

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 6 期

2017 年 12 月

目 次

• 论 著 •

- 异功散对小鼠慢性病贫血的治疗作用 郑 秦, 姜一陵, 季玉婷, 等(421)
- 几种炎症因子在小鼠跨区供血耳瓣 choke 区血管新生过程中的作用 温福利, 梁 成, 庄跃宏, 等(428)
- 应用微卫星 DNA 标记对福建亚种猕猴遗传多样性的分析 周建华, 李志雄, 杨燕燕, 等(434)
- 近交系长爪沙鼠生化标记遗传监测方法的建立及其应用 李 迎, 陈振文, 马兰芝, 等(442)
- 兔斯氏艾美耳球虫荧光定量 PCR 检测方法的建立 温福利, 郑和平, 党 源, 等(448)
- 不同跑台坡度对 SD 大鼠运动疲劳指标的影响 石鹤坤, 陈开杰, 林小凤, 等(455)
- 丙烯酰胺对幼年大鼠学习记忆能力的影响及维生素 C 缓解作用观察 刘 筱, 徐敬东, 于 放(460)
- 实验用斑马鱼成鱼内脏组织病理学检查方法的优化 田 芳, 王玉柱, 夏敏杰, 等(465)
- 近交系 CMU/1 和 CMU/2 长爪沙鼠 Willis 环缺失与生理生化参数比较 李 迎, 崔晓霞, 杜小燕, 等(470)
- 浅谈小型猪中医四诊信息采集 相 波, 范小雪, 余 丰, 等(475)
- 白化金黄仓鼠血液生理指标测定 崔晓霞, 尚世臣, 马兰芝, 等(478)
- 不同超排卵方案对 BALB/c 小鼠超排卵效果的影响 顾剑洁, 葛 蓉, 徐伟超, 等(482)

• 经验交流 •

- 1 例自发性肝硬化新西兰兔肝脏病理形态学观察 邱 波, 王 艳, 英 永, 等(485)
- 医学实验技术专业动物学教学实践 郭 萌, 蒋 辉, 王 迎, 等(488)

• 综 述 •

- P301S 突变 tau 转基因动物模型及其应用 马登磊, 张 兰(491)

• 总目次 • (497)

期刊基本参数: CN31-1954/Q*1981*b* 大 16*84*zh*P*¥10.00*2000*15*2017-12

协办单位(排名不分先后)

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

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

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

Laboratory Animal and Comparative Medicine

Vol.37 No.6

Dec. 2017

Main Contents

- Therapeutic Effects of Yi Gong San Decoction on Anemia of Chronic Disease in Mouse···ZHENG Qin, JIANG Yi-ling, JI Yuting, et al(421)
- The Role of MCP-1, CD68 and ICAM-1 in the Process of
Angiogenesis in Choke Area of Mice ·····WEN Fu-li, LIANG Cheng, ZHUANG Yue-hong, et al(428)
- Analysis on Genetic Diversity of *Macaca mulatta* littoralis
by Using Microsatellite DNA Markers ·····ZHOU Jian-hua, LI Zhi-xiong, YANG Yan-yan, et al(434)
- Establishment and Application of Genetic Monitoring Methods
for Inbred Gerbil by Biochemical Markers·····LI Ying, CHEN Zhen-wen, MA Lan-zhi, et al(442)
- Detection of Eimeria Stiedai by Real-Time PCR ·····WEN Fu-li, ZHENG He-ping, DANG Yuan, et al(448)
- Effect of Different Treadmill Slope on Exercise Fatigue Index in SD Rats·····SHI He-kun, CHEN Kai-jie, LIN Xiao-feng, et al(455)
- Effects of Acrylamide on Learning and Memory Ability in Young Rats and
Toxicity Alleviation by Vitamin C·····LIU Xiao, XU Jing-dong, YU Fang(460)
- Optimization on Methodology of Histopathological Examination in
Adult Zebrafish Visceral Tissues ·····TIAN Fang, WANG Yu-zhu, XIA Min-jie, et al(465)
- Comparison on Circle of Willis Patterns, Biochemical and Physiological
Characteristics of Inbred CMU/1 and CMU/2 Gerbils ·····LI Ying, CUI Xiao-xia, DU Xiao-yan, et al(470)
- Discussing on Four diagnostic information of
traditional Chinese medicine in Minipig·····XIANG Bo, FAN Xiao-xue, YU Feng, et al(475)
- Detection of Blood Physiological Parameters in
Albino Mutant Golden Hamster ·····CUI Xiao-xia, SHANG Shi-chen, MA Lan-zhi, et al(478)
- P301S Mutant Tau Transgenic Mouse and Their Applications·····MA Deng-lei, ZHANG Lan(491)

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6期 2017年12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.6 Dec. 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

邮发代号: 4-789

每期定价: 10.00 元

异功散对小鼠慢性病贫血的治疗作用

郑 秦¹, 姜一陵¹, 季玉婷¹, 夏乐敏¹, 张爱萍¹, 石 岭¹, 戴程怡¹, 薛 城¹, 邹纯朴², 罗梅宏¹

(1. 上海市宝山区中西医结合医院暨上海中医药大学附属曙光医院宝山分院血液科, 上海 201999;

2. 上海中医药大学基础医学院内经教研室, 上海 201203)

[摘要] 目的 观察异功散(YGS)对慢性病贫血(ACD)小鼠的治疗作用。方法 取8周龄雄性C57BL/6小鼠, 腹腔注射脂多糖(0.5 mg/mL), 第6 d腹腔注射酵母糖A(32 mg/mL), 第11 d模型小鼠随机分为模型组、中药干预组, 另设空白对照组。当日起给予药物干预, 中药干预组灌胃YGS水煎液, 剂量为每日15.413 g/kg生药; 空白对照组、模型组灌胃0.2 mL超纯水。采集外周血、肝、脾组织, 采用自动细胞计数仪检测小鼠血常规; 比色法检测血清铁(SI)、未饱和铁结合力(UIBC); ELISA法检测铁蛋白(SF); 普鲁士蓝染色观察肝、脾组织铁, 采用Image-Pro Plus 6.0软件分析普鲁士蓝铁离子阳性面积百分比, RT-PCR检测小鼠肝脏铁调素基因(*HAMP*) mRNA的表达。结果 与模型组比, 连续给药1周和2周后中药干预组小鼠血红蛋白(HB)、红细胞计数(RBC)、红细胞比容(HCT)均有显著提高($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 红细胞压积(MCV)无明显改善($P>0.05$), 血清SI和UIBC也明显上升($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 血清SF及肝、脾组织铁含量显著降低($P<0.01$ 或 $P<0.05$), 肝脏*HAMP* mRNA显著下降($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。结论 YGS可以改善ACD小鼠贫血, 调节其铁代谢的紊乱, 这一作用可能与其对铁调素的下调有关。

[关键词] 慢性病贫血(ACD); 异功散(YGS); 治疗; 铁调素

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)06-0421-07

慢性病贫血(ACD)即炎性贫血, 是指急性或慢性炎症相关的疾病引起的贫血, 这些疾病包括感染性疾病(细菌、真菌、病毒), 非感染性疾病(自身免疫性疾病、肿瘤、慢性肾病、心衰、肥胖等), 甚至老化(前炎症过程)^[1]。目前ACD已成为住院病

人最常见的贫血类型, 其发病率仅次于缺铁性贫血^[2]。ACD是铁代谢相关疾病, 其主要病理特点之一是, 铁过多贮存于单核巨噬系统, 不能循环再利用, 导致可利用的铁减少, 红细胞生成不足而出现贫血。结合中医理论有关“脾主运化”及“脾为气血生化之源”等理论, 我们认为作为精微物质的铁, 要通过“脾主运化”才得以正常输布、利用, “脾主运化”参与机体的整个铁代谢过程。因此, 应用“运脾法”可实现铁在体内的重新分布, 即促进单核巨噬系统内的铁释放入血, 以满足造血所需, 从而改善贫血^[3]。异功散(YGS)是“运脾法”代表方剂, 其中的陈皮意在行气化滞, 醒脾助运的作用, 使该方剂具有补而不滞、补中有行的优点, 临床用于ACD治疗, 可起到促进铁循环再利用的作用, 因此较之单纯的健脾补肾生血收效更佳。为探讨YGS调节ACD铁代谢的作用机制, 我们观察了YGS对ACD模型小鼠的血液学、铁代谢的影响及其与铁调素(Hepcidin)

[收稿日期] 2017-08-10

[基金项目] 国家自然科学基金青年项目(81102569), 国家自然科学基金面上项目(81774271), 上海卫生和计划生育委员会科研项目(201440587), 上海市自然科学基金面上项目(16ZR1425400)

[作者简介] 郑 秦(1986-), 硕士研究生, 住院医师, 主要研究方向: 中医药治疗血液病的临床与实验研究。

E-mail: 670251899@qq.com

[通讯作者] 邹纯朴(1971-), 医学博士, 副教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向: 内经理论临床应用。

E-mail: chunpuzou@shutcm.edu.cn

罗梅宏(1971-), 医学博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要研究方向: 中医药治疗血液病的临床与实验研究。E-mail: lmh021009@163.com

的关系。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级8周龄雄性C57BL/6小鼠(20 g左右),购自上海斯莱克实验动物有限公司[SCXK(沪)2012-0002],饲养于屏障设施的IVC饲养笼中(IVC-II型,苏州市冯氏实验动物设备有限公司)。

1.2 试剂和仪器

脂多糖(LPS)(美国Sigma公司,批号:L2755)、酵母糖A(美国Sigma公司,批号:Z4250)、血清铁检测试剂盒(美国Pointe Scientific公司,批号:MI48188)、小鼠铁蛋白ELISA试剂盒(美国ICL Lab公司,批号:E-90F)、普鲁士蓝(PB)染液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号:G1029)、BAY 120型全自动细胞计数仪(德国西门子公司)、Nano Drop 200型微量紫外分光光度计(美国Thermo公司)、ECLIPSE Ci型生物正置显微镜(日本Nikoni公司)、EMuleC7超薄切片机(美国Thermo公司)、CFX96 RT-PCR仪器(美国Bio-Rad公司)。

1.3 药物

YGS组方:生晒参(去芦)40 g,产地:吉林,上海雷允上中药饮片厂,批号:1607229;炒白术40 g,产地:浙江,上海雷允上中药饮片厂,批号:1606097;白茯苓(去皮)40 g,产地:安徽,上海雷允上中药饮片厂,批号:1606096;蜜炙甘草40 g,产地:新疆,上海雷允上中药饮片厂,批号:1603118;陈皮40 g,产地:浙江,上海雷允上中药饮片厂,批号:1607129,用8倍水加煎煮2次,每次1 h,合并滤液,调整pH值至中性,180℃蒸馏浓缩定容至100 mL,60℃真空加压干燥,粉碎成100目粉,由上海中医药大学药学院制备,常温干燥保存。

1.4 方法

1.4.1 造模 按照文献方法复制模型^[4],小鼠经适应性饲养3 d后,先按0.1 mL/10g体质量的剂量,给小鼠腹腔注射LPS溶液(0.5 mg/mL)后6 d,再按0.25 mL/10g,腹腔注射酵母糖A溶液(32 mg/mL)后5 d,造模成功,成功率约80%。

1.4.2 分组及干预方法 按随机数字表法将48只C57 BL/6小鼠随机分为3组,分为空白对照组、模型组、中药干预组,每组各16只,每组于连续给药1周及2周后,分别处死8只。YGS按临床常用量

由人参(去芦)15 g、白术15 g、茯苓(去皮)15 g、炙甘草15 g、陈皮15 g组成。给药剂量参照《药理实验方法学》^[5]中人和小鼠间按体表面积折算的等效剂量比值估算为15.413 g生药/kg/d,中药配置终浓度为1.5413 g/mL的水溶液,按0.01 mL/g给中药干预组灌胃。空白对照组、模型组每只灌胃0.2 mL超纯水,采集外周血、肝、脾组织标本。

1.4.3 观察指标及方法

1.4.3.1 血液学指标 经眼眶后静脉丛采集约400 μ L全血,置于EDTA抗凝微量采血管内,送至上海市食品药品检测所药理毒理实验室,使用动物专用自动细胞计数仪检测血红蛋白(Hb)等部分血液学指标。

1.4.3.2 血液生化指标的检测 经眼眶后静脉丛采集全血约200 μ L于微量血清分离管内,3 000 r/min,25 min,4℃分离血清,约40 μ L。按依照试剂说明书,比色法检测血清铁(SI)、未饱和铁结合力(UIBC)、ELISA法检测铁蛋白(SF)。

1.4.3.3 肝、脾组织PB染色 肝、脾组织样本固定在质量分数4%多聚甲醛,石蜡包埋,然后切片,4 mm $\times$ 11 mm $\times$ 1 mm, PB染色,显微境观察并采集图像。Image-Pro Plus 6.0软件分析PB铁离子阳性面积百分比(含铁血红素)方法:每组内每张切片在200倍视野下进行拍照。拍照时尽量让组织充满整个视野,保证每张照片的背景光一致。应用Image-Pro Plus 6.0软件对每张照片进行分析得出每张照片蓝色铁离子占整个组织面积的比率即PB阳性面积百分比。

1.4.3.4 荧光实时定量PCR检测 首先,使用RNAiso Plus试剂盒(D9108A,日本TaKaRa公司),按说明书提取肝组织RNA;然后使用PrimeScript试剂盒(日本TaKaRa公司),按说明书在RT-PCR仪器反转录RNA;进而使用SYBR Premix Ex试剂盒(DRR420A,美国Bio-Rad公司),按说明书在RT-PCR仪器检测 β -actin,铁调素基因(HAMP) mRNA表达, β -actin作为内参。

β -actin 引物序列

上游:5'-AGCTGAGAGGAAATCGTGCG-3';

下游:5'-GTGCCACCAGACAGCACTGTG-3';

HAMP mRNA 引物序列

上游:5'-AGCACCACCTATCTCCATCAAC-3';

下游:5'-TGTCTCTCTTCTTCTCTTCTGTC-3'

1.5 统计学方法

数据采用SPSS 22.0分析软件进行统计分析。

计量资料数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。经方差齐性检验, 方差齐的数据, 多组间比较采用单因素方差分析, 两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 异功散可以改善 ACD 小鼠贫血

如表 1, 与空白对照组比, 模型组小鼠血红蛋白(HB)、红细胞计数(RBC)、红细胞比容(HCT)、红细胞压积(MCV)水平均显著下降($P < 0.01$); 与模型

组比, 连续给药 1 周及 2 周后, 中药干预组小鼠 HB、RBC、HCT 含量均显著提高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), MCV 无明显改变($P > 0.05$)。

2.2 异功散可调节 ACD 小鼠铁代谢

2.2.1 异功散可提高 ACD 小鼠外周血可利用铁水平与空白对照组相比, 模型组 SI、UIBC 明显下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), SF 明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与模型组相比, 连续给药 1 周及 2 周后, 中药干预组小鼠 SI、UIBC 的含量显著提高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), SF 明显降低($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(表 2)。

表 1 各组小鼠部分血液学指标变化

组别	n	HB /g · L ⁻¹		RBC/10 ⁹ · L ⁻¹		HCT /%		MCV/fl	
		1 周	2 周	1 周	2 周	1 周	2 周	1 周	2 周
空白对照组	8	11.70 ± 0.19	11.57 ± 0.29	8.07 ± 0.32	8.07 ± 0.32	45.86 ± 1.55	45.86 ± 1.55	56.84 ± 0.90	56.84 ± 0.90
模型组	8	9.01 ± 1.06**	8.73 ± 0.39**	7.04 ± 0.93**	7.27 ± 0.69**	38.02 ± 4.02**	38.83 ± 3.41**	53.48 ± 1.14**	53.4750 ± 1.14**
中药干预组	8	10.8 ± 0.33**△△	9.52 ± 0.43**△△	8.13 ± 0.35△△	7.96 ± 0.43△	42.18 ± 3.39*△	42.61 ± 1.84*△△	53.79 ± 0.86**	53.9125 ± 0.83**

注: 与空白对照组比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比, △ $P < 0.05$, △△ $P < 0.01$; 下表同

表 2 各组小鼠外周血铁代谢指标变化

组别	n	SI /mg · L ⁻¹		UIBC/mg · L ⁻¹		SF/μg · L ⁻¹	
		1 周	2 周	1 周	2 周	1 周	2 周
空白对照组	8	130.41 ± 56.73	120.876 ± 17.60	704.62 ± 67.95	406.32 ± 94.99	243.27 ± 46.88	221.79 ± 17.72
模型组	8	53.20 ± 16.34*	22.57 ± 12.66**	625.35 ± 70.73*	53.66 ± 10.26**	38.02 ± 4.02**	355.60 ± 31.90**
中药干预组	8	117.08 ± 44.92△	72.51 ± 32.51**△△	847.38 ± 290.62△	190.28 ± 36.07**△△	42.18 ± 3.39*△	284.79 ± 74.62*△

2.2.2 异功散可以降低 ACD 小鼠脾组织铁含量 与空白对照组比, 模型组小鼠脾组织铁含量均明显升高($P < 0.05$); 与模型组比, 连续给药 1 周及 2 周后, 中药干预组小鼠脾组织铁含量均显著下降($P < 0.01$)(表 3、图 1)。

表 3 各组小鼠脾铁含量变化 %

组别	n	1 周	2 周
空白对照组	8	0.03 ± 0.04	0.03 ± 0.04
模型组	8	0.05 ± 0.03*	0.05 ± 0.03*
中药干预组	8	0.00 ± 0.00**△△	0.01 ± 0.00**△△

2.2.3 异功散可降低 ACD 小鼠肝组织铁含量 与空白对照组比, 模型组小鼠肝组织铁含量均明显升高($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$); 与模型组比, 连续给药 1 周及 2 周后, 中药干预组肝组织铁含量显著下降($P < 0.01$)(表 4、图 2)。

2.2.4 异功散可降低 ACD 小鼠肝 HAMP mRNA 表达 与空白对照组比, 模型组小鼠肝组织 HAMP

mRNA 的相对表达量均明显升高($P < 0.01$); 与模型组比, 连续给药 1 周及 2 周后, 中药干预组肝组织 HAMP mRNA 的相对表达量显著下降($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)(表 5)。

3 讨论

中医没有 ACD 的病名, 通常将其与缺铁性贫血一并归属于“萎黄”、“黄病”或“血虚证”等范畴。然而, 与缺铁性贫血不同, ACD 所表现的低铁血症不是由于铁的供应不足, 而是由于铁的吸收、利用等应答过程失调, 导致供应的铁不能被吸收入血、贮存铁不能动员入血进行再利用即铁稳态失衡。这一病理特点提示, ACD 不是单纯的健脾补肾所能奏效的疾病。据此, 课题组提出^[3]“受气取汁, 变化而赤”是脾正常调节铁代谢的过程, ACD 的病理环节是“中焦受气取汁”的过程受损; 脾有运化“水湿精微”的功能, 铁是体内

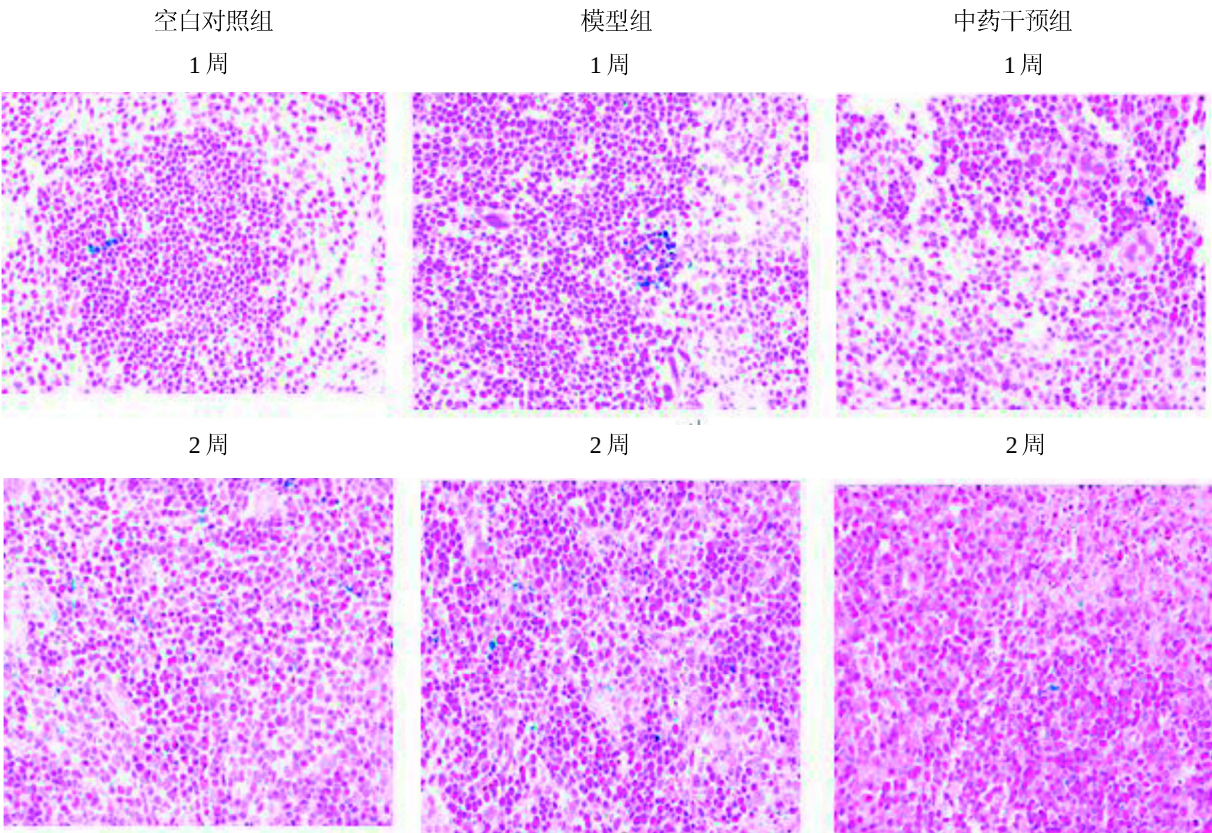


图 1 各组小鼠脾组织铁(PB × 400)

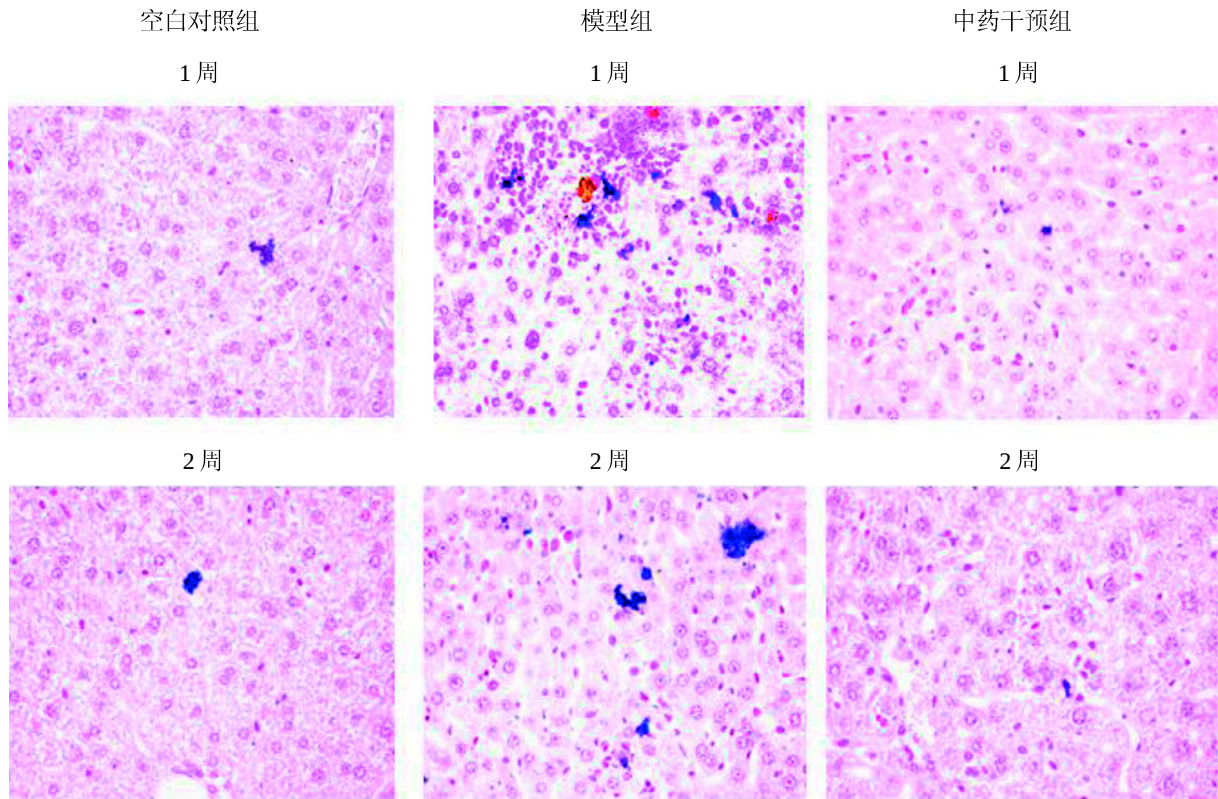


图 2 各组小鼠肝组织铁(PB × 400)

表4 各组小鼠肝组织铁含量变化 %

组别	n	1周	2周
空白对照组	8	0.13 ± 0.03	0.08 ± 0.01
模型组	8	0.14 ± 0.16*	0.27 ± 0.20**
中药干预组	8	0.02 ± 0.03**△△	0.05 ± 0.02**△△

表5 各组小鼠肝组织 HAMP mRNA 的相对表达量

组别	n	1周	2周
空白对照组	8	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	8	2.45 ± 0.33**	3.78 ± 0.81**
中药干预组	8	1.54 ± 0.19△	2.01 ± 0.74**△△

的精微物质之一,铁代谢紊乱反映的是脾运失常,临床应以“运脾”法恢复其功能。YGS是由四君子汤加味而成,方中“参、术、苓、草,甘温益胃,有健运之功,具冲和之德”(《名医方论》),加陈皮意在行气化滞,醒脾助运,有补而不滞、补中有行的优点,为运脾立法之良方。铁作为精微物质,需依赖“脾运”之功在机体内正常运转分布,发挥其功能。异功散之“补中有行”的特点使得该方能参与铁的整个代谢过程,尤其是铁的动员、循环和再利用。

目前认为,铁调素是机体调节铁代谢的核心蛋白,在ACD发病机制中起着至关重要的作用^[6,7]。铁调素是在肝脏中由HAMP基因编码的小分子肝肽,是维持机体铁稳态的关键。其主要在炎症、缺氧、铁过载等情况下抑制小肠对铁的吸收,促进巨噬细胞对铁的摄入,从而调节铁的吸收和循环^[8-11]。前期我们观察了YGS对炎症介导的小鼠体内铁代谢紊乱的作用。进一步研究发现^[12,13],YGS对正常小鼠铁代谢并没有影响,但能通过降低炎症介导的小鼠血清IL-6的升高,抑制肝脏铁调素表达,改善血清低铁状态,纠正肝组织铁贮存过多。由此我们推测异功散可通过抑制铁调素的过表达来调节炎症介导的铁代谢紊乱。那么异功散是否可以通过抑制铁调素的过表达来调节ACD铁代谢紊乱从而纠正贫血呢?为回答这一问题,本研究选用了公认的ACD小鼠模型^[4,14]观察研究异功散对ACD小鼠模型的治疗作用。

文献^[4]及我们的预实验结果均表明,注射酵母糖A 5 d后小鼠HB、RBC、HCT、MCV开始明显降低,SI减少,SF升高,表现出典型ACD的病理特征改变。因此,我们在造模第5日起给药,

连续给药1周或2周,观察中药的作用。虽然MCV无明显变化,但HB、RBC、HCT均明显提高,说明异功散可以改善ACD小鼠贫血。

机体内16%的铁以铁蛋白及含铁血黄素形式储存于肝、脾及骨髓中^[15],ACD时铁过多地蓄积于肝、脾等系统内,不能循环再利用,导致可利用的循环铁减少,导致贫血。如果能将此部分铁动员再利用,恢复铁的正常分布,那么就有可能使ACD得到根本的治疗。虽然目前骨髓铁仍是评价机体储存铁的金标准,然而临床上由于取材欠佳等原因,约有20%骨髓标本不能对机体存储铁做出正确的判定,因此临床上常采用SF评估机体储存铁的情况^[16]。已有研究表明^[17],骨髓铁与SI、SF呈正相关;与UIBC呈负相关。由此可见,SI、UIBC、SF可以很好地评价机体铁代谢的情况。本文研究表明,ACD小鼠肝脏HAMP mRNA表达升高,血清中SI、UIBC下降,SF升高,肝脾组织铁增高,给予异功散干预后,小鼠肝脏HAMP mRNA表达相对下降,血清SI、UIBC显著增加,SF及肝脾组织铁明显减少。由此推测,异功散可以通过降低铁调素的表达,从而动员肝、脾组织内的储铁向外周血转移,提升循环中可利用的铁水平,以供造血所需,增加红细胞生成,改善贫血。

本实验结果已初步证明,异功散通过降低铁调素的过表达从而调节铁代谢的紊乱,改善贫血,为开展进一步的研究,阐明诸如药效关系、药效成分及作用机理等科学问题,赋予该方应用于临床的更多科学依据,具有实际的临床意义。另外,本研究中,无论是连续给药1周还是2周,异功散均可以调节ACD小鼠铁代谢,改善贫血,两者并没有明显的差异,可能异功散的效价的提高并不在于时间的延长,而在于药物浓度的改变。因此,后续的工作,我们将改变给药浓度,进一步探寻异功散治疗ACD最佳浓度及相关的作用机制。

参考文献:

- [1] Poggiali E, Migone De Amicis M, Motta I, et al. Anemia of chronic disease: a unique defect of iron recycling for many different chronic diseases [J]. Eur J Intern Med, 2014, 25(1): 12-17.
- [2] Fraenkel PG. Understanding anemia of chronic disease[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2015, 2015: 14-18.

- [3] 罗梅宏. 从脾主运化和运脾生血理论探讨慢性病贫血的中医病机和治疗[J]. 中医杂志, 2013, 54(18):1556-1557.
- [4] Lasocki S, Millot S, Andrieu V, et al. Phlebotomies or erythropoietin injections allow mobilization of iron stores in a mouse model mimicking intensive care anemia[J]. Crit Care Med, 2008, 36(8):2388-2394.
- [5] 徐叔云. 药理实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002:20.
- [6] Theurl I, Aigner E, Theurl M, et al. Regulation of iron homeostasis in anemia of chronic disease and iron deficiency anemia: diagnostic and therapeutic implications[J]. Blood, 2009, 113(21):5277-5286.
- [7] Sun CC, Vaja V, Babitt JL, et al. Targeting the hepcidin-ferroportin axis to develop new treatment strategies for anemia of chronic disease and anemia of inflammation[J]. Am J Hematol, 2012, 87(4):392-400.
- [8] Rochette L, Gudjoncik A, Guenancia C, et al. The iron-regulatory hormone hepcidin: a possible therapeutic target? [J]. Pharmacol Ther, 2015, 146:35-52.
- [9] Singh B, Arora S, Agrawal P, et al. Hepcidin: a novel peptide hormone regulating iron metabolism[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(11-12):823-830.
- [10] Ward DM, Kaplan J. Ferroportin-mediated iron transport: expression and regulation[J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1823(9):1426-1433.
- [11] Silva B, Faustino P. An overview of molecular basis of iron metabolism regulation and the associated pathologies[J]. Biochim Biophys Acta, 2015, 1852(7):1347-1359.
- [12] 郑秦, 管宇, 王志成, 等. 异功散对脂多糖介导的小鼠铁代谢紊乱的影响[J]. 中医杂志, 2015, 56(20):1767-1770.
- [13] Zheng Q, Guan Y, Xia L, et al. Effect of Yi Gong San decoction on iron homeostasis in a mouse model of acute inflammation [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016, 2016: 2696480.
- [14] Rivera S, Ganz T. Animal models of anemia of inflammation [J]. Semin Hematol, 2009, 46(4):351-357.
- [15] 郁敏燕, 朱俐. 低氧与铁代谢相关蛋白[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2012(10):897-905.
- [16] 彭碧, 曾白华, 陈小红. 铁代谢相关血清学指标在贫血诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2014(5):552-554, 556.
- [17] 魏小平, 马泽荣, 郑贵星, 等. 骨髓铁与常用血清铁指标的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2011(14):1546-1547, 1549.

Therapeutic Effects of Yi Gong San Decoction on Anemia of Chronic Disease in Mouse

ZHENG Qin¹, JIANG Yi-ling¹, JI Yuting¹, XIA Le-ming¹, ZHANG Ai-ping¹,
SHI Ling¹, DAI Cheng-yi¹, XUE Cheng¹, ZOU Chun-pu², LUO Mei-hong¹

(1. Department of Hematology, Shanghai Baoshan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine (Baoshan Branch of Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine), Shanghai 201900, China; 2. Neijing Department, School of Basic Medical Science, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Objective To observe the therapeutic effects of Yi Gong San decoction (YGS) on anemia of chronic disease (ACD) in mouse. **Methods** Totally 48 male 8-week-old male C57 BL/6 mice were randomly divided into blank control group, model group, intervention group. Each group was sacrificed 8 mouse after the continuous administration of 1 week or 2 weeks. The model group and intervention group intraperitoneally injected with zymosan A after 6 days of intraperitoneally injected with LPS. After 5 days of zymosan A injection, YGS (15.413 g per day) was administered to mice intragastrically in intervention group for successive 1 or 2 weeks while 0.2 mL of ultra-pure water was administered to mice intragastrically in blank control group and the model group. The mouse blood routine was measured by automatic cell counting. Colorimetric method was used to detect serum iron (SI) and unsaturated iron binding (UIBC). ELISA was used to detect ferritin (SF). The ratio of iron in liver and spleen were analyzed by software using Prussian blue staining. The positive area of Prussian blue iron was analyzed by Image-Pro Plus 6.0 software. The expression of hepcidin antimicrobial peptide (*HAMP*) mRNA in mouse liver was detected by RT-PCR. **Results** In the 1 or 2 weeks, the content of hemoglobin (HB), erythrocyte count (RBC), hematocrit (HCT) in mice was significantly increased (vs model group, $P < 0.01$ or $P < 0.05$); Hematocrit (MCV) was not changed ($P > 0.05$). The SI and UIBC was increased (VS model group, $P < 0.01$ or $P < 0.05$); the SF and the ratio of iron in liver and spleen reduced significantly (VS model group, $P < 0.01$ or $P < 0.05$). Liver *HAMP* mRNA was significantly decreased ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). **Conclusion** Yi Gong San decoction can improve the degree of anemia and adjust the iron metabolism disorder in mouse of anemia of chronic disease by decreasing *HAMP* mRNA relative expression. **[Key words]** Anemia of chronic disease (ACD); Yi Gong San decoction (YGS); Treatment; Hepcidin

几种炎症因子在小鼠跨区供血耳瓣 choke 区血管新生过程中的作用

温福利¹, 梁 成¹, 庄跃宏², 马 雷¹, 郑和平¹

(1. 福建医科大学福总临床医学院(南京军区福州总医院)比较医学科, 福州 350025;

2. 福建医科大学人体解剖与组织胚胎学系, 福州 350108)

[摘要] 目的 探讨几种炎症因子在 choke 区血管新生过程中的作用。方法 建立小鼠跨区供血耳瓣模型, 切取小鼠耳瓣, HE 染色后, 观察血管管径变化。运用免疫组织化学技术, 分别在造模术后当日(0 d)、1 d、3 d、5 d、7 d 检测细胞间黏附分子-1(ICAM-1)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)、巨噬细胞标记物(CD68)的表达情况。结果 对小鼠耳瓣血管管径观察显示, 术后 3 d 可见新生血管, 7 d 后血管扩张明显。在术后 3 d, 两个 choke 区中 CD68 标记的巨噬细胞聚集量最大, MCP-1 和 ICAM-1 在术后早期炎症反应期间出现高表达。choke 区血管扩张期间, 组织中的三种炎症因子表达明显增多。结论 ICAM-1、CD68、MCP-1 三种炎症因子在血管重塑中起重要作用, 适当的炎症反应对皮瓣存活起到积极作用。

[关键词] 免疫组织化学; 炎症因子; choke 区; 血管

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)06-0428-06

随着显微外科技术的不断发展和成熟, 跨区供血皮瓣在临床中得到广泛应用^[1]。跨区供血能力对皮瓣存活至关重要, choke 区血管的交通吻合是保障血供的组织基础^[2], 而炎症反应被认为是影响 choke 区血管新生和血管重塑的重要因素^[3]。本实验通过建立的小鼠跨区供血耳瓣模型, 对 choke 区细胞间黏附分子-1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1) (又称 CD54)、单核细胞趋化蛋白-1(monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1)、巨噬细胞标记物(cluster of differentiation 68, CD68)三种炎症因子的表达情况进行检测, 初步探讨三种炎症因子在 choke 区血管新生中的作用, 为提高临床跨区皮瓣的存活提供理论基础。

[收稿日期] 2017-10-25

[基金项目] 福建省自然科学基金资助项目(2015J01412)和全军实验动物科研课题(SYDW(2016)007)

[作者简介] 温福利(1987-), 男, 技师, 硕士研究生, 研究方向: 比较医学。E-mail: wen_fuli@163.com

[通讯作者] 郑和平(1962-), 男, 教授/主任医师, 研究方向: 比较医学。E-mail: zhpzf@163.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 KM 小鼠 36 只, 体质量 20~25 g, 鼠耳完整无皮肤病变或外伤, 均购于福建医科大学实验动物中心[SCXK(闽)2016-0002]; 饲养于南京军区福州总医院比较医学科屏障环境[SYXK(闽)2013-0004], 环境温度(22 ± 1) °C, 相对湿度 40%~65%。

1.2 模型建立

用质量分数 2% 戊巴比妥钠(30 mg/kg)将小鼠麻醉成功后, 用棉签刮取脱毛膏对鼠耳进行脱毛, 观察鼠耳的血管分布情况, 用眼科剪从鼠耳尾侧向头侧剪断小鼠耳基底部尾侧 2/3, 保留头侧 1/3, 形成以耳前动静脉为蒂内含 3 个血管体和 2 个 choke 区的跨区供血耳瓣^[12,13]。小鼠右耳为模型组, 按上述方法建立耳瓣模型。左耳为对照组, 仅作脱毛处理。

1.3 病理学检测

术后 3 d、7 d 分别切取小鼠耳瓣, 置于体积分数 10% 甲醛溶液固定 24 h, 进行常规脱水包埋和切片, HE 染色, 封片。用 PS 标尺工具测量模

型组与对照组血管径变化。

1.4 免疫组织化学检测

在术后当日(0 d)、1 d、3 d、5 d、7 d分别切取小鼠耳瓣,置于体积分数10%甲醛溶液固定24 h,垂直于耳基部线切取choke I区和choke II区组织,进行常规脱水和石蜡包埋,切片置于65℃烤箱过夜后,采用直接煮沸修复法进行柠檬酸盐抗原修复,封闭后滴加美国Abcam公司的兔源一抗ICAM-1(ab124760)、CD68(ab125212)、MCP-1(ab25124),以磷酸盐缓冲液替代一抗作为阴性对照,二抗按照兔超敏二步法免疫组织化学试剂盒说明滴加,DAB显色,封片。在20×物镜下,随机选取不同时间点choke I区和choke II区的10根血管,运用Image-pro Plus 6.0可对免疫组织化学结果进行半定量分析,计算血管及血管旁50 μm内阳性标志物的累积吸光度值(A),检测ICAM-1、CD68、MCP-1三种炎症因子的表达情况。

1.5 统计分析

用SPSS 20.0软件对模型组与对照组的差值进行相关性分析,所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 血管管径变化

模型组小鼠choke区血管管径平均值均大于对照组,模型组血管管径随着术后天数的增加而呈现

上升趋势(图1),术后3 d可见新生血管,术后7 d血管扩张明显,可见耳瓣基底部形成静脉回流血管,随后血管变化趋于稳定。

2.2 免疫组织化学检测结果

2.2.1 MCP-1的表达情况 MCP-1兔源一抗的最佳稀释度为:1:1 500, MCP-1阳性表达于间质细胞,呈棕褐色颗粒(图2)。模型组choke I区MCP-1表达峰值在术后1 d,choke II区的峰值在术后3 d,模型组与对照组比较,差异显著($P < 0.01$)(表1)。随后A值逐渐下降,7 d时模型组与对照组差异不明显。

2.2.2 CD68的表达情况 CD68兔源一抗的最佳稀释度为:1:1 000, CD68阳性表达主要见于单核细胞,呈棕褐色颗粒(图3)。皮瓣切取后,choke I区和choke II区CD68表达水平均在术后3 d达到峰值,模型组与对照组比较差异均显著($P < 0.01$)(表2)。

2.2.3 ICAM-1的表达情况 ICAM-1兔源一抗的最佳稀释度为:1:900, ICAM-1阳性表达主要见于血管内皮细胞,血管壁染色后呈棕黄色(图4)。术后5 d,choke I区ICAM-1的表达量最大,choke II区在术后3 d达到峰值,模型组与对照组比较差异均显著($P < 0.01$)(表3)。在术后第7日,两个choke区模型组ICAM-1的表达量略大于对照组。

3 讨论

外科皮瓣的缺血性坏死是一种常见的并发症,可能导致严重的功能缺陷^[4]。跨区皮瓣可划分为解

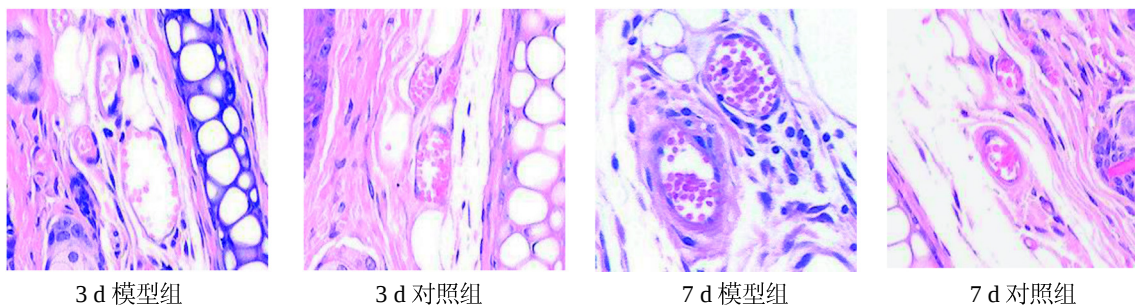
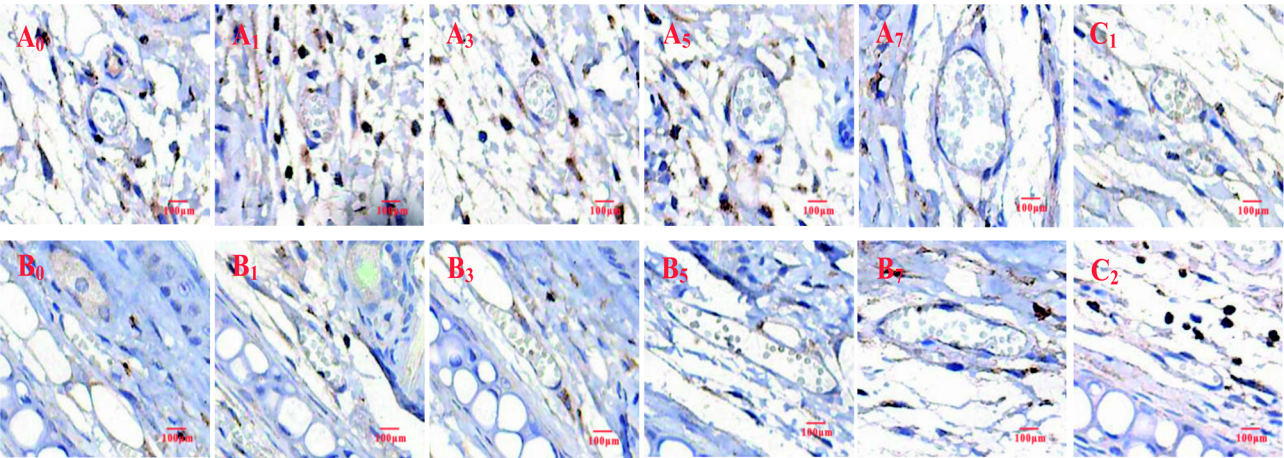


图1 choke区血管的管径变化 (HE × 200)

表1 MCP-1 累积A值的测量结果

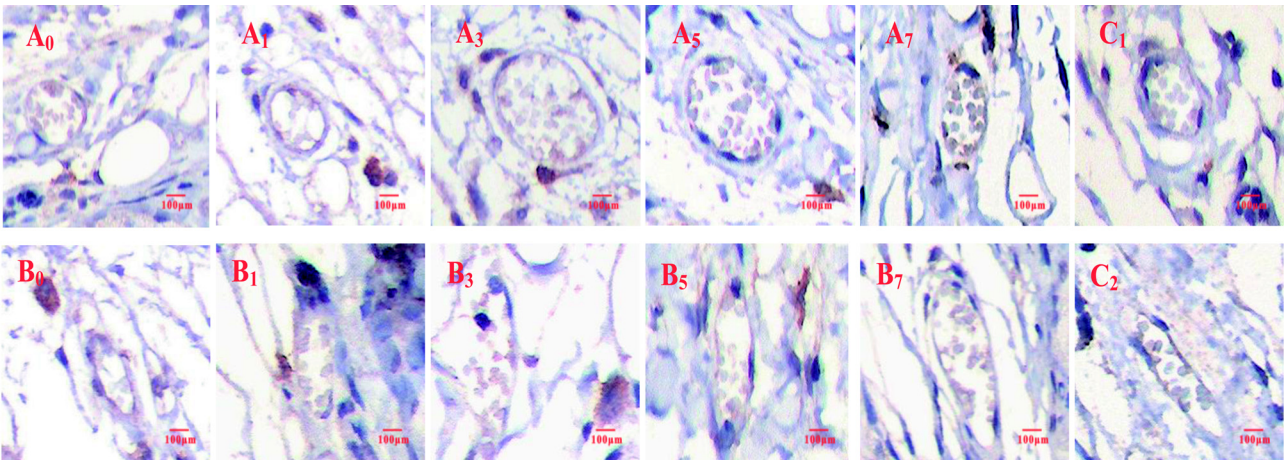
MCP-1	choke I区					choke II区				
	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
对照组	439.07 ± 37.03	384.90 ± 25.83	378.29 ± 26.72	448.54 ± 31.78	305.78 ± 25.47	157.90 ± 13.99	267.27 ± 15.95	405.07 ± 30.36	319.91 ± 27.55	263.21 ± 15.90
模型组	644.98 ± 41.39	2 607.55 ± 233.61	1 961.81 ± 123.78	1 159.38 ± 134.63	865.74 ± 37.39	837.79 ± 41.47	1 319.57 ± 101.61	1 691.62 ± 95.44	1 161.09 ± 59.65	921.67 ± 67.10



A₀: 0 d choke I 区 模型组; A₁: 1 d choke I 区 模型组; A₃: 3 d choke I 区 模型组; A₅: 5 d choke I 区 模型组; A₇: 7 d choke I 区 模型组; C₁: choke I 区 对照组

B₀: 0 d choke II 区 模型组; B₁: 1 d choke II 区 模型组; B₃: 3 d choke II 区 模型组; B₅: 5 d choke II 区 模型组; B₇: 7 d choke II 区 模型组; C₂: choke II 区 对照组

图 2 MCP-1 在 choke 区血管的表达情况(免疫组织化学× 200)



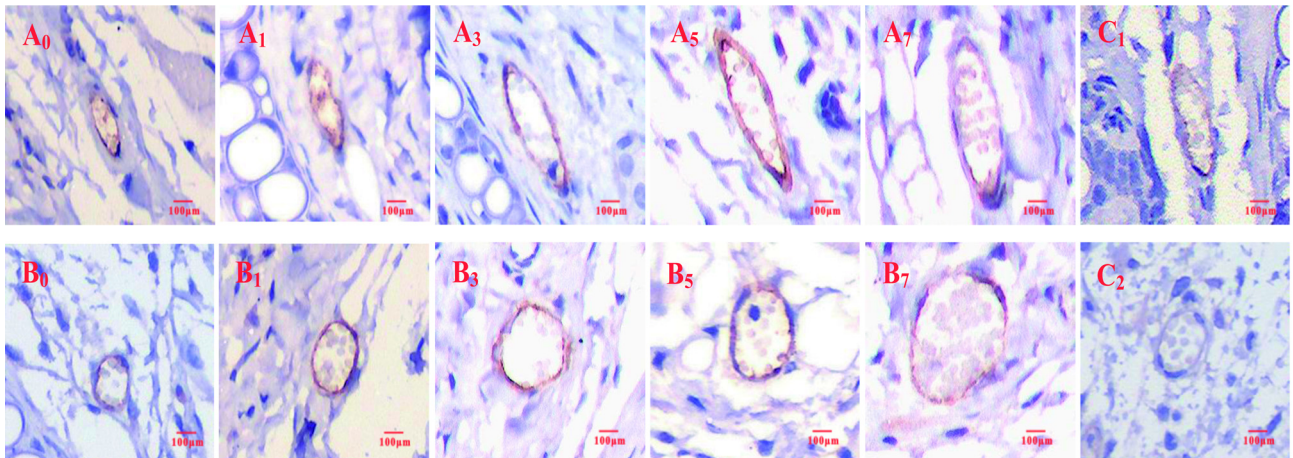
A₀: 0 d choke I 区 模型组; A₁: 1 d choke I 区 模型组; A₃: 3 d choke I 区 模型组; A₅: 5 d choke I 区 模型组; A₇: 7 d choke I 区 模型组; C₁: choke I 区 对照组

B₀: 0 d choke II 区 模型组; B₁: 1 d choke II 区 模型组; B₃: 3 d choke II 区 模型组; B₅: 5 d choke II 区 模型组; B₇: 7 d choke II 区 模型组; C₂: choke II 区 对照组

图 3 CD68 在 choke 区血管的表达情况 (免疫组织化学× 200)

表 2 CD68 的累积 A 值测量结果

CD68	choke I 区					choke II 区				
	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
对照组	242.55 ± 21.70	346.88 ± 28.93	396.53 ± 24.79	365.59 ± 30.84	376.25 ± 24.03	302.41 ± 24.82	210.55 ± 14.34	298.37 ± 21.67	279.76 ± 31.09	313.13 ± 24.66
模型组	606.20 ± 52.90	1 636.71 ± 125.39	1 743.24 ± 147.71	1 283.08 ± 91.53	1 134.01 ± 136.34	849.50 ± 56.06	1 021.5 ± 99.01	1 209.60 ± 116.08	1 066.81 ± 84.74	718.18 ± 40.53



A₀: 0 d choke I 区 模型组; A₁: 1 d choke I 区 模型组; A₃: 3 d choke I 区 模型组; A₅: 5 d choke I 区 模型组; A₇: 7 d choke I 区 模型组; C₁: choke I 区 对照组

B₀: 0 d choke II 区 模型组; B₁: 1 d choke II 区 模型组; B₃: 3 d choke II 区 模型组; B₅: 5 d choke II 区 模型组; B₇: 7 d choke II 区 模型组; C₂: choke II 区 对照组

图 4 ICAM-1 在 choke 区血管的表达情况 (免疫组织化学×200)

表 3 ICAM-1 的累积 A 值测量结果

ICAM-1	choke I 区					choke II 区				
	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d	0 d	1 d	3 d	5 d	7 d
对照组	205.91 ± 19.79	265.89 ± 22.28	232.41 ± 20.83	286.81 ± 28.55	198.64 ± 15.79	372.11 ± 33.18	243.57 ± 28.91	352.22 ± 40.51	419.93 ± 40.43	386.52 ± 25.91
模型组	259.07 ± 27.33	1 361.76 ± 74.54	2 136.95 ± 102.58	2 674.12 ± 196.34	1 598.76 ± 78.12	754.13 ± 55.41	1 781.14 ± 97.40	2 373.01 ± 162.20	1 613.06 ± 149.56	936.22 ± 83.21

剖学供区、动力学供区和潜在供区,皮瓣是否坏死主要取决于跨区吻合部位(choke 区)的血供能力^[5-7]。习珊珊等^[8]对建立的背部跨区供血皮瓣模型大鼠注射二甲氧乙二酰甘氨酸(dimethyloxalylglycine, DMOG)后观察表明,DMOG 可增大 choke 区血管管径,克服缺血、缺氧的损伤。庄跃宏等^[9]研究表明,基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9, MMP-9)在 choke 区血管扩张期间血管重塑过程中比基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)发挥更大作用。血管重塑是动脉生成过程,而动脉生成需要炎症环境和众多的细胞因子^[3,10]。

单核细胞浸润是炎症反应的一个重要特征。MCP-1 是早期炎症的重要因子,主要由单核细胞、血管内皮细胞等合成分泌。在正常生理状态下,外周血 MCP-1 含量较少。机体发生病变时, MCP-1 激活并诱导单核细胞向病变组织聚集^[11]。ICAM-1 主要聚集于中性粒细胞、单核细胞、内皮细胞表面。在正常生理状态下, ICAM-1 很少表

达。当机体出现炎症时, ICAM-1 可促进单核细胞游离出血管,使其转变成 CD68 标记的巨噬细胞,发挥组织修复与重建的作用^[12]。ICAM-1 可作为单核细胞参与 choke 区血管扩张的重要因子。研究表明, MCP-1 启动炎症级联反应可促进单核细胞穿过血管壁进行补给和迁移^[13], MCP-1 细胞因子可快速增强侧支血管生长^[14,15]。ICAM-1 已被用做动脉生成相关联的单核细胞粘附和浸润的指标^[16]。

本研究中跨区供血耳瓣模型建立后, choke I 区模型组 MCP-1 的表达量在建模后 1 d 就达到峰值,累积 A 值增加 4 倍,随后缓慢降低。choke II 区模型组 ICAM-1 的表达量在 3 d 也达到峰值,在术后动脉阻塞 3 d,两个 choke 区 CD68 标记的巨噬细胞聚集量最大, MCP-1 和 ICAM-1 在术后早期炎症反应期间出现高表达。通过对小鼠耳瓣的血管管径变化观察显示,术后 3 d 可见新生血管,7 d 后血管扩张明显^[17,18]。MCP-1、ICAM-1、CD68 是炎症反应的相关因子, choke 区血管扩张后,组

织中的三种炎症因子表达明显增多。本研究结果提示,炎症反应在血管重塑中起重要作用,适当的炎症反应对皮瓣存活起到积极作用。

参考文献:

- [1] 吴泽东, 郑和平. 嵌合穿支皮瓣的发展与现状[J]. 临床外科杂志, 2015, 23(5):330-333.
- [2] 庄跃宏, 梁成, 温福利, 等. 延迟术通过加强血管扩张的方式促进跨区皮瓣存活[J]. 中国临床解剖学杂志, 2015, 33(1):44-50.
- [3] Williams BA, Currie RW, Morris SF. Impact of arteriogenesis in plastic surgery: choke vessel growth proceeds via arteriogenic mechanisms in the rat dorsal island skin flap[J]. Microcirculation, 2009, 169(3):235-250.
- [4] Sun Y, Li QF, Zhang Y, et al. Isoflurane preconditioning increases survival of rat skin random-pattern flaps by induction of HIF-1 α expression[J]. Cell Physiol Biochem, 2013, 31(4):579-591.
- [5] Ghali S, Butler PE, Tepper OM, et al. Vascular delay revisited [J]. Plast Reconstr Surg, 2007, 119(6):1735-1744.
- [6] 戴开宇, 胡斯旺, 庄跃宏. 大鼠背部跨区皮瓣的Choke静脉的变化规律[J]. 解剖学报, 2013, 44 (2):238-244.
- [7] Tao XY, Wang L, Gao WY, et al. The effect of inducible nitric oxide synthase on multiterritory perforatorflap survival in rats[J]. Reconstr Microsurg, 2016, 32(9):643-649.
- [8] 习珊珊, 丁茂超, 郑俊, 等. 尾静脉注射DMOG对大鼠跨区皮瓣choke血管区的影响[J]. 中华显微外科杂志, 2016, 39(2):143-147.
- [9] Zhuang Y, Fang F, Lan X et al. The vascular evolution of an extended flap on the dorsum of rats and the potential involvement of MMP-2 and MMP-9[J]. Microvas Res, 2017, 112(27):20-29.
- [10] Qing L, Lei P, Tang J, et al. Inflammatory response associated with choke vessel remodeling in the extended perforator flap model[J]. Exp Ther Med, 2017, 13(5):2012-2018.
- [11] 贺周. 慢性牙周炎牙龈组织单核巨噬细胞的浸润及相关基因的表达[D]. 北京: 中国协和医科大学, 1999:1-2.
- [12] 庄跃宏;穿支体形态学及跨区皮瓣存活机制的研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2012:40-41.
- [13] Khmelewski E, Becker A, Meinertz T, et al. Tissue resident cells play a dominant role in arteriogenesis and concomitant macrophage accumulation[J]. Circ Res, 2004, 95(6):56-64.
- [14] Heil M, Schaper W. Pathophysiology of collateral development [J]. Coron Artery Dis, 2004, 15(7):373-378.
- [15] Helisch A, Schaper W. Arteriogenesis: the development and growth of collateral arteries[J]. Microcirculation, 2003, 10(1): 83-97.
- [16] Zhang X, He H, Lu G, et al. Specific inhibition of ICAM-1 effectively reduces bladder inflammation in a rat model of severe non-bacterial cystitis[J]. Sci Rep, 2016, 6:35672.
- [17] 梁成, 庄跃宏, 郑和平, 等. 新型小鼠跨区供血耳瓣模型的构建[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 26(7):25-29.
- [18] 温福利, 梁成, 庄跃宏, 等. 小鼠跨区供血耳瓣 choke 区的组织学观察[J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(5):345-349.

The Role of MCP-1, CD68 and ICAM-1 in the Process of Angiogenesis in Choke Area of Mice

WEN Fu-li¹, LIANG Cheng¹, ZHUANG Yue-hong², Ma Lei¹, ZHENG He-ping¹

(1. Department of Comparative Medicine, Fujian Medical University Affiliated Fuzhou General Hospital of Nanjing Command, PLA, Fuzhou 350025, China; 2. Department of human Anatomy and History and Embryo, Fujian Medical University, Fuzhou 350108, China)

[Abstract] **Objective** To explore the role of inflammation in angiogenesis in choke area. **Methods** The ear flap model of mice was established and the changes of blood vessel diameter was observed by HE staining. The expressions of intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1), monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and cluster of differentiation 68 (CD68) were detected by immunohistochemistry on the day after modeling(0 d), 1 d, 3 d, 5 d and 7 d, respectively. **Result** By observing the vascular diameter of the ear flap in mice, it was found that the vessels were visible at 3 d after operation and the vascular dilatation was obvious at 7 d. CD68-labeled macrophages had the largest accumulation in two choke area at 3 d. High expression of MCP-1 and ICAM-1 was observed in the early stage of postoperative inflammatory response. The expression of the three inflammatory factors in the tissue was increased significantly during the vascular dilation. **Conclusion** The three inflammatory factors (ICAM-1, CD68 and MCP-1) play an important role in vascular remodeling. Proper inflammatory response plays a positive role in flap survival.

[Key words] Immunohistochemistry; Inflammatory factor; Choke area; Vessels

应用微卫星 DNA 标记对福建亚种 猕猴遗传多样性的分析

周建华¹, 李志雄², 杨燕燕¹, 谢金东¹, 俞春英¹, 王训立¹

(1. 福建中医药大学实验动物中心, 福州 350122;

2. 福建省计划生育科学技术研究所, 福州 350011)

[摘要] 目的 研究福建亚种猕猴的遗传多样性水平, 为猕猴遗传质量监测方法提供基础资料。
方法 采用 20 个微卫星 DNA(SSR)标记技术, 经基因组 DNA 提取、PCR 扩增、非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳等, 对 28 只福建亚种猕猴遗传多样性进行分析, 用 POPGENE 1.32 等软件统计分析。
结果 福建亚种猕猴 20 个微卫星位点共检测到等位基因 200 个, 观察等位基因数(N_a)为 10.0000 ± 3.1119 ; 有效等位基因数(N_e)为 6.8438 ± 2.4905 ; 期望杂合度(H_e)为 0.8509 ± 0.0564 ; 观察杂合度(H_o)为 0.4607 ± 0.1247 ; 香隆信息指数(I)为 2.0166 ± 0.3463 ; 多态信息含量(PIC)为 0.8154 ± 0.0665 ; 显示检测的 20 个微卫星 DNA 位点均存在高度的遗传多态性, 其中有 17 个位点偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.01$)。
结论 有效地分析了福建亚种猕猴群体的遗传多态性, 为今后建立福建亚种猕猴遗传质量监测方法提供理论依据。

[关键词] 微卫星标记; 福建亚种猕猴; 遗传多样性

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)06-0434-08

我国有 6 个猕猴亚种^[1], 在形态、行为、生理生化和遗传等生物学特性方面各亚种之间存在较大差异, 其中福建亚种(*Macaca mulatta littoralis*)尚未被规模化开发成实验动物。利用猕猴种质资源, 有助于开发高标准的具有自主知识产权的非人灵长类实验动物及重大疾病的研究模型, 有利于丰富非人灵长类实验动物资源利用的多样性。所以, 研究福建亚种猕猴的遗传背景特性, 为福建亚种猕猴遗传监测方法提供基础资料, 对福建亚种猕猴实验动物化进程, 具有重要意义。微卫星 DNA(microsatellite DNA), 也称为简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)、短串联重复序列(short tandem repeat,

STR), 由于在基因组内核心序列重复数目的不同, 产生了 DNA 多态性。与其它分子标记相比, 微卫星 DNA 标记具有数量多、分布广、共显性遗传、多态性丰富、且选择中性、重复性好、易检测, 可提供高分辨率的遗传信息等特点, 已广泛应用于遗传图谱的构建, 亲缘关系、遗传多样性分析, 品种及菌株鉴别等^[2-5], 是一种理想的分子标记。本研究从福建亚种猕猴的原主产地——福建武夷山区野捕来的野生猴群中随机抽取 28 只, 应用 20 个微卫星 DNA 标记对该猴群进行遗传多样性检测, 以期获得福建亚种猕猴群体的遗传概貌信息, 为建立福建亚种猕猴遗传质量监测方法提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物和基因组 DNA 提取

野捕福建亚种猕猴 28 只, 雌雄各半, 9~14 岁, 体质量 6~11 kg[特许猎捕证(闽): (猎)字 2008-1],

[收稿日期] 2017-04-27

[基金项目] 福建省实验动物研究重点项目(2014Y0080)

[作者简介] 周建华(1969-), 男, 硕士, 高级实验师, 研究方向: 实验动物学。E-mail: zjh001866@sina.com

[通讯作者] 王训立(1964-), 男, 研究员,

E-mail: wxl@fjtc.edu.cn

饲养于普通级动物实验室[SCXK(闽)2010-0002]、[SYXK(闽)2010-0005]。自上肢静脉空腹抽取全血 2 mL, EDTA 抗凝。采用 Promega 基因组 DNA 纯化试剂盒提取 DNA, 操作步骤见说明书。

1.2 主要试剂和仪器

Wizard® Genomic DNA Purification Kit 试剂盒(Promega 公司, 美国)、Gotaq®Green Master Mix 试剂盒(Promega 公司, 美国)、pBR322 DNA/MspI 标记物(TIANGEN 公司, 中国)。凝胶成像系统(BioRad 公司, 美国), 电泳仪、垂直电泳槽(北京六一仪器厂, 中国)和 ABI Veriti 梯度 PCR 仪(ABI 公司, 美国)。

1.3 引物设计及 PCR 扩增

自 GenBank 网站及相关文献^[6-11]查取 50 个具有多态性高的微卫星 DNA 标记, 上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 扩增: 反应体系 25 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 40~61 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 最终延伸 7 min。扩增产物 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.4 电泳及结果记录

50 个微卫星 DNA 位点中有 20 个位点呈特异性扩增, 且表现不同程度的多态性(每个微卫星位点都有 5 个以上等位基因)。20 个微卫星标记在染色体上的分布等信息见表 1。

20 个位点扩增产物经质量分数 2% 琼脂糖凝胶电泳测定是否在长度范围之内; 后经质量分数 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染和凝胶成像系统照相保存。

1.5 统计分析

电泳图谱经 BioRad 凝胶成像系统分析, 以大小不同的扩增片段(核苷酸条带分子量大小)为不同的等位基因从小到大的顺序分别依次定名为 A、B、C、D、E……(1、2、3、4、5……)等。用 POPGENE version 1.32 软件计算出各基因位点的观察等位基因数(observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数(effective number of alleles, N_e)、等位基因频率(gene frequency)、期望杂合度(H_e)、观察杂合度(H_o)、香隆信息指数(Shannon's information index, I)等指标, 并计算多态信息含量(polymorphism information content, PIC)。同时检验群体的 Hardy-Weinberg 遗传平衡状态。

2 结果

2.1 PCR 扩增结果检测

采用质量分数 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 20 个微卫星位点的 PCR 扩增产物, 本文以 D21S1246 位点的电泳图谱为例说明(图 1)。

2.2 不同福建亚种猕猴个体间 DNA 多态性分布信息

对 28 只福建亚种猕猴的 20 个微卫星 DNA 位点的等位基因多态性分析, 显示其能反映出该猴群个体间的遗传概况情况(表 2)。

2.3 福建亚种猕猴群体遗传多样性分析

根据各微卫星位点的基因型, 利用 POPGENE version 1.32 软件计算出各位点 N_a 及其频率、 N_e 、 H_o 、 I 等指标(表 3、表 4)。

20 个微卫星位点共检测到等位基因 200 个, N_a 在 5~16 个, 平均为 10 个(10.0000 ± 3.1119), 其中, 最多的位点是 D7S503, 有 16 个等位基因, 最少的位点是 D1S548, 有 5 个等位基因。 N_e 在 3.7333~11.6148 个(6.8438 ± 2.4905), 其中, D1S207 位点最高, D1S548 位点最低。 H_e 在 0.7455~0.9305 (0.8509 ± 0.0564), 其中, D1S207 位点最高, D1S548 位点最低。 H_o 在 0.3214~0.7500(0.4607 ± 0.1247), 其中, D2S1333 位点最高, D21S1246、D14S255、D18S537、D1S548 位点较低。 I 在 1.3998~2.5963(2.0166 ± 0.3463), 其中, D7S503 位点最高, D1S548 位点最低。PIC 在 0.6862~0.9074(0.8154 ± 0.0665), 其中, D1S207 位点最高, D1S548 位点最低。实验显示, 20 个微卫星位点均存在高度的遗传多态性。经 Hardy-Weinberg 遗传平衡检验显示, 20 个微卫星位点中除 D6S493、D5S820、D2S1333 位点外, 其余 17 个位点均偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P < 0.01$)。

3 讨论

通常用多个基因位点的遗传多样性参数平均值来描述群体的遗传多样性, 本研究中各微卫星位点的 N_a 为 10 个; N_e 为 6.8438 个; H_e 为 0.8509; H_o 为 0.4607; I 平均值为 2.0166; PIC 为 0.8154(均大于 0.5), 各微卫星位点均属于高度多态性位点, 由此可见, 本研究的猴群等位基因数多、多态信息含量高、杂合度大, 说明该猴群基因型一致性不高, 遗传

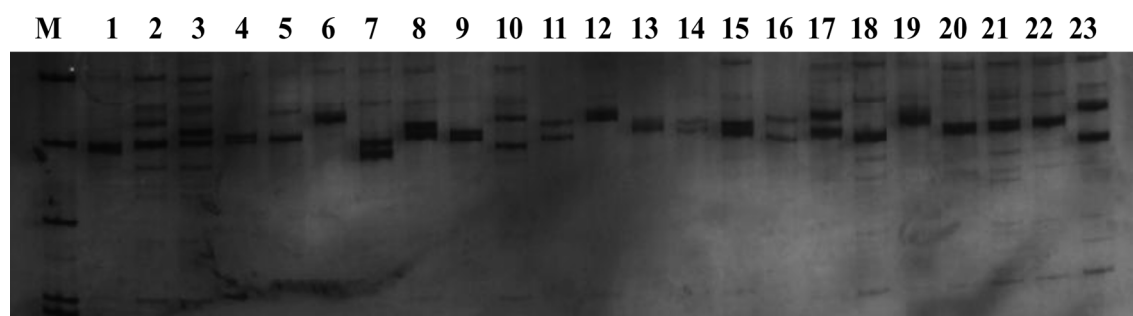
表 1 20 个微卫星 DNA 标记的相关信息
Table 1 The information of 20 microsatellite DNA markers

序号	位点	染色体	引物序列(5'-3')	退火温度/°C
1	D21S1246	3	F: GATAAAGTAGACAGGTAAACA R: GGATTATAATTCAAGATGAGAT	58
2	D7S513	3	F: AGTGTTTTGAAGGTTGTAGGTTAAT R: ATATCTTTCAGGGGAGCAGG	58
3	D6S493	4	F: ATCCCAACTCTTAAATGGGC R: TTCCATGGCAGAAATTGTTT	58
4	D5S820	6	F: ATTGCATGGCAACTCTTCTC R: GTTCTTCAGGGAACAGAACC	60
5	D14S255	7	F: AGCTTCCAATACCTCACCAA R: ATCCTCTGGCTGGATAAGTG	55
6	D10S611	9	F: CATAACAGAACTGTGTAGTGC R: CTGTATTTATGTGTGTGGATGG	50
7	D2S1333	12	F: CTTTGTCTCCCCAGTTGCTA R: TCTGTCATAAACCGTCTGCA	56
8	D2S146	13	F: TCATCCTTACTCTAAGCAAAGATCC R: CACCACATTCAAATGCCTCC	56
9	D11S2002	14	F: CATGGCCCTTCTTTTCATAG R: AATGAGGTCTTACTTTGTTGCC	50
10	D16S403	20	F: GTTTTCTCCCTGGGACATTT R: TATTCATTGTGTGGGCATG	50
11	D9S934	15	F: TTTCTAGTAGCTCAAGTAAAGAGG R: AGACTTGGACTGAATTACACTGC	60
12	DXS6810	X	F: ACAGAAAACCTTTTGGGACC R: CCCAGCCCTGAATATTATCA	56
13	D9S252	15	F: ACCATGATTTGTCAACTCCTA R: ACAATGAACATCCATATACCC	56
14	D1S207	1	F: CACTTCTCCTTGAATCGCTT R: GCAAGTCCTGTTCCAAGTCT	57
15	D18S537	18	F: TCCATCTATCTTTGATGTATCTATG R: AGTTAGCAGACTATGTAAATCAGGA	51
16	D7S503	2	F: ACTTGAGTAATGGGAGCAG R: GTCCCTGAAAACCTTTAATCAG	55
17	D6S311	6	F: ATGTCCTCATTGGTGTGTG R: GATTCAGAGCCCAGGAAGAT	60
18	D1S548	1	F: GAACTCATTGGCAAAAGGAA R: GCCTCTTTGTTGCAGTGATT	57
19	D3S1768	3	F: GGTTGCTGCCAAAGATTAGA R: CACTGTGATTTGCTGTTGGA	61
20	D6S2741	6	F: AGACTAGATGTAGGGCTAGC R: CTGCACTTGGCTATCTCAAC	58

变异大，遗传多样性丰富。

本研究检测的 20 个微卫星位点，除位点 D6S493、D5S820、D2S1333 外，有 17 个偏离 Hardy-Weinberg 平衡($P<0.01$)，说明检验的猴群存

在杂合子缺失现象。17 个微卫星位点处于 Hardy-Weinberg 不平衡状态，其原因可能与野生猕猴的生活习性有关，野生猴群由猴王统治(时间长也会有更替)，其有优先交配权，其它雄猴交配机会偏少，



M: pBR322 DNA 分子量标准, 1~23: 样品编号

图1 D21S1246 位点 PCR 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果

M: pBR322 DNA marker, 1~23: Number of samples

Figure 1 The polyacrylamide gel electrophoresis image of PCR products at D21S1246 locus

且外来进群的猕猴极少, 猴群长时间处于非随机交配体制中, 存在着一定程度的近交繁殖^[12]。

本研究与徐玉蕊等^[6]对安徽本省的野生猕猴福建亚种的遗传多态性研究所筛选的14个多态性微卫星位点比较, 在全部的14个位点中, 只有D5S820、D1S207、D18S537、D7S503、D6S311、D1S548、D3S1768、D6S2741等8个位点一样显现多态性, 且只有D1S548等位基因数目相同(都是5个), 说明虽是同一亚种, 不同产地、不同群体的遗传多样性也有较大差异; 二者更多的生物学特性差异有待进一步研究。

微卫星标记技术是实验动物种质遗传多样性监测和谱系构建的重要手段, 已在非人灵长类动物遗传监测、亲子鉴定等得到了有效应用^[13-18]。本实验应用20个微卫星引物, 对28只野生福建亚种猕猴个体进行PCR扩增, 结果呈现出明显的DNA多态性, 说明这20个微卫星标记具有一定的代表性, 能反映出福建亚种猕猴个体间的遗传概貌, 可有效地作为福建亚种猕猴群体的遗传质量监测和谱系构建的微卫星标记。

参考文献:

- [1] 蒋学龙, 王应祥, 马世来. 中国猕猴的分类及分布[J]. 动物学研究, 1991, 12(3):241-247.
- [2] 禹文海, 和占龙, 鲁绍雄, 等. 基于微卫星DNA标记的恒河猴遗传多样性研究[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(3): 21-25.
- [3] 皮道元, 谢莉萍, 卢晟盛, 等. 利用微卫星标记分析4个食蟹猴群体的遗传多样性[J]. 中国兽医学报, 2011, 31(3): 444-448.

- [4] Sodhi M, Mukesh M, Mishra BP, et al. Microsatellite analysis of genetic population structure of zebu cattle (*Bos indicus*) breeds from north-western region of India[J]. Anim Biotechnol, 2011, 22(1):16-29.
- [5] Korrida A, Jadallah S, Chbel F, et al. Patterns of genetic diversity and population structure of the threatened *Houbara* and *Macqueen's* bustards as revealed by microsatellite markers [J]. Genet Mol Res, 2012, 11(3):3207-3221.
- [6] 徐玉蕊. 安徽野生猕猴实验动物化及其种质特异性研究[D]. 合肥: 安徽大学, 2013.
- [7] 李瑞生. 用微卫星DNA标记建立猕猴遗传检测方法及对群体遗传多态性的分析[D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2009.
- [8] 黄晓峰. 基于微卫星的猕猴川西亚种遗传多样性研究[D]. 成都: 四川农业大学, 2008.
- [9] Jeffrey R, Mackenzie B, Roy G, et al. A panel of 20 highly variable microsatellite polymorphisms in rhesus macaques selected for pedigree or population genetic analysis[J]. Am J Primatol, 2005, 67(3):377-383.
- [10] Kanthaswamy S, Smith DG. Effects of geographic origin on captive *Macaca mulatta* mitochondrial DNA variation[J]. Comp Med, 2004, 54(2):193-201.
- [11] Hadfield RM, Pullen JG, Davies KF, et al. Toward developing a genome-wide microsatellite marker set for linkage analysis in the rhesus macaque (*Macaca mulatta*): identification of 76 polymorphic markers[J]. Am J Primatol, 2001, 54 (4):223-231.
- [12] 王中洲. 猕猴与科学实验[M]. 福州: 福建科学技术出版社, 1994:1-2.
- [13] Kanthaswamy S, Kou A, Smith DG. Population genetic statistics from rhesus macaques (*Macaca mulatta*) in three different housing configurations at the California National Primate Research Center[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2010, 49(5):598-609.
- [14] Kanthaswamy S, Kou A, Satkoski J, et al. Genetic character-

表2 福建亚种猕猴不同个体的微卫星 DNA 多态性分布信息

Table 2 DNA polymorphic microsatellites analysis among individual <i>Macaca mulatta littoralis</i>																												
基因位点	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
D21S1246	5	5	5	6	6	13	2	6	5	2	4	10	6	6	5	1	2	1	6	2	3	4	1	6	9	10	13	12
D7S513	5	5	9	6	6	13	5	8	5	11	8	10	6	6	5	7	8	1	6	2	3	4	8	13	9	10	13	12
D6S493	8	1	7	2	6	6	3	4	3	8	6	3	4	9	7	7	7	3	4	4	5	7	6	4	6	6	2	2
D6S493	8	1	7	6	6	6	7	4	7	8	6	10	11	9	7	7	7	7	9	4	9	7	9	8	8	6	7	5
D5S820	5	7	2	1	5	4	3	2	6	2	3	4	3	3	5	2	7	5	3	8	6	8	4	2	3	4	2	3
D5S820	7	9	6	4	5	4	7	6	6	2	5	5	6	8	10	6	7	5	5	11	6	8	7	2	3	4	2	3
D14S255	2	2	2	1	3	3	3	3	3	3	5	1	3	3	2	3	2	2	3	3	3	3	7	7	1	1	3	3
D14S255	2	2	2	5	5	3	3	3	4	5	5	3	6	3	4	3	2	3	8	7	7	7	8	7	1	4	8	2
D10S611	9	8	7	8	8	6	9	3	7	7	7	8	5	7	4	8	4	4	7	5	4	1	4	2	2	2	4	2
D10S611	9	8	7	8	8	6	9	7	7	7	7	8	8	7	7	8	4	8	7	5	4	4	7	3	3	2	4	5
D2S1333	3	7	2	7	5	6	4	2	8	7	2	3	4	6	4	10	3	3	3	8	10	2	3	3	2	4	1	2
D2S1333	3	7	6	7	5	6	7	5	8	7	8	3	4	6	8	10	7	9	8	8	10	5	3	7	8	4	4	7
D2S1333	6	6	9	2	4	5	5	3	9	7	6	1	6	3	8	2	3	4	1	1	1	2	3	8	8	8	6	4
D2S146	6	6	14	6	9	8	8	6	9	13	10	1	12	6	12	11	3	4	4	2	5	6	3	10	14	13	8	14
D2S146	1	5	1	3	1	1	1	1	1	4	3	1	5	7	2	1	5	3	2	3	8	5	2	5	2	1	5	3
D11S2002	1	5	4	3	3	1	1	4	7	4	3	1	5	7	6	9	5	3	2	2	8	5	2	9	9	5	8	3
D11S2002	3	3	3	3	1	1	2	3	4	4	3	5	4	4	2	6	3	4	3	4	2	8	1	4	4	4	2	6
D16S403	3	4	3	3	4	3	4	6	4	4	3	5	4	4	2	6	4	6	6	4	4	1	1	4	4	6	5	6
D16S403	3	2	1	7	1	1	3	6	7	6	7	7	7	10	7	8	7	3	8	8	9	1	1	4	6	2	7	10
D9S934	7	7	5	7	1	9	7	6	7	6	7	7	7	10	10	8	7	3	8	8	9	6	5	10	11	2	7	10
D9S934	5	3	2	2	2	1	2	1	1	1	1	2	1	1	2	1	3	6	3	3	2	4	5	1	1	1	1	1
D9S934	5	3	4	3	3	1	2	1	3	1	1	2	1	2	2	3	3	6	6	3	6	4	5	2	2	3	2	2
DXS6810	6	5	4	4	3	5	4	4	4	4	5	6	4	6	5	1	2	6	7	8	8	7	8	4	4	5	4	4
DXS6810	8	7	4	7	3	5	4	4	6	4	8	10	8	6	5	6	6	6	6	7	8	7	8	8	8	9	7	8
D9S252	3	2	3	2	2	2	3	3	2	1	2	2	1	2	1	1	2	1	1	2	1	1	1	5	4	1	4	2
D9S252	3	4	3	3	2	3	3	7	4	2	2	3	1	2	1	4	2	1	3	2	3	2	1	5	4	6	4	5
D1S207	9	9	7	2	6	2	6	4	1	1	1	5	2	7	6	7	9	3	3	6	9	4	3	13	7	9	5	10
D1S207	9	13	11	6	6	8	10	4	5	5	7	10	5	10	6	7	10	3	3	10	9	8	12	13	12	14	15	15
D18S537	3	2	2	1	1	2	2	3	5	2	7	3	6	3	4	6	3	2	5	5	2	2	3	2	1	3	4	5
D18S537	3	2	2	1	1	5	2	3	5	6	7	7	6	6	4	6	6	4	5	5	4	4	3	2	2	3	4	5
D7S503	11	11	15	5	5	5	7	6	6	8	9	8	5	5	2	2	2	1	2	1	4	5	3	10	12	12	9	10
D7S503	11	16	15	12	14	9	7	14	9	12	13	13	5	5	5	6	6	6	8	8	8	5	3	10	12	12	13	10
D6S311	3	2	2	1	2	2	3	3	8	3	1	2	2	3	3	3	3	3	5	2	7	2	8	3	2	2	4	2
D6S311	6	2	3	2	3	7	3	3	8	3	4	5	3	4	4	6	3	6	5	4	7	6	8	5	5	5	4	2
D1S548	1	1	1	3	2	3	3	4	2	1	3	4	4	4	4	4	2	2	4	4	4	3	2	1	1	1	1	1
D1S548	1	1	3	3	2	3	4	4	4	3	5	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	3	2	1	2	1	1	2
D3S1768	4	3	3	3	3	6	2	4	5	3	2	3	2	2	3	5	1	5	6	3	6	3	5	5	5	10	10	6
D3S1768	8	4	7	3	3	6	4	6	6	7	2	3	6	6	9	5	1	5	10	8	6	3	11	5	5	10	10	6
D21S1246	5	6	3	4	7	12	11	10	7	10	4	12	13	5	9	6	8	9	7	8	4	6	3	2	1	6	4	1
D21S1246	5	6	7	10	7	12	11	10	7	10	9	12	13	13	13	13	12	8	9	7	8	10	11	10	2	6	4	4

注: 位点 D21S1246 的第一只猴的等位基因位置为第五个等位基因(纯合子 5/5), 第三只猴的等位基因位置为第五和第九个等位基因(杂合子 5/9)

表 3 福建亚种猕猴群体 20 个微卫星位点的等位基因频率信息
Table 3 Frequency of alleles information at 20 microsatellite loci of *Macaca mulatta littoralis* population

基因位点	等 位 基 因 频 率															
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P
DD21S1246	0.0714	0.0893	0.0357	0.0536	0.1786	0.2143	0.0179	0.0713	0.0536	0.0714	0.0179	0.0357	0.0893			
DD7S513	0.0357	0.0536	0.0714	0.1250	0.0357	0.1964	0.2500	0.1071	0.0893	0.0179	0.0179					
DD6S4934	0.0357	0.1607	0.1607	0.1250	0.1607	0.1250	0.1071	0.0714	0.0179	0.0179	0.0179					
DD5S820	0.0893	0.2500	0.3571	0.0536	0.0893	0.0178	0.0893	0.0536								
DD14S255	0.0178	0.0893	0.0536	0.1786	0.0714	0.0357	0.2679	0.2143	0.0714					0.0536		
DD10S611	0.0178	0.1071	0.1786	0.1250	0.0714	0.0893	0.1786	0.1429	0.0179	0.0714						
DD2S1333	0.0893	0.0714	0.1071	0.0893	0.0536	0.1964	0.0179	0.1250	0.0714	0.0357	0.0179	0.0357	0.0357			
DD2S146	0.2500	0.1071	0.1964	0.0714	0.1964	0.0179	0.0536	0.0536								
DD11S2002	0.1071	0.0714	0.2321	0.3929	0.0536	0.1429										
DD16S403	0.1071	0.0536	0.0714	0.0180	0.0357	0.1071	0.3214	0.1071	0.0536	0.1071	0.0179				0.0357	
DD9S934	0.3214	0.2678	0.2143	0.0536	0.0893	0.0536										
DDXS6810	0.0179	0.0179	0.0357	0.2679	0.1071	0.1786	0.1250	0.2143	0.0179	0.0177					0.0179	0.0179
DD9S252	0.2500	0.3214	0.2143	0.1250	0.0536	0.0179	0.0178							0.0178	0.0357	
DD1S207	0.0536	0.0536	0.0893	0.0536	0.0893	0.1250	0.1071	0.0357	0.1250	0.1071	0.0179	0.0357	0.0536	0.0357		
DD18S537	0.0893	0.2500	0.1964	0.1250	0.1607	0.1250	0.0536									
DD7S503	0.0357	0.0714	0.0357	0.0179	0.1786	0.0893	0.0357	0.0893	0.0714	0.0714	0.0536	0.1071	0.0536			
DD6S311	0.0357	0.2500	0.3214	0.0714	0.1071	0.0893	0.0536	0.0715								
DD1S548	0.2500	0.1607	0.1964	0.3750	0.0179											
DD3S1768	0.0357	0.1071	0.2321	0.0714	0.1786	0.1786	0.0357	0.0357	0.0179	0.0893	0.0179					
DD6S2741	0.0357	0.0357	0.0357	0.1071	0.0536	0.1250	0.1250	0.0714	0.0714	0.1250	0.0536	0.0893	0.0715			

表 4 福建亚种猕猴群体 20 个微卫星位点的遗传多态性

Table 4 The genetic diversity measured at 20 microsatellite loci of *Macaca mulatta littoralis* population

基因位点	DNA 片段 (bp)	等位基因 数 Na	有效等位 基因数 Ne	期望杂 合度 He	观察杂 合度 Ho	香隆信息 指数 I	多态信息含量 PIC	χ^2	P
D21S1246	380-432	13	8.4757	0.8981	0.3214	2.3300	0.8714	272.9056	0.0000
D7S513	204-224	11	6.7879	0.8682	0.4643	2.1083	0.8369	141.5563	0.0000
D6S493	256-324	11	7.8400	0.8883	0.5714	2.1637	0.8589	77.9793	0.0225
D5S820	179-207	8	4.5449	0.7942	0.5714	1.7469	0.7519	33.8558	0.2057
D14S255	197-215	9	5.8074	0.8429	0.3214	1.9310	0.8065	156.2335	0.0000
D10S611	172-208	10	7.6863	0.8857	0.4643	2.1290	0.8559	114.6791	0.0000
D2S1333	270-334	14	9.8000	0.9143	0.7500	2.4417	0.8896	110.6286	0.0792
D2S146	193-211	9	6.0541	0.8500	0.3571	1.9560	0.8146	105.9878	0.0000
D11S2002	256-276	6	4.0308	0.7656	0.3571	1.5687	0.7177	59.0087	0.0000
D16S403	150-176	11	6.1732	0.8532	0.3571	2.0869	0.8231	147.2810	0.0000
D9S934	189-213	6	4.2609	0.7792	0.4643	1.5770	0.7283	63.8355	0.0000
DXS6810	171-207	10	5.5801	0.8357	0.5000	1.8964	0.7973	104.7952	0.0000
D9S252	241-269	7	4.3315	0.7831	0.4643	1.6020	0.7328	43.2787	0.0029
D1S207	127-159	15	11.6148	0.9305	0.6786	2.5578	0.9074	147.3452	0.0041
D18S537	154-178	7	5.9170	0.8461	0.3214	1.8524	0.8091	94.7588	0.0000
D7S503	133-173	16	11.4453	0.9292	0.6071	2.5963	0.9064	310.2500	0.0000
D6S311	235-253	8	5.0096	0.8149	0.5000	1.8192	0.7754	83.4196	0.0000
D1S548	188-204	5	3.7333	0.7455	0.3214	1.3998	0.6862	33.5676	0.0002
D3S1768	190-238	11	6.8174	0.8688	0.4286	2.0986	0.8369	139.9780	0.0000
D6S2741	257-285	13	10.6650	0.9253	0.3929	2.4709	0.9015	224.9673	0.0000
$\bar{x} \pm s$		10.000 $\pm$ 3.1119	6.8438 $\pm$ 2.4905	0.8509 $\pm$ 0.0564	0.4607 $\pm$ 0.1247	2.0166 $\pm$ 0.3463	0.8154 $\pm$ 0.0665		

ization of specific pathogen-free rhesus macaque (*Macaca mulatta*) populations at the California National Primate Research Center (CNPRC) [J]. Am J Primatol, 2010, 72(7): 587-599.

[15] Kanthaswamy S, Satkoski J, George D, et al. Interspecies hybridization and the stratification of nuclear genetic variation of rhesus (*macaca mulatta*) and long-tailed macaques (*macaca fascicularis*)[J]. Int J Primatol, 2008, 29(5):1295-1311.

[16] 李瑞生, 李晓娟, 高蓉, 等. 食蟹猴微卫星 DNA 标记遗传监测及多态性分析[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(8): 27-30.

[17] Nurnberg P, Sauermann U, Kayser M, et al. Paternity assessment in rhesus macaques (*Macaca mulatta*): multilocus DNA fingerprinting and PCR marker typing[J]. Am J Primatol, 1998, 44(1):1-18.

[18] Xu YR, Li JH, Zhu Y, et al. Development of a microsatellite set for paternity assignment of captive rhesus macaques (*Macaca mulatta*) from Anhui province, China [J]. Genetika, 2013, 49(7):838-845.

Analysis on Genetic Diversity of *Macaca mulatta littoralis* by Using Microsatellite DNA Markers

ZHOU Jian-hua¹, LI Zhi-xiong², YANG Yan-yan¹, XIE Jin-dong¹, YU Chun-ying¹, WANG Xun-li¹

(1. Laboratory Animal Center, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, China;

2. Fujian Research Institute of Family Planning, Fuzhou 350011, China)

[Abstract] Objective To analyze the genetic diversity of *Macaca mulatta littoralis* and providing basic data for genetic quality monitoring methods of the population. **Methods** Twenty-eight *Macaca mulatta littoralis* were genotyped by using 20 microsatellite DNA markers, DNA was extracted from blood and amplified by PCR, and PCR products were analyzed by non-modified polyacrylamide gel electrophoresis. Every microsatellite locus was calculated by software POPGENE 1.32 and Excel. **Results** All 20 microsatellite loci were highly polymorphic, 200 alleles were found in the population. The number of alleles (Na), effective number of alleles (Ne), expected heterozygosity (He), observed heterozygosity (Ho), Shannon's information index (I) and polymorphism information content (PIC) were ranged from 5 to 16, 3.7333 to 11.6148, 0.7455 to 0.9305, 0.3214 to 0.7500, 1.3998 to 2.5963, and 0.6862 to 0.9074, with an average of 10, 6.8438, 0.8509, 0.4607, 2.0166 and 0.8154, respectively. All of 17 loci showed significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium. **Conclusions** There are high genetic diversity in *Macaca mulatta littoralis* of this colony. The experiments can provide a theoretical foundation for establishing genetic quality monitoring method with specific microsatellite loci.

[Key words] Microsatellite marker; *Macaca mulatta littoralis*; Genetic diversity

近交系长爪沙鼠生化标记遗传监测方法的建立及其应用

李 迎^{1,3}, 陈振文², 马兰芝¹, 尚世臣¹, 尚玉璞¹,

赵 权³, 李桂军¹, 崔晓霞¹, 王冬平¹, 杜小燕²

(1. 军事科学院军事医学研究院实验动物中心, 北京 100071;

2. 首都医科大学实验动物科学部, 北京 100069;

3. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118)

[摘要] 目的 建立近交系长爪沙鼠生化标记遗传检测方法, 开展对长爪沙鼠脑缺血模型 CMU/1 和 CMU/2 近交系的纯合度进行分析, 为判定其遗传状况提供依据。方法 采用醋酸纤维板电泳法, 选 26 个生化标记进行近交系长爪沙鼠各组织器官样品电泳, 参考前期方法优化最佳电泳条件, 并对样品处理和染色的方法进行一定的改良后; 针对 F21~23 代 77 只 CMU/1 和 44 只 CMU/2 近交系动物 26 个生化标记的纯合度进行检测。结果 在 2 个近交系长爪沙鼠共 121 只动物中均能成功检测到 26 个生化标记。其中有 24 个位点在 CMU/1 和 CMU/2 品系内和品系间均显示单态性, 但是 Es-3 和 Es-4 位点在 2 个品系间有差异。结论 建立了长爪沙鼠近交系生化标记遗传检测方法; 确定近交系 CMU/1 和 CMU/2 动物 26 个生化标记, 其纯合度达到 100%, 说明 2 个近交品系符合近交系动物的标准(GB14923-2010)。

[关键词] 长爪沙鼠; 近交系; 脑缺血模型; 生化位点标记; 遗传监测

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)06-0442-06

长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus*)又名长爪沙土鼠、蒙古沙鼠(*Mongolian gerbil*)等, 隶属哺乳纲, 啮齿目, 鼠科, 沙鼠亚科, 沙鼠属。野生型沙鼠主要分布在我国西北、华北及蒙古的干旱和半干旱地区的草原地带^[1]。由于长爪沙鼠具有特殊的生物学特性, 自 1960 年代开始作为实验动物应用于医学研究之中^[2]。目前在美国、日本和欧洲都有商品化的封

闭群动物出售, 美国加州大学已育成两个近交品系: WJL/uc(癫痫发作易感型)和 STR/uc(癫痫发作抵抗型)^[3], 日本也报道了育成癫痫品系 MGS/ldr 和保有 MGS/Sea、Mon/JmsGbs、KWL、Hos 等 4 个品系^[4]。在我国, 首都医科大学从 2009 年开始了长爪沙鼠脑缺血模型近交系的培育, 现已培育至第 23 代, 成功获得了近交系 2 个支系, 按照近交系动物的命名原则^[5], 分别命名为 CMU/1(Capital Medical University 首字母大写)和 CMU/2, 但这 2 个品系的遗传状况如何尚未阐明。依据报道^[6]的长爪沙鼠遗传生化标记位点多态性资料, 本研究通过优化 26 个位点和实验条件建立长爪沙鼠近交系生化标记遗传检测方法, 并对 CMU/1 和 CMU/2 两个脑缺血模型近交系动物的纯合度进行评价, 监测近交系基因纯合度, 为长爪沙鼠近交系遗传检测提供方法, 也为该品系动物提供遗传背景资料。

[收稿日期] 2017-08-10

[基金项目] 国家科技支撑计划课题(2015BAI09B01-04)

[作者简介] 李 迎(1993-), 女, 硕士, 研究方向: 实验动物生物学特性研究。651998038@qq.com

[通讯作者] 王冬平(1964-), 女, 副研究员, 研究方向: 实验动物生物学特性研究。E-mail: Wangdp6493@126.com
杜小燕(1971-), 女, 副教授, 研究方向: 实验动物遗传与发育。E-mail: duduyan@ccmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级3~4月龄CMU/1近交系长爪沙鼠77只(雌26,雄51),CMU/2近交系长爪沙鼠44只(雌28,雄16),F21~23代,由首都医科大学实验动物部提供,实验动物自由采食和饮水,室温为20~24℃[SYXK(京)-2013-0005]。本实验通过首都医科大学实验动物和动物实验伦理委员会批准(No.AEEI-2017-032)。

1.2 仪器设备及试剂

低温高速冷冻离心机(CF16RX)、DYY-III-6B稳压稳流电泳仪、DYY-III-38B电泳槽、DYY-I玻璃组织匀浆机、脱色摇床(GFL3018)、超级加样器(WD-9404)、醋酸纤维板均购于北京六一仪器厂;染色试剂均来自于美国Sigma公司;常规生化试剂为分析纯。大、小鼠遗传检测参考品购于中国食品药品检定研究院。

1.3 样品的制备

1.3.1 血清、血浆、溶血素 眼眶静脉取血,质量分数1%的肝素抗凝血及全血(不少于150 μL),静止30 min,5 000 r/min离心10 min制备血清,制备抗凝血备用。血细胞加入蒸馏水(1:0.5),震荡制备溶血素。

1.3.2 脏器匀浆制备 动物颈椎脱臼处死,取心脏、肺脏、肾脏、睾丸,放入5 mL EP管中,按1:1的比例添加蒸馏水,用组织匀浆机研磨,置于低温高速离心机10 000 r/min离心60 min,吸取上清液置-20℃冰箱保存备用。

1.4 生化基因位点

26个生化基因位点:葡萄糖-6-磷酸脱氢酶-1(Gpd-1)、酯酶-3(Es-3)、碳酸酐酶-2(Car-2)、碱性磷酸酶-1(Akp-1)、异柠檬酸脱氢酶-1(Idh-1)、苹果酸酶-1(Mod-1)、磷酸葡萄糖转位酶-1(Pgm-1)、肾过氧化氢酶-2(Ce-2)、肽酶-3(Pep-3)、葡萄糖磷酸异构酶-1(Gpi-1)、血红蛋白-β链(Hbb)、转铁蛋白(Trf)、酯酶-1(Es-1)、酯酶-10(Es-10)、甘油磷酸脱氢酶-1(Gdc-1)、β-葡萄糖苷酸酶-1(Gus-1)、酯酶-2(Es-2)、乳酸脱氢酶调节体-1(Ldr-1)、血清蛋白-1(Sep-1)、淀粉酶-1(Amy-1)、酯酶-6(Es-6)、酯酶-8(Es-8)、酯酶-9(Es-9)、酯酶-4(Es-4)、过氧化氢酶-1(Cs-1)、酯酶-12(Es-12)。

1.5 电泳条件及染色方法

见表1。

2 结果

2.1 检测方法的优选

通过26个遗传生化标记位点进行电泳分析,电压和时间参照文献报道^[7]进行调整,优化出了长爪沙鼠近交系动物的遗传生化标记的检测条件(表1)。对脏器器官进行了优选,Gpd-1、Gdc-1、Gus-1、Amy-1也可选择肾脏,与肝脏得到一致的结果(图1)。其次根据电泳结果对染色试剂量和比例进行确定,比如Gpd-1染色法:染色试剂0.5 mol,葡萄糖-6-磷酸300 μL,质量分数1%噻唑蓝(MTT)150 μL,质量分数0.25%吩嗪硫酸甲脂(PMS)150 μL,质量分数1%三磷酸吡啶核苷酸(TPN)150 μL,优选为0.5 mol/L葡萄糖-6-磷酸900 μL,质量分数1%MTT 450 μL,质量分数0.25%PMS 450 μL,质量分数1%TPN 450 μL。依此我们对26个位点的检测条件优化后各位点均成功检出,建立了近交系长爪沙鼠26个遗传生化标记检测方法。

2.2 CMU/1和CMU/2生化标记

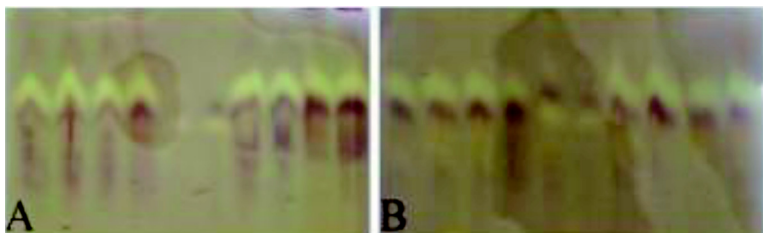
从表2可见,有24个位点在两个近交系内所有个体和两个近交系间电泳表型一致,均呈单态性,未见杂合型与多态性位点。例如:Es-1、Gpi-1、Es-10、Mod-1、Idh-1等每个位点的基因型与相应的大、小鼠参考品电泳图谱进行比对,根据蛋白质和同工酶的泳动快、慢、一致或状态来确定脑缺血长爪沙鼠26个生化位点标记,用小写的英文字母标识(图2~3)。而Es-3和Es-4位点在2个近交系间电泳图带型表现不一致(图4)。

3 讨论

生化标记分析是国家标准中规定的一种近交系大、小鼠遗传质量检测方法^[8],它是利用不同的或变异的蛋白质和同工酶经电泳后所泳动的距离不同而判定是否动物基因型出现了差异,进而对近交系动物的纯合度进行评价。同工酶是生物体内代谢过程中重要的调节酶类,不同的个体、组织器官、发育阶段或外界环境不同都可能产生同工酶上的差异,具有多态性和共显性,能直接反映蛋白质水平差异。生化标记分析不仅方法简便、灵敏度

表 1 脑缺血沙鼠同工酶和蛋白质的电泳条件

Table 1 The information of the isozymes and proteins electrophoresis for ischmenia-prone gerbils detection						
位点名称	靶器官样品	电压 /V	时间 /min	方向	缓 冲 液	染(显)色法
Gpd-1	肾匀浆	200	50	- → +	Tris-Glycine pH8.9	琼脂覆盖法
Es-3	肾匀浆	200	50	- → +	Tris-Glycine pH8.9	琼脂覆盖法
Car-2	溶血素	240	40	+ → -	NaC2H3O2-EDTA pH5.4	蛋白染色法
Akp-1	肾匀浆	200	40	- → +	Tris-Citrate pH8.3	琼脂覆盖法
Idh-1	肾匀浆	200	35	- → +	Tris-Citrate pH7.6	琼脂覆盖法
Mod-1	肾匀浆	200	35	- → +	Tris-Citrate pH7.6	琼脂覆盖法
Pgm-1	肾匀浆	200	40	- → +	Tris-Glycine pH8.5	琼脂覆盖法
Ce-2	肾匀浆	200	25	- → +	Tris-Citrate pH7.6	琼脂覆盖法
Pep-3	肾匀浆	200	30	- → +	Tris-Glycine pH8.5	琼脂覆盖法
Gpi-1	溶血素	200	30	+ → -	Tris-Glycine pH8.5	琼脂覆盖法
Hbb	溶血素	200	30	- → +	Tris-Glycine pH8.5	蛋白染色法
Trf	血浆	200	30	- → +	Tris-Glycine pH8.5	蛋白染色法
Es-1	血清	140	30	- → +	Phosphate buffer pH7.0	琼脂覆盖法
Es-10	肺匀浆	200	35	- → +	Tris-EDTA-Borate pH8.4	琼脂覆盖法
Gdc-1	肾匀浆	200	30	- → +	Tris-H ₃ BO ₃ -Na ₂ HPO ₄ -EDTA pH8.0	琼脂覆盖法
Gus-1	肾匀浆	200	60	- → +	EDTA-NaAc pH5.4	琼脂覆盖法
Es-2	肾匀浆	140	30	- → +	Phosphate buffer pH7.0	琼脂覆盖法
Ldr-1	溶血素	200	40	- → +	Tris-Citrate pH8.3	琼脂覆盖法
Sep-1	血浆	250	30	- → +	Tris-giy pH8.5	蛋白染色法
Amy-1	肾匀浆	300	30	- → +	Tris-EDTA-Borate pH8.4	蛋白染色法
Es-6	睾丸匀浆	200	35	- → +	Tris-EDTA-Borate pH8.4	琼脂覆盖法
Es-8	睾丸匀浆	200	35	- → +	Tris-EDTA-Borate pH8.4	琼脂覆盖法
Es-9	睾丸匀浆	200	35	- → +	Tris-EDTA-Borate pH8.4	琼脂覆盖法
Es-4	肾匀浆	200	35	- → +	Tris-EDTA-Borate pH8.4	琼脂覆盖法
Cs-1	溶血素	250	40	- → +	Tris-EDTA-Borate pH8.4	琼脂覆盖法
Es-12	心匀浆	150	60	- → +	Borate pH8.6	琼脂覆盖法



A: 肝脏; B: 肾脏

图 1 Gdc-1 不同脏器的电泳图谱

Figure 1 The results of electrophoresis patterns for locus Gdc-1 from different tissues

高，而且快速准确、经济有效，是分子生物学检测方法的一种良好的补充方法，因此在研究生物群体的遗传结构和近交系动物的一致性检验方面应用广泛^[9]。与此同时，生化标记有其局限性，一定程度受所选用酶的种类和数量的限制而使结果发生偏差，在种内同工酶分析需要较多的遗传变异和检

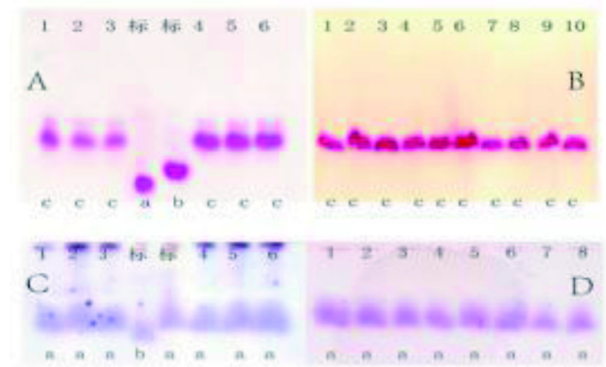
测的基因组存在足够的等位酶标记，物种的进化发育、遗传变异，某种程度上对生化标记的检测存在影响^[10]。

本文根据已发表的方法对脑缺血近交系长爪沙鼠 26 个生化标记进行分析，优化电泳条件，改良样品制备和染色方法来确立生化标记检测方法，使

表 2 CMU/1 与 CMU/2 生化标记位点比较

Table 2 Comparison of biochemical marker loci between CMU/1 and CMU/2

位点	CMU/1	CMU/2
Gpd-1	c	c
Es-3	b	d
Car-2	c	c
Akp-1	a	a
Idh-1	c	c
Mod-1	a	a
Pgm-1	c	c
Ce-2	a	a
Pep-3	d	d
Gpi-1	a	a
Hbb	e	e
Trf	c	c
Es-1	c	c
Es-10	c	c
Gdc-1	c	c
Gus-1	c	c
Es-2	d	d
Ldr-1	b	b
Sep-1	c	c
Amy-1	b	b
Es-6	a	a
Es-8	c	c
Es-9	c	c
Es-4	c	d
Cs-1	b	b
Es-12	a	a



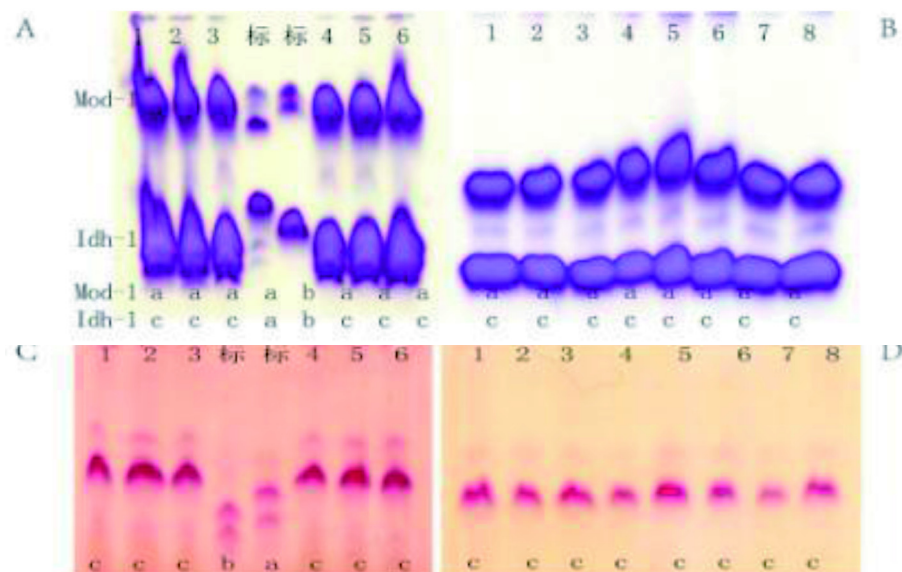
数字是动物编号，“标”是小鼠参考品，下表同；

A: Es-1 带参考图谱, CMU/1(1~3), 小鼠参考品(编号 1 和 2), CMU/2(4~6); B: Es-1 样品图谱, CMU/1(1~6), CMU/2 (7~10); C: Gpi-1 带参考图谱, CMU/1(1~3), 小鼠参考(编号 3 和 4), CMU/2(4~6); D: Gpi-1 样品图谱, CMU/1(1~5), CMU/2(6~8)

图 2 Es-1 和 Gpi-1 的电泳图谱

Figure 2 The results of electrophoresis patterns of loci Es-1 and Gpi-1

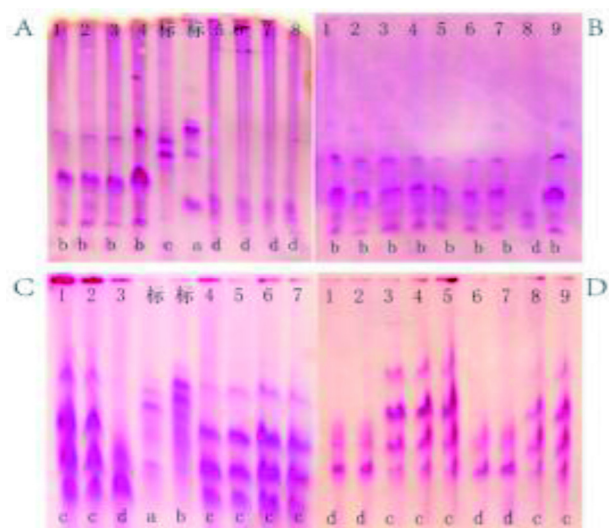
26 个生化标记电泳图谱清晰呈现, 部分位点增添肾脏组织样品, 有助于今后近交系长爪沙鼠遗传检测标准制备提供参考。但是生化标记遗传检测方法目前使用的醋酸纤维板为国产的, 板的均衡程度有差异, 每个样品含同工酶和蛋白的浓度不一样, 电泳点样器加样量, 电压的稳定等的差异, 会出现



A: Mod-1 和 Idh-1 带参考图谱, CMU/1(1~3), 小鼠参考 6 和 7, CMU/2(4~6); B: Mod-1 和 Idh-1 样品图谱, CMU/1(1~5), CMU/2(6~8); C: Es-10 带参考图谱, CMU/1(1~3), 大鼠参考 13 和 15, CMU/2(4~6); D: Es-10 样品图谱, CMU/1(1~5), CMU/2(6~8)

图 3 Mod-1、Idh-1 和 Es-10 的电泳图谱

Figure 3 The results of electrophoresis patterns of loci Mod-1, Idh-1 and Es-10



A: Es-3 带参考图谱, CMU/1(1~4), 小鼠参考 5 和 6, CMU/2(5~8); B: Es-3 样品图谱, CMU/1(1~7,9), CMU/2(8); C: Es-4 带参考图谱, CMU/1(1~2, 4~7), 大鼠参考 5 和 6, CMU/2(4); D: Es-4 样品图谱, CMU/1(3~5,8~9), CMU/2(1, 2, 6, 7)。

图 4 Es-3 和 Es-4 电泳图谱

Figure 4 The results of electrophoresis patterns of loci Es-3 and Es-4

不一致的结果, 需要重复实验来综合判断。比如: 文中 *Idh-1* 的 B 图出现的现象, 没有出现阶梯式的快慢, 并且 CMU/2 的 6~7 号样品与 A 图 CMU/2 的 4~5 号是同一份样品, 因此判断为直线。本研究为长爪沙鼠近交系动物的遗传生化标记提供方法和参考对照。

近交系动物最基本的特征是遗传基因高度纯合、表型一致^[11]。生化标记在品种鉴定、传变异性、遗传纯度检测、构建指纹图谱以及探讨基因的进化等方面都有着广泛的应, 也是新品系背景资料不可缺少的。本研究中近交系长爪沙鼠 CMU/1 和 CMU/2 的 26 个生化位点标记在品系内电泳表型一致, 说明这 2 个近交系动物在上述位点均已纯合, 已选的 26 个生化标记纯合度达到 100%。选择的样品动物为近交繁育的 F21~23 代, 参考国家标准哺乳类实验动物的遗传质量控制的标准, 从生化位点的纯合度判断两个长爪沙鼠的遗传质量符合近交系动物的遗传标准。但有 2 个生化标记位点在 CMU/1 和

CMU/2 两个品系间图带不一致, 说明 2 个近交系有一定的遗传差异。因此, 建立 CMU/1 和 CMU/2 近交系沙鼠 26 个遗传生化位点标记十分必要, 为确定该品系的特性、一致性和稳定性具有重要意义, 为近交系的鉴定提供理论依据, 标记方法在前人基础上更加系统化。下一步我们还需要应用基因水平的遗传检测方法如微卫星 DNA^[12]或者单核苷酸多态性(SNP)^[13]进一步对这两个品系进行遗传分析, 结合本实验蛋白水平的检测结果指导育种工作。

参考文献:

- [1] 卢耀增. 实验动物学[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995:212-214.
- [2] 李长龙, 杜小燕, 陈振文. 长爪沙鼠资源开发利用进展[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(6):106-109.
- [3] Fujisawa N, Maeda Y, Yamamoto Y, et al. Newly established low seizure susceptible and seizure-prone inbred strains of Mongolian gerbil[J]. Exp Anim, 2003, 52(2):169-172.
- [4] 丁贤明, 钱宝珍, Junichiro M, 等. 长爪沙鼠的遗传多样性分析[J]. 遗传, 2008, 30(7):877-884.
- [5] GB 14923-2010. 实验动物 哺乳类实验动物的遗传质量控制[S].
- [6] 陈振文, 赵太云, 孙贺娟, 等. 微卫星 DNA 与生化标记分析对长爪沙鼠群体遗传分析的比较[J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(4):276-279.
- [7] 孙贺娟, 王东平, 王钊, 等. 长爪沙鼠生化基因位点检测方法的建立[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(4):211-213
- [8] GB/T 14927.1-2008. 实验动物近交系小鼠、大鼠生化标记检测法[S].
- [9] 葛颂, 洪德元. 遗传多样性及其检测方法, 生物多样性研究原理和方法[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [10] 宋国华. 遗传标记在实验动物遗传质量控制中的应用[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2011:45-55.
- [11] 刘秀英, 胡怡秀, 黄跃龙, 等. 近交系大、小鼠遗传检测方法研究进展[J]. 实用预防医学, 2008, 15(6):1993-1996.
- [12] Du XY, Li W, Sa XY, et al. Selection of an effective microsatellite marker system for genetic control and analysis of gerbil populations in China[J]. Genet Mol Res, 2015, 14(3):11030-11042.
- [13] Takagi Y, Matsuda H, Taniguchi Y, et al. Predicting the phenotypic values of physiological traits using SNP genotype and gene expression data in mice[J]. PLoS One, 2014, 9(12):e115532.

Establishment and Application of Genetic Monitoring Methods for Inbred Gerbil by Biochemical Markers

LI Ying^{1,3}, CHEN Zhen-wen², MA Lan-zhi¹, SHANG Shi-chen¹, SHANG Yu-pu¹,

ZHAO Quan³, LI Gui-jun¹, CUI Xiao-xia¹, WANG Dong-ping¹, DU Xiao-yan²

(1. Laboratory Animal Center, Military Medical Sciences, Military Academy, Beijing 100071, China;

2. Department of Laboratory Animal Science, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

3. College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

[Abstract] Objective To establish genetic monitoring method by biochemical markers for inbred gerbils and apply it in analyzing the homogenous of the ischemia-prone inbred gerbil lines CMU/1 and CMU/2. **Methods** Twenty-six biochemical marker loci were selected to perform cellulose acetate fiber electrophoresis for several kinds of gerbil tissues by optimum electrophoresis conditions referred to previous report and optimized the sample treatment and staining method. Then these methods were used in detecting homogeneous of 2 inbred lines CMU/1 (77 gerbils) and CMU/2 (44 gerbils) genetic quality involved generation F21-F23. **Results** All of 26 biochemical marker loci could be detected successfully in both inbred gerbil of 121 gerbils. Thereinto, 24 loci exhibited monomorphism within and between CMU/1 and CMU/2. However, the loci Es-3 and Es-4 showed polymorphism between two strains. **Conclusion** The biochemical marker method for genetic monitoring of inbred gerbil has been successfully established. The 26 biochemical marker loci for inbred gerbil strain CMU/1 and CMU/2 has been confirmed which homogeneous reached to 100%. These data indicated that two inbred strains match the standard of inbred laboratory animals (GB14923-2010).

[Key words] Gerbil; Inbred strain; Ischemia model; Biochemical marker locus; Genetic monitoring

兔斯氏艾美耳球虫荧光定量 PCR 检测方法的建立

温福利, 郑和平, 党 源, 薛来恩, 张诗兰
(南京军区福州总医院比较医学科, 福州 350025)

[摘要] 目的 建立荧光定量PCR检测兔斯氏艾美耳球虫的方法。方法 根据斯氏艾美耳球虫(内转录间隔区 1)ITS1 序列区设计特异性引物, 构建重组质粒, 并作为标准品绘制标准曲线, 对建立的荧光定量 PCR 检测方法进行特异性、敏感性和重复性试验。结果 建立的荧光定量 PCR 能特异性地检测兔斯氏艾美耳球虫, 且可检测到含一个卵囊 DNA 的样本。该方法的重复性较好, 组内、组间重复试验的变异系数均小于 2%。结论 建立了一种特异性好、敏感度高、可靠的检测兔斯氏艾美耳球虫荧光定量 PCR 方法。

[关键词] 兔斯氏艾美耳球虫; 荧光定量 PCR; 检测

[中图分类号] S858.28 Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)06-0448-07

随着医学、生命科学等领域的快速发展, 实验兔在科研、教学中的应用越来越广, 实验兔的质量控制也愈受重视。兔球虫病是危害较严重的一种寄生虫病, 致病虫株的种类繁多, 其中寄生于肝脏的斯氏艾美耳球虫是致病性最高的种类之一^[1,2]。

兔球虫主要以饱和盐水漂浮法或直接压片法进行检测, 但费时费力, 存在漏检的可能。闫文朝等^[3]根据斯氏艾美耳球虫内转录间隔区 1,2(ITS1/2)序列超变区设计种特异引物, 建立了灵敏、特异的 PCR 检测方法。近年来, 实时荧光定量 PCR 技术因特异性好、可定量、高敏感性、重复性好、高通量等优点, 被广泛的应用于药物疗效考核、基因表达分析、转基因研究、病原体检测等诸多领域的定量及定性检测^[4,5]。樊翀宇等^[6]通过 TaqMan 探针法建立了 *E. Stiedai* 的荧光定量 PCR 检测方法, 目前未见斯氏艾美耳球虫 SYBR Green 实时荧光定量 PCR 检

测 *E.stiedai* 的报道。本研究利用实时荧光定量 PCR 技术建立一种科学、准确的斯氏艾美耳球虫分子生物学检测方法, 为兔球虫病的防治提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 虫种来源

斯氏艾美耳球虫(*E. stiedai*)、大型艾美耳球虫(*E. magna*)、肠艾美耳球虫(*E. intestinalis*)、黄艾美耳球虫(*E. falvenscens*)4 种兔艾美耳球虫卵囊均由中国农业大学索勋课题组提供。

1.2 主要试剂、仪器

SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒、DNA 胶回收试剂盒、植物基因组 DNA 快速抽提试剂盒、一步法快速感受态细胞制备试剂盒均购于上海生工生物有限公司。pMD[®] 18-T Vector、10 × PCR Buffer、DNA Marker 等均购于大连宝生物工程有限公司。SMA4000 微量分光光度计购自美国 Merinton 公司; HC-2518R 高速冷冻离心机购自安徽中科中佳仪器有限公司; PCR 反应扩增仪购自美国 BIO 公司; DYY-6C 型稳压稳流电泳仪购自北京六一; FR980 凝胶成像系统购自上海复日科技有限公司; StepOne 型荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司。

[收稿日期] 2017-10-26

[基金项目] 福建省科技计划引导性项目(2015Y0075)和南京军区福州总医院临床应用研究专项(2015L01)

[作者简介] 温福利(1987-), 男, 技师, 主要从事实验动物寄生虫学研究, E-mail: wen_fuli@163.com

[通讯作者] 郑和平(1962-), 男, 汉族, 教授, 主要从事比较医学研究, E-mail: zhpz@163.com

1.3 引物设计和 cDNA 的提取

用软件 Primer Premier 5.0 设计兔斯氏艾美尔球虫的 ITS1 区的引物, 即: F(5' → 3'): TGGCTTT-CGCCAACCAACAT, R(5' → 3'): CTGCCTGCG-CCAGTAGTAAC, 扩增片段 261 bp, 引物由上海生工生物有限公司合成。分别将 10⁶ 个卵囊和 2 000 个卵囊置于含磁珠的振荡器震荡 20 min, 然后按照植物基因组 DNA 快速抽提试剂盒说明书提取 DNA, -20 °C 保存。

1.4 质粒标准品的制备

1.4.1 目的基因的扩增及回收 以提取的 *E. stiedai* 卵囊 DNA 为模板, 利用设计的引物扩增目的片段。PCR 扩增反应体系为 25 μL, 反应条件为: 95 °C, 预变性 3 min; 94 °C, 变性 30 s; 57 °C, 退火 30 s; 72 °C, 延伸 30 s, 共 35 个循环, 72 °C 延伸 5 min。反应结束后, 取 5 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

1.4.2 构建重组质粒 将凝胶回收的 PCR 产物与 PMD-18T 载体连接, 并将其转入感受态大肠埃希菌 DH5α 中, 蓝白斑筛选出疑似克隆的白色菌落。将疑似克隆的菌落进行大量培养后, 使用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒提取重组质粒 DNA, 送上海生工生物公司进行测序, 把序列比对正确的阳性重组质粒作为实时荧光定量 PCR 反应用的标准品。

1.5 实时荧光定量 PCR 反应及定量标准曲线建立

实时荧光定量 PCR 反应以阳性重组质粒作为模板, 上、下游引物(10 μmol/L)各 0.4 μL, SybrGreen qPCR Master Mix(2 ×), 模板 DNA 1 μL, 补加双重蒸馏水至 20 μL。实时荧光定量 PCR 反应条件是: 95 °C, 预变性 3 min; 进行 45 个循环: 95 °C, 变性 15 s, 57 °C, 退火 20 s, 72 °C, 延伸 30 s。微量分光光度计测定阳性重组质粒的浓度, 计算质粒浓度的拷贝数量为 3.6 × 10⁸ 拷贝/μL, 将重组质粒进行 10 倍梯度稀释, 用于荧光定量 PCR 标准曲线的建立。

1.6 特异性、敏感性、重复性试验

对 1 个、5 个、10 个、25 个、50 个 *E. stiedai*, 以及 *E. magna*、*E. intestinalis* 和 *E. flsvescens* 的 DNA 分别为模板单独进行实时荧光定量 PCR 反应, 并用双蒸水作为阴性对照, 检验该方法的特异性和确定其最低检测限。用不同梯度的稀释液, 检测该方法的重复性, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

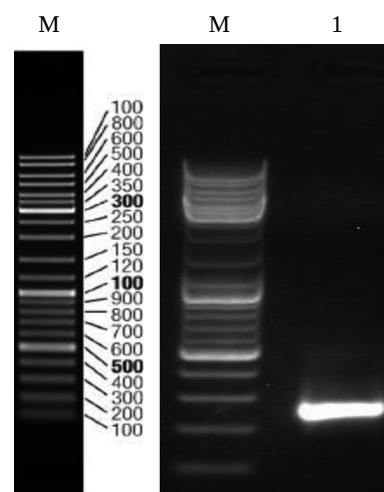
2 000 个 *E. stiedai* 卵囊的 DNA 提取液 20 μL

(原液), 按照下列方法进行稀释: 1 个卵囊 = DNA 原液(0.5 μL) + 稀释液(24.5 μL), 取混合液 0.5 μL 作 DNA 模板; 5 个卵囊 = DNA 原液(0.5 μL) + 稀释液(4.5 μL), 取混合液 0.5 μL 作 DNA 模板; 10 个卵囊 = DNA 原液(0.5 μL) + 稀释液(2 μL), 取混合液 0.5 μL 作 DNA 模板; 25 个卵囊 = DNA 原液(0.5 μL) + 稀释液(0.5 μL), 取混合液 0.5 μL 作 DNA 模板; 50 个卵囊 = DNA 原液(0.5 μL) + 稀释液(0 μL), 取混合液 0.5 μL 作 DNA 模板。

2 结果

2.1 *E. stiedai* ITS1 区基因的 PCR 扩增

用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 *E. stiedai* ITS1 基因的 PCR 扩增产物, 扩增的片段在 200~300 bp, 与预期片段(261 bp)基本一致(图 1)。



M: DNA maker; 1: 扩增条带

图 1 *E. stiedai* 区基因的 PCR 扩增结果

Figure 1 The amplification of the gene in ITS1 region of *E. Stiedai*

2.2 重组质粒的鉴定

经蓝白斑筛选的阳性克隆, 扩大培养的菌液, 送上海生工有限公司进行测序, 其测序的结果在 NCBI 中进行比对, 所扩增的基因序列与 GenBank 上已经发表的匹配率 99%(图 2)。

2.3 标准曲线的建立

重组质粒的连接和转化效率较高, 根据公式计算得, 重组质粒的拷贝数为 3.6 × 10⁸ 拷贝/μL, 将其进行 10 倍梯度的稀释, 取 3.6 × 10¹ 拷贝/μL~3.6 × 10⁸ 拷贝/μL 八个梯度的质粒标准品为模板进行的

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
475 bits(257)	2e-130	260/261(99%)	1/261(0%)	Plus/Plus
Query 1	TGGCTTTCGCCAACCAACATCCTTTCGTTTCGAAAGAGATATGGTGGTAGGGAATAATAAT	60		
Sbjct 910	TGGCTTTCGCCAACCAACATCCTTTCGTTTCGAAAGAGATATGGTGGTAGGGAATAATAAT	969		
Query 61	GAGGTTGTTGCATGTGTACGACGACATACATACATACCTCTTATTTATTCCTTCCTCTTT	120		
Sbjct 970	GAGGTTGTTGCATGTGTACGACGACATACATACATACCTCTTATTTATTCCTTCCTCTTT	1029		
Query 121	TATCTCGTTTGATAGGACCAGTTTGTGTGGTCCAAGCGGAAGGTAGAGTAGTAGTGGTGAG	180		
Sbjct 1030	TATCTCGTTTGATAGGACCAGTTTGTGTGGTCCAAGCGGAAGGTAGAGTAGTAGTGGTGAG	1089		
Query 181	GCGGAGACATGTGATGTAGCTTGTGGCGCGCGCATAACATGCT-GCCATGATGTGTCAGT	239		
Sbjct 1090	GCGGAGACATGTGATGTAGCTTGTGGCGCGCGCATAACATGCTGGCCATGATGTGTCAGT	1149		
Query 240	AGTTACTACTGGCGCAGGCAG	260		
Sbjct 1150	AGTTACTACTGGCGCAGGCAG	1170		

图 2 序列比对结果

Figure 2 The result of sequence alignment

实时荧光定量 PCR 检测, 由图 3 可以看出, 在指数增长长期时, 曲线是平行的, 说明实时荧光定量 PCR 的扩增效率比较相近。由图 4 可以看出, 八个梯度的质粒标准品有一个共同的特征峰, 基本无其它杂峰, 说明方法可靠。以质粒标准品浓度的 log 值为横坐标、扩增曲线的 Ct 值为纵坐标构建的标准曲线为 $Y=-5.043 \times \log(x)+51.815$, 扩增效率为 57.88%, 相关系数 R^2 为 0.999(图 5), 这表明本研究建立的实时荧光定量 PCR 方法具有良好的线性关系, 可信度高。

2.4 特异性和敏感性试验

对 1 个、5 个、10 个、15 个、25 个、50 个 *E. stiedai* 卵囊的 DNA 及 *E. magna*、*E. Intestinalis*、

E. flsvescens 的 DNA 进行实时荧光定量 PCR。由扩增曲线可知, 含有 *E. stiedai* 的 DNA 的样品均可看到光滑的扩增曲线, 而 *E. magna*, *E. intestinalis*, *E. flsvescens* 的 DNA 样品均没有扩增曲线(图 6)。这表明该方法的特异性强。此外, 由溶解曲线(图 7)也可以看到, 含有兔斯氏艾美尔球虫卵囊 DNA 的样品均有一个特征峰, 而 *E. magna*, *E. intestinalis*, *E. flsvescens* DNA 样品的溶解曲线基本是水平的, 即无溶解曲线, 再次证实该方法的特异性极强。

对 1 个、5 个、10 个、15 个、25 个、50 个 *E. stiedai* 的 DNA 进行实时荧光定量 PCR 检测, 结果显示, 最低检测量为 1 个 *E.stiedai* 卵囊的 DNA, 换算成拷贝数为 42.65 拷贝/μL(表 1), 说明该方法

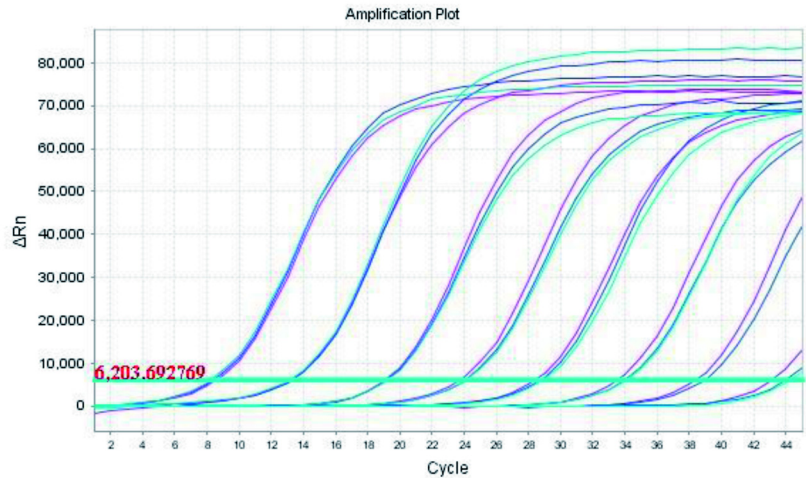


图 3 重组质粒实时荧光定量 PCR 的扩增曲线

Figure 3 Dynamic curve of RT-PCR for recombinant plasmid

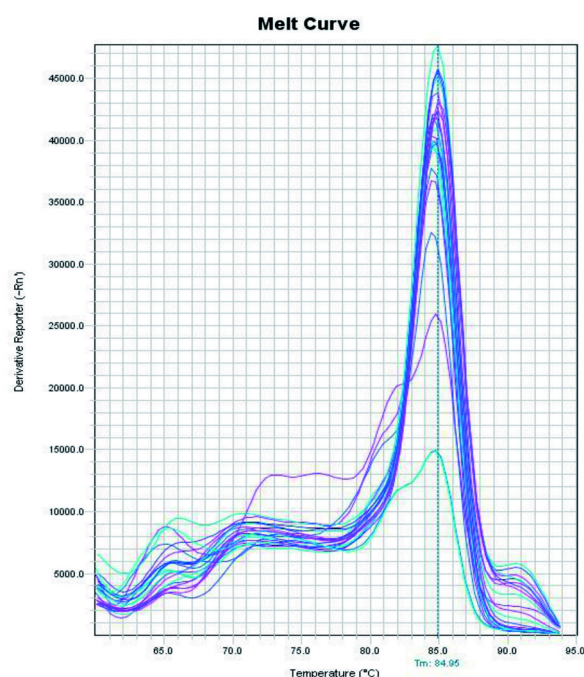


图4 重组质粒实时荧光定量PCR的熔解曲线

Figure 4 Solubility curve of RT-PCR for recombinant plasmid

的敏感性高。

2.5 重复性实验

原始的DNA按照10倍梯度稀释,进行组间和组内的重复试验,每个试验重复3次(表2)。组内、组间重复试验的变异系数,分别是0.27%~1.73%、0.48%~1.95%,均小于2%,表明该方法的重复性良好。

3 讨论

兔球虫中,*E. stiedai*是致病性最强的种类之一,成年兔感染时一般没有明显的临床症状,而幼兔感染会出现轻微的厌食、腹泻甚至黄疸、死亡等症状,主要表现为肝脏的脓肿、坏死^[7]。Jing等^[8]对*Eimeria*在中国家兔的感染状况调查表明,总感染率为41.9%。宋鸿雁等^[9]对江苏省4个实验兔供应基地球虫感染情况进行了调查,结果显示感染率为100%,共检测出10种艾美尔球虫。樵星芳等^[10]对重庆市中药研究院实验兔场球虫感染种类

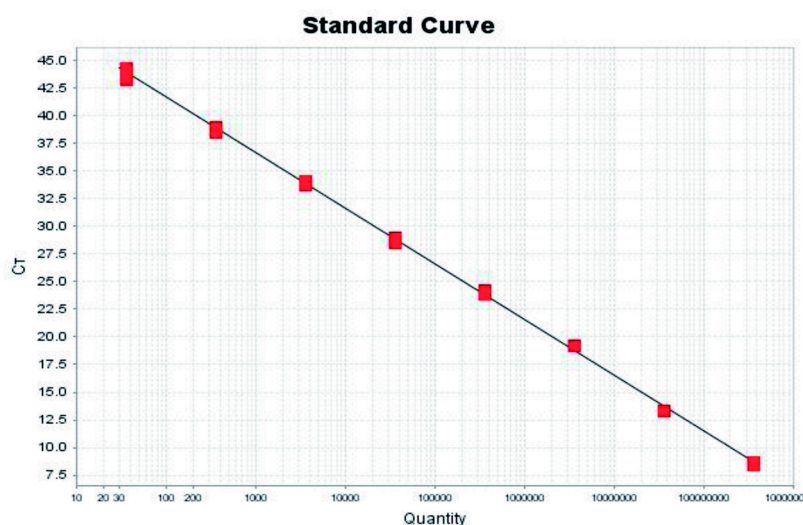


图5 实时荧光定量PCR的标准曲线

Figure 5 Standard curve of RT-PCR

进行调查表明,*E. Stiedai*的感染率最高,达23%。因此需要开发一种快速、有效、特异的方法对兔群进行跟踪监测,及时做出预防措施,减少损失。

Fernandez等^[11]通过序列特征扩增特定区域基因的标记技术,利用多重PCR的方法鉴定7种艾美耳球虫属。Carvalho等^[12]用20个卵囊成功鉴定了

7种感染能力强的艾美尔球虫即*E.mitis*、*E. maxima*、*E. acervulina*、*E. tenella*、*E. necatrix*、*E. brunetti*和*E. praecox*。You^[13]采用多重PCR扩增ITS1区域的序列,使用1~5 pg的DNA样本,即可检测出*E. tenella*、*E. acervulina*、*E. maxima*和*E. necatrix*。Yan等^[14]对6种兔艾美耳球虫(*E.stiedai*、*E. intestinalis*、

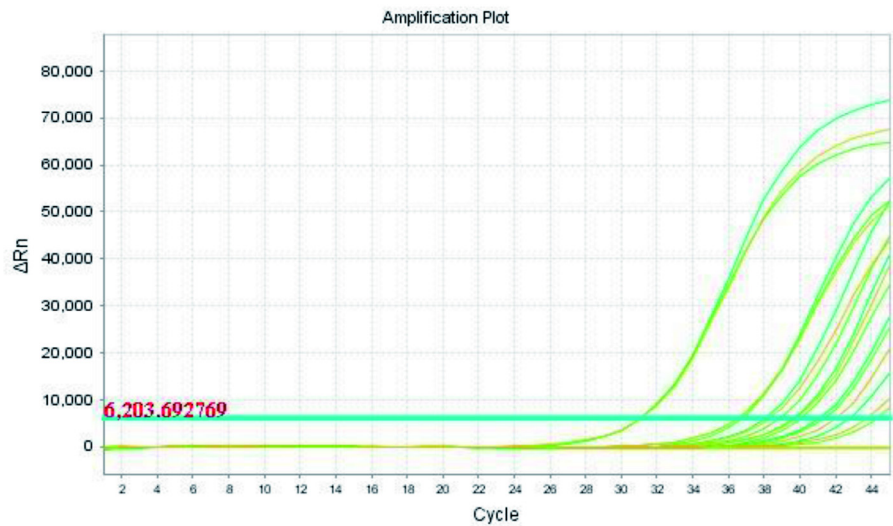


图 6 不同个数 *E. stiedai* 卵囊和其他球虫卵 DNA RT-PCR 的扩增曲线

Figure 6 Dynamic curve of RT-PCR for different number of *E. stiedai* and other kinds of Coccidia eggs

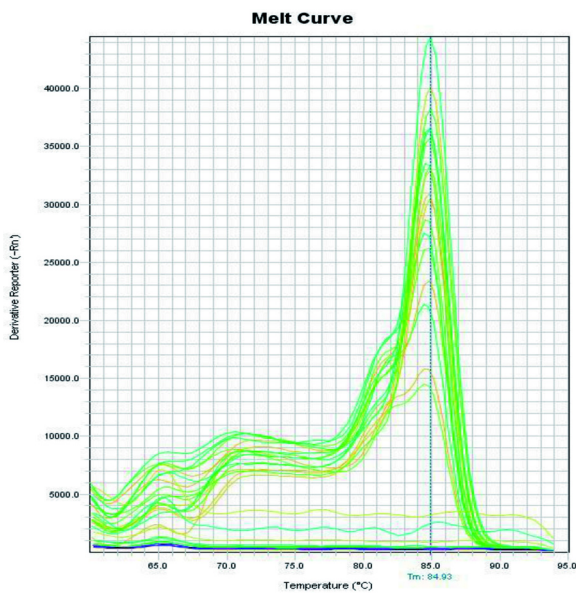


图 7 不同个数 *E. stiedai* 卵囊和其他球虫卵 DNA RT-PCR 的熔解曲线

Figure 7 Solubility curve of RT-PCR for different number of *E. stiedai* and other kinds of Coccidia eggs

E. flavescens、*E. media*、*E. magna* 和 *E. irrisidua*) 的 ITS1 和 ITS2 进行扩增, 通过多重 PCR 诊断方法成功鉴定三种高致病性兔艾美耳球虫(*E. stiedai*、*E. intestinalis* 和 *E. Flavescens*)。Hassan 等^[15]采用 ITS1-PCR 扩增方法检测兔艾美耳球虫对兔的感染情况, 结果显示, 在球虫感染兔的第 15 日, 不规则的黄白色病变结节呈现在肝脏上, 能够在肠道

表 1 特定个数 *E.stiedai* 卵囊 DNA 的荧光定量 PCR 检测

Table 1 The detection a certain number of *E.stiedai* DNA on RT-PCR

<i>E. stiedai</i> 卵囊 个数	Ct	拷贝数/μL
1	43.68 ± 0.74	42.65 ± 0.89
5	41.57 ± 0.46	109.38 ± 1.20
10	39.91 ± 0.18	230.52 ± 3.56
25	38.48 ± 0.42	446.25 ± 8.25
50	36.71 ± 0.10	989.22 ± 7.59
106	31.19 ± 0.03	12 288.11 ± 40.20

表 2 荧光定量 PCR 组内重复性试验结果

Table 2 The result of RT-PCR repetitive experiments in the group

DNA 稀 释倍数	Ct 值			Ct 平均值	变异系数 /%
	1	2	3		
10 ¹	8.33	8.53	8.69	8.52 ± 0.15	1.73
10 ²	13.22	13.41	13.35	13.32 ± 0.08	0.60
10 ³	19.28	19.28	19.17	19.24 ± 0.05	0.27
10 ⁴	24.21	24.15	23.80	24.05 ± 0.18	0.75
10 ⁵	29.01	28.81	28.49	28.77 ± 0.21	0.74
10 ⁶	34.17	34.07	33.61	33.95 ± 0.24	0.72
10 ⁷	38.88	38.99	38.48	38.78 ± 0.22	0.57
10 ⁸	44.33	44.09	43.17	43.86 ± 0.50	1.14

上皮组织的病理切片上检查到 *E. stiedae* 裂殖体和配子体; 第 21~24 日, 可以看到明显的肝肿大和肝腹

水;在兔感染球虫的第12日,肝组织PCR扩增的结果首次呈阳性,第18日粪便样品的PCR检测结果呈阳性,而血液样品PCR的结果仍呈阴性。由此说明,PCR作为常规的诊断技术可有效的检测兔球虫的波动,对于预防兔球虫的感染有着重要的作用。

普通PCR方法操作简单、成本低,但是检测技术比较耗时,产物需纯化才能测序,假阳性率高^[16]。实时PCR因其灵敏度高、特异性好等优点,在微生物的分子生物学、生物学等研究领域得到了越来越广泛的应用,如小麦镰孢菌病害^[17]、大豆孢囊线虫^[18]。合格标准品的制备在实时荧光定量PCR技术中对靶标基因的准确定量有着重要的作用。体外人工合成的单链DNA、质粒DNA、纯化的dsDNA及体外转录的RNA等常被用于构建标准曲线的标准品^[19,20]。其中重组质粒DNA和体外转录的RNA标准品是较为常见的标准品。因保存稳定、易于标准化,重组质粒作为标准品的应用也较多^[21,22]。因此本研究通过构建ITS1基因的重组质粒作为实时荧光定量PCR检测方法标准曲线的标准品。实验结果表明,利用重组质粒的DNA作为标准品,建立的实时荧光定量PCR检测*E. stiedai*的方法具有足够的特异性和高敏感性,可用于*E. stiedai*的定量检测。

本研究根据*E. stiedai* ITS1区域的基因保守序列设计引物,采用重组质粒标准品建立检测*E. stiedai*的实时荧光定量PCR标准曲线,为检测感染兔*E. stiedai*提供快速定量检测的技术支持,也为*E. stiedai*的防治打下一定的技术基础。本研究建立的实时荧光定量PCR方法对*E. stiedai*的检测特异性强,灵敏度高,可检出含一个卵囊的DNA样本,适用于*E. Stiedai*感染初期的定量检测,有利于实验兔场及时做好*E. Stiedai*的预防措施,减少经济损失。同时,也能为科研实验提供质量合格的实验兔,保证科研实验数据的可靠性。

参考文献:

- [1] Singh S, Bonner WA, Kyle T, et al. Intestinal coccidiosis infection in domestic rabbits[J]. Int J Biol Sci, 2014, 2(2): 131-133.
- [2] Elshahawi GA, Elfayomi HM, Abdelhaleem HM. Coccidiosis of domestic rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) in Egypt: light microscopic study[J]. Parasitol Res, 2012, 110(1):251-258.
- [3] 闫文朝, 韩利方, 张龙现, 等. 斯氏艾美耳球虫 ITS1-5.8S rRNA-ITS2 序列的克隆及 PCR 检测方法的建立[J]. 畜牧兽医学报, 2012, 43(6):1003-1008.
- [4] 闫文朝, 索勋, 薛帮群. 国内外家兔球虫病研究现状[J]. 中国养兔杂志, 2011, (5):21-26.
- [5] Heim A, Ebnet C, Harste G, et al. Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR[J]. J Med Virol, 2003, 70(2):228-239.
- [6] 樊翀宇. 斯氏艾美耳球虫 TaqMan 实时荧光定量 PCR 检测方法的建立[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2016:16-65.
- [7] Wang JS, Tsai SF. Prevalence and pathological study on rabbit hepatic coccidiosis in Taiwan[J]. Proc Natl Sci Coun Repub China B, 1991, 15(4):240-243.
- [8] Jing F, Yin G, Liu X, et al. Large-scale survey of the prevalence of *Eimeria* infections in domestic rabbits in China [J]. Parasitol Res, 2012, 110(4):1495-1500.
- [9] 宋鸿雁, 朱顺星, 刘春. 江苏省实验兔球虫感染情况调查研究[J]. 动物医学进展, 2012, 33(12):88-91.
- [10] 樵星芳, 陈建康, 张云美. 重庆市中药研究院实验兔球虫感染种类调查[J]. 四川动物, 2012, 31(6):936-938.
- [11] Fernandez S, Pagotto AH, Furtado MM, et al. A multiplex PCR assay for the simultaneous detection and discrimination of the seven *Eimeria* species that infect domestic fowl[J]. Parasitology, 2003, 127(4):317-325.
- [12] Carvalho FS, Wenceslau AA, Teixeira M, et al. Diagnosis of *Eimeria* species using traditional and molecular methods in field studies[J]. Vet Parasitol, 2011, 176(2):95-100.
- [13] You MJ. Detection of four important *Eimeria* species by multiplex PCR in a single assay[J]. Parasitol Int, 2014, 63(3):527-532.
- [14] Yan W, Wang W, Wang T, et al. Simultaneous identification of three highly pathogenic *Eimeria*, species in rabbits using a multiplex PCR diagnostic assay based on ITS1-5.8S rRNA-ITS2 fragments[J]. Vet Parasitol, 2013, 193(1):284-288.
- [15] Hassan KM, Arafa WM, Mousa WM, et al. Molecular diagnosis of *Eimeria stiedae* in hepatic tissue of experimentally infected rabbits[J]. Exp Parasitol, 2016, 169(3):1-5.
- [16] 蒋磊, 刘庆梅. 兔球虫病的诊断与防治[J]. 当代畜牧, 2017(2):20-21.
- [17] Hogg AC, Johnston RH, Johnston JA, et al. Monitoring *fusarium* crown rot populations in spring wheat residues using quantitative real-time polymerase chain reaction[J]. Phytopathology, 2010, 100(1):49-57.
- [18] Li Y, Lawrence GW, Lu S, et al. Quantitative field testing *Heterodera glycines* from metagenomic DNA samples isolated directly from soil under agronomic production[J]. PLoS One, 2014, 9(2):e89887.
- [19] Zimmermann B, Holzgreve W, Wenzel F, et al. Novel real-time quantitative PCR test for trisomy 21[J]. Clin Chem, 2002, 48(2):362-363.

- [20] Muller PY, Janovjak H, Miserez AR, et al. Processing of gene expression data generated by quantitative real-time RT-PCR. [J]. Biotechniques, 2002, 32(6):1379-1380.
- [21] Chang KW, Ho TF, Lin YC, et al. Development of real-time RT-PCR assays for detection and quantification of Pine-apple Mealybug wilt-associated viruses-1[J]. J Phytopathol, 2016, 164(6):363-371.
- [22] Xu MY, Liu SQ, Deng CL, et al. Detection of Zika virus by SYBR green one-step real-time RT-PCR[J]. J Virol Methods, 2016, 236:93-97.

Detection of Eimeria Stiedai by Real-Time PCR

WEN Fu-li, ZHENG He-ping, DANG Yuan, XUE Lai-en, ZHANG Shi-lan
(Department of Comparative Medicine, Fuzhou General Hospital
of Nanjing Command, PLA, Fuzhou 350025, China)

[Abstract] Objective To develop the method for quantitatively detecting *Eimeria stiedai* (*E. stiedai*) by Real-Time PCR (RT-PCR). **Methods** Specific primers were designed and synthesized according to a part of the sequence of ITS1 region of *E. stiedai*. The recombinant plasmid was constructed to established the standard curve of RT-PCR. The specificity, sensitivity and reproducibility of the RT-PCR method were performed. **Result** The method was specific and sensitive for detection of *E. stiedai*. Meanwhile, the sensitivity of the present method could detect the DNA of one *E. stiedai* and the variation coefficients of intra-assay and inter-assay were less than 2.0% respectively. **Conclusion** The established RT-PCR is a specific, sensitive and reliable method for the quantitative detection of *E. stiedai*.

[Key words] *E. stiedai*; Real-Time PCR(RT-PCR); Detection

不同跑台坡度对 SD 大鼠运动疲劳指标的影响

石鹤坤¹, 陈开杰¹, 林小凤¹, 禹 乐², 朱启淦², 费 燕¹

(解放军第 175 医院 / 厦门大学附属东南医院 1. 药学科, 2. 病理科, 漳州 363000)

[摘要] 目的 探讨不同跑台坡度对大鼠运动疲劳指标的影响。方法 32 只 SD 大鼠随机分为对照组以及 0°、-15° 和 15° 跑台运动组, 运动组大鼠每日按照方案进行跑台训练。大鼠经过 6 周训练结束后检测血清中葡萄糖(GLU)、尿素(BUN)、乳酸(LA)、肌酸激酶(CK)及血液中血红蛋白(HGB)、红细胞(RBC), 腓肠肌指数, 对腓肠肌进行 HE 染色, 并统计大鼠被电击次数。结果 与对照组比较, 不同跑台坡度对大鼠的血液代谢产物、能量物质及运动能力均有明显变化。其中, 各运动组大鼠外周血中 GLU、HGB 与 RBC 较对照组显著降低($P<0.01$, $P<0.05$), 腓肠肌指数显著增高($P<0.01$); 15° 跑台与 -15° 跑台运动组血清中 LA、BUN 浓度及 CK 活性均显著增高($P<0.01$, $P<0.05$)。与 0° 跑台运动组比较, 15° 跑台与 -15° 跑台运动组大鼠被电击次数显著增多($P<0.05$)。HE 染色结果显示, 运动后各组大鼠腓肠肌细胞有肿胀损伤的趋势。结论 15° 跑台坡度比 -15° 或 0° 跑台坡度复制大鼠运动疲劳模型更佳。

[关键词] 运动疲劳模型; 跑台坡度; 运动能力; 大鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)06-0455-05

运动疲劳是近年来国内外运动医学领域专家关注的热点课题, 建立与人体运动机能相同的运动疲劳模型有助于研究运动疲劳的发生机制, 并探讨其如何快速消除疲劳、增强人体运动能力与健康维护。实验大鼠有高达 98% 基因与人类相似, 是建立运动疲劳模型常用的研究对象, 已有跑台运动大鼠模型的评价方法多为上坡跑台, 对于下坡跑台较少研究^[1]。由于不同坡度运动大鼠的跑姿、强度不同, 及时评估其对运动疲劳程度的影响具有重要意义。目前, 在运动性疲劳实验中, 运动时间长短, 运动姿势被用作反映运动耐力的行为学指标; 体液中乳酸(LA)、尿素氮(BUN)、肌酸激酶(CK)、血糖(GLU)含量等是判定疲劳常用的生化指标^[2]。因此, 本研究拟采用不同的跑台坡度对比运动疲劳指

标的差异, 通过监测大鼠行为能力、代谢产物及能量物质, 客观评价不同跑台坡度对大鼠运动疲劳各指标的影响, 为运动疲劳动物模型相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性 SD 大鼠 32 只, 8 周龄, 体质量 220~240 g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2012-0002]。实验在解放军第 175 医院中心实验室进行[SYXK(军)2012-054]并获得解放军第 175 医院实验动物伦理委员会批准, 按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀。

1.2 实验仪器及试剂

ZH-PT 动物实验跑台, 安徽正华生物仪器设备有限公司; ADVIA 2400 全自动生化分析仪, 德国西门子公司; LH750 全自动血液分析仪, 美国贝克曼库尔特公司; RM2245 石蜡切片机及 ASP300S 全自动脱水机, 德国徕卡生物有限公司; CX31 显微镜, 奥林巴斯有限公司; Pico-17 离心机, 美国赛默飞世尔公司; BS223S 电子天平, 德国赛多利斯集

[收稿日期] 2017-06-23

[基金项目] 解放军第 175 医院青年苗圃基金资助项目
(No.13Y017)

[作者简介] 石鹤坤(1980-), 男, 硕士, 主要从事中药药理学。
E-mail: zzphshk@163.com

[通讯作者] 费 燕(1980-), 女, 硕士, 主要从事医院药事管理、临床药学。E-mail: feiyanfy@126.com

团公司等。LA 试剂盒(批号: 332138), 购于英国朗道实验诊断有限公司; GLU试剂盒(批号: D1503113), BUN 试剂盒(批号: D1503083), CK 试剂盒(批号: D1501133)均购于上海复星长征医学科学有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 大鼠分组及造模 根据体质量将大鼠随机分为 4 组, 每组 8 只。各跑台坡度模型组大鼠在本实验室适应性饲养 3 d 后进行 3 d 的适应性跑台训练, 每日 2 次, 每次 15~20 min, 之后 6 周大鼠每日均以 20 m/min 的速度运动 15 min, 休息 1 min, 继续运动 15 min。跑台仪上设定光、声音与电刺激, 刺激电压 1.2 mA, 记录电刺激次数, 最后一次运动跑至力竭。判断力竭状态的标准为: 大鼠跑姿由蹬地式变为伏地式, 滞留在跑道末端不能继续跑动, 且光、声音与电刺激均不能驱使动物继续维持跑动^[3]。

1.2.2 实验指标的测定 大鼠运动结束后 30 min, 采用乙醚麻醉, 腹主动脉负压管采血促凝、EDTA 抗凝各 2 mL。促凝血置于离心机中以 3 000 r/min 离心 10 min, 取出血清, 严格按试剂盒说明书测定大鼠血清中 GLU、BUN、LA 和 CK 的含量; EDTA 抗凝血对血液中的血红蛋白(HGB)、红细胞(RBC)进行测定。脱臼处死大鼠, 取其后肢腓肠肌精密

称重, 计算腓肠肌指数, 腓肠肌指数的计算: 腓肠肌指数=[腓肠肌质量(mg)/ 体质量(g)]^[4]。将大鼠后肢腓肠肌置于质量分数 4% 甲醛溶液中固定 24 h, 放入自动脱水机中进行自动脱水、透明、浸蜡, 石蜡包埋, 取腓肠肌中 1/3 用切片机沿水平面切成 5 μm 薄片, 进行 HE 染色。腓肠肌组织切片置于显微镜下进行图像采集。

1.3 统计学方法

所有测得实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS16.0 统计软件进行分析, 均数间比较采用 One-way ANOVA 检验, 组间比较使用 *t* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 GLU、BUN、LA、CK

如表 1 所示, 与对照组比较, 运动后不同跑台坡度运动大鼠的 GLU 均有显著降低(*P*<0.01), 而 BUN、LA 均有显著升高(*P*<0.01, *P*<0.05), 说明疲劳造模成功。15° 跑台大鼠血清中的 BUN、LA 升高更显著(*P*<0.01)。与对照组比较, 不同跑台坡度运动大鼠血清中 CK 含量虽有升高, 但只有 15° 跑台大鼠的 CK 含量有显著性差异(*P*<0.05)。

表 1 不同坡度对运动大鼠血清 GLU、BUN、LA、CK 的影响
Table 1 Effect of GLU, BUN, LA and CK in exercise rats with different slope

组 别	GLU/mmol · L ⁻¹	BUN/mmol · L ⁻¹	LA/mmol · L ⁻¹	CK/μmol · L ⁻¹
对照组	6.39 ± 0.51	5.49 ± 0.95	3.38 ± 0.83	373.14 ± 75.87
0° 跑台运动组	5.45 ± 0.64**	6.45 ± 0.54*	4.98 ± 1.57*	413.45 ± 114.11
-15° 跑台运动组	5.65 ± 0.52**	6.65 ± 1.10*	4.71 ± 1.38*	436.65 ± 96.75
15° 跑台运动组	5.59 ± 0.54**	6.89 ± 0.44**	5.16 ± 1.18**	487.98 ± 121.00*

注: 与对照组比较, **P*<0.05、***P*<0.01; *n*=8; 下表同

2.2 血液 HGB、RBC

如表 2 所示, 经过 6 周强制运动后, 不同跑台坡度运动大鼠与对照组比较, HGB 均有显著降低(*P*<0.05); 0° 与 15° 跑台运动组的 RBC 降低(*P*<0.05)。

2.3 大鼠体质量、腓肠肌质量及腓肠肌指数

如表 3 所示, 跑台运动 6 周后, 与对照组比较, 不同跑台坡度运动大鼠腓肠肌质量与腓肠肌指数均显著增加(*P*<0.01, *P*<0.05), 但各跑台运动大鼠体质量下降没有统计学差异(*P*>0.05)。

表 2 不同坡度对运动大鼠血液 HGB、RBC 的影响
Table 2 Effect of HGB and RBC in exercise rats with different slope

组 别	HGB/g · L ⁻¹	RBC/10 ¹²
对照组	144.00 ± 7.13	7.83 ± 0.44
0° 跑台运动组	135.50 ± 8.26*	7.29 ± 0.37*
-15° 跑台运动组	135.00 ± 7.15*	7.69 ± 0.50
15° 跑台运动组	133.50 ± 6.34**	7.28 ± 0.27*

表 3 不同坡度对运动大鼠体质量、腓肠肌质量及腓肠肌指数的影响

Table 3 Effect of body, gastrocnemius muscle weight and index in exercise rats with different slope

组 别	体质量/g	腓肠肌重量/g	腓肠肌指数/%
对照组	309.87 ± 27.92	0.50 ± 0.06	1.63 ± 0.27
0° 跑台运动组	302.75 ± 53.94	0.62 ± 0.02**	2.09 ± 0.31**
-15° 跑台运动组	293.25 ± 38.83	0.59 ± 0.05*	2.02 ± 0.21**
15° 跑台运动组	299.50 ± 28.64	0.61 ± 0.04**	2.06 ± 0.28**

2.4 大鼠被电击次数及行为活动状态观察

各运动组大鼠初期均活泼好动,对光、声音及电刺激反应灵敏。运动至第3周后,15°跑台与-15°跑台运动组大鼠,逐渐出现倦怠神情,双眼暗淡无光,对光、声音刺激反应迟钝,运动20 min后,多只大鼠跑姿由开始时的蹬地跑变为半卧位跑,腹部与跑道时有接触,不能维持其跑台的速度,并滞跑道后1/3处,对光、声音刺激驱赶无效,被电击次数明显增加。图1结果显示,0°跑台运动组大鼠电击次数的均数第1周为8.75次,随着运动时

间的增加而减少,第6周减至1.38次。-15°跑台运动组大鼠电击次数的均数第1周为9.13次,第2周5.25次,第6周升至6.25次。15°跑台运动组大鼠电击次数的均数第1周为10.50次,第2周降为7.50次,随后逐渐升至9.63次。

2.5 大鼠腓肠肌形态学分析

HE染色结果显示:经过6周的跑台运动后,运动组大鼠与对照组比较,肌纤维有不同程度的肿胀(图2箭头所指),出现圆形肌纤维,边界处有炎性细胞聚集浸润,以-15°跑台运动组较为严重(图2)。

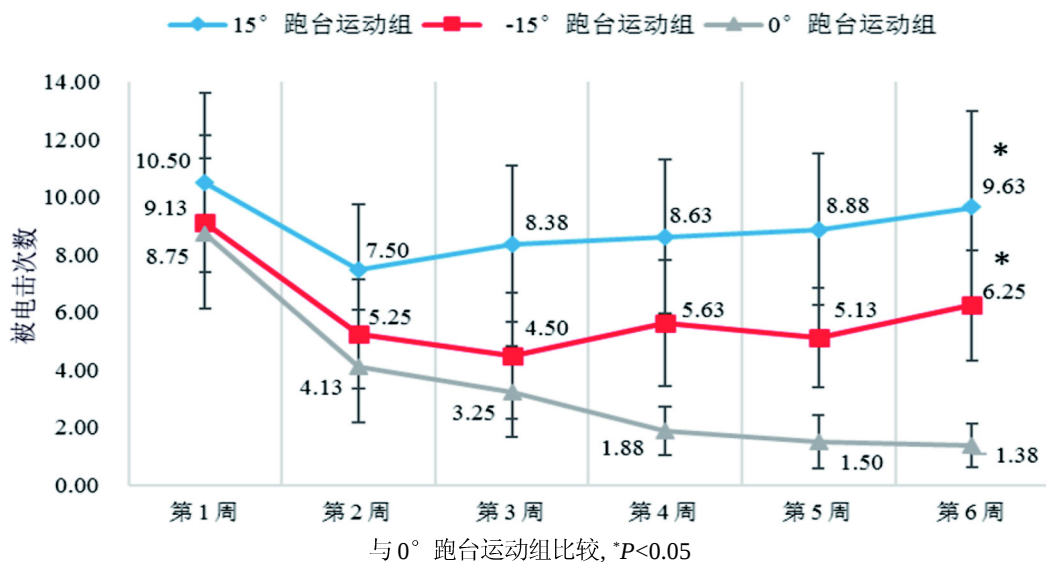
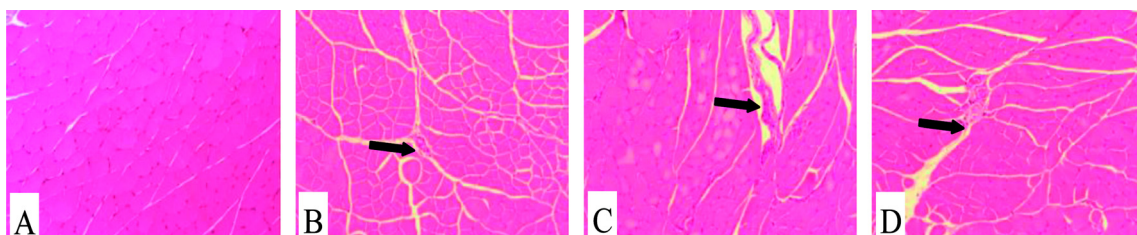


图1 不同跑台坡度大鼠平均被电击的次数

Figure 1 The times of electric shock in the rats with different treadmill slope



A: 对照组; B: 0° 跑台运动组; C: -15° 跑台运动组; D: 15° 跑台运动组

图2 大鼠后肢腓肠肌病理学观察(HE × 200)

Figure 2 Pathological observation of gastrocnemius muscle in posterior limb of rats

3 讨论

机体在进行高强度运动时肌肉最初消耗的是提供直接能量的肌糖原,随着运动时间的延长与强度的增加,进而大量消耗血糖以补充能量,当机体消耗血糖的速度高于肝糖原分解入血的速度时,可引起血糖降低,肌肉收缩能量物质不足而导致收缩能力降低,即出现运动疲劳^[5]。大鼠经过6周的运动训练,不同跑台坡度运动大鼠的GLU均有显著降低($P<0.01$)。LA是糖酵解的代谢产物,运动训练时骨骼肌中LA的生成量与运动强度成正比,其大量堆积在体内可引发酸中毒,内环境的酸化可降低肌钙蛋白对 Ca^{2+} 灵敏度,增加 H^{+} 与 Ca^{2+} 竞争结合至肌钙蛋白,干扰肌肉兴奋收缩偶联过程,并且可抑制磷酸果糖激酶(PFK)的活性,糖酵解的代谢过程被减慢或中止,导致肌肉酸痛和疲劳^[6]。随着肌糖原与血糖浓度的进一步下降,氨基酸与蛋白质分解代谢加强,机体内BUN生成增多^[7]。长时间持续高负荷的运动可致肌肉组织的损伤,肌细胞损伤可伴随多种酶的释放激活,其中CK激活的量与肌肉运动负荷强度和运动持续时间呈正相关^[8]。因此,GLU、LA、BU、CK均被认为是反映机体疲劳程度的重要指标。本实验结果表明,与对照组比较,不同跑台坡度运动大鼠血清中GLU浓度显著降低;LA、BUN浓度明显升高,不同跑台坡度运动大鼠变化趋势基本一致。15°跑台运动组高负荷运动使得LA、BUN、CK与0°和-15°跑台运动组相比有进一步的生长。

机体中血液的HGB、RBC常被用来判断过度疲劳与运动性贫血的指标,高强度耐力运动如跑步、游泳、自行车等易导致运动性贫血,使血液运输 O_2 和 CO_2 的能力及能量物质能力下降,从而影响机体的运动能力^[9]。万发达等^[10]研究表明,长时间递增负荷跑台运动可使大鼠机体HGB、RBC含量下降。本次实验结果显示:15°跑台大鼠运动后HGB、RBC与对照组比较均有显著性差异($P<0.01$, $P<0.05$)。分析认为,大鼠经过6周的上坡负荷训练运动后,疲劳连续积累,出现了运动性贫血表现与报道相符。图1结果提示,各组大鼠在第1周时,处于对跑台的适应阶段,电击次数普遍较高。15°跑台大鼠由于高负荷,从第3周开始,由于疲劳的累积,电击次数逐渐增加,运动至第

6周,电击次数为运动训练3组中最高,平均达到9.63次,与0°跑台模型大鼠比较($P<0.05$),说明运动疲劳程度最高。-15°跑台大鼠虽然负荷较轻,但与0°跑台大鼠比较电击次数亦显著升高($P<0.05$),结合图2大鼠后肢腓肠肌HE染色的实验结果,分析认为,大鼠经过6周连续下坡运动后,引起肌肉或关节面的损伤而影响大鼠的运动能力。

大鼠长时间的跑台运动可增加肌肉蛋白质合成,使腿部的肌肉有明显的增加。Pasini等^[4]研究表明,连续8周中等强度耐力运动可增加约38%的雄性大鼠股四头肌质量。本研究结果显示,连续6周以速度20 m/min,不同坡度的运动大鼠的腓肠肌重量与腓肠肌指数增加约增加20.0%,与对照组比较均有显著性差异。综上所述,与对照组比较,不同跑台坡度大鼠的外周血液中LA、BUN浓度以及CK活力显著性增高,GLU、HGB、RBC则显著低于对照组,说明大鼠已达到疲劳状态,运动疲劳模型建立成功。从运动大鼠代谢产物、能量物质、被电击次数、肌肉损伤及跑姿综合评价,15°跑台运动更容易复制运动性疲劳模型。从电击次数、大鼠行为活动状态与腓肠肌组织HE染色观察推测,-15°跑台运动大鼠可有肌肉与关节损伤的可能,其具体的机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 赵俊,邹任玲,胡秀枋,等.大鼠跑台训练模型方法研究进展[J].动物医学进展,2014,35(9):101-105.
- [2] 代朋乙,黄昌林.运动性疲劳研究进展[J].解放军医学杂志,2016,41(11):955-964.
- [3] 刘晓莉,罗勇,乔德才.大鼠一次性力竭跑台运动模型的建立及动态评价[J].中国实验动物学报,2012,20(3):25-28.
- [4] Pasini E, Le Douairon Lahaye S, Flati V, et al. Effects of treadmill exercise and training frequency on anabolic signaling pathways in the skeletal muscle of aged rats[J]. Exp Gerontol, 2012, 47(1):23-28.
- [5] 龚云,王超.运动疲劳对大鼠骨骼肌显微结构及糖代谢的影响[J].兰州文理学院学报:自然科学版,2017,31(1):77-81.
- [6] Peng H, Chen Q, Tan Y. Frequent ejaculation associated free radical and lactic acid accumulation cause noninfectious inflammation and muscle dysfunction: A potential mechanism for symptoms in Chronic Prostatitis /Chronic Pelvic Pain Syndrome[J]. Med Hypotheses, 2009, 73(3):372-372.
- [7] 齐阳,蔡东联.抗运动性疲劳作用进展[J].氨基酸与生物资

- 源, 2011, 33(4):58-62.
- [8] Koch AJ, Pereira R, Machado M. The creatine kinase response to resistance exercise[J]. J Musculoskelet Neuronal Interact, 2014, 14(1): 68-77.
- [9] Robinson Y, Cristancho E, Böning D. Intravascular hemolysis and mean red blood cell age in athletes[J]. Med Sci Sports Exerc, 2006, 38(3): 480-483.
- [10] 万发达, 彭峰林, 邓树勋. 递增负荷运动训练对大鼠红细胞及血红蛋白的影响[J]. 军事体育进修学院学报, 2008, 27(4):115-119.

Effect of Different Treadmill Slope on Exercise Fatigue Index in SD Rats

SHI He-kun¹, CHEN Kai-jie¹, LIN Xiao-feng¹, YU Le², ZHU Qi-gan², FEI Yan¹

(1. Department of Pharmacy; 2. Pathology Department, 175 Hospital of PLA/ Affiliated Southeast Hospital of Xiamen University, Zhangzhou, Fujian 363000, China)

[Abstract] **Objective** To study the influence of exercise fatigue index on different treadmill slope in rats. **Methods** 32 SD rats were randomly divided into 4 groups: the control group, and 0°-, -15°- and 15°- treadmill slope exercise groups. The model group was given treadmill exercise according to the scheme. Related indexes were detected after 6 weeks training. The serum content of glucose(GLU), blood urea nitrogen(BUN), lactic acid (LA), creatine kinase (CK), hemoglobin (HGB), red blood cell (RBC). Gastrocnemius muscle index and the number of electric shock in the rats were calculated. **Results** Compared with the control group, there were significant changes in the blood metabolites, energy material and exercise ability during different treadmill slope exercise in the rats. The GLU, HGB and RBC in the peripheral blood samples of each exercise group were significantly lower than those in the control group ($P<0.01$, $P<0.05$), and the gastrocnemius muscle index was significantly higher ($P<0.01$). The serum of LA, BUN concentration and CK activity were significantly increased ($P<0.01$, $P<0.05$) in the 15° treadmill and -15° treadmill exercise groups. Compared with the 0° treadmill exercise group, the number of electric shock in the rats were significantly increased in the 15° treadmill and -15° treadmill exercise groups ($P<0.05$). HE staining showed that the gastrocnemius muscle cells of rats had a tendency of swelling and injury after exercise. **Conclusions** At 15° treadmill exercise groups, the exercise fatigue model replication of rats was better than that of 0° or -15° treadmill exercise groups. **[Key words]** Exercise-induced fatigue; Treadmill slope; Exercise ability; Rat

丙烯酰胺对幼年大鼠学习记忆能力的影响及维生素 C 缓解作用观察

刘 筱¹, 徐敬东², 于 放¹

(1. 北京市十五中学, 北京 100054; 2. 首都医科大学基础医学院生理学与病理生理学系, 北京 100069)

[摘要] 目的 观察丙烯酰胺(ACR)对幼年大鼠学习记忆能力的影响及维生素 C 对 ACR 毒性的缓解作用。方法 将 40 只 SPF 级 SD 大鼠随机分为对照组(生理盐水)和低剂量组(2.5 mg/kg)、高剂量组(10 mg/kg)和 ACR+ 维生素 C 泡腾片(维生素 C 组, 10 mg/kg ACR+ 1 mg/kg 维生素 C), 每组 10 只, 雌雄各半。采用灌胃方式进行染毒, 每周染毒 5 次, 连续染毒 4 周。每周测量大鼠体质量、染毒结束后进行转棒试验和水迷宫试验及大鼠脑组织 HE 染色。结果 与对照组相比, 高剂量 ACR 染毒可引起大鼠体质量减轻($P<0.05$)、转棒停留时间缩短($P<0.05$)、水迷宫试验潜伏期延长($P<0.05$)和游泳路程增加($P<0.05$); HE 染色提示大鼠海马组织有损伤; 维生素 C 组的各项指标好于实验组。结论 ACR 可引起幼年大鼠运动功能和学习记忆能力降低, 维生素 C 可在一定程度上减轻 ACR 的毒性、缓解 ACR 对大鼠海马引起的损伤。

[关键词] 丙烯酰胺 ACR; 学习记忆; 氧化; 维生素 C

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)06-0460-05

丙烯酰胺(acrylamide, ACR)是一种化工原料, 广泛存在于人类的食物和饮用水中。高淀粉食物在高温烘焙过程中($>120^{\circ}\text{C}$)可以产生 ACR, 油炸马铃薯、咖啡、茶叶都是 ACR 含量高的食物^[1]。研究表明, ACR 具有神经毒性、生殖毒性和潜在的致癌性, 有一定的蓄积性^[2], ACR 的神经毒性显著影响大鼠的学习记忆能力^[3,4]。据调查, 薯片、饼干等油炸食品是儿童偏好食品之一, 导致儿童摄入 ACR 的量约为成人 2~3 倍^[5]。因此, 儿童暴露 ACR 的风险较成年人更高, 可能会对儿童造成更大危害。本实验建立幼年大鼠 ACR 染毒模型, 观察幼年大鼠成长过程中 ACR 对其学习记忆能力的影响及摄入维生素 C 是否可以降低 ACR 神经毒性作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3 周龄 SPF 级 SD 大鼠 40 只, 体质量为 70~90 g, 雌雄各半, 由北京维通利华有限公司提供 [SCXK(京)2016-0005], 均饲养于首都医科大学实验动物部 [SYXK(京) 2013-0005]。

1.2 仪器设备与试剂

ACR(纯度为 99.9%, CAS: 79-06-1, 北京化学试剂厂, 中国), 采用生理盐水配制成浓度为 2.5g/L 的储存液; 维生素 C 泡腾片(国药准字 H20056946, 北京拜耳医药保健有限公司, 中国), 采用蒸馏水配制成浓度为 0.1g/L 的储存液; 水合氯醛(CAS 号: 302-17-0, 北京化学试剂厂, 中国); TD6102 型电子天平(金兆市金诺天平仪器有限公司, 中国); 大鼠转棒实验仪(Ugo Basile, 型号: 47750, 意大利); Morris 水迷宫仪(中国医药科学院药物研究所, 型号: DNS-2, 中国)。

1.3 大鼠分组与处理

大鼠适应性饲养 7 d 后随机分成 4 组, 每组各

[收稿日期] 2017-08-10

[作者简介] 刘 筱(2000-), 女, 北京市十五中学在校高中学生。E-mail: kongluxinxiang@sina.com

[通讯作者] 于 放(1973-), 男, 硕士, 讲师。研究方向: 生物学。E-mail: 13701063432@139.com

10只,雌雄各半,其中对照组给予生理盐水;ACR低剂量组,2.5 mg/kg;ACR高剂量组,10 mg/kg;ACR高剂量加维生素C泡腾片(简称维生素C组),每日10 mg/kg ACR,同时给予1 mg/kg 维生素C。4组均采用灌胃方式给药,每周5次,连续4周,第6周后采用体积分数10%水合氯醛麻醉处死;每周测量大鼠的体质量。第5周开始进行运动能力及神经行为学测试。

1.4 外周神经损伤检测实验

4组大鼠在灌胃给药4周后进行转棒(运动协调性)实验^[6,7]。观察动物在一定转速转棒上的停留时间,推测动物的后肢运动能力,判断ACR的外周神经毒性作用。第5周时先适应性训练大鼠站在转棒上10 min,随后训练大鼠在转速为20 r/min的转棒上保持平衡,并能持续保持1 min。每日3次,连续5 d。若在此期间坠落在转棒底部,将受到转棒下电刺激器的电激惩罚,促使每次实验中大鼠都能尽最大能力在转棒上运动。当所有动物达到这一成绩后,开始正式测试。第6周正式测试时的转速20 r/min,每只动物先适应3次后,连续测5次记录大鼠能够停留在转棒上的时间,取其平均值进行统计,每次测试时间为1 min、间隔1 min。

1.5 学习记忆能力的测试

采用Morris水迷宫对动物学习记忆能力进行测试^[8]。本实验采用的Morris水迷宫仪是一个圆形水池,直径180 cm、高55 cm,隐蔽性平台高30 cm,直径12 cm。采用视频追踪技术记录大鼠寻找隐藏在水面下平台的时间(逃避潜伏期, escape latency)和游泳总路程。测试前,大鼠先被置于不含平台的水池中自由游泳2次,熟悉迷宫环境。在定位航行实验中,将平台置于第一象限,将大鼠面向池壁分别从4个入水点放入水中。若大鼠在入水游泳1 min以内未能找到水池中的平台,引导其至平台上站立20 s。大鼠爬上平台休息10 s后将其从平台上拿下来,休息1 min以后再进行下一次训练,每日于固

定时间段训练4次,连续3 d,记录每次训练逃避潜伏期和游泳总路程,取平均值进行统计学分析。第5日撤去平台,进行空间探索实验。任选一个入水点将大鼠放入水池中,记录其在1 min内的游泳轨迹,考察大鼠对原平台的记忆。另外,将平台置于第三象限(对位台子),同样记录其在1 min内的游泳轨迹,考察大鼠的整合记忆能力。第9日进行长期记忆实验,将平台依旧放在第一象限,同样训练4次,记录其平均逃避潜伏期和游泳总路程。

1.6 海马HE染色

染毒和行为学测试实验结束后,以10 mL/kg的剂量给予大鼠体积分数10%水合氯醛过量麻醉对大鼠实施安乐死后,取出大鼠的脑组织置于质量分数4%多聚甲醛中固定24 h后进行脱水、透明、浸蜡、包埋等步骤得到组织蜡块,修整切片为7 μ m,经HE染色后光学显微镜下观察海马组织。

1.7 统计学分析

调查所得数据均录入Excel 2007软件,采用t检验检查两组间差异。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ACR对大鼠体质量的影响

由表1可见,低剂量ACR组SD大鼠的体质量与对照组体质量比较无明显差异($P>0.05$);高剂量ACR组大鼠体质量始终低于对照组,至第6周时体质量与对照组达到显著差异($P<0.05$)。维生素C组体质量与对照组比较没有显著差异($P>0.05$)。

2.3 ACR对大鼠运动功能的影响

与对照组比较,雄性及雌性SD大鼠高剂量组在转棒运动的第2日和第3日,均显示出在匀速转动转棒上的停留时间降低($P<0.05$, $P<0.01$)(表2),并且雄性组的停留时间(3.00 ± 13.75 s)明显短于雌性组(26.50 ± 18.35 s, $P<0.05$);维生素C组在匀速转动转棒上的停留时间也出现性别差异,雌性SD

表1 不同剂量丙烯酰胺及维生素C摄入对大鼠体质量的影响

Table 1 Effects of different doses of acrylamide and vitamin C on the rats weight

组别	n	第1周	第2周	第3周	第4周	第5周	第6周
对照组	10	69.50 $\pm$ 9.40	120.50 $\pm$ 15.86	165.50 $\pm$ 25.46	197.17 $\pm$ 42.22	236.50 $\pm$ 51.20	253.17 $\pm$ 61.90
低剂量组	10	67.17 $\pm$ 7.49	117.17 $\pm$ 16.99	170.17 $\pm$ 21.65	210.50 $\pm$ 38.35	242.00 $\pm$ 44.29	260.83 $\pm$ 51.78
高剂量组	10	65.00 $\pm$ 2.19	115.50 $\pm$ 6.28	162.67 $\pm$ 14.17	201.33 $\pm$ 26.74	218.17 $\pm$ 41.76	223.83 $\pm$ 52.09 [△]
维生素C组	10	69.00 $\pm$ 1.41	113.33 $\pm$ 6.62	169.83 $\pm$ 19.93	208.17 $\pm$ 39.46	232.17 $\pm$ 54.16	250.17 $\pm$ 65.84

注:与对照组比较, [△] $P<0.05$

大鼠与高剂量组比较仅在第2日出现转棒上停留时间增加的趋势($P>0.05$);而在雄性维生素C组,与高剂量组比较,在第2日和第3日均显示出停留时间显著增加($P<0.05$)。

2.4 ACR 对大鼠学习记忆功能的影响

结果表明(表3),低剂量组SD大鼠上岸潜伏

期及游泳距离与对照组相比无明显差异,高剂量组SD大鼠在第2日、第5日(空间探索)、第5日(对位台子)及第九日均表现出上岸潜伏期、游泳距离较对照组显著增加($P<0.05$)。第3日及第9日,维生素C组的上岸潜伏期和游泳距离均较高剂量组低($P<0.05$),但仍高于对照组($P<0.05$)。

表 2 不同剂量丙烯酰胺及维生素 C 摄入对大鼠运动功能的影响
Table 2 Effects of different doses of acrylamide and vitamin C on motor function in rats

性 别	组别	n	停留时间/s		
			第1日	第2日	第3日
雌性大鼠	对照组	5	58.33 ± 2.89	59.47 ± 0.92	60.00 ± 0.00
	低剂量组	5	54.75 ± 9.09	39.93 ± 19.10	51.40 ± 8.89
	高剂量组	5	58.08 ± 2.70	26.50 ± 18.35 [△]	39.67 ± 16.79 [△]
	维生素C组	5	51.75 ± 12.74	33.30 ± 21.67	12.50 ± 6.85 ^{△▲}
雄性大鼠	对照组	5	50.58 ± 9.77	51.40 ± 27.81	52.80 ± 26.80
	低剂量组	5	48.58 ± 11.14	49.60 ± 25.34	26.07 ± 30.05
	高剂量组	5	43.75 ± 14.84	3.00 ± 13.75 ^{△△▽}	1.00 ± 17.90 ^{△▽}
	维生素C组	5	52.08 ± 6.87	18.87 ± 9.54 [▲]	31.60 ± 7.32 [▲]

注: 与同性别对照组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$; 与高剂量雌性比较, [▽] $P<0.05$; 与同性别高剂量组比较, [▲] $P<0.05$

表 3 不同剂量丙烯酰胺及维生素 C 摄入对大鼠水迷宫逃避潜伏期和游泳距离的影响
Table 3 Effects of different doses of acrylamide and vitamin C on the latency and the swimming distance in MWM

组别	n	第3日		第5日(空间探索)	第5日(对位台子)		第9日	
		潜伏时间/s	游泳路程/cm	游泳路程/cm	潜伏时间/s	游泳路程/cm	潜伏时间/s	游泳路程/cm
对照组	10	18.46 ± 23.55	234.72 ± 188.27	624.41 ± 118.13	27.66 ± 25.44	321.13 ± 287.62	40.60 ± 19.88	455.10 ± 227.34
低剂量组	10	35.62 ± 19.00	329.47 ± 190.02	660.12 ± 82.73	38.20 ± 22.68	368.59 ± 237.06	75.71 ± 22.31	517.39 ± 220.00
高剂量组	10	45.07 ± 12.32▲	500.14 ± 176.90▲	748.49 ± 107.38▲	38.49 ± 23.80▲	428.79 ± 209.21▲	89.58 ± 23.41▲	794.99 ± 230.55▲
维生素C组	10	36.66 ± 24.89△▲	362.99 ± 131.89△▲	729.53 ± 102.90▽	33.35 ± 22.22	342.40 ± 101.12△	68.95 ± 17.40△▲	526.65 ± 173.89△▲

注: 与对照组比较, [▲] $P<0.05$; 维生素C组与高剂量组比较, [△] $P<0.05$

2.5 ACR 对大鼠海马的损伤

从图1可见,对照组、低剂量、高剂量以及维生素C组的大鼠海马的齿状回(dentate gyrus, DG)区形态类似,CA1区细胞排列紧密,形态完整,细胞核饱满、核仁清晰,然而在高剂量组CA1区明显出现细胞排列疏松、紊乱、细胞形态不规则,胞膜皱缩、胞核固缩、破裂、浓染,甚至出现核仁模糊或消失。低剂量及维生素C组CA1区与对照组差异不明显。

3 讨论

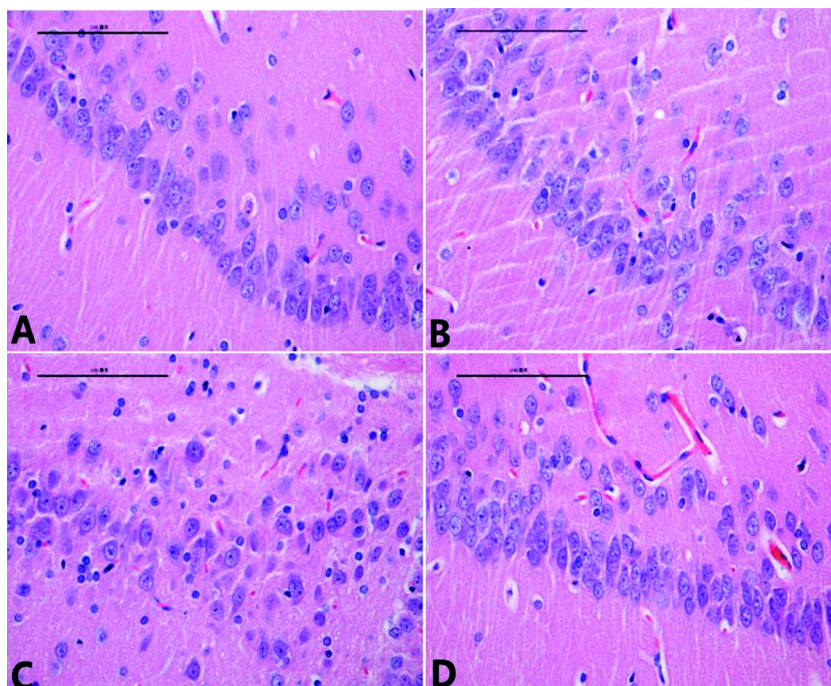
3.1 ACR 神经毒性的发病机制

ACR是神经蓄积性毒物,急性或亚急性损害以中枢神经系统及小脑功能障碍为主,慢性中毒以周围神经损害为主^[9]。本文结果表明,高剂量ACR染毒4周后,与对照组相比,大鼠体质量下降,周围神经损害明显,运动功能受损。据文献^[10-12]

报道,ACR进入人体后,在肝脏细胞色素P450的作用下,生成活性环氧丙烯酰胺,与ACR和血红蛋白结合形成加合物,聚集在神经、肝、肾及生殖系统中。另外,ACR与驱动蛋白、动力蛋白疏基相结合,抑制轴浆转运的有关酶类,从而抑制神经生长因子等的转运,导致髓鞘变性、脱失^[13-15]。此外,大鼠在ACR染毒后,脑和肝中的超氧化物歧化酶活性下降,脂质过氧化增强^[16];高浓度的ACR可通过增加细胞内活性氧簇的水平,诱导神经前体细胞的凋亡和坏死,导致神经前体细胞的增殖明显减少,这些提示氧化损伤可能是ACR神经毒性的重要发病机制。因此本实验在ACR暴露的同时给予抗氧化剂维生素C,结果表明维生素C能在一定程度上缓解ACR毒性,降低损伤。

3.2 ACR 可通过损伤海马引起大鼠学习记忆能力下降

有研究^[17]观察到ACR中毒后大鼠大脑皮层、



A: 对照组; B: 低剂量组; C: 高剂量组; D: 维生素 C 组

图 1 HE 染色观察 ACR 对大鼠海马的损伤作用及维生素 C 的保护作用 (HE $\times 100$, 标尺: 100 μm)Figure 1 The effect of acrylamide on rat hippocampal injury and the protective effect of vitamin C by HE staining (HE $\times 100$, scale: 100 μm)

小脑、海马及视丘等出现多发部位损害, 海马, 属大脑边缘系统, 与学习记忆关系密切。大鼠海马通常由 CA1、CA3 和 CA4 区组成, CA4 区有齿状回(DG)的多形层。研究^[18]表明, 海马 CA1 区锥体神经元对缺血性损伤十分敏感, CA3 区和 DG 区则对缺血性刺激相对耐受, 反应出 CA1 区是易损区。本文结果显示, ACR 的长期蓄积引起 SD 大鼠海马组织 CA1 区的损伤, 出现颗粒细胞层数明显减少、细胞排列紊乱、细胞形态改变及细胞核固缩, 因此本文作者认为, 高剂量的 ACR 可能直接损伤海马组织, 进而影响了大鼠学习记忆能力。Morris 水迷宫实验证实, 高剂量组 SD 大鼠的短期记忆及长期记忆均受到影响, 表现为逃避潜伏期及游泳总路程较对照组明显增加, 这也证明 ACR 对幼年大鼠记忆力的影响可能是通过损伤 CA1 区发生的。

3.3 维生素 C 一定程度上控制了大鼠的 ACR 毒性

天然维生素 C 广泛存在于新鲜水果和绿色蔬菜中, 在体内可直接参与氧化还原反应或间接还原其它抗氧化系统, 是重要的水溶性强抗氧化剂。本文结果表明, 维生素 C 组与高剂量组相比, 长期记忆的潜伏期缩短, 但仍长于对照组。说明 1 mg/kg 的维生素 C 一定程度上缓解了 ACR 对 SD 大鼠的海

马损伤, 但并未扭转或彻底清除毒性作用。维生素 C 可能通过清除自由基减轻 ACR 的神经毒性, 对脑组织有保护作用, 其具体机制有待进一步阐明。

本文结果提示, 人类应该尽可能避免摄入高 ACR 食品, 经常摄入高 ACR 食品的人群尽可能搭配高维生素 C 食品, 以降低其危害。

(致谢: 感谢首都医科大学实验动物中心提供我们实验的场所; 感谢首都医科大学公卫学院余焕玲教授、实验动物学系杜小燕副教授给予论文的指导和英文撰写的帮助; 感谢首都医科大学解剖教研室杨春副教授给予大鼠脑 HE 染色的指导与帮助。)

参考文献:

- [1] 刘宇洁, 谷大海, 普岳红, 等. 油炸马铃薯片中丙烯酰胺形成的协同阻断研究[J]. 食品安全质量检测学报, 2016, 7 (1):331-337.
- [2] 李红秀. 丙烯酰胺毒性及检测方法[J]. 黑龙江医药, 2015, 28(3):472-474.
- [3] Dong J, Ding J, Weng J, et al. Graphene enhances the shape memory of poly (acrylamide-co-acrylic acid) grafted on graphene[J]. Macromol Rapid Commun, 2013, 34(8):659-664.
- [4] 张蔓, 孟涛, 赵文锦, 等. 丙烯酰胺对雌性 Wistar 大鼠学习

- 记忆和长时程增强的影响及其可能机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2017, 31(1):87-93.
- [5] 罗勤. 油炸食品儿童应少吃[J]. 家庭医学, 2013(5): 15.
- [6] Alessandri B, Vonau MH, Classen W. The use of an unbaited radial maze in neurotoxicology: II. sensory inputs, general malaise and locomotor activity[J]. Neurotoxicology, 1994, 15(2):359-370.
- [7] Sekeroglu ZA, Aydin B, Sekeroglu V. Argan oil reduces oxidative stress, genetic damage and emperipolexis in rats treated with acrylamide[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 94: 873-879.
- [8] 马宁, 徐海滨. 神经行为毒理学测试方法的现状和进展[J]. 中国食品卫生杂志, 2009, 21(1):63-67.
- [9] He Y, Tan D, Mi Y, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates cerebral cortex damage and promotes brain regeneration in acrylamide-treated rats[J]. Food Funct, 2017, 8(6):2275-2282.
- [10] Hamdy SM, Shabaan AM, Abdel Latif AKM, et al. Protective effect of Hesperidin and Tiger nut against Acrylamide toxicity in female rats[J]. Exp Toxicol Pathol, 2017, 69(8):580-588.
- [11] 李闪霞, 姜红芹, 崔宁, 等. 丙烯酰胺对大鼠大脑皮质神经细胞退变及bcl-2和bax表达的影响[J]. 毒理学杂志, 2008, 22(1):31-32.
- [12] 赵萌萌, 张亚琼, 李细霞, 等. 丙烯酰胺神经发育毒性的研究进展[J]. 神经解剖学杂志, 2014, 30(3):385-388.
- [13] Razavinasab M, Shamsizadeh A, Shabani M, et al. Pharmacological blockade of TRPV1 receptors modulates the effects of 6-OHDA on motor and cognitive functions in a rat model of Parkinson's disease[J]. Fundam Clin Pharmacol, 2013, 27(6): 632-640.
- [14] 李坊贞, 刘菲予, 黄贤华, 等. 丙烯酰胺对小鼠氧化损伤的实验研究[J]. 赣南医学院学报, 2005, 25(2):133-134.
- [15] Lu CH, Guo W, Hu Y, et al. Multitriggered Shape-Memory Acrylamide-DNA Hydrogels[J]. J Am Chem Soc, 2015, 137(50):15723-15731.
- [16] Li L, Sun HY, Liu W, et al. Silymarin protects against acrylamide-induced neurotoxicity via Nrf2 signalling in PC12 cells[J]. Food Chem Toxicol, 2017, 102:93-101.
- [17] 孙晓彩, 李力, 张敏, 等. Wistar 大鼠海马 CA1 区、CA3 区和齿状回区的解剖分割[J]. 中国应用生理学杂志, 2012, 28(2):189-192.
- [18] 袁向山, 马全祥, 毛泽善, 等. 丙烯酰胺染毒小鼠海马组织结构和 Caspase-3、GFAP 表达的变化[J]. 毒理学杂志, 2011, 25(3):187-190.

Effects of Acrylamide on Learning and Memory Ability in Young Rats and Toxicity Alleviation by Vitamin C

LIU Xiao¹, XU Jing-dong², YU Fang¹

(1. Beijing 15 Middle School, Beijing 100054, China; 2. Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medical Sciences, The Capital Medical University, Beijing 100069, China)

[Abstract] Objective To study the effects of acrylamide on learning and memory ability in young rats and alleviated effect of vitamin C. **Methods** Forty SPF grade SD rats weighing 70-90 g were randomly divided into four groups, 10 in each group and male and female in half. The control groups were given normal saline. The rats in experimental groups were given acrylamide dissolved in normal saline, at the doses of 2.5 mg/kg, 10 mg/kg and vitamin C group was given 10 mg/kg and 1 mg/kg vitamin at the same time. All animals were given test substances through oral gavage, 5 days/week, for 4 weeks. Body weight was measured per week. Special tests included the rotarod Test and the staining of rat brain tissue. Learning and memory ability was tested by Morris water maze (MWM). **Results** Compared with the control group, the weight of rats in high-dose group treated with acrylamide was decreased ($P<0.05$) and time for rats standing rotarod was decreased ($P<0.05$) and the latency was extended and the distance was increased by Morris water maze (MWM); The HE staining suggested that the hippocampal tissue of rats was damaged. The indexes of vitamin C group were better than the experimental groups. **Conclusion** Acrylamide can damage motor function and learning-memory capability in young rats and vitamin C can decrease the ACR toxicity and alleviate the hippocampal tissue damage in some degree.

[Key words] Acrylamide; Learning and memory; Oxidation; Vitamin C

实验用斑马鱼成鱼内脏组织 病理学检查方法的优化

田芳¹, 王玉柱¹, 夏敏杰¹, 孙冰¹, 丁训城¹, 李卫华¹, 许慧慧², 胡晶莹¹

(1. 上海市计划生育科学研究所, 国家计划生育药具重点实验室, 上海 200032;

2. 上海市疾病预防控制中心, 上海 200336)

[摘要] 目的 探索并优化适合于斑马鱼成鱼内脏组织的病理学检查技术。方法 将斑马鱼整条固定于Dietrich's固定液后,分段切开,取包含内脏组织的胸腹段,剥除斑马鱼鱼皮,梯度乙醇脱水时间优选为30 min、二甲苯透明、石蜡包埋、沿斑马鱼体轴纵向连续切片、HE染色后用温水冲洗切片进行颜色反蓝,正置显微镜下观察效果。结果 经过反复的条件摸索和优化,光学显微镜下观察心脏、肝脏、脾脏、胆囊、肾脏、胰腺、消化道、精巢和卵巢等组织切片和染色的效果,可见斑马鱼组织均切片完整,无折叠或断裂,各脏器的解剖学与组织细胞学结构清晰,易于辨认,细胞核与细胞质染色分明。结论 优化后的斑马鱼成鱼内脏组织病理学方法效果较为理想,可获得高质量的内脏组织学标本。

[关键词] 斑马鱼; 内脏组织; 连续切片; HE染色

[中图分类号] R332 Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)06-0465-05

斑马鱼(Zebrafish, *Danio rerio*)是小型热带硬骨淡水鱼,具有繁殖能力强、性成熟周期短、胚胎透明、个体小、易于养殖等优点。近年来,斑马鱼作为实验模式生物,已被广泛运用于环境毒理学、发育生物学等研究领域^[1,2]。

在开展斑马鱼研究工作中,高质量的组织病理学检查是必不可少的一项实验技术,包括斑马鱼胚胎以及成鱼心脏、肝脏、脾脏、肾脏和性腺(包括精巢和卵巢)等内脏组织的病理切片及染色观察^[3-10]。

在斑马鱼研究的经典技术用书《The Zebrafish Book》^[11]中,主要描述了幼鱼和胚胎的组织学实验方法,对斑马鱼成鱼的组织病理切片实验方法并未进行详细阐述。由于斑马鱼的脏器非常小,结构性质也与常用哺乳类动物有区别,因此在病理学检查实践中经常出现切片和染色效果差的情况,无法满足研究需求。

本研究在现有斑马鱼组织切片染色方法的基础上^[12,13],进行了条件摸索和优化,旨在探索一种较为理想的斑马鱼成鱼内脏组织病理学实验方法,为开展斑马鱼研究工作的同行提供技术参考。

[收稿日期] 2017-05-10

[基金项目] 上海市科委实验动物研究专项(15140901200);上海市第四轮公共卫生三年行动计划重点学科建设计划—环境卫生学与劳动卫生学(15GWZK0201);上海市青年科技英才扬帆计划(15YF1410000)

[作者简介] 田芳(1985-),女,硕士,助理研究员,生殖毒理学方向。E-mail: 376616808@qq.com

[通讯作者] 胡晶莹,女,博士,助理研究员,生殖毒理方向。

E-mail: hujingying@aliyun.com;

许慧慧,女,硕士,主任医师,环境卫生方向。

E-mail: xuhuihui@scdc.sh.cn.

1 材料与方法

1.1 实验动物

成年野生型(AB系)斑马鱼购自国际斑马鱼研究中心(俄勒冈州立大学),体长3~4 cm,分别选取雌雄斑马鱼各5条。

1.2 试剂与仪器

Dietrich's固定液^[11](实验室配制,配方:体积分

数 100% 乙醇 300 mL, 冰醋酸 20 mL, 甲醛 100 mL, 蒸馏水 580 mL, 混匀封口); 二甲苯(国药集团化学试剂有限公司); 无水乙醇(国药集团化学试剂有限公司); 体积分数 95% 乙醇(上海实验试剂有限公司); 体积分数 75% 乙醇(上海实验试剂有限公司); Harris 苏木素染色液(德国 Carl Roth GmbH Co. KG); 伊红(国药集团化学试剂有限公司); 中性树胶(国药集团化学试剂有限公司); Leica RM2235 石蜡切片机(德国莱卡公司); Olympus BX43 型生物显微镜(日本奥林巴斯株式会社), Leica DFC425 彩色数码摄像机(德国莱卡公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 切片标本制作方法 斑马鱼在 Dietrich's 固定液固定 72 h, 如图 1 横切分成头段、胸腹段和臀段, 取胸腹段自来水冲洗 30 min 后, 将斑马鱼鱼皮剥除, 进行脱水、透明和浸蜡, 具体步骤: 体积分数 75% 乙醇 30 min; 体积分数 85% 乙醇 30 min; 体积分数 95% 乙醇 30 min; 100% 乙醇(I) 30 min; 100% 乙醇(II) 30 min; 100% 乙醇: 二甲苯(1:1) 10 min; 二甲苯(I) 至组织半透明; 二甲苯(II) 组织全透明; 二甲苯: 石蜡(1:1) 10 min; 石蜡(I) 60 min; 石蜡(II) 60 min; 石蜡(III) 60 min, 斑马鱼一侧胸腹段平行于蜡模底部包埋, 蜡块凝固后, 沿斑马鱼体轴纵向连续切片, 切至内脏部分开始用载玻片收集组织切片, 直至背侧中线脊椎处, 切片厚度为 5 μ m。

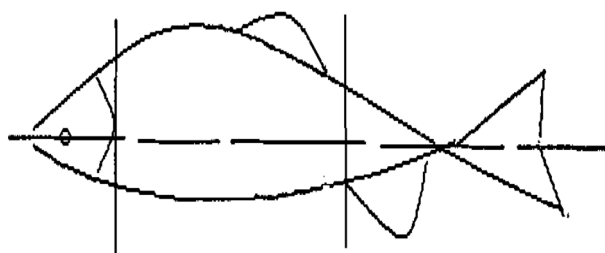


图 1 斑马鱼分段切开示意图

1.3.2 连续切片 HE 染色步骤 切片烘干后, 进行脱蜡, 水化, 染色, 脱水, 透明, 封片。具体步骤为: 二甲苯(I) 10 min, 二甲苯(II) 10 min, 二甲苯(III) 10 min, 体积分数 100% 乙醇(I) 3 min, 体积分数 100% 乙醇(II) 3 min, 体积分数 95% 乙醇 2 min, 体积分数 85% 乙醇 2 min, 体积分数 75% 乙醇 2 min, 双蒸水 1 min, Harris 苏木素染色液

1.5 min, 温水冲洗 7 min, 双蒸水 1 min, 体积分数 95% 乙醇 1 min, 伊红染色液 1 min, 体积分数 75% 乙醇 30 s, 体积分数 85% 乙醇 1 min, 体积分数 95% 乙醇(I) 2 min, 体积分数 95% 乙醇(II) 2 min, 体积分数 100% 乙醇(I) 3 min, 体积分数 100% 乙醇(II) 3 min, 二甲苯(I) 2 min, 二甲苯(II) 2 min, 二甲苯(III) 2 min, 中性树胶封片, 显微镜下观察并拍照。

1.3.3 标本制作方法改进 经过反复的条件摸索和优化, 确定了四点改进方法。首先, 胸腹段脱水前先将固定后的斑马鱼鱼皮剥除, 这一步骤对观察后面的透明过程非常重要; 其次, 沿斑马鱼体轴纵向连续切片, 直至背侧中线脊椎处, 切至内脏部分开始用载玻片收集组织切片; 再次, 根据剥皮后斑马鱼二甲苯透明程度, 摸索最佳脱水时间, 梯度乙醇脱水时间优化为 30 min; 最后, HE 染色后用温水冲洗切片进行颜色反蓝。

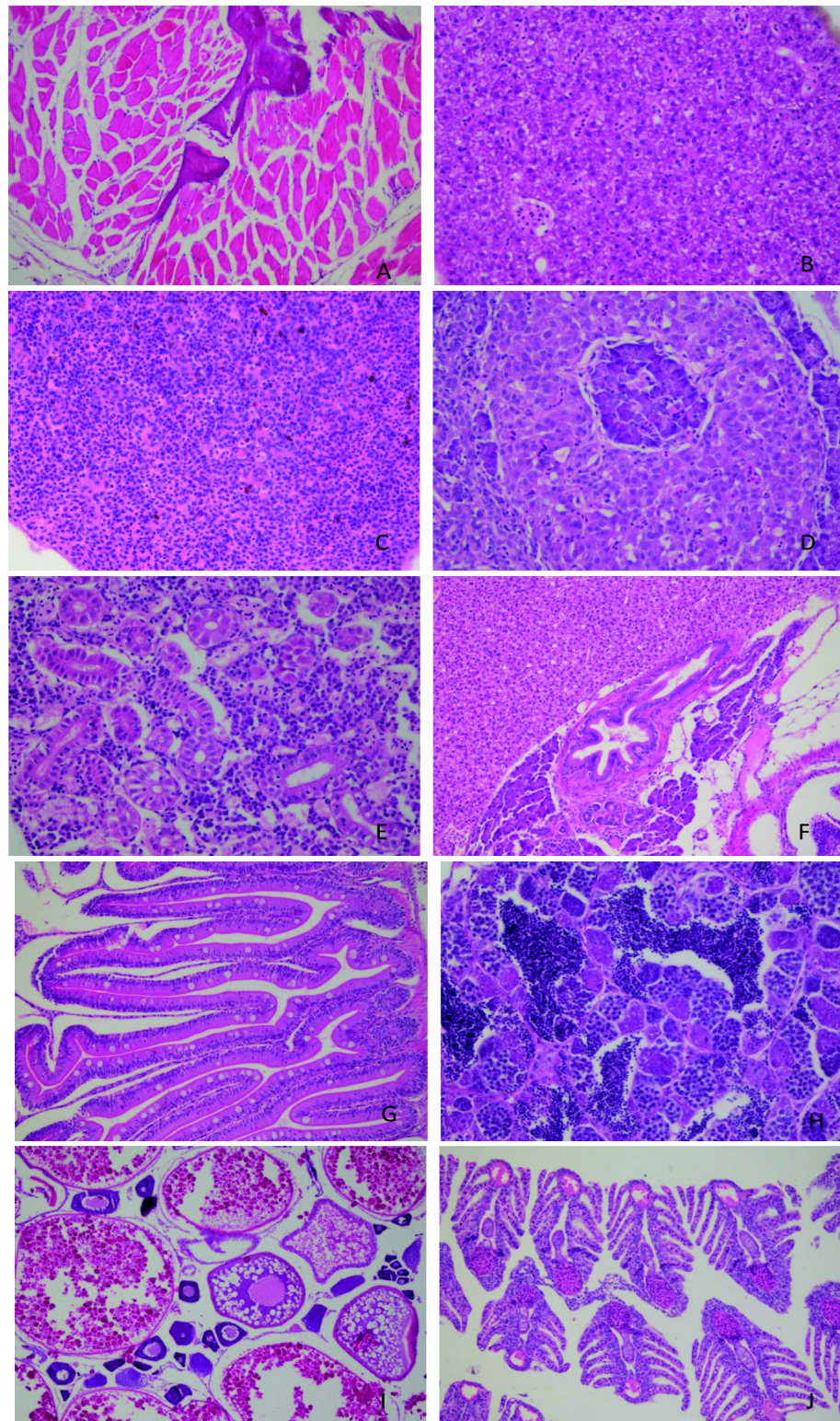
2 结果

采用优化的方法制作斑马鱼成鱼内脏组织连续切片和染色, 显微镜下分别观察心脏、肝脏、脾脏、胆囊、肾脏、胰腺、消化道及雌雄斑马鱼性腺(精巢和卵巢), 结果见图 2。图 2J 为部分斑马鱼鳃没有全部切除, 组织切片染色的结果。

从图中可以可到斑马鱼组织均切片完整, 无折叠或裂开, 组织细胞核蓝染, 细胞质红染区分明显, 不同内脏组织解剖学和细胞学特点清晰, 没有出现组织脆裂或收缩。

3 讨论

与哺乳类动物相比, 斑马鱼体积较小, 内脏脏器非常集中, 主要在胸腹段, 包括心脏、肝脏、脾脏、肾脏、消化道及性腺等组织和器官, 有研究者采用固定前取出各内脏脏器和组织进行固定、包埋和切片^[10,13], 但因为斑马鱼内脏脏器比较小, 新鲜取材时容易对组织造成物理损伤, 切片的组织学形态也会改变。本实验采用整鱼固定后连续切片, 可最大程度保持斑马鱼内脏各脏器的组织形态, 包埋切片后, 染色显示各脏器细胞学特点明显, 结合解剖学大致定位, 有利于对各脏器组织进行病理学研究。斑马鱼内脏组织病理学研究必



A: 心脏(HE × 20); B: 肝脏(HE × 40); C: 脾脏(HE × 40); D: 胰腺(HE × 40); E: 肾脏(HE × 40); F: 胆囊(HE × 20); G: 消化腺(HE × 20); H: 精巢(HE × 40); I: 卵巢(HE × 10); J: 腮腺(HE × 20)

图 2 斑马鱼内脏器官组织学观察

须依据清晰高质量的脏器组织染色切片,因此,成功的连续切片标本制作是关键,包括固定、脱水、透明、包埋、切片和染色。若脱水不充分,无法进行后面的透明和浸蜡;二甲苯没有完全置换乙醇,组织内也不能充满石蜡,都不能顺利切片。相反,乙醇处理时间太长,容易引起组织收缩;二甲苯透明处理时间过长,则会引起组织脆裂,因此,每个步骤都需要反复摸索和优化。

斑马鱼固定时保证鱼体的平展,避免弯曲,为保证内脏器官完整,进行分段时垂直于体轴,分别在鳃盖后方和臀鳍前平泄殖孔处横切,将斑马鱼分为头段、胸腹段和臀段,取胸腹段制作连续切片标本,可以观察到完整的内脏器官。鳃作为斑马鱼的呼吸器官,可通过观察病理组织变化评价其呼吸机能^[10,14],本实验显示部分鳃没有完全切除的斑马鱼,通过本方法得到的斑马鱼鳃组织切片无折叠或裂开,所以评价目的器官为斑马鱼鳃时,可以考虑分段时在鳃盖前方横切,后续采用本方法包埋切片,染色后也可以清晰观察斑马鱼鳃组织学变化。

因为斑马鱼体侧具有像斑马一样的暗蓝与银色相间的条纹,本研究预实验表明二甲苯透明过程因鱼皮反射光线,不能观察透明程度,因此考虑将鱼皮剥除。首先尝试了新鲜斑马鱼剥皮,但难度大,并且具有牵拉过程伤及内脏,因此改为固定后对斑马鱼进行剥皮,比较容易完成,而且有利于保持内脏组织形态。

固定后斑马鱼进行脱水,根据剥皮后斑马鱼二甲苯透明程度,摸索最佳脱水时间,本实验设计梯度乙醇脱水时间分别设为:10 min、30 min、45 min,结果显示脱水30 min和45 min组织透明均较为理想,考虑节约时间,梯度乙醇脱水时间优化为30 min。

HE染色过程也要注意:首先,染色前将苏木素染色液过滤,二甲苯和梯度乙醇保持新鲜;其次,苏木素染色后,用温水(40℃左右)冲洗切片进行颜色反蓝。通过优化制作方法,制作出的斑马鱼连续切片标本,各脏器组织染色效果好,可以清晰观察各组织结构和细胞学特点。

综上所述,本研究通过反复摸索,优化了斑马鱼成鱼内脏组织病理学标本制作和染色方法,效

果较为理想。针对已有斑马鱼成年连续切片方法文献在操作细节上进行进一步细化和完善,补充并丰富了不同组织脏器的HE染色图片^[12]。

本研究为获得高质量的斑马鱼内脏组织病理学标本提供了一种方法,希望能为开展斑马鱼研究工作的同行们提供技术参考。

参考文献:

- [1] 李洁斐,李卫华,王强毅,等. 斑马鱼应用于毒理学研究的现状[J]. 实验动物与比较医学, 2005, 25(4):247-252.
- [2] 常嘉,陆亮,王庆利,等. 斑马鱼在药物早期毒性筛选中的应用进展[J]. 中国新药杂志, 2013, 22(13):1500-1504.
- [3] Schneider AC, Gregorio C, Uribe-Cruz C, et al. Chronic exposure to ethanol causes steatosis and inflammation in zebrafish liver[J]. World J Hepatol, 2017, 9(8):418-426.
- [4] Cornet C, Calzolari S, Minana-Prieto R, et al. ZeGlobalTox: an innovative approach to address organ drug toxicity using zebrafish[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(4):864.
- [5] 张云,邹玉,韩利文,等. 异烟肼对斑马鱼的发育毒性及其机制研究[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2016, 30(10):1091.
- [6] 刘林,赵群芬,金凯星,等. 纳米氧化锌对斑马鱼肝脏的毒性效应[J]. 环境科学, 2015(10):3884-3891.
- [7] 王雪,王希敏,刘可春,等. 斑马鱼胚胎在肾毒性损伤研究中的应用进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2014, 28(1):134-138.
- [8] 蒲韵竹,王卓,王丽星,等. 敌敌畏对斑马鱼的遗传毒性和生殖毒性作用表现[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(2):263-267.
- [9] 郑美娜,刘金荣,吴雄宇,等. 香泽兰总黄酮对斑马鱼脾脏毒性病理组织学作用[J]. 中兽医医药杂志, 2012, 31(1):5-8.
- [10] 杨蓉,聂芳红,孔庆波,等. 3-甲基胆蒽对斑马鱼组织病理效应的初步研究[J]. 广东海洋大学学报, 2008, 28(4):91-94.
- [11] Westerfield M. The Zebrafish Book: A Guide for the Laboratory Use of Zebrafish (*Danio Rerio*)[M]. Eugene: University of Oregon Press, 2000.
- [12] 袁广明,胡黎平,李燕,等. 成年斑马鱼石蜡连续切片的制作和苏木精-伊红染色[J]. 解剖学研究, 2006, 28(1):73-75.
- [13] 郑伟,严继舟. 斑马鱼组织石蜡切片质量的优化[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11):260-263.
- [14] 孙馨,王雅楠,王薇,等. 水中纳米零价铁在斑马鱼体内的生物富集和组织病理学研究[J]. 安全与环境学报, 2016, 16(3):371-377.

Optimization on Methodology of Histopathological Examination in Adult Zebrafish Visceral Tissues

TIAN Fang¹, WANG Yu-zhu¹, XIA Min-jie¹, SUN Bing¹,

DING Xun-cheng¹, LI Wei-hua¹, XU Hui-hui², HU Jing-ying¹

(1. State Key Labs of Family Planning Devices, Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032, China; 2. Shanghai Municipal Center For Disease Control & Prevention, Shanghai 200336, China)

[Abstract] **Objective** To explore the optimized method of paraffin serial section and hematoxylin-eosin (HE) staining of the adult zebrafish visceral tissues. **Methods** After the zebrafish was fixed, the tissues were segmented, and the thoracic/abdominal segment which contains internal organs was stripped of skin and dehydrated by gradient ethanol (dehydration time was optimized to 30 min), transparented by xylene and embedded by paraffin. The tissue was sectioned serially along the body axis, rinsed with warm water after HE staining, and observed under microscope. **Results** The microscopic observation of heart, liver, spleen, gallbladder, kidney, pancreas, gastrointestinal tract, testis and ovary showed that effects of tissue sectioning and staining were favorable. The sections were intact without collapse or fracture, the anatomical and cytological structure of all organs were clear and complete, the nucleus were neatly blue-stained and the cytoplasm were neatly red-stained. **Conclusion** With the optimized histopathological method, we were able to obtain high quality histological specimens of the internal organs of adult zebrafish.

[Key words] Zebrafish; Visceral tissue; Serial section; Hematoxylin-eosin (HE) staining

近交系 CMU/1 和 CMU/2 长爪沙鼠 Willis 环缺失与生理生化参数比较

李 迎^{1,3}, 崔晓霞¹, 杜小燕², 马兰芝¹, 尚世臣¹,

黄 斌¹, 郭子潇¹, 赵 权³, 李桂军¹, 王冬平¹, 陈振文²

(1. 军事科学院军事医学研究院实验动物中心, 北京 100071; 2. 首都医科大学实验动物科学部, 北京 100069; 3. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118)

[摘要] 目的 比较 CMU/1 和 CMU/2 近交系长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环缺失比率, 检测血液生理生化指标, 分析比较二者差异, 为其实验应用提供参考数据。方法 采用 Beckman 全自动生化分析仪(CX5)和日本光电全自动血细胞分析仪(MEK-7222K)对 17 项血液生化指标: 总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、尿酸(URIC)、总胆红素(TBIL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LD)、肌酸激酶(CK)、淀粉酶(AMY)、镁(Mg)以及葡萄糖(GLU)和 22 项血液生理指标: 白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYM)、中性粒细胞(NEUT)、单核细胞(MON)、嗜酸性粒细胞(EOS)、嗜碱性粒细胞(BAS)、淋巴细胞百分比(LYM%)、中性粒细胞百分比(NEUT%)、单核细胞百分比(MON%)、嗜酸性粒细胞百分比(EOS%)、嗜碱性粒细胞百分比(BAS%)、红细胞(RBC)、平均红细胞血红蛋白含量(MCH)、红细胞体积分布宽度(RDW)、血红蛋白(HGB)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞压积(HCT)、红细胞平均体积(MCV)、血小板(PLT)、血小板压积(PCT)、血小板平均体积(MPV)、血小板体积分布宽度(PDW)进行测定。应用 SPSS23.0 软件进行独立样本 *t* 检验的统计分析。结果 CMU/1 和 CMU/2 近交系长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环缺失比例均为 76% 以上; 血液生理生化的 12 项指标: GLU、CRE、TG、CHOL、PLT、MPV、BAS、LYM%、PDW、HCT、MCV、MCH 雌雄差异显著; CMU/1 和 CMU/2 雌性 ALT、PLT、PDW 差异显著, 雄性的 HDL、MCH 差异显著; 品系间 3 项指标 ALP、ALT、AST 差异显著。结论 脑缺血模型长爪沙鼠近交系的基因型对血液生化和生理指标有一定的影响。

[关键词] 长爪沙鼠; 近交系; 脑缺血模型; 血液生化指标; 血液生理指标

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] A [文章编号] 1674-5817(2017)06-0470-05

长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环前后交通支存在不同程度的缺失, 因不能构成完整的 Willis 动脉环而

成为天然的脑缺血动物模型, 在研究脑缺血和脑梗塞疾病治疗方面是理想的动物模型而得到广泛的应用^[1]。然而由于 Willis 环前后交通支类型较为复杂, 使模型的稳定性和均一性较差, 因此定向培育长爪沙鼠脑缺血模型高发生率近交系十分必要。我国长爪沙鼠实验动物化研究已有一些报道^[2], 但近交系动物尚未见报道。前期通过脑缺血模型症状和脑底动脉缺失类型定向培育近交系长爪沙鼠, 目前已具有近交 20 代后的近交系动物 2 个支系, 分别命名为 CMU/1(首都医科大学, Capital medical university 首字

[收稿日期] 2017-08-10

[基金项目] 国家科技支撑计划课题(2015BAI09B01-04)

[作者简介] 李 迎(1993-), 女, 硕士, 研究方向: 实验动物生物学特性研究。E-mail: 651998038@qq.com

[通讯作者] 王冬平(1964-), 女, 副研究员, 研究方向: 实验动物生物学特性研究。E-mail: Wangdp6493@126.com
陈振文(1959-), 男, 教授, 研究方向: 实验动物遗传学。E-mail: czwen@ccmu.edu.cn

母大写)和 CMU/2, 但有关 2 个近交系动物生物学特性指标尚不完全清楚。本实验针对 2 个支系的 17 项血液生化和 22 项血液生理指标进行测定, 分析 CMU/1 与 CMU/2 近交系动物雌雄之间和 2 个近交系动物之间的差异, 为该近交系动物的生物学特性提供基础数据, 为其特性研究和应用提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

3~4 月龄 CMU/1 近交系长爪沙鼠 77 只(雌 26, 雄 51), CMU/2 近交系长爪沙鼠 44 只(雌 28, 雄 16), F21~23 代, 由首都医科大学实验动物中心提供, 实验动物自由采食和饮水, 室温为 20~24 °C [SYXK(京)-2013-0005]。本实验通过首都医科大学实验动物和动物实验伦理委员会批准(No. AEEI-2017-032)。

1.2 仪器设备及主要试剂

生化数据使用 Beckman 全自动生化分析仪(CX5 PRO)及配套试剂, Beckman 公司(美国)提供生化各项指标的配套试剂; 血细胞计数使用日本光电全自动血细胞分析仪(MEK-7222K)及配套试剂, 为上海东湖生物医学有限公司生产。血液离心使用日本 Hitachi 公司低温离心机(CF16RX); 解剖显微镜购自日本奥林巴斯公司(BX51)。

1.3 方法

1.3.1 血液标本采集和处理 实验前沙鼠空腹 12~24 h, 自由饮水。眼眶静脉取血, 静止 30 min, 5 000 r/min 离心 10 min 制备血清, 质量分数 1% 的肝素抗凝, 抗凝血备用。

1.3.2 CMU/1 和 CMU/2 近交系沙鼠脑缺失观察 取血处死, 脑部解剖, 通过解剖显微镜观察沙鼠 Willis 动脉环缺失状态。

1.3.3 测定指标 血液生化指标 17 项: 总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆固醇(CHOL)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL)、尿素氮(BUN)、肌酐(CRE)、尿酸(URIC)、总胆红素(TBIL)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LD)、肌酸激酶(CK)、淀粉酶(AMY)、镁(Mg)以及葡萄糖(GLU)。

血液生理指标 22 项: 白细胞(WBC)、淋巴细胞(LYM)、中性粒细胞(NEUT)、单核细胞(MON)、嗜酸性粒细胞(EOS)、嗜碱性粒细胞(BAS)、淋巴细胞百分比(LYM%)、中性粒细胞百分比(NEUT%)、单核细胞百分比(MON%)、嗜酸性粒细胞百分比(EOS%)、嗜碱性粒细胞百分比(BAS%)、红细胞(RBC)、平均红细胞血红蛋白含量(MCH)、红细胞体积分布宽度(RDW)、血红蛋白(HGB)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞压积(HCT)、红细胞平均体积(MCV)、血小板(PLT)、血小板压积(PCT)、血小板平均体积(MPV)、血小板体积分布宽度(PDW)。

1.3.4 数据处理 采用 SPSS 23.0 软件进行统计学处理, 使用独立样本 *t* 检验进行数据分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CMU/1 和 CMU/2 近交系环缺失情况

通过脑解剖, 显微镜下观察 Willis 动脉环前交通支细小或缺失, 左缺失、右缺失和双侧缺失及细小等现象统计为缺失, 否则为完整。结果表明, CMU/1 Willis 环缺失为 76.62%(59/77), CMU/2 为 77.27%(34/44)。

2.2 血液生化检测

CMU/1 近交系沙鼠的 GLU、CRE 指标雌雄差异显著($P < 0.05$), TG 差异极显著($P < 0.01$); CMU/2 近交系沙鼠的 CHOL 指标雌雄差异显著($P < 0.05$)。CMU/1 与 CMU/2 近交系沙鼠雌性的 ALT 指标差异显著($P < 0.05$), 雄性的 HDL 指标差异显著($P < 0.05$)。CMU/1 和 CMU/2 近交系沙鼠之间的 ALP、ALT、AST 指标差异显著($P < 0.05$)其余均无显著性差异($P > 0.05$)(表 1)。

2.3 血液生理检测

CMU/1 近交系沙鼠的 PLT、MPV、BAS、LYM% 指标雌雄差异显著($P < 0.05$), PDW 差异极显著($P < 0.01$); CMU/2 近交系沙鼠的 HCT、MCV、MCH 指标雌雄差异显著($P < 0.05$)。CMU/1 与 CMU/2 近交系沙鼠雌性的 PLT、PDW 指标差异显著($P < 0.05$), 雄性的 MCH 指标差异显著($P < 0.05$), 其余均无显著性差异($P > 0.05$)(表 2)。

表 1 CMU/1 和 CMU/2 近交系沙鼠的血液生化指标
Table 1 Blood biochemical parameters in CMU/1 and CMU/2 inbred strains

检测项目	性别	CMU/1	CMU/2
ALB/g · L ⁻¹	♀	21.29 ± 1.88	21.45 ± 2.13
	♂	20.80 ± 2.58	24.09 ± 1.92
TP/g · L ⁻¹	♀	58.20 ± 4.02	60.03 ± 4.20
	♂	58.04 ± 4.45	64.00 ± 3.77
ALP/IU · L ⁻¹	♀	260.85 ± 57.70	208.88 ± 48.26
	♂	255.57 ± 76.71	255.00 ± 69.31
BUN/mmol · L ⁻¹	♀	13.31 ± 2.11	11.55 ± 1.94
	♂	12.00 ± 2.77	15.12 ± 2.74
HDLD/mmol · L ⁻¹	♀	1.58 ± 0.32	1.71 ± 0.33
	♂	1.40 ± 0.28	2.01 ± 0.47 [#]
CHOL/mmol · L ⁻¹	♀	2.02 ± 0.49	2.10 ± 0.33
	♂	2.04 ± 0.53	2.71 ± 0.63 [*]
ALT/IU · L ⁻¹	♀	89.12 ± 15.78	80.75 ± 9.81 [#]
	♂	98.73 ± 16.04	86.36 ± 17.96
URIC/μmol · L ⁻¹	♀	20.81 ± 10.76	17.06 ± 8.80
	♂	19.98 ± 12.60	20.60 ± 3.06
GLU/mmol · L ⁻¹	♀	4.49 ± 0.62	4.71 ± 0.65
	♂	4.44 ± 1.29 [*]	4.36 ± 0.72
TG/mmol · L ⁻¹	♀	0.20 ± 0.08	0.24 ± 0.14
	♂	0.27 ± 0.19 ^{**}	0.22 ± 0.09
AST/IU · L ⁻¹	♀	318.15 ± 67.38	279.30 ± 48.49
	♂	320.33 ± 76.19	303.00 ± 51.96
Mg/mmol · L ⁻¹	♀	1.41 ± 0.14	1.33 ± 0.14
	♂	1.42 ± 0.14	1.54 ± 0.15
TBIL/μmol · L ⁻¹	♀	6.57 ± 1.91	5.87 ± 1.55
	♂	6.80 ± 2.12	5.66 ± 1.33
LD/IU · L ⁻¹	♀	329.09 ± 174.97	266.10 ± 112.85
	♂	306.64 ± 158.17	393.36 ± 107.88
CK/IU · L ⁻¹	♀	1 643.00 ± 508.75	1 542.93 ± 420.64
	♂	1 918.85 ± 590.18	1 485.33 ± 518.00
CRE/mg · L ⁻¹	♀	2.10 ± 0.60	1.80 ± 0.70
	♂	1.90 ± 0.80 [*]	2.10 ± 0.70
AMY/IU · L ⁻¹	♀	1 186.42 ± 118.96	1 221.67 ± 160.38
	♂	1 181.78 ± 155.38	1 240.73 ± 131.69

注: 同品系性别间比较, **P*<0.05, ***P*<0.01; 相同性别 CMU/2 与 CMU/1 比较, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01

3 讨论

血液各项成分的相对稳定是生命活动正常进行的基本条件。实验动物血液生化和生理参数主要是动物自身的遗传因素与环境因素决定。遗传因素是决定实验动物血液生理参数的内在物质基础, 而环境因素则是决定血液生理参数变化的外在条件^[3]。正

表 2 CMU/1 和 CMU/2 近交系沙鼠的血液生理指标
Table 2 Blood physiological parameters in CMU/1 and CMU/2 inbred strains

检测项目	性别	CMU/1	CMU/2
WBC/10 ⁹ · L ⁻¹	♀	5.18 ± 2.16	4.95 ± 2.17
	♂	4.23 ± 1.73	3.10 ± 0.14
RBC/10 ¹² · L ⁻¹	♀	12.23 ± 1.75	12.08 ± 1.42
	♂	11.88 ± 1.83	13.65 ± 0.64
HGB/g · L ⁻¹	♀	166.61 ± 29.01	162.21 ± 23.29
	♂	161.47 ± 28.78	183.00 ± 9.90
HCT/%	♀	51.82 ± 8.18	51.02 ± 7.08
	♂	51.15 ± 8.53	58.40 ± 2.69 [*]
MCV/g · L ⁻¹	♀	42.32 ± 1.39	42.19 ± 1.46
	♂	43.02 ± 1.30	42.70 ± 0.14 [*]
MCH/pg	♀	13.57 ± 0.64	13.40 ± 0.57
	♂	13.55 ± 0.51	13.35 ± 0.07 ^{**}
MCHC/g · L ⁻¹	♀	320.72 ± 8.41	317.90 ± 7.93
	♂	315.12 ± 7.96	313.50 ± 2.12
RDW/%	♀	14.17 ± 0.65	13.99 ± 0.74
	♂	14.39 ± 0.69	13.60 ± 0.57
PLT/10 ⁹ · L ⁻¹	♀	866.50 ± 172.99	958.66 ± 364.04 [#]
	♂	1 065.22 ± 453.94 [*]	1 159.00 ± 62.23
PCT/%	♀	0.07 ± 0.02	0.07 ± 0.03
	♂	0.06 ± 0.03	—
MPV/g · L ⁻¹	♀	0.78 ± 0.20	0.87 ± 0.46
	♂	0.65 ± 0.43 [*]	—
PDW/%	♀	21.78 ± 1.46	23.24 ± 2.66 [#]
	♂	23.19 ± 2.64 ^{**}	24.60 ± 0.28
LYM/10 ⁹ · L ⁻¹	♀	1.87 ± 0.84	1.72 ± 0.74
	♂	1.41 ± 0.74	0.40 ± 0.14
MON/10 ⁹ · L ⁻¹	♀	0.22 ± 0.22	0.22 ± 0.27
	♂	0.21 ± 0.31	0.15 ± 0.07
NEUT/10 ⁹ · L ⁻¹	♀	2.64 ± 1.75	2.50 ± 1.64
	♂	2.26 ± 1.39	2.30 ± 0.00
EOS/10 ⁹ · L ⁻¹	♀	0.34 ± 0.30	0.38 ± 0.40
	♂	0.36 ± 0.42	0.20 ± 0.00
BAS/10 ⁹ · L ⁻¹	♀	0.12 ± 0.19	0.11 ± 0.16
	♂	0.11 ± 0.11 [*]	0.05 ± 0.07
LYM/%	♀	42.54 ± 27.86	39.74 ± 22.11
	♂	35.34 ± 19.50 [*]	12.20 ± 4.38
MON/%	♀	3.83 ± 3.24	3.66 ± 3.37
	♂	5.20 ± 8.51	4.05 ± 2.33
NEUT/%	♀	45.45 ± 22.50	46.98 ± 18.53
	♂	49.45 ± 18.51	75.60 ± 5.52
EOS/%	♀	6.26 ± 5.41	7.37 ± 7.57
	♂	7.66 ± 6.86	6.40 ± 0.99
BAS/%	♀	1.92 ± 3.08	2.21 ± 2.73
	♂	2.34 ± 2.07	1.75 ± 2.47

注: 同品系性别间比较, **P*<0.05, ***P*<0.01; 相同性别 CMU/2 与 CMU/1 比较, [#]*P*<0.05, ^{##}*P*<0.01, CMU/2 的 PCT、MPV 测试超出仪器范围未出结果

常的血液生理生化指标在医学生物学研究中是重要的指标,是病理学、毒理学等研究的重要参考依据^[4]。

长爪沙鼠由于脑底动脉 Willis 环的前后交通支变异缺失类型复杂,当行单侧或双侧颈总动脉结扎时,其典型脑缺血模型发生率较低,却模型症状不均一。作者前期研究表明,长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环的前后交通支缺失是脑缺血模型发生的基础,只有当后交通支缺失伴随前交通支细小或缺失时,模型症状才显著。本实验结果表明 CMU/1 和 CMU/2 近交系沙鼠 Willis 动脉环后交通支缺失 100%,前交通支细小或缺失均为 76% 以上;而文献报道长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环的缺失发生率仅有 30%~40%^[5],说明定向培育近交系可增加 Willis 环的前后交通支缺失比率,这也为脑缺血模型研究提供了新的近交品系。

动物的血液生理生化指标与遗传基因差异有关,CMU/1 和 CMU/2 是在近交系的培育过程中分化出的 2 个支系,经遗传检测显示有些遗传基因位点 2 个品系有多态性,说明该 2 个近交系的生理生化指标可能也会存在差异。本实验结果也证实了这一点。CMU/1 近交系沙鼠的血液生化和生理指标结果雌雄之间 GLU、CRE、PLT、MPV、BAS、LYM% 差异显著, TG、PDW 差异极显著, CMU/2 近交系沙鼠雌雄之间 CHOL、HCT、MCV、MCH 差异显著;相同性别比较,雌性 CMU/1 与 CMU/2 近交系沙鼠的 ALT、PLT、PDW 指标差异显著,雄性间比较 HDLD、MCH 指标差异显著。CMU/1 和 CMU/2 近交系沙鼠的血液生化和生理指标结果中 ALP、ALT、AST 差异显著,而其余指标均无显著性差异。王钜等^[2]对长爪沙鼠 33 项血液生理生化指

标正常参考值进行研究, GLU、CRE、TG、CHOL、ALP、PLT、LYM% 雌雄比较差异显著,与本文结果一致; CK、URIC、LD、RBC、HGB、MCHC、NEUT、WBC 差异显著,本文结果差异不显著,这可能与沙鼠进行近交 20 代后,遗传基因稳定性有关。戴丽军等^[4]研究结果表明雌雄间 HCT、MCH 差异显著,与本文结果一致。研究过程 PLT 与报道长爪沙鼠比较升高很多,使得 PCT、MPV 雄性测定结果超出仪器范围^[2,4]。上述分析结果表明: CMU/1 和 CMU/2 近交系沙鼠的基因型不同影响酶代谢,动物的年龄、性别、饲养环境及动物遗传基因型等因素对血液生化和生理指标有一定的影响。

本研究结果为脑缺血模型长爪沙鼠近交系沙鼠的生物学特性积累了基础数据,为脑缺血模型长爪沙鼠近交系在医学生物学中的广泛应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] Malek M, Duszczyk M, Zyszkowski M, et al. Hyperbaric oxygen and hyperbaric air treatment result in comparable neuronal death reduction and improved behavioral outcome after transient forebrain ischemia in the gerbil[J]. *Exp Brain Res*, 2013, 224(1):1-14.
- [2] 王钜, 卢静, 陈振文, 等. 长爪沙鼠血液生理生化正常参考值的研究[J]. *中国实验动物学报*, 2004, 12(2):108-111.
- [3] 孙靖. 实验动物学基础[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2005:60.
- [4] 戴丽军, 肖庆忠, 梁成结, 等. 不同性别长爪沙鼠血液生理生化值的比较[J]. *广州医学院学报*, 2003, 31(2):63-65.
- [5] Kuchinka J, Nowak E, Szczurkowski A, et al. Arteries supplying the base of the brain in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*)[J]. *Vet Sci*, 2008, 11(4):295-299.

Comparison on Circle of Willis Patterns, Biochemical and Physiological Characteristics of Inbred CMU/1 and CMU/2 Gerbils

LI Ying^{1,3}, CUI Xiao-xia¹, DU Xiao-yan², MA Lan-zhi¹, SHANG Shi-chen¹, HUANG Bin¹,
GUO Zi-xiao¹, ZHAO Quan³, LI Gui-jun¹, WANG Dong-ping¹, CHEN Zhen-wen²

(1. Laboratory Animal Center, Military Medical Sciences, Military Academy,
Beijing 100071, China; 2. Department of Laboratory Animal Science,
Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. College of Animal Science
and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

[Abstract] Objective To compare the ratio of the incomplete circle of Willis patterns and detect the blood biochemical and physiological indexes of 2 ischemia-prone inbred gerbil lines CMU/1 and CMU/2, and to analyze the differences between 2 strains, provide reference data for gerbils experimental application.

Methods Beckman automatic biochemical analyzer (CX5) and Japan photoelectric automatic blood cell analyzer (MEK-7222K) were used to determine 17 blood biochemical parameters and 22 physiological parameters. SPSS 23.0 software was used for statistical analysis by independent samples T test.

Results The ratios of incomplete circle of Willis patterns in both ischemia-prone inbred gerbil lines CMU/1 and CMU/2 were more than 76%. The 12 parameters of blood physiology and biochemistry, glucose, creatinine, triglycerides, cholesterol, platelet, mean platelet volume, basophilic granulocyte, lymphocyte%, platelet distribution width, hematocrit, mean corpuscular volume, mean Corpuscular hemoglobin, were significantly different between male and female. CMU/1 and CMU/2 were significantly different in female alanine transaminase, platelet and platelet distribution width, and high-density lipoprotein cholesterol and mean corpuscular hemoglobin in males were significantly different. There were significant differences in alkaline phosphatase, alanine transaminase and aspartate transaminase between strains. **Conclusion** The genotypes of ischemia-prone inbred gerbil have some impact on blood biochemical and physiological parameters.

[Key words] Gerbil; Inbred strain; Ischemia model; Biochemical index; Physiological index

浅谈小型猪中医四诊信息采集

相 波, 范小雪, 余 丰, 路雪婧

(成都中医药大学, 成都 610075)

[摘要] 小型猪与人类有诸多相似之处, 已广泛应用于动物科研中。在中医证候模型创建中, 采用小型猪造模取得了较为显著的进步, 但其中医四诊信息的采集一直困扰着许多科研工作者。论文从望、闻、问、切四个方面来对其进行论述, 望对中医四诊信息的采集提供参考。

[关键字] 小型猪; 望诊; 闻诊; 问诊; 切诊

[中图分类号] R2 Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2016)06-0475-03

小型猪在解剖、生理、病理、生化指标等诸多方面与人类有相似之处, 具有体质量轻、生长慢、品种纯、性格相对温顺等优势, 已广泛应用于医学诸多领域的研究, 如心血管、消化系统、呼吸系统、五官科等等^[1]。小型猪品系较多, 国外较有影响力的品系主要有明尼苏达霍麦(Minnesota Hormel)、哥廷根系(Gottingen)、阿米尼系(Oh mini)、科西嘉系(Corsica)等等; 国内主要有五指山小型猪、贵州小型香猪、广西巴马小型猪、藏猪、版纳微型猪等^[2]。实验中可以根据实验方向的不同, 选择不同品系的猪种。

中医四诊包括望、闻、问、切四部分内容。《难经》曰:“望而知之谓之神, 闻而知之谓之圣, 问而知之谓之工, 切脉而知之谓之巧。”掌握四诊的“神”“圣”“工”“巧”, 在疾病的诊疗中起着至关重要的作用。在中医证候模型的创建中, 气虚血瘀^[3]、痰瘀互结^[4]等模型的建造获得较为理想的效果, 这使得小型猪备受中医药研究关注。中医证候动物模型学是研究如何在动物上复制中医证候的一门学科, “动物”是指动物的某一部分, 如器官、细胞、组织, “证候”是中

医的症状和病^[5]。鉴于此, 证候模型的复制是探究中医证候实质的关键^[6], 那么四诊信息的采集对验证实验成果显得尤为重要。近些年, 由于舌面象采集设备、脉诊仪、中医声诊检测系统等技术的问世, 使中医四诊信息的采集取得了突飞猛进的发展。但由于人和动物在表达、相貌、行为等方面具有巨大差异性, 在动物实验中, 四诊信息的采集难度依然很大。现从对小型猪的望诊、闻诊、问诊、切诊四方面进行论述。

1 望诊

望诊是通过观察患者的全身、局部、排泄物等变化, 来测知其健康状况的一种诊疗方法。在动物实验中, 我们可以用肉眼仔细观察动物的眼神、皮肤、毛发、鼻唇、耳窍、二便、行为活动、舌象等情况。望其眼神, 应看其是灵活明亮有神、还是呆滞目光少神, 或者晦暗无光彩; 望其皮肤, 应看其是否发红、发紫、发黄、发白, 是否干燥、脱屑或水肿, 是否有斑疹、丘疹、水泡等皮肤病症; 望鼻唇, 应看其色泽(淡白、深红、青紫、青黑)、形态(干燥皲裂、脱屑、糜烂、溃疡)、鼻部起伏的节律、出汗、流涕; 望耳, 主要是看其形态(肥大、瘦小、皮肤甲错、干枯萎缩)和动态(竖立、垂拉); 望其小便, 看其小便的色质(清长、短黄、尿中带血、混浊如米泔)和量(占其承接其器皿的量); 望其大便, 看其量(占其承接其器皿的量)、色质地(水样便、干结如

[收稿日期] 2017-06-07

[基金项目] 国家重大科学仪器设备开发专项项目
(2013YQ490859)

[作者简介] 相 波(1990-), 女, 硕士研究生。
E-mail: 790101774@qq.com

[通讯作者] 路雪婧(1972-), 女, 博士生导师。
E-mail: 5482271@qq.com

羊屎、黄褐如糜);望其行为活动,是狂躁不安(碰撞笼具,顶翻餐具),还是倦怠蜷卧(耳朵向下垂拉,眼神涣散)。同时我们可借助一些工具和其他的症状来观察,刘蕾等^[7]利用数码照相机观察小型猪的精神状况、皮毛、尾巴、耳朵、眼睛、鼻盘、口唇等变化。张宇沁等^[8]利用特定的笼具和监控系统观察小猪实验前后尿量、便量;夜间和白日的活动次数、时间;饮食速度、排泄数量;觅食次数和时间;爬栏次数等内容。王勇^[3]等以摇尾次数减少反映心气虚证的“神疲乏力”和“心悸或胸闷”。为方便观察其舌象,可在其制动的情況下,用开口器暴露其舌体大体进行观察,看其舌苔是发黄、发白,舌体是胖大、还是瘦小、干燥起裂,是否有瘀斑、瘀点等情况。

2 闻诊

闻诊是通过听声音和嗅排泄物、房间的气味来辨别患者的状态。在日常数据的采集中,由于小型猪所处环境不同,会发出不同声音,可通过耳朵仔细倾听,并结合其肢体动作来辨别。在其欣喜情况下,特别是欲进食的时候,会表现出急迫、骚乱的情绪,在笼具中四处打转,碰撞笼具,发出急促“嗯嗯”的叫声。在其愤怒的情况下,发出“嗷嗷”的叫声,眼神犀利,呼吸急迫,肌肉紧绷,耳朵竖立。在其忧愁、思虑的情况下,眼神凄冷,懒言少动,倦怠蜷卧,偶发出短暂的“嗯嗯”声,呼吸深长。在其恐惧的情况下,叫声特别刺耳,身体躁动不安,周围的动物也会相应声。在其进食时,会发出“吧唧吧唧”的声音。在其休息时,偶尔会发出“哼哼”的轻微叫声,或者“呼噜呼噜”嘈杂的声音,伴随身体懒散的挪动和起伏等等。同时也可借助听诊器记录其心率和呼吸,将小型猪清醒状态下吊床保定,待其平静1~2 min后,记录每分钟心跳的次数和呼吸的频率。闻气味,主要闻其大、小便的气味,是酸臭、腥臭,还是臊臭等。鉴于动物饲养条件的原因,我们大多数时候只能闻出整间动物房的味道,我们可借助望诊、问诊进行判断,必要时可对其大、小便做细菌学培养。

3 问诊

问诊需进行询问,了解病情。人和动物难以进行交流,问诊不可行。但可询问饲养员其精神状态、行为活动、饮食和排便情况,或查饲养记录(饮食、饮水、二便)等。对问诊的内容保持客观的态度,将其和临床检验结果相结合,作出一些初步的判断。尽可能地贴近动物,观测其行为活动,也可用一些诱导措施,观察其反应能力和活动度,如木棍轻碰一下其身体,或者轻敲一笼具。

4 切诊

切诊包括两个部分,即切脉和按诊。切脉,指手指对身体特定部分的动脉进行切按,体验脉动应指的形象。关于切诊部位,有三部九候诊法、人迎寸口诊法、仲景三部诊法、寸口诊法等,“独取寸口”的理论在《脉经》中得到很好的阐述,后经历代医家的分类和汇总,最终形成了现代常用的28种脉(浮、洪、濡、散、芤、革、沉、伏、迟、弱、牢、缓、涩、结、数、疾、促、动、虚、细、微、代、短、实、滑、弦、紧、长)。在小型猪的切脉中,可食指和中指并拢,切按其腋动脉和股动脉,感受其脉动应指的形象。同时可借助心电图和脉诊仪。黄丽洁等^[9]用吊床绑定小型猪,将电极按顺序夹在四肢皮下,待动物情绪平稳10 min后,记录6个肢体导联的心电图。陈冬志^[10]选取小型猪为研究对象,采用NX-8型多功能脉诊仪获取压力脉图,切按其腋动脉和股动脉获取脉图部位,创建了13种脉象的模型。按诊,是切诊的重要组成部分,是医生用手直接触摸或按压病人某些部位,以了解局部冷热、润燥、寒热、软硬、压痛、肿块或其他异常变化,从而推断疾病部位、性质和病情,辨别病证的一种诊察方法^[11]。对于小型猪也可利用此方式进行按诊,同时可借助检测技术辅助动物体表的切诊,如吕圭源^[12]等利用FoorFLPI散斑全帧实时扫描成像系统测定高血压、高血脂、高血糖等动物模型的微循环血流量。

5 问题与展望

在中医四诊信息的采集中存在的问题: ①日常观测可能导致其躁动不安, 影响数据客观性和真实性; ②观测中医四诊信息如何标准化和量化。近些年, 伴随动物生理信号遥测系统的发展, 可遥测动物的血压、体温、呼吸、心电图等变化, 使动物的无创研究成为可能, 标准和量化问题得到了解决, 中医望闻问切变得更具操作性, 避免了耗费大量人力物力和因动物的应激因素导致实验心电生理参数产生的误差^[13]。同时应注意望闻问切四诊合参, 对小型猪的整体进行预估, 以便对造模前后的变化和组间的对比情况进行有效评估。相信伴随科学技术的发展和科研工作者的全情投入, 会使传统的中医四诊在动物实验中起重要作用。

参考文献:

- [1] 庞琳琳, 张会永, 杨关林. 巴马小型猪在医学研究中的应用进展[J]. 中国实验动物学报, 2014, 22(1):94-98.
- [2] 王桂花, 尹晓敏, 孙霞, 等. 国内外小型猪资源概况[J]. 中国比较医学杂志, 2009, 19(2):71-73.
- [3] 王勇, 李春, 啜文静, 等. 基于小型猪冠心病慢性心肌缺血模型气虚血瘀证的证候评价[J]. 中国中西医结合杂志, 2011, 31(02):233-237.
- [4] 李欣志, 刘建勋, 任建勋, 等. 痰瘀互结证冠心病小型猪模型的建立[J]. 中国中西医结合杂志, 2009, 29(3):228-232.
- [5] 陈小野. 中医证候动物模型学概述及进展[J]. 北京实验动物科学, 1991, 8(3):9-12.
- [6] 张会永, 庞琳琳, 张哲, 等. 小型猪中医动物模型进展及在中医药研究中的应用[J]. 中华中医药学刊, 2014(6):1266-1269.
- [7] 刘蕾, 王伟, 郭淑贞, 等. 小型猪慢性心肌缺血模型四诊信息采集的方法探索[J]. 中华中医药学刊, 2008, (07):1438-1440.
- [8] 张宇沁, 田宇瑛, 丁玉龙, 等. 实验用小型猪行为学应用于中医基础研究的方法学探讨[J]. 实验动物科学, 2011, 18(02):47-51.
- [9] 黄丽洁, 贾琳, 苟鹏, 等. 三个品系小型猪正常心电图的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2008, (03):23-26.
- [10] 陈冬志. 中医脉诊实验教学模型的建立与评价[D]. 北京中医药大学, 2008.
- [11] 朱文锋. 中医诊断学[M]. 北京: 中国中医药出版社, 2013: 97.
- [12] 吕圭源. 激光多普勒法微循环血流量测定应用于三高动物模型中的中药药效评价[A]. 中国中西医结合学会微循环专业委员会. 第十二次全国中西医结合微循环学术会议会议指南及论文摘要[C]. 中国中西医结合学会微循环专业委员会. 南京: 2012.
- [13] 江霞, 吴清洪, 顾为望. 动物生理信号遥测系统的国内研究进展[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2014(3):49-51.

Discussing on Four diagnostic information of traditional Chinese medicine in Minipig

XIANG Bo, FAN Xiao-xue, YU Feng, LU Xue-jing
(Chendu University of TCM, Chendu 610075, China)

[Abstract] The minipig and human have many similarities. It has been widely used in animal research. In model creation of traditional Chinese medicine, it has made a little progress, but many researchers have been plagued by the four diagnostic information collection of traditional Chinese medicine. The essay discusses collection of TCM four diagnostic information basing on looking, listening, questioning and feeling the pulse, hoping it provide useful reference for us.

[Key words] Minipig; Looking; Listening; Questioning; Feeling the pulse

白化金黄仓鼠血液生理指标测定

崔晓霞¹, 尚世臣¹, 马兰芝¹, 黄斌¹, 尚玉璞¹, 王冬平¹, 陈振文², 王全新³

(1.军事科学院军事医学研究院实验动物中心, 北京 100071;

2.首都医科大学实验动物科学部, 北京 100069;

3.辽宁长生生物技术有限公司, 本溪 117004)

[摘要] 目的 测定白化金黄仓鼠的血液生理指标, 并与野生型金黄仓鼠进行比较。方法 用眶静脉丛采血的方法采集白化及野生型金黄仓鼠全血, 制备抗凝血, 应用全自动血细胞分析仪及半自动血液凝固分析仪进行测定, 应用 SPSS17.0 软件包对结果进行统计分析。结果 初步测定了白化突变及野生型金黄仓鼠的血液生理指标, 二者的部分指标存在差异。结论 金黄仓鼠的白化基因突变可能对血液生理指标有一定影响。

[关键词] 白化突变; 金黄仓鼠; 血液生理指标

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)06-0478-04

金黄仓鼠作为实验动物使用范围广泛, 根据其生理特点, 多用于肿瘤、生殖生理、组织移植、神经、血管生理学及微循环等方面的研究^[1-3], 同时是乙型肝炎减毒活疫苗的研制和狂犬病毒及乙型肝炎病毒的研究及其疫苗生产的主要生物材料, 使用数量很大^[4,5]。

白化金黄仓鼠是由金黄仓鼠白化突变个体培育而成, 1964 年武汉生物制品研究所饲养的金黄仓鼠群中首次发现了白色变种^[6]。辽宁长生生物技术有限公司目前已繁殖保种一定规模的种群, 但该白化突变金黄仓鼠的生物学特性、白化机制及应用的研究刚刚起步。血液生理指标是实验动物的重要生物学特性之一, 是应用实验动物进行科学研究的基础数据。本文针对白化突变金黄仓鼠突变群的白细胞数、红细胞数、血红蛋白浓度、红细胞压积等 22 项血细胞和 4 项凝血因子的生理指标进行测定,

比较其与野生型金黄仓鼠在血液生理指标的差异, 开发出自主知识产权的白化突变新品种, 进而为医学生物学及药物研发提供新的动物模型奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 8 周龄金黄仓鼠 60 只, 雌雄各 30 只; 清洁级 8 周龄白化金黄仓鼠 60 只, 雌雄各 30 只, 均由辽宁长生生物技术有限公司提供[SCXK(辽)2010-0001]。

1.2 仪器设备及主要试剂

血细胞计数使用日本光电 MEK-7222K 全自动血细胞分析仪(应用本仪器调试的动物参数)及配套试剂, 凝血四项指标测定使用山西亚森实业有限公司 FB-40 型半自动血液凝固分析仪。

1.3 抗凝血制备

禁食 12~24 h, 乙醚麻醉后, 眼眶静脉丛采血, EDTA-2K 抗凝血用于测定血液生理指标, 枸橼酸钠抗凝血用于凝血 4 项指标测定。

1.4 血液生理指标测定及方法

血细胞: 白细胞数(WBC)、红细胞数(RBC)、血红蛋白浓度(HGB)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞体积(MCV)、红细胞分布宽度(RDW)、血小

[收稿日期] 2017-07-18

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 3137227)

[作者简介] 崔晓霞(1977-), 女, 硕士, 研究方向: 实验动物遗传与病理。E-mail: cuixiaoxia@tom.com

[通讯作者] 王冬平(1964-), 女, 副研究员, 研究方向: 实验动物生物学特性研究。E-mail: wangdp6493@126.com
陈振文(1959-), 男, 教授, 研究方向: 实验动物遗传学。E-mail: czwen@ccmu.edu.cn

板数(PLT)、血小板压积(PCT)、平均血小板体积(MPV)、血小板分布宽度(PDW)。白细胞分类计数及百分比:淋巴细胞(LYM)、单核细胞(MON)、嗜中性粒细胞(NEUT)、嗜酸性粒细胞(EOS)、嗜碱性粒细胞(BAS)。

凝血4项:凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间(TT)、纤维蛋白原(FIB)。

1.5 数据处理

应用Spss17.0统计分析软件,进行 t 检验和方差数据处理。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血细胞

白化金黄仓鼠与金黄仓鼠的血细胞测定结果显示,雄性间LYM差异显著($P<0.05$),WBC、MCV、MON、NEUT、EOS、BAS、MON%、EOS%、BAS%差异极显著($P<0.01$),其余无显著性差异($P>0.05$);雌性间EOS%、BAS%差异显著($P<0.05$),LYM、EOS差异极显著($P<0.01$),其余无显著性差异($P>0.05$)(表1)。

金黄仓鼠雌性和雄性间WBC、MON、NEUT、MON%、BAS%差异极显著($P<0.01$),其余均无显著性差异($P>0.05$)(表1)。白化金黄仓鼠雄性和雌性间LYM差异极显著($P<0.01$),其余均无显著性差异($P>0.05$)(表1)。

2.2 凝血指标

白化金黄仓鼠与金黄仓鼠的凝血指标测定结果显示,雄性间APTT差异显著($P<0.05$),PT差异极显著($P<0.01$),其余均无显著性差异($P>0.05$);雌性间TT和FIB差异显著($P<0.05$),其余均无显著性差异($P>0.05$)(表2)。

金黄仓鼠雄性和雌性间FIB差异极显著($P<0.01$),其余均无显著性差异($P>0.05$)(表2)。白化金黄仓鼠雄性和雌性间PT差异极显著($P<0.01$),APTT差异显著($P<0.05$),其余均无显著性差异($P>0.05$)(表2)。

3 讨论

实验动物血液生理参数主要是动物自身的遗传因素与环境因素决定。遗传因素是内在物质基础,而环境因素则是外在条件^[6]。不同品种(系)的动物

血液正常生理值存在较大差异,每个品种(系)的血液指标都有其相对稳定值,这也是区别各品种(系)的一个重要指标^[7]。血液生理生化指标在医学生物学研究中是重要的指标,是判断动物健康状态和选择合格动物的依据,也是病理学、毒理学等研究的重要参考依据^[8]。

凝血过程是一系列血浆凝血因子相继酶解激活的过程,一般分为内源性凝血途径,外源性凝血途径和凝血共同途径。目前,临床主要用凝血4项(PT、APTT、TT、FIB)测定来反映体内凝血系统的状况。其中PT是外源性凝血系统较为敏感和常用的筛选试验,反映血浆中凝血因子II、V、VIII、X和I的总体活性;APTT是内源性凝血系统较为敏感和常用的筛选试验,能反映血浆凝血因子VIII、IX、XI、XII的水平;TT测定主要反映凝血共同途径纤维蛋白原转变为纤维蛋白的过程中,是否存在纤维蛋白原异常及是否发生纤溶和是否存在抗凝物质的情况。FIB主要由肝脏合成,是凝血酶作用的底物,在凝血酶水解下形成肽A和肽B,最后形成不溶性的纤维蛋白以达到止血作用。血液离体即开始变化,随存放方式和时间的不同,凝血因子逐渐消耗而导致检验结果不同,实验室外在因素对实验准确性十分重要,不适当的标本采集如血量多或少、标本溶血、标本凝固和送检时间往往是导致结果误差的主要因素^[9-14]。本研究表明金黄仓鼠雌雄间FIB差异极显著;白化仓鼠的雌雄间PT差异极显著,APTT差异显著;金黄仓鼠与白化仓鼠雄性间PT差异极显著,APTT差异显著,雌性间TT和FIB结果差异显著。

目前,对于金黄仓鼠和白化仓鼠的研究报道很少,本研究对8周龄成年金黄仓鼠及白化仓鼠正常血液生理值进行检测,结果表明:大多数所检测指标均在正常值范围内,与灰仓鼠、黑线仓鼠及大、小鼠等无明显差异^[15-19],同种动物雌雄个体间在少数几个指标存在一定差异,如WBC、MON、NEUT、FIB等,这可能与性别有关。而金黄仓鼠与其白化仓鼠雄性之间LYM差异显著,WBC、MCV、MON、NEUT、EOS、BAS、MON%、EOS%、NEUT%差异极显著;雌性间EOS%、NETU%差异显著,LYM、EOS差异极显著,这或许与白化仓鼠的突变基因有一定关系。

本研究为白化突变仓鼠积累生物学特性数据,

表 1 两种仓鼠血细胞生理指标雌雄比较

Table 1 Comparison of Blood physiological index between male and female

检测项目	性别	金黄仓鼠	白化金黄仓鼠	P
WBC/ $10^9 \cdot L^{-1}$	♂	3.39 ± 1.05	6.84 ± 3.79	$P < 0.01$
	♀	5.50 ± 3.12^a	5.69 ± 3.70	$P > 0.05$
RBC/ $10^{12} \cdot L^{-1}$	♂	0.86 ± 0.16	0.61 ± 0.14	$P > 0.05$
	♀	0.84 ± 0.20	0.75 ± 0.14	$P > 0.05$
HGB/g $\cdot L^{-1}$	♂	184.39 ± 20.86	173.60 ± 14.74	$P > 0.05$
	♀	175.30 ± 23.54	179.57 ± 17.90	$P > 0.05$
HCT/%	♂	8.52 ± 1.59	6.22 ± 1.38	$P > 0.05$
	♀	8.44 ± 1.92	7.60 ± 1.37	$P > 0.05$
MCV/g $\cdot L^{-1}$	♂	99.49 ± 1.54	103.12 ± 2.75	$P < 0.01$
	♀	100.17 ± 1.90	100.96 ± 1.73	$P > 0.05$
RDW/%	♂	26.45 ± 2.01	29.11 ± 3.09	$P > 0.05$
	♀	28.65 ± 2.63	28.57 ± 2.57	$P > 0.05$
PLT/ $10^9 \cdot L^{-1}$	♂	317.27 ± 95.50	305.97 ± 70.13	$P > 0.05$
	♀	305.27 ± 90.25	320.23 ± 80.61	$P > 0.05$
PCT/%	♂	0.18 ± 0.06	0.23 ± 0.09	$P > 0.05$
	♀	0.14 ± 0.07	0.16 ± 0.10	$P > 0.05$
MPV/g $\cdot L^{-1}$	♂	5.67 ± 1.91	7.49 ± 2.14	$P > 0.05$
	♀	4.67 ± 2.03	5.05 ± 2.38	$P > 0.05$
PDW/%	♂	21.96 ± 1.70	20.30 ± 1.82	$P > 0.05$
	♀	22.57 ± 1.68	22.13 ± 1.98	$P > 0.05$
LYM/ $10^9 \cdot L^{-1}$	♂	1.79 ± 0.98	3.20 ± 1.59	$P < 0.05$
	♀	2.24 ± 1.60	1.60 ± 0.80^a	$P < 0.01$
MON/ $10^9 \cdot L^{-1}$	♂	0.05 ± 0.07	0.33 ± 0.52	$P < 0.01$
	♀	0.30 ± 0.44^a	0.31 ± 0.71	$P > 0.05$
NEUT/ $10^9 \cdot L^{-1}$	♂	1.33 ± 0.61	3.22 ± 2.44	$P < 0.01$
	♀	2.75 ± 1.86^a	3.66 ± 2.64	$P > 0.05$
EOS/ $10^9 \cdot L^{-1}$	♂	0.13 ± 0.12	0.06 ± 0.07	$P < 0.01$
	♀	0.14 ± 0.15	0.08 ± 0.07	$P < 0.01$
BAS/ $10^9 \cdot L^{-1}$	♂	0.09 ± 0.12	0.02 ± 0.04	$P < 0.01$
	♀	0.07 ± 0.10	0.03 ± 0.05	$P > 0.05$
LYM/%	♂	51.17 ± 19.83	50.36 ± 16.43	$P > 0.05$
	♀	41.28 ± 16.44	31.87 ± 12.44	$P > 0.05$
MON/%	♂	1.58 ± 1.96	3.70 ± 4.05	$P < 0.01$
	♀	5.14 ± 6.45^a	3.47 ± 4.67	$P > 0.05$
NEUT/%	♂	40.31 ± 17.24	44.15 ± 14.28	$P > 0.05$
	♀	48.76 ± 13.50	61.83 ± 11.12	$P > 0.05$
EOS/%	♂	3.94 ± 3.91	1.19 ± 1.45	$P < 0.01$
	♀	3.23 ± 3.54	1.89 ± 1.75	$P < 0.05$
BAS/%	♂	3.00 ± 4.03	0.60 ± 1.01	$P < 0.01$
	♀	1.59 ± 2.00^a	0.94 ± 1.04	$P < 0.05$

注: 同品种雌雄间比较, $^a P < 0.01$

表 2 两种仓鼠凝血 4 项指标比较
Table 2 Comparison of four items of blood coagulation
between male and female

检测项目	性别	金黄仓鼠	白化仓鼠	P
PT/s	♂	9.61 ± 3.23	11.36 ± 4.30	P<0.01
	♀	7.51 ± 1.62	9.83 ± 2.30 ^{aa}	P>0.05
APTT/s	♂	18.26 ± 4.80	22.56 ± 7.94	P<0.05
	♀	18.21 ± 2.78	20.23 ± 4.82 ^a	P>0.05
TT/s	♂	16.41 ± 4.39	18.85 ± 5.31	P>0.05
	♀	13.18 ± 3.29	16.97 ± 4.41	P<0.05
FIB/g · L ⁻¹	♂	25.33 ± 13.69	19.93 ± 13.85	P>0.05
	♀	16.29 ± 5.84 ^{aa}	25.63 ± 20.90	P<0.05

注: 同品种性别间比较, ^aP<0.05, ^{aa}P<0.01

为进一步研究突变机理奠定基础, 对该动物的实验应用及饲养管理等方面都具有重要意义, 从而为其在医学生物学中的广泛应用提供依据。

参考文献:

- [1] Yu WC, Liu CY, Lai WS. Repeated, intermittent social defeat across the entire juvenile period resulted in behavioral, physiological, hormonal, immunological, and neurochemical alterations in young adult male golden hamsters[J]. Front Behav Neurosci, 2016, 10(6):1-15.
- [2] Lai WS, Yu WC, Liu CY, et al. A new method for studying social eavesdropping using male golden hamsters[J]. Physiol. Behav, 2014, 128(4):202-211.
- [3] Bastida CC, Puga F, Delville Y. Risk assessment and avoidance in juvenile golden hamsters exposed to repeated stress[J]. Horm Behav, 2009, 55(6):158-162.
- [4] 谢夏阳, 符杰, 龚玉花, 等. SPF 级金黄地鼠的主要生物学特性[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(2):133-138.
- [5] 张渝, 白明亮, 吴杰, 等. 近交系白化地鼠 -WHBA 的培育及部分生物学特性观察[J]. 北京实验动物科学, 1992, 9(1):17-20.
- [6] 王钜, 卢静, 陈振文, 等. 长爪沙鼠血液生理生化正常参考值的研究[J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(2):108-111.
- [7] 娄成民. 实验动物质量管理标准与检验检测技术实用手册[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2003:1168.
- [8] 孙靖. 实验动物学基础[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 2005:60.
- [9] 于秉振, 袁彦平. 金黄地鼠与白化地鼠血浆血管紧张素 II 的测定[J]. 北京实验动物科学, 1991, 8(1):18-19.
- [10] 张英杰, 王会君, 侯荣伟, 等. 凝血四项的临床应用[J]. 检验医学与临床, 2013, 10(4):450-452.
- [11] 赵红纪. 常见影响凝血四项检测结果的因素[J]. 中国医学创新, 2011, 8(30):77-79.
- [12] 丛玉隆. 临床实验室分析前质量管理及对策[J]. 中华检验医学杂志, 2004, 27(8):483-487.
- [13] 边红放, 王晓青. 凝血四项检测过程中应注意的问题[J]. 实用医技杂志, 2007, 20(12):1653-1654.
- [14] 廖扬, 郑兰, 石玉玲. 临床标本采集量对凝血系统检测结果的影响[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(5):809-810.
- [15] 赵爽, 王冬平, 刘晓, 等. 黑线仓鼠及其白化突变系血液生理生化值的测定与分析[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(7):17-21.
- [16] 王洪, 张华琼, 黄麟, 等. 雌雄金黄地鼠血液生理生化指标的比较分析[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(2):35-42.
- [17] 陈朝阳, 张锐虎, 景志杰, 等. 山医群体近交系中国地鼠血液生理生化指标的测定分析[J]. 中国实验动物学报, 2010, 18(3):262-264.
- [18] 王冬平, 李慕, 尚世臣, 等. 不同日龄 SPF 级 KM 小鼠血液生理生化正常指标的探讨[J]. 实验动物科学, 2008, 25(4):5-9.
- [19] 詹纯列, 肖育华, 李新春, 等. 普通级、SPF 级 SD、Wistar 大鼠血液生化值的测定与比较[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(2):94-96.

(下转第 487 页)

不同超排卵方案对 BALB/c 小鼠超排卵效果的影响

顾剑洁^{1,2}, 葛 蓉², 徐伟超³, 刘丽均²

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 200240;

2. 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 上海 201615;

3. 南京农业大学动物医学院, 南京 210095)

[摘要] 目的 研究不同剂量及注射时间的促黄体素释放激素(LHRH-A2)、孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、抑制素抗血清(IAS)对小鼠超排卵效果的影响。方法 以 BALB/c 近交系小鼠为实验对象, 160 只雌性小鼠随机分为 4 组, 每组 40 只, 按照注射剂量不同分为 4 组, A 组: 腹腔注射 5 IU LHRH-A2, 间隔 72 h 后注射 10 IU PMSG, 间隔 48 h 后注射 10 IU hCG; B 组: 腹腔注射 5 IU LHRH-A2, 间隔 48 h 后注射 10 IU PMSG, 间隔 48 h 后注射 10 IU hCG; C 组: 腹腔注射 10 IU PMSG, 间隔 48 h 后注射 10 IU hCG; D 组: 腹腔注射 0.2 mL IAS, 间隔 48 h 后注射 10 IU hCG。次日早取卵、体外受精(IVF)培养, 统计排出卵母细胞的数量, IVF 率(IVF%)和异常率。结果 D 组平均超数排卵数高于另外 3 组($P<0.05$), 但同时 IVF 率低于另外 3 组($P<0.05$)。A、B、C 组平均超数排卵数, IVF 率, 异常率均无统计学差异($P>0.05$)。结论 对于 BALB/c 小鼠, 采用 IAS 和 hCG 超排激素组合, 得到的卵子数目比另外 3 组显著增多, 但 2- 细胞期胚胎数少。采用 LHRH-A2、PMSG 和 hCG 超排激素组合, 得到的 2- 细胞期胚胎数比另外 3 组更多, 异常卵数少。

[关键词] BALB/c 小鼠; 抑制素抗血清(IAS); 促黄体素释放激素(LHRH-A2)

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2017)06-0482-03

小鼠是现代生物医学中应用最为广泛的实验动物, 随着基因工程技术(如基因导入、基因置换及基因剔除)的发展, 对小鼠胚胎的需求量逐渐增多。另外, 一些特殊疾病动物模型的资源保存和品系培育, 也需要大量的胚胎进行冷冻保藏。依靠小鼠的自然排卵, 得到的胚胎数较少而且耗时耗力耗财^[1]。用外源激素处理雌性小鼠, 改变其性周期, 使之按照预定时间超数量地排卵, 从而在短时间内可以获得大量的胚胎以满足工作的需要, 称

为超排卵(简称超排)^[2]。用激素处理动物进行超数排卵是进行胚胎移植、基因修饰、克隆等研究的基础技术之一, 通过超数排卵获得大量一致的、优质的卵子或受精卵是胚胎移植的关键技术之一, 这种方法在现代生物医学研究中具有重要的意义。

黄体激素释放激素(LHRH)是与生殖功能密切相关的由 10 个氨基酸组成的多肽, 由于它能刺激垂体前叶释放促性腺激素, 故又称为促性腺激素(GnRH)^[3]。天然的 LHRH 是由丘脑下部弓状核合成, 作用于脑垂体促性腺细胞, 能促使动物垂体前叶释放促黄体素(LH)和促卵泡素(FSH)合成与分泌, 调控受体激素水平及生殖功能, 调节 LH 和 FSH 的合成与分泌。1971 年 LHRH 的结构被确定并合成, 1972 年以来, 人工合成的 LHRH 上千种, 近 30 年来, LHRH 及其他类似物在动物生殖系统促进繁殖等方面广为应用。

[收稿日期] 2017-03-31

[基金项目] 上海市科委实验动物专项科研计划项目
(14140900500, 15140900100)

[作者简介] 顾剑洁(1984-), 女, 硕士生, 研究方向: 动物生殖工程和低温生物学。E-mail: 770980460@qq.com

[通讯作者] 刘丽均(1974-), 女, 副研究员, 研究方向: 低温生物学和生殖工程。E-mail: lijunliu2005@163.com

C57BL/6背景小鼠是在2002年完成的第一个基因组测序的小鼠品系,广泛应用于建立转基因小鼠模型^[4]。对于C57BL/6背景小鼠超排的最适合的激素剂量,国内外已做过很多相关实验,目前,常规剂量国外多采用PMSG与hCG各5 IU或各7.5 IU剂量^[5],国内采用PMSG与hCG各5 IU或各10 IU剂量的方法,间隔时间为48~52 h^[6]。2015年日本熊本大学实验室通过结合使用抑制素抗血清(IAS)与马绒毛膜促性腺激素(eCG),相对PMSG与hCG的方法,C57BL/6J小鼠超排卵子数目提高了3倍^[7]。

但对于BALB/c,使用IAS与hCG是否有同等效果,目前还未可知。另外,在常规激素组合PMSG和hCG中,尝试添加LHRH,是否能提高小鼠超排卵子数目。

本试验在雌鼠的年龄与体质量、外源激素等因素不变的条件下,以BALB/c小鼠为试验材料,实验探索外源激素LHRH,PMSG,hCG,IAS不同剂量组合对白化小鼠超排的最佳剂量组合,为今后的相关研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级BALB/c小鼠(雌鼠8周龄左右,雄鼠10周龄以上)由上海斯莱克实验动物有限公司[SCXK(沪)2012-0002]提供;饲养于清洁级动物室内[SYXK(沪)2012-0002],自由采食和饮水,室温(22 ± 2)℃,光照12 h/d,8:00~20:00,调节生理周期,使其适应环境。

1.2 实验器械

超净工作台,CO₂恒温培养箱,体视显微镜,实体倒置显微镜,维纳斯剪,捡卵针,口吸式移卵管等。

1.3 实验试剂

促黄体素释放激素A₂(LHRH-A₂)(生产批号:兽药字(2016)110252086)、PMSG(生产批号:兽药字(2015)110254564)、hCG(生产批号:兽药字(2016)110251281)均购自宁波第二激素厂;人输卵管液(HTF)按QQuinn的方法^[8]配制;IAS由熊本大学实验室提供,其余试剂除特殊说明外均为美国Sigma公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 雌鼠的超排 选用8周龄的雌鼠40只,雌鼠

随机分为4组,每组10只,激素剂量分别为LHRH-A₂(5 IU),PMSG(10 IU),hCG(10 IU),IAS(0.2 mL),按照注射时间不同分别分为:A组每只小鼠腹腔注射LHRH-A₂,间隔72 h后注射PMSG,间隔48 h后注射hCG;B组每只小鼠腹腔注射LHRH-A₂,间隔48 h后注射PMSG,间隔48 h后注射hCG;C组每只小鼠腹腔注射PMSG,间隔48 h后注射hCG;D组每只小鼠腹腔注射IAS,间隔48 h后注射hCG进行超排,实验重复4次。

1.4.2 培养皿的准备 第6日用35 mm养皿做HTF培养滴,矿物油覆盖,放入37℃,体积分数5% CO₂培养箱平衡过夜,第7日使用。

1.4.3 精子获能 10周龄雄鼠颈椎脱臼法处死,剖腹取附睾,用注射针刺破附睾,挤出精子团放入HTF培养滴中,培养箱培养1.5 h获能^[9]。

1.4.4 卵母细胞的收集 雌鼠脱颈处死,在超净台中取出两侧输卵管,利用体视显微镜,用眼科镊撕开输卵管膨大的壶腹部,并将卵母细胞-卵丘复合物收集到HTF液点内。

1.4.5 体外受精(IVF) 显微镜下观察培养1.5 h后的精子活力和数量,取适量的已获能的精子加入含卵母细胞的培养滴中,培养箱中过夜培养。隔日在显微镜下观察,统计卵母细胞数、2-细胞期胚胎数、未受精卵数、异常卵数,并计算IVF率=(2-细胞期胚胎数/卵母细胞数)×100%,异常率=(异常卵/卵母细胞数)×100%^[10]。

1.5 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,利用SPSS19.0软件进行统计分析,采用方差分析和多重比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

对4组剂量组超排效果进行比较,D组的卵母细胞数明显高于A、B、C组($P < 0.05$)。但D组的IVF率明显低于A组、B组、C组($P < 0.05$)(表1)。

实验显示,使用IAS后,有效提高了BALB/c小鼠超排数目,但同时降低了卵母细胞的受精率。添加LHRH-A₂后,卵母细胞数没有显著提高,但2-细胞期胚胎数的增加和异常卵的减少,实际上提高了IVF获得的有效胚胎数(表1)。

表 1 4组激素组合对 BALB/c 小鼠超排效果比较

组别	激素组合/注射间隔	激素剂量 /IU	卵母细胞数/枚	平均超排数/只	受精率/%	异常率/%
A	LHRH-A ₂ (72 h)+PMSG+hCG	5+10+10	579(40)	14.48 ± 6.04	25.56 ± 9.30	5.11 ± 2.41
B	LHRH-A ₂ (48 h)+PMSG+hCG	5+10+10	600(40)	15.00 ± 4.30	20.73 ± 5.84	6.65 ± 1.05
C	PMSG+hCG	10+10	562(40)	14.05 ± 2.60	25.09 ± 11.69	8.11 ± 3.92
D	IAS+hCG	0.2 (mL)+5	914(40)	22.87 ± 3.44*	17.34 ± 8.90*	9.01 ± 3.90

注: D 与分别 A、B、C 三组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

在小鼠 IVF- 胚胎移植(ET)实验中, 常用 PMSG 模拟内源性 FSH 的促进卵成熟作用, hCG 模拟 LH 的诱导作用^[11]。

超排成功与否取决于雌鼠的年龄与体质量、激素的剂量和注射时间以及小鼠的品系。根据我们实验室前期的实验结果显示, 相比 C57BL/6J 雌鼠超排, BALB/c 雌鼠的最适日龄是大于 8 周龄, 这可能与白化雌性小鼠的性成熟程度有关, 8 周龄小鼠已达到性成熟, 卵泡成熟周期已经开始, 对 FSH 有反应, 所以本实验中所用的小鼠统一为 8 周龄^[12]。另外, 不同品系的小鼠其受精率也不尽相同, 这取决于对 FSH 和 LH 的敏感程度。尽管对于大多数小鼠品系, 推荐使用 PMSG 和 hCG 剂量是腹腔注射 5 IU, 但因具体小鼠品系和激素生产厂家的不同而有所区别, 本实验采用 LHRH-A₂ 的剂量为 5 IU, PMSG 和 hCG 的剂量为 10 IU。注射激素的间隔时间, 既影响卵母细胞发育的同步性, 又影响获得卵母细胞的数量。

超排的最终目的是通过 IVF 可以获得大量早期发育的且分裂同步的优质受精卵, 可以用于小鼠品系资源的保存, 尤其适用于每年不断新增的遗传工程小鼠, 从而节省大量人力、经费和物力的投入。在本实验中, 相比 PMSG 与 hCG 的组合, 使用 IAS 与 hCG 的组合能有效提高 BALB/c 小鼠超排卵子数目, 但同时却又降低了卵母细胞的受精率, 2-细胞期胚胎数并没有显著增多。IAS 对于 BALB/c 小鼠并没有达到 C57BL/6J 小鼠的相同效果。添加了 LHRH 后, 虽然不能显著提高获得的卵母细胞数, 但 2-细胞期胚胎数的增加和异常卵的减少, 实际上提高了 IVF 获得有效胚胎的效率, 对于某些以白化小鼠为背景的转基因小鼠的有效保持, 以及白化小鼠生物净化等工作提供了思路。对于 LHRH 注射

剂量的进一步细化、LHRH 注射是否能提高 IVF 胚胎的着床率以及仔鼠出生率, 我们还在进一步研究当中。对于 IAS 对其他品系的白化小鼠超排的效果如何, 需要进一步实验研究。

参考文献:

- [1] 薛莲, 张守纯, 沈龙, 等. 周龄对昆明小鼠超排效果及胚胎体外发育的影响[J]. 饲料研究, 2016, 6:1-4.
- [2] 徐平. 不同日龄和品系小鼠超排卵、体外受精及受孕率的比较研究[J]. 中国实验动物学杂志, 2001, 11(2):78-81.
- [3] 扈正桃, 杨芳炬, 黄继华, 等. lhrh 药代动力学试验[J]. 四川生理科学杂志, 2005, 27(1):9-11.
- [4] 冯蕾, 吴发伟, 张振强, 等. PMSG 与 hCG 给予剂量及时间对小鼠超排卵效果的影响[J]. 现代肿瘤医学, 2010, 18(12): 2321- 2323.
- [5] 曹俊伟, 赖双英, 张文广, 等. 不同剂量 PMSG/hCG 对小鼠超排效果及胚胎卵裂率的影响 [J]. 内蒙古农业大学学报, 2010, 1:152-154.
- [6] 孙玉成, 张建芳, 孟令君, 等. 影响小鼠超数排卵效果的因素[J]. 北京农学院学报, 2005, 20(4):17-19.
- [7] Takeo T, Nakagata N. Superovulation using the combined administration of inhibin antiserum and equine chorionic gonadotropin increases the number of ovulated oocytes in C57BL/6 female mice[J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0128330.
- [8] Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. Improved pregnancy rate in human *in vitro* fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid[J]. Fertil Steril, 1985, 44(4):493-498.
- [9] 孙青原, 陈大元 (译). 小鼠胚胎操作实验手册[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006:121-130.
- [10] 徐平, 川野佳代, 刘丽均, 等. 实验大鼠、小鼠胚胎的缓慢冷冻和玻璃化冷冻的比较 [J]. 上海交通大学学报, 2002, 20(4):261-265.
- [11] 宋绍征, 王怡, 王宝珠, 等. 激素剂量、小鼠品系及周龄对超数排卵的影响[J]. 实验动物科学, 2011, 28(4):5-8.
- [12] 徐平, 山村绫子, 唐一岷, 等. 不同品系小鼠的体外受精、胚胎冷冻及移植的比较研究 [J]. 中国实验动物学报, 2004, 12(3):147- 151.

1 例自发性肝硬化新西兰兔 肝脏病理形态学观察

邱波¹, 王艳², 英永¹, 屈卉锦¹, 王凤乾¹, 张海静¹, 张鑫¹, 胡建廷¹

(1. 山东省药学院新药评价中心, 济南 250101; 2. 山东英才学院, 济南 250104)

[摘要] 在试验周期为6个月, 试验分5组, 分别为低、中、高剂量、模型及空白对照组(每组为6只)的新西兰兔膝关节刺激试验中, 解剖偶然见空白对照组中出现一例肝硬化病变。肉眼观察, 该患病动物消瘦、体质量减轻、皮肤黏膜轻度黄染等体征。该患病动物肝脏形状不规则、质地变硬, 表面可见大小不一的颗粒状结节突出于肝脏表面。随即对肝脏进行HE、Masson及网状纤维染色。通过光学显微镜下观察表明其符合肝硬化病理形态学特点。

[关键词] 新西兰兔; 肝硬化; 病理形态学

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2017)06-0485-03

肝硬化是严重威胁人类健康的常见疾病, 任何破坏肝脏内环境稳定的过程, 炎症、毒性损害、肝血流改变、先天性代谢障碍、化学物质和药物毒性、肝内循环紊乱和胆汁流动阻塞等都可导致肝硬化^[1]。新西兰兔常用于小动物肝硬化模型的制作, 该模型可用于筛选抗肝硬化药物研究、观察外科手术治疗的效果。常用的制作肝硬化模型的方法包括化学损伤方法(四氯化碳法、乙醇法、致癌物法、铁代谢法及D-半乳糖胺法); 外科方法(胆管阻塞法、门静脉缩窄法); 复合法及其他方法(免疫法、营养法、血吸虫法、病毒法)等^[2-6], 但关于新西兰兔自发性肝硬化的文献未见相关报道。本文以空白对照组(试验周期为6个月)出现的1例肝硬化新西兰兔为研究对象, 通过肉眼形态学及组织病理学观察, 对新西兰兔肝脏的病理形态学进行深入的探讨。

1 患病动物概况及剖检

本试验为周期6个月的药物对新西兰兔膝关节的刺激试验, 以期观察该药物对膝关节的损伤及修复情况。普通级新西兰白兔30只, 2月龄体质量约1.5~2.5 kg, 购自济南西岭角养殖繁育中心[SCXK(鲁)2010-0005], 动物饲养于本中心普通级设施[SYXK(鲁)2010-0004]。试验分5组, 每组6只, 分别为低、中、高、模型及空白对照组。试验结束, 肉眼观察空白对照组中1例雌性动物消瘦、体质量减轻、皮肤黏膜有轻度黄染等体征。解剖观察该患病动物肝脏形状不规则、质地变硬, 表面可见大小不一的颗粒状结节突出于肝脏表面(图1A), 腹腔内出现约10 mL淡黄色腹水, 其它组织脏器均无明显的肉眼形态学变化。

2 病理形态学检查

对肝组织进行常规取材、脱水、包埋、石蜡切片、HE染色, 并根据说明书步骤进行网状纤维染色^[7]和Masson染色^[8], 光学显微镜下观察患病动物肝脏病理形态学改变。HE染色显示患病动物肝脏肝细胞呈弥漫性变性、坏死伴结节状再生; 再生的肝细胞排列紊乱, 形成数量不等的假小叶, 假小叶

[收稿日期] 2017-05-10

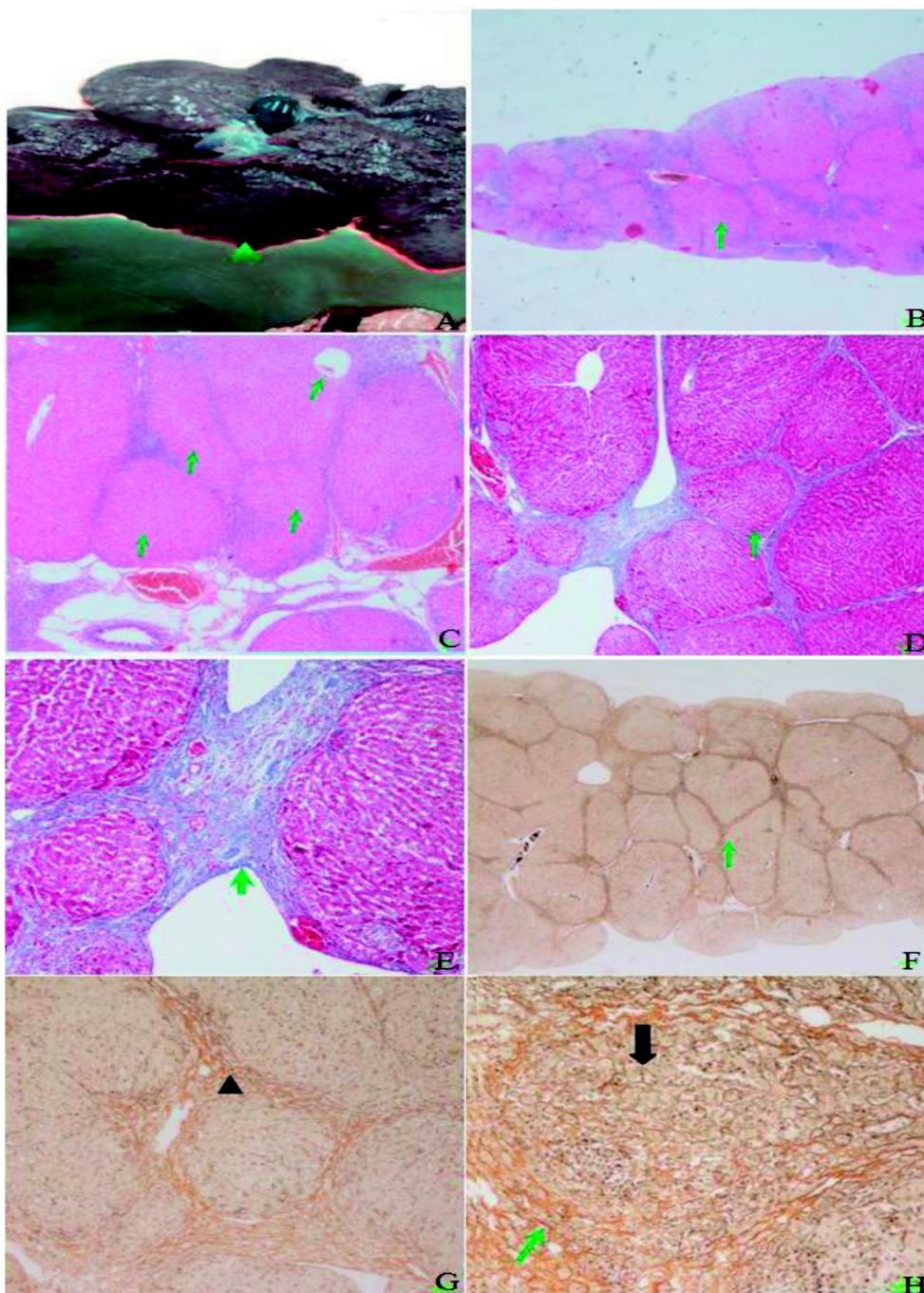
[基金项目] 山东省科技厅山东省创新公共服务平台专项(2014CXPT00001)

[作者简介] 邱波(1983-), 男, 硕士研究生, 主要从事药物的毒性病理学研究。E-mail: qiubo.1983@163.com

[通讯作者] 胡建廷(1979-), 男, 硕士, 副高, 主要从事药物的毒性病理学研究。E-mail: jiantinghu@126.com

内中央静脉缺如或偏位 (图 1B、图 1C)。Masson 染色显示蓝染的增生的胶原纤维将肝组织分成数量不等的假小叶, 假小叶被蓝染的增生的胶原纤维分割、包裹 (图 1D、图 1E)。网状纤维染色显示假

小叶被棕黄色胶原纤维分割、包裹(图 1F、图 1G); 肝组织及假小叶内可见黑色的网状纤维及棕黄色胶原纤维; 肝细胞坏死区域和假小叶周围未见黑色网状纤维塌陷或沉积, 仅见棕黄色胶原纤维增生(图 1H)。



A: 肝脏表面形状不规则、质地变硬, 表面可见大小不一的颗粒状结节(如箭头所示); B: 肝细胞结节状再生。肝细胞排列紊乱, 形成假小叶(HE $\times 40$); C: 假小叶中央静脉缺如或偏位(如箭头所示)(HE $\times 100$); D: 假小叶被胶原纤维分割、包裹(如箭头所示)(Masson $\times 100$); E: 假小叶被蓝染的胶原纤维分割、包裹(如箭头所示)(Masson $\times 200$); F: 假小叶被棕黄色胶原纤维分割、包裹(如箭头所示)(网状纤维 $\times 20$); G: 假小叶被棕黄色胶原纤维分割、包裹(如三角形所示)(网状纤维 $\times 200$); H: 肝组织内可见黑色的网状纤维(如黑色箭头所示), 肝细胞坏死区域和假小叶周围未见黑色网状纤维塌陷或沉积 (网状纤维 $\times 400$)

图 1 兔肝脏病理学观察

3 讨论

新西兰兔是目前科学研究中常用的实验动物之一,广泛用于药物的各种刺激性实验(血管、肌肉、关节、皮下等)、各类生物制剂的热原实验、生殖生理和胚胎学研究、避孕药物的筛选及制备高效价和特异性强免疫血清等实验。为了对药物相关性肝病和自发性病变进行正确鉴别,需加强对实验动物自发性肝脏病变的研究,以建立实验动物的背景资料。因此,本试验系统描述了1例自发性肝硬化新西兰兔肝脏肉眼形态学、组织病理学变化特征。经肉眼形态学观察提示,该患病动物出现的肝脏病变为结节性肝硬化。为进一步证实肝脏病变状况的进展,可通过网状纤维染色与亚急性肝衰竭进行鉴别诊断,因为亚急性肝衰竭时肝细胞坏死区域和假小叶周围可见网状纤维塌陷或沉积^[12]。经网状纤维染色,肝细胞坏死区域和假小叶周围未见黑色网状纤维塌陷或沉积,仅见棕黄色胶原纤维增生,进一步确诊该肝脏病变为结节性肝硬化。

参考文献:

- [1] 徐安书,文正荣,孙志为.肝硬化实验动物模型的研究现状[J].医学综述,2010,4(16):1046-1048.
- [2] 翟伟,刁广浩,李瑞生,等.不同浓度CCl₄注射联合饮用乙醇诱导大鼠肝硬化模型研究[J].实用肝脏病杂志,2016,11(19):713-714.
- [3] 郭丽丽,张铁成,赵明,等.四氯化碳法兔肝硬化模型的建立[J].中国实验诊断学,2011,2(15):229-230.
- [4] 付山峰,陈文生,金博,等.兔胆总管部分结扎肝硬化模型的建立[J].天津医药,2009,10(37):878-880.
- [5] 金博,程留芳,孙涛,等.兔四氯化碳实验性肝硬化模型的建立[J].海军总医院学报,2005,9(18):129-131.
- [6] 郑煜煌,冯清泉,李或章,等.吸虫病性肝硬化兔的部分实验指标测定[J].上海实验动物科学,1993,5(13):34-35.
- [7] 王晓燕,高俊岩,王艳霞.网状纤维染色在临床病理诊断中的应用及技术[J].中国医药导报,2016,13(9):72-75.
- [8] 李敏,姚梅宏,曾玲.PASM-Masson 染色法在肾穿刺活检特殊染色中的应用与体会[J].临床与实验病理学杂志,2014,30(6):693.
- [9] Mallat A, Lotersztain S. Cellular mechanisms of tissue fibrosis novel insights into liver fibrosis [J]. Am J Physiol Cell Physiology, 2013, 305(8):789-799.
- [10] Hegazy SK, El-Bedewy M, Yagi A. Antifibrotic effect of aloe vera in viral infection-induced hepatic periportal fibrosis [J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(3):2026-2034.
- [11] Sousa AM, Liu T, Guevara O, et al. Smooth muscle alpha-actin expression and myofibroblast differentiation by TGF beta are dependent upon MK2[J]. Cell Biochem, 2007, 100(8):1581-1592.

(上接第 481 页)

Detection of Blood Physiological Parameters in Albino Mutant Golden Hamster

CUI Xiao-xia¹, SHANG Shi-chen¹, MA Lan-zhi¹, HUANG Bin¹,

SHANG Yu-pu¹, WANG Dong-ping¹, CHEN Zhen-wen², WANG Quan-xin³

(1. Laboratory Animal Center, Military Medical Sciences, Military Academy, Beijing 100071, China;

2. Department of Laboratory Animal Science, Capital Medical University, Beijing 100069, China;

3. Liao Ning Chang Sheng Biotechnology Co., LTD, Benxi 117004, China)

[Abstract] Objective To detect the normal range of blood physiological parameters in albino mutant golden hamster and compared with wild type golden hamster. **Methods** Blood samples were taken from orbital venous plexus of hamsters. A number of blood physiological parameters were measured using automatic blood cell analyzer and semi-automatic coagulometer. The data was analyzed with SPSS17.0. **Results** The range of normal values of blood physiological data of albino mutant golden hamster and golden hamster were detected. There were significant differences between albino mutant golden hamster and golden hamster in some indexes. **Conclusion** The albino mutant in golden hamster may be influence the normal values of some blood physiological indexes.

[Key words] Albino mutant; Golden hamster; Blood physiological parameters

医学实验技术专业动物学教学实践

郭 萌, 蒋 辉, 王 迎, 陈柏安, 杜小燕

(首都医科大学基础医学院实验动物学系, 北京 100069)

[摘要] 目的 为医学实验技术专业动物学课程的教学提供借鉴经验。方法 从教学内容、教学方法和考核方式等方面总结近五年的动物学教学实践。结果 根据医学实验技术专业特点, 设置了更符合本专业要求的动物学教学内容, 运用了多种教学方法和实验教学改革措施, 激发了学生学习热情, 取得了良好教学效果。结论 这些经验对医学实验技术专业动物学教学具有参考价值。
[关键词] 医学实验技术专业; 动物学; 教学实践

[中图分类号] Q95-33 [文献标识码] B [文章编号] 1674-5817(2017)06-0488-03

首都医科大学医学实验技术专业是基于前期实验动物技术专科教育实践, 于2003年建立的本科专业。该专业注重对学生医学研究中涉及的动物实验理论、动物实验技术及基础医学研究思维和能力等方面的培养。动物学是医学实验技术专业教育的重要专业基础课。它是研究动物类群的形态结构、分类、生命活动规律、生命活动与环境关系以及发生发展规律的一门学科, 涉及从原生动到脊索动物的全部动物类群^[1]。随着近年来我国医学和生命科学领域的快速发展, 国家和社会对医学实验相关的实验动物专业人才需求发生了变化, 从过去的实验动物管理和动物实验技术人员向从事医学实验动物学研究与应用, 特别是实验动物资源的开发利用与管理的高素质创新型复合型人才转变^[2]。因此, 作为医学院校开设的以实验动物为主要学习和就业方向医学实验技术专业, 设置了动物学基础课程, 其目的是让学生掌握动物学的基础理论和基本操作技能, 为其后续实验动物学课程学习和研究奠定基础。然而, 医学院校的医学实验技术专业在动物学教学内容和教学方法等方面尚缺少可供借鉴的成功

经验。本文总结了近五年来在本科动物学教学中的一些实践经验, 供其他院校相关专业教学参考。

1 理论教学

1.1 教学内容

动物学是医学实验技术专业培养中最为重要的专业基础课之一, 在课程设置上将动物学确定为180学时的教学内容, 其中理论课126学时、实验课54学时, 理论课与实验课学时比例为2:1, 分两学期完成, 并选取《普通动物学》^[1]作为教材, 由具有动物学或动物学相关专业博士学位教师授课。根据医学实验技术专业人才培养需求, 本专业动物学教学大纲以生物专业动物学教学大纲为基础, 增加了常见致病动物类群介绍, 各门、纲动物间的比较解剖以及各类群动物在生物医药研究中的应用等内容, 同时减少了生态学的相关内容。经过优化的教学大纲具有实验课程比例较高, 总体课程容量较大的特点, 总学时数和总理论课学时数多于生物学、动物医学、动物科学等专业, 而总实验课学时数也与这些专业相当。这样的课程设置, 不仅与医学实验技术专业的“从事医学实验动物学教育、研究、实验动物培育与管理的一专多能、具备一定开拓创新和组织管理能力的高层次复合型人才”的培养目标相一致, 而且在一定程度上弥补了医学院校动物学课程中学生没有野外实习课程的缺憾。由于动物学内容丰富, 庞杂, 分

[收稿日期] 2017-06-09

[基金项目] 国家科技支撑计划(No. 2015BAI09B01); 国家自然科学基金(Nos. 31402027)

[作者简介] 郭 萌(1984-), 女, 讲师, 博士, 主要从事实验动物遗传与发育。E-mail: helloguomeng@163.com

[通讯作者] 杜小燕(1971-), 女, 副教授, 博士, 主要从事实验动物遗传与发育。E-mail: duduyan@ccmu.edu.cn

支多,从原生动物到脊索动物的各动物类群,其形态结构特征、功能、分类与进化及与环境的关系各不相同,易使学生在课程学习中走马观花,抓不住重点。因此,结合医学实验技术专业特点和要求,动物学教学内容应以进化为主线,重点突出各动物类群的形态结构特征和功能特点,分析各类群与环境、进化的关系,带领学生以动态发展的视角,从整体上把握各类群的特征与进化、环境的关系^[3]。使学生充分掌握动物学的基本内容和原理。

虽然动物学在生命科学各学科中建立较早,体系较为完善,但传统教学内容中仍存在诸多问题,如一些特殊类群的分类地位尚存争议,动物学理论的分子机理论据单薄等。随着近年来二代测序技术和具有物种通用性的规律间隔成簇短回文重复序列(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas9 基因编程技术的蓬勃发展,动物学领域也涌现了诸多令人振奋的研究成果,可以在一定程度上补充传统教学内容中的这些问题。这就要求我们的授课教师将这些最新科学进展融合到动物学的经典教学内容当中,不仅能够极大提升学生的学习兴趣,而且有助于学生对动物学基本原理和发展趋势有更深刻的理解。

1.2 教学方法

1.2.1 多媒体教学 动物学是一门实践性很强的学科,学生在学习过程中应先建立直观的感性认识,经理解总结归纳升华为理性认识。然而,在课堂授课中仅仅依赖传统的标本、幻灯和板书无法很好地使学生对繁多的动物类群及其之间的关系建立起直观化、具体化、形象化的认识。而在医学院校的动物学课程体系中,由于没有野外实习,学生无法实际观察动物类群的分布、形态和习性等。因此,多媒体技术成为了动物学理论课教学的必要手段。通过多媒体视频或动画的播放,学生可以看到一些难以直接观察而又需要观察的生物学现象,超越时空的距离,使学生与动物世界进行零距离的接触,大大提升学生的学习兴趣^[4]。例如,在讲授两栖纲起源时,涉及到总鳍鱼类和肺鱼类的结构特征和生活环境,这些生活于非洲的鱼类即使在水族馆也很难见到,通过相关纪录片内容的播放,使学生对其结构及其相应的习性有了直观了解,从而更易理解两栖纲从这两类鱼类起源的假说。又如,各种寄生类群的生活史复杂,容易混

淆,课程涉及的9种常见寄生虫生活史通过生动逼真的动画放映,变静态为动态,变微观为宏观,将复杂漫长的生活史串联起来,便于区别记忆。

1.2.2 交互式教学 为了激发学生的求知欲和探索精神,在教学中我们结合最新研究进展,以问题为导向,要求学生查找阅读文献,积极思考,变学生被动接受为师生互动,共同探讨。案例1,桦尺蠖的工业黑化现象是讲授进化论的教科书级案例。在19世纪中叶工业革命之前,英国大部分地区桦尺蠖为淡色、带斑点。随着工业革命导致的污染加重,在短短几十年间,该地区桦尺蠖从浅色斑点变成了黑色。这样,桦尺蠖就能隐藏在被灰尘覆盖的树叶草丛中,不易被天敌发现,从而保护自己。这一案例被称为达尔文进化理论的“完美注解”,即生物体内适应环境的有利突变经自然选择得到保留。这一案例学生容易理解,很多学生也在中学生物课中接触过。而在我们的讲授中,不仅仅涉及以上内容,更通过此案例引导学生思考如下两个问题:(1)现在英国大气环境改善后,该地区桦尺蠖颜色是否发生改变?(2)内在突变是进化驱动力,那么桦尺蠖的这种突变究竟是什么?它的分子基础是什么呢?我们以2016年6月自然杂志《一个转座子元件引起英国桦尺蠖的工业黑化》一文为主要依据,要求一组学生阅读准备并制作幻灯回答这两个问题^[5]。案例2,蛇为什么没有腿?在讲授爬行动物有鳞目蛇亚目时,我们会向学生提问蛇为什么会没有腿?要求学生仔细阅读2016年发表在细胞杂志的文献《一个后肢增强子在蛇进化中的逐渐功能丢失》^[6],文中不仅找到了蛇没有腿的原因,更做到了让小鼠也没有腿。既趣味性十足,适于学生阅读,又解决了动物学的重要理论问题。学生阅读文献,并以课堂报告的形式为大家讲述蛇没有腿的机理和研究思路,进而扩展到脊椎动物后肢的进化。并回答老师和同学的提问,任课教师给予适当的引导、补充和总结。课堂报告成绩评定则以PowerPoint制作、内容、讲解及回答问题等方面打分。教师通过给予学生最新的动物学研究进展,以问题为导向,充分调动了学生的学习主观能动性,激发了学生的科研思维,锻炼了学生的语言表达能力和逻辑组织能力。学生不再是被动接受知识,而是主动获取最新研究进展,更深刻地理解动物学原理和前沿热点。在提升学习

兴趣和效果的同时,学生也成为知识的传播者。

2 实验教学

2.1 教学内容

动物学实验是通过各门、纲代表动物解剖、装片或标本的观察以及相关类群的比较观察等,使学生掌握动物各门、各纲的主要特征及其主要类群。通过实验课教学验证、加深理解和巩固课堂所学知识,熟悉动物学的基本操作技术,提高动手能力及观察分析问题能力。

2.2 教学方法

首先,在动物学教学中充分利用学校及周边地区丰富的动物资源,如周围水域中的眼虫、涡虫,校园中的蚯蚓和蝗虫等,带领学生参加教师的实验材料准备,以培养学生的科研能力和动手能力,充分调动学生的主动性,并对该地区该物种的生活环境、生活方式以及种群特征产生直观的认识。其次,代表动物的形态解剖实验是动物学实验教学的核心,对于认识该物种的内部结构及器官特征,并建立对该门或纲的整体特征认识具有不可或缺的作用,同时教师通过代表动物讲解使学生了解该物种在医学、生命科学领域的应用和价值。然而,传统实验课程设置通常为每次课解剖单一物种,这样的设置容易使学生在产生割裂感,连续性差,而动物学的学习强调动物进化的动态性和连续性。因此,我们在教学中尝试将部分单一的解剖实验改成比较解剖实验,涡虫与蛔虫、蚯蚓的比较,两栖类与爬行类的比较等。通过比较解剖使学生不仅了解到相关动物形态结构的异同,加深了学生从进化的角度认识和理解动物体的结构和功能及其与环境的关系,使学生在动物学实验学习中具有整体性和连续性,并为今后学习高等动物和人体解剖学打下基础。

3 考核方式

根据医学实验专业本科学生对动物学学习的特

点,本课程的考核方式采取理论闭卷考试(60%)、实验考核(30%)和平时考核(10%)相结合的方式。考虑到医学实验技术专业的学生和本课程特点,在实验考核中侧重考核学生的实际操作能力,以实验报告考核为辅;平时考核则以课堂提问、课堂报告以及考勤等几部分为依据进行综合评分。这样的考核方式避免了学生把重点放在机械记忆概念和理论知识上,更能突出培养学生的动手能力和学习主动性。总之,在医学实验技术专业(医学实验动物方向)动物学课程的教学实践中,我们开展了理论和实验课程教学内容和方法的新尝试,并在学生动物学课程学习中取得良好效果,理论课和实验课出勤率均达到100%,期末平均成绩达80分,及格率100%,80分以上比率为59%。尤其是实验课80分以上者达到79%。而且,学生针对教学内容掌握,兴趣激发,与发展前沿联系,思维能力培养等方面情况给予教师的评教成绩达平均分97.94分(百分制),居全校教师评教分数前30%。这些数据充分说明了学生对该课程具有浓厚兴趣,教、学效率俱佳,这些改革措施为医学实验技术专业的动物学教学建设积累了宝贵经验。

参考文献:

- [1] 刘凌云,郑光美.普通动物学(第四版)[M].北京:高等教育出版社.2009,3-5:496-522.
- [2] 贺争鸣,王洪军,陈振文,等.加快实验动物高级复合型管理人才的培养[J].实验动物与比较医学,2013,33(2):160-161.
- [3] 文陇英,付义强,聂丽,等.以进化为主线的动物学教学探讨[J].现代农业科技,2013,10:330-331.
- [4] 徐纯柱,郭自荣,谢桂林,等.如何在动物学教学中提高多媒体技术的直观性[J].黑龙江畜牧兽医科技版,2011,23:146-147.
- [5] Van't Hof AE, Campagne P, Rigden DJ, et al. The industrial melanism mutation in British peppered moths is a transposable element [J]. Nature, 2016, 534(7605):102-105.
- [6] Kvon EZ, Kamneva OK, Melo US, et al. Progressive loss of function in a limb enhancer during snake evolution [J]. Cell, 2016, 167(3):633-642.

P301S 突变 tau 转基因动物模型及其应用

马登磊, 张 兰

(首都医科大学宣武医院药物研究室, 神经变性病教育部重点实验室,
北京市神经药物工程研究中心, 北京 100053)

[摘要] 微管相关蛋白 tau 在细胞内形成的神经纤维缠结是包括阿尔茨海默病(AD)、连锁于 17 号染色体伴帕金森综合征的额颞叶痴呆(FTDP-17)等在内的多种 tau 蛋白病(tauopathies)的主要病理表现之一。国内外学者在 FTDP-17 患者中发现了 tau 基因存在多个位点的突变, 并以此为基础制作了多种 tau 转基因动物模型。其中 P301S 突变 tau 蛋白转基因小鼠模型在国内外的 tau 相关疾病研究中得到了广泛应用。本文综述了 P301S 突变 tau 转基因小鼠的病理表现及应用的新进展。

[关键词] P301S 突变; tau 蛋白; 转基因小鼠; 阿尔茨海默病; tau 蛋白病

[中图分类号] Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2017)06-0491-06

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的两个主要病理特征为由 β -淀粉样蛋白(β -amyloid, A β)沉积而形成的老年斑和由过度磷酸化 tau 蛋白在细胞内聚集形成的神经原纤维缠结(neurofibrillary tangles, NFTs)。研究表明, AD 患者脑内 NFTs 与神经元死亡和认知功能降低具有更高的相关性^[1,2], 因此以 tau 蛋白为靶点的药物研究获得了越来越多的关注^[3]。目前国内外学者已经建立了多种 tau 蛋白相关动物模型^[4,5]。其中, tau 蛋白转基因动物模型可以模拟 AD 及其他 tau 蛋白病(tauopathy)的一些疾病特征, 例如 tau 蛋白的磷酸化和病理性沉积、神经元死亡、认知功能障碍等^[4]。本文对应用比较广泛的 P301S 突变 tau 蛋白转基因小鼠模型做一综述, 说明模型的主要病理表现及其在药理学研究中的应用。

1 微管相关蛋白 tau

1.1 结构和功能

Tau 蛋白是微管结合蛋白家族中的一员。在正常的神经元中, tau 蛋白主要富集于神经元轴突内, 主要生理功能是与微管结合, 调节微管的组装与解聚, 维持微管的稳定性^[6]; tau 蛋白还辅助神经元轴突的运输功能, 参与维持细胞形态、信号传递等生理过程^[7]; 同时还具有促进轴突生长发育和神经元极性的作用等^[8]。在异常情况下, tau 蛋白的高度磷酸化和聚集可引起多种 tau 蛋白病, 包括阿尔茨海默病、连锁于 17 号染色体 tau 突变伴帕金森综合征的额颞叶痴呆(frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to tau mutations on chromosome 17, FTDP-17)、Pick 病、进行性核上性麻痹、皮质基底节变性等。

1.2 Tau 蛋白的磷酸化和聚集

在 tau 蛋白病中, tau 蛋白会发生多种病理变化, 例如磷酸化、构象改变、寡聚体以及 tau 蛋白的聚集, 其中 tau 蛋白的过度磷酸化为主要的病理表现之一。研究结果显示, 在 AD 及其他 tau 蛋白病的病理变化中均含有高度磷酸化的 tau 蛋白^[9]。过度磷酸化的 tau 蛋白从微管上解聚, 不再发挥正常的生理功能, 并聚集形成神经原纤维缠结, 进

[收稿日期] 2017-08-14

[基金项目] 国家自然科学基金项目(No. 81473373), 国家重大新药创制科技重大专项(No. 2015ZX09101016001), 北京市教委新医药学科群项目(No. XK100270569), 北京市高层次卫生技术人员计划(No. 2014-2-014)

[作者简介] 马登磊(1988-), 男, 博士研究生, 研究方向: 神经药理学。E-mail: ma_denglei@126.com

[通讯作者] 张 兰, 教授, 研究方向: 神经药理学。
E-mail: lanizhg@126.com

而影响轴突的正常转运,引起神经元变性和功能损伤^[10]。在AD患者脑中,游离于细胞质中的磷酸化tau蛋白(AD P-tau)不仅不能与微管蛋白结合发挥正常的生理功能,反而会抑制微管的组装^[11]。

1.3 Tau 的基因突变

微管相关蛋白tau(microtubule-associated protein tau, MAPT)的基因突变最早发现于FTDP-17患病家系中^[12]。目前已经在17号染色体多个位点上发现了Tau基因突变,包括R5L、K257T、I260V、G272V、ΔK280、P301L、P301S、Q336R、V337M、R406W等^[13]。其中,P301S突变位于外显子10,编码全长tau第301位氨基酸的三个碱基中第一个C错义突变为T,导致该位置的脯氨酸(Pro)变为丝氨酸(Ser)。P301S突变位点位于MAPT基因片段的微管结合区,影响tau蛋白与微管的结合,促进tau纤维丝的形成^[14,15];在体内和体外实验中均显示该突变会促进磷酸化tau蛋白聚集成细丝或神经原纤维缠结^[16,17]。

2 PS19 转基因小鼠

很多FTDP-17突变tau通过单转或者多转的方式,建立了相应的过表达转基因动物模型。其中,过表达P301S突变tau蛋白的转基因小鼠(PS19转基因小鼠)具有很明显的tau蛋白相关病理表现和认知功能障碍,因此得到较为广泛的应用。

2.1 PS19 转基因小鼠的病理表现

Yoshiyama等^[18]构建了以鼠PmP为启动子过表达P301S突变的人1N4R tau蛋白的转基因小鼠模型,即PS19转基因小鼠。PS19转基因小鼠在皮层和海马等部位过表达3~5倍的人源P301S突变tau蛋白。在PS19转基因小鼠3月龄时,突变tau蛋白与微管结合的能力降低,小鼠脑内神经元开始出现因高度磷酸化形成的不可溶tau蛋白。5月龄,PS19转基因小鼠新皮层、海马和杏仁核出现tau蛋白聚集形成的双股螺旋细丝(paired helical filaments, PHFs)和NFTs^[18]。另外有研究^[19]显示,PS19转基因小鼠脑脊液中tau蛋白的浓度为内源性鼠tau的5倍,与脑内过表达tau的量是一致的;而随着月龄增长及tau蛋白聚集的增加,小鼠脑脊液中tau单倍体的含量减少,提示细胞外tau蛋白与聚集态tau蛋白存在一个平衡状态。除了tau蛋白相关病变外,PS19

转基因小鼠还会出现小胶质细胞激活等神经炎症反应,并进一步导致皮层和海马体积缩小和神经元的丢失^[18,20]。同时在tau病变的早期,PS19转基因小鼠出现氧化应激和线粒体紊乱,并通过激活促肾上腺皮质激素释放因子受体通路进一步加剧tau蛋白病变和认知障碍^[21,22]。PS19转基因小鼠还出现突触可塑性的降低以及突触丢失,并影响谷氨酸受体进而损伤突触功能^[23]。另有研究^[24]表明,P301S突变可以引起转基因小鼠脑组织染色体发生非整倍体变化,这可能也是促进神经退行性病变的机制之一。

2.2 PS19 转基因小鼠的行为学变化

6月龄PS19转基因小鼠在Morris水迷宫、Barnes迷宫和Y迷宫试验中均出现空间认知障碍,在三室社交试验中显示社交记忆障碍,物体识别试验中表现出记忆障碍,前脉冲抑制试验中显示信息处理和感觉运动阈异常,旷场试验中显示高活动性症状,而运动能力和协调能力未发生明显变化;但老年PS19转基因小鼠会出现后肢瘫痪等运动症状^[18,21,25]。以上行为学试验结果表明,PS19转基因小鼠出现了明显的认知能力障碍和精神异常;在青年期无明显的运动异常,但在老年期出现明显的运动障碍。由于该小鼠品系表现出明显的包括tau病变在内的多个病理表现以及行为异常,因此近些年来广泛用于tau蛋白病和神经退行性疾病的发病机制研究以及药物研究中。

3 PS19 转基因小鼠的应用

3.1 在病理机制研究中的应用

作为一个具有明显病理表现的tau蛋白转基因模型,PS19转基因小鼠可以用于研究tau蛋白相关的病理机制,例如tau seeding, tau的乙酰化等。应用PS19转基因小鼠研究发现P301S突变tau蛋白在体内引起的tau seeding可以预测tau蛋白病变的发展程度^[26];另有研究^[22, 27, 28]在幼年PS19转基因小鼠脑内注射AD患者的tau蛋白或合成的tau纤维丝之后,可以诱导和促进病理性tau蛋白在脑内的分散和传播,加重疾病进程,从而探明脑内病理性tau蛋白扩散的方式和机制。在PS19转基因小鼠模型中,tau的乙酰化可以通过抑制tau蛋白与微管的结合以及促进tau蛋白聚集从而加速tau的病理变化,而应用相应抗体抑制tau蛋白的乙酰化可以减轻tau

蛋白高度磷酸化等病变^[29,30]。另外, PS19 转基因小鼠作为疾病模型还应用于正电子发射断层扫描(positron emission tomography, PET)诊断以及生物标志物的研究中^[31,32]。

3.2 在药理学研究中的应用

目前, 以 PS19 转基因小鼠为疾病模型进行了诸多方面的药物研发。包括:

3.2.1 胆碱酯酶抑制剂 有研究^[33]报道胆碱酯酶抑制剂多奈哌齐可以增高 PS19 转基因小鼠的存活率, 降低 tau 蛋白异常磷酸化以及 NFTs 等病理变化, 改善突触和神经元的丢失和形态; 其机制可能与多奈哌齐抑制 MAPK 和 JNK 通路的激活以及胶质细胞的激活、发挥抗炎作用有关。而给予抗胆碱类药物可以加重 PS19 转基因小鼠的病理表现^[34]。

3.2.2 Tau 蛋白免疫疗法 抗 tau 抗体侧脑室注射或腹腔注射到 6 月龄 PS19 转基因小鼠中, 3 个月后可以降低 tau 蛋白的异常磷酸化, 减少 tau 的聚集和神经原纤维缠结, 改善条件恐惧认知障碍和感觉运动障碍, 其机制可能与抗体阻断病理性 tau 的传播, 促进小胶质细胞对病理性 tau 的消除有关^[35, 36]。给予 PS19 转基因小鼠抗磷酸化 tau 蛋白抗体, 可以降低脑内和脑脊液中磷酸化 tau 蛋白的含量, 改善物体识别试验中的认知障碍^[37]。以 tau 蛋白双磷酸化位点的肽段作为疫苗引发 PS19 转基因小鼠的主动免疫, 可降低 tau 蛋白病变, 改善小鼠的行为障碍和存活率^[38]。

3.2.3 降低 tau 蛋白磷酸化和聚集 苯扎贝特作为过氧化物酶体增殖剂激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors, PPARs)激动剂, 给药后可以降低 PS19 转基因小鼠脑内 tau 蛋白磷酸化和聚集, 抑制神经炎症, 改善脂类代谢和氧化应激, 并改善小鼠的行为障碍^[39]。新药 anle138b 可以与 PS19 转基因小鼠体内聚集的 tau 蛋白结合并抑制 tau 蛋白的聚集, 保护神经元和突触, 进而改善小鼠行为学表现和存活率^[40]。雷帕霉素作为 mTOR 通路抑制剂, 可以降低 PS19 转基因小鼠 tau 高度磷酸化, 改善突触和神经元丢失, 并改善轴突功能和认知行为障碍, 其机制可能与雷帕霉素抑制糖原合成酶激酶 3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)的活性以及增强自噬功能有关^[41]。坦西莫司可以降低 PS19 转基因小鼠体内 tau 蛋白磷酸化水平, 改善空间认知障碍, 其机制可能与抑制 GSK-3 β 的活性和激活细胞自噬有关^[42]。

3.2.4 Tau 蛋白的清除 转录因子 EB(TFEB)作为自噬溶酶体途径重要的调节因子, 在 PS19 转基因小鼠中过表达可以减少 tau 蛋白聚集形成的 PHF 和溶酶体碎片, 保护神经元和认知功能^[43]。在 PS19 转基因小鼠侧脑室注射人 tau 的反义寡核苷酸 ASOs, 可以降低 tau 的 mRNA 和蛋白的表达水平, 减轻 tau 蛋白病变, 防止海马体积萎缩和神经元死亡, 改善行为障碍^[44]。

3.2.5 微管稳定剂 埃博霉素 D 给予 PS19 转基因小鼠治疗 3 个月, 可以减轻脑内 tau 病变, 减少神经元和突触丢失, 改善突触功能和认知功能, 其机制主要是药物维持了微管的稳定性, 进而保护了轴突^[45,46]。烟酰胺-核苷酸腺苷转移酶 1(nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 1, Nmnat1)作为轴突退化抑制剂, 在 PS19 转基因小鼠过表达可以降低不溶性 tau 蛋白的含量, 保护神经元的功能^[47]。

3.2.6 抑制神经炎症 通过促进髓系细胞 2 中表达触发受体(triggering receptor expressed on myeloid cells 2, TREM2)基因的表达, 可以改善 PS19 转基因小鼠的认知障碍, 降低 tau 蛋白磷酸化和神经元丢失等神经病理表现; 主要机制为 TREM2 改变了小胶质细胞的表型, 降低了神经炎症和 tau 蛋白相关激酶的活性^[48,49]。

3.2.7 改善代谢 辅酶 Q 和亚甲蓝可以通过改善线粒体代谢或抑制氧化应激, 进而改善 PS19 转基因小鼠的 tau 蛋白病变和行为障碍^[50, 51]。另外也有研究^[52, 53]显示, 运动锻炼可以改善 PS19 或肥胖 PS19 转基因小鼠的 tau 相关病变以及行为学表现。

3.2.8 其他药物或药物靶点 存在于溶酶体的天冬酰胺内肽酶(asparagine endopeptidase, AEP)在老化过程中被激活并裂解 tau 蛋白, 使后者丧失微管装配功能, 诱导 tau 蛋白聚集并引发神经退行性病变; 而在 PS19 转基因小鼠中敲除 AEP 的编码基因, 可以显著降低 tau 蛋白的过度磷酸化和突触损失, 改善突触功能和认知能力^[54]。治疗糖尿病的药物二甲双胍可以降低 PS19 转基因小鼠的 tau 蛋白磷酸化, 但是同时也会促进 tau 蛋白的聚集, 加重小鼠的运动障碍和高活性等行为异常^[55]。

4 其他 P301S 突变 tau 转基因动物

除了 PS19 转基因小鼠外, Allen 等^[56]以鼠 Thy1.2 为启动子, 构建了表达 P301S 突变人源 0N4R tau

蛋白的转基因小鼠, 该小鼠 tau 蛋白的表达量约为野生型的两倍。该转基因小鼠在 5~6 月龄时, 神经元内出现高度磷酸化不溶性 tau 蛋白, 随后出现 NFTs 和 Pick 小体样内涵体, 以及扭曲状 tau 蛋白纤丝。此外, 该转基因小鼠还出现小胶质细胞的激活和神经炎症^[57], 同时也会出现脊髓运动神经元的丢失并引发肌力降低等运动症状^[58]。P301S 突变 tau 蛋白除了用于构建单转基因小鼠外, 还可与其他基因一起构建双转基因小鼠模型, 从而获得多种表型和病理改变^[59]。

5 结语

与野生型 tau 蛋白相比, P301S 突变 tau 蛋白更容易发生聚集; 因此 P301S 转基因小鼠由于 P301S 突变 tau 蛋白的过表达引起的明显的 tau 病理改变, 进而可以很好地模拟 tau 蛋白病(tauopathy), 例如 AD 等。因此, 该模型可以用于研究 AD 等 tau 蛋白相关疾病的发病机制和靶点药物的开发。但是 PS19 转基因小鼠在 9~12 月龄开始出现后肢等部位的萎缩, 进而影响小鼠的运动功能, 最终引起小鼠的死亡, 因此在应用该小鼠模型时建议使用较早月龄的小鼠。另外, 该模型只是过表达一种突变的 tau 蛋白, 而人的 tau 蛋白有多种异构体, 因此该模型不能完全模拟疾病模型中 tau 蛋白病变过程。同时, AD 具有多种病理表现, tau 转基因小鼠模型并不能完全模拟 AD 等复杂疾病的发病机制。尽管如此, P301S 突变 tau 转基因小鼠模型的建立加深了对于 AD 等 tau 蛋白病的分子机制的认识, 尤其是 tau 蛋白病变与神经退行性病变的关系。同时, 这些模型也广泛应用于以 tau 蛋白为靶点的药理学研究中, 对于 AD 及其他 tau 蛋白病的新药研发具有重要的意义。

参考文献:

- [1] Nagy Z, Esiri MM, Jobst KA, et al. Relative roles of plaques and tangles in the dementia of Alzheimer's disease: correlations using three sets of neuropathological criteria[J]. *Dementia*, 1995, 6(1):21-31.
- [2] Murray ME, Lowe VJ, Graff-Radford NR, et al. Clinicopathologic and 11C-Pittsburgh compound B implications of Thal amyloid phase across the Alzheimer's disease spectrum[J]. *Brain*, 2015, 138(Pt 5):1370-1381.
- [3] Gong CX, Grundke-Iqbal I, Iqbal K. Targeting tau protein in Alzheimer's disease[J]. *Drugs Aging*, 2010, 27(5):351-365.
- [4] Dujardin S, Colin M, Bué e L. Invited review: Animal models of tauopathies and their implications for research/translation into the clinic[J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2015, 41(1): 59-80.
- [5] Noble W, Hanger DP, Gallo JM. Transgenic mouse models of tauopathy in drug discovery[J]. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, 2010, 9(4):403-428.
- [6] Weingarten MD, Lockwood AH, Hwo SY, et al. A protein factor essential for microtubule assembly[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1975, 72(5):1858-1862.
- [7] Dixit R, Ross JL, Goldman YE, et al. Differential regulation of dynein and kinesin motor proteins by tau [J]. *Science*, 2008, 319(5866):1086-1089.
- [8] Liu CW, Lee G, Jay DG. Tau is required for neurite outgrowth and growth cone motility of chick sensory neurons [J]. *Cell Motil Cytoskeleton*, 1999, 43(3):232-242.
- [9] Iqbal K, Liu F, Gong CX, et al. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration [J]. *Acta Neuropathol*, 2009, 118(1):53-69.
- [10] Iqbal K, Liu F, Gong CX. Tau and neurodegenerative disease: the story so far [J]. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12(1):15-27.
- [11] Li B, Chohan MO, Grundke-Iqbal I, et al. Disruption of microtubule network by Alzheimer abnormally hyperphosphorylated tau [J]. *Acta Neuropathol*, 2007, 113 (5):501-511.
- [12] Hutton M, Lendon CL, Rizzu P, et al. Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17 [J]. *Nature*, 1998, 393(6686):702-705.
- [13] Stenson PD, Mort M, Ball EV, et al. The human gene mutation database: building a comprehensive mutation repository for clinical and molecular genetics, diagnostic testing and personalized genomic medicine [J]. *Hum Genet*, 2014, 133(1):1-9.
- [14] Hong M, Zhukareva V, Vogelsberg-Ragaglia V, et al. Mutation-specific functional impairments in distinct tau isoforms of hereditary FTDP-17 [J]. *Science*, 1998, 282(5395): 1914-1917.
- [15] Chang E, Kim S, Yin H, et al. Pathogenic missense MAPT mutations differentially modulate tau aggregation propensity at nucleation and extension steps [J]. *J Neurochem*, 2008, 107(4):1113-1123.
- [16] Alonso AD, Mederlyova A, Novak M, et al. Promotion of hyperphosphorylation by frontotemporal dementia tau mutations [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279(33):34873-34881.
- [17] Ludvigson AE, Luebke JI, Lewis J, et al. Structural abnormalities in the cortex of the rTg4510 mouse model of tauopathy:

- a light and electron microscopy study [J]. *Brain Struct Funct*, 2011, 216(1):31-42.
- [18] Yoshiyama Y, Higuchi M, Zhang B, et al. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model [J]. *Neuron*, 2007, 53(3):337-351.
- [19] Yamada K, Cirrito JR, Stewart FR, et al. *In vivo* microdialysis reveals age-dependent decrease of brain interstitial fluid tau levels in P301S human tau transgenic mice [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(37):13110-13117.
- [20] López-González I, Aso E, Carmona M, et al. Neuroinflammatory gene regulation, mitochondrial function, oxidative stress, and brain lipid modifications with disease progression in tau P301S transgenic mice as a model of frontotemporal lobar degeneration-tau [J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2015, 74(10):975-999.
- [21] Dumont M, Stack C, Elipenhli C, et al. Behavioral deficit, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction precede tau pathology in P301S transgenic mice [J]. *FASEB J*, 2011, 25(11):4063-4072.
- [22] Boluda S, Iba M, Zhang B, et al. Differential induction and spread of tau pathology in young PS19 tau transgenic mice following intracerebral injections of pathological tau from Alzheimer's disease or corticobasal degeneration brains [J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 129(2):221-237.
- [23] Crescenzi R, DeBrosse C, Nanga RP, et al. *In vivo* measurement of glutamate loss is associated with synapse loss in a mouse model of tauopathy [J]. *Neuroimage*, 2014, 101:185-192.
- [24] Rossi G, Conconi D, Panzeri E, et al. Mutations in MAPT give rise to aneuploidy in animal models of tauopathy [J]. *Neurogenetics*, 2014, 15(1):31-40.
- [25] Takeuchi H, Iba M, Inoue H, et al. P301S mutant human tau transgenic mice manifest early symptoms of human tauopathies with dementia and altered sensorimotor gating [J]. *PLoS One*, 2011, 6(6):e21050.
- [26] Holmes BB, Furman JL, Mahan TE, et al. Proteopathic tau seeding predicts tauopathy *in vivo* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(41):E4376-4385.
- [27] Iba M, Guo JL, McBride JD, et al. Synthetic tau fibrils mediate transmission of neurofibrillary tangles in a transgenic mouse model of Alzheimer's-like tauopathy [J]. *J Neurosci*, 2013, 33(3):1024-1037.
- [28] Kaufman SK, Sanders DW, Thomas TL, et al. Tau prion strains dictate patterns of cell pathology, progression rate, and regional vulnerability *in vivo* [J]. *Neuron*, 2016, 92(4):796-812.
- [29] Cohen TJ, Guo JL, Hurtado DE, et al. The acetylation of tau inhibits its function and promotes pathological tau aggregation [J]. *Nat Commun*, 2011, 2:252.
- [30] Min SW, Cho SH, Zhou Y, et al. Acetylation of tau inhibits its degradation and contributes to tauopathy [J]. *Neuron*, 2010, 67(6):953-966.
- [31] Maeda J, Zhang MR, Okauchi T, et al. *In vivo* positron emission tomographic imaging of glial responses to amyloid-beta and tau pathologies in mouse models of Alzheimer's disease and related disorders [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(12):4720-4730.
- [32] Ji B, Maeda J, Sawada M, et al. Imaging of peripheral benzodiazepine receptor expression as biomarkers of detrimental versus beneficial glial responses in mouse models of Alzheimer's and other CNS pathologies [J]. *J Neurosci*, 2008, 28(47):12255-12267.
- [33] Yoshiyama Y, Kojima A, Ishikawa C, et al. Anti-inflammatory action of donepezil ameliorates tau pathology, synaptic loss, and neurodegeneration in a tauopathy mouse model [J]. *J Alzheimers Dis*, 2010, 22(1):295-306.
- [34] Yoshiyama Y, Kojima A, Itoh K, et al. Anticholinergics boost the pathological process of neurodegeneration with increased inflammation in a tauopathy mouse model [J]. *Neurobiol Dis*, 2012, 45(1):329-336.
- [35] Yanamandra K, Kfoury N, Jiang H, et al. Anti-tau antibodies that block tau aggregate seeding *in vitro* markedly decrease pathology and improve cognition *in vivo* [J]. *Neuron*, 2013, 80(2):402-414.
- [36] Yanamandra K, Jiang H, Mahan TE, et al. Anti-tau antibody reduces insoluble tau and decreases brain atrophy [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2015, 2(3):278-288.
- [37] Sankaranarayanan S, Barten DM, Vana L, et al. Passive immunization with phospho-tau antibodies reduces tau pathology and functional deficits in two distinct mouse tauopathy models [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5):e0125614.
- [38] Richter M, Mewes A, Fritsch M, et al. Doubly phosphorylated peptide vaccines to protect transgenic P301S mice against Alzheimer's disease like tau aggregation [J]. *Vaccines (Basel)*, 2014, 2(3):601-623.
- [39] Dumont M, Stack C, Elipenhli C, et al. Bezafibrate administration improves behavioral deficits and tau pathology in P301S mice [J]. *Hum Mol Genet*, 2012, 21(23):5091-5105.
- [40] Wagner J, Krauss S, Shi S, et al. Reducing tau aggregates with anle138b delays disease progression in a mouse model of tauopathies [J]. *Acta Neuropathol*, 2015, 130(5):619-631.
- [41] Caccamo A, Magri A, Medina DX, et al. mTOR regulates tau phosphorylation and degradation: implications for Alzheimer's disease and other tauopathies [J]. *Aging Cell*, 2013, 12(3):370-380.
- [42] Jiang T, Yu JT, Zhu XC, et al. Temsirolimus attenuates tauopathy *in vitro* and *in vivo* by targeting tau hyperphosphorylation and autophagic clearance [J]. *Neuropharmacology*, 2014, 85:121-130.
- [43] Wang H, Wang R, Carrera I, et al. TFEB overexpression in the

- P301S model of tauopathy mitigates increased PHF1 levels and lipofuscin puncta and rescues memory deficits [J]. *eNeuro*, 2016, 3(2):1-18.
- [44] DeVos SL, Miller RL, Schoch KM, et al. Tau reduction prevents neuronal loss and reverses pathological tau deposition and seeding in mice with tauopathy [J]. *Sci Transl Med*, 2017, 9(374):1-14.
- [45] Brunden KR, Zhang B, Carroll J, et al. Epothilone D improves microtubule density, axonal integrity, and cognition in a transgenic mouse model of tauopathy [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(41):13861-13866.
- [46] Zhang B, Carroll J, Trojanowski JQ, et al. The microtubule-stabilizing agent, epothilone D, reduces axonal dysfunction, neurotoxicity, cognitive deficits, and Alzheimer-like pathology in an interventional study with aged tau transgenic mice [J]. *J Neurosci*, 2012, 32(11):3601-3611.
- [47] Musiek ES, Xiong DD, Patel T, et al. Nmnat1 protects neuronal function without altering phospho-tau pathology in a mouse model of tauopathy [J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2016, 3(6):434-442.
- [48] Jiang T, Tan L, Zhu XC, et al. Silencing of TREM2 exacerbates tau pathology, neurodegenerative changes, and spatial learning deficits in P301S tau transgenic mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(12):3176-3186.
- [49] Jiang T, Zhang YD, Chen Q, et al. TREM2 modifies microglial phenotype and provides neuroprotection in P301S tau transgenic mice [J]. *Neuropharmacology*, 2016, 105:196-206.
- [50] Elipenahli C, Stack C, Jainuddin S, et al. Behavioral improvement after chronic administration of coenzyme Q10 in P301S transgenic mice [J]. *J Alzheimers Dis*, 2012, 28(1):173-182.
- [51] Stack C, Jainuddin S, Elipenahli C, et al. Methylene blue upregulates Nrf2/ARE genes and prevents tau-related neurotoxicity [J]. *Hum Mol Genet*, 2014, 23(14):3716-3732.
- [52] Ohia-Nwoko O, Montazari S, Lau YS, et al. Long-term treadmill exercise attenuates tau pathology in P301S tau transgenic mice [J]. *Mol Neurodegener*, 2014, 9:54.
- [53] Koga S, Kojima A, Ishikawa C, et al. Effects of diet-induced obesity and voluntary exercise in a tauopathy mouse model: implications of persistent hyperleptinemia and enhanced astrocytic leptin receptor expression [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 71:180-192.
- [54] Zhang Z, Song M, Liu X, et al. Cleavage of tau by asparagine endopeptidase mediates the neurofibrillary pathology in Alzheimer's disease [J]. *Nat Med*, 2014, 20(11):1254-1262.
- [55] Barini E, Antico O, Zhao Y, et al. Metformin promotes tau aggregation and exacerbates abnormal behavior in a mouse model of tauopathy [J]. *Mol Neurodegener*, 2016, 11:16.
- [56] Allen B, Ingram E, Takao M, et al. Abundant tau filaments and nonapoptotic neurodegeneration in transgenic mice expressing human P301S tau protein [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(21):9340-9351.
- [57] Bellucci A, Westwood AJ, Ingram E, et al. Induction of inflammatory mediators and microglial activation in mice transgenic for mutant human P301S tau protein [J]. *Am J Pathol*, 2004, 165(5):1643-1652.
- [58] Scattoni ML, Gasparini L, Alleve E, et al. Early behavioural markers of disease in P301S tau transgenic mice [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 208(1):250-257.
- [59] Rosenmann H, Grigoriadis N, Eldar-Levy H, et al. A novel transgenic mouse expressing double mutant tau driven by its natural promoter exhibits tauopathy characteristics [J]. *Exp Neurol*, 2008, 212(1):71-84.

P301S Mutant Tau Transgenic Mouse and Their Applications

MA Deng-lei, ZHANG Lan

(Department of Pharmacology, Xuanwu Hospital of Capital Medical University;

Key Laboratory for Neurodegenerative Diseases of Ministry of Education;

Beijing Engineering Research Center for Nerve System Drugs, Beijing 100053, China)

[Abstract] Microtubule associated protein tau is the major component of the intracellular filamentous deposits of several tauopathies, including Alzheimer's disease, frontotemporal dementia with Parkinsonism linked to tau mutations on chromosome 17(FTDP-17) and so on. Mutations in Tau as the cause of FTDP-17 have been identified in recent years. And transgenic animal models based on tau mutations have been established. Among these models, P301S transgenic mouse has been widely used in the research on tauopathies. This article reviews the research progress in pathogenic manifestations of P301S mutant tau transgenic mice and their applications.

[Key words] P301S mutation; Tau protein; Transgenic mouse; Alzheimer's disease; Tauopathy

《实验动物与比较医学》 第37卷 第1~6期总目次

• 论 著 •

- FGF21siRNA 对 STZ 诱导的 1 型糖尿病小鼠心脏功能的影响.....陈 翠, 孟哲颖, 郑元义, 等(1)
- ND3 在自发性糖尿病长爪沙鼠 5 种组织中的表达.....李银银, 龚菁菁, 吴绍亮, 等(6)
- Tamoxifen 诱导敲除多囊肾小鼠 *Pkd1* 基因后的肾脏病理变化.....周卫民, 朱科燕, 陈方明, 等(11)
- 侧脑室注射神经节苷脂钠对脑瘫模型大鼠学习记忆能力的影响.....杨凤翔, 张小乔, 罗秀玲(15)
- 非酒精性脂肪性肝纤维化小鼠模型的建立及炎症因子的表达.....杨 华, 赵亚娟, 欧 强(20)
- 上海地区常用近交系小鼠品系的单核苷酸多态性分型研究.....韩 琳, 谢建云, 杨 斐, 等(25)
- 大鼠细小病毒双重 PCR 检测方法的建立.....饶 丹, 朱余军, 伍妙梨, 等(32)
- 不同因素对环磷酸腺苷诱导的免疫抑制小鼠模型效果的影响.....宋 莹, 郭雅娟, 黄铭倩, 等(36)
- 小鼠剪尾出血模型的优化.....田 靖, 崔庆华, 郭 平, 等(40)
- 单笼与群居饲养对雌性食蟹猴情绪的影响.....李 伟, 金 益, 邢正弘, 等(46)
- 三品种实验用小型猪繁殖性能测定.....杨李厂, 周文兵, 丁 隽, 等(50)
- 新疆子午沙鼠尿液采集方法的建立及尿液部分生化指标的测定.....徐艺玫, 史 深, 罗 芸, 等(55)
- 外固定架制作兔股骨延迟愈合模型.....孔庆柱, 杨佳宁, 王贺龙, 等(59)
- 胡椒根提取物对大鼠骨关节炎模型的治疗作用.....王 慧, 卓书洪, 高 雨(64)
- 槲皮素对大鼠非酒精性脂肪肝炎的治疗作用及其机制.....李剑波, 余陈欢, 王志远, 等(83)
- Afp-cre-lacZ 转基因小鼠的构建.....顾晓雯, 孙瑞林, 费 俭(89)
- 斑马鱼鳍和鳞片色素细胞的显微观察.....林金杏, 冯丽萍, 胡建华, 等(94)
- 4- 苯基咪唑 + 氢氧化铝复合佐剂对甲型肝炎减毒活疫苗
诱导小鼠体液免疫应答的影响.....马 静, 王海漩, 李思瑾, 等(102)
- 吡啶胺 -2,3- 双加氧酶抑制剂联合铝佐剂对甲型肝炎减毒活
疫苗诱导小鼠体液免疫应答的效应分析.....何 慧, 李彦涵, 李建芳, 等(108)
- 树鼩甲型肝炎减毒活疫苗、乙型肝炎疫苗及
联合硫酸乙酰肝素佐剂免疫后的免疫效果评价.....王东宝, 胡云章, 胡凝珠, 等(113)
- 自发性糖尿病长爪沙鼠环氧化酶(COX)-2 在三种组织中的表达.....王菲菲, 龚菁菁, 霍学云, 等(118)
- 肠道病毒 71 型体外感染树鼩肾细胞特性观察.....王文广, 匡德宣, 尹博文, 等(123)
- 树鼩角膜原代上皮细胞的分离培养、纯化与鉴定.....苗雨润, 宋庆凯, 匡德宣, 等(130)
- 紫杉醇缓释微球对卵巢癌裸小鼠原位移植瘤的抑瘤效果.....饶子亮, 王 弋, 王 诺, 等(136)
- 不同辐照剂量率 X 射线对小鼠外周血细胞及免疫器官的影响.....于纯淼, 王 贺, 赵力松, 等(140)
- 生化标记方法在 KM 小鼠遗传结构分析中的应用.....王 洪, 魏 杰, 李晓波, 等(144)
- 排气通风笼具微环境的动态检测.....王贵平, 薛智谋, 周正宇, 等(150)
- 三种不同固定液对小鼠组织过碘酸雪夫染色效果比较.....徐瑶瑶, 李思琪, 田雪梅(155)
- 树鼩形觉剥夺性近视模型的建立及观察.....杨冬梅, 朱 勤, 李 娜, 等(171)
- 硒对氟致大鼠肾小管上皮细胞线粒体膜电位改变的拮抗作用.....常 凯, 王 裕, 庞文彪, 等(179)
- 泛素特异性蛋白酶 19 对烟熏诱导慢性阻塞性肺疾病大鼠
模型骨骼肌萎缩的作用及机制.....刘 乾, 刘 松, 徐卫国, 等(185)

- 二乙基亚硝胺诱导建立 *Apc* 基因突变大鼠与 F344 大鼠肝癌模型的比较 ···谢 蓓, 赵 磊, 孙 婧, 等(191)
- ICR 小鼠感染呼肠孤病毒 III 型的实验研究 ······罗银珠, 张 钰, 何丽芳, 等(198)
- 仙台病毒核酸测序检测方法的建立 ······张欢欢, 余陈欢, 戴方伟, 等(204)
- 不同糖油比例高脂饲料建立高脂血症大鼠模型的比较 ······覃辉艳, 王绍龙, 温平镜, 等(209)
- 氯化钠的大鼠亚慢性毒性观察 ······李光先, 刘香梅, 刘冬虹, 等(214)
- SPF 鸡不同生长阶段粪便菌群组成及多样性研究 ······周 妍, 刁晨曦, 张圆圆, 等(231)
- 鹅细小病毒 VP3 蛋白抗血清的制备及在鸭胚和
鸭胚成纤维细胞中的增殖研究 ······牛银杰, 刘柏含, 赵丽丽, 等(240)
- miR-200b-3p 和 miR-200b-5p 在马立克氏病抗性与
易感 SPF 鸡法氏囊组织的差异表达分析 ······王瑞琪, 廉传江, 易 诚, 等(244)
- 应用 PCR 方法快速鉴定 SPF 金定鸭性别 ······徐丽晶, 孙 畅, 陆涛峰, 等(249)
- 抗原处理相关转运体基因多态性与疾病相关性的研究进展 ······王兴童, 陈洪岩, 韩凌霞(252)
- 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, 谌业帅, 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 ······潘蓁捷, 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)
- 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通径分析 ······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)
- 体外诱导树鼯骨髓间充质干细胞向神经元样细胞分化的实验研究 ······苗雨润, 李 娜, 匡德宣, 等(337)
- 瘦素基因敲除小鼠模型的建立及表型分析 ······池 骏, 龚 慧, 何玥炜, 等(334)
- 雌二醇诱导雄性长爪沙鼠乳腺增生模型的初探 ······王存龙, 杜小燕, 刘 欣, 等(352)
- 大鼠离体肾脏灌流模型在筛选慢性肾病药物的初步应用 ······傅婷婷, 刘 艳(357)
- 瑞芬太尼联合脐血间充质干细胞移植对脊髓
损伤大鼠电生理及后肢功能的影响 ······李 敏, 杨 磊, 叶 奎(363)
- 大鼠微小病毒和细小病毒双重荧光定量 PCR 检测方法建立 ······孙竹筠, 蔡晓垚, 熊 炜, 等(372)
- 小家鼠螺旋杆菌 TaqMan-qPCR 检测方法的建立 ······伍妙梨, 朱余军, 饶 丹, 等(378)
- 应用无约束全身体积描记系统检测小鼠肺功能 ······赵 玮, 俞 冰, 张水娟, 等(383)
- 应用树鼯对硫酸乙酰肝素佐剂的安全性初步评价 ······李彦涵, 李建芳, 孙 静, 等(390)
- 基于 CT 三维重建技术研究隧道法射频对猪舌的损伤 ······和守皖, 孙 青, 陈国辉, 等(395)

米非司酮对 Wistar 大鼠窗口期子宫内膜整合素

和血管内皮生长因子基因表达的影响唐 彬, 黎福荣, 付新录, 等(399)

超促排卵后不同取卵时间对昆明小鼠卵子质量、

体内成熟率和体外受精率的影响彭礼繁, 张小建, 廖梅旭, 等(405)

巴马小型猪心脏生物电特性遥测杨李厂, 周文兵, 丁 隽, 等(410)

裸鼯鼠血清中免疫球蛋白的分离纯化及含量的检测程继帅, 袁 征, 杨文静, 等(414)

浅谈生物安全在高等院校实验动物学实验课程中的重要性杨文静, 程继帅, 黄小凤, 等(418)

异功散对小鼠慢性病贫血的治疗作用郑 秦, 姜一陵, 季玉婷, 等(421)

几种炎症因子在小鼠跨区供血耳瓣 choke 区血管新生过程中的作用温福利, 梁 成, 庄跃宏, 等(428)

应用微卫星 DNA 标记对福建亚种猕猴遗传多样性的分析周建华, 李志雄, 杨燕燕, 等(434)

近交系长爪沙鼠生化标记遗传监测方法的建立及其应用李 迎, 陈振文, 马兰芝, 等(442)

兔斯氏艾美耳球虫荧光定量 PCR 检测方法的建立温福利, 郑和平, 党 源, 等(448)

不同跑台坡度对 SD 大鼠运动疲劳指标的影响石鹤坤, 陈开杰, 林小凤, 等(455)

丙烯酰胺对幼年大鼠学习记忆能力的影响及维生素 C 缓解作用观察刘 筱, 徐敬东, 于 放(460)

实验用斑马鱼成鱼内脏组织病理学检查方法的优化田 芳, 王玉柱, 夏敏杰, 等(465)

近交系 CMU/1 和 CMU/2 长爪沙鼠 Willis 环缺失与生理生化参数比较李 迎, 崔晓霞, 杜小燕, 等(470)

浅谈小型猪中医四诊信息采集相 波, 范小雪, 余 丰, 等(475)

白化金黄仓鼠血液生理指标测定崔晓霞, 尚世臣, 马兰芝, 等(478)

不同超排卵方案对 BALB/c 小鼠超排卵效果的影响顾剑洁, 葛 蓉, 徐伟超, 等(482)

• 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)

• 经验交流 •

关于实验动物行业高端复合型管理人员培训体系建设的几点思考杨文静, 崔淑芳(68)

实验动物从业人员远程培训考核指标体系初探余琛琳, 崔淑芳(71)

罗格列酮、吡格列酮对兔血脂调节作用的比较吴小利(220)

不同厂家试剂盒检测大鼠血清中碱性磷酸酶活性的比较李 红, 余儒洋, 李 疆, 等(222)

一种实验动物新型隔离器系统的研制卢领群, 石巧娟, 金秀清, 等(224)

实验动物行业高端复合型管理人才培训师队伍选拔与评价方法的初步探讨林丽芳, 崔淑芳(227)

1 例自发性肝硬化新西兰兔肝脏病理形态学观察邱 波, 王 艳, 英 永, 等(485)

医学实验技术专业动物学教学实践郭 萌, 蒋 辉, 王 迎, 等(488)

• 综 述 •

PI3K/Akt 和 AMPK 信号通路在运动诱导的啮齿动物

骨骼肌内 GLUT4 转位和表达中的作用张云丽, 王 林, 刘铁民(76)

甲状腺疾病啮齿类动物模型的研究进展塔 拉, 金 山(160)

实验动物福利实施研究进展冶冬阳, 孙 静, 李引乾(166)

P301S 突变 tau 转基因动物模型及其应用马登磊, 张 兰(491)

Laboratory Animal and Comparative Medicine

Vol.37 No.1~6 2017

Main Contents

Reduction of Cardiac Function Induced by FGF21siRNA in Type 1 Diabetic Mice.....	CHEN Cui, MENG Zhe-ying, ZHENG Yuan-yi, et al(1)
Expression of ND3 in 5 Tissues of Hereditary Diabetic Mongolian Gerbils	LI Yin-yin, GONG Jing-jing, WU Shao-liang, et al(6)
Pathological Change of Kidney in <i>Pkd1</i> Knock-out Mice with Polycystic Kidney Induced by Tamoxifen.....	ZHOU Wei-min, ZHU Ke-yan, CHEN Fang-ming, et al(11)
Effect of Lateral Ventricle Injection of Ganglioside Sodium on Learning and Memory in Rats with Cerebral Palsy	YANG Feng-xiang, ZHANG Xiao-qiao, LUO Xiu-ling(15)
Establishment of Nonalcoholic Fatty Liver Fibrosis Model and Expression of Inflammatory Factors in Mice.....	YANG Hua, ZHAO Ya-Juan, OU Qiang(20)
The Single Nucleotide Polymorphism Genotyping of Inbred Mice from Shanghai	HAN Lin, XIE Jian-yun, YANG Fei, et al(25)
Development of Dual PCR for Detection of Rat Parvovirus	RAO Dan, ZHU Yu-jun, WU Miao-li, et al(32)
Effect of Different Factors on Cyclophosphamide Induced Immunosuppression Mice Model	SONG Ying, GUO Ya-juan, HUANG Ming-qian, et al(36)
Improvement on Tail Tip Bleeding Model in Mice	TIAN Jing, CUI Qing-hua, GUO Ping, et al(40)
Effects of Single Caged and Social Feeding on Emotion of Female <i>Macaca Fascicularis</i>	LI Wei, JIN Yi, XING Zheng-hong, et al(46)
Reproductive Performance of Three Breeds of Minipigs	YANG Li-chang, ZHOU Wen-bing, DING Jun, et al(50)
Establishment of Urine Collection Method and Determination of Some Biochemical Indexes for <i>Meriones Meridianu</i> in Xinjiang.....	XU Yi-mei, SHI Shen, LUO Yun, et al(55)
Establishment of Femoral Delayed Healing Model with External Fixation in Rabbit	KONG Qing-zhu, ZHAO Jia lin, FENG Zhen, et al(59)
PI3K/Akt and AMPK Signaling Pathway and Effect of Exercise on Rodent Skeletal Muscle GLUT4 Translocation and Expression	ZHANG Yun-li, WANG Lin, LIU Tie-min(76)
Therapeutic Effects and Mechanisms of Quercetin on Non-alcoholic Steatohepatitis in Rats.....	LI Jian-bo, YU Chen-huan, WANG Zhi-yuan, et al(83)
Construction of Afp-cre-lacZ Transgenic Mouse Model	GU Xiao-wen, SUN Rei-lin, FEI Jian(89)
Microscopical Observation on Pigment Cells in Fins and Scales of Zebrafish.....	LIN Jin-xing, FENG Li-ping, HU Jian-hua, et al(94)
Impact of 4-Phenylimidazole Combined with Aluminum Hydroxide on Humoral Immune Response Induced by Hepatitis A Virus Attenuated Live Vaccine in Mice.....	MA Jing, WANG Hai-xuan, LI Si-jin, et al(102)
Effects of Indoleamine-2,3-dioxygenase Inhibitor Combined with Aluminum Adjuvant on Humoral Immune Response Induced by Hepatitis A Virus Attenuated Live Vaccine in Mice.....	HE Hui, LI Yan-han, LI Jian-fang, et al(108)
The Immunity Effect Evaluation on Tree Shrew by Hepatitis A Virus Attenuated Live Vaccine, Hepatitis B Vaccine Independently or Combined Adjuvant Heparan Sulfate.....	WANG Dong-bao, HU Yun-zhang, HU Ning-zhu, et al(113)
Analysis on Cyclooxygenase 2 Expression in Different Tissues from Spontaneous Diabetic Mongolian Gerbils	WANG Fei-fei, GONG Jing-jing, HUO Xue-yun, et al(118)
Study on Infectivity of EV71 in Kidney Cells of Tree Shrew	WANG Wen-guang, KUANG De-xuan, YIN Bo-wen, et al(123)
Primary Isolation, Culture, Purification and Identification of Corneal Epithelial Cells in Tree Shrew.....	MIAO Yu-run, SONG Qing-kai, KUANG De-xuan, et al(130)
Inhibition of Paclitaxel-Poly Lactic Acid Phosphate(PLCE) Microspheres on Growth of Ovarian Cancer Transplanted in Nude Mice.....	RAO Zi-liang, WANG Yi, WANG Nuo, et al(136)

- Effects of X-ray Irradiation with Different Dose Rates on Peripheral Blood Cell and Immune Organs in Mouse.....YU Chun miao, WANG He, ZHAO Li song, et al(140)
- Application of Biochemical Markers on Analysis of Population
- Genetic Structure in KM miceWANG Hong, WEI Jie, LI Xiao-bo, et al(144)
- Dynamic Assessment on Microenvironment of a New Type
- Exhaust Ventilation Closed-System CageWANG Gui-ping, XUE Zhi-mou, ZHOU Zheng-yu, et al(150)
- Comparison on Periodic Acid Schiff Staining Effect on
- Mice Tissues with Three Different Fixatives.....XU Yao-yao, LI Si-qi, et al(155)
- Establishment of Rodent Model of Thyroid Diseases.....TA La, JIN Shan(160)
- Research Progress on Implementation of Laboratory Animal Welfare.....YE Dong-yang, SUN Jing, LI Yin-qian(166)
- Preliminary Establishment and Research on Form Deprivation Myopia Model
- in Tree ShrewYANG Dong-mei, ZHU Qin, LI Na, et al(171)
- Antagonistic Effect of Selenium on Change of Mitochondrial Membrane
- Potential of NRK-52E Cells Induced by Sodium Fluoride.....CHANG Kai, PANG Wen-biao, WANG Yu, et al(179)
- Effect and Mechanism of Ubiquitin-specific Peptidase 19 on Muscle Atrophy of Chronic Obstructive
- Pulmonary Disease Induced by Cigarette Smoke Exposure in RatsLIU Qian, LIU Song, XU Wei-guo, et al(185)
- Comparison on Hepatocarcinoma Model Induced by Diethylnitrosamine
- in Apc-mutant Rat and F344 RatXIE Bei, ZHAO Lei, SUN Jing, et al(191)
- Research on Reovirus III (Reo-3) Infection in ICR MiceLUO Yin-zhu, ZHANG Yu, HE Li-fang, et al(198)
- Development of Detection Method for Sendai Virus by
- Nucleic Acid SequencingZHANG Huan-huan, YU Chen-huan, DAI Fang-wei, et al(204)
- A Comparison on Hyperlipidemia Rat Models Induced by High-fat
- Diet with Different Proportions of Sugar and Oil.....QIN Hui-yan, WANG Shao-long, WEN Ping-jing, et al(209)
- The Sub-chronic Toxicity of Sodium Chloride in Rats.....LI Guang-xian, LIU Xiang-mei, LIU Dong-hong, et al(214)
- Composition and Diversity of Fecal Microflora in SPF Chickens
- at Different Growth StagesZHOU Yan, DIAO Chen-xi, ZHANG Yuan-yuan, et al(231)
- Preparation of Goose Parvovirus VP3 Antiserum and Identification of
- Propagation in Duck Embryo and Duck Embryo Fibroblasts.....NIU Yin-jie, LIU Bai-han, ZHAO Li-li, et al(240)
- Differential Expression Analysis of miR-200b-3p and miR-200b-5p
- in Marek's Disease Resistant and Susceptible SPF ChickensWANG Rui-qi, LIAN Chuan-jiang, YI Cheng, et al(244)
- Application of PCR Method for Rapid Sex Determination in SPF Jinding Duck ...TXU Li-jing, SUN Chang, LU Tao-feng, et al(249)
- Advances in Research on Relationship between Transporter Associate with
- Antigen Processing Gene Polymorphism and DiseasesWANG Xing-tong, CHEN Hong-yan, HAN Ling-xia(252)
- 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 ExtractXIE Jia-jun, ZHANG Guo-ming, QIAO Zheng-dong, et al(278)
- The Feasibility of Social Housing for Adult Laboratory RabbitsLI Cai-yun, JIANG Zi-rui, PAN Xue-ying, et al(283)
- Effect of Sodium Pantothenate on Cardiovascular in Beagle DogsZHANG Cheng-mei, JI Jian-bo, WU Chuan-tao, et al(288)
- Influence of Butyric Acid Bacteria on Harmful Gas Emissions in MicePAN 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 EmbryosJIN 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 RatXIONG Ying, ZHANG Jin-juan, LI Lin, et al(315)

- The Protective Effect of Oxymatrine on Asthma MiceLAN Lu-sha, ZHAO Bing-bing, YANG Hongyu, et al(320)
- Primiparous Reproductive Performance of Outbred Guizhou Miniature
Pigs and its Correlation and Path AnalysisCHEN Ming-fei, YAO Gang, ZHAO Hai, et al(324)
- Induction and Differentiation of Tree Shrew Bone Marrow
Mesenchymal Stem Cells into Neuron-Like Cells *in Vitro*.....MIAO Yu-run, LI Na, KUANG De-xuan, et al(337)
- Generation and Phenotyping Analysis of *Lep* Gene Knockout MiceCHI Jun, GONG Hui, HE Yue-wei, et al(344)
- Mammary Gland Hyperplasia Model in Male
Mongolian Gerbil Induced by EstradiolWANG Cun-long, DU Xiao-yan, LIU Xin, et al(352)
- Pilot Application of Isolated Perfused Chronic Kidney Transgenic Rat Kidney Model for Discovery
and Evaluation of Chronic Kidney Disease DrugFU Ting-ting, LIU Yan(357)
- Remifentanyl Combined with Cord Blood Mesenchymal Stem Cells Transplantation
on Hindlimb Function and Electrophysiology in Spinal Cord Injured Rats.....LI Min, YANG Lei, YE Kui (363)
- Establishment of TaqMan Real-time Fluorescent Quantitative
PCR for Detecting Rat Minute Virus and Rat Parvovirus.....SUN Zhu-yun, CAI Xiao-yao, XIONG Wei, et al(372)
- Development of TaqMan-qPCR for Detection of *Helicobacter muridarum*.....WU Miao-li, ZHU Yu-jun, RAO Dan, et al(378)
- Measurement of Lung Function by Using Non-invasive
Whole-body Plethysmograph System in Mice.....ZHAO Wei, YU Bing, ZHANG Shui-juan, et al(383)
- Safety Evaluation on Adjuvant Heparan Sulfate in Tree Shrew.....LI Yan-han, LI Jian-fang, SUN Jing, et al(390)
- Study on Tunnel Radiofrequency Volumetric Reduction of Porcine
Tongue by Computed Tomography 3D Reconstruction.....HE Shou-huan, SUN Qing, CHEN Guo-hui, et al(395)
- Effects of Mifepristone on Expression of Integrin $\alpha\beta_3$ and Vascular
Endothelial Growth Factor in Wistar Rats at Implantation Window PhaseTANG Bin, LI Fu-rong, FU Xing-Lu, et al(399)
- Different Oocyte Collecting Time Impact on Quality of Oocyte, *in Vivo* Maturation Rate
and *in Vitro* Fertilization Rate after Superovulation in KM MicePENG Li-fan, ZHANG Xiao-jian, LIAO Mei-xu(405)
- Investigation on Electrocardiogram of Bama Minipigs by Telemetry.....YANG Li-chang, ZHOU Wen-bing, DING Jun, et al(410)
- Therapeutic Effects of Yi Gong San Decoction on Anemia of Chronic Disease in Mouse...ZHENG Qin, JIANG Yi-ling, JI Yuting, et al(421)
- The Role of MCP-1, CD68 and ICAM-1 in the Process of
Angiogenesis in Choke Area of MiceWEN Fu-li, LIANG Cheng, ZHUANG Yue-hong, et al(428)
- Analysis on Genetic Diversity of *Macaca mulatta* littoralis
by Using Microsatellite DNA MarkersZHOU Jian-hua, LI Zhi-xiong, YANG Yan-yan, et al(434)
- Establishment and Application of Genetic Monitoring Methods
for Inbred Gerbil by Biochemical Markers.....LI Ying, CHEN Zhen-wen, MA Lan-zhi, et al(442)
- Detection of *Eimeria Stiedai* by Real-Time PCRWEN Fu-li, ZHENG He-ping, DANG Yuan, et al(448)
- Effect of Different Treadmill Slope on Exercise Fatigue Index in SD Rats.....SHI He-kun, CHEN Kai-jie, LIN Xiao-feng, et al(455)
- Effects of Acrylamide on Learning and Memory Ability in Young Rats and
Toxicity Alleviation by Vitamin C.....LIU Xiao, XU Jing-dong, YU Fang(460)
- Optimization on Methodology of Histopathological Examination in
Adult Zebrafish Visceral TissuesTIAN Fang, WANG Yu-zhu, XIA Min-jie, et al(465)
- Comparison on Circle of Willis Patterns, Biochemical and Physiological
Characteristics of Inbred CMU/1 and CMU/2 GerbilsLI Ying, CUI Xiao-xia, DU Xiao-yan, et al(470)
- Discussing on Four diagnostic information of
traditional Chinese medicine in Minipig.....XIANG Bo, FAN Xiao-xue, YU Feng, et al(475)
- Detection of Blood Physiological Parameters in
Albino Mutant Golden HamsterCUI Xiao-xia, SHANG Shi-chen, MA Lan-zhi, et al(478)
- P301S Mutant Tau Transgenic Mouse and Their Applications.....MA Deng-lei, ZHANG Lan(491)