

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 4 期

2017 年 8 月

目 次

• 论 著 •

- 人胃癌细胞系的建立及其评价.....葛晓梅, 张一心, 谢付波, 等(257)
- 3D 打印多孔钛材料修复兔股骨髁骨缺损的实验研究.....邓 威, 郑 欣, 湛业帅, 等(266)
- 基于数字化三维重建技术的新西兰兔桡骨解剖学观测及研究芮 敏, 郑 欣, 李成宇, 等(273)
- 柘木提取物抗胃肠道肿瘤的免疫机制研究谢家骏, 张国明, 乔正东, 等(278)
- 成年实验兔群体饲养的可行性考察.....李彩云, 姜子睿, 潘学营, 等(283)
- 泛酸钠对 Beagle 犬心血管指标的影响.....张成梅, 纪建波, 武传涛, 等(288)
- 酪酸菌对小鼠有害气体排放的影响.....潘黎捷, 余文兰, 任斌斌, 等(292)
- 不完全睡眠剥夺对青春期 SD 大鼠生长发育的影响朱寅秋, 汪雅荻, 严国锋, 等(295)
- 绿色荧光裸小鼠动情周期的观察胡文娟, 方 天, 陈 莉, 等(300)

• 政策与法规 •

- 《美国公共卫生署人道管理和使用实验动物政策》(2015 年版)简介盛俊杰, 胡庆元, 王可洲, 等(303)

• 第十六届中国西部实验动物管理与学术研讨会论文专题 •

- Irx5a* 基因过表达对斑马鱼胚胎早期造血的影响.....金 璐, 李 燕, 李志操, 等(309)
- 香烟烟雾对慢性阻塞性肺疾病大鼠肺功能及血清细胞因子水平影响熊 英, 张金娟, 李 玲, 等(315)
- 氧化苦参碱对小鼠哮喘模型保护作用的初步研究.....兰露莎, 赵兵兵, 杨红宇, 等(320)
- 贵州小型猪母猪初产繁殖性状及其相关和途径分析陈明飞, 姚 刚, 赵 海, 等(324)
- 川北医学院实验动物屏障系统管理初探杨国淋, 魏 玲, 苏 畅, 等(328)
- 动物实验教学能促进学生对动物伦理福利的认知姚 刚, 赵 海, 陈明飞, 等(331)
- 突出“趣味”教学理念的实验动物学课程教学改革罗 红, 沈祥春, 智 妍, 等(334)

期刊基本参数: CN31-1954/Q*1981*b* 大 16*80*zh*P*¥ 10.00*2000*17*2017-08

协办单位(排名不分先后)

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

Laboratory Animal and Comparative Medicine

Vol.37 No.4

Aug. 2017

Main Contents

- Establishment and Characterization of Patient Derived Gastric Cancer Cell Lines···GE Xiao-mei, ZHANG Yi-xin, XIE Fu-bo, et al(257)
- An Experimental Study on Repairing Femoral Condyle Defect by
Printing Porous Titanium with 3D Technology in Rabbits·····DENG Wei, ZHENG Xin, SHEN Ye-shuai, et al(266)
- Application of Digital Three-dimensional Reconstruction Technique in Anatomical Measurement and
Investigation of Radius in New Zealand White Rabbits·····RUI Min, ZHENG Xin, LI Cheng-yu, et al(273)
- Immunologic Mechanism of Inhibition on Gastrointestinal
Tract Tumors of ZHEMU Extract ······XIE Jia-jun, ZHANG Guo-ming, QIAO Zheng-dong, et al(278)
- The Feasibility of Social Housing for Adult Laboratory Rabbits ······LI Cai-yun, JIANG Zi-rui, PAN Xue-ying, et al(283)
- Effect of Sodium Pantothenate on Cardiovascular in Beagle Dogs ······ZHANG Cheng-mei, JI Jian-bo, WU Chuan-tao, et al(288)
- Influence of Butyric Acid Bacteria on Harmful Gas Emissions in Mice ······PAN Li-jie, YU Wen-lan, REN Bin-bin, et al(292)
- An Introduction of 《Public Health Service Policy on Humane Care and Use of
Laboratory Animals (Revised 2015)》·····SHENG Jun-jie, HU Qing-yuan, WANG Ke-zhou, et al(303)
- Effects of *Irx5a* Gene Overexpression on Early Hematopoietic in Zebrafish Embryos ······JIN Lu, LI Yan, LI Zhi-cai, et al(309)
- Effects of Cigarette Smoke on Lung Function and Serum Cytokine
Levels in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rat ······XIONG Ying, ZHANG Jin-juan, LI Lin, et al(315)
- The Protective Effect of Oxymatrine on Asthma Mice ······LAN Lu-sha, ZHAO Bing-bing, YANG Hongyu, et al(320)
- Primiparous Reproductive Performance of Outbred Guizhou Miniature
Pigs and its Correlation and Path Analysis ······CHEN Ming-fei, YAO Gang, ZHAO Hai, et al(324)

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4期 2017年8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.4 Aug. 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

人胃癌细胞系的建立及其评价

葛晓梅^{1,2}, 张一心³, 谢付波^{1,4}, 刘继斌³, 杨磊³, 渠颖颖¹,
顾莹^{1,5}, 李学廷¹, 杨伟敏¹, 刘喜朋², 周禾^{1,4,5}, 强福林³

(1. 上海睿智化学研究有限公司, 上海 201203; 2. 上海交通大学, 上海 200240;
3. 南通市肿瘤医院, 南通 226361; 4. 药物转化工程技术研究中心, 上海 201203;
5. 开拓者医学研究(上海)有限公司, 上海 201203)

[摘要] 目的 利用已建立的胃癌人源化异种移植瘤 (Patient-derived xenograft, PDX) 模型建立胃癌细胞系, 并对建立的胃癌细胞系进行生物学特性评价。方法 选择 12 例生长状态良好的胃癌 PDX 模型, 待小鼠移植瘤体积生长至 500~900 mm³ 时, 取出肿瘤组织进行癌细胞的原代培养建立细胞系, 通过细胞形态学观察、染色体分析、短片段重复序列 (STR) 分析、免疫组织化学染色、体外药敏及体内成瘤实验对其生物学特性进行分析鉴定, 并在此基础上利用建立成功的胃癌细胞系进行化疗药物药效学评价。结果 12 例 PDX 模型中共成功建立 6 例胃癌细胞系, 细胞系可稳定多次传代。选择其中 2 例胃癌细胞系 (GAXC031 和 GAXC066) 进行生物学特性鉴定。遗传学结果证实, 这 2 例细胞系来自亲本 PDX 模型, 符合恶性胃癌的遗传学特征, 在裸小鼠体内具有致瘤性。由细胞系建立的移植瘤模型在保留主要临床生物学特征的前提下, 具有成瘤率高, 潜伏期短, 生长均一性好等特点。体外和体内药敏实验结果均表明, GAXC031 对 5-氟尿嘧啶有一定的敏感性 [体外半抑制浓度 (IC₅₀) 为 0.265 μmol/L, 体内肿瘤生长抑制率 (TGI) 为 30%~50%], 而 GAXC066 不敏感 (体外 IC₅₀ 为 >200 μmol/L, 体内 TGI < 0); 2 例细胞系对顺铂的敏感性均较强 (TGI > 60%)。结论 成功建立了 6 例人源胃癌细胞系。对 GAXC031 和 GAXC066 细胞系全面的分析和鉴定显示, 细胞系与亲本 PDX 模型高度相关。细胞系体内外药敏实验结果显示, 对同一个化疗药物, 其体内与体外数据间存在很高的一致性。这些细胞系及相关模型可用于抗癌药物的研发和肿瘤基础研究。

[关键词] 人源化异种移植瘤 (PDX); 胃癌; 细胞系; 生物学特性; 药效学实验

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)04-0257-09

胃癌是全球发病率最高的癌症之一, 在恶性肿瘤的死亡病因中高居第 2 位, 仅次于肺癌^[1,2]。近年来, 虽然胃癌的全球发病率有所下降, 但相比于西方国家, 亚洲的发病率仍然很高^[3-5]。中国是

胃癌发病率最高的国家之一, 胃癌的新发病例已占全球的 40% 以上^[6]。据全国肿瘤登记中心统计显示, 无论城乡, 胃癌的发病率和死亡率都居高不下^[7]。

目前胃癌的治疗模式已经从单一的手术治疗进入综合治疗加规范化手术的新治疗模式, 其中辅助化疗作为综合治疗方法之一, 已得到越来越多的关注^[2,8]。尽管对于早期胃癌患者而言, 施行手术治疗可使其 5 年生存率达到 90% 以上, 但遗憾的是早期胃癌的诊断率却不足 10%^[9,10]; 而进展期胃癌由于其手术切除率比较低, 联合应用综合治疗后虽然可明显提高其 5 年生存率, 但患者的预后仍然比较差^[11]。胃癌临床化疗往往会面临以下问题: 首先, 常用的化疗方案缺乏客观指标反应药物的抗癌敏感性^[12]; 其

[收稿日期] 2017-01-25

[基金项目] 科技部国家科技支撑计划项目(2015BAH24F00)

[作者简介] 葛晓梅(1989-), 女, 硕士, 研究方向: 肿瘤药理。

E-mail: xmge@chempartner.cn

共同第一作者: 张一心(1956-), 男, 博士, 研究方向: 肿瘤学。E-mail: drzhangyx@163.com

[通讯作者] 周禾, 女, E-mail: zhhe@chempartner.cn

共同通讯作者: 强福林, 男。

E-mail: tian2008@163.com

次, 耐药现象的发生仍然是胃癌化疗中存在的最大问题^[13,14]。尽管人们已经在抗癌药物的筛选及克服化疗药物耐药性方面做了很多的研究, 但至今这些问题还未得到根本解决。鉴于此, 建立与临床肿瘤病理表现相同的胃癌细胞系, 可为临床前药物的筛选和临床耐药现象的研究提供重要的实验材料。

由于直接运用临床肿瘤组织建立肿瘤细胞系成功率比较低, 因此, 通过运用临床肿瘤标本先建立动物肿瘤模型, 进而通过原代培养建立人源肿瘤细胞系更具有可行性, 同时也接近于肿瘤的临床生物学特性, 对药物的耐药性及敏感性具有良好的预测性, 而且也有效地弥补了人源化肿瘤异种移植模型用时长、通量低、均一性差、难以进行机理研究等弱点。另外利用这些细胞系还可建立体内移植瘤模型, 进而可以获得体外、体内两个相关联的药物筛选平台。因此, 本研究选择 12 例生长状态良好的胃癌患者原代肿瘤异种移植(PDX)模型, 通过原代培养, 建立了人胃癌细胞系, 对其生物特性进行分析鉴定, 并利用所建立的细胞系进行体内体外药效学评价。

1 材料与方法

1.1 实验动物

雌性 BALB/c 裸小鼠共 110 只, 5~6 周龄, 体质量 16~19 g, 购自北京维通利华实验动物有限公司 [SCXK(京)2012-0001], 饲养于上海睿智化学研究有限公司 SPF 动物实验设施 [SYXK(沪) 2012-0030], 适应一周后开始实验。

1.2 主要试剂和药物

HBSS 缓冲液、RPMI-1640 培养液、胎牛血清购自美国 Invitrogen 公司; DNA 提取试剂盒购自美国 Axygen 公司; anti-CEA、anti-Cytokeratin、anti-Vimentin、anti-CA19-9 购自美国 Santa Cruz 公司; anti-HER-2 购自美国 Cell Signaling 公司; DAB 试剂盒购自福州迈新生物技术开发有限公司; CellTiter Glo 试剂盒购自美国 Promega 公司; 基质胶 Matrigel 购自美国 BD 公司; 秋水仙素、5-氟尿嘧啶(货号 47576)、奥沙利铂(货号 09512)、伊立替康(货号 I1406)购自美国 Sigma 公司; 顺铂购自江苏豪森药业股份有限公司(国药准字 H20040813); 多西紫杉醇购自美国 Fluka 公司(货号 01885)。

1.3 肿瘤组织来源

本研究中所有胃癌肿瘤组织均从上海睿智化学

研究有限公司成功建立的 PDX 获得^[15]。肿瘤组织最初的获取和相关处理通过上海睿智化学研究有限公司伦理委员会的审核。

1.4 细胞原代培养

从胃癌 PDX 模型库中选择 12 例生长状态较好的模型, 待裸小鼠体内移植瘤体积增长至 500~900 mm³ 时, 对荷瘤鼠施行安死术。在无菌条件下, 取出肿瘤组织后去除黏膜组织及血管, 将肿瘤组织切成小块, 用肿瘤细胞消化液重悬, 并置于 37 °C 摇床上消化 2~4 h, 70 μm 滤膜过滤, 红细胞裂解液裂解红细胞, 淋巴细胞分离液(Histopaque)纯化肿瘤细胞后, 向培养瓶内加入含有 5% 胎牛血清, 100 U/mL 青霉素 G, 100 μg/mL 硫酸链霉素和 0.25 μg/mL 两性霉素 B 的 RPMI-1640 培养基, 在 37 °C、体积分数 5% CO₂ 恒温培养箱中静置培养。当细胞铺满培养瓶底约 70% 时, 传代细胞同时利用成纤维细胞与肿瘤细胞贴壁速率不同对细胞进行纯化, 如此反复进行直至将成纤维细胞去除。培养过程中避免肿瘤细胞间的交叉污染。

1.5 细胞形态学观察

将生长状态良好的细胞置于倒置显微镜下观察细胞生长状态, 有无污染情况, 并进行显微摄影。

1.6 染色体数目鉴定

将纯化后的细胞分别置于 37 °C、体积分数 5% CO₂ 条件下培养 12 h 后, 加入 0.4 μg/mL 秋水仙素, 再继续培养 10 h。采集分裂中期的细胞, 向细胞中加入 0.075 mol/L 的 KCl 低渗溶液, 37 °C 孵育 20~30 min, 离心弃上清液, 用新鲜配制的固定液(甲醇: 乙酸=3:1)固定 30 min, 离心后用 PBS 重悬细胞, 将细胞悬液滴于预冷的载玻片上, 用 Giemsa 染色液染色 10 min, 清水冲洗, 晾干, 封片, 在显微镜下计数染色体数目。

1.7 短片段重复序列(STR)鉴定

分别收集新鲜培养的细胞, 用试剂盒提取细胞基因组 DNA, 用 5' 端荧光标记的引物进行 PCR 扩增, 对所得产物进行测序, 分析包括 Amelogenin, THO1, TPOX, D13S317, vWA, D16S539, D5S818, CSF1PO 以及 D7S820 等各个 STR 位点的序列重复数。

1.8 组织来源鉴定

将培养的细胞分别接种在盖玻片上进行培养, 等细胞伸展后, 用质量分数 4% 甲醛固定过夜后, 将固定液吸弃, 并使用 PBS 进行漂洗。透化处理细

胞膜后加入封闭液封闭 30 min, 然后加入适量一抗 (anti-CEA, anti-Cytokeratin, anti-Vimentin, anti-CA19-9, anti-HER-2) 4℃ 孵育过夜, 加入二抗室温孵育 30 min 后, 进行 DAB 染色。封片后使用 ScanScope(Aperio) 切片扫描系统进行扫描。

1.9 体外细胞毒性实验

体外测定胃癌临床常用的化疗药物: 5- 氟尿嘧啶、顺铂、奥沙利铂、多西紫杉醇和依立替康对细胞的抗增殖作用。分别将受试细胞以 3000 个 / 孔的密度接种在 96 孔板中, 加入不同浓度梯度的药物, 各药物终浓度梯度分别为: 5- 氟尿嘧啶(200.00 μmol/L、50.00 μmol/L、12.50 μmol/L、3.13 μmol/L、0.78 μmol/L、0.20 μmol/L); 顺铂(200.00 μmol/L、50.00 μmol/L、12.50 μmol/L、3.13 μmol/L、0.78 μmol/L、0.20 μmol/L); 奥沙利铂(100.00 μmol/L、25.00 μmol/L、8.33 μmol/L、2.78 μmol/L、0.93 μmol/L、0.31 μmol/L); 多西紫杉醇(4.00 μmol/L、0.80 μmol/L、0.16 μmol/L、0.03 μmol/L、0.01 μmol/L、0.001 μmol/L); 依立替康(200.00 μmol/L、66.67 μmol/L、22.22 μmol/L、7.41 μmol/L、2.47 μmol/L、0.82 μmol/L), 每个浓度设立三个复孔, 培养 72 h 后, 用 CellTiter Glo 试剂盒测定细胞活力, 利用 XLFit 软件计算半数抑制浓度(IC₅₀)。

1.10 体内生长曲线及组织学观察

分别收集细胞并制成悬液, 双侧皮下接种至 5 只裸小鼠, 接种的细胞量视细胞生长速率而定。接种后注意观察肿瘤的生长情况, 每周对小鼠体质量进行称量。待肿瘤生长至可测量时, 使用游标卡尺每周定期测量肿瘤的长(a)与宽(b)。待实验结束时, 用过量的 CO₂ 麻醉荷瘤小鼠并施行安死术, 将肿瘤剥离, 先大体观察剥离的肿瘤, 使用质量分数 4% 中性甲醛固定液固定肿瘤组织, 然后进行石蜡包埋、切片及 HE 染色, 并在光学显微镜下进行观察。

1.11 体内药效实验

体外收集对数期细胞, 各接种至 50 只裸小鼠单侧皮下。待肿瘤长至合适体积(100~300 mm³)时, 挑选肿瘤形状比较规则且体积比较接近的小鼠进行随机分组, 每组小鼠 8~10 只, 腹腔给药, 共 3 组: 对照组; 5- 氟尿嘧啶组, 25 mg/kg 连续给药 5 d 后停药 2 d; 顺铂组, 5 mg/kg 每周给药一次。分组当日开始给药, 给药前称量并记录小鼠体质量, 共给药 2 周。给药后每周定期测量小鼠肿瘤体积。

1.12 数据分析

小鼠肿瘤体积(TV)计算公式为: $TV = 1/2ab^2$ (a、b 分别为肿瘤长径和短径), 根据所得数值来绘制肿瘤生长曲线。针对每一例人胃癌细胞系体内移植瘤模型, 使用肿瘤生长抑制率(TGI)作为药效实验评价指标, 计算公式为: $TGI\% = [1 - (T_i - T_0) / (V_i - V_0)] \times 100$, (T_i: 给药组当日测量的 TV; T₀: 给药组分组时的 TV; V_i: 对照组当日测量的 TV; V₀: 对照组分组时的 TV)。实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 并使用 GraphPad Prism 5.0 软件进行统计学分析, 两组内数据的比较采用 Two-way ANOVA 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建立的人胃癌细胞系相关信息

12 例人胃癌 PDX 模型共成功建立 6 例细胞系 (表 1), 这些细胞系性状都比较稳定, 能在体外长期生长和稳定传代。

表 1 12 例胃癌 PDX 模型相关信息

Table 1 The information of 12 gastric cancer PDX models

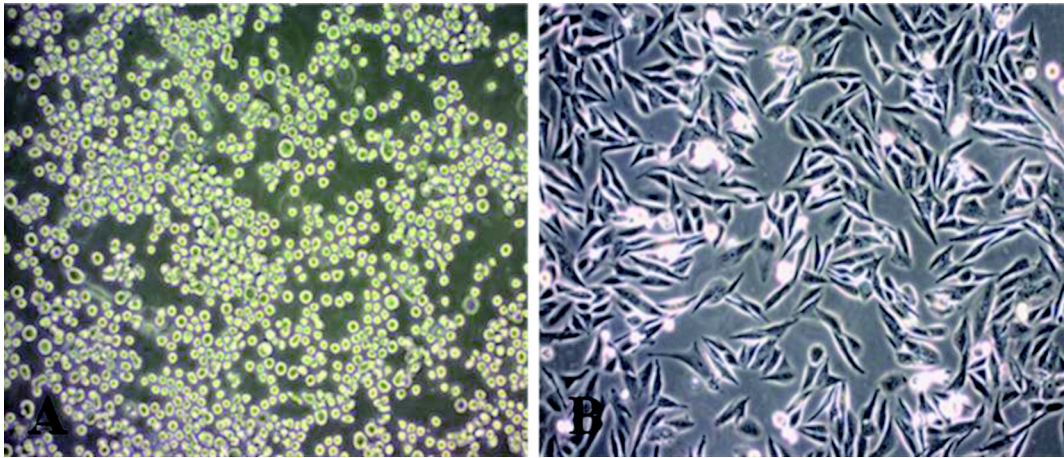
PDX 模型编号	病理诊断	细胞名称	建系状态
GAX001	胃: 低分化腺癌	GAXC001	成功
GAX023	胃: 低-中分化腺癌	GAXC023	成功
GAX027	胃: 乳头状腺癌	-	失败
GAX031	胃: 低分化腺癌	GAXC031	成功
GAX034	胃: 低-中分化腺癌	-	失败
GAX036	胃: 低-中分化腺癌	GAXC036	成功
GAX049	低-中分化腺癌	-	失败
GAX058	低分化腺癌	-	失败
GAX059	胃: 低分化腺癌	-	失败
GAX066	低-中分化腺癌	GAXC066	成功
GAX150	胃: 低分化腺癌	GAXC150	成功
GAX159	胃: 低分化腺癌	-	失败

2.2 胃癌细胞系呈恶性生长

以细胞系 GAXC031 和 GAXC066 为例, 显微镜下可见体外生长的 GAXC031 细胞呈恶性生长, 有重叠生长, 贴壁生长部分呈扁平状, 无明显接触抑制; 体外生长的 GAXC066 主体细胞呈大柳叶形, 无明显接触抑制特性 (图 1)。

2.3 染色体畸变严重

细胞系 GAXC031 和 GAXC066 在经过连续传代



A: GAXC031; B: GAXC066
图 1 倒置显微镜下人胃癌细胞系的细胞形态 (100 ×)

Figure 1 Cell morphological observation of human gastric cancer cell lines under Inverted microscope (100 ×)

后，染色体仍保持人源性肿瘤细胞染色体的特征，表现为多倍体。GAXC031 染色体总数为 79 ± 3 ，占 71.29%，表现为高异倍性；GAXC066 染色体总数为 51 ± 2 ，占 80.89%，表现为超二倍体。二者均存在多数中央及亚中央着丝粒染色体，且染色体数目和结构畸变严重，符合人恶性肿瘤的遗传学特征(图 2)。

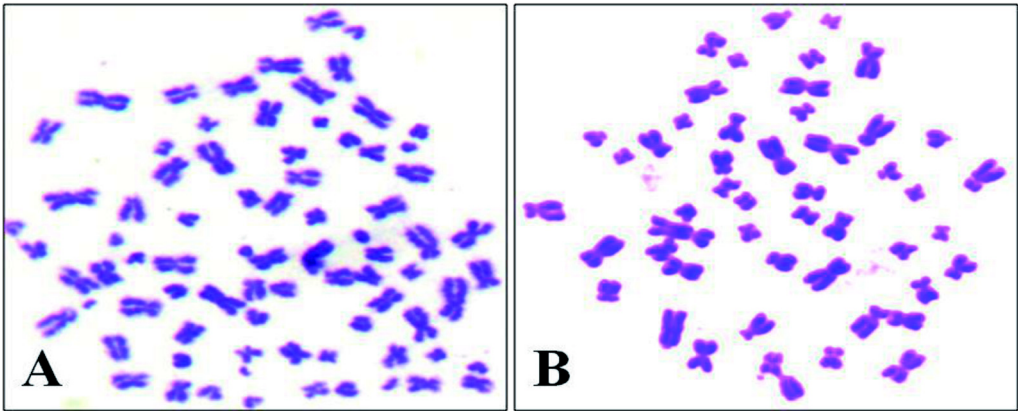
2.4 STR 具有细胞系特异性

对细胞系GAXC031和GAXC066的Amelogenin, THO1, TPOX, D13S317, vWA, D16S539, D5S818, CSF1PO 以及 D7S820 等各个 STR 位点的序列重复数进行分析，其中 STR 位点的拷贝数如表 2 所示，并与其亲本 PDX 组织的 STR 结果进行比对分析。由表可见，这 2 例细胞系的各个位点数目与其亲本 PDX 组织的基本保持一致，GAXC031 与 GAX031 仅

在 vWA 存在细微差异(GAXC031 的序列重复数为 16，而 GAX031 为 16 和 17)，而 GAXC066 与 GAX066 也仅在 D13S317 存在稍许不同(GAXC066 的序列重复数为 10，而 GAX066 为 7 和 10)。据此可以判定这 2 例细胞系来自其相应的亲本 PDX 肿瘤。上述序列和 ATCC, DSMZ 等细胞库的数据进行查询比对，未返回相同的遗传图谱。由此可以证明细胞系的独一无二性，且在原代培养过程中未发生和其他细胞的交叉污染。

2.5 免疫组织化学染色表现为胃腺癌

细胞系GAXC031和GAXC066免疫组织化学染色结果相似。以 GAXC066 为例，结果如图 3 所示，其中 Vimentin 为强阳性；Cytokeratin 为强阳性，CA19-9 为阳性，提示其肿瘤类型与腺癌相关；



A: GAXC031; B: GAXC066
图 2 细胞系 GAXC031 和 GAXC066 染色体分析结果 (1000 ×)
Figure 2 Chromosome analysis of GAXC031 and GAXC066 cell line (1000 ×)

表 2 细胞系 GAXC031 和 GAXC066 的 STR 位点拷贝数
Table 2 Copies of STR for GAXC031 and GAXC066 cell line

STR 位点	GAXC031	GAX031	GAXC066	GAX066
Amelogenin	X, Y	X, Y	X	X
TH01	9	9	9	9
TPOX	12	12	8, 9	8, 9
D13S317	10, 11	10, 11	10	7, 10
vWA	16	16, 17	17	17
D16S539	11	11	9, 10	9, 10
D5S818	9, 13	9, 13	13	13
CSF1PO	9	9	9	9
D7S820	10, 11	10, 11	8	8

CEA 为强阳性，提示该细胞系恶性程度较高；HER-2 表达常见于腺癌而少见于鳞癌，表达为弱阳性。结合其来源组织的临床信息和病理诊断结果，判断该细胞来源于胃腺癌。

2.6 各化疗药物对细胞系 GAXC031 和 GAXC066 的药物敏感性

各化疗药物对细胞系GAXC031和GAXC066的IC₅₀值如表 3 所示，生长抑制曲线如图 4 所示。对 5- 氟尿嘧啶而言，GAXC031 对其敏感性较强，而

GAXC066 的敏感性则比较弱；细胞 GAXC031 和 GAXC066 对顺铂敏感; GAXC031 对奥沙利铂的敏感性明显大于 GAXC066; 伊立替康对这 2 例细胞的生长抑制作用相当, IC₅₀ 均在 25~40 μmol/L; 而化疗药物多西紫杉醇对这 2 例细胞的敏感性较强，IC₅₀ 值均比较低。

2.7 胃癌细胞系具有强致癌性

细胞系GAXC031和GAXC066接种到小鼠皮下 1 周后开始生长，成瘤率均高达 90% 以上。肿瘤潜伏期(肿瘤体积达到 100~300 mm³ 所需要的时间)较亲本 PDX 模型缩短 2~3 周。细胞系的成瘤率和生长均一性相对其亲本 PDX 模型(成瘤率 60% 左右)都有所提高。

HE 染色结果显示，细胞系移植瘤的组织形态均高度接近其来源组织瘤块，且病理诊断结果均为低分化胃腺癌, 以 GAXC066 为例，结果如图 5 所示。

2.8 体内成瘤组织对 5- 氟尿嘧啶和顺铂的敏感性

经过 13~14 d 给药后，给药组与对照组相比，5- 氟尿嘧啶对 GAXC031 肿瘤的生长具有一定的抑制作用，而顺铂对其具有较强的抑制作用(*P*<0.05)，并且这 2 个化疗药物在 GAXC031 与 GAX031 中的敏

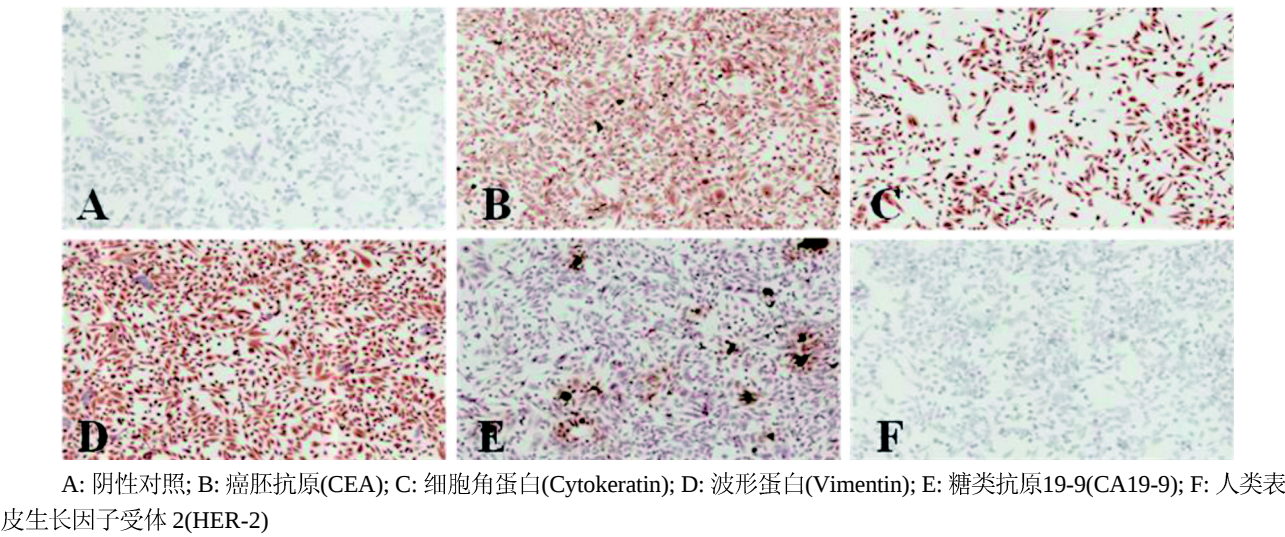
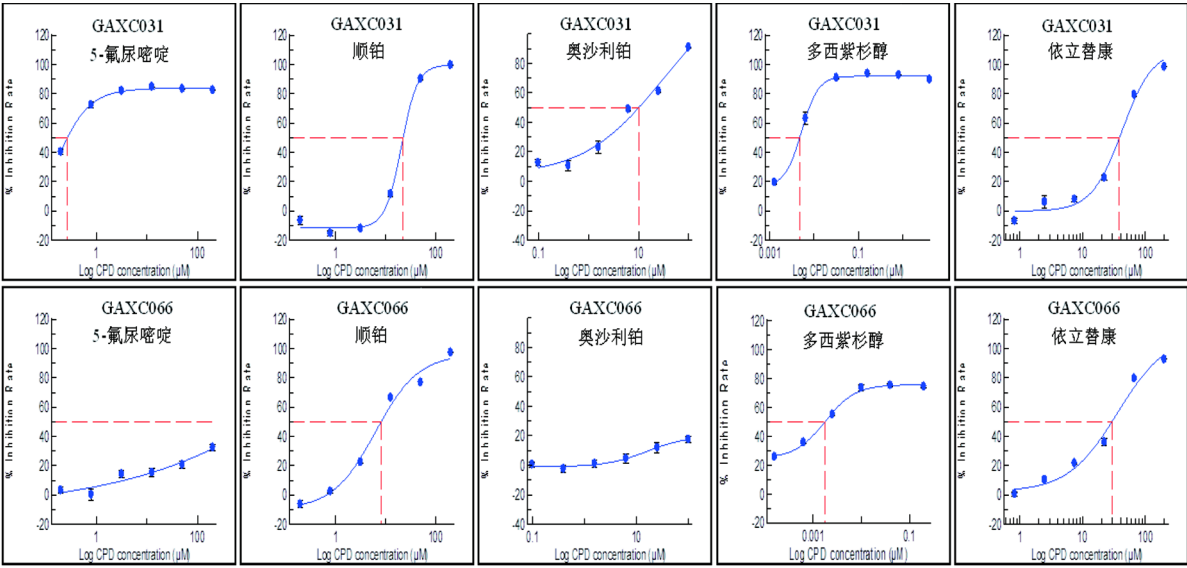


图 3 细胞系 GAXC066 免疫组织化学染色结果 (200 ×)
Figure 3 Immunohistochemical analysis of GAXC066 cell line (200 ×)

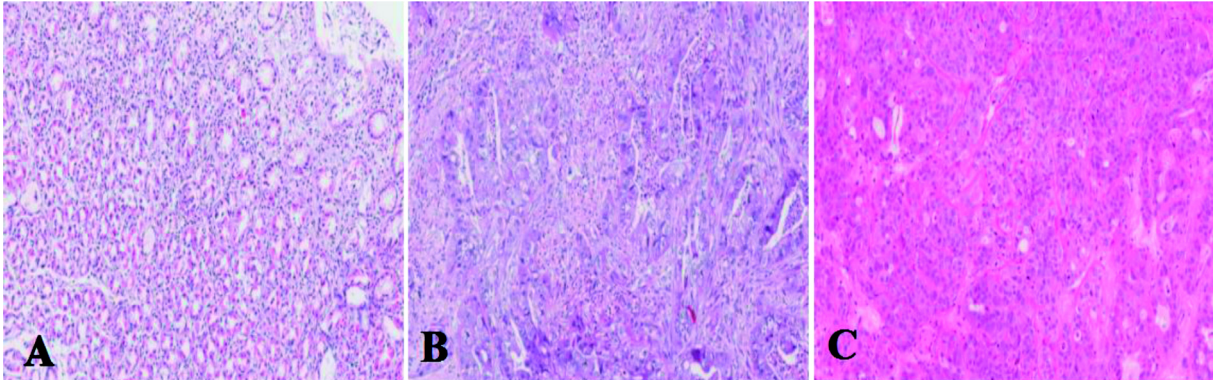
表 3 各化疗药物对细胞系 GAXC031 和 GAXC066 的 IC ₅₀ Table 3 IC50 of chemotherapy drugs on GAXC031 and GAXC066 cell line					μmol/L
细胞系	5- 氟尿嘧啶	顺铂	奥沙利铂	多西紫杉醇	伊立替康
GAXC031	0.265	22.312	10.059	0.005	38.549
GAXC066	>200	8.098	>100	0.002	29.258



Inhibition rate 为抑制率; Log CPD concentration 为化合物浓度的对数值

图 4 各化疗药物对细胞系 GAXC031 和 GAXC066 的生长抑制曲线

Figure 4 The growth inhibition of chemotherapy drugs on GAXC031 and GAXC066 cell line



A: 相应的癌旁组织(HE × 100); B: GAX066 移植瘤组织(HE × 100); C: 细胞系 GAXC066 体内成瘤组织 (HE × 100)

图 5 GAXC066 移植瘤的组织形态观察

Figure 5 Observation on histomorphology of GAX066 xenograft tumor

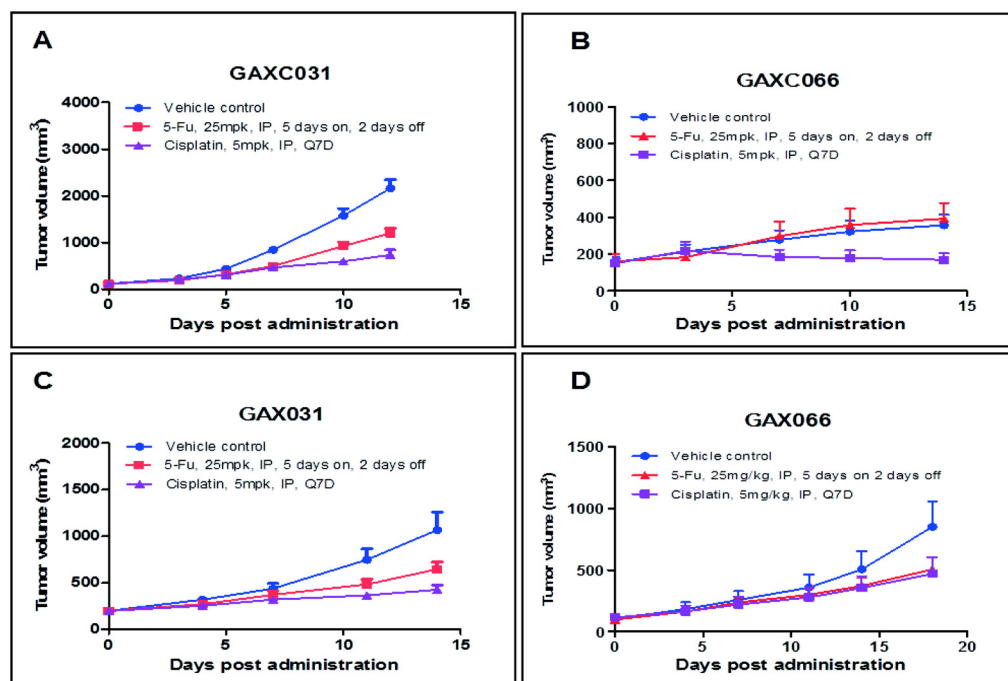
感性保持一致, 具有高度相关性; 顺铂对 GAXC066 具有较强的敏感性($P<0.05$), 而 5- 氟尿嘧啶对其不敏感($P>0.1$), 与 GAX066 体内药效实验具有一定的相似性, 但并没有表现出完全的一致性(图 6), 可能与亲本 GAX066 模型具有更高的异质性有关。

3 讨论

我国胃癌发病率比较高, 其病因尚不完全清楚, 其高发区主要集中在西北及沿海的各省市, 如甘肃省、上海市和江苏省等地^[17]。本研究在建立细胞

系时所使用的肿瘤模型均来源于江苏省南通市肿瘤医院的临床肿瘤标本^[15], 这为研究具有区域特异性胃癌的发生与发展及治疗提供了理想的体外研究模型, 而且选取的 12 例胃癌 PDX 模型均为腺癌, 这与中国人群中胃癌患者的病理分布情况也是相符合的^[16]。

本研究所建立的细胞系 GAXC031 和 GAXC066 性状均比较稳定, 可以稳定多次传代, 具有成瘤性强、潜伏期短、均一性较好等优点。在遗传学和病理学方面高度接近原肿瘤组织, 很好保持了肿瘤的临床生物学特性, 这对于抗癌药物的疗效具有很好预测性, 同时由于肿瘤来源于中国人群, 比较



A: GAXC031 体内药效曲线; B: GAXC066 体内药效曲线; C: GAX031 体内药效曲线; D: GAX066 体内药效曲线; Tumor volume 为肿瘤体积; Days post administration 为给药后天数; Vehicle control 为对照组, 5-Fu 为 5- 氟尿嘧啶, Cisplatin 为顺铂

图 6 体内 5- 氟尿嘧啶和顺铂对成瘤组织的生长抑制作用

Figure 6 *In vivo* tumor growth inhibitions of 5-Fu and Cisplatin on gastric cancer xenograft models

符合中国人的遗传特征, 因此, 这些新建立的细胞系对研发适合中国人的抗胃癌新药具有十分重要的理论和临床意义, 是胃癌研究理想的实验材料。

针对化疗药物 5- 氟尿嘧啶和顺铂而言, 细胞系 GAXC031 和 GAXC066 体内与体外药物敏感性相似, 这说明体内与体外数据间存在较高的相关性。体外药敏实验表明, GAXC031 和 GAXC066 对 5- 氟尿嘧啶的敏感性差异较大, 在体内药效实验中对肿瘤生长的抑制效果也具有明显的差异性; 而在体外药敏实验中对顺铂的敏感性无明显差异, 在体内药效实验中对顺铂的反应性也区别不大。通过体内药效实验相比, GAXC031 与 GAX031 对 5- 氟尿嘧啶和顺铂的反应性具有高度的相关性, 对于化疗药物的初步筛选具有很大的意义。

由于在胃癌治疗过程中, 铂类联合氟尿嘧啶类化疗一直是一线且唯一的临床推荐方案, 所以取得合适的研究材料以加深对 5- 氟尿嘧啶和顺铂耐药机制的了解, 有助于解决胃癌化疗中耐药现象产生的问题, 进而大大提高胃癌的化疗效果, 对胃癌的临床治疗具有非常重要的意义。对于细胞系 GAXC066 而言, 在体内与体外实验中对 5- 氟尿嘧

啶均表现出显著的耐药性。已有文献^[18-20]指出 5- 氟尿嘧啶的治疗效果与其代谢分解相关的靶向酶胸苷酸合成酶 (thymidylate synthase, TS) 和二氢嘧啶脱氢酶 (dihydropyrimidine dehydrogenase, DPD) 呈负相关, 其耐药的发生可能是与此类酶的表达以及基因多态性有关。但是到目前为止, 5- 氟尿嘧啶耐药的确切分子机制还不十分明确。因此, 细胞系 GAXC066 非常适用于研究 5- 氟尿嘧啶的耐药机制, 本研究中所建立的人胃癌细胞系对于有效指导临床研究也具有重要作用。

传统的肿瘤细胞系及移植瘤模型在药物研发中被广泛用于药物筛选。但由于长期体外培养, 传统细胞系逐渐丧失了很多疾病特征, 药效与临床存在很大的差异, 极大影响了药物研发进程。2016 年初美国国家癌症研究所 (NCI) 宣布, 于 2016 年春季末正式废弃已经被世界各地的研究人员使用了长达 25 年之久的 NCI-60 细胞系, 取而代之的是 PDX 模型及相关原代细胞系^[21]。PDX 模型是将患者肿瘤组织块接种到免疫缺陷小鼠中, 与传统细胞系建立的动物模型相比, 减少了体外培养步骤, 保持临床肿瘤的形态和分子学特征, 因而用该模型做的药

效结果更具有临床预测性。同时 PDX 模型接近于肿瘤的临床生物学特性,对药物的耐药性及敏感性具有良好的预测性,是辅助精准化医疗的有效工具之一。但 PDX 模型用时长、通量低、均一性差、难以进行大规模的药物筛选和机理研究。从 PDX 模型建立肿瘤原代细胞系,保持了 PDX 模型的基因和区域特性,同时可以像传统的细胞系一样在体外传代扩增,在很大程度上克服了 PDX 模型的缺陷。另外利用这些细胞系还可建立体内移植瘤模型,可以获得体外、体内两个相关联的药物筛选平台。本研究通过 PDX 模型肿瘤细胞原代培养,成功建立了人胃癌细胞系,对其生物特性进行分析鉴定,证实这些细胞系及移植瘤模型与亲本 PDX 模型相关性极好,可以作为 PDX 模型的补充。但必须指出,从 PDX 模型建立的肿瘤原代细胞系与 PDX 模型相比异质性降低,所以药物敏感性上与 PDX 模型可能存在不同。本研究中 5-氟尿嘧啶在 GAX066 PDX 模型有一定疗效,但对 GAXC066 细胞及移植瘤模型几乎没有任何疗效。提示 PDX 模型来源的肿瘤细胞系不能完全替代 PDX 模型,需要和 PDX 模型结合使用。

综上所述,本研究成功建立了 PDX 模型来源的胃癌细胞系,基本保持了 PDX 模型的特性,为胃癌的相关基础研究和药物研发提供了更多的工具。

参考文献:

- [1] Cidon EU, Centeno RG, Lagarto EG, et al. HER-2 evaluation in a specific gastric cancer population with the highest rate of mortality in Spain[J]. *J Oncol*, 2011;391564[Epub 2011 Oct 27].
- [2] Ye H, Jing YF, Shu DX. Can the incidence of gastric cancer be reduced in the new century[J]. *J Digest Dis*, 2013, 14(1): 11-15.
- [3] Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics [J]. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2):69-90.
- [4] He YT, Hou J, Chen ZF, et al. Trends in incidence of esophageal and gastric cardia cancer in high-risk areas in China [J]. *Eur J Cancer Prev*, 2008, 17(2):71-76.
- [5] Jin H, Pinheiro PS, Callahan KE, et al. Examining the gastric cancer survival gap between Asians and whites in the United States[J]. *Gastric Cancer*, 2016 [Epub ahead of print].
- [6] 刘天艺, 焦宇飞. 胃黏膜活检标本中上皮内瘤变及早期癌的病理诊断[J]. *中华病理学杂志*, 2014, 43(9):644-646.
- [7] 王江红, 项颖. 早期胃癌的筛查现状及诊断进展[J]. *重庆医学*, 2009, 38(20):2634-2636.
- [8] Dan Liu, Ming Lu, Jian Li, et al. The patterns and timing of recurrence after curative resection for gastric cancer in China [J]. *World J Surg Oncol*, 2016, 14(1), 305.
- [9] Binn M, Ruskoné fourmestraux A, Lepage E, et al. Surgical resection plus chemotherapy versus chemotherapy alone: comparison of two strategies to treat diffuse large B-cell gastric lymphoma[J]. *Ann Oncol*, 2003, 14(12):1751-1757.
- [10] Moelans CB, Milne AN, Morsink FH, et al. Low frequency of HER2 amplification and overexpression in early onset gastric cancer[J]. *Cell Oncol (Dordr)*, 2011, 34(2):89-95.
- [11] Liu KH, Hung CY, Lu CH, et al. Survival outcomes of geriatric patients with clinically resectable gastric cancer: to operate or not[J]. *J Surg Res*, 2016, 206(2):481-489.
- [12] Thiel A. Targeted therapy in gastric cancer[J]. *APMIS*, 2015, 123(5):365-372.
- [13] Li C, Zou J, Zheng G, et al. MiR-30a Decreases Multidrug Resistance (MDR) of Gastric Cancer Cells[J]. *Med Sci Monit*, 2016, 22:4509-4515.
- [14] Tang QF, Sun J, Yu H, et al. The Zuo Jin Wan formula induces mitochondrial apoptosis of cisplatin-resistant gastric cancer cells via Cofilin-1[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, 2017(1):8203189.
- [15] 许春花, 杨磊, 汤旭葵, 等. 人源性胃癌移植瘤模型的初步建立及其评价[J]. *实验动物与比较医学*, 2014, 34(4): 259-265.
- [16] 崔晋峰, 赵晨燕, 曹立勇, 等. 食管胃交界腺癌和远端胃癌 KLF4SP1 及 CyclinD1 表达的对比研究[J]. *中国肿瘤临床*, 2014, 41(2):108-112.
- [17] 李平. 浅谈胃癌的中医药治疗[J]. *中医药临床杂志*, 2011, 23(3):207-208.
- [18] Terashima M, Irinoda T, Fujiwara H, et al. Roles of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in tumor progression and sensitivity to 5-fluorouracil in human gastric cancer[J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(2A):761-768.
- [19] Qin B, Tanaka R, Shibata Y, et al. In-vitro schedule-dependent interaction between oxaliplatin and 5-fluorouracil in human gastric cancer cell lines[J]. *Anticancer Drugs*, 2006, 17(4):445-453.
- [20] Zhang X Q, Zhang H M, Sun X E, et al. Inhibitory effects and mechanism of 5-fluorouracil combined with celecoxib on human gastric cancer xenografts in nude mice[J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(1):105-111.
- [21] Chabner BA. NCI-60 Cell Line Screening: A Radical Departure in its Time[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2016, 108(5).

Establishment and Characterization of Patient Derived Gastric Cancer Cell Lines

GE Xiao-mei^{1,2}, ZHANG Yi-xin³, XIE Fu-bo^{1,4}, LIU Ji-bin³, YANG Lei³, QU Ying-ying¹,
GU Ying^{1,5}, Li Xue-ting¹, YANG Wei-min¹, LIU Xi-peng², ZHOU He^{1,4,5}, QIANG Fu-lin³

(1. Shanghai ChemPartner Co., Ltd, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China;

3. Nantong Tumor Hospital, Nantong 226361, China;

4. Engineering Research Center for Pharmaceutical Translation, Shanghai 201203, China;

5. Clinical Explorer (Shanghai) Co., Ltd, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective To establish and characterize primary gastric cancer cell lines derived from gastric cancer patient-derived xenograft (PDX) models. **Methods** Tumors from 12 stable gastric cancer PDX models were selected to establish primary tumor cell lines when the tumor volume reached 500~900 mm³. The established cell lines were characterized by cell morphology, chromosome, STR and immunohistochemical analyses, *in vivo* tumorigenicity, as well as drug sensitivity *in vitro* and *in vivo*. **Results** Six primary gastric tumor cell lines were successfully established. GAXC031 and GAXC066 were selected and characterized thoroughly. STR analysis confirmed that these 2 cell lines were consistent with their parental PDX models. These 2 cell lines presented the morphological, histological and genomic characteristics of malignant gastric cancer cells. They generated xenograft readily in nude mice and these tumors maintained histology characteristics of the parental PDX tumors. Moreover, compared to the parental PDX models, these 2 cell lines initiated xenografts with higher take rate, shorter incubation period, and better uniformity in tumor growth. *In vitro* and *in vivo* drug sensitivity test showed that GAXC031 was more sensitive to 5-fluorouracil than that of GAXC066, while both cell lines were sensitive to cisplatin. **Conclusions** Six patient derived gastric cell lines were successfully established from PDX models in this study. Deep characterization showed that these cell lines maintained many characteristics of the original PDX models with improved take rate, latent period and uniformity, therefore represent useful tools in basic research and drug screening.

[Key words] Patient-derived xenograft (PDX); Gastric cancer; Cell lines; Biological characteristics; Drug efficacy study

3D 打印多孔钛材料修复兔股骨 髌骨缺损的实验研究

邓 威¹, 郑 欣¹, 湛业帅¹, 芮 敏¹, 王 帆², 李 赛², 郭吉强¹, 刘 洪², 郭开今¹
(徐州医科大学附属医院骨科, 徐州 221000; 2. 徐州市第一人民医院影像科, 徐州 221000)

[摘要] 目的 研究 3D 打印的多孔钛材料对骨缺损的修复能力和成骨性能。方法 选取 20 只 6 月龄新西兰白兔, 在其股骨髌上制备直径 6 mm, 深 10 mm 的临界性骨缺损。实验组将多孔钛材料迅速注入骨缺损区。对侧生理盐水冲洗, 不植任何材料, 作为对照组。术后 3 d、4 周、8 周、12 周通过 X 线及 CT 观察骨缺损处生长变化, 术后 12 周处死所有新西兰白兔, 通过大体观察、X 线、CT、Micro-CT 及组织学观察骨缺损处的修复情况。结果 实验组与对照组一般情况良好, 术后 12 周取出标本清理周围软组织, 实验组缺损部位被新生骨填充; 对照组见缺损处骨质凹陷; 影像学观察, 实验组植入物区域与周围界限模糊不清; 对照组未见明显新生骨阴影; Micro-CT 观察, 术后 12 周实验组植入物区域空隙内长入新生骨组织, 植入物附近可见骨小梁长入; 对照组缺损区未见明显的骨长入; 硬组织切片观察, 实验组植入材料与成骨细胞结合, 可见成熟的哈佛氏系统散在分布于新生骨内; 对照组骨缺损区被大量纤维组织填充。IPP5.1 计算新生骨与缺损区面积比, 差异有统计学意义。结论 多孔钛材料可以促进骨组织的生长愈合, 新生骨组织可以长入并充满孔隙, 是一种很有应用前景的组织工程修复材料。

[关键词] 兔; 股骨髌; 骨缺损; 多孔钛; 3D 打印

[中图分类号] R683.4 Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)04-0266-07

由高能创伤、感染、骨肿瘤或先天性畸形切除引起的大段骨缺损, 至今仍是骨科临床医生面临的难题之一^[1]。目前较为常用方法有自体骨移植或同种异体骨移植, 但这两种方法都存在一定局限性^[2]。自体骨移植需要增加额外的手术, 创伤大, 取骨处往往会伴有神经损伤、骨折、感染等相关并发症^[3]; 同种异体骨移植有诱发免疫反应、与宿主骨整合、重塑缓慢、传播疾病等风险^[4]。多孔钛支架材料因其多孔结构与自然骨相接近, 利于新生骨

组织的长入而成为潜在的骨替代材料, 为治疗骨缺损提供了一种新的方式^[5]。作者利用激光立体成形技术对钛粉进行加工, 制备出多孔钛材料, 采用动物实验的方法, 验证该材料修复兔股骨髌骨缺损的能力, 为下一步临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、材料及相关仪器

选取 6 月龄普通级新西兰白兔 20 只, 雌雄不限, 体质量为 2.8~3.2 kg, 由徐州医科大学实验动物中心提供[SCXK(苏)2014-0009]。实验过程中对动物的处置参照科技部《关于善待实验动物的指导性意见》。多孔钛材料(创生医疗器械有限公司, 中国); 手术器械, 电钻及带刻度 6 mm 关节镜钻头(Smith & Nephew 公司, 美国); DR 设备(Philips 公司, 荷兰); CT(Siemens 公司, 德国); 光学显微镜(Olympus

[收稿日期] 2017-02-23

[基金项目] 江苏省卫生计生委面上科研课题(H201528); 江苏省省级重点研发专项资金项目(BE2015627); 第 59 批中国博士后科学基金面上项目(2016M591929); 徐州市科技社会发展项目(KC15SH067)共同资助

[作者简介] 邓 威(1986-), 男, 医学硕士, 研究方向: 运动创伤与关节镜。E-mail: dengwei0223@163.com

[通讯作者] 郭开今, E-mail: xzgj@sina.com

公司, 日本); Micro-CT(SkyScan1176 公司, 美国); 硬组织切片机(EXAKT 公司, 德国)。

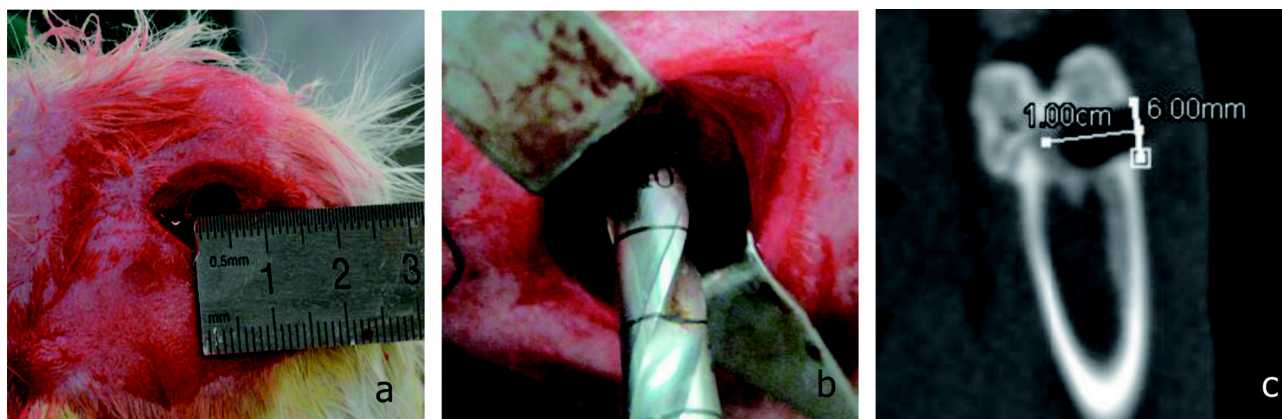
1.2 实验操作

多孔钛材料经高压蒸汽灭菌备用。以氯胺酮加氟哌利多肌肉注射麻醉, 地西洋耳缘静脉注射维持麻醉效果, 麻醉生效后将兔仰卧位固定于动物实验台上, 经过消毒铺巾, 在股骨外髁中点处做长约 2 cm 的纵形切口, 依次切开并分离皮肤、皮下组织、肌肉及骨膜, 暴露股骨外侧髁。用带刻度

直径 6 mm 关节镜钻头在股骨髁中心距远端关节面 4 mm 处钻出直径 6 mm、深 10 mm 的骨缺损空腔(图 1)。随机选择一侧股骨外髁, 植入多孔钛材料, 对侧股骨外髁缺损不植任何材料, 生理盐水冲洗, 作为对照组。逐层关闭切口, 伤口辅料包扎。术后所有兔单笼饲养, 连续 3 d 给予青霉素 80 万 U 肌肉注射。

1.3 观测指标

1.3.1 大体观察 观察术前及术后兔的饮食、活



a: 测量骨缺损直径为 6 mm; b: 测量骨缺损深度为 10 mm; c: CT 测量骨缺损直径及深度

图 1 实验兔股骨髁缺损造模

动、伤口愈合情况。术后 12 周处死实验动物, 取出标本, 观察植入材料有无漏出, 尽量多地去除周围软组织, 肉眼大体观察骨缺损区的修复及植入材料有无降解及多孔钛材料与宿主骨之间的愈合情况。

1.3.2 影像学观察 X 线观察术前兔股骨髁有无畸形并与术后对照, 术后 3 d、4 周、8 周、12 周观察骨缺损植入材料有无移位、脱出, 以及愈合和修复的情况。并做常规 CT, 三维重建及最大骨密度成像(MIP)。

1.3.3 Micro-CT 观察 术后 12 周选用 SkyScan1176 Micro-CT, 空间分辨率: 9 μm , 18 μm ; X-射线源: 密封 X-射线电子管 20~90 kV; 光斑尺寸: <5 μm ; 功率: 25 W; 样品扫描尺寸: 在最高分辨率的情况下, 直径为 68 mm, 最大扫描长度为 200 mm; 用 Overlay 叠加的方法通过不同颜色复合显示各个标本植入物区域内的新生骨。

1.3.4 组织学观察 制作股骨髁硬组织切片, HE 染色, 光学显微镜下观察新骨形成情况进行形态学分析, 并应用 IPP5.1 图像分析软件(美国 Media Cybernetics

公司)计算出新骨生成面积百分比(新生骨面积/骨缺损面积 $\times 100\%$)。

1.4 统计学处理

应用 SPSS19.0 统计学软件, 实验数据计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体观察

植入材料后兔的一般情况良好, 术后手术侧兔下肢有不同程度肿胀, 术后 5 d 时肿胀消失, 切口愈合良好, 无感染迹象, 实验过程中无兔死亡, 活动及进食正常。术后 12 周处死实验兔, 取出标本清理周围软组织, 可见实验侧骨缺损部位被新生骨组织填充, 新生骨覆盖材料, 骨缺损边界模糊不清, 与周围骨组织无明显差别; 对照组仍可见骨缺损处仍较周围骨质略凹陷, 被纤维包膜覆盖, 未修复(图 2)。

2.2 X 线及 CT 观察

2.2.1 X 线观察 术后 3 d, 术后 4 周、8 周两组于

骨缺损处及周围有不同程度的骨膜反应, 均见少量骨痂形成。术后 12 周 2 组均见骨痂形成, 实验组骨缺损植入物区域密度较宿主骨高, 骨痂形成较多, 与周围骨之间的界限模糊不清, 材料表面的腔隙已被充填。对照组骨缺损区域密度较低, 与周围骨界限清晰可见, 缺损区呈完全低密度透光影, 可见低密度缺损区及点状新生骨阴影(图 3)。

2.2.2 CT 观察 术后 3 d, 通过 CT 三维成像及最大密度投影(MIP)技术, 可见骨缺损, 植入物位置良好, 排列整齐; 术后 4 周, 可见骨缺损区域有纤维组织长入; 术后 8 周两组标本均可见不同程度的骨膜反应在骨缺损区及植入材料周围, 并可见少量骨痂形成; 到术后 12 周, 取出标本行 CT 检查。两组均见骨痂形成, 实验组多孔钛植入区域密度较周围宿主骨高并骨痂形成较多, 并与周围骨之间的界

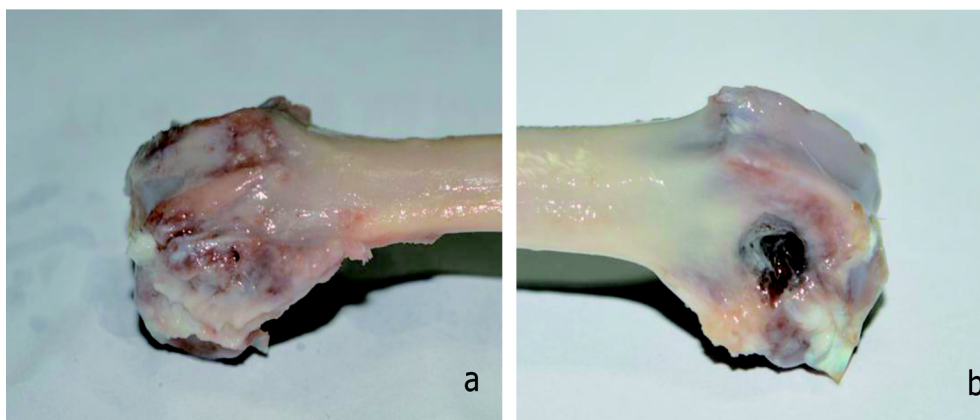
限模糊不清, 多孔区域已被充填。对照组骨缺损区域密度较低, 与周围骨界限清晰可见, 缺损区呈完全低密度透光影, 可见低密度缺损区及点状新生骨阴影(图 4)。

2.3 Micro-CT

术后 12 周可见实验组植入物区域空隙内长入新生骨组织, 与周围宿主骨连接处有成片或者成网状骨小梁生长, 新生骨与多孔材料结合紧密(图 5)。

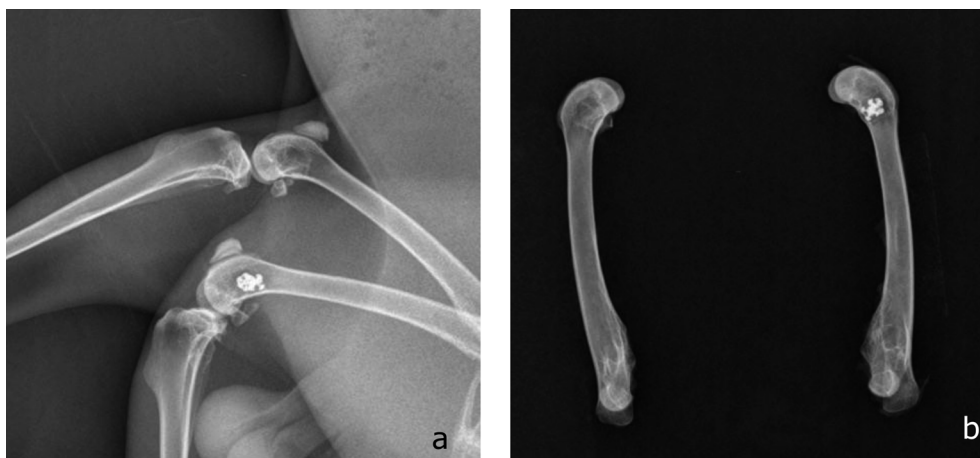
2.4 组织学观察

术后 12 周, 实验组植入材料与周围骨组织紧密结合, 未见明显炎性细胞浸润, 无纤维组织间隔, 植入材料区域无明显的骨吸收及骨溶解, 材料与成骨细胞结合, 新的骨小梁结构形成并与多孔钛紧密结合, 可见成熟的哈弗氏系统散在分布于新生骨内, 新生骨小梁结构通过多孔钛周边部向骨缺



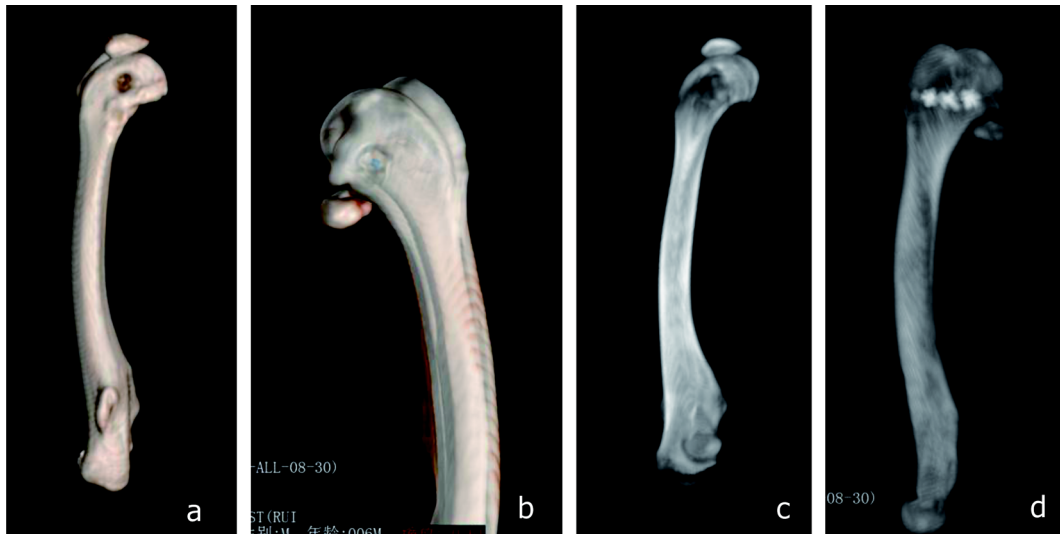
a: 植入材料组骨缺损区基本修复完整; b: 对照组骨缺损区被纤维包膜覆盖

图 2 兔股骨髓缺损标本



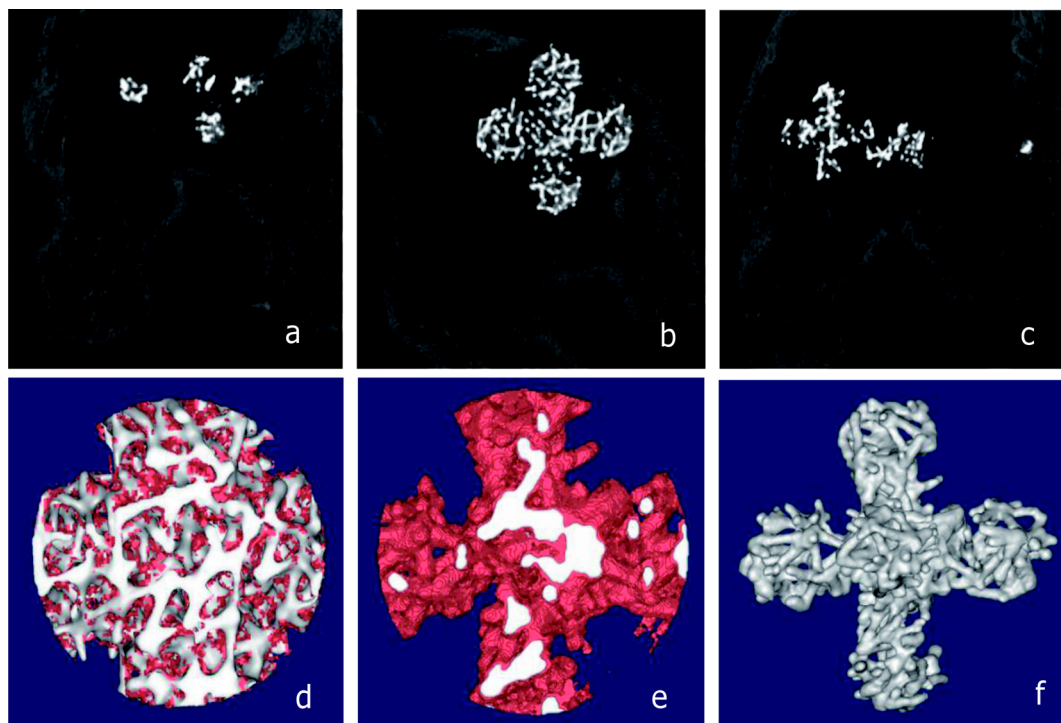
a: 术后 3 d, 植入物在位良好; b: 术后 12 周 X 线

图 3 兔股骨髓缺损术后 X 线观察



a: 对照组三维 CT 成像; b: 实验组三维 CT 成像; c: 对照组 MIP 成像; d: 实验组 MIP 成像

图 4 兔股骨髓缺损术后 CT 观察

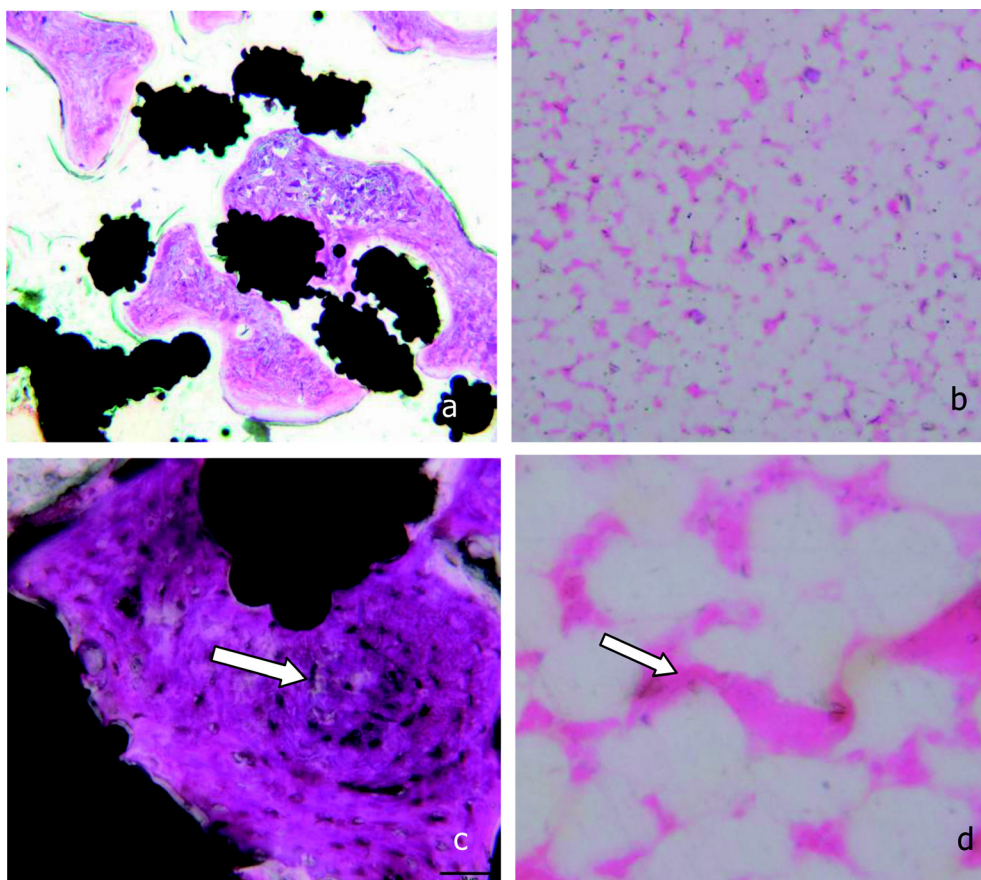


a: 可见骨小梁与材料紧密结合; b: 完整植入物显示; c: 植入物周围有新生骨包绕; d: 多孔材料空隙内新生骨长入(红色为新生骨); e: 材料被新生骨包绕(红色为新生骨); f: 植入材料 Micro-CT 三维显示

图 5 兔股骨髓缺损术后 Micro-CT 观察

损中心区长入, 植入材料被新生骨包绕, 多孔钛材料空隙内均可见新生骨长入; 对照组在骨缺损区边缘可见无序的新生骨形成, 数量较少, 骨缺损区被大量的纤维组织填充(图 6)。

实验组和对照组各选取 5 个切片, 通过 IPP5.1 图像分析软件计算新骨生成面积百分比 = 新生骨面积 / 骨缺损面积 $\times 100\%$ 。实验组和对照组在光学显微镜 $10\times$ 视野下随机选取 5 个视野, 计算出新



a: 实验组, 骨组织长入孔隙内(HE $\times 10$); b: 对照组, 骨缺损区未见明显骨长入(HE $\times 10$);
c: 实验组, 可见成熟的哈弗氏系统(HE $\times 40$); d: 对照组, 纤维组织被染成粉红色(HE $\times 40$)

图 6 兔股骨组织切片观察

生骨与骨缺损面积比为 0.1721 ± 0.0465 ; 对照组为 0.0291 ± 0.0421 ($P < 0.01$)。

3 讨论

骨缺损是严重危害人类健康的常见骨科疾病, 造成骨缺损的原因很多, 创伤、感染、肿瘤切除等较为常见, 由于骨质的缺失, 骨组织无法修复再生。骨缺损的治疗是骨科最为困难的部分之一, 目前主要为植骨, 包括自体植骨或同种异体骨移植为主, 且自体骨移植被公认为骨缺损修复的“金标准”。但采骨量有限, 术后供区疼痛等制约了

自体骨移植的应用, 异体骨移植虽然克服了自体骨的一些缺点, 却有引发免疫排斥反应、传播疾病的危险^[6,7]。多孔材料利于成骨细胞和血管的长入和骨生成、骨诱导和骨传导, 而成为近年来研究的热点^[8]。近年来, 新兴的组织工程人工骨技术给骨缺损治疗带来了希望。

多孔钛材料是一种优良的生物医用材料, 与人体骨骼密度和较为接近, 具备良好的可加工性, 以及很好地环境适应性^[9]。表面多孔结构, 有利于骨组织的长入, 改善植入体和骨组织的相容性, 同时能促进纤连蛋白和玻连蛋白在材料表面及内部的沉积^[10]。

基于3D打印的多孔钛材料因其多孔特性而成为骨替代物,其一,多孔结构利于成骨细胞的粘附、分化和生长,新生骨组织长入孔隙,加强了多孔钛材料与宿主骨的连接,达到生物固定的作用;其二,多孔钛的密度、强度和弹性模量能通过改变其孔隙度来调整,进而到达与宿主骨相匹配的力学相容性,避免植入体内发生骨变形、坏死和发生新骨畸变等;另外,开放的多孔结构利于血液和养料在植入物内的传输,促进组织的再生和重建,加快修复进程。有学者^[11]研究表明,多孔材料相互连通的孔隙能给血管提供长入空间,为组织提供营养,促进新生骨的长入。

本实验所采用的3D打印多孔钛材料,通过常规CT, Micro-CT观察,多孔钛材料的外形符合骨缺损部位的大小和形态;通过硬组织切片HE染色证实多孔钛材料能很好的修复骨缺损区域。多孔钛材料内部为相互连通的多孔开放系统,可以促进毛细血管向内生长,提供细胞所需的充足的营养和氧分^[12]。

有学者^[13,14]认为多孔钛材料的孔径150~600 μm 都能让骨组织长入。研究^[15,16]表明,40%孔隙率连通性差的多孔钛合金植入体内其钙磷含量低于孔隙率70%为连通性好的植入体,间接表明了连通的孔隙结构对体液转运的促进作用。本实验所采用的多孔钛材料的孔径范围是145~253 μm ,空隙互相贯通,术后12周通过常规CT, Micro-CT,硬组织切片组织学观察,植入材料的孔隙内均已长入并充满成熟的骨组织,骨缺损修复完整,植入物与周围骨组织形成连续的骨性结合,说明本实验所采用的多孔材料选择恰当,适合成骨细胞长入,达到了骨缺损修复的实验预期。

实验表明,多孔钛材料表面及孔隙内大量新生骨组织生成及长入,材料的多孔性更加利于成骨的早期贴附、增殖,有利于骨缺损的修复。3D打印的多孔钛材料在动物实验中表现出良好的生物相容性,植入物周围骨组织修复愈合良好,植入物与骨界面形成骨结合,新生骨组织长入并充满材料的多孔结构。

参考文献:

- [1] Yuan J, Cui L, Zhang WJ, et al. Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous β -tricalcium phosphate[J]. *Biomaterials*, 2007, 28(6):1005-1013.
- [2] Komaki H, Tanaka T, Chazono M, et al. Repair of segmental bone defects in rabbit tibiae using a complex of betatricalcium phosphate, type I collagen, and fibroblast growth factor-2[J]. *Biomaterials*, 2006, 27(29):5118-5126.
- [3] Samartzis D, Shen FH, Goldberg EJ, et al. Is autograft the gold standard in achieving radiographic fusion in one-level anterior cervical discectomy and fusion with rigid anterior plate fixation [J]. *Spine(Phila Pa 1976)*, 2005, 30(15):1756-1761.
- [4] Ding H, Mao Y, Yu B, et al. The use of morselized allografts without impaction and cemented cage support in acetabular revision surgery: a 4- to 9-year follow-up[J]. *J Orthopaedic Surg Res*, 2015, 10(1):77.
- [5] Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. Bone graft substitutes[J]. *Expert Rev Med Dev*, 2006, 3(1):49-57.
- [6] Olender E, Brubaker S, Uhrynowska-Tyszkiewicz I, et al. Autologous osteoblast transplantation, an innovative method of bone defect treatment: role of a tissue and cell bank in the process[J]. *Transplant Proc*, 2014, 46(8):2867-2872.
- [7] Faldini C, Traina F, Perna F, et al. Surgical treatment of aseptic forearm nonunion with plate and opposite bone graft strut. Autograft or allograft [J]. *Int Orthop*, 2015, 39(7):1343-1349.
- [8] Bucholz RW. Nonallograft osteoconductive bone graft substitutes[J]. *Clin Orthop Relat Res*, 2002(395):44-52.
- [9] Kenneth Ward W. A review of the foreign-body response to subcutaneously-implanted devices: the role of macrophages and cytokines in biofouling and fibrosis[J]. *J Diabetes Sci Technol*, 2008, 2(5):768-777.
- [10] Besong AA, Hailey JL, Ingham E, et al. A study of the combined effects of shelf ageing following irradiation in air and counterface roughness on the wear of UHMWPE[J]. *Biomed Mater Eng*, 1997, 7(1):59-65.
- [11] Al-Malaika S. Vitamin E: an effective biological antioxidant for polymer stabilisation[J]. *Polymers Polymer Composites*, 2000, 8(8):537-542.
- [12] Drosse I, Volkmer E, Capanna R, et al. Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach [J]. *Injury*, 2008, 39(Suppl 2):S9-S20
- [13] Wolfarth D, Ducheyne P. Effect of a change in interfacial geometry on the fatigue strength of porous-coated Ti-6Al-4V[J]. *J Biomed Mater Res A*, 1994, 28(4):417-425.
- [14] Gibson LJ, Ashby MF. Cellular solids: structure and properties [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1999.
- [15] Dugaard H, Elmengaard B, Bechtold JE, et al. Bone growth enhancement *in vivo* on press-fit titanium alloy implants with acid etched microtexture[J]. *J Biomed Mater Res A*, 2008, 87(2):434-440.
- [16] Shim J, Nakamura H, Ogawa T, et al. An understanding of the mechanism that promotes adhesion between roughened titanium implants and mineralized tissue[J]. *J Biomech Eng*, 2009, 131(5):054503.

An Experimental Study on Repairing Femoral Condyle Defect by Printing Porous Titanium with 3D Technology in Rabbits

DENG Wei¹, ZHENG Xin¹, SHEN Ye-shuai¹, RUI Min¹, WANG Fan²,

LI Sai², GUO Ji-qiang¹, LIU Hong², GUO Kai-jin¹

(1. Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, XuZhou 221000, China;

2. Imaging Department of Xuzhou No.1 People's Hospital, XuZhou 221000, China)

[Abstract] Objective To investigate the ability of the 3D printed porous titanium material for bone defect repairing and bone formation. **Methods** The critical bone defect models (6 mm in depth and 10 mm in diameter) were made of 20 six-month-old New Zealand white rabbits' femoral condyle. One of the porous titanium material was swiftly implanted into the bone defect area (experimental group, $n=20$), with the opposite side as control group (also the blank group, $n=20$), washed with saline and sutured without any implants. The samples were harvested and observed by X-ray and CT examinations at 3 days and 4, 8, 12 weeks after the operation to assess bone growth in the bone defect area. At 12 weeks after the operation, all rabbits were euthanized and evaluate the bone defect repair through X-ray, CT, histology and Micro-CT. **Results** Both the experimental group and control group recovered with good condition. At 12 weeks after the operation, we can see that the bone defect area was filled with new bone in the experimental group after removing the soft tissue surrounding the bone defect area; In contrast, the bone defect in control group was seen hollow and covered with fibrous capsule. According to the radiological observation, the demarcation line between the defect area and the surrounding area was obscure in the experimental group; the bone defect area in control group saw an entire translucency with no obvious shadow reflecting the new-borne bone. The Micro-CT observations proved fresh bone tissue formed in the plantation area at 12 weeks after the operation, and the surrounding area could see bone trabecula grown, In comparison, there was no obvious bone formed in the defect area of control group, which was filled by fiber tissue and relatively less bone trabecula and new-borne bone tissue. The results of un-decalcificated bones slicing showed the implanted material appeared combined with osteoblast, and the mature harversian system was seen distributed within the new-borne bone; for control group, a small amount of unordered bone formed in the defect area, filled with a lot of fiber texture. The area ratio of new-borne bone and the defect area was calculated via the IPP5.1 software, producing differences that have statistical significance. **Conclusion** A series of experiments prove that the porous titanium material has high biosecurity and ability to promote bone growth and healing. The new-borne bone tissue can grow and fill the lacuna, thereby effectively repairing bone defect. In short, the 3D printed porous titanium is a kind of promising repairing material in the tissue engineering field.

[Key words] Rabbits; Femoral condyle; Bone defect; Porous titanium; 3D printing

基于数字化三维重建技术的新西兰兔桡骨解剖学观测及研究

芮 敏, 郑 欣, 李成宇, 姜 伟, 姚圣城, 郭开今
(徐州医科大学附属医院骨科, 徐州 221006)

[摘要] 目的 利用 CT 图像三维重建技术获取不同月龄新西兰兔桡骨的解剖学数据, 为兔骨缺损实验研究及制造骨组织工程支架提供参考。方法 选取 3 月龄及 6 月龄雄性新西兰白兔各 20 只, 根据兔月龄不同分为 A 组(3 月龄)及 B 组(6 月龄), 所有兔双侧桡骨行 CT 扫描, 应用 Mimics10.0 软件行数字化三维重建技术重建桡骨, 标定桡骨解剖标志后测量桡骨长度, 桡骨中点矢状径、横径, 前曲角及侧曲角。结果 新西兰白兔桡骨两端粗大、中间细小, 中段存在明显弧形凸起, A 组及 B 组前曲角分别为 $(24.19 \pm 1.18)^\circ$ 及 $(23.97 \pm 1.35)^\circ$, 侧曲角分别为 $(26.13 \pm 1.04)^\circ$ 及 $(25.66 \pm 1.23)^\circ$, 二者差异均无统计学意义 ($P>0.05$); A 组桡骨线性长及曲线长分别为 (63.05 ± 1.33) mm 及 (65.03 ± 1.10) mm, B 组分别为 (66.56 ± 1.53) mm 及 (70.41 ± 1.06) mm, 组间比较差异均具有统计学意义 ($P<0.05$)。A 组、B 组桡骨中点横径分别为 (4.24 ± 0.19) mm 及 (4.30 ± 0.23) mm; 中点矢状径分别为 (3.23 ± 0.16) mm 及 (3.29 ± 0.18) mm。中点横径、矢状径与桡骨长度均无相关性 ($P>0.05$)。结论 基于 CT 影像的新西兰白兔桡骨数字化三维重建技术能良好反映桡骨外形, 可清晰识别桡骨解剖标志并进行解剖学测量, 为兔骨缺损实验研究及组织工程支架制造提供解剖数据。**[关键词]** 数字化三维重建; 新西兰白兔; 桡骨

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)04-0273-05

在骨组织工程实验研究中, 骨缺损动物模型是应用最为广泛的模型^[1], 理想的骨缺损动物模型是获得可靠实验数据的基础。新西兰白兔是最常使用的实验动物, 既往实验研究多采用游标卡尺等传统工具测量桡骨标本以获得相关解剖学参数, 但该方法具有一定局限性^[2], 如动物需处死后方能获得骨标本进行测量, 成本较大、可重复性低等^[3]。

随着医学数字技术快速发展, 数字化三维重建技术可对连续性断层图像进行三维重建, 不仅能

够精确显示骨骼三维外形, 且能设置为任意角度及方向观察其三维立体解剖结构, 并利用计算机软件精确测量相关参数^[4]。本实验通过对不同月龄新西兰白兔桡骨经 CT 扫描后行三维重建及相关解剖学参数测量, 并探讨兔桡骨解剖学参数间的相关性, 以为兔桡骨骨缺损动物模型及相关骨组织工程支架制备提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

3 月龄及 6 月龄普通级雄性新西兰白兔各 20 只, 由江苏省动物实验中心提供[SCXK(苏)2014-005], 排除骨骼发育畸形等疾病。3 月龄兔体质量 (2.24 ± 0.09) kg, 6 月龄兔体质量 (3.24 ± 0.10) kg。依据兔月龄将实验兔分为 A 组(3 月龄组)及 B 组(6 月龄组)[SYXK(苏)2014-005], 每组共计 40 例桡骨标本。

[收稿日期] 2017-02-02

[基金项目] 江苏省卫生计生委面上项目(H201528), 江苏省科技厅社会发展重点项目(BE2015627), 第 59 批中国博士后科学基金面上项目(2016M591929), 徐州市科技社会发展项目(KC15SH067)

[作者简介] 芮 敏(1990-), 硕士研究生, 从事骨组织工程实验研究。E-mail: ruimin325@163.com

[通讯作者] 郭开今。E-mail: xzgkj@sina.com

1.2 图像采集与保存

所有兔经肌肉注射地西洋注射液(2 mg/kg), 镇静麻醉后取仰卧位, 并使双侧前肢完全伸直, 使用 128 排 CT 机(Definition Flash, 德国 Siemens 公司)行双侧前肢平扫。扫描范围为肘关节至腕关节以确保获取完整桡骨数据。扫描参数: 80 kV, 300 mAs; 层厚 0.625 mm, 螺距 0.6 mm, 旋转时间 1.0 s。所获得的连续性断层图像以 Dicom 格式存储, 每组共获取 40 组兔桡骨 CT 影像数据。

1.3 三维重建与解剖参数测量

将扫描获取的 Dicom 格式桡骨 CT 数据导入 Mimics 10.0 软件(比利时 Materialise 公司), 对其进行数字化三维重建, 并去除附着的软组织及关节面软骨。根据三维图像中解剖标志定位确认桡骨干中点标记点, 以此为参考获得桡骨中点解剖平面及桡骨干解剖轴线, 利用 Mimics 软件进行影像解剖学参数测量。桡骨全长分别采用与大体测量技术相同的直线测量法及基于计算机软件的曲线测量法, 并对比这两种技术所获取的结果是否存在差异性; 选取桡骨中点并分割出与中点处骨干垂直平面定义为桡骨中点横截面。测量参数包括: 桡骨全长(线性长及曲线长)、桡骨干中点矢状径、横径, 前曲角, 侧曲角。其中, 定义线性长为桡骨两端关节面中点连线长; 曲线长为经曲线测量工具所获得的桡骨外侧皮质长。前曲角及侧曲角分别为侧位图、正位图中桡骨曲度最高点与桡骨两端皮质骨中点连线夹角。所有图像均放大 3 倍以上进行操作, 测量操作过程及结果均经两人复查确认并取平均值以减少误差。

1.4 统计学分析

应用 SPSS16.0 软件进行统计分析, 所有数据均经正态性分布检验。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 t

检验比较两组间测量参数, 对兔桡骨长度与中点矢状径、中点横径进行相关性检验(Pearson/Spearman 相关分析), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 桡骨数字化三维重建影像

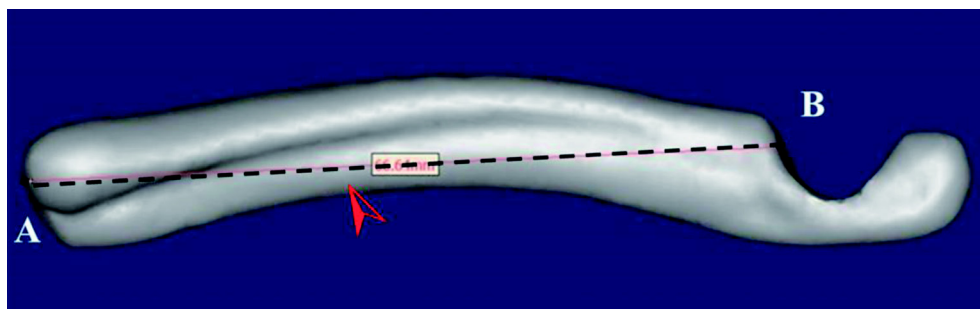
数字化重建后的新西兰白兔尺桡骨三维图像与大体标本相比无明显失真, 可清晰显示桡骨形态, 并能任意旋转角度, 从不同角度观察兔桡骨的解剖特点, 精确标定相应解剖标志、测量桡骨解剖参数。新西兰白兔尺桡骨由上下尺桡关节紧密连接, 桡骨近端外径较远端明显粗大, 且由两端向桡骨中段逐渐减小, 桡骨中段外径相对恒定(图 1); 侧位图可见桡骨中部向桡侧呈明显弧形凸出, 与尺骨凸起弧度基本一致(图 2); 正位图可见桡骨中部呈弧形向外侧稍凸出(图 3)。桡骨中点横断面图像显示桡骨断面近似椭圆形, 横径略大于矢状径(图 4)。

2.2 桡骨解剖参数测量

所有参数测量结果均经正态性检验分析, A 组(3 月龄)桡骨长度短于 B 组(6 月龄)桡骨长度($P < 0.05$); A 组及 B 组桡骨线性长度均短于曲线长度($t = 7.261$, $P < 0.05$; $t = 13.103$, $P < 0.05$); 两组桡骨中点横径、矢状径间的差异均无统计学意义($P > 0.05$)(表 1)。Pearson 相关分析结果显示, A、B 两组桡骨中点横径、矢状径与桡骨长度均无相关性($P > 0.05$)(表 2)。

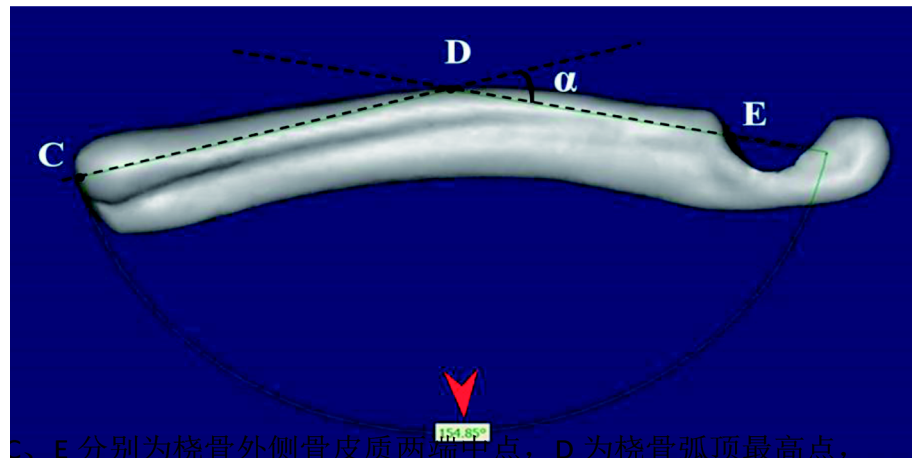
3 讨论

新西兰白兔桡骨解剖学参数是制备兔骨缺损动物模型及骨组织工程支架的重要参考数据, 但目前尚没有兔桡骨解剖学影像学测量的实验研究。传统的解剖学测量方法多是通过尸体标本进行解

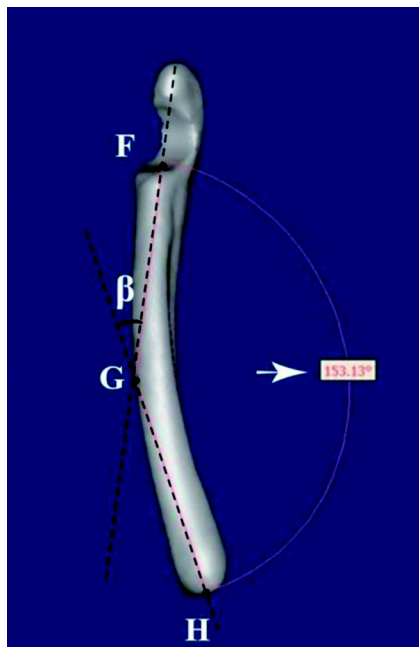


A、B 分别为桡骨两端关节面中点, 红色箭头标记为 AB 两点间直线距离

图 1 数字化重建尺桡骨侧位图



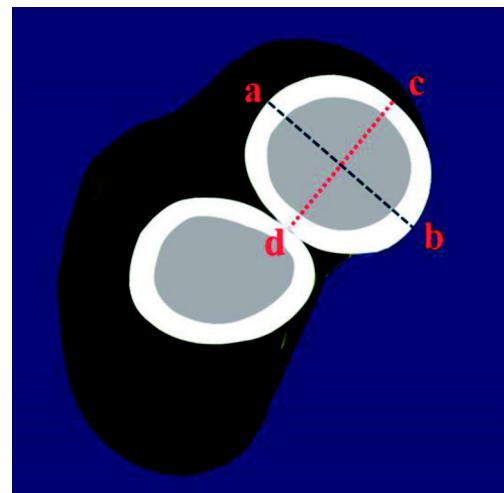
C、E 分别为桡骨外侧骨皮质两端中点, D 为桡骨弧顶最高点, 箭头标记为 CD、DE 连线交角, 前曲角($\angle \alpha$)为其补角
图 2 桡骨侧位及前曲角测量示意图



F、H 分别为桡骨上侧骨皮质两端中点, G 为桡骨侧凸最高点, 箭头标记为 GH、FG 连线交角, 侧曲角($\angle \beta$)为其补角

图 3 桡骨正位及侧曲角测量示意图

剖、剥离后, 利用游标卡尺等工具进行测量, 受实验标本数量的限制, 成本也较大、可重复性差^[5]。



虚线 ab、cd 分别为桡骨中点横截面横径及矢状径

图 4 桡骨中点横截面及横径、矢状径示意图

鉴于此, 作者采用计算机辅助的三维重建技术通过对连续性断层图像按其原始空间结构、位置进行三维重建, 能够保证样本量及测量方法的可重复性。虚拟解剖测量技术重建图像时可去除附着于桡骨的肌肉、肌腱等组织, 从任意角度及方向观察兔桡骨大体形态, 精确定位相关解剖标记点; 同时, 还可利用相关软件对桡骨任意平面切割, 进行距离、角

表 1 桡骨参数测量值

组 别	中点横径/mm	中点矢状径/mm	桡骨长度/mm		前曲角/°	侧曲角/°
			直线长	曲线长		
A 组(3 月龄)	4.24 ± 0.19	3.23 ± 0.16	63.05 ± 1.33	65.03 ± 1.10	24.19 ± 1.18	26.13 ± 1.04
B 组(6 月龄)	4.30 ± 0.23	3.29 ± 0.18	66.56 ± 1.53	70.41 ± 1.06	23.97 ± 1.35	25.66 ± 1.23
t 值	1.201	1.684	10.945	22.256	0.762	1.860
P	0.233	0.096	<0.001*	<0.001*	0.448	0.067

表2 参数间相关性分析(Pearson 相关分析)

参 数	相关系数 r	P
桡骨长度与中点横径	0.169	0.133
桡骨长度与中点矢状径	0.211	0.060

度等相关参数的测量,以求测量数据能够更好地应用于兔桡骨骨组织工程实验研究^[6]。

本研究三维重建图像显示新西兰白兔桡骨并非规则的线性柱状结构(图1),其中段存在一定弧度,因而通过测量大体解剖标本的方法无法获得精确的桡骨长度数据。作者通过模拟传统方法测量桡骨全长,即直线测量法,并与曲线测量法对比,结果显示桡骨线性长度小于曲线长度($P<0.05$)。这可能是由于传统的线性测量法仅能测量桡骨两端关节面间的直线距离,而兔桡骨中段存在明显弧度,将其弧线长度简单计算为线性距离往往导致测量误差增大。本实验6月龄兔桡骨直线长度与沈为栋等^[2]的实验结果存在一定差异,他们在实验中使用游标卡尺测量5~6月龄新西兰白兔桡骨,其平均长度约为 (70.66 ± 1.91) mm。Özkadif等^[4]采用多排CT对16只12~18月龄新西兰白兔(8只雌性,8只雄性)尺桡骨进行扫描三维重建后,行解剖学测量表明,雄性新西兰白兔右侧及左侧桡骨直线长度分别 (64.5 ± 10.76) mm及 (66.65 ± 10.92) mm,二者间差异无统计学意义,其测量结果与本实验6月龄组桡骨直线距离较为接近。本实验及Özkadif等^[4]的结果与沈为栋等^[2]的结果不同,可能与桡骨大体标本两端软组织剥离不充分,部分附着于关节面有关。三维重建图像时并未包括桡骨两端关节面软骨,而常规测量技术往往将关节软骨计算在内,这些干扰因素可能是导致其测量结果大于本实验结果的主要原因。另外,两组实验可能选取了不同封闭群的新西兰白兔,它们的遗传差异也可能导致二者桡骨参数不同。

在本研究中,3月龄兔桡骨长度约为6月龄兔桡骨长度的92.4%,相关性分析结果显示,新西兰白兔桡骨长度与体质量呈正相关。桡骨生长趋势基本与Rivas等^[7]研究结果一致,他们通过对新西兰白兔长骨在不同生长阶段的生长方式进行研究表明,16周龄兔长骨长度可达成成年兔长骨长度的95%,且其长骨在19~32周龄停止生长。本实验三维重建图像显示新西兰白兔桡骨形态不规则状,存在一定弧度,其外径由两端向中段呈渐进性减小趋势,中段横截面图

像显示其横径略长于矢状径(图4)。Giannoudis等^[8]提出“骨组织工程菱形概念”,他们认为骨组织工程支架与骨缺损断端间的机械稳定性对断端骨愈合至关重要。因此,在实验中选取规则的圆柱形结构支架往往导致支架与桡骨横断面及桡骨弧度不能完全匹配,而引起植入物与骨断端间断端机械性不稳、过度活动,甚至发生骨不愈合^[9],另外骨组织工程支架与宿主骨形态的不匹配也可能引起断端新生骨的畸形愈合。

本实验主要不足是未对兔桡骨大体解剖标本进行测量,并与影像学测量结果进行对比分析。后期作者将通过结合尸体标本的大体测量及数字化虚拟解剖测量技术,以获得更完整的新西兰白兔桡骨解剖形态数据,为兔桡骨骨缺损模型制作及骨组织工程支架设计提供更精确的数据参考。

综上所述,数字化三维重建技术能良好反映新西兰兔桡骨外形,清晰识别桡骨解剖标志并进行解剖学测量,为兔骨缺损模型构建及组织工程支架制造提供解剖数据,同时也为测量兔骨形态参数提供了方法。

参考文献:

- [1] 李东亚,郑欣,邱旭升,等.兔桡骨骨缺损动物模型中骨缺损长度及缺损位置的影像学比较研究[J].中国矫形外科杂志,2014,22(8):737-741.
- [2] 沈为栋,刘昌戎,张铁洪,等.新西兰大白兔桡骨的解剖学观测[J].中华实验外科杂志,2010,27(9):1331-1332.
- [3] 黎健伟,雷蕾,金丹,等.数字化组织瓣的虚拟临床解剖学测量[J].中国骨与关节外科,2013,6(1):25-29.
- [4] Özkadif S, Eken E, Beşoluk K, et al. Three-dimensional reconstruction of New Zealand rabbit antebrachium by multidetector computed tomography[J]. Iran J Vet Res, 2015, 16(2):205-209.
- [5] 马敏,罗树林,蔡俊丰,等.数字技术在全膝关节置换术股骨旋转控制中的应用[J].中华解剖与临床杂志,2014,19(6):460-464.
- [6] 孙辉红,陈益光,李晶,等.螺旋CT三维重建技术对股骨后髁角个体化测量的应用研究[J].中国CT和MRI杂志,2012,10(5):92-94.
- [7] Rivas R, Shapiro F. Structural stages in the development of the long bones and epiphyses: a study in the New Zealand white rabbit[J]. J Bone Joint Surg Am, 2002, 84-A(1):85-100.
- [8] Giannoudis PV, Einhorn TA, Marsh D. Fracture healing: the diamond concept[J]. Injury, 2007, 38(Suppl 4):S3-6.
- [9] 刘建恒,张里程,唐佩福.骨折延迟愈合和不愈合的诊治现状[J].中华外科杂志,2015,53(6):464-467.

Application of Digital Three-dimensional Reconstruction Technique in Anatomical Measurement and Investigation of Radius in New Zealand White Rabbits

RUI Min, ZHENG Xin, LI Cheng-yu, JIANG Wei, YAO Sheng-cheng, GUO Kai-jin

(Department of Orthopaedics, Affiliated Hospital of Xu Zhou

Medical University, Xu Zhou 221006, China)

[Abstract] **Objective** To obtain anatomical data of radius in New Zealand white rabbits with different age by three-dimensional reconstruction technique of CT images and provide references for rabbit bone defect experiment and bone tissue engineering scaffold manufacture. **Methods** Forty male New Zealand white rabbits aged 3 months and 6 months were included respectively in this study. According to their age, the rabbits were divided into group A (3 month) and group B (6 month). Computed tomography (CT) scanning of bilateral radius was conducted and the contours of 3D-reconstructed radius were observed by Mimics 10.0, the anatomical parameters including the length of radius, transverse diameters and sagittal diameters of middle of radius, front curvature angle and lateral curvature angle were measured respectively. **Results** The contours of radius were bulky at ends, narrow in the middle. The obvious camber was observed in radial middle, and the mean front curvature were $(24.19 \pm 1.18)^\circ$ in group A and $(23.97 \pm 1.35)^\circ$ in group B, and the lateral curvature angles were $(26.13 \pm 1.04)^\circ$ in group A and $(25.66 \pm 1.23)^\circ$ in group B respectively, and there was no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). The straight and curvilinear length of radius were (63.05 ± 1.33) mm and (65.03 ± 1.10) mm in group A, and (66.56 ± 1.53) mm and (70.41 ± 1.06) mm in group B respectively, with no significant difference ($P < 0.05$). The transverse diameters of the middle of radius were (4.24 ± 0.19) mm in group A and (4.30 ± 0.23) mm in group B. The sagittal diameters of the middle of radius were (3.23 ± 0.16) mm in group A and (3.29 ± 0.18) mm in group B respectively. There was no significant difference between the two groups with regard to sagittal diameters ($P > 0.05$). And the transverse diameters and the sagittal diameters of the middle of radius were not correlated with length of radius ($P > 0.05$). **Conclusions** It is feasible to accurately identify the contours and bony landmarks on the three-dimensional reconstruction of the radius. Digital measurement can provide accurate parameters for establishment of bone defect model and manufacture of bone-tissue engineering scaffold.

[Key words] Digitalization; Three-dimensional reconstruction; New Zealand white rabbits; Radius

柘木提取物抗胃肠道肿瘤的免疫机制研究

谢家骏¹, 张国明^{2,3}, 乔正东⁴, 陆宏祺⁵, 严惠芳⁵, 成苗^{2,3}

(1. 上海中医药大学, 上海 201203; 2. 上海市中药研究所, 上海 201400; 3. 上海雷允上药业有限公司, 上海 201400; 4. 上海市浦东医院, 201399; 5. 上海医药工业研究院, 上海 201203)

[摘要] 目的 观测柘木提取物对正常或荷瘤动物免疫功能变化的影响, 探讨其抗癌作用机制。方法 给药后观察正常小鼠碳粒廓清能力和腹腔巨噬细胞吞噬功能, 检测荷瘤小鼠淋巴细胞转化和自然杀伤(NK)细胞毒活性。结果 柘木提取物对正常小鼠碳粒廓清能力和腹腔巨噬细胞吞噬功能、对荷 C26 肠癌小鼠淋巴细胞转化和 NK 细胞活性均有增强作用, 最低有效剂量均为 0.3 g/kg, 相当于柘木生药 5.46 g/kg, 为临床单日使用剂量的 1.3 倍。结论 柘木提取物对胃肠道肿瘤抑制作用机制与其对胃肠道肿瘤细胞的直接抑制作用以及提高机体特异性和非特异性免疫功能有关。

[关键词] 柘木提取物; 胃肠道肿瘤; 抗肿瘤作用; 免疫功能

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)04-0278-05

柘木为桑科柘属植物柘树[*Maclura tricuspidata* Carrière, *Cudrania tricuspidata* (Carr.) Bur. ex Lavallee] 去皮后的干燥根和藤茎^[1]。柘木性温味甘无毒, 具有清热凉血、舒筋活络的功效, 近代民间有用其水煎液治疗癌症的报道^[2]。20 世纪中后叶, 柘木治疗胃肠道肿瘤的药品开发得到了广泛关注^[3-5]。在作者先期研究中显示, 柘木提取物对 SGC-7901 胃癌细胞和 HCT-116 肠癌细胞的生长均有抑制活性, 对裸小鼠 SGC-7901 移植瘤和 F1 小鼠 C26 肠癌足趾重量均有减轻效果^[6]。临床应用也证实柘木制剂对胃肠道肿瘤患者化疗或放疗有辅助治疗作用, 并能改善病人的生活质量^[7,8]。但有关柘木提取物治疗胃肠道肿瘤的免疫机制却少见有文献报道, 为此, 本文通过选用正常及荷瘤动物免疫功能检测方法对柘木提取物抑制胃肠道肿瘤的可能机制进行探索。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 F1 小鼠(BALB/c × ICR), 体质量

18~20 g, 由上海斯莱克实验动物有限公司提供[SCXK(沪)2002-0010]; 清洁级雄性 ICR 小鼠, 体质量 18~20 g, 由上海西普尔-必凯实验动物有限公司提供[SCXK(沪)2003-0002]。上述所有小鼠均分笼饲养(4~6 只/笼), 饲以鼠用固体高压料, 试验前禁食 12 h 时, 不禁水。

1.2 受试物

柘木提取物: 柘木, 切成小块, 加水 7 倍, 提取 4 h, 收取药液; 药渣加水 5 倍, 提取 3 h; 合并二次提取液后减压浓缩至相对密度 1.07(80 °C), 经喷雾干燥而成干浸膏粉。该浸膏粉外观性状为黄棕色, 味微苦、涩, 每克浸膏粉相当于 18.2 g 生药。该浸膏粉含总黄酮 1.8%, 山奈酚-7-O-β-D-葡萄糖甙 0.2%, 槲皮素-7-O-β-D-葡萄糖甙 0.18%, 由上海市中药研究所制备和提供, 批号 020708。实验前, 用蒸馏水配制成所需浓度的药液备用。氟尿嘧啶针剂, 250 mg/10 mL, 内容为微黄色透明液体, 上海旭东海普药业有限公司产品, 批号 990632。使用时, 用生理盐水稀释至 10 mg/mL 浓度备用。人参提取物: 外观性状为淡黄色干浸膏粉, 富含人参皂甙。使用时, 用蒸馏水稀释至 800 mg/100 mL 浓度的药液备用。云芝糖肽胶囊: 上海新康制药厂产品, 批号 020707, 实验时, 用蒸馏水稀释至 0.08 g/mL 浓度的药液, 备用。

[收稿日期] 2017-02-06

[作者简介] 谢家骏(1959-), 男, 研究员, 研究方向: 主要从事中药药理毒理学研究与中药新药开发研究。

E-mail: xiej001@163.com

1.3 肿瘤细胞株

小鼠 C26 肠癌和 L929 细胞株, 由上海医药工业研究院药理室提供。

1.4 仪器、试剂

8453 紫外可见分光光度计(美国 Agilent 公司); 310 型 CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司); 5804R 冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); 2-16K 离心机(德国 Sigma 公司)。

1.5 试验方法

1.5.1 碳粒廓清试验 小鼠 48 只, 按体质量随机分成 4 组, 每组 12 只。受试物给药组小鼠分别灌胃给柘木提取物 0.3 g/kg、0.8 g/kg, 阳性药对照组灌胃给人参提取物 0.16 g/kg, 空白对照组灌胃给等容量蒸馏水。每日给药 1 次, 连续 7 d。给药容量均为 20 mL/kg。末次给药后 1 h, 分别在各小鼠尾静脉处注入印度墨水 0.1 mL/只, 于注射后 1 min 及 10 min, 先后自小鼠眼眶后静脉丛取血 20 μ L, 溶于 2 mL 质量分数 0.1%Na₂CO₃ 溶液中混匀, 用紫外分光光度计, 在 680 nm 波长处比色, 读取吸光度值(A), 并按以下公式计算吞噬指数 X 值和吞噬活性 α 值。

$$K=(\text{Log}A_1-\text{Log}A_{10})\div(t_{10}-t_1)$$

$$\alpha=K/3\times\text{体质量}\div(\text{肝重}+\text{脾重})$$

其中 A₁ 和 A₁₀ 分别为注射印度墨水 1 min 和 10 min 时所取血样的 A, t₁₀-t₁ 为两次取血样的时间差。

1.5.2 巨噬细胞吞噬试验 小鼠 60 只, 按体质量随机分成 4 组, 每组 12 只。受试物给药组小鼠分别灌胃给柘木提取物 0.3 g/kg、0.8 g/kg, 阳性药对照组灌胃给人参提取物 0.16 g/kg, 空白对照组给等容量蒸馏水, 每日 1 次, 连续 7 d。给药容量均为 20 mL/kg。末次给药后每鼠腹腔注射体积分数 2% 鸡红细胞 0.5 mL, 1 h 后颈椎脱臼法处死, 剪开腹腔皮肤, 腹腔内注入 2 mL 生理盐水, 轻揉小鼠腹部后, 吸取腹腔冲洗液滴于载玻片上, 于 37 $^{\circ}$ C 温育 30 min, 孵毕, 于生理盐水中漂去未被吞噬的鸡红细胞, 吹干, 1:1 丙酮-甲醇溶液固定 5 min, 4%Giemsa-Wright 染色液染色 3 min, 晾干后于油镜下观察。计数 100 个巨噬细胞, 按下式计算吞噬百分率和吞噬指数。

吞噬百分率=100个巨噬细胞中吞噬有鸡红细胞的巨噬细胞数 $\div$ 100个巨噬细胞数 $\times$ 100%;

吞噬指数=100个巨噬细胞吞噬鸡红细胞的总

数 $\div$ 100个巨噬细胞数

1.5.3 淋巴细胞增殖试验 取 F1 小鼠, 右足趾皮下接种无菌制备的 C26 肠癌混悬液 0.05 mL/鼠 (约 1×10^6 个肿瘤细胞), 次日随机分成 7 组, 每组 8 只。受试物不同剂量给药组分别灌胃给柘木提取物 0.3 g/kg、0.6 g/kg、1.3 g/kg、2.6 g/kg、5.2 g/kg, 模型对照组灌胃给蒸馏水, 阳性药对照组灌胃给云芝糖肽胶囊药液 2 g/kg。每日 1 次, 连续 10 d。给药容量均为 20 mL/kg。末次给药后次日在无菌条件下取小鼠脾脏, 用 100 目筛网制成单个脾细胞悬液, 用含体积分数 10% 灭活小牛血清的 RPMI 1640 培养液调节细胞浓度为 1×10^7 个细胞/毫升, 加入 96 孔细胞培养板, 每孔 100 μ L (1×10^6 个细胞/孔), 再加入含 ConA(5 μ g/mL)培养液 100 μ L, 置 37 $^{\circ}$ C 体积分数 5%CO₂ 条件培养 72 h。轻轻吸弃上清液 100 μ L, 加入噻唑蓝(MTT)溶液(MTT 5 mg/mL)20 μ L。放置 37 $^{\circ}$ C 体积分数 5% CO₂ 条件培养 2 h 后加入消化液 100 μ L, 再放置至次日测各孔 A 值。实验重复 2 次。刺激指数计算公式: 刺激指数 = 实验组 A 值 / 对照组 A 值

1.5.4 自然杀伤(NK)细胞毒活性检测 取 F1 小鼠, 右足趾皮下接种无菌制备的 C26 肠癌混悬液 0.05 mL/鼠 (约 1×10^6 个肿瘤细胞), 次日随机分成 7 组, 每组 8 只。受试物不同剂量给药组 5 组, 分别灌胃给柘木提取物 0.3 g/kg、0.6 g/kg、1.3 g/kg、2.6 g/kg、5.2 g/kg, 模型对照组灌胃给蒸馏水, 阳性药对照组灌胃给云芝糖肽胶囊药液 2 g/kg。每日 1 次, 连续 10 d。给药容量均为 20 mL/kg。末次给药后次日在无菌条件下取小鼠脾脏, 用 100 目筛网制成单个脾细胞悬液, 低渗除去红细胞, 将细胞悬液转入培养瓶中, 37 $^{\circ}$ C 体积分数 5% CO₂ 条件培养 1 h 后去除贴壁细胞, 计数活细胞并调整细胞浓度为 3×10^6 个细胞/毫升作为效应细胞。靶细胞取 L929 体外培养细胞, 常规培养 24 h, 以培养液调整细胞浓度为 1.5×10^5 个细胞/mL, 使效靶细胞之比为 20:1。取 96 孔培养板分别加入效应细胞和靶细胞, 另设效应细胞和靶细胞对照, 于 37 $^{\circ}$ C 体积分数 5% CO₂ 条件培养 4 h 后, 加入 MTT 染色液, 再培养 2 h 后加入消化液, 于次日测各孔 A 值。实验重复 2 次。NK 细胞毒活性计算公式:

NK 细胞毒活性(%)=[1-(实验组 A 平均值-效应细胞 A 平均值)/靶细胞对照组 A 平均值] $\times$ 100%

1.5.5 数据统计 采用 SPSS 21.0 软件对实验数据进行统计。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较用单因素方差分析, 方差齐性时用 LSD 及 SNK 方法分析, 方差不齐时用非参数检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 碳粒廓清试验

柘木提取物使小鼠吞噬指数 K 值和校正吞噬活性 α 值均有升高, 与空白对照组比较差异显著 ($P < 0.05$)(表 1)。

表 1 柘木提取物对正常小鼠碳粒廓清能力的影响
Table 1 Effects of ZHEMU extrac on the ink clearance abilities in normal mice

组 别	剂量 /g · kg ⁻¹	n	吞噬指数 K	吞噬活性 α
空白对照	—	12	0.026 3 ± 0.006 5	4.32 ± 0.44
柘木提取物	0.3	12	0.028 5 ± 0.005 1	4.52 ± 0.25
柘木提取物	0.8	12	0.031 2 ± 0.003 8*	4.75 ± 0.42*
人参提取物	0.16	12	0.031 5 ± 0.005 3*	4.70 ± 0.37*

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$

2.2 巨噬细胞吞噬试验

柘木提取物使小鼠对鸡红细胞的吞噬百分率或吞噬指数均有明显提高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)(表 2)。

表 2 柘木提取物对正常小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能的影响
Table 2 Effects of ZHEMU extrac on the phagocytosis of peritoneal macrophages in normal mice

组 别	剂量 /g · kg ⁻¹	n	吞噬百分率 /%	吞噬活性
空白对照	—	12	51.5 ± 5.4	0.638 ± 0.081
柘木提取物	0.3	12	59.2 ± 9.5*	0.883 ± 0.215**
柘木提取物	0.8	12	61.6 ± 12.5*	0.976 ± 0.350*
人参提取物	0.16	12	57.7 ± 8.0*	0.838 ± 0.185**

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.3 淋巴细胞增殖试验

柘木提取物对 C26 荷瘤小鼠的淋巴细胞转化活性均有非常显著的提高作用($P < 0.01$)。受试物各剂量(由低剂量至高剂量)淋巴细胞转化活性刺激指数分别为 1.37、1.45、1.38、1.35、1.39(表 3)。

2.4 NK 细胞毒活性检测

柘木提取物对 C26 荷瘤小鼠的 NK 细胞毒活性均有非常显著提高作用($P < 0.01$)(表 4)。

表 3 柘木提取物对 C26 荷瘤小鼠淋巴细胞增殖活性的影响
Table 3 Effects of ZHEMU extrac on T Lymphocytes proliferative activity in C26 tumor bearing mice

组 别	剂量 /g · kg ⁻¹	n	A 值	刺激指数
柘木提取物	5.2	8	0.828 ± 0.04**	1.39
柘木提取物	2.6	8	0.803 ± 0.05**	1.35
柘木提取物	1.3	8	0.823 ± 0.08**	1.38
柘木提取物	0.6	8	0.860 ± 0.07**	1.45
柘木提取物	0.3	8	0.813 ± 0.07**	1.37
云芝糖肽	2.0	8	0.883 ± 0.08**	1.48
模型对照	—	16	0.595 ± 0.08	—

注: 与空白对照组比较, ** $P < 0.01$

表 4 柘木提取物对 C26 荷瘤小鼠 NK 细胞毒活性的影响
Table 4 Effects of ZHEMU extrac on the cytotoxicity of NK cell in C26 tumor bearing mice

组 别	剂量 /g · kg ⁻¹	n	A 值	NK 活性 /%
柘木提取物	5.2	8	0.41 ± 0.05**	55.9
柘木提取物	2.6	8	0.44 ± 0.05**	52.7
柘木提取物	1.3	8	0.45 ± 0.06**	49.8
柘木提取物	0.6	8	0.44 ± 0.06**	52.9
柘木提取物	0.3	8	0.44 ± 0.05**	52.8
云芝糖肽	2.0	8	0.38 ± 0.07**	59.8
模型对照	—	16	0.56 ± 0.05	40.0

注: 与模型对照组比较, ** $P < 0.01$; 靶细胞对照组的 A 值为 0.94 ± 0.05

3 讨论

柘木提取物(水煎剂)治疗胃肠道肿瘤始于民间, 以柘木提取物作为药用原料进行抗癌药物开发始于 1960 年代。经上海中药制药二厂、上海市第九制药厂、上海市医药工业研究院、河南医学学科研究所、上海市中药研究所以及上海雷允上药业有限公司的历代科研人员的不懈努力, 柘木糖浆^[4]产品于 1977 年被批准上市, 柘木注射剂在 1980 年研发成功, 柘木颗粒^[5]于 2008 年获得生产批件。

40 多年来, 以柘木提取物作为药用原料的制剂在临床上得到广泛应用^[9,10]。临床结果显示, 柘木制剂对胃肠道肿瘤具有明显抑制疗效。前期主要药效学研究结果亦显示, 柘木提取物体外对 SGC-7901 胃癌细胞和 HCT-116 肠癌细胞生长有直接抑制活性, 灌胃给药对裸小鼠 SGC-7901 移植瘤和 F1 小鼠 C26 肠癌足趾重量有明显减轻效果^[6]。药效和临床结果均显示, 柘木提取物对消化道肿瘤具有明显抑制作用。

柘木提取物对胃肠道肿瘤患者化疗或放疗呈现良好辅助治疗作用已成为其临床应用的一大特点,表现为能改善患者临床征候,保护细胞免疫功能,改善病人生活质量,且未见明显不良反应^[7]。对此,本文就柘木提取物对机体免疫调节作用进行了探索,结果表明其能显著提高正常小鼠碳粒廓清能力和腹腔巨噬细胞吞噬功能,明显增强对荷瘤小鼠淋巴细胞转化和NK细胞毒的活性。该结果提示,柘木提取物对胃肠道肿瘤的抑制作用与其通过免疫系统直接或间接增强机体抗肿瘤效应有关。关于柘木提取物对正常和荷瘤动物的淋巴细胞转化试验及各种细胞因子测定等有待进一步研究。

据成分分析,本受试物柘木提取物中富含黄酮和多糖类化合物。有研究认为,柘木中的黄酮类化合物是抗癌、抑癌的有效成分^[10-14],多糖类化合物参与了机体的免疫调节^[15,16],两者对胃肠道肿瘤具有协同对抗作用。柘木提取物抑制胃肠道肿瘤的多靶点效应,其所富含的黄酮和多糖类化合物可能就是其药效活性物质基础。

参考文献:

- [1] 中科院“中国植物志”编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2013.
- [2] 姜琳, 翟延君, 李正言. 柘木研究概述[J]. 辽宁中医药大学学报, 2009, 11(4):55-57.
- [3] 曹根生. 抗肿瘤新药柘木注射液[J]. 中成药研究, 1980(1): 34-35.
- [4] 上海中药二厂. 柘木糖浆[J]. 医药工业, 1977, 12:65.
- [5] 徐晓英, 邓海林, 袁华梁, 等. 柘木颗粒的质量标准研究[J]. 中成药, 2005, 27(12):1478-1479.
- [6] 谢家骏, 张国明, 乔正东, 等. 柘木提取物对胃肠道肿瘤的抑制作用[J]. 中成药, 2017, 39(3):602-604.
- [7] 许得盛, 肖丽明. 柘木糖浆治疗胃癌与化疗合用减毒作用的疗效观察[C]. 青岛: 第八届全国中西医结合肿瘤学术会议论文集, 2000:94-95.
- [8] 丁红华, 陈栋晖, 朱莉菲, 等. 柘木糖浆治疗胃癌疗效观察[J]. 中成药, 2001, 23(2):151-152.
- [9] 王佩芳, 沈辉, 唐红敏, 等. 柘木糖浆对胃癌前病变阻断逆转作用的疗效观察[J]. 中华医学实践杂志, 2003, 2 (1):57-58.
- [10] 孙菩, 袁耀宗, 郑舜华, 等. 柘木糖浆治疗活动期慢性胃炎及胃黏膜肠腺化生的疗效观察[J]. 中成药, 2005, 27(5): 12-14.
- [11] 张聪敏, 萧丽. 对柘木黄酮引起细胞凋亡及其机制的初步研究[J]. 漳州师范学院学报: 自然科学版, 2004, 17(4):98-101.
- [12] 张英慧, 徐誉泰. 柘木根黄酮注射液对小鼠 S180 肿瘤的抑制作用[J]. 佛山科学技术学院学报: 自然科学版, 2001, 19(3):75-77.
- [13] Kwon SB, Kim MJ, Yang JM, et al. *Cudrania tricuspidata* stem extract induces apoptosis via the extrinsic pathway in siha cervical cancer cells[J]. PLoS One, 2016, 11(3):e0150235.
- [14] 皮恩浩. 柘树抗肿瘤活性成分的药代动力学研究[D]. 上海: 复旦大学, 2010.
- [15] 宫丽华, 汪海霞, 王先磊, 等. 柘木根多糖对小鼠腹腔巨噬细胞活性的影响及其抑瘤作用[J]. 山东中医药大学学报, 2002, 56(2):145-146.
- [16] 杜卫东, 沈达明, 宋晓华, 等. 柘木糖浆对胃肠道肿瘤手术后化疗病人肿瘤标记物和细胞免疫的影响[J]. 临床医药杂志, 2004, 17(3):11-14.

Immunologic Mechanism of Inhibition on Gastrointestinal Tract Tumors of ZHEMU Extract

XIE Jia-jun¹, ZHANG Guo-ming^{2,3}, QIAO Zheng-dong⁴, LU Hong-qi⁵, YAN Hui-fang⁵, CHENG Mao^{2,3}

(1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Institute of Chinese Materia Medica, Shanghai 201400, China;

3. Shanghai Leiyunshang Pharmaceutical Co., Ltd, Shanghai 201400, China;

4. Shanghai Pudong Hospital, Shanghai 201399, China;

5. Shanghai Institute of Pharmaceutical Industry, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective To observation the changes of immune function in normal or tumor bearing animal after dose ZHEMU extract. **Methods** The carbon particle clearance test, macrophage phagocytosis test. NK cells activity and lymphocyte transformation in tumor bear animal are detected. **Results** The carbon granula clearance ability and phagocytosis of macrophage cell in abdominal on normal mice, and the lymphocyte transformation and natural killer (NK) cell activity in tumor bearing mice were enhanced after dosing, and the lowest effective dose were 0.3 g/kg, equivalent to the crude herb 5.46 g/kg, which was 1.3 times of clinical daily dose. **Conclusions** ZHEMU extract can restrain the growth of gastrointestinal tract tumors, and its mechanism may be related to the direct inhibition of the gastrointestinal tract cancerous cells growth and the improvement of the body's specific and non-specific immune function.

[Key words] ZHEMU extract; Gastrointestinal tract tumors; Anti-tumor activity; Immune function

成年实验兔群体饲养的可行性考察

李彩云^{1,2}, 姜子睿^{1,2}, 潘学营^{1,2}, 宋 征^{1,2}, 常 艳^{1,2}

(1. 国家上海新安全评价研究中心, 上海 201203;

2. 上海益诺思生物技术有限公司, 上海 201203)

[摘要] 目的 考察成年实验兔群体饲养的可行性。方法 取6月龄新西兰白兔38只, 雌雄各半, 单笼饲养, 群养前1d测定摄食量和体质量, 然后按性别分为2组, 每组19只, 分为8个群养笼, 其中, 5个群养笼2只/笼, 3个群养笼3只/笼, 群养7d, 观察实验兔摄食量、体质量、打斗及受伤情况, 随后继续单笼饲养至28d。结果 成年雌兔群养后比群养前摄食量下降, 群养影响动物体质量的正常增长; 且在群养第1日的观察中打斗频率较高, 社会等级确立后打斗减少或消失, 动物无明显受伤。成年雄兔群养期间摄食量降低明显, 并造成体质量下降, 打斗在整个群养期间持续发生, 导致动物明显的受伤甚至死亡。恢复单笼饲养后, 摄食量和体质量增长逐渐恢复。结论 成年雌兔经过群养初期的适应后可适当进行群体饲养, 成年雄兔群养不可行。

[关键词] 实验兔; 群体饲养; 配对饲养

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)04-0283-05

群体饲养(Social housing, 简称群养)是将2只及2只以上动物饲养在一个可全方位接触的指定区域。群养是现代实验动物行业中环境丰富程序的重要组成部分之一, 欧盟^[1]和美国均从法规方面提出了群养的要求, 尤其是在国际实验动物饲养管理评估机构AAALAC的倡导下, 在其作为指导的参考书《实验动物饲养管理和使用指南》(The Guide for the care and use of laboratory animals)第8版中明确说明群体饲养对于实验动物福利的重要性^[2]。前期已有研究^[3,4]表明, 群体饲养对于群居动物在行为学改善和福利提升方面都有很大的优势。兔属于社会性群居动物之一, 野生兔也被认为具有群居社交行为^[5], 而现实操作显示, 群体饲养实验兔并不成功, 实验兔群居性较差。本文通过对成年实验兔的群体饲养的实验观察, 进一步探讨群养对于成年实验兔的可行性。

[收稿日期] 2017-01-16

[基金项目] 上海市研发公共服务平台项目(15DZ2290300)

[作者简介] 李彩云(1983-), 女, 兽医学硕士, 助理研究员。

E-mail: cyli@ncdser.com

[通讯作者] 常 艳(1974-), 女, 药理学博士, 研究员。

E-mail: ychang@ncdser.com。

1 材料与方法

1.1 实验动物与仪器

SPF级6月龄新西兰白兔38只, 雌雄各半, 购自中国食品药品检定研究院[SCXK(京)2014-0013]。以上实验兔饲养于上海益诺思生物技术有限公司SPF区域兔饲养室内[SYXK(沪)2014-0009], 温度20~24℃, 相对湿度30%~70%。经过3d的检疫期, 确认通过检疫的动物进入本实验。开始实验前适应期不少于2d。实验前动物饲养于三层改良聚苯醚带多孔底板兔笼中(0.65m×0.65m×0.45m, 底面积为0.42m²), 每笼每只动物配有一个球状玩具, 自由饮水, 限制饮食, 每日给予150g配方颗粒饲料, 上下午各75g, 每周添加经果蔬清洗剂清洗和紫外灯照射消毒的果蔬2次, 及⁶⁰Co辐照干草2次。配方颗粒饲料和干草均来源北京科澳协力饲料有限公司[SCXK(京)2014-0010], 每批饲料均提供包含常规营养成分、重金属、农药和微生物学等检测指标; 新鲜果蔬来源于长期合作经过检测合格的水果商店。并按实验动物使用的3R原则给予人道关怀。

体质量称量工具TCS-15电子秤, 分度值5g;

摄食量称量工具PB3001-S/A电子天平,分度值0.1 g,均由METTLER TOLEDO公司(中国)生产。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 按性别分两组,雌性兔为组1,雄性兔为组2,每组19只,各组分8个群养笼,其中,5个群养笼2只/笼,3个群养笼3只/笼。实验前一直单笼饲养,以群养前1 d(简称“D-1”,实验第一日为D1,以此类推)动物单笼饲养的摄食量和体质量为自身对照组;单笼饲养时无打斗行为和受伤,对组1和组2进行比对分析。

实验前称重和一般体征检查,检查中发现有任何的异常均需记录,以便于和群养造成的异常进行区分。

1.2.2 群养 D-1打开单笼间的实质网板保留网格板进行间接接触群养,观察动物之间的情况。持续观察30 min,如动物未表现攻击性,在1 h、3 h时再次观察。群养7 d(D1~D7),D1拉开网格板,进行直接接触饲养,持续观察1 h,观察中出现有打架攻击行为需采取措施分隔动物并记录。D2~D7上下午各观察一次,包括饮食饮水、粪便尿液、外伤、打斗次数和异常行为等。D7下午4点后将所有群养动物分开,恢复单笼饲养至D28,D-1、D7、D14及D28称重和进行一般症状检查,记录动物身体状态等相关信息。群养中出现打斗比较严重的,如大出血,较严重外伤等问题,应立即停止群养。

动物摄食量观测方法:第2日加食前观察前一日的摄食量,以百分比做半定量观察并记录。单养时摄食量为单个动物的半定量值,群养时以每个食盒中的半定量值相加除以群养的动物数得到每只动物的摄食量。

体质量和受伤情况:在设定称重日的上午加食前测定动物体质量,同时进行动物一般症状检查。受伤分级:无任何外伤=0,脱毛,胆小,活动少=1,耳部皮肤小破损,微出血=2,睾丸、眼睛等重要部位破损或大的出血=3。

打斗次数和异常行为:打斗行为的观察分为群养D1持续观察1 h和群养D2~D7上下午短期观察。笼旁持续观察和定期观察时,群养动物之间身体接触性打斗或异常行为记录为1次,1 min以内出现的多次打斗和异常行为记录为1次。

1.3 统计学方法

动物体质量和摄食量采用SPSS21.0进行t检验

统计分析。打斗行为(次数)作为等级变量采用Wilcoxon秩和检验统计,受伤情况和异常行为(有无)作为二分类变量采用Pearson卡方统计分析。 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

群养D-1打开动物之间的实体挡板,保留网格板的间接接触方式,期望让动物进行熟悉和交流便于后面的直接接触群养,观察结果显示保留网格板的模式动物之间并无交流也不影响动物的摄食和活动,同完全隔离无任何差别。

实验分组中分别采用了2只或3只动物群养的方式,以期考察群养不同动物只数之间的差别。实验结果显示,群养时由于活动空间的增大,动物的突然暴起和窜动略有增加,其余试验结果均未见明显差异,因而实验结果分析未做群养动物数量的区分。组2雄性动物在群养的第3日其中一只动物因严重外伤死亡,以下数据统计实际上组1雌性为19只,组2雄性为18只。

2.1 体质量

组1雌性动物,群养前后体质量配对t检验P值均 <0.01 ,群养期间(D1~D7)动物体质量平均增长0.14 kg,隔离后单笼饲养(D8~D14)雌性动物体质量平均增重0.18 kg,群养影响雌性动物体质量增长率($\downarrow 29\%$),群养结束后一周(D14),雌性动物体质量仍增长显著,因而D28未对雌性动物再进行称重。组2雄性动物,群养前后体质量配对t检验P值均 <0.01 ,且群养期间(D1~D7)动物平均体质量较配对前体质量显著下降($\downarrow 0.08$ kg),分笼单养D7~D14,动物平均体质量有增长趋势($\uparrow 0.02$ kg),但仍未恢复至配对前动物平均体质量,直至分笼D28雄性动物体质量较配对前才有了明显增长($\uparrow 0.18$ kg),表明群养可导致雄性动物体质量下降(表1)。

表1 群养前后的动物体质量

日期	体质量/kg	
	组1	组2
D-1	3.98 $\pm$ 0.34	4.29 $\pm$ 0.32
D7	4.12 $\pm$ 0.35**	4.21 $\pm$ 0.24**
D14	4.30 $\pm$ 0.41**	4.23 $\pm$ 0.26
D28	N/A	4.46 $\pm$ 0.30**

注:与D-1比较,** $P<0.01$;组1 $n=19$,组2 $n=18$

2.2 摄食量和饮水

组1雌性动物D-1~D7和组2雄性动物D-1~D15的摄食量、饮水情况的观察结果(表2)显示,群养对组1雌性动物摄食量影响显著($P<0.01$),群养期间每日摄食量约为30%~40%,饮水变化不大,在停止群养后摄食量迅速恢复至接近100%。组2雄性动物在群养过程中的摄食量下降显著($P<0.01$),从数值上看摄食量接近于0,同时伴随饮水量大幅度减少或几乎无饮水。群养结束单笼饲养后,摄食量和饮水逐渐恢复。饮食饮水的下降导致组2雄性动物的粪便和尿液减少或粪便颗粒变小。组1雌性动物粪便和尿液量和形状则无明显变化。

日期	组1	组2
D-1	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
D1	27.89 ± 14.42**	3.33 ± 4.45**
D2	26.57 ± 20.71**	0.00 ± 0.00**
D3	36.57 ± 12.96**	0.00 ± 0.00**
D4	32.09 ± 17.17**	1.39 ± 2.08**
D5	32.88 ± 16.77**	2.51 ± 3.60**
D6	35.46 ± 13.22**	1.98 ± 2.13**
D7	96.32 ± 8.14	36.0 ± 28.76**
D8	N/A	28.89 ± 31.97**
D9	N/A	28.33 ± 26.00**
D10	N/A	52.78 ± 36.87**
D11	N/A	41.11 ± 37.24**
D12	N/A	44.72 ± 37.24**
D13	N/A	54.72 ± 36.44**
D14	N/A	65.28 ± 34.19**
D15	N/A	63.06 ± 31.07**

注:与D-1比较,** $P<0.01$;N/A:组1动物摄食量仅测定至D7;组1 $n=19$,组2 $n=18$

2.3 行为学表现

打斗行为:组1雌性动物在D1持续观察1h期间表现的打斗次数多,8个群养笼中打斗次数4次以上的有6笼,另外2笼打斗仅1~2次;组2雄性动物在D1开始群养的1h内,均表现安静,有6个群养笼动物未见打斗,仅1笼动物打斗有4次(表3)。群养后D2至D6的短期观察中雌性动物打斗极少发生,仅1笼动物观察到2次;雄性动物相反,均发现有多次打斗,仅1笼未观察到打斗(表4)。雌雄对比差异显著($P=0.003$),雌性动物的打斗均集中在刚开始群养的1h内,雄性动物的打斗则在后续的群养过程中明显多于雌性($P=0.011$)。

表3 群养D1持续观察1h打斗次数($n=8$)

组别	打斗次数						合计
	0次	1次	2次	4次	5次	8次	
组1	0	1	1	4	1	1	32
组2	6	1	0	1	0	0	5

注:组间比较, $P=0.003$

表4 群养D2~D6上下午观察到打斗次数结果($n=8$)

组别	打斗次数				合计
	0次	1次	2次	3次	
组1	7	0	1	0	2
组2	1	2	3	1	9

爬跨行为和其他异常行为:群养时较常见的行为表现为性成熟的成年动物之间表现出爬跨的交配行为。本实验显示雄性动物100%在D1表现有爬跨行为,雌性动物相对较少($P=0.055$)。其他异常行为则包括个别动物表现的卧倒不动、呼吸急促、瞳孔缩小、尖叫、咬尾、突然跳起窜动等,这些异常行为雌雄动物均出现,3只动物群养由于活动空间的增大暴起窜动的次数较多(表5)。

表5 爬跨行为和其他异常行为($n=8$)

组别	爬跨行为动物组		其他异常行为	
	无	有	无	有
组1	3	5	4	4
组2	0	8	4	4

组间比对:爬跨行为 $P=0.055$,无显著性差异;其他异常行为: $P=1$,无差异

2.4 受伤情况

实验前体检,所有动物均无身体肿块、外伤等其他可见异常。群养过程中体检观察到的受伤情况包括:阴茎皮肤擦伤极少量的出血,掉毛,耳朵皮肤擦伤或出血,眼睑划伤,睾丸皮肤擦伤,睾丸坏死,动物死亡等(表6)。组1大部分动物无外伤,少数动物掉毛或极小的耳部皮肤的轻微擦伤,无严重外伤动物。组2雄性动物严重受伤的有3只,其中一只因睾丸受伤坏死死亡,另两只一只睾丸皮肤受伤,另一只眼睑划伤而中断群养,其他动物均未见明显异常。雌雄受伤情况综合评价差异显著($P=0.032$)。

表6 群养过程中出现的受伤情况($n=19$)

组别	受伤情况分级			
	0	1	2	3
组1	10	6	3	0
组2	12	0	4	3

3 讨论

实验动物环境丰富的目标之一就是提倡对于实验动物的群养,目前大部分机构的对于实验兔的饲养方式依然是单独将动物饲养在较小的有限制的笼具中,这种方式很大程度限制了兔的正常行为表达和正常姿势的调整^[6]。已有研究表明,将兔群养在两个单笼中,活动空间的增倍和社群刺激可有效提升动物福利,群养动物会将更多的时间用于运动,可有效预防骨质疏松提升骨密度^[4,7]。Turner等^[8]研究证明,实验兔群养比单养更少发生异常行为如呆板症。

野生兔在自然环境中是社群动物,实验兔起源于野生兔,从理论上说,实验兔应该能很好适应群养。而现实情况是:实验兔本身非常温顺且表现和人非常亲近,然后当同性别动物出现在一起时,互相之间攻击性反而表现比野外时更强烈^[9]。在实验兔群养研究中,打斗是兔群养最大的挑战和难题。另一方面有人认为^[4]攻击性也是一种社交行为,但是对于实验动物饲养的有限环境中,攻击性则变成了一个问题。且随着动物从幼龄趋于性成熟,群养动物之间的打斗逐渐增加。有人认为^[10]从出生开始就建立群体饲养的方式可以有效的降低融合性的问题,Nevalainen等^[11]研究表明,这种情况并不能完全解决动物的攻击性行为,雌性新西兰兔从大约7周龄至5月龄群养,与单养动物相比,血液生化指标均无明显差异,群养动物的碱性磷酸酶和体质量有明显的降低;而打斗情况从21周开始至5月龄打斗明显,甚至有动物因打斗受伤需要中止实验。Debbie Gunn^[12]提出对于未达到性成熟之前实验兔,无论雌雄,均可以非常好地实现群养而不会造成打斗伤害,这种群养在离乳后就可以开始建立。将同群的兄弟姐妹群养是比陌生个体之间群养更好的方式,因同族群之间在哺乳期已经形成了很好的社会等级关系,而对于超过6月龄的兔不建议群养,这时候动物易于恐惧,缺乏适当的运动协调,长期的养缺乏足够运动使骨质结构易于受伤。只建议在幼龄动物或成年雌性动物中实行群养。Chu等^[4]研究显示,幼龄动物的群养,如果群养环境除了食槽外,无其他躲避或者隔离区域,打斗和受伤也有发生,但不会影响动物体质量增长。Held等^[13]研究表明,雌兔群养过程中的打斗主要发生在群养初期的社会等级建立,建立之后打

斗频率会有明显下降,这与本实验研究结果类似。Turner等^[10]研究结果表明,将5月龄雌兔4~5只群养,其免疫抑制平均值与单养动物比较,并无明显变化,且单养和群养兔在平均生长率上也无差别。而对于成年雄性,群养会产生非常大的攻击性并有造成严重伤害。支配(或优势)地位的争斗和对于领土对抗都是不可逾越的风险,动物之间无法建立和维持一个稳定的社会等级关系^[14]。

尽管实验兔群养在实践中存在一定困难,但是基于群养带来的动物福利提升,如将群养动物间的打斗降低到一个可以忍受水平,群养依然可以实现,例如未成年雌性和雄性,成年雌性之间。Whary等^[14]认为,合适的空间需求对于实验兔群养有一定意义,群养时每只动物占笼底面积大于3 750 cm²,动物间打斗会相对较少。Krohn等^[15]研究表明,对群养动物限制喂食和提供可以保护隐私的隔离墙或躲避区可以有效减少打斗或在打斗时减少受伤几率。

成年雌兔在进行短时间适应和社会等级的争斗后,能有效形成群养,群养对动物的摄食和体质量增长影响小,社会等级确立后打斗急剧减少甚至消失。成年雄兔间的打斗会严重影响动物摄食和体质量增长,打斗频率并不会随着时间增长而减少。

参考文献:

- [1] Council of Europe. Appendix A of the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS No. 123) [M]. Guidelines for accommodation and care of animals. Approved by the Multilateral Consultation. 2006, 42-50.
- [2] National Research Council of the National Academies. Guide for the care and use of laboratory animals [M], Eighth Edition. Washington DC., The National Academies Press, 2010:41-75.
- [3] Princz Z, Zotte AD, Radnai I, et al., Behaviour of growing rabbits under various housing conditions [J]. Appl Anim Behav Sci, 2008, 111(3-4), 342-356.
- [4] Chu L, Garner JP, Mench JA. A behavioral comparison of New Zealand White rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) housed individually or in pairs in conventional laboratory cages [J]. Appl Anim Behav Sci, 2004, 85(2), 121-139.
- [5] Cathy L, Kenneth L, Dave T, et al. Comfortable Quarters for Laboratory Animals [M]. Tenth Edition, Washington DC: Animal Welfare Institute, 2015, 65-76.
- [6] Gunn D, Morton DB. Inventory of the behaviour of New Zealand White rabbits in laboratory cages [J]. Appl Anim

- Behav Sci, 1995, 45(3-4):277-292.
- [7] Shimamura C, Iwamoto J, Takeda T, et al. Effect of decreased physical activity on bone mass in exercise-trained young rats [J]. Orthop Sci, 2002, 7(3):358-363.
- [8] Turner RJ, Held SD, Hirst JE, et al. An immunological assessment of group housed rabbits [J]. Laboratory Animals, 1997, 31(4):362-372.
- [9] Kraft R. Vergleichende Verhaltensstudien an Wildund Hauskaninchen: I. Das Verhaltensinventar von Wild-und Hauskaninchen [J]. J Anim Breed Genet, 1978, 95(1-4):140-162.
- [10] Stauffacher M, Peters A, Jennings M, et al. Future Principles for Housing and Care of Laboratory Rodents and Rabbits [M]. Report for the revision of the Council of Europe Convention ETS 123 Appendix A for rodents and rabbits. Part B issued by the Council's group of experts for rodents and rabbits, 2001.
- [11] Nevalainen TO, Nevalainen JI, Guhad FA, et al. Pair housing of rabbits reduces variances in growth rates and serum alkaline phosphatase levels [J]. Lab Anim, 2007, 41(4):432-440.
- [12] Debbie Gunn. Comfortable quarters for laboratory animals [M]. In: Viktor Reinhardt (ed). Washington DC: Animal Welfare Institute, 1997:46-54.
- [13] Held SDE, Turner RJ, Wootton RJ. Choices of laboratory rabbits for individual or group-housing [J]. Appl Anim Behav Sci, 1995, 46(1-2):81-91.
- [14] Whary M, Peper R, Borkowski G, et al. The effects of group housing on the research use of the laboratory rabbit [J]. Lab Anim, 1993, 27(4):330-341.
- [15] Krohn TC, Ritskes-Hoitinga J, Svendsen P. The effects of feeding and housing on the behaviour of the laboratory rabbit [J]. Lab Anim, 1999, 33(2):101-107.

The Feasibility of Social Housing for Adult Laboratory Rabbits

LI Cai-yun^{1,2}, JIANG Zi-rui^{1,2}, PAN Xue-ying^{1,2}, SONG Zheng^{1,2}, CHANG Yan^{1,2}

(1. National Shanghai Center for New Drug Safety Evaluation and Research, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Innostar Bio-tech Co. Ltd., Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective To study the feasibility of social housing for adult laboratory rabbits.

Methods Totally 38 New Zealand white rabbits aged at 6 months with 19 males and 19 females were single housed. Food intake and body weight were observed one day prior to social housing, then the rabbits were divided into 2 groups (19 male, 19 female), each group respectively housed in 8 cages (5 cages with 2 rabbits, 3 cages with 3 rabbits) for 7 days, food intake, body weight, fighting and injury were observed during 7 days social housing, and then single housed for 21 days. **Results** The food intake of female rabbits was decreased compared with that of being single housed, the normal growth of body weight was affected; high fighting frequency was observed at the first day of social housing, fighting frequency reduced or stopped after social hierarchy established; no obvious injuries were observed. The amount of food intake and body weight were reduced significantly for adult male rabbits during social housing, frequent and continuous fights were observed that caused serious injuries even death.

Conclusions Adult female rabbits can be social housed under proper nursing by animal care staff during the initial stage of social housing, social housing for adult male rabbits is infeasible.

[Key words] Laboratory rabbits; Social housing; Pair housing

泛酸钠对 Beagle 犬心血管指标的影响

张成梅¹, 纪建波², 武传涛¹, 宋文延³, 史艳秋¹

(山东大学 1. 实验动物中心, 济南 250012; 2. 药学院药理学研究所, 济南 250012;

3. 医学院诊断学研究所, 济南 250012)

[摘要] 目的 观察泛酸钠对 Beagle 犬心血管指标的影响。方法 选取健康 Beagle 犬 16 只, 雌雄各半, 随机分为泛酸钠低剂量(L, 0.26 mg/kg)、中剂量(M, 0.52 mg/kg)、高剂量(H, 1.04 mg/kg)组及生理盐水(NS)对照组, 每组 4 只。静脉给予质量分数 3% 戊巴比妥钠麻醉, 分离一侧颈动脉, 插入充满肝素-NS 溶液的动脉插管, 测定收缩压、舒张压; 分离一侧后肢股静脉, 按 1 mL/kg 静脉单次给药; 将针状电极插入四肢皮下, 待动物各项观察指标稳定后, 分别记录药前、药后 5 min、15 min、30 min、45 min 和 60 min 的血压、心率及心电图(ECG)指标。结果 L、M、H 三个剂量组与 NS 组比较, 泛酸钠对 Beagle 犬颈动脉平均动脉压、心率及心电等指标的差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 泛酸钠对麻醉状态下 Beagle 犬心血管指标无明显影响。

[关键词] 泛酸钠; 心电图指标; 血压; 心率; Beagle 犬

[中图分类号] R965.3; R-332 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)04-0288-04

泛酸(Pantothenate acid)属于维生素 B 族中的一种, 是人和动物所必需的营养物质, 作为辅酶A(CoA)的一个重要组成部分参与体内新陈代谢, 特别是对脂肪的合成与代谢起着十分重要的作用^[1]。自然界中游离泛酸极不稳定, 临床常用的泛酸制剂有泛酸的钙盐和钠盐两种形式, 泛酸钙原料及其片剂已经收载于中国药典 2000 版^[2], 但由于泛酸经常需要与其他 B 族维生素(如核黄素磷酸钠)或其他磷酸盐类的药物合用, 泛酸钙会因形成磷酸钙而降低效价, 所以必须使用泛酸的钠盐^[3,4]。随着泛酸钠制剂在临床上的广泛应用, 它的安全性也引起人们重视, 本文探讨了泛酸钠对 Beagle 犬心血管指标的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级 Beagle 犬 16 只, 体质量 10.5~13.5 kg,

12~16 月龄, 雌雄各半, 南京安利默实验动物有限公司生产[SLXI(苏)2002-0002], 饲养于山东大学实验动物中心[SYXK(鲁)2013-0001]。

1.2 仪器及试剂

多导生理记录仪 BL-410 型(四川成都泰盟科技有限公司), YP100 血压换能器、JZ100 张力换能器(四川成都仪器厂)。泛酸钠(Pantothenic acid sodium, 含量 98%, 浙江杭康海洋生物药业股份有限公司, 批号 030109), 戊巴比妥钠(中国医药上海化学试剂有限公司进口分装, 批号 F20021216), 肝素钠(烟台东诚生化有限公司, 批号 02100241), 生理盐水(NS, 山东华鲁制药有限公司, 批号 A03010208)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及给药 动物按体质量随机分 4 组, 每组 4 只, 分别为泛酸钠低、中、高剂量组及生理盐水对照组(NS 组), 单次静脉给药。泛酸钠低、中、高剂量组给药剂量分别为 0.26 mg/kg、0.52 mg/kg、1.04 mg/kg, 对照组给予等容积的生理盐水, 给药体积为 1 mL/kg。

1.3.2 手术操作^[5,6] Beagle 犬静脉给予质量分数 3% 戊巴比妥钠麻醉, 仰位固定, 分离一侧颈动脉, 插入充满肝素-NS 液的动脉插管, 经压力换能器测

[收稿日期] 2016-12-12

[基金项目] 山东省自然科学基金(ZR2011CZ001)

[作者简介] 张成梅(1967-), 女, 硕士, 主要从事实验动物及药物安全性评价研究。E-mail: Zhangcm@sdu.edu.cn

[通讯作者] 史艳秋(1966-), 女, 硕士生导师, 研究方向为药理学。E-mail: Shiyq@sdu.edu.cn

定收缩压、舒张压;分离一侧后肢股静脉,静脉单次给药,给药容积1mL/kg;将针状电极插入四肢皮下,待动物各项观察指标稳定后,分别记录给药前、给药后5 min、15 min、30 min、45 min和60 min的血压、心率指标,观察心电图(ECG)的ST、PR、T波。

1.4 统计分析

采用SPSS10.0统计学软件进行统计分析,用单因素方差分析(ANVOA)进行 q 检验。组间比较用方差分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 泛酸钠对麻醉状态下 Beagle 犬平均动脉压的影响

泛酸钠L、M、H各剂量组间、组内以及与NS组比较,在给药前、给药后5 min、15 min、30 min、45 min和60 min对麻醉Beagle犬平均动脉压差异没有统计学意义($P>0.05$)(表1)。

2.2 泛酸钠对麻醉状态下 Beagle 犬心率的影响

泛酸钠L、M、H各剂量组的组间、组内与NS组比较,在给药前、给药后5 min、15 min、

30 min、45 min和60 min对麻醉Beagle犬心率没有明显改变($P>0.05$)(表2)。

2.3 泛酸钠对麻醉状态下 Beagle 犬 ECG T波影响

泛酸钠L、M、H各剂量组间、组内以及与NS组比较,在给药前,L组与NS组比较,虽然出现了差异有统计学意义($P<0.05$),但没有生理学意义。给药后5 min、15 min、30 min、45 min和60 min泛酸钠各剂量组对麻醉Beagle犬ECG T波没有显示明显变化($P>0.05$)(表3)。

2.4 泛酸钠对麻醉状态下 Beagle 犬 ECG ST段的影响

泛酸钠L、M、H各剂量组间、组内以及与NS组比较、在药前、药后5 min、15 min、30 min、45 min和60 min泛酸钠对麻醉Beagle犬ECG ST段没有明显变化($P>0.05$)(表4)。

2.5 泛酸钠对麻醉状态下 Beagle 犬 ECG PR间期的影响

泛酸钠L、M、H各剂量组间、组内以及与NS组比较、在给药前、给药后5 min、15 min、30 min、45 min和60 min泛酸钠对麻醉Beagle犬ECG PR间期差异没有统计学意义($P>0.05$)(表5)。

表1 泛酸钠对 Beagle 犬平均动脉压的影响

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	给药前	给药后时间/min					kPa
			5	15	30	45	60	
NS	—	139.72 ± 19.72	141.21 ± 20.77	141.61 ± 21.44	142.08 ± 20.69	138.76 ± 14.87	134.62 ± 19.64	
L	0.26	127.46 ± 32.53	135.62 ± 19.15	135.61 ± 19.15	136.83 ± 19.61	133.74 ± 17.04	131.76 ± 18.87	
M	0.52	134.25 ± 28.90	133.40 ± 33.43	134.08 ± 29.81	133.13 ± 28.73	133.78 ± 30.80	135.61 ± 30.96	
H	1.04	141.73 ± 29.13	139.08 ± 33.10	137.42 ± 31.29	137.96 ± 33.94	136.01 ± 30.65	138.75 ± 35.36	

表2 泛酸钠对 Beagle 犬心率的影响

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	给药前	给药后时间/min					次/min
			5	15	30	45	60	
NS	—	109.00 ± 2.16	108.25 ± 2.28	113.75 ± 11.50	114.00 ± 12.00	114.25 ± 11.84	113.50 ± 11.00	
L	0.26	107.75 ± 1.71	110.50 ± 7.72	112.50 ± 10.38	112.50 ± 11.03	112.25 ± 10.53	112.25 ± 9.88	
M	0.52	108.00 ± 1.41	108.00 ± 2.45	109.50 ± 3.11	109.00 ± 3.46	108.75 ± 3.59	108.50 ± 3.11	
H	1.04	112.25 ± 11.21	111.50 ± 8.23	113.25 ± 11.24	113.00 ± 11.37	113.25 ± 11.30	111.00 ± 6.22	

表3 泛酸钠对 Beagle 犬 ECG T波的影响

组别	剂量/ mg·kg ⁻¹	给药前	给药后时间/min					mV
			5	15	30	45	60	
NS	—	0.41 ± 0.05	0.40 ± 0.01	0.28 ± 0.10	0.25 ± 0.10	0.25 ± 0.05	0.30 ± 0.02	
L	0.26	0.29 ± 0.09*	0.33 ± 0.09	0.30 ± 0.12	0.29 ± 0.17	0.31 ± 0.17	0.32 ± 0.15	
M	0.52	0.35 ± 0.14	0.39 ± 0.10	0.31 ± 0.10	0.28 ± 0.14	0.29 ± 0.16	0.34 ± 0.08	
H	1.04	0.33 ± 0.05	0.33 ± 0.10	0.30 ± 0.08	0.35 ± 0.10	0.29 ± 0.10	0.30 ± 0.08	

注:与对照组比较,* $P<0.05$

表 4 泛酸钠对 Beagle 犬 ECG ST 段的影响

mV

组别	剂量/ mg · kg ⁻¹	给药前	给药后时间 /min				
			5	15	30	45	60
NS	—	0.38 ± 0.05	0.40 ± 0.011	0.38 ± 0.05	0.41 ± 0.05	0.30 ± 0.01	0.35 ± 0.06
L	0.26	0.43 ± 0.05	0.43 ± 0.05	0.36 ± 0.08	0.36 ± 0.11	0.34 ± 0.08	0.38 ± 0.09
M	0.52	0.40 ± 0.00	0.39 ± 0.03	0.37 ± 0.05	0.39 ± 0.08	0.33 ± 0.07	0.36 ± 0.05
H	1.04	0.39 ± 0.03	0.36 ± 0.05	0.39 ± 0.03	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.04	0.38 ± 0.05

表 5 泛酸钠对 Beagle 犬 ECG PR 间期的影响

s

组别	剂量/ mg · kg ⁻¹	给药前	给药后时间 /min				
			5	15	30	45	60
NS	—	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.10 ± 0.01	0.11 ± 0.09
L	0.26	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.19	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01
M	0.52	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.01
H	1.04	0.10 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.11 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.10 ± 0.01

3 讨论

维生素是人们日常膳食中不可缺少的一大类营养素, 为人体内不能合成的一组有机化合物, 必须从食物中获得。虽然人体对维生素的需要量甚微, 但对于维持代谢的正常进行不可缺少^[7]。从营养学角度看, 泛酸属于维生素 B 族中的一种, 为水溶性维生素, 广泛分布于生物界, 如肝、肾、蛋黄、花生和米糠中的含量较高, 于 1933 年从酵母中首次分离。泛酸在体内主要以 CoA 形式参与糖、脂肪、蛋白质的代谢, CoA 在代谢中起转移酰基的作用^[8]。临床上应用泛酸、泛硫乙胺作为 CoA 合成的前体物质, 进入 CoA 合成通路转化成 CoA, 提高体内细胞 CoA 的水平, 起 CoA 的作用。它可帮助生物体细胞形成, 维持正常发育和中枢神经系统的发育, 维持肾上腺的正常机能, 也是抗体合成、人体利用对氨基苯甲酸和胆碱的必需物质^[9,10]。

随着对泛酸盐研究的进一步深入^[11], 发现泛酸钠适用于先天性甲状腺功能减退症(克汀病)与儿童及成人的各种原因引起的甲状腺功能减退症的长期替代治疗, 也可用于单纯性甲状腺肿, 慢性淋巴细胞性甲状腺炎, 甲状腺癌手术后的抑制(及替代)治疗。流行病学研究结果显示, 近些年, 我国人群甲状腺疾病有上升趋势, 在女性、老年人、伴有其他自身免疫性疾病的患者及碘缺乏或碘过量地区的人群中更高, 并且其发病随年龄增加而增加^[12]。因此, 作为对这一类疾病有疗效的药物, 泛酸钠的

临床药用价值越来越引起人们的重视。

本文结果显示, 泛酸钠给药后不同时间检测 Beagle 犬的血压、心率及 ECG 等指标, 与给药前比较没有统计学差异($P>0.05$), 表明对犬的心血管指标没有明显影响。此次动物试验, 只是属于泛酸钠临床前一般药理试验的一部分, 其安全性还有待结合其它动物试验结果进一步确证。但随着近些年患甲状腺疾病人群的逐年增加, 泛酸钠作为治疗甲状腺疾病的辅助药物, 有待进一步开发及应用。

参考文献:

- [1] Weeks AM, Coyle SM, Jinek M. Structural and biochemical studies of a fluoroacetyl-CoA-specific thioesterase reveal a molecular basis for fluorine selectivity[J]. Biochemistry, 2010, 49(43):9269-9279.
- [2] 中华人民共和国药典二部[S]. 泛酸钙、泛酸钙片质量标准. 2000:317.
- [3] 张潇潇, 裘娟萍. 泛酸生物合成相关酶及其基因的研究进展[J]. 科技通报, 2008, 24(6):899-905.
- [4] 王璇. 泛酸、生物素、胆碱[J]. 食品与健康, 2007, 11(7): 10-11.
- [5] 史红, 吕燕萍, 钱伯初. 安全药理学研究的基本要求及其规范化[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2005, 10(9):961-965.
- [6] 王三龙, 张颖丽, 齐卫红, 等. 清醒Beagle犬安全药理心血管遥测系统验证研究[J]. 中国药理学杂志, 2010, 45(11):828-831.
- [7] 姜骅, 唐成康. 泛酸研究及其应用[J]. 四川食品与发酵, 2004, 40(1):11-13.
- [8] Bender DA. Optimum nutrition: thiamin, biotin and pantothenate[J]. Proc Nutr Soc, 1999, 58(2):427-433.

- [9] Aileen R, Downs DM. Elevated levels of ketopantoate hydroxymethyltransferase(PanB) lead to a physiologically significant coenzyme A elevation in salmonella enterica serovar typhimurium[J]. J Bacteriol, 2002, 84(1):2827-2832.
- [10] Scott DE, Ciulli A, Abell C. Coenzyme biosynthesis: enzyme mechanism, structure and inhibition[J]. Nat Prod Rep, 2007, 24(5):1009-1026.
- [11] Jonczyk R, Ronconi S, Rychlik M. Pantothenate synthetase is essential but not limiting for pantothenate biosynthesis in Arabidopsis[J]. Plant Mol Biol, 2008, 66(1):1-14.
- [12] 江彤, 郭帅, 吕艳. 亚临床甲状腺功能减退症[J]. 中国综合临床, 2006, 22(7):671-672.

Effect of Sodium Pantothenate on Cardiovascular in Beagle Dogs

ZHANG Cheng-mei¹, JI Jian-bo², WU Chuan-tao¹, SONG Wen-yan³, SHI Yan-qiu¹

(1. Laboratory Animal Center of Shandong University, Jinan 250012, China;

2. Institute of Pharmacology, School of Pharmacy, Shandong University, Jinan 250012, China;

3. Institute of Medical Diagnostics, School of Medicine, Shandong University, Jinan 250012, China)

[Abstract] **Objective** To observe the general influence of sodium pantothenate on the cardiovascular indicators of Beagle dogs. **Method** Sixteen healthy Beagle dog with half female and male. They were randomly divided into four groups: high, medium and lower dose of sodium pantothenate with 0.26 mg/kg, 0.52 mg/kg, 1.04 mg/kg and normal saline control group (NS). The dogs were anesthetized with intravenous injection of 3% pentobarbital sodium. The unilateral carotid artery was dissociated so as to insert the artery cannulae for measuring systolic and diastolic blood pressure. Then unilateral femoral vein is isolated for a single intravenous injection of 1 mL/kg sodium pantothenate, and electrodes were placed into their limbs to record the indexes of blood pressure, heart rate and electrocardiograph before administration and at different time points after drug administration while each observation index of the Beagle dogs was constant. **Result** In this experiment, sodium pantothenate did not evidently change the value of blood pressure, heart rate and electrocardiographic in Beagle dogs after intravenous injection ($P>0.05$). **Conclusion** The sodium pantothenate has no evident effects on the cardiovascular indicators of Beagle dogs.

[Key words] Sodium pantothenate; electrocardiograph (ECG) index; Blood pressure; Heart rate; Beagle dogs

酪酸菌对小鼠有害气体排放的影响

潘黎捷, 余文兰, 任斌斌, 陈 嘉, 马晓莉, 张俊俊, 刘永伦, 刘忠华
(华南农业大学, 广州 510642)

[摘要] 目的 探讨酪酸菌对小鼠有害气体排放的影响。方法 80只KM小鼠分4组, 每组20只, 雌雄各半, I组为对照组, II组、III组、IV组分别连续21d灌胃酪酸菌500 mg/kg、1 000 mg/kg、1 500 mg/kg, 每日测定独立通气笼内氨(NH₃)和硫化氢(H₂S)浓度, 试验21d测定各组小鼠生长性能、小鼠粪便中脲酶活性。结果 与对照组相比, III组、IV组小鼠的平均日增重略有提高, 但没有统计学差异; 灌胃后7d, III组、IV组笼内NH₃含量明显低于I组和II组($P<0.05$), 各组均未检测到H₂S。结论 酪酸菌可能会影响小鼠的生长性能和氨的排放。

[关键词] 酪酸菌; 小鼠; 有害气体; 脲酶

[中图分类号] Q95-336 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)04-0292-03

实验动物作为科学研究中“活的分析天平”已经广泛用于生物医药、食品科学等多个领域, 其中小鼠是最常用的实验动物。但是, 饲养实验过程中, 实验小鼠排放的有害气体包括氨气、硫化氢等具有强烈的刺激性气味及毒性, 会影响实验动物健康, 从而影响动物实验质量, 同时也可能工作人员的健康。酪酸菌作为微生态制剂研究, 最早由宫入近治博士于1993年报道^[1]。由于它具有高活性、高稳定性、耐热耐酸及对常用抗菌素有抗性等特点, 在临床上广泛应用于治疗各种肠道疾病, 是一种较理想的有开发前景的微生态制剂^[2]。根据微生态理论, 酪酸菌制剂能够在数量或种类上补充肠道内的正常微生物菌群, 纠正肠道菌群紊乱, 维持肠道内微生态平衡。本实验通过研究酪酸菌对实验动物小鼠粪便有害气体及脲酶活性的影响, 旨在寻找新型除臭方法, 降低有害气体对动物的影响, 提高实验动物福利及科研质量。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级KM小鼠80只, 体质量(18±2)g, 雌雄各半, 由广东省医学实验动物中心提供[SCXK(粤)2013-0002], 饲养于华南农业大学[SYXK(粤)2014-0136]独立通气笼内, 每笼5只。每日定量给饲料, 自由饮水。7d更换一次垫料。

1.2 试验仪器及药品

酪酸菌为湖北某生物公司赠送, 活菌数 $\geq 2.0 \times 10^8$ cfu/g; 10%尿素、甲苯、苯酚钠、次氯酸钠、丙酮均购自广州维宁生物科技有限公司; 氨气(NH₃)检测仪(JSA8-NH₃-X)、硫化氢(H₂S)检测仪(JSA8-H₂S-X)购自广州市渝通商贸有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 将小鼠按雌雄各半原则分为4组, 每组20只, 其中I组为对照组, II组、III组、IV组分别按酪酸菌500 mg/kg、1000 mg/kg、1 500 mg/kg连续灌胃21d。

1.3.2 小鼠生产性能的测定 每只小鼠每日定量给10g饲料, 每日记录小鼠的耗料量, 试验开始和21d结束时称重, 计算日采食量、日增重和饲料增重比。

1.3.3 NH₃和硫化氢H₂S的测定 通过NH₃、H₂S检测仪每日通过测试孔检测小鼠独立通气笼中的NH₃和H₂S的浓度。

[收稿日期] 2017-07-16

[基金项目] 广东省科技计划项目(2014A030304028)

[作者简介] 潘黎捷(1982-), 女, 硕士, 研究方向为实验动物学, E-mail: 164666607@qq.com

[通讯作者] 刘忠华(1970-), 男, 博士, 教授, 研究方向为实验动物学, E-mail: 1003280841@qq.com

1.3.4 粪样脲酶活性测定 实验 21 d 采集各组新鲜粪便, 取 2 g 粪样, 加入 0.5 mL 甲苯 15 min 后加入 5 mL 尿素和 10 mL pH 6.7 柠檬酸盐缓冲液, 摇匀, 37 °C 培养 24 h, 取上清, 加水 2 mL, 4 000 r/min 离心 5 min, 取 1 mL 上清液采用靛酚蓝比色法测定脲酶活性(以 $\text{NH}_3\text{-N}$ 含量表示)。

1.4 统计分析

使用 SPSS 统计软件单因素方差分析(ANOVA)和最小显著差数法(LSD)进行分析处理, 所有结果均采用平均值 $\pm$ 标准差表示, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 酪酸菌对小鼠生产性能的影响

如表 1, III组、IV组小鼠平均日增重略高于对照组, 但无统计学差异($P>0.05$), 料重比略低于对照组($P>0.05$), 日采食量没有明显变化($P>0.05$)。

表 1 不同浓度酪酸菌对小鼠生产性能的变化

组别	日增重/g	日采食量/g	料重比
I 组	0.67 ± 0.15^a	6.32 ± 1.01^a	9.24 ± 0.32^a
II 组	0.71 ± 0.19^a	6.75 ± 1.79^a	9.51 ± 0.41^a
III组	0.79 ± 0.24^a	6.45 ± 1.32^a	8.56 ± 0.54^a
IV组	0.83 ± 0.22^a	6.29 ± 2.02^a	8.12 ± 0.32^a

注: 样本数 $n=20$; 同列数据肩标相同小写字母表示组间差异不显著($P>0.05$)

2.2 酪酸菌对小鼠粪便中 NH_3 和 H_2S 排放的影响

从表 2 可见, 灌胃后 7 d, III组、IV组中 NH_3 的排泄量明显低于 I 组和 II 组($P<0.05$), 7 d 更换垫料, 重复 2 周, 各组间笼内氨浓度与第一周没有明显差异($P>0.05$)。各组 H_2S 浓度检测读数均为零。

表 2 灌胃不同浓度酪酸菌不同时间小鼠粪便中 NH_3 的浓度 mg/m^3

组别	灌胃后时间/d			
	1	3	5	7
I 组	0	2.48 ± 2.19^a	38.97 ± 9.37^b	65.44 ± 5.1^b
II 组	0	6.96 ± 2.15^a	18.71 ± 7.69^a	59.31 ± 6.54^b
III组	0	5.92 ± 2.38^a	20.85 ± 4.47^a	24.78 ± 3.92^a
IV组	0	6.39 ± 3.33^a	16.19 ± 6.53^a	18.72 ± 4.95^a

注: 样本数 $n=20$; 同列数据肩标相同小写字母表示组间差异不显著($P>0.05$), 同列数据肩标不同小写字母表示组间差异显著($P<0.05$)

2.3 酪酸菌对小鼠粪便中脲酶的影响

如图 1, III组、IV组粪便中相对脲酶活性比 I 组和 II 组分别降低 14.4% 和 11.8%, 但无统计学差异($P>0.05$)。

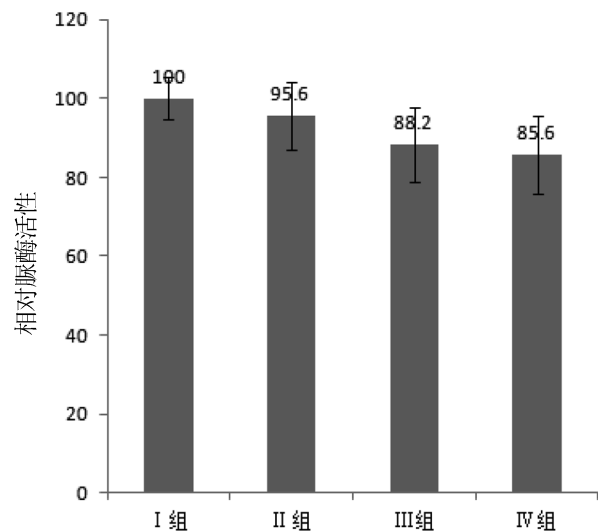


图 1 灌胃不同浓度酪酸菌对脲酶活性的影响

3 讨论

酪酸菌即丁酸梭菌, 是归属于梭菌属的革兰阳性厌氧芽胞杆菌, 在自然界中存在于人与动物粪便、天然酸奶、土壤等, 同双歧杆菌、嗜酸乳杆菌及粪链球菌一样, 是调节人体及动物体肠道微生态平衡的有益菌^[3]。研究表明, 酪酸菌能提高动物体内的免疫球蛋白和巨噬细胞活性, 增强动物机体免疫功能, 增强抗病能力, 产生多种酶类和维生素, 提高动物对饲料的利用率^[4]。刘来亭等^[5]研究表明肉鸡饲料中添加一定量的酪酸菌制剂能明显提高肉鸡平均日增重和日采食量, 降低发病率、死亡率和淘汰率。王保正等^[6]研究表明, 在哺乳仔猪日粮中添加酪酸芽孢杆菌制剂可以提高动物抗病力和免疫力, 提高其成活率、增重率和饲料转化率。黄俊等^[7]实验显示, 饲料中添加 2% 酪酸菌能提高猪日增重, 降低料肉比, 并显著降低粪便中 NH_3 的含量。本研究中表明, 1 000 mg/kg、1 500 mg/kg 酪酸菌组的平均日增重和料重均略高于对照组, 表明一定浓度的酪酸菌可能会促进小鼠的生长; 1 000 mg/kg、1 500 mg/kg 酪酸菌组小鼠 NH_3 的排泄量明显低于对照组, 相对脲酶活性略低于对照组, 表明 1 000 mg/kg 酪酸菌可能降低小鼠 NH_3 的排放, 这可能是因为添加

酪酸菌能与肠道中乳酸菌、双歧杆菌等有益菌的共生,抑制魏氏杆菌、沙门氏菌等有害菌的繁殖,这些有害菌主要分解蛋白质产生 NH_3 和 H_2S 等有害气体。

目前国内主要通过化学试剂或生物酶类进行环境除臭的方式控制实验动物有害气体排放,从肠道菌群角度降低有害气体排放的方法还未见报道。酪酸菌作为一种新型微生态制剂,进入肠道后能促进有益菌生长,促进肠道微生态平衡,能减少有害菌群分解蛋白质产生氨,能为控制实验动物有害气体的排放提供参考。

参考文献:

- [1] 庄志发,贺连智,冯紫慧.简述微生态活菌(酪酸菌)制剂的研究应用[J].山东食品发酵,1999(1):32-35.
- [2] 朱晓慧,唐宝英,刘佳.酪酸菌对肠道有益菌的增殖作用和共生关系研究[J].中国微生态学杂志,2004,16(4):193-196.
- [3] 王立生,潘令嘉,施理,等.双歧杆菌的完整肽聚糖对LPS激活裸鼠腹腔巨噬细胞功能的影响[J].中华微生物学和免疫学杂志,2000,20(1):4-6.
- [4] 易中华,敖清根.饲用酪酸菌制剂的研发机器在动物生产中的应用[J].饲料研究,2013,(5):22-24.
- [5] 刘来亭,田鹏飞,杜灵广,等.酪酸菌对肉鸡生产性能和死淘率及小肠形态结构的影响[J].河南农业科学,2009,(7):130-134.
- [6] 王保正,杨清付,董晓东,等.酪酸菌对猪生长特性的影响[J].饲料工业,2007,28(16):39-40.
- [7] 黄俊,韩铭海,陈小娥,等.新型微生物饲料添加剂的开发及应用效果研究[J].生物技术应用,2003,24(12):40-43.

Influence of Butyric Acid Bacteria on Harmful Gas Emissions in Mice

PAN Li-jie, YU Wen-lan, REN Bin-bin, CHEN Jia, MA Xiao-li,
ZHANG Jun-jun, LIU Yong-lun, LIU Zhong-hua
(South China Agricultural University, GuangZhou 510642, China)

[Abstract] Objective To explore the influence of butyric acid bacteria on harmful gas emissions in KM mice. **Methods** Eighty KM mice were randomly divided into four groups (group I, II, III and IV) with equal number of females and males in each group. The mice in group II, III and IV were fed with butyric acid bacteria at the dose of 500 mg/kg、1000 mg/kg、1500 mg/kg by gavage for 21 d, respectively, and group I as control. The concentration of ammonia and hydrogen sulfide were monitored every day, and the growth performance, the activity of urease in faeces in each group were tested at 21 d. **Result** Compared to the control group, the average daily weight gain of group III and group IV were improved. On day 7 of gavage, the ammonia emission of group III and IV were significantly lower than that of group I and group II ($P<0.05$), while the H_2S emission were not effected. The urease activities of group III and IV were lower than group I and II, but not significantly ($P>0.05$). **Conclusion** The butyric acid bacteria may improve the production performance and reduce the ammonia emission of mice.

[Key words] Butyric acid bacteria; Mice; Harmful gas; Urease

不完全睡眠剥夺对青春期 SD 大鼠生长发育的影响

朱寅秋^{1,3}, 汪雅荻², 严国锋³, 周 晶³, 汪 静³, 袁聪俐¹, 马政文³

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240; 2. 上海卢湾中学, 上海 200025;

3. 上海交通大学医学院实验动物科学部, 上海 200025)

[摘要] 目的 观察不完全睡眠剥夺对青春期大鼠生长发育的影响, 从而为充足睡眠对青少年生长发育的重要性提供实验参考依据。方法 4 周龄 SD 大鼠(雌雄各半)随机分为正常对照组和三个睡眠剥夺实验组(睡眠 9 h、睡眠 6 h、睡眠 3 h)。采用“小平台水环境”方法建立睡眠剥夺模型, 观察 SD 大鼠在整个青春发育期(4~8 周龄), 实验组与对照组大鼠间体质量、体长、行为习惯及大脑海马发育情况等方面的变化。结果 实验组大鼠体质量、体长增长减缓($P<0.01$); 行为躁狂易激惹、精神状态差甚至出现死亡; 性腺周围脂肪明显减少, 性激素分泌减少。结论 长期不完全睡眠剥夺可能造成青春期 SD 大鼠发育迟缓。

[关键词] 睡眠剥夺; 青春期; 大鼠; 生长发育; 性激素

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2017)04-0295-05

睡眠剥夺(睡眠缺失/不足, sleep deprivation)即睡眠时间至正常生理需要量以下。研究表明, 睡眠不足的人常伴有情绪异常、感知和学习记忆能力降低, 而青少年睡眠不足会影响身体和智力发育^[1-5]。

有关睡眠对儿童生长发育影响的研究^[6], 缺乏实验动物的实验数据支持。长期不完全睡眠剥夺, 接近于现实生活中的睡眠缺失情况。本课题模拟青少年长期不完全睡眠不足, 对 4 周龄青春期 SD 大鼠按组别每日给予不同时间的睡眠剥夺, 连续 4 周。采用“小平台水环境”方法建立长期不完全睡眠剥夺模型, 观测睡眠剥夺对大鼠在整个青春发育期(4~8 周龄)的体质量、体长、行为习惯、性激素水平、性腺周围脂肪重量、性腺发育及大脑海马

的影响, 以期青少年充足睡眠对生长发育的重要性提供实验参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

4 周龄清洁级 SD 大鼠 40 只, 雌雄各半, 购自上海斯莱克实验动物有限公司(SCXK(沪)2012-0002); 饲养于上海交通大学医学院[SYXK(沪)2013-0050]。

1.2 实验器材

1.2.1 自制睡眠剥夺水台装置 用透明有机玻璃粘合, 搭建 60 cm × 60 cm × 30 cm 的全包围有机玻璃盒子, 盒子内用有机玻璃搭建 9 个高度 5 cm、顶部直径 5 cm 的圆柱形水台, 该水台大小以只允许一只大鼠站立其上为准。通常装置内水面高度离水台 1 cm 左右。有机玻璃盒子上配有多个通气孔、透明有机玻璃上盖, 以保持空气畅通, 同时防止大鼠逃逸。

1.2.2 仪器、设备与试剂 称量天平(YB601N 上海海康电子仪器厂)、Thermo 离心机(Legend micr 017)、化学发光免疫测定仪(雅培, 美国 Architect i2000)、石蜡切片机(德国、Leica2235)。氯胺酮(福建古田药业, 批号: 1507294)。

[收稿日期] 2016-05-06 **[修回日期]** 2017-03-31

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金 81200940 和 2013 闵行区产学研合作基金

[作者简介] 朱寅秋(1986-), 男, 硕士研究生, 从事动物实验与兽医研究。E-mail: zhuyq@shsmu.edu.cn

[通讯作者] 马政文(1972-), 女, 博士, 副研究员, 从事动物实验与神经生物学。E-mail: mazhengwen@shsmu.edu.cn
袁聪俐(1981-), 男, 副研究员, 从事感染与免疫方面的研究。E-mail: yec@sjtu.edu.cn

1.3 研究方法

1.3.1 实验动物分组 40只大鼠随机分为4组:睡眠3 h(睡眠剥夺8 h)组、睡眠6 h(睡眠剥夺5 h)、睡眠9 h(睡眠剥夺2 h)组和正常对照组。自然状态下,4周龄大鼠的睡眠时间约为11 h/24 h。

1.3.2 大鼠睡眠剥夺模型建立 采用“小平台水环境法”,4周龄大鼠实验组按组别每日分别在特殊水台上放置21 h(睡眠3 h组)、18 h(睡眠6 h组)和15 h(睡眠9 h组),大鼠限制于水台上,一旦瞌睡就会跌入水中,强迫其清醒复位,从而建立睡眠剥夺模型。睡眠剥夺实验实施至大鼠8周龄(性成熟),为期4周。

1.3.3 大鼠行为学观察 每日观察大鼠进食、被毛光泽、行为、习惯、精神状态变化。

1.3.4 大鼠生长发育相关指标观察 每2周检测一次,用称量天平称量大鼠的体质量;用标准皮尺测量仰卧位大鼠从鼻尖到尾尖的距离为体长;大鼠经麻醉(100 mg/kg 体质量)后,心脏采血,3 000 r/min 离心15 min,分离血清,用化学发光免疫测定仪检测孕酮、睾酮、雌二醇、催乳素水平。心脏采血后自由休息24 h,停止睡眠剥夺实验,使大鼠恢复。

1.3.5 大鼠性成熟后卵巢观察 至大鼠8周龄,取性腺周围脂肪称重,比较正常对照组与实验组之间的区别。取雌性大鼠卵巢,直接浸入质量分数4%多聚甲醛固定,4~5 d后梯度乙醇脱水、石蜡包埋,切片后苏木素-伊红染色(HE染色),观察卵巢结构。

1.4 统计方法

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用Prism(4.5版本)软件,用One-way ANOVA进行统计学处理,在每个时间点上进行组间方差分析(Two-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功建立青春期SD大鼠睡眠剥夺模型

实验开始前(4周龄)心脏采血时有4只大鼠未能从麻醉中复苏。进入正式实验大鼠,对照组8只(雄性=4,雌性=4),9 h组9只(雄性=5,雌性=4)都经历4周睡眠剥夺,没有死亡;6 h组、3 h组于实验开始后1周内分别有1只和2只雄性大鼠死亡,而在6周龄心脏采血后,3 h组有一只雌性大鼠未能从麻醉中复苏。因此,6 h组有8只大鼠(雄性=4,雌性=4)、3 h组有6只大鼠(雄性=3,雌性=3)完成整个实验。

2.2 发育期大鼠行为学观察

对照组与各实验组每日饲料消耗量,雌性大鼠基本相同,雄性大鼠中对照组略高于各实验组,尤其是6~8周龄,而各实验组间同性别大鼠没有差别。

对照组大鼠被毛光滑、性格温顺、状态良好;9 h组与正常组差别不大;6 h组大鼠毛发光泽度不够,开盖时偶有大鼠往外跳、试图逃跑,实验开始一周内1只雄性大鼠溺水;3 h组大鼠毛发无光泽、个别被毛粗糙,眼球突出、状态较差,开盖时经常有大鼠往外跳、试图逃跑,暴躁易激惹、狂躁尖叫、出现攻击行为、捕捉不易,实验开始一周内2只雄性大鼠溺水、1只雌鼠采血后死亡。

2.3 发育期大鼠生长发育相关指标变化

2.3.1 体质量变化 如表1所示,实验初始各组大鼠体质量相似。6周龄时,各实验组大鼠体质量增长均低于对照组($P < 0.01$),雌性大鼠9 h组明显高于3 h组($P < 0.01$);雄性大鼠9 h组与6 h、3 h组相比有统计学差异($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。8周龄时,各实验组大鼠体质量增长明显低于对照组($P < 0.01$)。雌、雄性大鼠3 h组均明显低于9 h、6 h组($P < 0.01$);9 h组与6 h组间也有统计学差异($P < 0.01$)。

2.3.2 体长变化 与体质量变化趋势基本一致,详见表1。

2.3.3 发育期大鼠性激素变化 由表2可知,6周龄时,相同性别中对照组孕酮分泌明显高于各实验组($P < 0.001$);8周龄时,各组内雄性与雌性大鼠的孕酮含量有显著性差异($P < 0.001$)。雌性大鼠9 h、6 h组及对照组的组内8周龄与4周龄孕酮有显著差异($P < 0.01$);雄性对照组大鼠8周龄孕酮含量明显低于6周龄($P < 0.05$)。雌性大鼠睾酮8周龄时对照组与3 h组有统计学差异($P < 0.05$);8周龄时雄性大鼠睾酮对照组与6 h、3 h组之间有统计学差异($P < 0.05$ 和 $P < 0.001$),9 h组与3 h组之间有统计学差异($P < 0.01$)。对照组雌雄大鼠在8周龄与4周龄的睾酮有统计学差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。6周龄时,实验组与对照组无统计学差异。8周龄时,雌性大鼠雌二醇对照组与6 h组之间有统计学差异($P < 0.05$);相同周龄雌雄大鼠之间无统计学差异,相同性别各实验组间有显著差异($P < 0.01$)。各组雌雄大鼠血清中的催乳素含量在4到8周内维持在相似水平,且各组之间无统计学差异。

2.4 SD大鼠性成熟后的性腺周围脂肪、卵巢组织的观察

2.4.1 性腺周围脂肪变化 SD大鼠在8周龄时解

表 1 大鼠各阶段体质量及体长

项 目	组别	性别	4 周	6 周	8 周
体质量/g	对照组	雌	58.10 ± 3.30	139.30 ± 3.19	190.20 ± 5.57
		雄	58.03 ± 0.28	160.30 ± 3.09	255.50 ± 5.39
	9 h 组	雌	56.78 ± 0.49	110.20 ± 2.63*	149.00 ± 4.48*
		雄	59.22 ± 4.60	126.90 ± 1.96*&	187.50 ± 2.34* [@]
	6 h 组	雌	59.48 ± 2.76	102.60 ± 3.01*	139.60 ± 3.54*
		雄	55.30 ± 0.64	107.10 ± 3.14*	163.20 ± 5.08*
	3 h 组	雌	58.78 ± 6.92	90.20 ± 5.62* [#]	98.88 ± 7.43* ^{#&}
		雄	59.54 ± 1.06	102.10 ± 2.34* [#]	127.30 ± 7.20* ^{#&}
	对照组	雌	22.90 ± 0.35	31.20 ± 0.10	35.58 ± 0.18
		雄	22.57 ± 0.21	32.93 ± 0.70	37.88 ± 1.27
体长/cm	9 h 组	雌	22.98 ± 0.29	29.10 ± 0.27*	31.98 ± 0.35*
		雄	22.86 ± 0.50	29.90 ± 0.68*	34.93 ± 0.89*
	6 h 组	雌	23.35 ± 0.85	28.55 ± 0.12*	31.98 ± 0.35*
		雄	22.40 ± 0.29	28.75 ± 0.36*	32.95 ± 0.59*
	3 h 组	雌	22.68 ± 1.35	27.90 ± 0.74*	29.20 ± 1.27* ^{#&}
		雄	23.08 ± 0.29	28.38 ± 0.77*	30.98 ± 0.12* [#]

注: 相同性别, 与对照组比较, * $P<0.01$; 与 9 h 比较, [#] $P<0.01$; 与 6 h 比较, & $P<0.05$, @ $P<0.01$

表 2 大鼠各阶段激素水平

激 素	组别	性别	4 周	6 周	8 周
孕酮/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	对照组	雌	25.37 ± 15.14	36.52 ± 2.22	39.18 ± 0.76 ■
		雄	21.32 ± 1.33	28.37 ± 3.46	11.03 ± 2.07 ◇◆
	9 h 组	雌	9.98 ± 5.67	9.02 ± 3.56 [△]	39.63 ± 0.25 ■
		雄	25.58 ± 6.51	12.40 ± 2.30 [△]	5.89 ± 0.37 ◇
	6 h 组	雌	17.41 ± 4.86	14.86 ± 7.80 [△]	35.72 ± 4.28 ■
		雄	24.28 ± 6.46	13.60 ± 6.63 [△]	8.09 ± 9.89 ◇
	3 h 组	雌	17.49 ± 6.15	10.11 ± 5.98 [△]	29.10 ± 7.23 ▲
		雄	24.87 ± 13.24	5.49 ± 1.31 [△]	9.50 ± 1.93 ◇
睾酮/ $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	对照组	雌	0.14 ± 0.02	0.17 ± 0.02	0.24 ± 0.08 □
		雄	0.14 ± 0.02	0.24 ± 0.04	2.10 ± 0.79 ■
	9 h 组	雌	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.02	0.14 ± 0.03
		雄	0.14 ± 0.01	0.27 ± 0.03	1.28 ± 0.43
	6 h 组	雌	0.13 ± 0.01	0.14 ± 0.01	0.15 ± 0.03
		雄	0.14 ± 0.02	0.24 ± 0.02	0.34 ± 0.11 ▲
	3 h 组	雌	0.14 ± 0.01	0.13 ± 0.01	0.16 ± 0.03 ▲
		雄	0.14 ± 0.06	0.24 ± 0.08	0.19 ± 0.03 ^{△#}
雌二醇/ $\text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$	对照组	雌	15.20 ± 0.71	30.40 ± 1.33	33.80 ± 5.70
		雄	18.68 ± 0.95	28.67 ± 1.86	25.30 ± 3.54
	9 h 组	雌	14.22 ± 4.47	28.00 ± 1.41 ■	28.67 ± 1.86 ■
		雄	12.60 ± 2.12	26.60 ± 3.54 ■	28.67 ± 1.86 ■
	6 h 组	雌	12.82 ± 1.10	27.75 ± 1.41 ■	26.00 ± 1.41 ▲■
		雄	11.40 ± 0.02	27.00 ± 5.66 ■	28.25 ± 3.54 ■
	3 h 组	雌	17.00 ± 5.66	27.67 ± 5.66	34.00 ± 0.03 ■
		雄	10.25 ± 0.01	22.50 ± 2.12 ■	25.33 ± 2.83 ■

注: 相同性别, 与对照组比较, [△] $P<0.001$, ▲ $P<0.05$; 与 9h 比较, [#] $P<0.01$; 相同性别, 与 4 周龄比较, ■ $P<0.01$, □ $P<0.05$; 与 6 周龄比较, ◆ $P<0.05$; 不同性别, 相同周龄比较, ◇ $P<0.001$

剖、分离性腺周围包裹的脂肪,并称重。正常组雌性大鼠卵巢周围的脂肪重量几乎是各实验组脂肪重量的10倍($P<0.001$),而各实验组间没有统计学差异。正常组雄性大鼠睾丸周围的脂肪重量是各实验组脂肪重量的3.36~6.85倍($P<0.001$),9 h、6 h、3 h实验组性腺周围脂肪的重量依次降低,但组间没有统计学差异。

2.4.2 卵巢发育 SD雌性大鼠8周龄时,正常对照组和各实验组的卵巢已基本发育成熟。卵巢外覆结缔组织白膜。卵巢外周部的皮质较厚,含有发育不同阶段、大小不一的卵泡(图1,对照组: A-B; 6 h组: G-I),可见卵泡腔较大的次级卵泡(*),以及很大的黄体(图1, A, D, G, J中标记“L”)。中央部为髓质(图1, A中“#”标记处),结缔组织较疏松,无卵泡,含血管较多。初级卵泡发育成为

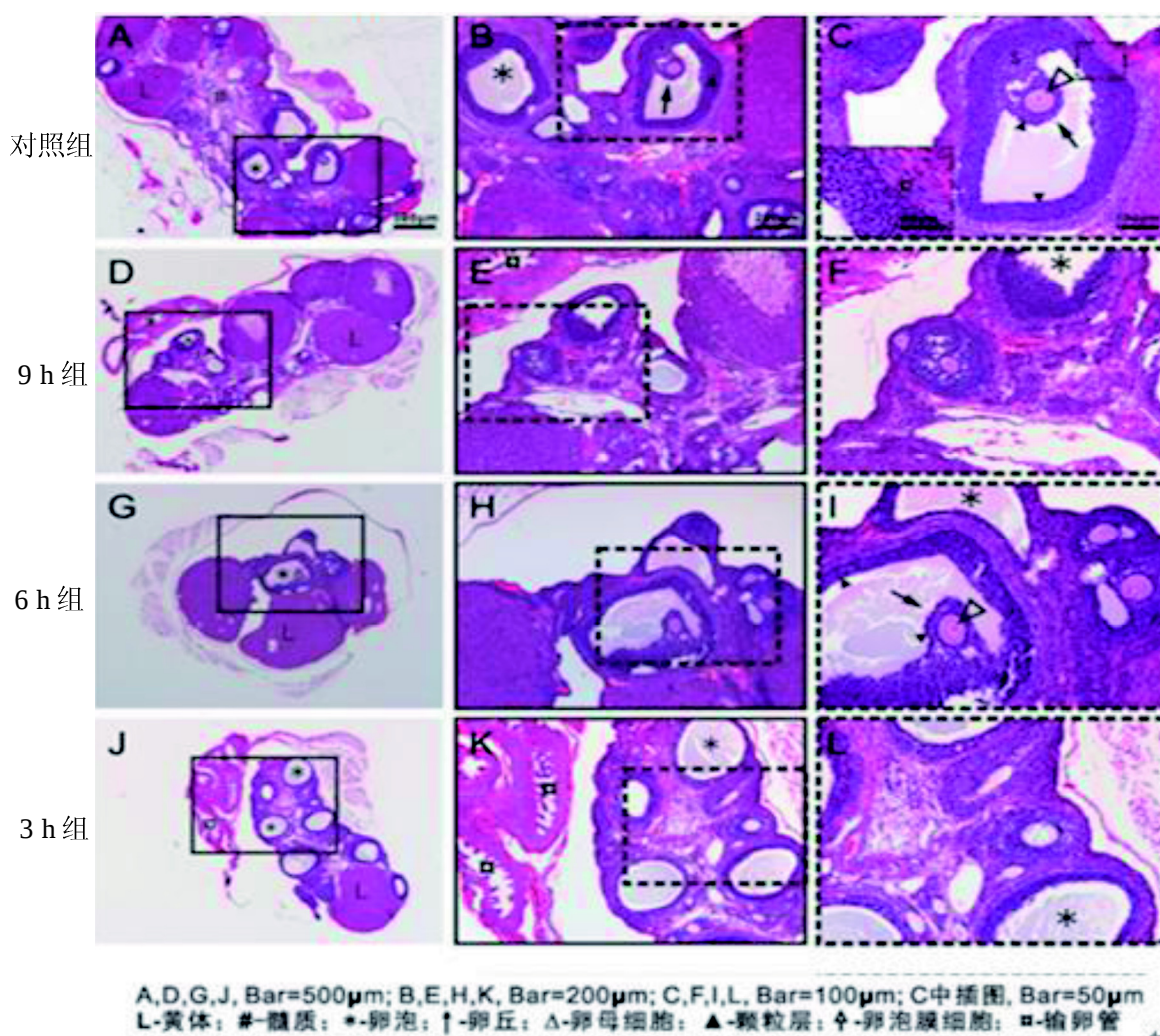
次级卵泡,后者有一个更大的卵泡腔(图1, C和I),初级卵母细胞(图1, C和I中“△”所指)位居卵泡一侧并与周围的卵泡细胞凸向卵泡腔,形成卵丘(图1, C和I中“↑”所指),卵泡腔周围密集的卵泡细胞(又称颗粒细胞)形成颗粒层(图1, C和I中“▲”所指),其外侧为卵泡膜。卵泡膜内层细胞较多、胞质染色浅,称膜细胞。卵泡发育中分泌的雌激素是由颗粒细胞和膜细胞协同作用生成的。

图1中E和K显示输卵管(O)结构。黏膜皱襞发达,皱襞高而分支多;肌层薄,外膜为疏松结缔组织。

3 讨论

了解睡眠剥夺对机体生长、发育造成的影响,并采取相应措施减少睡眠剥夺将具有实际意义。

睡眠剥夺是一种经典的内源性应激^[7],可激活



第一列为低倍视野图像;第二列图是第一列图中黑色实线方框的高倍视野图像;第三列图是第二列图中黑色虚线方框的高倍视野图像

图1 8周龄雌性SD大鼠卵巢结构

人体下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴(HPA轴),致机体内分泌、免疫、泌尿生殖、神经精神系统等功能紊乱,甚至导致死亡。本实验中4周龄SD大鼠开始睡眠剥夺后一周内,6h组和3h组分别有1只雄性和2只雄性大鼠死亡,并随着周龄增长,各实验组大鼠虽然状态不好(睡眠越少,状态越差),但是再没有出现死亡现象。提示年龄越小,睡眠剥夺后造成的影响越严重;而雄性相对雌性更易受应激,严重时或产生猝死现象。这与流行病学调查一致,睡眠时间的持续减少与人群猝死率的上升有关^[7]。

各实验组大鼠在4周龄到8周龄发育过程中,体质量与体长的增长都较正常对照组滞缓,随着发育进程,这种差异越明显;而各实验组间也呈现差异,睡眠时间越少,增长越慢。青春期大鼠的体质量、体长增长可能直接与睡眠时间有关,睡眠越少,体质量体长增长越慢。Cohen等^[8]应用平台法剥夺大鼠睡眠实验中,也表明睡眠剥夺可引起动物的体质量减轻及胸腺重量减轻,机体免疫反应抑制等,与本文实验结果相符。

正常组雌性大鼠孕酮分泌从4周龄开始持续上升,而各实验组则在6周龄时下降,然后再上升;正常组及各实验组雌二醇分泌在6周龄时都较4周龄升高一倍,正常组与9h组雌二醇分泌持续升高至8周龄,而6h和3h组雌二醇分泌则下降。提示剥夺青春期雌性大鼠睡眠可能使其发育延迟。正常组雄性大鼠睾酮分泌略有升高,8周龄时升高明显,而各实验组有升高也有降低,9h组与6h组不如正常组睾酮含量高,其中6h组与正常组比较有统计学差异,而3h组睾酮分泌则下降。提示剥夺青春期雄性大鼠睡眠可能使其发育滞后。孙清梅等^[9]曾报道,对青春期Wistar大鼠(4~5周龄)进行72h睡眠剥夺,雌性大鼠雌二醇含量、雄性大鼠睾酮含量都较对照组明显降低,差异有统计学意义。这一结果显示短期、完全性睡眠剥夺会导致青春期大鼠性激素分泌减少。本文所用的不完全睡眠剥夺模型也显示了长期反复睡眠剥夺可能会使大鼠性激素分泌减少、发育滞后。有报道^[5]睡眠剥夺后,HPA轴过度激活,负反馈作用减弱,从而导致睡眠剥夺后性激素分泌减少,发育滞后。

性腺周围脂肪属于内脏脂肪的一种,雌激素通过结合脂肪细胞上的雌激素受体而作用于脂肪细胞,因此,脂肪含量与雌激素水平有关。脂肪越多,雌激素水平越高,而脂肪中的芳香酶也会将雄激素(睾酮)转化成雌激素。当脂肪含量少时,雌激素水平也会降低。典型的雌性和雄性脂肪分布方式出现在青春

期,与血液循环中性激素水平的升高相关^[10]。而在本文实验中睡眠剥夺的发育期大鼠,其性腺周围脂肪含量少,与对照组比较有明显的统计学差异。一方面反应了其体内脂肪少,另一方面青春期睡眠剥夺影响了性腺周围脂肪的分布和含量,可能是导致实验组雌激素含量减少的原因之一。尽管雌激素含量降低、性腺周围脂肪减少,但是各组8周龄时卵巢发育基本正常。提示睡眠剥夺对雄性生殖系统的不良影响比对雌性生殖系统的影响可能更大些。

综上所述,长期不完全睡眠剥夺(部分睡眠剥夺)会影响青春期大鼠生长、发育,表现在体质量、体长增长缓慢,性激素分泌减少,性腺周围脂肪含量减少。因此,睡眠剥夺对青春期身体影响是多方面的,探究睡眠剥夺对身体影响机理,对于寻求有效预防措施和干预手段、并指导青少年正确学习、睡眠具有重要意义。

参考文献:

- [1] 王晓宁. 儿童矮小262例病因分析[J]. 中国基层医药, 2005, 12(12):1720-1721.
- [2] Alatzoglou KS, Webb EA, Le Tissier P, et al. Isolated growth hormone deficiency (GHD) in childhood and adolescence: recent advances [J]. *Endocr Rev*, 2014, 35(3):376-432.
- [3] 魏虹, 梁雁, 王燕逊. 矮小儿童的生长激素、胰岛素样生长因子轴功能的检查[J]. 中华儿科杂志, 2005, 45(2):99-103.
- [4] Ranke MB, Feldt Rasmussen U, Bang P, et al. How should insulin-like growth factor I be measured A consensus statement [J]. *Horm Res*, 2001, 55 (Suppl 2):106-109.
- [5] Sahin U, Ozturk O, Ozturk M. Habitual snoring in primary school children: prevalence and association with sleep-related disorders and school performance [J]. *Med Princ Pract*, 2009, 18(6):458-465.
- [6] 沈晓明, 江帆, 李生慧, 等. 睡眠对儿童生长发育影响的研究及其应用[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2012, 32(9): 1209-1213.
- [7] 杨佳琳, 宋红涛, 张理义, 等. 睡眠剥夺对青年人神经内分泌激素的影响[J]. 中华保健医学杂志, 2014, 16(6):439-441.
- [8] Cohen HB, Dement WC. Sleep: changes in threshold to electroconvulsive shock in rats after deprivation of "paradoxical" phase[J]. *Science*, 1965, 150(3701):1318-1319.
- [9] 孙清梅, 李冬艳, 冯铁娟, 等. 睡眠剥夺对青春期大鼠性激素水平的影响[J]. 中国校医, 2009, 3:269-270.
- [10] 赵文燕, 董耀, 仇树林. 脂肪细胞雌激素受体的表达及其与人体脂肪分布的相关性[J]. 中国美容医学, 2005, 14(5): 534-536.

绿色荧光裸小鼠动情周期的观察

胡文娟, 方 天, 陈 莉, 刘 彪, 梁 磊, 许龙祥, 恽时峰

(南京军区南京总医院比较医学科, 全军实验动物科普与伦理教育基地,
全国科普教育基地, 南京 210002)

[摘要] 目的 观察绿色荧光裸小鼠(GFP nu/nu)动情周期的变化。方法 采用阴道涂片法, 连续 15 d, 分别对 40 只性成熟期未生育的雌性绿色荧光裸小鼠(GFP nu/nu)、绿色荧光杂合小鼠(GFP nu/+), BALB/c 裸小鼠(非 GFP nu/nu)及 BALB/c 杂合小鼠(非 GFP nu/+)进行阴道涂片观察, 计算规律动情周期发生率, 记录动情周期各阶段阴道涂片特征及持续天数, 作比较分析。结果 绿色荧光裸小鼠及绿色荧光杂合小鼠的规律动情周期发生率分别为 77.5% 和 82.5%, 明显低于 BALB/c 裸小鼠及 BALB/c 杂合小鼠的 90% 及 95%; 绿色荧光裸小鼠及绿色荧光杂合小鼠的动情周期总持续时间为 7~8 d, 而普通 BALB/c 裸小鼠和 BALB/c 杂合小鼠的持续时间为 5~6 d ($P<0.05$), 其中绿色荧光裸小鼠及绿色荧光杂合小鼠的动情前期、动情期、动情后期持续时间与普通 BALB/c 裸小鼠的持续时间相差较大($P<0.05$)。结论 通过阴道涂片法可以确认绿色荧光裸小鼠所处的动情周期阶段, 为后期在不同的动情周期内研究雌性绿色荧光小鼠生殖功能提供可靠的实验数据, 提高实验操作的准确性。

[关键词] 绿色荧光; 动情周期; 阴道涂片; 生殖功能

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)04-0300-03

绿色荧光蛋白(GFP)现已成为细胞生物学和分子生物学中应用最广泛的分子标记之一。绿色荧光裸小鼠是将 GFP 基因导入 BALB/c 裸小鼠而得来^[1]。本科室自建立绿色荧光转基因裸鼠以来, 对该品系鼠进行了多项研究, 测定了主要的生理生化指标及部分免疫学指标, 检测了主要脏器质量和脏器系数, 并研究了在主要组织中荧光蛋白的分布特点^[2-5]。在日常繁育中, 观察到绿色荧光裸小鼠繁殖性能较为低下, 对雄性绿色荧光裸小鼠研究显示, 该品系雄性小鼠精子质量低下可能导致了繁殖性能的下降^[6]。作者推测 GFP 基因可能对雌性小鼠的生理功能也产生影响。因在实际生产操作中, 大多采用雄性纯合子(GFP nu/nu)与雌性杂合子(GFP nu/+)交

配, 故本实验连续 15 d 对性成熟期未生育的雌性绿色荧光裸小鼠(GFP nu/nu)、绿色荧光杂合小鼠(GFP nu/+)、BALB/c 裸小鼠(非 GFP nu/nu)及 BALB/c 杂合小鼠(非 GFP nu/+)分别进行阴道涂片观察, 以确定雌性绿色荧光裸小鼠的规律动情周期^[7](动情前期、动情期、动情后期、动情间期)发生率以及动情周期各阶段的阴道涂片特征及持续天数, 为后期在不同动情周期内研究 GFP 是否对绿色荧光裸小鼠生殖功能产生影响, 提高实验操作的准确性。

1 材料与方法

1.1 实验动物、器材与试剂

分别取未生育的 8~10 周龄 SPF 级雌性绿色荧光裸小鼠(GFP nu/nu)、绿色荧光杂合小鼠(GFP nu/+)、BALB/c 裸小鼠(非 GFP nu/nu)及 BALB/c 杂合小鼠(非 GFP nu/+)各 40 只, 绿色荧光裸小鼠及杂合子为本科室提供[SCXK(军)2012-0014], BALB/c 裸小鼠及杂合子购于常州卡文斯实验动物有限公司[SCXK

[收稿日期] 2017-02-09

[作者简介] 胡文娟(1990-), 女, 技师, 本科, 从事荧光裸小鼠的育种与科研。E-mail: 452665670@qq.com

[通讯作者] 恽时峰(1965-), 男, 教授, 从事医学实验动物学专业。E-mail: yunshifeng1@163.com

(苏)2011-0003]。四组动物均在 SPF 级设施饲养[SYXK(军)2012-0047]。光学显微镜、载玻片、医用棉签、生理盐水。

1.2 方法

将 40 只雌性绿色荧光裸小鼠、绿色荧光杂合小鼠、BALB/c 裸小鼠及 BALB/c 杂合小鼠分别编号,于每日清晨 8:00~8:30 检测小鼠动情周期。用左手食指和拇指捏住小鼠尾,余下三指轻轻按压小鼠后腰背部,将其固定在操作台上,翻起尾暴露阴道口,用浸润了生理盐水的医用消毒棉签缓缓插入小鼠阴道内 0.5~1 cm,转动 2~3 周,蘸取脱落细胞,并将其均匀涂在载玻片上^[8]。对涂片采用美兰染色,于光学显微镜下观察阴道脱落细胞,记录小鼠动情周期变化情况。

根据文献^[9]方法判断动情周期各个阶段:动情前期阴道脱落细胞以体积较大的有核上皮细胞为主;动情期阴道涂片多为无核的角化上皮细胞,像落叶一样堆积在一起;动情后期兼有白细胞,有核上皮细胞与无核角化细胞,三种细胞数量无明显差别;动情间期以白细胞为主。

1.3 统计学处理

记录实验数据,计算规律动情周期发生率(%)=(发生规律动情周期的小鼠数/总实验小鼠数)×100%^[10];采用 SPSS 软件对记录的动情周期变化维持时间进行统计学处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 规律动情周期发生率

实验表明,31 只绿色荧光裸小鼠出现规律的动情周期,9 只并未出现动情周期或动情周期极为不规律,即绿色荧光裸小鼠的规律动情周期发生率为 77.5%(31/40)。绿色荧光杂合小鼠、BALB/c 裸小鼠和 BALB/c 杂合小鼠的规律动情周期发生率分

别为 82.5%(33/40)、90.0%(36/40)和 95.0%(38/40)。

2.2 动情周期脱落细胞观察

镜下观察显示,绿色荧光裸小鼠的动情周期脱落细胞情况与其他几组小鼠并无明显差异,故只附上绿色荧光裸小鼠的镜下照片以供观察。动情前期:阴道分泌物中大多为膨大的有核上皮细胞,呈椭圆形,白细胞较少(图 1A);动情期:多为无核的角化上皮细胞,外形不规则,成堆聚集在一起,呈落叶状(图 1B);动情后期:白细胞开始增多,有核上皮细胞及无核角化上皮细胞均可见(图 1C);动情间期:以白细胞为主,偶见一些有核上皮细胞,细胞总数较少(图 1D)。

2.3 动情周期各阶段

绿色荧光裸小鼠动情周期持续时间为(186.27 ± 22.72) h,其余 3 组小鼠的持续时间分别为(184.49 ± 14.12) h、(131.12 ± 18.87) h($P < 0.05$)和(133.95 ± 20.04) h($P < 0.05$)。四组小鼠各阶段所占时间见表 1。绿色荧光裸小鼠及绿色荧光杂合小鼠的动情前期、动情期和动情后期持续时间与 BALB/c 裸小鼠存在明显差异($P < 0.05$);BALB/c 杂合小鼠与 BALB/c 裸小鼠在动情周期中并无统计学差异。

3 讨论

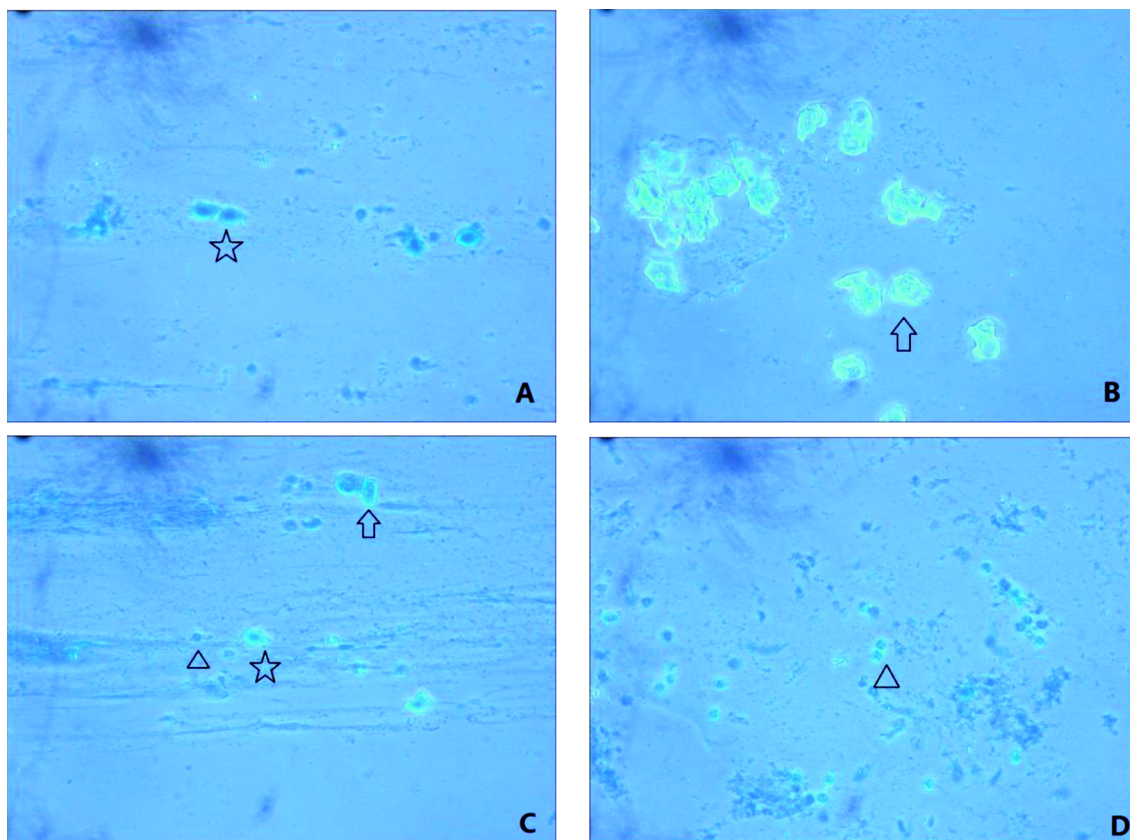
研究 GFP 基因对小鼠生殖功能的影响,了解动情周期是个关键问题之一。因此,确定雌性绿色荧光小鼠所处动情周期的阶段及各阶段所持续的时间,可提高后期实验的准确性,使研究更为科学可靠。阴道涂片法是目前常用的动情周期判定方法之一,常见的 3 种细胞分别为角化上皮细胞、有核上皮细胞以及白细胞,细胞形态易区分^[11],所以采用此法判断动情周期简易实用。

本实验连续 15 d 分别对 40 只性成熟期未生育的雌性绿色荧光裸小鼠、绿色荧光杂合小鼠、BALB/c 裸小鼠及 BALB/c 杂合小鼠分别进行阴道涂

表 1 四组小鼠动情周期各阶段持续时间

组 别	动情周期各阶段持续时间				h
	动情前期	动情期	动情后期	动情间期	
绿色荧光裸小鼠	40.77 ± 13.85*	69.00 ± 17.41*	35.58 ± 10.54*	40.92 ± 13.46	
BALB/c 裸小鼠	22.89 ± 10.04	49.02 ± 15.23	17.55 ± 12.26	43.96 ± 13.65	
绿色荧光杂合小鼠	37.46 ± 12.44*	70.34 ± 15.30*	37.04 ± 10.49*	39.65 ± 12.17	
BALB/c 杂合小鼠	21.34 ± 10.58	52.87 ± 12.35	18.29 ± 13.02	41.45 ± 10.12	

注:与 BALB/c 裸小鼠比较,* $P < 0.05$



A: 动情前期; B: 动情期; C: 动情后期; D: 动情间期
☆: 有核上皮细胞; ↑: 无核角化上皮细胞; △: 白细胞

图1 绿色荧光小鼠阴道涂片脱落细胞

片观察,结果显示,雌性绿色荧光裸小鼠及绿色荧光杂合小鼠的规律动情周期的发生率分别为 77.5% 和 82.5%,明显低于对 BALB/c 裸小鼠及 BALB/c 杂合小鼠的规律动情周期发生率(90.0% 和 95.0%)。出现规律动情周期的绿色荧光裸小鼠及绿色荧光杂合小鼠,其动情周期总持续时间为 7~8 d,而普通 BALB/c 裸小鼠和 BALB/c 杂合小鼠的持续时间为 5~6 d ($P<0.05$),其中绿色荧光裸小鼠及绿色荧光杂合小鼠的动情前期、动情期、动情后期持续时间与普通 BALB/c 裸小鼠的持续时间相差较大($P<0.05$),而动情间期持续时间无明显差异。本文绿色荧光裸小鼠的动情周期与李娟等^[12]对 BALB/c 小鼠动情周期观察结果比较也存在较为明显差异。

研究表明^[13],在动情间期,雌激素含量低,孕酮含量高;在动情前期,雌激素分泌开始增加,但是对阴道上皮的刺激作用仍然很低;动情期,雌激素水平达到阈值;动情后期是动情期向动情间期的过渡。雌性小鼠生殖周期的变化主要通过丘脑下

部、垂体前叶和卵巢分泌的激素进行调节。通过阴道脱落细胞涂片法观察动物动情周期的变化能够合理地反映卵巢活性及其分泌性激素的能力。动情周期的紊乱是反应性激素代谢失调的敏感指标^[14]。GFP 基因可能对小鼠的激素调控基因表达方面造成影响,从而改变了雌性绿色荧光裸小鼠的激素水平,使激素代谢失调可能导致动情周期的变化,为确认此推测,后续将进一步研究雌性绿色荧光裸小鼠的生殖功能,包括脏器系数、激素水平等。

本实验通过阴道涂片法对雌性绿色荧光裸小鼠、绿色荧光杂合小鼠、BALB/c 裸小鼠及 BALB/c 杂合小鼠的规律动情周期发生率以及动情周期各阶段的阴道涂片特征及持续天数进行了观察,为后期在不同的动情周期内研究雌性绿色荧光裸小鼠生殖功能提供可靠的实验数据,提高实验操作的准确性;进一步找出绿色荧光裸小鼠繁殖性能下降的原因,也有助于将绿色荧光裸小鼠更好、更为广泛地运用于科学实验。

(下转第 316 页)

《美国公共卫生署人道管理和使用实验动物政策》(2015 年版)简介

盛俊杰¹, 胡庆元², 王可洲¹, 吕素军¹

(1. 山东省实验动物中心, 济南 250002; 2. 夏威夷大学马诺阿分校, 夏威夷州 96822)

[摘要] 《美国公共卫生署人道管理和使用实验动物政策》(以下简称 PHS 实验动物政策)是美国实验动物福利法律体系的重要组成部分, 是政府部门实施实验动物行业管理的主要规范, 是在科学研究活动中管理和使用实验动物的依据。《PHS 实验动物政策》覆盖了所有美国公共卫生署(PHS)资助的涉及到实验动物的科学研究活动。美国国家卫生研究院(NIH)下属的实验动物福利办公室负责《PHS 实验动物政策》的监督执行, 并于 2015 年 6 月对《PHS 实验动物政策》进行了最新修订。通过本文介绍, 为行业同仁了解和学习美国实验动物福利相关法规, 借鉴美国实验动物福利保护方法和经验, 人道管理和使用动物开展科学研究提供参考。

[关键词] 美国公共卫生署(PHS); 人道管理和使用; 实验动物; 政策

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** C **[文章编号]** 1674-5817(2017)04-0303-06

作为开展生物医学研究必备的载体和支撑, 实验动物在推动科技进步、促进人类健康方面做出了默默无闻的巨大贡献, 人类有责任和义务善待实验动物, 保障实验动物福利。美国作为全球生物医学领先大国, 非常重视实验动物福利的保护, 建立了较为完善的实验动物福利法律体系, 制定了相关的法规、政策和指南, 明确专门的组织机构监督执行, 以规范实验动物的管理和使用, 确保人道对待动物。目前, 美国在保障实验动物福利方面最重要的法律和规范有以下三个:

《动物福利法》(《Animal Welfare Act》), 美国联邦政府在 1966 年颁布了《实验动物福利法》, 最初只是规范了动物的管理和运输, 以及防止被窃

动物的买卖行为, 之后经过 1970 年、1976 年、1985 年、1990 年、2002 年、2007 年、2008 年、2013 年 8 次修订完善, 最终形成了现在的《动物福利法》。它是美国唯一一部关于保护动物福利的联邦法律, 规范了人们在研究、展示、运输和买卖动物时的行为。《动物福利法》被誉为美国动物保护法律中的“宪法”, 是其他法律、规范、指南援用的最低限度的可接受标准。该法的管理权归于美国农业部(USDA), 并由其下属的动植物检疫局(APHIS)负责监督执行。

《美国公共卫生署人道管理和使用实验动物政策》(《Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals》)(以下简称《PHS 实验动物政策》), 是美国政府部门实施实验动物行业管理的主要规范。《PHS 实验动物政策》最早于 1971 年由隶属于美国卫生和福利部美国公共卫生署(PHS)的国家卫生研究院(NIH)制定, 它覆盖了所有 PHS 资助的涉及到实验动物的科学研究活动。《PHS 实验动物政策》由美国 NIH 下属的实验动物福利办公室负责监督执行, 实验动物福利办公室于 2015 年 6 月对《PHS 实验动物政策》进行了最新修订。

《实验动物管理和使用指南》(《Guide for the

[收稿日期] 2017-01-10

[基金项目] 山东省医学科学院医药卫生科技创新工程项目; 山东省自主创新成果转化专项
(No. 2012ZHZX1A0419)

[作者简介] 盛俊杰(1977-), 女, 硕士, 主要从事实验动物法规、实验动物福利研究。

E-mail: junjiesheng@hotmail.com

[通讯作者] 胡庆元(1952-), 男, 博士, 教授。

E-mail: chinghu@hawaii.edu

Care and Use of Laboratory Animals》)(以下简称《指南》),1963年由芝加哥地区研究机构兽医师组成的动物管理小组制定了第一版《指南》,随后的版本由国家科学院下属的实验动物研究所负责修订编审。《指南》是被广泛接受的关于实验动物管理和使用的参考标准和主要指南,被美国卫生和福利部及一些实验动物评估机构如AAALAC视为评价机构实验动物工作的重要依据。《指南》由实验动物医学方面的专家定期更新,最新版本是2011年发布的第八版。

以上三个法律规范是美国实验动物福利法律体系的最重要内容,是在科学研究活动中管理和使用实验动物的依据。从约束力角度讲,法律重于规范,规范重于指南。《动物福利法》和《PHS实验动物政策》是美国联邦、州和地方政府制定实验动物相关法规的基础。《指南》是在前两个法律规范的基础上,对如何以科学、技术、人道的方式恰当管理和使用动物,做出的具体详细的指南。

《PHS实验动物政策》作为美国实验动物福利的规范性文件,其保护涵盖的动物包括所有脊椎动物,其约束覆盖的机构包括国家机构、科研单位、高等院校、企业等各类公共或私人的组织、商业公司或机构。了解和借鉴美国先进的实验动物福利保护内容和方法,有必要对《PHS实验动物政策》进行解读和学习,并将其主要内容在此归纳介绍,供大家参考。

1 《PHS实验动物政策》作用和特点

1.1 《PHS实验动物政策》的作用

自1971年NIH制定《PHS实验动物政策》以来,它已经过数次修订。《PHS实验动物政策》是对《美国政府关于在测试、研究和培训中使用和管理脊椎动物的原则》的补充和执行。《美国政府关于在测试、研究和培训中使用和管理脊椎动物的原则》于1985年由美国实验动物机构跨部联席委员会制定发布,并被美国政府各机构采用,它是美国人道管理和使用实验动物的基本框架,是评审科研项目的重要依据。当政府机构制定在测试、研究和培训中使用动物的规范和要求时,以及政府机构在资助或开展涉及使用动物的项目时,必须要确保《美国政府关于在测试、研究和培训中

使用和管理脊椎动物的原则》得到遵守。1986年,《美国政府关于在测试、研究和培训中使用和管理脊椎动物的原则》合并至《PHS实验动物政策》中。

在美国,开展生物医学研究的绝大部分经费来自于联邦政府资助,NIH是联邦政府支持生物医学研究的最大资助机构,每年获得高达300亿美元的政府资金,2017年预算达到331.36亿美元,在美国联邦政府研发经费中的份额仅次于国防部。《PHS实验动物政策》覆盖了所有由NIH提供经费资助的项目,PHS要求在公共卫生署内部开展或对外部提供资助的需要使用脊椎动物的活动,必须要遵守《PHS实验动物政策》。为获得NIH提供的经费资助,研究项目的申请者机构必须向NIH下属的实验动物福利办公室提交一份关于动物福利的书面保证,保证在科学研究实验中考虑和保障实验动物福利,遵守《动物福利法》,按照《指南》给予实验动物人道关怀和对待。只有保证书经过机构实验动物管理和使用委员会(IACUC)审查和批准,并获得NIH实验动物福利办公室的认可,且申请者机构按照提交的福利保证书开展实验动物活动,公共卫生署才会对这个研究项目给予资助。可以说,《PHS实验动物政策》是申请和开展政府资助项目的重要依据,遵守并执行《PHS实验动物政策》,是获得政府经费资助的必要条件。

1.2 《PHS实验动物政策》的特点

与《动物福利法》相比较,《PHS实验动物政策》有其自身的特点。

1.2.1 适用范围有特殊限定 《动物福利法》适用所有类型的动物,包括农用动物、实验动物、伴侣动物、工作动物、娱乐动物和野生动物等,是对人们研究、展示、运输和买卖动物等活动做出的行为规范。《PHS实验动物政策》仅适用于实验动物,是对人们在研究、培训、实验、测试或其他相关活动中人道对待和使用实验动物所作出的规范。

1.2.2 覆盖的机构有特定条件 《动物福利法》覆盖了所有与动物活动有关的人和机构。《PHS实验动物政策》只对由PHS提供资助开展研究的机构有约束,这些机构可以是联邦、州和地方政府的组成机构,可以是大学和研究院所,也可以是其他公共或私人的商业组织或机构,前提是接受公共卫生署的经费资助,且开展的研究活动涉及到实验动物的管理和使用。

1.2.3 保护的实验动物范围广 《动物福利法》所指动物包括各种活体或死的猫、犬、仓鼠、兔、非人灵长类、豚鼠以及农业部秘书处确定的研究、伴侣或展览用的各种温血动物,并不包括鸟类、实验大鼠和小鼠、农用动物及所有冷血动物。《PHS 实验动物政策》保护的实验动物范围包括了所有的活的脊椎动物——温血动物和冷血动物。其在第三部分中定义“动物”为:“用于研究、研究培训、实验、生物测试或其他相关用途的活的脊椎动物。”

1.2.4 强调机构自律和自我管理 《动物福利法》作为联邦法律,具有强制约束力,比如强制要求使用动物的企业和个人必须取得农业部颁发的执照或通过注册,动物设施每年必须经过动植物检疫局(APHIS)的监督检查。而《PHS 实验动物政策》则强调了机构的自我管理和自律:一是《PHS 实验动物政策》要求机构提供其承诺实验动物福利得到考虑和保障的承诺性文件,即实验动物福利保证。二是《PHS 实验动物政策》强调了机构内部IACUC的职责,IACUC是由机构首席执行官任命的一个隶属于机构自身的部门,主要工作是依据《指南》监督和评估机构内所有涉及动物管理和使用的活动。三是《PHS 实验动物政策》明确机构负责原始记录的保存,包括实验动物福利保证的认可文件、IACUC 会议记录、评估记录等。

2 《PHS 实验动物政策》中涉及到的相关机构简介

2.1 美国卫生和福利部

美国卫生和福利部(United States Department of Health and Human Services, 简称 HHS),是维护美国公民健康,提供公共卫生服务的联邦政府行政部门。美国卫生和福利部是美国医疗系统的最高管理机构,也是世界上最大的支持医学研究的机构,大约每年投入 300 亿美元的联邦研究资助,这些资金通过 PHS 内部和外部的研究项目投入到生物医学和行为科学研究中。

2.2 美国农业部

美国农业部(United States Department of Agriculture, 简称 USDA),是负责支持农业生产,提高国民生活质量的联邦政府行政部门。美国农业

部作为动物管理的主管部门,对《动物福利法》的执行进行强制性的监督检查。农业部下属的动植物检疫局(APHIS),负责《动物福利法》的监督检查执行,动植物检疫局下设动物福利中心(CAW),专门负责动物福利事宜。

2.3 PHS

PHS,隶属于美国卫生和福利部,是美国卫生和福利部的执行部门,负责促进美国国民身体健康和精神健康的保护和发展。PHS 建立于 1798 年,最早为商船队提供医疗保健服务,随后的立法大幅扩大了其工作范围,使其成为执行国家国民健康政策、开展生物医学研究、确保药品医疗安全的政府机构。PHS 也是联邦内负责管理和监督实验动物的机构。

2.4 NIH

NIH 是 PHS 的下属部门之一,隶属于美国卫生和福利部。它是一个具有双重功能的政府机构,集生物医学研究和科研管理于一身,既是一个拥有 27 个研究所的研究机构,又是一个拥有 300 亿美元拨款,资助管理全美各大学和研究机构经费的基金组织。NIH 的基金约 83%用于院外项目研究,资助美国国内外大学和研究机构,10%的预算用于院内项目研究,资助其内部直属实验室的科学家开展研究,另有约 7%左右的预算作为院内院外研究项目的共同基金。

2.5 实验动物福利办公室

实验动物福利办公室(Office of Laboratory Animal Welfare, 简称 OLAW),隶属于 NIH,负责《PHS 实验动物政策》的解释、指导和监督执行;管理和协调公共卫生署所资助研究活动的实验动物福利事宜;对研究机构遵守实验动物福利保证,按照《PHS 政策》要求开展动物活动的情况进行监督;接受研究机构提交的实验动物福利相关事宜的报告。

2.6 AAALAC

AAALAC 是一个私营的、非政府的、国际公认的实验动物项目评估认证组织,向公众提供非政府性质的民间评估认证。经过 50 多年的发展,AAALAC 已经成为具有国际影响力的实验动物认可组织,通过它的认证已成为在实验动物生产繁育和管理使用方面具有很高水平和规范的一个国际标签。

2.7 IACUC

IACUC 是设置于机构内部的部门,负责监督和评价机构开展的动物项目、计划、程序和设施

条件, 审查批准科学研究中动物实验的申请, 确保机构所有涉及动物的活动按照联邦法律、规范、指南进行。根据《动物福利法》规定, 研究机构必须建立 IACUC, 监督和评估机构内所有涉及动物管理和使用的内容。根据《PHS 实验动物政策》规定, IACUC 负责机构实验动物福利保证书的审查和批准。

3 《PHS 实验动物政策》的内容要点

3.1 《PHS 实验动物政策》是对《美国政府关于在测试、研究和培训中使用和管理脊椎动物的原则》这一基本框架原则的补充和执行

《PHS 实验动物政策》不影响各州和地区设立具有更严格标准的实验动物法律规章, 并要求所有机构遵守《动物福利法》及其他相关法律法规。其在第一部分“引言”中明确: “《PHS 实验动物政策》要求 PHS 或由其资助的机构要建立并保持适当措施, 以确保在研究、研究培训, 以及生物测试等活动中, 按照 PHS 的指导要求合理管理和使用动物。PHS 认同实验动物机构跨部联席委员会制定的《美国政府关于在测试、研究和培训中使用和管理脊椎动物的原则》。此政策旨在对《美国政府关于在测试、研究及培训中使用和管理脊椎动物的原则》进行补充和实施。”

3.2 《PHS 实验动物政策》适用于 PHS 开展或资助的涉及动物的所有活动

既包括 PHS 内部开展的活动, 也包括 PHS 支持资助的外部机构开展的活动; 既包括美国机构的活动, 也包括由 PHS 资助的外国机构的活动。另外, 《PHS 实验动物政策》明确其资助的涉及动物的活动, 原则上不向个人提供。其在第二部分“适用范围”中明确: “本政策适用于 PHS 开展或资助的涉及动物的所有活动, 适用范围为在美国、波多黎各、以及所有美国属地和托管地的 PHS 机构、受资助机构及其他机构。接受 PHS 资助的外国机构应遵守此政策, 并向 PHS 提供其在人道管理和使用动物方面符合政策标准的证明。由 PHS 资助的涉及动物的活动, 不向个人提供, 除非个人隶属于机构或被机构担保, 且机构能够作出对其行为符合政策承担责任的保证; 个人与 PHS 有其他约定的除外。该政策不影响各州和地区设立具有更

严格标准的管理和使用实验动物的法律规章。所有机构必须遵守《动物福利法》及其他与动物有关的联邦法律法规。”

3.3 《PHS 实验动物政策》的核心内容是“机构的执行”

即涉及实验动物活动的所有机构, 包括国家机构、科研单位、高等院校、企业等各类公共或私人的组织、商业公司或机构(包括联邦、州和地方政府的组成机构), 它们如何执行 PHS 实验动物政策, 确保在研究、培训以及生物测试等活动中, 按照 PHS 的指导要求人道管理和使用动物。其中主要包括如下几项内容:

3.3.1 动物福利保证 机构必须按照《PHS 实验动物政策》作出实验动物福利保证书, 提交实验动物福利办公室进行评估, 并在获得实验动物福利办公室的批准之后, 方能取得公共卫生署的资助, 开展研究活动。在保证书中, 要对机构的动物管理和使用方案、机构的类别、机构 IACUC 的设置等内容进行详细的描述。其在第四部分“机构的执行”中阐述: “由 PHS 开展或资助的涉及动物的项目, 其机构必须遵守《PHS 实验动物政策》规定, 提交 PHS 认可的书面保证书。保证书向 NIH 的实验动物福利办公室提出。保证书应由机构实验动物负责人签署。实验动物福利办公室向机构提供必要的指导和合适的保证书范本。机构按照《PHS 实验动物政策》向 PHS 提交的保证书, 将由实验动物福利办公室进行评估, 并确定这些由 PHS 开展或资助的项目, 是否符合动物管理和使用要求。实验动物福利办公室以此评估为依据, 做出批准或不批准此保证的决定, 或与机构协商做出一个可获批准通过的保证。保证许可的有效期限为一个特定的时期(不能超过五年), 超过有效期限, 机构必须向实验动物福利办公室提交新的保证。实验动物福利办公室可设定一个限制期限, 期限内任何已批准的保证须保持有效, 否则实验动物福利办公室有权限制或撤销对其的批准。由 PHS 开展或资助的涉及动物研究的项目, 若没有 PHS 认可的书面保证书, 则不准许继续进行。”同时, 此部分对机构动物管理和使用方案、机构类别、IACUC 等内容进行了详细阐述。

3.3.2 IACUC 的职能 规定了 IACUC 的工作职责, 要求委员会要以《指南》为依据, 审查机构人道

管理和使用动物的情况,检查机构的动物设施,并据此作出半年评估报告。委员会还负责向机构实验动物负责人提出动物项目、设施、人员培训等方面的建议,以及对机构活动作出审查、批准、要求修改、不予批准或暂停活动的决定。在此部分中描述了 IACUC 的职能:“针对 PHS 开展或资助的活动, IACUC 代表机构履行如下职能:以《指南》为评价依据,至少每六个月对本机构在研究项目中人道管理和使用动物的情况进行一次审查。以《指南》为评价依据,至少每六个月检查一次本机构的所有动物设施(包括附属设施)。在完成前两项工作之后,准备 IACUC 评估报告,并向机构实验动物负责人提交报告。审查重点关注机构对动物的管理和使用情况。就本机构的动物项目、设施、人员培训等各方面情况,向机构实验动物负责人提出建议。对《PHS 实验动物政策》所述的由 PHS 开展或资助的涉及动物管理和使用的活动,做出审查、批准、要求修改(以获得批准),或不予批准等行为。对正在开展的活动中动物使用有重大改变的,做出审查、批准、要求修改(以获得批准),或不予批准等行为。有权依据《PHS 实验动物政策》规定,做出暂停某项涉及动物活动的决定。”

3.3.3 IACUC对公共卫生署开展或资助项目的审查规定了委员会的审查内容。规定了委员会在审查前、召开 IACUC 会议、以及审查后做出决定的工作步骤,以及对已获批或正进行的项目开展持续审查和暂停项目的情况。明确了机构开展的研究项目应满足的七项要求,即:“动物程序应避免或减少动物的不适感、痛苦和疼痛,应设计完善的研究方案。对可能会引起动物超过瞬时或轻微痛苦的程序,应在适当的镇定、镇痛或麻醉状态下执行,除非研究者由于科研原因提供书面正当理由的。若动物将承受无法缓解的严重或慢性疼痛和痛苦,则在实验程序结束之时或在进程中的适当时候,使其无痛死亡。动物的生活环境应满足物种的需求,有利于动物的健康舒适;动物房、饲养和非医疗保健,须由兽医或者有管理、操作和使用此物种的培训和工作经验的科研人员指导。所有的动物医疗保健必须要由合格的兽医提供,但是兽医不必为专职。对特定物种进行操作,操作人员必须有相关的操作经验和训练。对动物使用安乐死方式,

要与美国兽医协会安乐死审委会的建议相一致,除非研究者由于科研原因提供书面正当理由的。”

3.3.4 机构申请公共卫生署资助需要提交的资料分别所有机构、保证书已获认证机构、保证书未获认证机构三种情况,在申请公共卫生署资助时,对其项目申请或方案中应包含的信息内容做出了要求。对所有机构要求:“涉及动物管理和使用的 PHS 资助项目的申请和方案(竞争性的和非竞争性的),应包含以下信息:动物品系和动物使用的大概数量;使用动物及使用品系和数量合理性的理由;动物使用计划的完整描述;程序设计的描述,用以保证:尽量限制在开展科学研究过程中对动物造成的不可避免的不适和伤害,使用镇痛、麻醉和镇定药物以最小化动物的不适感和痛苦;对使用的安乐死方法的描述。除完全开放竞争以外的非竞争性申请和合同方案,如果在前次申请中提供的信息完整且没有显著变化,则不需要重复提供上述信息。但是,申请或方案中必须注明所要求的信息没有显著变化。如果信息中有显著变化,申请或方案中必须具体指出变化的内容,并说明变化的原因。”

3.3.5 记录保存的要求和书面报告的要求对获得公共卫生署资助机构的记录保存内容和保存时间作出了规定。对 IACUC 通过机构实验动物负责人向实验动物福利办公室提交报告的内容和时间作出了要求。记录保存要求是:“获资助的机构应该保存如下资料:PHS 认可的保证书文件; IACUC 会议备忘录,包括:出席人、委员会活动、委员会决议等记录;关于动物管理和使用方面的申请、方案和显著变化的记录,以及 IACUC 做出的批准或否决的决定; IACUC 的半年报告,以及向机构实验动物负责人提出的建议(包括少数人建议);评审机构所做出的决定。所有的记录至少保存三年;对于经 IACUC 审查并批准的正在进行的项目,与其申请、方案和显著变化直接相关的记录,应该在项目期间予以保存,并在项目完成后继续保存三年。所有记录应便于实验动物福利办公室或其他 PHS 代表机构在合理时间以合理方式检查和复制。”

3.4 《PHS 实验动物政策》也规定了 PHS 执行内容

3.4.1 实验动物福利办公室的具体职责“实验动物福利办公室负责《PHS 实验动物政策》的总体管理和协调,具体包括:要求和协商、批准或否决、以及必要时限制或撤销对机构保证的认证;将

已获得保证认证的机构名单, 分发至科学审查的初审和复审负责人, 以及 PHS 资助发放单位; 指导资助发放单位和获资助机构执行《PHS 实验动物政策》; 对《PHS 实验动物政策》的违规指控作出评定; 有审查并批准或否决《PHS 实验动物政策》豁免的权力; 对选定机构进行实地考察。”

3.4.2 PHS 资助发放单位的职责 “有希望获得资助的机构和其他所有参与机构, 其涉及动物管理和使用的保证已获得实验动物福利办公室的认证文件, 并能提供涉及动物项目的申请或方案获得 IACUC 批准的证明, 方能得到 PHS 资助发放单位的资助。如果其中任何一个机构没有获得实验动物福利办公室的认证文件, 资助发放单位在授予资助前, 可以请求实验动物福利办公室与获资助机构就许可事宜进行协商。只有在机构向实验动物福利办公室提交保证且通过其认证, 同时机构提供了 IACUC 批准涉及动物管理和使用内容的证明之后, 才能给予其资助。”

3.4.3 公共卫生署开展的实地考察 “PHS 职员和

顾问可以在任何时候对每个受资助机构进行审查, 审查包括实地考察, 用以评估机构对《PHS 实验动物政策》合规的充分性和准确性。”

3.4.4 对《PHS 实验动物政策》条款的豁免 “机构可以向实验动物福利办公室提请一项或多项《PHS 实验动物政策》条款的豁免。机构必须提供充分的豁免理由, 并获得实验动物福利办公室的书面批准。”

参考文献:

- [1] United States Department of Health and Human Services; Office of Laboratory Animal Welfare, National Institutes of Health. Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals [Z]. Revised 2015.
- [2] United States Code; Title 7- Agriculture. Animal Welfare Act [Z]. 2013 Edition.
- [3] National Research Council of the National Academies; Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [M]. Eighth Edition. Washington DC: The National Academies Press, 2011.

An Introduction of 《Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals (Revised 2015)》

SHENG Jun-jie, HU Qing-yuan, WANG Ke-zhou, LV Su-jun

(1. Shandong Laboratory Animal Center, Jinan 250002, China;

2. University of Hawaii at Manoa, Honolulu, HI 96822)

[Abstract] 《Public Health Service Policy on Humane Care and Use of Laboratory Animals》is an important part of the legal system of laboratory animal welfare in the United States. It is the main policy for U.S. government to implement the management of laboratory animal industry, and also the foundation for caring and using laboratory animals in scientific research. The PHS Policy covers all the research activities conducted or supported by the Public Health Service (PHS). The Office of Laboratory Animal Welfare, National Institute of Health (NIH), which has responsibility for the general administration and coordination of the Policy, revised the PHS Policy in June 2015. The authors translated the full-text PHS Policy into Chinese and provided reference to understand and study the laws and regulations on laboratory animal welfare of U.S. The essay may be used for reference to learn the methods and experience on humane care and use of laboratory animals.

[Key words] Public Health Service; Humane Care and Use; Laboratory Animals; Policy

Irx5a 基因过表达对斑马鱼胚胎早期造血的影响

金璐^{1,2}, 李燕², 李志操^{1,2}, 吴西军¹, 周艳华¹, 何志旭^{1,2}, 舒莉萍^{1,3,4}

(贵州医科大学 1. 组织工程和干细胞实验中心; 2. 儿童医学中心;

3. 基础医学院免疫学教研室; 4. 实验动物中心, 贵阳 550004)

[摘要] 目的 探讨易洛魁族同源盒 5a(*Irx5a*)基因对斑马鱼胚胎早期造血相关转录调控因子的影响。方法 于斑马鱼胚胎 1 细胞受精卵期, 显微注射 *Irx5a-EGFP* mRNA 斑马鱼胚胎作为实验组、显微注射增强型绿色荧光蛋白(*EGFP*) mRNA 斑马鱼胚胎作为实验对照组、野生型斑马鱼作为空白对照组, 应用 qPCR 检测相关造血转录调控因子在斑马鱼胚胎受精后 9 h (9 hpf)、12 h、18 h、24 h 和 30 h 时相的表达水平。结果 实时荧光定量 PCR 结果表明, 在原始造血转录因子 *lmo2*、*scl* 中, 实验组从 9 hpf~24 hpf 较另外两组间明显减低; 在定向造血转录因子中, *c-myb* 实验组从 12 hpf~24 hpf 较另外两组间明显减低, *runx1* 实验组从 9 hpf~30 hpf 较另外两组间明显减低; 髓系造血转录因子 *pu.1* 和红系造血转录调控因子 *gata-1* 实验组从 9 hpf~30 hpf 较另外两组间明显减低, 且差异有统计学意义。结论 *Irx5a* 基因在斑马鱼原始造血、成体造血、红系造血、髓系造血的重要转录调控因子中发挥着抑制作用。

[关键词] 斑马鱼; 5a(*Irx5a*); 造血转录调控因子

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)04-0309-06

造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)属多能干细胞, 是存在于造血组织中的一群原始造血细胞, 具有高度的自我更新、多向分化以及损伤后修复的能力, HSC 的自我更新是由促进生长的正调控信号和导致凋亡的负调控信号之间的平衡来实现调控的。HSC 以一个细胞分裂成两个细胞时, 其中一个细胞仍然保持干细胞的一切生物特性, 而另一个细胞则进一步分化成为各类成熟血细胞^[1]。造血干细胞在发育过程中的不同阶段, 其各系中有特异的造血转录调控因子, 如原始造血相关因子 *lmo2* 和 *scl*; 定向造血相关因子 *c-myb* 和 *runx1*; 红系造血相关因子 *gata-1*; 髓系造血相关因子 *pu.1* 等^[2]。

易洛魁族同源盒(*iroquois homeobox, Irx*)基因最

早在果蝇的神经系统中被发现^[3, 4], 该基因编码一个含高度保守同源盒序列的三氨基酸环延伸(three amino acid, TALE)超家族蛋白。在哺乳动物中由 A、B 两个基因簇组成的 6 个 *Irx* 基因, *IrxA* 位于 13 号染色体, 含有 *Irx1*、*Irx2* 和 *Irx4*, *IrxB* 位于 8 号染色体, 含有 *Irx3*、*Irx5* 和 *Irx6*。在斑马鱼中含有 11 个 *Irx* 基因 4 个基因簇, *IrxAa* (*Irx1a*, 2a, 4a), *IrxAb* (*Irx1b*, 4b), *IrxBa* (*Irx3a*, 5a, 6a), and *IrxBb* (*Irx3b*, 5b), 另外还有 *Irx7*, 其中的 *Irx5a* 与高等的脊椎动物 *IrxB* 基因簇有着类似的功能^[5-7]。例如, 在小鼠中 *IrxB* 基因的缺失可以引起肾母细胞瘤肿瘤细胞分化而导致肾母细胞瘤, 在人类前列腺癌细胞中 *Irx5* 基因的下调可使细胞周期停止, 凋亡细胞增加^[8,9]。故本研究以 *Irx5a* 为研究对象, 探讨其对早期造血发育中相关转录调控因子的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所需野生型斑马鱼 Tübingen 由本实验室

[收稿日期] 2017-05-30

[基金项目] 国家自然科学基金(31460312)

[作者简介] 金璐(1991-), 女, 临床医学硕士研究生, 贵州医科大学组织工程和干细胞实验中心,
E-mail: 326687520@qq.com

[通讯作者] 舒莉萍, 教授。E-mail: gyslp-456@163.com

何志旭, 教授。E-mail: hzx@gmc.edu.cn

繁殖培育, 养殖条件: $28 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 用带有过滤系统的循环水系统进行养殖, 光照 12 h/d 。予丰年虫早晚各喂食 1 次, 雌雄鱼分缸饲养, 待斑马鱼发育至性成熟, 按雌雄 1:2 的比例配对, 在次日 0.5 h 后收集胚胎, 对受精卵进行清洗后, 移入斑马鱼受精卵培养用水(egg water)中并置于 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱培养。根据斑马鱼生长发育图谱以了解斑马鱼胚胎发育不同时相。

1.2 主要试剂及仪器

Trizol reagent (Ambion 15596026), iQTM SYBR® Green super(Bio-Rad 1708882AP), First strand cDNA synthesis(Fermentas MBIK1612), KOD plus(Toyobo Kod-201), 无水乙醇(分析纯, 中国上海振兴化工一厂), 氯仿(分析纯, 中国汕头市西陇化工厂), 德国 Eppendorf AG22331 梯度 PCR 仪, 德国 Eppendorf 低温离心机, 美国紫外分光光度计(UV1700), 美国凝胶成像系统(Bio-Rad), 美国 Bio-Rad CFX96 Real-Time PCR 仪, 上海生化培养箱(LRH 系列, 一恒科技有限公司), 中国北京爱生科技斑马鱼循环养殖系统。

1.3 Irx5a 过表达模型的建立

将 Irx5a- 增强型绿色荧光蛋白(EGFP)正义 mRNA 经显微注射导入 1~2 细胞期的野生型斑马鱼 Tübingen 胚胎中作为实验组; 将 EGFP 正义 mRNA 经显微注射导入 1~2 细胞期的野生型斑马鱼 Tübingen 胚胎中作为实验对照组; 未进行任何处理的野生型斑马鱼作为空白对照组。注射后的胚胎均置于 $28.5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中, 定期更换培养液并挑出死胚胎, 防止影响其他胚胎的发育。经显微注射后的胚胎在体视镜下观察胚胎发育时相, 选取所需时相, 并于荧光显微镜下筛选具有特异性绿色荧光蛋白表达的胚胎, 按照斑马鱼形态发育图谱辨认其发育过程, 并收集实验所需的时相。

1.4 提取斑马鱼胚胎 RNA 及制备 cDNA

分别收集三个实验组受精后不同时相(9 h、12 h、18 h、24 h、30 h)的胚胎, 每个时相 20 枚放于无酶 Epp 管中, PBS 清洗一次后加 $150\text{ }\mu\text{L}$ Trizol 液于室温放置 5 min, 每 1 mL Trizol 液加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 氯仿剧烈振荡 15 s 并室温放置 2~3 min, $12\text{ }000\text{ g}$ 离心 15 min ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), 将上清(约 60%)转移至新的无酶 Epp 管中, 加入等体积的异丙醇上下颠倒 10 次并静置冰上 10 min, $12\text{ }000 \times g$ 再次离心 15 min ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$), 弃

上清可见白色沉淀附于管壁, 加入 1 mL 的体积分数 75% 乙醇-DEPC-treated water 洗涤沉淀并 $7\text{ }500\text{ g} \times 5\text{ min}$ ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$)后弃上清, 室温放置 5~10 min 使乙醇挥发后每管加入 $10\text{ }\mu\text{L}$ 无酶水溶解 RNA 并用紫外分光光度计检测其纯度。最后将上述所得的 RNA 进行逆转录, 从而得到斑马鱼不同时相的 cDNA, 在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中保存。

1.5 引物设计及合成

从 GenBank 中获取下表斑马鱼基因的 cDNA 序列, 应用 Primer Express 软件, 根据 SYBR Green 染料法的引物设计原则, 在各自保守区域设计特异性引物, 以 β -actin 和 GAPDH 作为内参基因。造血转录调控因子: 原始造血 *lmo2*、*scl*, 成体造血 *c-myb*、*runx1*, 红系造血 *gata-1*, 髓系造血 *pu.1* 作为目的基因, 引物序列(表 1), 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.6 实时荧光定量 PCR

在上述所得 cDNA 中分别加入 SYBR 和各转录因子引物, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, $55.8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 30 s, 39 个循环。溶解曲线: 每 5 s 升高 $0.5\text{ }^{\circ}\text{C}$, 从 $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 到 $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。以 GAPDH、 β -actin 作为内参基因, 对 *lmo2*、*scl*、*C-myb*、*Runx1*、*Gata-1*、*Pu.1* 进行相对定量分析。利用 Bio-Rad CFX manager 2.0 软件分析相对表达值, 用内参基因做标准, 进行分析比较, 最后通过 SPSS16.0 进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

斑马鱼 GAPDH、 β -actin、*lmo2*、*scl*、*C-myb*、*Runx1*、*Gata-1*、*Pu.1* 基因的溶解曲线均为单峰曲线, 说明所扩增的目的基因引物设计良好, 在使用所选择的最适温度时, 无非特异性产物生成; 并且扩增曲线光滑、连续, 多次重复, 结果较好。

2.1 lmo2 在不同组各时相中的变化

受精后 9 h~24 h(9 hpf~24 hpf)中实验组较另外两组的相对表达量均下降, *lmo2* 在实验组 9 hpf 有少量表达, 12 hpf 表达量最高, 随着时相的增加逐渐下降, 30 hpf 后基本无表达($P < 0.05$, 表 2)。

2.2 Scl 在不同组各时相中的变化

9 hpf~24 hpf 中实验组较另外两组的相对表达量均下降, *scl* 在实验组 9 hpf 已有所表达, 12 hpf 表达量最高, 随着时相的增加逐渐下降, 30 hpf 后基本无表达($P < 0.05$, 表 3)。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列和产物长度

Table 1 The sequences of primers and products length of qPCR

基因名称	Genebank NO.	引物序列	产物长度/bp
β -actin	NM_703909	正向:ATGCCCCTCGTGCTGTTTT 反向:TCTGTCCCATGCCAACCAT	87
GAPDH	NM_001115114	正向:ACCCGTGCTGCTTTCTTGAC 反向:GACCAGTTTGCCGCCTTCT	91
lmo2	NM_131111	正向:CCACTGTCTGTCACTTCA 反向:GATTCCAAGCATCCTTCATT	91
scl	NM_213237	正向:TCCTATCACTCATTCGTTA 反向:CAAGACTGGTTACTCAATC	145
c-myb	NM_131266	正向:CATCACATCTCTACCTTC 反向:AATCTCCACATCATCATC	96
runx1	NM_131603	正向:GTCGTATGAGCAGTCGTA 反向:GGTGAGATTGGTGTGTAG	75
gata-1	NM_131234	正向:TTAACTACACAACAGACTC 反向:GAATAATACGATGGCAGTA	97
pu.1	NM_198062	正向:CGATGAGGAGTGTATGAGAG 反向:CAGAAGGTCAAGCAGGAA	100

表 2 lmo2 在 *Irx5a* 基因 mRNA 的相对表达量 (n=3)Table 2 Expression of lmo2 in the mRNA of *Irx5a* (n=3)

组别	lmo2 在 <i>Irx5a</i> 基因 mRNA 的相对表达量				
	9 hpf	12 hpf	18 hpf	24 hpf	30 hpf
空白对照组	10.45 ± 1.24	80.45 ± 10.83	14.62 ± 1.21	6.52 ± 0.23	0.42 ± 0.10
实验对照组	12.28 ± 1.21 *	73.64 ± 4.22 *	15.43 ± 2.40 *	7.96 ± 1.56 *	0.31 ± 0.24 *
实验组	1.00 ± 0.00 **▲	22.40 ± 0.97 **▲	3.24 ± 1.52 **▲	1.28 ± 0.42 **▲	0.43 ± 0.17

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与实验对照组比较, ▲ $P < 0.05$

表 3 scl 在 *Irx5a* 基因 mRNA 的相对表达量 (n=3)Table 3 Expression of scl in the mRNA of *Irx5a* (n=3)

组别	scl 在 <i>Irx5a</i> 基因 mRNA 的相对表达量				
	9 hpf	12 hpf	18 hpf	24 hpf	30 hpf
空白对照组	14.22 ± 1.68	87.72 ± 11.08	40.22 ± 6.43	7.72 ± 1.67	1.38 ± 0.33
实验对照组	11.63 ± 1.16 *	71.18 ± 0.40 *	37.48 ± 1.24 *	8.19 ± 1.73 *	1.71 ± 0.39 *
实验组	1.00 ± 0.00 **▲	44.03 ± 1.18 **▲	16.81 ± 2.77 **▲	4.22 ± 1.15 **▲	1.86 ± 0.58 *

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与实验对照组比较, ▲ $P < 0.05$

2.3 C-myb 在不同组各时相中的变化

后逐渐增加, 18 hpf 表达量最高, 随着时相的增

12 hpf~24 hpf 中实验组较另外两组的相对表达量均下降, c-myb 在实验组 9 hpf 少量表达, 以

加逐渐下降($P < 0.05$, 表 4)。

表 4 c-myb 在 *Irx5a* 基因 mRNA 的相对表达量 (n=3)Table 4 Expression of c-myb in the mRNA of *Irx5a* (n=3)

组别	c-myb 在 <i>Irx5a</i> 基因 mRNA 的相对表达量				
	9 hpf	12 hpf	18 hpf	24 hpf	30 hpf
空白对照组	1.34 ± 0.84	62.05 ± 0.78	100.32 ± 8.77	45.49 ± 1.14	5.35 ± 1.84
实验对照组	2.48 ± 0.53 *	51.72 ± 0.46 *	94.51 ± 0.79 *	46.60 ± 0.42 *	4.29 ± 1.33 *
实验组	1.00 ± 0.00 **	34.03 ± 1.18 **▲	81.78 ± 1.48 **▲	25.71 ± 1.60 **▲	4.56 ± 0.85 *

注: 与空白对照组比较, * $P < 0.05$; 与实验对照组比较, ▲ $P < 0.05$

2.4 Runx1 在不同组各时相中的变化

9 hpf~30 hpf 中实验组较另外两组的相对表达量均下降, runx1 在实验组 9 hpf 少量表达, 在 9 hpf 已有所表达, 12 hpf 表达量最高, 随着时相的增加逐渐下降, 30 hpf 后基本无表达($P<0.05$, 表 5)。

2.5 Gata-1 在不同组各时相中的变化

9 hpf~30 hpf 中实验组较另外两组的相对表达量均下降, gata-1 在 mRNA 实验组 9 hpf 少量表达, 18 hpf 表达量最高, 随着时相的增加逐渐下降, 30hpf 后明显减少($P<0.05$, 表 6)。

表 5 runx1 在 *Irx5a* 基因 mRNA 的相对表达量 ($n=3$)
Table 5 Expression of runx1 in the mRNA of *Irx5a* ($n=3$)

组 别	runx1 在 <i>Irx5a</i> 基因 mRNA 的相对表达量				
	9 hpf	12 hpf	18 hpf	24 hpf	30 hpf
空白对照组	47.29 ± 6.86	123.07 ± 6.63	83.73 ± 4.18	50.92 ± 0.13	20.40 ± 8.42
实验对照组	41.35 ± 0.69 *	117.65 ± 7.13 *	63.88 ± 3.06 *	54.81 ± 4.75 *	14.45 ± 2.80 *
实验组	1.00 ± 0.00 **▲	42.723 ± 4.77 **▲	21.288 ± 0.63 **▲	10.53 ± 0.23 **▲	0.37 ± 0.11 **▲

注: 与空白对照组比较, * $P<0.05$; 与实验对照组比较, ▲ $P<0.05$

表 6 gata-1 在 *Irx5a* 基因 mRNA 的相对表达量 ($n=3$)
Table 6 Expression of gata-1 in the mRNA of *Irx5a* ($n=3$)

组 别	gata-1 在 <i>Irx5a</i> 基因 mRNA 的相对表达量				
	9 hpf	12 hpf	18 hpf	24 hpf	30 hpf
空白对照组	42.88 ± 2.94	124.45 ± 12.91	200.30 ± 7.05	112.77 ± 11.38	35.92 ± 1.67
实验对照组	45.12 ± 3.05 *	113.97 ± 6.07 *	231.99 ± 2.93 *	99.72 ± 5.23 *	42.53 ± 4.32 *
实验组	1.00 ± 0.00 **▲	19.97 ± 2.45 **▲	77.93 ± 6.32 **▲	28.55 ± 4.35 **▲	12.09 ± 2.31 **▲

注: 与空白对照组比较, * $P<0.05$; 与实验对照组比较, ▲ $P<0.05$

2.6 Pu.1 在不同组各时相中的变化

9 hpf~30 hpf 中实验组较另外两组的相对表达量均下降, pu.1 在实验组 9 hpf 已有所表达, 12 hpf 表达量最高, 随着时相的增加逐渐下降, 30 hpf 后表达量明显下降($P<0.05$, 表 7)。

因组序列已全部被测出, 其中有 80 多个与哺乳动物造血相关的基因, 如 scl、lmo2、gata-1 和 c-myb 等^[10]。斑马鱼的造血发育与人类有着许多相似之处, 造血发育同样具有原始造血(primitive hematopoiesis)和定向造血(definitive hematopoiesis),

表 7 pu.1 在 *Irx5a* 基因 mRNA 的相对表达量 ($n=3$)
Table 7 Expression of pu.1 in the mRNA of *Irx5a* ($n=3$)

组 别	pu.1 在 <i>Irx5a</i> 基因 mRNA 的相对表达量				
	9 hpf	12 hpf	18 hpf	24 hpf	30 hpf
空白对照组	53.35 ± 7.35	162.45 ± 5.27	86.73 ± 7.29	42.47 ± 2.79	10.38 ± 0.70
实验对照组	57.51 ± 6.14 *	158.85 ± 2.15 *	78.57 ± 6.22 *	53.04 ± 4.56 *	8.18 ± 1.72 *
实验组	1.00 ± 0.00 **▲	51.11 ± 9.187 **▲	25.16 ± 4.79 **▲	10.50 ± 0.87 **▲	1.71 ± 0.94 **▲

注: 与空白对照组比较, * $P<0.05$, 与实验对照组比较, ▲ $P<0.05$

3 讨论

斑马鱼作为一种新兴的动物模型是研究基因功能的有效载体, 相比较于其他模式生物, 其优势在于其生殖周期短、生殖能力强、高产卵量、体积小、发育快且胚胎透明, 经济适用等优点, 并且斑马鱼基因与人类基因保守度约 85%。斑马鱼基

这两个造血峰存在于所有脊椎动物, 包括斑马鱼。不同的是斑马鱼的原始造血存在于两个区域, 第一个区域分为两部分即前部侧板中胚层(anterior lateral mesoderm, ALM)和后部侧板中胚层(posterior lateral mesoderm, PLM), 它是某些髓系前体细胞及早期巨噬细胞起源的区域, 叫作侧板中胚层。第二个区域称为中间细胞群(intermediate cell mass,

ICM), 位于脊索和躯干中胚层之间, 相当于哺乳动物卵黄囊, 原始造血过程中的造血干细胞来自于 ICM 区^[10,11]。在人类中 *Irx5* 基因定位于第 16 号染色体, 而在斑马鱼中则有两个子基因, 其中 *Irx5a* 位于第 7 号染色体, *Irx5b* 位于第 25 号染色体^[12]。

本研究通过观察实验组, 实验对照组和空白对照组中各个造血相关转录调控因子的变化来探讨 *Irx5a* 对斑马鱼早期造血的影响。对于原始造血发育的转录因子主要有 *lmo2*、*scl*、*gata2*、*fli1a* 等。*lmo2* 是具有 LIM 结构域的转录因子, 在斑马鱼中 *lmo2* 在 10~11 hpf 表达于 ALM 和 PLM 区, 然后在 ICM 区域有所表达。*Scl* 对于原始和定向造血及血管生成均发挥着关键作用, 与急性淋巴细胞白血病有着密切的关系^[13-15]。从实验结果中可以看出, 原始造血 *lmo2* 和 *scl* 在过表达 *Irx5a* 时对造血发育发挥着抑制作用。定向造血发育中发挥着重要作用的转录因子主要有 *c-myb*、*runx1*、*cbf β* 等, *c-myb* 为 *myb* 原癌基因家族最早被鉴定成员之一, 主要表达于不成熟血细胞, 随着血细胞不断成熟分化而表达下降。*runx1* 是 *runt* 家族成员之一, *runt* 家族在多个发育过程中均发挥重要作用, 包括神经发育、造血发育、骨发育及细胞分裂等, *runx1* 在原始造血的成熟和定向造血的发育中均发挥着作用。从实验结果中可以看出, *c-myb* 和 *runx1* 均在过表达 *Irx5a* 基因时对造血发育发挥抑制作用^[16, 17]。*gata-1* 通过与结合多个转录因子来产生效应, 在斑马鱼 ICM 区原始红细胞和髓细胞间的平衡主要是通过 *gata-1* 和 *pu.1* 来调控的, *gata-1* 的正常功能是部分限制细胞中 *pu.1* 的表达, 所以, *gata-1* 不仅是促进红系发育而且抑制髓细胞的表达^[18]。实验结果中可以证明 *gata-1* 和 *pu.1* 在红系和髓系造血中发挥着相互抑制的作用。

综上所述, 过表达 *Irx5a* 基因可以下调造血转录调控因子, 即 *Irx5a* 基因在斑马鱼原始造血、成体造血、红系造血和髓系造血的重要转录调控因子中发挥着抑制作用的。

参考文献:

- [1] Huang X, Cho S, Spangrude GJ. Hematopoietic stem cells: generation and self-renewal[J]. Cell Death Differ, 2007, 14(11):1851-1859.
- [2] de Jong JL, Zon LI. Use of the zebrafish system to study primitive and definitive hematopoiesis[J]. Annu Rev Genet, 2005, 39:481-501.
- [3] Cavodeassi F, Modolell J, Gomez-Skarmeta JL. The Iroquois family of genes: from body building to neural patterning[J]. Development, 2001, 128(15):2847-2855.
- [4] Diez del Corral R, Aroca P, Gómez-Skarmeta JL, et al. The Iroquois homeodomain proteins are required to specify body wall identity in *Drosophila*[J]. Genes Dev, 1999, 13(13):1754-1761.
- [5] Dildrop R, Ruther U. Organization of Iroquois genes in fish [J]. Dev Genes Evol, 2004, 214(6):267-276.
- [6] Gómez-Skarmeta JL, Modolell J. Iroquois genes: genomic organization and function in vertebrate neural development [J]. Curr Opin Genet Dev, 2002, 12(4):403-408.
- [7] Lecaudey V, Anselme I, Dildrop R, et al. Expression of the zebrafish Iroquois genes during early nervous system formation and patterning[J]. J Comp Neurol, 2005, 492(3):289-302.
- [8] Mengelbier LH, Karlsson J, Lindgren D, et al. Deletions of 16q in Wilms tumors localize to blastemal-anaplastic cells and are associated with reduced expression of the *IRXB* renal tubulogenesis gene cluster[J]. Am J Pathol, 2010, 177(5):2609-2621.
- [9] Myrthue A, Rademacher BL, Pittsenbarger J, et al. The iroquois homeobox gene 5 is regulated by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human prostate cancer and regulates apoptosis and the cell cycle in LNCaP prostate cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(11):3562-3570.
- [10] Jing L, Zon LI. Zebrafish as a model for normal and malignant hematopoiesis[J]. Dis Model Mech, 2011, 4(4):433-438.
- [11] Chen AT, Zon LI. Zebrafish blood stem cells[J]. J Cell Biochem, 2009, 108(1):35-42.
- [12] Kerner P, Ikmi A, Coen D, et al. Evolutionary history of the iroquois/*Irx* genes in metazoans[J]. BMC Evol Biol, 2009, 9:74.
- [13] Davidson AJ, Zon LI. The 'definitive' (and 'primitive') guide to zebrafish hematopoiesis[J]. Oncogene, 2004, 23(43):7233-7246.
- [14] Hsia N, Zon LI. Transcriptional regulation of hematopoietic stem cell development in zebrafish[J]. Exp Hematol, 2005, 33(9):1007-1014.
- [15] Paik EJ, Zon LI. Hematopoietic development in the zebrafish [J]. Int J Dev Biol, 2010, 54(6-7):1127-1137.
- [16] Gering M, Patient R. Hedgehog signaling is required for adult blood stem cell formation in zebrafish embryos[J]. Dev Cell, 2005, 8(3):389-400.
- [17] Jin H, Xu J, Wen Z. Migratory path of definitive hematopoietic stem/progenitor cells during zebrafish development[J]. Blood, 2007, 109(12):5208-5214.
- [18] Rhodes J, Hagen A, Hsu K, et al. Interplay of *pu.1* and *gata1* determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish [J]. Dev Cell, 2005, 8(1):97-108.

Effects of *Irx5a* Gene Overexpression on Early Hematopoietic in Zebrafish Embryos

JIN Lu^{1,2}, LI Yan², LI Zhi-cao^{1,2}, WU Xi-jun¹, ZHOU Yan-hua¹, HE Zhi-xu^{1,2}, SHU Li-ping^{1,3,4}

(1. Tissue Engineering and Stem Cell Research Center, 2. Department of Pediatrics,

3. Department of Immunology, 4. Laboratory Animal Center,

Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and influence of early hematopoietic related genes in zebrafish embryos. **Method** The single-cell-stage zebrafish embryos were micro-injected with iroquois homebox 5a-enhanced green fluorescent protein (*Irx5a-EGFP*) mRNA as experimental group, *EGFP* mRNA as experimental control group, wild type zebrafish as blank control group. Compared the hematopoietic transcript factor genes with three groups by quantificational reverse transcription-PCR (qPCR). Such as primitive hematopoiesis *scl* and *lmo2*, definitive hematopoiesis *c-myb* and *runx1*, erythroid hematopoiesis *gata-1*, myeloid hematopoiesis *pu.1*. The zebrafish embryos' time point are 9 h、12 h、18 h、24 h、30 h post fertilization (pf). **Results** From the real-time fluorescence quantitative PCR can be seen in the original hematopoietic transcription factor *lmo2* and *scl*, the experimental group from 9 hpf to 24 hpf significantly lower than the other two groups. In the targeted hematopoietic transcription factor, *c-myb* experimental group from 12 hpf to 24 hpf significantly lower than the other two groups, *runx1* experimental group from 9 hpf to 30 hpf significantly lower than the other two groups. Myeloid hematopoietic transcription factor *pu.1* and erythroid hematopoietic transcription factor *gata-1*, the experimental group from 9 hpf to 30 hpf were significantly lower than the other two groups. The differences were statistically significant. **Conclusion** *Irx5a* gene plays an inhibitory role in the transcriptional regulators of primitive hematopoiesis, adult hematopoiesis, erythroid hematopoiesis and myeloid hematopoiesis in the zebrafish.

[Key words] Zebrafish; Iroquois homebox 5a(*Irx5a*); Hematopoietic transcription factor

(上接第 302 页)

参考文献:

- [1] 张立波, 刘彪, 田小芸, 等. 绿色荧光裸小鼠的选育初报[J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(4):306-309.
- [2] 尤金伟, 张立波, 方天, 等. 绿色荧光裸鼠血液生理生化指标检测分析[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(9):23-26.
- [3] 尤金伟, 董敏, 刘彪, 等. GFP在绿色荧光裸鼠不同组织中的表达及分析[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(5):67-70.
- [4] 方天, 尤金伟, 张立波, 等. GFP转基因裸鼠脾脏组织学观察[J]. 中国比较医学杂志, 2012, 22(11):6-9.
- [5] 尤金伟, 刘彪, 张旭亮, 等. 绿色荧光裸鼠部分免疫学指标的测定及分析[J]. 实验动物科学, 2015, 32(5):15-17.
- [6] 胡文娟, 方天, 刘彪, 等. 绿色荧光裸小鼠睾丸组织学观察及精子质量检查[J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(2):126-128.
- [7] 魏泓. 医学实验动物学[M]. 成都: 四川科学技术出版社, 1998:164-165.
- [8] 刘晓宇, 王娇, 钱欣, 等. 围绝经期大鼠动情周期的变化研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2014, 48(5):358-360.
- [9] 何秋明, 肖尚杰, 夏慧敏. 大鼠阴道涂片的观察[J]. 广州医学院学报, 2007, 35(4):54-56.
- [10] 杜纳纳, 许丹丹, 黄莉莉, 等. 去卵巢和性成熟期ICR小鼠动情周期的观察[J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(12): 2301-2304.
- [11] 张森, 王新, 韦旭斌, 等. 大鼠发情周期各阶段的阴道细胞变化观察[J]. 动物医学进展, 2006, 27(2):69-72.
- [12] 李娟, 李芝兰. BALB/c 系小鼠动情周期的观察[J]. 甘肃科技情报, 1996, 12(3):31.
- [13] 王洁, 吴素慧, 尚海霞, 等. 性成熟雌性 SD 大鼠动情周期的观察[J]. 当代医学, 2013, 19(28):25-26.
- [14] 杨秀文, 李晓英, 金焕荣, 等. 苯乙烯对生殖内分泌和动情周期的影响[J]. 癌变·畸变·突变, 1995, 7(6):358-360.

香烟烟雾对慢性阻塞性肺疾病大鼠 肺功能及血清细胞因子水平影响

熊英¹, 张金娟¹, 李玲¹, 陈燕², 吴艳俊¹, 黄惠妍²

(贵州医科大学 1. 机能实验室(花溪区大学城), 贵阳 550025; 2. 附属医院内科, 贵阳 550004)

[摘要] 目的 探讨被动吸烟联合气道内注入脂多糖(LPS)法制备大鼠慢性阻塞性肺疾病(COPD)模型过程中, 大鼠肺功能及血清中细胞因子水平的变化。方法 72只雄性SD大鼠随机均分为4周、6周、8周模型组, 自然愈合3周、6周组和对照组。采用气管内两次注入LPS联合持续熏烟的方法建立COPD大鼠模型, 动态监测被动吸烟过程中及停止熏烟后, 动物肺功能指标0.3s用力呼气容积(FEV_{0.3})及其与用力肺活量(FVC)比值(FEV_{0.3}/FVC)的变化; 同时用酶联免疫吸附方法检测血清中白细胞介素8(IL-8)、白细胞介素10(IL-10)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量, 并进行相关分析。结果 与对照组比较, 各模型组FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC、IL-10水平降低, IL-8、TNF- α 水平升高(P 均 <0.05); 且随着熏烟时间延长细胞因子及肺功能指标变化更为显著。模型组IL-8、TNF- α 水平与FEV_{0.3}/FVC呈负相关($P<0.001$, $r=-0.579$; $P=0.034$, $r=-0.354$)。与对照组比较, 自然愈合6周组IL-8、TNF- α 水平下降(P 均 <0.05), IL-10升高($P<0.05$), 各自然愈合组FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC均低于对照组(P 均 <0.05)。结论 香烟烟雾刺激能显著影响COPD大鼠体内细胞因子水平。

[关键词] 慢性阻塞性肺疾病(COPD); 细胞因子; 动物模型; 香烟烟雾

[中图分类号] R332; R563; Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)04-0315-05

随着人口老龄化和环境污染加重, 世界卫生组织预计慢性阻塞性肺疾病(chronic obstructive pulmonary disease, COPD)导致的社会经济负担将进一步增加^[1]。吸烟和反复感染是人类COPD的重要发病因素^[2], 被动吸烟复合气道内注入脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)法建立的COPD大鼠模型具有发病机制与人类相似、造模方法容易掌握的优点, 是目前国内研究者常用的动物模型。该模型具有造模时间短, 4周即可建立COPD大鼠模型^[3,4]的优点, 但亦存在实验动物短时间内需经受多种刺激(烟熏、LPS、麻醉、气管滴注机械损伤等), 以

及熏烟的剂量较大的缺点。香烟烟雾对动物气道的直接损害, 以及机体对刺激的应激反应都会引起动物体内细胞因子水平的改变。本实验就香烟烟雾对COPD模型大鼠体内细胞因子水平的影响进行了探讨, 以进一步明确该动物模型体内细胞因子水平变化的意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养条件

72只清洁级雄性SD大鼠, 体质量(200 $\pm$ 20)g, 第三军医大学大坪医院实验动物中心提供[SCXK(军)2012-0011]。于贵州医科大学实验动物中心[SYXK(黔)2012-0001]适应性饲养1周后用于实验, 环境温度18~25℃, 通风良好。

1.2 主要仪器与试剂

HX200插管式呼吸传感器、BL-420S生物机能实验系统, 成都泰盟软件有限公司; 酶标仪, 美国

[收稿日期] 2017-05-30

[基金项目] 贵州省科学技术基金(黔科合LG字[2012]014号)

[作者简介] 熊英(1977-), 女, 讲师, 硕士。主要研究方向: 机能实验、药理学。E-mail: xiongying1116@163.com

[通讯作者] 黄惠妍(1980-), 女, 临床医学硕士, E-mail: huanghuiyan8039@163.com

BioTek 公司; 黄果树(10 mg)过滤嘴香烟, 贵州中烟公司; 脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)(L2880-10 mg), 索莱宝生物技术有限公司; 白细胞介素 8(interleukin-8, IL-8)、IL-10、肿瘤坏死因子 α (tumour necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒, 上海沪鼎生物技术有限公司; 有机玻璃熏烟箱(50 cm $\times$ 40 cm $\times$ 20 cm)自制。

1.3 实验方法

1.3.1 动物分组和造模方法 (1)动物分组: 计算机随机分组法将 72 只 SD 大鼠分成对照组、4 周、6 周和 8 周模型组、自然愈合 3 周和 6 周组, 每组 12 只。(2)造模方法: 采用气管内滴注脂多糖联合持续熏烟的方法造模, 于造模第 1 日和第 14 日, 参照陈燕等^[5]的方法将动物麻醉(质量分数 8% 水合氯醛 4.5 mL/kg, 腹腔注射)后行直视下气管插管术, 除对照组注入等量生理盐水外, 其余各组大鼠气道内均注入质量分数 0.1% LPS 溶液 200 μ L。从造模第 2 日起, 除对照组外各组大鼠均予以被动吸烟, 1 次/日(参照前期的实验方法^[6]: 将 6 只大鼠放入有机玻璃熏烟箱内, 同时点燃 2 支香烟并置于箱内两对角的位置, 待自行燃尽后立即更换, 每次熏烟共需燃尽 8 支香烟, 约 45 min)。4 周、6 周和 8 周模型组分别连续熏烟 28 d、42 d 和 56 d; 自然愈合 3 周和 6 周组则连续熏烟 56 d 后停止熏烟, 于造模前相同条件下分别饲养 21 d 和 42 d。气管内滴注 LPS 当日不予熏烟, 对照组术后不予熏烟。

1.3.2 病理学观察 取大鼠左肺行病理学检查。用 7# 留置针行颈动脉穿刺抽尽全血, 待动物死亡后迅速开胸取出双侧肺组织, 生理盐水冲洗表面, 取左肺用体积分数 10% 中性甲醛固定, 脱水, 石蜡包埋, 切片, 苏木素-伊红(HE)染色, 光学显微镜下观察。

1.4 指标检测

各模型组于熏烟结束后次日将动物麻醉后先测定呼吸功能 0.3 s 用力呼气容积(FEV_{0.3})及其与用力肺活量(FVC)比值(FEV_{0.3}/FVC), 再行颈总动脉插管术收集全血、分离血清, 测定 IL-8、IL-10 和 TNF- α 的含量。对照组与 4 周模型组在同日进行检测。自然愈合组分别于停止熏烟 3 周和 6 周后, 用同样方法检测上述各项指标。

1.4.1 肺功能测定 麻醉后行气管切开插管术, 将 Y 型插管的一端与呼吸传感器连接, 并通过 BL-4 20 s 生物机能实验系统监测呼吸曲线, 另一端接三通阀。在呼气末打开三通阀并快速向气管内推入空气

6 mL(相当于被动深吸气^[7]), 通过记录到的呼吸曲线计算 FEV_{0.3} 和 FEV_{0.3}/FVC。

1.4.2 细胞因子含量测定 用 7# 留置针行颈总动脉穿刺, 并用真空采血管(普通血清管)收集全血, 室温下静置 20 min 后离心(3 000 r/min, 20 min), 分离血清。用酶联免疫吸附(ELISA)法测定细胞因子含量。

1.5 统计分析

用 SPSS 17.0 软件进行统计分析, 实验数据以表示, 多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), 相关分析采用 Pearson 法, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

造模过程中逐渐出现毛发微黄、体质量减轻、精神萎靡、反应迟钝以及呼吸伴喘鸣音等症状。停止熏烟后上述症状均有所好转、体质量增加。

2.2 病理观察结果

对照组大鼠支气管周围及间质无明显炎症细胞浸润, 支气管、终末细支气管、肺泡无明显破坏, 肺泡壁完整(图 1A)。各模型组均出现肺泡壁变薄、肺泡腔扩大或肺泡壁破裂、融合形成肺大疱; 支气管黏膜坏死、脱落, 伴淋巴细胞、浆细胞为主的炎症细胞浸润等(图 1B、C、D), 肺气肿和支气管炎的病理学改变, 结合肺功能指标(FEV_{0.3}, FEV_{0.3}/FVC)下降说明造模成功。与模型组比较, 自然愈合组炎症细胞浸润、肺泡扩张融合等现象均有不同程度的减轻(图 1E、F), 其中以 6 周组更为明显。

2.3 肺功能测定

与对照组比较, 各模型组和自然愈合组 FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC 均显著下降($P < 0.05$), 各模型组之间比较, 6 周、8 周模型组与 4 周模型组有统计学差异(P 均 < 0.05); 与 8 周模型组比较, 各自然愈合组 FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC 升高(P 均 < 0.05), 且自然愈合 6 周组较 3 周组升高($P < 0.05$), (表 1)。

2.4 细胞因子检测

与对照组比较, 各模型组血清 IL-8、TNF- α 水平升高(P 均 < 0.05), IL-10 水平下降($P < 0.05$)。模型组间比较 IL-8 水平有统计学差异(P 均 < 0.05)。各自然愈合组与 8 周模型组比较, IL-8、TNF- α 水平显著

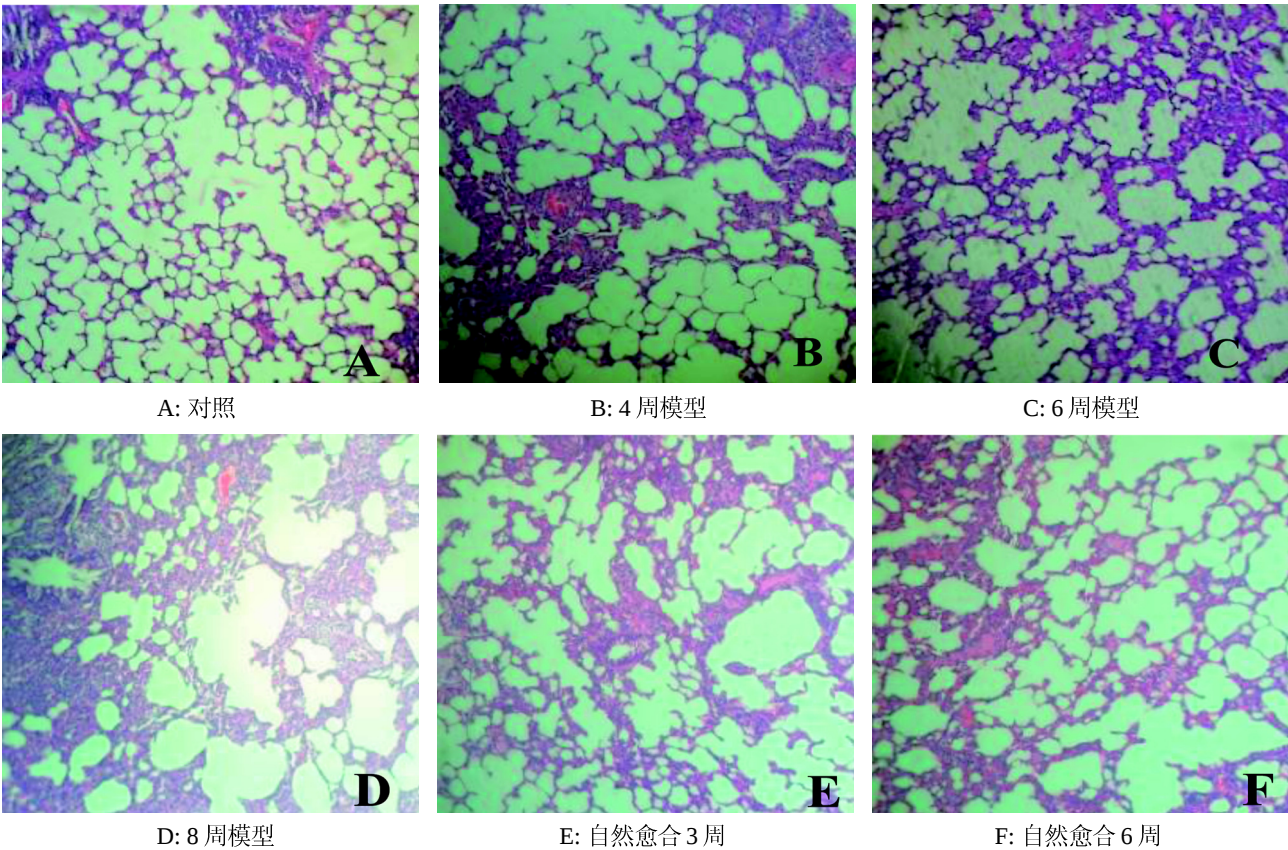


图 1 各组大鼠肺组织HE染色(× 100)

Figure 1 HE staining of lung tissue in rats of each group

下降(P 均 <0.05), 而 IL-10 水平显著升高($P<0.05$); 自然愈合组组间比较上述细胞因子水平均有统计学差异($P<0.05$)。与对照组比较, 自然愈合 6 周组 IL-8、TNF- α 水平下降, IL-10 升高($P<0.05$)(表 1)。

2.5 相关性分析

将全部模型组血清 IL-8、TNF- α 、IL-10 水平

与 FEV_{0.3}/FVC 作直线相关分析, 模型组 IL-8、TNF- α 水平与 FEV_{0.3}/FVC 呈负相关($P<0.000$, $r=-0.579$; $P=0.034$ 相关系数 $r=-0.354$); 而 IL-10 与 FEV_{0.3}/FVC 无线性相关($P=0.304$)。同样对全部自然愈合组的上述指标进行相关分析, IL-8 与 FEV_{0.3}/FVC 呈负相关($P=0.041$, $r=-0.420$)。

表 1 各组大鼠肺功能和细胞因子水平比较

Table 1 The concentration of IL-8, IL-10, TNF- α and lung function in rats of each groups

组 别	FEV _{0.3} /mL	FEV _{0.3} /FVC(%)	IL-8/ng · L ⁻¹	TNF- α /ng · L ⁻¹	IL-10 ng · L ⁻¹
对照组	4.79 ± 0.15	79.93 ± 2.52	356.16 ± 6.93	278.45 ± 7.24	56.42 ± 3.15
4 周模型组	4.20 ± 0.33 ^a	69.96 ± 5.50 ^a	448.32 ± 4.86 ^a	317.36 ± 7.40 ^a	43.75 ± 3.41 ^a
6 周模型组	3.82 ± 0.32 ^{ab}	63.66 ± 5.41 ^{ab}	467.10 ± 7.18 ^{ab}	328.73 ± 7.68 ^{ab}	40.90 ± 2.70 ^{ab}
8 周模型组	3.60 ± 0.37 ^{ab}	59.84 ± 6.20 ^{ab}	483.15 ± 6.08 ^{abc}	331.55 ± 7.21 ^{ab}	39.74 ± 3.00 ^{ab}
自愈 3 周组	3.93 ± 0.43 ^{ad}	65.52 ± 7.20 ^{ad}	357.63 ± 12.12 ^d	276.34 ± 6.70 ^d	56.43 ± 2.92 ^d
自愈 6 周组	4.20 ± 0.26 ^{ade}	70.05 ± 4.74 ^{ade}	330.30 ± 7.89 ^{ade}	263.02 ± 9.95 ^{ade}	61.89 ± 3.33 ^{ade}
F 值	17.47	17.56	835.73	175.75	111.33
P 值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$, 与 4 周模型组比较, ^b $P<0.05$, 与 6 周模型组比较比较, ^c $P<0.05$; 与 8 周模型组比较, ^d $P<0.05$, 与自愈 3 周组比较, ^e $P<0.05$; $n=12$

3 讨论

COPD 是呼吸系统常见疾病, 反复发作的肺部感染是导致疾病加重的重要因素。肺部炎症会导致机体的全身炎症反应和炎症细胞的异常活化, 并释放大炎症相关细胞因子, 细胞因子和炎症细胞相互作用进一步放大炎症效应, 并导致肺组织结构的破坏。因此细胞因子水平变化和炎症细胞活化是全身炎症反应的标志。动物模型是研究疾病发病机制和治疗方法的基础, 但是由于 COPD 病因复杂且动物和人存在种属差异, 目前尚无公认的标准 COPD 动物模型制备方法。熏烟复合气道内注入 LPS 法最早由宋一平等^[3]报道, 该方法模拟了人类 COPD 的发病诱因, 动物病理生理状况与人类相似, 被许多国内学者采用。但是除了疾病导致的机体炎症反应外, 大剂量烟雾刺激能够通过氧化应激直接损伤气道上皮细胞, 引起细胞因子水平的变化。因此, 熏烟法建立的 COPD 动物模型用于细胞因子相关的实验研究时, 应该充分考虑香烟烟雾对动物体内细胞因子水平的直接影响。

本研究分别监测了持续熏烟不同时间及停止熏烟后大鼠的肺功能和血清 IL-8、IL-10 和 TNF- α 的水平, 结果显示, 造模 4 周后动物肺功能指标显著下降, IL-8、TNF- α 升高、IL-10 下降(P 均 <0.05), 结合病理检查结果说明该动物模型成立, 并且细胞因子在早期就有显著改变。模型组之间比较显示, 随着造模时间延长上述细胞因子水平变化更为显著, 且模型组 IL-8、TNF- α 水平与 FEV_{0.3}/FVC 呈负相关, 与国外文献报道一致^[8]。IL-8 主要由肺泡巨噬细胞产生, 是中性粒细胞重要的趋化因子。TNF- α 是炎症反应的启动因子, 主要由活化的单核细胞和巨噬细胞分泌, 其通过气道慢性炎症网络, 参与了 COPD 气道重塑和阻塞进程^[9]。IL-10 是重要的抗炎因子, 研究认为 IL-10 的减少与 COPD 气道炎症的持续存在关系密切^[10]。临床研究认为, IL-8 和 TNF- α 相互影响, 共同参与了气道炎症反应和气道重塑过程, 导致患者肺功能下降^[11,12], 本实验的研究结果提示, 模型组大鼠血清 IL-8、TNF- α 水平与 FEV_{0.3}/FEV_{0.3}/FVC 有负相关关系, 且自然愈合组 IL-8 与 FEV_{0.3}/FEV_{0.3}/FVC 也呈负相关, 提示这两个因子一定程度上反映了该动物模型 COPD 的严重程度。

为了进一步探讨该动物模型体内细胞因子水平变化与烟雾刺激的关系, 监测了停止熏烟 3 周和 6 周后大鼠肺功能和血清中上述因子的水平, 结果显示: 自然愈合组大鼠肺功能指标较 8 周模型组改善(P 均 <0.05), 但与对照组比较, FEV_{0.3}、FEV_{0.3}/FVC 降低(P 均 <0.05); 与 8 周模型比较, 自然愈合组上述细胞因子水平呈显著恢复趋势; 自然愈合 3 周组细胞因子水平与对照组接近。提示香烟烟雾是引起细胞因子水平变化的因素之一, 停止熏烟后因子水平的变化能在短时间内恢复, 但肺功能损伤不可逆。

被动吸烟复合气道内注入 LPS 法建立的 COPD 大鼠模型虽然具有发病机制与人类相似、建模所需时间短的优点, 且大鼠血清 IL-8 和 TNF- α 水平与肺功能下降有相关关系, 但是短时间内大剂量香烟烟雾刺激导致的呼吸道损伤, 也是导致体内部分细胞因子水平变化的重要因素, 停止熏烟后血清细胞因子水平变化会在短时间内恢复, 与人类 COPD 的慢性呼吸道和全身炎症反应导致的细胞因子变化不完全相同, 因此在采用这一动物模型进行细胞因子相关的实验研究时应充分考虑该因素的影响。

参考文献:

- [1] Lopez AD, Shibuya K, Rao C, et al. Chronic obstructive pulmonary disease: current burden and future projections [J]. *Eur Respir J*, 2006, 27(2):397-412.
- [2] 刘君波, 黄梦珊, 余晨曦, 等. 慢性阻塞性肺疾病模型[J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(2):129-133.
- [3] 宋一平, 崔德健, 茅培英, 等. 慢性阻塞性肺疾病大鼠模型气道重塑及生长因子的研究[J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2001, 24(5):283-285.
- [4] 杨金星, 袁嘉丽, 管翰粟, 等. 活血化淤药对 COPD 模型大鼠气道重塑的干预作用[J]. *现代中西医结合杂志*, 2013, 22(23):2524-2526.
- [5] 陈燕, 熊英, 李玲, 等. 慢性阻塞性肺疾病模型大鼠细胞因子水平变化的研究[J]. *中华疾病控制杂志*, 2015, 19(8): 839-842.
- [6] 熊英, 张金娟, 黄惠妍, 等. 异丙托溴铵雾化吸入治疗对 COPD 大鼠肺功能的保护作用及机制[J]. *山东医药*, 2016, 56(21): 27-29.
- [7] 王翠茹, 李玲, 韩云霞, 等. 补肺胶囊对慢性阻塞性肺疾病模型大鼠肺功及血气分析的影响[J]. *时珍国医国药杂志*, 2012, 23(1):104-106.
- [8] Paone G, Conti V, Leone A, et al. Analysis of sputum markers in the evaluation of lung inflammation and functional

- impairment in symptomatic smokers and COPD patients[J]. Dis Markers, 2011, 31(2):91-100.
- [9] Mukhopadhyay S, Hoidal JR, Mukherjee TK. Role of TNF- α in pulmonary pathophysiology[J]. Respir Res, 2006, 7(1):125-133.
- [10] Takanashi SY, Hasegawa Y, Kanehira Y, et al. Interleukin-10 level in sputum is reduced in bronchial asthma, COPD and in smokers[J]. Eur Respir J, 1999, 14(2):309-314.
- [11] 牛颖梅. 慢性阻塞性肺疾病急性加重期细菌感染和细胞因子变化的临床研究[J]. 中国现代医学杂志, 2010, 20(9): 1354-1357.
- [12] 王晓青. 慢性阻塞性肺疾病患者血清 IL-8、IL-10、 α -HBDH、CRP 及 NO 水平的变化[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2010, 26(12):1262-1263.

Effects of Cigarette Smoke on Lung Function and Serum Cytokine Levels in Chronic Obstructive Pulmonary Disease Rat

XIONG Ying¹, ZHANG Jin-juan¹, LI Lin¹, CHEN Yan², WU Yan-jun¹, HUANG Hui-yan²

(1. Department of Medical Function of the Laboratory, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China;

2. Department of Medicine, the Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550025, China)

[Abstract] Objective To investigate the influence of cigarette smoke on lung function and serum cytokine levels in chronic obstructive pulmonary disease (COPD) rats which were established by the complex stimulation of lipopolysaccharide (LPS) and smoked cigarettes. **Methods** Seventy-two male SD rats were randomly divided into six groups, 4 weeks, 6 weeks and 8 weeks model group, 3 weeks and 6 weeks natural healing group, and control group. A COPD rat model was established by the complex stimulation of two times LPS injection and smoked cigarettes. The lung function of the rats was measured during passive smoking and quit smoking. At the same time serum interleukin-8(IL-8), IL-10 and tumour necrosis factor- α (TNF- α) levels were monitored by Enzyme-linked immunosorbent assay. Correlation analysis concerning cytokine levels and pulmonary function index were conducted. **Results** Compared with control group, forced expiratory volume in 0.3 second (FEV_{0.3}), forced expiratory volume in 0.3 second as a percentage of forced vital capacity (FEV_{0.3}/FVC) and IL-10 were decreased ($P<0.05$), IL-8 and TNF- α levels were increased in the model groups ($P<0.05$). And as the building time prolonged, the changes of those cytokines and lung function indexes were more obvious than before. IL-8 and TNF- α levels were inversely associated with FEV_{0.3}/FVC ($P<0.001$, $r=-0.579$; $P=0.034$, $r=-0.354$). Compared with control group, IL-8 and TNF- α levels were decreased in the 6 weeks healing group, at the same time IL-10 levels was increased ($P<0.05$), the FEV_{0.3} and FEV_{0.3}/FVC were decreased in the healing groups ($P<0.05$). **Conclusions** Cigarette smoke is the primary cause of changes on cytokine levels in this animal model.

[Key words] Chronic obstructive pulmonary disease (COPD); Cytokines; Animal model; Cigarette smoke

氧化苦参碱对小鼠哮喘模型 保护作用的初步研究

兰露莎, 赵兵兵, 杨红宇, 罗 红, 江 滢
(贵州医科大学实验动物中心, 贵阳 550004)

[摘要] 目的 初步探讨氧化苦参碱(OMT)对哮喘小鼠的保护作用。方法 用 $\text{Al}(\text{OH})_3$ 和卵清白蛋白诱发BALB/c小鼠过敏性哮喘, 每日观察小鼠一般情况和体质量变化。哮喘模型建立后, 予OMT或地塞米松进行治疗, 分别在治疗后5 d、15 d处死部分小鼠, 留存肺组织和支气管肺泡灌洗液进行检测。将留存的肺组织行HE染色观察其病理变化, BALF预处理后瑞氏染色行细胞总数和嗜酸性粒细胞计数。结果 OMT介入可改善哮喘小鼠体质量降低, 在治疗后5 d和15 d时, 各治疗组肺组织亦出现与哮喘模型组相似的病理变化, 但炎性细胞或嗜酸细胞浸润不同程度减少。OMT的各治疗组与哮喘模型组比较, BALF中的细胞总数和嗜酸性粒细胞计数均降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。结论 氧化苦参碱对哮喘小鼠具有治疗作用。

[关键词] 氧化苦参碱(OMT); 哮喘; 病理变化; 保护作用; 小鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)04-0320-04

支气管哮喘(简称哮喘)是由多种细胞, 包括炎性细胞、气道结构细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症^[1]。反复发作可引起气道重塑, 导致不可逆气流受限, 其原因与气道慢性炎症间接引起气道壁结构改变有关, 被称为是哮喘的一个重要特征^[2]。目前对于哮喘的治疗仍以糖皮质激素为主, 但副作用较大。尚缺乏疗效满意且副作用小的抑制气道炎症及抗气道高反应性药物^[3]。氧化苦参碱(Oxymatrine, OMT)又名苦参素, 是从豆科属植物苦参或平科植物广豆根中分离出来的生物碱。OMT具有调节免疫、抗病原体、抗炎性反应等广泛的药理作用^[4], 并被临床证实具有一定的抑制气道炎症及抗气道高反应性作用, 但机制不详。因此, 本文通过OMT

对建立的小鼠哮喘模型的介入初步探讨OMT防治支气管哮喘的治疗作用。为拓宽OMT在临床治疗哮喘疾病的应用, 以及开发该药的新用途提供实验室依据, 并为进一步探明OMT的作用及其作用机制等提供良好的思路与方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雌性BALB/c小鼠, 54只, 4~6周龄, 体质量18~24 g, 购自贵州省实验动物工程中心[SCXK(黔)2012-001], 饲养于贵州医科大学实验动物中心屏障系统[SYXK(黔)2012-001]。

1.2 主要试剂和仪器设备

质量分数2% $\text{Al}(\text{OH})_3$ 凝胶佐剂(Aluminium Hydroxide Gel Adjuvant), 购自美国InvivoGen公司, 10 mg/mL(Cat. Code: vac-alu-250, Lot #5113, Expiry date, Mar. 2017); 卵清白蛋白(Albumin from chicken egg white, OVA), 购自美国Sigma公司, A5378-1G(Lot #SLBD2313V, PCODE 1001988500, CAS 9006-59-1); 注射用地塞米松磷酸钠, 购自马

[收稿日期] 2017-05-30

[基金项目] 贵州省科技厅省科技合作计划项目(黔科合LH字[2016]7369)

[作者简介] 兰露莎(1984-), 女, 硕士研究生, 实验师。

E-mail: 1558809668@qq.com

[通讯作者] 江 滢(1976-), 女, 医学博士, 教授, 从事病毒致病机制及抗病毒免疫相关研究。

E-mail: jiangyan3313@sina.com

鞍山丰原制药有限公司, 5 mg/支, 批号 150512-1。用无菌蒸馏水溶解稀释; 药物: OMT, 购自中国药品生物检定所, 为国家药品标准物质, 批号 110780-201007; 苏木素伊红(HE)染色试剂盒, 购自碧云天生物技术有限公司, C0105; 瑞氏染液购自北京索莱宝公司, G8220。小动物屏障系统和 IVC 笼具(FRI-42), 购自重庆腾鑫生物技术有限公司; 医用雾化器(402B)江苏鱼跃医疗设备股份有限公司; 倒置显微镜(CKX41)日本 Olympus 公司。

1.3 小鼠哮喘模型的建立

根据文献^[5]方法并予以改进建立哮喘模型: 实验 1 d、8 d、15 d 腹腔注射 OVA 及 Al(HO)₃ 凝胶混合液 0.2 mL(内含 OVA 60 μ g 及 2.25 mg Al(HO)₃ 凝胶)致敏; 实验 21 d 开始用 5% OVA 溶液 8 mL 行超声雾化, 每次 30 min, 连续雾化 5 d 进行激发。通过观察小鼠是否出现烦躁、呼吸急促、抽搐及口唇紫绀等症状, 支气管肺泡灌洗液(BALF)细胞计数和肺组织病理变化情况, 以验证建模是否成功。

1.4 OMT 治疗哮喘小鼠的实验分组

54 只小鼠随机分为 6 组, 每组 9 只: ①正常对照组(CON), 用生理盐水代替 OVA 进行致敏和雾化, 不给药; ②哮喘模型组(AST), 按上述方法进行致敏和激发, 不给药; ③治疗对照组(TRE), 按上述方法进行致敏和激发, 于每次激发前 30 min 腹腔注射地塞米松(0.5 mg/kg); ④ OMT 高剂量组(OMT-H)、中剂量组(OMT-M)和低剂量组(OMT-L), 按上述方法进行致敏和激发, 于每次激发前 30 min 分别腹腔注射 OMT 25 mg/kg、12.5 mg/kg 和 6.25 mg/kg。于治疗后 5 d 每组处死小鼠 3 只, 同时①摘眼球取血并制备血清冻存于 -20 $^{\circ}$ C; ②从气管注射无菌生理盐水 0.5 mL 入肺, 抽吸 3 次后将抽出液体即 BALF 冻存于 -20 $^{\circ}$ C; ③称小鼠体质量并记录; ④取右下肺叶置于质量分数 4% 多聚甲醛中固定; ⑤余下肺组织冻存于 -80 $^{\circ}$ C。各组小鼠不再激发, 隔日给予相应药物 1 次, 持续 5 次后, 处死小鼠, 留存标本及相应检查同前。

1.5 BALF 细胞计数

取 150 μ L BALF 细胞悬液与细胞计数液按 1:1 稀释混匀, 显微镜下计数细胞总数, 余下 BALF 在 4 $^{\circ}$ C、以 2 000 r/min 离心 10 min, 取沉淀物涂片, 瑞氏染色后在显微镜下观察, 每个标本计数 200 个细胞, 共观察 10 个视野计数。

1.6 肺组织切片 HE 染色观察

质量分数 4% 多聚甲醛固定 24 h 后的肺组织, 按常规病理学方法进行石蜡包埋、切片及 HE 染色, 显微镜下观察并留存图像。

1.7 统计学处理

各组所得计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS19.0 软件处理数据, 两组间均数比较用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠一般情况及体质量观察

每日观察小鼠一般情况, 并称各组小鼠的体质量。在致敏阶段, 各组小鼠一般情况均好, 无明显差别。开始激发后, AST、TRE、OMT-H、OMT-M 和 OMT-L 组小鼠均出现烦躁、精神萎靡、进食减少、腹肌抽搐和口唇发绀等变化, 各组间无明显差异。AST 组小鼠体质量较 CON 组下降, 其他治疗组小鼠体质量介于二者之间(图 1)。

2.2 BALF 细胞计数

AST 组小鼠在激发后 5 d 或 15 d, BALF 中的细胞总数和嗜酸性粒细胞计数较正常组都显著增高($P < 0.01$)。使用地塞米松或 OMT 的各治疗组与 AST 组比较, BALF 中的细胞总数和嗜酸性粒细胞计数均降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$, 表 1)。

2.3 肺组织切片 HE 染色观察结果

HE 染色片可见, CON 组气管、肺组织中无明显病理改变, 肺泡、小血管、支气管等结构完整(图 2A); AST 组肺组织中肺大泡形成, 肺充血, 肺泡内出现泡沫样渗出物, 间质水肿, 可见淋巴细胞、单核细胞浸润; 肺组织中气道上皮增厚, 管腔狭窄, 肺间质出现淋巴细胞和嗜酸细胞浸润; 气管壁和肺泡周围无炎性浸润(图 2B)。各治疗组亦出现于 AST 组相似的病理变化, 但炎性细胞或嗜酸细胞浸润不同程度减少(图 2C、D、E 和 F)。

3 讨论

哮喘是一种世界范围的呼吸道常见疾病, 近年来, 哮喘的发病率在世界范围内呈上升趋势, 造成的社会负担不断增加^[6]。已知哮喘是由多种细胞, 包括炎性细胞、气道结构细胞和细胞组分参与的气道慢性炎症^[7]。哮喘会引起支气管壁出现炎

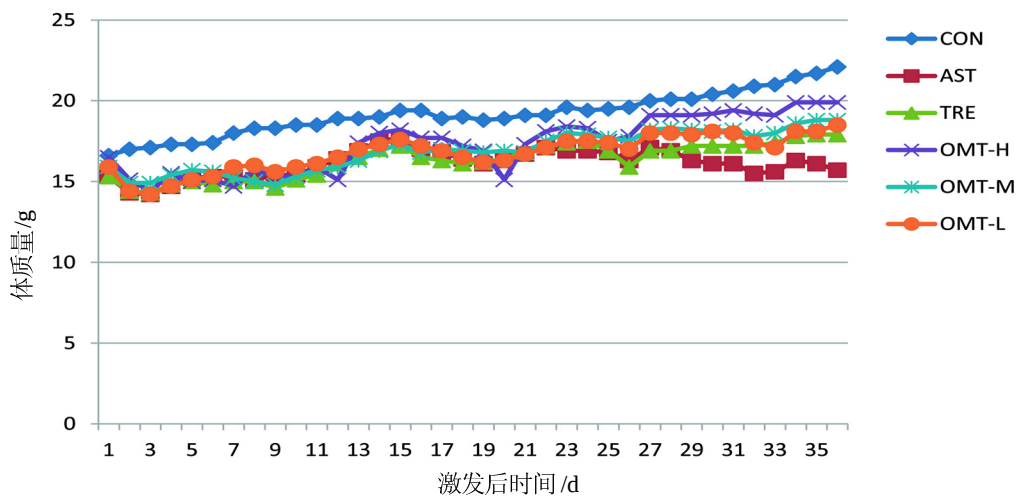
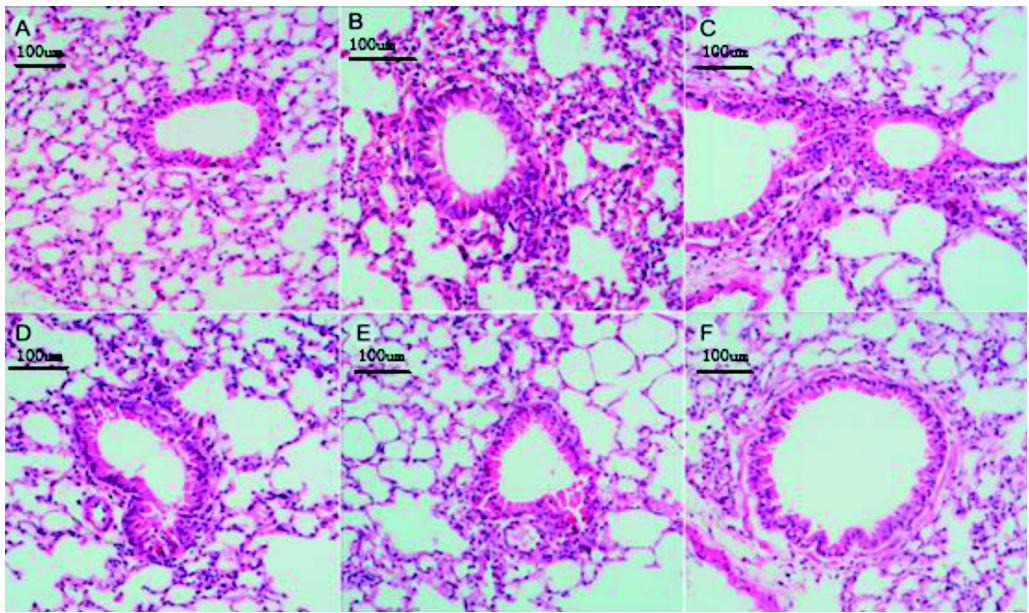


图 1 各组小鼠体重变化情况

表 1 BALF 细胞总数和嗜酸性粒细胞计数(n=3)				10 ⁹ /L
组别	激发后 5 d		激发后 15 d	
	细胞总数	嗜酸粒细胞计数	细胞总数	嗜酸粒细胞计数
CON	6.62 ± 0.19	0.050 ± 0.003	6.62 ± 0.19	0.050 ± 0.003
AST	12.89 ± 0.18 [#]	1.330 ± 0.070 [#]	9.08 ± 0.08 ^{#&}	0.930 ± 0.044 ^{#&}
TRE	8.22 ± 0.18 [*]	0.810 ± 0.032 ^{**}	7.27 ± 0.12 ^{*&}	0.700 ± 0.012 ^{*&}
OMT-H	7.10 ± 0.06 ^{**}	0.630 ± 0.022 ^{**}	6.42 ± 0.12 [*]	0.540 ± 0.021 ^{*&}
OMT-M	8.26 ± 0.07 ^{**}	0.770 ± 0.020 ^{**}	7.31 ± 0.23 ^{*&}	0.680 ± 0.007 [*]
OMT-L	8.39 ± 0.17 [*]	0.810 ± 0.001	7.44 ± 0.16 ^{*&}	0.690 ± 0.022 ^{*&}

注: 与 CON 组比较, [#]P<0.01; 与 AST 组比较, ^{*}P<0.05; ^{**}P<0.01; 与同组激发后 5 d 比较, [&]P<0.05

性增厚改变, 肥大细胞、单核巨噬细胞、淋巴细胞的活性增加, 使肺组织开始出现纤维化, 肺泡和肺间质就会随着纤维化不断受损, 哮喘患者就会出现呼吸困难、心律失常等一系列呼吸衰竭症状,



A: CON 组, B: AST 组, C: TRE 组, D: OMT-H 组, E: OMT-M 组, F: OMT-L 组

图 2 OMT 治疗 5 d 哮喘小鼠肺组织病理观察(HE × 200)

还会导致哮喘猝死、肺心病等病症^[8]。但是,关于哮喘确切的发病机理目前尚不清楚,目前的治疗措施难以取得满意效果。

苦参碱来源于豆科植物苦参等,药理作用广泛,尤其在哮喘病的应用方面受到关注。OMT是豆科槐属植物中提取的一种生物碱,其结构中均具有四环的喹啉。它是一类具有苦参次碱-15-酮化学结构的化合物,具有多方面的药理活性^[9-14]。本文研究结果表明,OMT能有效改善哮喘动物模型的一般情况,对抗哮喘动物模型肺组织炎性细胞浸润,肺组织炎性反应得到明显改善。这为OMT治疗哮喘奠定了一定的中医理论基础。OMT减轻肺组织炎症反应的机制,以及对气道高反应性和肺组织纤维化进行调节是我们需要进一步关注的问题。

参考文献:

- [1] 陈欣,林江涛.我国支气管哮喘防治现状[J].内科急重症杂志,2008,14(5):225-226.
- [2] 王美玲,李国华.支气管哮喘气道炎症发生机制的研究进展[J].中外医疗,2014(8):190-191.
- [3] 于国华,张凤,孙洪光.中医药治疗哮喘病[J].世界最新医学信息文摘:电子版,2013(16):287-287.
- [4] 吴琴,高云.氧化苦参碱药理作用的分子机制研究进展[J].中国药理学通报,2015,31(6):759-762.
- [5] 罗琿,徐湛,孙大勇.BCG-CpG-DNA对支气管哮喘小鼠肺组织STAT4、STAT6表达的影响[J].国际呼吸杂志,2015,35(5):321-324.
- [6] 成琳,吴小萍,李智君,等.苦参碱空气压缩雾化治疗儿童哮喘急性发作的疗效观察[J].中国社区医师:医学专业,2011,13(33):61-61.
- [7] 雷泽林,刘晓菊,马建秀,等.苦参碱对支气管哮喘小鼠气道炎症和早期气道重塑的影响[J].中华结核和呼吸杂志,2009,32(3):165-170.
- [8] 中华医学会呼吸病学分会哮喘学组.支气管哮喘防治指南(支气管哮喘的定义、诊断、治疗和管理方案)[J].中华结核和呼吸杂志,2008,31(3):177-185.
- [9] 黄美蓉,王志强.氧化苦参碱对哮喘大鼠气道高反应和CD54、CD44的影响[J].中国病理生理杂志,2010,26(10):2026.
- [10] 焦霞,沈其昀,王利民,等.氧化苦参碱对哮喘小鼠的抗炎作用及对ICAM-1 mRNA表达的影[J].首都医科大学学报,2006,27(1):28-31.
- [11] 侯伟,刘海燕,王爱荣.氧化苦参碱对小鼠哮喘模型气道炎症及细胞因子的影响[J].西安交通大学学报:医学版,2004,25(6):587-589.
- [12] 刘艳丰,张平.氧化苦参碱治疗支气管哮喘的研究进展[J].现代医药卫生,2015(3):377-379.
- [13] Zhang TZ, Qiang FU, Chen T, et al. Anti-asthmatic effects of oxymatrine in a mouse model of allergic asthma through regulating CD40 signaling[J].中国天然药物,2015,13(5):368-374.
- [14] Hou W, Liu H Y, Yang X D, et al. Effect of oxymatrine on the distribution of dendritic cells in lung and spleen tissues of asthmatic mice[J].Chin J Contemp Pediatr, 2011, 13(13):40-43.

The Protective Effect of Oxymatrine on Asthma Mice

LAN Lu-sha, ZHAO Bing-bing, YANG Hong-yu, LUO Hong, JIANG Yan

(Experimental Animal Center, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

[Abstract] Objective To study the protective effect of Oxymatrine (OMT) on asthma mice. **Methods** The asthmatic BALB/c mice were induced by ovalbumin (OVA) and aluminium hydroxide. The general situations and weights of mice were observed every day. Then these mice were treated by using OMT and/or dexamethasone and were sacrificed at 5 or 15 days after treatment. The bronchoalveolar lavage fluid (BALF) and lung tissue of mice were obtained. Their pathological reaction was observed through HE stain. The total number of cells and eosinophils cells in BALF were counted. **Result** OMT can improve the weights of asthma mice. On day 5 and 15, the pathological reactions of the lung tissue in each treatment groups were the same with that of the asthma group, but the number of inflammatory cells in lung tissue was much less than that of the asthma group. The total number of cells and eosinophils cells in BALF were reduced compared with the asthma group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** OMT has protective effect on the asthma mice.

[Key words] Oxymatrine(OMT); Asthma; Pathological changes; Protection; Mice

贵州小型猪母猪初产繁殖性状 及其相关和通径分析

陈明飞, 姚 刚, 赵 海, 钱 宁, 吴曙光
(贵阳中医学院实验动物研究所, 贵阳 550002)

[摘要] 目的 为了揭示母猪繁殖性状间的相互关系, 找出影响离乳窝重的主要因子。方法 选取 30 头普通级封闭群贵州小型猪初产母猪, 测定产仔总数(X1)、产活仔数(X2)、初生个体质量(X3)、初生窝重(X4)、21 日龄活仔数(X5)、21 日龄个体质量(X6)、21 日龄窝重(X7)、离乳仔猪数(X8)、离乳个体质量(X9)、离乳窝重(Y)等 10 个繁殖性状表型值, 并对各繁殖性状表型值进行相关及通径分析, 以揭示母猪繁殖性状间的相互关系。结果 贵州小型猪母猪离乳窝重与各繁殖性状间均存在极显著($P<0.01$)正相关。通径分析结果表明, X7~X9 对离乳窝重以直接正向作用为主, X5~X6 对离乳窝重则以间接正向作用为主, X1~X4 对离乳窝重的影响则很小。结论 离乳窝重受先天遗传因素的影响较小, 而受后天环境的影响较大。

[关键词] 封闭群贵州小型猪; 繁殖性状; 通径分析

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)04-0324-04

贵州小型猪(*Sus scrofa domestica* var. *mino Guizhounensis* Yu)是贵阳中医学院培育成功的实验用小型猪品种, 历经 30 年群内选育而成^[1]。贵州小型猪具有遗传背景清楚、体质量合适、性情温驯、遗传稳定、性成熟早、抗病力强、耐受性好等优点, 其心血管系统、免疫系统、消化系统等均与人类相似, 广泛应用于营养、心血管疾病、烧创伤、抗衰老及代谢研究, 应用前景良好^[2]。

母猪的繁殖性状一般包括产仔总数、产活仔数、初生窝重、初生个体质量、21 日龄窝重(泌乳力)、离乳仔猪数、离乳重、离乳窝重等^[3]。其中离乳窝重是衡量母猪繁殖性能的最重要指标之一, 其作为一个复合性状, 受到其它繁殖性状的

影响。由于影响母猪离乳窝重的相关性状较多, 且这些性状间也存在着复杂的相互关系, 因此需要精简测定项目, 找出影响离乳窝重的主要因素, 从而提高育种效率^[4]。通径分析可以揭示各自变量对因变量的直接作用和间接作用, 并可反映自变量对因变量影响的大小及各自变量之间的相互关系, 从而找出影响因变量的主要因素^[5]。本研究对贵州小型猪母猪多个繁殖性状进行了相关和通径分析, 揭示了繁殖性状间的相互关系, 找出了影响离乳窝重的主要因子, 从而为贵州小型猪母猪的育种工作提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

本文所用数据为贵阳中医学院贵州小型猪保种场 30 头初产母猪的繁殖记录。分析性状包括产仔总数(X1)、产活仔数(X2)、初生个体质量(X3)、初生窝重(X4)、21 d 活仔数(X5)、21 d 个体质量(X6)、21 日龄窝重(泌乳力)(X7)、离乳仔猪数(X8)、离乳个体质量(X9)、离乳窝重(Y)。仔猪

[收稿日期] 2017-05-30

[基金项目] 中央引导地方科技发展专项资金(黔科中引地[2016]4007 号)

[作者简介] 陈明飞(1988-), 男, 山东泰安人, 助理实验师, 硕士, 主要从事实验动物学研究。

E-mail: 1464881484@qq.com

[通讯作者] 吴曙光(1971-), 女, 高级实验师, 硕士, 主要从事实验动物学研究。E-mail: 243099502@qq.com

45 日龄离乳。猪群饲养管理条件前后基本一致。

1.2 数据处理

数据用 excel 2007 软件进行整理。用 SPSS19.0 进行相关分析。参考杜鹃等^[6]介绍方法进行通径分析。

2 结果

2.1 繁殖性状的表型参数

由表 1 可知，贵州小型猪初生个体质量平均为 0.57 kg，离乳个体质量为 4.05 kg。各繁殖性状的变异系数在 15.08%~27.89%，其中离乳窝重的变异系数最大，说明该小型猪封闭群个体间繁殖性状差异较大，通过选育提高繁殖力有较大潜力。

2.2 繁殖性状间的简单相关

由表 2 可知，初生个体质量、21 日龄个体质

表 1 贵州小型猪封闭群繁殖性状表型参数

变量	平均值	标准差	变异系数 /%
X1(头)	5.60	0.97	17.29
X2(头)	5.03	1.00	19.86
X3(kg)	0.57	0.09	15.08
X4(kg)	2.86	0.69	24.15
X5(头)	4.67	0.92	19.76
X6(kg)	2.94	0.42	14.27
X7(kg)	13.79	3.70	26.86
X8(头)	4.37	0.81	18.52
X9(kg)	4.05	0.67	16.59
Y(kg)	17.80	4.96	27.89

量、离乳个体质量与产仔总数、产活仔数、21 日龄活仔数、离乳个体数之间呈弱正相关($P>0.05$); 其余各繁殖性状之间皆呈极显著($P<0.01$)正相关。

表 2 贵州小型猪封闭群繁殖性状间的简单相关系数矩阵

性状	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	Y
X1	0.869**	0.041	0.726**	0.811**	0.119	0.675**	0.634**	0.163	0.542**
X2	—	0.001	0.806**	0.798**	0.107	0.650**	0.624**	0.126	0.497**
X3	—	—	0.586**	0.111	0.887**	0.542**	0.149	0.838**	0.591**
X4	—	—	—	0.720**	0.620**	0.866**	0.606**	0.602**	0.770**
X5	—	—	—	—	0.170	0.846**	0.863**	0.168	0.702**
X6	—	—	—	—	—	0.658**	0.204	0.979**	0.719**
X7	—	—	—	—	—	—	0.765**	0.641**	0.922**
X8	—	—	—	—	—	—	—	0.190	0.807**
X9	—	—	—	—	—	—	—	—	0.724**

注: 相关关系显著, $*P<0.05$, 相关关系极显著, $**P<0.01$

根据相关系数的大小可以看出，与离乳窝重相关程度最大的是泌乳力，其次是离乳个体质量和初生窝重，其相关系数分别为 0.922、0.807 和 0.770。

2.3 繁殖性状间的通径分析

根据通径分析理论，以离乳窝重(Y)为因变量，以 X1~X9 为自变量，建立方程组如下：

$$\begin{cases} 1.000 & 0.869 & 0.041 & 0.726 & 0.811 & 0.119 & 0.675 & 0.634 & 0.163 \\ 0.869 & 1.000 & 0.001 & 0.806 & 0.798 & 0.107 & 0.650 & 0.624 & 0.126 \\ 0.041 & 0.001 & 1.000 & 0.586 & 0.111 & 0.887 & 0.542 & 0.149 & 0.838 \\ 0.726 & 0.806 & 0.586 & 1.000 & 0.720 & 0.620 & 0.866 & 0.606 & 0.602 \\ 0.811 & 0.798 & 0.111 & 0.720 & 1.000 & 0.170 & 0.846 & 0.863 & 0.168 \\ 0.119 & 0.107 & 0.887 & 0.620 & 0.170 & 1.000 & 0.658 & 0.204 & 0.979 \\ 0.675 & 0.650 & 0.542 & 0.886 & 0.846 & 0.658 & 1.000 & 0.765 & 0.641 \\ 0.634 & 0.624 & 0.149 & 0.606 & 0.863 & 0.204 & 0.765 & 1.000 & 0.190 \\ 0.163 & 0.126 & 0.838 & 0.602 & 0.168 & 0.979 & 0.641 & 0.190 & 1.000 \end{cases} \begin{matrix} P_1 \\ P_2 \\ P_3 \\ P_4 \\ P_5 \\ P_6 \\ P_7 \\ P_8 \\ P_9 \end{matrix} = \begin{matrix} 0.542 \\ 0.497 \\ 0.591 \\ 0.770 \\ 0.702 \\ 0.719 \\ 0.922 \\ 0.807 \\ 0.724 \end{matrix}$$

计算可得繁殖性状对离乳窝重的直接途径系数： $P_1=-0.003$ ， $P_2=-0.121$ ， $P_3=-0.029$ ， $P_4=0.131$ ， $P_5=-0.607$ ， $P_6=-0.691$ ， $P_7=0.856$ ， $P_8=0.670$ ， $P_9=0.724$ 。根据公式 $P_{ij}=r_{ij}P_i$ 计算可以得到间接途径系数。直接途径系数和间接途径系数结果见表 3。

由表 3 可知， $X_1\sim X_9$ 对离乳窝重的总效应(相关系数)均为正值且达到了极显著水平($P<0.01$)，说明对这些性状进行正向选择均能提高离乳窝重。

直接途径系数是标准化了的偏回归系数，反映了自变量对因变量的相对重要程度。比较各繁殖性状直接途径系数大小，表明繁殖性状 $X_5\sim X_9$ 的直接途径系数较大且达到了极显著水平($P<0.01$)， $X_1\sim X_4$ 的直接途径系数很小，说明 $X_5\sim X_9$ 对离乳窝重影响较大， $X_1\sim X_4$ 对离乳窝重影响较小。其中 X_7 对离乳窝重的直接影响最大，其直接途径系数为 0.856，其次为 X_9 、 X_6 和 X_8 ，其直接途径系数分别为 0.788、-0.691 和 0.670。

表 3 各繁殖性状的途径系数

性状	相关系数	直接途径	总和	间接途径								
				X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9
X1	0.542	-0.003	0.545	-	-0.105	-0.001	0.095	-0.492	-0.082	0.578	0.425	0.128
X2	0.497	-0.121	0.619	-0.003	-	0.000	0.106	-0.484	-0.074	0.556	0.418	0.099
X3	0.591	-0.029	0.620	0.000	0.000	-	0.077	-0.067	-0.613	0.464	0.100	0.660
X4	0.770	0.131	0.165	-0.002	-0.098	-0.017	-	-0.437	-0.428	0.741	0.406	0.474
X5	0.702	-0.607	1.309	-0.002	-0.097	-0.003	0.094	-	-0.118	0.724	0.578	0.132
X6	0.719	-0.691	1.410	0.000	-0.013	-0.026	0.081	-0.103	-	0.563	0.137	0.772
X7	0.922	0.856	0.067	-0.002	-0.079	-0.016	0.113	-0.514	-0.455	-	0.513	0.505
X8	0.807	0.670	0.137	-0.002	-0.076	-0.004	0.079	-0.524	-0.141	0.655	-	0.150
X9	0.724	0.788	-0.064	-0.001	-0.015	-0.024	0.079	-0.102	-0.677	0.549	0.127	-

3 讨论

遗传育种是小型猪实验动物标准化的重要环节，而母猪的繁殖性能是重要的数量性状。离乳窝重是衡量母猪繁殖性能的最重要指标之一，其作为一个复合性状，常受到其它繁殖性状的影响。由于猪的繁殖性状多为数量性状，不同性状间存在着相互促进、相互制约、相互依存和互为因果的关系。在母猪的遗传育种中，需要揭示繁殖性状间的相互关系，以提高育种工作的效率。相关分析、途径分析是通常用于研究母猪繁殖性状间相互关系的方法。相关分析能够体现两个变量间线性相关关系的程度；途径分析可以将相关系数剖分为自变量对因变量的直接作用和自变量通过相关变量而对因变量产生的间接作用，它既可以反映自变量对因变量作用程度的大小，又可以反映自变量对因变量的作用方式和作用特点，它比相关分析更直观、更准确，更有利于指导育种工作^[7~12]。

本研究对影响贵州小型猪母猪离乳窝重的有关

繁殖性状进行了相关、途径分析。根据各繁殖性状对离乳窝重的作用特点来看， $X_7\sim X_9$ 直接途径系数较大且为正值，而间接系数之和则较小，说明 $X_7\sim X_9$ 对离乳窝重以直接正向作用为主，对 $X_7\sim X_9$ 进行正向选择可直接提高离乳窝重，因此宜将 $X_7\sim X_9$ 作为提高离乳窝重的主要影响因子； $X_5\sim X_6$ 虽然对离乳窝重的影响较大，但其直接途径系数为负值，间接途径系数之和为正值且远大于直接途径系数，说明 $X_5\sim X_6$ 对 Y 主要起间接正向作用，且 $X_5\sim X_6$ 对离乳窝重的间接正向作用也是通过 $X_7\sim X_9$ 而实现的，因此 $X_5\sim X_6$ 只能作为提高离乳窝重的次要影响因子； $X_1\sim X_4$ 的直接途径系数很小，其对离乳窝重的影响可以忽略不计，这反映出数量性状遗传的特点，即受先天遗传因素的影响较小，而受后天环境的影响较大。提示除了通过选育提高母猪的繁殖力外，更应该注重饲养管理水平的提高，如保证母猪的营养需要，提高兽医防疫护理技术，及时补饲，促使仔猪早日开食，便能有效的提高离乳窝重。

参考文献:

- [1] 甘世祥, 冯济凤, 董菲洛, 等. 贵州小型猪—实验用小香猪[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1997.
- [2] 甘世祥, 钱宁, 冯济凤, 等. 贵州小型猪组织学图谱[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2001.
- [3] 杨葆春, 张军霞. 大约克夏猪繁殖性状的通径分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2007 (11):41-42.
- [4] 闵凡贵, 潘金春, 袁文, 等. 封闭群五指山小型猪主要繁殖性状的多重回归与通径分析[J]. 中国畜牧兽医, 2011 (12): 145-148.
- [5] 陈海燕, 李江波, 叶选怡, 等. 长白猪有关繁殖性状对 60d 窝重影响的分析[J]. 生物数学学报, 2005 (1):97-100.
- [6] 杜鹃. 通径分析在 Excel 和 SPSS 中的实现[J]. 陕西气象, 2012 (1):15-18.
- [7] 苏从成, 宗绍志. 大白猪繁殖性状的相关及通径分析[J]. 畜牧兽医杂志, 2010 (3):14-17.
- [8] 陈海燕, 傅衍, 陆建定. 利用通径分析法研究台系杜洛克的繁殖性状[J]. 畜牧与兽医, 2003 (4):14-15.
- [9] 鲁绍雄, 连林生, 严达伟, 等. 撒坝猪专门化母系繁殖性状的相关与通径分析[J]. 畜牧与兽医, 2003 (11):1-3.
- [10] 马旭平, 吴占福, 吴淑琴, 等. 塞北兔主要繁殖性状的相关分析[J]. 畜牧与兽医, 2005 (11):25-26.
- [11] 李寸欣, 孙杏君, 田树飞, 等. 獭兔主要繁殖性状的相关分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2012 (-3):138-140.
- [12] 华升, 梅书棋, 彭先文. 影响杜洛克猪新品系 60 日龄窝重繁殖性状因素的相关性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2009 (12): 204-206.

Primiparous Reproductive Performance of Outbred Guizhou Miniature Pigs and its Correlation and Path Analysis

CHEN Ming-fei, YAO Gang, ZHAO Hai, QIAN Ning, WU Shu-guang

(Laboratory Animal Institute, College of Guiyang Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

[Abstract] **Objective** To screen the reproductive traits significantly associated with reproductive performance of outbred Guizhou Miniature Pigs. **Methods** Ten reproductive traits of 30 gilts were determined and analyzed with correlation and path analysis. The traits were as following: total number of born (X1), number of alive born (X2), average weight at birth (X3) and litter weight (X4), average number alive (X6) and weight (X5) and litter weight (X7) at 21 days, number weaned (X8), average weaning weight (X9) and weaning weight of litter (Y). **Result** There were extremely significant ($P < 0.01$) positive correlation between weaning weight of litter and other reproductive traits. Path analysis showed that X7~X9 had positive direct effects on weaning weight of litter but X5~X6 had positive indirect effects, and X1~X4 had weak effects. **Conclusion** Compared with genetic factor, the life environment had decisive influence on weaning weight of litter.

[Key words] Outbred; Guizhou Miniature Pigs; Reproductive performance; Path analysis

川北医学院实验动物屏障系统管理初探

杨国淋¹, 魏 玲², 苏 畅¹, 李阳友¹

(1. 川北医学院实验动物中心, 南充 637100; 2. 南充职业技术学院, 南充 637131)

[摘要] 实验动物是医学、生命科学研究的重要支撑条件。屏障环境是进行清洁级和 SPF 动物的生产、实验和检疫的必要条件, 是提供合格、标准、高质量实验动物的保障。本文结合我校实验动物的繁殖、饲养和实验环境, 参照国家实验动物环境标准 (GB 14925-2010), 从屏障环境设施的标准操作规程、操作人员的管理、屏障设施维护、屏障系统环境因素和实验动物的质量监控几个方面进行探讨。希望为我国高等医学院校实验动物中心的屏障环境设施建设和有效管理提供一定的参考。

[关键词] 实验动物; 屏障系统管理; 初探

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2017)04-0328-03

实验动物是高等医学院校顺利开展科学研究的重要支撑条件, 实验动物环境的控制和管理是提供标准化质量动物的保证^[1]。屏障环境又是医学院校进行动物实验和科学研究的基本环境, 也是目前最常用的实验动物饲养和实验环境^[2]。建立规范合理的实验动物屏障系统是适应现代生命科学研究的必然。

1 实验动物对医学院校科学研究的重要性

在医学和生命科学研究领域内, 顺利开展试验研究的四个基本条件是动物(animal)、设备(equipment)、信息(information)和试剂(reagent), 简称“AEIR”^[3]。近年来, 随着科学技术的发展, 各种高端的研究设备和试剂不断被研发出来。国际学术交流和信息的分享也不断加强。因此, 对于生命科学研究来说, 设备, 信息和试剂是相对容易获得的。而实验动物是活的“精密仪器”, 具有更多的差异性和不可控性, 需要更加严格的要求。如果在科研过程中使用的实验动物质量要求不合格或使用的实验动物不恰当, 那么所得到的实验数据和效果评

价就不具有很强的说服力, 研究价值不高。21 世纪是生命科学的新时代, 各国科学家都希望通过实验动物学的研究成果, 来探索生命起源, 揭示遗传奥秘, 研究疾病与衰老的机制, 从而延长人类的寿命, 提高生命的质量^[4]。合格标准化的实验动物生产及饲养管理是科研工作者从事医学和生命科学研究的前提。屏障系统是提供标准质量实验动物重要的设施, 屏障系统维护和管理, 具有重要意义。

2 实验动物屏障系统的内涵

实验动物的环境从微生物控制角度可分为隔离系统、屏障系统和开放系统。屏障环境设施是指符合屏障环境要求, 用于实验动物生产或动物实验的建筑物和设备的总称, 所有进入空气都必须经初、中、高三级过滤器的进化处理, 洁净度为 10 000 级, 系统内应保持空气压差, 不低于 20~50 Pa。屏障环境是指洁净度能够达到 7 级的封闭式建筑物或层流柜、IVC 等设备, 该环境是进行清洁级动物、SPF 级动物的生产、实验和检疫的必须条件^[5]。实验动物屏障设施应具有密闭的建筑物(或设备)、配套的净化控制系统等硬件条件, 通过配套管理措施的实施, 能够对进出其内部的各种人员、物品、动物和空气进行严格人工控制。能够使设施内的温度、湿度、换气、噪声、光照等可调节性因素

[收稿日期] 2017-05-30

[作者简介] 杨国淋(1989-), 助教。

E-mail: yangguolin1989@163.com

[通讯作者] 李阳友, 副教授。E-mail: liyangyou@126.com

适合动物的需要,也能避免生物性、化学性、放射性等危害因素对设施内环境的危害,从而保证设施内动物的生长、发育、繁殖和动物实验工作进行^[6-8]。屏障环境设施是实验动物质量得到有效控制最基础的条件。

3 实验动物屏障设施环境的建设与管理

3.1 屏障系统标准的制度化建设

屏障环境设施管理制度主要包括人员的进出管理、动物的进出管理和物品的进出管理。为了对屏障系统内实验动物实时监控,减少人员流动,可在实验动物屏障设施的房间内和大门处可以安装监控设备。与实验动物生产、实验、设施运行管理的无关人员,均不得进入设施。进入屏障系统开展科研的人员必须至少提前2周提出申请,征得屏障系统管理人员同意,并且经过培训后方可进入屏障系统开展科研,进入屏障系统后严格按照实验动物中心各项管理规定操作执行。如违规,需视情况进行口头和书面批评,情况严重者取消使用屏障系统资格。屏障系统内工作人员应经过专业知识和业务技能培训,身体健康,不携带传染病,特别是重大人兽共患病,要具有良好无菌卫生观念,熟悉实验动物法规和标准,执行本单位制定的各种规章制度和SOP^[9,10]。工作人员进入屏障设施环境的外环境时,应换已消毒拖鞋;进入第一道更衣间后,要将随身携带物品放入储存柜,进入消毒间消毒;然后赤脚进入第二更衣室后,按照“穿上衣—戴口罩—穿裤子—穿拖鞋—戴手套”的顺序,穿着已消毒工作服,经过风淋至少10 s后才能进入屏障设施进行相关操作。

进入屏障系统的实验动物必须要有动物质量合格证明,并且清楚来源和遗传背景,并做好动物品系、性别、规格、体质量、数量等详细信息登记。对进入屏障系统动物应置于隔离观察检疫室观察48 h,观察结果未见异常才能转入饲养间进行饲养和开展相关研究实验。工作人员对进入设施的实验动物按照要求饲养、管理,未经许可不能随意处置动物,饲养室仅可进行动物的称重、粪便的收集等最基本操作,其他例如采血、手术、处死等操作必须在屏障系统的实验操作间的无菌操作

台里进行,严禁在饲养间直接进行试验。

所有进入屏障系统的物品都需经过消毒灭菌处理,耐高温的物品要在121℃条件下灭菌30 min 高温高压灭菌处理,并用灭菌指示试纸条检测待达到安全状态后,放置在物品储存室。对于真空包装已经灭菌的物品如垫料、饲料等进入屏障系统需在传递窗内紫外照射15 min 以上,从传递窗的内侧进入屏障系统。所有传出屏障系统的垫料、笼具和动物尸体等污物都需从污物走廊离开,不能再返回洁净区域。

3.2 实验动物屏障设施的维护与消毒

对实验动物屏障设施进行科学管理和维护是十分重要的。实验动物屏障系统设施主要有饲养室、动物实验室、隔离观察检疫室和其他辅助设施组成^[11]。工作人员每日记录屏障系统里温度、湿度、通风次数、压差等差数,以大鼠屏障系统为例,设施温度维持在21℃、相对湿度保持在70%、换气次数维持在10~20次/h、压差维持在45 Pa。设施运行管理人员要全面负责安全管理工作,每周检查一次设施运行安全情况。每季度组织设施使用人员学习有关安全防范措施,确保设施正常、安全运行。设施内严禁存放易燃、易爆试剂和化学危险品。

对于屏障设施的维护必须做到设施内部的净化和防止外来微生物的入侵,确保设施的正常运行和环境的洁净^[12]。在屏障设施内环境的自身净化方面,重点要做好卫生消毒工作,按照“洁物储存室—洁净走廊—动物饲养间—其它房间—污物走廊”的顺序对屏障系统的内环境进行消毒。每日需保持饲养室的整洁,门、墙壁、地面、鼠盒、架子每日擦洗,为避免交叉污染,房间每周用体积分数0.1%新洁尔灭和0.1%过氧乙酸消毒液交替进行消毒。每月用0.1%过氧乙酸喷雾进行一次大消毒。我校屏障系统是“双走廊设施”设计形式,进入设施的相关物品必须经过消毒处理。能经受高温高压灭菌的物品需采用高压灭菌121℃灭菌30 min,不能经受高温的物品,需采用0.2%过氧乙酸药物浸泡消毒。对于饲养盒,先把体积分数2%的84消毒液加入自动洗笼机的药物箱喷洗消毒,再传入大型脉动真空高压灭菌箱中121℃灭菌30 min,从内侧门取出放入屏障系统的物品存储室。目前对笼架、动物饲养室的墙壁和空气大多采用0.2%过氧乙酸进行消毒,也有相关实验人员认为,采用过氧乙酸气溶胶喷雾剂消毒剂对人和动物的刺激性较强、对

环境设施具有腐蚀性,因此也采用其他消毒剂,例如0.21 mg/m³臭氧加1%的84消毒液、0.21 mg/m³臭氧加0.1%新洁尔灭消毒剂来进行设施的消毒^[13]。在实际操作中,为避免设施环境对消毒液产生耐药性,可以交替使用不同的消毒剂。

3.3 实验动物屏障系统的环境控制

影响实验动物屏障环境设施的环境因素很多,主要包括饲养室内温度、相对湿度、气流速度、空气中的颗粒物、微生物、有害气体,光照和噪声等^[14]。屏障设施的过滤系统要定期更换,保持屏障环境通风顺畅,一般1个月换一次初效过滤系统、3个月换一次中效过滤系统、1年换一次高效过滤系统。屏障设施要有备用发电机,以防特殊情况停电而导致系统无法正常运行。

4 实验动物质量监测

我校实验动物屏障系统每三个月进行一次实验动物微生物质量检测和屏障环境设施指标质量检测。SPF实验动物饲料主要是从有资质的公司外购质量合格的辐照饲料,目前暂未开展实验动物遗传质量检测。微生物质量检测严格按照国家标准(GB/T 14926.1-14926.64和GB/T 18448.1-18448.10)进行细菌、病毒、寄生虫检测。检测程序:随机选取屏障系统中的哨兵鼠进行外观检查,然后用质量分数3%戊巴比妥钠按照2.3 mL/kg腹腔注射麻醉,皮肤取样进行真菌检查,股动脉取血分离血清,进行病毒抗体检测,无菌解剖取分泌物、肠内容物和脏器分离细菌进行检测。目前多数微生物质量检测都有成熟检测试剂盒,我们一般使用苏州西山生物公司的ELISA检测试剂盒进行检测,有时也采用PCR技术对试验结果进行验证。实验动物生产间和动物实验间的环境指标按国标(GB14925-2010)进行测定,保证环境的温度、日温差、最小换气次数、沉降菌浓度、氨气浓度、噪声和照度等各项指标都在规定范围内。

5 小结

实验动物是高等医学院校的学生和教师从事动物实验和科学研究的基本条件。我校实验动物中心屏障系统于2007年正式运行,是西南实验动物屏障设施建成较早的单位之一,由于先前管理经验不足和一些设施没有得到很好维护,屏障系统已经不

能正常高效运转,今年也是我校实验动物中心升级改造之年。为此,我们参观多家医学院校的实验动物中心,再结合我校实验动物中心屏障系统多年的运行管理经验总结此文。实验动物的屏障设施环境不仅需要大量的硬件设施,更需要管理队伍的培养和管理制度的完善,严格按照实验动物的国家标准,地方标准和行业标准执行,屏障系统才能有序的运行。欧美发达国家已经开始将屏障系统与互联网联系,与大数据结合,使得屏障系统管理更加的智能化,人性化和规范化。

近几十年来,我国实验动物行业迎来高速发展时期。实验动物质量的标准化,整个实验动物行业的规范化、有序化发展,需要整个行业共同努力。

参考文献:

- [1] 刘恩岐. 医学实验动物学[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- [2] 李学勇, 靳洪涛, 刘欣. 实验动物屏障设施管理中的几个关键问题[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(1):69-76.
- [3] 卢笑丛, 戴涌. 实验动物科学的教育和继续教育[J]. 实验动物科学, 2000(3):7-10.
- [4] 陈主初 吴端生. 实验动物学[M]. 长沙: 湖南科技出版社, 2006.
- [5] 孔丽娟, 王欣丽, 王成, 等. 浅谈高校IVC动物实验室的管理制度[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(4):328-329.
- [6] 潘劫, 张杰, 米本中, 等. 实验动物屏障系统利旧改造及环境控制效果分析[J]. 四川动物, 2013, 32(2):289-291.
- [7] Cheng-Zhi YU, Xun-Song NI, Fei GL. Discussion on energy-saving design of laboratory animal barrier environment[J]. Lab Anim Sci, 2012, 29(4):40-43.
- [8] 刘伟, 汪思应, 黄德武. 实验动物屏障设施的应用及人员管理[J]. 畜牧与饲料科学, 2009, 30(6):184-185.
- [9] Sakuma K, Hayashi S, Otokuni K, et al. Standard operating procedures for maintaining cleanliness in a novel compact facility for breeding SPF mice[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2013, 52(6):717-724.
- [10] 刘艳, 赵赤鸿, 李晓燕, 等. 实验动物屏障设施运行管理标准操作规程的制定和实施[J]. 中国医学装备, 2014(1):14-16.
- [11] 邹移海, 黄韧, 魏社林, 等. 屏障系统动物设施平面布局分析[J]. 中国比较医学杂志, 2001, 11(4):246-249.
- [12] Balls M. First thoughts on the effects on the protection of laboratory animals of the UK's departure from the European Union[J]. Altern Lab Anim, 2016, 44(3): 177-179.
- [13] 叶尤松, 代解杰. 一种实验动物屏障环境及设施维持性消毒的新方法[J]. 实验动物科学, 2011, 28(1):60-62.
- [14] Bayne K, Würbel H. The impact of environmental enrichment on the outcome variability and scientific validity of laboratory animal studies[J]. Rev Sci Tech, 2014, 33(1):273-280.

动物实验教学能促进学生对 动物伦理福利的认知

姚 刚, 赵 海, 陈明飞, 吴曙光, 钱 宁
(贵阳中医学院实验动物研究所, 贵阳 550025)

[摘要] 目的 调查大学生的实验动物伦理知识, 促进教师改进动物伦理知识的教学方法, 提高学生对动物伦理福利的认识。方法 研究设计调查问卷了解某中医院校学生对实验动物伦理知识的知晓程度。结果 学生实验动物伦理知识较匮乏, 但接受过动物实验课程的学生能增加相关知识的储备; 女大学生群体中, 不知道实验动物伦理概念的学生数量显著高于知道者。结论 学生对实验动物伦理方面的知识较匮乏; 动物实验课能促进学生对相关知识的掌握; 教师需要在以后的实验教学中增加相关知识讲授, 讲授过程中需要注意不同性别学生群体对知识的掌握情况。

[关键词] 中医院校; 动物福利; 实验动物学教学

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2017)04-0331-03

动物实验在现代医药学研究中占有极其重要作用^[1]。应用实验动物模型进行中医学理论研究, 可使传统中医学理论与形态学、生物化学、病理学和药理学等不同领域的学科紧密联系^[2-4]。使用中医疾病动物模型研究中医药学, 可以为中医理论提供更加可靠的实验科学数据, 加深对中药毒副作用的研究, 证实中药的治疗效果^[5,6]。然而, 在中医药实验动物使用过程中, 正确合理的使用实验动物以及保障实验动物福利伦理仍然是每一位科学研究者需要考虑的问题。

目前使用和饲养实验动物的人员主要是研究院所的科研人员、老师、学生等。他们对待实验动物的方式及态度决定了实验动物的福利, 对他们有关实验动物福利伦理的调查研究有助于改进实验动物福利伦理情况, 对学生实验动物伦理知识的调查可以改进《实验动物学》实验动物伦理相关知识

的教学方法, 提高学生对实验动物伦理福利的认识。因此本调查研究的目的是调查不同年级、不同性别和不同专业学生对实验动物伦理的认识差异。

1 研究对象及方法

1.1 研究对象

本调查研究对象为 2016~2017 两年间选修《实验动物学》课程的学生, 来源于不同的专业。调查时发放调查问卷 200 份, 其中有效调查问卷共 187 份。调查过程中以针灸推拿学(31 人)、中西医结合基础(54 人)、中医学(41 人)以及药学类(25 人)专业学生较多, 在以专业类为统计基础时将以这几个专业的学生为主。在填写调查问卷表时, 调查对象均未接受过《实验动物学》课程学习。此外, 从统计的实验课程来看, 一年级学生未接受过任何实验动物相关实验, 而二年级学生接受过一个学期与动物实验相关的课程教学, 由于三年级学生人数较少, 在研究不同年级学生对动物伦理认知的情况时, 将以一、二年级学生作为统计对象。

1.2 调查方法

《实验动物福利伦理审查指南》国家标准正在广泛征求意见中, 本调查依据《北京市实验动

[收稿日期] 2017-05-30

[基金项目] 博士启动基金[3043-160004]; 贵州省教育厅青年科技人才成长项目[黔教合 KY 字[2016] 182]; 中央引导地方科技科技发展专项基金项目[黔科中引地[2016]4007 号]。

[作者简介] 姚 刚(1982-), 男, 博士; 研究方向: 实验动物学。

E-mail: yaogang901@163.com

物福利伦理审查指南》设计调查问卷, 整个问卷包括两部分, 第一部分包括性别、专业、年级; 第二部分包括各种不同的伦理基础知识认知问题, 部分采用“是”或者“否”、“知道”或者“未知”、“有”或者“没有”等调查方式进行, 部分采用复选题的形式进行调查。全卷共 12 题, 其中反向题 3 题、复选题 1 题, 其余为正向题。

1.3 统计方法

调查结束后, 利用卡方检验统计不同年级学生对实验动物伦理概念认知、道德伦理问题认识、动物处死方法认识等方面的差异, 利用复选题分析方法分析获得实验动物伦理相关知识的来源问题; 利用卡方检验统计不同性别学生对实验动物伦理概念的认知、道德伦理问题的认识以及动物实验完成后的处死方法等方面的差异; 此外, 还利用卡方检验统计不同专业学生对实验动物道德伦理关注的差异、实验动物处死方法选择等方面的差异, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同年级和性别学生对实验动物伦理的认知

不同年级学生对实验动物伦理概念认知的结果见表 1。结果表明, 学生对实验动物伦理学方面的知识知道并不多, 但是二年级学生的认知水平显著高于一年级学生($P<0.05$)。本调查结果还表明, 支持实验动物替代方案的二年级学生也显著高于一年级学生($P<0.05$)。此外, 一、二年级学生在动物福利伦理所关注的对象以及教师是否需要讲授相关知识等方面均无显著性差别, 均认为实验教师上课时应该讲解实验动物福利知识、动物处死方法等方面的内容。

调查结果表明, 学生了解实验动物伦理的概念主要来源于新闻(48.8%)以及外界的宣传(42.7%), 二年级的学生主要来源于新闻, 而一年级学生主要来源外界宣传。

整体上, 男女生间在实验动物伦理认知方面没有显著性的差异, 但是女生中不知道实验动物福利伦理者显著高于知道者($P<0.05$, 表 1), 而男生并没有此差异。男女生均认为道德伦理不应只关注人类, 还应该关注实验动物, 饲养的实验动物与生俱来与人类并非不平等。另外, 男女生均认为在

未来的学习、研究中均需要寻找替代实验动物实验的办法, 然而拥有此想法的女生显著多于男生($P<0.05$)。此外, 男女生均认为应该对动物实行安乐死。因此, 在动物实验的操作过程中, 他们也一致认为包括处死实验动物在内的一切操作程序都是同等的重要。

表 1 不同年级和性别学生对实验动物伦理的认知

性别	年 级		总 体
	一年级	二年级	
男生	34.78%/65.22%	47.22%/52.78%	46.38%/53.62%
女生	22.92%/77.08%	42.22%/57.78%	36.61%/63.39%*
总体	25.68%/74.32%	44.44%/55.56%*	-

注: 表内数据为知道 / 不知道实验动物伦理学概念的学生百分比; 二年级与一年级比较, * $P<0.05$

2.2 不同专业学生对实验动物伦理的认知

在针灸推拿学、中西医结合基础、中医学及药学类专业的学生中, 认为应该关注动物伦理道德的学生显著高于只关注人类道德伦理的学生($P<0.05$)。调查结果也表明, 针灸推拿学、中西医结合基础、中医学及药学类专业的学生均认为在实验课的讲授过程中, 实验教师需要给学生讲解实验动物伦理福利相关的知识($P<0.05$), 而在实验动物处死方法中, 认为应该实施安乐死处死实验动物的学生显著高于利用其他方法的学生($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 不同年级和性别学生对实验动物伦理知识认知

调查结果表明, 一年级新生对实验动物伦理知识的了解甚少, 不知道实验动物伦理概念者显著性多于知道者, 认为实验动物与其它动物一样需要关注道德伦理的学生也显著性少于认为不需要关注者。此外, 从调查结果可知, 学生对实验动物的了解途径主要来源于新闻及外界宣传, 而就目前新闻所关注的事件来看, 社会对实验动物相关新闻关注较少, 因此, 一年级新生对实验动物伦理知识的了解就相对较少。从之前的一些研究也可以看出, 学生对动物伦理的知识甚是匮乏, 例如, 在对北京市实验动物从业人员的调查表明, 即使是研究生, 他们对实验动物伦理认识的储备也极其有限^[7], 另外对其它医学院校学生的调查结果也得出了同样的结论^[8,9]。

调查结果表明,二年级学生对实验动物伦理概念的认知要显著性的强于一年级学生,这可能与二年级学生接受过动物相关实验有关。因此,在一定程度上可知,动物实验课能促进学生对实验动物伦理的认知。此外,对二年级学生的调查表明,虽然二年级及更高年级学生中知道实验动物伦理概念者与不知道者间没有显著性差别,但是学生对实验动物伦理的认知程度有限,知道实验动物伦理的学生比例仍然小于50%,这意味着实验教师在实验课上应该给学生强调更多实验动物伦理相关的知识,此种现象也存在于高职护理学生^[10]以及其它相关医学院校学生中^[7-9]。

调查结果显示,在实验动物伦理概念的认知等方面,男生中知道者与未知者两者之间没有显著差别。然而,女生中知晓实验动物伦理概念的学生显著性少于不知道者($P<0.05$)。虽然并不知道其中具体原因,但是这些调查结果或可指导教师的教学。

3.2 不同专业学生对实验动物伦理的认知

本调查结果显示,不同专业学生对实验动物相关知识的认知没有显著差别。本调查对象在调查前均未接触过实验动物伦理相关知识的学习,而在进入大学前,学生接触实验动物伦理的相关知识仅是从新闻或者外界宣传获知。虽然不同专业的学生在后面的学习过程中会不同程度接受到动物实验。

但在接触动物实验之前,不同专业学生对实验动物伦理知识的掌握程度并没有什么差别。因此,在以后的教学过程中,我们应该不分专业给学生讲授足够的实验动物伦理相关知识。

参考文献:

- [1] 赵辉,刘昕. 中医实验动物模型研究的思考与展望[J]. 国医论坛, 2001, 16(5):14-17.
- [2] 黄文华,马居里,韩曼. 中医药实验研究中实验动物的选择与动物模型的应用[J]. 中医学刊, 2004, 22(8):1459-1460.
- [3] 王郁金,苏衍进. 对中医病证结合实验动物模型的思考[J]. 云南中医中药杂志, 2013, 34(10):15-16.
- [4] 王灿,苗艳艳,苗明三. 中医药动物实验研究的再思考[J]. 中医学报, 2015, 30(4):548-550.
- [5] 褚素敏,钟秀会. 中药药理学实验实验动物的选择[J]. 中兽医学杂志, 2003, 115(6):29-30.
- [6] 毕津莲,张秀芹,禹正扬,等. 中药药理动物模型的研究进展[J]. 中国药房, 2015, 26(34):4877-4879.
- [7] 李虹,魏鹤. 北京实验动物从业人员对动物福利认知的问卷调查[J]. 医学科研伦理, 2013, 34(9):46-48.
- [8] 王强芬. 医学生眼中的动物实验生命伦理意识调查及分析[J]. 医学与哲学, 2010, 31(10):73-74.
- [9] 郑亚楠,常欣峰,李奕慧. 医学生对实验动物伦理知晓情况的调查[J]. 医学科研伦理, 2013, 37(8):31-33.
- [10] 龙香娥,陈慧玲,房杏青. 高职护生动物实验伦理意识的调查分析[J]. 科技信息, 2013(34):179.

突出“趣味”教学理念的实验动物学课程教学改革

罗 红, 沈祥春, 智 妍, 邹习俊, 杨红宇
(贵州医科大学实验动物中心, 贵阳 550004)

[摘要] 根据《实验动物学》教学现状, 围绕着“趣味”这一教学理念对本校开设的《趣味实验动物学》本科选修课教学进行了一系列的教学改革与探讨, 以期在本科生的认知中初步构建实验动物学的知识框架, 夯实实验动物学的理论基础, 更多调动学生对实验动物学的兴趣, 提高学习主动性, 加强医学科研思维的训练, 为以后的教学实践提供指导。

[关键词] 实验动物学; 教学; 改革

[中图分类号] Q95-33 G642.421 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2017)04-0334-03

实验动物学是生物、医学的重要基础学科之一, 是大多数医学类院校专业开设的主干课程^[1-3]。动物实验在生命科学、医学和农学等研究中发挥着十分重要的作用。目前医学研究中很多重大发现, 基本上都是在动物实验中首先被验证的, 采用动物进行实验研究已成为医学教学或者研究中应用十分广泛的手段之一, 是探讨生命奥秘、人类疾病发病机制及药物治疗等不可或缺的手段。为了适应当前社会对医学创新人才宽口径、厚基础、复合型的要求, 本校于2015年为本科生开设了《趣味实验动物学》选修课。

1 学情分析

目前大多数医学院校都开设实验动物学这门课程, 但是由于实验动物学涉及多种学科, 如动物

学、微生物、营养学、遗传学、胚胎学等, 教学内容杂、多、广, 学科与学科之间交叉广泛^[4,5], 对于较少接触医学实验本科生来说, 实验动物学的理论学习, 学习起来单调枯燥, 教学效果差。因此针对本科生的基础薄弱, 专业知识储备较少等特点, 我们对实验动物学的教学进行了一系列教学改革与尝试, 突出实验动物学的趣味性, 重点以调动学生的学习兴趣, 提高学习的主动性为主。

2 教学内容

首先, 由于实验动物学涉及学科多, 教学内容丰富, 根据本科生的知识结构和兴趣特点, 我们对实验动物学的教学内容进行了精简, 着重突出“什么是实验动物, 实验动物的用途, 如何采用实验动物开展科学研究”。围绕着这条主线, 我们选取了实验动物的概述, 标准化以及环境和营养控制等实验动物相关的基础内容, 再讲述常见实验动物的特点及其应用、医学实验中实验动物的选择及应用来阐明实验动物的用途, 最后用人类疾病动物模型、医学实验中实验动物的选择及应用和免疫缺陷动物等来讲述医学科研实验中实验动物的运用, 介绍实验动物中的胚胎工程和转基因动物等新技术进一步扩展实验动物的医学用途。

[收稿日期] 2017-05-30

[基金项目] 民族药药理学创新思维人才培养教学模式的构建, 黔教研合 JG 字[2015]011。中药学(民族药学)创新人才培养模式构建与实践研究, 黔教高发[2015]337 号

[作者简介] 罗 红(1983-), 女, 实验师, 硕士。

E-mail: luohong1011@163.com

[通讯作者] 杨红宇(1970-), 男, 高级实验师。

E-mail: 438212095@qq.com

3 教学方法

本课程不仅介绍医学实验动物学的专门知识与技巧,也注重实验动物基本概念与科研思想的建立,该课程主要以生动、形象的教学方法对实验动物学的相关理论知识进行讲述,选取一些与医学实验动物学相关的有趣切入点,初步在本科生中构建实验动物学的理论知识,为后续的培养及课程学习奠定基础,增加学生对实验动物学的兴趣。以下则是采用的具体的教学方法:

3.1 巧设问题情境,激发学习兴趣

将近年来的实验动物学的科技前沿与传统的实验动物学知识相结合,为每章都起了与本章内容相符合,又很有趣的题目,采用问题型教学模式,在导入新课时巧设问题情境,激发学习兴趣。提出一些具有趣味性的问题,使学生一开始就被教师打动,随着教师的思维而思维,循着教师的问题而思考,激发出解决问题的欲望,设置问题情景有助于组织教学、集中学生注意力、激发学生强烈的求知欲。

例如第一章题目“我们为医学事业而献身!”学生看到这样的题目会产生这样的疑问:什么为了医学事业而献身?接着展示北京大学生命科学学院、中科院上海实验动物中心、西北大学、复旦大学上海医学院等高校设立实验动物纪念

碑的图片,让学生从视觉和心理上感觉实验动物为人类医学献身的崇高和重要性,回答在章节题目中隐藏的问题,加深学生的印象。接下来分为两方面进行讲述:一方面着重强调采用实验动物进行生命科学研究必要性,另一方面又要注重实验动物的福利原则。相较于平铺直叙,这样既顺理成章引出本章的内容,又成功的吸引了学生的注意力,加深了学生的印象。

又如第三章题目“我是一只鼠,但我的生活很幸福”,先采用标题来吸引学生的注意力,然后再提出问题:为什么老鼠的生活会幸福呢?引发学生的好奇心,激发学生的求知欲,接着再讲述屏障系统中大鼠舒适的生活,如温度、湿度、换气速度的控制,给予灭菌饲料及消毒的饮用水,并定期对屏障环境中的尘埃和细菌进行检测等等,解释前面提出的问题,呼应前面的章节题目,接着再引出更深一层的问题:为什么要给屏障系统中的动物提供这样舒适的生活呢?进一步引导学生思考,引出实验动物标准化的内容,最大程度减少由于实验动物本身的因素造成实验结果的差异性。这样既加深了前面的动物标准化的内容在学生头脑中的印象,又为后面医学实验中实验动物的选择及应用做了铺垫。

以下是每个章节的题目以及导入新课时设置的一些问题情境:

章节	标 题	教学内容
第一章	我们为医学事业而献身!	实验动物概述
导入	各高校为实验动物树立纪念碑。	
第二章	如何保证实验动物的一致性?	实验动物的标准化
导入	如何获得质量稳定的实验动物?	
第三章	我是一只鼠,但我的生活很幸福!	实验动物的环境及营养控制
导入	屏障系统中大鼠享受的福利。	
第四章	吓死鼠,不偿命!	常见实验动物的特点及其应用
导入	豚鼠胆小易惊,对外界突然的响声、震动十分敏感,常出现呆滞不动、僵直不动等状况。	
第五章	我是一只患有高血压、肝炎……的老鼠!	人类疾病动物模型
导入	自发性高血压大鼠、肿瘤小鼠	
第六章	不同的实验用不同的动物!	医学实验中实验动物的选择及应用
导入	动脉粥样硬化家兔、烧伤小型猪	
第七章	尽管我是老鼠,但是我没有毛!	免疫缺陷动物
导入	裸鼠	
第八章	如何培育试管动物?	实验动物的胚胎工程
导入	试管婴儿的流程	
第九章	我是会发光的小猪!	转基因动物
导入	转基因荧光猪	

3.2 知识层面从已知拓展到未知,选取有趣点进行讲述

对于实验动物的胚胎工程,单凭教师讲述,学生理解起来还是有一定困难。我们采用先从学生熟悉的试管婴儿讲起,放映试管婴儿的操作流程,在此基础上进一步讲述实验动物的胚胎工程,由于是将学生的认知从一个熟悉的事物开始扩展到未知的领域,这样有利于学生理解和记忆。对于转基因动物的讲述,先导入转基因荧光猪的例子,调动学生的兴趣,再放映转基因动物“多莉羊”制作的视频,既让学生见识转基因技术的神奇之处,进一步了解转基因动物的发展历史,开拓了学生的眼界,加深学生的知识底蕴,激发学生对动物实验的探知欲,对于活跃课堂气氛起到良好的作用。充分发挥多媒体的作用,放映一些相关电教片^[6],有助于学生的理解,提高学生兴趣。

3.3 采用具体的案例教学,增强学习的主动性

采用真实的案例教学,在进行人类疾病动物模型教学时,比较了小鼠、雪貂和猕猴等动物感染流感病毒的不同表现,比较不同品系小鼠感染流感病毒的体温、表现、肺泡形态学以及分泌抗炎因子的变化等,采用完整的科学研究以及数据来阐明即使是同一种疾病在不同种类、不同品系的动物身上都有着不一样的表现,相比平铺直叙来说,案例教学更具说服力,便于学生接受,锻炼学生的科研思维、引导学生如何排除一些可能的干扰因素设计科学动物实验。此外,光凭讲述,学生对实验动物很难有直观的认识,我们还组织学生参观本校的实验动物中心大小鼠繁育基地,IVC实验室等,让学生理论联系实际,增强学生对实验动物的认识,充分调动学生的学习兴趣。开展教学改革之前,我们制作了教学满意度问卷发放给学生进行教学效果打分,满意度仅为65%,评教分数为

70分,大部分学生认为实验动物学的教学还是一种填鸭式的教学模式,很多内容不熟悉,听不懂,不感兴趣。我们开展“趣味”教学理念的教学改革后,学生对教学的满意度提高到87%,评教分数为85分,出勤率明显增加,83%的学生认为愿意来上趣味实验动物学,因为觉得上课变得有趣,讲的东西很有意思,他们很感兴趣。以上统计数据虽然可能不完全具有统计学意义,但是开展“趣味”教学理念的教学改革以来,教师明显感觉到学生学习兴趣提高,学习专注力增强。

4 教学反思与改进

尽管我们对实验动物学进行了一系列的教学改革及探索,充分发挥实验动物学的趣味性,激发学生学习兴趣,增强学习主动性,对锻炼学生的科研思维能力有一定作用,但是根据如何提高学生综合素质及创新能力还有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] 韩喜彬. 动物医学专业实验动物学教学改革初探[J]. 中国兽医杂志, 2014, 5(50):98-99.
- [2] 曾昭智, 江涛, 张锦红. 医药院校实验动物学教学思考[J]. 西北医学教育, 2013, 2(21):312-314.
- [3] 师长宏, 张海, 王四旺, 等. 四阶段四层次医学实验动物学教学模式的建立[J]. 现代生物医学进展, 2012, 26(12):5160-5162, 5150.
- [4] 罗小泉, 祁风义, 万睿, 等. 实验动物学教学改革与实践[J]. 黑龙江畜牧兽医: 科技版, 2011(4):149-150.
- [5] 杨正梅, 王胜, 杨根岭, 等. 医学院校实验动物学实验教学体会[J]. 基础医学教育, 2015, 6(17):508-510.
- [6] 袁进, 顾为望. 运用多媒体技术优化实验动物学课堂教学的尝试[J]. 山西医科大学学报: 基础医学教育版, 2008, 10(6):749-751.