



中国科技论文统计源期刊 (中国科技核心期刊)

ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

ISSN 1671-7856

CN 11-4822/R

原名《中国实验动物学杂志》

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE



2015 **7**

邮发代号: 82-917

第25卷 (第7期) Vol.25 No.7

ISSN 1671-7856



主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

月刊 1991 年 3 月创刊

第 25 卷 第 7 期 2015 年 7 月 30 日出版

主管
中国科学技术协会

主办
中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所

主编
秦 川

编辑
《中国比较医学杂志》编辑部

出版
中国实验动物学会

发行
《中国比较医学杂志》编辑部
100021, 北京市朝阳区潘家园南里 5 号
电话: (010) 67779337
传真: (010) 67763674
E-mail: b67761337@126.com
http://zgswdw.alljournal.ac.cn/
zghjyxzz/ch/index.aspx

广告经营许可证
京朝工商广字第 8131 号

照 排
同方知网(北京)技术有限公司

印 刷
北京市百善印刷厂

邮发代号
82-917

定 价
每期 20.00 元, 全年 240 元

中国标准连续出版物号
ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

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

目 次

研究报告

- 肥胖对小鼠肝脏铁代谢调控分子 hepcidin、lipocalin-2 和 ferroportin-1 表达的影响 张万山, 李蔓, 高倩, 等(1)
- 失眠增加心血管病致病因子的研究 袁蓉, 王阶, 郭丽丽, 等(7)
- 三转基因银屑病小鼠模型建立与表型分析 高祥, 刘宁, 葛文萍, 等(11)
- 脊神经后根切断对大鼠膝关节软骨退变的影响 张影, 林毅, 颜赫, 等(16)
- 恒河猴 *BST-2* 基因编码区单核苷酸多态性及其对蛋白结构和功能的影响 董志会, 王卫, 丛喆, 等(20)
- 衰老对小鼠肺干细胞修复能力的影响 朱栩栋, 姚超, 龚松迪, 等(25)
- Lewis 大鼠急性慢性期风湿性心脏炎模型的比较 李文婷, 曾志羽, 桂春, 等(30)
- 微卫星标记在布氏田鼠封闭群遗传结构研究中的应用 张曼, 施海霞, 宋铭晶, 等(34)
- SiRNA 干扰慢性炎性痛大鼠患侧背根神经节 MrgC 受体表达及 PKC ϵ 磷酸化的研究 林小溪, 方芳, 方剑乔, 等(39)
- 白金胶囊对 CUMS 诱导的抑郁症大鼠模型行为学及脑内单胺类神经递质的影响 张荣, 董世芬, 倪博然, 等(46)
- 共伴侣蛋白 FKBP51 在高脂诱导肥胖中的作用 张曼, 邱彬, 曹勇, 等(53)

技术方法

- PMSG 和 hCG 诱导长爪沙鼠超数排卵方案的优化 唐旺, 李长龙, 杜小燕, 等(59)
- 实验小鼠不同部位骨髓病理切片的比较 冯璟, 于远望(64)
- 实验病理标本前期处理应注意的若干问题 李建瑛, 刘江伟, 许琴, 等(66)

综述与专论

- 脂肪干细胞分离纯化方法研究进展 刘琴, 王丽平, 陈芳, 等(69)
- PD-1; PD-L1/PD-L2 通路在结核感染中的免疫作用 占玲俊, 唐军, 秦川(74)
- 多发性硬化症信号传导通路异常研究进展 郑娜, 王奇, 尹琳琳(77)

教育与科普

- 实验动物的 10 个“不愿意”(三) 魏强(81)

广告

期刊基本参数: CN11-4822/R * 1991 * m * 大 16 * 80 * zh * p * ¥20.00 * 2000 * 18 * 2015-7

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 25 Number 7 July 30 2015

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

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

Editing

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

Editor-in-Chief

QIN Chuan (秦川)

Publishing

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

Printing

The Baishan Printing House of Changping, Beijing

Distributor

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

Mail-order

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

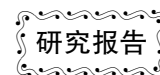
CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2015 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- Effects of obesity on the expression of hepcidin, lipocalin-2 and ferroportin-1 related with iron metabolism of mice's liver ZHANG Wan-shan, LI Man, GAO Qian, et al. (1)
- Effect of insomnia on rat cardiovascular disease factors YUAN Rong, WANG Jie, GUO Li-li, et al. (7)
- Establishment of the psoriasis transgenic mouse model and analysis of the phenotype Gao xiang, LIU Ning, GE Wen-ping, et al. (11)
- Effect of dorsolateral rhizotomy on cartilage of degenerative changes in knee joint of rats ZHANG Ying, LIN Yi, YAN He, et al. (16)
- Polymorphisms of coding region in BST-2 gene of Rhesus macaques and their effects on protein structure and function DONG Zhi-hui, WANG Wei, CONG Zhe, et al. (20)
- Effect of aging on repair capability of lung stem cells ZHU Xu-dong, YAO Chao, GONG Song-di, et al. (25)
- A comparative study of different animal model of acute and chronic rheumatic carditis in Lewis rats LI Wen-ting, ZENG Zhi-yu, GUI Chun, et al. (30)
- Applications of microsatellite marker technology in the genetic structure research for closed colony of Brandt's voles ZHANG Man, SHI Hai-xia, SONG Ming-jing, et al. (34)
- SiRNA interference on expression of MrgC and phosphorylation of PKC ϵ in ipsilateral dorsal root ganglion of rats with chronic inflammatory pain LIN Xiao-xi, FANG Fang, FANG Jian-qiao, et al. (39)
- The pharmacodynamic research of baijin capsule on depression in chronic unpredictable mild stress rats ZHANG Rong, DONG Shi-fen, NI Bo-ran, et al. (46)
- FKBP51 plays an important role in high fat diet-induced obesity ZHANG Man, QIU Bin, CAO Yong, et al. (53)
- The optimization scheme of Mongolian gerbil superovulation induced by PMSG and hCG TANG Wang, LI Chang-long, DU Xiao-yan, et al. (59)
- Comparison of the experimental mice of different parts of the bone marrow biopsy FENG Jing, YU Yuan-wang (64)
- Several issues should be mentioned before pathological specimen processing LI Jian-ying, LIU Jiang-wei, XU Qin, et al. (66)
- Progress in the isolation and purification methods of adipose-derived stem cells LIU Qin, WANG Li-ping, CHEN Fang, et al. (69)
- The immune role of PD-1: PD-L1/PD-L2 pathway in Mycobacterium tuberculosis infection ZHAN Ling-jun, TANG Jun, QIN Chuan (74)
- Progress of signaling pathways abnormal in multiple sclerosis ZHENG Na, WANG Qi, YIN Lin-lin (77)



肥胖对小鼠肝脏铁代谢调控分子 hepcidin、 lipocalin-2 和 ferroportin-1 表达的影响

张万山^{1,2}, 李 蔓^{1,2}, 高 倩^{1,2}, 王 辰^{1,2}, 魏守刚^{1,2}

(1. 首都医科大学公共卫生学院儿少卫生与妇幼保健学系, 北京 100069;
2. 首都医科大学, 环境毒理学北京市重点实验室, 北京 100069)

【摘要】 目的 通过建立高脂饮食诱导的肥胖动物模型, 观察肥胖对小鼠肝脏中铁代谢相关调控分子铁调素 (hepcidin)、脂质运载蛋白-2 (lipocalin-2, LCN2) 和膜铁输出蛋白-1 (ferroportin-1, FPN1) mRNA 及蛋白表达的变化, 初步探讨肥胖影响肝脏铁代谢相关分子表达调控的机制。**方法** 将 4~6 周龄 C57BL/6J 小鼠随机分为正常对照组和膳食诱导的肥胖模型组, 每组 10 只, 对照组给予正常饲料喂养, 肥胖组给予高脂饲料喂养, 实验饲喂周期为 15 周。建模成功后取小鼠肝脏, 采用实时荧光定量 PCR 法检测小鼠肝脏中铁代谢相关调控分子 hepcidin、LCN2 和 FPN1 mRNA 的表达, 并应用 Western Blot 法检测小鼠肝脏 LCN2 和 FPN1 蛋白的表达。**结果** 与对照组小鼠比较, 肥胖模型组小鼠肝脏 hepcidin mRNA 表达水平显著升高, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$), 而 LCN2 和 FPN1 mRNA 及蛋白表达水平差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。**结论** 肥胖可以显著上调小鼠肝脏 hepcidin 的表达, 而对肝脏铁代谢相关调控分子 LCN2 和 FPN1 的表达并无显著影响。故还不能认为肥胖可以影响肝脏铁代谢调控分子 lipocalin-2 和 ferroportin-1 的表达, 进而导致细胞摄取及释放铁的能力发生障碍, 使得机体对铁的需求不能满足要求, 出现铁代谢功能紊乱, 导致肥胖性铁缺乏的发生, 而是通过上调肝脏 hepcidin 表达直接或间接影响其他铁代谢相关调控分子或者存在更为复杂的调控机制, 这仍需我们进一步的实验研究及探索。这也为进一步研究肥胖对肝脏铁代谢相关调控分子表达的影响及引起铁缺乏的机制提供了理论和实验基础。

【关键词】 肥胖; 铁代谢; 铁调素; 脂质运载蛋白-2; 膜铁输出蛋白-1

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0001-06

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.001

Effects of obesity on the expression of hepcidin, lipocalin-2 and ferroportin-1 related with iron metabolism of mice's liver

ZHANG Wan-shan^{1,2}, LI Man^{1,2}, GAO Qian^{1,2}, WANG Chen^{1,2}, WEI Shou-gang^{1,2}

(1. Department of Maternal, Child and Adolescent Health, School of Public Health,
Capital Medical University, Beijing 100069, China;

2. Beijing Key Laboratory of Environmental Toxicology, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

【Abstract】 Objective We established the animal models of obesity induced by high-fat diet, in order to study the mRNA and protein expression of regulation molecules related with iron metabolism about hepcidin, lipocalin-2 (LCN2),

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(81373020); 北京市自然科学基金资助项目(7112014)。

【作者简介】 张万山(1987-), 男, 硕士, 主要从事肥胖与铁缺乏及肝脏铁代谢相关调控分子影响机制的研究, E-mail: wanshan0822@163.com。

【通讯作者】 魏守刚(1965-), 男, 教授, 主要从事儿童期慢性病预防控制, E-mail: shangwei@ccmu.edu.cn。

ferroportin-1 (FPN1) in obese mice's liver and the molecular regulation mechanism. **Methods** C57BL/6J (4 ~ 6 weeks) mice were randomly divided into control group and obesity model group, each group of ten. The obesity group were fed with a high-fat diet and the control group were given the normal diet for lasting 15 weeks. After we successfully established the obesity animal model, the expression level of hepcidin, LCN2 and FPN1 mRNA in the liver were measured by Real-time fluorescent quantitative PCR method and the protein expression level of LCN2 and FPN1 were measured by Western-Blot. **Results** Compared with the control group, the expression level of hepcidin mRNA in the liver was increased in obesity group ($P < 0.05$), however, the expression level of LCN2, FPN1 was no significant difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Obesity can increase the expression of hepcidin mRNA, however, there was no significantly effect on the expression of LCN2, FPN1. So, we can't think that obesity can affect the expression of LCN2 and FPN1, lead to the ability of cells uptake and release iron abnormal, then appear iron metabolism disorders. As a result, leading to iron deficiency. Maybe obesity can affect other regulatory molecules related with iron metabolism through up-regulation the expression of Hepcidin or the more complex regulatory mechanisms. We still need further experimental research and exploration. This research also provides the basis of theoretical and experimental for the further study the effects of obesity on the expression of regulation molecules related with iron metabolism in obesity mice's liver and the mechanism of iron deficiency.

【Key words】 Obesity; Iron metabolism; Hepcidin; Ferroportin-1; Lipocalin-2

随着现代居住条件的改善、交通的发展、加之学习负担的加重,学生进行户外活动、体育锻炼、做家务等身体活动的时间越来越少,这就导致机体摄入的总能量与身体活动消耗的总能量不平衡,使得我国儿童青少年超重和肥胖流行日趋严重,已经成为影响我国儿童青少年身心健康的重要问题^[1]。铁是人体内含量最丰富的必需微量元素,是维持生命的主要物质之一,具有重要生理功能,儿童缺铁除导致贫血外,还使运动能力低下、体温调节不全、智力发育障碍、免疫力下降等。肥胖和铁缺乏是我国乃至全球儿童面临的两大公共卫生问题,许多研究提示肥胖存在着铁代谢的异常,早在 1960 年代,就有学者发现青少年血清铁水平的下降与肥胖密切相关^[2-3],而近年来的许多研究发现,肥胖患者比正常体重人群更易发生铁缺乏、缺铁性贫血从而加重对健康的危害^[4],并且肥胖与铁缺乏集于一身,会使儿童受到双重健康危害^[5],例如运动能力下降和认知功能受损程度远大于任何一种因素单独存在时^[6-8]。因此防治肥胖性铁缺乏、缺铁性贫血成为当前急需解决的课题。

在机体铁稳态的调节中,hepcidin、lipocalin-2 和 ferroportin-1 起着调节机体铁代谢平衡的作用。hepcidin 主要在肝细胞中合成,之后分泌至血液将体内铁需要的信号传至小肠,参与机体铁稳态的调控^[9]。ferroportin-1 在脾和肝脏的巨噬细胞等都有表达,是重要的跨膜铁输出分子,参与机体的铁吸收和巨噬细胞对铁的再循环等过程^[10]。lipocalin-2 广泛分布于人体各种组织,包括肺,肝脏的脂肪细

胞和巨噬细胞, lipocalin-2 可结合转运小分子铁化合物到细胞膜,从而激活或抑制铁应答基因^[11]。

目前有研究证实肥胖可以使小鼠十二指肠铁代谢相关调控分子二价金属离子转运体 (divalent metal transporter 1, DMT1) 和 FPN1 表达下降,进而肠上皮细胞吸收和释放铁的能力减弱,造成机体不能满足对铁的需求,导致肥胖性铁缺乏的发生^[12],然而有关肥胖对肝脏铁代谢相关调控分子表达影响的机制研究较少,相关铁代谢分子相互作用方式尚不清楚。因此本实验旨在通过构建高脂膳食诱导的肥胖动物模型,观察肥胖对肝脏铁代谢相关调控分子 hepcidin、LCN2 和 FPN1 表达的影响,初步探讨维持机体铁代谢稳态的分子调控机制,为进一步研究及有效预防和治疗肥胖性铁代谢障碍提供理论机制基础。

1 材料和方法

1.1 动物分组及处理

健康野生型 C57BL/6J 小鼠 4 ~ 6 周龄 20 只 (雌性), 体重 10 ~ 14 g, 由军事医学科学院实验动物中心提供【SCXK (军) 2012-0004】。实验动物饲养于首都医科大学实验动物中心【SYXK (京) 2010-0022】无特定病原体 (specific-pathogen free, SPF) 级动物房。随机分为两组: 高脂膳食组、普通膳食组, 每组 10 只。普通膳食组饲以 SPF 级普通饲料, 高脂膳食组饲以 SPF 级高脂饲料 (由军事医学科学院实验动物科学部生产)。高脂饲料配方为: 猪油 10%、基础饲料 79%、蛋黄粉 10%、胆固醇 1%。两组小

鼠均自由饮水,饲养期 15 周,每周称量体重一次,比较两组动物体重差异并计算模型组动物肥胖度,最终建立肥胖动物模型。动物实验符合《实验动物管理条例》,并经首都医科大学伦理委员会认可。

建模成功后,用 10% 水合氯醛 400 mg/kg 体重腹腔注射麻醉小鼠并固定于固定板上,腹部采用 75% 酒精及碘伏消毒,行纵行切口开腹暴露腹腔,迅速取肝脏组织,使用生理盐水冲洗后转移至冻存管内放入液氮中,随后转入 -80°C 冰箱保存备用。

1.2 RT-PCR 法检测小鼠肝脏 hepcidin、LCN2 和 FPN1 mRNA 表达量

取冻存组织 80 ± 5 g,用超纯 RNA 提取试剂盒 (CWbio. Co. Ltd, Cat # CW0581) 提取总 RNA。取 $5\mu\text{L}$ RNA 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,以检测 RNA 的完整性。用 DNase I 试剂盒 (CWbio. Co. Ltd, Cat # CW2090) 对 RNA 中残留的基因组 DNA 进行消化处理。处理后的总 RNA 样本用 HiFi-MMLVcDNA 第一链合成试剂盒 (CWbio. Co. Ltd, Cat # CW0744) 进行反转录,严格按照使用说明进行实验操作。

应用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪 (美国 Applied Biosystems 公司),按照 Ultra SYBR Mixture PCR 试剂盒 (With ROX) (CWbio. Co. Ltd, Cat # CW0956) 进行扩增。扩增反应体系为 $20\mu\text{L}$: $2 \times$ UltraSYBR Mixture $10\mu\text{L}$,上游引物 $0.4\mu\text{L}$ (浓度 $10\mu\text{M}/\text{mL}$),下游引物 $0.4\mu\text{L}$ (浓度 $10\mu\text{M}/\text{mL}$),cDNA $2\mu\text{L}$ 。扩增程序为: 95°C 预变性 10min , (95°C 15s , 60°C 60s) $\times 45$ 个循环,每个样本同时做 3 个重复。 β -actin 上游引物序列为 5'-GCC TTC CTT CTT GGG TAT-3',下游引物序列为 5'-GGC ATA GAG GTC TTT ACG G-3',hepcidin 上游引物序列为 5'-TGC CTG TCT CCT GCT TCT CCT CC-3',下游引物序列为 5'-TCG CAA TGT CTG CCC TGC TTT C-3',lipocalin-2 上游引物序列为 5'-CAC GGA CTA CAA CCA GTT CG-3',下游引物序列为 5'-TGA TGT TGT CGT CCT TGA GG-3',ferroportin-1 上游引物序列为 5'-CCC TTC CGC ACT TTC CGA AT-3',下游引物序列为 5'-GAG AAT AGA CCA GTC CGA ACA AGG C-3'。实验结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法进行数据的相对定量分析,即 $\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{目的基因}} - \text{Ct}_{\text{内参基因}}$; $\Delta\Delta\text{CT} = \Delta\text{Ct}_{\text{实验组}} - \Delta\text{Ct}_{\text{基准组}}$ 。

1.3 Western Blot 法检测小鼠肝脏 LCN2 和 FPN1 蛋白表达量

应用 RIPA 试剂提取小鼠肝脏组织蛋白,BCA

法测定蛋白浓度,并用 RIPA 试剂调整蛋白浓度为 $4\text{mg}/\text{mL}$,煮沸变性 5min 。根据目的蛋白的分子量,配制 12% 的分离胶,待检测蛋白样品上样量为 $20\mu\text{g}/\text{孔}$, 300mA 恒流,转移至 $0.45\mu\text{m}$ 孔径 NC 膜,转膜时间 1h ,转膜完成后丽春红染色试剂对膜进行染色,观察转膜效果。将膜完全浸没 3% BSA-TBST 中室温轻摇 30min 进行封闭,然后加入兔抗 LCN2、FPN1 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 1:2000) 室温孵育 10min ,放 4°C 过夜。第二天取出膜使用 TBST 洗膜 5 次 ($3\text{min}/\text{次}$) 后加入 1:5000 辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗兔 IgG (H + L) 抗体 (北京天德悦生物科技有限公司) 室温轻摇 40min ,洗膜 6 次 ($3\text{min}/\text{次}$),使用 ECL 加到膜上后反应 $3 \sim 5\text{min}$,胶片曝光,显影 2min ,定影。以 GAPDH 鼠单抗作为内参,重复试验 3 次。胶片曝光结果扫描输入计算机后,用 TotalLab quant 凝胶定量分析软件进行处理,以目的蛋白与内参蛋白的积分光密度 (integral optical density, IOD) 比值表示相对表达水平。

1.4 统计分析

实验所得各组数据用均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,利用 SPSS 18.0 软件进行两独立样本 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义的判定水准。

2 结果与分析

2.1 肥胖动物模型的构建

肥胖动物模型组与对照组小鼠,分别饲喂高脂饲料及普通饲料,每周称量体重,自第三周起肥胖模型组小鼠体重较对照组小鼠体重出现明显增长,具有显著性差异,且随着干预时间延长,两组的体重差异逐渐增大,至干预第 15 周,肥胖模型组和对照组小鼠平均体重分别为 $34.08 \pm 1.28\text{g}$ 和 $24.50 \pm 0.85\text{g}$ (图 1)。依据肥胖度计算公式计算肥胖模型组每只小鼠的肥胖度:肥胖度 (%) = (模型组实际体重 - 对照组平均体重) / 对照组平均体重 $\times 100\%$,结果肥胖模型组全部小鼠体重均高于对照组小鼠平均体重的 20%,且最轻体重小鼠肥胖度为 27.65%,故可以判定肥胖动物模型建立成功。

2.2 RT-PCR 相对定量结果分析

通过超纯 RNA 提取试剂盒提取小鼠肝脏组织样本中总 RNA 后,利用分光光度计检测提取 RNA 的纯度,结果表明各样本的 OD 值 A260/280 均处于 1.9 ~ 2.1 之间,说明 RNA 纯度较高。分别取 $5\mu\text{L}$

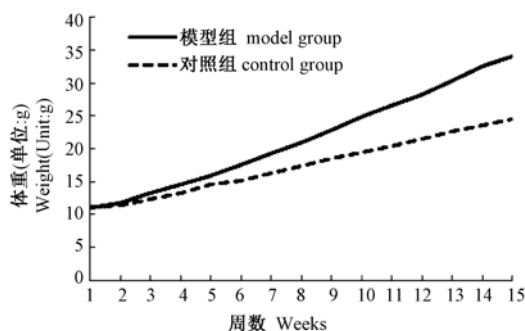
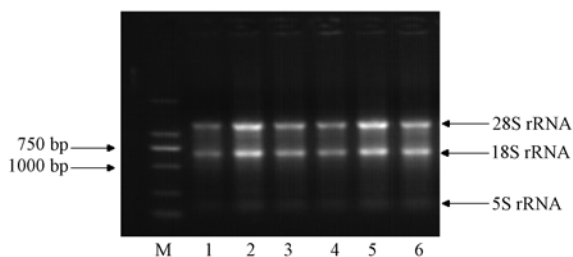


图 1 肥胖模型组与对照组小鼠各周平均体重

Fig.1 Body weight in different weeks of different groups

各样本 RNA 用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,以检测 RNA 的完整性,可见 28s rRNA、18s rRNA 和 5s rRNA 三条条带,无明显拖带,且 28S 条带相比 18S 的条带亮度高 2 倍,说明 RNA 完整性好,没有被降解(图 2)。



注:1,2,3:对照组样本;4,5,6:肥胖模型组样本。

图 2 肝脏样本 RNA 凝胶电泳图

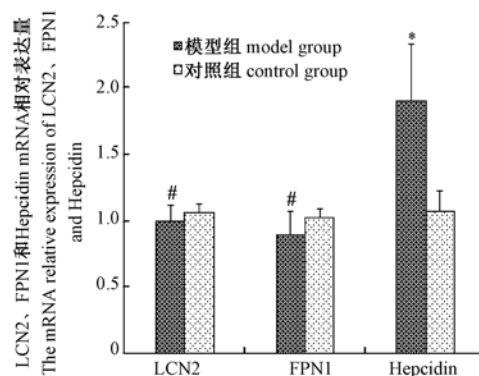
Note: 1, 2, 3: control group; 4, 5, 6: model group.

Fig.2 The gel electrophoresis figure of the liver RNA

应用 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪,分别对内参基因引物和目的基因引物进行扩增,同时在 60℃~95℃进行融解曲线分析,仪器自动绘制出对应的内参基因标准曲线和目的基因的标准曲线,各标准曲线的相关系数(R^2)均达到 0.99,说明线性相光度很高,且扩增效率均在 90% 以上,溶解曲线呈单峰,即各基因均为特异性扩增。根据实时荧光定量 PCR 原始检测结果,按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 相对定量计算公式,计算出各样品的目的基因相对定量结果。经统计分析可知,与对照组比较,肥胖模型组小鼠 hepcidin mRNA 的相对表达水平显著升高,差异具有统计学意义($P < 0.05$),而 LCN2 和 FPN1 mRNA 的相对表达水平差异不具有统计学意义($P > 0.05$)(图 3)

2.3 Western Blot 相对定量结果分析

小鼠肝脏样本进行目的蛋白的 Western Blot 检测,所得胶片扫描结果见图 4。利用分析软件进行



注: * 与对照组比较 $P < 0.05$, # 与对照组比较 $P > 0.05$ 。

图 3 两组小鼠肝脏 LCN2、FPN1 和 hepcidin mRNA 相对表达量

Note: * compared with control group $P < 0.05$, # compared with control group $P > 0.05$.

Fig.3 The mRNA relative expression of LCN2, FPN1 and hepcidin in liver of two group mice

每个条带的灰度值分析,然后利用目的蛋白的灰度值除以内参蛋白的灰度值以校正误差,所得结果即为样本目的蛋白的相对表达量,由图 5 可知模型组小鼠与对照组小鼠目的蛋白 LCN2 和 FPN1 的相对表达量差异不具有统计学意义($P > 0.05$)。

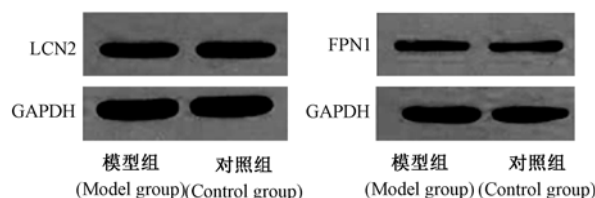
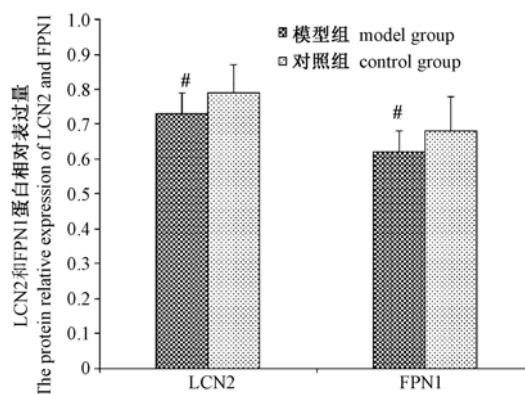


图 4 Western Blot 胶片扫描条带

Fig.4 The film scanning strip of western blot



注: # 与对照组比较 $P > 0.05$ 。

图 5 两组小鼠肝脏 LCN2 和 FPN1 蛋白的相对表达量

Note: # compared with control group $P > 0.05$.

Fig.5 The protein relative expression of LCN2 and FPN1 in liver of the two groups mice

3 讨论

肥胖是指进食热量多于身体消耗量并以脂肪形式储存于体内,当体脂增加使体质量超过标准体质量 20% 或 BMI > 24 kg/m 者称为肥胖症。肥胖症是多种慢性非传染性疾病的危险因素,如高血压、糖尿病、冠心病、脑血管疾病、慢性肾脏病等,同时也给社会带来了巨大的疾病负担。因此,防治肥胖症具有十分重要的意义。肥胖动物模型是研究肥胖及其相关疾病发病机制的主要工具,其中与人类肥胖最为接近的高脂饮食诱导营养性肥胖动物模型的应用最为广泛^[13],而在国内外很多相关研究中,由于 C57BL/6J 小鼠对高脂饮食又较为敏感,故常被采用。因此,本实验采用 C57BL/6J 小鼠作为研究对象建立高脂饮食诱导的肥胖动物模型,以高脂组体质量超过对照组平均体质量 20%,且差异有统计学意义为标准,判断肥胖动物模型是否构建成功。

在机体整体铁稳态调节中,体内铁的代谢平衡主要依靠肠道对铁吸收的调节,而在分子水平,机体内铁的平衡则主要依赖于多种铁代谢调节分子调控的影响,如肠铁吸收和释放铁主要依赖于十二指肠上皮细胞的铁相关蛋白的介导,而其中起关键调节作用的分子为 DMT1 和 FPN1,并有研究证实在肥胖状态下 DMT1 和 FPN1 表达下降,使得肠上皮细胞吸收和释放铁的能力减弱,造成机体不能满足对铁的需求,导致肥胖性铁缺乏的发生^[12]。然而在肥胖状态下,是否也存在对肝脏中铁代谢相关调控分子 hepcidin、LCN2 和 FPN1 类似的调控机制和结果呢?目前国内外有关肥胖对肝脏铁代谢相关调控分子影响及相互作用机制的研究还不甚清楚。作为机体铁稳态的调节因子,hepcidin、LCN2 和 FPN1 起着调节机体铁代谢平衡的作用。hepcidin 是 2000 年发现的一种在肝脏合成并富含半胱氨酸的抗菌多肽,之后分泌至血液,将体内铁需要的信号传至小肠,参与机体铁稳态的调控,其表达受机体信号因子以及炎症、低氧等疾病状态的影响^[14],hepcidin 是主要的铁调节激素,炎症性贫血的关键调节剂、铁代谢和固有免疫之间联系的桥梁,在机体铁代谢平衡的调节中起关键作用。Pigeon 等^[15]在寻找与小鼠肝脏负荷增多相关基因时,明确铁调素是机体铁稳态调控中一种重要的调节因子。FPN1(2000 年发现)在成熟的十二指肠绒毛上皮细

胞基底面、脾和肝的巨噬细胞等都有表达,是一种重要跨膜的铁输出蛋白,是铁离子释放的唯一出口,负责将细胞内的铁转运出细胞,有研究表明,hepcidin 表达增加时,可结合 FPN1,促使其在溶酶体内内化和降解,从而有效阻止细胞内铁的排出;相反,hepcidin 表达减少时,以允许大部分铁通过 FPN1 流出,来维持细胞外正常的铁浓度^[16]。LCN2 主要是由脂肪组织分泌的脂肪细胞因子之一,广泛分布于人体各种组织,包括肺、肝脏、胸腺、肾脏、小肠、脂肪细胞以及巨噬细胞,有研究发现肝脏以及脂肪组织可能是肥胖状态下循环中过多的 LCN2 的主要来源,LCN2 具有铁代谢相关运铁蛋白功能,可结合转运小分子铁化合物到细胞膜,从而激活或抑制铁应答基因,体外研究也证明,LCN2 能增强细胞铁吸收能力^[17]。

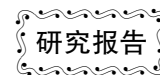
综上所述,本实验通过构建高脂膳食诱导的肥胖动物模型,观察肥胖对肝脏铁代谢相关调控分子 hepcidin、LCN2 和 FPN1 表达的影响,初步探讨维持机体铁代谢稳态的分子调控机制。本次实验实时荧光定量 PCR 结果表明,肥胖模型组小鼠肝脏 hepcidin 表达水平显著高于对照组,而 hepcidin 作为一种肝脏分泌的负性铁调节因子,Nicolas 等^[18]发现 USF2 基因敲除的小鼠,其下游的 hepcidin 基因不表达,造成肝脏和脾脏铁大量积累,并与遗传血色病(hereditary haemochromatosis, HH)、HFE、 β 2-M 缺陷小鼠相似(Fleming 2001, Ahmad 2002);然而 hepcidin 转基因小鼠的肝脏,由于过早、过多的表达 hepcidin,导致了铁的严重缺乏而造成贫血。且近期的一项研究也证实肥胖会下调机体十二指肠 DMT1 和 FPN1 的表达,进而导致铁吸收不良^[12],因此可以证明肥胖可以显著上调肝脏 hepcidin 的表达,进而造成机体铁代谢功能紊乱,造成铁缺乏的发生。而肝脏铁代谢相关调控分子 LCN 和 FPN1 的表达水平在模型组与对照组间并无显著性差异,表明肝细胞摄取及释放铁的能力并无明显变化,故还不能够认为肥胖可以影响肝脏铁代谢调控分子 LCN2 和 FPN1 的表达,进而导致细胞摄取及释放铁的能力发生障碍,使得机体对铁的需求不能满足要求,出现铁代谢功能紊乱,导致肥胖性铁缺乏的发生,而可能是通过上调肝脏 hepcidin 表达直接或间接影响其他铁代谢相关调控分子或者存在更为复杂的调控机制,这仍需我们进一步的实验研究及探索。这也为进一步研究肥胖对肝脏铁代谢相关调控分子表

达的影响及引起铁缺乏的机制提供了理论和实验基础。

参考文献:

- [1] 马军, 蔡赐河, 王海俊. 1985-2010 年中国学生超重与肥胖流行趋势[J]. 中华预防医学杂志, 2012, 46(9): 776-780.
- [2] Wenzel B J, Stults H B, Mayer J. Hypoferraemia in obese adolescents[J]. The Lancet, 1962, 280(7251): 327-328.
- [3] SELTZER C C, MAYER J. Serum Iron and Iron-Binding Capacity in Adolescents II. Comparison of Obese and Nonobese Subjects[J]. The American Journal of Clinical Nutrition, 1963, 13(6): 354-361.
- [4] Nead K G, Halterman J S, Kaczorowski J M, et al. Overweight children and adolescents: a risk group for iron deficiency[J]. Pediatrics, 2004, 114(1): 104-108.
- [5] Manios Y, Moschonis G, Chrousos G P, et al. The double burden of obesity and iron deficiency on children and adolescents in Greece: the Healthy Growth Study[J]. Journal of Human Nutrition & Dietetics, 2013, 26(5): 470-478.
- [6] Cepeda-Lopez A C, Osendarp S J M, Melse-Boonstra A, et al. Sharply higher rates of iron deficiency in obese Mexican women and children are predicted by obesity-related inflammation rather than by differences in dietary iron intake[J]. The American journal of clinical nutrition, 2011, 93(5): 975-983.
- [7] Saloojee H, Pettifor J M. Iron deficiency and impaired child development: the relation may be causal, but it may not be a priority for intervention[J]. BMJ: British Medical Journal, 2001, 323(7326): 1377.
- [8] Farr S A, Yamada K A, Butterfield D A, et al. Obesity and hypertriglyceridemia produce cognitive impairment[J]. Endocrinology, 2008, 149(5): 2628-2636.
- [9] 付丽娟, 段相林, 钱忠明, 等. 铁代谢与铁调素 hepcidin [J]. 生理科学进展, 2005, 36(3): 233-236.
- [10] 李静, 钱忠明, 常彦忠, 等. 膜铁转运蛋白 Ferroportin 1 的研究进展[J]. 生理科学进展, 2005, 35(4): 349-351.
- [11] Wu G, Li H, Zhou M, et al. Mechanism and clinical evidence of lipocalin-2 and adipocyte fatty acid-binding protein linking obesity and atherosclerosis[J]. Diabetes/metabolism Research & Reviews, 2013, 30(6): 447-456.
- [12] 高倩, 李蔓, 张万山, 等. 肥胖对小鼠十二指肠 DMT1 和 FPN1 表达的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(9): 18-22.
- [13] 汤锦花, 严海东. 营养性肥胖大鼠模型的建立及评价[J]. 同济大学学报: 医学版, 2010, 31(1): 32-34.
- [14] Rochette L, Gudjoncik A, Guenancia C, et al. The iron-regulatory hormone hepcidin: A possible therapeutic target[J]. Pharmacology & Therapeutics, 2014: 35-52.
- [15] Pigeon C, Ilyin G, Courselaud B, et al. A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload[J]. Journal of biological chemistry, 2001, 276(11): 7811-7819.
- [16] 王书敏, 于鹏, 段相林, 等. 膜铁转运蛋白 1, 铁调素的靶分子[J]. 生物物理学报, 2006, 22(1): 12-18.
- [17] Wang Y, Lam K S L, Kraegen E W, et al. Lipocalin-2 is an inflammatory marker closely associated with obesity, insulin resistance, and hyperglycemia in humans[J]. Clinical chemistry, 2007, 53(1): 34-41.
- [18] G N, M B, I D, et al. Lack of hepcidin gene expression and severe tissue iron overload in upstream stimulatory factor 2 (USF2) knockout mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2001, 98(15): 8780-8785.

[修回日期]2015-07-02



失眠增加心血管病致病因子的研究

袁 蓉^{1,2}, 王 阶¹, 郭丽丽¹, 林 飞¹

(1. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053; 2. 北京中医药大学, 北京 100029)

【摘要】 目的 观察睡眠剥夺(sleep deprivation, SD)对大鼠心血管病致病因子的影响, 初步为中医安神治疗心血管病机制的研究提供基础实验依据。**方法** 16 只大鼠随机均分为空白对照组(control check, CC)和睡眠剥夺组(SD)。测量 CC 组及 SD 组大鼠 SD 前、SD 后 2 d、5 d、7 d 体重及心电图, 并眼球取血测血清褪黑素(MT)、内皮素-1(ET-1)、炎症相关因子白介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- α)等。**结果** 与 SD 前比较, SD 组大鼠体重明显减轻, CC 组大鼠体重明显增加, SD 后 5 d 及 7 d, SD 组大鼠体重与 CC 组比较明显减轻($P < 0.05$); 与 CC 组比较, SD 组大鼠 SD 后 5 d TNF- α 升高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 随 SD 时间的延长心率逐渐增快, QTc 间期逐渐延长, MT 逐渐降低, ET-1、IL-6、TNF- α 逐渐升高, 7 d 时两组的各指标差异均具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 长期失眠可使体重减轻, 心率明显加快, QTc 间期延长, 褪黑素水平降低, 内皮素和炎症因子升高, 增加心血管病致病因子, 为进一步研究安神中药对心血管病的作用提供基础实验支持。

【关键词】 睡眠剥夺; 冠心病; 心率; 内皮; 炎症

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0007-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 007. 002

Effect of insomnia on rat cardiovascular disease factors

YUAN Rong^{1,2}, WANG Jie¹, GUO Li-li¹, LIN Fei¹

(1. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical sciences, Beijing 100053, China;

2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

【Abstract】 Objective Investigate the effect of insomnia on cardiovascular disease factors and offer the experimental evidence for treating cardiovascular disease with traditional Chinese medicine tranquillization methods. **Methods** Sixteen Wistar rats were randomly divided into two groups named sleep deprivation (SD) group and normal control check(CC) group. Body weight and electrocardiogram were recorded and serum concentrations of melatonin (MT), endothelin-1 (ET-1), IL-6 and TNF- α were tested before SD and 2 days, 5 days, 7 days after SD. **Results** Body weight decreased in SD group while increased in CC group. Compared with CC group, body weight of SD rats decreased significantly in 5 days and 7 days after SD($P < 0.05$). Compared with CC group, TNF- α increased significantly in 5 days($P < 0.05$). With the time, heart rate accelerate and QTc were prolonged, MT decreased while ET-1, IL6, TNF- α increased significantly in 7 days after SD ($P < 0.05$). **Conclusion** Long term insomnia would decrease body weight and MT, while increase heart rate, QTc, ET-1 and inflammatory factors, which increase cardiovascular disease factors. It provided the experimental evidence for the study on traditional Chinese medicine tranquillization methods in the treatment of cardiovascular disease.

【Key words】 Sleep deprivation; Coronary heart disease; Heart rate; Endothelium; Inflammation

[基金项目] 科技部“重大新药创制”专项(2012ZX09102-201-006)。

[作者简介] 袁蓉(1991-), 女, 硕士生, 研究方向: 心血管。E-mail: yuanrong427@163.com。

[通讯作者] 王阶(1956-), 男, 主任医师, 博士生导师, 研究方向: 中西医结合心血管, E-mail: wangjie0103@126.com。

失眠是心血管疾病风险的独立预测因子,已成为亚临床心脏疾病的标志^[1],大规模的人群调查已发现失眠和逐渐增高的心梗、心衰的危险因素相关^[2-4],失眠可引起机体的神经内分泌紊乱,交感神经兴奋,内源性激素分泌紊乱,内皮功能紊乱等^[5],可能影响心血管病相关的心率、内皮功能、炎症反应及同时与睡眠相关的褪黑素水平,而心率是心肌耗氧量的最主要决定因素,也是心血管疾病的独立危险因素^[6];内皮素对血管收缩,心肌缺血,血管损伤均会产生影响^[7];心血管疾病的发生、发展和转归也与炎症反应有着密切的关系;褪黑素可影响心血管系统,具有抗高血压、调节脂代谢、抗心肌损伤及保护血管内皮的作用^[8]。因此,本研究利用“小平台水环境法”制备大鼠睡眠剥夺模型,观察不同睡眠剥夺时间对心血管病相关的心率、内皮素、褪黑素及炎症因子的影响,试图为中医安神法治疗心血管病的机制研究提供实验基础。

1 材料和方法

1.1 实验仪器及材料

Power Lab 4/30 多导生理记录仪,澳大利亚 AD 公司产品;Lab Chart 6 软件,澳大利亚 AD 公司产品;大鼠内皮素放射免疫分析药盒,批号 S20083014;大鼠褪黑素酶连免疫分析药盒,批号 CSB-E11315r;IL-6 酶联免疫分析药盒,批号 EK3061-48T;大鼠 TNF- α 酶联免疫分析药盒,批号 EK3821,均购于优科卓越生物技术(北京)有限公司。

1.2 动物分组及睡眠剥夺 sleep deprivation (SD) 模型的建立

SPF 级 Wistar 雄性大鼠 16 只,体重 270 ~ 290 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXX(京)2012-0001】,实验在广安门医院实验动物中心动物实验设施进行【SYXK(京)2014-0041】,并按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。适应性饲养 3 d 后随机分为睡眠剥夺组(SD 组)和空白对照组(control check,CC),每组 8 只。利用“小平台水环境法”制备大鼠睡眠剥夺模型。用直径 80 cm 的水箱,底部放置 12 个高 6 cm、直径 3 cm 的圆形小平台,每个平台间隔距离 15 cm,箱内注有水,水面低于平台 1 cm,顶部用铁丝网盖住,大鼠不能逃脱但可自由进食、饮水。大鼠可在平台间自由活动,但当进入睡眠时,由于骨骼肌的松弛使大鼠掉入水中而惊醒,造成睡眠剥夺。每日换水添食,室温保持

23℃ ~ 25℃。将 SD 组大鼠置于 24 h 拟光照环境中,进行连续 7 d 的睡眠剥夺;CC 组模拟正常作息,饲养在每天 12 h 拟光照,12 h 黑暗的环境中,不给予任何干预,正常饲养。每日定时记录大鼠的饲养环境的温度以及观察 SD 组、CC 组大鼠在行为、反应能力,进食及皮毛光泽等方面的差异,并于 SD 前及 SD 后 2、5、7 d 进行称重,心电图(ECG)检查和眼球取血检测。

1.3 心电活动检查

所有大鼠于 SD 前、SD 后 2、5、7 d 固定大鼠,在清醒状态下多导生理记录仪连接大鼠肢体记录心电图并进行分析,于 Lab Chart 6 上记录心率并计算校正的 QTc 间期,QTc = QT/ $\sqrt{RR}$ 。

1.4 血清检测

所有大鼠于 SD 前、SD 后 2、5、7 d 眼球取血 1 mL 于 EP 管内,静置 40 min,3500 r/min 离心 10 min 后取上清液冻存于 -80℃ 冰箱保存待测。按试剂盒说明书用 ELISA 法检测褪黑素(MT)、内皮素-1(ET-1)、白介素 6(IL-6)、肿瘤坏死因子(TNF- α)的浓度。

1.5 统计学处理

采用 SPSS 17.0 软件进行分析,所有数据以均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠睡眠剥夺后一般状态观察

CC 组大鼠正常,精神状态良好,活动自如。SD 组大鼠睡眠剥夺 2 d 时兴奋性增高,对刺激反应敏捷;5 d 时兴奋性增高,狂躁,至睡眠剥夺第 7 天,大鼠表现出狂躁,易“激惹”,出现尖叫,撕咬,攻击行为,精神状态差,消瘦,皮毛无光泽。

2.2 睡眠剥夺对体重影响

与 SD 前比较,SD 组大鼠体重明显减轻,SD 后 5、7 d,SD 组与 CC 组比较体重明显减轻, $P < 0.01$,均有显著性差异。

2.3 心电活动检查结果 CC 组正常大鼠心电图无明显变化,SD 组大鼠心电图表现出心率增快,QT 间期延长,且随剥夺时间延长而心率加快,QTc 逐渐延长,7 d 时两组比较 $P < 0.01$,有显著性差异。

2.4 血清检测结果 SD 组大鼠 ET-1、IL-6、TNF- α 水平随时间的延长而逐渐升高,7 d 时两组比较差异有统计学意义;MT 水平随时间延长而逐渐降低,7 d 时两组比较差异具有统计学意义。

表 1 睡眠剥夺(SD)对体重的影响
Tab.1 The effect of sleep deprivation on the weight

组别 Groups	N	SD 前 Before SD	SD2d 2days after SD	SD5d 5days after SD	SD7d 7 days after SD
CC	8	291.03 ± 4.26	294.00 ± 15.64	313.88 ± 22.34	331.63 ± 23.83
SD	8	292.14 ± 4.38	298.75 ± 8.62 *	281.25 ± 15.55 **	271.88 ± 14.75 **

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note:Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 睡眠剥夺(SD)对心率和 QTc 的影响
Tab.2 The effect of sleep deprivation on HR and QTc

组别 Groups	N	心率(HR)				QTc			
		SD 前 Before SD	SD2d 2days after SD	SD5d 5days after SD	SD7d 7 days after SD	SD 前 Before SD	SD2d 2days after SD	SD5d 5days after SD	SD7d 7 days after SD
CC	8	458.53 ± 50.56	466.50 ± 72.14	477.38 ± 48.61	386.63 ± 67.75	0.48 ± 0.05	0.49 ± 0.02	0.49 ± 0.03	0.50 ± 0.03
SD	8	440.00 ± 38.64	460.50 ± 72.80	496.75 ± 77.15	532.00 ± 51.75 **	0.49 ± 0.04	0.51 ± 0.06	0.53 ± 0.08	0.65 ± 0.03 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note:Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 3 睡眠剥夺(SD)对内皮素和褪黑素的影响
Tab.3 The effect of sleep deprivation on endothelin and melatonin

组别 Groups	N	内皮素 endothelin				褪黑素 melatonin			
		SD 前 Before SD	SD2d 2days after SD	SD5d 5days after SD	SD7d 7 days after SD	SD 前 Before SD	SD2d 2days after SD	SD5d 5days after SD	SD7d 7 days after SD
CC	8	40.67 ± 7.02	38.64 ± 2.35	40.90 ± 6.87	37.90 ± 4.27	0.53 ± 0.06	0.52 ± 0.16	0.55 ± 0.16	0.60 ± 0.10
SD	8	42.59 ± 11.37	44.57 ± 10.03	47.01 ± 6.13	49.78 ± 6.66 **	0.57 ± 0.09	0.53 ± 0.22	0.49 ± 0.15	0.42 ± 0.10 *

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note:Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 4 睡眠剥夺(SD)对 IL-6 和 TNF-α 的影响
Tab.4 The effect of sleep deprivation on IL-6 and TNF-α

组别 Groups	N	IL-6				TNF-α			
		SD 前 Before SD	SD2d 2days after SD	SD5d 5days after SD	SD7d 7 days after SD	SD 前 Before SD	SD2d 2days after SD	SD5d 5days after SD	SD7d 7 days after SD
CC	8	61.45 ± 30.24	61.40 ± 25.64	61.48 ± 34.53	61.43 ± 20.73	91.26 ± 15.36	90.78 ± 16.25	91.37 ± 8.64	90.30 ± 21.39
SD	8	61.47 ± 29.34	65.43 ± 31.25	70.36 ± 35.95	79.25 ± 39.07 *	92.07 ± 27.90	112.10 ± 26.25	135.03 ± 24.25 **	145.07 ± 25.54 **

注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。
Note:Compared with control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3 讨论

本实验针对心血管病相关的心率、内皮素,以及 IL-6、TNF-α 等炎症因子和具有保护作用的褪黑素进行研究,寻找睡眠剥夺后与心血管病相关的致病因子的改变,结果显示睡眠剥夺 7 d 时机体出现各种病理变化,说明失眠可导致心血管病致病因子变化而增加心血管风险,为安神中药治疗心血管病

提供基础研究数据。

快速心率是心血管病的独立危险因素,并成为心肌缺血和心律失常的危险因素^[6]。睡眠剥夺影响了固有生物节律使机体处于应激状态,自主神经功能紊乱,持久的交感神经兴奋可能会加快心率,对心脏自主神经平衡产生影响,致室颤阈降低,同时 QT 间期延长容易诱发尖端扭转性室速,易引起室颤、晕厥、猝死^[9]。本实验研究发现睡眠剥夺 7 d

时心率增快,QT 间期延长,与对照组比较均有统计学差异,说明失眠可能通过交感神经兴奋引起心率加快,损伤心肌细胞导致部分心肌复极时间延长,QT 间期延长,从而易诱发心律失常。

血管内皮功能在心血管系统中起着重要作用。内皮损伤,各种炎性细胞聚集、浸润,平滑肌细胞和成纤维细胞增生迁移,血管内皮细胞释放 ET-1 可导致血管舒缩功能失调、血小板凝聚等病理生理改变,促进动脉粥样硬化和血栓形成^[10]。其中内皮素的升高在冠状动脉粥样硬化及缺血性心脏病发生、发展中有重要作用,并且会影响心梗、心衰、高血压的预后^[11]。因此本实验研究发现 SD 后 7 d 时内皮素显著升高,说明失眠可损伤内皮功能,引起一系列高血压、动脉粥样硬化、血栓形成等病理变化而增加心血管风险。

炎症反应是机体对损伤因子所产生的防御反应,与高血压、动脉粥样硬化等心血管疾病有关。IL-6 作为前炎症细胞因子,可通过体液和细胞免疫功能影响炎症和组织损伤,在炎症反应中起核心调节作用,是动脉粥样硬化的重要炎症因子;TNF- α 作为前炎症细胞因子可调节脂类代谢,影响内皮功能,并刺激自身和 IL-6 的表达,与动脉粥样硬化的形成密切相关,其浓度与病情严重程度成正比,因此 IL-6、TNF- α 等炎症标志物的水平能够预测冠心病病情及病变程度^[12]。本实验研究发现 SD 后 7 d IL-6 和 TNF- α 均显著升高,说明失眠可通过炎症损伤作用于心血管系统。

褪黑素作为影响睡眠的重要激素与心血管疾病有着密切联系。褪黑素不仅可以直接调节心血管系统的活动,还可影响其他所有激素的分泌间接调节心血管系统的活动,有着抗应激、抗氧化、抑制炎症反应的作用^[8]。因此本实验研究发现中褪黑素在睡眠剥夺 7 d 时显著下降,说明失眠可损伤心血管系统的保护作用,各种危险因素之间相互影响,构成一个复杂的网络,通过多种途径影响心血管病的发生、发展和预后。

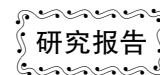
综上,本实验证实了失眠可通过加快心率,延长 QT 间期,升高内皮素和炎症因子,减少褪黑素等多途径增加心血管病致病因子。失眠时交感神经过度兴奋,可能引起儿茶酚胺分泌增加,血小板黏附聚集性增强,血液粘滞度增加,增加血栓形成危险因素^[10]。目前中医药在调节失眠引起的危险因素方面有良好优势,可作用于心肌膜上各种离子通

道,影响心肌细胞膜受体及酶类,影响自主神经功能,改善心率,抗心律失常^[13],调节内皮功能,抗炎、抗氧化,多途径多靶点预防血栓形成、动脉粥样硬化等发生^[14],因此,本实验为进一步探讨失眠对心血管病的影响机制及中医安神方药干预研究提供了基础数据和参考资料,而其具体机制仍需进一步研究。

参考文献:

- [1] Irwin MR, Ziegler M. Sleep deprivation potentiates activation of cardiovascular and catecholamine responses in abstinent alcoholics [J]. *Hypertension*, 2005, 45(2): 252-257.
- [2] Laugsand LE, Vatten LJ, Platou C, *et al.* Insomnia and the Risk of Acute Myocardial Infarction: A Population Study [J]. *Circulation*, 2011, 124(19): 2073-2081.
- [3] Janszky I, Ahnve S, Ljung R, *et al.* Daylight saving time shifts and incidence of acute myocardial infarction - Swedish Register of Information and Knowledge About Swedish Heart Intensive Care Admissions (RIKS-HIA) [J]. *Sleep Med*, 2012, 13(3): 237-242.
- [4] Tofield A. Insomnia linked to increased risk of heart failure [J]. *Eur Heart J*, 2013, 34(24): 1771.
- [5] Mullington JM, Haack M, Toth M, *et al.* Cardiovascular, Inflammatory, and Metabolic Consequences of Sleep Deprivation [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2009, 51(4): 294-302.
- [6] 朱绍民,张庆,程真霞. 冠心病与静息心率相关性研究[J]. *中国现代药物应用*, 2012, (6)1: 23-25.
- [7] 李培武,伏旭,傅仲学. 内皮素受体及其受体拮抗剂在心血管疾病中的作用[J]. *中国现代应用药学*, 2014, 31(3): 376-379.
- [8] 王鹏,李海涛,白华. 褪黑素与心血管疾病相关性研究进展[J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2009, 1(2): 115-116.
- [9] 郭敬宾,何非,宋旭东. 部分睡眠剥夺对健康大鼠心电活动及血管内皮功能的影响[J]. *解放军医学杂志*, 2010, 35(6): 691-695.
- [10] 张亚晶,卢才义. 睡眠剥夺对心血管系统的影响及其研究进展[J]. *中华老年多器官疾病杂志*, 2008, 7(6): 529-532.
- [11] 王蕾,曹长春. 心血管疾病的血浆内皮素变化及其临床意义[J]. *中外医疗*, 2010, 15(1): 15-16.
- [12] 刘虹,徐庆科,夏伟. 冠心病与炎症因子 IL-6、IL-8、IL-10、hs-CRP 及 TNF 的相关性研究[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2011, 19(9): 1446-1448.
- [13] 苏丹,牛小麟,宋安齐. 中药抗心律失常的现状与展望[J]. *现代中西医结合杂志*, 2011, 20(25): 3246-3248.
- [14] 王令淳,李七一. 冠心病内皮功能紊乱的中医药诊治进展[J]. *南京中医药大学学报*, 2009, 25(3): 238-240.

[修回日期]2015-06-10



三转基因银屑病小鼠模型建立与表型分析

高 祥, 刘 宁, 葛文萍, 潘 烁, 张海涛, 张连峰, 董 伟

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

【摘要】 目的 尿激酶型纤溶酶激活剂 (PLAU)、尿激酶型纤溶酶激活剂受体 (PLAUR) 和信号传导与转录激活因子 3 (STAT3) 是参与银屑病病理发生的重要基因。本文目的是制备皮肤特异性表达 *PLAU*、*PLAUR* 和 *STAT3* 三种基因的转基因小鼠, 建立可进行性再现银屑病病理进程的小鼠模型。**方法** 将 *PLAU*、*PLAUR* 和 *STAT3* 基因分别插入牛角蛋白 5 启动子 (BK5) 下游, 构建转基因表达载体, 通过显微注射法建立在皮肤组织同时高表达 *PLAU*、*PLAUR* 和 *STAT3* 三种基因的转基因 C57BL/6J 小鼠。利用 PCR 法鉴定转基因小鼠的基因型, Western blot 检测基因表达水平, HE 染色观察皮肤病理表型。**结果** *PLAU*、*PLAUR* 和 *STAT3* 三种基因在选定的转基因小鼠皮肤组织均有明显表达; 转基因小鼠与同龄野生型小鼠相比表皮状态差, 炎症明显; 4 月龄的转基因小鼠真皮变薄, 表皮过度角化, 棘层增厚, 毛囊减少、发育异常、部分毛囊内未见毛干, 角化不全区域内可见 Munro 氏小脓肿, 真皮炎细胞浸润。**结论** 建立了稳定传代的皮肤特异性表达 *PLAU*、*PLAUR* 和 *STAT3* 基因的转基因小鼠品系, 转基因小鼠具有进行性的银屑病表型, 可以作为多病因综合银屑病小鼠模型。

【关键词】 银屑病; 信号传导与转录激活因子 3; 尿激酶型纤溶酶激活剂; 转基因小鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0011-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.003

Establishment of the psoriasis transgenic mouse model and analysis of the phenotype

GAO Xiang, LIU Ning, GE Wen-ping, PAN Shuo, ZHANG Hai-tao, ZHANG Lian-feng, DONG Wei

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

【Abstract】 Objective To develop a model that could copy the pathological development of psoriasis, the triple-transgenic mice that harboring Plasminogen activator, urokinase (PLAU), PLAUR receptor (PLAUR) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) were generated. They are the important genes involved in the pathological development of psoriasis. **Methods** The transgenic plasmid was constructed by insertion of the *PLAU*, *PLAUR* and *STAT3* into the downstream bovine keratin 5 promoter respectively. The transgenic mouse was produced by microinjection and the genotyping was detected by PCR. The expression level of the transgenic gene was determined by Western blotting. The pathological changes were observed by HE staining. **Results** One mouse line was selected with over expression of the *PLAU*, *PLAUR* and *STAT3* in the tissue of skin. The transgenic mice showed decreased dermal layer, a hyperkeratinized cuticular layer and increased stratum spinosum. The number of hair follicle was reduced and developed abnormally in the transgenic mice. The Munro abscess in the dermal layer and the increased inflammatory cell infiltrates in dermal layer were

also observed in the transgenic mice. **Conclusions** A transgenic mouse line was produced and passage stably, which expressed the *PLAU*, *PLAUR* and *STAT3* in the tissue of skin and developed the psoriasis progressively. All of our results suggested that the transgenic mice were a useful animal model for psoriasis.

【Key words】 Psoriasis; Signal transducer and activator of transcription 3; Plasminogen activator urokinase; Transgenic mice

银屑病(牛皮癣, psoriasis)是一种以表皮过度增生和真皮慢性炎症反应为特征的常见皮肤病。白色人种发病率较高约为 2%~5%, 黄种人发病率较低约为 0.5%, 难根治, 易复发。目前发病原因不明, 与呼吸道感染, 胃炎, 饮食习惯, 精神紧张、忧虑, 不当使用激素药物等有关。有两方面的病理特征, 一方面是真皮慢性炎症反应, 包括 T 细胞、中性粒细胞浸润, 炎症因子: 比如 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-23 分泌增加等^[1-2]。另一方面, 是表皮过度增生, 包括一些与表皮增生相关的血纤维蛋白溶酶原激活因子(tPA), 双调蛋白(AREG)等高表达^[3-4]。银屑病是人类特有的一类疾病, 在动物中少见, 银屑病动物模型的制作主要采用化学制剂诱导, 基因修饰或组织移植等方式制备, 可以在一定程度上模拟银屑病的病理表型、慢性炎症等^[4-7], 但是各有优缺点, 银屑病药物评价需要一种既有表皮过度增生因素又有慢性炎症因素参与的多病因动物模型的研发。

信号传导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是 STAT 转录因子家族的一员, JAK/STAT 信号通路是大部分细胞因子, 包括 IL2、IL7、IL12、IL10、IL21 等发挥生物学作用的核心通路, STAT3 调控 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、Th17、Treg 细胞和 B 细胞等多种淋巴细胞的分化与成熟, 与炎症关系密切^[8]。STAT3 参与皮肤伤口的愈合、角质细胞迁移、毛囊生长、抵抗皮肤的放射损伤等, 皮肤转基因表达活化的 STAT3 可引发类似银屑病的病变, 而抑制 STAT3 表达可以改善银屑病症状^[9], 推测, STAT3 参与表皮过度增生和真皮慢性炎症过程, 也是重要的治疗靶点之一。

血纤维蛋白溶酶原, 血纤维蛋白溶酶, 抑制因子, 激活因子细胞受体是一个多基因成员参与的体系, 调节细胞外基质的水解与细胞外基质信号, 参与血管生成、肿瘤发生、皮肤发育等多种过程^[10]。尿激酶型纤溶酶激活剂(plasminogen activator, urokinase, PLAU)是多种血纤维蛋白溶酶原的激活因子, PLAU 和 PLAU 受体(plasminogen activator, urokinase receptor, PLAUR,) 也叫做 UPAR 或 CD87,

都在皮肤组织表达^[11-12]。PLAU/PLAUR 表达升高可能是银屑病发生的重要原因^[12]。

本文利用转基因技术, 将 *STAT3*、*PLAU* 和 *PLAUR* 同时转入小鼠基因组, 建立皮肤特异表达三种基因的转基因小鼠, 小鼠表现毛囊发育异常、表皮过度增生和慢性炎症, 可以作为多病因综合小鼠银屑病。

1 材料和方法

1.1 人 *PLAU*、*PLAUR* 及鼠 *STAT3* 三种表达载体的构建及转基因

人 *PLAU*、*PLAUR* 及鼠 *STAT3* 三个基因的 cDNA 购买自 Origene 公司, 用 PCR 的方法克隆三种基因的开放阅读框, 并在两端引入酶切位点 Kpn I (宝生物工程有限公司 中国) 和 EcoRV (宝生物工程有限公司 中国), 插入 pMD-18T Simple Vector (宝生物工程有限公司 中国), 测序证实序列正确。以 Kpn I 和 EcoRV 进行酶切回收三种基因片段, 均插入牛角质蛋白 5 (bovine keratin 5) 启动子下游构建人 *PLAU*、*PLAUR* 及鼠 *STAT3* 三种表达载体。构建成功后, 再用 Sal I (宝生物工程有限公司 中国) 将其线性化。调整转基因片段浓度至 4 ng/ μ L, 用显微注射法 (TE2000-U 显微注射仪) 将线性化的三种混合后的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中, 制备三转基因小鼠^[13]。C57BL/6J 小鼠购自北京维通利华生物技术有限公司【SCXK (京) 2014-0001】。实验室使用许可【SYXK (京) 2013-0004】。实验中涉及动物的操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会的批准, 批准号为 ILAS-GC-2015-002。

1.2 PCR 鉴定三转基因小鼠的基因型

转基因小鼠在 9~14 日龄时用剪趾法标记, 收集剪下的组织, 用碱裂解法提取基因组 DNA, 利用特异引物通过 PCR 法进行检测。PCR 反应条件: 鼠尾 DNA 模板 10~100 ng, *PLAU* 基因上游引物 5' GGGCAGCACTGTGAAATAGATAAG 下游引物为 5' CCCAGGTAGACGATGTAGTCCTC; *PLAUR* 基因上游引物为 5' GATTGCCGTGTGGAAGAGTG 下游引物为

5' TCAGGAAGTGAAGGTGTCG; *STAT3* 基因上游引物为 5' GAGAGTCAAGACTGGGCATATGC 下游引物为 5' CCAGCTCACTCACAATGCTTCTC。PCR 反应体系 20 μ L (试剂购自宝生物工程有限公司, 中国)。反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环。目的基因片段分别为 *PLAU* 基因 545 bp, *PLAUR* 基因 475 bp, *STAT3* 基因 550 bp。

1.3 Western blot 检测鉴定三种基因的表达

提取三转基因小鼠与同龄野生型小鼠皮肤总蛋白, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 蛋白转移至 NC 膜上 (Millipore 美国), 置于 5% 脱脂奶粉封闭液, 分别用兔抗人 *PLAU* 抗体 (Abcam)、兔抗人 *PLAUR* 抗体 (Abcam)、鼠抗鼠 *STAT3* 抗体 (Cell Signaling) 检测基因的表达水平。采用辣根过氧化物酶 (Hrp)-耦联的羊抗兔抗体和羊抗鼠抗体结合一抗 (Pierce, USA), 用 Hrp-耦联的鼠抗 β -actin 单克隆抗体做为内参 (康成生物, 中国)。

1.4 转基因小鼠与同龄野生型小鼠的大体观察

选用同龄同性别的转基因阳性小鼠和野生型小鼠, SPF 级动物房, 同等条件正常饲养, 定期观察两组小鼠表皮毛发生长情况, 并拍照记录。

1.5 HE 染色观察 4 月龄转基因小鼠与同龄野生型小鼠的皮肤组织

选用 4 月龄的转基因阳性和同龄野生小鼠, 取小鼠背部及腹部皮肤, 固定在 10% 中性甲醛中 48 h, 进行修块、脱水、包埋、切片、HE 染色和镜下观察 (Nikon 显微镜, 日本和 Leica MZ16F 体视镜, 德国) [14]。

2 结果

2.1 人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 三种基因表达载体的构建

用 PCR 克隆的人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 基因, 测序结果表明同已报道的序列完全一致 (*PLAU* Gene ID: 5328, NM-002658; *PLAUR* Gene ID: 5329, NM-002659; *STAT3* Gene ID: 20848, NM-011486;)。将三种基因分别插入皮肤特异的表达启动子 BK5 下游, 构建人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 基因三种转基因载体 (图 1)。

2.2 三转基因小鼠基因型的鉴定

用显微注射法将线性化的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中, 转入到假孕受体 ICR 小

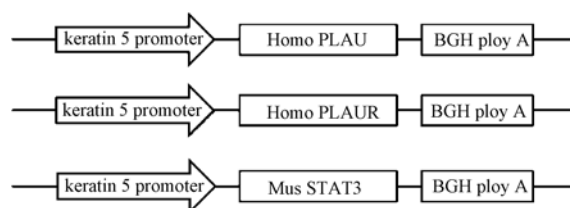
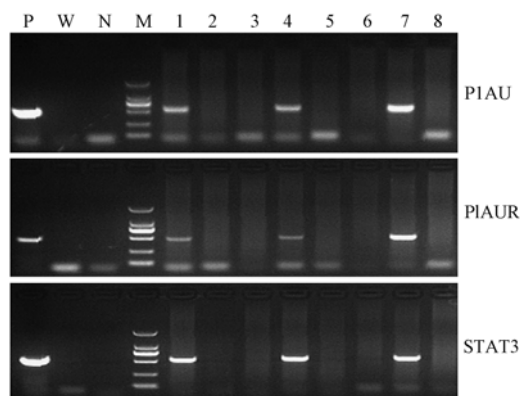


图 1 人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 基因转基因表达载体

Fig. 1 *PLAU*, *PLAUR*, *STAT3* transgenic construct

鼠中, 小鼠出生后 9 ~ 14 d 提取基因组 DNA, 用 PCR 扩增目的基因片段来检测转基因小鼠, 三种目的基因片段分别为 *PLAU* 基因 545 bp, *PLAUR* 基因 475 bp, *STAT3* 基因 550 bp (图 2), 共得到 3 只首建鼠均可传代。



注: P: 阳性对照; N: 阴性对照; W: 空白对照;

M: DNA 相对分子质量标记; 1, 4, 7 是 F0 代阳性转基因小鼠; 2, 3, 5, 6, 8 是 F0 代阴性小鼠。

图 2 PCR 鉴定转基因小鼠基因型

Note: P, positive control; N, negative control; W, blank control; M, DNA molecular weight marker; Lane 1, 4, 7 the positive transgenic mice; Lane 2, 3, 5, 6, 8 negative.

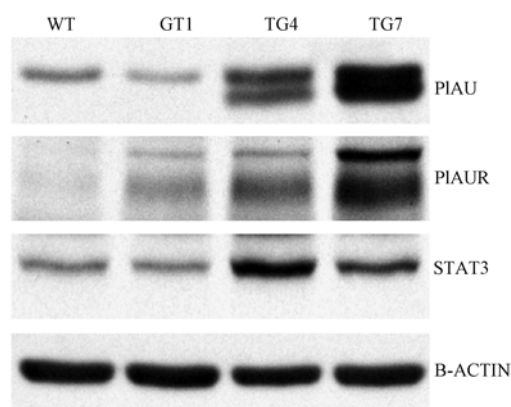
Fig. 2 Genotyping the transgenic mice by PCR

2.3 人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 三种基因的表达

首先用 Western blot 分析 3 个系 1 月龄的转基因小鼠皮肤中人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 的表达情况, 结果显示三种蛋白在皮肤中均有表达, 表达量各有差别 (图 3), 选取三种基因均有较高表达水平的 TG7 保种繁殖, 并进行下一步实验。

2.4 转基因小鼠与同龄野生型小鼠表皮差异

先用 Western blot 结果显示 TG4 皮肤中主要高表达 *PLAU* 和 *STAT3*, 而 TG7 皮肤中 *PLAU*, *PLAUR* 和 *STAT3* 均高表达。和 TG4 小鼠比较 TG7 小鼠表型更明显, 说明三种基因同时表达对病理发生是关键。TG7 小鼠在 1 月龄就表现腹部毛发稀疏, 无光



注: WT: 野生型小鼠; TG1、TG4、TG7: 转基因小鼠; 内参: β -actin。

图 3 三种基因在转基因小鼠皮肤中的表达

Note: WT was Wild type mice; TG1, TG4 and TG7 were the transgenic lines; The Western blot was normalized with β -actin.

Fig. 3 The expression of the transgenic genes in the skin of mice

泽, 表皮粗糙, 至 4 月龄表现典型腹部皮肤红肿和炎症(图 4)。皮肤炎症主要表现在腹部, 背部表型不明显。除皮炎表型外, 小鼠生育和发育无异常。

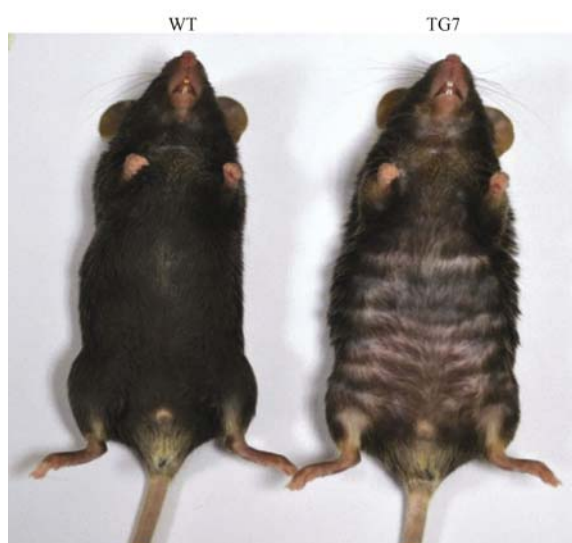


图 4 转基因小鼠表皮表型

Fig. 4 The phenotype of the transgenic mouse

2.5 皮肤病理表型(图见彩插 1)

选用 4 月龄的转基因阳性和同龄野生小鼠, 采取颈椎脱臼法牺牲, 取背部及腹部皮肤, HE 染色, 镜下观察显示, 转基因小鼠真皮变薄(图 5A), 表皮过度角化和棘层增厚(图 5B), 毛囊减少和发育异常, 部分毛囊内未见毛干(图 5C), 角化不全区域内可见中性白细胞构成的小脓肿(Munro 氏小脓肿)和真皮炎细胞浸润((图 5D)。

3 讨论

真皮慢性炎症反应和表皮过度增生是银屑病的 2 个典型的病理特征, 参与银屑病的病理发生因素很多, 如 T 细胞、中性粒细胞浸润, 炎症因子分泌增加^[1-2], 一些与表皮增生相关的因子表达增多, 如 tPA, AREG, STAT3, PLAU, PLAUR^[3-4, 11-12]。利用一些具有刺激和损伤作用的化学物质对动物皮肤进行处理, 比如, 可以用 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)涂抹小鼠背部皮肤造成银屑病样体征, 但是这种模型一方面病理发生机制与银屑病病理发生机制差别较大, 主要局限于病理表型的模仿; 另一方面, 在移出化学物质后, 动物会自行痊愈, 没有渐进性的特点, 留给药物治疗的观察时间也比较短。通过转基因的方式在皮肤局部表达参与银屑病发生的一些基因, 可以在病因和病理发生过程方面更好的模仿银屑病。针对参与银屑病发生的一些基因单独转基因有时候并不能引发皮肤银屑病样体征, 比如, *Wnt5a* 基因在银屑病发病过程高表达, 但是在皮肤转基因表达 *Wnt5a* 只观察到毛囊发育异常, 而没有银屑病样体征^[15]。所以, 将多种相关基因一起转基因可以整合多种病因的作用, 更真实的模仿银屑病。

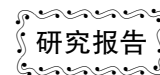
PLAU, PLAUR 和 STAT3 都是参与银屑病病理发生的重要基因^[9, 11-12]。牛角蛋白 5 启动子(BK5)是常用的皮肤组织特异表达的启动子^[16]。本文利用 BK5 启动子驱动 PLAU, PLAUR 和 STAT3 的表达, 建立了在皮肤中同时表达这三种基因的转基因小鼠(图 1-3)。和野生型小鼠相比, 转基因小鼠在 1 月龄就表现腹部毛发稀疏, 无光泽, 表皮粗糙, 至 4 月龄表现典型腹部皮肤红肿和炎症(图 4)。转基因小鼠真皮变薄, 表皮过度角化和棘层增厚, 毛囊减少和发育异常, 角化不全区域内可见中性白细胞构成的 Munro 氏小脓肿和真皮炎细胞浸润(图 5)。转基因小鼠在病因、炎症和皮肤损伤三方面都能表现银屑病特征, 并且具有累进性的特点, 可以作为多病因综合银屑病小鼠模型。

参考文献:

- [1] Tokura YI, Mori T, Hino R. Psoriasis and other Th17-mediated skin diseases[J]. JUOE. 2010 Dec 1;32(4):317-28.
- [2] Yamamoto M, Nakajima K, Takaishi M, et al. Psoriatic inflammation facilitates the onset of arthritis in a mouse model[J]. J Invest Dermatol. 2015, 135(2):445-53.

- [3] Airola K1, Reunala T, Salo S, *et al.* Urokinase plasminogen activator is expressed by basal keratinocytes before interstitial collagenase, stromelysin-1, and laminin-5 in experimentally induced dermatitis herpetiformis lesions[J]. J Invest Dermatol. 1997,108(1):7-11.
- [4] CookPW, Piepkom M, Clegg CH, *et al.* Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype [J]. J Clin Invest. 1997,100: 2286-2294.
- [5] Zhu X, Wu Y, Huang S C, *et al.* Overexpression of Wnt5a in mouse epidermis causes no psoriasis phenotype but an impairment of hair follicle anagen development[J]. Exp Dermatol. 2014,23(12):926-8.
- [6] Schön M, Behnenburg C, Denzer D, *et al.* Pathogenic function of IL-1 beta in psoriasiform skin lesions of flaky skin (fsn/fsn) mice[J]. Clin Exp Immunol. 2001,123(3):505-10.
- [7] Nickoloff BJ, Kunkel SL, Burdick M, *et al.* Severe combined immunodeficiency mouse and human psoriatic skin chimeras. Validation of a new animal model[J]. Am J Pathol. 1995,146(3):580-8.
- [8] Kane A, Deenick EK, Ma CS, *et al.* STAT3 is a central regulator of lymphocyte differentiation and function [J]. Curr Opin Immunol. 2014,28(6):49-57.
- [9] Sano SI, Chan KS, DiGiovanni J. Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases[J]. J Dermatol Sci. 2008 Apr;50(1):1-14. Epub 2007 Jul 2.
- [10] Montuori N, Ragno P. Role of uPA/uPAR in the modulation of angiogenesis[J]. Chem Immunol Allergy. 2014;99:105-22.
- [11] Gao Q1, Fu G, Huang G, *et al.* Relationship between urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) and the invasion of human prenatal hair follicle[J]. Arch Dermatol Res. 2010,302(6):409-18.
- [12] Jensen PJ, Baird J, Belin D, *et al.* Tissue plasminogen activator in psoriasis[J]. J Invest Dermatol. 1990,95(5):13S-14S.
- [13] 路迎冬,张旭,马婧,等. Sleeping Beauty 转座酶转基因小鼠模型的建立[J]. 中国比较医学杂志. 2013,23(10):7-12.
- [14] 张丽,关菲菲,张旭,等. 瘦素基因敲除肥胖大鼠的血糖及病理长期观察[J]. 中国比较医学杂志. 2014,24(3):45-49.
- [15] Omoto D, Yamaguchi T, Haruyama S. *et al.* Is Wnt5a overexpression sufficient for generating a psoriasis-like phenotype in transgenic mice? [J]. Exp Dermatol. 2015,24(3):183-4.
- [16] Diamond I, Owolabi T, Marco M, *et al.* Conditional gene expression in the epidermis of transgenic mice using the tetracycline-regulated transactivators tTA and rTA linked to the keratin 5 promoter[J]. J Invest Dermatol. 2000,115(5):788-94.

[修回日期] 2015-06-05



脊神经后根切断对大鼠膝关节软骨退变的影响

张 影¹, 林 毅¹, 颜 赫¹, 张才新¹, 时晓迪¹, 金利新²

(1. 青岛大学医学院临床学院, 青岛 266071; 2. 青岛大学医学院解剖学教研室, 青岛 266071)

【摘要】 目的 观察脊神经后根切断大鼠不同时期关节软骨的变化特点及规律, 进一步验证部分感觉障碍可以引起关节软骨损伤。**方法** 10 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠 33 只随机分为实验组 (18 只) 和对照组 (15 只)。切断实验组大鼠右侧 L3、L4 脊神经后根。对照组只切开皮肤及椎旁肌。观察大鼠行为学改变。于术后 2 周、6 周和 10 周三个时间点取右后肢股骨下端, 制作组织石蜡切片。常规 HE 染色、番红 O/固绿染色观察关节软骨的组织学改变及特点。**结果** 术后随时间推移, 实验组大鼠右侧后肢经历一过性瘫痪、协调运动障碍及主动运动的变化过程。右后肢股骨髁面逐渐变浅变宽。关节软骨依次出现表面粗糙、细胞排列紊乱、细胞减少、潮线复制、漂移和中断等变化。实验组关节软骨 ACC/TAC 值随时间推移呈逐渐增大 ($t = 5.25 \sim 8.13, P < 0.05$)。**结论** 脊神经后根切断可引起关节软骨损伤及退行性改变。

【关键词】 脊神经后根切断; 关节软骨; 软骨损伤

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0016-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.004

Effect of dorsal rhizotomy on cartilage of degenerative changes in knee joint of rats

ZHANG Ying¹, LIN Yi¹, YAN He¹, ZHANG Cai-xin¹, SHI Xiao-di¹, JIN Li-xin²

(1. Department of Clinical Medicine, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, China;

2. Department of Anatomy, Medical College of Qingdao University, Qingdao 266071, China)

【Abstract】 Objective To investigate the changing characteristics and rules of the different period of articular cartilage in rats after dorsal rhizotomy, and to verify the partial sensory disturbance can cause articular cartilage injury. **Methods** Thirty-three ten-month-old SPF male Wistar rats were randomly divided into experimental group ($n = 18$) and control group ($n = 15$). The rats in the experimental group were sectioned the L3、L4 dorsal roots in the right. The rats in the control group were only incised the skin and paravertebral muscles. To observe the behavior changes in rats. At 2, 6 and 10 weeks, the specimens of the right hind lower end of femur were drawn out to make paraffin sections, then HE staining and Safranin O/ Fast Green staining. The changes and characteristics of the morphology of the articular cartilage was observed. **Results** With the prolonging of period, the right hind limb of the experimental rats through the change process of transient paralysis, coordination of movement disorders and active movement. In the experimental group, the patellar surface of right hind femur gradually became shallow and wide. The articular cartilage underwent rough, cells disorganized, cells decreased, and duplicated drifted and interrupted tide line. The ratios of ACC/TAC of the experimental group were gradually high ($t = 5.25 \sim 8.13, P < 0.05$). **Conclusion** Dorsal rhizotomy can cause injury

[基金项目] 青岛大学医学院国家级实验教学示范中心创新实验项目。

[作者简介] 张影 (1992 -), 女, 本科生, E-mail: zhangying1611@163.com。

[通讯作者] 金利新 (1967 -), 男, 副教授, 医学硕士, 研究方向: 临床应用解剖, 运动医学, 骨关节损伤与修复, E-mail: 13061491213@126.com。

and degenerative changes in articular cartilage.

【Key words】 Dorsal rhizotomy; Articular cartilage; Cartilage injury

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种以软骨退行性变和累及整个关节的慢性退行性骨关节病, 严重威胁人类的健康与生活质量。研究显示 65 岁以上人群中放射学 OA 的患病率可达 50% 以上, 而在 75 岁以上人群中, 这一数值可达到 80% 左右, 但 OA 的病因及病理机制并不明确^[1-3], 也缺乏有效的临床治疗方法与手段。有临床研究显示 OA 患者均存在不同程度的本体感觉误差, 而且对 OA 患者进行本体感觉康复训练, 患者关节周围的肌力、稳定性、反应速度等都有所提高, 临床症状得到缓解^[4-5]。提示本体感觉障碍可能参与了 OA 的形成与发展。完整的反射弧是保证骨骼肌张力及关节稳定的基本条件的前提。经典骨关节炎动物模型是通过切断关节韧带、肌腱等效应器装置导致关节不稳而引起软骨损伤。可以推测, 切断反射弧传入神经, 同样也可引起关节稳定性改变和运动障碍, 进而引起关节软骨损伤, 这可能是 OA 患者潜在的致病诱因。

本实验旨在制作关节周围感觉缺失动物模型, 通过观察实验动物行为学变化及关节软骨的形态学改变, 探讨感觉缺失可能引起的关节软骨损伤及变化特点, 可为 OA 病因及发病机制提供新的模型和思路, 为 OA 的预防治疗提供参考。

1 材料和方法

1.1 动物分组及造模

10 周龄 SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 33 只, 体重 268.2 ± 23.5 g, 来源于青岛市实验动物和动物实验中心【SCXK(鲁) 2014-0001】, 随机分为实验组 (18 只) 和对照组 (15 只)。无菌手术在青岛大学医学院动物实验中心【SYXK(鲁) 2003-0008】进行。实验组大鼠用 10% 水合氯醛进行腹腔注射麻醉, 行脊正中线偏右侧切口, 钝性分离椎旁肌, 从椎间孔入路切断右侧 L3、L4 脊神经后根。生理盐水冲洗手术视野, 依次缝合消毒。对照组只切开椎旁肌, 不损伤脊神经。术后每天肌肉注射青霉素 4 万 U/只, 连续注射 3 d。正常饮食, 自然光照。每天强制大鼠活动 30 min, 观察记录模型大鼠右后肢恢复情况, 采用 Tarlov 评分标准进行运动功能评分。

1.2 标本采集与处理

术后 2 周、6 周和 10 周 3 个时间点处死大鼠 (实验组 6 只, 对照组 5 只), 取右后肢股骨下端 1

cm, 置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h ~ 48 h, 15% EDTA-2Na 微波脱钙, 石蜡包埋, 切片。HE 染色、番红 O/固绿染色, 光学显微镜下观察关节软骨的组织学改变, 并参考改良的 Mankin 评分标准对关节软骨进行评分, 应用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件测量软骨钙化层、软骨全层厚度, 计算软骨钙化层 / 软骨全层比值 (articular calcified cartilage/total articular cartilage, ACC/TAC)。

1.3 主要试剂

EDTA-2Na (北京索莱宝科技有限公司), 番红 O (北京索莱宝科技有限公司), 固绿 (北京华迈科生物技术有限公司)。

1.4 统计学分析

运用 SPSS 18.0 统计软件包对数据进行分析。Mankin 评分采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 不同实验组之间采用单因素方差分析, 相邻两组之间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 大鼠行为学改变

实验组大鼠术后第 2 天, 右后肢不能正常活动, 静止时呈足背翻转向下姿势 (持续至第 2 周末), 在运动过程中不能配合其它肢体协同运动、呈被动拖动、瘫痪状态; 针刺右侧大腿前外侧无躲避反应, 针刺右侧足背及左侧下肢有躲避反应。术后第 4 天, 模型大鼠运动时右后肢呈外展、被动划步姿势。1 周后模型大鼠运动时右后肢呈外展位划步姿势、足背翻转与复位相交替 (彩插 2 图 1)。第 2 周后, 模型大鼠静止时右足背正常姿势, 运动时呈外展位划步姿势、偶然出现足背翻转。第 6 周后模型大鼠右后肢活动仍呈划步姿势, 但足背恢复正常位置。第 9 周后, 模型大鼠右后肢活动基本恢复正常姿势。此过程中, 右后肢大腿前外侧始终针刺无躲避反应。

术后 1 周末, 实验组大鼠运动功能 Tarlov 评分达到 4 分的有 10 只 (55.6%), 术后第 2 周末所有大鼠运动功能达到 4 分 (100%)。

对照组大鼠术后活动正常。

2.2 股骨下端大体形态变化

实验组大鼠术后第 2 周末右后肢股骨下端关节面较为光滑, 髌面较窄、髌面中间凹陷较深; 术后第 6 周末右后肢股骨下端关节面欠光滑, 髌面开始变宽, 髌面中间凹陷开始变浅, 失去正常光泽, 色泽不

均;术后第 10 周末右后肢股骨下端关节面不光滑,髌面变宽,髌面中间凹陷变浅,色泽不均,透亮度下降(彩插 2 图 2)。

2.3 组织形态学观察

光学显微镜下,对照组 HE 染色,关节软骨表面光滑,软骨细胞排列整齐,结构层次清晰,着色均匀,潮线完整。番红 O/固绿染色,软骨着色为红色,着色均匀。

实验组 HE 染色,关节软骨面粗糙,软骨着色不均匀;软骨细胞减少、排列紊乱(15 例,83.3%);出现潮线复制、漂移和中断的现象(10 例,55.6%)。番红 O/固绿染色,软骨层着色不均匀,着色变浅(17 例,94.4%),在高倍镜下观察潮线复制、漂移和中断现象比 HE 染色观察更为明显(12 例,66.7%)。上述变化随时间推移呈加重趋势。各时间点 Mankin 评分结果(见表 1)。

表 1 大鼠膝关节软骨 Mankin 评分结果比较
Tab. 1 Comparison of Mankin score in knee articular cartilage in rats

组别 Groups	只数 Cases	2 周 2 Weeks	6 周 6 Weeks	10 周 10 Weeks
对照组 Control group	15	—	—	—
实验组 Experimental group	18	2.57 ± 0.73	4.26 ± 0.81 **	5.89 ± 0.75 **

注:实验组各时间段间比较, $F = 29.31, P < 0.01$; 相邻时间段间比较, $t = 3.69 \sim 3.96, ** P < 0.01$ 。

Note: Comparison of different period in the experimental group, $F = 29.31, P < 0.01$; Comparison between adjacent period, $t = 3.69 \sim 3.96, ** P < 0.01$.

对照组于术后第 2 周、6 周、10 周关节软骨 ACC/TAC 值分别为 37.96 ± 3.92 、 40.04 ± 4.65 、 40.82 ± 5.39 , 实验组于术后第 2 周、6 周、10 周关节软骨 ACC/TAC 值依次为 36.58 ± 5.41 、 50.39 ± 6.55 、 57.97 ± 5.36 。实验组 6 周与 10 周大鼠关节软骨 ACC/TAC 值较实验组 2 周及对照各组均显著升高 ($F = 20.49, P < 0.01, t = 3.64 \sim 8.13, P < 0.01$)。实验组关节软骨 ACC/TAC 值随时间推移呈逐渐增大($t = 5.25 \sim 8.13, P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 感觉缺失与关节软骨损伤

骨关节炎可以涉及到全身多个关节,其中以膝关节、髌关节、脊柱(如颈椎和腰椎)等承重关节最为常见^[6]。虽然骨关节炎的病因尚不是很清楚,但其主要的危险因素已经得到流行病学确认,如年龄、性别、遗传、职业、肥胖、运动及生物力学异常等^[1-3]。骨关节炎的核心病理改变是软骨的损伤。各种危险因素通过不同方式作用于关节软骨,引起软骨细胞凋亡、细胞外基质分解代谢、自身免疫等病理改变,最终导致软骨的损伤^[7]。关节不稳可能在软骨损伤中扮演着重要角色。

反射弧的完整是保证骨骼肌及关节正常运动的基本条件和前提,也是维持关节应力平衡的基础。传入神经损伤引起的传入信息的缺失、特别是本体感觉功能的丧失,会导致骨骼肌肌张力、协同运动、关节初始状态及应力紊乱,引起关节功能紊乱,进而可引起软骨损伤。有临床资料显示,OA 患

者均存在不同程度的本体感觉误差与功能障碍;而且对 OA 患者进行本体感觉康复训练,患者关节周围的肌力、稳定性、反应速度等都有所提高,临床症状得到缓解^[4-5]。间接证实上述传入神经损伤引起关节功能紊乱及关节软骨损伤的推断。提示本体感觉障碍可能参与了 OA 的形成与发展。研究探讨本体感觉功能障碍对关节软骨的影响,可有助于进一步认识 OA 的病理机制,对 OA 的防治具有积极意义。

本实验研究结果显示,实验动物关节软骨出现不同程度损伤,并随时间推移呈进行性加重趋势,表现为软骨着色不均匀、软骨细胞减少、细胞排列紊乱,潮线复制、漂移和中断等现象,与经典 OA 的病理改变一致^[8-9],也与感觉障碍可引起关节软骨炎性反应的观点一致^[10-11]。脊神经后根切断可以造成关节应力平衡失调,进而引起关节软骨损伤。各种原因引起的感觉障碍、特别是本体感觉功能障碍,可能是 OA 的始发或伴发因素。

3.2 感觉部分障碍动物模型的设计及特点

经典 OA 动物模型大多通过效应器损伤引起关节不稳,进而引起关节高应力或低应力变化,导致关节软骨损伤。但是,通过损伤效应器诱发骨关节炎的造模方法不可避免地会引起关节的出血、直接损伤以及炎症,影响骨关节炎早期软骨、滑膜的生化代谢,干扰骨关节炎的病理变化^[12]。大鼠 L3、L4 脊神经后根参与了股神经(L2 ~ L5)与坐骨神经(L3、L6)^[13-14]的形成。基于反射弧及本体感觉在骨骼肌运动中的调节作用,我们设计了 L3、L4 脊神

经后根切断大鼠动物模型,并观察发现关节软骨损伤退变特点及规律。将 L3、L4 脊神经后根切断,可使大鼠手术侧后肢局部传入神经阻断,改变了膝关节周围骨骼肌肌张力及协同运动,造成关节不稳与关节应力平衡失调,进而引起关节软骨损伤。其核心在于本体感觉功能的缺失。而一般痛温觉障碍引起的关节软骨损伤称为夏科氏关节病,是由脊髓空洞症、脊髓脊膜膨出、脊柱脊髓损伤、糖尿病等疾病造成的神经系统病变而引起的无痛性关节病。主要表现为受累关节无痛性的肿胀,活动时伴有骨摩擦音,患肢痛温觉障碍,但触觉和深感觉正常^[15-16]。由于夏科氏关节病患者早期症状不明显,故很少在发病早期得到治疗,多以关节炎就诊于骨科、风湿科^[17]。不具有 OA 患者早期间断性隐痛及关节僵硬的体征及特点。无痛觉保护是夏科氏关节病的主要特征。

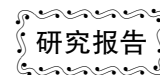
本实验动物模型与夏科氏关节病的最大差别在于,前者是关节周围部分感觉的缺失、特别是本体感觉功能缺失;后者是某一局部的痛觉整体缺失。L3、L4 脊神经后根切断后,其前根所支配的大腿肌肌张力及协调运动发生障碍,但关节周围的其余部分感觉仍然可以通过邻近脊神经后根传入,通过脊髓固有束间接完成脊髓反射,通过功能锻炼可以起到一定的代偿作用。虽然这两种感觉障碍均引起关节软骨的退变,但应该是两种不同的病理机制及变化。本体感觉缺失可能是 OA 与夏科氏关节病的重要差别之一。

本实验是在 OA 患者存在本体感觉误差及前期预实验的基础上为进一步验证本体感觉障碍影响关节软骨代谢而设计进行的。由于在脊髓后根中存在多种感觉神经纤维,分离区分脊神经后根纤维成分并选择切断本体感觉纤维存在较高技术困难,也无法避免浅感觉神经纤维的损伤,所以尚不能确定本体感觉在软骨损伤中所承担的比重。通过延长实验时间、运动康复及本体感觉训练,结合损伤侧肌电图及关节软骨变化特点及规律,将有助于对本体感觉在软骨损伤中的作用、关节软骨损伤的病因及机制作出合理的阐述,也会为临床 OA 的预防治疗提供参考和指导。

参考文献:

- [1] Zhang Y, Jordan JM. Epidemiology of osteoarthritis[J]. Clin Geriatr Med, 2010, 26(3):355-369.
- [2] Du H, Chen SL, Bao CD, *et al.* Prevalence and risk factors of knee osteoarthritis in Huang-Pu District, Shanghai, China[J]. Rheumatol Int, 2005, 25(8):585-590.
- [3] 李儒军,林剑浩. 骨关节炎流行病学研究进展[J]. 中国临床医生, 2010, 38(7):6-10.
- [4] Bennell KL, Hinman RS, Metcalf BR, *et al.* Relationship of knee joint proprioception to pain and disability in individuals with knee osteoarthritis[J]. J Orthop Res, 2003, 21(5):792-797.
- [5] 白海军. 平衡垫训练对女性膝骨关节炎患者膝关节本体感觉影响的研究[J]. 成都体育学院学报, 2012, 38(5):91-94.
- [6] 李宁华. 中老年人群骨关节炎的流行病学特征[J]. 中国临床康复, 2005, 9(38):133-135.
- [7] Aigner T, Söder S, Gebhard PM, *et al.* Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis—structure, chaos and senescence[J]. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007, 3(7):391-399.
- [8] 王昱. 人原发性膝骨关节炎关节不同部位软骨形态学及组织学的比较研究[D]. 大连医科大学, 2012.
- [9] 陈喜德,魏波,谭宏昌. 骨关节炎关节软骨的代谢及调节的研究现状[J]. 广东医学院学报, 2010, 28(6):691-693.
- [10] Kobayashi M1, Squires GR, Mousa A, *et al.* Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage[J]. Arthritis Rheum, 2005, 52(1):128-135.
- [11] 焦士浩,孙康,韩昆,等. 感觉障碍对膝关节软骨退变的影响[J]. 青岛大学医学院学报, 2014, 50(1):29-30.
- [12] 欧云生,安洪. 鼠骨关节炎动物模型建立的现状[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(1):41-44.
- [13] 曹学成. 大鼠坐骨神经的解剖学研究[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(4):213-214.
- [14] 钟贵彬,李伟,刘祖德,等. SD 大鼠腰神经根的解剖学观察[J]. 中国临床解剖学杂志, 2011, 29(6):695-697.
- [15] Zwipp H, Rammelt S, Dahlen C, *et al.* The Charcot joint[J]. Orthopade, 1999, 28(6):550-558.
- [16] 母春华,母光锐. 脊髓空洞症伴夏科氏关节病 3 例[J]. 现代中西医结合杂志, 2000, 9(8):751-752.
- [17] 罗永春,沈春森,秦家振,等. 脊髓空洞—Chiari 复合征致上肢夏科氏关节病诊治体会[J]. 中华神经医学杂志, 2009, 8(7):747-748.

[修回日期]2015-06-12



恒河猴 *BST-2* 基因编码区单核苷酸多态性 及其对蛋白结构和功能的影响

董志会, 王 卫, 丛 喆, 熊圣文, 骆 杨, 陈 霆, 魏 强

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

【摘要】 目的 筛查恒河猴 *BST-2* 基因编码区单核苷酸多态性(coding-region single nucleotide polymorphism, cSNP), 研究其对蛋白结构和功能的影响。**方法** 提取恒河猴外周血 RNA, RT-PCR 扩增, 单克隆测序比对, 确定猴 *BST-2* 的 cSNP 位点; 通过蛋白质结构分析软件对蛋白结构进行分析; 比较不同基因型猴体内 SHIV_{SF162 p3} 复制水平的差异。**结果** 序列比对发现 8 个非同义突变位点; 经 Psipred 软件预测, 其中 G41A、T128C、C129 和 A333C cSNP 位点可影响 *BST-2* 蛋白二级结构。在 SHIV_{SF162 p3} 感染平台期, 参考基因型猴(DLQ)病毒复制水平要高于 GLQ 型猴 ($P < 0.05$), 其他基因型猴之间无显著差异。**结论** cSNP (G41A) 可能影响 *BST-2* 的抗病毒功能, 这为后续研究提供参考信息。

【关键词】 *BST-2*; cSNP; 蛋白质结构; 恒河猴

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0020-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 007. 005

Polymorphisms of coding region in *BST-2* gene of Rhesus macaques and their effects on protein structure and function

DONG Zhi-hui, WANG Wei, CONG Zhe, XIONG Sheng-wen, LUO Yang, CHENG Ting, WEI Qiang

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

【Abstract】 Objective To explore the impacts of cSNP on the structure and function of rhesus macaque's *BST-2*. **Methods** Extracting RNA from peripheral blood of rhesus macaques, then RT-PCR, Monoclonal sequencing to find the cSNP sites; Forecasting the structure of these proteins; Comparing the Level of SIVmac239 replication between the different genotypic Rhesus macaques. **Results** We found 8 non-synonymous mutation sites, in the 8 non-synonymous mutation sites, Only G41A, T128C, C129 and A333C change the secondary protein structure of *BST-2* by forecasting of Psipred software; At the plateau of SHIVSF162p3 replication, The SHIVSF162p3 replication level of reference genotype rhesus macaque (DLQ) is higher than rhesus macaques of GLQ genotype, other genotypes rhesus macaques have no significant difference. **Conclusion** cSNP (G41A) may influence the antiviral activity of rhesus macaque's *BST-2*, this study gives us a reference to further research work.

【Key words】 *BST-2*; cSNP; Structure; Rhesus macaque

[基金项目] “十二五”传染病重大专项课题(2012ZX10004-501-001; 2013ZX10004-608-003)

[作者简介] 董志会(1988-), 男, 硕士生, 专业: 比较医学。

[通讯作者] 魏强(1964-), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向: 实验动物病毒学。E-mail: weiqiang0430@sohu.com。

骨髓基质细胞抗原-2 (bone marrow stromal cell antigen 2, BST-2), 也称 tetherin, CD317 或 MH1.24, 是近年来新发现的包膜病毒限制因子之一^[1-2]。BST-2 是一种具有特殊拓扑结构的脂筏相关跨膜蛋白, 其通过连接病毒和宿主细胞膜, 将新出芽病毒束缚在细胞膜表面, 从而限制病毒的释放^[1]。有研究表明, 其他天然抗病毒蛋白在与病毒协同进化的过程中, 会出现某些位点核苷酸的突变, 从而影响它们的抗病毒能力^[1,3-4]; 有文献报道, 人 BST-2 基因部分氨基酸残基位点的改变可能影响 HIV-1_{vpu} 对 BST-2 的敏感性^[5]。但有关恒河猴 BST-2 基因多态性, 及对蛋白结构和功能的影响尚未见报道。本研究旨在通过基因测序、序列比对、蛋白质结构预测等技术找到恒河猴 BST-2 基因中影响抗 SIV 功能的 cSNP 位点, 以及比较不同基因型猴艾滋病病毒复制的峰值与控制值, 从而为后面探究猴 BST-2 抗病毒作用提供一定理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物与样品采集

中国恒河猴 55 只, 购自北京协尔鑫生物资源研究所【SCXK(京)2005-2005】; 分别采集动物外周血 1 mL, EDTA 抗凝, 样品采集后 4 h 内提取 RNA。

1.2 实验动物病毒感染与指标测定

在实验 55 只猴中选取 20 只恒河猴采取静脉注射感染, 感染病毒为 SHIV_{SF162p3}, 毒力为 300TCID₅₀, 在攻毒后 3 d, 7 d, 10 d, 后每隔 7 d 采集动物外周血 1 mL, EDTA 抗凝; 样品采集后 4 h 内, 分血浆, 实时荧光定量 PCR 测血浆病毒载量, 流式细胞术和血常规对全血进行分析。

1.3 外周血 RNA 的提取及反转录

实验猴 EDTA 抗凝全血使用 RNA BLOOD MINI KIT(购自 QIAGEN 公司)进行总 RNA 的提取, 提取过程参照试剂盒说明书; 提取 RNA 后立即对其进行反转录。

1.4 RT-PCR 扩增

BST-2 基因扩增采用两步法, 第一步使用 PrimeScriptTM 1st Strand cDNA Synthesis Kit(TaKaRa, 大连)进行 RT-PCR 合成 cDNA 第一条链, 操作过程参照试剂盒说明书; 第二步用高保真酶 KOD-Plus 试剂盒(TOYOBO, 上海)扩增 BST-2 基因, 操作过程参照试剂盒说明书。BST-2 基因引物来自参考文献^[6], 由 Invitrogen 公司合成。引物序列为: F 5'-ATA ACT CGA GGT GGA ATT CAT GGC ACC TAT

TTT GTA TGA C -3', R 5'-ATA TTG GTA CCT CAC AGC AGC AGA GCG CTC AAG CCC AGC AGC AG -3', 退火温度 63℃。PCR 在 System 9700 PCR 仪上进行(Applied Biosystems 公司)

1.5 单克隆分型检测

使用 QIAquick PCR Purification Kit(购自 QIAGEN 公司)对 PCR 产物进行纯化回收, 纯化回收过程参照试剂盒说明书; 对纯化回收回来的 DNA 片段用 DNA A-Tailing Kit(TaKaRa, 大连)进行加 A 尾, 加 A 尾过程参照试剂盒说明书; 对加完 A 尾的 DNA 片段回收, 与 pMDTM18-T Vector 进行连接, 连接步骤参照 pMDTM18-T Vector Cloning Kit(TaKaRa, 大连)说明书; 对连接好后的质粒进行转化, 感受态细胞为 E. coli JM109 Competent Cells(TaKaRa, 大连), 转化过程参考试剂盒说明书; 转化好后的感受态细胞放于 1 mL 无抗生素的 SOS 培养基中, 在摇床上 37℃, 180 r/min 培养 1 h, 然后从 1 mL 的菌液中抽取 300 μL 平铺在带有氨苄抗性的平板上, 37℃ 恒温培养 16 h; 待平板长出菌落, 挑取菌落, 进行菌落 PCR, 每个样品选取 6 个阳性菌, 送诺塞(北京)公司测序。

1.6 序列比对和生物软件分析

DNA 测序由北京诺赛基因公司完成。利用 BioEdit 软件进行核苷酸和氨基酸序列比对, 恒河猴 [Macaca mulatta] BST-2 参考 cDNA 序列为: Transcript_id = "NM_001161666.1"; 恒河猴 [Macaca mulatta] BST-2 氨基酸参考序列为: Protein_id = "NP_001155138.1"。分别用 Psipred 软件, SWISS-MODEL 软件进行蛋白质二级和三级结构的预测。

2 结果

2.1 中国恒河猴 BST-2 基因编码区 cSNP 位点的分布

提取 20 只恒河猴全血 RNA, 逆转录 PCR 后进行测序比对(参照序列为 NCBI 上公布的 BST-2 cDNA 序列, NM_001161666), 一共找到 9 个突变位点, 分别位于基因的胞质区、跨膜区和胞外区(表 1); 通过使用 BioEdit 软件进行翻译和氨基酸序列比对, 发现其中 8 个突变位点为非同义突变, 在 BST-2 蛋白一级结构上的位置分别是: 9 (C/G), 12 (P/S), 14 (D/G), 29 (L/V), 43 (L/P), 111 (Q/H), 159 (P/S)(图 1)。其中 G9R, P12S, D14G 分布在 BST-2 的胞质区; I29V, L43P 分布在 BST-2 的跨膜区上; Q111H, P159S 分布在 BST-2 的胞外区上。

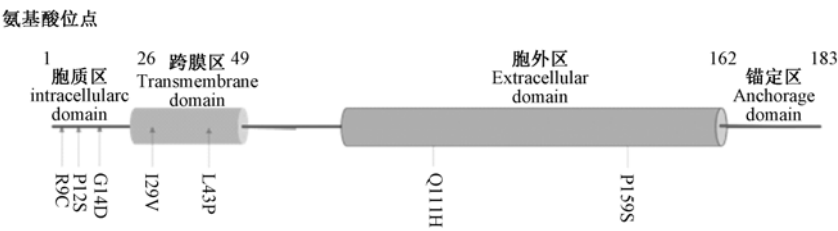


图 1 恒河猴 BST-2 的蛋白质结构及 SNP 分布情况

Fig. 1 Protein structure and SNP distribution in BST-2 of rhesus macaques

表 1 恒河猴 BST-2 基因突变位点
Tab. 1 Nucleotide mutants of rhesus macaques

结构域 Structural domain	突变位点 (bp) Mutation site	核苷酸突变 dNt point mutation	氨基酸位置 (aa) Amino acid mutation site	氨基酸突变 Amino acid mutation
胞外区 Intracellular domain	25	C-T	9	R-C
	34	C-T	12	P-S
	41	G-A	14	G-D
跨膜区 Transmembrane domain	85	A-G	29	I-V
	128	T-C	43	L-P
	129	C-G		
胞外区 Extracellular domain	333	A-C	111	Q-H
	411	G-T	137	/
	475	C-T	159	P-S

2.2 非同义 cSNP 对 BST-2 蛋白二级结构的影响

Psipred 软件分析结果显示,3 个非同义 cSNP 位点突变影响了 BST-2 蛋白的二级结构,具体分析,在 13~15 氨基酸残基位置由一个无规则卷曲变成 α 螺旋,40~42 氨基酸残基由 α 螺旋转变为无规则卷曲,111 氨基酸残基从原来的 α 螺旋转变成无规则卷曲,其它结构均未发生变化(图 2)。

2.3 基因分型及 cSNP 位点的频率测定

通过单克隆测序,用 BioEdit 软件比对发现 55 只中国恒河猴中 G41A 基因频率占 2.17%;T128C 的基因频率为 22.5%;C129G 的基因频率为 50%;A333C 的基因频率为 5%。对基因分型结果进行分析,共找到了 6 种主要基因型(自然存在的)(表 2)。

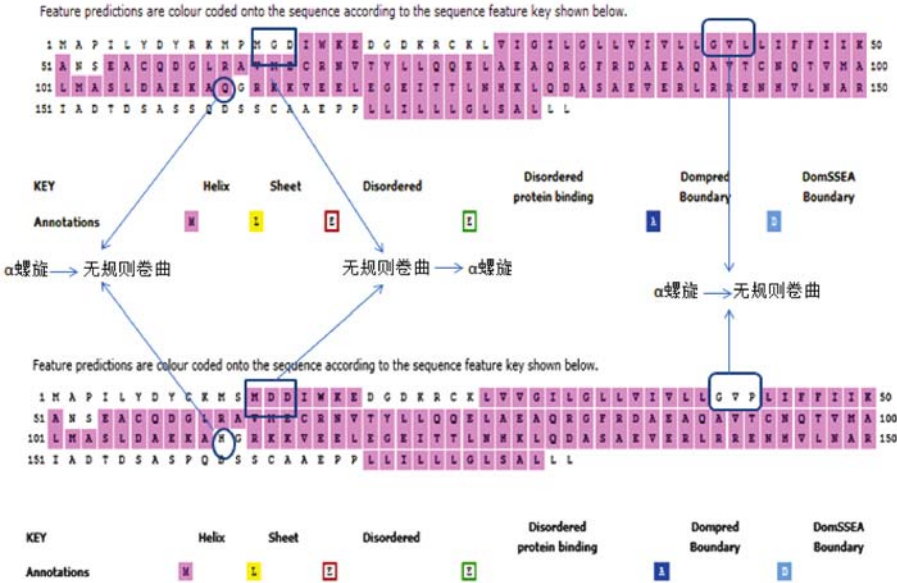


图 2 BST-2 基因 cSNP 引起的蛋白二级结构变化

Fig. 2 The change of secondary structure caused by cSNP of BST-2

表 2 恒河猴 *BST-2* 基因型及比率
Tab. 2 Genotypes of rhesus macaques' *BST-2*

名称 Name	基因型 Gene type (...41...128/129...333...)	比率 Rate(%)
RM1	...G...TC...A...	35%
RM2	...G...CG...A...	2.5%
RM3	...A...CC...A...	12.5%
RM4	...A...CG...A...	5%
RM5	...A...TG...A...	42.5%
RM6	...A...CC...C...	2.5%

2.4 不同基因型对猴艾滋病疾病进程的影响

经过对不同基因型猴 *BST-2* 蛋白的二级结构预测,我们对这 20 只猴进行了基因型的分类,共分成了 5 群,分别是 GLP(4 只),DLQ(5 只),DLQ/DPQ(4 只),DLQ/GLQ(5 只),DPH/DPQ(2 只)。G/D 是第 14 位氨基酸残基类型,L/P 是第 43 位氨基酸残基类型,Q/H 第 111 位氨基酸残基类型。在这里,我们对不同基因型猴感染 SHIV_{SF162p3} 之后病毒复制峰值和病毒复制控制值做了统计分析,统计方法采用单因素方差分析,通过 Student-Newman-Keuls 检测,进行两两比较,以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。从图中我们可以看出,除了在病毒复制控制值上,DLQ 型基因猴组高于 GLQ 型猴组有统计学差异外($P < 0.05$),其他基因型猴组在病毒复制峰值和病毒控制值上两两之间均无统计学差异。具体来说,GLQ 型与 DLQ 相比,DLQ 型组峰值要高于 GLQ;比较 DLQ 型和 DLQ/DPQ 型,DLQ 组峰值和控制值要高于 DLQ/DPQ 组;比较 DLQ/DPQ 型和 DPH/DPQ 型,DLQ/DPQ 型组与 DPH/DPQ 型组峰值差异不明显,DLQ/DPQ 组控制值要略高于 DLQ/DPQ 组(图 3)。

3 讨论

BST-2 主要在未分化的 B 细胞,骨髓基质细胞,

树突状细胞等多种细胞中表达是一种典型的 II 型跨膜蛋白^[7]。*BST-2* 氨基端位于胞质内,随后是一个 α 螺旋结构的跨膜蛋白域,胞外区也呈 α 螺旋结构,其羧基端有一个糖基磷脂酰肌醇锚定点^[5]。*BST-2* 不仅可以抑制免疫缺陷病毒的释放,还可以抑制多重包膜病毒的释放^[7-8],由此,我们可以看出 *BST-2* 具有广泛的抗包膜病毒释放作用,因此,*BST-2* 抗病毒的作用不可能是与病毒特异性的结合,2009 年,Perez-Caballero 年发现与 *BST-2* 具有相似拓扑结构的二聚体分子同样具有束缚 HIV-1 的作用,表明是 *BST-2* 的拓扑结构而不是其一级结构氨基酸的序列起抗病毒作用^[9]。现在,人们普遍认为,*BST-2* 作为一个桥梁连接宿主细胞和病毒,从而把病毒粘连在宿主细胞表面,进而把一部分病毒内吞降解。研究发现,不同病毒对 *BST-2* 的抗病毒作用有拮抗作用,如 HIV-1vpu 可以与人 *BST-2* 的跨膜区结合,从而诱导 *BST-2* 膜定位的转移及降解^[1];SIV nef 蛋白可以与猴 *BST-2* 的胞质区氨基酸残基结合,诱导降解 *BST-2*^[10]。比较人与恒河猴的 *BST-2* 蛋白一级结构,发现人 *BST-2* 胞质区比猴的 *BST-2* 蛋白胞质区少了 5 个氨基酸残基,而这 5 个氨基酸残基正是 SIVnef 与猴 *BST-2* 相互作用的关键部位^[11]。Marina Laplana 2013 年发现,不同的人 *BST-2* 基因型对艾滋病疾病进程具有一定的影响^[12]。

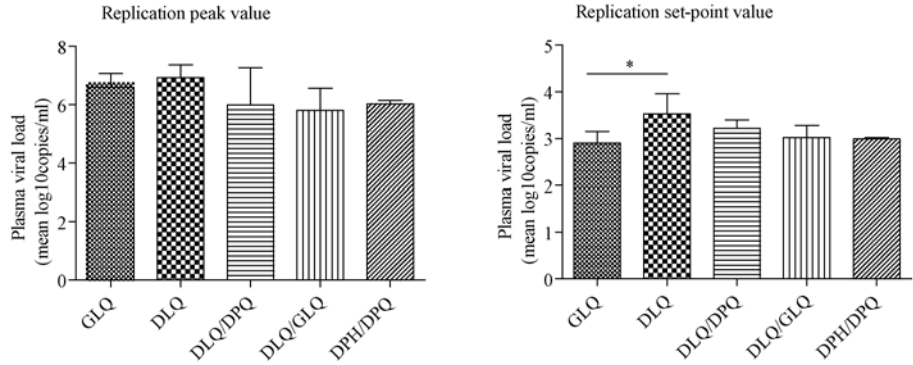


图 3 不同 *BST-2* 基因型的病毒复制峰值和控制值

Fig. 3 The replication peak value and set-point value of different *BST-2* genotype

因此,有可能不同猴 *BST-2* 基因型对猴艾滋病疾病进展有影响。

由 cSNP 碱基序列的不同而产生的非同义突变会造成蛋白质一级结构的变化,从而影响蛋白的高级结构。这种改变常常造成蛋白质一些功能的变化。本研究主要找出猴 *BST-2* 非同义 cSNP 碱基序列的改变,通过蛋白二级结构预测和结合猴艾滋病疾病进程来分析这些 cSNP 对猴 *BST-2* 功能的影响。

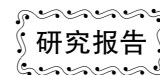
在这里,我们发现了八个非同义 cSNP 位点,用 Psipred 软件分析显示,只有三个 cSNP 位点的改变对猴 *BST-2* 的二级结构产生了影响,尤其是第 14 为 G/D 的变化使得猴 *BST-2* 胞质区的一小段 α 螺旋得以延伸,而第 14,15,16,17,18,19 位这几个氨基酸残基正是 SIV nef 的结合关键位点,而其他两个 cSNP 位点的改变虽对 *BST-2* 的二级结构产生了一些变化,但是用 SWISS-MODEL 软件分析发现,这两个 cSNP 对猴 *BST-2* 的三级结构几乎没有影响,而且在 *BST-2* 是以其独特的拓扑结构来发挥其抗病毒作用,因此这两个 cSNP 对 *BST-2* 的功能可能不会有太大影响。在不同基因型猴艾滋病疾病进程的比较中,DLQ 型峰值和控制值要高于 GLQ 型,DLQ 型峰值和控制值要高于 DLQ/DPQ 型,DLQ/DPQ 型与 DPH/DPQ 型峰值差异不明显,DLQ/DPQ 型控制值要略高于 DLQ/DPQ 型,这些说明了猴 *BST-2* 蛋白在第 14 位,第 43 位氨基酸残基分别是 G 和 P 时,有可能可以增强其抗病毒作用,而 111 位氨基酸残基的变化可能对猴 *BST-2* 抗病毒作用并无影响。在这里我们需要提出的是,艾滋病是一个极其复杂的病毒感染性疾病,有很多因素影响着其疾病进程,因此,我们还需要进一步实验验证这些位点与猴 *BST-2* 蛋白抗病毒作用有关。

本实验为进一步研究猴 *BST-2* 蛋白功能提供一定参考依据,为病毒拮抗该蛋白的机制研究提供参考。下一步,我们将在细胞实验上去验证这 3 个 cSNP 位点对猴 *BST-2* 抗病毒作用的影响。

参考文献:

- [1] STUART J N, ZANG T, BIENIASZ P D. Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu [J]. *Nature*, 2008, 451(7177): 425 - 430.
- [2] VAN DAMME N, GOFF D, KATSURA C, *et al.* The interferon-induced protein BST-2 restricts HIV-1 release and is downregulated from the cell surface by the viral Vpu protein [J]. *Cell Host Microbe*, 2008, 3(4): 245 - 252.
- [3] MCEWAN WA, SCHALLER T, YLINEN LM, *et al.* Truncation of TRIM5 in the feliformia explains the absence of retroviral restriction in cells of the domestic cat [J]. *Virol*, 2009, 83(16): 8270 - 8275.
- [4] ROLLASON R, KOROLCHUK V, HAMILTON C, *et al.* Clathrin-mediated endocytosis of a lipid-raft-associated protein is mediated through a dual tyrosine motif [J]. *Cell Sci*, 2007, 120(Pt 21): 3850 - 3858.
- [5] KUPZIG S, KOROLCHUK V, ROLLASON R, *et al.* Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology [J]. *Traffic*, 2003, 4(10): 694 - 709.
- [6] YOSHIDA T, KAO S, STREBEL K. Identification of residues in the BST-2 TM domain important for antagonism by HIV-1 VPU using a Gain-of-Function approach [J]. *Front Microbiol*, 2011, 2: 35.
- [7] ISHIKAWA J, KAISHO T, TOMIZAWA H, *et al.* Molecular cloning and chromosomal mapping of a bone marrow stromal cell surface gene, BST2, that May be involved in pre-B-cell growth [J]. *Genomics*, 1995, 26(3): 527 - 534.
- [8] JOUVENET N, NEIL SJ, ZHADINA M, *et al.* Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin [J]. *J Virol*, 2009, 83(4): 1837 - 1844.
- [9] PEREZ-CABALLERO D, ZANG T, EBRAHIMI A, *et al.* Tetherin inhibits HIV-1 release by directly tethering virions to cells [J]. *Cell*, 2009, 139(3): 499 - 511.
- [10] ZHANG F, WILSON SJ, LANDFORD WC, *et al.* Nef proteins from simian immunodeficiency viruses are tetherin antagonists [J]. *Cell Host Microbe*, 2009, 6(1): 54 - 67.
- [11] EVANS DT, SERRA-MORENO R, SINGH RK, *et al.* BST-2/tetherin: a new component of the innate immune response to enveloped viruses [J]. *Trends Microbiol*, 2010, 18(9): 388 - 396.
- [12] LAPLANA M, CARUZ A, PINEDA JA, *et al.* Association of BST-2 gene variants with HIV disease progression underscores the role of BST-2 in HIV type 1 infection [J]. *Infect Dis*, 2013, 207(3): 411 - 419.

[修回日期] 2015-06-10



衰老对小鼠肺干细胞修复能力的影响

朱栩栋, 姚 超, 龚松迪, 何立锋, 李晓燕, 张玲玲

(杭州师范大学, 杭州 311121)

【摘要】 目的 研究衰老对小鼠肺组织干细胞在生理状态和支气管上皮细胞 (Clara 细胞) 损伤后修复能力的影响。**方法** 通过流式细胞术对老龄和低龄组小鼠的肺组织干细胞比例进行分析, 研究衰老对肺组织干细胞稳态维持的影响; 通过免疫组化染色对肺组织病理切片进行分析, 确立支气管上皮细胞 (Clara 细胞) 损伤模型; 通过流式细胞术、免疫组化染色、肺组织病理切片研究老龄和低龄组小鼠在支气管上皮细胞 (Clara 细胞) 损伤后肺组织干细胞的损伤修复能力。**结果** 老龄组肺组织干细胞比例 (肺上皮干细胞/前体细胞, 肺间质干细胞/前体细胞) 在稳态维持的情况下较老龄组改变不显著; 在肺支气管上皮细胞 (Clara 细胞) 损伤后, 老龄组小鼠支气管上皮出现较严重的细胞受损; 在接下来的观察中发现, 小鼠肺组织前体细胞/肺组织总细胞比例在老龄组显著下降, 且增殖细胞在肺组织前体细胞和肺组织干细胞中的比例出现显著下降; 同时, 小鼠支气管上皮恢复程度在老龄组明显较差。**结论** 在稳态维持的状态下, 衰老对肺组织干细胞的没有影响。在支气管上皮细胞受到损伤后, 肺组织干细胞占肺总细胞比例降低, 修复与再生能力显著下降。可能为临床上衰老更易产生肺组织损伤及病变更严重的原因。

【关键词】 肺损伤修复; 衰老; 流式细胞术; 肺干细胞

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0025-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 007. 006

Effect of aging on repair capability of lung stem cells

ZHU Xu-dong, YAO Chao, GONG Song-di, HE Li-feng, LI Xiao-yan, ZHANG Ling-ling
(Hang Zhou Normal University, Hangzhou 311121, China)

【Abstract】 Objective To study the impact of aging on the capability of lung stem cell steady-state maintaining and bronchial epithelial cells regeneration and differentiation during the repair of lung epithelial cells after naphthalene induced bronchial epithelial injury. **Methods** The proportion of lung stem cells in mice after naphthalene treatment was analyzed by immunohistochemistry and FACS. The repair efficiency of lung epithelial cell in young and old mice was examined by immunohistochemistry staining and FACS. **Results** The data suggested that aging didn't change the proportion of lung stem cells (including the distal lung epithelial stem cells/progenitor cells and lung mesenchymal stem cells/progenitor cells) under normal physiological conditions. After naphthalene injury, more serious injury and decreased repairing capacity was observed in old group. Lung progenitor cells /total lung cells decreased during the repair process of lung bronchial epithelialium (clara cell) injury. The ratio of regenerated cell to lung progenitor and stem cells were also significantly decreased in old group. **Conclusion** The regenerated capability of lung stem cells after lung bronchial epithelialium injury decreased with aging. This might be the reason of more incidence of lung injury and worse therapeutic results in the elder in clinic.

【基金项目】 国家自然科学基金 (81300264); 2012 年度浙江省大学生科技创新活动计划 (新苗人才计划 2012R4210007)。

【作者简介】 朱栩栋 (1987 -), 男, 讲师。

【通讯作者】 张玲玲 (1982 -), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 衰老与成体干细胞。E-mail: zhangll821025@163. com。

【Key words】 Lung damage and repair; Aging; FACS; Lung stem cell

在我国,呼吸系统疾病的致死率仅次于心脑血管和恶性肿瘤,位居我国居民死亡原因的第三位。人口老龄化是影响呼吸系统疾病发生的重要因素。肺干细胞在肺组织损伤修复和稳态维持中发挥重要作用^[1-3]。呼吸系统疾病发生时可能存在着肺干细胞增殖分化和稳态维持的失衡^[1,4]。在衰老过程中,肺组织的形态结构发生改变,通气功能逐渐减弱,但是衰老是否影响了肺干细胞的稳态维持和损伤修复能力尚不清楚。

小鼠的肺组织由多种细胞组成,其中上皮细胞包括基底细胞、纤毛细胞、杯状细胞、刷细胞、小颗粒细胞、Clara 细胞、I 型肺泡上皮细胞、II 型肺泡上皮细胞和神经内分泌细胞等。Clara 细胞被认为是远端支气管上皮的一种主要细胞,主要分布在小鼠的远端细支气管上皮。Clara 细胞占小鼠支气管上皮细胞数目的 89.5%,人类的终末细支气管上皮细胞的(11±3)%,人类呼吸性细支气管上皮细胞的(22±5)%,随着支气管内径的减小,其比例逐渐增多^[5]。

肺脏具有一定程度的再生能力,在肺损伤发生时可通过局部的修复来维持组织的结构和功能。这是由肺干细胞在损伤后进一步分化、增殖,替代受损伤的细胞,维持着肺上皮组织的稳定。参与肺组织的再生和损伤修复的肺干细胞主要存在两种类型:肺上皮干细胞和肺间质干细胞。我们利用蔡特异性损伤 Clara 细胞,建立支气管上皮细胞损伤模型。观察肺组织干细胞对年轻和衰老两种状态下在支气管上皮细胞损伤后的稳态维持能力。由于目前尚无公认的肺干细胞表面标记,对肺组织干细胞的来源亦是众说纷纭^[2]。近几年来,研究人员利用流式细胞分析技术对肺组织干细胞进行分析和分选,极大地方便了对肺衰老和组织损伤修复过程的研究^[6-8]。因此,本研究中利用流式细胞技术观察衰老过程中肺组织干细胞数量和构成的改变,观察肺支气管上皮细胞损伤模型修复过程中肺干细胞的改变,了解衰老对肺组织干细胞在肺支气管上皮细胞损伤修复中的影响。

1 材料和方法

1.1 肺组织单细胞悬液的制备:

根据文献报道,制备肺组织单细胞悬液^[6],每个样品准备 1 mg/mL 胶原酶 I 溶于无菌的 PBS 中,

预热至 37℃。脱颈处死小鼠,打开腹腔,下腔静脉放血。打开胸腔,取肺,放入装有冷的 PBS 的 15 mL 离心管中。在这一步骤中,将肺部的支气管去除,只留下肺的远端细胞。在离心管中轻轻搅动肺叶,去除多余的血液直至肺组织变白,用眼科剪将肺剪碎,剪碎的组织放入 15 mL 离心管内,加入预热的 3 mL 胶原酶溶液。将离心管放在 thermo 的混匀器上 750 r/min,37 度震荡 0.5 h。5 mL 注射器吹打悬液,使大块结缔组织分离,在混匀器上 750 r/min,37 度继续震荡 0.5 h,1 mL 注射器吹打悬液,使细胞分离,0.22 μm 滤膜过滤,制备单细胞悬液,1400 r/min 离心 5 min,加入 1 mL 红细胞裂解液,去除红细胞。

1.2 肺干细胞流式分析

根据文献报道的研究方法^[6,9],以 CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺作为肺干细胞的表面标记,CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺EpCAM⁻作为肺间质干细胞标记;CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺CD34⁺EpCAM⁺作为肺上皮干细胞标记。将 CD31-Biotin, CD45-Biotin, SA-PE/FITC, Sca-1-PE-Cy7 抗体用稀释液 10 倍稀释;肺组织细胞悬液离心后去上清,保留终体积约 50 μL。加入 CD31-Biotin(1-10)10 μL,CD45-Biotin(1-10)10 μL,冰上孵育 30 min;加入抗体稀释液 2 mL,1500 r/min 离心 5 min;去上清,终体积 50 μL。加入 SA-PE(1-10)15 μL, Sca-1-PE-Cy7(1-10), APC-Epicam(1-10)稀释液 10 μL, CD34-FITC 3 μL 冰上孵育 45 min;加入稀释液 2 mL,用 50 μm 滤膜过滤,1500 r/min 离心,5 min;去上清,加入抗体稀释液 300 μL 混匀;利用流式细胞仪分析肺上皮干细胞的比率。

1.3 蔡致肺 Clara 细胞损伤模型的制备

我们将 C57 BL/6J 野生型小鼠根据年龄分为两组,老龄组(>72 周龄)和低龄组(8~16 周龄),每组 8 只。对年轻和年老组小鼠给予 275 mg/kg 蔡(用玉米油溶解)腹腔注射,同年龄对照组小鼠给予等体积的玉米油腹腔注射。3~7 d 后取小鼠肺组织实验。SPF 级 C57 BL/6J 小鼠,来源于杭州师范大学实验动物中心【SCXK(浙)2011-0048】。蔡致肺 Clara 细胞损伤模型构建在杭州师范大学医学实验中心进行【SYXK(浙)2011-0157】。

1.4 苏木素-伊红染色

将小鼠脱颈处死,分离肺组织取右下肺叶,固定于 4% 多聚甲醛溶液中,24 h 后石蜡包埋。进行

连续石蜡切片,厚度 5 μm 。切片固定到载玻片上。切片脱水后,进行苏木素伊红染色。

1.5 免疫荧光染色:

将小鼠脱颈处死,分离肺组织取右下肺叶,固定于 4% 多聚甲醛溶液中,24 h 后石蜡包埋。进行连续石蜡切片,厚度 5 μm 。切片固定到载玻片上。对石蜡切片进行胞内抗原 CCSP 染色,观察肺损伤修复过程中 Clara 细胞的形态结构^[10]。

1.6 统计学分析

数据用均数 $\pm$ 标准误表示,组间比较采用 student *t* 检验。

2 结果

2.1 衰老对小鼠肺组织干细胞比例的影响

为研究衰老状态是否会影响小鼠远端肺干细胞占肺总细胞的比例,我们对远端肺干细胞在老龄组和低龄组的比例进行了分析(图 1A-B)。分离肺组织,采用 CD31⁻CD45⁻Sca-1⁻EpCAM⁺ 标记肺上皮干细胞,流式细胞仪分析比例。结果表明肺上皮干细胞(CD31⁻CD45⁻Sca-1⁻EpCAM⁺)(老龄组 37.02% $\pm$ 6.58%,低龄组 36.12% $\pm$ 0.61%)和肺间质干细胞(CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺EpCAM⁻)(老龄组 10.46% $\pm$ 4.36%,低龄组 9.85% $\pm$ 2.31%) 在肺总细胞中所占比例在老龄组和低龄组之间无显著差异。另据文献报道,EpCAM^{hi} 标记细胞属于上皮

干细胞,将其进行体外培养,可生成上皮细胞样克隆球^[11]。根据该文献,我们将 EpCAM⁺(CD31⁻CD45⁻Sca-1⁻EpCAM⁺) 细胞分为 EpCAM^{hi}, EpCAM^{med}, EpCAM^{low} 三群(图 1A)。其中 EpCAM^{hi}(老龄组 4.75% $\pm$ 1.23%,低龄组 4.81% $\pm$ 4.72%),EpCAM^{med}(老龄组 22.5% $\pm$ 4.98%,低龄组 19.78% $\pm$ 0.97%),EpCAM^{low}(老龄组 9.18% $\pm$ 1.13%,低龄组 12.29% $\pm$ 3.26%) 细胞群并未在衰老组中出现显著差异($P > 0.05$)(图 1B)。说明在正常生理稳态下,衰老并不影响在远端肺组织中干细胞的比率。

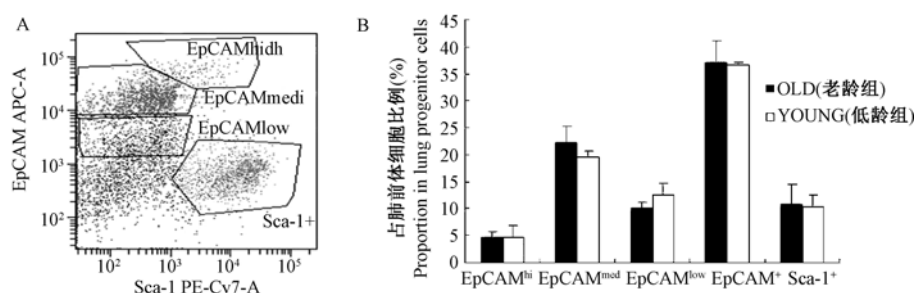
2.2 肺支气管上皮损伤小鼠模型的建立及肺组织干细胞修复能力的观察

2.2.1 肺支气管上皮损伤小鼠模型的建立

利用 Clara 细胞的蔡易损伤的特性,建立小鼠的支气管上皮细胞特异性损伤模型。对小鼠进行蔡的腹腔注射,在支气管气道上皮中可选择性地去除表达 CCSP 的 Clara 细胞。蔡处理 3 d 后的肺组织进行 HE 染色,观察标本,可见 Clara 细胞在细支气管上皮形成空泡,部分部位出现脱落。上皮结构受到破坏,不完整,有断裂出现(彩插 3 图 2)。

2.2.2 肺支气管上皮损伤小鼠模型的修复能力

蔡损伤 7 d 后,观察肺支气管上皮是否进行了修复,可见 Clara 细胞的蔡特异性损伤依然存在,同时出现部分修复(彩插 3 图 3)。



注:(A)流式示意图。(B)老龄组和低龄组肺组织干细胞比例比较。EpCAM^{hi}: CD31⁻CD45⁻Sca-1⁻EpCAM^{hi}细胞/肺总细胞; EpCAM^{med}: CD31⁻CD45⁻Sca-1⁻EpCAM^{med}细胞/肺总细胞; EpCAM^{low}: CD31⁻CD45⁻Sca-1⁻EpCAM^{low}细胞/肺总细胞; EpCAM⁺(肺上皮干细胞): CD31⁻CD45⁻Sca-1⁻EpCAM⁺细胞/肺总细胞; Sca-1⁺(肺间质干细胞): CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺EpCAM⁻细胞/肺总细胞。OLD: 老龄组(n=8), YOUNG: 低龄组(n=8)。

图1 年轻、年老小鼠远端肺组织干细胞的比例比较

Note: (A) The FSC schematic diagram. (B) Comparison of the proportion of lung stem cells between young and old group. EpCAM^{hi} means the proportion of CD31⁻CD45⁻Sca-1⁻EpCAM^{hi} cells to total lung cells; EpCAM^{med} means the proportion of CD31⁻CD45⁻Sca-1⁻EpCAM^{med} cells to total lung cells; EpCAM^{low} means the proportion of CD31⁻CD45⁻Sca-1⁻EpCAM^{low} cells to total lung cells; EpCAM⁺ (lung epithelial stem cells/total lung cells): CD31⁻CD45⁻Sca-1⁻EpCAM⁺ cells to total lung cells; Sca-1⁺ (lung mesenchymal stem cells/total lung cells): CD31⁻CD45⁻Sca-1⁺EpCAM⁻ cells to total lung cells. OLD: old group (n=8), YOUNG: young group (n=8).

Fig. 1 The number of lung stem cells in total distal lung cell in young and old group mice

2.3 衰老对支气管上皮损伤修复的影响 (图见彩插 4)

2.3.1 年轻和年老蔡损伤模型的肺组织病理改变

将 C57BL/6J 小鼠分为老龄组 (>72 周龄) 和低龄组 (8~16 周龄), 每组各 8 只。进行蔡的腹腔注射 (200 mg/kg)。将肺组织的石蜡切片进行 HE 染色 (图 4A-D)。细支气管上皮细胞在老龄对照组 (未经蔡处理组) (图 4B) 较老龄组 (图 4A) 变薄, 在上皮细胞中未观察到脱落及死亡。在蔡损伤组中, (图 4C-D) 我们发现细支气管上皮细胞出现部分脱落及破坏, 间隙变大; 老龄组 (图 4D) 肺上皮细胞大部分出现脱落, 破坏严重; 低龄组 (图 4C) 则表现较轻, 具体为细胞间隙增大, 少量脱落。对肺组织进行免疫荧光染色, CCSP 特异性标记细支气管上皮 (Clara 细胞) 细胞 (图 4E-H)。染色显示蔡可特异性损伤支气管上皮 Clara 细胞。老龄组损伤更明显 (图 4H), 3 d 后即可看到大部分 Clara 脱落, 死亡。甚至细支气管上皮层出现结构破坏; 与此同时, 低龄组 Clara 细胞仍可见。 (图 4G)。

2.3.2 年轻和年老小鼠肺支气管上皮损伤修复过程中肺干细胞的分析

肺支气管上皮损伤模型建立后, 我们对远端肺干细胞在老龄和低龄组中的比例进行了分析。具体如下, 老龄组 (>72 周龄) 和低龄组 (8~16 周龄) 的 C57 BL/6J 野生型小鼠各 8 只, 蔡处理特异性损伤肺支气管上皮细胞。用 $CD31^{-}CD45^{-}Sca-1^{+}CD34^{+}$ 对在处理 7 d 的小鼠肺组织进行上皮干细胞表面标记, 同时用 BrdU 标记增殖细胞, 并在流式细胞仪上进行分析 (图 5)。结果显示蔡处理后老龄组

较低龄组小鼠肺前体细胞 ($CD31^{-}CD45^{-}$)/肺总细胞比值 (老龄组 $12.24\% \pm 2.53\%$, 低龄组 $18.74\% \pm 2.05\%$) 及肺组织干细胞 ($CD31^{-}CD45^{-}Sca-1^{+}CD34^{+}$)/肺总细胞比值 (老龄组 $0.89\% \pm 0.13\%$, 低龄组 $1.38\% \pm 0.15\%$) 均出现显著降低。无论是肺前体细胞 ($CD31^{-}CD45^{-}$) (老龄组 $8.21\% \pm 1.46\%$, 低龄组 $12.57\% \pm 1.59\%$) 还是肺组织干细胞 ($CD31^{-}CD45^{-}Sca-1^{+}CD34^{+}$) (老龄组 $6.85\% \pm 0.46\%$, 低龄组 $8.57\% \pm 0.89\%$) 中增殖细胞所占比例低龄组明显高于老龄组 ($P < 0.05$)。该数据提示损伤后, 低龄组的干细胞增殖能力在修复过程中较老龄组高。

3 讨论

肺组织衰老的发生过程和衰老过程中肺脏相关的各种疾病的致病机制仍有待深入研究。成体干细胞在组织再生中具有重要作用, 越来越多的研究表明衰老与干细胞功能的下降密不可分^[12-15]。随着干细胞生物学方法的建立, 关于其研究也在不断深入。在肺脏相关疾病及损伤修复过程中肺组织干细胞所扮演的角色也越来越受到人们的重视。肺干细胞的体外培养为相关疾病的发生发展体外研究提供了模型, 并为干细胞在肺相关疾病的治疗提供了理论基础^[3]。但肺干细胞由于标记物不明确而延缓了其相关的研究, 研究报道表明肺间质和上皮干细胞可以使用流式细胞术进行筛选^[6]。根据文献报道我们采用流式细胞术对肺干细胞进行了表面标记。研究在衰老变化中成体肺组织干细胞的自我更新和分化能力, 以期探讨成体干细胞在

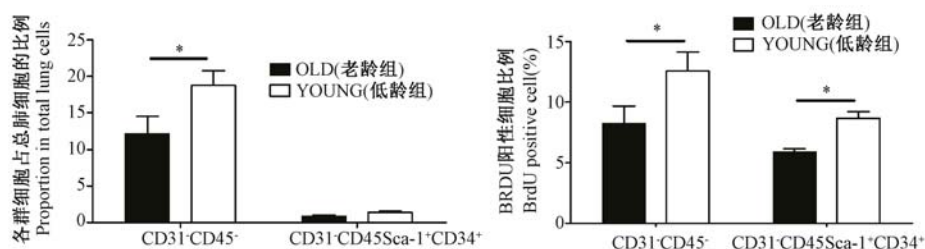


图 5 A. 肺支气管上皮损伤后老龄组和低龄组肺前体细胞 ($CD31^{-}CD45^{-}$) 和肺组织干细胞 ($CD31^{-}CD45^{-}Sca-1^{+}CD34^{+}$) 占肺组织总细胞比例; B. 肺支气管上皮损伤后老龄组和低龄组肺前体细胞 ($CD31^{-}CD45^{-}$) 中增殖细胞和肺组织干细胞 ($CD31^{-}CD45^{-}Sca-1^{+}CD34^{+}$) 中增殖细胞所占比例。OLD 为老龄组 ($n=8$), YOUNG 为低龄组 ($n=8$); * 为 $P < 0.05$

Fig. 5 A. The proportion of progenitor cells ($CD31^{-}CD45^{-}$); lung stem cells ($CD31^{-}CD45^{-}Sca-1^{+}CD34^{+}$) to total lung cell in different ages mice after naphthalene treatment. B. The proportion of BrdU positive cell in $CD31^{-}CD45^{-}Sca-1^{+}CD34^{+}$ and $CD31^{-}CD45^{-}Sca-1^{+}CD34^{+}$ cell. OLD: the old group ($n=8$); YOUNG: the young group ($n=8$). *: $P < 0.05$

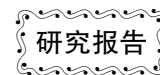
肺组织器官的衰老和衰老相关疾病的发生中的作用。

在生理状态下,肺干细胞拥有有限的增殖能力,为了发掘肺干细胞的增殖潜力,我们建立了肺上皮细胞损伤模型。蔡能够特异性损伤小鼠支气管上皮 Clara 细胞,我们利用该动物模型来研究肺干细胞在肺衰老生理状态及肺上皮细胞损伤过程中再生修复能力。研究显示衰老在生理状态下对肺干细胞(包括远端肺上皮干细胞和肺间质干细胞/肺总细胞)的比例影响不明显。而在小鼠肺支气管上皮(Clara)细胞特异性损伤修复过程中,肺上皮干细胞和肺间质干细胞/肺总细胞的比例出现下降。为了进一步比较损伤修复状态下年轻和年老小鼠肺组织干细胞修复能力的差异,我们通过 BrdU 染色对肺组织干细胞的增殖能力进行了分析,发现老龄组较低龄组的肺干细胞增殖比例下降,表明在衰老显著影响了肺上皮细胞损伤后肺干细胞修复的能力。由此可见,在正常生理状态下衰老对以肺干细胞比例为代表的肺干细胞表型没有影响,而一旦在应激状态下(Clara 细胞受损)肺干细胞不仅出现比例下降的表型且增殖能力也存在明显的减弱趋势。该研究发现揭示了衰老状态下肺组织干细胞尚能保持稳态维持,但在损伤后的对肺组织的修复却无能为力。该发现为肺组织衰老和肺组织干细胞的研究提供了理论依据,并为干细胞在特异性组织器官衰老预防及治疗提供了研究思路。

参考文献:

- [1] Royce SG, Moodley Y, Samuel CS. Novel therapeutic strategies for lung disorders associated with airway remodelling and fibrosis. *Pharmacol Ther* 2013.
- [2] Kotton DN, Morrissey EE. Lung regeneration: mechanisms, applications and emerging stem cell populations. *Nat Med* 2014; 20:822 – 32.
- [3] Desai TJ, Brownfield DG, Krasnow MA. Alveolar progenitor and stem cells in lung development, renewal and cancer. *Nature* 2014;507:190 – 4.
- [4] Lee JH, Bhang DH, Beede A, *et al.* Lung stem cell differentiation in mice directed by endothelial cells via a BMP4-NFATc1-thrombospondin-1 axis. *Cell* 2014;156:440 – 55.
- [5] Boers JE, Ambergen AW, Thunnissen FB. Number and proliferation of clara cells in normal human airway epithelium. *Am J Respir Crit Care Med* 1999;159:1585 – 91.
- [6] Bertoncello I, McQualter J. Isolation and clonal assay of adult lung epithelial stem/progenitor cells. *Curr Protoc Stem Cell Biol* 2011;Chapter 2;Unit 2G 1.
- [7] Ding BS, Nolan DJ, Guo P, *et al.* Endothelial-derived angiocrine signals induce and sustain regenerative lung alveolarization. *Cell* 2011;147:539 – 53.
- [8] Kajstura J, Rota M, Hall SR, *et al.* Evidence for human lung stem cells. *N Engl J Med* 2011;364:1795 – 806.
- [9] Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, *et al.* Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 2005;121:823 – 35.
- [10] Rock JR, Barkauskas CE, Counce MJ, *et al.* Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:E1475 – 83.
- [11] McQualter JL, Yuen K, Williams B, *et al.* Evidence of an epithelial stem/progenitor cell hierarchy in the adult mouse lung. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:1414 – 9.
- [12] Liu J, Finkel T. Stem cell aging: what bleach can teach. *Nat Med* 2006;12:383 – 4.
- [13] Oh J, Lee YD, Wagers AJ. Stem cell aging: mechanisms, regulators and therapeutic opportunities. *Nat Med* 2014;20:870 – 80.
- [14] Beerman I, Bock C, Garrison BS, *et al.* Proliferation-dependent alterations of the DNA methylation landscape underlie hematopoietic stem cell aging. *Cell Stem Cell* 2013; 12: 413 – 25.
- [15] Beerman I, Seita J, Inlay MA, *et al.* Quiescent hematopoietic stem cells accumulate DNA damage during aging that is repaired upon entry into cell cycle. *Cell Stem Cell* 2014;15:37 – 50.

[修回日期] 2015-07-02



Lewis 大鼠急慢性期风湿性心脏炎模型的比较

李文婷, 曾志羽, 桂 春, 郑慧蕾, 李 靖, 韦 恒, 文 宏, 黄伟强

(广西医科大学第一附属医院, 南宁 530021)

【摘要】 目的 比较 3 种急慢性期风湿性心脏炎模型, 找出理想的动物模型。**方法** 抗原 I、II 分别为灭活溶血性链球菌(GAS)与完全弗氏佐剂(CFA)、不完全弗氏佐剂(IFA)混合的乳化剂。Lewis 雌鼠随机分成四组: 实验 A、B、C 组首次后足垫注射 0.2 mL 抗原 I, 随后分别注射抗原 I、II、未灭活 GAS 免疫刺激建立模型, 对照组 D 组分别对应 ABC 组各 6 只, GAS 替换为生理盐水免疫刺激。于第 7、12、24 周末处死每组各 6 只, 行血液生化及心脏 HE 染色检查。**结果** C 组死亡率 25%; A 组心脏炎发生率最高, 12 周 A、C 组急性期损伤心肌、瓣膜弥漫性炎症细胞浸润, 心肌间质风湿细胞聚集, 较 B 组明显; 24 周慢性期损伤 A 组瓣膜纤维化程度及比率较 B、C 组高; D 组心肌、瓣膜均无病理改变。**结论** A 组 CFA 与 GAS1:1 混合乳化剂免疫大鼠 5 次, 之后 GAS 连续刺激, 能为急慢性期风湿性心脏病的实验研究提供较好的可复制的动物模型。

【关键词】 A 族溶血性链球菌; Lewis 大鼠; 风湿性心脏炎; 风湿性心脏病

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0030-04

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 007. 007

A comparative study of different animal model of acute and chronic rheumatic carditis in Lewis rats

LI Wen-ting, ZENG Zhi-yu, GUI Chun, ZHENG Hui-lei, LI Jing, WEI Heng, WEN Hong, HUANG Wei-qiang
(The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China)

【Abstract】 Objective To make comparisons of the three models of acute and chronic rheumatic carditis to find out an optimal animal model. **Methods** Antigen I was a emulsifier mixed by complete freund's adjuvant(CFA) and Group A streptococcus(GAS). Antigen II was mixed by incomplete freund's adjuvant(IFA) and GAS. Female Lewis rats were randomly divided into four groups: A, B, C treatment groups were immunized with antigen I at the foot pad firstly. Subsequently, rats in group A、B、C were injected antigen I, antigen II and activated GAS respectively to make the models of RHD. Rats in control group D were immunized with the same protocol outlined as treatment groups but without GAS. Respectively 7, 12, 24 weeks the rats were sacrificed 24 (each group was 6). The blood biochemical item and Hematoxylin-eosin(HE) staining of hearts were detected. **Results** In group C the mortality was 25%. In group A, the incidence of carditis was the highest. Histopathological manifestations of group A, C was not only revealed acute damage such as inflammatory cell infiltrate as well as group B, but also the Aschofflike cells in the myocardial cells interstitial. But in group A and C there had a great degree of the inflammatory cells infiltration than group B. At 24th week rats in group A detected the rate and degree of valve fibrosis in chronic damage were higher than group B and C. None of rats in group D presented carditis or valvulitis. **Conclusion** In group A, giving the GAS with continuous stimulation after using the mixed

[基金项目] 国家自然科学基金(81260067)。

[作者简介] 李文婷(1988-), 女, 硕士生, 专业: 心血管内科学。Email: lwt2010liebe@163.com。

[通讯作者] 曾志羽(1965-), 男, 主任医师, 研究方向: 心血管疾病诊治与研究。Email: zhiyuzeng@163.com。

emulsification of CFA and GAS to immune Lewis rats for five times was a appropriate method which could provide an optimal animal model for experimental study of acute and chronic rheumatic heart disease.

【Key words】 Group A streptococcus; Lewis rat; Rheumatic carditis; Rheumatic heart disease

风湿热由革兰阳性 A 组乙型溶血性链球菌 (GAS) 咽部感染所引起, 长期、反复发作的风湿热最终导致 30% ~ 40% 的病人严重并发症风湿性心脏病 (RHD) 的发生^[1]。近年来在发展中国家和一些发达国家贫困地区, 风湿性心脏病的发病率、致残率及致死率仍然较高^[2], 给人们的生活和经济带来了沉重的负担^[3-4], 但其发病机制和有效防治策略尚未完全明确, 且目前没有稳定并能被广泛应用的风湿性心脏病动物模型供后续的研究。本研究采用三种造模方法对急性慢性期风湿性心脏炎成模率进行比较, 为 RHD 的实验研究提供较为理想的动物模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物和主要试剂

8 周龄 SPF 级 Lewis 雌性大鼠 78 只, 体重 150 ~ 180 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】, 动物饲养于广西医科大学动物中心 SPF (specific pathogen free, SPF) 级实验动物房【SYXK(桂)2014-0003】。完全弗氏佐剂、不完全弗氏佐剂均购自 Sigam 公司。

1.2 细菌培养、灭活

复苏 -20℃ 甘油中的 A 组乙型溶血性链球菌标准菌株, 接种于羊血平皿上, 37℃ 培养 48 h, 见细菌生长良好, 刮取菌落接种于 1L 脑心浸液 (Biomérieux, 法国) 中, 37℃, 110 r/min 快速震荡培养 24 h, 4000 r/min, 5 min 离心收取细菌。灭菌生理盐水洗涤 3 次, 挑取细菌接种于羊血平皿培养, 48 h 后观察无杂菌。均分细菌悬液, 一份储存于 4℃, 一份离心后于 10 mL 40 g/L 多聚甲醛溶液中灭活 6 h, 洗涤 5 次并再次挑取细菌接种于羊血平皿培养, 48 h 后观察无细菌生长。

1.3 抗原制备

①配制目标浓度细菌悬液: 酶标仪 600 nm 波长检测相应灭活菌悬液 OD 值, 根据公式 Y (细菌总数) $Y = 51.102X$ (OD 值) - 3.931^[5] 检测细菌悬液浓度 ($\times 10^8$ CFU/mL), 并配置成浓度 1×10^{11} 菌落形成单位 (colonyforming unit, CFU)/mL 悬液, 置于冰中超声破碎; ②制备抗原: 无菌条件下, 灭活细菌悬液分别与弗氏完全佐剂 (CFA)、弗氏不完全佐剂 (IFA) 按 1:1 混合, 超声细胞破碎仪乳化 (40%, 4 mL, 10 min) 制备成抗原 I、抗原 II; 取浓度为 $1 \times$

10^{11} CFU/mL 活菌悬液即为抗原 III。

1.4 模型诱导方法

实验 A、B、C 组, 对照组 D 组: A、B、C 组各有大鼠 18、18、24 只, 分别首次后足垫 (掌面皮下) 注射抗原 I 0.2 mL。初次足垫部位免疫后, A、B 组每周 1 次于腹部皮下注射抗原 I 0.5 mL 共 4 次, 第 5 周 A 组 (CFA 组) 给予灭活 GAS, B 组 (IFA 组) 给予抗原 II, 量及部位同前, C 组 (活菌组) 每周 1 次于尾静脉注射抗原 III (活菌) 0.5 mL 共 4 次, 第 5 周始不予任何处理。对照组 D 组 18 只, 每 6 只对应各实验组, 同样方法注射, 将 GAS 换成生理盐水。

1.5 实验室检查

观察大鼠体征, 分别于第 7、12、24 周末水合氯醛腹腔注射麻醉后解剖动物, 每次每组 6 只。取眼球后静脉血测抗链球菌溶血素 O (ASO)、类风湿因子 (RF)、超敏 C-反应蛋白 (CRP), 检测方法采用免疫比浊法, 试剂购自上海执诚生物科技股份有限公司。取心脏于中性福尔马林固定, 按常规石蜡切片和 HE 染色, 进行病理观察。

1.6 统计方法

所有数据均以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 统计软件使用 SPSS16.0, 用单因素方差分析及两独立样本资料的 t 检验进行统计学处理, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 C 组 24 只, 存活 18 只, 死亡率 25%, 死亡大鼠不被列入观察对象。初次免疫后, 各组大鼠后足部出现红肿热, 2 周后消失, 实验 A、B、C 组于之后的免疫过程中出现其它关节部位红肿, 未见畸形。

2.2 实验室检查

A、B、C、D 各组大鼠第 7、12、24 周 CRP 均为阳性, RF 为阴性, 各组检测结果比较差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。A、B、D 组各时间段 ASO 均为阴性, C 组 ASO 第 7、12 周为阳性, 24 周为阴性, 较 D 组明显增高 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.3 心脏组织病理结果

D 组心肌、瓣膜均未见有病理改变 (表 2 及彩插 5 图 1)。A、B、C 各组第 7、12、24 周心肌和瓣膜均有炎性改变, 但发生率不同。A 组心肌炎和瓣膜炎发生率均较其它组高 (表 2), 7 周各组心肌细胞间

质水肿,有散在淋巴细胞、浆细胞浸润,偶见黏液样变性(彩插 6 图 2a)。12 周 A、C 组可见心肌及瓣膜弥漫性炎症细胞浸润(彩插 6 图 2b,c),心肌细胞间质血管旁风湿细胞聚集(彩插 6 图 2d),B 组心肌及瓣膜炎症细胞浸润程度未及 A、C 组明显,多呈散在分布,1 只出现风湿细胞聚集。24 周 A 组 6 只中 5 只瓣膜纤维化(表 2 及彩插 6 图 2e,f),B、C 组瓣膜纤维化不明显。

表 1 不同时间段四种免疫方法诱导大鼠各项实验室检查

Tab.1 Laboratory results of rats induced by four immunity methods at different time periods

组别 (Group)	CRP(mg/L)			ASO(IU/mL)			RF(IU/mL)		
	7W	12W	24W	7W	12 W	24W	7W	12W	24W
A	11.79 ± 1.31	9.92 ± 2.25	13.11 ± 3.08	5.33 ± 5.39	7.83 ± 9.17	9.50 ± 8.01	2.95 ± 0.73	7.40 ± 9.56	5.42 ± 2.09
	12.32 ± 0.97	12.03 ± 1.98	13.74 ± 2.06	4.50 ± 5.65	12.50 ± 6.66	22.00 ± 3.74	4.48 ± 1.78	4.03 ± 0.42	6.92 ± 1.69
B	13.85 ± 1.04	12.07 ± 2.06	13.83 ± 1.47	172.00 ± 132.30 *	168.67 ± 68.77 *	65.67 ± 29.96 *	3.90 ± 1.77	3.06 ± 0.74	6.21 ± 1.78
	12.39 ± 1.43	9.80 ± 1.79	11.50 ± 1.57	3.75 ± 5.65	1.00 ± 0.63	7.33 ± 10.51	3.91 ± 1.41	3.76 ± 1.06	4.27 ± 1.46
C									
D									

注:W:week,CRP:超敏 C-反应蛋白,ASO:抗链球菌溶血素“O”,RF:类风湿因子;* :与对照组比较 $P < 0.05$ 。
Note:W: week, CRP: C-reactive protein, ASO: anti hemolytic streptococcus antibodies, RF: rheumatoid factor, *: $P < 0.05$ vs control.

表 2 不同时间段 Lewis 大鼠心肌炎和瓣膜炎发生率比较

Tab.2 Comparison of incidence of myocarditis and valvulitis in Lewis rats at different time periods

组别 (Group)	7W 阳性数/总粒数 (No. of rats with/no. tested at 7 weeks)		12W 阳性数/总粒数 (No. of rats with/no. tested at 12weeks)		24W 阳性数/总粒数 (No. of rats with/no. tested at 24weeks)	
	心肌炎 (Myocarditis)	瓣膜炎 (Valvulitis)	心肌炎 (Myocarditis)	瓣膜炎 (Valvulitis)	心肌炎 (Myocarditis)	瓣膜炎 (Valvulitis)
A	5/6	6/6	6/6	6/6	6/6	5/6
B	4/6	4/6	3/6	4/6	3/6	3/6
C	3/6	6/6	5/6	6/6	5/6	3/6
D	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6	0/6

3 讨论

本研究中采用的 Lewis 大鼠属近交系,具有高度纯合,个体差异小,重复性好等优势,而且对于自身免疫性疾病易感,此外,RHD 患者多为女性,因此选择雌性 Lewis 大鼠较适合于风湿性心脏病动物模型研究。大鼠首次接受免疫后足部红肿热,2 周后消失,之后的实验过程中对侧后足部甚至前肢出现红肿,无畸形,该体征与风湿热多发性关节炎有很大的相似度。CRP 各组均为阳性,主要考虑为皮下注射对大鼠自身的刺激所引起,RF 均为阴性,此二者对风湿热的诊断不具特异性。C 组 ASO 在第 7、12 周检测为阳性,第 24 周为阴性但较其它组增高,A、B 组采用无活性 GAS 免疫未能引起 ASO 增高,而 C 组尾静脉注射未灭活 GAS,在急性期 ASO 增高,非风湿活动期降低为阴性。仅从生化检查分析,C 组较为符合急慢性期风湿性心脏病发生发展结果。

风湿病根据病变发展过程大致分为以下三期:变质渗出期,增生期,瘢痕期。前二者属于急性期心脏病理损伤,后者瘢痕期即心脏纤维化期属于慢性期损伤。虽然在风心病动物模型制造方面国内

外有一些探索性的研究,但很少且不全面。Cunningham MW 工作组^[6]首次通过腹腔注射重组链球菌 M6 蛋白免疫 Lewis 大鼠,大鼠 17 d 后出现心脏炎,证实了 Lewis 大鼠诱导风湿性心脏病的可行性,但是发生率较低。Lymbury RS 等^[7]用链球菌 M5 蛋白保守区肽段于 Lewis 大鼠上诱导出心瓣膜炎,但未见典型风湿细胞。此两种方法证实在诱发实验性风湿性心脏炎过程中 M 蛋白发挥的重要作用,但没有考虑到 GAS 抗原完整性的影响。Brimberg L 等^[8]用 GAS 抗原与 CFA 混合乳化剂成功诱导大鼠类似儿童链球菌感染后神经系统损伤性舞蹈病。这一系列动物模型验证了保持 GAS 抗原完整性的重要性,风心病的发生是因 GAS 抗原的长久而持续的刺激所引起,所以对于以上造模方法需要进行改良。本研究利用了链球菌抗原的完整性,A 组即 CFA 组类似于余步云^[9]的方法,但是增加了乳化剂腹部皮下免疫的次数,动物模型实验结果较为满意,7 周处死的大鼠心肌组织见黏液样变性,淋巴细胞、浆细胞、单核细胞浸润呈散在或灶状分部,发生心肌炎及瓣膜炎的概率为 83.3% (5/6)、100% (6/6),12 周发生心肌炎及瓣膜炎的概率均为

100%, 12 周心肌间质血管旁见风湿细胞聚集, 24 周大鼠 6 只中有 5 只瓣膜纤维化, 表明急慢性期风湿性心脏病已成功诱导。据报道 CFA 能够促使大量 IL17 产生^[10-11], 而 IL17 对自身免疫性疾病的发生发展有很大影响^[12], 从结果分析来看, 加大佐剂 CFA 的刺激次数后, CFA 组成模率已较余步云^[9]大大提高, 无论是急性期心肌炎及瓣膜炎的发生率, 还是慢性期大鼠心脏瓣膜纤维化发生率及程度, 并且较为符合临床风湿性心脏病的发展历程。

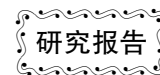
此外, 本研究 B 组即 IFA 组, 于第 4 周给予 GAS + CFA 乳剂刺激之后, 第 5 周开始每周持续给予 GAS + IFA 乳剂免疫 Lewis 大鼠, 第 7、12 周处死的 6 只大鼠中 4 只出现心脏炎, 但炎症细胞呈散在分布, 12 周大鼠 1 只心肌间质有类似风湿细胞, 24 周大鼠 2 只发生少量瓣膜纤维化。或许是因 IFA 能增加 IL10 大量分泌^[10-11], 且 Yang S 等^[13]的自身免疫心肌炎体外研究发现 IL10 使炎性细胞对心肌的浸润明显减少, 能有效抑制抗原呈递和促炎因子释放。持久的 IFA 与 GAS 乳化剂刺激未能引起心脏瓣膜明显炎性改变, 与 IL10 的大量分泌存在一定的关系。因此, B 组并未能更好地诱导出动物风心病模型。

另外, 国内外学者采用未灭活 GAS 来诱导风湿性心脏病动物模型, 最早 Unny SK 等^[14]采用皮内注射溶血性链球菌, 但是诱导出风湿热病变却很少; 之后宋志刚等^[15]经家兔耳缘静脉注射 GAS, 并于 GAS 免疫后第二天肌注青霉素缓解家兔症状, 但以上的探索均未能提高动物风心病的发生率。本研究实验 C 组中采用 Lewis 大鼠尾静脉注射未灭活的 GAS, 血清 ASO 检查利于 A 族溶血性链球菌感染的诊断, 表明 12 周前存在风湿热活动, 病理结果心肌及瓣膜于各个时间段均有不同程度病变, 病理变化结合血生化检查结果提示此法诱导风湿性心脏病模型是可行的。然而, 该组大鼠死亡率 25%, 并且多于尾静脉注射活菌后 1 d 死亡, 主要考虑为溶血性链球菌急性感染所致, 因此如何降低 GAS 急性感染死亡率, 是否使用青霉素及其用量多少, 这些问题均有待解决, 因而此法尚不能作为风心病造模方法首选。

综上所述, A 组完全弗氏佐剂与灭活 GAS1:1 混合超声乳化后免疫大鼠 5 次, 然后给予灭活的 GAS 连续刺激, 该造模方法所诱导的风湿性心脏病与人类该疾病相似度大, 且成模率高, 能为急慢性期风湿性心脏病的实验研究提供较好的可复制的动物模型。

参考文献:

- [1] Guilherme L, Fae K, Oshiro SE, *et al.* Molecular pathogenesis of rheumatic fever and rheumatic heart disease[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2005, 7:1-15.
- [2] Marijon E, Mirabel M, Celermajer DS, *et al.* Rheumatic heart disease[J]. *The Lancet*, 2012, 379:953-964.
- [3] Iung B, Vahanian A. Epidemiology of Acquired Valvular Heart Disease[J]. *Canadian Journal of Cardiology*, 2014, 30:962-970.
- [4] Manjunath CN, Srinivas P, Ravindranath KS, *et al.* Incidence and patterns of valvular heart disease in a tertiary care high-volume cardiac center: a single center experience[J]. *Indian Heart J*, 2014, 66:320-326.
- [5] 罗映辉, 邹国军, 余俊龙, 等. 细菌繁殖与计数新方法的实验研究[J]. *实用预防医学*, 2003, 10:828-829.
- [6] Quinn A, Kosanke S, Fischetti VA, *et al.* Induction of autoimmune valvular heart disease by recombinant streptococcal m protein[J]. *Infect Immun*, 2001, 69:4072-4078.
- [7] Lymbury RS, Olive C, Powell KA, *et al.* Induction of autoimmune valvulitis in Lewis rats following immunization with peptides from the conserved region of group A streptococcal M protein[J]. *J Autoimmun*, 2003, 20:211-217.
- [8] Brimberg L, Benhar I, Mascaro-Blanco A, *et al.* Behavioral, Pharmacological, and Immunological Abnormalities after Streptococcal Exposure: A Novel Rat Model of Sydenham Chorea and Related Neuropsychiatric Disorders [J]. *Neuropsychopharmacology*, 2012, 37:2076-2087.
- [9] Xie XJ, Zhou HJ, Huang JL, *et al.* An animal model of chronic rheumatic valvulitis induced by formalin-killed streptococci[J]. *Rheumatology International*, 2010, 30:1621-1625.
- [10] Nikoospour E, Schwartz JA, Huszarik K, *et al.* Th17 Polarized Cells from Nonobese Diabetic Mice Following Mycobacterial Adjuvant Immunotherapy Delay Type 1 Diabetes[J]. *Journal of Immunology*, 2010, 184:4779-4788.
- [11] Yoshizaki A, Yanaba K, Ogawa A, *et al.* Immunization With DNA Topoisomerase I and Freund's Complete Adjuvant Induces Skin and Lung Fibrosis and Autoimmunity via Interleukin-6 Signaling [J]. *Arthritis and Rheumatism*, 2011, 63:3575-3585.
- [12] Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis[J]. *Journal of Immunology*, 2006, 177:566-573.
- [13] Yang S, Li W, Liu W, *et al.* IL-10 gene modified dendritic cells induced antigen-specific tolerance in experimental autoimmune myocarditis[J]. *Clin Immunol*, 2006, 121:63-73.
- [14] Unny SK, Middlebrooks BL. Streptococcal rheumatic carditis [J]. *Microbiol Rev*, 1983, 47:97-120.
- [15] 宋智钢, 刘维永, 晏培松, 等. 实验性风湿性心脏病动物模型的建立[J]. *第四军医大学学报*, 2002, 23:1853-1856.



微卫星标记在布氏田鼠封闭群遗传结构研究中的应用

张 曼,施海霞,宋铭晶

(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,北京 100021)

【摘要】 目的 使用微卫星标记分析连续三代布氏田鼠封闭群遗传结构的稳定性。**方法** 使用高盐沉淀法从鼠尾中提取布氏田鼠基因组 DNA,将筛选出 7 对微卫星引物并用荧光标记(Fam),然后对布氏田鼠封闭群连续三代的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,测序仪检测 PCR 产物,整理原始数据并对布氏田鼠基因组 DNA 进行微卫星分析。**结果** 由平均有效杂合度和多态信息含量的分析得出该布氏田鼠种群传代过程中保持着较高而且稳定的杂合度。**结论** 该实验结果说明本实验室布氏田鼠封闭群的遗传结构比较稳定。

【关键词】 布氏田鼠;封闭群;遗传结构;微卫星 DNA 标记

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0034-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.008

Applications of microsatellite marker technology in the genetic structure research for closed colony of Brandt's voles

ZHANG Man,SHI Hai-xia,SONG Ming-jing

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

【Abstract】 Objective Analysis of the genetic structure stability of Brandt's vole (*lasiodomys brandtii*) in closed colony using microsatellite marker technology. **Methods** Genomic DNA was extracted from tail tip using high-concentration-salt precipitation methods. Marked with fluorescent tags(Fam), 7 microsatellite primers were filtered out by PCR, and the DNA structure of three consecutive generations of Brandt's vole was analyzed by microsatellite marker. **Results** By the analysis of the average heterozygosity and polymorphism information content, Brandt's vole populations maintained a closed group of qualified genetic structure. **Conclusions** The present results show that the closed group of Brandt's vole species in our laboratory maintain a stable genetic structure.

【Key words】 Brandt's vole;Closed colony;Genetic structure;Microsatellite DNA marker

2007 年从中国农业大学引入了已在室内随机交配 3 年的布氏田鼠 (Brandt's vole, *lasiodomys brandtii*) 普通级实验室种群,在本实验室连续繁殖 3 年,并对该种群进行了系统药物净化和同胞选择筛

选。2011 ~ 2013 年经清洁级实验动物微生物和寄生虫学检测达到了清洁级的标准^[1],到目前已建立了连续繁殖 8 代的清洁级布氏田鼠远交系(封闭群),同时 2013 年我们尝试使用剖腹产净化和 SPF

[基金项目] 国家自然科学基金项目(31301890);北京市自然科学基金资助项目(7122110)。

[作者简介] 张曼(1989-),女,硕士生,研究方向实验动物学。E-mail:zh_man89@foxmail.com。

[通讯作者] 宋铭晶,博士,副研究员。E-mail: songmj@cnilas.org

级 ICR 雌鼠代乳得到净化的布氏田鼠仔鼠,剖腹产子代通过了 SPF 级的检测,说明本实验室有繁育和净化得到 SPF 级布氏田鼠的能力^[2]。

封闭群遗传结构的稳定是该封闭群维持遗传背景清晰和优质的必要条件,因此我们利用微卫星标记(simple sequence repeats, SSR)技术检测布氏田鼠封闭群连续三代(F6 ~ F8)的遗传结构的稳定性,分析布氏田鼠封闭群遗传结构的变化,进而推测在传代中种群大小的变化,对等位基因多样性的影响。最终,我们旨在通过 SSR 检测和合理繁育配对建立经济高效的布氏田鼠封闭群的传代体系。

SSR 标记是被广泛应用并为学者认可的检测不同动物种群遗传多态性的有效工具^[3],蔡磊等^[4]检测采集于广东深圳大鹏湾浅水区的诸氏鲮虾虎鱼的平均多态信息指数(polymorphism information content, PIC)为 0.447;安徽大学笼养的野外种群猕猴的平均 PIC 值为 0.730^[5]。而实验室内的实验动物种群也利用 PIC 值作为其遗传多态性的重要检测指标之一,李芳芳^[6]等研究的两个豚鼠封闭群(1994 年引自日本,封闭至今;2004 年引自 Charles River)的平均 PIC 值为 0.552;班建荣等^[7]检测引自兰州公司实验动物室并连续封闭 6 年的 SPF 级 KM 小鼠封闭群 PIC 值为 0.368 ~ 0.830;申幸娇等人检测来自北京三个单位的封闭群兔(SPF 级日本大耳白兔,SPF 级新西兰白兔,SPF 级青紫蓝兔)平均 PIC 值为 0.410、0.549、0.470^[8]。但还未见有学者尝试运用 SSR 标记检测连续传代的封闭群的遗传稳定性,从而探索将野生种群在实验室内以最优的繁育规模繁育,以实现该动物的实验动物化,因此本实验为田鼠类动物封闭群的建立和实验动物化研究提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

清洁级的布氏田鼠饲养在独立送排风净化动物笼(individually ventilated cage, IVC)中,饲养室温度 22℃ ~ 25℃,湿度 50% ~ 70%,光照条件 14L:10D,自由摄食和饮水。动物饮水、垫料和笼具均经高压灭菌处理,饲料经 CO₂ 照射消毒达到 SPF 级动物饲料标准。饲料生产许可证编号【SCXK(京)

(2012、2013、2014)-0008】。动物实验批准号,ILAS-PG-2014-011。

1.1.2 试剂与仪器

1.1.2.1 试剂

蛋白酶 K(SIGMA 公司)

Taq DNA 聚合酶、10 × PCR buffer (Mg²⁺)、dNTP、DNA Marker(20 bp)(TaKaRa)

胶回收试剂盒(BIOMIGA 公司)

KAPA Taq HotStart 扩增试剂(KAPA 公司)

1.1.2.2 仪器

7100 型全自动生化测定仪(日本日立公司产品),酶标仪(Thermo),ROX-500 分子量内标(北京阅微基因技术有限公司),BC-subMIDI 电泳仪(北京六一仪器厂),JY300C 电泳槽(北京君意东方电泳设备有限公司),NAS-99 分光光度计(ACTGene 公司),BioSens SC 810B 凝胶成像仪(上海山富科学仪器有限公司),GeneAmp 9600 PCR 仪(ABI 公司),3730XL DNA analyzer(ABI 公司)

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取

布氏田鼠基因组 DNA 来自连续三代的清洁级布氏田鼠幼仔(F6 代 50 只,F7 代 36 只,F8 代 40 只,雌雄各半),采用高盐沉淀法提取,具体步骤如下:取布氏田鼠尾部组织置于 1.5 mL 离心管中,加入 500 μL 鼠尾裂解液(Tris·HCL 10 mmol/L, Na₂EDTA 0.1 mol/L, pH8.0 配制)和 10 μL 蛋白酶 K(20 mg/mL),55℃ 消化过夜,待鼠尾组织完全溶解仅有少许尾骨残骸后,加入 300 μL 6 mol/L 饱和 NaCl 混匀,冰上静置 15 min,12000 r/min 离心 15 min 后取上清,加入与上清等体积的异丙醇沉淀 DNA,70% 乙醇清洗两次,然后倒掉乙醇自然风干,200 μL TE 溶解沉淀,分光光度计检测 DNA 浓度,调整样品浓度至 10 ng/μL。

1.2.2 引物的筛选

随机选取 1 只布氏田鼠基因组 DNA 用 10 条微卫星 DNA 引物^[9]进行 PCR 扩增,用胶回收试剂盒回收目的片段后溶至 30 μL 无菌水中,取 20 μL 做基因组测序服务。根据测序结果筛选出与核心序列一致的 7 条引物,用带有荧光标记(Fam)的上游引物对布氏田鼠的基因组 DNA 进行微卫星分析。7 个布氏田鼠微卫星位点及其特征描述见表 1。

表 1 7 个布氏田鼠微卫星位点及其特征描述
Tab.1 The primer and characteristics of 7 microsatellites loci for Brandt's voles

序列号位点 Site number	重复单元 Microsatellite Motif	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	退火温度(℃) Annealing (℃)	目的片段长度(bp) Fragmen tlength (bp)
BVM01 DQ886925	(GTT) ₅ TA(T) ₅ GT(GTTT) ₃	GAATGGAGCTATGTAGACA GAGCTAACATTCCAGGAC	48	162
BVM03 DQ886927	(GA) ₂₁	ACAGCAGGCACTGGTTCA ATCTACTGTTGAGCTTCATTCC	57	165
BVM06 DQ886930	(AC) ₁₂	CACCCACACACTGAGACAAC GTGGATGCTTGGACCAGAAC	67	200
BVM02 DQ886926	(CA) ₉ GA(CA) ₈	GATCACCTTTTCCCTCAC CTTAGACTACCTCTCCTGG	55	145
BVM05 DQ886929	(TG) ₁₀ TA(TG) ₃	GGAGTGGGCTGACTATAGAAG CCAACAGTCTCCACCTTATC	65	180
BVM09 DQ886932	(AG) ₅ GT(AG) ₂₀	CAGCTTAACTTAATGGGATGA CTGGGAGCAACCAAATATC	60	176
BVM13 DQ886934	(AG) ₃ ATAGAC(AG) ₃ AC(AG) ₅	CATCCAAATGTTTTAGAGTGTG GGGATTAAAGTGCTGTGC	61	136

1. 2. 3 PCR 反应条件及电泳

利用 7 对微卫星引物对布氏田鼠基因组 DNA 进行 PCR 扩增,反应条件如下:10 × Buffer (Mg²⁺), 1.5 μL; 2.5 mmol/L dNTP, 1.2 μL; 上游和下游引物 (5 μmol/L), 1 μL; DNA Taq 聚合酶 (5 U/μL), 0.1 μL; 模板 DNA, 1 μL; 3d H₂O 补齐至 15 μL。PCR 反应程序为预变性 95℃, 5 min, 1 个循环; 然后进行 35 个循环, 包括变性 95℃, 30 s; 退火 (各引物最适退火温度), 30 s, 延伸 72℃, 30 s; 最后延伸 72℃, 7 min; 之后进入 4℃ 保存。PCR 产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1. 2. 4 3730 XL 测序仪检测

在 96 孔板中每孔加入分子量内标和甲酰胺混合液 (0.5:8.5) 9 μL, PCR 产物 1 μL, 轻轻混匀后进行上机检测, 95℃ 变性 3 min。

1. 2. 5 数据统计和分析

将检测得到的原始数据文件导入到分析软件 3730XL DNA analyzer 中进行分析, 运用 Genepop4.2 软件进行整理数据, 计算观测杂合度 (observed number of heterozygotes, H_o) = 观测杂合个体数/总种群个体数, H_e = 期望杂合个体数/总种群个体数, $PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2P_i^2 P_j^2 = 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k P_i P_j (1 - P_i P_j)$ 来计算, 其中 k 表示等位基因数目, P_i 和 P_j 分别是表示第 i 和 j 个等位基因的频率。

2 结果

2.1 微卫星引物扩增及多态性

选取 7 个微卫星座位检测三代布氏田鼠封闭群

的遗传多态性, 发现 DQ886927 座位有 12 个等位基因, DQ886932 座位有 11 个等位基因, DQ886926 座位有 10 个等位基因, DQ886925 座位有 9 个等位基因, 具有丰富的多态性, DQ886929 和 DQ886930 座位各有 7 个等位基因, DQ886934 座位最少, 为 4 个等位基因。7 个微卫星座位的平均等位基因数为 8.57 个。

2.2 杂合度和多态信息含量

三代布氏田鼠种群 7 个基因座位的观测等位基因数 (observed number of alleles)、H_o、H_e 和 PIC 值见表 2。由表 2 中可以计算出, F6 代布氏田鼠种群 7 个不同座位的平均期望杂合度为 0.606, F7 代布氏田鼠种群 7 个不同座位的平均期望杂合度为 0.512, F8 代布氏田鼠种群 7 个不同座位的平均期望杂合度为 0.507。

3 讨论

目前常用的分子标记技术主要有 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、SNP 和 EST 技术等。RFLP 标记为显性遗传, 但对 DNA 多态性的检出灵敏度不高; RAPD 技术为显性遗传, 不能识别杂合子位点; AFLP 技术对基因组纯度和反应条件要求较高^[10-11]; SNP 技术和 EST 技术多用于大规模的 DNA 序列检测^[12]。较之于上述 5 种分子标记技术, 微卫星 DNA 分布广泛, 为共显性标记, 具有较高的多态性和重复性, 对 DNA 的浓度要求不高, 可提供高分辨率的遗传信息, 适合于个体水平和种群水平上遗传结构的研究^[13]。

表 2 三代布氏田鼠种群 7 个基因座位的遗传特点

Tab. 2 Genetic characteristics of 7 microsatellite locus in three generations of Brandt's voles

基因座位 Locus	种群 Populations	观测等位 基因数 Observed number of alleles	等位基因大小(bp) Alleles size(bp)	观测杂 合度 H_o	期望杂 合度 H_e	多态信息含量 PIC
BVM01 DQ886925	F6	7	162 ~ 174	0.520	0.640	0.603
	F7	4	163 ~ 174	0.694	0.667	0.612
	F8	5	163 ~ 174	0.625	0.650	0.601
BVM02 DQ886926	F6	6	139 ~ 146	0.380	0.640	0.601
	F7	5	139 ~ 147	0.556	0.500	0.459
	F8	6	139 ~ 151	0.375	0.475	0.460
BVM03 DQ886927	F6	10	151 ~ 194	0.460	0.680	0.663
	F7	6	151 ~ 179	0.778	0.667	0.629
	F8	9	151 ~ 183	0.600	0.750	0.716
BVM05 DQ886929	F6	5	175 ~ 186	0.560	0.460	0.380
	F7	3	173 ~ 181	0.306	0.278	0.249
	F8	3	175 ~ 181	0.425	0.325	0.290
BVM06 DQ886930	F6	5	192 ~ 210	0.300	0.600	0.548
	F7	4	192 ~ 211	0.306	0.361	0.341
	F8	4	192 ~ 209	0.275	0.275	0.265
BVM09 DQ886932	F6	9	170 ~ 210	0.680	0.680	0.669
	F7	5	170 ~ 203	0.583	0.750	0.706
	F8	6	171 ~ 203	0.525	0.675	0.639
BVM13 DQ886934	F6	4	125 ~ 134	0.440	0.540	0.430
	F7	2	126 ~ 134	0.361	0.361	0.296
	F8	2	126 ~ 134	0.325	0.400	0.326

目前国内没有国家标准或行业标准作为指导实验动物封闭群遗传多样性的建立和维持的规范。 H_e 和 PIC 值是评价种群遗传多态性量化的主要指标,一般 H_e 或 PIC 值越大,该基因座位杂合子的比例就越大,携带的遗传信息量就越大。本研究中,7 个微卫星座位各自在连续三代的布氏田鼠种群传代下的平均 PIC 和 H_e 值分别为 DQ886925:0.606 和 0.652;DQ886926:0.507 和 0.538;DQ886927:0.669 和 0.699;DQ886929:0.306 和 0.354;DQ886930:0.385 和 0.412;DQ886932:0.672 和 0.702;DQ886934:0.350 和 0.434,说明本实验室连续繁殖 6 代以上的布氏田鼠种群的平均 PIC 值在 0.306 ~ 0.672,平均 H_e 值在 0.354 ~ 0.702。同有关学者研究的种群的遗传多态性相比较,如:C Marchi 等^[14]2007 ~ 2008 年研究丹麦两个农业区域和一个自然区域的东方田鼠种群 (H_e :0.671 ~ 0.835)、Magdalena Mikowska^[15]2009 年取自小岛、大陆、重金属污染区共 10 个地域的堤岸田鼠种群 (H_e :0.578 ~ 0.869)、Claudia Melis 等^[16]2006 年在挪威北部的 14 个水鼠种群 (H_e :0.115 ~ 0.486) 等,本实验室的布氏田鼠封闭群在实验室繁育规模较小的情况下,也没有发生明显的遗传漂变。并且 genepop4.2 的

Hardy-Weinberg test 分析得出三代布氏田鼠种群均达到平衡状态,因此可以判定该群体在传代过程中保持着合格封闭群的遗传结构。

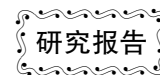
总之,本研究表明该布氏田鼠封闭群在连续传代过程中保持着稳定的遗传结构和高度的遗传多态性,该结论为我们建立最优化的传代体系提供了重要的理论支撑。鉴于目前国内还没有对封闭群的遗传多样性有指导性的要求,本研究在 25 对繁育笼的情况下,保持了该封闭群的遗传多态的稳定性,为田鼠类野生动物的引种和繁育提供了借鉴。

参考文献:

- [1] 梁虹,潘思丹,施海霞,等. 布氏田鼠封闭群建立及繁殖特性研究[J]. 中国卫生检验杂志,2009,19(12):2767-2769.
- [2] 潘思丹,张曼,施海霞,等. 布氏田鼠剖腹产净化技术的建立[J]. 中国卫生检验杂志,2014,24(3):352-354.
- [3] Deng Wang, Yongwang Guo, Dazhao Shi. Genetic structure of Brandt's vole (*Lasiopodomys brandtii*) populations in Inner Mongolia, China based on microsatellite analysis [J]. Conservation Genetics. 2011,12(3):659-667.
- [4] 蔡磊,陈小曲,郑伟强,等. 诸氏鰕虎鱼多态性微卫星标记的开发及评价[J]. 中国实验动物学报,2015(1):57-62.
- [5] 徐玉蕊. 安徽野生猕猴实验动物化及其种质特异性研究[D]. 安徽大学,2013.

- [6] 李芳芳,魏杰,王洪,等. 应用微卫星标记对两个豚鼠封闭群的遗传学研究[J]. 中国比较医学杂志,2014,24(12):33-46.
- [7] 班建荣,胡芹宝,张新创. 两个封闭群 SPF 级昆明小鼠遗传背景调查[J]. 微生物学免疫学进展,2013,41(5):6-9.
- [8] 申幸娇,岳秉飞. 应用微卫星标 DNA 记对三个封闭群兔遗传分析[J]. 中国比较医学杂志,2013(9):12-18.
- [9] Wang Deng, Shi Dazhao. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci from Brandt's voles (*Lasiopodomys brandtii*) [J]. Molecular Ecology Notes,2007,7(4):671-673.
- [10] Greg W. DOUHAN, Lucie VINCENOT, Herve GRYTA, *et al.* Population genetics of ectomycorrhizal fungi: from current knowledge to emerging directions [J]. FUNGAL BIOLOGY, 2011, 115: 569-597.
- [11] Milee Agarwal, Neeta Shrivastava, Harish Padh. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences[J]. Plant Cell Reports,2008,27:617-631.
- [12] 唐立群,肖层林,王伟平. SNP 分子标记的研究及其应用进展[J]. 中国农学通报,2012,28(12):154-158.
- [13] Alisoltani A, Fallahi H, Shiran B, *et al.* RNA ~ Seq SSRs and small RNA ~ Seq SSRs: New approaches in cancer biomarker discovery[J]. Gene,2015,560(1):34-43.
- [14] C Marchi, LW Andersen, C Damgaard. Gene flow and population structure of a common agricultural wild species (*Microtus agrestis*) under different land management regimes [J]. Heredity,2013,111:486-494.
- [15] Magdalena Mikowska, Aneta Gaura, Edyta Sadowska, *et al.* Genetic Variation in Bank Vole Populations in Natural and Metal ~ Contaminated Areas [J]. Archives of Environmental Contamination Toxicology,2014, 67:535-546.
- [16] Claudia Melis, Asa Alexandra Borg, Henrik Jensen, *et al.* Genetic variability and structure of the water vole *Arvicola amphibius* across four metapopulations in northern Norway[J]. Ecology and Evolution,2013,3(4):770-778.

[修回日期]2015-05-28)



SiRNA 干扰慢性炎性痛大鼠患侧背根神经节 MrgC 表达及 PKC ϵ 磷酸化的研究

林小溪, 方 芳, 方剑乔, 刘盈君

(浙江中医药大学第三临床医学院, 杭州 310053)

【摘要】 目的 观察鞘内注射小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA) 对完全弗氏佐剂 (complete freund's adjuvant, CFA) 诱导的慢性炎性痛大鼠患侧背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 中 MrgC (Mas-related G protein-coupled receptor C, MrgC) mRNA 与蛋白表达的干扰作用, 并观察该作用对大鼠患侧痛阈及患侧 DRG PKC ϵ 丝氨酸 729 点位磷酸化 (phosphorylation of PKC ϵ Ser729, p-PKC ϵ Ser729) 水平的影响。**方法** 健康雄性 SD (Sprague-Dawley, SD) 大鼠 16 只, 随机分为对照 siRNA 组, MrgC siRNA 组, 每组 8 只。大鼠脊髓鞘内插管成功后, 两组大鼠给予相应药物鞘内注射 4 d, 1 次/d, 5 μ g/d/只。给药第 4 d, 大鼠右后足底注射 CFA 0.1 mL 建立慢性炎性痛模型, 此后隔日注射药物, 直至给药第 11 d 处死。分别于鞘内置管前、给药前、给药 4 d (CFA 造模 0 h)、给药 5 d (CFA 造模 24 h)、给药 11 d (CFA 造模 7 d) 5 个时点检测大鼠患侧机械缩腿阈 (Paw withdrawal thresholds, PWTs) 的变化。荧光定量 PCR 法检测患侧 DRG MrgC 的 mRNA 的表达, 免疫荧光法检测患侧 DRG MrgC 表达量及 p-PKC ϵ Ser729 的含量。**结果** 与给药 4 d 比较, 给药 5 d 两组大鼠的 PWTs 均有显著的下降 ($P < 0.01$); 给药前后各时点, 两组大鼠之间 PWTs 没有明显差异。观察给药 11 d 时大鼠患侧 L4-L6 DRG MrgC mRNA 的表达, 与对照 siRNA 组比较, MrgC siRNA 组各神经节 MrgC mRNA 的表达均明显下降 ($P < 0.01$); 观察大鼠给药 11 d 时大鼠患侧 L4-L6 DRG MrgC 与 p-PKC ϵ Ser729 的表达, 与对照 siRNA 组比较, MrgC siRNA 组患侧 DRG 的 MrgC 阳性细胞率明显减少 ($P < 0.01$), 而 p-PKC ϵ Ser729 的阳性细胞率显著上升 ($P < 0.05$)。**结论** MrgC siRNA 片段可有效干扰 CFA 慢性炎性痛大鼠患侧 L4-L6 DRG MrgC mRNA 与 MrgC 的表达, 对 MrgC 的干扰作用能显著上调 PKC ϵ Ser729 磷酸化的水平, 但不影响大鼠患侧机械缩腿阈。

【关键词】 小干扰 RNA; MrgC; 蛋白激酶 C ϵ 亚基 Ser729 磷酸化; 慢性炎性痛; 背根神经节

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0039-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.009

SiRNA interference on expression of MrgC and phosphorylation of PKC ϵ in ipsilateral dorsal root ganglion of rats with chronic inflammatory pain

LIN Xiao-xi, FANG Fang, FANG Jian-qiao, LIU Ying-jun

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

【Abstract】 Objective To observe the Interference effects of siRNA (small interference RNA) intrathecal injection on the expression of mRNA and protein of MrgC, on PWTs (paw withdrawal thresholds) and the phosphorylation of PKC ϵ Ser729 in ipsilateral DRG (dorsal root ganglion) of rats with chronic inflammatory pain induced by CFA (complete freund's

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目 (81202755); 浙江省医药卫生科技计划 (2015KYA172)。

【作者简介】 林小溪, 女 (1989-), 硕士生。方芳, 女 (1976-), 助理研究员。

【通讯作者】 方剑乔 (1961-), 男, 教授, 博士生导师。研究方向: 针刺镇痛的效应基础研究。E-mail: Fangjianqiao7532@163.com。

s adjuvant). **Methods** 16 health adult male SD (Sprague-Dawley) rats were randomly divided into 2 groups: control siRNA group and MrgC siRNA group, 8 rats in each group. After success of intrathecal catheterization, corresponding siRNA was injected in rats for 4d, once a day, 5 μ g/d per rat. The model of chronic inflammatory pain was established by CFA (0.1ml per rat) subcutaneously injected into the right hind paw at 4th day post-administration, then two groups were administrated corresponding siRNA on alternate day and executed at the 11th day post-administration. The PWTs were measured at 5 time points of pre-intrathecal catheterization, pre-administration, 4th day post-administration (0h post-CFA injection), 5th day post-administration (24h post-CFA injection), 11th day post-administration (7 d post-CFA injection). The expression of MrgC mRNA in ipsilateral DRG was detected by fluorogenic quantitative PCR, and the expression of MrgC and the phosphorylation of PKC ϵ Ser729 in ipsilateral DRG was detected by immunofluorescence method. **Result** Compared with 4th day post-administration, PWTs of both two groups at 5th day post-administration decreased significantly ($P < 0.01$). While there was no significant difference of PWTs between two groups at every detective time point. Compared with control siRNA group, the expression of MrgC mRNA and the rate of MrgC positive cells in MrgC siRNA group both decreased significantly ($P < 0.01$, $P < 0.05$), whereas the rate of p-PKC ϵ Ser729 positive cells increased obviously ($P < 0.05$) at 11th day post-administration. **Conclusion** MrgC siRNA can effectively interfere the expression of mRNA and protein of MrgC in L4-L6 ipsilateral DRGs of rats with chronic inflammatory pain induced by CFA, and the siRNA interference on MrgC can obviously up-regulate the phosphorylation of PKC ϵ Ser729, while it has no significant effect on PWTs of rats.

【Key words】 SiRNA; MrgC; Phosphorylation of PKC ϵ Ser729; Chronic inflammatory pain; Dorsal root ganglion

慢性炎性疼痛广泛地存在于各种疾病的进程中,目前抑制疼痛的药物阿片受体激动剂吗啡与炎性介质抑制剂的临床疗效都不佳,而慢性疼痛相关的外周细胞与分子功能研究成为镇痛研究的重要方向。

2001 年发现的 MrgC (Mas-related G protein-coupled receptor C, MrgC) 是一种新型的 G 蛋白偶联受体,其基因仅在外周神经系统中与痛觉调制有密切联系的背根神经节 (dorsal root ganglion, DRG) 和三叉神经节的中小型感觉神经元高度表达^[1-2]。研究证实 MrgC 参与慢性炎症引发的外周痛觉过敏的调制,但其机制远未阐明,且目前尚未有 MrgC 特异性抑制剂供进一步深入研究。

细胞内信号转导分子蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一种丝氨酸/苏氨酸激酶^[3]。其亚基 PKC ϵ 在慢性疼痛外周痛觉敏化的形成中起着关键性作用^[4]。PKC ϵ 磷酸化是其功能被激活的重要标志^[2, 5]。研究表明 MrgC 的调制作用与 PKC 密切相关^[6],因此本实验拟建立完全弗氏佐剂 (complete freund's adjuvant, CFA) 慢性炎性痛模型,鞘内注射 MrgC 小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA),观察该片段对大鼠患侧 L4-L6 DRG MrgC mRNA 和受体表达的沉默作用及其对 PKC ϵ 丝氨酸 729 点位磷酸化 (phosphorylation of PKC ϵ Ser729, p-PKC ϵ Ser729) 水平和机械痛的影响,为后续 MrgC 生理药理功能的深入研究打下基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选用清洁级健康雄性 SD 大鼠 16 只,体重 280 ~ 300 g,购自上海斯莱克实验动物有限公司【SCXK (沪)2013-0016】,由浙江中医药大学实验动物中心饲养【SYXK (浙)2013-0184】,饲养期间给予啮齿动物标准颗粒饲料及自由饮水,12 h 循环灯光,室温 $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 主要实验试剂和仪器

MrgC 抗体 (批号:0121212030827,美国 Abnova 有限公司); CFA (批号:051M8725,美国 Sigma 公司); 山羊血清封闭液 (批次:140214; BIOS 公司); 多聚赖氨酸处理载玻片 (南通天盛实验器材有限公司); MrgC siRNA 与对照 siRNA (批号:3360; life technologies 公司); Goatanti-rabbit IgG (批号: A120101F13; 美国 Abnova 有限公司); Anti-PKC ϵ (phospho S729) antibody (批号 F1510; 美国 Abnova 有限公司); 抗荧光淬灭 PVP 封片液 (产品编号: p0128; 碧云天生物技术研究); Trizol: (批号: 28218; life technologies 公司) 逆转录试剂盒 (批号: RR047A, 大连宝生物公司); PCR 试剂盒 (批号: 1725201AP; 美国 Bio-Rad 公司)。其他试剂均为国产分析纯。

Thermo 冰冻切片机 (型号: HM550, 美国 Thermo Scientific 公司); 激光共聚焦显微镜 (型号:

AIR;日本尼康公司);紫外分光光度计(型号:smartspec™plus,BIO-RAD 公司);荧光定量 PCR 仪(型号:CFX96™ Real-Time system,BIO-RAD 公司);逆转录仪(S1000™ Thermal cycler,BIO-RAD 公司);PE 导管(型号:PE-10,OD 0.5 mm,ID 0.25 mm;公司:宁波市科技园区安来软件科技有限公司)。

1.3 实验动物模型制备

1.3.1 脊髓鞘内置管模型^[7-10]

大鼠禁食 1 d 后,水合氯醛 350 mg/kg 麻醉,剃除腰背部鼠毛,酒精消毒,切开皮肤,分离肌肉,暴露 L5 棘突,用咬骨钳扳掉棘突,将 PE-10 聚乙烯管插入脊髓蛛网膜下腔,从 L5 向 L2 缓缓进管约 3.5 cm。见有脑脊液流出后,即封住外口,缝合肌肉和皮肤,并将 PE-10 管固定于浅层肌肉上。术后恢复 3 d 后,鞘内给予 10 μ L 盐酸利多卡因,选取在 30 s 内双下肢瘫痪,5~10 min 内恢复正常的大鼠进行后续试验。

1.3.2 CFA 慢性炎性痛模型

从大鼠右后足垫部向踝关节方向注入 CFA (0.1 mL/只),4 h 后注射关节局部出现炎症反应,并出现痛觉过敏,大鼠致炎关节肿胀疼痛可持续 4 周以上^[11]。

1.4 实验动物分组与处理

1.4.1 实验动物分组

大鼠行鞘内置管术后恢复 5 d,检测大鼠患侧足缩腿阈,随机分为两组,对照 siRNA 组和 MrgC siRNA 组,每组 8 只。

1.4.2 药物配制与实验动物处理

1.4.2.1 药物配制

MrgC siRNA 序列为^[12] 5'-CAUGUCAGCUAUUAUAUGUt-ps-t-3' 和 3'-t-ps-t GUACAGUCGAUAAUAUACA-5';错位对照 siRNA 序列为 5'-CAAGUUAUC UAGUAAUUAUa-ps-t-3 和 3'-t-ps-a GUU CAA UAG AUC AUU AAU A-5'。序列中的“t”代表 2-O-甲基尿嘧啶核苷;“a”代表 2'-O-甲基腺嘌呤;“ps”代表硫代磷酸键。均为 life technologies 公司制备。将 siRNA 50 μ g 加入 DEPC 水 43.3 μ L 配置成 100 μ m siRNA 溶液,将 siRNA 加入 216.5 μ L 的 I-fect™ 转染试剂中,用枪头轻轻搅拌,使之均匀,在室温放置 5 min,使 siRNA 和转染试剂充分反应成有效的转染试剂 siRNA 复合物。

1.4.2.2 实验动物处理

两组大鼠 CFA 造模前分别给予 4 d 不同药物:

对照 siRNA 组给予对照 siRNA 和 MrgC siRNA 组给予 MrgC siRNA,第 4 天药后 CFA 造模,造模后隔日注射相应药物 3 次,剂量均为 5 μ g/d/10 μ L。

于鞘内置管前、给药前、给药 4 d (CFA 造模 0 h)、给药 5 d (CFA 造模 24 h)、给药 11 d (CFA 造模 7 d) 共计 5 个时点检测大鼠患侧足缩腿阈。

1.5 样本制备

大鼠行腹腔水合氯醛 350 mg/kg 麻醉,用于免疫荧光检测的大鼠生理盐水经心灌注后,再用 4% 多聚甲醛滴注,快速取得患侧 L4-L6 DRG,用 4% 多聚甲醛溶液固定 4 h,蔗糖溶液梯度脱水(15% 蔗糖溶液 24 h,30% 蔗糖溶液 48 h),经液氮速冻,放入 -80℃ 冰箱中保存备用。用于 PCR 的大鼠仅灌注生理盐水,冰上取患侧 L4-L6 DRG,立即置于 -80℃ 冰箱中保存备用。

1.6 指标检测

1.6.1 足缩腿阈(paw withdrawal thresholds,PWTs)

以患侧 PWTs 作为机械痛敏的评定值:测量前,将大鼠放置于透明塑料盒(69 cm $\times$ 17 cm $\times$ 14 cm)中适应 15 min。待大鼠安静后,将类似 Von Frey 丝的金属丝(φ 0.5 mm)置于大鼠足底正中(避开足垫),从 0 开始以 2.5 g/s 递增的强度刺激大鼠足底,直至引发大鼠缩足反射,记录此时刺激强度,连续测量 3 次,每次间隔 5 min,取平均值作为测定结果。设定最大刺激强度为 50 g,截止时间为 20 s,以免大鼠足爪损伤。

1.6.2 大鼠患侧 L4-L6 DRG 中的 MrgC mRNA 的表达

总 RNA 的提取:取出大鼠 L4-L6 DRG,加入 1 mL Trizol,冰上超声粉碎,室温静置 5 min,加入 200 μ L 氯仿,混匀后剧烈震荡,静置 15 min,4℃,11,440 r/min 离心 15 min,取上清液再加入 500 μ L 异丙醇,混匀后 4℃,11,440 r/min 离心 10 min,取沉淀加入 75% 乙醇 1 mL,用移液枪进行轻轻吹打,4℃,10,444 r/min 离心 5 min,待 RNA 沉淀干燥后,加入 0.1% DEPC 水溶解。紫外分光光度法检测 OD260/OD280 的比值,并计算其浓度。取该比值在 1.8~2.0 之间的 RNA 溶液进行后续实验

逆转录:采用含 DNA 酶消化步骤的 Takara 的逆转录试剂盒,按说明书操作,合成 cDNA:吸取 2 μ L 总 RNA 溶液、随机引物、RTmix (含 RNasin 和 DTT)、dNTP 混合液、DEPC 水按照逆转录体系比例配制反应体系。

定量 PCR: 采用 PRIMER5.0 软件设计引物, MrgC 上游引物: 5'-ACTCTGGCTCTTGGGATT-3', 下游引物: 5'-GAGGGACCGATGCTTTT-3'; 采用糖酵解反应中的甘油三磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 为内参^[13], 其上游引物: 5'-TGCTGAGTATGTCG TGGAG-3', 下游引物: 5'-GTCTTCTGAGTGGCAGTG AT-3', 均由上海生工生物技术有限公司合成。参照 BIORAD 试剂盒, 以 cDNA 为模板, GAPDH 为内参, 采用 SYBR Green 法在 20 μ L 反应体系中扩增 cDNA 样品。MrgC 与 GAPDH 的反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s, 然后 95 $^{\circ}$ C 5 s, 56 $^{\circ}$ C 30 s, 共 39 循环。设置溶解曲线检测产物反应的纯度 65 $^{\circ}$ C ~ 95 $^{\circ}$ C 5 s, 0.5 $^{\circ}$ C 步进。每次扩增的同时设置无 cDNA 的阴性对照, 每个样本设 3 个复孔。采用 $2^{-\Delta CT}$ 法进行计算, 结果以对照 siRNA 组基因表达量的倍率表示。

1.6.3 大鼠患侧 L4-L6 DRG 中 MrgC 和 p-PKC ϵ 的阳性细胞率的检测

采用贴片法, DRG 冰冻切片 (14 μ m), 贴于载玻片上, 室温晾干 1 h。用组化油笔将待染组织圈好, 1% PBS 浸洗 4 次, 每次 10 min。取出玻片, 滴加 10% 山羊血清 (1% PBS 稀释) 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。弃山羊血清, 加入 MrgC 抗体 (1:100) (p-PKC ϵ (1:2000)), 置湿盒中 4 $^{\circ}$ C 过夜。次日拿出湿盒, 放于 37 $^{\circ}$ C 孵育 45 min, 弃一抗, 1% PBS 浸洗 4 次, 每次 10 min。滴加羊抗兔 IgG (1:1000) (羊抗小鼠 IgG (1:1000)) 进行荧光标记, 37 $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h。弃二抗, 1% PBS 浸洗 4 次每次 10 min (避光)。晾干后滴加抗荧光淬灭封片液封片。设立阴性对照: 采用不含一抗的稀释液替代一抗, 其余条件不变。激光共聚焦显微镜下观察并拍片。以阴性对照为参考, 用 Ipp 6.0 软件进行细胞计数, 计算患侧 L4-L6 DRG 中总细胞数及阳性细胞数, 并计算 MrgC 与 p-PKC ϵ 阳性细胞的表达率。

1.7 统计结果

本实验数据采用 SPSS 19.0 进行统计, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较采用独立样本 T 检验; 均以 $P < 0.05$ 为差异显著的标准。

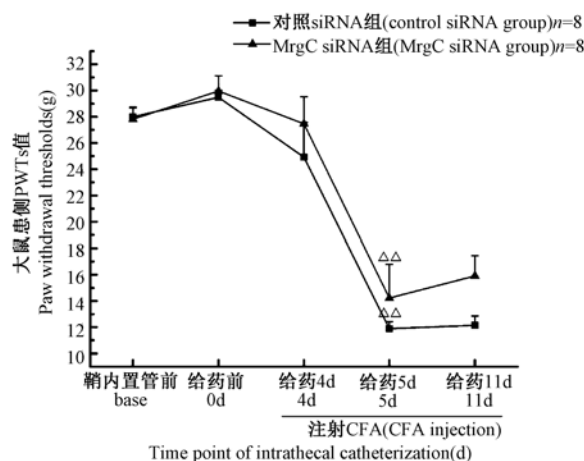
2 结果

2.1 鞘内注射 siRNA 对 CFA 大鼠 PWTs 的影响

笔者分别检测了鞘内置管前、给药前、给药 4 d

(CFA 造模 0 h)、给药 5 d (CFA 造模 24 h)、给药 11 d (CFA 造模 7 d) 共计 5 个时点的大鼠患侧 PWTs, 来评价大鼠机械痛阈, 将给药前的痛阈作为基础痛阈。

如图 1 所示, 鞘内置管术前、给药前两组大鼠之间患侧后足 PWTs 没有明显差异 ($P > 0.05$)。给药 4 d 后于大鼠 CFA 造模前 (CFA 造模 0 h) 检测两组 PWTs, MrgC siRNA 组的足缩腿阈较对照 siRNA 组有所上升, 但其差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。给药 5 d (CFA 造模后 24 h) 时, 可见两组 PWTs 较给药 4 d (CFA 造模 0 h) 均明显下降 ($P < 0.01$), MrgC siRNA 组的 PWTs 高于对照 siRNA 组, 两组间差异仍无统计学意义 ($P > 0.05$)。此趋势一直持续到给药第 11 天, 两组的 PWTs 均低于给药 4 d (CFA 造模 0 h) 的 PWTs, 但两组之间并无明显差异 ($P > 0.05$)。



注: 两组同时点比较, $P > 0.05$;

与 CFA 造模 0 h 比较, $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

图 1 两组大鼠在各时点 PWTs 变化情况

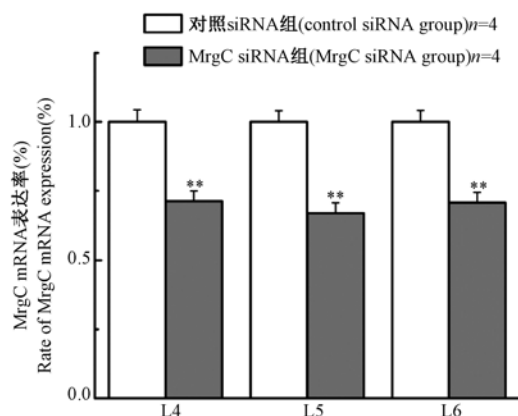
Note: Compared with control siRNA group,

** $P > 0.05$; 4d VS 5d, $\Delta\Delta P < 0.01$.

Fig. 1 The PWTs of two groups at different time points

2.2 鞘内注射 MrgC siRNA 对大鼠患侧 L4-L6 DRG 中 MrgC mRNA 表达的影响

分别检测给药 11 d 后两组大鼠患侧腰神经节 L4、L5、L6 的 MrgC mRNA 的表达量, 以对照 siRNA 组表达量的倍数作图, 结果见下图 2。如图中所示, MrgC siRNA 组患侧 L4、L5、L6 的 MrgC mRNA 表达量均低于对照 siRNA 组对应神经节的表达量 ($P < 0.01$, $P < 0.01$, $P < 0.01$), 分别为对照 siRNA 组表达量的 0.71、0.67、0.71 倍。



注: 对照 siRNA 组和 MrgC siRNA 组相比, ** $P < 0.01$ 。

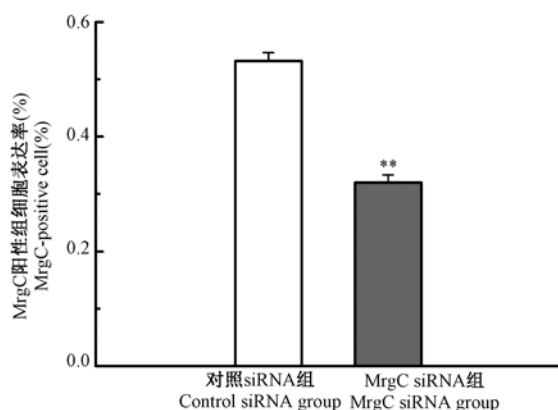
图 2 两组大鼠患侧 L4-L6 DRG MrgC 的 mRNA 表达量的变化

Note: compared with control siRNA group, ** $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Comparison of the expression of MrgC mRNA in ipsilateral DRG L4-L6 between two groups

2.3 鞘内注射 MrgC siRNA 对大鼠患侧 L4-L6 DRG 中 MrgC 受体表达的影响

如图 3 中所示, MrgC 主要表达在 DRG 的中小神经元中。分别检测给药 11d 后两组的 MrgC 表达变化, 与对照 siRNA 组比较, MrgC siRNA 组的 MrgC 阳性细胞率明显降低 ($P < 0.01$), 约为对照 siRNA 组的 60%。荧光结果见彩插 7 图 5。



注: 与组对照 siRNA 组相比, ** $P < 0.01$ 。

图 3 两组大鼠患侧 L4-L6 DRG MrgC 阳性细胞率的比较

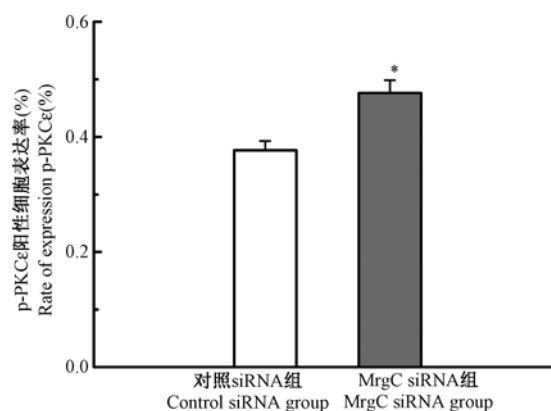
Note: compared with control siRNA group, ** $P < 0.01$ 。

Fig. 3 Rate of the expression of MrgC cells in L4-L6 ipsilateral DRG in each group

2.4 鞘内注射 MrgC siRNA 对大鼠患侧 L4-L6 DRG 中 p-PKC ϵ 阳性细胞率的影响

检测给药 11 d 后 L4-L6 DRG PKC ϵ Ser729 点位磷酸化的变化, 以 p-PKC ϵ 的阳性细胞率来评价。

结果如图 4, 与对照 siRNA 组比较, MrgC siRNA 组的 p-PKC ϵ 阳性细胞率明显升高 ($P < 0.05$), 约为对照 siRNA 组的 126%。荧光结果见彩插 7 图 6。



注: 于对照 siRNA 组相比, * $P < 0.05$ 。

图 4 两组大鼠患侧 DRG p-PKC ϵ 阳性细胞率的比较

Note: compared with control siRNA group, * $P < 0.05$ 。

Fig. 4 Rate of the expression of p-PKC in ipsilateral DRG of each group

3 讨论

MrgC 是 2001 年发现的一类新型的 G 蛋白偶联受体, 其基因仅仅高度表达于外周神经系统的 DRG 和三叉神经节的中小型感觉神经元中。研究发现 MrgC 参与慢性炎症引发的外周痛觉过敏的调制^[14]。但由于目前尚未发现 MrgC 特异性抑制剂, 未有直接的证据证实 MrgC 在慢性炎症痛发展过程中对疼痛的调制作用, 进一步的功能研究只能通过 siRNA 干扰 mRNA 表达或基因敲除。siRNA 干扰是指内源性或外源性小片段双链 RNA 与靶基因的 mRNA 同源互补, 在细胞内特异降解靶 mRNA, 从而特异性封闭靶基因的过程^[15]。研究报道, 脊髓鞘内给予 siRNA 能够通过转染脊髓背角浅层的初级传入神经纤维逆行至 DRG 发挥其干扰作用^[16]。本实验研究通过鞘内给予 siRNA, 观察到给药 11 d 时即 CFA 造模后第 7 天, MrgC siRNA 组别 DRG L4-L6 的 MrgC mRNA 的表达量均明显低于对照 siRNA 组相应神经节的表达量, 进一步观察发现 MrgC siRNA 组 MrgC 的表达明显降低, 约为对照 siRNA 组的 60%, 与 MrgC mRNA 变化相一致。这说明鞘内注射该 siRNA 片段有效的抑制 MrgC 基因及其蛋白的表达, 从而在 CFA 慢性炎症痛的基础上成功建立了 MrgC 基因沉默模型。

CFA 致炎性痛模型为一种经典的研究慢性炎

性痛的模型,单侧注射 CFA 诱导产生的痛觉过敏一般在 4 h 内发展,为炎性痛的急性期,24 h ~ 48 h 为慢性炎性痛早期,随后在 7 d 左右痛觉过敏有个小高峰,之后慢慢恢复。文献报道患侧的痛觉过敏可持续 4 ~ 6 周,而在健侧产生的炎性镜像痛一般在 18 d 以上^[11]。以往的研究多集中在 CFA 慢性炎性痛早期,Jiang^[14]等人发现在椎管内注射 MrgC 特异性激动剂牛肾上腺髓质 8-22 肽 (bovine adrenal medulla 8-22, BAM8-22) 不能够影响正常大鼠的基础痛阈和削弱 CFA 引发的早期机械痛觉过敏 (24 h),但能够削弱 CFA 引发的早期热痛觉过敏 (24 h)。与该研究的结果相一致的是,本研究 CFA 造模前鞘内给与 4 次 MrgC siRNA 干扰 (文献报道以 2 μ g/次剂量,4 次注射该 siRNA 片段能够使正常大鼠的 MrgC mRNA 表达量下降 50%^[12]),与对照 siRNA 组比较,没有显著的改变大鼠的机械痛阈。CFA 造模后 24 h,可见两组的 PWTs 较造模前均显著下降,提示 CFA 模型的成功建立。但继续给与 siRNA 干扰直至 CFA 第 7 天,两组间机械痛阈仍未见明显差异。这结果表明抑制 MrgC 的表达未能影响 CFA 引发的机械痛觉过敏。另有 Guan Y 等^[17]敲除 Mrg 基因家族 (含 MrgC 基因) 后鞘内注射 BAM8-22 能同时延缓 CFA 引起的早期机械痛觉过敏与热痛觉过敏 (24 h),该现象可能是由于同时沉默了除 MrgC 基因之外的 Mrg 基因家族成员而引发的。因为本研究没有观察干扰 MrgC 基因对于 CFA 引起的热痛觉过敏的影响,这将是我们的进一步研究的目标。

PKC 是一种重要的细胞内信号转导分子^[3],在损伤或炎症引起的慢性痛觉过敏启动与维持中起着重要的作用^[18],它的膜移位和磷酸化是 PKC 被激活的重要标志^[19]。Honan 等人基于正常大鼠的原痛研究发现,鞘内给予 MrgC 特异性激动剂 BAM8-22,应用全细胞膜片钳技术发现与热痛密切相关的辣椒素受体 (transient receptor potential vanilloid type 1, TRPV1) 敏化的神经元大约占 13% 的 DRG 神经元,这一效应被 PKC 特异性抑制剂 Ro-31-8220 所抑制^[6];有研究表明鞘内注射 BAM8-22 抑制了 CFA 诱发的脊髓背角膜上 PKC γ 的上升^[20]。以上研究提示 PKC 在 MrgC 对疼痛的调控中起着重要的作用。但是目前尚无 DRG 中 PKC 在 MrgC 对 CFA 诱发的慢性炎性痛调制过程功能性改变的研究。PKC 的亚基 ϵ 在 90% 以上的 DRG 中小直径神经元中表达,其 Ser729 点位磷酸化是 PKC ϵ 引发痛

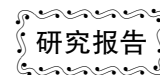
觉过敏的一个必要调节因素,本研究观察到在有效沉默 MrgC 基因后,PKC ϵ 的 Ser729 点位磷酸化水平明显上升,该结果提示抑制 DRG 中 PKC ϵ 的 Ser729 点位磷酸化从而抑制 PKC ϵ 功能性激活是 MrgC 调制 CFA 慢性炎性痛的重要细胞学机制。

综上所述,本研究在 CFA 慢性炎性痛的基础上成功地建立了 MrgC 基因沉默模型,该模型中对 MrgC 的抑制作用显著上调 PKC ϵ Ser729 磷酸化的水平,基于 PKC 是一个蛋白激酶,它激活了多种与疼痛密切相关的伤害性感受器,如 TRPV1,下一步的研究将围绕着 MrgC/PKC 深入展开。

参考文献:

- [1] Dong X, Han S, Zylka M J, *et al.* A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons[J]. *Cell*, 2001, 106(5): 619 - 632.
- [2] Lembo P M, Grazzini E, Groblewski T, *et al.* Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs[J]. *Nat Neurosci*, 2002, 5(3): 201 - 209.
- [3] 刘峰,田玉科. PKC γ 的功能概述[J]. *医学综述*, 2010(5): 656 - 658.
- [4] 王远胜,胡兴国. 蛋白激酶 C 与疼痛的中枢敏感化[J]. *国外医学. 麻醉学与复苏分册*, 2002(2): 108 - 111.
- [5] Liao G Y, Wagner D A, Hsu M H, *et al.* Evidence for direct protein kinase-C mediated modulation of N-methyl-D-aspartate receptor current[J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 59(5): 960 - 964.
- [6] Honan S A, McNaughton P A. Sensitisation of TRPV1 in rat sensory neurones by activation of SNSRs [J]. *Neuroscience Letters*, 2007, 422(1): 1 - 6.
- [7] 章沿锋,张小洛,姚尚龙. 大鼠三种鞘内置管术的效果比较[J]. *中华麻醉学杂志*, 2010, 30(2): 252 - 254.
- [8] 邓亚南,刘艳芳,陈建平,等. 经大鼠腰骶部鞘内置管给药技术的研究[J]. *中国医学创新*, 2014(18): 33 - 35.
- [9] Yaksh T L, Rudy T A. Chronic catheterization of the spinal subarachnoid space[J]. *Physiol Behav*, 1976, 17(6): 1031 - 1036.
- [10] Poon Y Y, Chang A Y, Ko S F, *et al.* An improved procedure for catheterization of the thoracic spinal subarachnoid space in the rat[J]. *Anesth Analg*, 2005, 101(1): 155 - 160.
- [11] De Castro C M, De Sutter P, Gybels J, *et al.* Adjuvant-induced arthritis in rats: a possible animal model of chronic pain[J]. *Pain*, 1981, 10(2): 173 - 185.
- [12] He S Q, Li Z, Chu Y X, *et al.* MrgC agonism at central terminals of primary sensory neurons inhibits neuropathic pain [J]. *Pain*, 2014, 155(3): 534 - 544.
- [13] Du J, Fang J, Liang Y, *et al.* Electroacupuncture attenuates mechanical allodynia by suppressing the spinal JNK1/2 pathway in a rat model of inflammatory pain[J]. *Brain Res Bull*, 2014, 108: 27 - 36.

- [14] Jiang J, Wang D, Zhou X, *et al.* Effect of Mas-related gene (Mrg) receptors on hyperalgesia in rats with CFA-induced inflammation via direct and indirect mechanisms [J]. Br. J. Pharmacol, 2013, 170 (5): 1027 – 1040.
- [15] Fire A, Xu S, Montgomery M K, *et al.* Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391 (6669): 806 – 811.
- [16] Luo M C, Zhang D Q, Ma S W, *et al.* An efficient intrathecal delivery of small interfering RNA to the spinal cord and peripheral neurons [J]. Mol Pain, 2005, 1: 29.
- [17] Guan Y, Liu Q, Tang Z, *et al.* Mas-related G-protein-coupled receptors inhibit pathological pain in mice [J]. PNAS, 2010, 107 (36): 15933 – 15938.
- [18] Mochly-Rosen D, Das K, Grimes K V. Protein kinase C, an elusive therapeutic target? [J]. Nat rev drug discov, 2012, 11 (12): 937 – 957.
- [19] Kang J, Toita R, Kim C W, *et al.* Protein kinase C (PKC) isozyme-specific substrates and their design [J]. Biotechnol. Adv, 2012, 30 (6): 1662 – 1672.
- [20] 吕庆琴. 大鼠 MrgC 受体抑制 CFA 诱发炎性疼痛的细胞学机制 [D]. 福建师范大学, 2013.
- [修回日期] 2015-07-02



白金胶囊对 CUMS 诱导的抑郁症大鼠模型行为学及脑内单胺类神经递质的影响

张 荣¹, 董世芬¹, 倪博然², 王志清¹, 倪 健¹, 孙建宁¹

(1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100102; 2. 北京中医药大学基础医学院, 北京 100029)

【摘要】 目的 观察白金胶囊对慢性不可预知温和应激(CUMS)致抑郁症大鼠模型行为学及脑内单胺类神经递质的影响。**方法** 采用慢性不可预知温和应激结合孤养的方法建立抑郁症大鼠模型,造模 7 周后,采用白金胶囊(12.6 g/kg、4.2 g/kg、1.4 g/kg)和盐酸氟西汀(3.5 mg/kg)连续灌胃 4 周进行治疗,给药期间继续实施应激方案,共计 11 周,另设正常对照组,常规饲养。监测糖水偏嗜度、以及动物在旷场中的水平运动、垂直运动等行为学指标;实验终点,采用高效液相-电化学法测定大鼠脑皮层、海马部位单胺类神经递质(5-HT、DA、NE 及其代谢产物)的水平。**结果** 与正常对照组比较,模型大鼠造模 7 周后,体重、糖水消耗百分比、旷场水平运动和垂直活动明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,白金胶囊连续给药 4 周后,各剂量可显著增加糖水消耗百分比,旷场水平运动距离和垂直运动次数($P < 0.05$, $P < 0.01$),改善抑郁动物行为学;可升高抑郁模型脑皮层中 5-HT、DA 以及 NE 的含量($P < 0.05$)。**结论** 白金胶囊可改善 CUMS 致抑郁症大鼠模型的行为学异常,作用机制可能与增加脑皮层中单胺类神经递质含量有关。

【关键词】 白金胶囊;抑郁症;慢性不可预知温和应激;神经递质

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0046-07

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.010

The pharmacodynamic research of baijin capsule on depression in chronic unpredictable mild stress rats

ZHANG Rong¹, DONG Shi-fen¹, NI Bo-ran², WANG Zhi-qing¹, NI Jian¹, SUN Jian-ning¹

(1. School of Chinese MateriaMedica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China;

2. School of Basic Medical Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

【Abstract】 Objective To evaluate the effects of baijin capsule on behavioral changes and monoamine neurotransmitters concentration in chronic unpredictable mild stress (CUMS) depression rat model. **Methods** The depression rat model was induced by 11-week chronic unpredictable mild stress combining with solitary. After the model were established, rats were given the decoction of baijin capsule (12.6 g/kg, 4.2 g/kg, 1.4 g/kg) or fluoxetine hydrochloride (3.5 mg/kg) by intragastric for 4 weeks. During the experiment period, sucrose consumption and open-field experiment were conducted to monitor the behavior of rats, such as sucrose consumption percentage, horizontal motion, and vertical motion. At the end of the experiment, the levels of the monoamine neurotransmitters in the cerebral cortex and hippocampus were analyzed by method of high performance liquid chromatography-electrochemistry. **Results** Compared

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目(81173563);国家“重大新药创制”科技重大专项(2012ZX09103201-026);北京中医药大学在读研究生资助项目(2015-JYB-XS084)。

【作者简介】 张荣(1990-),女,硕士生,研究方向:中药神经精神药理研究。

【通讯作者】 孙建宁(1952-),女,教授,博士生导师,研究方向:中药防治重大疾病创新药物研究, E-mail: jn_sun@sina.com。

with the normal group, the weight, horizontal displacement distance, vertical movement times, and sucrose consumption percentage of rats in model group decreased significantly after stimulated with CUMS and solitary for 7 weeks ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with model group, consecutively administrated for 4 weeks, horizontal displacement distance, vertical movement times, and the percentage in sugar water consumption significantly increased with the treatment of baijin capsule ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Meanwhile, the content of norepinephrine (NE), dopamine (DA), and 5-hydroxytryptamine (5-HT) in the cortex were significantly increased in rats of the baijin capsule ($P < 0.05$). **Conclusions** The results indicated that baijin capsule improved the behavioral disturbances in depression rat model, which were related to enhancement of the concentration of monoamine neurotransmitters in the cortex.

【Key words】 Baijin capsule; Depression; Chronic unpredictable mild stress; Neurotransmitter

随着现代社会竞争压力的增加,抑郁症发病率也呈逐年上升趋势。世界卫生组织(WHO)报道,2012 年全球患有抑郁症的人数达到 3.5 亿。到 2020 年,抑郁症将成为全球导致残疾的第二大因素^[1],抑郁症已经成为危害世界公众健康的高发疾病之一^[2]。

单胺类递质假说是迄今研究最多最深入的抑郁症发病机制之一,该假说认为脑内 5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)、多巴胺(dopamine, DA)、去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)等神经递质含量不足或功能低下可导致抑郁^[3]。临床抑郁症治疗多采用三环类(TCAs)、选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)、5-羟色胺和去甲肾上腺素再摄取双重抑制剂(SNRIs)等,其抗抑郁机制以 5-HT、NE 和 DA 等单胺受体为靶标,副作用较多^[4],如 SNRIs 类药物可引发患者头晕、恶心;四环类更易引发头痛等缺点^[5-6]。因此,研究开发副作用小,疗效好的抗抑郁药具有重要的意义。

白金胶囊是由白芍、合欢花、郁金等四味中药组成,具有解郁安神的功效,临床上主要用于治疗抑郁症等疾病^[7]。本研究采用慢性不可预知温和应激(chronic unpredictable mild stress, CUMS)结合孤养的方法建立抑郁症大鼠模型,给予白金胶囊和选择性 5-羟色胺再摄取抑制剂盐酸氟西汀治疗,并在治疗过程中对大鼠行为学进行动态监测,治疗结束后应用高效液相-电化学法分析海马、脑皮层中神经单胺类物质 5-HT、NE、DA 及其代谢产物的含量,以期阐明白金胶囊的抗抑郁作用机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠,72 只,雌雄各半,体重 120 ~ 150 g,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供【SCXK(京)2012 ~ 0001】,实验动物使用许可证号

【SYXK(京)2011 ~ 0024】,室温为 $(23 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度为 $(65 \pm 5)\%$,实验前动物适应性饲养 1 周,自由摄取食水。

1.2 药品与试剂

受试药:白金胶囊,黄色粉末,由北京中医药大学中药制剂系提供,临床人用量为 0.6 g/kg,大鼠受试剂量根据临床人用量分别设为 12.6 g/kg,4.2 g/kg,1.4 g/kg,其中 4.2 g/kg 为临床等效剂量;阳性对照药:盐酸氟西汀分散片,PATHÉON FRANCE 有限公司产品,批号 4086A,大鼠灌胃给药剂量为 3.5 mg/kg。上述药物临用时以水配成所需浓度的混悬液,均灌胃(i.g.)给药。

5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT),批号 # 030M12681V;5-羟吲哚乙酸(5-hydroxy-indole-acetic acid, 5-HIAA),批号 # BCBL9722V;去甲肾上腺素(norepinephrine, NE),批号 SLBF3808V;多巴胺(dopamine, DA),批号 P500090;3,4-二羟苯乙酸(3,4-dihydroxyphenyl-acetic acid, DOPAC),批号 1451791V,高香草酸(homovanillic acid, HVA),批号 306081;以上试剂为标品,仅供含量测定用;均购自 SIGMA 公司。甲醇为色谱纯(Thermo Fisher Scientific, USA),其他试剂为分析纯。

1.3 主要仪器

Alliance 2695 高效液相色谱仪, ECD2465 电化学检测器,玻碳工作电极和银/氯化银(Ag/AgCl)参比电极, JY88-IIIN 超声细胞粉碎机。色谱柱为 Atlantis C18($3\ \mu\text{m}$, $2.1\ \text{mm} \times 150\ \text{mm}$)。循环水式多用真空泵, Heraeus Fresco 21 高速冷冻离心机, PHS-3B 精密 PH 计, JA1103N 分析天平,自制敞箱($80\text{cm} \times 80\text{cm} \times 40\text{cm}$),小动物行为分析系统(Ethovision XT 9)。

1.4 动物分组及给药

大鼠置于自然昼夜节律光照条件下,适应性饲养 1 周,6 只/笼。1 周后根据体重和旷场实验结果

随机分为正常对照组和应激模型组,正常对照组大鼠 6 只/笼,模型组大鼠均单笼饲养。模型组大鼠造模 7 周后,按体重和旷场实验结果随机分为应激模型组,模型 + 盐酸氟西汀组,模型 + 白金胶囊高、中、低剂量组,动物仍保持单笼饲养,正常对照组大鼠饲养方式不变。

造模第 8 周开始,进行灌胃给药,正常对照组和应激模型组每日灌胃蒸馏水,模型 + 盐酸氟西汀组每日灌胃盐酸氟西汀 3.5 mg/kg,模型 + 白金胶囊高、中、低剂量组每日灌胃白金胶囊溶液(12.6 g/kg、4.2 g/kg、1.4 g/kg),给药体积 10 mL/kg,连续给药 4 周。

1.5 动物模型的建立

根据 Katz、Willner^[8-9] 的应激方法稍作改动。应激方法如下:禁食(24 h)、禁水(24 h)、夹尾(1 min)、热应激(45℃,5 min)、潮湿垫料(24 h)、昼夜颠倒(24 h)、冰水游泳(4℃,5 min)、常温游泳(23℃,10 min)。除对照组外,应激组大鼠每天被迫接受应激,每日 1 种应激,连续处理 11 周。于实验前随机抽取每日刺激方式,避免同一种应激方式连续使用。

1.6 行为学检测

1.6.1 体重测定

分别在大鼠分组前、造模 3 周、7 周以及 11 周对大鼠进行体重测定。

1.6.2 旷场实验

将动物置于高 40 cm,边长 80 cm,四周及底部均为黑色的封闭方形旷场中心位置,适应 5 min 后,用摄像系统观察并记录动物在旷场内 5 min 的行为表现,包括水平活动距离,垂直运动次数,其中水平活动距离可以通过行为学分析系统获得数据。分别于大鼠分组前、造模 3 周、7 周以及 11 周对大鼠进行水平运动和垂直运动的测定。

1.6.3 糖水消耗实验

开始造模前 1 周对大鼠进行 1% 糖水偏好训

练。于造模开始前进行第 1 次糖水偏好度测试。糖水偏好训练和测试均于大鼠禁水 22 h 后,测定 2 h 内饮用量(中途 1 h 时交换瓶子位置)。计算糖水偏好度,计算公式如下:

$$\text{糖水偏好度}(\%) = \frac{\text{糖水消耗}}{\text{总液体消耗}} \times 100\%$$

1.7 脑组织单胺类递质的检测

各组大鼠末次给药 30 min 后处死,冰上迅速剥离大脑皮层和海马部位,称重后加入 500 μ L 0.1 mol/L HClO_4 (含 0.3 mmol/L Na_2EDTA , 0.5 mmol 无水亚硫酸钠,4℃预冷),超声匀浆,10000 r/min 高速离心 10 min,取上清 200 μ L,10000 r/min 再次离心 10 min,取 20 μ L 进样检测单胺类神经递质及其主要代谢产物的浓度,包括 5-HT, 5-HIAA, DA, HVA, DOPAC, NE。待测样品于 -80℃ 保存。

1.8 统计学处理

所有结果用以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。统计分析软件为 SPSS 17.0,采用单因素方差分析(one-way ANOVA)统计,用 LSD 检验比较两组间的差异。

2 结果

2.1 CUMS 实施 0 周、3 周以及 7 周的行为学研究结果

2.1.1 CUMS 实施 0 周、3 周以及 7 周大鼠体重变化结果

与正常对照组相比,实验第 3 周,模型组大鼠体重无显著差异;实验第 7 周时,模型大鼠的体重显著降低($P < 0.01$),结果见表 1。

2.1.2 CUMS 实施 0 周、3 周以及 7 周大鼠糖水偏好度变化结果

与正常对照组相比,实验第 3 周模型组大鼠糖水偏好度无显著差异,造模 7 周时,模型组大鼠糖水偏好度明显降低($P < 0.01$),提示 CUMS 实施 7 周后已引起动物快感缺失的症状,结果见表 2。

表 1 CUMS 实施 0 周、3 周以及 7 周大鼠体重变化结果

Tab. 1 The body weight changes of rats with CUMS induction at the week 0, 3, 7

组别 Groups	例数 N	体重 Weight(g)		
		0 周 Week 0	3 周 Week 3	7 周 Week 7
正常组 Control	12	170.90 $\pm$ 12.54	238.90 $\pm$ 29.98	344.92 $\pm$ 78.76
模型组 Model	60	170.49 $\pm$ 10.28	230.52 $\pm$ 25.67	262.98 $\pm$ 35.83**

注:与对照组相比,** $P < 0.01$ 。

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

2.1.3 CUMS 实施 0 周、3 周以及 7 周大鼠旷场水平运动和垂直运动变化结果

与正常对照组相比,实验第 7 周时,模型组大鼠水平运动和垂直运动显著降低 ($P < 0.01$),提示 CUMS 复制抑郁大鼠模型成功,已引起动物的抑郁症状如自主活动减少、对外界新鲜环境探知欲望降低等,结果见表 3。

2.2 白金胶囊干预对 CUMS 致抑郁症大鼠模型行为学的影响

2.2.1 白金胶囊干预对 CUMS 致抑郁症大鼠模型体重、糖水偏嗜度的影响

研究报道,慢性应激造模成功后,即使 3 周不进行应激刺激,动物仍保持行为学异常^[10]。为避免动物在治疗期间自行恢复,对模型动物进行为期 4 周的治疗过程中,除正常对照组外,其余各组仍然进行应激刺激。结果显示,与正常对照组相比,造模

11 周后,模型组大鼠的体重、糖水百分比持续降低 ($P < 0.05, P < 0.01$);与模型组相比,白金胶囊给药 4 周后,12.6 g/kg、4.2 g/kg 以及 1.4 g/kg 组可显著升高抑郁模型大鼠糖水偏嗜度 ($P < 0.05, P < 0.01$),但对大鼠体重无显著影响,结果见表 4。

2.2.2 白金胶囊干预对 CUMS 致抑郁症大鼠模型旷场水平运动和垂直运动的影响

结果显示,与正常对照组相比,造模 11 周后,模型组大鼠水平运动距离、垂直运动次数仍表现为降低 ($P < 0.01$),提示该模型持续保持抑郁状态^[8]。与模型组相比,白金胶囊给药 4 周后,12.6 g/kg、4.2 g/kg 以及 1.4 g/kg 组可改善抑郁模型大鼠水平运动距离缩短、垂直运动次数减少行为学指标,有显著性差异 ($P < 0.01$),提示白金胶囊具有抗抑郁作用,结果见表 5。

表 2 CUMS 实施 0 周、3 周以及 7 周大鼠糖水偏嗜度变化结果

Tab. 2 The sucrose percentage changes of rats with CUMS induction at the week 0, 3, 7

组别 Groups	例数 N	糖水偏嗜度 Sucrose percentage(%)		
		0 周 Week0	3 周 Week 3	7 周 Week 7
正常组 Control	12	75.97 ± 6.22	74.76 ± 9.29	68.63 ± 13.27
模型组 Model	60	72.77 ± 11.06	64.66 ± 25.86	43.60 ± 23.64**

注:与对照组相比,** $P < 0.01$ 。

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

表 3 CUMS 实施 0 周、3 周以及 7 周大鼠旷场水平运动和垂直运动变化结果

Tab. 3 The changes of horizontal motion and vertical motion of rats with CUMS induction at the week 0, 3, 7

组别 Groups	例数 N	水平运动 Horizontal motion(cm)			垂直运动 Vertical motion(n)		
		0 周 Week 0	3 周 Week 3	7 周 Week 7	0 周 Week 0	3 周 Week 3	7 周 Week 7
正常组 Control	12	2798.74 ± 576.43	2929.27 ± 1188.32	3059.91 ± 425.08	12.35 ± 5.34	12.50 ± 6.56	14.83 ± 3.95
模型组 Model	60	2754.44 ± 695.34	2876.07 ± 1349.13	1155.32 ± 630.31**	12.11 ± 5.23	10.04 ± 4.62	4.95 ± 2.41**

注:与对照组相比,** $P < 0.01$ 。

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

表 4 白金胶囊干预对 CUMS 致抑郁症大鼠模型体重、糖水偏嗜度的影响

Tab. 4 The effects of baijin capsule on weight, sucrose percentage indepression rat model induced by CUMS

组别 Groups	剂量 Dose(g/kg)	体重 Weight(g)	糖水偏嗜度 Sucrose percentage(%)
正常对照 Control	—	366.92 ± 89.63 *	81.05 ± 8.37 **
模型 Model	—	293.17 ± 57.36	42.83 ± 21.58
氟西汀 Fluoxetine	0.0035	296.33 ± 60.60	79.81 ± 18.91 **
	12.6	287.83 ± 59.91	69.34 ± 26.07 *
白金胶囊 Baijin capsule	4.2	309.25 ± 56.43	73.79 ± 17.88 **
	1.4	294.08 ± 56.28	66.63 ± 16.72 **

注:与模型组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the model group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 5 白金胶囊干预对 CUMS 致抑郁症大鼠模型旷场水平运动和垂直运动的影响
Tab.5 The effects of Baijin capsule on horizontal motion, vertical movement in depression rat model induced by CUMS

组别 Groups	剂量 Dose(g/kg)	水平运动 Horizontal motion(cm)	垂直运动 Vertical movement(n)
正常对照 Control	—	2989. 95 ± 859. 51 **	13. 27 ± 3. 41 **
模型 Model	—	669. 97 ± 333. 21	1. 60 ± 1. 35
氟西汀 Fluoxetine	0. 0035	2407. 29 ± 564. 88 **	13. 18 ± 5. 86 **
	12. 6	1865. 93 ± 478. 16 **	15. 20 ± 7. 84 **
	4. 2	2061. 79 ± 927. 28 **	13. 80 ± 4. 44 **
	1. 4	2002. 25 ± 907. 30 **	11. 04 ± 3. 89 **

注:与模型组相比, ** $P < 0. 01$ 。
Note: Compared with the model group, ** $P < 0. 01$.

2.3 白金胶囊干预对 CUMS 致抑郁症大鼠模型脑内单胺类神经递质的影响

2.3.1 白金胶囊干预对 CUMS 致抑郁症大鼠模型脑皮层单胺类神经递质的影响

与正常对照组相比,模型组大鼠脑皮层 5-HT、

DA、NE 的含量明显降低 ($P < 0. 05$);与模型组相比,白金胶囊 4. 2 g/kg 剂量组可显著升高抑郁大鼠脑皮层中 5-HT、DA 以及 NE 的含量 ($P < 0. 05$, $P < 0. 01$), 1. 4 g/kg 剂量组可显著升高抑郁大鼠脑皮层中 5-HT 和 DA 的含量 ($P < 0. 05$), 结果见表 6。

表 6 白金胶囊干预对 CUMS 致抑郁症大鼠模型脑皮层单胺类神经递质的影响
Tab.6 The effects of baijin capsule on monoamine neurotransmitters concentration in cerebral cortex in depression rat model induced by CUMS

组别 Groups	剂量 Dose(g/kg)	例数 N	5-羟色胺 5-HT(ng/g)	5-羟吲哚乙酸 5-HIAA(ng/g)	多巴胺 DA(ng/g)	去甲肾上腺素 NE(ng/g)
正常对照 Control	—	10	407. 04 ± 114. 63 *	149. 71 ± 20. 47	1075. 90 ± 385. 94 *	169. 61 ± 47. 40 *
			297. 58 ± 82. 06	143. 53 ± 11. 22	604. 31 ± 163. 47	133. 10 ± 22. 53
模型 Model	—	10	462. 73 ± 122. 81 **	154. 59 ± 41. 15	1163. 66 ± 438. 68 *	166. 33 ± 18. 91 **
			345. 07 ± 125. 93	148. 46 ± 43. 30	833. 03 ± 343. 19	154. 14 ± 42. 91
氟西汀 Fluoxetine	0. 0035	10	410. 66 ± 101. 20 *	147. 50 ± 21. 14	1087. 54 ± 347. 78 *	176. 60 ± 40. 40 *
	12. 6	10	416. 30 ± 153. 19 *	129. 29 ± 23. 27	864. 22 ± 218. 44 *	140. 23 ± 45. 40

注:与模型组相比, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$ 。
Note: Compared with the model group, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$.

2.3.2 白金胶囊干预对 CUMS 致抑郁症大鼠模型海马单胺类神经递质的影响

与正常对照组相比,模型组大鼠海马中 5-HT 和 5-HIAA 的含量明显降低 ($P < 0. 05$, $P < 0. 01$);与

模型组相比,白金胶囊 4. 2 g/kg 剂量组可升高抑郁大鼠海马中 5-HIAA 的含量 ($P < 0. 05$), 结果见表 7。

表 7 白金胶囊干预对 CUMS 致抑郁症大鼠模型海马单胺类神经递质的影响
Tab.7 The effects of baijin Capsule on monoamine neurotransmitters concentration in hippocampus in depression rat model induced by CUMS +

组别 Groups	剂量 Dose(g/kg)	例数 N	5-羟色胺 5-HT(ng/g)	5-羟吲哚乙酸 5-HIAA(ng/g)
正常对照 Control	—	10	226. 15 ± 54. 27 **	105. 82 ± 17. 81 *
模型 Model	—	10	137. 87 ± 26. 08	80. 38 ± 15. 86
氟西汀 Fluoxetine	0. 0035	10	179. 98 ± 56. 60	123. 02 ± 44. 59 *
	12. 6	10	120. 16 ± 21. 92	85. 80 ± 28. 63
白金胶囊 Baijin capsule	4. 2	10	140. 39 ± 20. 27	114. 28 ± 37. 29 *
	1. 4	10	132. 09 ± 27. 90	98. 28 ± 26. 01

注:与模型组相比, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$ 。
Note: Compared with the model group, * $P < 0. 05$, ** $P < 0. 01$.

3 讨论

抑郁症是一种以心境低落、兴趣缺失为主要特征的情感障碍疾病,具有患病率高、复发率高、致残率高和致死率高等特点,被称为“第一心理杀手”。因此,国内外学者们对抑郁症的研究越来越受到重视,准确可靠的疾病动物模型对药物的治疗效果的评价有重要的意义,而且有益于揭示抑郁症的发病机制。

CUMS 模型是由 Willner 提出,模型中应激源不可预知性和多样性是造模成功的关键,并且应激因子强度较低,与实际生活中长期遭受低水平应激导致的抑郁症病理生理机制相似。此外,此模型具有较高的有效性,可持续时间较长,并且抗抑郁药物在该模型的治疗时程与临床抑郁患者的治疗时程相似(通常为 2~5 周)^[11]。因此该模型被广泛用于抑郁症病理机制以及抗抑郁药物的研究。

大鼠对糖水消耗量反映了对奖赏系统的反应性,本实验造模 7 周后,模型大鼠糖水偏嗜度明显降低,表现出了临床抑郁症患者的核心症状—快感缺失^[12-14]。旷场实验常用来评价应激的有效性,其中水平运动反映了模型的自主活动性,垂直运动反映了模型对外界新鲜环境的探知欲望,实验结果显示,造模 7 周后,与正常对照组比较,模型大鼠水平运动距离以及垂直运动次数显著降低,表明抑郁动物模型自主活动减少,探知欲望降低,说明慢性不可预知应激模型可成功复制抑郁症。研究表明大多数抗抑郁药物可逆转上述行为学,而无抗抑郁作用的药物对该行为学无效^[8],模型大鼠经过 4 周治疗显示,白金胶囊可逆转上述模型大鼠行为学改变,提示白金胶囊具有抗抑郁作用。

海马和皮层是调节情绪的重要脑区,也是参与下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴监管系统和应激反射的大脑结构^[15]。应激导致抑郁大鼠皮层和海马 5-HT、DA 等多种神经递质以及受体失调^[16],还能引起结构和功能的改变。研究表明,慢性应激可导致大鼠海马锥体细胞树突总长度缩短和树突分支减少,伴随着突触神经元可塑性损伤和认知功能障碍;而前额皮质突触形态改变比海马更明显,显然,慢性应激也会引起前额皮质锥体细胞树突缩短,前额皮质突触蛋白基因上调^[17]。抑郁症患者海马体积缩小、神经元损伤,皮层厚度、灰质密度减少。总之,应激引起海马和皮质结构与功能变化是抑郁症

发生的重要因素。

5-HT 是脑内重要的单胺类神经递质,主要参与 5-HT 主要参与情绪、体温、摄食、认知、睡眠等功能的调控作用^[18-20]。5-HT 耗竭能使抑郁病情加剧,且 5-HT 含量降低程度与病情的严重程度成正比。大量临床研究发现,抑郁患者脑内以及慢性应激动物模型海马、前额叶皮质中腺苷酸环化酶(AC)活性降低,cAMP 和 PKA 水平降低,从而导致 cAMP 信号通路下调;大多数一线抗抑郁药物如氟西汀、帕罗西汀等通过作用于 5-HT_{1A}受体,减少突触前膜 5-HT 的释放,增加突触后膜 5-HT 受体敏感性,升高突触间隙 5-HT 水平,上调 cAMP 信号通路,达到抗抑郁作用,由于突触前膜 5-HT_{1A}自受体对 5-HT 系统负反馈调节,从而造成起效时间延迟^[21],致使在 2~4 周后才发挥抗抑郁作用,这不仅导致抑郁病情不能得到及时的改善,长期服用这些西药还会产生严重的副作用,甚至增加患者自杀的几率^[22]。DA 既是儿茶酚胺类递质,又是奖赏系统中最关键的递质,主要参与情感、运动、摄食和体重多个环节的调控^[23]。有研究表明,应激可导致动物伏隔核、海马以及前额叶 DA、DOPAC、HVA 含量下降以及多巴胺 D₂受体、多巴胺 D₃受体表达下调;还能增加动物对精神类药物的依赖性。中药作用靶点多,不仅可以增加 5-HT、DA 系统功能达到抗抑郁作用,还能通过调控 HPA 轴、脑源性神经生长因子进行抗抑郁,副作用小,成为研究的重点。

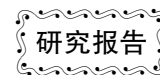
本研究中,遭受应激的大鼠脑皮层中 5-HT、DA、NE 以及海马组织中 5-HT、5-HIAA 的含量显著降低,而经过 4 周治疗后,白金胶囊可显著升高大鼠皮层中 5-HT、DA 以及 NE 的含量。研究表明,5-HT 可影响 DA 神经元的活性,增加 DA 的含量,并且 DA 以及受体分布密集的脑区也发现有大量 5-HT 受体存在^[24],因此推测白金胶囊抗抑郁作用机制可能与影响中枢 5-HT 能神经系统作用,增加皮层单胺类神经递质 5-HT、DA 以及 NE 的含量有关。

参考文献:

- [1] Slattery DA, Markou A, Cryan JF. Evaluation of reward processes in an animal model of depression [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 2007, 190(4):555-568.
- [2] Sartorius N. The economic and social burden of depression [J]. *J Clin Psychiatry*, 2001, 62(15): 8-11.
- [3] Holmes A, Heilig M, Rupniak NM, *et al.* Neuropeptide systems as novel therapeutic targets for depression and anxiety disorders [J]. *Trends PharmacolSci*, 2003, 24(11): 580-588.

- [4] 李涛. 抗抑郁药物的作用机理与研究进展 [J]. 齐鲁药事, 2010, 29(8): 481–483.
- [5] Anderson HD, Pace WD, Libby AM, *et al.* Rates of 5 common antidepressant side effects among new adult and adolescent cases of depression: a retrospective US claims study [J]. Clin Ther, 2012, 34(1): 113–123.
- [6] Mark TL, Joish VN, Hay JW, *et al.* Antidepressant use in geriatric populations: the burden of side effects and interactions and their impact on adherence and costs [J]. Am J Geriatr Psychiatry, 2011, 19(3): 211–221.
- [7] 张慧, 付京, 陈杨, 等. 正交试验法优化白金胶囊中白芍的提取工艺 [J]. 中国中医药信息杂志, 2014, 21(7): 64–66.
- [8] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression [J]. Neurosci Biobehav Rev, 1981, 5(2): 247–251.
- [9] 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(3): 358–364.
- [10] 许晶, 李晓秋. 慢性应激抑郁模型的建立及其评价 [J]. Chinese Journal of Behavioral Medical Science, 2003, 12(1): 14–17.
- [11] Yan HC, Cao X, Das M, *et al.* Behavioral animal models of depression [J]. Neurosci Bull, 2010, 26(4): 327–337.
- [12] Zhou J, Li L, Tang S, *et al.* Effects of serotonin depletion on the hippocampal GR/MR and BDNF expression during the stress adaptation [J]. Behav Brain Res, 2008, 195(1): 129–138.
- [13] Henningsen K, Andreassen JT, Bouzinova EV, *et al.* Cognitive deficits in the rat chronic mild stress model for depression: relation to anhedonic-like responses [J]. Behav Brain Res, 2009, 198(1): 136–141.
- [14] Sun JD, Liu Y, Yuan YH, *et al.* Gap junction dysfunction in the prefrontal cortex induces depressive-like behaviors in rats [J]. Neuropsychopharmacology, 2012, 37(5): 1305–1320.
- [15] Bremner JD. Traumatic stress: effects on the brain [J]. Dialogues Clin Neurosci, 2006, 8(4): 445–461.
- [16] Arnsten AF. Stress signalling pathways that impair prefrontal cortex structure and function [J]. Nat Rev Neurosci, 2009, 10(6): 410–422.
- [17] Müller HK, Wegener G, Popoli M, *et al.* Differential expression of synaptic proteins after chronic restraint stress in rat prefrontal cortex and hippocampus [J]. Brain Res, 2011, 1385: 26–37.
- [18] Nichols DE, Nichols CD. Serotonin receptors [J]. Chem Rev, 2008, 108(5): 1614–1641.
- [19] Berger M, Gray JA, Roth BL. The expanded biology of serotonin [J]. Annu Rev Med, 2009, 60: 355–366.
- [20] Feijó Fde M, Bertoluci MC, Reis C. Serotonin and hypothalamic control of hunger: a review [J]. Rev Assoc Med Bras, 2011, 57(1): 74–77.
- [21] Qin JJ, Chen HX, Zhao N, *et al.* The role of activation of the 5-HT_{1A} receptor and adenylyl cyclase in the antidepressant-like effect of YL-0919, a dual 5-HT_{1A} agonist and selective serotonin reuptake inhibitor [J]. Neurosci Lett, 2014, 582: 104–108.
- [22] Coupland C, Dhiman P, Morriss R, *et al.* Antidepressant use and risk of adverse outcomes in older people: population based cohort study [J]. BMJ, 2011, 343: d4551.
- [23] Yen HH, Roseberry AG. Decreased consumption of rewarding sucrose solutions after injection of melanocortins into the ventral tegmental area of rats [J]. Psychopharmacology (Berl), 2015, 232(1): 285–294.
- [24] Lanzenberger R, Hahn A, Windischberger C, *et al.* Serotonin-1A receptor binding and Reward-dependent Activation are associated within the Human Dorsal Raphe Nucleus as revealed by PET-fMRI [J]. Neuroimage, 2009, 47: 176.

[修回日期] 2015-07-02



共伴侣蛋白 FKBP51 在高脂诱导肥胖中的作用

张 曼,邱 彬,曹 勇,徐玉雪,邓 然,杨志伟,雍伟东

(北京协和医学院 & 中国医学科学院医学实验动物研究所,基因与发育实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 通过 FKBP51 基因敲除小鼠模型和细胞脂肪分化模型,探究 FKBP51 在高脂诱导肥胖中的机制。**方法** 4 周龄雄性野生型和 FKBP51 基因敲除小鼠以普通或高脂饲料单只单笼喂养 6 周,每周记录小鼠体重和饮水量,应用 MM-100 代谢笼系统,监测各组小鼠 24 h 内氧气消耗量、二氧化碳产生量、呼吸交换率和产热量的变化,对上述小鼠肝脏组织进行油红 O 染色,同时检测肝脏和脂肪组织代谢相关基因的表达情况。同时对取自野生型和 FKBP51 基因敲除小鼠的永生化成纤维细胞(MEF)进行脂肪诱导分化,观察 FKBP51 缺失对脂肪分化的影响。**结果** 高脂饮食诱导后,两种基因型小鼠饮水量无明显变化,但与野生型小鼠相比,FKBP51 基因敲除小鼠体重明显减轻,肝脏中脂滴减少。FKBP51 基因敲除小鼠在基础和高脂诱导条件下,氧气消耗量、二氧化碳产生量、呼吸交换率以及产热量均高于野生型小鼠,肝脏中糖异生相关酶 PEPCK、G6Pase 等表达上调,脂肪中能量代谢相关基因 UCP-1 等表达上调。此外,FKBP51 基因缺失的 MEF 诱导脂肪分化,细胞内脂滴明显少于野生型 MEF 细胞。**结论** FKBP51 基因在脂肪合成和能量代谢方面起着重要作用,因此 FKBP51 基因缺失小鼠能够抵制高脂诱导的肥胖。

【关键词】 FKBP51;能量代谢;脂肪分化;肥胖

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0053-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 007. 011

FKBP51 plays an important role in high fat diet-induced obesity

ZHANG Man, QIU Bin, CAO Yong, XU Yu-xue, DENG Ran, YANG Zhi-wei, YONG Wei-dong

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

Laboratory of Gene and Development, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective The goal of this study is to understand the function of FKBP51 in resistant to high fat diet-induced obesity using FKBP51 knockout (KO) mice and *in vitro* adipocyte differentiation. **Methods** Four-week old male FKBP51 KO and wild type (WT) mice were fed separately with regular or high fat diet for 6 weeks. The body weight and food consumption were recorded weekly, the energy expenditure differences (O_2 consumption, CO_2 production, respiratory exchange ratio, and heat production) of each group were monitored using the MM-100 metabolism cages system for 24 hours, then the liver from the above animals were stained with the Oil red-O to detect the lipid accumulation and the expression of metabolic genes. In addition, induction of adipocyte differentiation of immortalized MEF cells from WT and FKBP51 KO mice were used to observe the effect of FKBP51 gene on lipogenesis. **Results** Compared to WT mice, FKBP51 KO mice has less weight increment, and less lipid accumulation in the liver, but with no difference on food consumption during high-fat diet fed. Moreover, FKBP51 KO mice exhibited more O_2 consumption, CO_2 production and heated production under both RD and HF diet conditions. The PEPCK, G6Pase and UCP-1 genes up-regulation. In addition, lipid content was reduced in FKBP51 gene deficient MEF cells after adipocyte differentiation. **Conclusions** The

[基金项目] 863 项目(2012AA02240);国家自然科学基金(81272273);协和学生创新项目(33320140151)。

[作者简介] 张曼(1988-),女,硕士生,E-mail: M_zhang0607@163.com。

[通讯作者] 雍伟东,男,研究员,E-mail: wyong@cnilas.org。

FKBP51 gene plays an important role in high fat diet-induced obesity through the energy metabolism enhancement and lipogenesis inhibition.

【Key words】 FKBP51; Energy metabolism; Lipogenesis; Obesity

糖皮质激素受体 (GR) 是甾体激素受体超家族中的一员, 其为配体依赖性转录因子, 可介导糖皮质激素的功能。GR 功能的发挥需要与 Hsp90 等伴侣蛋白、以及共伴侣蛋白结合形成蛋白复合体^[1], FKBP51 作为 TPR 蛋白之一, 对 GR 活性起着负调节的作用^[2]。

在脂肪细胞中, GR 活性是脂肪细胞分化所必需的, 对脂肪的胰岛素敏感性发挥着重要作用, 同时调节脂质的代谢^[3-4]。有研究发现^[5], 在脂肪生成中, GR 复合物的共伴侣分子 FKBP51/FKBP52 发挥重要作用。且研究表明, 小鼠下丘脑中高表达的 FKBP51 能够抑制糖皮质激素受体的作用, 促进肥胖的表型, 即下丘脑中 FKBP51 通过对糖皮质激素受体的调节, 在能量调节平衡中发挥作用^[6]。以上证据表明 FKBP51 在肥胖形成和脂肪分化中可能具有重要的作用, 本研究通过给予 FKBP51 基因敲除小鼠和野生对照小鼠高脂饮食, 以及体外细胞脂肪诱导分化实验, 从能量代谢和脂肪生成两个方面研究 FKBP51 基因在高脂诱导肥胖中的作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

FKBP51 基因敲除小鼠为本实验室保存, 清洁级 C57BL/6J 小鼠购自于北京华阜康生物科技股份有限公司【SCYK(京)2014-0004】, 动物饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所屏蔽环境【SYXK(京)2013-0004】, 温度 (20 ~ 26) °C, 饲养期间给予灭菌饲料及纯净水。实验共分为四组, 每组约 6 ~ 8 只, 正常饮食的雄性 FKBP51 基因敲除小鼠 (RDKO, 51 -/-)、正常饮食的雄性 C57BL/6J 小鼠 (RDWT, 51 +/+), 高脂饮食的雄性 FKBP51 基因敲除小鼠 (HFKO, 51 -/-)、高脂饮食的雄性 C57BL/6J 小鼠 (HFWT, 51 +/+)。

1.2 试剂与仪器

高脂饲料 (60 kcal% fat, D12492, 美国 REASERCH DIETS)、SYBR Green PCR Master Mix (Takara)、地塞米松 (DEX, sigma)、IBMX (sigma)、胰岛素 (sigma)、完整的代谢监测设备 (MM-100 系统 (CWE)、MMX 扩张单元、气泵和计算机运行系统)、冰冻切片 (德国 Leica)、Realtime PCR 仪 (A/B)。

1.3 体重和摄食的测量

对小鼠的体重和摄食量进行测量, 在 RDKO、RDWT、HFKO 与 HFWT 小鼠 4 周龄时开始分别进行正常饮食和高脂诱导, 单只分笼饲养, 每周记录一次小鼠的体重和高脂诱导小鼠的饮食量, 记录到 10 周龄。

1.4 小鼠能量代谢监测

调节 MM-100 代谢检测仪气道的通气量, 待其达到平稳值, 通道气量至约 650 mL/min (小鼠) 即可, 300 s 后即进入下一通道通气量的调节。动物称重、记录编号, 放入代谢笼扩张单元盒中, 确定动物盒盖密闭好, 动物及仪器气流平衡约 1 ~ 4 h。打开能量检测系统软件 CWE-MMcomm, 设置参数, 录入各通道动物体重, 点击开始即开始记录数据了。中途需要及时的观察小鼠的状态和数据的稳定性。对其进行 24 h 的检测, 其中 12 h 照明/12 h 黑暗, 与其饲养环境保持一致。测量数据以标准 ASCII 格式保存在磁盘文件。

1.5 肝脏组织油红 O 染色

取高脂诱导的 6 周后的小鼠肝脏, 并以正常饮食的同周龄的小鼠作为对照, 即取四组小鼠的肝脏; 正常饮食 (RDWT/RDKO) 和高脂饮食 (HFWT/HFKO)。取 1 × 1 × 0.5 cm 肝脏进行常规冰冻切片, 油红 O 染色。油红 O 染色由中国医学科学院医学实验动物研究所病理科完成。

1.6 MEF 细胞诱导脂肪分化实验

将永生化的 51 WT 和 KO MEF 细胞接种于培养板中, 待细胞长至 80% ~ 90% 时, 继续接触抑制培养两天 (记为第 -2 天)。2 d 后 (记为第 0 天) 更换为含 10% 胎牛血清的 DMEM, 并加入终浓度为 0.5 mmol/L 的 IBMX、1 μmol/L 的 DEX 和 10 μmol/mL 的 Insulin。培养 48 h 后 (记为第 2 天) 更换为只含有 10% 胎牛血清和胰岛素 (浓度同上) 的 DMEM 培养基。之后每 2 天 (分别记为第 4 和 6 天) 再以 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基换液一次。细胞诱导分化第 8 天即可有 90% 细胞呈成熟脂肪细胞表型, 第 8 天的细胞进行油红 O 染色, 在光学显微镜下观察其分化程度的不同。

1.7 Realtime PCR 测定

分别提取 RDKO、RDWT、HFKO 与 HFWT 四组

小鼠肝脏组织和脂肪组织的 RNA,定量,逆转录为 cDNA,采用半定量法检测相关基因 mRNA 的表达水平。

1.8 统计分析

资料数据以平均值 $\pm$ 标准差表示,实验数据采用 PRISM 统计软件进行分析,组间比较采用单因素方差分析 t 检验。其中 $P < 0.05$,表明差异有统计学意义,用 * 或 #表示; $P < 0.01$ 表明差异有显著统计学意义,用 ** 或 ##表示。

2 结果

2.1 FKBP51 基因敲除小鼠抵制高脂诱导的肥胖

小鼠体重测定结果如表 1 所示,在正常饮食 6 周后,野生型小鼠体重达到 $26.2 \pm 0.7\text{g}$ (RD WT),FKBP51 基因敲除小鼠体重为 $23.5 \pm 1.8\text{g}$ (RD KO);高脂诱导后,野生型小鼠体重达到 $39.03 \pm 0.84\text{g}$ (HF WT),而 FKBP51 基因敲除小鼠体重仅为 $25.69 \pm 1.53\text{g}$ (HF KO),相差约 10 g 左右,有显著性差异($P < 0.01$)。从上述结果可以看出,在高脂喂养 6 周后,FKBP51 基因敲除小鼠体重明显小于野生型小鼠,抵制高脂诱导的肥胖。

2.2 高脂诱导的 FKBP51 基因敲除小鼠体重变化与饮食量无关

体重的变化与摄食量有关,为排除食物摄入量对小鼠体重变化的影响,我们对 HF WT 和 HF

KO 小鼠 4 ~ 10 周的摄食量进行了统计分析。结果如表 2 所示,两种基因型小鼠的摄食量总体上没有明显差异($P > 0.99$),说明 FKBP51 基因敲除小鼠出现抵制高脂诱导肥胖的表型与摄食量无关。

2.3 FKBP51 基因敲除小鼠具有较高的能量代谢

(1)FKBP51 基因敲除小鼠具有较高的基础能量代谢

对正常饮食小鼠的呼吸代谢测定结果如图 1 所示,FKBP51 基因敲除小鼠氧气的平均消耗量为白天 $2.49 \pm 0.1\text{ (mL/h/g)}$ 、晚上 $2.79 \pm 0.1\text{ (mL/h/g)}$,均明显高于野生型小鼠白天($2.3 \pm 0.1\text{ mL/h/g}$, P 值)和晚上($2.37 \pm 0.11\text{ mL/h/g}$)的平均耗氧量(图 1. A),($P < 0.05$, $P < 0.01$);FKBP51 基因敲除小鼠白天二氧化碳产量($2.1 \pm 0.1\text{ mL/h/g}$)与野生型小鼠($2.0 \pm 0.1\text{ mL/h/g}$)没有差别($P > 0.05$),而夜间二氧化碳产量($2.7 \pm 0.1\text{ mL/h/g}$)明显高于野生型小鼠($2.3 \pm 0.1\text{ mL/h/g}$)($P < 0.01$,图 1. B);此外 FKBP51 基因敲除小鼠白天($12.1 \pm 0.3\text{ cal/h/g}$)和夜间($13.7 \pm 0.4\text{ cal/h/g}$)热量的产生也高于野生型小鼠白天($11.1 \pm 0.5\text{ cal/h/g}$, $P < 0.05$)和夜间($11.6 \pm 0.5\text{ cal/h/g}$, $P < 0.01$)的产热量(图 1C)。这些结果表明,正常饮食条件下,FKBP51 基因敲除小鼠具有较高基础能量代谢。

表 1 FKBP51 基因敲除小鼠和野生型小鼠高脂和正常饮食体重记录表

Tab.1 Comparison of body weight between 51KO and WT mice

体重 Weight	4 周 (4Weeks)	5 周 (5Weeks)	6 周 (6Weeks)	7 周 (7Weeks)	8 周 (8Weeks)	9 周 (9Weeks)	10 周 (10Weeks)
正常饮食野生组 (RDWT)	16.1 $\pm$ 0.4	19.7 $\pm$ 0.8	21.4 $\pm$ 0.2	23.4 $\pm$ 0.9	24.8 $\pm$ 0.5	25.9 $\pm$ 2.3	26.2 $\pm$ 0.7
正常饮食 KO 组 (RDKO)	15.4 $\pm$ 0.2	19.4 $\pm$ 1.2	20.3 $\pm$ 1.0	21.4 $\pm$ 0.4 *	22.4 $\pm$ 1.0 *	22.8 $\pm$ 1.0 *	23.5 $\pm$ 1.8 *
高脂饮食野生组 (RDWT)	19.0 $\pm$ 1.5	24.7 $\pm$ 2.3	27.1 $\pm$ 1.6	32.1 $\pm$ 2.3	34.9 $\pm$ 3.3	37.0 $\pm$ 3.1	40.9 $\pm$ 3.8
高脂饮食 KO 组 (RDKO)	15.2 $\pm$ 0.9 #	20.8 $\pm$ 0.7 #	22.0 $\pm$ 1.3 ##	23.9 $\pm$ 1.8 ##	24.8 $\pm$ 2.2 ##	25.7 $\pm$ 2.4 ##	27.8 $\pm$ 2.9 ##

注:与野生型对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

Note: Compared with the RDWT, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

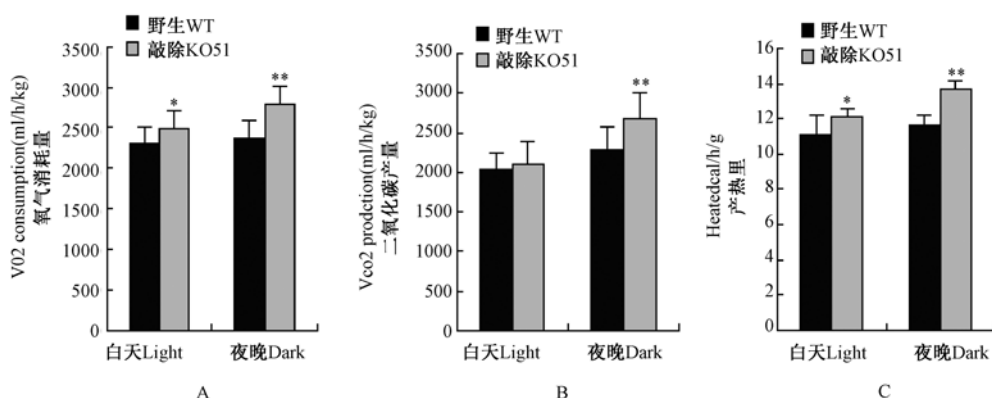
表 2 FKBP51 基因敲除小鼠和野生型小鼠高脂饮食量记录表

Tab.2 Comparison of food intake between male 51 KO and WT mice

体重 Weight	4 周 (4Weeks)	5 周 (5Weeks)	6 周 (6Weeks)	7 周 (7Weeks)	8 周 (8Weeks)	9 周 (9Weeks)	10 周 (10Weeks)
高脂饮食野生组 (RDWT)	10.5 $\pm$ 1.35	9.3 $\pm$ 0.85	8.4 $\pm$ 0.75	9.5 $\pm$ 0.7	19.0 $\pm$ 3.48	22.9 $\pm$ 0.16	23.6 $\pm$ 1.27
高脂饮食 KO 组 (RDKO)	7.3 $\pm$ 0.5 *	8.28 $\pm$ 1.4	8.8 $\pm$ 1.65	8.6 $\pm$ 1.6	19.5 $\pm$ 3.3	20.7 $\pm$ 2.8	21.8 $\pm$ 3.97

注:与野生型对照组相比, * $P < 0.05$ 。

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

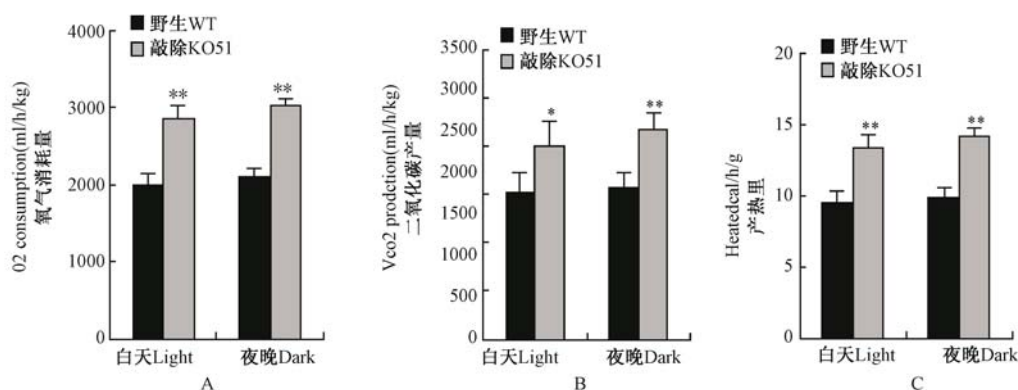


注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, 与对照组比较。

图 1 正常饮食小鼠昼夜平均氧气消耗量、二氧化碳产量、产热量的比较

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, compared with control group.

Fig. 1 Comparison of O₂ consumption, CO₂ production and heated production during day and night



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

图 2 高脂诱导小鼠昼夜平均氧气消耗量、二氧化碳产量、产热量的比较

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$, compared with control group.

Fig. 2 Comparison of O₂ consumption, CO₂ production and heated production during day and night

(2) 高脂诱导 FKBP51 基因敲除小鼠能量代谢较旺盛

对高脂饮食小鼠的呼吸代谢测定结果如图 2 所示,小鼠昼夜平均耗氧量 (VO₂) (图 2A)、二氧化碳产生量 (VCO₂) (图 2B) 和产生的热量 (图 2C)。结果显示:高脂诱导后 FKBP51 基因敲除小鼠的 O₂ 消耗量、CO₂ 的产量、产热量均明显高于对照组小鼠 ($P < 0.01$),表明 FKBP51 基因敲除小鼠在高脂诱导后呼吸代谢明显增强。

2.4 FKBP51 基因敲除小鼠高脂饮食诱导后肝脏中脂质沉积较少

肝脏 HE 染色结果如彩插 8 图 3 所示,在正常饮食条件下,野生型 (图 3A) 和 FKBP51 基因敲除 (图 3C) 小鼠肝脏中均没有脂质的异位沉积。在高脂喂养后的野生型小鼠肝脏中 (图 3B),可见大量

被染成红色的脂滴,说明肝脏中脂滴沉积数量较多,并已表现为脂肪肝;而高脂诱导的 FKBP51 基因敲除小鼠肝脏中 (图 3D),脂滴数量较少,脂肪肝症状也较野生型小鼠有所减轻。这一结果提示,FKBP51 基因敲除小鼠对高脂诱导肥胖的抵抗效应可能是通过减少脂质生成或促进脂质分解来实现的。

2.5 FKBP51 基因敲除小鼠 MEF 细胞脂肪诱导分化受阻

对野生型小鼠和 FKBP51 基因敲除小鼠的永生分化 MEF 细胞诱导脂肪分化第 8 天时,油红 O 染色结果如彩插 8 图 4 所示,已有 80% 以上 WT 型 MEF 细胞分化为成熟的脂肪细胞,而 FKBP51 KO 中只有很少的细胞分化为成熟的脂肪细胞。这些结果显示 FKBP51 基因的缺失后脂肪细胞的分化将受到

抑制。

2.6 小鼠肝脏和脂肪组织相关基因的检测

肝脏组织实时荧光定量 PCR 实验结果如图 5 所示,我们发现,高脂诱导后,野生型小鼠肝脏中糖异生相关酶 PDK4、G6Pase、PEPCK 表达受到抑制,mRNA 水平下调($P < 0.05$)。糖异生作用减弱,表明非糖物质向葡萄糖转化方向受抑制。而高脂诱导后,与野生型小鼠(HFWT)相比,KO51 小鼠(HFKO)中,糖异生的限速酶 G6Pase、PEPCK 表达均上调($P < 0.05$, $P < 0.05$)。并且我们还发现,在肝脏糖脂代谢中发挥重要调节作用的转录辅助激活因子(PGC-1 α),HFKO 小鼠中表达上调($P < 0.05$)。

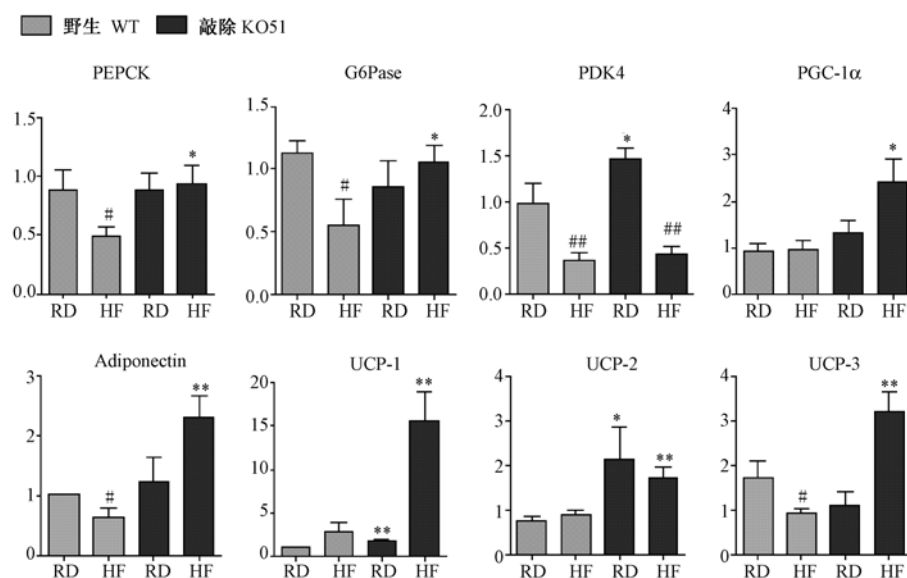
脂肪组织实时荧光定量 PCR 实验结果如图 5 所示,我们发现,在 KO51 小鼠中,与能量代谢相关的线粒体基因 UCP-1 表达显著上调($P < 0.01$)、UCP-2 表达上调($P < 0.05$)、UCP-3 表达显著上调($P < 0.01$)。

3 讨论

在近些年的研究中,围绕 FKBP51 基因与脂肪细胞分化关系的研究中,有两种不太一致的实验结果:有结果认为,FKBP51 抑制 3T3-L1 前脂肪细胞的分化,Toneatto J 等^[7]发现,对诱导分化转染 24 h 后 FLAG-FKBP51 载体的 3T3-L1 细胞,进行油红 O 染

色,脂质积累明显少于转染空载体的细胞,脂联素等表达也低于对照组;而有的结果却发现,脂肪的生成需要 FKBP51 的参与,在 Stechschulte 等^[8]的研究中,在脂肪生成刺激因子的作用下,FKBP51KO 的 3T3-L1 细胞脂质积累降低,且脂肪生成标志蛋白的表达也降低。当细胞中的 FKBP51 基因重新表达,上述的情况就恢复了正常。这证实了 FKBP51 在细胞脂质的积累中起到很重要的调节作用,脂肪生成过程中 FKBP51 被高诱导表达^[9-10]。我们取 FKBP51 基因敲除小鼠 MEF 细胞进行脂肪诱导分化实验,结果与 Stechschulte 等人的观点一致,这些实验结果,多是基于体外的细胞实验,缺乏对体内的研究与验证。因此,通过对 FKBP51 基因敲除小鼠模型的来探究 FKBP51 基因的作用显得尤为重要。

我们首次对 FKBP51 基因敲除小鼠进行高脂诱导,发现其出现抵制高脂诱导肥胖的表型。在肝脏组织基因分析中,发现高脂诱导后对照组糖异生相关酶 PDK4、G6pase、PEPCK 表达下调,摄入的脂质堆积在肝脏中,出现脂肪肝。PEPCK 等是糖异生途径的限速酶,其转录的多少决定着糖异生的速度^[11]。而在 KO51 小鼠肝脏中,PDK4、G6pase、PEPCK 表达上调,糖异生途径增加,促进脂质向葡萄糖的转化,从而使得肝脏中脂滴的积累减少。上游的转录辅助激活因子 PGC-1 α 表达也上调,PGC-1 α 可与肝细胞核因子结合形成复合物,使之活化,从而启动 G6pase、PEPCK



注:与野生型对照组相比,* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与自身对照组相比,# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ 。

图5 肝脏组织和脂肪组织中代谢相关基因 mRNA 水平的检测

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

Fig. 5 The mRNA level of metabolism related genes in the liver and adipose

编码基因转录^[12-13]。因此,FKBP51 的缺失可能通过影响糖异生酶上游的调控因子来发挥作用,从而减少了脂质在肝脏中的积累。

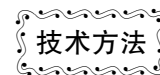
在基础代谢情况下,大多数组织依靠脂肪氧化作为主要能源。KO51 小鼠脂肪组织中,我们发现解偶联蛋白、脂联素的表达上调。脂联素(adiponection)是一种内源的脂肪因子,可促进脂肪酸的氧化,在许多代谢通路中发挥作用^[14]。解偶联蛋白是一类线粒体内膜上的载体,其中 UCP-1、UCP-2、UCP-3 在结构上十分相似。UCP1 特异表达在棕色脂肪组织^[15-16],嵌入细胞的线粒体膜内消除线粒体电位,驱动消耗脂肪,将其转化为热而非 ATP。UCP-2 与 UCP-3 也有产热功能,但目前被认为主要在控制脂肪酸氧化中起作用,且均与肥胖相关^[17-19]。以上这些基因的表达增加,是 FKBP51 基因敲除小鼠呼吸代谢与产热量增加、脂肪积累减少的有力证据。

综上所述,我们发现 FKBP51 基因敲除小鼠抵制高脂诱导肥胖,其原因可能有两个方面,一方面是 FKBP51 基因的缺失阻碍脂肪分化和脂质积累;另一方面,通过上调组织中脂代谢和能量代谢相关基因 PDK4、UCP-1,从而增加能量代谢。FKBP51 在机体中的调控十分的复杂,还许多问题需要解决,例如 FKBP51 在机体的调控机制,其抑制剂是否能够抑制体重的增加、是否促进肥胖者减肥、是否能够防止糖尿病人的葡萄糖耐量继续恶化,以及进行激素处理等等问题还需要进行长远探究。

参考文献:

- [1] E. R. Sanchez, D. O. Toft, M. J. Schlesinger, *et al.* Evidence that the 90-kDa phosphoprotein associated with the untransformed L-cell glucocorticoid receptor is a murine heat shock protein [J]. *J. Biol. Chem.* 1985, 260 (23): 12398 - 12401.
- [2] Reynolds PD, Ruan Y, Smith DF, *et al.* Glucocorticoid resistance in the squirrel monkey is associated with overexpression of the immunophilin FKBP51 [J]. *J Clin Endocrinol Metab* 1999, 84(2): 663 - 669.
- [3] Gregoire FM. Adipocyte differentiation: from fibroblast to endocrine cell [J]. *Exp Biol Med.* 2001; 226(11): 997 - 1002.
- [4] Gregoire FM, Smas CM, Sul HS. Understanding adipocyte differentiation [J]. *Physiol Rev.* 1998; 78(3): 783 - 809.
- [5] Toneatto JI, Charó NL, Susperreguy S, *et al.* The dynamic mitochondria-nuclear redistribution of FKBP51 during the process of adipocyte differentiation is regulated by PKA [J]. *Medicina (B Aires).* 2013; 73(5): 401 - 405.
- [6] Linda Yang, Fumiko Isoda. Hypothalamic Fkbp51 is induced by fasting, and elevated hypothalamic expression promotes obese phenotypes [J]. *Am J Physiol Endocrinol.* 2012, 302(8): E987 - E991.
- [7] Toneatto J, Guber S, Charó NL, *et al.* Dynamic mitochondrial-nuclear redistribution of the immunophilin FKBP51 is regulated by the PKA signaling pathway to control gene expression during adipocyte differentiation [J]. *J Cell Sci.* 2013, 126(23): 5357 - 5368.
- [8] Stechschulte LA, Hinds TD Jr, Khuder SS, *et al.* FKBP51 controls cellular adipogenesis through p38 kinase-mediated phosphorylation of GR α and PPAR γ [J]. *Mol Endocrinol.* 2014, 28(8): 1265 - 1275.
- [9] Yeh W C, Li T K, Bierer B E, *et al.* Identification and characterization of an immunophilin expressed during the clonal expansion phase of adipocyte differentiation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1995, 92(24): 11081 - 11085.
- [10] Yeh W C, Bierer B E, McKnight S L. Rapamycin inhibits clonal expansion and adipogenic differentiation of 3T3-L1 cells [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* 1995, 92(24): 11086 - 11090.
- [11] Goto M, Yoshioka T, Battelino T, *et al.* TNF alpha decreases gluconeogenesis in hepatocytes isolated from 10 - day-old rats [J]. *Pediatr Res,* 2001, 49(4): 552 - 557.
- [12] Kurukulasuriya R, Link JT, Madar DJ, *et al.* Potential drug targets and progress towards pharmacologic inhibition of hepatic glucose production [J]. *Curr Med Chem* 2003, 10(2): 123 - 153.
- [13] Nakae J, Kitamura T, Silver DL, *et al.* The forkhead transcription factor Foxo1 (Fkhr) confers insulin sensitivity onto glucose-6-phosphatase expression [J]. *J Clin Invest,* 2001, 108(9): 1359 - 1367.
- [14] Kakali Ghoshal, Maitree Bhattacharyya. Adiponectin: Probe of the molecular paradigm associating diabetes and obesity [J]. *World J Diabetes.* 2015, 6(1): 151 - 166.
- [15] D. G. Nicholls, E. Rial. A history of the first uncoupling protein UCP1 [J]. *J Bioenerg Biomembr.* 1999, 31(5): 399 - 406.
- [16] K. Fukuchi, M. Tatsumi, Y. Ishida, *et al.* Radionuclide imaging metabolic activity of brown adipose tissue in a patient with pheochromocytoma [J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes,* 2004, 112(10): 601 - 603.
- [17] Moore GB1, Himms-Hagen J, Harper ME, *et al.* Overexpression of UCP-3 in skeletal muscle of mice results in increased expression of mitochondrial thioesterase mRNA [J]. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001, 283(4): 785 - 790.
- [18] Diano S., Horvath T. L. Mitochondrial uncoupling protein 2 (UCP2) in glucose and lipid metabolism [J]. *Trends Mol. Med.* 2012; 18(1): 52 - 58.
- [19] Esterbauer H. A common polymorphism in the promoter of UCP2 is associated with decreased risk of obesity in middle-aged humans [J]. *Nat Genet,* 2001, 28(2): 178 - 183.

[修回日期] 2015-06-29



PMSG 和 hCG 诱导长爪沙鼠超数排卵方案的优化

唐 旺, 李长龙, 杜小燕, 陈振文

(首都医科大学基础医学院, 北京 100069)

【摘要】 目的 优化 PMSG 和 hCG 诱导长爪沙鼠超数排卵方案。**方法** 通过对动物周龄、激素剂量和间隔时间等系统研究, 优化出用于长爪沙鼠超数排卵的最佳动物周龄、激素组合剂量和间隔时间。**结果** 对 6 周龄长爪沙鼠使用 10 单位激素计量及间隔 70 h 可以获得最佳超数排卵效果。在合笼 16 h 后 80% 的动物得以排卵, 获卵数为 32.6 ± 3.0 枚/只, 其中 24.8 ± 5.4 枚/只可以发育至二细胞胚胎。**结论** 本研究获得了利用 PMSG 和 hCG 诱导长爪沙鼠超数排卵的优化方案, 为长爪沙鼠胚胎生物技术研究奠定了基础。

【关键词】 长爪沙鼠; 超数排卵; 孕马血清促性腺激素; 人绒毛膜促性腺激素

【中图分类号】 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0059-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.012

The optimization scheme of Mongolian gerbils superovulation induced by PMSG and hCG

TANG Wang, LI Chang-long, DU Xiao-yan, CHEN Zhen-wen

(School of Basic Medical Science, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

【Abstract】 Objective To optimize the scheme of Mongolian gerbil superovulation. **Methods** Based on the analysis of the animal-week-old, the dose and time interval of hormone, we got the best animal-week-old, dose and time interval of hormone for Mongolian gerbil superovulation. **Results** The 6 week old female Mongolian gerbils which injected of 10 IU PMSG and followed by 10 IU hCG in 70 hours later could get the best superovulation. We collected eggs at 16 hour after mate with male gerbils. The ovum pick-up rate reached 80%, the number of oocytes were 32.6 ± 3.0 , the number of the fertilized egg developed to 2-cell are 24.8 ± 5.4 . **Conclusions** This study summarizes the optimization scheme of Mongolian gerbil superovulation induced by PMSG and hCG and it supported the foundation for Mongolian gerbils embryo biotechnology.

【Key words】 Mongolian gerbil; Superovulation; PMSG; hCG

长爪沙鼠是源自中国的实验动物, 随着对长爪沙鼠实验动物化研究的不断深入, 长爪沙鼠的应用领域不断扩大, 培育的长爪沙鼠模型品种也逐渐增多^[1-9]。为了保存这些珍贵的动物资源, 人们除了加强活体保种外, 为了确保种子安全, 还要开展动物胚胎冷冻保存^[10]。这就需要更多的长爪沙鼠胚

胎来源, 超速排卵为解决胚胎来源提供了最有效途径^[11]。近年来随着应用长爪沙鼠开展更为深入的研究, 制作转基因和基因敲除动物已成为迫切需求, 应用长爪沙鼠开展特殊生物学特性的发育生物学研究也备受重视。但这些研究无不需以长爪沙鼠胚胎为实验材料, 因此超数排卵就成了关键技

【基金项目】 国家科技支撑计划项目(2015BAI09B01; 2011BAI15B01-32); 北京市自然科学基金重点课题(7141002)。

【作者简介】 唐旺(1989-), 男, 硕士生, 研究方向: 实验动物遗传学, E-mail: 522636161@qq.com。

【通讯作者】 陈振文(1959-), 男, 教授, 博导, 研究方向: 实验动物遗传育种, E-mail: czwenteam@163.com。

术。虽然超数排卵在小鼠、金黄地鼠、大鼠等多种实验动物已成为成熟技术,但在长爪沙鼠尚存在许多疑虑,国内外对长爪沙鼠超数排卵方案研究中鲜有较为稳定高效的报道,在使用动物的周龄、激素剂量及间隔时间等也存在较大差异^[12-14],极大地阻碍了应用长爪沙鼠开展科学研究的进程和保种规划的实施。本研究拟利用首都医科大学饲养的长爪沙鼠通过对动物周龄、激素剂量及间隔时间的对比研究,优化出高效稳定的长爪沙鼠超数排卵方案。通过本研究不但可为长爪沙鼠资源冷冻保存奠定基础,而且将加速应用长爪沙鼠开展科学研究的进展,扩大其在生命科学研究及生物医药产业中的应用。

1 材料和方法

1.1 实验动物

雌性普通级长爪沙鼠 200 只,10 周龄以下,体重 30~60 g;雄性普通级长爪沙鼠 50 只,10~12 周龄,体重 60~80 g。所有长爪沙鼠均来自首都医科大学实验动物部,饲养于控制温湿度的普通环境中【SYXK(京)2013-0005】。

1.2 试剂和仪器

孕马血清促性腺激素(PMSG)购自宁波第二激素厂(批号:140324),人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自宁波第二激素厂(批号:140322),M2 培养基(M7167, Sigma),M16 培养液(M7292, Sigma),透明质酸酶(H1136, Sigma),生理盐水,75%酒精等。35 mm 无菌塑料培养皿,体视显微镜,倒置显微镜,CO₂ 培养箱,超净工作台,灭菌手术器械(眼科剪、眼科镊、显微剪和显微镊等)。

1.3 实验设计

1.3.1 动物周龄的优化

随机挑选 5、6、7、8、9、10 周龄的长爪沙鼠,每组 20 只,注射剂量为 10 IU PMSG/hCG。激素注射间隔时间 50 h,激素注射方式为腹腔注射,注射 hCG 后合笼,次日检查阴道栓并取卵。

1.3.2 激素剂量的优化

随机将 12 只 6 周龄雌性沙鼠分为 4 组,每组 3 只,剂量分别为 5、10、20、30 IU 的 PMSG/hCG。激素注射间隔时间 50 h,激素注射方式为腹腔注射,注射 hCG 后合笼,次日检查阴道栓并取卵。

1.3.3 激素间隔时间的优化

随机将 60 只 6 周龄雌性沙鼠分为 3 组,每组 20

只,剂量为 10 IU 的 PMSG/hCG。激素注射间隔时间分别为 50 h、70 h 和 90 h,激素注射方式为腹腔注射,注射 hCG 后合笼,次日检查阴道栓并取卵。

1.4 取卵步骤

注射 hCG 后并与雄鼠合笼 16~17 h 后,在漏底饲养笼下托盘上检查阴道栓脱落情况,并将超数排卵使用的雌性长爪沙鼠脱颈处死,俯卧喷洒 75% 酒精,打开背侧腹腔,分别取出两侧输卵管和卵巢置于盛有 M2 培养液液滴的培养皿中,在体视显微镜下,用显微镊撕开输卵管膨大的壶腹部,释出卵母细胞-卵丘细胞复合体,重复检查确保将所有卵母细胞取出。将卵母细胞-卵丘细胞复合体收集到含有 0.1% 透明质酸酶的 M2 液滴中,处理 3~5 min,移入 M2 液滴中,洗涤 3 次,在体视显微镜和倒置显微镜下观察,计算卵母细胞数;移入 M16 液滴中,放入 CO₂ 培养箱中,37℃ 培养,次日统计二细胞胚胎数。

1.5 统计学分析

对于不同激素剂量、不同周龄以及不同激素间隔时间各组间的比较,采用单因素方差分析方法进行统计学分析, $P < 0.05$ 的值在统计学上具有显著性差异。

2 结果

2.1 动物周龄对超数排卵的影响

通过注射 10 IU 激素剂量,激素间隔时间为 50 h,对不同周龄(10 周龄及以下)长爪沙鼠进行超排,结果显示:5 及以下周龄长爪沙鼠没有检查到阴道栓,取卵数为 0;9~10 周龄动物获得平均 7.1~7.6 枚卵;6~8 周龄鼠的动物平均每只获得 14.6~17.5 枚卵。统计结果表明,6~8 周龄动物超数排卵数量显著高于与 9~10 周龄动物($P < 0.05$);6 周龄超数排卵率为 80%,明显高于其他周龄组(表 1)。

2.2 激素剂量对超数排卵的影响

激素剂量是超数排卵的重要影响因素。通过腹腔注射激素,激素间隔时间 50 h,对 6 周龄长爪沙鼠激素剂量优化,结果如表 2 所示,5 IU 激素剂量不能促进长爪沙鼠排卵,取卵数为 0;10~30 IU 激素剂量均能产生超数排卵效应,其中 10 IU 剂量组获得 55 枚卵,每只平均取卵数为 27.5 枚。5 IU 激素剂量组未检测到阴道栓,在输卵管也未发现排卵现象。10 IU 以上剂量组均有排卵现象,排卵数随着激素剂量的升高而降低。

表 1 不同周龄长爪沙鼠注射 10IU PMSG 和 hCG 间隔 50 h 超数排卵效果比较
Tab.1 Comparison of effects of different weeks old of Mongolian gerbils injected 10 IU PMSG and hCG at 50 hours intervals to superovulation

组别 Group	周龄(周) Weeks	使用鼠(只) Number of gerbils used	获胚胎鼠(只) Number of gerbils collected eggs	超数排卵率(%) Ovum pick-up rate	平均排卵数(枚) Average ovulation
1	10	20	9	45	7.6 ± 3.6 ^a
2	9	20	9	45	7.1 ± 3.7 ^a
3	8	20	10	50	14.6 ± 5.9 ^b
4	7	20	12	60	16.2 ± 6.3 ^b
5	6	20	16	80	17.5 ± 4.8 ^b
6	5	20	—	—	—

注:a,b 字母相同表示差异不显著 ($P > 0.05$),字母不同表示差异显著 ($P < 0.05$)。
Note: Values with same superscript letters show insignificant difference ($P > 0.05$),those with different superscript letters show significant difference ($P < 0.05$).

表 2 不同剂量 PMSG 和 hCG 注射间隔时间 50 h 6 周龄长爪沙鼠超数排卵效果比较
Tab.2 Comparison of effects of different dosages of PMSG and hCG injected at 50 hours intervals to superovulation in 6-weeks-old Mongolian gerbils

组别 Group	激素量(IU) Dosages	使用鼠(只) Number of gerbils used	获胚胎鼠(只) Number of gerbils collected eggs	平均排卵数(枚) Average ovulation
1	5	3	—	—
2	10	3	2	27.5 ± 2.8
3	20	3	2	22.5 ± 2.1
4	30	3	2	10.0 ± 7.1

表 3 不同间隔时间 10 IU PMSG 和 hCG 注射 6 周龄长爪沙鼠超数排卵情况比较
Tab.3 Comparison of effects of different time interval of 10 IU PMSG and hCG injected to superovulation in 6-week-old Mongolian gerbils

组别 Group	激素间隔 时间(小时) Time interval of hormone	使用鼠(只) Gerbils used	获胚胎鼠(只) Gerbils collected eggs	平均排 卵数(枚) Average ovulation	2-细胞(枚) 2-cell eggs	发育率(%) Developmental rate
1	50	20	16	17.5 ± 4.8	7.5 ± 1.7	43
2	70	20	16	32.6 ± 3.0 [*]	24.8 ± 5.4 [*]	76
3	90	20	8	3.0 ± 1.6	—	—

注: * 表示 70 h 组与 50 h 组比较,有显著差异 ($P < 0.05$)。
Note: * Values with the groups of 50 hours and 70 hours show significant difference ($P < 0.05$).

2.3 激素给予间隔时间对超数排卵的影响

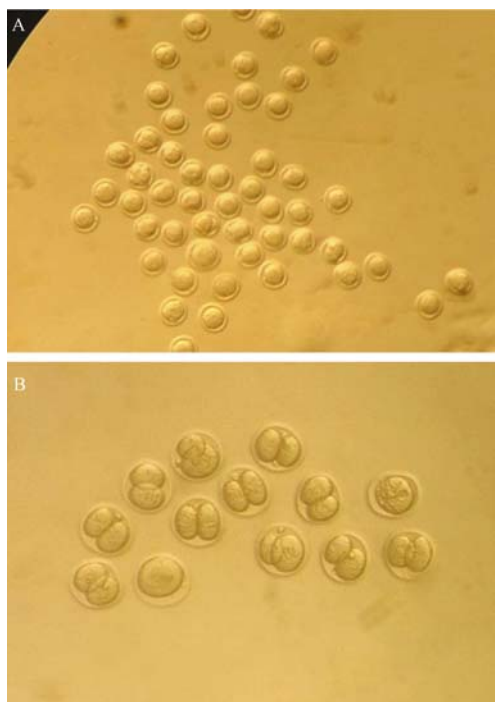
两种激素给予间隔时间对超数排卵有很大的影响。通过 10 IU 激素剂量,对 6 周龄长爪沙鼠给予 2 种激素的间隔时间 50 h、70 h 和 90 h 观察超数排卵效果,结果如表 3 所示,90 h 未能达到超数排卵效果,平均取卵数仅为 3 枚;70 h 获得最佳的超数排卵效果,平均取卵数为 32 枚(图 1 A),发育至 2-细胞(图 1 B)也更多,卵发育率由 43% 提高到 76%,显著优于 50 h 和 70 h 组 ($P < 0.05$),图 1 显示取得的卵及其发育的 2-细胞。

3 讨论

排卵是由一系列极其复杂的生理过程累积而产生的结果,影响因素诸多,包括动物遗传特性、体

况、营养状态、年龄、发情周期、卵巢功能、季节、温度以及激素等^[15]。野生和实验室培育的长爪沙鼠均为“一雌一雄”长期同居的繁殖方式,一只死亡后另一只很难形成繁殖单元,强行合笼繁殖则导致严重争斗致死^[16-17]。长爪沙鼠的这种习性为后期配对增加了难点。为了克服这一问题,我们将离乳(4 周)幼鼠雌雄分笼饲养,并且雄鼠(8 周龄)单笼饲养,待实验时,挑选合适周龄,并在注射激素后合笼,该方法可有效减少长爪沙鼠之间争斗行为。

腹腔注射 PMSG/hCG 是一种有效地诱导长爪沙鼠超数排卵的方法。由于选择动物随机性,固定的发情周期对激素的作用会产生一定影响。年轻动物发情周期正在建立,机体自身分泌激素量少,容易受外界激素影响,此时注射激素可以降低动物



注:A:消化后的卵($\times 6$);B:受精卵发育至2-细胞($\times 11.5$)。

图1 采集的卵及发育的2-细胞胚胎

Note: A: The digested eggs($\times 6$);

B: The fertilized eggs developed to 2-cell embryos($\times 11.5$).

Fig.1 The collected eggs and the developed 2-cell embryos

自身激素对研究结果的影响。10 周龄以上的长爪沙鼠在诱导超数排卵时,由于体内激素影响,不仅排卵数目少(少于 10 枚),并且超数排卵极不稳定,超数排卵率也低于 40%,在增加激素量后也未见较好效果,故未统计在实验数据中。超排长爪沙鼠 9~10 周龄接近性成熟,发情周期趋于稳定,超数排卵受本身激素影响较大;5 周龄及以下的雌鼠其卵巢发育未成熟,卵巢不具备排卵的能力,而 6~8 周龄雌鼠具备较好的超数排卵条件^[12, 18-19],实验结果也表明该年龄段可获得良好的超数排卵效果,尤其在 6 周段,雌鼠超数排卵不仅排卵数目较高,而且超数排卵成功率(80%)极高。

超数排卵对 PMSG/hCG 的注射剂量有一定要求,已有的报道中长爪沙鼠超数排卵使用的激素剂量范围较大(10~40 IU)^[12-14],参考价值较低。一般认为激素剂量过低,不能引起机体对激素的反应,或者不能抵御自身发情周期所分泌的激素影响;而激素剂量过高,机体对激素负反馈调节效应增强,抑制机体对激素产生效应;10~20 IU 激素剂量能较好地克服自身发情周期影响,且不引起强烈的激素负反馈调节效应,能高效地诱导长爪沙鼠

超数排卵效果^[12-14, 18-19]。本研究中优化了激素剂量,发现 10 IU PMSG/hCG 可以有效诱导 6~8 周龄长爪沙鼠超数排卵。如果实验过程中使用年龄和体重较大的动物,可适当增加激素剂量,以提高超数排卵效率^[12, 14]。

激素给予间隔时间也是超数排卵的重要影响因素。长爪沙鼠发情周期为 4~6 d, PMSG/hCG 的注射间隔时间需要探讨。激素间隔时间过短, PMSG 促进卵泡发育尚未达到最高效应,超数排卵后收集的卵较少;激素注射时间过长, PMSG 效应减退,不能起到超数排卵效果^[12-13]。本实验结果发现, PMSG/hCG 的最佳间隔时间为 70 h,同时胚胎发育率也提高至 76%。

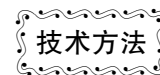
本研究得到的长爪沙鼠高效稳定的超数排卵方案为:6 周龄雌鼠, PMSG/hCG 的剂量为 10IU,间隔时间为 70 h,注射激素后立即与雄鼠合笼,在 16~17 h 后取卵。本实验中,最多单只雌鼠能取得 57 枚卵,其中 56 枚见明显原核(即受精卵),发育至 2-细胞数占 90%。本研究的优化方案大大的提高了长爪沙鼠超数排卵效率,为长爪沙鼠资源保存和胚胎生物技术研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 聶嘉伍, 王国良, 任运智, 等. 长爪沙鼠生物净化的研究[J]. 中国比较医学杂志. 1993, 3(3, 4): 135-138.
- [2] 聂金荣, 刘金明, 叶亚玉. 长爪沙鼠的饲养管理与繁殖[J]. 上海实验动物与科学. 1989, 9(1): 20-22.
- [3] 黄继荣, 王炎, 李联涛. 长爪沙鼠生物学特性调查研究[J]. 宁夏农林科技. 2006, 6: 36-37.
- [4] 刘锋华, 郭红刚, 楼琦. 链脲佐菌素诱导长爪沙鼠 I 型糖尿病模型的实验研究[J]. 中国实验动物学报; 2010, 18(6): 489-494.
- [5] Honda S, Fujioka T, Tokieda M, et al. Cancer Res. Development of Helicobacter pylori-induced gastric carcinoma in Mongolian gerbils [J]. 1998, 58(19): 4255-9.
- [6] Du XY, Zhu XD, Dong G, et al. Characteristics of circle of Willis variations in the mongolian gerbil and a newly established ischemia-prone gerbil group[J]. ILAR J. 2011, 52(1): E1-7.
- [7] 李长龙, 郭红刚, 石巧娟, 等. 长爪沙鼠高胆固醇血症模型的建立与辛伐他汀的作用[J]. 中国比较医学杂志; 2010, 20(8): 44-49.
- [8] Cheal ML. The gerbil: unique model for research on aging [J]. Exp Aging Res. 1986, 1: 3-21.
- [9] 姚莘莘, 徐芳, 朱函坪, 等. 肾综合征出血热的 4 周龄长爪沙鼠模型[J]. 中国人兽共患病杂志. 2005, 1: 60-61.
- [10] 刘雅琳, 张益鸣. 动物胚胎冷冻保存技术研究进展[J]. 上海畜牧兽医通讯; 2006, (5): 12-13.

- [11] 章志国, 章孝荣. 动物超数排卵的影响因素及发展现状[J]. 安徽农业科学. 2003, 31(1): 41-43.
- [12] 郭红刚, 卢领群, 周生来, 等. 乙二醇玻璃化冷冻液二步法对长爪沙鼠 2-细胞胚胎的冷冻保存[J]. 实验动物科学. 2014, 31(4): 28-31.
- [13] 路静, 朱祥宇, 王超, 等. 周龄和激素水平对长爪沙鼠超数排卵效果的影响[J]. 中国比较医学杂志. 2012, 22(8): 15-17.
- [14] Kameyama Y, K Arai, Ishijima Y. Interval between PMSG Priming and hCG Injection in Superovulation of the Mongolian Gerbil[J]. J Mamm Ova Res. 2004, 21: 105-109.
- [15] 刘维俊, 高珊, 唐菲, 等. 小鼠超数排卵相关问题的探讨[J]. 黑龙江动物繁殖. 2011, 19(1): 1-9.
- [16] 朱景丽, 王靖宇, 李慧玲. 长爪沙鼠的生理及行为研究初探[J]. 辽东学院学报(自然科学版). 2007, 2: 73-76.
- [17] 聂金荣, 聂朝晖. 长爪沙鼠行为观察[J]. 上海实验动物科学. 1995, 3: 154-156.
- [18] 卢静, 乔欣, 石淑静, 等. 长爪沙鼠生长繁殖性能的研究[J]. 中国实验动物学报. 2004, 12(2): 123-126.
- [19] 刘寒英, 文端成, 戴丽军, 等. 长爪沙鼠生长与繁殖性能的主要指标测定[J]. 动物科学与动物医学. 2004, 21(12): 35-36.

[修回日期]2015-06-25



实验小鼠不同部位骨髓病理切片的比较

冯 璟¹, 于远望²

(1. 陕西中医药大学医学技术学院, 陕西 咸阳 712046; 2. 陕西中医药大学基础医学院, 陕西 咸阳 712046)

【摘要】 目的 探讨制作实验小鼠骨髓病理切片的最佳取材部位。**方法** 将实验小鼠颈椎脱臼处死后取胫骨、股骨、颅骨、胸骨、髌骨等 5 个不同部位制作骨髓病理切片, 光镜下观察并拍照。比较不同部位骨髓实质及造血微环境的分布情况, 选择最能反映骨髓造血功能的取材部位。**结果** 髌骨骨髓切片可见大量分布均匀的红系、粒系细胞, 血窦和巨核细胞清晰, 支架组织结构紧密, 脂肪细胞少。颅骨、胸骨、胫骨、股骨骨髓切片造血细胞显示不清, 增生不活跃, 且存在较多脂肪细胞。**结论** 髌骨是作为制作骨髓切片的最佳取材部位之一。

【关键词】 骨髓切片; 部位; 比较

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0064-02

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 007. 013

Comparison of the experimental mice of different parts of the bone marrow biopsy

FENG Jing¹, YU Yuan-wang²

(1. School of Medical Techniques in Shanxi University of Chinese Medicine, Shanxi Xianyang 712046, China;

2. Basic Medical College of Shaanxi University of Chinese Medicine, Shanxi Xianyang 712046, China)

【Abstract】 Objective To explore the best sampling position of bone marrow biopsy in mice. **Methods** Mice were sacrificed by cervical dislocation, then take the skull, sternum, tibial, femoral and iliac bone, making pathological section. Observed and photographed under light microscope. Comparison of the distribution of the essence and the hematopoietic microenvironment in different parts. Select site which can best reflect the hematopoietic function of bone marrow. **Results** A large number of hematopoietic cells in ilium marrow sections visible. The cells are evenly distributed. Blood and megakaryocytes were clearly visible. The arrangement of the structure of the scaffolds for tissue closely. The number of fat cells less. Bone marrow hematopoietic cells in the skull, sternum, tibial, femoral were not clear and not active. And there are more fat cells. **Conclusions** As the best sampling position of bone marrow biopsy, is ilium.

【Key words】 Bone marrow biopsy; Part; Comparison

骨髓是机体的主要造血器官, 由骨髓实质和造血微环境组成, 其造血功能的强弱可通过骨髓病理切片反应出来。当骨髓被致病因素抑制时, 骨髓实质分化增殖不良, 造血微环境的改变均可导致机体造血功能下降^[1-2]。因此, 众多实验研究者通常选择制作骨髓组织病理切片并观察其镜下特点, 以此作为检测造血系统损伤的指标之一。

在大量实验研究制作小鼠骨髓病理切片时, 实验者大多选择将小鼠处死后取其股骨, 作为制作切片的主要取材部位^[3-7], 也有研究报道采用取小鼠腰椎骨髓^[8]或胸骨骨髓^[9]的方法制作骨髓病理切片。对于选取何处病理组织制作切片最能反映机体的造血功能, 尚鲜有报道。本实验通过选取小鼠不同部位骨髓组织制作病理切片, 镜下观察其骨髓

实质及造血微环境,探寻能够更好反映小鼠骨髓病理变化的部位,为今后动物实验制作骨髓病理切片的取材部位选择提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

健康 SPF 级昆明种小鼠 10 只,雄性,6 ~ 8 周龄,体重 18 ~ 22 g,由西安交通大学医学院动物实验中心提供【SCXK(陕)2013-001】,在陕西中医药大学中药药理实验室【SYXK(陕)2007-006】中取材。

1.2 仪器与材料

E220 光学生物显微镜(Olympus 公司)、病理图文系统分析工作站、轮转式切片机、推片与烤片两用器、苏木精-伊红(HE)染液等。

1.3 方法

健康 SPF 级昆明种小鼠 10 只,适应性饲养 7 d 后,颈椎脱臼处死并解剖,分别取小鼠胫骨、股骨、颅骨、胸骨、髂骨等 5 个不同部位制做骨髓病理切片,常规 HE 染色,40 倍光镜下观察并拍照。

2 结果

光镜下各部位骨髓切片均可见不同分化阶段粒、红、巨核细胞,但胫骨、股骨骨髓切片镜下脂肪细胞较多,支架结构较疏松;颅骨、胸骨骨髓切片镜下造血红系、粒系细胞数量较少,微环境排列较松散;唯有髂骨骨髓切片镜下红系、粒系细胞大量存在,分布均匀且排列紧密,血窦和巨核细胞清晰,粒细胞胞浆嗜碱性,增生活跃,并可见核分裂像,骨髓造血组织支架结构紧密且脂肪细胞数量较少,可较好的反映骨髓的造血功能。因此,可将髂骨作为制作骨髓病理切片的首选取材部位(彩插 5 图 1)。

3 讨论

骨髓存在于长骨(如胫骨、股骨)的骨髓腔,扁骨(如髂骨、肋骨)和不规则骨(胸骨、脊椎骨等)的松质骨中,观察骨髓切片可以全面了解骨髓造血细胞的增生程度、分布及细胞密度,还可以反应骨髓细胞原先的面貌^[10]。小鼠出生时,全身骨髓腔内充满具有造血功能的红骨髓,随着年龄增长,骨髓中脂肪细胞逐渐增多,相当一部分红骨髓被没有造血功能的黄骨髓取代,仅在椎管、胸骨、肋骨、髂骨、颅骨及股骨和肱骨上端的松质内保留有红骨髓。考

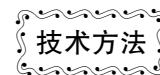
虑到在制作骨髓病理切片时,椎管、颅骨等部位取材较困难,目前实验研究多选取小鼠股骨作为制作骨髓病理切片的主要部位。但因具有造血功能的红骨髓多存在于股骨上端的骨松质内,在制作骨髓切片时不易将其与位于股骨干内的黄骨髓分离,因此镜下观察股骨骨髓病理切片脂肪细胞较多,造血细胞比例明显下降,不利于反映骨髓的造血功能。

本实验通过对比小鼠不同部位的骨髓病理切片,镜下观察骨髓实质和造血微环境,发现小鼠髂骨较颅骨、胸骨、股骨、胫骨等其他部位骨髓切片显示造血细胞更清晰、分布更均匀,其支架结构更紧密,脂肪细胞含量较少,且实验的可行性和操作性较强,可作为制作骨髓病理切片的一个最佳取材部位。

参考文献:

- [1] 陆英,钟雪云,陈运贤,等. 参芪扶正注射液对化疗后小鼠造血功能影响的实验研究[J]. 热带医学杂志,2005,5(6):750-752.
- [2] 何晓莉,张雁,吴宏,等. 当归多糖对辐射损伤小鼠造血系统保护作用的研究[J]. 重庆医学,2012,41(35):3734-3736,封4.
- [3] 申星,熊国林,柳晓兰,等. 不同剂量 HS6101 对环磷酰胺损伤小鼠造血功能的影响[J]. 国际药学研究杂志,2014,(6):693-697.
- [4] 侯新然,王晓波,裴荣刚,等. ⁶⁰Co 射线损伤后小鼠造血系统生理指标的动态变化[J]. 解放军药理学学报,2012,28(6):491-494,498.
- [5] 顾宏涛,杨岚,田琼,等. WR-2721, PF4 对于全身照射条件下小鼠造血系统保护作用的比较[J]. 第四军医大学学报,2003,24(21):2006-2008.
- [6] 黄茜,祝彼得,石娅萍,等. 八珍汤对骨髓损伤小鼠脾脏指数外周血象及骨髓造血组织面积影响的实验研究[J]. 现代医药卫生,2012,28(8):1123-1125.
- [7] 孙巍巍,孙强,王巍,等. 不同剂量补髓生血颗粒对再生障碍性贫血模型大鼠外周血及骨髓的影响[J]. 中医药信息,2008,25(6):64-66.
- [8] 常公民,彭瑞云,高亚兵,等. rhIL-11 和 rhG-CSF 对中子照射致小鼠骨髓损伤的治疗作用[J]. 中华放射医学与防护杂志,2009,29(4):375-379.
- [9] 胡锴勋,孙琪云,刘丽辉,等. 间充质干细胞治疗急性骨髓型放射病的实验研究[J]. 中华放射医学与防护杂志,2005,25(3):221-224.
- [10] 卢兴国. 骨髓细胞学和病理学[M]. 北京:科学出版社,2008:759-877.

[修回日期]2015-06-10



实验病理标本前期处理应注意的若干问题

李建瑛, 刘江伟, 许 琴, 张东辉, 赵红艳, 是文辉,
李佳佳, 董 翔, 马 娜, 许永华

(兰州军区乌鲁木齐总医院动物实验科, 乌鲁木齐 830000)

【摘要】 实验病理技术中标本的取材、固定以及后续的制片染色, 对病理诊断结果的可靠性、真实性有很大的影响, 本文对动物实验病理制片关键步骤中易出现的问题及对策进行探讨。

【关键词】 实验病理; 组织固定; 切片制作; 病理诊断

【中图分类号】 R-332 【文献标识码】 A 【文章编号】 1671-7856(2015) 07-0066-03

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 007. 014

Several issues should be mentioned before pathological specimen processing

LI Jian-ying, LIU Jiang-wei, XU Qin, ZHANG Dong-hui, ZHAO Hong-yan,
SHI Wen-hui, LI Jia-jia, DONG Xiang, MA Na, XU Yong-hua

(Animal Experiment Department, Lanzhou Military District Urumqi General Hospital, Urumqi 830000, China)

【Abstract】 Experimental pathology is an important part of life science research associated with animal experiment. Acquisition and fixation of optimum specimen and subsequent section of paraffin embedded tissue and dyeing are key factors playing important role in reliability, authenticity of pathological diagnosis. This paper summarizes the problems encountered in pathological section making of animal experiment and it correspond solutions.

【Key words】 Experimental pathology; Tissue fixation; Section making; Pathological diagnosis

近几年随着病理技术大力发展, 在医学领域成果倍出。笔者从事动物实验病理技术多年, 发现部分科研人员对病理技术不了解, 缺乏病理基础知识, 甚至得出错误结论, 造成人为的损失, 其共性是轻视了病理组织标本的前期处理, 这是一个在病理工作中十分关键的步骤, 根据笔者多年工作经验对该问题谈谈体会。

1 取材前的准备工作

1.1 取材器械准备

准备一支 HB 铅笔, 一套取材器械, 包括: 组织

剪、无齿镊、刀柄及一次性手术刀片。标本取材的编号一定要用铅笔标注清晰。取材器械要锋利, 尤其是手术刀片要定期更换。

1.2 固定液的选择

固定液需根据标本制作的需要而选择不能一概而论。常用固定液有以下几种: ①甲醛: 一般作为固定剂使用的 10% 甲醛是用水和 40% 甲醛 (9: 1) 混合而成, 实际上是 4% 的甲醛溶液^[1]。②中性甲醛: 是最常用的固定液之一, 固定效果好, 为免疫组织化学最常用的固定液, 对组织穿透性好, 组织收缩小。③多聚甲醛: 该固定液适用于动物灌注固

[基金项目]

[作者简介] 李建瑛 (1977 -), 女, 实验师, 本科, 专业: 实验病理学技术。Email: 1610801584qq.com。

[通讯作者] 许永华 (1956 -), 女, 主任技师, 研究方向: 医学实验动物学。Email: xyh821023@sina.com。

定取材,也可用于组织标本的较长时间保存,也可用于光镜及免疫组织化学实验。④戊二醛($C_5H_8O_2$)电镜固定液:戊二醛固定液的优点是对糖原、糖蛋白、微管内质网和细胞基质等有较好的固定作用。一般戊二醛的 pH 为 4.0~5.0 贮存时间过长时 pH 会下降,当 pH 降至 3.5 以下就不能使用,戊二醛原液应在冰箱保存^[2]。

1.3 固定标本容器的选择要合适

有时标本瓶口过小,等到修材时,无法取出标本从而引起由于过度牵拉而导致组织形态结构的破坏;有时出现标本大小与固定液容积比例不合适,固定液过少而造成组织渗透不全固定不完全^[2-3]。

2 取材

2.1 阴性对照组标本的取材

动物实验中均有阴性对照组,在动物实验病理中一定要取 3~5 只,排除其个体差异。标本的取材一定要正规,不能随意对待标本。

2.2 组织标本的取材

主要取之于活组织检查标本、动物模型组织标本、解剖标本均为新鲜组织夹取标本用无齿镊,以免对组织造成人为损伤。如机体死亡 2 h 以上的组织可能有不同程度的自溶,其抗原可能发生变性消失或严重弥漫现象,因此尽快固定处理以免影响免疫组织化学标记效果。防止人为因素的影响:切取组织时应用锋利的刀剪,刀刃宜薄、并足够长。一般标本切取的组织块厚约 0.2~0.3 cm,根据情况可略作调整,大小以 $1.5 \times 1.5 \times 0.2 \sim 0.3$ cm 为宜,用于免疫组织化学染色的组织以 $1 \text{ cm} \times 1 \text{ cm} \times 0.2$ cm 为好,不要太大以免浪费试剂。取材时间应尽可能短:原则上应尽快取材,如:胃、肺、肠、脑组织、脊髓等组织要先固定再取材因组织薄软、含水量多等特点所以最好先固定再取材。注意特殊情况:取材应避免过多的坏死组织或凝血块,组织块上如有血液、粘液粪便等到污物应先用水冲洗干净再取材。

2.3 标本初步固定后的修材

修材切取组织时不宜过度用力,否则会挫伤或挤压组织引起组织结构的变形和损伤,取材组织大小 $1.5 \times 1.5 \times 0.2 \sim 0.3$ cm 为宜,

2.4 特殊取材

由于电镜电子束穿透能力的限止,必须把标本切成厚度小于 0.1 μm 以下的薄片才适用,(1)取材动

作应迅速(争取在 1 min 内)投内固定液;(2)所取组织的体积要小,一般不超过 $0.2 \times 0.2 \times 0.3$ cm;(3)操作最好在低温($0 \sim 4^\circ\text{C}$)下进行,因固定剂的渗透能力较弱以降低酶的活性防止细胞自溶,还可能由于污染微生物在组织内繁殖使细胞微结构遭受破坏。(4)将取材的组织放在洁净的卡片纸上,滴一滴冷却的固定液用新的锋利刀片垂直往下切,然后用牙签或镊子将组织移至盛有冷固定液的小瓶中^[4]。

3 组织固定

3.1 标本固定要及时充分

良好的组织学切片取决于及时充分的组织固定,组织固定不良或不及时在以后的标本制备过程中则无法加以纠正,也无法切出优质的切片,固定液的量是我们常忽略的问题,组织与固定液的比例至少是 1:10,所以一些大的标本应取材后再固定或固定一段时间后更换固定液。固定的容器宜相对要大,并且能加盖封闭,防止组织与容器粘连或固定液挥发而产生固定不良,瓶底常垫以棉花防止组织标本与容器粘连使固定剂不能均匀渗入组织块,若为脏器标本体积较大时应切开脏器,平铺固定,实质器官取成小块组织固定^[5]。固定不及时或不当引起自溶出现细胞核质着色较浅轮廓不清以及程度不等的条状发白区现象。标本无论大小离体后 30 min 内立即固定。固定组织时固定液量要足量,一般应为组织块总体积的 5~10 倍,也可达 15~20 倍。最好固定 24 h 后再取材。

3.2 组织固定方法

大多数组织采用浸泡法固定,即体外固定。动物取材尤其是对比较娇嫩的组织如:脑积液、内耳及视网膜等,最好采用灌注法固定,即通过血管将固定液灌注到所要固定的组织。一般大动物可通过动脉或静脉导管灌注,小动物可直接用注射针插入心室或主动脉,在固定前先用生理盐水把血液冲洗干净然后再进行灌注固定^[3]。

4 病理切片

石蜡切片:其优点是组织结构保存良好,在病理诊断和回顾性研究中有较大的实用价值能连续切组织结构清晰,抗原定位明确。冰冻切片:是免疫组织化学染色中最常用的一种方法,其最突出的优点是能够较完好的保存多种抗原的免疫活性尤其是细胞表面抗原应采用冰冻切片。超薄切片:电

镜取材,切取 1 mm × 1 mm × 1 mm 大小的组织数块,置于镧醛固定液,4℃ 过夜,锇酸处理。丙酮梯度脱水,环氧树脂浸透、包埋、聚合,光学显微镜下进行组织块修整,超薄切片,铜网捞片,在透射电镜扫描电镜下观察并照片,用于观察微生物或病毒形态及细胞器结构^[6]。

5 染色

组织切片要经过烘烤使其与玻璃片粘帖牢固,一般捞片后在空气中略微干燥后即烤片,一般在 60℃ 左右烤箱内烤 30 min。免疫组化染色则需要先在 HE 制片基础上放在 37℃ 恒温箱过夜,这样减少染色中脱片现象。皮肤组织应及时烤片。石蜡切片必需经过脱蜡后才能染色,脱蜡前切片要经烘烤组织切片脱蜡应完全彻底,脱蜡不净是影响染色不良的重要原因^[7]。苏木精染色要充分,应根据染片的多少和液体的新鲜来确定时间;盐酸酒精分化要适当,必要是应在镜下观察,返蓝要充分这样细胞核会更清晰;伊红染色不宜过长,切片经伊红染后,水洗时间要短。切片经过染色后,通过从低浓度到高浓度各级酒精脱水。低浓度酒精对伊红有分化作用,切片经过低浓度时间要短快速,向高浓度时逐步延长脱水时间,脱水要彻底,如脱水不彻底会造成切片发雾,在显微镜下组织结构模糊不清。染色后必须经二甲苯处理透明才能用树胶封片,如透明不充分切片会出现结构模糊不明^[8]。染色后进行封片,在封片时树胶不能太稀或太稠,也不能滴太多或太少,太稀或太少切片容易出现空泡。HE 染色结果:因细胞核呈兰色,细胞浆呈淡红色,颜色鲜艳,细胞核浆对比明显清晰。

6 讨论

在多年的病理技术工作中发现许多实验人员

对病理技术了解不深,不严格按照规定操作流程处理标本,不慎重随意性大。针对这个问题,我们加强了对实验人员的病理基础知识培训,在病理工作的配合方面取得了良好效果。

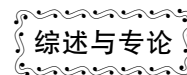
另外在人员少工作量大的情况下,坚持病理技术人员参与动物实验制度。掌握实验进展,指导实验人员共同制订病理工作计划。

我们还坚持严格执行病理医生取材制度。在工作中注意实验人员、技术人员、病理工作人员多方紧密合作完成实验病理工作。通过以上工作保证动物实验病理诊断的准确性,维护其“金标准”地位。

参考文献:

- [1] 郭志杰. 病理制片中固定液的选择[J]. 实用医技杂志, 2009,6(6):146.
- [2] 王伯云,李玉松,黄高昇,等. 病理学技术[M]. 人民卫生出版社,北京;2000年(第一版):61-76.
- [3] 王晓鸿,曹婉维. 制作优质 HE 病理组织切片的要素[J]. 中国实用医药, 2011,6(6):135.
- [4] 刘桦,卢鹤翔. 影响病理切片制作的因素及质量控制[J]. 中国煤炭工业医学杂志,2005,8(12):1339.
- [5] 张同海. 病组织标本前期处理常见问题[J]. 实用医技杂志, 2006,13(19):145.
- [6] 赖英荣,钟觉民,罗灿峤. 活体组织 HE 制片程序探讨[J]. 实用医技杂志,2007,14(12):1532.
- [7] 张新新,付红霞,李艳丽. 日常病理切片技术的几点体会[J]. 临床合理用药,2010,3(2):8.
- [8] 胡双庆. 有关影响常规病理制片质量几个问题的探讨[J]. 中国社区医师,2010,12(229):103.

[修回日期]2015-06-25



脂肪干细胞分离纯化方法研究进展

刘 琴,王丽平,陈 芳,张 宜

(解放军广州军区武汉总医院医学实验科,武汉 430070)

【摘要】 脂肪干细胞作为种子细胞广泛应用于组织工程中,而获得足够量的、活性高的、高纯度的脂肪干细胞是其在组织工程中应用的前提。本文综述近几年来脂肪干细胞分离纯化方法的研究进展,比较各方法的优缺点,为分离纯化出理想的脂肪干细胞提供理论依据。

【关键词】 脂肪干细胞;分离;纯化;组织块贴壁法;酶消化法;免疫磁珠分选法;密度梯度离心法

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0069-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2015. 007. 015

Progress in the isolation and purification methods of adipose-derived stem cells

LIU Qin, WANG Li-ping, CHEN Fang, ZHANG Yi

(Department of Medical Experiments, Wuhan General Hospital of Guangzhou Military Command, Wuhan 430070, China)

【Abstract】 Adipose-derived stem cells (ASCs) as potential seeded cells have been widely used in tissue engineering. Thus to obtain enough, high activity, high purity adipose-derived stem cells is the particular important premise of the application in tissue engineering. In this paper, the isolation and purification methods of ASCs were reviewed and the merit and demerit of different methods were compared in order to provide theoretical basis for safe and high-effective isolation and purification of ASCs.

【Key words】 Adipose-derived stem cells; Isolation; Purification; Explants culture method; Enzymatic digestion method; Immunomagnetic beads sorting method; Density gradient centrifugation

脂肪干细胞(adipose-derived stem cells)来源于脂肪组织,取材方便、对自体损伤较小,具有自我更新、多向分化能力、自体移植不发生排斥反应等特点,是组织工程中最有应用前景的种子细胞之一。然而有研究表明,脂肪组织中存在的脂肪干细胞含量很低,占3%左右,并且分离出来的细胞纯度不理想^[1]。因此如何获得足够量的、活性高的、高纯度的细胞极为重要。随着科研技术的不断发展,研究者提出了脂肪干细胞不同的分离纯化方法。本文

就近年来脂肪干细胞分离纯化方法的新研究进展作一综述。

1 脂肪干细胞分离方法

1.1 组织块贴壁法

组织块贴壁法即将脂肪组织剪成适宜大小的组织块,然后将组织块贴壁到培养瓶中进行培养^[2]。此法的核心是确保脂肪组织块贴壁,但在实际操作中很难保证每块组织块贴壁,尤其是在换液

[作者简介]刘琴(1986-),女,技师,硕士,从事细胞生物学和分子生物学方面的研究,E-mail: liuqin_0629@163.com

[通讯作者]张宜(1965-),男,硕士,主任药师,从事药学信息研究,E-mail: abcd1566@sina.com

过程中,组织块很容易漂浮,导致脂肪组织的浪费。

Jing W 等人^[3]采用组织块贴壁法分离培养 8 周龄 BALB/c 小鼠脂肪干细胞时,在脂肪组织剪碎之前,先吸取脂肪组织表面附着的多余水分,将脂肪组织块接种到培养瓶后让组织块贴壁一段时间后再加入细胞培养液,这样的处理可以使脂肪组织块更加牢固地贴在培养瓶上。本实验室采用此法分离脂肪干细胞时将组织块接种到培养瓶后置于培养箱内培养 30 min 后再加入培养液,使得组织块贴壁更加牢固^[4]。

1.2 酶消化法

酶消化法为原代细胞培养常用的方法之一,原理是利用新鲜离体组织的细胞生物学特性未发生明显的变化,仍具有二倍体遗传特性,通过消化液去除细胞间质,使细胞能够更好地吸收外界营养和排出代谢产物,短时间内获得大量的活细胞。脂肪组织酶消化法即脂肪组织被剪成碎块置于酶中消化,再通过过滤、洗涤和离心等步骤去除漂浮在上层的脂肪细胞和油脂,从而得到脂肪干细胞。Jiang A 等^[5]通过酶消化法从人脂肪组织中分离出脂肪干细胞,所培养的细胞贴壁生长、细胞形态为典型的长梭形成纤维样,表达脂肪干细胞特殊的表面标记物 CD29、CD44、CD105,阴性表达造血干细胞相关的表面标记物 CD34、CD45。

酶消化法实际上是一种费时、昂贵的方法,尤其是在需要分离大量脂肪组织的时候,其弊端显得更为突出;在酶的种类、浓度、消化时间上存在很大差异,缺乏统一的标准,大多数研究者采用 I 型胶原酶消化分离原代细胞^[6],少数采用 II 型胶原酶^[7]、IV 型胶原酶、VIII 型胶原酶^[8]、胰酶^[9]或者胶原酶联合应用胰酶^[10]进行消化分离,酶的使用浓度从 0.05 ~ 2.5 g/L 不等^[11-14],消化时间范围为 0.5 ~ 3 h^[15-17],从而使得分离出来细胞的活性、表型、潜能存在一定的差异;另一方面,市场上的胶原酶和胰酶纯度不高,可能包含有色素、内毒素、异种抗原、异种蛋白酶体^[18-19];消化法获得的脂肪干细胞不纯;人为操作过多,容易造成污染;此外,需要的脂肪组织量较大,当脂肪组织量较少时,采用此法无法扩增出足够量的脂肪干细胞用于后续分析^[20]。

Griesche N 等^[21]在常规胶原酶消化法分离脂肪干细胞的基础上作了一些改进,在消化获得的细胞接种培养 60 min 后马上进行换液,与常规胶原酶消化法相比,此法可以明显减少 desmin、smA 和 six2

的表达,提高干细胞标记物 nestin、oct-4 和 sall-1 的表达。Carvalho PP 等^[22]使用临床级的无异源蛋白的释放酶消化人脂肪组织,消化获得的脂肪干细胞活性和功能与使用科研级的胶原酶 I、胶原酶 A、胶原酶 NB4 相比无明显区别,表明高度纯化的释放酶可替代科研级的胶原酶,减少酶中异源蛋白对脂肪干细胞的污染。Güven S 等^[23]使用 sepax 装置自动分离脂肪干细胞,方法是将样品和胶原酶装入转移袋中,37℃ 孵育 1 h 后,转移袋与 CS-490.1 试剂盒相接,在 sepax 装置中启动 CS-490.1 试剂盒开始自动消化,收集消化所得细胞,此装置分离得到的脂肪干细胞比传统的手动消化法效率高、细胞产量高、人为干预少。胡金灵等^[24]分离 SD 大鼠脂肪干细胞时采用 0.25% I 型胶原酶消化脂肪组织 30 min,离心,将获得的细胞接种培养获得所需的细胞,此法提高了胶原酶浓度,缩短消化时间,可减少胶原酶对细胞活性的影响;省略了传统胶原酶消化法中筛网过滤和红细胞裂解两个步骤,降低人为操作、试剂对脂肪干细胞的损伤。

1.3 其他方法

近几年来,除了传统的脂肪干细胞分离方法,还有些寻求突破的新方法出现。

1.3.1 吸附柱法

Ito K 等^[25]于 2010 年首次使用由非织造织物组成的装置从骨髓中成功分离出间充质干细胞,分离出来的细胞表达间充质干细胞细胞表型标记物,具有成脂成骨潜能。Doi K 等^[26]参照上述方法设计出一个由无纺纤维和聚乙烯织物组成的网格直径为 100 μm 的吸附柱,此无纺纤维和聚乙烯织物对贴壁细胞具有亲和力,具体方法是将抽脂产物的液体部分通过吸附柱,贴壁细胞吸附到吸附柱中,再通过逆行流冲洗出吸附柱中吸附的细胞,获得的细胞接种培养,扩大的细胞表达脂肪干细胞相关的表面标记物,具有向脂肪细胞与成骨细胞分化的能力,成功从抽脂产物液体部分中分离出脂肪干细胞。此法可以避免酶的使用,但是仅适用于抽脂产物的液体部分,而且需要大量的样品。

1.3.2 直接离心法

直接离心法的原理是通过离心收集吸脂时吸脂产物中混有的游离脂肪干细胞,将离心得到的脂肪干细胞接种培养。Shah FS 等^[27]将得到的吸脂产物用磷酸盐缓冲液洗涤,离心,分别收集上层漂浮物和下层沉淀物,上层漂浮物加入磷酸盐缓冲液再

次洗涤,离心,此过程重复 3 ~ 4 次,将每次获得的下层沉淀物接种到培养瓶则可获得脂肪干细胞。此法仅适用于吸脂手术获得的脂肪组织,并且需要大量的吸脂产物。

1.3.3 胶原酶消化法结合组织块贴壁法

候晓琳等^[28]分离 C57BL/6J 小鼠脂肪干细胞时将 I 型胶原酶消化获得的单细胞以及未消化完全的脂肪组织块一起接种到培养皿中,8 ~ 9 d 时细胞即铺满皿底。此法将胶原酶消化法与组织块贴壁法两种方法有机结合起来,在短时间内适度消化降低胶原酶对细胞活力损伤,同时把剩余未消化的脂肪组织块一起接种,可以充分利用脂肪组织。不足之处是此法未与单独采用 I 型胶原酶消化法、组织块贴壁法所获得的脂肪干细胞在细胞产量、活性、分化潜能等方面进行比较。

2 脂肪干细胞纯化方法

为获得纯度较高的脂肪干细胞,目前有学者在分离的基础上结合相应的纯化方法,以获得研究需要的细胞,现有的脂肪干细胞纯化方法如下。

2.1 免疫磁珠分选法

免疫磁珠分选法分离纯化细胞的原理是基于细胞表面抗原与连在磁珠上相应的特异性单抗结合,当单细胞悬液通过特定的外加磁场时,与磁珠相结合的细胞被吸附滞留在磁场中,未与磁珠结合的细胞则不能被吸附在分选柱内,从而使细胞得以分离。免疫磁珠分选法将细胞生物学、磁力学和免疫学等知识融于一体,具有高度特异性分选细胞的特点。Gierloff M 等^[29]使用免疫磁珠分离法从培养的大鼠脂肪干细胞中分离纯化出 CD29⁺、CD71⁺、CD73⁺、CD90⁺ 各脂肪干细胞亚群,各干细胞亚群均具向脂肪细胞分化的能力,但是 CD29⁺ 干细胞亚群的成脂能力强于 CD71⁺、CD73⁺、CD90⁺ 各干细胞亚群。

免疫磁珠分选法纯化脂肪干细胞顺利进行的重点侧重于标记磁珠时相应抗体的选择,若只用单一特异性标记物原则上会造成其他脂肪干细胞亚群的丢失。目前有报道用 CD29、CD44、CD49d、CD73、CD105 等作为纯化脂肪干细胞的表面标记物^[30]。然而,至今为止研究者们对于脂肪干细胞的特异性标记物还存在一定的争议,尤其是 CD34。2006 年国际细胞治疗协会规定 CD34 为脂肪干细胞的阴性标记物^[31]。随后许多研究者也同样认为脂

肪干细胞不表达 CD34。最近几年,越来越多的研究者发现早期培养的脂肪干细胞表达 CD34^[32-35]。Baer PC^[36]认为脂肪干细胞的细胞表型在体外是动态的,随着传代次数的增多有的细胞表型消失,有的细胞表型增加。故采用免疫磁珠法纯化脂肪干细胞时选择的抗体和细胞传代次数很重要。此外,常用的免疫磁珠分选法如亲和吸附柱、FACS 组织培养瓶铺展贴壁、MACS 都存在一些不足之处,如实验设备昂贵、试验成本高、技术要求高、分离出来的细胞容易污染、对细胞活力有一定的损伤等。重要的是分离出来的细胞仍然具有人工修饰的非自身的 Ig 片段,进行细胞移植治疗时可能会引发一系列宿主反应,尤其是会产生活性氧,活性氧进一步引起炎症反应,同时影响脂肪干细胞自身的修复能力^[37]。

2.2 密度梯度离心法

密度梯度离心法是根据不同颗粒之间的沉降系数不同,在一定离心力作用下,不同颗粒以自己的速度沉降,在密度梯度不同区域上形成区带,从而不同密度的细胞得到分离。杜明昌等^[38]采用密度梯度离心法分离由真空负压抽脂法吸取的猪皮下脂肪 50 g,可获得 $(2.1 \sim 2.7) \times 10^6$ 个脂肪干细胞。

密度梯度离心法能够顺利进行在于介质的选择和介质最佳密度的确定上,目前常用的离心介质为聚蔗糖(Ficoll)和经过聚乙烯吡咯烷酮处理的硅胶颗粒混悬液(Percoll)。Chang 等^[39]研究发现利用 Ficoll 分离纯化出来的人骨髓间充质干细胞在成核细胞数目及集落形成率均高于 Percoll 法,且 Ficoll 法纯化出来的细胞显著高表达 CD90⁺、CD105⁺、CD166⁺ 和 SH3⁺,认为 Ficoll 更适用于制备人骨髓间充质干细胞。Bourzac 等^[40]的研究表明采用 Percoll 法分离纯化马骨髓间充质干细胞的细胞产量及自我更新潜能优于 Ficoll 法。Grisendi 等^[41]用 1.073 g/mL、1.077 g/mL 两种不同密度的 Ficoll 分离纯化骨髓间充质干细胞,结果显示,前者所得细胞在免疫荧光表达实验中更具有活力,成纤维细胞集落形成单位高出后者 1.5 倍,细胞产量高出后者 1.8 倍。上述研究表明使用不同介质、不同密度的同一种介质体外分离纯化骨髓间充质干细胞时对细胞的活性、产量、表型有着不同程度的影响,然而密度梯度离心常用介质是否对脂肪干细胞的各方面存在影响还不得而知。

3 小结

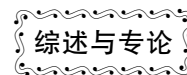
寻找一种操作简单、可控性强、经济的脂肪干细胞分离方法一直是学者们研究的重要内容。现有脂肪干细胞的分离方法种类较多,都存在一些缺点。组织块贴壁法在操作中保证脂肪组织块牢固贴壁是一个难题。酶消化法需要在酶的种类、浓度、消化时间上制定统一标准。有研究表明采用组织块贴壁法分离出来的脂肪干细胞产量高于酶消化法,所得细胞活性、细胞表型、成脂成骨分化能力与酶消化法相比无明显区别^[3,20]。若能解决组织块贴壁法组织块贴壁难的问题,那么组织块贴壁法将是一种前景可观的脂肪干细胞分离方法,因为组织块贴壁法既可避免酶的使用对细胞各方面造成的潜在影响,又具有经济实惠、可控性比酶消化法强的特点。其他脂肪干细胞的分离方法虽然在一定程度上可以弥补传统方法的一些缺点,但是仍然不能解决现有脂肪干细胞分离方法存在的不足。要获得高纯度的脂肪干细胞,紧接细胞分离后即可进行细胞纯化,免疫磁珠分选法所使用的设备和抗体比较昂贵,不适用于一般的科研试验和临床研究。密度梯度离心法所使用的试剂和设备比免疫磁珠分选法所采用的试剂和设备相对来说便宜很多,而且分离出来的脂肪干细胞纯度较高,若能弄清楚离心介质是否对脂肪干细胞各方面造成影响,则密度梯度离心法将是比较理想的脂肪干细胞纯化方法。

参考文献:

- [1] Fraser JK, Zhu M, Wulur I, *et al.* Adipose-derived stem cells [J]. *Methods Mol Biol*, 2008, 449:59–67.
- [2] Priya N, Sarcar S, Majumdar AS, *et al.* Explant culture: a simple, reproducible, efficient and economic technique for isolation of mesenchymal stromal cells from human adipose tissue and lipoaspirate[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2012, 27:1–9.
- [3] Jing W, Xiao J, Xiong Z, *et al.* Explant culture: an efficient method to isolate adipose-derived stromal cells for tissue engineering[J]. *Artif Organs*, 2011, 35(2):105–112.
- [4] 刘琴,王丽平,喻晶,等. 组织块贴壁法扩增兔脂肪干细胞[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(1):88–93.
- [5] Jiang A, Li M, Duan W, *et al.* Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by adipose-derived stem-cells-assisted lipotransfer combined with bFGF[J]. *Scientific World Journal*, 2015, 2015:968057.
- [6] Kim DS, Lee MW, Yoo KH, *et al.* Gene expression profiles of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells are modified by cell culture density [J]. *PLoS One*, 2014, 9(1):e83363.
- [7] Cakici C, Buyrukcü B, Duruksu G, *et al.* Recovery of fertility in azoospermia rats after injection of adipose-tissue-derived mesenchymal stem cells: the sperm generation[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:529589.
- [8] Huang SJ, Fu RH, Shyu WC, *et al.* Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential[J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(4):701–709.
- [9] Markarian CF, Frey GZ, Silveira MD, *et al.* Isolation of adipose-derived stem cells: a comparison among different methods[J]. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(4):693–702.
- [10] He F, Pei M. Extracellular matrix enhances differentiation of adipose stem cells from infrapatellar fat pad toward chondrogenesis[J]. *J Tissue Eng Regen Med*, 2013, 7(1):73–84.
- [11] Razmkhah M, Jaberipour M, Ghaderi A. Downregulation of MMP2 and Bcl-2 in Adipose Derived Stem Cells (ASCs) following Transfection with IP-10 Gene[J]. *Avicenna J Med Biotechnol*, 2014, 6(1):27–37.
- [12] Sunay O, Can G, Cakir Z, *et al.* Autologous rabbit adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of bone injuries with distraction osteogenesis[J]. *Cytherapy*, 2013, 15(6):690–702.
- [13] Fu BC, Gao JH, Lu F, *et al.* Experimental study of the effect of adipose stromal vascular fraction cells on the survival rate of fat transplantation[J]. *Zhonghua Zheng Xing Wai Ke Za Zhi*, 2010, 26(4):289–94.
- [14] Pak J, Lee JH, Lee SH. Regenerative repair of damaged meniscus with autologous adipose tissue-derived stem cells[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014:436029.
- [15] Bhang SH, Park J, Yang HS, *et al.* Platelet-rich plasma enhances the dermal regeneration efficacy of human adipose-derived stromal cells administered to skin wounds [J]. *Cell Transplant*, 2013, 22(3):437–445.
- [16] Jiang M, Wang X, Liu H, *et al.* Bone formation in adipose-derived stem cells isolated from elderly patients with osteoporosis: a preliminary study[J]. *Cell Biol Int*, 2014, 38(1):97–105.
- [17] Hoke NN, Salloum FN, Kass DA, *et al.* Preconditioning by phosphodiesterase-5 inhibition improves therapeutic efficacy of adipose-derived stem cells following myocardial infarction in mice [J]. *Stem Cells*, 2012, 30(2):326–335.
- [18] Jahr H, Pfeiffer G, Hering BJ, *et al.* Endotoxin-mediated activation of cytokine production in human PBMCs by collagenase and Ficol[J]. *J Mol Med*, 1999, 77(1):118–120.
- [19] Yamamoto T, Ricordi C, Messinger S, *et al.* Deterioration and variability of highly purified collagenase blends used in clinical islet isolation[J]. *Transplantation*, 2007, 84(8):997–1002.
- [20] Ghorbani A, Jalali SA, Varedi M. Isolation of adipose tissue mesenchymal stem cells without tissue destruction: a non-enzymatic method[J]. *Tissue Cell*, 2014, 46(1):54–58.
- [21] Griesche N, Luttmann W, Luttmann A, *et al.* A simple modification of the separation method reduces heterogeneity of

- adipose-derived stem cells[J]. *Cells Tissues Organs*, 2010, 192(2):106–115.
- [22] Carvalho PP, Gimble JM, Dias IR, *et al.* Xenofree enzymatic products for the isolation of human adipose-derived stromal/stem cells[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2013, 19(6):473–478.
- [23] Güven S, Karagianni M, Schwalbe M, *et al.* Validation of an automated procedure to isolate human adipose tissue-derived cells by using the Sepax® technology [J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2012, 18(8):575–582.
- [24] 胡金灵, 邵世飏, 梁廷波. 脂肪干细胞提取方法的改良[J]. *浙江临床医学*, 2015, 17(2):215–217.
- [25] Ito K, Aoyama T, Fukiage K, *et al.* A novel method to isolate mesenchymal stem cells from bone marrow in a closed system using a device made by nonwoven fabric[J]. *Tissue Eng Part C Methods*, 2010, 16(1):81–91.
- [26] Doi K, Kuno S, Kobayashi A, *et al.* Enrichment isolation of adipose-derived stem/stromal cells from the liquid portion of liposuction aspirates with the use of an adherent column[J]. *Cytotherapy*, 2014, 16(3):381–391.
- [27] Shah FS, Wu X, Dietrich M, *et al.* A non-enzymatic method for isolating human adipose tissue-derived stromal stem cells [J]. *Cytotherapy*, 2013, 15(8):979–985.
- [28] 侯晓琳, 郁卫东, 崔梅花, 等. 小鼠脂肪间充质干细胞的分离培养及肠道归巢[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(6):854–860.
- [29] Gierloff M, Petersen L, Oberg HH, *et al.* Adipogenic differentiation potential of rat adipose tissue-derived subpopulations of stromal cells [J]. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 2014, 67(10):1427–1435.
- [30] Rada T, Reis RL, Gomes ME. Distinct stem cells subpopulations isolated from human adipose tissue exhibit different chondrogenic and osteogenic differentiation potential [J]. *Stem Cell Rev*, 2011, 7(1):64–76.
- [31] Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, *et al.* Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells [J]. The international Society for Cellular Therapy position statement[J]. *Cytotherapy*, 2006, 8(4):315–317.
- [32] Mitchell JB, McIntosh K, Zvonic S, *et al.* Immunophenotype of human adipose-derived cells: temporal changes in stromal-associated and stem cell-associated markers [J]. *Stem Cells* 2006, 24:376–385
- [33] Yoshimura K, Shigeura T, Matsumoto D, *et al.* Characterization of freshly isolated and cultured cells derived from the fatty and fluid portions of liposuction aspirates[J]. *J Cell Physiol*, 2006, 208:64–76
- [34] Varma MJ, Breuls RG, Schouten TE, *et al.* Phenotypic and functional characterization of freshly isolated adipose tissue-derived stem cells[J]. *Stem Cells Dev*, 2007, 16:91–104.
- [35] Scherberich A, Di Maggio ND, McNagny KM. A familiar stranger: CD34 expression and putative functions in SVF cells of adipose tissue[J]. *World J Stem Cells*, 2013, 5:1–8.
- [36] Baer PC. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: An update on their phenotype in vivo and in vitro[J]. *World J Stem Cells*, 2014, 6(3):256–265.
- [37] Hunt JA, Fok M, Bryan N. Impact of cell purification technique of autologous human adult stem cells on inflammatory reaction [J]. *Biomaterials*, 2013, 34(31):7626–7631.
- [38] 杜明昌, 刘宪民, 祖启明, 等. 自体脂肪干细胞复合不同初始浓度诱导支架修复猪膝关节软骨缺损的初步观察[J]. *中华临床医师杂志(电子版)*, 2013, 7(6):2523–2527
- [39] Chang Y, Hsieh PH, Chao CC. The efficiency of Percoll and Ficoll density gradient media in the isolation of marrow derived human mesenchymal stem cells with osteogenic potential [J]. *Chang Gung Med J*, 2009, 32(3):264–275.
- [40] Bourzac C, Smith LC, Vincent P, *et al.* Isolation of equine bone marrow-derived mesenchymal stem cells: a comparison between three protocols[J]. *Equine Vet J*. 2010, 42(6):519–527.
- [41] Grisendi G, Annerén C, Cafarelli L, *et al.* GMP-manufactured density gradient media for optimized mesenchymal stromal/stem cell isolation and expansion [J]. *Cytotherapy*, 2010, 12(4):466–477.

[修回日期]2015-06-10



PD-1:PD-L1/PD-L2 通路在结核感染中的免疫作用

占玲俊,唐 军,秦 川

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

【摘要】 PD-1:PD-L1/PD-L2 通路在肿瘤和某些感染性疾病中发挥免疫抑制作用,而在结核病中的免疫作用尚不明确。结核菌感染后,免疫细胞上 PD-1:PD-L1/PD-L2 通路高表达,体外实验显示:用该通路的抗体阻断后保护性 T 细胞增强,而体内免疫作用不明确。PD-1 与配体 PD-L1 结合后可能发挥免疫抑制作用,其中 PD-L1 表达受 Th1 细胞因子调控;PD-1 与配体 PD-L2 结合后可能发挥免疫保护作用,其中 PD-L2 表达受 Th2 型细胞因子调控。利用 Cas9-CRISPR 基因敲除方法分别敲除特定免疫细胞上 PD-1、PD-L1 和 PD-L2,可研究 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 在结核感染中免疫作用及机制,为结核病的防控提供理论依据。

【关键词】 PD-1:PD-L1/PD-L2 通路 结核感染 免疫作用

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0074-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.016

The immune role of PD-1:PD-L1/PD-L2 pathway in Mycobacterium tuberculosis infection

ZHAN Ling-jun, TANG Jun, QIN Chuan

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Key Laboratory of Human Diseases
Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese
Academy of Medical Sciences, Pan Jia Yuan Nan Li No. 5, Chao Yang District, Beijing 100021, China)

【Abstract】 PD-1:PD-L1/PD-L2 pathway played negative immune role in most tumor and several infectious diseases, but the immune role in tuberculosis (TB) was not explicated. Since the high expression of PD-1:PD-L1/PD-L2 pathway was correlated with MTB infection both in vitro and in vivo, the in vitro negative immune role was indicated by inhibited T cell protective immune function, while the in vivo immune role was not clear. The binding of PD-1 and PD-L1 played an immunosuppression role, the expression of PD-L1 was regulated by Th1-type cytokines. The binding of PD-1 and PD-L2 played protective immune role, and the expression was regulated by Th1-type cytokines. The immune role and mechanism of PD-1, PD-L1 and PD-L2 would be investigated by Cas9-CRISPR technique, which would provide theoretical basis for the tuberculosis prevention and control.

【Key words】 PD-1:PD-L1/PD-L2 pathway; Mycobacterium tuberculosis infection; Immune role

结核病是免疫相关的感染性疾病, T 细胞、APC (巨噬细胞、DC) 等是重要的免疫细胞^[1-3]。结核菌进入机体后, 首先被巨噬细胞吞噬, 当巨噬细胞的杀伤力强于结核菌的毒力时, 结核菌被清除, 反

[基金项目] “十二五-艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”国家科技重大专项子课题(2012ZX10004501)。

[作者简介] 占玲俊, 博士, 副研究员, 研究方向: 结核病与结核动物模型研究。

[通讯作者] 秦川, 教授, 博士生导师。E-mail: chuanqin@vip.sina.com。

之,结核菌裂解巨噬细胞产生病变,继而感染其他巨噬细胞,导致感染播散^[2]。此外,结核菌还经 APC 进行抗原加工并提呈给 T 细胞,刺激免疫应答的产生,通过 $\text{IFN-}\gamma^+$ CD4^+ T 细胞和 $\text{IFN-}\gamma^+$ CD8^+ T 细胞^[1-2]发挥免疫保护作用,通过分泌 IL-17 细胞因子的 Treg 细胞^[3]发挥免疫抑制作用,感染的结果取决于保护性免疫和抑制性免疫抗衡的结果。

1 程序性死亡配体-1 (PD-1) 通路 与免疫

PD-1 通路包括 PD-1 及两个配体 PD-L1 和 PD-L2。PD-1 主要表达于 CD4^+ T 细胞,PD-L1 表达于 T 细胞和 APC(单核/巨噬细胞,DC 和 B 细胞)表面,PD-L2 表达于炎性巨噬细胞、DC、B1 细胞表面。在病原或某些抗原蛋白诱导下,PD-L1、PD-L2 均可表达于 T 细胞,PD-L1 的表达受 Th1 细胞调控,PD-L2 的表达受 Th2 细胞调控^[4]。

在肿瘤、自身免疫病和某些持续性感染病(包括病毒如 HIV、HCV 等、细菌、寄生虫和真菌感染)中,PD-1:PD-L1/PD-L2 通路向 T 细胞传递抑制性第二信号,导致 T 细胞“无能”或“耗竭”,从而发病^[5]。虽然 PD-1:PD-L1/PD-L2 通路整体发挥免疫抑制作用,但其中 PD-L1 和 PD-L2 可能发挥相反的免疫作用。PD-L1 能分别与 PD-1 和 B7-1 作用,发挥免疫抑制作用;PD-L2 能分别与 PD-1 和 B7-2 作用,发挥免疫保护作用^[6-7]。

2 PD-1:PD-L1/PD-L2 通路 与结核感染

在活动性结核病人中,T 细胞、单核/巨噬细胞及 B 细胞上 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 的表达均明显上升,以 PD-L1 表达升高为主要特点。其中 T 细胞上以 PD-1 升高为主;单核巨噬细胞和 B 细胞以 PD-L1 为主,PD-1 和 PD-L2 的表达也升高,表达水平接近。

体外实验证明:用 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 的单抗分别阻断结核病人外周血 T 细胞上 PD-1、单核细胞上 PD-L1/PD-L2、或联合阻断 PD-1 和 PD-L1/PD-L2,均能挽救保护性的 $\text{IFN-}\gamma^+$ CD3^+ T 细胞,并且保护性 $\text{IFN-}\gamma$ 分泌增加,提示 PD-1:PD-L1/PD-L2 通路抑制抗结核的保护性免疫^[8-9]。

BCG 感染小鼠后,PD-1 敲除的 C57 小鼠脾组织荷菌量比 C57 野生小鼠明显低,PD-1:PD-L1 作用使 Th1 型细胞免疫受损,提示:敲除 PD-1 对结核感染产生保护性免疫。而 H37Rv 感染 PD-1 敲除的 C57 小鼠后,肺组织病变比 C57 野生鼠重,肺、脾组织荷菌量也比野生小鼠高^[10],提示:PD-1 帮助清除小鼠体内的 H37Rv 结核菌,但不能确定 PD-1 是否有免疫抑制作用^[11]。

深入分析可知:BCG 和 H37Rv 感染后 PD-1 通路免疫作用不同,可能与 PD-L1、PD-L2 的表达差异

有关。BCG 感染后,PD-L1 高表达,而 PD-L2 表达无明显变化。PD-1:PD-L1 使 Th1 型细胞免疫受损,PD-1 敲除后可以拯救 Th1 型细胞免疫,表现出免疫保护作用,即脾组织荷菌量比野生小鼠低^[10]。H37Rv 感染后,PD-L1 和 PD-L2 均高表达,PD-1:PD-L1 可能发挥免疫抑制作用,而 PD-1:PD-L2 可能发挥免疫保护作用^[11]。

3 结核感染中 PD-1:PD-L1/PD-L2 的免疫作用 机制

用抗体阻断结核病人外周血淋巴细胞上 PD-1:PD-L1/PD-L2 通路后,特异性脱颗粒的 CD8^+ T 细胞和 $\text{IFN-}\gamma^+$ CD3^+ T 细胞升高,提示结核急性感染中 PD-1:PD-L1/PD-L2 通路能抑制效应 CD8^+ T 细胞功能^[12]和 $\text{IFN-}\gamma^+$ CD3^+ T 细胞功能。其中 PD-1、PD-L1 和 PD-L2 的作用机制各有特点。

(1)结核中 PD-L1、PD-L2 的免疫作用机制:用 PD-L1 抗体治疗败血症引起的肝损伤,可逆转因 T 细胞耗竭而致的肝损伤^[13]。在哮喘、气道变态反应疾病中研究发现:PD-L1 与 PD-1 和 B7-1 结合后,可抑制 T 细胞增殖。用抗体阻断 PD-L1 后, $\text{IFN-}\gamma$ 表达上调;单独阻断 PD-L1 与 B7-1 结合,对 $\text{IFN-}\gamma$ 分泌无明显影响,提示 PD-1:PD-L1 能抑制 NKT 细胞产生 $\text{IFN-}\gamma$ 。PD-L2 主要通过影响 CD4^+ T 细胞的增殖及细胞因子或共刺激分子的分泌来发挥免疫作用,PD-L2 的作用可以不依赖 PD-1^[6,14]。Treg 或 NKT 细胞也可参与 PD-L2 的免疫作用。结核中 PD-L1 和 PD-L2 的免疫作用机制可能与上述疾病中类似。

(2)PD-L1 可能的作用机制:与潜伏感染相比,活动性结核病人中高表达 PD-L1 的嗜中性粒细胞显著增加^[15],而嗜中性粒细胞在小鼠结核中有病理损伤作用,提示 PD-L1 可能介导嗜中性粒细胞聚集所致的免疫病理损伤^[16]。H37Rv 感染人单核细胞后,PD-L1、PD-L2 表达都明显增高,PD-L1 水平高于 PD-L2;用单抗阻断 PD-L1 后, $\text{IFN-}\gamma^+$ T 细胞增殖明显、凋亡减少,提示 PD-L1 可抑制保护性 T 细胞增殖、促进其凋亡。

(3)PD-L1 和 PD-1 的免疫抑制作用机制不完全相同:在肿瘤和多种慢性感染中,PD-1:PD-L1 作用均被证实能抑制 T 细胞的保护性免疫^[5,13,17],其免疫抑制作用在结核的体外实验中也得到证实^[8,18-20]。PD-1 表达于活化的 T 细胞、B 细胞、NK 细胞、DC 细胞和单核细胞表面,也表达于“耗竭”的 T 细胞表面。PD-1 通过与 PD-L1、PD-L2 结合,抑制 T 细胞的 TCR 信号,下调免疫激活因子和存活相关的蛋白表达,促进免疫抑制因子 IL-10 的表达。而表达于 APC 上的 PD-L1 是 MAPK/细胞因子/STAT-3 依赖模式;在 STAT-3 调控下,TLR-APC 高表达 IL-

6 和 IL-10,抑制 STAT-3 的活化,从而阻断 PD-L1 的表达^[21]。因此,阻断 PD-1 和 PD-L1 后免疫反应存在差异。

(4)结核感染中 PD-L1、PD-L2 的表达和调控:结核病人中 Th1 (CD4⁺ T 细胞)和 Th2 (CD8⁺ T 细胞)细胞均发挥免疫作用。Th1 和 Th2 细胞在 BCG 与 H37Rv 感染的小鼠中表达有差异:BCG 感染中期,发挥免疫保护作用的主要是 Th1 细胞,Th2 细胞的免疫保护作用很微弱;而 H37Rv 感染小鼠后,Th1 细胞和 Th2 细胞均发挥作用。PD-L1 和 PD-L2 的表达分别由 Th1 和 Th2 细胞来调控,在 LPS、Th1 型细胞因子 IFN- γ 刺激下,巨噬细胞上 PD-L1 的表达调控依赖 STAT1,而 Th2 型细胞因子 IL-4 刺激炎性巨噬细胞上 PD-L2 表达,其表达调控依赖 STAT6^[7]。BCG 感染 DC 细胞后,PD-L2 高表达,其表达依赖于 IL-10,通过 TLR2-p38 MAPK 信号通路来调控^[22]。

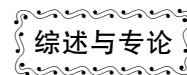
4 结语

PD-1;PD-L1/PD-L2 通路于结核感染有很大的相关性,而具体的免疫作用和机制还未深入进行,可以在细胞和动物水平用特异性基因敲除技术研究 PD-L1 和 PD-L2 的免疫作用及相关的机制。明确该通路的作用和机制的同时,也为结核的干预提供指导。

参考文献:

- [1] Tubo NJ, Jenkins MK. CD4 + T Cells: Guardians of the Phagosome. *Clinical Microbiology Reviews* 2014, 27 (2):200 - 213.
- [2] Flynn JL, Chan J. Immunology of tuberculosis. *Annual review of immunology* 2001, 19(1):93 - 129.
- [3] Urdahl KB, Shafiani S, Ernst JD. Initiation and regulation of T-cell responses in tuberculosis. *Mucosal Immunology* 2011, 4 (3):288 - 293.
- [4] Hamid O, Carvajal RD. Anti-programmed death - 1 and anti-programmed death-ligand 1 antibodies in cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther* 2013, 13(6):847 - 861.
- [5] Sakthivel P, Gereke M, Bruder D. Therapeutic Intervention in Cancer and Chronic Viral Infections: Antibody Mediated Manipulation of PD - 1/PD-L1 Interaction. *Reviews on Recent Clinical Trials* 7, 2012, 7(1):10 - 23.
- [6] Akbari O, Stock P, Singh AK, *et al.* PD-L1 and PD-L2 modulate airway inflammation and iNKT-cell-dependent airway hyperreactivity in opposing directions. *Mucosal Immunology* 2009, 3(1):81 - 91.
- [7] Loke P, Allison JP. PD-L1 and PD-L2 are differentially regulated by Th1 and Th2 cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2003, 100(9):5336 - 5341.
- [8] Javier O. Jurado IBA, Virginia Pasquinelli, *et al.* Programmed Death (PD) - 1;PD-Ligand 1/PD-Ligand 2 Pathway Inhibits T Cell Effector Functions during Human Tuberculosis. *The Journal of Immunology* 2008, 181(1):116 - 125.
- [9] Singh A, Mohan A, Dey AB, *et al.* Inhibiting the Programmed Death 1 Pathway Rescues Mycobacterium tuberculosis-Specific Interferon-Producing T Cells From Apoptosis in Patients With Pulmonary Tuberculosis. *Journal of Infectious Diseases* 2013, 208(4):603 - 615.
- [10] Sakai S, Kawamura I, Okazaki T, *et al.* PD - 1 - PD-L1 pathway impairs Th1 immune response in the late stage of infection with Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin. *International Immunology* 2010, 22(12):915 - 925.
- [11] Khader S, Tousif S, Singh Y, *et al.* T Cells from Programmed Death - 1 Deficient Mice Respond Poorly to Mycobacterium tuberculosis Infection. *PLoS ONE* 2011, 6(5):e19864.
- [12] Jurado JO, Alvarez IB, Pasquinelli V, *et al.* Programmed death (PD) - 1; PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. *J Immunol* 2008, 181(1):116 - 125.
- [13] Zhu W, Bao R, Fan X, *et al.* PD-L1 Blockade Attenuated Sepsis-Induced Liver Injury in a Mouse Cecal Ligation and Puncture Model. *Mediators of Inflammation* 2013, 2013:1 - 7.
- [14] Singh AK, Stock P, Akbari O. Role of PD-L1 and PD-L2 in allergic diseases and asthma. *Allergy* 2011, 66(2):155 - 162.
- [15] McNab FW, Berry MP, Graham CM, *et al.* Programmed death ligand 1 is over-expressed by neutrophils in the blood of patients with active tuberculosis. *European Journal of Immunology* 2011, 41(7):1941 - 1947.
- [16] Marzo E, Vilaplana C, Tapia G, *et al.* Damaging role of neutrophilic infiltration in a mouse model of progressive tuberculosis. *Tuberculosis* 2014, 94(1):55 - 64.
- [17] Ryoyo Ikebuchi SK, Tomohiro Okagawa, Kazumasa Yokoyama, *et al.* Blockade of bovine PD - 1 increases T cell function and inhibits bovine leukemia virus expression in B cells in vitro. *Veterinary Research* 2013, 44(59):1 - 15.
- [18] Bhatt K, Kim A, Kim A, *et al.* Equivalent functions for B7.1 and B7.2 costimulation in mediating host resistance to Mycobacterium tuberculosis. *Cellular Immunology* 2013, 285(1 - 2):69 - 75.
- [19] Mendoza-Coronel E, Camacho-Sandoval R, Bonifaz LC, *et al.* PD-L2 induction on dendritic cells exposed to Mycobacterium avium downregulates BCG-specific T cell response. *Tuberculosis* 2011, 91(1):36 - 46.
- [20] Ivana B. Alvarez VP, Javier O. Jurado, Eduardo Abbate, *et al.* Role Played by the Programmed Death-1 - Programmed Death Ligand Pathway during Innate Immunity against Mycobacterium tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases* 2010, 202(4):524 - 532.
- [21] Sabine J. Wölflé JS, Holger Bartz, Aline Sa`hr, *et al.* PD-L1 expression on tolerogenic APCs is controlled by STAT-3. *Eur J Immunol*, 2011, 41(2):413 - 424.
- [22] Elizabeth Mendoza-Coronela RC-S, Laura C. Bonifazb, Yolanda López-Vidala. PD-L2 induction on dendritic cells exposed to Mycobacterium avium downregulates BCG-specific T cell response. *Tuberculosis* 2011, 91(1):36 - 46.

[修回日期] 2015-06-24



多发性硬化症信号传导通路异常研究进展

郑 娜^{1,2}, 王 奇², 尹琳琳¹

(1. 首都医科大学宣武医院药物研究室, 北京市老年病医疗研究中心, 北京 100053;
2. 广州中医药大学临床药理研究所, 广州 510405)

【摘要】 多发性硬化症的病因涉及多种信号传导途径改变, 这就为我们研发更加有效的治疗药物提出了更大挑战。已知在多发性硬化症中多种细胞因子及其受体信号传导异常, 根据其下游效应分子不同分为: Jak/Stat, NF- κ B, ERK1/2, p38 or Jun/Fos 通路等。目前仅有部分多发性硬化症治疗药物靶向上述信号通路, 本文将综述系统生物学最新研究成果分别阐述多发性硬化症发生发展过程中信号通路的异常, 为今后靶向上述通路的新药研发提供个体化或复合型治疗策略。

【关键词】 多发性硬化症; 信号传导通路; 药物研发

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0077-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.017

Progress of signaling pathways abnormal in multiple sclerosis

ZHENG Na^{1,2}, WANG Qi¹, YIN Lin-lin²

(1. Xuan-Wu Hospital of Capital Medical University, Beijing Geriatrics Medical Research Center, Beijing 100053, China;
2. Institute of Clinical Pharmacology, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China)

【Abstract】 The pathogenesis of multiple sclerosis (MS) involves alterations to multiple pathways and processes, which represent a significant challenge for developing more-effective therapies. In MS, abnormalities have been identified in several cytokine-signaling pathways, as well as those of other immune receptors. Among the downstream molecules implicated are Jak/Stat, NF- κ B, ERK1/2, p38 or Jun/Fos, current MS drugs target some of these pathways. This article will with the aid of the latest research results of systems biology approaches that study pathway dysregulation in the process of MS development, targeting these relevant MS-signaling pathways, offers the opportunity to accelerate the development of novel individual or combination therapies for the future of new drug research.

【Key words】 Multiple sclerosis; Signaling pathways; Drug research and development

多发性硬化症 (multiple sclerosis, MS) 是以中枢神经系统 (central nervous system, CNS) 炎症性脱髓鞘为主要病理改变的自身免疫性疾病。目前 MS 的发病机制尚不明确, 本文将借助系统生物学方法通过对临床信息和数据的整合, 并结合当前的生物学知识, 关注如何从信号传导通路的角度研究 MS

的发病机制和药物作用的分子靶点, 以提高我们对该病的认识了解、并有助于开辟新的疗法。

1 MS 中信号传导通路的异常

1.1 JAK/STAT 信号传导通路异常与 MS

Janus 激酶/信号转导与转录激活子 (JAK/

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81341088; 81273817); 北京市科技新星计划 (Z12111000250000)。

【作者简介】 郑娜 (1989 -), 女, 硕士生, 研究方向: 中药治疗神经系统疾病。E-mail: 371747985@qq.com。

【通讯作者】 尹琳琳 (1977 -), 女, 副研究员, 研究方向: 中枢神经炎症的中药干预策略。E-mail: yinll913@126.com。

STAT) 是一条由多种细胞因子和生长因子共同介导的信号通路,广泛参与细胞的增殖、分化、凋亡及免疫调节等病理生理过程。该信号通路主要由酪氨酸激酶相关受体、JAK 和 STAT 组成。至今已发现的 JAK 家族成员有 JAK1、JAK2、JAK3、TYK2,其中 JAK1、JAK2 和 TYK2 广泛存在于各种细胞和组织中,JAK3 则仅存在于骨髓和淋巴系统中^[1]。STAT 蛋白长约 800 个氨基酸,相对分子量 89 ~ 97kDa,STAT 家族由 STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B, and STAT6 共 7 个成员组成^[2]。JAK/STAT 信号传导通路是一种进化保守通路,它介导胞外信号向胞核的传递。细胞因子或生长因子与细胞膜上相应受体结合,形成同源或异源二聚体,使胞质内 JAKs 发生聚集,邻近的 JAKs 相互磷酸化而被激活,激活后 JAKs 磷酸化受体上的酪氨酸位点,使受体产生与 STATs 结合的区域。STATs 通过 SH2 结构域将 STAT 补位到受体复合物的酪氨酸磷酸化特异位点,此时 JAKs 接近 STATs 并使 STATs 的一个羟基酪氨酸磷酸化,从而激活 STATs,活化后的 STATs 与受体分离,形成二聚体转位至胞核,与特定的 DNA 片段结合调控基因转录,转录结束后,STAT 在核内酪氨酸磷酸酶的作用下去磷酸化,核输出因子将非磷酸化的二聚体转运至胞质。JAK/STAT 信号通路除了在各种细胞活动中起关键的作用外,还与几种人类疾病的发病机制相关。

已证实 JAK/STAT 信号传导通路异常与 MS 的发生发展密切相关^[3],在拟 MS 的实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)大鼠上发现:疾病高峰期动物脑组织中 JAK/STAT 信号转导通路关键蛋白磷酸化显著增加;抑制 JAK/STAT 信号通路蛋白磷酸化能够降低实验动物的发病率、减轻发病的严重程度,并对模型动物的行为功能障碍有一定改善作用^[4]。由此可见,抑制 JAK/STAT 信号传导通路的异常活化对 MS 的治疗十分有效,JAK/STAT 有望做为 MS 治疗的一个新靶点^[5]。

1.2 NF- κ B 信号传导通路异常与 MS

NF- κ B 是 NF- κ B/Rel 蛋白家族成员之一,目前已发现 5 种 NF- κ B/Rel 蛋白,包括 p50(NF- κ B1)、p52(NF- κ B2)、RelA(p65)、RelB 和 c-Rel。每一个 NF- κ B/Rel 蛋白家族成员的 N 端均含有一段由约 300 个氨基酸组成的 Rel 同源区(Rel homology domain, RHD),其中含有核定位信号序列、二聚化区域、DNA 结合区和 I κ B 结合位点,其中 p65 和 p50 组成的二聚体复合物存在最为广泛^[6]。细胞处于静息态时,NF- κ B 以非活化状态存在于细

胞质中,且通常以无活性的 p65/p50 /NF- κ B 抑制因子 α (inhibitor of NF- κ B- α , I κ B- α) 三聚体复合物形式存在于胞质中,三聚体复合物可以被多种因素激活,包括细胞因子如白细胞介素 6(interleukin-6, IL-6) 和 IL-17、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、细菌内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、蛋白激酶 C 和理化因素(X 射线、氧化剂及化疗药物制剂)等,NF- κ B 受两个激酶 IKK α 和 IKK β 调节,IKK β 特别重要,因为 I κ B 的磷酸化、泛素化,并通过 26S 蛋白酶体降解,从而使 NF- κ B 活化。

转录因子 NF- κ B 介导了 IL-17 调节下游细胞信号通路的作用,抑制 NF- κ B 信号通路使得由 IL-17 诱导的巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α) 表达显著降低,而 MIP-1 α 参与了包括 MS 在内的多种病理过程。例如,在 EAE 实验动物的胼胝体中星形胶质细胞激活并伴有 MIP-1 α 表达显著增加,IL-17 可调节星形胶质细胞中 MIP-1 α 的表达;同时,NF- κ B 信号通路异常活化可导致 MIP-1 α 表达的过度增加,抑制 NF- κ B 信号通路可降低 MIP-1 α 的表达从而对 MS 起治疗作用^[7]。因此,NF- κ B 信号传导通路亦可做为一个 MS 的潜在治疗靶点。

1.3 ERK 信号传导通路异常与 MS

细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)是有丝分裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinases, MAPKs)家族的一个重要亚族。ERK1 和 ERK2 是其中的两个重要成员,相对分子量分别为 44×10^3 和 42×10^3 。ERK 通路主要由 3 个蛋白激酶级联组成,即丝裂原活化的蛋白激酶激酶激酶(MAPKKK)、丝裂原活化的蛋白激酶激酶(MAPKK)和细胞外信号调节激酶(ERK)^[8],ERK 激酶家族属于酪氨酸蛋白激酶,此类激酶在磷酸化以后才能发挥作用进行细胞信号的转导。ERK 信号传导通路受多种因素刺激而被激活,其中 Ras-Raf-MEK-ERK 是激活 ERK 通路的主要途径。ERK 信号通路在生长因子分泌增多和氧化应激时被激活^[9],生长因子与受体结合后激活酪氨酸激酶,通过衔接蛋白将信号传递给 Ras 蛋白,Ras-GTP 直接与 Raf 相结合,形成一个短暂的膜锚定结构。活化的 Raf 通过磷酸化促分裂原激活的蛋白激酶的激酶(MEK)激活环上的丝氨酸残基。MEK 再将促分裂原激活的蛋白激酶(ERK)激活,进而磷酸化许多与胞质和胞膜相连的底物。ERK 具有控制细胞分化的功能,并与细胞的增殖、分化、迁移、侵袭、凋亡、癌性转化等密切相关^[10]。在炎症过

程中, MAPKs 活性增加, 并调节炎性介质生成, 因此, MAPKs 成为最重要的抗炎治疗靶点之一^[11]。ERK 信号通路抑制剂能够减轻 EAE 模型动物疾病发展期和缓解期的行为功能障碍, 分析认为上述作用可能与 ERK 抑制剂具有特异性抑制 Th17 和 Th1 细胞的免疫应答有关^[12]。抑制 ERK 信号转导通路的过度活化有利于 MS 的治疗。

1.4 p38MAPK 信号传导通路异常与 MS

p38 是由 360 个氨基酸残基组成的相对分子质量为 38×10^3 的钙结合蛋白, 与 JNK 同属 SAPK。是丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinases, MAPK) 家族成员之一。同时, p38MAPK 是 MAPK 家族中的重要组成部分, 并参与炎症、增殖、凋亡等多种生理过程。p38MAPK 家族中包括 p38 α 、p38 β 、p38 γ 、p38 δ 4 种异构体亚型。Han 等^[13]研究发现, p38 β 、p38 γ 及 p38 δ 在蛋白质一级结构上与 p38 α 分别具有 73%、63% 和 62% 的序列同源性。p38 不同亚型的分布具有组织特异性。p38 α 在白细胞、肝、脾、小脑、骨髓、甲状腺及胎盘中广泛表达且水平较高; p38 β 主要在心脏和大脑组织中高表达; p38 γ 主要在骨骼肌中高表达; p38 δ 主要在肺、肾、肠的表皮细胞和睾丸、卵巢、肾上腺和垂体中表达。p38MAPK 信号通路与其他 MAPK 通路一样, 都是保守的三级酶促级联反应: MAPK 激酶 (MAPKKK)-MAPK 激酶 (MAPKK)-MAPK。p38MAPK 的信号转导途径亦是细胞内磷酸化级联反应的最后步骤: MEKKs/TAK-MKK6/MKK3-p38MAPK, 其中 p38 通路的关键酶有 MAPK 激酶类的 MKK3、MKK4、MKK6 以及 MAPK 激酶类的 TAK、ASK、MLK 等, 其中 MKK3 与 MKK6 是公认的 p38 上游激酶, 他们能直接磷酸化酪氨酸、丝氨酸/苏氨酸残基激活 p38, MKK3 只激活 p38 α 和 p38 β , 而 MKK6 则能够强烈激活所有 p38MAPK 亚型。伴着细胞激活, p38 从胞质进入细胞核, 激活多种蛋白激酶和转录因子, 在炎症反应、细胞分化、细胞周期、细胞凋亡和发育等方面均发挥重要的调节作用。例如, 环氧合酶 (COX)-2、诱导型一氧化氮合酶 (iNOS)、白介素 10 (IL-10) 等炎症因子的产生都依赖于 p38 信号通路的调节。p38 MAPK 的激活除能促进单核巨噬细胞产生 TNF- α 、IL-1、IL-4、IL-6、IL-8、IL-12 等炎性因子外, 还可显著促进抑炎因子 IL-10 的产生。IL-10 在 MS 中起重要作用, 有文献报道 MS 患者外周血 B 细胞分泌了少量的 IL-10; IL-10 在动物实验中对 EAE 的行为改善有一定调节作用^[14]。p38MAPK 信号通路激活能够诱导 IL-10 的

产生^[15], 从而对 MS 所致损伤有保护作用。

1.5 Jun/Fos 信号传导通路异常与 MS

Jun 家族包括 c-Jun、JunB 和 JunD。Jun 家族各成员的基因结构相似, 都是仅有一个外显子, 但是功能存在差异, c-Jun 促进细胞增殖, 与激活的 ras 基因一起可以使细胞转化, 而 JunD 的过表达可以减慢细胞生长, 拮抗 ras 基因的细胞转化作用。Fos 蛋白作为细胞原癌基因, 最初是在鼠的骨肉瘤细胞中发现的, 有研究表明, 表达该蛋白的基因属一种原癌基因, 在细胞的恶性转化方面发挥了重要作用。Fos 家族包括 c-Fos、FosB、fra-1、fra-2。c-Fos 及其他 Fos 家族成员常与 Jun 家族成员如 c-Jun 等形成异源二聚体以 AP-1 的形式发挥作用^[16], 其中 c-Fos 和 c-Jun 组成的异源二聚体最稳定。AP-1 中的 Jun 家族成员既可同源聚合, 也可与 Fos 家族成员异源聚合; 而 Fos 家族成员只能与 Jun 蛋白嵌合形成异源二聚体的 AP-1 形式。激活蛋白 (AP-1) 参与了增生、炎症、分化、凋亡、细胞迁移和伤口愈合等多个病理生理过程。因此, Fos 蛋白涉及细胞的增殖、分化、和转化。与对照组相比, 在 MS 的白质中发现 Fos 蛋白的 RNA 链增长了两倍, 提示 Fos 蛋白在 MS 发病中可能发挥中枢调控作用^[17]。

2 信号传导通路分析面临的挑战与问题

细胞内多条信号传导通路间存在明显的交叉感应, 同一关键蛋白质也同时参与多个信号传导通路的级联反应中。因此, 信号传导通路分析中仍然面临着巨大挑战。首先, 同一细胞中各信号通路间的感应是复杂的, 仅根据现有实践经验很难研究; 其次, 在系统层面间的感应如何转化为特异细胞型反应; 再次, 由于 MS 主要影响身体中最为复杂的两个组织/器官系统, 即免疫系统和中枢神经系统, 解释分析现有 MS 数据非常困难; 第四, 基因功能信息仍不完善。由此可见, 现有数据不足以提供一个可以完全模拟的机械模型, 阻碍了对新的信号机制的预测。

3 结合已知信号通路的新药研发

尽管近年来科技飞速发展, 为 MS 治疗提供了大量相关数据, 但 MS 药物研发仍步履维艰。究其原因, 主要归咎于生物信息如何转化为适当的疾病模型的问题没有得到解决。新药研发主要受制于以下几个方面: 来自于人体/患者的定量和动力数据的有效性; 个体的异质性和基因背景的整合对界定治疗的反应; 需要建立方法来整合和模拟的既包括

细胞,还有组织的复杂网络。

此外,多种药物协调、联合应用以同时调节多条信号传导通路亦是一个有效治疗策略。不同作用机制的药物协同效应可提高疗效、安全性和耐受性。临床、生物体和医药等数据可通过计算模型的整合来评估药物的疗效和协同效应。最后,提高药物研发效率的另一个关键问题是预测该药物治疗的副作用。信号通路和药物蛋白网络可以使用机器学习的方法来重新定位现有药物,推断药物新的适应症或预测毒性。

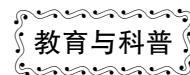
4 结论与展望

多发性硬化症的发病机制十分复杂,涉及多条信号传导通路的数百个基因和蛋白,并且这些基因和蛋白随着时间和疾病的进展不断变化,不同疗法对这些基因和蛋白的影响在不同个体上也呈现出不同反应。系统生物学整合了遗传易感性的作用,其是按风险等位基因轻微的调控参数来管理通路的功能。因此,单一的等位基因对给定的通路并没有显著的影响,但所有风险等位基因聚集在给定的个体中可能影响免疫通路对产生自身免疫激活水平的功能。这些因素可能有助于提高自身免疫反应在个体层面的预测。同样,没有针对任何单一风险等位基因的药物分层,如果有新的治疗策略能够靶向多发性硬化症相关基因和调控药物的生物效能,上述情况则有可能改变。一些数学建模方法在系统生物学领域已成功建立,它们将能够广泛应用于从逻辑到物理化学模型范围的信号通路的研究中^[18]。一旦数据从数据库中检索,生物信息学工具允许识别可以作为假设的基因、蛋白质和细胞之间的相互作用。系统生物学整合现有的知识、实验结果和医学数据,结合与 MS 发生发展相关的信号传导通路,构建模拟 MS 发病的综合模型,有利于我们发现 MS 新的作用机制,预测 MS 治疗的方向和最优治疗药物组合。

参考文献:

- [1] Smimova OV, Ostroukhova TY, Bogorad RL. JAK-STAT pathway in carcinogenesis: is it relevant to cholangiocarcinoma progression? [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(48):6478 - 6491.
- [2] Kisseleva T, Bhattacharya S, Braunstein J, Schindler CW. Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges[J]. Gene, 2002, 285 (1-2):1 - 24.
- [3] Benveniste EN, Liu Y, McFarland BC, et al. Involvement of the janus Kinase/signal transducer and activator of transcription signaling pathway in multiple sclerosis and the animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Interferon Cytokine Res, 2014, 34(8): 577 - 588.
- [4] Yin L, Chen Y, Qu Z, et al. Involvement of JAK/STAT signaling in the effect of cornel iridoid glycoside on experimental autoimmune encephalomyelitis amelioration in rats [J]. Neuroimm- unol, 2014, 274(1-2):28 - 37.
- [5] Liu Y, Holdbrooks AT, De Sarno P, et al. Therapeutic efficacy of suppressing the Jak/STAT pathway in multiple models of experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Immunol, 2014, 192(1):59 - 72.
- [6] Lawrence T. The nuclear factor NF - κ B pathway in inflammation [J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6):1 - 10.
- [7] Yi H, Bai Y, Zhu X, et al. IL - 17A induces MIP - 1 α expression in primary astrocytes via Src/MAPK/PI3K/NF- κ B pathways: implications for multiple sclerosis [J]. Neuroimmunol, 2014, 274(1-2):28 - 37.
- [8] Yoav D. Shaul, Rony Seger. The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions [J]. Biochimica Biophysica Acta, 2007, 1773 (8) 1213 - 1226.
- [9] Bonvin C, Guillon A, van Bemmelen MX, et al. Role of the amino-terminal domains of MEKs in the activation of NF kappa B and MAPK pathways and in the regulation of cell proliferation and apoptosis[J]. Cell Signal, 2002, 14(2):123 - 131.
- [10] 潘伟东. ERK1/2 研究进展及其与神经胶质瘤相关性[J]. 海南医学, 2011, 22:121 - 124.
- [11] Kaminska B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy —from molecular mechanisms to therapeuticbenefits[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1754 (1-2):253 - 262.
- [12] Brereton CF, Sutton CE, Lalor SJ, et al. Inhibition of ERK MAPK suppresses IL - 23 - and IL - 1 - driven IL - 17 production and attenuates autoimmune disease [J]. Immunol, 2009, 183(3): 1715 - 1723.
- [13] 张频捷,朱立新,耿小平. p38 MAPK 信号传导通路及其抑制剂的研发现状[J]. 安徽医药, 2010, 14(5):596 - 598.
- [14] Ireland SJ, Monson NL, Davis LS. Seeking balance: Potentiation and inhibition of multiple sclerosis autoimmune responses by IL - 6 and IL - 10[J]. Cytokine, 2015, 73(2): 236 - 244.
- [15] Rajgopal A, Rebhun JF, Burns CR, et al. Immunomodulatory Effects of Lippia sidoides Extract: Induction of IL - 10 Through cAMP and p38 MAPK-Dependent Mechanisms[J]. Med Food, 2015, 18(3):370 - 377.
- [16] Malnou CE, Brockly F, Favard C, et al Heterodimerization with different Jun proteins controls c-Fos intranuclear dynamics and distribution[J]. Biol Chem. 2010, 285(9):6552 - 6562.
- [17] Liu M, Hou X, Zhang P, et al. Microarray gene expression profiling analysis combined with bioinformatics in multiple sclerosis[J]. Mol Biol Rep, 2013, 40(5): 3731 - 3737.
- [18] Kholodenko B, Yaffe MB, Kolch W. Computational approaches for analyzing information flow in biological networks [J]. Sci Signal, 2012, 5(220):1 - 14.

[修回日期]2015-06-25



实验动物的 10 个“不愿意”(三)

魏 强

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

(接上期)

4 它们对不能表达天性可以说

自由不仅对人类正常生活至关重要,同样,对动物也非常重要。能相对自由地表达天性,是动物最本质的要求和权利,也是动物福利和伦理的首要关注点。通俗地讲,表达天性,是能让动物想干什么就干什么。

动物种类不同,基因型不同,表现的生物特性也不同,表达的天性也不同。一般来说,动物等级越高,其表达天性的欲望越明显。天性包括诸多方面,如能随时采食、饮水,能自由活动,能自主独处或群居,能施展本能,能享受空间,能相对选择环境,能根据喜好的方式生存等等。因此我们应该了解、理解各种实验动物特性,知道它们需要什么、想干什么、禁忌什么,才能最大程度满足要求。

毋宁置否,实验动物是用来做实验的。这也是人们不太在乎动物最常见、最充足的理由。这里强调的天性表达,也是提倡在保证实验完成的基础上,尽可能使动物保持天性。其实,只要愿意,在任何条件下都能尽可能让动物实现相对的天性表达,这样既关怀了动物,也可将因动物不满影响动物实验的程度降低到最低水平。

啮齿类动物是昼伏夜动性动物,所以白天需要休息,做完实验后,要尽量不去打扰它们。乳鼠对母鼠依赖性非常强,不可使其分离时间过长。最好不用酒精、乙醚等刺激性物质接触到乳鼠身上,母鼠会靠味觉识别,干扰过大,母鼠会拒绝哺乳。啮齿类动物还怕强光、噪声等,都要非常注意避免。

犬的依从性最好,也最喜欢和人建立感情的动物,因而,犬常常可通过适当的培训,配合一些采样、抽血等实验操作,对其伤害性也小。因此,犬的实验,应尽量能和犬“商量”,建立鼓励机制和良好的条件反射系统,让它能配合实验,同时能表达天性。

灵长类动物非常聪明,因而能识破或改变一些培训技巧,因此,尽管也提倡培训猴类,但一定要在确保安全的情况下进行。一般要求尽量对其麻醉后再进行实验。

动物在长期进化过程中获得了种类天性,具备了与生俱来的特性,特别是对其他种类的喜欢和恐惧。因而,不能将猫和鼠放在一起,猴和兔放在一起,这样鼠、兔一直处于恐惧状态,对劣势动物非常不公平,不符合动物伦理要求。

常见造成动物不能表达天性的行为有:不了解动物天性表达的需求,不提供表达自由的环境条件,限制动物活动,随意虐待、伤害动物,将不同品系、品种动物混放在一起饲养等。

5 它们对虐待、伤害、不必要的痛苦可以说

动物们用于实验,并不是说就应该受到伤害、痛苦。伤害、痛苦确实是实验不可比避免带来的后果,但不能随意产生、扩大。虐待和产生疼痛是导致动物伤害和痛苦的最常见原因。可能人们有个误解,认为动物对疼痛、伤害不如人类敏感。其实不然,只是动物表现可能与人类不同。

人类是有表情的动物,受到伤害和痛苦,能够通过多种途径表达,如诉说、表情表示、极端行为来显示。动物不会,更多的是忍耐。动物和人类一样,受到伤害、威胁时,会有几个阶段,先是克制,不能克制时会表现为不满表达(人类会商议、争吵、谈判,动物会表现不安、行为异常、恶性信号表达),其次是斗争(人类会打斗、打仗,动物也会打斗),失败后是示弱、逃跑,逃跑都不行时,是拼命或自杀,当受到极端威胁,感到后果绝望、生不如死时,不仅自残、自杀还会伤害、咬死幼崽。因此,当我们发现动物不安、异常、打斗、伤人、躲避、自残、自虐、拒食、嗜仔时,肯定是受到了不同程度的伤害。

实验人员一般不懂或忽视这些现象,只关心实验结果如何。其实,在这种情况下得到的实验结果,是“受试物”加上“影响因素”的结果,不是真正意义上的真实结果。因此,良好的动物实验,应该排除这些程度不定的影响因素。

国际上通常的做法是,实验中要有实验动物兽医(请注意,这里说的是专业的实验动物兽医,懂得实验动物需求、习性和特点)监护实验动物,代表实验动物发言,表达受到的伤害、痛苦等,如果程度严重,兽医可以对实验提出建议、劝告、改良方法,甚

至终止实验活动,一是保护实验动物,二是避免不科学实验结果。

曾经见到过,手术后的动物被放回笼具中后,因处理不当,动物抓挠伤口,造成再次伤害。小鼠通过去眼球采血后,止血不好,被放回后,遭其他动物嗜咬,非常残忍。

犬和猴的实验遇到最多的问题是动物不好控制,因此,威胁、打骂、惩罚的种种方法经常出现,伤害也非常严重。加之它们灵性很强,精神伤害也非常大,如见到伤害它们的人员或闻到气味,表现得非常恐惧。

还见到过实验人员忘记关闭紫外灯,第二天猴眼睛睁不开,面部开始变红,一周内眼睛红肿、惧光,面部脱皮、肿胀、变形,表情极其痛苦。

曾经出过一道动物疼痛考题,可以看出大家对动物疼痛的认识。如果从 A、B、C、D、E(分别代表无知觉疼痛、一过性轻微疼痛、轻微疼痛、中度疼痛和不可逆疼痛)依疼痛的程度却越来越高判断,疫苗注射猴实验应该判为那种程度的疼痛?绝大多数给出的答案是 B 或 C。问为什么,答曰,打一针,也就是针头刺痛,不算什么!但大家想一想,我们为什么要做疫苗猴体实验?如果直接给你打疫苗,你愿意么?肯定不愿意,你会说疫苗安全么?正是因为疫苗可能不安全,打入机体后,可能会引起局部红肿、发热、过敏反应、毒性反应、休克、甚至死亡,了解了这些可能的后果,还会选择 B 或 C 吗?疼痛的判断,不仅要注重“疼—伤疼”更要注重“痛—痛苦”。

常见造成动物伤害、痛苦的行为有:饲养环境不好,粗暴、野蛮操作,手术后缺乏护理。不良方法标记动物,如打耳孔、断趾标记等。不执行终点处死原则。

6 它们对滥用可以说

随着生命科学、医药产业的发展,利用、使用实验动物日益增加。但是,许多实验动物实际上是被误用、错用、滥用了。使用生物材料和实验动物的福利、伦理或人文理念的基本原则应该是:能用细胞做实验,就不用组织;能用组织,就不用器官;能用器官,就不用动物;能用简单动物,就不用复杂动物;能用低等动物,就不用高等动物。

国际上在使用动物方面,提倡“3R”原则,分别是减少(Induction)、替代(Replacement)和优化(Refinement)的意思。“减少”直接的意思就是减少实验动物数量的使用,通俗地讲,只要能得出结果,说明问题,使用动物数量越少越好。“替代”是指尽量用其他的办法、方法替代动物实验,或用相对简单的动物替代复杂的动物,最终理念是避免动物实

验,根本上解决动物实验带来的福利、伦理等问题。“优化”是在减少、替代的基础上,优化动物实验的所有环节,特别是动物实验方案,使动物实验高效准确,达到节省、爱护动物的目的。

通常人们认为做动物实验动物数量越多,数据可比性越好。其实,往往是因为不了解实验动物而造成的,以最常用的近交系小鼠、大鼠为例,它们通过全同胞雌雄个体交配达到 20 代以上,具有高度纯合的遗传背景,个体之间的近交系数(即相似性或一致性)达到 99% 以上,也就是说和人的单卵双生的兄弟姐妹类似。

高度的个体一致性,理论上讲,得出的结果应该非常相似,不应该得出差异较大的结果,不需要通过加大动物量来减少个体差异,取得平均数。如果数据真的相差甚大,需要去掉最高值、最低值来统计,说明使用的近交系动物本身有问题,影响了实验结果。因此,近交系动物的使用,一般每组 6—8 只就足够了,避免的只是操作误差、人为误差或测试仪器误差等。

有些统计方法,对近交系动物是不合适的,实验者应该懂得这些。曾经看到过研究生每组使用 50 只近交系小鼠做实验,问其缘由,答曰根据统计学要求,群体数量即 n 值越大,误差越小。实际上,说明既不了解实验动物特性,也不了解统计学的真正含义。生物学意义,是建立在正确的统计学意义上的。如果不是这样,很多实验动物就被滥用了。

还有灵长类动物,最好进行“个体分析”,不十分强调组份比对,即使需要,也要将数量降到最少,每组 4 只左右,而且提倡共享对照组数据或发表的基础数据。灵长类动物许多生物学特性和人类相近,从它们身上能看到我们的“过去”,从伦理、情感上讲,也应尽量减少使用,而且要做到能不用就不用。

很遗憾尽管有研究替代动物实验方法,但离理想状态要差很多,将尽可能多的方法用于替代所有动物实验,是动物免遭实验痛苦的最好办法,人类也能在不同程度的负罪感中终将解脱出来。

“优化”是我们能做得到的。比如制备抗血清、抗体等,通过优化抗原、优化免疫方法、优化动物,得到的产物每高一个效价单位或滴度,从 1:10 提高到 1:100 的话,动物使用数量即可降低十倍,产品的毒副作用、非特异性等也降低了,何乐而不为呢?

常见造成动物滥用的行为有:不了解动物实验的“3R”原则,不了解动物数量和实验结果的关系,认为动物数量使用越多越好,错用动物,使用不易感动物等。

(未完待续)