

实验动物与比较医学 (原《上海实验动物科学》)

Laboratory Animal and Comparative Medicine

第 37 卷第 1 期

2017 年 2 月

目 次

• 论 著 •

- FGF21siRNA 对 STZ 诱导的 1 型糖尿病小鼠心脏功能的影响.....陈 翠, 孟哲颖, 郑元义, 等(1)
- ND3 在自发性糖尿病长爪沙鼠 5 种组织中的表达.....李银银, 龚菁菁, 吴绍亮, 等(6)
- Tamoxifen 诱导敲除多囊肾小鼠 *Pkd1* 基因后的肾脏病理变化周卫民, 朱科燕, 陈方明, 等(11)
- 侧脑室注射神经节苷脂钠对脑瘫模型大鼠学习记忆能力的影响杨凤翔, 张小乔, 罗秀玲(15)
- 非酒精性脂肪性肝纤维化小鼠模型的建立及炎症因子的表达杨 华, 赵亚娟, 欧 强(20)
- 上海地区常用近交系小鼠品系的单核苷酸多态性分型研究韩 琳, 谢建云, 杨 斐, 等(25)
- 大鼠细小病毒双重 PCR 检测方法的建立.....饶 丹, 朱余军, 伍妙梨, 等(32)
- 不同因素对环磷酸腺苷诱导的免疫抑制小鼠模型效果的影响宋 莹, 郭雅娟, 黄铭倩, 等(36)
- 小鼠剪尾出血模型的优化田 靖, 崔庆华, 郭 平, 等(40)
- 单笼与群居饲养对雌性食蟹猴情绪的影响李 伟, 金 益, 邢正弘, 等(46)
- 三品种实验用小型猪繁殖性能测定杨李厂, 周文兵, 丁 隽, 等(50)
- 新疆子午沙鼠尿液采集方法的建立及尿液部分生化指标的测定徐艺玫, 史 深, 罗 芸, 等(55)
- 外固定架制作兔股骨延迟愈合模型孔庆柱, 杨佳宁, 王贺龙, 等(59)
- 胡椒根提取物对大鼠骨关节炎模型的治疗作用王 慧, 卓书洪, 高 雨(64)

• 经验交流 •

- 关于实验动物行业高端复合型管理人员培训体系建设的几点思考杨文静, 崔淑芳(64)
- 实验动物从业人员远程培训考核指标体系初探余琛琳, 崔淑芳(71)

• 综 述 •

- PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路在运动诱导的啮齿动物
骨骼肌内 GLUT4 转位和表达中的作用.....张云丽, 王 林, 刘铁民(76)

期刊基本参数: CN31-1954/Q*1981*b* 大 16*80*zh*P*¥10.00*2000*17*2017-02

协办单位(排名不分先后)

上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司	上海交通大学医学院实验动物科学部	山东省实验动物中心
扬州大学比较医学中心	浙江省实验动物中心	浙江中医药大学动物实验研究中心
苏州大学动物实验中心	上海斯莱克实验动物有限责任公司	第二军医大学实验动物中心
广东省医学实验动物中心	南通大学实验动物中心	杭州师范大学实验动物中心
中国科学院上海药物研究所实验动物室	上海市公共卫生临床中心	复旦大学药学院
上海市实验动物质量监督检验站	上海儿童医学中心	

Laboratory Animal and Comparative Medicine

Vol.37 No.1

Feb. 2017

Main Contents

- Reduction of Cardiac Function Induced by FGF21siRNA
in Type 1 Diabetic Mice.....CHEN Cui, MENG Zhe-ying, ZHENG Yuan-yi, et al(1)
- Expression of ND3 in 5 Tissues of Hereditary Diabetic Mongolian GerbilsLI Yin-yin, GONG Jing-jing, WU Shao-liang, et al(6)
- Pathological Change of Kidney in *Pkd1* Knock-out Mice with
Polycystic Kidney Induced by Tamoxifen.....ZHOU Wei-min, ZHU Ke-yan, CHEN Fang-ming, et al(11)
- Effect of Lateral Ventricle Injection of Ganglioside Sodium on Learning
and Memory in Rats with Cerebral PalsyYANG Feng-xiang, ZHANG Xiao-qiao, LUO Xiu-ling(15)
- Establishment of Nonalcoholic Fatty Liver Fibrosis Model
and Expression of Inflammatory Factors in Mice.....YANG Hua, ZHAO Ya-Juan, OU Qiang(20)
- The Single Nucleotide Polymorphism Genotyping of Inbred Mice from ShanghaiHAN Lin, XIE Jian-yun, YANG Fei, et al(25)
- Development of Dual PCR for Detection of Rat ParvovirusRAO Dan, ZHU Yu-jun, WU Miao-li, et al(32)
- Effect of Different Factors on Cyclophosphamide
Induced Immunosuppression Mice ModelSONG Ying, GUO Ya-juan, HUANG Ming-qian, et al(36)
- Improvement on Tail Tip Bleeding Model in MiceTIAN Jing, CUI Qing-hua, GUO Ping, et al(40)
- Effects of Single Caged and Social Feeding on Emotion of Female *Macaca Fascicularis*LI Wei, JIN Yi, XING Zheng-hong, et al(46)
- Reproductive Performance of Three Breeds of MinipigsYANG Li-chang, ZHOU Wen-bing, DING Jun, et al(50)
- Establishment of Urine Collection Method and Determination of Some
Biochemical Indexes for *Meriones Meridianu* in Xinjiang.....XU Yi-mei, SHI Shen, LUO Yun, et al(55)
- Establishment of Femoral Delayed Healing Model with
External Fixation in RabbitKONG Qing-zhu, ZHAO Jia lin, FENG Zhen, et al(59)
- PI3K/Akt and AMPK Signaling Pathway and Effect of Exercise on
Rodent Skeletal Muscle GLUT4 Translocation and ExpressionZHANG Yun-li, WANG Lin, LIU Tie-min(76)

实验动物与比较医学

SHIYAN DONGWU YU BIJIAO YIXUE

1981年9月创刊, 双月刊

第37卷第1期 2017年2月

主 编 高 诚
编辑出版 《实验动物与比较医学》编辑部
主管单位 上海科学院
主办单位 上海市实验动物学会 上海实验动物研究中心
印 刷 上海盛通时代印刷有限公司
发 行 上海市报刊发行局
订 购 全国各地邮局, 邮发代号 4-789
地 址 上海市金科路 3577 号 201203
电 话 (021)50793648-81018, 50793657
电子函件 bjb50793657@163.com
在线投稿 211.144.119.130:8080/jweb/CN/volumn/current.shtml
网 址 med.wanfangdata.com.cn/Journal/shsydwkx.aspx
广告经营许可证号: 3101520130002
(责任编辑 富群华)

Laboratory Animal and Comparative Medicine

Established in September 1981, Bimonthly

Vol.37 No.1 Feb. 2017

Editor-in-Chief GAO Cheng

Edited, Published and Distributed by

Editorial Department of *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, 3577 Jin Ke Road, Shanghai 201203, China

Sponsored by

Shanghai Laboratory Animal Science Association

Shanghai Laboratory Animal Research Center

Tel. (021)50793648-81018, 50793657

E-mail bjb50793657@163.com

Online submit 211.144.119.130:8080/jweb/CN/volumn/current.shtml

http:// med.wanfangdata.com.cn/Journal/shsydwkx.aspx
(Managing Editor: FU Qun-hua)

ISSN 1674-5817

CN 31-1954

公开发行人

邮发代号: 4-789

每期定价: 10.00 元

FGF21siRNA 对 STZ 诱导的 1 型糖尿病小鼠心脏功能的影响

陈 翠¹, 孟哲颖¹, 郑元义¹, 胡 兵^{1,2}, 申 铿^{1,2,3}

(1. 上海交通大学附属第六人民医院, 上海 200233;

2. 上海超声医学研究所, 上海 200233;

3. 上海交通大学医学院附属同仁医院, 上海 200336)

[摘要] 目的 探讨成纤维细胞生长因子 21(FGF21)siRNA 对链脲佐菌素(STZ)诱导的 1 型糖尿病(T1DM)小鼠心脏功能的影响机制。方法 16 只 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为正常对照组(n=6), FGF21siRNA 对照组(n=10), 16 只 T1DM 模型小鼠分为 T1DM 组(n=6), T1DM+FGF21siRNA 组(n=10)。T1DM 模型由单次腹腔注射 STZ(150 mg/kg)建立。8 周后行 FGF21siRNA 给药。实验到达终点时采用小动物高分辨超声仪测量小鼠心脏功能;光学显微镜下 HE 染色观察心肌细胞形态, Masson 染色观察纤维化程度, 利用实时 PCR 技术检测心肌组织 α -肌球蛋白重链(α -MHC), β -肌球蛋白重链(β -MHC), 心房钠尿肽(ANP)、I 型胶原(Col I) 和 III 型胶原(Col III)及 FGF 21 mRNA 的表达含量。结果 与正常对照组小鼠相比, T1DM 小鼠的心脏功能减低, 心肌细胞肥大, 胶原纤维增生, 伴随小鼠心肌组织 ANP、 α -MHC、 β -MHC、Col I、Col III mRNA 表达增加, T1DM 小鼠经 FGF 21siRNA 处理后上述表现进一步加重。结论 FGF21siRNA 能降低 1 型糖尿病小鼠的心脏功能, 其机制可能与心肌肥大和心肌纤维化有关。

[关键词] 成纤维细胞生长因子 21(FGF 21) siRNA; 1 型糖尿病(T1DM); 糖尿病心肌病; 心肌肥大; 心肌纤维化

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)01-0001-05

1972 年 Rubler 等^[1]研究了 4 例伴有充血性心力衰竭的糖尿病患者, 其冠状动脉正常, 没有其他引起充血性心力衰竭的病因, 他们提出该疾病是由糖尿病心肌病导致。Bell 等^[2]将糖尿病心肌病定义为与冠状动脉疾病不相关的疾病, 它以舒张功能障碍为特征, 少有明显的临床表现, 除非并发高血压(临床表现明显时)和 / 或心肌缺血(临床表现严重时)。

成纤维细胞生长因子 21(fibroblast growth factor 21, FGF21)是含有 209/210 个(人 / 啮齿类动物)氨基酸残基组成的多肽, 主要由肝脏、脂肪组织及胸腺

产生和分泌^[3]。FGF21 也在其他组织中表达, 例如心肌^[4]。FGF21 作为内源性的物质代谢调节因子, 其与肥胖、糖尿病及代谢综合征等代谢性疾病的关系研究已成为热点, 人血清 FGF21 在上述疾病中表达的升高提示 FGF21 参与代谢性疾病的发生发展^[5, 6]。然而, FGF21 对心脏的作用还有待深入研究。现有研究^[7]表明 FGF21 通过促进大量抗氧化基因表达阻止心脏肥大, 并且以自分泌形式抑制活性氧形成。1 型糖尿病(T1DM)大鼠的心脏 FGF 21 mRNA 表达与糖尿病进展呈正相关^[4]。本实验拟用 STZ 诱导的小鼠 T1DM 模型, 应用 FGF21siRNA 降低小鼠 FGF21 的表达, 观察小鼠心脏功能变化、心肌组织 α -肌球蛋白重链(α -myosin heavy chain, α -MHC)、 β -肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β -MHC)、心房钠尿肽(ANP)、I 型胶原(Col I)和 III 型胶原(Col III)表达, 从功能及结构方面探讨 FGF21 对糖尿病心肌病的影响机制。

[收稿日期] 2016-09-06

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(NO.81270208)

[作者简介] 陈 翠(1989-), 女, 临床医学硕士研究生。

E-mail: sjtuchencui1989@163.com

[通讯作者] 申 铿(1968-), 女, 主任医师, 从事糖尿病心肌病研究。E-mail: shene126@126.com

1 材料与方法

1.1 糖尿病动物模型建立及分组

SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 40 只, 5~6 周龄, 体质量 18~20 g, 购于上海斯莱克实验动物有限公司 [SCXK(沪)2007-0005], 于上海交通大学附属第六人民医院动物实验中心 [SYXK(沪)2011-0128] 操作实验。小鼠达 8 周龄后, 随机选取 20 只通过一次性腹腔注射链脲佐菌素(STZ)(150 mg/kg) 建立 T1DM 小鼠模型, 48 h 后经鼠尾静脉采血并检测, 血糖大于 16.7 mmol/L 为成模。本实验中成模率 80%, 成模后随机选取同等数量正常组小鼠 16 只, 共 32 只小鼠分为 4 组: 正常对照组($n=6$), FGF21siRNA 对照组($n=10$), T1DM($n=6$), T1DM+FGF21siRNA 组($n=10$)。成模 8 周后行 FGF21siRNA 尾静脉注射, 给药剂量为 5 μ g/g, 实验于给药 72 h 后结束。

1.2 主要试剂及仪器

STZ(美国 Sigma 公司), Onetouch II 血糖仪(美国强生公司); 小动物用高分辨超声仪 (Vevo2100, 加拿大 VisualSonics 公司); FGF21siRNA (Genepharma, 上海), DEPC 水, 转染试剂, 葡萄糖, Trizol 试剂(美国 Sigma 公司)。

1.3 超声心动图技术测量心脏功能

于实验终点使用小动物高分辨超声仪检测小鼠心脏功能:腹腔注射质量分数 1.5% 戊巴比妥钠进行麻醉(0.1 mL/20 g), 然后将小鼠固定在 37℃ 的恒温垫上, 小鼠四肢末端用 4 个电极连接。获取胸骨旁长轴切面 M 型超声心动图, 测定左心室舒张末期内径(LVIDd), 左室收缩末期内径(LVIDs), 取 3 个持续心动周期的平均值作为原始数据, 软件自动测算左室短轴缩短率(fractional shortening, FS), 左室射血分数 (ejection fraction, EF)。

1.4 光学显微镜下观察心肌细胞形态及胶原纤维

小鼠左心室心肌组织用体积分数 10% 中性甲醛固定, 脱水、清洗、石蜡包埋后制成切片, HE 染色及 Masson 染色后在光学显微镜下观测并摄片。

1.5 实时 PCR 检测

使用 Trizol 试剂抽提总 RNA 并检测浓度和纯度, 取 2 μ g 总 RNA 按照 M-MLV 逆转录酶行反转录(RT), 合成 cDNA, 加入特异引物(引物序列见表 1)及 PCR 所需试剂, 行 PCR 循环。检测目的基因 α -MHC、 β -MHC、Col I 和 Col III、ANP 及 FGF 21 mRNA。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) 作为内参。总反应体积为 20 μ L, 扩增条件为 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 60 s, 62℃ 40 s, 72℃ 60 s, 延伸 10 min, 内参扩增 27 个循环, 目的基因扩增 32 个循环。以目的基因 β -MHC、 α -MHC、ANP、Col I、Col III 及 FGF21 与 GAPDH 比率做定量分析。

1.6 统计学处理

用 SPSS21.0 统计软件包完成数据统计分析, 计量资料以均数士标准差表示, 组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA), 两两比较用 q 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖尿病小鼠体质量及血糖变化

STZ 注射后 48 h 小鼠较正常组小鼠体质量降低, 血糖升高($P<0.05$), 表明造模成功。各组小鼠体质量及血糖变化(表 2)。

2.2 糖尿病小鼠心脏功能变化

相比于正常对照组, T1DM 组小鼠 EF, FS 明显减低($P<0.05$); T1DM+FGF21siRNA 组比 T1DM 组 EF 和 FS 进一步减低($P<0.05$); 但 FGF21siRNA 对照组与正常对照组差异不具有统计学意义($P>0.05$)(表 3、图 1)。

表 1 β -MHC, α -MHC, Col I, Col III, ANP, FGF21, GAPDH 的 PCR 扩增引物
Table 1 Primer sequence of β -MHC, α -MHC, Col I, Col III, ANP, FGF21, GAPDH

引物名称	引物序列(正向 5'-3')	引物序列(反向 5'-3')
β -MHC	TGCAAAGGCTCCAGGTCTGAG	GCCAACACCACCCTGTCCAAG
α -MHC	CTGCTGGAGAGGTTATTCCTC	GGAAGAGTGAGCGGCGCATC
Col I	GACGCATGGCCAAGAAGACA	GCACCAGGAGGACCAGGAAGT
Col III	AAACTGGTGAAGGTGGCTATG	TTTTACCTCCAACCTCCAATG
ANP	GGCTCCTTCTCCATCACCAA	TGTTATCTTCGGTACCG
FGF21	GGTGCTGCCAAGGCTGTGGG	CCAGGCGGCATGTCAGATCCAC
GAPDH	AATGGATTGGACGCATTGGT	TTTGCACTGGTACGTGTTGAT

表 2 各组小鼠体质量及血糖
Table 2 Changes of body weight and blood glucose in mice

组 别	STZ 注射后		实验终点	
	体质量	血糖	体质量	血糖
正常对照	22.60 ± 0.98	9.10 ± 1.35	28.57 ± 1.85	9.77 ± 0.55
FGF 21 siRNA 对照	23.06 ± 1.17	8.82 ± 1.66	29.38 ± 2.02	8.28 ± 2.15
T1DM	23.73 ± 3.01	20.10 ± 2.20*	21.40 ± 0.82*	24.17 ± 4.73*
T1DM + FGF 21 siRNA	23.11 ± 1.85	20.30 ± 2.58*	21.72 ± 0.65*	29.79 ± 4.48*

注: 与正常对照组比较, *P<0.05

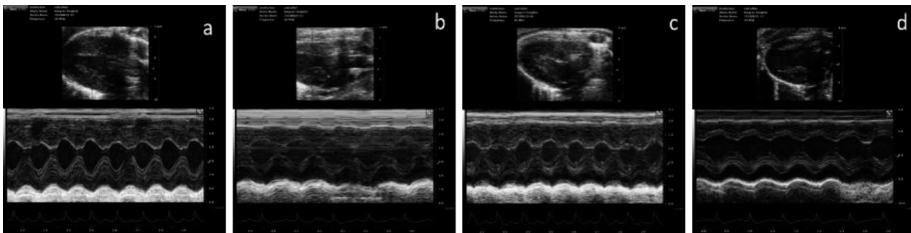
2.3 心肌细胞形态改变及胶原纤维增生

与正常对照组小鼠心肌细胞(图 2 A)比较, T1DM 组小鼠心肌排列紊乱, 心肌细胞肥大, 细胞核增大(图 2C), FGF21siRNA 处理 T1DM 小鼠后, 心肌细胞肥大程度及细胞核增大程度更显著(图 2D), 单纯 FGF 21siRNA 处理组则未见明显改变(图 2B)。Masson 染色显示 FGF21siRNA 处理后的 T1DM 小鼠(图 2H)较未处理小鼠(图 2G)胶原纤维明显增加, 正常对照组(图 2E)与 FGF21siRNA 组(图 2F)

表 3 小鼠心脏功能变化
Table 3 Cardiac function of mice in each group %

组 别	EF	FS
正常对照	92.920 ± 2.521	63.969 ± 5.184
FGF21siRNA 对照	89.327 ± 0.380	57.644 ± 0.6974
T1DM	84.439 ± 3.275*	51.713 ± 3.860*
T1DM+FGF21siRNA	73.986 ± 3.367#	41.832 ± 2.896#

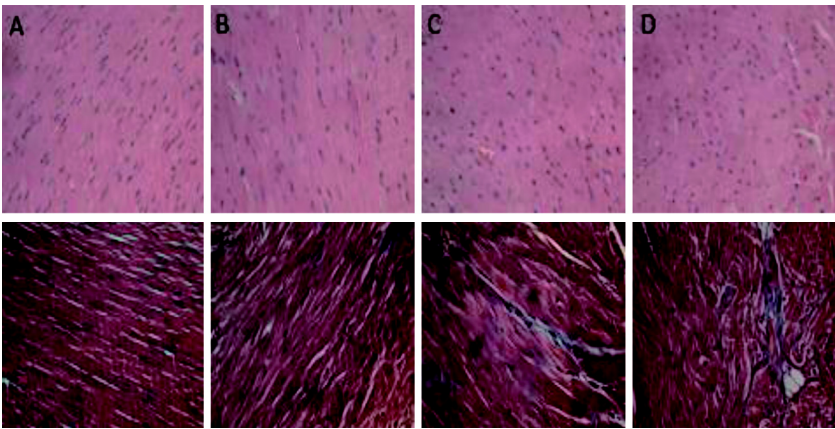
注: 与正常对照组比较, *P<0.05; 与 T1DM 组比较, #P<0.05



注: a: 正常对照组; b: T1DM; c: FGF21siRNA 对照组; d: T1DM+FGF21siRNA 组

图 1 小鼠心脏超声表现

Figure 1 Echocardiography performance of mice



A: 正常对照组(HE × 40); B: FGF21siRNA 对照组(HE × 40); C: T1DM 组(HE × 40); D: T1DM+FGF21siRNA 组(HE × 40); E: 正常对照组(Masson × 40); F: FGF21siRNA 对照组(Masson × 40); G: T1DM 组(Masson × 40); H: T1DM+FGF21siRNA 组(Masson × 40)

图 2 小鼠心肌细胞形态及胶原纤维增生

Figure 2 Cardiomyocytes morphology and collagen fibro proliferation

未见明显差异。

2.4 FGF21siRNA 沉默效果

与正常对照组比较, FGF21siRNA处理组心肌组织内 *FGF 21* mRNA 表达水平降低($P<0.05$), 表明 FGF21siRNA 有效沉默 *FGF 21* mRNA 表达(图 3)。

2.5 心肌组织 β/α -MHC、Col I、Col III、ANP 变化

与正常对照组比较, T1DM 组小鼠心肌组织内 β/α MHC 比值及 ANP, Col I, Col III 表达水平均升高($P<0.05$); T1DM+FGF21siRNA 组 β/α MHC 比值及 ANP, Col I, Col III 表达水平较 T1DM 组升高($P<0.05$); 但 FGF21siRNA 对照组与正常对照组差异不具有统计学意义($P>0.05$)(表 4)。

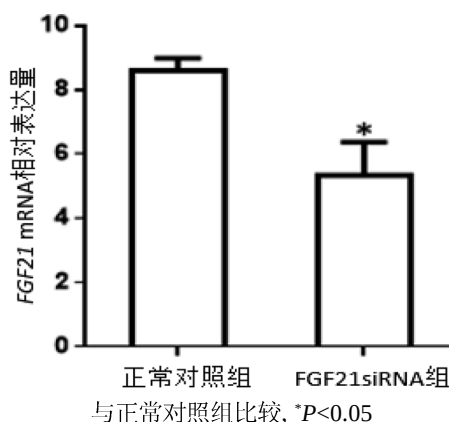


图 3 FGF 21siRNA 处理组 *FGF 21* mRNA 表达量

Figure 3 Expression of *FGF 21* mRNA in cardiac tissue of mice treated with FGF21siRNA

表 4 各组小鼠心肌组织 β/α -MHC、Col I、Col III、ANP 变化

Table 4 Changes of β/α -MHC, Col I, Col III, ANP in cardiac tissue of mice

组 别	ANP	β/α -MHC	Col I	Col III
正常对照	0.024 ± 0.008	0.011 ± 0.005	1.0 ± 0	1.0 ± 0
FGF21siRNA 对照	0.031 ± 0.006	0.012 ± 0.003	1.15 ± 0.13	1.12 ± 0.2
T1DM	0.59 ± 0.17*	0.124 ± 0.037*	2.9 ± 0.26*	2.2 ± 0.3*
T1DM+FGF21siRNA	0.87 ± 0.16*	0.158 ± 0.024*	4.2 ± 0.3*	3.4 ± 0.4*

注: 与正常对照组比较, * $P<0.05$; 与 DM 比较, # $P<0.05$

3 讨论

血清 FGF21 与心血管疾病关系密切, 动脉粥样硬化、冠心病、心肌缺血, 心脏肥大, 糖尿病心肌病的患者血清中 FGF21 含量增加^[3]。外源性 FGF21 干预能显著预防 DM 早期诱导的心肌细胞凋亡^[6], 内源性 FGF21 在糖尿病状态下也能发挥抗心肌细胞凋亡作用^[4]。本实验应用 STZ 构建 DM 病小鼠模型, 通过 FGF21siRNA 降低小鼠心肌中 *FGF21* mRNA 表达, 研究 FGF21 与糖尿病心肌病的关系。超声心动图检查显示 T1DM 组小鼠心脏功能低于正常组, 经过 FGF21siRNA 处理后心脏功能进一步降低, 表明 FGF21siRNA 可降低心脏射血分数及左室短轴缩短率, 降低 T1DM 小鼠的心脏功能。

β/α -MHC 比值及 ANP 是反应心肌肥大的代表性指标。与正常对照组小鼠相比, T1DM 组小鼠心肌组织中 ANP 表达明显增加, β/α -MHC 比值明显升高, FGF21siRNA 处理后, ANP 表达进一步增加,

β/α -MHC 比值进一步升高, 差别具有统计学意义, 符合光学显微镜下观察到的心肌细胞肥大表现。实验结果表明 FGF21siRNA 可促进心肌组织中 ANP 表达及升高 β/α -MHC 比值。以往的研究^[10]报道高血糖引发糖尿病心肌病并且启动一系列刺激因素进而引起心肌纤维化及胶原沉积, 心肌纤维化主要表现为心肌胶原含量增加, 胶原类型及胶原比例发生改变, 心肌组织中主要含有 Col I 和 Col III。本实验中 T1DM 组小鼠较正常组小鼠心肌组织中 Col I、Col III 表达显著增加, FGF21siRNA 处理后表达程度进一步增加, 这与光学显微镜下观察到胶原纤维增生进展表现一致, 表明 FGF21siRNA 可引起心肌组织胶原纤维增生。

本实验结果显示: FGF21siRNA 可引起心肌肥大和心肌纤维化, 使心脏功能减低; 该作用可能是通过影响心肌肥大及心肌纤维化关键基因转录水平的表达实现的。

参考文献:

- [1] Rubler S, Dlugash J, Yuceoglu YZ, et al. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis [J]. *Am J Cardiol*, 1972, 30(6):595-602.
- [2] Bell DS. Diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetes Care*, 2003, 26(10):2949-2951.
- [3] Cheng P, Zhang F, Yu L, et al. Physiological and pharmacological roles of FGF21 in cardiovascular diseases [J]. *J Diabetes Res*, 2016, 2016:1540267.
- [4] Zhang C, Huang Z, Gu J, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from apoptosis in a diabetic mouse model via extracellular signal-regulated kinase 1/2-dependent signalling pathway [J]. *Diabetologia*, 2015, 58(8):1937-1948.
- [5] Woo YC, Xu A, Wang Y, et al. Fibroblast growth factor 21 as an emerging metabolic regulator: clinical perspectives [J]. *Clin Endocrinol*, 2013, 78(4):489-496.
- [6] Mraz M, Bartlova M, Lacinova Z, et al. Serum concentrations and tissue expression of a novel endocrine regulator fibroblast growth factor-21 in patients with type 2 diabetes and obesity [J]. *Clin Endocrinol*, 2009, 71(3):369-375.
- [7] Planavila A, Redondo AI, Ribas F, et al. Fibroblast growth factor 21 protects the heart from oxidative stress [J]. *Cardiovasc Res*, 2015, 106(1):19-31.
- [8] 张芳芳, 林秀飞, 陈聪聪, 等. Akt在FGF21预防糖尿病心脏病中的作用研究 [J]. *温州医科大学学报*, 2016, 46(7):490-496, 502.
- [9] Planavila A, Redondo I, Hondares E, et al. Fibroblast growth factor 21 protects against cardiac hypertrophy in mice [J]. *Nat Commun*, 2013, 4:2019.
- [10] Aneja A, Tang WH, Bansilal S, et al. Diabetic cardiomyopathy: insights into pathogenesis, diagnostic challenges, and therapeutic options [J]. *Am J Med*, 2008, 121(9):748-757.

Reduction of Cardiac Function Induced by FGF21siRNA in Type 1 Diabetic Mice

CHEN Cui¹, MENG Zhe-ying¹, ZHENG Yuan-yi¹, Hu Bing^{1,2}, SHEN E^{1,3}

(1. Shanghai Jiaotong University Affiliated No.6 Hospital, Shanghai 200233, China

2. Shanghai Institute of Ultrasound in Medicine, Shanghai 200233, China

3. Tong Ren Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200336, China)

[Abstract] Objective To investigate the effects of Fibroblast growth factor 21 (FGF21) siRNA on cardiac function in type 1 diabetic (T1DM) mice and explore the mechanisms of actions. **Methods** Sixteen C57BL/6J mice were randomly divided into, control group and FGF21siRNA control group, sixteen T1DM model mice were divided into T1DM group and T1DM + FGF21siRNA group, type 1 diabetes was induced by STZ. Cardiac function was analyzed by echocardiography, morphological changes of cardiomyocytes were observed by HE staining, collagen fiber was observed by Masson staining, the expression of α -myocin heavy chain (α -MHC), β -myocin heavy chain (β -MHC), atrial natriuretic peptide (ANP), type I collagen (Col I) and type III collagen (Col III) of myocardium were detected by Real-time PCR. **Results** The expression of α -MHC, β -MHC, ANP, Col I and Col III in myocardium of T1DM mice treated with FGF21siRNA were increased compared to those of untreated ones. Cardiac function, cardiomyocyte hypertrophy and collagen fiber proliferation of treated mice were worse than those of untreated ones. **Conclusion** FGF21siRNA may contribute to cardiac malfunction T1DM mice, which may associate with the development of myocardial hypertrophy, myocardial fibrosis. **[Key words]** FGF21siRNA; Type 1 diabetic (T1DM); Diabetic cardiomyopathy; Myocardial hypertrophy; Myocardial fibrosis

ND3 在自发性糖尿病长爪沙鼠 5 种组织中的表达

李银银¹, 龚菁菁¹, 吴绍亮³, 李小红¹, 王存龙¹, 霍学云¹, 路 静¹,

吕建祎¹, 刘 欣¹, 郭 萌^{1,2}, 李长龙¹, 陈振文¹, 杜小燕^{1,2}

(首都医科大学 1. 基础医学院; 2. 实验动物部, 北京 100069; 3. 山东省临沭县人民医院, 临沭 276700)

[摘要] 目的 分析糖尿病长爪沙鼠 5 种组织中 ND3 基因在 mRNA 和蛋白水平的表达, 以期探索长爪沙鼠糖尿病模型中 ND3 的作用及其靶器官。方法 选取血糖正常对照组沙鼠和糖尿病实验组沙鼠各 6 只, 分别采集动物的肾脏、肝脏、骨骼肌、脑和心脏组织, 采用实时定量 PCR 和 Western blotting 方法检测在各组织中 ND3 mRNA 和 ND3 蛋白水平表达状况。结果 与对照组动物相比, 糖尿病长爪沙鼠 ND3 mRNA 表达水平在肾脏组织中极显著升高, 肝脏和肌肉组织中则显著降低, 脑组织中仅有降低趋势, 而在心脏组织中仅有升高趋势。检测 ND3 蛋白水平表明, 除心脏组织外, 其他组织均与 mRNA 水平表达结果一致。结论 肾脏组织可能是糖尿病长爪沙鼠 ND3 基因作用的主要部位, 同时在其他 4 种组织中该基因也发挥着一定作用。

[关键词] 长爪沙鼠; 2 型糖尿病; ND3 基因; 实时定量 PCR; Western blotting

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)01-0006-05

糖尿病是严重威胁人类健康的重大疾病之一, 近半个世纪来, 其患病率和死亡率呈明显上升趋势, 在我国已成为继心血管疾病、肿瘤之后位列第三的常见病、多发病和慢性非传染性疾病^[1]。其中 2 型糖尿病即非胰岛素依赖型是糖尿病的主要类型^[2]。2 型糖尿病是由遗传因素和环境因素共同作用导致的复杂遗传病, 以葡萄糖耐量降低、胰岛素抵抗为主要特征^[3]。本研究室前期通过定向培育的方法初步筛选到一只糖尿病长爪沙鼠近交系模型, 其具有空腹血糖升高、糖耐量受损、胰岛素抵抗和瘦素抵抗、脂联素水平降低等 2 型糖尿病模型特征, 且具有遗传性^[9]。

由于糖尿病是多基因控制复杂疾病, 2 型糖尿病的发病机制目前仍不完全清楚, 易感基因的存在及其功能改变可能是影响糖尿病发生的重要因素^[4]。作者前期^[5]通过抑制消减杂交(suppression subtractive hybridization, SSH)的方法在自行培育的近交系高血糖长爪沙鼠和正常血糖长爪沙鼠骨骼肌中发现烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)脱氢酶亚单位 3(NADH dehydrogenase 3, ND3)基因表达有差异, 但其在遗传性 2 型糖尿病长爪沙鼠不同组织中的表达情况还不够清楚。因此, 本实验旨在对 ND3 在糖尿病沙鼠和正常沙鼠的肾脏、肝脏、骨骼肌、脑和心脏组织中 mRNA 和蛋白水平的表达情况进行分析, 以期探索长爪沙鼠糖尿病模型致病机制中 ND3 的作用和靶器官, 为长爪沙鼠 2 型糖尿病新模型的发生机制研究提供新的切入点。

1 材料与方法

1.1 实验动物选择

选取近交系糖尿病模型长爪沙鼠和正常对照组沙鼠各 6 只, 12~15 周龄, 雌雄各半。所有动物均来

[收稿日期] 2016-09-30

[项目基金] 国家科技支撑计划(No. 2015BAI09B01); 国家自然科学基金(Nos. 31272393, 31572348); 北京自然科学基金(No. 7141002)

[作者简介] 李银银(1989-), 女, 硕士研究生, 专业: 实验动物学。E-mail: yy17590@163.com

[通讯作者] 杜小燕(1971-), 女, 博士, 副教授。主要从事实验动物教学和研究。E-mail: duduyan@ccmu.edu.cn

自首都医科大学实验动物部[SCXK(京)2015-0009], 于温湿度控制的普通环境中饲养[SYXK(京)2013-0005]。

1.2 样品采集

糖尿病和正常长爪沙鼠均用过量戊巴比妥溶液腹腔注射麻醉施行安死术, 快速采集新鲜的肾脏、肝脏、骨骼肌、脑和心脏等 5 种组织后立即置于液氮中冻存待用。

1.3 仪器和试剂

仪器: 研磨珠均质器(BioSpec, 美国); 低温高速离心机(Eppendorf Centrifuge 5417R, Eppendorf, 德国); Nanodrop 2000c(Thermo Scientific, 美国); PCR 仪(Applied Biosystems, 美国); Bio-Rad CFX96 manager System; 电泳仪、电转仪和凝胶图像分析系统(Bio-Rad, 美国)。

试剂: 戊巴比妥(北京化学试剂公司); TRIzol Reagent 试剂(Invitrogen, 美国); 三氯甲烷、无水乙醇、异丙醇(北京畅力通有限公司, 北京); 快速反转录试剂盒(Fast Quant RT Kit)和实时定量 PCR 试剂盒(SuperReal PreMix Plus, SYBR Green)(天根生化科技有限公司, 北京); 组织蛋白提取试剂盒和二喹啉甲酸

(Bicinchoninic Acid, BCA)蛋白定量试剂盒(康为世纪生物科技有限公司, 北京); ND3 抗体(Abcam, 英国)。

1.4 各组织 RNA 提取及 cDNA 的制备

将长爪沙鼠 5 种组织从液氮中取出, 剪取部分组织于均质管中, 分别加入约 1 mL TRIzol Reagent 试剂后进行组织破碎, TRIzol 试剂法抽提组织总 RNA^[6]。得到 RNA 沉淀晾干后, 加入适量不含 RNase 水溶解得组织总 RNA。采用 Nanodrop 2000c 分析 RNA 浓度和纯度。使用快速反转录试剂盒对上述总 RNA 样品进行逆转录。首先用试剂盒所含 gDNase, 42 °C 孵育 3 min 后去除基因组 DNA, 利用试剂盒所含高效反转录酶在 42 °C 条件下先孵育 15 min, 接着 95 °C 再孵育 3 min, 完成反转录得到相应的 cDNA 低温保存, 用于后续实验。

1.5 实时定量 PCR

按照 SSH 得到的 ND3 基因片段序列, 利用 Primer Premier 5.0 设计 PCR 扩增引物 3 对并优化选择, 最终使用 ND3-1 引物(表 1)进行实验。5 种组织均选取 β -actin 基因作为内参基因并设计引物(表 1)。各引物均由北京天一辉远生物科技有限公司合成。

采用实时定量 PCR 法在 Bio-Rad CFX96 manager

表 1 ND3 和内参基因实时定量 PCR 引物序列

Table 1 Primer sequence of ND3 and internal control genes for Real time-PCR

引物名称	上游引物	下游引物	片段大小 /bp
β -actin	5'-GGAAATCGTGCGTGAC-3'	5'-CCCAGGAAAGAAGGCT-3'	186
ND3-1	5'-TTGAAATCGCCCTAC-3'	5'-TCATACGCAAGACCTAA-3'	115
ND3-2	5'-TATCCCTAACGCTAATT-3'	5'-TGGTAGACGTGCAGAG-3'	175
ND3-3	5'-TTTATTATCCCTAACGC-3'	5'-TGGTAGACGTGCAGAG-3'	199

System 上对 ND3 的 mRNA 水平进行检测。所用试剂盒为实时定量 PCR 试剂盒, 反应体系总为 20 μ L。体系中包含如下组分: 2 $\times$ Super Real PreMix Plus 10 μ L, 上游引物 0.6 μ L, 下游引物 0.6 μ L, 模板 cDNA 1 μ L, RNase-Free H₂O 7.8 μ L。反应程序均为: 95 °C 15 min, 之后 95 °C 10 s, 59.1 °C 30 s, 共循环 40 次, 每个循环结束时检测荧光; 从 60 °C 到 95 °C 分析熔解曲线, 每增加 0.5 °C 检测一次。

1.6 Western blotting

取液氮冻存的长爪沙鼠肾脏、肝脏、骨骼肌、脑和心脏等 5 种组织于均质管中, 剪碎后用组织蛋白提取试剂盒提取组织总蛋白, 采用 BCA 定量法对蛋白进行定量。取 30 μ g 总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 半干法电转蛋白至 NC 膜。以 TBST (25 mmol/L Tris-base, 0.15 mol/L NaCl, 0.05%

Tween-20, pH7.5) 含 5% 脱脂牛奶封闭膜过夜。用 ND3 抗体(1 : 1 000 稀释) 4 °C 孵育过夜, TBST 洗涤 3 次后与第二抗体(辣根过氧化酶联的抗兔血清)室温孵育 1 h, TBST 洗膜后用化学发光法显色。5 种组织均选用 GAPDH 作为内参蛋白。最后用凝胶图像分析系统扫描蛋白质印迹条带灰度。

1.7 统计学处理

所有数据均采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析。两组间比较采用独立样本 *t* 检验方法分析。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 在糖尿病沙鼠和对照组的 5 种组织中 ND3 mRNA 表达水平的差异

与对照组(Control)相比, 糖尿病组(DM)肾脏

(Kidney)组织中 *ND3* mRNA 的表达极显著升高(图1), 参照 SSH 的结果中, 该基因在糖尿病沙鼠中的表达量高于正常沙鼠, 该结果与消减杂交结果相一致。在肝脏(Liver)和肌肉(Muscle)组织中, *ND3* 在糖尿病组的表达量均显著低于对照组, 脑(Brain)组织 mRNA 表达量仅有下降趋势, 而在心脏(Heart)组织中, mRNA 的表达仅有升高趋势。

2.2 在糖尿病沙鼠 5 种组织中 *ND3* 蛋白表达水平

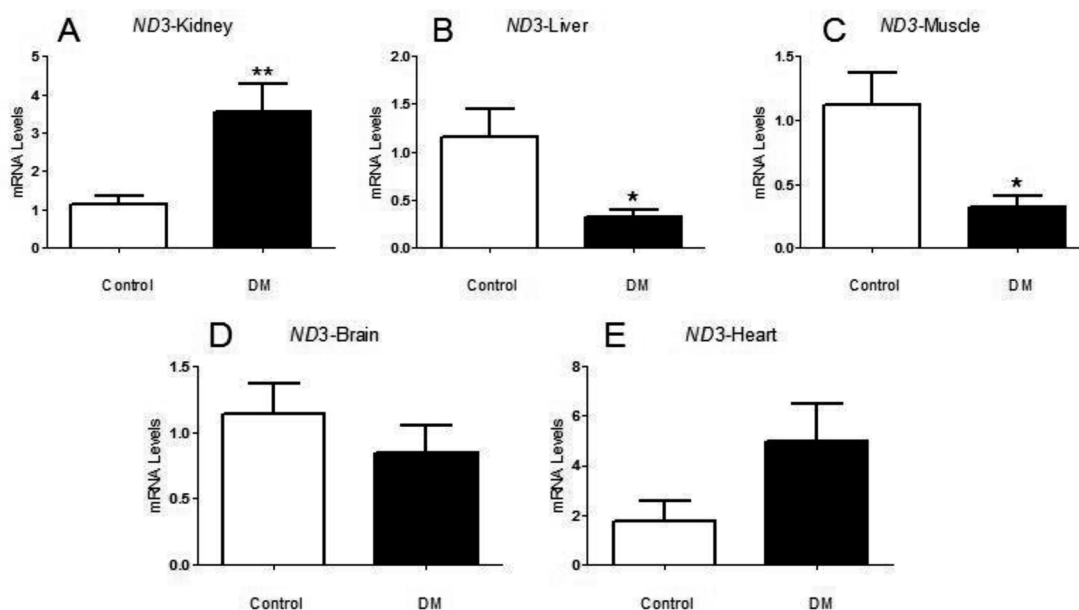
Western blotting 检测 *ND3* 蛋白在 5 种组织中的表达结果显示, 肾脏中糖尿病组的蛋白水平极显著高于对照组, 与实时定量 PCR 的趋势结果一致(图2)。肝脏组织中 *ND3* 在糖尿病组中蛋白水平显著低于对照组, 脑组织有极显著下降, 均与其 mRNA 的表达水平趋势相一致。在心脏组织中, 糖尿病组与对照组相比 *ND3* 蛋白也显著降低, 而骨骼肌中仅有降低趋势。

3 讨论

2 型糖尿病在糖尿病患者中占比达 90% 以上^[7], 因此多数相关研究是针对 2 型糖尿病发生机制的研

究。2 型糖尿病是由多基因控制的复杂内分泌代谢性疾病, 因此用自发性糖尿病模型研究其分子遗传发生机制是理想的手段^[8]。现有糖尿病动物模型包括实验诱导的、自发的及转基因小鼠、大鼠和猪, 但都有不同程度的缺陷, 如耗时、丢失基因表型等。本研究室前期^[9]经过定向培育形成了一个自发性糖尿病长爪沙鼠模型群体, 经研究证实它具有 2 型糖尿病特性, 能够自发形成糖尿病并具有遗传性, 在群体中的发生率较高(目前培育到 F17 代, 发生率在 66% 以上), 是对已有模型的重要补充。作者利用这一实验材料, 通过 SSH 方法从骨骼肌中筛选到糖尿病和正常沙鼠差异表达的基因 *ND3*, 并对该基因进行了不同组织器官的表达水平研究。

由于 2 型糖尿病会影响一些外周组织和核心器官的代谢和功能^[10], 作者选取了肾脏、肝脏、骨骼肌、脑和心脏组织进行 *ND3* 基因表达水平的研究。有报道^[11]称线粒体基因变异与 2 型糖尿病的发生存在一定的相关性。*ND3* 是由线粒体 *ND3* 基因编码的蛋白质, *ND3* 变体与线粒体脑肌病伴乳酸血症和卒中样发作有关, 以及与 Leigh 综合征、亚急性坏死性脑病和 Leber 氏遗传性视神经病相关^[12]。

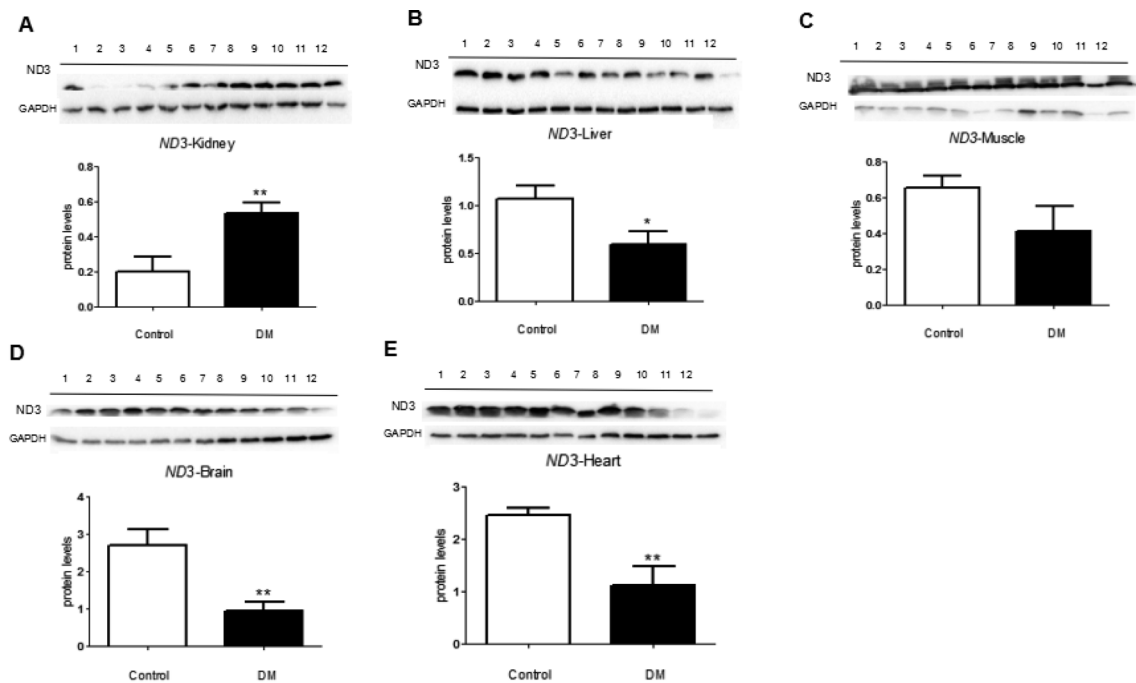


A~E: 分别为肾脏、肝脏、骨骼肌、脑和心脏组织中 *ND3* 的 mRNA 表达情况, 用 β -actin 为内参基因进行相对定量($n=6$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

图 1 *ND3* 在沙鼠 5 种组织 mRNA 表达水平

A-E: The relative mRNA expression levels of *ND3* in 5 tissues (kidney, liver, muscle, brain and heart) between both groups of gerbils. Results were normalized to the housekeeping gene β -actin($n=6$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Figure 1 mRNA expression level of *ND3* in 5 tissues from control and diabetic gerbils



A~E: 分别为ND3在肾脏、肝脏、肌肉、脑和心脏组织的蛋白表达情况。上半部分为曝光后的条带图,其中1~6为对照组,7~12为糖尿病组,下方是条带图灰度值的统计图($n=6$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

图2 ND3在沙鼠5种组织中蛋白的表达

A-E: The relative protein expression levels of ND3 in 5 tissues (kidney, liver, muscle, brain and heart) between control and diabetic gerbils. 1 to 6 are from control group, 7 to 12 are from diabetes group. Below the bands of gray scan, semi-quantitation of data shown corresponding statistics determined by using Image J ($n=6$, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Figure 2 Protein expression level of ND3 in 5 tissues from diabetic and control gerbils

由于线粒体ND3基因所表达的酶亚单位是呼吸链复合物I的重要组成部分,理论上 β 细胞ND3基因缺陷会导致呼吸链复合物I活性降低,从而引起胰岛 β 细胞功能障碍使糖尿病发病成为可能,则ND3在2型糖尿病致病机制中可能发挥着重要作用^[13]。

本文中糖尿病长爪沙鼠肾脏组织ND3 mRNA和ND3蛋白表达水平均有升高($P<0.01$)。糖尿病性肾病是糖尿病慢性并发症之一^[14],肾脏中糖尿病相关的血糖紊乱、微血管病变可致慢性肾功能不全、蛋白尿以及肾小球病变^[15,16]。有研究表明^[17]ND3变异可能引起线粒体氧化磷酸化作用的缺失,以及与糖尿病肾病、肌肉萎缩和脂肪肝等相关。本文结果还表明,糖尿病长爪沙鼠的肝脏中ND3的转录和翻译水平降低,而肝脏是血糖代谢调节的重要器官,当血糖浓度较高时,肝脏通过合成肝糖原及脂蛋白来降低血糖浓度;血糖浓度较低时,肝脏通过肝糖原分解或糖异生作用升高血糖。因此,在糖尿病动物中其线粒体氧化供能作用降低,由此可能引起ND3的表达水平也降低^[18]。

骨骼肌是葡萄糖吸收和脂肪酸氧化最大的器官,在胰岛素的作用下吸收人体大部分的血糖以进行肌肉的有氧和无氧呼吸,因此它对全身糖代谢起非常重要作用^[19],而ND3基因的缺失会导致线粒体氧化吸收葡萄糖作用降低,呼吸作用受影响。本研究检测到2型糖尿病模型长爪沙鼠肌肉中ND3的表达降低可能也与肌肉中该基因的变异有关。糖尿病患者脑内线粒体利用葡萄糖产生大量活性氧导致机体发生氧化应激,影响脑部神经电生理和病理状态^[20]。并且有研究表明^[21]线粒体ND2基因C5178A多态性与2型糖尿病患者并发心脑血管病有密切关系,同为线粒体电子呼吸链上复合体I的编码基因之一,ND3基因在本研究中也也在心脏和脑组织中有mRNA和蛋白水平的表达变化。

综上所述,作者对长爪沙鼠糖尿病模型研究表明,肾脏组织可能是糖尿病长爪沙鼠ND3基因作用的主要部位,同时在其他4种组织中该基因也发挥着一定作用,这一结果或可对利用长爪沙鼠深入研究2型糖尿病发生的分子机制提供新的思路。

参考文献:

- [1] 李聪然, 游雪甫, 蒋建东. 糖尿病动物模型及研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2005, 15(1):59-63.
- [2] 陈思东, 余守义, 许雅, 等. II型糖尿病发病危险因素研究[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(7):814-815.
- [3] Ashcroft FM, Rorsman P. Diabetes mellitus and the β cell: the last ten years[J]. Cell, 2012, 148(6):1160-1171.
- [4] 赵进英, 金力, 方福德, 等. 中国北方汉族2型糖尿病易感基因位点的定位[J]. 科学通报, 2000, 45(11):1154-1157.
- [5] Li Z, Huo X, Zhang S, et al. Selection of genes associated with variations in the circle of Willis in Gerbils using suppression subtractive hybridization[J]. PLoS One, 2015, 10(5):1-14.
- [6] 邓莉, 马春明, 袁琼兰, 等. 用TRIzol试剂抽提新生鼠脑组织总RNA[J]. 泸州医学院杂志, 2005, 28(6): 505-506.
- [7] 李娜, 曲卉, 曹宇立, 等. II型糖尿病动物模型的研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(1):66-69.
- [8] 丁晓慧, 杨泽. 2型糖尿病易感基因研究进展[J]. 中国糖尿病杂志, 2010, 18(4):311-313.
- [9] Li X, Du X, Chen Z, et al. Establishment and characterization of a newly established diabetic Gerbil Line[J]. PLoS One, 2016, 11(7):1-13.
- [10] 张义德, 刘志红, 谢红浪, 等. 2型糖尿病肾病患者心脏病变与肾脏损害的相关分析[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2009, 18(6):513-518.
- [11] 赵新波, 郭振奎, 荣海钦. 线粒体基因突变糖尿病[J]. 医学综述, 2007, 13(15):1158-1159.
- [12] Giles RE, Blanc H, Cann HM, et al. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA[J]. Proc Natl Acad Sci, 1980, 77(11):6715-6719.
- [13] 葛焕琦, 杨洋, 杨光. 线粒体基因突变与2型糖尿病发病机制[J]. 吉林大学学报: 医学版, 2004, 30(4):656-658.
- [14] 刘志红. 糖尿病肾病诊断中需注意的几个问题[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2007, 16(6):538-539.
- [15] 廖群, 陈芳华. 尿蛋白、微量白蛋白及尿蛋白电泳联合检测诊断糖尿病早期肾损害[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(11):1944-1945.
- [16] 彭静, 杨桂英, 杜刚. 非浓缩尿蛋白电泳、尿总蛋白肌酐比与微量白蛋白联合检测在诊断糖尿病早期肾损伤中的临床价值评价[J]. 新疆医学, 2014, 44(8):50-52.
- [17] Hinokio Y, Suzuki S, Komatu K, et al. A new mitochondrial DNA deletion associated with diabetic amyotrophy, diabetic myoatrophy and diabetic fatty liver[J]. Muscle Nerve Supplement, 1995, 3(Supplement 14):S142-S149.
- [18] Wang HN, Chen HD, Chen KY, et al. Highly expressed MT-ND3 positively associated with histological severity of hepatic steatosis[J]. APMIS, 2013, 122(5):443-451.
- [19] Jin W, Patti ME. Genetic determinants and molecular pathways in the pathogenesis of Type 2 diabetes[J]. Clin Sci (Lond), 2009, 116(2):99-111.
- [20] 陈金梁, 孙悦, 赵宇星, 等. 糖尿病脑病的现代认识[J]. 重庆医科大学学报, 2015, 1(11):1390-1394.
- [21] 酃卫星, 吴含, 吕建新, 等. 线粒体ND2基因C5178A多态性与2型糖尿病患者并发心脑血管病的关系评价[J]. 中华检验医学杂志, 2013, 36(6):519-522.

Expression of ND3 in 5 Tissues of Hereditary Diabetic Mongolian Gerbils

LI Yin-yin¹, GONG Jing-jing¹, WU Shao-liang³, LI Xiao-hong¹, WANG Cun-long¹, HUO Xue-yun¹,
LU Jing¹, LV Jian-yi¹, LIU Xin¹, GUO Meng^{1,2}, LI Chang-long¹, CHEN Zhen-wen¹, DU Xiao-yan^{1,2}
(1. School of Basic Medical Science; 2. Department of Laboratory Animal, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. The People's Hospital of Linshu, Linshu 276700, China)

[Abstract] Objective To investigate the mRNA and protein expression level of NADH dehydrogenase 3(ND3) gene in 5 different tissues of diabetic gerbils, to understand the location and target tissue of ND3 in diabetic gerbil model. **Methods** Six gerbils for control and diabetic groups were selected respectively. The kidney, liver, skeletal muscle, brain and heart from each group were collected. The mRNA and protein expression of ND3 were evaluated by Real time-PCR and Western blotting in both groups. **Results** The mRNA expression of ND3 in diabetic group was extremely significantly increased in kidney, and significantly decreased in liver and skeletal muscle compared with those of control animal. While it just showed decreasing tendency in brain and increasing tendency in heart tissue. The detection of protein expression showed that the protein level was consistent with mRNA expression in all tissues except heart. **Conclusions** The kidney may be the target tissue of ND3 in diabetic gerbil. In addition, ND3 also exhibits effect in other 4 tissues of diabetic gerbil.

[Key words] Mongolian gerbils; Type 2 diabetes; ND3; Real-time PCR; Western blotting

Tamoxifen 诱导敲除多囊肾小鼠 *Pkd1* 基因后的肾脏病理变化

周卫民, 朱科燕, 陈方明, 蔡月琴, 方明笋, 齐月寒, 陈民利
(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究中心, 杭州 310053)

[摘要] 目的 探讨 Tamoxifen 诱导下敲除 *Pkd1*^{fl}:Cre 转基因小鼠多囊肾病 1(*Pkd1*)基因前后的肾功能变化情况。方法 选用出生 11 d 的 *Pkd1*^{fl}:Cre 转基因小鼠和 *Pkd1*^{f/f} 野生型小鼠用 Tamoxifen 进行诱导, 分别于诱导后 7 d、14 d、21 d 检测血清肌酐与尿素氮含量, 检测 21 d 时体质量、肾脏重量及其脏器系数。结果 诱导敲除后 7 d 小鼠血清肌酐与尿素氮含量开始升高, 14 d、21 d 小鼠血清肌酐与尿素氮含量明显升高($P<0.01$)。21 d 时诱导敲除小鼠肾脏系数明显高于未敲除小鼠。结论 Tamoxifen 能使条件诱导敲除 *pkd1* 基因的小鼠肾功能产生明显改变, 肾组织出现大量囊泡症状。

[关键字] 多囊肾(PKD); 转基因小鼠; 肾功能; Tamoxifen; 诱导

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)01-0011-04

随着医药卫生事业的发展, 转基因小鼠已成为生命科学研究中不可缺少的实验动物模型。多囊肾(polycystic kidney disease, PKD)是一种常染色体显性遗传并以双肾出现无数圆形液性囊泡为主要特征疾病。*Pkd1*^{fl}:Cre 转基因小鼠是条件敲除小鼠, 在条件诱导敲除后, 除了肾脏外, 其他器官组织不会发生囊泡样病理组织变化。为了探讨在本实验室情况下经 Tamoxifen 诱导后多囊肾 *Pkd1*^{fl}:Cre 转基因小鼠在不同时间段肾功能的变化, 本研究分别在诱导前后各时间点对 *Pkd1*^{fl}:Cre 转基因小鼠和 *Pkd1*^{f/f} 野生型小鼠进行肾脏病理及血清肌酐(以下简称 CREA)和血清尿素氮(以下简称 BUN)进行检测。

1 材料与方法

1.1 动物

由瑞士苏黎世大学赠送的 *Pkd1*^{fl}:Cre 转基因小

鼠, 在本中心得到稳定的保种及传代[SCXK(浙)2013-0054], 每只小鼠都经 PCR 进行 DNA 基因型鉴定。以上实验动物使用 3R 原则给予人道关怀。小鼠均饲养于屏障系统的 IVC 笼具中, 相对湿度 50%~70%, 温度: $22 \pm 1^\circ\text{C}$, 15~20 次/h 的换风次数, 12 h 明暗交替, 噪音小于 50 dB, 由电脑自动控制温度、湿度、光照、压力梯度等指标[SYXK(浙)2013-0184]。

1.2 试剂和仪器

日立 7020 全自动生物化学分析仪, 日本日立公司; HM 335E 型轮转切片, 德国 Microm 公司; Leica ST501 染色机, 德国 Leica 公司; AP280 组织包埋机、全自动脱水机, 德国 Microm 公司; AG204- 电子分析天平, 瑞士 METTLER 公司。BUN 试剂盒: 07248/00002221, CREA 试剂盒: 171036/50003007, 生产厂家: 德赛诊断系统(上海)有限公司, Tamoxifen 和棉籽油由美国 Sigma 公司提供。

1.3 Tamoxifen 诱导

出生 11 d 的 *Pkd1*^{fl}:Cre 转基因小鼠和 *Pkd1*^{f/f} 野生型小鼠经腹腔注射 Tamoxifen 10 mg/kg, (Tamoxifen 用棉籽油溶解)。

1.4 CREA 和 BUN 测定

各组小鼠在 Tamoxifen 诱导后 7 d、14 d、21 d, 在小鼠颌下静脉处用采血针采血, 经 3 000 r/min 离

[收稿日期] 2016-10-27

[基金项目] 浙江省公益性技术应用研究计划项目(2014C37009), 浙江中医药大学比较医学创新团队(XTD201301)

[作者简介] 周卫民(1979-), 男, 研究方向: 实验动物与动物实验。E-mail: zwm@zcmu.edu.cn

[通讯作者] 陈民利(1963-), 女, 教授, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: cmli991@aliyun.com

心 10 min, 分离上清血清, 用日立 7020 全自动生物化学分析仪对 CREA 和 BUN 测定。

1.5 肾组织的脏器系数

Tamoxifen 诱导后 21 d, 各组小鼠进行称重、采用 CO₂ 施行安死术, 解剖取肾脏组织, 称重, 并计算脏器系数(= 脏器重量 / 体质量)。

1.6 组织病理学观察

取肾脏组织用体积分数 10% 中性甲醛溶液固定 24 h 后, 乙醇脱水, 石蜡包埋, 切片, 进行 HE 染色和 PAS 染色, 光学显微镜下观察肾组织病理学变化。

1.7 数据处理

用 $\bar{x} \pm s$ 表示实验数据, 各组间小鼠 CREA 和 BUN 的参数采用 SPSS11.5 软件进行单因素 ANOVA 方差分析和 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 CREA 变化

Tamoxifen 诱导后 7 d, Pkd1^{flf}:Cre 诱导组 CREA 与 Pkd1^{flf}:Cre 未诱导组及 Pkd1^{flf} 野生型组比较有升高趋势($P > 0.05$); 诱导后 14 d、21 d, Pkd1^{flf}:Cre 诱导组 CREA 与 Pkd1^{flf}:Cre 未诱导组及 Pkd1^{flf} 野生型组比较, 有极显著升高($P < 0.01$); 各时间点 CREA 在 Pkd1^{flf}:Cre 未诱导组与 Pkd1^{flf} 野生型诱导组和未诱导组间比较无明显差异, Pkd1^{flf} 野生型诱导组与 Pkd1^{flf} 未诱导组比较无明显差异(表 1)。

2.2 血清 BUN 变化

Tamoxifen 诱导后 7 d, Pkd1^{flf}:Cre 诱导组 BUN 与 Pkd1^{flf}:Cre 未诱导组及 Pkd1^{flf} 野生型组比较有升高趋势($P > 0.05$), 与 Pkd1^{flf} 野生型未诱导组比较有显著差异($P < 0.05$)。诱导后 14 d、21 d, Pkd1^{flf}:Cre 诱导组 BUN 与 Pkd1^{flf}:Cre 未诱导组及 Pkd1^{flf} 野生型组比较有极显著升高($P < 0.01$); 其他三组间比较无明显差异(表 2)。

2.3 体质量、肾脏重量及系数

Tamoxifen 诱导后 21 d, Pkd1^{flf}:Cre 诱导组体质量与 Pkd1^{flf}:Cre 未诱导组、Pkd1^{flf} 野生型诱导组、Pkd1^{flf} 野生型未诱导组比较有极显著减轻($P < 0.01$); Pkd1^{flf}:Cre 诱导组肾脏重、肾脏系数与 Pkd1^{flf}:Cre 未诱导组、Pkd1^{flf} 野生型诱导组、Pkd1^{flf} 野生型未诱导组比较有极显著增加($P < 0.01$); 体质量、肾脏重量及系数在其余三组间比较无差异(表 3)。

2.4 肾脏组织病理学观察

Pkd1^{flf}:Cre 小鼠经 Tamoxifen 诱导后产生多囊肿, 肾体积比没有囊肿的肾大 1 倍左右, 包膜紧张, 颜色变淡, 呈现水肿的病理变化, 并见肾表面粗糙坑洼(图 1 A1、A2); 多囊肿肾皮质层充满圆形囊肿, 其大小不一, 圆囊内充满液体, 在光学显微镜下, 可见多囊肿肾仅在各圆形囊肿间存在少量的完整肾结构, 呈现肾小球硬化, 肾小管萎缩、肾间质纤维化, 气球样变性, 白细胞浸润等(图 1B1、C1)。无囊肿肾脏表面光滑, 色泽红润, 肾组织

表 1 小鼠血清 CREA 变化
Table 1 Serum CREA changes of mice

组 别	Tamoxifen 诱导后时间/d		
	7	14	21
Pkd1 ^{flf} :Cre 诱导	41.61 ± 6.07	61.00 ± 8.70 ^{aabbcc}	74.83 ± 8.14 ^{aabbcc}
Pkd1 ^{flf} :Cre 未诱导	34.27 ± 4.21	36.86 ± 6.01	35.26 ± 4.43
Pkd1 ^{flf} 野生型诱导	37.17 ± 5.38	36.41 ± 3.94	34.82 ± 4.32
Pkd1 ^{flf} 野生型未诱导	38.94 ± 4.17	38.73 ± 4.99	36.05 ± 4.12

注: 与 Pkd1^{flf} 野生型未诱导组比较, ^{aa} $P < 0.01$; 与 Pkd1^{flf} 野生型经诱导组比较, ^{bb} $P < 0.01$; 与 Pkd1^{flf}:Cre 未诱导组比较, ^{cc} $P < 0.01$; $n=6$; 下表同

表 2 小鼠血清 BUN 变化
Table 2 Serum BUN changes of mice

组 别	Tamoxifen 诱导后时间/d		
	7	14	21
Pkd1 ^{flf} :Cre 诱导	8.89 ± 0.87 ^a	14.89 ± 3.17 ^{aabbcc}	21.49 ± 3.23 ^{aabbcc}
Pkd1 ^{flf} :Cre 未诱导	7.86 ± 0.75	7.49 ± 0.74	7.54 ± 0.94
Pkd1 ^{flf} 野生型诱导	7.62 ± 1.26	7.91 ± 0.87	7.45 ± 0.66
Pkd1 ^{flf} 野生型未诱导	6.99 ± 0.97	6.98 ± 0.96	6.88 ± 0.81

表 3 诱导 21 d 小鼠体质量、肾脏重量及系数变化

Table 3 Body weight, kidney weight and organ coefficients of mice after 21 days induction

组 别	体质量/g	肾重/g	肾脏系数/%
Pkd1 ^{flf} :Cre 诱导	11.7 ± 1.4 ^{aabccc}	0.418 ± 0.023 ^{aabccc}	0.036 ± 0.03 ^{aabccc}
Pkd1 ^{flf} :Cre 未诱导	18.0 ± 1.3	0.205 ± 0.015	0.011 ± 0.01
Pkd1 ^{flf} 野生型诱导	18.3 ± 2.0	0.221 ± 0.042	0.012 ± 0.01
Pkd1 ^{flf} 野生型未诱导	18.4 ± 1.4	0.224 ± 0.028	0.012 ± 0.01

结构完整，肾小球、肾小管排列有序，清晰可见（图 1B2、C2）。

3 讨论

多囊肾是一种常染色体显性遗传肾病，其两侧肾脏均可发生囊肿，还会影响其他器官，可发生肝、脾、胰囊肿，还会形成颅内动脉瘤、发生二尖瓣脱垂的心脏疾病，是一种全身性系统性疾病^[1-3]。与 PKD 发病有关基因已发现 2 个，其中 PKD1 基因定位于染色体 16p13-3，其突变约占 PKD 的 85%；PKD2 基因定位于 4q21~23，其突变约占 15%^[4]。

血清 BUN 测定是检查肾功能的主要指标之一，BUN 是体内蛋白质代谢和氨基酸分解的终产

物，主要经肾小球过滤随尿液排出体外，BUN 的高低会受诸多因素的影响，如高蛋白饮食等，BUN 的产生均明显增加而使血清中 BUN 增高。常用检测血清 CREA 的含量方法来了解肾功能的情况，血清中 CREA 浓度主要由肾小球滤过功能决定的，肾小球滤过功能减退时，血清中 CREA 可升高。

多囊肾 Pkd1^{flf}:Cre 转基因小鼠是有条件目标 PKD1 等位基因^[5]敲除小鼠，并结合有选择性的 Cre 重组酶，当重组酶 Cre 被 Tamoxifen 诱导之后，Cre 表达，介导两个 LoxP 位点序列的重组，从而把目标 PKD1 等位基因(LoxP-Pkd1-LoxP)敲除，在条件诱导敲除后，除了肾脏外，其他器官组织不会发生囊泡样病理组织变化^[6]。研究表明^[7]，在小鼠 10~12 日龄进行诱导，诱导后，PKD1 等位基因

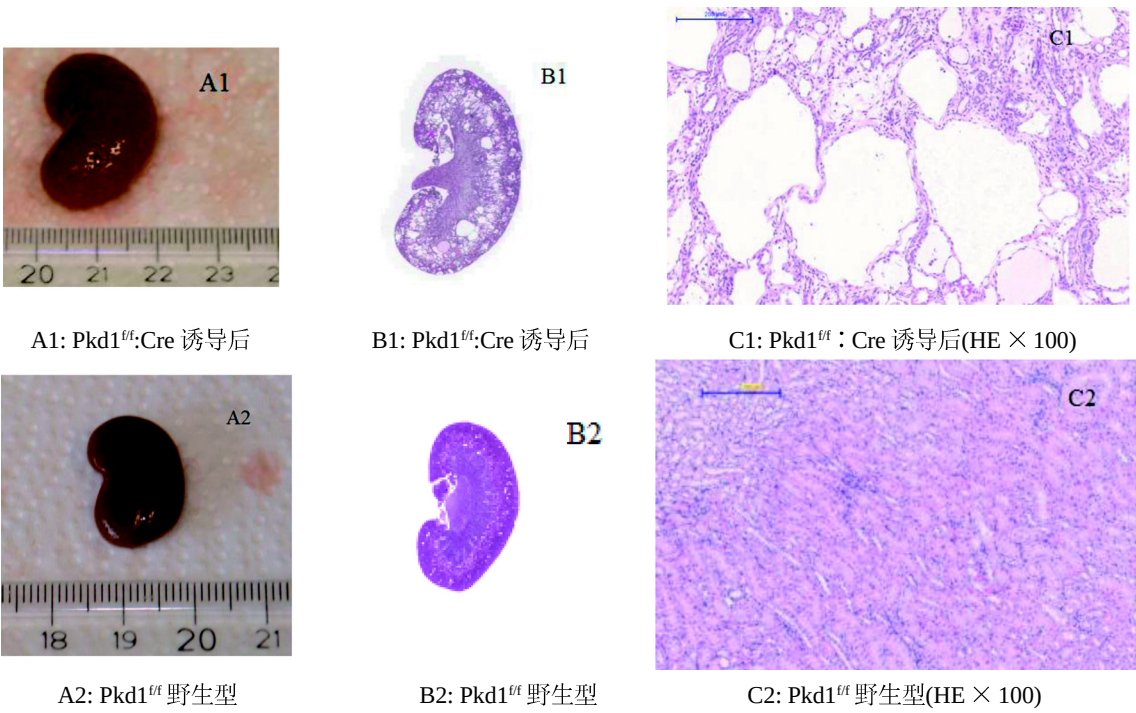


图 1 Tamoxifen 诱导后 21 d 小鼠肾脏病理变化

Figure 1 The pathological changes of kidney in mice after 21 days Tamoxifen induction

(LoxP-Pkd1-LoxP)敲除的小鼠一般实验都可做到35~38日龄,本实验在小鼠11日龄,用棉子油溶解的Tamoxifen(10 mg/kg)按体质量对小鼠进行腹腔注射诱导敲除,随着小鼠的生长,小鼠状态越来越差,在32日龄开始死亡,比研究资料^[7]显示的存活时间要短。由诱导后7 d、14 d、21 d的BUN和CREA测定结果表明,在诱导敲除后7 d的BUN和CREA已开始上升,表明肾小球滤过功能已受到影响。在诱导敲除后14 d、21 d的BUN和CREA明显高于未敲除的小鼠,21 d时BUN升高3倍多,CREA升高2倍多(均 $P<0.01$),在21 d时敲除小鼠的肾脏重量是没有敲除小鼠的2倍,肾脏器系数3~4倍,体质量下降明显,表明诱导敲除后,随着时间的延长,小鼠肾功发生了进行性恶化,肾中囊泡增多,逐渐挤压正常的肾小球和组织,影响血液循环,使肾小球硬化,肾小管萎缩、肾间质纤维化,并出现肾衰症状,采食量减少,体质量下降。此转基因小鼠的发病特点与人类常染色体显性遗传引起的多囊肾发病进程较一致,此研究为该转基因小鼠的推广利用提供数据,为研究多囊肾病分子发病机理、研发多囊肾病新药提供有用的模型。

参考文献:

- [1] 梅长林,李林.常染色体显性遗传性多囊肾病分子遗传、发病机制及治疗进展[J].肾脏病与透析肾移植杂志,2001,10(5):454-460.
- [2] Omori S, Hida M, Fujita H, et al. Extracellular signal-regulated kinase inhibition slows disease progression in mice with polycystic kidney disease[J]. J Am Soc Nephrol, 2006,17(6):1604-1614.
- [3] Hughes P, Robati M, Lu W, et al. Loss of PKD1 and loss of Bcl-2 elicit polycystic kidney disease through distinct mechanisms[J]. Cell Death Differ, 2006, 13(7):1123-1127.
- [4] 高晋生,杨宝学.常染色体显性遗传多囊肾病的治疗研究进展[J]中国药理学通报,2009,25(2):141-144.
- [5] Shibasaki S, Yu Z, Nishio S, et al. Cyst formation and activation of the extracellular regulated kinase pathway after kidney specific inactivation of Pkd1[J]. Hum Mol Genet, 2008, 17(11):1505-1516.
- [6] Baoxue Y, ND Sonawane, Dan Z, et al. Small-molecule CFTR inhibitors slow cyst growth in polycystic kidney disease [J]. J Am Soc Nephrol, 2008, 19(7):1300-1310.
- [7] Leuenroth SJ, Bencivenga N, Chahboune H, et al. Triptolide reduces cyst formation in a neonatal to adult transition Pkd1 model of ADPKD[J]. Nephrol Dial Transplant, 2010, 25(7): 2187-2194.

Pathological Change of Kidney in *Pkd1* Knock-out Mice with Polycystic Kidney Induced by Tamoxifen

ZHOU Wei-min, ZHU Ke-yan, CHEN Fang-ming,

CAI Yue-qing, FANG Ming-sun, Qi Yue-han, CHEN min-li

(Laboratory Animal Research Center, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

[Abstract] Objective To explore the change of kidney function of polycystic kidney disease (PKD) mice before and after the knockout *Pkd1*^{fl/fl}: Cre gene induced by Tamoxifen induction. **Methods** The *Pkd1*^{fl/fl}:Cre transgenic mice, *Pkd1*^{fl/fl}:Cre wild type mice aged on 11 days were induced by Tamoxifen, the contents of serum creatinine and urea nitrogen were detected at 7 days, 14 days and 21 days after induction. The body weight, kidney weight and the kidney viscera coefficient were detected after 21 day. **Result** After 7 days induction, the contents of serum creatinine and urea nitrogen began to rise after 14 days and 21 days induction, the parameters were significantly increased ($P<0.01$) After 21 days induction, the kidney coefficient of knocked out transgenic mice kidney coefficient was higher than that of wild type mice. **Conclusion** The renal function of *Pkd1*^{fl/fl}:Cre transgenic mice were obviously changed by Tamoxifen induction, the kidney of transgenic mice showed symptoms of a large number of vesicles.

[Key words] Polycystic kidney disease (PKD); Transgenic mice; Kidney function; Induction

侧脑室注射神经节苷脂钠对脑瘫模型大鼠学习记忆能力的影响

杨凤翔, 张小乔, 罗秀玲

(十堰市太和医院神经康复中心, 十堰 442000)

[摘要] 目的 探讨神经节苷脂钠(GM)侧脑室注射对脑瘫模型大鼠学习记忆能力的机制, 为临床治疗脑瘫提供理论依据。方法 将36只SPF级SD大鼠随机分为对照组、模型组和GM组。模型组和GM组大鼠通过切除大脑皮质及部分脑组织建模。成模后1d、10d、20d、30d用大鼠脑定位仪经大鼠侧脑室注射GM给药。在成模后和末次给药后用水迷宫仪进行空间探索实验、定位航行、悬吊、斜坡等实验, 比较大鼠学习记忆能力及运动能力改变, 并采用ELISA测定脑海马区乙酰胆碱(Ach)及眶静脉血乙酰胆碱脂酶(AChE)活性; 脑组织液钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CaMKII)及钙调蛋白(CaM)。结果 与模型组比较, GM组大鼠治疗后找到平台时间及斜坡实验时间显著缩短; 悬吊时间、第一象限和中环停留时间明显延长; 定位航行中潜伏期、游泳距离缩短, 脑海马区Ach含量降低、AChE活性增强; 脑组织液CaMKII及CaM增高($P<0.05$)。结论 GM可明显抑制脑瘫模型大鼠脑组织液CaMKII和CaM合成, 降低神经细胞钙蛋白水解和钙内流, 并通过阻断CaMKII这一信号传导通路, 提高AChE活性, 抑制Ach释放来降低大鼠因脑缺血缺氧对中枢神经造成的损伤, 使受损脑神经纤维修复和再生, 进而促进中枢神经纤维功能恢复来提高学习记忆能力。

[关键词] 神经节苷脂钠(GM); 乙酰胆碱(Ach); 钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CaMKII); 钙调蛋白(CaM); 空间探索实验; 学习记忆能力

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)01-0015-05

脑性瘫痪又称脑瘫, 产伤窒息、缺血缺氧性脑病、早产、低体质量及脊髓灰质炎病毒感染等均是造成脑瘫的主要病因^[1]。脑瘫患儿智力发育不良, 并多伴随持续存在的躯体运动或中枢性运动障碍性症候群等临床症状^[2]。神经节苷脂钠(GM)通过维持细胞内外钙离子平衡、稳定神经细胞膜通透性保护神经细胞^[3]。有研究表明^[4], 乙酰胆碱(Ach)过量释放会引起神经元癫痫样放电和突触后神经元

坏死。通过参与调节脑组织中神经递质Ach合成与释放、提高乙酰胆碱脂酶(AChE)可减轻Ach对神经元的神经毒性, 促进神经细胞修复而减轻脑损伤, 提高学习与认知功能^[5]。本实验中, 作者采用国内外公认的行为学检测方法作为鉴定脑瘫模型的成模标准^[6], 经侧脑室注射GM给药后, 用Morris水迷宫等实验来观察其学习记忆功能改变, 并检测大鼠脑组织中Ach和AChE活性、脑组织液钙调蛋白依赖性蛋白激酶II(CaMKII)及钙调蛋白(CaM)含量, 试图分析GM治疗脑瘫作用机制, 为临床治疗脑瘫提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

SPF级雄性SD大鼠36只, 体质量180~210g,

[收稿日期] 2016-08-26

[基金项目] 湖北省教育厅项目(D20152101, 2013Z-B13)

[作者简介] 杨凤翔(1973-), 女, 副主任护师, 从事骨科康复医学研究。E-mail: fengyanqin163163@126.com

[通讯作者] 张小乔(1962-), 男, 神经学博士, 主任医师, 从事老年神经系统疾病康复医学研究。

E-mail: fengyanqin163163@126.com

由十堰市太和医院动物中心提供 [SCXK(鄂)2011-0008]，将动物随机分为对照组、模型组和 GM 组。动物实验在本院科技中心动物实验室完成 [SYXK(鄂)2011-0031]。

1.2 实验仪器与药品

WMT-100 型 Morris 水迷宫视频跟踪分析系统(成都泰盟软件有限公司成都泰盟软件有限公司); 51600 U 高精度标准脑立体定位仪(上海玉研科学仪器有限公司); GM(北京赛升药业股份有限公司, 批号 20093980); 戊巴比妥钠(北京普博斯生物科技有限公司, 批号: P3761)。

1.3 大鼠脑瘫模型制备方法

参照文献[7]方法, 造模前动物禁食 12 h, 不禁水, 用质量分数 3% 的戊巴比妥钠腹腔注射麻醉, 麻醉后俯卧位固定于 51600 U 高精度标准脑立体定位仪, 剪去头顶被毛, 碘伏消毒后用体积分数 75% 乙醇脱碘, 铺无菌巾。造模时切开大鼠颅顶正中皮肤, 刮去骨膜暴露矢状缝, 用骨钻在矢状缝左侧 0.2 cm 处钻孔开窗, 切开大鼠硬脑膜暴露大脑皮质, 沿颅骨窗边缘切开大脑皮质, 切除部分大脑髓质和皮质, 然后用骨水泥修补骨窗, 清创缝合并用碘伏消毒, 一般在术后 7 d 建成脑瘫模型^[8]。对照组骨钻开窗后不剥离大脑髓质和大脑皮质, 等待 10 min 后, 用骨水泥修补骨窗, 清创缝合并用碘伏消毒。

1.4 治疗方法

成模后 1 d、10 d、20 d 及 30 d, 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 用 51600 U 高精度标准脑立体定位仪固定。GM 组用微量注射器经大鼠侧脑室注射 GM 给药, 用量: 20 μ L/次, 每 10 d 注射 1 次, 共 3 次。

对照组和模型组注等体积生理盐水。

1.5 观察指标

于末次给药后 10 d, 用斜坡和悬吊实验测试运动功能^[9]。运动功能测试完成后将大鼠放入 Morris 水迷宫中观察脑瘫大鼠的学习记忆能力^[10]。并在第一次和末次给药后 10 d, 分别处死 6 只大鼠, 抽取 5 μ L 脑组织液用以检测 CaM 及 CaMKII, 剥取脑海马区, 用 ELISA 法检测海马区 Ach 含量, 抽取眶静脉血检测 AChE 活性。

1.6 统计学方法

采用 SPSS19.0 软件进行统计学处理, 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠脑海马区 Ach 和 AChE

对照组脑海马区 Ach 和 AChE 治疗前后无明显差异。与对照组比较, 模型组 AChE 降低、Ach 升高($P < 0.05$)。与模型组同组治疗前比较, GM 组大鼠治疗后 Ach 降低、AChE 升高($P < 0.05$), 但 GM 组大鼠治疗后 Ach 和 AChE 未完全恢复至对照组水平($P < 0.05$)(表 1)。

2.2 大鼠脑组织液 CaMKII 和 CaM

对照组脑组织液 CaMKII 和 CaM 治疗前后无明显差异。与对照组比较, 模型组 CaMKII 和 CaM 降低($P < 0.05$)。与模型组及同组治疗前比较, GM 组大鼠治疗后 CaMKII 和 CaM 降低($P < 0.05$)(表 2)。

2.3 大鼠运动功能

在斜坡实验中, 对照组大鼠反应敏捷, 滑落

表 1 治疗前后 3 组大鼠脑海马区 Ach 和静脉血 AChE 比较

组 别	Ach/ μ g $\cdot$ g ⁻¹		AChE/ μ mol $\cdot$ L ⁻¹	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	151.85 $\pm$ 17.47	147.13 $\pm$ 19.25	412.75 $\pm$ 46.23	419.55 $\pm$ 45.87
模型组	373.15 $\pm$ 41.36 Δ	382.70 $\pm$ 40.52 Δ	196.24 $\pm$ 22.86 Δ	204.42 $\pm$ 23.50 Δ
GM 组	377.02 $\pm$ 43.51 Δ	182.72 $\pm$ 21.48 Δ ▲#	201.75 $\pm$ 30.85 Δ	353.81 $\pm$ 39.27 Δ ▲#

注: 与对照组比较, Δ $P < 0.05$; 与模型组比较, Δ $P < 0.05$, 与同组治疗前比较, # $P < 0.05$; 下表同

表 2 治疗前后 3 组大鼠 CaMKII 和 CaM 比较

组 别	CaM/ μ mol $\cdot$ L ⁻¹		CaMK II / μ mol $\cdot$ L ⁻¹	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	1.85 $\pm$ 0.19	1.89 $\pm$ 0.20	4.24 $\pm$ 0.29	4.89 $\pm$ 0.23
模型组	3.79 $\pm$ 0.23 Δ	3.701 $\pm$ 0.40 Δ	8.20 $\pm$ 0.52 Δ	9.47 $\pm$ 0.42 Δ
GM 组	3.87 $\pm$ 0.26 Δ	2.01 $\pm$ 0.22 Δ ▲#	8.17 $\pm$ 0.47 Δ	3.35 $\pm$ 0.20 Δ ▲

底部时会掉头向上,用时很短;悬吊实验中,大鼠悬吊运动灵活准确、悬吊时间长。与对照组比较,模型组大鼠斜坡实验中掉头用时延长、其反应迟缓、滑落底部时不能及时掉头向上($P<0.05$);悬吊实验中很快滑落、其悬吊时间缩短,肢体肌力、灵活性和稳定性明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,GM组大鼠肢体肌力、灵活性和稳定性明显好转,掉头向上时间明显缩短、悬吊时间明显延长($P<0.05$),但GM组大鼠治疗后悬吊实验和斜坡实验未完全恢复到对照组水平($P<0.05$)(表3)。

2.4 大鼠学习能力实验

在 Morris 水迷宫空间探索实验中,与对照组比较,模型组学习找平台时间明显延长,第一、二象限停留时间明显降低,中环停留时间长于内环和外环($P<0.05$)。与模型组比较,GM组大鼠学习找平台时间明显缩短,第一象限和中环停留时间明显延长($P<0.05$),但均未达对照组水平($P<0.05$)(表4)。

2.5 大鼠定位航行实验

与对照组比较,模型组定位航行潜伏期和游

表3 治疗后3组大鼠悬吊实验和斜坡实验比较

组别	悬吊实验/min	斜坡实验/s
对照组	4.55 ± 0.31	3.81 ± 0.23
模型组	1.32 ± 0.17 [△]	10.24 ± 0.53 [△]
GM组	5.24 ± 0.26 ^{△▲}	7.12 ± 0.35 ^{△▲}

表4 治疗后3组大鼠 Morris 水迷宫空间探索比较

项目	对照组	模型组	GM组
学习找平台时间/min	3.45 ± 0.17	6.97 ± 0.45 [△]	5.41 ± 0.37 ^{△▲}
内环/s	9.25 ± 0.72	16.97 ± 1.42 [△]	15.28 ± 2.76 [△]
中环/s	56.94 ± 7.24	49.32 ± 5.14 [△]	60.35 ± 8.41 [▲]
外环/s	54.36 ± 6.72	43.50 ± 5.39 [△]	42.75 ± 6.73 [△]
第一象限/s	42.25 ± 6.11	34.54 ± 4.12 [△]	67.27 ± 8.45 ^{△▲}
第二象限/s	36.25 ± 4.38	24.77 ± 4.49 [△]	26.36 ± 3.59 [△]
第三象限/s	24.12 ± 3.43	20.46 ± 3.35	19.25 ± 2.83
第四象限/s	25.42 ± 5.15	21.71 ± 4.42	19.76 ± 2.28

泳距离明显延长($P<0.05$)。与模型组比较,GM组大鼠潜伏期和游泳距离明显缩短($P<0.05$),但游泳距离未达对照组水平($P<0.05$)(表5)。

表5 大鼠定位航行比较

组别	潜伏期/s		游泳距离/cm	
	治疗前	治疗后	治疗前	治疗后
对照组	1.35 ± 7.45	49.27 ± 10.54	613.72 ± 66.45	612.63 ± 62.35
模型组	119.74 ± 13.04 [△]	136.35 ± 19.15 [△]	1 021.24 ± 91.82 [△]	901.45 ± 87.25 [△]
GM组	120.33 ± 14.27 [△]	54.96 ± 7.75 ^{▲#}	1 032.04 ± 97.68 [△]	719.43 ± 80.59 ^{△▲#}

3 讨论

GM是从猪脑中提取的具有保护受损神经细胞的物质,即单唾液酸四己糖神经节苷脂钠(GM),能促进受损中枢神经系统功能恢复。研究表明^[12],GM可以与神经细胞膜结合,改善细胞膜酶活性,减轻神经细胞水肿,促进“神经重构”(包括神经细胞的生存、轴突生长和突触生长)。GM作为神经营养因子的增强剂,可通过调节细胞膜Ca²⁺-ATP酶和Na⁺-K⁺-ATP酶活性,稳定神经细胞膜的结构和功能,并促进受损神经细胞能量代谢神经中枢系统起到对受损神经细胞的保护作用^[13]。临床上常用于治疗脑性瘫痪、脊髓损伤、脑梗死、新生儿缺氧缺血性脑病、脑萎缩、脑出血等颅脑损伤性疾病^[14]。

本实验中,GM组经3次侧脑室注射GM给药

后,脑海马区ACh含量降低、AChE活性增强;脑组织液CaMK II及CaM增高。以上结果提示侧脑室注射GM给药治疗脑瘫有效,脑瘫大鼠学习记忆能力提高。研究表明^[15],ACh是中枢胆碱能神经的重要神经递质之一,ACh广泛分布于乙酰胆碱能神经末梢,尤以脑干、丘脑、海马-杏仁核等为多,ACh与运动、学习、记忆和认知等有密切相关。而AChE是水解ACh酶,AChE降低会影响AChE是水解,造成ACh在神经突触蓄积中毒^[16]。脑瘫导致神经损伤后,AChE活性降低、ACh大量蓄积神经突触而加重神经损伤,使学习和记忆能力降低^[17,18]。本实验中观察到GM组脑海马区ACh含量降低、AChE活性增强,说明GM可能通过抑制中枢胆碱能神经释ACh,提高AChE活性来水解ACh,减少神经突触ACh蓄积来降低神经损伤。实验还观察到GM组脑组织液中CaMKII和CaM降低,

这可能是GM阻断了脑瘫大鼠中枢神经系统兴奋性氨基酸对神经元的毒性作用,选择性抑制谷氨酸过度激活引起的中枢神经病理改变^[19]。在电生理方面,细胞内钙超载会直接造成中枢神经细胞受损,而Ca²⁺作为胞浆内第二信使,可与CaM形成Ca²⁺-CaM复合物,这种复合物可进一步激活CaMKII,并使CaMKII酶的构象发生改变,Ca²⁺大量内流而加重钙超载^[20]。GM可能在这一环节起到抑制Ca²⁺内流来减轻或防止钙超载对中枢神经细胞损伤。另外,GM也有可能通过调节细胞膜Na⁺-K⁺-ATP和Ca²⁺-ATP活性,稳定神经细胞膜的结构和功能来达到保护神经功能的作用,但这一点需要用膜片钳实验来证实。此外,外源性GM能与神经细胞膜结合,促进神经生长因子生长,对受损神经元具有修复再生作用^[21]。有研究表明^[22,23],增加脑海马区ACh含量可明显缩短实验动物的正确反射恢复时间,改善水迷宫学习和认知能力。本实验也证实,GM组水迷宫认知能力明显提高,大鼠找到平台时间及斜坡实验时间显著缩短,悬吊时间、第一象限和中环停留时间明显延长,定位航行中潜伏期、游泳距离缩短。这与GM抑制中枢胆碱能神经释放ACh,提高AChE活性来水解ACh,降低CaMKII和CaM,阻断Ca²⁺/CaM-CaMK II信号传导通路引起的钙超载,促进受损神经再生及功能的恢复有关。

参考文献:

- [1] 王春丽,龙旭浩. 50例脑性瘫痪患儿高危因素分析[J]. 中国中西医结合儿科学, 2016, 8(1):85-87.
- [2] 孙琦,王丹,刘海兵,等. 中医手法结合运动疗法治疗痉挛型脑性瘫痪临床研究[J]. 浙江中西医结合杂志, 2016, 26(1):6-9.
- [3] 汪新体,方侃. 缺氧缺血性脑病的疗效分析单唾液酸四己糖神经节苷脂联合纳洛酮治疗新生儿[J]. 实用药物与临床, 2016, 16(11):1027-1029.
- [4] Tolwani RJ, Buekrnaster PS, Varma S, et al. BDNF overexpression increases dendrite complexity in hippocampal dentate gyrus [J]. Neuroscience, 2002, 114(3):795-805.
- [5] Dunbar GL, Rylett RJ, Schmidt BM, et al. Hippocampal choline acetyltransferase activity correlates with spatial learning in aged rats[J]. Brain Res, 1993, 604(1-2):266-272.
- [6] 王忠诚. 王忠诚神经外科学[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2005:371-372.
- [7] 张敬东,张新,俞兴,等. 构建大鼠痉挛型脑性瘫痪模型[J]. 中国临床康复, 2006, 10(38):150-153.
- [8] Xie C, Zhou K, Wang X, et al. Therapeutic benefits of delayed lithium administration in the neonatal rat after cerebral hypoxia-ischemia[J]. PLoS One, 2014, 9(9):90-92.
- [9] 俞雅珍,邓亚仙,高宝勤,等. 电损毁致大鼠痉挛性脑性瘫痪动物模型制备及其鉴定[J]. 实用儿科临床杂志, 2007, 22(12):928-930.
- [10] 熊顺华,王燕,郭青平,等. 侧脑室注射吡咯喹啉酮对大鼠学习记忆的影响[J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(2):266-268.
- [11] 姚茂忠,符健. 氯氰菊酯对雄性大鼠红细胞乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(1):23-24.
- [12] 李小强,陈莉峰. 单唾液酸四己糖神经节苷脂钠治疗脑卒中的疗效观察[J]. 河北医药, 2013, 35(18):2806-2828.
- [13] 梁达理. 单唾液酸四己糖神经节苷脂钠注射液治疗新生儿缺氧缺血性脑病[J]. 中国现代医生, 2012, 50(6):61-62.
- [14] 黄卿琛,封派. 单唾液酸四己糖神经节苷脂钠治疗新生儿缺氧缺血性脑病疗效观察[J]. 中西医结合心血管病杂志(电子版), 2013, 1(3):43-45.
- [15] 李启华,吉青. 创伤性脑损伤大鼠乙酰胆碱、脑源性神经生长因子表达变化的研究[J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(1):23-24.
- [16] Hao Y, Yang JY, Guo M, et al. Morphine decreases extracellular levels of glutamate in the anterior cingulate cortex: an *in vivo* microdialysis study in freely moving rats[J]. Brain Res, 2005, 1040:191-196.
- [17] Duysen EG, Stribley JA, Fry DL, et al. Rescue of the acetylcholinesterase knockout mouse by feeding a liquid diet; phenotype of the adult α -cetylcholinesterase deficient mouse [J]. Brain Res Dev Brain Res, 2002, 137(1):43-54.
- [18] Lazaris A, Bertrnad F, Lazarus C, et al. Baseren and 8-OH-DPAT-induced release of acetylcholine in the hippocampus of aged rats with different levels of cognitive dysfunction [J]. Brain Res, 2003, 967(1-2):181-190.
- [19] 李霞,任莉,陈振辉,等. 神经节苷脂头部穴位注射佐治小儿脑性瘫痪临床研究[J]. 中国中西医结合儿科学, 2010, 2(5):441-442.
- [20] 张丽,杨艳,曾晓荣,等. 小电导钙激活钾通道磷酸化相关调节及其在心血管疾病中的作用[J]. 中国心血管病研究, 2012, 10(10):624-627.
- [21] 胡冰凌,周勇,刘强,等. 神经节苷脂对脑出血患者血清髓鞘碱性蛋白及凝血酶的影响[J]. 实用药物与临床, 2015, 18(8):936-938.
- [22] 王征,李运曼,龚晓健,等. 脑脉泰胶囊对脑缺血再灌注大鼠学习记忆功能及脑组织乙酰胆碱含量的影响[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(12):459-462.
- [23] Jia JP, Jia JM, Zhou WD, et al. Differential acetylcholine and choline concentrations in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. Chin Med J(Engl), 2004, 117(24):1161-1164.

Effect of Lateral Ventricle Injection of Ganglioside Sodium on Learning and Memory in Rats with Cerebral Palsy

YANG Feng-xiang, ZHANG Xiao-qiao, LUO Xiu-ling

(Department of Nerve rehabilitation Center, Taihe Hospital, Shiyan 442000, China)

[Abstract] **Objective** To study the mechanism of Ganglioside (GM) lateral ventricle injection on learning and memory ability of rats with cerebral palsy, and to provide theoretical basis for clinical treatment of cerebral palsy. **Methods** Thirty-six SPF rats were randomly divided into blank control group, model group and GM group. The model group and GM group were randomly divided into the model group and the SD group. After modeling, 1 days and 10, 20, 30 days with the brain localization of rat instrument by rat intracerebroventricular injection of GM administered after modeling and administration after the water maze experiment instrument to explore, navigation, suspension and slope experiments comparing the ability of learning and memory of rats and exercise the ability to change space. And using the ELISA method for the determination of acetylcholine in hippocampus (Ach) and orbital venous blood acetylcholinesterase (AChE) activity. Determination of brain tissue and calmodulin dependent protein kinase II (CaMKII) and calmodulin (CaM). **Results** Compared with the model group, the rats in group GM after treatment, the time of finding the platform and slope experiment time was significantly shortened, suspension time, the first quadrant and the residence time in the voyage prolonged; positioning latency, swimming distance shortened, the Ach level was decreased, and AChE activity was increased. the brain tissue of liquid CaMK and CaM increased ($P<0.05$). **Conclusion** In rat cerebral palsy model, GM could inhibit the synthesis of CaMKII and CaM, reduce hydrolysis of neuronal calcium protein and calcium influx. By blocking the signaling pathway of CaMKII, GM treatment increases the activity of Ach, reduces brain damage caused by cerebral ischemia and hypoxia, thus promoting repair and regeneration of lesioned nerves and subsequently learning and memory. **[Key words]** Ganglioside sodium; Acetylcholine; Calmodulin dependent protein kinase II(CaMKII); Calmodulin(CaM); Space exploration experiment; Learning and memory

非酒精性脂肪性肝纤维化小鼠模型的建立及炎症因子的表达

杨 华¹, 赵亚娟², 欧 强²

(1. 上海市公共卫生临床中心, 上海 201508; 2. 上海市第八人民医院, 上海 200235)

[摘要] 目的 建立非酒精性脂肪性肝纤维化小鼠模型, 观察其病变及炎症因子的表达情况。方法 20只雄性C57BL/6J小鼠随机分成对照组、非酒精性脂肪性肝纤维化模型组。对照组小鼠予以蛋氨酸-胆碱充足(MCS)饲料喂养, 模型组小鼠予以蛋氨酸-胆碱缺乏(MCD)饲料喂养造模。于造模8周末处死小鼠。观察肝脏组织病理学变化, 检测小鼠血清草氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)水平。结果 造模8周末, 模型组小鼠体重显著下降。肝组织病理学观察显示严重肝脂肪变, 肝细胞水肿, 可见点灶状坏死及淋巴细胞浸润, 局灶见界面肝炎, 汇管区扩大, 纤维组织增生。模型组小鼠肝脏炎症活动度得分和纤维化得分均显著高于对照组($P<0.01$)。模型组小鼠血清ALT、AST、TNF- α 、IL-6与对照组比较显著升高, 而TG和TC水平显著下降($P<0.01$)。结论 小鼠经MCD饲料喂养8周出现严重肝脂肪变、肝纤维化和炎症因子高表达, 表明成功诱导小鼠非酒精性脂肪性肝纤维化模型。该方法造模简单, 成模快, 存活率高, 适合用于非酒精性脂肪性肝纤维化发病机制和药物干预等方面的研究。

[关键词] 非酒精性脂肪性肝纤维化; 蛋氨酸-胆碱缺乏(MCD); C57BL/6J小鼠; 炎症因子

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)01-0020-05

随着肥胖、糖尿病和代谢综合症的全球化流行, 非酒精性脂肪性肝病(non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD)的发病率也逐渐升高, 已成为慢性肝病的重要病因之一^[1]。研究表明, 非酒精性脂肪性肝纤维化的发生和严重程度与NAFLD患者死亡率密切相关, 采取积极有效的治疗手段阻断非酒精性脂肪性肝纤维化进展是防治NAFLD的关键^[2]。建立理想的非酒精性脂肪性肝纤维化动物模型, 对于深入研究非酒精性脂肪性肝纤维化的发病机制,

筛选有效治疗药物, 具有非常重要的意义。

C57BL/6小鼠是第一个完成基因组测序的小鼠品系, 以C57BL/6J小鼠为遗传背景的基因工程小鼠在探讨疾病的分子机制方面发挥了关键作用^[3-5]。国外已有采用C57BL/6J小鼠制备NAFLD动物模型的文献报道^[6]。本实验采用蛋氨酸-胆碱缺乏(Methionine and choline-deficient, MCD)饲料喂养C57BL/6小鼠造模, 观察肝组织病理学变化, 并检测血清生化指标和炎症因子表达情况, 为该模型在非酒精性脂肪性肝纤维化发病机制、药物评价等方面的应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性C57BL/6J小鼠20只, 6~8周龄, 体重 22 ± 2 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公

[收稿日期] 2016-09-12

[基金项目] 上海市第八人民医院人才引进科研基金
(BY201406)

[作者简介] 杨 华(1973-), 女, 高级兽医师, 主要从事动物模型研究。E-mail: yanghua@shaphc.org

[通讯作者] 欧 强, 男, 博士, 副主任医师, 主要从事非酒精性脂肪肝基础和临床研究。

E-mail: ouqiang76@163.com

司提供[SCXK(沪)2013-0016]。小鼠饲养于上海市公共卫生临床中心实验动物中心[SYXK(沪)2015-0008]。明 12 h : 暗 12 h, 室温保持 22~25 °C, 相对湿度 40%~60%, 实验期间小鼠自由饮食。

1.2 饲料和试剂

蛋氨酸-胆碱缺乏(MCD)饲料和蛋氨酸-胆碱充足(MCS)饲料, 即在 MCD 饲料配方基础上, 加上胆碱 2 g/kg、蛋氨酸 3 g/kg, 均购自南通特洛菲饲料科技有限公司[苏饲证(2014)06092]; 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)ELISA 试剂盒购自上海科华生物科技股份有限公司。

1.3 实验方法

小鼠适应性饲养 1 周后随机分为 2 组: (1)对照组 10 只, 予 MCS 饲料饲喂; (2)非酒精性脂肪性肝纤维化模型组(简称模型组)10 只, 给予 MCD 饲料饲喂。实验期间观察小鼠一般情况, 包括精神状态、活动情况、皮毛光泽度、食量等。

造模第 8 周末处死模型组和对照组小鼠。小鼠处死前禁食过夜, 称重, 用戊巴比妥钠(35 mg/kg)麻醉后, 眼眶静脉丛采血, 制备血清, 检测天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、TNF- α 、IL-6 指标。肝脏称重后作大体观察, 再取肝右叶, 部分用体积分数 10% 中性甲醛固定, 肝组织石蜡包埋切片, 行 HE 及 Masson 染色, 部分冰冻制片行油红染色, 光学显微镜下行组织形态学观察。采用 Ishaki

评分系统评价肝组织炎症活动度和肝纤维化程度。

1.4 统计学处理

所有数据采用统计软件 SPSS 19.0 进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用两独立样本 t 检验。两组间肝脏炎症活动度得分和纤维化得分比较采用 Mann-Whitney U 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

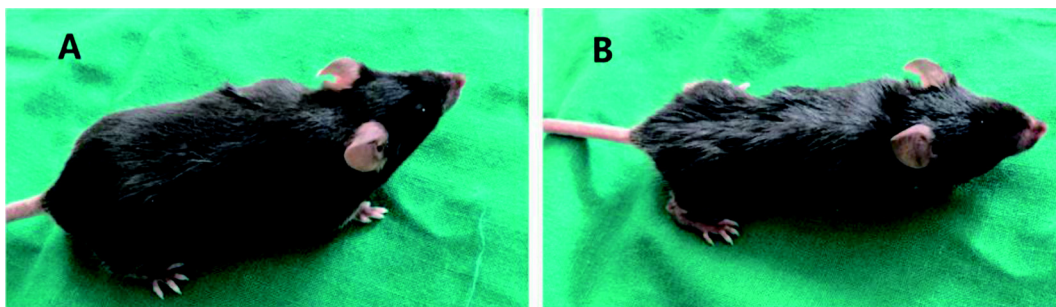
两组小鼠均未见死亡。对照组小鼠灵活度好, 毛发光泽, 饮食、粪便正常, 体质量持续增加(图 1A)。模型组小鼠行动迟缓、精神萎靡、毛发紊乱, 光泽度差, 小鼠摄入 MCD 饲料后, 摄食量大幅度减少(图 1B)。

2.2 体质量和血清生化指标

从造模开始, 模型组小鼠体质量持续下降。第 8 周末模型组小鼠体质量与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。第 8 周末, 模型组小鼠血清 ALT 和 AST 明显高于对照组($P < 0.01$), 而 TG、TC 水平低于对照组($P < 0.01$)(表 1)。

2.3 肝脏外观变化

造模第 8 周, 对照组小鼠肝表面光滑, 外观红褐色, 质地软, 肝缘锐利(图 2A)。模型组小鼠肝脏色泽暗淡, 泛黄, 体积变小, 质地尚软, 边



A: 对照组

B: 模型组

图 1 小鼠第 8 周活体外观

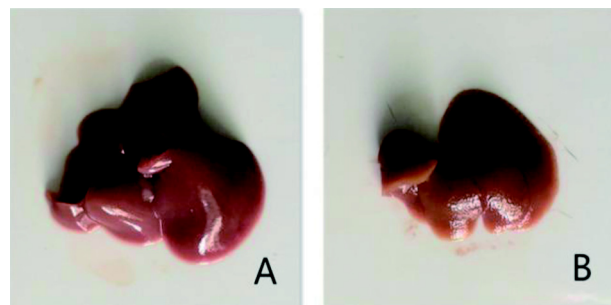
表 1 对照组和模型组小鼠体质量和血清生化指标比较

分 组	体质量/g	ALT/U · L ⁻¹	AST/U · L ⁻¹	TG/mmol · L ⁻¹	TC/mmol · L ⁻¹
对照组	31.2 ± 1.7	28.6 ± 7.5	85.6 ± 10.2	0.98 ± 0.2	3.2 ± 0.2
模型组	13.8 ± 0.6	123.3 ± 13.5	187.3 ± 16.1	0.63 ± 0.1	0.7 ± 0.1
t	29.8	19.7	16.9	4.8	15
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

缘较钝, 触之有明显颗粒感(图 2B)。

2.4 小鼠肝组织病理学变化

第 8 周末, HE 染色光学显微镜下可见对照组



A: 对照组

B: 模型组

图 2 小鼠第 8 周肝脏大体外观

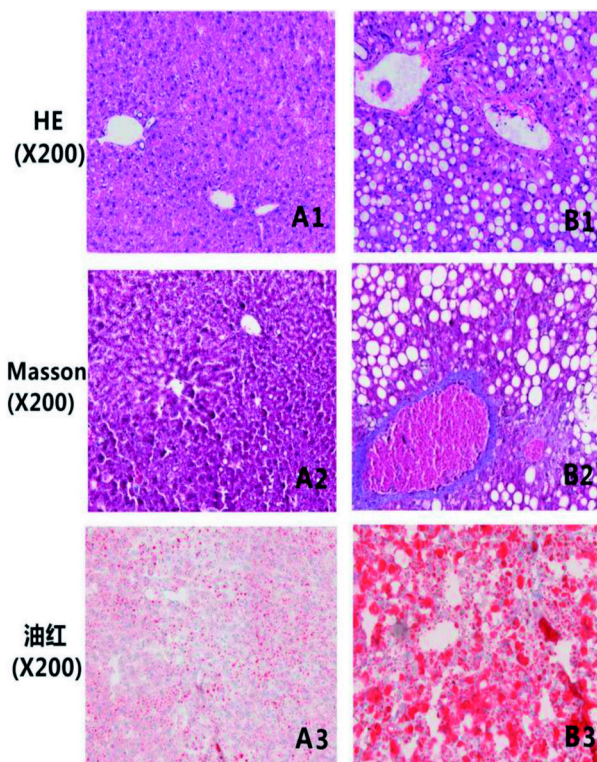
小鼠肝细胞大小形态正常, 肝细胞索排列整齐, 肝窦清晰可见, 肝细胞结构清晰, 肝细胞内局灶见微泡脂滴沉积, 无炎症改变, 无纤维化(图 3A1), 模型组小鼠肝细胞大泡状脂肪变, 肝细胞水肿, 可见点灶状坏死及淋巴细胞浸润, 局灶见界面肝炎, 汇管区扩大, 淋巴细胞及少量中性粒细胞浸润, 纤维组织增生(图 3B1)。Masson 染色光学显微镜下可见对照组小鼠肝脏无明显染色, 没有胶原沉积(图 3A2), 模型组浅蓝染显示肝细胞点灶状坏死, 深蓝染显示大部分汇管区及汇管区周围窦周纤维化(图 3B2)。油红染色可见对照组红色微泡脂滴(图 3A3), 模型组可见肝细胞内大量红色大脂滴, 提示严重肝脂肪变(图 3B3)。

2.5 肝脏炎症活动度和纤维化评分

肝脏炎症活动度得分和纤维化得分组间比较差异显著($P < 0.01$)(图 4)。

2.6 炎症因子的表达

模型组小鼠血清 TNF- α 和 IL-6 水平明显高于



A: 对照组

B: 模型组

图 3 小鼠肝组织病理学变化

对照组($P < 0.01$)(表 2)。

3 讨论

建立一个与人类病变相似的非酒精性脂肪性肝纤维化动物模型, 对于深入研究其发病机制和研发治疗药物意义重大^[7]。目前非酒精性脂肪性肝纤维化动物模型的建立主要有以下三种: ①由基因变异或基因敲除引起的遗传性小鼠模型如瘦素缺乏型(ob/ob)小鼠^[8]; ②高脂高糖饮食诱导模型^[9]; ③MCD 饮食诱导模型^[10,11]。相对于遗传性动物模型, 饮食诱导动

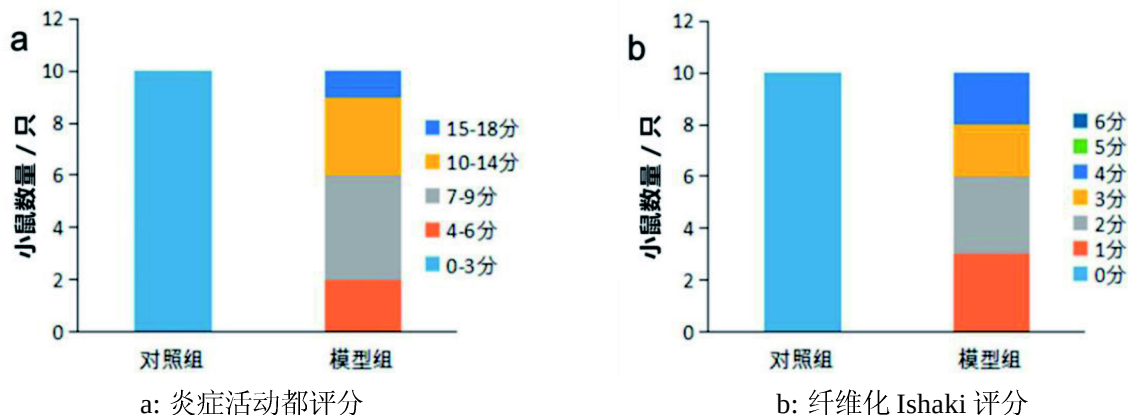


图 4 小鼠肝脏炎症活动度和纤维化 Ishaki 评分

表 2 对照组和模型组小鼠血清炎症因子表达比较

指 标	对照组(n=10)	模型组(n=10)	t	P
TNF- α /ng $\cdot$ L ⁻¹	28.2 $\pm$ 3.7	88.6 $\pm$ 9.5	18.7	<0.01
IL-6/ng $\cdot$ L ⁻¹	10.8 $\pm$ 2.6	28.3 $\pm$ 5.5	9.1	<0.01

物模型取材便利,应用更为广泛。高脂饮食诱导模型可出现肝脂肪含量增加,胰岛素抵抗等,与人类 NAFLD 临床特征相类似^[12]。但该模型主要缺陷在于造模时间过长,炎症和肝纤维化程度较轻^[13,14]。MCD是指在喂养饲料中选择性地不含有蛋氨酸及胆碱。其作用机理在于减少了脂蛋白的合成,尤其是极低密度脂蛋白,造成了甘油三酯在肝脏细胞的沉积,并且损伤了抗氧化屏障机制导致了氧化应激加剧,在非酒精性脂肪性肝纤维化发生和发展的多个环节都产生作用^[15,16]。

研究表明^[17],不同的动物种系及性别对MCD的敏感性不同,与大鼠相比,小鼠具有敏感性高、模型周期短,肝组织病理学特点显著等优点。Marcolind等^[18]采用MCD饮食诱导C57BL/6J小鼠非酒精脂肪性肝炎(NASH)模型,喂养2周即观察到模型小鼠血清ALT和AST水平明显升高,肝组织纤维化评分显著高于对照组。为进一步证实MCD饮食诱导非酒精性脂肪性肝纤维化模型的可靠性和肝脂肪变、纤维化程度,了解该模型炎症因子的表达情况,本文采用MCD饮食喂养C57BL/6J小鼠诱导非酒精性脂肪性肝纤维化,观察其肝组织炎症和肝纤维化程度、肝功能和血清TNF- α 、IL-6水平变化情况。研究表明,第8周末,模型组小鼠血清ALT和AST水平显著高于对照组($P<0.01$)。肝组织形态学观察显示,模型组小鼠肝细胞大泡状脂肪变非常明显,并出现点灶状坏死及淋巴细胞浸润,局灶见界面肝炎,大部分汇管区及汇管区周围窦周纤维化。模型组小鼠肝组织炎症活动度和纤维化得分显著高于对照组($P<0.01$)。肝组织慢性炎症是非酒精性脂肪性肝纤维化发病机制之一,表现为炎症因子高表达^[19]。本文结果表明,模型组小鼠血清TNF- α 、IL-6水平明显升高。研究结果证实,C57BL/6J小鼠对MCD饮食敏感性好,饲养8周可诱导小鼠出现明显肝组织炎症活动和肝纤维化,伴随血清转氨酶和炎症因子升高,诱导时间短,重复性好,是较为理想的非酒精性脂肪性肝纤维化造模方法。整个实验过程中未见小鼠自然死亡,提示该模型存活率高。

本研究还观察到,模型组小鼠拒食现象较常

见,从造模开始体质量持续下降,同时TG和TC下降,与人类NAFLD代谢表型相反^[20]。由于非酒精性脂肪性肝纤维化发病机制非常复杂,目前尚无一种动物模型能全面模拟人类病变过程。因此,在实际研究工作中应根据不同实验目的,选择重复性高、操作方法简便的动物模型。

综上所述,采用MCD饲料喂养8周可成功诱导C57BL/6J小鼠非酒精性脂肪性肝纤维化模型。该方法造模方法简单,成模快,动物存活率高,适合用于非酒精性脂肪性肝纤维化发病机制及药物干预等方面的研究。

参考文献:

- [1] WGO(World Gastroenterology Organiastion). World Gastroenterology Organiastion Global Guidelines Nonalcoholic Fatty Liver Disease and Nonalcoholic Steatohepatitis [J]. J Clin Gastroenterol, 2014, 48(6):467-473.
- [2] Angulo P. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: is liver histology of any prognostic significance [J]. Hepatology, 2010, 51(2):373-375.
- [3] Mishina M, Sakimura K. Conditional gene targeting on the pure C57BL/6 genetic background [J]. Neurosci Res, 2007, 58(2): 105-112.
- [4] Duval C, Teixeira-Clerc F, Leblanc AF, et al. Chronic exposure to low doses of Dioxin promotes liver fibrosis development in the C57BL/6J diet-induced obesity mouse? model [J]. Environ Health Perspect, 2016. [Epub ahead of print]. DOI: 10.1289/EHP316.
- [5] Chen YJ, Myracle AD, Wallig MA, et al. Dietary broccoli protects against fatty liver development but not against progression of liver cancer in mice pretreated with diethylnitrosamine [J]. J Funct Foods, 2016, 24(1):57-62.
- [6] Yun-Hee L, Sou Hyun K, Sang-Nam K, et al. Sex-specific metabolic interactions between liver and adipose tissue in MCD diet-induced non-alcoholic fatty liver disease [J]. Oncotarget, 2016, 7(30):46959-46971.
- [7] 王振, 杨涛, 李世朋, 等. 脂肪肝动物模型研究进展 [J]. 实用器官移植电子杂志, 2016, 4(2):105-108.
- [8] Engstler AJ, Aumiller T, Degen C, et al. Insulin resistance alters hepatic ethanol metabolism: studies in mice and children with non-alcoholic fatty liver disease [J]. Gut, 2016, 65(9):1564-1571.
- [9] Bavia L, Cogliati B, Dettoni JB, et al. The complement component C5 promotes liver steatosis and inflammation in murine non-alcoholic liver disease model [J]. Immunol Lett, 2016, 177(1):53-61.
- [10] Di Pasqua L, Berardo C, Rizzo V, et al. MCD diet-induced

- steatohepatitis is associated with alterations in asymmetric dimethylarginine (ADMA) and its transporters[J]. *Mol Cell Biochem*, 2016, 419(2):147-155.
- [11] Yamada T, Obata A, Kashiwagi Y, et al. Gd-EOB-DTPA-enhanced-MR imaging in the inflammation stage of nonalcoholic steatohepatitis (NASH) in mice[J]. *Magnetic Resonance Imaging*, 2016, 34(6):724-729.
- [12] 吴睿, 陈征, 徐亚运, 等. 高脂饲料诱导的非酒精性脂肪肝大鼠模型建立及其血浆 nesfatin-1 的变化[J]. *卫生研究*, 2016, 5(3):452-457.
- [13] Anstee QM, Goldin RD. Mouse models in non-alcoholic fatty liver disease and steatohepatitis research[J]. *Int J Exp Pathol*, 2006, 87(1):1-16.
- [14] Boga S, Koksar AR, Alkim H, et al. Plasma pentraxin 3 differentiates nonalcoholic steatohepatitis (NASH) from Non-NASH[J]. *Metab Syndr Relat Disord*, 2015, 13(9):393-399.
- [15] 齐慧慧, 陈岳祥. 非酒精性脂肪性肝病常用动物模型的研究进展[J]. *国际消化病杂志*, 2012, 23(3):145-147.
- [16] Caballero F, Fernandez A, Matias N, et al. Specific contribution of methionine and choline in nutritional nonalcoholic steatohepatitis: impact on mitochondrial S-adenosyl-L-methionine and glutathione[J]. *J Biol Chem*, 2010, 285(24):18528-18536.
- [17] Kirsch R, Clarkson V, Shephard EG, et al. Rodent nutritional model of non-alcoholic steatohepatitis: species, strain and sex difference studies[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2003, 18(11):272-282.
- [18] Yasuka M, Yusuke N, Toshiaki F, et al. LUBAC formation is impaired in the livers of mice with MCD-dependent nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Mediators Inflamm*, 2015, 2015:125380.
- [19] 刘晓琳, 明雅南, 茅益民. 非酒精性脂肪性肝病及其伴随疾病动物模型的建立[J]. *肝脏*, 2014, 15(9):374-376.
- [20] Marcolin E, Forgiarini L, Tieppo J, et al. Methionine and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis[J]. *Arquivos De Gastroenterologia*, 2011, 48(1):72-79.

Establishment of Nonalcoholic Fatty Liver Fibrosis Model and Expression of Inflammatory Factors in Mice

YANG Hua¹, ZHAO Ya-Juan², OU Qiang²

(1. Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201508, China;

2. Eighth People's Hospital of Shanghai, Shanghai 200235, China)

[Abstract] Objective To establish the non-alcoholic fatty liver fibrosis model in mice and observe the pathological changes and the expression of inflammatory factors. **Methods** Twenty male C57BL/6J mice were randomly divided into control group and model group. The mice in control group were fed with methionine and choline-supplement(MCS) diet, and the model group were fed with methionine choline deficiency (MCD) diet. The mice were weighed and sacrificed at after 8 weeks feeding. The histopathological changes in liver were observed. The level of serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), cholesterol (TC), triglyceride (TG), tumor necrosis factor - α (TNF- α) and interleukin (IL-6) were detected. **Results** The body weight of mice in the model group decreased significantly at the end of the study. Severe hepatic steatosis, liver cell edema, visible focal necrosis and focal lymphocytic infiltration, interface hepatitis, periportal enlargement, hyperplasia of fibrous tissue were observed. The scores of liver inflammation activity and fibrosis score in model group were significantly higher than those in control group ($P < 0.01$). The level of serum ALT、AST、TNF- α 、IL-6 were significantly higher in the model group than that of control group ($P < 0.01$). **Conclusion** After feeding mice with MCD diet feeding for 8 weeks, non-alcoholic fatty liver fibrosis model of mice was successfully induced. The modeling method was simple, rapid, and with has high survival rate. It is suitable for the pathogenesis and drug intervention study of nonalcoholic fatty liver fibrosis.

[Key words] Non-alcoholic fatty liver Fibrosis; Methionine choline deficiency(MCD); C57BL/6J mice; Inflammatory factors

上海地区常用近交系小鼠品系的 单核苷酸多态性分型研究

韩琳¹, 谢建云², 杨斐³, 胡樱³, 田立立², 鲍世民¹

(1. 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 上海 201615;

2. 上海实验动物研究中心, 上海 201203

3. 复旦大学实验动物科学部, 上海 200032)

[摘要] 目的 比较上海地区常用近交系小鼠单核苷酸多态性(SNP)位点分型情况。方法 采用多重PCR-LDR检测技术, 选取上海地区2家单位的10个近交系小鼠, 对21条染色体上的44个SNP位点进行分型检测, 同时, 随机选取上海地区2个近交系品系作为双盲样本, 对分型方案进行验证, 差异位点利用测序法进行验证。结果 同一来源的10个近交系小鼠, 同品系间SNP分型结果完全一致; 不同种群来源6个品系SNP分型结果提示, BALB/c, FVB, DBA/2和C3H/He在44个位点上分型结果均相同, CBA和C57BL/6分别在7个和2个位点存在差异; 差异位点经测序验证结果与SNP分型方案一致。结论 上海地区常用近交系小鼠中, 同一来源的品系中SNP遗传质量具有良好稳定性和一致性, 不同种群来源的相同品系间SNP分型存在差异。

[关键字] 近交系小鼠; 遗传监测; 单核苷酸多态性(SNP)分型

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)01-0025-07

实验动物的遗传背景和反应特性是影响实验结果的重要因素, 遗传的变异, 或者不同亚系之间的差异, 都会造成实验结果的差异, 甚至出现错误结果。随着生物医学的发展, 对实验动物质量的要求越来越高, 因而对实验动物质量的遗传监测方法也提出了更高的要求。单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)作为新一代的分子标记, 具有分布广泛, 遗传稳定, 易于自动化技术筛选等特性^[1], 多应用于人类基因鉴定, 细菌病毒鉴定等, 许多国外实验动物科研机构和实验室亦

将SNP检测技术运用于近交系小鼠遗传质量检测和易混淆品系或不同亚系间的鉴定^[2-4], 并在相应网站(如Pubmed等)提供了大量的位点信息数据库^[5]。然而国内实验动物生产或使用单位在采用分子生物学标记检测时, 检测位点信息较少, 检测技术操作繁琐, 工作量较大^[6,7], 常常不能进行全面和大规模的实验动物遗传特性分析监测。本文采用灵敏度和检测效率较高的PCR-LDR技术^[8-12], 检测上海地区常用近交系小鼠44个SNP位点, 以提供全面准确的近交系小鼠遗传特性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6周龄雄性C57BL/6, BALB/c, FVB, DBA/1, DBA/2, C3H/He, CBA, NOD, SJL/J小鼠, 各品系3只, 来自上海斯莱克实验动物有限责任公司(以下简称SLAC)[SCXK(沪)2012-0002]; 6周龄雄性C57BL/6, BALB/c, FVB, DBA/2,

[收稿日期] 2016-09-30

[基金项目] 上海市科学技术委员会科研计划项目
(14140900800)

[作者简介] 韩琳(1982-), 女, 硕士, 实验师, 研究方向: 实验动物遗传质量控制, PDX肿瘤模型。
E-mail: hanlin594@126.com

[通讯作者] 鲍世民, 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物遗传育种和质量控制。E-mail: baoshimin@sibs.ac.cn

C3H/He, CBA, 129S1 小鼠, 各品系 3 只, 来自上海西普尔-必凯实验动物有限责任公司(以下简称 BK)[SCXK(沪)2013-0016]6 周龄雄性 C57BL/6, BALB/c, 各 4 只, 来自上海灵畅生物科技有限公司[SCXK(沪)2013-0018], 作为双盲样本。所有动物均为 SPF 级。鼠尾取材在上海斯莱克实验动物有限责任公司综合实验室进行[SYXK(沪)2012-0002], 对所使用的实验动物按 3R 原则给予人道关怀。

1.1.2 试剂 基因组 DNA 抽提试剂盒(Cat.No:69504), HotStar Taq Plus DNA 聚合酶(Cat.No: 203603), dNTP Mix (Cat.No:201900), 均购自德国 Qiagen 公司, Taq DNA 连接酶(M0208)购自英国 New England Biolab 公司; 所有引物, 序列见附表 1, 由上海生工生物工程有限公司合成; 所有探针, 序列见附表 2, 由英潍捷基(Invitrogen, 上海)贸易有限公司合成; 所有测序仪检测均由上海捷瑞生物科技有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 鼠尾基因组 DNA 提取 小心剪取小鼠尾尖约 0.5 cm, 按照 Qiagen 基因组 DNA 提取试剂盒说明操作, 所抽提小鼠基因组 DNA, -20°C 保存。微量紫外分光光度计测定 DNA 浓度, 将浓度调整至 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$ 待用; 测定吸光度值 $A_{260/280}$ 。

1.2.2 多重 PCR 反应 PCR 反应体系 $10\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ PCR 缓冲液 $1\text{ }\mu\text{L}$, 25 mmol/L Mg^{2+} $1.2\text{ }\mu\text{L}$, DNTPs (各 10 mmol), 多重引物终浓度各 $0.025\text{ }\mu\text{mol/L}$, HotStar Taq DNA 聚合酶($5\text{U}/\mu\text{L}$) $0.05\text{ }\mu\text{L}$, 模板 DNA ($50\text{ ng}/\mu\text{L}$) $2\text{ }\mu\text{L}$ 。按顺序加入上述成份, 轻微振荡, 瞬时离心。反应程序为: 95°C 预变性 15 min ; 94°C 变性 30 s , 56°C 退火 $1\text{ min }30\text{ s}$, 72°C 延伸 1 min , 35 个循环; 72°C 10 min 。

1.2.3 多重 LDR 反应 LDR 反应体系 $7\text{ }\mu\text{L}$, $10\times$ LDR 缓冲液 $0.7\text{ }\mu\text{L}$, 多重探针(各 $0.05\text{ }\mu\text{mol}$) $0.7\text{ }\mu\text{L}$, Taq DNA 连接酶($1\text{U}/\text{反应}$) $0.0375\text{ }\mu\text{L}$, PCR 产物 ($10\text{ ng}/\mu\text{L}$) $4.6\text{ }\mu\text{L}$, ddH₂O $1\text{ }\mu\text{L}$; 96 孔板反应, 程序如下: 94°C 2 min ; 94°C 30 s , 50°C , 30 个循环; 20°C 保温。

1.2.4 PCR-LDR 产物的检测 将 PCR-LDR 产物短暂离心, $1\text{ }000\text{ r/min}$, 10 s ; 取 $1\text{ }\mu\text{L}$ LDR 产物, 加入 $1\text{ }\mu\text{L}$ ROX500 分子量标准和 $8\text{ }\mu\text{L}$ 甲酰胺, 混匀, 95°C 变性 3 min , 冰浴 10 min ; 使用 ABI 3730 自动测序仪进行检测, 收集数据。

1.2.5 部分 SNP 位点测序验证 对需测序验证的位点进行 PCR 扩增反应, 反应体系, 反应程序同 1.2.2。将 PCR 产物送上海捷瑞生物工程有限公司进行纯化和测序反应。测序采用双脱氧末端终止法, 单向测序引物选取 PCR 扩增引物中的一条。

1.2.6 结果分析 每组测序仪电泳结果中, 每个峰对应一个 SNP 位点。通过对照已知的分子量标准, 确定每个峰对应的分子量大小, 对比附表 3 中各位点 LDR 连接产物片段大小, 以此判断 SNP 位点的基因分型。

2 结果

2.1 SNP 位点分型情况

SNP 分型结果(表 1, 表 2)显示, 同一单位来源的同品系 3 只小鼠, 分型结果完全一致, 而同一品系在不同单位间分型结果存在差异, 差异较明显的主要是 CBA 和 C57BL/6 两品系。SLAC 来源的 CBA 小鼠在 a10, a11, b5, b9, b10, c1, c11 位点的分型依次为 G, T, A, C, A, G, A, 而 BK 来源的依次为 C, G, G, A, G, A, G; SLAC 来源的 C57BL/6 在 c6, c9 位点分型为 G, G, BK 来源的则为 C, A; 两单位来源其他品系的各位点 SNP 分型结果均相同。

2.2 对同一品系小鼠分型差异位点的验证

差异位点测序结果提示, 不同来源的 CBA 小鼠在 a10, a11, b5, b9, b10, c1, c11 位点与本实验中 PCR-LDR 法分型结果(表 1, 表 2)一致。图 1 为 CBA 在 a10, a11 位点的测序图, 其结果显示, SLAC 来源 CBA 小鼠 a10 位点为 G, 而 BK 来源的则为 C, 与实验分型结果一致, 进一步验证 PCR-LDR 分型方法的准确性。

2.3 双盲样本验证

随机选取上海灵畅生物科技有限公司 2 个近交系品系小鼠, 每品系 4 只, 采用本文中的分型方案进行双盲实验, 44 个 SNP 位点分型结果见表 3。该 2 个品系分型结果与 SLAC 公司 C57BL/6 和 BALB/c 各位点分型结果完全一致, 且灵畅公司近交系品系种群来自 SLAC 公司, 据此, 可推断出品系 1 为 C57BL/6, 品系 2 为 BALB/c。同时, 品系 1 在 c6, c9 位点分型为 G, G, 与 BK 公司 C57BL/6 品系分型不同, 其余位点均相同。

表1 SLAC 来源9 品系小鼠 SNP 基因分型

Table 1 The SNP genotyping of 9 inbred strains from SLAC

SNP 位点编号	C57BL/6	FVB	C3H/He	BALB/c	DBA/2	DBA/1	CBA	SJL/J	NOD
a1	C	T	C	T	C	C	C	T	T
a2	G	A	G	G	A	A	G	A	G
a3	A	A	C	C	C	C	C	A	C
a4	A	A	A	A	A	A	A	A	T
a5	C	C	C	C	T	T	C	C	T
a6	G	G	G	T	T	G	G	G	G
a7	A	G	G	G	G	G	G	G	G
a8	G	G	G	G	A	G	G	G	G
a9	C	A	A	A	A	A	A	A	C
a10	G	C	G	G	C	C	G*	C	G
a11	G	T	G	G	G	G	T*	T	T
b1	A	A	C	C	A	C	C	A	A
b2	A	G	G	G	G	G	G	A	G
b3	C	G	G	G	G	G	G	G	C
b4	A	A	G	G	A	A	G	A	G
b5	G	G	A	A	A	A	A*	G	G
b6	G	G	G	G	A	A	A	G	G
b7	A	G	G	G	A	A	G	G	A
b8	A	A	G	A	G	G	G	G	A
b9	A	A	C	A	C	A	C*	A	A
b10	A	A	G	A	G	G	A*	A	A
b11	A	A	A	A	A	A	A	A	T
b12	T	T	G	G	G	G	G	T	T
c1	G	G	G	G	A	A	G*	G	G
c2	T	C	T	T	C	C	T	C	C
c3	G	C	C	C	C	C	C	C	C
c4	G	T	T	T	G	T	T	T	G
c5	G	G	G	C	C	C	G	G	G
c6	G**	C	C	C	C	C	C	C	G
c7	G	—	G	G	G	G	G	—	—
c8	G	G	A	A	G	G	A	A	G
c9	G**	G	G	G	A	G	G	G	G
c10	T	T	C	C	C	C	C	T	C
c11	G	A	A	G	G	G	A*	A	A
d1	A	G	A	A	G	A	A	A	A
d2	G	A	G	A	G	G	G	A	G
d3	A	A	G	A	G	G	G	A	A
d4	C	C	T	T	C	C	T	C	C
d5	G	G	C	C	C	C	C	G	C
d6	C	C	C	A	A	A	C	C	C
d7	G	C	C	C	G	G	C	C	G
d8	G	C	G	C	G	G	G	C	G
d9	A	A	G	G	A	A	G	A	A
d10	C	C	C	T	T	T	C	C	C

注: * 表示该位点分型结果与 BK 来源 CBA 的结果不一致; ** 表示该位点分型结果与 BK 来源 C57BL/6 的结果不一致

表 2 BK 来源 7 品系小鼠 SNP 基因分型

Table 2 The SNP genotyping of 7 inbred strains from BK

SNP 位点编号	C57BL/6	FVB	C3H/He	BALB/c	DBA/2	CBA	129S1
a1	C	T	C	T	C	C	T
a2	G	A	G	G	A	G	A
a3	A	C	C	C	C	C	C
a4	A	A	A	A	A	A	A
a5	C	C	C	C	T	C	T
a6	G	G	G	T	T	G	T
a7	A	G	G	G	G	G	G
a8	G	G	G	G	A	G	G
a9	C	A	A	A	A	A	A
a10	G	C	G	G	C	C*	C
a11	G	T	G	G	G	G*	T
b1	A	A	C	C	A	C	C
b2	A	G	G	G	G	G	G
b3	C	G	G	G	G	G	G
b4	A	A	G	G	A	G	G
b5	G	G	A	A	A	G*	G
b6	G	G	A	G	A	A	G
b7	A	G	G	G	A	G	G
b8	A	A	G	A	G	G	G
b9	A	A	C	A	C	A*	A
b10	A	A	G	A	G	G*	A
b11	A	A	A	A	A	A	A
b12	T	T	G	G	G	G	T
c1	G	G	G	G	A	A*	A
c2	T	C	T	T	C	T	C
c3	G	C	C	C	C	C	G
c4	G	T	T	T	G	T	G
c5	G	G	G	C	C	G	G
c6	C**	C	C	C	C	C	C
c7	G	—	G	G	G	G	G
c8	G	G	A	A	G	A	G
c9	A**	G	G	G	A	G	G
c10	T	T	C	C	C	C	C
c11	G	A	A	G	G	G*	A
d1	A	G	A	A	G	A	G
d2	G	A	G	A	G	G	G
d3	A	A	G	A	G	G	G
d4	C	C	T	T	C	T	T
d5	G	G	C	C	C	C	G
d6	C	C	C	A	A	C	A
d7	G	C	C	C	G	C	C
d8	G	C	G	C	G	G	G
d9	A	A	G	G	A	G	A
d10	C	C	C	T	T	C	T

注: *表示该位点分型结果与SLAC来源CBA的结果不一致; **表示该位点分型结果与SLAC来源C57BL/6的结果不一致

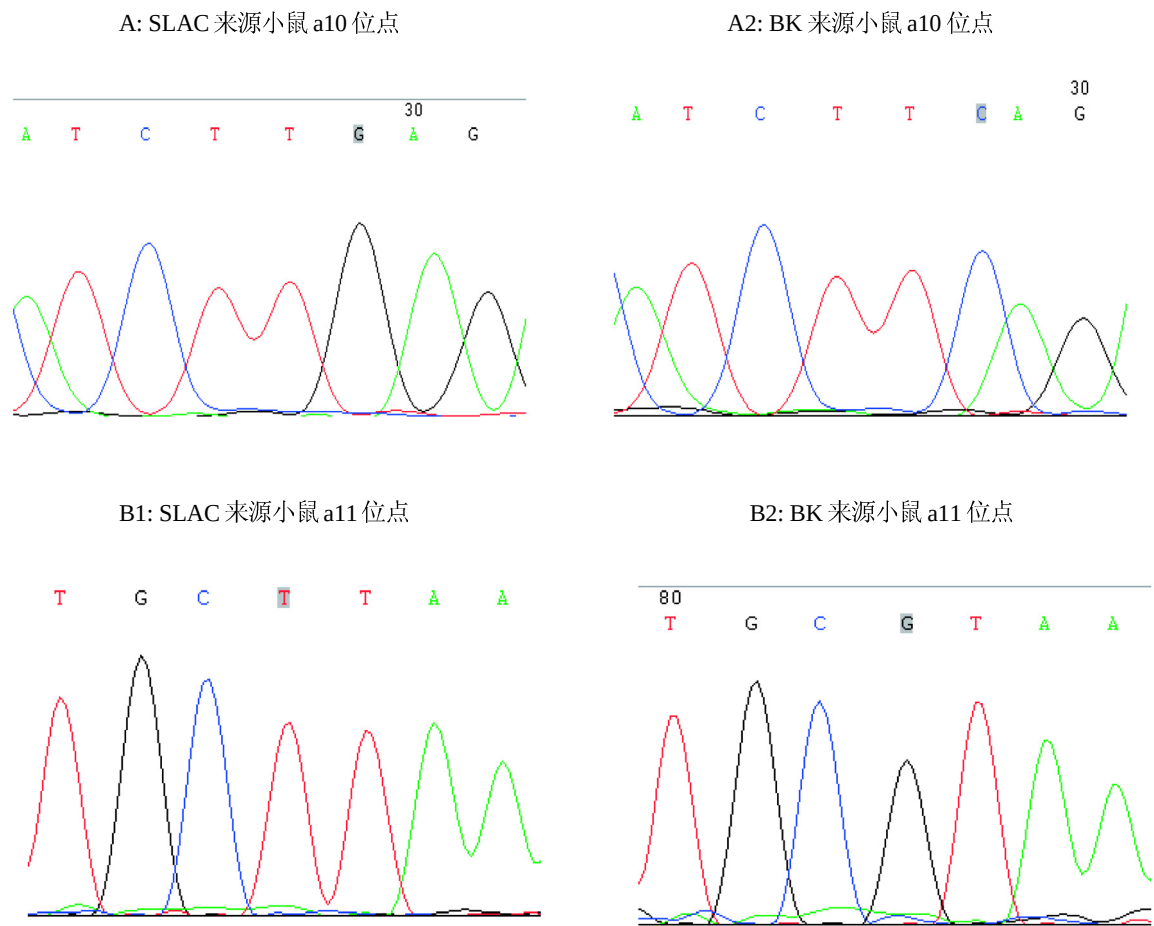


图 1 SLAC 及 BK 来源 CBA 小鼠在 a10 和 a11 位点测序图
Figure 1 The sequencing of the a10 and a11 in CBA from SLAC and BK

表 3 随机选取 2 品系近交系 SNP 分型结果
Table 3 The SNP genotyping of 2 inbred strains as double blind

A 组 SNP	a1	a2	a3	a4	a5	a6	a7	a8	a9	a10	a11	
品系 1	C	G	A	A	C	G	A	G	C	G	G	
品系 2	T	G	C	A	C	T	G	G	A	G	G	
B 组 SNP	b1	b2	b3	b4	b5	b6	b7	b8	b9	b10	b11	b12
品系 1	A	A	C	A	G	G	A	A	A	A	A	T
品系 2	C	G	G	G	A	G	G	A	A	A	A	G
C 组 SNP	c1	c2	c3	c4	c5	c6	c7	c8	c9	c10	c11	
品系 1	G	T	G	G	G	G**	G	G	G**	T	G	
品系 2	G	T	C	T	C	C	G	A	G	C	G	
D 组 SNP	d1	d2	d3	d4	d5	d6	d7	d8	d9	d10		
品系 1	A	G	A	C	G	C	G	G	A	C		
品系 2	A	A	A	T	C	A	C	C	G	T		

注: ** 表示该位点与 BK 来源 C57BL/6 分型不一致

3 讨论

实验动物的遗传质量对实验结果的可比性、可重复性和准确性起着决定性作用。由于实验动物饲养过程中的遗传变异,不同亚系之间的差异,或者管理操作失误,均会对实验结果造成影响。本研究选取的44个SNP位点分布于21条染色体上,能较全面地在基因水平概括近交系小鼠遗传特性。每个位点的PCR产物经检验具有良好特异性,且各位点均100%纯合,适宜于作为一套SNP分型方案对常用近交系小鼠进行遗传质量的监测。研究所采用的多重PCR-LDR分型方案,常应用于微生物、寄生虫的检测^[8,9],肿瘤基因诊断^[10],人类疾病诊断分型^[11],小鼠染色体的替换系等^[12]领域,因其特异性强,检测效率和灵敏性高,操作简单,成本容易控制,非常适宜于作为实验动物日常遗传质量监测的标准化分型方案。

实验选取上海地区规模较大的2家实验动物生产单位的常用近交系小鼠,其检测结果提示,同一单位来源同品系小鼠在44个SNP位点分型结果均一致,表明上海地区常用近交系小鼠的遗传质量稳定性较高;不同单位来源的同一品系分型结果存在差异,主要是CBA和C57BL/6。对于同品系中出现差异的位点,采用双脱氧末端终止法进行测序验证,测序结果与本实验中结果一致,进一步证实了本分型方案的准确性。倪丽菊等^[13]采用多重荧光STR技术,对上海地区的常用近交系小鼠微卫星位点进行检测,结果表明,同品系小鼠在不同种群之间部分微卫星位点存在差异,主要集中在CBA/CaBkl和CBA/JSlac, C57BL/6Bkl和C57BL/6 JSlac之间,这与本研究的SNP分型结果较为一致,该文作者认为,出现这一差异的原因,一是由不同亚系导致,二是由于不同种群来源,在长期培育过程中出现遗传分化导致。Mekada等^[4]检测不同种群来源C57BL/6N和C57BL/6J小鼠1-X染色体上的100个SNP位点,分型结果显示有较大差异, C57BL/6N的不同亚系亦显示出明显SNP分型差异。本实验同时选取的2品系近交系小鼠作为双盲实验样本,实验结果提示,利用SNP分型技术,能够用于区分和确定近交系小鼠品系,且所测样品的SNP分型结果与其引种单位的完全一致,进一步表明本研究中所选取SNP位点在近交系小鼠品系中具有良好

的遗传稳定性。

目前国内实验动物生产或使用单位,仍多采用国家标准中推荐的生化标记检测,或虽采用分子生物学标记检测,但检测位点信息较少,检测技术复杂多样,且工作量较大,常常不能全面准确地反映实验动物的遗传特性。胡培丽等^[6]选用16个SNP位点,对4个近交系品系进行分型检测,作者希望进一步检测更多的SNP位点,同时增加更多近交系小鼠品系,以备建立比较完善的SNP数据库。SNP位点具有遗传稳定,检测通量高,可自动化操作,适用于实验动物饲养过程中的日常遗传质量控制,品系鉴定,遗传特性检测等^[14,15]。崔淑芳等^[7]应用双色荧光杂交芯片技术对4个近交系小鼠的6个SNP位点进行检测,结果表明该技术的分型准确率较高,且能高通量操作,适合进行少量品系大样本量的遗传检测和品系鉴定。本研究采用多重PCR-LDR检测手段,对上海地区常用10个近交系小鼠,44个SNP位点进行分型检测,操作简便,结果准确率高。今后还需在国内多家单位采集双盲样本,对SNP分型方案进行进一步验证,同时希望能够收集国外著名实验动物公司的近交系小鼠SNP位点信息,建立完善而准确的SNP数据库,以期为实验动物遗传质量控制提供更为全面可靠的信息。

参考文献:

- [1] Gorham JD, Ranson MS, Smith JC, et al. 1 + 1 = 3: Development and validation of a SNP-based algorithm to identify genetic contributions from three distinct inbred mouse strains.[J]. J Biomol Techniques, 2012, 23(4):136-146.
- [2] Petkov PM, Ding Y, Cassell MA, et al. An efficient SNP system for mouse genome scanning and elucidating strain relationships.[J]. Genome Res, 2004, 14(9):1806-1811.
- [3] Petkov PM, Cassell MA, Sargent EE, et al. Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse [J]. Genomics, 2004, 83(5):902-911.
- [4] Mekada K, Hirose M, Murakami A, et al. Development of SNP markers for C57BL/6N-derived mouse inbred strains [J]. Exp Anim (Tokyo), 2015, 64(1):91-100.
- [5] Sherry ST, Ward MH, Kholodov M, et al. dbSNP: the NCBI database of genetic variation[J]. Nucleic Acids Res, 2001, 29(1):308-311.
- [6] 胡培丽, 范昌发, 岳秉飞, 等. 4个近交系小鼠SNP位点的测定[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(5):278-280.
- [7] 崔淑芳, 瞿秀华, 韩士忠, 等. 双色荧光杂交芯片在近交系

- 小鼠遗传监测中的应用[J]. 动物学研究, 2008, 29(1):10-16.
- [8] Mcnamara DT, Thomson JM, Kasehagen LJ, et al. Development of a multiplex PCR-ligase detection reaction assay for diagnosis of infection by the four parasite species causing malaria in humans[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(6):2403-2410.
- [9] Granger K, Rundell MS, Pingle MR, et al. Multiplex PCR-ligation detection reaction assay for simultaneous detection of drug resistance and toxin genes from *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, and *Enterococcus faecium*[J]. J Clin Microbiol, 2010, 48(1):277-280.
- [10] Khanna M, Park PM, Cao W, et al. Multiplex PCR/LDR for detection of K-ras mutations in primary colon tumors[J]. Oncogene, 1999, 18(1):27-38.
- [11] Liu JL, Wang TS, Zhao M. Genome-wide association mapping for female infertility in inbred mice[J]. G3 (Bethesda), 2016, 6(9):2929-2935.
- [12] Kai L, Bei C, Zhou Y, et al. Multiplex quantification of 16S rDNA of predominant bacteria group within human fecal samples by polymerase chain reaction-ligase detection reaction (PCR-LDR) [J]. J Microbiol Methods, 2009, 76(3): 289-294.
- [13] 倪丽菊, 赵丽亚, 赵立虎, 等. 利用多重荧光STR技术分析上海地区7品系常用近交系小鼠核心群的遗传特性[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(1):72-79.
- [14] Lindblad-Toh K, Winchester E, Daly MJ, et al. Large-scale discovery and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the mouse [J]. Nat Genet, 2000,24(4):381-386
- [15] 谢雯, 鲍世民, 谢建云, 等. 基于 PCR-LDR 平台的近交系小鼠遗传质量快速检测方法[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(4):1-8.

The Single Nucleotide Polymorphism Genotyping of Inbred Mice from Shanghai

HAN Lin¹, XIE Jian-yun², YANG Fei³, HU Ying³, TIAN Li-li², BAO Shi-min¹

(1. Shanghai SLAC Laboratory Animal Ltd.Co., Shanghai, 201615;

2. Shanghai Laboratory Animal Center, Shanghai, 201203;

3. Fu Dan University, Shanghai, 200433)

[Abstract] Objective To analyze the single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping of inbred mice from Shanghai. **Methods** 44 SNP loci on 21 chromosomes of 10 inbred mice strains from 2 laboratory animal companies of Shanghai were detected by the PCR-LDR genotyping panels, and the other 2 inbred mice strains were selected as the double blind samples for verification. And discrepancy locus were verified by sequencing. **Results** The SNP genotyping results of all the samples from the same inbred mice strains were homomorphism, but 6 inbred mice strains from different populations (BALB/c, FVB, DBA/2 and C3H/He) were polymorphism with 7 and 2 discrepancy locus respectively. The sequencing results to verify the discrepancy locus were the same as the SNP genotyping results. **Conclusions** The SNP genotyping was very stable and consistent in inbred mice strains from the same population in Shanghai, and the SNP genotyping of the same inbred mice strains from different populations was polymorphism.

[Key words] Inbred mice; Genetic monitoring; Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping

大鼠细小病毒双重 PCR 检测方法的建立

饶 丹, 朱余军, 伍妙梨, 袁文, 王 静, 尹雪琴, 丛 锋, 练月晓,
黄碧洪, 徐凤娇, 刘向楠, 刘助红, 黄 韧, 张 钰, 郭鹏举
(广东省实验动物监测所, 广州 510663)

[摘要] 目的 建立快速检测大鼠细小病毒的 PCR 方法。方法 根据大鼠细小病毒基因序列的特点, 建立鉴别检测大鼠细小病毒(RPV)与其他三种大鼠细小病毒(H-1、KRV、RMV)的双重 PCR 方法。根据 RPV 核酸序列的性质, 在 VP2 基因筛选了一对用于特异扩增 RPV 株的引物, 在 NS1 基因设计了一对用于特异性扩增 H-1、KRV 和 RMV 的引物。结果 两对引物组成的二重 PCR 方法可以特异性的扩增 RPV 而不扩增核酸同源性高的小鼠细小病毒和多种其他病原微生物; 敏感性实验表明, 二重 PCR 的最低检测限可达 1 000 拷贝/μL。双重 PCR 结合测序在检测 23 份临床样本中, 检测出 7 份 RMV 阳性, 包括 1 份与 RPV 共感染阳性样本。结论 本研究建立的检测 RPV 的双重 PCR 方法具有特异性好、灵敏度高及操作简单等优点, 是一种简便、可靠的检测方法。

[关键词] 大鼠细小病毒(RPV); H-1; KRV; RMV; 双重 PCR

[中图分类号] S855.3 Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)01-0032-04

大鼠细小病毒是一类广泛存在于大鼠群中的病毒, 属于细小病毒科, 细小病毒属, 为一类无包膜的小 DNA 病毒。H-1(Toolan virus-1)株和 KRV (Kilham Rat Virus)株是 1950 年代末期因感染大鼠中传代的肿瘤细胞系而被发现, 后续又在自然感染大鼠中发现了 RPV(rat parvovirus)株和 RMV(rat minute virus)株^[1,2]。通常情况下, 自然感染细小病毒的成年大鼠无临床体征表现; 临床观察到只有少数几例 KRV 自然感染的情况但还未发现 H-1 株自然感染的病例^[3]。自然感染 KRV 株的大鼠可出现胎儿被母体吸收和胎儿小脑发育不全、乳鼠黄疸及幼鼠脱水等症状。H-1、RMV 和 RPV 株感染大鼠后临床症状不明显, 但也可在鼠群中造成持续性感染。在野生大鼠中大鼠细小病毒有较高的感染率较高, 被感

染鼠可通过粪便长期向外排毒, 污染饲料、饮水和周围环境, 细小病毒在鼠群中持续存在对动物实验研究结果造成干扰甚至严重影响^[4]。

由于 RPV 株与其他 3 种大鼠细小病毒株及其他啮齿动物细小病毒核酸同源性差异大^[1], 建立一种检测四种大鼠细小病毒株而不检测其他啮齿动物细小病毒株的单重 PCR 方法比较困难, 这也给一次性筛查大鼠细小病毒株带来不便。

本文建立了检测 4 种大鼠细小病毒株的双重 PCR 方法, 并经特异性、敏感性及临床样品检测。

1 材料与方法

1.1 试剂

核酸提取试剂盒为 DNA/RNA 共抽提试剂盒(天根), PCR 反应酶试剂、pMD-19T 载体等试剂为 TAKARA 相关产品(大连宝生物)。

1.2 样本的收集

大鼠细小病毒株 H-1, KRV 来自于 ATCC, RMV、RPV 及其他病原株为本实验室保存株。

病毒细胞培养物及临床野生鼠样本, 用于试验方法的验证。

[收稿日期] 2016-09-05

[基金项目] 广东省科技计划项目(2014B070706006); 国家科技支撑计划(2015BAI07B00)广东省科技计划项目(2013B060400028)

[作者简介] 饶 丹(1988-), 研究实习员, 研究方向: 临床应用分子生物学。E-mail: raodan2007@126.com

[通讯作者] 郭鹏举(1970-), 研究员, 研究方向: 兽医免疫学。E-mail: PIGuo2016@163.com

1.3 引物的设计

NCBI 下载大鼠细小的所有全基因序列及小鼠、猪等细小病毒序列, 比对全基因序列筛选扩增 RPV 株的特异引物及同时扩增 H-1, KRV 和 RMV 的引物。其中 P1/P2 引物用于扩增大鼠细小病毒 RPV 株, P3/P4 引物用于扩增 H-1, KRV 和 RMV

株(表 1)。

1.4 病毒 DNA 的提取

采用天根 DNA/RNA 提取试剂盒提取样品中的大鼠细小病毒 DNA, 样品包括组织脏器、粪便或细胞培养物。以从 ATCC 获取的 H-1、KRV 株, 本实验室分离保存的 RMV、RPV 为阳性对照, 以

表 1 双重 PCR 引物
Table 1 Primers of double PCR

引物名称	引物序列 5'-3'	位置基因	扩增片段
P1	TCCAACCTCTCACTGACTCTGCT	VP2	317 bp
P2	GGAAGTCATAGTGCCTTTGG	VP2	
P3	CTGCTTTCATTTCTGAGTCTGT	NS1	226 bp
P4	GACTTCAGCTCGTCATCTTGT	NS1	

小鼠细小病毒 MVM 株、多瘤病毒(Poly)、肝螺旋菌、鼠伤寒沙门氏菌为样本阴性对照, 及水为空白对照。

1.5 PCR 反应

采用 Takara Premix Ex-Taq 预混酶为 PCR 反应酶试剂, 反应总体积为 20 μ L, 内含 Premix Ex-Taq 10 μ L、引物 P1/P2(各 0.5 μ L, 终浓度均为 0.25 μ mol/L)、引物 P3/P4(各 0.5 μ L, 终浓度为 0.25 μ mol/L), DNA 模板 2 μ L, 双重蒸馏水 6 μ L。

PCR 扩增反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s; 循环 35 次; 72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。

1.6 敏感性分析

分别将各毒株扩增的基因片段插入 PMD-19T 载体中, 将质粒从 1×10^7 拷贝/ μ L 稀释至 1×10^1 拷贝/ μ L, 以各稀释质粒为模板进行 PCR 扩增。

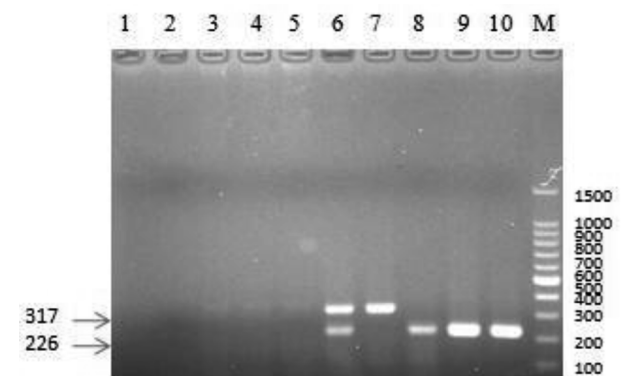
1.7 扩增反应分析

PCR 产物以上样量 5 μ L 点样于 1.5% 琼脂糖凝胶中进行电泳, 紫外透射仪下观察扩增条带。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果

图 1 为阳性对照样品与其他病原微生物在引物 P1/P2, P3/P4 下扩增的 PCR 产物电泳图。混合模板能够清晰的扩增出 RPV 与 RMV 目的条带而非特异性扩增。与大鼠细小病毒核酸同源性高的小鼠细小病毒 MVM 株以及其他病原微生物无扩增片段。



1~5 为阴性对照, 其中 1: 空白对照, 2: 鼠伤寒沙门氏菌, 3: 肝螺旋菌, 4: 多瘤病毒样本, 5: 小鼠细小 MVM 株; 6: RPV 与 RMV 混合样品, 7: RPV 株, 8: RMV 株, 9: KRV 株, 10: H-1 株, M: 100 bp Ladder Marker

图 1 双重 PCR 检测电泳图

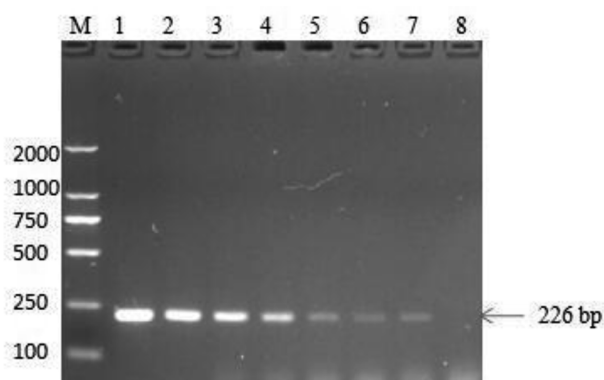
Figure 1 Electrophoresis of dual PCR

2.2 PCR 敏感性

为了能够定量分析方法中引物的扩增效率, 构建 4 种毒株基因片段的质粒。敏感性分析结果(图 2~4)表明, 以单模板 RMV 基因片段构建的质粒在二重引物 PCR 扩增下检测至少可达质粒稀释的最大倍数的浓度 10 拷贝/ μ L, 以单模板 RPV 基因片段构建的质粒在双重引物扩增下的敏感性可达 100 拷贝/ μ L, 以 RPV 和 RMV 混合模板在双重引物扩增下的最低检测浓度为 1 000 拷贝/ μ L。

2.3 临床样本检测

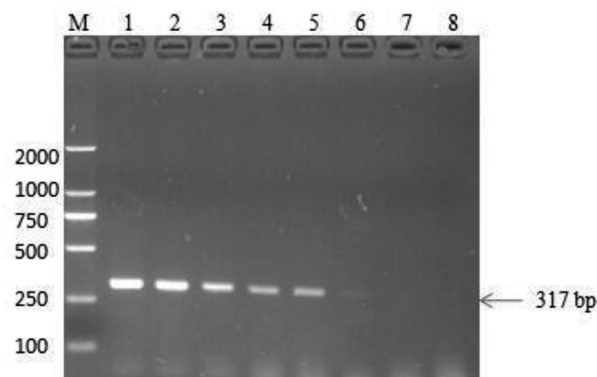
抽取野鼠样本 23 份肝、脾组织混合样品用于检测验证, 样本按照试剂盒说明抽提样本总 DNA/RNA。检测结果(表 2)显示: 除一份共感染的样本



M: DL2000 Marker; 1~7: 1×10^7 拷贝/ μL 至 1×10 拷贝/ μL 浓度梯度; 8: 空白对照

图2 RMV 单模板敏感性分析

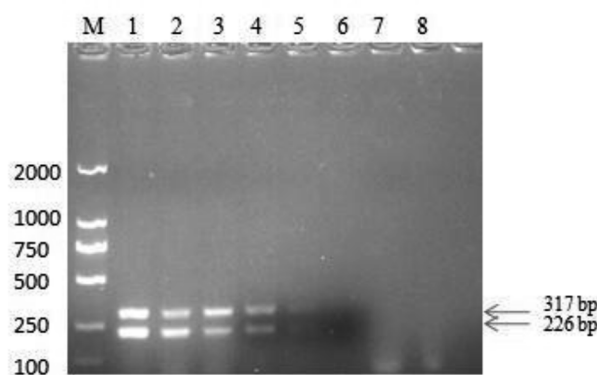
Figure 2 Sensitivity analysis of RMV single template



M: DL2000Marker; 1~7: 1×10^7 拷贝/ μL 至 1×10 拷贝/ μL 浓度梯度; 8: 空白对照

图3 RPV 单模板敏感性分析

Figure 3 Sensitivity analysis of RPV single template



M: DL2000Marker; 1~7: 1×10^7 拷贝/ μL 至 1×10 拷贝/ μL 浓度梯度; 8: 空白对照

图4 双重 PCR 敏感性分析

Figure 4 Sensitivity analysis of dual PCR

表2 临床样本检测结果

Table 2 Detection of clinical sample

	H-1/KRV/RMV	RPV
阳性	7	1
阴性	16	22
阳性率	30.4%	4.5%

外, 其他多份样本的 PCR 扩增条带大小为 226 bp, 说明存在 H-1、KRV 和 RMV 株的其中一种或几种, 通过其他 PCR 验证及测序分析, 表明细小病毒株为 RMV 株, 未检测到 H-1 和 KRV 株。与 RMV 和 RPV 株在鼠群中感染率比较高的相关报道一致^[5]。

3 讨论

大鼠细小病毒是大鼠感染中比较常见的病毒, 自然感染的大鼠通常无临床症状。PCR 方法已经用于啮齿动物细小病毒的检测^[4,6,7], 但还没有一种用于检测包括 4 种大鼠细小病毒株在内的 PCR 方法。本研究建立了一种可用于检测包含 4 种大鼠细小病毒在内的双重 PCR 方法, 一对特异性引物扩增 RPV 株的 VP2 基因片段, 另一对引物扩增另外 3 种大鼠细小病毒(H-1、KRV 和 RMV)的 NS1 基因序列。两对物扩增的片段大小差为 91 bp, 便于凝胶电泳图中对目的条带的识别, 同时因扩增片段大小差别适中对相互的扩增效率影响小。建立的方法通过特异性验证, 对于多种其他病原微生物无特异性扩增片段及可见杂带, 阳性样本可获得清晰的目的扩增片段并且无非特异性扩增。敏感性试验中, 单模板最低检测限度分别可达 10 及 100 拷贝/ μL , 混合模板的最低检测限度均可达 1 000 拷贝/ μL , 可见两对引物的扩增效率高, 可作为可靠的检测用引物。本研究建立的大鼠细小病毒双重 PCR 方法对筛查大鼠细小病毒的感染具有一定的应用价值。

参考文献:

- [1] Besselsen DG, Besch-Williford CL, Pintel DJ, et al. Detection of H-1 parvovirus and Kilham rat virus by PCR[J]. J Clin Microbiol, 1995, 33(7):1699-1703.
- [2] 贺争鸣, 卫礼, 张然, 等. 检测大鼠细小病毒抗体的 ELISA、IEA 和 HI 法比较[J]. 上海实验动物科学, 1993, 13(3):132-134.

- [3] 刘先菊, 佟魏, 张丽芳, 等. 大鼠细小病毒 H-1 株培养方法的建立[J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(6):495-498.
- [4] Ball-Goodrich LJ, Leland SE, Johnson EA, et al. Rat parvovirus type 1: the prototype for a new rodent parvovirus serogroup [J]. J Virol, 1998, 72(4):3289-3299.
- [5] Wan CH, Soderlund-Venermo M, Pintel DJ, et al. Molecular characterization of three newly recognized rat parvoviruses [J]. J Gen Virol, 2002, 83(8):2075-2083.
- [6] Wan CH, Bauer BA, Pintel DJ, et al. Detection of rat parvovirus type 1 and rat minute virus type 1 by polymerase chain reaction[J]. Lab Anim, 2006, 40(1):63-69.
- [7] 李晓波, 付瑞, 王吉, 等. 大鼠细小病毒 H-1 株和 KRV 株双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(6):46-52.

Development of Dual PCR for Detection of Rat Parvovirus

RAO Dan, ZHU Yu-jun, WU Miao-li, YUAN Wen, WANG Jing, YIN Xue-qin, CONG Feng,
LIAN Yue-xiao, HUANG Bi-hong, XU Feng-jiao, LIU Xiang-nan, LIU Zhu-hong,
HUANG Ren, ZHANG Yu, GUO Peng-ju

[Abstract] **Objective** To establish a PCR method for rapidly detecting rat parvovirus. **Methods** According to the characters of nucleotide sequence of rat parvovirus, a dual PCR was developed to differentially detect RPV and other three rat parvovirus (H-1/KRV/RMV). A pair of primers amplifying VP2 gene were applied to exclusively amplify RPV while another pair of primers targeting the NS1 gene was designed for specific amplification of H-1, KRV and RMV primer. **Result** Rat parvovirus were screened without detecting minute virus of mice which had high nucleotide homology with rat parvovirus and also negative for three other microorganism pathogen. Sensitivity tests showed that the minimum detectable concentration was as low as 1 000 copies μL . When dual PCR combined with sequencing were applied to detect 23 clinical samples, seven samples detected were RMV positive including one coinfecting with RPV. **Conclusion** The dual PCR was verified to be specific and sensitive which could be used as a reliable method to screen rat parvovirus.

[Key words] Rat Parvovirus (RPV); H-1; KRV; RMV; Dual PCR

不同因素对环磷酰胺诱导的免疫抑制小鼠模型效果的影响

宋莹¹, 郭雅娟², 黄铭倩¹, 梁金强¹, 黄芝瑛²

(中山大学 1. 实验动物中心; 2. 药学院, 广州 510006)

[摘要] 目的 探究环磷酰胺(CY)剂量和检测终点对 BALB/c 小鼠免疫抑制模型效果的影响。

方法 将 BALB/c 小鼠按照体质量随机分为对照组、CY 40 mg/kg 组、CY 60 mg/kg 组, 此三组均设末次给药后第 5 日为检测终点, 并设 CY 60 mg/kg-2 组, 末次给药后第 3 日为检测终点, 检测终点时进行血液学检查, 测定脾脏、胸腺的脏器重量, 检测 T、B 淋巴细胞介导的免疫功能改变。

结果 与对照组相比, 各模型组上述检测指标均有不同程度的改变; 比较各模型组结果, 当检测终点相同时, 60 mg/kg 剂量造模效果更好; 固定 CY 剂量, 选择末次给药第 3 日为检测终点效果更优。**结论** CY 剂量和检测终点的不同会影响 BALB/c 小鼠免疫抑制模型效果, 选择 60 mg/kg CY 剂量的造模效果优于 40 mg/kg; 末次给药后第 3 日更适合作为免疫评价模型的检测终点。

[关键词] 环磷酰胺(CY); 检测终点; 免疫抑制; 小鼠模型

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)01-0036-04

目前市场上提高人体免疫力的保健品层出不穷, 建立快速、灵敏的免疫抑制模型对药品、保健品的免疫学评价有重要意义。环磷酰胺(cyclophosphamide, CY)是一种烷化剂类化疗药物, 临床上常用于抗肿瘤, 此外 CY 还具有较强的免疫抑制作用, 是制备免疫抑制模型常用的阳性药^[1]。但是目前尚无较统一的免疫抑制模型造模条件, 而条件设置对药品、保健品等的免疫学评价效果有明显影响。本文旨在探索 CY 剂量高低以及检测终点不同对免疫抑制模型效果的影响, 为药品、保健品等的免疫学效果评价建立合适的模型提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 32 只, 11~12 周龄, 雌

雄各半, 由广东省医学实验动物中心提供[SCXK(粤)2013-0002]。

1.2 药物、试剂与仪器

CY(批号 04131204), 山西普德药业股份有限公司; 质量分数 0.9% 氯化钠注射液(批号 B14070303), 江西科伦药业有限公司; CD3e-PerCP(批号 5079796)、CD4-FITC(批号 5040579)、CD8a-PE(批号 5047674)、CD19-FITC(批号 5138957)、CD25-APC(批号 5329646)、CD69-APC(批号 3207812)、CD80-PE(批号 3234833)、CD86-APC(批号 4076926)、IFN- γ -APC(批号 5245918)、IL-4-PE(批号 5119577)、Transcription Factor Buffer Set(批号 5275574)、裂解液(批号 4189857)、细胞固定液(批号 4098726); Leukocyte Activation Cocktail(批号 5215748)均为美国 BD 公司; 磷酸盐缓冲液(批号 NAA1316)、胎牛血清(批号 NYB0814), 赛默飞世尔生物化学制品有限公司; RPIM-1640 培养基(批号 1687968), 美国 life technologies 公司; LPS(批号 025M4040V)、Con-A(批号 SLBN0358V), 美国 Sigma 公司; CFSE 细胞增殖荧光染料(批号 E10114-1641), 美国 eBioscience 公司; CCK-8 法细胞增殖检

[收稿日期] 2016-08-19

[作者简介] 宋莹(1988-), 女, 硕士, 研究方向为药理及毒理学。E-mail: keaisongying@126.com

[通讯作者] 黄芝瑛, 教授。E-mail: hzhiying@mail.sysu.edu.cn

测试试剂盒(批号 20160325), 凯基生物技术有限公司。Accuri C6 流式细胞仪, 美国 BD 公司; L535R-1 型冷冻离心机, 湖南湘仪离心机仪器有限公司; Genius 3 型漩涡混合器, 德国艾卡仪器设备有限公司; Ascent 型多功能酶标仪, 美国赛默飞公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及给药 将 BALB/c 小鼠按体质量随机分为对照组、CY40 mg/kg 组、CY60 mg/kg 组以及 CY60 mg/kg -2 组, 每组 8 只, 雌雄各半。模型组均腹腔注射 CY, 连续 3 d, 除 CY60 mg/kg -2 组为末次给药后第 3 日解剖测定各项指标外, 其余 3 组为末次给药后第 5 日解剖测定各项指标。

1.3.2 指标测定 试验结束后测定动物的脾脏、胸腺系数[= 脏器质量(g)/ 体质量(g)]^[2]。其余血液学及免疫学指标按试剂盒说明书进行。

1.4 数据分析

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用 SPSS 13.0 软件, 应用单因素方差分析进行数据处理, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 60 mg/kg CY 造模效果优于 40 mg/kg 剂量

两个剂量对 BALB/c 小鼠都可以造成免疫抑

制, 60 mg/kg CY 组的造模效果更优。与对照组相比, 60 mg/kg CY 组胸腺和脾脏系数下降趋势更为明显(表 1)。外周血中网织红细胞比例(RET%)、白细胞计数(WBC)和单核细胞比例(MONO%)显著降低($P < 0.05$)(表 2); NK 细胞的活性明显受到抑制, 脾 B 淋巴细胞的增殖速度也大大降低, 且随着 CY 剂量增大降低幅度越大(表 3)。

2.2 末次给药后第 3 日为检测终点优于末次给药后第 5 日

末次给药后第 3 日的 60 mg/kg CY-2 组脾脏受损更为严重(雌雄小鼠的胸腺和脾脏系数分别为 0.170 ± 0.030 、 0.186 ± 0.027 和 0.189 ± 0.012 、

表 1 CY 剂量不同对免疫抑制模型脏器系数的影响
Table 1 The effect of different dosages of CY on immune organ coefficient of immunosuppressed mice model

组别	性别	胸腺系数	脾脏系数
对照组	♀	0.293 ± 0.041	0.442 ± 0.051
CY 40 mg/kg		$0.168 \pm 0.033^{**}$	0.323 ± 0.060
CY 60 mg/kg		$0.116 \pm 0.059^{**}$	0.361 ± 0.103
对照组	♂	0.156 ± 0.048	0.370 ± 0.054
CY 40 mg/kg		$0.092 \pm 0.012^{*}$	0.332 ± 0.090
CY 60 mg/kg		$0.136 \pm 0.026^{*}$	$0.218 \pm 0.040^{*}$

注: 与对照组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与 CY 40 mg/kg 组比较, $^{*}P < 0.05$; $n=4$, 下表同

表 2 CY 剂量不同对免疫抑制模型血常规的影响

Table 2 The effect of different dosages of CY on blood routine examination of immunosuppressed mice model

组别	性别	RET/%	WBC/ $10^9 \cdot L^{-1}$	MONO/%
对照组	♀	5.19 ± 1.17	10.78 ± 1.39	7.7 ± 1.0
CY40 mg/kg		$2.45 \pm 0.82^{*}$	$7.43 \pm 0.71^{*}$	7.5 ± 0.1
CY60 mg/kg		$1.89 \pm 2.06^{*}$	8.49 ± 1.76	$6.3 \pm 4.5^{***}$
对照组	♂	4.78 ± 0.57	7.97 ± 0.33	7.2 ± 1.3
CY40 mg/kg		$1.02 \pm 0.24^{**}$	$6.10 \pm 0.85^{**}$	11.5 ± 0.7
CY60 mg/kg		$0.45 \pm 0.09^{***}$	$5.53 \pm 0.69^{**}$	$14.0 \pm 4.5^{*}$

注: 与对照组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与 CY 40 mg/kg 组比较, $^{***}P < 0.01$

表 3 CY 剂量不同对免疫抑制模型免疫细胞的影响

Table 3 The effect of different dosages of CY on immunocytes of immunosuppressed mice model

组别	性别	NK 细胞活力 /%	B 淋巴细胞增殖率 /%	CD19+/%	CD80+CD3+/%	外周血 CD3+/%
对照组	♀	7.06 ± 2.81	506 ± 177	44.65 ± 1.91	1.03 ± 0.15	37.60 ± 11.98
CY40 mg/kg		3.62 ± 1.70	$252 \pm 91^{*}$	$25.42 \pm 4.01^{**}$	1.13 ± 0.15	$63.20 \pm 7.49^{*}$
CY60 mg/kg		$2.81 \pm 1.02^{*}$	$220 \pm 28^{*}$	$23.63 \pm 5.98^{**}$	$1.58 \pm 0.33^{*}$	$72.05 \pm 13.67^{**}$
对照组	♂	7.44 ± 0.73	498 ± 49	41.03 ± 1.77	1.20 ± 0.14	32.83 ± 12.71
CY40 mg/kg		$3.72 \pm 0.23^{**}$	$215 \pm 72^{**}$	$26.00 \pm 1.39^{**}$	1.50 ± 0.17	$64.98 \pm 5.60^{**}$
CY60 mg/kg		$4.10 \pm 0.15^{**}$	$165 \pm 48^{***}$	$14.73 \pm 1.65^{***}$	$1.60 \pm 0.20^{*}$	$78.90 \pm 2.47^{***}$

续表 3

组 别	性别	CD4 ⁺ /CD8 ⁺	CD4 ⁺ CD25 ⁺ /%	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ /%	IFN- γ /CD4 ⁺	IL-4/CD4 ⁺
对照组	♀	1.85 $\pm$ 0.38	11.50 $\pm$ 3.21	21.37 $\pm$ 3.77	0.44 $\pm$ 0.09	0.28 $\pm$ 0.07
CY 40 mg/kg		2.33 $\pm$ 0.63	4.50 $\pm$ 0.44**	7.73 $\pm$ 1.26**	0.33 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.06
CY 60 mg/kg		3.21 $\pm$ 0.95	3.13 $\pm$ 0.93**	4.53 $\pm$ 0.97**#	0.32 $\pm$ 0.02*	0.23 $\pm$ 0.05
对照组	♂	1.44 $\pm$ 0.36	7.50 $\pm$ 2.79	14.30 $\pm$ 3.35	0.45 $\pm$ 0.01	0.37 $\pm$ 0.09
CY 40 mg/kg		1.80 $\pm$ 0.39	4.90 $\pm$ 1.50	9.25 $\pm$ 1.12*	0.42 $\pm$ 0.07	0.36 $\pm$ 0.19
CY 60 mg/kg		3.03 $\pm$ 0.46**	4.05 $\pm$ 0.91	6.53 $\pm$ 1.61**#	0.39 $\pm$ 0.10	0.31 $\pm$ 0.08

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 CY 40 mg/kg 组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

0.156 $\pm$ 0.021)。血常规结果也显示末次给药后第 3 日 WBC[雌(3.47 $\pm$ 0.48) $\times 10^9$ /L、雄(2.20 $\pm$ 0.53) $\times 10^9$ /L]和 RET%(雌 0.31 $\pm$ 0.03、雄 0.43 $\pm$ 0.02) 下降更为严重。小鼠外周血中 CD4⁺/CD8⁺ 比例在末

次给药后第 3 日增长的程度更强, Th1、Th2 细胞的比例则下降更为明显; 脾细胞悬液中 T 淋巴细胞的比例也显著上升, 活化比例下降, 但是 B 淋巴细胞的活化比例显著上升(表 4)。

表 4 末次给药后第 3 日为检测终点时免疫抑制小鼠模型的免疫细胞

Table 4 The immunocytes of immunosuppressed mice model tested at 3 days after the last administration

性别	外周血 CD4 ⁺ /CD8 ⁺	IFN- γ /CD4 ⁺	IL-4/CD4 ⁺	脾细胞 CD3 ⁺ /%	CD3 ⁺ CD69 ⁺ /%	CD80 ⁺ CD3 ⁺ /%	CD86 ⁺ CD3 ⁺ /%
♀	5.98 $\pm$ 0.92 [#]	0.18 $\pm$ 0.06 ^{##}	0.07 $\pm$ 0.02 ^{##}	48.50 $\pm$ 8.95 ^{##}	1.88 $\pm$ 0.13 ^{##}	1.83 $\pm$ 0.53	1.33 $\pm$ 0.26 [#]
♂	3.95 $\pm$ 1.32	0.23 $\pm$ 0.08 [#]	0.12 $\pm$ 0.06 [#]	50.25 $\pm$ 4.43 ^{##}	1.95 $\pm$ 0.19 [#]	2.08 $\pm$ 0.38	1.48 $\pm$ 0.63 [#]

注: 与表 3 中 CY 60 mg/kg 组相应指标比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

3 讨论

胸腺和脾脏是重要的免疫器官, 是淋巴细胞发育的重要场所, 常被用于评价免疫功能强弱; RET 是晚幼红细胞核脱核后到成熟的红细胞之间的过渡细胞, 与红细胞免疫有密切的关系^[3], 白细胞和单核细胞则是机体固有免疫的重要组成部分; NK 细胞被认为是机体天然免疫的第一道防线, 它是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁^[4]; 在机体受到外来物质侵害时, T 淋巴细胞能迅速增殖发挥免疫作用, 因此 T 细胞的状态与免疫功能密切相关; CD4⁺CD25⁺Treg(regulatory T cells, Treg)免疫调节中发挥重要作用, 能抑制 T 细胞和 B 细胞增殖, 并抑制抗体的产生^[5,6], Foxp3 为 Treg 细胞的特异性标志^[7], CD4⁺Th 淋巴细胞按其所产生的细胞因子种类不同可以分为 Th1 和 Th2 淋巴细胞, 其中 IFN- γ 促进 Th 细胞分化为 Th1, 主要参与细胞免疫; IL-4 促进 Th 细胞分化为 Th2, 主要参与体液免疫^[8]。本实验运用多个指标对免疫抑制的造模效果进行评估, 例如脏器系数和血常规; 另外, 运用流式细胞术检测外周血或脾脏各淋巴细胞分群和活化状态,

该指标灵敏度高, 代表性强, 是反映机体免疫功能的首选。

CY 和糖皮质激素类药物是免疫抑制模型常用阳性药物, 各个药物的给药途径、给药剂量、给药周期均可影响免疫抑制模型的效果, 宋雁等^[9]比较了不同途径和剂量 CY 对模型的影响, 该文建议一次性大剂量腹腔给予 200 mg/kg CY 造模。虽然不同的条件均可诱导免疫抑制模型, 但是免疫抑制模型的应用是较为广泛的, 而应用时对免疫抑制模型效果的要求也有所区别, 本实验是基于本实验室前期保健品免疫功效评价中出现的, 即给药 4 周左右的小鼠用 40 mg/kg CY 剂量造模, 末次给药后第 5 日检测时免疫抑制模型组与对照组较难出现免疫学指标的统计学改变, 为此进行了本次探索。

在此类型评价中需要考虑到保健类药品在功效方面可能会弱于相应的药品, 在造模时既要考虑到免疫抑制效果的出现, 又不能严重地抑制动物的免疫功能而掩盖保健药物的潜在免疫调节作用。

综上所述, 本实验结果证明了 CY 剂量以及检测终点的不同确实会对造模的效果产生影响。而对于保健品、食品等类型的免疫学评价中, 经常会

遇到给药一定周期如给药 4 周来观察药物对免疫系统的调节作用,此时在给药结束前使用 CY 造模时,本实验推荐选择 60 mg/kg CY 剂量连续给药 3 d,其造模效果优于 40 mg/kg;末次给药后第 3 日更适合作为免疫学评价模型的检测终点。

参考文献:

- [1] Pelaez B, Campillo JA, Lopez-Asenjo JA, et al. Cyclophosphamide induces the development of early myeloid cells suppressing tumor cell growth by a nitric oxide-dependent mechanism[J]. *J Immunol*, 2001, 166(11):6608-6615.
- [2] 吕颖坚, 黄俊明, 蔡玟, 等. 环磷酰胺和氢化可的松建立免疫抑制模型方法比较[J]. *卫生研究*, 2012, 41(6):951-955.
- [3] 门剑龙. 测定自身免疫溶血性贫血患者未成熟网织红细胞指数的临床价值[J]. *临床检验杂志*, 2004, 22(1):47-57.
- [4] 杨颖, 蔡玟, 黄志彪, 等. 环磷酰胺致小鼠免疫功能低下模型建立与评价[J]. *中国公共卫生*, 2008, 24(5):581-583.
- [5] Ralainirina N, Poli A, Michel T, et al. Control of NK cell functions by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells[J]. *J Leukoc Biol*, 2007, 81(1):144-153.
- [6] Wei H, Yang M, Zhao T, et al. Functional expression and characterization of grass carp IL-10: an essential mediator of TGF-beta1 immune regulation in peripheral blood lymphocytes[J]. *Mol Immunol*, 2013, 53(4):313-320.
- [7] 王胜军, 许化溪, 杨胜利. CD4⁺CD25⁺ 调节性 T 细胞[J]. *细胞生物学杂志*, 2005(27):61-65.
- [8] 张李峰, 蒲建中, 鲍英存, 等. 比较同一复方中用红芪与用黄芪对免疫抑制小鼠淋巴细胞和 Th1/Th2 型细胞因子的影响[J]. *免疫学杂志*, 2012, 28(3):212-216.
- [9] 宋雁, 贾旭东, 崔文明, 等. 不同途径和剂量环磷酰胺建立小鼠免疫抑制模型的对比研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2013, 25(3):218-225.

Effect of Different Factors on Cyclophosphamide Induced Immunosuppression Mice Model

SONG Ying¹, GUO Ya-juan², HUANG Ming-qian¹, LIANG Jin-qiang¹, HUANG Zhi-ying²

(1. Laboratory Animal Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China;

2. School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510006, China)

[Abstract] Objective To investigate the different dosages of cyclophosphamide (CY) and endpoint-detection on the effects of immunosuppression model. **Methods** BALB/c mice were divided into 4 groups randomly: negative control group (A), CY 40 mg/kg group (B), CY 60 mg/kg group (C), which were all tested at 5 days after the last administration, and CY 60 mg/kg group-2 (D) was tested at 3 days after. The animal's body weight was measured every day, hematological parameters and immune organ index were detected when the experiments finished, as well as immune function was mediated by T or B lymphocytes testing. **Results** The different doses of CY and endpoint-detection have impact on the immunosuppression effect. 60 mg/kg CY has stronger immunosuppression effect when tested at 5 days after the last administration. The alteration of immune indicators were more obvious when tested at 3 days after the last administration compared with 5 days at the dosage of 60 mg/kg CY. **Conclusion** Dosages of CY and endpoint-detection have impact on immunosuppressed mice model. 60 mg/kg CY is more effective than 40 mg/kg CY, and the results are better when 3 days after the last administration is chosen as the endpoint-detection.

[Key words] Cyclophosphamide (CY); Endpoint-detection; Immunosuppression; Mice model

小鼠剪尾出血模型的优化

田 靖, 崔庆华, 郭 平, 张志晓, 冯子良, 郑 颖, 范泉水
(成都军区疾病预防控制中心, 昆明 650032)

[摘要] 目的 探讨小鼠剪尾出血模型在凝血药物体内评价过程中应用的可行性。方法 对传统鼠尾出血模型实验过程进行考察和比较分析, 对小鼠剪尾模型制备方法进行优化, 建立了一种可快速准确检测鼠尾出血量和出血时间的方法。并利用商品化凝血酶药物苏灵验证了该方法在凝血药物药效学评价中的有效性, 对鼠尾出血量(出血时间)与小鼠凝血时间指标的敏感性比较也显示了此模型的优越性。结果 优化后的鼠尾出血模型可对小鼠出血量进行低至微升级的精确检测, 通过一定时间间隔的出血量来确定出血终点的方法, 很大程度上消除了实验中的人为误差。该模型操作简便、易于使用, 可以敏感且有效模拟体外创伤的动物模型, 在评价凝血药物的药效中发挥作用。结论 小鼠剪尾出血模型可以敏感反应凝血药物的体内作用, 可作为凝血药物初步筛选和评价的有效工具。

[关键词] 小鼠剪尾出血模型; 创伤模拟; 出血量; 出血时间

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2016)06-0040-06

鼠尾出血模型造模简单方便、易于观察, 在动植物凝血活性成分的评价以及白血病药物的研发中发挥着重要作用。然而, 小鼠尾部出血模型使用 40 多年来, 不同实验室在小鼠出血模型的制备方法上存在一些差异, 这些差异体现在造模和检测的各个细节, 由于没有统一标准来说明这些操作的合理性和必要性, 使得该模型制备缺乏规范, 限制了鼠尾出血模型的广泛应用。

本文作者认为, 小鼠尾部出血造模这一过程实际上对小鼠尾部静脉、动脉和组织均造成损伤, 可视为一种较为理想的体外创伤模型。作者试图在小鼠清醒状态下剪尾造模, 确保室温条件下鼠尾平放、血液自由流动, 用滤纸采集血液, 准确检测

出血量, 以出血量值判定出血时间, 弥补出血时终点判定模糊等人为误差, 从而使该模型能够有效反应药物对小鼠出血量和出血时间的影响。本文通过对小鼠鼠尾出血模型的造模过程以及研究方法的优化, 使其能够很好模拟生物创伤出血过程, 以探讨该模型在凝血药物筛选和评价中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠, 4~5 周龄, 体质量 18~22 g, 购自中国人民解放军第三军医大学实验动物中心 [SCXK-2012-0011]; 饲养于昆明医科大学 SPF 动物实验室 [SYXK(滇)K2015-0002]。

1.2 药物、试剂和仪器

苏灵, 代号 Saculin, 购自北京康辰药业有限公司; NaOH, 购自广东光华化学厂有限公司; EDTANa₂, 购自美国 Sigma 公司; 生理盐水, 购自昆明南疆制药厂; Stat Fax® 2100 型酶标仪, 购自美国 Awareness technology 公司; NanoDrop2000 超微量分光光度计(型号 ND2000), 购自美国 Thermo scientific 公司; 水浴锅, 购自金坛市杰瑞尔电器有限公司, 型号 HH-2J; #4

[收稿日期] 2016-08-08

[基金项目] 全军医学科技青年培育项目(14QNP055)

[作者简介] 田 靖(1982-), 女, 博士, 主治医师, 从事生物毒素及其机制的研究。

E-mail: tianjing1980s@126.com

[通讯作者] 郑 颖, 女, 博士, 主任医师, 研究方向: 药学和生物毒素学。E-mail: zhengyingcdc@163.com

范泉水, 男, 博士, 主任医师, 研究方向: 病毒学和生物毒素学。E-mail: fqsl68@126.com

滤纸, 购自美国 Whatman 公司; 2.5 mL 注射器, 购自江西洪达医疗器械集团有限公司; 96 孔板, 购自广州洁特生物过滤制品有限公司。

1.3 血液样品最大吸收波长测定

小鼠眼眶内眦取血法采集小鼠新鲜血液 1 mL, 用质量浓度为 4% EDTA Na₂ 抗凝, 取 20 μ L 小鼠抗凝血液溶解于 2 mL 质量浓度为 10% 的 NaOH 裂解液中, 震荡试管, 使血细胞充分裂解 30 min, 得血液裂解样品。取 2 μ L 裂解液, 用 NanoDrop 对其进行蛋白吸收波长进行扫描, 将明显吸收峰处波长确定为最大吸收波长。

1.4 血液裂解标准品吸光度曲线绘制

分别取小鼠抗凝血 2 μ L、4 μ L、6 μ L、8 μ L、10 μ L、12 μ L、14 μ L、16 μ L 和 18 μ L 加入到 2 mL 质量浓度为 10% NaOH 溶液中, 充分裂解 30 min, 以质量分数 10% NaOH 溶液为空白对照, 用 NanoDrop 依次测定其在 418 nm 处吸光值, 绘制拟合曲线, 计算 R² 值。将各样品依次加入到 96 孔板中, 200 μ L/孔, 每个浓度重复三孔, 用酶标仪测定样品在 450 nm、405 nm、492 nm 波长以及双波长 405 nm/630 nm、450 nm/630 nm 处吸光值, 绘制拟合曲线, 计算 R² 值。

1.5 出血量检测方法建立以及回收率检测

将 #4 滤纸剪成 15 mm $\times$ 15 mm 方块, 在滤纸上分别滴加抗凝血 3 μ L、9 μ L 和 18 μ L, 使滤纸片充分吸收血液后将滤纸片放入含有 2 mL 质量浓度为 10% NaOH 裂解液的试管中, 室温下充分震荡, 观察滤纸片纤维完全松散, 滤纸片上血液完全溶解为止。静止试管 30 min, 取上清 200 μ L/孔测定 450 nm/630 nm 处的吸光值, 利用标准曲线计算回收血液量, 计算回收率。同以上方法, 检测微量血液(0.4 μ L~1.8 μ L)的回收血液量, 计算回收率。

1.6 小鼠出血量与出血时间检测

小鼠 20 只, 雌雄各半, 按照体质量随机分为 2 组, 每组 10 只, 尾静脉给药, 样品组给予生理盐水配制的苏灵(0.62 U/kg), 对照组给予相应体积的生理盐水。用药 30 min 后将小鼠用固定器固定, 用含有乙醚的棉球对小鼠进行吸入性麻醉, 使其减少自主行动后将鼠尾平放于桌面上, 用体积分数 70% 乙醇消毒鼠尾, 待酒精挥发后在鼠尾末端 5 mm 处用灭菌的手术刀片割断, 立即用 15 mm $\times$ 15 mm 定量滤纸片吸取断尾处血液(不要直接接触到尾部)并开始计时, 每 2 min 将吸取血液的滤纸片放入装

有 2 mL 质量浓度 10% NaOH 溶液的玻璃试管中, 稍微震荡, 待滤纸片上血液完全溶解后, 静置 30 min 后加入 96 孔板, 用分光光度计检测 450 nm/630 nm 吸光度, 对照标准曲线, 计算出每分钟内的流血量(μ L), 以累积出血量计算出每只小鼠的出血总量。当每 2 min 流出血液少于 1 μ L 判定为出血终止, 记录出血终止前 2 min 时间点为出血时间。同时按照常规方法记录小鼠实际出血时间, 以滤纸片上肉眼未见血点为出血终止。

1.7 小鼠凝血时间检测

小鼠 40 只, 雌雄各半, 随机分为 4 组, 每组 10 只。每组小鼠分别静脉给予剂量为 0.16 U/kg、0.64 U/kg 和 2.48 U/kg 生理盐水稀释的苏灵溶液, 对照组给予生理盐水。给药 30 min 后小鼠眼眶内眦取血并计时, 丢弃第一滴血, 取两滴血液滴于 37 $^{\circ}$ C 水浴保温的玻片上, 用针尖垂直挑动血液, 10 s 挑动一次, 待出现第一丝纤维蛋白时停止计时, 即为小鼠凝血时间。

1.8 统计方法

采用 SAS 9.2 软件采用相应的统计学分析方法进行显著性差异分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血液裂解样品最大吸收波长确定

将溶解在质量分数 10% NaOH 中的小鼠抗凝血样品进行全波长扫描后发现该血液样品在 418 nm 处具有最大吸收峰, 扫描结果见图 1。

2.2 酶标仪检测波长对吸光度的影响

血液标准样品吸光度检测及拟合曲线如图 2A 和图 2B 所示。通过比较同一样品在不同检测波长

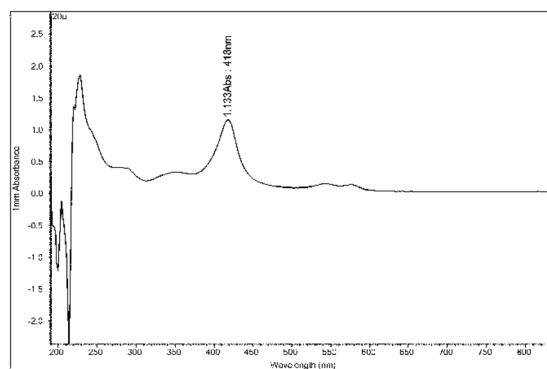
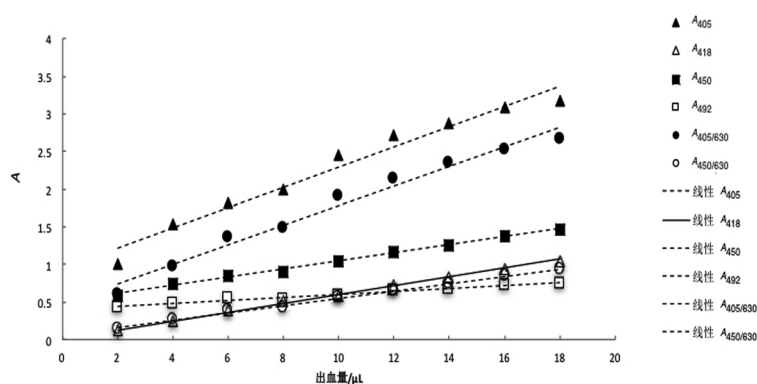


图 1 血液裂解样品的蛋白广谱扫描图

下吸光值拟合曲线显示, 酶标仪 450 nm/630 nm 吸光值曲线($R^2=0.98485$)具有良好的线性关系, 而在 450 nm、405 nm、492 nm 和 405 nm/630 nm 波长下检测则线性不佳。与 NanoDrop 分光光度计检测到的 418 nm 吸光值曲线($R^2=0.99434$)相比, 酶标仪 450 nm/630 nm 吸光值曲线也最为接近, 因此, 可以用酶标仪 450 nm/630 nm 处吸光值代替 418 nm 处吸光值, 进行大量样品的吸光度检测。

A

检测波长下吸光值	拟合直线	R^2 值
A_{405}	$y=0.2089x$	0.60406
A_{418}	$y=0.0587x$	0.99434
A_{450}	$y=0.092x$	0.36846
A_{492}	$y=0.0497x$	-1.8752
$A_{405/630}$	$y=0.1725$	0.84258
$A_{450/630}$	$y=0.0536x$	0.98485



A: 表格显示在 405 nm、418 nm、450 nm、492 nm 以及双波长 405 nm/630 nm 和 450 nm/630 nm 检测条件下的吸光度(A)拟合曲线。 R^2 值代表拟合系数。B: 标准血液样品在不同吸光度条件下的吸光值曲线图。

图 2 血液样品标准品在不同波长检测条件下的吸光度值

表 1 模拟血液样品的回收率

血液体积/ μL	450 nm/630 nm 吸光度值	回收体积/ μL	回收率/%
0.4	0.020	0.37	93.28
0.6	0.026	0.48	80.84
0.8	0.033	0.62	76.96
1	0.051	0.95	95.15
1.2	0.073	1.36	113.49
1.4	0.083	1.55	110.61
1.6	0.089	1.66	103.78
1.8	0.102	1.90	105.72
3	0.153	2.85	95.15
9	0.486	9.10	101.09
18	1.016	18.51	102.85

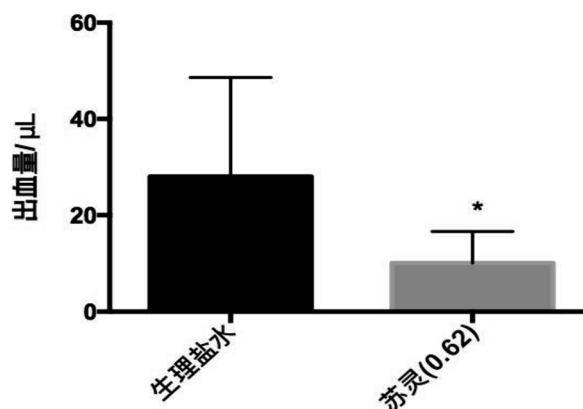
2.4 鼠尾出血模型出血量和出血时间检测的有效性验证

为了验证鼠尾出血时间和出血量检测是否可以有效评价药物的止血效果, 评价了商品化药品苏灵给药对这两个指标的影响。结果显示, 0.62 U/kg 剂量苏灵(Saculin)(由临床使用剂量换算)可以显著缩短

2.3 酶标仪 450 nm/630 nm 波长检测血液样品的回收率

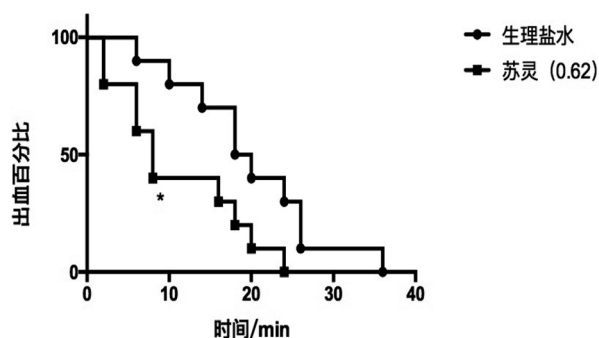
对血液量检测方法进行了回收率验证, 血液量小于 1 μL 的微量血液样本(0.4 μL ~0.8 μL)的回收率在 76.96%~93.28%, 血液量大于 1 μL (1.0 μL ~18 μL)时, 样品回收率在 95.15%~113.49%, 表明本方法可以较为准确检测小鼠实际出血量, 并且对大于 1 μL 的血液样本检测准确率更接近于真实值。

小鼠尾部出血总量(图 3)、显著缩短出血时间(图 4), 凝血效果显著。出血准确时间检测直接统计, 按照原方法进行统计分析(表 2), 结果也显示与改进后的出血时间统计方法得出结论一致。



注: 苏灵(0.62)表示苏灵使用剂量为 0.62 U/kg, 利用 SAS9.2 软件进行单因素多水平非参数检验(Kruskal-Wallis 检验), $P=0.014<0.05$ 。

图 3 剪尾后小鼠出血量检测($n=10$)



注: 苏灵(0.62)表示苏灵使用剂量为 0.62 U/kg, 本实验设计为成组资料一元生存分析, 利用 SAS9.2 软件对断尾后小鼠出血率进行乘积极限法(kaplan-meier 法)估算, $P=0.0283<0.05$

图 4 剪尾后出血小鼠出血百分比与时间曲线($n=10$)

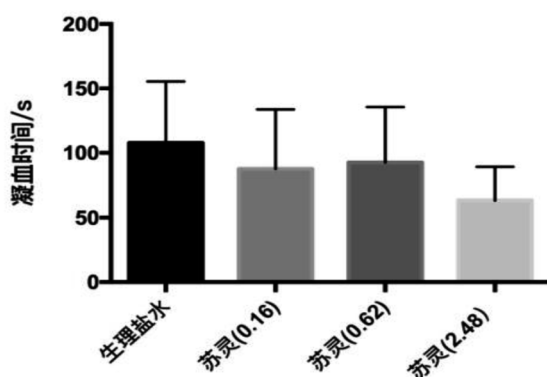
表 2 精确测定小鼠出血时间

分 组	凝血时间 /min
生理盐水	26.29 ± 8.87
苏灵(0.62)	15.35 ± 6.78

注: 利用 SAS9.2 软件进行单因素多水平非参数检验 (Kruskal-Wallis 检验), $P=0.0065<0.05$

2.5 鼠尾出血量和出血时间检测与小鼠凝血时间指标敏感性的比较

为了评价出血量和出血时间指标在检测药物药效中的敏感性方面是否具有优势, 将这两个指标与凝血时间指标进行比较。结果显示, 引起小鼠出血时间显著缩短的苏灵剂量(0.62 U/kg)对小鼠凝血时间并没有显著性影响, 随着给药剂量增加 4 倍(2.56 U/kg), 凝血时间有缩短的趋势, 但与对照组比较无显著性差异(图 5)。



注: 苏灵 (0.16)、苏灵 (0.62) 和苏灵(2.48)表示苏灵使用剂量为 0.16U/kg、0.62U/kg 和 2.48U/kg。本实验资料属于单因素多水平一元定量资料, 利用 SAS9.2 软件进行单因素 4 水平设计定量资料的方差分析(SNK 检验), $P=0.1370>0.05$, 说明组间均值无显著性差异。

图 5 小鼠凝血时间($n=10$)

3 讨论

从模拟创伤的角度去看待小鼠尾部出血模型是 본 연구의出发点, 作者对模型进行了必要改进, 在检测方法上也有所创新。

国内在制作小鼠剪尾模型时通常不进行麻醉, 而国外剪尾模型中使用最多的麻醉剂如异氟醚(isoflurane)^[1]、氯氨酮(ketamine)/美托咪定^[2]、氯氨酮(ketamine)/甲苯噻嗪^[3]、戊巴比妥钠(pentobarbital sodium)^[4]等在静脉给药麻醉时通常会导致动物体温降低^[5]或导致收缩压改变^[6]等情况而影响鼠尾出血量, 本方法在满足动物福利的基础上采用乙醚对小鼠进行吸入麻醉, 以最大限度减少麻醉剂对凝血参数的影响。鼠尾切口的选择常按照距离尾尖 2 mm~20 mm^[4,7-9]、鼠尾直径(3 mm)^[10]处剪断, 或是只选择性切断尾部静脉^[11], 本方法通过严格控制小鼠体质量达到尽量缩小鼠尾个体间差异, 而 5 mm 剪尾位置的确定可以保证小鼠具有足量可供检测的出血量外, 不会对其生命或者健康造成影响。剪尾后观察出血情况是将鼠尾平放于桌面或是将其垂直放入 37 °C 生理盐水^[12,13]中, 除了维持一个恒定的环境温度外, 还利于血液的收集, 37 °C 水浴条件下观察与室温平放鼠尾观察相比, 前者可显著缩短出血时间^[14], 因此在室温条件下收集血液、观察出血时间可能比较接近自然创伤后出血和止血的生理过程。

采用滤纸浸润面积^[15]和滤纸称重法来估算^[16]出血量比较粗略。本实验检测小鼠血液裂解液样品在 418 nm 吸光度值的方法可以大大提高检测精确性, 并不同于文献报道^[17,18]的在 550 nm 左右进行吸光度检测的方法。为了达到出血量的大样本检测, 降低方法对实验仪器设备的要求, 作者探索了利用 96 孔板酶标仪的现有波长组合酶标仪 450 nm/630 nm 双波长来代替 418 nm 检测的吸光度值, 标准样品在两个吸光度条件下标准曲线可以较好重叠, 并达到良好线性结果, 使血液检测量可以达微升级。究其原因, 450 nm 波长与 418 nm 波长相接近, 用 630 nm 波长抵消一部分背景之后, 恰好能满足 418 nm 波长检测的需要, 这一推测已在实验中验证。

各研究者判定出血终点以出血时间不长于 30 min^[4]、60 min^[19]或者 30 s 内不出现反复出血为出血终止, 而绝大多数实验方法中并没有对出血终

止的判定方法加以准确说明。实际操作中,对出血终点的判定往往不是特别清晰,小鼠由于个体差异会出现停止出血后再出血,甚至多次反复出血的情况,使出血时间指标浮动性变大,对实验结果造成影响。本方法将出血量与出血时间检测相结合,以出血量判定出血时间。由于血液定量方法在检测 $>1\mu\text{L}$ 血液样品时准确性较高,因此人为规定将鼠尾间隔2 min内出血量 $<1\mu\text{L}$ 的阶段判定为出血终止,并用生存分析法对小鼠出血时间进行显著性差异分析。此方法可以很好代替传统精确测量出血时间的方法,统计学处理方法的调整也可以更科学分析出血时间不属于正态分布的时间相关数据。

动物实验中曾证实^[20]苏灵可以使小鼠剪尾出血时间和兔凝血时间显著缩短,因此苏灵可作为阳性药物进行方法学比较。结果显示,能够显著缩短出血量和出血时间剂量的苏灵并不能显著缩短小鼠凝血时间,因此凝血时间指标和出血时间(出血量)指标的敏感性显而易见。

然而,动物实验方法只能是对药物药效进行一个初步的预判,不能代表药物在人体的真实作用。因此应该谨慎对待动物实验的结果,从实验动物的种属类别、检测指标、检测方法等多方面进行考虑和实验设计,以求最大限度预测药物对人体的作用。

参考文献:

- [1] Mei B, Pan C, Jiang H, et al. Rational design of a fully active, long-acting PEGylated factor VIII for hemophilia A treatment [J]. *Blood*, 2010, 116(2):270-279.
- [2] Broze GJ Jr, Yin ZF, Lasky N. A tail vein bleeding time model and delayed bleeding in hemophiliac mice[J]. *Thromb Haemost*, 2001, 85(4):747-748.
- [3] Maroney SA, Cooley BC, Ferrel JP, et al. Absence of hematopoietic tissue factor pathway inhibitor mitigates bleeding in mice with hemophilia[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012, 109(10):3927-3931.
- [4] Tranholm M, Kristensen K, Kristensen AT, et al. Improved hemostasis with superactive analogs of factor VIIa in a mouse model of hemophilia A[J]. *Blood*, 2003, 102(10):3615-3620.
- [5] Taylor DK. Study of two devices used to maintain normothermia in rats and mice during general anesthesia[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2007, 46(5):37-41.
- [6] Flecknell P. *Laboratory Animal Anaesthesia*, Fourth Edition [M]. Elsevier Academic Press, 2016:50.
- [7] 许火龙, 李冲, 韦晓慧, 等. 核桃叶提取液对小鼠出血时间和凝血时间的影响[J]. *中外医学研究*, 2016, 14(12):2-4.
- [8] 刘萍, 刘文波, 张婧, 等. 仙脉通胶囊对小鼠出血时间和凝血时间的影响[J]. *中医药信息*, 2012, 29(6):40-41.
- [9] 吴晓宁, 余陈欢, 徐静红. 乌蕨总黄酮及水提液的药理实验[J]. *康复学报*, 2004, 14(1):13-14.
- [10] Ivanciu L, Toso R, Margaritis P, et al. A zymogen-like factor Xa variant corrects the coagulation defect in hemophilia[J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(11):1028-1033.
- [11] Johansen PB, Tranholm M, Haaning J, et al. Development of a tail vein transection bleeding model in fully anesthetized haemophilia A mice characterization of two novel FVIII molecules[J]. *Haemophilia*, 2016, 22(4):625-631.
- [12] 祝晓雯, 宋熾, 金若敏, 等. 水蛭超细粉及水煎液活血化瘀作用的比较研究[J]. *中药新药与临床药理*, 2011, 22(1):33-37.
- [13] 聂牧, 王云, 郭守东, 等. 板栗多糖抗动脉血栓形成的作用食品科学[J]. 2015, 36(11):187-190.
- [14] Dejana E, Callioni A, Quintana A, et al. Bleeding time in laboratory animals. II - A comparison of different assay conditions in rats[J]. *Thromb Res*, 1979, 15(1-2):191-197.
- [15] 刘彬, 张海涛, 刘慧明, 等. 鲨素对小鼠出血时间和凝血时间的影响[J]. *广东医学院学报*, 2015, 33(1):49-51.
- [16] 张家铨, 邹节明. 血伤宁的药理研究[J]. *中成药*, 1980(2):43-46.
- [17] 王继生, 李惠芝, 邱宗荫, 等. 茅莓总皂苷的主要药效学研究[J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(1):34-36.
- [18] Shaw ST Jr, Aaronson DE, Moyer DL. Quantitation of menstrual blood loss-further evaluation of the alkaline hematin method[J]. *Contraception*, 1972, 5(6):497-513.
- [19] Warner RL, McClintock SD, Barron AG, et al. Hemostatic properties of a venomous protein in rat organ trauma[J]. *Exp Mol Pathol*, 2009, 87(3):204-211.
- [20] 沈稚琴, 黄稚萍. 月经血量测定的方法学和临床应用[J]. *现代检验医学杂志*, 1995, 10(2):5-7.

Improvement on Tail Tip Bleeding Model in Mice

TIAN Jing, CUI Qing-hua, GUO Ping, ZHANG Zhi-xiao, FENG Zi-liang, ZHENG Ying, FAN Quan-shui
(*Institute of Military Medical, Chengdu Military Region's Center for
Disease Control & Prevention, Kunming 650032, China*)

[Abstract] **Objective** The application of tail tip bleeding model in mice was explored to evaluate the hemostatic activity of some coagulation components. **Method** This tail tip bleeding model improved to be used as a trauma model in the aspect of coagulant evaluation was compared with the traditional operation process. The new method was established for fast quantitative detection of the blood loss and decided the bleeding time from the starting point when the tail was cut off to the end point when the blood loss was less than 1 μL in two minutes intervals. Saculin approved as a coagulant drug on sale in domestic market was used to verify the effectiveness of this assay. The sensitivity between coagulate time and blood loss (or bleeding time) is also compared in mice. **Results** The advanced tail tip bleeding model in mice can quantitative analysis blood loss and bleeding time in order to reduce the personal error to a great extent. This model is easy to use and can simulate the process of trauma properly. **Conclusion** The tail tip bleeding model in mice can reflect the action of the coagulant drug sensitively, which is a useful tool for screening and assessment of coagulants.

[Key words] Tail tip bleeding model; Mice; Simulated trauma; Blood loss; Bleeding time

单笼与群居饲养对雌性食蟹猴情绪的影响

李 伟¹, 金 益¹, 邢正弘^{1,2}, 陈国强^{1,2}

(1. 上海西普尔-必凯实验动物有限公司, 上海 201203; 2. 上海实验动物研究中心, 上海 201203)

[摘要] 目的 了解单笼与群居饲养雌性食蟹猴的血清单胺类神经递质[去甲肾上腺素(NA)、5-羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)]及与情绪相关的心电、血压的差异, 探讨生活环境对食蟹猴情绪的影响。方法 选取9只4~6岁雌性食蟹猴, 前5个月单笼饲养, 后5个月群居饲养, 分别测量其心电、血压、NA、5-HT、DA、日常表情行为等相关指标。结果 整个实验期间, 心电参数中的心室率、PR间期、QT间期及血清单胺类神经递质(NA、5-HT、DA)、血压中的舒张压值等指标组间比较差异显著($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。单笼阶段的愤怒、焦虑因子得分显著高于群居; 性行为、活动度、快乐因子得分显著低于群居($P<0.05$)。结论 食蟹猴更适合群居饲养, 如果长期单笼饲养, 将对其血清单胺类神经递质及心电、血压参数中某些指标产生较大影响, 并易于产生多种负面情绪。

[关键词] 食蟹猴; 雌性; 情绪; 生物源单胺类; 心电; 血压

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)01-0046-04

非人灵长类实验动物是生命科学研究的重要组成部分, 被称为“活的指示剂”。非人灵长类实验动物福利状况越来越成为关注的问题^[1]。其中, 情绪行为异常在人工圈养非人灵长类实验动物中十分常见^[2-4], 原因可能是其进化程度更高和群居性更强^[5]。基于我国经济社会发展阶段和基本国情, 目前国内科学研究中用到的非人灵长类实验动物, 因限于场地和操作难度等因素, 通常采用单笼饲养, 所以动物情绪行为异常发生率普遍较高, 试验数据的可靠性也值得怀疑^[6]。

本文开展了单笼与群居饲养对雌性食蟹猴的情绪影响的对比研究, 通过测量血清单胺类神经递质含量^[7,8]及观察记录日常表情行为^[9,10], 从不同层面研究生活环境对雌性食蟹猴情绪的影响, 为提高食蟹猴动物福利提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4~6岁普通级雌性食蟹猴9只购于海南金港生

物技术股份有限公司[SCXK(琼)2010-0001], 月经正常, 体质量3~5 kg, 以1~9号不锈钢彩色颈牌进行编号识别。

1.2 饲养条件

开放环境, 露天阳光棚; 群居饲养于环境开放的, 有憩息架、秋千、岩洞等设施的露天阳光棚, 其规格为10 m × 4.2 m × 3.5 m, 单笼饲养于不锈钢笼具内, 笼具规格65 cm × 70 cm × 80 cm, 笼具安置在环境开放的露天阳光棚里。温度26℃左右, 相对湿度40%~70%。全价猴专用饲料, 定时加喂水果, 饮水经煮沸消毒。单笼适应性饲养2个月后开始试验[SYXK(沪)2009-0081]。

1.3 检测仪器

施诺华医疗系统有限公司G3C多参数动物监护仪, 深圳市凯沃尔电子有限公司ECG-1106L Vet数字式心电图机。

1.4 测定方法

本实验所有指标均为隔夜禁食16 h后在每月中旬某日上午测量, 单笼与群居阶段各连续测量5个月数据。

1.4.1 血清单胺类神经递质测定 用促凝剂真空采血管采集血液, 采血量为1 mL, 采集后的血液置于碎冰中保存。用Thermo-legend RT+冷冻离心机2 500 × g, 4℃, 离心15 min, 分离血清。分

[收稿日期] 2016-08-14

[基金项目] 上海市科委实验动物研究专项(13140901200)

[作者简介] 李 伟(1980-), 男, 助理研究员。

E-mail: tianshixz@126.com

[通讯作者] 邢正弘

离好的血清放入 1.5 mL 冷冻离心管, -80°C 保存。委托上海酶联生物科技有限公司用其生产的相关试剂盒进行测定。

1.4.2 心电、血压测定 将食蟹猴固定在猴椅上, 待其安静后, 用 ECG-1106L Vet 数字式心电图机进行心电的测定^[11], 用 G3C 多参数动物监护仪进行血压的测定^[12]。

1.5 食蟹猴日常表情行为的观察记录

采用《雌性猕猴情绪评价量表观察表》^[9,10], 结合实情, 进行观察记录。每月定时定点观察记录两次, 整个实验由同一个人进行观察记录。

1.6 统计学方法

数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SAS9.1 软件分析, 采用重复测量方差分析及 t 检验(仅用于情绪因子得分统计)比较单笼与群居阶段食蟹猴各项指标差异的显著性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清单胺类神经递质

群居饲养的去甲肾上腺素(NA)、5 羟色胺(5-HT)均值极显著高于单笼饲养($P < 0.01$), 群居饲养的多巴胺(DA)极显著低于单笼饲养($P < 0.01$)(表 1)。

2.2 心电图

群居饲养的心室率均值极显著低于单笼饲养

表 1 雌性食蟹猴血清单胺类神经递质测量值

Table 1 The serum monoamine neurotransmitters measurement of female *Macaca fascicularis*

项 目	单 笼	群 居
NA/ng · L ⁻¹	102.1 ± 22.56	121.31 ± 15.34**
5-HT/ng · L ⁻¹	1423.53 ± 276.92	1628.26 ± 313.85**
DA/ng · L ⁻¹	87.31 ± 19.01	68.43 ± 10.31**

注: 单笼与群居组间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 9$; 下表同

($P < 0.01$), PR 间期、QT 间期均值显著高于单笼饲养($P < 0.05$), 其他指标无显著差异(表 2)。

2.3 血压

单笼饲养舒张压极显著低于群居阶段($P < 0.01$)(表 3)。

2.4 日常表情行为

《雌性猕猴情绪评价量表观察表》结果显示单笼阶段的愤怒因子得分显著高于群居, 而性行为因子得分显著低于群居阶段($P < 0.05$)(表 4)。

3 讨论

血清单胺类递质是 NA、DA、5-HT 等的总称, 这 3 种单胺类递质相互作用、相互影响, 其作用十分复杂, 主要与精神活动行为、情绪等密

表 2 雌性食蟹猴心电参数测量值(II 导联)

Table 2 The ECG parameter of female *Macaca fascicularis* (lead II)

项 目	单 笼	群 居
心室率 / 次 · min ⁻¹	247.73 ± 15.97	223.09 ± 22.55**
PR 间期 / ms	52.51 ± 20.64	62.36 ± 20.41*
P 波长 / ms	37.44 ± 22.04	39.44 ± 14.61
QRS 间期 / ms	170.51 ± 142.56	162.09 ± 109.82
VAT 时间 / ms	53.56 ± 58.74	60.91 ± 66.99
T 波长 / ms	34.71 ± 10.29	33.96 ± 8.63
QT 间期 / ms	178.55 ± 55.37	209.31 ± 41.56*
QTc 间期 / ms	361.68 ± 110.72	401.58 ± 74.95
P 振幅 / mV	0.03 ± 0.08	0.03 ± 0.08
Q 振幅 / mV	-0.13 ± 0.12	-0.16 ± 0.17
R 振幅 / mV	0.54 ± 0.30	0.48 ± 0.29
S 振幅 / mV	-0.10 ± 0.13	-0.10 ± 0.16
ST 振幅 / mV	-0.03 ± 0.09	-0.01 ± 0.12
T 振幅 / mV	0.00 ± 0.14	0.01 ± 0.15

表 3 雌性食蟹猴血压测量值

Table 3 The blood pressure of female *Macaca fascicularis*

测量批次	收缩压 / mmHg		舒张压 / mmHg	
	单 笼	群 居	单 笼	群 居
第 1 月	120.33 ± 16.85	128.22 ± 7.79	54.67 ± 8.22	82.56 ± 7.86
第 2 月	132.00 ± 23.64	128.89 ± 13.59	59.56 ± 13.76	72.11 ± 17.72
第 3 月	132.11 ± 20.20	126.78 ± 10.29	63.00 ± 11.32	84.89 ± 7.20
第 4 月	129.22 ± 18.55	129.11 ± 5.62	65.22 ± 11.61	84.44 ± 11.17
第 5 月	129.67 ± 11.47	129.33 ± 13.18	76.00 ± 11.39	86.22 ± 7.66
均值	128.67 ± 18.25	128.47 ± 10.10	63.69 ± 13.03	82.04 ± 11.74**

表 4 雌性食蟹猴日常表情行为情绪因子得分

Table 4 The emotional observation score of female *Macaca fascicularis*

情绪类型	单笼	群居
愤怒	17.1	9.0*
焦虑	29.4	27.3
恐惧	27.4	26.7
快乐	23.3	27.0
性行为	8.5	18.0

切相关^[13]。肖红等^[14]研究表明,外周血单胺类神经递质代谢产物可反映脑中单胺类神经递质的状况。血浆中单胺类神经递质的变化可作为抑郁症的诊断及疗效评定重要参考指标。本实验中,血清中的NA、5-HT单笼饲养阶段显著低于群居,DA显著高于群居。NA是强烈的 α 受体激动剂,对 β_1 受体作用较弱,对 β_2 受体几无作用。通过 α 受体的激动作用,可引起小动脉和小静脉血管收缩。使血压升高。 α 受体激动的心脏方面表现主要是心肌收缩力增强,心率加快,心排血量增高;整体情况下由于升压过高,可引起反射性兴奋迷走神经,使心率减慢。这与本实验中观察到的群居阶段舒张压比单笼阶段的高,以及心室率比单笼阶段的低相吻合。5-HT是一种能产生愉悦情绪的信使,几乎影响到大脑活动的每一个方面:从调节情绪、精力、记忆力到塑造人生观。抗抑郁药如盐酸氟西汀就是通过提高脑内5-HT水平而起作用的。5-HT水平较低的人群更容易发生抑郁、冲动行为、酗酒、自杀、攻击及暴力行为。本实验的日常表情行为观察结果亦表明单笼阶段易致愤怒等不良情绪产生,而群居会增加性行为等良性情绪的出现频率,此可能与血中5-HT浓度不同有一定关系。DA是大脑中一种重要的神经递质,它参与生理和病理条件下人和哺乳动物的许多活动,尤其在运动调节、学习和记忆以及药物成瘾过程中起着关键作用。产生DA这一神经递质的神经元(即多巴胺能神经元)对所释放的DA采取了类似于“返回式卫星”的管理方式,即根据大脑活动需要释放DA,同时又利用DA转运体作为DA的“回收泵”,将释放出去的DA适时、适量地予以回收,这样既达到调节细胞外DA浓度,适应生理活动需要的目的,又能使DA得到重复再利用,节能增效。一旦DA“回收泵”系统发生功能障碍,就会发生多种中

枢神经系统疾病,例如药物成瘾、焦躁等^[16,17]。本实验中单笼阶段的DA浓度显著高于群居,说明长期单笼饲养对DA的回收可能存在一定影响,而转为群居后可一定程度恢复。有报道^[15],抑郁人群的NE、5-HT水平显著低于正常人群,其所用的分析方法与本实验类似,结果也一致。而一项针对肝气郁证猕猴模型研究表明,肝气郁证模型组的NE、DA显著高于正常组^[7],可能与分析方法不同有关。此外本实验设置样品采集时间时,未考虑食蟹猴的月经周期,因此不能排除月经对单胺类神经递质的影响,但是本实验数据采集均在每月中旬,基本保证了单笼和群居时同一只食蟹猴处于同一月经周期,保证了单笼和群居的可比性。

从日常表情行为情绪因子得分可以看出,雌性食蟹猴长期单笼饲养易致愤怒等不良情绪产生,而群居会增加性行为等良性情绪的出现频率。环境对动物情绪的影响十分明显。

长期单笼饲养对雌性食蟹猴体重、血液学、尿常规等生理指标也有显著影响^[18]。本研究通过在食蟹猴饲养房间内增设憩息架、秋千、假山、岩洞等设施使环境更加丰富,这样既可以确保实验动物健康,满足其生活习性,也可以为科学实验提供更可靠、更稳定、更接近正常反应的实验数据。但在动物实验时,常因各种实验要求而难以群养。因此,单笼饲养时,可采用足够大的笼具及其相关的福利设施(如,动物玩具、采食器及方式、大自然的音乐、录像等)等以提高食蟹猴的福利,减少对其情绪的影响,提高实验结果的可信度^[19]。

参考文献:

- [1] Meade TM, Hutchinson E, Krall C, et al. Use of an aquarium as a novel enrichment item for singly housed rhesus macaques (*Macaca mulatta*)[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2014, 53(5): 472-477.
- [2] Baker KC, Bloomsmit M, Neu K, et al. Positive reinforcement training moderates only high levels of abnormal behavior in singly housed rhesus macaques[J]. J Appl Anim Welf Sci, 2009, 12(3):236-252.
- [3] Sommanustweechai A, Kasantikul T, Somsa W, et al. Environmental management procedures following fatal melioidosis in a captive chimpanzee (*Pan troglodytes*)[J]. J Zoo Wildl Med, 2013, 44(2):475-479.
- [4] Wallace EK, Kingston-Jones M, Ford M, et al. An investigation into the use of music as potential auditory enrichment for

- moloch gibbons(*Hylobates moloch*)[J]. *Zoo Biol*, 2013, 32 (4): 423-426.
- [5] Márquez-Arias A, Santillán-Doherty AM, Arenas-Rosas RV, et al. Environmental enrichment for captive stump-tail macaques (*Macaca arctoides*)[J]. *J Med Primatol*, 2010, 39 (1):32-40.
- [6] 孙晓梅, 李春花, 叶尤松, 等. 促进人工饲养实验猕猴心理康乐[J]. *中国比较医学杂志*, 2008, 18(2):79-82.
- [7] 魏盛, 侯金良, 巢玉彬, 等. 郁怒诱发经前期综合征肝气郁证猕猴模型血清单胺类神经递质含量分析[J]. *中西医结合学报*, 2012, 10(8):925-931.
- [8] Reed SC, Levin FR, Evans SM. Changes in mood, cognitive performance and appetite in the late luteal and follicular phases of the menstrual cycle in women with and without PMDD (premenstrual dysphoric disorder) [J]. *Horm Behav*, 2008, 54(1):185-193.
- [9] 张惠云, 乔明琦, 魏盛. 《雌性实验猕猴情绪评价量表》建立及修订[C]. 见:第八届全国中西医结合实验医学研讨会论文集汇编. 2006:118-122.
- [10] 乔明琦, 张惠云, 王海军. 《雌性实验猕猴情绪评价量表》建立及信度检验与效度估计[J]. *浙江中医药大学学报*, 2006, 30(2):176-188.
- [11] 齐卫红, 李伟, 李欣, 等. 食蟹猴心电图研究[J]. *中国药事*, 2012, 26(5):449-452.
- [12] 韦祝梅, 黄俊华, 陈健东, 等. 食蟹猴体温、呼吸率、血压值和脉搏数的测定[J]. *广西畜牧兽医*, 2009, 25(5):265-266.
- [13] 袁勇贵, 吴爱勤, 张心保, 等. 焦虑和抑郁障碍共病血浆单胺类神经递质研究[J]. *临床精神医学杂志*, 2001, 11(3):129-131.
- [14] 肖红, 姚辉, 侯刚, 等. 畅抑郁症与血浆中单胺类神经递质代谢产物畅神经疾病与精神卫生[J]. 2002, 2(4):209-210.
- [15] 周俐, 李俐, 刘艳萍, 等. 血清单胺类神经递质与支气管哮喘反复发作的关联研究[J]. *广州医药*, 2014, 45(1):37-39.
- [16] Zhu SY, Zhao CJ, Wu YY, et al. Identification of a Vav2-dependent mechanism for GDNF/Ret control of mesolimbic DAT trafficking[J]. *Nat Neurosci*, 2015, 18(10):1084-1093.
- [17] Siciliano CA, Calipari ES, Yorgason JT, et al. Chronic ethanol self-administration in macaques shifts dopamine feedback inhibition to predominantly D2 receptors in nucleus accumbens core[J]. *Drug Alcohol Depend*, 2016, 158 (1):159-163.
- [18] 李伟, 金益, 柏熊, 等. 单笼与群居饲养对雌性食蟹猴生理指标的影响[J]. *实验动物与比较医学*, 2016, 36(5):369-373.
- [19] 高建峰, 滕利, 郭铭, 等. 环境丰容对长期单笼圈养食蟹猴行为的影响[J]. *四川动物*, 2016, 35(2):243-248.

Effects of Single Caged and Social Feeding on Emotion of Female *Macaca Fascicularis*

LI Wei¹, JIN Yi¹, XING Zheng-hong^{1,2}, CHEN Guo-qiang^{1,2}

(1. Sino-British SIPPR/BK Laboratory Animal LTD., Co, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective To understand the differences on serum monoamine neurotransmitters (5-hydroxytryptamine, norepinephrine, dopamine) in single caged and social group female *macaca fascicularis* and ECG, blood pressure which were associated with the emotion, explored the influence of living environment on the emotion of *macaca fascicularis*. **Methods** Nine female *macaca fascicularis* at the age of 4-6 years old were singly raised in cage at the first 5 months, and group raised in next 5 months. The ECG, blood pressure, norepinephrine (NA), dopamine (DA), 5-hydroxytryptamine (5-HT) were measured, daily facial expressions also were recorded. **Results** During the whole experiment, the indexes of ventricular rate, PR interval, QT interval, serum monoamine neurotransmitter (NA, 5-HT and DA) and diastolic pressure; value were compared between groups difference significant ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Anger and anxiety score in single caged stage were significantly higher than in group phase ($P < 0.05$), but sexual behavior, activity and happiness score were lower ($P < 0.05$). **Conclusion** The *macaca fascicularis* was more suitable for the breeding of group, during long-term single caged feeding, it could have a greater impact on the serum monoamine neurotransmitters and some indicators of ECG, blood pressure, and were prone to a variety of negative emotions.

[Key words] *Macaca fascicularis*; Female; Emotion; Biogenic monoamines; ECG; Blood pressure

三品种实验用小型猪繁殖性能测定

杨李厂¹, 周文兵¹, 丁 隽¹, 周新初², 谢 东¹, 杨伟敏¹

(1. 上海睿智化学研究有限公司, 上海 201203;

2. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240)

[摘要] 目的 选取饲养于上海地区的巴马小型猪、贵州小型猪和版纳小型猪, 分别测定三品种母猪和公猪的繁殖性能。方法 采用场内结合实验室测定的方法, 分别测定初情年龄、初配年龄等母猪繁殖性能指标及性行为年龄、初配年龄等公猪繁殖性能指标。结果用单因素方差分析比较。结果 对比巴马小型猪、贵州小型猪和版纳小型猪的母猪繁殖性能 10 个指标, 贵州小型猪和版纳小型猪的初生窝重和断奶成活率存在显著差异($P<0.05$)。分析三品种的公猪繁殖性能, 群体间性行为年龄存在显著差异($P<0.05$); 三品种初配年龄比较接近; 比较初配年龄和初配体质量, 表明三品种的小型猪在相同初配年龄时, 巴马小型猪个体偏小, 版纳小型猪的体质量最大。结论 系统测定了雌性和雄性巴马小型猪、贵州小型猪和版纳小型猪的繁殖性能, 为实验用小型猪提供了遗传育种工作的基础, 也为小型猪实验动物化提供了背景数据。

[关键词] 巴马小型猪; 贵州小型猪; 版纳小型猪; 繁殖性能

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)01-0050-05

中国现有的小型猪都是培育于较封闭区域的家猪品种, 在工业社会之前便已形成成熟的品种。在南部和西部的山区出现很多的小型猪品种, 每个品种都有特异的外观特征以及其它生物学特性。相比国外的多品种杂交的小型猪, 我国小型猪多是在原产地长期近亲交配形成的, 具有遗传稳定、体型小等特点。2004 年, 国家“十五”科技攻关计划把“中国实验用小型猪资源开发与研究应用”作为重点项目之一, 之后国内许多著名科研院所陆续进行小型猪的驯养繁殖和应用研究, 知名小型猪品种有广西巴马小型猪、贵州小型猪和版纳小型猪^[1],

上海的医药研究水平较高、实验动物使用量 and 研究水平也在国内前列, 1980 年代就开展了小型猪的实验动物化引进。现在这些引进的巴马小型

猪、贵州小型猪和版纳小型猪等品种越来越多应用于医药研究领域。本文测定了饲养于上海地区三品种小型猪的繁殖性能, 并分析其遗传规律。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 实验用巴马小型猪、版纳小型猪由上海市浦东新区老港镇华新特种养殖场 [SCXK(沪)2012-0013] 提供, 种源来自广西原产地和云南原产地。贵州小型猪由上海市浦东新区老港镇华新特种养殖场提供, 上海交通大学农学院从原产地引进并培育。

1.1.2 饲养管理 种猪的饲养管理: 养殖场位于郊区, 远离其他养殖场。母猪猪舍处在上风向, 栏舍内覆盖保温材料, 圈栏由卧息区、采食区和运动场组成。公猪单圈饲养, 设运动场, 保证其充足的运动。

饲料和喂养方法: 猪饲料分种公猪料、种母猪料, 日粮量按体质量的 4%~5% 进行调节, 每日饲喂 2 次, 自由饮水。仔猪在离乳前同母猪单圈进行饲

[收稿日期] 2016-10-13

[基金项目] 上海市实验动物创新行动计划项目 (13140900200)

[作者简介] 杨李厂 (1981-), 男, 硕士, 研究方向: 动物生理/生化。E-mail: lchyang@chempartner.cn

[通讯作者] 杨伟敏, 高级实验师, 研究方向: 实验动物科学与管理。E-mail: wmyang1@chempartner.cn

养, 离乳后仔猪公、母分开, 分圈, 并饲喂仔猪料。

1.2 实验方法

1.2.1 动物选择与记录存档 母猪和公猪都有唯一编号, 然后根据父母系记录, 选择血缘较远, 品系特征明显的个体, 每头猪建立一个档案。在饲养过程中, 和饲养员一起观察个体生长情况、食欲是否正常、是否有外伤和以及其他病患或季节疾病。

1.2.2 繁殖性能测定 母猪繁殖性能指标包括: 初情年龄、初配年龄、发情周期、发情持续时间、妊娠期、离乳日龄、窝产仔数、产活仔数、活仔率和初生窝重。

公猪繁殖性能指标包括: 性行为年龄、初配年龄和初配体质量。

1.2.3 繁殖性状间的遗传相关系数^[2]分析 三品种小型猪母猪繁殖性能数据通过 Excel 整理后, 运用

SPSS16.0 进行相关分析和回归分析, 分析各性状之间的相关关系和回归关系。

1.3 统计分析

三品种小型猪的繁殖性能数据通过 Excel 整理后, 运用 SPSS16.0 软件进行统计分析。用单因素方差分析进行显著性比较, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 母猪繁殖性能

用单因素方差分析两两比较三品种小型猪的繁殖性能, 贵州小型猪和版纳小型猪的窝产仔数和离乳成活率存在显著差异($P<0.05$)。三品种小型猪的初配年龄因为人为控制, 没有进行显著差异比较。

2.2 母猪繁殖性状间遗传相关系数

产活仔数与窝产仔数的相关系数为 0.91($P<0.01$);

表 1 三品种小型猪母猪繁殖性能

Table 1 Reproductive performance of three breeds in female minipigs

性 状	巴马小型猪猪	贵州小型猪	版纳小型猪
初情年龄 /d	138.80 ± 16.67	135.60 ± 165.30	140.80 ± 26.34
初配年龄 /d	167.00 ± 5.61	165.70 ± 9.94	174.50 ± 14.63
发情周期 /d	21.40 ± 0.77	21.80 ± 0.89	21.80 ± 0.79
发情持续时间 /h	73.20 ± 3.82	74.10 ± 2.23	74.00 ± 2.58
妊娠期 /d	113.90 ± 0.88	113.55 ± 0.90	113.70 ± 0.95
窝产仔数 /头	7.50 ± 1.58	8.10 ± 1.37	6.60 ± 1.71 [#]
产活仔数 /头	7.10 ± 1.66	7.60 ± 1.71	5.70 ± 1.83
初生窝重 /kg	4.72 ± 0.93	4.43 ± 2.25	3.97 ± 1.04
离乳成活率 /%	92 ± 11	91 ± 6	85 ± 13 [#]

注: 相同性状, 与巴马小型猪比较, * $P<0.05$; 与贵州小型猪比较, [#] $P<0.05$; $n=10$

产活仔数与初生窝重的相关系数为 0.90($P<0.01$), 回归方程为 $Y1=0.503X1+1.152$; 窝产仔数与初生窝重的相关系数为 0.84($P<0.01$), 回归方程为 $Y1=0.497X2+0.997$; 初生窝重与产活仔数、窝产仔数的回归方程为 $Y1=1.026+0.423X1-0.093X2$; 仔猪出生平均体质量与初生窝重的相关系数为 0.02(表 2)。

贵州小型猪产活仔数与窝产仔数的相关系数为 0.98($P<0.01$); 产活仔数与初生窝重的相关系数为 0.92($P<0.01$), 回归方程为 $Y1=0.750X1-0.850$; 窝产仔数与初生窝重的相关系数为 0.89($P<0.01$), 回归方程为 $Y1=0.860X2-2.080$; 初生窝重与产活仔数、窝产仔数的回归方程为 $Y1=-0.436+0.948X1-0.238X2$; 仔猪出生平均体质量与初生窝重的相关系数为 0.53(表 3)。

表 2 巴马小型猪母猪繁殖性状间遗传相关系数

Table 2 Genetic correlation coefficient analysis of reproductive traits in female Bama minipig

性状	产活仔数 (X1)	窝产仔数 (X2)	初生窝重 (Y1)	仔猪出生平均 体质量(Y2)
X1	1.00	0.91	0.90	-0.17
X2	-	1.00	0.84	-0.44
Y1	-	-	1.00	0.02
Y2	-	-	-	1.00

版纳小型猪产活仔数与窝产仔数的相关系数为 0.90($P<0.01$); 产活仔数与初生窝重间的相关系数为 -0.44, 回归方程为 $Y1=0.534X1+0.926$; 窝产仔数与初生窝重间的相关系数为 0.93($P<0.01$), 回归方程为 $Y1=0.519X2+0.665$; 初生窝重与产活仔数、窝产

表3 贵州小型猪母猪繁殖性状间遗传相关系数

Table 3 Genetic correlation coefficient analysis of reproductive traits in female Guizhou minipig

性状	产活仔数 (X1)	窝产仔数 (X2)	初生窝重 (Y1)	仔猪出生平均 体质量(Y2)
X1	1.00	0.98	0.92	0.34
X2	-	1.00	0.89	0.36
Y1	-	-	1.00	0.53
Y2	-	-	-	1.00

仔数的回归方程为 $Y1=0.601+0.296X1+0.258X2$; 仔猪出生平均体质量与初生窝重的相关系数为 -0.39 (表4)。

表4 版纳小型猪母猪繁殖性状间遗传相关系数

Table 4 Genetic correlation coefficient analysis of reproductive traits in female Banna minipig

性状	产活仔数 (X1)	窝产仔数 (X2)	初生窝重 (Y1)	仔猪出生平均 体质量(Y2)
X1	1.00	0.90	0.93	-0.44
X2	-	1.00	0.90	-0.53
Y1	-	-	1.00	-0.39
Y2	-	-	-	1.00

2.3 公猪繁殖性能

单因素方差分析三品种公猪繁殖性能, 群体间性行为年龄存在显著差异($P<0.05$)。统计数据显示三品种初配年龄比较接近; 比较初配年龄和初配体质量, 表明三品种小型猪在相同初配年龄时, 巴马小型猪个体偏小, 版纳小型猪体质量最大(表5)。

3 讨论

小型猪目前在欧洲应用最广泛, 如哥廷根小型猪是国际公认的模式动物之一。哥廷根小型猪经过杂交、回交等繁育手段, 历经多年培育出著名的白色系和有色系。与国外小型猪比较, 中国小型猪品种多样, 而且各品种的种源单一, 遗传和

表型更加稳定。本文选择的三品种小型猪是上海以及周边地区使用比较广泛的小型猪。研究小型猪的繁殖性能, 便于更好优化小型猪的标准化饲养, 有利于繁殖实验的设计。

本实验结果显示, 巴马小型猪繁殖性状与国内文献报道^[3,4]结果相近。连林生等^[5]报道小型猪存在初产窝产仔猪数较少、经产母猪产仔数增加的现象, 本实验版纳小型猪产仔数与之相近。广东省医学实验动物中心联合多家单位^[6], 选择广西融水县小黑猪进行培育繁殖, 结果表明母猪繁殖性能接近于国内传统小型猪。中国也进行了品种间的杂交优化^[7], 如贵州大学以贵州从江香猪为母本, 中国农大小型猪1系为父本进行杂交, 杂交猪平均窝产仔数没有减少, 但体质量、体长均比贵州从江香猪低。上述研究证明, 国内小型猪母猪繁殖性能比较接近, 借助品种间优化技术手段可以有针对性地筛选和优化种源。本文所选饲养于上海地区的三品种小型猪窝产仔数略高于国外文献报道, 性成熟时间与国外小型猪测定结果接近^[8-10]。

文献报道^[2,3], 活产仔数与窝产仔数、初生窝重之间存在较高的表型相关, 离乳窝重与活产仔数、新生个体质量、离乳仔数这些性状间有显著的遗传相关性, 产活仔数与离乳体质量呈负相关^[11], 产活仔数应作为选种的另一项重要指标。根据初生个体均重、离乳窝重与其它窝性状的相关性分析, 表明母猪的产仔数越多, 出现发育较差的个体比例增加, 这与小型猪的产仔特性的比较结果一致^[12]。

三品种小型猪母猪繁殖性能的回归分析结果反映了巴马小型猪和贵州小型猪初生窝重与产活仔数、窝产仔数有着真实的回归关系, 巴马、贵州和版纳仔猪出生平均体质量与产活仔数、窝产仔数的相关系数不显著($P>0.05$), 仔猪出生平均体质量与初生窝重的相关系数不显著($P>0.05$); 版纳小型猪各性状之间存在正相关和负相关, 特别是产活仔数与初生窝重间呈负相关, 这一点与巴马小型猪和贵州小型猪不相同, 可能由个体体质量差异大或是不同窝体质量差异较大引起。

根据窝产活仔数与初生体质量相关性, 在选育过程中要选择初产窝产仔数多的母猪作为种猪, 这样既能提高繁殖性能, 又能使动物矮小化, 满足实验动物化、小型化和高产化的要求。小型猪实验动物标准化研究过程是一个繁琐而漫长的过

表5 三品种小型猪公猪繁殖性能

Table 5 Reproductive performance of three breeds in male minipigs

性状	性行为年龄/d	初配年龄/d	初配体质量/kg
巴马	91.30 ± 12.89*	190.60 ± 17.49	26.72 ± 3.38
贵州	86.60 ± 18.09*	187.70 ± 11.41	29.59 ± 1.38
版纳	105.40 ± 14.39*	180.40 ± 26.36	29.88 ± 4.56

注: 相同性状, 三品种小型猪两两比较, * $P<0.05$

程, 在选育与实验动物化期间既要做好环境和营养、疾病的控制, 又要从数量遗传学和分子遗传学层面上严格做好种群的选育工作。

猪窝产仔数是小型猪繁殖性能的一个重要指标, 但影响因素很多。众多研究表明^[13], 许多品种猪春季窝产仔数显著地高于冬季和夏季; 雌激素受体(ESR)不同基因型对窝平均产仔数也有影响。此外不同胎次、离乳时间等因素都会影响产仔数量和产仔质量。配种时公猪性状、配种方式以及妊娠期长短及叶酸与生物素的补充等方面对母猪繁殖性状都有影响^[14], 热应激会造成繁殖性能下降, 日粮中添加适量生物素, 窝产仔猪数和离乳仔猪数都可以提高超过 8%, 离乳至发情间隔时间缩短, 也可以提高受胎率及缩短离乳至发情间隔。

本实验巴马小型猪离乳日龄为 41 d 左右, 低于我国仔猪的平均离乳日龄 (45~60 d), 表明猪的离乳日龄仍可以提前; 就仔猪个体质量而言, 与卢晟盛等^[4]报道的巴马小型猪仔猪初生重一致, 而初生重与西藏小型猪无明显差异^[15]。

中国小型猪资源开发和应用全面发展, 研究也不再仅仅局限于传统研究领域, 现在基因技术也广泛应用于小型猪, 如基因定向敲除、基因打靶、转基因猪疾病模型等, 但小型猪的选种和定向培育依然是基础和重点。本文通过对三品种小型猪的繁殖性状的测定, 为小型猪的选种、鉴定提供背景资料, 也为实行标准化饲养提供参考依据。

参考文献:

- [1] 王桂花, 尹晓敏, 孙霞国, 等. 国内外小型猪资源概况[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(2):71-73.
- [2] 邵军伟, 李新建, 吕刚, 等. 猪窝产活仔数与初生窝重、断奶窝重及母猪乳头数的相关分析[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(5):283-285.
- [3] 段超伟. 实验用巴马香猪繁殖性能与仔猪生长性能测定[D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [4] 卢晟盛, 罗龙兴, 胡翠娥, 等. 巴马小型猪雌猪发情和产仔特性[J]. 动物学杂志, 2007, 42(2):81-86.
- [5] 连林生, 王鹤云, 徐家珍, 等. 版纳微型猪的生物学特性[J]. 上海实验动物科学, 1993, 13(4):185-191.
- [6] 施赫赫, 陈淦, 刘科, 等. 融水小型猪的实验动物化系列研究概述[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(3):86-89.
- [7] 陈明飞, 许厚强, 陈伟, 等. 贵州从江香猪与中国农大小型猪 I 系的杂交性能[J]. 贵州农业科学, 2015, 43(6):1120-122.
- [8] Bode G, Clausen P, Gervais F, et al. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology [J]. J Pharmacol Toxicol Methods, 2010, 62(3):196-220.
- [9] Alfonso L, Noguera JL, Babot D, et al. Estimates of genetics parameters for litter size at different parities in pigs [J]. Live Prod Sci, 1997, 47(2):149-156.
- [10] Perez-Enciso M, Gianola D. Estimates of genetics parameters for litter size in six strains of iberian pigs [J]. Lives Prod Sci, 1992, 32(32):283-293.
- [11] 张毅, 向钊, 朱丹, 等. 荣昌猪繁殖性状的研究[J]. 中国畜牧杂志, 2004, 40(5):52-54.
- [12] 王爱德, 甘世祥, 冯书堂, 等. 丹麦Gottingen小型猪科学考察报告[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(1):47.
- [13] 韩艳云. 影响猪产活仔数的因素及种猪选择技术的探讨[D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [14] 杨群, 谢金防, 韦启鹏, 等. 影响母猪产仔数因素的研究进展[J]. 中国畜牧业, 2009, 26(12):5-6.
- [15] 任丽华. 西藏小型猪实验动物化的初步研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2006:19-20.

Reproductive Performance of Three Breeds of Minipigs

YANG Li-chang¹, ZHOU Wen-bing¹, DING Jun¹, ZHOU Xin-chu², XIE Dong¹, YANG Wei-min¹

(1. Shanghai Chempartner Co. Ltd, Shanghai 201203, China

2. School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China)

[Abstract] **Objective** To determine the reproductive performance of Bama minipigs, Guizhou minipigs and Banna minipigs reared in Shanghai. **Method** The data of reproductive performance of Bama minipigs, Guizhou minipigs and Banna minipigs such as puberty age, sexual mature age, breeding age, and so on were combined from farm and laboratory, and then compared the results with one-way ANOVA among three breeds. **Result** Among ten reproductive parameters of female Bama minipigs, Guizhou minipigs and Banna minipigs, litter weight at birth and survival rate at weaning between Guizhou minipigs and Banna minipigs were significant different ($P<0.05$). Sexual mature age among the three breeds of minipigs (Bama, Guizhou and Banna minipigs) were significant different ($P<0.05$); breeding age among the three breeds of minipigs were close, and average body weight at breeding of Bama minipigs was lightest and Bana minipigs was heaviest. **Conclusion** Determination of the reproductive performance of Bama minipigs, Guizhou minipigs, and Banna minipigs will provide the basis data for genetic breeding of minipigs and background data for laboratory animals industrializing.

[Key words] Bama minipigs; Guizhou minipigs; Banna minipigs; Reproductive performance

新疆子午沙鼠尿液采集方法的建立 及尿液部分生化指标的测定

徐艺玫¹, 史 深¹, 罗 芸¹, 燕顺生¹, 赵红琼², 廖力夫¹

(1. 新疆实验动物研究中心, 乌鲁木齐 830002; 2. 新疆农业大学, 乌鲁木齐 830002)

[摘要] 目的 建立子午沙鼠尿液采集方法, 测定分析野生子午沙鼠尿液部分生化和电解质指标, 并与SD大鼠尿液生化指标进行比较。方法 在实验室内适应性饲养野生子午沙鼠3个月, 采用自制尿液收集装置采集40只子午沙鼠和40只SD大鼠24 h尿液, 用于尿液部分生化与电解质指标测定。结果 自制装置可成功收集子午沙鼠和SD大鼠24 h尿液。子午沙鼠24 h的尿液量为3~3.5 mL, 1.5月龄SD大鼠为8~10 mL。肉眼观察, 子午沙鼠和SD大鼠的尿液多为黄色、透明、有氨味。子午沙鼠尿液pH为 7.80 ± 0.40 ; 尿比重为 1.011 ± 0.005 ; SD大鼠尿液相应数值为 7.12 ± 0.03 和 1.018 ± 0.003 。子午沙鼠和SD大鼠的生化指标大多为阴性, 但有个别动物样本有不同程度的阳性。子午沙鼠尿液电解质指标在捕获地区间和性别间均未见明显差异($P>0.05$)。结论 本文建立的尿液采集方法和测定结果为子午沙鼠实验动物化和相关研究提供基础资料。**[关键词]** 子午沙鼠; 尿液; 生化检测; 电解质; 尿液收集笼

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)01-0055-04

子午沙鼠(*Meriones meridianus* Pallas, 1773)隶属啮齿目(Rodentia), 仓鼠科(Cricetidae), 沙鼠亚科(Gerbillinae), 沙鼠属(*Meriones*)小型啮齿动物, 分布于欧亚大陆中部荒漠、半荒漠区, 是沙鼠种类中分布最广的鼠种之一^[1], 亚种分类不下十种^[2], 国外主要分布于蒙古、哈萨克斯坦、塔吉克斯坦、伊朗和阿富汗等中亚国家, 向西一直可达里海沿岸地区。国内主要分布于内蒙古锡林郭勒的浑善达克沙地以西, 河北西北部, 山西中北部, 河南西北部, 陕西秦岭以北, 甘肃和宁夏全境, 青海东北部和柴达木盆地, 以及新疆的全境^[3]。在自然界, 子午沙鼠可传播鼠疫、黑热病、李斯特菌病、蜱传回归热和布鲁氏菌病等疾病。目前实验室繁殖的子午沙鼠已人工驯化20多年, 并成功开展多种疾病的动物模型实验^[4-6]。子午沙鼠栖息于

干旱荒漠生活环境, 因水源稀少, 所需水主要靠食物和代谢水补充, 关于其尿液生化指标背景报道很少。本文选取在吐鲁番(叶氏亚种, *M. meridianus*. Jie Wang 1964)^[1,7]和轮台(叶城亚种 *M. m. cryptorhinus* Blanford 1875)^[8,9]地区捕获的子午沙鼠, 收集尿液进行检测, 为子午沙鼠的实验动物化和生物学研究提供基础资料和依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

1.5月龄清洁级SD大鼠40只, 雌雄各半, 雌性体质量100~120 g, 雄性130~150 g, 来源于新疆实验动物研究中心[SCXK(新)2011-0001]; 捕自新疆吐鲁番和轮台地区的1.5月龄子午沙鼠40只, 雌雄各半, 雌性体质量60~80 g, 雄性80~100 g, 均饲养于新疆实验动物研究中心实验设施内[SYXK(新)2011-0002], 子午沙鼠适应性饲养3个月用于实验。子午沙鼠饲养室环境温度17~26℃, 相对湿度30%~65%, 明12 h: 暗12 h, 使用自动换

[收稿日期] 2016-10-27

[项目基金] 国家自然科学基金(项目编号: 31460579)

[作者简介] 徐艺玫(1973-), 女, 硕士, 副研究员, 研究方向: 实验动物管理与动物模型。E-mail: xyymeimei@163.com

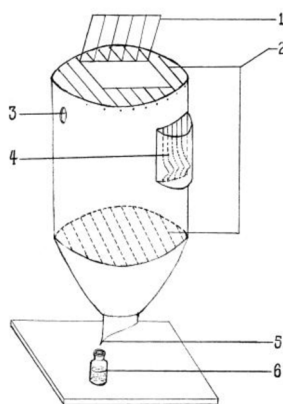
气扇全天换气, 每换气 30 min 停 10 min, 饲养室定期清扫消毒。

1.2 主要仪器和试剂

爱科来 AUTION11AE4020 尿样分析仪(日本京都, 日本), IMS-972 Popular 电解质分析仪(深圳希莱恒, 中国), 尿液检测用试剂, 批次代码为 DZ009018, 爱科来国际贸易(上海)有限公司生产。

1.4 尿液收集笼的制作

① 500 mL 圆形塑料水瓶去底后倒置, 瓶颈处和顶部加装不锈钢丝网(图 1-2), 顶部不锈钢丝网开笼盖(图 1-1)。②瓶身开小孔(直径 10 mm), 用于放置饮水瓶(图 1-3)。另一侧瓶身开方形小窗(40 mm × 40 mm), 小窗加不锈钢丝网, 外部加装饲料斗(图 1-4)。③瓶口切成斜面, 将斜面尖端用酒精灯烤热, 塑成鸟喙状(图 1-5), 下方放置尿液收集瓶(10 mL)(图 1-6), 该装置位于图中 4 的对面。



1. 笼盖; 2. 铁丝网; 3. 饮水瓶孔; 4. 饲料斗; 5. 尿液收集口; 6. 尿液收集瓶

图 1 尿液收集装置示意图

1.5 子午沙鼠尿液的收集

将子午沙鼠和 SD 大鼠于当日 18:00 放入自制尿液收集装置中, 饲喂饲料和清洁饮用水。在装置下方鸟喙状末端处放置玻璃瓶收集尿液。在同样的环境条件下, 放置称量好 5 mL 水的玻璃瓶, 用来测量当前环境中水分蒸发量。第二日 18:00 收集尿液, 用移液枪移入 EP 管, 进行新鲜尿液检测。

1.6 尿常规的检测

用尿液分析仪检测尿胆原、胆红素、酮体、潜血、蛋白质、亚硝酸盐、白细胞、葡萄糖、比重、pH 值(定性和半定量)。

1.7 尿电解质的检测

用电质分析仪检测尿液 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 。

1.8 统计学处理

用 SPSS20.0 软件对其进行统计学处理, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 尿液收集装置设计原理和接尿效果

塑料水瓶垂直放置时瓶壁与下瓶口角度小, 粪便和饲料残渣直接掉入放置于下瓶口下的培养皿中; 鸟喙状末端位于下瓶口外缘, 尿液延瓶壁顺着下瓶口边缘集中到鸟喙状末端流入接样瓶, 解决了尿液与粪便的完全分离, 可以收集到无污染的尿液。

该尿液收集装置设计的饲料口和饮水瓶口, 解决了实验期间动物饮水和饲料的给予。图中装置的窗口 3 是给水口, 窗口 4 的上下两边每隔 1 cm 装一根直径为 0.2 cm 的 L 型不锈钢铁丝, 外包不锈钢铁皮形成 U 型给料窗口, 使得小鼠啃食的饲料残渣直接落入培养皿, 不会掉入收集尿液瓶中。灌满水的饮水瓶从尿液收集装置的上部侧面水平插入, 既可减少重力作用防止水滴落下, 也可避免饮水下落稀释尿液, 从而保证收集到新鲜干净的子午沙鼠尿液。

2.2 尿液感官性状

肉眼观察, 子午沙鼠和 SD 大鼠的尿液多为黄色、透明、有氨味, 检测样品中, 子午沙鼠显示黄色的共 32 份, 淡黄、黄、深黄占总样品量的 80%, 并澄清, 在透明度中占 77.5%; SD 大鼠尿液样品中, 黄色共 35 份, 淡黄、黄、深黄共占总样品量的 87.5%, 澄清, 在透明度中占 80%。

2.3 尿液采集量

将子午沙鼠和 SD 大鼠于当日 18:00 时放入自制尿液代谢笼中, 饲喂全价饲料和清洁饮用水。并于第二日 18:00 收集尿液, 用移液枪移入 EP 管, 同时, 称量放置于相同环境下玻璃瓶内水的剩余量, 就可以测出在当前环境下尿液水分的蒸发量, 再进行新鲜尿液检测。SD 大鼠和子午沙鼠 24 h 尿量分别为 8~10 mL 和 3~3.5 mL。

2.4 尿液常规检测结果

生化检测结果显示, 子午沙鼠的 pH 为 7.80 ± 0.40 ; 尿比重为 1.011 ± 0.005 ; SD 大鼠的 pH 值为 7.12 ± 0.03 ; 尿比重为 1.018 ± 0.003 ; 子午沙鼠和 SD 大鼠

的多数生化指标呈阴性,如子午沙鼠的尿白细胞、尿胆原、尿胆红素和SD大鼠的尿白细胞、亚硝酸盐、尿胆原、葡萄糖均为阴性结果;但有个别动物样本有不同程度的弱阳性,如子午沙鼠的尿蛋白、亚硝酸盐、尿红细胞、葡萄糖和酮体为弱阳性,但阴性结果占总数的大多数,分别为77.5%、97.5%、92.5%、82.5%、80.0%;SD大鼠的尿蛋白、尿红

细胞、尿胆红素和酮体为弱阳性结果,阴性结果占总样本数的大多数,分别为77.5%、90.0%、97.5%、90.0%。

2.5 尿电解质检测结果

吐鲁番和轮台捕获的子午沙鼠雄、雌尿液中的K⁺、Na⁺、Cl⁻检测结果见表1,两地各自的雌雄鼠尿液电解质相比未见明显差异(P>0.05)(表1)。

表 1 子午沙鼠尿电解质指标
Table 1 urinary electrolyte indicators in Meriones meridianus

捕获地区	n	性别	K ⁺	Na ⁺	mmol/L Cl ⁻
吐鲁番	9	♂	68.78 ± 5.87	79.25 ± 20.92	121.75 ± 26.85
	10	♀	63.34 ± 9.02	68.78 ± 17.05	112.32 ± 21.58
轮台	10	♂	72.82 ± 8.05	80.58 ± 19.48	141.61 ± 22.79
	11	♀	65.48 ± 11.95	88.77 ± 14.76	123.51 ± 26.48

3 讨论

子午沙鼠属典型耐干旱啮齿类动物,对干旱环境具有较强的适应性。长期栖息于荒漠或半荒漠区的野生子午沙鼠,很少饮水,偶尔摄取露水,排尿少。作者曾尝试采用刺激排尿法收集尿液,但因尿量太少,无法满足尿生化检测需求;手术法收集尿液造成伤害,影响生产繁殖;塑料薄膜法易造成尿液、粪便和食物的污染^[10-12]。市售小鼠代谢笼体积大,子午沙鼠尿液浓度高、尿液少,不适用于子午沙鼠的尿液收集。故作者自制了适合子午沙鼠的尿液收集装置。本文利用自制装置收集的大鼠尿液测定结果与已报道的大鼠尿液测定结果相近^[13],表明该尿液收集装置可以满足尿量少少的动物尿液收集。

该自制尿液收集装置具有以下优势:①能自动分离粪尿,避免粪尿污染;②收集笼体积小,适合排尿量小的鼠类,如耐干旱的子午沙鼠和灰仓鼠等;③收集尿液装置,均为表面光滑材料制成,易于清洗并重复使用;④体积小,质量轻,易于拆装、携带和搬动;⑤结构简单,材料普遍,可自行制作,易于推广。

动物尿液的采集手段,动物品种、年龄、性别等自身因素,都会影响尿液指标的检测结果。本实验设计已考虑各个方面的因素。选取动物样本时尽量挑选体质量接近的个体作为测定对象。子午

沙鼠的尿液检测结果显示,其K⁺和Na⁺略低于SD大鼠,而Cl⁻高于SD大鼠。表明子午沙鼠对钾钠的回收高,具有耐干旱的习性,可用于耐干旱,尿浓缩等的研究。此外,子午沙鼠的草食性、对包虫病、病毒性肝炎的易感性等特性亦可用于相关研究。

实验动物生物学特性数据化表达是实验动物标准化的重要内容之一,也是实验动物资源建设和推动资源共享的基础性工作^[14]。尿常规和尿电解质的基础资料是每种动物进行动物实验的重要基础指标和科学依据。本文对子午沙鼠尿常规指标和电解质指标的测定为清洁级子午沙鼠种群的建立和相关研究奠定了基础。

参考文献:

[1] 张荣祖. 中国哺乳动物分布 [M]. 北京: 中国林业出版社, 1997:219-221.

[2] 王延正. 陕西啮齿动物志[M]. 西安: 陕西师范大学出版社, 1992:140-143.

[3] 马勇. 新疆北部地啮齿动物地理分布的研究[J]. 动物学报, 1998, 27(2):180-187.

[4] 赵素元, 廖力夫, 皱林椒. 子午沙鼠感染戊型肝炎病毒传代的实验研究[J]. 中国媒介生物学及其控制杂志, 2001, 12 (3):215-217.

[5] 伊斯拉音, 焦伟, 廖力夫, 等. 子午沙鼠和灰仓鼠实验感染多房棘球蚴的比较观察[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂

- 志, 1998, 16(2):130-132.
- [6] 伊斯拉音, 焦伟, 廖力夫, 等. 子午沙鼠和草原兔尾鼠实验感染细粒棘球蚴和多房棘球蚴的实验研究[J]. 地方病通报, 2000, 15(3):71-74.
- [7] 廖力夫, 黎唯. 温度光照条件对灰仓鼠和子午沙鼠的繁殖影响[J]. 上海实验动物科学, 1999, 19(2):27-29.
- [8] 蒋卫, 郑强, 张兰英. 人工饲养条件下子午沙鼠的繁殖特征[J]. 兽类学报, 1995, 15(1):75-76.
- [9] 孟雁, 关崇谦, 周宝忠. 子午沙鼠实验室人工饲养繁殖初探[J]. 中国实验动物学杂志, 1991, 3(3-4):284.
- [10] 包伦. 一种简易用于同位素示踪和药代动力学教学的大鼠代谢笼制作[J]. 科技资讯, 2005(26):164.
- [11] Kurien BT, Everds NE, Scofield RH. Experimental animal urine collection: a review[J]. Lab Anim, 2004, 38(4):333-361.
- [12] White WA. A technique for urine collection from anesthetized male rats[J]. Lab Anim Sci, 1971, 21(5):401-402.
- [13] 田嶋嘉雄. 实验动物的生物学特性资料[M]. 东京: 株式会社出版, 1989:204.
- [14] 贺争鸣, 邢瑞昌. 浅谈我国开展动物实验替代方法研究的保障措施[J]. 实验动物科学与管理, 2005, 22(2):61-64.

Establishment of Urine Collection Method and Determination of Some Biochemical Indexes for *Meriones Meridianus* in Xinjiang

XU Yi-mei¹, SHI Shen¹, LUO Yun¹, YAN Shun-sheng¹, ZHAO Hong-qiong², LIAO Li-fu¹

(1. Xinjiang Laboratory Animals Research Center, Xinjiang 830002, China;

2. Xinjiang Agricultural University, Xinjiang 830002, China)

[Abstract] Objective To establish the method for urine collection, detect and analyses the urine biochemical and electrolyte index of *Meriones meridianus* in Xinjiang area, and compare the index with SD rats. **Methods** Wild *Meriones meridianus* was reared in the laboratory for three months, to adapt to the laboratory artificial rearing conditions. The urine of selected 40 *Meriones meridianus* and 40 clean grade SD rats was collected using simple urine collection cage to analyze urine biochemical parameters and electrolyte index. **Results** The amount of urine of *Meriones meridianus* and 1.5 months aged SD rat in 24h was 3-3.5 mL and 8-10 mL respectively. The urine of *Meriones meridianus* and SD rat's was yellow, transparent, odor of ammonia by visual observation. The pH of *Meriones meridianus*'s urine was 7.80 ± 0.40 , urine specific gravity was 1.011 ± 0.005 . The pH of SD rats's urine was 7.12 ± 0.03 , urine specific gravity was 1.018 ± 0.003 . The results of biochemical test showed that the most of *Meriones meridianus* and SD rats are negative, but there were individual animal samples with different degrees of positive. All urine electrolytes showed no significant difference between the negative index of *Meriones meridianus* ($P>0.05$), the urine electrolytes showed no significant difference between male and female ($P>0.05$). **Conclusions** The results provided basic biological information and research on *Meriones meridianus* as experimental animal.

[Key words] *Meriones meridianus*; Urine; Biochemical detection; Electrolyte; Urine collecting cage

外固定架制作兔股骨延迟愈合模型

孔庆柱, 杨佳宁, 王贺龙, 赵胜军, 孔素红, 赵佳林, 金 宇

(承德医学院附属医院创伤小儿骨科, 承德 067000)

[摘要] 目的 使用外固定架制作兔股骨骨折延迟愈合模型。方法 将72只新西兰白兔随机分成对照组, 实验A组、B组, 将所有兔左侧股骨中段截骨, 以微型可调节外固定架为固定装置, 实验A组及B组去除10 mm皮质骨, 同时去除内外骨膜及骨髓, 实验A组保持骨折断端1 mm间隙, 实验B组使用骨蜡封堵骨折断端, 然后保持骨折断端接触。对照组截断骨皮质后即行外固定, 不去除骨膜及骨髓。术后通过大体观察、影像学观察及组织学方法观察截骨端的愈合情况。结果 实验A组及B组愈合时间均为12周, 对照组愈合时间为4周。结论 该实验建立的兔股骨骨折延迟愈合模型具有延迟愈合的X线及病理特征, 说明该模型制作合理、可靠。

[关键词] 模型; 动物; 外固定器; 新西兰白兔; 股骨; 骨折; 不愈合

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)01-0059-05

众所周知, 骨折最常见的并发症是骨折延迟愈合及不愈合^[1], 因此, 骨折延迟愈合和不愈合也就成了骨科的热点问题, 但仍有很多问题未能解决。在临床上, 骨折延迟愈合是骨折不愈合的前期表现, 很多骨折延迟愈合病人因未及时处理而使病情进展成为骨折不愈合。根据李冀等^[2]调查, 骨折不愈合在骨折术后并发症中发生率高达10%。

骨折延迟愈合的原因不仅是最初的高能量创伤所致的骨与血管的损伤, 骨折的治疗方式也是其中之一^[3]。虽然目前对骨折的治疗技术水平越来越高, 但骨折延迟愈合的治疗却仍是一个棘手的难题。而不能及时处理骨折延迟愈合, 则可能使其发展成为更为棘手的骨折不愈合。因此, 骨折延迟愈合的积极治疗能有效地减少骨折不愈合的发生。

目前关于骨折不愈合的研究较多, 而关于骨折延迟愈合的研究却很少^[4]。关于利用兔制作骨折不愈合模型的研究相对较多, 但骨折延迟愈合模型的研究却少之又少。本实验拟应用单边可调外固定

架, 制作新西兰白兔股骨骨折延迟愈合模型, 为骨折延迟愈合建立一个客观的动物模型, 为临床治疗提供实验支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

4~6月龄普通级新西兰白兔72只, 体质量1.5~2.5 kg, 由承德医学院实验动物中心提供[SCXK(冀)2015-0100], 饲养于清洁级环境下[SYXK(冀)20014-0012]。将所有实验动物进行编号, 使用随机数字法将兔分为实验A组、B组及对照组, 每组24只。

1.2 模型建立方法

参照文献^[5-7]方法制作兔股骨骨折延迟愈合模型。以兔左侧后肢为术侧, 左大腿外侧为术区, 使用电动剃毛器予术区剃毛。术前半小时内肌注青霉素40万单位预防感染。使用体积分数3%戊巴比妥钠按照1.0 mg/kg的剂量注入耳缘静脉进行麻醉, 实验兔取左侧卧位固定于兔台上, 保持其呼吸通畅, 使用0.5%碘伏予术区消毒, 常规铺无菌单。取兔大腿中部外侧纵形切口, 逐层分离软组织, 最大程度避免损伤软组织, 于股外侧肌和股后肌之间的肌间隔钝性分离, 充分暴露兔股骨干。分别

[收稿日期] 2016-07-22

[基金项目] 承德市科技支撑计划项目(201422036)

[作者简介] 孔庆柱, 男, 硕士, 主治医师。

E-mail: kongqingzhu0314@163.com

[通讯作者] 金 宇, 男, 硕士, 主任医师。

E-mail: 792027135@qq.com

于股骨远端及近端平行放置两枚1.5 mm外固定架螺钉,然后安装外固定架(图1左),确保外固定架固定牢固。用线锯在股骨中段截骨,实验A组去除10 mm皮质骨(图1中),同时去除内外骨膜及骨髓,去除后调节外固定架,保持骨折断端1 mm间隙,骨折断端不用骨蜡封堵;实验B组去除10 mm皮质骨,同时去除内外骨膜及骨髓,去除后将骨折断端使用骨蜡封堵,然后调节外固定架,保持骨折断端接触;对照组截骨后不去除骨膜及骨髓,直接外固定架固定。截骨过程中反复用生理盐水冲洗截骨处,避免截骨周围骨膜及软组织因线锯截骨产热而受损。然后彻底止血,用生理盐水注射液及5%碘伏消毒液反复冲洗手术伤口后缝合,包扎伤口(图1右)。于清洁级环境下分笼饲养。术后每日肌肉注射青霉素40万单位,连续3 d,并每日2次用5%碘伏消毒液消毒伤口预防感染。

1.3 模型评价

分别于术后4周、8周、12周对各组动物行X线检查,并分别于4周、8周、12周处死8只兔,截取骨折断端骨痂软组织,取材包括骨折双侧正常骨端0.3 cm,行常规脱钙、脱水、透明及石蜡包埋,5 μ m连续切片,HE染色,于20 $\times$ 20倍光学显微镜下进行组织学观察。

2 结果

2.1 大体观察

各组兔术后均可自由活动,3 d后恢复术前状态,步态无异常。实验期间,全部兔生长均正常,外固定架固定牢固。

2.2 X线检查

术后4周对照组兔骨折均愈合(图2A)。实验A组及B组兔均可见清晰骨折线(图2B、图2C)。8周时实验A组及B组兔骨折线模糊,可见较多骨痂(图2D、图2E)。12周除实验B组1只兔未愈合外,其余兔均愈合(图2F、图2G),各组总体愈合率没有差异。

2.3 组织学检查

术后4周,对照组兔可见骨折断端连接良好(图3A),实验A组及B组均为纤维瘢痕组织(图3B、图3C);术后8周,实验A组及B组可见骨痂形成,软骨细胞向成骨细胞转化(图3D、图3E)。术后12周

实验A组及B组可见骨折连接良好,骨折愈合(图3F、图3G)。

3 讨论

骨折愈合是一个复杂而连续的过程,分为三个阶段,分别为:血肿机化演进期;原始骨痂形成期;骨痂改造塑形期^[8]。尽管骨折的愈合能力很强,但骨折不愈合在骨折术后并发症中发生率仍高达10%^[2]。而骨折不愈合有一大部分的前期表现为延迟愈合,若骨折延迟愈合不及时处理则会导致骨折不愈合的发生。因此,骨折延迟愈合的治疗对于避免骨折愈合的发生也至关重要。

骨折的愈合时间一般为3个月,超过3个月未愈合则为延迟愈合。但该标准为人类愈合标准,通过对照组兔可得出兔骨折正常愈合时间为4周。

影响骨折愈合的因素有很多,如年龄、生活习惯、骨折类型、手术方式等。某一因素或者某几种因素都可能导致骨折的延迟愈合或不愈合。目前骨折延迟愈合的治疗方式分为手术治疗及非手术治疗^[9]。但无论哪种治疗方式都需要大量的前期临床分析及动物实验提供理论支持才能应用于临床。因此,一种客观的动物模型的建立尤为重要。

目前关于骨不连模型的建立研究很多^[10-12],但骨折延迟愈合模型的研究却很少。Brownlow等^[13]将新西兰长耳大白兔的胫骨截骨,彻底清除胫骨干长度的骨折断端骨膜及髓腔内组织,用外固定架固定骨折断端,同时调节外固定架使骨折断端保持2 mm的间隙。术后第8周行X线及病理学检查,可见大量瘢痕组织,符合萎缩性骨不连的表现。Eckardt等^[14]则将外固定架改为了内固定钢板,也成功建立了骨不连的模型。本实验是对Brownlow等方法的改进,同时实验B组采用骨蜡封堵断端,在骨蜡吸收之前也可延缓骨折愈合。

本实验的创新点在于选用兔股骨使用外固定方式造模。兔股骨最主要研究应用方向是以兔股骨头制作股骨头坏死模型,而以股骨作为研究骨折的部位较少。本研究以股骨为骨折造模部位,主要考虑股骨长度最长且骨皮质较厚,而且与胫腓骨共同作为兔的主要承重骨。尺桡骨及胫腓骨长度较短,外固定架螺钉之间距离无法掌握,而且因上述四个部位骨的皮质骨较薄,放置螺钉时较股骨更易劈



图 1 固定股骨所用外固定架(左)、截取后股骨(中)及骨折不愈合模型兔(右)

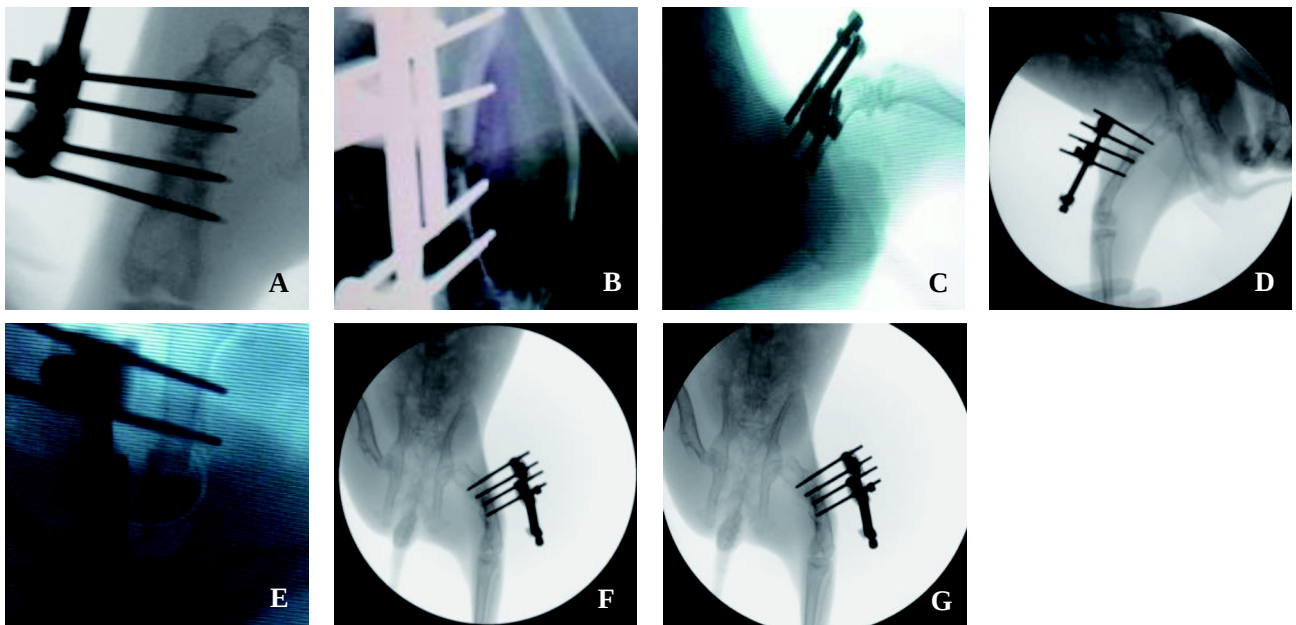
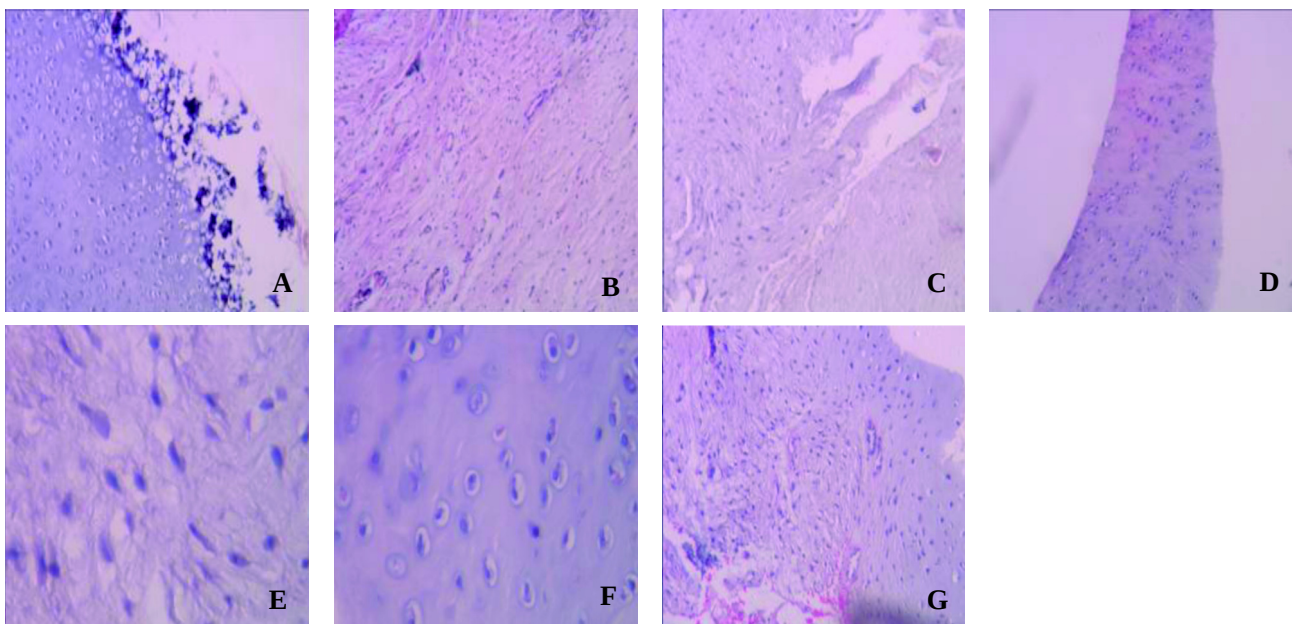


图 2 兔股骨截骨后从断端明显骨折线到骨折线模糊骨痂形成再到最后的骨性愈



分别经历了从大量纤维、软骨+骨纤维、软骨细胞, 到最后的软骨细胞和成骨细胞共存的 4 个阶段

图 3 兔骨折断端骨痂软组织观察

裂。目前动物骨折实验的内固定方式主要有采用克氏针进行髓内固定、微型钢板进行内固定以及外固定架进行外固定三种。髓内固定和钢板内固定的抗旋转能力比较差,而实验动物无法制动,因此内固定可能会因实验动物自由活动产生的旋转力导致内固定失效,同时由于内固定的抗旋转能力差而导致骨折断端旋转微动造成局部血运受到破坏,使实验的干扰因素增多^[15-17]。本研究采用外固定方式,外固定架的螺钉穿透股骨的层皮质,较内固定有更强的抗旋转力,同时也可牢固固定,因此对局部血运影响不大,而且只固定局部,不影响关节,实验动物可以自由活动。

本实验的不足之处: 1)骨折愈合影响因素有年龄、力学因素、局部血运是否丰富及内分泌等,同时临床上骨折有粉碎性、螺旋形、横行骨折等多种,本实验仅从兔股骨的横行骨折造模进行实验研究,力求在可控性应力与微动作用下证明该实验的客观性,为临床应用提供理论基础。但本实验仅从横行骨折造模进行实验过程,对轴向应力促进骨折愈合方面进行初步研究,尚不能作为临床治疗各种骨折的参考依据,需要从广度、深度上进一步研究。2)该实验的实验对象为新西兰白兔,虽然该实验达到了预期造模效果,但该模型的实验成果如需应用于临床治疗,因新西兰白兔与人存在物种差异,需在伦理及临床允许下,谨慎进行部分临床实验,取得显著成果后才可广泛用于临床治疗。

参考文献:

- [1] 邢丹, 马信龙, 宋东辉, 等. 长骨骨折愈合力学环境的研究现状[J]. 生物医学工程与临床, 2012, 6(6):602-606.
- [2] 李冀, 赵伟超, 关鹏飞, 等. 长骨医源性骨不连的临床流行病学调查[J]. 中国骨与关节损伤杂志, 2012, 27(1):34-36.
- [3] Zhang M, Wang G, Zhang H, et al. Repair of segmental long bone defect in a rabbit radius nonunion model: comparison of cylindrical porous titanium and hydroxyapatite scaffolds. [J]. Artif Organs, 2014, 38(6):493-502.
- [4] 郭树章, 李明华, 许刚, 等. 兔骨折延迟愈合动物模型的建立[J]. 实用骨科杂志, 2012(3):230-232.
- [5] Tawonsawatruk T, Kelly M, Simpson H. Evaluation of native mesenchymal stem cells from bone marrow and local tissue in an atrophic nonunion model[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2013, 20(6):524-532.
- [6] Wang L, Qin L, Cheung WH, et al. A delayed bone-tendon junction healing model established for potential treatment of related sports injuries[J]. Br J Sports Med, 2010, 44(2): 114-120.
- [7] Kaipel M, Schützenberger S, Hofmann AT, et al. Evaluation of fibrin-based gene-activated matrices for BMP2/7 plasmid codelivery in a rat nonunion model[J]. Int Orthop, 2014, 38 (12):2607-2613.
- [8] 吴孟超, 吴在德, 吴肇汉, 等. 外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013:634-635.
- [9] Hsu TL, Chiu FY, Chen CM, et al. Treatment of nonunion of humeral shaft fracture with dynamic compression plate and cancellous bone graft[J]. J Chin Med Assoc, 2005, 68(2):73-76.
- [10] Zhang M, Wang G, Zhang H, et al. Repair of segmental long bone defect in a rabbit radius nonunion model: comparison of cylindrical porous titanium and hydroxyapatite scaffolds [J]. Artif Organs, 2014, 38(6):493-502.
- [11] Roberto-Rodrigues M, Fernandes RMP, Senos R, et al. Novel rat model of nonunion fracture with vascular deficit[J]. Injury, 2015, 46(4):649-654.
- [12] Nakamura A, Akahane M, Shigematsu H, et al. Cell sheet transplantation of cultured mesenchymal stem cells enhances bone formation in a rat nonunion model[J]. Bone, 2010, 46(2): 418-424.
- [13] Brownlow HC, Simpson A. Metabolic activity of a new atrophic nonunion model in rabbits[J]. J Orthopaedic Res, 2000, 18(3):438-442.
- [14] Eckardt H, Ding M, Lind M, et al. Recombinant human vascular endothelial growth factor enhances bone healing in an experimental nonunion model[J]. J Bone Joint Surg Br, 2005, 87(10):1434-1438.
- [15] Mark H, Rydevik B. Torsional stiffness in healing fractures: influence of ossification: an experimental study in rats[J]. Acta Orthopaedica, 2005, 76(3):428-433.
- [16] Sangkaew C. Distraction osteogenesis for the treatment of post traumatic complications using a conventional external fixator: a novel technique[J]. Injury, 2005, 36(1):185-193.
- [17] Drosse I, Volkmer E, Seitz S, et al. Validation of a femoral critical size defect model for orthotopic evaluation of bone healing: a biomechanical, veterinary and trauma surgical perspective[J]. Tissue Eng Part C Methods, 2008, 14(1):79-88.

Establishment of Femoral Delayed Healing Model with External Fixation in Rabbit

KONG Qing-zhu¹, ZHAO Jia lin², FENG Zhen³

(Affiliated Hospital of Chengde Medical College, Chengde 067000, China)

[Abstract] **Objective** To establish a model of rabbit femoral delayed healing with the external fixation. **Methods** Seventy and two New Zealand white rabbits were randomly divided into three groups, including the control group, the experimental group A and experimental group B. Make osteotomies of all the animals' left femur, is in the middle, and make the micro adjustable external fixator as the fixtures. 10mm cortical bone has been removed of the experimental group A and group B while removing the inner and outer periosteum and bone marrow. Keep the experimental group A 1mm gap to the fracture site. The experimental group B has been using bone wax plugging the fracture site, while maintained contact with the fracture fragments. The control group cut off the cortical bone and then fixed with the external fixator, without removing the periosteum and bone marrow. Observe the healing of osteotomy by gross observation, radiographic and histological observation postoperatively. **Results** The healing time of the experimental group A and group B are 12 weeks, while the control group are four weeks. **Conclusion** The rabbit femur fracture delayed union model has X-ray and pathological features of delayed healing, indicating that the model is reasonable and reliable

[Key words] Models; External fixator; New Zealand White Rabbits; Femur; Fractures; Delayed healing

胡椒根提取物对大鼠骨关节炎模型的治疗作用

王 慧, 卓书洪, 高 雨

(海南省药物研究所, 海口 570314)

[摘要] 目的 对比研究胡椒根两种提取物对大鼠骨关节炎模型的治疗作用。方法 建立关节内注射木瓜蛋白酶诱发骨关节炎模型, 分别通过设立高、低剂量组、模型组及阳性对照组等多个组别, 研究造模4周中两种提取物各个剂量组对大鼠体质量、膝关节直径、关节腔表面状态、及血清中肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 白细胞介素1 β (IL-1 β), 白细胞介素6(IL-6)的影响。结果 所有造模动物在实验2周时体质量增长较空白对照组有较大程度减轻($P<0.05$)。除醇提物低剂量组外, 膝关节直径变化量与模型组比较, 差异均具有统计学意义($P<0.05$)。在血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 炎症因子测定中, 挥发油高剂量组、醇提物高剂量组与空白对照组比较, 差异不具有统计学意义($P>0.05$), 但醇提物高剂量组数值多显示出边缘显著现象(P 接近0.05)。结论 胡椒根两种提取物在本次试验中所用剂量对骨关节炎模型均有一定程度改善作用, 但挥发油提取物高剂量组效果较好。

[关键词] 胡椒根提取物; 骨关节炎模型; 木瓜蛋白酶; 肿瘤坏死因子 α (TNF- α); 白细胞介素1 β (IL-1 β); 白细胞介素6(IL-6)

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2017)01-0064-04

胡椒根为胡椒科攀援性藤本植物胡椒的根部, 含有丰富的活性物质胡椒碱, 此活性物质在镇痛、镇静、抗炎、抗惊厥等多方面具有一定的功效。研究表明^[1], 胡椒根乙醇提取物口服给药具有显著的镇痛、抗炎、镇静及抗惊厥作用, 胡椒根挥发油具有明显的抗炎、镇痛、镇静作用。临床数据亦证明^[2], 胡椒根具有抗炎镇痛作用, 以胡椒根为主要原料药制成的制剂口服对软组织损伤等关节炎、骨损伤、坐骨神经痛等症具有一定的治疗功效^[3]。

为充分研究胡椒根对骨关节炎的治疗作用, 本实验通过对关节内注射木瓜蛋白酶诱发骨关节炎模型的药效学作用, 对胡椒根治疗骨关节炎的功效做一综合评价。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级SD大鼠, 45~55日龄, 体质量200~

250 g, 购于广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2013-0002]。饲养于海南省药物研究所内[SYXK(琼)2014-0025]。动物饲料由长沙市天勤生物技术有限公司[SCXK(湘)2014-0011]提供, 自由饮食。

1.2 药品、试剂与仪器

吲哚美辛肠溶片, 25 mg/片, 广东华南药业集团有限公司生产, 批号20150107; 胡椒根醇提物及胡椒根挥发油, 海南省药物研究所自行提取; 肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 白细胞介素1 β (IL-1 β), 白细胞介素6(IL-6)试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司, 产品编号分别为m1003549、m1002828、m1002859; L-半胱氨酸, 国药集团化学试剂有限公司, 批号20150210; 木瓜蛋白酶, 东恒华道生物科技有限公司提供, 批号20150405。酶标仪(KHB-ST360, 上海科华仪器厂); 离心机(DT5-2, 时代北利); 电子天平(AUW220D, 日本岛津公司)。脱水机(TP1020)、石蜡包埋机(EG1150H)、轮转式切片机(RM2245)和摊片机(HI1210, 均为德莱卡公司); 立式显微镜(日本索尼公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 骨关节炎模型的建立 质量分数4%木瓜蛋白酶溶液与0.03 mol/L L-半胱氨酸按1:1混合

[收稿日期] 2016-07-08

[基金项目] 海南省自然科学基金(20158302)

[作者简介] 王 慧(1984-), 女, 助理研究员, 研究方向: 药理学。
42321346@qq.com

后静置 0.5 h 配制混合液备用。分别在实验 1 d、4 d、7 d 于大鼠右膝关节腔注射该混合液 20 μ L, 4 周后完成实验造模^[4]。

1.3.2 实验分组及给药剂量 造模大鼠 48 只, 雌雄各半, 将其随机分为模型组、阳性对照组(吲哚美辛肠溶片)及实验组(挥发油高、中剂量组, 醇提取物高、中剂量组), 每组 8 只。挥发油高、低剂量组剂量分别为 2.5 g/kg、1.3 g/kg, 醇提取物、低剂量组剂量分别为 3.6 g/kg、1.8 g/kg。挥发油及醇提取物剂量组的剂量设置来源于胡椒根挥发油及醇提取物急性毒性试验中 LD₅₀ 的计算, 各提取物的高、低剂量组剂量分别为对应提取物的 LD₅₀ 的 1/10、1/20。阳性对照组: 将吲哚美辛肠溶片用蒸馏水溶解, 按其说明书指示及实验动物与人按体表面积折算的等效剂量比值计算, 给药剂量为 0.016 g/kg(按人一日最大给药量 150 mg)计。另取 8 只正常大鼠作为空白对照组。各组予以受试药物, 2 mL/只, 每日一次, 自造模后第一日起连续灌胃给药 4 周。模型组及空白对照组予以蒸馏水。

1.4 观察指标

1.4.1 动物状态及体质量变化 观察记录整个实验过程中动物的活动及死亡情况, 分别于实验前(0 d)、实验 2 周与实验 4 周(结束)测定大鼠的体质量, 比较各组大鼠两个阶段给药后体质量增长的变化。体质量增长量 = 检测当日动物体质量 - 试验前(0 d)动物体质量。

1.4.2 大体观察 实验结束后处死全部动物, 肉眼观察给药部位软骨及滑膜表面情况。

1.4.3 膝关节直径的测定^[5] 分别于试验前(0 d)与实验结束测定大鼠给药部位的膝关节直径, 观察比较各组大鼠给药前后膝关节直径的变化, 膝关节直径变化量 = 实验结束(4 周)膝关节直径 - 试验前(0 d)膝关节直径。

1.4.4 生化指标测定^[4] 麻醉后大鼠下腔动脉取血, 使用一次性人体静脉血样采集容器收集血液, 分离血清, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存。酶联免疫吸附测定法测定 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6, 水平。操作按照试剂盒操作说明要求进行。

1.4.5 病理学观察 大体观察结束后, 各组随机取 2~3 只动物, 打开关节腔后, 取关节面软骨片, 常规甲醛固定, 石蜡包埋切片, HE 染色, 光学显微镜下观察关节滑膜及软骨的情况。

1.5 统计学方法

采用 SPSS22.0 软件进行统计分析, Dunnett-t(方差齐)或 Dunnett-T3(方差不齐)进行正态分布检验, 检验各组差异性, 多组间比较进行单因素方差分析, 所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物状态、体质量的影响

实验过程中, 未见动物死亡, 但在首次注射木瓜蛋白酶后 2 周内均出现不同程度的进食量变少、活动量减少的情况, 实验最后两周有所缓解。实验结束时, 造模大鼠注射关节部位出现一定程度的肿胀, 造模的腿部部分动物出现严重瘸行等状态, 但挥发油高剂量组及阳性对照组大鼠尚能正常站立, 在笼内走动, 饮食、活动状态优于其它的组别, 模型组大鼠全体动物均出现瘸行状态。所有造模动物在实验初期始重与空白对照组比较, 差异无统计学意义($P > 0.05$), 实验 2 周时体质量增长明显低于空白对照组($P < 0.05$), 实验后期体质量增长量逐渐恢复(表 1)。

2.2 关节腔大体肉眼观察及病理学观察

动物麻醉处死后打开关节腔, 肉眼观察可见空白对照组关节软骨表面光滑, 透明, 呈极淡蓝色; 模型组膝骨软骨无光泽, 破坏较严重, 部分软

表 1 胡椒根提取物对大鼠体质量的影响

组别	剂量/g $\cdot$ kg ⁻¹	起始体质量/g	2 周增长量/g	4 周增长量/g
挥发油高剂量组	2.5	212.2 $\pm$ 6.0	33.3 $\pm$ 13.3*	88.1 $\pm$ 41.1
挥发油低剂量组	1.3	212.0 $\pm$ 7.4	29.75 $\pm$ 14.9*	78.6 $\pm$ 28.3
醇提取物高剂量组	3.6	213.0 $\pm$ 7.4	36.0 $\pm$ 13.0*	93.5 $\pm$ 22.0
醇提取物低剂量组	1.8	214.0 $\pm$ 8.7	30.75 $\pm$ 11.2*	74.4 $\pm$ 32.3
阳性对照组	0.016	209.8 $\pm$ 7.4	40.1 $\pm$ 21.7*	91.0 $\pm$ 38.2
模型组	-	211.2 $\pm$ 8.5	28.6 $\pm$ 19.2*	59.7 $\pm$ 24.0*
空白对照组	-	209.7 $\pm$ 5.49	71.9 $\pm$ 31.1 ^{##}	114.7 $\pm$ 50.2 ^{##}

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与阳性对照组比较, ^{##} $P < 0.01$; $n=8$, 下表同

骨充血, 出现局部糜烂, 裂纹等症状; 阳性对照组、挥发油高剂量组、醇提取物高剂量大部分软骨颜色淡白, 部分关节软骨光滑, 透明; 挥发油低剂量组、醇提取物低剂量组软骨表面略粗糙, 大多呈淡白至淡黄色, 透明度较低。取部分切片进行病理学检查, 光学显微镜下观察可见空白对照组大鼠关节结构完整, 软骨表面光滑(图 1A), 模型组表面有纤维结缔组织增生, 细胞排列无序, 炎症细胞浸润(图 1B); 阳性对照组软骨变薄, 接近正常关节组织(图 1C); 挥发油高剂量组细胞纤维化, 少量炎症细胞浸润(图 1D); 挥发油低剂量组、醇提取物高剂量组及低剂量组均出现纤维结缔组织增生, 不等细胞排列无规则, 炎症细胞浸润(图 1E、图 1F 及图 1G)。

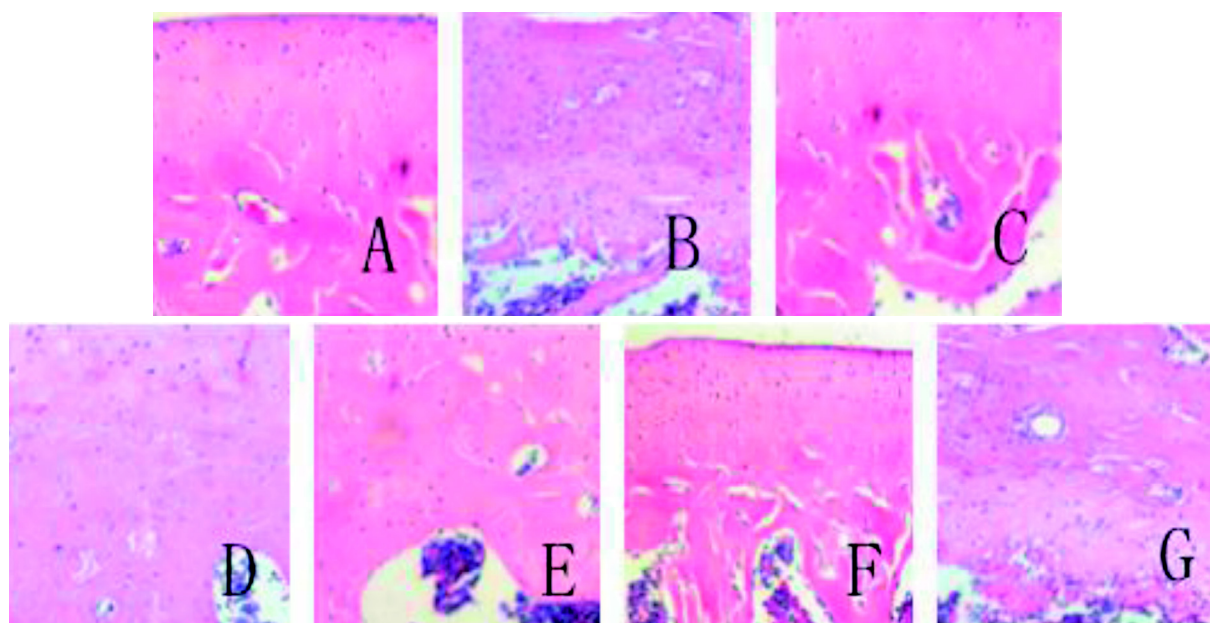
2.3 提取物对膝关节直径的影响

实验显示, 空白对照组实验前后膝关节直径无变化。各组造模大鼠给药部位的膝关节直径实验

前后均有一定变化, 除醇提取物低剂量组外, 膝关节直径变化量与模型组比较, 差异均显著($P<0.01$); 除挥发油高剂量组及醇提取物高剂量组外, 其他各组与阳性对照组比较, 差异均显著($P<0.01$)(表 2)。

2.4 提取物对关节炎致炎因子的影响

模型组 $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 含量均远超空白对照组($P<0.01$)(表 3)。除醇提取物低剂量组外, 其他各组 $\text{TNF-}\alpha$ 与模型组比较, 差异具有极显著意义($P<0.01$), 醇提取物低剂量组数值显示出边缘显著现象($P=0.057$); 醇提取物低剂量组及模型组与阳性对照组比较, 差异均显著($P<0.01$)。挥发油高剂量组、醇提取物高剂量组 $\text{IL-}\beta$ 与空白组比较, 差异不显著($P>0.05$), 但醇提取物高剂量组数值亦显示出边缘显著现象($P=0.061$); 各组与模型组比较, 差异显著($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 醇提取物低剂量组及模型组与阳性对照组比较, 差异均显著($P<0.01$)。各组 IL-6



A: 空白对照组; B: 模型组; C: 阳性对照组; D: 挥发油高剂量组; E: 挥发油低剂量组; F: 醇提取物高剂量组; G: 醇提取物低剂量组

图 1 大鼠关节软骨组织病理学观察(HE × 100)

表 2 胡椒根提取物对大鼠膝关节直径的影响

组别	剂量 /g · kg ⁻¹	试验前 /mm	试验结束 /mm	变化量 /mm
挥发油高剂量组	2.5	11.270 ± 0.111	11.346 ± 0.102	0.076 ± 0.028**
挥发油低剂量组	1.3	11.301 ± 0.164	11.486 ± 0.194	0.185 ± 0.068***
醇提取物高剂量组	3.6	11.275 ± 0.132	11.377 ± 0.153	0.103 ± 0.029**
醇提取物低剂量组	1.8	11.291 ± 0.106	11.512 ± 0.133	0.221 ± 0.079***
阳性对照组	0.016	11.333 ± 0.146	11.422 ± 0.158	0.089 ± 0.037**
模型组	—	11.281 ± 0.175	11.563 ± 0.224	0.283 ± 0.070***
空白对照组	—	11.243 ± 0.080	11.243 ± 0.080	0.000 ± 0.000***

注: 与模型组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与阳性对照组比较, *** $P<0.01$

与模型组比较, 差异均显著($P<0.01$ 或 $P<0.05$); 醇提物低剂量组及模型组与阳性对照组比较, 差异均有显著($P<0.01$)(表 3)。

3 讨论

目前用于诱导大鼠膝骨性关节炎(OA)的主要方式包括手术及化学药物注射法, 其中膝关节腔注射

药物被誉为建立 OA 动物模型的经典方法^[6], 而注射木瓜蛋白酶为常见药物之一, 模型成功率高, 造模时间短, 重复性好, 且具有与人类骨关节炎类似的特点^[7]。在本次实验方案中选用此模型, 模型组发生了严重的炎症反应, 证明造模具有可靠性。

本试验结果表明, 胡椒根提取物给药后期, 与空白组比较, 各给药组体重质量增长基本恢复正常

表 3 胡椒根提取物对大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 表达的影响

组 别	提取物剂量 /g · kg ⁻¹	TNF- α /ng · L ⁻¹	IL-1 β / ng · L ⁻¹	IL-6/ng · L ⁻¹
挥发油高剂量组	2.5	29.90 ± 3.91 ^{△△}	8.70 ± 0.42 ^{△△}	73.03 ± 7.04 ^{△△}
挥发油低剂量组	1.3	32.98 ± 4.38* ^{△△}	8.89 ± 0.40* ^{△△}	76.43 ± 7.22* ^{△△}
醇提物高剂量组	3.6	30.26 ± 3.34 ^{△△}	8.79 ± 0.39 ^{△△}	76.36 ± 6.22* ^{△△}
醇提物低剂量组	1.8	40.37 ± 3.56* ^{###}	9.81 ± 0.42* ^{△##}	92.25 ± 4.44* ^{△##}
阳性对照组	0.016	29.83 ± 5.30 ^{△△}	8.64 ± 0.48 ^{△△}	74.52 ± 7.23 ^{△△}
模型组	—	45.23 ± 2.87* ^{###}	10.48 ± 0.6* ^{###}	101.07 ± 4.03* ^{###}
空白对照组	—	25.33 ± 1.63 ^{△△}	8.26 ± 0.17 ^{△△}	68.64 ± 1.66 ^{△△}

注: 与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与模型组比较, Δ $P<0.05$, $\Delta\Delta$ $P<0.05$; 与阳性对照组比较, $\Delta\Delta$ $P<0.01$

($P>0.05$)。在大体肉眼观察与病理观察中, 各组均显示不同程度的软骨颜色变异、炎症细胞浸润等病变。与模型组比较, 胡椒根两种提取物在按剂量给药后, 均可不同程度地降低 OA 模型对大鼠体重、膝关节直径及血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 炎症因子的影响, 其中挥发油高剂量组、醇提物高剂量组在膝关节直径测定及血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 炎症因子测定中, 与阳性对照组比较, 差异均不具有统计学意义($P>0.05$), 提示两种提取物在高剂量给药与阳性对照组比较, 疗效相当。血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 炎症因子测定中, 与空白组比较, 挥发油高剂量组差异均不具有统计学意义($P>0.05$), 而醇提物高剂量组在血清 IL-1 β 、IL-6 炎症因子测定, 数值多显示出边缘显著现象(分别为 $P=0.061$ 及 $P=0.048$), 提示醇提物高剂量与空白组比较, 差异均有不确定性, 疗效与挥发油高剂量组具有一定的差异性。本项研究中, 两种提取物在降低大鼠 OA 动物模型膝关节直径及血清 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 炎症因子方面具有一定剂量依赖关系, 即高剂量优于低剂量, 且挥发油提取物疗效优于醇提取物。

本研究表明, 胡椒根在高剂量使用上具有一定的抑制骨关节炎作用, 因此, 该植物药在抑制

骨关节炎研究方面有可持续性研究意义。但本研究中提取物只选取了常用药效剂量(各提取物 LD₅₀ 的 1/10 及 1/20)进行实验, 提高剂量是否可以达到更佳治疗效果未进行探讨。另外, 本次试验中动物模型样本数量偏少、治疗周期较短, 两种提取物的剂量设置在疗效上的差异有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 敖平, 李斌, 廖福龙, 等. 胡椒根乙醇提取物药理活性研究 [J]. 中医药学报, 1998(3):61-62.
- [2] 何思煌, 朱全红, 徐小燕. 胡椒根挥发油的中枢药理作用研究 [J]. 广东药学, 2003, 13(2):35-36.
- [3] 李云燕, 张玉娥, 徐毅, 等. 半枫荷散治疗膝关节骨性关节炎 50 例疗效观察 [J]. 新中医, 2005, 37(7):17-18.
- [4] 韦尼, 薛智丰, 陈自佳, 等. 补肾通络颗粒对膝骨关节炎大鼠血清细胞因子及关节软骨含水率的影响 [J]. 风湿病与关节炎, 2015, 4(10):5-9.
- [5] 黄永明, 潘建科, 郭达, 等. II型胶原蛋白酶诱导SD大鼠膝骨关节炎模型的建立 [J]. 广东医学, 2015, 36(8):1145-1148.
- [6] 张立, 王培民. 膝骨关节炎动物模型的选择 [J]. 世界中西医结合杂志, 2014, 9(7):782-786.
- [7] 邓宇, 伍筱梅, 任医民, 等. 关节腔内注射不同蛋白酶建立兔膝骨关节炎模型的对比研究 [J]. 中华关节外科杂志, 2009, 3(3):332-339.

关于实验动物行业高端复合型管理 人员培训体系建设的几点思考

杨文静, 崔淑芳

(第二军医大学实验动物中心, 上海 200433)

[摘要] 实验动物学属于新兴跨学科专业, 其发展与生物医药领域的进步息息相关。为了保证实验动物行业持续健康发展, 作者期望探索一种适用于实验动物行业的培训体系, 为实验动物行业打造一批具备系统专业知识, 具有全球战略眼光, 拥有较强管理创新能力、市场开拓力以及社会责任感的复合型高端管理人员队伍。

[关键词] 实验动物行业; 复合型管理人员; 培训体系

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2017)01-0068-03

实验动物是生物医学研究领域“活”的研究工具, 在教学、科研及医药工业的生产中发挥着举足轻重的作用。实验动物的质量与科研结果的准确性和产品的安全性密切相关。在实验技术以及检测手段的创新驱动下, 生命科学飞速的发展也对实验动物行业提出了更高的要求。除了动物的饲养繁育, 在新技术的引领下挖掘或改造出能够助力生物医药行业发展的新型实验动物及服务保障模式, 已经成为当下生物医学领域对实验动物行业的重新定位, 而其中一项重要限制因素是人才的匮乏。因此, 完善实验动物行业人才库的构建机制显得十分必要。

从 1983 年起, 实验动物专业技术人员培训班陆续在北京、上海等地举办, 培训班的内容主要限于实验动物科学的某一分支领域, 如微生物学监测, 遗传学监测, 实验动物设施, 初级和中级饲

养管理人员学习班等。随着生物医学的快速发展, 局限于单一领域的实验动物行业培训方式已无法满足需求, 有必要探索一种适用于实验动物行业的有效培训模式, 即培养出一种具有实验动物高级管理与领军能力, 同时具有核心管理能力、决策能力、对生物医药领域具有掌控能力、对实验动物行业发展具有宏观把握能力、市场营运能力以及领导力, 能够提高实验动物行业竞争力, 具有可持续发展能力的实验动物高端复合型管理人才, 为实验动物行业以及生物医学、医药工业等领域的持续健康发展提供强有力的保障。

1 培训需求分析

为了准确把握我国实验动物行业发展的前沿信息, 提高实验动物行业管理人员的领导能力以及市场运营能力, 推动生物医药领域的持续健康发展。作者在探索实验动物行业高端复合型管理人员培训体系构建之初进行了全面、系统的需求分析, 重点是我国实验动物行业现状与发展趋势对于高端管理人员的知识结构、领袖能力的要求, 在此基础上制定培训体系的目标人才定位。

培训需求主要包括以下三方面内容: 一是从国家科技中长期发展战略规划出发, 分析国内外实验动物科学与行业的现状与近 5 年发展趋势; 二是

[收稿日期] 2016-09-05

[基金项目] 上海市科技创新计划(13140900800, 16140900100); 国家科技部支撑计划(2015BAI09B02); 2014 年度军队实验动物专项科研课题面上项目(SYDW[2014]005 号)联合资助

[作者简介] 杨文静(1986-), 女, 讲师。研究方向: 实验动物学。E-mail: wenjing2006123@126.com

[通讯作者] 崔淑芳, 教授。研究方向: 实验动物学高端复合型人才管理。E-mail: youngstar_sf@163.com

分析企业身处的环境、所需的资源配置,以及未来的发展空间;三是分析受训者的知识结构、能力与期望值之间的差距。

培训需求的对象主要包括政府科技管理部门人员、实验动物科技行业专家、企业管理专家等三类。其中行政管理人员对国家科技发展战略规划、国内外生物医药行业的现状与趋势有较全面与客观的把握;实验动物学专家和企业管理专家对学科发展与实验动物行业现状及发展有较全面的了解;而受训者个人对我国企业内外环境、市场前景及个人业务需求有比较清晰的认识。

培训需求实现的方法主要是座谈会法、互联网问卷调查法、实地调研法。座谈会可以采用混合抽样法选择调查对象^[1],实施过程中,交流讨论环节的设计要能充分反映所需的内容,提出的问题既要全面又要具有可操作性。这种方法获得的数据较为直接,且多属于定性数据,能够为后期量化分析提供指导方向。互联网问卷调查法需要调研人员对问卷的提问和选项都进行详细而又全面的设计,多以选择题为主。互联网调查问卷法得到的数据易于进行量化分析。实地调研法是一种能够获得直接数据的方法,需要事先征得被调研单位的同意,在周密的调研计划下进行操作。调研人员可以结合实际情况灵活应用需求分析模式,通过多种渠道和方法收集数据,尽量保证分析结果最大程度上接近真实情况^[2]。

本项目通过调查问卷法完成了对政府科技管理部门人员、实验动物行业知名专家、企业管理专家的培训需求分析(表1),培训内容涵盖了实验动物科学、管理学、市场营销学、金融学等多个方面,这些学科方向是构建师资队伍的基础。

2 构建优质的师资库

构建优质的师资库是保质保量的开展实验动物行业高端复合型管理人员培训工作的主要成功因素之一。因此需要从师资来源、师资类别、师资准入条件以及师资权责义务等方面对师资库进行构建和维护。

2.1 师资来源与类别

结合培训需求,充分将中国科学院、高校以及优质企业的高级科研人员和管理人员进行有机整合。培训教师还包括对党的路线方针、国家政策法规以及实验动物领域的相关政策和制度有着较强

表1 培训需求内容分析

培训内容	投票率/%
实验动物科学新知识与技术	5.32
国内外生物医药、实验动物行业现状与发展前沿	7.56
实验动物行政法律与法规	9.23
管理学基本原理	9.45
经济法基本原理	8.15
市场营销学基本原理	13.45
领导力与管理	11.56
人力资源管理与团队建设管理	7.71
财务与税务管理	8.12
市场销售与营销管理	5.23
生产运营管理	4.23
通用能力培训(含国学礼仪)	6.23
实地考察	2.41
其他	1.35

储备经验和阅历的实验动物行业管理人员;对科技政策、科技创新和高新技术企业发展和管理具有敏锐洞察力的企业人员;具有税务管理、财务管理理论知识及工作经验的硕士以上专业人员^[3]。

2.2 师资入库条件

首先,根据实验动物行业高端培训项目和市场的实际需求,定期发布师资需求信息,采取“毛遂自荐”、社会举荐等方式接收报名。对于报名的人员进行初审和面试,对申报人员的信息、资历、专业素养、科技成果和胜任能力进行专业评审,最终确定优质师资的人选^[4]。最后,对拟进入师资库的人员进行聘用,同时保留师资退出聘用的权利。

2.3 师资权责义务

进入师资库的教师,需根据各自承担的课程进行培训讲义的撰写、实施授课及考核、开展课程的建设 and 教学质量评估、参与教学和培训工作的改进和完善,每年完成不少于120课时的教学任务。教师有权利根据国家相关的规章制度获得相应的报酬。

3 构建健全的培训课程体系

首先根据实验动物行业的发展趋势及培训需求,初步构建实验动物高端复合型管理人员的培训课程大纲,为课程实施指明方向^[5]。培训大纲内容主要包括:实验动物领域的前沿技术和行业发展现状,实验动物行业相关的法律法规体系,实验动物行业相关的管理学、财务及税务、国学礼仪等方面内容^[6]。实验动物高端复合型人员培训体系

的课程体系构建需要满足不同专长人士的需求,尤其是在人力资源管理、市场营销、财务管理和团队建设等实验动物专业人士涉猎较浅的专业,以案例式的授课方式保障知识传授效果。课程大纲包括以课程模块为主题的目录大纲,以知识点和标准项为要点的二级课程大纲以及以具体课程内容和实施案例为标准的三级大纲^[7,8]。

在课程大纲制定的基础上完成教学课件和讲义的制定工作。教学课件可以采用灵活多样的形式,包括PPT、视频等形式,加深参训人员的理解。课程具体实施过程中可以采用多种教学模式,包括案例讨论、角色模拟、视频教学、知识竞赛等方式,达到良好的知识传授效果^[9,10]。在课程实施过程中,允许学生根据自身工作需求,定制个性化的课程方案,以提高学习的针对性。

4 建立交互的培训评价系统

实验动物高端复合型管理人员培训评估体系主要参照柯式评估模型。这一评估模式将学生学习效果、学生满意度、学生知识运用程度以及受训学员创造的经济效益等四个层面分别进行评估^[11]。

学习层评估主要包括日常考勤、课堂参与互动情况、课程作业完成情况、结业测试情况、结业论文撰写情况等。其中,日常考勤占10%,结业论文撰写占40%,结业测试占40%,课堂互动作为加分项^[12]。

反应层评估主要通过学生对培训系统的满意程度进行衡量。满意度包括对教师及培训整体设置的满意程度。其中,对授课教师的满意度主要包括授课态度及风范、内容充实性及应用性、课程启发性及互动效果、课堂宏观把控能力等四个方面。培训整体满意度的衡量包括培训内容是否丰富、案例分析是否贴近实验动物行业发展实情、课堂互动组织情况等方面。每个方面分为优秀、良好、一般、差四个等级进行评价^[13]。

知识运用程度评估是指受试者对所获知识的理解及运用能力。这一阶段的评估只能在学生回归工作岗位时才能进行,通过对其所在单位的同事进行访谈,对其工作能力进行调研等方式进行评价。

效益评估是指考察受训学员依据所学知识能够创造出的经济效益。这需要从更高层面和较长的时间进行调研,考察公司的实验动物产出效率、实

验动物品种推广应用以及企业的口碑信誉等情况。

5 结语

在实验动物行业高端复合型管理人员培训体系构建过程中,需要密切结合实验动物行业发展中面临的机遇和挑战,综合实验动物、人力资源管理、财务管理和市场营销、国学礼仪等专业领域的理论,为提高整个实验动物行业的未来核心竞争力设置合理的培训体系。在完善培训需求分析的基础上,构建具有专业任职资格的师资力量,设置定制化的课程体系,开展多种模式的培训方式,并针对培训评价体系,不断优化课程质量,使实验动物行业高端复合型管理人员培训体系能够切实提高实验动物行业人员的综合管控能力,进而发挥重要的行业领军作用,为推动实验动物行业的健康快速发展及中国生物医药事业的发展提供强有力的支撑。

参考文献:

- [1] 李妮,陈芙蓉,李小珍.非现役文职护士的培训需求分析与对策[J].福州总医院学报,2009,16(2):117-118.
- [2] 滑霏,厉瑛,曾友燕,等.我军文职人员护士任职教育培训需求的调查[J].解放军护理杂志,2015,32(18):21-23.
- [3] 唐广华.加快组建继续教育师资队伍努力增强继续教育吸引力—中小学教师继续教育师资队伍研究[J].常州教育学院学报:综合版,2000,18(1):5-8.
- [4] 陈乙熙.优化资源建立师资库加强对教师队伍的规范管理[J].工商行政管理,2007(21):57-58.
- [5] 花文秀,王基林.关于高等职业教育专业设置规范化的思考[J].南京农专学报,2001,17(4):73-75.
- [6] 李芳.培训课程体系建设五步法[J].企业管理,2011,8(9):82-84.
- [7] 赵海涛.基于胜任素质模型的企业培训课程体系研究[J].中国证券期货,2012,4(2):298-299.
- [8] 任秀娟.基于岗位胜任力模型的企业培训课程体系建设[J].现代企业教育,2010,3(6):294-295.
- [9] 孙鹏.在线教育在大学生思政教育领域中的应用[J].电大理工,2015(3):60-62.
- [10] 梁乐明,曹俏俏,张宝辉.微课程设计模式研究—基于国外微课程的对比分析[J].开放教育研究,2013,19(1):65-73.
- [11] 朱仁宏.以柯氏模型为导向的培训评估体系研究[J].胜利油田职工大学学报,2006,20(4):1-3.
- [12] 陆少颖.基于柯氏模型的教师培训评估模型研究[J].宁波教育学院学报,2013,15(6):24-28.
- [13] 胡重霞.基于柯氏模型的企业培训效果评估体系的构建[J].网络财富,2010(20):62-63.

实验动物从业人员远程培训考核指标体系初探

余琛琳, 崔淑芳

(第二军医大学训练部实验动物中心, 上海 200433)

[摘要] 根据实验动物从业人员远程培训考核指标体系的构建原则, 联合运用层次分析法和德尔菲法, 构建了符合考核指标体系的各项指标内容及其权重系数, 初步制定实验动物从业人员远程培训考核指标体系, 为实验动物从业人员远程培训考核提供较为客观、系统的评价标准。

[关键词] 实验动物从业人员; 远程培训; 考核指标体系

[中图分类号] R-332 Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2017)01-0071-05

随着互联网及电视等多种传播媒体技术和网络技术在现代教育和培训中的推广应用^[1], 实验动物从业人员远程教学和培训平台建设也得以快速发展, 这对提高实验动物工作者的业务素质、促进实验动物科学事业的健康快速发展、乃至推进生物医药和生命科学研究的发展都起着至关重要的作用。实验动物从业人员远程教学和培训突破了传统教学方式的一些弊端, 具有开放性、灵活性、共享性等诸多优点, 如学员可以不受时空限制随时进行培训学习, 以及可以根据个人工作需求制定学习计划和任务等。但是, 在远程教学和培训中, 对学员培训效果的评估管理一直是比较薄弱的环节。如果没有科学、系统的考核评价标准, 学员无法客观了解自身学习情况, 其学习积极性和主动性在一定程度上会受到制约, 难以达到良好的学习培训效果。因此, 本文将对实验动物从业人员远程培训考核指标体系的构建进行初步探索, 以为实验动物从业人员远程教学和培训平台的建设提供相应的基础。

[收稿日期] 2016-09-06

[基金项目] 上海市科技发展基金项目(13140900800, 12140900701); 2014 年度军队实验动物专项科研课题青年项目(SYDW[2014]007 号)资助

[作者简介] 余琛琳(1981-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向: 实验动物学教学和科研工作。E-mail: ycl0408@163.com

[通讯作者] 崔淑芳(1969-), 女, 教授。
E-mail: youngstar_sf@163.com

1 构建实验动物从业人员远程培训考核指标体系的必要性

实验动物从业人员远程培训是提高实验动物工作者专业技术水平的重要手段之一, 而培训效果评估通常是培训体系的最后一个环节, 也是必不可少的一个环节, 是对学员培训学习的总结, 更是实验动物从业人员远程培训工作可持续性发展的重要指南。

2 实验动物从业人员培训考核指标体系的构建原则

科学性原则: 进行实验动物从业人员培训效果评估的关键是确定评估指标, 即通过对什么内容或指标进行评价来确定培训效果。评价指标体系是反映培训效果指示器, 其设置是否科学、合理, 将直接影响到评价的质量和效果。因此, 指标的设置必须科学、合理。

全面性原则: 考核体系设置的指标应能够较为全面地体现学员在整个培训过程中的学习情况, 既包括各项知识点的理解与掌握, 也包括学习时间、培训作业以及交流互动等多方面的情况。

客观性原则: 考核体系设置的指标应能够客观反映学员在整个培训过程中的学习情况, 并且评价指标含义的描述也应该客观, 例如以分值、时间长短等详细指标进行评价, 而尽量避免设置具有主

观评价倾向的指标。

具体性原则:考核指标体系设置的目的是在实验动物从业人员远程培训过程中得以应用。因此,指标的设置及其内涵切忌抽象、笼统或空泛,而应该描述清晰而精准,便于对考核人员的评价使用。

3 实验动物从业人员培训考核指标体系的构建方法

3.1 考核指标体系的分类和考核指标项目的调研

根据参加培训人员的岗位需求和教学内容,对实验动物从业人员的远程培训进行分类设置和管理^[2,3],初步探索将培训对象分类为实验动物科技管理人员、动物实验科技人员、动物饲养人员三大类^[4],其中实验动物科技管理人员主要从事实验动物生产或动物实验的综合管理工作;动物实验科技人员主要从事实验操作及技术指导等;而饲养人员主要从事实验动物的饲养、生产及日常管理等。

从科学、全面、客观、具体地建立实验动物从业人员培训考核指标体系的角度出发,结合资料文献查询和咨询专业人士,初步设计制定了不同类别从业人员考核体系指标项目调查咨询表。调研过程中,共收集到各项具体指标 50 余项。通过分析和筛选,对于不同受训人员,初步确定了以下五类一级指标及相应的二级指标和三级指标。

本考核指标体系的项目设置中,一级指标包括课程学习、学习时间、培训作业、培训主题研讨与参与、培训体会与学习小结五项指标(表 1~3)。其中,课程学习体现了不同培训人员对专业知识点的学习和掌握情况,是远程培训的首要任务和重点考核内容。但不同类别培训人员,其工作岗位的需求不同。因此,针对一级指标课程学习,调查咨询表提供了实验动物相关法律、法规、制度、标准、部门管理、实验动物和动物实验质量保证、动物福利、职业健康与安全、动物实验管理、实验动物科学基础、动物健康、疾病与预防、实验动物生产管理操作技术等 10 余项供选择的二级指标项目,进行调研,经专家综合评价分析后,确定各类培训人员的二级考核指标项目。进而,每一个二级指标又涵括了不同的三级指标,如针对实验动物相关法律、法规、制度、标准此项二级指标,设置了实验动物管理政策和法规、

实验动物行业标准、实验动物管理制度三项三级考核指标进行调研分析;针对职业健康与安全此项二级指标,设置了生物安全、物理因素损伤的危害和防护措施、化学因素损伤的危害和防护措施、生物因素损伤的危害和防护措施四项三级考核指标进行调研分析。

实验动物从业人员远程培训为受训学员在教学时空上比现场教学培训提供了更多便利,便于学员自由安排学习时间。但是,从保障教学培训效果的角度出发,充分的学习时间是学员得以学习和掌握专业培训知识的重要保障。因此,一级考核指标中学习时间的设置是指标体系中的必要元素,也是远程培训中教学质量的必备考核指标。

培训作业的完成,有助于学员在远程培训过程中,了解自身对学习内容掌握情况。学员根据作业完成的反馈情况,可以及时调整学习计划和方案,以提高学习效率和培训效果。因此,培训作业也是指标体系中重要的一级考核指标。

培训主题研讨与参与,一方面可以反映受训学员对各项培训内容的熟悉、掌握程度以及应用能力,另一方面有助于提高学员学习的积极性和主动性,为学员之间提供良好的学术交流机会和氛围。因此,此项考核指标具有重要的参考意义。

培训体会与学习小结一般是在远程培训结束时,每位学员根据自身情况,回顾和总结整个学习过程中的培训效果和个人感受等等,包括对所学知识或内容的了解、熟悉和掌握程度;对具体学术问题的理解和探究;对整体课程学习情况的小结;对学习或工作的启发或帮助;以及对培训课程提出具有建设性的意见和建议等等,有助于本课程体系的建设和完善,形成良性循环机制。

3.2 考核指标体系中考核指标及其权重系数的确定

采用德尔菲法和层次分析法分析确定本考核指标体系中各项考核指标及其权重系数。

德尔菲法(Delphi)又称为专家评分法或者专家函询法^[5],是一种综合多名专家经验与主观判断的方法,由组织者就拟定的研究问题设计出调查问卷,通过信函分别向专家组各位成员进行咨询,通过几轮征询和反馈,使得各位专家的意见逐渐集中,最后获得具有统计学意义的结果^[6]。层次分析法(AHP)是一种定性与定量相结合的系统分析方法,通过将复杂问题中各种因素划分为相互关联而又层

次清晰有序的架构，根据专家对架构内每个层次的多项指标相对重要性的次序，进行定量表示，最终确定全部指标相对重要性次序的数值^[7,8]。在研究过程中，作者共收集到各类、各项具体指标50余项，根据实验动物从业人员培训考核指标体系的构建原则，初步拟定相应考核指标，并设计专家调查表。

在第一轮专家咨询调查过程中，作者向专家详细介绍了本体系的研究背景、Delphi法的流程等以供各位专家参考，并初步构建了指标体系框架，拟定了考核指标，请专家对各项指标的判断依据、熟悉程度、入选条件等进行评分。在第一轮专家咨询调查结束后，对回收的专家咨询表进行统计分析，并将分析结果反馈给各位专家，同时拟定第二轮专家咨询表，请专家根据第一轮调查结果，对各项指标重新进行评分。根据实验动物从业人员培训考核指标体系的构建原则，并结合第二轮专家咨询结果，构建出各类实验动物从业人员培训考核

指标体系层次结构模型，一、二、三级指标分别对应目标层、准则层、指标层^[9]。

针对各类培训人员设置的一级指标，二级指标以及三级指标详见表1~3。根据确定的考核指标体系，在第三轮专家咨询中让专家对指标系统中的所有指标相对重要关系采用1~9标度作出判断^[10]，即将2个对象区分为“同样重要”、“稍微重要”、“重要”、“重要得多”和“绝对重要”几个等级，在相邻两级中再插入一级，共9级^[11]，构建成一个判断矩阵，再按照初始权重系数计算公式和归一化权重系统计算公式，计算各项指标的权重系数^[12]。最后，检验权重系数的一致性，并最终确定各项指标的权重系数。指标权重及指标一致性比率(C.R.值)见表4、5(由于篇幅所限，以实验动物科技管理人员培训考核评价指标体系中一级指标及课程学习下属二级指标权重及C.R.值为例列出)。C.R.<0.1时，比较矩阵的一致性是可以接受的；C.R.>0.1时，比较矩阵应进行合理修正^[9]。

表 1 实验动物科技管理人员培训考核评价指标体系

一级指标	二级指标	三级指标
课程学习	实验动物相关法律、法规、制度、标准	实验动物管理政策和法规
		实验动物行业标准
	部门管理	实验动物管理制度
		部门管理规章制度
		部门运行经费预算、开支统计等
	实验动物和动物实验质量保证	时间管理
		实验动物质量保障
	动物福利	设施、设备质量保障
		动物实验质量保障
		动物福利法则
	职业健康与安全	动物实验伦理
		动物实验项目伦理审核
		生物安全
		物理因素损伤的危害和防护措施
		化学因素损伤的危害和防护措施
学习时间	学习时数	生物因素损伤的危害和防护措施
培训作业	学习频率	
培训主题研讨与参与	发起学术研讨主题	
培训体会与学习小结	参与学术研讨主题	
	培训体会与感受(培训过程或培训结束，对所学知识或探究问题的理解、体会或感悟)	
	培训学习小结(培训结束，对整体课程学习情况的小结，以及对培训课程提出意见和建议等)	

表 2 动物实验科技人员培训考核评价指标体系

一级指标	二级指标	三级指标
课程学习	实验动物相关法律、法规、制度、标准	实验动物管理政策和法规
		实验动物行业标准
		实验动物管理制度
	动物实验管理	动物实验设计和方法学
		动物福利
		突发事件应急处理
	实验动物科学基础	实验动物的生物学特性及其应用
		人类疾病动物模型的应用与选择
		动物实验设施
		动物实验环境
	动物健康、疾病与预防	动物实验技术
		动物健康维持
		健康与疾病
	职业健康与安全	生物安全
		物理因素损伤的危害和防护措施
		化学因素损伤的危害和防护措施
		生物因素损伤的危害和防护措施
	学习时间	
	学习时数	
	学习频率	
培训作业		
培训主题研讨与参与	发起学术研讨主题	
培训体会与学习小结	参与学术研讨主题	
	培训体会与感受(培训过程或培训结束, 对所学知识或探究问题的理解、体会或感悟)	
	培训学习小结(培训结束, 对整体课程学习情况的小结, 以及对培训课程提出意见和建议等)	

4 结语

开展对实验动物从业人员远程培训考核指标体系的研究, 旨在为实验动物工作者的远程培训考核提供理想的考核评价和管理工具, 通过对实验动物从业人员远程培训中各项学习指标进行量化管理和目标考核, 达到调动参训人员的积极性和主动性、激发其独立学习的兴趣, 同时满足比较客观、全面地评价参训学员的综合学习能力, 为实验动物从业人员远程教学和培训平台的建设奠定基础, 以期更好地促进实验动物远程教育平台的构建和发展。

参考文献:

- [1] 李志满, 董玉杰, 田之宁, 等. 以远程教育取代集中培训的实验动物学岗位培训构想[J]. 实验动物科学, 2010, 27(5): 56-58.
- [2] 李根平, 吕建, 贺争鸣, 等. 中国实验动物人才培训考核信息系统的建立研究[J]. 实验动物科学, 2012, 29(4):47-49.
- [3] 李志满, 柳怀玉, 洪花, 等. 关于实验动物从业人员岗位培训的几点建议[J]. 实验动物科学, 2011, 28(5):48-50.
- [4] 徐增年, 刘福英, 李兴琴, 等. 河北省实验动物从业人员现状及教育培训对策[J]. 实验动物科学, 2010, 27(5):59-61.
- [5] 杜占江, 王金娜, 肖丹. 构建基于德尔菲法与层次分析法的文献信息资源评价指标体系[J]. 现代情报, 2011, 31(10): 9-14.
- [6] 余琛琳, 刘志学, 蔡丽萍, 等. 常用人类疾病动物模型制备效果评价软件的开发研究[J]. 医学动物防制, 2010, 26(6): 491-495.
- [7] 余琛琳, 刘志学, 蔡丽萍, 等. 实验动物学设计性实验考核指标体系的建立研究[J]. 西北医学教育, 2011, 19(1): 89-91.
- [8] 余琛琳, 汤球, 刘志学, 等. 层次分析法耦合德尔菲法构建高校设计性实验考核指标体系[J]. 中华医学教育探索杂志, 2012, 11(8):786-790.
- [9] 高宵, 刘保春. 基于层次分析法的网络课堂教学质量评价

表 3 动物饲养生产人员培训考核评价指标体系

一级指标	二级指标	三级指标
课程学习	实验动物相关法律、法规、制度、标准	实验动物管理政策和法规
		实验动物行业标准
		实验动物管理制度
	动物福利	动物福利法则
		动物实验伦理
		实验动物的生物学特性
	实验动物科学基础	实验动物的常见疾病
		实验动物的生产
		实验动物的遗传质量控制标准
		实验动物的微生物和寄生虫质量控制标准
		实验动物环境与设施的质量控制标准
		实验动物的营养质量控制标准
		实验动物饲养设施、设备的使用和维护
		实验动物的遗传与繁殖技术
		实验动物的卫生防疫
		生物安全
		物理因素损伤的危害和防护措施
		化学因素损伤的危害和防护措施
		生物因素损伤的危害和防护措施
学习时间	学习时数	
	学习频率	
培训作业		
培训主题研讨与参与	发起学术研讨主题	
	参与学术研讨主题	
培训体会与学习小结	培训体会与感受(培训过程或培训结束, 对所学知识或探究问题的理解、体会或感悟)	
	培训学习小结(培训结束, 对整体课程学习情况的小结, 以及对培训课程提出意见和建议等)	

表 4 实验动物科技管理人员培训考核评价指标体系中一级指标权重及 C.R.值

一级指标	权重	C.R.值
课程学习	0.6038	0.0793
学习时间	0.1025	
培训作业	0.1017	
培训主题研讨与参与	0.1009	
培训体会与学习小结	0.0911	

表 5 实验动物科技管理人员培训考核评价指标体系中课程学习下属指标权重及 C.R.值

二级指标	二级指标权重	C.R.值
实验动物相关法律、法规、制度、标准	0.1024	0.0547
部门管理	0.2912	
实验动物和动物实验质量保证	0.3005	
动物福利	0.2156	
职业健康与安全	0.0903	

体系构建[J]. 天津外国语学院学报, 2009, 16(6):73-78.

- [10] 吴志芳, 杨晓燕, 李任波. 基于 DPS 数据处理系统的层次分析法在评价体系中的应用[J]. 林业调查规划, 2009, 34 (2):57-59.
- [11] 张涛. 基于层次分析法的多媒体教材评价体系研究[J]. 河南科技学院学报, 2016, 36(2):73-78.
- [12] 刘莹昕, 刘飒, 王威尧. 层次分析法的权重计算及其应用[J]. 沈阳大学学报:自然科学版, 2014, 26(5):373-375.

PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路在运动诱导的啮齿动物骨骼肌内 GLUT4 转位和表达中的作用

张云丽, 王 林, 刘铁民
(聊城大学体育学院, 聊城 252059)

[摘要] 骨骼肌在葡萄糖稳态中扮演重要作用, 葡萄糖转运体 4(glucose transporter 4, GLUT4)作为骨骼肌内最主要的葡萄糖转运蛋白, 其转位和表达的变化与胰岛素抵抗的发生密切相关。本文综述了近年来关于啮齿动物骨骼肌内 GLUT4 转位和表达的运动激活以及磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)和腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路介导运动改善骨骼肌葡萄糖摄取的研究进展, 旨在为全面了解和明确运动影响啮齿动物骨骼肌内 GLUT4 转位和表达的机制。

[关键词] 骨骼肌; 运动; 胰岛素抵抗; 葡萄糖转运体 4(GLUT4); 磷脂酰肌醇-3-激酶(PI3K); 蛋白激酶 B(Akt); 腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)01-0076-07

骨骼肌是代谢葡萄糖的重要外周组织, 其葡萄糖代谢水平在调节全身血糖稳态中发挥着重要作用。葡萄糖转运体 4(glucose transporter 4, GLUT4)是骨骼肌内最重要的葡萄糖转运蛋白, 其介导的葡萄糖跨细胞膜的转运是骨骼肌葡萄糖代谢的主要限速步骤, 而 GLUT4 的转位和表达的变化可以在一定程度上反映骨骼肌细胞的糖代谢状况。关于 GLUT4 的转位存在两种不同刺激机制的假说, 胰岛素刺激的 GLUT4 的转位主要涉及磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinases, PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase, Akt)(PI3K/Akt)信号通路, 而运动刺激的 GLUT4 的转位主要涉及腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)信号通路^[1,2]。

本文基于 PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路存在复杂的交互作用以及运动对这两种信号通路均可以发挥影响的理论作为依据, 对运动刺激的啮齿动物骨骼肌内 GLUT4 转位和表达中 PI3K/Akt 和 AMPK 信号

通路的作用进行探讨, 这对于了解胰岛素抵抗相关疾病及评价运动对胰岛素抵抗相关疾病的干预效果具有重要意义。

1 PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路在啮齿动物骨骼肌内 GLUT4 转位和表达

1.1 骨骼肌内 GLUT4 的转位和表达

GLUT4 为跨膜转运糖蛋白, 相对分子质量约为 45 000~55 000, 由 12 个跨膜片段(M1~M12)和 1 个位于 N 端的胞外环状结构域组成。由 GLUT4 介导的葡萄糖摄取是骨骼肌利用葡萄糖的主要限速步骤, GLUT4 的表达减少、转位受阻及含 GLUT4 的囊泡不能与细胞膜融合或已融合但 GLUT4 活性降低等因素被认为是导致骨骼肌葡萄糖摄取缺陷, 最终引起胰岛素抵抗的主要因素^[3,4]。有研究表明^[5], GLUT4 基因敲除小鼠出现胰岛素抵抗和葡萄糖耐受不良, 靶向破坏肌肉的 GLUT4, 引起 GLUT4 的蛋白表达减少, 会使参与转位的 GLUT4 的数量减少, 导致骨骼肌细胞对葡萄糖的摄取与利用发生障碍, 进而减弱胰岛素信号转导, 并最终引起胰岛素抵抗的发生。

[收稿日期] 2016-06-15

[基金项目] 山东省自然科学基金资助项目(ZR2011CM040)

[作者简介] 张云丽(1977-), 女, 讲师,

E-mail: zhangyunli@luc.edu.cn

骨骼肌细胞有一个复杂的膜系统,其中包括表面细胞膜和起源于横小管的膜内陷(T-小管)。基础状态下,由于缺乏刺激, GLUT4 主要储存于细胞内的囊泡,受刺激时这些囊泡转位至质膜系统,囊泡膜与质膜发生融合, GLUT4 插入质膜以增加葡萄糖摄取^[6-9]。对新生 SD 大鼠的骨骼肌细胞进行原代培养,结果表明胰岛素和运动刺激通过不同的信号途径促进骨骼肌细胞 GLUT4 转位至质膜^[10]。

1.2 PI3K/Akt 信号通路与骨骼肌内 GLUT4 转位和表达

胰岛素刺激的骨骼肌内 GLUT4 的转位主要涉及 PI3K/Akt 信号通路。主要步骤如下:胰岛素与胰岛素受体结合,继而激活胰岛素受体底物(insulin receptor substrate, IRS)和 PI3K,导致磷脂酰肌醇三磷酸(phosphatidylinositol 3-phosphate, PIP3)的产生;随后 PIP3 分别与 Akt 和非典型蛋白激酶 C(atypical protein kinase C, aPKC)结合,进而促使 GLUT4 转位至表面细胞膜以摄取葡萄糖^[11]。虽然 IRS 与 PI3K 的结合对于高脂饮食诱导的胰岛素抵抗的 SD 大鼠骨骼肌内 GLUT4 的转位是必要的,但是二者的结合还不足以刺激 GLUT4 介导的葡萄糖摄取的增加,葡萄糖摄取的增加需要 Akt 的参与^[11]。Akt 是一种丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶, PIP3 与 Akt 的 PH 结构域结合,促进 Akt 激活,进而促进 GLUT4 的转位和肌肉葡萄糖摄取^[12]。有研究表明^[9], Akt 的激活可以促进骨骼肌内 GLUT4 的转位,从而增加肌细胞的葡萄糖摄取。在胰岛素刺激下, GLUT4 从细胞内囊泡向质膜的转位可以促进葡萄糖摄取增加大约 40%^[13]。与 Akt 对 GLUT4 转位的作用类似,最近一些证据表明^[14], aPKC ζ/λ 在胰岛素刺激的骨骼肌 GLUT4 转位和葡萄糖摄取中也起着重要作用, aPKC ζ/λ 的磷酸化激活可以促进胰岛素刺激的 GLUT4 的转位和 L6 肌管对葡萄糖的摄取。PIP3 与 aPKC ζ/λ 的调节域结合导致 aPKC ζ/λ 的激活,进而促进 GLUT4 的转位^[15]。

虽然通过 Akt 刺激骨骼肌内 GLUT4 转位的精确分子机制仍然不是很清晰,但相对分子量为 160 000 的 Akt 底物 AS160 被认为是 Akt 介导 GLUT4 转位的一个重要的调控分子^[16]。AS160 是一种可以与 Rab 蛋白发生特异性作用的 GTP 酶激活蛋白。Rab 蛋白是细胞内囊泡运输的分子开关,其通过与上游调控因子以及下游效应子的相互作用,参与了囊泡的形成、转运、粘附、锚定和融合等过程。AS160 被认为通过与 Rab

蛋白相互作用参与了 Akt 对 GLUT4 的转位调节^[17-20]。当 AS160 的 Ser588 和 Thr642 位点突变为丙氨酸时,可以显著抑制胰岛素刺激的 GLUT4 转位^[17],显示 AS160 在胰岛素刺激的 GLUT4 的转位中发挥着重要作用。但也有研究表明^[21], Akt 促进 GLUT4 转位过程的调节是非 AS160 依赖的,并且已证明其他参与 GLUT4 转位的 Akt 底物,如含 FYVE 指磷酸肌醇激酶(FYVE finger-containing phosphoinositide kinase, PIKfyve)^[22]。Roach 等^[23]研究表明,与 AS160 关系密切的 TBC1 域家族成员 1(TBC1 domain family member 1, TBCID1)也有类似的可以被 Akt 磷酸化的位点。可见 Akt 促进 GLUT4 转位过程中 AS160 的作用仍然扑朔迷离,很有可能 AS160 和其他 Akt 底物一起共同参与了 GLUT4 的转位过程。

1.3 AMPK 信号通路与骨骼肌内 GLUT4 转位和表达

除 PI3K/Akt 信号通路, AMPK 的激活也可以促进 GLUT4 的转位和表达。5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸(5-Aminoimidazole-4-carboxamide 1- β -D-ribofuranoside, AICAR)(AMPK 激活剂)激活 AMPK 后可以上调大鼠比目鱼肌细胞以及原代培养的肌细胞的葡萄糖摄取和 GLUT4 mRNA 的表达,提示 GLUT4 是 AMPK 参与糖代谢调节的重要下游靶点^[24,25]。Hommes 等^[26]研究表明,给大鼠注射 AICAR 引起 AMPK 的激活,引起大鼠腓肠肌内 GLUT4 的蛋白表达增加。李蕾等^[27]研究表明, AMPK 可以通过调节糖代谢的下游靶蛋白,增加 GLUT4 的转位,进而增强肌肉胰岛素敏感性。有研究报道^[1],在 AMPK 活化的过程中同样会激活 AS160。因此, AS160 可能是调节骨骼肌内 GLUT4 转位的 PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路的一个关键交汇点。但胰岛素刺激和 AMPK 激活对 AS160 的影响似乎是通过两个不同的通路。渥曼青霉素(PI3K 抑制剂)可以抑制胰岛素对离体大鼠骨骼肌 AS160 的磷酸化效果,但 AICAR 所致 AMPK 激活和 AS160 磷酸化增加并不涉及 Akt 的磷酸化改变^[28]。

2 PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路在运动影响啮齿动物骨骼肌内 GLUT4 转位和表达中的作用

2.1 PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路存在复杂的交互作用

PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路并不是彼此孤立,

而是存在复杂的交互作用。首先, AMPK 对 PI3K/Akt 信号通路可以发挥双向调节作用。有研究者认为^[28-31], AMPK 的激活以及 AICAR 的使用可以促进 IRS、PI3K 和 Akt 等多种 PI3K/Akt 信号通路分子的活性增加。通过 AICAR 激活小鼠 C2C12 肌管的 AMPK, 结果表明 AMPK 的激活与 IRS-1 的 Ser789 位点的磷酸化之间存在直接的相互作用^[30]。Jakobsen 等^[32]研究表明, AMPK 的激活可以引起小鼠 C2C12 肌管的 IRS-1 的 Ser789 位点的磷酸化水平增加, 进而引起 PI3K 的活性增加。但 Tzatsos 等^[33]报道, AMPK 的激活可以促进 IRS-1 的 Ser794 位点磷酸化, 进而抑制 PI3K/Akt 信号通路。而 IRS-1 的 Ser794 位点磷酸化增加对 PI3K/Akt 信号通路的抑制可以导致 GLUT4 的转位减少^[34-36]。其次, PI3K/Akt 信号通路可以调节 AMPK 的活性, 比如 Akt 的激活可以下调 AMPK 的活性^[37,38]。Rider 等^[39]认为, Akt 所致的 AMPK 的 Ser487 或 Ser491 位点的磷酸化是胰岛素引起 AMPK 活性下降的关键步骤。

Liu 等^[40]研究表明, 高脂喂养引起大鼠骨骼肌内 AMPK α 的表达和活性受损, 而二甲双胍激活 AMPK 后可以明显改善高脂饮食诱导的胰岛素抵抗, 提示 AMPK 的活化与胰岛素信号通路之间存在关联, 而 AMPK 活性的下降可能会加速胰岛素抵抗和代谢异常的进展。Jessen 等^[41]报道, 运动激活 AMPK 后, 可以通过刺激 GLUT4 的表达调节 Wistar 大鼠骨骼肌的胰岛素敏感性。那么在运动影响骨骼肌 GLUT4 的转位和表达中 PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路是否共同发挥了作用呢?

2.2 PI3K/Akt 信号通路在运动影响骨骼肌内 GLUT4 转位和表达中的作用

对骨骼肌胰岛素抵抗的研究中, PI3K/Akt 信号通路受到众多研究者的关注, 但 Krook 等^[42]认为运动对骨骼肌内 GLUT4 转位和表达的影响与 PI3K/Akt 信号通路无关。对肥胖 Zucker 大鼠的研究表明, 运动可以上调 GLUT4 的蛋白表达, 但 IRS-1 的酪氨酸磷酸化水平并无明显变化^[43]。这些研究似乎暗示 PI3K/Akt 信号通路在运动调节骨骼肌内 GLUT4 的转位和表达中并不起作用。然而, 有研究者持不同意见, Chibalin 等^[44]的研究表明, 游泳运动可增强 Wistar 大鼠 IRS-2、PI3K 和 Akt 的活性, 同时增加 GLUT4 的蛋白表达。研究结果的不一致可能与采用的动物模型、使用的干预手段及检测的信

号分子等不同有关。

2.3 AMPK 信号通路在运动影响骨骼肌内 GLUT4 转位和表达中的作用

AMPK 信号通路在运动增加 GLUT4 转位和表达中发挥重要作用。一方面, 运动可以诱导 GLUT4 的转位, 其机制涉及 AMPK 信号通路^[45]。另一方面, 运动可以通过激活 AMPK 信号通路增加骨骼肌 GLUT4 mRNA 和蛋白表达^[46]。有研究者认为^[42], AMPK 是通过非胰岛素依赖的机制增加骨骼肌葡萄糖摄取, 并有一些研究者对此机制进行了深入探讨。有研究者报道^[47], AMPK 可以通过直接磷酸化过氧化物酶体增殖活化受体 γ 辅助活化因子 1 α (α subunit of peroxisome proliferators-activated receptor- γ coactivator-1, PGC-1 α) 调节骨骼肌 GLUT4 的表达。还有研究者认为^[48,49], AMPK 可以通过对 p38 分裂原激活的蛋白激酶 (p38 mitogen activated protein kinases, p38MAPK) 或内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 的作用刺激 GLUT4 转位。此外, AMPK 的主要上游激酶 (liver kinase B1, LKB1) 可能也参与了骨骼肌葡萄糖摄取。据报道^[50], 骨骼肌缺乏 LKB1 导致肌肉收缩诱导的葡萄糖摄取受到抑制。值得关注的是, 抑制 AMPK 活性对肌肉收缩诱导的小鼠骨骼肌葡萄糖摄取并无明显影响^[51,52]。考虑到这些研究结果存在的差异, 有必要进一步审查 AMPK 信号通路在运动影响骨骼肌内 GLUT4 转位和表达中的作用。

2.4 PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路可能共调运动对骨骼肌内 GLUT4 转位和表达的影响

早期的研究表明, 胰岛素和运动通过不同的信号传导机制促进 GLUT4 转位和葡萄糖摄取。然而对 PI3K 下游的胰岛素信号分子的进一步研究表明, aPKC ζ/λ 在胰岛素和运动刺激小鼠肌肉内 GLUT4 转位和葡萄糖摄取中均发挥了作用^[53,54]。Lessard 等^[55]研究表明, 运动训练可以增加高脂喂养大鼠骨骼肌 AMPK α 活性, 同时可通过增强胰岛素信号通路, 促进葡萄糖摄取。这些研究提示 PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路可能共调运动对骨骼肌内 GLUT4 转位和表达的影响。

有研究者报道, 在某些情况下 Akt 的激活与 PI3K 之间存在不一致^[55], 原因可能与 Akt 存在非 PI3K 依赖途径调节有关, 如钙/钙调素依赖性蛋白激酶 (calcium-calmodulin dependent protein kinase,

CaMK)的活化可直接磷酸化 Akt 的 Thr308 位点^[56]。值得注意的是, CaMK 除了可调节 Akt 的活性外,还可影响 AMPK 的激活。李良刚等^[25]认为, AMPK 可能位于 CaMK 途径的下游来调节骨骼肌细胞 GLUT4 mRNA 的表达。可见, AMPK 信号通路与胰岛素信号通路在调节运动引起的骨骼肌内 GLUT4 转位和表达方面存在密切的联系, CaMK 可能参与了这种联系。

很多研究者^[57-59]认为 AMPK α 的 Thr172 位点磷酸化是其激活的关键步骤。但有研究表明^[60], AMPK α 的 Ser485 位点的磷酸化也参与了 AMPK 活性的调节。值得关注的是, AMPK α 的 Ser485 位点是一个自我磷酸化位点, 并且此位点是 Akt 的一个靶点, 即 Akt 可以通过磷酸化 AMPK 的 Ser485 位点调节 AMPK 的活性。那么, Akt 对 AMPK 的 Ser485 位点的调节作用是否参与了运动对 GLUT4 的转位和表达的影响呢? 这些问题均有待于进一步的研究给予证实。除 AMPK 信号通路, 运动时还存在其它机制参与了对骨骼肌葡萄糖摄取的调节。有研究显示^[61], AMPK 失活的转基因小鼠在缺氧或 AICAR 激活后已糖摄取能力被完全阻断, 但收缩刺激的已糖摄取只是部分地被抑制。因此, 运动刺激的骨骼肌内 GLUT4 转位和表达增加很可能是多条信号通路共同作用的结果, 而非 PI3K 依赖的 Akt 信号通路很可能参与其中。

3 小结

由于 PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路之间存在复杂的交互作用, 并且二者均与骨骼肌内 GLUT4 的转位和表达有关, 因此本文对近年来关于 GLUT4 的转位和表达的运动激活以及 PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路介导运动改善啮齿动物骨骼肌葡萄糖摄取的研究进展进行了综述, 但是运动能否通过 PI3K/Akt 或非 PI3K 依赖性 Akt 信号通路以及 AMPK 信号通路共调运动刺激的 GLUT4 的转位和表达仍然存在诸多的不确定性, 对于可能联系这种共调作用的具体分子机制依然不甚明了。所以进一步明确运动刺激下参与 GLUT4 转位和表达的多种信号通路的作用, 尤其是深究运动调控的 GLUT4 改变是否涉及 AMPK 和 PI3K/Akt 信号通路之间的交互作用是有必要的, 在这方面的研究进展将有助于胰岛素抵抗相关慢性疾病的防治。

参考文献:

- [1] Habets DD, Luiken JJ, Ouwens M, et al. Involvement of atypical protein kinase C in the regulation of cardiac glucose and long-chain fatty acid uptake[J]. *Front Physiol*, 2012, 3: 361.
- [2] Jessen N, Goodyear LJ. Contraction signaling to glucose transport in skeletal muscle[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2005, 99(1):330-337.
- [3] 赵海燕, 王勇, 马永平, 等. 胰岛素信号转导障碍与胰岛素抵抗[J]. *新医学*, 2010, 41(4):267-271.
- [4] Ryder JW, Yang J, Galuska D, et al. Use of a novel impermeable biotinylated photolabeling reagent to assess insulin- and hypoxia-stimulated cell surface GLUT4 content in skeletal muscle from type 2 diabetic patients[J]. *Diabetes*, 2000, 49(4):647-654.
- [5] Zisman A, Peroni OD, Abel ED, et al. Targeted disruption of the glucose transporter 4 selectively in muscle causes insulin resistance and glucose intolerance[J]. *Nat Med*, 2000, 6(8): 924-928.
- [6] Bryant NJ, Govers R, James DE. Regulated transport of the glucose transporter GLUT4[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002, 3(4):267-277.
- [7] Huang S, Czech MP. The GLUT4 glucose transporter[J]. *Cell Metab*, 2007, 5(4):237-252.
- [8] Larance M, Ramm G, James DE. The GLUT4 code[J]. *Mol Endocrinol*, 2008, 22(2):226-233.
- [9] Thong FS, Dugani CB, Klip A. Turning signals on and off: GLUT4 traffic in the insulin- signaling highway[J]. *Physiology (Bethesda)*, 2005, 20(4):271-284.
- [10] Osorio-Fuentealba C, Contreras-Ferrat AE, Altamirano F, et al. Electrical stimuli release ATP to increase GLUT4 translocation and glucose uptake via PI3K γ -Akt-AS160 in skeletal muscle cells[J]. *Diabetes*, 2013, 62(5):1519-1526.
- [11] Lee SH, Lee HJ, Lee YH, et al. Korean red ginseng (Panax ginseng) improves insulin sensitivity in high fat fed Sprague-Dawley rats[J]. *Phytother Res*, 2012, 26(1):142-147.
- [12] Sasaki T, Sasaki J, Sakai T, et al. The physiology of phosphoinositides[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, 30(9):1599-1604.
- [13] Machado UF, Schaan BD, Seraphim PM. Glucose transporters in the metabolic syndrome[J]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, 2006, 50(2):177-189.
- [14] Bandyopadhyay G, Kanoh Y, Sajan MP, et al. Effects of adenoviral gene transfer of wild-type, constitutively active, and kinase-defective protein kinase C-lambda on insulin-stimulated glucose transport in L6 myotubes[J]. *Endocrinology*, 2000, 141(11):4120-4127.
- [15] Farese RV. Function and dysfunction of aPKC isoforms for glucose transport in insulin- sensitive and insulin-resistant

- states[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 283(1):E1-11.
- [16] Eguez L, Lee A, Chavez JA, et al. Full intracellular retention of GLUT4 requires AS160 Rab GTPase activating protein [J]. *Cell Metab*, 2005, 2(4):263-272.
- [17] Sano H, Kane S, Sano E, et al. Insulin-stimulated phosphorylation of a Rab GTPase-activating protein regulates GLUT4 translocation[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(17):14599-14602.
- [18] Taniguchi CM, Emanuelli B, Kahn CR. Critical nodes in signalling pathways: insights into insulin action[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2006, 7(2):85-96.
- [19] Frøig C, Richter EA. Improved insulin sensitivity after exercise: focus on insulin signaling[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2009, 17(S3):S15-20.
- [20] Chen S, Wasserman DH, MacKintosh C, et al. Mice with AS160/TBC1D4-Thr649Ala knockin mutation are glucose intolerant with reduced insulin sensitivity and altered GLUT4 trafficking[J]. *Cell Metab*, 2011, 13(1):68-79.
- [21] Bai L, Wang Y, Fan J, et al. Dissecting multiple steps of GLUT4 trafficking and identifying the sites of insulin action [J]. *Cell Metab*, 2007, 5(1):47-57.
- [22] Berwick DC, Dell GC, Welsh GI, et al. Protein kinase B phosphorylation of PIKfyve regulates the trafficking of GLUT4 vesicles[J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 25):5985-5993.
- [23] Roach WG, Chavez JA, Miinea CP, et al. Substrate specificity and effect on GLUT4 translocation of Rab GTPase-activating protein TBC1D1[J]. *Biochem J*, 2007, 403(2):353-358.
- [24] Sakoda H, Ogihara T, Anai M, et al. Activation of AMPK is essential for AICAR-induced glucose uptake by skeletal muscle but not adipocytes[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2002, 282(6):1239-1244.
- [25] 李良刚, 陈槐卿. CaMK 和 AMPK 信号通路能共调收缩信号诱导的骨骼肌细胞 GLUT4 基因转录[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2009, 36(4):471-479.
- [26] Holmes BF, Kurth-Kraczek EJ, Winder WW. Chronic activation of 5'-AMP-activated protein kinase increases GLUT4, hexokinase, and glycogen in muscle[J]. *J Appl Physiol* (1985), 1999, 87(5):1990-1995.
- [27] 李蕾, 李之俊. 运动改善胰岛素抵抗与腺苷酸活化蛋白激酶关系的研究进展[J]. *生理学报*, 2014, 66(2):231-240.
- [28] Bruss MD, Arias EB, Lienhard GE, et al. Increased phosphorylation of Akt substrate of 160 kDa (AS160) in rat skeletal muscle in response to insulin or contractile activity[J]. *Diabetes*, 2005, 54(1):41-50.
- [29] Tao R, Gong J, Luo X, et al. AMPK exerts dual regulatory effects on the PI3K pathway [J]. *J Mol Signal*, 2010, 5(1):1.
- [30] Jakobsen SN, Hardie DG, Morrice N, et al. 5'-AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamideriboside[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(50):46912-46916.
- [31] 黄德强, 罗凌玉, 王丽丽, 等. AMPK在胰岛素信号转导通路中的作用[J]. *中国细胞生物学学报*, 2011, 33(11):1220-1229.
- [32] Jakobsen SN, Hardie DG, Morrice N, et al. 5' AMP-activated protein kinase phosphorylates IRS-1 on Ser-789 in mouse C2C12 myotubes in response to 5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside[J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(50):46912-46916.
- [33] Tzatsos A, Tschlis PN. Energy depletion inhibits phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling and induces apoptosis via AMP-activated protein kinase-dependent phosphorylation of IRS-1 at Ser-794[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(25):18069-18082.
- [34] Ni YG, Wang N, Cao DJ, et al. FoxO transcription factors activate Akt and attenuate insulin signaling in heart by inhibiting protein phosphatases[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(51):20517-20522.
- [35] Leto D, Saltiel AR. Regulation of glucose transport by insulin: traffic control of GLUT4[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(6):383-396.
- [36] Watson RT, Pessin JE. Bridging the GAP between insulin signaling and GLUT4 translocation[J]. *Trends Biochem Sci*, 2006, 31(4):215-222.
- [37] Hahn-Windgassen A, Nogueira V, Chen CC, et al. Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity[J]. *J Biol Chem*, 2005, 280(37):32081-32089.
- [38] Kovacic S, Soltys CL, Barr AJ, et al. Akt activity negatively regulates phosphorylation of AMP-activated protein kinase in the heart[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(41):39422-39427.
- [39] Rider MH. The ubiquitin-associated domain of AMPK-related protein kinases allows LKB1-induced phosphorylation and activation[J]. *Biochem J*, 2006, 394(Pt3):e7-9.
- [40] Liu Y, Wan Q, Guan Q, et al. High-fat diet feeding impairs both the expression and activity of AMPK α in rat skeletal muscle [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 339(2):701-707.
- [41] Jessen N, Pold R, Buhl ES, et al. Effects of AICAR and exercise on insulin-stimulated glucose uptake, signaling, and GLUT-4 content in rat muscles[J]. *J Appl Physiol*(1985), 2003, 94(4):1373-1379.
- [42] Krook A, Wallberg-Henriksson H, Zierath JR. Sending the signal: molecular mechanisms regulating glucose uptake[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2004, 36(7):1212-1217.
- [43] Christ CY, Hunt D, Hancock J, et al. Exercise training improves muscle insulin resistance but not insulin receptor signaling in obese Zucker rats[J]. *J Appl Physiol* (1985), 2002, 92(2):736-744.
- [44] Chibalin AV, Yu M, Ryder JW, et al. Exercise-induced changes in expression and activity of proteins involved in insulin signal

- transduction in skeletal muscle: differential effects on insulin-receptor substrates 1 and 2[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2000, 97(1):38-43.
- [45] Olmes B, Dohm GL. Regulation of GLUT4 gene expression during exercise[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2004, 36(7):1202-1206.
- [46] Holmes B, Dohm GL. Regulation of GLUT4 gene expression during exercise[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2004, 36(7):1202-1206.
- [47] J ger S, Handschin C, St-Pierre J, et al. AMP-actived protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(29):12017-12022.
- [48] Li J, Hu X, Selvakumar P, et al. Role of the nitric oxide pathway in AMPK-mediated glucose uptake and GLUT4 translocation in heart muscle[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287(5):E834-841.
- [49] Li J, Miller EJ, Ninomiya-Tsuji J, et al. AMP-activated protein kinase activates p38 mitogen-activated protein kinase by increasing recruitment of p38 MAPK to TAB1 in the ischemic heart[J]. *Circ Res*, 2005, 97(9):872-879.
- [50] Sakamoto K, McCarthy A, Smith D, et al. Deficiency of LKB1 in skeletal muscle prevents AMPK activation and glucose uptake during contraction[J]. *EMBO J*, 2005, 24(10):1810-1820.
- [51] Atherton PJ, Babraj J, Smith K, et al. Selective activation of AMPK-PGC-1 α or PKB-TSC2-mTOR signaling can explain specific adaptive responses to endurance or resistance training-like electrical muscle stimulation[J]. *FASEB J*, 2005, 19(7):786-788.
- [52] J rgensen SB, Viollet B, Andreelli F, et al. Knockout of the α 2 but not α 1 5'-AMP-activated protein kinase isoform abolishes 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -D-ribofuranosidebut not contraction-induced glucose uptake in skeletal muscle[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(2):1070-1079.
- [53] Farese RV, Sajan MP, Yang H, et al. Muscle-specific knockout of PKC-lambda impairs glucose transport and induces metabolic and diabetic syndromes[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(8):2289-2301.
- [54] Richter EA, Vistisen B, Maarbjerg SJ, et al. Differential effect of bicycling exercise intensity on activity and phosphorylation of atypical protein kinase C and extracellular signal-regulated protein kinase in skeletal muscle[J]. *J Physiol*, 2004, 560(Pt 3):909-918.
- [55] Lessard SJ, Rivas DA, Chen ZP, et al. Tissue-specific effects of rosiglitazone and exercise in the treatment of lipid-induced insulin resistance[J]. *Diabetes*, 2007, 56(7):1856-1864.
- [56] Kumari S, Liu X, Nguyen T, et al. Distinct phosphorylation patterns underlie Akt activation by different survival factors in neurons[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 96(1-2):157-162.
- [57] Leclerc I, Rutter GA. AMP-activated protein kinase: a new beta-cell glucose sensor: Regulation by amino acids and calcium ions[J]. *Diabetes*, 2004, 53(S3):S67-74.
- [58] Zang M, Zuccollo A, Hou X, et al. AMP-activated protein kinase is required for the lipid-lowering effect of metformin in insulin-resistant human HepG2 cells[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(46):47898-47905.
- [59] Hardie DG. Minireview: the AMP-activated protein kinase cascade: the key sensor of cellular energy status[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(12):5179-5183.
- [60] Horman S, Vertommen D, Heath R, et al. Insulin antagonizes ischemia-induced Thr172 phosphorylation of AMP-activated protein kinase α -subunits in heart via hierarchical phosphorylation of Ser485/491[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(9):5335-5340.
- [61] Mu J, Brozinick JT Jr, Valladares O, et al. A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle[J]. *Mol Cell*, 2001, 7(5):1085-1094.

PI3K/Akt and AMPK Signaling Pathway and Effect of Exercise on Rodent Skeletal Muscle GLUT4 Translocation and Expression

ZHANG Yun-li, WANG Lin, LIU Tie-min
(Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

[Abstract] Skeletal muscles play an important role in glucose homeostasis. The translocation and expression changes of glucose transporter 4 (GLUT4) as one of the most important glucose transporter proteins in skeletal muscle are closely associated with insulin resistance. This paper reviewed the recent research progress on the exercise-induced translocation and expression of GLUT4 as well as the improvement of exercise-induced glucose uptake by phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K) / protein kinase B (Akt) and AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathways in rodent skeletal muscle. The purpose of this paper is to clearly understand the mechanism underlying GLUT4 translocation and expression in rodent skeletal muscles.

[Key words] Skeletal muscle; Exercise; Insulin resistance; Glucose transporter 4 (GLUT4); Phosphatidylinositol 3-kinases (PI3K); Protein kinase B (Akt); AMP-activated protein kinase (AMPK)