

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 3 期

2017 年 6 月

目 次

• 论 著 •

- 树鼩形觉剥夺性近视模型的建立及观察 杨冬梅, 朱 勤, 李 娜, 等(171)
- 硒对氟致大鼠肾小管上皮细胞线粒体膜电位改变的拮抗作用 常 凯, 王 裕, 庞文彪, 等(179)
- 泛素特异性蛋白酶 19 对烟熏诱导慢性阻塞性肺疾病大鼠
模型骨骼肌萎缩的作用及机制 刘 乾, 刘 松, 徐卫国, 等(185)
- 二乙基亚硝胺诱导建立 *Apc* 基因突变大鼠与 F344 大鼠肝癌模型的比较 谢 蓓, 赵 磊, 孙 婧, 等(191)
- ICR 小鼠感染呼肠孤病毒 III 型的实验研究 罗银珠, 张 钰, 何丽芳, 等(198)
- 仙台病毒核酸测序检测方法的建立 张欢欢, 余陈欢, 戴方伟, 等(204)
- 不同糖油比例高脂饲料建立高脂血症大鼠模型的比较 覃辉艳, 王绍龙, 温平镜, 等(209)
- 氯化钠的大鼠亚慢性毒性观察 李光先, 刘香梅, 刘冬虹, 等(214)

• 经验交流 •

- 罗格列酮、吡格列酮对兔血脂调节作用的比较 吴小利(220)
- 不同厂家试剂盒检测大鼠血清中碱性磷酸酶活性的比较 李 红, 余儒洋, 李 疆, 等(222)
- 一种实验动物新型隔离器系统的研制 卢领群, 石巧娟, 金秀清, 等(224)
- 实验动物行业高端复合型管理人才培训师队伍选拔与评价方法的初步探讨 林丽芳, 崔淑芳(227)

• 禽类实验动物的研究与应用 •

- SPF 鸡不同生长阶段粪便菌群组成及多样性研究 周 妍, 刁晨曦, 张圆圆, 等(231)
- 鹅细小病毒 VP3 蛋白抗血清的制备及在鸭胚和
鸭胚成纤维细胞中的增殖研究 牛银杰, 刘柏含, 赵丽丽, 等(240)
- miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 在马立克氏病抗性与
易感 SPF 鸡法氏囊组织的差异表达分析 王瑞琪, 廉传江, 易 诚, 等(244)
- 应用 PCR 方法快速鉴定 SPF 金定鸭性别 徐丽晶, 孙 畅, 陆涛峰, 等(249)
- 抗原处理相关转运体基因多态性与疾病相关性的研究进展 王兴童, 陈洪岩, 韩凌霞(252)

期刊基本参数: CN31-1954/Q*1981*b* 大 16*80*zh*P*¥ 10.00*2000*17*2017-06

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
扬州大学比较医学中心
苏州大学动物实验中心
广东省医学实验动物中心
中国科学院上海药物研究所实验动物室
上海市实验动物质量监督检验站

上海交通大学医学院实验动物科学部
浙江省实验动物中心
上海斯莱克实验动物有限责任公司
南通大学实验动物中心
上海市公共卫生临床中心
上海儿童医学中心

山东省实验动物中心
浙江中医药大学动物实验研究中心
第二军医大学实验动物中心
哈尔滨兽医研究所
杭州师范大学实验动物中心
复旦大学药学院

Laboratory Animal and Comparative Medicine

Vol.37 No.3

Jun. 2017

Main Contents

- Preliminary Establishment and Research on Form Deprivation Myopia Model
in Tree ShrewYANG Dong-mei, ZHU Qin, LI Na, et al(171)
- Antagonistic Effect of Selenium on Change of Mitochondrial Membrane
Potential of NRK-52E Cells Induced by Sodium Fluoride.....CHANG Kai, PANG Wen-biao, WANG Yu, et al(179)
- Effect and Mechanism of Ubiquitin-specific Peptidase 19 on Muscle Atrophy of Chronic Obstructive
Pulmonary Disease Induced by Cigarette Smoke Exposure in RatsLIU Qian, LIU Song, XU Wei-guo, et al(185)
- Comparison on Hepatocarcinoma Model Induced by Diethylnitrosamine
in Apc-mutant Rat and F344 RatXIE Bei, ZHAO Lei, SUN Jing, et al(191)
- Research on Reovirus III (Reo-3) Infection in ICR MiceLUO Yin-zhu, ZHANG Yu, HE Li-fang, et al(198)
- Development of Detection Method for Sendai Virus by
Nucleic Acid SequencingZHANG Huan-huan, YU Chen-huan, DAI Fang-wei, et al(204)
- A Comparison on Hyperlipidemia Rat Models Induced by High-fat
Diet with Different Proportions of Sugar and Oil.....QIN Hui-yan, WANG Shao-long, WEN Ping-jing, et al(209)
- The Sub-chronic Toxicity of Sodium Chloride in Rats.....LI Guang-xian, LIU Xiang-mei, LIU Dong-hong, et al(214)
- Composition and Diversity of Fecal Microflora in SPF Chickens
at Different Growth StagesZHOU Yan, DIAO Chen-xi, ZHANG Yuan-yuan, et al(231)
- Preparation of Goose Parvovirus VP3 Antiserum and Identification of
Propagation in Duck Embryo and Duck Embryo Fibroblasts.....NIU Yin-jie, LIU Bai-han, ZHAO Li-li, et al(240)
- Differential Expression Analysis of miR-200b-3p and miR-200b-5p
in Marek's Disease Resistant and Susceptible SPF ChickensWANG Rui-qi, LIAN Chuan-jiang, YI Cheng, et al(244)
- Application of PCR Method for Rapid Sex Determination in SPF Jinding Duck ...TXU Li-jing, SUN Chang, LU Tao-feng, et al(249)
- Advances in Research on Relationship between Transporter Associate with
Antigen Processing Gene Polymorphism and DiseasesWANG Xing-tong, CHEN Hong-yan, HAN Ling-xia(252)

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3期 2017年6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
(责任编辑 富群华)

Laboratory Animal and Comparative Medicine

Established in September 1981, Bimonthly

Vol.37 No.3 Jun. 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

树鼩形觉剥夺性近视模型的建立及观察

杨冬梅¹, 朱 勤¹, 李 娜², 郭立云¹, 张晓帆¹, 张洁莹¹, 胡 敏¹, 代解杰²

(1. 云南省第二人民医院眼科中心 昆明医科大学第四附属医院眼科, 昆明 650021;

2. 中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所, 昆明 650118)

[摘要] 目的 建立树鼩性成熟期及成年早期形觉剥夺性近视(FDM)模型, 探讨年龄在近视发生发展中的作用及以视网膜形态变化为主的局部视网膜机制与近视的关系。方法 4月龄和5月龄树鼩各30只, 随机分为空白对照组、遮盖组。遮盖组右眼遮盖作为实验眼, 左眼开放作为自身对照眼。用自制半透明眼罩建立形觉剥夺近视模型, 然后撤出干预因素, 分别于遮盖3周、6周测量各组屈光度及眼轴长度; 于遮盖6周观察视网膜厚度及视网膜各层细胞数目变化情况。结果 4月龄和5月龄树鼩遮盖右眼3周后, 遮盖眼远视度数均有所降低, 但与自身对照眼相比差异无统计学意义($P>0.05$); 而遮盖6周后: 两组的屈光度和眼轴与对照眼比较均有明显差异($P<0.05$); 在遮盖期间, 形觉剥夺眼眼轴不断增长, 近视度数也逐渐增加, 二者有很好的直线负相关关系; 并且4月龄组所诱导出的近视程度高于5月龄组($P<0.05$)。形觉剥夺可引起各层视网膜普遍变薄, 有核细胞层、感光细胞层、内核层、神经节细胞层中胞核数减少, 排列稀疏紊乱。结论 形觉剥夺可以诱导性成熟期及成年早期树鼩的近视形成及视网膜形态发生变化。

[关键词] 树鼩; 形觉剥夺性近视(FDM); 视网膜形态学

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0171-08

世界各地的青少年近视患病率明显增高, 且绝大部分为病理性近视^[1-5]。我国学龄期青少年近视眼患病率高达70%~80%, 位居世界第二位, 且发病率呈上升趋势^[6-8]。因此, 阐明青少年近视的发生机制并有效干预近视的发生发展具有重要意义。本实验通过选择与人类视觉系统高度相似的4月龄和5月龄树鼩作为实验动物^[9-12], 采用改良的自制半透明眼罩遮盖实验眼, 造成形觉剥夺成像障碍,

建立并诱导出树鼩性成熟期及成年早期形觉剥夺性近视(FDM)模型, 探讨年龄在近视发展中的作用; 并从形态学方面, 初步探索局部视网膜机制在近视形成中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物及模型建立和分组

排除先天性近视及其他眼部疾患的4月龄及5月龄雄性健康实验用树鼩各30只, 体质量120~200 g, 由昆明医科大学实验动物中心提供[SCXK(滇)K2013-0002]。将4月龄、5月龄树鼩各随机分为空白对照组和遮盖组, 每组15只。A₀组: 4月龄空白对照组; A组(4月龄遮盖组): 右眼遮盖作为实验眼, 左眼开放作为自身对照眼, 于遮盖3周(A₃)和6周(A₆)时测量眼轴及屈光度; B₀组: 5月龄空白对照组; B组(5月龄单纯遮盖组): 右眼遮盖, 左眼开放作为自身对照眼, 于遮盖3周(B₃)和6周(B₆)时测量眼轴及屈光度。将自制半透明眼罩(外径

[收稿日期] 2016-12-12

[基金项目] 国家自然科学基金(81560168), 国家科技支撑计划项目(2014BAI01B01), 云南省联合支持国家计划项目(2015GA009), 云南省自然科学基金(2013FZ191), 昆明医科大学重点联合专项(2014FA017), 云南省卫生科技计划项目(2014NS043)

[作者简介] 杨冬梅(1985-), 女, 硕士研究生, 住院医师, 研究方向: 斜视弱视小儿眼病。E-mail: 12326703@qq.com

[通讯作者] 胡 敏。E-mail: fudanhumin@sina.com

代解杰。E-mail: 278206145@qq.com

1.428 mm, 内径 1.314 mm), 用 1-0 黑丝线缝于实验组树鼯右眼内外眦皮肤处, 深达骨膜, 打活结固定(以备定期进行眼罩消毒), 并在眼罩上打孔供透气用(图 1)。室内人工饲养, 自然昼夜节律, 自由进食饮水, 室温 22~28 °C。遮盖过程中, 隔日观察遮盖情况, 缝线松动或脱落立即重新缝合。



图 1 半透明眼罩遮盖右眼建立形觉剥夺模型

1.2 主要仪器设备和试剂

复方托吡吡胺滴眼液, 规格: 10 mL/支, 批号: M584571, 盐酸奥布卡因滴眼液, 规格: 20 mL: 80 mg/支, 批号: J20100128, 均为日本 Santen 参天制药(中国)有限公司; 戊巴比妥钠, 规格: 50 mg/瓶, 美国 Sigma 公司, 批号: P3761; 外径千分尺, 中国 LINKS/哈量, 型号: 300; A 超增益矫正仪器, 天津迈达公司, 型号: ODM-2100S; 带状检影镜, 苏州六六公司, 型号: YZ24。

1.3 眼球生物学参数测量

1.3.1 屈光度测量 动物在安静状态时, 于结膜囊点质量分数为 1% 复方托吡吡胺滴眼液共 3 次(间隔

10 min), 充分散瞳 0.5 h 后于暗室内行视网膜检影。动物头部位置固定, 工作距离为 0.50 m, 以 0.25D 间隔在水平及垂直子午线上带状光检影, 散光以半量计入球镜, 每眼重复测量 3 次取平均值。1.3.2 眼轴测量 盐酸奥布卡因滴眼液共 3 次(间隔 3 min), 调整 A 超增益矫正仪器后, 自动模式下测量眼轴长度(取角膜顶点到眼球后极部玻璃体视网膜界面的距离) 6 次, 精确到 0.01 mm, 取平均值。各时间段生物测量结束后, 于各组随机取 1 只树鼯用质量分数 3% 戊巴比妥(0.1 mL/kg)深度麻醉后迅速摘除眼球后, 用外径千分尺测量树鼯眼球前后径(图 2)。

本实验设计采用单盲法, 检影验光及眼轴测量均由同一位专业人员操作, 实验过程中具体的分组方法及干预措施, 操作人员均不知情。

1.4 视网膜形态学观察

于遮盖 6 周时, 腹腔内注射过量质量分数 3% 戊巴比妥钠深度麻醉树鼯, 在树鼯上方、鼻侧巩膜缝线标记后立即摘出眼球, 放入新鲜配制的混合固定液(体积分数 40% 甲醛、冰醋酸、蒸馏水、体积分数 95% 乙醇, 按 2:1:7:10 的比例配制)中, 4 °C 固定 24 h, 同时显微镜下用 1 mL 注射器刺破角膜, 向玻璃体腔内注射少量固定液, 以便充分固定和防止视网膜脱离, 待组织变硬后在显微镜下去除眼前节, 将眼球壁全层完整分离。所取标本以流水冲洗 24 h, 然后常规梯度乙醇脱水, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 连续切片 5 张, 每张切片厚度 4 μm, 1 张用于 HE 染色, 2 张用于 TUNEL 染色, 其余备用。用三乙氧基硅烷(APES)处理过的玻片收取组织切片, 恒温箱 60 °C 烤片 3~4 h。光镜下观察 HE 切片中的视网膜厚度及各层细胞形态学变化。

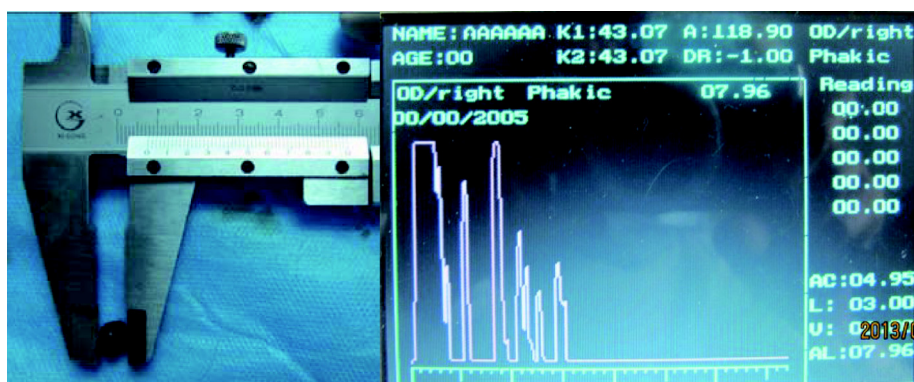


图 2 眼球前后径及眼轴的测量

1.5 统计学分析

本实验所有数据均采用表示,应用统计软件SPSS17.0进行数据检验。同一时间点双眼比较采用配对 t 检验,不同时间点的数据比较采用单因素方差分析(ANOVA),组间两两比较比较采用LSD法,不同年龄组同一时间点数据比较采用配对 t 检验,眼轴与屈光度关系采用 Person 相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 眼球生物参数测量

A₀组、B₀组双眼及其他各组左眼随生长发育屈光度呈生理性远视化发展,眼轴逐渐延长;A₃组

右眼远视度数有所降低,眼轴较左眼延长约0.05 mm;A₆组右眼屈光度与左眼的差值为 3.49D,呈明显近视漂移,眼轴较左眼延长 0.33 mm;B₃组右眼屈光度及眼轴与左眼无明显差异;B₆组右眼诱导出的相对近视程度约为 2.56 D,眼轴比左眼增长 0.23 mm。将各组右眼的屈光度及眼轴长度差值进行单因素方差分析,除A₀组与A₃组、B₀组与B₃组外,其他各组间比较均有差异(表1,表2)。

将A₆组双眼屈光度差值(d_1)及眼轴的差值(d_2)与B₆组进行比较,A₆组诱导出的屈光度及眼轴数值明显高于B₆组(表3)。并且在遮盖期间,随着形觉剥夺眼轴不断增长,近视度数也逐渐增加,二者有很好的直线负相关关系(A₆组 $r=-0.926$, $P<0.01$;B₆组 $r=-0.922$, $P<0.01$)。

表1 4月龄树鼩各组屈光度、眼轴长度比较

Table 1 Four months tree shrews at the age of diopter and axial length contrast

组别	n	屈光度(D)		眼轴长度/mm	
		右眼(OD)	左眼(OS)	右眼(OD)	左眼(OS)
A ₀	15	7.02 ± 0.19	7.07 ± 0.12	7.79 ± 0.08	7.81 ± 0.12
A ₃	15	6.72 ± 0.30	6.87 ± 0.15	7.87 ± 0.12	7.83 ± 0.15
A ₆	15	2.71 ± 0.26 ^{△△}	5.90 ± 0.28	8.19 ± 0.20 ^{△△*&&}	7.86 ± 0.13

注:与A₀组比较,△△ $P<0.01$;与A₃组比较,* $P<0.05$,右眼与左眼比较,&& $P<0.01$

表2 5月龄树鼩各组屈光度、眼轴长度比较

Table 2 Five months tree shrews at the age of diopter and axial length contrast

组别	屈光度(D)		眼轴长度/mm	
	右眼(OD)	左眼(OS)	右眼(OD)	左眼(OS)
B ₀	6.53 ± 0.30	6.37 ± 0.33	7.82 ± 0.12	7.83 ± 0.17
B ₃	5.47 ± 0.23	5.83 ± 0.24	7.89 ± 0.09	7.87 ± 0.06
B ₆	2.91 ± 0.26 ^{△*&}	5.58 ± 0.22	8.12 ± 0.26 ^{△*&}	7.91 ± 0.13

注:与B₀组比较,△ $P<0.05$,与B₃组比较,* $P<0.05$,右眼与左眼比较,& $P<0.05$, $n=15$

表3 4月龄和5月龄树鼩形觉剥夺6周后双眼屈光度与眼轴差值比较

Table 3 Form deprivation after six weeks of age in four and five months at the age of tree shrew binoculus diopter difference and axial length difference

组别	屈光度 d_1 (D)	眼轴 d_2 (mm)
A ₆	3.43 ± 0.25	0.41 ± 0.02
B ₆	2.92 ± 0.18	0.33 ± 0.02
t	10.269	11.685
P	0.000	0.000

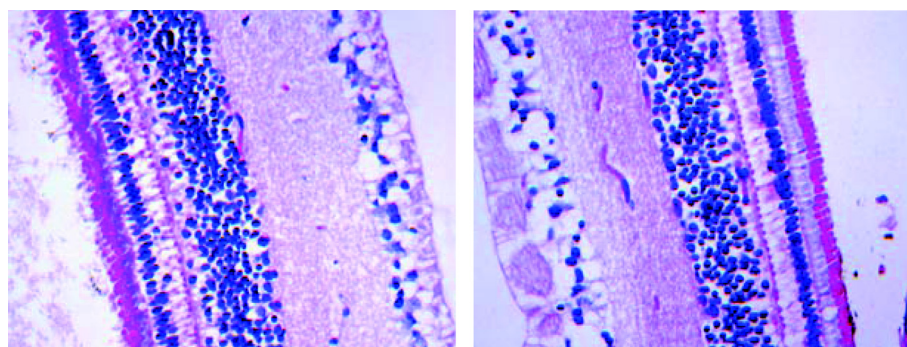
注: d_1 (D)=左眼屈光度-右眼屈光度; d_2 (mm)=右眼眼轴长度-左眼眼轴长度

2.2 视网膜形态变化观察

光学显微镜下可见,A₀组和B₀组双眼视网膜厚度及各层细胞核数无明显差别(图3,图4);A₆组和B₆组实验眼与对照眼相比视网膜各层普遍变薄,尤以神经纤维层、内丛状层、内核层最为明显(图5,图6);而有核细胞层胞核数减少、排列紊乱,尤以感光细胞层、内核层最为明显;感光细胞层胞核明显减少、内外节排列紊乱,内核层胞核层数明显减少、排列稀疏(图7,图8)。

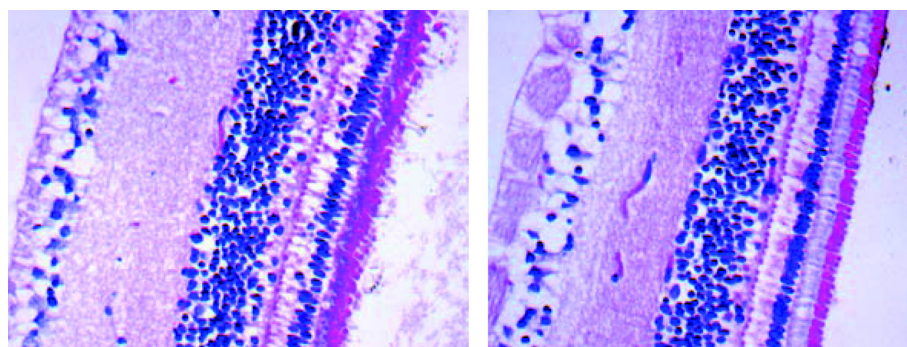
3 讨论

人类正视化过程中眼球发育经历了两个阶段,婴儿期:此期眼轴发育较快,2~3年增加约5 mm,远视度数明显降低;青少年期:此期约持续10年甚至更长的时间,眼球生长速度变缓,眼轴仅增加1 mm,屈光状态向正视眼方向继续发展^[13,14]。但是异常的视觉环境可以改变这种眼球正视化的既定模式以适应新的视觉刺激,使眼球生长失去调控,眼轴过度延长导致屈光不正。在经典的动物实验性



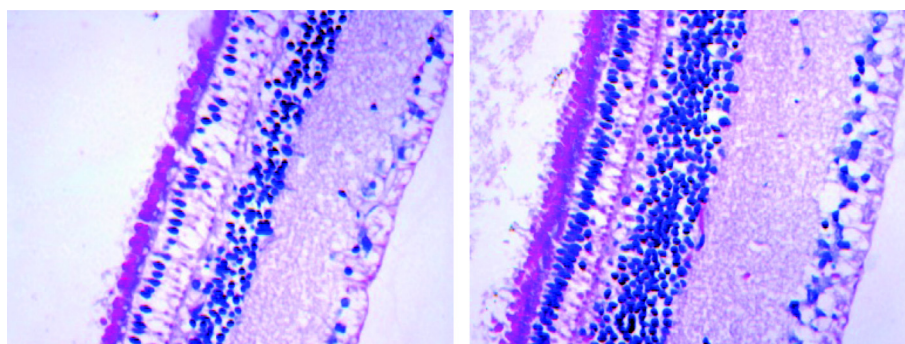
右眼

左眼

图 3 A₀ 组树鼯视网膜(HE × 400)Figure 3 A₀ group of retina in tree shrew (HE × 400)

右眼

左眼

图 4 B₀ 组树鼯视网膜(HE × 400)Figure 4 B₀ group of retina in tree shrew (HE × 400)

右眼

左眼

图 5 A₆ 组树鼯视网膜(HE × 400)Figure 5 A₆ group of retina in tree shrew (HE × 400)

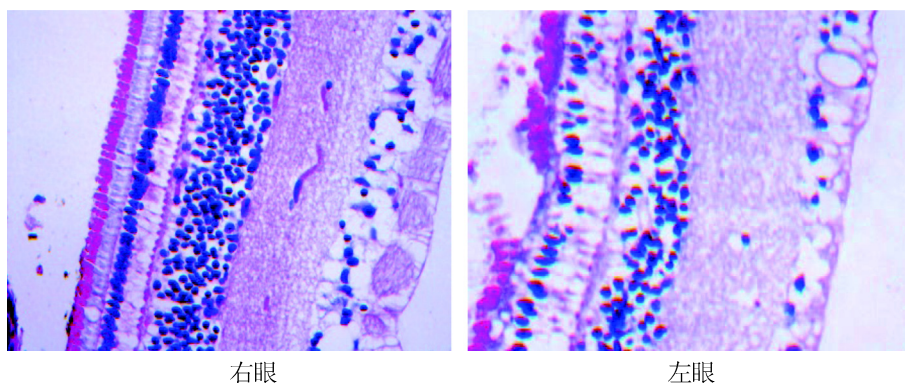
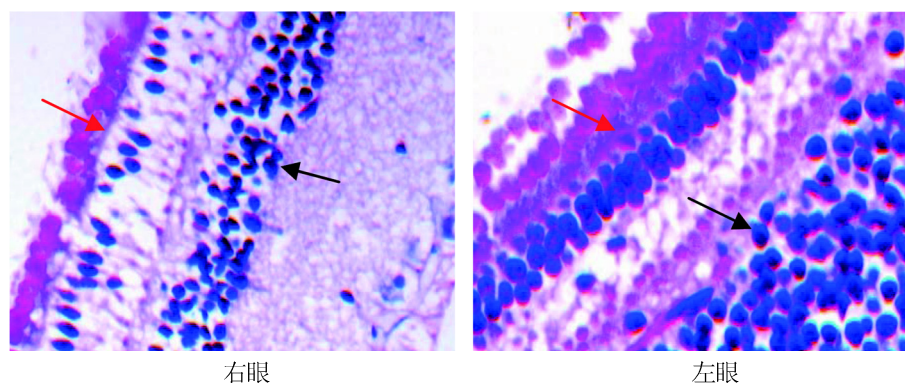
图 6 B₆组树鼯视网膜 (HE × 400)Figure 6 B₆ group of retina in tree shrew (HE × 400)图 7 A₆组树鼯视网膜的感光细胞层(红色→)、内核层(→) (HE × 400)

Figure 7 Photoreceptor cell layer (红色→) and inner nuclear layer (→) of retina of A6 group in tree shrew (HE × 400)

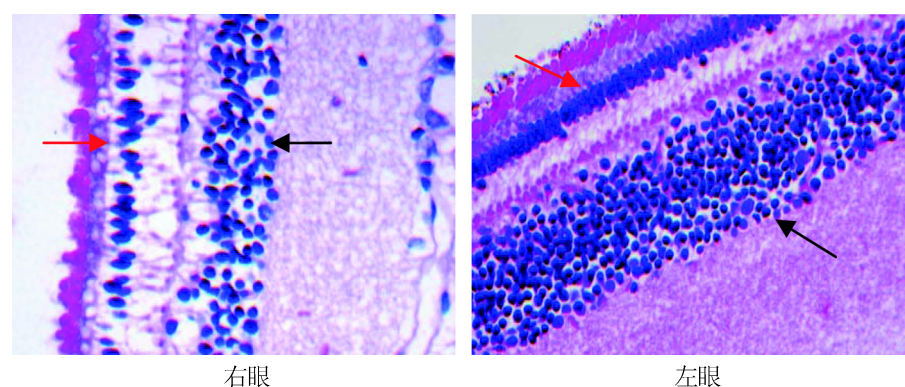
图 8 B₆组树鼯视网膜的感光细胞层(红色→)、内核层(→) (HE × 400)

Figure 8 Photoreceptor cell layer (红色→) and inner nuclear layer (→) of retina of B6 group in tree shrew (HE × 400)

近视模型中, FDM 可以通过眼睑缝合或戴弥散镜片等方式, 使物像无法在视网膜上聚焦, 视觉系统缺乏相应的反馈信号, 眼球生长失去调控, 过度延长而发生^[15-18]。国内外目前比较成熟的 FDM 动物模型包括: 鸡、豚鼠、树鼩、猕猴、松鼠猴和啮齿类动物等^[19-23]。

尽管对 FDM 进行了大量实验研究, 然而多数经典的实验动物模型几乎都采用眼球发育敏感期的婴幼儿模型, 那么进入青春期后以及成年早期, 正视化机制是否依然发挥作用; 在正视化的末期或结束后, 异常视觉的输入能否破坏眼球原有生长模式, 从而产生近视。大量的流行病学统计^[24-26]及相关研究表明^[18, 27-28], 人类的近视绝大部分是从正视化的末期(大约 7~9 岁左右)开始出现, 且高发于眼球发育的第二阶段(青少年期), 即人类 FDM 形成的最敏感时期为 8~16 岁; 并且成年后正视化机制仍在发挥作用, 只是表现方式发生了变化^[18, 29]。研究表明^[30], 暗光下鸡可以形成近视眼, 暗光环境中主要是视锥细胞受影响; 以视锥细胞为主的动物(如松鼠)对形觉剥夺极为敏感^[31], 而以视杆细胞为主的猫对形觉剥夺不敏感^[32]; 用甲酰缩肌胺选择性损伤视锥细胞后, 鸡对形觉剥夺的反应明显减轻^[33]; 说明以视锥细胞为主的局部视网膜作用机制在 FDM 的形成中有重要作用。用外源性甲状腺素抑制剂喂养性成熟期的大鼠和小鼠, 造成与甲状腺激素受体 β 缺陷时相同的表现: 中波长视蛋白表达减少, 短波长视蛋白普遍表达增多^[34]。说明青春期(性成熟后)视锥细胞的视蛋白表达, 仍具有一定的可塑性, 但是鼠的视网膜以视杆细胞为主, 且其视觉系统与人类相差甚大。因此, 选择与人类正视化机制存在共性及视锥细胞为主的动物为研究对象, 建立青少年期动物的 FDM 模型, 研究结果才更具有比较医学意义。

树鼩具有发达的视觉系统和一些灵长类动物的视觉特征, 双眼视觉和色觉都很发达, 它的光感受器以视锥细胞为主(视杆细胞少于 4%), 为二色视、昼行性动物, 是国内外较成熟的近视眼动物模型。据文献报道, 树鼩在正视化过程中眼球发育的两个阶段与人类接近, 与人类的正视化机制存在共性^[9, 11, 12, 35, 36]。根据眼部各屈光成分及眼轴发育曲线可知: 15~18 周龄(4 月龄左右)的树鼩相当于人类的青少年时期(10~15 岁), 此时正是人类近视的高发

期; 20 周龄(近 5 月龄)相当于成年早期(18~20 岁)^[12]。因此, 本实验选择与人类视觉系统发育较接近的青春期(4 月龄)和成年早期(5 月龄)树鼩作为实验动物, 采用改良的自制半透明眼罩遮盖实验眼, 造成形觉剥夺成像障碍, 结果表明诱导并建立了青春期及成年早期树鼩单眼 FDM 动物模型。

树鼩出生 15 d 左右睁眼时屈光状态为 +25D, 然后迅速下降, 30 d 后基本稳定在 +5D 左右, 眼轴长约 7.8 mm^[37]。本实验中, 出生 4 月龄的树鼩屈光度约为 7.00 D, 眼轴为 7.80 mm, 出生 5 月龄时屈光度下降约 0.75 D, 眼轴增加 0.02 mm, 与 Siegwart 等^[37]和 Norton 等^[10]的研究结果一致, 即树鼩性发育成熟后眼球处于缓慢发育阶段, 眼轴缓慢变长, 趋于正视。4 月龄和 5 月龄树鼩在遮盖 3 周后屈光度和眼轴变化不明显, 仍然呈高度远视状态; 而遮盖 6 周后, 4 月龄和 5 月龄树鼩则分别诱导出的相对近视程度为 3.49 D 和 2.56 D, 眼轴相对增长约 0.33 mm 和 0.23 mm, 均明显形成了近视; 4 月龄树鼩所形成的近视程度远高于 5 月龄, 这与 Siegwart 等^[37]提出的在树鼩青春期和成年早期可以成功诱导出近视模型的观点相一致。此外, 遮盖眼的屈光度和眼轴长度之间存在负性线性相关关系; 证实了形觉剥夺主要造成树鼩遮盖眼眼轴的延长, 形成的近视属轴性近视, 且剥夺发生越早、持续时间越长, 其近视程度越重。

尽管树鼩的视网膜厚度与人类相比较薄, 但其视网膜结构及主要组成细胞与人类极为相似^[38, 39]。本实验结果显示: 随形觉剥夺时间延长至 6 周时, 近视形成, 树鼩视网膜全层普遍变薄, 尤以内核层、内丛状层、神经纤维层最为明显, 而有核细胞层感光细胞层、内核层、神经节细胞层中不仅胞核数减少, 而且排列稀疏紊乱, 与一些研究者^[40-43]对豚鼠 FDM 视网膜形态学的研究结果一致。

综上所述, 本实验研究表明, 在性成熟期以及成年早期树鼩的眼球发育过程中, 正视化机制仍然发挥作用, 形觉剥夺仍然可以对此年龄段树鼩的屈光状态及视网膜形态造成明显影响, 初步证实了建立与人类视觉发育比较接近的形觉剥夺性动物近视模型的可行性。从实验结果推测, 以感光细胞为主的视网膜细胞减少可能是高度近视眼患者永久性视网膜变薄、视功能障碍的重要原因之一。如果能从视锥细胞发育分化调控及其可塑性研究的途径入

手并予以有效地干预, 将会为病理性近视的药物治
疗提供新的思路, 这也是本课题下一步研究的重点。

参考文献:

- [1] Chow YC, Dhillon B, Chew PT, et al. Refractive errors in Singapore medical students[J]. Singapore Med J, 1990, 31 (5):472-473.
- [2] Wong TY, Foster PJ, Hee J, et al. Prevalence and risk factors for refractive errors in adult Chinese population in Singapore [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(9):2486-2494.
- [3] Mohan M, Pakrasi S, Zutshi R. Myopia in India[J]. Acta Ophthalmol Suppl, 1988, 185:19-23.
- [4] Fledelius HC. Myopia prevalence in Scandinavia.A survey, with emphasis on factors of relevance for epidemiological refraction studies in general[J]. Acta Ophthalmol Suppl, 1988, 185:44-50.
- [5] Sperduto RD, Seigel D, Roberts J, et al. Prevalence of myopia in the United states[J]. Arch Ophthalmol, 1983, 101(3):405-407.
- [6] Saw SM, Shih-Yen EC, Koh A, et al. Interventions to retard myopia progression in children:an evidence-based update [J].Ophthalmology, 2002, 109(3):415-421.
- [7] Lin LL, Chen CJ, Hung PT, et al. Nation-wide survey of myopia among school children in Taiwan, 1986[J]. Acta Ophthalmol Suppl, 1988, 185:29-33.
- [8] Wilson A, Woo G.A review of the prevalence and causes of myopia[J]. Singapore Med J, 1989, 30(5):479-484.
- [9] Norton TT, McBrien NA. Normal development of refractive state and ocular component dimensions in the tree shrew (*Tupaia belangeri*) [J]. Vision Res, 1992, 32(5):833- 842.
- [10] Siegwart JT Jr, Norton TT. The susceptible period for deprivation induced myopia in tree shrew[J]. Vision Res, 1998, 38(22):3505-3515.
- [11] JiangBC, Woessner WM. Vitreous chamber elongation is responsible for myopia development in a young adult [J]. Optom Vis Sci, 1996, 73(4):231-234.
- [12] McBrien NA, Adams DW. A longitudinal investigation of adult-onset and adult-progression of myopia in an occupational group.Refractive and biometric findings[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1997, 38(2):321-333.
- [13] Larsen JS. The sagittal growth of the eye. 3. Ultrasonic measurement of the posterior segment (axial length of the vitreous) from birth to puberty[J]. Acta Ophthalmol(Copenh), 1971, 49(3):441- 453.
- [14] Wiesel TN,Raviola E.Myopia and eye enlargement after neonatal lid fusion in monkeys[J]. Nature, 1977, 266(5597): 66-68.
- [15] Marsh-Tootle WL, Norton TT. Refractive and structural measures of lid-suture myopia in tree shrew[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1989, 30(10):2245-2257.
- [16] Qiao-Grider Y, Hung LF, Kee CS, et al. Recovery from form-deprivation myopia in rhesus monkeys[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(10):3361-3372.
- [17] Lu F, Zhou X, Zhao H, et al. Axial myopia induced by a monocularly-deprived facemask in guinea pigs: A non-invasive and effective model[J]. Exp Eye Res, 2006, 82(4):628-636.
- [18] Grosvenor T. Reduction in axial length with age: an emmetropizing mechanism for the adult eye? [J]. Am J Optom Physiol Opt, 1987, 64 (9):657-663.
- [19] Wildsoet C, Wallman J. Choroidal and scleral mechanisms of compensation for spcetacle lenses in chicks[J]. Vision Res, 1995, 35(9):1175-1194.
- [20] Wallman J, Gottlieb MD, Rajaram V, et al. Local retinal regions control local eye growth and myopia[J]. Science, 1987, 237 (4810):73-77.
- [21] Raviola E,Wiesel TN. Effect of dark-rearing on experimental myopia in monkeys[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1978, 17 (6):485-488.
- [22] Schaeffel F, Howland HC. Properties of feedback loops controlling eye growth and refractive state in the chicken[J]. Vision Res, 1991, 31(4):717-734.
- [23] Hu M, Hu Z, Xue L, et al. Guinea pigs reared in a monochromatic environment exhibit changes in cone density and opsin expression[J]. Exp Eye Res, 2011, 93(6):804-809.
- [24] Zhao J, Pan X, Sui R, et al. Refractive error study in children: results from Shunyi District, China[J]. Am J Ophthalmol, 2000,129(4):427-435.
- [25] He M, Huang W, Zheng Y, et al. Refractive error and visual impairment in school children in rural southern China[J]. Ophthalmology, 2007, 114(2):374-382.
- [26] He M, Zeng J, Liu Y, et al. Refractive error and visual mipairment in urban children in southern china[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2004, 45(3):793-799.
- [27] Rada JA, Nickla DL, Troilo D, et al. Decreased proteoglycan synthesis associated with form deprivation myopia in mature primate eyes[J].Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41 (8): 2050-2058.
- [28] O' Leary DJ, Millodot M.Eyelid closure causes myopia in humans[J]. Experientia, 1979, 35(11):1478-1479.
- [29] Lee KE, Klein BE, Klein R. Changes in refractive error over a 5-year interval in the Beaver Dam Eye Study[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci , 1999, 40(8):1645-1649.
- [30] Lauber JK, Kinnear A. Eye enlargement in birds induced by dim light[J]. Can J Ophthalmol, 1979, 14(4):265-269.
- [31] McBrien NA, Moghaddam HO, New R, et al. Experimental myopia in a diurnal mammal(*Sciurus carolinensis*) with no accommodative ability[J]. J Physiol, 1993, 469:427-441.
- [32] Nathan J, Crewther SG, Grewther DP, et al. Effects of retinal image degradation on ocular growth in cats[J]. Invest

- Ophthalmol Vis Sci, 1984, 25(11):1300-1306.
- [33] Westbrook AM, Crewther SG, Liang H, et al. Formoguanamine-induced inhibition of deprivation myopia in chick is accompanied by choroidal thinning While retinal function is retained. Vision Res, 1995, 35(14):2075-2088.
- [34] Lind GJ, Chew SJ, Marzani D, et al. Muscarinic acetylcholine receptor antagonists inhibit chick scleral chondrocytes[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 1998, 39(12):2217-2231.
- [35] McBrien NA, Norton TT. The development of experimental myopia and ocular component dimensions in monocularly lid-sutured tree shrews (*Tupaia belangeri*) [J]. Vision Res, 1992, 32(5):843-852.
- [36] Jacobs GH, Neitz J. Spectral mechanisms and color vision in the tree shrew (*Tupaia belangeri*) [J]. Vision Res, 1986, 26(2): 291-298.
- [37] Norton TT, McBrien NA. Normal development of refractive state and ocular component dimensions in the tree shrew (*Tupaia belangeri*) [J]. 1992, 32(5):833-842.
- [38] Samorajski T, Ordy JM, Keefe JR. Structural organization of the retina in the tree shrew (*Tupaia glis*) [J]. J Cell Biol, 1966, 28(3):489-504.
- [39] Foelix RF, Kretz R, Rager G. Structure and postnatal development of photoreceptors and their synapses the retina of the tree shrew (*Tupaia belangeri*) [J]. Cell Tissue Res, 1987, 247(2):287-297.
- [40] 文丹, 刘双珍, 毛俊峰, 等. 豚鼠形觉剥夺性近视视网膜形态学研究[J]. 国际眼科杂志, 2006(5):1045-1048.
- [41] Ehrlich D, Sattayasai J, Zappia J, et al. Effects of selective neurotoxins on eye growth in the young chick[J]. Ciba Found Symp, 1990, 155:63-84.
- [42] Pruett RC. Complications associated with posterior staphyloma[J]. Curr Opin Ophthalmol, 1998, 9(3):16-22.
- [43] 徐格致, 李维英, 曹安民. 病理性近视视网膜变性中感光细胞的凋亡[J]. 中华眼底病杂志, 1996(3):68-70.

Preliminary Establishment and Research on Form Deprivation Myopia Model in Tree Shrew

YANG Dong-mei¹, ZHU Qin¹, LI Na², GUO Li-yun¹,

ZHANG Xiao-fan¹, ZHANG Jie-ying¹, HU Min¹, DAI Jie-jie²

(1. Department of Ophthalmology, the Second People's Hospital of Yunnan Province & the Fourth Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming 650021, China;

2. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Tree Shrew Germplasm Resource Center, Kunming 650018, China)

[Abstract] Objective To establish the adolescence and early adulthood form deprivation myopia (FDM) model in tree shrew and to observe the retinal morphology, in order to explore the role of age in the development of myopia and the effect of local retinal mechanism for FDM. **Method** Thirty tree shrews at age of 4 months and 5 months without congenital myopia and other eye diseases were respectively selected. All tree shrews were randomly divided into: control group, and cover group. In the cover group, right eyes served as the experimental eye, left eye as control eyes. Experimental eye were covered with handmade semi-translucent film. then measure the diopter and axial length of tree shrews after being covered for 3 weeks and 6 weeks. The retinal thickness and the number of cells in each layer of retina were observed by electron microscopy after being covered for 6 weeks. **Results** The tree shrews were born 4 months and 5 months form deprivation after 3 weeks, hyperopia was alleviated but not statistically significant compared with control eyes, and two groups of tree shrews cover eye diopter and eye axis are different obviously compared with control eyes after 6 weeks. At deprivation period, axial continue to extend and gradually increase to myopia, and they have a good negative linear relationship. Form deprivation can lead to thinning of the retina of the tree shrew, can also lead to number decrease on photoreceptor cell layer, inner nuclear layer, and ganglion cell layer cells. **Conclusion** Form deprivation can induce myopia formation and retinal morphological change in adolescence and early adulthood tree shrews. **[Key words]** Tree shrew; Form deprivation myopia (FDM); Retinal morphology.

硒对氟致大鼠肾小管上皮细胞线粒体膜电位改变的拮抗作用

常 凯, 王 裕, 庞文彪, 高继萍, 陈朝阳, 宋国华

(山西医科大学实验动物中心, 实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室, 太原 030001)

[摘要] 目的 探究硒对氟致大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E细胞)线粒体膜电位改变的拮抗作用。方法 实验共设4组: 染氟组(5 mg/L和20 mg/L的氟化钠)、染硒组(0.0171 mg/L和0.0342 mg/L的亚硒酸钠)、硒干预组(氟化钠和亚硒酸钠联合干预)和对照组, 按照分组干预NRK-52E细胞48 h。流式细胞仪检测其线粒体膜电位, 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和总抗氧化力(T-AOC)试剂盒测定酶的活性。结果 与对照组比, 随着氟化钠浓度的升高, 染氟组NRK-52E细胞线粒体膜电位下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)且SOD、T-AOC、GSH-PX和CAT酶活性均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与染氟组相比, 相对应的硒干预组线粒体膜电位升高($P<0.01$)。与20 mg/L的染氟组比较, 相对应硒干预组的SOD、T-AOC、GSH-PX和CAT酶活性均升高($P<0.05$)。与0.0171 mg/L染硒组相比, 相对应的硒干预组线粒体膜电位降低($P<0.01$)且T-AOC、GSH-PX和CAT酶活性均降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。5 mg/L加氟组与加硒组相比, 线粒体膜电位显著变化($P<0.01$), 但SOD、GSH-PX、CAT、T-AOC酶活性均无显著变化。20 mg/L加氟组与加硒组相比, 线粒体膜电位具有显著性差异($P<0.01$)且SOD、GSH-PX、CAT、T-AOC酶活性均有显著性差异($P<0.01$)。结论 一定浓度的硒可以拮抗氟诱导大鼠肾小管上皮细胞线粒体膜电位下降, 可能通过恢复抗氧化酶活性实现。

[关键词] 氟; 硒; 肾小管上皮细胞; 线粒体膜电位; 抗氧化酶

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0179-06

我国是地方性氟病较严重的国家之一, 长期暴露于高氟可引起机体慢性氟中毒^[1]。对慢性氟中毒的大鼠体内自由基含量检测, 结果表明损伤的主要原因是氟中毒时自由基含量上升^[2-4]。自由基攻击生物膜系统, 会导致线粒体受损和生物膜脂质的过氧化^[5]。线粒体的氧化损伤与慢性氟中毒关系密切^[6]。线粒体结构和功能异常改变可能是因为慢性氟中毒而引起的氧化应激水平升高^[3,6-9]。微量元素硒是维持生命活动所必须的, 杨克敌等^[10]早在

1998年的研究已表明一定剂量的硒可拮抗氟中毒, 这一结论被许多学者所支持^[11-14]。Miao等^[15]用不同浓度的含硒水饲喂大鼠表明, 氟化钠+硒组较氟化钠组的谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性高。本文将探究硒对氟致NRK-52E细胞线粒体膜电位改变是否具有拮抗作用。

本实验以大鼠肾小管上皮细胞为载体, 以不同浓度的氟化钠(NaF)(5 mg/L、20 mg/L)和亚硒酸钠(Na_2SeO_3)(0.0171 mg/L、0.0342 mg/L)处理大鼠肾小管上皮细胞48 h, 然后对其线粒体膜电位和一类抗氧化酶系统包括: 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、GSH-PX和总抗氧化力(T-AOC)^[16,17]进行检测, 旨在探究硒对氟致NRK-52E细胞线粒体膜电位改变的作用, 为抗氟药物的开发和应用提供参考数据。

[收稿日期] 2016-10-30

[基金项目] 山西省实验动物专项(2012k02); 山西医科大学青年基金项目(02201429)

[作者简介] 常 凯(1993-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: 932719380@qq.com

[通讯作者] 宋国华, 女, 教授。E-mail: ghsongg@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 细胞系来源及培养

本实验所用的大鼠肾小管上皮细胞(NRK-52E 细胞)购自于中国科学院上海细胞库^[12]。将大鼠肾小管上皮细胞置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中培养,使用含体积分数 10% 灭活胎牛血清,体积分数 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基。

1.2 主要试剂

胎牛血清(杭州四季青公司),NaF 分析纯(天津市博迪化工有限责任公司),Na₂SeO₃ 分析纯(购自天津市化学试剂厂),线粒体膜电位检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司),冰醋酸、SOD、GSH-PX、CAT 和 T-AOC 测定试剂盒(均购于南京建成生物工程研究所)。

1.3 细胞的分组及处理

NRK-52E 细胞的具体分组情况见表 1。大鼠肾小管上皮细胞按 1 × 10⁵/mL 的密度接种于 6 孔培养板,每孔培养液 3 mL。待细胞全部贴壁后,再用 PBS 洗涤 2 次,按照表 1 的分组方法进行给药,处理 48 h。

表 1 实验分组情况

Table 1 Experimental group			mg/L
组别	NaF	Na ₂ SeO ₃	
对照组	0	0	
	5	0	
	20	0	
加氟组	0	0.0171	
	0	0.0342	
	5	0.0171	
加硒组	5	0.0342	
	20	0.0171	
	20	0.0342	

1.4 线粒体膜电位的测定

NRK-52E 细胞给药处理 48 h 后,用 PBS 洗涤 2 次(2 000 × g、离心 5 min),收集细胞;加入 500 μL 培养液和 JC-1 染色工作液,颠倒混匀,然后置于 37℃、体积分数 5% CO₂ 的培养箱中孵育 20 min;孵育结束后,600 × g 4℃离心 3~4 min,沉淀细胞;弃上清用 JC-1 染色缓冲液(1 ×)洗涤 2 次,600 × g 4℃离心 3~4 min;250 μL JC-1 染色缓冲液(1 ×)重悬

细胞,用流式细胞仪分析,记录好实验结果。

1.5 氧化应激指标的测定

按照表 1 的分组方法对 NRK-52E 细胞进行给药,测定大鼠肾小管上皮细胞的应激指标,包括:SOD 值、GSH-PX 值、CAT 值和 T-AOC 值。具体操作方法参见 SOD 测试盒、GSH-PX 测试盒、CAT 测试盒和 T-AOC 测定试剂盒说明书进行。

1.6 统计学分析

实验数据采用 SPSS19.0 软件进行分析处理,以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。方差齐的多组比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)和 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 线粒体膜电位

硒对氟诱导的 NRK-52E 细胞的线粒体膜电位的测定结果见表 2 和图 1。线粒体膜电位较高时,JC-1 以聚合物形式存在于线粒体基质中,发红色荧光;当线粒体膜电位较低时,发出绿色荧光。5 mg/L 加氟组与加硒组相比、20 mg/L 加氟组与加硒组相比都具有显著性差异(*P* < 0.01)。与对照组相比,随着 NaF 浓度的升高(从 5 mg/L 到 20 mg/L),JC-1 绿色荧光比值上升,线粒体膜电位降低(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。0.0171 mg/L 的加硒组与对照组相比,其线粒体膜电位无显著变化。硒干预组与对照组相比,具有显著性差异(*P* < 0.01);0.0171 mg/L 的硒干预组与同剂量加硒组相比,具有显著性差异(*P* < 0.01);硒干预组与等剂量加氟组相比,线粒体膜电位显著升高(*P* < 0.01)。这说明硒对氟致 NRK-52E 细胞线粒体膜电位的变化具有拮抗作用。

2.2 氧化应激指标

如表 3 所示,5 mg/L 加氟组与加硒组相比,SOD、GSH-PX(除 0.0171 mg/L 的加硒组)、CAT、T-AOC 酶活性均无显著变化;20 mg/L 加氟组与加硒组相比,具有显著性差异(*P* < 0.01)。与对照组相比,染氟组 SOD、GSH-PX、CAT、T-AOC 酶活性均降低(*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。与 0.0171 mg/L 加硒组相比,相对应的硒干预组 T-AOC、GSH-PX 和 CAT 酶活性均降低(*P* < 0.01 或 *P* < 0.05)。与 20 mg/L 染氟组比较,相对应的硒干预组 SOD、T-AOC、GSH-PX 和 CAT 酶活性均升高(*P* < 0.05)。

表 2 硒干预对氟化钠诱导的肾小管上皮细胞线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

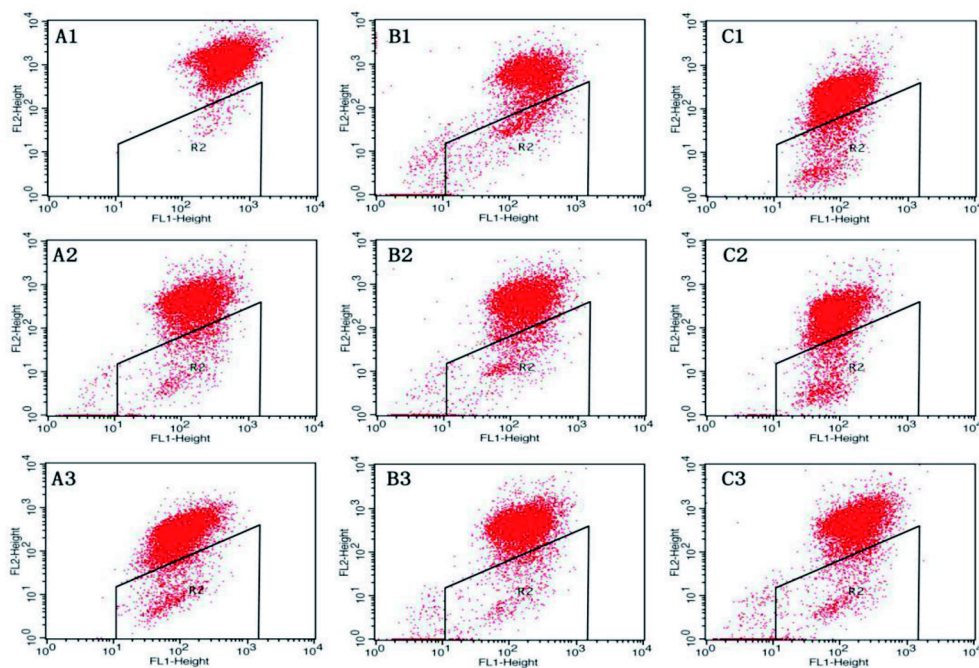
Table 2 Effect of selenium intervention on mitochondrial membrane potential of NRK-52E cells induced by sodium fluoride ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

组别	NaF/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	Na_2SeO_3 $/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	绿色荧光 比值/%
对照	0	0	9.71 ± 0.21
加氟组	5	0	$11.62 \pm 0.39^*$
	20	0	$25.56 \pm 1.30^{**}$
加硒组	0	0.0171	$9.33 \pm 0.07^{\text{bbcc}}$
	0	0.0342	$15.61 \pm 0.15^{**\text{bbcc}}$
硒干预组	5	0.0171	$15.65 \pm 0.14^{**\#\text{aa}}$
	5	0.0342	$19.33 \pm 0.21^{**\#\text{aa}}$
	20	0.0171	$17.94 \pm 0.22^{**\#\text{aa}}$
	20	0.0342	$16.59 \pm 0.06^{**\#\text{aa}}$

注: 与对照组相比, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$; 各硒干预组与同剂量加氟组相比, $^{\#\#}P<0.01$; 各硒干预组与同剂量加硒组相比, $^{\text{aa}}P<0.01$; 20 mg/L 加氟组与加硒组相比, $^{\text{bb}}P<0.01$; 5 mg/L 加氟组与加硒组相比, $^{\text{cc}}P<0.01$

3 讨论

线粒体是机体产生能量与储存能量的主要场所, 由内外两层膜包被^[18], 线粒体的内膜存在跨膜的质子梯度电位差, 跨膜电位外室为正电位, 内室为负电位, 内膜上的 ATP 合成酶利用跨膜电势能可合成维持细胞正常功能所需的 ATP^[19]。线粒体膜电位对维持线粒体正常功能极为重要^[20,21], 甚至影响细胞乃至整个机体的基本生理功能。膜电位改变可反映出多种与线粒体功能相关的变化, 如: 线粒体蛋白复合体的结构变化、细胞色素 C 释放和 ATP 的合成等。过量氟可致氧化代谢紊乱, 从而引起细胞病理损伤甚至细胞的凋亡^[22]。另外膜电位的下降被认为是细胞早期凋亡的标志性事件, 更是细胞早期凋亡的不可逆事件^[23]。本研究表明, 随着 NaF 浓度的升高, 染氟组 NRK-52E 细胞线粒体膜电位下降($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与加硒组相比, 同剂量



A1: 对照组; B1: 染氟组NaF (5 mg/L); C1: 染氟组NaF (20 mg/L); A2: 染硒组 Na_2SeO_3 (0.0171 mg/L); B2: 硒干预组NaF(5 mg/L) + Na_2SeO_3 (0.0171 mg/L); C2: 硒干预组NaF (20 mg/L)+ Na_2SeO_3 (0.0171 mg/L); A3: 染硒组 Na_2SeO_3 (0.0342 mg/L); B3: 硒干预组NaF (5 mg/L)+ Na_2SeO_3 (0.0342 mg/L); C3: 硒干预组NaF(20 mg/L)+ Na_2SeO_3 (0.0342 mg/L)

图 1 硒干预对氟化钠诱导肾小管上皮细胞线粒体膜电位的流式图

Figure 1 The mitochondrial membrane potential flow pattern of selenium intervention of NRK-52E cells induced by sodium fluoride

表 3 硒对氟诱导大鼠肾小管上皮细胞培养液中氧化应激指标的影响($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 3 Effect of selenium on oxidative stress in NRK-52E cells induced by fluoride ($\bar{x} \pm s, n=6$)

U/mL

组别	处 理	SOD 活性	CAT 活性	T-AOC 活性	GSH-PX 活性
对照组	—	44.78 ± 0.20	2.92 ± 0.03	0.74 ± 0.12	55.58 ± 5.72
加氟组	5 mg/L NaF	43.20 ± 0.45	2.30 ± 0.05**	0.58 ± 0.03	42.83 ± 1.97*
	20 mg/L NaF	35.65 ± 0.38**	1.25 ± 0.22**	0.25 ± 0.01**	20.23 ± 0.19**
加硒组	0.0171 mg/L Na ₂ SeO ₃	43.88 ± 3.24 ^{bb}	3.06 ± 0.07 ^{bb}	0.76 ± 0.02 ^{bb}	53.88 ± 0.57 ^{bbcc}
	0.0342 mg/L Na ₂ SeO ₃	43.86 ± 0.05 ^{bb}	2.79 ± 0.12 ^{bb}	0.66 ± 0.05 ^{bb}	40.86 ± 2.15 ^{**bb}
硒干预组	5 mg/L NaF+0.0171 mg/L Na ₂ SeO ₃	44.66 ± 0.85	2.51 ± 0.07 ^{*a}	0.57 ± 0.03 ^a	39.36 ± 1.73 ^{**aa}
	5 mg/L NaF+0.0342 mg/L Na ₂ SeO ₃	44.46 ± 0.65	2.44 ± 0.14 [*]	0.52 ± 0.10 [*]	39.89 ± 2.66 ^{**}
	20 mg/L NaF+0.0171 mg/L Na ₂ SeO ₃	40.98 ± 1.60 [#]	1.64 ± 0.13 ^{**#aa}	0.49 ± 0.02 ^{**aa}	28.96 ± 0.08 ^{**#aa}
	20 mg/L NaF+0.0342 mg/L Na ₂ SeO ₃	39.93 ± 0.03 [#]	1.70 ± 0.21 ^{**#aa}	0.50 ± 0.01 [#]	28.73 ± 1.15 ^{**#aa}

注: 与对照组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 各硒干预组与同剂量加氟组相比, # $P<0.05$; 各硒干预组与同剂量加硒组相比, ^a $P<0.05$,

^{aa} $P<0.01$; 20 mg/L 加氟组与加硒组相比, ^{bb} $P<0.01$; 5 mg/L 加氟组与加硒组相比, ^{cc} $P<0.01$

的硒干预组线粒体膜电位降低($P<0.01$), T-AOC、GSH-PX 和 CAT 酶活性均降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。这提示了氟可诱导NRK-52E细胞线粒体膜电位的改变。另外本研究还显示, 染氟组细胞内的 SOD、T-AOC、GSH-PX 和 CAT 酶活性均降低($P<0.05$)。由此本文作者推测过量氟的摄入致细胞内氧化系统和抗氧化系统失衡, 导致脂质过氧化作用增强, 从而使机体有害的自由基不能及时清除, 而线粒体膜由磷脂双分子层构成, 膜上的钠钾 ATP 酶易受自由基攻击, 这使得线粒体膜结构、功能受损和离子平衡紊乱, 导致其膜电位发生改变。

5 mg/L加氟组与加硒组相比线粒体膜电位具有显著性差异($P<0.01$)但 SOD、GSH-PX、CAT、T-AOC 酶活性均无显著性差异。20 mg/L 加氟组与对照组、加硒组相比, 线粒体膜电位具有显著性差异($P<0.01$)且 SOD、GSH-PX、CAT、T-AOC 酶活性均有显著性差异($P<0.01$), 表明 20 mg/L 的 NaF 已足够对 NRK-52E 细胞造成损伤, 但氟对 NRK-52E 细胞造成损伤的最小剂量还需进一步研究。

硒元素具有抗氧化性^[24,25], 是维持机体的正常生命活动所必需的元素。本研究显示, 与染氟组相比, 硒干预组线粒体膜电位升高($P<0.01$), SOD、T-AOC、GSH-PX 和 CAT 酶活性均升高, 推测硒拮抗氟致线粒体膜电位变化的机理: 硒可以拮抗 NRK-52E 细胞内的高浓度氟, 促进尿氟的排泄, 清除自由基, 使抗氧化酶活性恢复并明显抑制脂代谢紊乱和氟诱导的脂质过氧化, 从而提高机体的抗氧化能力, 对线粒体膜电位起到保护修复作用, 这一点在其它文献中也有提及^[26-30]。

综上所述, 氟可以诱导 NRK-52E 细胞线粒体膜电位下降, 抗氧化酶(SOD、T-AOC、GSH-PX 和 CAT 酶)活性降低, 一定浓度的硒对氟致 NRK-52E 细胞线粒体膜电位改变具有拮抗作用, 可能是通过恢复抗氧化酶活性来实现的。

参考文献:

[1] 马士成. 铝对茶树氟吸收、累积、分布特性的影响及其机理研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2012.

[2] 吴延莉, 徐小东, 曾贝贝, 等. 过量氟摄入对大鼠骨组织氧化应激的影响[J]. 中华地方病学杂志, 2015, 34(10):729-732.

[3] 秦双立. Fis1 和 Mfn1 表达及氧化应激在慢性氟中毒大鼠肾小管上皮细胞线粒体损伤中的作用[D]. 贵阳: 贵阳医学院, 2013:1-46.

[4] 苗可可. 氟暴露致体外培养 PC12 细胞损伤机理的研究[D]. 金华: 浙江师范大学, 2014:1-53.

[5] 秦双立, 官志忠. 线粒体损伤和氧化应激的关系[J]. 国外医学: 医学地理分册, 2013, 34(3):197-201.

[6] 楼迪栋, 刘燕斐, 张凯琳, 等. 慢性氟中毒对大鼠大脑皮质神经细胞活性氧水平和线粒体融合的影响[J]. 中国地方病学杂志, 2011, 30(3):256-260.

[7] Suzuki M, Bandoski C, Bartlett JD. Fluoride induced oxidative damage and SIRT1/autophagy through ROS-mediated JNK signaling[J]. Free Radic Biol Med, 2015, 89:369-378.

[8] Mahaboob BP, Saumya SM. Suppression of mitochondrial oxidative phosphorylation and TCA enzymes in discrete brain regions of mice exposed to high fluoride: amelioration by Panax ginseng (Ginseng) and Lagerstroemia speciosa (Banaba) extracts [J]. Cell Mol Neurobiol, 2013, 33(3):453-464.

[9] Qin SL, Deng J, Lou DD, et al. The decreased expression of mitofusin-1 and increased fission-1 together with alterations

- in mitochondrial morphology in the kidney of rats with chronic fluorosis may involve elevated oxidative stress [J]. *J Trace Elem Med Biol*, 2015, 29:263-268.
- [10] 杨克敌, 陈军, 王桂珍, 等. 不同浓度硒拮抗氟致肾脂质过氧化和微量元素影响的研究[J]. *卫生研究*, 1998, 27(3): 201-204.
- [11] 段鹏, 陈晋, 杨波, 等. 硒拮抗氟致大鼠肝细胞氧化应激和DNA损伤作用[J]. *中国公共卫生*, 2013, 29(11):1626-1629.
- [12] 冯佩. 硒对慢性氟中毒致血液抗氧化能力损伤影响机理的研究[D]. 金华: 浙江师范大学, 2012.
- [13] 王桂芹. 硒和VitC对高氟所致氧化应激、DNA损伤及Bcl-2蛋白表达影响研究[D]. 广州: 广东药学院, 2011.
- [14] Qian W, Miao K, Li T, et al. Effect of selenium on fluoride-induced changes in synaptic plasticity in rat hippocampus. [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2013, 155(2):253-260.
- [15] Miao K, Zhang L, Yang S, et al. Intervention of selenium on apoptosis and Fas/FasL expressions in the liver of fluoride-exposed rats.[J].*Environ Toxicol Pharmacol*, 2013, 36(3): 913-920.
- [16] 田洪艳, 李质馨, 徐冶, 等. 蒺藜提取物对小鼠损伤睾丸氧化/抗氧化系统的影响[J].*中国妇幼保健*, 2015 (26):4551-4554.
- [17] 王裕. 氟对大鼠肾小管上皮细胞的毒性作用及硒干预机制的研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2015.
- [18] 范颖, 才丽平, 于彩娜, 等. 参附汤、芪附汤、姜附汤对阿霉素心脏毒性损伤大鼠线粒体途径细胞凋亡的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2010, 16(8):135-138.
- [19] 房晓玮. 二氮嗪对窒息新生大鼠心肌线粒体保护作用机制研究[D]. 汕头: 汕头大学, 2011:1-78.
- [20] 吴伟, 徐蔚. 线粒体通透性转换孔结构和功能的研究进展[J]. *医学信息*, 2011, 24(3):1753-1754.
- [21] 苏米雅, 张家新. 哺乳动物细胞凋亡分子机理的研究进展[J].*中国农学通报*, 2011, 27(17):1-5.
- [22] Wang Z, Yang X, Yang S, et al. Sodium fluoride suppress proliferation and induce apoptosis through decreased insulin-like growth factor-I expression and oxidative stress in primary cultured mouse osteoblasts [J]. *Arch Toxicol*, 2011, 85(11):1407-1417.
- [23] 朱启伟, 王浩, 叶平, 等. 吡格列酮对缺氧/复氧后新生大鼠心肌细胞线粒体膜电位的影响[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2011, 42(6):784-788.
- [24] 陈剑杰, 曹谨玲, 罗永巨, 等. 纳米硒对氟胁迫下鲤鱼肝抗氧化功能及组织结构的影响[J]. *应用生态学报*, 2013, 24 (10):2970-2976.
- [25] 尉俊仁, 冯佩, 章子贵. 硒对慢性氟中毒致雄性大鼠生殖毒性的拮抗作用[J].*浙江师范大学学报: 自然科学版*, 2011, 34(1):86-90.
- [26] 张兵, 张爱君. 硒与氟中毒[J]. *中国地方病防治杂志*, 2008, 23(4):263-267.
- [27] 祝文静, 章子贵, 申秀英, 等. 氟中毒发病机制及硒的抗氟作用[J]. *中国地方病学杂志*, 2009, 28(6):704-706.
- [28] Feng P, Wei JR, Zhang ZG. Influence of selenium and fluoride on blood antioxidant capacity of rats[J]. *Exp Toxicol Pathol*, 2012, 64(6):565-568.
- [29] 孙岩. 饮水型氟中毒致肾脏损伤的分子机制及硒的影响[D]. 金华: 浙江师范大学, 2016.
- [30] 杜俊文, 吴韬, 张坤, 等. 氟中毒致血管损伤及动脉硬化的临床研究[J]. *中国地方病防治杂志*, 2016(3):289.

Antagonistic Effect of Selenium on Change of Mitochondrial Membrane Potential of NRK-52E Cells Induced by Sodium Fluoride

CHANG Kai, WANG Yu, PANG Wen-biao, GAO Ji-ping, CHEN Zhao-yang, SONG Guo-hua
(Shanxi Medical University, Laboratory Animal Center, Shanxi Key Laboratory of Experimental
Animal Science and Human Disease Animal Model, Taiyuan 030001, China)

[Abstract] **Objective** To study effects of fluoride on the change of mitochondrial membrane potential in rat renal tubular epithelial cells (NRK-52E cells). **Methods** The experiments were divided into 4 groups: the control group, the fluoride group, the selenium group and the selenium intervention group. NRK-52E cells were cultured with fluoride and selenium respectively in various concentration, and fluoride and selenium combination for 48 h. (5 mg/L or 20 mg/L NaF、0.0171 mg/L or 0.0342 mg/L Na₂SeO₃). The mitochondrial membrane potential were detected by flow cytometry. The activity of enzymes and the content of free radicals were examined by relevant reagent kit, such as superoxide dismutase (SOD) reagent kit. **Results** Compared with the control group, the mitochondrial membrane potential decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$) and SOD, total antioxidant capacity (T-AOC), glutathione peroxidase (GSH-PX) and catalase (CAT) enzyme activities decreased ($P<0.05$) with the increase of the concentration of sodium fluoride. The mitochondrial membrane potential of the selenium intervention group was increased ($P<0.01$) compared with that of the fluoride exposed group. Compared with the fluoride group of 20 mg/L, the relative selenium intervention group SOD, T-AOC, GSH-PX and CAT activities were increased ($P<0.01$). Compared with the selenium group of 0.0171 mg/L, the relative selenium intervention group the mitochondrial membrane potential decreased ($P<0.01$) and SOD, T-AOC, GSH-PX and CAT enzyme activities decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$). 5 mg/L the fluoride group compared with the selenium group, the mitochondrial membrane potential changed significantly ($P<0.01$). But for SOD, T-AOC, GSH-PX and CAT activities, there were no significant changed. 20 mg/L the fluoride group compared with the selenium group, the mitochondrial membrane potential changed significantly ($P<0.01$). SOD, T-AOC, GSH-PX and CAT activities also changed significantly ($P<0.01$). **Conclusion** The certain concentration of selenium could induce the decrease of mitochondrial membrane potential in NRK-52E cells induced by fluoride, that may be achieved by restoring the activities of activities. **[Key words]** Sodium fluoride; Selenium; Rat renal tubular epithelial cells; Mitochondrial membrane potential; Antioxidant enzymes

泛素特异性蛋白酶 19 对烟熏诱导慢性阻塞性肺疾病大鼠模型骨骼肌萎缩的作用及机制

刘 乾, 刘 松, 徐卫国, 管思彬, 郭雪君

(上海交通大学医学院附属新华医院呼吸科, 上海 200092)

[摘要] 目的 通过烟熏制备慢性阻塞性肺疾病(COPD)大鼠模型, 研究泛素特异性蛋白酶-19(USP-19)在 COPD 相关骨骼肌萎缩中的作用及机制。方法 烟熏诱导大鼠 COPD 模型, 观察肺及骨骼肌组织的组织形态学变化, 利用蛋白质印迹法(Western blotting)及实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR)观察骨骼肌细胞内 USP-19、肌球蛋白重链(MHC)及丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)基因的表达情况。结果 烟熏建立的大鼠 COPD 模型, 大鼠肺组织呈肺气肿改变, 烟熏 12 周时, 每高倍镜视野下肌纤维数量增多 40%, 间接提示骨骼肌发生萎缩; 骨骼肌细胞内 MHC 表达明显下调, 与烟熏时间呈负相关; 萎缩的骨骼肌细胞内 USP-19 基因的转录和表达均明显上调, 与烟熏时间呈正相关, 与 MHC 表达呈负相关; 萎缩的骨骼肌细胞内 MAPKs 通路磷酸化水平明显增强 ($P<0.05$)。结论 USP-19 基因参与 COPD 模型鼠骨骼肌萎缩的发生, 起负性调节作用, 此作用可能通过 MAPKs 通路实现。

[关键词] 烟熏; 泛素特异性蛋白酶-19(USP-19); 慢性阻塞性肺疾病(COPD); 骨骼肌萎缩; 丝裂原活化蛋白激酶(MAPKs)

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)03-0185-06

目前, 全球慢性阻塞性肺疾病(Chronic Obstructive Pulmonary Disease, 以下简称 COPD)的发病率和死亡率正逐年增高, 吸烟是 COPD 发生的主要危险因素之一。除呼吸系统的症状及体征外, 营养不良、体质量下降以及骨骼肌萎缩等被视为较为重要的肺外表现。近年来研究表明, 骨骼肌的消耗与肌蛋白降解加速密切相关, 其中由泛素介导的蛋白质降解途径发挥了重要作用。目前已有研究多集中在泛素连接过程, 对于去泛素化的研究还知之甚少。

本实验采用烟熏制备 COPD 大鼠模型, 对实验大鼠进行了骨骼肌的病理形态学观察, 同时选取

泛素特异性蛋白酶-19(USP-19)作为研究对象, 分别检测烟熏前后股四头肌组织内 USP-19 基因的表达。试图通过动物实验来探讨模型大鼠如何发生骨骼肌萎缩, 以及 USP-19 参与骨骼肌细胞萎缩的发生过程, 为今后临床上 USP-19 基因用于治疗骨骼肌萎缩提供实验数据。

1 材料与方法

1.1 制备 COPD 大鼠模型与分组

SPF 级 15 周龄雄性 SD 大鼠, 平均体质量 350 g, 购自上海斯莱克实验动物责任公司[SCXK(沪)2007-0005], 饲养于上海交通大学医学院附属新华医院实验动物中心[SYXK(沪)2008-0052]。实验动物分组: 随机数字方法将实验动物分为对照组(6 只), 烟熏 4 周模型组(6 只), 烟熏 8 周模型组(6 只)和烟熏 12 周模型组(6 只)。使用烤烟型大前门香烟(购自上海烟草集团公司, 焦油量为 11 mg), 模型组每日上午在自制有机玻璃箱(容积为 240 L, 长宽高分别

[收稿日期] 2017-03-20

[基金项目] 上海市卫生局青年科研项目(编号: 20134Y015)和国家青年科学基金项目(81400026)

[作者简介] 刘 乾(1980-), 女, 医学博士, 呼吸科主治医师, 从事呼吸系统疾病研究。

E-mail: liuqian_1980@hotmail.com

[通讯作者] 郭雪君(1964-), 男, 医学博士, 呼吸科主任医师, 从事呼吸系统疾病研究。E-mail: snowgen@126.com

为 80 cm, 60 cm, 50 cm)内被动吸烟。每 6 只动物一箱, 每次同时燃烧 6 支香烟, 每日 4 次, 每次烟熏间隔时间为 2 h。连续烟熏 4 周、8 周和 12 周。对照组动物正常吸入空气。分别于实验 4 周、8 周和 12 周称量体质量, 用腹腔注射质量分数 1% 戊巴比妥钠处理动物并取肺组织及股四头肌(骨骼肌)。

1.2 大鼠营养不良的判断

COPD 模型组大鼠体质量降低大于预计值的 10%, 可判断为营养不良。预计值为同等条件下正常对照组同龄大鼠的平均体质量。

1.3 病理组织学分析

将肺组织及股四头肌于体积分数 4% 多聚甲醛内固定 24 h, 石蜡包埋, 行 HE 染色后于光学显微镜下观察。

1.4 大鼠各组织内 USP-19 基因表达情况

取正常大鼠皮肤、大脑、肺脏、肝脏、心脏、股四头肌、血管、脾脏, 提取各组织总 RNA。

1.5 实时定量聚合酶链式反应(RT-PCR)

提取的总 RNA 经逆转录后进行 RT-PCR。循环条件如下: 预变性: 95℃ 30 s; PCR 反应: 95℃ 5 s, 60℃ 34 s, 进行 40 个循环。2- $\Delta\Delta$ Ct 法进行相对定量分析, 公式: Δ Ct = Ct_{target} - Ct_{GAPDH}; $\Delta\Delta$ Ct = Δ Ct(CS) - Δ Ct(CTRL); 基因表达水平 = 2- $\Delta\Delta$ Ct。引物序列:

GAPDH 上游: 5'-AAG GTC GGA GTC AAG GGA TTT-3'

GAPDH 下游: 5'-AGA TGA TGA CCC TTT TGG CTC-3'

USP-19 上游: 5'-GGC ACA AGA TGA GGA ACG A-3'

USP-19 下游: 5'-CAG ATA AAG GAA CGG GTC AA-3'

MHC 上游: 5'-GCG GAA AGA AAG GTG GCA AGA-3'

MHC 下游: 5'-TGG GAA TGA GGC ATC GGA CAA-3'

MyoG 上游: 5'-GCG GAA AGA AAG GTG GCA AGA-3'

MyoG 下游: 5'-TGG GAA TGA GGC ATC GGA CAA-3'

1.6 Western blotting

提取细胞总蛋白, 利用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)进行变性电泳, 转膜, 一抗孵育过夜后二抗孵育 2 h; 用 ChemiDoc XRS+ Systems 远红外成像系统扫描结果, 并通过 Image Lab 2.0 软件以 GAPDH 为内参进行分析, 分别进行三次独立实验。

1.7 统计方法

RT-PCR、Western blotting 结果进行数据统计, 数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 13.0 软件进行方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

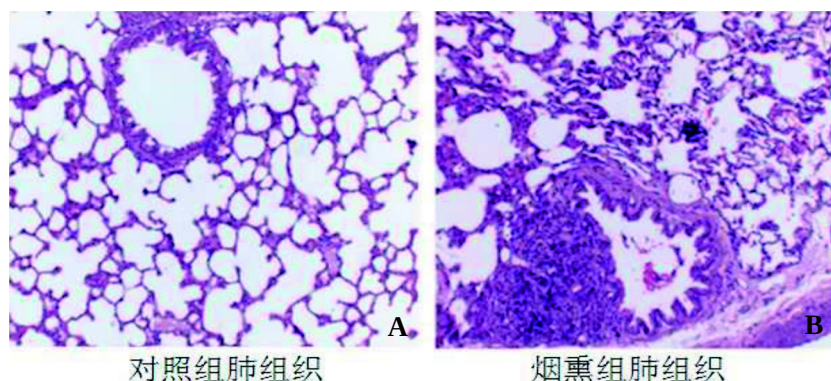
2 结果

2.1 大鼠的一般情况

建模早期(染毒 4 周)模型组大鼠在染毒箱中吸烟时比较安静, 驱散大鼠聚堆时, 部分大鼠有轻度喘息, 停止吸烟约半小时后饮食与活动恢复正常, 与正常对照组无明显区别。继续烟熏, 部分大鼠在吸烟以外的时间出现轻度喘息, 活动相对减少, 皮毛黄涩, 行动迟钝, 摄食、饮水减少。正常对照组大鼠饮食正常, 活动灵敏, 皮毛清洁有光泽。

2.2 COPD 大鼠模型肺组织的病理改变

对照组大鼠气道上皮结构完整, 肺泡结构正常(图 1A); 烟熏组大鼠细支气管狭窄变形, 管腔内有炎症细胞及脱落的上皮细胞; 黏膜下及细支气管周围可见以淋巴细胞为主的炎症细胞浸润; 肺泡壁增厚, 有炎症细胞浸润, 可见纤维细胞增生, 部分肺泡壁破裂, 相邻肺泡融合形成肺大泡; 具有慢性细支气管炎及肺气肿的病理改变(图 1B)。



对照组肺组织

烟熏组肺组织

图 1 大鼠肺脏组织学形态 (HE × 100)

Figure 1 Histopathological observation on lung of rat (HE × 100)

2.3 大鼠体质量变化

造模前模型组和对照组大鼠体质量差异无统计学意义($P>0.05$)。随后烟熏组大鼠体质量增长速度下降。烟熏 8 周时模型组大鼠体质量明显低于对照组,但尚未达到营养不良的标准;烟熏 12 周时模型组大鼠体质量明显低于对照组($P<0.01$),且体质量下降已超过预计值的 10%,出现营养不良改变(表 1)。

2.4 COPD 模型大鼠骨骼肌组织形态变化

大体观察见对照组大鼠股四头肌组织饱满、有光泽、弹性佳,显微镜下见肌纤维排列紧密,细胞核排列整齐,间质内有少量纤维组织(图 2A)。而烟熏大鼠骨骼肌组织暗涩、绵软,显微镜下观察见肌纤维横截面积较正常对照组减小,间质内纤维组织增多,血管组织增生及部分毛细血管扩张充血(图 2B)。高倍镜下每个视野烟熏大鼠肌纤维数量(362.0 ± 17.7 个)较正常对照组(257.0 ± 15.1 个)明显增多,间接反应出肌纤维发生萎缩。

2.5 大鼠各组织内 USP-19 基因表达情况

各组织内均有 USP-19 基因表达,心肌组织骨骼肌组织内表达较高(图 3)。

2.6 大鼠骨骼肌内 MHC 及 USP-19 基因表达

与对照组相比,8 周及 12 周的烟熏大鼠骨骼肌组织内 USP-19 mRNA 和蛋白表达均有所上调($P<0.05$),且与烟熏持续时间呈正相关,烟熏 4 周后 USP-19 表达虽上调,但与对照组相比差异不明显;4 周、8 周及 12 周烟熏后大鼠股四头肌组织内 MHC mRNA 和蛋白表达均下调($P<0.05$),且与烟熏时间呈负相关与体质量下降呈正相关。提示烟熏引起骨骼肌萎缩是体质量下降、营养不良的原因之一;USP-19 蛋白在骨骼肌萎缩过程中可能起到负性调节作用(图 4)。

2.7 COPD 大鼠模型骨骼肌内 MAPKs 活性的变化

总 ERK 和 p38 水平未发生明显改变,烟熏组大鼠骨骼肌组织内磷酸化 ERK 和 p38 水平明显升高,表明细胞内 ERK 和 p38 信号通路被激活(图 5)。

表 1 大鼠体质量				
组别	0 周	4 周	8 周	12 周
对照组	356.5 ± 7.9	379.5 ± 5.6	400.1 ± 7.2	411.3 ± 12.7
烟熏组	358.1 ± 6.9	377.3 ± 5.6	380.8 ± 8.4*	366.8 ± 9.6*

注: 与对照组比较, * $P<0.01$

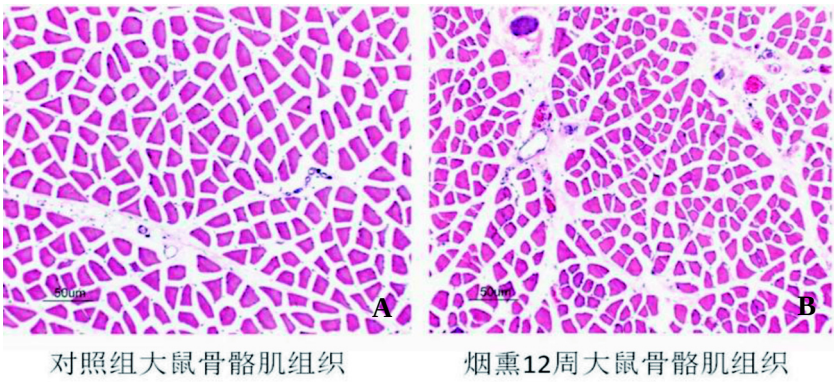


图 2 大鼠股四头肌组织学形态 (HE × 100)

Figure 2 Histopathological features of rats quadriceps femoris (HE × 100)

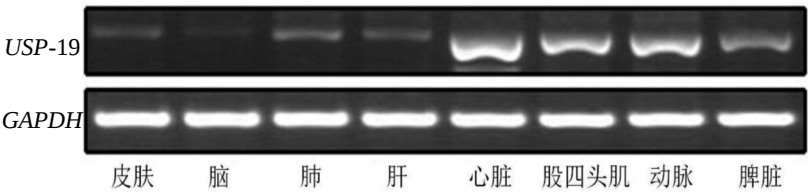


图 3 USP-19 在组织内的表达

Figure 3 USP-19 expression pattern in normal tissues

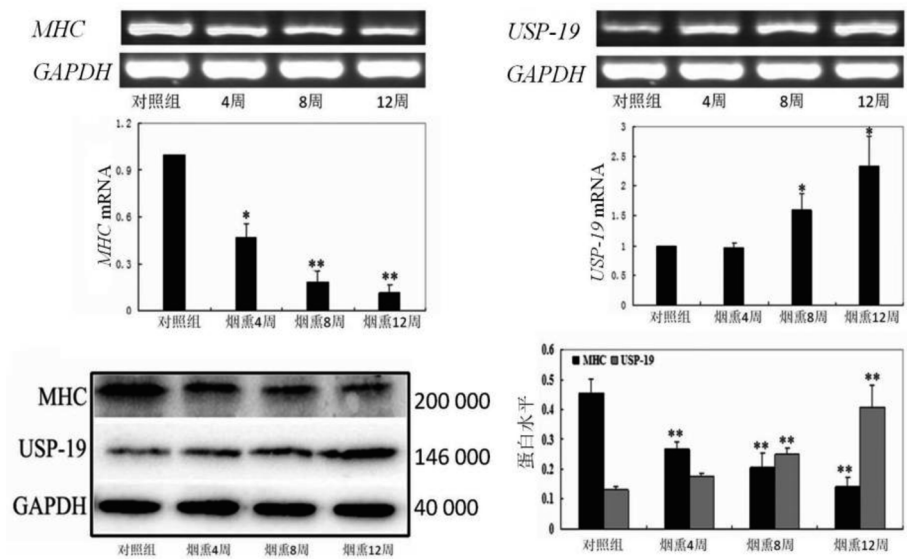


图 4 大鼠骨骼肌组织内 *MHC* 和 *USP-19* 基因的表达变化
Figure 4 *MHC* and *USP-19* gene expression levels

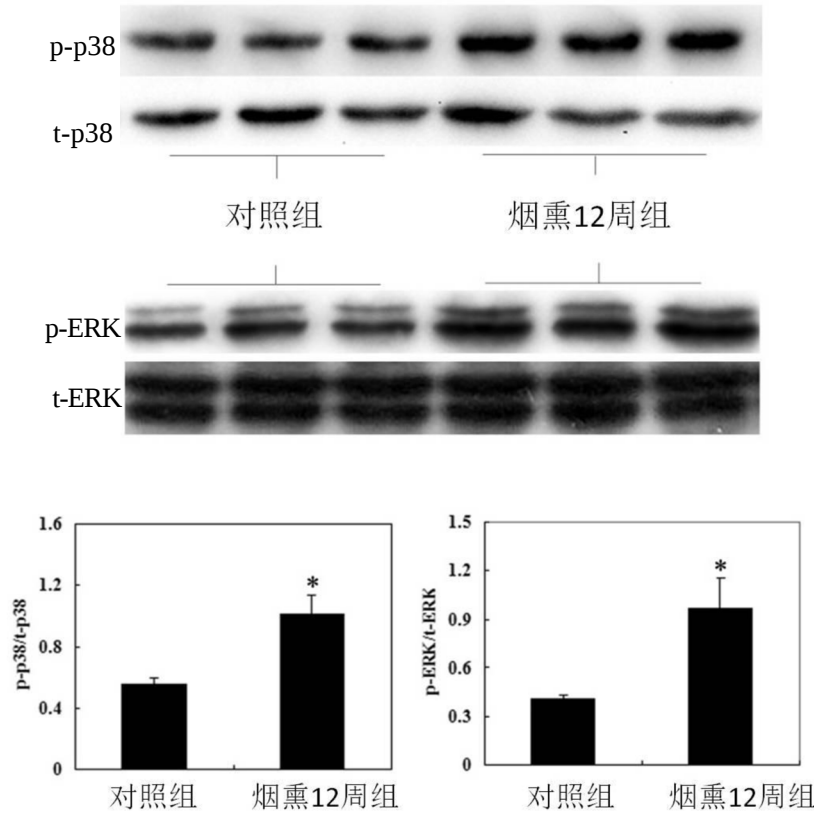


图 5 大鼠骨骼肌组织内 MAPKs 通路表达情况

Figure 5 Cigarette smoke affected MAPKs signaling pathways activities in skeletal muscle

3 讨论

近年来, COPD 的发病率和病死率逐年增加, COPD 可引起广泛的肺外损伤, 已知泛素-蛋白酶体系参与骨骼肌萎缩的过程, 这一体系是由多种泛素化酶及去泛素化酶构成, 目前研究多集中在泛素化过程, 对于去泛素化酶的作用及机制还知之甚少^[11]。

本文实验证实, 通过 12 周的烟熏可使大鼠肺组织产生肺气肿改变, 且 8 周及 12 周的烟熏暴露可诱发显著的体质量减轻及肌肉体积减少。Lee 等^[2]研究表明, 16 周的持续烟熏可导致大鼠肺实质损伤, 气肿形成及体质量减轻, 与本文结果相似。实验显示, 在核酸及蛋白质水平, 骨骼肌组织内的 MHC 发生明显减少, 表明骨骼肌组织发生萎缩, 烟熏引起骨骼肌萎缩的因素可能包括缺氧, 高碳酸血症, 营养耗竭, 全身炎症反应和氧化应激^[3]。

骨骼肌细胞内表达多种去泛素化酶, 其中部分在骨骼肌内特异性表达^[4]。Urso 等^[5]研究制动 48 h 后人骨骼肌细胞内基因的表达, 表明泛素特异性蛋白酶-6(USP-6)mRNA 水平明显升高; Radom-Aizik 等^[6]对 COPD 患者进行 12 周的耐力训练后检测骨骼肌的基因表达, 表明泛素特异性蛋白酶-15(USP-15)表达较未参加训练者明显升高; Bosch-Comas 等^[7]研究表明, USP-25 表达增强可以抑制肌球蛋白结合蛋白 C1 的降解, 从而影响肌肉的分化和生长。本文作者研究首次表明, 烟熏可刺激萎缩的骨骼肌组织内 USP-19 基因的表达。USP-19 的表达与体质量, MHC 水平呈负相关, 且与烟熏暴露时间呈正相关。这些结果提示, USP-19 基因为骨骼肌分解代谢中的负性调节因子。Combaret 等^[8]研究表明, 恶性肿瘤及长期使用糖皮质激素可诱导大鼠发生骨骼肌萎缩, 萎缩的骨骼肌细胞内 USP-19 基因表达明显上调; Bedard 等^[9]研究表明, USP-19 基因敲除的小鼠在糖皮质激素化过程中, 较对照组不易发生骨骼肌萎缩。这些结果与本文结果一致。

本实验中烟熏 12 周后, 骨骼肌细胞内 2 条主要的 MAPKs 信号传导通路被激活, 分别为 p38 及 ERK 通路。这与已有的多项研究结果相似。如 Lecker 等^[10]证实 USP-14 在骨骼肌萎缩过程中起负向调节作用, 而这一作用可能通过刺激细胞内

ERK 磷酸化水平而实现; Lee 等^[2]也证实氧自由基, 肿瘤坏死因子 α (TNF- α)所诱导的肌纤维的降解机制与 p38 MAPK 有关, p38 的磷酸化水平升高有利于骨骼肌细胞萎缩和蛋白质降解。Penna 等^[11]研究证实, 恶性肿瘤诱发的恶病质病程中, 大鼠的骨骼肌组织发生明显萎缩, 萎缩肌肉内 ERK 磷酸化水平明显升高; Koistinen 等^[12]研究表明, 2 型糖尿病模型大鼠的萎缩骨骼肌组织内 p38MAPK 通路磷酸化水平明显上调。这些证据均提示 MAPKs 通路参与骨骼肌萎缩的发生。

总之, 本研究初步证实 USP-19 作为一个负性调节基因, 参与了 COPD 大鼠骨骼肌萎缩的过程。欲证实 USP-19 基因是否通过 MAPKs 通路参与骨骼肌细胞的降解, 需通过体外实验, 利用 p38 及 ERK 抑制剂及沉默 RNA 技术加以论证。本文研究结果将有助于对 COPD 患者骨骼肌功能障碍/骨骼肌萎缩的发生机制的探索, 有助于临床早期发现并避免其高危因素、预防萎缩的发生。

参考文献:

- [1] Wing SS. Deubiquitinases in skeletal muscle atrophy[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2013, 45(10):2130-2135.
- [2] Lee JH, Lee DS, Kim EK, et al. Simvastatin inhibits cigarette smoking-induced emphysema and pulmonary hypertension in rat lungs[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2005, 172(8):987-993.
- [3] Man WD, Kemp P, Moxham J, et al. Skeletal muscle dysfunction in COPD: Clinical and laboratory observations [J]. Clin Sci (Lond), 2009, 117(8):251-264.
- [4] Quesada V, Díaz-Perales A, Gutiérrez-Fernández A, et al. Cloning and analysis of 22 novel human ubiquitin-specific proteases[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2004, 314(1): 54-62.
- [5] Urso ML, Scrimgeour AG, Chen YW, et al. Analysis of human skeletal muscle after 48h immobilization reveals alterations in mRNA and protein for extracellular matrix components [J]. J Appl Physiol, 2006, 101(4):1136-1148.
- [6] Radom-Aizik S, Kaminski N, Hayek S, et al. Effects of exercise training on quadriceps muscle gene expression in chronic obstructive pulmonary disease[J]. J Appl Physiol, 2007, 102(5):1976-1984.
- [7] Bosch-Comas A, Lindsten K, Gonzalez-Duarte R, et al. The ubiquitin-specific protease USP25 interacts with three sarcomeric proteins[J]. Cell Mol Life Sci, 2006, 63(6):723-734.
- [8] Combaret L, Adegoke OA, Bedard N, et al. USP19 is a ubiquitin-specific protease regulated in rat skeletal muscle

- during catabolic states[J]. Am J Physiol Endocrinol Metab, 2005, 288(4):693-700.
- [9] Bédard N, Jammoul S, Moore T, et al. Inactivation of the ubiquitin-specific protease 19 deubiquitinating enzyme protects against muscle wasting[J]. FASEB J, 2015, 29(9): 3889-3898.
- [10] Liu N, Kong T, Chen X, et al. Ubiquitin-specific protease 14 regulates LPS-induced inflammation by increasing ERK1/2 phosphorylation and NF- κ B activation[J]. Mol Cell Biochem, 2017. doi: 10.1007/s11010-017-2978-0. [Epub ahead of print]
- [11] Penna F, Costamagna D, Fanzani A, et al. Muscle wasting and impaired myogenesis in tumor bearing mice are prevented by ERK inhibition[J]. PLoS One, 2010, 5:e13640.
- [12] Koistinen HA, Chibalin AV, Zierath JR. Aberrant p38 mitogen-activated protein kinase signaling in skeletal muscle from Type 2 diabetic patients[J]. Diabetologia, 2003, 46(10): 1324-1328.

Effect and Mechanism of Ubiquitin-specific Peptidase 19 on Muscle Atrophy of Chronic Obstructive Pulmonary Disease Induced by Cigarette Smoke Exposure in Rats

LIU Qian, LIU Song, XU Wei-guo, GUAN Si-bin, GUO Xue-jun
(Department of Respiration Medicine, Xinhua Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200092)

[Abstract] Objective To investigate the effects of ubiquitin-specific peptidase 19 (USP-19) on rats bearing chronic obstructive pulmonary disease (COPD) induced by cigarette smoke (CS) exposure. **Methods** Rats exposed to chronic CS was chosen for the study. For histological examination, lungs and quadriceps femoris muscle were stained with hematoxylin and eosin. Total RNA and protein were extracted for Real-time PCR and Western blot analysis to assess the MHC, USP-19 and MAPKs gene expression. **Results** Twelve weeks CS exposure produced lung lesions that morphologically resembled human emphysema, leading to the enlargement of alveolar ducts. Skeletal cell numbers per high-power (HP) lens increased after 12 weeks by 40% in comparison with the control group, suggesting muscle wasting. Chronic CS exposure decreased the mRNA level of MHC. MHC protein content in the quadriceps femoris muscle was decreased in the 8- and 12-week groups. CS significantly stimulated phosphorylation of ERK1/2, p38 without altering the total ERK1/2, p38 content. **Conclusions** Cigarette smoke-induced skeletal muscle atrophy is associated with up-regulation of USP-19, which via MAPKs probably.

[Key words] Cigarette smoke exposure; Ubiquitin-specific peptidase 19 (USP-19); Chronic obstructive pulmonary disease (COPD); Muscle atrophy; Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)

二乙基亚硝胺诱导建立 *Apc* 基因突变大鼠 与 F344 大鼠肝癌模型的比较

谢 蓓¹, 赵 磊², 孙 婧¹, 张丽娟¹, 库本高志³, 魏虎来¹

(1. 兰州大学基础医学院, 甘肃省新药临床前研究重点实验室, 兰州 730000;

2. 中牧实业股份有限公司兰州生物药厂, 兰州 730046;

3. 京都大学医学院实验动物研究所, 日本京都 6068501)

[摘要] 目的 采用二乙基亚硝胺(DEN)在 F344 大鼠、Kyoto *Apc* Delta(KAD)大鼠体内诱发制备肝癌模型, 并比较其优劣。方法 KAD 大鼠 25 只, 随机法分组, 阴性对照组(5 只)给予正常饮水; DEN 造模组(20 只)前 5 周饮水中添加 40 $\mu\text{g/mL}$ DEN, 6~20 周给予正常饮水; 定期解剖大鼠, 肉眼观察肝脏病变并取病变组织及癌旁组织制作病理切片。25 只 F344 大鼠采用相同方法进行实验。结果 F344 大鼠和 KAD 大鼠均可成功诱发肝癌, 且肝癌发生病理过程与人类相似。造模 16 周时 KAD 大鼠就可见灰白色病灶点, 3/4 大鼠成瘤, 平均病灶数为 1.00 ± 0.82 个; 造模 20 周时, KAD 大鼠全部(4/4)成瘤, 病灶数为 3.50 ± 1.29 个; 而 F344 大鼠迟至 20 周时才可观察到类似病灶, 3/4 大鼠成瘤, 病灶数为 1.25 ± 0.96 个。KAD 大鼠的诱导成瘤性显著高于亲代 F344 大鼠($P < 0.05$)。结论 与亲代 F344 大鼠相比, 抑癌基因 *Apc* 突变的 KAD 大鼠经 DEN 诱导更易发生肝癌, 且该模型具有肝癌诱发时间短、相同诱导时间肝癌发生率高、诱发病灶数多等优点, 是化学诱发制备肝癌动物模型的良好模式动物。

[关键词] KAD 大鼠; F344 大鼠; 肝癌诱导; 二乙基亚硝胺(DEN)

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0191-07

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 其发生涉及多因素、多阶段包含启动、促进和癌变的复杂病理过程, 发病机制尚未完全阐明。类似肝癌发病特点及过程的动物模型在研究肝癌发病机制中起着重要的作用, 建立一种理想的肝癌动物模型, 不仅有助于探索肝癌发生发展的分子机制, 而且对肝癌的预防、临床治疗肝癌药物的开发等具有重要

意义。目前, 肝癌动物模型建立的方法多样, 有自发、诱发、移植、转基因等^[1,2], 其中以诱发性肝癌模型应用最广。该模型接近于人类肝癌的发病特点和过程, 但由于其诱导时间长(需 3~5 个月甚至 1~2 年)、动物死亡率高等因素制约其广泛应用^[3], 迫切需要探索开发短时高效诱发肝癌模型的模式动物。二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN)诱癌特点是成功率高, 对肝脏专一, 癌变过程与人类肝癌发生过程十分相似, 是迄今应用最广泛的肝癌诱发化学物之一^[4-7]。

Kyoto *Apc* Delta 大鼠, 即 KAD 大鼠, 为 Kuramoto Takashi 实验室使用 F344 大鼠经 N-乙基-N-亚硝基脲(ethylnitrosourea, ENU)诱发制备的结肠腺瘤样息肉(adenomatous polyposis coli, *Apc*)基因 S2523 位点发生无义突变的基因突变大鼠^[8]。KAD 大鼠的 APC 蛋白缺少碱基区(basic domain, BD)、

[收稿日期] 2017-01-05

[基金项目] 甘肃省自然科学基金计划项目
(1208RJZA190)

[作者简介] 谢 蓓(1980-), 女, 讲师, 博士, 研究方向: 肿瘤分子生物学。E-mail: xieb@lzu.edu.cn

赵 磊(1980-), 共同第一作者, 男, 兽医师, 研究方向: 动物医学。E-mail: leilei8071@hotmail.com

[通讯作者] 魏虎来(1962-), 男, 教授, 研究方向: 肿瘤分子生物学。E-mail: weihulai@lzu.edu.cn

EB1 结合区及 PDZ 区域,但仍保留完整的 β -catenin 蛋白结合区。虽然, KAD 大鼠 *Apc* 基因发生了无义突变,编码的 APC 蛋白翻译提前终止,但该大鼠体内并无任何疾病发生;经诱癌物氧化偶氮甲烷(azoxy methane, AOM)和葡聚糖硫酸钠(dextran sodium sulfate, DSS)诱发后, KAD 大鼠能高效快速的诱发结肠癌^[8];经 4-硝基喹啉 N-氧化物(4-nitroquinoline 1-oxide, 4-NQO)诱导 KAD 大鼠易发生舌癌等^[9]。

基于 KAD 大鼠使用不同诱癌剂诱发制备的肿瘤模型具有肿瘤诱发时间短、成功率高等优点,这些肿瘤动物模型对疾病的发生机制^[10,11]及抗肿瘤药物的筛选具有重要意义^[12],且 KAD 大鼠是否经诱导易于发生肝癌目前尚未见报道。本实验拟以 F344 大鼠和 KAD 大鼠为研究对象,探索使用诱癌剂 DEN 在两种大鼠体内短期高效诱发肝癌模型的方法并比较其优劣。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

诱癌剂:二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DEN),分子式(C_2H_5)₂NNO,密度:0.95 g/mL,购自 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司。

1.2 实验动物

5 对 SPF 级 4 周龄 KAD 大鼠由日本京都大学 Kuramoto Takashi 教授购自日本 SLC Inc.公司并赠送本实验室。经 1~2 周隔离检疫后,大鼠饲养于兰州大学医学实验动物中心屏障系统设施 [SCXK(甘)2013-0002]中繁殖传代,定期使用实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(qRT-PCR)方法检测 KAD 大鼠中 *Apc* 基因突变是否仍存在。SPF 级 F344 大鼠由兰州大学医学实验中心供给 [SCXK(甘)2013-0002]。实验时取 SPF 级 5 周龄雄性 KAD 大鼠(体质量 90~100 g)和 SPF 级 F344 大鼠(体质量 110~120 g)各 25 只,实验在兰州大学医学实验动物中心屏障系统设施 [SYXK(甘)2013-0003]中进行,光照周期明 12 h:12 h 暗,自由摄食和饮水。动物实验方案经兰州大学实验动物管理机构审查,符合科技部《关于善待实验动物的指导性意见》的要求。

1.3 KAD 大鼠突变基因的鉴定

取 SPF 级 KAD 大鼠和 SPF 级 F344 大鼠各 3 只,

体质量 200~220 g,剪尾法取大鼠尾部尖端组织。常规方法提取基因组 DNA,使用 *Apc* 基因引物采用定量 RT-PCR 方法扩增基因, *Apc* 基因引物序列:上游 5'-ATCTGTTTCAGGCAGGTGGAT-3',下游 5'-TCACTCGAGGAAGGGATGAG-3'。MnII 内切酶剪切基因扩增产物,琼脂糖凝胶电泳检测。

1.4 KAD 大鼠和 F344 大鼠体内肝癌模型的制备

雄性 KAD 大鼠 25 只,采用随机法分组,1 组(5 只)为阴性对照组,给予正常饮水,饲养 20 周;另一组(20 只)为 DEN 造模组,前 5 周饮水中添加 40 μ g/mL DEN,5 周后给予正常饮水,继续饲养 15 周至共 20 周;期间分别于 4、8、12、16 及 20 周分批次分别处死阴性对照组 KAD 大鼠 1 只, DEN 造模组大鼠 4 只(随机选择)。雄性 F344 大鼠 25 只,使用与 KAD 大鼠相同的分组及造模方法处理。实验动物乙醚麻醉、颈椎脱臼处死后迅速开腹,肉眼观察肝脏是否发生病变后完整摘取肝脏组织,称其重量;切取部分肿瘤组织和癌旁组织分别放入体积分数 10% 中性甲醛溶液中进行固定,其余组织放入 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中备用。

1.5 实验动物整体观察

每日随时观察动物的精神、毛色、饮食、粪便及活动情况并进行记录。动物处死后,立即进行解剖学检查,称体质量、肝脏重量,观察肝脏大小、色泽、质地及有无肿瘤结节形成,无癌灶者取肝组织,出现癌灶者取癌结节及距癌灶边缘 0.5~1 cm 癌旁组织。

1.6 病理组织学显微结构观察

对所取组织常规行体积分数 10% 中性甲醛固定、脱水、石蜡包埋、切片,苏木精-伊红(HE)染色后进行病理组织学检查,光学显微镜下观察并拍照。

1.7 统计学分析

应用 SPSS16.0 软件对数据进行统计分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间分析比较采用方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 KAD 大鼠突变基因鉴定

F344 大鼠和 KAD 大鼠剪取鼠尾,分别提取 DNA,经 RT-PCR 扩增和内切酶剪切后,产物由琼脂糖凝胶电泳检测 KAD 大鼠 *Apc* 基因突变状况。

结果显示: KAD 大鼠因 *Apc* 基因发生突变, 基因中 *MnII* 酶切位点消失、基因扩增产物不能被剪切; F344 大鼠 *Apc* 基因未发生突变, *MnII* 酶切位点仍存在, 经 *MnII* 内切酶作用后 *Apc* 基因片段被剪切发生断裂(图 1), 检测结果证实 KAD 大鼠中 *Apc* 基

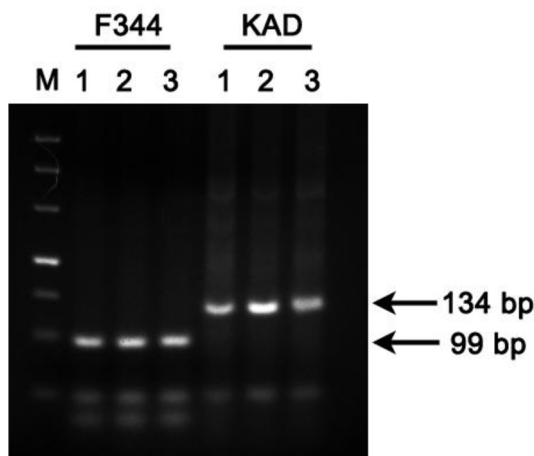


图 1 KAD 大鼠 *Apc* 基因突变鉴定

Figure 1 Authentication results of *Apc* gene in F344 rats and KAD rats

因突变并稳定遗传。

2.2 大鼠一般状况观察

KAD 大鼠和 F344 大鼠在诱癌过程中精神状态均良好, 活动自如, 毛色光亮, 排粪排便自如, 粪便形态良好, 无稀释样, 亦不干燥。大鼠在整

个肝癌诱发过程中摄食、饮水自由, 至造模结束摄食量变化如表 1 所示: 因 KAD 大鼠前期体型偏小, 摄食量偏少($P<0.01$), 后期体质量增至 200~300 g 时, 各时间段摄食量无明显差异; 因 F344 大鼠对诱癌剂比较敏感, 造模组摄食量明显少于对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 而 KAD 大鼠对诱癌剂敏感性较弱, 造模组 KAD 大鼠摄食量与对照组相比无明显差异。饮水量变化见表 2: KAD 大鼠和 F344 大鼠 DEN 造模组饮水量与阴性对照组相比均无明显差异, 只是随大鼠体质量增长饮水量增加。至造模结束无任何动物意外死亡, 大鼠存活率均为 100%。肝癌诱发过程中, 大鼠体质量增长变化如表 3 所示, 随造模时间延长, KAD 大鼠和 F344 大鼠造模组及阴性对照组体质量均增长; 因 F344 大鼠对 DEN 比较敏感, 造模初期体质量增长缓慢($P<0.05$), 后期两种大鼠的造模组与对照组相比体质量增长均无明显差异; KAD 大鼠的体质量增长慢于同期 F344 大鼠。

2.3 KAD 大鼠和 F344 大鼠诱发肝癌比较

定期选取大鼠, 乙醚麻醉、颈椎脱臼处死后开腹, 观察肝脏的表观变化, 结果如图 2 所示: 阴性对照组 KAD 大鼠和 F344 大鼠肝脏均颜色鲜红, 表面光滑, 色泽明亮均一; 造模组前期, F344 大鼠和 KAD 大鼠肝脏表观亦正常; 造模后期, F344 大鼠和 KAD 大鼠肝脏均经历略失光泽—肝脏偏黄—色泽不均—不光亮—灰白色病灶出现等过程。造模

表 1 F344 和 KAD 大鼠在 DEN 诱发肝癌过程中摄食量变化

Table 1 The food intake of F344 and KAD rats during DEN inducing hepatocarcinoma						g
组别	造模时间 / 周					
	4	8	12	16	20	
F344 对照	454.00 ± 20.14(n=5)	483.00 ± 17.01(n=4)	482.00 ± 23.64(n=3)	438.00 ± 11.31(n=2)	463.00 ± 0.00(n=1)	
F344 造模	425.00 ± 14.23*(n=20)	438.12 ± 8.63**(n=16)	428.17 ± 8.25*(n=12)	419.00 ± 12.73(n=8)	417.00 ± 0.00(n=4)	
KAD 对照	350.00 ± 18.85(n=5)	428.00 ± 15.29*** (n=4)	452.00 ± 23.64*** (n=3)	480.00 ± 15.56*** (n=2)	492.00 ± 0.00*** (n=1)	
KAD 造模	330.20 ± 15.97(n=20)	424.38 ± 9.09*** (n=16)	419.33 ± 17.62*** (n=12)	423.00 ± 16.97*** (n=8)	467.00 ± 0.00*** (n=4)	

注: 与同时间段同种属对照组大鼠相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与同组造模 4 周大鼠相比, *** $P<0.01$

表 2 F344 和 KAD 大鼠在 DEN 诱发肝癌过程中饮水量变化

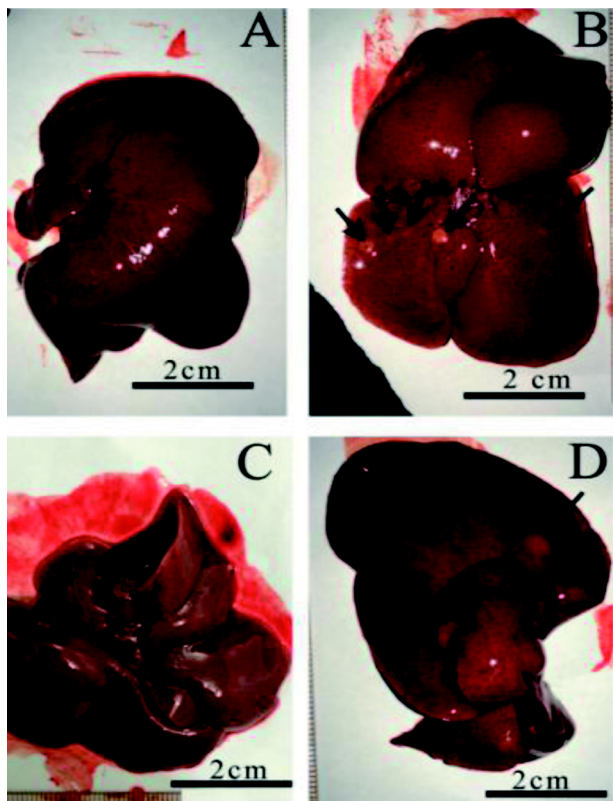
Table 2 The water intake of F344 and KAD rats during DEN inducing hepatocarcinoma						mL
组别	造模时间 / 周					
	4	8	12	16	20	
F344 对照	892.60 ± 14.08(n=5)	899.50 ± 24.91(n=4)	920.33 ± 19.04(n=3)	1 049.00 ± 56.67*** (n=2)	1 075.00 ± 0.00*** (n=1)	
F344 造模	830.00 ± 27.54** (n=20)	853.00 ± 29.14(n=16)	887.00 ± 24.88# (n=12)	984.00 ± 84.85*** (n=8)	1 016.00 ± 0.00*** (n=4)	
KAD 对照	845.00 ± 20.99(n=5)	873.50 ± 26.84(n=4)	925.00 ± 27.50*** (n=3)	952.00 ± 21.21*** (n=2)	1 010.00 ± 0.00*** (n=1)	
KAD 造模	859.00 ± 25.01(n=20)	852.50 ± 38.73(n=16)	956.67 ± 32.01*** (n=12)	939.00 ± 31.11*** (n=8)	1 075.00 ± 0.00*** (n=4)	

注: 与同时间段同种属对照组大鼠相比, ** $P<0.01$; 与同组造模 4 周大鼠相比, # $P<0.05$, *** $P<0.01$

表 3 F344 和 KAD 大鼠在 DEN 诱发肝癌过程中体质量增长变化

Table 3 The body weight gains of F344 and KAD rats during DEN inducing hepatocarcinoma						g
组别	造模时间 / 周					
	4	8	12	16	20	
F344 对照	63.80 ± 13.33(n=5)	134.63 ± 23.7(n=4)3	177.67 ± 22.05(n=3)	219.50 ± 15.56(n=2)	274.00 ± 0.00(n=1)	
F344 造模	39.25 ± 14.27*(n=20)	128.50 ± 20.14(n=16)	196.00 ± 22.37(n=12)	233.00 ± 22.68(n=8)	278.50 ± 23.21(n=4)	
KAD 对照	74.33 ± 21.37(n=5)	101.50 ± 22.42(n=4)	121.50 ± 24.56(n=3)	162.50 ± 26.87(n=2)	201.5 ± 0.00(n=1)	
KAD 造模	59.88 ± 11.12(n=20)	96.88 ± 20.23(n=16)	111.60 ± 21.72(n=12)	151.13 ± 24.18(n=8)	188.75 ± 27.47(n=4)	

注: 与同时时间段同种属对照组大鼠相比, *P<0.05



A: 阴性对照组 KAD 大鼠肝脏; B: DEN 造模组 KAD 大鼠肝脏; C: 阴性对照组 F344 大鼠肝脏; D: DEN 造模组 F344 大鼠肝脏; 图中黑色箭头指示灰白色病灶及肝癌

图 2 DEN 诱发肝癌形成时 F344 大鼠和 KAD 大鼠肝脏的表观变化

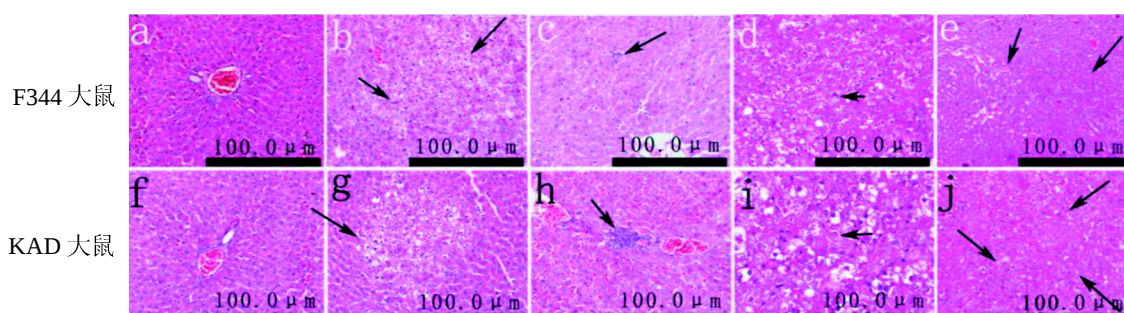
Figure 2 The appearance of livers in F344 and KAD rats when the hepatocarcinomas were induced

16 周时 KAD 大鼠肝脏实质中就已可见单发、圆形、边界清晰的灰白色病灶点, 体积较小。3/4 大鼠成瘤, 平均病灶数为 1.00 ± 0.82 个; 造模 20 周时, KAD 大鼠全部(4/4)成瘤, 病灶数为 3.50 ± 1.29 个, 且病灶体积明显增大, 肝脏边缘部分亦可见病灶出现。而 F344 大鼠迟至 20 周时才可观察到类似病灶, 3/4 大鼠成瘤, 病灶数为 1.25 ± 0.96 个。KAD 大鼠的诱导成瘤性显著高于亲代 F344 大鼠($P<0.05$)。上述实验结果初步提示抑癌基因 *Apc* 突变的 KAD 大鼠更易经 DEN 诱导发生肝细胞肝癌, 且具有诱发时间短、相同诱导时间成瘤率高、成瘤病灶明显且数目多等优点。整个造模过程中, 取样时未见 KAD 大鼠和 F344 大鼠的肝脏 / 体质量比有明显差异(表 4)。

HE 染色光学显微镜观察结果显示: 阴性对照组 KAD 大鼠和 F344 大鼠细胞排列均比较整齐, 核 / 质比较接近; 造模组 KAD 大鼠和 F344 大鼠均经历脂肪样变性、脂肪变性空泡化、淋巴细胞浸润、嗜酸性小体出现、明显的癌变等过程。造模 8 周时, KAD 大鼠脂肪细胞空泡化明显, 细胞形态发生了明显的变化, 可见核 / 质比明显升高, 核异质明显, 细胞形态不规则, 排列比较松散; 造模 12 周时, 出现明显的淋巴细胞浸润; 造模 16 周时, 出现嗜酸性小体; 造模 20 周, 则可观察到明显的癌变(图 3)。F344 大鼠造模 8~12 周时, 脂肪变性加剧; 造模 16 周, 可见淋巴细胞浸润; 造模 20 周, 可观察到嗜酸性小体出现, 部分区域可见小的癌变病灶(图 3)。

表 4 DEN 诱导 KAD 和 F344 大鼠肝癌过程中肝脏系数变化

Table 4 The liver coefficient in F344 and KAD rats during the hepatocarcinoma formation						%
组 别	造模时间 / 周					
	4	8	12	16	20	
F344 对照(n=1)	3.67 ± 0.00	4.29 ± 0.00	4.26 ± 0.00	3.92 ± 0.00	3.98 ± 0.00	
F344 造模(n=4)	3.94 ± 0.32	4.06 ± 0.27	4.09 ± 0.17	4.00 ± 0.33	3.82 ± 0.28	
KAD 对照(n=1)	3.94 ± 0.00	4.07 ± 0.00	4.20 ± 0.00	3.96 ± 0.00	3.92 ± 0.00	
KAD 造模(n=4)	3.84 ± 0.30	3.88 ± 0.38	3.98 ± 0.17	3.98 ± 0.23	3.87 ± 0.20	



a、f 分别为阴性对照组 F344 及 KAD 大鼠; b 为造模过程中 F344 大鼠肝细胞发生了脂肪变性; c、g 为肝细胞发生了脂肪变性空泡化; d、h 为淋巴细胞浸润; e、i 为嗜酸性小体的出现; j 为肝组织发生了明显的癌变; 图中黑色箭头指示病理变化区域

图 3 HE 染色检测 DEN 诱导肝癌过程中 F344 和 KAD 大鼠肝脏组织病理变化

Figure 3 Monitoring of the pathological changes by HE in F344 and KAD rats

3 讨论

肝癌是人类最常见的恶性肿瘤之一, 肝癌的发生是一个多步骤多因素参与的复杂过程, 迄今为止, 有关肝癌发生和发展的生物学机制尚未完全阐明^[2,13,14]。能真实反映人类疾病且类似人类疾病状态的大鼠、小鼠等肝癌动物模型已经成功建立, 为肝癌发生、发展的机制研究提供了有力的工具, 同时, 为药物筛选及临床治疗方法的临床前测试提供了良好的动物模型^[2]。肝癌动物模型建立的方法多种多样, 主要有自发性肝癌动物模型、化学诱导动物模型、转基因动物模型、异种移植性动物模型等^[1,2]; 每种方法都有其优点及缺点; 能忠实反映或者至少部分反映肝癌发生发展机制的动物模型的建立仍具挑战性^[14]。化学诱导肝癌动物模型的建立历经启动、促进、演进和癌变的复杂过程, 与人类肝癌发生相似, 都经过肝损伤—纤维化—恶性化过程而大受青睐^[1,15]。系列抗氧化剂和植物化学物等各类化合物已经作为致癌物在啮齿类动物中诱发肝癌形成; 如 DEN、二甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)、硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)、四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl₄)、2-乙酰氨基苊(2-acetylaminofluorene, AAF)、N-亚硝基吗啉(N-nitrosomorpholine, NMOR)、黄曲霉毒素(aflatoxin)等, 它们可通过摄食、饮水、灌胃、呼吸、腹腔注射、皮下注射等方式在啮齿类动物中诱发肝癌^[2,14]。DEN 诱发肝癌动物模型的发病过程不仅与人类肝癌发生过程相似, 且操作比较简单、诱癌成功率较高, 在肝癌及肝硬化癌前病变等研究中广

泛使用^[4,6,7]。DEN 的致癌能力在于其可烷基化 DNA 结构, 引起 DNA 损伤及细胞变性和在肝细胞中通过激活细胞色素 P450 形成活性氧而发生诱癌功能^[16], 主要局限性在于需要长期注射, 一般建立肝癌模型的时间需 50 周。本实验使用 5 周龄雄性大鼠, 饮水中加入 40 μg/mL DEN, 仅诱导 5 周, KAD 大鼠在 16 周即可观察到肿瘤结节形成, 而 F344 大鼠 16 周时无病灶形成; 至造模结束 20 周时, 平均每只 KAD 大鼠诱发肝癌病灶数为 3.50 ± 1.29 个, 平均每只 F344 大鼠诱发病灶数仅为 1.25 ± 0.96 个, 两者间差异显著($P < 0.05$), 且两种大鼠死亡率均为 0。KAD 大鼠与 F344 大鼠相比, 不仅诱癌时间缩短、大鼠存活率 100%、相同诱导时间肝癌发生率高、诱发病灶数多, 且在肝癌诱发过程中先后出现了肝细胞损伤—淋巴细胞浸润—嗜酸性小体出现—癌变的过程, 是化学诱导建立肝癌动物模型的理想模型动物。

Wnt/β-catenin 信号通路在肝癌发生过程中会异常激活, 是人类肝癌发生的主要途径之一, 但是肝癌发生过程中此信号通路的作用仍未完全阐明^[17]。已发现编码 Wnt 信号通路成分的多种基因在肝癌中发生突变: 如 β-catenin(19%~44%), AXIN1 and AXIN2 (5%~14% and 3%~10%)^[18-20]; 此外, 免疫组织化学研究结果显示 17~40% 人肝癌中出现异常的 β-catenin 细胞质和细胞核的大量聚集^[20]。80% 的结肠癌中报道有 Apc 基因的体细胞突变和 5q21 Apc 位点杂合性丢失, 而肝细胞癌中尚无类似报道^[17]。Colnot 等^[17]构建一种突变的小鼠模型 Apc^{lox/lox}, 即在 Apc 基因的 14 号外显子中插入 loxP 序列, 发现肝细胞中 β-catenin 大量聚集, 同时肝组织中因

β -catenin 靶向基因活化而活化 β -catenin 信号通路。相反,如在肝癌细胞中过表达 *Apc* 基因,则会对肝癌生长起抑制作用^[21]。体细胞 *Apc* 基因的敲除可为人类肝癌研究提供一种极有价值的模型,对肝癌发生的研究非常必要^[17]。本实验使用的 KAD 大鼠为 *Apc* 基因无义突变的大鼠,编码的 APC 蛋白翻译提前终止,但 KAD 大鼠体内无任何疾病发生;经 DEN 诱导后, *Apc* 基因突变可促进肝癌发生、加快 DEN 诱导的肝癌发生进程,但具体机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research [J]. *Int J Exp Pathol*, 2009, 90(4):367-386.
- [2] Wu L, Tang ZY, Li Y. Experimental models of hepatocellular carcinoma: developments and evolution [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2009, 135(8):969-981.
- [3] Cortinovis C, Klimek F, Nogueira E. Rat hepatocarcinogenesis induced by N-nitrosodiethylamine and N-nitrosomorpholine continuously administered at low doses [J]. *Am J Pathol*, 1991, 139(5):1157-1171.
- [4] Tanaka T, Kojima T, Kawamori T, et al. Chemoprevention of diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by a simple phenolic acid protocatechuic acid in rats [J]. *Cancer Res*, 1993, 53(12):2775-2779.
- [5] Okubo H, Moriyama M, Tanaka N, et al. Detection of serum and intrahepatic hepatocyte growth factor during DEN-induced carcinogenesis in the rat [J]. *Hepatol Res*, 2002, 24(4):385-394.
- [6] Jayaprakash R, Ramesh V, Sridhar MP, et al. Antioxidant activity of ethanolic extract of *Tinospora cordifolia* on N-nitrosodiethylamine (diethylnitrosamine) induced liver cancer in male Wistar albino rats [J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2015, 7(Suppl 1):S40-S45.
- [7] Ma G, Bai R, Jiang H, et al. Assessment of hemodynamics in a rat model of liver cirrhosis with precancerous lesions using multislice spiral CT perfusion imaging [J]. *Biomed Res Int*, 2013, 813174.
- [8] Yoshimi K, Tanaka T, Takizawa A, et al. Enhanced colitis-associated colon carcinogenesis in a novel *Apc* mutant rat [J]. *Cancer Sci*, 2009, 100(11):2022-2027.
- [9] Tanaka T, Shimizu M, Kochi T, et al. *Apc*-mutant Kyoto *Apc* Delta (KAD) rats are susceptible to 4-NQO-induced tongue carcinogenesis [J]. *Cancers (Basel)*, 2014, 6(3):1522-1539.
- [10] Yoshimi K, Tanaka T, Serikawa T, et al. Tumor suppressor APC protein is essential in mucosal repair from colonic inflammation through angiogenesis [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(4):1263-1274.
- [11] Irving AA, Yoshimi K, Hart ML, et al. The utility of *Apc*-mutant rats in modeling human colon cancer [J]. *Dis Model Mech*, 2014, 7(11):1215-1225.
- [12] Yoshimi K, Hashimoto T, Niwa Y, et al. Use of a chemically induced-colon carcinogenesis-prone *Apc*-mutant rat in a chemotherapeutic bioassay [J]. *BMC Cancer*, 2012, 12:448.
- [13] Newell P, Villanueva A, Friedman SL, et al. Experimental models of hepatocellular carcinoma [J]. *J Hepatol*, 2008, 48(5):858-879.
- [14] Hoshida Y, Fuchs BC, Tanabe KK. Prevention of hepatocellular carcinoma: potential targets, experimental models, and clinical challenges [J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2012, 12(9):1129-1159.
- [15] Park ST, Jang JW, Kim GD, et al. Beneficial effect of metronomic chemotherapy on tumor suppression and survival in a rat model of hepatocellular carcinoma with liver cirrhosis [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010, 65(6):1029-1037.
- [16] De Minicis S, Kisseleva T, Francis H, et al. Liver carcinogenesis: rodent models of hepatocarcinoma and cholangiocarcinoma [J]. *Dig Liver Dis*, 2013, 45(6):450-459.
- [17] Colnot S, Decaens T, Niwa-Kawakita M, et al. Liver-targeted disruption of *Apc* in mice activates β -catenin signaling and leads to hepatocellular carcinoma [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(49):17216-17221.
- [18] Thompson MD, Monga SP. WNT/ β -catenin signaling in liver health and disease [J]. *Hepatology*, 2007, 45(5):1298-1305.
- [19] Shang N, Arteaga M, Zaidi A, et al. FAK is required for c-Met/ β -catenin-driven hepatocarcinogenesis [J]. *Hepatology*, 2015, 61(1):214-226.
- [20] Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, et al. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(16):7385-7392.
- [21] Liu LJ, Xie SX, Chen YT, et al. Aberrant regulation of Wnt signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(33):7486-7499.

Comparison on Hepatocarcinoma Model Induced by Diethylnitrosamine in *Apc*-mutant Rat and F344 Rat

XIE Bei¹, ZHAO Lei², SUN Jing¹, ZHANG Li-juan¹, KURAMOTO Takashi³, WEI Hu-lai¹

(1. Key Laboratory of Preclinical Study for New Drugs of Gansu Province,

School of Basic Medical Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China;

2. CAHIC Lanzhou Biological Pharmaceutical Factory, Lanzhou 730046, China;

3. Institute of Laboratory Animals, Graduate School of Medicine,

Kyoto University, Kyoto 6068501, Japan)

[Abstract] **Objective** To establish hepatocarcinoma models induced by diethylnitrosamine (DEN) in F344 rats, KAD (Kyoto *Apc* Delta) rats and compare the advantages and disadvantages between them. **Methods** Twenty-five KAD rats were randomly divided into 2 groups. The 5 rats in control group were given the normal water. The 20 rats in experimental group were given the water containing 40 µg/mL DEN for 5 weeks, and the remaining 15 weeks they were given the normal water. Every 4 weeks, part of KAD rats was sacrificed to undergo pathological examination and make pathological sections of liver tissues and tumor tissues. Twenty-five F344 rats were treated the same as KAD rats. **Results** Hepatocarcinoma could be induced successfully in KAD rats and F344 rats. The same pathological developing process was found in them, which was similar with human. The average of 1.00 ± 0.82 grey-white lesions could be found in 3 KAD rats (3/4) when they were induced in the 16th week, while no lesions could be found in F344 rats (0/4) at that time. Until the end of the experiments (20 weeks), 3.50 ± 1.29 cancers and gray-white lesions had been developed in KAD rats, while only 1.25 ± 0.96 could be found in F344 rats. The success rate of hepatocarcinoma induction in KAD rats was better than that in F344 rats significantly ($P < 0.05$). **Conclusion** Comparing to F344 rats, KAD rats could be a better hepatocarcinoma induction model, with shorter induction time, higher success rate and numbers of hepatocarcinoma. KAD rat may be an ideal model for dynamically researching the hepatocarcinoma induction.

[Key words] KAD rat; F344 rat; Hepatocarcinoma induction; Diethylnitrosamine (DEN)

ICR 小鼠感染呼肠孤病毒 III 型的实验研究

罗银珠, 张 钰, 何丽芳, 黄碧洪, 吴瑞可, 闵凡贵, 潘金春, 袁 文, 王 静, 郭鹏举, 黄 韧
(广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663)

[摘要] 目的 利用呼肠孤病毒III型(Reo-3)感染 ICR 小鼠, 分析小鼠的临床体征、靶器官病毒载量及血清抗体水平的动态变化。方法 通过动物体内适应试验增强病毒毒力, 利用尾静脉注射与腹腔注射途径建立系统性感染 ICR 小鼠模型, 观察动物临床体征, 于感染 0 d、4 d、7 d、18 d、25 d、35 d、72 d、129 d 分别采集小鼠(2~3 只小鼠)血液并剖检。47 d、81 d、103 d 随机对 3 只小鼠进行血液采集跟踪。采用实时 qPCR 方法检测靶器官病毒核酸量, ELISA 方法检测血清抗体水平。结果 病毒经过 4 次小鼠体内适应其毒力明显增强。小鼠攻毒后 6 d、7 d、9 d、10 d、11 d、16 d 出现死亡, 实时 qPCR 结果显示, 肝脏病毒载量最高, 其次是心、脾、肺。多数器官病毒载量峰值出现在 6~11 d, 129 d 后, 多数靶器官检测阴性。血清抗体最早在 18 d 达到阳性, 25 d 达到峰值, 并维持高抗体水平至试验结束。结论 小鼠体内适应方法可以明显增强 Reo-3 毒力, 该病毒感染可引起小鼠多器官炎症反应, 并导致小鼠死亡。本研究为该病毒模型建立及致病机理研究提供了参考数据。

[关键词] 呼肠孤病毒 III 型(Reo-3); 感染; 临床研究; 呼吸道肠道病

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0198-06

呼肠孤病毒(Reovirus, Reo)是人兽共患病毒^[1], 能从人及多种动物如貂、河虾、蟹、禽、鸭、猪、羊、牛等分离到。该病毒由编码 10 个片段的双股 RNA 组成, 属于呼肠病毒科, 正呼肠病毒属^[2]。呼肠孤病毒 III 型(Reo-3)是该病毒属的代表株。该病毒可感染所有哺乳动物, 包括小鼠、仓鼠、豚鼠、猫和犬等^[3]。Reo-3 感染人, 能引起幼年儿童腹泻、呼吸道感染及脑膜炎等疾病^[4,5]。感染动物能引起动物急性的呼吸窘迫综合征和肺组织纤维化, 脑炎, 也可隐性感染动物并在体内产生抗体, 给血液制品、单克隆抗体、细胞培养等外来致病因子的检定及动物试验带来一定的困难^[1]。Reo-3 在实验动物微生物学等级及监测(GB14922.2-2011)

中被列为 SPF 等级实验动物必须排除的病原微生物。目前对哺乳动物呼肠孤病毒的结构、功能及分子生物学方面研究较多, 而针对小鼠系统性感染模型的临床及相关报道不多, 本实验经尾静脉和腹腔注射 Reo-3 感染 ICR 小鼠, 并进行长达 18 周的血清学及组织核酸监测, 为防控与研究 Reo-3 及呼吸道肠道病毒疾病提供数据。

1 材料与方法

1.1 病毒和细胞株

Reo-3 购自美国典型菌种保藏中心(ATCC VR-824), BHK-ATCC 细胞由本实验室保存。

1.2 实验动物

3 周龄 SPF 级雄性 ICR 小鼠 24 只, 体质量 15~18 g, 购自北京维通利华(SCXK(京)2016-0011), 饲养于广东省实验动物监测所负压感染动物实验室内(SYXK(粤)2012-0122), 自由饮食, 动物实验开展经广东省实验动物监测所动物使用和管理委员会批准(IACUC2015003)。实验前, 随机剖杀 2 只动

[收稿日期] 2016-12-30

[基金项目] 广东省科技计划项目(2014B070706006)、
(2013B060400028)

[作者简介] 罗银珠(1983-), 女, 硕士, 兽医师, 研究方向: 病原学及实验动物模型研究。E-mail: agluo122@sina.com

[通讯作者] 黄 韧(1959-), 男, 博士, 研究员。

E-mail: labking@sohu.com

物经酶联免疫吸附试验(ELISA)和QPCR检测确定为Reo-3 抗原抗体阴性。

1.3 主要试剂和仪器

ELISA 抗体检测试剂盒购自美国Express Bio 公司, 酶标仪购自美国 Thermo 公司。荧光定量 PCR 仪 ABI 7500 购自美国 ABI 公司, DMEM 培养液购自美国 Gibco 公司, RNA 提取试剂 TRizol 购自美国 Invitrogen 公司, DNA 聚合酶购自中国大连宝生物公司, 其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.4 QPCR 引物合成

所用 Reo-3 引物参照参考文献^[6]。引物由上海英潍捷基生物技术有限公司合成。

1.5 病毒滴度测定

将 Reo-3 接种 BHK 细胞, 吸附作用 1 h 后加入含体积分数 2% 血清的维持液, 放入 37 °C、体积分数 5% CO₂ 细胞培养箱中培养, 倒置生物显微镜

表 1 Reo-3 引物序列

Table 1 Primer sequences of Reo-3

引 物	序 列
正向引物	5'- TGTGAGGTGGACGCGAATAG -3'
反向引物	5'-CGTTGATGCAGCGTGAAGAG -3'
探针	5'-JOE -CGGCCGGCTGGTGATCAGAGTATG-ECLIPS -3'

观察细胞形态, 70% 细胞产生细胞病变(CPE)后收获病毒液, 反复冻融 3 次, 离心取上清液作为感染病毒, 并用 qPCR 对病毒拷贝数进行定量。

1.6 动物回归试验

取浓度约为 3.1×10^6 拷贝/μL 的 Reo-3 细胞培养病毒液尾静脉和腹腔注射病毒液各 0.2 mL/ 只, 感染后 3 d 剖杀, 取感染鼠的肝和肺进行研磨, 离心后获得病毒液上清, 重复感染小鼠, 反复 4 次。最后一次获得的组织研磨上清液, 放 -80 °C, 备用。

1.7 感染动物试验

取经过体内适应增毒后的 Reo-3 病毒液, 浓度为 1.5×10^7 拷贝/μL, 尾静脉和腹腔注射病毒液各 0.2 mL/ 只。动物接种病毒后, 观察 129 d。每日记录动物的被毛、行为活动、饮食和精神状态。并在小鼠感染后 4 d、7 d、18 d、25 d、35 d、72 d 和 129 d 对 2~3 只小鼠进行眼眶采血后脱颈椎处死并采集心、肝、脾、肺、肾、脑、胃、盲肠内容物置 -20 °C 保存备用。在感染实验进行过

程中的 47 d、81 d、103 d, 随机抽取 3 只小鼠进行眼眶采血分离血清置 -20 °C 保存待测血清抗体。

1.8 QPCR 检测各组织病毒核酸含量

称量适量组织, 加入 600 μL 的 PBS 缓冲液于组织研磨机上研磨 3~5 min, 将组织匀浆。研磨后, 10 000 r/min 离心 10 min, 取 200 μL 上清抽提核酸, 具体步骤参照核酸提取试剂盒(TIANamp Genomic DNA Kit)说明书。最后应用 ABI 7500 Real-Time PCR System, Taqman RT-PCR 两步法试剂盒(Takara)即 95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 进行 40 个循环, 荧光信号采集设于 60 °C, 溶解曲线设置为: 95 °C 5 s, 65 °C 1 min, 50 °C 30 s, 进行荧光定量 PCR 检测鉴定。

1.9 小鼠血清抗体检测

根据试剂盒说明进行操作与读数判定: 样本稀释及加样, 将血清样本从 1 : 50 稀释, 再向 ELISA 微孔板各加 100 μL 稀释好的样本; 37 °C 孵育后洗板, 每孔加 100 μL 酶标二抗, 37 °C 孵育后洗板, 加显色液; 反应完毕, 立即用酶标仪读数, 测试波长为 405 nm。

1.10 统计分析

实验结束, 所有数据采用 GraphPad Prism 5.01 进行数据处理及分析。

2 结果

2.1 病毒动物回归试验

为提高病毒在小鼠体内适应能力, 本实验进行了 4 次小鼠体内适应试验, 结果显示, 病毒初次接毒后体征不明显、不死亡、而适应接毒后小鼠体征加重。初次感染小鼠, 病毒在体内增殖慢并且含量减低 (图 1A), 多次体内适应后, 体内主要脏器肝、脾、肺病毒载量升高(图 1B), 表明病毒适应后感染能力及毒力增强。

2.2 临床观察

采用经过小鼠回归试验后含有 Reo-3 的组织研磨上清感染 ICR 小鼠, 潜伏期(0~5 d)小鼠出现立毛、扎堆, 个别小鼠精神差, 运动减少; 发病期(6~18 d), 感染鼠立毛明显, 并出现腹式呼吸, 感染后 6 d, 7 d, 9 d, 10 d, 11 d, 16 d, 小鼠出现死亡, 剖检见肺有出血, 肝有白色坏死点, 胃胀气, 脾缩小; 恢复期(19~129~d), 小鼠状态逐渐良好, 精神好转。

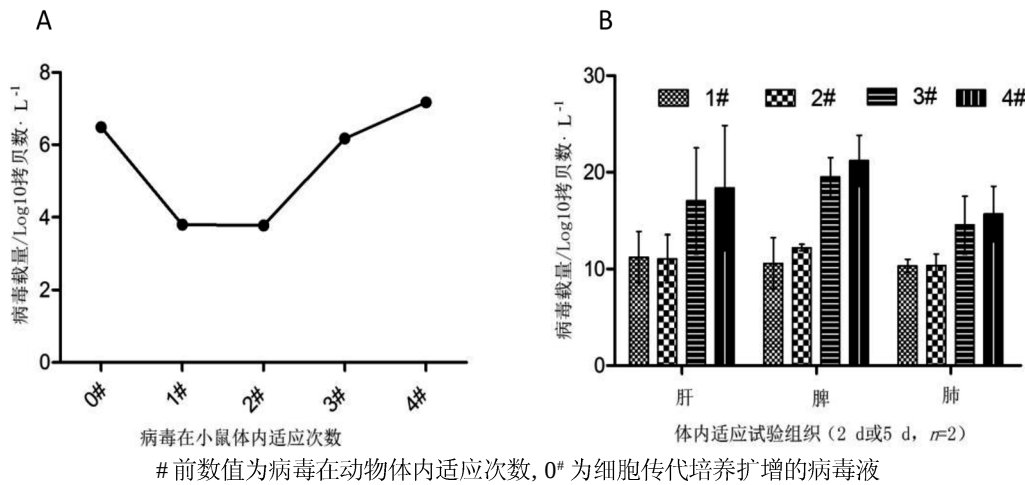


图 1 Reo-3 病毒小鼠体内适应结果
Figure 1 Reo-3 virus adaption to mice

2.3 血清抗体滴度变化

感染小鼠体内抗体滴度随着感染时间迁移而升高, 接种后 18 d 抗体阳性, 之后抗体效价逐渐升高, 在 25 d 抗体稀释度达到 128 倍并维持至 129 d (抗体稀释度达 512 倍)(表 2)。

2.4 组织病毒含量变化

2.4.1 靶器官核酸含量变化 感染早期小鼠以肝病毒载量最高(图 2A), 其次是心、脾、肺(图 2B,C,D)。肝以 6 d (3.3×10^6 拷贝/ μL)含量最高(图 2A), 心在 11 d (4.5×10^5 拷贝/ μL)(图 2B), 肺在 18 d ($2.9 \times$

表 2 感染小鼠抗 Reo-3 血清抗体的测定
Table 2 Determination of serum antibody against Reo-3 of infected mice

检测结果	接种后时间/d										
	0	4	7	18	25	35	47	72	81	103	129
抗体滴度	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	0.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 1.41	7.48 $\pm$ 0.74	7.50 $\pm$ 0.71	8.00 $\pm$ 1.41	7.33 $\pm$ 1.15	8.33 $\pm$ 0.58	8.33 $\pm$ 0.00	8.67 $\pm$ 1.16

注: 抗体滴度为能检出阳性结果的最大稀释倍数; n=2 或 3

10^4 拷贝/ μL)(图 2C), 脑在 4 d (4.3×10^5 拷贝/ μL)(图 2D), 脾在 6 d (8.7×10^3 拷贝/ μL)(图 2E), 肾在 18 d (1.9×10^4 拷贝/ μL)(图 2F), 并随着时间推移小鼠各组织内病毒核酸含量总体呈现下降趋势, 到 129 d 除心和脾外检测到少量核酸外, 其他组织均检测不到病毒核酸。

2.4.2 胃肠道消化道核酸含量变化 感染后的小鼠取胃及盲肠内容物进行核酸检测, 结果显示病毒可以在胃中缓慢增殖, 但到感染 4 个月后检测不到(图 3A)。盲肠内容核酸检测除 1 只能检测到外, 其余的均不能检测出来(图 3B), 该结果暗示该病毒在本实验中基本不经粪便排毒和传播。

2.4.3 死亡鼠主要脏器及组织核酸 感染实验后 6 d,

7 d, 9 d, 10 d, 11 d, 16 d 分别死亡 1 只(图 5)。脏器核酸结果显示早期死亡小鼠(6 d, 7 d)肝和脑病毒载量高于其他组织, 暗示两个器官为病毒早期增殖和损伤的主要器官。肝的核酸含量在不同时间死亡小鼠中均呈现高载毒量, 显示病毒在小鼠肝脏大量复制, 是致死的重要因素。肝、脾、肺、肾、胃病毒载量以 7 d 死亡鼠核酸含量最高, 并呈现随着时间推移逐步减低。

3 讨论

呼肠孤病毒具有宿主谱广泛的特点, 除人外, 从自然感染的小鼠、禽、犬、猫、牛、猪、猕

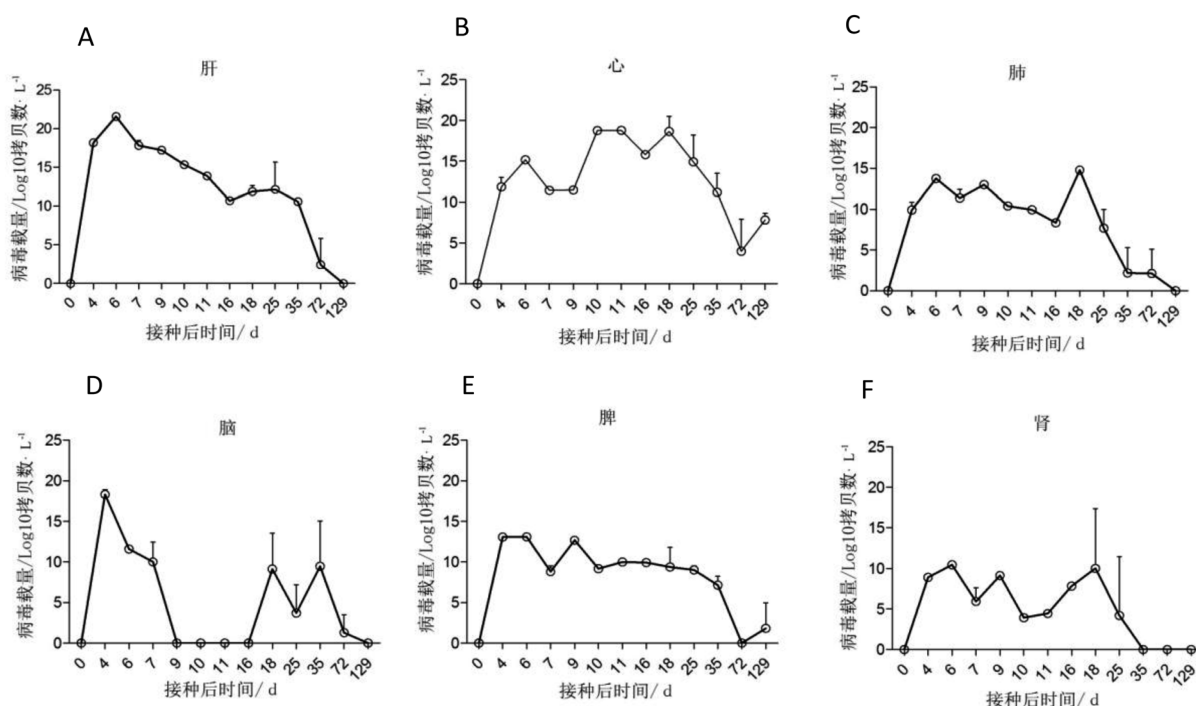


图2 感染小鼠各内脏组织核酸测定(n=1~3)

Figure 2 Content of Reo-3 nucleic acids in organs of infected mice (n=1~3)

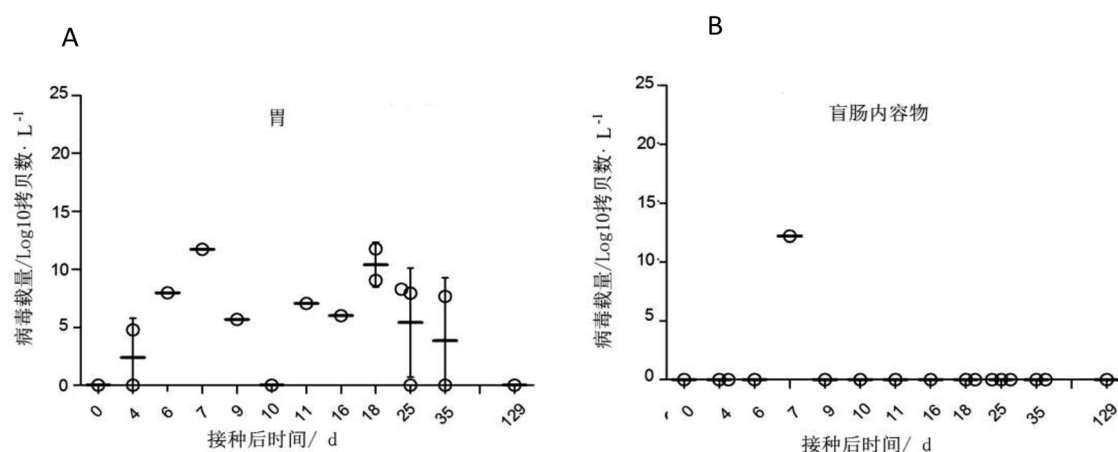


图3 感染小鼠胃肠道核酸含量变化 (n=1~3)

Figure 3 Content of Reo-3 nucleic acids in gastrointestinal tract of infected mice (n=1~3)

猴、黑猩猩、昆虫、鱼，蝙蝠等体内都分离到呼肠孤病毒^[7-11]。根据国际病毒分类委员会第七次报告，正呼肠孤病毒属分3个亚群。非融合基因哺乳动物正呼肠孤病毒(MRV)属于第一个亚群。该亚群目前有4个血清型(Reo-1, Reo-2, Reo-3, R4)^[2,12]。Reo-3病毒在鼠群中常呈隐性感染，威胁实验动物的健康，进而影响动物实验的可靠性和准确性^[13-14]。

据报道^[14]，1980年代上海地区普通级鼠群感染率达35%，血清阳性率5.8%，屏障小鼠血清阳性率1.9%，感染呈间发性流行，时隐时现。近年报告^[15]显示该病毒在SPF级实验鼠中流行率低。本实验室2015年对野鼠Reo-3抗体阳性率抽检阳性率30% (24/80)。2007年英国研究者^[16]曾对野外捕获小鼠进行病原血清调查表明Reo-3阳性率10%。目前，

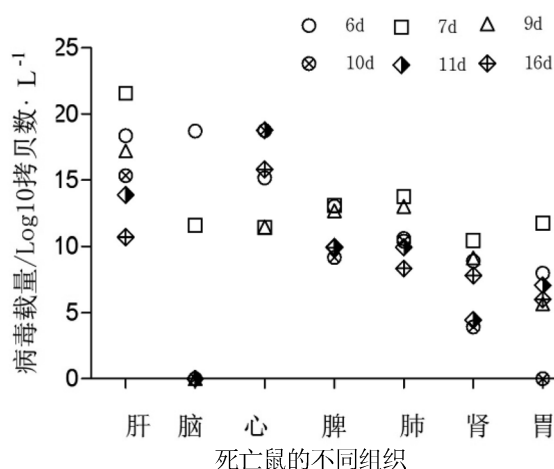


图4 死亡小鼠核酸含量变化 (n=1)

Figure 4 Content of Reo-3 nucleic acids in dead mice (n=1)

该病毒在实验动物病原微生物质量检测中被列为必须检测项目, 要求阴性。

本实验通过人工攻毒方式模拟感染小鼠后, 出现了急性死亡及慢性带毒感染。死亡病例集中于感染后2周内, 之后至18周小鼠均呈现隐性感染。肺是呼肠孤死亡小鼠的主要靶器官, 小鼠死前均表现出腹式呼吸, 呼吸困难, 精神差等的呼吸综合征候, 此与人感染Reo体征^[17]有相近之处且实验操作简单, 是研究人感染Reo或药效评价的良好模型。

本实验从体内组织肝, 肺, 心, 脑, 脾, 肾等多脏器分离到病毒, 且病毒携带时间大于4周, 心与脑携带病毒时间长达18周仍然能检测到病毒核酸。这结果与研究报道^[13]病毒污染鼠群的可引起多种系统性疾病, 包括坏死性肝炎、心肌炎、胰腺炎以及脑膜炎结果一致。本实验证实了该病毒可穿透血脑屏障, 在脑内定殖从而损伤脑组织, 需引起重视。心在本实验中直到实验结束129d仍能检测到, 暗示着该病毒有可长时间存在于血液循环而引起病毒血症, 该结果也显示在一些血制品卫生安全方面需引起重视。

小鼠经人工病毒感染后呈现全身性多组织多器官感染, 感染早期病毒在各脏器定殖扩增并能引起动物死亡, 随着时间推移小鼠各组织内病毒核酸含量总体呈现下降趋势, 部分脏器内病毒逐渐被机体清除, 此结果显示动物自身免疫系统在抗病毒中发挥重要作用, 在某些脏器内限制了病毒的复制及损伤, 表现在临床上动物死亡率减少, 动物状态恢复。

研究报道^[18]Reo-3在动物群体中通过空气和粪-

口途径传播, 并且有人认为Reo-3在环境中能稳定生存是造成病毒污染的主要原因, 主要通过水平传播和垂直传播两种方式进行传播, 其中以呼吸道和消化道传播为主要传播方式。本实验针对呼吸道(肺)及胃肠进行临床跟踪及核酸检测, 结果发现感染早期肺病变明显, 出血, 充血, 动物出现呼吸困难综合征, 食欲下降, 胃的核酸检测结果显示病毒呈低滴度复制。而盲肠内容检测结果除一只死亡鼠检测阳性外其余均为阴性。作者推测该毒株在经过多次动物全身性适应试验后可能改变了排毒途径, 消化道传播方式减弱或消失, 以呼吸道水平传播为主。

综上所述, 小鼠感染Reo-3可作为研究Reo-3的良好模型。呼吸道传播方式对该病的防控提供有效指导方向。通过抗体来监测该病毒有效期可为18周或更长。以上对研究呼肠孤病毒及相关呼吸道肠道病提供了良好实验数据。

参考文献:

- [1] 郎书惠, 贺争鸣, 吴惠英. 呼肠孤病毒感染不同免疫功能状态小鼠的病理组织学研究[J]. 实验动物科学与管理, 1998,15(3):54.
- [2] 田克恭. 实验动物病毒性疾病[M]. 北京: 中国农业出版社, 1992:41-45.
- [3] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997:329-330.
- [4] Tyler KL, Barton ES, Ibach ML, et al. Isolation and molecular characterization of a novel type 3 reovirus from a child with meningitis[J]. J Infect Dis, 2004, 189:1664-1675.
- [5] Ouattara LA, Barin F, Barthez MA, et al. Novel human reovirus isolated from children with acute necrotizing encephalopathy [J]. Emerg Infect Dis, 2011, 17:1436-1444.
- [6] Bootz F, Sieber I, Popovic D, et al. Comparison of the sensitivity of in vivo antibody production tests with in vitro PCR-based methods to detect infectious contamination of biological materials[J]. Lab Anim, 2003, 37(4):341-351.
- [7] Zhang Y W, Liu Y, Lian H, et al. A natural reassortant and mutant serotype 3 reovirus from mink in China[J]. Arch Virol, 2016, 161(2):495-498.
- [8] Zhang S, Shu X, Zhou L, et al. Isolation and identification of a new reovirus associated with mortalities in farmed oriental river prawn, *Macrobrachium nipponense* (de Haan, 1849), in China[J]. J Fish Dis, 2016, 39(3):371-375.
- [9] Mor SK, Verma H, Sharafeldin TA, et al. Survival of turkey arthritis reovirus in poultry litter and drinking water[J].

- Poultry Sci, 2015, 94(4):639-642.
- [10] Kumar S, Dick EJ, Bommineni Y R, et al. Reovirus-associated meningoencephalomyelitis in baboons[J]. Vet Pathol, 2014, 51(3):641-650.
- [11] Bai B, Shen H, Hu Y, et al. Serological survey of a new type of reovirus in humans in China[J]. Epidemiol Infect, 2014, 142(10):2155-2158.
- [12] Stanley N F, Dorman D C, Ponsford J. Studies on the pathogenesis of a hitherto undescribed virus (hepatoen- cephalomyelitis) producing unusual symptoms in suckling mice[J]. Aust J Exp Biol Med Sci, 1953, 31(2):147-159.
- [13] Jacoby RO, Lindsey JR. Risks of infection among laboratory rats and mice at major biomedical research institutions[J]. ILAR J, 1998, 39(4):266-271.
- [14] 徐蓓, 李建平, 屈霞琴, 等. 上海地区实验小鼠病毒性传染病的血清学调查[J]. 上海实验动物科学, 1989, 9(1):34-36.
- [15] 王翠娥, 陈立超, 周倩, 等. 实验大鼠和小鼠多种病毒的血清学检测结果分析[J]. 实验动物科学, 2014, 31(2):20-24.
- [16] Marty G D, Morrison D B, Bidulka J, et al. Piscine reovirus in wild and farmed salmonids in British Columbia, Canada: 1974-2013[J]. J Fish Dis, 2015, 38(8):713-728.
- [17] Cheng P, et al. A novel reovirus isolated from a patient with acute respiratory disease[J]. J Clin Virol, 2009, 45:79-80.
- [18] Waggle K, Kagiya N, Allen AM. Manual of microbiologic monitoring of laboratory animals [M]. Bethesda:MD: NIH Publication, 1994:99-100.

Research on Reovirus III (Reo-3) Infection in ICR Mice

LUO Yin-zhu, ZHANG Yu, HE Li-fang, HUANG Bi-hong, WU Rui-ke,
Min Fan-gui, PAN Jin-chun, YUAN Wen, WANG Jing, Guo Peng-ju, HUANG Ren
(Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangdong Provincial
Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangzhou 510663, China)

[Abstract] Objective To establish reovirus type 3 (Reo-3) infection model of ICR mice and observe clinical syndrome, investigate virus load in target organs and serology dynamic change in infected mice. **Method** Animal adaption method was used to increase the virus's virulence. Systemic infection model was established with tail vein and intraperitoneally inoculation to ICR. The clinical sign was observed. The tissues and serums were harvested on 0 d before and 4 d、7 d、18 d、25 d、35 d、72 d、129 d after inoculation. Blood samples of three mice were randomly collected on 47 d、81 d、103 d. qPCR and ELISA were respectively used to detect the virus nucleic acid at target tissue and the antibody level. **Results** Virus virulence was increased after four times adaption trial. Mice death was observed at d7, d9, d10, d11, d16 post inoculation. The highest load of the virus was found in liver through qPCR, followed by heart, spleen, and lung. The peaks of viral load emerged from 6 to 11 d in all organs, negative results appeared at 129 d in the most organs. The earliest antibody detect time was on 18 d. The titer of antibody hit the peak on 25 d, then maintained a high level till to 129 d. **Conclusion** virus virulence can be enhanced significantly through mouse in-vivo inoculation, multiple organs inflammation and early death in mice can be identified by the systemic infection way of Reo-3. This experiment provides an approach to establish Reo-3 infected mice animal model and provides good experimental data for further research on Reo-3 infection mechanism .

[Key words] Reovirus type 3(Reo-3); Infection; Clinical research; Respiratory intestinal disease

仙台病毒核酸测序检测方法的建立

张欢欢¹, 余陈欢¹, 戴方伟¹, 马月¹, 郎秋蕾², 王瑜², 应华忠¹

(1. 浙江省医学科学院浙江省实验动物中心, 杭州 310013;

2. 杭州联川生物技术有限公司, 杭州 310018)

[摘要] 目的 建立仙台病毒(SeV)的核酸测序检测方法。方法 根据SeV序列设计覆盖不同毒株的通用引物, 然后优化成测序引物并摸索建库条件, 进行核酸测序和结果分析。结果 获得1对特异性强的通用引物, 序列为: 上游引物 5'-GCTGCAAAACGCTGTGGG-3', 下游引物 5'-TGGRACYTCAGAAAGAATRG-3'; 建库条件优化为: 第一轮以cDNA为模板用通用引物扩增, 第二轮以第一轮产物为模板用测序引物扩增。测序分析可以有效地将SeV与其他微生物区分开, 并且精确到TianJin亚株。结论 建立了SeV核酸测序检测方法, 为后续SeV感染实验动物的检验检疫提供依据。

[关键词] 仙台病毒(SeV); 核酸测序; 检测

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0204-05

仙台病毒(Sendai virus, SeV), 亦称副流感病毒1型或血凝病毒(HVJ), 是副粘病毒科的一种单股负链RNA病毒^[1]。SeV传染性强、易扩散, 是严重危害实验动物的传染病之一, 同时也是人类呼吸道感染的重要病原。由于其与人类副流感病毒血细胞吸附第2型(HA-2)病毒同属副流感病毒I型, 二者间有十分密切的抗原关系^[2], 常散发或混合在流感流行中, 可引起婴幼儿下呼吸道严重疾病。啮齿类动物感染SeV会对其淋巴细胞转化、致癌作用及繁殖等产生影响, 从而影响实验结果; 此外, 动物一旦感染很难清除, 严重影响幼鼠生长发育并降低成年鼠的繁殖率^[3]。

实验动物病原微生物检测的国家标准中, 无论是清洁级还是SPF级, SeV都是必检项目。目前最主要的检测方法是血清学试验, 但该方法的检测结果受机体抗体水平影响, 不利于早期疫情控制^[4,5]。

近年来分子生物学技术广泛应用于微生物检测, 包括实时定量PCR^[6]、多重PCR技术^[7]; 其他还有基因芯片^[8]和环介导等温扩增技术(LAMP)等^[9], 这些方法都能够快速、准确的进行检测, 但不能有效区分仙台病毒亚型, 对突变型也不能准确判断。

核酸测序技术在微生物检测^[10]方面具有几个明显优点——通量高、周期短、准确率高、操作简单、成本低。而其最大的优势是一个测序通道内可放置几十甚至上百个样品, 不仅降低了单个样品的检测成本, 更实现了多种微生物同时检测^[11], 极大地缩短了实验动物微生物检测周期。本研究以此技术为基础, 建立了一种能够快速检测SeV亚型的检测方法。

1 材料与方法

1.1 病毒样品及处理

SeV(TianJin株), 由上海实验动物中心馈赠; SeV(Fushimi株和52株), 由浙江省疾病预防控制中心提供; 其余病毒株和沙门氏菌(*Salmonella entericaserovar Typhimurium*)均为本实验室保存。样品采用病毒RNA提取试剂盒提取并反转录成cDNA进行后续实验。

[收稿日期] 2016-11-14

[项目基金] 浙江省卫生高层次人才, 浙江省科技厅院所专项(2012F30026, 2016F30001), 浙江省科技厅实验动物计划项目(2016C37106)

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

[通讯作者] 应华忠(1968-), 男, 研究员, 研究方向: 动物疾病模型。E-mail: yhz0101@126.com

1.2 主要试剂

Viral RNA Kit(美国 Omega Bio-Tek 公司, R6874), PrimeScript® RT reagent Kit[宝生物工程(大连)有限公司, DRR037A], Premix Ex Taq™ Hot Start Version[宝生物工程(大连)有限公司, RR030A], DL2000 DNA Marker[宝生物工程(大连)有限公司, 3427], Axygen PCR Clean Up Kit(美国康宁, AP-PCR-500), Qubit dsDNA HS Assay Kit(美国 Invitrogen 公司, Q32851), MiSeq V2 Reagent Kit(美国 Illumina 公司, MS-102-2002)。

1.3 通用引物选择及测试

设计扩增区分不同亚株的 SeV 通用引物, 设计原则是通用引物位于基因组保守区, 其间序列变化差异较大。然后以 SeV 以及阴性样品 cDNA 样本为模板进行扩增, 测试引物的特异性。

1.4 测序引物优化

在通用引物(正向引物为 FP, 反向引物为 RP)的基础上, 加上接头序列(Linker)、区分样本的条形码序列(Index)以及增加文库均一性和丰富度的连接碱基(Heterogeneity Spacer), 如图 1 所示。该引物可以直接用于建库。

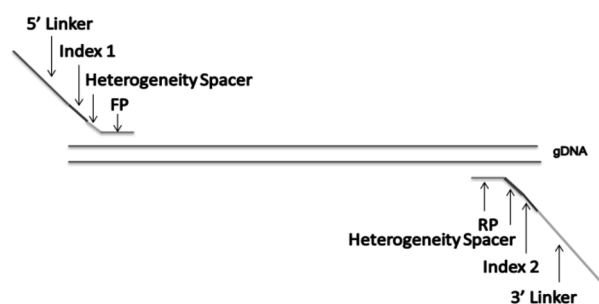


图 1 建库引物设计示例

1.5 建库条件摸索

SeV 建库主要从退火温度进行条件摸索, 反转录体系 RNA 模板量为 500 ng, 建库 PCR 体系均为 25 μ L。采用两步 PCR 法: 第一步是用通用引物进行 PCR 扩增, 循环数为 40 个, 退火温度为 56℃; 第二步是以第一步的 PCR 产物作为模板, 用建库引物进行 PCR 扩增, 循环数为 10 个, 退火温度为 58℃。

1.6 核酸测序体系的特异性和敏感性检测

将各检测样本分别核酸提取、建库。采用 Illumina Miseq 测序仪进行核酸测序, 具体方法如下: Miseq 测序得到的 PE reads 首先根据 overlap 关系

进行拼接, 将成对的 reads 拼接成一条序列, 同时对 reads 质量和 merge 的效果进行质量质控和过滤, 去除序列末端的后引物和接头序列、多碱基 N、polyA /T 尾巴及低质量碱基; 去除所得序列的 barcode 标签序列、前引物序列; 丢弃长度短于 200 bp、模糊碱基数>0、序列平均质量低于 20 的序列。核酸测序结果与样本信息进行对比, 评价核酸测序体系检测仙台病毒特异性和敏感性。

1.7 检测结果的重复性、特异性及灵敏性分析

为进一步确认其灵敏性和最低检测限, 提取病毒滴度为 100TCID₅₀ 的 SeV 细胞培养物中总 RNA, 测定其浓度为 78 ng/ μ L, 进行 10 倍比稀释, 设置 100~10⁻⁶ 的 7 个稀释浓度样品, 用所建立的方法进行检测。并采用文献^[12]RT-PCR 的方法进行平行检测, 确定该法的 SeV 最低检出量。同时, 分别提取实验小鼠常见病原微生物(沙门氏菌、鼠痘病毒、小鼠肝炎病毒和小鼠肺炎病毒)的总 RNA, 采用核酸测序方法检测, 确定该法的特异性。

2 结果

2.1 通用引物设计及测试

SeV 总基因组序列为 15 384 bp, 通用引物要尽可能多的覆盖各种 SeV 毒株的序列, 经过比对, 本研究选取的引物序列如表 1, 其中反向引物包含 3 个兼并碱基, 可以扩增多种 SeV。

表 1 SeV 通用引物基本信息

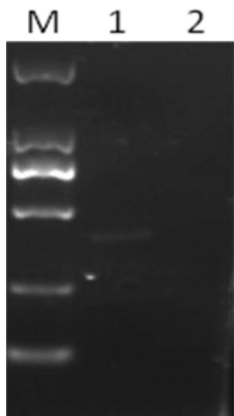
SeV 引物	通用引物序列(5'-3')	片段长度 /bp
正向引物	GCTGCAAAACGCTGTGGG	388
反向引物	TGGRAC ⁻ TCAGAAAGAATRG ⁻	

注: 简并碱基用下划线强调

以 SeV cDNA 和阴性对照为模板, 测试通用引物的扩增效率以及特异性, 结果如图 2 所示, 仅在 SeV 样本扩增到单一条带, 而在 SeV 阴性样品(小鼠肺炎病毒和小鼠肝炎病毒的混合品)中, 无法扩增得到条带, 证明该通用引物具有非常强的特异性。

2.2 建库引物设计

本研究 SeV 建库引物序列如表 2 所示。其中, 正向引物(YSV-F23)和反向引物(YSV-R19)的条形码序列(Barcode)不同, 而且每个样品在建库时都有自己独特的一对 barcode 序列, 通过相应的 Barcode 可以将样品从总文库中区分。



M: DL2000 marker; 1: 仙台病毒样本; 2: 阴性对照
图 2 SeV 通用引物测试

2.3 建库条件摸索

反转录后, 首先尝试建库引物直接扩增, 未获得理想 PCR 产物。然后优化为两步 PCR 法, 以此条件进行建库, 扩增到单一条带, 证明该建库条件可行, 结果如图 3。

2.4 测序结果分析

通过 barcode 的区分, 调出 SeV 序列, 拼接后共得到91个有效序列, 结果显示为SeV_Tianjin亚株, 无其他 SeV 亚株, 也无其他病毒序列。表 3 中列出了排位前 10 的数据结果。由于前期采用双盲实验, 测序结果与样品制备方比对后完全一致, 证明该法具有较高的准确性, 且可以精准到病毒株亚型的确认。

表 2 建库引物序列信息

名 称	序 列	长度 /bp
YSV-F23	CAAGCAGAAGACGGCATACGAGATGTGACTGGAGTTCAGACGTGTGCTCTT CCGATCTCGCGGTTACTAACCTGGAGGCTGCAAAACGCTGTGGG	95
YSV-R19	AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACACTCTTTCCCTACACGACGCTCTTC CGATCTCACCTTACCTTATTCTCTTGGGRACYTCAGAAAGAATRGG	97

注: 斜体部分为接头序列, 粗体部分为识别码, 下划线序列为连接序列

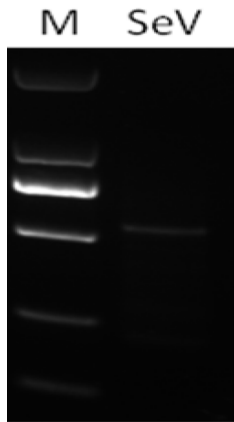


图 3 SeV 建库 PCR 的电泳结果

2.5 检测结果的重复性、特异性及灵敏性分析

各样本检测到的 SeV 与目的病毒株基本一致, 且多次重复, 检测结果均一致(表 4)。本研究建立的方法可鉴定出不同来源的SeV病毒株亚型; 且SeV病毒液经 10^5 稀释(即 7.8×10^{-4} ng/ μ L)后, 仍能被分析、检出。采用 RT-PCR 方法进行平行检测, 该法的 SeV 最低检出量仅为 0.78 ng/ μ L(即原液 10^2 稀释), 远远大于核酸测序方法的 SeV 最低检出量, 表明核酸测序方法的敏感性明显高于 RT-PCR 法。此外, 其余病毒株和沙门氏菌作为干扰样品, 以及平行空白试剂作为阴性对照, 均不能被检测, 证明该法具有较好的特异性。

表 3 SeV 部分序列结果

查询号	序列长度	参考物种	E 值	相似度
1_8407	347	SeV_Tianjin	0	344/347 (99%)
4_477	346	SeV_Tianjin	0	343/346 (99%)
6_154	346	SeV_Tianjin	0	343/346 (99%)
21_42	348	SeV_Tianjin	0	345/348 (99%)
22_41	347	SeV_Tianjin	0	345/347 (99%)
54_23	345	SeV_Tianjin	0	342/345 (99%)
60_22	347	SeV_Tianjin	0	342/345 (99%)
86_18	345	SeV_Tianjin	0	342/345 (99%)
97_16	347	SeV_Tianjin	0	342/345 (99%)
101_16	347	SeV_Tianjin	0	340/343 (99%)

注: Query: 下划线前的数值代表的是在这个样品中该类别的排位, 该排位是根据每个类别的 Copy 数计算得到, 下划线后的数值代表的是该类别的 Copy 数; Query_Len: 该数值代表的是去掉 Barcode 序列、连接碱基和引物后剩余的序列长度, 仙台病毒在 340 bp 以上被认为是可信; ref_name: 该栏代表的是经Blast比对后比对到的菌种名称; evalue: 用于评价该比对的可信度, 0 代表完全可信; similarity: 同源性比较

3 讨论

病原微生物的快速检测一直是实验动物质量控制的重点和难点。随着近年来各类动物资源的大量开发应用, 环境变化以及药物滥用, 一些在动物体内潜藏的病原体发生变异, 开始产生人兽感染; 而有些已知病原体, 发生变异或获得了新的

表 4 SeV 样本核酸测序检测结果

检测目标	检测量 /ng · μL ⁻¹	n	检测结果
SVT	7.8	5	SVT
SVT	0.78	5	SVT
SVT	7.8 × 10 ⁻²	5	SVT
SVT	7.8 × 10 ⁻³	5	SVT
SVT	7.8 × 10 ⁻⁴	5	SVT
SVT	7.8 × 10	5	-
SVF	3.9	5	SVF
SV52	7.6	5	SV52
SET	5.1	3	-
ECT	3.3	3	-
MHV	8.4	3	-
PVM	2.8	3	-
空白对照	-	3	-

注: SVT, SeV 病毒Tianjin株; SVF, SeV 病毒Fushimi株; SV52, SeV 病毒52株; SET, 沙门氏菌; ECT, 鼠痘病毒; MHV, 小鼠肝炎病毒; PVM, 小鼠肺炎病毒; n 为重复次数; “-”表示未检出

特性, 适应于人体, 增加了致病性^[13]。尽管目前PCR技术的普遍应用, 已可满足临床各种感染性疾病的快速检测, 但是特异性探针设计困难, 难以做到逐一检测, 且只能检测已知病原体。特别是很多新发病原微生物基因组序列信息缺乏或不足, 无法检测新的突变亚型和未知病原体^[14,15], 因此无法满足当今快速应对生物安全防御的要求。

本研究建立了一种SeV核酸测序检测方法。首先, 在设计通用引物时, 既要求引物位置具有保守性, 又要求扩增产物具有区分不同毒株的特异性, 综合以上原则, 作者在反向引物内设立了3个兼并碱基, 可以与多种模板进行结合, 扩增结果也显示在阴性样品中无法扩增, 具有SeV特异性。其次, 建库条件摸索是一个非常复杂的体系。因为建库PCR采用的是90~97 bp长度的长链引物, 这与普通16~25 bp的引物PCR扩增条件会有很多不同, 长链引物扩增条件比普通引物扩增的条件要苛刻得多。作者在尝试用建库引物直接扩增的方法未获得理想PCR产物后, 之后优化为两步法, 并进行退火温度的条件摸索, 最终确定了建库条件。这为其他微生物检测的建库条件提供了很好的借鉴。

本研究所有SeV样品、其他病毒株样本以及42个沙门氏菌样品均通过双盲实验一起上机测序。测序数据分析结果表明, 核酸测序不仅能够快速检测SeV, 还能区分到SeV病毒亚株。这一结果也与前期沙门氏菌测序准确率相一致^[16], 表明采用核酸测序法可

快速、微量、准确地区分不同微生物样品, 为实验动物多种病原微生物的同时检测提供了参考。

参考文献:

- [1] Shi L, Chen J, Zhong Q. Inactivated Sendai virus strain Tianjin, a novel genotype of Sendai virus, inhibits growth of murine colon carcinoma through inducing immune responses and apoptosis [J]. *J Transl Med*, 2013, 11:205.
- [2] 张泉, 朱慧霞, 李翎瑜, 等. 仙台病毒抗肿瘤的研究进展[J]. *实验动物与比较医学*, 2014, 34(6):515-518.
- [3] 扈荣良. 现代动物病毒学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014:1066-1067.
- [4] 向志光, 佟巍, 刘先菊, 等. 小鼠仙台病毒ELISA抗体检测规范化试剂盒的研制与应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(11):41-45.
- [5] 王吉, 卫礼, 付瑞, 等. 长爪沙鼠仙台病毒(SeV)抗体ELISA检测方法的建立与应用[J]. *实验动物科学*, 2015, 32(6):39-43.
- [6] 熊炜, 林颖峥, 魏晓锋, 等. 仙台病毒核酸快速检测方法的建立和应用[J]. *中国动物传染病学报*, 2014, 22(4):23-28.
- [7] Kwon JY, Hong JS, Kim MJ, et al. Simultaneous multiplex PCR detection of seven cucurbit-infecting viruses [J]. *J Virol Methods*, 2014, 206:133-139.
- [8] McLoughlin KS. Microarrays for pathogen detection and analysis [J]. *Brief Funct Genomics*, 2011, 10(6):342-353.
- [9] Sasaya T. Detection methods for rice viruses by a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) [J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1236: 49-59.
- [10] Di Bella JM, Bao Y, Gloor GB, et al. High throughput sequencing methods and analysis for microbiome research [J]. *J Microbiol Methods*, 2013, 95(3):401-414.
- [11] Wu L, Wen C, Qin Y et al. Phasing amplicon sequencing on Illumina Miseq for robust environmental microbial community analysis[J]. *BMC Microbiol*, 2015, 19(15):125.
- [12] 李晓波, 付瑞, 王吉, 等. 仙台病毒 RT-PCR 检测方法的建立及灰仓鼠中流行情况调查[J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(12):18-22.
- [13] 冯丽萍, 陶凌云, 冯洁, 等. 2010~2013年上海地区实验大鼠小鼠病原体感染情况分析[J]. *实验动物与比较医学*, 2015, 35(5):398-402.
- [14] Yeh HY, Yates MV, Chen W, et al. Real-time molecular methods to detect infectious viruses [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2009, 20(1):49-54.
- [15] Boonham N, Kreuze J, Winter S, et al. Methods in virus diagnostics: from ELISA to next generation sequencing [J]. *Virus Res*, 2014, 186:20-31.
- [16] 胡毅翔, 张欢欢, 余陈欢, 等. 基于核酸测序技术的实验动物沙门氏菌检测方法的建立与评价[J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(10):72-78.

Development of Detection Method for Sendai Virus by Nucleic Acid Sequencing

ZHANG Huan-huan¹, YU Chen-huan¹, DAI Fang-wei¹, MA Yue¹,
LANG Ju-lia², WANG Yu², YING Hua-zhong¹

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

2. LC-bio technology company, Hangzhou 310018, China)

[Abstract] **Objective** To develop the method for detection of Sendai virus by nucleic acid sequencing. **Methods** General primers according to Sendai virus genome sequences were designed and optimized to sequencing primers. Then the best condition of creating library was established. This method was verified by nucleic acid sequencing and analysis. **Results** A pair of highly specific general primers was designed. The sequences are respectively 5'-GCTGCAAAACGCTGTGGG-3' and 5'-TGGRACYT-CAGAAAGAATRGG-3', and the sequencing primers were established by ligated adaptor sequences to the 5'-end of general primers. The established condition of creating library and library products were obtained by the first round amplification using general primers and the second round using sequencing primers. Sendai virus was effectively distinguish from other organisms by nucleic acid sequencing and analysis, and was precised to TianJin strain. **Conclusion** A detection method was developed for Sendai virus by nucleic acid sequencing, which may be as the base for microbiological detection in laboratory animals.

[Key words] Sendai virus; Nucleic acid sequencing; Detection

不同糖油比例高脂饲料建立高脂血症大鼠模型的比较

覃辉艳, 王绍龙, 温平镜, 赵 鹏, 李 彬, 张洁宏
(广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 530028)

[摘要] 目的 探讨不同糖油比例高脂饲料建立高脂血症大鼠模型的效果。方法 将40只大鼠分为空白对照组和3个高脂饲料(I、II和III)组, 每组10只, 分别喂饲全价饲料和3种不同糖油比例的高脂饲料, 共6周, 每周定时称量体质量和检测大鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)。结果 3种配方的高脂饲料对大鼠体质量增长均无明显影响($P>0.05$)。各配方组每周的大鼠血清TC含量、LDL-C含量及TC/HDL-C比值均高于空白对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。高脂饲料II组每周的大鼠血清TG含量均高于空白对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 高脂饲料I组大鼠第1~4周的血清TG含量高于空白对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 高脂饲料III组大鼠血清TG含量除第2周高于空白对照组外其余各周与空白对照组均无统计学差异($P>0.05$)。结论 高脂饲料I和高脂饲料II均能快速稳定建立混合型高脂血症大鼠模型, 高脂饲料II效果更优; 高脂饲料III仅适用于建立高胆固醇血症大鼠模型。

[关键词] 高脂饲料; 糖和油; 高脂血症; 大鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0209-05

高脂血症是体内脂质代谢紊乱导致血脂水平增高的一种病症。据统计, 我国血脂异常的患病率高达18.6%, 高脂血症与脑卒中、心肌梗死、心脏猝死、糖尿病、高血压、脂肪肝等疾病的发生有着密切的关系, 且高脂血症是冠心病、脑卒中、心肌梗死重要的危险因素, 此外, 高脂血症还可诱发胆结石、胰腺炎, 加重肝炎, 导致男性性功能障碍、老年痴呆症等疾病^[1,2]。建立高效稳定的高脂血症动物模型, 对探讨如何有效降低血脂防治高脂血症有重要意义。文献^[3,4]表明, 高饱和脂肪酸、高胆固醇、高糖饮食易导致血脂增高, 本研究采用三种不同糖油比例配方的高脂饲料对大

鼠进行造模, 以筛选并建立与人类高脂血症的发病机制相同或相近的高脂血症动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物和环境

SPF级雄性SD大鼠40只, 广西医科大学实验动物中心提供[SCXK(桂)2014-0002]。饲养于屏障设施[SYXK(桂)2011-0005]。温度22~25℃, 相对湿度55%~70%。动物实验经广西疾病预防控制中心伦理审查委员会认可。

1.2 主要仪器与试剂

OLYMPUS AU400全自动生化分析仪(奥林巴斯, 日本)、Sigma 4-16K高速冷冻离心机(Sigma, 德国)。总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)试剂盒均为北京万泰德瑞诊断技术有限公司生产。全价饲料: 由广东省医学实验动物中心提供, 主要营养成分含量: 粗蛋白18.1%, 钙1.19%, 磷

[收稿日期] 2016-10-31

[基金项目] 广西科技基础条件平台建设项目(13-29-04)

[作者简介] 覃辉艳(1981-), 女, 硕士, 主管技师, 研究方向: 保健食品毒理与功能评价。

E-mail: qinhuiyan123@sina.com

[通讯作者] 张洁宏(1969-), 男, 主任技师, 研究方向: 保健食品毒理与功能评价。E-mail: zhjh510@126.com

0.85%，粗灰分 5.9%。

1.3 实验方法

40 只大鼠在实验环境下喂饲全价饲料观察 5 d 后，不禁食，经眼内眦采血，测定血清 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平。根据 TC 水平，采用分层随机抽样方法将大鼠分为 4 组，每组 10 只，并适当调整使各组大鼠 TG、HDL-C、LDL-C 及初始体质量尽可能均衡。4 个组分别为空白对照组(全价饲料喂养)和 3 个高脂饲料(I、II 和 III)组，3 个高脂饲料组分别采用不同糖油比例的高脂饲料诱导高脂血症，根据国食药监保化[2012]107 号《关于印发抗氧化功能评价方法等 9 个保健功能评价方法的通知》辅助降血脂功能评价方法的高脂血症模型饲料配方及对此改良。高脂饲料 I (I 组): 20%蔗糖 +15%猪油 +1.2%胆固醇 +0.2%胆酸钠 +9.8%酪蛋白 +53.8%全价饲料。高脂饲料 II(II 组): 10%蔗糖 +10%猪油 +1.2%胆固醇 +0.2%胆酸钠 +5.8%酪蛋白 +72.8%全价饲料。高脂饲料 III(III 组): 5%蔗糖 +15%猪油 +1.2%胆固醇 +0.2%胆酸钠 +5.8%酪蛋白 +72.8%全价饲料。每组每日分别给予相应饲料喂饲 6 周，每周称量体质量，每周固定时间不禁食经眼内眦采血^[9]，检测血清 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 的水平。

1.4 数据处理

实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 统计软件进行方差分析统计处理， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠体质量的影响

实验前各配方组的大鼠体质量与空白对照组一致($P > 0.05$)。分别给予各配方高脂饲料后，各配方组每周的大鼠体质量与空白对照组的差异均无统计学意义($P > 0.05$)，各配方组组间也无差异($P > 0.05$)

(表 1)，表明各配方高脂饲料对大鼠的体质量增长无明显影响。

2.2 对血清 TC 和 TG 含量的影响

从表 2 可见，实验前各配方组的大鼠血清 TC、TG 含量与空白对照组一致($P > 0.05$)。分别给予各配方高脂饲料后，各配方组第 1 周的大鼠血清 TC 含量即高于空白对照组($P < 0.01$)，其中，I 组在第 5 周达到峰值，II、III 组在第 4 周达到峰值，各配方组每周的大鼠血清 TC 含量均高于空白对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)；各配方组组间比较，II 组大鼠血清 TC 含量分别在第 3 周高于 I 组，第 1 周至第 3 周、第 6 周高于 III 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各配方组的大鼠血清 TG 含量均在第 2 周达到峰值，I 组第 1~4 周的大鼠血清 TG 含量高于空白对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)，II 组每周的大鼠血清 TG 含量均高于空白对照组($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)，III 组除第 2 周高于空白对照组($P < 0.05$)外其余各周与空白对照组均无差异($P > 0.05$)；各配方组组间比较，II 组大鼠血清 TG 含量分别在第 2 周高于 I 组，第 1 周和第 2 周高于 III 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

2.3 对血清 LDL-C 和 HDL-C 含量的影响

从表 3 可见，实验前各配方组的大鼠血清 LDL-C、HDL-C 含量与空白对照组一致($P > 0.05$)。分别给予各配方高脂饲料后，各配方组第 1 周的大鼠血清 LDL-C 含量即高于空白对照组($P < 0.01$)，其中，I 组在第 5 周达到峰值，II、III 组在第 4 周达到峰值，各配方组每周的大鼠血清 LDL-C 含量均高于空白对照组($P < 0.01$)；各配方组组间比较，I 组与 II 组无差异($P > 0.05$)，II 组分别在第 1 周至第 3 周、第 6 周高于 III 组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各配方组大鼠血清 HDL-C 含量除 I 组第 1 周、II 组第 1 周和第 2 周高于空白对照组($P < 0.01$)，III 组第 6 周低于空白对照组($P < 0.01$)外，其余各周与空白

表 1 实验前后各组的大鼠体质量变化

实验时间 / 周	空白对照组	I 组	II 组	III 组
0	198.2 ± 9.5	199.5 ± 9.6	197.3 ± 5.5	197.4 ± 5.0
1	248.1 ± 14.0	248.8 ± 12.7	250.1 ± 6.6	251.1 ± 11.1
2	291.5 ± 16.6	298.1 ± 14.2	297.3 ± 10.4	296.5 ± 13.5
3	328.7 ± 17.4	330.3 ± 19.7	330.5 ± 16.1	334.7 ± 18.2
4	361.7 ± 20.5	354.1 ± 23.8	357.2 ± 19.9	356.5 ± 19.4
5	390.5 ± 22.2	378.3 ± 26.0	386.5 ± 20.1	391.9 ± 24.0
6	415.6 ± 24.0	404.1 ± 26.4	410.2 ± 23.5	417.8 ± 22.7

注: $n=10$, 下表同

表 2 实验前后各组的大鼠血清 TC、TG 含量

		mmol/L			
测定项目	实验时间 / 周	空白对照组	I 组	II 组	III 组
TC	0	2.249 ± 0.181	2.295 ± 0.242	2.294 ± 0.214	2.287 ± 0.219
	1	2.461 ± 0.224	5.005 ± 0.910**	5.573 ± 0.915**	4.181 ± 0.509**##
	2	2.402 ± 0.167	5.025 ± 1.009**	5.865 ± 0.909**	4.267 ± 0.419**##
	3	2.490 ± 0.065	4.860 ± 0.837**	5.779 ± 1.164**△	4.344 ± 0.483**##
	4	2.620 ± 0.350	6.902 ± 1.224**	7.747 ± 1.754**	6.614 ± 1.173**
	5	2.767 ± 0.340	7.073 ± 1.447**	6.903 ± 1.859**	5.692 ± 1.197**
	6	2.715 ± 0.330	6.441 ± 1.299**	6.831 ± 1.727**	4.284 ± 0.894*△△##
TG	0	2.249 ± 0.799	2.214 ± 0.358	2.259 ± 0.705	2.174 ± 0.540
	1	2.511 ± 0.834	4.909 ± 1.883**	5.596 ± 2.140**	3.097 ± 1.342##
	2	2.710 ± 0.902	5.620 ± 1.387**	7.382 ± 1.783**△	4.684 ± 1.775**##
	3	2.947 ± 1.180	4.841 ± 1.884*	5.024 ± 1.811*	4.012 ± 1.052
	4	2.795 ± 0.792	4.838 ± 1.201**	4.769 ± 2.111*	4.093 ± 1.240
	5	2.833 ± 1.319	3.886 ± 1.159	4.356 ± 1.502*	3.640 ± 1.429
	6	2.774 ± 1.030	3.915 ± 0.941	4.023 ± 1.291*	3.043 ± 1.153

注: 各配方组与空白对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; II、III 组与 I 组比较, △ $P<0.05$, △△ $P<0.01$; III 组与 II 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$; 下表同

对照组均无统计学差异($P>0.05$), 但各配方组每周的大鼠血清 TC/HDL-C 比值均高于空白对照组($P<0.01$), 峰值分别为 8.4、8.6、7.1, 均高于空白对照组的 3.6($P<0.01$), 且 II 组血清 TC/HDL-C 比值分别在第 1 周、第 3 周和第 4 周高于 III 组($P<0.05$)。

3 讨论

本研究采用喂养法建立高脂血症动物模型, 喂养法符合人类由于饮食变化而形成高脂血症的特点^[6]。且本研究高脂饲料以添加猪油、蔗糖、胆

固醇为主, 不同于既往的高脂配方(以添加猪油、蛋黄粉、胆固醇为主), 更接近人类因高饱和脂肪酸、高糖、高胆固醇饮食造成高脂血症的病因^[3,4]。猪油的饱和脂肪酸含量达 45%, 为日常食用油中饱和脂肪酸含量较高的油^[7], 血清 TG 的水平与饱和脂肪酸正相关^[8]。蔗糖被食用后, 在胃肠中转化成葡萄糖和果糖, 葡萄糖可被组织利用转化成糖原或脂肪贮存, 且进食糖量比例过高, 引起血糖升高, 刺激胰岛素分泌增加, 出现高胰岛素血症, 后者可促进肝脏合成 TG, 从而引起血清 TG 水平升高^[4]。进食胆固醇主要影响血清 TC 和 LDL-C 水平。此

表 3 实验前后各组的大鼠血清 LDL-C、HDL-C 含量

		mmol/L			
测定项目	实验时间 / 周	空白对照组	I 组	II 组	III 组
LDL-C	0	0.486 ± 0.057	0.489 ± 0.097	0.522 ± 0.067	0.519 ± 0.069
	1	0.522 ± 0.068	1.481 ± 0.324**	1.617 ± 0.313**	1.244 ± 0.230**##
	2	0.504 ± 0.062	1.505 ± 0.361**	1.709 ± 0.309**	1.209 ± 0.186**##
	3	0.527 ± 0.045	1.468 ± 0.289**	1.748 ± 0.404**	1.323 ± 0.207**##
	4	0.502 ± 0.044	2.146 ± 0.428**	2.508 ± 0.670**	2.128 ± 0.355**
	5	0.525 ± 0.065	2.223 ± 0.456**	2.177 ± 0.627**	1.713 ± 0.462**
	6	0.547 ± 0.055	2.029 ± 0.438**	2.074 ± 0.571**	1.297 ± 0.301**△△##
HDL-C	0	0.641 ± 0.063	0.644 ± 0.090	0.639 ± 0.060	0.634 ± 0.077
	1	0.733 ± 0.090	0.930 ± 0.133**	0.954 ± 0.129**	0.844 ± 0.070
	2	0.742 ± 0.090	0.775 ± 0.140	0.941 ± 0.165**△	0.717 ± 0.103##
	3	0.764 ± 0.121	0.723 ± 0.103	0.829 ± 0.139	0.710 ± 0.063#
	4	0.820 ± 0.104	0.933 ± 0.186	0.917 ± 0.242	0.943 ± 0.148
	5	0.865 ± 0.118	0.847 ± 0.155	0.853 ± 0.143	0.810 ± 0.085
	6	0.807 ± 0.121	0.868 ± 0.129	0.881 ± 0.154	0.625 ± 0.083**△△##

外,目前国际上越来越趋向于常规血脂检测不需要空腹,因此本研究采用非空腹采血检测血脂。人群研究^[9]显示,餐后TG比空腹TG有更强的、独立的心血管病危险预测能力。国外一项对儿童全国性的横断面研究^[10]也表明血脂检测前不需要空腹。对成人的研究^[11]也表明,空腹与非空腹的LDL预测价值等同。近期的一篇循证临床综述^[12]也表明,非空腹检测与空腹检测相比,TC、HDL和LDL水平无显著变化,TG水平仅有轻度变化。非空腹和空腹血脂水平相比,至少有同等的不良心血管疾病事件预测价值;有时非空腹水平有更强的预测价值,其原因可能是因为非空腹状态对于大多数人来说是主要的代谢状态。

本研究结果显示,I组和II组大鼠在分别给予各配方高脂饲料后,第1周的血清TC、TG、LDL-C含量及TC/HDL-C比值均迅速升高($P<0.01$),且II组整个实验期间保持高于空白对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$);I组血清TC、LDL-C含量及TC/HDL-C比值每周高于空白对照组($P<0.01$),TG含量第1至第4周高于空白对照组($P<0.01$ 或 $P<0.05$);表明I组和II组的饲料配方均能快速稳定地建立混合型高脂血症大鼠模型。陈秀锦等^[13]和罗宇东等^[14]在探讨降血脂保健品时均以添加猪油、蔗糖、胆固醇为主的高脂饲料进行造模,喂饲5周,模型成立,与本研究实验结果相似。高脂饲料II在保持大鼠血清TG含量方面更优于高脂饲料I,其建模稳定性更佳,高脂饲料I的糖油比例(20%蔗糖+15%猪油)均高于高脂饲料II(10%蔗糖+10%猪油),表明高脂饲料中较高的糖油比例反而不利于保持TG含量,原因可能为饲料中糖油含量较大,适口性欠佳,实验后期大鼠易出现“厌食”现象,因此,适当降低糖油比例更利于高脂模型的形成。而为增加适口性大幅降低糖的含量(高脂饲料III:5%蔗糖+15%猪油)亦不利于模型的形成,研究结果显示,III组每周的大鼠血清TC、LDL-C含量及TC/HDL-C比值均高于空白对照组($P<0.01$),但TG含量仅第2周高于空白对照组($P<0.05$),其余各观察时间点与空白对照组的差异均无统计学意义($P>0.05$),表明高脂饲料III对升高并保持大鼠血清TG含量无明显影响,高脂饲料中糖含量较低亦不利于升高并保持TG水平。且III组在造模初期(第1周和第2周)的TC、TG、LDL-C含量均低于II组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),表

明高脂饲料中糖含量较低亦不利于快速升高血脂。高脂饲料III不适用于建立混合型高脂血症大鼠模型,仅适用于建立高胆固醇血症大鼠模型。

HDL-C参与体内胆固醇的逆转运,被视为动脉粥样硬化和冠心病的保护因子。造模期间,I组第1周的大鼠血清HDL-C含量高于空白对照组($P<0.01$),II组第1和第2周的大鼠血清HDL-C含量高于空白对照组($P<0.01$),两组HDL-C含量升高原因可能为初期给予高脂饲料大鼠血脂迅速升高后机体的反馈调节所致。但两组的TC/HDL-C比值一直保持高于空白对照组($P<0.01$)。目前研究^[15]表明,TC/HDL-C比值越大,对冠心病的发生风险及心血管事件的预测价值越高,TC/HDL-C是血脂指标中冠心病发病最为显著的独立危险因素,TC/HDL-C比值比HDL-C单项指标更具参考价值。

综上所述,高脂饲料I和II均能快速稳定建立混合型高脂血症大鼠模型,高脂饲料II优于高脂饲料I;高脂饲料III仅适用于建立高胆固醇血症大鼠模型。各配方组大鼠血清TC、LDL-C含量在第4或第5周达到峰值后开始呈下降稳定趋势,TG水平在第2周达到峰值后则逐渐降低,为保持有效性,整个实验时间尽可能控制在4~6周。

参考文献:

- [1] 刘永兰,赵喜荣,李燕.高脂血症的危害及其预防对策[J].中国医学创新,2012,26(9):150-151.
- [2] 苏蓉,于德水.高脂血症的危害及防治[J].中国当代医药,2009,16(8):128-129.
- [3] 周韞珍.膳食营养与心血管疾病[J].公共卫生与预防医学,2004,15(5):42-44.
- [4] 赵水平.血脂第3讲:高脂血症的病因[J].中国临床医生,2003,31(11):15-17.
- [5] 国家食品药品监督管理局.关于印发抗氧化功能评价方法等9个保健功能评价方法的通知[S].2012.
- [6] 刘海利,肖学凤,莫凡,等.几种高脂血症实验动物模型的研究进展[J].实验动物科学,2010,27(2):38-40.
- [7] 卜文婕,朱建梁,李艳,等.不同食用油脂对大鼠血脂代谢及脂肪肝的影响[J].食品工业科技,2014,35(11):337-340.
- [8] 楼大钧,朱麒麟,叶飞,等.代谢综合征患者血清甘油三酯水平与饱和脂肪酸的相关性[J].中华全科医学,2013,11(10):1502-1503.
- [9] 王抒,王正,黎健.应用空腹和餐后三酰甘油预测心血管疾病的危险性[J].中国心血管杂志,2011,16(4):255-258.
- [10] Steiner MJ, Skinner AC, Perrin EM, et al. Fasting might not be necessary before lipid screening a nationally representative

- cross-sectional study[J]. *Pediatrics*, 2011, 128(3):463-470.
- [11] Wootten M, Stulberg DB, Prasad S, et al. Skip this step when checking lipid levels[J]. *J Fam Pract*, 2015, 64(2):113-115.
- [12] Mora S. Nonfasting for routine lipid testing from evidence to action[J]. *JAMA Intern Med*, 2016, 176(7):1005-1006.
- [13] 陈秀锦, 林蔚, 黄佳宁. 磷虾油软胶囊的降脂功能研究[J]. *预防医学论坛*, 2016, 22(7):546-550.
- [14] 罗宇东, 蒋林, 刘源焕, 等. 蓝参降脂片对高脂模型大鼠血脂水平的影响[J]. *广西中医药*, 2015, 38(2):72-74.
- [15] 匡龙, 赵良平, 佟光明, 等. 总胆固醇与高密度脂蛋白胆固醇比值预测冠状动脉粥样硬化程度的价值 [J]. *江苏医药*, 2015, 41(8):898-900.

A Comparison on Hyperlipidemia Rat Models Induced by High-fat Diet with Different Proportions of Sugar and Oil

QIN Hui-yan, WANG Shao-long, WEN Ping-jing, ZHAO Peng, LI Bin, ZHANG Jie-hong
(Guangxi Autonomous Regional Center for Disease Control
and Prevention, Nanning 530028, China)

[Abstract] Objective To compare hyperlipidemia rat models induced by high-fat diet with different proportions of sugar and oil. **Methods** Forty rats were divided into normal control group and three high-fat diet (I, II and III) groups with 10 rats per each. The normal control group was fed with normal diet, and the other three groups were fed with high-fat diet with different proportions of sugar and oil for 6 weeks respectively. The body weight and the total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) in serum were detected weekly. **Results** No significant difference were observed on body weight among different groups. The TC, LDL-C and TC/HDL-C ratios in all high-fat diet groups were higher than those of normal control group at each time point. The TG in high-fat diet II group was higher than normal control group at each time point, but was only higher at the first 4 weeks in high-fat diet I group, and no significant difference in high-fat diet III group except at second week. **Conclusion** Both high-fat diet I and II can induce combined hyperlipidemia rat models rapidly and steady, and high-fat diet II is more superior. High-fat diet III may be applied to induce hypercholesterolemia in rat.

[Key words] High-fat diet; Sugar and oil; Hyperlipidemia; Rat

氯化钠的大鼠亚慢性毒性观察

李光先, 刘香梅, 刘冬虹, 刘颖, 孙侠, 陈汉金, 郭新东, 黄宇锋
(广州质量监督检测研究院, 广州 511447)

[摘要] 目的 探索氯化钠的大鼠亚慢性经口毒性。方法 将 80 只 SPF 级 SD 大鼠按体质量随机分为对照组、氯化钠低剂量组、中剂量组和高剂量组, 每组 20 只, 雌雄各半。低、中、高剂量组染毒剂量分别为 100 mg/kg、500 mg/kg、1 000 mg/kg, 采取灌胃方式染毒, 连续染毒 90 d, 对照组给予纯水。试验期间观察大鼠临床表现, 记录大鼠体质量和摄食量, 染毒结束后将大鼠麻醉, 经腹主动脉采血分别用于检测血液生化、血常规和电解质。解剖主要脏器称量脏器重量计算脏器系数并进行组织病理学检查。结果 试验结束后各组大鼠的体质量、血常规指标、食物利用率和脏器系数均无明显变化($P>0.05$); 血生化结果显示, 对照组与低剂量组各项生化指标均无明显变化($P>0.05$), 中、高剂量组大鼠血清丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平低于对照组($P<0.05$), 总胆红素(TBIL)和钙含量升高($P<0.05$)。组织病理学结果显示, 中、高剂量组大鼠出现肝脏局灶性炎细胞浸润、海绵状变性和淤血, 雄性大鼠出现肾小管钙化、胸腺及淋巴结出血, 对照组和低剂量组大鼠未见明显病理损伤。结论 氯化钠亚慢性经口染毒可能引起雄性大鼠的血液循环障碍和肾脏钙盐沉积。

[关键词] 氯化钠; 大鼠; 亚慢性毒性

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)03-0214-06

氯化钠作为各种盐的主要成分, 被广泛用于食品工业, 保健食品、化妆品行业、医疗卫生行业和玻璃、染料、冶金等工业中。氯化钠在日常生活中有重大的意义, 在食品和保健食品中主要为调味剂和防腐剂, 化妆品中主要是在高温热源中与氯化钾和氯化钡等配成盐浴, 医疗卫生行业中主要是利用其生理作用^[1-3]。有研究显示, 盐水灌胃可引起胃黏膜细胞的损害, 长期过咸刺激可损伤胃黏膜导致黏膜萎缩, 长期高盐溶液灌胃会加剧小鼠结肠炎, 而高盐则是损害利尿、肾脏和全身血管反应性以及高血压的诱因^[4,5]。因此其安全性极为重要。目前有关氯化钠的研究甚多, 其急性毒性和短期毒性资料较为明确, 但是亚慢性毒性和长期毒

性资料较少, 且说法不一。因此, 本研究通过亚慢经口毒性试验对氯化钠的亚慢性经口毒性进行探讨, 完善其毒理学相关资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 80 只, 6~8 周龄, 雌雄各半, 购自广东省医学实验动物中心[SCXK(粤 2013-0002)]。饲养于广州质量监督检测研究院毒理实验室[SYXK(粤)2014-0137]。动物实验经广州质量监督检测研究院动物福利和伦理委员会批准。

1.2 主要仪器与试剂

QUINTIX5102-1CN 电子天平, 德国赛多利斯公司; XT-2000i 型全自动五分类细胞分析仪, 日本 Sysmex 公司; SA-6000 型电解质分析仪, 上海科华生物工程股份有限公司; 7020 型日立动生化分析仪, 日本 Hitachi 公司。氯化钠(批号 18012288H), 湖南省轻工盐业集团有限责任公司。

[收稿日期] 2017-02-20

[作者简介] 李光先(1987-), 女, 硕士, 技术员。从事环境与职业毒理学方面研究。E-mail:1033193315@qq.com

[通讯作者] 黄宇锋, 硕士, 高级工程师。

E-mail: 78649403@qq.com

1.3 试验方法^[6]

将 80 只大鼠按体质量随机分为对照、低、中、高剂量 4 个组, 每组 20 只, 雌雄各半。低、中、高剂量组染毒剂量为 100 mg/kg、500 mg/kg 和 1 000 mg/kg 的氯化钠溶液, 按 10 mL/kg 连续灌胃 90 d, 对照组采用同样方法给予纯水。低剂量为略高于日常使用的生理盐水的剂量, 中剂量为我国推荐标准中人食用氯化钠量折合为大鼠的剂量, 高剂量为中剂量的 2 倍。试验期间每日观察大鼠的临床表现, 每周称量体质量和饲料消耗, 并计算饲料利用率。试验中期(45 d)经眼眶静脉采血检测血常规和血生化。末期(90 d 结束)麻醉后经腹主动脉采集血液测定血常规, 血液生化和电解质指标。对大鼠施行安死术后, 分离脑、心、肝、脾、肾、肾上腺、胃、肠、胸腺、淋巴结、附睾、卵巢、睾丸或子宫等脏器, 称量脏器湿重计算脏器系数。将脏器置于体积分数 10% 甲醛溶液中固定, 做组织病理学检查。

1.4 检测指标

血常规指标包括白细胞计数(WBC)、红细胞计数(RBC)、血红蛋白(Hb)、红细胞比容(HCT)、血小板数(PLT)、中性粒细胞(GR%)、淋巴细胞(LY%)、单核细胞(MO%)、嗜酸性细胞(EO%); 血液生化指标包括丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、尿素氮(BUN)、血液肌酐(CRE)、总胆红素(TBIL)、血糖(GLU)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(GHO); 血清电解质指标包括 K^+ 、 Na^+ 、 Cl^- 、 Ca 、 P 。

1.5 统计分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析。满足正态性和方差齐性的资料采用单

因素方差分析(One Way ANOVA), 不满足参数检验的资料采用非参数检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般临床表现及体质量、脏器系数变化

对照组和各染毒组所有大鼠在整个试验过程中未见明显中毒症状, 试验期内无大鼠死亡。整个试验期间, 各染毒组大鼠体质量、饲料消耗较对照组无差异($P > 0.05$), 各组试验末体质量雌性分别为 329.4 ± 36.9 g、 339.2 ± 33.5 g、 325.9 ± 32.5 g 和 326.9 ± 28.9 g; 雄性分别为 615.0 ± 44.0 g、 611.8 ± 47.0 g、 588.8 ± 53.2 g 和 627.1 ± 42.7 g。饲料消耗雌性分别为 1813.4 ± 113.5 g、 1842.0 ± 102.8 g、 1796.0 ± 34.8 g 和 1848.0 ± 55.2 g; 雄性分别为 2771.8 ± 150.1 g、 274709 ± 106.5 g、 2649.8 ± 234.1 g 和 2833.5 ± 162.5 g。染毒结束后大鼠的脑、心脏、肝脏、脾脏、肾脏、睾丸/子宫的脏器系数较对照组无明显差异($P > 0.05$), 如脑系数雌性分别为 0.60 ± 0.09 、 0.61 ± 0.07 、 0.63 ± 0.03 和 0.60 ± 0.06 ; 雄性分别为 0.36 ± 0.03 、 0.36 ± 0.02 、 0.37 ± 0.04 和 0.34 ± 0.02 。肾系数雌性分别为 0.60 ± 0.04 、 0.60 ± 0.04 、 0.61 ± 0.06 和 0.63 ± 0.05 ; 雄性分别为 0.58 ± 0.05 、 0.56 ± 0.05 、 0.57 ± 0.04 和 0.61 ± 0.06 。

2.2 血液学变化

试验中期, 各染毒组大鼠血液学指标较对照组差异无统计学意义($P > 0.05$)。染毒结束后, 中剂量组雄性大鼠血液中 WBC 较低剂量组升高($P < 0.05$), 低剂量组雌性大鼠血液中 Hb 含量高于对照组($P < 0.05$); 其余指标差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。

表 1 氯化钠对大鼠血液学指标的影响

性别	组别	WBC / $10^9 \cdot L^{-1}$	RBC / $10^{12} \cdot L^{-1}$	Hb /g $\cdot L^{-1}$	HCT /%	PLT / $10^{12} \cdot L^{-1}$	GR/%	LY/%	MO/%	EO/%
雌	对照组	4.42 ± 2.20	7.62 ± 0.43	138.4 ± 5.3	40.97 ± 1.83	0.91 ± 0.08	12.13 ± 2.10	82.44 ± 8.32	4.01 ± 1.22	1.42 ± 0.56
	低剂量组	3.94 ± 1.22	7.84 ± 0.30	$143.5 \pm 5.2^*$	41.70 ± 1.71	0.91 ± 0.10	11.68 ± 3.69	83.52 ± 4.45	3.19 ± 1.53	1.61 ± 0.85
	中剂量组	4.25 ± 2.41	7.64 ± 0.23	140.0 ± 3.5	40.91 ± 1.17	1.01 ± 0.10	10.33 ± 4.26	84.73 ± 5.08	3.08 ± 0.73	1.88 ± 1.02
	高剂量组	3.70 ± 1.61	7.80 ± 0.41	142.2 ± 6.0	41.05 ± 1.32	0.87 ± 0.12	12.71 ± 3.96	81.54 ± 5.48	4.15 ± 1.27	1.60 ± 0.87
雄	对照组	7.43 ± 1.80	8.82 ± 0.37	148.2 ± 5.4	43.81 ± 1.53	1.01 ± 0.11	13.13 ± 3.64	81.65 ± 4.33	3.73 ± 0.84	1.49 ± 0.42
	低剂量组	6.64 ± 2.23	8.57 ± 0.49	147.7 ± 5.0	43.17 ± 1.59	1.01 ± 0.13	14.32 ± 2.61	80.23 ± 3.64	3.87 ± 1.55	1.57 ± 0.39
	中剂量组	$8.94 \pm 1.75^*$	8.62 ± 0.23	149.1 ± 4.0	42.83 ± 1.79	1.01 ± 0.09	13.79 ± 5.30	80.45 ± 5.66	4.33 ± 0.70	1.44 ± 0.36
	高剂量组	8.29 ± 3.26	8.86 ± 0.25	151.4 ± 5.7	44.23 ± 1.71	1.01 ± 0.08	12.57 ± 4.41	81.61 ± 5.17	4.17 ± 1.55	1.64 ± 0.52

注: 相同性别与对照组比较, * $P < 0.05$, 与低剂量组比较, # $P < 0.05$; 下表同

2.3 血液生化变化

试验中期各染毒组大鼠血生化指标较对照组无差异($P>0.05$)。染毒结束后,各染毒组雌雄大鼠血清中ALT和AST均低于对照组,且中、高剂量组较低剂量组减少($P<0.05$);低剂量组雄性大鼠血清中ALP含量高于其余三个组($P<0.05$);雌性中,高剂量组和雄性高剂量组大鼠血清中GLU含量均高于对照组($P<0.05$);低剂量组雌性大鼠血清中BUN含量高于对照组($P<0.05$);中、高剂量组大鼠血清TBIL高于对照组和低剂量组($P<0.05$);其余指标差异不明显($P>0.05$)(表2)。

2.4 血清电解质变化

试验末期,中、高剂量组雄大鼠血清中总钙含量均高于对照组($P<0.05$),其余指标无差异($P>0.05$)(表3)。

2.5 病理组织学检查

染毒结束后,对照组和染毒组大鼠的肝脏、肾脏、胸腺和淋巴结均有出现不同程度的病理改变。且中、高剂量组大鼠的肝脏局灶炎细胞浸润、海绵状变性和淤血大鼠数明显增加,且雄性大鼠肾小管钙化、胸腺及淋巴结出血发生率显著升高($P<0.05$)(表4、图1、图2)。

3 讨论

本文结果表明,不同剂量的氯化钠染毒90 d后对大鼠的的体质量、食物利用率、脏器湿重和脏器系数均无影响;染毒结束时中、高剂量组部分血象指标与对照组相比,差异有统计学意义,但并未表现出剂量-反应关系,且AST、ALT、和CRE含量

表2 氯化钠对大鼠血清生化指标的影响

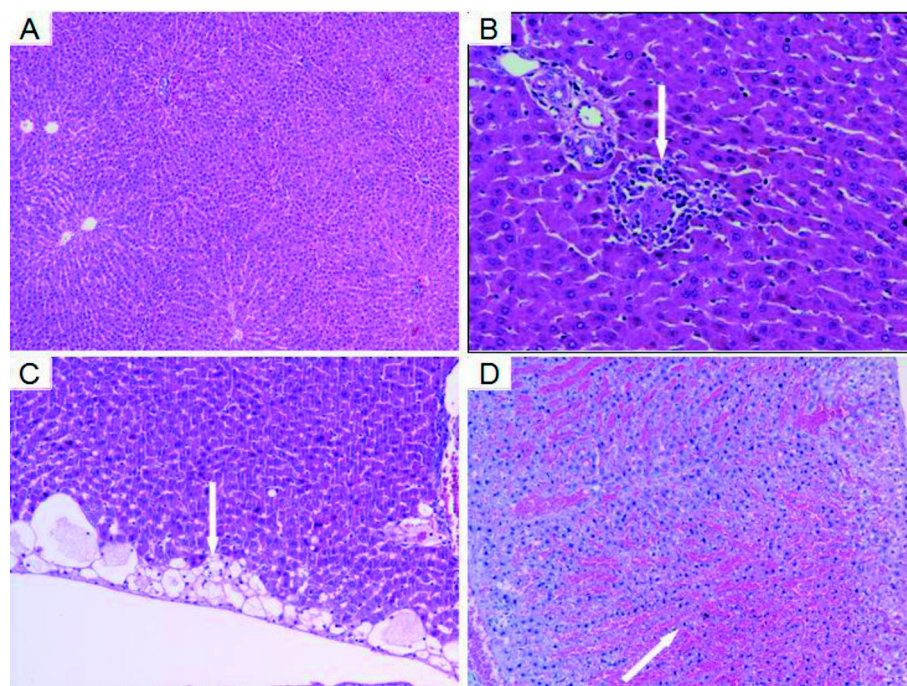
性别	组别	ALT/ U · L ⁻¹	AST/ U · L ⁻¹	ALP/ U · L ⁻¹	TP/ g · L ⁻¹	ALB/ g · L ⁻¹	GLU/ mmol · L ⁻¹	CRE/ μmol · L ⁻¹	BUN/ μmol · L ⁻¹	TBIL/ mmol · L ⁻¹	TG/ mmol · L ⁻¹	GHO/ mmol · L ⁻¹
雌	对照组	24.7 ± 2.5	98.2 ± 14.2	45.0 ± 13.8	60.6 ± 3.4	43.9 ± 3.7	6.5 ± 1.6	42.4 ± 4.7	6.7 ± 0.6	1.4 ± 0.4	0.5 ± 0.3	2.0 ± 0.6
	低剂量组	22.0 ± 3.1	74.4 ± 10.4*	43.1 ± 9.3	59.7 ± 5.7	44.9 ± 3.1	7.0 ± 0.8	43.3 ± 5.8	7.8 ± 0.8*	1.2 ± 0.4	0.4 ± 0.2	2.0 ± 0.2
	中剂量组	17.9 ± 2.2**	70.9 ± 11.6*	41.9 ± 7.2	61.1 ± 3.9	45.6 ± 3.5	8.0 ± 0.6*	43.9 ± 7.6	7.6 ± 1.4	1.7 ± 0.6#	0.5 ± 0.6	2.1 ± 0.4
	高剂量组	18.3 ± 1.8**	61.6 ± 13.4**	38.5 ± 7.3	56.5 ± 3.0	41.8 ± 3.2	7.7 ± 1.1*	42.4 ± 3.9	7.1 ± 1.1	1.6 ± 0.5#	0.5 ± 0.2	2.0 ± 0.3
雄	对照组	28.5 ± 3.1	92.0 ± 14.9	107.0 ± 16.9	51.8 ± 2.2	33.5 ± 1.0	9.3 ± 1.1	36.8 ± 2.6	6.9 ± 0.8	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.5	1.9 ± 0.3
	低剂量组	33.4 ± 6.2	83.7 ± 14.3	126.4 ± 15.4*	52.8 ± 2.7	35.1 ± 2.5	9.8 ± 1.1	36.3 ± 3.5	6.2 ± 0.7*	0.8 ± 0.3	1.0 ± 0.7	1.9 ± 0.5
	中剂量组	31.1 ± 6.2	75.0 ± 26.7	106.5 ± 19.7#	51.9 ± 3.1	33.8 ± 1.6	10.3 ± 0.7	33.1 ± 3.0*	6.3 ± 0.6	1.2 ± 0.3**	1.4 ± 0.7	2.1 ± 0.4
	高剂量组	27.8 ± 7.7	77.4 ± 17.3	98.3 ± 15.5#	52.4 ± 2.2	34.9 ± 2.3	10.4 ± 1.1*	31.6 ± 2.1*	6.8 ± 0.8	1.1 ± 0.4**	0.9 ± 0.4	1.8 ± 0.4

表3 氯化钠对大鼠血清电解质的影响

性别	组别	n	K ⁺	Na ⁺	Cl ⁻	Ca	P
雌	对照组	10	4.1 ± 0.6	145.4 ± 1.4	102.3 ± 1.2	2.4 ± 0.1	2.1 ± 0.4
	低剂量组	10	3.8 ± 0.2	145.2 ± 1.0	103.3 ± 1.0	2.4 ± 0.0	1.9 ± 0.2
	中剂量组	10	3.9 ± 0.1	144.6 ± 1.6	101.1 ± 1.6#	2.5 ± 0.1	2.0 ± 0.2
	高剂量组	10	4.3 ± 0.7	145.5 ± 0.7	102.1 ± 1.4	2.5 ± 0.1	2.0 ± 0.3
雄	对照组	10	4.3 ± 0.1	144.6 ± 1.3	102.3 ± 1.1	2.2 ± 0.1	2.2 ± 0.2
	低剂量组	10	4.1 ± 0.2	144.3 ± 1.2	102.1 ± 0.7	2.4 ± 0.1	2.2 ± 0.2
	中剂量组	10	4.3 ± 0.2	143.4 ± 1.5	102.5 ± 1.2	2.6 ± 0.1**	2.1 ± 0.1
	高剂量组	10	4.3 ± 0.1	144.6 ± 1.0	101.5 ± 1.3	2.5 ± 0.1**	2.4 ± 0.1

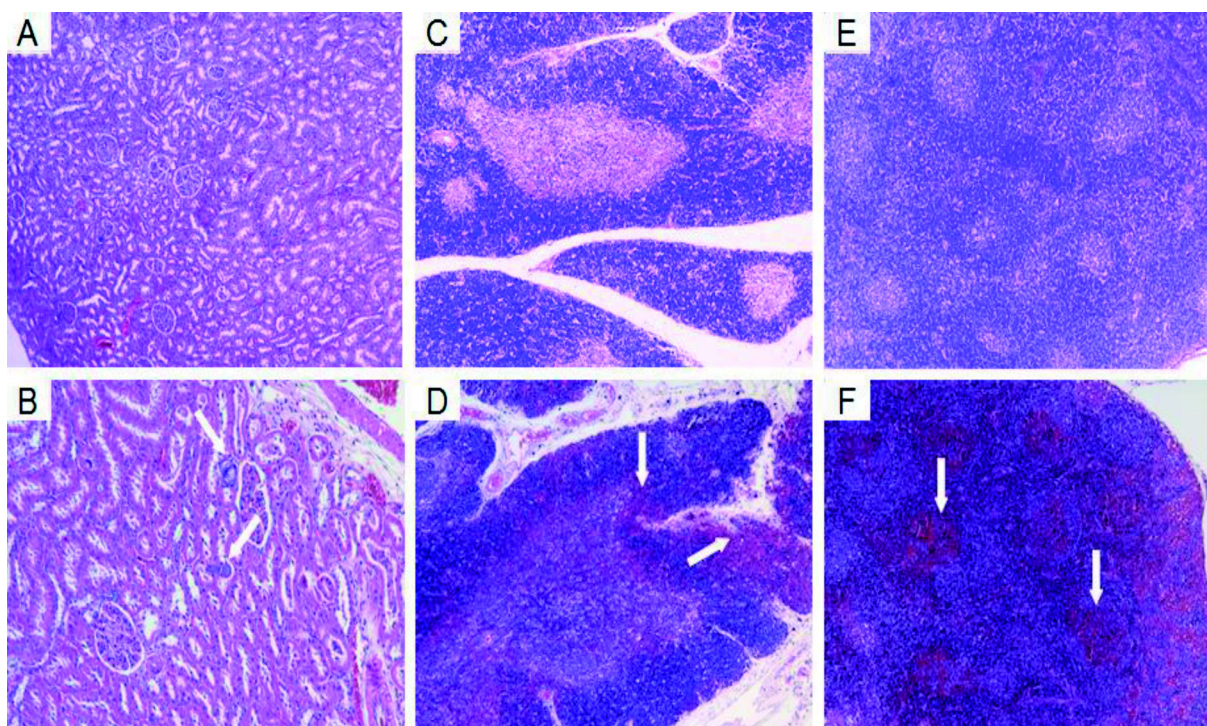
表4 氯化钠灌胃90 d后大鼠的脏器病理改变分布

组别	肝脏病理改变				肾脏病理改变	胸腺	淋巴结
	局部炎细胞浸润	肝细胞脂肪变性	海绵状变性	淤血	个别肾小管钙化	出血	出血
对照组	1雌1雄	1雌1雄	0	0	1雄	0	0
低剂量组	1雌	1雄	0	0	0	0	0
中剂量组	2雌2雄	2雌2雄	1雌2雄	2雄	4雄	3雄	4雄
高剂量组	3雌4雄	1雌2雄	1雌1雄	1雌1雄	6雄	5雄	3雄



A: 正常肝脏组织; B: 肝脏局部炎细胞浸润(箭头所指); C: 肝脏海绵状变性(箭头所指);
D: 肝脏淤血(箭头所指);

图1 氯化钠灌胃 90 d 后大鼠肝脏的病理损伤 (HE × 50)



A: 正常肾脏组织; B: 个别肾小管钙化(箭头所指); C: 正常胸腺组织; D: 胸腺出血(箭头所指);
E: 正常淋巴结组织(箭头所指); F: 淋巴结出血(箭头所指);

图2 氯化钠灌胃 90 d 后大鼠肾脏、胸腺和淋巴结的病理损伤 (HE × 50)

降低不存在生物学意义,血清中 ALP、BUN 和 GLU 变化在 SD 大鼠正常范围内^[7-10]。血象生化检测上,与对照组比较,中剂量组雄性大鼠 WBC 升高和低剂量组雌性大鼠 Hb 含量增加,但变化均在 SD 大鼠正常范围内^[11]。中、高剂量组大鼠血清 TBIL 高于对照组和低剂量组。胆红素是肝功能敏感性指标,当肝细胞发生病变,胆红素不能正常地转化成胆汁以及因肝细胞肿胀使肝内的胆管受压,排泄胆汁受阻使血中的胆红素升高,以此 TBIL 升高提示有肝功能的异常或肝胆病变^[12,13]。同时组织病理学检查显示,中、高剂量组大鼠的肝脏局灶炎细胞浸润、海绵状变性和淤血大鼠数明显增加,肝脏病变率分别为 65% 和 70%。

电解质检测结果表明,中、高剂量组雄性大鼠血清总钙含量高于对照组和低剂量组。钙摄入增多、血钙生成增多和肾功能不全均可导致血钙含量升高,其中肾功能不全导致尿钙排出减少而引起血钙升高,最终导致高血钙症^[14]。组织病理学检查显示,中、高剂量组雄性大鼠肾小管钙化发生率显著增加,肾脏病变率分别为 40% 和 60%。高钙血症可造成肾组织和功能损伤,当血钙恢复正常后肾脏病变和功能障碍仍继续存在,但是肾脏 X 线片上可显示钙质在肾脏内广泛沉积成为肾钙化症。肾钙化症的原因,一般认为长期高钙血症,使钙在肾内广泛沉积^[15,16]。本文结果表明,大鼠血钙升高,同时出现肾小管钙化病变。因此当大鼠长期使用剂量大于 500 mg/kg 体质量的氯化钠时可能引起肾脏钙盐沉积而导致肾钙化。

组织病理学检查显示,中、高剂量组雄性大鼠胸腺及淋巴结出血发生率显著升高,中剂量组胸腺出血率为 30%,淋巴结出血率为 40%;高剂量组胸腺出血率为 50%,淋巴结出血率为 30%。胸腺是造血器官,临床研究表明正常胸腺内发生特发性胸腺出血的病因学至今不明,这可能涉及特发性胸腺出血的原发性病因学^[17,18]。淋巴结是重要的免疫器官,其出血常见于炎症并伴随淋巴结肿大^[19]。

综上,氯化钠亚慢性经口剂量高于 500 mg/kg 体质量时可能引起雄性大鼠的胸腺以及淋巴结血液循环障碍和肾脏钙盐沉积。其相关机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 刘兰霞,章睿,赵怀卓.食用氯化钠替代明矾在马铃薯粉丝(条)中的应用[J].农产品加工,2010(11):107-108.
- [2] 卓晓晖,蒋山春.氯化钠在高温环境剧烈运动保障中的应用[J].中国社区医师,2014,30(1):123-124.
- [3] 赵晓光.氯化钠的新应用[J].牙膏工业,2009,19(2):46-50.
- [4] 张玲霞,张沥,陶梅,等.盐水灌胃大鼠胃黏膜组织细胞的超微结构观察[J].中国组织工程研究与临床康复,2007,11(4):703-706.
- [5] Da Silva RC, de Souza P, da Silva-Santos JE, et al. Increased diuresis, renal vascular reactivity, and blood pressure levels in young rats fed high sodium, moderately high fructose, or their association: a comparative evaluation[J]. Appl Physiol Nutr Metab, 2016, 41(12):1233-1239.
- [6] 国家食品药品监督管理总局.化妆品安全技术规范[S].北京:中国标准出版社,2015.
- [7] 林健,郑丽红,陈润,等.SD大鼠血液生化指标正常参考值范围的探讨[J].医学动物防制,2005,19(3):321-322.
- [8] 王茵,楼正清,来伟旗,等.SD大鼠血液生化指标正常参考值范围的探讨[J].卫生毒理学杂志,2000,14(2):112-113.
- [9] 蒋中仁,徐薇,金伟,等.SD大鼠血液学指标、血生化指标及脏器比正常值范围探讨[J].预防医学情报杂志,2011,27(10):789-791.
- [10] 严妍,贾博宇,吴娟,等.长毒试验中动物动-静脉血液生化指标的比较试验[J].畜牧兽医科技信息,2009(12):27-28.
- [11] 郎天琦,邹世颖,侯曼,等.SD大鼠90 d喂养试验生理生化指标正常参考值的研究[J].中国兽医杂志,2016,52(12):99-101.
- [12] Kato H, Horita N, Miyazawa N, et al. Risk factors for liver injury with an elevated serum bilirubin concentration caused by antituberculous drugs[J]. Intern Med, 2013, 52(19):2209-2214.
- [13] Chen SS, Yu KK, Huang C, et al. The characteristics and clinical outcome of drug-induced liver injury in a Chinese hospital: A retrospective cohort study[J]. Medicine (Baltimore), 2016, 95(34):1-9.
- [14] 刘铮,李燕,刘凤奎.全身酸痛伴血钙增高[J].中国医刊,2016,51(1):14-16.
- [15] Harada K, Suzuki S, Ishii H, et al. Nutrition status predicts severity of vascular calcification in non-dialyzed chronic kidney disease[J]. Circ J, 2017, 81(3):316-321.
- [16] Keskin M, Savaş-Erdeve Ş, Sağsak E, et al. Risk factors affecting the development of nephrocalcinosis, the most common complication of hypophosphatemic rickets[J]. J Pediatr Endocrinol Metab, 2015, 28(11-12):1333-1337.
- [17] 刘树森,李柱虎,金凤杰,等.特发性胸腺出血伴真性胸腺增生猝死1例[J].临床与实验病理学杂志,2011,27(9):1029-1030.
- [18] Sakuraba M, Tanaka A, Tsuji T, et al. Spontaneous thymic hemorrhage in an adult[J]. Ann Thorac Surg, 2014, 97(5):1800-1802.
- [19] 赵越,范洪刚.引起犬贫血、出血性素质和淋巴结肿大的疾病的鉴别[J].养殖技术顾问,2014(11):207.

The Sub-chronic Toxicity of Sodium Chloride in Rats

LI Guang-xian, LIU Xiang-mei, LIU Dong-hong, LIU Yin,

SUN Xia, CHEN Han-jin, GUO Xin-dong, HUANG Yu-feng

(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China)

[Abstract] **Objective** To explore the sub-chronic toxicity of sodium chloride on rat by oral gavage. **Methods** Eighty SPF SD rats were randomly divided into control, low-dose, middle-dose and high-dose groups with half male and half female. The treatment groups were exposed to sodium chloride (low-dose group with 100 mg/kg, middle-dose with 500 mg/kg and high-dose group with 1 000 mg/kg) and the control group were exposed with pure water by oral gavage for continuous 90 days. Clinical observations, daily diet consumption and body weight of rats in each group were recorded during exposure. After exposure completed, the rats were anesthetized and blood samples were collected from abdominal aorta to test the routine blood indexes, serum biochemistry and plasma electrolytes. The main organs were dissected and weighed to calculate the organ coefficients. Histopathology changes of main organs were observed by microscopy. **Results** There were no difference in body weight, blood routine index, daily ration and organ coefficients between all groups ($P>0.05$). Serum biochemistry examination showed that, compared with the control group, the ALT and AST were decreased ($P<0.05$) while the TBIL and calcium content were increased ($P<0.05$) in middle-dose and high-dose groups. In the pathological examination of rats, pathological changes of spongy degeneration, congestion, necrosis and infiltration of liver were found in some rats in middle-dose and high-dose groups. And some male rats in middle-dose and high-dose groups also found renal tubular calcification, thymic hemorrhage and bleeding tendency of lymph nodes. No changes of biological significance were found in the serum biochemistry examination in the control and low-dose group. No pathological lesion can be seen in the control and low-dose group. **Conclusion** The sub-chronic toxicity of sodium chloride by oral administration can cause blood circulatory disorder and renal deposition of calcium salt in male rat.

[Key words] Sodium chloride; Rats; Sub-chronic toxicity

罗格列酮、吡格列酮对兔血脂调节作用的比较

吴小利

(丰利镇中心卫生院, 南通 226408)

[摘要] 目的 比较罗格列酮、吡格列酮对兔血脂的调节作用。方法 雄性新西兰白兔 30 只使用高脂高胆固醇饲料喂养诱导血脂紊乱模型, 10 周后分为模型组、吡格列酮组和罗格列酮组并继续高脂高胆固醇饲喂, 后两组每日分别给予吡格列酮(3 mg/kg)和罗格列酮(1.2 mg/kg), 另 10 只为正常对照组, 饲喂普通饲料。实验 8 周后, 对兔的血脂、血糖、瘦素(脂肪组织合成的一种肽类蛋白质)、载脂蛋白(APOAL)进行检测。结果 给予高脂高胆固醇饲料后, 兔的体质量明显增加, 体内脂肪细胞含量增加。罗格列酮、吡格列酮处理后, 对模型兔血脂有明显调节作用。吡格列酮处理后, 血脂紊乱兔的甘油三酯(TG)由 1.48 ± 0.36 mmol/L 降到 1.12 ± 0.39 mmol/L, 胆固醇(TC)由 8.51 ± 0.49 mmol/L 降到 6.72 ± 1.86 mmol/L, 用罗格列酮处理后, 高密度脂蛋白(HDL-C)由 4.31 ± 2.88 mmol/L 上升到 4.65 ± 2.26 mmol/L。结论 罗格列酮对提升 HDL-C 的作用大于吡格列酮, 而吡格列酮降 TG 的作用更强。两种药物能同时改善动脉粥样硬化。

[关键词] 噻唑烷二酮类; 血脂紊乱; 调节作用

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0220-02

吡格列酮、罗格列酮都属于噻唑烷二酮类药物, 胰岛素增敏剂, 能高选择性地激动过氧化物酶体增殖因子活化受体 γ (PPAR- γ)。PPAR- γ 的活化, 与胰岛素存在有关, 能调节控制脂类、葡萄糖代谢的胰岛素。使胰岛素加快分泌, 减少外周组织和肝脏的胰岛素对抗。降低血浆游离脂肪酸水平, 减轻脂肪组织对机体的毒害, 保护胰岛 β - 细胞。对血脂异常有调节作用, 能降低甘油三酯(TG)、增加高密度脂蛋白(HDL-C)^[1]。本文探讨吡格列酮、罗格列酮对高脂高胆固醇喂养新西兰白兔血脂代谢的影响。比较这两种制剂对血脂紊乱的调节作用, 以供临床应用参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级雄性新西兰白兔 40 只, 9~10 周龄, 体质量 2.00 ± 0.45 kg, 由南京市浦口区莱英养殖场提供[SCXK(苏)2014-0006], 饲养于南通通大化学物安

全性评价中心[SYXK(苏)2006-0060]。

1.2 仪器与试剂

低温冷冻高速离心机(良友 TGL-16G、江苏常州医疗电子股份有限公司), 全自动生化分析仪(Mindray BS-800、深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司), 质量分数 10% 水合氯醛(天津市大茂化学试剂厂), 罗格列酮($4 \text{ mg} \times 14$, 成都恒瑞制药, 批号: 20160901), 吡格列酮($15 \text{ mg} \times 14$, 北京太平洋制药, 批号: 20160701), 猪油(广东茂民食品加工厂), 胆固醇(TC)(北京鸿润宝顺科技有限公司)。

1.3 动物模型制作与分组

新西兰兔先随机分成 2 组: 一组 10 只作为空白对照组, 普通饲料(粤饲证 201511031)喂养, 每日 55 g/kg, 另外一组 30 只每日除了普通饲料喂养外再加高脂高胆固醇饲料(1% 胆固醇、5% 猪油)喂养, $140 \sim 150 \text{ g/d}$, 喂养 10 周建立血脂紊乱模型后, 将模型动物分成血脂紊乱组、吡格列酮和罗格列酮处理组, 继续普通饲料加高脂高胆固醇饲料喂养, 后两组饲料中每日分别加吡格列酮 3 mg/kg 和罗格列酮 1.2 mg/kg, 继续喂养 8 周。实验时给足饮水, 并分笼饲养, 定期称量兔的体质量, 注意观察兔的饮食量, 兔的活动情况。

[收稿日期] 2017-03-06

[作者简介] 吴小利(1971-), 女, 本科。

E-mail: wuxiaoli368@163.com

1.4 血液标本的采集测定

实验结束(8周)后兔自由饮食 8 h, 采集心脏全血后用质量分数 10% 水合氯醛(1 mL/kg)耳缘静脉注射麻醉处死。标本经 4 000 r/min 离心 5 min 后采用全自动生化分析仪检测瘦素、载脂蛋白(APOAL)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL-C)、高密度脂蛋白(HDL-C)。

1.5 统计学分析

采用统计软件 SPSS 13.0 处理、检验, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 各组间数据比较分析用单因素方差进行分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体质量、脂肪细胞、瘦素、APOAL 的变化

实验兔继续高胆固醇饲养 8 周, 活动欠佳、精神不振、食量减少, 以血脂紊乱组最为明显。除对照组外, 兔体内脂肪细胞和 APOAL 明显增加, 处理组瘦素高于血脂紊乱组 and 对照组(表 1)。对照组体质量与血脂紊乱组比较无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 血脂变化

吡格列酮组 TC 比罗格列酮组低 19.81%($P < 0.05$), TG 比罗格列酮低 35.26%, 吡格列酮组 TC 明显低于罗格列酮组($P < 0.05$)。对升高 HDL-C 的作用罗格列酮明显高于吡格列酮($P < 0.05$)(表 2)。

表 1 实验兔体质量、脂肪细胞、瘦素、APOAL 的变化

组 别	体质量/kg	脂肪细胞/mm ² · L ⁻¹	瘦素/μg · L ⁻¹	APOAL/g · L ⁻¹
对照组	2.25 ± 0.13	21.90 ± 4.54	0.198 ± 0.031	0.218 ± 0.081
血脂紊乱组	2.78 ± 0.19	46.28 ± 3.25 ^{***}	0.094 ± 0.062 [*]	0.209 ± 0.12
罗格列酮组	2.87 ± 0.12 [*]	45.9 ± 64.69 ^{**}	0.219 ± 0.091 ^{**}	0.227 ± 0.09
吡格列酮组	2.65 ± 0.11 [*]	43.12 ± 2.68 ^{**}	0.230 ± 0.087 ^{**}	0.264 ± 0.09 [*]

注: 与对照组比较, ^{**} $P < 0.01$; 与血脂紊乱组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与罗格列酮组比较, [#] $P < 0.005$

表 2 实验兔 TG、TC、LDL-C、HDL-C 的测定结果

组 别	TG	TC	LDL-C	HDL-C
对照组	1.27 ± 0.18	5.58 ± 0.47	2.09 ± 0.32	1.69 ± 0.53
血脂紊乱组	1.48 ± 0.36	8.51 ± 0.49 [*]	2.61 ± 0.58	4.31 ± 2.88 [*]
罗格列酮组	1.73 ± 0.51	8.38 ± 0.21 [*]	2.48 ± 0.92	4.65 ± 2.26 [*]
吡格列酮组	1.12 ± 0.39 [*]	6.72 ± 1.86 ^{##}	2.49 ± 0.92	2.32 ± 1.49 ^{##}

注: 与对照组比较, ^{*} $P < 0.01$; 与血脂紊乱组比较, ^{*} $P < 0.05$; 与罗格列酮组比较, [#] $P < 0.005$

参考文献:

- [1] 王晓丽, 刘辉, 张斌. 罗格列酮灌胃对兔急性心肌梗死后心室重构的影响[J]. 山东医药, 2012, 52(46):35-37.
- [2] 卢宇, 马德琳, 余学锋. 罗格列酮和吡格列酮的心血管安全性[J]. 药物不良反应杂志, 2015, 4(17):138-139.
- [3] 李红旗, 章琦, 陈莉, 等. 吡格列酮对 HDL 功能的调节及其

3 讨论

血浆中的脂质代谢紊乱易诱发动脉粥样硬化的发生^[3], 噻唑烷二酮类药物吡格列酮、罗格列酮增加胰岛素敏感性, 促进脂肪的合成, 与 PPAR- γ 亲和力和大, 激活骨骼肌、脂肪、肝脏 PPAR- γ 后, 调整胰岛素应答基因的转录, 使体内 TC、TG 降低^[4], 罗格列酮和吡格列酮可能激活 PPAR- γ 后降低了细胞中胆固醇的流出。吡格列酮适用于肥胖的或不肥胖的糖尿病 II 型患者, 降血糖的同时, 能明显降低 TC 和 TG, 罗格列酮减少心血管的发病率^[5]。对动脉粥样硬化有一定的预防和治疗作用。

瘦素作用于下丘脑的调节中枢, 是由脂肪组织分泌的肽类蛋白质, 参与机体对脂肪的代谢。本研究中, 吡格列酮处理使血脂紊乱兔瘦素提升, 从而调节能量平衡, 使兔体质量减轻。

从本研究中得知, 用 1% 胆固醇和 5% 猪油饲养新西兰兔后, 血清中的 TG、TC、LDL-C、HDL-C 明显升高, 出现血脂紊乱, 吡格列酮、罗格列酮处理后, TC、LDL-C 均明显下降, 说明两种药物对血脂异常均有一定的调节作用。本文结果表明, 罗格列酮对提升 HDL-C 的作用大于吡格列酮, 而吡格列酮降 TG 的作用更强。临床医生在使用这两种药物时要权衡利弊, 充分考虑患者的具体情况。

抗动脉粥样硬化的机制[J]. 安徽医学杂志, 2013, 17(11): 1841-1843.

- [4] 祝海英. 二甲双胍和罗格列酮治疗 2 型糖尿病肾病的疗效比较[J]. 中国老年学杂志, 2012, 10(31):3816-3817.
- [5] 韩芳, 刘同美, 张代娟. 吡格列酮和罗格列酮对脂多糖诱导大鼠血管平滑肌细胞增殖的影响[J]. 数理医药学杂志, 2014, 6(21):674-676.

不同厂家试剂盒检测大鼠血清中碱性磷酸酶活性的比较

李 红¹, 余儒洋², 李 疆¹, 施嘉琛¹

(1. 北京市疾病预防控制中心 / 北京市预防医学研究中心, 北京 100013)

(2. 中国农业大学动物医学院 (学生), 北京 100083)

[摘要] 目的 比较两个厂家生产的碱性磷酸酶(ALP)试剂检测大鼠血清是否存在差异, 开展大鼠血清 ALP 活性的检测。方法 用国际临床化学与检验医学联合会(IFCC)推荐的连续监测法, 两个厂家生产的 ALP 试剂同时测定大鼠血清。结果 两个厂家的 ALP 试剂检测大鼠血清差异极显著($P<0.01$)。结论 两个厂家的 ALP 试剂均可开展大鼠血清检测工作, 要分别建立实验室的参考范围, 如果动物实验采用实验前后比较时, 中间过程不能更换试剂的厂家。

[关键词] 碱性磷酸酶; 比对试验; 大鼠血清

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] C [文章编号] 1674-5817(2017)03-0222-02

碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)存在于成骨细胞、白细胞、肝细胞、脾、肾、胎盘、前列腺和小肠内, 血清中的 ALP 具有四种结构亚型: 肝-骨-肾型、小肠型、胎盘型和胚细胞型的变体, 其中肝-骨-肾型最为重要。儿童和青少年在骨骼成长时成骨细胞增加导致ALP活性会生理性升高, 甲状旁腺功能亢进、Paget病、佝偻病和骨软化病等骨骼疾病, 阻塞性黄疸、胆汁郁积都会使ALP病理性升高^[1]。诸多动物实验研究中, 准确检测ALP的活性变化是重要研究依据^[2-7]。在食品安全国家标准28 d经口毒性试验中也新增加了ALP活性的检测, 因此, 建立正确的ALP检测方法, 对于相关动物实验具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 仪器设备

7600-日立全自动生化分析仪(日立高新技术有限公司, 日本), 仪器设备在中国计量科学研究院进行年检, 检定合格, 且检测过程在检定期内。

[收稿日期] 2016-11-15

[作者简介] 李 红(1968-), 女, 本科, 副主任技师。主要从事生化分析工作。E-mail: benlih@sina.com

1.2 试剂、校准品和质控血清

厂家1: ALP试剂、酶校准品和多项质控品均由WaKo(和光纯药工业株式会社, 日本)提供。ALP试剂R1: 4×49 mL, R2: 4×15 mL; 酶校准品批号: DR134, 规格 4×3 mL; 多项质控品1批号: EK476, 规格 10×5 mL; 质控品2批号: EK477, 规格 10×5 mL。厂家2: ALP试剂、酶校准品和多项质控品均由DiaSys[德赛诊断系统(上海)有限公司, 德国]提供。试剂货号: 14104101001, 包装规格 R1: 2×80 mL, R2: 2×20 mL; 酶校准品TruLab U货号: 591009910063, 包装规格: 20×3 mL; 多项质控品TruLab N货号: 590009910061, 包装规格: 6×5 mL; 多项质控品TruLab P货号: 590509910061, 包装规格: 6×5 mL。

1.3 血样

本中心实验室送检Wistar大鼠血清66例, 采集腹主动脉血样室温放置30 min, 600A BAIYANG离心机, $1\ 500 \times g$, 10 min离心分离血清。清洁级大鼠(雌雄各半), 体质量雌性168~216 g, 雄性189~299 g, 6~8周龄。由军事医学科学院实验动物中心提供[SCXK(军) 2012-0004]。

1.4 实验方法

1.4.1 实验条件 进行仪器设备的常规维护保养,

在 P 模块上分别建立分析参数,两个厂家的试剂都是液体双试剂均可直接使用,在 37℃条件下,选用速率 A 法,主波长 405 nm、副波长 505 nm,连续监测吸光度的上升速率($\Delta A/\text{min}$),吸光度增高速率计算 ALP 活性,大鼠样本血清为 4.0 μL ,WaKo 试剂 R1 是 160 μL ,试剂 R2 是 40 μL ,选用 24 到 34 测光点。DiaSys 试剂 R1 是 200 μL ,试剂 R2 是 50 μL ,选用 21 到 31 测光点。

1.4.2 校准程序 酶校准品为冻干粉状,小心打开瓶盖。在酶校准品中准确加入 3.0 mL 离子交换水或者蒸馏水后,轻轻颠倒使其完全溶解混合均匀,复溶后保存于 2~8℃可使用 3 d。在 P 模块上执行两点定标程序。

1.4.3 质量控制程序 在多项质控品中准确加入 5.0 mL(或者用称重法)离子交换水或者蒸馏水后,轻轻颠倒混合使其完全溶解分装保存,可放置在质控位或者是常规标本位置检测。

1.4.4 样品检测 执行两点定标程序通过后,首先检测两个厂家提供的质控血清,再同时对 66 例大鼠血清进行 ALP 检测,质控血清放置在常规标本后再检测。ALP 结果计算(U/L)= 样品($\Delta A/\text{min}$)/校准($\Delta A/\text{min}$) $\times$ 校准品活性(U/L)。

1.5 统计方法

全部实验测定结果直接由生化分析系统输出,数据使用 SPSS 20.0 软件包进行配对 t 检验统计处理; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

多项质控品检测结果均在 1 个标准差以内,使用两个厂家试剂检测大鼠血清 ALP 结果差异极显著($P<0.01$)(表 1)。两个厂家试剂测定大鼠血清 ALP 活性结果的线性回归方程 $Y=1.0228x+0.635$,相关系数 $r=0.9994$, $r^2=0.9988$ 。

表 1 大鼠血清中 ALP 的检测结果

厂家	n	ALP / $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$
WaKo	66	119.82 $\pm$ 51.36
DiaSys	66	123.18 $\pm$ 52.57

3 讨论

WaKo 和 DiaSys 多项质控血清检测结果均在 1 个标准差以内,符合室内质量控制要求,可以用于检测大鼠血清 ALP 活性。两个厂家生产的试剂检测大鼠血清 ALP 结果相关性良好,但差异仍有统计学意义,应分别建立实验室的参考范围。生化检测结果的准确性在动物实验中至关重要,使用的仪器设备、试剂以及工作人员的责任心对检测结果都有很大影响^[8~10]。实验组和对照组,实验动物结果前后比较时要使用同一检测方法同一厂家生产的试剂,中间不能更换。遇到试剂批间差异大时,为确保一致性应使用同一批号试剂,从而保证检测结果的准确性。

参考文献:

- [1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M],第三版,南京:东南大学出版社,2006,415.
- [2] 曾云贵,何俊虎,牛晓光,等.运动训练对大鼠锌铜代谢及血清 ALP, LDH 活性影响的研究[J].北京体育大学学报,2003,26(4):467-471.
- [3] 翁锡全,徐国琴,林文钺,等.不同运动强度对糖尿病大鼠血清骨代谢生化指标的影响[J].中国运动医学杂志,2009,28(5):522-525.
- [4] 王德军,周卫民,王辉,等.光照不均匀性对 SD 大鼠血液生理生化指标的影响[J].实验动物与比较医学,2010,30(4):277-282.
- [5] 王立媛,马雪梅,王婷婷,等.多因素诱导蒙古沙鼠胃癌模型的建立及其血清中碱性磷酸酶和乳酸脱氢酶的变化[J].临床和实验医学杂志,2014,13(20):1665-1667.
- [6] 任小娟,许多红,严会荣.骨松汤对去卵巢小鼠骨质疏松血清 ALP 影响的实验研究[J].新疆中医药,2015,33(3):12-13.
- [7] 张洋,杨少峰,卜淑敏.全身垂直振动对去卵巢骨质疏松大鼠血清和骨组织碱性磷酸酶水平的影响[J].中国运动医学杂志,2013,32(1):41-44.
- [8] 李红,施嘉琛,杨奕,等.大鼠不同部位采血血清肌酸激酶及其同工酶检测结果[J].实验动物与比较医学,2014,34(1):68-70.
- [9] 李红,施嘉琛,丁晓静,等.生化分析仪的两个模块检测大鼠血清生化结果的比较[J].医学动物防制,2014,30(10):1063-1065.
- [10] 李红,施嘉琛.两种方法检测大鼠血清转氨酶结果比较[J].实验动物与比较医学,2014,34(6):500-502.

一种实验动物新型隔离器系统的研制

卢领群, 石巧娟, 金秀清, 刘月环, 郭红刚

(浙江省医学科学院, 杭州 310013)

[摘要] 介绍了一种新型无菌隔离器的工作原理及结构, 与传统的隔离器相比, 其操作更加灵活、高效。该隔离器已授权为国家实用新型专利 (ZL200920117874.X)。

[关键词] 新型; 无菌隔离器; 结构

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0224-03

1928年美国圣母大学细菌学实验室的Reyniers研制出不锈钢无菌动物隔离器, 1930年Gustafsson设计了第二代不锈钢隔离器^[1], 国外在1970~1980年代就已进入研发高峰, 尤其是英国、法国和日本等国, 利用隔离器培育了许多种无菌动物^[2-4]。我国是在1980年代初由上海生物制品研究所的陈天培教授从英国引进该技术, 并进行小规模研发和生产^[5]。1990年代初起, 国内多家企业开始了无菌隔离器的研制和生产, 目前已经形成系列无菌隔离器产品, 包括可控温湿度, 可调节风量、配以不间断电源等隔离器系统。从材料和结构而言, 有塑料薄膜、有硬塑、有不锈钢等; 从功能而言, 有正压, 也有负压。现国内许多单位使用隔离器进行大规模动物饲养繁殖、保种和进行动物实验^[6-8]。

隔离器既能实现动物饲养屏障环境的功能, 又能保持良好的单元隔离效果, 具有便捷、经济、实用的重要特点。随着生命科学对实验动物质量要求的不断提高, 隔离器已经在我国被逐步推广应用于SPF级大、小鼠, 转基因小鼠、免疫缺陷动物、高致病性动物模型保种与饲养、实验动物的隔离检疫以及相关研究。

作者在培育无菌大鼠的工作中感觉目前隔离器高效过滤器更换频繁, 饮水通过传递窗频繁传递很容易造成动物污染, 此外也存在风量不可调节, 内环境控制无有效手段, 无备用电源等缺陷。目前关于动物饲养用隔离器的硬件设计、软件控制、智能化水平及推广应用方面均明显落后于国际水平。

本文作者根据隔离器设计原理, 针对目前通常使用的隔离器的不足之处, 设计了一款新型隔离器, 该隔离器对存放空间要求低, 减少了高效过滤器的更换频率, 可以调节隔离器中的风量调节阀来控制内环境, 设计了隔离器外动物自动灌水装置, 既确保动物能喝到无菌水, 又减少污染风险, 同时配有备用电源, 作者结合实验室现有条件及课题组的实际工作经验, 通过技术创新, 设计、开发了一套既能长时间维持高级别实验动物(无菌动物、SPF动物、免疫缺陷动物)质量与生命安全, 又符合转基因动物保种需求还相对节能、经济、方便的实验动物隔离系统, 下面将详细介绍该款新型隔离器的工作原理和结构。

1 隔离器外环境的建立

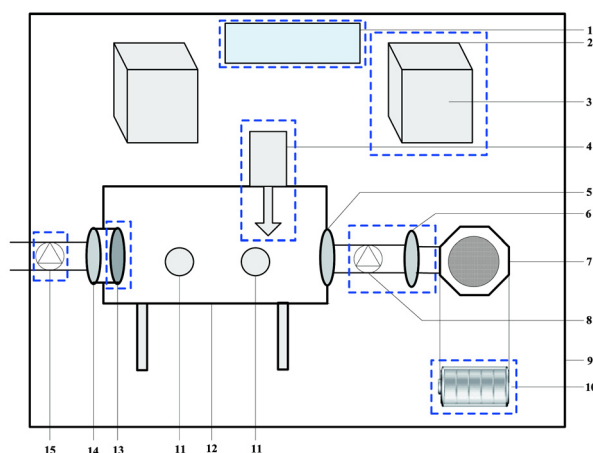
新型隔离器结构及外环境设施平面示意图如图1所示。选定一普通房间, 在房间墙壁(一般为窗户)上安装一进风口, 在进气口安装初效2、中效过滤器3, 安装温控系统1, 隔离器内空气在进风压力作用下, 经出风口中效13、高效过滤器14过滤后, 通过排气管道排到房间外, 建立既环保又有相对节能的隔离器外环境。

[收稿日期] 2016-11-12

[基金项目] 浙江省公益性技术应用研究计划
(No. 2014C37013)

[作者简介] 卢领群(1976-), 男, 实验师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: lulingqun@sohu.com

[通讯作者] 郭红刚(1976-), 男, 助理研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: sxguohonggang@163.com



1: 外环境温控系统; 2: 进风口初效过滤器; 3: 进风口中效过滤器; 4: 饮水传递系统; 5: 隔离器进风口高效过滤器; 6: 风机高效过滤器; 7: 风机; 8: 进风口风量调节阀; 9: 普通房间; 10: 备用电池; 11: 隔离器操作窗; 12: 隔离包; 13: 隔离器出风口中效过滤器; 14: 隔离器出风口高效过滤器; 15: 出风口风量调节阀; 图中蓝色虚线部分及图注中加粗斜体为改进加装内容。

图1 新型隔离器结构示意图及外环境设施平面示意图

2 节能型通风系统的建立

隔离器的空气净化装置是该隔离系统最重要、最核心部件, 其对于隔离器内空气的流通、有害气体的排出以及动物微生物的控制十分重要。



图2 进风口高效(箭头所示)

2.1 进风过滤系统的建立

在进风口设置一个初效过滤器2, 在初效过滤器的里端设置一个中效过滤器3, 在风机的出风口设置一个高效过滤器6, 风机出风口上的高效过滤器6通过风管与隔离器上的高效过滤器5连接, 在5,6两个高效过滤器中加装风量调节阀8。

2.2 出风过滤系统的建立

在隔离器出风口内端设置一个中效过滤器13, 在隔离器出风口设置隔离器出风口高效14, 隔离器出风口高效与排风管连接, 经过出风口风量调节阀15后将废气室外。

在风机上安装初、中、高效(图2), 进、出风口加配风量调节阀, 并在隔离器出风口前端安装简易过滤膜(图3), 只要定期更换出风口的简易过滤膜, 使隔离器进、出风口上的高效可以使用2~3年, 仍能保证隔离器内的风速、换气次数、压差、尘埃粒子等指标符合国家标准, 从而避免了因频繁更换隔离室上的高效过滤器造成的污染, 还实现了该隔离器在低能耗的开放环境中经济、方便应用。该设计改进隔离器通风系统, 使之更适用于开放环境, 通过风量调节阀的设计, 实现空气流量的调节并且在更换高效过滤器时可有效避免微生物污染, 使隔离器内环境各指标长期保持符合国家标准要求。

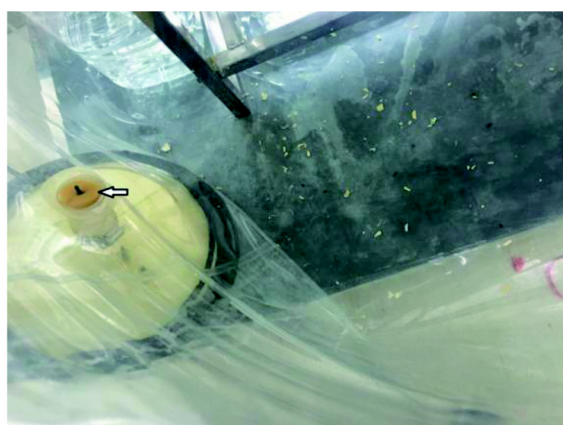


图3 出风口简易过滤膜(箭头所示)

3 隔离器内动物饮用水新型传递系统的建立

目前隔离器内动物饮用水都是通过隔离器传递窗进行传递, 由于动物饮水量比较大, 必须经常打开传递窗进行传递, 从而也加大了污染机会。作者设计

的隔离器外添加自动灌水装置(图4), 水通过隔离器的连接装置进入隔离器内, 在出水前经过0.22 μm滤器(图4箭头所示)后供动物饮用, 既确保动物能饮用无菌水, 又减少污染风险。该系统改变以往隔离器动物饮用水传递方式, 降低传递窗传递次数, 同时能保证在传递过程中不会对无菌水和隔离器内环境造成污染。

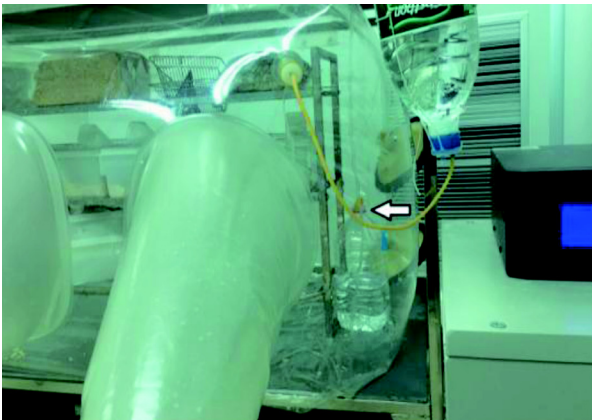


图 4 饮水传递系统及不间断电源

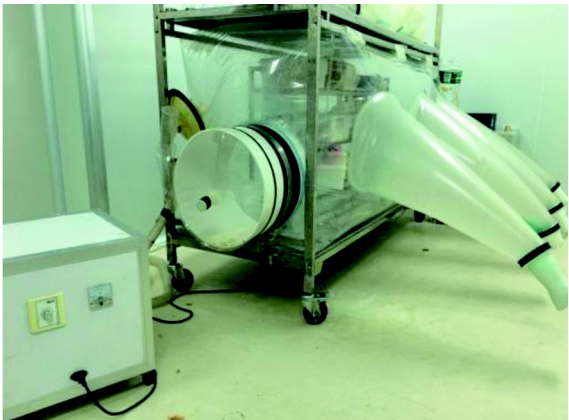


图 5 新型隔离器样机

4 应急电池在隔离器风机上的应用

隔离器风机由于停电而停止运转时, 应急电池能自动启动风机运转, 以防因意外停电对隔离器内动物的影响。用市场上购买的备用电池安装在隔离器风机上, 当隔离器风机由于意外停电而停止运转时, 备用电池(图 4)能自动恢复隔离器风机运转。

5 新型隔离器的初步应用

根据以上设计,作者组装了一台样机(图5), 然后进行小规模饲养, 对其参数进行测定表明, 饲养环境符合 SPF 级的要求(表 1)。作者设计的该系统已初步应用于免疫缺陷动物及 SPF 动物的繁育。

参考文献:

[1] Gustafsson BE. Lightweight stainless steel systems for rearing germfree animals[J]. Ann N Y Acad Sci, 1959, 78:17-28.
[2] Miyakawa M. The Miyakawa remote-control germfree rearing unit[J]. Ann N Y Acad Sci, 1959, 78:37-46.

表 1 新型隔离器的各项参数		
	环境指标标准	实测值
换气次数	≥ 20	30
静压差	≥ 50	75
空气洁净度	5	5
沉降菌最大平均浓度	0	0
噪声	≤ 60	52
气流速度	≤ 0.2	0.06

[3] Trexler PC, Reynolds LI. Flexible film apparatus for the rearing and use of germfree animals[J]. Appl Microbiol, 1957, 5(6): 406-412.
[4] Trexler PC. The use of plastics in the design of isolator systems [J]. Ann N Y Acad Sci, 1959, 78:29-36.
[5] 陈天培, 皇甫在, 洪美玉, 等. 塑料薄膜无菌隔离器的研制与应用[J]. 实验动物与比较医学, 1984, 4(1):5-9.
[6] 施美莲, 徐平. 关于隔离器保种中的几个实验动物质量保证问题[J]. 上海实验动物科学, 2001, 21(6):127-129.
[7] 王琰, 康峰, 尹良宏, 等. 现行可调、拆装更换快捷安全的隔离器空气净化装置[J]. 实验动物科学, 2012, 29(2):38-41.
[8] 戴方伟, 萨晓婴, 周莎桑, 等. 无菌大鼠培育中无菌检测影响因素分析[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(9):65-69.

实验动物行业高端复合型管理人才培训 师资队伍选拔与评价方法的初步探讨

林丽芳, 崔淑芳

(第二军医大学实验动物中心, 上海 200433)

[摘要] 为实验动物行业持续发展组建优秀管理人才队伍, 本课题组探索实验动物行业高端复合型管理人才培训体系的建立, 并构建管理人才培训师资选拔方法。在制定选拔对象、选拔要求的基础上, 构建胜任型师资队伍选拔评价体系。通过专家访谈法、问卷调查法、层次分析法等形成培训体系师资的评价方法。

[关键词] 实验动物行业; 高端复合型管理人才; 师资选拔; 评价方法; 培训

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0227-04

目前生物医药行业的快速发展对实验动物行业管理人才的知识结构、行业素养、接受与处理新问题的能力等要求越来越高, 同时对于企业领导人捕捉行业发展信息资源、把握行业发展方向、制定企业战略措施的能力也越来越高。因此, 针对实验动物行业的管理人才组织培训, 为实验动物行业发展持续培养并输送具有社会责任感、具备系统专业知识、具有核心管理能力、决策能力、市场开拓精神和市场运营能力以及对实验动物行业发展具有宏观把握能力的实验动物高端复合型管理人才, 是当前行业发展的需要, 也是国家中长期人才发展的需要。教师是教育的主体性资源, 建立优秀的师资队伍是培训顺利开展的基础, 是建立培训体系与执行培训的人力资源保障, 直接影响实验动物管理人才的培训质量。科学选拔同时具备教学经验和企业经营管理能力的师资队伍也是培训体系建立的重点。

选拔评价即选拔性的测评, 是按照不同岗位

需求, 对候选者进行素质测评。选拔评价通过区分和选拔出优秀的符合相应岗位的人才, 该评价强调对不同人才的针对性, 更具区分功能, 而非淘汰。选拔评价的最终体现为分数或等级, 要求实施过程客观、公平、公正、准确, 结果明确。选拔评价模式最早起源于西方, 随后在军事和管理学上成功推广, 并逐渐发展成体系^[1]。为建立一支优秀、经验丰富且人员结构稳定的师资队伍, 本课题组通过查阅文献综述、专家访谈法、职位分析设计问卷初稿, 进一步使用层次分析法以及模糊综合评价法从而确定实验动物高端复合型人才培养师资队伍的选拔评价指标。

1 选拔对象

1.1 基本条件

从事与培训课程内容相应的工作岗位达 10 年(含 10 年)以上, 具备本科及以上学历, 或具有高级职称。普通话水平达到高校教员的最低要求。

1.2 选拔范围

师资队伍的人员应吸纳各行各业具有相关专业工作与教学经验的专家。选拔范围主要有: ① 从实验动物科技机构高级科研人员中选拔, 应在实验动物科技领域拥有较高威望, 对实验动物新科学、新技术及发展趋势有精确的把握, 着重承担科学技

[收稿日期] 2016-09-05

[基金项目] 上海市科技发展基金项目(13140900800)

[作者简介] 林丽芳(1986-), 女, 硕士, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: linlifang2012@126.com。

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

术领域的课程内容编写、设计工作。②从实验动物科技机构高端管理人员中选拔,应精通专业,对实验动物科学与行业发展有较强的宏观把握能力,又在企业经营管理方面积淀了丰富的实战经验,拥有大量有培训价值的管理实践案例,着重承担专业管理方面的课程设计,同时协同管理学方面的专家共同设计案例式教学方式。③从MBA办学机构中甄选优秀的管理与教育专家,着重承担管理学、市场营销学等课程内容的编写、培训形式设计等工作。④邀请国内外知名企业家和著名专家学者,举办专题讲座,起到引领、拔高、把关的作用。

首批师资队伍构建后,本项目将以课题组成员为主,在教师的共同参与及项目专家组的指导下,完成课程体系、培训模式、评估体系的构建工作及首次培训班的培训工作。最终结合培训实践与反馈信息,建立授课教员准入、培训与管理制度,使之成为培训体系的要素之一,保障培训体系的规范性与长效性。

2 选拔要求

2.1 品德优良和责任感强

2.1.1 政治素质 拥护党的路线、方针、政策,具有良好的思想政治素质和道德修养。热爱教育事业,有严谨的工作作风和教风。

2.1.2 师德素养 具有高尚的师德,具有现代化的教育思想,业务精湛,富于创新,作风严格,谦和淡泊,遵纪守法,廉洁自律,爱岗敬业,讲求奉献,教书育人,开拓进取,为人师表。

2.2 职业素质

2.2.1 专业素养 能承担一门学科的教学任务,具有理解和掌握教育教学理论的能力和教学实践的创新能力;能灵活采用多种教学方法和掌握现代教育技术手段;能将理论知识应用到企业的运行和管理的具体事项中。

2.2.2 科研素质 树立科研意识,善于收集教育信息,善于总结教学经验和探索教育规律;具有从教学中发现问题,选择研究课题,设计研究方案,实施研究过程,撰写研究论文的能力;具有对教材和学员心理特征的研究能力。

2.2.3 管理素质 应具有较强的组织能力和凝聚力,能组织和开展各种交流活动,能制定目标明确的工

作计划并能有效地实施。

3 选拔与评价方法

选拔具有教学经验同时具备企业管理经验的优秀师资是实验动物高端复合型管理人才培训体系的保障。若对师资队伍缺乏全面的评价,可能会影响培训需求的顺利实现,给培训造成极大风险。因此,规范、科学化师资队伍选拔评价方法尤为重要。目前国内对于实验动物管理人才的培训师资选拔标准研究成果较少,暂未形成系统的标准体系。作者从胜任力模型出发,结合文献综述法、职位分析法、层次分析法等,建立了实验动物高端复合型管理人才培训师资选拔评价方法(图1),确保培训师资选拔工作的规范和科学。

3.1 问卷法制定选拔评价标准

3.1.1 文献综述法 整理并总结了管理人才培训教师需具备的基本条件、选拔评价、胜任力模型等理论和国内外研究进展,做好理论基础工作。

3.1.2 职位分析法 针对不同科目构建选拔评价指标的粗略框架。分析不同科目的特点、科目与实验动物行业单位的结合点以及该科目任课教师应具备的素质特征,充分细化分类,保证师资队伍的知识结构与实验动物管理人才培训需求充分接轨,从而形成问卷的框架。

3.1.3 专家访谈 采集任教胜任力要素。针对行业尖端人才、知名培训师、教学名师等进行问卷调查及深度访谈。从被访人交谈中,捕捉任教胜任力的知识技能、行为特征和个体特质。通过对访谈内容分析,初步梳理归纳出包括个性特征、必备知识、技能和综合能力、经历经验在内的构成要素。然后,根据问卷调查数据汇总分析,形成关键性要素、参考性要素。

3.2 问卷调查

经过前期的文献整理、相应职位分析,形成实验动物管理人才培训师资胜任素质,同时构建《实验动物高端复合型管理人才培训师资选拔评价指标调查问卷》,并向实验动物行业相关研究机构和企业管理人员、各高校实验动物中心管理人员的中上层领导等发放100份问卷。回收及统计问卷数据,确定实验动物高端复合型管理人才培训师资选拔评价指标。

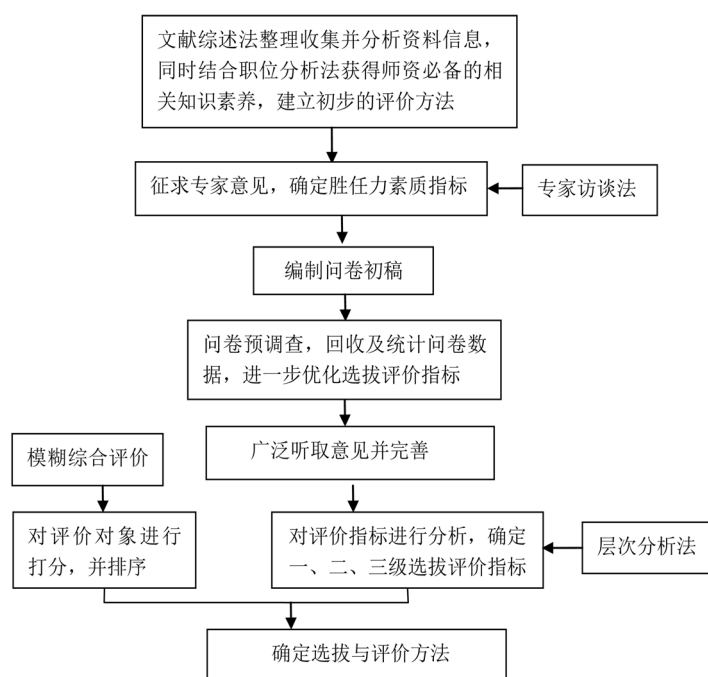


图1 实验动物高端复合型人才培训教师选拔与评价方法的建立

3.3 广泛听取意见并完善

根据前期问卷调查分析结果中的选拔评价指标，广泛听取行业内意见，明确指标的合理性及量化标准，修正完善相关指标，力求提高评价指标的针对性和区分度，获得最后的选拔评价指标。

3.4 对评价指标进行层次分析

参考访谈专家的意见，使用层次分析法对评价指标进行分析，两两比较指标的重要性，得出各项指标的权重，确定一、二、三级选拔评价指标，完成指标系统的建立。

3.5 推荐候选人

将形成的选拔指标发送给各单位，由各单位根据选拔指标自荐或者推荐候选人。

3.6 对候选人进行选拔打分

由3~5位相关学科具有高级职称的专家组成专家评议组，按照最终确定的各项指标权重，分别对候选人进行组织考察、个别访谈以及试讲。根据前期确定的选拔评价标准，使用模糊综合评价法对评价对象给予评分，按照权重比最终得出被评者的综合分数。根据被评对象得分排序，择优选择。建立教学资源专家库，授予任教资格。

3.7 培训结果反馈

于课程进行和结束时，综合专家督导意见与

培训评估结果，组织机构参照培训评估结果对选拔关键要素进行调整与补充。

4 对实验动物高端复合型人才培训教师选拔评价方法的思考

培训师资的选拔评价具有一定的误差和复杂性。选拔评价从某种层面上讲又可称为人才测评。人才测评是通过履历筛选、面试及评价中心技术等多种综合手段，采用定性和定量结合的方法，采集被测评者主要活动领域中的表征信息，对其基本素质和绩效进行测量和评定的活动^[2,3]。由于人才测评主要针对候选者的能力、价值观、气质等心理现象的测评，并非物理测量，具有复杂性和主观性，存在一定的测评误差；其次，人才测评对象是抽象的素质、技能等，仅能经行为表现衡量，是间接测评^[3]。因此，应丰富选拔评价方式，如增加笔试、心理测评等，减少评价误差，严格规范测评程序。

目前针对教师选拔评价指标体系的研究相对较少，对于行业管理人才的培训师资评价体系更有待提高。较早的岗位选拔评价研究集中在军事领域，主要通过团体测验进行官兵分配和选拔，取得一定成效^[4]。1989年，Richard^[5]研究了美国空军的资

格评测、能力偏向、个性检测以及心理运用为一体的选拔体系,显著提高了选拔的效度。而经过对韩国铁路司机的调查显示^[6],身心素质较高,经验丰富的司机上下车发生事故的的概率明显较低。左文龙参考美国研究型大学的教师评价标准,构建了我国研究型大学教师的评价指标体系^[7]。由此可见,选拔评价体系的研究已应用到各个行业,但针对实验动物行业管理人才培养师资的选拔评价标准报道很少,期待通过今后的实际工作使行业管理人才培养师资选拔制度日趋完善。

参考文献:

- [1] 萧鸣政. 人员测评与选拔[M]. 上海: 复旦大学出版社, 2005:42.
- [2] 刘承功. 人员素质测评的理论与实践探索[D]. 成都: 成都理工大学, 2007:14-19.
- [3] 石云, 陈洪震, 安瑞武. 人才测评理论概述[J]. 经济述评, 2004, 19:137-139.
- [4] 庞辉, 纪红, 王实, 等. 人员素质测评理论与方法[M]. 沈阳: 东北大学出版社, 2003:25-28.
- [5] Richard HC. Psychomotor screening for USAF pilot candidates: selecting a valid criterion[J]. Aviat Space Environ Med, 1989, 60(12):1153-1156.
- [6] Yuma BS, Roh JH, Ryu JC, et al. Symptoms of PTSD according to individual and work environment characteristics of korean railroad drivers with experience of person-under-train accidents[J]. J Psychosom Res, 2006, 61(5):691-697.
- [7] 左文龙. 研究型大学教师评价指标体系的探讨[D]. 西安: 电子科技大学, 2008:5.

SPF 鸡不同生长阶段粪便菌群组成及多样性研究

周 妍^{1,2}, 刁晨曦^{1,3}, 张圆圆¹, 于海波¹, 陆涛峰¹, 赵丽丽¹, 陈洪岩¹

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室/黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 实验动物与比较医学创新团队, 哈尔滨 150069; 2. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030; 3. 牡丹江师范学院生命科学与技术学院, 牡丹江 157011)

[摘要] 目的 提供 SPF 鸡不同生长阶段肠道菌群的组成及多样性数据。方法 采集 10 日龄、12 周龄、23 周龄和 52 周龄 SPF 鸡粪便, 利用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序方法, 对样品 16S rRNA 的两个高变区(V3-V4)进行测序分析, 并进行了 α -多样性指数、 β -多样性指数和粪便群落特征分析。结果 四个生长阶段粪便样品菌群具有相似的较高的丰富度和良好的均匀度, 物种多样性无显著差异($P>0.05$); 厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)丰度占 95% 以上; 乳杆菌属(*Lactobacillus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、肠球菌属(*Enterococcus*)为优势菌属, 不同时期丰度差异达显著水平($P<0.05$)。结论 四个生长阶段菌群组成多样, 且优势菌群主要为有益菌。该实验结果能够为 SPF 鸡品质评定、健康监测和安全性评价提供依据。

[关键词] SPF 鸡; 不同生长阶段; 粪便菌群; 16s rRNA; Illumina HiSeq 2500 高通量测序

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0231-09

SPF 鸡可以安全可靠地排除特定微生物及所携带病原体的干扰, 其机体、胚及胚细胞可被用于肿瘤免疫学、药理学、毒理学、血清和疫苗制造以及生物学鉴定等方面, 因此在国内、外应用广泛。SPF 鸡对非典型肺炎(SARS)疾病的控制和疫苗的研制起到了至关重要的作用。作为生物制品研发和疫病防控的前提和保障, SPF 鸡自身的健康状况

评定及其相应的基础研究需要进一步明确。肠道微生物直接影响鸡对饲料营养成分的分解、消化和吸收, 对宿主的机能调节起到至关重要的作用^[1]。基于 SPF 鸡饲养环境及无动物性原料饲料影响其肠道发育及微生物区系情况的研究还未见系统报道。本研究利用 Illumina HiSeq 2500 高通量测序平台, 针对中国农业科学院哈尔滨兽医研究所国家禽类种子中心 SPF 鸡粪便菌群的组成及多样性进行分析, 以期获得各生长阶段的粪便菌群参数, 为 SPF 鸡的生长发育研究提供理论基础, 为鸡群健康及生物安全监测提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物与饲养管理

实验用 SPF 鸡来自中国农业科学院哈尔滨兽医研究所国家禽类种子中心[SCXK(黑)2011-008], [SYXK(黑)2011-022], 选取 10 日龄(C 组)、12 周龄

[收稿日期] 2017-03-16

[基金项目] 国家科技支撑计划(2015BAI07B02-02); 中国农业科学院基本科研业务费专项(Y2016PT41); 国家自然科学基金(31601974)

[作者简介] 周 妍(1993-), 女, 硕士。研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: 2609814396@qq.com

共同第一作者: 刁晨曦(1992-), 女, 硕士。研究方向: 实验动物与比较医学。

E-mail: 2410880274@qq.com

[通讯作者] 陈洪岩(1963-), 男, 研究员。研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: hychen@hvri.ac.cn

(B 组)、23 周龄(L 组)和 52 周龄(P 组)SPF 鸡各 12 只,公、母各 6 只,母鸡相对应的时期为育雏期、育成期、产蛋前期和产蛋高峰期。随机选 3 只饲养于一个正压隔离器内,10 日龄雏鸡环境温度 25~27 ℃、其余时期温度 22~25 ℃;相对湿度 30%~70%;压力 50~150 Pa;12 h 光照。上、下午定时定量饲喂,自由饮水。

1.2 饲料样品的检测

饲料根据不同生长阶段由饲料生产厂家加工,经剂量 25 kGy 辐照灭菌,生产至使用期限不超过 2 周。于采样日期对辐照灭菌饲料的微生物进行检测,大肠菌群(GB/T 18869-2002 饲料中大肠菌群的测定)、沙门氏菌(GB/T 13091-2002 饲料中沙门氏菌的检测方法)、细菌(GB/T 13093-2006 饲料中细菌总数的测定)和霉菌(GB/T 13092-2006 饲料中霉菌总数测定方法)均未检出。

参照 GB/T 146991-2005 饲料采样要求,采集每个生长阶段辐照后无菌饲料样品 3 个;各生长阶段饲料主要营养成分测定方法及计算方法参照国标:水分(GB/T 6435-2014 饲料中水分的测定)、粗蛋白(GB/T6432-1994 饲料中粗蛋白的测定方法)、粗灰分(GB/T 6438-2007 饲料中粗灰分的测定)、粗脂肪(GB/T 6433-2006 饲料粗脂肪测定方法)、粗纤维(GB/T 6434-2006 饲料中粗纤维测定方法),钙(GB/T 6436-2002 饲料中钙的测定)、总磷(GB/T 6437-2002 饲料中总磷的测定分光光度法),饲料主要营养成分见表 1。

1.3 粪便样品的收集与处理

分别于 10 日龄、12 周龄、23 周龄和 52 周龄当日,早晨喂食前,无菌取新鲜粪便(尽量多取),将同一隔离器内 3 只鸡粪便均匀混合为一个样品,每

个时间点最终为 4 份样品,取 2 g 粪便放入无菌的 2 mL 离心管中,液氮速冻,-80 ℃冰箱保存备用。

1.4 粪便样品分析

1.4.1 粪便 DNA 提取 粪便样品中的细菌基因组 DNA 采用目前在肠道微生态研究中广泛应用的商品化粪便 DNA 提取试剂盒(QIAamp DNA Stool Mini Kit, 货号: 51504)提取。对于所提取样本 DNA,采用 Nanodrop 2000(Thermo Fisher, 美国)测定其浓度,将合格样品($A_{260/280}=1.8\sim2.0$, 浓度 ≥ 50 ng/ μ L, 总量 ≥ 2 μ g)送至诺禾致源公司(北京)进行高通量测序。

1.4.2 PCR 扩增及扩增产物的纯化 取适量样品于离心管中,使用无菌水稀释样品至 1 ng/ μ L。以稀释后的基因组 DNA 为模板,根据测序区域的选择,使用带 Barcode 的特异引物, New England Biolabs 公司的 Phusion® High-Fidelity PCR Master Mix with GC Buffer 和高效高保真酶扩增 16s rRNA V3-V4 区。根据 PCR 产物浓度进行等量混合样品,充分混匀后使用质量分数 2 % 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,利用胶回收试剂盒(QIAGEN)回收目的条带。

1.4.3 文库构建和上机测序 使用 TruSeq® DNA PCR-Free Sample Preparation Kit 建库试剂盒进行文库构建,构建好的文库经过 Qubit 和 Q-PCR 定量,文库合格后,使用 HiSeq 2500 PE250(诺禾致源公司,北京)进行上机测序。

1.4.4 测序数据的处理 根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从下机数据中拆分出各样品数据,截去 Barcode 和引物序列得到的拼接序列为原始 Tags 数据(Raw Tags),经过拼接和质控得到高质量的 Tags 数据(Clean Tags),再进行 Tags 截取、Tags 长度过滤和去除嵌合体序列,得到最终的有效数据(Effective Tags)。基于有效数据进行 OTUs (Operational Taxonomic Units)聚类。

1.5 数据统计分析

利用 Uparse 软件对所有样品的全部 Effective Tags 进行聚类,默认以 97% 的一致性将序列聚类成为 OTUs。对 OTUs 代表序列进行物种注释和分析,获得分类学信息。并分别在各个分类水平:界、门、纲、目、科、属、种统计各样本的群落组成形成分类树。根据物种注释结果,选取每个样品在门和属上最大丰度排名前 10 的物种,生成物种相对丰度柱形累加图。进一步对 OTUs 进行丰度分析、 α -多样性和 β -多样性计算等,以得

表 1 各生长阶段饲料主要营养成分
Table 1 The main nutrient content at each stage of growth %

营养成分	生长阶段			
	10 日龄	12 周龄	23 周龄	52 周龄
水分	9.82	9.33	10.24	9.67
粗灰分	6.00	8.94	7.52	11.08
粗蛋白	17.25	16.47	16.81	16.39
粗脂肪	7.68	8.20	4.20	3.91
粗纤维	2.36	1.80	2.67	1.62
钙	1.04	1.23	1.87	4.22
总磷	0.60	0.77	0.63	0.58

到样品内物种丰富度和均匀度信息等。

α -多样性用于分析样本内的微生物群落多样性^[2],通过单样本的多样性分析可以反映样本内的微生物群落的丰富度和多样性。使用 Qiime 软件(Version 1.7.0)计算稀释曲线和 Rank Abundance 曲线。

β -多样性是对不同样本的微生物群落构成进行比较分析。首先根据所有样本的物种注释结果、OTUs之间的系统发生关系及各样本中微生物序列间的进化信息,计算 Unifrac 距离(Unweighted Unifrac)^[3],结合 OTUs 的丰度信息进一步构建 Weighted Unifrac 距离^[4]通过无度量多维标定法(NMDS, Non-Metric Multi-Dimensional Scaling)从中发现不同样品(组)间的差异。为进一步挖掘分组样品间的群落结构差异,选用 t 检验统计分析方法对分组样品的物种组成和群落结果进行差异显著性检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 高通量测序数据

四个生长阶段即 10 日龄(C 组)、12 周龄(B 组)、23 周龄(L 组)和 52 周龄(P 组)共 16 个粪便样品(C.1、

C.2、C.3、C.4、B.1、B.2、B.3、B.4、L.1、L.2、L.3、L.4、P.1、P.2、P.3、P.4)经过 Illumina Hi Seq 2500 平台测序后分别得到各自的下机数据 Raw PE(原始的 PE Reads),经过拼接和质控后得到 Clean Tags(高质量的 Tags 数据),经过嵌合体过滤后得到 Effective Tags (有效数据)。16 个样品高通量测序后共得到 560 822 条可用于分析的序列。以 97% 的一致性,将每个样品所得的序列聚类成 OTU,四个时期的平均 OTU 数为 908、747、721 和 958 (表 2)。

根据物种注释情况,统计每个样品注释到各分类水平上的序列数目,在界(Kingdom)、门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)、科(Family)、属(Genus)、种(Species)7 个水平上,10 日龄序列数分别为 33 074、33 059、33 028、32 921、32 522、28 574、和 11 979; 12 周龄 30 860、30 853、30 841、30 760、30 567、28 479 和 8 345; 23 周龄 35 402、35 392、35 367、35 257、35 004、33 103 和 11 040; 52 周龄 34 126、34 111、34 083、33 971、33 611、30 494 和 7 033。

根据四个分组的物种分类结果,筛选特别关注的物种(默认选择最大相对丰度前 10 的属)进行物

表 2 各生长阶段粪便样品的 Tags 和 OTUs 数目统计表

Table 2 Tags and OTUs number of stool samples at each growth stage

生长样品	阶段编号	总 Tags 数目	注释信息的 Tags 数目	无注释信息的 Tags 数目	不聚类的 Tags 数目	OTUs 数目
10 日龄	C.1	32 901	31 947	3	951	753
	C.2	33 405	32 107	0	1 298	842
	C.3	39 082	35 772	0	3 310	1 070
	C.4	35 144	32 471	0	2 673	968
12 周龄	B.1	31 932	30 827	0	1 105	794
	B.2	31 480	30 425	0	1 055	847
	B.3	30 444	29 393	0	1 051	787
	B.4	33 749	32 797	0	952	562
23 周龄	L.1	29 171	28 528	0	643	508
	L.2	35 929	35 000	0	929	478
	L.3	43 124	41 218	0	1 906	932
	L.4	38 230	36 862	0	1 368	967
52 周龄	P.1	37 274	34 321	0	2 953	1 021
	P.2	31 709	29 213	0	2 496	981
	P.3	43 610	40 443	0	3 167	950
	P.4	33 638	32 528	0	1 110	881

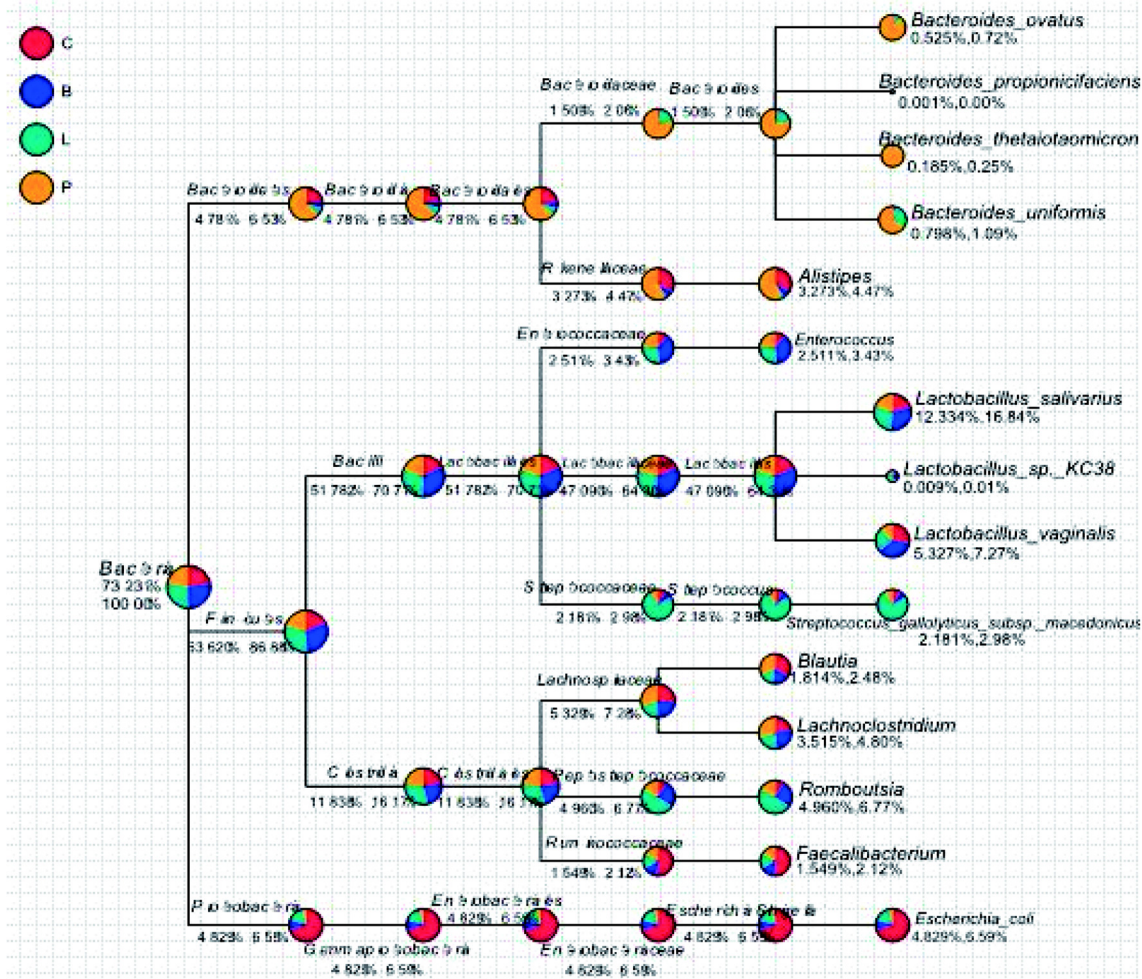
注: Total Tags 指每个样品的总 Tags 数目(等同于 Effective Tags, 每个样品用于 OTU 聚类后续分析的有效数据); Taxon Tags 指用于构建 OTUs 并且获得注释信息的 Tags 数目; Unclassified Tags 指没有获得注释信息的 Tags 数目; Unique Tags 指频数为 1, 并且无法被聚类到 OTUs 的 Tags 数目(无法聚类到 OTUs 的序列将不用于后续分析); OTU 数目: 指每个样品得到的 OTUs 数目。

种分类树统计, 分组的物种分类树见图 1。如图所示, 总体展现了组间菌的种类在各个分类水平上的分布及所占比例。厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)和拟杆菌门(*Bacteroidetes*)占有物种的百分率为 63.62%、4.83% 和 4.78%。乳酸菌属(*Lactobacillus*)、*Romboutsia*、大肠志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、*Alistipes*、链球菌属(*Streptococcus*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、肠球菌(*Enterococcus*)、*Lachnoclostridium*、*Blautia* 和 *Faecalibacterium* 占有物种的百分率为 47.10%、4.96%、4.82%、3.27%、2.18%、1.51%、2.51%、3.52%、1.81% 和 1.55%。

2.2 各时期 SPF 鸡粪便群落特征

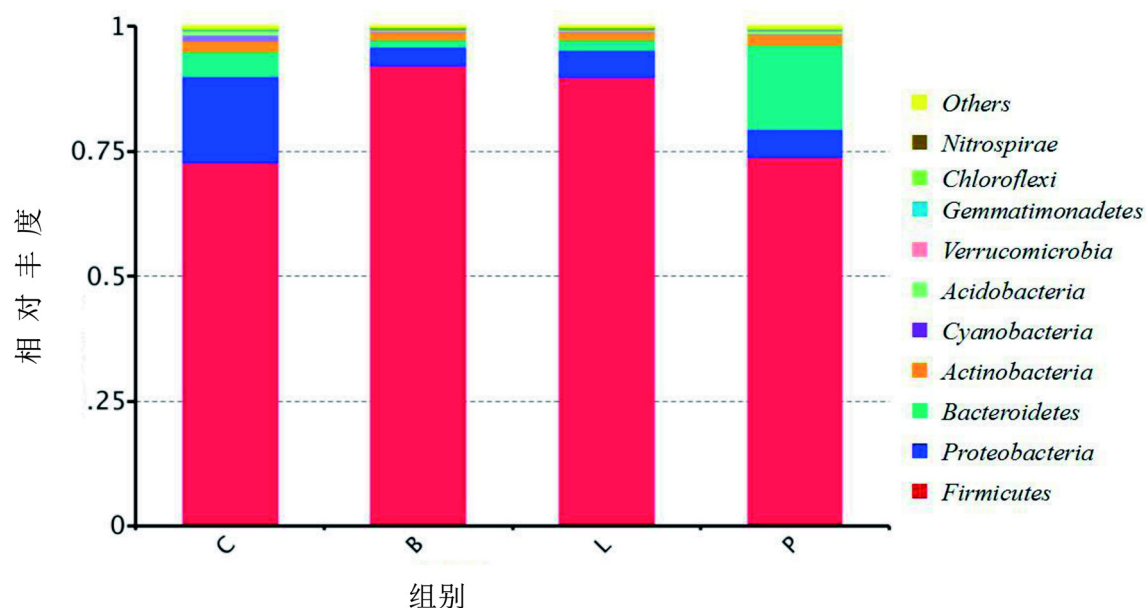
2.2.1 物种相对丰度展示 选取门(图 2)和属(图 3)

水平最大丰度排名前10的物种生成的物种相对丰度柱形图。从图 2 中可知, 排名前十的菌群为厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)、酸杆菌门(*Acidobacteria*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)、绿弯菌门(*Chloroflexi*)和硝化螺旋菌门(*Nitrospirae*)。B 组和 L 组的厚壁菌门(*Firmicutes*)丰度分别显著高于 C 组($P=0.022$; $P=0.024$)和 P 组($P=0.034$; $P=0.042$); P 组拟杆菌门(*Bacteroidetes*)丰度显著高于 B($P=0.044$)组和 L 组($P=0.046$); C 组和 P 组的芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)丰度显著高于 B 组($P=0.025$; $P=0.041$)。其余门的丰度各组间差异未达到显著水平($P>0.05$)。



圆圈中不同颜色的扇形表示不同的分组, 对应左侧图例; 扇形的大小表示该分类上相对丰度的比例大小; 分类名下方的数字表示所有分组在该分类上的平均相对丰度百分率, 有两个数字, 前者表示占有物种的百分率, 后者表示占有所选物种的百分率

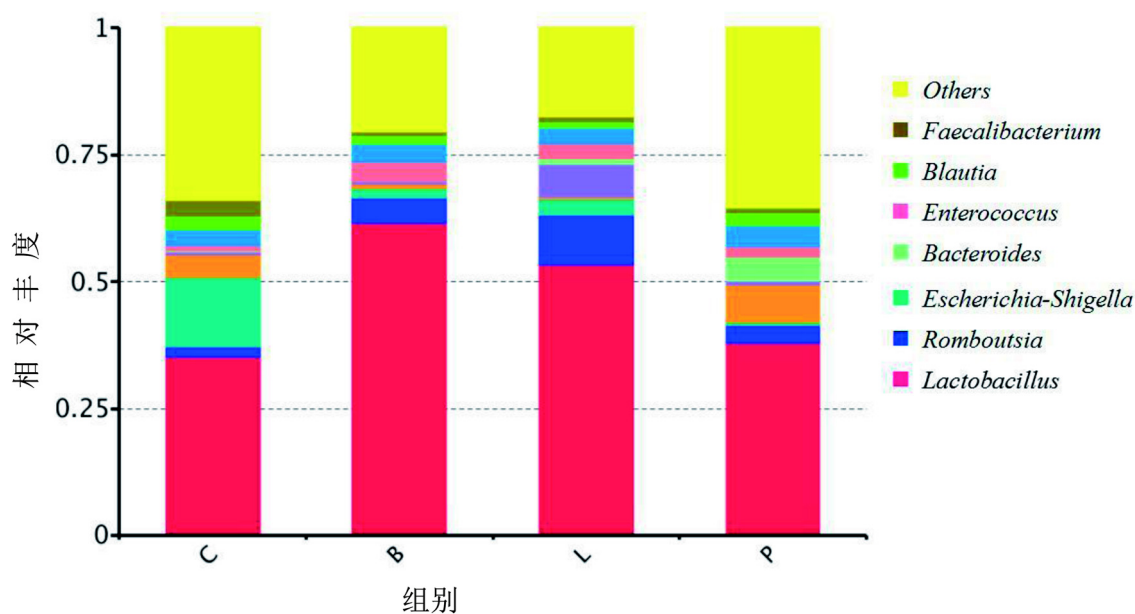
图 1 分组物种分类树
Figure 1 Classification tree of each group



Others 表示图中这 10 个门之外的其他所有门的相对丰度之和

图 2 样品在门水平物种相对丰度

Figure 2 Relative abundance of species in phylum level



Others 表示图中这 10 个属之外的其他所有属的相对丰度之和

图 3 样品在属水平物种相对丰度

Figure 3 Relative abundance of species in genus level

从图 3 中可知, 排名前十的菌群为乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、*Romboutsia*、大肠志贺氏菌属 (*Escherichia-Shigella*)、*Alistipes*、链球菌属 (*Streptococcus*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、肠球菌 (*Enterococcus*)、*Lachnoclostridium*、*Blautia*、*Faecalibacterium*。B 组乳酸菌属 (*Lactobacillus*) 丰度

显著高于 P 组 ($P=0.022$) 和 C 组 ($P=0.021$); L 组链球菌属 (*Streptococcus*) 丰度显著高于 C 组 ($P=0.016$)、B 组 ($P=0.016$) 和 P 组 ($P=0.017$); P 组拟杆菌属 (*Bacteroides*) 丰度显著高于 C 组 ($P=0.033$) 和 B 组 ($P=0.032$); B 组肠球菌 (*Enterococcus*) 显著高于 C 组 ($P=0.029$)。其余属的丰度各组间差异未达到显著

水平($P>0.05$)。

2.2.2 各时期 SPF 鸡粪便群落的 α -多样性 稀释曲线可直接反映测序数据量的合理性，并间接反映样品中物种的丰富程度。全部样本的稀释曲线如图 4 所示，每组样品的稀释曲线均趋于平缓或接近平台期，说明测序数据量渐进合理。

等级丰度(Rank Abundance)曲线可直观地反映

样品中物种的丰富度和均匀度，在水平方向上，物种的丰富度由曲线的宽度来反映，物种的丰富度越高，曲线在横轴上的跨度越大；在垂直方向上，曲线的平滑程度，反映了样品中物种的均匀程度，曲线越平缓，物种分布越均匀。本实验样本的等级丰度曲线如图 5 所示。4 组样本曲线走势相似，各组粪便样本具有相似的丰度和均匀度。

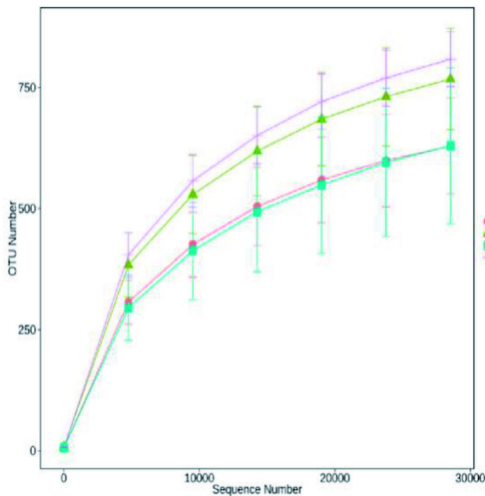


图 4 稀释曲线
Figure 4 Rarefaction curves of samples

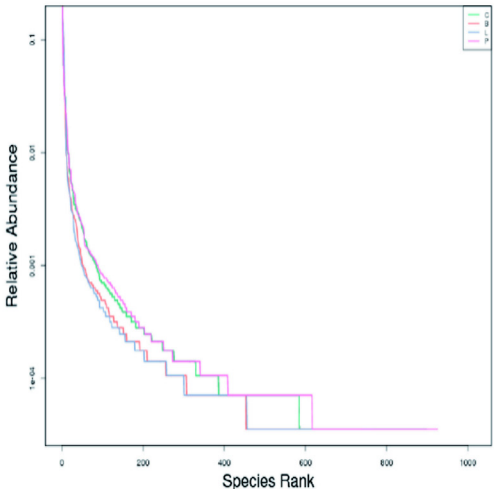
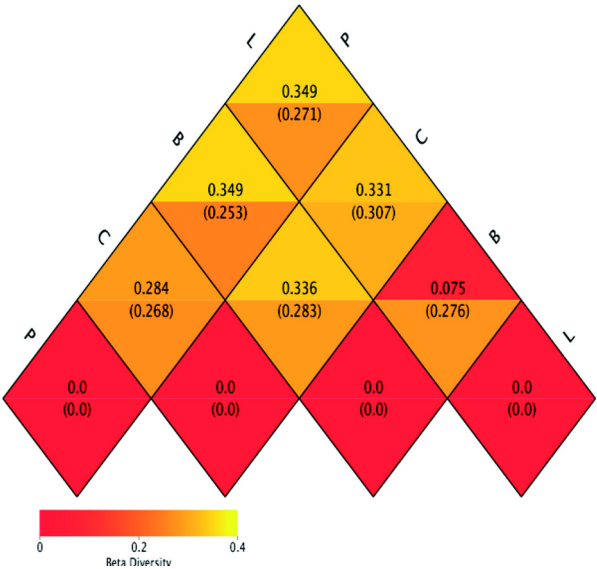


图 5 等级丰度曲线
Figure 5 Rank Abundance distribution

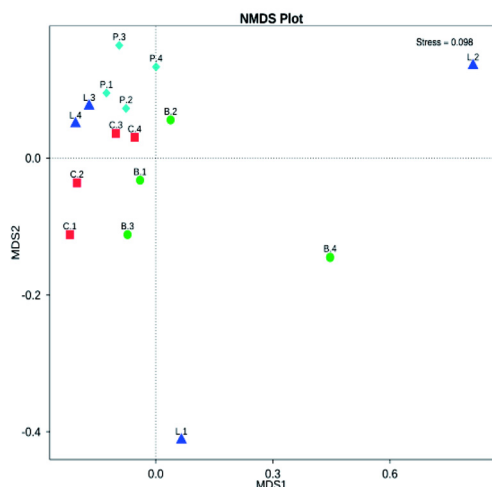
2.2.3 细菌群落结构的相似性分析 β -多样性研究中，选用加权 Unifrac 距离(Weighted Unifrac)和不加权 Unifrac 距离(Unweighted Unifrac)两个指标来衡量两个组间的相异系数，其值越小，表示这两个样品在物种多样性方面存在的差异越小。以 Weighted Unifrac 和 Unweighted Unifrac 距离绘制的 Heatmap 展示结果见图 6，以 Weighted Unifrac 差异排序为 BL<CP<CL<BC<BP=LP，随着年龄的增长，粪便菌群物种多样性差异无明显趋势。

非度量多维标定法(NMDS)是非线性模型，其设计目的是为了克服线性模型(包括 PCA、PCoA)的缺点，更好地反映生态学数据的非线性结构。应用 NMDS 分析，根据样本中包含的物种信息，以点的形式反映在多维空间上，而对不同样本间的差异程度，则是通过点与点间的距离体现，能够反映样本的组间和组内差异等。基于 OTU 水平的 NMDS 分析结果展示见图 7。不同时期分组组大致可以分开，部分组别聚集程度较好，如 C 组和 P 组，但部分组仍存在交叠现象；部分样品组内聚集



图中方格中的数字是样品两两之间的相异系数，相异系数越小的两个样品，物种多样性的差异越小；同一方格中，上下两个值分别代表 Weighted Unifrac 和 Unweighted Unifrac 距离

图 6 β -多样性指数热图
Figure 6 Heat maps of beta diversity



注: 图中的每个点表示一个样品, 点与点之间的距离表示差异程度, 同一个组的样品使用同一种颜色表示。Stress 小于 0.2 时, 说明 NMDS 可以准确反映样品间的差异程度

图 7 NMDS 分析

Figure 7 NMDS analysis

程度不好, 需进一步加大样本进行分析。

3 讨论

SPF 鸡通常不存在对实验研究可能产生干扰的微生物, 而且鸡对各种病原敏感, 且反应一致, 重复性好。因此, 为禽病致病机理研究、免疫机理研究、流行毒株的致病性研究、疫苗的制备和鉴定、检测试剂制备、禽病治疗用制品等工作提供基础^[5]。SPF 鸡除了不携带国家标准规定的 19 种病原以外, 还应维持种群及健康的稳定。目前, 肠道被认为是机体最重要的防御器官, 在吸收营养物质的同时, 阻止肠腔内细菌及其内容物对机体的侵袭, 为机体内环境的稳定及健康提供保障。最新研究表明, 肠道微生物对机体的影响, 不仅局限于肠道本身, 其种类以及多样性直接调节宿主的免疫功能、代谢功能及神经调节^[6]。与正常鸡群相比, SPF 鸡特殊的无菌饲养环境及灭菌的无动物性原料饲料配方, 都对其肠道发育和菌群产生影响。

SPF 鸡胚胎孵化出壳后, 即饲养于无菌正压隔离器中, 尽管环境、水与饲料无菌, 但在 10 日龄雏鸡的粪便中, 仍旧检测到大量的多样的菌群, 其 OTU 数与 52 周龄鸡接近, 且高于 12 周龄和 23 周龄。雏鸡出壳前其消化道是无菌的, 出壳后约 1 h, 就可在嗉囊、腺胃中检出细菌^[7], 随后出现细菌的

大量繁殖, 在生长过程中, 经胃肠道内厌氧环境和饲料刺激, 从而达到本研究检测到的水平, 其他菌群一并随着年龄的增长而变化。

本研究表明, 10 日龄时, 在肠道菌群中, 厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)占优势比例, 这之前报道^[8]的很多哺乳动物及一般饲养环境鸡的菌群的状况一致。本研究中变形菌门(*Proteobacteria*)的丰度比例 10 日龄高于 12 周龄、23 周龄和 52 周龄, 但差异未达到显著水平。研究表明, 厚壁菌门/拟杆菌门的比例, 与肥胖相关^[9], 体制含量高的人比例高, 而 52 周龄时厚壁菌门/拟杆菌门的比例显著低于 12 和 23 周龄, 推断脂肪被动员用作母鸡的产蛋或公鸡的性机能维持。85 日龄散养大骨公鸡盲肠菌群中芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)丰度是笼养的 3.25 倍^[10], 鸡的粪肥中同样检测到芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)的存在^[11]。本研究结果表明高龄和低龄 SPF 鸡粪便中芽单胞菌门(*Gemmatimonadetes*)显著高于 12 周龄。

李犹平^[12]利用 ERIC-PCR 指纹图谱技术研究鸡肠道微生物群落结构的变化, 其结果显示鸡肠道菌群主要由乳酸杆菌、拟杆菌、大肠杆菌及肠球菌四类细菌组成。与此结论相类似, 本研究不同时期差异显著的菌群为乳酸杆菌、拟杆菌及肠球菌。生理有益菌^[1]乳杆菌属(*Lactobacillus*), 可以发酵碳水化合物产生乳酸, 阻止病原菌对肠道的入侵和定植, 抑制病原菌, 抗感染, 维持肠道的微生态平衡, 保护肠道黏膜屏障, 增强机体免疫力, 促进消化等^[13]。在属水平上, 各周龄占比分别为 10 日龄 35.27%、12 周龄 61.58%、23 周龄 53.47% 和 52 周龄 38.04%, 乳杆菌属(*Lactobacillus*)是绝对优势菌群, 且 12 周龄时丰度显著高于 10 日龄和 52 周龄。1 日龄岭南黄肉鸡基础日粮 +50 mg/kg 硫酸新霉素(干品效价为 675 U/mg)饲养 42 日后, 回肠粘膜乳杆菌属(*Lactobacillus*)较未添加硫酸新霉素组显著增加, 达到 49.46% 成为优势菌群^[14]。与之相比, SPF 鸡无需添加药物, 肠道有益菌占比已达最大。靳利娥等^[15]利用酸性培养基对筛选出鸡嗉囊内的内源益生菌为细菌的链球菌属(*Streptococcus*)、乳酸的杆菌属、真菌的酵母菌。本研究显示 23 周龄的链球菌属(*Streptococcus*)占 6.61%, 显著高于其他时间点(10 日龄 0.76%、12 周龄 0.62% 和 52 周龄 0.73%)。1 日龄罗曼粉壳蛋鸡基础日粮分别添加 1×10^7 CFU/g

枯草芽孢杆菌、戊糖片球菌和植物乳杆菌饲养 32 周,盲肠内容物拟杆菌属(*Bacteroides*)为优势菌群,本研究中 SPF 鸡粪便菌群拟杆菌属(*Bacteroides*)为 10 大优势菌群之一,其与自然饲养环境下鸡添加益生菌的效果和比例近似。肠球菌属(*Enterococcus*)目前被认为是肠道有益菌之一,具有抑制大肠杆菌、痢疾杆菌和金黄色葡萄球菌等致病菌的生长,起到调整肠道菌群失调的作用^[16]。本研究中肠球菌属丰度在 12 周龄时(3.82%)显著高于 10 日龄(1.07%),在无有害菌威胁的情况下,有益菌占据肠道并大量增值,23 周龄(2.88%)和 52 周龄(2.28%)时同样维持较高水平。本实验中对于 SPF 鸡性别引起的粪便菌群差异未作进一步研究,可作为下一步的研究内容。

本研究利用 HiSeq 测序技术对中国农业科学院哈尔滨兽医研究所国家禽类种子中心饲养的健康 SPF 鸡不同时期肠道菌群变化进行分析,揭示了粪便菌群的丰度和多样性,为 SPF 鸡的肠道健康及品质评定提供参考,为鸡群的生物安全监测提供依据。

参考文献:

- [1] Aazami N, Kalantar E, Poormazaheri H, et al. Selection and characterization of potential probiotic *Lactobacilli* spp isolated from chicken feces may be used as a potent antibacterial agent[J]. Asian J Dairy Food Res, 2016, 35(1):50-57.
- [2] Li B, Zhang X, Guo F, et al. Characterization of tetracycline resistant bacterial community in saline activated sludge using batch stress incubation with high-throughput sequencing analysis[J]. Water Res, 2013, 47(13):4207-4216.
- [3] Lozupone C, Lladser ME, Knights D, et al. UniFrac: an effective distance metric for microbial community comparison[J]. ISME J, 2011, 5(2):169-172.
- [4] Lozupone CA, Hamady M, Kelley ST, et al. Quantitative and qualitative diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities[J]. AEM, 2007, 73(5):1576-1585.
- [5] 翟新验, 曲萍, 马英, 等. SPF 鸡在禽病防控中的应用[J]. 实验动物科学, 2013, 30(4):59-61.
- [6] Kurath G. Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals.[J]. Rev Sci Tech, 2008, 27(1):175-196.
- [7] 何昭阳, 王增辉, 吴延春, 等. 雏鸡消化道主要正常菌群定植规律的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(1):41-48.
- [8] Qu A, Brulc JM, Wilson MK, et al. Comparative metagenomics reveals host specific metavirolomes and horizontal gene transfer elements in the chicken cecum microbiome [J]. PLoS One, 2008, 3(8):e2945.
- [9] Feng ZM, Li TJ, Wu L, et al. Monosodium L-Glutamate and dietary fat differently modify the composition of the intestinal microbiota in growing pigs [J]. Obes Facts, 2015, 8(2): 87-100.
- [10] 肖海蒂, 许云贺, 张莉力, 等. 不同饲养方式对大骨鸡盲肠细菌区系影响的研究[J]. 饲料研究, 2015 (23):41-45.
- [11] Pecchia J, Cortese R, Albert I, et al. Investigation into the microbial community changes that occur in the casing layer during cropping of the white button mushroom, *Agaricus bisporus*. [C]// International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products. India (New Delhi), 2014: 309-313.
- [12] 李犹平. 采用 ERIC-PCR 技术研究鸡白痢、新城疫感染雏鸡及健康鸡肠道菌群结构[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
- [13] 谭诺研. 一种中药复方对文昌鸡肠道菌群影响的研究[D]. 广州: 华南农业大学, 2016.
- [14] 容庭, 刘志昌, 王刚, 等. 亚剂量硫酸新霉素对黄羽肉鸡回肠黏膜菌群组成的影响[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47(11): 2301-2309.
- [15] 靳利娥, 于连林, 鲍卫仁. 鸡嗉囊中内源益生菌的初步筛选分离[J]. 生物技术, 2008, 18(1):34-36.
- [16] 李天杰. 益生菌对蛋鸡生产性能及肠道微生物变化与基因表达研究[D]. 四川: 四川农业大学, 2016.

Composition and Diversity of Fecal Microflora in SPF Chickens at Different Growth Stages

ZHOU Yan^{1,2}, DIAO Chen-xi^{1,3}, ZHANG Yuan-yuan¹, YU Hai-bo¹,

LU Tao-feng¹, ZHAO Li-li¹, CHEN Hong-yan¹

(1. Division of Laboratory Animal and Comparative Medicine, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology/Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory

Animal and Comparative Medicine, Harbin Veterinary Research Institute,

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China;

2. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

3. College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mu Danjiang 157011, China)

[Abstract] Objective To provide the composition and diversity of intestinal flora at different growth stages of SPF chickens. **Methods** The feces of SPF chickens at 10 d , 12 weeks , 23 weeks and 52 weeks old were collected. The two hypervariable regions (V3-V4) of the 16S rRNA of the samples were sequenced using the Illumina HiSeq 2500 platform, and the alpha diversity, beta diversity and fecal community characteristics were analyzed. **Results** The fecal flora sample at four time points had similar high abundance and good uniformity and there was no significant difference in species diversity between the two groups ($P>0.05$). More than 95% of abundance were found in *Firmicutes*, *Proteobacteria* and *Bacteroidetes*; *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacteroides*, and *Enterococcus* were dominant species, and the abundance of different periods were significantly different ($P<0.05$). **Conclusions** The feces flora of SPF chicken at different growth stages are diverse, and the dominant bacteria are mainly beneficial bacteria. The experimental results are expected to provide the basis for assessing the quality, health monitoring and safety evaluation of SPF chickens.

[Key words] SPF chicken; Different growth stages; Feces microbiota; 16s rRNA; Illumina HiSeq 2500 platform

鹅细小病毒 VP3 蛋白抗血清的制备及在鸭胚和鸭胚成纤维细胞中的增殖研究

牛银杰, 刘柏含, 赵丽丽, 孙 畅, 陈洪岩

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室/黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 实验动物与比较医学创新团队, 哈尔滨 150069)

[摘要] 目的 制备鹅细小病毒(GPV) VP3 衣壳蛋白的兔抗血清, 在绍兴麻鸭鸭胚及其成纤维细胞中成功增殖 GPV。方法 根据 GPV H 分离株的 VP3 基因序列构建原核表达载体 pET3a-VP3, 诱导纯化 VP3 蛋白, 皮下注射免疫新西兰白兔, 收集和纯化 VP3 抗血清, 经 Western blotting 检测 VP3 抗血清与 VP3 蛋白的反应性。GPV H 株鹅胚尿囊液接种 SPF 绍兴麻鸭胚和其成纤维细胞, 通过 PCR 反应和间接免疫荧光方法, 检测 GPV 在鸭胚及其成纤维细胞中的增殖。结果 成功制备了 VP3 的兔抗血清, 同时 GPV 在鸭胚及其成纤维细胞中进行良好增殖。结论 VP3 抗血清的制备及 GPV 在绍兴麻鸭鸭胚及成纤维细胞中的增殖实验为 GPV 分子生物学特性及致病机制的研究奠定基础。**[关键词]** 鹅细小病毒(GPV); VP3 基因; VP3 抗血清; 增殖

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0240-04

小鹅瘟(Gosling plaque), 是由鹅细小病毒(goose parvovirus, GPV)引起的一种急性、高度接触性、败血性传染病, 该病具有病程短、传染性强、传播快、死亡率高特点^[1]。GPV 属于细小病毒科, 细小病毒属, 病毒粒子为六角形或球形, 无囊膜, 其基因组为单链、线性 DNA, 大小约 5.2 kb, 由两个开放读码框组成, 右侧读码框编码衣壳蛋白 VP1, VP2 和 VP3, 左侧编码非结构蛋白 NS1 和 NS2^[2]。其中 VP3 衣壳蛋白是 GPV 的主要衣壳蛋白, 约占衣壳蛋白总量的 80%, 是主要免疫保护型抗原蛋白^[3-5]。目前, GPV 的夹心 ELISA 方

法还未建立, 因此 VP3 抗血清的制备是十分必要。

GPV 对体外培养物的专一性很强, 初代分离培养 GPV 时, 只能用鹅胚、番鸭胚及鸭胚成纤维细胞(DEFs), 其他细胞和禽胚均不能使其增殖。GPV 经鹅胚连续培养十几个代次后, 在 DEFs 中培养, 不能形成病变, 培养物中病毒的滴度也很低。病毒分离及繁殖的局限阻碍了 GPV 致病机制及其生物学特性的研究。

本实验在麻鸭胚及其 DEFs 培养增殖 GPV, 利用原核表达系统表达 VP3 蛋白, 制备 VP3 兔抗血清, 为 GPV 诊断方法的建立及其致病机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和实验动物

质粒 pET30a 由本实验室保存, DEFs 由本实验室制备; 绍兴麻鸭鸭胚取自哈尔滨兽医研究所实验动物中心[SCXK(黑)2011-008], [SYXK(黑)2011-022]; 感受态细胞 BL21(DE3)和 DNA marker 购自 TaKaRa 公司。SPF 新西兰白兔购自长春生物制品有限公司[SCXK(吉)-2013-0002]。

[收稿日期] 2017-04-06

[基金项目] 国家科技支撑计划(2015BAI07B02-02); 中国农业科学院基本科研业务费专项(Y2016PT41); 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD2016006)

[作者简介] 牛银杰(1987-), 女, 博士研究生, 研究方向: 预防兽医学。E-mail: niuyinjie0530@163.com;
共同第一作者: 刘柏含(1992-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 微生物学。E-mail: liubaihan456@163.com

[通讯作者] 陈洪岩(1963-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: chenhongyan@caas.cn

1.2 主要试剂和培养基

T4 DNA 连接酶和限制性内切酶购自美国 NEB 公司。质粒提取试剂盒和 PCR 产物纯化试剂盒购自全式金公司, DNA 提取试剂盒购自美国 Omega 公司。弗氏完全佐剂和不全佐剂购自德国 Sigma 公司。异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)购自索莱宝。兔源红外标记抗体购自 LI-COR 公司。

1.3 病毒的增殖

200 μ L GPV 尿囊液接种 8 个 11 日龄绍兴麻鸭, 记录鸭胚的死亡情况, 并观察胚体的变化。同时在 DEFs 上接种 GPV, 观察细胞的病变情况。收取尿囊液和细胞上清, 提取病毒 DNA, 进行 PCR 鉴定。

1.4 载体的构建和鉴定

根据 H 株 VP3 基因序列设计上下游引物, 上游: CGGGATCCATGGCAGAGGGAGGAGGCGGAG-CTT(下划线为酶切位点); 下游: CCAAGCTTTTAC-AGATTTTGTAGTATATCTG(下划线为酶切位点) 扩增 VP3 基因。将扩建成成功的 VP3 与载体 pET30a 进行双酶切, 凝胶回收后, 使用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 过夜连接。将连接产物转化感受态 BL(DE3), 挑取菌落 PCR 鉴定阳性菌, 经测序鉴定成功的重组质粒命名为 pET 30a-VP3。

1.5 重组蛋白诱导纯化

将活化后的重组菌液 1:100 转接至 100 mL 含 100 mg/L Kana 的 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养至 $A_{600}=0.4\sim 0.6$, 1:100 加入诱导剂 IPTG, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h。将培养的菌液进行蛋白纯化。

1.6 抗血清的制备

将纯化好的蛋白与等体积的弗氏佐剂充分乳化后, 每只兔 1 mg 的用量进行背部皮下多点注射。初次免疫使用完全佐剂, 二次和三次免疫使用不完全佐剂, 其时间间隔为 2 周。经兔耳缘静脉采血, 采用间接 ELISA 测定兔血清效价。三次免疫后间隔 1 周加强免疫, 心脏采血, 分离血清, 分装后保存备用。

1.7 Western blotting 鉴定抗血清的反应原性

分别收集少量诱导表达纯化的蛋白样品, 进行 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 用半干法将蛋白转到硝酸纤维素膜(NC 膜)上, 进行封闭 2 h, 洗膜 3 次每次 5 min 后, 加入 1:200 稀释的兔抗血清室温孵育 2 h, PBST 漂洗一抗后加入 1:8 000 稀释兔源红外标记抗体, 室温温育 1 h, 洗膜 3 次后, 红外扫描保存结果。

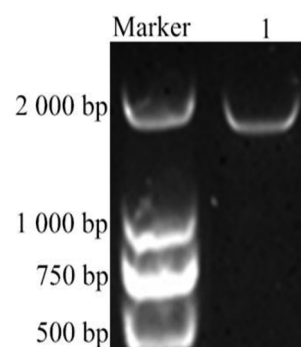
1.8 间接免疫荧光检测

制作原代 DEFs 细胞, 消化细胞均匀铺在 6 孔板中, 细胞长至 80%~90%, 接种 100 个 50% 组织细胞感染量(TCID₅₀) GPV, 37 $^{\circ}$ C 体积分数 5% CO₂ 温箱中培养 48 h 后, VP3 抗血清为一抗, 异硫氰酸荧光素(FITC)标记羊抗兔 IgG 为二抗, 利用倒置荧光显微镜观察。

2 结果

2.1 病毒的增殖情况

GPV 接种鸭胚 4 d 后, 无鸭胚死亡, 观察胚体无明显病变, 与对照一致。而 DEFs 在 120 h 出现病变。提取尿囊液核酸, PCR 鉴定在 1 605 bp 位置出现条带(图 1), 证明 GPV 在鸭胚中进行了良好的增殖。



Marker=2 000 bp, 1= 尿囊液 PCR 鉴定条带

图 1 GPV 增殖的 PCR 鉴定

Figure 1 Identification of GPV replication by PCR

2.2 原核载体 pET30a-VP3 的鉴定及 VP3 蛋白表达

pET30a-VP3 测序结果正确。诱导表达蛋白经过纯化大小与预期 VP3 蛋白大小一致, 约为 70 000, 证明成功表达 VP3 蛋白(图 2)。

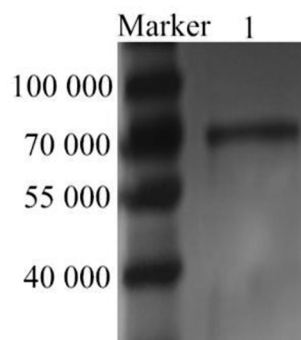


图 2 重组 VP3 蛋白的 SDS-PAGE 的鉴定

Figure 2 Identification of recombinant VP3 protein by SDS-PAGE

2.3 Western blotting 鉴定多克隆抗体的特异性检测

Western blotting 结果表明兔多抗具有特异性和良好的反应原性(图 3)。

2.4 间接免疫荧光

VP3 抗血清与接种 GPV 的 DEFs 反应良好,与没有接种的细胞无反应(图 4)。进一步说明 GPV 在 DEFs 中具有良好的增殖。

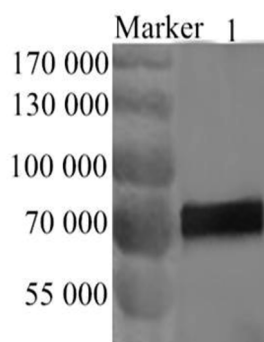
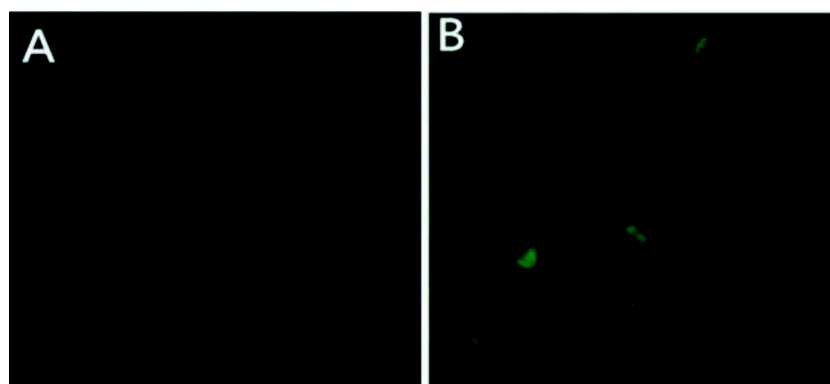


图 3 VP3 的 Western blotting 鉴定
Figure 3 VP3 identification of Western blotting



A: 对照组; B: 孵育 GPV 的 DEFs

图 4 VP3 的间接免疫荧光鉴定

Figure 4 VP3 identification of Indirect immunofluorescence

DEFs 增殖 GPV, 结果表明, GPV 能在麻鸭胚及其 DEFs 进行良好的增殖。GPV 在麻鸭胚及其 DEFs 的增殖为 GPV 致病机制的研究奠定了基础。

GPV 的基因编码衣壳蛋白 VP1, VP2 和 VP3, 他们有共同的羧基端。其中 VP3 是主要结构蛋白, 约占总蛋白的 80%^[7]。VP3 蛋白氨基酸序列大多位于病毒粒子的表面, 含有 GPV 的主要抗原决定簇, 可以诱导产生中和抗体^[8]。为了构建夹心 ELISA 方法, 作者构建了原核表达载体 pET30a-VP3, 诱导表达了 VP3 蛋白, 免疫新西兰白兔, 制备了 VP3 兔抗血清。VP3 蛋白和 VP3 抗血清的成功制备, 为 VP3 蛋白单抗的制备及其诊断方法的建立提供了便利条件。

参考文献:

- [1] 吴清民. 兽医传染病学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2002:312-315.
- [2] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 第2版. 北京: 科学出版社, 1997:1165-1167.
- [3] Le Gall-Recule G, Jestin V, Chagaud P. Expression of

3 讨论

GPV 的自然宿主是鹅和番鸭, 所有品系的家鹅均易感, 除番鸭和莫斯科鸭外, 其他动物均无易感性^[6]。GPV 在进行初次分离时, 只能用鹅胚和番鸭胚或是它们的原代成纤维细胞才能使它们增殖进行分离。在本研究中, 利用绍兴麻鸭及其

muscovy duck parvovirus capsid proteins (VP32 and VP33) in a baculovirus expression system and demonstration of immunity induced by the recombinant proteins[J]. J Gen Virol, 1996, 77(9):2159-2163.

- [4] 刘海霞, 刘海涛, 张靖, 等. 鹅细小病毒 NS2 基因以及 VP1 与 VP3 非重叠序列基因的真核表达[J]. 中国兽医科学, 2007, 37(9):772-776.
- [5] 许洪洁, 张鑫, 夏铭琦, 等. 小鹅瘟病毒 VP3 基因真核表达质粒在小鼠中的免疫效果[J]. 中国兽药杂志, 2008, 42(1):5-8.
- [6] Takehara K, Nakata T, Takizawa K, et al. Expression of goose parvovirus VP1 capsid protein by a baculovirus expression system and establishment of fluorescent antibody test to diagnose goose parvovirus infection[J]. Arch Virol, 1999, 144(8):1639-1645.
- [7] Le Gall-Recule G, Jestin W. Biochemical and genomic characterization of muscovy duck parvovirus[J]. Arch Virol, 1994, 139(1-2):121-131.
- [8] Zadori Z, Stefancsik R, Rauch T, et al. Analysis of the complete nucleotide sequences of goose and muscovy duck parvoviruses indicates common ancestral origin with adeno-associated virus 2[J]. Virology, 1995, 212(2):562-573.

Preparation of Goose Parvovirus VP3 Antiserum and Identification of Propagation in Duck Embryo and Duck Embryo Fibroblasts

NIU Yin-jie, LIU Bai-han, ZHAO Li-li, SUN Chang, CHEN Hong-yan

(Division of Laboratory Animal and Comparative Medicine, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology/Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

[Abstract] **Objective** To prepare antiserum against VP3 protein and propagate goose parvovirus (GPV) H in duck embryo and duck embryo fibroblasts (DEFs). **Methods** The prokaryotic expression vector pET30a-VP3 were constructed based on VP3 sequence of GPV H. VP3 protein was induced, expressed and purified, then immunized the New Zealand white rabbit. The VP3 antiserum was collected, purified and verified by Western blotting. GPV H fluid was inoculated into shaoxing duck embryo and DEFs, and the propagation of GPV was identified by PCR and indirect immunofluorescence. **Result** The VP3 antiserum was successfully prepared, and GPV H was well propagated in shaoxing duck embryo and DEFs. **Conclusion** VP3 antiserum preparation and GPV replication in duck embryo and DEFs may be provided basis for GPV molecular biological characteristic and pathogenic mechanism research.

[Key words] Goose parvovirus (GPV); VP3 gene; VP3 antiserum; Propagation

miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 在马立克氏病抗性与易感 SPF 鸡法氏囊组织的差异表达分析

王瑞琪^{1,2}, 廉传江², 易 诚^{1,2}, 韩凌霞², 杨春文¹, 陈洪岩²

(1. 牡丹江师范学院 生命科学与技术学院, 牡丹江 157011; 2. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室/黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 实验动物与比较医学创新团队, 哈尔滨 150069)

[摘要] 目的 在前期高通量测序分析的基础上, 进一步利用荧光定量 PCR 验证 miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 在马立克氏病(MD)抗性(B21 单倍型)与易感(B19 单倍型)鸡法氏囊组织的差异表达情况。方法 通过经优化后确定的最佳实时荧光定量 PCR 反应体系和扩增条件, 进行荧光定量 PCR 分析。结果 miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 荧光定量 PCR 结果与高通量测序结果上下调情况基本一致, 但差异表达显著性分析结果却不完全相同。结论 尽管差异表达显著性分析结果不完全一致, 但两种方法的结果均提示来源于同一前体的 miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 可能与 MD 抗性/易感性相关。

[关键词] miR-200b; 马立克氏病(MD); 抗性/易感性; 高通量测序; 荧光定量 PCR

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0244-05

马立克氏病(Marek's disease, MD)是由马立克氏病毒(Marek's disease virus, MDV)引起的一种高度传染的肿瘤性疾病。随着疫苗的应用, 该病对养禽业的影响逐渐减小, 但全球每年由于 MD 造成的经济损失依然巨大^[1]。近年来, 由于 MDV 毒性不断增强, 很可能导致现有疫苗免疫的失败, 如何改进防控策略已显得刻不容缓。因此, 必须了解病毒与宿主之间的相互作用, 从宿主角度深入研究 MD 遗传抗性的机制, 在遗传本质上提高家禽的抗病力。

miRNAs 是一类内源性的具有调控功能的非编

码小 RNA, 其通常作用于靶基因 mRNA 的 3'-UTR, 抑制靶基因翻译或引起其降解。miRNA 在几乎所有生物学过程中发挥重要功能。在多种病毒感染过程中, miRNA 通过对宿主或者病毒基因表达进行调控, 进而影响病毒在宿主体内的侵染致病过程。目前 miRNA 已作为一种有效靶标应用于癌症早期治疗和预后治疗^[2]。

本团队前期在细胞遗传学和群体遗传学研究的基础上, 以 SPF 鸡为基础培育成功了我国特有的禽类实验动物资源 B2、B19(易感)、B21(抗性)等 6 种 MHC-B 单倍型鸡群。免疫后 MDV 超强毒株 Md5 攻毒结果证实, 不同 MHC-B 单倍型鸡对 MD 具有显著的抗性差异。作者进一步选择 B21 和 B19 系 SPF 鸡为研究对象, 在 MDV(Md5)攻毒实验的基础上, 利用高通量测序技术分别构建了 B21 和 B19 鸡在非感染与感染状态下三个关键阶段(感染后 5 d、11 d、20 d)法氏囊组织 miRNA 差异表达谱, 在生物信息学分析的基础上, 筛选并鉴定可能与 MD 遗传抗性/易感性相关的 miRNAs。本文将利用荧光定量 PCR 方法验证高通量测序结果, 并进一步分析 miR-200b-3p

[收稿日期] 2016-11-23

[项目基金] 国家自然科学基金项目(31500997); 黑龙江省科技计划项目(PC13S04)

[作者简介] 王瑞琪(1991-), 男, 硕士研究生, 专业: 动物学。
E-mail: 870831997@qq.com

[通讯作者] 杨春文(1959-), 男, 博士, 专业: 动物学。

E-mail: yangchunwen@sina.com

陈洪岩(1963-), 男, 博士, 专业: 预防兽医学。

E-mail: chenhongyan@caas.cn

廉传江(1981-), 男, 博士, 专业: 实验动物学。

E-mail: lcj121916@163.com

和 miR-200b-5p 在 B21 与 B19 单倍型鸡感染过程中法氏囊组织的差异表达情况,为进一步探讨它们可能与 MD 抗性/易感性相关的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与毒株

B21 和 B19 单倍型 SPF 鸡保存于中国农业科学院哈尔滨兽医研究所国家禽类实验动物种子中心[SCXK(黑)2011-007], 马立克氏病毒 Md5 株由本实验室保存。

1.2 主要仪器和试剂

Bio-Rad 荧光定量 PCR 仪(美国 BIO-RAD 公司), Sigma 3-18K 型离心机(德国 Sigma 公司), 宝生物工程(大连 TaKaRa 公司)有限公司的反转录试剂盒(PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser)和 SYBR 染料法荧光定量试剂盒(SYBR Premix Ex Taq™)。

1.3 抗性鸡和易感鸡 Md5 体内感染实验

取 1 日龄 B21 单倍型和 B19 单倍型鸡各 40 羽, 随机分为正常对照组(命名为 B21C、B19C)和感染组(命名为 B21I、B19I), 感染组每羽腹腔接种 800 pfu MDV 超强毒株 Md5 细胞毒, 正常组和攻毒组分别饲养于负压生物安全二级禽隔离器[SYXK(黑)2011-022], 在接种后的 5 d、11 d 和 20 d (MDV 感染的三个重要时期, 分别为前期溶细胞期、潜伏期和后期溶细胞期)分别采集法氏囊组织。

1.4 抗性鸡和易感鸡法氏囊组织 miRNA 差异表达谱的构建与筛选

分别提取 5 d、11 d 和 20 d 各处理组 3 羽法氏囊组织总 RNA 混成池, 与华大基因公司合作完成 12 个小 RNA 文库 Solexa 高通量测序。获得 B19 和 B21 攻毒组、各攻毒组与对照组之间 miRNA 差异表达谱。根据差异表达谱筛选出 $\text{express reads} \geq 1\ 000$ (高表达)并且差异倍数(fold-change) ≥ 1 和 $\text{fold-change} \leq -1$ (差异显著)的 miRNA。

1.5 引物设计与合成

利用在线软件自主设计 miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 特异性反转录引物(RT)、荧光定量引物(正向与反向)和内参 U6 snRNA 引物, 引物由哈尔滨博仕生物公司合成, 引物序列如下:

miR-200b-3p RT 引物: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACATCATC-3';

miR-200b-5p RT 引物: 5'-GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTTCGCACTGGATACGACTCCAAT-3'。

miR-200b-3p 正向引物: 5'-GCGGGCTAATACCTGCCTGG-3';

miR-200b-5p 正向引物: 5'-GCGGGCTCTTACTGGGCAGC-3';

通用反向引物: 5'-ATCCAGTGCAGGGTCCGAGG-3'。

内参为 U6, 正向引物: 5'-GCTTCGGCAGCACA-TATACTAAAAT-3';

反向引物: 5'-CGCTTCACGAATTTGCGTGTCAT-3'。

1.6 荧光定量 PCR 检测体系建立

利用 Trizol 法分别提取 5 d、11 d 和 20 d 各处理组法氏囊组织总 RNA, 按试剂盒说明书进行反转录。以反转录好的 cDNA 为模板进行实时荧光定量 PCR, 采用经过优化后确定的最佳实时荧光定量 PCR 反应体系和扩增条件^[3]。反应体系: 正、反向引物各 0.5 μL , cDNA 模板 1 μL , SYBR Premix Ex Taq™ II 10 μL , DEPC H₂O 补至 20 μL 。扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 3 min, 1 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 40 个循环; 75 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 41 个循环。同时以 DEPC H₂O 代替 cDNA 为模板作为阴性对照。

1.7 统计学方法

荧光定量 PCR 差异倍数以 $^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算^[4]。所得数据应用 SPSS19 统计软件进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抗性鸡和易感鸡法氏囊组织 miRNA 差异表达谱的筛选

miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 在 B21 和 B19 单倍型鸡的 5 d、11 d、20 d 的正常组间均无显著差异, 在感染后的 5 d 和 11 d 也均不存在显著差异。但在 20 d, miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 在 B19 单倍型鸡感染后均显著上调, 而 B21 单倍型鸡感染后虽上调表达但差异未达到显著水平(表 1)。

2.2 荧光定量验证高通量测序

miR-200b-3p 荧光定量 PCR 结果显示, 仅 B19 感染后 11 d 和 B21 感染后 5 d 差异不显著($P > 0.05$), 其他各组间均差异显著(表 2)。miR-200b-5p 荧光定

表 1 高通量测序 miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 在 MD 抗性与易感鸡法氏囊组织的差异表达倍数

Table 1 The fold-change of miR-200b-3p and miR-200b-5p in bursa with Marek's disease resistance/susceptibility by Solexa sequencing

感染后时间/d	组别	miR-200b-3p	miR-200b-5p
		差异倍数	差异倍数
5	B21C-B19C	-0.70	-0.74
	B19C-B19I	-0.26	-0.25
	B21C-B21I	0.02	0.10
11	B21C-B19C	-0.68	-0.14
	B19C-B19I	0.02	0.30
	B21C-B21I	0.72	0.35
20	B21C-B19C	0.18	0.07
	B19C-B19I	2.36	2.32
	B21C-B21I	0.86	0.80

注: C 为正常组, I 为感染组即攻毒组; 差异倍数 >0 为上调, 差异倍数 <0 为下调; 差异倍数 ≥ 1 为差异显著上调, -1 ≤ 差异倍数 ≤ 1 为无显著差异, 差异倍数 ≤ -1 为差异显著下调

量 PCR 结果显示, 仅 B19 感染后 11 d 差异不显著 ($P>0.05$), 其他各组间均差异显著(表 2)。

表 1 和表 2 结果比较表明, 高通量测序结果中 B19 和 B21 感染后 miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 表达下调的有: B19 和 B21 感染后 5 d、11 d 二者对照组间; B19 感染后 5 d 感染组对照组间。其余表达均上调, 其中 B19 感染后 20 d 感染组对照组间差异显著上调。荧光定量 PCR 结果中 B19 和 B21 感染后 miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 表达下调的有: B19 和 B21 感染后 5 d、11 d 二者对照组间; B19 感染后 5 d 感染组对照组间, 其中 B19 感染后 11 d 感染组对照组间 miR-200b-5p 下调, 这是表 1 和表 2 miRNA 差异表达上、下调关系唯一不同。其余表达均上调。

3 讨论

miRNA-200 家族包括 miR-200a、miR-200b、miR-200c、miR-141 和 miR-429 共 5 个成员。多数

表 2 荧光定量 PCR 检测 miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 在 MD 抗性与易感鸡法氏囊组织的差异表达倍数

Table 2 The fold-change of miR-200b-3p and miR-200b-5p in bursa with Marek's disease resistance/susceptibility by qPCR

感染后时间/d	组别	miR-200b-3p		miR-200b-5p	
		差异倍数 $\bar{x} \pm s$	差异显著性	差异倍数 $\bar{x} \pm s$	差异显著性
5	B21C-B19C	-6.26 ± 0.17	**	-6.48 ± 0.08	**
	B19C-B19I	-1.38 ± 0.15	**	-2.34 ± 0.44	**
	B21C-B21I	0.01 ± 0.86	-	2.16 ± 0.33	**
11	B21C-B19C	-0.67 ± 0.29	*	-1.75 ± 0.26	**
	B19C-B19I	0.47 ± 0.59	-	-0.05 ± 0.33	-
	B21C-B21I	6.48 ± 0.69	**	3.02 ± 0.65	**
20	B21C-B19C	3.65 ± 0.74	**	1.11 ± 0.54	*
	B19C-B19I	11.45 ± 0.59	**	8.85 ± 0.41	**
	B21C-B21I	9.04 ± 0.59	**	8.59 ± 0.54	**

注: C 为正常组, I 为感染组即攻毒组; 差异倍数 >0 为上调, 差异倍数 <0 为下调; * $P<0.05$, ** $P<0.01$

文献支持 miRNA-200 水平的改变与肿瘤的恶化和细胞的存活相关^[5]。miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 具有同一个前体(发卡结构)。最近越来越多的文献表明: 位于同一发卡结构上的 5p 端和 3p 端可作用于相同或不同的靶基因, 发挥相同或不同的功能^[5]。miR-200b-3p 是从前体 3' 端加工而来, miR-200b-5p 则是从前体 5' 端加工而来。从以上结果中可以看出, miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 两者在相同组织中具有极为相似的表达趋势。这可能与二者同源有关。

MDV 通过呼吸系统进入宿主体内, 被下呼吸道的巨噬细胞吞噬后, 运输到胸腺、法氏囊和脾

脏等二级淋巴器官。在 B 淋巴细胞感染后 5~7 d 开始溶解, 激活的 T 淋巴细胞在此期受到感染, 称为早期溶细胞感染阶段。在感染后 7~10 d, MDV 潜伏在细胞里, 遗传抗性较强的鸡可能会长期停留在潜伏感染阶段, 在经历一个短暂的晚期溶细胞感染后(18~21 d), 形成肿瘤, 而敏感鸡体内病毒不断增殖, 未出现肿瘤即早期死亡^[6,7]。从表中可以得出, B19 品系感染组感染后 20 d 也就是晚期溶细胞期出现差异极显著性上调, 这可能与在晚期形成肿瘤有关, 导致感染组 miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 两者表达量急剧升高。

B21 和 B19 具有相同的遗传背景,但具有独特的 MHC-B 单倍型^[8-10],所选的 B21 为抗性鸡, B19 品系为易感鸡。从所得结果可知,在感染后期, B19 品系 miRNA 表达高于 B21 品系,说明 MDV 感染效果在 B19 品系鸡上更强。这可能与 B21 品系本身为抗性鸡系有关。

新一代高通量测序技术的发展日新月异^[11]。该技术可以对数百万个 DNA 分子进行同时测序。这使得对一个物种的转录组和基因组进行细致全貌的分析成为可能^[12]。目前国内外已有多个研究小组将高通量测序技术应用到了鸡 MD 致病过程研究中。通过对鸡胚成纤维细胞(CEF)、肿瘤(细胞、组织)及其他免疫器官(组织)等进行 miRNA 差异表达谱构建,从而筛选出一些与 MDV 侵染宿主过程中相关的 miRNA^[13]。

实时荧光定量 PCR 技术同样在现阶段应用广泛,在基因表达水平分析、突变和多态性研究、病原体的定性和定量检测等方面被科研人员认同。以操作简单、高灵敏度、高特异性、速度快著称^[14]。通过该技术同样可以对 MDV 宿主进行相关 miRNA 差异表达分析。从 miRNA 高通量测序结果来看, miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 仅在 B19 单倍型鸡感染后显著上调,其他各时间点组别均无差异表达。而在荧光定量 PCR 结果中,多数表现为存在显著差异。由此可见应用两种检测方法所得出的结果存在一定差异,而从 miRNA 上下调情况来看,两种检测方法又存在一致性。反映出这种差异表现在所得结果的差异显著性分析上。造成这种现象最可能的原因是由于两种检测方法检测方式的异同。荧光定量结果是经过多次重复实验所得,表 2 能通过荧光定量结果真实得出同源的两种 miRNA 在相同组织中感染后表达具有一致性,这也能反向证明荧光定量 PCR 结果的可靠性。

参考文献:

- [1] Morrow C, Fehler F. Marek's disease: a worldwide problem [M]. In: Davison F, Nair V (eds). Marek's disease: An evolving problem. London: Elsevier, 2004, 49-61.
- [2] Villanueva MT. Tumorigenesis: miRNAs - novel regulators in skin cancer[J]. Nat Rev Cancer, 2014, 15(1):5.
- [3] 高正琴,邢进,冯育芳,等. TaqMan MGB探针实时荧光定量 PCR 快速检测布鲁氏菌[J]. 中国人兽共患病学报, 2011, 27(11):995-1000.
- [4] 庾蕾,刘建平,庄志雄,等. 实时 RT-PCR 基因表达相对定量 REST(C)软件分析与 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法比较[J]. 热带医学杂志, 2007, 7(10):956-958.
- [5] 吴渊. microRNA-200 家族调控 AP-2 α 基因表达的研究 [D]. 长沙: 湖南师范大学, 2012.
- [6] Parvizi P, Abdul-Careem MF, Haq K, et al. Immune responses against Marek's disease virus[J]. China Poultry, 2012, 11(2):123-134.
- [7] Parvizi P, Abdul-Careem MF, Haq K, 等. 鸡抗马立克氏病毒免疫应答机制研究[J]. 中国家禽, 2012, 34(10):1-6.
- [8] 牛成明. MHC 特异单倍型 SPF 鸡群的建立及其对 MD 抗性的研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [9] 高彩霞. 不同 MHC 单倍型 SPF 鸡 MHC I 类和 II 类分子的差异表达与 MD 致病性的相关研究[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2012.
- [10] Gao C, Han L, Han J, et al. Establishment of six homozygous MHC-B, haplotype populations associated with susceptibility to Marek's disease in Chinese specific pathogen-free BWEL chickens[J]. Infect Genet Evol, 2014, 29:15-25.
- [11] 夏围围,贾仲君. 高通量测序和 DGGE 分析土壤微生物群落的技术评价[J]. 微生物学报, 2014, 54(12):1489-1499.
- [12] 王兴春,杨致荣,王敏,等. 高通量测序技术及其应用[J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(1):109-114.
- [13] 李新. miR-26a 和 miR-181a 在鸡马立克氏病肿瘤形成过程中的作用机制研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2014.
- [14] 周勇,曾令兵,孟彦,等. 大鲵虹彩病毒 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[J]. 水产学报, 2012, 36(05):772-778.

Differential Expression Analysis of miR-200b-3p and miR-200b-5p in Marek's Disease Resistant and Susceptible SPF Chickens

WANG Rui-qi^{1,2}, LIAN Chuan-jiang², YI Cheng^{1,2}, HAN Ling-xia², YANG Chun-wen¹, CHEN Hong-yan²

(1. College of Life Science and Technology, Mudanjiang Normal University, Mudanjiang 157011

2. Division of Laboratory Animal and Comparative Medicine, State Key Laboratory of

Veterinary Biotechnology/Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory

Animal and Comparative Medicine, Harbin Veterinary Research Institute,

Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

[Abstract] Objective To validate high throughput sequencing results by fluorescence quantitative PCR technique and analyze the expression of miR-200b-3p and miR-200b-5p in bursa, and explore possible molecular mechanism associated with Marek's disease (MD) resistance/susceptibility. **Methods** Through optimization, the ideal amplification conditions and reaction system of real-time fluorescence quantitative PCR were identified. **Results** miR-200b-3p and miR-200b-5p fluorescence quantitative PCR results and high throughput sequencing results were consistent in down-regulation, but not significant difference. miR-200b-3p and miR-200b-5p two homologous miRNA showed similar expression after infected by Marek's disease virus (MDV). **Conclusion** Although the difference is not consistent with the results of significant analysis, miR-200b-3p and miR-200b-5p may be associated with resistance / susceptibility of MD.

[Key words] MiR-200b; Marek's disease (MD); Resistance/susceptibility; High throughput sequencing; Fluorescence quantitative PCR

应用 PCR 方法快速鉴定 SPF 金定鸭性别

徐丽晶^{1,2}, 孙 畅¹, 陆涛峰¹, 陈洪岩¹, 赵丽丽¹

(1.中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室 /
黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 实验动物与比较医学创新团队,
哈尔滨 150069; 2. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030)

[摘要] 目的 利用 PCR 方法鉴定 SPF 金定鸭的性别。方法 根据已有报道合成一对禽类性染色体上的染色质解螺旋蛋白 DNA 结合蛋白 1(CHD1)基因的通用引物 gCHD。采集培育中的 85 只 SPF 金定鸭血液样品, 提取血液基因组 DNA, 进行 PCR 扩增。通过分析 PCR 扩增产物凝胶电泳后的条带数判定禽类性别。结果 PCR 扩增产物经琼脂糖电泳分析后, 雌性鸭样品扩增出 CHD1-Z 和 CHD1-W, 而雄性鸭样品只出现 CHD1-Z。结论 本文建立的方法可作为禽类性别的有效鉴定方法。

[关键词] SPF 金定鸭; 性别鉴定; PCR

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)03-0249-03

SPF 金定鸭饲养繁育过程中, 根据不同的生产需求, 需要对金定鸭的性别进行鉴定。提前鉴定 SPF 金定鸭性别, 不仅能够为饲养提供合理指导, 也能满足科研领域区分禽类性别的需求。目前鉴定禽类性别的分子生物学方法有很多, 如外观鉴定方法、鸣管鉴定方法、肛门揉捏鉴定方法和肛门反转鉴定方法等。其中外观及鸣管鉴定法得到的结果准确率较低, 在禽类性别鉴定中应用较少。肛门反转鉴定方法常被用于禽类性别鉴定, 但由于肛门反转鉴定方法操作规范较复杂, 对个体的应激较大且鉴定错误率较高^[1,2]。PCR 技术因其操作简便、灵敏度高, 只需从羽毛、血液和胚胎中提取微量 DNA 样品即可完成性别鉴定而被广泛应用于遗传育种的实验研究中^[3-5]。

家禽的性别由 W 和 Z 染色体决定。雌性和雄性基因型分别为 ZW 和 ZZ 类型。而传播给子代的 Z 和 W 的概率相同, 都是 50%^[2,6,7]。本研究根据

刘宏祥等^[8]对禽类性染色体上的 CHD1 基因, 设计了一对引物并通过扩增产物凝胶电泳后的条带数目和大小来快速、准确地鉴定禽类的性别。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 金定鸭血液样本由中国农业科学院哈尔滨兽医研究所实验动物中心[SCXK(黑)2011-007]提供, 其中 F0 代金定鸭 27 羽, 年龄 98 周, 体质量 3 kg。F1 代金定鸭 58 羽, 年龄 45 周, 体质量 2.0~2.5 kg。每个样品由鸭翅静脉分别取 1~2 mL 抗凝血, 存于 -20 °C 冰箱备用。

1.2 主要试剂

DL2000 DNA Marker 购自宝生生物工程(大连)有限公司; 血液基因组 DNA 提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司(D3392-01), 其它常规分子试剂购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.3 引物设计与合成

参照文献合成禽类的通用引物 gCHD^[8], 由哈尔滨博仕生物技术有限公司合成,

CHD1-Z: 5'-TGCAGAAGCAATATTACAAGT-3', 467 bp

CHD1-W: 5'-AATTCATTATCATCTGGTGG-3', 326 bp

1.4 血液基因组的提取

用血液基因组 DNA 提取试剂盒提取血液 DNA 样本。

[收稿日期] 2017-04-06

[基金项目] 国家科技支撑计划(2015BAI07B02-02); 中国农业科学院基本科研业务费专项(Y2016PT41); 黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD2016006)

[作者简介] 徐丽晶(1990-), 女, 硕士研究生。研究方向: 动物学。E-mail: 602943167@qq.com

[通讯作者] 赵丽丽(1983-), 女, 博士, 助理研究员。研究方向: 兽医微生物和免疫学。E-mail: zhaolili213@163.com

1.5 PCR 扩增及检测

PCR 反应体系: 共 25 μ L, 2 $\times$ Premix Taq 12.5 μ L, ddH₂O 8.5 μ L, 上下游引物(10 pmol/L)各 1 μ L, 提取的 DNA 模板 2 μ L。PCR 反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 51 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将扩增产物进行质量分数 2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用凝胶成像系统观察并记录结果。

1.6 性别鉴定

将 PCR 产物经过质量分数 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定, 根据条带数目及分子量, 判定个体的性别, 并与通过翻肛法及常规方法鉴定的性别进行对

照, 比较两种方法的优劣。

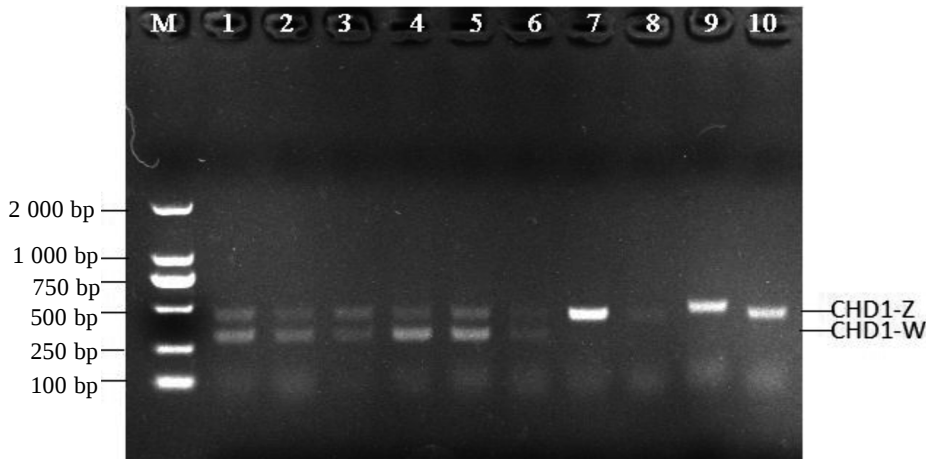
2 结果

2.1 PCR 检测

将 PCR 产物经过质量分数 2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果以 1-10 号鸭为例(图 1)。

2.2 性别鉴定结果

通过质量分数 2% 的琼脂糖凝胶电泳对 85 只 SPF 金定鸭进行性别鉴定, 以翻肛法及常规方法对相同 SPF 金定鸭个体进行性别鉴定, 将两种方法得到的结果进行对照。结果显示, PCR 鉴定与翻肛法及常规方法相比一致(符合率达 100%)(表 1)。



1~10: 鸭只编号
图 1 PCR 产物凝胶电泳图

表 1 翻肛法及常规方法与 PCR 鉴定法对金定鸭性别判定结果比较

方 法	代次和总个体数	
	雌性	雄性
翻肛法及常规方法	F0 : 18	9
	F1 : 38	20
PCR 法	F0 : 18	9
	F1 : 38	20

注: 表中分子法的性别鉴定是根据gCHD引物扩增产物凝胶电泳后的条带数目判定的, 并以这种方法为标准, 与翻肛法及常规方法判定的性别结果进行比较, 并给出两种方法的正确率

3 讨论

本实验根据已有文献报道^[8], 合成一对禽类的通用引物 gCHD, 选取 F0 和 F1 代共 85 只 SPF 金定鸭, 运用 PCR 方法对其进行性别鉴定, 并将翻

肛法及性状观察法所获得的结果进行比较, 结果表明两者符合率 100%。说明 PCR 方法可以用于 SPF 金定鸭的性别, 且灵敏度准确率均较高。王利红等^[9]根据已报道的位于家禽 W 染色体上保守的特异性基因片段对番鸭进行了性别鉴定, 得到的结果也充分证明了 PCR 方法准确度高, 可以用于番鸭性别鉴定。胡艳等^[10]也利用 CHD1 基因序列的 DNA 扩增片段长度多态性特点, 成功获得引物, 并通过实例验证了 PCR 方法在家鸭性别鉴定中的有效性和准确性。综合以上的实验结果和文献报道, 可以认为 PCR 方法是一种可靠的鉴定方法, 能够用于 SPF 金定鸭的性别鉴定。

刘铸等^[13]和李明等^[14]曾利用朱鹮的近缘种东方白鹮 W 性染色体上的性别相关基因设计引物, 用 PCR 方法成功扩增出朱鹮的性别相关基因, 对朱鹮性别进行了鉴定。同时他们还将其序列与其他 5 种

远源鸟类相应序列进行分析,证实了PCR方法在鸟类性别鉴定中的科学性和可信性。一些学者^[11,15,16],同样应用PCR方法对国家一级保护鸟类进行了性别鉴定,其准确率高达99%~100%。Grifiths等^[17]描述了利用PCR技术鉴定鸡胚性别的方法,证实了PCR方法能够用于鸡胚性别鉴定。这些报道都充分说明了,PCR方法不仅可用于家禽及水禽的性别鉴定,还可用于国家保护鸟类的性别鉴定。

参考文献:

- [1] Ottinger MA. Sexual differentiation of neuroendocrine systems and behavior[J]. Poult Sci, 1989, 68(7):79-89.
- [2] Xu WJ, Hu Y, Song C, et al. A new detecting method for the sequence difference of CHD1 gene on sex chromosomes Z and W in domesticated ducks of China[J]. Anim Husband Feed Sci, 2016, 8(6):327-330.
- [3] 孙嘉杨, 树青, 孙珂, 等. 采用血液、羽毛等材料鉴别鸡性别PCR方法的应用研究[J]. 家禽科学, 2016, 11(5):11-15.
- [4] 彭树英, 雍德祥, 王永生, 等. LAMP法鉴定家鸡性别的初步研究[J]. 淮北师范大学学报, 2014, 35(4):52-56.
- [5] 郑喜邦, 何宝祥, 张翊华, 等. 尼克红鸡染色体性别鉴定的研究[J]. 中国兽医学报, 2005, 25(2):213-216.
- [6] Wang Z, Zhou X, Lin Q, et al. New primers for sex identification in the Chinese egret and other ardeid species[J]. Mol Ecol Resour, 2011, 11(1):76-79.
- [7] Chen CC, Liu YS, Cheng CC, et al. High throughput sex identification by melting curve analysis in blue breasted quail and chicken[J]. Theriogenology, 2012, 77(9):51-58.
- [8] 刘宏祥, 胡艳, 姬改革, 等. 快速鉴定主要禽类性别的一对新的通用引物[J]. 农业生物技术学报, 2014, 22(12):1567-1574.
- [9] 王利红, 顾月琴, 高勤学, 等. 番鸭性别的PCR鉴定技术研究[J]. 中国家禽, 2007, 29(16):52.
- [10] 胡艳, 徐文娟, 宋迟, 等. 中国地方家鸭ZW性染色体上CHD1基因序列差异的检测新方法[J]. 畜牧兽医学报, 2013, 44(5):817-822.
- [11] 张莉, 单达聪, 刘彦, 等. 通过CHD基因快速鉴定鸽子性别方法的研究[J]. 中国畜牧兽医, 2016, 43(5):1379-1384.
- [12] 张宏宽, 徐善金, 辛卫, 等. 模糊模式识别方法在雏鸽性别鉴定方面的应用[J]. 养殖与饲料, 2012, 27(8):11-13.
- [13] 刘铸, 田秀华, 白素英, 等. 一种准确简便的东方白鹳性别分子鉴定方法[J]. 野生动物杂志, 2006, 27(3):50-53.
- [14] 李明, 丁长青, 魏辅文, 等. 朱鹮性别相关基因及其性别鉴定[J]. 科学通报, 2001, 46(2):129-131.
- [15] 胡锐颖, 耿昕, 马珺, 等. 一种简单通用的鸟类性别分子鉴定技术[J]. 实验生物学报, 2003, 36(5):401-404.
- [16] He PJ, Yu JQ, Fang SG. Sex identification of the black swan (*Cygnus atratus*) using the locus specific PCR and implications for its reproduction[J]. Repord Domest Anim, 2005, 40(3):196-198.
- [17] Griffiths R, Double MC, Orr K, et al. A DNA test to sex most birds[J]. Mol Ecol, 1998, 7(8):1071-1075.

Application of PCR Method for Rapid Sex Determination in SPF Jinding Duck

XU Li-jing^{1,2}, SUN Chang¹, LU Tao-feng¹, CHEN Hong-yan¹, ZHAO Li-li¹

- (1. Division of Laboratory Animal and Comparative Medicine, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology/Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China;
2. College of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

[Abstract] Objective To determine the sex of SPF Jinding Duck, the universal primer gCHD of avian chromosomal DNA-binding protein 1 (CHD1) gene on avian chromosomes were synthesized. **Methods** Blood of 85 SPF Jinding Duck were collected and genomic DNA was extracted for PCR amplification. The sex of the birds were determined by analyzing the number of bands after gel electrophoresis. **Results** The CHD1-Z and CHD1-W were found in the PCR products of agarose gel electrophoresis from females and CHD1-Z was from males. **Conclusions** The PCR can be used as an effective method for sex identification in birds.

[Key words] SPF Jinding ducks; Sex identification; PCR

抗原处理相关转运体基因多态性与疾病相关性的研究进展

王兴童, 陈洪岩, 韩凌霞

(中国农业科学院哈尔滨兽医研究所 兽医生物技术国家重点实验室/黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 实验动物与比较医学创新团队, 哈尔滨 150069)

[摘要] 抗原处理相关转运体(TAP)是一种异二聚体跨膜转运蛋白, 具有高度多态性, 主要功能是将胞质中加工产生的抗原肽转运到内质网腔, 与主要组织相容复合体(MHC) I 类分子组装形成抗原肽—MHCI 复合物后转运至细胞表面, 被 CD8+ T 淋巴细胞识别, 诱导机体产生细胞免疫应答。某些特定的人类疾病同 TAP 的多态性相关, 包括多种肿瘤疾病、自身免疫疾病和传染性疾病等。本文就实验动物的 TAP 基因在与疾病相关性方面的比较医学研究进展做一综述。

[关键词] 抗原处理相关转运体(TAP); 多态性; 疾病; 相关性

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)03-0252-05

抗原处理相关转运体(antigen transfer associated process protein, TAP)是由 TAP1 和 TAP2 两个亚基形成的异二聚体跨膜转运蛋白, 其主要功能是将胞质中加工产生的抗原肽转运到内质网腔, 与内质网中新合成的主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC) I 类分子组装形成抗原肽—MHCI 复合物后转运至细胞表面, 被 CD8+ T 淋巴细胞识别, 诱导机体产生细胞免疫应答^[1]。TAP 基因具有多态性, 其基因组序列的突变及其调节机制的缺陷可以导致活性下降和表达下调, 最终引起病毒性感染或肿瘤等疾病的发生^[2]。世界卫生组织人类白细胞抗原(HLA)委员会已经命名了人类的 7 个 TAP1 和 4 个 TAP2 等位基因^[3]。TAP 在进化过程中具有保守性, 人、猪、牛以及鼠科动物中的氨基酸同源性达到 70%~80%^[4]。哺乳动物尤其人类的 TAP 研

究相对较成熟, 而无特定病原体(SPF)鸡和鸭是禽类实验动物的代表, 在 TAP 基因多态性与疫病的相关性研究中, 具有独特的比较医学意义^[5]。本文就 TAP 的结构和疾病相关性等方面的比较医学研究进展做一综述。

1 TAP 蛋白

1.1 TAP 蛋白的结构

不同种属动物的 TAP 基因均位于 MHC 核心区域, 但大小和在基因组中的位置各不相同。人类的 TAP1 和 TAP2 基因位于 6p21.3, 在 MHC II 区域的 DQB1 和 DPB1 之间。TAP1 基因长 8.6 kb, TAP2 基因长 10.2 kb, 二者相距约 70 kb^[6]。TAP 蛋白是一种异二聚体三磷酸腺苷(ATP)结合转运复合物, TAP1 和 TAP2 两个亚基的 N 端为跨膜区, C 端有深入胞质的核苷酸结合域(NBD)^[7]。TAP1 和 TAP2 的跨膜区分别包含 10 个和 9 个跨膜螺旋——TAP1 N 端的 4 个跨膜螺旋和 TAP2 N 端的 3 个跨膜螺旋构成核心跨膜区, 每个 TAP 亚基的核心跨膜区可自主招募作为接头蛋白的 TAP 相关蛋白(Tapasin)(图 1)^[8]。TAP1 和 TAP2 C 端的 6 个跨膜螺旋与 NBD 组成对抗原肽转运十分必要的转运体核

[收稿日期] 2016-11-30

[基金项目] 国家科技支撑计划(2015BAI07B02-02), 中国农业科学院基本科研业务费专项(Y2016PT41), 中国农业科学院基本科研业务费专项(302016013)

[作者简介] 王兴童(1991-), 女, 硕士研究生, 主要从事兽医微生物和免疫学方面的研究。

E-mail: 827203295@qq.com

[通讯作者] 韩凌霞。E-mail: hanlingxia@caas.cn

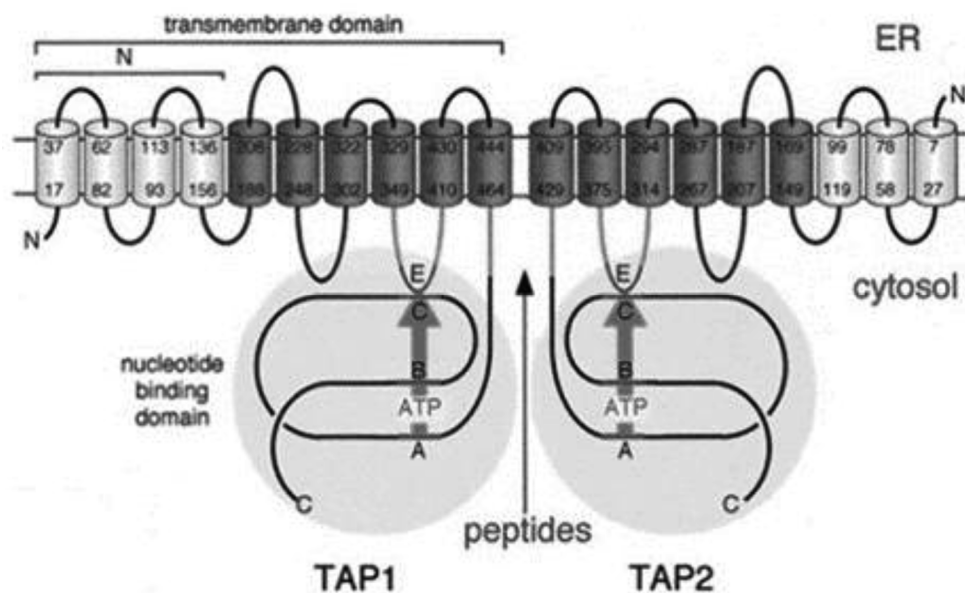
图1 TAP结构^[9]

Figure 1 Structure of TAP

心区。TAP1在C末端编码区含有三个特征性基序: Walker A、Walker B和C-loop。Walker A和Walker B形成高度保守的ATP结合盒,三磷酸腺苷(ATP)和其它核苷酸结合到ATP结合盒上,并依赖 Mg^{2+} 进行水解^[2]。Walker A和Walker B之间的6~8个氨基酸组成C-loop,促进抗原肽的转运^[9]。TAP优先转运8~16个氨基酸残基的短肽,但也可以容纳长达40个氨基酸残基的肽段,只是转运效率降低^[10]。

1.2 TAP蛋白的作用机制

MHCI类分子提呈的抗原大多是在胞核和胞质中内源性合成的肽,包括肿瘤抗原、病毒编码蛋白等。抗原递呈时,肿瘤抗原在抗原递呈细胞(APC)内与泛素结合,被蛋白酶复合物水解成8~10个氨基酸的短肽,长度适合的抗原肽结合至位于内质网膜上的TAP胞质侧的抗原结合槽,激活TAP上的ATP酶,ATP水解释放能量促使TAP二聚体结构发生改变,跨膜通道开放,抗原肽随即被转运于内质网腔内,在Tapasin、钙连接蛋白(calnexin)和钙网蛋白(calreticulin)等分子伴侣的协同作用下与内质网中新合成组装完整的MHCI α / β 2m分子上的肽结合槽结合,形成稳定的MHCI-抗原肽复合物,分泌至APC细胞表面,被CD⁸⁺T细胞识别并引起免疫应答^[11]。TAP分子对HLAI类分子在细胞膜上表达的密度和稳定性起重要作用,TAP分子缺陷或表达降低,可导致HLAI类分子因没有荷载抗原肽而无法稳定地在细胞表面表达^[12,13]。

2 TAP多态性与人类疾病的相关性

肿瘤是体内外各种因素综合作用的结果,是多原因、多阶段、多次突变所致的一类疾病。肿瘤细胞在免疫系统持续选择的压力下,成功逃避了宿主的免疫识别。而主要的抗肿瘤效应淋巴细胞—CD⁸⁺T淋巴细胞,不能识别单个的或整个的肿瘤抗原分子,只能识别由HLAI类分子提呈的抗原肽。因此,肿瘤细胞表面HLAI类分子表达异常可导致肿瘤细胞免疫原性低下,从而逃避机体的免疫杀伤,这是肿瘤细胞免疫逃逸的重要机制之一。在肿瘤发生和病毒性感染同时发生时,抗原递呈相关基因的表达和功能都有可能受到影响,包括TAP1和TAP2、Tapasin、MHCI类分子等。人为给瘤细胞直接转导/转染MHCI重链基因,结果尽管胞内MHCI重链的mRNA含量增加,细胞表面I类分子的表达并不能逆转^[14]。

TAP基因的缺失或突变可能导致TAP表达下降或功能障碍,而TAP功能障碍或表达下降都将导致肿瘤抗原不能被有效地转运,致使肿瘤逃逸免疫监视^[15]。人类鼻咽癌与种族易感性(黄种人较白种人患病多)、遗传因素及EB病毒感染等有关。鼻咽癌标本中的TAP1、TAP2和HLAI的表达低于健康标本^[16]。鼻咽癌组织中TAP1的阳性表达率为44.83%(26/58),极显著($P<0.01$)低于慢性鼻咽炎组

织中的70.00%(14/20)^[12]。原发性黑色素瘤切除标本中,抗原处理相关分子中仅有TAP1($P=0.026$)和TAP2($P=0.42$)的下调与肿瘤转移进程高度相关^[17]。而且,TAP表达与肿瘤低分化程度和恶性呈正相关,如对53例乳腺癌样本HLA I和TAP表达检测表明,16例低度恶性期(G1)切片TAP1、TAP2、HLA I染色均呈强阳性,而37例高度恶性期(G2/3)标本中仅有12例(32%)染色阳性^[18]。

TAP2基因的多态性也与汉族食管癌存在相关性^[19]。例如TAP2基因的G379A突变是哈萨克族食管癌的危险因素($P<0.05$),杂合型(G/A)及突变型(A/A)是野生型(G/G)个体患病风险的1.57倍^[20]。宫颈上皮内瘤变(CIN)是宫颈癌前病变,由于持续感染人乳头瘤病毒所致,单倍型为mut-wt-wt-wt-wt(TAP多态位点t1135-t1341-t1693-t1993-t2254)的女性,感染CIN的风险极显著低于单倍型为wt-wt-wt-wt-wt的女性^[21]。

由于TAP的结构和功能特点,有可能成为某些疾病的易感因子^[11]。TAP基因可能影响强直性脊柱炎(AS)的易感性。Feng等^[22]调查了中国AS患者TAP1和TAP2基因多态性,结果表明TAP1第1910位等位基因G的基因型为AG,和TAP2第1693位的基因型AA,能增加b27阴性患AS的风险($P<0.05$)。TAP1*020101的GGGGG和TAP1*0101-TAP2*0102的GGAGG-GAG增加GGGGG-GAG(TAP1*020101-TAP2*0102)患AS风险($P<0.05$)。而GGAGG-GGG型(TAP1*0301-TAP2×0101)的患者较少,分析原因可能改变抗原肽的选择和运输是AS的一个潜在发病机制。还有很多自身免疫疾病也同TAP相关,如急性细胞排斥反应等^[23],研究TAP对了解这些疾病的发生机制有很大帮助。

肺结核(PTB)患者中TAP1-2出现GG纯合子和AG杂合子的频率(3.94, $P=0.001$)高于对照组的(2.87, $P=0.0001$),TAP1-2突变极显著增加了对结核病(PTB)的易感性,而野生型A(A/A)可能抗结核感染^[24]。TAP基因多态性还可能同伊朗东南部扎黑丹PTB患者具有相关性^[25]。TAP与斑秃^[26]和麻风病^[27]等未知病因的疾病也存在联系。

3 TAP多态性在比较医学研究中的进展

不同种属动物的TAP氨基酸产物呈现高度的同

源性,可以用于比较医学研究。例如,犬TAP1和TAP2基因的启动区和编码区也存在多态性,但功能区比其他物种保守。将犬TAP2基因转移到鼠TAP2缺陷细胞系中,检测到MHCI分子表达。为研究犬TAP缺失或等位基因突变与内源性疫病和癌症的关系提供了数据^[28]。

火鸡的TAP基因还没有明确鉴定,但是已通过序列分析获得了功能和序列类似的MDR/TAP基因。鸡TAP2基因与优势表达的MHC经典I类分子 α 链编码基因BF2紧密相连^[1]。鹌鹑TAP基因结构更为复杂,与经典I类分子4个拷贝基因相邻^[9]。鸭有TAP1和TAP2两个反向转录的拷贝基因,其中TAP2与MHCI类分子优势表达基因UAA毗邻^[29]。

潘章源表明TAP1基因表达量的上调可能与断奶仔猪F18大肠杆菌抗性和免疫应答有关。TAP1基因外显子2 G729A变异位点3种基因型个体的表达结果分析显示:BB基因型个体表达普遍高于AA型和AB型,在脾、肺、肾、胸腺、淋巴结、十二指肠和空肠组织中,BB基因型TAP1的表达显著高于AA型和AB型($P<0.05$),位点G729A对表达有明显的调控作用,有可能作为一个重要的抗性分子标记^[30]。

SPF鸡和鸭是禽类实验动物的代表,其进化程度低于哺乳动物,其TAP基因多态性与疫病的相关性研究,具有更深远的比较医学意义。

中国国家禽类实验动物种子中心根据SPF绍兴麻鸭TAP1和TAP2基因组序列的多态性,已选育成功4个MHC单倍型鸭品系,各品系鸭的TAP1和TAP2基因组序列完全纯合,分别命名为HBW-B1、B2、B3和B4。

利用鸭疫里默氏杆菌感染B1、B2、B3系和B2/B4杂系鸭,死亡率分别为40%、25%、20%和33.3%;利用I型鸭病毒性肝炎人工感染,结果表明B2单倍型鸭死亡率(36%)明显低于其他单倍型(73%~93%)^[31]。

利用表达H5N1亚型禽流感病毒HA基因重组鸭瘟活载体疫苗免疫HBK-SPF雏鸭,免疫后连续9周的观察中,B3系SPF鸭的血凝抑制(HI)抗体效价始终显著高于其它3个品系^[32]。将不同浓度的鸭瘟病毒(DEV)和抗血清混合接种于B3系和B1系鸭原代鸭胚成纤维细胞(DEF),结果血清抗体和病毒相同浓度时,B3系DEF出现的CPE比B1的严重,且

被检孔的平均病毒拷贝数(8.38×10^5)大于 B1(1.89×10^5)品系。被相同浓度血清抗体中和时, B3 系的病毒含量更高, 增殖更快(数据未发表)。表明鸭的 TAP 基因型影响鸭肠炎病毒的复制能力, 并且 B3 系 HBK 鸭比 B1 系更敏感。

4 小结与展望

TAP 蛋白的进化保守和基因组序列的多态性, 以及在免疫应答方面的重要作用, 使其在研究肿瘤疾病、自身免疫病和传染性疾病的发病机制等具有不容忽视的地位, 利用 TAP 缺陷小鼠研究肿瘤的免疫逃避机制已得到广泛应用^[32], 而较低等的禽类实验动物有可能将为利用 TAP 基因进行遗传学分型^[33]、TAP 结构和功能的研究^[34], 疫病免疫遗传相关性等方面提供比较医学研究意义。

参考文献:

- [1] 张晓娜, 韩凌霞. 抗原处理相关转运体(TAP)的结构和功能研究进展[J]. 实验动物科学, 2014, 31(3):56-59.
- [2] 杨杰, 董宋鹏, 李子彬, 等. 抗原处理相关转运体蛋白的研究进展[J]. 生命科学, 2014, 26(10):1018-1025.
- [3] Marsh SG, Albert ED, Bodmer WF, et al. Nomenclature for factors of the HLA system[J]. HLA, 2016, 87(2):126-130.
- [4] García-Borges CN, Phanavanh B, Crew MD. Characterization of porcine TAP genes: alternative splicing of TAP1[J]. Immunogenetics, 2006, 58(5):374-382.
- [5] Kaufman J, Milne S, Göbel TW, et al. The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex[J]. Nature, 1999, 401(6756):923-925.
- [6] 赵金玲, 刘利民, 孙学科, 等. TAP 的研究进展[J]. 免疫学杂志, 2006, 22(3):120-123.
- [7] Eggensperger S, Tampé R. The transporter associated with antigen processing: a key player in adaptive immunity[J]. Biol Chem, 2015, 396(9-10):1059-1072.
- [8] Hulpke S, Baldauf C, Tampé R. Molecular architecture of the MHC I peptide-loading complex: one tapasin molecule is essential and sufficient for antigen processing[J]. FASEB J, 2012, 26(12):5071-5080.
- [9] Shiina T, Shimizu S, Hosomichi K, et al. Comparative genomic analysis of two avian (quail and chicken) MHC regions [J]. J Immunol, 2004, 172(11):6751-6763.
- [10] 万晓伟, 刘芳, 宗洁, 等. 抗原处理相关转运体的研究进展[J]. 中国临床研究, 2012, 25(9):920-922.
- [11] 闵伟琪. 抗原处理相关转运体(TAP)基因多态性与自身免疫性疾病[J]. 国外医学:临床生物化学与检验学分册, 2000, 21(4):206-207.
- [12] 邢瑾. TAP1 在鼻咽癌组织中的表达及其意义[D]. 昆明: 昆明医学院, 2011.
- [13] 谢维. MHC 基因多态性和肿瘤的发生[J]. 现代免疫学, 2004, 24(6):441-444.
- [14] 印彪. 中国人群抗原加工相关转运体(TAP)基因多态性研究及其与强直性脊柱炎(AS)疾病关联分析[D]. 上海: 华东师范大学, 2009.
- [15] Ren YX, Yang J, Zhang LJ, et al. Downregulation of expression of transporters associated with antigen processing 1 and 2 and human leukocyte antigen I and its effect on immunity in nasopharyngeal carcinoma patients[J]. Mol Clin Oncol, 2014, 2(1):51-58.
- [16] Cao B. LMP7/TAP2 gene polymorphisms and HPV infection in esophageal carcinoma patients from a high incidence area in China[J]. Carcinogenesis, 2005, 26(7):1280-1284.
- [17] Kamarashev J, Ferrone S, Seifert B, et al. TAP1 down-regulation in primary melanoma lesions: an independent marker of poor prognosis [J]. Int J Cancer, 2001, 95(1):23-28.
- [18] Vitale M, Rezzani R, Rodella L, et al. HLA class I antigen and transporter associated with antigen processing (TAP1 and TAP2) down-regulation in high-grade primary breast carcinoma lesions [J]. Cancer Res, 1998, 58(4):737-742.
- [19] 陈玲. HPV 感染及 TAP1 基因多态性与新疆哈萨克族食管癌相关性研究[D]. 石河子: 石河子大学, 2007.
- [20] 曾同霞, 张海峰, 雷丽娟, 等. TAP2 基因多态性及遗传因素与新疆哈萨克族食管癌的相关性[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(31):3255-3258.
- [21] Natter C, Polterauer S, Rahhalschupp J, et al. Association of TAP gene polymorphisms and risk of cervical intraepithelial neoplasia[J]. Dis Markers, 2013, 35(2):79-84.
- [22] Feng MB, Yin T, Shen Q, et al. TAP1 and TAP2 polymorphisms associated with ankylosing spondylitis in genetically homogenous Chinese Han population[J]. Hum Immunol, 2009, 70(4):257-261.
- [23] Kamei H, Masuda S, Nakamura T, et al. Association of transporter associated with antigen processing (TAP) gene polymorphisms in donors with acute cellular rejection in living donor liver transplantation[J]. J Gastrointest Liver Dis, 2013, 22(2):167-171.
- [24] Wang D, Zhou Y, Ji L, et al. Association of LMP/TAP gene polymorphisms with tuberculosis susceptibility in Li population in China[J]. PLoS One, 2012, 7(3):e33051.
- [25] Naderi M, Hashemi M, Amininia S. Association of TAP1 and TAP2 gene polymorphisms with susceptibility to pulmonary tuberculosis.[J]. Iran J Allergy Asthma Immunol, 2016, 15(1):62-68.
- [26] Kim HK, Lee H, Lew BL, et al. Association between TAP1 gene polymorphisms and alopecia areata in a Korean population

- [J]. Genet Mol Res, 2015, 14(4):18820-18827.
- [27] Shinde V, Marcinek P, Rani DS, et al. Genetic evidence of TAP1, gene variant as a susceptibility factor in Indian leprosy patients[J]. Hum Immunol, 2013, 74(6):803-807.
- [28] Gojanovich GS, Ross P, Holmer SR, et al. Characterization and allelic variation of the transporters associated with antigen processing (TAP) genes in the domestic dog (*Canis lupus familiaris*) [J]. Dev Comp Immunol, 2013, 41(4):578-586.
- [29] Xia C, Lin CY, Xu GX, et al. cDNA cloning and genomic structure of the duck (*Anas platyrhynchos*) MHC class I gene [J]. Immunogenetics, 2004, 56(4):304-309.
- [30] 潘章源. TAP1 基因对断奶仔猪 F18 大肠杆菌抗性和部分免疫指标的效应分析[D]. 扬州: 扬州大学, 2012.
- [31] 武永淑. HBK-SPF 鸭 MHC 单倍型筛选及其 TAP 基因的生物信息学分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.
- [32] Doorduijn EM, Sluiter M, Querido BJ, et al. TAP-independent self-peptides enhance T cell recognition of immune-escaped tumors [J]. J Clin Invest, 2016, 126(2):784-794.
- [33] 赵丽丽, 杨超, 张晓娜, 等. 鸭不同 MHC 单倍型对禽流感重组疫苗免疫效果的影响[J]. 实验动物科学, 2014, 31(3): 30-32.
- [34] 张晓娜, 吴少莲, 文辉强, 等. 鸭抗原相关转运体 TAP1 和 TAP2 原核表达及多克隆抗体的制备[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015, 6(11):40-43.

Advances in Research on Relationship between Transporter Associate with Antigen Processing Gene Polymorphism and Diseases

WANG Xing-tong, CHEN Hong-yan, HAN Ling-xia

(Division of Laboratory Animal and Comparative Medicine, State Key Laboratory of Veterinary Biotechnology/Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animal and Comparative Medicine, Harbin Veterinary Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150069, China)

[Abstract] Transporter associate with antigen processing (TAP) is a heterodimer which plays a crucial role in antigen presenting process by transporting endogenous antigen peptide from the cytoplasm to the endoplasmic reticulum where can be bound by the major histocompatibility complex (MHC) class I molecules and further be recognized by CD8⁺T lymphocyte. Polymorphisms of TAP gene and the expression level of TAP protein are associated with susceptibility to certain specific diseases including tumor, autoimmune disease, viral disease and infectious diseases. Here, some similar comparative medicine researches of TAPs in laboratory animals to diseases associations are reviewed.

[Key words] Antigen transfer associated process protein (TAP); Polymorphism; Diseases; Association