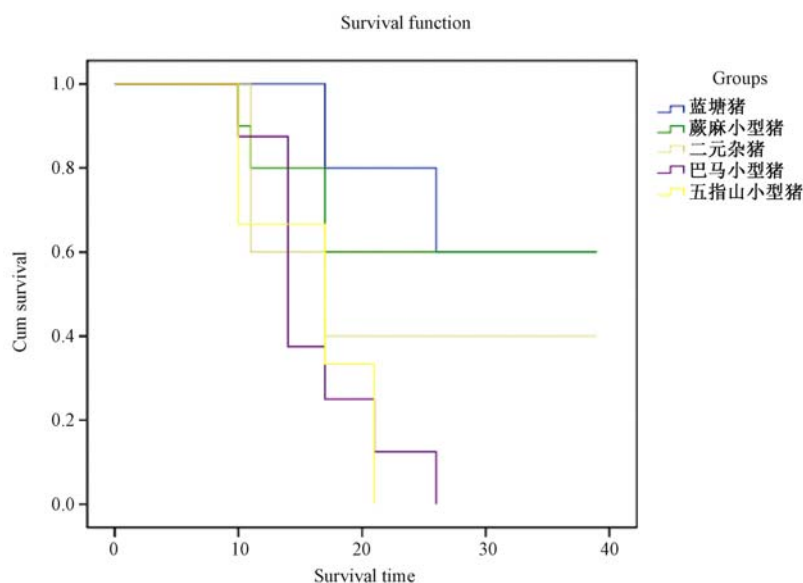
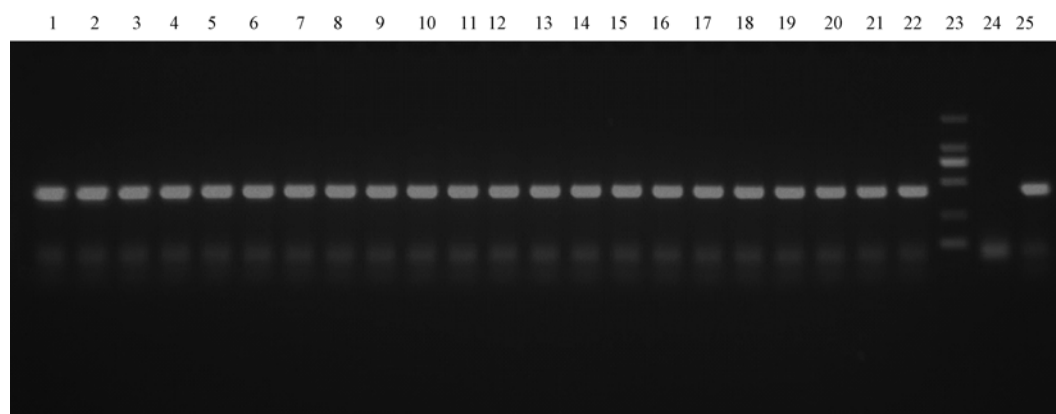


图 1 攻毒后各组生存曲线

Fig.1 Survival curves of the minipigs of each group after inoculation



注:1~22 泳道分别为蓝塘猪(4 头)、蕨麻小型猪(4 头)、巴马小型猪(8 头)、五指山小型猪(3 头)、二元杂猪(3 头);23 泳道为 marker(DL2000);24 泳道为阴性对照;25 泳道为阳性对照(436 bp 条带)

图 2 RT-PCR 检测电泳图 Note. Tracks 1~22: Lantang minipigs (4), Juema minipigs (4), Bama minipigs (8), Wuzhishan minipigs (3), Binary hybrid pigs (3); Track 23: DNA marker (DL2000); Track 24: Negative control; Track 25: Positive control (436 bp)

Fig. 2 The patterns of RT-PCR electrophoregram

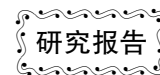
本研究选取的实验动物都为 PRRSV 抗体阴性,而攻毒后动物出现了 PRRS 的典型症状和病变,RT-PCR 检测为阳性,存活动物的 PRRSV 抗体全为阳性,说明动物死亡是由 HP-PRRSV 造成的,符合农业部《高致病性猪蓝耳病防治技术规范》高致病性蓝耳病的诊断标准。

接种 HP-PRRS 活疫苗是防控 PRRS 的有效方法,而检验该疫苗需要使用对 HP-PRRSV NVDC-JXA1 强毒株敏感的猪种,并且该猪种攻毒后 21 d 死亡率要达到 40% (2/5) 以上^[6]。本研究中所有动物的死亡时间在接种后 15 d~21 d 之间,符合 21d 内死亡的要求;对照组二元杂猪死亡率达到 60%,符合第 1548 号公告 40% 以上死亡率的要求,本次试验结果能够成立;从猪种上看,所有动物都出现死亡,且死亡率达到 40% 或 40% 以上,说明这 4 种猪对 PRRS 都有一定的敏感性;其中巴马小型猪和五指山小型猪白系死亡率达到 100%,初步说明这两种小型猪对 PRRS 比较敏感,其敏感性超过了对照组二元杂猪,可用于 HP-PRRS 活疫苗的检验。

参考文献:

- [1] Neumann EJ, Kliebenstein JB, Johnson CD, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome on swine production in the United States [J]. J Am Vet Med Assoc, 2005, 227(3): 385-392.
- [2] Holtkamp DJ, Kliebenstein JB, Neumann EJ, et al. Assessment of the economic impact of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on United States pork producers [J]. J Swine Health Prod. 2013, 21(2): 72-84.
- [3] 张青娟,王克领,张立宪,等. 高致病性蓝耳病的研究进展[J]. 中国畜牧兽医, 2008, 35(9): 105-107.
- [4] 张传红. 高致病性猪蓝耳病的防治技术[J]. 中国畜禽种业, 2014, (4): 132-133.
- [5] 许进红,黄跃明,尚建明,等. 高致病性猪蓝耳病活疫苗免疫效果观察及临床应用探讨[J]. 当代畜牧, 2014, 2:26-29.
- [6] 高致病性猪繁殖与呼吸道综合征活疫苗(JXA1-R 株)质量标准、说明书和内包装标签[E]. 中华人民共和国农业部公告第 1548 号.
- [7] 孙倩. 实验动物学基础[M]. 北京:北京科学技术出版社. 2005:75.
- [8] 陈溥言. 兽医传染病学[M]. 北京:中国农业出版社. 2008: 221-223.
- [9] 薛平,曲向阳. 我国高致病性蓝耳病研究进展[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(5): 138-139.

[修回日期]2015-04-21



慢性束缚应激模型致焦虑和抑郁共病的行为学研究

孙秀萍, 张楠, 高杰, 宋铭晶, 秦川

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

【摘要】 目的 建立焦虑抑郁共病动物模型, 为焦虑抑郁共病的神经生物学机制及治疗方法的研究奠定基础。**方法** C57BL/6J 小鼠随机分为正常组、模型组和西酞普兰组。采用慢性束缚加孤养方法建模, 模型组和西酞普兰组每日束缚 4 h (10:00 ~ 14:00), 连续进行 35 d, 单笼饲养。造模 14 d 后, 正常组和模型组给予生理盐水, 西酞普兰组给予西酞普兰 10 mg/kg, 腹腔注射, 注射剂量为 0.1 mL/10 g, 给药时间为 21 d。应用糖水偏爱实验和强迫游泳实验评价模型抑郁症状的转化效率, 应用空场实验和高架十字迷宫实验评价模型焦虑症状的转化效率, 同时观察西酞普兰对焦虑抑郁模型行为学改善作用。**结果** 糖水偏爱实验和强迫游泳实验结果显示, 慢性束缚模型组糖水偏爱指数明显下降, 强迫游泳不动时间明显延长, 与正常组比较差异具有显著性 ($P < 0.01$, $P < 0.01$)。空场实验结果显示, 模型组小鼠在中央区停留时间和运动路程明显减少, 与正常组比较差异具有显著性 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。西酞普兰增加模型小鼠的中央区时间及中央区运动路程 ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。高架十字迷宫实验结果显示, 模型组动物进入开臂次数比例及时间比例下降, 与正常组比较具有显著性差异 ($P < 0.05$, $P < 0.05$)。西酞普兰未能逆转这种行为学改变。**结论** 慢性束缚应激模型表现为焦虑抑郁共病, 转化效率稳定, 可作为焦虑抑郁共病动物模型, 用于焦虑抑郁共病生物学机制及其治疗研究。

【关键词】 慢性束缚; 应激; 小鼠, 焦虑症, 抑郁症

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0018-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.004

Chronic restraint stress produces comorbidity behavior of anxiety and depression disorders in mice

SUN Xiu-ping, ZHANG Nan, GAO Jie, SONG Ming-jing, QIN Chuan

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

【Abstract】 Objective To investigate the effect of chronic restraint stress on the comorbidity behavior of anxiety and depression disorders in mice. **Method** C57BL/6J mice were randomly divided into 3 groups ($n = 10$ per group): control (normal saline), chronic restraint stress (normal saline), and positive control (citalopram, 10 mg/kg). Citalopram and normal saline were administered by intraperitoneal injection. Chronic restraint stress and individual housing was applied to establish the stress model. The mice were individually housed and restrained for 4 h per day in a 50-mL polypropylene

[基金项目] 北京市自然科学基金资助项目 (资助编号: 7142105)。

[作者简介] 孙秀萍 (1974-), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 神经精神疾病药理及方法学。

[通讯作者] 秦川, 研究员, E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn。

conical tube with ventilation holes. This daily restraint was repeated for 35 consecutive days. Sucrose preference test and forced swim test were applied to evaluate the depressive behavior of the mice. Open field test and elevated plus maze test were used to assess the anxiety effect of chronic restraint stress in the mice. **Results** The sucrose intake was significantly reduced in the chronic restraint stress models compared with the control mice ($P < 0.01$). The immobility time was increased in the forced swim test ($P < 0.01$). The cumulative duration and distance moved in the center were decreased in the open field test ($P < 0.01, P < 0.05$). Chronic treatment with citalopram reversed the above mentioned behavior change. The open arm entry and open arm time were decreased in the elevated plus maze test ($P < 0.05, P < 0.05$). Citalopram did not reverse this behavior change. **Conclusions** Mouse models created by chronic restraint and individual housing stress display both anxiety and depressive behavior making them a potent animal model in the treatment of comorbidity of anxiety and depression disorders.

【Key words】 chronic restraint; stress; mice; anxiety; depression

近年来,焦虑症和抑郁症发病率不断攀升。二者虽是相互独立的疾病单元,但在临床上共病发生率很高,约有一半的抑郁症患者伴发焦虑症^[1]。应激因素是这两种精神疾患的重要风险因子,因此应激动物模型广泛应用于焦虑症和抑郁症神经生物学机制及其治疗策略研究^[2]。但目前,尚缺乏转化效度稳定的焦虑、抑郁共病应激动物模型。动物实验研究表明,非社会应激因素引起明显的抑郁症状,但焦虑行为表现不稳定,而社会应激因素更多产生焦虑行为,所伴发的抑郁症状不稳定^[3]。建立转化效度更为稳定的焦虑抑郁共病动物模型,对临床焦虑抑郁共病的治疗具有重要意义。慢性束缚应激,作为非社会应激因素,广泛应用于应激相关疾病的研究^[4]。孤养,即将动物单笼饲养,对于群居动物,是一种社会应激因素。本研究复合非社会应激因素和社会应激因素,采用慢性束缚加孤养应激方式,研究小鼠的焦虑和抑郁共病行为,建立稳定的焦虑、抑郁共病动物模型,为焦虑抑郁共病的病理生理机制及治疗研究奠定基础。西酞普兰(citalopram)是选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂,具有抗焦虑和抗抑郁双重作用。本研究同时观察西酞普兰对焦虑抑郁共病动物模型行为的改善作用。

1 材料和方法

1.1 动物

C57BL/6J 雄性小鼠,SPF 级,体重 25 g,30 只。由北京华阜康生物科技股份有限公司提供。许可证号:SCXK(京)2014-0004。动物使用许可证号:SYXK(京)2014-0029。动物自由进食进水,室内温度:(23~25)℃,相对湿度:(55±10)%。维持 12 h 光照/12 h 黑暗的昼夜节律。动物适应环境 1 周进行实验。

1.2 仪器

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

1.3 实验方法

动物随机分为正常组、慢性束缚组、西酞普兰组,每组 10 只。模型组和西酞普兰组动物单笼饲养,慢性束缚方法参照文献[5],将动物置于 50 mL 离心管(离心管上烙制直径 2 mm 小孔数十个,用于通风),每日束缚 4 h(10:00~14:00),连续进行 35 d。正常组动物 5 只/笼,不给予任何干预,放置在另一房间。造模 14 d 后,正常组和模型组给予生理盐水,西酞普兰组给予西酞普兰 10 mg/kg。三组均腹腔注射,注射剂量为 0.1 mL/10 g,给药时间为 21 d。造模结束,进行行为学实验。

1.3.1 糖水偏爱实验:根据文献报道^[6],糖水偏爱测试方法分为训练期和测试期。训练期内,使动物适应蔗糖饮水,第 1 个 24 h,给予动物两瓶 1% 蔗糖水,第 2 个 24 h,给予动物 1 瓶 1% 蔗糖水,1 瓶纯水。测试前不禁食禁水,测试期,同样给予动物 1 瓶 1% 蔗糖水,1 瓶纯水,测试时间为 15 h。为避免位置偏爱影响因素,测试中间,将两瓶位置互换。测试结束,计算糖水偏爱指数(糖水偏爱指数 = 糖水消耗/总液体消耗 × 100%)。

1.3.2 空场实验:方形空场环境尺寸为 50 cm × 50 cm × 30 cm(长 × 宽 × 高)。中央区是以空场中心点为中心,边长 20 cm 的正方形区域,边缘区宽 8 cm。将小鼠置于空场,观察 5 min 内的自发活动及在中央区和边缘区的停留时间。实验采用动物行为学视频跟踪系统,记录动物的运动路程、速度及在各区的停留时间等。

1.3.3 强迫游泳实验:动物在测试房间适应 1 h 后,进行强迫游泳实验。根据文献^[7],将小鼠放入

高 20 cm, 直径 12 cm, 水深 10 cm 的圆形玻璃容器中, 水温 25℃, 观察 6 min, 记录后 4 min 内动物的累计不动时间。判定不动的标准是动物在水中停止挣扎, 呈漂浮状态, 仅有细小的肢体运动以保持头部浮在水面。

1.3.4 高架十字迷宫实验: 高架十字迷宫由两对相对开臂和两对相对闭壁成十字交叉型组成, 开臂尺寸为 30 cm × 5 cm (长 × 宽), 闭臂尺寸为 30 cm × 5 cm × 15 cm (长 × 宽 × 高), 中央区尺寸为 5 × 5 cm, 连接四壁。四壁距离地面 100 cm。根据文献^[8], 将动物面对开臂方向, 放在中央区, 观察动物在开臂和闭臂中的活动情况。实验采用动物行为学视频跟踪系统, 记录动物进入开臂时间 (open arm time, OT) 和次数 (open arm entry, OE), 进入闭臂的时间 (close arm time, CT) 和次数 (close arm entry, CE)。计算动物进入开臂次数比例 ($OE\% = OE / (OE + CE) \times 100\%$) 以及开臂时间比例 ($OT\% = OT / (OT + CT) \times 100\%$)。

1.4 统计学方法

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

2 结果

2.1 慢性束缚模型对小鼠糖水偏爱实验的影响

如图 1 所示, 慢性束缚模型组糖水偏爱指数下降, 与正常组比较, 差异具有极显著性 ($P < 0.01$)。西酞普兰提高模型组糖水偏爱指数, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

2.2 慢性束缚模型对小鼠强迫游泳实验的影响

如图 2 所示, 慢性束缚模型组强迫游泳不动时间显著延长, 与正常组比较, 差异具有极显著性 ($P < 0.01$)。西酞普兰缩短强迫游泳不动时间, 与模型组比较, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。

2.3 慢性束缚模型对小鼠空场实验的影响

如图 3A 和 3B 所示, 慢性束缚模型组和正常组小鼠的运动路程和运动速度无显著性差异, 表明慢性束缚的应激方式未影响动物的运动能力。如图 3C 所示, 模型组小鼠在中央区时间明显减少, 与正常组相比, 差异具有极显著性 ($P < 0.01$); 西酞普兰增加小鼠的中央区时间, 与模型组相比, 差异具有显著性 ($P < 0.05$)。如图 3D 所示, 模型组小鼠在中

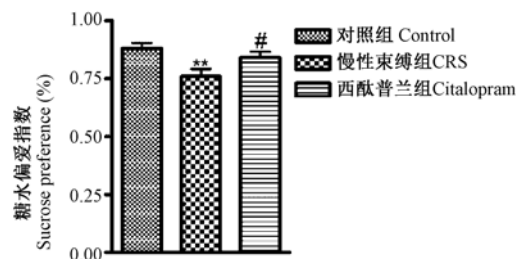


图 1 慢性束缚模型对糖水偏爱指数的影响

($\bar{x} \pm s$, ** $P < 0.01$,

与正常组比较; # $P < 0.05$, 与模型组比较)

Fig. 1 Effect of chronic restraint stress on the sucrose preference test in the mice ($\bar{x} \pm s$, ** $P < 0.01$, compared with the control group; # $P < 0.05$, compared with the model group)

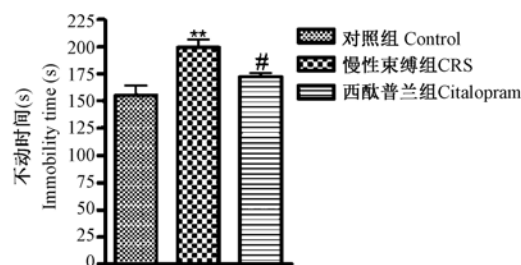


图 2 慢性束缚模型对强迫游泳实验的影响

($\bar{x} \pm s$, ** $P < 0.01$,

与正常组比较; # $P < 0.05$, 与模型组比较)

Fig. 2 Effect of forced swim test on the immobility time in the mice ($\bar{x} \pm s$, ** $P < 0.01$, compared with the control group; # $P < 0.05$, compared with the model group)

央区运动路程明显减少, 与正常组相比, 具有显著差异 ($P < 0.05$); 西酞普兰增加小鼠的中央区运动路程, 与模型组相比, 具有显著性差异 ($P < 0.05$)。

2.4 慢性束缚模型对小鼠高架十字迷宫的影响

如图 4A 所示, 慢性束缚模型减少小鼠进入开臂次数比例, 与正常组相比, 差异具有显著性 ($P < 0.05$); 西酞普兰组进入开臂次数比例增加, 但与模型组相比差异无显著性 ($P = 0.055$)。如图 4B 所示, 慢性束缚模型减少小鼠进入开臂时间比例, 与正常组相比, 差异具有显著性 ($P < 0.05$); 西酞普兰组进入开臂次数比例增加, 但与模型组相比差异无显著性。

3 讨论

动物模型的转化效度评价包括表观效度 (face validity)、预测效度 (predictive validity) 和结构效度

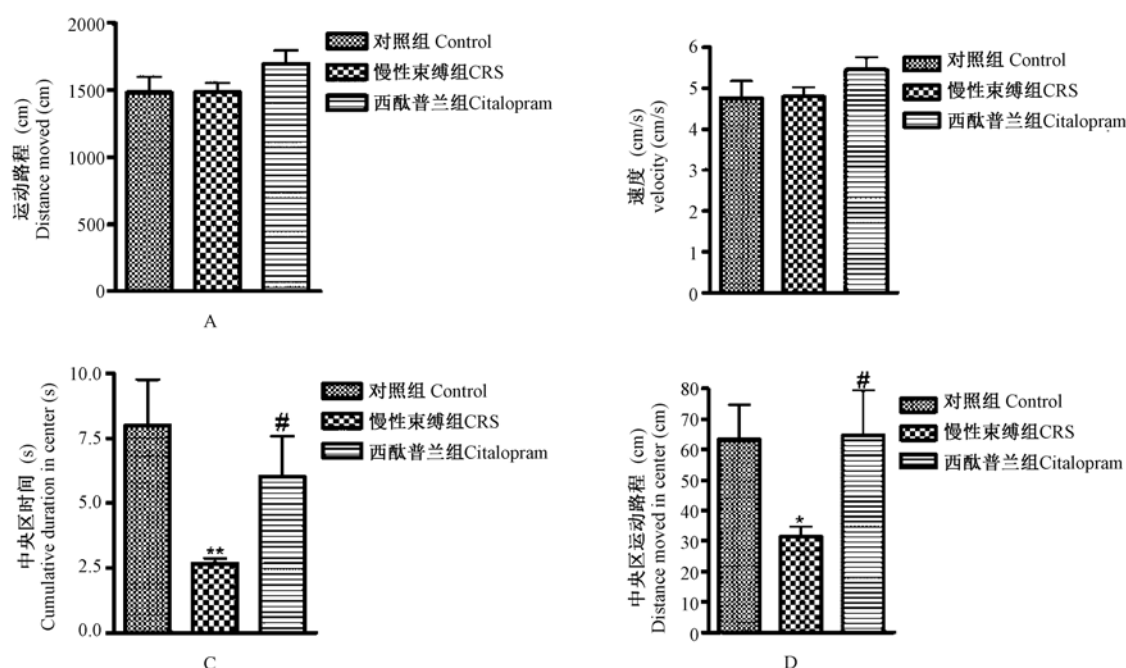


图3 慢性束缚模型对空场实验的影响($\bar{x} \pm s$, ** $P < 0.01$, 与正常组比较; # $P < 0.05$, 与模型组比较)

Fig.3 Effect of chronic restraint stress on open field test in the mice ($\bar{x} \pm s$ ** $P < 0.01$, compared with the control group; # $P < 0.05$, compared with the model group)

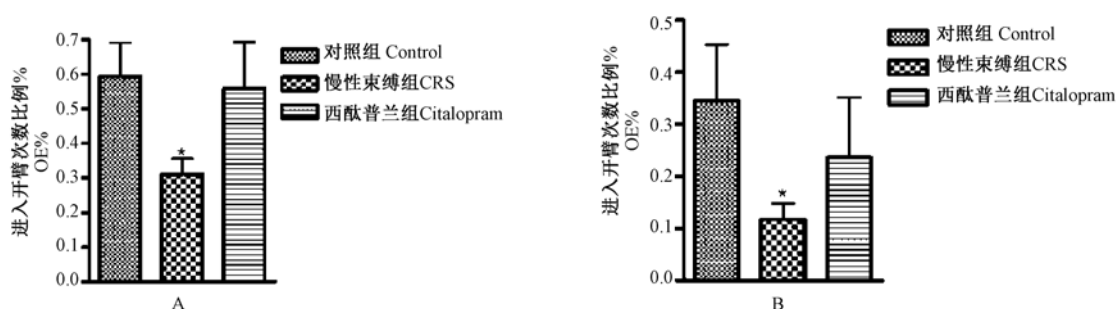


图4 慢性束缚模型对高架十字迷宫实验的影响($\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$, 与正常组比较)

Fig.4 Effect of chronic restraint stress on elevated plus maze test in the mice ($\bar{x} \pm s$, * $P < 0.05$, compared with the control group)

(construct validity) 三个层面^[9]。表观效度指动物模型中动物和人类之间症状学的相似性。预测效度指治疗药物能有效干预动物模型的相应症状表现, 结构效度指模型与某个假说理论的符合程度。本研究基于应激是焦虑症、抑郁症等精神疾患的重要风险因子理论, 研究了小鼠接受非社会因素(慢性束缚)和社会因素(孤养)叠加应激后的焦虑及抑郁行为表现, 并观察西酞普兰(具有抗抑郁和抗焦虑双重作用)对模型焦虑和抑郁行为的改善作用。因此本研究从表观效度、预测效度和结构效度三个方面考察了慢性束缚小鼠模型的转化效度。

快感缺失是动物抑郁行为最为核心的症状之

一, 啮齿类动物快感缺失的定量评价方法主要为糖水偏爱实验(sucrose preference test)^[10]。该行为学评价方法基于啮齿类动物(主要为大小鼠)喜好糖水的天性, 是目前使用最为广泛的用于评价快感缺失的动物行为学测试方法。本研究结果显示, 经过 35 d 的慢性束缚应激, 模型小鼠的糖水偏爱指数明显下降, 与正常组比较差异具有极显著性。强迫游泳实验是动物被迫在一个局限的空间游泳, 首先试图挣扎逃跑, 随后处于一种间歇性不动状态, 这种状态被称为“行为绝望”, 与人类抑郁症相似^[11]。本研究结果表明, 模型小鼠强迫游泳的不动时间显著延长。糖水偏爱实验和强迫游泳实验结果提示

模型小鼠出现抑郁样行为。

动物焦虑行为学评价方法主要基于动物对新环境既产生恐惧又产生探究的矛盾心理冲突^[12]。空场实验中,中央区对动物来说,是未知的威胁情景,焦虑水平高的动物由于对陌生环境的恐惧,主要在边缘区域活动,而在中央区域活动较少^[13]。本研究结果显示,慢性束缚应激模型小鼠在中央区的停留时间及运动路程明显减少,提示模型出现焦虑行为。高架十字迷宫实验中,由于开臂和外界相通,对动物来说具有一定的新奇性同时又具有一定的威胁性,焦虑水平高的动物会离开开臂退缩到闭臂中,反之则在开臂停留更多的时间,对开臂的探究次数也增多。本研究结果显示,慢性束缚应激模型小鼠进入开臂的时间比例和次数比例均显著下降,提示产生焦虑行为,与空场实验结果一致。

以上实验结果提示,经过 35 d 的慢性束缚加孤养,小鼠同时表现出抑郁和焦虑行为,提示慢性束缚应激模型具有较好的抑郁焦虑共病表观效度。

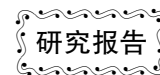
西酞普兰为选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂,具有抗抑郁和抗焦虑双重作用^[14]。本研究中,西酞普兰可提高慢性束缚模型的糖水偏爱指数,缩短强迫游泳不动时间,显示其良好的抗抑郁作用。同时,西酞普兰可增加模型小鼠空场实验中在中央区的停留时间和运动路程,显示其抗焦虑作用。但是,西酞普兰对高架十字迷宫中,模型小鼠进入开臂的次数和时间比例无影响,这可能与动物在高架十字迷宫实验中的个体差异较大有关。西酞普兰的上述作用提示慢性束缚应激模型具有较好的预测效度。

综上所述,慢性束缚应激模型表现为焦虑抑郁共病,西酞普兰可逆转这些行为学改变。该模型可作为焦虑抑郁共病动物模型,用于焦虑抑郁共病神经生物学机制及其治疗研究。

参考文献:

- [1] Hirschfeld RMA. The comorbidity of major depression and anxiety disorders: recognition and management in primary care [J]. Prim Care Companion J Clin Psychiatry. 2001, 3(6): 244 - 254.
- [2] Bouwknecht JA. Behavioral studies on anxiety and depression in a drug discovery environment; Keys to a successful future [J]. Eur J Pharmacol. 2014, 753(2015): 158 - 176.
- [3] Yoon SH, Kim BH, Ye SK, et al. Chronic non-social stress affects depressive behaviors but not anxiety in mice [J]. Korean J Physiol Pharmacol. 2014, 18(3): 263 - 268.
- [4] Barha CK, Brummelte S, Lieblich SE, et al. Chronic restraint stress in adolescence differentially influences hypothalamic-pituitary-adrenal axis function and adult hippocampal neurogenesis in male and female rats [J]. Hippocampus. 2011, 21(11): 1216 - 1227.
- [5] Zhang W, Rosenkranz JA. Repeated restraint stress enhances cue-elicited conditioned freezing and impairs acquisition of extinction in an age-dependent manner [J]. Behav Brain Res. 2013, 248(0): 12 - 24.
- [6] Schweizer MC, Henniger MS, Sillaber I. Chronic mild stress (CMS) in mice: of anhedonia, 'anomalous anxiolysis' and activity [J]. PLoS ONE. 2009, 4(1): e4326.
- [7] Chhillar R, Dhillon D. Antidepressant-like activity of gallic acid in mice subjected to unpredictable chronic mild stress [J]. Fundam Clin Pharmacol. 2012, 27(4): 409 - 418.
- [8] Colla AR, Rosa JM, Cunha MP, et al. Anxiolytic-like effects of ursolic acid in mice [J]. Eur J Pharmacol. 2015, 758(2015): 171 - 176.
- [9] Willner P. Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation [J]. Psychopharmacology (Berl). 1997, 134(4): 319 - 329.
- [10] Strekalova T, Spanagel R, Bartsch D, et al. Stress-induced anhedonia in mice is associated with deficits in forced swimming and exploration [J]. Neuropsychopharmacology. 2004, 29(11): 2007 - 2017.
- [11] Porsolt R, Bertin A, Jalfre M. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants [J]. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1977, 229(2): 327 - 336.
- [12] 亓晓丽, 林文娟. 焦虑和抑郁动物模型的研究方法和策略 [J]. 心理科学进展, 2005, 13(03): 327 - 332.
- [13] Prut L, Belzung C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review [J]. Eur J Pharmacol. 2003, 463(1-3): 3 - 33.
- [14] Andreassen JT, Fitzpatrick CM, Larsen M, et al. Differential role of AMPA receptors in mouse tests of antidepressant and anxiolytic action [J]. Brain Res. 2015, 1601(2015): 117 - 126.

[修回日期] 2015-05-07



维生素 C 对紫外线诱导的光老化大鼠皮肤结构的影响

楼彩霞¹, 高擎², 孙侠¹, 黄威¹, 钟志勇¹, 邝少松¹, 葛亚中²

(1. 广东省医学实验动物中心比较医学实验室, 佛山, 广东 528248; 2. 无限极(中国)有限公司, 广州, 广东 510000)

【摘要】 目的 研究维生素 C 对光老化大鼠皮肤结构的保护作用, 为临床用药和保健提供依据。**方法** 用紫外线辐射背部皮肤的方法建立光老化大鼠模型, 每周照射 2 次, 连续 4 周, UVA 累计辐射量为 123 J/cm², UVB 累计辐射量为 5 J/cm²。造模期间, 大鼠每天灌胃给予维生素 C 溶液 50 mg/kg, 持续 30 d。实验结束后, 比较模型组和治疗组照射部位皮肤在大体形态、光镜和透射电镜下的组织结构差异。**结果** 与模型组相比, 维生素 C 组以下方面的皮肤结构损伤程度得到减轻: 红疹、溃疡、表皮细胞增生、表皮增厚、真皮血管扩张、炎细胞浸润、成纤维细胞增生、内质网扩张、线粒体肿胀和空泡化、弹力纤维变性和局灶性蓄积、胶原纤维横断面粗细不均。**结论** 大鼠皮肤光老化模型建立成功。维生素 C 对紫外线诱导的光老化皮肤结构损伤有明显的保护作用。

【关键词】 维生素 C; 抗光老化; 皮肤结构; 模型, 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0023-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.005

Effects of vitamin C on UV-induced photoaged skin in rats

LOU Cai-xia¹, GAO Qing², SUN Xia¹, HUANG Wei¹, ZHONG Zhi-yong¹, KUANG Shao-song¹, GE Ya-zhong²

(1. Laboratory of Comparative Medicine, Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan, Guangdong 528248, China; 2. Infinitus (China) Co., Ltd., Guangzhou, Guangdong 510000, China)

【Abstract】 Objective To study the protective effect of vitamin C on UV-induced photoaged skin structure in rats and provide a basis for clinical medicine and health care. **Methods** Photoaging skin models were set up by chronic ultraviolet radiation in 24 SPF female Sprague-Dawley rats, irradiated twice weekly for 4 weeks. The rat photoaged skin was induced by exposure to a total dose of 123 J/cm² UVA and 5 J/cm² UVB for 4 weeks. Vitamin C was administered by gastric gavage in a dose of 50 mg/kg once daily for 30 days during the model development. We compared the pathological changes in the irradiated skin using HE, Masson's trichrome and Victoria blue B staining, and compared the ultrastructural changes by electron microscopy. **Results** Rat models with photoaged skin were developed successfully. The vitamin C group showed significant reduction of pathological severity including erythema, ulcers, epidermal cell proliferation, epidermal thickness, dermis vasodilation, inflammatory cell infiltration, fibroblast proliferation, endoplasmic reticulum dilatation, mitochondrial swelling and vacuolization, elastic fibers degeneration and focal accumulation, collagen fibers swelling with uneven thickness, compared with the rats of model group at the irradiation site. **Conclusions** Vitamin C is effective in reducing the structural damage of UV-induced photoaged skin in rats.

【Key words】 Vitamin C; Anti-photoaging; Skin structure; Model rat; Histopathology; Pathology; Electron microscopy

【基金项目】 国家自然科学基金(编号:81403212); 广东省医学科研基金(编号:B2014062); 广东省中医药管理局基金(编号:20142019)。

【作者简介】 楼彩霞(1983-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向: 药理学和保健食品功能评价。E-mail: alou_1218@163.com。

【通讯作者】 葛亚中, E-mail: Star.Ge@infinitus-int.com。

皮肤细胞经常暴露于外源性和内源性来源的活性氧(ROS)和氧化应激中,由于紫外线可以增强细胞活性氧的产生,使得皮肤老化通常与紫外线辐射密切相关^[1]。紫外线辐射是致皮肤老化或皮肤癌发展最重要的环境因素,通过降低暴露于紫外线的辐射水平或增加抗氧化防御有效地清除活性氧能够减少皮肤的老化损伤^[2]。可以保护我们皮肤的内源性物质是黑色素和酶的抗氧化剂,补充抗氧化剂可以对紫外线辐射起到保护作用^[1]。日常生活中引起皮肤光老化的紫外线,主要是长波 UVA 和中波 UVB。UVA 具有很强的穿透力,有超过 98% 能到达地球表面,可以直达肌肤的真皮层,破坏弹性纤维和胶原纤维;UVB 具有中等穿透力,仅有不足 2% 能到达地球表面,对皮肤具有红斑作用。维生素 C 常被作为化妆品添加物用于防治皮肤老化,抗氧化方面的指标研究得比较多,它作为抗氧化剂、酪氨酸酶抑制剂,可以诱导胶原合成,对皮肤皱纹、质地、强度和均匀度有修复的功效^[3],对人体皮肤癌细胞因紫外线辐射诱导的细胞凋亡有保护作用^[4]。由于人体皮肤组织标本不易获取,动物实验在一定程度上可以弥补人体试验的局限性。目前未见针对维生素 C 对光老化动物皮肤在电镜和光镜下结构影响的报道。本研究一方面通过大致模拟日光中 UVA 和 UVB 辐射比例参数,采用 UVA + UVB 紫外线辐射的方法建立光老化大鼠模型,为光老化动物模型研究提供背景数据和方法学参考;另一方面通过采用在大鼠造模期间灌胃给予维生素 C 的方法,研究模型组和维生素 C 组照射部位皮肤在大体形态、光镜和透射电镜下组织结构的差异。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

SPF 级 SD 大鼠,24 只,雌性,体重(180 ~ 220) g,均购于广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2013-0002]。本实验所有动物实验操作均在广东省医学实验动物中心实验设施内进行[SYXK(粤)2013-0002]。

1.2 主要试剂

维生素 C 片(批号 130803),广东华南药业集团有限公司;石蜡、二甲苯、酒精、丽春红,上海试剂三厂;伊红、苏木素,广州市中南化学试剂有限公司;维多利亚蓝 B(批号 1112067),Aladdin Chemistry;中性树胶,中国上海标本模型厂。

1.3 主要仪器

紫外光疗仪,天津市合普科技有限公司;BS224S 天平,德国 Sartorius 公司;TS-12N 全自动生物组织脱水机,湖北宏业医用仪器有限公司;RM2135 轮转切片机,德国徕卡;RS-18II 全自动生物组织染色机,湖北宏业医用仪器有限公司;正置光显微镜, Olympus BX41; Image-Pro Express 5.1.1.14 病理图像分析系统;Hitachi(日立)-7650 透射电子显微镜。

1.4 动物造模

将检疫合格的 24 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组和维生素 C 组,每组 8 只。空白对照组不进行任何处理;模型组每次照射前,在大鼠背部 5 cm × 5 cm 区域内剃毛,使皮肤充分暴露,将大鼠置于头部避光、背部暴露的固定器中,放入紫外光疗仪(UVA + UVB)灯具正下方的 30 cm 处照射,每周照射 2 次,连续照射 4 周,UVA 累计辐射量为 123 J/cm²,UVB 累计辐射量为 5 J/cm²;维生素 C 组参照模型组方法照射紫外线。本实验所有动物实验操作均经过广东省医学实验动物中心实验动物伦理委员会批准。

1.5 维生素 C 干预

空白对照组不进行任何处理;模型组灌胃同体积溶媒,每周照射紫外线 2 次,连续照射 4 周;大鼠给予维生素 C 的剂量为每天 50 mg/kg,连续灌胃 30 d,期间每周照射紫外线 2 次。造模过程中,观察大鼠照射部位皮肤的变化。

1.6 组织学检测

给药 30 d 后,动物用 3% 戊巴比妥钠麻醉,安乐处死,切取受试部位皮肤进行检测。各组每只动物的受试部位皮肤同时分成两份进行处理:一部分皮肤切成 0.5 cm × 0.5 cm 大小,放置于 4% 多聚甲醛液固定,常规制作石蜡切片,分别进行苏木精-伊红染色法(H&E)、马松三色法(Masson's trichrome)、维多利亚蓝 B(Victoria blue B)染色;另一部分皮肤切成 1 mm × 2 mm 大小,放置于 3.1% 的 4℃ 戊二醛溶液固定,常规制作电镜样品,超薄切片,透射电镜观察各组之间受试部位皮肤病理学形态差异。

2 结果

2.1 大体观察

除空白对照组外,其他组动物在造模期间照射部位皮肤出现不同程度的皮损,如红疹、溃疡、结痂

等。实验结束时,空白对照组大鼠皮肤正常,肉眼未见皮损,表皮厚薄均匀;模型组大鼠紫外线辐射部位皮肤表面出现局部红疹、溃疡、结痂,表皮厚薄不均;维生素 C 组大鼠紫外线辐射部位皮肤表面出现少量红疹、溃疡、结痂,表皮厚度增厚,程度都较模型组减轻。(图 1 见文后彩插 1)。

2.2 皮肤组织 H&E、Masson's trichrome、Victoria blue B 染色结果

经 H&E 染色后,空白对照组皮肤表皮厚薄均匀,皮脂腺未见明显增生;模型组紫外线照射部位皮肤表面局部坏死结痂,表皮细胞明显增生,表皮厚度明显增厚,厚薄不均,真皮层血管扩张、炎细胞浸润、成纤维细胞增生,皮脂腺明显增生,毛囊明显增大;维生素 C 组皮肤真皮间质血管扩张、炎细胞浸润、成纤维细胞增生较模型组减轻。图 2,见文后彩插 1。

经 Masson's trichrome 染色后,空白对照组胶原纤维呈蓝色,弹力纤维呈红色,胶原纤维丰富,弹力纤维较均匀的散在分布在胶原束之间;模型组真皮层纤维排列较乱,弹力纤维变性、局灶性蓄积、增粗、排列紊乱;维生素 C 组皮肤真皮层纤维排列较规整,弹力纤维变性、局灶性蓄积较模型组减轻。(图 3 见文后彩插 2)。

经 Victoria blue B 染色后,空白对照组见胶原纤维呈红色,弹力纤维呈蓝绿色,弹力纤维较均匀地分布在胶原束之间,数量较胶原纤维少;模型组见弹力纤维变性、局灶性蓄积、增粗、排列紊乱;维生素 C 组见弹力纤维变性、局灶性蓄积较模型组减轻。(图 4 见文后彩插 2)。

2.3 电镜检测

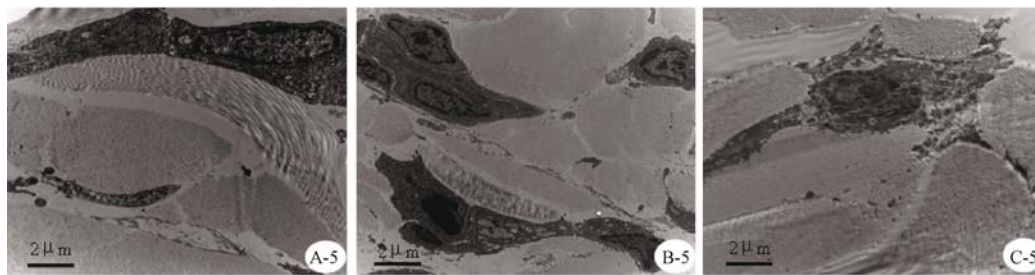
空白对照组表皮细胞之间间隙小,细胞间可见桥粒连接,表皮基底膜完整,真皮纤维排列整齐,成纤维细胞散在稀少,胶原纤维横截面大小较均一,胶原纤维纵切面周期性横纹清晰可见,成纤维细胞形态正常,胞质内见大量粗面内质网,内质网未见扩张,线粒体未见空泡化,真皮间质血管未见明显扩张充血;模型组表皮细胞之间间隙明显增宽,局部表皮基底膜中断、不连续,真皮纤维排列较乱,真皮层成纤维细胞数目明显增多,胶原纤维肿胀,胶原纤维横断面粗细不均,部分胶原纤维之间见较多致密物质,成纤维细胞内质网高度扩张,线粒体空泡化,局部成纤维细胞周围见新生的网状纤维和弹性纤维,真皮间质血管明显扩张充血、出血;维生素

C 组表皮细胞之间间隙较模型组略减小,表皮基底膜完整,真皮纤维排列较整齐,成纤维细胞数目较模型组减少,胶原纤维横断面粗细较均一,胶原纤维纵切面周期性横纹较清晰,成纤维细胞内质网轻度扩张,间质血管扩张充血、出血较模型组减轻。各组真皮成纤维细胞数目、内质网和线粒体胶原纤维的微观结构变化见图 5、6、7。

3 讨论

本研究采用 UVA + UVB 紫外线辐射的方法,成功建立了光老化大鼠模型,此模型可以广泛用于抗光老化药物的药效学筛选。SD 大鼠由于价格低廉、适用性广、可取材面积大,被本研究选用作为造模动物。杨汝斌等^[5]采用 UVA + UVB 辐射成功建立 SD 大鼠光老化模型,造模结束时 UVA、UVB 辐照强度累计分别为 148.5 J/cm² 和 21.38 J/cm²。在杨研究的基础上,本研究采用了更接近日光 UVA、UVB 比例的辐射参数,更模拟日常光老化环境,大鼠光老化皮肤模型的病理改变和杨报道的基本一致,损伤程度也相应减轻。本研究详细阐述了模型建立之后照射皮肤病理结构上的改变,也通过使用公认的抗氧化剂维生素 C 的干预,表明维生素 C 在一定程度上可以改善光老化大鼠表皮和真皮层皮肤的结构,具有一定的光保护作用,同时也验证了模型的有效性。我们通过本研究其他数据(本文未列出)推测其作用机制可能与增加皮肤中 HYP 含量,提高皮肤 III 型胶原蛋白水平有关。有一点需要说明的是,在我们的实验中,维生素 C 干预的大鼠个体差异比较大,疗效参差不齐。结合文献分析,我们认为导致上述结果的原因可能是由于口服补充抗氧化剂,受到溶解性、皮肤渗透效率、存储过程不稳定等因素的限制,皮肤生物利用度下降^[6]。

国内外研究表明,外用或口服抗氧化剂可以改善紫外线辐射引起的皮肤损伤。Oresajo C 等^[7]研究发现外用含维生素 C、阿魏酸和根皮素的抗氧化剂混合物,对紫外线诱导的光损伤人体皮肤有保护作用;Reeve VE 等^[8]研究发现小鼠口服宁夏枸杞浆汁可以通过抗氧化途径减少由于紫外线辐射引起的皮肤损伤。针对口服补充抗氧化剂的局限性,目前国内外有一些方法可以提高皮肤的生物利用度,如通过外用补充皮肤抗氧化剂增强抗氧化防御、对维生素进行化学修饰、使用新胶体药物递送系统(如微乳液)等,可以达到更好的疗效。

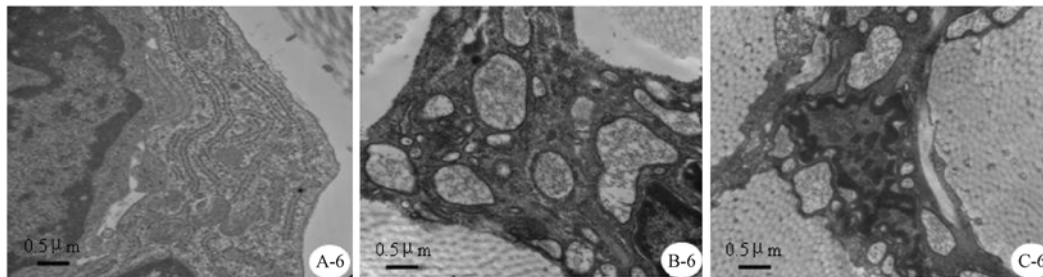


注: A-5:空白对照组;B-5:模型组;C-5:维生素 C 组。

图 5 大鼠皮肤成纤维细胞数目比较(标尺 = 2 μm)

Note: A-5: Control group; B-5: Model group; C-5: Vitamin C group.

Fig. 5 Comparison of the number of fibroblasts in rats with normal or UV-induced photoaged skin. Bar = 2 μm

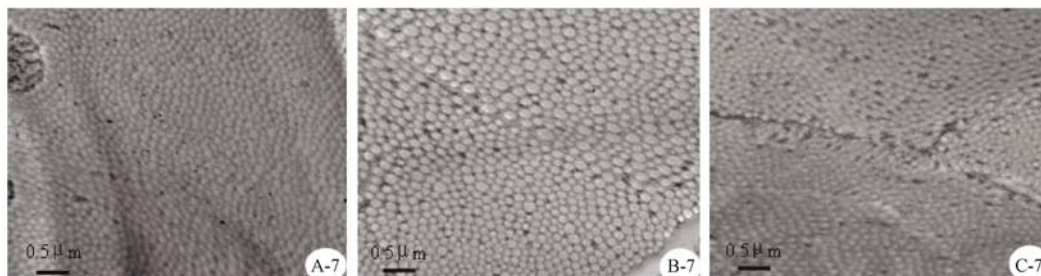


注: A-6:空白对照组;B-6:模型组;C-6:维生素 C 组。

图 6 大鼠皮肤真皮层成纤维细胞内质网和线粒体微观结构比较(标尺 = 0.5 μm)

Note: A-6: Control group; B-6: Model group; C-6: Vitamin C group.

Fig. 6 Comparison of the microstructure of endoplasmic reticulum and mitochondria in dermis fibroblasts of rats with normal or UV-induced photoaged skin. Bar = 0.5 μm.



注: A-7:空白对照组;B-7:模型组;C-7:维生素 C 组。

图 7 大鼠皮肤胶原纤维微观结构比较(标尺 = 0.5 μm)

Note: A-7: Control group; B-7: Model group; C-7: Vitamin C group.

Fig. 7 Comparison of the microstructure of collagen fibers in rats with normal or UV-induced photoaged skin. Bar = 0.5 μm.

参考文献:

- [1] Masaki H. Role of antioxidants in the skin: anti-aging effects [J]. J Dermatol Sci, 2010, 58(2): 85-90.
- [2] Godic A, Poljšak B, Adamic M, et al. The role of antioxidants in skin cancer prevention and treatment [J]. Oxid Med Cell Longev, 2014; 860479.
- [3] Baumann L, Duque DK, Schirripa MJ. Split-face vitamin C consumer preference study [J]. J Drugs Dermatol, 2014, 13(10): 1208-1213.
- [4] Lin JR, Qin HH, Wu WY, et al. Vitamin C protects against UV irradiation-induced apoptosis through reactivating silenced tumor suppressor genes p21 and p16 in a Tet-dependent DNA demethylation manner in human skin cancer cells [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2014, 29(6): 257-264.
- [5] 杨汝斌,万屏,刘玲,等. SD 大鼠皮肤光老化动物模型建立方法的探索 [J]. 中国皮肤性病学杂志, 2011, 25(3): 199-202.

- [6] Ga šperlin M, Gosenca M. Main approaches for delivering antioxidant vitamins through the skin to prevent skin ageing [J]. Expert Opin Drug Deliv, 2011, 8(7): 905 – 919.
- [7] Oresajo C, Stephens T, Hino PD, et al. Protective effects of a topical antioxidant mixture containing vitamin C, ferulic acid, and phloretin against ultraviolet-induced photodamage in human skin [J]. J Cosmet Dermatol, 2008, 7(4): 290 – 297.
- [8] Reeve VE, Allanson M, Arun SJ, et al. Mice drinking goji berry juice (*Lycium barbarum*) are protected from UV radiation-induced skin damage via antioxidant pathways [J]. Photochem Photobiol Sci, 2010, 9(4): 601 – 607.
- 〔修回日期〕2015-04-27

《中国比较医学杂志》论文书写格式要求

论文包括中文题目、作者、单位(单位所在地和邮编)、中文摘要以及英文题目、作者、单位与摘要、中文关键词(3~8个)、中图分类号、英文关键词(与中文关键词对应)、正文、参考文献。

1. 题目应简明扼要、准确地反映文章的主题,避免使用非公知公用的缩略语符号和代号。一般以 20 个字内为限,英文题名不宜超过 10 个实词。中英文题名含义应一致。

2. 作者姓名之间以逗号隔开,姓字母全部大写,名第一个字母大写,双名之间加连字符(-)。作者单位要求同中文,后面加 China。不同单位的作者,应在姓名右上角标上角码。作者单位另起一行在作者姓名之下,包括单位全称,所在城市名称和邮编,两端加圆括号。不同单位的作者,应在单位名称前加上与作者名字相同的标识。如:

链脲佐菌素诱导 1 型糖尿病大鼠模型稳定性观察

蒋 升¹, 谢自敬¹, 张 莉²

(1. 新疆医科大学第一临床医学院内分泌科, 乌鲁木齐 830054; 2. 武警新疆总队医院眼科, 乌鲁木齐 830000)

Observation of Stability of Type I Diabetic Rat Models Induced by Streptozotocin

JIANG Sheng¹, XIE Zi-jing¹, ZHANG Li²

(1. Department of Endocrinology, First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China;

2. Xinjiang General Hospital of Chinese People's Armed Police Force, Urumqi 830091, China)

3. 摘要和关键词

中文摘要应包括目的、方法、结果(应有主要数据)、结论四部分内容。篇幅一般 300 字左右。摘要不分段。英文摘要应有英文题目、作者、作者单位、邮政编码、正文和关键词。英文摘要正文的内容与中文摘要基本相同,可更为详细些,但不宜过长。英文摘要置于中文摘要下方。

关键词是反映文章最主要内容的术语。中英文的意思要相同。关键词之间用分号隔开。

4. 脚注(文章首页左下方):(1)基金项目(论文所受资助的课题基金来源及编号);(2)作者简介(第一作者);(3)通讯作者。第一作者和通讯作者简介包括:姓名(生年-)、性别、职称、学位、研究方向。

5. 正文:格式和层次结构按照引言、材料和方法、结果、讨论 4 部分撰写。各层次标题应简短明确,同一级标题应反映同一层次的内容(格式为 1 1.1 1.1.1 1.2……2 2.1 2.2……)。

凡在文中出现的生物名称请用正确的中英文学名,并在第一次使用时提供其完整的拉丁学名。

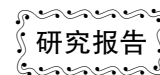
凡可用文字说明者均不用图表。每个图表均应有图表题。图表题及其文字说明及注释采用中英文两种文字,先中文后英文。图、表按照在文中出现的顺序编号,图表序号一律用阿拉伯数字。表格一律采用三线表。图表置于正文中。如是彩图,按照顺序统一置于文章参考文献后,作彩版使用。

参考文献采用顺序编码标注,按照引文先后顺序,用阿拉伯数字连续编号。参考文献格式如下:(1)期刊:著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“et al.”). 文题[文献标识码]. 刊名,出版年,卷:起-止页。

(2)专著:著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“et al.”). 书名(版次)[文献标识码]. 出版地:出版者,出版年:起-止页。

(3)论文集:著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“et al.”). 文题[文献标识码]. 见(In):著者(一、二、三名作者全列,三名以上只列前三名后加“等”或“et al.”). 论文集,出版地:出版者,出版年:起-止页。

文献标识码按:期刊[J]、专著[M]、论文集[C]、标准[S]、学位论文[D]。



猕猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 基因真核细胞 表达载体的构建及表达

王 新¹, 易思萌^{1,2}, 刘慧芳^{1,2}, 马 凯¹, 范君文², 马雨楠², 游 颖², 孙兆增²

(1. 青岛农业大学, 青岛 266109; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 目的 构建猕猴 B 病毒囊膜蛋白 gD 的真核表达载体, 并且检测其在 293T 细胞内的表达情况。**方法** 首先通过基因合成手段获得含 B 病毒 gD 蛋白的基因片段, 在经由 *Pst* I 和 *Not* I 双酶切后连接到 pEGFP-N3 载体, 随后将构建的 pEGFP-N3-GD 重组质粒转染到人胚胎肾上皮细胞系 293T 细胞。再用 Western blot 检测所提蛋白其在细胞内的表达情况, 并用激光共聚焦分析其在细胞内的表达定位情况。**结果** 成功获得携带 gD 基因的阳性重组质粒 pEGFP-N3-GD, 且 pEGFP-N3-GD 重组质粒能在 293T 细胞的表面正常表达。**结论** 利用真核表达系统, 既能够在细胞表面产生 B 病毒 gD 蛋白的特异性重组抗原, 而且可用于 B 检测抗原的制备。

【关键词】 猕猴 B 病毒; gD 蛋白; 载体构建; 真核表达

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0028-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.006

Construction of eukaryotic vector of monkey B virus glycoprotein D gene and the gD gene expression

WANG Xin¹, YI Si-meng^{1,2}, LIU Hui-fang^{1,2}, MA Kai², FAN Jun-wen², MA Yu-nan²,
YOU Ying², SUN Zhao-zeng²

(1. Qingdao Agriculture University, Qingdao 266109, China;

2. Laboratory Animal Center of the Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

【Abstract】 Objective To establish an eukaryotic vector of monkey B virus glycoprotein D gene and analyze the expression of gD gene in human embryonic kidney 293T cells. **Method** First, the protein of monkey B virus glycoprotein D was obtained by gene synthesis. The gene fragments were digested with *Pst* I and *Not* I, and ligated to pEGPF-N3. Then, the recombinant plasmid pEGPF-N3-GD was transfected into 293T cells. The expression of gD protein in the cells was detected by Western blot, and the expression localization was investigated using laser scanning confocal microscopy. **Results** The recombinant plasmid pEGPF-N3 carrying gD gene was successfully constructed, and normally expressed in the 293T cells. **Conclusions** Glycoprotein D of monkey B virus is expressed successfully in the 293T cells and the protein is located on the cell surface. It may be useful for the preparation of specific recombinant antigen to the glycoprotein D of monkey B virus on cell surface, and can be also used for preparation of antigen slide for detection of monkey B virus.

【Key words】 Monkey B virus; gD protein; Vector construction; Eukaryotic expressing

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31272387); 十二五重大传染病专项(2011zx09201-031)。

[作者简介] 王新(1973-)男, 副教授, 研究方向: 中兽医学。

[通讯作者] 孙兆增(1977-)男, 副研究员, 研究方向: 实验动物分子微生物学, E-mail: laxszz@aliyun.com。

猴 B 病毒,也叫猴疱疹病毒 I 型(cercopithecine herpesvirus I), α -疱疹病毒亚科,单纯疱疹病毒属。和它同一种属的还有会引起人口腔溃疡的单纯疱疹病毒 1 型病毒(herpes simplex type 1, HSV-1)和人生殖器疱疹病毒 HSV-2^[1-3]。B 病毒主要自然宿主是猕猴等灵长类动物,感染率极高,它可使恒河猴引起一过性的疱疹样口炎,于 7~14 d 内自愈,但却能使人类等非自然宿主动物出现致死性的脑炎或上行性脑脊髓炎(死亡率超过 70%)^[1-3],正是由于其对人生命安全的高度威胁性,而被归于生物安全 4 级病原。在 B 病毒的快速检测方面,国内目前主要使用的检测抗原是 HSV-1 和 HSV-2,而国外主要使用的检测抗原是 SA8 和 HVP-2 等同源病毒^[3,4],虽然这些病毒抗原具有较高的安全性,但同样较高的抗原交叉性致使 B 病毒的检测误差可达 3%~10%。同样在 B 病毒的有效防治方面,受制于检测抗原的影响,对其防治办法的深入研究与防治效果的追踪反馈也相应的遇到了瓶颈。因此,找寻安全高效的特异性抗原对于研究猕猴 B 病毒的有效防治与快速诊断十分重要。

蛋白 gB、gC、gD 和 gG 等,均属于 B 病毒不同类型的囊膜蛋白,不同类型的囊膜蛋白在 B 病毒的复制传播中所起到的作用也各有不同。囊膜 gD 蛋白,它主要负责参与猕猴 B 病毒的吸附、膜融合和入侵;同时又与病毒的传播以及逃避机体免疫监视有着密切的关系。这些糖蛋白是猕猴 B 病毒检测的主要候选抗原,其中囊膜蛋白 gB,其敏感性最高(99%),但特异性最低。gG 重组蛋白的检测特异性最好(97.5%),但敏感性只有 80%^[5];而重组蛋白 gD 的检测敏感性较 gG 要高,且特异性较 gB 要好,因此,gD 重组蛋白是猕猴 B 病毒诊断的有效抗原。

本实验构建的重组真核细胞表达载体 pEGFP-N3-gD(含 gD 基因片段),并将其转染 293T 细胞,确认 gD 重组蛋白可在 293T 细胞的表达,为进一步研究 gD 蛋白对猕猴 B 病毒生物学功能的影响,以及将重组蛋白 gD 作为猕猴 B 病毒快速诊断用特异性抗原的研究提供相应的支持。

1 材料和方法

1.1 材料

猕猴 B 病毒 gD 胞外区基因序列由博迈德合成,DH5 α 感受态细胞、质粒回收试剂盒、胶回收试

剂盒、DNA marker 2000、DNA marker 10000、2 $\times$ Taqmix 购自北京博迈德生物公司。转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司。细胞培养试剂购自 Hyclone 公司。Myc 标签一抗购自 AB-mart 公司。T4 连接酶、限制性内切酶 *Pst* I 和 *Not* I 等,来自 Takara 公司。山羊抗小鼠 IgG(辣根过氧化物酶标记),采购自中杉金桥公司。

1.2 方法

1.2.1 gD 基因合成:gD 为糖蛋白的一种,具有明显糖蛋白的特质,基因序列由胞外区、胞内区和跨膜区组成。根据其基因序列,合成基因片段,长度约为 1 304 bp,主要包括 gD 蛋白的胞外区域。并在基因的 5'端引入了 MHC I 类分子的信号肽序列和 *Pst* I 酶切位点,在基因 3'端引入 myc 标签序列和 *Not* I 酶切位点。设计完成后,由北京博迈德生物有限公司负责合成。

1.2.2 pEGFP-N3-gD 重组质粒的构建:用 *Pst* I 和 *Not* I 将之前测序筛选过的 gD 基因片段进行双酶切,所产生的基因回收产物利用与 T4 连接酶 pEGFP-N3 质粒相连接。将重组质粒转化到 DH5 α 感受态细胞,利用卡那抗性的平板进行选择培养,并进一步使用 PCR 的方法筛选出阳性克隆,最终选出的 PCR 阳性质粒再利用酶切的方法进一步鉴定。

1.2.3 细胞培养和重组质粒的转染:在 DMEM 培养基中(内含 10% 的胎牛血清)培养的 293T 细胞,并传代至 6 孔培养板。在培养箱(37 $^{\circ}$ C、5% CO₂)中培养到 70%~80% 时(在 6 孔板中),再用 Lipofectamine 2000 转染重组质粒。然后将这些细胞置于培养箱中培养 1 d 或 2 d 后,收集这些细胞进行接下来的实验。

1.2.4 Western blot 免疫印迹实验:用细胞核—胞浆—胞膜制备试剂盒来提取蛋白,吸取 40 μ L 总蛋白进行 10% SDS-PAGE 蛋白电泳,然后转移到 PVDF 膜上进行 Western-blot 检测。用脱脂奶粉(浓度为 5%)来封闭 PVDF 膜,在两个小时以后加入 Myc 一抗(1:5 000);置于 4 $^{\circ}$ C 摇床上,孵育 12 h,充分洗涤后,再加入山羊抗鼠的二抗(1:8 000),在室温下培养 1 h,TBST 缓冲液洗涤 3 次,然后加入发光显色剂,再置于暗室用 X 光进行曝光、显影。利用 β -actin 蛋白作为对照。

1.2.5 细胞表达定位实验:转染后的 293T 细胞在继续培养 36 h 后,使用 4% 多聚甲醛进行固定,对细

胞的固定一般需要 15 min, 之后再用 0.3% Triton X-100 透化处理。以上处理完成后, 加入 10% BSA 封闭, 再用 myc 标签的一抗和 FITC 荧光的二抗孵育之后, 接着用浓度为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 RNase (1 ml/孔) 消化 RNA, 最后加入 PI, 600 μL 左右染色 10 min。再用适量的抗荧光猝灭封固液, 封片固定。之后利用德国蔡司公司生产的 Zeiss Ism 510 Meta 荧光共聚焦成像显微镜进行观察、拍照。

2 结果

2.1 基因合成结果分析

利用 PCR 法鉴定已合成 gD 基因, 试验结束后所得的结果显示, 目的片段的大小与预期结果相符, 目的片段大小为 1 000 ~ 2 000 bp 之间 (图 1), 而预期结果大小为 1 400 bp 左右。并且在测序后, 根据所得结果可知, 这段经 PCR 鉴定的 gD 基因与恒河猴 gD 基因的同源性可达 100%。

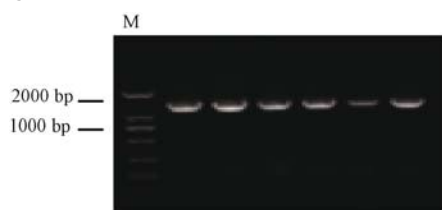


图 1 gD 基因片段的 PCR 扩增结果

Note. M: Marker 2000;

Fig. 1 PCR amplification results of gD protein

2.2 pEGFP-N3-gD 重组质粒的构建结果分析

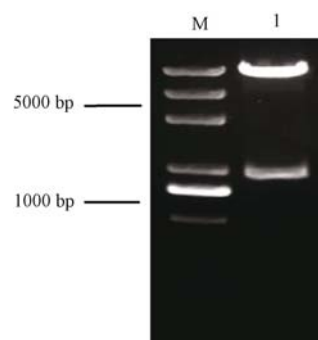
利用 T4 连接酶, 将已经合成的 gD 基因定向的连接到 pEGFP-N3 载体。利用 PCR 方法筛选阳性重组质粒。并利用双酶切法的方法进行鉴定。结果如图 2, 表明经双酶切后的阳性重组质粒 pEGFP-N3-gD, 分别在 5 000 bp 左右和 1 000 bp 左右切成两个片段, 由此可知 gD 成功克隆到 pEGFP-N3 载体上。

2.3 pEGFP-N3-gD 的 Western-Blot 鉴定

利用 Western-Blot 对 pEGFP-N3-gD 的表达情况进行鉴定。试验初预测 pEGFP-N3-gD 分子量为 45 kDa, 而由图 3 显示的实验结果分子量在 50 kDa 左右。说明 gD 重组蛋白可以在 293T 细胞内进行准确翻译, 并可能进行了一定的翻译后加工修饰。

2.4 pEGFP-N3-gD 在细胞内的定位表达

利用激光共聚焦显微镜观察 gD 基因在 293T 细胞的表达情况, 观察它们转染后的形态, 结果发现, (其重组蛋白) 能发出绿色荧光 (在经过 FITC 标

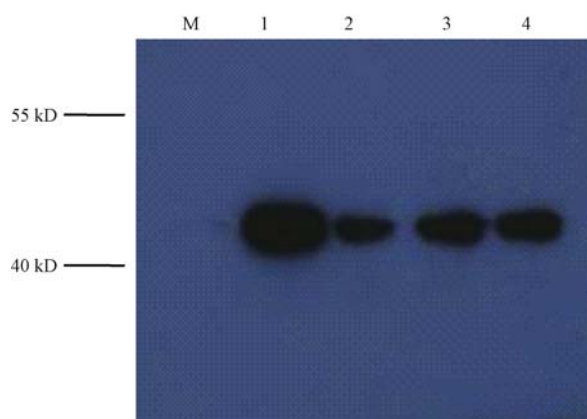


注: M: DNA 分子量标准; 1: 重组质粒 pEGFP-N3-GD 的 *Pst* I 和 *Not* I 双酶切结果

图 2 双酶切鉴定重组质粒 pEGFP-N3-GD

Note. M: DNA molecular standard; 1: The products of enzyme digestion with *Pst* I and *Not* I

Fig. 2 Enzyme digestion analysis of the recombinant plasmid pEGFP-N3-GD



注: M: 低水平蛋白; 1-4: pEGFP-N3-gD 基因的表达鉴定结果。

图 3 gD 基因表达的 western-blot 鉴定

Note. M: Low molecular weight protein marker; 1-4: Identification of the gD expression.

Fig. 3 Identification of the expression of gD protein by Western-blotting

记抗体染色), 但是, 由 PI 染色过的细胞核发出的荧光却为红色。由图 4 (见文后彩插 2) 可知, pEGFP-N3-gD 重组蛋白主要在细胞膜上进行表达, 可能是 MHC I 类分子 (附加在 gD 蛋白前端) 的信号肽引导 gD 蛋白在细胞膜上表达。

3 讨论

近年来, 关于猕猴 B 病毒 gD 囊膜蛋白在 B 病毒的诊断和防治方面的不断深入研究发现, gD 囊膜蛋白可以作为诱导机体产生免疫应答的主要靶点之一, 国外的研究者曾经以 B 病毒 gD 蛋白基因为基础设计 DNA 疫苗; 进一步的实验证实能诱导猴产

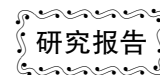
生免疫应答,并对 B 病毒有一定的中和保护作用^[6]。另外一个课题组的研究结果表明,将 gD 基因插入到痘苗病毒载体制成核酸疫苗,91% (10/11)被免疫的兔子可抵抗病毒的攻击^[7]。国内学者肖镜等探索了利用 gB、gC 和 gD 重组蛋白以及 gD 的肽合成片段进行 B 病毒的检测^[8];张文韬等^[9]则对关于 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 基因的克隆及原核表达进行了研究。

真核表达蛋白可进行翻译后加工,例如糖基化修饰等,并可正确折叠。利用真核系统产生的抗原,能够最大程度的模拟病毒蛋白,用于检测时的特异性和灵敏性更高。但真核表达系统的表达量低,获得重组抗原的数量较少。本实验利用真核表达系统成功表达了 gD 蛋白,并利用信号肽设法让蛋白在细胞的表面表达。蛋白在细胞的表面表达,拟不用纯化抗原,直接用细胞制备抗原片,用于病毒血清的检测。在下一步的实验中,会获得 gD 蛋白的稳定表达细胞株,直接用于病毒检测抗原片的制备,为新型猕猴 B 病毒检测方法的建立提供新的方法。

参考文献:

- [1] Huff JL, Barry PA. B-virus (Cercopithecine herpesvirus 1) infection in humans and macaques: potential for zoonotic disease [J]. Emerg Infect Dis, 2003, 9(2): 246-250.
- [2] Weigler BJ. Biology of B virus in macaque and human hosts: a review [J]. Clin Infect Dis, 1992, 14(2): 555-567.
- [3] Whitley RJ, Roizman. B Herpes simplex virus infections [J]. Lancet, 2001, 357(9267): 1513-1518.
- [4] Fujima A, Ochiai Y, Saito A, et al. Discrimination of antibody to herpes B virus from antibody to herpes simplex virus types 1 and 2 in human and macaque sera [J]. J Clin Microbiol, 2008, 46(1): 56-61.
- [5] Pereylygina L, Patrusheva I, Hombaiah S, et al. Production of herpes B virus recombinant glycoproteins and evaluation of their diagnostic potential. J Clin Microbiol, 2005, 43(2): 620-628.
- [6] Hirano M, Nakamura S, Mitsunaga F, et al. Efficacy of a B virus gD DNA vaccine for induction of humoral and cellular immune responses in Japanese macaques [J]. Vaccine, 2002, 20(19-20): 2523-2532.
- [7] Bennett AM, SlomkaMJ, Brown DWG, et al. Protection against herpes B virus infection in rabbits with a recombinant vaccinia virus expressing glycoprotein D [J]. J Medical Virol, 1999, 57: 47-56.
- [8] 肖镜,付瑞,贺争鸣,等. 猴 B 病毒 BVgD-多肽 ELISA 检测方法的建立 [J]. 实验动物科学, 2008, 25(2): 20-23.
- [9] 张文韬,董罡,袁菊芳,等. 猴 B 病毒囊膜糖蛋白 gD 的克隆表达及其诊断价值评价 [J]. 中国人兽共患学报, 2012, 28(4): 363-366

[修回日期]2015-05-07



靶向脐带间充质干细胞的构建及其 在小鼠脾脏内的定位

秦力维¹, 张宁坤², 路平³, 彭秀军¹, 王桂琴¹, 高原¹, 曹利群¹, 崔蓓¹, 郭建巍⁴

(海军总医院 1 眼科, 2 心脏中心, 3 病理科, 4 检验科, 北京 100048)

【摘要】 目的 构建含小分子肽 P1-GFP 融合基因慢病毒载体, 用携带 P1-GFP 融合基因的慢病毒感染 MSC, 使 MSC 具有靶向性, 将靶向 MSC 注入小鼠体内后观察 MSC 在小鼠脾脏的定位及与淋巴细胞的关系。**方法** 用组织片贴壁法培养健康人脐带间充质干细胞, 用基因工程技术构建含小分子肽 P1-GFP 融合基因慢病毒载体并感染人脐带间充质干细胞, 通过尾静脉将转入 P1-GFP 融合基因的 MSC 注入小鼠体内, 18 h 后免疫组化染色观察 GFP 在小鼠脾脏的定位。**结果** 培养的健康人脐带间充质干细胞生长良好, MSC 感染含 P1-GFP 融合基因的慢病毒 18 h 后 MSC 开始出现绿色荧光, 随着培养时间的延长, 荧光强度逐渐增强, 72 h 达高峰。靶向 MSC 表达髓系干细胞的表面标记 CD105(90.0%)/CD44(98%), CD73(85.0%)/CD90(98.5%)。将靶向 MSC 经尾静脉注入小鼠体内, 18 h 后小鼠脾脏出现大量 GFP 阳性细胞, 并与脾脏淋巴细胞密切接触。**结论** 本研究成功构建了含 P1-GFP 融合基因的靶向 MSC, 靶向 MSC 成功定向脾脏, 并与脾脏淋巴细胞密切接触, 可用于后续的实验研究。

【关键词】 靶向; 脐带间充质干细胞; 慢病毒; 脾脏

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0032-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.007

Construction of targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells and their distribution in the mouse spleen

QIN Li-wei¹, ZHANG Ning-kun², LU Ping³, PENG Xiu-jun¹, WANG Gui-qin¹,
GAO Yuan¹, CAO Li-qun¹, CUI Bei¹, GUO Jian-wei⁴

(1. Department of Ophthalmology, 2. Heart Center, 3. Department of Pathology,
4. Department of Clinical Laboratory, Chinese PLA Navy General Hospital, Beijing 100048, China)

【Abstract】 Objective To construct lentiviral vectors containing peptide P1-GFP fusion genes. Umbilical cord derived mesenchymal stem cells were infected with lentivirus carrying peptide P1 and GFP fusion genes. To inject the targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells into mice and to detect GFP expression in the spleen. **Methods** Umbilical cord derived mesenchymal stem cells were cultured with adhered tissues of umbilical cord smaller than 1 mm³. Lentiviral vector containing P1-GFP fusion genes with engineering technology was constructed and infected the umbilical cord derived mesenchymal stem cells. Targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells were intravenously injected in the mouse tail vein and after 18 hours GFP expression was detected with immunohistochemical staining of the spleen tissues. **Results** Harvested umbilical cord derived mesenchymal stem cells grew well in culture medium. Green

[基金项目] 国家自然科学基金(30872394)及海军总医院创新培育基金资助(CXPY201312)。

[作者简介] 秦力维, 女, 副主任医师, 医学硕士, 主要从事视网膜疾病的免疫治疗。E-mail: lwkin@sohu.com。

[通讯作者] 郭建巍, 男, 主任医师, 硕士生导师, 从事分子诊断临床及研究工作。E-mail: jwkuo@sohu.com。

fluorescence on umbilical cord derived mesenchymal stem cells were observed under fluorescence microscope at 18 hours after infected with lentivirus. Green fluorescence intensity of umbilical cord derived mesenchymal stem cells was increasing over time and reached a peak at 72 hours. Umbilical cord derived mesenchymal stem cells highly expressed CD105 (90.0%)/CD44 (98%) and CD73 (85.0%)/CD90 (98.5%) molecules. GFP expression was detected in the spleen after intravenous injection of targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells in the mice 18 hours later. GFP expressing cells intimately contacted with lymphocytes. **Conclusions** Targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells contain P1-GFP fusion genes are constructed. Targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells can be targeted to mouse spleen and intimately contact with lymphocytes after intravenous injection. Our results lay the groundwork for further studies.

【Key words】 Targeted umbilical cord derived mesenchymal stem cells; Lentivirus; Spleen; Mice

间充质干细胞(mesenchymal stem cells, MSC)是来源于胚胎中胚层的一类成体干细胞,除具有向多胚层细胞分化、促进损伤修复、抗炎以及神经营养等功能外^[1], MSC 还可减低以树突状细胞(dendritic cells, DC)DC 为代表的单核巨噬细胞抗原递呈能力,具有免疫抑制作用^[2]。我们在前期研究中获得了一种能与单核巨噬细胞特异性结合的小分子肽 P1,在 P1 肽的导向下, P1-绿色荧光蛋白(GFP)融合蛋白在粘膜免疫中可到达消化道免疫相关组织^[3]。本研究的目的旨在构建 P1-GFP 融合基因慢病毒载体,用携带 P1-GFP 融合基因的慢病毒感染 MSC,使 MSC 具有靶向性,希望通过小分子肽 P1 把 MSC 带到 DC 等抗原呈递细胞处,以期在后续的研究中提高 MSC 在自身免疫性疾病中的治疗效率。

1 材料和方法

1.1 试剂

BamHI / AgeI 限制性核酸内切酶(NEB), 琼脂糖(赛百盛公司), In-Fusion™ PCR Cloning Kit (Clontech), Taq polymerase (SinoBio), dNTP (Takara), Plasmid 抽提 Kit (Promega), 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(天根生化), Primer 由瑞生物技术有限公司合成, 兔抗 GFP 多克隆抗体(北京康为世纪有限公司);引物 KL6470-P1: GATCCCGCCACCA TGAGCAGTGAAAAGGCTGAACAACAGTGGGCTA, K L6470-P2: CCGGTAGCCCACTGTTGTTTCAGCCTTTTC ACTGCTCATGGTGGCGG。PCR 鉴定引物 KL6470-P3: GTGAAAAGGCTGAACAACAGTG, EGFP-N-R: CG TCGCCGTCCAGCTCGACCAG

1.2 仪器

PCR 仪 (ABI 7600), 稳压 DNA 电泳仪 (Bio-Rad), 凝胶成像仪(天能公司), HI-9211K 细菌摇床(华利达实验设备公司), 细菌培养箱(上海一恒科

学仪器有限公司), TGL-16G-A 高速离心机(日立公司)。

1.3 载体信息

载体名称:GV287(上海吉凯基因化学技术有限公司提供), 元件顺序: Ubi-MCS-3FLAG-SV40-P1-EGFP;Ubi-MCS-3FLAG-SV40- EGFP(图 1)。

1.4 动物

雌性 C57 小鼠, SPF 级, 体重 18~20 g, 购自军事医学科学院动物实验中心, 动物生产合格证号: SCXK (军)2012-0004, 由海军总医院动物实验中心饲养, 使用许可证号: SYXK (军)2012-0012。

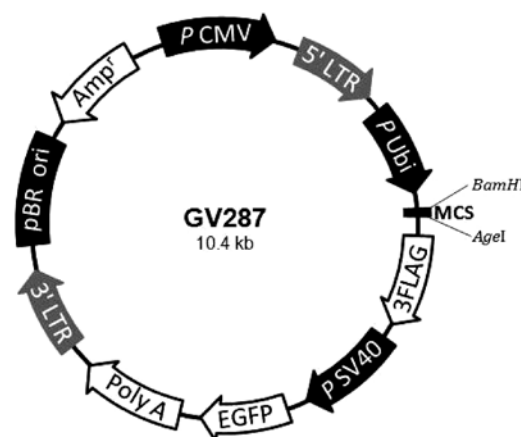


图 1 GV287 载体构建示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the construction of vector GV287

1.5 实验方法

1.5.1 人脐带间充质干细胞的高效分离与鉴定^[4]: 无菌取剖腹产新鲜脐带, 以平衡盐溶液洗去脐带残留血液, 剪成 3~4 cm 的小段, 取每一段沿静脉腔剪开, 平铺后剔除脐带动、静脉, 取血管之间血管与外膜之间的胶状物并剪切成小于 1 mm³ 小块, 以平衡盐溶液冲洗后, 把组织块放置含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基, 在 37℃ 5% CO₂ 培养箱中

培养。24 h 后半量换液,待组织块周围均有贴壁细胞出现时,移出组织块,当细胞扩增占 80% ~ 90% 细胞瓶底面积时,用 0.05% 胰蛋白酶-EDTA 液消化后传代,用 0.01 mol/L PBS 调整细胞浓度为 5×10^5 /mL, 0.01 mol/L PBS 洗涤 2 次后,加入 PBS 1 mL 重悬细胞,取 1×10^6 个细胞待用,本研究用第 3 代细胞进行实验。

1.5.2 过表达慢病毒载体构建:委托上海吉凯基因化学技术有限公司完成,实验组含 P1-GFP 融合基因,对照组只含 GFP 基因。病毒效价 $TU/\mu L = 2.00E + 8 TU/mL$ 。

1.5.3 用慢病毒载体感染 MSC:用含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基在 37℃ 5% CO_2 培养箱中培养 MSC,感染前保证 MSC 良好生长状态,进行病毒感染时细胞的融合率约为 30% ~ 50%,37℃ 5% CO_2 培养箱中培养过夜。预先从 -80℃ 取出病毒液在冰上融化,同时在培养基中添加 5 $\mu g/mL$ 的 polybrene,轻轻混匀,使培养基和病毒等试剂充分混匀,然后把细胞板放回培养箱孵育。8 ~ 12 h 以后观察细胞状态,弃去细胞上清液,更换为新鲜含 15% 胎牛血清的 DMEM 培养基。感染后每日观察荧光表达情况,72 h 后收获细胞用于后续实验。

1.5.4 MSC 经静脉输入小鼠体内后的分布:用无菌 PBS 调整慢病毒载体感染脐带间充质干细胞浓度至 1×10^6 /mL,随机数字法将 10 只雌性 BALB/C 小鼠分为实验组及对照组二组,每组 5 只。实验组和对照组每只小鼠尾静脉注射分别注入含 P1-GFP 和 GFP 融合基因的 MSCs 细胞液,每只 0.5 mL,分别于 6 h、12 h、18 h 后处死,取脾脏 30% 甲醛固定 24 h,常规免疫组化染色,显微镜下观察 GFP 在脾脏的分布及与淋巴细胞的关系。

2 结果

2.1 MSC 形态及病毒感染效果

培养的 MSC 细胞形态不规则长梭形,边缘较钝,细胞内外不见明显颗粒,表面光滑、状态良好,(图 2A)。慢病毒感染的含目的基因 MSC 形态细胞形态仍呈不规则长梭形,边缘光滑,细胞内外偶见颗粒,状态良好(图 2B)。用荧光显微镜每日观察慢病毒感染含目的基因 MSC,发现感染 18 h 后 MSC 开始出现绿色荧光,随着培养时间的延长,荧光强度逐渐增强(图 3A),到 72 h 达高峰(图 3B),以后逐渐下降,本研究选用感染后 72 h 的细胞用于动物

实验。(图 2,3 见文后彩插 3)。

慢病毒感染的含目的基因的 MSC 仍表达髓系间质干细胞的表面标记 CD105 (90.0%)/CD44 (98%), CD73 (85.0%)/CD90 (98.5%) (图 4)。

2.1 MSC 经静脉输入小鼠体内后的分布

将慢病毒载体感染脐带间充质干细胞经静脉途径输入小鼠体内,不同时间段取小鼠脾脏,经免疫组化染色,在 18 h 取出的小鼠脾脏发现了大量 GFP 阳性细胞(图 5C),空载体与 GFP 对照组阳性信号明显低于实验组(图 5A,图 5B),说明靶向 MSC 成功定向脾脏,并与脾脏淋巴细胞密切接触。(图 4,5 见文后彩插 4)。

3 讨论

脐带间充质干细胞 (umbilical cord derived mesenchymal stem cells, UC-MSCs) 是组织工程和再生医学理想的种子细胞^[1,2,4]。目前,用 MSC 治疗疾病的临床试验正在许多国家进行,但干细胞疗法成功与否很大程度依赖足量的干细胞归巢到损伤组织,提高 MSC 归巢至靶器官是治疗疾病的关键。

巨噬细胞在胶原诱导的关节炎、肾炎、甲状腺炎、变应性脑脊髓炎等实验性自身免疫性疾病的组织损伤中发挥着重要作用。骨髓来源的活化的巨噬细胞是实验性自身免疫性葡萄膜炎 (experimental autoimmune uveitis, EAU)^[5] 组织损伤中主要的效应细胞。而巨噬细胞并未行使抗原呈递的功能,而是在组织损伤中发挥了效应细胞和清除死亡细胞的功能。目前所有研究结果均提示抑制树突状细胞和单核巨噬细胞功能,改变免疫应答类型将是治疗 EAU 的一个有效途径,并在最新的研究中得到了证明^[6]。

在国家自然科学基金的资助下,本课题组获得了一种具有自主知识产权的、能与单核巨噬细胞特异性结合的小分子肽 P1,在 P1 肽的导向下,P1-绿色荧光蛋白(GFP)融合蛋白在粘膜免疫中可到达消化道免疫相关组织。P1-GFP 融合蛋白免疫小鼠后,小鼠脾脏中的 $CD4^+$ 细胞通过分泌 $TGF\beta$ 和非成熟 DC 共同发挥了免疫调节作用^[3,7,8]。

本研究通过分子克隆技术,将前期研究获得的能特异性靶向抗原呈递细胞的小分子肽 P1 与 GFP 融合蛋白成功克隆入慢病毒病毒载体,通过慢病毒感染使 MSC 获得融合蛋白基因^[9],制备了靶向

MSC。将慢病毒载体感染脐带间充质干细胞经静脉途径注入小鼠体内, 18 h 后在小鼠脾脏发现了大量 GFP 阳性细胞, 说明靶向 MSC 成功定向脾脏, 并与脾脏淋巴细胞密切接触。

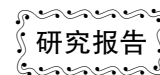
脾脏是体内重要的外周淋巴器官, 是免疫应答发生的主要场所, 脾脏主要通过单核巨噬细胞系统发挥吞噬作用而实现在非特异性免疫调控, 在抗感染免疫和肿瘤免疫中具有重要的作用。我构建的靶向 MSC 成功定向脾脏, 并与脾脏淋巴细胞密切接触, 说明我们构建的靶向 MSC 功能良好, 可用于后续的实验研究。

由于 MSC 在体外还可减低 DC 抗原递呈能力, 抑制 T 细胞增殖, 抑制 Th1 和 Th17 细胞因子分泌, 增强 Th2 细胞因子分泌, 上调 CD4⁺ CD25⁺ Treg 细胞^[10-13], 通过靶向 MSC 改善脾脏中 DC 和巨噬细胞免疫微环境, 重建免疫平衡, 抑制 EAU 的进展将是我们下一步要做到的工作。

参考文献:

- [1] Salem HK, Thiemermann C. Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status [J]. Stem Cells. 2010, 28(3): 585-96.
- [2] Xue Q, Luan XY, Gu YZ, et al. The negative co-signaling molecule b7-h4 is expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mediates its T-cell modulatory activity [J]. Stem Cells Dev. 2010, 19(1): 27-38.
- [3] 郭建巍, 秦力维, 冯健男, 等. 基于蓖麻毒素 B 链的新型粘膜免疫佐剂设计及靶向效果初步评价 [J]. 中国免疫学杂志, 2013, 29(9): 974-988.
- [4] 秦力维, 张宁坤, 郭建巍, 等. 人脐带间充质干细胞的高效分离及对小鼠免疫功能的影响 [J]. 转化医学杂志, 2014, 3(6): 333-336.
- [5] Sanui H, Redmond TM, Kotake S, et al. Identification of an immunodominant and highly immunopathogenic determinant in the retinal interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) [J]. J Exp Med. 1989, 169(6): 1947-60.
- [6] Suzuki J, Yoshimura T, Simeonova M, et al. Aminoimidazole carboxamide ribonucleotide ameliorates experimental autoimmune uveitis [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012, 53(7): 4158-4169.
- [7] 郭建巍, 秦力维, 冯健男. 一种诱导 Th1 型免疫应答的粘膜免疫佐剂及应用 [P]. 中国发明专利: 201210017786. 9.
- [8] 郭建巍, 秦力维, 冯健男, 等. 基于 RTB 的新型免疫增强剂构建、表达及免疫效果评估 [J]. 免疫学杂志, 2013, 29(11): 966-969.
- [9] Treacy O, Ryan AE, Heinzl T, et al. Adenoviral transduction of mesenchymal stem cells: in vitro responses and in vivo immune responses after cell transplantation [J]. PLoS ONE. 2012, 7(8): e42662.
- [10] Wan F, Lenardo MJ. The nuclear signaling of NF-kappaB: current knowledge, new insights, and future perspectives [J]. Cell Res. 2010, 20(1): 24-33.
- [11] Zhang X, Ren X, Li G, et al. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune uveoretinitis by comprehensive modulation of systemic autoimmunity [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011, 52(6): 3143-3152.
- [12] Spaggiari GM, Moretta L. Cellular and molecular interactions of mesenchymal stem cells in innate immunity [J]. Immunol Cell Biol. 2013, 91(1): 27-31.
- [13] English K. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation [J]. Immunol Cell Biol. 2013, 91(1): 19-26.

[修回日期] 2015-04-25



滇西亚种树鼯微卫星分子标记的筛选

张媛, 李晓飞, 李振宇, 仝品芬, 陈玲霞, 尹博文, 代解杰

(中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所树鼯种质资源中心, 昆明 650118)

【摘要】 目的 筛选出适用于滇西亚种树鼯种群遗传质量控制的特异性微卫星分子标记。**方法** 首先从树鼯全基因组序列中筛选出约 700 个微卫星位点, 择优选出约 100 个位点设计引物, 去除有不良因素的, 最后保留 33 对和文献报道的 13 对引物对滇西亚种树鼯 DNA 进行 PCR 扩增, 根据琼脂糖电泳和聚丙烯酰胺电泳结果筛选保留, 进行 STR 扫描再次筛选适于树鼯遗传检测的微卫星位点组合。**结果** 筛选出树鼯微卫星位点 22 个, STR 基因扫描有明显 Stutter 峰。比较备选位点和最终筛选出的位点, 普通树鼯位点中选取 5 个, 2 个可用, 与滇西亚种的重合率是 40%; 印度小树鼯位点中选取 5 个, 2 个可用, 重合率是 40%; 中缅树鼯的位点中选取 3 个, 2 个可用, 重合率约 70%。**结论** 筛选出的 22 个微卫星位点适用于滇西亚种树鼯的遗传检测, 为树鼯种群的遗传质量监测提供科学依据。

【关键词】 滇西亚种树鼯; 微卫星分子标记; STR 扫描

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0036-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.008

Isolation and characterization of microsatellite markers in *Tupaia belangeri chinensis*

ZHANG Yuan, LI Xiao-fei, LI Zhen-yu, TONG Pin-fen, CHEN Ling-xia, YIN Bo-wen, DAI Jie-jie

(Center of Tree Shrews Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To screen out specific microsatellite markers for use in *Tupaia belangeri chinensis* genetic testing. **Methods** Firstly to screen about 700 microsatellite loci from whole genome. Secondly to choose about 100 better loci without defect factors. Lastly 46 primers were designed by 33 tree shrew's microsatellite loci obtained from whole genome and other references. Agarose gel electrophoresis and polyacrylamide gel electrophoresis were used for PCR products, and better loci based on electrophoresis results were chosen. Then STR scan was used to select the microsatellite loci combination for genetic testing. **Results** Twenty-two microsatellite loci were selected with a significant Stutter peak on STR scanning. Comparing the alternative loci and ultimately selected loci, there were two loci available in the five alternative loci of *T. glis*. The coincidence rate between *T. glis* and *T. b. chinensis* was 40%. There were two loci available in the five alternative loci of *T. minor*, and the coincidence rate between *T. minor* and *T. b. chinensis* was 40%. There were two loci available in the three alternative loci of *T. belangeri*, and the coincidence rate between *T. belangeri* and *T. b. chinensis* was about 70%. **Conclusions** The 22 microsatellite loci screened in this study are well applied for genetic

[基金项目] 国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01); 云南省科技创新平台建设(2013DA002)。

[作者简介] 张媛(1988-), 女, 硕士, 研究方向: 实验动物遗传质量控制。E-mail: zyuan5788@163.com。

[通讯作者] 代解杰, 男, 研究员, 课题负责人, E-mail: djj@imbcams.com.cn。

testing of *Tupaia belangeri chinensis*, therefore, provide a scientific basis for the genetic quality monitoring of tree shrews.

【Key words】 *Tupaia belangeri chinensis*; Microsatellite maker; STR loci gene scan; Genetic quality monitoring

树鼩, 攀鼩目动物^[1]。线粒体 DNA 分析结果倾向于树鼩与兔形目动物亲缘关系最近^[2-5], 基因序列数据分析结果和系统发育关系显示树鼩与灵长类的亲缘关系最近^[6,7]。可见树鼩与人类的亲缘关系要高于广泛应用于生物、医药物研究的非灵长动物。20 世纪 80 年代以来树鼩被广泛应用于人类病毒感染的动物模型研究, 多种人类病毒都可以感染树鼩^[8-10]。世界卫生组织 (WHO) 曾建议用树鼩代替大型灵长类动物进行科学实验^[11]。树鼩作为新兴实验动物资源具有很大的潜在价值。

实验动物的遗传质量决定着实验的可重复性、稳定性, 所以遗传质量控制是实验用树鼩标准化的重要部分。目前国际上使用最多的实验用树鼩是滇西亚种, 被用于建立各种疾病模型, 但其遗传质量控制存在着问题, 实验用树鼩多来自于野生型, 由于尚未建立标准有效的遗传检测方法, 实验用树鼩的遗传背景不清晰, 遗传质量不能保证, 直接导致了实验结果的重复性和稳定性降低, 因此迫切需求遗传质量控制标准。黎家敏等曾建立树鼩 RAPD 遗传标记分析方法, 筛选出 20 条可以用于树鼩群体遗传分析的引物^[12]。但由于 RAPD 本身的技术局限, 其遗传多样性检出水平低、检测方法不够稳定, 该方法已逐渐被新技术取代。目前, 被广泛使用的遗传多样性检测技术包括了微卫星多态性分析等技术。但是, 已报道的树鼩微卫星位点很少, 6 个普通树鼩 (*T. glis*) 位点, 7 个印度小树鼩 (*T. minor*), 14 个中缅树鼩位点其中的 2 个位点不存在多态性^[13-15], 针对于滇西亚种的特异性位点很匮乏仅有 14 个, 且部分位点有非特异性扩增条带^[16]。必须寻找到更多的特异性微卫星分子标记, 丰富树鼩的遗传信息, 建立滇西亚种树鼩的遗传检测标准, 为实验用树鼩的种群建立、遗传质量控制提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

动物: 所用树鼩均来源于医学生物学研究所树鼩种质中心饲养的 P₀ 代滇西亚种树鼩 (生产许可证号: SCXK(滇) K2013-0001), 共抽取 30 只, 其中雌

性、雄性各占一半, 分别对 30 只树鼩尾静脉采血各 0.3 mL, 用血液基因组 DNA 提取试剂盒 (天根 DP318-02) 提取 DNA 样本, Nanodrop-1000 测定质量和浓度, 将 30 份样本 4℃ 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 位点和引物的筛选: 从 NCBI 中下载树鼩全基因组序列片段, 使用 SSR Hunter 软件设定单元碱基个数最大值为 5, 单元重复次数最小值为 15 进行微卫星筛选, 选出了约 700 个位点, 从中择优选出重复次数大于 30 次、单元碱基 2~5 个的位点约 100 个, 然后使用 Primer 5.0 软件设计引物, 设计过程中将含有发卡结构、错配、引物二聚体等不良影响因素较多的位点剔除, 最后保留 33 对引物作为初筛备选位点, 编号 1~33。连同从文献中选取的另外 13 对非滇西亚种树鼩的引物共 46 对引物交由 TaKaRa 公司合成。

1.2.2 梯度 PCR 扩增和产物检测: 使用 TaKaRa 公司 PCR 试剂盒 (R011) 做温度梯度 PCR, PCR 反应总体积为 25 μL, 10 × PCR buffer 2.5 μL, dNTP 2 μL, 上游引物 (25 pmol/μL) 0.2 μL, 下游引物 (25 pmol/μL) 0.2 μL, Taq 酶 0.25 μL, DNA 模板 1 μL, 灭菌双蒸水 18.85 μL, PCR 反应条件: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 35 s, 退火 40 s (退火温度 50℃~56℃), 72℃ 延伸 40 s, 30 个循环, 72℃ 充分延伸 5 min。

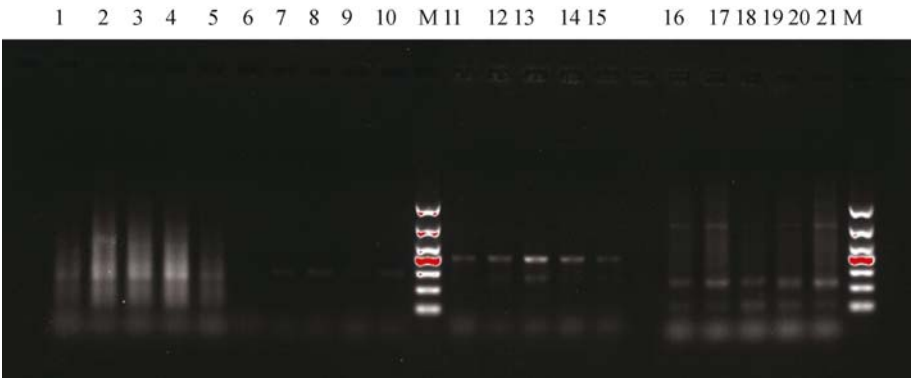
2 结果

2.1 电泳

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳 (图 1), 选取条带明亮清晰的再进行 12% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳后银染显色 (图 2), 剔除扩增后无产物、产物特异性差的位点, 保留条带清晰、特异性强的微卫星位点共 29 个, 同时通过引物在不同退火温度的产物电泳图的比较确定各引物的合适退火温度。

2.2 STR 扫描

STR 扫描结果: 有 22 个位点可见典型的 Stutter 峰, 如图 3 (图 3 为位点 TBC26 的 STR 扫描图)。将筛选保留的新位点编号 TBC15~TBC30。22 个位点的引物和退火温度等见表 1。

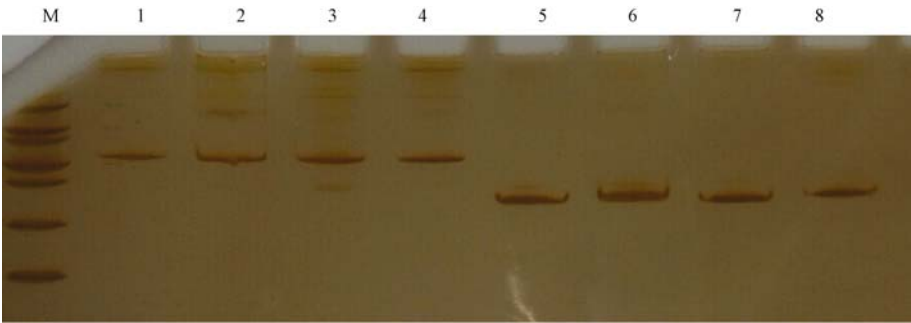


M; DL1000 marker; 1 ~ 5 为初筛备选位点 4, 6 ~ 10 为 TBC17, 11 ~ 15 为 TBC18, 16 ~ 21 为初筛备选位点 7

图 1 引物初筛备选位点 4、5、TBC6、TBC7 在树鼩基因中扩增后产物的琼脂糖电泳

Note. M; DL1000 marker; 1 - 5; alternative loci 4, 6 - 10; TBC17; 11 - 15; TBC18; 16 - 21; Alternative locus 7

Fig. 1 The results of gel electrophoresis showing amplified products with the alternative loci 4, 5, TBC6, TBC7 of primers for microsatellites in the tree shrew



M; DL1000 marker; 1 ~ 4 为 TBC19, 5 ~ 8 为 TBC20

图 2 引物 TBC19、TBC20 在树鼩基因中扩增后聚丙烯酰胺电泳

Note. M; DL1000 marker; 1 - 4; TBC19; 5 - 8; TBC20

Fig. 2 The results of PAGE electrophoregram showing amplified products with the TBC19 and TBC20 of primers for microsatellites in the tree shrew

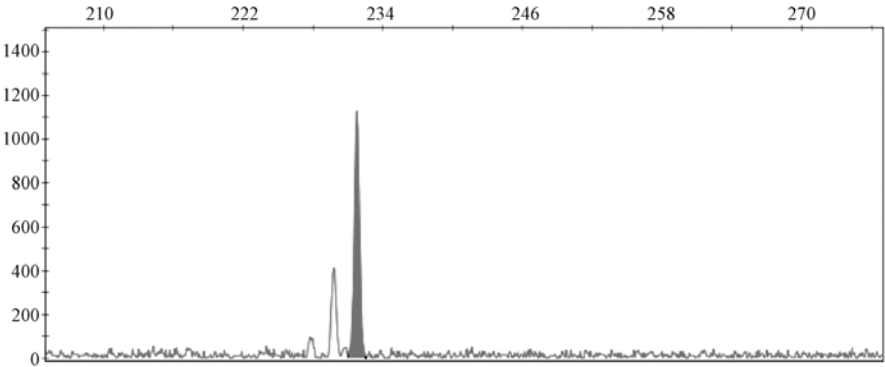


图 3 引物 TBC26 在树鼩基因中扩增后 STR 基因扫描图

Fig. 3 The results of STR Genescan showing amplified products with the primer TBC26 for microsatellites in the tree shrew

表 1 STR 分子标记引物序列
Tab.1 Microsatellite markers and their primers

位点 Loci	引物序列 (5'-3') Primer sequence	复性温度 Annealing temperature	重复单元 Repeat element	镁离子浓度 Mg ²⁺ (mM)
TBC15	F: TGGAAATAACAGCCACAA R: ACCTGCCCCAGTAATAAG	52℃	—	1.5
TBC16	F: CCATCCTGACTACTGCTTAC R: AGGGCTACTTTATAGGTTTC	51℃	—	1.5
TBC17	F: AGCAGATAATAACAAACA R: TAAACTGTAAAGGAAAGA	52℃	(AC) _n	1.5
TBC18	F: TTTTGGTATGGATCTCCT R: AGTGAATCAACAGCCTTC	52℃	(TTAT) _n	1.5
TBC19	F: AGGGAACCAAATGAACAA R: GTCACCGAAGTCACAACC	53℃	(AC) _n	1.5
TBC 20	F: TTAAATTTGACCAGACAC R: TGGCAATATGACATAGAC	53℃	(GA) _n	1.5
TBC21	F: AGGAAAAGGGACTTACTG R: TTGGGAATCAAATGACTATA	52℃	(CA) _n	1.5
TBC 22	F: TGGCTTATCCTACTGGTC R: CTTGTAGTTGCTGCTTT	51℃	(AC) _n	1.5
TBC23	F: GCTTTGTCACTTTCCTTCCTA R: TGCCTCGTGGCTATTTT	53℃	(GA) _n	1.5
TBC24	F: TGGAAATAACAGCCACAA R: ACCTGCCCCAGTAATAAG	53℃	(TTC) _n	1.5
TBC25	F: TGTCTCCCTGGTCATATT R: GTGCTCTTCTCAGCGTTT	54℃	(AAGG) _n	1.5
TBC26	F: CATCCCTGAATCCAAGCC R: CACCAGCAAGGTAAGTCC	53℃	(CA) _n	1.5
TBC27	F: GTTAAGGCACTGGACATT R: GTGAACCCACAAATAATCTA	55℃	(TC) _n	1.5
TBC28	F: TGGGCTGGAATACATAA R: GCTGTGAGACCCTGTTGG	54℃	(TG) _n	1.5
TBC29	F: CAAATCAAAATGAGCCAAAA R: TCGGGACTCAAAGTGTGG	53℃	—	1.5
TBC30	F: AGCCTGGGCTGGAATAC R: GCTGTGAGACCCTGTTGG	53℃	—	1.5
TB1	F: ATCAGAATCTGGTTTCAAAGGT R: GCACACCATGATGTAGCTGT	56℃	(AAGAAA) _n	1.5
TB6	F: AGACAGAATGCAAGAAATCAC R: ATGTGCAATGTAATAGTTCCAG	56℃	(AAAAC) _n	1.5
TG4	F: TGAAAAGTGGCAATTATATGC R: CAATCCTTTTTCGTTAGTTTGTG	52℃	(CA) _n	1.5
TG22	F: GTGAGTGCACTTGCCCTGTA R: TCCTGAACCTGGTGGCTAAC	55℃	(CA) _n	1.5
JS188	F: ACACACACAAAATCATTTATCC R: TCTACACGAATGTGCCAACC	57℃	(CA) _n	1.5
SKTg22	F: GAGTGCACTTGCCCTGTAAC R: TCCTGAACCTGGTGGCTAAC	57℃	(CA) _n	1.5

3 讨论

微卫星技术是近二十年来发展起来的一种新的分子标记,它是以几个核苷酸(1~6个)为单位多次重复的简单序列,相对于限制性酶切片段长度

多态性和随机扩增多态性等分子标记,微卫星分子标记具有数量多、在真核生物的基因组中分布广且均匀、多态信息含量高、共显性遗传、检测快速以及适合自动化分析等优点,适合于封闭群动物较多检测样本、较多检测位点的需求。微卫星标记应用

于实验动物的遗传检测已被证明具有独特优势和良好前景^[17,18]。我们筛选的 22 个位点可以为建立树鼩封闭群提供依据,可以对封闭群繁殖四代以上的树鼩种群,使用微卫星标记扩增检测,计算每世代的有效等位基因数(N_e)、观察杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、遗传分化指数(F_{ST})等,评估种群各个世代的遗传关系,当各世代之间的上述遗传信息两两比较均差异无显著性($P > 0.05$),种群合格,或是检验种群是否达到哈迪—温伯格平衡,若达到即为合格封闭群,若未达到则说明仍有基因频率的变化,不能达到封闭群的要求。

STR 基因扫描技术比琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺电泳技术结果更加准确客观,可以检测到微小片段差异,相对于以电泳技术确定等位基因数,STR 基因扫描可以得到更准确的等位基因数。

树鼩相关遗传研究较少,没有建立有效的遗传检测方法极大的限制了它的应用。微卫星标记具有种属差异性,必须采用特异的引物进行 PCR 检测,因而存在特异位点引物筛选的问题。找到更多的微卫星分子标记是建立遗传质量检测标准的需要,据所查阅到的文献显示,目前有关于树鼩的微卫星分子标记仅有约 40 个,其中部分并不属于滇西亚种树鼩,如:普通树鼩(*T. glis*) 6 个位点,印度小树鼩(*T. minor*) 7 个位点等^[13-16]。表 1 中的 22 个位点,TBC15 ~ TBC30 是从树鼩全基因组序列中筛选出的全新滇西亚种特异位点,另外的 6 个位点则筛选于文献报道的其他品种树鼩位点。微卫星位点初级筛选时我们选取了其他品种树鼩(包括普通树鼩、印度小树鼩、中缅树鼩等) 13 个位点对滇西亚种树鼩进行扩增,我们的研究表明:普通树鼩选取的 5 个位点,有 2 个位点有清晰条带,3 个位点扩增效果差,与滇西亚种的重合率是 40%;印度小树鼩选取的 5 个位点,有 2 个位点有清晰条带,3 个位点扩增效果差,与滇西亚种的重合率是 40%;中缅树鼩选取的 3 个位点,2 个位点有清晰条带,1 个位点扩增效果差,与滇西亚种的重合率约 70%,由此推测不同种树鼩之间存在着基因差异,微卫星位点并不完全通用,位点重合率的高低也较符合几种树鼩间地域隔离的特点,较远的重合率低,较近的重合率高,证明了扩增结果的准确性。实验中所筛选出的 22 个新位点在电泳后均出现清晰、特异性强的条带,如图 1 中的 TBC17 和 TBC18 等,而条带模糊拖带的初筛备选位点 4、7 等位点则被认为特异性

差而剔除,STR 基因扫描更精准确定了所选位点是特异的 STR 位点。相对于以前筛出的 14 个滇西亚种 STR 位点会出现拖带、非特异扩增的缺点,本次所筛选的 22 个位点更适合用于滇西亚种树鼩的遗传质量检测,筛选出的新位点同样可以应用于遗传图谱构建、遗传多样性评估、QTL 定位等更深一步的遗传研究。

参考文献:

- [1] 郑永唐,姚永刚,徐林. 树鼩基础生物学与疾病模型 [M]. 昆明:云南科技出版社. 2014: 4.
- [2] Arnason U, Gullberg A, Janke A. The mitochondrial DNA molecule of the *aardvark*, *Orycteropus afer*, and the position of the Tubulidentata in the eutherian tree [J]. Proc Biol Sci, 1999, 266(1417): 339-345.
- [3] Schmitz J, Ohme M, Zischler H. The complete mitochondrial genome of *Tupaia belangeri* and the phylogenetic affiliation of Scandentia to other eutherian orders [J]. Mol Phyl Evol, 2000, 17(9): 1334-1343.
- [4] Xu L, chen SY, Nie WH, et al. Evaluating the phylogenetic position of Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) based on complete mitochondrial genome: implication for using tree shrew as an alternative experimental animal to primate in biomedical research [J]. J Genet Genomics, 2012, 39(3): 131-137.
- [5] Adkins RM, Honeycutt RL. Molecular phylogeny of the superorder Archonta [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(22): 10317-10321.
- [6] Lindblad-Toh K, Garber M, Zuk O, et al. A high-resolution map of human evolutionary constraint using 29 mammals [J]. Nature, 2011, 478(7370): 476-482.
- [7] Fan Y, Huang ZY, Cao CC, et al. Genome of the Chinese tree shrew [J]. Nat Commun, 2013, 4:1426.
- [8] Amako Y, Tsukiyama-Kohara K, Katsume A, et al. Pathogenesis of hepatitis C virus infection in *Tupaia belangeri* [J]. J Virol, 2010, 84(1): 303-311.
- [9] Zhang L, Ben KL. In vitro infection of tree shrew immunocytes with human immunodeficiency virus type I [J]. Zool Res, 2001, 22: 33-40.
- [10] Yang EB, Cao J, Su JJ, et al. The tree shrews: useful animal models for the viral hepatitis and hepatocellular carcinoma [J]. Hepatogastroenterology, 2005, 52(62): 613-616.
- [11] 杨芳,何保丽,何永蜀,等. 树鼩生化与微卫星标记的初步研究 [J]. 昆明医学院学报, 2010, 5: 8-11.
- [12] 黎家敏,李海燕,李婧潇,等. 应用 RAPD 标记技术对树鼩遗传多样性的分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(2): 34-40.
- [13] Srikan S, Hufford K, Lori Eggert L, et al. Variable microsatellite markers for genotyping tree shrews, *Tupaia*, and their potential use in genetic studies of fragmented populations

- [J]. ScienceAsia, 2002, 28: 93 - 97.
- [14] Munshi-south J, Wilkinson GS. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in Bornean tree shrews (*Tupaia spp.*) [J]. Molec Ecol Notes, 2006, 6(3): 698 - 699.
- [15] Liu XH, YAO YG. Characterization of 12 polymorphic microsatellite markers in the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Zool Res, 2013, 34(2): 62 - 68.
- [16] 李婧潇, 王新兴, 王文广, 等. 中缅树鼩微卫星分子标记的筛选 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(4): 312 - 315.
- [17] Basta PV, Whitmore SP, Basham KB, et al. Microsatellite analysis in FVB/ N mice [J]. Comp Med, 2004, 54(5): 524 - 527.
- [18] Katoh H, Yoshino S, Inui Y, et al. Microsatellite genotyping for genetic quality testing using sperm cells in the mouse [J]. Exp Animals, 2005, 54(4): 373 - 376.
- [修回日期] 2015-04-22

《中国比较医学杂志》约稿 欢迎踊跃投稿

《中国比较医学杂志》是中国实验动物学会和中国医学科学院医学实验动物研究所共同主办的全国性学术刊物(月刊),主要刊载实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,比较医学成果和进展。本刊开设研究报告,综述与专论,研究快报,技术方法,经验交流,管理科学,国外研究进展,学术信息,简讯等。

1 文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。

2 来稿须附第一作者主管单位正式介绍信,作者单位应对稿件内容的真实性负责,声明无署名纠纷,无一稿两投或多投。

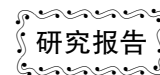
3 请登录(<http://zgswdw.alljournal.ac.cn/zgbjyxzz/ch/index.aspx>) 注册后按照提示投稿。作者也可通过登陆中国实验动物学会网站(www.calas.org.cn) 链接进入投稿系统。

4 两刊采用论文授权书形式替代单位介绍信,请在投稿系统网站下载中心下载后填写盖章,扫描件或照片件以附件形式随文章一同投稿上传。

本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网和中国实验动物学会网站等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。

地址:北京朝阳区潘家园南里 5 号《中国比较医学杂志》编辑部,邮编:100021

电话:010 - 67779337 传真:010 - 67781534 E-mail: b67761337@126.com



PSGL-1 缺失导致 MDSCs 上调

周泽启, 李江超, 张潇涵, 韩 露, 叶宇翔, 王丽京

(广东药学院血管生物学研究所, 广州 510006)

【摘要】 目的 P-选凝素糖蛋白配体 1 (P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1) 主要特异性表达在白细胞上, 我们的研究 PSGL-1 缺失在小鼠体内脾脏、骨髓中 MDSCs 的变化。**方法** 利用我们实验室现有的 PSGL-1^{-/-} 小鼠进行试验, 经过鉴定后, PSGL-1^{-/-} 后代小鼠; 利用流式细胞术检测 C₅₇ 和 PSGL-1^{-/-} 小鼠脾脏、骨髓中 Gr-1 和 CD11b 阳性细胞的变化。**结果** 与对照组 C₅₇ 小鼠相比, PSGL-1^{-/-} 基因工程小鼠 MDSCs 在脾脏、骨髓中显著上调 ($P < 0.001$), **结论** PSGL-1 的缺失导致小鼠脾脏、骨髓中 MDSCs 升高。

【关键词】 PSGL-1; MDSCs; 基因工程小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0042-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.009

MDSCs are upregulated in PSGL-1-deficient mice

ZHOU Ze-qi, LI Jiang-chao, ZHANG Xiao-han, HAN Lu, YE Yu-xiang, WANG Li-jing

(Vascular Biology Center, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

【Abstract】 Objective PSGL-1 is specifically expressed in leucocytes. The aim of this study was to explore the changes of myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) in the spleen and bone marrow in PSGL-1-deficient mice. **Methods** PSGL-1^{-/-} mice were used in the experiment. After identification of the offsprings, flow cytometry was used to test the expression of CD11b and Gr-1 in C₅₇ and PSGL-1^{-/-} mice. **Results** Compared with the C₅₇ mice, the expression of MDSCs was up-regulated in the PSGL-1-deficient mice ($P < 0.001$). **Conclusion** The expression of MDSCs is upregulated in PSGL-1-deficient mice.

【Key words】 P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1; Myeloid-derived suppressor cells, MDSCs; Spleen; Bone marrow; Transgenic mice; PSGL-1-deficient mice

P-选凝素糖蛋白配体 1 (P-selectin glycoprotein ligand 1, PSGL-1) 是 90 年代发现其为同源二聚体的一种跨膜的糖蛋白, 表达于白细胞的膜表面^[1,2]。在炎症环境中, PSGL-1 与 P-选凝素的相互作用, 促进白细胞与内皮细胞的黏附和滚动, 在粘附的起始阶段发挥着重要作用^[3,4]。

在现有的报道中有人认为炎症是能激发先天免疫和组织修复和再生, 但是大多数人认为炎症是

促进机体逐步走向衰老、病态的一个诱因^[5,6]。PSGL-1 介导白细胞粘附的同时, 还作为信号分子转导胞外信号, 促进白细胞活化, 具有重要的生理意义^[7,8]。最近在研究表明, PSGL-1 在血小板与中性粒细胞结合中起到非常重要作用, 当中性粒细胞无法结合血小板时, 它们不能正常迁移, 炎症会减少^[9,10]。在 PSGL-1 介导的粘附过程中发现, 当 PSGL-1 敲除使其粘附血小板的能力降低, 且白细胞

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (44164007; 81472336) 和 广东省医学科研基金, 项目号: A2013312。

【作者简介】 周泽启, 男, 硕士, E-mail: zhouzeqi199131@163.com。

【通讯作者】 王丽京, 女, 教授, E-mail: wanglijing62@163.com。

向炎症部位的爬行变慢。

肿瘤免疫作为一个新型的肿瘤研究方向,其作用方式和免疫应答相当复杂,涉及一系列的免疫分子及其之间的相互作用。髓系抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells, MDSCs)作为一种免疫细胞在肿瘤逃逸中越来越引起关注,MDSCs 主要参与肿瘤免疫逃逸、免疫抑制进而促进肿瘤的发生发展。MDSCs 借助外源物质和肿瘤自身的特性进而帮助肿瘤实现逃逸功能。MDSCs 主要是一群异质性细胞和粒细胞,巨噬细胞等的前体,在小鼠体内 MDSCs 即为 CD11b⁺/Gr-1⁺ 双阳性细胞,但是目前国际上对于人的 MDSCs 细胞还没有明确的划分,HLA-DR-CD14-CD33⁺CD11b 被大多数人认可^[11]。在本研究中采取的动物模型为,PSGL-1 缺失的转基因小鼠,其对照鼠采用其背景鼠 C₅₇。首先需要采取基因鉴定的方法鉴定其基因类型,在分别利用流式细胞术检测其脾脏和骨髓中 MDSCs 的变化,在我们的实验中我们发现其脾脏和骨髓中 MDSCs 显著升高。

1 材料和方法

1.1 材料

PSGL-1^{-/-}小鼠(B6. Cg-Selp^{lgtm}^{1Fur}/J)均购买自美国 Jackson 实验室,SPF 环境中饲养扩群。C57BL/6 小鼠购自广东省医学实验动物中心,生产许可证号:SCXK(粤)2008-0002。使用许可证号,SYXK(粤)2012-0125,PCR 引物由 Invitrogen 公司合成,引物 Mix 购自 thermo。Flowjo 进行流式分析。

1.2 方法

1.2.1 小鼠饲养和鉴定:所有小鼠均于 SPF 级环境下饲养,现将购买的 PSGL-1^{-/-}小鼠与 C57 进行杂交,得到后代中鉴定其基因型,将 PSGL-1^{+/+}雄鼠和 PSGL-1^{+/+}雌鼠杂交,得到的子代有三种情况 PSGL-1^{+/+}、PSGL-1^{+/+}、PSGL-1^{-/-},经鉴定后得到实验鼠 PSGL-1^{-/-}小鼠和对照鼠 PSGL-1^{+/+}。PSGL-1 小鼠鉴定引物序列为: P1: 5'-AGCTTC CTTGTGCTG CTGAC-3', P2: 5'-TCAAAATCGTCATCCCCAAC-3', P3: 5'-CCTTCTATCGCCTTCTTGACG-3'。PCR 反应条件为:94℃ 预变性 5 min,94℃ /30 s,65℃ /1 min、72℃ /1 min,35 个循环;72℃ 延伸 2 min。P1 和 P2 是鉴定野生型条带,扩增条带为 140 bp,P2 和 P3 是鉴定突变型条带,扩增条带为 500 bp,用 1% 琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 结果,紫外灯下观察结果并

拍照。

1.2.2 脾脏 MDSCs 细胞检测:取 8 周的 PSGL-1^{-/-}、PSGL-1^{+/+}小鼠各 6 只,眼眶取血,去脾脏用 PBS 在尼龙筛网上进行研磨,取研磨下层的细胞液,用红细胞裂解液进行裂解 15 min,离心,进行计数,取大约 1×10^6 个细胞数,350 r/min,5 min;弃上清液,用纸吸干管口液体,1 mL 0.5% BSA 重悬细胞液,离心,350 r/min,5 min,加入工作液,,避光孵育 30 min,弃上清液,洗 1~2 次,上机检测。

1.2.3 骨髓 MDSCs 细胞检测:对上述分组小鼠,取完脾脏后将后腿剪下,抽取骨髓,同上述步骤检测。

2 结果

2.1 PSGL-1 缺失小鼠脾脏中 MDSCs 上调

脾脏是人和脊椎动物最大的淋巴器官,同时也是机体最大的免疫器官。取 C57 小鼠和 PSGL-1^{-/-}小鼠的脾脏进行单细胞悬液的制备,而后用流式细胞术技术标记 Gr-1 和 CD11b 两种抗体,检测结果显示在 PSGL-1 缺失小鼠中两者双阳性细胞即 MDSCs 细胞急剧上升,与正常小鼠对比,统计结果见图 1,差异明显($P < 0.001$)。

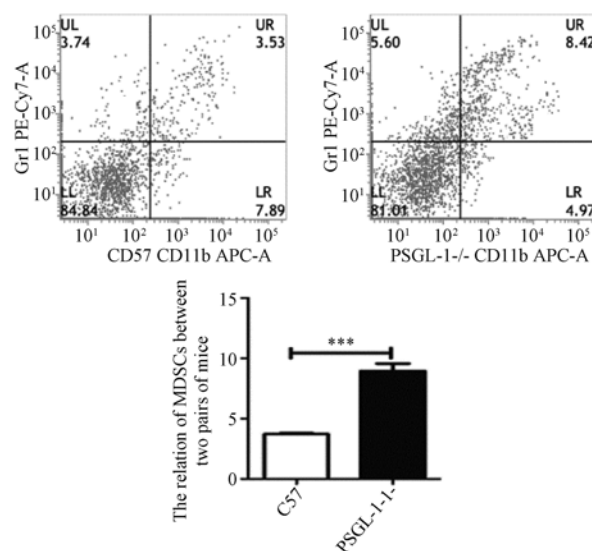


图 1 PSGL-1 缺失小鼠脾脏中 MDSCs 上调

Fig. 1 MDSCs are upregulated in the spleen of the PSGL-1^{-/-} mice

2.2 PSGL-1 缺失小鼠骨髓中 MDSCs 上调

骨髓不但是造血器官,它还是重要的免疫器官。在上述脾脏中看到 MDSCs 急剧上升,但是在白细胞大量来源地的骨髓是否也有同样结果,我

们不得而知,所以接下来我们进行骨髓方面的实验,实验结果显示,同脾脏一样,MDSCs 也是急剧上升,差异明显($P < 0.001$)。具体结果见图 2。

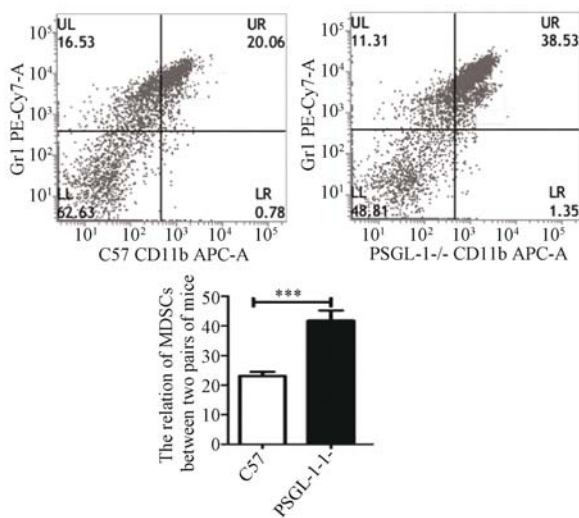


图 2 PSGL-1 缺失小鼠骨髓中 MDSCs 上调

Fig. 2 MDSCs are upregulated in the bone marrow of the PSGL-1^{-/-} mice

3 讨论

在炎症环境中,白细胞的滚动粘附起着重要作用,近年来研究发现的 PSGL-1 与其配体 P-selectin 在粘附的起始阶段发挥着重要作用^[12]。其主要作用是由 PSGL-1 介导的信号级连反应来完成具有重要的生理意义。PSGL-1 有三个与其对应的选凝素,其中造血祖细胞向骨髓的归巢以及细胞的分化是由 E-selectin 介导完成^[13]。研究还发现 PSGL-1 能参与趋化因子的趋化反应,如 PSGL-1 与 CCL19 (chemokine (C-C motif) ligand 19) 和 CCL21 (chemokine (C-C motif) ligand 21) 结合,并支持其趋化反应。也有文献报道 PSGL-1 和多发性骨髓瘤的发病机理有关系^[14-15]。提示 PSGL-1 可能与肿瘤发生发展和转移密切相关。上述研究表明,PSGL-1 在炎症反应中和血液肿瘤中发挥重要作用。

在不同器官,不同组织中,和不同病理条件下(炎症,肿瘤等环境),MDSCs 的表达会有所差异。受细胞因子的作用,这些髓系来源的前体细胞成熟受阻,因而停留在各个分化阶段,成为具有免疫抑制功能的 MDSCs。当在病理条件下,特别是肿瘤情况下,通过自分泌或旁分泌细胞因子,进而抑制 T 细胞正常功能,影响机体免疫。有研究报道靶向 MDSCs 的药物研究能有效抑制黑色素瘤患者的病

理进程,且患者两年生存率良好。所以在此基础上我们的研究才显得意义重大。通过我们的实验研究,发现在 PSGL-1 缺失小鼠中 Gr-1 和 CD11b 双阳性细胞急剧上升,且统计学差异显著($P < 0.001$),提示我们 PSGL-1 对机体免疫防护有着重要指示作用。本研究的创新点在于揭示 PSGL-1 在免疫中 MDSCs 升高,且差异显著。最新研究表明 PSGL-1 介导中性粒细胞引起的血小板黏附,阻断 PSGL-1 时炎症加剧,我们和其他研究者的结果揭示 PSGL-1 在人体机体免疫中发挥重要作用。

参考文献:

- [1] Siegel R, Naishadham D, Jemal A, Cancer statistics 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2012. 62(1): 10-29.
- [2] Wang HB, Wang JT, Zhang L, et al. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation [J]. Nat Immunol, 2007, 8(8): 882-892.
- [3] Thaker AI, Rao MS, Bishnupuri KS, et al. IDO1 metabolites activate beta-catenin signaling to promote cancer cell proliferation and colon tumorigenesis in mice [J]. Gastroenterology, 2013. 145(2): 416-425 e1-4.
- [4] Carlow DA, Gossens K, Naus S, et al. PSGL-1 function in immunity and steady state homeostasis [J]. Immunol Rev, 2009. 230(1): 75-96.
- [5] Wang HB, Wang JT, Zhang L, et al. P-selectin primes leukocyte integrin activation during inflammation [J]. Nat Immunol, 2007. 8(8): 882-892.
- [6] Katayama Y, Hidalgo A, Furie BC, et al. PSGL-1 participates in E-selectin-mediated progenitor homing to bone marrow: evidence for cooperation between E-selectin ligands and alpha4 integrin [J]. Blood, 2003. 102(6): 2060-2067.
- [7] Veerman KM, Williams MJ, Uchimura K, et al. Interaction of the selectin ligand PSGL-1 with chemokines CCL21 and CCL19 facilitates efficient homing of T cells to secondary lymphoid organs [J]. Nat Immunol, 2007. 8(5): 532-539.
- [8] Matsumoto M, Miyasaka M, Hirata T. P-selectin glycoprotein ligand-1 negatively regulates T-cell immune responses [J]. J Immunol, 2009. 183(11): 7204-7211.
- [9] Chen SC, Huang CC, Chien CL, et al. Cross-linking of P-selectin glycoprotein ligand-1 induces death of activated T cells [J]. Blood, 2004. 104(10): 3233-3242.
- [10] Rivera-Nieves J, Burcin TL, Olson TS, et al. Critical role of endothelial P-selectin glycoprotein ligand 1 in chronic murine ileitis [J]. J Exp Med, 2006. 203(4): 907-917.
- [11] Peranzoni E, Zilio S, Marigo I, et al. Myeloid-derived suppressor cell heterogeneity and subset definition [J]. Curr Opin Immunol, 2010. 148(7): 2574-2527.
- [12] Cunningham D, Zilio S, Marigo I, et al. Colorectal cancer [J]. Lancet, 2010. 375(9719): 1030-1047.

- [13] Meira, LB, Bugni JM, Green SL, et al. DNA damage induced by chronic inflammation contributes to colon carcinogenesis in mice [J]. J Clin Invest, 2008. 118(7): 2516–2525.
- [14] 李江超, 周泽启, 叶杰, 等. PSGL-1 基因敲除小鼠血中 MIP-1 γ 和 TNF- α 的表达 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(02): 70–78.
- [15] Raderer, M, Pfeffel F, Pohl G, et al. Regression of colonic low grade B cell lymphoma of the mucosa associated lymphoid tissue type after eradication of Helicobacter pylori [J]. Gut, 2000. 46(1): 133–135.

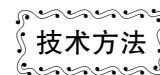
[修回日期]2014-05-04

2015 年《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》组织专题计划

2015 年《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》将计划由以下编委组织 7 期高水平专题:(1)顾为望教授:小型猪在生物医药研究中的应用(已完成);(2)范慧敏教授:实验动物心肺移植模型的建立及相关研究(已完成);(3)范永升教授:中医药研究与“病症”结合动物模型(杂志截稿日期:2015 年 2 月 28 日);(4)高诚教授:实验动物质量检测、标识标记、模型和评价(学报截稿日期:2015 年 5 月 31 日);(5)王强教授:斑马鱼在发育生物学及实验动物模型中的应用(学报截稿日期:2015 年 7 月 31 日);(6)代解杰教授:实验动物新资源标准化研究及疾病动物模型的创建(杂志截稿日期:2015 年 8 月 31 日);(7)肖杭教授:实验动物在药理毒理方面的应用研究(杂志截稿日期:2015 年 9 月 30 日)。

欢迎全国的同道积极参与符合上述专题内容的论文撰写、投稿,请注意各个专题的截稿日期;论文可以通过《中国实验动物学报》网站(<http://zgswdw.alljournal.ac.cn/sydwbyjyx/ch/index.aspx>);《中国比较医学杂志》网站(<http://zgswdw.alljournal.ac.cn/zgbjyxzz/ch/index.aspx>)上的两刊远程稿件管理系统注册并投稿(请在投稿后,在“消息管理”中向编辑部发送消息,注明是哪个专题),收到后将与上述各位教授所组织的专题论文一起进行严谨的审稿,入选论文将在两刊专题中刊出。我刊还特别欢迎各位专家教授撰写有学术导向和指导意义的评论性文章(包括专家论坛、专论、学术争鸣,等等),此类论文可以随时通过 Email 直接发送到邮箱:b67761337@126.com。相信在各位编委、审稿专家和广大实验动物工作者的积极参与下,我刊 2015 年的学术质量和影响力度会更上一层楼。

《中国实验动物学报》《中国比较医学杂志》编辑部



大鼠细小病毒 H-1 株和 KRV 株双重 PCR 检测方法的建立及应用

李晓波, 付 瑞, 王 吉, 卫 礼, 王淑菁, 岳秉飞, 贺争鸣

(中国食品药品检定研究院 实验动物资源研究所, 北京 100050)

【摘要】 目的 建立大鼠细小病毒 H-1 和 KRV 株双重 PCR 方法并对方法进行初步应用。**方法** 根据 NCBI 发表的 H-1 (NC_001358) 和 KRV (U790330) 基因组序列分别设计特异引物, 以 H-1 和 KRV 病毒 DNA 为模板建立双重 PCR 方法, 对方法进行优化后验证方法的敏感性和特异性; 经口感染大鼠, 分为 H-1 和 KRV 单独感染组和混合感染组, 感染后第 2, 4, 6, 8, 10 天采集大鼠粪便, 第 10 天处死所有大鼠, 采集心、肝、脾、肺、肾和盲肠内容物等组织, 用建立的方法对粪便和组织样本进行检测。**结果** 建立的双重 PCR 方法以 H-1 和 KRV 为模板能够分别扩增出 183 bp 和 302 bp 2 个条带, 敏感性验证显示能够检测到的最低 H-1 量为 3.8 pg/mL, 最低 KRV 量为 0.73 pg/mL; 在以小鼠微小病毒、犬细小病毒和猫细小病毒为模板时无任何条带扩增出, 特异性良好。感染第 2 天在所有大鼠粪便中均检测到病毒核酸, 感染大鼠均无明显临床症状, 感染第 10 天采集组织, H-1 在各组织的检出率分别是心 50% (4/8), 肝 50% (4/8), 脾 62.5% (5/8), 肺 50% (4/8), 肾 37.5% (3/8), 盲肠内容物 62.5% (5/8), 且单独感染组检出率高于混合感染组; KRV 在各组织的检出率分别是心 0 (0/8), 肝 25% (2/8), 脾 87.5% (7/8), 肺 12.5% (1/8), 肾 25% (2/8), 盲肠内容物 62.5% (5/8), 混合感染组检出率高于单独感染组。**结论** 建立的 H-1 和 KRV 双重 PCR 方法能够高效的检测大鼠粪便及组织中的病毒感染, 可作为实验动物国家标准的有力补充。

【关键词】 大鼠细小病毒; H-1; KRV; 双重 PCR

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2015) 06-0046-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.010

Development and application of duplex PCR for detection of H-1 and KRV strains

LI Xiao-bo, FU Rui, WANG Ji, WEI Li, WANG Shu-jing, YUE Bing-fei, HE Zheng-ming

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

【Abstract】 Objective To develop a duplex PCR assay for detection of rat parvovirus H-1 and KRV and its application. **Methods** To design specific primers on the basis of H-1 (NC_001358) and KRV (U790330) genome sequences published in NCBI and establish a duplex PCR assay using H-1 and KRV DNA as templates. To verify the sensitivity and specificity of the method after optimizing PCR. The rats were infected by oral inoculation. The rats were divided into three groups: H-1 infection, KRV infection and mixed infection groups. To collect feces at the 4th, 6th, 8th

【基金项目】 国家科技支撑计划“实验动物质量监测体系的完善与检测关键技术研究”(2013BAK11B00)。

【作者简介】 李晓波 (1980 -), 助理研究员, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: lxb8493059@163.com。

【通讯作者】 贺争鸣 (1957 -), 研究员, 研究方向: 实验动物微生物学。E-mail: zhengminghe57@163.com。

and 10th days postinfection. Rats were euthanized on the 10th day and samples from heart, liver, spleen, lung, kidney and cecal contents were collected from each rat, then all the samples were screened with the duplex PCR. **Results** The 183 bp and 302 bp bands were amplified using H-1 and KRV as templates. The sensitivity test showed that the PCR method can detect as low as 3.8 pg/mL H-1 and 0.73 pg/mL KRV. There were no bands amplified when mouse minus virus, canine parvovirus and feline parvovirus were used as templates, showing that the specificity of the duplex PCR assay is very good. The nucleic acids of H-1 or KRV were detected in all rat feces on the 2th day postinfection and there was no obvious clinical symptoms in all the infected rats. The positive rates of H-1 were as follows: 50% (4/8) heart tissues, 50% (4/8) liver tissues, 62.5% (5/8) spleen tissues, 50% (4/8) lung tissues, 37.5% (3/8) kidney tissues and 62.5% (5/8) cecum contents, and the positive rate of single infection group was higher than that of mixed infection group. The positive rates of KRV were as follows: 0 (0/8) heart tissues, 25% (2/8) liver tissues, 87.5% (7/8) spleen tissues, 12.5% (1/8) lung tissues, 25% (2/8) kidney tissues and 62.5% (5/8) cecum contents, and the positive rate of mixed infection group was higher than that of single infection group. **Conclusions** The duplex PCR assay for H-1 and KRV established in this study can effectively detect H-1 or KRV infection in rat feces and other tissues, and can be used as an effective supplement to the national standard of lab animals.

【Key words】 Rat parvovirus, RPV; H-1; KRV; Duplex PCR; Rats

大鼠细小病毒 (rat parvovirus, RPV) 是对实验大鼠危害最为严重的病毒之一,分类上属细小病毒科,细小病毒属。Kilham 等^[1]从患肿瘤的大鼠体内首次分离到 RPV,通常称为 Kilham 大鼠病毒 (Kilham rat virus, KRV);随后 Toolan 等^[2]从经大鼠传代的人肿瘤细胞系 (HEP-1) 分离到得第 2 株 RPV,通常称为 H-1 病毒,又称 Toolan 病毒。RPV 在野生大鼠中有较高的感染率,成年大鼠感染多无临床症状,但感染鼠可通过粪便长期向外排毒,污染饲料、饮水和周围环境,并重新感染易感动物,造成 RPV 在鼠群中持续存在。RPV 还可污染肿瘤移植物和细胞系,对实验研究造成严重干扰^[3]。我国实验动物国家标准 (GB 14922.2-2011) 规定大鼠细小病毒 KRV 和 H-1 株为 SPF 实验大鼠病毒的必检项目^[4]。

本实验建立了大鼠细小病毒 H-1 株和 KRV 株的双重 PCR 方法,能够在同一反应体系里同时检测 H-1 株和 KRV 株,缩短了检测时间,提高了检测效率。

1 材料

1.1 试剂

PCR 相关试剂购自 Takara 公司;DNA 提取试剂盒为 Qiagen 公司产品。

1.2 病毒毒株

大鼠细小病毒 H-1 和 KRV 株、小鼠微小病毒 (MVM)、犬细小病毒均为本室保存,猫细小病毒购自 ATCC。

1.3 SPF 大鼠

13 只,购自本所动物生产供应室,动物生产许可证号:SCXK(京)2014-0013,使用许可证号:SYXK(京)2011-0008,品系 SD,8 周龄,雌雄各半。

2 方法

2.1 引物的设计

根据 NCBI 发表的大鼠细小病毒 H-1 株 (NC_001358) 和 KRV 株 (U790330) 基因组序列分别设计特异引物,扩增区域均为病毒的衣壳蛋白,两对引物间无交叉反应 (表 1)。

表 1 大鼠细小病毒双重 PCR 引物
Tab.1 Primers for the RPV duplex PCR assay

引物名称 Primers	序列 (5'至 3') Sequences (5' - 3')	基因组中的位置 Position in genome	产物长度 Product length
H1F2	CGGTCACCGTTCAACAATA	3041	183bp
H1R2	CAAGATTCCGCGATTCCA	3223	
KRVF1	GTGCTATCACTCTATTGC	3549	
KRVRI	AATGGTCCTCTCTGTTT	3850	
			302bp

2.2 病毒 DNA 的提取

大鼠细小病毒 H-1 和 KRV 株 C6 细胞培养物经 3 次冻融后,分别取 200 μL 按试剂盒的操作说明提取 DNA,作为双重 PCR 反应的模板,同时提取各对照病毒 DNA。

2.3 PCR 反应条件优化

对双重 PCR 反应体系 dNTP 浓度、HS Taq 酶量、H-1 和 KRV 引物比例、引物浓度及退火温度等进行优化,确定最佳反应条件。

2.4 敏感性测定

紫外分光光度法测定 H-1 和 KRV 模板 DNA 浓度,分别进行 $10^{-1} \sim 10^{-10}$ 系列稀释,用建立的 PCR 方法进行扩增,检测方法的灵敏度。

2.5 特异性测定

分别以 KRV 和 H-1 混合 DNA、KRV、H-1、小鼠微小病毒、犬细小及猫细小病毒 DNA 为模板进行双重 PCR 扩增,阳性 PCR 产物送上海生工进行核酸序列测定,验证方法的特异性。

2.6 初步应用

12 只 SPF 大鼠分为 3 组,每组 4 只,第 1 组按 200 μL /只的剂量经口感染 H-1,第 2 组按同样方式感染 KRV,第 3 组同时感染 H-1 和 KRV,最后 1 只为阴性对照。感染后第 2,4,5,6,10 天采集大鼠粪便,加入适量 PBS 悬浮离心,上清过滤除菌,取 200 μL 提取 DNA 进行双重 PCR 检测。第 10 天处死所有大鼠,无菌采集心、肝、脾、肺、肾和盲肠内容物等组织,提取 DNA 后进行检测。

3 结果

3.1 PCR 反应体系及条件

优化后的反应体系为 $10 \times \text{PCR buffer } 2.5 \mu\text{L}$, dNTP 2 μL , 2 对引物 ($10 \mu\text{mol/L}$) 各 1 μL , DNA 模板 2 μL , HS Taq 酶 0.5 μL , 最后加灭菌双蒸水补至 25 μL 。反应条件为 $94^{\circ}\text{C } 30 \text{ s}$, $56^{\circ}\text{C } 30 \text{ s}$, $72^{\circ}\text{C } 30 \text{ s}$, 共 40 个循环,最后 72°C 延伸 7 min。

3.2 PCR 产物测序

提取 H-1 和 KRV 细胞培养物 DNA,用建立的双重 PCR 方法进行扩增,产物送上海生工进行测序,序列经 NCBI Blast 比对,结果见图 1,符合率均为 99%。

3.3 敏感性测定

紫外分光法测得 H-1 DNA 模板浓度为 384.52 ng/mL, KRV 为 732.42 ng/mL。由图 2 可见,单一

PCR 检测限均为 10^{-7} ,即单一 PCR 能够检出的最低浓度分别为 H-1 0.38 pg/mL, KRV 0.73 pg/mL;双重 PCR 检测限为 H-1 10^{-6} , KRV 10^{-7} ,检出的最低浓度为 H-1 13.8 pg/mL, KRV 0.73 pg/mL (图 3)。

3.4 特异性测定

用建立的双重 PCR 方法分别扩增 KRV 和 H-1 混合 DNA、单独 KRV 或 H-1、小鼠微小病毒、犬细小及猫细小病毒,结果显示 (图 4),该双重 PCR 方法与小鼠细小、犬细小和猫细小均无交叉反应, KRV 和 H-1 相互间也无交叉反应。

3.5 初步应用

所有大鼠均无明显临床症状,感染后第 2 天在感染大鼠的粪便中均检测到相应的目的条带 (图 5),通过测序证实为相应的病毒;取感染大鼠的心、肝、脾、肺、肾和盲肠内容物等组织进行检测,结果显示 H-1 在各组织的检出率分别是心 50% (4/8), 肝 50% (4/8), 脾 62.5% (5/8), 肺 50% (4/8), 肾 37.5% (3/8), 盲肠内容物 62.5% (5/8), 单独感染组检出率高于混合感染组; KRV 在各组织的检出率分别是心 0 (0/8), 肝 25% (2/8), 脾 87.5% (7/8), 肺 12.5% (1/8), 肾 25% (2/8), 盲肠内容物 62.5% (5/8), 混合感染组检出率高于单独感染组。对照小鼠各组织中均未检出 H-1 或 KRV,具体见表 2。监测感染大鼠粪便排毒情况,第 10 天仍能检测到 KRV 排出 (表 3)。

4 讨论

血清学方法是目前诊断实验大鼠中 H-1 和 KRV 感染的常用方法,实验动物国标中规定的血清学方法包括酶联免疫吸附试验 (ELISA), 免疫酶试验 (IEA), 免疫荧光试验 (IFA) 和血凝抑制试验 (HIA), ELISA 或 IFA 一般用做大规模的筛查, HIA 一般用来做确证试验^[4]。ELISA 和 IFA 敏感性较高,但由于细小病毒非结构蛋白比较保守,会产生抗体间的交叉反应,因而方法的特异性较差,同时血清学方法也不适用病毒在动物间急性感染而血清还未发生阳转的情况^[5]。PCR 方法以其较高的灵敏度和特异性已经广泛应用于病毒的检测,本试验建立了大鼠 H-1 和 KRV 的双重 PCR 检测方法,特异性好,灵敏度高,能够在同一反应体系中同时检测并区分 H-1 和 KRV,与传统的 PCR 方法^[5,6]相比提高了检测效率。

表 2 各感染组大鼠组织中病毒的分布情况
Tab. 2 Distribution of virus in the rat tissues of each group

实验组 Groups	动物 编号 Animal number	检测 项目 Test items	心 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidney	盲肠内 内容物 Cecum contents
H-1 感染组 H-1 infection	1	H-1	+	+	+	+	+	+
	2	H-1	+	+	+	+	+	+
	3	H-1	-	-	-	-	-	-
	4	H-1	+	-	+	+	-	+
KRV 感染组 KRV infection	1	KRV	-	-	+	-	-	-
	2	KRV	-	-	+	-	-	+
	3	KRV	-	-	+	-	-	+
	4	KRV	-	-	-	-	+	+
H-1&KRV 感染组 H-1 & KRV infection	1	H-1	+	+	+	-	+	-
		KRV	-	+	+	+	+	-
	2	H-1	-	+	+	+	-	+
		KRV	-	-	+	-	-	+
	3	H-1	-	-	-	-	-	-
		KRV	-	-	+	-	-	-
	4	H-1	-	-	-	-	-	+
		KRV	-	+	+	-	-	+
对照组 Control	/	H-1	-	-	-	-	-	-
		KRV	-	-	-	-	-	-

表 3 感染后不同时间粪便中病毒监测结果
Tab. 3 Results of virus detection in the feces at different times post-infection

实验组 Groups	动物 编号	检测 项目	2pi	4 pi	5 pi	6 pi	10 pi
H-1 感染组 H-1 infection	1	H-1	+	+	+	+	-
	2	H-1	+	+	+	+	-
	3	H-1	+	+	+	+	-
	4	H-1	+	+	+	+	-
KRV 感染组 KRV infection	1	KRV	+	+	+	+	+
	2	KRV	+	+	+	+	+
	3	KRV	+	+	+	+	+
	4	KRV	+	+	+	+	+
H-1&KRV 感染组 H-1&KRV infection	1	H-1	+	+	+	+	-
		KRV	+	+	+	-	-
	2	H-1	+	+	+	+	-
		KRV	+	+	+	+	+
	3	H-1	+	+	+	+	-
		KRV	+	+	+	+	+
	4	H-1	+	+	+	+	-
		KRV	+	+	+	+	-
对照组 Control	/	H-1	-	-	-	-	-
		KRV	-	-	-	-	-

通过比较不同细小病毒毒株的基因组序列,我们选择 H-1 和 KRV 特有的区域设计了 2 对引物,扩增的区域均位于衣壳蛋白基因,每对引物只能特异的扩增相应毒株,与其他毒株无交叉反应,特异性验证显示针对 H-1 的引物在以 H-1 DNA 为模板时能够扩增特定大小的单一目的片段,以 KRV、MVM 及猫、犬等哺乳动物细小病毒为模板无任何条带出

现,KRV 也同样如此,说明方法的特异性良好。先前报道的 PCR 方法^[7]虽然也能够特异的扩增 H-1 和 KRV,但两者的 PCR 产物大小相近,电泳不容易区分,无法在同一反应体系中建立双重 PCR 方法,本试验 2 对特异引物扩增的片段大小分别为 183 bp 和 302 bp,电泳能够很好的区分,适合在同一反应体系中同时检测 H-1 和 KRV,大大提高了检测效率。

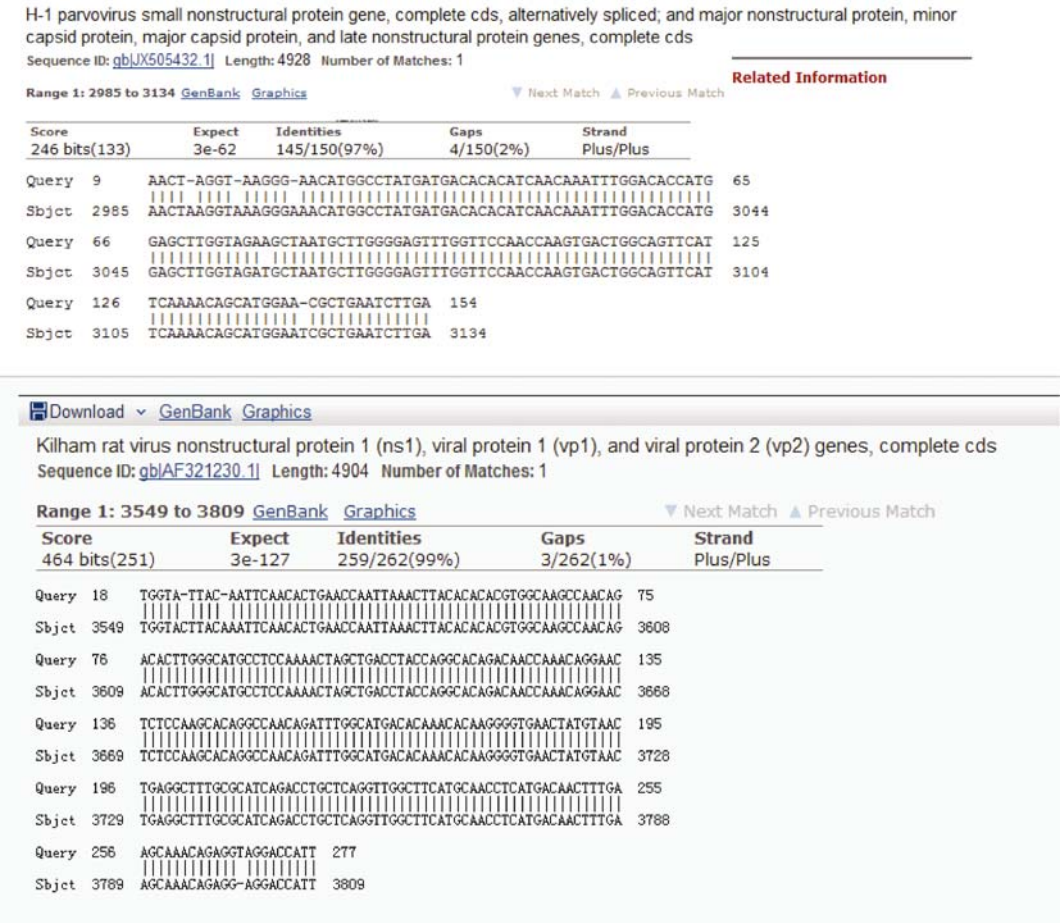
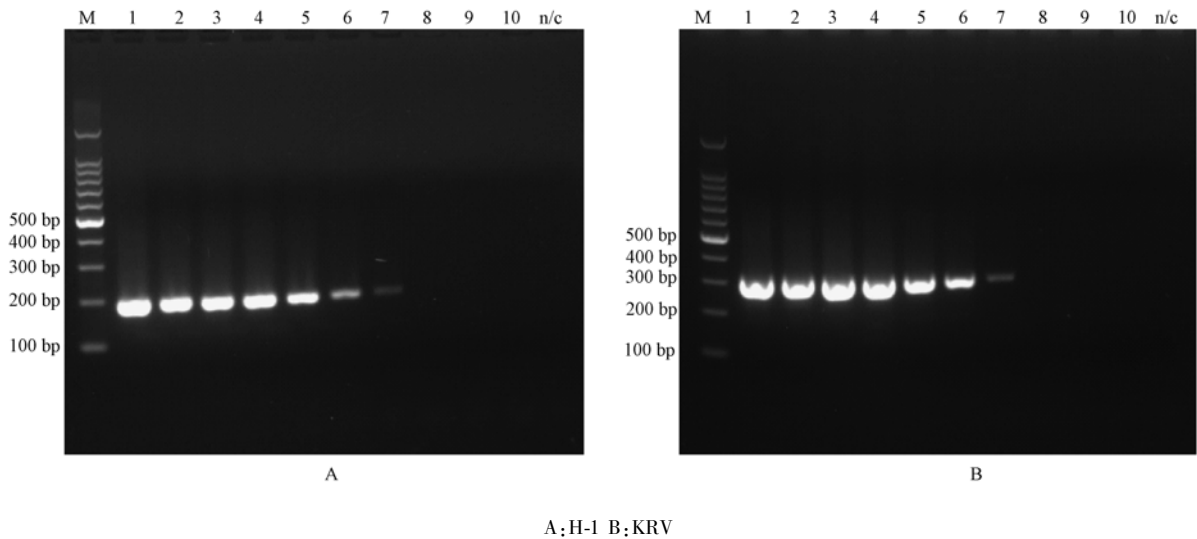
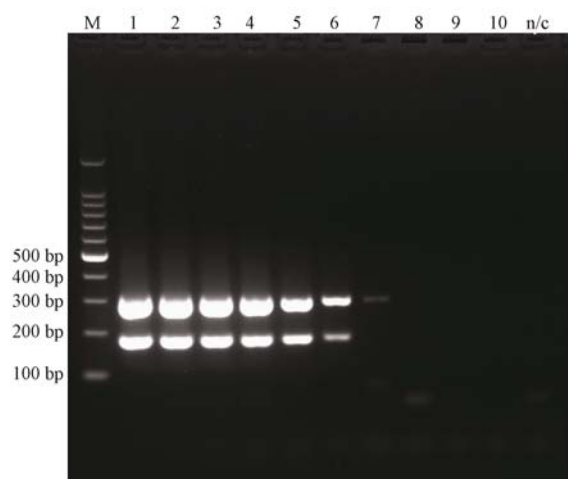


图 1 H-1 和 KRV PCR 产物测序结果比对
Fig.1 Comparison of the BLAST results of PCR products sequencing of H-1 and KRV



M: 100 bp marker; 1 ~ 10: DNA 模板分别 10^{-1} ~ 10^{-10} 稀释
图 2 单一 PCR 敏感性结果
M: 100 bp marker; 1 to 10: 10^{-1} to 10^{-10} dilution of H-1 or KRV DNA
Fig.2 The sensitivity results of single PCR assay

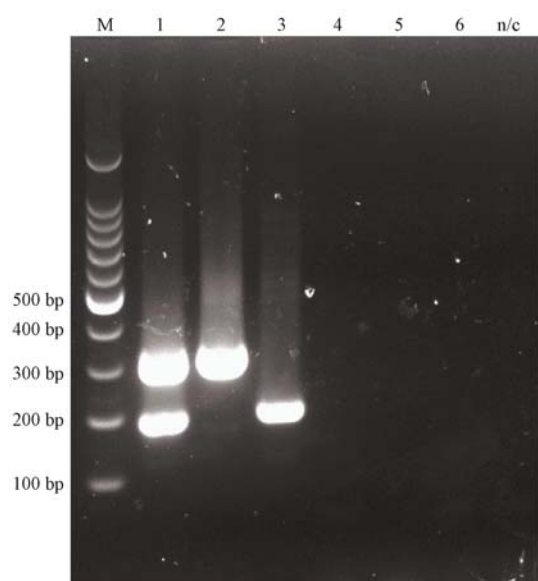
对方法的敏感性测定显示 H-1 和 KRV 在单独 进行 PCR 扩增时敏感性相差不大,检测的最小 DNA



M: 100 bp marker; 1 ~ 10: H-1 和 KRV cDNA 模板分别 10^{-1} ~ 10^{-10} 稀释
图 3 大鼠细小病毒双重 PCR 敏感性结果

M: 100 bp marker; 1 to 10: 10^{-1} to 10^{-10} dilution of H-1 and KRV DNA

Fig. 3 The sensitivity results of duplex PCR assay of RPV

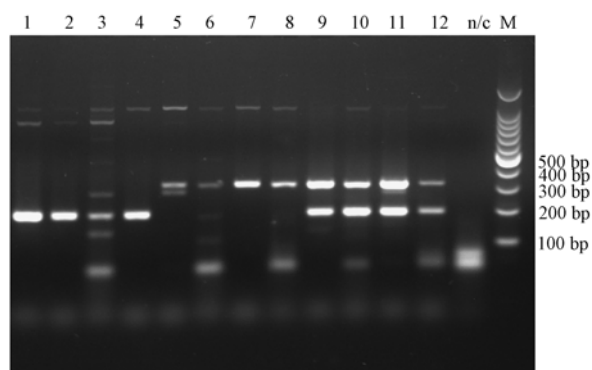


1 ~ 6: KRV 和 H-1 混合模板、KRV、H-1、MVM、犬细小、猫细小病毒
图 4 大鼠细小病毒双重 PCR 特异性结果

1 to 6: KRV and H-1 mixed template, KRV, H-1, MVM, CPV, FPV

Fig. 4 The specificity results of duplex PCR of RPV

浓度分别为 0.38 pg/mL 和 0.73 pg/mL,而在同一体系进行双重 PCR 时 KRV 的敏感性无变化,H-1 的敏感性降低了一个数量级,为 3.8 pg/mL,即使对双重体系进行优化敏感性仍没有显著提高,如何将两



1 ~ 4: H-1 单独感染组;5 ~ 8: KRV 单独感染组;9 ~ 12: 混合感染组

图 5 感染第 2 天大鼠粪便中 RPV 检测结果

1 to 4: H-1 infection group; 5 to 8: KRV infection group; 9 to 12: H-1 & KRV infection group

Fig. 5 The results of duplex PCR assay for RPV of rat feces collected on the 2th day

个反应间的影响降至最低是后续方法优化的重点。

大鼠细小病毒感染后可通过粪便长期排毒,我们经口感染大鼠,定期采集粪便使用建立的双重 PCR 方法进行检测,感染第 2 天即在所有感染大鼠粪便中检出相应病毒,感染大鼠均无明显临床症状,感染第 10 天仍能够检出 KRV,但均未检出 H-1,说明 KRV 在大鼠体内能够持续存在并向外排毒,这与文献报道相符^[8];H-1 虽然在粪便中未检出,但在大鼠的组织样本中能够检测到,说明 H-1 可能在大鼠体内潜伏感染。由于实验样本有限,H-1 的感染特征还需进一步研究证实。我们还用该方法检测了感染大鼠心、肝、脾、肺、肾和盲肠内容物中病毒的分布情况,结果显示 H-1 在心、肝、脾、肺、肾和盲肠内容物中均有分布,单独感染组检出率高于 H-1&KRV 混合感染组;KRV 在心组织未检出,在脾中的检出率明显高于其他组织,且混合感染组检出率高于单独感染组,说明 H-1 的同时感染可能对 KRV 的感染有协同作用,这有待进一步证实。

考虑到各种影响检测的因素,笔者认为要获得最佳的检测结果,需要注意以下两点:(1)样本采集后最好马上处理,不能马上处理的需 -70°C 保存,避免反复冻融。(2)由于粪便中杂质较多,有可能存在影响病毒核酸提取的物质,建议采用粪便专用的核酸提取试剂盒,去除粪便中的杂质干扰。本实验未对大鼠血清及全血样本进行检测,不能确定动物是否产生病毒血症及组织器官中病毒为血液来源还是组织特异富集病毒,这需要在后续的实验进行

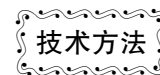
补充。

综上所述,本试验建立的双重 PCR 方法特异性好,敏感性高,能够高效的检测大鼠粪便及组织中的细小病毒,并且可以用来检测细胞培养物中的病毒污染情况,可作为实验动物国家标准的补充方法。

参考文献:

- [1] Kilham L, Olivier LJ. A latent virus of rats isolated in tissue culture [J]. *Virology*, 1959, 7: 428 – 437.
- [2] Toolan HW, Dalldorf G, Barclay M, et al. An unidentified filterable agent isolated from transplanted human tumors [J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1960, 46: 1256 – 1259.
- [3] 田克恭. 实验动物病毒性疾病 [M]. 农业出版社. 1992; 126 – 132.
- [4] Lindsey JR, Boorman GA, Collins MJ, et al. Multiple systems. In Committee on Infectious Disease of Mice and Rats (ed.), *Infectious diseases of mice and rats* [M]. National Academy Press, Washington, D. C. 1991, 236 – 256.
- [5] Taylor K, Copley CG. Diagnosis of Kilham rat virus using PCR [J]. *Lab. Anim*, 1993, 28: 26 – 30.
- [6] Wan CH, Bauer BA, pintel DJ, et al. Detection of rat parvovirus type 1 and rat minute virus type 1 by polymerase chain reaction [J]. *Lab Anim*, 2006, 40(1): 63 – 69.
- [7] Besselsen DG, Besch CL, Pintel DJ, et al. Detection of H-1 parvovirus and Kilham rat virus by PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 1995, 33(7): 1699 – 1703.
- [8] Jacoby RO, Johnson EA, Paturzo FX, et al. Persistent rat parvovirus infection in individually housed rats [J]. *Arch Virol*, 1991, 117: 193 – 205.

[修回日期] 2015-04-20



实时荧光定量 TaqMan-PCR 检测 小鼠多瘤病毒方法的建立

尹雪琴,袁 文,王 静,黄碧洪,饶 丹,伍妙梨,朱余军,
冯胜鹏,郭鹏举,张 钰,黄 韧

(广东省实验动物重点实验室,广东省实验动物监测所,广州 510663)

【摘要】 目的 建立一种快速、特异、敏感的小鼠多瘤病毒 (murine polyomavirus, MPyV) 荧光定量 TaqMan PCR 检测方法,用于 MPyV 核酸的检测。**方法** 根据 GenBank 中小鼠多瘤病毒基因组序列设计了一对特异性引物及 TaqMan 探针,扩增长度为 69 bp 的片段,通过优化反应体系和反应条件,对构建的重组质粒标准品进行检测,并绘制标准曲线,进行特异性、敏感性和重复性试验。最后用建立的方法对人工感染 MPyV 的肺脏、脾脏和粪便,及 86 份小鼠临床样本进行检测,验证在临床应用中的效果。**结果** 所建立的检测方法特异性强,只能在小鼠多瘤病毒 DNA 中检出荧光信号,检测灵敏度达到 100 拷贝,批内和批间重复性好,检测结果变异系数 (CV) 均小于 1.13%,人工感染 MPyV 小鼠的肺脏、脾脏和粪便均为阳性,对 86 份临床样本进行检测,有 3 份样本呈阳性 (阳性率为 3.5%)。**结论** 建立的 MPyV 荧光定量 TaqMan-PCR 检测方法特异性强、敏感性高、重复性好,适合用于 MPyV 临床诊断、日常监测和流行病学调查。

【关键词】 小鼠多瘤病毒;实时荧光定量 PCR;TaqMan 探针

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0053-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.011

Establishment of a TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR for detection of murine polyomavirus

YIN Xue-qin, YUAN Wen, WANG Jing, HUANG Bi-hong, RAO Dan, WU Miao-li,
ZHU Yu-jun, FENG Sheng-peng, GUO Peng-ju, ZHANG Yu, HUANG Ren

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

【Abstract】 Objective To establish a rapid, specific and sensitive TaqMan real-time fluorescence quantitative PCR assay for detection of murine polyomavirus (MPyV). **Methods** The specific primers and TaqMan probe were designed based on genome sequence of MPyV. The primers amplified a 69 bp fragment. After optimizing the reaction system and reaction condition, the standard curve was plotted by detecting recombinant plasmid standards. The specificity, sensitivity and reproducibility of this method were evaluated. In addition, samples of lungs, spleens and feces obtained from experimentally infected mice and 86 clinical samples were used to validate the efficacy of this real-time PCR assay. **Results** The specificity assay showed that this assay could specifically detect MPyV and the sensitivity for MPyV was about 100

[基金项目] 国家科技支撑计划 (编号:2013BAK11B01);广东省科技计划项目 (编号:2012B010300026)。

[作者简介] 尹雪琴 (1988-),女,实习研究员,研究方向:实验动物病毒学。E-mail: yinxueqin.dr@163.com。

[通讯作者] 黄韧 (1959-),男,研究员,研究方向:实验动物学和比较医学研究。E-mail: labking@sohu.com。

copies/well. The coefficients of variation (CV) of both intra-assay and inter-assay were less than 1.13%. All of the samples from experimentally infected mice were positive for MPyV and 3 out of 86 clinical samples were positive by this TaqMan-PCR detection with a positive rate of 3.5%. **Conclusions** The real-time fluorescence quantitative TaqMan-PCR assay established in this study has high specificity, sensitivity and stability. It can be used for clinical diagnosis, routine detection and epidemiological investigation of murine polyomavirus infections.

【Key words】 Murine polyomavirus; Real-time fluorescence quantitative PCR; TaqMan probe; Mice

小鼠多瘤病毒 (murine polyomavirus, MPyV) 属于多瘤病毒科多瘤病毒属, 为双链 DNA 病毒, 病毒粒子呈圆形, 无囊膜, 可存在于实验鼠群和野生鼠群中, 为中国实验动物国家标准《实验动物微生物等级及监测》(GB14922. 2-2011) 中 SPF 级小鼠必要时需排除的病原^[1-3]。此外人工感染可使小鼠等动物产生各种组织肿瘤, 故 MPyV 也可用于研究病毒介导的肿瘤机制以及肿瘤模型的建立。然而尽管 MPyV 具有致肿瘤的特性, 但在自然条件下小鼠感染多瘤病毒呈隐性或亚临床感染^[4-6]。在研究病毒介导肿瘤的模型中, 小鼠体内 MPyV 含量的变化是分析肿瘤发展、免疫反应及疾病表征的重要指标。故隐性感染一方面可对实验动物本身造成危害, 对科研工作造成潜在干扰, 另一方面也可作为研究感染病毒后宿主免疫反应的模型。因此建立一个敏感有效的监测 MPyV 感染小鼠的检测方法, 不仅可以保证实验动物的质量, 而且有利于建立一个针对病毒、免疫和肿瘤有效的模型系统。本试验建立了荧光定量 PCR 检测 MPyV 的方法, 具有敏感性高、特异性强、稳定性好、速度快的特点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 仪器和试剂: 荧光定量 PCR 仪为 ABI 的 7500, 常规 PCR 仪为购自 Biometra 的 TProfessional Standard Gradient, 紫外分光光度计 Nanodrop 2000C 购自 Thermo; PCR Premix、PMD-T19 载体、T4 连接酶、HotStart Tag 酶、dNTPs、MgCl₂ 和 DL5000 DNA marker 均购自 Takara 公司, 病毒 DNA 抽提试剂盒、质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒购自 Omega 公司。

1.1.2 动物、毒株及菌株: 小鼠多瘤病毒购自美国典型菌种保藏中心 (ATCC VR-252), BHK 细胞及大肠埃希菌 DH-5 肠菌株由本实验室保存, SPF 级 BALB/c 小鼠购自广东省医学实验动物中心 (SCXK (粤) 2013-0002)、(SYXK (粤) 2008-0002)。

1.1.3 引物和探针: 根据小鼠多瘤病毒基因组序列 (GenBank: AF442959.1), 应用 Oligo7 软件设计一对

特异性引物, 扩增产物用于克隆至 pMD-T19 载体中, 上游引物 P1: 5'-CCATGGCCTACTT CATTCCG-3', 下游引物 P2: 5'-CGGTCAACATAGCGCGTCA-3', 该引物扩增的目的片段长度为 1603 bp。同时在上述扩增片段内设计一对特异性引物及探针用于荧光定量检测, 上游引物 P3: 5'-CGGCGTCTCTAAA TGCGAG-3', 下游引物 P4: 5'-AGCAGTTTGGG AAC GGGTG-3', TaqMan 探针: 5'-(FAM) CAAAATGTA CAAAGGCCTGTCCAAGACCC (BHQ-1)-3', 该引物扩增的目的片段长度为 69 bp。

1.2 方法

1.2.1 病毒 DNA 提取: 于 BHK 细胞接种小鼠多瘤病毒, 48 h 后反复冻融细胞 3 次收获病毒, 按照病毒 DNA 抽提试剂盒操作步骤提取病毒 DNA, -20℃ 保存备用。

1.2.2 MPyV 基因片段的 PCR 扩增: PCR 反应体积为 20 μL, 反应液包括 DNA 2 μL, P1、P2 上下游引物各 1 μL (终浓度为 0.4 μM)。PCR 扩增程序: 95℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 50 s, 60℃ 退火 50 s, 72℃ 延伸 90 s, 共进行 35 个循环, 72℃ 延伸 10 min, 同时设阴性对照。取 PCR 扩增产物于经溴乙锭预染的 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 5 μL DL 5000 DNA marker 作分子量参照, 凝胶成像仪下观察结果。

1.2.3 MPyV 标准质粒的构建: P1、P2 扩增的 PCR 产物 (1603 bp) 电泳后经胶回收试剂盒回收纯化后 TA 克隆连接到 pMD-T19 载体, 并转化至 DH-5α 感受态细胞中, 37℃ 培养过夜, 挑取单个菌落, 筛选阳性克隆并送立菲生物技术有限公司测序。扩增阳性克隆菌落, 提取重组质粒, 命名为 pMD-T19-MPyV, 通过紫外分光光度计测定浓度后, 按公式: 浓度 (拷贝/μL) = [质粒浓度 (g/ml) × 6.02 × 10²³] / [质粒大小 (bp) × 660] 计算初始拷贝数, 重组质粒于 -20℃ 保存备用。

1.2.4 荧光定量 PCR 反应体系的建立和优化: 以质粒 pMD-T19-MPyV 为模板, 用 P3、P4 及 TaqMan 探针建立荧光定量 PCR 检测方法, 按照 Premix Ex Tag (probe) 试剂盒操作说明配制反应体系, 分别对

引物浓度(0.1 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$)、探针浓度(0.2 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$)、退火温度(55 ~ 65) $^{\circ}\text{C}$ 、循环条件(两步法与三步法)进行条件优化,每个条件 3 个重复孔,通过比较同一浓度质粒的 Ct 值,荧光强度来判断最优条件。同时设置 BHK 细胞 DNA 为阴性对照,水为空白对照。

1.2.5 荧光定量 PCR 检测方法特异性分析:使用 10 种感染小鼠病原的 DNA 或 cDNA 为模板进行特异性分析,包括:小鼠巨细胞病毒(MCMV)、小鼠细小病毒 MVM 株(MVM)、鼠痘病毒(ECT)、小鼠腺病毒(MAD)、小鼠脑脊髓炎病毒(TMEV)、呼肠孤病毒 III 型(Reo3)、仙台病毒(SV)、小鼠肝炎病毒(MHV)、小鼠诺如病毒(MNV)、小家鼠螺旋杆菌(*H. muridarum*),每种病毒 2 个重复孔。同时设立小鼠多瘤病毒 DNA 为阳性对照,BHK 细胞 DNA 为阴性对照,水为空白对照。

1.2.6 荧光定量 PCR 检测方法敏感性验证及线性标准曲线的建立:重组质粒 pMD-T19-MPyV 计算出初始拷贝数后,用超纯水连续 10 倍梯度稀释至浓度在(1.0×10^1) ~ (1.0×10^7) 拷贝/ μL ,取 2 μL 作为荧光定量 PCR 模板,反应体系为 1.2.4 建立的最优条件。

1.2.7 实时荧光定量 PCR 检测方法的重复性分析:取 3 份阳性感染 MPyV 的 BHK 细胞 DNA 用该方法测定 3 次;每次试验每个样本设 3 个重复孔,计算批内、批间差异,从而对本方法检测的重复性进行考核。

1.2.8 实时荧光定量 PCR 方法在临床实际样本的检测:

1.2.8.1 对人工感染 MPyV 组织样本的检测:人工感染试验在本实验室的屏障环境实验间[SYXK(粤)2012-0122]进行。用 MPyV 细胞毒(Ct 值为 28.33)对 1 日龄 BALB/c 小鼠进行 0.5 μL 滴鼻感染,感染后 1 周再滴鼻感染 10 μL ,共感染 6 只;另设 2 只阴性对照小鼠,滴鼻等量灭菌生理盐水。饲养小鼠至 21 日龄,断颈处死后收集肺脏、脾脏和粪便,按照 DNA 抽提试剂盒操作步骤提取样本 DNA,用本研究建立的荧光 PCR 方法分别对 6 只攻毒鼠与 2 只阴性小鼠各组织器官样品进行检测,每份做 3 个重复检测,观察扩增曲线。

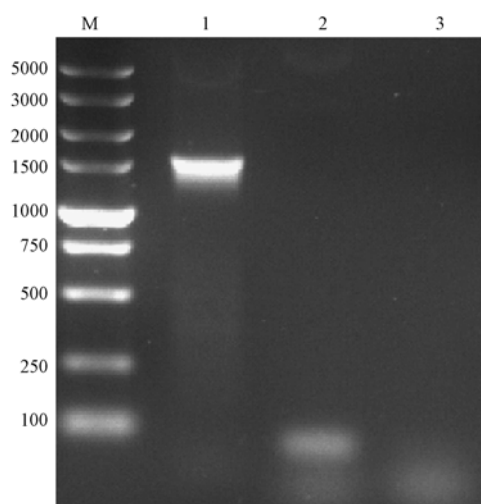
1.2.8.2 对临床样品的检测:用建立的荧光 PCR 方法对来自广东省广州市一家大型实验鼠场的 86 份送检粪便样品进行了测定,同时设立阳性对照,

观察各样品的扩增曲线与 Ct 值。并用引物对 P1/P2 PCR 扩增阳性粪便 DNA,同时设立阴性对照,凝胶电泳观察结果。

2 结果

2.1 重组质粒的鉴定

用引物对 P1/P2 对构建的重组质粒 pMD-T19-MPyV 进行 PCR 扩增,得到约 1 603 bp 长度的片段,与预期大小一致,且测序鉴定表明与 GenBank 登记的序列同源性为 100%。经荧光定量 PCR 引物对 P3/P4 扩增出的片段长度约为 69 bp,条带具有特异性,没有二聚体,结果见图 1。提取的重组质粒浓度为 117.7 ng/ μL 。



注:Marker:DL5000;泳道 1 为 P1/P2 对构建的重组质粒 pMD-T19-MPyV 进行 PCR 扩增,片段约 1603 bp;泳道 2 为 P3/P4 对构建的重组质粒 pMD-T19-MPyV 进行 PCR 扩增,片段约 69 bp;泳道 3 为水空白对照。

图 1 重组质粒 pMD-T19-MPyV 的 PCR 鉴定

Note. Lane M is 5Kb DNA ladder, lane 1-2 represent PCR results of positive recombinant plasmids using primers P1/P2 and P3/P4, respectively, lane 3 represents blank control.

Fig. 1 PCR-identified results of the recombinant plasmid pMD-T19-MPyV

2.2 实时荧光定量 PCR 方法的条件优化

以重组质粒 DNA 为模板,通过对引物浓度(0.1 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$)、探针浓度(0.2 ~ 1.0 $\mu\text{mol/L}$)、退火温度(55 ~ 65) $^{\circ}\text{C}$ 、循环条件(两步法与三步法)条件的优化,筛选出最佳反应体系如下:上、下游引物终浓度 0.4 $\mu\text{mol/L}$,探针终浓度 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 。反应程序两步法为:95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 34 s,40 个循环。读板温度为 60 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.3 特异性试验

对小鼠多瘤病毒及其他非小鼠多瘤病毒的病原 DNA 或 cDNA 进行检测,只有小鼠多瘤病毒 DNA 出现特异性扩增,在小鼠巨细胞病毒 (MCMV)、小鼠细小病毒 MVM 株 (MVM)、鼠痘病毒 (ECT)、小鼠腺病毒 (MAD)、小鼠脑脊髓炎病毒 (TMEV)、呼肠孤病毒 III 型 (Reo3)、仙台病毒 (SV)、小鼠肝炎病毒 (MHV)、小鼠诺如病毒 (MNV)、小家鼠螺旋杆菌 (*H. muridarum*)、BHK 细胞阴性对照及水空白对照组中无扩增 (图 2)。

2.4 敏感性验证及线性标准曲线的建立

提取的重组质粒浓度为 $117.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$, 换算成拷贝数为 3.5×10^{10} 拷贝/ μL , 本试验建立的荧光定

量 PCR 方法以 $10^7 \sim 10^1$ 拷贝稀释度为模板, 样本检测呈现良好的线性关系, 相关性为 0.999。 10^1 拷贝稀释度起峰较晚, 重复性较其他稀释度差, 故排除, 因此本方法判定 100 个拷贝以上有较好的线性相关性, C_t 值大于 33.085 为阴性, 反之为阳性。图 3 为以样本的拷贝数为横轴, 检测的循环数为纵轴, 建立的标准曲线。

2.5 重复性分析

用荧光定量 PCR 对 3 份不同的阳性细胞毒 DNA 进行重复性检测, 每次试验每个样本设 3 个重复, 并对检测结果进行统计学分析, 做出批内批间重复性评价, 结果表明批内检测变异系数 (CV) 均小于 0.85% (表 1), 批间检测变异系数 (CV) 均小于 1.13% (表 2)

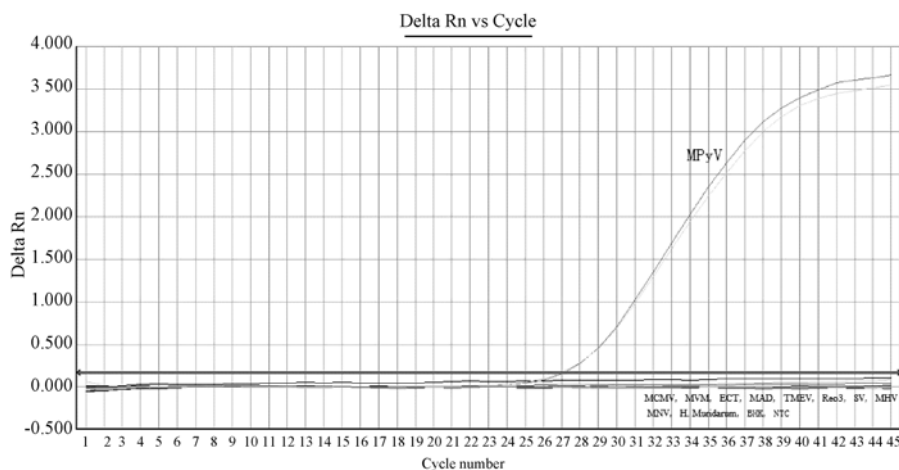
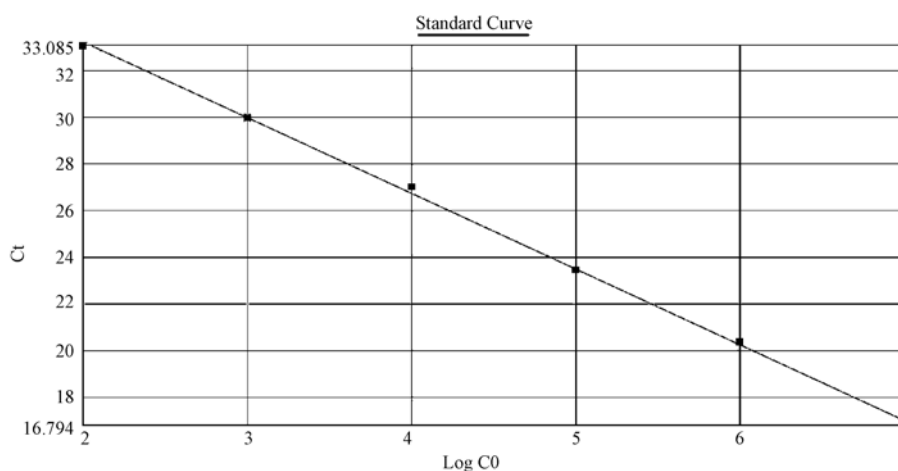


图 2 MPyV TaqMan-PCR 方法特异性试验结果

Fig. 2 Specificity evaluation of the TaqMan-PCR method



注: 从左到右依次为 10^2 到 10^7 拷贝 10 倍系列稀释质粒标准品; 标准曲线定量线性方程: $Y = -3.25x + 39.75, R^2 = 0.999$ 。

图 3 荧光定量 PCR 检测 MPyV DNA 的标准曲线

Note. Standard curve was obtained with serial dilution of the recombinant plasmid from 10^2 to 10^7 copies.

The quantitative linear equation of the standard curve: $Y = -3.25x + 39.75, R^2 = 0.999$.

Fig. 3 The standard curve of quantitative fluorescence PCR to detect the DNA of MPyV

表 1 阳性样本批内重复性实验

Tab. 1 The intra-assay reproducibility of the positive samples

阳性样本 Positive samples	Ct 值			平均值 Mean values	变异系数 CV%
	1	2	3		
1	27.96	28.33	28.06	28.12	0.69
2	24.53	24.62	24.53	24.56	0.20
3	21.68	21.53	21.90	21.70	0.85

表 2 阳性样本批间重复性实验

Tab. 2 The inter-assay reproducibility of the r positive samples

阳性样本 Positive sample	Ct 值			平均值 Mean values	变异系数 CV%
	1	2	3		
1	28.12	28.06	28.43	28.20	0.70
2	24.56	24.76	24.79	24.70	0.50
3	21.70	21.88	22.19	21.92	1.13

2.6 对人工感染 MPyV 组织样本的检测

从 21 日龄的试验感染鼠的组织脏器中检出病毒;6 只感染小鼠的肺脏与脾脏的荧光定量 PCR 检测均为强阳性(Ct 值在 21.10 ~ 28.61 内),且每只小鼠脾脏病毒含量高于肺脏,粪便检测 Ct 值在 22.24 ~ 32.97 范围内,2 只阴性对照小鼠均为阴性。

2.7 临床样品调查结果

用本研究建立的荧光定量 PCR 方法对广东省广州市一家大型实验鼠场抽样送检的 86 份粪便样品进行了测定,检出 3 只小鼠粪便中含有多瘤病毒,引物对 P1/P2 对此 3 只粪便 DNA 进行 PCR 扩增,凝胶电泳结果显示片段大小为 1 603 bp 左右,与预期片段大小一致,证实为 MPyV 阳性。

3 讨论

MPyV 感染对实验动物本身造成危害,对科研工作造成潜在干扰,且小鼠体内 MPyV 含量的变化是分析肿瘤发展、免疫反应及疾病表征的重要指标,而病毒感染的病理学研究亦需要一个敏感有效的检测方法。TaqMan 探针荧光定量 PCR 技术具有较高的灵敏度和特异性,操作简单快速,且后期不需要开盖处理,大大降低了假阳性的发生,因其显著的优越性,已被国内外广泛应用于临床诊断^[7,8]。我们根据小鼠多瘤病毒基因组序列(GenBank: AF442959.1)中保守的序列设计引物和探针建立了实时荧光定量 PCR 检测 MPyV 病毒 DNA 方法,该方法只能从含有 MPyV 病毒的样本中检测出特异性扩增荧光信号,而不与正常组织及小鼠巨细胞病毒等非 MPyV 病原 DNA 发生交叉反应,充分证明了其检测的高度特异性。

用荧光定量 PCR 检测构建的 pMD-T19-MPyV 重组质粒标准品,在样本 DNA 为 10⁷ ~ 10² 拷贝时呈

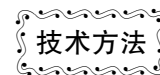
现良好的线性关系,其定量准确性可达到 100 拷贝,对应的 Ct 值为 33.085,即 Ct 值大于 33.085 判定为阴性,小于 33.085 判为阳性。重复性分析批内检测变异系数(CV)均小于 0.85%,批间检测变异系数(CV)均小于 1.13%,说明方法稳定可靠。且从样本核酸提取到报告结果全程在 3 小时内即可完成。

经母体垂直传播的 7 日龄幼鼠体内唾液腺、肾脏、肝脏和脾脏的病毒量最高^[9],本研究对 1 日龄 BALB/c 小鼠滴鼻 0.5 μL MPyV 病毒液因不确实病毒是否进入小鼠体内,故于 7 日龄进行了第二次滴鼻,21 日龄时取肺、脾脏及粪便。本研究未能在不同时间点采取组织样本以研究 MPyV 在小鼠体内载量的变化规律,但通过建立的荧光定量 PCR 检测结果可知感染后的小鼠在其 21 日龄均可检出 MPyV,且脾脏病毒含量高于肺脏,证明 MPyV 通过鼻腔进入体内并在体内增殖。同时 86 个实验小鼠场的粪便检查出 3 份样品为阳性,说明建立的定量方法能用于人工感染小鼠及临床样品的检测,也为进一步的研究提供了技术支持。佟巍等曾报道用血清学方法及普通 PCR 方法对北京地区实验小鼠 MPyV 感染情况进行初步调查,结果表明对实验动物使用机构检出了 MPyV^[4]。谢军芳^[10]也建立了小鼠多瘤病毒的血清学普通 PCR 检测方法。上述的血清学方法及普通 PCR 方法虽然能检测小鼠多瘤病毒 DNA,但不能定量,而本研究建立的 TaqMan 探针荧光定量不仅能满足小鼠多瘤病毒临床快速诊断检疫及其分子流行病学调查的需要,还能精确定量,敏感度高,报告结果快,能较好满足 MPyV 临床快速诊断、日常监测和分子流行病学调查的需要,对实验动物质量检测具有实际应用价值。

参考文献:

- [1] Sullivan CS, Sung CK, Pack CD, et al. Murine polyomavirus encodes a microRNA that cleaves early RNA transcripts but is not essential for experimental infection [J]. *Virology*, 2009, 387(1): 157–167.
- [2] Nakamichi K, Takayama-Ito M, Nukuzuma S, et al. Long-term infection of adult mice with murine polyomavirus following stereotaxic inoculation into the brain [J]. *Microbiol Immunol*, 2010, 54(8): 475–482.
- [3] Simon C, Klose T, Herbst S, et al. Disulfide linkage and structure of highly stable yeast-derived virus-like particles of murine polyomavirus [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(15): 10411–10418.
- [4] 佟巍, 张丽芳, 向志光, 等. 北京地区 2011~2012 年度实验小鼠 POLY 病毒感染情况调查与分析 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(12): 40–43.
- [5] Carroll J, Dey D, Kreisman L, et al. Receptor-binding and oncogenic properties of polyoma viruses isolated from feral mice [J]. *PLoS Pathog*, 2007, 3(12): e179.
- [6] Benjamin TL. Polyoma virus: old findings and new challenges [J]. *Virology*, 2001, 289(2): 167–173.
- [7] 袁文, 王静, 赵维波, 等. 结合内标的小鼠诺如病毒荧光定量 RT-PCR 检测方法的建立及应用 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(1): 50–56.
- [8] 王静, 张钰, 闵凡贵, 等. 猴免疫缺陷病毒(SIV)实时荧光定量 PCR 检测方法的建立 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23(9): 68–72.
- [9] Zhang S, McNees AL, Butel JS. Quantification of vertical transmission of murine polyoma virus by real-time quantitative PCR [J]. *J Gen Virol*, 2005, 86(10): 2721–2729.
- [10] 谢军芳. TMEV、Ect、LCMV、POLY 和 PVM 病毒免疫血清制备及 ELISA 等检测方法的研究 [D]. 硕士学位论文, 中国医学科学院实验动物研究所, 2009, 45–54.

[修回日期] 2015-04-09



鼠痘病毒荧光定量 Taqman-PCR 检测方法的建立与应用

杜江涛¹, 戴方伟¹, 周莎桑¹, 宋晓明², 吕 宇¹, 萨晓婴¹

(1 浙江省医学科学院实验动物中心, 杭州 310013; 2 杭州师范大学实验动物中心, 杭州 310036)

【摘要】 目的 建立鼠痘病毒的荧光定量 Taqman-PCR 检测方法,以期能快速、准确、灵敏、特异的检出鼠痘病毒。**方法** 经过比对和筛选,本研究选取鼠痘病毒的 ERPV_027 基因 480 – 800 位序列段,作为引物设计位点设计引物和探针,并对该引物对和探针的特异性、灵敏性、稳定性和重复性进行检测。**结果** 本研究建立的方法,对鼠痘病毒的检测极限是 68 copies/ μ L;该方法特异性强,只对鼠痘病毒特定片段进行特异性扩增,而对小鼠肝炎病毒、仙台病毒、沙门氏菌等其它病毒、细菌无扩增;该方法稳定性和重复性均较好。**结论** 本研究成功建立了检测鼠痘病毒的荧光定量 Taqman-PCR 方法,该方法特异性强、灵敏度高,且具有较好的稳定性和重复性,具有广阔的应用价值。

【关键词】 鼠痘病毒;荧光定量 PCR;Taqman 探针

【中图分类号】 R – 33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0059-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 006. 012

Establishment and application of a fluorescence quantitative Taqman-PCR detection method of mouse poxvirus

Du Jiang-tao¹, DAI Fang-wei¹, ZHOU Sha-sang¹, SONG Xiao-ming², LV Yu¹, SA Xiao-ying¹

(1. Center of Laboratory Animals, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China;

2. Center of Laboratory Animals, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036)

【Abstract】 Objective To establish a fluorescence quantitative Taqman-PCR method for rapid and accurate detection of mouse poxvirus. **Methods** After sequence alignment and comparison, ERPV_027 gene was selected as the primer and probe design gene. Furthermore, the specificity, sensitivity, stability and reproducibility of these primers and probes were detected. **Results** The detection limitation of this method was 68 copies/ μ L. Data showed that this method has high specificity, which specifically amplifies mouse poxvirus, with no amplification signal of mouse hepatitis virus, Sendai virus, Salmonella and some other viruses and bacteria. This method also showed good stability and reproducibility. **Conclusions** This study has successfully established a fluorescence quantitative Taqman-PCR method for detection of mouse poxvirus, with high specificity, sensitivity, good stability and reproducibility, and a broad application potential.

【Key words】 Mouse poxvirus; Fluorescence quantitative PCR; Taqman probe

鼠痘 (mouse pox) 是由鼠痘病毒 (mouse poxvirus, MPV) 感染引起的实验小鼠的一种烈性传

[基金项目] 科技部“十二五”科技支撑计划项目子项目 (2013BAK11B01-41), 浙江省医药卫生科技计划项目 (2012ZDA010), 浙江省科技计划项目 (2012C37097)。

[作者简介] 杜江涛 (1986 –) 男, 研究实习员, 从事实验动物微生物检测等工作。E-mail: djtao1986@126.com。

[通讯作者] 萨晓婴。E-mail: saxiaoyin@163.com。

染病。本病多呈爆发性流行,致死率较高,常造成全群淘汰,危害极大^[1]。临床表现以四肢、尾和头部肿胀、溃烂、坏死甚至脚趾脱落为特征,故又称脱脚病(Ectromelia, Ect)^[2]。

目前,鼠痘病毒的检测方法主要是酶联免疫吸附技术(ELISA)和免疫荧光技术(IFA)^[3]等血清学方法。传统的血清学方法对检测鼠痘病毒感染,特别是隐性感染存在较大的局限性。近年来,随着分子生物学的快速发展,聚合酶链反应(PCR)越来越多地应用于传染病的诊断检测^[4, 5]。关于鼠痘病毒的普通 PCR 检测方法及应用已有报道^[6-8],但未见其荧光定量 PCR 检测方法的相关报道。本研究针对鼠痘病毒建立荧光定量 PCR 检测方法,能快速、准确、灵敏、特异的检出鼠痘病毒。

1 材料方法

1.1 病毒株核酸及样品

鼠痘病毒标准株核酸 ECT-BJ、ECT-GZ (ECT-GZ-1、ECT-GZ-2) 和 4 个临床分离株核酸 001、MB35、HZ、1436R 由中国食品药品检定研究院和广东实验动物监测所提供。种属外病原核酸包括牛痘病毒、泰泽病原体、仙台病毒、小鼠肝炎病毒(以上均来源于中国食品药品检定研究院)以及沙门氏菌、李斯特杆菌、支气管鲍特菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌及 42 份鼠源性动物粪便、组织等样品(由本实验室收集保存)。

1.2 主要试剂及器材

DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶纯化试剂盒购自 Qiagen 公司;PMD18-T Vector 载体、DNA Taq 酶、JM109 感受态细胞、聚合酶链反应(PCR)相关试剂

购自日本 TaKaRa 中国分公司;TaqMan Fast Advanced Master Mix 购自 ABI 公司;质粒 DNA 纯化试剂盒由 Axygen 公司生产;DNA Marker、6 × Loading Buffer 为上海捷瑞产品;常温离心机(Thermo),微量紫外分光光度计(Nanodrop 2000-Thermo),水平电泳仪(Tanon),Gel Image System(Tanon),生化培养箱(上海精宏仪器有限公司),普通 PCR 扩增仪(Bio-RAD),荧光定量 PCR 仪(ABI 7500)。

1.3 方法

1.3.1 引物、探针设计及合成:从 NCBI 上下载鼠痘病毒的全基因组序列,从中选出四个基因利用 Primer Express 3.0 设计荧光定量 PCR 引物对和探针(表 1)。经过筛选和验证,本研究最终选取 ERPV_027 基因作为靶基因引物、探针均由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.3.2 DNA 提取:参照 QIAamp DNA Mini Kit 说明书,分别提取鼠痘病毒感染样本、细菌、鼠源性动物粪便组织等样品的 DNA。

1.3.3 特异性检测:对设计的 4 对引物进行筛选后,选择特异性最好的 ECT-027 引物对和探针进行检测,并对 PCR 程序进行优化。

优化后的普通 PCR 体系如下:10 × Taq PCR buffer (含 Mg²⁺) 2 μL, dNTPs mixture(2.5 mmol/L) 2 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.5 μL, 上下游引物(10 μmol/L) 各 0.5 μL, 模板 DNA(10 ng/μL) 2 μL, 补水至 20 μL。扩增程序为:95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 15 s, 55℃ 退火 20 s, 72℃ 延伸 20 s, 共 40 个循环;72℃ 再延伸 7 min; 8℃ 保存。

优化后的荧光定量 Taqman-PCR 体系如下:2 × TaqMan Fast Advanced Master Mix 12.5 μL, 上下游

表 1 四组荧光定量 PCR 引物对和 Taqman 探针序列

Tab. 1 Four groups of fluorescence quantitative PCR primer pairs and Taqman probe sequences				
编号 Codes	靶基因 Target gene	引物 Primers	碱基序列(5'-3') Base sequences	扩增产物(bp) Amplification products
ECT-027	ERPV_027	184F	ACAAGGGGTTGGGTGTAAGA	186
		369R	GCGTGCTAGTGGTTGCATTA	
		225P	ACCAAAGTGGGTAGACGATGT	
ECT-150	ERPV_150	228F	TGGTTTGGTTGTCGCGTTAG	154
		381R	ATTACACCTGGATCGACGCA	
		340P	TCAAAGCATGTGACTTATTCGT	
ECT-177	ERPV_177	763F	AGACCAAGCGTTGTTTCACA	192
		954R	CGTTATGGCATCGTCGTGAA	
		879P	AGGATGGGAATTGATAACGACT	
ECT-33221	secreted chemokine binding protein	202F	CAAGCAAGACCAACACCGA	145
		346R	CATTCTCAGACCTCCACCGA	
		263P	TCTGAAGACGATGGGGTATCCGA	

引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 0.5 μL , 探针(5 $\mu\text{mol/L}$)1.0 μL , 模板 DNA(10 $\text{ng}/\mu\text{L}$)1.0 μL , 补水至 25 μL 。扩增程序为:50 $^{\circ}\text{C}$ 培育 2 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 10 min;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s,预扩增 10 个循环;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火延伸 1 min,共 40 个循环,收集荧光信号并读取数据。

普通 PCR 和荧光定量 Taqman-PCR 分别对鼠痘病毒标准株 ECT-BJ、ECT-GZ-1、ECT-GZ-2 和分离株 001、MB35、1436R、HZ DNA,荧光定量 Taqman-PCR 对小鼠肝炎病毒、牛痘病毒、仙台病毒、泰泽病原体、沙门氏菌、李斯特菌、支气管鲍特菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌,及鼠痘病毒感染组织样品 DNA 进行扩增,检测引物和探针的特异性。

1.3.4 敏感性检测:

1.3.4.1 标准曲线与表达式的建立:将 ERPV_027 基因克隆至 PMD 18-T vector 上,并对重组质粒(21.7 $\text{ng}/\mu\text{L}$)依次作 10 倍稀释直到 $21.7 \times 10^{-8} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。选取($21.7 \times 10^{-8} \sim 21.71 \times 10^{-1}$) $\text{ng}/\mu\text{L}$ 进行 TaqMan 探针检测制作标准曲线。

1.3.4.2 探针灵敏性:将重组质粒(21.7 $\text{ng}/\mu\text{L}$)依次作 10 倍稀释直到 $21.7 \times 10^{-9} \text{ ng}/\mu\text{L}$,再取 1 μL 各稀释倍数的 ERPV_027 克隆质粒作为模板,用荧光定量 Taqman-PCR 进行检测,PCR 扩增体系和反应程序同上。

1.3.5 稳定性和重复性实验:取鼠痘病毒标准株 ECT-BJ、ECT-GZ-1、ECT-GZ-2,分离株 001、MB35、1436R、HZ DNA 及同一批 PCR 检测试剂于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱放置 1 周、2 周、3 周,用荧光定量 Taqman-PCR 检测,3 次试验各做 3 个重复,PCR 扩增体系和反应程序同上。

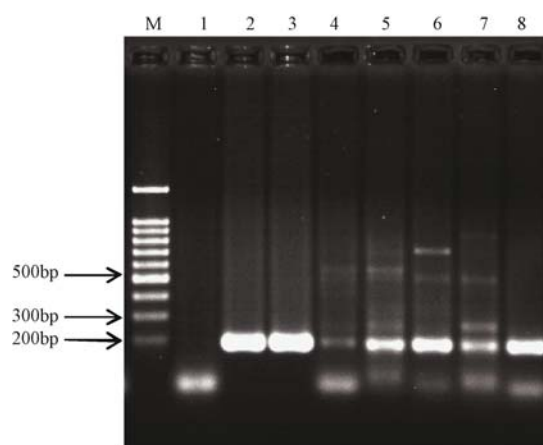
1.3.6 实际检测应用:以 ERPV027 基因克隆质粒作为阳性对照,用荧光定量 Taqman-PCR 分别对取自鼠源性动物粪便、组织等 42 份样品的 DNA 样品及鼠痘病毒感染样本(鼠痘病毒感染的 BHK21 细胞)的 DNA 样品进行检测。

2 结果

2.1 引物和探针的特异性

普通 PCR 和荧光定量 Taqman-PCR 分别对鼠痘病毒标准株 ECT-BJ、ECT-GZ-1、ECT-GZ-2,分离株 001、MB35、1436R、HZ 进行检测,均能得到特异性扩增条带和曲线(图 1、2)。荧光定量 Taqman-PCR

对鼠痘病毒感染样本,都能够特异性扩增,而对其它病毒及细菌,如牛痘病毒、泰泽病原体、仙台病毒、小鼠肝炎病毒、沙门氏菌、李斯特杆菌、支气管鲍特菌、大肠埃希菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌则无扩增结果。

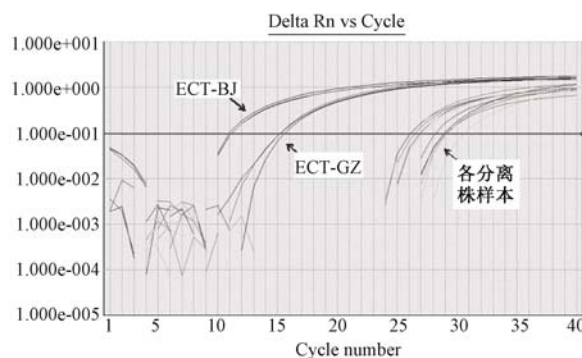


注:M 为 100 bp DNA ladder;1-8 依次为阴性对照(NTC)、ECT-GZ-2、ECT-BJ、001、MB35、1436R、HZ、ECT-GZ-1 的扩增结果

图 1 各鼠痘病毒 DNA 样本的普通 PCR 扩增结果

Note. Lane M represents 100 bp DNA ladder; Lanes 1-8 represent amplification results of NTC, ECT-GZ-2, ECT-BJ, 001, MB35, 1436R, HZ and ECT-GZ-1

Fig. 1 Regular PCR amplification results of each mouse poxvirus DNA samples



注:Delta Rn 表示标准指示信号值减去基线信号值, Cycle Number 表示 PCR 循环数。

图 2 荧光定量 Taqman-PCR 检测各鼠痘病毒 DNA 样本的扩增曲线

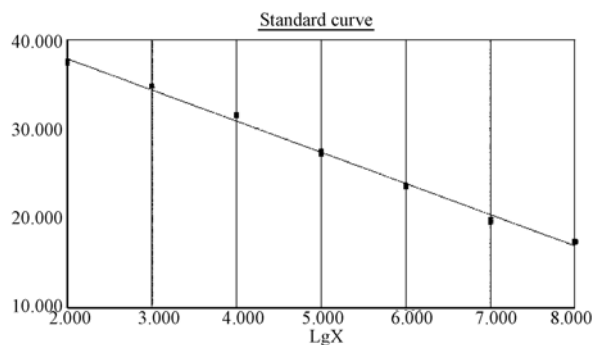
Note. Delta Rn represents the standard indication signal minus the baseline signal value. Cycle number represents the number of PCR cycles.

Fig. 2 Amplification curve of mouse poxvirus DNA detected by FQ Taqman-PCR

2.2 敏感性

2.2.1 标准曲线与表达式的建立:将 ERPV_027 基

因克隆至 PMD 18-T vector 上,并对重组质粒($21.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$)依次作 10 倍稀释直到 $21.7 \times 10^{-8} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 。选取 ($21.7 \times 10^{-8} \sim 21.7 \times 10^{-1}$) $\text{ng}/\mu\text{L}$ 进行 TaqMan 探针检测制作标准曲线,横坐标是以 10 为底的质粒拷贝数的对数值,纵坐标是循环阈值 C_t 。从标准曲线得出重组质粒拷贝数(copy number)与循环阈值(C_t)之间的线性关系曲线表达式 $C_t = -3.47 \times \lg(\text{copy number}) + 44.66$,根据该表达式测算出重组质粒的初始拷贝数。根据标准曲线得知,已建立的荧光定量 PCR 的相关系数为 $R^2 = 0.996$,扩增效率为 94%,表明已建立的荧光定量 PCR 方法误差较小,使用的标准品是合格的(图 3、4)。

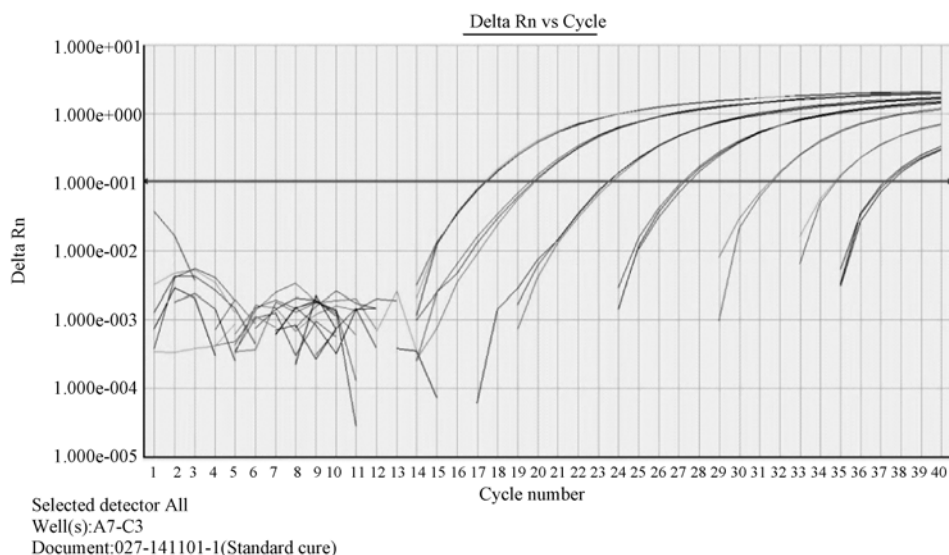


注:横坐标是以 10 为底的质粒拷贝数的对数值,纵坐标是循环阈值 C_t

图 3 标准曲线

Note. The abscissa is $\lg(\text{Copy numbers})$, and ordinate is C_t .

Fig.3 The standard curve



注:曲线从左到右依次为克隆质粒 $21.7 \times 10^{-1} \sim 21.7 \times 10^{-7} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 稀释

图 4 标准曲线扩增图

Note. The curves from left to right are cloning plasmid $21.7 \times 10^{-1} \sim 21.7 \times 10^{-7} \text{ ng}/\mu\text{L}$ dilution

Fig.4 The standard amplification curves

2.2.2 探针灵敏性检测:将 ERPV027 基因克隆质粒($21.7 \text{ ng}/\mu\text{L}$)依次 10 倍稀释直到 $21.7 \times 10^{-9} \text{ ng}/\mu\text{L}$,各取 $1 \mu\text{L}$ 作为模板,用荧光定量 Taqman-PCR 进行检测。结果显示:在 40 个 PCR 循环内,最小可以检测到 $21.7 \times 10^{-8} \text{ ng}/\mu\text{L}$,即:68 copies,探针灵敏性较好。扩增曲线见图 5;从左到右分别是 $21.7 \times 10^{-1} \text{ ng}/\mu\text{L} \sim 21.7 \times 10^{-9} \text{ ng}/\mu\text{L}$, $21.7 \times 10^{-9} \text{ ng}/\mu\text{L}$ 已经看不到完整的扩增曲线。

2.3 稳定性和重复性

取鼠痘病毒标准株 ECT-BJ、ECT-GZ-1、ECT-GZ-2,分离株 001、MB35、1436R、HZ DNA 及同一批荧光定量 PCR 检测试剂于 -20°C 冰箱放置 1 周、2 周、3 周,用荧光定量 Taqman-PCR 检测(表 2)。3 次试验各做 3 个重复,3 次试验的 C_t 的标准差 SD

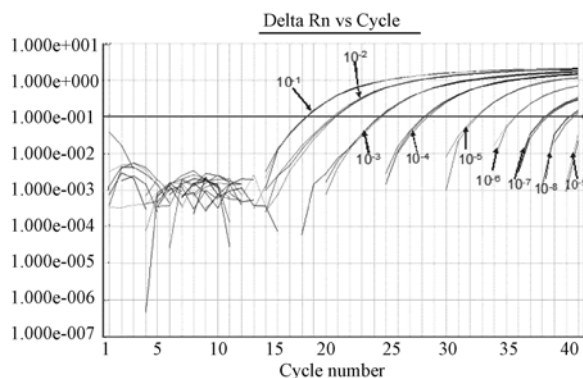


图 5 荧光定量 Taqman-PCR 对 10 倍梯度稀释质粒扩增结果

Fig.5 Amplification results of the plasmid in 10-fold dilutions by FQ Taqman-PCR

表 2 鼠痘病毒 DNA 及试剂放置一段时间后用检测结果

Tab. 2 Detection results of mouse poxvirus DNA samples by FQ Taqman-PCR. The DNA samples and reagents were stored for some time.

编号	检测周期(周)	CT 值			平均 Ct 值	SD 值	CV(%)	DNA 浓度 (ng/μL)
		CT 值 1	CT 值 2	CT 值 3				
ECT-BJ	1	11.03	11.24	11.23	11.23	0.12	1.07	27
	2	11.08	11.26	11.21	11.21	0.09	0.80	27
	3	11.58	11.76	11.70	11.70	0.09	0.77	27
001	1	28.26	28.37	28.49	28.37	0.12	0.42	25.8
	2	28.75	28.40	28.76	28.75	0.21	0.73	25.8
	3	29.30	29.19	29.41	29.30	0.11	0.38	25.8
HZ	1	29.13	29.09	29.04	29.09	0.04	0.14	16.7
	2	27.54	27.66	27.71	27.66	0.09	0.33	16.7
	3	28.65	28.56	28.47	28.56	0.09	0.32	16.7
MB35	1	26.20	26.24	26.17	26.20	0.04	0.15	27.8
	2	26.01	26.17	26.09	26.09	0.08	0.31	27.8
	3	27.43	27.46	27.47	27.46	0.02	0.07	27.8
1436R	1	29.25	29.27	29.24	29.25	0.02	0.07	21.8
	2	29.23	28.89	29.42	29.23	0.27	0.92	21.8
	3	29.08	29.01	29.04	29.04	0.03	0.10	21.8
ECT - GZ - 1	1	26.54	26.92	27.20	26.92	0.33	1.23	45.1
	2	26.21	26.78	26.35	26.35	0.30	1.14	45.1
	3	26.37	26.54	26.46	26.46	0.08	0.30	45.1
ECT - GZ - 2	1	15.28	15.65	15.32	15.32	0.20	1.31	10.1
	2	15.47	15.48	15.45	15.47	0.01	0.06	10.1
	3	15.52	15.69	15.70	15.69	0.10	0.64	10.1

值小于 0.5,变异系数(CV)小于 5%,说明用引物 027 建立的 FQ Taqman-PCR 方法稳定性和重复性均较好。

2.4 实际检测应用

以 ERPV027 基因克隆质粒作为阳性对照,用荧光定量 Taqman-PCR 对取自鼠源性动物粪便、组织等 42 份样本的 DNA 样品及鼠痘病毒感染样本(鼠痘病毒感染的 BHK21 细胞)的 DNA 样品进行 Real-time PCR 检测。鼠源性动物粪便、组织中均未检测出鼠痘病毒目的基因,鼠痘感染样品中检测到目的基因且含量较高。

3 讨论

目前国内通用的检测鼠痘病毒的方法是血清学方法,如免疫荧光技术(IFA)^[3]、酶联免疫吸附技术(ELISA)等。但对于急性发病鼠群,其体内尚未产生相应的抗体或抗体未达到可检出的水平时,血清学方法会出现假阴性结果,造成漏检^[9]。而且血清学检测方法对抗原的纯度要求较高,对能产生抗 DNA 抗体的小鼠血清会出现假阳性,且不能鉴别痘苗病毒免疫抗体和 MPV 感染所产生的抗体。对病毒的早期诊断,存在着很大的局限性。近年来,随着分子生物学的快速发展,应用 PCR 技术扩增病毒

基因的特异 DNA 片段^[10],可以在病毒诱生抗体之前确定感染,且可分型和定量。目前,关于鼠痘病毒的普通 PCR 检测已有相关报道^[6-8],但其荧光定量 PCR 检测方法仍未见报道。

本研究从 NCBI 的 FTP 下载一株 Ectromelia virus 全基因组的基因序列(Ectromelia virus culture - collection ATCC: VR - 1431, GenBank Accession No: JQ410350.1),将其 183 个基因与 Nt 库对比,获得全部的比对结果。在分析比对结果时,发现 ERPV_027、ERPV_60、ERPV_64、ERPV_77、ERPV_116、ERPV_140、ERPV_142、ERPV_145、ERPV_148、ERPV_149、ERPV_150、ERPV_174、ERPV_175、ERPV_177 基因,有非常好的种内特异和种间的差异性(与牛痘病毒差别较大)。我们选择了特异性最好的三个基因 ERPV_027、ERPV_150、ERPV_177 三个基因作为候选基因,设计特异性检测引物。此外,我们还参考文献,将鼠痘的 secreted chemokine binding protein 也作为靶基因设计引物。

针对 ERPV_027、ERPV_150、ERPV_177 三个基因,我们下载了不同分离株各三条序列,针对 secreted chemokine binding protein 我们下载了五条分离株的序列,利用 Mega5 进行多序列联配,针对不同分离株的保守性区域利用 Primer Express 3.0

设计引物和探针(表 1)。我们将 4 对引物用普通 PCR 对标准株进行扩增,发现都能得到目的条带,之后又对不同来源的分离株进行 PCR 检测,发现仅 ERPV_027 有很好的扩增效果。我们将 ERPV_027 基因作为候选基因,对 7 株病毒株进行检测,结果也符合预期。

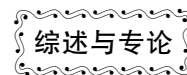
为了进一步验证其特异性,我们对 32 个样本进行检测,其中 18 个样本为鼠痘感染的生物样本,其余样本为不同病原体感染的生物样本。检测结果显示我们所设计的探针的特异性为 100%。为了检测引物的灵敏性,我们制作了该目的基因的标准品,Taqman 检测结果表明该方法对鼠痘病毒的检测限为 68 copies/ μL ,与普通 PCR 相比,大大提高了检测灵敏度。取鼠痘病毒标准株和分离株样品 DNA 及同一批 PCR 检测试剂于 -20°C 冰箱放置 1 周、2 周、3 周,Taqman PCR 检测能得到良好的扩增效果,证明所建立的方法稳定性和重复性较好。用荧光定量 Taqman-PCR 均未从鼠源性动物粪便、组织样本的 DNA 中检出鼠痘病毒目的基因,但从鼠痘感染样本的 DNA 中检测到目的基因且含量较高,证明该方法具有良好的实际应用价值。

本方法在实际检测应用中,仅对本实验室收集的沙鼠粪便和组织,野鼠粪便样本及鼠痘病毒感染的 BHK21 细胞样本进行了检测,并未对鼠痘感染的动物组织样本进行过检测,表明该方法在实际应用中,尚需进一步的验证。

参考文献:

- [1] 景志忠,贾怀杰,周涛. 痘病毒病:值得高度重视的一类人兽共患病[J]. 中国病毒病杂志, 2011. 1(6): 416-418.
- [2] 师长宏,李六金,李成,等. KM 和 BALB/c 小鼠痘病毒感染的诊断[J]. 动物医学进展, 2002. 23(3): 72-73.
- [3] 应贤平,钱琴,屈霞琴,等. 实验小鼠痘病毒感染检测分析[J]. 中国实验动物学杂志, 2000. 10(2): p. 69-72.
- [4] Scaramozzino N, Ferrier-Rembert A, Favier AL, et al. Real-time PCR to identify variola virus or other human pathogenic orthopox viruses[J]. Clin Chem, 2007. 53(4): 606-613.
- [5] Labelle P, Hahn NE, Fraser JK, et al. Mousepox detected in a research facility: case report and failure of mouse antibody production testing to identify Ectromelia virus in contaminated mouse serum[J]. Comp Med, 2009, 59(2): 180-186.
- [6] 赵雅静,宁磊,于风刚. 小鼠痘病毒的聚合酶链反应检测法[J]. 上海实验动物科学, 1998. 18(2): 88-90.
- [7] 付瑞,岳秉飞,贺争鸣. 鼠痘病毒 PCR 检测方法的建立及在鼠源性生物制品检定中的应用[J]. 实验动物科学, 2012. 29(3): 12-14.
- [8] 杨松涛,夏咸柱,乔军,等. 鼠痘病毒 CC 强毒株的分离与鉴定[J]. 中国病原生物学杂志, 2007, 2(1): 5.
- [9] Parker S, Siddiquia AM, Oberlea C, et al. Mousepox in the C57BL/6 strain provides an improved model for evaluating anti-poxvirus therapies[J]. Virology, 2009. 385(1): 11-21.
- [10] Kochneva GV, Kolosova TA, Lupan GF, et al. [Orthopoxvirus genes for kelch-like proteins. III. Construction of mousepox (ectromelia) virus variants with targeted gene deletions][J]. Mol Biol (Mosk), 2009. 43(4): 567-572.

[修回日期]2015-05-18



预测肿瘤药物临床试验效果的动物模型新进展

余 飞, 丁 慧

(南京大学医学院附属鼓楼医院, 南京 210008)

【摘要】 基于人体试验的实际应用及伦理方面的考虑, 合适的动物模型对于肿瘤药物研发至关重要。制药公司和研究机构在肿瘤治疗新药的开发过程中消耗大量资源, 最佳动物体内模型的选择可以改进或缩短研发进程。在技术复杂性方面, 肿瘤遗传工程小鼠模型(GEMM)已逐步完善, 并且 GEMM 能够准确重建人类肿瘤的同源发生, 为加快肿瘤药物的开发提供机遇。本文主要综合比较预测肿瘤药物临床试验效果的不同类型动物模型, 探讨其优劣, 并对体内模型的评估方法及与临床转化等进行简述, 为肿瘤药物临床前试验提供参考。

【关键词】 抗肿瘤药物; 模型; 动物; GEMM; 临床转化

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0065-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 006. 013

Progress in animal models for predicting the results of clinical trials of cancer drugs

YU Fei, DING Hui

(Nanjing Drum Tower Hospital, the Affiliated Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

【Abstract】 Due to practical and ethical concerns associated with human experiments, animal models have been essential in cancer research. Vast resources are expended during the development of new cancer therapeutics, and selection of optimal in vivo models should improve this process. Genetically engineered mouse models (GEMM) of cancer have progressively improved in technical sophistication and, accurately recapitulating the human cognate condition, have provided opportunities to accelerate the development of cancer drugs. In this article we consider the different types of animal models used for predicting the results of clinical trials of cancer drugs, and discuss the strengths and weaknesses of each in this regard. In addition, the methods of predicting in vivo models and clinical translation are discussed.

【Key words】 Antineoplastic drugs; Model animal; GEMM; Clinical transformation

制药公司和研究机构在开始抗肿瘤药物临床试验之前, 一般会进行广泛的临床前研究, 利用体外(细胞培养)和体内(动物实验)试验来探讨药物的初步疗效、毒性和药物代谢动力学。肿瘤生物学、化疗和靶向治疗的试验曾广泛使用体外培养的细胞, 对肿瘤研究的前期进展有一定贡献。然而, 体外试验有较大的缺点, 如无法复制三维肿瘤结

构, 缺乏肿瘤微环境以及细胞培养基中生长因子和细胞因子的人为设置等^[1]。早期的在体试验主要用来验证药物安全性, 以帮助研究人员决定该候选药物是否具有进一步研究的价值。国外多个国家的食品、药品管理局(FDA)和卫生部都规定在人体接受一个新分子试验前必须进行动物实验。所以, 在药物开发过程中为了得到能准确反映疗效的模

【基金项目】 中央高校苗圃项目(编号:20620140707)。

【作者简介】 余飞(1982-), 女, 助理研究员, 主要研究方向: 实验动物学。E-mail: yufei0802@yeah.net。

【通讯作者】 丁慧(1983-), 女, 助理研究员, 主要研究方向: 肿瘤学。E-mail: huiding@126.com。

拟条件,选择最合适的体内模型必不可少。使用能够重建人类恶性肿瘤复杂程度的动物模型开发创新的临床前试验,能够推进药物开发,提高潜在的临床试验新疗法成功率。本文就预测肿瘤药物临床试验效果的动物模型新进展及与临床转化等问题作简要综述。

1 常用的体内动物模型类型

目前在肿瘤学药物研发中最常用的动物模型系统仍然是可移植的或植入模型,即将培养的人(异种移植)或小鼠(同种异体移植)细胞或肿瘤组织外植物移植到免疫缺陷或免疫活性低的受体小鼠体内。这些模型已经广泛地用于为临床试验选择优先考虑的药物,在新的肿瘤干预措施的有效性和安全性评估方面起到重要作用。

1.1 异种移植模型

1.1.1 异种异位移植模型:异种异位移植模型是通过移植人体细胞或组织片段至免疫缺陷小鼠皮下而产生的模型,异种移植瘤通常是生长迅速且往往对化疗敏感的少数人体细胞系,目前已经建立了几乎所有的人类肿瘤动物模型^[2]。皮下移植模型有快速检查相对均一的肿瘤大样本的能力,这些肿瘤的生长以及对药物的反应易于评估。虽然受体相关的免疫调节作用被破坏,异种移植模型仍是评价人源化单克隆抗体如曲妥珠单抗和贝伐单抗直接效用的一个有用方法。但是,虽然这些模型相对便宜、便捷易使用,却并不能完全代表相应的人类肿瘤。

1.1.2 异种原位移植模型:异种原位移植模型是通过移植患者肿瘤组织或肿瘤细胞至免疫缺陷小鼠相应器官膜下的原位位点而产生。原位模型的建立更具技术挑战性,但是,它们在检测微环境(尽管人体细胞和组织处在小鼠微环境下)及转移扩散的影响方面具有优势。例如,药物敏感性和血管化这类已知受肿瘤微环境影响较大的参数必须在原位移植模型中检测^[3]。也有一些实例对皮下模型和原位模型进行了比较,相较于简单的皮下种植模型,原位移植肿瘤的潜在优势需要进一步研究^[4]。

1.2 同源(同种)移植模型

1.2.1 同源(同种)异位移植模型:同源(同种)异位移植模型是通过将小鼠肿瘤组织或肿瘤细胞皮下注射至免疫活性受体鼠内而产生的,这类模型避免了在其它异种移植模型中发现的免疫缺陷。然而,可能由

于人类和小鼠细胞生物学先天的差异,在同系或基于细胞分析检测到的药物的治疗活性和其在人类临床应用中的疗效之间相关性并不理想。

1.2.2 同源(同种)原位移植模型:同源(同种)原位移植模型是将小鼠肿瘤组织或肿瘤细胞移植至活性受体小鼠相应器官膜下的原位位点而产生的,这类模型既避免异种移植模型中发现的免疫缺陷又提供与该肿瘤起源相同的体内微环境,保持肿瘤细胞原有的生物学特性。但可能由于不能准确的重建肿瘤和受体之间复杂的相互作用,这类模型临床相关性较差。

1.3 遗传工程小鼠模型(GEMMs)

在治疗领域当前研究最多的小鼠模型系统是遗传工程小鼠模型(GEMMs),在这些模型中肿瘤发生在原位或在适当的组织间生成从而模拟复杂的成瘤过程(表1)。因此,携带天然恶性肿瘤遗传特征的 GEMMs 可以概括除临床行为之外的肿瘤生物学表现并提供一个替代传统临床前试验的选择^[5]。人类肿瘤模型的 GEMMs 具有相似的遗传质谱,并且这些基因质谱可以在适当的细胞类型中找到。部分具有优异特性的 GEMMs 已用于临床前药物评价试验,例如已报道的 Kras 驱动的非小细胞肺癌和胰腺癌模型^[6,7]。但是 GEMM 也存在一些固有缺陷,如成瘤时间较长,不易监测肿瘤发展,需要复杂的育种计划等。尽管有这些限制,GEMMs 在加速新药评估研制领域仍有很大潜力。

2 体内动物模型的评估

动物模型建立后,目前有多种方法来决定其是否可以准确的预测新疗法的反应。对标准治疗的反应,该模型可以评定^[8];即使肿瘤恶性程度限制有效的治疗方法,即便肿瘤未见疗效,但仍要评价目前使用的药品。如果模型对治疗有反应而相应的人类癌症对治疗未见效果,很可能该模型无法有效的预测新药,这是异种移植模型对新型疗法预测效果较差的原因之一^[2]。

评估在体试验的治疗反应常用的是序列成像,但在临床前试验中功能性成像已落后。现在更专注于提高 GEMMs 中的成像方式,如正电子发射计算机断层显像(PET-CT),高分辨率超声等,并且通常根据待检模型的不同选择不同的最适合技术^[8]。这一领域可能引导类似的成像方式用于人类癌症治疗效果的早期放射性评估^[9]。

表 1 用以评估临床前疗效的肿瘤 GEMMs

Tab.1 GEMMs of cancer used to assess preclinical therapeutic efficacy

肿瘤类型 Tumor types	模型类型 Model types	治疗试验 Therapies tested	参考文献 Refs.
乳腺癌和卵巢癌 Breast and ovarian cancers	BRCA1、2 和 p53 缺陷模型; BRCA1 and 2 and p53-deficient models MMTV-Myc 和 MMTV-Ras 模型 MMTV-Myc and MMTV-Ras models	PARP 抑制剂 PARP inhibitor	24
		铂剂 Platinum agents 多柔比星, 紫杉醇 Doxorubicin, paclitaxel	25
肺癌 Lung cancer	内源性 Kras/PIK3CA 或 EGFR 突变或 p53 基因突变模型 Endogenous Kras/PIK3CA or EGFR mutations or p53 mutations	PI3K/AKT 抑制剂 PI3K/AKT inhibitors	26
		MEK 抑制剂 MEK inhibitors	27
		EGFR 抑制剂 EGFR inhibitors HSP90 和雷帕霉素 HSP90 and rapamycin	28
慢性粒细胞白血病 Chronic myeloid leukemia	BCR-ABL 突变模型 BCR-ABL mutation	BCR-ABL TKI	29
急性早幼粒细胞白血病 (APL)	PML-RAR α 和 PLZF-RAR α 模型 PML-RAR α and PLZF-RAR α models	RA; As ₂ O ₃	30
胰腺导管腺癌 Pancreatic ductal adenocarcinoma	内源性 Kras 和 p53 基因突变模型 Endogenous Kras and p53 mutations	吉西他滨 Gemcitabine	6
		刺猬抑制剂 Hedgehog inhibitors EGFR 和 VEGF 抑制剂 EGFR and VEGF inhibitors	7
胰腺神经内分泌癌 Pancreatic neuroendocrine cancer	RIP-TAg 模型 RIP-TAg model	环磷酰胺 Cyclophosphamide 舒尼替尼 (TKI) Sunitinib 依维莫司蛋白 (mTOR) Everolimus	31 32 33
淋巴瘤 Lymphoma	E μ -myc 模型 E μ -myc model	化疗药物 Chemotherapeutics	34
黑色素瘤 Melanoma	B-Raf 模型 B-Raf model	雷帕霉素 Rapamycin MEK 抑制剂 MEK inhibitor	35

备注:PARP:多聚(ADP-核糖)聚合酶;PI3K:磷脂酰肌醇 3-激酶;MEK:MAP 激酶的激酶;TKI:酪氨酸激酶抑制剂;mTOR:哺乳动物的雷帕霉素靶点;RA:维生素 A 酸;As₂O₃:三氧化二砷。

近年来的研究瓶颈在于不同的模型都无法准确地研究肿瘤转移能力。原位模型和 GEMMs 虽然能转移至相应的靶器官,但其发生率远比起对应的恶性肿瘤低^[10]。现已建立出用以研究自发肿瘤转移机制及检测药物在实体肿瘤中效用的模型^[10]。例如胰腺癌的小鼠模型,在动物模型的早期阶段出现肿瘤转移,而多数患者也出现转移,这些结果对胰腺癌的治疗有显著意义^[11]。

3 动物模型转化至临床实践的现状

将科学发现应用于临床是肿瘤研究人员的最终目标。实验发现开始于基础研究,通过临床前动物研究而发展,最后在人体临床试验中显示治疗效果。尽管动物模型在新的肿瘤干预措施的有效性和安全性评估方面起很大作用,但是遗传、分子和生理限制往往阻碍效用。在以往文献中,动物模型未被认为是生物学研究中的一个必要步骤^[12],人们日益认识到动物研究的局限性以及它缺乏对人类临床试验作出可靠预测的能力。

3.1 动物模型转化至临床试验的成功率

临床前疗效测试的主要目的是预测某个特定药物在临床上是否会成功。动物试验对治疗有效的可能性不高于 30%,因为有一些阴性结果并没有公布^[13]。在人体试验中检测到三分之一引用动物试验,这个高引用率也是同样的情况^[14]。三分之一进入临床试验的药物中,仅有 8% 的药物成功通过第一阶段^[14]。

转化失败可能部分归因于方法学应用的不合适以及动物模型不能准确模拟人类疾病条件。但问题的核心还是因为动物模型本身。不像人体临床试验,动物试验缺乏最佳实践标准^[15]。实验室环境对实验结果也有显著影响,例如对笼养小鼠来说,压力就是一个普遍因素^[16]。因此,治疗有效性不仅要在啮齿类动物中评估,还要在更高级的动物物种中评估,并且选样要随机,结果要盲评。此外,实验设计时的动物模型应该包括不同性别和年龄群,所有的数据都应公布。

3.2 动物模型在肿瘤研究中的局限性

临床检测前新药筛选的主要临床前工具就是在啮齿类动物上生长的实验性肿瘤。虽然小鼠是最常用的模型动物,实际上它们并不适宜作为模拟人类疾病的动物模型。人和鼠之间关键性遗传、分子、生物学和细胞学差异,使得这一动物模型无法成为寻求肿瘤治疗方法的有效手段^[17]。在人和鼠的四千多个基因中,研究者发现转录因子结合位点的物种间差异在 41% ~ 89% 之间^[15]。小鼠模型仅用于模拟疾病的特定过程或某一阶段的特定进展而无法模拟人类疾病环境中生理变化的整个过程^[15]。

在动物模型中应用成功却在肿瘤临床试验中失败的典型实例:在动物模型中成功却并未能转化至临床的一个最众所周知的例子是 TGN1412 试验^[12]。药物 TGN1412 由德国 TeGenero 公司研发,是一种人源化的免疫激动剂—抗 CD-28 单克隆抗体,开发用于治疗多发性硬化症,类风湿关节炎和某些肿瘤等。在进行人体试验前,TGN1412 在包括小鼠在内的不同动物中进行了测试,以确保其临床安全和有效。毒理学研究也证明在动物实验中给予比临床药用高百倍的剂量未引起任何毒性反应。尽管给予的亚临床剂量比动物试验中发现的安全剂量低 500 倍,但在 TGN1412 的第一个人体临床试验中,该药物就引起了患者全身脏器衰竭^[18]。

治疗性肿瘤疫苗在肿瘤治疗方法中变得越来越流行,但是也存在同样的情况。治疗性肿瘤疫苗是通过刺激机体的免疫系统来对抗肿瘤,这作为备选的方法比传统的细胞毒性治疗肿瘤更引人注目^[19]。包括肿瘤特异肽,或者蛋白片段的典型性治疗性疫苗可经皮下注射给动物或人。免疫系统将这种肽识别为攻击对象,刺激产生大量抗癌 T 细胞,达到对抗肿瘤的目的。这些疫苗在进入人体临床试验前必须先要在动物中进行检测以验证其有效性。在某些特定肿瘤中,临床前动物模型证实疫苗诱导的免疫反应以及在肿瘤治疗中极为重要的 T 细胞介导细胞应答^[20]。尽管动物模型中治疗性疫苗在启动免疫应答方面已有效果,但在人体临床试验中却产生了不同的结果。在最近的一篇综述文章中,有人指出 23 例 II/III 期临床治疗测试了 17 种不同的治疗性抗肿瘤疫苗,18 个研究宣布失败^[21]。例如默克公司的 Stimuvax(失败于非小细胞肺癌 III 期试验),葛兰素史克公司的 MAGE-A3(失败于黑色素瘤试验 III 期),维考的 Allovectin(失败于转移

性黑色素瘤试验 III 期),和 KAE1-GemVax 的 TeloVac(失败于胰腺癌试验 III 期)等^[22]。据推测,大多数肿瘤疫苗试验的失败是由于人体中循环免疫抑制细胞因子水平升高和各种人体免疫学检查点(checkpoint)可能不存在于啮齿动物中^[22]。

3.3 动物模型的替代策略

随着科学的发展大量可替换以动物为基础的临床研究的方法已经出现。这些措施包括“0 阶段研究”,流行病学研究,体外研究,电脑模拟模型,“芯片上的人体器官”——通过模仿微生物环境将某个器官的细胞种植到硅胶或塑料芯片上,在芯片上创造存活系统^[23]，“微流控芯片”——通过微小管道在一个细小的硅橡胶集成电路上实现一百多个细胞培养物或其他实验的自动化等。

目前较受关注的是“0 阶段研究”。在过去的十多年中,美国食品药品监督管理局和欧洲药品管理局介绍了用于测试人体内非常小的药物“微剂量”的指导方针^[23]。由于浓度很低(小于治疗剂量的 1/100),所以该药物可以在少数患者中提前应用而无须经过通常所要求的安全数据准备的 I 阶段试验。这些早期“0 阶段”的研究通过展示药物如何在体内分布、代谢以及它是否击中正确的分子靶点来迅速收集人体数据。约四分之一的分子进入临床试验会由于诸如不能够完全吸收或渗透到靶器官的药理学问题而失败^[23]。在人体进行直接试验,制药行业可以早点决定是否值得投入时间和金钱到药物临床研究中去。0 阶段的试验可能范围比较小,但是它们需要非常敏感的测试来检测体内微量药物和它们可能的作用机制。

尽管动物模型向临床研究转化成功率偏低,但其仍然是体内信息的唯一来源,实验动物仍在实验室普遍用于测试药物安全性、毒性和有效性。由于人体试验涉及显著的操作和伦理问题,在肿瘤研究中动物模型是必须的。

当前在不同肿瘤类型中正进行的多个早期临床试验,是根据 GEMMs 临床前研究的成功经验总结设计的。现在说这些实验最终是否会获得成功还言之尚早,但迄今的结果已经给研究者们带来信心。要想完成新型疗法的成功转化,必须全面了解治疗机制、临床前模型和早期阶段临床试验;且适时投入额外资源到更佳设计的预测性动物模型的临床前试验中,相信临床前试验转化至临床会有一个更有希望的未来。

参考文献:

- [1] Frese KK, Tuveson DA. Maximizing mouse cancer models [J]. Nat Rev Cancer, 2007, 7: 645 – 658.
- [2] Sharpless NE, Depinho RA. The mighty mouse: genetically engineered mouse models in cancer drug development [J]. Nat Rev Drug Discov. 2006, 5: 741 – 754.
- [3] Fidler IJ, Ellis LM. The implications of angiogenesis for the biology and therapy of cancer metastasis [J]. Cell, 1994, 79: 185 – 188.
- [4] Hoffman RM. Orthotopic metastatic mouse models for anticancer drug discovery and evaluation; a bridge to the clinic [J]. Invest New Drugs, 1999, 17: 343 – 359.
- [5] Van Dyke T, Jacks T. Cancer modeling in the modern era: progress and challenges [J]. Cell, 2002, 108: 135 – 144.
- [6] Olive KP, Jacobetz MA, Dacidsen CJ, et al. Inhibition of Hedgehog signaling enhances delivery of chemotherapy in a mouse model of pancreatic cancer [J]. Science, 2009, 324: 1457 – 1461.
- [7] Singh M, Lima A, Molina R, et al. Assessing therapeutic responses in Kras mutant cancers using genetically engineered mouse models [J]. Nat Biotechnol, 2010, 28: 585 – 593.
- [8] Olive KP, Tuveson DA. The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics [J]. Clin Cancer Res, 2006, 12: 5277 – 5287.
- [9] Seaman ME, Contino G, Bardesey N, et al. Molecular imaging agents; impact on diagnosis and therapeutics in oncology [J]. Expert Rev Mol Med, 2010, 12: E20.
- [10] Francia G, Cruz-Munoz W, Man S, et al. Mouse models of advanced spontaneous metastasis for experimental therapeutics [J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11: 135 – 141.
- [11] Rhim AD, Mirek ET, Aiello NM, et al. EMT and dissemination precede pancreatic tumor formation [J]. Cell, 2012, 148: 349 – 361.
- [12] Matthews RA. Medical progress depends on animal models - doesn't it? [J] J R Soc Med, 2008, 101: 95 – 98.
- [13] Sena ES, van der Worp HB, Bath PM, et al. Publication bias in reports of animal stroke studies leads to major overstatement of efficacy [J]. PLoS Biol., 2010, 8:e1000344.
- [14] Hackam DG, Redelmeier DA. Translation of research evidence from animals to humans [J]. JAMA, 2006, 296: 1731 – 1732.
- [15] Fingleton B. Matrix metalloproteinases as valid clinical targets [J]. Curr Pharm Des., 2007, 13:333 – 346.
- [16] Chesler EJ, Wilson SG, Lariviere WR, et al. Identification and ranking of genetic and laboratory environment factors influencing a behavioral trait, thermal nociception, via computational analysis of a large data archive [J]. Neurosci Biobehav Rev, 2002, 26: 907 – 923.
- [17] Schuh JC. Trials, tribulations, and trends in tumor modeling in mice [J]. Toxicol Pathol, 2004, 32 Suppl 1: 53 – 66.
- [18] Suntharalingam G, Perry MR, Ward S, et al. Cytokine storm in a phase 1 trial of the anti-CD28 monoclonal antibody TGN1412 [J]. N Engl J Med, 2006, 355: 1018 – 1028.
- [19] Vonderheide RH, Nathanson KL. Immunotherapy at large: the road to personalized cancer vaccines [J]. Nat Med, 2013, 19: 1098 – 1100.
- [20] Yaddanapudi K, Mitchell RA, Eaton JW. Cancer vaccines: Looking to the future [J]. Oncoimmunology, 2013, 2:e23403.
- [21] Ogi C, Aruga A. Immunological monitoring of anticancer vaccines in clinical Trials [J]. Oncoimmunology, 2013, 2: e26012.
- [22] Mak IW, Evaniew N, Ghert M. Lost in translation: animal models and clinical trials in cancer treatment [J]. Am J Transl Res, 2014, 6(2): 114 – 118.
- [23] Marchetti S, Schellens JH. The impact of FDA and EMEA guidelines on drug development in relation to Phase 0 trials [J]. Br J Cancer 2007; 97: 577 – 581.
- [24] Hay T, Matthews JR, Pietzka L, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase-1 inhibitor treatment regresses autochthonous Brca2/p53-mutant mammary tumors in vivo and delays tumor relapse in combination with carboplatin [J]. Cancer Res, 2009, 69: 3850 – 3855.
- [25] Bearss DJ, Subler MA, Hundley JE, et al. Genetic determinants of response to chemotherapy in transgenic mouse mammary and salivary tumors [J]. Oncogene, 2000, 19:1114 – 1122.
- [26] Engelman JA, Chen L, Tan X, et al. Effective use of PI3K and MEK inhibitors to treat mutant Kras G12D and PIK3CA H1047R murine lung cancers [J]. Nat Med 2008, 14:1351 – 1356.
- [27] Faber AC, Li D, Song Y, et al. Differential induction of apoptosis in HER2 and EGFR addicted cancers following PI3K inhibition [J]. Proc Natl. Acad Sci U S A., 2009, 106: 19503 – 19508.
- [28] De Raedt T, Walton Z, Yecies JL, et al. Exploiting cancer cell vulnerabilities to develop a combination therapy for ras-driven tumors [J]. Cancer Cell, 2011, 20: 400 – 413.
- [29] Hu Y, Swerdlow S, Duffy TM, et al. Targeting multiple kinase pathways in leukemic progenitors and stem cells is essential for improved treatment of Phi leukemia in mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A., 2006, 103:16870 – 16875.
- [30] Lallemand-Breitenbach V, Guillemin MC, Janin A, et al. Retinoic acid and arsenic synergize to eradicate leukemic cells in a mouse model of acute promyelocytic leukemia [J]. J Exp Med, 1999, 189:1043 – 1052.
- [31] Paez-Ribes M, Allen E, Hudock J, et al. Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis [J]. Cancer Cell, 2009, 15: 220 – 231.
- [32] Casanovas O, Hicklin DJ, Bergers G, et al. Drug resistance by evasion of antiangiogenic targeting of VEGF signaling in late-stage pancreatic islet tumors [J]. Cancer Cell, 2005, 8: 299 – 309.
- [33] Chiu CW, Nozawa H, Hanahan D, et al. Survival benefit with proapoptotic molecular and pathologic responses from dual targeting of mammalian target of rapamycin and epidermal growth factor receptor in a preclinical model of pancreatic neuroendocrine

- carcinogenesis [J]. J Clin Oncol, 2010, 28: 4425–4433.
- [34] Schmitt CA, Rosenthal CT, Lowe SW, et al. Genetic analysis of chemoresistance in primary murine lymphomas [J]. Nat. Med., 2000, 6(9): 1029–1035.
- [35] Dankort D, Curley DP, Carlidge RA, et al. Braf (V600E) cooperates with Pten loss to induce metastatic melanoma [J]. Nat Genet, 2009, 41: 544–552.
- [修回日期]2015-04-20

简 讯

实验动物福利操作技术规范网站建设说明

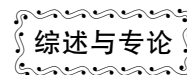
“实验动物福利操作技术规范网站”(Procedures With Care)是中国首例实验动物福利领域在线学习网站(网址:<http://pwc.cnilas.org>),由中国实验动物学会(CALAS)、中国医学科学院医学实验动物研究所信息中心和英国防止虐待动物协会(RSPCA)联合翻译制作。

网站于2013年10月开始试运行,2014年1月24日正式开通。网站提供一系列的技术资料供研究人员学习动物研究中常用的最佳操作技术方法。主要涉及小鼠和大鼠,它们是使用量最多的实验动物。未来还会增加其他有关小鼠和大鼠的操作技术和其他实验动物品种的技术资料。

网站建设目的是通过改善给药和无菌操作技术提高实验动物福利水平。技术内容经过欧洲及北美实验动物同行商议一致。除了文字外,还配了大量图片和视频资料。中国实验动物学会还计划联合中国医学科学院医学实验动物研究所信息中心、英国防止虐待动物协会等组织、机构建设一系列的实验动物技术培训在线学习网站,为中国实验动物领域继续教育和在线培训开拓一个新领域。

网站中的技术资料由英国纽卡斯尔大学(Newcastle University)编写,英国动物技术研究所(the Institute of Animal Technology, IAT)和英国实验动物3R研究中心(The National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research, NC3R)提供支持。

(下转第74页)



浅谈乳鼠在儿童药药理毒理学研究中的应用

朴成玉, 于 敏, 刘永武, 刘树民

(黑龙江中医药大学 药物安全性评价中心, 哈尔滨 150040)

【摘要】 实验动物是医学生物学研究的重要手段, 儿童是特殊的用药人群, 故儿童药实验研究中选择合适的实验动物进行药理毒理学研究是保证新药研究科学性的关键问题。作者通过查阅大量文献, 总结乳鼠在儿童常见疾病及其治疗药物药理学研究和毒理学评价中的应用情况, 归纳乳鼠在药理毒理学研究中存在的问题, 提出解决方法, 为儿童药研发中受试动物的应用提供参考。

【关键词】 儿童用药; 乳鼠; 药理; 毒理

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0071-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 006. 014

Application of suckling mice in pediatric pharmacological and toxicological studies

PIAO Cheng-yu, YU Min, LIU Yong-wu, LIU Shu-min

(Heilongjiang University of Chinese Medicine Center for Safety Evaluation of Drugs, Harbin 150040, China)

【Abstract】 Research on laboratory animals is an important issue in biomedicine. Children are a special drug-using population. The selection of suitable experimental animals is a key issue to ensure the scientific quality of research for pediatric drugs. Based on the review of a large number of literature, the authors summarized the application of suckling mice in the pharmacological research and toxicological evaluation of pediatric drugs for the treatment of common diseases in children. We also summarized the existing problems in pediatric toxicology and proposed solutions for providing a reference of test animal application in pediatric drug research.

【Key words】 Pediatric drugs; Suckling mice; Pharmacology; Children; Toxicology

随着“夺命退烧药——尼美舒利”的出现、“叫停鱼腥草注射液事件”和“不合理使用抗生素致聋”等儿童药不良反应的频发, 儿童用药安全已成为我国乃至全球医药行业最关注的问题。目前我国儿童药存在品种少、剂型规格缺乏、儿童和成人用药不区分、不合理用药、不良反应发生率高等问题, 而儿童药研发不足为其主要原因^[1,2], 给我国儿童带来健康隐患。儿童为特殊用药人群, 处于生长发育

阶段, 生理生化功能与成人差异较大, 同一药物在儿童和成人体内的动态过程(吸收、分布、代谢、排泄)过程也不同^[3], 故儿童药药理毒理作用应根据适用儿童年龄选用不同生长发育阶段的实验动物进行研究, 但关于实验动物适用情况的报道较少。本文通过查阅文献, 就乳鼠在儿童常见疾病研究和药理毒理学研究中应用情况进行整理和总结, 为儿童用药的研发提供研究方法和技術。

【基金项目】 黑龙江省应用技术研究及开发计划项目(PC13S14)。

【作者简介】 朴成玉(1980-), 博士, 主要从事中药药物安全性评价。E-mail: anping0451@126.com。

【通讯作者】 刘树民(1963-), 教授, 博士生导师, 主要从事中药安全性评价。E-mail: keji-liu@163.com。

1 乳鼠在儿童常见疾病研究中的应用

手足口病是肠道病毒感染而得的急性传染病,3 岁以下儿童为主,多数以发热出诊为主要特征^[4,5]。防治手足口病研究中多位学者选用 ICR、KM、BALB/c 不同日龄的乳鼠接种 CoxA16 或 EV71 病毒复制手足口病模型,观察给药后乳鼠的体重、死亡率、生命延长率、脑、后肢骨骼肌、肠组织中 EV71 病毒 VP1 蛋白表达等,研究对感染手足口病乳鼠的防御作用及其作用机理^[6-8]。袁媛等^[9]分别于交配前和受孕时注射免疫 ICR 雌鼠 EV71 VLP 疫苗、CVA16 VLP 疫苗和双价 VLP 疫苗,使母鼠产生抗体,产下仔鼠第 5 天乳鼠接种 EV71 和 CVA16 病毒,观察单价和双价疫苗对 5 日龄手足口病模型乳鼠的免疫保护作用,发现 EV71 VLP 疫苗、CVA16 VLP 疫苗和双价 VLP 疫苗均能通过母鼠传代于仔鼠降低乳鼠的死亡率,改善体重下降趋势。

早产儿视网膜病变是早产儿和低出生体重儿的常见疾病,也是儿童致盲的主要原因之一^[10],氧诱导视网膜病变(oxygen-induced retinopathy, OIR)动物模型是研究早产儿视网膜病变的常用手段,由于乳鼠的视网膜血管尚未发育完全,故为研究早产儿视网膜病变的良好动物^[11],C₅₇BL/6J、SD 乳鼠常用于 OIR 的研究。文献报道^[12-15],7 日龄 C₅₇BL/6J 乳鼠置高氧(75% ± 2%)条件下饲养 5 d,正常氧气条件下饲养 5 d,能成功复制 OIR 动物模型,研究发现缺氧条件能促进 OIR 乳鼠视网膜组织血管新生,降低抗氧化能力,缺氧条件下巨噬细胞具有促进新生血管形成作用。白内障是儿童致盲的主要原因,多位学者选用 12 日龄 Wistar 或 SD 乳鼠颈背部皮下注射亚硒酸钠溶液复制硒性白内障模型^[16,17],考察药物对硒性白内障的防治作用。胎儿酒精综合征是因孕期饮酒过量导致的新生儿发育异常综合征,唐永萍等^[18]研究发现 5 日龄 C₅₇BL/6J 颈部皮下注射 2 次 20% 酒精,两次给药间隔 2 h,给药第 2 天导致新生小鼠视网膜神经节细胞层神经元明显丢失。

新生儿缺血缺氧性脑损伤是新生儿窒息引起死亡或智力障碍的原因之一,研究报道^[19,20],不同日龄乳鼠麻醉手术结扎单侧颈总动脉,恢复后置低氧(氧/氮为 8/92)环境下饲养,可成功复制新生儿缺血缺氧性脑病模型,模型乳鼠学习记忆能力、平衡能力降低,出现脑水肿症状。

肠易激综合征是胃肠功能紊乱的慢性功能性疾病,而内脏高敏性是 IBS 的主要发病原因。汪建伟^[21],梁万年^[22]等通过自幼年期刺激动物(8 日龄 Wistar 乳鼠、14 日龄 SD 乳鼠)肠道,增加成年后的内脏敏感性,成功复制 IBS 大鼠模型。

人类轮状病毒(HRV)和产肠毒素大肠杆菌是 2 岁以下婴幼儿发生腹泻的最主要病因,姜晓等选用 5 日龄 NIH 乳鼠灌胃 HRV 病毒成功造模后,连续给药 5 d 七味白术散发现该药物能清除感染乳鼠肠道内 HRV,明显改善乳鼠小肠粘膜上皮细胞病变^[23];赵姝静等^[24]在抗大肠杆菌肠毒素卵黄抗体的研究中每只 3 日龄 KM 乳鼠灌胃给予 100 μL 致病菌和抗体混合物,验证了抗体对耐热肠毒素的中和作用。

2 乳鼠在药理学研究中的应用

胡金芳等将 7 日龄 C₅₇BL/6J 乳鼠置 75% ± 2% 用高氧箱内饲养 5 d,正常空气中饲养 5 d 复制 OIR 动物模型,治疗后发现渴络欣胶囊通过 HIF1-VEGF 信号途径抑制 VEGF 分泌,抑制新生血管生成,改善无灌注区的形成^[25]。张艳莎等^[26]发现来源于人脂肪间充质干细胞的条件培养基可以改善缺氧缺血脑损伤 7 日龄 SD 乳鼠移植神经干细胞的存活,减少其凋亡,降低活化的 caspase-3 表达,为治疗新生儿缺氧缺血脑损伤提供有效方法。新生儿缺氧性脑病是新生儿脑损伤中常见疾病,张艳等^[27]用珍宝丸干预 7 日龄 Wistar 乳鼠 7 d 后置缺氧(氧/氮为 8/92)箱内 1 或 4 h 复制缺氧性脑损伤模型观察脑组织,发现珍宝丸能明显改善治疗组脑组织结构,其作用机理可能与降低缺氧性脑损伤乳鼠脑组织中 p53 蛋白的表达有关。徐涛等^[28]首先结扎 7 日龄 SD 乳鼠颈总动脉,恢复 2h 后置低氧(氧/氮为 8/92)环境下 2.5 h 复制新生儿缺血缺氧性脑病模型,用电针治疗能促进 GFR 生儿的表达,具有较好的脑保护作用。

3 乳鼠在毒理学研究中的应用

草泽或等^[29]选用 5 日龄 ICR 乳鼠单次 ip 0.1 mL(生药 26 g/kg)或 0.1 mL/次连续 ip 给药 13 d 考察儿童药热毒宁注射液的单次和多次给药毒性,未见异常不良反应,可知该药物在临床生药剂量 2.23 g/kg 下安全。

陈祥鹏等^[30]将 CVA16 病毒从 1 × 10⁶ 按 10 倍稀释至 1 × 10² CCID₅₀/mL 接种于 2 日龄 ICR 乳鼠脑

腔感染,观察 21 d 内乳鼠的死亡情况,根据 Reed-Muench 法计算得 CVA16 病毒感染 ICR 乳鼠的 LD_{50} 为 $6.5CCID_{50}$,为手足口病模型制备提供接种病毒剂量依据。

徐培渝等^[31]连续观察 30 d 离乳 SD 大鼠体重、摄食量、肝、肾、脾、睾丸、卵巢等主要脏器,确定双性别 SD 大鼠的正常值范围,为药物毒理学研究提供正常参考值。

4 乳鼠在药理毒理学研究中存在的问题及展望

实验动物是指经人工饲养,对其携带微生物实行控制,遗传背景明确或者来源清楚,用于科学研究、教学、生产、检定以及其它科学实验的动物,是医学生物学研究的重要手段,常用实验动物包括啮齿类、非啮齿类、灵长类等,其中小鼠和大鼠为最常用的啮齿类实验动物。

儿童是特殊的用药人群,因其特殊的生长发育情况,药物在儿童体内的动态过程不同于成人,故儿童药研究应根据儿童常见疾病特点选择适宜的实验动物开展实验研究。经文献检索可知,目前关于幼龄实验动物生长发育成熟情况报道较少,乳鼠的生物学特征尚不清楚,尤其是解剖学和生理学特点不明确,因此在儿童药药理毒理学研究中如何有效结合用药儿童年龄、儿童疾病特征和乳鼠年龄、疾病在乳鼠的敏感性、动物模型稳定性,尽可能减少人类与实验动物种属间差异是促进儿童药研发成功的有效措施。

参考文献:

- [1] 郭志刚,吴彬,管晓东,等. 中国儿童用药研发现状及存在问题[J]. 中国新药杂志, 2014, 23(22): 2602-2606.
- [2] 吴世启,王强. 儿童用药现状浅析[J]. 中国药事, 2012, 26(7): 787-789.
- [3] 刘恩梅,陆权. 促进我国儿科临床合理用药[J]. 临床儿科杂志, 2014, 32(11): 1005-1007.
- [4] 刘瑞海,李晶,曲先锋,等. 需机械通气的危重症手足口病患儿临床特点及预后因素分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2015, 17(3): 249-253.
- [5] 胡茂红,陈盛恩,吴景文,等. 2009-2013 年南昌市重症手足口病疫情分析[J]. 中国病原生物学杂志, 2014, 9(11): 1025-1028.
- [6] 任庆杰,李敏,杨晓岚,等. Cox. A16 型手足口病乳鼠动物模型的建立及免疫、病理特征[J]. 中国兽医学报, 2013, 33(11): 1685-1690.
- [7] 杨倬,田波. 五肽对肠道病毒 71 型在人横纹肌肉瘤细胞和小鼠体内复制的抑制作用[J]. 药学报, 2014, 49(4): 457-462.
- [8] 郭姗姗,金亚宏,王意忠,等. 疏风解毒颗粒防治手足口病的体内外药效学研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2012, 18(2): 206-209.
- [9] 袁媛,刘鑫,周娅,等. 重组 EV71 和 CVA16 型手足口病双价 VLP 疫苗构建及免疫保护效果评价[J]. 免疫学杂志, 2014, 30(6): 469-473.
- [10] 欧阳丽娟,皮练鸿. 早产儿视网膜病变治疗研究进展[J]. 激光杂志, 2015, 36(2): 135-138.
- [11] 伍蒙爱,陈婕灵,王维,等. Apelin 及其受体和一氧化氮合酶在氧诱导的新生小鼠增生性视网膜病变中表达上调[J]. 中国病理生理杂志, 2013, 29(6): 1081-1085.
- [12] 潘琪琦,周容,刘晓铃. 改良的可定量氧诱导法建立视网膜新生血管小鼠模型[J]. 眼科研究, 2008, 26(7): 486-489.
- [13] 孟凡星,王志军,罗瑶,等. 氧诱导视网膜病变小鼠模型的建立与评价[J]. 暨南大学学报(医学版), 2011, 32(2): 199-204.
- [14] 余增洋,龚陈媛,张国庆,等. 氧诱导新生小鼠视网膜病变中血管新生和氧应激相关基因表达的变化[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(10): 1397-1401.
- [15] 高翔,王雨生. 巨噬细胞在小鼠氧诱导视网膜新生血管形成中的作用[J]. 眼科新进展, 2015, 35(3): 201-204.
- [16] 韩真真,李楠,郭丽丽,等. 两种黄芩苷眼用制剂防治晒性白内障作用研究[J]. 天津中医药大学学报, 2014, 33(3): 164-167.
- [17] 彭亚军,耿宇,张军,等. 二硫苏糖醇对大鼠晒性白内障的抑制作用[J]. 第二军医大学学报, 2007, 28(12): 1320-1323.
- [18] 唐永萍,杨阳,徐培,等. TO901317 修复酒精致新生小鼠视网膜节细胞损伤的实验研究[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(5): 376-380.
- [19] 陈刚,王伟哲,陈明钊,等. 新生幼鼠缺血缺氧性脑损伤模型的实验研究[J]. 中国康复理论与实践, 2012, 18(7): 612-614.
- [20] 毛娟,余加林,付雪梅,等. 新生大鼠缺氧缺血脑组织水肿及水通道蛋白 4 的表达变化[J]. 四川大学学报(医学版), 2014, 45(3): 386-389.
- [21] 旺建伟,殷越,隋方宇,等. 痛泻要方对内脏高敏性大鼠结肠 MC 活化与 5-HT 相关性影响的研究[J]. 中医药学报, 2013, 41(1): 82-85.
- [22] 梁万年,江涛,陈艳芬,等. 高良姜总黄酮对大鼠内脏高敏感性模型及镇痛作用研究[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(7): 263-267.
- [23] 姜晓,伍参荣,田雪飞,等. 七味白术散对人类轮状病毒感染乳鼠小肠黏膜上皮细胞的保护作用[J]. 中国中医药信息杂志, 2010, 17(5): 29-30.
- [24] 赵姝静,李丹丹,朱颖,等. 抗大肠杆菌肠毒素卵黄抗体的制备和鉴定[J]. 黑龙江畜牧兽医(科技版), 2014, 9: 22-26.
- [25] 胡金芳,王玮,吴建明,等. 渴络欣胶囊对缺氧诱导视网膜血管新生的抑制作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(10): 156-161.

- [26] 张艳莎, 杨印祥, 栾佐, 等. 间充质干细胞条件培养基对新生大鼠缺氧缺血脑损伤移植神经干细胞凋亡的影响 [J]. 中华细胞与干细胞杂志(电子版), 2014, 4(3): 175-182.
- [27] 张艳, 石博, 黄可欣, 等. 珍宝丸对缺氧性脑损伤新生鼠脑组织中 p53 蛋白表达的影响 [J]. 中国妇幼保健, 2014, 29: 1258-1260.
- [28] 徐涛, 王琳, 万浩, 等. 电针对缺氧缺血性脑病模型大鼠 GFR α 1 干预研究 [J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(3): 480-482.
- [29] 草泽彥, 常秀娟, 赵忠鹏, 等. 热毒宁注射液抗 A16 型柯萨奇病毒的研究 [J]. 中草药, 2014, 45(10): 1450-1455.
- [30] 陈祥鹏, 檀晓娟, 张勇, 等. 柯萨奇病毒 A 组 16 型灭活抗原对小鼠免疫保护作用的研究 [J]. 病毒学报, 2014, 30(3): 226-232.
- [31] 徐培渝, 刘晓刚, 王正书, 等. 成都地区 SD 大鼠参考值范围的探讨(一)——体重和主要脏器正常参考值 [J]. 现代预防医学, 2005, 32(9): 1055-1056.

[修回日期]2015-05-18

(上接第 70 页)

简 讯

实验动物福利操作技术规范网站

Procedures With Care

给药技术 无菌技术 英文版

您是第3841位访客

欢迎来到实验动物福利操作技术规范网站。本网站提供一系列的技术资料供研究人员学习实验动物研究中常用的最佳操作技术方法。主要涉及使用最多的实验动物小鼠和大鼠。未来本网站还会增加其他有关小鼠和大鼠的操作技术和其他实验动物的技术资料。

本网站中的技术资料是由英国纽卡斯尔大学 (Newcastle University) 编写, 同时动物技术研究所 (the Institute of Animal Technology) 和英国实验动物3R研究中心 (NC3R) 提供支持。

本网站视频可以下载, 但要遵从“使用条款”中的规定, 不得用于商业用途。如果视频不能正常播放, 请加载Flash插件。网页中的视频链接不能下载时, 请点击“英文对照”, 去对应的英文网站下载。请您把对本网站的意见和建议反馈给我们 (infor@cnilas.org), 以便于我们改进工作。



■ 给药技术



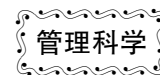
本网站包括一系列技术指南供研究人员学习实验动物给药技术。

■ 啮齿类外科无菌技术



这是一份全面的帮助研究人员使用最佳操作方法开展实验啮齿类动物的手术无菌技术的指南。

支持 使用条款 版权所有 ©2015英国纽卡斯尔大学。保留所有权利。



动物实验中的生物安全问题

魏 强

(北京协和医学院比较医学中心, 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)

【摘要】 实验动物用于病原性研究越来越多, 生物安全问题也随之显现出来, 有时还会非常严重。近十年来, 实验动物相关法规、标准不断完善, 加之实验室生物安全标准进一步提高, 为保障动物实验的生物安全, 提供了良好的控制要求。但是, 目前依然存在一些认识上、操作和管理上的问题, 如实验动物和实验用动物的使用要求、动物大小与饲养设备的安全控制、福利要求与生物安全的取舍侧重等方面。本文就以上问题, 进行了分析, 并提出一些观点, 以期为良好控制动物实验中的生物安全起到借鉴作用。

【关键词】 动物实验; 生物安全

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 06-0075-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.006.014

Biosafety issues in animal experiments in China

WEI Qiang

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

【Abstract】 Animal experiments in pathogen studies such as avian influenza viruses are increasing in recent years. Different Animal Biosafety Level (ABSL) facilities have been established completely according to the national standards for biosafety. However, issues of personal protection, experiment management, risk recognition and control, animal care with infectious pathogens, etc. should be strengthened. In this review, suggestions and comments are proposed, and hopefully, are useful for related guideline compilations.

【Key words】 Animal experiment; Laboratory animals; Biosafety

实验动物用于病原性研究越来越多, 生物安全问题应当引起重视。SARS 之后, 生物安全相关法规、标准不断完善, 加之实验室生物安全标准进一步提高, 为保障动物实验的生物安全, 提供了良好的控制要求。但是, 目前依然存在一些认识上、操作和管理上的问题, 如实验动物和实验用动物的使用要求、动物大小与饲养设备的安全控制、福利

要求与生物安全的取舍侧重等。通过问题分析, 提出一些观点, 以期为良好控制动物实验中的生物安全起到借鉴作用。

1 实验动物的生物安全特性

“标准化实验动物”是指以科研需要为目的的、人工饲养的有清楚的微生物、寄生虫学背景(即体

【基金项目】 卫计委行业基金: 新时期我国实验室生物安全重要问题及其对策研究(201302006)。

【通讯作者】 魏强(1964-), 男, 研究员, 主要研究方向: 微生物病原学, E-mail: Weiqiang 0430@sohu.com。

内病原微生物,寄生虫的携带\控制状况)和遗传学背景(即品系和品种)的实验动物。“人工饲养”涉及的环境设备因素,“携带微生物”和“遗传背景明确或者来源清楚”涉及的微生物、寄生虫和遗传因素,都会直接影响实验动物质量。

实验动物具有两大特点:一是为人类研究需要被改变,似像非像原种动物,成为“病态异类”;二是由于遗传改变,原有抵抗病原的能力呈现不同程度下降,对病原谱系发生改变,更易得病。实验动物、分泌物、排泄物、样品、器官、尸体等控制、操作不当会变成病原污染的扩大器,造成更大范围传播,因此,了解实验动物生物安全特性,就应该首先要做好思想准备,注重病原防控,防备于未然。

实验用动物由于种类繁多,目前尚无国家相应标准,病原体携带情况十分复杂,特别是有些严重人兽共患病病原宿主性动物严重威胁实验人员和环境的安全,应引起高度重视,制定通用性实验要求。

2 实验动物使用要求和安全保障

实验动物的使用应按国家相应的法规、制度、指南和标准进行。

普通级动物一般在普通环境或更好环境中繁殖和使用。普通动物由于排除的病原种类较少,主要排除对人体和动物健康造成危害的人兽共患病病原和动物烈性传染病的病原,残留微生物、寄生虫对动物的干扰也较大。考虑到繁育环境不是十分严格,一些危害较大的人兽共患病和动物烈性传染病有些要求必须免疫,达到保护动物和使用者的安全目的,但同时,干扰了动物机体免疫状态,对实验本身,尤其是免疫学、病原学研究可能造成程度不同的影响,因而,国外发达国家已经不使用此类动物。我国由于发展不平衡,完全取消普通动物的使用会造成诸多困难,因而规定,这类动物只适用于教学示范,一般不可用于科研性实验使用。

清洁级实验动物要求在屏障环境中繁殖和使用。清洁动物由于排除了对动物危害大和对科学研究干扰大的主要病原种类,因而,基本上能满足动物实验的要求。清洁级动物一般要求不能通过使用疫苗的方法控制动物病原性疾病,因为疫苗可诱发机体不同程度的免疫反应,影响实验结果,尤其是免疫学实验。理论上讲,清洁级动物要求在屏障环境中繁殖,发生感染的几率非常低。考虑到我

国实际国情,在不能提供充足 SPF 动物使用时,这类动物可被认为是低级别 SPF 动物,在我国作为标准实验动物,可用于科研性实验使用。

无特定病原体级动物(SPF)要求在屏障或隔离环境中繁殖和使用。在很大程度上满足了动物实验的要求。同时要求不能通过使用疫苗的方法控制动物病原性疾病,因而排除了因疫苗诱发的免疫反应而影响实验结果,基本实现了“实验动物应该处于、保持病原不可触及的机体状态”要求。理论上讲,SPF 动物要求在屏障或隔离环境中繁殖,发生病原感染的几率非常低。这类动物是较理想的实验动物,通常作为标准实验动物用于广泛科研使用。

无菌级实验动物体外、体内不存在任何实验室方法可检测到的外源性活性生物体。无菌动物要求在隔离环境中繁殖和使用,空气、饲料、饮水经过严格的消毒灭菌处理维持无菌环境。由于来源困难,目前尚未有用该类动物的系统病原研究应用。

实验用动物的使用原则上应有人兽共患病检测和控制,使用中应视为“生物体危险源”动物,必须加强生物安全防护措施。

3 实验动物病原体检测和检疫

使用的实验动物或实验用动物应经过质量监测,检疫合格,来源明确。动物实验之前应了解拟使用动物可能的携带、感染病原;动物必须排除人兽共患病病原污染,并做好防控。实验室应动态监控实验动物污染或携带微生物状况,及时了解实验动物健康状态,并采取一定综合措施保证实验动物安全。实验动物病原体检测和检疫强调:(1)实验动物饲养必须控制在《实验动物环境及设施标准》要求的饲养条件内,将污染的可能性降到最低;(2)必须按照《实验动物 微生物学等级及监测》和《实验动物 微生物学检测方法》两部分内容进行定期检测监控;(3)应采取相应卫生检疫、生物安全及管理要求对不合格、不健康实验动物进行相应处理,确保使用的实验动物质量合格。

微生物检测标准和指标是实验动物微生物质量控制的依据,具体检测要求及项目,包括动物的外观指标、病原菌指标和病毒指标,同时要求寄生虫检测同步进行。动物健康外观指标是指实验动物可以通过临床观察到的外观健康状况,如活动、精神、食欲等有无异常;头部、眼睛、耳朵、皮肤、四肢、尾巴、被毛等是否出现损伤、异常;分泌物、排泄

物等是否正常。实验动物要求外观必须健康、无异常,实验室检测合格。为确保生物安全,必须使用合格的实验动物用于实验。

实验用动物应参照类似要求或国家现有相关法规、标准等进行检测和检疫,最大限度上限定病原微生物的污染和扩散。

4 实验动物种类、病原种类和防护要求

实验动物体型不同,饲养设施、设备环境及安全控制存在客观差异。小型动物小鼠、大鼠、地鼠和豚鼠等饲养设备如 IVC、隔离器等条件较好,一般易于控制。中型动物兔、犬、猴等受到体型、特性等限制,应尽量做到有效控制。大型动物羊、牛、马等实验用动物尚无国家微生物、寄生虫等检测标准,实验应按相关要求要求进行。

病原感染性动物实验的设施、设备要求及人员防护取决于病原种类,即病原的烈性程度。高致病性的一、二类病原要求在 ABSL-3 或 ABSL-4 高等级实验室中进行。动物饲养应控制在能有效隔离保护的设施或环境内,如 IVC、隔离器、单向流饲养柜、特定实验室等。三类病原感染性动物实验应采用 IVC 或同类饲养设备进行饲养;四类病原应严格控制实验环境,有条件或必要时应采用 IVC 饲养。动物密度不可过高,饮水须经灭菌处理。动物的移动应做到每个环节实行有效防护,避免病原污染环境。

5 动物实验的安全操作和控制

在进行动物实验中,应该重点注意三方面内容:一是正确选择实验动物,对所用动物必须了解其整体概况,特别是微生物携带情况、免疫情况;二是保证动物应享有的福利,在使用动物进行实验研究时,尽量避免给动物带来不必要的痛苦或伤害。痛苦和伤害往往使动物活动增加、暴露增大,增加生物安全风险。三是在使用动物进行感染性病原研究时,必须保护好实验人员和周围环境,防止感染和污染。所以要求实验人员必须了解动物实验的原则和要求。

动物实验不同于体外实验,任何对动物带来的不良操作,都会影响实验结果或造成生物危害。要求所有从事实验动物和动物实验的人员,包括临时实验人员,必须经过一定时间的生物安全专业培训,考试合格,并取得上岗证后,才能进行动物实验。动物实验的安全控制要求实验人员应该具有

良好的动物实验的能力,包括动物饲养能力、对动物认知能力、操作能力、信息采集能力、分析能力、关怀能力、设施设备掌握能力和生物安全防护能力。具备了这些能力,才能完成良好的动物实验,同时保证实验中的生物安全。

动物实验不可避免要进行病原感染性实验,也是感染性动物模型制备的基础。比如艾滋病动物模型要用到猴,流感病毒要感染小鼠、雪貂;结核模型动物有小鼠、豚鼠和猴等;肝炎模型动物有树鼩、转基因小鼠、土拨鼠等。做这些感染性实验既要了解病原的危害,也要了解动物感染后的危害,和可能的生物安全风险,操作中要提高控制能力,降低风险。

动物活体检测、外科手术、活体采样、解剖取材等技能更是要求人员能够熟练掌握。必须经过严格培训,才能实际应用。能力,是安全的保证。

6 动物实验的生物安全和福利、伦理审查

动物实验单位应设立生物安全委员会和实验动物使用管理委员会,负责咨询、指导、评估、监督实验室的动物生物安全活动相关事宜以及动物实验活动安全管理。一般实验人员往往注重动物实验本身,不太关注或不够专业懂得动物福利、伦理和生物安全要求。因此,国际上提倡成立动物实验福利、伦理委员会,负责审查动物实验,对每个环节把关。

动物实验福利、伦理审查的基本原则是兼顾动物福利和人员利益,在综合评估动物所受的伤害和使用动物的必要性基础上进行科学审查。涉及动物保护、动物福利、伦理、科学需要、生物安全等各方面内容。遵循动物保护原则,禁止无意义滥养、滥用、滥杀实验动物,制止没有科学意义和社会价值或不必要的动物实验。

动物福利原则强调保证实验动物的权利。伦理原则,既要考虑动物的利益,善待动物,又要保证实验动物项目的科学性。生物安全原则提倡要保证实验人员和环境的安全。

动物实验方案审查的内容应该包括:实验人员是否符合操作要求;设施设备是否符合动物要求;饲料、垫料、饮水是否符合动物要求;动物运输是否符合要求;实验方案是否符合动物福利要求;动物处置是否符合伦理规范;动物处死是否符合安乐死原则;动物尸体处理是否符合无害化环保要求等等

方面。这些方面,都要有生物安全作为保障。

舒适措施(环境丰荣):福利提倡提供必要的玩具,特别是犬、猴。有条件时可以给动物增加音乐和色彩环境,对于中大型实验动物实验会产生较好效果。尽量保证恒温恒湿、通风换气、噪声、光照度等的合理,同时,设置必要的活动场地。但这些要求,增加了生物污染的范围,应该注意玩具等的消毒灭菌。高等级病原动物实验时,应以生物安全为第一要素,可减少或不提供玩具等。中型以上动物在病原感染实验时,不宜提倡配合性训练,应麻醉后再进行操作。

7 无脊椎动物实验室要求

无脊椎动物由于个体小,活动力强,易于藏匿并携带病原体广泛、难于控制等特点,实验室应能

有效控制动物本身的危害或可能从事病原感染的双重危害。应具备良好的防护装备、技术和功能,能有效控制动物的逃逸、扩散、藏匿等活动。特别是从事节肢动物(尤其是可飞行、快爬或跳跃的昆虫)的实验活动,应采取的主要措施包括:配备适用的捕虫器、灭虫剂和喷雾式杀虫装置。安装防节肢动物逃逸的纱网;设制冷温装置可以通过减低温度及时降低动物的活动能力;配备适用于放置装裱、螨容器的油碟;具备操作已感染或潜在感染的节肢动物的低温盘等一系列措施,防止动物失控。应配备消毒、灭菌设备和技术,能对所有实验后废弃动物、尸体、废物进行彻底消毒、灭菌处理;人员应根据动物种类危害和病原危害,以及风险评估结果采取相应防护水平。

简 讯

《中国实验动物学报》继续获得“中国科协精品科技期刊工程项目”资助

《中国实验动物学报》获得 2015 ~ 2017 年“中国科协精品科技期刊工程 - 学术质量提升项目”资助,这是本刊继 2013 ~ 2014 年“中国科协精品科技期刊工程”之后第 2 次获得该项目资助。

“精品科技期刊工程项目”由中国科协组织,目的是提升中国科协科技期刊的学术影响力和核心竞争力,发挥示范引领作用,更好地服务科技创新和广大科技工作者,发挥科技期刊在创新驱动发展战略中的重要支撑作用。2015 ~ 2017 年为中国科协精品科技期刊工程项目第 4 期。

《中国实验动物学报》是由中国科学技术协会主管,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办的国家级学术刊物。是我国医学实验动物科学领域唯一的学报级期刊。本刊创刊于 1993 年,创刊以来,及时地反映了我国实验动物科学领域的重要研究成果,为本学科发展发挥了积极的作用。设有研究论著、研究快报、综述、进展、平台建设等栏目。

主要刊载有关实验动物和动物实验的理论专著、科研成果论文、科学实验新方法、新材料、实验动物新资源开发、新的动物品系的培育和应用以及与实验动物有关的其他学科的科学论述。

本刊获得的“精品科技期刊工程项目”资助,将进一步促进期刊的传播与发展,并推动本刊对生物医药的支持作用,对于提高公众对实验动物的认知、增强实验动物福利、促进我国实验动物技术的发展,向世界展示我国实验动物科学的创新研究,都具有重要意义!

实验动物的 10 个“不愿意”

魏 强

(中国医学科学院医学实验动物研究所,北京 100021)

(接上期)

二、它们对饥渴之苦可以说不

实验动物种类不同,对食物、饮水的要求不尽相同。充足的饮食,是保证动物正常、健康的基本营养要求。除非有特殊要求或实验需要,只要动物存在,就应充分满足食物、饮水要求。

啮齿类动物需要磨牙,因此,供啮齿类动物食用的颗粒饲料非常干硬,一般为全价饲料,能满足营养需求,同时满足动物磨牙需要,千万不能好心办坏事,将干硬饲料泡软后喂食。

由于豚鼠、兔、猴机体不能完全合成维生素 C,鼓励添加清洁的富含维生素 C 的水果和蔬菜。

动物,特别是啮齿类动物应该满足随时采食和饮水需要,不可限定给食、给水,更不能随意或忘记供给饮食。充足的饮食,是保证动物身心健康的最基本条件。动物身体和心理依赖最大的就是饮食,饮食缺乏是引起动物不满、紧张、恐惧、抑郁等精神紊乱最根本因素。保障饮食,是动物最基本的权利和福利要求。

曾经发生过这样荒唐的事情:学生做小鼠实验,认为小鼠吃不了多少东西,计划每天给两粒颗粒饲料。而且分工不明,甲同学以为乙同学喂了,乙同学以为甲同学喂了,结果可想而知。小鼠日渐消瘦,实验结果错误百出,可能造成的原因都分析到了,似乎也得出了结论,但小鼠还是一周后陆续死亡。直到收拾残局时,才发现饲料袋还没打开,小鼠被生生饿死了。这样的事情本不应该发生,但动物的饮食完全依赖于人,遭受饥饿的事情时常发生。

常见使动物遭受饥渴之苦的行为有:有意限制动物饮食,为了配合训练特定时间给食,惩罚动物,提供劣质食物,不当食物,随意改变食物种类,忘记每天补充饮食等。

三、它们对困顿不适可以说不

实验动物尽管来源、改良于原种动物,但保持

着原种动物与生俱来的生物学特性。所有动物的本能活动能力往往超过人类,某种程度上讲是被动生存。

生活环境、空间的改变,会严重影响它们的本能发挥,进而影响精神状态,导致生理功能等变化。对实验动物来讲,空间条件是外部环境主要影响因素,直接造成实验动物困顿不适。如将大、小鼠等啮齿类动物放入过小笼具中、饲养密度过大时,动物感到“领地”受到威胁,会不安、紧张,严重时互相打斗、撕咬。会造成孕鼠流产,母鼠撕咬、吞食乳鼠。

曾经见过有人将幼小的大鼠饲养在小鼠笼中,一直到大鼠长大,狭小空间使大鼠长期不能转身,尾巴一直处于弯曲状态,尾尖部坏死,甚至脱落。垫料也不经常更换,几乎为大鼠的排泄物。大鼠周身被毛污秽不堪,哪里还是实验动物?!

犬和灵长类等较大动物对空间要求更高,应该能转身,自由活动。曾见过由于猴笼过低,猴被饲养半年后,放出后四肢不能伸直了。这种身心摧残、困顿无望的状态绝对应该避免。

犬应该尽可能实现定时“放风”(除非烈性病原等研究受限),并和实验者有一定时间的交流,使其处于健康状态。在美国、欧洲等地,做犬实验时,一般要求实验人员从实验开始前一个月就要与犬接触、认识、交流,并使受试犬渐进适应实验环境。不可实验当天才去领犬、操作,造成动物身心不适,处于应急状态。

良好的实验环境、空间不仅能满足动物活动需要,还应该丰富动物活动需求。如小鼠等啮齿类动物喜欢钻洞,应提供洞穴玩具。灵长类动物好动,应提供玩具和不锈钢镜,使它们在相对康乐的环境中生存。

常见造成动物困顿不适的行为有:很多动物拥挤在狭小空间,不按国家标准提供实验空间;设施、设备偷工减料、不合格,尺寸过小。不理解动物的环境、空间需求、过分实行物理限制等。

(待续)