

ISSN 1005-4847

CN 11-2986/Q

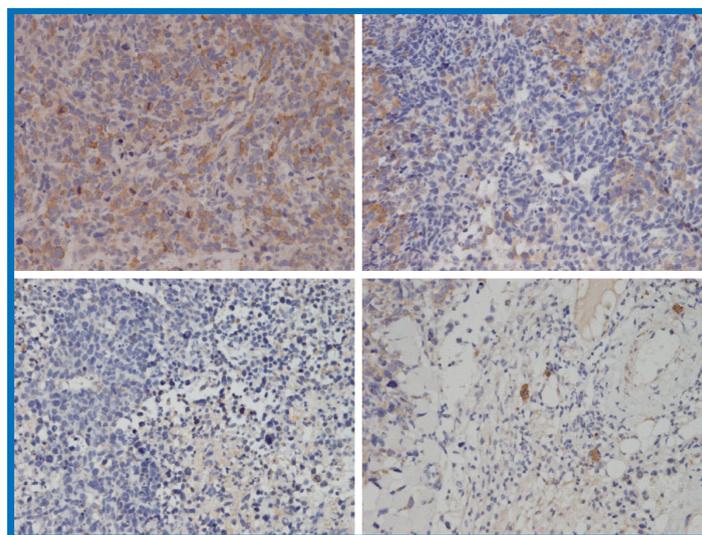


ACTA LABORATORIUM
ANIMALIS SCIENTIA SINICA

中国实验动物学报

ZHONGGUO SHIYAN DONGWU XUEBAO

第23卷 第3期 / Vol.23 No.3



数据库:

中国科学引文数据库CSCD

中国科技论文统计源期刊

世界卫生组织西太平洋地区医学索引

中国核心期刊(遴选)数据库

中国学术期刊综合评价数据库

中国生物医学文献数据库

万方数据资源系统中国数字化期刊群

美国化学文摘

主办单位:

中国实验动物学会

中国医学科学院医学实验动物研究所

ISSN 1005-4847



2015

3

中国实验动物学报

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

双月刊 1993年6月创刊

第23卷 第3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
中国实验动物学报编辑委员会

出版与发行
中国实验动物学会
100021,北京市朝阳区潘家园南里5号
电话:(010)67779337
传真:(010)67770690
E-mail: a67761337@126.com

网址: <http://zgswdw.alljournal.ac.cn/sydwbyjyx/ch/index.aspx>

照排
同方知网(北京)技术有限公司

印刷
北京昌平百善印刷厂

邮发代号
2-748

订购
中国实验动物学报编辑部
100021,北京市朝阳区潘家园南里5号

广告经营许可证号
京朝工商广字第8131号

定价
每期20.00元,全年120.00元

中国标准连续出版物号
ISSN 1005-4847
CN 11-2986/Q

2015年版权归中国实验动物学会所有
本刊已加入万方数据网络、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、中国科学引文数据库、美国化学文摘、世界卫生组织西太平洋地区医学索引等数据库,在本刊所支付的稿费中已包含上述网站著作权使用费。编辑部有复制权、发行权、汇编权以及信息网络传播权。
本刊电子版出版发行合作: 中邮阅读网: www.183read.com

本期执行主编 赵德明
本期责任编辑 李继平
英文编辑 周传农

目次

研究报告

- 顺铂联合氟西汀对肺癌伴抑郁小鼠干预的研究[△] 李密辉,吴晓,魏凯,林燕华,等(221)
- 小鼠早期肺腺癌模型的建立 肖时满,张玉,强金伟(227)
- 野生小鼠来源1号染色体替换系小鼠的生长表型
与血液生化检测 高逸,徐伟,徐福意,等(233)
- 肿瘤对小鼠肾上腺皮质细胞胆固醇稳态分子表达的影响 潘志强,方肇勤,卢文丽,等(239)
- 低频电刺激对不同动物血内激素水平的影响 俞发荣,宁晓希,俞文,等(245)
- 小鼠粪便及肠道各部位内容物细菌群落结构差异分析 武亚琦,钟根深,吴敏娜(249)
- 氨基酸转运载体 LAT1 对小鼠胎盘早期建立的影响 马婧,谭毅,谭冬梅,等(256)
- 椎间盘脱出模型大鼠脊髓血管生成因子 mRNA 的
表达变化及电针对其影响 吴伟澎,李伟,程鹏,等(261)
- 一种 gRNA 快速合成及检测方法的建立 杜建勇,邓然,高虹,等(267)
- 心理应激致孕鼠乳腺发育不良及雌/孕激素和受体水平异常 王瑞琼,吴国泰,刘峰林,等(272)
- 电针对脑缺血/再灌注模型大鼠双侧脑区 IL-1 β 、
ICAM-1 表达的影响 宋映周,孙琳琳,任映贞,等(278)
- 屈光度和眼轴长度对豚鼠视网膜神经纤维层厚度
和视乳头形态的影响 李涛,周晓东,江瀚然,等(285)
- 电针介导 eNOS 动员内源性 EPCs 促 MCAO/R 大鼠
脑内血管再生 朱艳含,罗勇,胥虹贝,等(291)
- 恒河猴 P21 基因在 COS-7 细胞中沉默位点的验证 李雨函,苏静芬,张晨,等(297)
- 系统性念珠菌感染小鼠模型的制备 吴玉娥,李航,陈梅玲,等(301)
- LPS/D-gal 诱导小鼠急性肝炎模型及 mTOR 信号的变化 李晓菲,陶玉芬,刘建生,等(306)
- 传统中药补肾固筋方对豚骨性关节炎 IL-1、
TNF- α 的作用机制 张冲,王恒树,阚秀莲,等(312)
- PPAR α 转基因小鼠在药物毒性评价中的应用 贺银丽,郭珣,赵显莉,等(316)

综述·进展

- 抑郁症动物模型及评价方法研究进展 薛涛,邬丽莎,刘新民,等(321)
- 实验动物环境丰富化 李军延,刘帅(327)

Δ :封面文章

ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA

Bimonthly, Established in June 1993

Volume 23 Number 3, June 30, 2015

Responsible Institution

China Association for Science and Tecnology

Sponsor

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

Editor-in-Chief

QIN Chuan(秦川)

Editing

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,
Beijing 100021
Tel: (010)67779337 Fax: (010)67770690
E-mail: a67761337@126.com

Publishing

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,
Beijing 100021
Tel: (010)67779337 Fax: (010)67770690
E-mail: a67761337@126.com

Undertaker

Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of
Medical Sciences
Department of Laboratory Animal Sciences, Peking Union
Medical College

Printing

Baishan Printing House of Changping, Beijing

Distributor and Mail-order

Editorial Office of ACTA LABORATORIUM ANIMALIS SCIENTIA SINICA
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District,
Beijing 100021
Tel: (010)67779337 Fax: (010)67770690

CSSN

ISSN 1005-4847
CN 11-2986/Q

Copyright 2014 by the Chinese Association for Laboratory
Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- Interventional effect of cisplatin combined with fluoxetine on mice bearing
Lewis lung cancer with depression
..... *LI Mi-hui, WU Xiao, WEI Kai, et al* (221)
- Establishment of a mouse model of early lung adenocarcinoma
..... *XIAO Shi-man, ZHANG Yu, QIANG Jin-wei* (227)
- Detection of growth phenotype and blood biochemical parameters of wild
type-derived chromosome 1 substitution mouse strain
..... *GAO Chuan, XU Wei, Xu Fu-yi, et al* (233)
- Effect of tumor size on the expression of adrenal cholesterol homeostasis mol-
ecules in H22 hepatoma-bearing mice
..... *PAN Zhi-qiang, FANG Zhao-qin, LU Wen-li, et al* (239)
- Effects of low frequency electrical stimulation on blood hormone levels in dif-
ferent animals ... *YU Fa-rong, NING Xiao-xi, YU Wen, et al* (245)
- Differential analysis of the bacterial community composition in mouse feces
and intestinal contents
..... *WU Ya-qi, ZHONG Gen-shen, WU Min-na* (249)
- Effect of LAT1 on early placenta formation in mice
..... *MA Jing, TAN Yi, TAN Dong-mei, et al* (256)
- Changes of expression of angiogenic factor mRNA in the spinal cord of rat
models of protruded intervertebral disc and the effects of electroacu-
puncture *WU Wei-peng, LI Wei, CHENG Peng, et al* (261)
- Establishment of a rapid method for synthesis and detection of gRNA
..... *DU Jian-yong, DENG Ran, GAO Hong, et al* (267)
- Mammary dysplasia and abnormal estrogen/progesterone or their receptor ex-
pression induced by psychological stress in pregnant rats
..... *WANG Rui-qiong, WU Guo-tai, LIU Feng-lin, et al* (272)
- Effects of electroacupuncture on the expressions of IL-1 β and ICAM-1 in bi-
lateral brain tissues of rats with cerebral ischemia/reperfusion injury
..... *SONG Ying-zhou, SUN Lin-lin, REN Ying-zhen, et al* (278)
- Effect of refraction and axial length on retinal nerve fiber layer thickness and
optic disc morphology in guinea pigs
..... *LI Tao, ZHOU Xiao-dong, JIANG Han-ran, et al* (285)
- Electroacupuncture promotes revascularization via eNOS mobilizing EPCs in
the middle cerebral artery occlusion/reperfusion rat
..... *ZHU Yan-han, LUO Yong, XU Hong-bei, et al* (291)
- Validation of the silencing site of rhesus monkey P21 gene in COS-7 cells
..... *LI Yu-han, SU Jing-fen, ZHANG chen, et al* (297)
- Preparation of a murine model of systemic *Candida albicans* infection
..... *WU Yu-e, LI Hang, CHEN Mei-ling, et al* (301)
- A murine model of LPS/D-gal-induced acute hepatitis and alterations in
mTOR signaling
..... *LI Xiao-fei, TAO Yu-fen, LIU Jian-sheng, et al* (306)
- Effect and mechanism of the traditional Chinese medicine Bushen Gujin pre-
scription on the expression of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α
in the rabbit model of knee osteoarthritis
..... *ZHANG Chong, WANG Heng-shu, KAN Xiu-lian, et al* (312)
- Application of PPAR α transgenic mice in the evaluation of drug toxicity ...
..... *HE Yin-li, GUO Xun, ZHAO Xian-li, et al* (316)
- Research progress on animal models of depression and their evaluation meth-
ods *XUE Tao, WU Li-Sha, LIU Xin-min, et al* (321)
- Environmental enrichment for laboratory animals
..... *LI Jun-yan, LIU Shuai* (327)



顺铂联合氟西汀对肺癌伴抑郁小鼠干预的研究

李密辉, 吴晓, 魏凯, 林燕华, 魏颖, 孙婧, 罗清莉, 刘宝君, 董竞成

(复旦大学附属华山医院, 上海 200040)

【摘要】 目的 通过顺铂联合氟西汀对肺癌伴抑郁小鼠进行干预,检测相关指标,观察氟西汀能否通过抗抑郁作用对肿瘤起到抑制作用。**方法** 通过社交失败应激及皮下接种 Lewis 肺癌细胞株建立小鼠肺癌伴抑郁模型;ELISA 方法检测血清皮质醇及 IL-6 水平;RT-PCR 方法检测海马组织中脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF) mRNA 表达;免疫组织化学方法检测肿瘤组织核转录因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)及血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)蛋白表达。**结果** 双药组皮质醇与 IL-6 水平与模型组相比明显降低($P < 0.05$);双药组海马 BDNF mRNA 表达显著升高($P < 0.05$);双药组肿瘤重量、肿瘤组织中 NF- κ B 及 VEGF 蛋白表达水平与单药组相比差异无显著性($P > 0.05$)。**结论** 氟西汀能够降低肺癌伴抑郁小鼠血清皮质醇水平并促进海马组织 BDNF mRNA 表达而发挥抗抑郁作用,但并未发现其抗抑郁效果能够抑制肿瘤进展。

【关键词】 肺癌伴抑郁;氟西汀;顺铂;核转录因子-KB

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)03-0221-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.001

Interventional effect of cisplatin combined with fluoxetine on mice bearing Lewis lung cancer with depression

LI Mi-hui, WU Xiao, WEI Kai, LIN Yan-hua, WEI Ying, SUN Jing, LUO Qing-li, LIU Bao-jun, DONG Jing-cheng

(Huashan Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Objective To observe if fluoxetine has a potency to inhibit the progression of Lewis lung cancer by combining the fluoxetine and cisplatin to treat the mice bearing Lewis lung cancer with depression. **Methods** We developed a mouse model of Lewis lung cancer with depression which was intervened with cisplatin and fluoxetine, and the indicators related to cancer and depression were tested. Social interaction test was used to measure the behavioral changes of the depressed model mice. The serum cortisol and IL-6, BDNF mRNA in the hippocampus, and NF- κ B and VEGF in the tumor tissue were selected for investigation and comparison. **Results** The mice which were induced by social defeat exhibited social avoidance behavior in the social interaction test. The cortisol and IL-6 level in both combination groups was decreased compared with that in the model group ($P < 0.05$), and the cortisol and BDNF mRNA in the combination group increased significantly ($P < 0.05$). There were no statistically significant differences in the tumor weight, NF- κ B and VEGF in tumor tissues between the single and combination groups ($P > 0.05$). **Conclusions** Fluoxetine has antidepressant effect by decreasing the high level of serum cortisol and promoting the BDNF mRNA expression in the hippocampus. However, fluoxetine is not found to have the potency to inhibit the expression of NF- κ B related with the progression of tumor.

【Key words】 Lung cancer with depression; Fluoxetine; Cisplatin; Nuclear factor-kappa B

肿瘤疾病作为一个重大的生活应激事件对患者心理有着很大的影响。有研究表明,肿瘤患者抑郁

发病率为 15% ~ 29%, 是正常人患病率的 3 ~ 5 倍^[1]。并且肿瘤治疗本身会增加患者患抑郁症的

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 81173390, No. 81102562); 国家教育部博士点科研基金(No. 20110071120072)。

[作者简介] 李密辉(1988-)女, 硕士研究生, 研究方向: 中西医结合肺病研究。E-mail: perfectlmh@sina.com。

[通讯作者] 董竞成, 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合肺病, 炎症性疾病及肿瘤研究。E-mail: jcdong2004@126.com。

风险^[2]。情感应激可降低肿瘤患者的生活质量、影响治疗效果并且会增加致死率^[3]。研究显示,抑郁平均会使肿瘤患者生存期下降 10% ~ 20% 左右,一项为期 17 年的前瞻性研究结果表明,癌症的死亡率和抑郁情绪密切相关,高度抑郁者的死亡率是非抑郁者的 2 倍^[4]。因此,肿瘤与抑郁相伴发生有着密切的病理生理关系。

本研究通过建立小鼠肺癌伴抑郁模型,使用抗抑郁药物氟西汀联合化疗药顺铂对其进行干预,通过观察抑郁及肿瘤相关指标的改善情况,评价其疗效并探讨其作用的内在机制。

1 材料和方法

1.1 材料

SPF 级 C57BL/6J 小鼠(简称“C57 小鼠”)40 只,雄性,7 周龄,体重 20 ~ 24 g,由中国科学院上海实验动物中心提供【SCXK(沪)2012-0002】。SPF 级 CD1 小鼠 30 只,雄性,9 ~ 10 月龄退役种鼠,体重 35 ~ 40 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2012-0036】。动物饲养于复旦大学药学院实验动物中心【SYXK(沪)2010-0099】;Lewis 肺癌(Lewis lung cancer, LLC)细胞株惠赠于复旦大学附属中山医院;小鼠鼠笼带孔有机塑料挡板;社交接触旷场(42 cm × 42 cm × 42 cm);Noldus 动物行为学视频跟踪系统(Ethovision XT8.5,复旦大学上海医学院脑科研究院提供);皮质醇试剂盒:德国 LDN 公司产品;IL-6 试剂盒美国 R&D 公司产品;抗 VEGF 抗体英国 Abcam 产品;抗 NF- κ B 抗体美国 CST 产品;盐酸氟西汀胶囊:苏州礼来制药有限公司产品;注射用顺铂:山东齐鲁制药有限公司产品。

1.2 小鼠社交应激性抑郁及肿瘤模型的建立

社交应激小鼠均采用单笼饲养,造模方法参考文献^[5-6],首次应激开始前将攻击性较强的 CD1 小鼠放置于透明挡板一侧 24 h;将 C57 小鼠放置 CD1 同侧社交应激 4 ~ 5 min,之后将 C57 放置于透明挡板另一侧,使之能观察到 CD1 并能嗅到对方气味,相处 24 h 后,开始新一轮应激;连续应激 10 d,10 d 之中 CD1 小鼠位置不变,C57 小鼠每天变换鼠笼,使之不遇到同一只 CD1 小鼠,应激结束后进行社交接触行为学实验。(2)肿瘤组小鼠均在社交应激结束后于右前肢腋后侧皮下接种 2×10^6 个 LLC 细胞。

1.3 实验分组及处理

1.3.1 动物分组

将 40 只 C57 小鼠随机分为正常对照组(正常组,10 只);肺癌伴抑郁模型组(模型组,10 只);模型 + 顺铂组(单药组,10 只);模型 + 顺铂 + 氟西汀组(双药组,10 只)。正常组小鼠正常饲养;模型组应激结束后接种 LLC 细胞,生理盐水灌胃 0.3 mL/d,共 14 d,肿瘤后每 3 天 1 次腹腔注射生理盐水每次 0.2 mL,共 4 次;单药组社交应激结束后接种 LLC 细胞,生理盐水灌胃 0.3 mL/d,共 14 d,肿瘤后每 3 天 1 次腹腔注射顺铂 2 mg/kg,共 4 次;双药组社交应激结束后接种 LLC 细胞,氟西汀 20 mg/kg 灌胃,共 14 d,肿瘤后每 3 天 1 次腹腔注射顺铂 2 mg/kg,共 4 次。正常组小鼠 5 只每笼,接受社交应激小鼠单笼饲养,自由进食饲料与水,室温 20 ~ 25℃,相对湿度 50% ~ 70%,光暗周期 12 h。

1.3.2 小鼠行为学观察

10 d 社交应激结束后,采用社交接触实验对小鼠行为学进行评价,实验分为两个 150 s,第一个 150 s 期间 CD1 小鼠不在旷场之内,将 C57 小鼠放置于社交接触旷场中,旷场一侧为透明有机玻璃围墙;中间间隔 30 s,在 30 s 内将 C57 小鼠从旷场转移到饲养鼠笼内,同时将未与该 C57 小鼠有社交应激接触的 CD1 小鼠放入到围墙内,同时将 C57 再次放入到社交旷场内,记录下一个 150 s 内 C57 小鼠在旷场内的运动轨迹^[5]。

1.3.3 血清标本收集

接种肿瘤第 15 天,所有小鼠眼眶动脉采血,4℃ 静置 2 h 后,3000 r/min,4℃ 离心 15 min,上清液 - 80℃ 保存,ELISA 方法检测血清中皮质醇及 IL-6 水平,按照试剂盒说明书进行检测。

1.3.4 RT-PCR 方法检测海马组织中脑源性神经营养因子(brain derived neurotrophic factor, BDNF) mRNA 表达

取血后将小鼠置于冰上,颈后部开颅,分离海马组织,迅速投入液氮中,实验结束后放入 - 80℃ 冰箱冻存待测。用 Trizol 试剂盒对海马组织中总 RNA 进行提取,将提取出的 mRNA 进行逆转录,合成 cDNA 模板,以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。引物序列,BDNF 上游引物:5' GAG GTC TGA CGA CGA CAT CAC 3',下游引物:5' GCT CCA AAG GCA CTT GAC TG 3'; β -actin 上游引物:5' CCT CTA TGC CAA CAC AGT 3';下游引物:5' AGC CAC CAA TCC ACA CAG 3'。总反应体系为 20 μ l,反应过程为:95℃ 5 min;95℃ 5 s;60℃ 30 s(40 个循环),以

β -actin 为内参,进行吸光度比值分析,以此代表目的基因的表达水平。

1.3.5 免疫组织化学方法检测肿瘤组织中 NF- κ B 与 VEGF 表达

小心剥离皮下肿瘤组织并称重,将其置于 4% 多聚甲醛中进行固定,用石蜡包埋切片,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5 h, DBA 显色 3~5 min, 镜下观察,阳性产物呈棕黄色或黄色。

1.4 统计学分析

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析,资料以均数 \pm 标准误表示 ($\bar{x} \pm s\bar{x}$);符合正态分布和方差齐性,资料采用单因素方差分析 (ANOVA),两两比较采用 LSD 检验,方差不齐采用秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

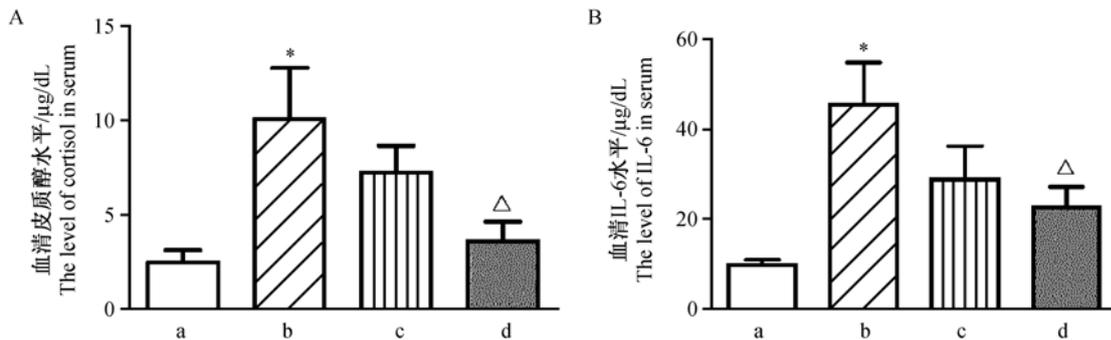
2 结果

2.1 社交应激行为学评价

末次社交应激结束 24 h 后对各组小鼠进行社交接触旷场实验,CD1 小鼠未出现时各组小鼠在社交区活动时间差异无显著性 ($P > 0.05$);CD1 小鼠出现后,接受过社交应激三组小鼠在社交区活动时间明显低于正常组 ($P < 0.05$);各组自身比较,正常组小鼠在 CD1 出现后表现出更为活跃的社交水平,在社交区停留时间明显延长,而接受社交应激的各组小鼠则表现出社交回避行为,在社交区停留时间较 CD1 未出现时明显下降 ($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 血清皮质醇及 IL-6 水平变化

与正常组比较,模型组血清皮质醇及 IL-6 水平

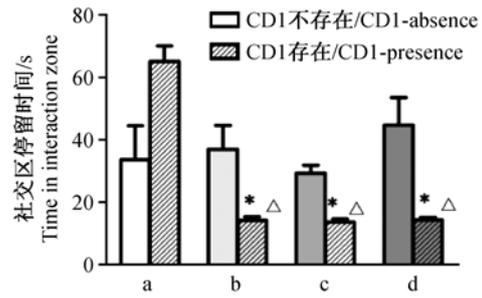


注:A 为各组小鼠血清皮质醇水平,与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较 $\Delta P < 0.05$ 。B 为各组小鼠血清 IL-6 水平,与正常组比较, * $P < 0.05$;与模型组比较 $\Delta P < 0.05$ 。a. 正常组;b. 模型组;c. 单药组;d. 双药组。

图 2 各组小鼠血清皮质醇与 IL-6 水平比较

Note. A. The level of serum cortisol. * P vs. normal group; $\Delta P < 0.05$ vs. model group. B. The level of IL-6 in serum, * $P < 0.05$ vs. normal group; $\Delta P < 0.05$ vs. model group. a. Normal group; b. Model group; c. Single drug group; d. Combination group

Fig. 2 The levels of serum cortisol and IL-6 in the mice of all groups



注:与正常组比较, * $P < 0.05$;与 CD1 未出现时比较, $\Delta P < 0.05$ 。a. 正常组;b. 模型组;c. 单药组;d. 双药组。

图 1 各组小鼠在 CD1 小鼠出现前后在社交区停留时间

Note. * $P < 0.05$ vs. normal group; $\Delta P < 0.05$ vs. CD1 mice absence. a. Normal group; b. Model group; c. Single drug group; d. Combination group

Fig. 1 The stay time in the interaction zone of mice of all groups before and after CD1 mice presence

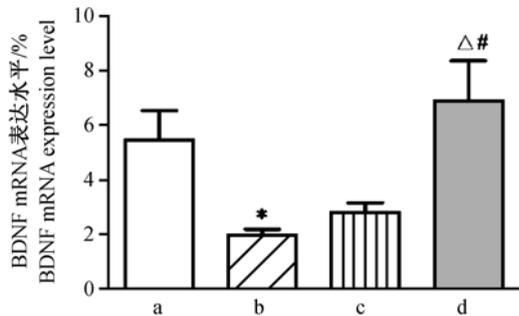
明显升高 ($P < 0.05$);单药组血清皮质醇及 IL-6 水平与模型组相比有降低趋势但差异无显著性 ($P > 0.05$);而双药组与模型组比较皮质醇及 IL-6 水平明显下降,差异有显著性 ($P > 0.05$)。见图 2。

2.3 海马组织 BDNF mRNA 表达

使用 RT-PCR 方法检测海马组织中 BDNF mRNA 表达,与正常组比较,模型组小鼠海马组织 BDNF mRNA 表达水平下降 ($P < 0.05$);单药组与模型组比较差异无显著性 ($P > 0.05$);双药组与模型组和单药组比较 BDNF mRNA 表达明显升高 ($P < 0.05$)。见图 3。

2.4 各组皮下肿瘤重量与模型组比较

单药组和双药组皮下肿瘤重量明显降低,差异具有显著性($P < 0.05$);单药组与双药组相比差异无显著性($P > 0.05$)。见图 4。

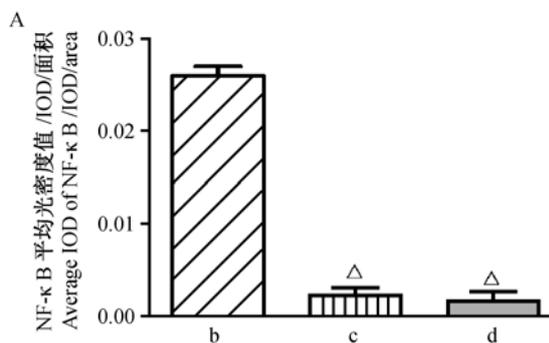


注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与模型组比较 $\Delta P < 0.05$;与单药组比较 $\#P < 0.05$ 。a. 正常组;b. 模型组;c. 单药组;d. 双药组。

图 3 各组小鼠海马 BDNF mRNA 表达水平

Note. * $P < 0.05$ vs. normal group; $\Delta P < 0.05$ vs. model group; $\#P < 0.05$ vs. single drug group. a. Normal group; b. Model group; c. Single drug group; d. Combination group.

Fig. 3 BDNF mRNA expression levels in the hippocampus of mice in all groups



注:与模型组比较 $\Delta P < 0.01$ b. 模型组;c. 单药组;d. 双药组。

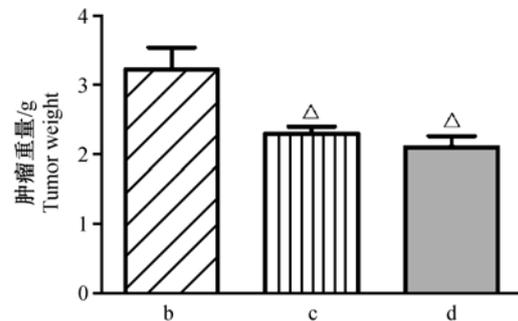
图 5 各组皮下肿瘤组织 NF-KB 与 VEGF 免疫组化平均吸光度值

Note. $\Delta P < 0.01$ vs. model group. b. Model group; c. Single drug group; d. Combination group

Fig. 5 The IOD of NF-KB and VEGF in tumor tissues determined by immunohistochemical staining.

2.5 肿瘤组织中 NF-κB 及 VEGF 蛋白表达

与模型组相比,单药组和双药组肿瘤组织中 NF-κB 及 VEGF 表达水平明显降低($P < 0.01$);单药组与双药组比较差异无显著性($P > 0.05$)。见图 5,6。

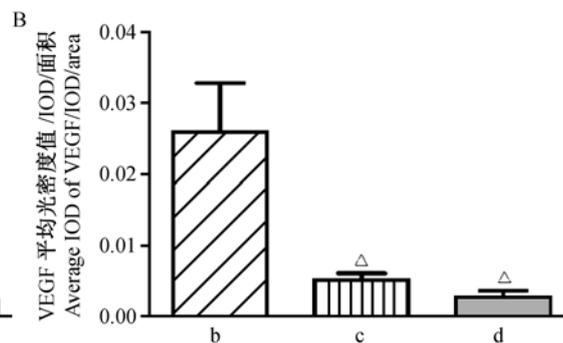


注:与模型组比较 $\Delta P < 0.05$ 。b. 模型组;c. 单药组;d. 双药组。

图 4 各组小鼠皮下肿瘤重量

Note. $\Delta P < 0.05$ vs. model group. b. Model group; c. Single drug group; d. Combination group

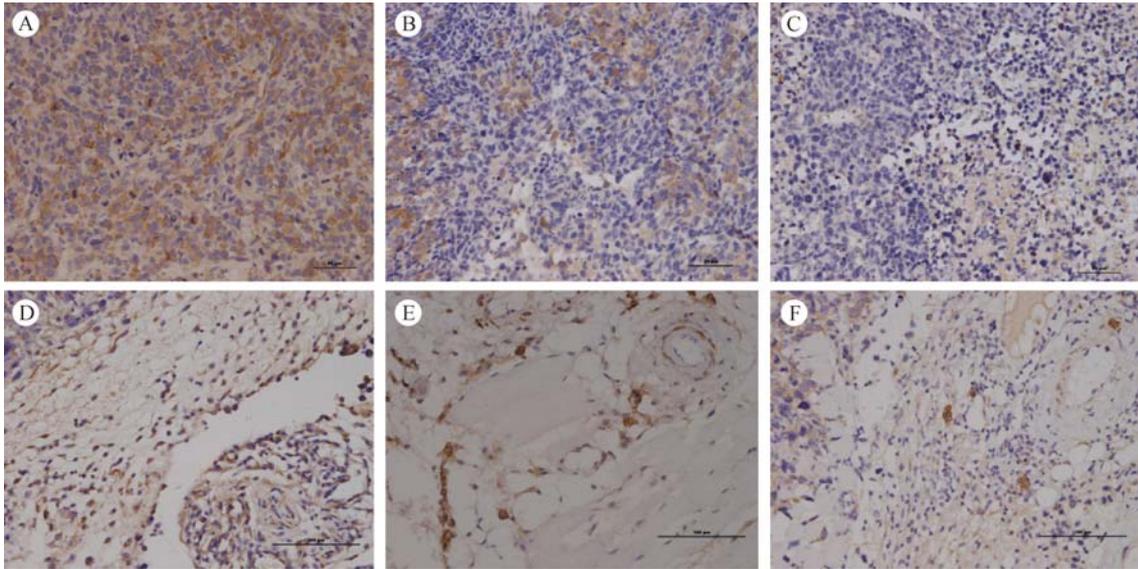
Fig. 4 Tumor weight of the mice in all groups



3 讨论

抑郁与肿瘤关系密切,许多临床研究发现应激、慢性抑郁、社会支持和心理因素可能影响肿瘤的发生及进展,其主要机制可能为各种应激性因素激活下丘脑-垂体-肾上腺轴和交感神经系统两条信号级联途径启动应激反应^[7]。本实验通过社交失败应激诱导 C57 小鼠建立社交应激性抑郁模型,该模型被认为是应激诱导抑郁相关情绪较为可靠的模型,与人类抑郁症的若干行为学和神经生物学改变具有相似性^[8]。通过社交接触旷场实验评价小鼠行为

学,发现遭受社交应激失败的各组小鼠比正常组小鼠在社交区停留时间明显缩短,这种社交回避行为在 CD1 小鼠出现以后更加明显,而正常组小鼠则表现出更为活跃的社交水平,实验结果表明重复性的暴露于社交失败应激因素之下,会导致抑郁样表型,表现为社交回避行为^[9]。研究表明,下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA 轴) 在抑郁症的发病机制中发挥着重要作用^[10]。在抑郁患者当中,HPA 轴被激活,肾上腺分泌大量糖皮质激素,导致血液中糖皮质激素水平升高。亦有研究报道急性应激能够使小鼠体内糖皮质激素升高^[11]。而糖皮质激素可使某些肿瘤



注:A 为模型组 NF- κ B 高表达;B 为单药组 NF- κ B 低表达;C 为双药组 NF- κ B 低表达;D 为模型组 VEGF 高表达;E 为单药组 VEGF 低表达;F 为双药组 VEGF 低表达。

图 6 各组小鼠肿瘤组织 NF- κ B 与 VEGF 蛋白表达($\times 200$)

Note. A: High expression of NF- κ B in a mouse of model group; B: Low expression of NF- κ B in a mouse of the single drug group; C: Low expression of NF- κ B in a mouse of the combination group; D: High expression of VEGF in a mouse of the model group; E: Low expression of VEGF in a mouse of the single drug group; F: Low expression of VEGF in a mouse of the combination group

Fig. 6 Expression of NF- κ B and VEGF in the tumor tissue of mice in all groups ($\times 200$)

细胞抵抗凋亡并且下调机体的免疫反应,这可能有助于肿瘤发生转移^[12]。我课题组前期研究亦证实给予社交应激能够促进肿瘤生长^[13]。研究发现 IL-6 与抑郁和肿瘤的进展有较为明确的相关性,肿瘤伴抑郁患者血清 IL-6 水平较不伴抑郁肿瘤患者明显升高^[14,15]。本实验中肺癌伴抑郁模型组小鼠血清皮质醇及 IL-6 水平较正常组明显升高,也印证这一观点。经氟西汀和顺铂药物治疗的双药组皮质醇和 IL-6 水平较模型组则明显下降,单药组皮质醇及 IL-6 水平经治疗后也有下降但较模型组差异不显著。说明抗抑郁与抗肿瘤治疗均能降低血清中炎症因子 IL-6 水平,但单纯抗肿瘤治疗不能改善 HPA 轴紊乱状态,经氟西汀治疗后,皮质醇及 IL-6 水平明显降低。临床研究发现氟西汀能够降低重度抑郁患者血清皮质醇水平,调节 HPA 轴紊乱状态,且多种抗抑郁药物具有抗炎作用,可改善抑郁患者血清 IL-6 升高状况^[16,17]。

BDNF 在抑郁症发病机制及治疗过程中有着重要的作用,本实验中模型组小鼠海马 BDNF mRNA 表达与正常组比较明显降低,经氟西汀治疗后双药组小鼠 BDNF mRNA 表达较模型组和单药组明显升高,差异有显著性。抑郁症发病学说之一就是脑内 BDNF 的缺乏,而脑内 BDNF 水平升高可能会起到抗抑郁效果^[18,19]。研究发现抑郁模型小鼠存在海

马区神经元凋亡伴 BDNF 表达水平下降,而外源性 BDNF 微量注入大鼠中脑、海马和侧脑室可有效缓解抑郁症大鼠的类抑郁行为^[20,21]。本实验表明口服氟西汀能够增强抑郁小鼠海马组织 BDNF mRNA 表达,从而发挥其抗抑郁作用,而单纯抗肿瘤治疗则并无此作用。

单药组及双药组小鼠皮下肿瘤重量、肿瘤组织 NF- κ B 及 VEGF 表达与模型组比较明显降低,双药组与单药组比较有下降趋势但差异无显著性,表明氟西汀抗抑郁治疗并未对肿瘤的发展起到明显抑制作用。NF- κ B 是一类普遍存在的转录调节因子,研究发现其可通过多种细胞因子的转录而发挥抗凋亡、促进细胞增殖、血管发生、肿瘤转移的作用^[22]。VEGF 是目前已知的作用最强的促血管形成因子之一,它可以通过促进血管生成从而参与肺癌浸润与转移。而 NF- κ B 与 VEGF 有着密切的联系,在肿瘤血管形成中 NF- κ B 起着核心作用,它通过上调 VEGF 的表达促进肿瘤血管的形成^[23]。而 NF- κ B 与抑郁症也有着密切的联系,文献报道慢性社交孤立导致的氧化或硝化应激可能是通过激活 NF- κ B 及增加诱导型一氧化氮合成酶表达实现的,文献报道大多数抗抑郁药物有着抗炎效果^[24,25]。本实验设想 NF- κ B 可能为抑郁与肿瘤相互作用的交互点之一,是否氟西汀可以通过抑制 NF- κ B 产生抗炎效

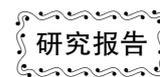
果从而对肿瘤有抑制作用,然而通过氟西汀与顺铂联合治疗与顺铂单药治疗进行对比,双药组与单药组相比肿瘤重量及相关蛋白表达虽有一定的下降趋势,但无统计学差异。分析可能为抗抑郁药物治疗时间较短,并且抑郁可通过多途径、多靶点促进肿瘤发生、发展与转移^[7]。氟西汀为选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂,能够增加突触间隙 5-羟色胺水平从而产生抑郁作用,而具体可能机理有增加海马 BDNF 水平、促进神经类固醇合成等^[26]。

综上所述,本研究未发现氟西汀对 NF- κ B 有明显的抑制作用,因此可能并未起到对肿瘤抑制作用。但服用氟西汀小鼠抑郁相关指标有明显改善,因此临床肿瘤伴抑郁病人服用氟西汀能够起到抗抑郁改善生活质量的目的。但抗抑郁药物能否对肿瘤有抑制作用,还需更多基础及临床试验进行验证。

参 考 文 献

- [1] Irwin MR, Olmstead RE, Ganz PA, et al. Sleep disturbance, inflammation and depression risk in cancer survivors [J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 30, Supplement; s58 - s67.
- [2] Fann JR, Fann MY, Unutzer J. Improving primary care for older adults with cancer and depression [J]. *J Gen Intern Med*, 2009, 24(Suppl 2): S417 - 424.
- [3] Linden W, Vodermaier A, Mackenzie R, et al. Anxiety and depression after cancer diagnosis: prevalence rates by cancer type, gender, and age [J]. *J Affectiv Dis*, 2012, 141(2 - 3): 343 - 351.
- [4] Shekelle RB, WJ Jr, Ostfeld AM, et al. Psychological depression and 17-year risk of death from cancer [J]. *Psychosom Med*, 1981, 43(2): 117 - 125.
- [5] Golden SA, Convington HE 3rd, Berton O, et al. A standardized protocol for repeated social defeat stress in mice [J]. *Nat Protoc*, 2011, 6(8): 1183 - 1191.
- [6] 吴晓, 吴金峰, 董竞成. 社交应激动物模型的建立及其效果评价 [J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(6): 800 - 804.
- [7] Antoni MH, Lutgendorf SK, Cole SW, et al. The influence of bio-behavioural factors on tumor biology: pathways and mechanisms [J]. *Nat Rev Cancer*, 2006, 6(3): 240 - 248.
- [8] Berton O, McClung CA, Dileone RJ, et al. Essential role of BDNF in the mesolimbic dopamine pathway in social defeat stress [J]. *Science*, 2006, 311(5762): 864 - 868.
- [9] Dryavtseva NN, Bakshantovskaya IV, Koryakina LA. Social model of depression in mice of C57BL/6J strain [J]. *Pharmacol Biochem Behav*. 1991, 38(2): 315 - 320.
- [10] 张莉, 齐刚, 熊小军, 等. 急性应激致糖皮质激素升高动物模型 [J]. *中国比较医学杂志*, 2004, 14(2): 107.
- [11] 马宗国, 江南, 余梦瑶, 等. 抑郁症发病机制及中药治疗研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(6): 549 - 553.
- [12] Herr I, Pfitzenm J. Glucocorticoid use in prostate cancer and other solid tumors implications for effectiveness of cytotoxic treatment and metastases [J]. *Lancet Oncol*, 2006, 7(5): 425 - 430.
- [13] 吴晓, 刘宝君, 吴金峰, 等. 不同时段社交应激对小鼠肺癌生长的影响 [J]. *复旦学报(医学版)*, 2014, 41(1): 8 - 14.
- [14] Jehn CF, Flath B, Strux A, et al. Influence of age, performance status, cancer activity, and IL-6 on anxiety and depression in patients with metastatic breast cancer [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2012, 136(3): 789 - 794.
- [15] Jehn CF, Kuhnhardt D, Bartholomae, et al. Association of IL-6, hypothalamus-pituitary-adrenal axis function, and depression in patients with cancer [J]. *Integr Cancer Ther*, 2010, 9(3): 270 - 275.
- [16] Jazayeri S, Keshavarz, SA, Tehrani-Doost M, et al. Effects of eicosapentaenoic acid and fluoxetine on plasma cortisol, serum interleukin-1beta and interleukin-6 concentrations in patients with major depressive disorder [J]. *Psychiatry Res*, 2010, 178(1): 112 - 115.
- [17] Sacre S, Medghalchi M, Gregory B, et al. Fluoxetine and citalopram exhibit potent antiinflammatory activity in human and murine models of rheumatoid arthritis and inhibit toll-like receptors [J]. *Arthritis Rheum*, 2010, 62(3): 683 - 693.
- [18] Razzoli M, Domenici E, Carboni L, et al. A role for BDNF/TrkB signaling in behavioral and physiological consequences of social defeat stress [J]. *Genes Brain Behav*, 2011, 10(4): 424 - 433.
- [19] Duman R, Monteggia LM. A neurotrophic model for stress-related mood disorders [J]. *Biol Psychiatry*, 2006, 59(12): 1116 - 1127.
- [20] Pillai A, Dhandapani KM, Pillai B, et al. Erythropoietin prevents haloperidol treatment-induced neuronal apoptosis through regulation of BDNF [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2008, 33(8): 1942 - 1951.
- [21] Hoshaw BA, Malberg JE, Lucki I. Central administration of IGF-I and BDNF leads to long-lasting antidepressant-like effect [J]. *Brain Res*, 2005, 1037(1/2): 204 - 208.
- [22] Yamanaka N, Sasaki N, Stasaki A, et al. Nuclear factor-kappa Bp65 is a prognostic indicator in gastric carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2004, 24(2C): 1071 - 1075.
- [23] Huang S, Ribinson JB, Deguzman A, et al. Blockade of nuclear factor-kappa B signaling inhibits angiogenesis and tumorigenicity of human ovarian cancer cells by suppressing expression of vascular endothelial growth factor and interleukin 8 [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(19): 5334 - 5339.
- [24] Zlatkovic J, Filipovic D. Chronic social isolation induces NF- κ B activation and upregulation of iNOS protein expression in rat prefrontal cortex [J]. *Neurochem Int*, 2013, 63(3): 172 - 189.
- [25] Mase M. The cytokine hypothesis of depression: inflammation, oxidative & nitrosative stress (IO&NS) and leaky gut as new targets for adjunctive treatments in depression [J]. *Neuro Endocrinol Lett*. 2008, 29(3): 287 - 291.
- [26] Pinna G, Rasmusson AM. Up-regulation of neurosteroid biosynthesis as a pharmacological strategy to improve behavioural deficits in a putative mouse model of post-traumatic stress disorder [J]. *J Neuroendocrinol*, 2012, 24(1): 102 - 116.

[收稿日期] 2014-12-05



小鼠早期肺腺癌模型的建立

肖时满, 张玉, 强金伟

(复旦大学附属金山医院, 上海 201508)

【摘要】 目的 构建小鼠早期肺腺癌模型,为影像学研究提供工具。方法 210只KM小鼠随机分为5个实验组(每组各40只)和1个对照组(10只)。实验组每周皮下注射亚硝基胍(MNNG)溶液0.2 mL(浓度2.0 mg/mL),按总剂量分为A、B、C、D和E组,分别注射1、2、4、8和12周。于首次注射后的第60、80、100、120天在每组中随机抽取10只处死,解剖肺脏并观察肿瘤鼠发生率、肿瘤数量和大小等。对照组每周皮下注射0.2 mL的生理盐水共12周。**结果** ①成瘤率和成瘤总数与时间、剂量呈正相关,但首次注射第60天时,实验组均无肿瘤生成。②第80天时,A、B、C、D、E组的成瘤率分别为0%、10%、30%、40%和50%,成瘤总数分别为0、4、42、60和81个,直径<0.5 mm的肿瘤数分别为0、4、25、31和40个。③第100天时,每组的成瘤率分别为20%、40%、100%、100%和100%,成瘤总数分别为6、19、187、223和301个,直径<0.5 mm的肿瘤数分别为5、16、132、124和123个。④第120天时,每组的成瘤率分别为30%、50%、100%、100%、100%,成瘤总数分别为30、124、302、351和362个,直径<0.5 mm的肿瘤数分别为21、98、123、140和108个。经病理证实这些肺肿瘤均为肺腺癌。**结论** 浓度为2.0 mg/mL的亚硝基胍溶液0.2 mL每周皮下注射,连续四周,100 d时能获得100%的肺腺癌成瘤率和最多的<0.5 mm肿瘤数,为最佳的小鼠早期肺腺癌模型。

【关键词】 肺腺癌;影像学模型;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)03-0227-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.002

Establishment of a mouse model of early lung adenocarcinoma

XIAO Shi-man, ZHANG Yu, QIANG Jin-wei

(Department of Radiology, Jinshan Hospital, Fudan University, Shanghai 201508, China)

【Abstract】 Objective To establish a mouse model of early lung adenocarcinoma to serve the imaging studies of early lung adenocarcinoma. **Methods** Two-hundred and ten 4-week old SPF female Kunming mice were randomly divided into 5 experimental groups (40 mice per group) and 1 control group (10 mice). The mice of experimental groups were subcutaneously injected with a dose of 0.2 ml 1-methyl-3-nitro-1-nitroso-guanidine (MNNG) solution in concentration of 2.0 mg/mL weekly for 1, 2, 4, 8, 12 weeks (group A-E), respectively, while the mice of control group was subcutaneously injected with 0.2 mL saline weekly for 12 weeks. Ten mice were randomly sacrificed from each experimental group at the 60th, 80th, 100th and 120th days after initial injection (group A₆₀, group A₈₀, group A₁₀₀, group A₁₂₀; group B₆₀,and so on), and the bilateral lungs were dissected. The tumor occurrence rate, number and size of lung tumors were observed and recorded. **Results** 1. The tumor occurrence rate and number of lung tumors were positively proportional to the time and dose of MNNG injection. No tumor was found in any group at the 60th day. 2. At the 80th day, the tumor occurrence rate in the groups A, B, C, D and E was 0, 10%, 30%, 40% and 50%, respectively. The number of tumors in each group was 0, 4, 42, 60 and 81, respectively. The number of tumors smaller than 0.5 mm in diameter was 0, 4, 25,

【基金项目】国家自然科学基金(81171340);上海市科委临床重点项目(10411956800)。

【作者简介】肖时满(1985年-),男,博士生,研究方向:胸腹部影像学;张玉(1987-),女,博士生,研究方向:胸腹部影像学。共同第一作者。

【通讯作者】强金伟, E-mail: dr.jinweiqiang@163.com

31 and 40, respectively. 3. At the 100th day, the tumor occurrence rate was 20%, 40%, 100%, 100% and 100%, respectively. The number of tumors was 6, 19, 187, 223 and 301, respectively, and the number of tumors smaller than 0.5 mm in diameter was 5, 16, 132, 124 and 123, respectively. 4. At the 120th day, the tumor occurrence rate was 30%, 50%, 100%, 100% and 100%, respectively. The number of tumors was 30, 124, 302, 351 and 362 per group, respectively. The number of tumors smaller than 0.5 mm in diameter was 21, 98, 123, 140 and 108, respectively. The induced lung adenocarcinomas were confirmed by pathology. **Conclusions** MNNG solution 0.2 mL (2.0 mg/mL) subcutaneously injected weekly for 4 weeks can produce 100% occurrence rate of lung adenocarcinoma in mice and most tumors are smaller than 0.5 mm in diameter at 100th day after initial injection. It is a most suitable model for imaging studies of mouse early lung adenocarcinoma.

【Key words】 Early stage lung adenocarcinoma; Tumor model, imaging study; mouse

CT 胸部筛查已成为发现早期肺癌的最重要的工具^[1]。在高危人群,肺内小结节的发现率达 22%~43%,其中 10% 为恶性结节^[2,3]。由于结节常较小,恶性肿瘤的征象常不典型,对其定性是影像医师面临的巨大挑战^[4,5]。因此,探索早期肺癌的发生发展规律,寻找其独特的形态学特征,对于早期微小肺癌的诊断具有重要意义。

然而,临床研究存在诸多局限,由于结节微小,在满足临床诊断后几乎不能再用于科学研究,与病理对照研究很难实现。肺癌动物模型的微型 CT 研究可以弥补临床不足,而制作一个适合微型 CT 研究的早期肺癌动物模型显得尤为重要^[6,7]。

到目前为止,我们还未见适于影像学研究的早期肺癌的动物模型。本研究探索应用甲基硝基亚硝基胍 (1-methyl-3-nitro-1-nitroso-guanidine, MNNG) 皮下注射 KM 小鼠以诱导肺癌的发生,确定适用于影像学研究的早期肺癌造模方法。

1 材料和方法

1.1 试剂和药品

诱癌试剂 N-甲基-N-硝基-亚硝基胍,简称亚硝基胍 (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG, 上海如吉生物科技有限公司)。

1.2 动物

SPF 级 KM 小鼠 210 只,4 周龄,18~22 g,雌性,购于上海杰思捷实验动物有限公司【SCXK(沪)2012-0006】。实验前适应饲养一周,条件为:23℃,相对湿度 65%~75%,自由摄食、饮水。动物实验在上海市公共卫生临床中心实验动物部进行【SYXK(沪)2010-0098】。

1.3 分组

将 210 只 KM 小鼠分为 5 个实验组和 1 个对照组,5 个实验组(A-E)每组各 40 只,每周一次皮下注

射 0.2 mL MNNG 溶液,浓度为 2.0 mg/mL。按剂量分组如下:A、B、C、D、E 组,分别注射 1、2、4、8、12 周;对照组 10 只,每周一次皮下注射生理盐水 0.2 mL,共 12 周。于首次注射后的第 60、80、100、120 天,从每个实验组中随机抽取 10 只牺牲取材,对照组 120d 全部牺牲取材。

1.4 病理学观察

解剖出肺脏,观察肿瘤数量,用标尺测量肿瘤大小。肺标本用福尔马林固定、切片、HE 染色,光镜下观察,确定病变性质和肿瘤病理类型。

2 结果

2.1 5 组成瘤概况

从 A 组到 E 组的成瘤率和成瘤总数与首次染毒剂注射后的时间和剂量呈正相关,不同剂量组在不同时间点肿瘤生成情况见表 1。

表 1 不同时间点肿瘤生成情况

Tab.1 Number of mice with tumor formation and number of tumors in mice of different groups (10 mice in each group)

组别 Groups	60 d	80 d	100 d	120 d
A 组	0 / 0	0 / 0	2 / 6	3 / 30
B 组	0 / 0	1 / 4	4 / 18	5 / 124
C 组	0 / 0	3 / 42	10 / 187	10 / 302
D 组	0 / 0	4 / 60	10 / 223	10 / 351
E 组	0 / 0	5 / 81	10 / 301	10 / 362

C 组、D 组、E 组在首次给药后 100 d 和 120 d 时,成瘤率均为 100%。其中 100 d 时,C₁₀₀组单个小鼠双肺内肿瘤数 5~27 个(图 1B);D₁₀₀组肿瘤数 6~40 个(图 2B);E₁₀₀组肿瘤数 7~56 个(图 2C)。120 天时,C₁₂₀组肿瘤数 9~45 个;D₁₂₀组 10~53 个;E₁₂₀组 12~58 个。每组的单个小鼠体内肿瘤数近似于正态分布。

2.2 第 60 天成瘤情况

首次染毒剂注射后第 60 天时,均未发现肺肿瘤

生成。

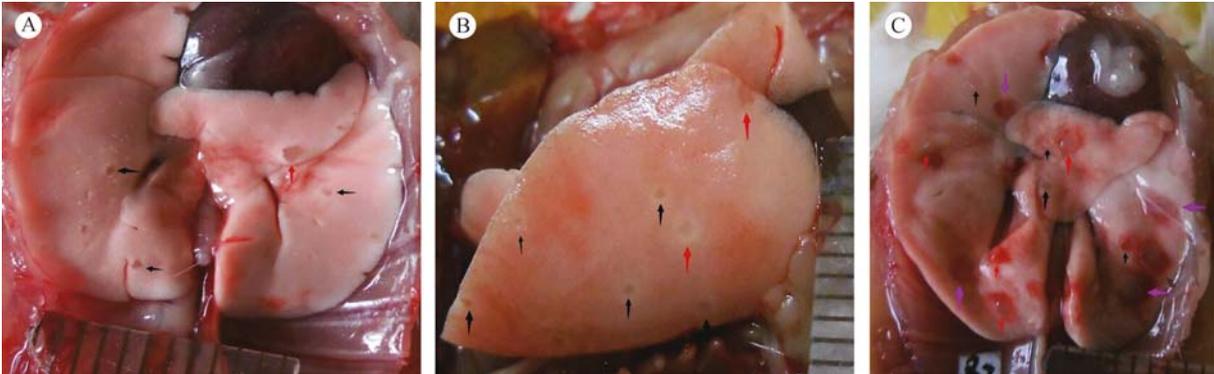
2.3 第 80 天成瘤情况

首次给药 80 d 时肿瘤生成情况见表 2。

第 80 天时,除 A 组(A₈₀组)无成瘤外,其余每
组都有成瘤,且随剂量增加而成瘤率和成瘤数上升。

A₈₀、B₈₀、C₈₀(见图 1A)、D₈₀和 E₈₀组(每组 10 只)的

成瘤率分别为 0%、10%、30%、40% 和 50%,成瘤总
数分别为 0、4、42、60 和 81 个。每组中直径小于
0.5 mm 的肿瘤的数分别为 0、4、25、31 和 40 个,分
别占成瘤总数的 0、100%、60%、50% 和 50% (图
1A)。

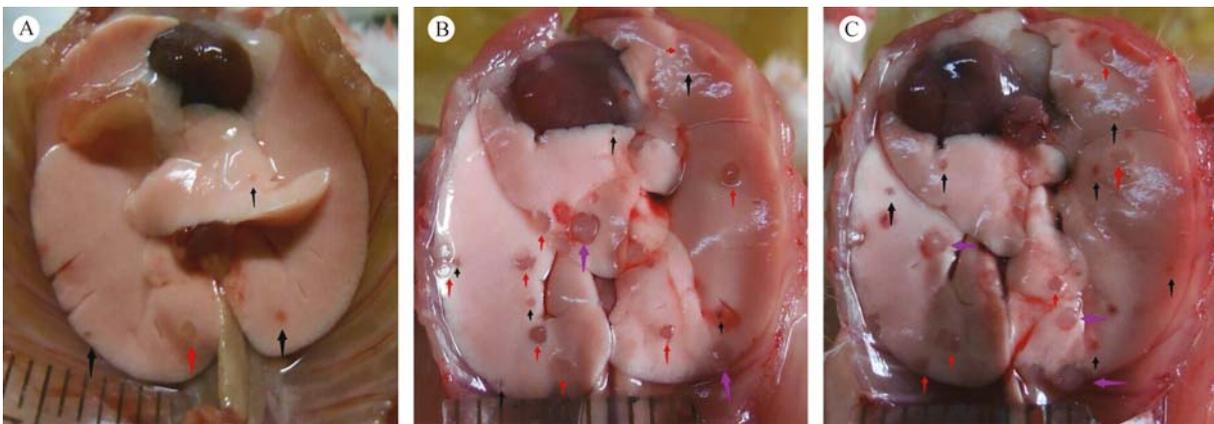


注:A、B 和 C 分别为 C 组(MNNG 0.2 mL/周 × 4 周)80、100 和 120 d 时的大体肺标本。肿瘤呈灰白色点状或结节状,其中粉红色箭头为大于 1 mm 的肿瘤,红色箭头为肿瘤大小 0.5 ~ 1 mm,黑色箭头为肿瘤大小小于 0.5 mm。第 100 天时成瘤率 100%, < 0.5 mm 的肿瘤数最多。实物尺每小格为 1 mm。

图 1 C 组不同时间点的肿瘤生成图

Note. A. Gross appearance of the lungs with visible tumors in a mouse of the 80th day group. B. Gross appearance of the lungs with visible tumors in a mouse of the 100th day group. C. Gross appearance of the lungs with visible tumors in a mouse of the 120th day group. The MNNG-induced tumors appear as grey nodules. The pink, red and black arrows point at tumors > 1 mm, 0.5 – 1 mm, and < 0.5 mm, respectively. At the 100th day, there is a 100% tumor formation rate and most tumors are smaller than 0.5 mm. Scale bar = 1 mm.

Fig. 1 Gross appearance of the lungs with visible tumors in different groups at different time points.



注:A、B 和 C 分别为 A 组(MNNG 0.2 mL/周 × 1 周)、D 组(MNNG 0.2 mL/周 × 8 周)和 E 组(MNNG 0.2 mL/周 × 12 周)100 d 时的大体标本图,其中 A 组肿瘤稀少,D 和 E 组肿瘤以大于 1 mm(粉红色箭头)和 0.5 ~ 1 mm(红色箭头)为主,实物尺每小格为 1 mm。

图 2 100 d 时不同组别的肿瘤生成图

Note. A. Gross appearance of the lungs with sparse visible tumors in a mouse after MNNG 0.2 mL/wk administration for one week. B. Gross appearance of the lungs with visible tumors in a mouse after MNNG 0.2 mL/wk administration for 8 weeks. Most tumors are > 1 mm (pink arrows). C. Gross appearance of the lungs with visible tumors in a mouse after MNNG 0.2 mL/wk administration for 8 weeks. Most tumors are 0.5 – 1 mm in size (red arrows).

Scale bar = 1 mm.

Fig. 2 Gross appearance of the lungs with visible tumors in different groups at the 100th day.

2.4 第 100 天时成瘤情况

首次给药 100 d 时肿瘤生成情况见表 2。

第 100 天时, A₁₀₀ (见图 2A)、B₁₀₀、C₁₀₀ (见图 1B)、D₁₀₀ (见图 2B) 和 E₁₀₀ (见图 2C) 组的成瘤率分别为 20%、40%、100%、100% 和 100%, 成瘤总数分别为 6、19、187、223 和 301 个。A₁₀₀、B₁₀₀、C₁₀₀、D₁₀₀ 和 E₁₀₀ 组, 每组中直径小于 0.5 mm 的肿瘤数分别为 5、16、132、124 和 123 个, 分别占总瘤数的 83%、84%、71%、56% 和 41% (图 1B)。

表 2 首次给药 80、100、120 d 时肿瘤生成情况

Tab. 2 Tumor formation in the mice of different groups at 80, 100, 120 days after MNNG administration. (10 mice in each sub-group)

首次给药 时间点/d Time point	剂量分组 Dose groups	肿瘤总数 Total number of tumors	肿瘤大小 Tumor size/mm				
			<0.5	0.5~1	1~2	2~3	>3
80	A ₈₀ 组	0	0	0	0	0	0
	B ₈₀ 组	4	4	0	0	0	0
	C ₈₀ 组	42	25	17	0	0	0
	D ₈₀ 组	60	31	29	0	0	0
	E ₈₀ 组	81	40	41	0	0	0
100	A ₁₀₀ 组	6	5	1	0	0	0
	B ₁₀₀ 组	19	16	2	1	0	0
	C ₁₀₀ 组	187	132	50	5	0	0
	D ₁₀₀ 组	223	124	76	23	0	0
	E ₁₀₀ 组	301	123	147	31	0	0
120	A ₁₂₀ 组	30	21	9	0	0	0
	B ₁₂₀ 组	124	98	20	6	0	0
	C ₁₂₀ 组	302	123	158	18	3	0
	D ₁₂₀ 组	351	140	174	28	7	2
	E ₁₂₀ 组	362	108	196	42	11	5

2.6 C₁₀₀ 组病理学观察概况

从 C₁₀₀ 组的 187 个肿瘤中随机选取 106 个肿瘤病理观察, 证实这些肺肿瘤均为肺腺癌 (图 3A、3B)。106 个肿瘤大小 0.19 ~ 1.60 mm, 平均 0.49 mm。实验组注射部位和肺以外其他部位未见肿瘤发生, 对照组所有部位未见肿瘤。

可见三种生长方式: ①鳞屑型 6 个, 大小 0.29 ~ 0.41 mm, 平均 0.34 mm; ②实性 29 个, 大小 0.19 ~ 1.60 mm, 平均 0.57 mm; ③混合型 71 个, 大小 0.19 ~ 1.10 mm, 平均 0.47 mm。混合型中鳞屑性成分大于 75%、50% ~ 75%、25% ~ 50% 和小于 25% 的肿瘤平均大小分别为 0.30、0.37、0.42、0.59 mm。

3 讨论

理想的适合于影像学研究的肺癌模型应该具有以下特点: ①动物具正常免疫, 容易获得; ②肺癌由诱导引起, 生物学和组织学特性与人类相同; ③致癌

2.5 第 120 天成瘤情况

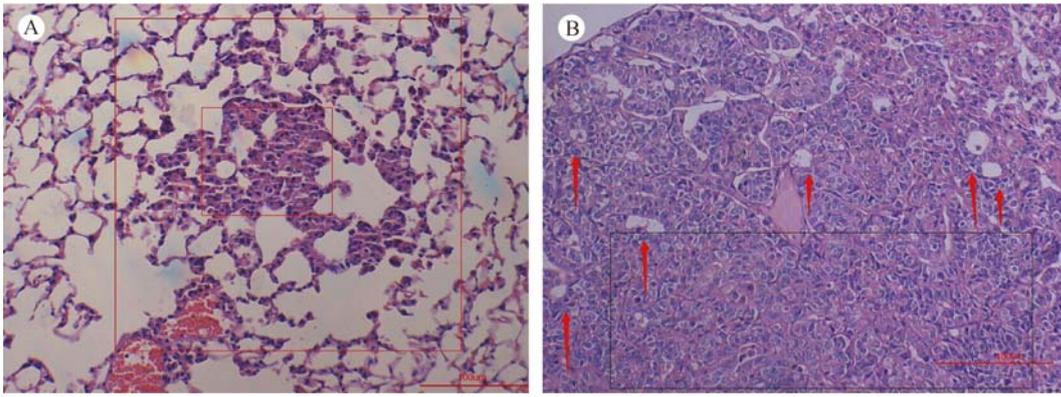
首次给药 120 d 时肿瘤生成情况见表 2。

A₁₂₀、B₁₂₀、C₁₂₀ (见图 1C)、D₁₂₀ 和 E₁₂₀ 组的成瘤率分别为 30%、50%、100%、100% 和 100%, 成瘤总数分别为 30、124、302、351 和 362。A₁₂₀、B₁₂₀、C₁₂₀、D₁₂₀ 和 E₁₂₀ 组, 每组中直径小于 0.5 mm 的肿瘤数分别为 21、98、123、140 和 108, 分别占总瘤数的 70%、79%、41%、40% 和 30% (图 1C)。

因子的作用机制与人类相同, 剂量和作用时间与成瘤率有相关性; ④成瘤率高, 重复性好; ⑤所需时间短, 操作简单, 费用低。

小鼠的肺癌在生物学、组织学、分子学和基因表达方面与人肺癌相似, 因而在肺癌研究中应用较多^[8]。小鼠有饲养繁殖容易、肿瘤的发展不受性别和年龄的影响、成瘤周期短等优点。用作肺癌模型的常用小鼠品种有^[9]: A/J 系小鼠、SWR 系小鼠、BALB/c 小鼠、C₅₇BL 小鼠、裸鼠和 KM 小鼠等, 但前几者或为近交系、有免疫缺陷或易产生免疫耐受, 或成瘤率低、价格较贵; KM 小鼠是远交系, 具有正常免疫功能, 且不容易产生免疫耐受, 且价格便宜^[9], 故本研究其作为模型动物诱导肺癌。

诱发型肺癌模型是指通过加入能够诱发肿瘤形成的因素而使动物产生肺癌的方法, 可经人为控制实验条件以及在限定的时间内获得可靠的结果, 同时可以通过试验品系的选择而减少个体差异, 可以



注:A. 腺瘤样增生 大红框为肿瘤整体,小红框内为小范围实变区,大框与小框之间为鳞屑样结构(lepidic pattern)。bar = 100 μ m。B. 腺癌 红色箭头示肿瘤腺管组织,框内为肿瘤实性浸润区。bar = 100 μ m。(HE, \times 100)

图3 早期、晚期肺腺癌镜下病理学表现

Note. A. Microscopic appearance of an early lung tumor in a mouse. The large red frame shows the whole tumor, while the small frame shows the solid component. The area between them shows the lepidic components. The scale bar in the lower right corner is 100 μ m. B. Invasive adenocarcinoma of the lung. The red arrows indicate the acinar structures of the tumor, while the structures inside black frame are the invasive components of the tumor. The scale bar in the lower right corner is 100 μ m.

Fig. 3 Microscopic appearance of an early invasive adenocarcinoma(HE, \times 100)

模拟相似的人类环境包括主要毒性物质的接触方式,从而制造出与人类肺癌发生、发展过程类似的肺肿瘤^[10,11]。此类模型不要求动物有免疫缺陷,不要求改变整个动物的肺组织或体细胞遗传基因,能最大程度的模拟了人体内环境,所以本研究采取此种研究方法。

致癌剂引入的途径可分成以下几类:经口、吸入、经皮穿刺肺内注射、支气管灌注、皮下注射和腹腔注射^[12-15,18]。其中皮下注射途径是指皮下注射肺癌诱导剂,吸收入血后循环至肺部后作用于肺部,从而诱导肺癌的方法。该方法操作简单,不损伤肺部组织原来的结构,不会引起感染等干扰。王修杰等^[15]用0.6%的亚硝基胍经皮下注射后雌性KM小鼠,每周一次,共12次,于第82天解剖发现肉眼肺肿瘤发生率为92%,镜下肺肿瘤恶变率54%。但他们诱导的肺癌多为晚期,用于影像学研究意义不大。我们借鉴其多次注射的方式,在保证了剂量足够的情况下可获得100%的致瘤率,仅需时100天,且模型稳定均一,均为腺癌。在100d时能获得最多小于0.5mm的早期肿瘤,平均每只鼠有13.2个。而且,0.5~1mm大小的肿瘤较少,只有极少的肿瘤达1~2mm,未发现大于2mm的肿瘤。我们还随机在镜下观察和测量了C₁₀₀组的106个肿瘤,见鳞屑型、实性和混合型三种生长方式。其中鳞屑型最小,平均大小0.34mm;实性最大,平均0.57mm;混合型

大小介于两者间,平均0.47mm。混合型中随着肿瘤增大,鳞屑性成分下降。上述生长方式及其与肿瘤大小的关系与人类肺癌是相同的。虽然小鼠早期肺癌的诊断标准未见报道,而且人类关于不典型腺瘤样增生、原位腺癌和浸润性腺癌的标准也不能套用于小鼠肺癌,但我们对照研究了20个小鼠肺和20个人类肺的直径和肺泡大小,发现两者大小均相差20倍。因此0.5mm大小的小鼠肺癌相当于10mm的人类肺癌,故以0.5mm大小为小鼠早期肺癌的标准是合理的。

能够诱导动物发生肿瘤的因素很多,主要有化学致癌物、物理致癌因素及生物致癌因素等,其中最常用的为化学致癌剂,包括芳香胺、曲霉毒素和亚硝基类等^[15-17]。芳香胺需要长期大量给药才能致癌,致癌作用常常受营养或者激素的影响。霉菌及其毒素,致癌性极强,小剂量即可引起动物死亡,不易把握,故较少用于制备动物肺癌模型^[17]。亚硝基类致癌性强,小剂量一次给药即可致癌,对多种动物的许多器官都致癌,具有不同结构的亚硝胺有明显的器官亲和性,其中二戊基亚硝胺、乙基亚硝胍和亚硝基胍等均能引起肺癌^[15,19]。本实验采用的亚硝基胍虽需多次给药,但总的使用剂量小,致癌剂量与致死剂量差距大,通过小鼠皮下注射药物后缓慢吸收,能特异性的引起肺肿瘤而不产生其他器官肿瘤,是理想的肺癌致癌剂。

本研究着眼点在早期肿瘤的形态学方面,所以设置了多个时间点,一方面明确肿瘤发生的时间点、各时间段的肿瘤发生率;另一方面明确早期肺癌的最佳时间段。另外,在剂量方面,通过简单的分组,我们得出了比前人更节省剂量的肺癌诱导型模型,为进一步研究早期肺腺癌的形态学奠定了基础。本研究结果表明:采用浓度为 2.0 mg/mL 的亚硝基胍溶液 0.2 mL 每周皮下注射,连续注射四周(C组),100 天时能获得 100% 的肺腺癌成瘤率和最多的小于 0.5 mm 肿瘤数,为最佳的小鼠早期肺腺癌模型。

(本文小鼠肺癌病理诊断得到上海市胸科医院病理科邵晋晨副主任医师的大力支持,在此致谢!)

参 考 文 献

- [1] Henschke CI, Boffetta P, Gorlova O, et al. Assessment of lung-cancer mortality reduction from CT screening [J]. *Lung Cancer*, 2011, 71 (3): 328 - 332.
- [2] Henschke CI, McCauley DI, Yankelevitz DE, et al. Early lung cancer action project: overall design and findings from baseline screening [J]. *Lancet*, 1999, 354(9173): 99 - 105.
- [3] Diederich S, Wormanns D, Semik M, et al. Screening for early lung cancer with low-dose spiral CT: prevalence in 817 asymptomatic smokers [J]. *Radiology*, 2002, 222(3): 773 - 781.
- [4] Sone S, Nakayama T, Honda T, et al. Long-term follow-up study of a population-based 1996 - 1998 mass screening programme for lung cancer using mobile low-dose spiral computed tomography [J]. *Lung Cancer*, 2007, 58(3): 329 - 341.
- [5] Xing Y, Li Z, Jiang S, et al. Analysis of pre-invasive lung adenocarcinoma lesions on thin-section computerized tomography [J]. *Clin Respir J*, 2014, 11(4): 282 - 286.
- [6] Cavanaugh D, Johnson E, Price RE, et al. In vivo respiratory-gated micro-CT imaging in small-animal oncology models [J]. *Mol Imaging*, 2004, 3(1): 55 - 62.
- [7] Li M, Jirapatnakul A, Biancardi A, et al. Growth pattern analysis of murine lung neoplasms by advanced semi-automated quantification of micro-CT images [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e83806.
- [8] Malkinson AM. Primary lung tumors in mice as an aid for understanding, preventing, and treating human adenocarcinoma of the lung [J]. *Lung Cancer*, 2001, 32(3): 265 - 279.
- [9] 李怡岚, 何宁, 乔珊珊, 等. 不同品系小鼠对乌拉坦诱导肺肿瘤的敏感性 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2006, 24(11): 671.
- [10] Liu J, Johnston MR. Animal models for studying lung cancer and evaluating novel intervention strategies [J]. *Surg Oncol*, 2002, 11(4): 217 - 227.
- [11] Tuveson DA, Jacks T. Modeling human lung cancer in mice: similarities and shortcomings [J]. *Oncogene*, 1999, 18(38): 5318 - 5324.
- [12] De Flora S, Izzotti A, D'Agostini F, et al. Induction and modulation of lung tumors: genomic and transcriptional alterations in cigarette smoke-exposed mice [J]. *Exp Lung Res*, 2005, 31(1): 19 - 35.
- [13] 顾其华, 胡成平, 夏莹, 等. 3,4-苯并芘肺内注射构建大鼠肺肿瘤模型的实验研究 [J]. *中国肺癌杂志*, 2007, 10(1): 172 - 175.
- [14] Koohdani F, Sasani F, Mohammad K, et al. Comparison of ki-67 antigen expression and K-ras mutation in lung tumours induced by urethane in mice [J]. *Singapore Med J*, 2009, 50(7): 729 - 733.
- [15] 王修杰, 罗德元, 王朝俊. 甲基硝基亚硝基胍诱发小鼠肺腺癌的病理观察 [J]. *华西医科大学学报*, 1988, 19(4): 376 - 379.
- [16] 罗琳琳, 李秋银. 实验动物模型的建立方法 [J]. *国际呼吸杂志*, 2011, 32(16): 1264 - 1267.
- [17] 黄向华, 张祥宏, 李月红, 等. 三种真菌毒素诱发 NIH 小鼠肺癌的试验研究 [J]. *河北医科大学学报*, 2003, 24(1): 22 - 23.
- [18] 张修彦, 詹纯列. 转基因肺癌动物模型研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(10): 64 - 66.
- [19] 侯敏, 戴丽军, 谭小军, 等. 小鼠肺腺癌模型的建立及肿瘤病理分析 [J]. *中国实验动物学杂志*, 2012, 20(4): 75 - 79.

[收稿日期] 2014-10-30



野生小鼠来源1号染色体替换系小鼠的生长表型与血液生化检测

高遒¹, 徐伟¹, 徐福意¹, 张耀奇¹, 赵莹², 赵丽亚², 周宇荀¹, 李凯^{1*}, 肖君华¹

(1. 东华大学化学化工与生物工程学院, 上海 201620; 2. 上海实验动物研究中心, 上海 201203)

【摘要】 目的 分析野生小鼠来源1号染色体替换系小鼠群体的生长表型与血液生化指标, 探讨替换系群体的QTL定位潜力。方法 以染色体替换系近交后代小鼠为研究对象, 测定其体重、体长、尾长、血液生化、内脏器官重量等表型数据, 统计其与C57BL/6差异显著性。结果 发现替换系小鼠在多个指标上与C57BL/6具差异有显著性。不同发育时期的外部表型上与C57BL/6相比, 体重具显著差异的是B6-Chr1^{KM}等6个品系, 体长具显著差异的是B6-Chr1^{KM}等5个品系, 尾长具显著差异的是B6-Chr1^{KM}等9个品系; 部分品系在肝、脾、肾脏和脑部重量上存在与C57BL/6的显著差异; 生化指标上, 丙氨酸氨基转移酶B6-Chr1^{CM}雌鼠显著偏高, 碱性磷酸酶B6-Chr1^{HZ}雌鼠显著偏高、B6-Chr1^{KM}雄鼠显著偏低, 总胆红素B6-Chr1^{CM}雄鼠、B6-Chr1^{SMX}雄鼠和B6-Chr1^{HZ}雄鼠显著偏高, 甘油三酯B6-Chr1^{SMX}雄鼠显著偏高, 总胆固醇B6-Chr1TM雄鼠显著偏高。结论 培育的野生小鼠来源的1号染色体替换系群体在部分表型上与C57BL/6差异有显著性, 具备作为QTL定位的遗传资源潜力。

【关键词】 近交系小鼠; 野生小鼠; 生长发育; 血液生化; 脏器系数; 染色体替换系小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)03-0233-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.003

Detection of growth phenotype and blood biochemical parameters of wild type-derived chromosome 1 substitution mouse strain

GAO Chuan¹, XU Wei¹, XU Fu-yi¹, ZHANG Yao-qi¹, ZHAO Ying², ZHAO Li-ya²,
ZHOU Yu-xun¹, LI Kai, XIAO Jun-hua¹

(1. College of Chemical Engineering & Biological Engineering, Donghua University, Shanghai 2016203, China;
2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203)

【Abstract】 Objective To analyze the growth phenotype and blood biochemical parameters of chromosome 1 substitution mouse strain (CSS1), and investigate their potential of QTL mapping. **Methods** Body weight, body length, tail length, organ weight of the CSS1 mice were measured at different days to create a growth curve while blood biochemical indexes were measured at about the 80th day. **Results** The CSS1 mice were different from C57BL/6 mice in several indexes. Compared with the C57BL/6 mice during different developmental stages, six strains including B6-Chr1^{KM} mice were significantly different in body weight. There were five strains including B6-Chr1^{CM} mice significantly different with C57BL/6 mice in body length, and all of the CSS1 mice were significantly different from C57BL/6 mice in tail length. Part of CSS1 mice were significantly different from C57BL/6 mice in the weight of liver, spleen, kidney and brain. The ALT of female B6-Chr1^{CM} mice was significantly higher than that in the C57BL/6 mice. The ALP of female B6-Chr1^{HZ} mice was significantly higher than that in the male C57BL/6 and B6-Chr1^{KM} mice, and was significantly lower than that in the C57BL/6 mice. The TB of male B6-Chr1^{CM}, B6-Chr1^{SMX} and B6-Chr1^{HZ} mice was significantly higher than that of the C57BL/6

【基金项目】 国家自然科学基金(编号:31171199);上海市创新行动实验动物研究项目(编号:11140900200, 13140900300);中央高校基本科研业务费专项资金, 东华大学“励志计划”(B201308)。

【作者简介】 高遒(1990-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 小鼠遗传学。Tel: 021-67792650; E-mail: chuan_g@126.com

【通讯作者】 李凯(1978-), 男, 副研究员, 研究方向: 小鼠遗传学。Tel: 021-67792652; E-mail: likai@dhu.edu.cn

mice. The TG of male B6-Chr1^{SMX} mice and male B6-Chr1^{TW} mice was significantly higher than that in the C57BL/6 mice.

Conclusions The phenotype of Chr1 CSS mice is quite different from commonly used inbred strain C57BL/6 mice. CCS1 mice show great potential in QTL mapping for their characteristic growth phenotype and blood biochemical indexes.

【Key words】 Inbred mice; Wild mice; Growth curve; Blood biochemical indexes; Organ coefficient; Chromosome 1 substitution mouse strain

由于与人类在遗传、生理和生化方面惊人的相似性,小鼠作为模式生物来研究决定生理性状的基因颇具历史^[1]。数以千计的数量性状基因座(quantitative trait loci, QTL)已经在小鼠基因组上被定位,主要使用经典的同源导入近交系法^[2]。由于该法受限于已有近交系小鼠群体的低分辨率 QTL 定位精度^[3,4],Nadeau 等^[5-10]在 2000 年左右提出的染色体替换系群体加速了 QTL 的定位与基因发现研究。染色体替换系群体是将供体品系中一根完整的染色体通过回交方式转入到受体品系的基因背景中,再通过回交的方式使得 99% 以上的基因背景与受体品系完全相同^[5,10,11]。由于排除了基因的相互作用以及多重 QTL 的共分离作用,在染色体替换系群体中观察到的表型差异往往比不同品系间的差异更明显^[9-11]。

早期的染色体替换系群体,多将一近交系的染色体替换至另一近交系小鼠,如 A/J 和 B6 之间的染色体替换群体对焦虑表型的 QTL 研究^[12],以及通过 MSM 小鼠与 B6 替换系群体定位代谢相关 QTL^[10]。然而,经典近交系小鼠的染色体替换系群体与自然群体相比 QTL 的数量非常有限,从而影响表型的差异以及基因座的发现^[13]。研究发现野生小鼠群体与实验室近交系小鼠相比具有更为广泛的连锁不平衡和更多的等位基因,这些发现使得野生小鼠成为发掘 QTL 的更为理想的模式生物^[2,14,15]。

本课题组自 2007 年起,开始收集中国野生小家鼠资源,并培育 1 号染色体替换群体。迄今已累计回交 7 代以上,并已近亲交配 2 代以上。本文就其中 9 个野生小家鼠 1 号染色体替换系的体重、体长、尾长变化等生长发育特性与内脏器官重量和血液生化指标进行了一系列测定,以分析其性状异同。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本课题组培育的 9 个染色体替换品系小鼠: B6-Chr1^{CM} (简称 CM), B6-Chr1^{HZ} (简称 HZ), B6-Chr1^{KM} (简称 KM), B6-Chr1^{SJ3} (简称 SJ3), B6-Chr1^{SMX} (简称 SMX), B6-Chr1^{TW} (简称 TW), B6-

Chr1^{ZC} (简称 ZC), B6-Chr1^{ZZ1} (简称 ZZ1), B6-Chr1^{ZZ2} (简称 ZZ2)。对照组 C57BL/6 小鼠(简称 B6),购自上海斯莱克实验动物有限公司[SCXK(沪)2012-0002]。饲料为上海西普尔-必凯实验动物有限公司生产的大小鼠高压饲料。染色体替换品系小鼠的饲养繁殖实验在东华大学实验动物设施内[SYXK(沪)2014-0022]进行。

用于检测生长曲线的小鼠每个品系个数和回交、自交代数见表 1。

表 1 生长发育检测用小鼠数量及自交代数

Tab. 1 The mice used for growth phenotyping

品系 Strains	回交代数 Back-cross generation	自交代数 Inter-cross generation	雄鼠 Males	雌鼠 Females
B6			10	10
CM	8	2	15	15
HZ	8	2	12	16
KM	8	1	13	11
SJ3	10	2	17	15
SMX	7	2	10	13
TW	10	2	11	18
ZC	10	2	14	10
ZZ1	9	2	14	17
ZZ2	9	2	14	24

1.2 主要试剂与仪器

血液生化试剂丙氨酸氨基转移酶(ALT),天冬氨酸转氨酶(AST),低密度脂蛋白(LDL),高密度脂蛋白(HDL),总蛋白(TP),白蛋白(ALB),碱性磷酸酶(ALP),甘油三酯(TG),总胆固醇(TC),尿酸(UA),总胆红素(TB),葡萄糖(GLU),肌酐(CRE)均购买自上海科华生物工程股份有限公司。使用上海科华生物工程股份有限公司生产的 KHB 卓越 310 全自动生化分析仪检测上述指标。

1.3 实验方法

1.3.1 体重测量

各品系分别选取一定数量的雌性和雄性小鼠(见表 1),由出生第一天起,每 2 天测量一次体重,直至第 31 天;由 43(第 6 周)天开始每周测量一次体重,直至第 85 天(第 12 周)。

1.3.2 体长测量

抓取小鼠后使用直尺测量小鼠鼻尖到尾巴根部

的长度,测量频率与体重测量相同。

1.3.3 尾长测量

抓取小鼠后使用直尺测量小鼠尾根到尾尖的长度,测量频率与体重测量相同。

1.3.4 血液生化测量

取日龄为 85d 后的小鼠在采血前 14h 隔夜禁食,保留饮用水。采用眼眶静脉丛采血法,采取血液后放置于 4℃ 冰箱内 4h 后,3000 r/min 离心 10 min,取上层血清保存进行实验。溶血的样本丢弃。

1.3.5 器官重量测量

小鼠在采血后立即使用颈椎脱臼法处死,用 75% 乙醇浸泡消毒全身后,固定于解剖板上,使用眼科手术剪与眼科手术钳依次摘取心脏、肝脏、肺、脾脏、肾脏、脑部,并称重。

1.3.6 脏器系数

器官重量占体重的比例,以百分比形式表示。

1.4 统计方法

体重、体长、尾长以出生第 1 天、第 19 天、第 31 天和第 85 天的数据统计分析。使用 SPSS 20.0 软件,数据以均数 \pm 标准差形式表示,各组数据使用 *t* 检验与 B6 小鼠的数据进行比较,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 小鼠生长曲线

2.1.1 体重变化

由生长曲线图(图 1A, B)可知,体重增长速度可分为三个阶段,较快期间为第 1~19 天,最快期间为 19~31d, 31d 后进入平缓增长。故以出生第 1、19、31 和 85 天作为节点详细分析。

出生第 1 天, B6 雌鼠体重最低且与 KM ($P = 0.000$)、ZZ1 ($P = 0.014$)、TW ($P = 0.031$) 的雌鼠具显著差异;雄鼠中 B6 显著低于 KM ($P = 0.013$)。第 19 天, KM 雌鼠体重显著高于 B6 ($P = 0.004$); SJ3 雄鼠显著轻于 B6 ($P = 0.0265$)。第 31 天雌鼠中, KM 体重显著高于 B6 ($P = 0.023$), 而 SJ3 ($P = 0.005$)、CM ($P = 0.010$) 和 HZ ($P = 0.025$) 体重显著低于 B6; 雌鼠中, KM 体重显著高于 B6 ($P = 0.001$), SJ3 ($P = 0.031$) 和 TW ($P = 0.044$) 体重显著低于 B6。第 85 天, KM 显著高于 B6 (KM 雌 $P = 0.005$, KM 雄 $P = 0.000$), 以及 TW 显著低于 B6 (TW 雌 $P = 0.006$, TW 雄 $P = 0.001$)。所有的替换系小鼠群体中, KM 雌鼠和雄鼠在体重上从出生开

始一直高于其他品系小鼠。

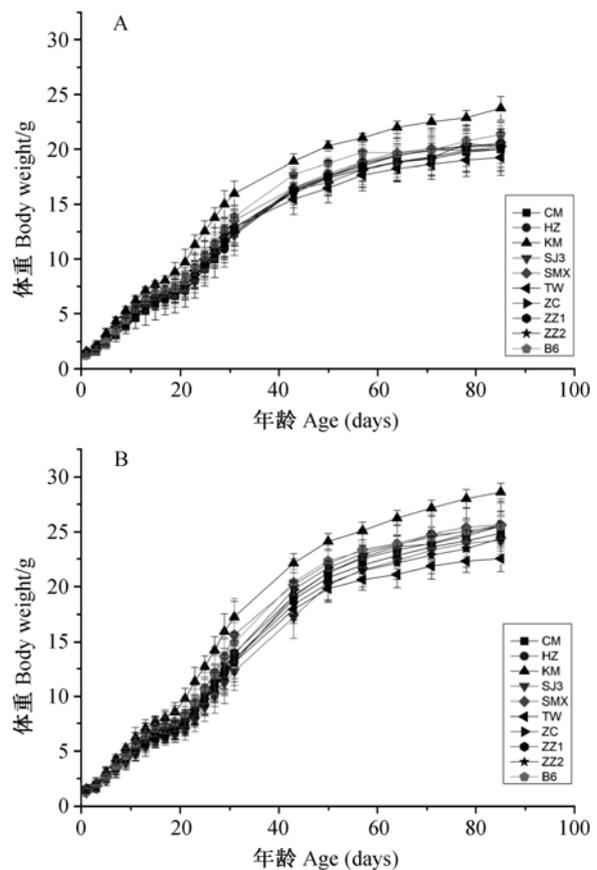


图 1 替换系群体小鼠(A. 雌鼠; B. 雄鼠)体重变化

Fig. 1 Growth curves of the chromosome substitution mice(A. Females; B. Males)

2.1.2 体长

体长变化如图 2(A, B)所示。第 1~19 天增长速度最快, 19~31d 次之, 31d 以后最为平缓。

替换系群体的新生鼠与 B6 差异无显著性。第 19 天时仅 KM 雌鼠体长显著大于 B6 ($P = 0.002$)。第 31 天雌鼠中, CM ($P = 0.001$)、SJ3 ($P = 0.001$)、HZ ($P = 0.013$)、SMX ($P = 0.028$) 与 ZZ1 ($P = 0.043$) 5 个品系的雌鼠体长显著低于 B6; 雄鼠中, KM 显著高于 B6 雄鼠 ($P = 0.006$), SJ3 显著低于 B6 ($P = 0.012$)。第 85 天时, 雌鼠中仅 CM 显著小于 B6 ($P = 0.039$); 雄鼠中, 仅 SMX 小于 B6 ($P = 0.023$)。

2.1.3 尾长

尾长变化如图 3(A, B)所示, 曲线趋势与体长类似。

新生替换系群体小鼠与 B6 差异无显著性。第 19 天, 雌鼠中 HZ ($P = 0.001$)、CM ($P = 0.001$)、

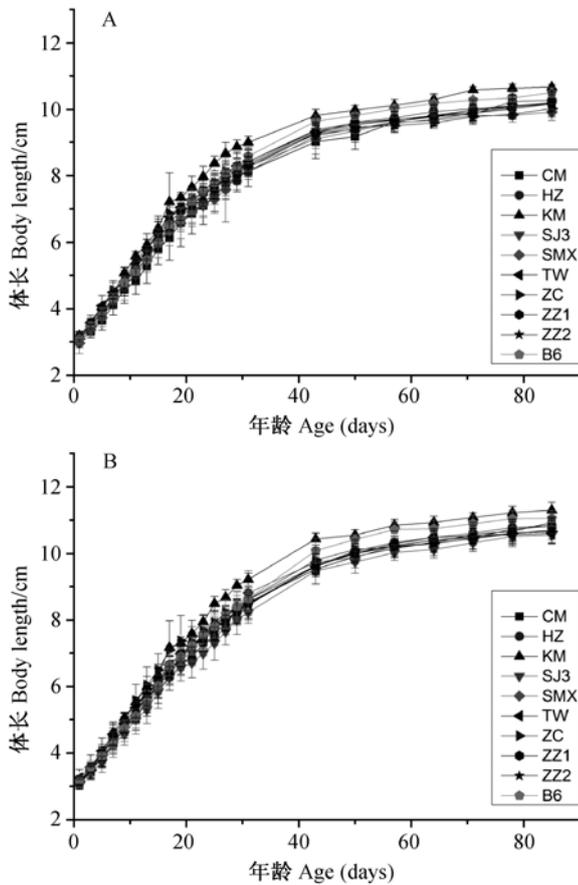


图 2 替换系群体小鼠(A. 雌鼠;B. 雄鼠)体长变化

Fig. 2 Body length curves of the male chromosome substitution mice(A. Females; B. Males)

SMX($P=0.015$)、ZZ2($P=0.028$)4 个品系的尾长显著低于 B6; 雄鼠中 HZ($P=0.000$)、SMX($P=0.000$)、SJ3($P=0.000$)、CM($P=0.000$)、ZZ2($P=0.001$)显著低于 B6。第 31 天时, 雌鼠中 HZ($P=0.001$)、SMX($P=0.002$)、ZZ2($P=0.005$)、CM($P=0.009$)显著短于 B6; 雄鼠中, SMX($P=0.000$)、CM($P=0.000$)、HZ($P=0.000$)、ZZ2($P=0.000$)、SJ3($P=0.001$)显著短于 B6。第 85 天, 雌鼠中 KM 显著长于 B6 显著($P=0.012$), 而 CM($P=0.000$)、HZ($P=0.000$)、SJ3($P=0.000$)、SMX($P=0.000$)、TW($P=0.000$)、ZC($P=0.001$)、ZZ1($P=0.013$)、ZZ2($P=0.000$)这 8 个品系均低于 B6 且差异有显著性。

2.2 替换系小鼠主要器官脏器系数

各品系小鼠主要器官的脏器系数如表 2 所示。

各品系小鼠心脏与 B6 差异无显著性。在肝与肺脏器系数上, 均仅 KM 雄鼠显著低于 B6; 在脾脏器系数上, HZ 雌鼠与 KM 雄鼠显著低于 B6; 在肾脏

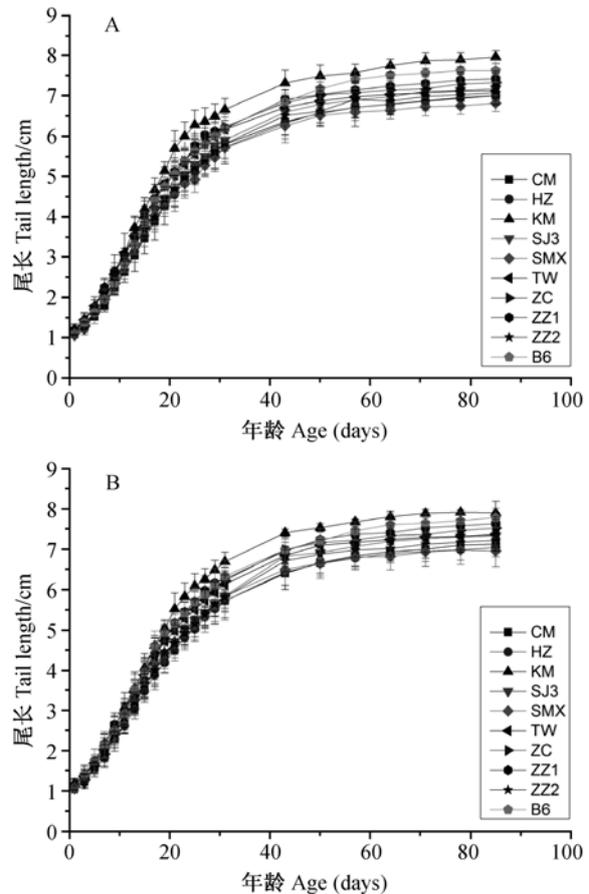


图 3 替换系群体小鼠(A. 雌鼠;B. 雄鼠)尾长变化

Fig. 3 Tail length curves of the chromosome substitution mice(A. Females; B. Males)

器系数上, KM 雄鼠、TW 雌鼠、ZC 雌雄鼠, 与 ZZ1 雄鼠显著低于 B6, ZZ2 雄鼠显著高于 B6; 在脑脏器系数上, 雌鼠中仅 KM 低于 B6, 雄鼠中 CM、HZ、KM、SMX、ZZ1 与 ZZ2 均显著低于 B6, TW 雄鼠显著高于 B6。

2.3 血液生化指标测定结果

总计 13 个指标中, ALB、AST、CRE、GLU、UA、TP、HDL 和 LDL 等 8 个指标与 B6 相比差异无显著性, 其余 5 个指标中存在替换系小鼠与 B6 差异有显著性(表 3)。

ALP 结果显示, HZ 雌鼠显著高于 B6($P=0.001$); KM 雄鼠显著低于 B6($P=0.031$); ALT 结果显示, CM 雌鼠显著高于 B6($P=0.011$); TB 的结果显示, 雄鼠中 CM($P=0.000$)、SMX($P=0.000$)与 HZ($P=0.041$)均显著高于 B6; TG 结果显示, SMX 雄鼠显著高于 B6($P=0.044$); TC 结果显示, TW 雄鼠显著高于 B6($P=0.005$)。

表 2 脏器系数

Tab. 2 Organ coefficients of the mice

品系 Strains	性别 Gender	心 Heart	肝 Liver	脾 Spleen	肺 Lung	肾 Kidney	脑 Brain
CM	♀	0.474	4.357	0.506	0.639	1.196	1.992
	♂	0.493	4.076	0.286	0.554	1.316	1.649*
HZ	♀	0.473	4.252	0.307*	0.572	1.138	2.075
	♂	0.452	4.254	0.304	0.566	1.217	1.593*
KM	♀	0.384	3.929	0.330	0.521	1.087	1.774*
	♂	0.421	3.701*	0.209*	0.444*	1.030*	1.446*
SJ3	♀	0.497	4.561	0.385	0.537	1.165	2.085
	♂	0.462	4.372	0.338	0.503	1.222	1.625*
SMX	♀	0.454	4.466	0.418	0.625	1.094	2.150
	♂	0.416	4.374	0.334	0.495	1.212	1.601*
TW	♀	0.487	4.926	0.385	0.616	1.186	2.243
	♂	0.462	4.887	0.474	0.537	1.144*	1.742*
ZC	♀	0.434	4.558	0.375	0.582	1.083*	2.321
	♂	0.414	4.456	0.268	0.524	1.097*	1.838
ZZ1	♀	0.457	4.526	0.393	0.553	1.118	2.059
	♂	0.413	4.384	0.379	0.507	1.119*	1.569*
ZZ2	♀	0.464	4.533	0.531	0.633	1.286	2.011
	♂	0.473	4.171	0.379	0.525	1.369*	1.641*
B6	♀	0.469	4.409	0.425	0.599	1.233	2.140
	♂	0.451	4.321	0.281	0.533	1.215	1.736

注:脏器系数 = 脏器重量(g)/体重(g) × 100。* P < 0.05, 与 C57BL/6 比较(下同)。

Note. Organ coefficient = organ weight (g)/ body weight (g) × 100. P < 0.05 compared with the C57BL/6 group. The same as below

表 3 替换系群体小鼠与 B6 存在显著差异的血液生化指标($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Blood biochemical indexes with significant differences between the chromosome substitution strain and B6 mice

品系 Strains	数量 n	性别 Sex	碱性磷酸酶 ALP U/L	丙氨酸氨基 基转移酶 ALT U/L	总胆红素 TB μmol/L	甘油三酯 TG mmol/L	总胆固醇 TC mmol/L
B6	10	♀	89.89 ± 26.14	24.3 ± 8.63	1.54 ± 0.46	0.62 ± 0.22	1.99 ± 0.36
	11	♂	70.1 ± 24.93	37.91 ± 21.71	1.87 ± 0.63	1.2 ± 0.32	2.41 ± 0.42
CM	11	♀	84.45 ± 26.42	66 ± 44.82*	2.65 ± 1.72	0.61 ± 0.16	1.77 ± 0.79
	13	♂	71.58 ± 17.17	46.92 ± 29.72	3.68 ± 0.64	1.29 ± 0.81	2.34 ± 0.62
HZ	16	♀	126.31 ± 35.89*	42.5 ± 25.44	2.43 ± 0.61	0.88 ± 0.32	2.63 ± 0.7
	10	♂	90.56 ± 21.08	32.67 ± 15.09	3.12 ± 1.07*	0.74 ± 0.22	2.23 ± 0.55
KM	10	♀	70 ± 33.7	34.6 ± 10.17	0.94 ± 0.46	0.82 ± 0.54	1.37 ± 0.86
	10	♂	48.36 ± 26.74*	35.27 ± 9.76	1.59 ± 0.44	0.97 ± 0.42	1.97 ± 0.79
SJ3	12	♀	81.58 ± 21.18	38.67 ± 11.23	2.06 ± 0.7	0.99 ± 0.61	2.35 ± 0.51
	12	♂	59.08 ± 24.42	31.75 ± 9.83	2.56 ± 0.47	1.04 ± 0.29	2.45 ± 0.75
SMX	14	♀	78.79 ± 33.96	38.36 ± 28.31	1.98 ± 0.48	1.29 ± 0.9	2.36 ± 0.52
	9	♂	49.11 ± 25.85	47.22 ± 31.48	3.31 ± 1.26	1.69 ± 0.92*	2.92 ± 0.81
TW	14	♀	104.86 ± 34.79	42.21 ± 19.92	1.64 ± 0.46	0.92 ± 0.37	2.9 ± 1.06
	16	♂	73 ± 21.38	45.81 ± 28.07	2.3 ± 0.59	1.24 ± 0.42	3.7 ± 0.93*
ZC	7	♀	92.88 ± 21.52	50.88 ± 18.19	1.31 ± 0.44	0.8 ± 0.16	2.6 ± 0.49
	10	♂	69 ± 21.72	44.45 ± 16.18	1.91 ± 0.57	1.15 ± 0.25	2.59 ± 0.57
ZZ1	15	♀	67 ± 21.54	42.6 ± 23.02	2.19 ± 0.47	0.82 ± 0.21	2.61 ± 0.55
	11	♂	49.78 ± 23.63	35.55 ± 17.58	2.77 ± 0.69	1.05 ± 0.27	2.27 ± 0.61
ZZ2	16	♀	92.75 ± 30.64	42.31 ± 20.74	2.67 ± 0.73	0.91 ± 0.34	2.21 ± 0.97
	12	♂	70.58 ± 13.07	42.09 ± 23.65	2.88 ± 0.65	1.06 ± 0.38	2.36 ± 0.51

3 讨论

在本研究中,对 9 个野生小鼠来源对的 1 号染色体替换系小鼠进行了表型检测,发现在体长、体重、尾长,以及心脏、肾脏、脑部重量,丙氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶、总胆红素、甘油三酯、总胆固醇这些指标上都存在着替换系群体小鼠与 B6 显著差

异。

纵观替换系小鼠整体生长过程,特别是体重曲线上,大部分品系在不同时间段的生长速度存在 2 个转折点。1 ~ 19 d 时,生长速度较快,而 19 ~ 31 d 左右生长速度最快,31 d 以后,增长则较为平缓,并且品系之间的差异逐渐明显,这一趋势与先前结果基本一致^[10]。

器官重量上总体差异不大,但在脏器系数上差异明显。除心脏外的其他器官,替换系与 B6 均存在显著差异。体重、体长在内的生长发育是由多个过程控制调节的,包括细胞增殖与生长,细胞的位置,细胞的凋亡^[16]。此外,已经发现身体发育和器官大小是由多个染色体影响的,因此仍有 QTL 挖掘的空间。

不同的染色体替换系品系小鼠在血液生化指标表现出较大的变异,如:TW 雌雄鼠在高密度脂蛋白、总胆固醇上的高数值;SMX 雌雄鼠在甘油三酯上显示出的高数值。B6-A/J 的染色体替换系的研究中,在不同染色体上发现了 7 个影响雄鼠血清胆固醇的 QTL^[8],而在 B6-M/m 的研究中则发现有 14 个染色体与胆固醇相关^[10]。血液生化、解剖学的 QTL 由基因和环境因素共同控制,但是自然环境累积的高度选择压力,使野生来源小鼠的表型在容易出现极端表型^[17]。

基因背景的差异对于小鼠的生长发育、血液生化等表型都有非常大的作用。目前已有超过 400 个控制重要生理生化性状的 QTL 在小鼠 1 号染色体上被发现^[10,13,18,19]。这些 QTL 可以认为是前人完成的科研“半成品”,需进一步的精细定位以便克隆相关基因。野生来源小鼠的许多指标已经展现出与基因功能研究的相关性^[20,21],是系统研究复杂性状新通路和新调控方式的潜在资源^[3,22]。随着 DNA 测序技术的快速发展,高通量的基因组测序数据已经远快于生理生化数据的产出,然而表型数据仍是揭示基因功能的重要基础^[23]。

参 考 文 献

- [1] O'Brien T, Woychik R. Our small relative [J]. Nat Genet, 2003, 33: 3-4.
- [2] Laurie CC, Nickerson DA, Anderson AD, et al. Linkage disequilibrium in wild mice [J]. PLoS Genet, 2007, 3(8): e144.
- [3] Guenet JL, Bonhomme F. Wild mice: An ever-increasing contribution to a popular mammalian model [J]. Trends Genet, 2003, 19(1): 24-31.
- [4] Wade CM, Kulbokas EJ, Kirby AW, et al. The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome [J]. Nature, 2002, 420: 574-578.
- [5] Nadeau JH, Singer JB, Matin A, et al. Analysing complex genetic traits with chromosome substitution strains [J]. Nat Genet, 2000, 24(3): 221-225.
- [6] Matin A, Collin GB, Asada Y, et al. Susceptibility to testicular germ-cell tumours in a 129. MOLF-Chr 19 chromosome substitution strain [J]. Nat Genet, 1999, 23: 237-240.
- [7] Cowley AW Jr, Roman RJ, Kaldunsk ML, et al. Brown Norway chromosome 13 confers protection from high salt to consomic Dahl S rat [J]. Hypertension, 2001, 37(2): 456-461.
- [8] Singer JB, Hill AE, Burrage LC, et al. Genetic dissection of complex traits with chromosome substitution strains of mice [J]. Science, 2004, 304(5669): 445-448.
- [9] Shao H, Burrage LC, Sinasac DS, et al. Genetics architecture of complex traits: large phenotypic effects and pervasive epistasis [J]. Proc Natl Acad Sci, 2008, 105(50): 19910-19914.
- [10] Takada T, Mita A, Maeno A, et al. Mouse inter-subspecific consomic strains for genetic dissection of quantitative complex traits [J]. Genome Res, 2008, 18(3): 500-508.
- [11] Gregorova S, Divina P, Storchova R, et al. Mouse consomic strains: exploiting genetic divergence between *Mus m. musculus* and *Mus m. domesticus* subspecies [J]. Genome Res, 2008, 18(3): 509-515.
- [12] Singer JB, Hill AE, Nadeau JH, et al. Mapping quantitative trait loci for anxiety in chromosome substitution strains of mice [J]. Genetics, 2005, 169(2): 855-862.
- [13] Xiao J, Liang Y, Li K, et al. A novel strategy for genetic dissection of complex traits: the population of specific chromosome substitution strains from laboratory and wild mice [J]. Mamm Genome, 2010, 21(7-8): 370-376.
- [14] Salcedo T, Geraldes A, Nachman MW. Nucleotide variation in wild and inbred mice [J]. Genetics, 2007, 177(4): 2277-2291.
- [15] Mott R, Flint J. Prospects for complex trait analysis in the mouse [J]. Mamm Genome, 2008, 19(5): 306-308.
- [16] Conlon I, Raff M. Size control in animal development [J]. Cell, 1999, 96(2): 235-244.
- [17] Zhou Y, Liang Y, Li K, et al. The phenotypic distribution of quantitative traits in a wild mouse F1 population [J]. Mamm Genome, 2012, 23(3-4): 232-240.
- [18] Champy MF, Selloum M, Zeitler V, et al. Genetic background determines metabolic phenotypes in the mouse [J]. Mamm Genome, 2008, 19(5): 318-331.
- [19] <http://www.informatics.jax.org>
- [20] 管彤,张静姝,李大鸣, et al. TW 近交系小鼠的血液生化及毛色基因检测 [J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(4): 39-42
- [21] 张婷婷,仝莉,肖君华,等. 特异区段替换小鼠性发育表型的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(2): 1-7
- [22] Peters LL, Robledo RF, Bult CJ, et al. The mouse as a model for human biology: a resource guide for complex trait analysis [J]. Nat Rev Genet, 2007, 8: 58-69
- [23] Brown SD, Hancock JM, Gates H. Understanding mammalian genetic systems: the challenge of phenotyping in the mouse [J]. PLoS Genet, 2006, 2(8): 1131-1137.

[收稿日期] 2014-12-08



肿瘤对小鼠肾上腺皮质细胞胆固醇 稳态分子表达的影响

潘志强, 方肇勤, 卢文丽, 刘小美, 张园园

(上海中医药大学基础医学院, 上海 201203)

【摘要】 目的 探讨肝癌状态下肿瘤大小对肾上腺皮质细胞内胆固醇稳态分子表达的影响。方法 在220只KM小鼠右腋下接种H22肝癌腹水细胞,复制肝癌荷瘤小鼠模型,在接种第11天依据肿瘤体积排序,筛选瘤体大组和瘤体小组各18只,并设立18只正常小鼠为对照组。采用生化方法检测血脂含量;应用实时荧光定量PCR检测各组小鼠肾上腺组织 *Srb1*、*Ldlr*、*Npc1*、*Npc2*、*Stard3*、*Hmgcr*、*Lipe*、*Acat1*、*Abca1*、*Abcg1*、*Srebp-1c*、*Lxra*、*Lxrβ*、*Rxra*、*Apoa1*、*ApoE* 基因 mRNA 表达,并以 *Gapdh* 和 β -actin 两个基因作内参照;应用 Western blot 方法检测 SRB1 和 ApoA1 蛋白表达。结果 瘤体大组小鼠肿瘤质量明显大于瘤体小组 ($P < 0.05$);与正常组比较,两组肝癌小鼠血浆 HDL-C 显著下降 ($P < 0.05$);瘤体大组肝癌小鼠,肾上腺皮质细胞胆固醇摄取相关分子 *Srb1*、*Ldlr*、*Apoa1* 基因表达显著升高 ($P < 0.05$),且 SRB1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$),而 ApoA1 蛋白表达在肿瘤大组明显高于肿瘤小组 ($P < 0.05$);调节胆固醇酯化及其分解酶 *Acat1* 与 *Lipe* 基因表达在瘤体大组显著低于肿瘤小组 ($P < 0.05$);调节胆固醇逆向流出胞外的 *Abca1* 和 *Abcg1* 基因表达在瘤体大组也显著下降 ($P < 0.05$);而调控细胞胆固醇稳态的核受体 *Srebp-1c*、*Lxra* 与 *Rxra* 基因表达无明显变化,但肿瘤小组 *Srebp-1c*、*Lxrβ* 与 *Rxra* 基因表达显著升高 ($P < 0.05$)。内质网合成胆固醇的酶 *Hmgcr* 与载脂蛋白 *ApoE* 在各组间均无显著差异。结论 在肝癌状态下,小鼠为适应肿瘤慢性反复的应激,肾上腺皮质细胞能有效利用胆固醇合成皮质激素。

【关键词】 肾上腺皮质;胆固醇;皮质激素;肝癌;高密度脂蛋白受体;载脂蛋白 A1;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)03-0239-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.004

Effect of tumor size on the expression of adrenal cholesterol homeostasis molecules in H22 hepatoma-bearing mice

PAN Zhi-qiang, FANG Zhao-qin, LU Wen-li, LIU Xiao-mei, ZHANG Yuan-yuan

(Basic Medical School of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai, 201203 China)

【Abstract】 Objective To study the effect of tumor size on the expression of adrenal cholesterol homeostasis molecules in H22 hepatoma-bearing mice. **Methods** Two hundred and twenty mice were injected with H22 hepatoma cells to their right armpit. On the 11th day after injection, the mice were sorted according to the tumor size. 18 mice with large tumor (large tumor group) and 18 mice with small tumor (small tumor group) were sacrificed, and the tumors were weighed. A control group consisting of 18 normal Kunming mice was also included in this study. The plasma TC, TG and HDL-C were detected using total cholesterol, triglycerides or HDL-C assay kits, respectively. The mRNA expressions of *Srb1*, *Ldlr*, *Npc1*, *Npc2*, *Stard3*, *Hmgcr*, *Lipe*, *Acat1*, *Abca1*, *Abcg1*, *Srebp-1c*, *Lxra*, *Lxrβ*, *Rxra*, *Apoa1* and *ApoE* were tested by real-time quantitative RT-PCR (qRT-PCR), and *Gapdh* and β -actin were used for normalization. SRB1 and ApoA1 proteins were analyzed by Western blot. **Results** The tumor weight was significantly higher in the large tumor group than that in the small tumor group ($P < 0.05$). Compared with the control group, the plasma HDL-C was significantly decreased in the two hepatoma groups ($P < 0.05$). The expression levels of *Srb1*, *Ldlr*, *Apoa1* mRNA and SRB1 protein

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81102533, 81473562)。

[作者简介] 潘志强(1977-),男,副教授,博士。研究方向:中医证候实验研究与类固醇激素研究。E-mail: pzq527@163.com

were significantly increased in the large tumor group ($P < 0.05$ for all). The ApoA1 protein level was significantly higher in the large tumor group than that in the small tumor group ($P < 0.05$). The expressions of *Acat1*, *Lipe*, *Abca1* and *Abcg1* mRNA were significantly lower in the large tumor group than those in the small tumor group ($P < 0.05$ for all). However, the expressions of *Srebp-1c*, *Lxr α* and *Rxra* mRNA were not significantly changed, then, *Srebp-1c*, *Lxr β* and *Rxra* mRNA expressions were significantly up-regulated in the small tumor group ($P < 0.05$). The expressions of *Hmgcr* and *ApoE* mRNA were not significantly different in the two groups. **Conclusions** In hepatoma-bearing mice, due to the adaptation to tumor-induced chronic stress response, the adrenal cortical cells can effectively utilize intracellular cholesterol to synthesize cortical hormones.

【Key words】 Adrenal cortex; Cholesterol; Liver cancer; *Srb1*; *Apoa1*; Cortical hormones, synthesis; Mice

细胞内胆固醇稳态机制在肝脏、主动脉研究很深入^[1,2],而胆固醇作为类固醇激素合成的前体物质,如何被肾上腺细胞用于合成皮质激素以适应各种应激尚缺乏深入研究。现有研究表明^[3],肾上腺皮质细胞通过 3 种方式获得类固醇激素合成的原料:①摄取血液胆固醇(人主要是低密度脂蛋白胆固醇,啮齿类动物主要是高密度脂蛋白胆固醇),②在内质网中从头合成胆固醇,③将脂滴中酯化胆固醇酶解为游离胆固醇。一旦细胞内胆固醇积聚过量,则通过细胞膜上三磷酸腺苷结合盒转运蛋白体 A1 和 G1 将胆固醇逆转运至细胞外。此外,肝 X 受体、固醇调节元件结合蛋白、过氧化物酶体增殖物激活受体等信号分子还参与细胞内胆固醇进出与转运调节^[4,5],肾上腺皮质细胞正是通过这一精密调控机制以确保胞内胆固醇的稳态。

然而,在肿瘤状态下,机体为适应肿瘤的慢性应激,肾上腺分泌皮质激素以抵御应激反应,那么,肿瘤大小是否对肾上腺皮质细胞胆固醇稳态有影响,尚未发现相关研究报道。本文在课题组对 H22 肝癌小鼠肾上腺皮质酮合成与分泌的研究基础上^[6],重点比较了不同肿瘤大小的肝癌小鼠肾上腺皮质细胞内胆固醇稳态分子的表达差异,发现肿瘤越大者,小鼠肾上腺皮质细胞对胆固醇需求越高,用于皮质激素的合成以抵御肿瘤的慢性应激。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 KM 雄性小鼠 250 只,7 周龄,体重(21 ± 1)g,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2007-0005】;实验在上海中医药大学动物实验中心设施内进行【SYXK(沪)2009-0069】。

1.1.2 试剂

乙二胺四乙酸二钾盐(EDTA-2K)抗凝剂购自

国药集团;总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。Trizol 购自 Invitrogen,反转录试剂盒 PrimeScript[®] RT Reagent Kit 和 PCR 试剂盒 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] (Tli RNaseH Plus) II 购自 TaKaRa 公司。SRB1、ApoA1、GAPDH 抗体购自 Abcam 公司,BCA 蛋白质定量检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司,免疫印迹化学发光试剂 ECL 试剂盒购自 Pierce 公司。

1.1.3 仪器

Elx800 型酶标仪(美国 Bio-TEK 公司),Elx50 型自动洗板机(美国 Bio-TEK 公司)。5417R 型冷冻台式离心机(德国 Eppendorf 公司),Eco-Illumina 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Illumina 公司),GBOX CheMI 凝胶扫描与分析系统。

1.2 方法

1.2.1 H22 肝癌小鼠模型建立

随机取 30 只小鼠作正常对照组,另 220 只小鼠腋下接种 H22 肝癌腹水癌细胞(课题组前期采用并保种冻存于 -196°C 液氮中),每只 0.2 mL(细胞浓度 1×10^7 个/mL)。

1.2.2 小鼠分组、处死、取材与组织湿重

采用游标卡尺精确测量小鼠腋下肿瘤最长直径(a)和最短横径(b),通过肿瘤体积预测公式 $V = 0.5ab^2$,估算肿瘤大小,按照肿瘤体积大小排序,选择瘤体最大者 18 只,瘤体最小者 18 只,同时选择体重居中的 18 只正常小鼠作为正常对照组,于接种肿瘤细胞后第 11 天处死瘤体大组、瘤体小组和正常组小鼠,摘眼球取血,常规分离血浆,剥离肿瘤并称重,多余小鼠用于后续实验。

1.2.3 血脂含量检测

按照试剂盒及所提供的方法进行操作,检测血浆总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇含量。

1.2.4 实时荧光定量 PCR 检测基因表达

上下游引物序列采用 Primer3 (v. 0. 4. 0) 在线软件合成(参见表 1), 委托 Life Technologies 公司上海合成部完成。按照 Trizol 试剂盒说明书抽提肾上腺总 RNA; 逆转录反应体系 20 μ L, 反应条件为 37 $^{\circ}$ C \times 15 min, 85 $^{\circ}$ C \times 5 s, 4 $^{\circ}$ C (逆转录反应程序结束, 可以取出, 也可以过任意时间后取出); PCR 扩增反应体系为 20 μ L, 反应程序为 95 $^{\circ}$ C \times 3 min,

95 $^{\circ}$ C \times 30 s, 60 $^{\circ}$ C \times 30 s, 40 cycles。基因相对表达量分析方法: 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法分析^[7], 以正常组作为对照组, 以 GAPDH 和 β -actin 基因 Ct 均值作为内参组, $\Delta Ct = Ct_{目的基因} - Ct_{内参基因}$ (其中, Ct 值为扩增 n 个循环基因的荧光数值), $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{肿瘤组} - \Delta Ct_{对照组}$, 目的基因相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

表 1 小鼠上、下游引物序列

Tab. 1 Sequences of the mouse primers

基因 Genes	mRNA 序列号 mRNA_ID	引物序列 Forward primer; Reverse primer	Tm 值 Tm	产物/bp Product size
<i>Gapdh</i>	NM_008084	上游 5' -GATGACATCAAGAAGGTGGTGA-3'	59.97	199
		下游 5' -TGCTGTAGCCGTATTCATTGTC-3'	60.16	
β -actin	NM_007393	上游 5' -AGCCATGTACGTAGCCATCC-3'	59.98	228
		下游 5' -CTCTCAGCTGTGGTGGTAA-3'	60.02	
<i>Srb1</i>	NM_001205083	上游 5' -AAGTGGTCAACCCAAACGAG-3'	60.01	121
		下游 5' -ACGGTGTCTGTCATTGAA-3'	60.01	
<i>Ldlr</i>	NM_010700	上游 5' -ATGAGTCCCCAGAGACATGC-3'	60.08	244
		下游 5' -GAGCCATCTAGGCAATCTCG-3'	59.94	
<i>Npc1</i>	NM_008720	上游 5' -ATGAGCGTCTTCAGGAGGAA-3'	59.95	214
		下游 5' -AACAGGCTCACAAAGCAGGT-3'	59.91	
<i>Npc2</i>	NM_023409	上游 5' -CACTCAGTCCCAGAACAGCA-3'	60.02	268
		下游 5' -CCAAGGAGCCTAGCTTGTGA-3'	60.53	
<i>Stard3</i>	NM_021547	上游 5' -TCCCCATTGTCTTTTCGTC-3'	60.05	284
		下游 5' -CACCGCAGTAGCTTCCTTTC-3'	60.02	
<i>Hmgcr</i>	NM_008255	上游 5' -TGGAGATCATGTGCTGCTTC-3'	59.95	248
		下游 5' -GCGACTATGAGCGTGAACAA-3'	60.02	
<i>Lipe</i>	NM_001039507	上游 5' -AGACACCAGCCAACGGATAC-3'	60.00	189
		下游 5' -GGGCATAGTAGCCATAGCA-3'	60.08	
<i>Acat1</i>	NM_144784	上游 5' -TATTTCCACTCCATGCACCA-3'	59.92	133
		下游 5' -ATTGGACATGCTCTCCATCC-3'	59.89	
<i>Abca1</i>	NM_013454	上游 5' -AGCCCTCTTTGGAGGAATA-3'	60.03	189
		下游 5' -TGCCTTGTAGCTGGTGTGTC-3'	59.90	
<i>Abcg1</i>	NM_009593	上游 5' -TCAACAGTGGAGAGCTGGTG-3'	60.02	261
		下游 5' -CTCGTCTGCCTTCATCCTTC-3'	59.95	
<i>Srebp-1c</i>	NM_011480	上游 5' -CCCTGTGTACTGGCCTTT-3'	60.03	292
		下游 5' -TTGCGATGTCTCCAGAAGTG-3'	59.98	
<i>Lxrα</i>	NM_013839	上游 5' -GGATAGGGTTGGAGTCAGCA-3'	60.07	179
		下游 5' -GCTCAGCACGTTGTAATGGA-3'	59.87	
<i>Lxrβ</i>	NM_009473	上游 5' -CTTCGGGCTTCCACTACAAC-3'	59.73	221
		下游 5' -CTTCCGAATCTGCTCCTCAG-3'	60.09	
<i>Rxra</i>	NM_011305	上游 5' -GGCAGCTGCACTCTCCTATC-3'	60.13	166
		下游 5' -GGTTTCATGGGTGAATTGAG-3'	60.17	
<i>Apoa1</i>	NM_009692	上游 5' -CAGCTGAACCTGAATCTCCTG-3'	60.00	221
		下游 5' -AGCTCCACATCCTCTTCCAT-3'	60.09	
<i>ApoE</i>	NM_009696	上游 5' -CATTGCTGACAGGATGCCTA-3'	59.82	172
		下游 5' -TGTGTGACTTGGAGCTCTG-3'	60.02	

1.2.5 Western blot 检测蛋白表达

采用 RIPA 裂解液裂解肾上腺组织,依据 BCA 蛋白质定量试剂方法进行蛋白定量,采用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白,并进行 PVDF 转膜与 5% 脱脂奶粉封闭,加入一抗(SRB1 抗体 1:1000 稀释、ApoA1 抗体 1:2000 稀释、GAPDH 抗体 1:2000 稀释)4℃过夜,用 TBST 洗涤,再加入相应辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗(1:2000 稀释)孵育, TBST 洗涤, ECL 化学发光显影,最后用 GBOX Chemi 凝胶扫描与分析系统进行半定量分析。

1.2.6 统计学方法

应用 SPSS 15.0 统计软件,两组比较采用 *t* 检验,三组比较采用单因素方差分析对实验指标进行统计。 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠去瘤体重与肿瘤质量比较

与正常组比较,两组肝癌小鼠去瘤体重差异无显著性;与瘤体小组比较,瘤体大组小鼠肿瘤质量明显增大($P < 0.05$) (见表 2)。

2.2 血脂含量比较

与正常组比较,两组肝癌小鼠血浆 TC 和 TG 差异均无显著性,而 HDL-C 显著下降($P < 0.05$),提示肝癌小鼠胆固醇逆向转运至肝脏的代谢能力下降

表 3 各组小鼠血脂含量比较($\bar{x} \pm s$, mmol/L)

Tab. 3 Comparison of blood TC, TG and HDL-C among the mice of all groups

组别 Groups	总胆固醇 TC	高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C	甘油三酯 TG
正常组 Control group	4.39 ± 0.61	1.18 ± 0.28	1.27 ± 0.35
瘤体大组 Large tumor group	3.52 ± 0.64	0.87 ± 0.13*	1.70 ± 0.39
瘤体小组 Small tumor group	3.49 ± 0.72	0.62 ± 0.18*	1.65 ± 0.45

注:与正常组比较,* $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$ compared with the control group.

表 4 各组小鼠肾上腺细胞胆固醇摄取与转运相关基因表达($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Comparison of the expression of cholesterol uptake and transport-related genes among all groups

组别 Groups	<i>Srb1</i>	<i>Ldlr</i>	<i>Npc1</i>	<i>Npc2</i>	<i>Stard3</i>
正常组 Control group	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.13	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.28
瘤体大组 Large tumor group	1.89 ± 0.24*	2.20 ± 0.47*▲	1.24 ± 0.11	0.83 ± 0.09	1.06 ± 0.08
瘤体小组 Small tumor group	1.35 ± 0.21	1.33 ± 0.15	1.16 ± 0.13	0.92 ± 0.06	1.29 ± 0.11

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与瘤体小组比较,▲ $P < 0.05$; *Stard3* 又名 *Mln64*, *Npc1* 又名 *Nmf164*。

Note. * $P < 0.05$, compared with the control group; ▲ $P < 0.05$, compared with the small tumor group. *Stard3* also known as *Mln64*. *Npc1* also known as *Nmf164*.

2.4 肾上腺皮质细胞胆固醇合成、转化与流出相关基因表达

与正常组比较,瘤体大组肝癌小鼠酰基辅酶 A:胆固醇酰基转移酶(*Acat1*)与胆固醇逆向流出胞外的三磷酸腺苷结合盒转运蛋白体 G1(*Abcg1*)基因表

(见表 3)。

表 2 各组小鼠去瘤体重与肿瘤质量比较($\bar{x} \pm s$, $n = 18$)

Tab. 2 Comparison of body weight and tumor weight among the mice of all groups

组别 Groups	去瘤体重/g Body weight	肿瘤/g Tumor weight
正常组 Control group	27.10 ± 1.44	-
瘤体大组 Large tumor group	29.45 ± 3.67	3.05 ± 0.64▲
瘤体小组 Small tumor group	28.47 ± 2.05	1.51 ± 0.43

注:与瘤体小组比较,▲ $P < 0.05$ 。

Note. ▲ $P < 0.05$ compared with the small tumor group.

2.3 肾上腺皮质细胞胆固醇摄取与转运相关基因表达

与正常组比较,瘤体大组肝癌小鼠肾上腺胆固醇摄取分子高密度脂蛋白受体(*Srb1*)和低密度脂蛋白受体(*Ldlr*)基因表达显著升高($P < 0.05$),且瘤体大组肝癌小鼠 *Ldlr* 基因表达显著高于瘤体小组($P < 0.05$)。 *Ldlr* 通过质膜内吞进入胞内体,释放胆固醇并通过含 START 结合域蛋白 3 (*Stard3*)、C 型尼曼-匹克病基因(*Npc1* 和 *Npc2*)等蛋白转运至内质网,然而这几个胆固醇转运分子基因表达在各组间差异无显著性(见表 4)。

达显著下降($P < 0.05$);与瘤体小组比较,瘤体大组肝癌小鼠酯化胆固醇的激素敏感脂肪酶(*Lipe*)、*Acat1*、*Abca1* 基因表达显著下调($P < 0.05$);然而,内质网胆固醇合成的 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶(*Hmgcr*)各组间差异无显著性(见表 5)。

2.5 调节胆固醇稳态分子的基因表达

与正常组比较, 瘤体大组肝癌小鼠肝 X 受体 β (*Lxr β*) 与载脂蛋白 a1 (*Apoa1*) 基因表达显著升高 ($P < 0.05$), 瘤体小组肝癌小鼠固醇调节元件结合蛋白-1c (*Srebp-1c*)、*Lxr β* 基因表达明显升高 ($P < 0.05$), 而 *Apoa1* 表达显著下调 ($P < 0.05$); 与瘤体小组比较, 瘤体大组肝癌小鼠 *Srebp-1c* 和 *Apoa1* 显著升高 ($P < 0.05$), 而肝 X 受体 α (*Lxr α*) 与载脂蛋

白 e (*Apoe*) 基因表达各组间差异无显著性 (见表 6)。

2.6 肾上腺 SRB1 与 ApoA1 蛋白表达

与正常组比较, 瘤体大组肝癌小鼠肾上腺 SRB1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$), 而瘤体小组 ApoA1 蛋白表达显著下降 ($P < 0.05$); 且瘤体大组肝癌小鼠 ApoA1 蛋白表达显著高于瘤体小组 ($P < 0.05$) (见图 1A、B)。

表 5 各组小鼠肾上腺细胞胆固醇合成、转化、流出相关基因表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 5 Comparison of expression of cholesterol synthesis, transform and efflux-related genes in all groups

组别 Groups	<i>Hmgcr</i>	<i>Lipe</i>	<i>Acat1</i>	<i>Abca1</i>	<i>Abcg1</i>
正常组 Control group	1.00 ± 0.33	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.06	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.37
瘤体大组 Large tumor group	1.03 ± 0.24	0.91 ± 0.15 [▲]	0.68 ± 0.05 ^{*▲}	0.76 ± 0.13 [▲]	0.54 ± 0.08 [*]
瘤体小组 Small tumor group	0.78 ± 0.01	1.36 ± 0.08	1.06 ± 0.06	1.19 ± 0.05	0.76 ± 0.09

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与瘤体小组比较, [▲] $P < 0.05$; *Lipe* 又名 *Hsl*。

Note. * $P < 0.05$, compared with the control group; [▲] $P < 0.05$, compared with the small tumor group. *Lipe* also known as *Hsl*.

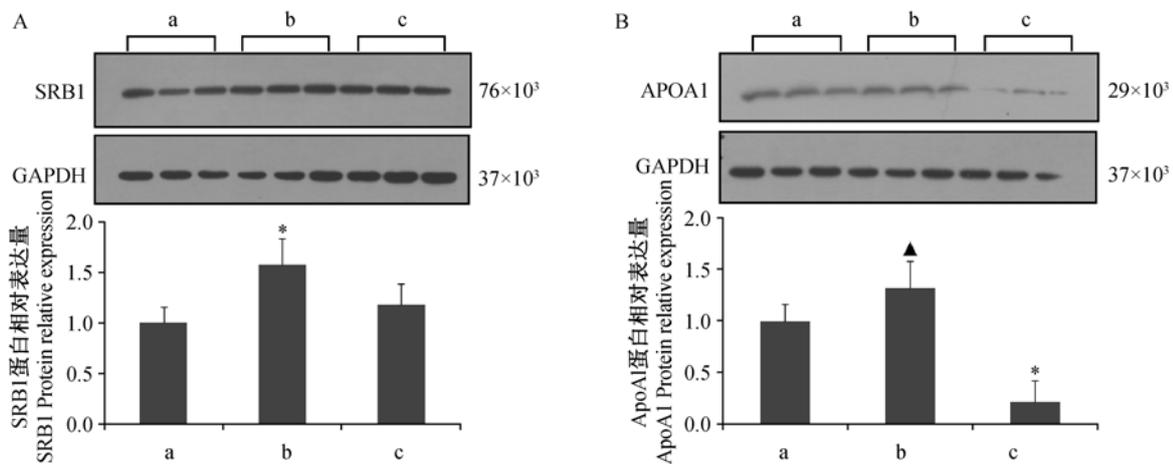
表 6 各组小鼠肾上腺细胞胆固醇稳态调节分子基因表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 6 Comparison of the expression of cholesterol homeostasis-related genes in the mice of all groups

组别 Groups	<i>Srebp-1c</i>	<i>Lxrα</i>	<i>Lxrβ</i>	<i>Rxrα</i>	<i>Apoa1</i>	<i>Apoe</i>
正常组 Control group	1.00 ± 0.12	1.00 ± 0.25	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.10	1.00 ± 0.21	1.00 ± 0.09
瘤体大组 Large tumor group	1.06 ± 0.19 [▲]	0.81 ± 0.13	1.52 ± 0.32 [*]	1.30 ± 0.28	1.79 ± 0.16 ^{*▲}	1.11 ± 0.08
瘤体小组 Small tumor group	1.88 ± 0.21 [*]	1.12 ± 0.12	1.40 ± 0.06 [*]	1.38 ± 0.06 [*]	0.18 ± 0.01 [*]	1.24 ± 0.03

注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与瘤体小组比较, [▲] $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$, compared with the control group; [▲] $P < 0.05$, compared with the small tumor group.



注: 与正常组比较, * $P < 0.05$; 与瘤体小组比较, [▲] $P < 0.05$ 。a. 正常组; b. 瘤体大组; c. 瘤体小组。

图 1 SRB1 (A)、ApoA1 (B) 蛋白相对表达量

Note. * $P < 0.05$, compared with the control group; [▲] $P < 0.05$, compared with the small tumor group. a. control group, b. large tumor group, c. small tumor group.

Fig. 1 SRB1 (A) and ApoA1 (B) protein relative expression in the mice

3 讨论

胆固醇是肾上腺皮质细胞合成类固醇激素的重要前体物质, 在肝癌疾病状态下, 机体为适应肿瘤的慢性反复应激, 肾上腺皮质需合成糖皮质激素以抵御应激反应, 因此, 维持肾上腺皮质细胞充裕的胆固

醇是必需的。课题组对各组小鼠血浆激素检测结果表明^[6], 肿瘤形成后, 小鼠血浆皮质酮水平平均高于正常对照组, 且瘤体越大者, 血浆促肾上腺皮质激素含量显著升高, 并存在垂体-肾上腺皮质轴的负反馈机制。那么, 对于皮质激素合成前期过程而言, 与肝细胞、主动脉内皮细胞、巨噬细胞类似, 肾上腺皮质

细胞也存在一套精密的调控胆固醇稳态机制,既可通过质膜上高密度脂蛋白受体和低密度脂蛋白受体摄入血液中的胆固醇并储存于脂滴中备用,又可在内质网中从头合成胆固醇,此外,胞内过量的胆固醇还将通过三磷酸腺苷结合盒转运蛋白体相关蛋白逆向流出胞外,而且,肝 X 受体、固醇调节元件结合蛋白、过氧化物酶体增殖物激活受体等信号分子还参与细胞内胆固醇的维稳过程^[8,9]。因此,生理状态下,肾上腺皮质细胞能充分协调有效利用各种途径的胆固醇并转运至线粒体内合成类固醇激素,在肿瘤病理状态下,有报道显示胆固醇代谢、血清胆固醇水平及胆固醇合成抑制剂与结直肠癌的关系密切^[10],那么,在肿瘤慢性应激过程中,肾上腺皮质细胞对胆固醇的利用如何?我们以 H22 肝癌小鼠为观察对象,深入研究不同大小肝癌的小鼠肾上腺皮质细胞胆固醇摄入、运输、转化、合成、流出及其参与维稳的调控分子表达差异,以阐明肿瘤对肾上腺皮质激素合成前胆固醇利用与稳态的影响。

基于 *Srb1* 与 *Apoa1* 协同作用是小鼠肾上腺皮质细胞摄取血浆胆固醇的主要方式,而 *Ldlr* 对胆固醇的内吞作用也很重要,结果表明肿瘤越大,肝癌小鼠肾上腺 *Srb1*、*Apoa1*、*Ldlr* 基因表达升高越显著 ($P < 0.05$),相应的蛋白表达检测显示肿瘤大组肾上腺 SRB1 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)、而 ApoA1 蛋白表达在肿瘤大组明显高于肿瘤小组 ($P < 0.05$),提示肿瘤越大,肝癌小鼠为适应肿瘤慢性反复的应激,需要摄取更多的胆固醇用于合成皮质激素以抵御应激。*Lipe* 主要将脂滴中酯化胆固醇分解为游离胆固醇,而 *Acat1* 则是将摄入的胆固醇通过酯化形式储存于脂滴中,结果显示肿瘤大组肝癌小鼠肾上腺 *Lipe* 和 *Acat1* 基因表达显著低于肿瘤小组 ($P < 0.05$),提示肿瘤大的肝癌小鼠为适应肿瘤慢性反复的应激,随时启动 fight or flight response、相比脂滴中胆固醇的储备量减少。然而,*Abca1* 和 *Abcg1* 主要负责将胞内过量的胆固醇逆向转出胞外,结果显示肿瘤大组肝癌小鼠肾上腺 *Abca1* 和 *Abcg1* 基因表达显著低于肿瘤小组 ($P < 0.05$),提示肿瘤大的肝癌小鼠肾上腺皮质细胞内胆固醇流程减少,主要用于线粒体内合成皮质激素。然而内质网自身合成胆固醇的关键酶 *Hmgcr* 在各组间无显著性变化。

细胞主要通过调节胆固醇的胞内合成、胞外摄取、酯化及外流等途径之间的平衡以维持正常的胞内胆固醇浓度,其中,*Lxr* 和 *Srebps* 对维持细胞内胆固醇平衡发挥重要作用。结果显示肿瘤大组肝癌小鼠肾上腺 *Sreb-1c*、*Lxr α* 与 *Rxr α* 基因表达无明显变

化,而肿瘤小组 *Sreb-1c*、*Lxr β* 与 *Rxr α* 基因表达显著升高 ($P < 0.05$),提示肿瘤越大,因胆固醇更多用于运输至线粒体内合成皮质激素、流出胞外减少,相应地调节肾上腺皮质细胞内胆固醇稳态的能力减弱。

综上,本研究发现,在肝癌状态下,小鼠血浆 HDL-C 含量下降,提示肝脏胆固醇代谢能力减弱,为适应肿瘤慢性反复的应激,瘤体越大者,维持胞内胆固醇稳态能力越弱,即储存于脂滴和流出胞外的胆固醇减少,相反,肾上腺皮质细胞通过摄取血胆固醇并即刻转运至线粒体内合成糖皮质激素,而以适应机体的各种应激反应。结合课题组张园园等研究结果^[11],化疗药物局部介入治疗联合索拉非尼灌胃治疗对 H22 肝癌小鼠抑瘤作用好,且对中医气虚血弱证候有影响,本研究结果将有助于从内分泌角度拓展认识肿瘤对机体的影响。

参 考 文 献

- [1] Yang T, Espenshade PJ, Wright ME, et al. Crucial step in cholesterol homeostasis: sterols promote binding of SCAP to INSIG-1, a membrane protein that facilitates retention of SREBPs in ER [J]. Cell, 2002, 110:489-500.
- [2] Kalaany NY, Gauthier KC, Zavacki AM, et al. LXRs regulate the balance between fat storage and oxidation [J]. Cell Metab, 2005, 1: 231-244.
- [3] Miller WL, Auchus RJ. The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its disorders [J]. Endocr Rev, 2011, 32: 81-151.
- [4] Cummins CL, Mangelsdorf DJ. Liver X receptors and cholesterol homeostasis: spotlight on the adrenal gland [J]. Biochem Soc Trans, 2006, 34: 1110-1113.
- [5] Xia X, Jung D, Webb P, et al. Liver X receptor β and peroxisome proliferator-activated receptor δ regulate cholesterol transport in murine cholangiocytes [J]. Hepatology, 2012, 56: 2288-2296.
- [6] 潘志强, 方肇勤, 卢文丽, 等. 不同程度邪毒证 H22 肝癌小鼠血液激素含量动态变化分析 [J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 32: 1361-1365.
- [7] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C (T)) method [J]. Methods, 2001, 25: 402-408.
- [8] Yang F, Vought BW, Satterlee JS, et al. An ARC/mediator subunit required for SREBP control of cholesterol and lipid homeostasis [J]. Nature, 2006, 442: 700-704.
- [9] Zelcer N, Hong C, Boyadjian R, et al. LXR regulates cholesterol uptake through Idol-dependent ubiquitination of the LDL receptor [J]. Science, 2009, 325: 100-104.
- [10] 杨永涛, 盛华, 李志文, 等. 胆固醇代谢与结直肠癌的关系及其机制 [J]. 中华内分泌代谢杂志, 2014, 30(3): 254-257.
- [11] 张园园, 方肇勤, 王艳明. 不同治疗方案对 H22 肝癌荷瘤小鼠的疗效比较 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 67-71, 77.

[收稿日期] 2014-12-09



低频电刺激对不同动物血内激素水平的影响

俞发荣, 宁晓希, 俞文*, 谢明仁, 连秀珍, 李登楼, 张诗爽

(甘肃政法学院 甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室, 兰州 730070)

【摘要】 **目的** 探索低频电刺激对不同动物血内激素水平的影响。**方法** 分别给予中国树鼩、Wistar 大鼠、BALB/c 小鼠低频电刺激后, 分别在 12、24、36 h 各取一组动物采血, 用放射免疫法检测去甲肾上腺素 (noradrenaline, NA)、内皮素 (endothelin, ET) 水平。**结果** 给予中国树鼩、Wistar 大鼠、BALB/c 小鼠低频电刺激后 12、24、36 h, NA、ET 水平比对照组显著升高 ($P < 0.01$), 给予利血平后 24 h, 再给予相同电刺激, NA、ET 水平比单纯电刺激组明显降低 ($P < 0.05 \sim 0.01$)。不同动物对同一刺激的应激敏感程度不同, 敏感程度按照中国树鼩、Wistar 大鼠、BALB/c 小鼠的顺序依次降低。**结论** 低频电刺激能促进中国树鼩、Wistar 大鼠、BALB/c 小鼠 NA、ET 释放, 利血平具有降低机体对低频电刺激的应激作用。

【关键词】 低频电刺激; 激素; 应激; 中国树鼩; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0245-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.005

Effects of low frequency electrical stimulation on blood hormone levels in different animals

YU Fa-rong, NING Xiao-xi, YU Wen*, XIE Ming-ren, LIAN Xiu-zhen, LI Deng-lou, ZHANG Shi-shuang

(Key Laboratory of Evidence Science and Technology Research and Application,
Gansu Provincial Institute of Political Science and Law, Lanzhou 730070, China).

【Abstract】 **Objective** To study the effect of low frequency electrical stimulation on blood hormone levels in different animals. **Methods** At 12 h, 24 h and 36 h after low frequency electrical stimulation to Chinese tree shrews, Wistar rats, and BALB/c mice, respectively, the blood noradrenaline (NA) and endothelin (ET) levels were determined by radioimmunoassay (RIA). **Results** The blood NA and ET levels of electrical stimulation group were significantly higher than that in the control group ($P < 0.01$). At 24 h after reserpine treatment, the same electrical stimulation was given. The NA, ET levels were significantly decreased compared with that in the electrical stimulation group ($P < 0.05$ to 0.01). Different animals responded to the same electric stimulus differently, following the order of Chinese tree shrews > Wistar rats > BALB/c mice. **Conclusions** Low frequency electrical stimulation can promote the release of noradrenaline and endothelin in Chinese tree shrews, Wistar rats and BALB/c mice. Reserpine can reduce the stress induced by low frequency electric stimulation to the body.

【Key words】 Low frequency electrical stimulation; Hormone; Stress; Chinese tree shrews; Rats; Mice

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31060283); 国家社会科学基金项目(07BSH054); 甘肃省基础研究创新群体项目(No. 145RJIA333); 甘肃政法学院重点项目(GZF2014XZDLW18)。

【作者简介】 俞发荣(1959-), 男, 博士, 研究员。研究方向: 法医学、社会环境压力对人类健康的影响、药理学和毒理学实验及实验动物学。E-mail: yfr6340@gsli.edu.cn

【通讯作者】 俞文, 副教授, E-mail: yw6137@gsli.edu.cn

社会环境因素对人类行为生理和健康影响的研究,是目前生命科学与人口健康研究的重要课题之一。随着社会的高速发展,工作和生活节奏不断加快,时代对人类的要求也愈来愈高,人类将更多地处于应激之中,应激对人类的危害也将不断加剧。机体在遭遇紧急情况时,如恐惧、惊吓、焦虑、创伤或失血等情况,交感神经活动加强,去甲肾上腺素(noradrenaline, NA)、肾上腺素(adrenaline, A)的分泌量大大增加。NA、A 作用于中枢神经系统细胞膜受体,激活腺苷酸环化酶,将三磷酸腺苷(ATP)催化生成环-磷酸腺苷(cAMP),cAMP 激活蛋白激酶 A(PKA),使蛋白质磷酸化,产生细胞反应,从而提高机体的兴奋性,使机体处于警觉状态,反应灵敏,以适应在应急情况下的需要,或使机体发病^[1],甚至猝死^[2]。内皮素(endothelin, ET)是调节心血管功能的重要因子,对维持基础血管张力与心血管系统稳态起重要作用。内皮素是迄今为止发现的作用最强的缩血管物质。并且缩血管升血压效应还可反射性引起心率抑制,造成心肌供血不足、代谢紊乱,内皮素(ET)与去甲肾上腺素是引起猝死的关键因素,在应激损伤过程中具有至关重要的作用。

本文给予中国树鼩、Wistar 大鼠、BALB/c 小鼠低频电刺激,观察相同刺激对不同种类动物应激反应的程度,探索 NA、ET 在应激损伤中的作用,为法医学病理学研究和应激损伤案例分析提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

中国树鼩(滇西亚种, *Tupaia belangeri chinensis*^[3]), 90 只, 雄性, 体重 120 ~ 125 g, 购于中国科学院昆明动物研究所【SCXK(滇)K2013-0003】。SPF 级 Wistar 大鼠, 90 只, 雄性, 体重 200 ~ 210 g。SPF 级 BALB/c 小鼠, 90 只, 雄性, 体重 20 ~ 22 g, 大、小鼠均购于甘肃省中医学院科研实验中心【SCXK(甘)2011-0001】。

1.1.2 试剂

利血平:批号:130406, 广东邦民制药厂有限公司生产;去甲肾上腺素(NA)、内皮素(ET)放免检测试剂盒,北京北免东雅生物技术研究所生产。

1.1.3 仪器

GC-1200 γ 计数放免仪:美国 Picker 公司制造;Dossy-2H 多通路生理参数采集存储仪:购于成都达

硕生物科技有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 动物分组

选取中国树鼩、SPF 级 Wistar 大鼠、BALB/c 小鼠各 90 只。中国树鼩在实验室饲养笼(250 cm × 150 cm × 150 cm 连接 50 cm × 30 cm × 20 cm 休息室)内饲养,每笼 5 只;Wistar 大鼠、BALB/c 小鼠在独立通气笼(individual ventilated cages, IVC)内饲养,自由饮水进食,人工光照 12 h。实验室温度 18 ~ 22℃, IVC 内温度(22 ± 0.2)℃,湿度 55% ~ 65%,适应 7 d。每种动物按体重随机各分为 3 组,每组 30 只。电刺激组(给予脉冲直流电刺激^[4])。利血平组(各组在饮水中加入利血平 2mg/100mL,次日给予电刺激,刺激条件同电刺激组)。

1.2.2 动物实验、标本采集和检测

实验前,每只动物均剃去左侧前、后肢体毛各约 1.0 mm × 1.0 mm,实验时,将 Dossy-2H 多通路生理参数采集存储仪皮肤电极片(面积 0.7 mm × 0.7 mm)粘贴于去毛处,外用尼龙带扎紧。对照组和实验组分别在实验(电刺激)后 12、24、36 h 各取 10 只动物(各组采血前禁食 6 h,不禁水),用乙醚吸入麻醉,从心脏采血 1 mL,3000 r/min 离心 10 min,分离血清,冻存待测。全部血清用 GC-1200 γ 计数放免仪检测 NA、ET 水平。

1.3 统计学分析

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。低频电刺激对动物血激素水平的影响用百分比表示,组间差异采用单因素方差分析,用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低频电刺激对中国树鼩血激素水平的影响

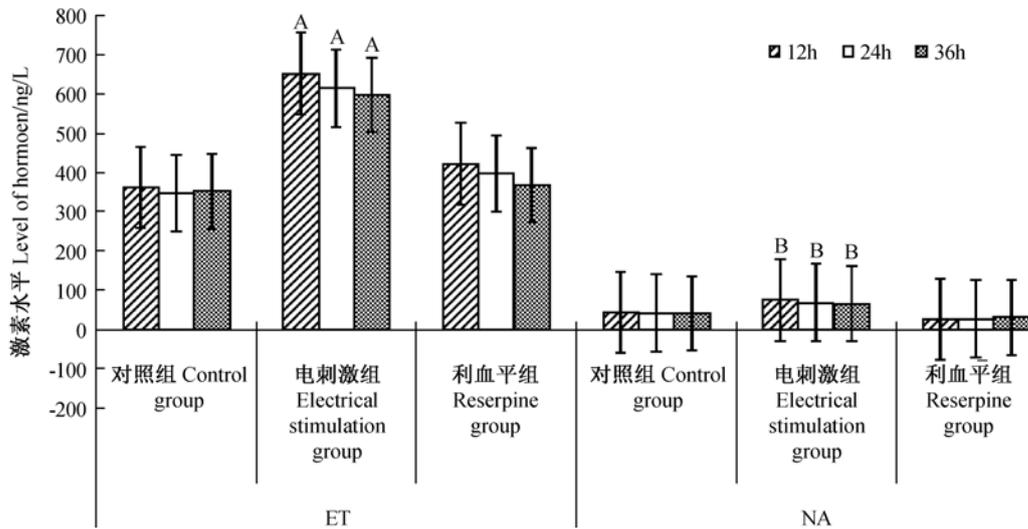
电刺激后 12、24、36 h 检测,电刺激组中国树鼩血内皮素(ET)水平比对照组分别升高了 79.84%、77.03%、69.52% ($P < 0.01$);利血平组(先给予利血平,再给予相同的低频电刺激)中国树鼩血 ET 水平比电刺激组分别降低了 35.19%、35.38%、33.80% ($P < 0.01$);电刺激组中国树鼩血 NA 水平比对照组分别升高了 72.51%、64.99%、60.48% ($P < 0.01$),利血平组中国树鼩血 NA 水平比电刺激组分别降低了 65.38%、59.56%、52.60% ($P < 0.01$)。见图 1。

2.2 低频电刺激对 Wistar 大鼠血激素水平的影响

电刺激后 12、24、36 h 检测,电刺激组 Wistar 大

鼠内皮素 (ET) 水平比对照组分别升高了 68.05%、47.30%、24.28% ($P < 0.01$); 利血平组 Wistar 大鼠血 ET 水平比电刺激组分别降低了 32.54%、26.85%、14.28% ($P < 0.05 \sim 0.01$); 电刺激组 Wist-

ar 大鼠血 NA 水平比对照组分别升高了 66.12%、53.62%、44.39% ($P < 0.01$), 利血平组 Wistar 大鼠血 NA 水平比电刺激组分别降低了 69.84%、65.10%、60.38% ($P < 0.01$)。见图 2。

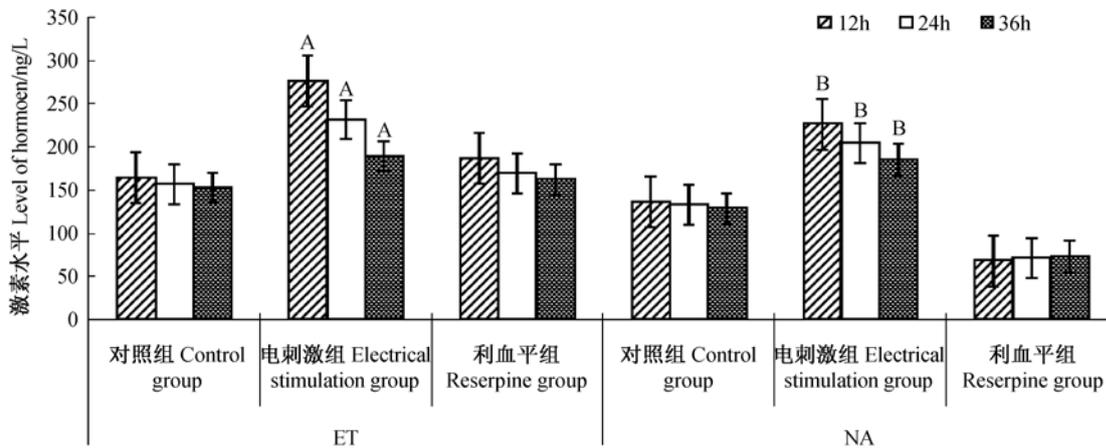


注: ET. 与对照组比^A $P < 0.01$; NA. 与对照组比^B $P < 0.01$ 。

图 1 低频电刺激对中国树鼩血激素水平的影响

Note. ET: ^A $P < 0.01$, vs. the control group; NA: ^B $P < 0.01$, vs. the control group.

Fig. 1 Effect of low frequency electrical stimulation on blood hormone levels in the Chinese tree shrews.



注: ET. 与对照组比^A $P < 0.01$; NA. 与对照组比^B $P < 0.01$ 。

图 2 低频电刺激对 Wistar 大鼠血激素水平的影响

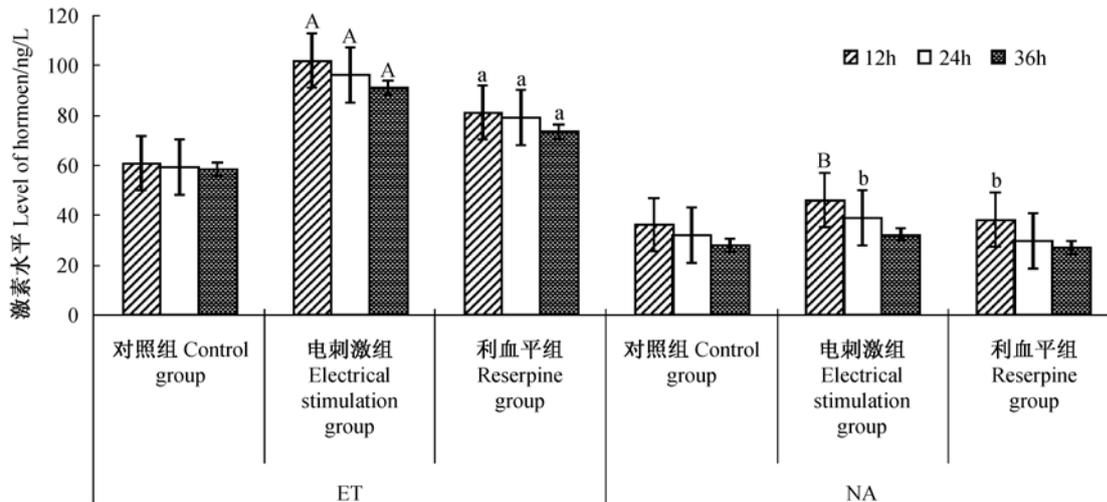
Note. ET: ^A $P < 0.01$, vs. the control group; NA: ^B $P < 0.01$, vs. the control group.

Fig. 2 Effect of low frequency electrical stimulation on blood hormone levels in the Wistar rats

2.3 低频电刺激对 BALB/c 小鼠血激素水平的影响

电刺激后 12、24、36 h 检测, 电刺激组 BALB/c 小鼠血内皮素 (ET) 水平比对照组分别升高了 67.39%、62.57%、55.59% ($P < 0.01$); 利血平组 BALB/c 小鼠血 ET 水平比电刺激组分别降低了

20.44%、17.82%、19.27% ($P < 0.05 \sim 0.01$); 电刺激组 BALB/c 小鼠血 NA 水平比对照组分别升高了 27.58%、21.72%、14.83% ($P < 0.05$), 利血平组 BALB/c 小鼠血 NA 水平比电刺激组分别降低了 17.25%、24.18%、16.04%。见图 3。



注:ET. 与对照组比^A $P < 0.01$, ^a $P < 0.05$; NA. 与对照组比^B $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$ 。

图3 低频电刺激对 BALB/c 小鼠血激素水平的影响

Note. ET: ^A $P < 0.01$, ^a $P < 0.05$, vs. the control group; NA: ^B $P < 0.01$, ^b $P < 0.05$, vs. the control group.

Fig. 3 Effect of low frequency electrical stimulation on blood hormone levels in the BALB/c mice

3 讨论

为了探索社会环境压力对人们身心健康的影响,很多学者对相关的动物模型进行了长期的研究,发现慢性环境刺激使中国树鼩血象^[5]、血激素水平^[6]、生殖系统^[7]发生病理性变化。慢性束缚应激能引起大鼠学习记忆能力降低^[8]、肠功能紊乱^[9],热刺激造成小鼠肝脏、十二指肠和空肠严重损伤^[10]。反复电刺激清醒状态下大鼠上矢状窦^[11],大鼠出现抑郁的行为。旋转刺激能引起大鼠促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone)、促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin releasing hormone)水平升高^[12],激发肾上腺皮质激素的释放,增进抵抗力。高浓度的 NA 加速内皮细胞合成并释放内皮素(ET)和血小板活化因子(platelet-activating factor)^[13]。升高的 ET 不仅本身有强烈的缩血管作用,而且增强 NA 的缩血管作用^[14]。睾酮(testosterone)水平下降^[15],可使大鼠血管内皮受损,ET 释放增加^[16]。NA、ET 的过度分泌,在引起血管收缩的同时加剧血小板的激活并释放血栓素(thromboxane),活化的血小板因子(PAF)又可进一步促进内皮细胞释放 ET,PAF 加速血小板集聚,引起心、脑血管痉挛和血栓形成,造成机体损伤、发病甚至猝死。本文实验结果显示,给予中国树鼩、Wistar 大鼠、BALB/c 小鼠电刺激后,各组动物血 NA、ET 水平均显著升高(均 $P < 0.01$)。给予利血平后再给予相同的电刺激后 12 h 测定,各组动物 NA、ET 水平比电

刺激组明显降低($P < 0.05 \sim 0.01$),其中 ET 降低程度依次为中国树鼩(35.38%) > Wistar 大鼠(32.54%) > BALB/c 小鼠(20.44%)。实验结果表明,在应激反应中,因应激原种类、动物种属、性别、生理状态、应激状态的不同而有所差异;社会环境刺激能显著增加机体(人、动物)血液中 NA、ET 水平;NA、ET 参与高血压、心脏病乃至猝死的病理过程;利血平能阻碍体内 NA 的合成和释放,使交感-肾上腺髓质轴和下丘脑-垂体-性腺轴的兴奋降低,缓解了机体对应激损伤的反应,对机体有保护作用。

参 考 文 献

- [1] 刘水平,陈玉川,郭薇,等. 挤压伤大鼠血浆内皮素含量与心脏损伤的关系[J]. 中山医科大学学报, 2002, 23(1): 27-28.
- [2] 李军杰,叶平,骆雷鸣,等. 慢性应激与血清皮质醇、肾上腺素和去甲肾上腺素的关系[J]. 解放军医学院学报, 2010, 31(6): 558-559.
- [3] 王应祥. 中国树鼩的分类研究[J]. 动物学研究, 1987, 8(3): 213-230.
- [4] 俞发荣,连秀珍,张振南,等. 即刻刺激对中国树鼩体内 DA、cMAP、cMGP 水平的影响[J]. 中国法医学杂志, 2014, 29(6): 548-550.
- [5] 连秀珍,张红梅,谢明仁,等. 慢性环境刺激对中国树鼩行为方式的影响[J]. 生态科学, 2012, 31(6): 666-670.
- [6] 俞发荣,常青云,连秀珍,等. 生活环境条件对中国树鼩血激素水平和心理行为的影响[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(3): 62-66.

(下转第 255 页)



小鼠粪便及肠道各部位内容物细菌群落结构差异分析

武亚琦¹, 钟根深², 吴敏娜^{1*}

(1. 新乡医学院基础医学院, 河南 新乡 453003; 2. 新乡医学院第一附属医院, 河南 卫辉 453100)

【摘要】 目的 分析小鼠粪便及肠道各部位内容物细菌群落结构差异, 探讨粪便取样研究肠道微生物与疾病关系的科学性和客观性, 为相关实验设计提供参考。**方法** 利用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)和荧光定量PCR(qPCR)技术对BALB/c小鼠肠道不同部位(十二指肠、空肠、回肠、盲肠、结肠和直肠)内容物及粪便中细菌群落组成和丰度进行比较, 分析细菌群落在小鼠粪便及肠道各部位的分布差异。**结果** 粪便与直肠、结肠中优势片段均为244、255 bp和449 bp, 而小肠内容物(十二指肠、空肠及回肠)的优势片段则为60、73、261、268 bp和272 bp, 且小肠各部位之间细菌群落结构差异较大; 十二指肠和空肠内容物中的细菌丰度较低, 分别为 $6.9 \log(\text{copies})/\text{g}$ 和 $8.3 \log(\text{copies})/\text{g}$, 而粪便中细菌丰度高达 $11.8 \log(\text{copies})/\text{g}$, 约2倍于十二指肠细菌丰度, 显著高于十二指肠和空肠($P < 0.05$), 与大肠各部位及回肠内容物细菌丰度相当, 差异不显著($P > 0.05$)。**结论** 大肠各部位内容物和粪便的细菌群落结构相似, 个体差异较小肠小, 适合通过粪便取样进行大肠部位特别是结直肠的肠道微生态与某些疾病的相关分析。

【关键词】 末端限制性片段长度多态性; 变性梯度凝胶电泳; 荧光定量PCR, 小鼠; 肠道微生态

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)03-0249-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.006

Differential analysis of the bacterial community composition in mouse feces and intestinal contents

WU Ya-qi¹, ZHONG Gen-shen², WU Min-na^{1*}

(1. Basic Medical School of Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China;

2. the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100)

【Abstract】 Objective To explore the objectivity and scientificity of fecal sampling, and to provide reference for investigating the relationship between intestinal microbes and diseases. **Methods** Terminal restriction fragment length polymorphism, degeneration gradient gel electrophoresis and real time fluorescent quantitative PCR techniques were applied to differentially analyze the bacterial community composition and abundance of intestinal contents and feces taken from different sites of BALB/c mouse intestine. **Results** The predominant T-RFLP fragments (T-RFs) in feces in the rectum and colon were 244 bp, 255 bp and 449 bp, however, those in feces of the small intestine including duodenum, jejunum and ileum were 60 bp, 73 bp, 261 bp, 268 bp and 272 bp, and with a larger variation of the bacterial community composition in various parts of the small intestine. The bacterial abundance in the contents of duodenum and jejunum were $6.9 \log(\text{copies})/\text{g}$ and $8.3 \log(\text{copies})/\text{g}$, fewer than in the other parts of the intestine, while the bacterial abundance in the feces was as high as $11.8 \log(\text{copies})/\text{g}$, being about 2 times higher than that in the duodenum and jejunum ($P < 0.05$), and similar to that in the ileum and colon content ($P > 0.05$). **Conclusions** The inter-mouse variations of bacterial community composition in the large intestine contents are small. The bacterial composition and abundance are similar suggest that

[基金项目] 国家自然科学基金(40901125,81201765);新乡医学院科研培育基金(2013ZD102)。

[作者简介] 武亚琦(1989-),男,硕士研究生,专业:病原生物学。E-mail: yaqiwww@163.com。

[通讯作者] 吴敏娜(1981-),女,副教授,硕士生导师,研究方向:肠道微生态。E-mail: minnawu@xxmu.edu.cn。

studies on the relationship between large intestine especially colorectal microbiota and diseases may be conducted via fecal sampling.

【Key words】 Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP); Degeneration gradient gel electrophoresis (DGGE); Real-time fluorescent quantitative PCR (qPCR); Mouse; Intestinal microbiota

肠道中含有数量巨大的微生物,数量超过 10^{14} , 约 10 倍于人体细胞^[1]。这些微生物在维持人类生命健康方面发挥着重要作用^[2]。近来研究发现肠道微生物与炎性肠病(IBD)、结直肠癌(CRC)、肥胖、二型糖尿病等多种疾病密切相关^[3-6]。因此,加强对肠道微生态的了解有助于对一些肠道疾病的诊断及治疗。

肠道微生物群的检测方法众多,通过粪便中微生物的群落结构来反映肠道微生态是许多研究人员选用的方法^[7,8]。然而,遗传、肠道内外部环境因素造成肠道各部位及个体之间肠道微生物群落组成的差异^[9]。因此粪便是否可真实反映肠道微生态还有待进一步探讨。本文利用末端限制性片段长度多态性(T-RFLP)、变性梯度凝胶电泳(DGGE)和荧光定量 PCR(qPCR)技术,通过比较同龄雄性 BALB/c 小鼠粪便和肠道不同部位内容物中微生物群落结构和丰度的差异,分析粪便取样研究肠道微生物与某些相关疾病的科学性和客观性,为相关实验设计提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物饲养及取样

SPF 级 BALB/c 雄性小鼠,12 周龄,体重均为 24g 左右,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】,饲养于华兰生物工程股份有限公司 SPF 级实验室【SYXK(豫)2012-0003】。SPF 级饲料购自北京科澳协力饲料有限公司,室温(22 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度为 30%~40%,采用日光灯照明,12 h 明/12 h 暗,自由饮用纯净水,适应性饲养 1d 后在无菌环境中收集粪便于 2 mL EP 管中,然后处死小鼠并解剖取出从幽门至肛门小鼠整个肠道。根据肠道解剖学特征依次截取相应的部位,剪开肠段,用无菌手术刀刮取内容物,置于 2 mL EP 管中,立即放入 -80°C 冰箱中保存备用。

1.2 细菌基因组 DNA 的提取

采用 Tiangen 粪便 DNA 提取试剂盒(DP328, Tiangen)进行粪便及肠道内容物中细菌基因组 DNA 的提取,按说明书进行操作。然后用紫外分光光度计(Nano Drop 2000, Thermo, USA)测定所提取 DNA

的浓度。

1.3 普通 PCR 扩增与产物的纯化

采用细菌 16S rDNA 特异性引物 8F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') 和 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')^[10]对样品中的目的基因进行 PCR 扩增,其中引物 8F 的 5' 端带有 FAM 标记。PCR 扩增试剂购自宝生物工程有限公司(大连),扩增体系和程序按参考文献进行^[10]。然后将 PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,严格按照琼脂糖凝胶回收试剂盒(DP214, Tiangen)说明书操作纯化 PCR 产物。

1.4 T-RFLP 分析

采用限制性内切酶 *Alu I* (宝生物工程有限公司,大连)对纯化后的 PCR 产物进行酶切,酶切反应体系为:*Alu I* 1 μL (10 U), 10 \times buffer 2 μL , 17 μL 纯化后的 PCR 产物,共 20 μL ,混匀后在 37°C 恒温条件下酶切 4 h,然后于 80°C 水浴 20 min 使酶失活,最后将酶切产物低温快递送至上海桑尼生物科技有限公司测序。

1.5 DGGE 分析

用细菌 16S rDNA V3 区特异性引物 341F (5'-CCTACGGGAGGCAGCAG-3') 和 518R (5'-ATTACCGCGGCTGCTGG-3')^[11]对粪便细菌基因组进行扩增,PCR 体系和程序据参考文献进行^[12]。制备 8% 浓度、变性范围为 35%~55% 的聚丙烯酰胺凝胶,保持 60°C 恒温,在 60 V 恒压下电泳 16h。电泳结束后,使用 EB 染色 25 min,然后在凝胶成像系统(EC3, UVP, USA)下成像。

1.6 荧光定量 PCR

用 pMDTM18-T 载体连接试剂盒和感受态大肠杆菌 DH-5 α (宝生物,大连)构建含 16S rDNA V3 区 341-518 片段的质粒,选取 $1 \times 10^9 \sim 1 \times 10^5$ copies/ μL 这 5 个浓度的质粒作为标准品,每个标准品设 3 个重复,在荧光定量 PCR 仪(Step One PlusTM, ABI, USA)中生成标准曲线。

对样品 DNA 进行 qPCR,反应体系为:SYBR premix Ex Taq (Tli RNaseH Plus) (2 \times) 10 μL ,引物 341F 和 518R 均为 0.4 μL , ROX reference dye (50 \times) 0.4 μL , DNA 模板 2 μL , ddH₂O 6.8 μL , 共

20 μL。荧光定量反应体系为:95 °C 30 s,1 个循环;95 °C 5 s,60 °C 34 s,40 个循环;反应结束后进行生成溶解曲线的程序,即 95 °C 15 s,60 °C 60 s,95 °C 15 s。

1.7 数据处理

用 T-RFs 的峰高所占总峰高的百分比作为相对丰度。去掉末端片断长度小于 30 bp 和相对丰度小于 1% 的 T-RFs,将相差 ± 1 bp 的 T-RFs 合并为同一个 T-RF^[13]。然后将数据用 SPSS 19.0 进行统计学分析,并计算丰富度 Richness (S)、多样性指数 Shannon-Weaner index (H') 和均匀度 Evenness (E)^[13]。Richness (S) = T-RFs 数量 ± 标准误; Shannon-Weaner index (H') = - Σ (p_i) ln (p_i); Evenness = H/lnS;其中 p_i = n_i/N, n_i 为单一 T-RF 的丰度值, N 为 T-RFs 的总丰度值, S 为样品 T-RFs 数量。用 Canoco 软件做对应分析 (correspondence analysis, CA)。用单因素方差 (ANOVA) 分析样品方差齐性, 然后进行 Tukey 检验后比较样品之间的显著性差异。用 Quantity One 软件分析 DGGE 图谱, 根据 unweighted pair group method clustering (UPG-

MA) 算法构建树状图。T-RFs 信息上传至 T-RFLP 在线比对网站 MICA: Microbial Community Analysis III (<http://mica.ibest.uidaho.edu/runpat.php>) 上进行比对。

2 结果与分析

2.1 T-RFLP 分析结果

2.1.1 细菌多样性分析

肠道各部位的丰富度、多样性、均匀度, 结果见表 1。结果表明粪便中细菌多样性指数最高, 为 2.30, 显著高于小肠三个部位的内容物 (P < 0.05); 大肠中结肠的细菌多样性指数为 2.23, 盲肠的为 2.17, 直肠的为 2.30, 与粪便中细菌多样性指数差异无显著性 (P > 0.05); 而小肠内容物中细菌的多样性指数显著低于大肠和粪便, 回肠、空肠和十二指肠部位分别为 1.68、1.61 和 1.90, 其中十二指肠部位细菌多样性指数又显著高于回肠和空肠部位的。大肠和粪便中细菌的丰富度和均匀度亦明显高于小肠部位。

表 1 BALB/c 小鼠肠道各部位内容物及粪便中细菌多样性分析

Tab.1 Diversity analysis of the bacterial community in different sites of the intestines and feces of BALB/c mice

部位 Position	丰富度 Richness (S)	均匀度 Evenness (E)	香农-威纳多样性指数 Shannon-Weaner index (H')
粪便 Feces	16.75 ± 0.48 ^a	0.84 ± 0.02 ^a	2.37 ± 0.07 ^a
直肠 rectum	16.00 ± 1.41 ^a	0.82 ± 0.02 ^a	2.30 ± 0.08 ^a
结肠 colon	15.25 ± 1.25 ^a	0.82 ± 0.03 ^a	2.23 ± 0.12 ^a
盲肠 cecum	14.75 ± 0.85 ^b	0.81 ± 0.04 ^a	2.17 ± 0.09 ^a
回肠 ileum	9.00 ± 1.00 ^c	0.77 ± 0.02 ^b	1.68 ± 0.10 ^c
空肠 jejunum	9.50 ± 1.19 ^c	0.72 ± 0.04 ^b	1.61 ± 0.140 ^c
十二指肠 duodenum	12.50 ± 3.27 ^b	0.79 ± 0.06 ^b	1.90 ± 0.24 ^b

注:用字母 a, b 或 c 表示各部位之间的差异 (P < 0.05); 结果为 4 个重复, 用 $\bar{x} \pm s$ 表示。

Note. Significant differences (P < 0.05) between the parts are shown with letters a, b, or c; The results are $\bar{x} \pm s$, n = 4 for each method measurement.

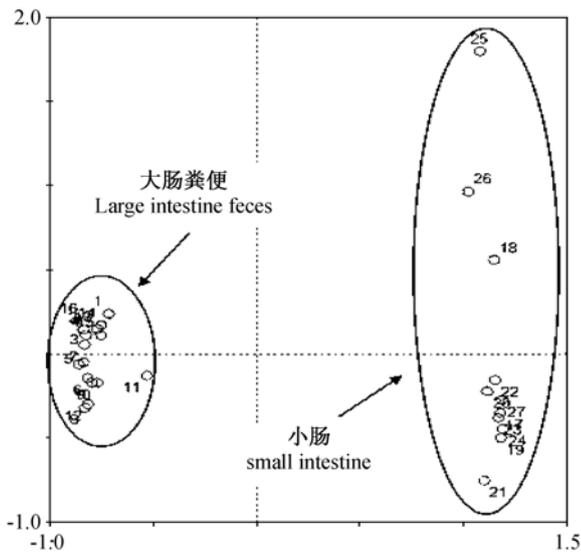
2.1.2 肠道各部位之间细菌群落结构分析

对应 (CA) 分析结果如图 1 所示, 其中去掉一个明显离群的十二指肠样品。图中的 1-16 代表大肠内容物和粪便样品, 它们紧密的聚在一起, 表明他们的细菌群落组成十分相似且不同 BALB/c 小鼠大肠各部位内容物相似性较高且重复性好。17-27 代表小肠内容物, 其中 18 (回肠), 25 (十二指肠), 26 (十二指肠) 明显与其他小肠样品的成分相差较大, 表明 BALB/c 小鼠小肠各部位内容物相似度和重复性不如大肠部位的高。粪便和大肠样品聚集在一起, 与小肠样品分别位于二维轴的两端, 表明 T-RFs 反映出的 BALB/c 小鼠的粪便和大肠内容物的细菌

组成比较相似, 而与小肠内容物组成差异较大。

2.1.3 优势菌群分析

根据 T-RFs 在样品中的峰度值用 Excel 生成堆积柱状图 2。在粪便、直肠和结肠中 244、255 bp 和 449 bp 占有的比重较高 (6.95% ~ 42.71%), 为优势 T-RFs, 表明在这些肠道部位中共同存在着一些优势菌群; 而这些 T-RFs 在盲肠中存在但所占的比重明显减小, 表明盲肠部位细菌的优势菌群有所改变。此外, 大肠和粪便中共同拥有许多其他的 T-RFs, 如 60、183、261、265、426 bp 和 437 bp 等, 表明大肠部位和粪便中细菌的组成相似度较高。不同于大肠部位和粪便样品, 小肠部位的内容物中优势 T-



注:1~4. 粪便;5~8. 直肠;9~12. 结肠;13~16. 盲肠;17~20. 回肠;21~24. 空肠;25~27. 十二指肠。

图 1 细菌群落结构 CA 分析

Note. 1-4. Feces; 4-8. Rectum; 9-12. Colon; 13-16. Cecum; 17-20. Ileum; 21-24. Jejunum; 25-27. Duodenum.

Fig. 1 CA analysis of the bacterial community composition.

RFs 则为 60、73、261、268 bp 和 272 bp (4.01% ~ 55.14%)。其中 60 bp 在小肠中占有的比重最高 (19.33% ~ 61.15%)，但是沿着肠道向下比率逐渐的减小,73 bp 只存在于小肠中,将 T-RFs 信息上传

至在线比对网站 MICA 上发现,60 bp 代表乳杆菌属 (*Lactobacillus*),而 73 bp 代表克雷伯菌属 (*Klebsiella*)。

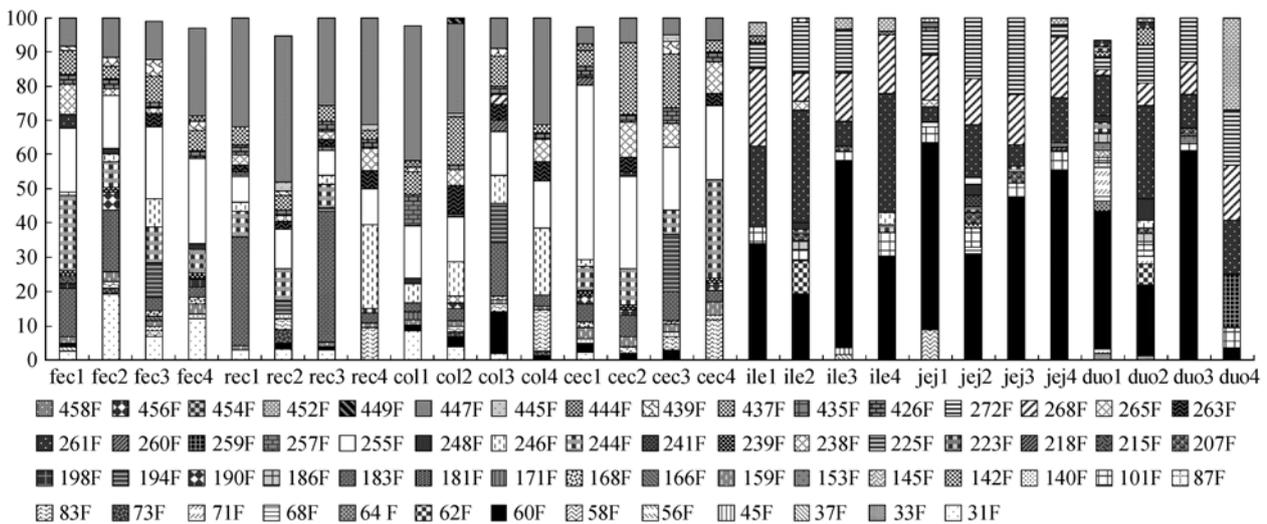
2.2 DGGE 分析

如图 3 所示,粪便和大肠各部位条带较小肠多,表明粪便和大肠内容物较小肠拥有更多的细菌种类;粪便和大肠拥有的优势条带相同,小肠部位的优势条带与大肠不同,与 T-RFLP 结果相一致。

进一步用 Quantity One 软件分析 DGGE 图谱,得到聚类分析树状图(图 4)。除一个粪便样品外,树状图中粪便和大肠各部位聚集成一簇,空肠和回肠样品聚集成一簇,说明大肠和粪便的细菌群落组成相似性较高,与小肠样品相似性较低,十二直肠内容物中细菌与粪便及空肠、回肠差别较大。

2.3 荧光定量 PCR 分析结果

荧光定量 PCR 分析各部位细菌丰度,结果如图 5 所示,小鼠肠道中,小肠部位的十二指肠和空肠内容物中细菌丰度分别为 6.9 log (copies)/g 和 8.3 log (copies)/g;粪便中细菌丰度高达 11.8 log (copies)/g,显著高于十二指肠和回肠这两个小肠部位 ($P < 0.05$),约为十二指肠的 2 倍,而与大肠各部位及回肠内容物中细菌的丰度相当,差异无显著性 ($P > 0.05$)。

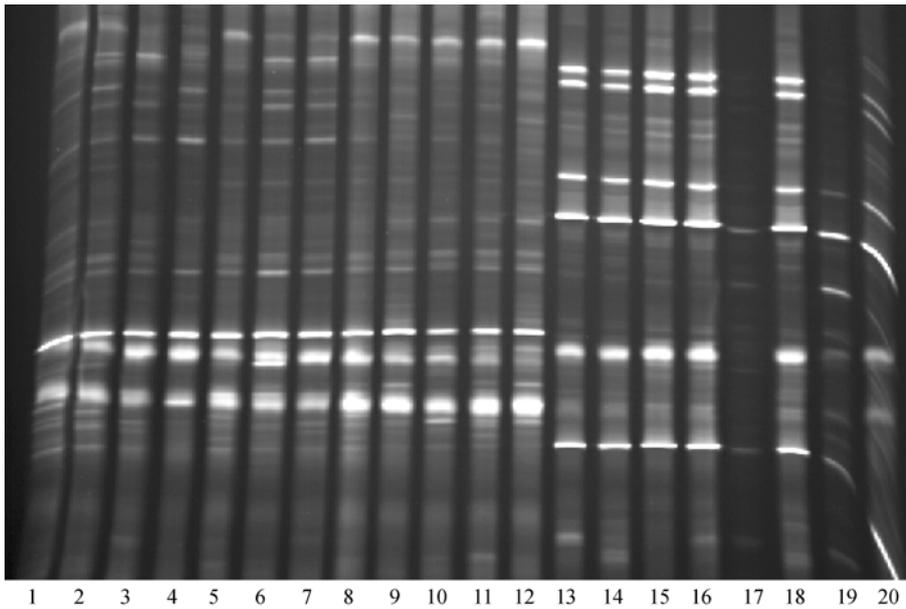


注:Fec:粪便;rec:直肠;col:结肠;cec:盲肠;ile:回肠;jej:空肠;duo:十二指肠。样品后边的数字代表小鼠编号,如,col 1 代表 1 号小鼠的结肠。

图 2 细菌 T-RFLP 分析柱状图

Note. Fec: Feces; rec: Rectum; col: Colon; cec: Cecum; ile: Ileum; jej: Jejunum; duo: Duodenum. The number following the sample stands for the mouse number. For example, col 1 stands for the colon of the first mouse.

Fig. 2 T-RFLP patterns of the bacterial populations.

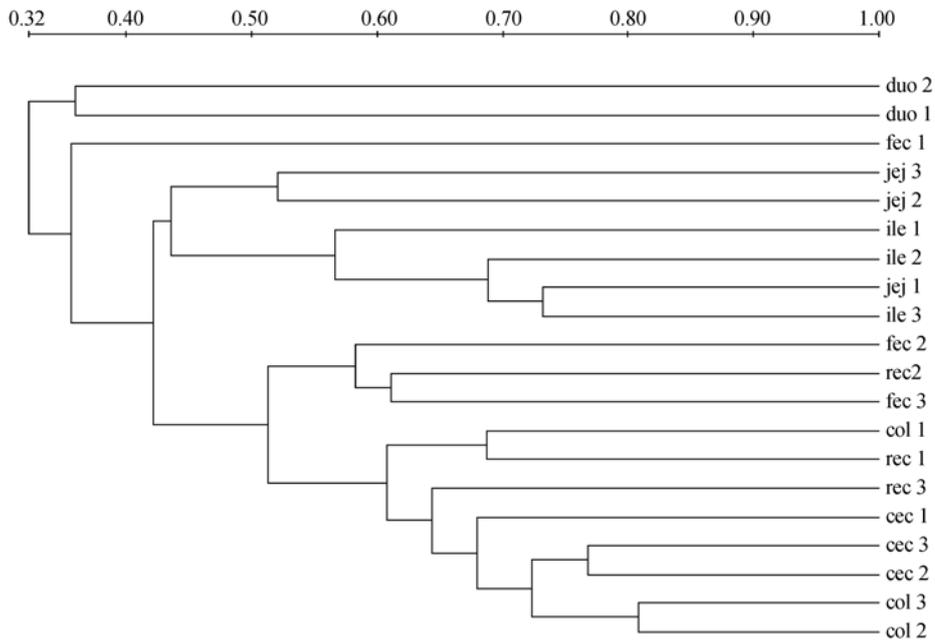


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20
 注:1~3. 粪便;4~6. 直肠;7~9. 结肠;10~12. 盲肠;13~15. 回肠;16~18. 空肠;19~20. 十二指肠。

图 3 16 S rDNA 的 PCR-DGGE 分析图谱

Note. Feces: 1 - 3; Rectum: 4 - 6; Colon: 7 - 9; Cecum: 10 - 12; Ileum: 13 - 15; Jejunum: 16 - 18; Duodenum: 19 - 20.

Fig. 3 The 16S rDNA PCR-DGGE profiles



注: fec: 粪便; rec: 直肠; col: 结肠; cec: 盲肠; jej: 空肠; ile: 盲肠; duo: 十二指肠。

图 4 DGGE 图谱聚类分析树状图

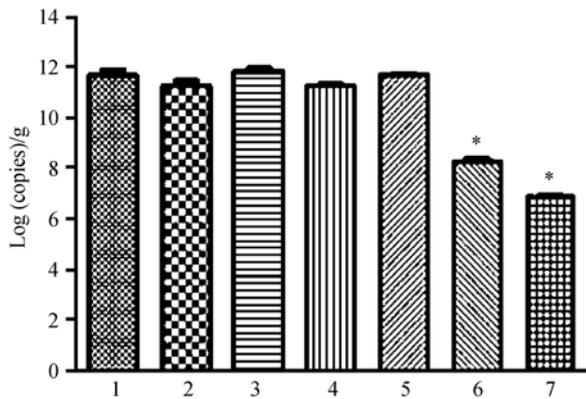
Note. fec: Feces; rec: Rectum; col: Colon; cec: Cecum; ile: Ileum; jej: Jejunum; duo: Duodenum.

Fig. 4 Cluster analysis of the DGGE profiles

3 讨论

肠道特有的环境使得体外分离培养肠道菌群存

在很大的局限性^[14]; 基于 PCR 的方法目前已被广泛应用于微生物分子生态学研究^[15,16], 其中 T-RFLP 技术用限制性内切酶将 DNA 酶切成不同的末



注:1:粪便;2:直肠;3:结肠;4:盲肠;5:回肠;6:空肠;7:十二指肠,*, $P < 0.05$,与粪便样品差异有显著性。

图5 小鼠粪便及肠道内容物细菌丰度

Note. *, $P < 0.05$. 1. Feces; 2. Rectum; 3. Colon; 4. Cecum; 5. Ileum; 6. Jejunum; 7. Duodenum.

Fig. 5 The abundance of bacteria in the mouse intestines and feces.

端片段(T-RFs),相同长度的T-RFs在一定程度上代表一类物种,可高效直观地进行微生物群落结构的分析^[17];DGGE则利用变性剂梯度将长度相同但组成不同的DNA分开从而检测DNA的多态性等^[18]。本研究通过T-RFLP分析发现BALB/c小鼠肠道不同部位有其适合生存的特异性细菌种群,即优势的T-RFs,其中60 bp代表乳杆菌属(*Lactobacillus*),乳酸杆菌为兼性厌氧菌,60 bp片段自小肠到大肠丰度逐渐减少可能跟小肠至大肠氧气含量逐渐减少有关。PCR-DGGE分析结果与T-RFLP结果表现出一致的趋势:粪便与大肠部位内容物中细菌多样性相似,且明显高于小肠部位内容物;粪便和结直肠共同拥有一些优势菌群,表明粪便和结直肠的细菌群落结构相似。同时BALB/c小鼠粪便与大肠各部位之间在细菌丰度上亦十分相似,与空肠、十二指肠差异显著;且大肠各部位细菌丰度较为稳定,小肠各部位之间细菌丰度波动较大。小肠主要是消化和吸收营养物质的场所,该部位影响细菌分布的影响因素很多,如pH、消化液、分泌物和激素等,而相比之下大肠内部环境相对稳定,这可能是造成大肠内细菌丰度稳定性高于小肠的一个重要原因^[19]。

本实验中BALB/c小鼠大肠各部位之间细菌群落结构重复性较好,且与粪便中细菌组成相似,小肠各部位细菌群落与粪便差别显著且个体间差异较大,小鼠粪便并不能代表整个肠道内容物,而只适用于大肠部位特别是结直肠相关疾病的研究,如结直肠癌等;对小肠部位微生态与疾病的相关研究应该

选择其他合适的方法。除小鼠外,利用代谢产物来分析其他哺乳动物肠道微生态也是科研人员常用的方法,如Ilmberger等^[20]用大象粪便反应其肠道微生态来研究大象的胃肠系统;赵立平等^[21]利用大熊猫粪便来检测大熊猫肠道微生物区动态,虽然不同物种间的胃肠道系统可能存在差异,但是本研究可为大型动物及稀有濒危哺乳动物的研究提供参考。

参 考 文 献

- [1] Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing [J]. Nature, 2010, 464(7285): 59-65.
- [2] Mazmanian SK, Round JK, Kasper DK. A microbial symbiosis factor prevents intestinal inflammatory disease [J]. Nature, 2008, 453(29): 620-625.
- [3] Kostic AD, Xavier RJ, Gevers D. The microbiome in inflammatory bowel diseases: current status and the future ahead [J]. Gastroenterology, 2014, 146(6): 1489-1499.
- [4] Wang T, Cai G, Qiu Y, et al. Structural segregation of gut microbiota between colorectal cancer patients and healthy volunteers [J]. ISME, J, 2012, 6(2): 320-329.
- [5] Fei N, Zhao L. An opportunistic pathogen isolated from the gut of an obese human causes obesity in germfree mice [J]. IMSE, 2013, 7(4): 880-884.
- [6] Arthur JC, Perez-Chanona E, Mühlbauer M, et al. Intestinal inflammation targets cancer-inducing activity of the microbiota [J]. Science, 2012, 338(6103): 120-123.
- [7] Etxeberria U, Arias N, Boqué N, et al. Shifts in microbiota species and fermentation products in a dietary model enriched in fat and sucrose [J]. Beneficial Microbes, 2014, 11: 1-5.
- [8] Rooks MG, Veiga P, Wardwell-Scott LH, et al. Gut microbiome composition and function in experimental colitis during active disease and treatment-induced remission [J]. ISME, 2014, 8(7): 1043-1417.
- [9] Mondot S, de Wouters T, Doré J, et al. The human gut microbiome and its dysfunctions [J]. Dig Dis, 2013, 31(3-4): 278-285.
- [10] Desai C, Madamwar D. Extraction of inhibitor-free metagenomic DNA from polluted sediments, compatible with molecular diversity analysis using adsorption and ion-exchange treatments [J]. Bioresour Technol, 2006, 98(4): 761-768.
- [11] 彭绪亚, 邸玉翠, 贾传兴, 等. 基于PCR-TGGE技术的餐厨垃圾厌氧消化微生物群落结构解析 [J]. 环境科学学报, 2012, 32(4): 960-967.
- [12] 张素珍, 李思施, 韦婷婷, 等. 基于PCR-DGGE的小鼠肠道菌群基因组提取方法的建立 [J]. 微生物学杂志, 2013, 33(5): 32-36.
- [13] Montes-Borrego M, Metsis M, Landa BB. Arbuscular mycorrhizal fungi associated with the olive crop across the Andalusian Landscape: factors driving community differentiation [J]. PLoS ONE, 2014, 9(5): e96397.

- [14] Ianiro G, Bibbò S, Gasbarrini A, et al. Therapeutic modulation of gut microbiota: current clinical applications and future perspectives [J]. *Curr Drug Targets*, 2014, 15(8):762-770.
- [15] 高倩, 王有明, 吴旧生. 肠道菌群变化对实验小鼠肠黏膜免疫的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(5): 45-49.
- [16] 戴方伟, 宋晓明, 周莎桑, 等. 大鼠肠内容物细菌基因组 DNA 提取方法的比较 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(3): 246-249.
- [17] Green BJ, Wiriyachaiyorn S, Grainge C, et al. Potentially pathogenic airway bacteria and neutrophilic inflammation in treatment resistant severe asthma [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(6): e100645.
- [18] 董莹, 何雪心, 于卓, 等. 实时荧光定量法和 PCR-DGGE 技术研究大肠癌患者肠道微生态特征 [J]. 2014, 34(7): 551-553.
- [19] Gu SH, Chen D, Zhang JN, et al. Bacterial community mapping of the mouse gastrointestinal tract [J]. *PLoS ONE*, 2013, 8(10): e74957.
- [20] Ilmberger N, Güllert S, Dannenberg, et al. A comparative metagenome survey of the fecal microbiota of a breast- and a plant-fed Asian elephant reveals an unexpectedly high diversity of glycoside hydrolase family enzymes [J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(9): e106707.
- [21] 鲁海峰, 魏桂芳, 李仲逵, 等. ERIC-PCR 分子杂交技术分析大熊猫肠道菌群结构 [J]. *中国微生态学杂志*, 2005, 17(2): 81-84.

[收稿日期] 2015-01-04

(上接第 248 页)

- [7] 俞发荣, 连秀珍, 张红梅, 等. 慢性环境刺激对中国树鼩生殖生理的影响 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2014, 30(5): 442-444.
- [8] 王逸, 卢聪, 宋广青, 等. 慢性束缚应激对 SD 和 Wistar 大鼠学习记忆能力的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(02): 40-44.
- [9] 周晨, 胡浪, 李天雪, 等. 应激所致肠功能紊乱大鼠模型的建立及内源性标志物的评价 [J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(6): 13-17, 2.
- [10] 王超, 赵传超, 施忠秋, 等. 热应激对小鼠器官指数、小肠损伤及胃 HSP70 mRNA 表达的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(5): 63-66, 10.
- [11] 李征, 于生元, 梁景耀, 等. 反复电刺激大鼠上矢状窦后的抑郁行为学表现 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, 20(2): 6-10.
- [12] 汤冠荣, 蒋锐, 姜正林, 等. 前庭功能锻炼对运动病大鼠血浆应激相关激素水平的影响 [J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(6): 1065-1069.
- [13] 王吉文, 丘宇茹, 符少萍, 等. 大鼠脑缺血/再灌注致心肌损伤中心肌内皮素和去甲肾上腺素的表达 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2008, 19(6): 695-700.
- [14] Mitchell A, Rushentsova U, Siffert W, et al. The angiotensin II receptor antagonist valsartan inhibits endothelin 1-induced vasoconstriction in the skin microcirculation in humans in vivo; influence of the G-protein beta3 subunit (GNB3) C825T polymorphism [J]. *Clin Pharmacol Ther*. 2006, 79(3): 274-281.
- [15] 刘占东, 鲍晓力, 张进禄, 等. 慢性应激状态下大鼠睾酮水平测定 [J]. *中国实验动物学报*, 2010, 19(6): 526-529.
- [16] 谈世进, 王艳妮, 丁在咸. 睾酮水平的变化对雄性大鼠血管内皮功能的影响 [J]. *同济大学学报(医学版)*, 2012, 33(6): 27-30.

[收稿日期] 2014-12-18



氨基酸转运载体 LAT1 对小鼠胎盘早期建立的影响

马婧¹, 谭毅¹, 谭冬梅¹, 卢俊杰¹, 梁浩¹, 罗文萍^{2,3*}

(1. 重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016; 2. 重庆医科大学附属口腔医院, 重庆 401147;
3. 口腔疾病与生物医学重庆市重点实验室, 重庆 401147)

【摘要】 目的 观察 L 型氨基酸转运载体 1 (L-type amino acid transporter 1, LAT1) 在妊娠小鼠第 8 天 (D8) 子宫中的表达, 探讨 LAT1 在早期胎盘形成过程中的作用。方法 120 只 6~8 周龄 SPF 级 KM 雌鼠作为研究对象, 免疫组织化学检测 LAT1 在妊娠小鼠 D8 子宫中的表达情况, 原代分离 D8.5 的绒毛膜锥 (EPCs), 检测 LAT1 特异抑制剂 2-氨基双环[2.2.1]庚烷-2-羧酸 (2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid, BCH) 以及 LAT1 的作用底物亮氨酸 (L-leucine) 对 EPCs 黏附及外延生长能力的影响。结果 LAT1 高表达于 D8 子宫蜕膜区, 在 EPCs 中亦呈现阳性表达。LAT1 的特异性抑制剂 BCH 显著性抑制 EPCs 的外延生长, 而亮氨酸对 EPCs 的外延生长抑制作用差异无显著性。结论 LAT1 表达于小鼠早期胎盘形成期的子宫中, 从而推测 LAT1 可能促进滋养层对母体蜕膜组织的侵袭, 进而参与胎盘早期的建立。

【关键词】 小鼠; 胎盘; L 型氨基酸转运载体 1; 绒毛膜锥

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0256-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.007

Effect of LAT1 on early placenta formation in mice

MA Jing¹, TAN Yi¹, TAN Dong-mei¹, LU Jun-jie¹, LIANG Hao¹, LUO Wen-ping^{2,3**}

(1. Laboratory Animal Center, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China;
2. Stomatological Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 401147;
3. Chongqing Key Laboratory of Oral Diseases and Biomedical Sciences, Chongqing 401147)

【Abstract】 **Objective** To explore the expression and role of LAT1 in mouse uterus on early placenta formation on day 8 of pregnancy (D8). **Methods** One hundred and twenty 6-8-week old SPF female Kunming mice were used in this study. Immunohistochemistry was applied to determine the localization of LAT1 protein in the mouse uterus on D8 of pregnancy. The ectoplacental cones (EPCs) were dissected out from D8.5 uterus, and then cultured in vitro with different concentrations of BCH (2-aminobicyclo-(2,2,1)-heptane-2-carboxylic acid, specific antagonist of LAT1) and L-leucine (substrate of LAT1) to determine the role of LAT1 during the EPC attachment and outgrowth. **Results** LAT1 protein was highly expressed in secondary decidual zone and also positively expressed in the mouse uterus on D8. As a specific antagonist of LAT1, BCH significantly suppressed the ectoplacental cone outgrowth, whereas L-leucine showed no significant effect on it. **Conclusions** LAT1 is expressed in the mouse uterus during early placenta formation and promotes ectoplacental cone outgrowth, suggesting that LAT1 may promote the trophoblast invasion into maternal decidual tissue, and participates in the early formation of placenta.

【Key words】 Mouse; Placenta formation; L-type amino acid transporter 1; Ectoplacental cones

在哺乳动物胚胎的植入过程中, 胚外滋养层对子宫蜕膜的适度侵袭是成功植入的重要事件。该过

程受到严格的时空调节, 侵袭时间的早晚、侵袭程度的强弱都可能影响早期胎盘形成, 甚至导致整个妊

【基金项目】 国家自然科学基金青年基金资助项目 (31301221)。

【作者简介】 马婧 (1988 -), 女, 硕士研究生, 专业: 动物学 E-mail: mj5658700@126.com

【通讯作者】 罗文萍 (1985 -), 女, 助理研究员, 博士, 研究方向: 哺乳动物胚胎着床。E-mail: lwplucky@163.com Tel: 86-23-88602353

娠事件的成败。在 小鼠围植入期,靠近内细胞团(inner cell mass)的细胞增殖分化形成绒毛膜锥(ec-toplacental cone, EPCs),绒毛膜锥的外层细胞分化为具有侵袭性的次级滋养层细胞(trophoblast giant cells, TGCs),随后侵入母体蜕膜组织,形成胎盘。小鼠的滋养层细胞侵袭开始于 D8^[1,2]。小鼠作为研究人类滋养层细胞侵袭和胎盘早期发生的理想动物模型^[3],小鼠妊娠第 8 天时外胎盘锥中相关调节因子的表达规律及作用机制一直受到研究者的广泛关注,而 L 型氨基酸转运载体 1(L-type amino acid transporter 1, LAT1)在小鼠早期胎盘发生过程中的作用尚鲜有报道。

氨基酸是构成蛋白质的基本元件,而氨基酸转运载体除了可以将氨基酸转移进出细胞外,还可参与氨基酸对神经细胞兴奋、抑制等重要细胞功能的调节过程^[4]。L 型氨基酸转运载体系统是一个非 Na⁺ 依赖性的大中性氨基酸转运载体^[5],作为其中的一员,L 型氨基酸转运载体 1 主要负责转运一些 Na⁺ 非依赖性大中性氨基酸,其中包含亮氨酸、赖氨酸等必需氨基酸。亮氨酸作为 LAT1 的转运底物,在一定范围内其浓度升高时, LAT1 表达水平增加,从而促进转运速度。而 BCH 作为转运抑制剂能够抑制 LAT1 的活性,从而调控氨基酸的转运。亮氨酸和 BCH 的抑制作用均受浓度和时间的双重调控。研究者发现, LAT1 大量表达于小鼠胎盘组织^[6],推测其可能与胎儿发育过程中的氨基酸吸收和营养代谢相关^[7],比如胎儿从母体摄取重要氨基酸(如丝氨酸)^[8]、激素(如甲状腺激素)等过程可能都依赖于 LAT1 的参与。LAT1 功能的异常或可影响胎儿发育过程中氨基酸的正常吸收,甚至导致严重的代谢障碍性疾病。除此以外,鉴于在胎盘中 LAT1 主要表达在与侵袭表型相关的滋养层细胞^[9,10],我们推测 LAT1 或许也可参与滋养层侵袭行为的调节,进而影响胎盘发生过程。因此,我们检测了 LAT1 在 D8 小鼠子宫中的表达,并通过体外检测 BCH 和亮氨酸对 EPCs 外延生长的影响,探讨 LAT1 在早期胎盘形成中的作用,促进我们对胎盘形成过程中分子调节机制的进一步认识。

1 材料和方法

1.1 材料

6-8 周龄 SPF 级 KM 雌鼠 120 只,体重 20~25 g,购自重庆医科大学实验动物中心【SCXK(渝)2012-0001】,饲养及实验动物操作均于重庆医科大学实验动物中心动物屏障系统环境内【SYXK(渝)

2012-0001】。KM 雄鼠与动情期雌鼠 1:2 合笼,第 2 天早晨观察到阴栓的记为妊娠第 1 天(D1)。D8 取材,收集子宫组织,将组织放入液氮中速冻,然后放在 -80℃ 低温冰箱内保存,用于制作冰冻切片。

兔源性 LAT1 多克隆抗体购自 Santa Cruz 公司;兔 SP 检测试剂盒(SP-9001)、DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Matrigel Basement Membrane Matrix 基质胶购自美国 BD Biosciences 公司;BCH、亮氨酸均购自 Sigma 公司;Gibco 胎牛血清、Gibco F-12 培养基均购自 Invitrogen 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测 LAT1 在 D8 小鼠子宫中的表达

妊娠小鼠 D8 的子宫组织冰冻切片进行免疫组织化学染色:3% H₂O₂ 甲醇溶液孵育 20 min,山羊血清封闭 30 min,一抗(浓度为 1:800 的兔源性 LAT1 多克隆抗体;阴性对照组采取同种兔正常血清代替一抗)4℃ 孵育过夜,第 2 天滴加二抗山羊抗兔 IgG,室温孵育 1 h,然后滴加辣根酶标记链酶卵白素工作液(S-A/HRP)室温孵育 30 min,用 DAB 试剂显色,并用苏木精复染,盐酸酒精分化,梯度脱水,封片。显微镜下观察 LAT1 在妊娠小鼠 D8 子宫中的表达位置。

1.2.2 体外检测 BCH 以及亮氨酸对绒毛膜锥(EPCs)黏附能力及外延生长的影响

每次取 20 只孕鼠,每组 5 只。参考 Peng 等^[11]方法分离 D8.5 的 EPCs。断颈椎处死妊娠 D8.5 的小鼠,小心用剪刀和镊子打开子宫壁,取出鼓包,放入培养基中清洗,然后在显微镜下用眼科镊分离出 EPCs,每只获取 6~8 个结构完整的 EPCs,并随机将 EPCs 放到铺有 Matrigel 胶的 24 孔板中培养。2~4 h 后,加入完全培养基(F12 + 10% FBS)。BCH 及亮氨酸的处理浓度参考 Chrostowski^[9]文献报道,其中处理组分别加入 0.1、1、4 μmol/L BCH。对照组不做处理。亮氨酸处理实验取材和方法同 BCH 处理。处理组亮氨酸浓度分别为:20、200、800 μmol/L。

观察各组 EPCs 黏附及外延生长的情况。EPCs 的黏附情况及外延生长的测定参考 Peng 等方法。将培养至 24、48 h 的 EPCs 轻微晃动 20 s,观察,依然在 Matrigel 胶上不动的 EPCs 记为黏附成功,并在显微镜下拍照,测量 EPCs 距离。每组实验重复 3 次。

1.2.3 统计学方法

所有实验数据采用平均值 ± 标准差表示,使用 SPSS 17.0 对数据进行统计学分析,组间比较采用 *t*

检验或方差分析。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组织化学检测 LAT1 在 D8 小鼠子宫中的表达

免疫组织化学结果显示, LAT1 强表达于 D8 小鼠子宫蜕膜区域的细胞中, 并且 LAT1 在 EPCs 中呈现阳性表达 (图 1)。

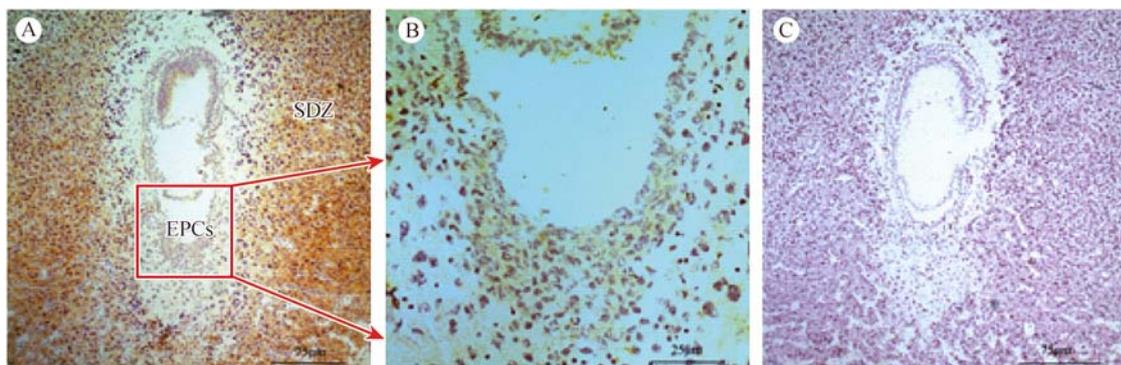
2.2 亮氨酸对绒毛膜锥黏附及外延生长能力的影响

为了探讨 LAT1 的作用底物亮氨酸对 EPCs 侵袭能力的影响, 我们检测了 20、200、800 $\mu\text{mol/L}$ 亮氨酸对 EPCs 黏附能力及对外延生长的影响。结果, 在培养至 24 h 及 48 h 时, 不同组的 EPCs 的黏附率均在 90% 以上, 各组之间差异无显著性。提示

亮氨酸对 EPCs 的黏附能力没有影响。用 ImageJ 软件对 EPCs 外延生长距离分析可知, 24 h 及 48 h 时, 不同浓度亮氨酸均对 EPCs 的外延生长无影响 (图 2)。

2.3 氨基酸转运抑制剂 BCH 对绒毛膜锥黏附及外延生长能力的影响

为了探讨氨基酸转运抑制剂 BCH 对 EPCs 侵袭能力的影响, 我们检测了 0.1、1、4 $\mu\text{mol/L}$ BCH 对 EPCs 黏附能力及对外延生长的影响。结果, 在培养至 24 h 及 48 h 时, 不同组的 EPCs 黏附率均在 90% 以上, 各组之间差异无显著性。提示了 BCH 信号对 EPCs 的黏附能力没有影响。用过 ImageJ 软件对 EPCs 外延生长距离分析可知, 在 24 h 时, 1、4 $\mu\text{mol/L}$ BCH 均可抑制 EPCs 的外延生长, 与对照组比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$), 在 48 h 时, 0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 可显著抑制 EPCs 的外延生长 ($P < 0.05$) (图 3)。

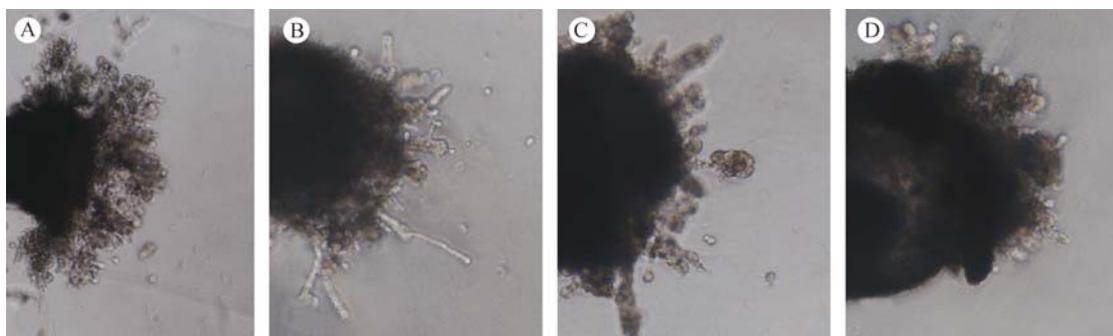


注: A: LAT1 在 D8 子宫中表达; B: 图 A 中 EPCs 放大; C: 阴性对照; SDZ: 次级蜕膜带; EPCs: 绒毛膜锥。

图 1 免疫组化检测 LAT1 在 D8 小鼠子宫中的表达

Note. A: LAT1 expression in the mouse uteri on day 8; B: A higher magnification of EPC in (A); C: negative control; SDZ: Secondary decidual zone; EPCs: Ectoplacental cone.

Fig. 1 Immunohistochemical staining of LAT1 in the mouse uteri on D8 of pregnancy.

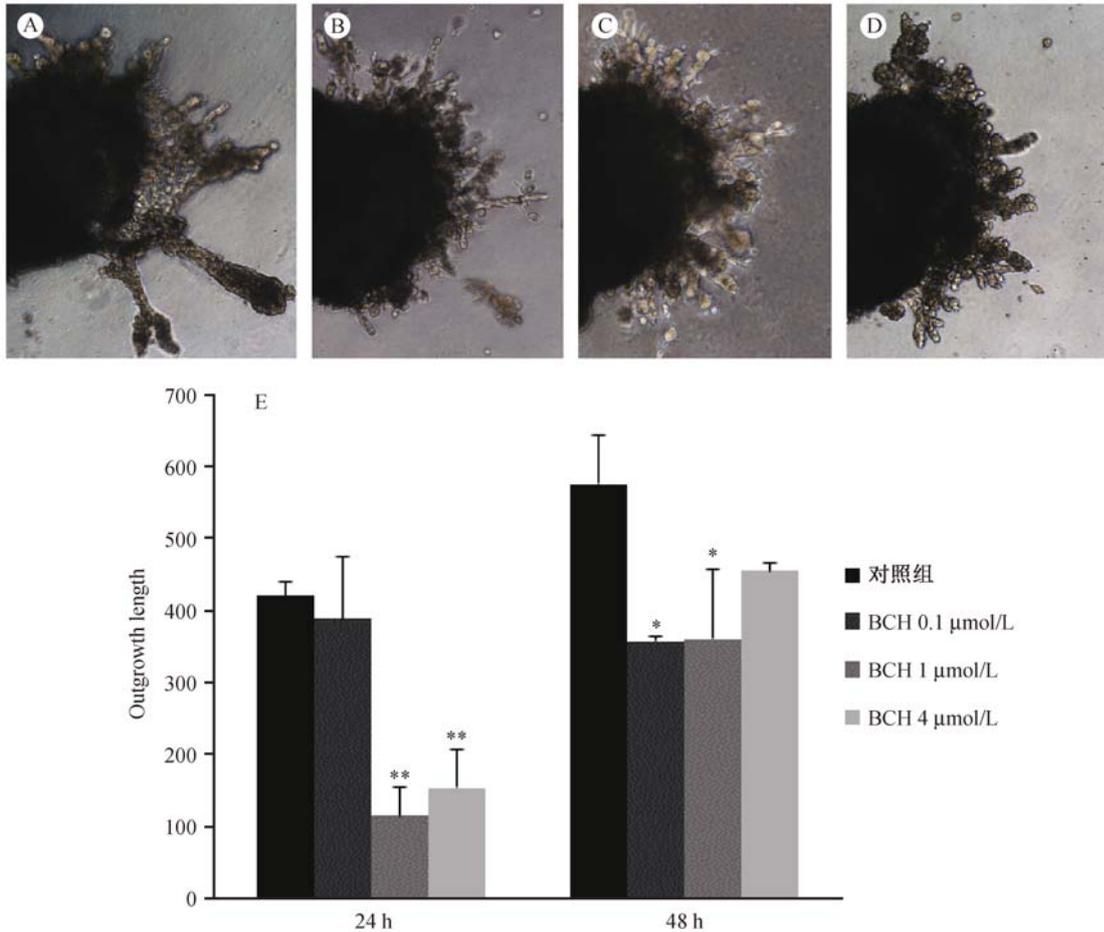


注: A-D: 对照组, 20、200、800 $\mu\text{mol/L}$ 亮氨酸。

图 2 48 h 时, 不同浓度亮氨酸对 EPCs 外延生长能力的影响

Note. A-D: Control, 20, 200, 800 $\mu\text{mol/L}$ L-leucine.

Fig. 2 Effects of different concentrations of L-leucine on EPCs outgrowth at 48 h



注:A-D:48 h 时,EPCs 外延生长图,分别为:对照组,0.1、1、4 μmol/L BCH;E:外延生长统计图;* $P < 0.05$,与对照组比;** $P < 0.01$,与对照组比。

图3 不同浓度 BCH 对 EPCs 外延生长能力的影响

Note. A-D: At 48 h, the outgrowth length of EPCs, Respectively, Control, 0.1 μmol/L, 1 μmol/L, 4 μmol/L BCH; E: Statistics of the outgrowth length in different treatment groups; * $P < 0.05$, Compared with the control group; ** $P < 0.01$, Compared with the control group.

Fig.3 Effects of different concentrations of BCH on EPCs outgrowth

3 讨论

作为构成蛋白质的基本元件氨基酸参与了细胞内许多代谢途径,而氨基酸转运蛋白为氨基酸的摄取提供了载体通道。其中 LAT1 大量表达在胎儿脑、肝脏、骨髓、胎盘及生殖器等正常组织以及癌细胞中^[12],组织部位、细胞类型的不同导致表达水平不同^[13]。

滋养层细胞侵入母体子宫发生蜕膜化是胚胎植入的关键步骤,在这一过程中,侵袭性的滋养层细胞的侵袭能力和行为方式与肿瘤细胞相似,此过程均涉及基质金属蛋白酶、激素以及母体免疫、代谢及内分泌等活动的调节^[14,15]。因此,从某种意义上讲,滋养层细胞对母体蜕膜侵入的精确调控与肿瘤细胞侵袭的失控是同一种细胞行为的两种表型^[14]。有

研究报道,LAT1 在滋养层细胞株 Rs26 TS 细胞中高表达,采用基因沉默或者是 LAT1 的拮抗剂 BCH 干预细胞,均可降低小鼠滋养层细胞株 Rs26 TS 细胞侵袭^[16]。因此,LAT1 在小鼠胎盘组织中的高表达可能是通过参与调节滋养层细胞侵袭行为进而影响早期胎盘发生进程。

在本实验中,我们检测了 LAT1 在小鼠滋养层细胞对子宫内膜开始侵袭时(即妊娠第 8 天)妊娠子宫中的表达,结果证实,LAT1 强表达于次级蜕膜带的蜕膜细胞胞膜上以及侵袭性的 EPCs 中。在胎盘未形成之前,大核多核的蜕膜细胞可为胚胎的生长提供能量,因此 LAT1 在次级蜕膜带的强表达可能提示其在胚胎发育中的营养作用。为了进一步验证 LAT1 在 EPCs 侵袭过程中所扮演的角色,我们选

择体外分离培养的 D8.5 的 EPCs 作为研究小鼠胚胎植入及滋养层侵袭的体外模型,将 EPCs 种植于 Matrigel 胶上,并分别以不同浓度的 LAT1 的氨基酸作用底物亮氨酸及氨基酸转运抑制剂 BCH 进行干预。在小鼠滋养层细胞株 Rs26 TS 的完全培养基中含有 200 mg/L 亮氨酸,而研究发现在较低浓度 (40 $\mu\text{mol/L}$) 的亮氨酸培养基中,细胞 LAT1 mRNA 和蛋白表达水平均升高。因此,限制亮氨酸的浓度可以改变 LAT1 的表达水平。在 EPCs 培养的 F12 完全培养基中加入不同浓度的亮氨酸,直至将培养基中亮氨酸浓度额外增加至 800 $\mu\text{mol/L}$ (200 mg/L) 的浓度,依然没有发现 EPCs 的粘附及外延生长能力受到影响。分析原因,可能是因为在完全培养基中,氨基酸浓度 (包括亮氨酸) 非常高,因此再额外的添加亮氨酸,已经不能改变 LAT1 的表达水平,这也与本文中亮氨酸处理 EPCs 后外延生长情况无显著性差异的检测结果相吻合。如果要更进一步的研究 LAT1 的作用底物在 EPCs 的粘附及外延生长能力方面的影响,应该自制选择性培养基,去除 F12 完全培养基中的 LAT1 底物氨基酸,再给予定量添加。

BCH 为 LAT1 转运亮氨酸的竞争性抑制剂。在肿瘤细胞中,BCH 可能通过影响氨基酸的胞内转运,影响 mTOR 磷酸化及其下游信号,进而通过转录后修饰调节等方式改变 LAT1 的表达水平^[16]。我们采用不同浓度的氨基酸特异抑制剂 BCH 处理 EPCs,结果提示,在 24 h 时,1、4 $\mu\text{mol/L}$ BCH 均可显著抑制 EPCs 的外延生长,而在 48h 时,0.1、1 $\mu\text{mol/L}$ 可表现出显著的抑制作用,4 $\mu\text{mol/L}$ 组的抑制作用差异不显著。在加入亮氨酸及 BCH 处理 EPCs 后,无法从 Matrigel 胶上分离出外延生长的滋养层细胞,因此无法检测该细胞中 LAT1 的表达水平是否发生变化。有文献报道在 Rs26 TS 细胞中,BCH 对 LAT1 的表达水平改变能力尚不如亮氨酸的作用。BCH 作用 48 h 时,LAT1 的蛋白表达水平无显著变化,但依然可以发现 Rs26 TS 细胞的侵袭能力产生了显著变化。

因此我们推测 LAT1 可能促进 EPCs 的外延生长从而参与胎盘的形成。但 LAT1 通过何种分子机制参与调节 EPCs 的侵袭行为,以及在体内以何种复杂方式参与早期胎盘的发生,仍需进一步实验研究。

参 考 文 献

[1] Erica DW, Cross JC. Development of structures and transport functions in the mouse placenta [J]. *Physiology*, 2005, 20: 180 - 193.
[2] Lagu MN, Detmar J, Paquet M, et al. Decidual PTEN expres-

sion is required for trophoblast invasion in the mouse [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(6): 936 - 946.
[3] Hu D, Cross JC. Development and function of trophoblast giant cells in the rodent placenta [J]. *Int J Dev Biol*, 2010, 54(2 - 3): 341 - 354.
[4] 魏宗友,徐柏林,郝志敏,等. 氨基酸转运载体的研究进展 [J]. *中国饲料*, 2010, (13): 19 - 23.
[5] Imai H, Kaira K, Oriuchi N, et al. L-type amino acid transporter 1 expression is a prognostic marker in patients with surgically resected stage I non-small cell lung cancer [J]. *Histopathology*, 2009, 54(7): 804 - 813.
[6] Yanagida O, Kanai Y, Chairoungdua A, et al. Human L-type amino acid transporter (LAT1): characterization of function and expression in tumor cell lines [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2001, 1514(2): 291 - 302.
[7] Aiko Y, Askew DJ, Aramaki S, et al. Differential levels of amino acid transporters system L and ASCT2, and the mTOR protein in placenta of preeclampsia and IUGR [J]. *BMC Pregnancy Childbirth*. 2014, 14:181.
[8] Lewis RM, Glazier J, Greenwood SL, et al. L-serine uptake by human placental microvillous membrane vesicles [J]. *Placenta*, 2007, 28(5 - 6): 445 - 452.
[9] Chrostowski MK, McGonnigal BG, Stabila JP, et al. LAT1 expression in pre and post implantation embryos and placenta [J]. *Placenta*. 2009, 30(3): 270 - 276.
[10] Jones H, Crombleholme T, Habli M. Regulation of amino acid transporters by adenoviral-mediated human insulin-like growth factor-1 in a mouse model of placental insufficiency in vivo and the human trophoblast line BeWo in vitro [J]. *Placenta*, 2014, 35(2): 132 - 138.
[11] Peng S, Li J, Miao C, et al. Dickkopf-1 secreted by decidual cells promotes trophoblast cell invasion during murine placentation [J]. *Reproduction*, 2008, 135(3): 367 - 375.
[12] 吴信,褚武英,石常友,等. 氨基酸转运载体 LAT1 研究进展 [J]. *生命科学*. 2008, 20(2): 253 - 257.
[13] Kaira K, Oriuchi N, Imai H, et al. L-type amino acid transporter 1 and CD98 expression in primary and metastatic sites of human neoplasms [J]. *Cancer Sci*, 2008, 99(12): 2380 - 2386.
[14] Estellal C, Herrer I, Atkinson SP, et al. Inhibition of histone deacetylase activity in human endometrial stromal cells promotes extracellular matrix remodelling and limits embryo invasion [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7(1): 305 - 308.
[15] Godbole G, Suman P, Gupta SK, et al. Decidualized endometrial stromal cell derived factors promote trophoblast invasion [J]. *Fertil Steril*, 2011, 95(4): 1278 - 1283.
[16] Chrostowski MK, McGonnigal BG, Stabila JP, et al. Role of the L-amino acid transporter-1 (LAT1) in mouse trophoblast cell invasion [J]. *Placenta*, 2010, 31(6): 528 - 534.
[17] Yamauchi K, Sakurai H, Toru Kimura T, et al. System L amino acid transporter inhibitor enhances anti-tumor activity of cisplatin in a head and neck squamous cell carcinoma cell line [J]. *Cancer Lett*, 2009, 276(1): 95 - 101.

[收稿日期] 2005-01-07



椎间盘脱出模型大鼠脊髓血管生成因子 mRNA 的表达变化及电针对其影响

吴伟澎¹, 李伟¹, 程鹏¹, 姜代勋¹, 陈武^{2*}

(1. 北京农学院兽医学(中医药)北京市重点实验室; 2. 北京农学院动物科学技术学院, 北京 102206)

【摘要】 **目的** 探讨椎间盘脱出症中与血管生成相关因子的变化及其电针作用, 分析电针参与脊髓微血管生成的机理。**方法** 采用自制硅胶片在 T₁₃ 段脊髓的左腹侧位压迫建立椎间盘脱出模型, 将大鼠随机分为三组, 即电针治疗组($n=6$)、模型组($n=6$)、假手术组($n=6$), 电针组每日电针治疗一次, 模型组与假手术组不做任何治疗。术后 7 d 后取压迫部位脊髓组织, RT-PCR 法检测 Ang-1、Tie-1、Ang-2、Tie-2、VEGF、Flt-1、caspase-3、Tsp-1 的 mRNA 表达量, 组织切片法观察脊髓损伤情况。**结果** 电针组大鼠后肢运动机能显著改善; 脊髓组结构相对完整, 灰质、白质界限清晰; 荧光定量 PCR 结果显示模型组与假手术组相比 Ang-1、Ang-2、Tie-1、Tie-2、caspase-3、Tsp-1 表达极显著升高($P<0.01$), VEGF、Flt-1 差异无显著性($P>0.05$); 模型组与电针组相比 Ang-2、Tie-1、Tie-2、caspase-3、Tsp-1 极显著升高($P<0.01$), Ang-1、VEGF、Flt-1 差异无显著性($P>0.05$); 电针组与假手术组各指标差异均无显著性($P>0.05$); **结论** 脊髓压迫损伤后血管生成相关因子 mRNA 表达异常, 电针能够下调 Ang-2、Tie-2、Tsp-1 和 caspase-3 的表达, 使血管生成促进因子和抑制因子水平趋于正常, 从而为受损脊髓组织的修复提供有利条件。

【关键词】 椎间盘脱出模型; 血管生成因子; 电针; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0261-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.008

Changes of expression of angiogenic factor mRNA in the spinal cord of rat models of protruded intervertebral disc and the effects of electroacupuncture

WU Wei-peng¹, LI Wei¹, CHENG Peng¹, JIANG Dai-xun¹, CHEN Wu²

(1. Beijing Key Laboratory of Veterinary Traditional Chinese Medicine;

2. Department of Animal Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

【Abstract】 **Objective** The purpose of this study was to determine the changes of expression of angiogenic factor mRNA in the spinal cord of rats with protruded intervertebral disc and the effects of electroacupuncture, and to analyze the role of electroacupuncture in the spinal microvascular angiogenesis. **Method** Eighteen healthy male Sprague-Dawley rats were divided randomly into 3 groups: the electroacupuncture group, model group and sham-operated group. The protruded intervertebral disc models were generated by the left lateral and ventral spinal cord compression at T13 using a self-made silicon sheet. Only the rats in the first group were treated by electroacupuncture once a day for consecutive 7 days. Spinal cord tissue samples were taken from the compression site at 7 days after operation. The mRNA levels of Ang-1, Tie-1, Ang-2, Tie-2, VEGF, Flt-1, caspase-3 and Tsp-1 were determined by RT-PCR, and the pathological changes of the spinal cord was examined using HE staining. **Results** The rats in the electroacupuncture treated group showed significantly improved hind leg function, a relatively complete spinal cord structure, and a clear boundary between grey and white matters. The expression levels of Ang-1, Ang-2, Tie-1, Tie-2, caspase-3 and Tsp-1 in the spinal cord tissues of the model group

【基金项目】 国家自然科学基金项目(编号: 31372473)。

【作者简介】 吴伟澎(1989-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 针灸机理。E-mail: wwp2012@126.com

【通讯作者】 陈武(1966-), 男, 教授, 博士, 研究方向: 中西医结合兽医学。Tel/Fax: 010-80799434, E-mail: tcmchenwu@Hotmail.com

were significantly higher than those of sham-operated group ($P < 0.01$), but the levels of VEGF and Flt-1 between those two groups showed no significant difference ($P > 0.05$). The expression levels of Ang-2, Tie-1, Tie-2, caspase-3 and Tsp-1 of the electroacupuncture group were significantly lower than those in the model group ($P < 0.01$), while the expression levels of Ang-1, VEGF and Flt-1 were not significantly different between the two groups ($P > 0.05$). All the indexes between electroacupuncture and sham-operated groups showed no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusions** Our results demonstrate that mRNA expression of relevant angiogenic factors were abnormal after spinal cord compression, while electroacupuncture can down-regulate the expression of Ang-2, Tie-2, Tsp-1 and caspase-3, and modulate the promoting and inhibiting factors of angiogenesis to return towards normal, therefore, to create beneficial conditions for the repair of spinal cord injuries.

【Key words】 Protruded intervertebral disc, model; Angiogenic factors; Electroacupuncture; Rats

椎间盘脱出是人和动物常见病,针灸疗法显示了良好的疗效。髓核脱出压迫脊髓导致功能障碍与微循环障碍和微血管数量变化密切相关^[1]。本实验室前期研究表明椎间盘脱出压迫模型大鼠的脊髓微血管数量异常减少,而电针组能够改善这种异常变化^[2],但其机理不明。血管生成因子与血管生成抑制因子、血管破坏因子之间的动态平衡是维持微血管的数量和结构稳定性的重要因素^[3],本研究通过观察血管生成因子血管生成素 1 (angiopoietin-1, Ang-1)、血管生成素 2 (angiopoietin-2, Ang-2)、血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及它们的受体 Tie-1、Tie-2、Flt-1,血管生成抑制因子凝血酶敏感蛋白 1 (thrombospondin-1, Tsp-1),细胞凋亡因子 caspase-3 在脊髓受压损伤后表达量的变化以及电针对其的影响,为针灸治疗椎间盘病提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

东华牌电针治疗仪 (WQ-6F);毫针 (苏州天协针灸器械有限公司,规格 0.2 × 25 mm);微动力仪 (Surgic XT, NSK, Japan);Step One Plus 荧光定量 PCR 仪 (ABI);戊巴比妥钠 (北京化学试剂公司,德国进口分装);注射用青霉素钾 160 万单位、注射用硫酸链霉素 50 万单位;TRIzol (Invitrogen);Revert Aid TM First Stand cDNA Synthesis Kit (Thermo);Trans Start Green qPCR Super Mix (Trans Gen Biotech)。

1.2 实验动物分组

清洁级雄性 SD 大鼠 18 只,体重 180 ~ 200 g,由中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心提供【SCXK-(军) 2012-004】,实验在北京农学院屏障动物实验设施进行【SYXK (京) 2010 -0003】,并按

实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。实验动物随机分成三组,即电针治疗组 ($n = 6$)、模型组 ($n = 6$)、假手术对照组 ($n = 6$)。电针组和模型组进行脊髓压迫,假手术组只暴露脊髓不压迫。电针组进行电针治疗,对照组和假手术组不做任何治疗。

1.3 椎间盘脱出模型制作

大鼠椎间盘脱出模型参考文献^[4],腹腔注射戊巴比妥钠 40 mg/(kg·bw) 进行麻醉,俯卧保定,以胸腰段椎体为中心剃毛、消毒,以第一腰椎 (L_1) 为中心,沿背正中线切开皮肤约 2 cm,分离筋膜、背最长肌、多裂肌,充分暴露 L_1 的棘突、椎板和关节突,微动力仪小心打磨椎板,暴露脊髓背侧,将自制的硅胶片从 L_1 的左侧填塞入至 T_{13} 段脊髓的左腹侧位,假手术组则只暴露脊髓,不进行压迫。分层缝合肌肉、皮肤关闭切口。术后每只大鼠肌肉注射青霉素钾 30 000 U/(kg·bw);硫酸链霉素 15 mg/(kg·bw),2 次/日,连用 3 d。单独分笼饲养,正常供给饮水和饲料,人工帮助排尿、排便,每日三次。

1.4 穴位选取与电针方法

电针治疗组,根据本课题组前期研究,选用以下三组穴位:左右膀胱俞 (BL28);左侧足三里 (ST36)、趾间 (EX-LE10);右侧足三里 (ST36)、趾间 (EX-LE10),每组分别接通电针仪,频率 2 Hz,幅度为 5,每天一次,每次 20 min,连续治疗 7 d。

1.5 运动机能评分

采用 BBB 运动机能评分法^[5],于术前、术后每日,对大鼠左、右后肢分别进行运动机能评分,其中第 1 天在大鼠从麻醉状态完全清醒后开始评分。

1.6 标本收集

术后第 7 天,在麻醉状态下,500 mL 生理盐水进行心脏灌注,在冰块上快速取出脊髓,从压迫正中向头侧取 3 mm 用于 RT-PCR 检测,向尾侧取 3 mm 用于病理学检测。

1.7 病理学检测

脊髓组织在 4% 多聚甲醛中固定 24 h, 常规脱水、组织包埋、切片、HE 染色, 显微镜下观察脊髓损伤情况。

1.8 RT-PCR 检测

取 50 mg 脊髓组织, 用 TRIzol 提取总 RNA, 按表 1 血管生成相关因子基因引物

Tab.1 The primers of the related-angiogenic genes

基因 Gene	引物 (5' - 3') Primer	长度/bp Length	退火温度/°C Tm
Ang-1	GTGGCTGGAAAACTTGAGA TGGATTTCAAGACGGGATGT	200	56
Tie-1	TGCGAGCCCACTCCAAGAGA ACAGGGTAACTCAAAGGCTC	269	59
Ang-2	GACCACTGGGCATCGCTACG CTGGTTGCTGATGCTACTG	169	62
Tie-2	TGCCACCATCACTCAATACC AAACGCCAATAGCACGGTGA	216	58
VEGF	ACTGGACCCTGGCTTTACTGC TTGGTGAGGTTTGATCCGCATG	310	62
Flt-1	AGGAGAGGACCTGAAACTGTCCT TTCCTGGCTCTGCAGGCATAGGT	212	63
Caspase-3	TGCGGCGTTACACGACCTT CAAAGCCAGTGGCACTCATTCTC	200	61
Tsp-1	CCGGTTTGATCAGAGTGGT GGTTTCGGAAGGTGCAAT	200	58
GAPDH	ACCACCATGGAGAAGGCTGG GGTTTCTTACTCCTTGGAGG	707	61

1.9 分析方法

试验得到的数据均采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 记录。应用 SPSS 10.0 软件包, 采用 *t*-检验/LSD 多重比较分析组间差异显著性。P < 0.05 为差异有显著性。

2 结果分析

2.1 电针对椎间盘脱出模型大鼠后肢运动机能的影响

造模后大鼠的运动机能评分迅速降为零, 随着时间的延长, 后肢运动机能逐渐恢复 (见图 1-A, B)。对第 1、4、7 天数据进行统计分析, 由图 1-C 和图 1-D 可知, 在第 4 天和第 7 天, 电针组大鼠的左、右后肢运动机能评分极显著高于模型组 (P < 0.01)。电针组第 7 天大鼠的左、右后肢运动机能评分极显著高于第 4 天 (P < 0.01); 模型组第 7 天大鼠的左后肢运动机能评分与第 4 天相比差异无显著性 (P > 0.05), 第 7 天右后肢运动机能评分显著高于第 4 天 (P < 0.05)。表明电针能显著改善椎间盘脱出模型大鼠的后肢运动机能。

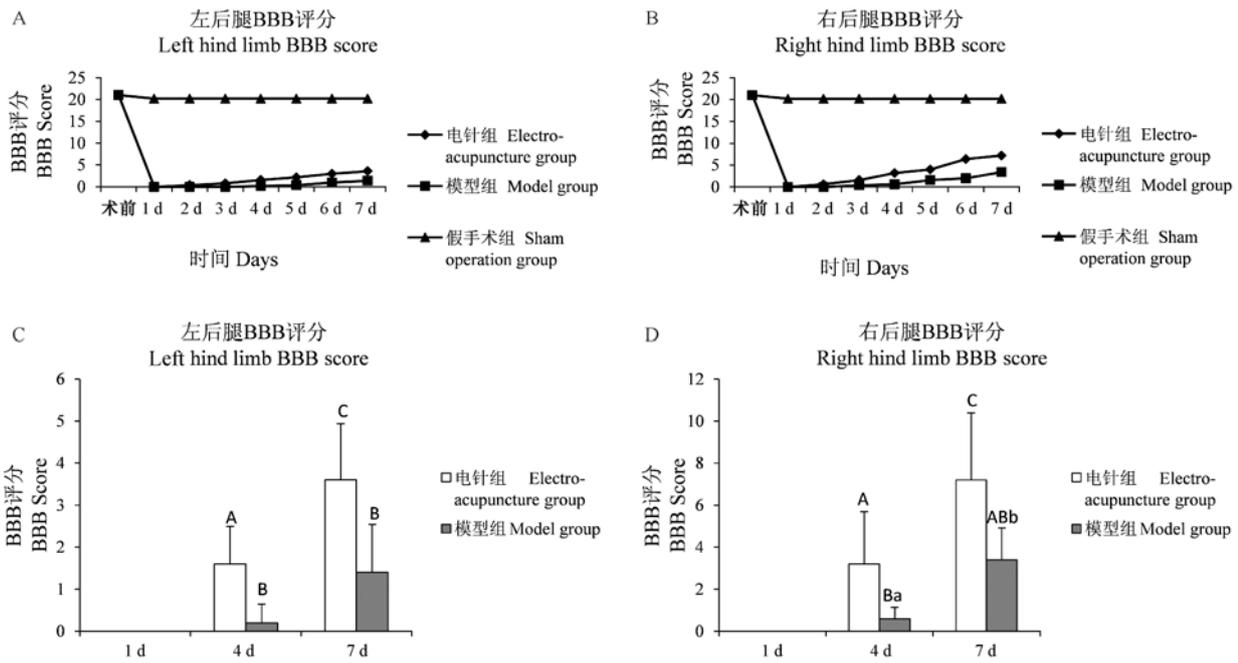
RevertAid™ First Stand cDNA Synthesis Kit 说明书反转录为 cDNA, 根据文献^[6,7]选取与血管生成相关因子引物 (见表 1), 扩增条件: 95°C 预变性 2 min; 94°C 20 s; 57 ~ 63°C 20 s; 72°C 30 s, 循环 40 次。拷贝 CT 值, 采用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析。

2.2 组织病理学变化

电针组神经元多完好, 尼氏小体可见, 灰质与白质分界明显, 轴索与髓鞘多完整排列有序, 偶见空泡化。模型组, 神经元少见且多损伤, 尼氏小体消失, 灰质与白质边界模糊不清, 残存的白质中可见到不完整的轴索和髓鞘, 多空泡化 (见图 2)。

2.3 电针对血管生成相关因子的 mRNA 表达的影响

由图 3 可知, 模型组与假手术组相比 Ang-1、Ang-2、Tie-1、Tie2、caspase-3、Tsp-1 极显著升高 (P < 0.01), VEGF、Flt-1 差异无显著性 (P > 0.05); 模型组与电针组相比 Ang-2、Tie-1、Tie2、caspase-3、Tsp-1 极显著升高 (P < 0.01), Ang-1、VEGF、Flt-1 无显著性变化 (P > 0.05); 电针组与假手术组各指标差异均无显著性 (P > 0.05)。结果显示, 模型组 Ang-2、Tie-1、Tie2、caspase-3、Tsp-1 的 mRNA 的表达量异常高于假手术组和电针组, 电针组与假手术组各指标差异均无显著性, 提示电针能维持血管生成相关因子的 mRNA 表达的相对稳定并使之接近机体正常水平。



注:任两数值比较,小写字母完全不一致表示 $P < 0.05$,大写字母完全不一致表示 $P < 0.01$ 。下同
 Note. Comparison of any two values, completely different small letters denote $P < 0.05$, completely different capital letters denote $P < 0.01$. The same as below.

图 1 电针对椎间盘脱出模型大鼠后肢运动机能的影响

Fig. 1 Effects of electroacupuncture on the hind limb motor function in the rat models of intervertebral disc herniation

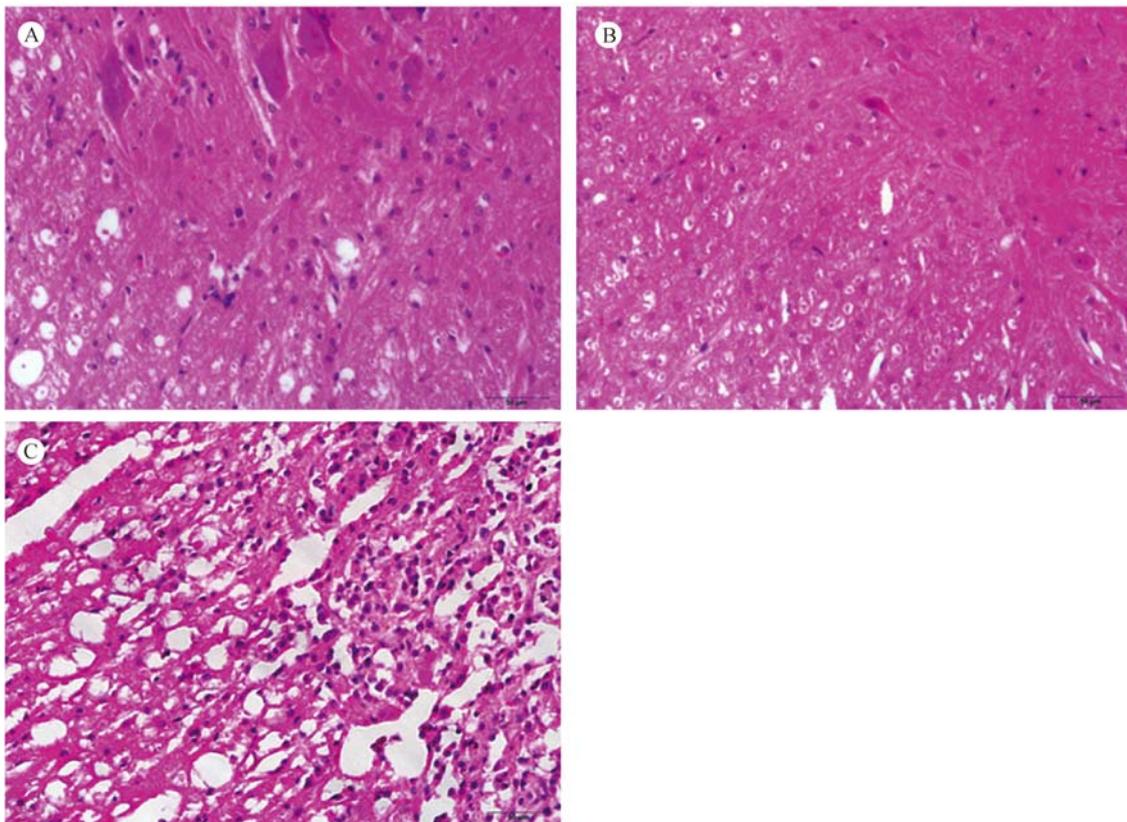


图 2 电针组(A),假手术组(B),模型组(C),脊髓腹角形态学观察(标尺 = 50 μm)

Fig. 2 Pathological changes in the anterior horn of spinal cord in the rats of the electroacupuncture group (A), sham operation group (B), and model group (C). HE staining, bar = 50 μm .

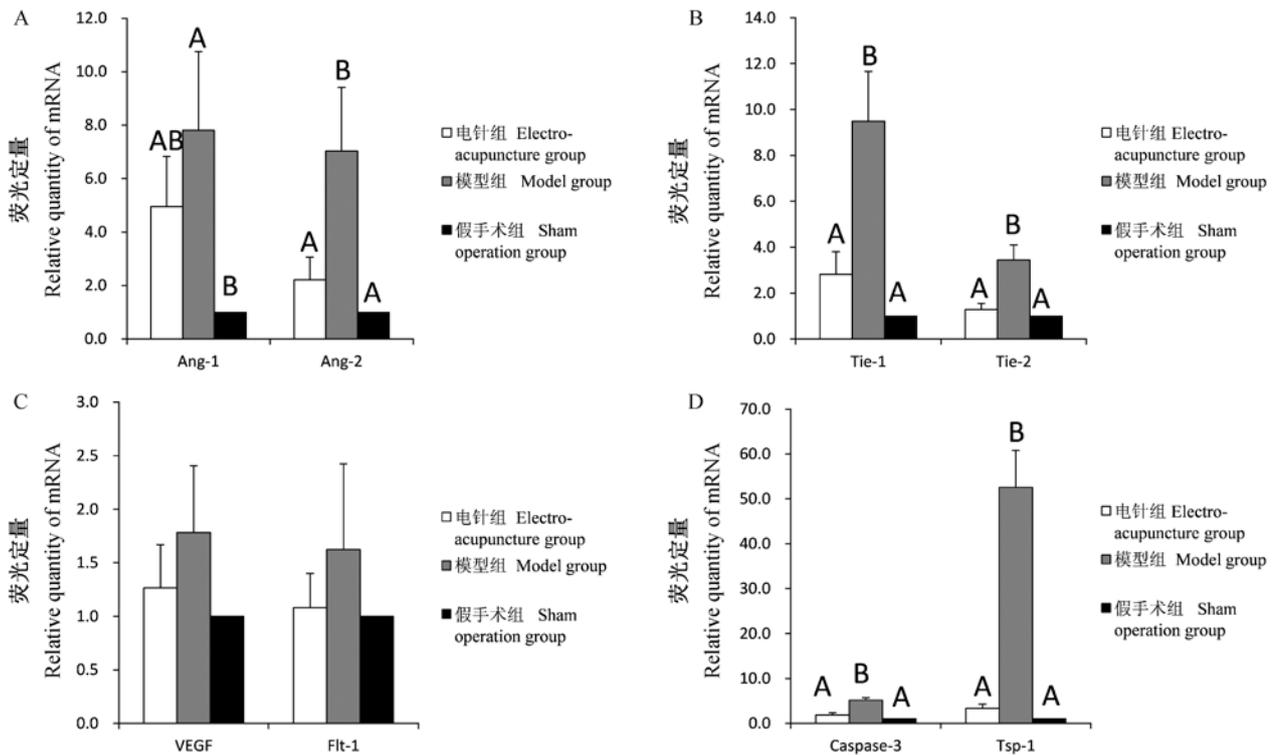


图3 电针对血管生成相关因子 mRNA 表达的影响

Fig. 3 Effects of electroacupuncture on the changes of mRNA expressions of angiogenesis-related factors

3 讨论

脊髓血管能为脊髓组织运送营养物质,同时移除组织代谢产物,对受损脊髓组织的修复意义重大。而血管结构的稳定与血管生成因子和血管生成抑制因子与细胞凋亡因子关系密切^[8]。

脊髓组织受到打击、压迫等损伤后,受损部位出血、水肿、缺氧,局部组织稳态受到破坏,导致大量钙离子内流,自由基大量产生,单胺类物质大量释放,致使血管收缩,脊髓微血管灌注量显著下降,进一步加剧组织缺血缺氧的状态^[9]。在低氧环境下机体过量表达的缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)与 VEGF 基因转录启动子的结合位点结合,促进 VEGF 的表达^[10]。VEGF 能促进血管内皮细胞的增殖和迁移,促进血管的新生。新生血管由于缺少血管周细胞和基质细胞,结构稳定性差,渗透性增强,加剧组织出血与水肿,造成脊髓组织二次损伤^[11]。在本次试验中,模型组 VEGF 和 Flt-1 的表达量有所上调,但与电针组和假手术组相比无统计学意义。

Tie-1、Tie-2 是一类酪氨酸受体,Tie-1 能维持血管内皮细胞结构及功能的完整性,促进新生血管的

成熟,其配体目前仍不十分清楚;Tie-2 的配体为 Ang-1 和 Ang-2^[12]。Ang-1 和 Ang-2 能竞争性与 Tie-2 结合并与 VEGF 协同作用,参与血管新生,并且在维持新生血管的稳定性中发挥重要作用。Ang-1 与 Tie-2 结合时表现为维持血管结构正常;Ang-2 与 Tie-2 结合表现为打破血管的正常结构,当在 VEGF 高度表达的环境下,Ang-2 与 Tie-2 结合有利于内皮细胞迁移,促进血管新生,反之则表现为血管的退变^[13]。本研究结果中,模型组的 Ang-2 与 Tie-2 的 mRNA 表达都显著上调,VEGF 的 mRNA 表达虽有上调,但与电针组和假手术组相比无显著差异,提示模型组存在 VEGF 低表达环境引起血管退变的因素。在 VEGF 低表达环境中 Ang-2 与 Tie-2 的结合表现为血管退变,而在模型组 Ang-2 与 Tie-2 的表达显著高于电针组 ($P < 0.01$),提示电针能够减少 Ang-2 与 Tie-2 的结合,从而有利于维持血管的正常结构。另外,电针组与假手术组的 Ang-1、Ang-2、Tie-1、Tie-2 均无显著差异,提示电针能够调节 Ang-1、Ang-2、Tie-2、VEGF 之间的平衡使之接近正常机体水平,维持受损脊髓的血管生成相关因子的相对稳定。本课题组前期研究表明,电针能显著提高压迫部位脊髓血流灌注量,促进神经机能的恢复^[4]。

本研究观察到电针下调 VEGF、Ang-1、Ang-2、Tie-2 的表达,这可能与电针增加压迫部位脊髓血流灌注量,缓解局部缺氧环境,减轻血管新生造成的二次损伤等相关^[11]。

Tsp-1 作为强效血管生成的负性调节因子之一,能与血管内皮细胞上的 CD36 受体作用,影响血管内皮细胞释放 VEGF,抑制血管内增殖、分化和迁移,从而抑制血管的生成;并能诱导血管内皮的凋亡,破坏血管结构的稳定^[14]。Caspase-3 处于凋亡有序级联反应的下游,是多种凋亡刺激信号传递的汇聚点,它的活化是凋亡进入不可逆阶段标志。TSP-1 能与细胞膜上的 CD47 受体结合,上调 Caspase-3 的表达^[15],诱导细胞凋亡。本研究结果显示模型组 Tsp-1 和 Caspase-3 的表达显著上调,而电针能极显著降低 TSP-1、Caspase-3 的 mRNA 表达,提示电针能够抑制血管生成负性调节因子的表达,从而为血管的生成和稳定提供有利环境。万赛英等^[16]研究也表明电针可以上调 Ang-1 及下调 TSP-1 的表达,促进脑缺血区的血管的重建。余晓慧^[17]等研究表明电针能通过抑制 Caspase-3 在大鼠脊髓损伤神经元中表达,抑制神经细胞凋亡,减轻了脊髓继发性损伤,促进神经功能恢复。

脊髓压迫损伤后血管生成相关因子 mRNA 表达异常,电针能够下调 Ang-2、Tie-2、Tsp-1 和 Caspase-3 的表达,从而使血管生成促进因子和抑制因子趋于正常水平,为受损脊髓组织修复提供有利条件。

参 考 文 献

- [1] 王雪乔,饶宇腾,吴伟澎,等. 犬椎间盘脱出模型的建立及其脊髓微循环与组织学变化观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(6): 22-26.
- [2] 卢知松. 电针对椎间盘脱出大鼠模型脊髓血流量及形态学影响的研究 [D]. 北京:北京农学院,2012.
- [3] Winkler EA, Sengillo JD. Blood-spinal cord barrier pericyte reductions contribute to increased capillary permeability [J]. J Cerebr Blood Flow Metab, 2012, 32(10): 1841-1852.
- [4] 卢知松,陈益山,姜代勋,等. 椎间盘脱出大鼠模型的脊髓血流量变化及电针效应 [J]. 中国实验动物学报,2011, 19(5): 381-386.
- [5] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. J Neurotrauma,1995, 12(1) : 1-21.
- [6] Io H, Hamada C, Ro Y, et al. Morphologic changes of peritoneum and expression of VEGF in encapsulated peritoneal sclerosis rat models [J]. Kidney Int. 2004, 65(5): 1927-1936.
- [7] 闫凤霞,高维娟,钱涛,等. 黄芪注射液对缺氧缺糖/复氧复糖大鼠海马神经元 caspase-3 表达的影响 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(7): 898-903.
- [8] Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [9] 黄辉,余化霖. 继发性脊髓损伤发病机制的研究进展 [J]. 医学综述, 2013, 19(7): 1162-1165.
- [10] Pugh CW, Ratcliffe PJ. Regulation of angiogenesis by hypoxia: role of the HIF system [J]. Nat Med, 2003, 9(6): 677-684.
- [11] Oudega M. Spinal cord injury and repair: role of blood vessel loss and endogenous angiogenesis [J]. Adv Wound Care, 2010, 1: 335-340.
- [12] Hara M, Nakamura M, Shirkawa Y, et al. Delayed cyst formation after radiosurgery for cerebral arteriovenous malformations: two case reports [J]. Minim Invasive Neurosurg,1998, 41(1): 40-45.
- [13] Suri C. Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie-1 and Tie-2 that disrupts in vivo angiogenesis [J]. Science, 2003, 245: 45-50.
- [14] Vailhe, Feige. Thrombospondins as anti-angiogenic therapeutic agents [J]. Curr Pharm Des, 2003. 9(7): 583-588.
- [15] Chung J, Wang XQ, Lindberg FP, et al. Thrombospondin-1 acts via IAP/CD47 to synergize with collagen in alpha2beta1-mediated platelet activation [J]. Blood, 1999, 94(2): 642-648.
- [16] 万赛英,谭峰,吴海科,等. 电针干预高血压大鼠脑缺血 Ang 1、TSP-1 的表达及细胞超微结构的研究 [J]. 中华中医药学刊, 2010, 12(28): 2544-2547.
- [17] 余晓慧. 电针对局灶性脑缺血大鼠 Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. 辽宁中医学院学报, 2005, 7(2): 167.

[收稿日期] 2015-01-08



一种 gRNA 快速合成及检测方法的建立

杜建勇, 邓然, 高虹, 雍伟东*

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

【摘要】 目的 建立一种 gRNA 快速合成及检测的方法。方法 设计引物并利用 PCR 技术迅速扩增 gRNA 的 DNA 模板片段, 然后通过体外转录纯化得到 gRNA; 最后通过体外反应迅速对 gRNA 和 Cas9 酶切效率及特异性进行检测。结果 体外合成的 gRNA 特异性强, 活性高, 在靶点上成功切开 DNA 双链。结论 成功建立 gRNA 快速合成及检测的方法, 为后续转染或显微注射筛选有活性 gRNA 节约了时间。

【关键词】 CRISPR/Cas9; PCR 扩增; 体外转录; 体外检测

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0267-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.009

Establishment of a rapid method for synthesis and detection of gRNA

DU Jian-yong, DENG Ran, GAO Hong, YONG Wei-dong

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College (PUMC); 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 The purpose of this study was to establish a rapid method for synthesis and detection of guide RNA (gRNA) which is an essential component in CRISPR/Cas9 knockout technology. **Methods** First, the *Nkp46* gRNA core fragment was synthesized as amplification template. Second, the forward and reversed primers of the matched gRNA were designed using the *Nkp46* gene as reference sequence. Third, the DNA fragment of *Nkp46* gRNA was amplified by PCR technology using the synthesized gRNA core fragment as template. The gRNA was reversely transcribed *in vitro* using amplified DNA fragment as template. The efficiency and specificity of gRNA and its interaction with Cas9 were detected *in vitro*. **Results** The specificity and activity of *Nkp46* gRNA were high. The obtained gRNA interacted with Cas9 enzyme and successfully cut the target double-stranded DNA at the designed site. **Conclusions** The method for synthesis and detection of gRNA established in this study is faster than the original method, and the created gRNA is fully functional.

【Key words】 CRISPR/Cas9; PCR amplification; *In vitro* transcription; *In vitro* detection

基因定点敲除技术通过对染色体上基因特异位点进行定点突变, 使其功能丧失, 进而达到研究其功能的目的。一些利用基因敲除技术创建的动物疾病模型对医学研究的发展做出了重要贡献。传统基因敲除技术于上世纪 80 年代末由 Smithies 等^[1]创立, 通过同源重组手段将构建的外源 DNA 片段插入并

替换相应染色体上特定的区段, 达到基因敲除的目的。这一技术的应用使人类能够有目的地研究基因功能和与之相关的疾病之间的直接关系。然而由于同源重组技术需要载体构建、ES 细胞打靶、筛选、显微注射、小鼠鉴定等一系列较为复杂的操作步骤, 并且成本较高、周期较长, 大大限制了这一技术的应

【基金项目】 国家高技术研究发展(863)计划(2012AA022403); 协和青年创新基金(33320140150); 国家重点基础研究发展(973)计划(2013CB945001)。

【作者简介】 杜建勇, 男, 研究方向: 基因与发育生物学。E-mail: 18813020162@163.com

【通讯作者】 雍伟东, 男, 研究方向: 生殖与发育生物学。Email: wyong@cnilas.org; 高虹, 女, 研究方向: 药理毒理学。Email: gaohongdws@aliyun.com

用。针对同源重组的缺点,科学家一直在探索用其他更简便的技术来实现基因敲除。先后发明了 ENU 随机突变、基因捕获、ES 细胞基因敲除细胞库等方法,但由于技术手段和操作成本的限制,这些技术都不能完全替代传统的同源重组技术。2009 年以后出现了一系列新的基因编辑技术,包括 ZFN、TALEN 和 CRISPR/Cas9,开创了基因敲除(敲入)新的时代。这些新基因编辑技术作用原理相似,即通过核酸酶在目的基因的 DNA 双链上制造切口,然后利用生物体自身的修复机制以同源重组或者非同源末端连接的方式实现修复,进而达到基因失活的目的。作为一种最新的基因编辑技术,CRISPR/Cas9 技术通过 gRNA 识别特异的靶序列,同时介导 Cas9 核酸酶在 DNA 的特异位点上制造切口^[2],然后利用生物体自身的修复机制进行 DNA 修复。这一过程中可能造成碱基改变、增加、缺失等突变现象,进而实现对目的基因的敲除与修饰^[3]。

CRISPR/Cas9 系统的高效基因组编辑功能已被成功应用于多种生物。包括人类细胞^[4]、斑马鱼^[5]、小鼠^[6,7]、大鼠^[8]、植物^[9,10]及细菌^[11]。众所周知,生物体的一个性状往往由多个基因共同决定,传统的基因敲除费时费力却只能一次敲除一个相关基因,而 CRISPR/Cas9 系统其中一个最重要的特点便是可在多个不同 gRNA 的引导下由 Cas9 核酸酶一次靶向敲除多个基因组位点^[12,13]。与其他基因编辑技术相比,CRISPR/Cas9 系统具有其独特的优势:首先,其 RNA 识别 DNA 机制即核酸之间的相互识别,避免了 DNA 甲基化造成的影响。其次,与 ZFN 和 TALEN 相比,具有相同或更高的基因编辑效率,尤其在点突变方面优于 ZFN 和 TALEN^[14,15]。第三,设计简单快速,无需重复构建核酸内切酶表达载体,适用于任何分子生物学实验室。

当前基因编辑技术迅速发展,CRISPR/Cas9 技术以其优势必将迅速推动基因组功能的研究。快速获取目标 gRNA 并检测验证其活性将会推动这项技术的发展。本文旨在建立一种体外 gRNA 快速合成及检测的方法,这一方法的建立将减少利用该系统实现基因编辑的时间,快速实现目标基因的敲除。

1 材料和方法

1.1 材料

8 周龄 SPF 级 C57 小鼠,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供【SCXK(京)2014-0004】,PCR

仪(Bio-Rad T100™ Thermal Cycler)、Tanon 全自动数码凝胶成像分析系统(上海天能公司)、NanoDrop 2000 超微量分光光度计(Thermo)、T7 转录试剂盒(Ambion_mMESSAGE_mMACHINE_T7)、RNA 纯化试剂盒(MEGAclear™ Kit, Ambion)、PCR 产物纯化试剂盒(QIAquick PCR Purification Kit)、无核酸酶水、dNTP mixture、高保真酶 Taq 酶(Sigma)、Cas9 核酸酶(北京唯尚立德生物科技有限公司)

1.2 gRNA 靶点选择及其寡核苷酸链合成

利用 <http://crispr.mit.edu/> 设计能够结合 *NKp46* 外显子 Exon3 上的 gRNA (20nt)。引物及 gRNA 通用模板由 Invitrogen 公司合成。

1.3 gRNA 转录模板的 PCR 扩增

利用 *NKp46* gRNA 特异的上游引物 m*NKp46*_g1F 和 gRNA 通用下游引物 gRNA-R,以人工合成的 gRNA 通用模板 DNA 片段为模板,通过 PCR 扩增得到 *NKp46* 基因特异的 gRNA 转录模板。具体反应条件如下:(94℃ 30s,60℃ 10s,72℃ 30 s) × 35,72℃ 10 min,4℃ 保存。取 5 μL 电泳检测 PCR 产物,确定得到目标 DNA 片段,大小为 123 bp。

1.4 gRNA 模板的体外转录

在得到 gRNA 转录模板后利用纯化试剂盒进行 gRNA 转录模板的纯化。将纯化后的产物用 T7 RNAkit 转录试剂盒(Ambion_mMESSAGE_mMACHINE_T7)进行 *NKp46* gRNA 体外转录并利用 RNA 纯化试剂盒(MEGAclear™ kit, Ambion)将转录产物进行纯化。合成的 gRNA 通过 NanoDrop 2000 超微量分光光度计检测检测浓度及纯度。分装并 -80℃ 冻存。

1.5 gRNA 体外活性及特异性检测

将得到的 gRNA 与 Cas9 核酸酶以及目的 DNA 混合孵育,电泳后观察条带大小并观察片段灰度来确定切割效率。反应体系:dsDNA(4μL),gRNA(体外转录)(1μL),Cas9 核酸酶(1μL),10 × buffer(2μL),ddH₂O(12μL),反应总体积(20μL)按照上述反应体系,混合好反应溶液,37℃ 30 min,65℃ 5 min。

2 结果

2.1 小鼠 *NKp46* 基因 gRNA 靶点选择

NKp46 基因存在于啮齿类动物(大鼠和小鼠)和灵长类动物,如黑猩猩和短尾猿中。同时 *NKp46* 是唯一能被小鼠细胞上表达配体所识别的人类 NK

细胞激活受体。为了研究 *NKP46* 基因在病毒感染过程中的作用,我们希望通过 Cas9 技术创建 *NKP46* 敲除小鼠。利用网站 <http://crispr.mit.edu/>, 设计得到 gRNA, 见表 1。

表 1 gRNA 靶点序列

Tab. 1 The CRISPR target sequences

Number 编号	CRISPR target sequences (5' - 3') gRNA 靶点序列 (5' - 3')
gRNA-1	GGTGAACATCTGGTGTCAAGGGG
gRNA-2	CTCGGTGAACATCTGGTGTCAAG
gRNA-3	CTCTCCCGAAACCCATCATCTGG
gRNA-4	TCTCCCGAAACCCATCATCTGGG
gRNA-5	GAGTGTGGCAGCATAACAGTGG
gRNA-6	AAGTAGGGTCGGTAGGTGCAAGG
gRNA-7	GACCTTTCAACCAATGAATCAGG
gRNA-8	ACCCAGAATCTCATTCGAATTGG
gRNA-9	CCAGAGGATCAACACTGAAAAGG
gRNA-10	CTGAAGACTGGCTCAGCAAGAGG
gRNA-11	CAAGAGGAAAAGATCATGAAGAGG
gRNA-12	GGCCAACAGATTAACAAATTTGG
gRNA-13	ATTGGGAATGCAGGAGAAGATGG
gRNA-14	ATGGAECTGAAGGCAACTCTCTG

本文以小鼠 *NKP46* 基因为例设计 gRNA。共选择了 2 条 gRNA 序列:

gRNA1 GGTGAACATCTGGTGTCAAGG, gRNA2 CTCGGTGAACATCTGGTGTCAAGG 这两个 gRNA 位于

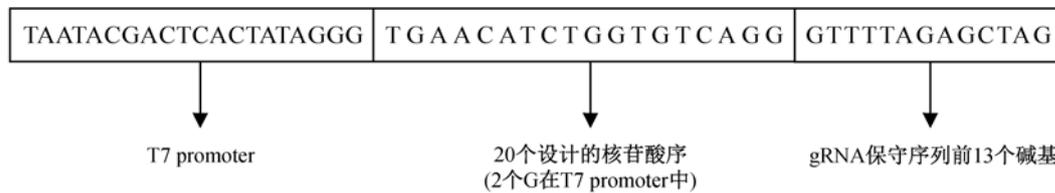
Nkp49 基因组上外显子 Exon3 处。

2.2 *NKp46*gRNA 体外扩增模板的设计

gRNA 转录模板的结构:T7 启动子、前导序列 (20nt)、保守序列。体外扩增模板序列是固定的即 gRNA 转录模板的保守序列 GTTTTAGAGCTAGA AATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAAC TTGAAAAAGTGGCACCAGTCCGGTCTTTTTTT, 该片段可以形成 gRNA 的发卡结构,是所有 gRNA 都包括的一部分。

2.3 上游引物 gRNA-F 的设计

将得到的 20nt 的序列前端加上一段 T7 启动子序列 TAATACGACTCACTATAGGG 并在末尾加上与 gRNA 固有序列前端相同的几个碱基 GTTTTAGAGCTAG, 最终设计得到一个 53nt 的片段。按照该方法设计并合成了靶向小鼠 *NKP46* 基因的 *mNKp46_g1F*。*mNKp46_g1F* 将作为转录模板合成过程中的上游引物,参与 PCR 反应。由于体外转录试剂盒在转录完成后会在 5' 端多出 3 个 G 所以在设计选择靶向 gRNA 时可以选择起始位置带 G 的序列,这样可以最大限度的减少体外转录的影响,它的构成 (图 1) *mNKp46_g1F* TAATACGACTCACTATAGGGTGAACATCTGGTGTCAAGGTTT TAGAGCTAG



注:引物由 3 部分组成: T7 promoter、设计的 gRNA 序列、gRNA 保守序列前 13 个碱基。

图 1 上游引物结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the forward primer structure. The designed primer consists of three parts:

T7 promoter, the target sequence (20nt), and 13 bp gRNA conserved sequence

2.4 gRNA 合成的通用下游引物

gRNA-R 的设计 AAAAAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTTC, 该序列与 gRNA 模板 3' 端互补。

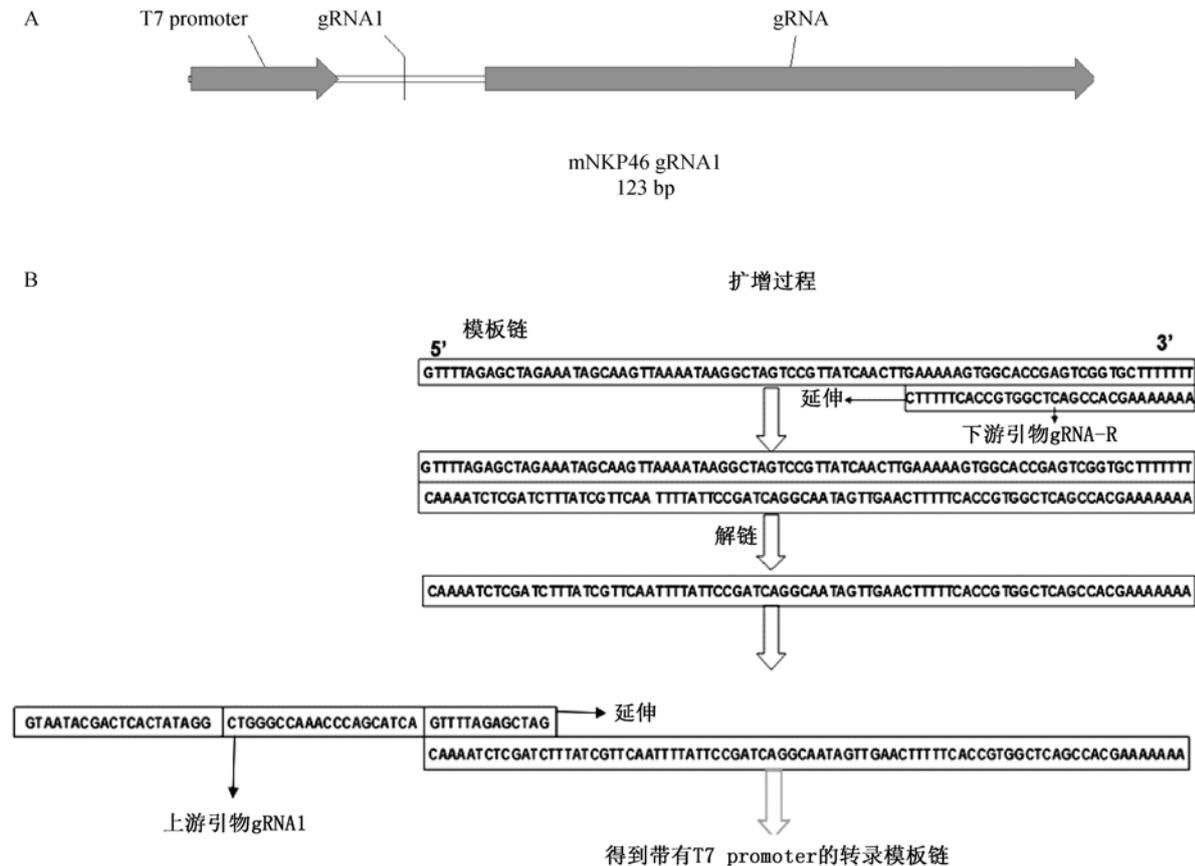
2.5 靶向小鼠 *NKP46* 基因的 gRNA 的转录模板在体外完成扩增

该过程十分简单只需一步 PCR 反应就可以迅速得到足够浓度的带有 T7 promoter 的 gRNA 的转录模板,参与反应的上游引物已经按照上述方法设计合成,其中下游引物和模板由于是通用的不具有特异性,不需要每次都合成。当研究者更换目标基因,只需设计合成一条新的上游引物即可,下游引物及模板不需要重复合成,十分的简单经济。扩增过

程 (见图 2)。然后体外转录得到足够浓度 gRNA 的靶向 *NKP46* 基因的 gRNA。

2.6 体外利用 Cas9 核酸酶检测验证该方法确实可以得到高特异性及活性的 gRNA

设计体外检测引物 *mNk46_gSF* TCCAAACACGTGCATGTTACACATG, *mNk46_gSR* CCCAGCTTTGACTCTCTTGTCCATC 以小鼠 DNA 作为模板,利用该引物可以扩增 *NKP46* 基因,作为体外酶切检测的片段。该片段中包含 gRNA 的靶点,利用这种体外检测方法,可以迅速对设计合成的 gRNA 的特异性及活性进行检测,通过电泳可以观察剪切条带的大小,以验证靶点位置是否正确,进一步可以通过 T-A 克



注:A. gRNA 转录模板由 3 部分组成: T7 promoter、gRNA (20nt) 设计序列、gRNA 保守序列。B. gRNA DAN 模板合成过程: 首先是下游引物结合, 一个循环后, 上游引物才发挥作用。35 个循环后得到足够浓度的带有 T7 promoter 的 gRNA 的 DNA 转录模板。

图 2 gRNA 的转录模板结构及转录示意图

Note. A. The structure of gRNA consists of three parts, T7 promoter, the designed sequence of gRNA(20nt), and the conserved sequence of gRNA. B. A schematic illustration of the gRNA DNA template amplification.

Fig. 2 A schematic diagram of the gRNA template structure and transcription

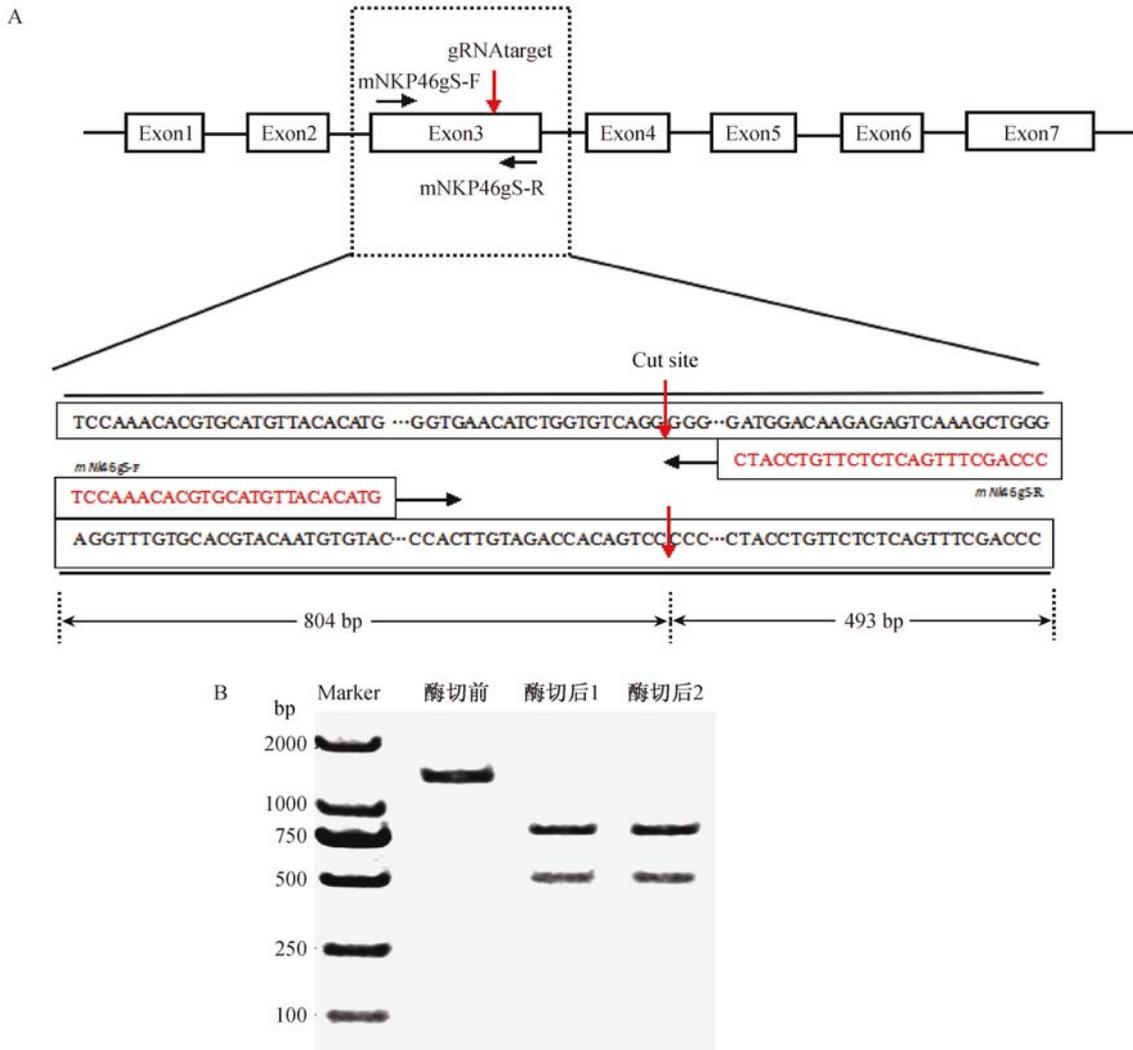
隆检测切开位置。本文设计的靶向 *NKP46* 的 gRNA 在靶点位置切开, 使得全长 1297 bp 检测条带, 被切成两条带, 大小分别为 804 bp 和 493 bp (图 3A)。通过对灰度的计算 (图 3B), 计算得到转录后原浓度的 gRNA 以及稀释一倍的 gRNA, 剪切效率都为 100%, 由此可以证明该方法设计合成 gRNA 特异性及活性较高, 同时体外检测快速检测的方法大大提高了 gRNA 检测的效率。

3 讨论

常规获取 gRNA 要构建表达载体, 需要把 gRNA 的转录模板连接到载体上, 经过涂板挑选单克隆再摇菌后提取质粒, 最后还要酶切使质粒线性化才能得到 gRNA 的体外转录模板, 得到 gRNA 最少也需要 3d 的时间。而本文建立的这种方法将极大地节约转录 gRNA 的时间, 一步 PCR 反应就可以得到足

够浓度的转录模板, 仅需半天时间就可以得到需要的 gRNA。本文建立的这种活性及特异性检测方法, 可以在体外迅速验证 gRNA 的其活性及特异性。将 Cas9 核酸酶、gRNA、PCR 扩增的靶基因片段混合孵育, 通过琼脂糖凝胶电泳可以十分清楚的观察到剪切位置并通过对电泳照片的灰度比较可以进一步计算剪切效率。

建立的这种快速利用 CRISPR / Cas 9 技术实现基因编辑的方法, 最具特色的是 gRNA 的获得及体外酶切检测。与常规方法相比我们不构建 gRNA 表达载体而是直接利用化学合成方法。在体外合成一段单链 DNA, 通过设计引物, 利用 PCR 技术迅速扩增该片段, 并转录纯化得到有功能的 gRNA。利用这种 gRNA 快速合成及检测的方法, 可以使每次基因编辑仅需合成一段与目的基因互补的一小段 DNA 链即一个上游引物即可, 模板和下游引物都是



注:A. 为小鼠 *NKP46* 基因有 7 个外显子,靶点设计在 Exon3 上。B. M: marker DL2000 (Takara),酶切前表示小鼠 *NKP46* 基因片段大小,酶切后 1 为 gRNA 原浓度的酶切结果,酶切后 2 为 1/2 gRNA 浓度的酶切图。gRNA 原浓度 119.3 ng/ μ L。

图 3 体外检测片段扩增及酶切位点示意图

Note. A. There are seven exons in the mouse *NKP46* gene. The target site is designed on Exon3. B. M: Marker DL2000 (Takara). Pre-digestion indicates the fragment size of mouse *NKP46* gene. After-digestion 1 indicates that the result of an original concentration of digesting for gRNA. After-digested 2 indicates that the result about half of concentration of the gRNA digested diagram. The original concentration of gRNA is 119.3 ng/ μ L.

Fig. 3 A schematic diagram of the amplification and detection of fragments cleavage sites in vitro

通用的方便而经济。本文建立的体外酶切检测方法可以在得到 gRNA 后迅速对其活性及特异性检测,为后续转染或显微注射筛选有效的 gRNA 节省了宝贵的时间。

参 考 文 献

[1] Smithies O, Gregg R G, Boggs SS, et al. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination [J]. Nature. 1985, 317 (6034): 230 - 234.
 [2] Weterings E, Chen DJ. The endless tale of non-homologous end-joining [J]. Cell Res. 2008, 18(1): 114 - 124.

[3] Mahfouz MM, Li L, Shamimuzzaman M, et al. De novo-engineered transcription activator-like effector (TALE) hybrid nuclease with novel DNA binding specificity creates double-strand breaks [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011, 108(6): 2623 - 2628.
 [4] Mali P, Yang L, Esvelt KM, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. Science. 2013, 339(6121): 823 - 826.
 [5] Chang N, Sun C, Gao L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos [J]. Cell Res. 2013, 23(4): 465 - 472.

(下转第 290 页)



心理应激致孕鼠乳腺发育不良及雌/孕激素和受体水平异常

王瑞琼¹, 吴国泰², 刘峰林², 魏彦明^{1*}, 吴玉泓²

(1. 甘肃农业大学, 兰州 730070; 2. 甘肃中医学院, 甘肃省中药药理与毒理学重点实验室, 兰州 730000)

【摘要】 目的 研究心理应激对孕鼠乳腺发育的影响, 评价相关激素及其受体的表达水平。方法 妊娠期 Wistar 大鼠随机分为对照组和实验组, 实验组大鼠 15 d 内随机施加噪音、束缚、昼夜颠倒、冰水游泳和夹尾致痛 5 种不可预见性应激刺激。观察大鼠乳房外观变化, 测量乳头直径和高度并计算乳房系数, 光密度法测定乳腺组织 DNA 和 RNA 水平, 放射免疫法测定血浆和乳腺组织雌激素 (E₂)、孕酮 (P)、生长激素 (GH) 及催乳素 (PRL) 水平, 放射配基结合分析法测定雌二醇、孕酮受体的最大结合容量 (Bmax) 和解离常数 (Kd), 乳房组织 H-E 染色, 光镜下观察组织形态变化。结果 与对照组比较, 实验组大鼠乳头直径和高度减小、乳房重量减轻、乳房系数减小 ($P < 0.05, P < 0.01$), 乳房组织 DNA、RNA 及 RNA/DNA 均明显减小 ($P < 0.05, P < 0.01$), 血浆 E₂、P 和 GH 水平明显下降 ($P < 0.05, P < 0.01$), 组织匀浆 E₂ 和 GH 水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.01$), E₂ 受体和 P 受体 Bmax 明显降低、Kd 均明显升高 ($P < 0.05, P < 0.01$); 乳腺小叶、小叶腺泡数目减少、腺泡直径明显降低 ($P < 0.05$)。结论 心理应激能导致孕鼠乳腺发育不良, 引起雌、孕激素水平及其受体表达异常。

【关键词】 心理应激; Wistar 大鼠; 乳腺发育; 雌二醇; 孕酮

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)03-0272-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.010

Mammary dysplasia and abnormal estrogen/progesterone or their receptor expression induced by psychological stress in pregnant rats

WANG Rui-qiong¹, WU Guo-tai², LIU Feng-lin², WEI Yan-ming^{1*}, WU Yu-hong²

(1. School of Animal Medicine, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; 2. Key Laboratory of TCM Pharmacology and Toxicology of Gansu Province, Gansu University of Traditional Chinese Medicine, Lanzhou 730000)

【Abstract】 **Objective** To study the effects of psychological stress on breast development and abnormal levels of related hormones or their receptors in pregnant rats. **Methods** Pregnant Wistar rats were randomly divided into control group and experimental group. The experimental group rats were given unpredictable stress stimuli for 15 days, including noise, restraint, reversal of day and night, swimming in cold water and tail pinch-induced pain. Gross changes of the breast were observed, the diameter and height of breast nipple was measured, and breast coefficient was calculated. DNA and RNA levels in the breast tissues were determined by optical density measurement. The estrogen (E₂), progesterone (P), growth hormone (GH) and prolactin (PRL) levels in plasma and breast tissues were determined by radioimmunoassay. Bmax and Kd of estradiol and progesterone receptors were measured by radolig and binding assay. Morphological changes of the breast tissues were examined by light microscopy using HE staining. **Results** Compared with the control group, the nipple diameter and height, breast weight and breast coefficient were significantly decreased in the experimental group ($P < 0.05, P < 0.01$), the levels of DNA, RNA and RNA/DNA

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (No. 31272600)。

[作者简介] 王瑞琼 (1981-), 女, 在读博士研究生。E-mail: wrqnn_418@163.com

[通讯作者] 魏彦明 (1963-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事临床兽医学和中药药理研究。E-mail: wym_1963@sina.com

ratio in the breast tissue were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the levels of plasma E₂, P and GH were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the levels of E₂ and GH in the breast tissue homogenate were decreased also ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the Bmax of E₂ receptor and P receptor were decreased, but their Kds increased significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the number of lobules and diameter of acini were significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Psychological stress can lead to breast dysplasia and abnormal levels of estrogen and progesterone and their receptors in pregnant rats.

[Key words] Psychological stress; Wistar rat; Mammary development; Estradiol; Progesterone

随着集约化养殖业的发展,孕畜的生存生活环境完全处于非自然状态,孕期乳腺发育受环境因素的影响越来越明显^[1-2],许多外界不良因素的刺激可引起孕畜的心理应激反应,如受到惊吓和强烈刺激等,另外棚舍低矮、阳光不足、通风不良、活动受限、冷热刺激,强行驱赶、噪声、慢性疼痛等环境应激都可能引起孕畜的乳腺发育障碍。初产母畜因乳腺发育不良而致无乳症,给畜牧业的生产和效益造成严重的经济损失^[3]。乳腺发育是动物泌乳性能的关键因素,而乳腺发育受“下丘脑-垂体-卵巢”神经内分泌轴的调控^[4],雌激素(E₂)、孕激素(P)、生长激素(GH)、催乳素(PRL)及其受体水平能真实反映乳腺发育的程度和状态^[5,6],现代医学研究发现心理应激与乳腺增生或乳腺癌的发生不一定存在直接关系,但是心理应激能导致女性内分泌紊乱,引起雌激素、孕激素水平变化,导致围产期母体乳腺异常^[7-9]。本研究基于环境异变引发心理应激,导致神经内分泌系统紊乱,进而阻碍乳腺发育的假说,研究怀孕大鼠乳腺发育与雌激素、孕激素及其受体水平变化的关系,探索规避伤害性刺激以期保护乳腺正常发育的科学方法,为相关研究和畜牧业生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 性成熟大鼠,由甘肃中医学院实验动物中心提供【SCXK(甘)2011-0001】,其中雌鼠 30 只,体重 200~250 g,80 日龄;雄鼠 15 只,体重 250~300g,90 日龄。在本中心无特定病原体(specific pathogen-free, SPF)实验室饲养【SYXK(甘)2011-0001】,SPF 级大鼠生长发育饲料由北京科奥协力饲料有限公司提供;室温(20±2)℃,相对湿度(50±5)%,12 h 明暗交替,适应 3d 后开始实验,实验过程中没有动物死亡及流产,本实验方案获得甘肃中医学院实验动物伦理委员会批准(批准号:20131015-02)。

1.1.2 药品与试剂

¹²⁵I-E₂、¹²⁵I-PROG、¹²⁵I-PRL 及 ¹²⁵I-GH 放射免疫试

剂盒(上海凯博生化试剂有限公司,中国),枸橼酸钠抗凝剂(四川绵竹鸿基制药有限责任公司,中国),³H-雌二醇(³H-E₂,放射比活度 2.25TBq/mmol,New England Nuclear 公司),³H-孕酮(³H-P,放射比活度 150.1 GBq/mmol,New England Nuclear 公司),考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒(南京建成生物工程研究所,中国)。其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器

培养倒立头显微镜(Nikon,日本);TGL20M 医用离心机(湖南凯达科学仪器有限公司,中国);高速冷冻离心机(Sigma,美国);HH-4 恒温水浴锅(金坛市丰仪器制造有限公司,中国);601-01 游标卡尺(哈尔滨量具刀具集团有限责任公司,中国);DT510H 超声波清洗器(Bandelin,德国);DW-86L338 医用低温保存箱(青岛海尔特种电器有限公司,中国);PAT-8 场景恐惧系统(成都泰盟科技有限公司,中国);JA3003B 电子天平(上海越平科学仪器有限公司,中国);SN-659 型智能放免 γ 测量仪(上海应用物理所日环光电仪器有限公司,中国);高速组织匀浆机(IKA,德国);微量分光光度计(Thermo,美国);7220 紫外-可见光分光光度计(上海第三分析仪器厂,中国);LS 6500 液体闪烁计数器(Beckman,美国)。

1.2 方法

1.2.1 动物筛选

实验前,30 只雌鼠行阴道脱落细胞涂片,HE 染色,连续观察 2 个动情周期,选用有 4 d 左右性周期的大鼠,将处于动情期的雌鼠与雄鼠(2:1)于每日 20:00-22:00 随机合笼交配,次日晨 8:00 观察阴栓情况,将发现阴栓且阴道涂片存在精子者确定为孕鼠,并定为妊娠的第 1 天。

1.2.2 分组与造模

将 20 只妊娠大鼠,随机分为对照组和实验组,每组 10 只。实验前观察大鼠近尾端第 2,3 对乳头的的外观并用游标卡尺测量乳头直径及高度。对照组大鼠每笼 5 只常规饲养(不给任何刺激),实验组大鼠单笼孤养并施加 5 种不可预见性应激刺激。5 种刺激 15 d 内随机安排,每天 1 种,每种刺激出现 3 次且不连续出现。

应激刺激操作方法:①噪音刺激:将大鼠置于 PAT-8 场景恐惧系统中,选择强度为 95 dB 的声音刺激 5 min;②束缚应激:将大鼠置于固定器中(直径 5.5 cm,管壁有直径为 0.4 cm 的小孔)6 h,不挤压大鼠尾巴;③昼夜颠倒:早 7:00 时将大鼠放入密闭暗室中,关灯使动物处于黑暗状态,晚 7:00 时打开暗室照明灯(功率 100 W 白炽灯),使大鼠处于光照状态,次日早 7:00 时取出;④冰水游泳:将大鼠置于盛有 4℃ 水池中(水深 30 cm)游泳 10 min;⑤夹尾致痛:固定器固定大鼠,露出尾部,用止血钳夹住距尾尖 1/3 处(使其发出叫声但不破皮),持续 30 min。

1.2.3 检测指标与方法

(1) 乳头直径、高度、乳房系数

造模前后观察乳头外观并用游标卡尺测量近尾端第 2、3 对乳头的直径及高度。造模第 16 天,各组大鼠腹腔注射 10% 的水合氯醛(0.3 mL/100 g)麻醉,心脏取血 2.0 mL 后,剥离近尾端第 2、3 对乳头皮肤,置于冰盘上,用 9 mm 打孔器摘取第 2、3 对乳房组织,电子天平精密称重,计算乳房系数。乳房系数 = 乳房重量(g)/体重(100 g)。

(2) 乳房 DNA、RNA 含量检测

取第 2 对右侧乳房组织, -70℃ 液氮冻存,待测 DNA 和 RNA。按文献^[10]方法提取 DNA 和 RNA。7220 紫外-可见分光光度计在 260 nm 处测量吸收度(A),稀释前 DNA、RNA 的浓度 = A 值 × 稀释倍数 × 50 μL/mL(1 个 A 值相当于 50 μL/mL 的 DNA 或 RNA),换算为 100 g 组织所含 DNA 或 RNA 的量。

(3) 血浆 E₂、P、GH 和 PRL 含量检测

按照(1)中所取 2.0 mL 血液加入 0.5 mL 4.0% 枸橼酸钠充分混匀,静置 15 min,4℃ 低温离心(4000 r/min, 15 min),取血浆 -20℃ 保存,按试剂盒说明书检测血浆 E₂、P、GH、PRL 水平。

(4) 乳房组织匀浆 E₂、P、GH 和 PRL 含量检测

取已冷冻的大鼠第 3 对右侧乳腺组织,冷生理盐水漂洗除去血液,滤纸吸干水分,精密称重,组织匀浆机中加入冷生理盐水制成 10 mg/mL 的组织匀浆,4℃, 3000 r/min 离心 15 min,取上清液,按试剂盒说明书检测乳腺组织 E₂、P、GH、PRL 水平。

(5) E₂ 和 P 受体水平

取已冷冻的大鼠第 3 对左侧乳腺组织,采用放射

配基结合分析法 R(LBA)测定,参照文献^[11,12],用 Lowry 法测定样本蛋白质浓度,胞质雌二醇和孕酮受体用加膜活性碳吸附法(DCC)测定,测定数据按 Scatchard 法作图,求得雌二醇、孕酮受体的解离常数(Kd)和最大结合容量 Bmax,受体数目以 fmol/mg 胞质蛋白质表示。

(6) 乳腺组织形态检查

取大鼠近尾端第 2 对左侧乳房组织,迅速用 10% 的中性甲醛磷酸缓冲液固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察组织形态变化,计算每张切片中乳腺小叶的数目、乳腺小叶平均腺泡数及每张切片中 3 个最大腺泡腔的直径。

1.2.4 统计方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 统计软件处理,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳房性状变化

对照组大鼠腹部近尾端第 2、3 对乳头体积较大,隆起较高,较坚实;实验组大鼠乳头体积较小,紧贴于皮肤,隆起较低,较松软。与对照组比较,实验组大鼠乳头直径和高度减小,乳房重量减轻,乳房系数减小,差异均有显著性(*P* < 0.05, *P* < 0.01),见表 1、2。

2.2 乳房 DNA、RNA 含量及 RNA/DNA 比值

实验组大鼠乳房组织 DNA、RNA 以及 RNA/DNA 均明显减小,与对照组比较,差异均有显著性(*P* < 0.05, *P* < 0.01),见表 3。

2.3 血浆 E₂、P、GH 和 PRL 含量

实验组大鼠血浆 E₂、P、GH 和 PRL 的含量均显著降低,与对照组比较,差异均有显著性(*P* < 0.05),见表 4。

2.4 乳房组织匀浆 E₂、P、GH 和 PRL 含量

与对照组比较,实验组大鼠乳房组织匀浆 E₂ 和 GH 的水平均显著降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01),实验组大鼠血浆 P 和 PRL 水平具呈现下降趋势,组间差异无显著性,见表 5。

2.5 E₂ 受体和 P 受体水平

与对照组比较,实验组大鼠乳房组织 E₂ 受体和 P 受体的 Bmax 均明显降低(*P* < 0.05, *P* < 0.01),E₂ 受体和 P 受体的 Kd 均明显增高(*P* < 0.01),见表 6。

表 1 孕鼠乳头高度及直径比较($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{mm}$)

Tab.1 Comparison of the diameter and height of rat breast nipples in different groups

组别 Groups	乳头高度 Nipple height		乳头直径 Nipple diameter	
	第 2 对 Second pair	第 3 对 Third pair	第 2 对 Second pair	第 3 对 Third pair
对照组 Control group	2.02 ± 0.16	1.98 ± 0.12	0.96 ± 0.09	0.91 ± 0.11
实验组 Test group	1.85 ± 0.11 *	1.62 ± 0.14 **	0.75 ± 0.12 **	0.79 ± 0.08 *

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 孕鼠乳房重量及乳房系数比较($\bar{x} \pm s, n = 10, \text{g}$)

Tab.2 Comparison of the rat breast weight and index in different group

组别 Groups	体重 Body weight	乳房重量 Breast weight	乳房系数 Breast index
对照组 Control group	273.82 ± 21.12	4.43 ± 0.21	16.18 ± 2.16
实验组 Test group	260.15 ± 16.14	3.47 ± 0.32 **	13.34 ± 2.92 *

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 3 孕鼠乳房 DNA 和 RNA 水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.3 Comparison of the rat breast DNA and RNA in different groups

组别 Groups	DNA (mg/100 g tissue)	RNA (mg/100 g tissue)	RNA/DNA ratio
对照组 Control group	32.52 ± 4.36	63.40 ± 13.66	1.95 ± 0.18
实验组 Test group	27.19 ± 5.61 *	44.02 ± 11.38 **	1.62 ± 0.26 *

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 孕鼠血浆 E_2 、P、GH 和 PRL 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.4 The level of E_2 , P, GH and PRL in the rat plasma in different groups

组别 Groups	E_2 /pg/mg	P/ng/mg	GH/ng/mg	PRL/mU/g
对照组 Control group	19.77 ± 4.98	8.23 ± 2.32	9.49 ± 2.15	14.08 ± 2.73
实验组 Test group	15.25 ± 3.55 *	6.04 ± 1.26 *	7.11 ± 2.52 *	11.85 ± 3.03 *

注:与对照组相比, * $P < 0.05$ 。 Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$.

表 5 孕鼠乳房组织 E_2 、P、GH 和 PRL 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.5 The levels of E_2 , P, GH and PRL in breast tissue homogenates in the rats of different groups

组别 Groups	E_2 /pg/mg	P/ng/mg	GH/ng/mg	PRL/mU/g
对照组 Control group	7.43 ± 2.46	3.63 ± 0.94	16.28 ± 3.23	8.12 ± 2.64
实验组 Test group	5.40 ± 1.28 **	2.98 ± 1.01	12.80 ± 4.88 *	6.90 ± 3.20

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 6 孕鼠雌二醇和孕酮受体水平比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.6 The levels of E_2 or P receptors in the pregnant rats of different groups

组别 Groups	E_2 receptor		P receptor	
	Bmax (fmol/mg protein)	Kd ($\times 10^{-12}$, mol/L)	Bmax (fmol/mg protein)	Kd ($\times 10^{-12}$, mol/L)
对照组 Control group	18.16 ± 2.57	0.61 ± 0.25	45.60 ± 6.24	1.16 ± 0.19
实验组 Test group	15.20 ± 3.68 **	2.12 ± 1.34 **	38.29 ± 5.52 *	1.62 ± 0.36 **

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

2.6 乳腺组织形态学变化

对照组大鼠乳腺呈小叶分布,小叶较大、数量较多;腺泡周围及小叶间结缔组织较少,血管丰富;可见到数量较多的乳腺导管与腺泡结构,导管较粗较长且分支均匀分布到整个乳腺区。腺泡呈圆形或椭圆形,大小不一,腺泡数量较多且体积较大,腺泡充盈且有大量分泌物,上皮细胞呈低立方柱状,排列整齐,胞质空

亮,可见圆形细胞核;实验组大鼠乳腺脂肪和结缔组织较多,乳腺小叶结构较少,导管和腺泡结构亦较少;导管较细较短且分支较少,腺泡数量较少,管腔萎缩甚至闭塞,上皮细胞扁平甚至消失,周围反应性间质减少、致密。见图 1。实验组乳腺小叶数目、乳腺小叶平均腺泡数、最大腺泡腔/小叶的直径均低于对照组,差异均具有统计学意义($P < 0.05, P < 0.01$),见表 7。

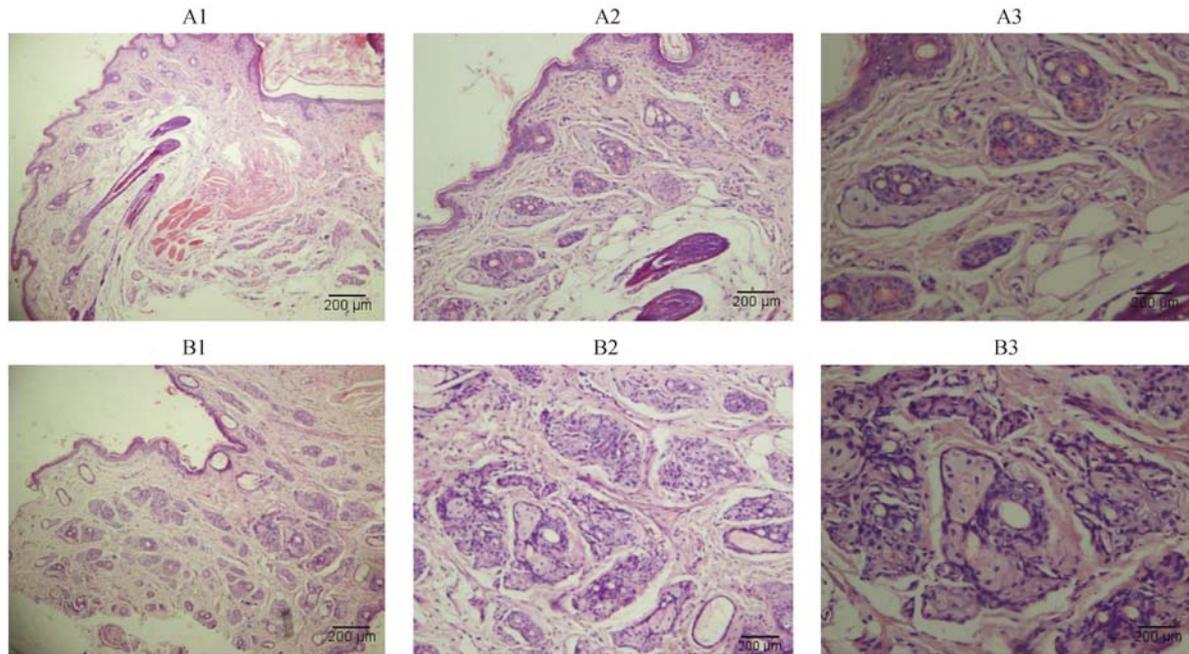


图1 乳腺组织形态观察(A. 对照组;B. 实验组。H-E 染色)

Fig.1 Mammary gland sections tissue in rats of normal control (A) and model (B) groups. H-E staining

表7 乳腺小叶数目、乳腺小叶平均腺泡数和腺泡直径比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab.7 The number of lobules, gland acini and acinus diameter in the rats of different groups

组别 Groups	乳腺小叶数目 Lobule number	乳腺小叶平均腺泡数 Number of glandular cells	腺泡直径/ μm Acinus diameter
对照组 Control group	55.23 \pm 6.30	61.23 \pm 11.36	509.48 \pm 141.25
实验组 Test group	46.46 \pm 5.12 **	48.43 \pm 7.74 *	361.59 \pm 97.63 *

注:与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。 Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

动物乳房发育受内分泌系统及神经系统的调控,并随年龄、发情周期、生理状态呈动态变化,且妊娠期是家畜乳腺主要的生长阶段,到妊娠晚期或泌乳早期乳房才达到完全发育状态^[14,15]。本研究根据动物乳腺发育及其生理活动特点,选择妊娠大鼠为研究对象,能短期集中反映乳腺发育的关键阶段,虽哺乳期动物乳腺发育持续进行,但是其组织形态已基本稳定^[13]。在动物乳腺发育过程中,除了营养因素外,环境不适引发心理应激是导致乳房发育不良的主要原因之一^[2]。本研究根据家畜在饲养管理及运输过程中存在的不良刺激因素,设计5种刺激因素诱导心理应激的发生。根据养殖场外围的噪声污染,采用场景恐惧系统输出噪音刺激,干扰大鼠生物反应;依据规模化集约式养殖的特点,设置束缚应激激发大鼠神经内分泌紊乱,影响其生长发育;模拟自然生存状态,采用昼夜颠倒翻转大鼠的生物节律,影响自然生存状态;采用冰水游泳的方法实现冷应激刺激同时模拟强制驱赶,与束缚应激形成

落差,导致大鼠体能、情志异常,出现抑郁甚至绝望;采用夹尾致痛的方法实现慢性疼痛和肢体不适带来的影响;综合以上5种伤害性刺激,根据随机、均衡的原则安排刺激因素,实现了不可预见性刺激反应,也体现了一定的交互作用或叠加作用,基本能真实反应环境异常导致的最常见心理应激,不足之处在于大鼠的孕期为19~22d,应激反应持续时间较短,如果选用孕期较长的动物可能会有新的发现。

本研究发现,心理应激影响大鼠的体重增长,可能与饲料的摄入不足或者胃肠功能紊乱有关,但差异在15天内无统计学意义;孕鼠乳头大小、乳房重量及系数的变化均能反映乳腺发育的大体性状,研究结果显示心理应激能阻碍乳房生长,预期对产后泌乳性能会带来不良结果。前期研究表明大鼠乳腺重量和DNA、RNA含量显著提高能促进乳腺发育^[10-14],本研究发现应激刺激使孕鼠乳房重量、乳房组织DNA、RNA、RNA/DNA水平均明显降低,与前期研究结果相符。

心理应激主要通过下丘脑-垂体-肾上腺轴而影响神经-内分泌-免疫网络,内分泌系统的紊乱是影响乳腺

发育的重要原因^[15-17]。E₂ 能促进乳腺导管的发育、刺激上皮增生、导管及小叶周围结缔组织的发育, P 能促进腺小叶及腺泡的发育, GH 有利于导管和小叶腺泡生长, PRL 诱导腺小叶的分化, 各种激素相互协同, 调节乳腺发育^[18-20]。E₂、PRL 与 GH 的协同作用可能是促进孕期乳房发育的重要因素。本研究中发现应激孕鼠乳腺组织 PRL 水平具有下降的趋势, 但差异无统计学意义, 可能与围产期的不同时间有关。在受体方面, Kd 是反映受体与配体结合的亲和力的参数, Kd 值越小, 表示激素与受体结合的亲和力越大。应激孕鼠 E₂ 受体和 P 受体的 Kd 均显著增高, 说明 E₂ 和 P 与其受体的亲和力降低, 不利于 E₂ 和 P 发挥正常的生理功能。本研究发现给予妊娠大鼠应激刺激后, 其乳腺组织形态发生了明显的变化, 脂肪和结缔组织增多, 小叶数目以及腺泡与导管的数量、体积均减少, 说明应激刺激后, 乳房组织结构呈现出发育不良现象。

本研究结果为畜牧业生产中规避伤害性刺激导致心理应激影响孕畜乳腺正常发育而致缺乳提供了实验依据, 也为复制乳腺发育不良大鼠模型, 开展促进乳腺发育、增强泌乳性能相关研究提供了方法参考。

参 考 文 献

- [1] 宋传德. 浅谈家畜的七情致病 [J]. 吉林畜牧兽医, 2002, (4): 33-34.
- [2] 张典. 论家畜的情志 [J]. 中兽医学杂志, 1982, (2): 3-6.
- [3] 蓝荣庚. 规模化猪场母猪的乳腺发育值得关注(下) [J]. 今日养猪业, 2014, (4): 15-17.
- [4] 王月影, 王艳玲, 李和平, 等. 动物乳腺发育的调控 [J]. 畜牧与兽医, 2002, 34(7): 36-38.
- [5] 赵国丽, 宫艳斌, 韩元, 等. 激素和生长因子调控奶牛乳腺发育的研究进展 [J]. 中国奶牛, 2011, 6(6): 25-30.
- [6] 江青东. 大鼠乳腺发育过程中雌激素、孕激素、催乳素及相应受体水平变化规律的研究 [D]. 河南农业大学, 2006.
- [7] Schraub S, Sancho-Garnier H, Velten M. Should psychological events be considered cancer risk factors? [J]. Revue d'Epidemiologie et de Sante Publique, 2009, 57(2): e7-e16.
- [8] Backeljauw PF, Dattani MT, Pinchas Cohen P, et al. Disorders of growth hormone/insulin-like growth factor secretion and action [M]. In: Sperling MA (Ed.): Pediatric Endocrinology (Fourth edition), Chapter 10. 2014, 291-404.
- [9] Henning JD, Jenkins FJ, Bovbjerg DH. Psychological stressors significantly speed the development of primary mammary tumors in the HER-2/neu mouse transgenic breast cancer model [C]. the 21st Annual PNIRS Meeting, 2014, e1-e52. Brain Behavior Immunity, 2014, Suppl: e35.
- [10] 张荣庆, 韩正康, 陈杰, 等. 大豆黄酮对大鼠乳腺发育作用的实验研究 [J]. 动物学报, 1995, 41 (3): 332-338.
- [11] 王伟群, 韩正康, 陈伟华, 等. 芒柄花素的促乳腺发育作用及机理探讨 [J]. 南京农业大学学报, 1993, 16(增刊): 19-24.
- [12] 彭珊珑, 欧阳雪宇, 王文杰. 小鼠腹腔巨噬细胞 PAF 受体放射配基受体结合分析方法 [J]. 中国药理学通报, 2004, 20 (5): 585-587.
- [13] 李健. 乳腺发育的内分泌调控 [J]. 国外兽医学-畜禽疾病, 1996, 1(1): 9-12.
- [14] 张荣庆, 韩正康, 陈杰, 等. 大豆黄酮促进妊娠大鼠乳腺发育和泌乳的实验研究 [J]. 动物学报, 1995, 41(4): 414-417.
- [15] 敖海清, 徐志伟, 严灿. 心理应激相关疾病的研究探要 [J]. 中医药学刊, 2004, 22(8): 1414-1415.
- [16] 王建红, 王敏璋, 伍庆华, 等. 心理应激大鼠卵巢内分泌功能降低模型的实验研究 [J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(4): 13-15.
- [17] 柯江维, 王建红, 段荣. 心理应激雌性大鼠海马-下丘脑-垂体雌激素受体的变化 [J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(1): 98-101.
- [18] Akers RM. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows [J]. J Dairy Sci. 2006, 89: 1222-1234.
- [19] Connor EE, Meyer MJ, Li RW, et al. Regulation of gene expression in the bovine mammary gland by ovarian steroids [J]. J Dairy Sci, 2007, 90(Suppl-1): 55-65.
- [20] 俞榕. 女性亚健康与肝的关系研究 [D]. 中国中医科学院, 2013.

[收稿日期] 2014-12-20



电针对脑缺血/再灌注模型大鼠双侧脑区 IL-1 β 、ICAM-1 表达的影响

宋映周¹, 孙琳琳², 任映贞¹, 张旭辉¹, 许明敏¹, 于森¹, 郭郁¹, 图娅¹

(1. 北京中医药大学针灸推拿学院, 北京 100029; 2. 北京首钢医院, 北京 100028)

【摘要】 目的 探讨脑缺血/再灌注损伤大鼠大脑健、患侧白介素-1 β (IL-1 β)和细胞间粘附分子-1(ICAM-1)的变化趋势及电针对二者的影响。方法 采用大脑中动脉线栓法制备大鼠脑缺血/再灌注模型(MCAO)。将大鼠随机分为空白组、模型组和电针组,造模后各组又分为6个时程组(12、24、48、72、96、144 h),每个时程组10只大鼠。取脑组织,制备冰冻切片,免疫组化检测健、患侧脑组织中IL-1 β 、ICAM-1的表达情况。结果 在脑缺血大鼠患侧与健侧脑区,IL-1 β 和ICAM-1的表达均呈现典型的双峰模式。模型组患侧IL-1 β 在12 h和48 h到达峰值,健侧在12 h和144 h到达峰值。模型组患侧IL-1 β 表达在48 h明显高于健侧($P < 0.05$),在96 h和144 h又明显低于健侧($P < 0.05$);电针组患侧IL-1 β 表达在24 h、48 h和144 h均低于健侧($P < 0.05$)。模型组患侧的ICAM-1在24 h和72 h达到峰值,健侧在24 h和144 h到达峰值;电针组患侧ICAM-1表达在各时间点均低于健侧($P < 0.05$)。结论 针刺可能通过降低大鼠患侧脑组织中IL-1 β 和ICAM-1的表达抑制炎症反应,从而改善脑缺血/再灌注对脑组织的损伤。

【关键词】 电针; 脑缺血/再灌注损伤; 白介素-1 β ; 细胞间粘附分子-1; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0278-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.011

Effects of electroacupuncture on the expressions of IL-1 β and ICAM-1 in bilateral brain tissues of rats with cerebral ischemia/reperfusion injury

SONG Ying-zhou¹, SUN Lin-lin², REN Ying-zhen¹, ZHANG Xu-hui¹, XU Ming-min¹, YU Miao¹, GUO Yu¹, TU Ya¹

(1. School of Acupuncture and Moxibustion, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

2. China Meitan General Hospital, Beijing 100028)

【Abstract】 Objective To explore the variation trends of interleukin-1 β (IL-1 β) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in both normal and affected sides of brain tissues in rats with ischemia-reperfusion injury and the therapeutic action of electroacupuncture. **Methods** The cerebral ischemia-reperfusion model was established with suture embolization in the right middle cerebral artery. The rats were randomly divided into control group, model group and electroacupuncture group. Each group was then divided into six subgroups by the time after operation (12 h, 24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 144 h), ten rats in each subgroup. Frozen sections of brain tissues were prepared and the expression of IL-1 β and ICAM-1 in brain tissues of both sides were detected by immunohistochemistry. **Results** The expressions of IL-1 β and ICAM-1 showed typical bimodal pattern in both affected ischemic region and contralateral normal region. In the model group, the peaks of IL-1 β in the cerebral ischemic region were at 12 h and 48 h, while in the contralateral normal region the peaks were at 12 h and 144 h, the expression of IL-1 β in the ischemic region was significantly higher than that in the contralateral normal region at 48 h ($P < 0.05$), and lower at 96 h and 144 h (P

[基金项目] 国家科技重大专项“重大新药创制”(NO:2009ZX09103-707)。

[作者简介] 宋映周(1973-),女,韩国,博士研究生,研究方向:针刺经典理论的现代研究。

[通讯作者] 图娅,电话:010-64287822 E-mail: tuyaba@263.net

<0.05). In the electroacupuncture group, the expressions of IL-1 β in the ipsilateral region were significantly lower than that in the contralateral region at 24 h, 48 h and 144 h ($P < 0.05$). In the model group, the peaks of ICAM-1 in the cerebral ischemic regions were at 24 h and 72 h, while in the contralateral normal regions the peaks were at 24 h and 144 h. In the electroacupuncture group, the expressions of ICAM-1 in the ischemic regions were significantly lower than that in the contralateral normal regions at all the 12 h, 24 h, 48 h, 72 h and 144 h ($P < 0.05$). **Conclusions** Our findings suggest that electroacupuncture may inhibit the inflammation of ischemia/reperfusion brain tissue through reducing the expression of IL-1 β and ICAM-1 to relieve the cerebral ischemia-reperfusion injury.

【Key words】 Electroacupuncture; Cerebral ischemia-reperfusion injury; Interleukin-1 β ; Intercellular adhesion molecule-1; Rat

脑血管病是人类健康大敌,当前威胁人类健康的三大疾患之一,具有发病率高、死亡率高、致残率高等特点。脑缺血炎性反应是缺血性脑损害的重要病理机制之一。脑缺血后级联式炎性反应是一个复杂的动态过程。缺血后机体处于应激状态,在缺血损伤区各种炎性因子表达增加,包括细胞因子和细胞间粘附分子。针刺对脑缺血性疾病具有良好干预作用^[1],且这种干预作用贯穿于脑缺血性疾病的急性期、损伤期及恢复期。研究发现针刺百会、足三里穴对神经、内分泌-免疫调节网络具有良性调节作用,可抑制脑缺血/再灌注区的炎性反应,促进脑梗死区的神经功能恢复^[2]。本实验通过对比观察不同时间大鼠健、患侧脑区 IL-1 β 和 ICAM-1 的表达情况,进一步探讨针刺干预脑缺血性疾病的作用机制。

1 材料与方法

1.1 动物、分组和处理

SPF 级 SD 大鼠,雄性,体重(275 \pm 15)g,动物来源于中国食品药品检定研究院实验动物资源中心【SCXK(京)2009-0017】。实验在中国医学科学院基础医学研究所进行【SYXK(京)2010-0021】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。将大鼠按随机数字表分成空白组(10 只)和造模组,造模成功(根据神经功能评分)的大鼠再随机分为模型组和针刺组,模型组和针刺组又分为 12、24、48、72、96 h 和 144 h 六个时程,每个时程 10 只。时程的计算方法:起点为拔栓实现再灌注时间,终止点为取材时间,之间时长为各时程。空白组不做任何处理;模型组造模成功后,于每日针刺组治疗时给予抓取刺激一次;针刺组电针刺激大鼠头部百会和足三里(患侧),采用疏密波,频率 2 ~ 100 Hz,强度 2 mA,每次 20 min,每日 1 次,首次治疗于拔栓后 30 min,末次治疗为灌注取材前 150 min。

1.2 试剂和仪器

兔抗大鼠 IL-1 β IgG(Santa Cruz Biotechnology, 批

号:G2110),山羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:V0602),山羊抗鼠 ICAM-1 IgG(R&D system 公司,批号:EWL0109111),生物素标记的兔抗山羊 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:W0524),辣根酶标记亲和素-HRP 连接物(北京中杉金桥生物技术有限公司,批号:V0723),DAB 显色试剂盒(北京西雅金桥生物技术有限公司),大鼠 MCAO 栓线-2432、2634、2636、4A 级(北京沙东生物技术有限公司),华佗牌无菌针灸针 0.30 \times 25 mm(苏州医疗用品厂有限公司),长城牌 KWD-808II 全能脉冲电针仪(常州市武进长城医疗器械有限公司),显微镜(日本 Olympus 公司)。

1.3 脑缺血/再灌注损伤模型制备和神经功能评分

参照改良的 Zea Longa 方法^[3]制备脑缺血/再灌注损伤大鼠模型。大鼠 10% 水合氯醛(0.35 mL/100 g)腹腔注射麻醉后,仰卧固定,取颈部正中切口,暴露右侧颈总动脉(CCA)、颈外动脉(ECA)、颈内动脉(ICA),结扎并切断 ECA 后,由 ECA 残端沿 ICA 缓慢插入栓线,此时栓线完全阻塞大脑中动脉入口。缺血后 2 h 进行再灌注,麻醉动物,缓慢轻拉栓线,大鼠清醒后自由进食水和食物。

参照改良的 Bederson 5 级评分法^[4]。0 级(计 0 分):无功能缺损;1 级(计 1 分):不能完全伸展左前肢;2 级(计 2 分):左前肢屈曲,向左侧推动时阻力下降;3 级(计 3 分):爬行时向左侧转圈;4 级:不能自发行走,意识丧失,包括 24 h 内死亡;剔除评级为 0 级和 4 级的大鼠。

1.4 指标检测与方法

免疫组化法检测双侧脑组织中 IL-1 β 和 ICAM-1 含量。用 10% 水合氯醛麻醉大鼠,切开胸腔,充分暴露心脏,依次用生理盐水和 4% 多聚甲醛灌注 300 ~ 400 mL,取脑组织置于 4% 多聚甲醛中,4 $^{\circ}$ C 保存。切取视交叉前后 2 ~ 3 mm 的脑组织截面,制备冰冻切片。检测时采用枸橼酸修复液,微波炉中微波热修复 10 ~

15 min, 用 PBS 冲洗 2 次, 加一抗(兔抗大鼠 IL-1 β , 山羊抗大鼠 ICAM-1)室温孵育 48 h; PBS 冲洗 3 次, 加二抗, 室温孵育 2 h; 加生物素-酶, 室温孵育 30 min; PBS 冲洗 3 次, DAB 显色, 中性树胶封固, 二甲苯擦拭玻片。

1.5 数据的读取与分析

在光学显微镜下对标本的健侧和患侧皮质、纹状体相关脑区进行分析和图像采集, 分别观察相关脑区 IL-1 β 、ICAM-1 的表达情况, 使用医学图像分析软件进行图像密度比对, 检测积分光度值(integrated optical density, IOD)。

1.6 统计学处理

表 1 模型组大鼠各时程造模后与取材前神经功能评分比较

Tab. 1 Comparison of the neurofunctional scores of the rats in the model group during the time course after modeling

观察时间 Observation time	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h
造模后 After modeling	2.29 \pm 0.73	2.00 \pm 0.67	2.40 \pm 0.51	2.00 \pm 0.60	2.40 \pm 0.52	2.20 \pm 0.42
取材前 Before execution	2.29 \pm 0.73	2.20 \pm 0.79	1.80 \pm 0.79	1.50 \pm 1.00	1.40 \pm 0.8 ^{###}	0.60 \pm 0.84 ^{###}

注: ^{###}: 与造模后神经功能评分比较, $P < 0.01$ 。

Note. ^{###} $P < 0.01$ vs. the neurofunctional scores after modeling.

2.2 各组大鼠脑组织 IL-1 β 变化趋势比较

脑缺血/再灌注损伤后, 模型组健、患侧脑组织 IL-1 β 表达均高于正常组, 且呈典型双峰模式。健侧在 12 h 到达第一峰峰值, 至 48 h 小幅下降后又持续增高, 在 144 h 到达第二峰峰值; 患侧在 48 h 到达第二峰峰值, 72 h 短暂下降后又持续增高。48 h 时, 患侧明显高于健侧($P < 0.05$), 而 96、144 h 时 IL-1 β 表达又明显低于

使用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。服从正态分布, 方差齐时, 各組间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA); 服从正态分布, 方差不齐, 采用 t 检验; 不服从正态分布, 采用非参数检验。以 $\alpha = 0.05$ 作为检验标准。

2 结果

2.1 神经功能评分

正常组大鼠无神经功能缺损表现, 模型组(在模型制备过程中死亡率为 28.8%)大鼠随着存活时间的延续, 神经功能评分有降低趋势, 96、144 h 的评分与造模后比较有极显著性差异($P < 0.01$)。

健侧($P < 0.05$)。针刺组健、患侧脑组织的 IL-1 β 均在 24 h 到达第一峰峰值, 之后迅速下降, 至 144 h 到达第二峰峰值, 但患侧的第一峰峰值和第二峰峰值均低于健侧($P < 0.05$)。除第 24 h, 针刺组健侧高于模型组健侧($P < 0.05$), 其余时间点均低于模型组健侧($P < 0.05$); 针刺组患侧在各时间点的 IL-1 β 表达均显著低于模型组患侧($P < 0.05$)。见表 2, 见图 1。

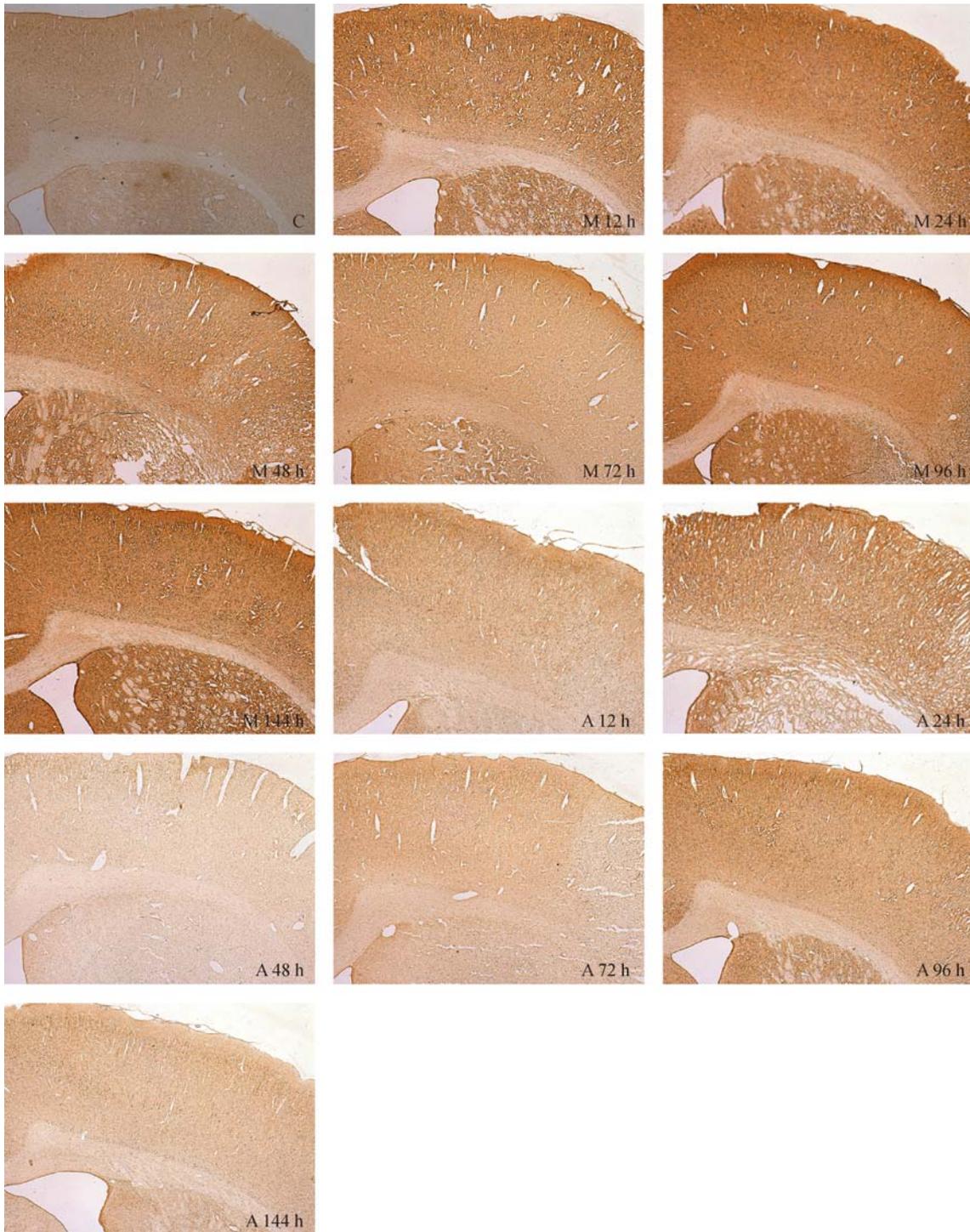
表 2 各组大鼠健、患侧脑组织中 IL-1 β 的 IOD 值比较($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 2 Comparison of the IL-1 β values between bilateral brain tissues of the rats in in each group

组别 Groups	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h	
空白组 Control group	158268.03 \pm 31433.72	158268.03 \pm 31433.72	158268.03 \pm 31433.72	158268.03 \pm 31433.72	158268.03 \pm 31433.72	158268.03 \pm 31433.72	
模型组 Model group	健侧 healthy side	263859.30 \pm 18863.82 [#]	240213.46 \pm 108386.47 [#]	338739.89 \pm 130629.53 [#]	418094.09 \pm 82264.77 [#]	470523.51 \pm 32894.01 [#]	
	患侧 affected side	279250.51 \pm 65430.68 [#]	284544.8 \pm 77287.66 [#]	340476.88 \pm 84865.46 ^{#Δ}	270354.62 \pm 24252.11 [#]	323688.62 \pm 71031.85 ^{#Δ}	391050.44 \pm 95572.07 ^{#Δ}
针刺组 Acupuncture group	健侧 healthy side	239633.38 \pm 40715.95 ^{Δ}	398421.28 \pm 45902.22 ^{Δ}	256400.21 \pm 71303.38	233507.35 \pm 55078.68 ^{Δ}	219471.50 \pm 98511.13 ^{Δ}	260347.54 \pm 50688.53 ^{Δ}
	患侧 affected side	191513.48 \pm 32696.92 ^{Δ}	200794.00 \pm 66092.71 ^{Δ} ^{\square}	166092.71 \pm 35070.34 ^{Δ} ^{\square}	183753.24 \pm 64289.76 ^{Δ}	192891.96 \pm 58550.56 ^{Δ}	209295.24 \pm 29807.97 ^{Δ} ^{\square}

注: [#]: 与空白组比较 $P < 0.05$; ^{Δ} : 与模型组健侧比较 $P < 0.05$; ^{Δ} : 与模型组患侧比较 $P < 0.05$; ^{\square} : 与针刺组健侧比较 $P < 0.05$ 。

Note. [#] $P < 0.05$, vs. control group; ^{Δ} $P < 0.05$, vs. model group healthy side; ^{Δ} $P < 0.05$, vs. model group affected side; ^{\square} $P < 0.05$, vs. acupuncture group healthy side.



注:空白组(C),模型组(M),针刺组(A)。模型组 48、96 和 144 h 阳性颗粒表达较其余时间点多;针刺组 24 和 144 h 组阳性颗粒表达较其余时间点多。

图 1 不同时间点大鼠患侧脑组织 IL-1 β 免疫组化图(×100)

Note. The granules of positive IL-1 β expression at 48 h, 96 h and 144 h in the model group are higher than that in other time-point subgroups. The granules of positive IL-1 β expression at 24 h and 144 h in the subgroups of acupuncture group are higher than that in other time-point subgroups.

Fig. 1 Expression of IL-1 β in affected side brain tissues at different time points in the rats of each group. Immunohistochemical staining, ×100.

2.3 各组大鼠脑组织 ICAM-1 变化趋势比较

脑缺血/再灌注损伤后,模型组健、患侧脑组织 ICAM-1 表达均呈现双峰模式,在 24 h 到达第一峰峰值,之后迅速下降,至 72 h 又呈上升趋势,在 144 h 时达到第二峰峰值。模型组健、患侧的两个峰值均高于正常组 ($P < 0.05$),且在 48 h 时,患侧的 ICAM-1 表达高于健侧 ($P < 0.05$)。针刺组健、患侧脑组织 ICAM-1 表达也均呈现双峰模式,在 24 h 到

达第一峰峰值,之后持续下降,分别在 144 h 和 96 h 呈上升趋势,并在 144 h 到达第二峰峰值。除第 96 h,针刺组健侧 ICAM-1 表达均高于针刺组患侧 ($P < 0.05$)。针刺组健侧在 12、24 和 48 h 的 ICAM-1 表达均高于模型组健侧 ($P < 0.05$)。针刺组患侧在 12、24、48 h 的 ICAM-1 表达均高于模型组患侧 ($P < 0.05$),在 144 h 时低于模型组患侧 ($P < 0.05$)。见表 3,见图 2。

表 3 各组大鼠健、患侧脑组织中 ICAM-1 的 IOD 值比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

Tab. 3 Comparison of IOD values of ICAM-1 between bilateral brain tissue in the rats of each group

组别 Groups	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h	144 h	
空白组 Control group	162304.14 ± 38542.74	162304.14 ± 38542.74	162304.14 ± 38542.74	162304.14 ± 38542.74	162304.14 ± 38542.74	162304.14 ± 38542.74	
模型组 Model group	健侧 healthy side	159509.92 $\pm 37488.98^{\#}$	288824.99 $\pm 85352.68^{\#}$	147767.39 ± 34214.72	181026.82 $\pm 64548.24^{\#}$	273672.49 $\pm 173401.83^{\#}$	307281.12 $\pm 125453.66^{\#}$
	患侧 affected side	162049.45 ± 38542.74	248977.65 $\pm 18853.59^{\#}$	155241.03 $\pm 74295.91^{\Delta}$	202082.30 $\pm 61369.86^{\#}$	203827.80 ± 55309.95	335731.39 $\pm 34122.78^{\#}$
针刺组 Acupuncture group	健侧 healthy side	402705.87 $\pm 183392.23^{\Delta}$	496248.81 $\pm 59003.44^{\Delta}$	347462.70 $\pm 60274.80^{\Delta}$	275956.55 ± 111158.30	272454.16 $\pm 105007.53^{\Delta}$	426407.09 ± 24300.12
	患侧 affected side	234326.77 $\pm 44547.28^{\blacktriangle\blacksquare}$	287853.74 $\pm 65379.62^{\blacktriangle\blacksquare}$	234156.08 $\pm 8424.30^{\blacktriangle\blacksquare}$	207482.43 $\pm 82936.51^{\blacksquare}$	218252.23 ± 94233.61	301480.25 $\pm 40683.47^{\blacktriangle\blacksquare}$

注: $^{\#}$: 与空白组比较 $P < 0.05$, $^{\Delta}$: 与模型组健侧比较 $P < 0.05$, $^{\blacktriangle}$: 与模型组患侧比较 $P < 0.05$, $^{\blacksquare}$: 与针刺组健侧比较 $P < 0.05$ 。

Note. $^{\#}P < 0.05$, vs. the control group; $^{\Delta}P < 0.05$, vs. the model group healthy side; $^{\blacktriangle}P < 0.05$, vs. the model group affected side; $^{\blacksquare}P < 0.05$, vs. acupuncture group healthy side.

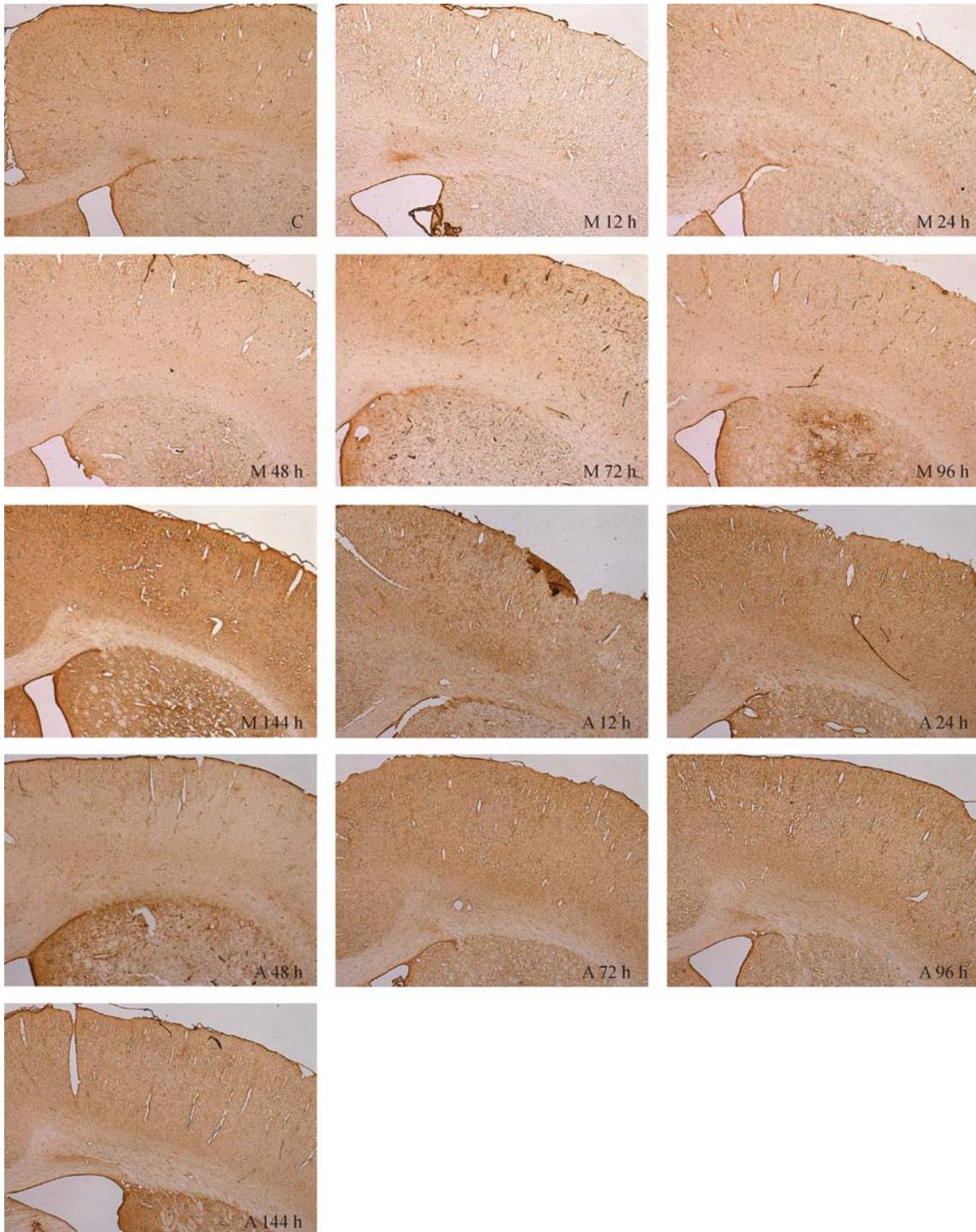
3 讨论

缺血性脑中风是常见的中风类型,其发生率约占中风总人数的 60% ~ 80%^[5]。对其损伤与修复机制的研究发现炎症反应是造成脑缺血/再灌注损伤的主要原因之一^[6-7]。早期给予溶栓、抗凝治疗可有效降低再灌注损伤,但这种治疗存在严格的时间窗限制,对于长期中风患者的恢复作用不显著。近年来,大量研究表明针刺对缺血性脑疾病有良好的干预作用。本实验选取百会和足三里(患侧)对脑缺血/再灌注损伤模型大鼠进行干预。其中百会为督脉穴,督脉循行于脊里,入络脑,与脑和脊髓都有密切联系,针刺百会可以促进脑神经细胞修复。足三里为足阳明胃经合穴,阳明经为多气多血之经,手足阳明经行于四肢外侧,汇聚于头部,刺激阳明经穴可以通调气血,改善肢体功能障碍,调节大脑皮质运动中枢。有研究认为针刺百会、足三里穴能减轻缺血时脑功能损伤,通过抑制脑缺血/再灌注区的炎症反应,降低 ICAM-1 表达,促进缺血区脑神经功能恢复^[2]。

IL-1 β 主要由神经元、血管内皮细胞、星形胶质细胞和少突胶质细胞产生。脑缺血再灌注后,IL-1 β 蛋白含量显著增多,其主要原因是缺血后再灌注可

激活小胶质细胞和星形胶质细胞,分泌大量 IL-1 β , 促使白细胞向缺血区浸润,导致神经元坏死^{[8][9][10]}。ICAM-1 为免疫球蛋白超家族成员,主要表达于神经元细胞、免疫细胞、血管内皮细胞、上皮细胞和神经胶质细胞,是重要的白细胞-内皮细胞间黏附分子之一,参与细胞间、细胞与基质间的信号交换,介导细胞黏附、识别、活化、增殖、分化、炎症反应,以及损伤修复等多种病理生理功能^[11]。脑缺血损伤后,炎症细胞因子 IL-1 β 可激活胞内信号通路,使 ICAM-1 在血管内皮细胞表达增高。在黏附分子介导下白细胞与内皮细胞相互作用,白细胞变形移出血管并浸润到脑组织,导致继发性神经元死亡和梗死面积扩大^[12]。

脑缺血/再灌注损伤初期(48 h 内),由炎症细胞分泌的炎症因子具有神经毒性作用,其持续时间越长、表达越多,应激损伤程度越强^[13-14]。脑缺血/再灌注损伤中后期(72 - 144 h),主要由胶质细胞分泌炎症细胞因子,该细胞因子具有神经保护作用,可刺激机体启动神经损伤修复功能,促进神经元存活及组织再生^[15-16]。本实验中正常组大鼠脑区的 IL-1 β 和 ICAM-1 均少量表达,主要来源于神经元细胞,与文献报道一致^[17-18]。模型组大鼠患侧脑区的 IL-1 β 和 ICAM-1 表达均呈现典型的双峰模式。



注:空白组(C),模型组(M),针刺组(A)。模型组和针刺组 24 h 和 144 h 组阳性颗粒表达较其余时间点多。

图 2 不同时间点大鼠患侧脑组织 ICAM-1 免疫组化图(×100)

Note. The positive granules of ICAM-1 expression at 24 h and 144 h are higher in that of both the model group and acupuncture group at other time points.

Fig. 2 Expression of ICAM-1 in the affected side brain tissues at different time points in the rats of each group. Immunohistochemical staining, ×100.

脑缺血早期,强烈的应激及损伤反应导致炎性细胞因子表达增高。脑缺血中后期,随着炎症反应的抑制及修复功能的启动而表达降低。针刺百会和足三

里穴后,早期患侧脑区 IL-1 β 的表达水平显著降低,炎症反应得到抑制。中后期,炎性因子增多,表达时间提前,可激活损伤-修复网络调节系统,促进损伤

区神经细胞修复。ICAM-1 在损伤修复早期和中后期表达水平均显著增高,表明针刺可活化胶质细胞,增强细胞间联系,促进细胞增殖分化,恢复神经元功能。

模型组患侧脑区 IL-1 β 在缺血再灌注早期表达高于健侧,在中后期低于健侧,提示早期的细胞损伤与 IL-1 β 表达增高有关,中后期健侧脑组织通过启动内源性保护机制,产生缺氧耐受,从而减缓了缺血区的细胞损伤。健、患侧脑组织中 ICAM-1 表达趋势相似,提示健侧脑组织在应激-损伤过程中可能发挥了协同替代作用。针刺组患侧脑区 IL-1 β 和 ICAM-1 的表达水平低于健侧,表明电针可以抑制缺血区的炎症反应,并活化了健侧脑区相关的细胞信号。

本研究结果表明针刺可影响双侧脑组织中 IL-1 β 和 ICAM-1 的表达,且患侧表达水平均低于健侧,提示针刺百会配伍足三里穴对脑缺血后机体产生的应激-损伤-修复信号链发挥了网络调节作用,针刺可通过降低患侧脑组织 IL-1 β 和 ICAM-1 的表达,抑制炎症反应,改善脑缺血再灌注损伤,这可能是针刺治疗脑缺血性疾病的机制之一。

参 考 文 献

- [1] 马惠芳,任秀君,图娅,等. 针刺对高脂血症合并脑缺血大鼠海马区 caspase-9 蛋白表达及神经行为学的影响 [J]. 针刺研究, 2008, 33(6): 382-386.
- [2] 徐虹,洪礼传,黄艳秋,等. 针刺对脑缺血再灌注模型大鼠脑组织基质金属蛋白酶、细胞间黏附分子表达的影响 [J]. 基础医学与临床, 2010, 30(7): 731-733.
- [3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
- [4] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination [J]. Stroke, 1986, 17(3): 472-476.
- [5] 王虹虹,曾红. 缺血性脑血管病概述 [J]. 中国临床医生, 2011, 39(6): 7-10.
- [6] Lu A, Tang Y, Ran R, et al. Genomics of the periinfarction cortex after focal cerebral ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab,

2003, 23(7): 786-810.

- [7] Mergenthaler P, Dirnagl U, Meisel A. Pathophysiology of stroke: lessons from animal models [J]. Metab Brain Dis, 2004, 19(3/4): 151-167.
- [8] 吕洋,沈维高,刘国辉. 脑缺血再灌注损伤中 IL-1B 的作用及机制 [J]. 北华大学学报, 2004, 5(6): 524-528.
- [9] 郭壮丽,裴海涛. 急性脑缺血再灌注大鼠脑内 IL-1B 蛋白表达及针刺对其抑制作用的研究 [J]. 中华物理医学与康复杂志, 2005, 27(1): 16-19.
- [10] Marcheselli VL, Hong S, Lukiw WJ, et al. Novel Docosanoids inhibit brain ischemia-reperfusion leukocyte infiltration and pro-inflammatory gene expression [J]. J Chin Med, 2003, 83(7): 541-544.
- [11] Ostrowski RP, Jadhav V, Chen W, et al. Reduced matrix metalloproteinase-9 activity and cell death after global ischemia in the brain preconditioned with hyperbaric oxygen [J]. Acta Neurochir Supp, 2010, 106: 47-49.
- [12] Supanc V, Biloglav Z, Kes VB, et al. Role of cell adhesion molecules in acute ischemic stroke [J]. Ann Saudi Med, 2011, 31(4): 365-370.
- [13] Utagawa A, Truettner JS, Dietrich WD, et al. Systemic inflammation exacerbates behavioral and histopathological consequences of isolated traumatic brain injury in rats [J]. Exp Neurol, 2008, 211(1): 283-291.
- [14] Pola R. Inflammatory markers for ischaemic stroke [J]. Thromb Haemost, 2009, 101(5): 800-801.
- [15] Clausen BH, Lambertsen KL, Babcock AA, et al. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha are expressed by different subsets of microglia and macrophages after ischemic stroke in mice [J]. J Neuroinflammation, 2008, 5: 46.
- [16] Kriz J, Lalancette-Hebert M. Inflammation, plasticity and real-time imaging after cerebral ischemia [J]. Acta Neuropathol, 2009, 117(5): 497-509.
- [17] Xuan A, Long D, Li J, et al. Neuroprotective effects of valproic acid following transient global ischemia in rats [J]. Life Sci, 2012, 90(11/12): 463-468.
- [18] Genovese T, Mazzon E, Paterniti I, et al. Modulation of NADPH oxidase activation in cerebral ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Brain Res, 2011, 1372: 92-102.

[收稿日期] 2014-11-13



屈光度和眼轴长度对豚鼠视网膜神经纤维层厚度和视乳头形态的影响

李涛, 周晓东*, 江瀚然, 朱杰

(复旦大学附属金山医院, 上海 201508)

【摘要】 目的 使用光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)观察豚鼠视网膜神经纤维层(retinal nerve fiber layer, RNFL)厚度及视乳头形态,并探讨豚鼠等效球镜和眼轴长度与这些参数的相关性。方法 选用20只普通级豚鼠,进行等效球镜和眼轴长度测量,以及运用OCT观察豚鼠RNFL厚度及视乳头形态。结果 豚鼠等效球镜与RNFL平均厚度、上方RNFL厚度、颞侧RNFL厚度、下方RNFL厚度、鼻侧RNFL厚度呈正相关;而眼轴长度与RNFL平均厚度、上方RNFL厚度、颞侧RNFL厚度、下方RNFL厚度、鼻侧RNFL厚度呈负相关。等效球镜和眼轴长度与盘沿面积、视盘面积、平均杯盘比、杯容积无相关性。等效球镜和垂直杯盘比无相关性,而眼轴长度与垂直杯盘比存在正相关。结论 等效球镜和眼轴长度对豚鼠各方位RNFL厚度均有影响。在使用豚鼠作为高眼压动物模型时,需考虑其屈光状态和眼轴长度的影响。

【关键词】 豚鼠;视网膜神经纤维层厚度;视乳头形态;光学相干断层扫描

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)03-0285-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.012

Effect of refraction and axial length on retinal nerve fiber layer thickness and optic disc morphology in guinea pigs

LI Tao, ZHOU Xiao-dong, JIANG Han-ran, ZHU Jie

(Jinshan Hospital of Fudan University, Shanghai 201508, China)

【Abstract】 Objective To observe the retinal nerve fiber layer (RNFL) thickness and optic disc morphology in guinea pigs by optical coherence tomography (OCT), and to investigate the correlation of spherical equivalent and axial length with those parameters. **Methods** Twenty healthy guinea pigs were used in this study. Spherical equivalent and axial length of nine guinea pigs were measured, and retinal nerve fiber layer thickness and optic disc morphology in the guinea pigs were analyzed by OCT. **Results** Spherical equivalent of the guinea pigs was positively correlated with average RNFL thickness, and with superior, temporal, inferior and nasal RNFL thicknesses; while ocular axial length was negatively correlated with average RNFL thickness, and with superior, temporal, inferior and nasal RNFL thicknesses. Spherical equivalent and axial length did not correlate significantly with disc edge area, optic disc area, average cup disc ratio, or cup volume. Vertical cup disc ratio significantly correlated with axial length, but did not with spherical equivalent. **Conclusions** The retinal nerve fiber layer thickness in guinea pigs is affected by both spherical equivalent and axial length. When guinea pigs are used as an animal model of glaucoma, the effect of refractive state and axial length should be considered.

【Key words】 Guinea pig; Retinal nerve fiber layer thickness; Optic disc morphology; Optical coherence tomography

[基金项目] 上海市科委自然科学基金(13ZR1405800), 上海市卫生局青年基金(2013-121), 金山区卫生局青年基金(2013-02)。

[作者简介] 李涛(1983-), 男, 硕士, 研究方向: 眼视光学。Email: litao13013@sina.com

[通讯作者] 周晓东(1963-), 男, 主任医师, 硕士生导师, Email: xdzhou2005@163.com

豚鼠作为一种良好的实验动物,已被广泛用于实验性近视的研究。此外,豚鼠因其视神经乳头结构与灵长类动物及人类相似,也被用作高眼压的动物实验模型,探讨高眼压对视神经的超微结构损害^[1]。视网膜神经纤维层(retinal nerve fiber layer, RNFL)厚度及视乳头形态分析是目前青光眼诊断中的重要依据,人类近视与青光眼具有密切关系,近视程度与 RNFL 厚度具有相关性。因此,在使用豚鼠作为高眼压动物模型时,需要考虑豚鼠屈光状态对 RNFL 厚度的影响。但尚未见到运用光学相干断层扫描(optical coherence tomography, OCT)测量豚鼠 RNFL 厚度及视乳头形态的有关报道。本研究拟使用 OCT 客观分析豚鼠 RNFL 厚度及视乳头形态,并探讨豚鼠等效球镜和眼轴长度与这些参数的相关性。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级 5~6 周龄英国种短毛三色雄性豚鼠 20 只,购自上海市松江区车墩实验动物良种场【SCXK(沪)2012-0008】,体重为 140~150 g,按实验动物使用的 3R 原则给予人道主义关怀。在复旦大学附属金山医院动物房中饲养 3 个月【SYXK(沪)2010-0098】,保持室温在 20~26℃,湿度 50%,采用日光灯照明,光照周期 12 h 明:12 h 暗;自由摄食、进水。

1.2 实验方法

1.2.1 等效球镜测量

右眼使用睫状肌麻痹剂复方托吡卡胺滴眼液(参天制药有限公司,中国),每 5 min 滴 1 次,共 4 次,30 min 后进行带状光检影验光(YZ24 型,中国苏州六六公司),由验光经验丰富的检查者检影(散光以半量计入球镜)。

1.2.2 眼轴长度测量

应用 Super SW1000 眼科 A 超测量仪,A 超频率为 11 MHz,测量前先行角膜表面麻醉,测量时探头对准角膜中心并垂直于角膜平面,测定右眼眼轴长度手动模式连续测量 5 次,计算平均值,精确到 0.01 mm。

1.2.3 OCT 检查

豚鼠处于自然清醒状态,每只豚鼠仅检查右眼用于分析。撑开眼睑,固定于 OCT(Cirrus-HD 4000,德国 Carl Zeiss 公司)颌架合适位置。通过监视屏观察,保证 OCT 探测光源对准视乳头。选用 Optic Disc Cube 200×200 程序扫描,系统自动识别视乳头中心,自动确定计算圆环的位置。选择 RNFL 和 ONH OU 程序分析结果。豚鼠 OCT 扫描过程均由两位医师在 OCT 检查室内进行操作完成,一名医师负责保持豚鼠眼睛位置,同时协助调整被检眼距离 OCT 扫描镜头的距离,以使监视器可以清晰看到视乳头和大血管;另一名医师负责进行 OCT 操作。重复检测 3 次以上,对其中成像清晰者存盘以备分析(图 1)。

RNFL 和 ONH OU 分析: Optic Disc Cube 200x200

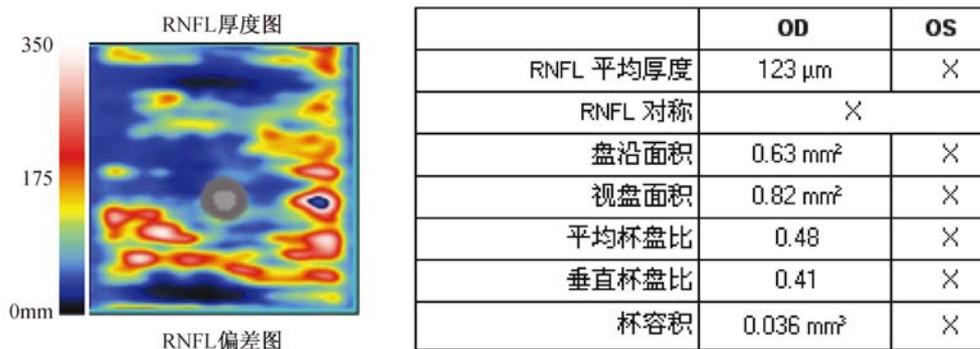


图 1 豚鼠右眼(等效球镜: +2 D)视网膜神经纤维层厚度和视乳头形态分析

Fig. 1 Analysis of retinal nerve fiber layer thickness and optic disc morphology of the right eye (spherical equivalent: +2 D) in a guinea pig.

1.3 统计分析

使用 SPSS 11.6 统计学软件分析, GraphPad Prism5 软件绘图。实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm$

s)表示,并进行正态性检验。豚鼠等效球镜和眼轴长度分别与 RNFL、盘沿面积、视盘面积、平均杯盘比、垂直杯盘比、杯容积采用线性回归分析。以 $P <$

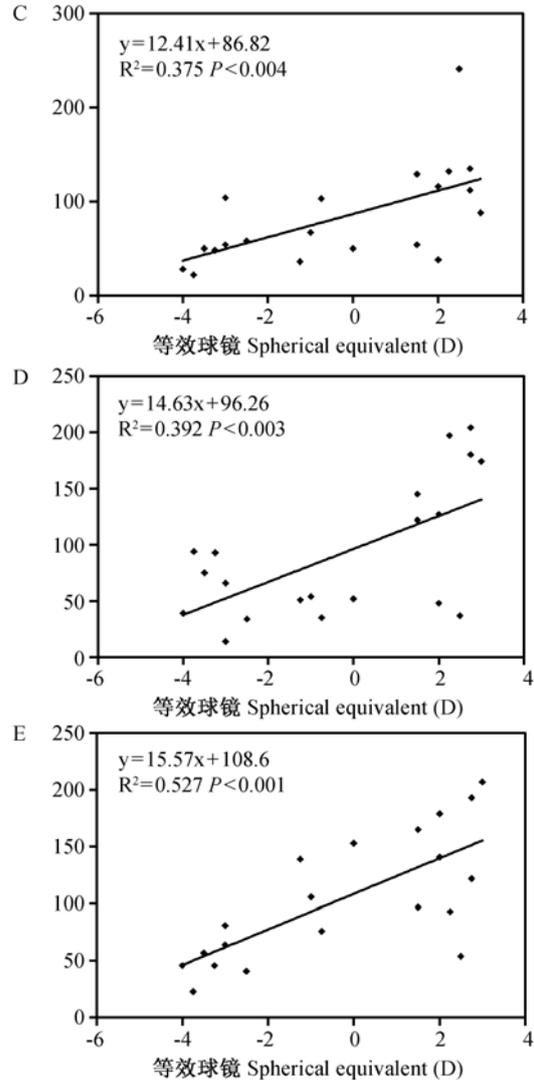
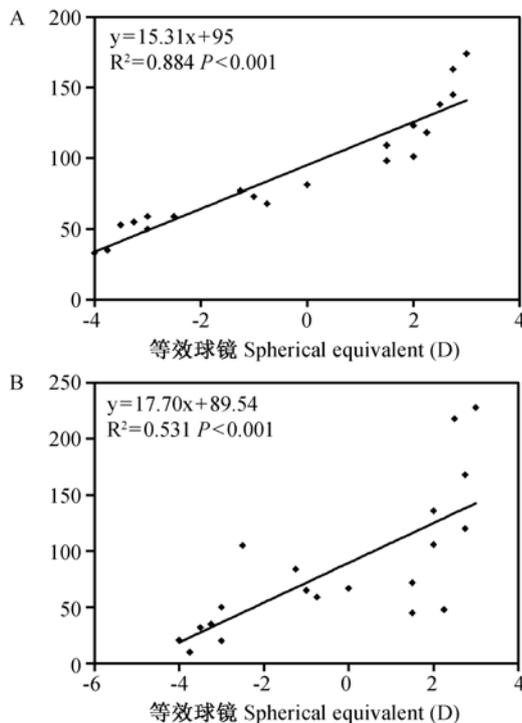
0.05 作为差异有显著性的标准。

2 结果

本实验中 20 只豚鼠的右眼平均等效球镜为 $(-0.29 \pm 2.58)D$ ($-4.00 \sim +3.00 D$), 眼轴长度为 $(8.52 \pm 0.04) mm$ ($8.43 \sim 8.58 mm$)。豚鼠右眼 RNFL 平均厚度为 $(90.6 \pm 42.0) \mu m$, 上方、颞侧、下方、鼻侧 RNFL 厚度分别为 $(84.5 \pm 62.7) \mu m$ 、 $(83.3 \pm 52.3) \mu m$ 、 $(92.1 \pm 60.3) \mu m$ 、 $(104.2 \pm 55.4) \mu m$, 盘沿面积、视盘面积分别为 $(0.85 \pm 0.46) mm^2$ 、 $(1.28 \pm 0.54) mm^2$, 平均杯盘比、垂直杯盘比分别为 (0.56 ± 0.11) 、 (0.52 ± 0.17) , 杯容积为 $(0.062 \pm 0.036) mm^3$ 。

2.1 等效球镜与多个参数之间的关系

豚鼠等效球镜与 RNFL 平均厚度、上方 RNFL 厚度、颞侧 RNFL 厚度、下方 RNFL 厚度、鼻侧 RNFL 厚度呈正相关(图 2)。随着等效球镜增加, RNFL 平均厚度及各方位厚度均变厚。等效球镜每增加 1D, RNFL 平均厚度、上方 RNFL 厚度、颞侧 RNFL 厚度、下方 RNFL 厚度、鼻侧 RNFL 厚度分别约变化 15.31、17.70、12.41、14.63、15.57 μm 。等效球镜与盘沿面积、视盘面积、平均杯盘比、垂直杯盘比、杯容积无相关性(表 1)。



注:A: 视网膜神经纤维层平均厚度; B: 上方视网膜神经纤维层厚度; C: 颞侧视网膜神经纤维层厚度; D: 下方视网膜神经纤维层厚度; E: 鼻侧视网膜神经纤维层厚度。

图 2 等效球镜与视网膜神经纤维层厚度的线性回归分析

Note. A: Mean retinal nerve fiber layer thickness; B: Superior retinal nerve fiber layer thickness; C: Temporal retinal nerve fiber layer thickness; D: Inferior retinal nerve fiber layer thickness; E: Nasal retinal nerve fiber layer thickness.

Fig. 2 Linear regression analysis of the relationship of spherical equivalent with retinal nerve fiber layer thickness.

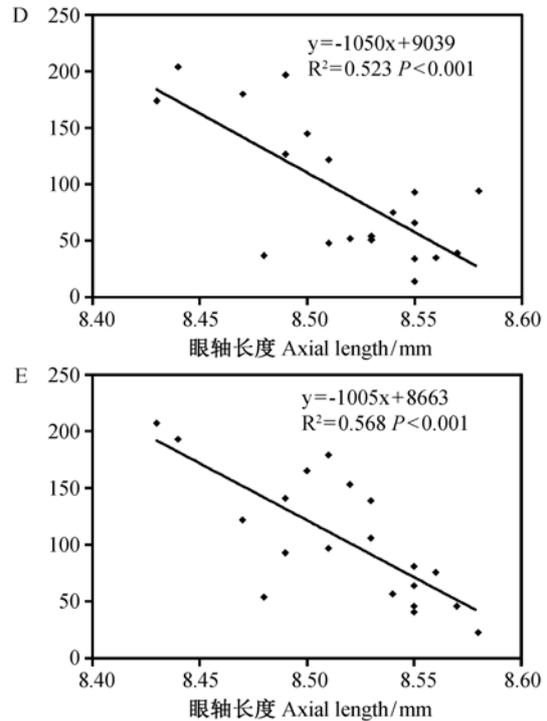
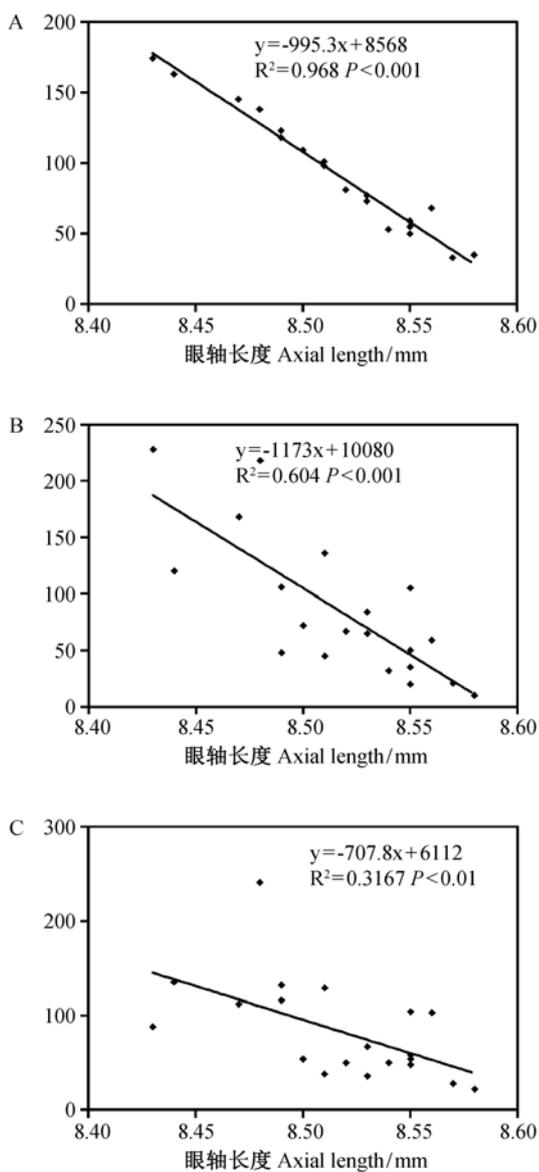
表 1 豚鼠等效球镜与视乳头形态参数的相关性

Tab. 1 Correlation between spherical equivalent and morphological parameters of the optic disc in the guinea pigs

参数 Parameters	R2	P
盘沿面积 Disc edge area	0.050	0.343
视盘面积 Optic disc area	0.014	0.616
平均杯盘比 Mean cup disc ratio	0.057	0.312
垂直杯盘比 Vertical cup disc ratio	0.162	0.079
杯容积 Cup volume	0.006	0.740

2.2 眼轴长度与多个参数之间的关系

豚鼠眼轴长度与 RNFL 平均厚度、上方 RNFL 厚度、颞侧 RNFL 厚度、下方 RNFL 厚度、鼻侧 RNFL 厚度呈负相关(图 3)。随着眼轴长度增加, RNFL 平均厚度及各方位厚度均变薄。眼轴长度每增加 0.1 mm, RNFL 平均厚度、上方 RNFL 厚度、颞侧 RNFL 厚度、下方 RNFL 厚度、鼻侧 RNFL 厚度分别约变化 99.53、117.3、70.78、105、100.5 μm 。眼轴长度与盘沿面积、视盘面积、平均杯盘比、杯容积无相关性;与垂直杯盘比正相关($R^2 = 0.2$; $P = 0.048$)(表 2)。



注: A: 视网膜神经纤维层平均厚度; B: 上方视网膜神经纤维层厚度; C: 颞侧视网膜神经纤维层厚度; D: 下方视网膜神经纤维层厚度; E: 鼻侧视网膜神经纤维层厚度。

图 3 眼轴长度与视网膜神经纤维层厚度的线性回归分析

Note. A: Mean retinal nerve fiber layer thickness; B: Superior retinal nerve fiber layer thickness; C: Temporal retinal nerve fiber layer thickness; D: Inferior retinal nerve fiber layer thickness; E: Nasal retinal nerve fiber layer thickness.

Fig. 3 Linear regression analysis of the relationship of axial length with retinal nerve fiber layer thickness.

表 2 豚鼠眼轴长度与视乳头形态参数的相关性

Tab. 2 Correlation between axial length and morphological parameters of optic nerve head in the guinea pigs

参数 Parameters	R^2	P
盘沿面积 Disc edge area	0.039	0.401
视盘面积 Optic disc area	0.005	0.750
平均杯盘比 Mean cup disc ratio	0.071	0.254
杯容积 Cup volume	0.004	0.792

3 讨论

OCT 作为一种非接触式、非侵入性、高分辨率的活体生物病理学检查方法,目前已广泛应用于临床和科研工作中。在动物实验中, OCT 已用于小鸡^[2]、牛^[3]、兔^[4]、树鼠^[5]和小鼠^[6]等的视网膜检查。李翊^[7]曾用 OCT 观察了豚鼠眼底形态结构,测

量了视网膜和脉络膜厚度,但未描述 RNFL 和视乳头形态结构的有关特征。

对实验动物,如猴^[8,9]和大鼠^[10]的 RNFL 厚度测量,多是基于青光眼的动物模型,即通过 OCT 测量明确疾病的动物模型 RNFL 厚度变化。刘敬东等^[10]观察了慢性高眼压大鼠模型的 RNFL 平均厚度,并未对各方位的 RNFL 厚度作进一步探讨分析。而灵长类动物猴^[8,9],即便是青光眼模型,其 RNFL 厚度分布也类似与人类,上下象限厚于鼻颞象限。RNFL 厚度的直接影响因素包括青光眼和近视等,而青光眼与近视存在一定相关性,并认为近视是青光眼发病的危险因素。研究近视眼 RNFL 厚度及视乳头形态特征有助于将近视导致的 RNFL 厚度及视乳头形态改变与早期青光眼加以鉴别。

本实验使用第四代 FD-OCT 观察豚鼠 RNFL 和视乳头形态,选用 Optic Disc Cube 200 × 200 程序扫描即对视乳头超过 6 × 6 mm² 的区域进行容积扫描而测量 RNFL 厚度,选择 RNFL 和 ONH OU 程序分析检测结果,发现豚鼠等效球镜和眼轴长度与 RNFL 平均厚度具有相关性:等效球镜越负, RNFL 厚度越薄;眼轴长度越长, RNFL 厚度越薄。这与人类的观察结果是一致的^[11-13]。

本实验中豚鼠等效球镜与上方、颞侧、下方、鼻侧 RNFL 厚度均正相关,而眼轴长度与这些参数呈负相关。陈伟等^[14]在 7-18 岁青少年中发现,等效球镜和眼轴长度与上方 RNFL 厚度无相关性,颞侧 RNFL 厚度与等效球镜负相关,下方、鼻侧 RNFL 厚度与眼轴长度负相关。Kang 等^[15]发现相比于正视眼,近视眼的颞侧 RNFL 将更厚,而上下方 RNFL 会更薄。他们认为这是由于视乳头周围的视网膜神经纤维的分布模式并非完全一样所导致的。此外,我们发现在豚鼠的 RNFL 厚度分布中,鼻侧最厚,下方其次,上方再次之,颞侧最薄。这与人类 RNFL 分布不同:人类 RNFL 分布呈驼峰形曲线,即上、下方象限均较厚,为两个“波峰”;鼻、颞侧象限均较薄,为两个“波谷”。我们推测豚鼠视乳头周围视网膜的组织结构分布可能与人类不同。

Abbott 等^[5]通过 OCT 对形觉剥夺性近视树鼠的视网膜进行观察,发现近视眼的视网膜厚度较对照眼薄,鼻侧较颞侧更薄的程度更大,但是他们并未测量比较 RNFL 厚度。本研究发现随着等效球镜和眼轴长度变化,鼻侧 RNFL 厚度变化程度比其他方位更大。我们推测在动物模型中,随着近视程度加

深和眼轴延长,视乳头周围的视网膜厚度变薄,同时 RNFL 也变薄,但鼻侧因其解剖结构特点而导致视网膜和 RNFL 厚度变化尤其显著。

此外,我们发现豚鼠等效球镜和眼轴长度的变化与视乳头形态参数,如盘沿面积、视盘面积、平均杯盘比、垂直杯盘比、杯容积均无相关性;等效球镜和垂直杯盘比无相关性,仅眼轴长度与垂直杯盘比存在正相关。这些视乳头形态参数对于青光眼的诊断和随访的敏感指标,具有一定的参考作用。青光眼患者的视杯容积、杯盘比和垂直杯盘比均显著增加;而盘沿面积显著降低^[16,17]。以往的动物实验中,研究者更关注于 RNFL 的变化,而对于这些视乳头形态参数的报道很少。近视患者,尤其是高度近视患者,因为视乳头倾斜、视乳头旁萎缩弧等异常结构变化往往会影响视乳头轮廓的描绘,进而干扰视乳头参数的计算。豚鼠视乳头在眼底的位置分布与人类不同以及等效球镜差异不大,可能是本实验中豚鼠盘沿面积等这些参数差异无显著性的主要原因。

参 考 文 献

- [1] 欧波. 高眼压豚鼠视神经损害的超微结构研究 [J]. 中国热带医学, 2003, 3: 352-353.
- [2] Huang Y, Cideciyan AV, Papastergiou GI, et al. Relation of optical coherence tomography to microanatomy in normal and rd chickens [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(12): 2405-2416.
- [3] Chauhan DS, Marshall J. The interpretation of optical coherence tomography images of the retina [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1999, 40(10): 2332-2342.
- [4] 骆荣江, 葛坚, 郭彦, 等. 兔眼视网膜厚度的光学相干断层扫描测量与组织学检查的相关性研究 [J]. 中华眼底病杂志, 2000, 16(2): 111-113.
- [5] Abbott CJ, Grunert U, Pianta MJ, et al. Retinal thinning in tree shrews with induced high myopia: optical coherence tomography and histological assessment [J]. Vision Res, 2011, 51(3): 376-385.
- [6] Horio N, Kachi S, Hori K, et al. Progressive change of optical coherence tomography scans in retinal degeneration slow mice [J]. Arch Ophthalmol, 2001, 119(9): 1329-1332.
- [7] 李翊. 应用光学相干断层扫描检测豚鼠眼底结构形态 [J]. 国际眼科杂志, 2011, 11(10): 1722-1723.
- [8] 黄丽娜, Joles Schuman, Wang N. 光学相干断层成像与组织形态学检测猴青光眼视网膜神经纤维层厚度的比较 [J]. 中华眼科杂志, 2001, 37(3): 31-35.
- [9] Schuman JS, Pedut-Kloizman T, Pakter H, et al. Optical coherence tomography and histologic measurements of nerve fiber layer thickness in normal and glaucomatous monkey eyes [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2007, 48(8): 3645-3654.
- [10] 刘东敬, 陈晓明, 孟丹, 等. 光相干断层扫描连续监测大鼠

- 慢性高血压模型视盘神经纤维厚度变化 [J]. 中华眼底病杂志, 2007, 23(5): 352-354.
- [11] Zhu BD, Li SM, Li H, et al. Retinal nerve fiber layer thickness in a population of 12-year-old children in central China measured by iVue-100 spectral-domain optical coherence tomography: the Anyang Childhood Eye Study [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2013, 54(13): 8104-8111.
- [12] Aykut V, Oner V, Tas M, et al. Influence of axial length on peripapillary retinal nerve fiber layer thickness in children: a study by RTVue spectral-domain optical coherence tomography [J]. Curr Eye Res, 2013, 38(12): 1241-1247.
- [13] Lim HT, Chun BY. Comparison of OCT measurements between high myopic and low myopic children [J]. Optom Vis Sci, 2013, 90(12): 1473-1478.
- [14] 陈伟, 傅培, 杨琦, 等. 7~18 岁近视青少年视网膜神经纤维层厚度及其影响因素的分析 [J]. 中华眼科杂志, 2010, 46(11): 1011-1015.
- [15] Kang SH, Hong SW, Im SK, et al. Effect of myopia on the thickness of the retinal nerve fiber layer measured by Cirrus HD optical coherence tomography [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2010, 51(8): 4075-4083.
- [16] 郭冉阳, 刘莉莉, 付文丽. OCT 测量视网膜神经纤维层厚度及视盘参数在青光眼早期诊断中的应用及意义 [J]. 眼科新进展, 2011, 21(9): 854-856.
- [17] Lee JY, Lee YK, Moon JI, et al. Spectral domain optical coherence tomography cross-sectional image of optic nerve head during intraocular pressure elevation [J]. Int J Ophthalmol, 2014, 7(6): 1022-1029.

[收稿日期] 2005-01-07

(上接第 271 页)

- [6] Shen B, Zhang J, Wu H, et al. Generation of gene-modified mice via Cas9/RNA-mediated gene targeting [J]. Cell Res. 2013, 23(5): 720-723.
- [7] 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.
- [8] Li D, Qiu Z, Shao Y, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system [J]. Nat Biotechnol. 2013, 31(8): 681-683.
- [9] Shan Q, Wang Y, Li J, et al. Targeted genome modification of crop plants using a CRISPR-Cas system [J]. Nat Biotechnol. 2013, 31(8): 686-688.
- [10] Feng Z, Zhang B, Ding W, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system [J]. Cell Res. 2013, 23(10): 1229-1232.
- [11] Jiang W, Bikard D, Cox D, et al. RNA-guided editing of bacterial genomes using CRISPR-Cas systems [J]. Nat Biotechnol. 2013, 31(3): 233-239.
- [12] Li W, Teng F, Li T, et al. Simultaneous generation and germline transmission of multiple gene mutations in rat using CRISPR-Cas systems [J]. Nat Biotechnol. 2013, 31(8): 684-686.
- [13] 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.
- [14] Cong L, Ran F A, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. Science. 2013, 339(6121): 819-823.
- [15] Ding Q, Regan S N, Xia Y, et al. Enhanced efficiency of human pluripotent stem cell genome editing through replacing TALENs with CRISPRs [J]. Cell Stem Cell. 2013, 12(4): 393-394.

[收稿日期] 2014-10-10



电针介导 eNOS 动员内源性 EPCs 促 MCAO/R 大鼠脑内血管再生

朱艳含, 罗勇*, 胥虹贝, 王盼欣

(重庆医科大学附属第一医院神经内科 重庆市神经病学重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】 目的 探讨内皮型一氧化氮合酶(eNOS)在电针干预下对局灶脑缺血/再灌注大鼠骨髓及外周血中内皮祖细胞(EPCs)数量变化的影响,及其促大鼠脑内血管再生的机制。**方法** 线栓法制备大鼠局灶脑缺血/再灌注模型,针刺“百会”穴及左侧“四关”穴。100只SD雄性大鼠随机分为正常组(N组)、模型组(L/R组)、模型+电针组(L/RE组)、模型+电针+L-NAME组(L/REL组)。除N组外的各组局灶脑缺血1.5h后分为再灌注1、2、7d三个亚组,每个亚组10只大鼠。在各时间点采用流式细胞术检测外周血及骨髓中VEGFR2⁺EPCs数量,荧光定量PCR技术检测缺血皮质区VEGFR2 mRNA的表达,免疫组织化学法检测缺血皮质区VEGFR2阳性细胞表达及CD34标记的微血管计数。**结果** 与L/R组比较,电针可明显提高骨髓及外周血中EPCs的数量($P < 0.01$, $P < 0.05$),而L/REL组的VEGFR2⁺EPCs数量相比于L/RE组则显著降低($P < 0.01$)。各时间点L/RE组缺血皮质区VEGFR2阳性细胞表达,VEGFR2 mRNA表达及CD34微血管计数明显高于L/R组($P < 0.01$),而L/REL组与之比较则显著减少($P < 0.01$)。**结论** 电针可动员局灶脑缺血/再灌注大鼠内源性EPCs促大鼠缺血脑区血管再生,该作用在eNOS被抑制后减弱,推测电针动员EPCs促血管再生的作用与eNOS的激活有关。

【关键词】 局灶脑缺血/再灌注;EPCs;eNOS;电针;血管再生;脑;大鼠

【中图分类号】 R743.31;Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)03-0291-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.013

Electroacupuncture promotes revascularization via eNOS mobilizing EPCs in the middle cerebral artery occlusion /reperfusion rat

ZHU Yan-han, LUO Yong, XU Hong-bei, WANG Pan-xin

(Department of Neurology, the First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University,
Chongqing Key Laboratory of Neurology, Chongqing 400016, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect and mechanism of electroacupuncture on eNOS in mobilizing endothelial progenitor cells (EPCs) in rat bone marrow and peripheral blood to promote revascularization in focal cerebral ischemia/reperfusion rat. **Methods** A total of 100 healthy male adult Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into normal group (N), model group (L/R), electroacupuncture group (L/RE) and L/RE plus L-NAME (A specific antagonist of eNOS) group (L/REL), and were further divided into 1 d, 2 d and 7 d subgroups after reperfusion, 10 rats in each group, in addition to the N group. The rats received filament occlusion of the right middle cerebral artery for 1.5 hours followed by reperfusion. “Baihui” (GV 20)/“Siguan” (Hegu LI 4/Taichong LR 3) were selected as acupuncture points. Flow cytometer was used to detect the percentage of EPCs in bone marrow and peripheral blood. The expression of VEGFR2 mRNA was tested by fluorescence quantitative PCR. Immunohistochemical staining was used to detect VEGFR2⁺ cells and to stain the CD34⁺ microvessels. **Results** Compared with the L/R group, there was a significant up-regulation of the percentage of EPCs in bone marrow and peripheral blood by electroacupuncture ($P < 0.01$, $P < 0.05$), but decreased by the inhibitor of

【基金项目】 教育部“高等学校博士学科点专项科研基金”联合资助课题(20095503110001);重庆市卫生局中医药科研重点(ZY20131027);重庆市卫生局中医药科研项目(渝中医2005-B-24)。

【作者简介】 朱艳含(1989年-),女,硕士研究生,从事脑血管病研究。Email: 337148346@qq.com

【通讯作者】 罗勇,博士,研究员,博士生导师,Tel: 023-89012307; E-mail: Luoyong1998@163.com

eNOS ($P < 0.01$). Compared with the I/R group, the VEGFR2⁺ cells, expression of VEGFR2 mRNA and CD34⁺ microvessels were significantly increased in the I/RE group ($P < 0.01$), but decreased in the I/REL group ($P < 0.01$).

Conclusions Electroacupuncture can effectively mobilize EPCs to promote the revascularization in focal cerebral ischemia/reperfusion rat. This effect is attenuated by inhibitor of eNOS, suggesting that the activation of eNOS mediated by electroacupuncture may be related to mobilizing EPCs to promote the revascularization.

【Key words】 Focal cerebral ischemia /reperfusion; EPCs; eNOS; Electroacupuncture; Angiogenesis; Brain; Rat

缺血性卒中(ischemic stroke),约占全部脑卒中的70%,严重威胁着人类的生命健康。如何改善急性脑缺血后的血供,增加缺血区的血管再生从而促进神经功能的恢复日益成为现今研究的热点。内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)是近年来发现的具有较强促血管再生能力的一种干细胞。研究表明,EPCs主要存在于机体的骨髓中,在某些病理生理环境下,可以从骨髓动员至外周血循环^[1]。当机体发生急性脑梗死时,如何更加有效地调动内源性(即骨髓内)EPCs参与脑梗死后的血管再生是目前研究的热点之一。前期研究发现电针可促进脑梗死大鼠的血流恢复及血管再生,并改善其神经功能症状^[2-4,13],但具体机制尚不十分明确。研究表明,eNOS的磷酸化可促进NO的释放并激活MMP-9,进而促进内源性EPCs的释放^[5-6]。本研究将电针与eNOS通路相结合来研究局灶脑缺血/再灌注后内源性EPCs的动员情况,进一步探讨电针治疗脑梗死的机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级成年雄性SD大鼠100只,250~300g,由重庆医科大学动物中心【SCXK(渝)2012-0002】提供,重庆医科大学附属第一医院实验研究中心【SYXK(渝)2010-0002】提供实验操作平台,并按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。100只大鼠随机分为正常组(N组)、模型组(I/R组)、模型+电针组(I/RE组)、模型+电针+L-NAME组(I/REL组),除N组外的其余三组根据局灶脑缺血1.5h再灌注后的观察时间点,分为1、2、7d三个亚组,各亚组10只。

1.2 主要试剂

兔抗大鼠VEGFR2抗体购自CST公司,Biotin-KDR购自Novus Biology公司,FITC-链球菌抗生物素蛋白购自eBioscience公司,小鼠抗大鼠CD34抗体购自Santa Cruz Biotechnology公司,L-NAME购自北京碧云天公司,免疫组化试剂盒购自北京中杉金

桥生物技术有限公司,荧光定量PCR相关试剂购自Takara公司。

1.3 动物模型制备及评判标准

线栓法制备大鼠右侧大脑中动脉局灶脑缺血/再灌注模型(middle cerebral artery occlusion/reperfusion, MCAO/R)^[7-8]。缺血1.5h。大鼠清醒后根据Longa等^[9]5分制评分标准对大鼠进行评分。以评分为2、3分为纳入标准。因各种原因不能纳入实验的大鼠,相应组别通过随机抽样原则补齐。

1.4 电针刺激方法及腹腔给药

针刺方法:选择大鼠“百会”穴(GV 20)及左侧“四关”穴(合谷LI 4/太冲LR 3)作为针刺穴位。取华佗牌不锈钢银针(直径为0.38mm,长度为1寸)一根斜刺“百会”穴;两根直刺“合谷”穴,间距约2mm;两根直刺“太冲”穴,间距约2mm。连接电针治疗仪,频率为2/20Hz,波型为疏密波,针刺20min,每日一次,强度以大鼠左侧肢体轻微颤动为宜。腹腔注射L-NAME(eNOS抑制剂):造模成功后,立即给予药物抑制组大鼠腹腔注射L-NAME,注射浓度为8mg/kg,配药浓度为8mg/mL(每8mg的L-NAME溶于1mL的生理盐水)^[10]。

1.5 取样及检测

1.5.1 取材

每组取5只大鼠到相应观察时间点时,采集腹主动脉血约2mL,流式细胞学检测备用;预冷的PBS冲出双侧后肢骨髓腔中的骨髓细胞,并调整细胞数在 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 左右,流式细胞学检测备用;流式取材完毕立即断头取脑,取大脑中动脉供血范围的缺血大脑皮质,-80℃保存,荧光定量PCR备用。各组其余5只大鼠到相应观察时间点时,经左心室内固定脑组织,取视交叉前后2mm脑组织作石蜡切片。

1.5.2 流式细胞术检测外周血及骨髓EPCs数量(EPCs占单核细胞数量的百分比)

取外周血及骨髓细胞悬液各100μL,分别加1μL兔抗大鼠VEGFR2抗体避光孵育30min,继而加2mL红细胞裂解液避光孵育5min,4℃下1500r/min离心5min,弃上清,2mL PBS重悬离心洗涤2

次之后,加 FITC 标记的二抗避光孵育 30 min,2 mL PBS 重悬离心洗涤之后用 100 μ L PBS 重悬细胞沉淀,流式细胞仪上机检测 EPCs 数量。

1.5.3 荧光定量 PCR 技术检测缺血大鼠皮质 VEGFR2 mRNA 的表达

将保存于 -80°C 的缺血大鼠皮质取出,按 Takara 说明书提取总 RNA,并逆转录成 20 μ L 体系的 cDNA。据 GenBank 提供的序列,扩增大鼠 VEGFR2 mRNA 的上游引物为 5'-GGAAAGGGTGTGTT GGT-GACTG-3',下游引物为 5'-GGTGTCCCGATAGAAG-CACT-3',产物长度 112 bp。扩增条件为预变性 95°C 30 s,PCR 反应 95°C 5 s, 60°C 30 s,40 个循环。

1.5.4 免疫组化法检测脑缺血区 VEGFR2 阳性细胞表达及 CD34 微血管计数

根据免疫组化试剂盒步骤对脑组织石蜡切片进行处理。结果的判定:VEGFR2 阳性细胞:采用 Image-Pro Plus 16.0 图像测量分析软件计算 VEGFR2 阳性细胞数(个/HP)。微血管密度:所有切片均编号,取非连续的 3 张切片,每张切片读取 2 个非连续

视野数值。缺血区微血管计数(microvessel count, MVC)结果的判定:在 200 倍视野下观察,染成棕褐色或棕黄色的细胞或细胞簇,直径 $<20\ \mu\text{m}$,与相邻的血管分界清楚,均认为是 1 条微血管。由第一作者和另 2 名经过专业训练的专业技术人员观察计数,微血管数(个/HP)为每个视野下的血管数。

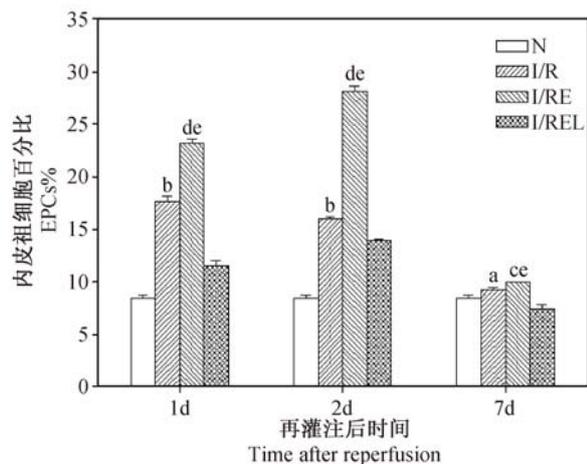
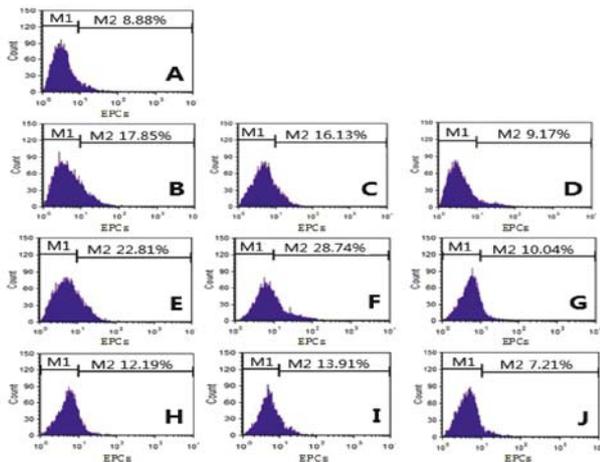
1.5.5 统计学分析

数据均用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用 SPSS 17.0 统计软件处理数据,采用单因素方差分析,组间比较用 LSD-t 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠外周血 VEGFR2⁺EPCs 数量变化情况

大鼠局灶脑缺血/再灌注损伤后 I/R 组外周血 VEGFR2⁺EPCs 数量明显高于 N 组($P < 0.05$, $P < 0.01$);I/RE 组在各时间点与 I/R 组相比均具有统计学差异($P < 0.01$, $P < 0.05$);而 I/REL 组的 VEGFR2⁺EPCs 数量相比 I/RE 组则显著降低($P < 0.01$)。见图 1。



注:A:正常组;B:模型组 1 d;C:模型组 2 d;D:模型组 7 d;E:电针组 1 d;F:电针组 2 d;G:电针组 7 d;H:药物组 1 d;I:药物组 2 d;J:药物组 7 d。a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, 与正常组比较; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$, 与模型组比较; e: $P < 0.01$, 与药物组比较。

图 1 各组大鼠外周血 VEGFR2⁺EPCs 数量的比较

Note. A, N, B; I/R 1 d; C; I/R 2 d; D; I/R 7 d; E; I/RE 1 d; F; I/RE 2 d; G; I/RE 7 d; H; I/REL 1 d; I; I/REL 2 d; J; I/REL 7 d. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$ vs. N group; c: $P < 0.05$, d: $P < 0.01$ vs. I/R group; e: $P < 0.01$ vs. I/REL group.

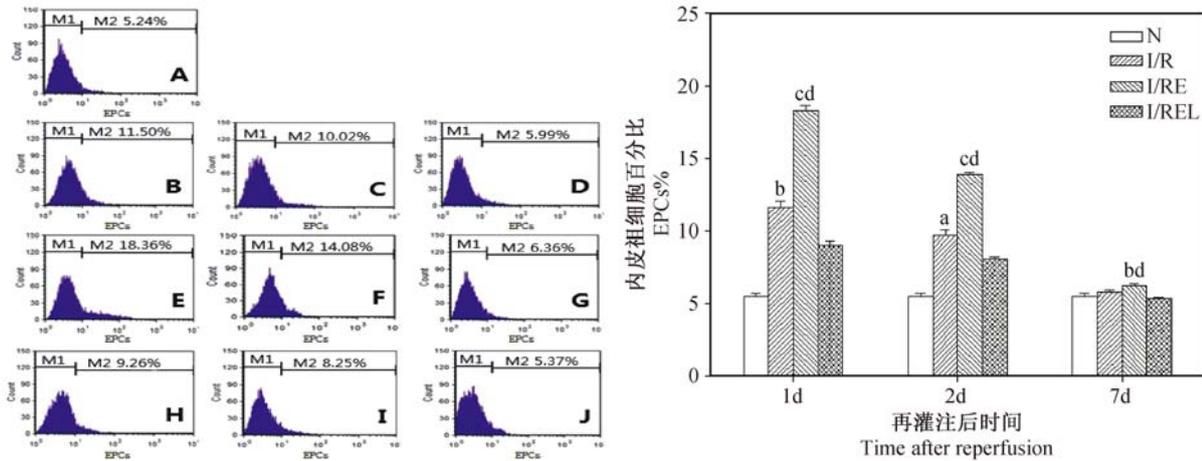
Fig. 1 Comparison of VEGFR2⁺EPCs percentage in the rat peripheral blood of each group

2.2 大鼠骨髓 VEGFR2⁺EPCs 数量变化情况

大鼠局灶脑缺血/再灌注损伤后 1、2 d I/R 组骨髓 VEGFR2⁺EPCs 数量明显高于 N 组($P < 0.01$), 7 d 时与 N 组相比无差异($P > 0.05$); I/RE 组在各时间点与 I/R 组相比有显著差异($P < 0.01$, $P < 0.05$); 而 I/REL 组的 VEGFR2⁺EPCs 数量相比 I/RE 组则显著降低($P < 0.01$)。见图 2。

2.3 大鼠局灶大脑缺血皮质区 VEGFR2 mRNA 及 VEGFR2 阳性细胞表达情况

与 N 组比较, I/R 组各时间点 VEGFR2 阳性细胞表达均增高($P < 0.01$); I/RE 组各时间点 VEGFR2 mRNA 的表达量及 VEGFR2 阳性细胞表达较 I/R 组均明显增高($P < 0.01$); 当 eNOS 被抑制后, 电针促 VEGFR2 mRNA 及 VEGFR2 阳性细胞表达作用则明显降低($P < 0.01$)。见图 3、表 1。

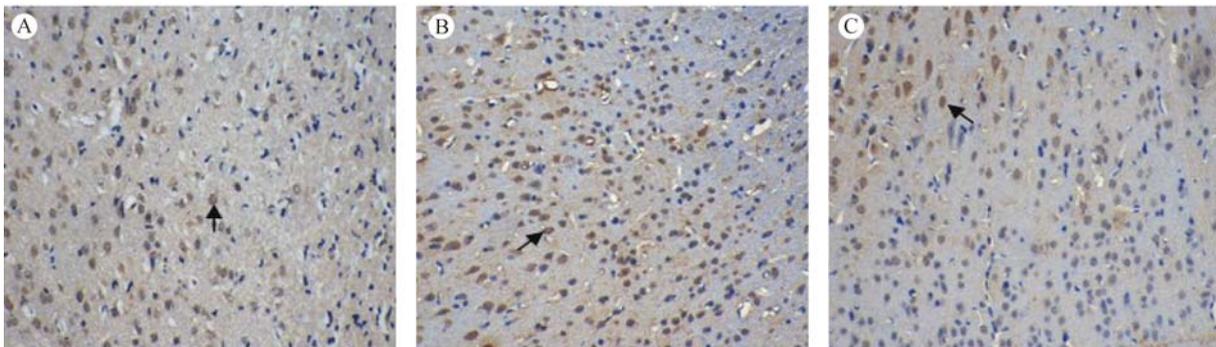


注:A:正常组;B:模型组 1d;C:模型组 2d;D:模型组 7d;E:电针组 1d;F:电针组 2d;G:电针组 7d;H:药物组 1d;I:药物组 2d;J:药物组 7d。a:与正常组比较, $P < 0.01$; b:与模型组比较 $P < 0.05$, c: $P < 0.01$; d:与药物组比较 $P < 0.01$ 。

图 2 各组大鼠骨髓 VEGFR2⁺ EPCs 数量的比较

Note. A: N; B: I/R 1 d; C: I/R 2 d; D: I/R 7 d; E: I/RE 1 d; F: I/RE 2 d; G: I/RE 7 d; H: I/REL 1 d; I: I/REL 2 d; J: I/REL 7 d. a: $P < 0.01$ vs. N group; b: $P < 0.05$, c: $P < 0.01$ vs. I/R group; d: $P < 0.01$ vs. I/REL group.

Fig. 2 Comparison of VEGFR2⁺ EPCs percentage in the rat bone marrow of each group



注:A:模型组 7 d;B:电针组 7 d;C:药物组 7 d;箭头所指为 VEGFR2 阳性细胞。

图 3 各组大鼠缺血脑皮质区 VEGFR2 阳性细胞表达情况 (×200)

Note. A: I/R 7 d; B: I/RE 7 d; C: I/REL 7 d. Arrows indicate VEGFR2-positive cells.

Fig. 3 VEGFR2-positive cells in the ischemic cerebral cortex of rats in each group (×200)

表 1 各组大鼠缺血皮质区 VEGFR2 mRNA 及 VEGFR2 阳性细胞的表达

Tab.1 The expression of VEGFR2 mRNA and VEGFR2⁺ cells in ischemic cerebral cortex of the rats in each group

组别 Groups	时间点 Time points	VEGFR2 基因表达 VEGFR2mRNA	VEGFR2 ⁺ 细胞 VEGFR2 ⁺ cells
正常组 N		-	6.8 ± 1.5
模型组 I/R	1 天 1 d	0.1503 ± 0.0106	16.2 ± 1.9 ^a
	2 天 2 d	1.0000 ± 0.0859	37.8 ± 1.6 ^a
	7 天 7 d	1.8180 ± 0.2716	103.0 ± 3.6 ^a
电针组 I/RE	1 天 1 d	0.3669 ± 0.0217 ^b	45.2 ± 1.5 ^{bc}
	2 天 2 d	2.1077 ± 0.0501 ^{bc}	62.8 ± 2.6 ^{bc}
	7 天 7 d	2.6851 ± 0.1834 ^{bc}	191.0 ± 2.5 ^{bc}
药物组 I/REL	1 天 1 d	0.3315 ± 0.0503	22.4 ± 2.4
	2 天 2 d	0.5095 ± 0.0278	30.0 ± 2.6
	7 天 7 d	0.7426 ± 0.0533	87.8 ± 2.2

注:a:与正常组比较 $P < 0.01$; b:与模型组比较 $P < 0.01$; c:与药物组比较 $P < 0.01$ 。

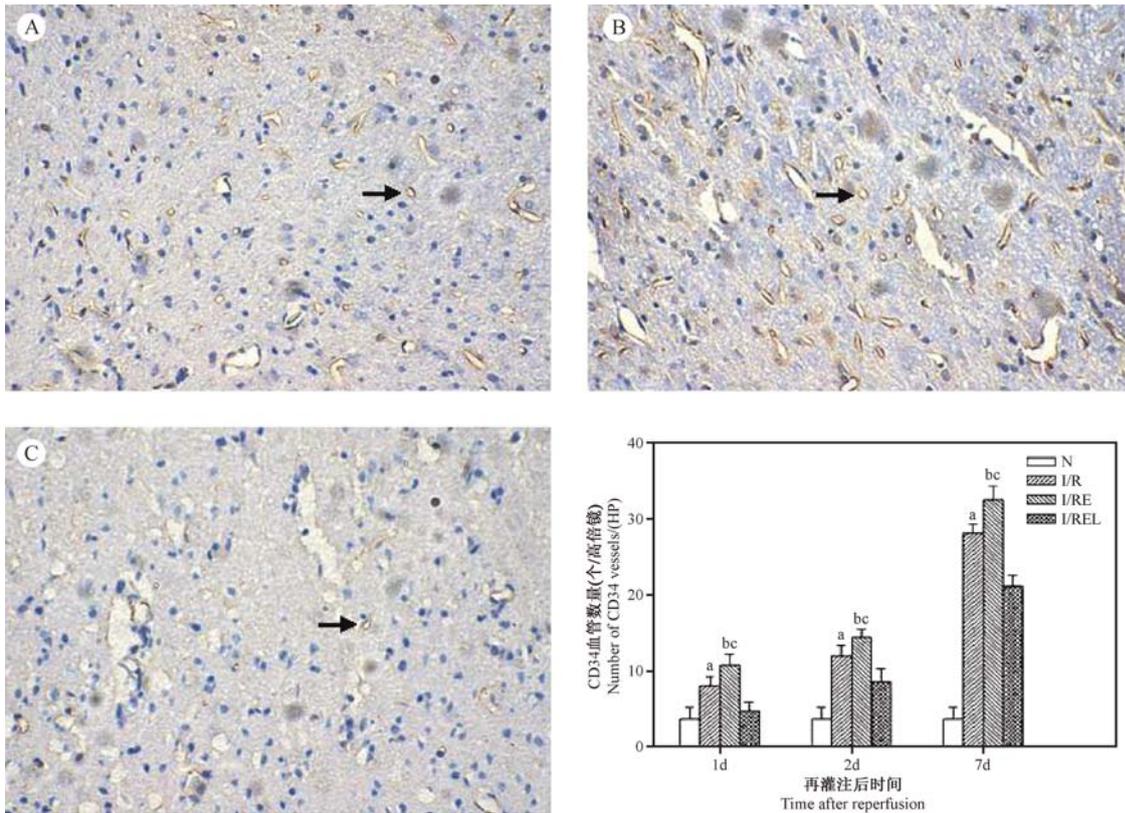
Note. a: $P < 0.01$ vs. N group; b: $P < 0.01$ vs. I/R group; c: $P < 0.01$ vs. I/REL group.

2.4 大鼠局灶性缺血皮质区 CD34 微血管计数

与 I/R 组比较, I/RE 组各时间点 CD34 微血管计数均显著增多 ($P < 0.01$), 在 eNOS 被抑制后电针促微血管生成的作用显著降低 ($P < 0.01$)。见图 4。

3 讨论

在我国针刺用于治疗脑梗死已有数千年的历史。研究表明, 电针可通过促骨髓干/祖细胞如 EPCs 等的动员来参与缺血区血管的再生^[11]。EPCs 是血管内皮细胞的前体细胞, 在成人主要存在于骨髓。在缺血缺氧等病理因素的刺激下, EPCs 可从骨髓动员出去, 并归巢至缺血靶区参与血管再生^[12-13]。现阶段关于可以准确代表 EPCs 的表面标记物的研究尚未明确, 一致认为 VEGFR2、CD34、CD31、CD133 等为主要标记物, 其中 VEGFR2⁺ EPCs 具有较强的血管修复能力^[14]。



注:A:模型组 7 d;B:电针组 7 d;C:药物组 7 d;箭头所指为 CD34⁺ 血管。a:与正常组比较 $P < 0.01$; b:与模型组比较 $P < 0.01$; c:与药物组比较 $P < 0.01$ 。

图 4 各组大鼠缺血皮质区 CD34 微血管计数的比较 (×200)

Note. A: I/R 7 d; B: I/RE 7 d; C: I/REL 7 d. Arrows indicate CD34⁺ vessels. a: $P < 0.01$ vs. N group; b: $P < 0.01$ vs. I/R group; c: $P < 0.01$ vs. I/REL group.

Fig. 4 Comparison of the number of CD34⁺ blood vessels in ischemic cerebral cortex in the rats of each group (×200)

张彤等^[15]发现电针预处理可上调局灶脑缺血/再灌注后大鼠骨髓及外周血中 VEGFR2⁺ EPCs 数量,推测电针对脑梗死的修复作用与对 EPCs 的动员有关;孙宏毅等^[12]研究表明电针治疗后局灶脑缺血/再灌注大鼠骨髓及外周血中 VEGFR2⁺ EPCs 数量明显增高,推测电针动员 EPCs 可促脑缺血区血管再生。此外,电针还可以上调局灶脑缺血/再灌注大鼠外周血中 VEGFR2⁺ PECAM-1⁺ EPCs、VEGFR2⁺ CD31⁺ EPCs、CD34⁺ EPCs 等的数量,从而促进血管再生^[16-18]。组织发生缺血后,是通过何种途径将骨髓髓内处于静止状态的 EPCs 激活并动员至外周血,进而参与缺血组织的血管再生,是目前研究的热点。

研究表明,eNOS 在干/祖细胞的动员及缺血组织的保护中起关键作用。Kim 等^[19]发现电针提高小鼠局灶脑缺血后的脑血流量及改善神经功能缺损症状的作用,在敲除 eNOS 基因的小鼠体内明显受

到抑制。Cui 等^[6]发现 eNOS 可以促进脑梗死后的血管再生,敲除 eNOS 基因的小鼠脑梗死后较野生型小鼠死亡率增高,神经功能缺损症状更为明显,在使用 NO 供体 DETA-NONOate 后明显改善。Aichner 等^[20]发现缺乏 eNOS 的小鼠,VEGF 诱导的 EPCs 的动员能力显著降低。同时,研究表明 SDF-1 α 对 EPCs 的动员作用,亦可在 eNOS 被阻断后受到抑制^[21]。提示 eNOS 在 EPCs 的动员及缺血后脑保护中处于关键地位。故本研究旨在探讨电针对 EPCs 的动员作用及对脑梗死的保护作用是否是通过 eNOS 的调控来实现的。本研究结果发现,电针可以促进局灶脑缺血/再灌注大鼠骨髓及外周血中 VEGFR2⁺ EPCs 的数量,其中骨髓内 VEGFR2⁺ EPCs 数量随大鼠缺血时间的延长逐渐减少,而外周血中 VEGFR2⁺ EPCs 数量则是先有一个增多的趋势继而再减少,可能与 VEGFR2⁺ EPCs 在机体内先由骨髓内动员至外周血,之后又归巢到缺血脑区有关;同

时,本研究发 现电针上调大鼠缺血大脑皮质中 VEGFR2 mRNA 及 VEGFR2 阳性细胞数的表达,这种作用在 eNOS 被阻断后受到抑制,有可能提示 eNOS 被阻断后,电针促局灶脑缺血后 VEGFR2 阳性细胞的归巢能力减弱;且电针治疗后大鼠缺血大脑皮质区微血管的数量生成增多,而电针的这种对脑梗死大鼠的保护作用在使用 eNOS 抑制剂后明显减弱。研究表明,电针可上调 eNOS 的表达^[22]。故我们推断电针或可通过介导 eNOS 的激活来促局灶脑缺血后骨髓 EPCs 动员至外周血,上调骨髓及外周血中 EPCs 数量,同时归巢到缺血脑区的 EPCs 数量增加,进而促进缺血大脑皮质区的血管再生。

本研究对电针动员 EPCs 的机制做了较为深入研究,既往研究发现电针一方面可以上调外周血及骨髓 EPCs 的数量,另一方面可以上调 VEGF、SDF-1 α 、eNOS 等一系列与 EPCs 动员、归巢密切相关的因子,但大多未将电针动员 EPCs 的机制与介导相关通路结合起来,仅是推测电针动员 EPCs 是通过激活 EPCs 动员相关因子来实现的,故本研究在既往的研究基础上,更加深入的探讨了电针动员内源性 EPCs,进而归巢到缺血脑区参与血管再生的机制,发现使用 eNOS 抑制剂 L-NAME 后电针对局灶脑缺血大鼠 EPCs 的动员作用及对脑血管的保护作用明显受到抑制。可见电针可通过介导 eNOS 动员内源性 EPCs 促局灶脑缺血大鼠脑内血管再生,进一步证明了电针治疗脑梗死的作用机理,为电针在临床上治疗脑梗死中提供坚实的理论依据。

参 考 文 献

- [1] Asahara T, Masuda H, Takahashi T, et al. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization [J]. *Circ Res*, 1999, 85(3): 221 - 228.
- [2] Lu T, Luo Y, Sun H, et al. Electroacupuncture improves behavioral recovery and increases SCF/c-kit expression in a rat model of focal cerebral ischemia/reperfusion [J]. *Neurol Sci*, 2013, 34(4): 487 - 495.
- [3] 唐曦,刘小卫,殷坚,等. 全经针刺法对恢复期脑梗死脑血流动力学影响的临床研究 [J]. *中国医药导报*, 2011, 8(17): 102 - 105.
- [4] 周秀丽,范为民. 电针对脑缺氧缺血新生大鼠海马结构 Nestin 与 Brdu 表达的影响 [J]. *中国医药导报*, 2008, 5(27): 9 - 11.
- [5] Cui X, Chopp M, Zacharek A, et al. Role of endothelial nitric oxide synthetase in arteriogenesis after stroke in mice [J]. *Neuroscience*, 2009, 159(2): 744 - 750.
- [6] Heissig B, Hattori K, Dias S, et al. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand [J]. *Cell*, 2002, 109(5): 625 - 637.
- [7] 罗勇,董为伟. Wistar 大鼠插线法局灶性脑缺血/再灌注模型的研究 [J]. *重庆医科大学学报*, 2002, 27(1): 1 - 4.
- [8] 包新杰,赵浩,赵英杰,等. 线栓法插线深度对大鼠脑梗死模型制备的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(3): 233 - 236.
- [9] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84 - 91.
- [10] Li XL, Zou XM, Gao P, et al. Role of nitric oxide in ischemia-reperfusion injury and acute rejection in rat intestinal transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2008, 40(10): 334 - 3345.
- [11] 孙宏毅,罗勇,卢桃利,等. 电针对局灶性脑缺血/再灌注大鼠外周血和骨髓内皮祖细胞的作用 [J]. *针刺研究*, 2012, 37(3): 179 - 185.
- [12] Orlic D, Kajstura J, Chimenti S, et al. Mobilized bone marrow cells repair the infarcted heart, improving function and survival [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001, 98(18): 10344 - 10349.
- [13] 谢宸宸,罗勇,高祥,等. 电针对局灶脑缺血/再灌注模型大鼠缺血海马区血管再生的影响及其机制 [J]. *中国实验动物学报*, 2014, 22(4): 41 - 46.
- [14] Friedrich EB, Walenta K, Scharlau J, et al. CD34⁻/CD133⁺/VEGFR-2⁺ endothelial progenitor cell subpopulation with potent vasoregenerative capacities [J]. *Circ Res*, 2006, 98(3): e20 - e25.
- [15] 张彤,林涛,王秀志,等. 电针预处理对脑缺血再灌注大鼠骨髓及血浆中 EPCs 及 VEGF 的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2009(5): 428 - 432.
- [16] 王秀志,张莉,蔡绍哲,等. 电针对脑缺血再灌注大鼠缺血局部脑血管形成的影响 [J]. *针灸临床杂志*, 2010, 26(8): 61 - 63.
- [17] 赵瑛,陈斯佳,于文娟,等. 电针刺激对脑缺血大鼠内源性 EPCs 及相关血清细胞因子的影响 [J]. *生物医学工程学报*, 2010, 27(6): 1322 - 1326.
- [18] 谢宸宸,罗勇,庞月珊,等. 电针对局灶脑缺血/再灌注大鼠骨髓及外周血 CD34⁺ EPCs 的影响 [J]. *针刺研究*, 2014, 39(4): 277 - 282.
- [19] Kim JH, Choi KH, Jang YJ, et al. Electroacupuncture acutely improves cerebral blood flow and attenuates moderate ischemic injury via an endothelial mechanism in mice [J]. *Plos One*, 2013, 8(2): e56736
- [20] Aicher A, Heeschen C, Mildner-Rihm C, et al. Essential role of endothelial nitric oxide synthase for mobilization of stem and progenitor cells [J]. *Nat Med*, 2003, 9(11): 1370 - 1376.
- [21] Zheng H, Fu GS, Dai T, et al. Migration of endothelial progenitor cells mediated by stromal cell-derived factor-1 α /CXCR4 via PI3K/Akt/eNOS signal transduction pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2007, 50(3): 274 - 280.
- [22] 卢桃利,罗勇,孙宏毅,等. 电针对局灶脑缺血再灌注大鼠大脑皮质 eNOS mRNA 及蛋白、MMP-9 蛋白表达的影响 [J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(2): 158 - 163.

[收稿日期] 2014-10-29



恒河猴 *P21* 基因在 COS-7 细胞中沉默位点的验证

李雨函¹, 苏静芬¹, 张晨², 石亮¹, 刘云波¹

(1. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021; 2. 北京大学生命科学学院, 北京 100871)

【摘要】 目的 在细胞水平筛选恒河猴 *P21* 基因的有效沉默靶点。方法 检测 COS-7 中 *P21* 基因的表达水平;设计 shRNA 并构建 *P21*-RNA 干扰慢病毒载体 FUGW-TDT-*P21*shRNA 转染 COS-7 细胞,通过 real-time PCR 检测沉默效率,并以 Western blot 在蛋白水平进行验证。结果 筛选到四个有效的靶位,分别位于 *P21* mRNA 的 541-561、542-562、215-239、624-648 bp。四个靶位点在 mRNA 水平的沉默效率分别为 $(91.82 \pm 3.21)\%$ 、 $(82.47 \pm 2.48)\%$ 、 $(81.31 \pm 2.69)\%$ 和 $(87.35 \pm 4.59)\%$ 。相应的蛋白表达量为 $(11.97 \pm 0.70)\%$ 、 $(20.22 \pm 0.65)\%$ 、 $(23.21 \pm 0.63)\%$ 和 $(14.42 \pm 0.86)\%$ 。结论 在细胞水平筛选得到四个有效的 *P21* 基因沉默靶点,可用于恒河猴基因沉默研究。

【关键词】 基因沉默; *P21* 基因;恒河猴

【中图分类号】 R743.31; Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0297-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.014

Validation of the silencing site of rhesus monkey *P21* gene in COS-7 cells

LI Yu-han¹, SU Jing-fen¹, ZHANG Chen², SHI Liang¹, LIU Yun-bo¹

(1. Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China;
2. College of Life Science, Peking University, Beijing 100871)

【Abstract】 **Objective** To screen the effective silencing targets of *P21* gene at the cellular level in rhesus monkey. **Methods** To detect the expression of *P21* gene in COS-7 cells (derived from the kidney of African green monkey, *Cercopithecus aethiops*). Four small hairpin RNA (shRNA) sequences targeting rhesus monkey *P21* gene were designed and inserted into lentivirus-based gene silencing constructs FUGW-TDT. The vectors were transfected into COS-7 cells respectively. The suppression of *P21* mRNA was detected by real-time PCR, and the expression of *P21* protein was detected by Western blot assay. **Results** Four gene-silencing sequences were screened that lied in 541-561 bp, 542-562 bp, 215-239 bp, and 624-648 bp of the rhesus monkey *P21* mRNA. Their silencing rate was $(91.82 \pm 3.21)\%$, $(82.47 \pm 2.48)\%$, $(81.31 \pm 2.69)\%$ and $(87.35 \pm 4.59)\%$, and the protein expression was $(11.97 \pm 0.70)\%$, $(20.22 \pm 0.65)\%$, $(23.21 \pm 0.63)\%$ and $(14.42 \pm 0.86)\%$, respectively. **Conclusions** Four effective silencing target sequences are screened at cellular level, which can be used in gene silencing research of rhesus monkeys.

【Key words】 Gene silencing; *P21* gene; Rhesus monkey

与目前广泛使用的啮齿动物相比,非人灵长类动物在生理、发育、行为、免疫以及基因背景与人类更加相近。在药物研发和安全性评价中,为减少啮齿动物与人类基因背景差距所带来的不稳定性

局限性,非人灵长类已成为重要的肿瘤研究和药物评价的实验动物^[1]。

虽然一直有非人灵长类自发神经、消化道等肿瘤的报道,但因发生率较低难以用其自发肿瘤作为

【基金项目】 国家科技支撑计划(No. 2014BAI03B01)。

【作者简介】 李雨函(1986-),女,研究方向:实验动物质量控制。E-mail: liyuhangz@sina.com

苏静芬(1987-),女,硕士研究生,研究方向:实验动物学。E-mail: jingfensu@126.com

李雨函和苏静芬为本文共同第一作者

【通讯作者】 刘云波, E-mail: yunbolu@126.com

研究模型^[2]。此外,在研究中由于非人灵长类动物个体间基因背景差异明显,对统计的分析要求较复杂,明显的个体基因差异也影响研究结果的解释。因此,利用癌症相关基因和基因工程技术建立和发展非人灵长类肿瘤模型动物为癌症机制的研究和抗癌药物研发以及临床前实验服务具有重要意义^[3]。

P21 (*Waf1/Cip1/Sdi1*) (文中简称 *P21*) 是细胞周期素依赖性激酶抑制因子,属于 CIP 家族。*P21* 具有广泛的 CDK 抑制活性,因其作用于细胞周期减少受损 DNA 的复制和积累,发挥抑癌作用,长期以来被认为具有抑制肿瘤的功能。近些年对 *P21* 的研究发现在 *Trp53*^{-/-} 和 *Atm*^{-/-} 小鼠自发性淋巴瘤中 *P21* 并没有抑制肿瘤的发生,因此有提出在特定的细胞环境和条件下 *P21* 有可能是致癌基因^[4,5]。*P21* 在癌症发生和发展中的功能非常重要,而其作用并不完全清楚。为利于以后建立相应基因沉默动物模型、深入研究 *P21* 在肿瘤发生及发展中的作用和功能,本研究从细胞水平筛选并确定了恒河猴 *P21* 基因的沉默靶点,为进一步探讨 *P21* 的功能作用奠定细胞水平的基础研究。

1 材料和方法

1.1 材料

COS-7 购自中国医学科学院基础研究所细胞中心, Vero, Vero-E6 购自 ATCC 细胞库。含有 ubiquitin promoter (Ubi promoter) 调控的红色荧光蛋白 tandem dimer tomato (tdt) 报告基因的 FUGW-TDT 慢病毒载体由北京大学实验室保存。胎牛血清 (FBS)、胰蛋白酶为 Invitrogen-Gibco 公司产品。细胞培养基 DMEM 购自 Hyclone; 质粒提取试剂盒购自 Promega; 逆转录试剂盒购自 Invitrogen; PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司; *E. coli* DH5 α 感受态细胞购自全式金公司; 鼠抗猴 *P21* 单克隆抗体, 购自 Santa Cruz 公司; HRP 标记的羊抗鼠-HRP 购自 Sigma; PCR 检测引合成及测序均由 Invitrogen 公司提供; β -actin 抗体购自上海康成生物; Xho I 和 Xba I 购自 NEB。

1.2 shRNA 的设计

Life technology 在线 shRNA 设计工具, 根据 NCBI 数据库中恒河猴 *P21* 基因的序列 (NM_00194722.2), 依照 shRNA 设计原则, 选择五个靶点设计 shRNA 序列 (序列见表 1)。靶点均与非洲绿猴 *P21* 基因同源。设计网址为 (<http://rnaidesigner.lifetechnologies.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=261946071111563135>)。

lifetechnologies.com/rnaiexpress/setOption.do?designOption=shrna&pid=261946071111563135)。

1.3 P21-RNA 干扰慢病毒载体的构建和鉴定

载体构建参考文献^[6]。用 Xho I 和 Xba I 对 FUGW-TDT 载体进行酶切消化, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收、纯化后备用。载体与需要导入的 shRNA 按比例混合 16 $^{\circ}$ C 过夜连接后转化至 *E. coli* DH5 α 中, 37 $^{\circ}$ C 培养后挑取单菌落培养后进行菌液鉴定及测序 (引物均为 F: 5'-AGGAAGATGGCTGTGAGG-3'; R: 5'-GCCTTGATCGTATAAGC-3', 提取阳性克隆菌液质粒, 命名为 FUGW-TDT-P21shRNA。本实验的阴性对照为未导入 shRNA 的空载 FUGW-TDT 空质粒。

1.4 细胞培养与慢病毒质粒转染

用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 培养箱中常规培养上述细胞。在六孔板中按每孔 (6~8) $\times 10^5$ 细胞种细胞, 24 h 内细胞密度达 70%~80% 时进行转染。实验分空载质粒组 (阴性对照) 和 FUGW-TDT-shP21 质粒组。其中质粒组分别为四个针对不同靶点设计的质粒。转染按照 Polyethylenimine (PEI) 试剂说明操作, 48 h 后观察荧光。

1.5 RT-PCR 检测各组细胞中 mRNA 的表达

收集各组细胞按照 Invitrogen Trizol Reagent 说明书分别提取细胞总 RNA, 测量其浓度后按试剂盒说明进行逆转录和 PCR。*P21* 基因引物为 F: 5'-CGAAGTCAGTTCCTTGTGGG-3', R: 5'-CATTAGCGCATCACAGTCGC-3' 预计扩增出 188 bp 左右的目的片段。内参 GAPDH, 其引物序列参考文献^[7], F: 5'-ACATCATCCCTGCCTCTACTG-3', R: 5'-AGTGGGTGTCGCTTTGAAGTC-3', 预计扩增出 261 bp 左右的目的片段。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.6 Western blot 检测各组细胞中 P21 蛋白的表达

转染细胞 48 h 后弃掉细胞培养液、吸净残液, 加入预冷的 1 \times PBS 冲洗两次后加入 1 \times SDS 裂解液, 均匀吹打细胞后收集裂解产物, 高速离心后收取上清测定总蛋白浓度。SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳用 8% 的分离胶以及 4% 的积层胶, 总蛋白上样量为 20 μ g。转膜后加鼠抗猴 *P21* 单克隆抗体 (1:1000) 封闭液 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, 1 \times PBS 充分洗膜后加

入 HRP 标记的羊抗鼠 IgG (1: 5000) 封闭液孵育 3 h, 曝光、显影后用 Image J 软件进行灰度扫描分析。

1.7 统计分析

进行方差齐性检验后采用 Fisher 检验, $P < 0.05$ 认为差异有显著性。

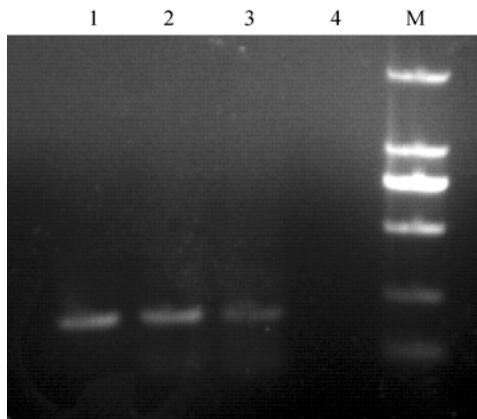
表 1 恒河猴 P21 基因沉默靶点

Tab. 1 The sites of P21 gene silencing in the rhesus monkeys

质粒名称 Plasmids	靶点 Sites	序列 Sequences	位置 Positions
FUGW-TDT-P21shRNA-1	1	GGCTGATCTTCTCCAAGAGGA	541 ~ 561
FUGW-TDT-P21shRNA-2	2	GCTGATCTTCTCCAAGAGGAA	542 ~ 562
FUGW-TDT-P21shRNA-3	3	GCGATGGAACCTCGACTTTGTCACC	215 ~ 239
FUGW-TDT-P21shRNA-4	4	CTACATCTTCTGCCTTAGCTTTAA	624 ~ 648

2.2 细胞中 P21 丰度的检测

选取 Vero、Vero-E6、COS-7 三种细胞提取 RNA 后逆转录为 cDNA, 普通 PCR 后电泳检测 P21 丰度 (图 1)。结果显示三种细胞 P21 的丰度均较高, 但实验中 COS-7 比 Vero、Vero-E6 更易转染, 因此本研究室优先选取 COS-7 用于基因抑制效率检测。



注: 图示为 P21 在三种细胞中的丰度, 1. COS-7; 2. Vero; 3. Vero-E6; 4. H₂O 为阴性对照。M: marker。

图 1 P21 细胞丰度检测

Note. This is the abundance of three types of cells, 1. COS-7, 2. Vero cells, 3. Vero-E6 cells, 4. H₂O as the negative control, M; marker.

Fig. 1 Detection of the P21 abundance

2.3 检测转染细胞中 P21 基因 mRNA 的表达

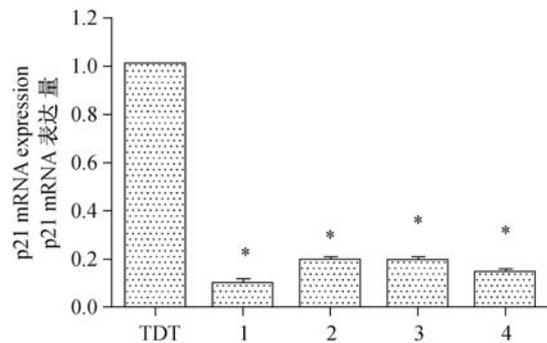
转染 48 h 后提取 RNA, RT-PCR 检测 P21 mRNA 在 COS-7 细胞中的表达, trizol 法提取 RNA, 逆转录后进行 real-time PCR, 按 2^{-ΔΔCt} 法进行计算。与空载 FUGW-TDT 质粒相比, 四个靶位点在 P21 mRNA 水平的沉默效率均明显 ($P < 0.05$), 其中 FUGW-TDT-P21shRNA-1 的沉默效率为 (91.82 ± 3.21)%, FUGW-TDT-P21shRNA-2 的沉默效率为

2 结果

2.1 恒河猴 P21 基因沉默靶点和 shRNA

Life technology 在线设计 shRNA 序列, 在恒河猴 P21 mRNA 中的位置见表 1。

(82.47 ± 2.48)%, FUGW-TDT-P21shRNA-3 的沉默效率为 (81.31 ± 2.69)%, FUGW-TDT-P21shRNA-4 的沉默效率为 (87.35 ± 4.59)% (图 2)。



注: 对照组 FUGW-TDT; 1. FUGW-TDT-P21shRNA-1; 2. FUGW-TDT-P21shRNA-2; 3. FUGW-TDT-P21shRNA-1; 4. FUGW-TDT-P21shRNA-4. $n = 4$, * 代表与对照组 FUGW-TDT 比较 $P < 0.05$ 。

图 2 SYBR-Green 法 real-time PCR 检测 P21 基因 mRNA 的表达

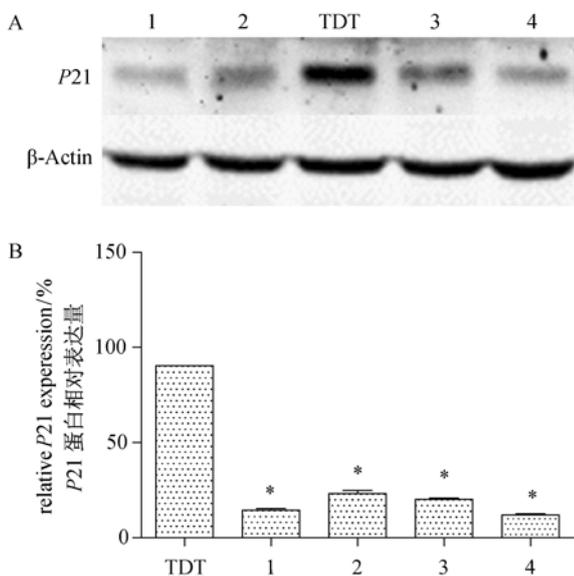
Note. Control group FUGW-TDT; 1. FUGW-TDT-P21shRNA-1; 2. FUGW-TDT-P21shRNA-2; 3. FUGW-TDT-P21shRNA-1; 4. FUGW-TDT-P21shRNA-4. $n = 4$, * means $P < 0.05$, compared with the control group FUGW-TDT.

Fig. 2 Detection of P21 mRNA by real-time PCR

2.4 FUGW-TDT shRNA 对 cos-7 细胞中 P21 蛋白表达的抑制作用

Western blot 检测 COS-7 细胞中 P21 的表达量, 结果显示 P21 shRNA 转染的细胞 P21 蛋白的表达量较对照组明显减少。经图像软件进行灰度分析, 其中 FUGW-TDT-P21shRNA-1 转染后细胞 P21 表达量为 (11.97 ± 0.70)%, FUGW-TDT-P21shRNA-2 转染后细胞 P21 表达量为 (20.22 ± 0.65)%, FUGW-TDT-P21shRNA-3 转染后细胞 P21 表达量为 (23.21 ± 0.63)%, FUGW-TDT-P21shRNA-4 转染后细胞

P21 表达量为 $(14.42 \pm 0.86)\%$ (图 3)。Western blot 显示的结果和 real-time PCR 保持一致,四个靶位点在 *P21* 蛋白水平的沉默效率明显。



注: A. Western Blot 结果; B. 灰度扫描图像分析结果。1. FUGW-TDT-shp53-1; 2. FUGW-TDT-shp53-2; 3. FUGW-TDT-shp53-3; 4. FUGW-TDT; $n=4$, * 表示 $P < 0.05$ vs 对照组 FUGW-TDT。

图 3 Western Blot 检测 COS-7 细胞中 *P21* 蛋白的表达量

Note. A. The results of Western blot; B. The result of Image J scan. 1. FUGW-TDT-P21shRNA-1; 2. FUGW-TDT-P21shRNA-2; 3. FUGW-TDT-P21shRNA-1; 4. FUGW-TDT-P21shRNA-4. $n=4$, * means $P < 0.05$ vs. control group FUGW-TDT.

Fig. 3 Detection of *P21* protein by Western blot.

3 讨论

在 *CDKN1A*^{-/-} 小鼠发生自发性肿瘤是 *P21* 首次从基因学证明其具有抑癌作用,虽然人类的直肠癌、宫颈癌、脑颈部癌症、肺癌等大多数癌症的发展都与 *P21* 的表达相关,但并没有证明 *CDKN1A* 的变异使 *P21* 的功能完全丧失,但可以说明 *P21* 在抑癌作用中发挥着重要作用,和其他一些抑癌因子共同调节抑制肿瘤发生和恶化^[8]。*P21* 与肿瘤的分化、浸润深度、增生和转移有关,具有判断预后的价值。

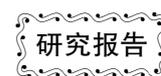
现有研究发现在特定条件下 *P21* 的错误调控和表达也会致癌。在人类前列腺癌、乳腺癌、鳞状细胞癌都有 *P21* 过量表达,虽然没有直接证据证明 *P21* 过量表达与癌症直接相关,或是此类发现有可能是受到化疗和放疗的影响,但 *P21* 是致癌基因的理论在少量基因小鼠的研究中已被发现^[4,9]。

本研究中 real time PCR 和 Western blot 分析 RNA 干扰的 COS-7 细胞中 *P21* mRNA 水平和蛋白表达量均比对照组显著降低,且二者结果一致,有助于建立 *P21* 沉默的恒河猴模型。

参 考 文 献

- [1] Eastmond DA, Vulimiri SV, French JE, et al. The use of genetically modified mice in cancer risk assessment: challenges and limitations [J]. Crit Rev Toxicol, 2013, 43(8): 611-31.
- [2] Cianciolo RE, Butler SD, Eggers JS, et al. Spontaneous neoplasia in the baboon [J]. Med Primatol, 2007, 36(2): 61-79.
- [3] Eric JV, Gregory MM. Nonhuman primate models in the genomic era: a paradigm shift [J]. ILAR J, 2013, 54: 154-165.
- [4] De la Cueva E, García-Cao I, Herranz M, et al. Tumorigenic activity of *P21*Waf1/Cip1 in thymic lymphoma [J]. Oncogene, 2006, 25: 4128-4132.
- [5] Wang YA, Elson A, Leder P. Loss of *P21* increases sensitivity to ionizing radiation and delays the onset of lymphoma in atm-deficient mice [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94(26): 14590-14595.
- [6] 苏静芬, 张晨, 李雨函, 等. 恒河猴 p53 基因沉默靶点在细胞水平的验证 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 8(24): 7-10.
- [7] Zhou HW, Lou SQ, Zhang K. Recovery of function in osteoarthritic chondrocytes induced by 16INK4a-specific siRNA in vitro [J]. Rheumatology, 2004, 43: 555-568.
- [8] McKenzie KE, Siva A, Maier S, et al. Altered WAF1 genes do not play a role in abnormal cell cycle regulation in breast cancers lacking p53 mutations [J]. Clin Cancer Res, 1997, 3(9): 1669-1673.
- [9] Roninson IB. Oncogenic functions of tumour suppressor *P21*Waf1/Cip1/Sdi1: association with cell senescence and tumour-promoting activities of stromal fibroblasts [J]. Cancer Lett, 2002, 179: 1-14.

[收稿日期] 2014-06-09



系统性念珠菌感染小鼠模型的制备

吴玉娥¹, 李航², 陈梅玲¹, 龚宝勇¹, 张钰¹, 黄韧^{1*}

(1. 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663; 2. 广东药学院, 广州 510224)

【摘要】 目的 建立稳定的系统性念珠菌感染小鼠模型, 规范其操作方法。方法 采用环磷酰胺(CY)对小鼠进行免疫抑制后, 选择白色念珠菌(*C. albicans*)和非白念珠菌(*C. parapsilosis*)分别接种 ICR 小鼠, 从免疫抑制、菌株制备、接种剂量和接种途径等方面对建模过程进行质量控制, 通过生存分析、组织载菌量和病理学检查对模型进行评价。结果 建立的系统性念珠菌感染小鼠模型显示肾脏为靶器官, 多器官弥散性真菌感染的典型病理组织学改变。结论 通过对建模过程各环节进行规范, 可得到稳定的系统性念珠菌感染小鼠模型, 该模型可应用于系统性念珠菌感染的致病机理, 免疫防御及抗真菌药物筛选等研究领域。

【关键词】 念珠菌; 动物模型; 小鼠; 感染

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0301-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.015

Preparation of a murine model of systemic *Candida albicans* infection

WU Yu-e¹, LI Hang², CHEN Mei-ling¹, GONG Bao-yong¹, ZHANG Yu¹, HUANG Ren¹

(1. Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China; 2. Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510224, China)

【Abstract】 To establish a stable mouse model of systemic *Candida* infection and to set up related standard operation procedure. **Methods** ICR mice were infected with *C. albicans* or *C. parapsilosis* by tail vein injection after immunosuppression by cyclophosphamide. The quality control key points included immunosuppression, strain preparation, inoculation doses and the route of inoculation. Survival analysis, bacterial loads and pathological examination were performed to evaluate the prepared model. **Results** The developed model showed fungal-specific lesions in multiple organs, especially in the kidneys revealed by histopathological examination. **Conclusions** A stable mouse model of systemic *Candida albicans* infection can be successfully established by following standardized operation procedure. This mouse model may provide a useful tool for studies on pathogenesis and immune defense of fungal infection and new anti-fungal drug development and so on.

【Key words】 *Candida albicans*; Animal model; Mouse; Fungal infection

动物模型是研究感染性疾病发病机制的主要工具^[1,2]。因其可在整体动物上模拟病原和宿主(人)间的复杂作用,并且可以避免伦理问题直接研究病原对动物的组织或因子的作用,动物模型具有体外试验不可比拟的优势。近年来,临床上侵袭性念珠菌感染的发病率和死亡率不断上升,相对应出现了许多真菌感染的动物模型研究。根据不同的研究目的,研究者们通常会选择不同的动物种类和感染途径来建立动物模型,但目前最为常用的还是静脉感染小鼠模型^[3]。本实验室长期进行念珠菌感染动物模型研究,

在系统性念珠菌感染小鼠模型建立上积累了丰富的经验。我们的建模方法稳定,具可重复性,已成功应用于念珠菌毒力研究及抗真菌药物筛选^[4]。本文主要从菌株制备、静脉接种、剂量选择及模型评价等方面对模型建立的每个关键步骤进行详细描述,希望为其他科研工作者提供参考和帮助。

1 材料与方法

1.1 菌株

白色念珠菌(*C. albicans*) SC5314、CaR、CaS、

[基金项目] 广东省科技计划项目(No. 2010B060500019)资助。

[作者简介] 吴玉娥(1978-),女,助理研究员,E-mail: jadejoanjadejoan@163.com

[通讯作者] 黄韧(1959-),男,博士,研究员,E-mail: labking@sohu.com

CaDel、CaCoM-A、CaCoM-B 及非白念珠菌 (*C. parapsilosis*), 均为中国科学院微生物研究所张立新博士馈赠。

1.2 实验小鼠

SPF 级 ICR 小鼠, 体重 22 ~ 26 g, 4 ~ 6 周龄, 购于上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK(沪)2012-0002】。动物实验在负压感染动物实验室进行【SYXK(粤)2012-0122】。动物实验开展经广东省实验动物监测所动物使用和管理委员会审批。

1.3 免疫抑制

环磷酰胺(江苏恒瑞制药厂)腹腔注射, 1 次/24 h, 共注射 3 次, 注射剂量为 100 mg/kg, 第 4 天进行念珠菌接种。

1.4 菌株制备

1.4.1 菌体培养

(1) 从 -80℃ 冰箱取出菌液, 解冻。使用灭菌接种环把解冻后的菌液接种到固体 YEPD 平板上, 30℃ 培养 26h, 观察菌体有无生长, 是否污染。

(2) 确定无污染后, 从培养皿上挑选单个菌落用无菌接种环接种到液体 YEPD^[2] 中, 30℃ 摇床培养 16 h, 200 r/min。

(3) 观察液体 YEPD 浑浊度, 浑浊为接种成功。

(4) 菌落形态观察: 取 1 滴乳酚甲苯胺蓝染色液加入 1 滴菌液, 混匀, 盖上盖玻片, 显微镜镜检。

1.4.2 分装保存

(1) 在超净工作台上将接菌成功的液体 YEPD 倒入已灭菌的 45 mL 离心管中, 离心 (3000 r/min, 10 min)。

(2) 丢弃上层液体, 加入适量灭菌生理盐水, 吹打混匀, 离心 (3000 r/min, 10 min)。重复二次。

(3) 丢弃上层液体, 加入适量灭菌生理盐水, 吹打混匀。使用 20% 无菌甘油-生理盐水配置成一定体积, 取 100 μL 于包被板中, 每个样品至少加两孔。用酶标仪测其 A 值, 使其 A 值达到 0.35 ~ 0.4 [此时菌液浓度为 (3 ~ 5) × 10⁷ CFU/mL], 分装置于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.4.3 接菌前浓度调整

于 -80℃ 冰箱内取出备用菌液, 解冻后置于 36℃ 培养箱中复苏 1 h, 按照预计接菌浓度对菌液进行梯度稀释。例如, 预计接种浓度为 (3.0 ~ 5.0) × 10⁵ cells/mL, 则将菌液稀释 100 倍。留取 1 mL 稀释后的菌液, 用于确定实际接菌浓度。

1.4.4 确定实际菌液浓度

菌液经 10 倍梯度稀释, 选择三个稀释度的菌液, 分别取 0.2 mL 加入固体无菌 YEPD 培养基, 使

用灭菌的玻璃涂棒涂布均匀。30℃ 培养箱培养 36 h, 计算菌落数目, 菌落数在 30 ~ 300 之间的稀释度有效。按下面公式计算出菌液的含菌数: 每毫升原菌液活菌数 = 同一稀释度三个重复平皿菌落平均数 × 稀释倍数 × 5。

1.4.5 菌株保存稳定性测试

按照 1.4.3 和 1.4.4 所述, 对 -80℃ 冰箱保存的菌株 (以 CaR, CaS, CaDel, CaCoM-A 和 CaCoM-B 为例) 定期取出进行稳定性测试。

1.5 静脉接种

采用 1 mL 注射器, 每只小鼠经尾静脉接种酵母型菌进行感染。接种当天秤量每只小鼠体重, 根据体重确定每只小鼠的接种剂量, 常用接种剂量为 0.2 mL 菌液/20 g 小鼠。

1.6 模型评价指标

生存情况: 感染动物以死亡为评价指标。接种后, 每天观察小鼠两次, 连续观察 14 d。当发现下列情况中任何两项时, 安乐死小鼠, 以减少对其的疼痛和应激。① 弓背、被毛松乱; ② 体重下降超过起始体重的 20%; ③ 体温降低, 触之冰冷; ④ 活动明显减少; ⑤ 不能进食; ⑥ 斜颈或原地打转。在进行生存观察时, 将安乐死小鼠死亡时间记录到下一天。一般采用生存曲线对感染小鼠的生存情况进行描述, 采用 Log-rank test 统计方法对生存曲线进行比较分析, $P < 0.05$ 时认为差异有统计学意义^[5]。

靶器官载菌量检测: 在染菌后的第 2 天、4 天和 6 天, 每组至少取 3 只小鼠, 采集心、肝、脾、肺、肾和脑, 称重后加入 1 mL 无菌生理盐水研磨成匀浆液, 进行 10 倍梯度稀释, 选择适当的稀释浓度, 取 0.2 mL 接种于 YPD 固体培养基, 30℃ 培养箱培养 36 h, 进行菌落计数。菌落数在 30 ~ 300 之间的匀浆液稀释度有效。计算组织的载菌量 log CFU/g。CFU/g = 3 个培养基的 CFU 的平均数 × 5 × 匀浆液体积 (mL) × 稀释倍数 ÷ 组织重量 (g)

病理组织学检测: 取小鼠主要靶器官心、肝、脾、肺、肾和脑, 中性福尔马林溶液固定后, 进行常规病理切片, 行 HE 和 PAS 染色。

2 结果

2.1 菌体形态学观察结果

以 CP 菌为例, 从 -80℃ 冰箱取出的菌种经培养, 镜检显示, CP 菌的形态处于酵母型, 未见假菌丝的出现 (图 1)。经台盼蓝染色镜检, 显示 90% 的菌体为活菌体。

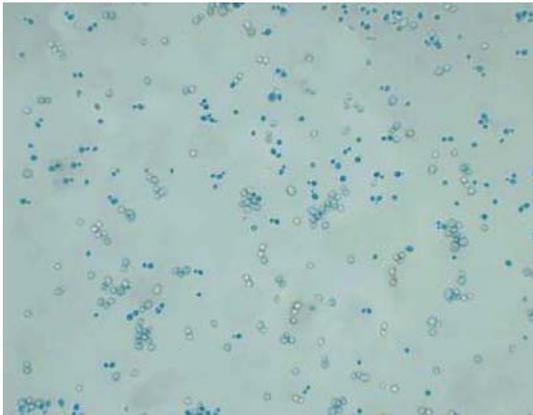


图 1 *C. parapsilosis* 形态观察(酵母型菌体形态)

Fig. 1 Morphologic observation of the *C. parapsilosis* (yeast type)

2.2 菌株保存稳定性测试结果

经过 7 个月的测试, CaR、CaS、CaDel、CaCoM-A 和 CaCoM-B 5 个菌株的活菌数一直保持稳定状态, 见图 2 所示。

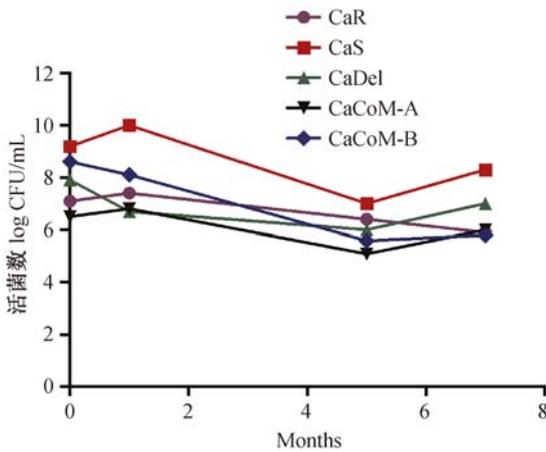


图 2 菌株保存稳定性测试结果

Fig. 2 Results of strains preservation stability test

2.3 免疫抑制结果

正常小鼠外周血白细胞总数约为 $(7 \sim 8) \times 10^9$ 个/L, 小鼠注射 CY 后第 1 天开始, 外周血白细胞总数出现明显下降趋势, 注射后第 4 天降至最低点约 1.6×10^9 个/L。第 5 天开始小鼠外周血白细胞总数开始回升, 至注射后第 8~12 天, 基本恢复到正常水平, 见图 1。根据实验结果, 我们选择免疫抑制后白细胞计数最低点(CY 给药后第 4 天)进行念珠菌接种。

2.4 生存情况

采用生存曲线对感染小鼠的生存情况进行描述和分析。选择相同接种剂量 (1.0×10^5 CFU/mL),

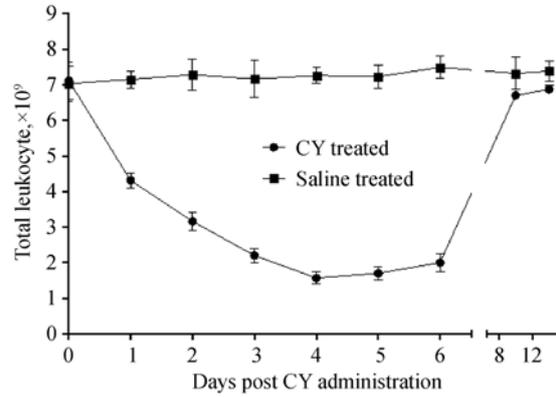


图 3 小鼠接种 CY 后外周血白细胞总数变化

Fig. 3 Total leukocyte counts in the cyclophosphamide-treated mice

CaR、CaDel、CaCoM-A 和 CaCoM-B 四个菌株引起小鼠死亡情况相近, 中位生存间分别是 7、8、7 d 和 6 d。采用 log-rank test 统计方法对生存曲线进行比较分析, 各组间无统计学差异。该结果说明在相同接种剂量下, 4 个菌株对小鼠的毒力无差异。见图 4 所示。

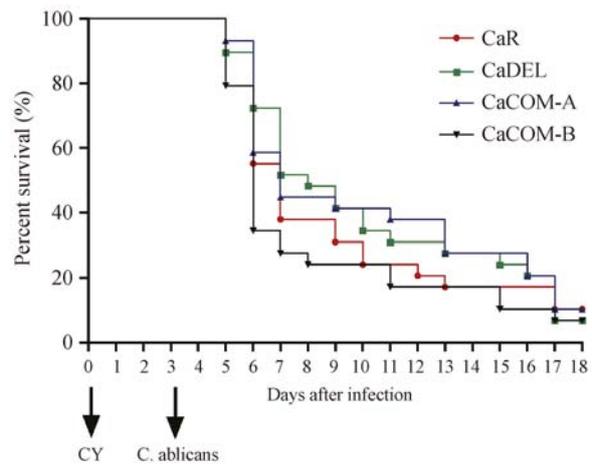


图 4 小鼠接种 CaR、CaDel、CaCOM-A 和 CaCOM-B 四个菌株后的生存情况

Fig. 4 Survival curves of the mice after inoculation of CaR, CaDel, CaCOM-A and CaCOM-B strain *Candida*

2.5 组织载菌量

在系统性真菌感染小鼠模型, 肾脏是真菌感染的主要靶器官。以 SC5314 为例, 接种剂量为 1.0×10^4 CFU/mL, 小鼠感染后第 2~4 天组织载菌量达高峰, 以肾脏载菌量最高, 可达到 $10^6 \sim 10^8$ CFU/g, 其他脏器如肝脏、脑、脾脏和肺脏等组织载菌量一般在 10^4 CFU/g, 随着感染时间延后, 各组织载菌量逐渐下降, 见图 5 所示。

2.6 组织病理变化

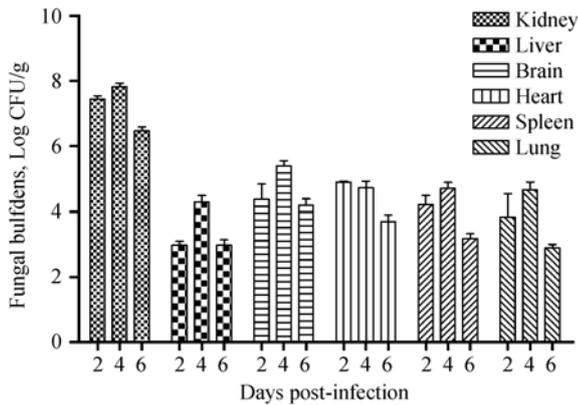


图 5 小鼠接种 SC5314 后各脏器组织载菌量变化

Fig. 5 Dynamic changes of tissue fungal burdens after SC5314 inoculation in the mice

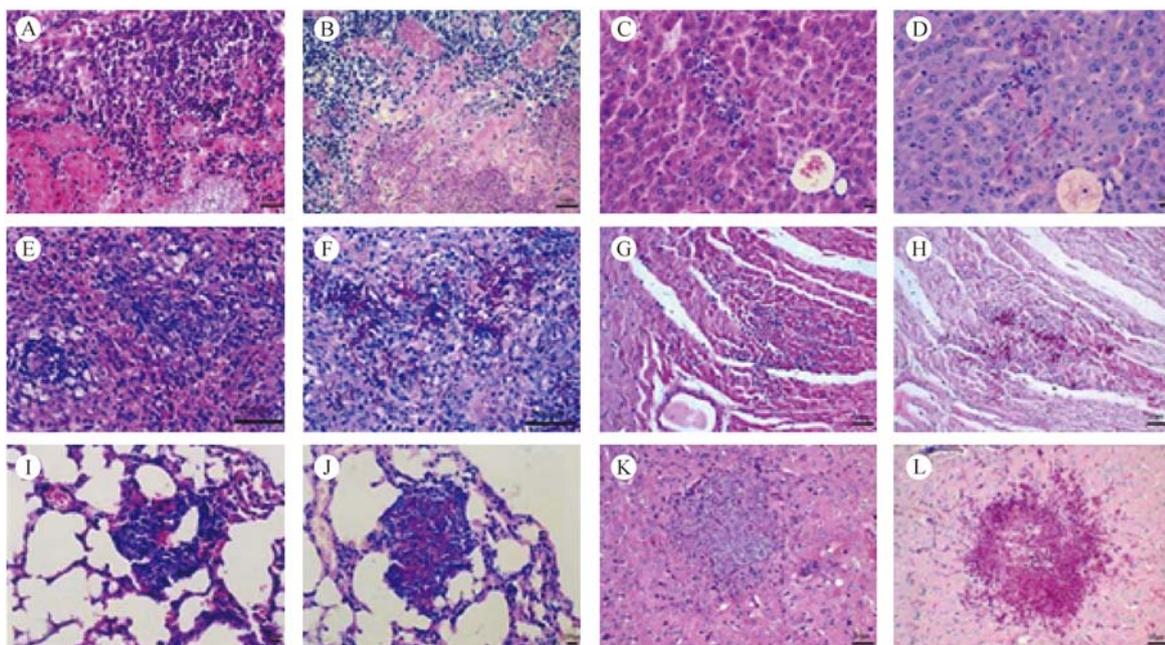
病理组织学观察显示以肾脏为靶器官,多器官弥散性真菌感染的典型病理组织学改变。除肾脏外,心脏、脑、肺、肝和脾亦可见真菌浸润病灶,见图 6 所示。

3 讨论

念珠菌形态学上的双向性与其毒力密切相关。在念珠菌弥散性感染小鼠模型建立过程中,菌体形

态是重要的质控要素。白色念珠菌和近平滑念珠菌 (*C. parapsilosis*) 均属于双向型真菌,在不同营养因素、化学因素或其他物理因素的作用下,可以由一种形态(酵母相)转变成另一种形态(菌丝相),当念珠菌从酵母相转变为菌丝相后,其毒力明显增强^[6]。我们在实验中发现,当给予免疫抑制小鼠接种 1.0×10^6 个/mL 菌丝型 *C. parapsilosis* 菌,可造成小鼠 48 h 内全部死亡;当给予免疫抑制小鼠接种相同剂量的酵母型菌,则小鼠全部死亡时间推迟为 8 天。菌丝型菌毒力明显增强,能使动物快速死亡,不适合建立动物模型。因此,严格进行菌体培养条件的质控,使注入实验动物体内的菌体为处于对数生长期的酵母型菌,是模型成功的关键。

真菌感染的发生是病原体、宿主及环境间相互作用的结果,念珠菌侵入人体后是否发病不仅取决于病原体的数量、毒力及入侵途径,也取决于宿主自身的免疫防御能力及各种外界因素的综合影响。临床上弥散性念珠菌病患者均处于不同程度的免疫缺陷状态^[7,8]。因此,为了模拟临床致病条件,在念珠菌弥散性感染小鼠模型的建立过程中首先要实现小鼠的免疫抑制。实验用形成免疫抑制的方法有多种,主要有抗肿瘤药阿糖胞苷,免疫抑制剂及激素可的松等。我们采用给小鼠注射免疫抑制剂环磷酰胺



注:A, C, E, G, I 和 K 分别为肾,肝,脾,心脏,肺和脑的 H.E. 染色切片。B, D, F, H, J 和 L 分别为肾,肝,脾,心脏,肺和脑的 PAS 染色切片。

图 6 小鼠接种 *C. parapsilosis* 后组织器官病理改变

Note. A: Kidney, C: Liver, E: Spleen, G: Heart, I: Lung, K: Brain. HE staining, showing representative alterations in the organs. B: Kidney, D: Liver, F: Spleen, H: Heart, J: Lung, L: Brain. PAS staining, showing the fungal mycelia infiltration in the organs.

Fig. 6 Histological changes in the organs of mice infected with *C. parapsilosis*

(CY),这种免疫抑制方式表现为白细胞数量下降,特别是嗜中性粒细胞的下降,不仅有利于念珠菌入侵感染,还有效地模拟了临床上较多见的嗜中性粒细胞下降引起的弥散性真菌病的病例。

菌株制备过程的质量控制是影响模型稳定性的关键环节。只有保证每批次实验小鼠接种的菌液浓度一致,才能保证模型的可重复性。本实验室采用一次性制备足够量的菌液,确定一个较高的菌液浓度(例如 5.0×10^7 CFU/mL)后进行分装, -80°C 冰箱保存备用。以后每次实验取出 1 支菌液,解冻后置于 30°C 培养箱中复苏 1 h,按照预计接种浓度对菌液进行梯度稀释。这样就可以保证每批次开展实验使用相同浓度的菌液。本保存方法经过半年的测试,保存的活菌数一直保持稳定状态。

静脉接种亦是影响模型重复性和稳定性的重要因素之一。真菌菌体较大,具有一定的重量,菌液放置一定时间后,菌体会自然下落并在容器下方沉积成丛。因此接菌时,每次抽取菌液前都要将菌液摇匀(至少 10 s),这样才能保证每次吸入的菌液浓度一致。通常采用 1 mL 注射器,经小鼠尾静脉接种菌液进行感染,常用接种剂量为 0.2 mL。当小鼠体重相差较大时,需要根据体重确定每只小鼠的接种剂量。静脉注射前可采用光照或涂擦酒精的方法使小鼠尾部血管扩张,以方便进针,注射完成后,按压注射位点约 30 s,防止菌液倒流。注射时,如因针头进入位置不当,偏离血管,则推注时阻力较大,并且出现注射部位皮肤变白,此时应立即停止注射,拔出针头,重新调整注射位置注射,一定要确保菌液完全接种入静脉。

系统性念珠菌感染小鼠模型建立过程中,除了需要考虑上述影响因素外,还要考虑感染菌株的致病性。具体实验中,由于选择的念珠菌种类不同,毒力不同,注射的菌量也不同。例如同样是利用念珠菌进行毒力研究,选择白色念珠菌 CaR 和近平滑念珠菌 CP 分别接种小鼠,要求接种后 2 周内小鼠死亡率达 90% 以上,则两个菌株的实际接种剂量分别为 1×10^5 CFU/mL 和 4.5×10^5 CFU/mL,两者相比较,CP 菌的毒力较低,达到相同实验目的需要的接种剂量要高。而感染菌株为 SC5314 时, 1×10^5 CFU/mL 接菌剂量可使小鼠在接种后 5 d 内全部死亡。因此,针对不同菌株我们都需要预先摸索不同接种剂量对动物的影响,并根据我们的实验目的来选择合适的接种剂量。

质量控制是决定动物模型成功建立的根本所在,忽略任何一个环节都会影响模型的稳定性。本文从免疫抑制、菌株制备、静脉接种、剂量选择及模型评价等多个方面对系统性念珠菌感染小鼠模型建立过程进行了逐一描述,指出影响模型质量的关键环节及质控方法。系统性念珠菌感染小鼠模型主要表现为以下特点:感染动物可出现死亡;静脉接种后短期内肾脏、心脏、脑及肺脏等多个脏器出现载菌量高峰,随后下降;病理组织学显示肾脏为靶器官,多器官弥散性真菌性感染的典型病理组织学改变。该模型可应用于系统性念珠菌感染的致病机理,免疫防御及抗真菌药物筛选等研究领域。

参 考 文 献

- [1] Szabo EK, MacCallum DM. The contribution of mouse models to our understanding of systemic candidiasis [J]. FEMS Microbiol Letters, 2011, 320(1): 1-8.
- [2] Repentigny LD. Animal models in the analysis of Candida host-pathogen interactions [J]. Microbiology, 2004, 7(4): 324-329.
- [3] MacCallum DM. Hosting infection: experimental models to assay candida virulence [J]. Int J Microbiol, 2012, Volume 2012, Article ID 363764, 12 pages.
- [4] Zhang LX, Yan KZ, Zhang Y, et al. High-throughput synergy screening identifies microbial metabolites as combination agents for the treatment of fungal infections [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007, 104(11): 4606-4611.
- [5] Salas V, Pastor FJ, Calvo E, et al. Anidulafungin in treatment of experimental invasive infection by *Candida parapsilosis*; *in vitro* activity, (1 \rightarrow 3)- β -d-glucan and Mannan serum levels, histopathological findings, and *in vivo* efficacy [J]. Antimicrob Agents Chemother, 2011, 55(11): 4985-4989.
- [6] van Asbeck EC, Clemons KV, Stevens DA. *Candida parapsilosis*; a review of its epidemiology, pathogenesis, clinical aspects, typing and antimicrobial susceptibility [J]. Crit Rev Microbiol, 2009, 35(4): 283-309.
- [7] Orasch C, Marchetti O, Garbino J, et al. *Candida* species distribution and antifungal susceptibility testing according to European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing and new vs. old Clinical and Laboratory Standards Institute clinical breakpoints: a 6-year prospective candidaemia survey from the fungal infection network of Switzerland [J]. Clin Microbiol Infect, 2014, 20(7): 698-705.
- [8] Ha JF, Italiano CM, Heath CH, et al. Candidemia and invasive candidiasis: a review of the literature for the burns surgeon [J]. Burns, 2011, 37(2): 181-195.

[收稿日期] 2014-12-04



LPS/D-gal 诱导小鼠急性肝炎模型及 mTOR 信号的变化

李晓菲¹, 陶玉芬¹, 刘建生¹, 李超¹, 梁新新¹, 叶尤松², 唐东红², 刘红旗^{1*}

(1. 中国医学科学院和北京协和医学院医学生物学研究所感染与免疫学实验室, 昆明 650118;

2. 中国医学科学院医学生物学研究所小动物实验部, 昆明 650118)

【摘要】 目的 探索 LPS/D-gal 诱导的急性肝炎中 mTOR 信号的变化。方法 LPS/D-gal 通过腹腔注射 ICR 雌性小鼠诱导急性肝炎模型。观察记录 24 h 内的存活率或在注射后 6 h 收集血清和肝脏组织样本, 进行相关的分析。结果 LPS/D-gal 注射 24 h 内引起小鼠急性死亡。注射后 6 h, 引起血清中转氨酶水平明显升高。肝脏组织炎症因子 *Tnfa* 和 *Il6* 表达水平上调。HE 染色显示明显的炎症细胞浸润, 研究结果表明 LPS/D-gal 可诱导 ICR 小鼠成为急性肝炎动物模型。此外, 肝脏组织免疫印迹分析发现, mTOR 和 NF- κ B 信号通路被激活, 凋亡相关蛋白 Caspase-3 的活性增加, 凋亡特征性的 DNA 片段化也显著增强。然而 mTOR 信号的抑制剂雷帕霉素并不能控制 LPS/D-gal 引起的肝脏凋亡和提高存活率。结论 mTOR 信号在 LPS/D-gal 诱导的急性肝炎的致病机制中可能发挥多重作用。

【关键词】 LPS/D-gal; 急性肝炎; 凋亡; 小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0306-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.016

A murine model of LPS/D-gal-induced acute hepatitis and alterations in mTOR signaling

LI Xiao-fei¹, TAO Yu-fen¹, LIU Jian-sheng¹, LI Chao¹, LIANG Xin-xin¹, YE You-song², TANG Dong-hong², LIU Hong-qi¹

(1. Infection and Immunity Laboratory, 2. Department of Small Laboratory Animals, Institute of Medical Biology,

Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

【Abstract】 Objective To explore the changes of mTOR signaling in LPS/D-gal-induced acute hepatitis in mice.

Methods Twenty-six healthy adult female ICR mice were divided into two groups: the control group and experimental group, 13 mice in each group. LPS/D-gal was used to induce acute hepatitis in the mice. The survival of mice was monitored within 24 hours after LPS/D-gal challenge. At 6 hours after challenge, samples of serum and liver tissue were collected for further analysis. **Results** Injection of LPS/D-gal resulted in acute death of the mice within 24 hours. At 6 hours post LPS/D-gal injection, the blood levels of ALT and AST were significantly increased. The mRNA expression of inflammatory cytokines *Tnfa* and *Il6* was up-regulated in LPS/D-gal-induced hepatitis, in which DNA fragmentation and activation of caspase-3 were subsequently observed. Immunoblot analysis showed that both mTOR pathway and NF- κ B pathway were activated. Unexpectedly, inhibition of mTOR signaling could neither decrease the apoptosis in the liver nor increase the survival of mice. **Conclusions** The results of the present study indicate that mTOR signaling may play pleiotropic roles in the pathogenesis of LPS/D-gal-induced hepatitis.

【Key words】 LPS/D-gal; Acute hepatitis; Apoptosis; Murine model

[基金项目] 医学生物学研究所人才引进项目 (IMB201); 云南省应用基础研究计划项目 (2013FZ143)。

[作者简介] 李晓菲 (1990-), 女, 硕士研究生。研究方向: 急性肝炎模型建立及致病机制的研究。Email: fantayeah@yeah.net

[通讯作者] 刘红旗, 博士。研究方向: 炎症、感染和免疫。Email: lhq@imbcams.com.cn

急性肝炎是临床上的一种常见病症,根据流行病学分析,每年的发病率和死亡率都居高不下。急性肝炎最主要的致病因素是肝炎病毒的感染,其次为药物引起肝损伤^[1]。多种机制可能参与了急性肝炎的致病作用,包括固有免疫调节、炎症细胞浸润、炎症因子参与和细胞凋亡等^[2-4],然而其致病机制目前为止还没有明确的定论。

动物模型是研究急性肝炎致病机制的重要手段。LPS/D-gal 诱导的小鼠急性肝炎模型从多方面模拟了临床上的各种肝炎疾病,如:肝功能受损,表现为转氨酶水平的上升;炎症因子分泌增加和肝细胞凋亡等^[5]。该模型目前被广泛地用于急性肝炎疾病机制研究和各种抗肝炎药物的筛选^[6]。

mTOR 途径主要通过响应外界环境中能量、营养和生长因子等刺激,参与调控细胞生长、增殖和存活等病理生理过程^[7],包括:炎症过程^[8]和细胞凋亡的调控^[9]。在体内,mTOR 可与机体其他蛋白形成两种不同的复合物 mTORC1 和 mTORC2,各自发挥不同的功能^[10]。其中 mTORC1 主要通过调控其下游的效应分子核糖体蛋白 S6 激酶 1(S6K1)以及核糖体蛋白 S6 的磷酸化,进而促进蛋白合成和细胞增殖,发挥其对细胞的调节作用。因此,S6 蛋白的磷酸化反应了 mTORC1 信号通路的激活情况。mTORC 的抑制剂雷帕霉素(Rapamycin)早期主要作为免疫抑制剂用于临床。然而,近期的研究表明 Rapamycin 能控制某些癌症增殖和转移,其作用机制是通过抑制 mTORC1 及其下游的效应分子。关于 mTOR 信号途径的研究目前多集中于肿瘤、器官移植以及自噬等方面,而对其是否参与 LPS/D-gal 诱导的急性肝炎过程还不是很清楚。本文主要通过建立 LPS/D-gal 诱导的 ICR 小鼠急性肝炎模型,研究 mTOR 信号在该模型中的变化情况,并通过其抑制剂 Rapamycin 来调节 mTOR 途径,从而研究 mTOR 信号的变化对急性肝炎的影响。本研究对进一步了解急性肝炎的致病机制具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

LPS 和 D-gal 购自 Sigma 公司。PBS 购于 Hyclone 公司。Rapamycin 购于 Gene Operation。DMSO 购于 MP Biomedicals。AST 和 ALT 检测试剂为 Mindray 公司 BS200 全自动生化分析仪配套试剂。

RNAiso-plus 试剂盒及逆转录酶相关试剂均购自 Takara 公司。PCR 体系采用 GoTaq © G2 Green Master Mix (Promega 公司)。抗体购自 Cell Signaling Technology 和 Santa Cruz 公司。DNA 片段化检测所用试剂根据参考文献^[11]配制。

1.1.2 实验动物

68 只清洁级性成熟雌性 ICR 小鼠,体重为(25 ± 1)g,由中国医学科学院医学生物学研究所小动物实验部(云南昆明)[SCXK(滇)K2014-0002]提供。所有的操作均按照医学生物研究所动物实验伦理委员会要求进行,实验在医学生物学研究所小动物实验部(云南昆明)动物实验设施内进行[SYXK(滇)K2014-0007]。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及处理

(1)动物模型建立:取 26 只 ICR 雌性小鼠,随机均等分为两组,实验组和对照组各 13 只。根据文献报道^[12],采用腹腔注射的方式,实验组按 40 μg/kg 体重 LPS + 800 mg/kg 体重 D-gal 的药物剂量,每只注射 200 μL,对照组采用同体积 PBS 处理,两组各随机分出 8 只进行存活率实验,观察记录注射药物后 24 h 内小鼠的存活情况,剩余每组取 5 只进行组织样品分析,在注射药物后 6 h,解剖小鼠和收集样本。

(2)Rapamycin 药物处理实验:取 42 只 ICR 雌性小鼠,随机均等分为三组,每组 14 只。第一组为 PBS 处理组,第二组则利用已建立的 ICR 小鼠模型,在腹腔注射 LPS/D-gal 45 min 后注射 Rapamycin (5 mg/kg 体重),第三组为 LPS/D-gal 药物处理组,三组各随机分出 8 只进行存活率实验,剩余每组分别取 6 只进行样品采集分析实验。

1.2.2 肝组织病理学观察

小鼠肝脏组织经 4% 甲醛固定后,进行常规石蜡包埋、切片,进行 HE 染色,显微镜下观察记录结果。

1.2.3 血清 ALT 和 AST 水平检测

眼球采血,每只小鼠收集血液 1mL 左右,于 37℃ 存放 1 h 后,置于 4℃ 过夜处理,3000 g 离心 10 min 后分离血清。取 100 μL 血清送至医学生物学研究所灵长类实验动物中心检测。检测系统为 Mindray 公司 BS200 全自动生化分析仪及配套试剂。

1.2.4 半定量 RT-PCR 检测肝组织炎性细胞因子的变化

取 ICR 小鼠肝脏组织,利用 RNAiso-plus 试剂

盒进行组织裂解,再通过酚-氯仿的方法提取 RNA,具体操作参照使用说明书。利用 Nanodrop2000 分光光度计(Thermo 公司)测定的浓度和纯度,最终以 2 μ g RNA 合成 cDNA。通过特异性引物 PCR 扩增炎症细胞因子 *Tnfa*, *Il6* 及 *Il1 β* ,扫描电泳图谱,以 *actin* 为参考标准比较实验组与对照组 *Tnfa*, *Il6* 及 *Il1 β* 转录水平的差异。其中 *Tnfa*, *Il6*, *Il1 β* 以及 *actin* 引物设计分别为: *Tnfa*-F: CTCTTCAAGGGACAAG-GCTG, *Tnfa*-R: CGGACTCCGCAAAGTCTAAG; *Il6*-F: GAGACTTCCATCCAGTTCGCC, *Il6*-R: CAGAATT-GCCATTGCACAAC; *Il1 β* -F: GACCTTCCAGGAT-GAGGACA, *Il1 β* -R: AGGCCACAGGTATTTTGTCC; *actin*-F: ACGGCCAAGTCATCACTATTG, *actin*-R: AGCCACCGATCCACACAGA。

1.2.5 免疫印迹检测蛋白表达情况

取 30mg 大小的 ICR 小鼠肝脏组织,加入 500 μ L RIPA 蛋白裂解液,组织匀浆机进行研磨,于 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 10 min,收集上清,利用 BCA 法检测蛋白浓度后,调整至统一浓度,25 mg 或 50 mg 总蛋白 SDS-PAGE 电泳后,用相应的抗体进行免疫印迹分析。利用 ECL 免疫印迹底物(Thermo 公司)显色,经 Bio-Rad 凝胶成像系统拍照记录结果。

1.2.6 DNA 片段化检测细胞凋亡情况

取 30 mg 大小的 ICR 小鼠肝脏组织,加入

500 μ L 裂解液进行裂解,组织匀浆机进行研磨,冰置 15 min,于 4 $^{\circ}$ C 12 000 g 离心 20 min,转移上清至新管,参照文献报道的方法^[11],提取和纯化 DNA,经琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段化情况。

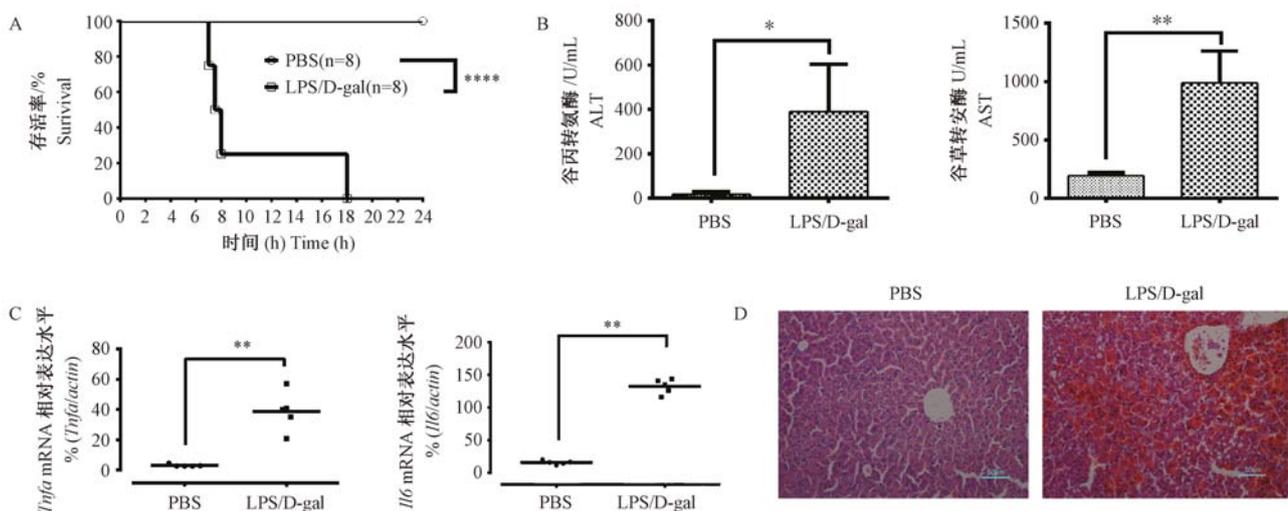
1.2.7 统计学分析

利用 GraphPad Prism 6 软件进行分析,组间比较采用 unpaired *t* 检验;存活率曲线比较采用 Log-rank (Mantel-Cox) 检验。 $P > 0.05$ 表示没有统计学差异,用 ns 表示; $P < 0.05$ 表示具有统计学差异,用 * 表示。

2 结果

2.1 建立 ICR 小鼠急性肝炎模型

我们通过联合 LPS 和 D-gal 成功地诱导了 ICR 小鼠的急性肝炎模型。小鼠在腹腔注射 LPS/D-gal 后 24h 内发生急性死亡,死亡率高达 100% (图 1A)。LPS/D-gal 诱导 6h 后,血清中转氨酶 AST 和 ALT 的水平显著上升(图 1B),表明肝功能发生异常。半定量 RT-PCR 结果显示炎症因子 *Tnfa* 和 *Il6* 的 mRNA 表达水平显著升高(图 1C)。进一步的组织病理学检查发现,LPS/D-gal 处理引起肝脏组织严重的炎症细胞浸润以及坏死等病理变化(图 1D)。以上研究结果表明,LPS/D-gal 在此剂量条件下能够成功诱导 ICR 小鼠的急性肝炎。



注:A:小鼠存活率;B:谷丙转氨酶(ALT)和谷草转氨酶(AST)活性;C:炎症因子 *Tnfa* 和 *Il6* 的 mRNA 相对表达水平;D:肝脏组织 HE 染色(200 \times)。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$,代表差异有显著性。

图 1 LPS/D-gal 诱导 ICR 小鼠的肝炎模型

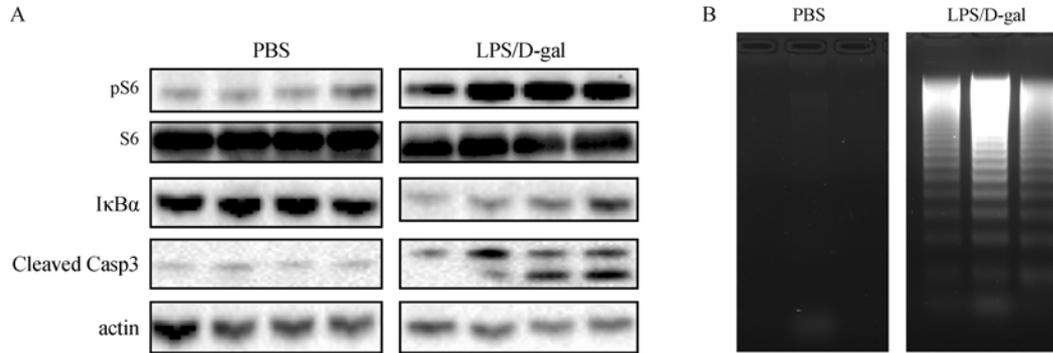
Note. A: Mice survival; B: Activity of ALT and AST; C: Relative mRNA levels of inflammatory cytokines *Tnfa* and *Il6*; D: H&E staining of liver tissue (200 \times). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, representing the significant difference.

Fig. 1 LPS/D-gal-induced hepatitis in the ICR mice

2.2 mTOR 信号途径在 LPS/D-gal 诱导的急性肝炎模型中被激活

免疫印迹分析结果显示, LPS/D-gal 处理诱导了核糖体蛋白 S6 的磷酸化水平 (pS6) 显著升高 (图 2A), 表明肝脏组织中 mTOR 信号途径在 LPS/D-gal 诱导的急性肝炎模型中被激活。LPS/D-gal 也导致了肝脏组织中 NF- κ B 抑制蛋白 I κ B α 的下调, 表明

调控炎症因子表达的 NF- κ B 信号途径被激活。此外, LPS/D-gal 还激活了凋亡相关蛋白 caspase-3, 肝脏组织表现为高水平裂解的 caspase-3 (图 2A) 和凋亡特征性的 DNA 片段化 (图 2B)。这些结果表明 LPS/D-gal 诱导激活的 mTOR 信号途径, 可能与肝细胞的凋亡及炎症反应有一定的相关性。



注: A: pS6, S6, I κ B α , Cleaved Casp3, Actin western blot 结果; B: DNA 片段化结果。

图 2 mTOR 信号途径与 LPS/D-gal 诱导的急性肝炎之间相关性分析

Note. Representative results of Western blotting (A) and DNA fragmentation (B).

Fig. 2 Correlation analysis of mTOR signaling pathway and LPS/D-gal-induced hepatitis

2.3 抑制 mTOR 信号途径对 LPS/D-gal 诱导的急性肝炎的影响

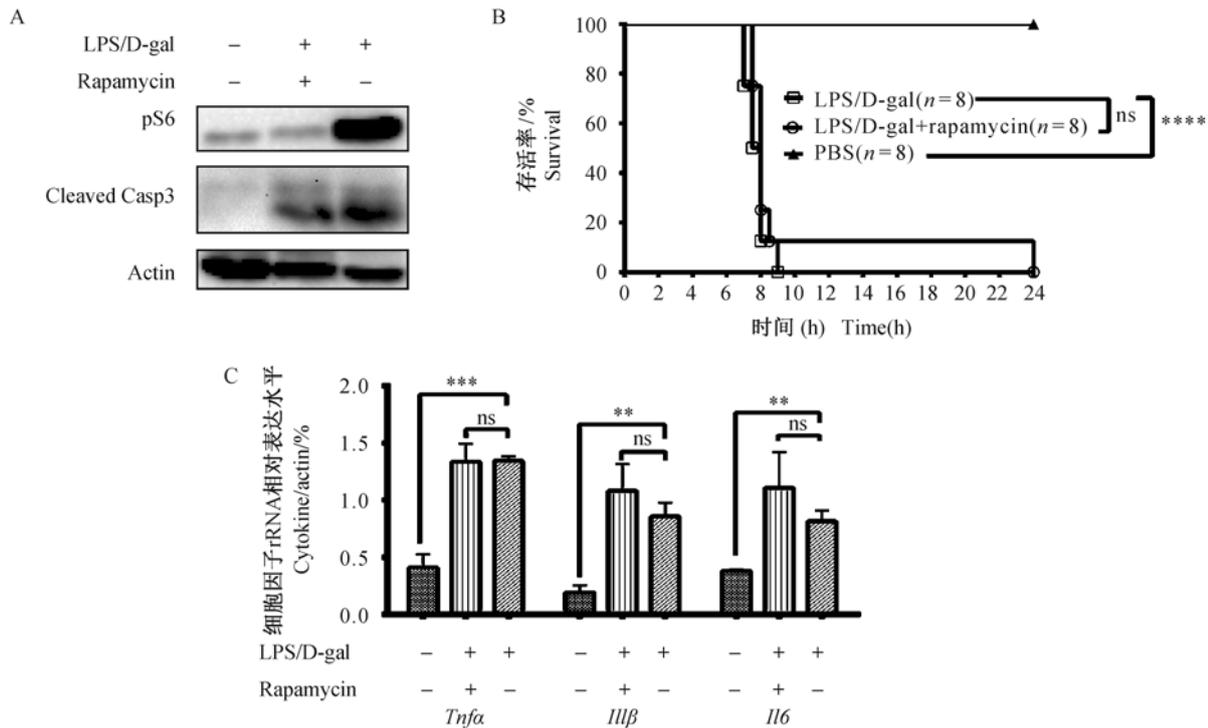
以前的研究表明, 在 LPS/D-gal 诱导的急性肝炎模型中, 小鼠死亡的直接原因可能与 LPS/D-gal 诱导产生的 *Tnfa* 引起的肝细胞凋亡有关。本研究中 mTOR 信号途径和 caspase-3 的激活暗示它们与肝脏组织的细胞凋亡有一定的相关性 (图 2A)。因此, 我们假设可以通过抑制 mTOR 信号途径来调控细胞凋亡, 从而降低 LPS/D-gal 诱导的急性肝炎引起的死亡。本研究表明, 尽管 mTOR 抑制剂 Rapamycin 在 45 min 内能够明显地抑制 mTOR 信号途径的效应分子 S6 的磷酸化 (图 3A), 但其并不能降低 LPS/D-gal 导致的高死亡率 (图 3B)。我们又进一步分析了 Rapamycin 对 LPS/D-gal 诱导的肝脏组织中炎症因子的影响。半定量 RT-PCR 结果表明, Rapamycin 处理并不能抑制 LPS/D-gal 诱导的炎症因子 *Tnfa*, *Il6* 及 *Il1 β* 的 mRNA 表达 (图 3C)。免疫印迹分析结果表明, Rapamycin 处理也不能完全抑制凋亡相关蛋白 caspase-3 的活性 (图 3A)。这些结果提示 LPS/D-gal 激活的 mTOR 信号途径在急性肝炎致病机制中可能起多重作用。

3 讨论

肝炎是目前世界上危害相当严重的一种疾病。

多种因素可以引起肝脏的炎症, 这种炎症不仅可导致肝脏组织的细胞凋亡和坏死, 最终还可能导致肝癌。早期常用于研究肝炎的模型是通过高剂量的细菌内毒素 LPS 进行诱导。后来发现 D-gal 与 LPS 联合运用可以大大降低 LPS 的用量, 而且通过该方法建立的急性肝炎模型, 能基本模拟病毒性肝炎等多种肝炎的病理过程。因此, 该模型引起了越来越多的关注。本研究通过 LPS/D-gal 联合作用 ICR 小鼠成功地建立了急性肝炎模型。

mTOR 信号途径的异常出现在多种疾病环境中, 是目前研究多种疾病治疗性药物的靶点。而 Rapamycin 作为 mTOR 信号抑制剂, 是研究其功能的常用药物。已有的研究表明, Rapamycin 能阻断 caspase-3 的激活, 从而提高细胞的存活率^[13]。Rapamycin 还可以通过抑制趋化因子和炎症因子的表达来抑制炎症反应^[14,15]。然而, 在一些疾病模型中, Rapamycin 预处理反而加速了炎症和细胞凋亡^[16]。在肝脏枯否细胞中, 真核延长因子 2 (eEF2) 能调控 *Tnfa* 的翻译水平, 进而控制 LPS 诱导的肝炎^[17]。mTOR/S6K1 则能调控真核延长因子 2 激酶 (eEF2K) 活性, 激活 eEF2, 因此, Rapamycin 处理则反向加重了肝炎的发生^[18]。Baker 等^[19]也发现在巨噬细胞中, Rapamycin 能减少 IL-10 的表达从而增



注: A: pS6, Cleaved Casp3, Actin western blot 结果; B: 小鼠存活率; C: 炎症因子 *Tnfa*、*Il1β* 和 *Il6* 的 mRNA 相对表达水平。ns 表示没有统计学差异, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, 差异有显著性。

图 3 抑制 mTOR 信号通路对 LPS/D-gal 诱导肝炎的影响

Note. A: Representative results of Western blotting; B: Mice survival; C: Relative mRNA levels of inflammatory cytokines *Tnfa*, *Il1β* and *Il6*. ns represents no significant difference, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, representing significant differences.

Fig. 3 Effects of inhibition of mTOR signaling pathway on the LPS/D-gal-induced hepatitis

强 LPS 诱导产生的 *Tnfa* 水平^[19]。因此,尽管我们能利用 Rapamycin 有效地抑制整个肝脏组织中 LPS/D-gal 诱导上调的 mTOR 信号,但由于其作用的双向性,导致其不能有效地控制炎症、肝脏细胞的凋亡以及存活率。另外, Rapamycin 对肿瘤和细胞凋亡的作用还与其工作浓度有关,低浓度 Rapamycin 能诱导自噬作用,对细胞有保护作用^[13],而高浓度的 Rapamycin 通过抑制蛋白合成相关的 4EBP1 来调控凋亡相关因子的表达,从而促进细胞凋亡,达到抗肿瘤的目的^[20]。

尽管 Rapamycin 的主要靶标是 mTORC1,是目前较常用的用于抑制 mTOR 信号途径的药物,然而由于 mTORC1 是多种信号途径的节点,它被抑制后,对其下游的多种信号途径都有影响,因此有时会引起与预期不一致的结果。Rapamycin 和其他药物的联合使用是克服这一现象的有效方法之一^[21]。此外,最近的研究表明 mTORC1 下游的效应分子 S6K1 是 mTOR 信号途径药物研究很好的靶点^[22]。小鼠中 S6K1 基因的缺陷能显著减弱人工诱导的肝

脏炎症^[23],这暗示了通过药物抑制 mTOR 信号途径下游的 S6K1 活性可能改善肝脏的炎症反应。

综上所述, mTOR 信号途径尽管可能参与了 LPS/D-gal 诱导的 ICR 小鼠急性肝炎的致病机制,然而直接利用 Rapamycin 抑制 mTOR 信号,并不能缓解急性肝炎的病理表现,这些结果提示了 mTOR 信号途径下游可能存在正反两种调节功能参与了急性肝炎致病机制。本研究结果对深入研究急性肝炎致病机制和设计相应的药物靶点具有重要的指导意义。

参 考 文 献

- [1] Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, et al. Acute liver failure [J]. Lancet, 2010, 376(9736): 190-201.
- [2] Szabo G, Mandrekar P, Dolganiuc A. Innate immune response and hepatic inflammation [J]. Semin Liver Dis, 2007, 27(4): 339-350.
- [3] Mandrekar P, Szabo G. Signalling pathways in alcohol-induced liver inflammation [J]. J Hepatol, 2009, 50(6): 1258-1266.
- [4] Rutherford A, Chung RT. Acute liver failure: mechanisms of

- hepatocyte injury and regeneration [J]. *Semin Liver Dis*, 2008, 28 (2): 167–174.
- [5] Wang X, Zhang L, Wei Z, et al. The inhibitory action of PDCD4 in lipopolysaccharide/D-galactosamine-induced acute liver injury [J]. *Lab Invest*, 2013, 93 (3): 291–302.
- [6] Wang H, Xu DX, Lv JW, et al. Melatonin attenuates lipopolysaccharide (LPS)-induced apoptotic liver damage in D-galactosamine-sensitized mice [J]. *Toxicology*, 2007, 237 (1–3): 49–57.
- [7] Yang H, Rudge DG, Koos JD, et al. mTOR kinase structure, mechanism and regulation [J]. *Nature*, 2013, 497 (7448): 217–223.
- [8] 林骏, 白晓春. mTOR 信号通路与“炎-癌”转变 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2014, (01): 79–86.
- [9] Castedo M, Ferri KF, Kroemer G. Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic [J]. *Cell Death Differ*, 2002, 9 (2): 99–100.
- [10] Bhaskar PT, Hay N. The two TORCs and Akt [J]. *Dev Cell*, 2007, 12 (4): 487–502.
- [11] Hugh J. Brady M. *Apoptosis Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology, Vol. 282)* [M]. First ed. Totowa, NJ: Humana Press. 2004. 1–17.
- [12] Hartman AL, Santos P, Dolce A, et al. The mTOR inhibitor rapamycin has limited acute anticonvulsant effects in mice [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (9): e45156.
- [13] Ravikumar B, Berger Z, Vacher C, et al. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis [J]. *Hum Mol Genet*, 2006, 15 (7): 1209–1216.
- [14] Mushaben EM, Kramer EL, Brandt EB, et al. Rapamycin attenuates airway hyperreactivity, goblet cells, and IgE in experimental allergic asthma [J]. *J Immunol*, 2011, 187 (11): 5756–5763.
- [15] Lin H, Chang KT, Hung CC, et al. Effects of the mTOR inhibitor rapamycin on monocyte-secreted chemokines [J]. *BMC Immunol*, 2014, 15 (1): 1–9.
- [16] Fielhaber JA, Carroll SF, Dydensborg AB, et al. Inhibition of mammalian target of rapamycin augments lipopolysaccharide-induced lung injury and apoptosis [J]. *J Immunol*, 2012, 188 (9): 4535–4542.
- [17] Gonzalez-Teran B, Cortes JR, Manieri E, et al. Eukaryotic elongation factor 2 controls TNF-alpha translation in LPS-induced hepatitis [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123 (1): 164–178.
- [18] Wang X, Li W, Williams M, et al. Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase [J]. *EMBO J*, 2001, 20 (16): 4370–4379.
- [19] Baker AK, Wang R, Mackman N, et al. Rapamycin enhances LPS induction of tissue factor and tumor necrosis factor-alpha expression in macrophages by reducing IL-10 expression [J]. *Mol Immunol*, 2009, 46 (11–12): 2249–2255.
- [20] Yellen P, Saqcena M, Salloum D, et al. High-dose rapamycin induces apoptosis in human cancer cells by dissociating mTOR complex 1 and suppressing phosphorylation of 4E-BP1 [J]. *Cell Cycle*, 2011, 10 (22): 3948–3956.
- [21] Shappley RK, Spentzas T. Differential role of rapamycin and Torin/KU63794 in inflammatory response of 264.7 RAW macrophages stimulated by CA-MRSA [J]. *Int J Inflam*, 2014, 2014: 1–9.
- [22] Barger JF, Gallo CA, Tandon P, et al. S6K1 determines the metabolic requirements for BCR-ABL survival [J]. *Oncogene*, 2013, 32 (4): 453–461.
- [23] Gonzalez-Rodriguez A, Alba J, Zimmerman V, et al. S6K1 deficiency protects against apoptosis in hepatocytes [J]. *Hepatology*, 2009, 50 (1): 216–229.

[收稿日期] 2005-01-04



传统中药补肾固筋方对膝骨性关节炎 IL-1、TNF- α 的作用机制

张冲, 王恒树, 阚秀莲, 李健, 郭梅, 祁永玲, 韩艳丽, 杨瑞成

(河北省中医院骨三科, 河北医科大学第二医院, 石家庄 050011)

【摘要】 目的 观察补肾固筋方对兔膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)血清及关节液 IL-1、TNF- α 的表达影响及调节机制。方法 新西兰兔 76 只, 随机分为正常组、模型组、西药组、中药组, 除正常组外均用改良 Hult 法造, 取血清及膝关节前方部分滑膜组织、股骨内髁关节软骨及软骨下骨, ELISA 法 IL-1、TNF- α 含量。结果 西药组关节间隙狭窄, 介于模型组和中药组之间, 关节面粗糙, 骨赘明显; 中药组关节间隙稍窄, 关节面稍粗糙伴轻微骨赘。模型组血清及关节液 IL-1、TNF- α 含量比正常组升高 ($P < 0.01$)。两个给药组血清及关节液 IL-1、TNF- α 含量比模型组降低 ($P < 0.01$), 两给药组之间差异无显著性。结论 补肾固筋方通过降低骨关节炎中 IL-1、TNF- α 的分泌水平促进软骨修复, 为临床应用提供科学的实验依据。

【关键词】 兔膝骨性关节炎; 补肾固筋方; 关节滑液; 白细胞介素-1; 肿瘤坏死因子- α ; 治疗

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0312-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.017

Effect of the traditional Chinese medicine Bushen Gujin prescription on the expression of interleukin-1 and tumor necrosis factor- α in rabbit models of knee osteoarthritis

ZHANG Chong, WANG Heng-shu, ZHANG Yong-hua, LI Jian, GUO Mei, QI Yong-ling

(The Third Department of Orthopaedics, TCM Hospital of Hebei Province, the Second Hospital of Hebei Medical University, Shijiazhuang 050011, China)

【Abstract】 Objective To explore the effect of traditional Chinese medicine (TCM) Bushen Gujin prescription on the expression of interleukin-1 (IL-1) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in the serum and synovial fluid of rabbit models of knee osteoarthritis. **Methods** Seventy-six healthy 8-month old male SPF New Zealand white rabbits were randomly divided into normal, model, western medicine (meloxicam) and TCM groups ($n = 19$ in each group). The rabbit models of knee osteoarthritis were generated by Hurth procedure, and were given respective drug treatment for consecutive 8 weeks. The expression of IL-1 and TNF- α in serum and synovial fluid was detected by ELISA assay. **Results** All the experimental rabbits showed narrowed knee articular space, rough articular cartilage surface, and obvious bone spur formation. The width of articular space of the meloxicam-treated rabbit models was between those of the model group and Chinese medicine-treated group. The expression of IL-1 and TNF- α in the serum and synovial fluid was increased in the rabbits of model groups, decreased in the two drug-treated groups (both $P < 0.01$), but not significantly different between the two drug-treated groups ($P > 0.01$). **Conclusions** The traditional Chinese medicine Bushen Gujin prescription can effectively inhibit synovial inflammation and reduce the expression of IL-1 and TNF- in the serum and synovial fluid. Our results provide experimental support for the use of this Chinese medicine in the treatment of knee osteoarthritis in clinics.

【Key words】 Bushen Gujin prescription; Rabbit; Knee osteoarthritis; Meloxicam; Chondrocytes; Interleukin-1; Tumor necrosis factor- α ; Synovial fluid; Therapy

[基金项目] 河北省中医药类科研计划指导性课题(No. 2014172)。

[作者简介] 张冲(1976-), 博士, 副教授, 研究方向: 骨关节微创技术, E-mail: 199876m@sina.cn。

膝骨性关节炎(knee osteoarthritis, KOA)以关节软骨变性和软骨下骨象牙样硬化为病理特征的退行性疾病。《内经·素问·痹论》：“风寒湿三气杂至合而为痹也^[1]”。临床多用非甾体类药物或胫骨高位截骨术、人工关节置换术，患者难以接受^[2]。中药多取补肾壮骨、活血止痛之效，如熟地、枸杞、杜仲、川牛膝等对 KOA 疗效确切，延缓骨关节炎的发展、促进关节软骨修复^[3]。本研究拟通过检测 IL-1、TNF- α 的表达阐明补肾固筋方与骨关节炎的作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物

76 只 SPF 级新西兰兔，雄性，3 月龄，体重大于或等于 1.5 kg，购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2013-0011]，实验、取材及标本测定在河北医科大学实验动物中心进行[SYXK(冀)2013-1-004]。

1.2 主要试剂及仪器

兔 IL-1、TNF- α ELISA 试剂盒(IL-1 ELISA kit, tumor necrosis factor- α , TNF- α ELISA kit, 规格:96T, Abcam US, 型号:AB2202);酶联免疫检测仪(型号:ELX800 BioTek, US.); Retsch 干燥箱(型号:TG10, 产地:德国 Hahn, Dusseldorf, Germany, Retsch Company);恒温水箱(DDIL-5 型,上海安亭科学仪器厂);石蜡切片机(U-641 型,美国贝克曼公司);荧光显微镜系统(Leica AF6000, Germany);全自动图像分析系统(Tanon1600, 中国上海);723 分光光度计(ELX8086 型,美国宝特公司);数码 X 光机(GEx86 型,美国 GE 公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型制备

76 只新西兰兔随机分成 4 组(正常组、模型组、西药组及中药组),每组 19 只。造模过程 2~3 周内各组均死亡 1 只后每组各 18 只。严格无菌、微创操作术后抗炎处理。

除正常组外均采用 Hulth 法造模^[4]。术前一晚禁食,配制成 3% 戊巴比妥钠按 20mg/kg 兔耳缘静脉麻醉,先注射总量的 2/3 随后根据情况追加 10% 直至麻醉成功。常规消毒趋血。右后肢膝关节内侧纵切口长约 2.5~3 cm,明确关节腔无原发病变后,切断内侧副韧带(medial collateral ligament, MCL);完全切断前十字韧带(anterior cruciate ligament,

ACL);完整切除内侧半月板但保留后十字韧带(posterior cruciate ligament, PCL)三个手术步骤造成力线内移及膝关节不稳。胫股关节面由正常外翻 10°变为内翻,X 线片后肢力线内移、跛行明显;膝关节内侧应力集中继发骨小梁改变;膝关节不稳及长期被迫运动造成软骨损伤及退变。术侧肢体不固定,头孢曲松钠注射液每次 0.5×2 g/d,肌注,连续 7 d。术后第 7 天即强迫兔奔跑(0.5 h/d),活动范围约每日 2h/800m 左右。造模 2 周软骨改变,6 周进入平台期,10 周出现典型的晚期 OA 改变,13 周可获得典型的 KOA 模型。兔跛行严重每日行走≤300m、X 线片显示胫股关节内翻 10°,前抽屉实验和内侧应力实验阳性即表示造模成功。造模成功率为 81.3%。

1.3.2 干预方法

补肾固筋方(熟地 18 g、杜仲 20 g、桑寄生 20 g、巴戟天 15 g、川牛膝 16 g、鸡血藤 15 g、丹参 12 g、木瓜 12 g)加减,根据饮食情况,精神状态,活动自如,喜暖恶寒,被毛光滑有光泽,四肢各关节无红肿,活动自如等情况中医辨证加减,风寒湿痹加防风、黄芪、羌活;风湿热痹加秦艽、羌活;瘀血闭阻证加桃仁、红花;肝肾亏虚偏阴虚者加枸杞子、山茱萸;偏阳虚者加菟丝子、肉桂;每剂取汁 400 mL。浓缩后加蒸馏水配制成 6~8g/10 mL;美洛昔康每粒 7.5 mg,四川宝光药业股份有限公司,国药准字:H20010209 批次号:120502770265;戊巴比妥钠(pentobarbital sodium,美国 Sigma,货号:P3809)。

造模 3 周后开始干预,按照人及动物之间药物剂量换算:Meeh-Rubner 氏公式 $A = K \times (W^{2/3} \div 10\ 000)$,美洛昔康每日 8 mg/kg,每日补肾固筋方 53 g/kg,正常组、模型组生理盐水 15mL 灌胃,2 次/日;连续干预 8 周一疗程。

1.3.3 观察指标

(1)步态观察:Coderre T. 步态分级^[5]评价。0 级:正常行走,行走时间 >5 min;I 级:轻微跛行,行走时间 3~5 min;II 级:中度跛行,行走时间 <3 min。

(2)X 线检查:处死动物前拍摄兔膝关节正位 DR 片,观察膝关节 X 线表现。X 线损伤情况按改良的 David T^[6]法分级,0 度:关节面光滑无骨赘;I 度:关节外侧间隙轻度狭窄;II 度:关节面粗糙明显变形伴可疑骨赘;III 度:关节间隙明显狭窄,骨赘清晰可见。

(3)形态学观察:1 mL 生理盐水灌洗关节腔,取胫骨内侧软骨面,肉眼观察兔膝关节软骨面情况,切取膝关节前方、内侧滑膜组织和股骨内髁及内髁前方两侧关节软骨及软骨下骨,剪成约 0.6 cm × 0.6 cm × 0.6 cm 大小均匀组织小块,病理切片、组织染色处理,观察关节软骨的层次组成、软骨细胞变化移行及软骨下骨的情况。

(4)IL-1、TNF- α 检测:实验结束造模后药物干预 8 周空腹处死动物后,立即心脏取血 5 mL,3000 r/min 离心 10 min 分离出血清及关节滑液 -60 $^{\circ}$ C 冰冻保存;5000 r/min 分离出关节软骨及滑液后, -80 $^{\circ}$ C 超低温冰箱保存 24h 后再放入液氮(-196 $^{\circ}$ C)保存。ELISA 法(enzyme-linked immunosorbent assay)检测。

1.4 统计学分析

SPSS 17.0 统计,数据采用均数标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间样本差异比较采用 F 检验,各样本均数间两两比较采用 q 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学

意义。

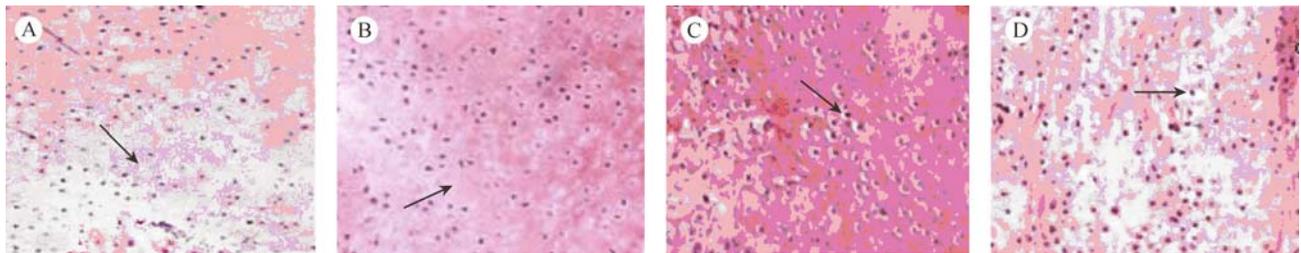
2 结果

2.1 肉眼及镜下观察

正常组膝关节内外侧间隙光滑平整,软骨色泽蓝白色透明,关节液量适中;模型组膝关节内侧间隙变窄,滑膜肿胀,软骨面不光滑与滑膜纤维性粘连凹凸不平,软骨剥脱;镜下见软骨细胞大小不均深层排列,软化灶形成;两个给药组关节软骨大体观察呈淡蓝半透明白色,表面平整光滑,滑膜乳白色淡黄黏稠的关节液含量较正常组稍多,镜下西药组软骨细胞排列欠完整,簇状增生;中药组关节面光滑平整软骨细胞排列完整(图 1)。

2.2 IL-1、TNF- α 含量比较

模型组含量升高($P < 0.01$)。两个给药组与模型组比较含量降低($P < 0.01$),两给药组之间比较差异无显著性($P > 0.05$)(表 1)。



注:A.正常组;B.模型组;C.西药组;D.中药组。箭头标明软骨细胞簇状增生情况。

图 1 各组软骨细胞镜下观察(HE × 40, 20 μ m/cm)

Note. The arrangement of chondrocytes and arrows addicate the chondrocyte proliferation clustered. A: A rabbit of the normal group; B: A rabbit of the model group; C: A rabbit of the meloxicam group; D: A rabbit of the Chinese medicine group

Fig. 1 Histological appearance of the cartilage of rabbits in different groups. HE staining. $\times 40$

表 1 各组血清及关节液 IL-1、TNF- α 含量比较($\bar{x} \pm s, n = 18$)

Tab. 1 Comparison of interleukin-1, tumor necrosis factor- α in the rabbit serum and synovial fluid

分组 Groups	血清 Serum		关节液 Synovial fluid	
	IL-1 ng/L	TNF- α pg/L	IL-1 ng/L	TNF- α pg/L
正常组 Normal	512.8 \pm 38.61 *	192 \pm 18.23 *	49 \pm 0.64 **	33.2 \pm 0.84 *
模型组 Model	866 \pm 44.23 *	436 \pm 24.17 *	92.8 \pm 0.64 *	91.4 \pm 0.66 *
中药组 Chinese medicine	644.2 \pm 36.24 *	43.9 \pm 21.01 *	61.4 \pm 0.85 *	54.2 \pm 0.87 *
西药组 Meloxicam	650.1 \pm 35.3 *	203 \pm 16.85 *	57.2 \pm 0.69 *	45.4 \pm 0.58 *

注:与模型组比较,* $P < 0.01$ 。Note. Compared with the model group, * $P < 0.01$ 。

3 讨论

Perlman^[7]报道在类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)中有 IL-1 的存在。IL-1 通过激活血管内皮细胞,增强内皮细胞粘附分子的分泌,促进血液中白细胞与粘附分子结合聚集在关节腔^[8,9],刺激

骨小梁重塑及成骨细胞聚集增生,软骨下骨萎缩。骨质异常增生或囊性变形成骨赘,生物力学的作用使之再苏醒最终形成关节变形功能缺失^[10,11]。炎性介质促进细胞浸润增加炎症反应及组织损伤,特别是 IL-1 正向促使 PGE₂ 及 TNF- α 在细胞质中的释放,这种表达强度及严重程度呈现递增改变^[12];研

究证实 TNF- α 通过促使关节软骨面滑膜中的成纤维细胞增殖纤维素样变性及多形核细胞分泌破坏骨关节面软骨和软骨下骨,同时 IL-1、TNF- α 协同作用裂解蛋白多糖、降解胶原片段活性,加快软骨基质剥脱骨质暴露^[13,14]。

治则温经活血、补益肝肾。君药熟地、杜仲、桑寄生,熟地微温味甘,滋阴养血、益肾填精;杜仲甘温,用于肾虚腰痛,筋骨无力;桑寄生苦甘平治风湿痹痛,腰膝酸软,筋骨无力,《本草再新》:寄生补气温中,治阴虚、壮阳道、利骨节。君药配伍促进血液循环改善关节腔内微循环,降低骨内压减轻疼痛;《纲目拾遗》:丹参性凉,味甘,通经络,和血脉^[15]。臣药巴戟天、川牛膝和丹参配和君药使用可减缓关节软骨细胞的坏死、增强超氧化物歧化酶的活性反应,加速软骨细胞合成及滑液吸收^[16],阻断了骨关节炎发病过程中氧自由基的释放及恶性循环减缓软骨退变的目的^[17];佐使药鸡血藤行气活血,通络、善治手足麻木、肢体瘫痪,风湿痹痛及促进静脉系统血液返流加速代谢的作用^[18]。补肾固筋方通过抑制 IL-1、TNF- α 的分泌来改善滑膜液性反应,可以有效修复软骨破裂控制软骨退变、缓解软骨细胞降解及增强滑膜渗透作用,促进软骨修复。

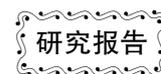
参 考 文 献

- [1] 国家中医药管理局. 中华人民共和国中医药行业标准. 中医病证诊断疗效标准[M]. 南京,南京大学出版社,1999.
- [2] Fitzgerald GK, White DK, Piva SR. Associations for change in physical and psychological factors and treatment response following exercise in knee osteoarthritis: an exploratory study [J]. Arthritis Care Res, 2012, 64(11): 1673 - 1680.
- [3] 崔向宁,李玉波,李妍,等. 活血、利水中药对脑出血大鼠脑组织肿瘤坏死因子- α 、核转录因子 KB 及水通道蛋 4 表达的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2012, 2(17): 513 - 515.
- [4] Rogart JN, Barrach HJ, Chichester CO. Articular collagen degradation in the Hulth-Telhag model of osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 1999, 7(6): 539 - 547.
- [5] Coderre TJ, Wall PD. Ankle joint urate arthritis in rats provides a useful tool for the evaluation of analgesic and anti-arthritis agents

[J]. Pharmacol Biochem Behav. 1988, 29(3): 461 - 466.

- [6] Felson DT, Naimark A, Anderson J, et al. The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly [J]. Arthritis Rheum. 1987, 30(8): 914 - 918.
- [7] Perlman H, Geroganas C, Pagliari LJ, et al. Bcl-2 expression in synovial fibroblast is essential for maintaining mitochondrial homeostasis and cell viability [J]. J Immunol 2000, 164(10): 5227 - 5235.
- [8] Parmelee PA, Harralson TL, McPherron JA, et al. The structure of affective symptomatology in older adults with osteoarthritis. Int J Geriatr Psychiatry, 2013, 28(4): 393 - 401.
- [9] Venkataramanan V, Gignac MA, Dunbar M, et al. The importance of perceived helplessness and emotional health in understanding the relationship among pain, function, and satisfaction following revision knee replacement surgery [J]. J Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(7): 911 - 917.
- [10] 梁秀军,翟泽玲,董文娟,等. 胶原性关节炎大鼠炎症细胞因子的动态观察[J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(3): 57 - 60.
- [11] 王晓冬,王庚启. 双醋瑞因对骨关节炎患者血清白细胞介素 1、肿瘤坏死因子 α 的影响和临床疗效 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(21): 102 - 103.
- [12] 张立国,马东升,程佳佳,等. 中药挥发油、水提物的抗炎、免疫及骨细胞修复活性的比较 [J]. 中药新药与临床药理, 2015, 1: 34 - 39.
- [13] 唐晶晶,梁德,江晓兵,等. 改良半椎板切除法建立大鼠腰神经根压迫模型 [J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(2): 48 - 51.
- [14] Olajide OA, Bhatia HS, de Oliveira, et al. Inhibition of neuroinflammation in LPS-activated microglia by cryptolepine [J]. Evidence-Based Compl Alt Med, 2013, 459723.
- [15] 郑进昌,徐东明,许凯洲. 独活寄生汤治疗膝关节退行性关节炎的临床研究 [J]. 中国医药导报, 2013, 10(3): 102 - 103.
- [16] 裴凌鹏,白岩,惠伯棣. 虾青素对骨关节炎软骨细胞氧化损伤及炎性的影响 [J]. 中国老年学杂志. 2012, 32(23): 5182 - 5184.
- [17] 谢平,董少梅,陈付强,等. 低浓度臭氧联合玻璃酸钠治疗膝骨关节炎的临床观察 [J]. 中国疼痛医学杂志, 2012, 18(7): 404 - 405.
- [18] 周光皎,孙宜坤,王超群. 鸡血藤中总黄藤的聚酰胺树脂纯化工艺优选 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(12): 34 - 37.

[收稿日期] 2015-01-20



PPAR α 转基因小鼠在药物毒性评价中的应用

贺银丽, 郭珣, 赵显莉, 裴彦宇, 孙井江, 高虹

(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** 研究 PPAR α 转基因小鼠在评价 PPAR α 激动剂类药物毒性时, 是否比传统动物更敏感。 **方法** 8 周龄 PPAR α 转基因小鼠 (Tg) 和 C57BL/6J 小鼠 (WT), 雌雄各半, 分别随机分成 3 组, 氯贝丁酯高剂量组 (400 mg/kg)、氯贝丁酯低剂量组 (300 mg/kg)、溶媒对照组 (10% 羧甲基纤维素钠)。连续灌胃一个月, 给药结束后检测血生化指标、心肝肾脏器系数及病理改变, 并观察动物的一般生长情况。 **结果** ① 血生化: Tg δ 高、低剂量组肌酐 (CREA)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 分别显著高于各对应的野生型对照组 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。② 脏器系数: Tg 高、低剂量组肾脏系数与 Tg 溶媒对照组比较均有显著增加 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。③ 组织病理: Tg 各剂量组肝脏、肾脏病理损伤较 WT 各剂量组更严重。 **结论** PPAR α 转基因小鼠评价 PPAR α 激动剂药物肝毒性和肾脏毒性时比常规 C57BL/6J 野生小鼠更敏感, 是一个新的动物模型。

【关键词】 PPAR α 转基因小鼠; PPAR α 激动剂; 肝毒性; 肾毒性

【中图分类号】 R743.31; Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)03-0316-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.018

Application of PPAR α transgenic mice in the evaluation of drug toxicity

HE Yin-li, GUO Xun, ZHAO Xian-li, PEI Yan-yu, SUN Jing-jiang, GAO Hong

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medical Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 **Objective** To explore whether PPAR α transgenic mice are more sensitive animal models in the evaluation of toxicity of PPAR α agonists. **Methods** Twenty-eight 8-week old PPAR α transgenic mice (Tg) and 28 C57BL/6J mice (WT) with half males and half females were randomly divided into high dose group (400 mg/kg of clofibrate), low dose group (30 mg/kg of clofibrate) and solvent control group (10% sodium carboxymethyl cellulose). The time of gavage administration lasted 28 days. The blood biochemistry, organ coefficient and pathological changes of the heart, liver, kidney were tested after the drug administration. The growth of mice was also recorded. **Results** ① Blood biochemistry: Compared with the WT male administration group, in the Tg male administration group, the levels of blood creatinine (CREA) and aspartate aminotransferase (AST) were markedly increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). ② Organ coefficient: Compared with the Tg control group, the kidney coefficients of Tg administration group were significantly increased ($P < 0.01$, $P < 0.05$). ③ Histopathology: Compared with the WT administration group, the pathological damages of liver and kidney were more serious in the Tg administration group. **Conclusions** Compared with C57BL/6J mouse, PPAR α transgenic mice are more sensitive in evaluation of hepatotoxicity and nephrotoxicity of PPAR α agonists. It is a new animal model.

【Key words】 PPAR α transgenic mouse; PPAR α agonist; Hepatotoxicity; Nephrotoxicity

过氧化物酶体增殖激活受体 α (peroxisome proliferator-activated receptor- α , PPAR α) 是脂肪酸氧化酶基因的主要转录调控子, PPAR α 激动剂临床上主

要用于高甘油三酯血症的治疗。氯贝丁酯 (clofibrate) 属于贝特类药物, 是 PPAR α 激动剂, 通过调节脂肪 β -氧化降低血脂^[1], 在临床上主要用于以甘

【基金项目】 国家十二五重大新药创制专项 (2013ZX09302302-002)。

【作者简介】 贺银丽 (1990-), 女, 硕士生, 研究方向: 药物安全评价。E-mail: heyinli414@163.com。

【通讯作者】 高虹, 研究员, 硕士生导师。E-mail: gaohongdws@aliyun.com。

油三酯增高为主的高脂血症,但因其毒副作用较大,现临床已淘汰此药物。本实验所使用的 PPAR α 转基因小鼠体内高表达人 PPAR α 基因,我们将其应用在 PPAR α 激动剂氯贝丁酯的毒理学评价中,期望能更加敏感地发现其毒性,为 PPAR α 激动剂类药物的临床前毒理学评价寻找更加快速、灵敏、准确的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 8 周龄 C57BL/6J 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】。清洁级 PPAR α 转基因小鼠,由中国医学科学院医学实验动物研究所遗传中心构建【SCXK(京)2009-007】,遗传背景为 C57BL/6J 小鼠,在本实验室繁育【SYXK(京)20130014】。

1.2 主要试剂及仪器

实验药品:氯贝丁酯(百灵威科技有限公司),羧甲基纤维素钠(广东汕头市西陇化工厂有限公司);主要仪器:日立 7100 生化自动分析仪。

1.3 动物分组及给药方法

8 周龄 PPAR α 转基因小鼠(Tg)和 C57BL/6J 野生小鼠(WT)各 28 只,每组雌雄各半,体重 18 ~ 22 g,分组及给药剂量见表 1。溶媒对照为 1% 甲基纤维素钠,灌胃给药 28d,每只动物灌胃体积为 0.2 mL/10 g 体重。各组小鼠在同等的屏障环境中饲养,自由摄食、饮水,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

表 1 实验小鼠分组及给药方法

Tab.1 The medication method and grouping of laboratory mice

品系 Animal types	组别 Groups	数量 Amount	剂量/mg/kg Doses
PPAR α 转基因小鼠 (PPAR α transgenic mouse, Tg)	高剂量组(HDG)	10	400
	低剂量组(LDG)	10	300
	溶媒对照组(SCG)	8	0
C57BL/6J 小鼠 (C57BL/6J wild type mouse, WT)	高剂量组(HDG)	10	400
	低剂量组(LDG)	10	300
	溶媒对照组(SCG)	8	0

注:HDG 代表 high dose group,LDG 代表 low dose group,SCG 代表 solvent control group。

Note. HDG represents high dose group, LDG represents low dose group, SCG represents solvent control group.

1.4 观察指标与方法

1.4.1 大体观察与体重测定

每天观察一次,观察指标包括小鼠外观和行为

(包括小鼠的皮肤毛发,眼和黏膜的变化,呼吸,中枢神经系统,四肢活动及其他表现)、排泄物等。每周测定小鼠体重,计算每周的体重增长率。

1.4.2 血生化指标测定

末次给药禁食不禁水 12 ~ 18 h 后,取全血 0.3 ~ 0.4 mL,收集血清,在日立 7100 生化自动分析仪上测定。主要测定肝功能和肾功能指标,包括丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、尿素(UN)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、肌酐(CREA)、甘油三酯(TG)。

1.4.3 脏器系数测定与组织病理学检查

采血结束后脱颈椎处死动物,取动物心脏、肝脏、肾脏,脏器称重后以 10% 中性福尔马林固定,组织经修块,梯度酒精脱水,石蜡包埋,切片厚度 5 μ m,HE 染色,光镜下检查。脏器系数 = 脏器重量/动物体重 \times 100%。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 20.0 统计软件进行分析,结果以($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义, $P < 0.01$ 为差异具有显著性。统计学方法为 t 检验,方差分析,非参数检验。

2 结果

2.1 一般体征观察

整个实验过程中动物眼睛与黏膜无异常分泌物,呼吸平稳,活动正常,无抽搐震颤等异常现象发生。给药组大便较稀,但仍成形。

2.2 体重变化

PPAR α 转基因小鼠和 C57BL/6J 小鼠在给药 28d 后,Tg 组与 WT 组比较,体重变化率差异无显著性($P > 0.05$)。但是 Tg 雄性高剂量组在给药第 3 周、第 4 周体重持续下降,而 WT 雄性高剂量组体重在第 3 周出现短暂下降后第 4 周又增加(图 1)。该结果提示 Tg 雄性小鼠对氯贝丁酯毒性更加敏感。

2.3 血生化指标变化

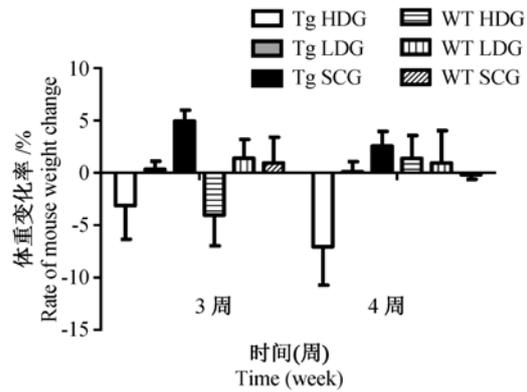
参考本中心 C57BL/6J 小鼠和 PPAR α 转基因小鼠背景数据^[2],并与本实验溶媒对照组比较,有显著性差异的生化指标见表 2。

从表 2 可以看出,①各给药组肌酐(CREA)均显著高于对照组($P < 0.01$),②Tg 雄性高、低剂量组肌酐值高于 WT 雄性高、剂量组($P < 0.05$)。对于天门冬氨酸氨基转移酶(AST),①Tg 雄性高、低剂量组 AST 显著高于对照组($P < 0.01, P < 0.05$);

②Tg 雄性高、低剂量组 AST 值显著高于 WT 雄性高、剂量组 ($P < 0.01, P < 0.05$)。Tg 雄性的肾脏损伤指标 CREA、肝脏损伤指标 AST 较 WT 雄性升高更多,提示 Tg 雄性小鼠肾脏损伤、肝脏损伤更严重。

2.4 脏器系数

①心脏系数:各给药组与对照组比,差异无显著性。②肝脏系数:Tg 和 WT 各高、低剂量组均显著高于对照组 ($P < 0.01, P < 0.05$) (图 2A)。③肾脏系数:Tg 高、低剂量组均显著高于对照组 ($P < 0.01, P < 0.05$); WT 高剂量组显著高于对照组 ($P < 0.05$) (图 2B)。WT 低剂量组肾脏系数并没有显著性增加,提示 WT 小鼠的肾脏损伤没有 Tg 小鼠严重。



注:HDG:高剂量组,LDG:低剂量组,SCG:溶媒对照组。
 图1 给予氯贝丁酯后雌性小鼠体重变化率
 Note. HDG: High dose group,LDG: Low dose group,SCG: Solvent control group.

Fig.1 The change rate of mouse body weight after the clofibrate administration

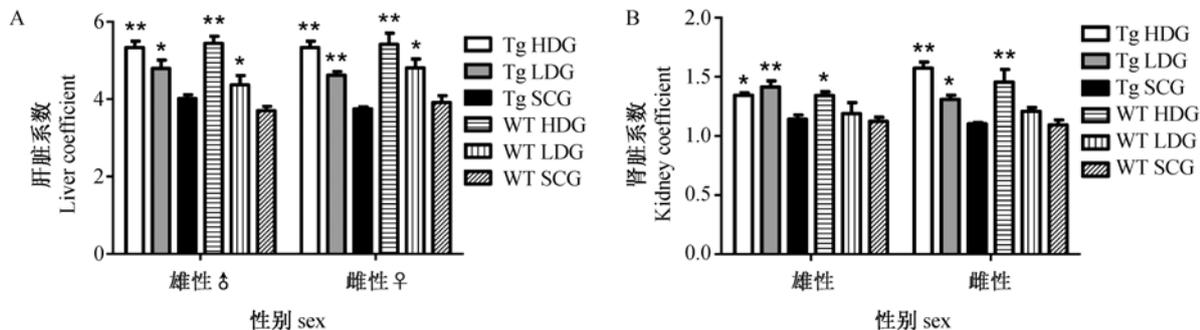
表2 给予氯贝丁酯后生化指标变化

Tab.2 Changes of serum biochemistry in the mice after clofibrate administration

品系 Animal types	组别 Groups	CREA/ $\mu\text{mol/L}$		AST/U/L		TG/ mmol/L	
		♂	♀	♂	♀	♂	♀
Tg	HDG	15.92 ± 0.73 ** #	16.51 ± 2.59 **	243.7 ± 28.4 ** ##	228.8 ± 30.4	1.11 ± 0.11 ** #	0.92 ± 0.17 **
	LDG	16.07 ± 0.54 ** #	15.05 ± 0.92 **	202.7 ± 24.0 * #	204.8 ± 16.9	1.40 ± 0.11 *	0.88 ± 0.14 ** #
	SCG	10.57 ± 2.87	10.20 ± 0.73	145.7 ± 15.6	187.3 ± 14.6	1.83 ± 0.33	1.35 ± 0.17
WT	HDG	14.02 ± 0.83 **	15.06 ± 1.04 **	147.3 ± 6.5	180.0 ± 26.0	1.26 ± 0.08	1.02 ± 0.15
	LDG	14.85 ± 0.81 **	14.41 ± 0.53 **	142.0 ± 3.6	173.0 ± 18.9	1.47 ± 0.12	1.21 ± 0.20
	SCG	10.16 ± 1.33	10.55 ± 0.25	132.7 ± 28.5	155.3 ± 16.1	1.67 ± 0.05	1.52 ± 0.32

注:HDG:高剂量组,LDG:低剂量组,SCG:溶媒对照组。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,相同基因型、相同性别,不同剂量相比较;# $P < 0.05$,## $P < 0.01$,相同剂量、相同性别,不同基因型相比较。

Note. HDG: High dose group; LDG: Low dose group; SCG: Solvent control group; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, administration group vs. control group of the same genotype and same sex; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, Tg vs. WT of the same dose and the same sex.



注:HDG:高剂量组,LDG:低剂量组,SCG:溶媒对照组。A:肝脏系数,B:肾脏系数。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,相同基因型、相同性别,不同剂量相比较。

图2 氯贝丁酯对小鼠肝脏系数、肾脏系数的影响

Note. HDG: High dose group; LDG: Low dose group; SCG: Solvent control group. A: Liver coefficient, B: Kidney coefficient. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, administration group vs. control group of the same genotype and the same sex.

Fig.2 Changes of liver coefficient and kidney coefficient after clofibrate administration

2.5 病理组织学变化

Tg 高剂量组:50% 发生肝细胞溶解坏死,伴有再生,100%发生肾小球上皮细胞空泡变性。Tg 低剂量组:50%发生肝细胞再生,50%发生肾小管上皮细胞脂肪变性、肾小管上皮细胞核固缩。WT 高剂量组:50%发生肾小球上皮细胞空泡变性,肝脏未见

病变。WT 低剂量组:50% 发生小灶性肝细胞坏死炎细胞浸润,50%发生肾小球上皮细胞空泡变性肾小管上皮细胞脂肪变性。Tg、WT 对照组各受检脏器未见明显病理改变。

从病理组织学结果可以看出氯贝丁酯对 Tg 小鼠肝脏、肾脏的病理损伤程度比 WT 小鼠更严重。

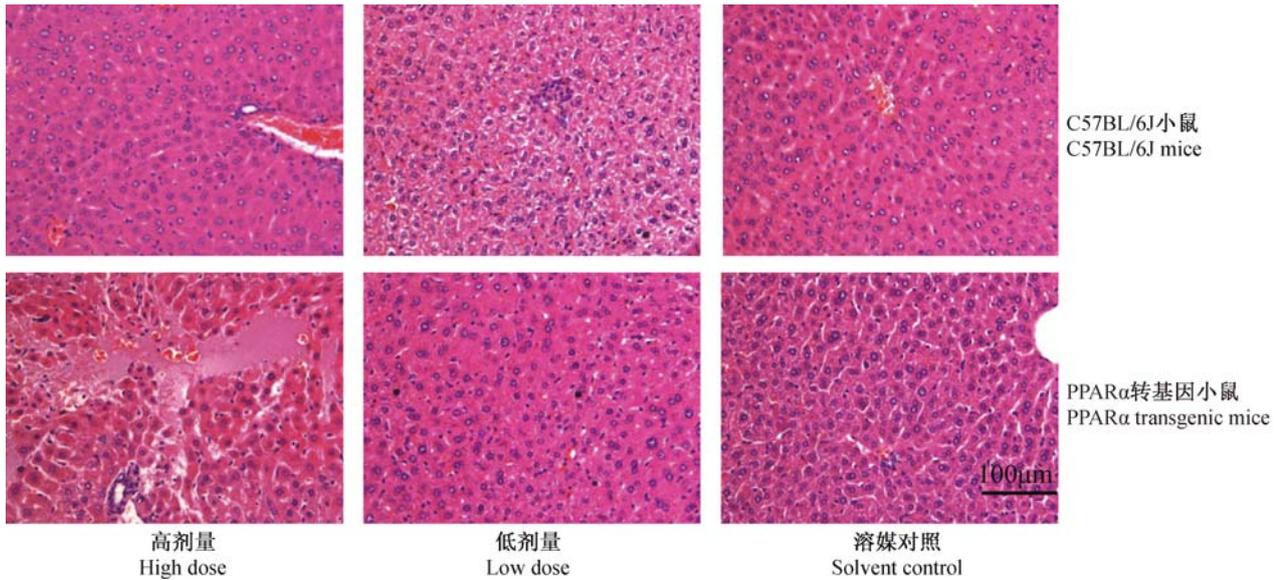


图3 给予氯贝丁酯后肝脏病理变化(HE染色,标尺=100 μm)

Fig.3 Histological changes of the liver after clofibrate administration. HE staining. Bar = 100 μm

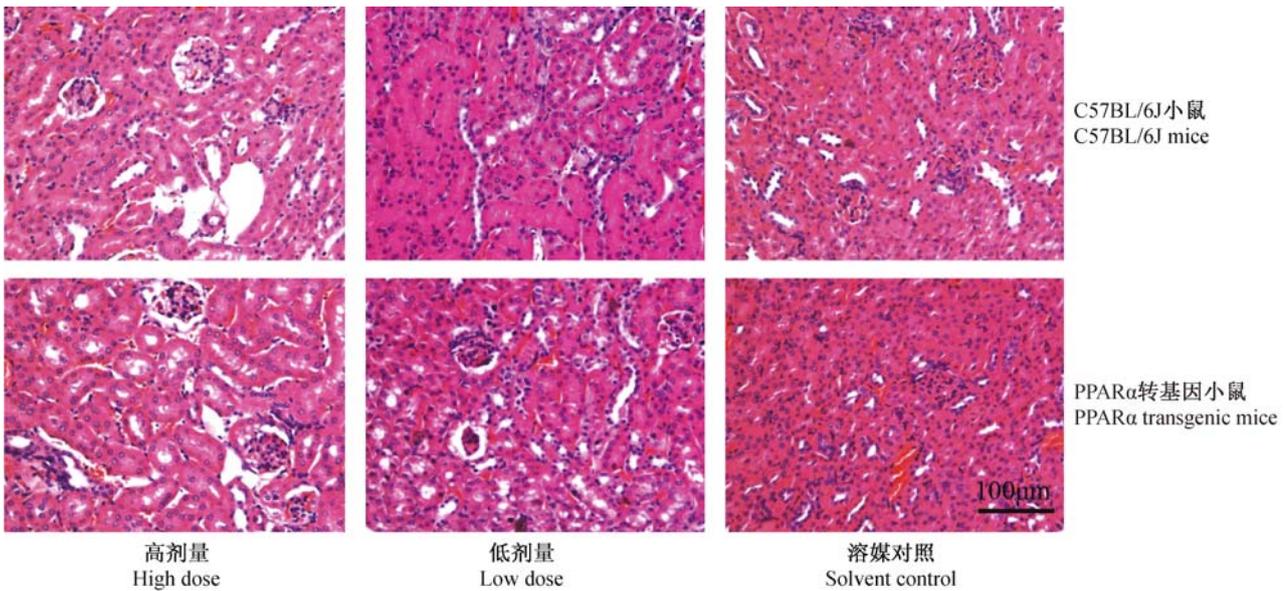


图4 给予氯贝丁酯后肾脏病理变化(HE染色,标尺=100 μm)

Fig.4 Histological changes of the kidney after clofibrate administration. HE staining. Bar = 100 μm

3 讨论

过氧化物酶体增殖激活受体(peroxisome proliferator-activated receptors, PPARs)是核受体家族中的配体激活受体,PPARs与配体结合激活后,与视黄醇类X受体(RXR)形成异二聚体,形成的异二聚体与靶基因启动子上游结合,最终调节靶基因的转录^[3]。PPARs有三个不同亚型,包括α、β、γ。PPARα通过基因转录控制氧化物酶、线粒体的β-氧

化途径、脂肪酸摄取和甘油三脂的分解,从而影响脂质代谢^[4-7],主要分布在代谢活性较高的组织中,如肝、肾、心脏,是脂类代谢分子基础的研究热点^[8]。

在新药研发过程尤其是临床试验阶段中,大量候选药物因为安全性问题被迫终止开发^[9]。阿斯利康公司研发的PPAR-α/γ双重激动剂Tetaslitazar在1个II期和4个III期临床试验后,终止了对Tetaslitazar的研究,因为在III期临床研究发现该药使血中肌酐升高,存在肾毒性。转基因动物模型是

基因组中含有外来遗传物质的动物,可建立敏感动物品系及人类相同疾病的动物模型^[10],在药物安全评价中,与传统动物模型比较,具有敏感性高、结果真实可靠、外推行强、时间短、花费小等优势^[11]。目前,PPAR α 转基因小鼠在国内外有用于心肌病的研究^[12],肝癌的发生机制的研究^[13]等。本实验使用 PPAR α 转基因小鼠评价 PPAR α 激动剂氯贝丁酯的毒性,期望能更加敏感地发现其毒性。

CREA 是评价肾功能的重要生化指标,增高多见于肾功能不全、急慢性肾小球炎等,肾脏代谢废物的能力下降。给药结束后,Tg 雄性小鼠 CREA 值显著高于 WT 雄性小鼠,提示 PPAR α 转基因雄性小鼠对该药物产生的肾脏损伤更加敏感,与阿斯利康公司研发的 PPAR- α/γ 双重激动剂 Tesalitamiz 在临床试验中所产生的副作用一致。AST 是评价肝功能的重要生化指标,主要存在于肝细胞线粒体内,当肝脏发生严重坏死或破坏时,血清中浓度会偏高,增高常见于肝炎、脂肪肝、肝癌等疾病^[14]。Tg 雄性小鼠 AST 显著高于 WT 雄性小鼠,提示 PPAR α 转基因雄性小鼠对该药物产生的肝脏损伤更加敏感。从表 2 中可以看出,Tg 雄性小鼠给药组 AST 与对照组比较有升高,但未见显著性差异,可能是因为雌性小鼠的生理周期导致酶水平的变化,也可能是性激素影响药物代谢转化的结果^[15]。此外,本实验结果中还发现 Tg 给药组甘油三酯(TG)与 Tg 对照组比有显著下降($P < 0.01, P < 0.05$),而 WT 组并没有显著下降,说明 PPAR α 转基因小鼠在评价 PPAR α 激动剂类药物的药效时,也是一个更加敏感的动物模型,与本课题组前期所做的药理学研究结果一致^[16]。

脏器重量变化是药物毒性反应的敏感指标之一,从病理学角度,当脏器出现细胞肿胀、出血、积水、增生等病理变化时,该脏器的重量可能增加^[17]。本实验中,各给药组肝脏系数、肾脏系数均有显著性增加,而心脏系数并没有显著性增加,与病理结果一致。根据本试验血生化、脏器系数和病理检测结果提示,PPAR α 转基因小鼠与 C57BL/6J 野生小鼠相比,在评价 PPAR α 激动剂毒性方面是一个新的、敏感的动物模型。

参 考 文 献

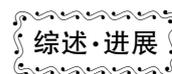
[1] Van Raalte DH, Li M, Pritchard PH, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future [J]. *Pharm Res*, 2004, 21 (9): 1531 - 1538.

[2] 尉明晓,陈威,高洁,等. PPAR α 转基因对小鼠的生理、生

化等影响研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23 (05): 5 - 11, 0, 2.

- [3] Bensinger SJ, Tontonoz P. Integration of metabolism and inflammation by lipid-activated nuclear receptors [J]. *Nature*, 2008, 454(7203): 470 - 477.
- [4] Kersten S, Desvergne B, Wahli W. Roles of PPARs in health and disease [J]. *Nature*, 2000, 405 (6785): 421 - 424.
- [5] Goto T, Takahashi N, Kato S, et al. Phytol directly activates peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha) and regulates gene expression involved in lipid metabolism in PPARalpha-expressing HepG2 hepatocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 337 (2): 440 - 445.
- [6] Qiu L, Ye H, Chen L, et al. Red clover extract ameliorates dyslipidemia in streptozotocin-induced diabetic C57BL/6 mice by activating hepatic PPARalpha [J]. *Phytother Res*, 2012, 26 (6): 860 - 864.
- [7] Zeng T, Zhang CL, Song FY, et al. Garlic oil alleviated ethanol-induced fat accumulation via modulation of SREBP-1, PPAR-alpha, and CYP2E1 [J]. *Food Chem Toxicol*, 2012, 50 (3 - 4): 485 - 491.
- [8] Everett L, Galli A and Crabb D. The role of hepatic peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) in health and disease [J]. *Liver*, 2000, 20 (3): 191 - 199.
- [9] Boverhof DR, Zacharewski TR. Toxicogenomics in risk assessment: applications and needs [J]. *Toxicol Sci*, 2006, 89 (2): 352 - 360.
- [10] Vijg J, van Steeg H. Transgenic assays for mutations and cancer: current status and future perspectives [J]. *Mutat Res*, 1998, 400 (1 - 2): 337 - 354.
- [11] 张峻,戴宇飞. 转基因动物模型在毒理学中的应用 [J]. *卫生研究*, 2012, 41 (05): 868 - 873.
- [12] Hopkins TA, Sugden MC, Holness MJ, et al. Control of cardiac pyruvate dehydrogenase activity in peroxisome proliferator-activated receptor-alpha transgenic mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285 (1): H270 - 276.
- [13] Yang Q, Nagano T, Shah Y, et al. The PPAR alpha-humanized mouse: a model to investigate species differences in liver toxicity mediated by PPAR alpha [J]. *Toxicol Sci*, 2008, 101 (1): 132 - 139.
- [14] Damsgaard T, Clausen N, West-Nielsen E, et al. Early diagnosis of acute myocardial infarction by means of aspartate aminotransferase, creatine kinase and creatine kinase isoenzyme MB [J]. *Dan Med Bull*, 1979, 26 (6): 298 - 302.
- [15] 李兰芳,李国风,解丽君. 大、小鼠口服腰痛宁胶囊的急性毒性研究 [J]. *实验动物科学与管理*, 2004, (04): 12 - 15.
- [16] 魏明晓,秦超,陈威,等. PPAR α 转基因小鼠在药物评价中的应用研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2013, 23 (01): 18 - 22.
- [17] 袁本利. 药物安全评价中脏器系数的意义及不足 [J]. *中国新药杂志*, 2003, 12 (11): 960 - 963.

[收稿日期] 2015-01-06



抑郁症动物模型及评价方法研究进展

薛涛¹, 邬丽莎¹, 刘新民², 王琼^{1*}

(1. 泸州医学院, 四川泸州, 646000; 2. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193)

【摘要】 抑郁症 (depression) 是一种严重危害人类身心健康的全球性的主要精神卫生问题。目前病因及病理机制尚不完全清楚, 但随着社会经济的发展, 生活节奏加快, 人们的压力增加, 情感冲击加大, 造成抑郁症发病率逐年增长。随着对抑郁症研究的深入, 抑郁症动物模型及其评价方法被广泛运用于抑郁症发病机制研究和抗抑郁新药的研发。动物模型模拟人类疾病状态的程度以及评价方法的可靠性和准确性直接影响实验研究结果的价值。本综述主要介绍了常用的抑郁症动物模型, 及整体、器官、分子水平的评价指标, 为后续新型抗抑郁药物的研发提供文献参考。

【关键词】 抑郁症; 动物模型; 行为学; 生化指标

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0321-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.019

Research progress on animal models of depression and their evaluation methods

XUE Tao¹, WU Li-sha¹, LIU Xin-min², WANG Qiong^{1*}

(1. Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 2. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100193)

【Abstract】 Depression, a seriously harmful disease to peoples' physical and mental health, is prevailing worldwide. But the etiology and pathological mechanism is still not fully uncovered. With the development of social economy and the pace of life speeding up, increasing pressure and vulnerable emotion cause depression incidence increased rapidly. For the further research on depression, study of depression mechanism and antidepressant drugs highly depends on effective animal models. The degree of similarity of animal models to human disease status and the accuracy and reliability of evaluation methods of animal models directly influence the value of the results of experiments. In this article we introduce the commonly used animal models of depression, the evaluation indicators at organism, organ, and molecular levels, and to provide theoretical references for the further studies on depression.

【Key words】 Depression; Animal model; Behavior; Biochemical criteria; Evaluation methods

抑郁症属于精神性疾病, 在 2002 年, 世界卫生组织已将抑郁症确定为世界第四大疾病, 其主要以情绪低落、兴趣丧失、思维迟缓为主要特征, 严重者有自杀念头及行为, 因其发病普遍, 复发率、致残率、致死率“三高”特点^[1]。目前, 抑郁症发病率逐年增加, 全球有 9 亿以上人口深受其害, 已成为威胁人类

身心健康的“杀手”, 预测到 2020 年, 其将上升为世界第二大疾病, 由此可见, 防治抑郁症的创新药物研发已成为医药科学发展的重要内容。其中, 抑郁症的机制研究和抗抑郁药的新药开发都离不开动物模型的建立^[2]。有关抑郁症的动物模型有很多, 目前建立模型的方法主要包括: 物理方法、化学方法、生

【基金项目】 全军医药卫生“十二五”科研项目 (BWS11J052); 人因工程重点实验室开放基金资助项目 (HF2012-K-06); 四川省科技厅-泸州市人民政府-泸州医学院联合科研基金项目 [14JC01323-LH50]。

【作者简介】 薛涛, 女, 硕士研究生, 研究方向: 神经药理, E-mail: 549488512xuetao@sina.com。

【通讯作者】 王琼, 女, 医学博士, 副研究员, 博士生导师, 研究方向: 中药神经药理学与航天医学, E-mail: wqimlad@126.com。

物方法 3 大类。本文将按照建模方法以及其评价方法进行综述。

1 抑郁症动物模型

大部分人类疾病动物模型(含抑郁症动物模型)主要参照以下 4 个原则:①动物行为表现与疾病具有相似性;②动物病理生理学改变与疾病具有相似性;③造模手段与疾病的病因有关联;④现有治疗疾病的药物治疗模型动物有效。学者们根据以上 4 个原则中的一个或几个,建立了以下多种抑郁症动物模型。

1.1 应激模型

1.1.1 绝望模型(behavioral despair, BD)

这类模型包括强迫游泳实验和悬尾实验。

(1) 大、小鼠强迫游泳实验

该模型最早由 Porsolt 等^[3]提出,大、小鼠被迫放在局限且不可逃避的游泳环境中,其将拼命游动,试图逃脱,随之感到逃脱无望,便不再挣扎和游动,将此状态称为“行为绝望”。将大、小鼠从进水里到第一次静止的时间以及总的静止时间作为抑郁行为发生和抑郁程度的指标,越快放弃实验动物越抑郁。实验具体做法是:小鼠强迫游泳实验分 1 天进行:让小鼠在 20~25℃水中强迫游泳 6 min,记录后 4 min 内不动时间即可;大鼠强迫游泳分 2 天进行,第 1 天适应环境,即让大鼠在 20~25℃的深水中强迫游泳 15 min,取出后擦干,放入笼中,第 2 天,在同一时间点,相同条件下进行大鼠强迫游泳 5 min,记录不动时间。在游泳实验中主要测试三个指标:①不动时间:大、小鼠在水中停止挣扎,仅将头露出水面漂浮的时间;②游泳时间:包括大、小鼠四肢划动水面、前肢拍打水面以及俯冲的时间;③攀爬时间:动物抓爬玻璃瓶壁的时间。需要注意的是:在本实验中水温是影响实验结果的一个很重要的因素,水温高于 25℃或低于 20℃都会显著增加动物游泳的不适感,缩短不动时间,其次,抑郁动物模型表现的“不动”是一种主动行为,和游泳空间的大小无关。

(2) 小鼠悬尾实验

悬尾实验也是一种“绝望模型”^[4],两种模型具有一样的理论基础,即悬尾小鼠为克服不正常体位而挣扎活动,当它们认识到无法逃脱时,会产生类似行为绝望的不动行为。具体做法是:将小鼠用胶带固定在其尾部距末端约 1 cm 处,使小鼠保持悬挂状态 6 min,记录后 4 min 的不动时间。陶震等^[5]通过

小鼠悬尾实验和小鼠强迫游泳实验发现人参总皂苷能显著缩短二者的不动时间,具有显著的抗抑郁作用。

此方法快捷、简便,多用于抗抑郁药物初筛以及对其他抑郁症动物模型行为改变的评价实验。两种模型有相同的理论基础,作用机制略有不同,可能与神经递质的变化及受体功能有关,但目前尚无定论^[6]。该模型存在的问题是:模型中动物的不动状态到底是由疲劳、适应还是抑郁导致仍存在争议,短暂的应激是否产生抑郁状态也值得怀疑。

1.1.2 获得性无助(learned helplessness, LH)模型

该模型是由美国心理学家 Seligman 等^[7]于 1967 年模拟抑郁症的某些主要特征建立的,最初是将实验动物(狗)置于无法逃避的电击笼里,电击前信号灯亮,由此反复多次电击后,打开笼门,给以信号灯,动物不出现逃避行为,反而倒地呻吟,呈现出的逃避无望的现象,同时还伴有体重减轻、运动性活动减少、攻击性降低等行为改变。现多用大鼠代替狗来制作此模型,具体做法是:实验第 1、2 天给予大鼠 30 次不可逃避的足底电击(0.65 mA),每次电击持续 30 s,间歇期半随机 18~42 s。第 3 天筛选可进行实验的大鼠:给予可逃避电击 30 次,每次电击持续 6 s,间歇期 24 s。在 30 次训练周期中,逃避失败次数超过 25 次就可以认为获得无助模型建成^[8]。该模型的优点在于它比较全面的模拟了抑郁症的症状,已日益用于抗抑郁药物的作用机制的研究。

1.1.3 慢性不可预测应激模型(chronic unpredictable stress model, CUMS)

该模型最早于 1982 年^[9]提出并经 Willner 等^[10]逐步发展而成,它的出现为抑郁症的研究开辟了新的前景。CUMS 抑郁症模型的制作是将多种日常生活中温和性应激因子连续长期作用于大、小鼠以致动物抑郁。这些刺激因素主要包括两大类:周围环境的改变(潮湿垫料、倾斜鼠笼、通宵照明、昼夜颠倒、摇晃等);身体的刺激(禁食、禁水、电击、夹尾、冰水游泳、高温刺激等)。以上刺激每日随机给予一种,造模结束后进行开场实验以及糖水偏好测定。一般动物经过 3~5 周的刺激机体便会出现功能障碍,导致精神性疾病抑郁症的发生,一旦此模型导致大鼠的行为改变,这种改变可以持续 3 个月左右^[11]。该模型与抑郁症具有高度的相似性,可以引起一系列与抑郁症患者相似的行为和神经系统的改变,是目前公认的经典模型之一,可能是最有效的抑

郁症动物模型,传统抗抑郁西药氟西汀可以在一定程度上扭转这些变化^[12]。常用于抗抑郁药物的筛选、作用机制及抑郁症病理生理机制的研究。该模型的缺点主要是:耗时较长,劳动量大,结果不稳定,难重复。此外,本实验还有一大难点是:造模的强度和um时间难以掌握,实验组动物刺激过于强烈动物会对应激产生耐受或者动物变得异常狂躁,刺激若过于温和,动物则不易产生抑郁样行为。

1.2 药物诱导的抑郁症动物模型

1.2.1 利血平拮抗模型

利血平拮抗(reserpine reversal)模型为最早用于抗抑郁药研究的药物诱导的动物模型^[13]。利血平是通过耗竭脑组织中的儿茶酚胺和 5-羟色胺贮存来抑制中枢神经系统,实验动物体内注射利血平后先后会出现上眼睑下垂、运动不能、体温降低等表现。眼睑下垂分为四个等级,实验者凭此进行打分,眼闭 1/4 为 1 分,眼闭 1/2 为 2 分,眼闭 3/4 为 3 分,全闭为 4 分^[14];其次,运动不能可通过空场实验(见 2.1.2)量化小鼠活动下降程度;体温下降则可通过测量小鼠肛温类衡量。国际上对于利血平模型剂量没有统一的标准,国内有学者发现 4 mg/kg 的注射剂量建模比较稳定^[15]。该模型被广泛地用于新型抗抑郁药物的筛选,其缺点表现为选择性较差,如多巴、苯丙胺等具有反利血平作用,产生假阳性抗抑郁作用,可信性受到限制,目前仅用于抗抑郁药的初筛。

1.2.2 高剂量阿扑吗啡模型

该模型是 Schekunov 在 1968 年首先提出。阿扑吗啡是一种突触后 DA 受体拮抗剂,皮下注射高剂量(16.0 mg/kg)阿扑吗啡诱导的低体温可被一些抗抑郁药逆转。这种模型本质上并没有模拟任何抑郁症行为学症状,但是能揭示药物提高突触去甲肾上腺素浓度的活性,目前仅用于抗抑郁药物的初筛。Xu 等^[16]证实了反式-白藜芦醇对此模型就存在明显的拮抗作用。

1.2.3 5-羟色氨酸(5-HTP)诱导的甩头行为

5-HTP 是 5-HT 的前体物质,经脱羧转变为 5-HT 起作用。尸检显示^[17],抑郁症患者脑脊液中 5-HT 含量降低。小鼠腹腔内注射 5-HTP,10 min 后可以诱导出小鼠甩头行为,这种甩头行为是 5-HT 导致神经元放电的表象。该模型常用于研究筛选作用于中枢 5-HT 或 NA 系统的抗抑郁药。杨洁^[18]、王海岭等^[19]用该模型证实了有效的抗抑郁药能显

著增加 5-HTP 诱导的小鼠甩头次数。

1.2.4 小鼠育亨宾模型(yohimbine potentiation model in mice)

该模型主要用于观察抑制去甲肾上腺素重摄取的抗抑郁药,育亨宾是一种天然的生物碱,可促进去甲肾上腺素的释放,抗三环类和大多数非典型抗抑郁药可以显著增加育亨宾在动物身上的毒性,即致死作用(增加小鼠心率和血压,最终导致死亡)。该模型容易发生假阳性,因此该模型可信性不高,配合其他模型用作抗抑郁药物的初筛。刘屏等^[20]证实了远志 3,6-二芥子酰基蔗糖能显著增强育亨宾的毒性作用。

1.3 其他模型

1.3.1 嗅球切除模型

嗅球位于端脑前,与大脑皮层及皮层下脑结构存在广泛的神经联系,嗅球与边缘系统功能有关,影响行为、情绪和内分泌。手术切除双侧嗅球的大鼠表现出逃避不能(自主活动性增加和被动回避反应能力欠缺)和血浆类固醇激素升高^[22],常伴有应激反应增强,进食和性行为改变等,这些症状与临床内源性抑郁病人的特征相似,长期给予抗抑郁药可反转切除嗅球引起的行为改变和降低血浆中类固醇水平,与临床抗抑郁治疗的时程相似^[23]。其优点是抑郁动物的病理生理学改变与人类抑郁相似度高,缺点在于实验难度大,动物死亡率较高。

1.3.2 操作行为模型-72s 低频率差式强化程序

该模型是美国 Seiden 行为药理组在 20 世纪 80 年代初建立的一种自动程序化动物模型。该模型要求动物(限食限水)压一次操作杆后,需等待 72 s,压杆才会获得食或水,因此该模型又称之为等待行为(waiting behavior)^[24]。此模型常用于抗抑郁药的筛选和研究。

除以上模型外,尚有脑卒中后抑郁模型^[25]、睡眠剥夺动物抑郁模型^[26]、更年期抑郁模型^[27]、孤养模型^[28]、电刺激小鼠角膜模型^[29,30]、Tryon Maze Dull 遗传型大鼠^[31]等,也都部分模拟了人类抑郁症症状,可用作抗抑郁症新药和抑郁症发病机制的研究。

2 抑郁症模型的实验室评价

2.1 整体动物的行为学评价

2.1.1 强迫游泳实验和悬尾实验

强迫游泳实验和悬尾实验既可以作为抑郁症动

物模型,也可以被用于评价抗抑郁药物药效。

2.1.2 空场实验(open field test, OFT)

OFT 是评价实验动物在陌生环境中自主行为、探究行为与紧张度的一种方法。国内学者王琼等^[32]在传统方法基础上研制了空场实验计算机实时检测分析处理系统,只需将实验动物面壁放入边缘区,计算机自动记录规定时间内动物的运动情况,包括运动时间、运动速度、运动距离,中央区运动比率等等。

2.1.3 糖水偏好实验

蔗糖饮水实验是根据动物对甜味的偏好而设计的一种检测方法,快感缺失指的是体验快乐的能力下降,是精神疾病及行为障碍的重要特征,当大鼠出现抑郁样行为时,其对糖水的嗜度降低^[33]。具体方法:造模前,进行糖水偏好训练及基线测试,根据测试结果,将动物分组,实验结束后再测量一次。检测共需 3d,检测期间动物均双瓶饲养,第 1 天,两瓶均装 1%~2% 蔗糖水,第 2 天,一个瓶装蔗糖水,一个瓶装纯净水,第 3 天实验动物禁食禁水。禁食禁水 24 h 后,每笼大鼠同时给予事先称量好的两瓶水:一瓶蔗糖水,一瓶纯水。1 h 后,取走两瓶并称量,计算动物的总液体消耗,糖水消耗,纯水消耗,糖水偏好指数。按公式计算糖水偏好指数% = 糖水消耗量 / (糖水消耗量 + 纯水消耗量) × 100%^[34]。

2.1.4 新奇事物探索实验

将动物放在新奇环境中适应 30 min,取出,放回原笼。24 h 后,在同一环境中间(圆心处)放置一新奇事物(半径 2 cm,高 4 cm),将动物面壁放入该环境,记录在 5 min 内首次接触新奇事物的时间。

2.1.5 新奇抑制摄食实验

该实验由 Dulawa 等^[35]于 2005 年提出,用来检测抗慢性抑郁症药物的药效。该实验测量动物到新环境后的进食潜伏期及食量,以评估抑郁症动物的焦虑状态。具体方法是:在测试区中心放一食物,动物禁食不禁水 48 h 后,检测 5 min 内摄食潜伏期(即第一次摄食时间,以开始咬食为标准)。

2.1.6 体重和摄食量的变化

在 CUMS 模型中,模型组大鼠都较正常对照组体重减轻,但究其原因,各学者意见不统一,有学者认为模型组体重减轻是由于大鼠情感抑郁,食欲下降导致体重增加缓慢;另外一些人认为模型组大鼠体重减轻是因为曾给予了禁食禁水刺激,直接导致大鼠体重增长缓慢,因此,体重不能成为抑郁症模型

成功与否的指标。临床上可以观察到有的抑郁症病人出现厌食、体重减轻;但也有患者贪食,体重增加。因此,体重的变化(以及变化率)和摄食量的改变不能用作衡量抑郁症模型成功与否的标准。

2.2 与抑郁症相关的生化指标

药物作用前后脑组织部位生物物质的变化是抑郁症药物研究开发的最重要指标^[36]。如以下各种指标均在一定程度上与抑郁症相关联。

2.2.1 氧化应激指标

抑郁症的发生与脑部情感相关中枢的结构及功能的损伤或变化密切相关。有研究显示^[37],在脑部结构及功能损伤过程中,氧自由基引起的氧化损伤是脑部功能继发性损害的主要原因之一。实验中常检测的指标有抗氧化指标超氧化物歧化酶(SOD)和氧化指标丙二醛(MDA)^[38]。

2.2.2 单胺类神经递质

单胺假说,即脑内单胺递质缺乏导致抑郁症,已为大多数人所接受。NE 合成的减少可引起嗜睡、精神运动迟滞、快感缺失等,DA 控制认知、情感、摄食和内分泌调节等功能,5-HT 系统则参与调节情绪、动机和食欲等^[39]。因此,多采用抑制神经递质再摄取、抑制神经递质灭活等方面的药物,增加脑内神经递质浓度来治疗抑郁症。

2.2.3 脑源性神经营养因子(BDNF)

BDNF 是广泛存在于中枢和外周神经系统,对各种神经的发育分化与生长再生中具有维持和促进作用。在动物实验中,慢性应激会导致海马部位 BDNF 表达减少^[40],临床实验也发现抑郁症患者海马和前额皮质 BDNF 表达水平显著低于正常人水平^[41]。有研究表明^[42],抗抑郁治疗能够增加 BDNF 的表达水平以及调节海马内神经发生,同时,抗抑郁药的作用又受 BDNF 表达水平和神经发生的调节。但也有研究表明,相同的慢性应激模型也没有减少动物脑内 BDNF 的表达^[43],甚至有 BDNF 表达增多的结果^[44],这可能与实验室环境、刺激种类、强度不同有关。

2.2.4 HPA 轴

下丘脑-垂体-肾上腺轴(HPA)是一个重要的内分泌轴,其作用机理如下:下丘脑分泌促肾上腺皮质激素分泌激素,激活垂体产生促肾上腺皮质激素,促肾上腺皮质激素促进肾上腺皮质组织增生以及皮质激素的生成和分泌。当机体受到强烈刺激时可使 HPA 轴兴奋,最终使得肾上腺合成分泌糖皮质激素

增多,高浓度的皮质醇会使患者脑内海马神经元损伤,导致认知能力下降^[45],另一方面,长时间应激引起的糖皮质激素持续增多会损伤负反馈机制。研究显示,抑郁症患者整天处于肾上腺皮质功能亢进状态,而 HPA 轴的这种亢进状态时依赖的,可逆的,此外,皮质酮浓度升高与学习记忆功能下降有关联^[46]。

由于抑郁症发病机制复杂,除以上陈述外,抑郁症的评价指标还有很多,如:神经细胞粘附分子(CHL1)^[47]、 ω -3 多不饱和脂肪酸^[48]、GFAP 蛋白^[49]、神经肽(NP)^[50]、 γ -氨基丁酸(GABA)^[51]等。

3 小结与展望

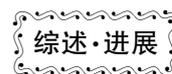
随着社会的发展和生活方式的改变,抑郁症患者逐年增多,各种抑郁症的患病率约占全球人口的 11%,现代医学认为本病病因复杂,至今尚未完全阐明,目前大多数抗抑郁药都存在抗抑郁谱窄、耐药性、副作用大、药价昂贵等不尽人意的弊端,开发研制高效低毒的抗抑郁新药已成为近年来研究的重点和热点。在抑郁症发病机制的研究中和抗抑郁新药的研发中,动物模型显得尤为重要。从上述抑郁症动物模型的分析可见,各种模型发生的病理生理机制各异,但都只表现抑郁症某一方面的症状,这些模型单独使用尚有难以克服的假阳性反应,而且因动物的品系、数量、实验环境和条件等因素不同,实验结果差异很大,因此,近年来,越来越多的学者倾向于以多种模型的结合来提高实验结果的可信性^[52]。其次,在抑郁症动物模型评价中,找到能准确反映抑郁症患者疾病发展的生物标志物也尤为重要,然而,此领域目前尚处于起步阶段,需进一步加强研究力度。随着新型抗抑郁药物的临床需求日益严峻,创新抗抑郁药的研制仍未有革命性的突破,不断完善动物模型和疾病评价指标将会对探索人类精神障碍疾病病理生理机制和治疗提供帮助。

参 考 文 献

- [1] H. Dang, Y. Chen, X. Liu, et al. Antidepressant effects of ginseng total saponins in the forced swimming test and chronic mild stress models of depression [J]. *Progr Neuro-psychopharmacol Biol Psychiatry*, 2009, 33: 1417-1424.
- [2] Willner P, Mitchell PJ. The validity of animal models of predisposition to depression [J]. *Behav Pharmacol*, 2002, 13(3): 169-188.
- [3] Porsolt RD, LePichon M, Jalfre M, et al. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatment [J]. *Nature*, 1977, 266(5604): 730-732.
- [4] Willner P. Validation criteria for animal models of human mental disorders: learned helplessness as a paradigm case [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1986, 10(6): 677-690.
- [5] 陶震, 鲁毅, 司梁宏, 等. 人参总皂苷对小鼠的抗抑郁作用 [J]. *药学与临床研究*, 2010, 18(4): 360-393.
- [6] Renard CE, Dailly E, David DJ, et al. Monoamine metabolism changes following the mouse forced swimming test but not the tail suspension test [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2003, 17(4): 449-455.
- [7] Seligman ME, Beagly G. Learned helplessness in the rat [J]. *J Comp Physiol Psychol*, 1975, 88(2): 534-541.
- [8] Kobayashi H, Iwata M, Mitani H, et al. Valproic acid improves the tolerance for the stress in learned helplessness rats [J]. *Neurosci Res*, 2012, 72: 355-363.
- [9] Kalz RJ, Sibel M. Further analysis of the specificity of a novel animal mode of depression: effects of an antihistaminic, antipsychotic and anxiolytic compound [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 1982, 16: 979-982.
- [10] Willner P, Towell A, Sampson D, et al. Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1987, 93: 358-364.
- [11] 高杉, 李蓐. 抑郁症动物模型及其评价标准研究进展 [J]. *天津中医药大学学报*, 2012, 31(1): 57-60.
- [12] Ducotet C, Griebel G, Belzung C. Effects of the selective non-peptide corticotropin-releasing factor receptor 1 antagonist antalarmin in the chronic mild stress model of depression in mice [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2003, 27: 625-631.
- [13] 晏忠, 罗质璞. 抗抑郁药理实验方法 [A]. 见: 张均田主编. 现代药理实验方法 [M]. 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998, 1061-1071.
- [14] Fouchard F, Menciau C, Duflos M, et al. Synthesis and pharmacological evaluation of new (in-dol-3-yl) alkylamines acting as potential serotonin uptake inhibitors [J]. *Arzneimittelforschung*, 1999, 49(2): 96-105.
- [15] 冯飞, 许崇涛. 利血平抑郁模型的剂量探讨 [J]. *汕头大学医学院学报*, 2007, 20(4): 223-225.
- [16] Xu Y, Wang ZG, You WT. Antidepressant-like effect of trans-resveratrol: Involvement of serotonin and noradrenaline system [J]. *Euro Neuropsychopharmacol*, 2010, 20(6): 405-413.
- [17] 杨权. 下丘脑-垂体-肾上腺轴应激反应的中枢控制 [J]. *生理学进展*, 2003, 31: 222.
- [18] 杨洁, 瞿融. 柴胡加龙骨牡蛎汤抗抑郁症剂量配比与量效学研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2013, 15(2): 64-66.
- [19] 王海岭, 师天元. 葛根异黄酮抗抑郁作用的实验研究 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2012, 18(21): 268-271.
- [20] 刘屏, 王东晓, 郭代红, 等. 远志 3,6-二芥子酰基蔗糖在药物诱发抑郁模型上的药效评价 [J]. *中国药理学杂志*, 2008, 43(18): 1391-1394.
- [22] Pandey DK, Mahesh R, Kumar AA, et al. A novel 5-HT2A receptor antagonist exhibits antidepressant-like effects in a battery

- of rodent behavioural assays; approaching early-onset antidepressants [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2010, 94(3): 363 – 373.
- [23] Sato A, Nakagawasai O, Tan-No K, et al. Effect of non-selective dopaminergic receptor agonist on disrupted maternal behavior in olfactory bulbectomized mice [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 210(2): 251 – 256.
- [24] Gronli J, Murison R, Fiske E, et al. Effects of chronic mild stress on sexual behavior, locomotor activity and consumption of sucrose and saccharine solutions [J]. *Physiol Behav*, 2005, 84(4): 571.
- [25] 刘福友, 杨石, 陈卫垠, 等. 脑卒中后抑郁大鼠模型的建立 [J]. *中国临床康复*, 2006, 10(42): 91 – 94.
- [26] Dugovic C, Maccari S, Weibel L, et al. High corticosterone levels in prenatally stressed rats predict persistent paradoxical sleep alterations [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(19): 8656 – 8664.
- [27] 韩萍, 宋卓敏. 解肝煎加味对更年期抑郁症大鼠神经递质 5-HT 及血脂水平的影响 [J]. *中医药临床杂志*, 2014, 26(4): 407 – 409.
- [28] Hennessy MB, Deak T, Schiml-Webb PA. Stress-induced sickness behaviors; an alternative hypothesis for responses during maternal separation [J]. *Dev Psychobiol*, 2001; 38(2): 76 – 83.
- [29] 吕俊华, 库宝善. 电刺激小鼠角膜诱发的不动状态: 一种新的抗抑郁药物研究动物模型 [J]. *北京医科大学学报*. 1990, 22(5): 354 – 356.
- [30] 吕俊华, 库宝善. 电刺激小鼠角膜诱发不动状态的药理研究 [J], *北京医科大学学报*, 1991, 23(2): 159 – 162.
- [31] Marrow LP, Overton PG, Brain PF. A re-evaluation of social defeat as animal model of depression [J], *J Psychopharmacol*, 1999; 13(2): 115 – 121.
- [32] 王琼, 买文丽, 李翊华, 等. 自主活动实时测试分析处理系统的建立与开心散镇静作用验证 [J]. *中草药*, 2009, 40(11): 1773 – 1779.
- [33] Ma XG, Jiang WH, Wang F. Social isolation-induced aggression potentiates anxiety and depressive-like behavior in male mice subjected to unpredictable chronic mild stress [J]. *PLoS ONE*, 2011, 6(6): 278 – 288.
- [34] Chen C, Yang JM, Hu, TT, et al. Elevated dopamine D2 receptor in prefrontal cortex of CUMS rats is associated with downregulated cAMP-independent signaling pathway [J]. *Physiol Pharmacol*, 2013, 91: 750 – 758.
- [35] Dulawa SC, Hen R. Recent advances in animal models of chronic antidepressant effects; the novelty-induced hypophagia test [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, 29(4–5): 771 – 783.
- [36] Anisman H, Merali Z, Hayley S. Neurotransmitter, peptide and cytokine processes in relation to depressive disorder; comorbidity between depression and neurodegenerative disorder [J]. *Prog Neurobiol*, 2008, 85(1): 174.
- [37] 于飞, 卫涛涛. 复合天然抗氧化制剂的抗氧化、抗运动疲劳、抗神经细胞氧化损伤作用研究 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2010, 26(1): 27 – 29.
- [38] 马占强, 李瑞鹏, 李月碧, 等. 半夏厚朴汤抗抑郁作用-改善脑内氧化应激水平 [J]. *药学与临床研究*, 2014, 22(3): 205 – 208.
- [39] 李红娅, 石延榜, 蒋艳玲. 丹栀逍遥散胶囊对慢性应激抑郁模型下丘脑单胺类神经递质的影响 [J]. *中国医药导报*, 2007, 10, 4(30): 61 – 62.
- [40] Murakami S, Imbe H, Morikawa Y, et al. Chronic stress, as well as acute stress, reduces BDNF mRNA expression in the rat hippocampus but less robustly [J]. *Neurosci Res*, 2005, 53(2): 129 – 139.
- [41] Maggio N, Segal M. Differential modulation of long-term depression by acute stress in the rat dorsal and ventral hippocampus [J]. *J Neurosci*, 2009, 29: 8633 – 8638.
- [42] 李巍, 牛卫卫, 张冬丽. 抗抑郁药潜在作用靶点-神经营养因子和神经发生 [J]. *中国医药导报*, 2013, 2, 10(6): 28 – 30.
- [43] Kuroda Y, McEwen BS. Effect of chronic restraint stress and tianeptine on growth factors, growth-associated protein-43 and microtubule-associated protein 2 mRNA expression in the rat hippocampus [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 1998, 59(1): 35 – 39.
- [44] Bergstrom A, Jayatissa MN, Mork A, et al. Stress sensitivity and resilience in the chronic mild stress rat model of depression: an *in situ* hybridization study [J]. *Brain Res*, 2008, 119(6): 41 – 52.
- [45] Williams RHM, Ferrier IN, Young AH, et al. Mood and neuropsychological function in depression: the role of corticosteroids and serotonin [J]. *Psychol Med*, 1998, 28(3): 573 – 581.
- [46] Vinberg M, Bukh JD, Bennike B, et al. Are variations in whole blood BDNF level associated with the BDNF Val66Met polymorphism in patients with first episode depression [J]. *Psychiatry Res*, 2013, 210(1): 102 – 108.
- [47] 黄欣, 朱玲玲, 范明, 等. 神经粘附分子 CHL1 在神经系统中的研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2007, 34(9): 925 – 928.
- [48] 苏虹, 孙洪丽, 张静, 等. 孕产妇血清中 ω -3 多不饱和脂肪酸与产后抑郁症的相关性 [J]. *昆明医科大学学报*, 2014, 35(4): 138 – 144.
- [49] Liu Q, Li B, Zhu HY, et al. Clomipramine treatment reversed the glial pathology in a chronic unpredictable stress-induced rat model of depression [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2009, 19(11): 796 – 805.
- [50] Geraciotti TD, Carpenter LL, Owens MJ, et al. Elevated cerebrospinal fluid substance P concentrations in posttraumatic stress disorder and major depression [J]. *Am J Psychiatry*, 2006, 163(4): 637 – 643.
- [51] Holm MM, Nieto-Gonzalez J, Vardya I, et al. Hippocampal GABAergic dysfunction in a rat chronic mild stress model of depression [J]. *Hippocampus*, 2011, 21(4): 422 – 433.
- [52] 蒋美琼, 苗明三. 中医药治疗抑郁症特点分析 [J]. *中医学报*, 2013, 28(187): 1880 – 1883.

[收稿日期] 2014-10-14



实验动物环境丰富化

李军延, 刘帅

(中国疾病预防控制中心职业卫生与中毒控制所, 北京 100050)

【摘要】 实验动物环境丰富化已成为行业热门话题, 本文试图根据文献报道, 结合实践经验就实验动物环境丰富化的使用原则、环境丰富化的设定、环境丰富化类型以及实施实验动物环境丰富化注意的要点展开讨论, 期望能够对行业实施实验动物环境丰富化有些许指导作用。

【关键词】 环境丰富化; 实验动物; 动物福利

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 03-0327-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.020

Environmental enrichment for laboratory animals

LI Jun-yan, LIU Shuai

(National Institute of Occupational Health and Poison Control, China CDC, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Environmental enrichment has become a hot topic in laboratory animal science, which is intended to improve the well-being of laboratory animals. This paper reviews the research in this area, focusing especially on the principle and procedure of planning enrichment strategies. The consideration of housing laboratory animals should not only focus solely on animal well-being, manpower and economics, but also on the precision and accuracy of the experimental results. It also introduces the type of environmental enrichment and practice in widespread use currently.

【Key words】 Environmental enrichment; Laboratory animals; Animal welfare

近年来, 实验动物环境丰富化已成为行业内的热门话题, 有人称之为丰富环境或环境丰荣。环境丰富化的概念最早于20世纪40年代被提出, 起初主要应用于神经学的研究中。自20世纪60年代开始一系列的实验以环境丰富为变量研究了其对大脑发育以及认知功能的影响^[1,2]。直到20世纪80年代, 随着动物福利逐渐被大众认知和认同, 以改善实验动物福利为目的的环境丰富相关研究才逐渐兴起^[3,4]。环境丰富的定义也取得了广泛共识, “增加刺激、提供选择满足动物物种特定需要以改善动物的机体和心理福利的所有环境改善措施”。近二十年来, 关于环境丰富化在实验动物饲养管理中重要作用的报道和文献很多, 美国和欧洲也将环境丰富化写入他们的指南和协议中^[5], 环境丰富化作为实验动物饲养管理中的要素已被广泛接受和应用。

环境丰富化并没有固定的模式和标准, 其实施过程多种多样, 应用于环境丰富的物品越来越多动

物的种类不同、性别和年龄阶段不同, 而且随着实验动物科学的发展, 转基因动物逐渐增多, 一个设施内可能有成百种带有自发或诱发型基因变异的动物, 都会对环境有一些特殊需求^[6]。想实施一种环境丰富方案而满足所有动物的需求是不可能的。

1 我国实验动物环境丰富化应用现状

环境丰富化在我国实验动物行业已经有所应用但不普遍。一是因为我国环境丰富化的研究较少, 行业内还没有环境丰富化的统一标准和共识。大部分研究主要聚焦于环境丰富对实验动物脑、神经系统功能的作用, 环境丰富仅作为神经学研究的一种工具^[7-9]。而环境丰富对实验动物福利改善作用的评估研究较少, 仅有零星报道^[10,11]。虽然国外从动物行为和生理指标两方面对环境丰富的作用进行了评估研究。但不同的研究结论常常不一致^[12]。差异的研究结果表明环境丰富的作用与采

【基金项目】 职业卫生与中毒控制所青年科技基金项目(编号:DW201404)。

【作者简介】 李军延(1963-), 女, 副研究员, 本科, 主要从事实验动物及管理研究。E-mail: clijy1@chinaacdc.cn

用的环境丰富的方式、作用时间,应用动物的品系、性别有关^[13],这也显示了对环境丰富进行评估研究的重要性。环境丰富化应用缺乏行业指南或是标准,各单位都是根据自己需要进行丰富化,丰富化的方式和选择的材料都不统一,这对不同实验室之间的结果比较是不利的。另外,较高的应用费用也阻碍了环境丰富化的普遍应用。

2 实验动物环境丰富化使用原则

2.1 动物需求

动物需求是使用环境丰富化的第一原则。环境丰富化要有利于发挥动物的物种特异性行为。因此要基于动物的物种特性、针对动物的需求而对其环境进行丰富化。实验动物的行为是我们了解动物需求的重要线索与依据,实施环境丰富化时,必须了解动物物种的典型行为特点,应尽量满足动物表达自然行为(天性)的需求。

2.2 可预测、可控制

不论采取何种丰富化措施,可预测、可控制是必须遵守的原则^[14]。研究结果的一致性和可靠性是科学研究的目的是,不能以动物的需求为借口忘记科学实验的目的。因此,不论采取什么样的环境丰富化措施,都必须可预测、可控制,不影响实验结果。某些环境丰富措施,特别是神经学研究中应用的超级环境丰富(superenrichment),不仅带来动物行为学以及生理指标上的改变^[15],而且也可能给动物本身带来伤害^[16]。动物本身都有控制自己“领域”的行为,增加新奇事物或复杂构建,也有可能增加动物的压力和攻击性^[17],这对动物实验、饲养管理和动物健康本身都是不利的。

2.3 协调一致、标准化

利用环境丰富化措施应协调一致标准化。标准化是实验动物发展的趋势和要求,更是保障动物实验结果准确性和可比较性的基础。在应用环境丰富化的同时,也应注意饲养环境的标准化。也就是说,在同一个设施内对同种动物的环境丰富化应该是标准统一的,如行业内环境丰富化的应用标准统一,环境丰富化的应用会更加科学合理。

3 环境丰富化类型

各机构应用的实验动物环境丰富化的具体措施多种多样,相关的文献与报道也比较多,甚至也有专门的著作^[18],本文就环境丰富化类型作一简介。

3.1 社会性丰富化

社会性丰富化又分为接触性和非接触性两种。接触性丰富化。社会性动物需要成对或群体饲

养,形成稳定的社会关系。群居是社会性动物最容易实施的环境丰富化措施,满足了社会性动物相互交流的需求,有效避免动物刻板行为的出现。

非接触性丰富化。当动物不能群体饲养时,要通过嗅觉、听觉或视觉实现同种动物之间的联络对于灵长类来说甚至还可增加一些自娱自乐的措施,比如给猴子设置镜子。

3.2 物理性丰富化

包括饲养笼盒的复杂化、感官刺激及营养刺激。

合适的饲养笼盒对于动物非常重要,合适的底面积给动物提供活动空间,满足动物自主活动。笼盒内容物的多样化可满足动物的特殊行为需要。比如啮齿类和兔类动物有打洞、做窝的习性,可以放置一些筑巢材料以及管子、盒子等遮蔽物满足动物习性。群居饲养时,尤其雄性动物在一起时,相互攻击的行为会增多,设置视觉障碍物或藏身处可以大大降低相互攻击的可能。视觉障碍物或藏身处为动物藏匿和探索行为提供分隔、占领、安全感觉及减少应激保障条件。玩具也有利于动物的探寻行为、主动活动和视觉活动,要想保持玩具对动物的持久吸引力,需要经常更换玩具或使用风车类的活动玩具。

动物之间除通过视觉、听觉、嗅觉和触觉进行直接或间接联络以促进社会刺激外,还可以采用不同的措施作用于上述感官以增强其感官刺激。不同物种适宜于不同强度的光线^[19],甚至不同光色对动物也具有不同的作用^[20],可以根据动物特点选取相应的措施增强视觉刺激。持续性背景声音可减小突发噪声刺激对动物的影响,并有益于保持动物的安静状态,一般来说,轻音乐较好。动物对于气味十分敏感,更换垫料后,因为气味的缺失,有时会出现噬咬行为。饲养技术人员与动物之间的接触,对动物的爱抚也有利于动物福利和动物实验结果^[21]。此外饲料口感的改变,也是一种丰富化措施^[22]。

饲料的形状、给料频次、给料时间的变化都可以用来丰富动物的环境。针对不同动物的采食习性,设置的便于动物表达物种特异采食行为的不同措施也是对动物福利的一种改善。

3.3 动物种类相关的丰富化措施

兔合适的丰富化措施包括提供粗饲料、干草块或咀嚼棒以及隐蔽处或平台,繁殖、筑巢的材料、巢箱等^[23]。

啮齿类动物筑巢材料有助于它们建立适当的微环境^[24,25]。筑巢对于小鼠来说是本能行为,不同性别和年龄段的小鼠都表现出筑巢行为^[26]。大鼠临产期的孕鼠会表现出明显的筑巢行为,此时添加筑巢材料是必要的^[27]。咀嚼棒也是很好的丰富化

措施。豚鼠自然环境中借助其他动物的洞穴居住,因此豚鼠的丰富化最好提供巢箱或其他庇护所供其隐藏。野生沙鼠会建立广泛的洞穴系统,实验室中也会表现出挖掘行为,最好提供更大的空间和足够厚度的垫料满足这一习性。仓鼠主要是单独居住的,尤其雄性动物应单独饲养。

为大多数非人灵长类动物提供社会性丰富化措施是简便易行的措施。恒河猴在野外群居,因此在实验室中可以成对饲养。和谐的成对饲养有助于增加积极的社会性行为,如梳理、拥抱、分享食物等。如果不能成对饲养,也可对灵长类动物的饲养环境进行丰富化,使他们能够表达正常的行为习惯,表现典型的物种特异行为^[28]。灵长类动物的笼子应有足够的垂直尺寸使他们能够充分利用。可添加秋千、栖木和树枝等,使动物显示广泛的运动能力^[3]。在食物的提供和获得上进行改善也是帮助灵长类动物表现天性行为的措施。在地板上放置深的橡胶碗给动物提供新奇的、混合的食物,或是在栖木上挂上旋转的储食罐,增加动物获取食物的难度。上述措施可减少动物的刻板行为和攻击行为,增加探索性行为 and 和游戏行为^[29]。增加动物操作性或者互动性的玩具也是显著又简便的环境丰富化措施。选用玩具时应选择耐用,便宜,无毒,对动物健康无影响,且容易清洗消毒的物品,例如尼龙球,塑胶环,能够反射影像的不锈钢托盘,绳索,软管,硬纸箱等。如有条件的话,观看视频和游戏操纵杆操作视频也很有益的。

猪是群居动物,应该购买已经形成群体、相互之间熟悉的动物。提供合适的垫料,包括秸秆、干草、木材、木屑、蘑菇渣和泥炭等^[30]。

犬应该成组或成对饲养。犬的零食和玩具会改善动物福利,但提供这些措施要充分论证和监督^[31,32]。此外与饲养人员的互动玩耍也是犬类所需要的。日常的互动和训练能够帮助动物消除对实验的恐惧,能够配合进行常规实验操作,如体重测量,采血等。

4 环境丰富化的设定

实际工作中在一个机构中如何设定环境丰富化措施,一般可按照以下程序思考。首先要了解动物种类特定的行为特点,知道动物的需求。其次查阅文献,确定哪种环境丰富方案或用品对提高实验动物福利有利。再次评估环境丰富可能对动物实验结果产生的影响。最后确定合适的环境丰富方案。

实施环境丰富除了上述需要遵循的原则和程序,还有一些问题需要考虑。

4.1 取得研究人员的许可

在实施环境丰富之前一定要先通知研究人员。考虑实施环境丰富化会不会影响实验结果,某些实验是不适宜进行环境丰富的,例如行为学实验。而某些实验只是不适于某些类型的环境丰富,例如营养学实验就不适宜食物营养方面的环境丰富。只有在不影响实验结果的前提下,实施环境丰富化改善动物福利才是合理的。其次还要考虑实验操作程序中环境丰富化措施的必要性,如果影响实验操作程序,环境丰富化是不适宜的。

4.2 支出成本

实施环境丰富可能增加三项支出,财务支出,人力支出,管理存储支出。财务支出主要来自两个方面,一是研究评估环境丰富化所需要的费用,二是实施环境丰富化本身需要的费用。除了这些明显的财务支出,人力成本也在增加。采购,加工,高压消毒,实施丰富化都会增加员工的劳动量。同样环境丰富材料的储存与管理也是需要考虑的成本^[33]。

4.3 员工培训与教育

所有员工,包括饲养员、技术员、研究员都应该了解环境丰富化的知识以及采取环境丰富化对于实验研究的影响。同时也应该制定环境丰富的标准操作规程,并增加到员工培训当中,以保证在本单位中环境丰富实施的标准化。

4.4 详细记录

记录的要求根据不同设施的制度和具体环境丰富方案的不同而不同。一个设施中提供的环境丰富材料可能是轮换的,以保持新鲜感。详细记录可以帮助我们避免重复和混乱。同时考虑到环境丰富可能对实验产生的影响,也应给研究人员提供环境丰富的详细记录,以便他们在实验材料和方法部分进行说明^[34]。

4.5 职业安全与健康

职业安全与健康在动物设施运行中始终是一个重要考量因素,所有采取的环境丰富化措施都不能伤及工作人员。

4.6 持续的评估

丰富化措施整体上有利于动物福利,但有时也会伴随负面作用,在增加新的环境丰富措施时持续的观察和评估是十分重要的。比如增加管子会改善啮齿类动物攻击行为,但也会增加其领地占有行为。增加筑巢材料可满足啮齿类动物的藏匿行为,但会影响员工对动物的观察。

总之,实验动物环境丰富化会改善动物福利,某种程度上也可以改善动物的繁殖、生产、生长发育已成共识。在具体实施过程中,我们不得不考虑,实施

的环境丰富化是否经过评估,是否适合具体的实验操作和具体的实验动物饲养方式。尤其是,我们必须牢记一点,实验动物用于科学实验的黄金标准是标准化,任何影响实验动物标准化的措施都不是好的措施,当然也包括实验动物环境丰富化。

参 考 文 献

- [1] La Torre JC. Effect of differential environmental enrichment on brain weight and on acetylcholinesterase and cholinesterase activities in mice [J]. *Exp Neurol*. 1968, 22(4): 493–503.
- [2] Henderson ND. Brain weight increases resulting from environmental enrichment: a directional dominance in mice [J]. *Science*. 1970, 169(3947): 776–778.
- [3] Line SW. Environmental enrichment for laboratory primates [J]. *J Am Vet Med Assoc*. 1987, 190(7): 854–859.
- [4] Ross PW, Everitt JJ. A nylon ball device for primate environmental enrichment [J]. *Lab Anim Sci*, 1988, 38(4): 481–483.
- [5] Kulpa – Eddy JA, Taylor S, Adams KM. USDA perspective on environmental enrichment for animals [J]. *ILAR J*, 2005, 46(2): 83–94.
- [6] van de Weerd HA, Baumans V, Koolhaas JM, et al. Strain specific behavioural response to environmental enrichment in the mouse [J]. *J Exp Anim Sci*. 1994, 36(4–5): 117–127.
- [7] 李春禄, 张佳婧, 王冬梅, 等. 丰富环境对野生小家鼠和昆明小鼠空间学习记忆能力的影响 [J]. *中华行为医学与脑科学杂志*. 2011, 20(7): 624–626.
- [8] 李娅娜, 李玲, 江山, 等. 丰富环境及康复训练对创伤性脑损伤大鼠神经功能恢复的影响 [J]. *中国康复医学杂志*, 2013, 28(5): 393–397.
- [v9] 郭忠信, 李文宇, 李骏然, 等. 丰富环境和贫瘠环境对锰中毒小鼠学习记忆能力的影响 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2013, 31(6): 409–412.
- [10] 梁磊, 许龙祥, 刘家宽, 等. 玩具对小鼠生长发育及繁殖性能的影响 [J]. *中国比较医学杂志*. 2014, 24(9): 48–52.
- [11] 顾卫忠, 王晓东, 鲍世民, 等. 玩具对小鼠生长繁育性能影响初探 [J]. *实验动物与比较医学*. 2008, 28(2): 131–132.
- [12] Toth LA, Kregel K, Leon L, et al. Environmental enrichment of laboratory rodents; the answer depends on the question [J]. *Comp Med*. 2011, 61(4): 314–321.
- [13] Spangenberg EM, Augustsson H, Dahlborn K, et al. Housing – related activity in rats; effects on body weight, urinary corticosterone levels, muscle properties and performance [J]. *Lab Anim*. 2005, 39(1): 45–57.
- [14] Videan EN, Fritz J, Schwandt ML, et al. Controllability in environmental enrichment for captive chimpanzees (*Pan troglodytes*) [J]. *J Appl Anim Welf Sci*, 2005, 8(2): 117–130.
- [15] Konkle AT, Kentner AC, Baker SL, et al. Environmental – enrichment – related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague – Dawley and Long Evans rat s [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2010, 49(4): 427–436.
- [16] Bayne K. Potential for unintended consequences of environmental enrichment for laboratory animals and research results [J]. *ILAR J*. 2005, 46(2): 129–139.
- [17] Mesa – Gresa P, Perez – Martinez A, Redolat R. Environmental enrichment improves novel object recognition and enhances agonistic behavior in male mice [J]. *Aggress Behav*. 2013, 39(4): 269–279.
- [18] Wolfensohn S, Lloyd M. *Handbook of laboratory animal management and welfare* [M]. Chichester, West Sussex, UK: Wiley – Blackwell. 2003.
- [19] Van der Meer E, Van Loo PL, Baumans V. Short-term effects of a disturbed light-dark cycle and environmental enrichment on aggression and stress-related parameters in male mice [J]. *Lab Anim*. 2004, 38(4): 376–383.
- [20] 胡樱, 许兰文, 杨斐, 等. 音乐、色彩干预对制动小鼠福利的影响 [J]. *实验动物与比较医学*. 2007, 27(2): 71–76.
- [21] Mehrkam LR, Verdi NT, Wynne CD. Human interaction as environmental enrichment for pair – housed wolves and wolf-dog crosses [J]. *J Appl Anim Welf Sci*. 2014, 17(1): 43–58.
- [22] 杨斐, 胡樱, 许兰文. 小鼠福利受损模型的建立及营养干预作用的研究 [J]. *实验动物与比较医学*. 2008, 28(2): 74–79.
- [23] Baumans V. Environmental enrichment for laboratory rodents and rabbits: requirements of rodents, rabbits, and research [J]. *ILAR J*. 2005, 46(2): 162–170.
- [24] 张孟蕾, 牛屹东. 筑巢材料在实验大、小鼠环境丰荣中的应用 [J]. *中国实验动物学报*. 2012, 20(2): 93–98.
- [25] Van de Weerd HA, Van Loo PL, Van Zutphen LF, et al. Preferences for nesting material as environmental enrichment for laboratory mice [J]. *Lab Anim*. 1997, 31(2): 133–143.
- [26] Olsson IA, Dahlborn K. Improving housing conditions for laboratory mice; a review of “environmental enrichment” [J]. *Lab Anim*. 2002, 36(3): 243–270.
- [27] Wheeler RR, Swan MP, Hickman DL. Effect of multilevel laboratory rat caging system on the well – being of the singly – housed Sprague Dawley rat [J]. *Lab Anim*. 2015, 49(1): 10–19.
- [28] 曹周燕, 钟源, 刘文荣, 等. 环境丰容在笼养黑猩猩饲养管理中的应用研究 [J]. *现代农业科技*, 2014, (11): 282–283.
- [29] Dean SW. Environmental enrichment of laboratory animals used in regulatory toxicology studies [J]. *Lab Anim*. 1999, 33(4): 309–327.
- [30] Smith ME, Gopee NV, Ferguson SA. Preferences of minipigs for environmental enrichment objects [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2009, 48(4): 391–394.
- [31] Herron ME, Kirby – Madden TM, Lord LK. Effects of environmental enrichment on the behavior of shelter dogs [J]. *J Am Vet Med Assoc*. 2014, 244(6): 687–692.
- [32] Veeder CL, Taylor DK. Injury related to environmental enrichment in a dog (*Canis familiaris*): gastric foreign body [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2009, 48(1): 76–78.
- [33] Bennett AJ, Corcoran CA, Hardy VA, et al. Multidimensional cost – benefit analysis to guide evidence – based environmental enrichment: providing bedding and foraging substrate to pen – housed monkeys [J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2010, 49(5): 571–577.
- [34] Hutchinson E, Avery A, Vandewoude S. Environmental enrichment for laboratory rodents [J]. *ILAR J*. 2005, 46(2): 148–161.

[收稿日期] 2015-05-27