

实验动物与比较医学 (原《上海实验动物科学》)

Laboratory Animal and Comparative Medicine

第39卷第2期

2019年4月

目次

• 人 物 •

- 刘老: 我们学习的榜样 漆畹生(83)
- 德高望重 无私奉献——深切缅怀刘瑞三教授 尹松林(85)
- 深切怀念中国实验动物科学界泰斗
- 河南省实验动物事业的功勋人物刘瑞三先生 王纯耀, 邢金山, 薛敬礼, 等(88)

• 专家论坛 •

- 我国比较医学研究的开创、发展及在现代医学科学发展中
- 的意义和作用 贺争鸣, 李冠民, 荣瑞章, 等(90)

• 论 著 •

- 内窥镜引导气管注入博来霉素建立小鼠肺纤维化模型 余华军, 吴 尚, 黄 慧, 等(94)
- 胰岛素抵抗合并高尿酸血症大鼠模型的建立及其比较 刘孟渊, 冯学轩, 黎莉斯, 等(99)
- 树鼩肺成纤维细胞的分离、鉴定和传代培养 王文广, 匡德宣, 陆彩霞, 等(105)
- 基于多重 PCR 靶向二代测序的近交系小鼠
- 遗传质量监测方法建立 钱 强, 徐 园, 王亚恒, 等(111)
- 饮食中糖分控制对雌黑腹果蝇寿命和中肠干细胞的影响 唐润东, 宋思远, 吴 薇, 等(118)
- 不同时间紫外线照射对 SD 大鼠的皮肤光毒性损伤作用 孙 侠, 刘香梅, 庞增雄, 等(124)
- 不同剂量 X 射线全身照射对小鼠部分免疫器官的影响 于纯淼, 付佳琪, 赵力松, 等(131)
- 中毒剂量下维生素 D₃ 对大鼠肾脏的影响 史向华, 杨文彬, 薛润苗, 等(136)
- 基于 Sequenom MassARRAY SNP 技术检测嗅觉受体基因
- 与工作犬嗅探能力的关联性研究 高一龙, 贺星亮, 强京宁, 等(140)
- C57BL/6J 背景基因修饰小鼠精子冷冻保种及品系恢复方法 牛博文, 陈丽香, 朱孟敏, 等(146)

• 经验交流 •

- 动物实验室实习生培训带教规范初探 王 诺, 李金凤, 黄小红, 等(151)

• 综 述 •

- 基于动物福利的雌性生殖发育毒性体外培养技术研究进展 陆 琴, 周跃华, 唐海飞, 等(155)
- 兔 VX2 肿瘤模型的研究进展 米金霞, 方肇勤(163)

期刊基本参数: CN31-1954/Q*1981*b* 大 16*84*zh*P*¥10.00*2000*17*2019-04

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.39 No.2

Apr. 2019

Main Contents

Endoscopy Guided Tracheal Injecting Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis in Mice	YU Hua-jun, WU Shang, HUANG Hui(94)
Establishment and Comparison of Rat Models of Insulin Resistance	
Combined with Hyperuricemia	LIU Meng-yuan, FENG Xue-xuan, LI Li-si, et al(99)
Isolation, Identification and Subculture of Pulmonary	
Fibroblasts in Tree Shrew	WANG Wen-guang, KUANG De-xuan, LU Cai-xia, et al(105)
Mouse Genetic Quality Monitoring Method Establishment Based	
on Next-generation Sequencing through Multiplex PCR	QIAN Qiang, XU Yuan, WANG Ya-heng, et al(111)
Effects of Sugar Concentration Control on the Longevity and the	
Mid-gut Stem Cells of female <i>Drosophila Melanogaster</i>	TANG Run-dong, SONG Si-yuan, WU Wei, et al(118)
Phototoxic Effects of Ultraviolet Irradiation with Different	
Time Course on Skin of SD Rats	SUN Xia, LIU Xiang-mei, PANG Zeng-xiong, et al(124)
Effects of X-ray irradiation with Different Dosages on Immune Organs in Mouse	YU Chun-miao, FU Jia-qi, ZHAO Li-song, et al(131)
Effect of Vitamin D ₃ on Kidney of Rat at Toxic Dose	SHI Xiang-hua, YANG Wen-bin, XUE Run-miao, et al(136)
SNP Genotypes of Olfactory Receptor Genes Associated with Sniffing Ability in	
Working-dogs Based on Sequenom MassARRAY SNP System	GAO Yi-long, HE Xing-liang, QIANG Jing-ning, et al(140)
Sperm Cryopreservation and Recovery of C57BL/6J	
Background Genetically Modified Mice	NIU Bo-wen, CHEN Li-xiang, ZHU Meng-min, et al(146)
Advances on <i>in Vitro</i> Culture of Female Reproductive and	
Development Toxicity Based on Animal Welfare	LU Qin, ZHOU Yue-hua, TANG Hai-fei, et al(155)
Research Progress of Rabbit VX2 Tumor Model	MI Jin-xia, FANG Zhao-qin(163)

实验动物与比较医学

SHIYAN DONGWU YU BIJIAO YIXUE

1981年9月创刊, 双月刊

第39卷第2期 2019年4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 上海宝山译文印刷厂
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.39 No.2 Apr. 2019

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

刘老：我们学习的榜样

漆畹生

(本刊原副主编、现顾问,中国实验动物学会第一届和
第二届理事会常务理事及“终身贡献奖”获得者)

[中图分类号] 824.2 [文献标志码] C [文章编号] 1674-5817(2019)02-0083-02

惊闻刘老瑞三已驾鹤西去,令人悲痛,还不由得使我忆起多年前的一些难忘的往事……

一个科学学科要站立起来并有成长和发展,条件之一是要有一个群众性学术团体。这个必要条件在世界各科技先进国家已经具备并有成效,但就中国20世纪80年代初的实验动物科技而言,它还是空白。我们要在“面向现代化、面向世界、面向未来”(邓小平,1983年10月1日)的方针指引下,尽快填补这一空白,要“补短板”。但是在改革开放之初,由于一些客观与主观上的原因,依据计划创建一个全新的学术团体是困难重重,不知何日得成。上海的实验动物科技工作者拥有创新精神,探索出一条新路,即挂靠在既有的学会——上海市畜牧兽医学会之下成立了一个实验动物科学学组。藉此,既可立即发挥一个学科学会的积极作用,又能争取各方支持,徐图由“学组”转为“学会”。这是我国首个本学科团体的雏形。建立了这个团体之后,就还需要办一个本学科的专门期刊,以期及时交流本学科的专业研究成果,又能向全社会普及本学科知识,防止反科学的各式骗子的伎俩得逞,逐步消除对本学科的一些社会偏见,创造一

个为第一生产力大发展的各大小学科和谐共生的学术生态……可是,那时要向出版主管部门申请并批准从而得以刊发一种新的学术期刊手续繁复,要取得一个公开发行的刊号持时很长。时不我待!学组的同志们还是想到了先行挂靠的办法,即挂靠在《上海畜牧兽医通讯》杂志之下,以“实验动物科学专辑”的形式出版,学组自筹办刊经费,刊物免费赠阅,再争取由“内刊”转为“公开发行”的期刊。中国的第一种实验动物科技专业刊物的新生儿就这样诞生了。它在全国各兄弟省市的同行中产生了积极的正面效应,反响热烈,也为有关行政主管部门(如国家科委)提供了参考信息。

在成就上列两件本学科的大事的过程中,刘老都发挥了至关重要的作用,因为他那时正是上海市畜牧兽医学会的理事长和《上海畜牧兽医通讯》杂志的主编。没有他个人的战略眼光、全球视野和包容创新理念与科学决策,上述的两个“挂靠”是搞不成的,虽然实验动物科技未必是他那时关心的唯一的工作主业。

一个学科的自立、成长与发展还要有一批专著和译作,包括经典性的教科书和传得开的科普作品在内。刘老在这方面不遗余力,反复组织各方专业人士参与编译著工作,适时公开出版,有益学科发展和工作进

步。我参与了刘老主持的这方面工作，印象深刻。我记得我于1991年参与刘老主持出版的译作即译自Fox,J.G等人的巨作《实验动物医学》时，他学术风格的严谨细致令人难忘。例如那时，他分派我着手译述的章节是关于鱼类实验动物的部分或许是因为我曾开展过利用我国金鱼试行诱发其肝癌的实验的缘故。工作中仅仅为了某些鱼种之俗名对应学名的准确性，刘老就委派专人同我联系、研判和定案。再如，我参与编写《实验动物科学管理实用手册》(1997年)时，刘老协同颜呈准同志(时任上海市科委副主任)共担主编。由于编写人员众多，文思不同，文风不一，刘老统稿难度大，但他一丝不苟，颇为不易，令人感动！刘老认真、负责、细致的学术风格影响广泛，他是我们科技工作者应当学习的榜样。

刘老有部分工作精力投入多个学会，也成绩斐然。学会是党和政府联系科技工作者的纽带与桥梁，也是科技工作者向全社会传播科学精神、坚定科学信念、学会科学方法、提高科技素养，摆脱一切迷信，不被坏人“忽悠”的动力源和推进器。我们现在搞的中国特色社会主义根本上是科学社会

主义，不是空想，更不是胡思乱想的东西。它不讲究科学是不可思议的，也不可能成功。对自然、对社会都是如此。刘老的个性很适合学会工作：倾于外向，平易近人；语言生动、乐观向上；不乏换位思考，总是将心比心；着眼学科全局，寻找中外差距，为学、赶、平、超谋篇布局；淡泊个人名利，真能达到“功成不必在我，功成必须有我”的高尚精神境界……我从第一次在上海科学会堂听他发言分析中外实验动物科技发展形势时留下的深刻印象起，反复接触，构成这些影像，不完全是改革开放之“时势造英雄”吧？刘老是党在科技工作领域贯彻群众路线的典范，也是我们应当学习的榜样。虽然常言道“性格决定命运”，但还需要个人努力吧？

刘老走了！我以为，对他最好的纪念莫过于我们继承他严谨的科学精神和优良的工作风格，把那些东西学到手并运用于自身工作中，不谋私利，不尚空谈、善于学习、敢于担当、勇于创新，为实现美好的中国梦并推动构建人类命运共同体而奉献高新科技力量。让我们不懈奋斗！“不到长城非好汉”(毛泽东，1935年10月)！

德高望重 无私奉献

——深切缅怀刘瑞三教授

尹松林

(上海交通大学医学院, 上海 200025)

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] C [文章编号] 1674-5817(2019)02-0085-03

去年冬天,上海特别阴冷。苍天沉沉,迷雾漫漫,淅淅沥沥的小雨下个不停,百年未遇的雨水让人心情异常郁闷,对于久病的高龄老人是一个难以逾越的关口。

刘老,您这次连续三年多的重病住院,万恶的病魔终于摧残了您的躯体,您就这样走了。三年多来,我经常来医院病房看您,拉着您的手跟您大声聊上几句。虽然您闭着眼睛,也不一定听得清楚,但我总想使您已萎缩的大脑细胞能恢复生机,创造以前多次住院又回来了的奇迹。犹如故往,仍能走出病房,聆听您神采飞扬地畅谈往事。您多次承诺,您一定能活到百岁,没有问题。然而,离百岁还差了832天,您就这样快地走了,这次真的走了!

您曾留下遗嘱:丧事从简,不开追悼会及告别仪式,死后遗体捐献给医学事业。

电波纵横传播,微信铺天盖地告知大家。您德高望重,厚德载物,无私奉献的精神,晚辈们听之心碎断肠,只能情不自禁地洒下泪水与您匆匆告别。

宝剑锋从磨砺出,梅花香自苦寒来。刘瑞三教授1921年生于北平,1944年毕业于南京中央大学家学院畜牧兽医学系,先后任四川省农业改良所畜牧改良场技佐、空军军犬训练班兽医室主任、上海市卫生局病畜化制场副技师兼技术组长。新中国成立后,曾任上海市乳肉管理所副所长、中国农业科学院家畜血吸虫病研究室副主任、上海市农业科学院畜牧兽医研究所第三研究室主任、中国农业科学院家畜寄生虫病研究所副所长等职。在各学

术团体中,曾担任中国实验动物学会副理事长、上海市畜牧兽医学会三届理事长、名誉理事长,《上海畜牧兽医通讯》主编、《中国畜牧兽医大词典》副主编、《中国农业百科全书·兽医卷》副主编及《中国大百科全书·农业卷兽医分册》副主编等。

刘瑞三教授与其他老前辈,不辞艰辛、呕心沥血,开创了我国实验动物科学事业。从1949年上海刚解放,刘老代表军管会接管原工部局实验动物房和狂犬病检验站开始,四处奔走调查,撰写长文,上书市长,呼吁各界关注实验动物科技工作,引起社会各界的重视。1980年代初,刘老又受命奔赴美国,奋楫争先为我国实验动物科学与比较医学探新路,砥砺前行学习发达国家的先进经验。在实验动物科技领域,刘老曾担任过农业部实验动物科技总顾问、上海市实验动物管理委员会副主任兼专家咨询组组长、上海市技术监管局实验动物标准化委员会主任、上海市畜牧兽医学会实验动物专业委员会顾问、《实验动物与比较医学》原《上海实验动物科学》杂志主编等职。刘老晚年,虽然年事已高,但他仍童颜未老,青春常在,思维敏捷,开拓进取;不断学习,奋力工作;提携后辈,诲人不倦。真可谓“老鹤无衰貌,寒松有本心”。

在近一个世纪的风风雨雨之中,刘老经历了二个完全不同的时代,选择了一条使国家富强的革命之路,科技创新之路。家国情怀,艰苦创业,开拓进取,勤勤恳恳地奋斗一生,为我国畜牧兽医、实验动物和比较医学作出了重大的贡献。刘老的一生勤奋好学,学贯中西,用之南北。为及早获取各种现代科技信息,耄耋之年还在电脑上上

网,发现新的科技知识,及时告诉年青的同志,使我们晚辈为之动容,万分感动。在工作中,您身体力行,以身作则,和大家朝日相见,和谐相处,协调各种上下关系,名扬全国,人皆知之。您热情待人,助人为乐,无私奉献。例如,那年他与我到河南医科大学看豫医无毛小鼠的繁育。悉之他们的实验动物楼建设遇到麻烦。随后,您不管自己年迈体弱,拉着我一同直奔省府大楼,以农业部实验动物科技总顾问之名义,找省委领导游说,最终获得省委领导的支持,给予尽快解决的答复。

刘老豁达大度,乐观幽默,不辞辛苦,努力工作。为了科技事业的发展,鼓励年青同志进取,一生不知为多少书籍亲自择写了前言或序言。当年青同志遇到困难时,会热情相助,言传身教,激励他们奋勇向前。例如,1989年,我受命负责原上海第二医学院的实验动物工作。由于当时教学用的动物房条件较差,准备新建实验动物大楼,但经费尚未落实,教学用实验动物的标准尚达不到市医管会的要求。有人反映给市卫生局领导,促使局长在大会上点名地批评:“大象屁股推不动”。我在台下听着,身感压力很大。我将此事告诉刘老(当时他正在筹备市动管会)后,他对我说:“你校纯种室不就是二医的科研动物房,教学用动物为什么一定要象科研用动物标准一样呢?你回去督促校领导加快实验动物大楼的建设步伐,二医一定能搞上去的”。老人家的鼓励成了我们工作的动力。后来,市动管会成立,我校新建的4900 m²实验动物大楼也落成了,成为当时全国高校中最大最新的实验动物大楼。随后,我们先后接待了276批国内外的来访者。接受了美国普渡大学委托的动物实验。成为学校争取首批“211工程”项目三个向评估专家开放参观点之一。我们接受了有6位院士参加的专家组审查,组长巴德年院士讲当时北京协和医学院还没有这样的实验动物大楼。这只“大象”在刘老的鼓励下终于大步地向前跑了。所以,我们要感谢刘老的大力鼓励和谆谆教导,让他老人家也享受到“赠人玫瑰,手留余香”的回味。

1999年开始,因我们实验动物大楼开放运转的需要,在全国率先研制了软垫式大动物手术台及独立通气笼盒系统(IVC)。在上海有关企业的配合下,获得成功,这也是在刘老和王楠田先生考察

美国回来,带来各种信息和不断鼓励的基础上,坚持不懈努力的结果。当时,一台48笼盒的进口IVC系统,国外厂商报价要50万元人民币,折合每个小鼠笼盒要上万元之多。我们买不起,也用不起。在刘老等老前辈的鼓励下,我们破解了IVC系统的净化原理及气流均匀分配的高新技术难点,终于研制成功国产第一台IVC系统,打破了国外的技术封锁和价格垄断。为了让我国实验动物界尽快普及这种先进设备的使用,在刘老无私奉献精神的鼓励下,我们不申请专利,不需要有偿转让,向国内所有实验动物设施生产企业公开IVC系统的技术要点,并撰写了30万字的《实验动物独立通气笼盒系统设计与应用》一书,进行IVC系统的科技普及,让国产的IVC系统能在国内实验动物界尽快使用,发挥绿色环保节能的效果。在这个项目的全过程中,从预审样机、鉴定、观察动物,为专著写序言及去企业看生产全过程,刘老自始至终都亲自参加指导。2005年,耄耋之年的刘老还乘车去苏州参加苏州市科委关于“全膜终端过滤式IVC系统”科研项目的鉴定,使该项目获得苏州市科技进步奖。

晚霞生辉,老骥新程。晚年的刘老为了推介“比较医学”,根据美国Jackson研究所诺贝尔奖获得者,G.D.Snell教授所言“比较医学”是推动人类健康研究的焦点学科,比较医学家将永远站在生物医学发展的基础线上……所言,认定比较医学是对动物和人类之健康与疾病进行类比研究,探讨其本质的一门新兴边缘学科。当时,他把当主编的《上海实验动物科学》改名为《实验动物与比较医学》,把实验动物科学与比较医学紧紧地联系在一起。为了让研究现代医学的临床医生,在从“循证医学”、“转化医学”过渡到“精准医学”的过程中,充分了解实验动物与“比较医学”的重要作用。刘老还介绍我与中国实验外科学会理事长杨镇教授联系,让我多次参加全国中华实验外科的学术年会,并多次作了关于实验动物与比较医学的学术报告。同时,《中国实验外科》杂志还约我择写了三篇论坛文章,详细介绍了实验动物的有关知识、法规和进展。后来,中国实验外科学会还邀请刘老和我与50多位专家学者共同编写140多万字的“实验外科学”,由我国外科界的泰斗、实验外科创始人、中国科学院院士裘法

祖教授主审，裘老对书中涉及实验动物、实验方法、实验技术和实验设计等内容在序言中评价很高。刘老年事已高，桑榆已晚，照旧执笔，一丝不苟，精神值得后辈敬仰。

历史的长河悠悠流畅，新世纪的曙光缤纷绽放，改革开放迎来了千禧之年。中国实验动物学会已在北京成立，而我们上海，实验动物科学的同仁们，还只是在上海市畜牧兽医学会下有一个实验动物专业委员会的二级学术组织团体，开展实验动物与比较医学的学术活动有一定的困难，大家对成立上海市实验动物学会呼声很高。为此，我作为当时实验动物专业委员会的负责人，在上海市畜牧兽医学会常务理事会上多次代表大家提出脱离上海市畜牧兽医学会，成立上海市实验动物学会的请求。然而，这个合理的请求，从上海市畜牧兽医学会到上海市科技协会，直到上海市民政局社团管理处，均一致不予同意。在这十分困难的时刻，曾担任过上海市畜牧兽医学会三届理事长的刘老，大公无私，又一次鼓励我们，并多方面为我们献计献策。利用解放初他曾为实验动物奔走调研，上书市长的经验，集思广益，要大家书写一份宣传实验动物科学重要性的材料，直送上海市市长亲阅，同时向市长提出成立上海实验动物学会的请求。不出所料，当时上海正在努力筹建制药工业及动员开展新药的研究。我们这份材料正中下怀，被市长看中，当即批示有关部门予以同意。很快，多方面催促我们尽快成立上海市实验动物学会的指令急促下达。不久，上海市实验动物学会终

于成立了。在这里我们要对刘老的大力支持和积极策划再次表示敬意和谢意。

银汉迢迢，白驹过隙。转瞬间刘瑞三老先生已驾鹤西去。追忆先师，感怀师恩，音容宛在，笑貌如故，犹在眼前。刘老1944年毕业于原中央大学，是现南京大学的前身。而我1957年进入南大，在南大学习、工作二十多年，我们是前后相差十多年的老校友，身感十分荣耀。曾教过刘老“动物学”的一级教授陈义先生和教过“生物化学”的一级教授郑集先生，后来也是我的老师，对他们的教学音容，我们同感身受。后来，我与刘老也有过近三十年的工作交往和接触。我们一同去参加过各种专业学术会议，从浙江到河南，从安徽到山东、江苏，沿路一起参观考察，一路聆听您的谆谆教导，使人永远铭记心中，鲜活生动的事例不胜枚举，感受至深，终身受益。

春蚕到死丝方尽，蜡炬成灰泪始干。您毕生奉献畜牧兽医、实验动物和比较医学科学事业。死后还捐献遗体为医学事业作出最后的贡献。真是德高望重，无私奉献，家国情怀，甘为人梯，死而后已。

尊敬的刘老，您一路走好，安息吧！晚辈们会学习您一生奉献科学事业的精神；学习您乐观向上、顾全大局、助人为乐、廉洁奉公的高尚品质；学习您爱护同志、关心青年的优良作风。您将激励我们去开拓新的世界，攀登中国实验动物与比较医学的高峰。

斯人去矣，风范长存！

深切怀念中国实验动物科学界泰斗

——河南省实验动物事业的功勋人物刘瑞三先生

王纯耀, 邢金山, 薛敬礼, 杜春燕, 杨 晓, 阴志刚, 时颂东
(河南省实验动物中心, 郑州 450052)

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] C [文章编号] 1674-5817(2019)02-0088-02

突闻刘瑞三先生仙逝, 深感悲痛。震惊之余, 不禁令人回忆起几十年前刘先生为河南省实验动物科技发展作出的重大贡献。

1 河南省实验动物中心的建立

1982年, 在昆明召开了全国第一次实验动物工作会议, 大家充分认识到实验动物科学既是生命科学的组成部分, 又是生命科学的重要研究条件, 几乎可以说, 近代生命科学的每一项重大成果都要应用实验动物。当时, 由于河南省的实验动物工作起步较晚, 在科学管理、技术队伍、动物质量和生产供应能力等方面尚处于落后状态。省内实验动物行业专家都明白, 要把河南省的实验动物工作提高到一个新水平, 急需建立河南省实验动物中心。

河南省当时比较有影响的实验动物机构是河南医科大学实验动物中心, 该中心成立于1950年, 经过30余年的发展, 在技术力量, 饲养场地, 动物品种、数量和质量方面都已初具规模, 在全省占一定优势。1983年, 经国家卫生部多次考察, 河南医科大学实验动物中心被确定为卫生部在全国布点的7个繁殖场之一。在卫生部、河南省卫生厅、河南省科委的支持下, 配备了本科、专科等专业技术人员, 初步形成了一支实验动物的专业队伍, 建立了微生物检测、遗传检测、营养检测、兽医检疫和动物净化5个实验室。

也就是在这样的历史背景下, 我们结识了刘

瑞三先生。1986年5月, 时任中国实验动物学会副理事长、中国农业科学院研究员的刘瑞三先生, 被聘为河南医科大学实验动物中心实验动物科技总顾问。刘先生祖籍河南焦作, 对家乡河南有着深厚的感情, 热衷于家乡科研工作尤其是实验动物事业的进步和发展。

刘先生敏锐地认识到, 在河南省建立实验动物中心的时机已经成熟, 然而一个机构的建立需要完整的程序, 成立一个全省的实验动物专业机构无疑是一件艰难的事情, 需要省政府的批准。1980年代, 百业待兴, 摆在省政府面前的很多工作远远比实验动物工作重要, 成立河南省实验动物中心极有可能得不到批准。

刘先生与时任河南医科大学副校长席雨人交流此事后, 得到了杜百廉校长的大力支持。然后刘先生与河南医科大学实验动物中心的负责同志一起商讨, 确定了一个合理可行的方案: 将原“河南医科大学实验动物中心”与“河南省实验动物中心”合并建立, 在学校同意方案后, 向省科委、省卫生厅的相关领导汇报了情况并申请报批。

作为国内实验动物科技界泰斗的刘瑞三先生无疑是有很大影响力的。经过一段时间的努力, 河南省科委、卫生厅同意了省实验动物中心建立的方案, 1988年12月30日, 河南省科委、河南省卫生厅、河南医科大学三机构联合行文向河南省编制委员会提出申请, 要求建立“河南省实验动物中心”。

提出申请后, 并没有很快得到上级机构的答复。为此, 刘先生亲自拜访了当时的河南省省长并得到其支持。在1980年代, 一个农业科学院的专家拜访一位省长, 并说服其支持建立一个当时看

似并不重要的实验动物机构,实在不是一件容易的事情。在省长的干预下,也就是在三机构联合向省编制委员会提出申请后一年半左右的1990年5月9日,省编制委员会下达了同意在河南医科大学建立“河南省实验动物中心”的文件[豫编(1990)57号],与河南医科大学实验动物中心为一套机构。

“河南省实验动物中心”的成立,标志着河南省的实验动物工作进入了一个新阶段,实验动物工作将更规范、更科学,为河南省实验动物工作提高到一个新水平奠定了基础。可以说没有刘先生,这个机构的建立就没有那么顺利。

2 实验动物设施的建设

1995年,卫生部在全国医药卫生系统实行统一格式的实验动物合格证制度,1995年3月省实验动物管理委员会发布了《河南省实验动物管理办法实施细则》,并于1995年7月1日起实行合格证制度。

按照新的要求,现有的实验动物设施已经不符合要求,需要省实验动物中心建一座标准化实验动物楼。又是经刘先生组织牵头,提出申请,并在1995年12月得到了河南省计划委员会的批复[豫计科技(1995)1369号]。得到批复后,由刘先生任专家组组长,中国药品生物制品检定所孙靖、北京实验动物研究中心荣瑞章、上海第二医科大学尹松林、

国家医药管理局罗改焕、河南省化工设计院朱彩霞等专家一起讨论并论证了实验动物楼的设计方案,并整理出了书面总结报告,使实验动物楼顺利建成。

3 科研与人才培养

河南省实验动物中心于1990年底在昆明小鼠繁育中发现了一种2周龄时开始脱毛,全身被毛脱光后终生不再长被毛,但有完整胸腺的一种无毛小鼠,经多年培育成为一个新品系。1996年,刘瑞三先生在上海组织了由他任组长的“河南医科大学豫医无毛小鼠论证会”,具体成员有卫生部上海生物制品研究所王楠田、第二军医大学胡开元、中科院上海分院金玫蕾、上海第二医科大学尹松林、卫生部上海生物制品研究所陈天培、中科院药物研究所张素胤等7名专家组成。该无毛小鼠为生物医学研究提供了一个很有发展前途的小鼠新品系。

刘先生在百忙之中,热心为河南省实验动物行业培养人才,1980年代末1990年代初为河南实验动物中心培养了2名硕士研究生。

如今,斯人已逝,但其音容笑貌仍历历在目。刘先生就像千千万万的科学工作者一样,为了祖国的发展兢兢业业的工作,赢得了全国实验动物学界的高度推崇。我们怀念刘先生,特写此文纪念。

[编者按: 本刊前主编、顾问, 中国实验动物科学和比较医学的奠基人之一刘瑞三先生于2018年12月29日逝世。本文详细阐述了我国比较医学研究的开创、发展、意义和作用, 并高度评价了刘瑞三先生在开创和推动我国比较医学研究中的巨大作用, 谨以此文作为纪念。]

我国比较医学研究的开创、发展及在现代医学科学发展中的意义和作用

贺争鸣¹, 李冠民¹, 荣瑞章², 李根平²

(1. 中国食品药品检定研究院, 北京 102629;

2. 北京市实验动物管理办公室, 北京 100195)

[摘要] 基于有关文献和实验动物科学研究现状, 阐述我国比较医学研究工作的开创、比较医学学科的建立与发展, 使国内同行和广大读者了解我国比较医学的发展过程, 以及比较医学的发展对现代医学和人类健康的重要意义, 也对随着生命科学的迅猛发展并取得一系列突破性进展的同时出现的新问题而赋予比较医学研究的发展方向进行展望。

[关键词] 实验动物; 比较医学; 生命科学

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0090-04

比较医学(comparative medicine)是利用分子生物学、生物化学、细胞生物学、发育生物学、遗传学、神经科学、免疫学等现代先进技术, 通过在个体、器官、细胞和分子水平的系统性类比研究, 揭示各种实验对象与人类正常和疾病状态之间的本质联系, 从而了解疾病发生的机制与规律, 为寻找和验证更加符合人类疾病研究和药物研发等需要的实验模型提供依据。比较医学研究的根本目的就是探索人类生命的奥秘, 以便更好控制人类疾病和衰老, 延长人类寿命, 增进人类健康^[1]。

因此, 比较医学是现代医学科学的一门重要前沿学科, 是发展前景广阔、应用潜力巨大、生命力极强的学科, 是现代医学赖以发展的基础。正如诺贝尔奖获得者 G.D.Snell 博士说: “比较医学是推动人类健康研究的焦点学科, 比较医学家将

永远站在生物医学发展的基础线上……”^[2]。随着生命科学、实验医学和临床医学的不断发展, 比较医学研究的内涵及外延还将不断扩展。

1 比较医学在我国的起步

比较医学是1980年代初, 首先在美国发展起来的一门新兴边缘学科。但是在美国许多著名的医学院, 如耶鲁大学、麻省理工学院等都在医学院内建有比较医学系, 开展比较医学的研究。应中国政府邀请, 1980年和1981年美国马里兰大学医学院比较医学系主任兼该校实验动物中心主任徐兆光教授访问中国, 受到了副总理万里、卫生部部长钱信忠、农业部部长何康、中国医学科学院院长沈其震、中国农业科学院院长程绍迥、北京农业大学校长沈其益以及科技界不少知名学者的接见与会见。在华期间, 他与国内有关机构一起举办了高级研讨班(1980年, 友谊宾馆)和高级讲习班(1981年, 西苑宾馆), 促成了42位学员联名提出加强我国实验动物工作的建议, 并与国家科委、中国科学院共同

[收稿日期] 2018-12-27

[作者简介] 贺争鸣(1957-), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物质量标准化研究。E-mail: zhengminghe57@163.com

[通信作者] 李根平(1962-), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物管理。E-mail: ligp@baola.org

提出有关我国实验动物事业的中长期规划。可以说由此启动了中国实验动物事业的现代化进程^[2]。

随后,我国著名实验动物专家刘瑞三教授应邀由中国政府派出到该校以访问学者和该校客座教授身份与徐兆光教授合作进行研究,课题之一就是组织编写国际学坛缺门的《比较医学》参考书。刘瑞三教授为此访问了约翰霍浦金斯大学医学院比较医学系图书馆、美国东部医学图书馆(马里兰大学医学院图书馆)、美国国会图书馆、俄勒冈州立大学医学院图书馆(波特兰)和农学院图书馆(考瓦拉斯)、德克萨斯州立大学图书馆(鲁伯克)、美国退伍军人医学研究中心(坦珀),并且随同中国国家科委实验动物考察团访问过美国卫生署(NIH)的动物资源局和14个大学比较医学系和研究所的动物中心,并以“比较血吸虫病学——血吸虫病学与比较医学”为题到4个大学做了巡回报告,参加了约翰霍浦金斯大学比较医学系为美军化学战中心开设的实验动物科学讲习班(巴尔的摩)及美国军事医学科学院的高级实验动物科学讲习班(佛里德雷克)和美国第一次艾滋病动物模型会议(华盛顿),广泛收集资料和交流对比较医学的看法。刘瑞三教授讲:“尽管当时美国已有19个医学院建立了比较医学系,但对这一学科的认识还是不足,还停留在朴素地从小动物模型直接推论到人的简单推论法,这确实令人忧虑。因为这种外插法推论(extrapolation)是科研工作之大忌,特别是用到医学、药学研究时是很危险的。人命关天,非同儿戏,社会责任推动我们继续为比较医学的学科建设呼吁,又回到编一本书的课题来。”

为编撰《比较医学》,徐兆光教授和刘瑞三教授收集了大量文献资料并汇集成册,但发现远远不够分量。即便如此,刘瑞三教授乃决定将资料带回国内,并请上海实验动物研究中心陈筱侠教授增补了一些材料,以《比较医学进展》^[3]出版,由此引起科技界对这门学科的关注。由于各种原因,编写《比较医学》专著的工作暂停了下来,但是为我国科技界能够了解该学科的重要性提供了基本素材,为后续工作的推进打下了坚实的基础。

2 我国比较医学研究的学科建立

2.1 编撰《比较医学》的过程

为建设我国比较医学学科,构建学术体系和知识体系,搭建比较医学研究机构和研究团队,

开展比较医学各个分支的研究,第四军医大学施新猷教授成为编撰《比较医学》专著的积极倡导者、响应者和推动者。施教授认为:“随着生命科学研究的深入开展,《比较医学》的重要性越来越被大家公认,编写一本系统、全面的《比较医学》参考书,是适应实验动物科学发展的需要,也是适应生命科学研究飞速发展的需要。”因此,从1987年起在《第四军医大学》学报先后刊出两期《比较医学》增刊,发表论文80余篇,并先后编著出版了《医学动物实验方法》^[4]、《人类疾病的动物模型》^[5]、《医用实验动物学》^[6]、《现代医学实验动物学》^[7]等多部专著,为编著《比较医学》打下了重要的基础。

为不辜负老前辈的重托和国内同行及广大读者的期盼,在原来编著书的基础上,由施新猷教授牵头,组织专家提出了编写《比较医学》的提纲和各章节的主要内容,在广泛征求意见的基础上,于2001年11月在上海召开了该书的审稿讨论会,最后定稿。

在参考了国内外大量有关文献、图书、资料的基础上,通过三年的辛勤努力完成了《比较医学》^[2]的编写,并于2003年由陕西科学技术出版社出版。徐兆光教授和刘瑞三教授为本书作序。

2.2 《比较医学》的基本构架与内容

本书分总论和各论两大篇共30章,近240万余字。总论篇包括:比较医学绪论,比较医学研究中实验动物的特点及应用,比较医学研究中的实验动物选择应用和影响因素,现代实验动物(近交系、免疫缺陷、悉生、无菌、免疫基因系统等动物)与比较医学,生物高新技术(动物基因组、转基因与基因剔除、克隆、胚胎工程、生物芯片、组织工程、纳米、IVC等技术)与比较医学,比较药理学,比较毒理学,比较环境卫生学及中医证型与比较医学等9章。各论包括:比较免疫学、肿瘤学、神经与精神病学、心血管病学、血液病学、呼吸病学、消化病学、泌尿病学、生殖生理与畸胎学、内分泌病学、骨骼病学、口腔病学、五官病学、理化损伤病学、营养与代谢病学、病毒病学、细菌病学、寄生虫病学、皮肤病学、遗传病学和老年病学等21章,各章均从比较解剖组织、比较生理、比较生物化学、比较病理、自发性模型、诱发性模型、细胞株、特殊动物实验技术等方面进行了详尽的论述。

这本专著是我国第一部介绍比较医学的巨著,它不仅为广大学者奉献了一本比较全面系统,具有科学性、先进性和实用性的比较医学研究参考书和工具书,而且也为我国创建比较医学学科奠定了基础。刘瑞三教授和徐兆光教授是这样评价的:“正如哲学指导社会科学一样,比较医学影响着整个实验动物科学事业。仅有“动物模型”或“模式动物”的建立,如果不广泛类比,就很难以推论为定论,也就是使动物实验降低可靠性甚至失掉意义。这正是比较医学强大生命力之所在。”

2.3 《比较医学》的出版推动了我国比较医学研究的起步与发展

《比较医学》专著的出版对促进我国比较医学研究起到了积极作用。我国诸多学者积极投入到这方面的研究,推动比较医学科学的建设。一些研究实力强、比较医学研究开展早的实验动物单位成立了比较医学机构,如扬州大学成立了比较医学中心,围绕着人类疾病动物模型与比较医学的研究等研究方向招收本科生和研究生。一些高校也开设了“比较医学”选修课。为应用实验动物对人类健康与疾病关系及其发生发展规律进行类比研究成果的交流搭建平台,2003年《中国实验动物学杂志》(1991年创刊)更名为《中国比较医学杂志》,该刊主编、中国实验动物学会副理事长、秘书长方喜业教授为此写了创刊词,施新猷教授撰写了开篇之作-《比较医学-生命科学的重要前沿学科》^[1]。2005年第二期起《上海实验动物科学》(1981年创刊)更名为《实验动物与比较医学》,为此,刘瑞三主编发表了“抚前瞻后,大力发展我国比较医学——写于本刊更名之际”^[8],杨镇编委发表了“如何开展外科比较医学研究”^[9],后续又有顾玉东院士发表了“在动物实验中解决临床难题”^[10],顾为望教授等专家学者撰写了“基因工程动物与现代比较医学研究”^[11]等系列文章。科技部、国家基金委等科技管理部门立项支持动物模型和比较医学研究,利用动物模型探索人类疾病发生、发展过程的机理,以及疾病控制预防的有效技术措施,极大地推动了我国比较医学研究的发展。

由此可见,专著的出版、杂志的易名、比较医学研究机构的建立、科研项目的设立与研究成果的突破,以及后来许多学者在此领域的贡献,推动了我国比较医学的研究,开创了我国的比较医学学科。

3 比较医学研究在推动现代医学科学发展中的意义和作用

3.1 意义

比较医学是现代医学赖以发展的基础学科,发展比较医学意义重大。其重要性表现在它不仅是生命科学研究的重要基础学科,直接影响着生命科学诸多领域研究成果的确立和水平的高低,而且它也是生命科学的重要前沿学科,它的提高和发展会把生命科学许多领域的研究引入新的境地,将对整个生命科学研究发展起到极大的促进和推动作用。

基于基因编辑技术的应用和一些模式生物(如斑马鱼、果蝇等)而得到的人类疾病动物模型已经在人类重大疾病(包括新发和再现传染病、肿瘤、心血管疾病、代谢性疾病、老年性疾病、神经性疾病及遗传性疾病等)发病机制和病因学研究,疾病早期诊断、预防和治疗,新药研发,以及生物与环境相互作用等方面的研究均起到了重要作用。反之,随着人类疾病的深入研究和新技术的应用,以及大量新发传染病的流行带来的压力,要求在建立具有不同特色的人类重大疾病动物模型的基础上,需要更加重视比较医学分析,阐述和解释人类重大疾病模型的特色和优势,为揭示人类重大疾病的发病分子机制提供技术支撑和理论基础。这些均显示出比较医学在推动现代医学科学发展中的重要性^[12]。

3.2 比较医学在推动现代医学科学发展中的主要研究内容

从比较医学研究的对象和方法看,与实验动物和动物实验密切相关。实验动物学的研究重点是实验动物资源开发和质量标准化等,而动物实验则是利用实验动物作为研究载体,通过在特定条件下实施特定的处理,以获得预期结果的过程,是进行科学研究必不可缺的方法和手段。但值得注意的是:我们不能简单把比较医学看成是实验动物或动物模型的应用;或就是动物实验或操作过程。随着基因编辑技术的飞速发展,尤其是CRISPR基因编辑技术的出现,利用动物建立相关疾病模型已成为科学家们对疾病机制和信号转导的了解和新药研发不可或缺的研究手段之一。虽然利用CRISPR技术制备疾病动物模型取得了令人瞩目的长足进步,利用这些疾病动物模型也极大推动了药物研发等领域的相关研究,但从目前所制备的大部分动物模型看,

仅具有研究目标的部分表型。制备的疾病模型从发病机制、发病过程与人类疾病的相似性,以及对发病各阶段的人为控制方面,与研究的需要还有差距,往往在应用中出现误导。

另外,人类疾病往往是多基因复杂性疾病,引起疾病发生具有主效基因和关联基因,因此,要阐明疾病的本质,就需要探讨哪些是主效基因?哪些是关联基因?主效基因之间的关系,关联基因之间的关系,以及主效基因与不同关联基因之间的关系。因此,动物模型与人类疾病之间不是一对一的简单对等关系,而是具有不同基因组合的一组(或一系列)动物模型。要获得可靠的动物模型,就要开展比较医学的深入研究,探讨哪一种模型与所要研究的人类疾病更加切合,或由哪些动物模型形成一个集成组,适合某种人类疾病的研究(模型组学)。

加强动物模型表型性状的精确测定和度量,探索表型与基因型的关联机制,分析表型、基因型及其在环境变化中的响应,开展利用不同物种建立的同一种模型之间的评价研究;动物模型与人类疾病和人类健康研究领域的比较医学研究;动物模型研究数据和临床数据结果的系统比较研究等,由此建立在遗传、免疫等多方面与人类高度近似的、能体现疾病发展进程的动物模型,这些均属于比较医学研究的重要内容。

3.3 比较医学研究是推动现代医学科学发展的基石和着力点

“转化医学”是医学研究的一次革命,是把基础医学的成果快速转化到临床实践中,为病人服务,为人类健康造福。因此,转化医学研究称为转化研究或转化科学,是现代医学研究的一个分支,已成为全球医学研究的一个新的起点和着力点。“精准医学”是现代医学发展的必然,其作为医学的未来是人类医学的变革,长期目标是为实现多种疾病的治愈提供有价值的信息^[13,14]。我国科技部于2016年发布了国家重点研发计划“精准医学研究”等重点专项指南,提出以我国常见高发、危害重大的疾病及若干相对较多的罕见病为切入点开展研究。

不管将基础研究与解决临床实际问题结合起来,将基础研究的成果转化为临床疾病预防、诊断和治疗的“转化医学”,还是包括精准诊断和精准治疗在内的“精准医学”,要实现从实验室

到临床研究的双向转化,还是实现让患者获得更为精确的诊断和有效的治疗,均离不开比较医学的基础研究,且必须以通过比较医学研究而获得的成果为基础,由此获得理论支持和成熟的技术,进而用于临床实践^[15]。

近年来,生命科学和生物技术是世界科技发展最为迅速的领域之一,并取得了一系列突破性进展。相信,随着新技术和新学科的兴起,作为生命科学研究的基础学科,比较医学研究将更加系统化和整体化,比较医学研究成果的应用将对疾病发病机制以及治疗的深入了解,对加快新药研发和增强药物使用的安全性等发挥重要的引领和驱动作用,也必将推动《“健康中国2030”规划纲要》战略目标的实现。

参考文献:

- [1] 施新猷. 比较医学 - 生命科学的重要前沿学科[J]. 中国比较医学杂志, 2003, 13(1):1-4.
- [2] 施新猷, 王四旺, 顾为望, 等. 比较医学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 2003.
- [3] 徐兆光, 刘瑞三, 陈筱侠. 比较医学进展[M]. 北京: 北京科学技术出版社, 1988.
- [4] 施新猷. 医学动物实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1980.
- [5] 施新猷, 顾为望. 人类疾病动物模型[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2008.
- [6] 施新猷. 医用实验动物学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989.
- [7] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000.
- [8] 刘瑞三. 抚前瞻后, 大力发展我国比较医学——写于本刊更名之际[J]. 实验动物与比较医学, 2005, 25(2):67-78.
- [9] 杨镇. 如何开展外科比较医学研究[J]. 实验动物与比较医学, 2005, 25(2):69-71.
- [10] 顾玉东. 在动物实验中解决临床难题[J]. 实验动物与比较医学, 2006, 26(1):3.
- [11] 顾为望, 刘光泽, 王万山. 基因工程动物与现代比较医学研究[J]. 实验动物与比较医学, 2006, 26(1):4-9.
- [12] 刘昌孝. 精准药理学:从转化医学到精准医学探讨新药发展[J]. 药物评价研究, 2016, 39(1):1-18.
- [13] 杨庭树. 精准医疗 - 从概念到实践[J]. 中华保健医学杂志, 2016, 18(4):335-336.
- [14] 张颖, 胡艳平, 马中良, 等. 精准医学下的非小细胞肺癌靶向药物及诊断标志物的研究进展[J]. 转化医学杂志, 2018, 7(3):182-187.
- [15] 陈长仁, 何发忠, 周宏灏. 精准医学的基础研究与临床转化[J]. 中国药理学通报, 2015, 31(12):1629-1632.

内窥镜引导气管注入博来霉素 建立小鼠肺纤维化模型

余华军¹, 吴 尚², 黄 慧², 林碧云³, 伍 俊³, 欧华俊¹, 张海涛²

(广东医科大学 1. 实验动物中心, 湛江 524023;

2. 生物化学与分子生物学教研室, 湛江 524023;

3. 附属医院呼吸内科, 湛江 524001)

[摘要] 目的 建立在内窥镜直视下气管插管法, 并采用此方法建立博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型。方法 将5只C57BL/6J小鼠, 在内窥镜直视下进行小鼠气管插管, 建立气管插管方法及步骤。将10只C57BL/6J小鼠随机均分为对照组和实验组, 按照建立的方法进行气管给药, 对照组气管插管给予50 μ L的生理盐水, 实验组气管插管给予50 μ L 3.5 mg/kg的博来霉素, 观察各组小鼠的死亡率。灌注后28 d, 颈椎脱臼法处死小鼠, 比较两组小鼠肺组织谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、超氧化物歧化酶(SOD)活性和羟脯氨酸(HYP)、丙二醛(MDA)含量。取小鼠肺组织进行病理切片, HE、Masson染色观察肺组织的病理情况。结果 15只C57BL/6J小鼠采用多功能内窥镜直视下气管插管均能成功, 无小鼠因插管后死亡, 5只给予印度墨汁的预实验小鼠气管下端开始直至肺部均有黑色物质均匀分布。与对照组比较, 实验组小鼠肺组织中HYP、MDA含量增高($P<0.01$); GSH-PX、SOD含量降低($P<0.01$)。进行HE、Masson染色显示, 与对照组比较, 实验组小鼠肺组织胶原沉积严重, 病理学表现符合肺纤维化改变。结论 采用多功能内窥镜直视下气管给药的方法, 给药量准确、安全、简便。以此方法建立博来霉素诱导小鼠肺纤维化的模型成功率高, 值得推广应用。

[关键词] 内窥镜; 气管插管; 肺纤维化; 动物模型

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0094-05

特发性肺纤维化(idiopathic pulmonary fibrosis, IPF)的病因不明, 可由环境中的有害物质、病毒感染、胃食管反流和吸烟等因素刺激, 通过炎症、组织损伤、修复持续叠加造成上皮细胞损伤和成纤维细胞活化, 引起细胞外基质沉积, 最终

发展为肺纤维化。建立稳定的肺纤维化动物模型, 对抗肺纤维化药物筛选和评价极其重要。目前国际上应用最为广泛的是博来霉素诱导动物肺纤维化模型。该模型主要通过气管给药、经鼻滴注、腹腔注射或静脉给药等方法建立^[1-4], 其中一次性气管内灌注的方法使用较为普遍。气管内灌注又分为直接灌注和间接灌注, 两者主要是有创与无创的区别。在肺纤维化小鼠模型制备的动物选择方面, C57BL/6J小鼠是最常用品系^[5]。目前研究及应用的小鼠气管插管给药方法中, 大多借助于专用仪器设备辅助插管。但普遍存在的不足是小鼠咽部结构视野范围较小及模糊, 不能清晰直观进行插管操作。本研究拟采用在多功能内窥镜直视下对C57BL/6J小鼠进行气管插管, 并通过此方法建立博来霉素诱导

[收稿日期] 2018-08-27

[基金项目] 国家自然科学基金(81772634, 81770034); 广东医科大学科研基金(2XK16042); 湛江市非资助科技攻关计划项目(2017B01064)

[作者简介] 余华军(1985-), 硕士研究生。主要从事天然药物活性成分的应用研究。E-mail: hjyu@gdmu.edu.cn

[通信作者] 张海涛(1970-), 男, 博士, 教授, 从事肿瘤分子细胞生物学研究和天然药物生化药理研究。

E-mail: taohaizhang33@163.com

小鼠肺纤维化模型,分析及评价动物模型的稳定性,为今后气管给药、肺纤维化及相关肺部疾病的研究应用奠定实验基础。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

SPF级C57BL/6J小鼠15只,18~22 g,雌雄各半,购自中山大学实验动物中心[SCXK(粤)2016-0029]。常规饲养于广东医科大学实验动物中心SPF级设施,12/12 h昼夜光照,温度22~24℃,相对湿度70%[SYXK(粤)2015-0147]。

1.2 主要试剂和仪器

博来霉素购自美国Sigma公司;羟脯氨酸(HYP)、丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)和超氧化物歧化酶(SOD)测试盒均购自南京建成公司;生理盐水、水合氯醛、内窥镜、冷光源放大镜和恒温加热板均购自北京鼎国公司;病理组织切片机和石蜡包埋机均购自美国赛默飞公司。

1.3 方法

1.3.1 内窥镜直视下气管插管操作步骤 ①使用体积分数10%水合氯醛麻醉5只小鼠,对照组和实验组各5只;②用丝线圈住小鼠门牙将小鼠悬挂在木板上,背部用泡沫垫高,保持头部和水平的角度在45°左右,用镊子轻轻顺向拉出舌头;③冷光源放大镜放于动物上部,用咽拭子将咽分泌物擦净,使用棉签下压舌部调整动物倾斜角度;④使用已酒精消毒的内窥镜探头伸入小鼠口腔内,调整角度直至可通过内窥镜显示面板清晰看到声门,固定探头软管;⑤手持气管导管贴门牙中间进针,沿着上颌中线插入,观察小鼠呼吸频率,在小鼠呼吸时,声门打开的瞬间插入导管,注入50 μL印度墨汁;⑥迅速从气道拔出套管针,抓着小鼠耳背皮肤直立旋转30 s,使药物在肺内分布均匀,侧卧位放置于恒温加热板(37℃)上。

1.3.2 实验处理 对照组和实验组各5只,按上述操作步骤,分别气管给予50 μL的生理盐水和50 μL平3.5 mg/kg的博来霉素^[6]。

1.3.3 博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型鉴定 常规饲养28 d^[7],颈椎脱臼法处死小鼠,取小鼠左肺浸于质量分数4%的多聚甲醛溶液中固定,进行石蜡包埋,病理切片,HE、Masson染色,小鼠右肺进行HYP、MDA、GSH-PX、SOD检测。

1.4 统计学处理

采用SPSS 17.0软件进行统计分析,正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多个样本均数的比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多功能内窥镜直视下气管插管

在多功能内窥镜显示面板上掌握小鼠的呼吸频率,在声门打开瞬间迅速插入导管,一边管口封堵30 s,小鼠此时出现躁动、口唇紫绀等缺氧症状,解除封堵后小鼠呼吸恢复、缺氧症状逐渐缓解,则表明插管成功^[8]。

2.2 插管过程

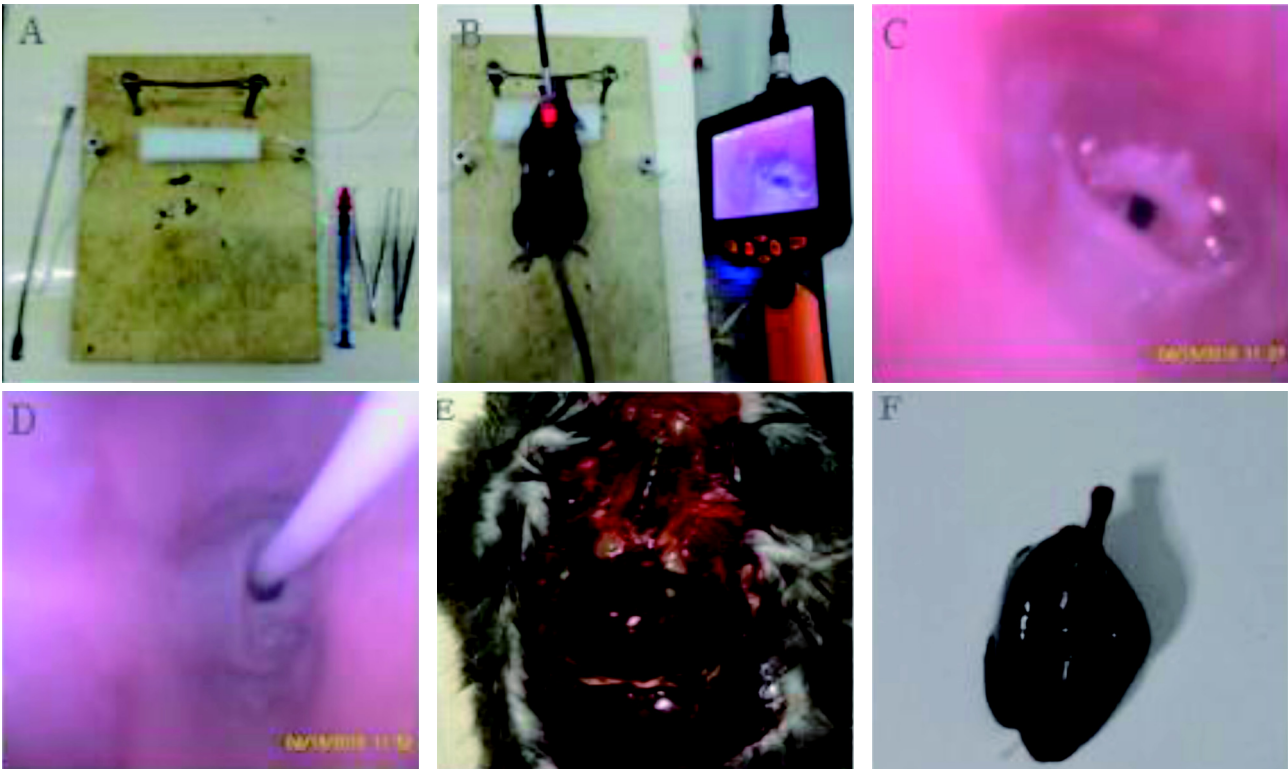
按照上述的气管插管方法,使用颈椎脱臼法处死小鼠,解剖暴露气管及胸腔,发现5只注入印度墨汁的小鼠气管下端直至肺部均有黑色物质均匀分布(图1)。且各组小鼠均插管成功,插管成功率高,给药量精确,插管后无小鼠死亡情况。

2.3 博来霉素诱导小鼠肺纤维化模型

由表1可见,小鼠肺组织中HYP、MDA含量,与对照组比较,实验组含量增加($P < 0.01$);小鼠肺组织中GSH-PX、SOD活性,与对照组比较,实验组活性降低($P < 0.01$)。小鼠肺组织进行病理切片经HE、Masson染色,显微镜下观察(图2),对照组的肺组织结构清晰,实验组肺泡间隔显著变宽,肺泡结构破坏严重,萎缩塌陷严重,胶原纤维显著增多,出现大量炎症细胞浸润。从以上生化指标及病理学观察结果表明,应用该气管插管方法,复制博来霉素诱导小鼠肺纤维化的模型成功率较高。

3 讨论

在医学研究上,人们通常借助于人类疾病动物模型来认识和研究各种疾病的发展及防治。建立合适的肺纤维化动物模型对临床上治疗肺纤维化疾病药物的筛选,探讨其发病机制具有重要的作用。诱导肺纤维化常用博来霉素、二氧化硅、异硫氰酸荧光素,通过辐射、病毒载体和转基因系统等^[9,10]。应用博来霉素来诱导肺纤维化是目前最普遍的实验性肺纤维化动物模型^[11-14]。博来霉素的造模给药途径有气管内滴入、雾化吸入、腹腔注射和静脉注



A: 小鼠固定装置及气管插管主要器械; B: 气管插管时小鼠的体位; C: 小鼠气管; D: 小鼠气管插管; E: 气管给予印度墨汁后小鼠气管及肺部在体形态; F: 分离气管给予印度墨汁后小鼠气管及肺部形态

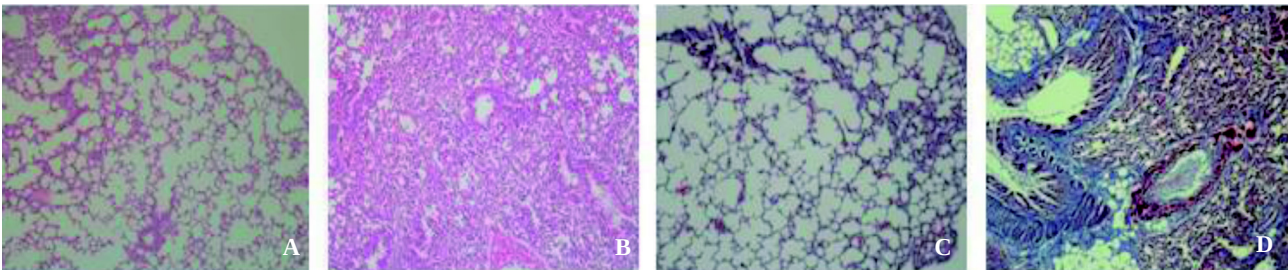
图 1 多功能内窥镜直视下气管插管

Figure 1 Endotracheal intubation under direct vision

表 1 小鼠肺组织中的生化指标
Table 1 The lung indexes of mice

组别	HYP/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	MDA/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	GSH-PX/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$	SOD/ $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$
对照组	16.68 ± 1.33	3.85 ± 0.44	$1\,090.54 \pm 74.55$	181.97 ± 4.84
实验组	$84.01 \pm 6.85^*$	$22.76 \pm 6.30^*$	$357.23 \pm 21.80^*$	$87.91 \pm 16.91^*$

注: 与对照组比较, $^*P<0.01$, $n=5$



A、B 分别为对照组、实验组(HE × 100); C、D 分别为对照组、实验组(Masson × 100)

图 2 小鼠肺纤维化的病理变化

Figure 2 Pathological changes of pulmonary fibrosis in mice

射等方式, 但各有优缺点。

Robbe 等^[15]使用雾化装置雾化方式吸入博来霉素, 诱导大鼠肺间质纤维化。此方法避免了大鼠手术感染的风险, 提高了造模成功率及肺内博来霉

素分布均匀, 但此方法消耗的博来霉素量大, 不能定量且雾化时间过长。有研究^[16]报道采用一次性大剂量和连续多次小剂量尾静脉注射博来霉素造模, 此方法复制的动物模型更接近于特发性肺纤维

化,但进行尾静脉注射对实验人员的技术操作要求较高。此外,腹腔内多次注射博来霉素建立的肺纤维化模型^[17],亦存在给药次数多、剂量大和造模时间长等缺点。

目前国内外最常用、最受认可的是一次性气管内灌注博来霉素诱导的动物肺纤维化模型^[18]。直接灌注法是通过气管插管向气管内灌注博来霉素,间接灌注法是在动物颈部切口,找到气管后向气管内注入博来霉素。在气管给药时,研究者更多采用气管切开后滴注的方法,但这种方法对小鼠造成有创损伤,影响实验的重复性及各项生理指标。比较以上给药方式,最理想的是采用无创的方式,一次性气管内灌注博来霉素诱导肺纤维化,但这种方法操作技术要求高,需借助一些仪器设备。实验人员通常利用专门仪器设备进行辅助插管。如 Brown 等^[19]和 Spoelstra 等^[20]在专业喉镜引导下进行气管插管给药。Vergari 等^[21]利用关节镜对小鼠进行气管插管,虽然成功率高,损伤小,但是需要特殊设备,成本高。本实验采用内窥镜辅助下实施小鼠气管插管,利用内窥镜探头冷光源进行调节光亮度及放大倍数,实验人员能在内窥镜的面板上更好地观察咽喉部的结构、小鼠的呼吸频率及声门的开启时间,掌握插管的方向,提高插管的成功率。

HYP含量能直接反映出结缔组织疾病的胶原代谢情况,通过检测组织中 HYP 含量,可以判断组织纤维化程度,还可以对预防与治疗纤维化药物的筛选。而 MDA 常与 SOD 的检测相互配合,SOD 的活性高低间接反映机体清除氧自由基的能力,而 MDA 的高低则反映机体细胞受自由基攻击的严重程度。GSH-PX 能特异催化还原型谷胱甘肽对过氧化氢的还原反应,起到保护细胞膜结构和维持正常功能的作用。通过此方法建立的小鼠肺纤维化模型,实验结果显示小鼠肺组织中 HYP、MDA 含量,与对照组比较,实验组含量均增加;小鼠肺组织中 GSH-PX、SOD 活性,与对照组比较,实验组含量均降低。小鼠肺组织进行病理切片,经 HE、Masson 染色,显微镜下观察实验组胶原纤维沉积严重。从以上生化指标及切片结果显示,应用该气管插管方法,复制博来霉素诱导小鼠肺纤维化的模型成功率较高,且对小鼠造成的损伤较小。

综上,在多功能内窥镜直视下的小鼠气管插管方法是一种操作便捷、成功率高、重复性好、

安全性高的插管方法;可正常通过小鼠口腔观察气管,有效地实现小鼠肺部给药,实验人员只需经过数次练习即可熟练开展实验,具有一定的优越性和实用价值,值得推广应用。

参考文献:

- [1] Clark JG, Kostal KM, Marino BA. Bleomycin-induced pulmonary fibrosis in hamsters. An alveolar macrophage product increases fibroblast prostaglandin E2 and cyclic adenosine mono-phosphate and suppresses fibroblast proliferation and collagen production [J]. J Clin Invest, 1983, 72 (6):2082-2091.
- [2] Gharaee M, Ullenbruch M, Phan SH. Animal models of pulmonary fibrosis [J]. Methods Mol Med, 2005, 117:251-259.
- [3] Felix C, Jack G, Geoffrey J. Pulmonary fibrosis searching for model answers [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2005, 33(1): 9-13.
- [4] Denis J, Schrier D, Robin G, et al. The role of strain variation in murine Bleomycin-induced pulmonary fibrosis [J]. Am Rev Respir Dis, 1983, 127:63-66.
- [5] Walkin L, Herrick SE, Summers A, et al. The role of mouse strain differences in the susceptibility to fibrosis: a systematic review[J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2013, 6 (1):18.
- [6] 陶章,李惠萍.不同剂量博来霉素致小鼠肺纤维化模型的比较[J].中国组织工程研究与临床康复,200,13(7):1214-1218
- [7] Moeller A, Ask K, Warburton D, et al. The bleomycin animal model: a useful tool to investigate treatment options for idiopathic pulmonary fibrosis? [M]. Int J Biochem cell biol, 2008, 40(3):362-382.
- [8] 吴月,王硕,王晴,等.在体视镜下施行无创性小鼠气管插管方法的建立[J].中国病理生理杂志,2009,25(8): 1662- 1664.
- [9] Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2008,294 (2): L152-160.
- [10] Degryse AL, Lawson WE. Progress toward improving animal models for idiopathic pulmonary fibrosis[J]. Am J Med Sci,2011, 341(6):444-449.
- [11] Wang QJ,Wang YJ,Dallas M et al. Effect of antibody against tinte grin on bleomycin induced pulmonary fibrosis in mice[J]. Biochem Pharmae, 2000, 60(12):1949-1958.
- [12] Gharaee-Kermani M, Ullenbruch M, Phan SH. Animal models of pulmonary fibrosis [J]. Methods Mol Med, 2005, 117: 251-259.

- [13] Chua F, Gauldie J, Lauernt GJ. Pulmonary fibrosis: searching for model answers [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2005, 33(1):9-13.
- [14] Shi K, Jiang J, Ma T, et al. Pathogenesis pathways of idiopathic pulmonary fibrosis in bleomycin-induced lung injury model in mice [J]. *Respir Physiol Neurobiol*, 2014, 190:113-117.
- [15] Robbe A, Tassin A, Carpentier J, et al. Intratracheal bleomycin aerosolization: the best route of administration for a scalable and homogeneous pulmonary fibrosis rat model [J]. *Bio Med Res Int*, 2015, 198418.
- [16] 杨聪颖, 彭雄群, 阳惠湘, 等. 不同剂量博来霉素诱导小鼠肺纤维化的差异及动态变化[J]. *中国实验动物学报*, 2013, 21(2):45-51.
- [17] 齐曼古丽·吾守尔, 夏宇, 巴哈尔古丽·米吉提, 等. 博来霉素致大鼠肺纤维化模型的建立方法及比较[J]. *新疆医科大学学报*, 2005, 28(6):495-498.
- [18] Moore BB, Hogaboam CM. Murine models of pulmonary fibrosis [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294(2):L152-L160.
- [19] Brown RH, Walters DM, Greenberg RS, et al. A method of endotracheal intubation and pulmonary functional assessment for repeated studies in mice [J]. *J Appl Physiol*, 1999, 87(6):2362-2365.
- [20] Spoelstra EN, Ince C, Koeman A, et al. A novel and simple method for endotracheal intubation of mice [J]. *Lab Anim*, 2007, 41(1):128-135.
- [21] Vergari A, Gunnella B, Rodolà F, et al. A new method of orotracheal intubation in mice [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2004, 8(3):103-106.

Endoscopy Guided Tracheal Injecting Bleomycin Model of Pulmonary Fibrosis in Mice

YU Hua-jun¹, WU Shang², HUANG Hui², LIN Bi-yun³, WU Jun³, OU Hua-jun¹, ZHANG Hai-tao¹

(1. *Experimental Animal Center, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China;*

2. *Institute of Biochemistry and Molecular Biology, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China;*

3. *Department of Respiratory Medicine, Affiliated Hospital, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524001, China)*

[Abstract] Objective To establish intratracheal intubation under direct vision of multifunctional endoscopic, and adopted to establish the model of bleomycin induced pulmonary fibrosis in C57BL/6J mice. **Methods** Establish method and steps of endotracheal intubation under direct vision of multifunctional endoscopic with five C57BL/6J mice. Ten mice were randomly divided into two groups (5 in each). Control group were given 50 μ L of saline and experimental group were given 50 μ L of bleomycin (3.5 mg/kg) to observe the death rates of mice. At the 28th day, the mice were sacrificed by cervical delocation. By compared the vitality of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-PX), the content of malondialdehyde (MDA) and hydroxyproline (HYP) in the two groups of mouse lung tissue. Lung tissue fibrosis degree were observed by HE and Masson stain. **Results** All C57BL/6J mice were successfully intubated by using multifunctional endoscopy under direct view and no mice died after intubation. The 5 mice given India ink had black materials evenly distributed from trachea bottom until the lungs. Compared with those of control group, HYP and MDA contents in mouse lung tissue experimental group elevated ($P<0.01$), while SOD and GSH-PX level in mice lung tissue decreased ($P<0.01$). The lung tissue was obtained and stained by HE and Masson. By comparison with control group, collagen deposition in experimental group mouse lung tissue is serious. The pathological changes were in accordance with pulmonary fibrosis. **Conclusion** The method of endotracheal intubation under direct vision of multifunctional endoscopic is safe, effective and convenient. This method was successful to establish pulmonary fibrosis in mice model with high efficiency induced by bleomycin, and worthy of popularization and application.

[Key words] Endoscopic; Endotracheal intubation; Pulmonary fibrosis; Animal models

胰岛素抵抗合并高尿酸血症大鼠模型的建立及其比较

刘孟渊¹, 冯学轩², 黎莉斯², 张美艺¹

(1. 广州市中医医院, 广州 510130; 2. 广东省医学实验动物中心, 佛山 528248)

[摘要] 目的 为制备成功、稳定的胰岛素抵抗合并高尿酸血症(IR-HUA)模型, 比较了IR-HUA模型、高尿酸血症(HUA)模型、胰岛素抵抗(IR)模型的制备方法。方法 选用40只雄性SD大鼠, 按体质量随机分为正常对照组(A组)、HUA模型组(B组)、IR-HUA模型组(C组)和IR模型组(D组), A组、B组喂饲普通饲料及饮用水; C组、D组喂饲自制高脂饲料及质量分数10%果糖水; 造模8周, 第6周始, B组、C组大鼠每日灌胃酵母膏(16 g/kg) 21 d; 于实验第6、8周末取样检测相关指标。结果 实验第8周末, 与A组相比, B组血尿酸(SUA)、尿酸(UUA)、尿酸排泄总量及尿酸排泄分数(FEUA)均升高; C组空腹胰岛素(FINS)、稳态模型胰岛素抵抗指数(HOMA-IR)值均下降, UUA浓度、FEUA均升高, 排尿体积下降; D组Lee's指数下降, 空腹血糖(FPG)升高, FINS下降, UUA浓度升高, 排尿体积、尿酸排泄总量均下降, 血、尿肌酐均升高。结论 给雄性SD大鼠每日灌胃酵母膏(16 g/kg) 21 d可制备HUA模型; 单纯给予高脂高糖饮食8周诱导大鼠IR模型欠理想, 大鼠未呈现出明显的IR特征, IR-HUA模型制备方法有待进一步完善。此外, 高脂高糖饮食可致大鼠排尿体积减少, 尿酸排泄下降; 并可致大鼠胰岛素分泌减少, 导致血糖升高。

[关键词] 胰岛素抵抗合并高尿酸血症(IR-HUA); 空腹血糖(FPG); 动物模型

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2019)02-0099-06

高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)目前已经成为继糖尿病之后最为常见的代谢性疾病。HUA是痛风最重要的生化基础^[1]。临床上, 单纯HUA及痛风较为少见, 尤其在中老年患者。大量流行病学及临床研究显示, HUA和代谢综合征(metabolic syndrome, MS)往往聚集性出现在同一个体, MS患者70%同时合并HUA, HUA也常与MS各项指标伴发, 如HUA合并3种以上代谢性危险因素的比例, 男性和女性分别高达76.92%和67.64%^[2,3]。

MS的发病率随着血尿酸水平的增加而升高, 而HUA亦常伴随着MS、IR及高胰岛素血症。因此有人认为MS与HUA可能互为因果关系, 提出将HUA纳入MS的一个组分^[4]。

胰岛素抵抗(insulin resistance, IR)是MS的病理基础和病理生理过程的核心环节^[5]。从HUA与MS的紧密联系亦可以推测HUA与IR密切相关, 大量的临床研究也证实了这一点^[6-8]。鉴于目前尚无理想而符合人类HUA发病过程的HUA动物模型。本实验模拟人类高脂高糖饮食诱导IR状态, 分别制备了大鼠IR-HUA模型、HUA模型及IR模型, 并对这三种模型之间的相关性进行了比较分析。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性SD大鼠40只, 体质量146.5~172.8 g,

[收稿日期] 2018-07-02

[基金项目] 广东省中管局建设中医药强省立项资助科研课题(20151066), 广州市医药卫生科技项目(20152A011004), 广州市科技创新委员会科学(技术)研究专项一般项目(201607010303)

[作者简介] 刘孟渊(1964-), 硕士, 教授, 从事内科疾病的中西医结合临床及科研工作。

E-mail: mymyliu@sina.cn

由广东省医学实验动物中心提供 [SCXK(粤)2013-0002]。饲养于 SPF 级动物实验室[SYXK(粤)2013-0002]。

1.2 药物、试剂与仪器

自制高脂饲料(每千克高脂饲料含 15 g 食盐、100 g 白糖、200 g 猪油、22.5 g 蛋黄粉, 662.5 g 普通饲料), 由广东省医学实验动物中心生产。结晶果糖购自山东西王糖业有限公司(批号 201606232), 使用时配制成质量分数 10% 果糖水。酵母膏购自北京奥博星生物技术有限责任公司生产(批号 20161028), 使用时用纯净水配制成 0.8 g/mL 酵母膏。多聚甲醛购自广东光华科技股份有限公司(批号 20161107)。日立 7020 全自动生化分析仪购自日本日立公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组 40 只雄性 SD 大鼠适应性喂养后, 测量身长和称重, 按体质量随机分为正常对照组(A 组)、HUA 组(B 组)、胰岛素抵抗-高尿酸血症(IR-HUA)组(C 组)、IR 组(D 组), 每组 10 只大鼠。

1.3.2 动物造模 动物分组后, A 组、B 组喂饲普通饲料, 饮用动物饮用水; C 组、D 组喂饲自配高脂饲料, 饮用 10% 果糖水; 共造模 8 周。第 6 周始, HUA 组、IR-HUA 组按 20 mL/kg 体质量每日灌胃 0.8 g/mL 浓度的酵母膏(相当于 16 g/kg), 连续 21d。

1.3.3 指标检测 造模第 6 周末, 各组大鼠称重, 测体长, 采集各大鼠 6 h 尿液, 采集尿液期间禁食并换为正常饮用水, 其后大鼠按 10 mL/kg 体质量腹腔注射(*i.p.*)质量分数 3% 戊巴比妥钠溶液麻醉, 眼眶静脉窦采血, 3 000 r/min 离心 10 min 收集血清, 检测空腹血糖(fasting plasma glucose, FPG), 空腹胰岛素(fasting insulin, FINS), 血尿酸(serum uric acid, SUA)及尿酸(urine uric acid, UUA)含量。

造模第 8 周末, 试验结束前 1 d, 各大鼠称

重, 量体长, 并收集 6 h 尿液, 测量尿液体积, 检测 UUA 及尿肌酐(urine creatinine, UCr)。试验结束当日, 禁食 6 h 并换为正常饮用水后, 每只大鼠按 20 mL/kg 体质量 *i.p.* 3% 戊巴比妥钠溶液麻醉, 腹主动脉采血致死, 3 000 r/min 离心 10 min 收集血清, 检测 FPG、FINS、SUA 及血清肌酐(serum creatinine, SCr); 并摘取两侧肾脏、胰腺、小肠(空肠), 以质量分数 4% 多聚甲醛固定, 作组织病理学检测。

完成各组大鼠的理化检测后, 计算以下指标:

① Lee's 指数 $\sqrt[3]{\text{体质量 (g)} \times 1000 / \text{体长 (cm)}}$, ② 尿酸排泄总量 = 尿酸浓度 $\times$ 排尿体积, ③ 尿酸排泄分数(fraction excretion of uric acid, FEUA) = (尿酸 $\times$ 血肌酐 / 尿肌酐 $\times$ 血尿酸) $\times$ 100%, ④ 稳态模型胰岛素抵抗指数(insulin resistance index in homeostasis model, HOMA-IR) = FPG $\times$ FINS / 22.5。

1.4 统计学处理

所有实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS21.0 软件进行统计分析; 计量资料数据方差不齐, 或数据经转换后方差不齐, 则采用组间两两比较单因素方差分析; 若数据经转换后方差不齐, 采用秩和检验进行统计分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量

与 A 组比较, 各组大鼠体质量均下降。B 组自实验开始至酵母膏灌胃前的大鼠体质量与 A 组的差别无统计学意义, 而给予酵母膏灌胃后的体质量下降较明显(均为 P < 0.01)。喂饲高脂高糖的 C 组、D 组大鼠体质量自 8 d 始下降, 而且体质量下降较明显(均为 P < 0.01)。

各模型组之间比较, 造模 56 d, B 组大鼠体质量高于 C 组和 D 组(均为 P < 0.01)。

表 1 HUA、IR-HUA、IR 模型的建立及比较实验期间各组大鼠体质量

g

组别	造模时间 / d					
	1	8	15	29	42	56
A 组	159.4 $\pm$ 7.0	239.8 $\pm$ 8.6	297.5 $\pm$ 12.5	422.1 $\pm$ 27.3	470.9 $\pm$ 36.8	514.6 $\pm$ 37.4 ^{c,d}
B 组	159.0 $\pm$ 6.4	234.6 $\pm$ 8.9	289.6 $\pm$ 10.2	398.3 $\pm$ 23.4	428.2 $\pm$ 29.7 ^a	471.0 $\pm$ 29.4 ^{a,c,d}
C 组	158.7 $\pm$ 7.0	201.1 $\pm$ 13.2 ^a	231.9 $\pm$ 15.8 ^a	323.2 $\pm$ 34.4 ^a	355.9 $\pm$ 35.3 ^a	397.4 $\pm$ 50.1 ^{a,b}
D 组	158.7 $\pm$ 6.9	202.3 $\pm$ 10.4 ^a	228.2 $\pm$ 15.8 ^a	322.8 $\pm$ 19.0 ^a	355.6 $\pm$ 25.7 ^a	391.2 $\pm$ 33.0 ^{a,b}

注: 采用重复测量的方差分析。与 A 组相比, ^aP < 0.05, ^aP < 0.01; 与 B 组比较, ^bP < 0.01; 与 C 组比较, ^cP < 0.01; 与 D 组比较, ^dP < 0.05, ^dP < 0.01; n=10; 下表同

2.2 各组大鼠 Lee's 指数

与 A 组相比,第 6 周末, B 组 Lee's 指数下降 ($P<0.01$); 第 8 周末, D 组 Lee's 指数下降 ($P<0.05$) (表 2)。

各模型组之间比较,第 6 周末, B 组 Lee's 指数低于 C 组及 D 组(均为 $P<0.01$); 第 8 周末, C 组的 Lee's 指数高于 D 组 ($P<0.05$)。

表 2 各组大鼠 Lee's 指数比较

组别	第 6 周末	第 8 周末
A 组	3.05 ± 0.08 ^b	3.08 ± 0.06 ^D
B 组	2.81 ± 0.08 ^{a,c,d}	3.07 ± 0.08
C 组	3.07 ± 0.05 ^b	3.08 ± 0.10 ^D
D 组	3.06 ± 0.07 ^b	3.01 ± 0.05 ^{A,c}

注: Lee's 指数采用重复测量方差分析

2.3 各组大鼠相关生化指标

2.3.1 大鼠 SUA、UUA、SCr、UCr 含量 与 A 组相比,第 8 周末 B 组 SUA 升高 ($P<0.05$), 其余各模型组于第 6 周末、第 8 周末的 SUA 均略有升高, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$) (表 3)。

与 A 组相比,第 6 周末, D 组 UUA 浓度上升 ($P<0.01$), C 组和 B 组的 UUA 浓度分别略有升、降 (但 $P>0.05$); 第 8 周末, B 组、C 组及 D 组 UUA 的浓度上升 (均为 $P<0.01$)。

与 A 组相比,第 8 周末, D 组 SCr 浓度及 UCr 浓度均升高 (分别为 $P<0.01$ 、 $P<0.05$)。

各模型组之间比较,第 6、8 周末,各模型

组的 SUA 水平之间差异无统计学意义。

第 6 周末, B 组的 UUA 浓度低于 C 组 ($P<0.05$) 和 D 组 ($P<0.01$); C 组的 UUA 浓度高于 B 组而低于 D 组 (均为 $P<0.05$); D 组的 UUA 浓度高于 B 组 ($P<0.01$) 和 C 组 ($P<0.05$); 第 8 周末, B 组的 UUA 浓度低于 D 组 ($P<0.05$);

第 8 周末, D 组的 SCr 及 UCr 均值最高。D 组的 SCr 高于 C 组 ($P<0.05$), D 组的 UCr 高于 B 组 ($P<0.01$)。

2.3.2 大鼠排尿体积、尿酸排泄总量、FEUA 与 A 组相比 (表 4), 第 6 周末, B 组排尿体积增加、而 C 组、D 组的排尿体积减少 (均为 $P<0.05$); 第 8 周末, C 组、D 组的排尿体积减少 (均为 $P<0.01$)。与 A 组相比,第 6 周末, C 组、D 组尿酸排泄总量减少 (分别为 $P<0.01$ 、 $P<0.05$); 第 8 周末, B 组尿酸排泄总量增加 ($P<0.01$), D 组尿酸排泄总量减少 ($P<0.05$); 与 A 组相比,第 8 周末, B 组、C 组的尿酸排泄分数 (FEUA) 增加 (均为 $P<0.01$)。

各模型组之间比较,第 6 周末, B 组的排尿体积高于其余两个模型组 (均 $P<0.01$); 第 8 周末, B 组的排尿体积高于 C 组 ($P<0.05$) 和 D 组 ($P<0.01$)。

第 6、8 周末, B 组的尿酸排泄总量均高于 C 组和 D 组 (均 $P<0.01$); 第 8 周末, C 组的尿酸排泄总量低于 B 组 ($P<0.01$) 而高于 D 组 ($P<0.05$); D 组的尿酸排泄总量低于 B 组 ($P<0.01$) 和 C 组 ($P<0.05$)。

第 8 周末, 依 B 组 → C 组 → D 组, FEUA 逐渐下降, 但各模型组间差异无统计学意义。

2.3.3 大鼠 FPG、FINS、HOMA-IR 水平 与 A 组相

表 3 各组大鼠 SUA、UUA、SCr、UCr 水平的比较

组别	SUA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		UUA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$		SCr/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	UCr/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$
	第 6 周末	第 8 周末	第 6 周末	第 8 周末	第 8 周末	第 8 周末
A 组	191.4 ± 28.2	71.1 ± 11.1 ^B	504.8 ± 204.9 ^d	229.4 ± 118.3 ^{b, c, d}	19.3 ± 1.7 ^d	3.6 ± 2.3 ^D
B 组	212.3 ± 26.8	87.2 ± 15.3 ^A	370.5 ± 114.1 ^{C, d}	460.1 ± 107.6 ^{a, D}	20.5 ± 1.9	2.8 ± 0.6 ^d
C 组	195.1 ± 53.2	82.0 ± 20.5	650.9 ± 201.4 ^{B, D}	533.4 ± 95.1 ^a	20.1 ± 2.4 ^D	4.0 ± 1.5
D 组	217.3 ± 30.7	79.6 ± 8.2	908.2 ± 452.6 ^{a, b, C}	582.8 ± 176.6 ^{a, B}	22.0 ± 1.2 ^{a, C}	6.1 ± 2.7 ^{A, b}

注: 血、尿酸浓度采用重复测量方差分析, 血肌酐采用方差分析, 尿肌酐采用 log 转换后方差分析

表 4 各组大鼠排尿体积、尿酸排泄总量及尿酸排泄分数的比较

组别	排尿体积 /mL		尿酸排泄总量 / μmol		FEUA
	第 6 周末	第 8 周末	第 6 周末	第 8 周末	第 8 周末
A 组	11.0 ± 4.8 ^{B, C, D}	13.2 ± 7.0 ^{c, d}	4.8 ± 1.2 ^{c, D}	2.8 ± 1.8 ^{b, D}	2.1 ± 1.1 ^{b, C}
B 组	17.7 ± 9.7 ^{A, c, d}	10.8 ± 4.3 ^{C, d}	5.7 ± 1.6 ^{c, d}	4.6 ± 1.4 ^{a, c, d}	4.1 ± 0.9 ^a
C 组	4.4 ± 2.0 ^{A, b}	5.2 ± 2.9 ^{a, B}	2.9 ± 1.5 ^{a, b}	2.7 ± 1.3 ^{b, D}	3.6 ± 1.0 ^a
D 组	4.6 ± 2.2 ^{A, b}	2.5 ± 1.2 ^{a, b}	3.6 ± 1.0 ^{A, b}	1.4 ± 0.7 ^{A, b, C}	2.6 ± 1.0

注: 排尿体积、尿酸排泄总量采用重复测量方差分析

比(表5),第6周末,各组FPG值差异无统计学意义($P>0.05$);第8周末,D组FPG值升高($P<0.05$)。与A组相比,第6、8周末,C组、D组的FINS含量均下降(分别为 $P<0.05$ 、 $P<0.01$);第6、8周末,

B组FINS含量与A组差异均无统计学意义。FINS含量下降可能与胰岛损伤,胰岛素分泌减少有关。

第8周末,各模型组HOMA-IR指数值均下降,其中C组与A组的差异有统计学意义($P<0.05$)。

表5 各组大鼠FPG、FINS、HOMA-IR的比较

组别	FPG/mmol · L ⁻¹		FINS/mIU · L ⁻¹		HOMA-IR	
	第6周末	第8周末	第6周末	第8周末	第6周末	第8周末
A组	5.50 ± 0.95	8.53 ± 0.96 ^D	21.61 ± 2.94 ^{C,D}	17.66 ± 2.85 ^{C,D}	5.30 ± 1.25	6.67 ± 1.19
B组	5.66 ± 0.90	7.98 ± 0.69 ^d	21.18 ± 2.08 ^C	16.98 ± 1.76 ^{C,D}	5.31 ± 0.85	6.03 ± 0.88 ^D
C组	6.35 ± 1.07 ^D	9.33 ± 1.94	18.38 ± 4.44 ^{A,B}	11.61 ± 3.21 ^{a,b}	5.02 ± 0.77	4.94 ± 2.19 ^{A,D}
D组	5.44 ± 0.52 ^C	12.04 ± 6.42 ^{A,B}	18.51 ± 2.95 ^A	12.44 ± 4.05 ^{a,b}	4.47 ± 0.82	6.29 ± 2.48 ^{B,C}

注:空腹血糖、胰岛素含量采用重复测量方差分析

各模型组之间比较,第6周末,C组的FPG水平高于D组($P<0.05$);第8周末,B组的FPG水平低于D组($P<0.05$);D组的FPG水平高于B组($P<0.01$)。

第6周末,B组的FINS水平高于C组($P<0.05$);第8周末,B组的FINS水平高于C组、D组(均为 $P<0.01$)。

第8周末,D组的HOMA-IR指数值高于B组、C组(均为 $P<0.05$)。

2.4 大鼠肾脏、胰腺及小肠组织的病理变化

各组大鼠肾脏组织病理检测可见肾小管扩张($\leq 20\%$),肾小球形态规则,未见异常病理改变;胰腺组织病理检测可见腺泡萎缩,分泌减少($>40\%$);小肠组织病理检测可见肠绒毛萎缩($>40\%$);显示A组及各模型组的肾脏、胰腺、小肠组织的病理检测结果无明显差异(图1)。

3 讨论

本实验基于临床HUA常与MS的组分聚集出现即HUA常伴有IR的临床特征^[9],提出模拟人类HUA乃至MS发病的常见饮食习惯,以高脂高果糖膳食喂饲联合酵母膏灌胃诱导IR-HUA大鼠模型,期望为制备IR-HUA动物模型创建新的方法,并为研究IR在HUA发病机制中的作用,以及HUA治疗药物的研究开发提供新的HUA动物模型。

为探索有效、稳定、优化的IR-HUA模型的制备方法,本文开展了IR-HUA模型、HUA模型、IR模型的制备及其比较研究,上述三种动物模型的评价方法参考杨传经等文献^[10,11]报道制订:①IR-HUA

模型:SUA、HOMA-IR水平大于A组均数+2倍标准差,则可判定IR-HUA模型造模成功,IR-HUA模型大鼠在SUA升高的同时存在HOMA-IR指数、Lee's指数均升高等IR表现;②HUA模型血清SUA水平大于A组均数+2倍标准差者为HUA合格动物模型;③IR模型血清FPG、HOMA-IR水平大于A组均数+2倍标准差者,则可判定合格IR动物模型。

结果显示,造模6周时各组大鼠模型特征不明显。实验第8周末,各模型组动物的表现如下:

①B组的SUA、UUA均升高,尿酸排泄总量增加,FEUA升高,显示HUA模型初步显现,提示给予大鼠酵母膏每日16 g/kg灌胃21 d可制备HUA模型,但需增加酵母膏灌胃的剂量,以期增加SUA升高的幅度。②C组的UUA和FEUA升高,INS下降、HOMA-IR值下降、排尿体积减少;FPG、SUA升高,但差异无统计学意义;Lee's指数值、UUA排泄总量均无明显变化;提示给予大鼠喂饲高脂高糖饲料、饮用10%果糖水5周后再予酵母膏每日16 g/kg灌胃21 d,制备的IR-HUA模型FPG、SUA升高幅度不足,IR表现不明显,模型欠理想。③D组的FPG、UUA水平升高,Lee's指数、FINS、排尿体积及UUA排泄总量下降;而SUA、FEUA略升高、HOMA-IR值略下降,但均无统计学意义;提示给予大鼠喂饲自配高脂高糖饲料、饮用10%果糖水造模8周制备的IR模型,虽FPG升高、但HOMA-IR值亦略下降,该IR模型尚欠理想,可能造模时间较短之故。实验结果显示,SUA升高多伴随着UUA、FEUA的升高,提示SUA的升高,导致肾脏尿酸排泄增加,UUA浓度上升。

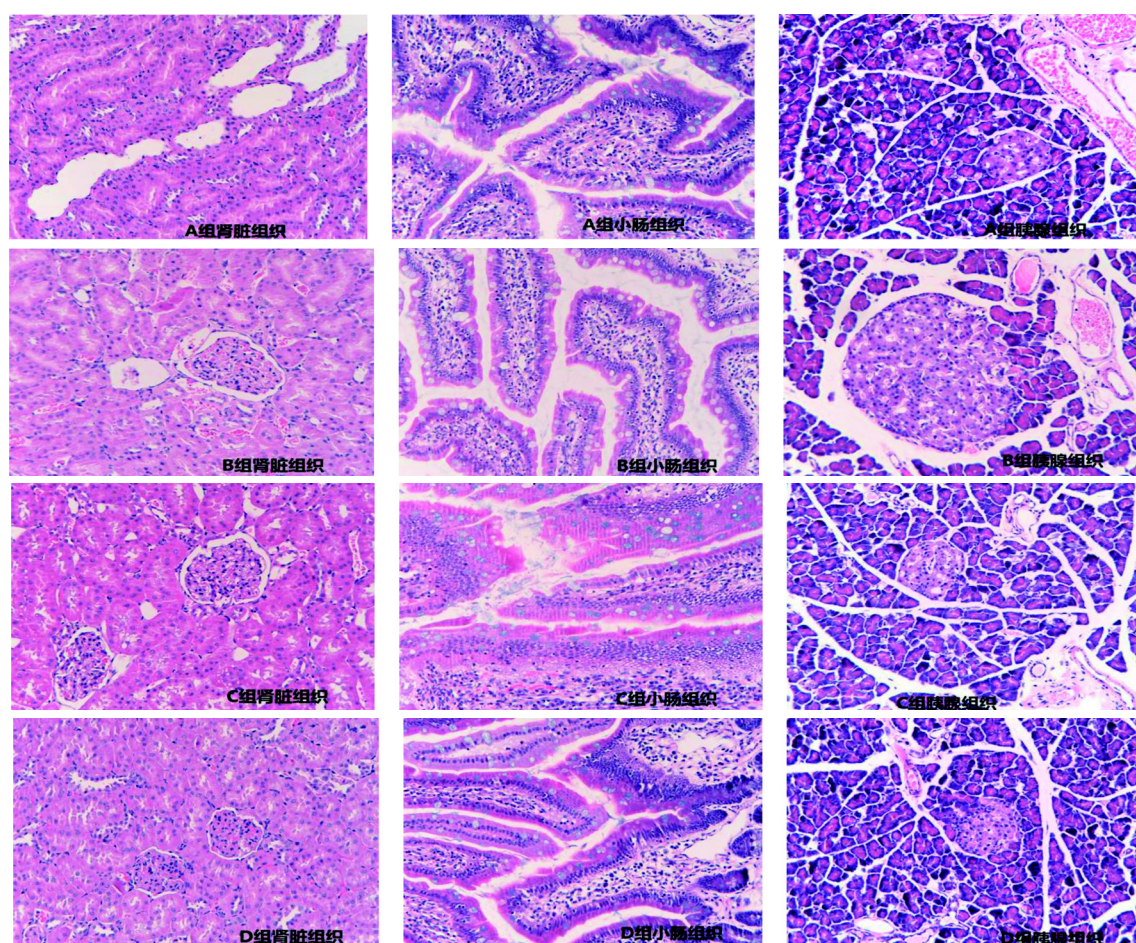


图1 各组大鼠肾脏、小肠、胰腺组织病理学观察 (HE × 200)

本实验D组的SCr、UCr同步升高,提示SCr浓度升高,可致UCr排泄增加,UCr浓度升高。实验结果表明,高脂高糖饮食可致大鼠排尿体积减少,尿酸排泄下降;并可致大鼠胰岛素分泌减少,导致血糖升高。实验结束后,各组大鼠肾脏、胰腺、小肠组织的病理检测结果未见明显差异,提示本实验各造模条件未造成大鼠组织的病理性损害。

综上所述,本实验结果表明,雄性SD大鼠酵母膏每日16 g/kg灌胃21 d可制备HUA模型。可能因造模时间过短,单纯给予高脂高糖饮食8周诱导大鼠IR模型,大鼠未出现明显的IR特征。因此,以高脂高果糖膳食喂饲联合酵母膏灌胃诱导大鼠IR-HUA模型,亦有待进一步完善造模方法,是否高脂高果糖饲料口感不佳、以及灌胃酵母膏可影响大鼠食欲,导致摄食减少及体质量减轻明显,可能亦是建模不理想的原因。

参考文献:

- [1] 郑敏,麻骏武. 高尿酸血症和痛风的遗传学研究进展[J]. 遗传, 2016, 38(4):300-313.
- [2] 朱文玲. 高尿酸血症合并心血管病诊治专家共识解读[J]. 中国心血管杂志, 2010, 15(6):412-414.
- [3] Kushiya A, Tanaka K, Hara S, et al. Linking uric acid metabolism to diabetic complications [J]. World J Diabetes, 2014, 5(6):787-795.
- [4] 郭立新. 无症状高尿酸血症合并心血管疾病诊治建议中国专家共识解读[J]. 中国实用内科杂志, 2011, 31(4):271-273.
- [5] Adeyanju OA, Michael OS, Soladoye AO, et al. Blockade of mineralocorticoid receptor ameliorates oral contraceptive-induced insulin resistance by suppressing elevated uric acid and glycogen synthase kinase-3 instead of circulating mineralocorticoid[J]. Arch Physiol Biochem, 2018, 13:1-10. doi: 10.1080/13813455.2018.1509220.

- [6] 魏凤江, 蔡春友, 时文涛, 等. 2型糖尿病合并高尿酸血症与胰岛素抵抗、血脂及血压相关性的研究[J]. 中国糖尿病杂志, 2013, 21(2):97-99.
- [7] 谢彦鹏, 钟锋, 肖光文. 腹型肥胖患者高尿酸血症与胰岛素抵抗的相关性研究[J]. 中国医学工程, 2014, 22(1):25,27.
- [8] 常颂桔, 黄伟. 高尿酸血症与高血压及糖尿病相关性研究进展[J]. 中国医疗前沿, 2012, 7(23):11-13.
- [9] Shahataa MG, Mostafa-Hedeab G, Ali EF, et al. Effects of telmisartan and pioglitazone on high fructose induced metabolic syndrome in rats[J]. Can J Physiol Pharmacol, 2016,94(8):907-917.
- [10] 杨传经, 李雪梅, 孔德明, 等. 单味中药黄芪改善胰岛素抵抗对血尿酸影响的相关性研究[J]. 时珍国医国药, 2009, 20(7):1621-1623.
- [11] 刘孟渊. 中药干预尿酸转运蛋白及基因表达的研究进展[J]. 上海中医药杂志, 2018, 52(8):93-97.

Establishment and Comparison of Rat Models of Insulin Resistance Combined with Hyperuricemia

LIU Meng-yuan¹, FENG Xue-xuan², LI Li-si², ZHANG Mei-yi¹

(1. Guangzhou Hospital of TCM, Guangzhou 510130, China;

2. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China)

[Abstract] Objective To prepare successful, stable and optimized insulin resistance combined with hyperuricemia (IR-HUA) models, the preparation methods of IR-HUA model, HUA model and IR model in rats were compared. **Method** Totally 40 male SD rats were randomly divided into the normal control group (A), the HUA model group (B), the IR-HUA model group (C), and the IR model group (D). The group A and group B were fed with the ordinary feed and drinking water, the group C and group D were fed with the high fat feed and high sugar diet and drinking 10% fructose water. During 8 weeks for modeling, at sixth weeks, rats in group B and group C were fed with yeast extract (16 g/kg/per day) 21d, At the end of sixth, eighth week, the observation index were detected. **Result** At the eighth weekend of the experiment, compared with group A, the concentrations of serum uric acid (SUA) and urine uric acid (UUA), total uric acid excretion and the fraction excretion of uric acid (FEUA) in group B increased; The levels of fasting insulin (FINS) and HOMA-IR index, and urination volume in group C decreased; the concentration of UUA and FEUA in group C increased; the levels of Lee 's index, FINS, urination volume, and total uric acid excretion in group D declined, the concentrations of fasting plasma glucose(FPG), UUA, serum creatinine (SCr) and uric creatinine (UCr) in group D increased. **Conclusion** HUA model could be prepared in SD rats by fed with yeast extract 16 g/kg/per day for 21d. The IR model in SD rats induced by high fat and high sugar diet for 8 weeks was not ideal, it could be due to the shorter molding time. The rat model showed no obvious characteristics of IR. The preparation method of IR-HUA model needs to be further improved. In addition, high-fat and high-sugar diet can reduce the volume of urine and the excretion of uric acid in rats, and reduce the secretion of insulin in rats, leading to the increase of FPG.

[Key words] Insulin resistance combined with Hyperuricemia (IR-HUA); Fasting plasma glucose (FPG); Animal model

树鼩肺成纤维细胞的分离、鉴定和传代培养

王文广, 匡德宣, 陆彩霞, 罕园园, 李娜, 全品芬, 孙晓梅, 代解杰

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心、

云南省重大传染病疫苗研发重点实验室、云南省眼科疾病防治研究重点实验室、

中国医学科学院医学生物学研究所实验树鼩标准化与应用研究省创新团队, 昆明 650118)

[摘要] 目的 建立适用于树鼩肺成纤维细胞的分离、鉴定和传代培养方法。方法 分别采用组织块贴壁培养法和胰酶消化法, 分离培养新生树鼩肺成纤维细胞, 通过倒置显微镜观察细胞生长情况, 用波形蛋白(Vimentin)对分离的成纤维细胞进行免疫荧光鉴定; 传代培养并开展冻存复苏实验, 采用 MTS 法绘制细胞生长曲线, 以人胚肺二倍体成纤维细胞(KMB-17)作对照。结果 通过组织块贴壁培养法和胰酶消化法均可获取树鼩肺成纤维细胞, 细胞主要呈现梭形, 波形蛋白免疫荧光鉴定普遍呈阳性, 与 KMB-17 一致。树鼩肺成纤维细胞可连续传代 4~5 次, 经冻存复苏后细胞仍能保持活力, 以 5×10^4 细胞/mL 的密度传代, 细胞可在 3 d 左右进入对数生长期。结论 组织块贴壁培养法和胰酶消化法均可有效获取树鼩的肺成纤维细胞, 可为肺部相关疾病的体外研究提供实验材料。

[关键词] 树鼩; 肺成纤维细胞; 鉴定; 传代培养

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0105-06

树鼩是一种新开发的极具潜力的实验动物资源, 与灵长类动物的进化关系比啮齿类动物更接近, 其免疫系统、神经系统中关键调节因子和信号通路与非人灵长类动物及人类有很高的同源性、保守性, 并有其独特的特征^[1], 因此越来越受到科研人员的重视。人们先后利用树鼩在病毒感染、肿瘤、内分泌、神经和视觉等方面进行了深入的研究, 也成功建立了多种病毒感染树鼩的动物模型, 树鼩有望在许多方面作为非人灵长类的替代动物而被广泛应用于生命科学研究^[2]。

同时, 基于树鼩细胞水平的体外研究也逐渐

发展, 目前文献报道的包括树鼩的原代肝细胞^[3]、肝枯否细胞^[4]、海马神经干细胞^[5]、脑星形胶质细胞^[6]、淋巴细胞^[7]、角膜上皮细胞^[8]和骨髓间充质干细胞^[9]等成功分离培养和应用, 一方面可在尽量减少个体差异干扰的情况下对体内模型起到补充验证作用, 另一方面也为各种疾病相关机制的探讨和药物的筛选提供了很好的体外实验平台。

本研究尝试建立一套树鼩肺成纤维细胞的分离、鉴定和传代培养方法, 以期因环境问题而日渐高发的各种肺病或其他感染性疾病研究提供新的实验材料。

1 材料与方法

1.1 实验动物和细胞

经人工繁育幼龄树鼩, 来自中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心[SCXK(滇) K2018-0002], 饲养于普通环境[SYXK(滇) K2018-0002]。对照用人胚肺二倍体成纤维细胞(KMB-17), 来自中国医学科学院医学生物学研究所。

[收稿日期] 2018-10-09

[基金项目] 云南省应用基础研究面上项目(编号: 2018FB045); 云南省科技人才和平台计划项目(编号: 2017HC019); 重点实验室运行补助专项(编号: 2017DG008); 云南省重大科技专项(编号: 2017ZF007)。

[作者简介] 王文广(1985-), 男, 助理研究员, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: windgoon@foxmail.com

[通信作者] 代解杰(1961-), 男, 研究员, 研究方向: 疾病动物模型研究。E-mail: dj@imbcams.com.cn

1.2 主要仪器及试剂

倒置荧光相差显微成像系统(ECLIPSE)购自日本尼康公司, CO₂ 培养箱购自美国 Thermo 公司, PowerWave XS2微孔板分光光度计购自美国 BioTek 公司, DMEM 培养基和胰蛋白酶购自美国 HyClone 公司, 胎牛血清购自以色列 BI 公司, MTS 一步法细胞活力检测试剂盒购自美国 Promega 公司, Vimentin 波形蛋白抗体购自德国 Merck Millipore 公司, DMSO 购自美国 Solarbio 公司, 一步法细胞冻存液 Ori Cell™ NCR Protein-Free Cryopreservation Medium 购自美国 Cyagen 公司。

1.3 方法

1.3.1 树鼩肺组织取材 选取新生2 d左右被母树鼩弃养的幼树鼩, 注射 1 mL 质量分数为 1% 戊巴比妥钠过量麻醉处死; 先以体积分数 75% 酒精浸泡消毒, 再用含体积分数 1% 双抗的 PBS 冲洗一次, 剪开胸腔, 取出肺组织, 剔除胸膜以及气管、支气管和血管较为集中的肺组织, PBS 冲洗 3 次后剪成 1 mm³ 组织小块备用。

1.3.2 组织块贴壁法培养树鼩肺成纤维细胞 用一次性巴氏吸管将 1.3.1 中肺部组织小块转入 25 cm² 细胞培养瓶中, 均匀分布, 静置 2~3 min 后轻轻翻转培养瓶, 加入 3 mL 含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 于 CO₂ 培养箱中 37 °C 倒置培养 1~2 h, 待组织块贴牢后轻轻翻转培养瓶正置培养。培养期间根据生长情况更换培养液, 使用倒置显微镜观察拍照。

1.3.3 酶消化法培养树鼩肺成纤维细胞 取 1.2.1 中所得肺组织小块, 按约 1:5 的体积比例加入质量分数 0.1% 胰酶, 37 °C 下振荡消化约 20 min, 至大部分组织块消化为细胞悬液; 加入等体积的 DMEM 完全培养液(含体积分数 10% 胎牛血清), 终止消化; 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清; 加入 4 mL DMEM 完全培养液重悬, 转入 25 cm² 培养瓶中, 于 CO₂ 培养箱中 37 °C 培养过夜; 第二日倒去培养液并用 PBS 洗去组织小块和未贴壁细胞, 加完全培养基继续培养。

1.3.4 树鼩肺成纤维细胞的传代培养 对原代培养的树鼩肺细胞进行定期观察, 当细胞铺满瓶底 80% 左右面积即可进行首次传代, 经 PBS 润洗后, 加质量分数 0.25% 胰酶消化, 用含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液终止, 并按照 1:2 进行传代培养, 定期观察拍照。采用差速贴壁法进

行纯化, 即消化传代的细胞 37 °C 贴壁培养 3 h 左右, 倒掉培养液并用 PBS 润洗以除去未贴壁细胞, 然后补足完全培养液继续培养。

1.3.5 树鼩肺成纤维细胞的免疫荧光鉴定 消化第二代树鼩肺细胞接种至 12 孔板, 培养 2 d 待其大部分长成细胞单层, PBS 清洗 2 次, 使用质量分数 4% 的多聚甲醛溶液固定 20 min; PBS 清洗 3 次, 用质量分数 0.5% 的 Triton-X100 穿孔 15 min; PBS 漂洗 3 次, 山羊血清封闭液封闭 30 min; PBS 漂洗 3 次, 加入经质量分数 3% 的 BSA 稀释的小鼠源 Vimentin 一抗(1:500)进行孵育, 4 °C 过夜; PBS 漂洗 3 次, 加入经质量分数 1% 的 BSA 稀释的荧光标记的兔抗鼠 IgG 二抗(1:500), 37 °C 避光孵育 1 h; 暗光环境中, PBS 漂洗 3 次, 滴加 DAPI 避光孵育 2 min, 对标本进行染核; PBS 漂洗 3 次, 洗去多余的 DAPI; 在荧光显微镜下进行观察。

1.3.6 树鼩肺成纤维细胞的冻存和复苏 选取状态良好的第三代树鼩肺成纤维细胞, 分别采用 DMSO 和一步法细胞冻存液 NCR Protein-Free Cryopreservation Medium 进行细胞的冻存。分别复苏细胞, 通过形态观察和细胞生长曲线的绘制来评价细胞复苏后的活力。

DMSO 冻存法: 取约 90% 长满瓶底的树鼩肺成纤维细胞, 质量分数 0.25% 胰蛋白酶消化, 用完全培养液吹打制成细胞悬液, 移至 15 mL 离心管中; 1 200 r/min 离心 5 min, 吸弃上清; 加入含体积分数 10% DMSO 的细胞冻存液重悬细胞, 转入细胞冻存管中, 细胞密度控制在 10⁵/mL~10⁶/mL; 将封好的冻存管于 4 °C 放置 15 min, 然后转入 -20 °C 放置 30 min, 再转入 -80 °C 过夜, 之后放入液氮长期保存。

一步法细胞冻存: 前期操作同 DMSO 法, 消化细胞, 制成细胞悬液, 移至 15 mL 离心管中; 1 200 r/min 离心 5 min, 吸弃上清; 加入一步法细胞冻存液 NCR Protein-Free Cryopreservation Medium, 重悬细胞, 转入细胞冻存管中, 细胞密度控制在 10⁵/mL~10⁶/mL; 将封好的冻存管直接转入 -80 °C 冰箱, 24 h 后转入液氮长期保存。

细胞复苏: 将细胞冻存管从液氮中取出后, 立即放入 37 °C 左右的温水中, 不断晃动, 使其迅速完全融化; 用体积分数 75% 乙醇消毒冻存管表面后移至超净工作台, 用加样枪将细胞悬液转至 15 mL

离心管中, 1 200 r/min 离心 5 min, 弃上清; 用适量 DMEM 完全培养液重悬细胞, 转入细胞培养瓶内, 于 CO₂ 培养箱中 37 °C 培养观察; 另留取适量复苏细胞重悬液台盼蓝染色, 通过细胞计数, 计算细胞的存活率。

1.3.7 细胞生长曲线 选择连续传代培养的和经两种方式冻存复苏处理的第 4 代树鼩肺成纤维细胞为对象, 以 KMB17 为对照, 按 MTS 法连续 7 d 测定细胞活力, 绘制细胞的生长曲线。贴壁完全树鼩肺成纤维细胞, 以质量分数 0.25% 胰酶消化后制备密度为 5×10^4 /mL 的细胞悬液, 按每孔 200 μ L 接入 96 孔板, 体积分数 5% CO₂ 培养箱中 37 °C 连续培养 7 d, 每 2 d 换液 1 次; 每隔 24 h, 对照组、空白组和实验组各取 3 个复孔, 每 100 μ L 培养液加入 20 μ L CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent, 孵育 2 h 后, 分光光度计读取 490 nm 波长下的吸光度(A)值; 连续测定 7 d 后, 根据培养时间和对应的吸光度值绘制各细胞的生长曲线。

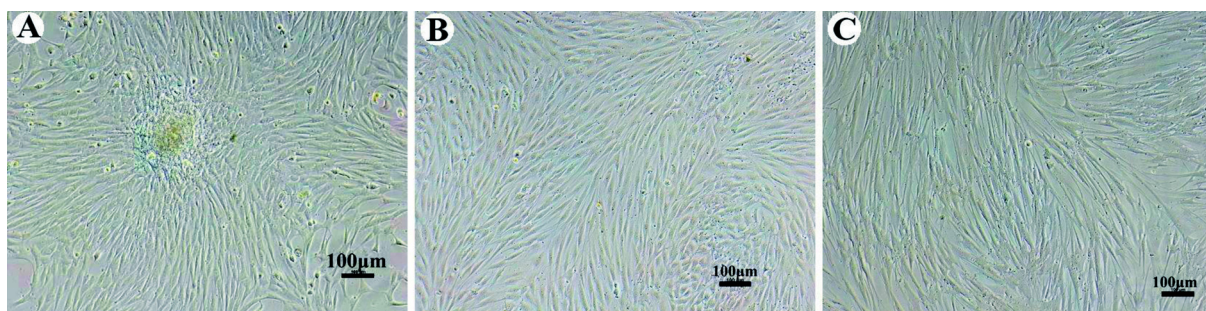
2 结果

2.1 树鼩肺细胞的原代培养

组织块贴壁法培养树鼩原代肺细胞, 2 d 左右可见细胞从肺组织块周边迁出, 随后不断扩大范围, 一般培养 7 d 左右新生细胞可以铺满培养瓶底约 80% 的面积, 培养 6 d 的细胞形态见图 1A, 多数成纤维状; 胰酶消化法培养周期相对较短, 2 d 左右可见基本长满瓶底, 细胞形态多呈现为梭形(图 1B); 两种方法均可培养出树鼩原代肺细胞, 并且多数细胞均呈梭形, 与 KMB-17(图 1C)大致相似。

2.2 树鼩肺细胞传代培养

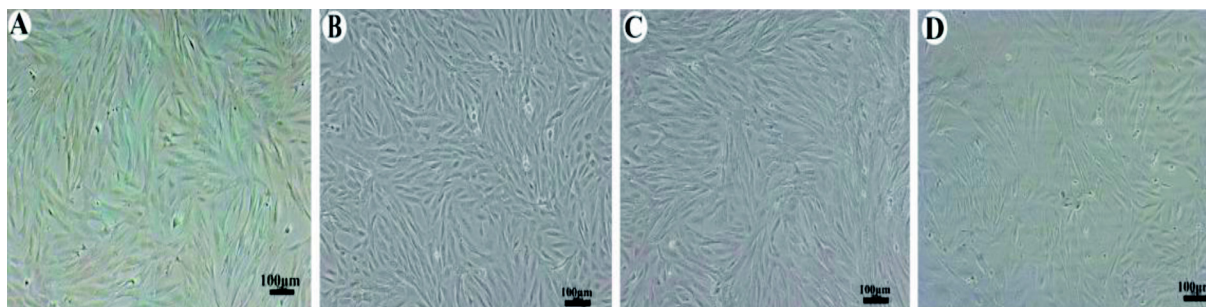
树鼩肺细胞经过原代培养形成细胞单层后, 即可进行传代, 通过差速贴壁法进行纯化, 培养 2 d 可见形成的细胞单层普遍表现出纤维状形态, 连续进行 4 次传代, 在倒置显微镜下观察细胞状态基本能够保持一致(图 2), 但成纤维细胞的纯度尚需进一步的鉴定。



A: 组织块贴壁法(6 d); B: 胰酶消化法(2 d); C: 对照细胞 KMB-17(2 d)

图 1 树鼩原代肺细胞培养形态

Figure 1 Culture morphology of primary pulmonary cells of tree shrew



A: 第 2 代; B: 第 3 代; C: 第 4 代; D: 第 5 代

图 2 树鼩肺细胞传代培养形态 (2 d)

Figure 2 Subculture morphology of tree shrew pulmonary cells (2 d)

2.3 树鼩肺成纤维细胞的鉴定

使用波形蛋白抗体 Vimentin 对培养的第3代树鼩肺细胞进行免疫荧光鉴定,以 KMB-17 细胞为对照,如图3所示,可见树鼩肺细胞波形蛋白普遍呈现绿色荧光,证明所培养细胞为成纤维细胞,纯度比例高达95%以上。

2.4 树鼩肺成纤维细胞的冻存与复苏

树鼩肺成纤维细胞的冻存分别采用了传统的DMSO法和一步法细胞冻存液 NCR Protein-Free Cryopreservation Medium进行,分别对复苏细胞计数,计算出DMSO法冻存复苏后细胞存活率77.5%,一步法试剂冻存复苏后细胞的存活率为82%。细胞复苏后24 h的形态见图4,可以看出两种方法冻存的细胞均能顺利恢复,并保持均一的成纤维细胞形态,而具体的细胞活力则通过细胞生长曲线的绘制来评价。

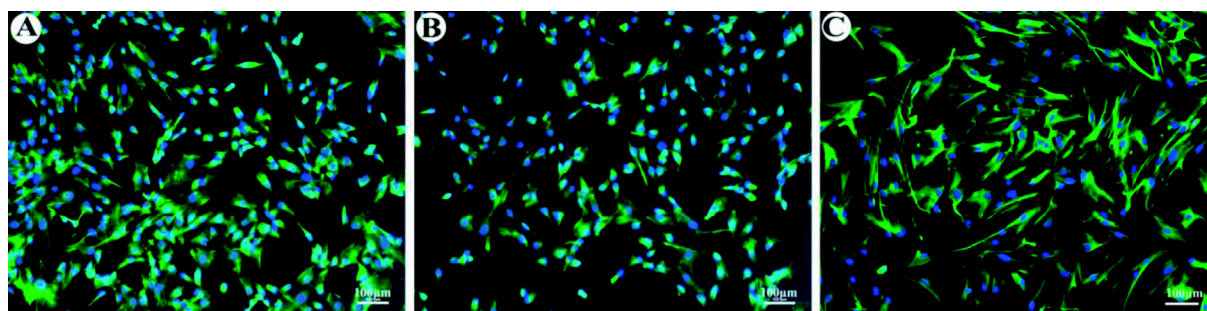
2.5 细胞生长曲线

MTS 法连续7 d测定细胞活力,根据490 nm

波长下的吸光度值绘制出细胞生长曲线如图5所示,可以看出各细胞生长状态大致呈现出经典的S型,先经过1~2 d恢复期,在3~4 d开始迅速增殖,基本从第5日开始维持在一个平台期,与正常连续传代的细胞相比,复苏后的树鼩肺成纤维细胞仍保持着良好的细胞活力,DMSO和一步法冻存液的冻存复苏效果基本一致。

3 讨论

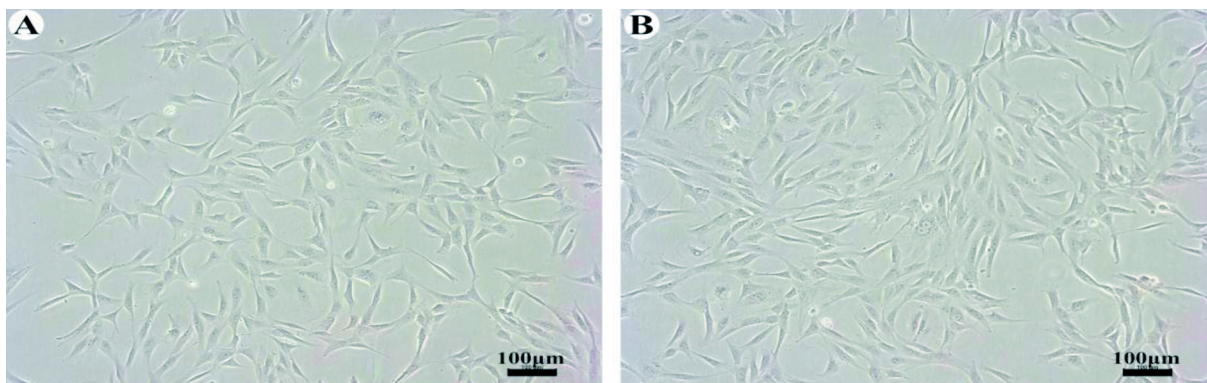
肺脏是呼吸系统的主要器官,大多数呼吸系统疾病的发展都与肺部密切相关,树鼩也曾先后被应用于各种人类呼吸系统疾病的研究。肺癌是目前死亡率最高的恶性肿瘤之一,陈小波等^[10]应用宣威烟煤粉尘PM10对树鼩行气管内灌注,研究表明宣威烟煤粉尘可以导致树鼩支气管上皮出现支气管粘膜上皮过度增生-鳞状化生-不典型增生-早期浸润癌的病理变化,有望利用树鼩建立宣威烟煤粉尘致



A: 组织块贴壁法; B: 胰酶消化法; C: 对照细胞 KMB-17

图3 树鼩第3代肺成纤维细胞的免疫荧光鉴定

Figure 3 Immunofluorescence identification of the third generation pulmonary fibroblasts of tree shrew



A: DMSO 法冻存; B: 一步法试剂冻存

图4 复苏后的树鼩肺成纤维细胞形态(24 h)

Figure 4 Morphology of tree shrew pulmonary fibroblasts after recover (24 h)

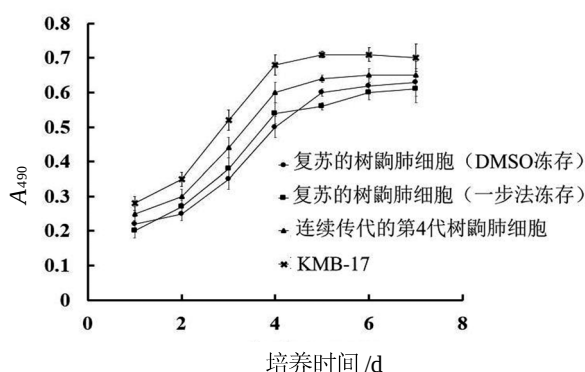


图5 树鼩肺成纤维细胞生长曲线

Figure 5 Growth curve of tree shrew pulmonary fibroblasts

肺癌模型。甲型 H1N1 流感曾在全球范围内大规模流行, 研究^[11]表明人的 H1N1 流感病毒可在树鼩的上呼吸道复制, 使其表现出轻微或中度的呼吸道症状及呼吸道的病理变化, 广泛分布于气管和鼻黏膜的受体是 sialic acid (SA)a2,6-gal, 而肺组织中的主要受体是(SA)a2,3-gal。

树鼩肺部细胞的分离培养及体外感染模型的建立, 对相关疾病的发病机制研究或药物筛选具有重要应用价值。成纤维细胞是肺组织中重要的间质细胞, 主要功能是参与肺脏的组织构架、合成和分泌胞外基质以及修复损伤组织等^[12]。肺成纤维细胞是体外研究慢性阻塞性肺疾病、肺纤维化等肺部相关疾病的重要实验材料, 其常见的分离培养方法有组织块贴壁法^[13]和酶消化法^[14]。本研究采用上述两种主流方法对树鼩肺成纤维细胞进行分离培养, 鉴于肺组织中有大量的血管和毛细血管、气管和支气管以及肺泡等, 这些材料均会影响成纤维细胞的培养纯度, 因此在进行组织取材时, 优先剪取各叶肺边缘区域组织, 尽量避开核心区域比较密集的血管和气管。组织块贴壁法培养 2 d 后可观察到细胞从组织块周边迁出, 7 d 左右细胞可大体铺满培养瓶底, 胰酶消化法则在 3 d 左右即可观察到细胞基本铺满瓶底, 两者均以成纤维状细胞为主, 与人胚肺二倍体成纤维细胞 KMB-17 相似。培养过程中, 不同细胞的贴壁时间不一样, 成纤维细胞贴壁最快, 而且经胰酶消化时也较易脱落, 因此, 可利用差速贴壁法对肺成纤维细胞进行纯化。传代时消化时间不要过久, 2 min 左右为宜, 及时终止消化并吹打细胞, 对胰酶不太敏感的细胞则滞留在培养瓶底; 细胞贴壁培养 2 h 左右, 进行换液, 除

去贴壁慢的其他细胞, 如此进行 2 ~3 次重复即可实现纯化。

成纤维细胞特异表达波形蛋白, 本研究使用小鼠源的波形蛋白抗体 Vimentin 对培养的第 3 代树鼩肺细胞进行免疫荧光鉴定, 同样以 KMB-17 为对照, 树鼩肺成纤维细胞普遍呈现绿色荧光, 其纯度在 95% 以上, 证明实验中所采用的树鼩肺成纤维细胞分离培养和纯化方法是可行的。

树鼩肺成纤维细胞使用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 可连续进行传代 4~5 次, 第 4~5 代细胞保持均一形态, 生长旺盛, 可用来开展相关实验。传至第 6 代以后, 细胞形态开始变化, 有不规则的空泡状细胞出现, 而且生长速度变慢, 长满单层时间延长, 不能继续传代, 因此, 需要及时对状态良好的树鼩肺成纤维细胞进行冻存。本研究选取第 3 代树鼩肺成纤维细胞, 分别采用传统的 DMSO 和一步法冻存试剂进行了细胞的冻存与复苏实验, 通过形态观察和生长曲线绘制进行活力评价, 表明两种方法均可有效冻存细胞, 细胞复苏后可仍保持良好的活力, 其中一步法冻存试剂操作便捷, 省时省力, 可有效减少人为操作的误差, 比较适合树鼩肺成纤维细胞的冻存。

参考文献:

- [1] Yao YG. Creating animal models, why not use the Chinese tree shrew (*Tupaia belangeri chinensis*) [J]. Zool Res, 2017, 38 (3):118-126.
- [2] Xiao J, Liu R, Chen CS. Tree shrew (*Tupaia belangeri*) as a novel laboratory disease animal model[J]. Zool Res, 2017, 38(3): 127-137.
- [3] 张顶, 高丽, 张远旭, 等. 树鼩肝细胞体外分离培养体系的复建及主要影响因素分析[J]. 动物学研究, 2009, 30(1): 24-30.
- [4] 阮萍, 杨春, 欧超, 等. 树鼩肝枯否细胞的分离及鉴定[J]. 临床与实验病理学杂志, 2014, 30(2):159-163.
- [5] 吴元杭, 欧阳轶强, 黄玲, 等. 新生树鼩海马神经干细胞的体外培养与鉴定[J]. 广西医学, 2012, 24(3):257-260.
- [6] 龚敏, 李树清, 李凡. 树鼩脑星形胶质细胞的体外培养及纯化[J]. 生理学报, 2011, 63(1):89-92.
- [7] 张理超, 张捷, 付必莽, 等. 树鼩淋巴细胞的快速分离和分析方法的初步建立[J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2013, 35(S2):359- 363+367.
- [8] 苗雨润, 宋庆凯, 匡德宣, 等. 树鼩角膜原代上皮细胞的分离培养、纯化与鉴定[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37 (2):130-135.

- [9] 陆彩霞, 李晓飞, 王文广, 等. 树鼩骨髓间充质干细胞体外分离培养及成脂成骨诱导[J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(3):10-13+84-85.
- [10] 陈小波, 贺猛, 李光剑, 等. 宣威烟煤粉尘诱发树鼩支气管黏膜上皮改变的研究[J]. 中国肺癌杂志, 2015, 18(8):469-474.
- [11] Yang Z F, Zhao J, Zhu Y T, et al. The tree shrew provides a useful alternative model for the study of influenza H1N1 virus[J]. Virol J, 2013, 10(1):111.
- [12] 高建, 刘干, 李俊. 肺成纤维细胞在肺纤维化进程中的作用[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(9):1125-1129.
- [13] 邓佳慧, 肖军花, 王嘉陵. 成年小鼠肺成纤维细胞分离纯化及原代培养[J]. 基础医学与临床, 2012, 32(6):713-714.
- [14] 连敏, 叶燕青, 汪甜, 等. 新生大鼠肺成纤维细胞的原代培养改良法及细胞鉴定[J]. 氨基酸和生物资源, 2014, 36(1):27-31.

Isolation, Identification and Subculture of Pulmonary Fibroblasts in Tree Shrew

WANG Wen-guang, KUANG De-xuan, LU Cai-xia, HAN Yuan-yuan,

LI Na, TONG Pin-fen, SUN Xiao-mei, DAI Jie-jie

(Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, the Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College; Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases; The Key Laboratory of Yunnan Province for Ophthalmic Research and Disease Control; Yunnan Innovation Team of Standardization and Application Research in Tree Shrew, Kunming 6500118, China)

[Abstract] Objective To establish a reliable method for isolation, identification and subculture of pulmonary fibroblasts in tree shrew. **Methods** Pulmonary fibroblasts of neonatal tree shrew were isolated and cultured by tissue adherence culture and trypsin digestion respectively. The fibroblasts was observed by inverted microscope and identified by immunofluorescence with Vimentin. Then the pulmonary fibroblasts was subcultured, and cryopreservation and recovery experiments were carried out. The cell growth curve was drawn by MTS method, and human embryonic lung diploid fibroblasts (KMB-17) were used as control. **Results** Tree shrew pulmonary fibroblasts could be obtained by both tissue adherence culture and trypsin digestion. The cells were mainly spindle-shaped, and vimentin immunofluorescence assay were generally positive, which were consistent with KMB-17. Tree shrew pulmonary fibroblasts can be subcultured 4-5 times continuously. After cryopreservation and recovery, the cells can still remain viable and enter the logarithmic growth phase about 3 days later with a cell density of 5×10^4 cells/mL. **Conclusion** The pulmonary fibroblasts in tree shrew can be effectively obtained by tissue adherence and trypsin digestion, which will be very helpful for the study of lung-related diseases *in vitro*.

[Key words] Tree shrew; Pulmonary fibroblast; Identification; Subculture

基于多重 PCR 靶向二代测序的近交系小鼠遗传质量监测方法建立

钱 强¹, 徐 园¹, 王亚恒¹, 周宇荀¹, 肖君华¹, 韩 琳², 鲍世民³, 李 凯¹

(1. 东华大学化学化工与生物工程学院, 上海 201620;

2. 上海市第十人民医院, 上海 200072;

3. 中国科学院上海生命科学院, 上海 200031)

[摘要] 目的 建立基于多重PCR靶向二代测序的小鼠遗传质量监测方案。方法 从小鼠单核苷酸多态性(SNP)数据库筛选出相对均匀分布在20条染色体上的112个SNP位点, 然后对SNP位点附近片段进行多重PCR扩增, 建库后进行Illumina高通量测序, 对原始测序数据进行生物信息学分析获得SNP信息。结果 测序结果显示, 多重PCR的扩增子均一性好, 各片段成功率高达90%以上, 特异性高, 高深度测序条件下, SNP位点的等位基因比例趋近于1或0, 符合纯合子条件; 分析4批近交系小鼠样本, 表明SNP位点成功鉴定的比例分别为99.82%, 92.00%, 99.10%和90.35%, 且所有小鼠品系个体的SNP位点均为纯合, 并被成功确定为目标品系; 品系间两两比较, 最大差异数为73个, 最小差异数为3个, 差异位点平均数为53个, 差异中位数为60个, 显示出本方案对常见近交系小鼠品系分辨率较高。结论 多重PCR靶向二代测序方案的SNP分型方案是一种准确、快速、高效的基因分型方案, 可用于遗传质量检测和品系鉴定。

[关键词] 多重PCR; 单核苷酸多态性(SNP); 近交系小鼠; 靶向二代测序; 遗传质量监测

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0111-07

动物遗传质量对实验结果有重要影响。近交系小鼠是医学生物学研究中广泛应用的实验动物, 其本身的质量尤其是个体基因的纯合性与不同个体遗传一致性对实验结果的可比性、可重复性和准确性起着决定性作用。Taft等^[1]研究表明, 即便少量的遗传污染也能造成结果重复性困扰, 故有必要确认品系的遗传背景以及是否发生基因突变和遗传污染。

由于小鼠基因组中单核苷酸多态性(SNP)位点数量庞大, 且比短串联重复序列(STR)易于实现高通量基因分型, 故国际上较知名的实验动物公司均

已使用SNP分型技术进行遗传检测。如2004年美国Jackson实验室筛选出28个SNP位点, 用以鉴别48种近交系小鼠^[2], 他们额外提供2 000个SNP的芯片(<http://jaxservices.jax.org/genome/snp.html>)用于检测与基因定位; Charles River实验室目前采用32个位点和384个位点的两个SNP组合对小鼠进行遗传检测(<http://www.criver.com>); Taconic实验室采用96个位点的SNP组合对小鼠进行遗传检测; Harlan实验室采用48个位点的SNP组合对小鼠进行遗传检测。可见, 基于SNP小鼠遗传质量检测方法逐渐成为国际通行标准。

基于多重PCR的SNP分型方案, 是一种高通量与高特异性的SNP分型方案^[3]。本研究在PCR-LDR(连接酶检测反应)技术的SNP分型方案被用于小鼠遗传鉴定的基础上^[4], 筛选出染色体上均匀分布的112个SNP位点, 利用靶向建库测序技术, 以期实现小鼠遗传质量检测的高通量SNP分型方案。

[收稿日期] 2018-10-31

[基金项目] 上海市创新行动计划课题(编号: 17140903100)

[作者简介] 钱 强(1994-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 小鼠遗传学。E-mail: 934389320@qq.com

[通信作者] 李 凯(1978-), 男, 副研究员, 研究方向: 小鼠遗传学。E-mail: likai@dhu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验小鼠 DNA 源于斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2012-0002], 共有 4 批小鼠样本(4 批样本数量分别为 16、43、6 和 60; 有 10 个近交系品系分别为 C57BL/6、FVB、C3H/He、BALB/c、DBA/2、DBA/1、AKR、CBA、SJL/J、NOD)。动物实验遵守《实验动物管理条例》。收集这些小鼠尾组织, -20°C 保存备用。

1.2 主要仪器和试剂

PCR 仪(A-100), 购自杭州朗基科学仪器有限公司; PCR 仪(Gene Amp PCR system 9600), 购自美国 Norwalk 公司; 电泳仪(JY600+), 购自北京君意东方电泳设备有限公司; 全自动紫外与可见分析装置(FR-200A)、生物电泳图像分析系统, 均购自上海复日科技有限公司。PCR 引物(PAGE 纯化)购自上海百力格生物技术有限公司; dNTP(promega)购自上海有渔生物工程有限公司; Taq 酶体系和 ddH₂O 属于实验室自制的。

1.3 SNP 位点筛选

从 NCBI 数据库查找在小鼠品系间中存在较高多态性的 SNP 位点, 为了避免连锁的可能性和提高分辨率, 保证结果准确可靠, 位点筛选原则如下: (1)尽量选择分布于不同染色体上, 包括所有的常染色体与 X 染色体, 每条染色体所含 SNP 最少为 3 个, 最多为 8 个, Y 染色体因为雄性小鼠独有, 且多样性极低, 故未选; (2)尽量选择品系间差异大的 SNP 位点; 我们最终选择了 112 个 SNP 位点(图 1)。

1.4 小鼠全基因组 DNA 抽提

使用动物基因组 DNA 快速提取试剂盒 Tiangen (天根生化科技有限公司), 从小鼠尾尖抽取全基因组 DNA。吸取 $1\mu\text{L}$ 抽提好的 DNA, 在 1% 琼脂糖凝胶电泳中检测其浓度, 然后将所有的 DNA 样本标准化到浓度为 $30\text{ ng}/\mu\text{L}$ 。 -20°C 储存备用。

1.5 引物设计

从 NCBI 数据库下载含有 112 个 SNP 基因位点的靶向区域的序列。为了获得特异性 PCR 产物, 设计了含有靶序列和通用序列的嵌合特异性引物。

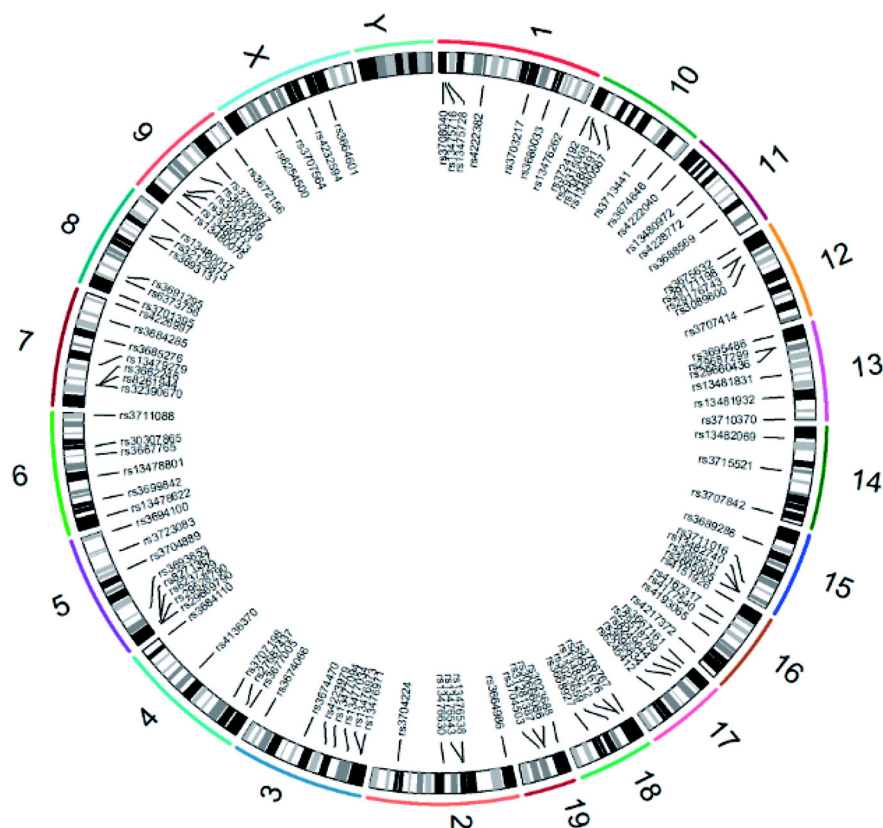


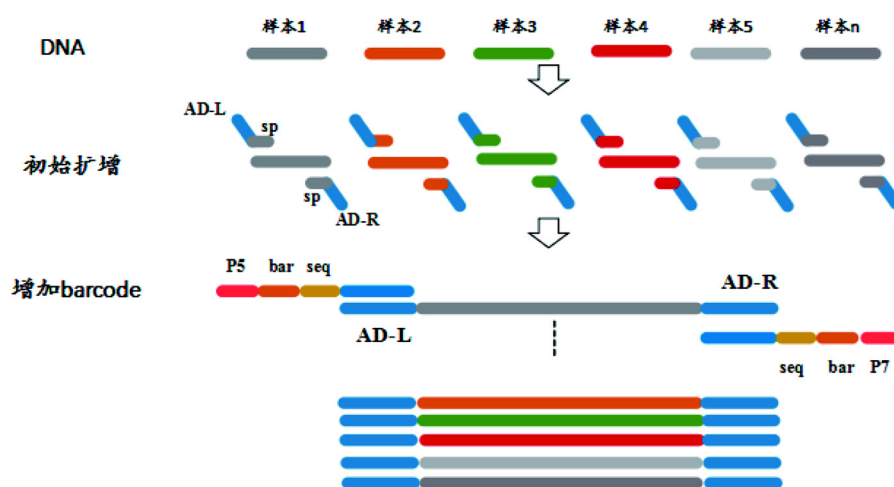
图 1 112 个 SNP 位点在染色体上的分布图

Figure 1 Distribution of 112 SNP loci on chromosomes

PCR 反应的产物大小在 200~250 bp, 引物长度为 20~30 bp, 熔解温度(T_m)为 55~65 °C, GC 含量为 20%~80%。为了区分不同的样品, 我们设计了 96 对含有索引序列和通用序列的条形码引物(图 2)。最后使用 Illumina 公司的 P5 与 P7 引物, 统一建库。

1.6 多重 PCR 建库

第一轮靶向 SNP 位点的特异性扩增体系为 10 μ L, 含 1 μ L 小鼠基因组 DNA(15~20 ng/ μ L), 1 μ L 1 $\times$ PCR 缓冲液(含 15 mmol/ μ L Mg^{2+}), 1 μ L 1 $\times$ PCR 辅助剂, 1 μ L 200 μ mol/ μ L dNTPs, 1 μ L 引物



Bar: 条形码引物, 长度为 6 bp, 两侧成对, 用于不同个体的区分;

AD-L、AD-R: 分别是左右两端接头, 连接测序引物和位点片段特异性引物;

sp: 位点片段特异性引物; P5、P7: 分别是 Illumina 公司 X-ten 测序仪所用的上引物

图 2 多重 PCR 的设计

Figure 2 Design of multiplex PCR

(0.2 μ mol/ μ L), 0.6 μ L 25 mmol/ μ L Mg^{2+} , 0.1 μ L 热启动 DNA 聚合酶(5U/ μ L), 再加重蒸 H_2O 补足 10 μ L。循环程序: 94 °C 15 min, [94 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 30 s] 20 个循环。为了探索最佳的退火温度, 设计了温度梯度实验(56 °C, 58 °C, 60 °C, 62 °C, 64 °C), 电泳结果表明, 在上述温度范围内 PCR 效率没有明显的差异, 因此所有引物的理论退火温度均为 60 °C, 故选用 60 °C 为统一的退火温度。第二轮添加条形码的 PCR 反应体系为 10 μ L, 以 3 μ L 第一轮 PCR 产物为模板, 1 μ L 1 $\times$ 10 PCR 缓冲液(含 15 mmol/ μ L Mg^{2+}), 1 μ L 1 $\times$ PCR 辅助剂, 1 μ L 200 μ mol/ μ L dNTPs, 0.1 μ L 条形码引物(0.2 μ mol/ μ L), 0.6 μ L 25 mmol/ μ L Mg^{2+} , 0.1 μ L 热启动 DNA 聚合酶(5 U/ μ L), 再加重蒸 H_2O 补足 10 μ L。循环程序: 94 °C 15 min, [94 °C 30 s, 60 °C 1 min, 72 °C 30 s] 20 个循环。第二轮产物经磁珠纯化后, 作为建库模板, 10 μ L 的反应体系, 以 3 μ L 第二轮 PCR 产物为模板, 1 μ L 1 $\times$ 10 PCR 缓冲液(含 15 mmol/ μ L Mg^{2+}), 1 μ L 1 $\times$ PCR 辅助剂, 1 μ L 200 μ mol/ μ L

dNTPs, 0.1 μ L P5 与 P7 引物(0.5 μ mol/ μ L), 0.6 μ L 25 mmol/ μ L Mg^{2+} , 0.1 μ L 热启动 DNA 聚合酶(5 U/ μ L), 再加重蒸 H_2O 补足 10 μ L。PCR 程序为: 94 °C 15 min, [94 °C 30 s, 60 °C 90 s, 72 °C 30 s] 15 个循环, 72 °C 10 min^[5]。建库产物送金唯智生物(苏州金唯智生物科技有限公司, 中国苏州)进行高通量测序, 使用机型为 illumina X-10, 上机前产物经安捷伦 2100 质控。

1.7 测序数据分析和 SNP 鉴定

首先利用 FASTQC^[6]对原始序列进行质控, 质控完通过使用 FASTX-Toolkit^[7], 根据条形码序列的错配碱基参数小于 1, 分离出所有样本。随后, 使用 Cutadapt^[8]软件切除全部接头, 获得每个样品的靶序列。通过使用 BWA(v0.7.12)^[9]和 Samtools(v0.1.19)^[10]的软件鉴定 SNP 位点。简言之, 将靶序列通过 BWA 比对到 SNP 参考序列(小鼠参考基因组 mm10), 使用 Samtools, 将 sam 文件生成 mpileup 文件, 该文件用于 SNP 位点碱基的统计。对于 SNP 的检出, 过滤小于 15 $\times$ 测序深度位点, 杂合子判定标准为等位基因的序列读长比例在 20%~80%。

2 结果

2.1 扩增子均一性

在某批次小鼠样本测序中, 6 个样本的原始数据总量为 685 M, 干净(clean)数据为 568 M, 平均深度为 5308 ×。在这批样本中总扩增子数量为 714 个, 有效扩增子的数量为 97%, 扩增子测序深度的中值为 3175 ×。根据 SNP 鉴定时, 有效深度不低于 15 ×, 本批样本的有效扩增子数量为 97%, 即 97% 的扩增子最后获得 SNP 数据(图 3)。

随后, 每个扩增子深度对平均深度进行了归一化, 如此则可直接观察到平均测序深度对每个扩增子的影响, 即可评价总体均一度。从图 4 可以看出, 约 80% 的数据分布于平均深度的 5 倍范围以内, 较高的总体均一度, 使得总体测序量得以降低。

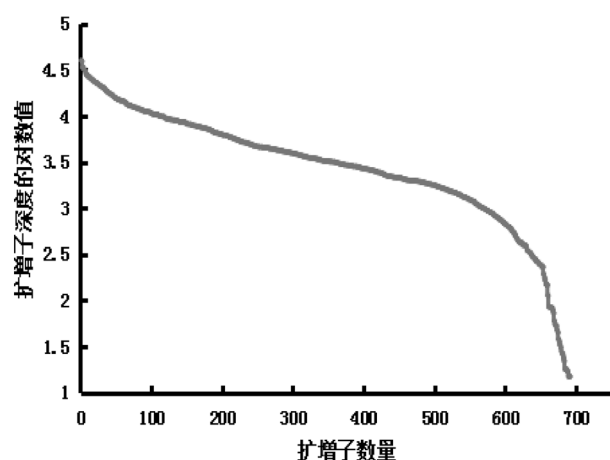


图 3 扩增子测序深度

Figure 3 Amplicon sequencing depth

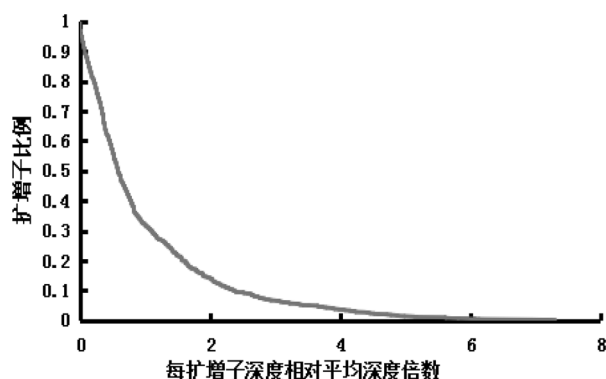


图 4 扩增子相对深度累积曲线

Figure 4 Normalized coverage distribution plots

2.2 Hi-SNP 特异性

从各 SNP 等位基因所在序列读长比例(图 5)看, 该批次全部样本为纯合子(<20% 或>80%), 而该批次样本均为核心群近交系小鼠, 符合遗传质量检测的要求。

同时, 我们对该批次不同品系小鼠分别进行靶向 Hi-SNP 高通量重测序与 LDR 鉴定。如表 1 所示, Hi-SNP 结果与 LDR 结果完全吻合。

2.3 遗传质量检测的有效性

检测了 4 批小鼠样本(共 98 个), 结果表明不同来源的同一品系 SNP 状态完全相同。在 4 批样品中, 共选择了 112 个 SNP 位点, SNP 位点出的比例分别为 99.82%, 92.00%, 99.10% 和 90.35% (表 2)。同时, 样品在这些位点处基因型是纯合的, 这证实这些小鼠品系都是纯系。

如表 2 中所示, 4 次测序获得总数据量为 32 M 序列读长, 经过滤后得到干净数据为 9 M。最低平均深度为 212 ×, 最高深度为 9542 ×, 位点鉴定成功率大于 90%, 样本鉴定成功率为 100%。

2.4 SNP 位点在品系间的差异分析

SNP 位点在品系间的差异数量决定了分辨率。针对常见的 10 个品系, 在两两品系之间进行位点差异比较, 最大差异数为 73 个, 最小差异数为 3 个, 差异位点平均数为 53 个, 差异中位数为 60 个(图 6)。

3 讨论

多重 PCR 靶向二代测序 SNP 分型方法相比于形态学、免疫学以及生物化学方法有着明显优势, 主要体现在通量大、建库方便、测序深度高、性

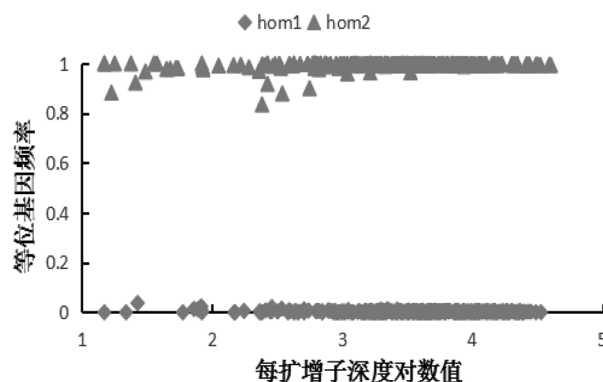


图 5 SNP 位点等位基因序列读长比例

Figure 5 SNP sites allele reads ratio

表 1 Hi-SNP 法与 LDR 结果对应表(部分)

Table 1 Table of Hi-SNP method and LDR results (partial)

Methods	sample	rs8271367	rs3694100	rs3674646	rs29581676	rs6373756	rs3023203	rs4217372	rs3699531
Hi-SNP	B6	AA	AA	AA	AA	AA	AA	CC	CC
LDR	B6	AA	AA	AA	AA	AA	AA	CC	CC
Hi-SNP	BALB/c	AA	AG	GG	GG	GG	AA	CC	TT
LDR	BALB/c	AA	AG	GG	GG	GG	AA	CC	TT
Hi-SNP	CBA	AA	GG	AA	GG	GG	GG	CC	TT
LDR	CBA	AA	GG	AA	GG	GG	GG	CC	TT
Hi-SNP	C3H	AA	AG	AA	GG	GG	AA	CC	TT
LDR	C3H	AA	AG	AA	GG	GG	AA	CC	TT
Hi-SNP	DBA/1	AA	AA	GG	AA	GG	AA	GG	CC
LDR	DBA/2	AA	AA	GG	AA	GG	AA	GG	CC
Hi-SNP	DBA_2	AA	AA	GG	AA	GG	GG	GG	CC
LDR	DBA_2	AA	AA	GG	AA	GG	GG	GG	CC

表 2 数据质控结果以及 SNP 位点分析结果

Table 2 Data quality control results and SNP sites analysis results

样本 批号	样本 数量	原始 序列	干净 序列	平均 深度	检出 比率
I	15	23759024	6866675	9 542	99.82%
II	36	2336881	656917	402	92.00%
III	6	701440	581632	5 308	99.10%
IV	41	1735552	717131	212	90.35%

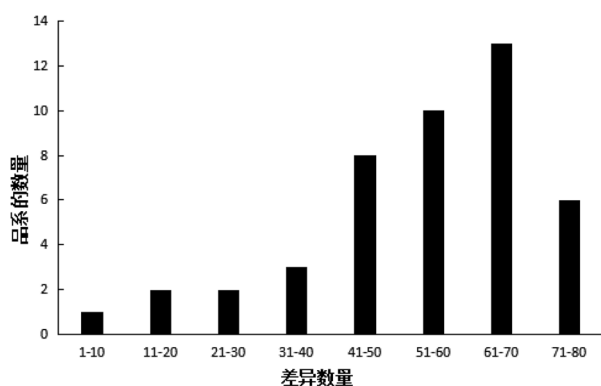


图 6 任意两个品系差异等位基因数目的分布图

Figure 6 Distribution of the number of alleles in any two strains

价比高、特异性强、分辨率高和价格低廉等方面。

多重 PCR 靶向二代测序方案, 在两端添加的条形码可以一次对上万个样本进行标记, 并在单次上样可得全部序列, 使得高通量的样本得以快速有效鉴定。在建库过程中, 只需几步 PCR 反应扩增,

纯化后可以直接进行测序, 建库方便。在费用上, 考虑到 PCR 的试剂费用以及一部分不当损耗, 分摊到每个样本, 引物加上反应试剂的费用微不足道。同时, 测序一个流通槽的费用大约 7 000~8 000 元, 一个流通槽的大小约为 90 G, 全基因组测序深度为 10~30X, 所需数据量为 30~90 G, 而靶向二代测序 SNP 分型方案的测序深度达到了数百 X 甚至数千 X(表 2), 100 个样本所需数据量为 4.5 G, 90 G 可产生 2 000 只小鼠的数据。分摊到每只小鼠的测序费用极低。

等位基因比例与 PCR-LDR 方法验证表明, 靶向二代测序 SNP 分型方案的特异性很高。对于纯合子个体样本, 在统计等位基因数量时, 应只出现一种等位基因(图 5), 等位基因所在的序列读长比例趋近于 0 或 1, 全部的样本都为纯合子。同时部分小鼠的结果与 PCR-LDR 完全一致, 可见所采集的近交系小鼠符合遗传质量检测要求。

本研究建立的靶向二代测序 SNP 分型方案, 相比于 PCR-LDR 分型方案^[11], 分辨率大大提高。同时, 112 个 SNP 位点对小鼠进行遗传监测的方案比 Harlan 实验室采用 48 个位点的 SNP 库对小鼠进行遗传检测的方案更加有效, 通过这 112 个 SNP 位点的信息完全可以鉴定近交系小鼠的品系。

就遗传质量控制的 DNA 技术方法而言, 对中国知网文献调研可知, 从 1986 年至今涉及小鼠 40 篇以上, 研究深度上, 从早期的血清学研究^[12]、到 1990 年代的 DNA 指纹^[13]与延续至今的 DNA 微卫星

技术^[14], 及至最近的 SNP 鉴定方案^[15,16]。从理论上讲, 品系间多态性越好的位点越适合进行品系鉴定, 但从有关近交系小鼠最初的培育奠基者数量极少的现实与检测结果来看, 短串联重复(STR)往往在不同品系间条带一致, 仅个别位点能进行区分^[17]。

鉴于国内应用 SNP 标记分析通量相对较低, 尚未建立针对我国常用小鼠进行系统而有效遗传检测的高通量 SNP 位点组合(SNP panel), SNP 遗传检测的方法及判定标准上的现状, 本研究通过高通量多重 PCR 技术联合二代测序, 优化出一套可用于小鼠品系遗传质量快速检测的高通量 SNP 鉴定方法, 易于标准化流程, 非常有利于提高我国的小鼠遗传质量控制的标准。

参考文献:

- [1] Taft RA, Davisson M, Wiles MV. Know thy mouse[J]. Trends Genet, 2006, 22(12):649-653.
- [2] Petkov PM, Cassell MA, Sargent EE, et al. Development of a SNP genotyping panel for genetic monitoring of the laboratory mouse[J]. Genomics, 2004, 83(5):902-911.
- [3] Chen K, Zhou YX, Li K, et al. Multiplex PCR with the blunt hairpin primers for next generation sequencing[J]. Biotechnol Bioproc E, 2017, 22:347-351.
- [4] 谢雯, 鲍世民, 谢建云, 等. 基于PCR-LDR平台的近交系小鼠遗传质量快速检测方法[J]. 中国实验动物学报, 2012, 20(4):1-8.
- [5] Chen K, Zhou YX, Li K, et al. A novel three-round multiplex PCR for SNP genotyping with next generation sequencing [J]. Anal Bioanal Chem, 2016, 408(16):4371-4377.
- [6] Bioinformatics B FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data[DB]. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>.2014.
- [7] Hannon Lab FASTX-Toolkit, FASTQ/A short-reads pre-processing tools[DB]. http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/index.html. Accessed 25 Feb 2011.
- [8] Marcel M. Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads[J]. EMBnet.journal, 2011, 17(1):10-12.
- [9] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler Transform[J]. Bioinformatics, 2009, 25(14):1754-1760.
- [10] Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The Sequence alignment/map (SAM) format and SAMtools[J]. Bioinformatics, 2009, 25(16):2078-2079.
- [11] 李凯, 谢雯, 鲍世民, 等. 一种用于鉴别近交系小鼠的 SNP 分型方法[P]. 中国发明专利(授权), 2014. ZLGL2012090102.
- [12] 朱福龄, 王汉荣, 黄帼英, 等. 应用多价抗血清作为近交系小鼠遗传控制检测方法的探讨[J]. 实验动物与比较医学, 1999, 6(2):99-101.
- [13] 陈丙波, 魏泓, 罗刚, 等. 应用 α -珠蛋白 3'-HVR 探针进行小鼠的 DNA 指纹分析[J]. 第三军医大学学报, 1999, 21(2): 97-99.
- [14] 陈振文. DNA 指纹图与微卫星 DNA 技术在近交系大、小鼠遗传监测中的应用研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2004.
- [15] 徐伟, 晁天柱, 刘丽均, 等. 小鼠冷冻胚胎和精子 SNP 遗传鉴定方案的建立[J]. 中国实验动物学报, 2016, 24(2):169-174.
- [16] Xu FY, Chao TZ, Zhang Y, et al. Chromosome 1 sequence analysis of C57BL/6J-Chr1KM mouse strain[J]. Int J genomics, 2017, 2017:1-7.
- [17] 李银银, 吴绍亮, 王洪, 等. 微卫星 DNA 分析国内 24 个近交系小鼠遗传状况[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 28(3): 43-49.

Mouse Genetic Quality Monitoring Method Establishment Based on Next-generation Sequencing through Multiplex PCR

QIAN Qiang¹, XU Yuan¹, WANG Ya-heng¹, ZHOU Yu-xun¹,

XIAO Jun-hua¹, HAN Ling², BAO Shi-ming³, LI Kai¹

(1. Institute of Biological Science and Biotechnology, Donghua University, Shanghai 201620, China;

2. Shanghai Tenth People's Hospital, Shanghai 200072, China;

3. Shanghai Institutes for Biological Sciences, China Academy of Science, Shanghai 2000031, China)

[Abstract] Objective To establish a multiplex PCR targeting next-generation sequencing for mouse genetic quality monitoring. **Methods** Firstly, 112 single nucleotide polymorphisms (SNPs) on 20 chromosomes were screened from common inbred mice. Then, multiplex PCR amplification was performed on the fragments near the SNPs. After the library was constructed, high-throughput sequencing on Illumina platform was performed. The data was analyzed in a bioinformatics pipeline to obtain SNP information. **Results** The sequencing results showed that the uniform depth of amplicon was obtained, and the success calling rate of each site was over 90%. Secondly, under high specificity and high-depth sequencing conditions, the allele ratio of SNP sites approached 1 or zero, which is consistent with homozygous conditions. After 4 batches of mouse samples (98 in total) were analyzed, the proportions of SNP sites successfully identified were 99.82%, 92.00%, 99.10% and 90.35%, respectively. All mouse individuals were found to be homozygous and were successfully identified as the target strain. Compared differences between each pair strains, the maximum number of difference was 73, the minimum number was 3, and the average number was 53. The median number of difference was 60, showing our approach has a higher resolution for common inbred mouse strains. **Conclusion** The SNP typing scheme of the multiple PCR protocol is an accurate, rapid and efficient genotyping program for genetic quality testing and strains identification.

[Key words] Multiplex PCR; Single nucleotide polymorphisms (SNPs) ; Inbred mice;

Targeted next-generation sequencing; Genetic quality control

饮食中糖分控制对雌黑腹果蝇寿命和中肠干细胞的影响

唐润东¹, 宋思远², 吴 薇³

(1. 上海市七宝中学, 上海 201100; 2. 上海外国语大学附属浦东外国语学校, 上海 200120;

3. 中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所, 上海 200031)

[摘要] 目的 研究饮食中糖分控制对雌黑腹果蝇寿命和中肠干细胞的影响, 以期给女性树立正确科学的饮食观念提供一定的指导。方法 用不同糖分食物喂养雌黑腹果蝇, 称体质量, 记录存活数目, 解剖中肠进行免疫荧光染色。结果 随着年龄的增长, 正常组(以正常培养基含糖量为 100% 糖分)和高糖组(正常组糖分基础上增加 20% 糖分)雌黑腹果蝇体质量均呈现先缓慢上升, 21 d 后快速上升趋势, 高糖组体质量增长高于正常组。高糖喂养后用糖分梯度递减培养基喂养, 体质量随着糖分减少呈先下降后上升趋势, 体质量增长最慢的是用 50% 糖分培养基喂养。随着处理时间的延长, 雌黑腹果蝇在前 14 d 基本没有死亡, 14 d 以后, 死亡数量剧增, 21 d 以后呈直线下降趋势。梯度糖分控制后, 雌黑腹果蝇平均寿命有不同程度的增加, 高糖喂养后喂食 50% 糖分培养基寿命增长最明显。喂养 28 d 的雌黑腹果蝇, 高糖组肠道比正常组增粗, 细胞形态变化大, 排列无序, 高糖喂养后用糖分梯度培养基喂养, 50% 和 25% 糖分处理组恢复效果较好, 但不能恢复到正常饮食组状态。结论 糖分对雌黑腹果蝇的体质量、寿命和中肠干细胞形态和分布都有一定的影响。适当减少糖摄入量对果蝇体质量增长有减缓作用, 对寿命有增加作用, 中肠损伤相对较轻。

[关键词] 黑腹果蝇; 体质量; 寿命; 中肠干细胞

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0118-06

暴饮暴食是当今不同年龄段人们共同面对的难题, 暴饮暴食带来一系列的危害。糖是饮食中重要的组成成分, 是能量的主要来源之一。研究表明, 高糖饮食会引发肥胖症、胰岛素抗性^[1]、心脏病^[2], 线粒体功能障碍者多食高糖还会引发代谢危机^[3]等。

黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)生命周期较短, 寿命只有 3 个月左右, 且与人类衰老基因有高度同源性, 特别适合开展寿命研究^[4-10]。越来越多学

者通过对果蝇寿命的研究来寻找合适的生存方式和药物开发。研究显示, 白砂糖、避孕药、鬼箭羽和荔枝核提取物、北虫草提取液、长白山虫草、紫薯提取物、山药粗多糖、绣球菌多糖、紫甘蓝和紫山药提取物等^[11-20]都对果蝇寿命产生影响。

果蝇的消化系统在生理结构、细胞构成、遗传调控及其干细胞的形态和功能上, 都与脊椎动物存在很大相似性。因此, 果蝇是适宜研究肠干细胞发育命运和调控机理的理想动物模型。Spradling^[21]和 Perrimon^[22]实验室运用肠道细胞的相关分子标记发现, 成体果蝇的中肠存在肠道干细胞(intestinal stem cell, ISC)。ISC 经过有丝分裂产生一个子代 ISC 和一个成肠细胞(enteroblast, EB), EB 又可以分化为吸收型的肠上皮细胞(enterocyte, EC)和分泌型的内分泌细胞(enteroendocrine cell, EE), 这些细胞共同构成了肠道组织, 并且通过 ISC 的增殖、分

[收稿日期] 2018-12-10

[作者简介] 唐润东(2000-), 男, 上海市七宝中学高三学生。

E-mail: rundongtang@sina.com

共同第一作者: 宋思远(2002-), 女, 上海外国语大学附属浦东外国语学校高二学生。E-mail: oceanesong@163.com

[通信作者] 吴 薇(1980-), 女, 博士, 高级工程师, 研究方向为果蝇生物学。E-mail: wuwe@sibcb.ac.cn

化来实现维持和更新。楼哲丰等^[23]研究表明,高浓度镉的摄入对果蝇中肠上皮细胞核膜、线粒体和微绒毛等超微结构造成损伤,该类损伤能够诱使果蝇肠道组织上调表达相关配体蛋白,从而激活干细胞的表皮生长因子受体(EGFR)和 Janus 激酶信号转导子和转录激活子(JAK/STAT)信号通路,促进 ISC 的增殖与分化能力,继而实现对肠道损伤组织进行及时的修复。然而,中肠干细胞增殖信号通路的持续激活以及干细胞的过度增殖同样具有诱发肠道肿瘤发生的潜在可能。唐润东等^[24]研究表明,食物中的营养失衡会显著影响果蝇的体质量以及肠壁和肠道干细胞的数目,导致果蝇体质量下降或上升,肠道细胞增殖功能紊乱,对果蝇发育产生严重影响。

综上所述,进行饮食中糖分控制是非常必要的,而寿命和中肠干细胞都是非常重要的测试指标。本试验用梯度糖分浓度控制方式研究糖分对雌黑腹果蝇体质量、寿命和中肠干细胞产生的影响,以期给女性树立正确科学的饮食观念提供一定的指导。

1 材料与方法

1.1 动物

黑腹果蝇 Canton-S 购自美国 Bloomington 果蝇

资源中心。

1.2 培养基

正常果蝇培养基配方:水 1 L,活性干酵母 25 g,大豆粉 9.18 g,玉米粉 66.8 g,蔗糖 40 g,麦芽糖 42.4 g,琼脂粉 6 g,对羟基苯甲酸甲酯/无水乙醇 0.25 mL/2.5 mL、苯甲酸钠 8 g,丙酸 6.875 mL。以正常培养基含糖量为 100% 糖分,高糖果蝇培养基配方(含 120% 糖分)是在上述正常培养基配方基础上增加质量分数 20% 含糖量(蔗糖+麦芽糖),余类推。

培养基原料均购自上海维编科贸有限公司,由中科院上海生物化学与细胞生物研究所果蝇资源与技术平台配制。

万分之一天平 FA1004 购自中国上海衡平仪器仪表厂。激光扫描共聚焦显微镜 Leica TCS SP8 购自德国徕卡公司。

1.3 方法

1.3.1 体质量和寿命统计 将 1 日龄黑腹果蝇置于装有不同培养基的果蝇培养管中饲养,每管 30 只,雌雄各 15 只(雌雄混合饲养是为了维持果蝇正常的生活状态)。25 °C、相对湿度 40%~60%、12 h 光照+12 h 黑暗培养,每 2~3 d 更换一次培养基。果蝇设 7 个组别(表 1),每组设 6 个重复(6 管),3 管用来称重,3 管用来解剖。每 7 d 用万分之一天平称各管雌果蝇体质量;每 7 d 统计雌果蝇存活数、死

表 1 果蝇组别设置

Table 1 Treatments of groups in *Drosophila melanogaster*

组别	喂食方案
A 组	正常培养基(含 100% 糖分)喂食
B 组	高糖培养基(含 120% 糖分)喂食
C 组	14 d 高糖培养基(含 120% 糖分)喂食后+正常培养基(含 100% 糖分)喂食
D 组	14 d 高糖培养基(含 120% 糖分)喂食后+含 75% 糖分培养基喂食
E 组	14 d 高糖培养基(含 120% 糖分)喂食后+含 50% 糖分培养基喂食
F 组	14 d 高糖培养基(含 120% 糖分)喂食后+含 25% 糖分培养基喂食
G 组	14 d 高糖培养基(含 120% 糖分)喂食后+含 0% 糖分培养基喂食

亡数,直到全部死亡,计算存活率和平均寿命。

1.3.2 中肠干细胞免疫荧光染色 28 d 时解剖 10 只雌果蝇(从 3 个重复管中平均选取)中肠,免疫荧光染色,观察干细胞形态和分布情况。染色条件为:果蝇中肠经质量分数 4% 甲醛固定后用 PBST(0.1% PBS/Triton X-100)洗 4 次,每次 20 min,接着用质量分数 2% BSA/PBST 溶液封闭 1 h,然后与一抗(按一定比例稀释于 PBST 溶液)孵育 2 h。PBST

洗 4 次,每次 20 min,与荧光二抗孵育(按一定比例稀释于 PBST)1 h,接着 PBST 洗 4 次,每次 20 min。解剖果蝇取中肠置于载玻片上,封片用于后续观察。在研究中使用的抗体包括鼠抗-Armadillo (1:500, v/v) (DSHB, Iowa City, Iowa, United States),鼠抗-Prospero(1:2000, v/v) (DSHB),DAPI 染细胞核。采用 Leica TCS SP8 系统观察激光共聚焦图片,实验图片采用 Adobe Photoshop 及

Image J 软件进行处理。

1.4 统计学方法

所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较均采用 Student's t-test 进行统计学分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 糖分控制对雌果蝇体质量的影响

28 d 以后, 果蝇死亡半数以上, 故不再称重。由图 1 可以看出, 随着年龄增长, A 组和 B 组雌果蝇体质量均呈现先缓慢上升, 21 d 后体质量快速上升趋势, A 组体质量增长 0.73 mg, B 组体质量增长 0.77 mg, 说明摄入过量糖会加速雌果蝇体质量增加。高糖喂养后用糖分梯度培养基喂养, 体质量增长趋势随着糖分减少呈先下降后上升趋势, 体质量增长最慢的是 E 组, 其次是 F 组。而 G 组效果不明显, C 组、D 组体质量增加没有减缓。

2.2 糖分控制对雌果蝇存活率的影响

56 d 统计时各组果蝇全部死亡。由图 2 可以看出, 随着处理时间的延长, 雌果蝇在前 14 d 基本没有死亡, 而在 14 d 以后, 死亡数量剧增, 21 d 以后呈直线下降趋势。B 组雌果蝇存活率远低于 A 组。梯度糖分控制后, 存活率有不同程度的增加, E 组存活率最高, 28 d 存活率为 86.67%, A 组为 62.22%, B 组为 40.00%。

2.3 糖分控制对雌果蝇平均寿命的影响

由图 3 可以看出, B 组雌果蝇平均寿命(25.2 d)与 A 组(29.4 d)没有显著差异。但经过糖分控制处理后, D 组和 E 组寿命增长明显, 且 E 组(35.15 d)与 B 组比差异显著, C 组和 G 组寿命几乎没有增

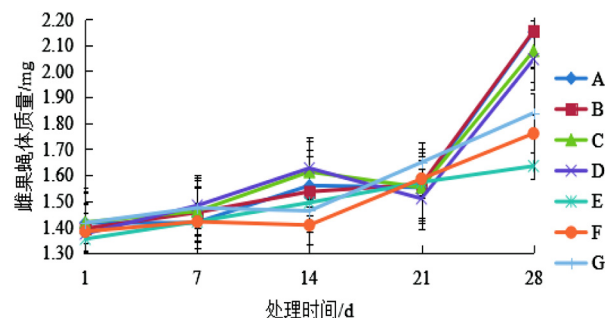


图 1 糖分控制对雌果蝇体质量的影响

Figure 1 The effects of sugar concentration control on body weight of female *Drosophila melanogaster*

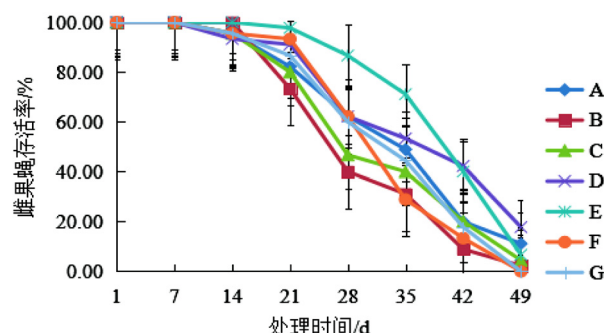
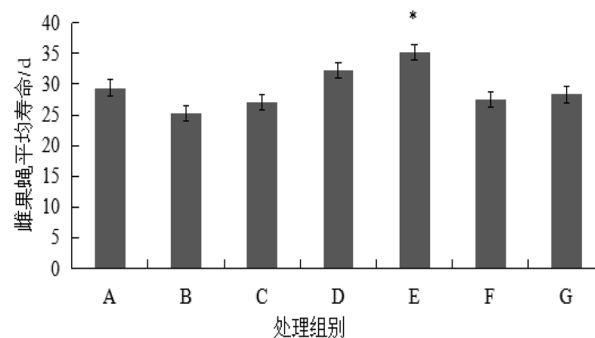


图 2 糖分控制对雌果蝇存活率的影响

Figure 2 The effects of sugar concentration control on survival rate of female *Drosophila melanogaster*



与 B 组比较, * $P < 0.05$

图 3 糖分控制对雌果蝇平均寿命的影响

Figure 3 The effects of sugar concentration control on average longevity of female *Drosophila melanogaster*

加。说明适当减少糖摄入量利于长寿, 但完全不吃糖也不利于寿命增加。

2.4 糖分控制对雌果蝇中肠细胞形态的影响

喂养到 28 d 时(图 4), A 组肠道细胞分布均匀, 形态正常, B 组肠道比 A 组增粗, 细胞形态变化很大, 排列无序, 说明中肠受到损伤。高糖喂食后用控制糖分培养基喂养, 各组中肠细胞形态与一直高糖喂养相比都有一定变化。C 组、D 组和 G 组细胞排列无序, E 组和 F 组细胞排列有序性增强, 说明肠道受损伤较轻, 但仍旧不能恢复到一直正常饮食状态, 说明合理控制糖分摄入对雌性身体健康是有好处的, 但暴食高糖后恢复正常或降低糖分摄入饮食短期内都不能完全减轻肠道损伤。

3 讨论

果蝇在实验室培养中, 能量的来源只有培养基, 因此研究培养基各成分对果蝇寿命的影响具有

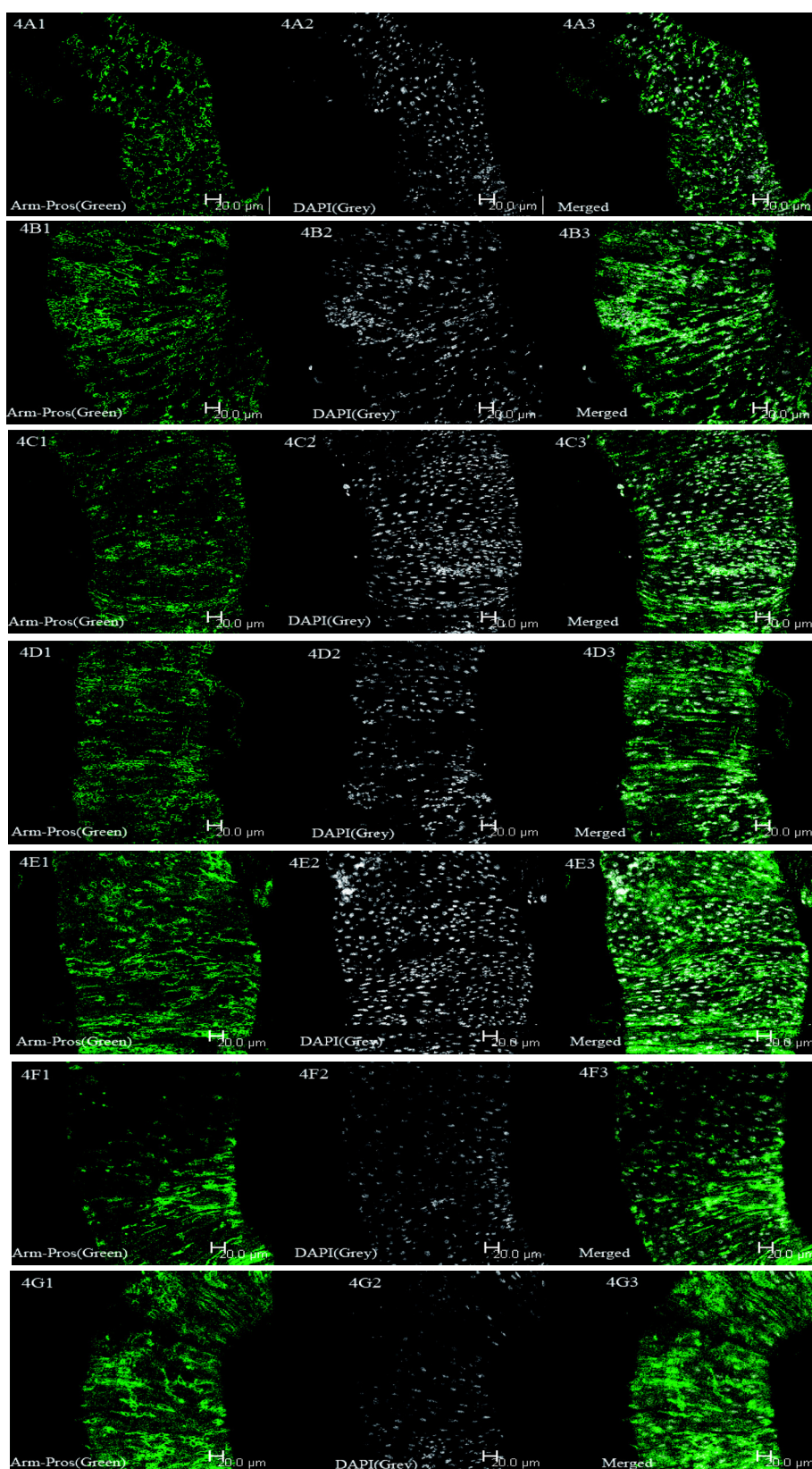


图 4 糖分控制对雌果蝇中肠干细胞形态的影响

Figure 4 The effects of sugar concentration control on midgut cells of female *Drosophila melanogaster*

实际意义。酵母粉是果蝇饲料中不可缺少的基本成分之一,研究表明酵母粉摄入限制下,果蝇寿命有明显的延长。但酵母粉摄入超过一定量时会促使果蝇寿命缩短,Min等^[25]研究表明,培养基中酵母粉含量达到质量分数8%和质量分数16%时,果蝇的寿命有明显的缩短,顾蔚等^[26]研究了高浓度酵母粉对果蝇生长及寿命的影响,显示高浓度酵母粉对果蝇生长具有促进作用,但寿命显著缩短。

糖也是果蝇饲料中不可缺少的基本成分之一,田祯祥等^[11]采用雌性黑腹果蝇寿命作为女运动员运动水平的模型,研究表明雌性黑腹果蝇的寿命与白砂糖浓度成倒U字型相关,正常糖分组处于寿命内稳态,低糖或高糖远离寿命内稳态。

本试验从不同糖浓度处理对雌果蝇的体质量、寿命和中肠干细胞形态影响的综合分析表明,高糖饮食后适度减糖能减缓体质量增长,延长寿命,但只能一定程度上减轻肠道损伤,不能完全恢复。说明对雌性果蝇来说,合理控制饮食,控制糖分摄入很重要。但糖分只是饮食的一个重要组成成分,还有脂肪、蛋白质等,也需要进一步研究。

参考文献:

- [1] Musselman LP, Fink JL, Narzinski K, et al. A high-sugar diet produces obesity and insulin resistance in wild-type *Drosophila*[J]. Dis Model Mech, 2011, 4(6):842-849.
- [2] Na J, Musselman LP, Pendse J, et al. A *Drosophila* model of high sugar diet induced cardiomyopathy[J]. PLoS Genet, 2013, 9(1):1-14.
- [3] Kempainen E, George J, Garipler G, et al. Mitochondrial dysfunction plus high-sugar diet provokes a metabolic crisis that inhibits growth[J]. PLoS One, 2016, 11(1):1-28.
- [4] Symonenko AV, Roshina NV, Kremmentsova AV, et al. Reduced neuronal transcription of escargot, the *Drosophila* gene encoding a snail-type transcription factor, promotes longevity[J]. Front Genet, 2018, 9:1-15.
- [5] Obata F, Fons CO, Gould AP. Early-life exposure to low-dose oxidants can increase longevity via microbiome remodelling in *Drosophila*[J]. Nat Commun, 2018, 9(1):975.
- [6] Joos JP, Saadatmand AR, Schnabel C, et al. Ectopic expression of S28A-mutated histone H3 modulates longevity, stress resistance and cardiac function in *Drosophila*[J]. Sci Rep, 2018, 8(1):2940.
- [7] Gendron CM, Pletcher SD. MicroRNAs mir-184 and let-7 alter *Drosophila* metabolism and longevity[J]. Aging Cell, 2017, 16(6): 1434-1438.
- [8] Dobson AJ, He X, Blanc E, et al. Tissue-specific transcriptome profiling of *Drosophila* reveals roles for GATA transcription factors in longevity by dietary restriction[J]. NPJ Aging Mech Dis, 2018, 4:5.
- [9] Staats S, Wagner AE, Kowalewski B, et al. Dietary resveratrol does not affect life span, body composition, stress response, and longevity-related gene expression in *Drosophila melanogaster*[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(1):223.
- [10] Garschall K, Dellago H, Gálíková M, et al. Erratum: Ubiquitous over-expression of the DNA repair factor dPrp19 reduces DNA damage and extends *Drosophila* life span[J]. NPJ Aging Mech Dis, 2017, 3:10.
- [11] 田祯祥. 乙醇对白砂糖依赖的雌性黑腹果蝇寿命内稳态的影响研究[J]. 四川体育科学, 2015, 2(1):38-44.
- [12] 王彩艳, 田祯祥, 刘承宜. 避孕药对不同糖质量浓度下雌性黑腹果蝇寿命的影响[J]. 华南师范大学学报: 自然科学版, 2015, 47(1):93-100.
- [13] 段寅慧, 吴敏. 鬼箭羽配伍荔枝核对果蝇模型糖脂代谢的影响[J]. 吉林中医药, 2014, 34(3):278-281.
- [14] 杨冬梅, 陈玲, 龙灿, 等. 北冬虫夏草提取液对果蝇繁殖力及寿命的影响[J]. 湖南农业科学, 2012 (11):87-89.
- [15] 李飞, 隋新. 长白山虫草属虫草多糖的抗氧化活性及其对果蝇寿命的影响[J]. 中国食品添加剂, 2015(4):69-73.
- [16] 赵江, 陈纯, 刘素稳, 等. 紫薯提取物对雌性果蝇寿命的影响及其作用机制[J]. 中国食品添加剂, 2014 (7):147-152.
- [17] 魏娜, 霍秀文, 张佳佳, 等. 山药粗多糖对果蝇寿命及繁殖力的影响[J]. 营养学报, 2016, 38(4):405-407.
- [18] 李颖, 王瀚, 赵志强, 等. 绣球菌多糖的提取及对果蝇寿命的影响[J]. 安徽农业科学, 2014, 42(13):3863-3864.
- [19] 王允, 刘冬梅, 王宇, 等. 紫甘蓝对果蝇寿命的影响及抗氧化的研究[J]. 广东化工, 2016, 43(14):10-11.
- [20] 王彦平, 袁贵英, 曹娅, 等. 紫山药提取物抗氧化与延长寿命作用的研究[J]. 食品工业科技, 2017, 38(1):360-364.
- [21] Ohlstein B, Spradling A. The adult *Drosophila* posterior midgut is maintained by pluripotent stem cells[J]. Nature, 2006, 439(7075):470-474.
- [22] Micchelli CA, Perrimon N. Evidence that stem cells reside in the adult *Drosophila* midgut epithelium[J]. Nature, 2006, 439 (7075):475-479.
- [23] 楼哲丰, 曹琼洁, 冯钰淇, 等. 镉对果蝇肠道上皮细胞损伤和调控中肠干细胞增殖、分化机制的研究[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(5): 602-608.
- [24] 唐润东, 毛菲菲. 食物营养对黑腹果蝇中肠干细胞的影响[J]. 昆虫学报, 2016, 59(2):148-155.
- [25] Min KJ, Tatar M. *Drosophila* diet restriction in practice: Do flies consume fewer nutrients ? [J]. Mech Ageing Dev, 2006, 127(1):93-96.
- [26] 顾蔚, 侯江瑜, 潘荣华. 高浓度酵母粉对果蝇生长及寿命的影响[J]. 中国老年学志, 2009, 29(15):1924-1926.

Effects of Sugar Concentration Control on the Longevity and the Mid-gut Stem Cells of female *Drosophila Melanogaster*

TANG Run-dong¹, SONG Si-yuan², WU Wei³

(1. Shanghai Qibao High School, Shanghai 201100, China;

2. Pudong Foreign Languages School, SISU, Shanghai 200120, China;

3. Institute of Biochemistry and Cell Biology, CAS, Shanghai 200031, China)

[Abstract] **Objective** To assess the effects of sugar concentration control on the longevity and the mid-gut stem cells of female *Drosophila Melanogaster* and then to find a optimum eating habits for women. **Methods** Detect the variance of body weight, survival rate, longevity and mid-gut stem cell's form with gradient sugar concentration treatment (the sugar concentration in normal medium as 100%). **Results** With the increase of the age, all the fly groups' body weight raised slowly first and then rapidly after 21 days. Body weight in the high sugar concentration treatment group increased faster than that of low sugar concentration treatment group. With the experiments of gradient sugar concentration treatment after high sugar concentration treatment, the optimum sugar concentration is 50%. With the extended of the treat time, the survival rate increased rapidly after 14 days. All the groups' survival rates were increasing with the gradient sugar concentration treatment after high sugar concentration treatment group. *Drosophila* in the 50% sugar concentration treatment group had the highest survival rate. With the sugar concentration control, all the fly groups' average longevity raised and the optimum sugar concentration was 50%. With the extended of the treat time, all the groups' mid-gut stem cell had large morphological changes. They had be rescued by the sugar concentration control and the optimum sugar concentration was 50%. **Conclusion** The sugar was a important nutrient for *D.melanogaster*. It had large effects on *D. melanogaster*'s body weight, longevity and mid-gut stem cell. The body weight decreased and the longevity increased with the diet control. And they could rescue the damage on mid-gut stem cell. **[Key words]** *Drosophila Melanogaster*; Body weight; Longevity; Mid-gut stem cells

不同时间紫外线照射对 SD 大鼠的皮肤光毒性损伤作用

孙 侠, 刘香梅, 庞增雄, 刘冬虹, 徐颖愉, 江 漪, 李 敏, 丘智峰, 黄宇锋
(广州质量监督检测研究院, 广州 511447)

[摘要] 目的 比较不同辐射时间紫外线引起的 SD 大鼠皮肤光毒性损伤差异。方法 采用长波紫外线(UVA, 320~400 nm)($4.5 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)+中波紫外线(UVB, 280~320 nm)($0.036 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)辐射的方法, 建立皮肤光毒性损伤大鼠模型, 每周照射 2 次, 连续 4 周, 模型 1 组、模型 2 组、模型 3 组累计辐射时间分别为 342 min、440 min、520 min, 正常对照组不予照射。实验结束后, 对大鼠皮肤进行组织病理学观察, 并采用免疫组化方法检测皮肤黑色素瘤特异性标记(HMB45)、波形蛋白(Vimentin)、内皮细胞标记(CD34)的表达情况。结果 与正常对照组比较, 模型 1 组、模型 2 组、模型 3 组均出现部分表皮角化过度、表皮厚薄不均、皱纹加深、毛囊增大、皮脂腺增生等变化; 另外, 随着辐射时间的增加, 表皮病变更为严重, 表皮厚度、皮脂腺横截面积更大, 皮肤损伤评分也更高。与正常对照组比较, 各模型组大鼠的皮肤成纤维细胞 Vimentin、真皮层毛细血管 CD34 表达均增多, 其中模型 2 组、模型 3 组增多更为明显; 模型 2 组、模型 3 组皮肤 HMB45 表达明显增多。结论 随着紫外线辐射时间的延长, 皮肤损伤程度也逐渐加重, 本研究或可为防晒功效评价提供合适的动物模型。

[关键词] 长波紫外线(UVA); 中波紫外线(UVB); SD 大鼠; 皮肤光毒性

[中图分类号] R758.14 Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0124-07

太阳光中的紫外线会对生物产生损伤, 依据不同的生物学损伤效应, 可根据波长分为短波紫外线(UVC, 100~280 nm)、中波紫外线(UVB, 280~320 nm)和长波紫外线(UVA, 320~400 nm)^[1]。其中波长最短的 UVC 可对生物产生较强的破坏作用, 但由于臭氧层的存在, UVC 几乎到达不了地球表面; UVB 具有中等穿透力, 主要穿透皮肤的角质层和表皮层, 仅有不足 2% 能到达地球表面, 它对皮肤较浅的人体皮肤产生的效应主要是急性的红斑反应以

及随后一定程度的色素沉积; 地球表面超过 98% 的紫外线是 UVA, UVA 具有很强的穿透力, 能穿透人体的角质层、表皮层、真皮层从而殃及皮下组织, 可造成严重和持久的皮肤危害^[2]。

根据《卫生部化妆品检验规定》(2002 年版)要求^[3], 具有紫外线吸收功能的化妆品必须进行光毒性试验安全性检验。在卫生部“化妆品卫生规范”(2007 年版)中皮肤光毒性试验方法规定了 30 min 的皮肤光毒性试验^[4]。但日常生活中, 太阳光的照射时间常常大于 30 min, 为探讨不同辐射时间紫外线引起的皮肤光毒性损伤作用, 本实验采用 UVA($4.5 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)+UVB($0.036 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)辐射的方法, 建立紫外线致皮肤光毒性损伤实验动物模型, 并对不同时间紫外照射引起的 SD 大鼠皮肤光毒性损伤进行了比较分析, 为皮肤光毒性损伤研究提供背景数据, 并为进一步防晒功效评价提供合适的动物模型。

[收稿日期] 2018-10-09

[基金项目] 广东省质量技术监督局科技项目(2017CZ05)

[作者简介] 孙 侠(1979-), 女, 硕士, 高级工程师。研究方向: 实验动物毒性病理与比较医学。

E-mail: 593533301@qq.com

[通信作者] 黄宇锋(1979-), 男, 硕士, 高级工程师。

E-mail: 78649403@qq.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠, 28 只, 体质量 180~220 g, 由广东省医学实验动物中心提供[SCXK(粤)2013-0002]。动物饲养于广州质量监督检测研究院毒理实验室[SYXK(粤)2014-0137]。动物实验方法经院动物福利和伦理委员会审核批准, 所有操作均符合 3R 原则。

1.2 主要试剂

抗波形蛋白(Anti-Vimentin)抗体、抗黑色素瘤(Anti-Melanoma)抗体和抗 CD34 抗体均购自英国 Abcam 公司; 小鼠和兔二步法试剂盒购自中杉金桥公司; DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司。

1.3 主要仪器

皮肤光毒性试验检测仪(型号: HOPE-MED 8130B)购自天津开发区合普工贸有限公司; ES 全封闭组织脱水机(型号: Excelsior)、组织包埋机(型号: HistoStar)、石蜡切片机(型号: HM340E)、烘片机(型号: Slimline Hotplate)、自动染片机(型号: Gemini AS)和自动封片机(型号: CTM 6)均购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 显微镜(型号: ZEISS Lab. A1)购自卡尔蔡司光学(中国)有限公司; 电子天平(型号: 双杰 JJ3000)购自双杰电子天平公司。

1.4 造模方法

28 只大鼠随机分成空白对照组、模型 1 组、模型 2 组和模型 3 组, 每组 7 只。除空白对照组外, 其余各组予以紫外线照射。每次照射前, 在大鼠背部 3 cm × 3 cm 区域内剃毛, 使皮肤充分暴露, 将大鼠放在皮肤光毒性试验检测仪(UVA+UVB)灯具正下方的 30 cm 处照射, 辐射参数设为 UVA (4.5 mJ · cm⁻² · s⁻¹) + UVB(0.036 mJ · cm⁻² · s⁻¹), 每周照射 2 次, 连续照射 4 周, 共 8 次。模型 1 组 8 次

照射时间分别为 6 min、12 min、24 min、36 min、48 min、60 min、72 min、84 min, 8 次累计共 342 min。模型 2 组 8 次照射时间分别为 20 min、30 min、40 min、50 min、60 min、70 min、80 min、90 min, 累计共 440 min。模型 3 组 8 次照射时间分别为 30 min、40 min、50 min、60 min、70 min、80 min、90 min、100 min, 累计共 520 min。

1.5 检测指标

1.5.1 皮肤刺激反应 每次照射后观察皮肤反应, 并按表 1 对皮肤刺激反应进行评分(红斑和焦痂形成、水肿分别积分, 最高积分为 8 分)。

1.5.2 病理学观察 取照射部位皮肤 1 cm × 1 cm 大小, 用质量分数 4% 中性甲醛溶液固定, 进行常规脱水、包埋、切片, HE 染色, 光学显微镜观察并照相, 观察各组之间照射部位皮肤病理学形态差异。在高倍显微镜下, 用 ZEN2 病理图文分析软件测量皮肤的表皮厚度和真皮层皮脂腺的横截面积, 参照 GB7919-87《化妆品安全性评价程序和方法》按表 2 进行皮肤损伤评分, 总分按(a+b+c+d+e+f+g+i+j+k)或(h+i+j+k)选择总分较大者。

1.5.3 免疫组织化学检测 用黑色素瘤特异性标记(HMB45)抗体检测皮肤表皮层黑素细胞变化, 用 Vimentin 抗体检测真皮层成纤维细胞增生情况, 用 CD34 抗体检测真皮层微血管的生成情况。

1.6 统计分析

所测数据采用 Excel 录入和 SPSS21.0 统计分析软件进行统计分析, 组间差异采用 *t* 检验、方差分析和多重比较(LSD 法), 以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 皮肤组织大体观察

正常对照组大鼠皮肤未见明显异常, 模型 1 组、

表 1 大鼠皮肤刺激反应评分
Table 1 Score of skin irritation response

皮肤反应		积分
红斑和焦痂形成	水 肿	
无红斑	无水肿	0
轻微红斑(勉强可见)	轻微水肿(勉强可见)	1
明显红斑	轻度水肿(皮肤隆起轮廓清楚)	2
中度~重度红斑	中度水肿(皮肤隆起约 1 mm)	3
严重红斑(紫红色)~轻微焦痂形成	重度水肿(皮肤隆起超过 1 mm, 范围扩大)	4

表 2 大鼠皮肤损伤评分标准
Table 2 Score standard of skin injury

皮肤病理学改变	积分	最高分
A. 棘层肥厚(a)		
轻度(表皮为正常厚度 1.5~3 倍)	1	3
中度(表皮为正常厚度 3~4 倍)	2	
重度(表皮为正常厚度 4 倍以上)	3	
B. 过度角化		
(b)颗粒层增厚	1	1
(c)角层增厚	1	1
C. 其他表皮改变		
(d)颗粒层缺乏	1	1
(e)角化不全	1	1
(f)表皮细胞空泡化或细胞内 水肿或基底细胞液化变性	1	1
(g)海绵形成	1	2
棘细胞间水肿	2	
水疱形成		
D. 表皮坏死(h)		
轻度(占表皮切面的 1/3 以下)	8	15
中度(占表皮切面的 1/3~2/3)	10	
重度(占表皮切面的 2/3 以上)	15	
E. 真皮变化		
(i)真皮结缔组织血管扩张充血或水肿	1	1
(j)胶原纤维变性或解离	1	1
(k)真皮炎细胞浸润		
轻度	1	3
中度	2	
重度	3	

模型 2 组、模型 3 组大鼠皮肤略黄, 各组均未见明显红斑和水肿形成。

2.2 皮肤组织病理学观察

正常对照组大鼠的背部皮肤表皮由角质层、颗粒层、棘细胞层和基底细胞层构成, 颗粒层和棘细胞层的细胞数较少, 表皮厚薄均匀(图 1A1); 真皮层由乳头层(真皮浅层)和网状层(真皮深层)组成, 胶原纤维是真皮结缔组织中最丰富的成分, 弹力纤维数量较胶原纤维少, 较均匀散在分布在胶原束之间(图 1A2); 真皮层皮肤附件由毛囊、皮脂腺组成, 均未见明显异常(图 1A3)。模型 1 组大鼠背部部分皮肤表皮角化过度(角质层、颗粒层增厚), 棘层肥厚(表皮为正常厚度 1.6~2.7 倍), 表皮厚薄不均, 皱纹明显加深, 真皮层散在的成纤维细胞增生(图 1B1、图 1B2); 真皮层毛囊增大, 皮脂腺增

生(图 1B3)。模型 2 组大鼠背部部分皮肤表皮角化过度(角质层、颗粒层增厚), 棘层肥厚(表皮为正常厚度 1.5~2.9 倍), 表皮厚薄不均, 皱纹明显, 真皮层少量胶原纤维变性伴少量成纤维细胞增生, 局部散在炎细胞浸润(图 1C1、图 1C2); 真皮层毛囊增大, 皮脂腺增生(图 1C3)。模型 3 组大鼠背部部分皮肤表皮角化过度(角质层、颗粒层增厚), 棘层肥厚(表皮为正常厚度 1.5~3.7 倍), 表皮厚薄不均, 皱纹明显, 部分表皮细胞空泡化, 真皮层纤维排列较乱, 部分胶原纤维变性伴部分成纤维细胞增生, 局部少量炎细胞浸润(图 1D1、图 1D2); 真皮层毛囊增大, 皮脂腺增生(图 1D3)。

2.3 各组大鼠皮肤表皮厚度和真皮层皮脂腺横截面积比较

表皮厚度和真皮层皮脂腺横截面积测定结果显示(表 3), 模型 1 组、模型 2 组、模型 3 组均较正常对照组显著增厚或增大($P<0.05$), 且随着辐照时间增加, 增厚或增大更为明显。

2.4 皮肤损伤评分

模型 1 组: 棘层肥厚 1 分, 角质层增厚 1 分, 颗粒层增厚 1 分; 模型 2 组: 棘层肥厚 1 分, 角质层增厚 1 分, 颗粒层增厚 1 分, 真皮层少量炎细胞浸润 1 分, 少量胶原纤维变性伴少量成纤维细胞增生 1 分; 模型 3 组: 棘层肥厚 1~2 分, 角质层增厚 1 分, 颗粒层增厚 1 分, 部分表皮细胞空泡化 1 分, 真皮层炎细胞浸润 1 分, 部分胶原纤维变性伴部分成纤维细胞增生 1 分。与正常对照组比较, 模型 1 组、模型 2 组、模型 3 组皮肤损伤评分均显著升高($P<0.05$), 且照射时间越长, 皮肤损伤的程度越重(表 4)。

2.5 免疫组织化学观察

根据图 2 结果, 正常对照组(图 2a1)、模型 1 组(图 2b1)皮肤未见明显 HMB45 的表达; 模型 2 组(图 2c1)、模型 3 组(图 2d1)局部皮肤可见少量细胞表达 HMB45, 表达部位位于表皮基底层和毛囊的上皮层。

正常对照组(图 2a2)皮肤真皮层见散在的成纤维细胞 Vimentin 表达(细胞数 ≤ 10 个/高倍视野); 模型 1 组(图 2b2)皮肤真皮层见成纤维细胞 Vimentin 表达增多(细胞数 >10 且 ≤ 20 个/高倍视野); 模型 2 组(图 2c2)、模型 3 组(图 2d2)皮肤真皮层见成纤维细胞 Vimentin 表达明显增多(细胞数 >20 个/高倍视野)。

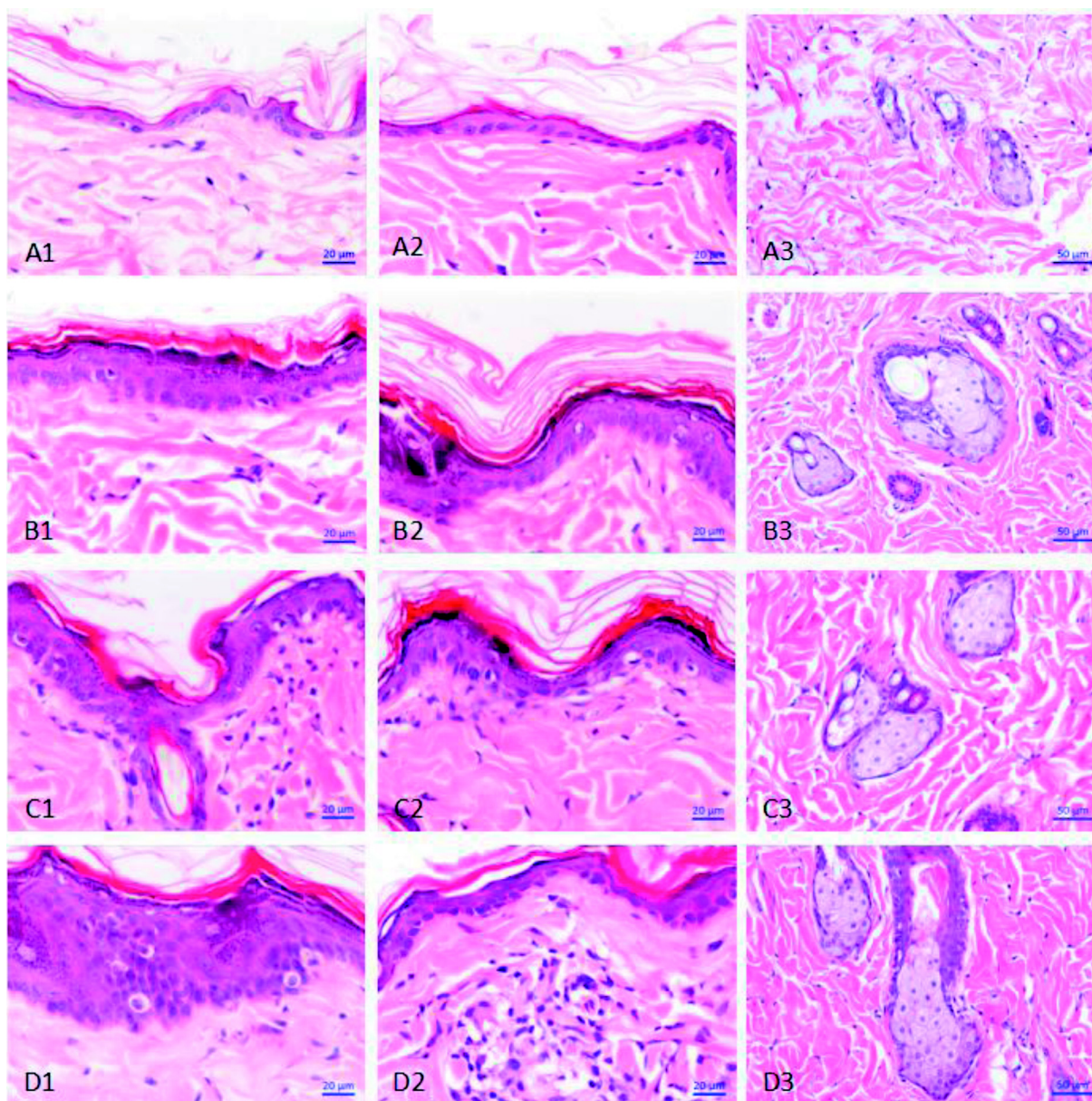


图1 紫外线照射大鼠皮肤组织病理学观察

表3 各组大鼠皮肤表皮厚度和真皮层皮脂腺横截面积比较
Table 3 Comparison of skin epidermal thickness and cross section area of sebaceous glands in dermis of SD rats in each group

组别	n	表皮厚度/ μm	皮脂腺横截面积/ $\times 10^3 \mu\text{m}^2$
正常对照组	7	10.79 ± 1.14	4.42 ± 1.90
模型1组	7	$22.53 \pm 4.33^*$	$11.99 \pm 4.72^*$
模型2组	7	$22.59 \pm 4.86^*$	$12.07 \pm 2.92^*$
模型3组	7	$25.89 \pm 8.32^*$	$14.68 \pm 3.17^*$

注: 与正常对照组比较, $^*P < 0.05$

表4 各组大鼠皮肤损伤评分比较
Table 4 Comparison of skin injury scores of SD rats in each group

组别	n	皮肤损伤评分
正常对照组	7	0
模型1组	7	$3.29 \pm 0.76^*$
模型2组	7	$5.14 \pm 1.21^*$
模型3组	7	$6.00 \pm 1.15^*$

注: 与正常对照组比较, $^*P < 0.05$

正常对照组(图 2a3)SD 大鼠背部皮肤真皮层毛细血管 CD34 的表达较少;模型 1 组(图 2b3)、模型 2 组(图 2c3)、模型 3 组(图 2d3)大鼠背部皮肤真皮层毛细血管 CD34 的表达均较正常对照组明显增多。

3 讨论

本研究在辐照参数 UVA($4.5 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) + UVB($0.036 \text{ mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)不变的基础上,通过延长辐照时间,设置了 3 个不同辐照剂量的模型组,其中,模型 1 组累计辐照时间为 342 min,模型 2 组累计辐照时间为 440 min,模型 3 组累计辐照时间为

520 min。根据皮肤组织病理学分析结果,模型 1 组大鼠皮肤表皮损伤较明显,真皮损伤较轻;模型 2 组大鼠皮肤表皮损伤较明显,真皮损伤较模型 1 组加重;模型 3 组大鼠皮肤表皮损伤和真皮损伤均较模型 1 组加重。可见,随着紫外照射时间的延长,皮肤损伤程度也逐渐加重。杨汝斌等^[5]采用 UVA+UVB 辐射成功建立 SD 大鼠光老化模型,造模结束时 UVA、UVB 辐照强度累计分别为 $148.5 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 和 $21.38 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 。楼彩霞等^[6]采用更接近日光 UVA、UVB 比例的辐照参数,造模结束时 UVA、UVB 辐照强度累计分别为 $123 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$ 和 $5 \text{ J} \cdot \text{cm}^{-2}$,成功建立了大鼠光老化模型,皮肤损伤程度较杨汝斌等报

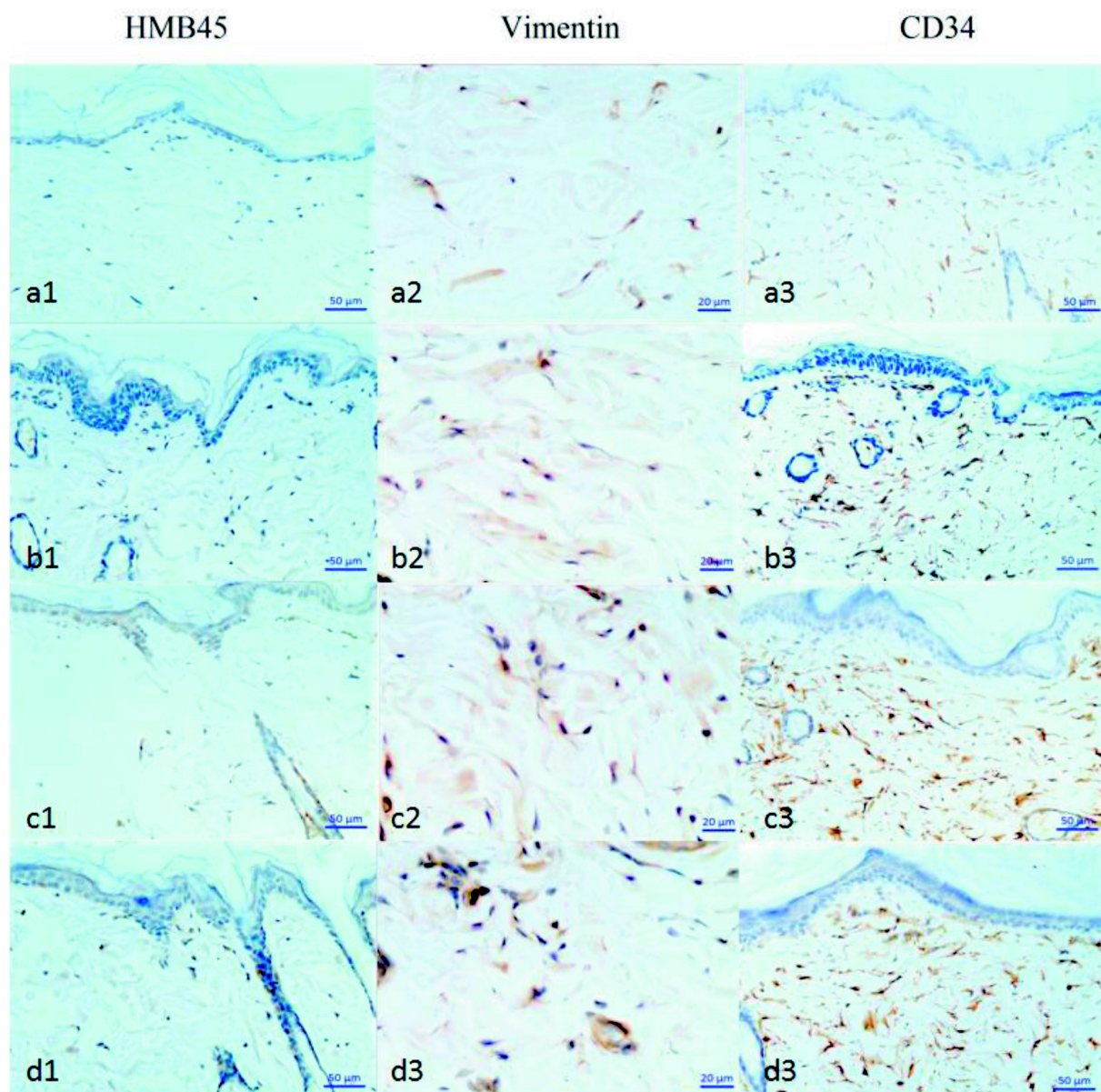


图 2 紫外线照射大鼠皮肤组织免疫组织化学观察

道的有所减轻。本实验采用的UVA 累计照射量与上述报道基本一致,而UVB 累计照射量则明显降低,真皮层未见明显的出血改变,皮肤病理改变也相应减轻,更能模拟人类皮肤经紫外线照射后的表现,也更适合于防晒化妆品的防晒功效评价。

HMB45 是 Gown 等^[7]发现的能与黑素瘤的一种抗原结合的单克隆抗体,它能识别前黑素小体球蛋白,可与增生活跃的黑素细胞及黑素瘤细胞起反应^[8]。Vimentin 是间质细胞中最主要的中间纤维,与皮肤损伤后修复及瘢痕增生有关^[9]。CD34 是细胞表面的一种磷酸化糖蛋白,选择性地表达于造血干/祖细胞、小血管内皮细胞等表面^[10],也可作为微血管再生的一个标记蛋白^[11]。本实验结果显示:空白对照组和模型1组大鼠皮肤未见明显HMB45的表达,模型2组、模型3组大鼠局部皮肤可见少量细胞表达HMB45,而3个模型组的Vimentin和CD34表达都增多。结果表明长时间紫外线照射可促进皮肤黑色素细胞增生,紫外辐照可造成皮肤损伤,紫外辐照可促进微血管的生成,这些效应可随辐照时间延长而更加严重。

本实验采用UVA+UVB 紫外线辐射的方法,成功建立了皮肤光毒性损伤实验动物模型,同时结合毒性病理学评价方法,分析比较了表皮厚度、表皮黑色素细胞HMB45表达、真皮成纤维细胞Vimentin表达、真皮毛细血管CD34表达、皮肤损伤评分等病理学指标。这些指标易于观察和量化,相比人体防晒系数(SPF)和防晒时间(PA)测试结果,更能直观反应防晒化妆品对紫外线引起的皮肤深层光损伤的防护作用,可用于防晒化妆品防晒功效评

价。本实验的模型2组、模型3组SD大鼠皮肤HMB45表达、皮肤光毒性损伤程度均明显加重,或可作为评价防晒化妆品功效的动物模型。

参考文献:

- [1] 吴斯敏,杨慧龄. 紫外线引起皮肤光老化机制及防治的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(2):341-346.
- [2] Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, et al. Effects of ultraviolet radiation, visible light and infrared radiation on erythema and pigmentation: A review [J]. Photochem Photobiol, 2013, 12 (1):54-64.
- [3] 卫生部化妆品检验规定[S]. 2002:6-7.
- [4] 化妆品卫生规范[S]. 2007:121-123.
- [5] 杨汝斌,万屏,刘玲,等. SD大鼠皮肤光老化动物模型建立方法的探索[J]. 中国皮肤性病杂志, 2011, 25(3):199-202.
- [6] 楼彩霞,高擎,孙侠,等. 维生素C对紫外线诱导的光老化大鼠皮肤结构的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2015(6):79-80.
- [7] Gown AM, Vogel AM, Hoak D, et al. Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes [J]. Am J Pathol, 1986, 123(2):195-203.
- [8] 尹占东,夏建新,王延龙,等. MITF、S-100蛋白、HMB45在黑素瘤以及色素痣中的表达及意义[J]. 中国实验诊断学, 2011, 15(12):2039-2040.
- [9] 王巧稚,石慧娟,颜丽萍,等. 大鼠胚胎皮肤I、III型胶原和波形蛋白表达的变化及意义[J]. 泸州医学院学报, 2011, 34(5):526-529.
- [10] 毛辉,王曾礼,刘春涛. 骨髓中表达白细胞介素5受体mRNA的CD34⁺细胞与支气管哮喘气道炎症的关系[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 26(3):152-156.
- [11] 郑丽娟. 基于炎症因子探讨藏医白脉疗法对缺血性脑卒中大鼠血管再生的调节机制[D]. 北京: 北京中医药大学, 2018.

Phototoxic Effects of Ultraviolet Irradiation with Different Time Course on Skin of SD Rats

SUN Xia, LIU Xiang-mei, PANG Zeng-xiong, LIU Dong-hong,

XU Ying-yu, JIANG Yi, LI Min, QIU Zhi-feng, HUANG Yu-feng

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

[Abstract] **Objective** To compare the skin phototoxicity damage of SD rats induced by ultraviolet radiation at different radiation time. **Methods** The skin phototoxicity damage rat models were established by ultraviolet radiation of UVA ($4.5\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$)+UVB($0.036\text{mJ} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). The models were irradiated twice a week for 4 weeks, and the cumulative radiation time of model 1, model 2 and model 3 were 342 min, 440 min and 520 min, respectively. At the end of the experiment, the skins were histopathologically observed, as well as the expression of melanoma specific marker (HMB45), Vimentin and endothelial cell marker (CD34) in skins were examined by immunohistochemistry. **Results** Compared to normal control, there showed partial hyperkeratosis of epidermis, uneven thickness of epidermis, deepening of wrinkle, enlargement of hair follicle, and hyperplasia of sebaceous gland in model 1, model 2 and model 3. In addition, with the increase of radiation time, the epidermal lesions were more serious, the skin thickness and sebaceous gland cross-sectional area were larger, and the skin injury scores were higher. Compared with normal control, the expressions of Vimentin of skin fibroblast and CD34 of Dermal capillaries increased tremendously in model 1, model 2 and model 3, and the increasement were more obviously in model 2 and model 3. At the same time, the expressions of HMB45 of skin increased distinctly in model 2 and model 3. **Conclusion** With the extension of ultraviolet radiation time, the degree of skin damage is gradually increased. At the same time, this study may provide an appropriate animal model for evaluating the efficacy of sunscreen.

[Key words] UVA;UVB; SD rats; Skin Phototoxicity

不同剂量 X 射线全身照射对小鼠 部分免疫器官的影响

于纯淼¹, 付佳琪¹, 赵力松², 国立东¹, 郭旭², 于栋华³

(1. 黑龙江中医药大学药学院, 哈尔滨 150040;

2. 哈尔滨医科大学附属第四医院放化疗科, 哈尔滨 150040;

3. 黑龙江中医药大学中医药研究院, 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的 探讨不同剂量 X 射线辐照后对小鼠免疫器官的影响。方法 BALB/c 小鼠 192 只, 随机分为正常对照组和单次照射 2.0 Gy、3.0 Gy、4.0 Gy、5.0 Gy、6.0 Gy 组。分别于照射后 24 h、48 h、96 h、192 h 每组取 8 只小鼠颈椎脱臼处死后取胸腺和脾脏称重, 计算胸腺指数和脾脏指数。并测定组织匀浆中超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)含量。结果 相同取样时间, 各辐照剂量组小鼠胸腺、脾脏指数及 SOD 含量与对照组比较均显著降低, 且与辐照剂量呈正相关。MDA 含量与对照组比较均显著升高, 且均有明显剂量效应。相同辐照剂量, 不同取样时间, 各组小鼠胸腺、脾脏指数均呈现先降低后升高趋势。胸腺中 MDA 含量随取样时间延长呈升高趋势, 脾脏中 MDA 含量呈先升高后降低趋势。胸腺中 SOD 含量随取样时间延长呈先升高后降低趋势; 辐照 2.0 Gy、3.0 Gy、4.0 Gy 组小鼠脾脏中 SOD 含量随取样时间延长呈升高趋势, 辐照 5.0 Gy、6.0 Gy 组小鼠脾脏中 SOD 含量随取样时间延长呈先升高后降低趋势。结论 在所观察照射剂量和测定时间内, X 射线对小鼠免疫器官的影响与辐照剂量相关。不同组织重量恢复时间不同, 且低剂量辐照开始恢复时间先于高剂量辐照。

[关键词] X 射线; 免疫器官; 损伤

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0131-05

随着核技术在工农业、医学生命科学等方面应用的迅速发展, 加之信息产业技术的突飞猛进, 人群接受长时期、低剂量电离辐射的危害已越来越严重。越来越多地接触放射物质和辐射源, 可导致机体出现各种电离辐射损伤, 主要包括骨髓抑制、造血组织功能障碍、外周血白细胞下降以及免疫功能降低等方面^[1-4]。辐射已严重危害着人类的健康, 辐射的危害已不容忽视。

免疫系统对电离辐射极度敏感, 辐射损伤机体免疫系统的器官、组织, 损伤淋巴细胞的质量, 最终导致机体免疫功能明显降低。脾脏是机体最大的免疫器官, 含大量淋巴细胞, 具有很高的辐射敏感性; 胸腺为中枢免疫器官, 也是 T 细胞发育、分化、成熟的重要场所, 在免疫系统中发挥重要的作用^[5-8]。本实验观察了不同剂量 X 射线辐照后, 对小鼠免疫器官胸腺、脾脏的影响, 探讨免疫器官对 X 射线辐射的放射生物学效应的规律, 期望可以为急性电离辐射损伤动物模型的建立、辐射防护及剂量研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级 BALB/c 小鼠 192 只, 雌雄各半, 6~

[收稿日期] 2018-10-22

[项目基金] 黑龙江省博士后资助项目(LBH-Z13157); 黑龙江省自然科学基金面上项目(H2016084); 黑龙江中医药大学科研基金(2012BS04)

[作者简介] 于纯淼(1978-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 中药保健食品研制与开发。E-mail: yuchunmiao@163.com

[通信作者] 于栋华(1979-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 中药药性理论及药效物质基础研究。

E-mail: yudonghua1015@163.com

8 周龄, 体质量(20 ± 2) g, 由黑龙江中医药大学药物安全性评价中心提供[SCXK(黑)2013-012]。小鼠饲养于动物屏障环境 [SYXK(黑)2013-012], 适应环境一周后开始试验。

1.2 试药、试剂与仪器

氯化钠注射液购自哈尔滨三精艾富西药业; 冰乙酸购自山东佰仟化工有限公司; 总超氧化物歧化酶(T-SOD)测试盒、丙二醛(MDA)测试盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所产品。

CLINAC21EX型医用电子直线加速器购自美国瓦里安医疗系统公司; AG135 型电子分析天平购自梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; DK-98-1 型电热恒温水浴锅购自天津市泰斯特仪器有限公司; SP-752型紫外可见分光光度计购自上海光谱仪器有限公司; TGL-16G 型高速台式离心机购自上海安亭科学仪器厂; XH-D型漩涡混匀器购自上海比朗仪器制造有限公司; 3-5N 型低速离心机购自湖南恒诺仪器设备有限公司。

1.3 照射条件

X 射线照射, 源皮距 100 cm, 剂量率 2.0 Gy/min, 将各组小鼠分别装入狭小塑料盒中限制其运动, 放置于治疗床上, 将准直器调整与塑料盒尺寸相同, 一次全身照射。

1.4 方法

192 只小鼠随机分为 6 组, 雌雄各半: 正常对照组和单次照射 2.0 Gy 组、3.0 Gy 组、4.0 Gy 组、5.0 Gy 组及 6.0 Gy 组。分别于照射后 24 h、48 h、

96 h、192 h 每组(包括对照组)取 8 只小鼠颈椎脱臼法处死后取胸腺和脾脏, 用滤纸吸干残血后, 称重(mg), 用以计算胸腺指数和脾脏指数[器官重(mg)/体质量(g) $\times 10$]。取一部分做组织匀浆, 测定匀浆中的 SOD 和 MDA 含量。

1.5 统计学处理

所测数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS19.0 统计软件进行统计处理分析, 组间比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 辐射对小鼠胸腺和脾脏指数的影响

如表 1 所示, 在相同取样时间, 各剂量组小鼠辐照后胸腺、脾脏指数与对照组比较均显著降低, 且指数降低程度与辐照剂量呈正相关。相同辐照剂量, 不同取样时间, 各组小鼠胸腺、脾脏指数均呈现先降低后升高趋势。

2.2 辐射对小鼠胸腺、脾脏组织 MDA 的影响

如表 2 所示, 在相同取样时间, 各剂量组小鼠辐照后胸腺、脾脏中 MDA 含量与对照组比较均显著升高, 相同辐照剂量, 各组小鼠胸腺中 MDA 含量随取样时间延长呈升高趋势, 各组小鼠脾脏中 MDA 含量呈先升高后降低趋势。

2.3 辐射对小鼠胸腺、脾脏组织 SOD 的影响

如表 3 所示, 在相同取样时间, 各剂量组小鼠辐照后胸腺、脾脏中 SOD 含量与对照组比较均显著降低, 相同辐照剂量, 各组小鼠胸腺中 SOD 含量随取样时间延长呈先升高后降低趋势; 辐照 2.0 Gy、

表 1 辐照后小鼠胸腺、脾脏指数的变化

指 标	组别	24 h	48 h	96 h	192 h
胸腺指数	对照组	19.40 $\pm$ 1.10	20.76 $\pm$ 1.14	21.45 $\pm$ 1.18	22.06 $\pm$ 1.16
	2.0 Gy 组	17.16 $\pm$ 1.33 ^{a,b,d}	10.83 $\pm$ 1.17 ^{a,b,c}	11.33 $\pm$ 1.31 ^{a,b,c}	20.55 $\pm$ 1.46 ^{c,d}
	3.0 Gy 组	17.11 $\pm$ 1.17 ^{a,b,d}	9.42 $\pm$ 0.57 ^{a,b,c}	10.46 $\pm$ 0.75 ^{a,b,c}	17.80 $\pm$ 0.88 ^{a,b,d}
	4.0 Gy 组	14.64 $\pm$ 1.45 ^{a,d}	8.47 $\pm$ 1.18 ^{a,c}	8.24 $\pm$ 0.84 ^{a,c}	20.18 $\pm$ 1.47 ^{c,d}
	5.0 Gy 组	11.25 $\pm$ 1.14 ^{a,b,d}	9.12 $\pm$ 1.14 ^{a,c,d}	6.94 $\pm$ 0.89 ^{a,b,c}	11.36 $\pm$ 0.91 ^{a,b,d}
	6.0 Gy 组	9.80 $\pm$ 1.36 ^{a,b,d}	9.67 $\pm$ 1.02 ^{a,b,d}	7.53 $\pm$ 0.83 ^{a,c}	14.60 $\pm$ 1.42 ^{a,b,c,d}
脾脏指数	对照组	47.81 $\pm$ 2.71	49.47 $\pm$ 1.40	50.64 $\pm$ 1.42	53.08 $\pm$ 1.68
	2.0 Gy 组	22.71 $\pm$ 1.68 ^b	17.40 $\pm$ 1.27 ^{a,b,c,d}	22.66 $\pm$ 1.60 ^b	30.52 $\pm$ 1.98 ^{a,b,c,d}
	3.0 Gy 组	23.83 $\pm$ 1.46 ^{a,b,d}	18.09 $\pm$ 0.94 ^{a,b,c}	17.81 $\pm$ 0.95 ^{a,b,c}	19.69 $\pm$ 0.77 ^{a,c,d}
	4.0 Gy 组	19.67 $\pm$ 1.21 ^{a,d}	12.36 $\pm$ 1.08 ^{a,c}	13.77 $\pm$ 1.26 ^{a,c}	20.64 $\pm$ 1.76 ^{a,d}
	5.0 Gy 组	17.36 $\pm$ 1.32 ^{a,b,d}	15.41 $\pm$ 0.93 ^{a,b}	15.15 $\pm$ 1.00 ^{a,b,c}	14.09 $\pm$ 1.56 ^{a,b,c}
	6.0 Gy 组	15.28 $\pm$ 1.14 ^{a,b,d}	13.11 $\pm$ 1.05 ^{a,c,d}	9.94 $\pm$ 1.19 ^{a,b,c}	11.44 $\pm$ 0.98 ^{a,b,c,d}

注: 相同取样时间, 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 2.0 Gy 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 4.0 Gy 组比较, ^b $P < 0.05$; 相同辐照剂量, 与 24 h 比较, ^c $P < 0.05$; 与 96 h 比较, ^d $P < 0.05$; $n = 8$ 下表同

表 2 辐照对小鼠胸腺、脾脏组织 MDA 的影响

指标	组别	nmol/mg 蛋白			
		24 h	48 h	96 h	192 h
胸腺	对照组	35.06 ± 0.88	32.32 ± 0.80	36.27 ± 0.81	38.90 ± 0.74
	2.0 Gy 组	34.71 ± 0.82 ^b	36.70 ± 1.00 ^{a,b}	33.96 ± 1.28 ^{a,b}	42.69 ± 0.69 ^{a,b,c,d}
	3.0 Gy 组	37.55 ± 0.92 ^{a,b,d}	38.89 ± 1.08 ^{a,b,d}	47.89 ± 0.68 ^{a,b,c}	51.96 ± 0.74 ^{a,c,d}
	4.0 Gy 组	41.18 ± 1.20 ^{a,d}	55.69 ± 1.21 ^{a,c,d}	65.92 ± 1.70 ^{a,c,d}	61.38 ± 1.21 ^{a,c}
	5.0 Gy 组	48.75 ± 0.72 ^{a,b,d}	75.00 ± 1.07 ^{a,b,c,d}	86.53 ± 1.33 ^{a,b,c}	86.87 ± 1.07 ^{a,b,c}
	6.0 Gy 组	58.80 ± 0.85 ^{a,b,d}	87.64 ± 0.74 ^{a,b,c,d}	95.62 ± 0.92 ^{a,b,c}	97.69 ± 0.76 ^{a,b,c}
脾脏	对照组	7.20 ± 0.37	6.14 ± 0.374	8.18 ± 0.34 [*]	8.32 ± 0.16
	2.0 Gy 组	7.16 ± 0.31 ^{b,d}	8.07 ± 0.24 ^{a,b,c,d}	9.95 ± 0.57 ^{a,b,c}	8.88 ± 0.13 ^{a,c,d}
	3.0 Gy 组	9.06 ± 0.43 ^{a,b,d}	10.05 ± 0.28 ^{a,b,d}	13.29 ± 0.35 ^{a,b,c}	13.08 ± 0.37 ^{a,b,c}
	4.0 Gy 组	12.16 ± 0.34 ^{a,d}	14.15 ± 0.47 ^{a,c,d}	18.43 ± 0.49 ^{a,c}	18.15 ± 0.39 ^{a,c}
	5.0 Gy 组	14.19 ± 0.41 ^{a,b,d}	17.19 ± 0.55 ^{a,b,c,d}	24.78 ± 0.56 ^{a,b,c}	23.06 ± 0.53 ^{a,b,c}
	6.0 Gy 组	16.01 ± 0.35 ^{a,b,d}	22.04 ± 0.63 ^{a,b,c,d}	26.14 ± 1.16 ^{a,b,c}	25.35 ± 0.53 ^{a,b,c}

表 3 辐照对小鼠胸腺、脾脏组织 SOD 的影响

指标	组别	U/mg 蛋白			
		24 h	48 h	96 h	192 h
胸腺	对照组	186.62 ± 2.66	193.57 ± 2.34	179.39 ± 2.29	173.24 ± 2.24
	2.0 Gy 组	193.72 ± 2.61 ^{a,b,d}	182.63 ± 1.85 ^{a,b}	170.34 ± 1.78 ^{a,b,c}	169.95 ± 2.33 ^{a,b,c}
	3.0 Gy 组	175.47 ± 2.06 ^{a,d}	164.40 ± 2.07 ^a	153.85 ± 2.27 ^{a,c}	161.59 ± 2.49 ^{a,c}
	4.0 Gy 组	164.79 ± 2.51 ^{a,d}	163.88 ± 1.91 ^a	150.14 ± 2.06 ^{a,c}	149.43 ± 2.13 ^{a,c}
	5.0 Gy 组	153.55 ± 1.66 ^a	151.90 ± 1.66 ^a	144.49 ± 2.19 ^a	142.22 ± 3.48 ^{a,c}
	6.0 Gy 组	149.40 ± 2.50 ^{a,b}	137.58 ± 1.78 ^{a,b,c}	137.84 ± 1.24 ^{a,b}	130.83 ± 2.03 ^{a,b,c}
脾脏	对照组	92.05 ± 1.66	92.10 ± 1.68	96.89 ± 1.44	100.18 ± 1.90
	2.0 Gy 组	91.63 ± 1.65 ^{b,d}	89.67 ± 1.60 ^{a,b}	87.38 ± 1.42 ^{a,b,c}	94.67 ± 1.14 ^{a,b,d}
	3.0 Gy 组	84.09 ± 1.23 ^{a,b}	79.40 ± 1.61 ^{a,b}	82.01 ± 1.04 ^{a,b}	83.00 ± 0.99 ^{a,b}
	4.0 Gy 组	76.92 ± 1.41 ^{a,d}	68.00 ± 1.32 ^{a,c}	64.28 ± 1.46 ^{a,c}	68.26 ± 1.14 ^{a,c}
	5.0 Gy 组	69.33 ± 1.76 ^{a,b,d}	61.20 ± 1.66 ^{a,b,c,d}	53.88 ± 2.11 ^{a,b,c}	52.34 ± 1.64 ^{a,b,c}
	6.0 Gy 组	63.96 ± 1.53 ^{a,b,d}	57.18 ± 1.64 ^{a,b,c,d}	50.01 ± 2.00 ^{a,b,c}	49.39 ± 1.67 ^{a,b,c}

3.0 Gy、4.0 Gy 组小鼠脾脏中 SOD 含量随取样时间延长呈升高趋势,辐照 5.0 Gy、6.0 Gy 组小鼠脾脏中 SOD 含量随取样时间延长呈先升高后降低趋势。

3 讨论

生物分子损伤是一切辐射生物效应的物质基础。产生电离辐射生物学效应的最基本的原因是由于放射线与物质的相互作用导致的生物分子的电离激发的直接作用以及由此而产生的自由基导致的继发作用^[9]。而对于辐射引起的组织细胞的损伤,生物机体具有完善的防御体系,有一系列的修复体系。如 SOD 作为抗氧化酶可清除体内的自由基,从而在一定程度上使生物分子和细胞免受损伤,消除其

对机体的损害,具有抗衰老、提高机体免疫力作用,其活性高低可反映机体抵抗自由基的能力^[10]。当机体细胞受到自由基攻击时,细胞内的脂质过氧化物会大量降解产生 MDA, 所以其含量变化可反映机体脂质过氧化水平,从而进一步反映细胞受自由基攻击的程度。

本实验以小鼠胸腺、脾脏为研究对象,观察了不同剂量 X 射线照射下,不同时间组织中 SOD 和 MDA 的变化情况。结果表明,取样时间相同,各剂量组小鼠胸腺、脾脏指数与对照组比较均显著降低,且指数降低程度与辐照剂量呈正相关;相同辐照剂量,不同取样时间,各组小鼠胸腺、脾脏指数均呈现先降低后升高趋势。因二者均为电离辐射敏感器官,经照射后胸腺细胞、脾脏细胞均出现不同程

度的凋亡,胸腺小体和脾小体缩小或完全消失,体积明显缩小,变化程度与辐照剂量有直接关系。但随着辐照后取样时间延长,细胞损伤开始进行自我修复,细胞数量增加,体积增大,同时表现出低剂量辐照开始恢复时间较高剂量辐照开始恢复时间早且不同组织恢复时间不同的规律,表明在辐照范围(2.0~6.0 Gy)条件下高剂量辐照的损伤强度较低剂量辐照高,但在辐照后一定时间均可发生自我修复。

当机体处于低剂量的电离辐射时,因生物体具有完善的防御机制,会产生大量相关的酶类保护组织免受自由基攻击,SOD活力升高,所以MDA含量会维持在一个相对较低的水平,当损伤因素解除,机体在短时间内会恢复正常。随辐射剂量增大,机体抗氧化机制受到破坏,随着自由基的不断增多,SOD被大量消耗,细胞被无法清除的自由基攻击,大量脂质过氧化物降解,MDA含量增加。这可能是脾脏、胸腺组织中MDA含量经不同剂量X射线照射后变化的原因,而MDA含量也会随着SOD活性的降低而升高。

综上所述,在所观察照射剂量和测定时间内,X射线对小鼠免疫器官的影响与辐照剂量正相关。不同组织重量恢复时间,低剂量辐照先于高剂量辐照。MDA含量与辐照剂量、辐照取样时间呈正相关,SOD活性呈负相关。

参考文献:

- [1] Sycheva LP, Shchegoleva RA, Lisina NT, et al. The dependence of the mutagenic effect on the dose of X-ray irradiation in an *In Vivo* experiment on female (CBA×C57Bl/6)F1 mice[J]. *Bull Exp Biol Med*, 2018, 166(1):43-45.
- [2] Biechonski S, Olender L, Roitman A Z, et al. Attenuated DNA damage responses and increased apoptosis characterize human hematopoietic stem cells exposed to irradiation[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1):6071-6084.
- [3] Wang B, Tanaka K, Ninomiya Y, et al. Increased hematopoietic stem cells/hematopoietic progenitor cells measured as endogenous spleen colonies in radiation-induced adaptive response in mice (Yonezawa Effect)[J]. *Dose Response*, 2018, 16(3): 1-10.
- [4] Shao L, Luo Y, Zhou D. Hematopoietic stem cell injury induced by ionizing radiation[J]. *Antioxid Redox Signal*. 2014, 20 (9): 1447-1449.
- [5] Lee EK, Kim JA, Kim JS, et al. Activation of de novo GSH synthesis pathway in mouse spleen after long term low-dose γ -ray irradiation[J]. *Free Radic Res*, 2013, 47(2):89-94.
- [6] Kovalchuk IP, Golubov A, Koturbash IV, et al. Age-dependent changes in DNA repair in radiation-exposed mice [J]. *Radiat Res*, 2014, 182(6):683-94.
- [7] Reiko I, Laura PH, Susan MG, et al. Late effects of exposure to ionizing radiation and age on human thymus morphology and function[J]. *Radiat Res*, 2017, 187(5):589-598.
- [8] 徐瑞明, 张占春, 金顺子. X射线全身照射对小鼠胸腺重量、细胞数及细胞凋亡的影响[J]. *浙江临床医学*, 2015, 17(1):3-5.
- [9] 李雅春, 万玲. 电离辐射与人体健康[M]. 北京: 原子能出版社, 2009:74-76.
- [10] 王崇道, 强亦忠. 电离辐射所致自由基对机体的损伤与自由基清除剂的研究[J]. *中华放射医学与防护杂志*, 2002, 22(6):461-463.

Effects of X-ray Irradiation with Different Dosages on Immune Organs in Mouse

YU Chun-miao¹, FU Jia-qi¹, ZHAO Li-song², GUO Li-dong¹, GUO Xu², YU Dong-Hua³

(1. *Pharmaceutical College, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;*

2. *Department of Radiotherapy and Chemotherapy, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150041, China;*

3. *Institute of Traditional Chinese Medicine, Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China)*

[Abstract] **Objective** To explore the effects of different irradiation dosages of X-rays on mouse immune organs. **Methods** Totally 192 mouse were randomly divided into 6 groups: the normal control group and single irradiation 2.0 Gy group, 3.0 Gy group, 4.0 Gy group, 5.0 Gy group and 6.0 Gy group. The samples were taken respectively from mouse of each group at 24 h, 48 h, 96 h, 192 h after irradiation, and the thymus glands and spleens were weighed and taken for calculating organ index and determining the content of superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA). **Results** At the same sampling time, the thymus glands and spleen index and the content of SOD in each dose group were significantly less than control group, The content of MDA was significantly higher than control group. The trends of change in thymus glands and spleen index of the mouse in each group increased and decreased first at the same irradiation dosages and different sampling time. The content of MDA in thymus glands increased with the prolongation of sampling time, and the content of MDA in spleen was a trend of reducing the rise first. The content of SOD in thymus increased first and then decreased with the prolongation of sampling time. The content of SOD in the spleen of irradiated 2.0 Gy, 3.0Gy and 4.0 Gy mouse increased with the sampling time. And in the irradiation of 5.0 Gy, 6.0 Gy group, the content of SOD in the spleen of mouse increased first and then decreased with the prolongation of sampling time. **Conclusion** The effect of X-rays on immune organs in mouse was positively correlated with the dose of irradiation during the observed dose and measurement time. Different tissue weight recovery times are different, and low-dose irradiation begins to recover time. Higher dose irradiation begins to recover earlier.

[Key words] X-ray; Immune organs; Injury

中毒剂量下维生素 D₃ 对大鼠肾脏的影响

史向华, 杨文彬, 薛润苗, 赵静宇, 续 艳, 张彩峰, 柴秋彦

(山西省医药与生命科学研究院药理研究室, 太原 030006)

[摘要] 目的 观察维生素 D₃(VitD₃)中毒剂量下对大鼠的血液及肾脏生化指标的影响。方法 SPF 级 SD 大鼠随机分为正常对照组、VitD₃ 低剂量组(1 875 IU/kg 组)、VitD₃ 中剂量组(3 750 IU/kg 组)、VitD₃ 高剂量组(7 500 IU/kg 组)和 VitD₃ 超高剂量组(15 000 IU/kg 组), 每日灌胃(ig)1 次, 连续 3 周, 实验结束, 检测相关指标。结果 各组大鼠血清中尿素氮(BUN)和肌酐(Cre)随着剂量降低呈明显下降、血清 Ca²⁺ 含量随着剂量增加呈明显上升, 超氧化物歧化酶(SOD)含量随着剂量增加逐渐降低; 大鼠血清丙二醛(MDA)含量随着剂量增加逐渐升高; 各组肾组织 Ca²⁺ 含量随着剂量增加逐渐升高、MDA 含量在 1 875 IU, 7 500 IU 时, 与对照组比较差异无统计学意义。结论 VitD₃ 在 7 500 IU/kg, 15 000 IU/kg 的剂量时, 对实验大鼠的肾功能生化指标 BUN、Cre 及血清 Ca²⁺ 含量均有明显影响, 表明 Vit D₃ 在此剂量范围内, 是引起实验大鼠肾脏毒性的剂量。

[关键词] 维生素 D₃(VitD₃); 大鼠; 中毒剂量; 肾脏

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0136-04

维生素 D₃(VitD₃)属脂溶性维生素, 是维持生命所必需的营养素之一, 它有两种形式, 即胆钙化醇(VitD₃)和角骨化醇(VitD₂)^[1]。VitD₃ 对人体的骨骼发育极为重要, 其主要功能是促进钙、磷在肠道的吸收, 维持血清钙和磷的浓度在正常范围内, 并促进钙在骨组织中的沉积, 维持人体骨骼的健全以及神经肌肉功能的正常。此外, VitD₃ 还具有免疫调节功能, 参与人体对感染的反应。当 VitD₃ 不足时, 在小儿可引起佝偻病(俗称缺钙), 在成人则可引起骨质疏松症(特别是妊娠和哺乳期的妇女), 与老年人的骨质疏松症也有密切关系。目前, 维生素 VitD₃ 在临床得到了广泛的使用, 作为动物生长和维持生命所必需的营养素之一, 在动物饲料配制中, 也进行了大量的添加使用。VitD₃ 虽是发育不可缺少的营养成分, 但并不是摄入越多越好, 过量服用会

引起中毒^[2]。VitD₃ 中毒常是因为使用不当, 或是在治疗佝偻病的过程中反复大量使用 VitD₃ 所致^[3]。VitD₃ 产生的中毒症状是通过增加肠钙的吸收而造成血液中钙水平升高所引起的。当血清钙浓度超过 110~130 mg/L 时, 出现全身症状, 如乏力、口渴、食欲不振、意识障碍等。急剧发生重症高钙血症会引发高钙血症性肾危象, 表现为以急性肾小管坏死为特征的急性肾功能衰竭^[4]。在某些情况下, 肾损害可能是不可逆转的。本实验拟通过给大鼠摄入大剂量的 VitD₃, 探讨中毒剂量 VitD₃ 对肾功能的生化指标、肾组织自由基及钙离子沉积的影响。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 5 周龄 SD 大鼠, 40 只, 雄雌各半, 体质量 150~170 g, 购自河北医科大学实验动物中心[SCXK(冀)2008-1003], 饲养于山西省医药与生命科学研究院药理研究室 SPF 屏障级动物房[SYXK(晋)2017-0001]。

1.2 主要试剂

VitD₃注射液(7.5 mg/mL), 购自上海通用药业股

[收稿日期] 2018-10-31

[基金项目] 山西省科技厅“实验动物专项基金”(No. 2009 K06)

[作者简介] 史向华(1973-), 男, 高级工程师, 研究方向: 药理学。E-mail: 270780750@qq.com

[通信作者] 柴秋彦, 男, 高级工程师, 研究方向: 新药药效及毒理学评价, E-mail: ChaiQY@vip.163.com

份有限公司生产(批号: 20100106); 超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒(批号: 20130408), 丙二醛(MDA)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cre)和尿酸(UA)测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所(批号: 20130416), 血液钙(Ca^{2+})定量检测试剂盒, 购自中生北控科技股份有限公司(批号: 2010416)。

1.3 主要仪器

电子天平(型号 BT2202S)购自北京赛多利斯仪器系统有限公司, 全自动生化分析仪(型号 ChemWell 2910)购自金西盟(北京)仪器有限公司, 半自动酶标仪(型号 R960型)购自长春赛诺迈德医学技术有限公司, 光学显微镜(型号 BH-2 型)购自日本 Olympus 公司, 全自动五分类动物专用血液分析仪(型号 HEMAVET950 型)购自北京卓越励新有限责任公司, 原子吸收光谱仪(型号 DUOAA)购自安捷伦科技(中国)有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 动物分组 将 40 只 SD 大鼠随机分为正常对照组、VitD₃ 低剂量组(1 875 IU/kg 组, VitD₃ I)、VitD₃ 中剂量组(3 750 IU/kg 组, VitD₃ II)、VitD₃ 高剂量组(7 500 IU/kg 组, VitD₃ III)和 VitD₃ 超高剂量组(15 000 IU/kg 组, VitD₃ IV)5 组, 每组 8 只, 雌雄各半; 动物在实验前不禁食, 不禁水。

1.4.2 给药途径、剂量和时间 VitD₃ 注射液, 以玉米油进行等量递增稀释, 分别配成所需浓度, 每日临用时现配。每日灌胃给药 1 次, 给药体积为 0.5 mL/100 g, 连续 3 周; 对照组大鼠灌胃等量生理盐水。

1.4.3 样本采集 血清样本采集, 禁食过夜后称量体质量, 用乙醚麻醉大鼠, 采用腹主动脉采血, 血样自然凝固后离心(4 °C, 3 000 r/min) 10 min, 取上清液贮存于 -4 °C 待测。

肾组织 Ca^{2+} 含量测定样品制备, 精确称取干燥后样本约 0.5 g 于 250 mL 高型烧杯, 加混合酸消化液 20~30 mL, 上盖表面皿。置于电热板或沙浴上加热消化。如未消化好而酸液过少时, 补加消化液, 继续消化, 直至无色透明。加 5 mL 水, 加热以除去多余的硝酸。待烧杯中液体量约 2~3 mL 时, 取下冷却。用 20 g/L 氧化铜溶液洗并转移于 10 mL 刻度试管中, 定容待测。

1.4.4 样本测定 体质量增长测定, 分别在实验 1 d、9 d、18 d、21 d 用电子天平称量并记录体质量。

血清生化指标测定, 利用全自动生化分析仪测定各组大鼠血清尿酸(UA)、尿素氮(BUN)、肌酐(Cre); 按试剂盒说明书分别测定 MDA、SOD。

肾组织 Ca^{2+} 含量测定, 取肾组织精密称量, 按 1:9 加入冷藏的生理盐水, 剪碎, 匀浆, 3 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 以原子吸收光谱仪测定; 取与消化试样相同量的混合酸消化液, 按上述操作试剂空白测定。

1.5 数据统计分析

SPSS 19.0 统计软件进行分析, 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 LSD-*t* 法进行分析。P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠一般情况

对照组大鼠精神状态良好, 被毛光亮, 活动如常, 能自由进食饮水。VitD₃ 用药各组大鼠, 在 1 周时, 外观被毛、活动、饮食、排便及体质量增长等一般状况, 与对照组无明显差别; 2 周时, VitD₃ III 和 VitD₃ IV 组大鼠的一般状况欠佳; 3 周时, VitD₃ III 和 VitD₃ IV 组大鼠活动及饮食明显减少, 被毛无色泽。

2.2 大鼠体质量

3 周后, VitD₃ III 和 IV 组雄性大鼠的体质量增长明显降低(P<0.05); 雌性大鼠体质量增长略有减缓(P>0.05)。与低剂量组比较, VitD₃ III 和 IV 在连续给药 21 d, 雄性大鼠体质量随着剂量的增加, 体质量增长明显减缓(P<0.05), 给药期间, 雌性大鼠体质量无明显变化, 详见表 1。

2.3 大鼠血清 BUN 和 Cre 浓度

连续 3 周后, 与对照组比较, VitD₃ III 和 IV 组大鼠 BUN 含量明显下降(P<0.05, P<0.01); 各剂量组大鼠 Cre 含量随着剂量增加明显下降(P<0.05, P<0.01), 详见表 2。

2.4 大鼠血清和肾组织 Ca^{2+} 、SOD 和 MDA 含量

给药 3 周后, VitD₃ 中剂量起各组大鼠血清 Ca^{2+} 含量明显上升(P<0.05, P<0.01)(表 3); 肾组织 Ca^{2+} 含量随着剂量的增加逐渐升高(P<0.05, P<0.01)(表 3)。

用药 3 周后, 与对照组比较, VitD₃ III 和 IV 组大鼠血清 SOD 含量随着剂量的增加逐渐降低(P<0.05, P<0.01); VitD₃ II、III 和 IV 组大鼠血清 MDA 含量随

表 1 VitD₃ 对大鼠体质量的影响

g

组别	1 d		9 d		18 d		21 d	
	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性	雄性	雌性
对照组	199 ± 12	173 ± 19	246 ± 17	189 ± 19	299 ± 22	212 ± 18	294 ± 20	204 ± 17
VitD ₃ I	195 ± 16	175 ± 15	254 ± 26	191 ± 8.7	317 ± 33	210 ± 7.5	323 ± 35	204 ± 7.4
VitD ₃ II	189 ± 7.3	169 ± 16	242 ± 7.9	194 ± 19	293 ± 14	212 ± 18	293 ± 11	208 ± 19
VitD ₃ III	191 ± 9	168 ± 20	228 ± 18	192 ± 24	270 ± 32	206 ± 23	268 ± 33 [○]	201 ± 24
VitD ₃ IV	194 ± 12	187 ± 18	237 ± 27	200 ± 17	258 ± 38	204 ± 22	258 ± 38 ^{□□}	200 ± 25

注: 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 VitD₃I 组比较, [○] $P<0.05$, ^{○○} $P<0.01$; 与 VitD₃II 组比较, [□] $P<0.05$, ^{□□} $P<0.01$

表 2 VitD₃ 对各组大鼠 BUN 和 Cre 的影响

组别	BUN/mmol · L ⁻¹	Cre/μmol · L ⁻¹
对照组	7.74 ± 0.64	46.25 ± 2.25
VitD ₃ I 组	7.28 ± 1.03	43.12 ± 3.36*
VitD ₃ II 组	7.47 ± 0.78	40.86 ± 2.19*
VitD ₃ III 组	6.77 ± 1.12*	40.88 ± 3.52**
VitD ₃ IV 组	5.42 ± 0.61** ^{○○□□△△}	40.75 ± 3.73**

注: 与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 VitD₃I 组比较, [○] $P<0.05$, ^{○○} $P<0.01$; 与 VitD₃II 组比较, [□] $P<0.05$, ^{□□} $P<0.01$; 与 VitD₃III 组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.05$

着剂量增加逐渐升高($P<0.05$, $P<0.01$)(表 3)。用药 3 周后, 与对照组比较, VitD₃ I、II 和 III 剂量组大鼠肾组织匀浆 MDA 含量未见明显的变化, VitD₃ IV 组 MDA 含量均明显降低($P<0.01$)(表 3)。

3 讨论

体质量增长是反映实验动物一般生理状况的重要指标, 特别是在药物的毒性实验评价中, 是必

表 3 VitD₃ 对各组大鼠血清和肾组织 Ca²⁺、SOD 和 MDA 含量

组别	血清 Ca ²⁺ /nmol · L ⁻¹	肾组织 Ca ²⁺ /nmol · L ⁻¹	血清 SOD/IU · kg ⁻¹	血清 MDA /nmol · g ⁻¹	肾组织 MDA /nmol · g ⁻¹
对照组	2.92 ± 0.18	4.89 ± 0.84	154.82 ± 13.5	4.26 ± 0.63	138.88 ± 37.05
VitD ₃ I 组	2.99 ± 0.22	5.45 ± 0.87	128.74 ± 10.83	5.66 ± 0.86	138.20 ± 26.79
VitD ₃ II 组	3.26 ± 0.34 [○]	6.29 ± 1.23*	124.15 ± 14.35	9.91 ± 1.22* ^{○○}	121.64 ± 15.23
VitD ₃ III 组	3.30 ± 0.29** ^{○○}	7.51 ± 0.85** ^{○○□}	98.74 ± 10.83* ^{○○□□}	12.66 ± 2.06* ^{○○□□}	138.90 ± 55.02
VitD ₃ IV 组	3.85 ± 1.13*	8.62 ± 2.72** ^{○○□}	86.15 ± 14.35** ^{○○□□}	14.91 ± 4.22** ^{○○□□}	90.38 ± 17.78** ^{○○□□△}

注: 与对照组比较: * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 VitD₃I 组比较, [○] $P<0.05$, ^{○○} $P<0.01$; 与 VitD₃II 组比较, [□] $P<0.05$

须考察的项目。本实验结果显示, Vit D₃ 用药组大鼠在连续 3 周用药后, 体质量增长均有减缓, 与对照组相比, 雌性大鼠差异无统计学意义, 但雄性大鼠体质量增长则明显降低, Vit D₃ 在 7 500 IU、15 000 IU 剂量时, 增长停滞, 体质量下降, 说明在此剂量时, 对大鼠的正常生理代谢功能造成了严重干扰, 出现了明显的毒性。并说明雄性大鼠比雌性大鼠更为敏感。

血清 BUN、Cre 含量是临床上反映机体肾脏功能的常用指标, 其含量的高低, 可以敏感反映肾小球的滤过功能和损害程度^[5]。在有关实验性肾功能损伤的研究中, 都把血清 BUN、Cre 含量作为衡量肾功能的主要指标之一, 但尚未见大剂量 Vit D₃ 用于大鼠造成中毒而引起血清 BUN、Cre 含量升高的报道。本实验结果显示, 在中毒剂量范围内的大鼠血清 BUN、Cre 含量随着剂量的增加而相应的下降, 同对照组比较, 差异具有统计学意义($P<0.01$),

可能在此中毒剂量时, 严重干扰了大鼠体内蛋白质和肌肉的合成和代谢, 使相应的代谢产物减少所致。

近年来的研究^[6]表明, 氧化应激损伤是肾损伤发病的重要机制之一。有文献^[7]通过实验证实 VitD₃ 能促进氧化作用产生过氧化物即 VitD₃ 自由基, 后者造成细胞膜的脂质过氧化, 引起组织损伤。细胞膜受损后, 即使血钙不升高, 也可发生营养不良性钙化。本实验所用剂量下, 大鼠血液过氧化物歧化酶 SOD 含量明显降低, MDA 含量明显上升, 说明实验大鼠使用 VitD₃ 可以使血清中 SOD 浓度下降, MDA 活性增高, 造成肾脏组织的自由基损伤, 同文献报道的研究结果相似。同时也提示大剂量使用 VitD₃ 后造成机体自由基增加造成的氧化应激性损伤, 可能是大剂量使用 VitD₃ 后产生肾脏毒性作用的机制之一。

实验结果表明, 1 875~7 500 IU/kg 剂量下,

大鼠肾组织匀浆 SOD、MDA 含量没有明显变化,但在 15 000/kg 剂量时明显降低,与大鼠血清 SOD、MDA 含量测定结果相反,排除实验结果误差外,尚无法作出合理的解释,有待进一步研究探讨。VitD₃用药组肾组织Ca²⁺含量随着剂量的增加逐渐升高,与对照组比较,差异有显著或十分显著的统计学意义,说明大剂量使用 VitD₃ 时可造成大量 Ca²⁺ 在肾组织中沉积,是造成肾脏毒性的主要原因。结果同以往文献^[8,9]报道结果一致。

本实验结果表明, VitD₃ 在 7500~15 000 IU/kg 剂量,已经达到引起大鼠肾脏毒性的剂量。

参考文献:

- [1] 张萌萌. 生命、骨骼、维生素 D₃[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(11):1496-1500.
- [2] 朱庆龄, 盛晓阳. VitD₃过量及中毒的研究进展[J]. 中华儿科杂志, 2015, 53(3):235-237.
- [3] 游诚, 钟燕, 赵莎, 等. 大剂量口服 VitD₃ 治疗婴幼儿 VitD₃ 缺乏性佝偻病的临床疗效观察[J]. 中国医师杂志, 2015, 17(7):1088-1091.
- [4] 谷口正智. VitD₃D 制剂引起的肾损害[J]. 日本医学介绍, 2006, 27(8):367-369.
- [5] 孙达, 王娇姣, 王力宁, 等. 慢性肾脏病患者 25-羟维生素 D₃ 水平的改变及其影响因素分析[J]. 临床肾脏病杂志, 2016, 16(5):265-270.
- [6] 佟苏东. 氧化应激与肾脏损伤[J]. 医学信息, 2013, 26(7):1.
- [7] Sahota O. Understanding vitamin D deficiency[J]. Age Ageing, 2014, 43(5):589-591.
- [8] 马玉玲, 何金生, 张晓敏. 滥用维生素 D₃ 导致婴幼儿异位钙化44例分析[J]. 中国儿童保健杂志, 2011, 19(11):1054-1055.
- [9] 李红菲, 关庆润, 谢英志. 不同剂量 VitD₃ 对大鼠脏器钙含量的影响[J]. 哈尔滨医科大学学报, 1989, 23(3):168-117.

Effect of Vitamin D₃ on Kidney of Rat at Toxic Dose

SHI Xiang-hua, YANG Wen-bin, XUE Run-miao,

ZHAO Jing-yu, XU yan, ZHANG Cai-feng, CHAI Qiu-yan

(Department of Pharmacology, Shanxi Academy of Medicine and Life Science, Taiyuan 030006, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of vitamin D₃ (VitD₃) at toxic dose on the blood and renal biochemical indicators of rats. **Methods** The specific pathogen free SD rats were randomly divided into five groups: control group, low dose VitD₃ group (1 875 IU), medium dose VitD₃ group (3 750 IU), high dose VitD₃ group (7 500 IU), and super high-dose VitD₃ group (15 000 IU). They were intragastric administration once a day for 3 weeks. The relevant indicators were detected after treatment finished. **Results** Serum blood urea nitrogen (BUN) and Creatinine (Cre) decreased significantly with the dose decreasing, and the content of serum Ca²⁺ increased significantly with the dose increasing. The content of superoxide dismutase (SOD), and serum malondialdehyde (MDA) decreased with the dose increasing. In renal tissue, the content of Ca²⁺ gradually increased with the dose increasing, and there was no significant difference in MDA at the dose of 1 875 IU and 7 500 IU. **Conclusions** At the dose of 1 875 IU to 15 000 IU, VitD₃ has significant effects on the renal biochemical indicators such as BUN, Cre and serum Ca²⁺, indicate that the dose range 1 875 IU to 15 000 IU can induce renal toxicity in experimental rats.

[Key words] Vitamin D₃(VitD₃); Rats; Toxic dose; Kidney

基于 Sequenom MassARRAY SNP 技术检测嗅觉受体基因与工作犬嗅探能力的关联性研究

高一龙, 贺星亮, 强京宁, 宋珍华, 温海, 陶晓冉, 孙勇, 秦海斌, 包喜军, 孟戈, 朱骞
(公安部南京警犬研究所, 警犬技术公安部重点实验室, 南京 210012)

[摘要] 目的 开展嗅觉受体基因(OR)的单核苷酸多态性(SNP)与工作犬嗅探能力之间的关联性研究。方法 应用 Sequenom MassARRAY SNP 技术, 对 OR 基因的单核苷酸多态性(SNP)位点进行检测, 并分析不同 SNP 基因型与工作犬嗅探能力之间的关联性。结果 建立的 Sequenom MassARRAY SNP 检测 OR 基因分型技术方法, 68 个 SNP 位点在史宾格犬、拉布拉多犬和德国牧羊犬 3 个犬种中检出率在 90% 以上; 显示与工作犬的嗅探能力呈一般统计学意义上显著相关($P < 0.05$)的 SNP 位点有 23 个, 但经过多重检验 bonferroni (BONF)法和 FDR_BH 法校正后, 表明 COR52AC1_436、rs850523383、CfOR0149_364 和 CfOR0055_265 这 4 个 SNP 位点与嗅探能力分别呈显著相关($P < 0.05$)和极显著相关($P < 0.01$)。结论 筛选出显著影响工作犬嗅探能力的主效 OR 基因 SNP 位点 4 个, 初步建立了一种适用于史宾格犬、拉布拉多犬和德国牧羊犬这 3 个工作犬种, 鉴定其嗅探能力的分子遗传学检测方法。

[关键词] Sequenom MassARRAY; 嗅觉受体(OR)基因; 单核苷酸多态性(SNP); 工作犬; 嗅探能力

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0140-06

鉴于犬的嗅觉能力突出, 目前各国警方广泛应用训练有素的工作犬搜查诸如爆炸物、毒品等隐匿的违禁品, 打击和预防犯罪。警犬的嗅探能力是受犬嗅觉受体(OR)基因调控的, 因此如果能够运用分子生物学技术开展警犬嗅探能力与 OR 基因之间的关联性研究工作, 发现主要的分子标记来挑选嗅觉灵敏的受训犬, 可以显著提高警犬的训成率。

OR 是由嗅觉细胞表达的一种蛋白质, OR 基因属于 G 蛋白偶联受体超家族^[1]。1991 年, 首先在

褐家鼠中发现 OR 基因超家族^[2], 阐明了嗅觉系统的结构组成和工作原理。OR 基因很小, 每一 OR 由大约 1 kb 单一编码的外显子组成, 编码区没有内含子。Olender 等^[3]研究识别了犬基因组中 1300 个 OR 基因, 约占犬 OR 基因组的 80%。虽然目前科研人员对犬 OR 基因的组成结构、分类分布和多态性等方面展开了研究, 但很少有人对犬 OR 基因多态性与其嗅探能力之间的关联性进行研究。

在本研究工作中, 以警用工作犬作为模式动物, 采用 Sequenom MassARRAY SNP 分型技术, 对 OR 基因的 68 个 SNP 位点进行分型检测, 并分析不同 SNP 基因型与工作犬嗅探能力之间的关联性, 来探索验证犬主效 OR 基因 SNP 位点, 寻找与犬嗅探能力相关的分子标记。

1 材料与方法

1.1 动物

本研究受试对象是由 113 只犬组成的群体, 为来自公安部南京警犬研究所实验动物中心生产的工

[收稿日期] 2018-11-16

[基金项目] “十三五”国家重点研发计划项目“警犬实战与训练、行为分析及综合评估技术研究”(2016YFC0800310), 江苏省自然科学基金——面上项目“工作犬主效嗅觉受体基因的筛选及其与嗅探能力的关联性研究”(BK20141092)

[作者简介] 高一龙(1982-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向: 主要从事警犬遗传育种、繁殖和行为遗传学研究。
E-mail: gaoyilong726@163.com

[通信作者] 贺星亮(1969-), 男, 博士, 研究员, 主要从事警犬疾病防控、遗传和行为研究。E-mail: ehxl69@163.com

作犬以及各市局警犬队的 1~3 岁的史宾格犬 44 只(雄 24, 雌 20)、拉布拉多犬 40 只(雄 25, 雌 15)和德国牧羊犬 29 只(雄 16, 雌 13)。这些犬大多是经过实战检验, 并且通过年度复核的嗅探犬, 或者是在某个特定专业方向进行训练, 处于训练最后一个阶段即实战验证之前的嗅探犬。所有工作犬全年饲养于户外, 一犬一舍(4 m × 4 m), 犬舍屋顶有隔热层, 并有独立的户外运动场(15 m × 6 m)。采用颗粒饲料定时定量饲喂, 自由饮水, 每日适度散放、运动, 定时训练。全程兽医监控健康保障。带犬民警和饲养管理人员, 按照犬训练使用保障条例以人道的方式对待所有受试工作犬。

1.2 主要仪器及试剂

2720 型 PCR 仪购自美国 ABI 公司; System electrophoresis Mupid (Mupid 2 plus)电泳槽购自日本 TaKaRa 公司; image system(EUV-LDUV)凝胶成像系统购自韩国 Biotech 公司; Centrifuge (MICRO 17TR)离心机购自韩国 Hanil 公司; Agena Mass ARRAY 购自美国 Agena 公司。血液基因组 DNA 提取试剂盒(DP348)和蛋白酶 K 购自天根生化科技有限公司; PCR Enzyme 购自瑞士 Roche 公司; PCR Accessory Set、SpectroCHIP Resin Kit 和 IPLEX Gold Reagent Kit(Large)均购自美国 Agena 公司; 滤膜(0.22 μm)购自南京天为生物科技有限公司; 引物由英潍捷基(上海)有限公司合成。

1.3 方法

1.3.1 嗅探能力测试以及评分 本实验研究参考文献^[4]测试方法, 结合公安机关使用的警犬专业考核方法, 通过警犬训导员专业考核评分(professional test, PT)和生物本能中性测试(instinct test, IT)两种方式, 综合考核受试犬只的嗅探能力。PT 法(百分制)是由具有丰富经验的专业警犬训导员, 按照公安部颁发的缉毒犬、搜爆犬和血迹搜索犬考核方法和评分标准, 对受试犬只的嗅探能力按百分制进行打分。IT 法(五分制)是设置与专业方向无关的食物气味中性测试方法, 利用动物觅食的本能, 考核工作犬嗅觉的灵敏性^[4]。

最终结果以这 2 种测试方法的加权成绩得分(grading score, GS), 确定嗅探能力等级, GS 越高, 则意味着该犬的嗅探能力等级越高。

加权公式: $GS = PT \times 0.1 \times 0.5 + IT$

1.3.2 血样采集 由具备资格兽医, 对试验犬使用

一次性真空抗凝管颈静脉采血, 每只 2~5 mL, 送至实验室 -20 °C 冰箱保存。

1.3.3 犬基因组 DNA 提取与检测 按照试剂盒说明书提取基因组 DNA, 琼脂糖凝胶电泳质检, 并测定浓度和吸光度(A)值, 合格的 DNA 样品, A_{260}/A_{280} 在 1.6~2.0。质检合格的 DNA 将浓度调整到 50 ng/μL。

1.3.4 OR 基因 SNP 的筛选 本研究根据前期预研实验和参阅相关文献^[5,6], 从犬 OR 基因超级家族的 SNP 数据库中, 挑选出 68 个 SNP 位点。挑选原则: (1)具有较高多态性, 最小等位基因频率(MAF)>0.1; (2)考虑到 OR 基因 SNP 在犬种分布上的异质性, 例如某些 OR 基因在某一犬种中的 SNP 位点数目特别多, 而在另外一个犬种的 SNP 位点相对较少, 因此重点将文献^[5,6]中所发现的史宾格犬和拉布拉多犬这 2 个犬种的 OR 基因 SNP 位点纳入范围(表 1)。

表 1 挑选的 SNP 信息(部分)

染色体	SNP ID	物理距离
5	CfOR0055_414	10189577
5	CfOR0055_331	10189659
11	rs850523383	66032398
11	CfOR0149_364	66032499
18	OR10H08_440	38151984
18	rs852932007	39752277
21	rs852255956	26646195
21	rs850772711	28583499
21	rs852725696	28583942
21	COR52AC1_436	28796553

1.3.5 引物设计 根据 SNP 的 ID 从 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), 查找所在 OR 基因 SNP 位点上下游 100 bp 参考序列, 使用 Sequenom 公司的引物设计软件 Assay design3.1, 设计 PCR 反应和单碱基扩展引物并合成, 引物具体序列信息见表 2。

1.3.6 PCR 扩增 采用多重 PCR 技术, 在 384 孔板中进行, 每个反应体系总体积为 5 μL, 在兼容 384 孔板的 PCR 仪上, 进行扩增反应。PCR 反应条件: 95 °C 预变性 2 min; 95 °C 20 s, 56 °C 30 s, 72 °C 60 s, 共 45 个循环; 72 °C 再延伸 3 min。

1.3.7 PCR 产物碱性磷酸酶处理 在 PCR 反应结束后, 将配制好的 SAP mix 溶液加入 384 孔 PCR 反应板, 进行碱性磷酸酶处理反应。反应体系总体积为 7 μL (PCR 产物 5 μL, SAP 混合液 2 μL)。

表 2 SNP 引物序列信息(部分)

SNP ID	正、反向引物 (5' → 3')	延伸引物
CfOR0055_265	正向引物 ACGTTGGATGCCCTACTTTACAGTGTGGTC	ggacGTGTGGTCATGTCCCC
	反向引物 ACGTTGGATGAGAGAAAGCCCAGGCTGAAG	
CfOR0006_195	正向引物 ACGTTGGATGGCCTGGACATCATCCTTATC	cCATCATCCTTATCACTGTTT
	反向引物 ACGTTGGATGGCATTGTTGAGAAGGGAGGTG	
rs852186221	正向引物 ACGTTGGATGGACACAGCAATGAGGATCAC	ggCCAAGATGACCATGACAAT
	反向引物 ACGTTGGATGGTGTCTGACATCACCATTAAAC	
rs852891756	正向引物 ACGTTGGATGGCTATTCTCATTGGCAATGG	gaAATGGTGCTATTCTCTTTCTGG
	反向引物 ACGTTGGATGCAGGAGCAGATACATTGGAC	
CfOR0149_82	正向引物 ACGTTGGATGTGGCATATGACCGTTACGTG	ACAGACCTGCCTGTT
	反向引物 ACGTTGGATGTGGCCATCTGCACACAGAC	
rs852502266	正向引物 ACGTTGGATGTTTCAGCACGGCCAGAATTTT	TGCGGGTGCCCCCTCT
	反向引物 ACGTTGGATGTGCTGGAACAGTTTCGCC	
rs852100630	正向引物 ACGTTGGATGTGCACTATTGCCGATAAAC	CAGGACAGACGGGCG
	反向引物 ACGTTGGATGGAGATATCAGAACAGGACAG	
CfOR0015_553	正向引物 ACGTTGGATGTGGTCTCTCCACTTCCATTG	TGGACATCCTGAGACA
	反向引物 ACGTTGGATGAGCAAGTAGATGGCACTGAG	
CfOR0149_364	正向引物 ACGTTGGATGTTCCGATGCTCTTGATTTGC	GCTTTGTTTCTTCCCTC
	反向引物 ACGTTGGATGCACAGGTGGAAAAAGCTTTG	
CfOR0525_356	正向引物 ACGTTGGATGTTTGGGTACATCGGAGTTGG	GGAGCAATGGCTGTGGAC
	反向引物 ACGTTGGATGACGATGTTGTACCTCAAGGG	
COR52AC1_436	正向引物 ACGTTGGATGCATGGAACATCTGTGGTACG	TGTGGTACGATCAGCCCTA
	反向引物 ACGTTGGATGTAGCGTAAAGGCTCACACAC	

碱性磷酸酶处理反应条件: 37 °C: 40 min; 85 °C 5 min, 4 °C 维持。

1.3.8 单碱基延伸 取出反应产物, 将配制好的 Extend mix 对应加入 384 孔反应板。对于每个反应孔, 单碱基延伸反应体系包含 SAP 处理后 PCR 产物 7 μL 及 Extend Mix 液 2 μL, 总体系 9 μL。启动 PCR 仪进行单碱基延伸反应。单碱基延伸 PCR 反应条件: 94 °C 预变性 30 s; 94 °C 5 s, (52 °C 5 s, 80 °C 5 s, 5 个内循环), 再一起 40 个外循环; 72 °C 再延伸 3 min。

1.3.9 树脂纯化 将反应产物加 16 μL 水进行稀释, 稀释后使用树脂进行脱盐。

1.3.10 芯片点样 沉淀树脂后使用 MassARRAY Nanodispenser RS1000 点样仪转移至 384 孔 SpectroCHIP(Sequenom)芯片上, 自然结晶。

1.3.11 质谱检测 上机进行 MALDI-TOF 质谱检测, 并收集数据, 采用 TYPER4.0 软件(Sequenom)进行基因型判读。

1.4 关联分析

关联分析中, 质控主要是评价样本及 SNP 位点

性能的操作, 通过质控剔除不符合条件的样本或 SNP 位点可有效降低关联假阳性的概率。样本的质控主要包括: 样本群体结构、杂合度等; SNP 位点的质控主要包括: call rate(检出率)、哈迪温伯格(H-W)平衡检验、最小等位基因频率等。

采用 plink 软件进行统计分析, 用线性回归模型, 对所有合格样品 SNP 与对应的工作犬考核评分, 进行嗅觉能力关联分析: 分析嗅觉灵敏个体(GS 高分)和嗅觉迟钝个体(GS 低分)在每个 SNP 位点上基因型和等位基因的差异, 寻找与工作犬嗅觉能力显著相关的 SNP 位点。

多重检验校正一般采用 bonferroni (BONF)校正法, 校正的方法是 P^* 位点数。比如我们一共做了 20 个位点, 校正后的 BONF 值为 P^*20 , 结果仍然 <0.05 , 这是可以判定为显著, <0.01 则为极显著。BONF 校正方法检验过于严格, 导致找不到显著差异的基因位点(假阴性)。而 FDR_BH 法, 是用一种简单好用且比较温和的方法校正 P 值, 可以在假阳性和假阴性间达到平衡, 将假 / 真阳性比例控制到一定范围之内。FDR(假阳性率)错误控制法

基本原理是通过控制FDR值来决定P值的值域。那么怎么从P值来估算FDR呢,人们设计了几种不同的估算模型,其中使用最多的是Benjamini and Hochberg方法,简称BH法。

因此,本研究对关联分析结果的P值,采取了BONF法和BH法进行多重检验校正。

2 结果

2.1 工作犬嗅探能力考核评分

嗅探能力综合考核评分结果见表3。

2.2 SNP位点检测分型

2.2.1 SNP位点检出率 68个SNP位点检出率,数据结果见表4。

表3 工作犬嗅探能力考评得分情况(部分)

芯片	品 种	IT分 (5分)	PT分 (100分)	综合成绩 (10分)
19348	史宾格	4	86.67	8.33 ± 0.62
19634	史宾格	5	96.67	9.83 ± 0.24
25519	史宾格	1	72.00	4.60 ± 0.11
23207	史宾格	4	92.00	8.60 ± 0.23
14599	史宾格	5	94.33	9.72 ± 0.10
20132	拉布拉多	4	93.33	8.67 ± 0.47
20142	拉布拉多	3	75.67	6.78 ± 0.61
20512	拉布拉多	5	86.00	9.30 ± 0.45
19738	拉布拉多	2	87.00	6.35 ± 0.50
22734	拉布拉多	5	93.67	9.68 ± 0.13
23214	德国牧羊犬	5	88.00	9.40 ± 0.35
18821	德国牧羊犬	1	87.50	5.38 ± 0.03
14742	德国牧羊犬	5	93.00	9.65 ± 0.05
20458	德国牧羊犬	4	85.00	8.25 ± 0.05
20820	德国牧羊犬	5	90.33	9.52 ± 0.26

表4 SNP位点检出率(部分)

SNP	检出率/%
CfOR0004_460	92.04
CfOR0015_553	92.92
CfOR0055_265	96.46
CfOR0149_364	90.27
CfOR0149_82	92.92
CfOR0525_490	92.92
rs23295854	92.92
rs850972820	94.69
rs851033146	93.81
rs852725696	95.58

2.2.2 SNP位点基因分型结果 受试的113只工作犬,在各个OR基因的SNP位点上,均能有效分型。

2.3 关联分析结果

2.3.1 最小等位基因频率及H-W平衡检验 对所研究的群体进行卡方检验, $P>0.05$,说明接受零假设,即群体满足H-W平衡,反之,如果 $P<0.05$,说明群体不满足H-W平衡。68个SNP位点经质控后合格的有52个($P>0.05$),说明采样的犬群满足H-W平衡,可以进行关联性分析研究(表5)。

2.3.2 关联分析结果 有23个SNP位点与工作犬的嗅探能力有统计学意义上的显著相关($P<0.05$),其余29个SNP位点的基因型与工作犬嗅探能力显著不相关($P>0.05$),工作犬嗅探能力关联分析情况详见表6。

经过多重检验BONF法校正后,COR52AC1_436、rs850523383、CfOR0149_364和CfOR0055_265这4个SNP位点与嗅探能力显著相关($P<0.05$);经过多重检验FDR_BH法校正后,COR52AC1_436、rs850523383、CfOR0149_364和CfOR0055_265这4个SNP位点与嗅探能力极显著相关($P<0.01$)。

3 讨论

3.1 检测方法的建立

本实验研究通过应用设计软件Assay design3.1,设计PCR反应和单碱基扩展引物,对引物浓度、碱性磷酸酶处理反应液(SAP Mix)、单碱基延伸反应液(EXTEND Mix)退火温度、模板量等进行优化,成功筛选出68组特异性好、灵敏度更高的引物,结果表明,建立的Sequenom MassARRAY SNP检测OR基因分型技术方法,68个SNP位点在在史宾格犬、拉布拉多犬和德国牧羊犬3个犬种中检出率在90%以上,说明该方法可以有效应用于这3个犬种的OR基因SNP分型。

3.2 关联分析结果校正

本研究对关联分析结果的P值,采取了BONF法和BH法进行了多重检验校正,均发现有同样的4个SNP位点与嗅探能力相关,只是显著程度有所区别,说明COR52AC1_436、rs850523383、CfOR0149_364和CfOR0055_265这4个SNP位点,可以作为建立嗅探能力分子检测方法的首选位点。

3.3 OR基因与犬嗅探能力的研究

Anna等^[4]曾挑选了5个OR基因,试图探究OR

表 5 基因频率及 H-W 平衡检验情况(部分)

染色体	SNP	次等位 基因 A	等位 基因 B	基因型 AA/AB/BB	最小等位 基因频率	观测 杂合率	期待 杂合率	哈-温平衡 检验 P 值
5	CfOR0055_265	G	C	32/42/35	0.486	0.385	0.500	0.0209
11	rs850523383	T	C	8/28/68	0.212	0.269	0.334	0.0717
11	CfOR0149_364	A	G	9/26/67	0.216	0.255	0.338	0.0173
11	rs852502266	T	C	0/4/102	0.019	0.038	0.037	1.0000
11	rs851746025	A	G	0/4/101	0.019	0.038	0.037	1.0000
18	rs22639325	G	A	2/18/90	0.100	0.164	0.180	0.2840
21	rs852255956	A	T	6/39/61	0.241	0.368	0.365	1.0000
21	rs850772711	T	C	1/21/85	0.108	0.196	0.192	1.0000
21	CfOR0006_449	C	T	4/28/72	0.173	0.269	0.286	0.4999
21	rs852100630	C	T	0/3/102	0.014	0.029	0.028	1.0000
21	CfOR0006_195	T	C	4/29/72	0.176	0.276	0.290	0.7342
21	rs9166499	A	G	0/29/78	0.136	0.271	0.234	0.2081
21	COR52AC1_436	C	T	9/27/74	0.205	0.246	0.325	0.0157
21	rs851033146	A	G	0/9/97	0.042	0.085	0.081	1.0000
21	rs852075784	A	G	16/45/44	0.367	0.429	0.464	0.4086

表 6 工作犬嗅探能力关联分析情况(部分)

染色体	SNP	无表型缺失 样本数	BETA 回归系数	回归系数 的 T 统计量	T 统计量的 渐进性 P 值	BONF	FDR_BH
21	COR52AC1_436	101	-0.7574	-3.589	0.0005	0.0269	0.0079
11	rs850523383	101	0.7557	3.579	0.0005	0.0278	0.0079
11	CfOR0149_364	99	0.7449	3.577	0.0005	0.0283	0.0079
5	CfOR0055_265	101	0.6051	3.54	0.0006	0.0318	0.0079
18	rs22639325	101	-0.9489	-2.643	0.0095	0.4961	0.0992
21	rs852293053	101	0.5109	2.458	0.0157	0.8159	0.1001
21	CfOR0006_671	101	0.5109	2.458	0.0157	0.8159	0.1001
21	rs22975134	101	-0.4353	-2.188	0.0310	1	0.1001
21	rs852899089	101	0.5248	2.106	0.0378	1	0.1001
25	rs23295854	101	-0.4345	-1.481	0.1417	1	0.2673
21	CfOR0192_109	101	0.03834	0.1398	0.8891	1	0.8891

基因与警犬嗅探能力之间的关系, 结果检测到 18 个 SNPs, 其中 cOR52N9_176 和 cOR9S13_592 这 2 个基因显著影响嗅探犬的检测能力。Yang 等^[7]曾应用 Beckman Genome-Lab SNP stream 技术, 选择了 OR 基因的 22 个 SNP 位点, 试图探究其与德国牧羊犬嗅探能力之间的关系, 结果显示, OR10H1-like 632C>T、OR10H1-like 770A>T、OR2K2-like 518G>A、OR4C11-like 511T>G 和 OR4C11-like 692G>A 这 5 个 SNP 位点可能极显著影响德国牧羊犬嗅探能力。

而本研究筛选了 OR 基因的 68 个 SNP 位点, 应

用 Sequenom MassARRAY SNP 技术对史宾格犬、拉布拉多犬和德国牧羊犬这 3 个品种工作犬 OR 基因的 SNP 位点进行基因分型检测, 发现与工作犬的嗅探能力呈一般统计学意义上的显著相关($P<0.05$)的 SNP 位点有 23 个, 其中经过多重检验校正后, 发现 COR52AC1_436、rs850523383、CfOR0149_364 和 CfOR0055_265 这 4 个 SNP 位点与这 3 个品种工作犬嗅探能力显著相关, 这 4 个 SNP 位点是国内外首次发现。本研究较 Anna 等^[4]和 Yang 等^[7]研究筛选的 SNP 数量更多, 发现的与工作犬嗅探能力显著相关的 SNP 位点适应的品种更为丰富, 为工作

犬嗅探能力相关基因的辅助育种提供了候选标记。

综上所述,本研究筛选出与工作犬嗅探气味能力相关联的主效 *OR* 基因 *SNP* 位点 4 个,初步建立了一种能适用于鉴定史宾格犬、拉布拉多犬和德国牧羊犬等 3 个工作犬种嗅探能力的分子遗传学检测方法。该方法可应用于选种选育,促进精准育种;也可以用于选择嗅探能力优秀的合格受训犬,节省人力物力和训练时间,提升警犬训练和实战使用的效果。

参考文献:

- [1] Sharon D, Glusman G, Pilpel Y, et al. Genome dynamics, evolution, and protein modeling in the olfactory receptor gene superfamily[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 1998, 855(30):182-193.
- [2] Buck L, Axel R. A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition[J]. *Cell*, 1991, 65(1):175-187.
- [3] Olender T, Fuchs T, Linhart C, et al. The canine olfactory subgenome[J]. *Genomics*, 2004, 83(3):361-372.
- [4] Anna L, Marta W, Tadeusz J, et al. Canine olfactory receptor gene polymorphism and its relation to odor detection performance by sniffer dogs[J]. *J Hered*, 2008, 99(5):518-527.
- [5] Tacher S, Quignon P, Rimbault M, et al. Olfactory receptor sequence polymorphism within and between breeds of dogs [J]. *J Hered*, 2005, 96(7):812-816 .
- [6] Robin S, Tacher S, Rimbault M, et al. Genetic diversity of canine olfactory receptors[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10:21.
- [7] Yang M, Geng GJ, Zhang W, et al. *SNP* genotypes of olfactory receptor genes associated with olfactory ability in German Shepherd Dogs[J]. *Anim Genet*, 2016, 47(2):240-244.

SNP Genotypes of Olfactory Receptor Genes Associated with Sniffing Ability in Working-dogs Based on Sequenom MassARRAY SNP System

GAO Yi-long, HE Xing-liang, QIANG Jing-ning, SONG Zhen-hua, WEN Hai,
TAO Xiao-ran, SUN Yong, QIN Hai-bin, BAO Xi-jun, MENG Ge, ZHU Qian
(Nanjing Policedog Institute of the Ministry of Public Security,
Policedog Technology Key Laboratory of MPS, Nanjing 210012, China)

[Abstract] **Objective** To find out the relationship between single nucleotide polymorphism (SNP) genotypes of canine olfactory receptor (OR) genes and odor detection performance in working-dogs. **Method** The multiplex Sequenom MassARRAY SNP system was adopted to detect the several SNP sites of *OR* genes and to analyze the correlation between different SNP genotypes and olfactory ability of working-dogs. **Results** The representative 68 SNP sites from canine OR genome were selected. The detection rate of this system in 3 breeds of Spinger Spaniel, Labrador Retriever and German Shepherd dog were all above 90%. The results showed that 23 SNP sites were found to be significantly correlated with the sniffing ability of working dogs ($P < 0.05$). But after the Bonferroni correction and FDR_BH correction, only 4 SNP sites including COR52AC1_436, rs850523383, CfOR0149_364 and CfOR0055_265 were found to be significantly correlated with sniffing ability ($P < 0.05$, BONF) and extremely significant ($P < 0.01$, FDR_BH). **Conclusion** Four major SNP sites of *OR* gene were screened, which significantly affected the sniffing ability of working dogs. A molecular genetic detection method was preliminary established to identify working-dogs potential sniffing ability, which was appropriate for Spinger Spaniel, Labrador Retriever and German Shepherd dog.

[Key words] Sequenom MassARRAY; Olfactory receptor (OR) gene;

Single nucleotide polymorphism (SNP), Working-dog; Sniffing ability

C57BL/6J 背景基因修饰小鼠精子 冷冻保种及品系恢复方法

牛博文, 陈丽香, 朱孟敏, 彭秀华, 秦波音, 李 峰

(上海市公共卫生临床中心, 上海 201508)

[摘要] 目的 建立一种高效的C57BL/6J背景基因修饰小鼠的精子冷冻及体外受精(IVF)方法。方法 以C57BL/6J小鼠为研究对象,围绕冷冻保护液、冷冻精子浓度、复苏后精子处理方法及IVF培养液等方面进行研究,IVF后2-细胞发育率作为冷冻和复苏效率评价标准,对比各组之间发育情况。结果 以R18S3(含质量比为18%棉子糖和3%脱脂奶粉)、M-R18S3冷冻保护液[含终浓度为477 $\mu\text{mol/L}$ 硫代甘油(MTG)的R18S3冷冻液]进行精子冷冻,复苏后在HTF培养液中进行IVF,2-细胞发育率分别为8.4%和20.6%;以R18S3和M-R18S3作为冷冻保护液,以含浓度为1 mmol/L 还原性谷胱甘肽(GSH)的HTF培养液进行IVF,2-细胞发育率分别为25.0%和43.5%。高浓度精子冷冻及复苏法可获得64.2%的2-细胞发育率;选取4种C57BL/6J背景基因修饰小鼠进行精子冷冻及IVF,2-细胞发育率34%~90%,胚胎移植后出生率40%~57%。结论 M-R18S3作为冷冻保护液,采用高浓度精子冷冻法进行精子冷冻,冷冻精子复苏后进行受精滴洗涤筛选,以含1 mmol/L GSH的HTF培养液进行冷冻精子IVF,此技术体系可以作为C57BL/6J背景基因修饰鼠的保种及品系恢复手段。

[关键词] 精子冷冻;体外受精(IVF);硫代甘油(MTG);谷胱甘肽(GSH);C57BL/6J小鼠

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0146-05

TALEN、CRISPR/Cas9等基因编辑技术的出现和发展极大缩短了基因修饰小鼠的制备周期,大量的靶位点修饰、转基因小鼠被应用于基因功能的研究,这些品系小鼠的活体保种工作也成为各研究机构工作的重要部分。配子冷冻保种是将小鼠精子、卵子以及胚胎保存在极低温度下,使其新陈代谢完全停止的一种保种方式,被认为可以替代活体保种^[1]。配子冷冻保存一方面可以防止品系的遗

传漂变,减少各种因素造成的品系丢失,另一方面可以减少活体保种带来的人力财力消耗。常用的品系保存方法包括胚胎冷冻法和精子冷冻法。精子冷冻相比于胚胎冷冻操作更加简单,仅需要少量的雄鼠即可完成,同时在复苏后可以在短时间内繁育出大量后代。对于大多数品系小鼠而言最常用的冷冻液由18%棉子糖和3%脱脂奶粉组成,但是对于C57BL/6J等品系小鼠,该冷冻液复苏后受精率在10%以下^[2,3],而大多数基因修饰鼠以C57BL/6J为背景鼠,所以改善该品系的精子冷冻和复苏效率尤为重要,本文主要围绕精子冷冻液、精子复苏方法和冷冻精子体外受精(IVF)等方面进行探索及优化。

[收稿日期] 2018-10-15

[基金项目] 上海市公共卫生临床中心院内课题项目(KY-GW-2017-04, KY-GW-2017-06, KY-GW-2018-11),上海市高等级生物安全病原微生物检测专业技术服务平台建设项目(18DZ2293000)

[作者简介] 牛博文(1990-),男,助理兽医师,主要从事基因修饰动物模型研究, E-mail: goodniubowen@163.com

[通信作者] 李 峰,男,副研究员,主要从事基因修饰动物模型研究, E-mail: lifeng30286@shphc.org.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物

3~6月龄C57BL/6J雄鼠、4周龄C57BL/6J雌

鼠、8周龄ICR雌鼠均为SPF级,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司[SCXK(沪)2013-0016];基因修饰小鼠为上海市(复旦大学附属)公共卫生临床中心实验动物部[SCXK(沪)2015-0002]保种品系,均饲养于上海市公共卫生临床中心实验动物部[SYXK(沪)2015-0008]SPF动物设施内,饲喂以高压灭菌水和 ^{60}Co 辐照饲料,饲养室相对湿度($50 \pm 10\%$),温度($23 \pm 3^\circ\text{C}$),光照12 h明暗交替。

1.2 主要试剂仪器

M2培养液(MR-015P-D)、KSOM培养液(MR-020P-5F)、HTF培养液(MR-070-D)、棉子糖(R0250)、MTG(56454)、GSH(G4251)、聚乙烯醇(polyvinyl alcohol, PVA, P8136)均购自德国Merck公司;脱脂奶粉(A600669)、D-PBS均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;孕马血清促性腺激素(PMSG)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)均购自宁波第二激素厂,0.25 mL细管(005565,法国卡苏公司),培养皿(美国Corning公司),体式显微镜(SZ61,日本Olympus公司),显微手术镊(苏州施强医疗器械公司),水浴锅(上海精宏实验设备公司)。

1.3 主要溶液配制方法

1.3.1 冷冻保护液配制 R18S3冷冻液:将9 g棉子糖加至30 mL去离子水中,80℃水浴锅中加热30 s使其完全溶解,再加入1.5 g脱脂奶粉,定容至50 mL,室温 $15\,000 \times g$ 离心20 min,弃沉淀,重复两次直至上清液透明,0.22 μm 过滤器过滤。M-R18S3冷冻液:每50 mL R18S3冷冻液中加入2 μL MTG,0.22 μm 过滤器过滤,分装,-20℃保存^[11]。

1.3.2 GSH配制 准确称取GSH 30.4 mg,用1 mL无菌超纯水,0.22 μm 过滤器过滤,分装,-20℃保存,此溶液浓度为100 mmol/L,使用前每100 μL HTF培养液中加入1 μL 进行稀释。

1.4 实验方法

1.4.1 冷冻装置 冷冻装置为高约20 cm的泡沫保温盒,液氮高度为10 cm,将厚度约为0.5 cm的泡沫板漂浮在液氮表面,在冷冻前30 min泡沫盒中加入液氮预冷泡沫漂浮板。

1.4.2 冷冻方法 ①低浓度精子冷冻法:无菌取出3~6月龄雄鼠附睾尾及1.5 cm输精管,在D-PBS中用显微镊剥离脂肪和血管,清洗干净后放入含有1 mL冷冻液的培养皿中,用1 mL注射器针头将附睾尾划破,挤压出附睾尾及输精管中的精子,37℃

温箱中放置10 min。培养结束后,取1 μL 精子于D-PBS中稀释10倍,观察精子运动状况,选择运动状况良好的精子,按照图1所示装入0.25 mm冷冻细管中,PVA封口结束后立即放入预冷的液氮漂浮板上预冷10 min,之后投入液氮中长期保存。②高浓度精子冷冻法:采集和冷冻方法同低浓度组,用120 μL 冷冻液悬浮撕开的附睾尾及输精管,每支细管装入10 μL (0.5 cm)冷冻精子。

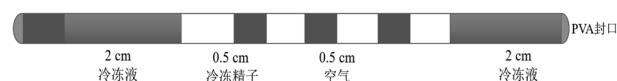


图1 0.25 mm冷冻细管填装冷冻精子示意图

1.4.3 冷冻精子复苏 在雌鼠注射hCG后12 h开始复苏精子。将细管从液氮中拿出,在空气中停留5 s,立即投入37℃水浴锅中,1 min后取出,擦干细管表面水分,剪掉两端冷冻液,将精子吹入空的培养皿中。①低浓度精子冷冻组,用枪头将10 μL 复苏的精子(约 10^6 个)吹入含200 μL HTF培养液的受精皿中,37℃,体积分数5% CO_2 培养箱中孵育1 h;②高浓度精子冷冻组,用10 μL 枪头将复苏的精子(约 10^7 个)吹入含80 μL HTF的获能皿中,37℃,体积分数5% CO_2 培养箱中放置30 min后用枪头在获能滴的边缘吸入10 μL 活动精子并转移至含200 μL HTF的受精皿中,培养箱中孵育30 min。

1.4.4 体外受精(IVF) 小鼠超数排卵:4周龄C57BL/6J雌鼠按每只5 IU腹腔注射PMSG,47 h后按每只5 IU腹腔注射hCG;在精子复苏后30 min开始收集卵丘卵母细胞复合体(COCs)。无菌取出超数排卵的雌鼠输卵管,在体式显微镜下用1 mL注射器针头撕开输卵管壶腹部,轻轻挤压出COCs,在HTF培养液中清洗3遍;用200 μL 枪头将COCs转移至含有精子的受精液中。4~6 h后用枪头吹散粘附在卵母细胞表面的精子,转入M2培养液中清洗5遍后将胚胎转移至过夜平衡的KSOM培养液中培养。

1.4.5 胚胎移植 取0.5 d假孕ICR受体鼠,麻醉,剔除背部毛发,酒精及碘酊消毒,剪开脊柱背侧皮肤,剪开脊柱两侧0.5 cm处肌肉层,在此创口处用钝头镊子夹住脂肪垫拉出附带的卵巢及输卵管,用脂肪夹固定,在体视显微镜下找出输卵管壶腹部,用1 mL注射器针头在壶腹部前侧刺一切口,之后将移卵针中的卵裂胚胎经此切口吹入输卵管壶

腹部(可用气泡作为标记),再将输卵管及卵巢放回腹腔,分别缝合肌肉层及皮肤,碘酊消毒。

2 结果

2.1 不同组合精子冷冻液及 IVF 液的冷冻复苏效率

以低浓度精子冷冻法进行精子冷冻,复苏后与 C57BL/6J 品系雌鼠卵子孵育进行 IVF,对比表 1 中几种不同组合的精子冷冻液和 IVF 液的胚胎发育情况(表 1),用 R18S3 或 M-R18S3 进行精子冷冻,复苏后以 HTF 培养液进行 IVF,2-细胞发育率分别为 8.4% 及 20.6%,而复苏后采用浓度 1 mmol/L GSH 的 HTF 液进行 IVF,2-细胞发育率可分别达到 25% 及 43.5%,若用 M-R18S3 进行精子冷冻,复苏后用浓度为 1.5 mmol/L GSH 的 HTF 培养液进行 IVF,2-细胞发育率降至 21.4%。

2.2 两种不同精子密度的冷冻和复苏方法比较

M-R18S3 作为冷冻保护液,分别用高、低浓

表 1 不同组合冷冻液及 IVF 液胚胎发育情况

冷冻液	IVF 液	2-细胞发育率 (2-细胞数/IVF 卵子数)
R18S3	HTF	8.4%(12/143)
M-R18S3	HTF	20.6%(36/174)
R18S3	1 mmol/L GSH+HTF	25.0%(27/108)
M-R18S3	1 mmol/L GSH+HTF	43.5%(161/370)
M-R18S3	1.5 mmol/L GSH+HTF	21.4%(9/42)

度精子冷冻及复苏法进行 IVF,高浓度精子冷冻组相比于低浓度精子冷冻组,2-细胞发育率由 41.3% (31/75)提高至 64.2%(36/64)。

2.3 不同类型基因修饰小鼠的冷冻效果

用高密度精子冷冻法对本中心保种的四种 C57BL/6J 背景的基因修饰小鼠进行精子冷冻、复苏及 IVF,结果(表 2)显示,冷冻精子 IVF 后 2-细胞发育率 34%~90%,将部分 2-细胞移植入假孕受体鼠输卵管中,4 种小鼠均有子代出生,出生率 40%~57%。

表 2 几种基因修饰小鼠冷冻精子 IVF 后胚胎发育及出生情况

修饰基因	修饰类型	2-细胞发育率(2-细胞数/IVF 卵子数)	移植出生率(出生数/移植数)
Myd88	敲除	90.3%(28/31)	40%(8/20)
Stat-1	敲除	51.6%(33/64)	50%(3/6)
Trif	敲除	34.0%(17/50)	50%(4/8)
Ella-Cre	转基因	48.6%(53/109)	57.1%(4/7)

3 讨论

随着基因修饰方法的不断改进和发展,基因修饰动物已经成为科学研究中常用的实验材料,传统的保种方式大多采用活体保种,这种方式往往会出现遗传变异,同时对动物设施要求较高。低温冷冻保存方式可以克服这些缺点,与胚胎冷冻相比,精子冷冻技术具有方便、快速、成本及设备要求低等特点,正被广泛应用。

精子冷冻即将精子保存在极低温度下(-196℃),完全抑制精子的新陈代谢,精子复苏后能够恢复受精能力。在这一过程中,由于渗透压、温度等的变化,精子细胞会受到一系列的损伤,导致精子死亡或者失去受精能力^[4],所以相比于新鲜精子,冷冻精子的受精率往往较低。目前,小鼠精子冷冻方法较多,包括冷冻液、冷冻容器、冷冻装置以及精子处理方法等方面均有相关的研究^[5,6]。本

实验室通过试验对比多种冷冻装置及容器,我们认为泡沫漂浮板及 0.25 mm 冷冻细管进行精子冷冻操作更加简便,冷冻效果较为稳定,且对于非专业技术人员较容易掌握。

小鼠精子冷冻常用的冷冻液是 R18S3,但是由于不同品系对于冷冻损伤的敏感性不同^[3],NOD、FVB、DBA 及杂交小鼠冷冻精子复苏后 2-细胞发育率可以达到 35%~70%,C57BL/6J、BALB/c、129S3/SvIm 等品系小鼠冷冻精子复苏后 2-细胞发育率仅为 6% 左右^[2],本实验中 C57BL/6J 品系小鼠冷冻精子复苏后 2-细胞发育率为 8.4%。实验证明,在 R18S3 冷冻液基础上加入抗氧化剂例如 GSH、谷氨酰胺、褪黑激素、橡黄素、红景天多糖等可以提高精子冷冻复苏效率,这是由于在冷冻降温 and 复苏后,精子呼吸代谢会产生大量的活性氧(ROS),ROS 能够氧化精子质膜,损伤精子功能,而抗氧化剂可以清除这些 ROS^[7-9]。参考相

关研究^[2, 10, 11], 本研究在 R18S3 冷冻液中加入终浓度为 477 $\mu\text{mol/L}$ 的 MTG, 2- 细胞发育率由 8.4% 升高至 20.6%, 这可能与 MTG 的抗氧化作用有关。冷冻精子在复苏后运动能力下降 50% 左右, 这类精子细胞往往缺乏受精能力^[12], 为了避免这些精子产生 ROS 影响受精率, 往往需要将复苏后的精子进行洗涤处理。在家畜精子复苏中通常采用浮游法和密度梯度离心法进行洗涤, 但是密度梯度离心法需要离心处理, 可能对精子造成二次损伤^[13], 本研究参考浮游法筛选获得活力较高的精子。此外, 为保证 IVF 时有足够的精子量, 本研究也采用高浓度精子冷冻法^[10], 精子复苏后在受精滴中用 IVF 液将高浓度精子稀释至合适的浓度, 孵育一定时间后活力较强的精子将浮游至液滴边缘, 用此类精子进行 IVF, C57BL/6J 小鼠的受精率可由 41.3% 提高至 64.2%。GSH 是人体内一种重要的内源性抗氧化物, 是存在于精子和精浆内的 ROS 清除剂之一, 在保护精子对抗氧化损伤的防御机制中起着重要作用^[14]。本研究在 IVF 液中加入 1 mmol/L GSH, 可使受精率显著提高, 达到 43.5%。有观点认为适当水平的 ROS 在精子的高活跃性运动、获能、顶体反应中具有重要作用^[14], 本研究在受精液中加入 1.5 mmol/L GSH 时, 受精率下降至 21.4%, 这可能与 GSH 消除较多的 ROS 导致精子获能及顶体反应受到影响有关。

根据 Jackson 实验室统计, 目前以 C57BL/6J 为背景的基因修饰小鼠约占 75%^[2], 为验证本研究建立的方法是否适合这些基因修饰小鼠的保种工作, 我们选取本中心几种 C57BL/6J 背景基因修饰小鼠进行精子冷冻。冷冻精子 IVF 后 2- 细胞平均发育率可以达到 50%, 且移植后均有子代出生。这说明本研究中所用方法可以作为 C57BL/6J 背景基因修饰小鼠的保种方法。

综上所述, 以 M-R18S3 作为冷冻保护液, 采用高浓度精子细管冷冻法进行精子冷冻, 冷冻精子复苏后通过受精滴浮游法进行筛选, 在含 1 mmol/L GSH 的 HTF 培养液中进行 IVF, 这一技术体系可以作为 C57BL/6J 背景基因修饰鼠的保种方法, 为

常规实验室进行精子冷冻提供了较理想的方法。

参考文献:

- [1] 贾青. C57BL/6J 小鼠精子冷冻与单精子胞浆内注射技术研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [2] Ostermeier GC, Wiles MV, Farley JS, et al. Conserving, distributing and managing genetically modified mouse lines by sperm cryopreservation[J]. PLoS One, 2008, 3(7):e2792.
- [3] Sztein JM, Farley JS, Mobraaten LE. *In vitro* fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm[J]. Biol Reprod, 2000, 63(6):1774-1780.
- [4] Shi X, Hu H, Ji G, et al. Protective effect of sucrose and antioxidants on cryopreservation of sperm motility and DNA integrity in C57BL/6 mice[J]. Biopreserv Biobank, 2018, doi: 10.1089/bio.2018.0037.
- [5] Li MW, Vallelunga JM, Kinchen KL, et al. IVF recovery of mutant mouse lines using sperm cryopreserved with mtg in cryovials[J]. Cryo Letters, 2014, 35(2):145-153.
- [6] Hasegawa A, Yonezawa K, Ohta A, et al. Optimization of a protocol for cryopreservation of mouse spermatozoa using cryotubes[J]. J Reprod Dev, 2012, 58(1):156-161.
- [7] 张树山. 猪精液冷冻保存技术研究[D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2006.
- [8] Gadea J, Molla M, Selles E, et al. Reduced glutathione content in human sperm is decreased after cryopreservation: Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders[J]. Cryobiology, 2011, 62(1):40-46.
- [9] Succu S, Berlinguer F, Pasciu V, et al. Melatonin protects ram spermatozoa from cryopreservation injuries in a dose-dependent manner[J]. J Pineal Res, 2011, 50(3):310-318.
- [10] Takeo T, Nakagata N. Mouse sperm cryopreservation using cryoprotectant containing l-glutamine[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2018, 2018(6):t94516.
- [11] Taft R. Mouse sperm cryopreservation using cryoprotectant containing monothioglycerol (MTG)[J]. Cold Spring Harb Protoc, 2017, 2017(11):t94490.
- [12] Sztein JM, Farley JS, Mobraaten LE. *In vitro* fertilization with cryopreserved inbred mouse sperm[J]. Biol Reprod, 2000, 63(6):1774-1780.
- [13] 陈大元. 受精生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [14] 张文举, 余四九. GSH 对体外保存精子品质和受精力影响的研究进展[J]. 中国兽医科学, 2018, 48(4):518-527.

Sperm Cryopreservation and Recovery of C57BL/6J Background Genetically Modified Mice

NIU Bo-wen, CHEN Li-xiang, ZHU Meng-min, PENG Xiu-hua, QIN Bo-yin, LI Feng
(Shanghai Public Health Clinical Center, Shanghai 201508, China)

[Abstract] Objective To establish a high-efficiency sperm cryopreservation and *in vitro* fertilization (IVF) method on C57BL/6J background gene-modified mice. **Methods** This study compared the effects of different methods on sperm cryoprotectant, sperm concentration, treatment after thawing and IVF medium on 2-cell cleavage rate, and then used technologies developed to cryopreserve and recover sperm of knockout mouse lines on inbred C57BL/6J backgrounds. **Results** Sperm were frozen with R18S3, which containing 18% gossylose and 3% skimmed milk powder, then thawed for IVF in HTF medium and their fertility (two-cell cleavage) was 8.4%. Sperm were frozen with M-R18S3, a cryoprotective solution that containing 477 $\mu\text{mol/L}$ monothioglycerol (MTG) in R18S3 and then IVF in HTF medium, their fertility (two-cell cleavage) was 20.6%. Sperm cryopreserved in M-R18S3, IVF in HTF with 1mmol/L reduced glutathione (GSH), have better IVF rate than when cryopreserved in R18S3 alone (43.5% vs 25%). High concentration sperm was cryopreserved in M-R18S3, then thawed for IVF in HTF medium with 1 mmol/L GSH and their fertility (two-cell cleavage) was higher than low concentration sperm (64.2% vs 43.5%). Sperm from 3 knockout and 1 transgenic mouse lines on C57BL/6J backgrounds cryopreserved using this techniques were all thawed successfully to obtain IVF fertility (two-cell cleavage) between 34% and 90%, and after embryo transplantation to get genotypically confirmed offspring. **Conclusion** High concentration sperm was frozen in M-R18S3, screened in IVF drop after thawing, and then IVF in HTF with 1 mmol/LGSH, can be used as an effective method for sperm preservation and recovery of C57BL/6J background genome-modified mice.

[Key words] Sperm cryopreservation; *In vitro* fertilization (IVF); Monothioglycerol (MTG); Glutathione (GSH); C57BL/6J mouse

动物实验室实习生培训带教规范初探

王 诺, 李金凤, 黄小红, 郑佳琳, 饶子亮, 王 刚, 邝少松
(广东省医学实验动物中心, 佛山 528248)

[摘要] 为提升比较医学实验室实习生的实践水平, 提高实习教学效果, 作者总结了所在实验室实习生带教管理工作, 建立科学、合理的实习生培训管理规范, 加强巩固实习生的基本理论知识, 进行动物实验技能培训, 锻炼实习生发现问题、分析问题和解决问题的能力, 把实习生培养成具有一定科研综合能力的人才方面进行了带教规范的有益探索与实践, 促进实验动物专业人才的成长。

[关键词] 比较医学实验室; 实习生培训; 实验技能

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0151-04

教育实习, 是贯彻理论与实践相结合原则的体现, 也是检验和进一步提高教学质量, 培养合格毕业生的重要措施。作者所在的广东省医学实验动物中心比较医学实验室(以下简称“实验室”)与中山大学、南方医科大学、中国医科大学、广东药学院等高校合作建立了实习生教学基地, 近年来培养实习生近百名。由于实习生专业背景知识的差异, 实验动物相关知识水平差异明显, 实习生对于实验动物技术相关知识的需求不同, 实验室从实验动物、动物实验和质量管理方面着手, 多年来进行不断的总结、改进、探索和创新, 形成一套系统性、包容性和操作性较强的培训管理规范。

1 实习引导

应结合实习生的简历专业特长, 指派特定的老师进行一对一带教辅导。用各种形式向实习生讲解实习内容及带教流程, 并将日常实验过程中易忽略、易出错环节提前告知实习生, 引导实习生快速融入到实验室工作的新环境中。

[收稿日期] 2018-09-17

[作者简介] 王 诺(1989-), 女, 本科, 助理实验师, 现从事实验动物药理毒理研究工作。

E-mail: 490416182@qq.com

[通信作者] 邝少松(1973-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事实验动物毒理学研究、实验室管理工作。

E-mail: 793053642@qq.com

2 岗前人身安全培训

2.1 生物安全

实验室内有“生物安全二级实验室”、细胞室和 SPF 级动物房, 涉及微生物、病毒、菌株、肿瘤细胞和屏障设施, 需明确告知实习生污染区和洁净区的界限范围, 处于污染区域操作时需注意的人身安全防护, 同时保护洁净区域环境不受污染。

2.2 医疗垃圾和生活垃圾分类

实验室涉及到的医疗垃圾有动物尸体、动物脏器标本、动物血液制品、注射器、破损玻璃锐器, 以及沾染动物血液的棉球、纱布、滤纸等, 均应与生活垃圾分开, 并分类放置, 严防混淆放置引起意外感染。

2.3 有毒有害试剂使用

实习生需熟知《化学品安全技术说明书》, 操作使用有毒有害试剂时正确穿戴工作服、橡胶手套、防护眼镜、过滤面罩和口罩。

2.4 消毒剂使用

实验室涉及的消毒剂有 0.05% 强力消毒灵、0.1% 新洁尔灭、0.17% 百毒杀、0.3% 过氧乙酸和 75% 乙醇, 实习生需尽快熟悉各种消毒剂的使用原则。

除以上情况之外, 实习生还需了解发生意外情况时的应急预案处理流程, 熟练使用报警器、安全淋浴、洗眼设备、沙土和灭火器, 确保人身安全。

3 实验动物与动物实验技能培训

由带教负责人制定培训方案, 内容主要包括: 培训主题、参加人员、培训要求、地点、时间以及考试要求, 并列出培训日程安排, 实验室负责人审核签字后进行公告通知, 实习生知悉, 提前做好安排。

培训日程安排主要包括培训日期、主讲者/操作者和培训内容。依据本实验室的特性, 培训内容: 实验室管理理论知识, 实验室概况和质量管理, 实验动物基本操作技术(包括大小鼠固定、抓取、灌胃、采血、腹腔注射、静脉注射等), SPF 级动物实验设施管理(理论), 常用实验动物选择, 动物房培训及操作考核讲解(技术), 认证认可和质量管理体系(理论), 供试品(对照品)的管理(理论), 动物实验影响因素与福利伦理要求, 实验动物解剖操作技术, 动物实验流程及注意事项(理论), 仪器、物品和档案的管理(理论)以及工作经验的交流等。实习生培训按照既定培训方案全面系统地开展。

实验动物与动物实验技能培训时间一般持续 1 个月, 然后进入理论和操作技能考核环节。在理论与技术学习、考核过程中, 带教老师需引导实习生对培训内容进行反复推敲, 全面梳理总结, 填写有效性评价表, 结合考核结果进行自我评价, 递交带教负责人和实验室负责人共同审阅。负责人根据实习生的培训考核情况给出评价意见。对于考核不合格实习生需进行再次培训, 直到考核合格。从制定培训方案到考核结束, 全程记录, 归档保存。

4 理论巩固加强和实验技能提升

通过考核后, 带教老师带领实习生一起进入实验操作环节。前面一系列的培训给实习生的操作技能打下基础, 但仍有许多其他实验技能需掌握。例如: 肿瘤原位移植(肝、胃、肠道等)、气管给药、足趾静脉给药、输精/卵管结扎、心肌缺血再灌注, 这些技能需带教老师耐心讲解、反复演练并指导。

带教老师针对实验常见技术操作和疾病动物模型做成课件进行系统讲解, 理论与实际相结合, 使实习生不仅“知其然”, 也“知所以然”。带教老师在实践操作过程中多指导、多鼓励、多发

现, 给实习生创造动脑、动手、动脑机会, 激发求知欲望, 并且做到一“放”一“严”。“放”, 放手让实习生大胆去做、去尝试, 培养实习生独立工作能力; “严”, 对实际操作的每个环节实行严格监督、严格把控, 做到放手不放眼, 严防影响实验质量事故的发生。

一旦发现异常情况, 带教老师需在最短时间内终止失误操作的延续, 立即采取纠正措施, 抓住重点环节, 及时弥补, 谨记教训, 吸取经验, 并对实习生心理进行疏导, 既严格要求又热情鼓励, 对实习生的能力给予信任, 维护实习生尊严, 增强其自信心, 使实习生以稳定的心态投入到学习中。

5 第二课堂学习

带教老师在实习生带教过程中可以借助一些手段、方法对传统带教方式进行有益补充, 例如拍摄实验动物基本操作技术微视频, 如大鼠小鼠的抓取、灌胃、腹腔注射、解剖, 豚鼠和兔皮肤敷贴等。通过微视频教学或关注相关公众号, 使实习生在带教过程中由被动的接受转变为主动的投入, 锻炼自主学习的能力。

动物实验检验检测仪器越来越多, 许多仪器操作软件都是全英文界面, 除此之外, 一份完整的动物实验研究方案往往需要查阅英文文献, 因此, 带教老师引导实习生掌握基本的专业英文和查阅文献的技能尤其重要。在具备动物实验思维方法和技能的同时, 带教老师灵活采用项目组间讨论、对话交流、角色扮演、实验观察等方式方法, 引导和协助实习生将学到的人文、社会、医药、生物、畜牧、实验动物与动物实验基础知识、规范, 全面系统应用到动物实验检验检测工作中, 培养实习生自学能力、思考能力、分析能力、沟通能力、表达能力和组织协调能力, 为科学研究储备人才。

6 加强质量控制

《药物非临床研究质量管理规范》^[1]对质量控制提出明确要求。带教老师把质量控制的观念传授给实习生, 包括动物实验前、实验中, 与实验后

的质量控制。“事前布控，事后可溯”，针对实验过程中“人、机、料、法、环”^[12]直接、真实、准确、清楚记录，及时对质量控制结果记录进行分析，使实习生意识到“质量是最高生命线”，只有在质量可控条件下才能保证实验结果的可靠性和准确性。

7 重视实验动物福利伦理

《实验动物管理条例》、GB/T 35892-2018《实验动物福利伦理审查指南》、《关于善待实验动物的指导性意见》和《实验动物环境及设施》中均规定了实验动物使用过程中的福利伦理审查和管理要求。实验动物科学家认为，善待实验动物是非常必要的，粗暴地对待动物，动物的心理和生理都会处于不正常的应激状态，在这种状态下得出的实验数据或结果的可信度不高^[13]，善待实验动物既体现尊重生命的精神，又彰显严谨求实的科学态度^[14]。带教老师应该加强对实习生在动物使用、动物饲养、实验操作技能规范性、笼具移位和笼具空间管理等方面实验动物福利伦理意识的培养。实验动物的抓取固定技术熟练、态度温和、动作轻柔；实验过程中与实验动物的交流；尾静脉注射手法准确、止血完全；动物实验手术时达到麻醉所需深度；动物实验结束，施行安死术的容器放入动物数量合适等，这些都属于实验动物福利伦理需考虑的范畴。

8 毕业论文

毕业论文的完成包括合理选择课题、检索查阅文献、开题报告、课题实施、实验数据收集、统计分析、论文撰写。实验室组织人员外出学习参加学术会议和培训，会议和培训完毕，进行实习生宣贯授课和学术交流，结合“教、学、做”的带教方法，为实习生在课题和论文的设计、撰写中有清晰的思路、明确的方向做引导。

9 加强沟通，认真考核

综合考核鉴定是实验室对学生整体实习情况的综合评定，科学、合理、公平、公正，实际的考核是对实习生整个实习过程中成绩的真实肯定，

也是对实习生提出进步的要求^[5]。带教老师耐心教导和帮助实习生，加强沟通，了解他们在实习过程中的需求，结合实习生平时学习工作情况，主要从行为规范、工作态度、操作技能、安全意识、团队精神、创新精神、出勤七个方面进行综合考核鉴定。同时实习生也要认真评价带教老师的工作，以带促教，以使带教老师自身素质不断提高^[16]。

10 讨论

实习阶段是学生从学校走向社会过渡的特殊阶段，是学生个人素质和专业知识和应用和体现的特殊时期，是学生未来从业生涯中重要的伦理道德、职业习惯、社会责任感等素养构建的关键时期，同时也是其专业科学精神和创新思维的起始阶段^[7]。对于实习生带教实践过程中遇到的问题，带教老师需要不断转变思想观念，认真研究并解决。只有在实践中不断探索和积累，切实做到教学相长，才能促进教学管理水平的不断提升^[8]。实验室近年来培养的近百名实习生顺利完成毕业论文，综合考核鉴定总体评价满意，实习生毕业院校和新入职企业回馈好评。实验室经过多年的探索和经验积累，建立了一套规范性、适用性较强的实习生培养管理规范，从安全培训、理论和操作技术培训、实验技能提升、第二课堂、质量控制、实验动物福利伦理、毕业论文、考核鉴定等，每一个环节一丝不苟、脚踏实地的落实，确保以严谨负责的态度带教实习生，保证实习生教育的质量。

随着生命科学技术的不断发展，实验动物学的研究和应用，已经从单一的动物实验转为集比较医学、育种学、生态学、遗传学和动物实验技术等学科为一身的综合性科学^[9,10]。本实验室建立了实验动物相关规章制度，在控制动物质量、课程设置及考核、实验动物生物安全防护措施等方面教学效果都较好，达到了实验动物实习生教学要求。但也存在缺点，实习内容较多，时间安排紧凑，对实习生今后从事的岗位专业相关性要求较高，在实习中、后阶段易出现兴趣不高、实习意识不强等现象。

很多实习生仅仅是将实习作为一项课程与任务，因为想要顺利毕业所以才去实习，还有一些学生仅仅是因为好奇与感觉有趣，才愿意去实习^[11]。有的实习生对实验动物实践探索热情不强烈，考虑

以后从事医院药房、连锁药店、宠物临床、畜禽养殖场等工作，对实验动物专业的认知不够全面，缺乏目的性和针对性。实习条件比较艰苦，环境不够理想，因此实习生的就业积极性受挫，继而便会对其就业、择业产生极大的影响^[12]。例如，一些实习生倾向于实验动物疾病模型的制作，实习期间将操作技术掌握得非常娴熟。一些实习生侧重食品药品的检测分析，将高效液相色谱仪运用的较好。还有一些实习生对实验资料的归类、整理，以及对简易实验方案和报告的撰写感兴趣。这些实习生毕业之后选择在一些药企、科研机构、医院、院校的研发部门、临检部门、档案管理部门和质量控制部门工作。也有少数实习生角色转换困难，面对岗位的条件艰苦、管理严格，产生抵触实验动物情绪，导致心情压抑烦躁、工作态度消极，中途申请更换实习单位前往药厂等地实习。每个专业的实习任务都不完全相同，各自有着不同的侧重点，选择合适的实习内容才有利于全面提高学生的实践能力。带教老师在引导和帮助实习生的过程中以人为本，多沟通了解实习生的真实想法，因材施教，提高带教质量，促进实习生职业生涯的发展，促进实验动物专业人才的成长。

参考文献:

- [1] 国家食品药品监督管理总局令第34号.《药物非临床研究质量管理规范》[S]. 2017.
- [2] 李少斐, 何宁. 关于检验检测机构资质认定飞行检查的一些思考[J]. 中国检验检测, 2017 (2):54-56.
- [3] 杨青. 国内外医学实验动物福利现状与思考[J]. 天津医学, 2011, 23(4):74-76.
- [4] 李小媚, 舒安利, 肖素军, 等. 关于实验教学中实验动物的伦理学研究[J]. 中国医学伦理学, 2014, 27(6):876-878.
- [5] 田静, 宋沧桑, 方甜甜. 药学专业本科实习生带教方法探讨[J]. 医学信息学, 2012, 25(8):26.
- [6] 房丽丽, 陈祥菲, 兰晓云. 围手术期病人的心理护理体会[J]. 微量元素与健康研究, 2014, 31(3):80.
- [7] 聂小蒙, 李强, 徐晓璐. 临床医学院做好实习生带教[J]. 解放军医院管理杂志, 2010, 17(2):170-172.
- [8] 张亚坤, 黄清秀, 等. 药学实习生带教管理工作实践与体会[J]. 中国药业, 2015, 24(10):15.
- [9] 曾昭智, 江涛, 张锦红. 医药院校实验动物学教学思考[J]. 西北医学教育, 2013, 21(2):312-314.
- [10] 王芳. 医学实验动物学实验教学与科研的有机结合[J]. 基础医学教育, 2013, 15(11):1016-1018.
- [11] 邓东红, 林梓. 浅谈规范医学教育毕业实习管理的几点看法——以广西医科大学第一附属医院为例[J]. 高教论坛, 2017, 10(8):107-109.
- [12] 陈洪静. 顶岗实习对高职学生就业选择的影响力研究与实践[J]. 高等教育在线, 2019(1):159.

基于动物福利的雌性生殖发育 毒性体外培养技术研究进展

陆 琴¹, 周跃华¹, 唐海飞^{2,3}, 王智文^{2,3}, 张 婷²

(1. 上海交通大学医学院附属同仁医院, 上海 200336;

2. 上海市计划生育科学研究所, 国家人口和计划生育委员会

计划生育药具重点实验室, 上海生殖健康药具工程技术研究中心, 上海 200032;

3. 上海应用技术大学生物工程系, 上海 201418)

[摘要] 生殖发育毒性研究的目的是通过动物试验检测外源物质对哺乳动物生殖功能和发育过程的影响, 预测其可能产生的对生殖细胞、受孕、妊娠、分娩、哺乳等亲代生殖机能以及对子代胚胎/胎儿发育、出生后发育的不良影响。整体动物雌性生殖发育毒性研究方法一直广泛应用于药品、食品、化学品和化妆品的生殖发育毒性评价中, 经过多年的验证并取得稳定的实验结果和结论。但它存在的主要问题是敏感、周期长、所需受试样品量多, 特别是由于体内实验生殖功能主要是以与生殖发育后果有关的参数作为基础, 因此难以揭示毒性作用位点和毒性作用机制。雌性生殖发育毒理学替代方法指在生殖发育毒性评估中能尽可能替代动物实验、减少所需动物数量或使动物实验程序得以优化而减少动物痛苦的任何方法或程序, 特别是在外源毒性物质的毒性初步评价上, 可以作为整体动物实验的补充。本文将从雌性生殖系统细胞和组织培养、胚胎细胞和组织培养、乳腺细胞培养几大类总结雌性生殖发育毒性体外培养技术及研究进展, 为雌性生殖发育毒性体外培养技术研究提供参考。

[关键词] 雌性; 生殖发育毒性; 动物福利; 体外培养技术

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0155-08

生殖发育毒性是指外源物质在动物繁殖周期的任何一个阶段中所产生的毒副作用, 既包括外源物质对亲代生殖功能的影响, 也包括对子代发育过程的有害影响。我国列入各类商品(药品、食品、化学品和化妆品)毒性检测指南的标准方法均来源于国际经济合作与发展组织(The Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)或者人用药品注册技术要求国际协调会(International Conference

on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, ICH)^[1-2]。传统的生殖发育毒性检测以动物试验为主, 包括分娩前发育毒性研究(OECD TG 414)、一代动物毒性研究(OECD TG 415)、二代动物毒性研究(OECD TG 416)、生殖毒性/发育毒性筛选检测(OECD TG 421)、重复剂量毒性研究结合生殖毒性/发育毒性筛选检测(OECD TG 422), 以及2009年发布的Hershberger实验(TG 411)和讨论中的发育神经毒性试验(TG 426)^[3-5]。完整的生殖发育毒性研究包括成年动物从受孕到子代性成熟的各个发育阶段接触受试物的反应。化学物的生殖发育毒性有2个显著的特点: ①生殖系统较机体的其他系统对化学物的毒性作用更为敏感; ②损害作用不仅影响接触化学物质的母体本身, 还可影响其后代。鉴于哺乳类动物繁殖过程的复杂性,

[收稿日期] 2018-09-11

[基金项目] 上海市科委“科技创新行动计划”实验动物研究领域项目(18140900800)

[作者简介] 陆琴(1966-), 女, 主任医师, 妇产科。

E-mail: luqin118@163.com

[通信作者] 张婷, 女, 副研究员, 研究方向: 女性生殖系统疾病药物药理与毒理。E-mail: fuzzyting@163.com

因此需要对繁殖过程的各个方面进行毒理学分析,包括致畸性、内分泌干扰、母细胞突变、生育受损等^[6]。2011年7月28日OECD提出了一项试验指南,称为延长一代生殖发育毒性研究(OECD TG443),用于替代一代和二代动物毒性研究(OECD TG 415和416)^[7],这项指南将动物福利等因素考虑进去,最大程度减少了实验动物的使用^[8]。

目前全世界每年用于实验的动物数以千万计,实验啮齿类、实验兔、犬、猪、牛、羊及非人灵长类动物等被广泛用于科学实验,引发动物保护组织的持续关注。促进3R,即减少(Reduction)、替代(Replacement)、优化(Refinement)理论发展,是实验动物使用者的责任^[9]。毒理学替代方法指能替代动物实验、减少所需动物数量或使动物实验程序得以优化而减少动物痛苦的任何方法或程序。其范围主要包括用组织学、胚胎学、细胞学或计算机等方法取代整体动物实验,或以低等动物取代高等级动物等。生殖和发育毒性检测中使用的动物数量较多,但因哺乳动物生殖周期的复杂性,生殖发育毒性替代方法的研究一直在进行中^[10]。已有3种体外模型,全胚胎培养试验(whole embryo culture test, WEC)、微团检测法(micromass test, MM)^[11]和胚胎干细胞试验(embryonic stem cell test, EST)^[12]于2003年正式通过欧洲替代方法验证中心(European Centre for the Validation of Alternative Methods, ECVAM)验证,并作为胚胎发育毒性的筛选方法^[13]。生殖发育毒性体外替代优化方法的研究思路是将整个繁殖过程分成数个连续的生物学部分,分别对其进行单独或联合研究,最大程度地鉴定出外源毒性物质的靶器官或组织。目前,已经探索出一些很有前景的体外模型和方法,本文重点介绍雌性生殖发育毒性研究中体外培养技术研究进展。

1 雌性生殖系统组织和细胞培养

1.1 卵巢颗粒细胞培养

1.1.1 原代卵巢颗粒细胞培养 采用成年雌性大、小鼠动情周期的窦状卵泡或21~30日龄幼年大鼠经注射孕马血清(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)或埋置己烯雌酚作72~96 h预处理后的卵巢,体外分离和加入刺激因子培养颗粒细胞。加入外源物质和细胞相互作用,随后检测细胞存活率和测定细胞分泌产物(雌二醇和孕酮)含量以评价颗

粒细胞的功能状态。该体外模型可以用来初步筛选影响颗粒细胞生长和发育的外源物质,缺陷是只能研究颗粒细胞的单一功能,不能研究对卵母细胞及其与卵泡膜细胞之间的相互作用,不能动态观察卵泡形成过程和配子发生^[14,15]。

1.1.2 永生化的颗粒细胞甾体生成试验 在化妆品生殖和发育毒性检测方法中选用永生化的小鼠颗粒细胞系NT-1和变异株NT-1-hAROM(表达人芳香化酶基因),研究外源物质对颗粒细胞甾体生成水平的影响。如检测对孕酮生成的影响,可将NT-1细胞与不同浓度受试物孵育,免疫法测定上清液中孕酮含量,贴壁细胞采用MTT法或者CCK-8法进行细胞活性测试。如检测对雌二醇生成的影响,可将NT-1-hAROM细胞与芳香化酶的底物雄烯二酮共孵育,酶联免疫法测定培养液中的雌二醇的产量,贴壁细胞可以检测细胞增殖情况^[16,17]。

1.2 卵巢黄体细胞培养

采用妊娠16 d大鼠的黄体或25~30日龄幼年雌性大鼠促排卵后的妊娠黄体,在体外用不同的分离液和消化液分离出黄体细胞,制成悬液在体外培养。加入外源物质和细胞相互作用,观察细胞存活率和测定细胞分泌产物孕酮含量,观察细胞形态学,测定环磷酸腺苷、DNA或蛋白质含量、激素受体等^[18,19]。该方法可以用来初步筛选影响黄体细胞生长和发育的外源物质,和大鼠卵巢颗粒细胞培养方法类似,缺陷是黄体细胞原代培养比颗粒细胞培养困难,培养时间也较短。

1.3 腔前卵泡培养

大、小鼠腔前卵泡的发育过程中,其组成部分在各个发育阶段都有可能对外源物质的损伤敏感,这些将影响卵泡的发育,还可能引起卵母细胞减数分裂异常、受精失败或者胚胎发育不良。通过卵泡形态学、生物功能和卵子的发生来检测外源物质对其影响,用于对卵巢功能有抑制作用或激活作用的外源物质的筛查,也可用于外源物质对卵泡发育和受精能力的作用机制研究。卵泡培养方法目前主要有二维培养(贴壁卵泡培养)和完整三维结构(球状结构)培养两种类型。方法是从12~14日龄的雌性大、小鼠卵巢中机械性分离腔前卵泡(120~170 μm)进行体外培养,检测指标主要是:卵泡的存活、卵泡的生长、卵丘细胞-卵母细胞复合体(COCs)的排出比率、卵母细胞的数量和成熟度-生发泡(germinal vesicle,

GV)、生发泡破裂(germinal vesicle breakdown, GVBD)和第一极体(polar body, PB)的形成率、性激素的水平如雄烯二酮、睾酮、雌二醇和孕酮水平^[20-22]。

1.4 卵巢器官培养

取大、小鼠胚胎卵巢或出生后大、小鼠卵巢器官进行培养,也可对卵巢通过未损伤的脉管系统进行培养基灌流培养,主要用于卵巢内血流作用、静止期卵泡的启动、卵泡生长发育、排卵和卵泡获得产生类固醇激素能力的研究^[23]。缺陷在于体外培养时间短,不利于长期培养。

1.4.1 卵巢灌流培养系统 卵巢体外灌流培养是将手术分离后的卵巢放置于循环灌流系统中灌流培养,灌流系统内添加不同培养基,通过未损伤的脉管系统进行灌流,观察培养后卵巢组织的生长并进行生物化学分析,也可检测卵泡发育、排卵和类固醇激素的合成。主要用于研究外源物质对卵巢内卵泡发育和排卵的影响,便于从整体水平上发现毒性靶点。以妊娠 13 d 小鼠胚胎卵巢为研究材料,建立小鼠胚胎卵巢器官体外无血清培养模型。胚胎卵巢培养分两步:首先在体积分数 2% 胎牛血清条件下胚胎卵巢进行贴壁培养 5 d,再以胰岛素硒添加剂(insulin transferring selenium, ITS)和胎球蛋白继续培养 14 d(相当于到产后 13 d),经过 19 d 的培养胚胎卵巢中有大量原始卵母细胞开始生长,培养中后期胚胎卵巢中出现许多早期次级卵泡。新生啮齿动物卵巢培养涉及从初生到出生 20 d 的整个卵巢培养,多数的卵巢在体外培养 8 d 后,将卵丘复合体分离再培养 14 d。这种培养体系可用于毒理学研究,找出可能干扰这些进程的潜在危险的外源物质^[24]。

1.4.2 卵巢皮质薄片培养 卵巢组织切片悬浮培养,增加了气体和营养物质的扩散,减少卵巢组织的坏死^[25,26]。通过组织切碎机将卵巢皮质层切成 100 μm 厚的薄片置于培养液中培养,组织培养到一定阶段后再从薄片分离腔前卵泡,进一步在体外发育为可以排卵、受精的卵母细胞。如有研究^[27]将成年人的卵巢切片在体外与环磷酰胺、顺铂等化疗药物以及促性腺激素释放激素激动剂共培养,表明促性腺激素释放激素激动剂对于化疗药物引起的卵巢损失并无保护作用。还有研究^[28,29]将妊娠 12.5 d 小鼠胚胎时期卵巢(除去中肾)切片在体外培养 28 d 用于分离卵母细胞做分析或切片在体外培养 8 d,用于观察生殖细胞密度。目前已证明,利用器官培

养或皮质薄片培养能够成功地在体外启动原始卵泡的生长,它既保留了卵巢整个器官培养时的优点,又克服了其缺点,它可以去除卵巢髓质分泌的抑制因子对卵母细胞在体发育的抑制作用,从而在体外同时获得大量发育程度相近的卵母细胞。该方法可以探究在体内很难评估的一些细胞因子对卵泡发育的影响,也可以研究卵巢在体外的类固醇激素合成能力及其影响因素。卵巢皮质薄片培养技术是卵巢器官培养的一个有力补充。

1.5 芳香化酶测试

芳香化酶在卵巢和胎盘中活性很高,具有将雄性激素转化为雌性激素的功能,不少杀虫剂、黄体类似物和芳香化酶抑制剂都有抑制芳香化酶的活性。体外芳香化酶检测通过测量芳香化酶对标记的雄烯二酮的代谢能力,用于筛选外源物质是否干扰芳香化酶的活性。目前有两种体外检测系统,分别是 JEG-3 和 JAR 绒毛癌细胞系^[30-32]。此外,还可以运用人类胎盘微粒体的体外亚细胞手段检测芳香化酶的活性。

1.6 雌激素受体结合试验

许多环境化合物虽然对人体不具有明显毒性,但却能干扰人的内分泌系统。这种内分泌干扰能够破坏几乎所有的脊椎动物的内分泌系统。雌激素主要通过雌激素受体(estrogen receptors, ERs)来介导细胞增殖、分化和内稳态的生物学作用。不同靶组织中的细胞质膜、线粒体、细胞核上的 ERs 有着相似的调节功能,但也存在一定的差异^[33]。雌激素受体结合试验用于检测能够与雌二醇受体结合的外源物质。通过定量检测外源物质和 17 β -雌二醇与 ERs 的竞争性结合能力,检测受试物是否能与 ERs 结合发挥雌激素作用或干扰正常雌激素活性^[34]。如应用雌激素竞争性受体结合试验检测乐果、乙酰甲胺磷、久效磷、马拉硫磷、对硫磷和对氧磷 6 种有机磷农药的雌激素样活性,结果显示这 6 种有机磷农药的结合率均未下降到 50%,说明这 6 种有机磷农药不与大鼠子宫雌激素受体的位点结合^[35]。

1.7 雌二醇受体转录检测

当外源物质干扰内分泌系统时可能会引起发育异常、生育障碍、患癌风险增加、免疫系统及神经系统功能异常等后果,其中最常受到影响的是性激素水平。雌二醇受体是一个诱导靶基因转录的转录因子,将雌二醇受体调控的 DNA 序列与易测的

报告基因连接,可以直接对雌激素类外源物质进行筛选。体外雌二醇受体转录检测主要用于鉴定在体内能够影响雌二醇活性的激动剂或拮抗剂。如293T、HSC-T6、MCF-7等细胞均可被转染成为检测细胞^[36-38]。OECD建议使用来自人的宫颈癌并经稳定转染的细胞系hERa-Hela-9903,细胞暴露于非细胞毒性浓度的受试物20~24 h以诱发报告基因的产生,同时检测4种性激素水平,包括强雌激素(17 β -雌二醇)、弱雌激素(17 β -雌二醇)、极弱雌激素(17- β -甲基睾酮)和阴性对照(皮质甾酮)。如果诱发的最高反应相当于或者超过阳性对照(1 nmol/L 17- β -雌二醇)反应的10%,可以判定为阳性物质(Test No.455)^[39]。

1.8 子宫颈/内膜上皮细胞体外试验

在基质中培养子宫颈/内膜上皮细胞,模拟体内环境,观察细胞的形态学变化^[40,41],用CCK-8法和基因表达技术研究外源物质对子宫颈/内膜上皮细胞增殖和分化的影响^[42]。类性激素外源物质会使子宫颈/内膜上皮细胞产生与内源性类固醇相似的反应,调节其功能。

2 胚胎组织和细胞培养

1990年代末,ECVAM推荐有效性较高的3个体外胚胎发育毒性筛选试验作为体外筛选外源毒性物质的首选方法,即体外全胚胎培养试验(WEC)、胚胎细胞微团培养试验(MM)和胚胎干细胞试验(EST)^[11]。根据体内发育毒性的数据,将外源物质分为3类:无胚胎毒性、弱胚胎毒性和强胚胎毒性。试验系统通过建立标准操作规程来达到标准化,结果显示出良好的预测能力和重现性^[43]。

2.1 WEC

胚胎毒性通常是指外源物质对胚胎选择性毒性作用,表现为妊娠着床前早期阶段或着床后阶段胚胎的丢失,或出生前引发的在胎儿期观察到的任何毒性表现。胚胎毒性虽然是在宫内引发,但表现在出生前或出生后发育过程中,主要包括妊娠卵枯萎、胎死宫内、胎儿生长受限、功能缺陷和畸形等。体外试验具有简便、经济、试验周期短、试验条件可控、剂量-反应关系易测和排除母体干扰等优点,已广泛应用于胚胎毒性的筛选和致畸机制的研究。体外全胚胎培养方法在致畸因素的筛选、

致畸作用机制的探讨及发育生物学等研究中均有广泛的应用价值,是一种将动物的完整胚胎移植到体外进行培养的实验技术。该方法1930年代由Nicholas等^[44]提出,1970年代由New等^[45]通过不断改进发展成熟和完善,该法主要模型动物有小鼠、大鼠和兔等。大鼠全胚胎培养是从妊娠9~10 d大鼠子宫取出胚胎,剥去胎膜,放入培养液中加入受试物,在含O₂、CO₂和N₂环境中旋转培养,观察胚胎发育情况,记录胚胎存活,检测胚芽、卵黄囊直径、体节和体长等情况。以胚胎的心跳和血液循环是否作为胚胎存活的指标;以卵黄囊直径、颅臀长和头长、体节数和胚胎重作为配套生长发育的指标;根据Brown评分对器官形态分化作出评价,包括17项形态指标:卵黄囊血管、尿囊、胚胎体位、心脏、前后神经管、前脑、中脑、后脑、听觉系统、视觉系统、嗅觉系统、鳃弓、上颌突、前肢芽、后肢芽和体节数。然后按各个组织器官形态分化过程分为5个层次,分别赋予0~4分,各组织器官累积得分为总得分。总得分越低,说明胚胎形态发育越不正常,即受试物的发育毒性作用程度越高^[46]。该方法可用于筛查外源物质的发育毒性、探讨其剂量反应关系和作用机制。用带脏层卵黄囊的妊娠10.5 d的兔胚胎在含100%氧气密封瓶中体外旋转培养,存活12 h;用妊娠10 d的日本大耳白兔胚胎在体外培养了48 h,形成了兔着床后全胚胎培养方法,评估体系与大鼠全胚胎培养方法类似^[47]。

2.2 MM

微团培养是1980年代由Flint^[48]建立,并经Renault等^[49]加以改善的体外培养试验系统,已广泛应用于胚胎毒物筛选。其理论基础是:一些毒性物质影响靶器官或靶组织细胞的分化、增殖、迁移及基质的改变,而这些改变可通过未分化细胞的体外培养表现出来,从而根据培养细胞集落形成数量、细胞形态、基质变化和超微结构的变化评价化学物质的毒性作用及其机制^[11]。胚胎肢芽细胞可取自鸡、兔或大、小鼠,细胞一般分离自器官形成中期胚胎的肢体或头部组织,制成单细胞悬液后,以高密度接种培养,通过分析外源物质暴露后细胞分化情况,对确定的毒理学终点进行检测。采用微团培养观察不同浓度的双酚A(0~50 mg/L)对体外培养的Wistar大鼠胚胎肢芽细胞增殖和分化的

影响,结果显示双酚A对体外培养的Wistar大鼠胚胎肢芽细胞的增殖和分化均有抑制作用,表现为染毒组肢芽细胞集落形成数量减少,细胞毒性试验吸光度值下降,并呈现出明显的剂量-反应关系^[50]。采用妊娠13 d小鼠胚胎后肢芽制成细胞悬液,微团培养检测续断水煎液对小鼠胚胎肢芽细胞增殖,分化和凋亡的影响,结果表明续断水煎液对胚胎肢芽细胞无毒性作用,还能促进肢芽细胞的增殖和分化,抑制肢芽细胞的凋亡^[51]。采用三维技术建立小鼠胚胎中脑体外培养系统,在2个小鼠品系中进行验证微团培养。从妊娠11 d的C57BL/6小鼠胚胎或妊娠12 d的A/J小鼠胚胎中分离脑细胞培养,高密度微团体外培养22 d进行比较,两种小鼠微团系统的蛋白表达模式相似。这种研究早期神经发生的3D培养方法,可应用于体外神经发育毒性的研究^[11]。

2.3 EST

外源物质对于生殖细胞或者早期胚胎的影响将会引起不孕或者种植前胚胎的发育异常,进而引起胚胎毒性或者是后代的畸形,胚胎干细胞(ES)由于其无限增殖及多向分化的潜能而作为研究体外胚胎毒性的细胞模型得到广泛应用,以ES为基础的EST是2003年获得ECVAM认可的胚胎毒性评价的体外替代方法,但该实验方法的快速性和准确性存在一定局限性,目前该细胞模型的研究主要集中于快速性和准确性的优化^[12]。方法参照ECVAM提供的EST操作程序,采用小鼠ES E14TG2a和成纤维细胞3T3细胞,或者分别以小鼠ES、人ES(hES)、人诱导多能干细胞为试验载体(hiPS)筛选外源物质对其影响^[52-53]。

3 乳腺上皮细胞体外试验方法

乳腺最主要的功能就是泌乳,乳腺上皮细胞是乳腺中唯一具有分泌功能的细胞。体外培养的乳腺上皮细胞在研究乳腺的发育机制、乳汁的分泌机制、乳腺生物反应器的构建和乳腺癌发生的研究中均有应用。与乳腺发育及泌乳相关的激素有三类。第一类是性激素:包括雌激素、孕激素、催乳素和催产素;第二类是与新陈代谢有关的激素:包括生长激素、类固醇激素、甲状腺激素和胰岛素;第三类是乳腺激素:泌乳刺激素、甲状旁腺激素相关肽和瘦素。雌激素和孕酮可以刺激单层小鼠乳腺上皮细

胞酪蛋白的合成,单独用雌激素可以促进小鼠乳腺合成酪蛋白及乳糖^[54,55]。乳腺上皮细胞可取自兔、大鼠、小鼠、牛和人^[56,57]。外源毒性物质与乳腺上皮细胞共孵育,观察对其生长增殖和相关蛋白的影响,通过该方法也容易找到相应的保护物质,如茶多酚可保护牛乳腺上皮细胞免受过氧化氢诱导的氧化损伤^[57]。

4 展望

现行完整的生殖发育毒性研究,包括二代生殖毒性在内,大约需要5 000多只动物。整体动物雌性生殖发育毒性研究方法仍是评价外源毒性物质的主要方法,特别是药物生殖发育毒性评估,但其存在不敏感、周期长、所需受试样品量多,特别是由于体内实验生殖功能主要是以与生殖后果有关的参数作为基础,因此难以揭示毒作用位点和毒作用机制。而且,成年动物雌性卵巢是由不同发育阶段各种卵泡群组成的,体内试验不易发现不同阶段的卵泡毒性。而雌性生殖发育毒性体外培养技术可以模拟生殖发育过程中的各个环节,对于优化和减少体内生殖毒性研究中动物的使用显示出巨大潜力,并且便于精准确定毒性靶器官和探索毒性机制。但体外试验也存在代谢能力和人体有差异、缺乏毒代动力学过程、种属外推、体细胞与生殖细胞敏感度不同等问题。任何一种体外方法无法全面模拟外源物质在体内对生殖发育系统影响的全过程,尚不能完全替代目前生殖发育毒性试验常用的整体动物实验。现代生殖发育毒理学研究不断引入新的体外培养技术,由传统的整体动物实验逐步发展到体外细胞和分子水平。三维培养系统的建立使相关培养方式更接近机体本身^[58,59],随着各个替代优化方法不断被验证实施,雌性生殖发育毒性体外方法学研究将得到新的发展和突破。

参考文献:

- [1] Rao KS, Dong J. Nonclinical reproductive toxicity testing requirements for drugs, pesticides, and industrial chemicals in India and China [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 947:13-30.
- [2] ICH. Detection of toxicity to reproduction for medicinal products and toxicity to male fertility S5(R2) [S]. Current step 4 version, 2005.

- [3] Marty MS, Allen B, Chapin RE, et al. Inter-laboratory control data for reproductive endpoints required in the OPPTS 870. 3800/OECD 416 reproduction and fertility test [J]. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol, 2009, 86(6):470-489.
- [4] Beekhuijzen M, de Raaf MA, Zmarowski A, et al. The underestimated value of OECD 421 and 422 repro screening studies: putting it in the right perspective [J]. Reprod Toxicol, 2014, 48:81-87.
- [5] Beekhuijzen M, van Otterdijk F, Wieland W, et al. Update of OECD DART guidelines with endocrine disruptor relevant endpoints: Practical considerations [J]. Reprod Toxicol, 2016, 64:64-71.
- [6] Wise LD. The ICH S5(R2) guideline for the testing of medicinal agents [J]. Methods Mol Biol, 2013, 947:1-11.
- [7] Fegert I, Billington R, Botham P, et al. Feasibility of the extended one-generation reproductive toxicity study (OECD 443) [J]. Reprod Toxicol, 2012, 34(3):331-339.
- [8] Moore NP, Beekhuijzen M, Boogaard PJ, et al. Guidance on the selection of cohorts for the extended one-generation reproduction toxicity study (OECD test guideline 443) [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2016, 80:32-40.
- [9] Barrow P. Revision of the ICH guideline on detection of toxicity to reproduction for medicinal products: SWOT analysis [J]. Reprod Toxicol, 2016, 64:57-63.
- [10] Beken S, Kasper P, van der Laan JW. Regulatory Acceptance of Alternative Methods in the Development and Approval of Pharmaceuticals [J]. Adv Exp Med Biol, 2016, 856:33-64.
- [11] Park JJ, Weldon BA, Hong S, et al. Characterization of 3D embryonic C57BL/6 and A/J mouse midbrain micromass *in vitro* culture systems for developmental neurotoxicity testing [J]. Toxicol In Vitro, 2018, 48:33-44.
- [12] Liu H, Ren C, Liu W, et al. Embryotoxicity estimation of commonly used compounds with embryonic stem cell test [J]. Mol Med Rep, 2017, 16(1):263-271.
- [13] Pratten M, Ahir BK, Smith-Hurst H, et al. Primary cell and micromass culture in assessing developmental toxicity [J]. Methods Mol Biol, 2012, 889:115-146.
- [14] 岑妍慧, 何国珍, 杨美春, 等. 大鼠卵巢颗粒细胞体外培养方法探讨[J]. 四川解剖学杂志, 2012, 20(4):19-21.
- [15] Zhang T, He WH, Feng LL, et al. Effect of doxorubicin-induced ovarian toxicity on mouse ovarian granulosa cells [J]. Regul Toxicol Pharmacol, 2017, 86:1-10.
- [16] 程树军, 刘超. 揭秘化妆品安全性评价技术(十一)—生殖和发育毒性及检测方法[J]. 中国化妆品, 2012, (15):85-90.
- [17] Chow ET, Mahalingaiah S. Cosmetics use and age at menopause: is there a connection? [J]. Fertil Steril, 2016, 106(4):978-90.
- [18] Huang Y, Li W, Zhao X, et al. Swainsonine differentially affects steroidogenesis and viability in caprine luteal cells *in vitro* [J]. Theriogenology, 2013, 80(1):41-49.
- [19] Wrobel MH, Grzeszczyk M, Mlynarczuk J, et al. The adverse effects of aldrin and dieldrin on both myometrial contractions and the secretory functions of bovine ovaries and uterus *in vitro* [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2015, 285(1):23-31.
- [20] 万旭英, 朱玉平, 马玺里, 等. 小鼠腔前卵泡体外培养方法的建立[J]. 卫生研究, 2009, 38(2):153-158.
- [21] Zhang T, Chen Y, Yang Y, et al. The potentiality of two-dimensional preantral follicle culture as an *in vitro* model in predicting premature ovarian failure [J]. Exp Toxicol Pathol, 2017, 69(7):477-484.
- [22] 夏仪, 王卓, 张天宝. 双酚A对大鼠卵泡体外生长和卵母细胞成熟的影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3):423-428.
- [23] Murase T, Iwase A, Komatsu K, et al. Follicle dynamics: visualization and analysis of follicle growth and maturation using murine ovarian tissue culture [J]. J Assist Reprod Genet, 2018, 35(2):339-343.
- [24] Devine PJ, Hoyer PB, Keating AF. Current methods in investigating the development of the female reproductive system[J]. Methods Mol Biol, 2009, 550:137-157.
- [25] Fortune JE, Kito S, Wandji SA, et al. Activation of bovine and baboon primordial follicles *in vitro* [J]. Theriogenology, 1998, 49(2):441-449.
- [26] Hovatta O, Wright C, Krausz T, et al. Human primordial, primary and secondary ovarian follicles in long-term culture: effect of partial isolation [J]. Hum Reprod, 1999, 14(10): 2519-2524.
- [27] Bildik G, Akin N, Senbabaoglu F, et al. GnRH agonist leuprolide acetate does not confer any protection against ovarian damage induced by chemotherapy and radiation *in vitro*[J]. Hum Reprod, 2015, 30(12):2912-2925.
- [28] Zhang ZP, Liang GJ, Zhang XF, et al. Growth of mouse oocytes to maturity from premeiotic germ cells *in vitro* [J]. PLoS One, 2012, 7(7):e41771.
- [29] Angenard G, Muczynski V, Coffigny H, et al. *In vitro* effects of Uranium on human fetal germ cells [J]. Reprod Toxicol, 2011, 31(4):470-476.
- [30] 李岑, 刘惠宁. 紫杉醇对绒癌 JEG-3 细胞增殖与凋亡的影响[J]. 安徽医药, 2014, 18(5):930-933.
- [31] Honkisz E, Wójtowicz AK. Modulation of estradiol synthesis and aromatase activity in human choriocarcinoma JEG-3 cells exposed to tetrabromobisphenol A[J]. Toxicol In Vitro, 2015, 29(1):44-50.
- [32] 庞苗苗, 惠建荣, 安瑞芳. 5-氟尿嘧啶对人绒毛膜癌细胞株 JAR 作用的观察[J]. 陕西医学杂志, 2015, 44(6):652-653.
- [33] Cui J, Shen Y, Li R. Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain [J]. Trends Mol Med, 2013, 19(3):197-209.

- [34] Li Z, Zhang H, Gibson M, et al. An evaluation on combination effects of phenolic endocrine disruptors by estrogen receptor binding assay [J]. *Toxicol In Vitro*, 2012, 26(6):769-774.
- [35] 郑光, 孙运光, 戴旭峰, 等. 竞争性受体结合试验检测农药拟雌激素样作用[J]. *环境与职业医学*, 2003, 20(6):403-405.
- [36] 李杰萍, 庄庆仁, 兰小鹏, 等. PES1对雌激素受体转录活性的调节作用[J]. *基础医学与临床*, 2012, 32(11):1298-1301.
- [37] 陈懿榕, 阙任焯, 刘进铿, 等. 柴胡皂苷 d 对肝星状细胞内雌激素受体转录激活的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2017, 34(4):550-555.
- [38] Traboulsi T, El Ezzy M, Dumeaux V, et al. Role of SUMOylation in differential ER α transcriptional repression by tamoxifen and fulvestrant in breast cancer cells [J]. *Oncogene*, 2018, doi: 10.1038/s41388-018-0468-9. [Epub ahead of print]
- [39] Dvořáková M, Kejlová K, Bendová H, et al. Alternative methods *in vitro* for screening of endocrine disruptors [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2016, 18, 37Suppl 1:123-131.
- [40] 芮瑞, 洪颖. 人体宫颈上皮细胞的体外培养及鉴定[J]. *中国妇幼健康研究*, 2016, 27(10):1285-1288.
- [41] 王雪银, 刘玉珍, 陈昭日, 等. 人正常宫颈上皮细胞的体外分离及细胞活性比较[J]. *现代妇产科进展*, 2014, 23(3):188-191.
- [42] 钟超, 夏承来. 姜黄素对人工宫颈上皮细胞体外细胞毒性作用[J]. *中国现代医生*, 2012, 50(18):35-36.
- [43] Dimopoulou M, Verhoef A, Gomes CA, et al. A comparison of the embryonic stem cell test and whole embryo culture assay combined with the BeWo placental passage model for predicting the embryotoxicity of azoles [J]. *Toxicol Lett*, 2018, 286:10-21.
- [44] Nicholas JS, Rudnick D. The development of rat embryos in tissue culture [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1934, 20(12):656-658.
- [45] New DA, Cockroft DL. A rotating bottle culture method with continuous replacement of the gas phase [J]. *Experientia*, 1979, 35(1):138-40.
- [46] Zhang C, Ball J, Panzica-Kelly J, et al. *In vitro* developmental toxicology screens: a report on the progress of the methodology and future applications [J]. *Chem Res Toxicol*, 2016, 29(4):534-544.
- [47] Marshall VA, Carney EW. Rabbit whole embryo culture [J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 889:239-252.
- [48] Flint OP. *In vitro* tests for teratogens: desirable endpoints, test batteries and current status of the micromass teratogen test [J]. *Reprod Toxicol*, 1993, 7 Suppl 1:103-111.
- [49] Renault JY, Caillaud JM, Chevalier J. Ultrastructural characterization of normal and abnormal chondrogenesis in micromass rat embryo limb bud cell cultures [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995, 130(2):177-187.
- [50] 李勇, 龙鼎新, 裴新荣. 采用微团培养技术探讨双酚 A 的体外发育毒性[J]. *卫生研究*, 2002, 31(3):178-179.
- [51] 李丽娟, 徐秀英, 李啸红, 等. 续断水煎液对小鼠胚胎肢芽细胞体外培养中增殖、分化、凋亡的影响[J]. *中国优生与遗传杂志*, 2017, 25(7):110-113.
- [52] 赵增明, 方海琴, 何俊, 等. 胚胎干细胞毒性评价模型的建立及其在药物安全性评价中的应用[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 27(3):487-488.
- [53] 贾栗, 彭辉, 赵增明, 等. 基于人胚胎干细胞的药物毒性测试替代法研究进展[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2016, 30(2):173-177.
- [54] 郝明超, 刘犇, 樊江峰, 等. 乳腺上皮细胞体外培养的研究进展[J]. *中国奶牛*, 2011, 14:39-43.
- [55] Monzani PS, Bressan FF, Mesquita LG, et al. β -casein gene expression by *in vitro* cultured bovine mammary epithelial cells derived from developing mammary glands [J]. *Genet Mol Res*, 2011, 10(2):604-614.
- [56] Reid JA, Mollica PA, Bruno RD, et al. Consistent and reproducible cultures of large-scale 3D mammary epithelial structures using an accessible bioprinting platform [J]. *Breast Cancer Res*, 2018, 20(1):122.
- [57] Ma Y, Zhao L, Gao M, et al. Tea polyphenols protect bovine mammary epithelial cells from hydrogen peroxide-induced oxidative damage *in vitro* [J]. *J Anim Sci*, 2018, 96(10):4159-4172.
- [58] Joshi P, Yu KN, Kang SY, et al. 3D-cultured neural stem cell microarrays on a micropillar chip for high-throughput developmental neurotoxicology [J]. *Exp Cell Res*, 2018, 370(2):680-691.
- [59] Zhou H, Shikanov A. Three-dimensional hydrogel-based culture to study the effects of toxicants on ovarian follicles [J]. *Methods Mol Biol*, 2018, 1758:55-72.

Advances on *in Vitro* Culture of Female Reproductive and Development Toxicity Based on Animal Welfare

LU Qin¹, ZHOU Yue-hua¹, TANG Hai-fei^{2,3}, WANG Zhi-wen^{2,3}, ZHANG Ting²

(1. Tongren Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200336, China;

2. National Population and Family Planning Key Laboratory of Contraceptives Drugs and Devices,

Shanghai Engineering Research Center of Reproductive Health Drug and Devices,

Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032, China;

3. Department of Bioengineering, Shanghai Institute of Technology, Shanghai 201418, China)

[Abstract] The aim of reproductive and developmental toxicity study is to identify the effects of exogenous substances on reproductive function and development of mammals by animal experiments, predicting the potential adverse effects on reproductive cells, pregnancy, pregnancy, delivery, lactation and other parental reproductive functions, as well as on the development of offspring embryos/fetuses and postnatal development. The methods of studying the reproductive and developmental toxicity of whole animal in females have been widely used in the evaluation of reproductive and developmental toxicity of drugs, food, chemicals and cosmetics. However, its main problems are insensitivity, long cycle, and large sample size. Especially, as the reproductive function of *in vivo* experiments is mainly based on parameters related to reproductive and developmental consequences, it is difficult to reveal the toxic action site and mechanism. Alternative method of female reproductive and developmental toxicology refers to any method or procedure which can replace animal experiments whenever possible, reduce the required number of animals or optimize and reduce animal suffering in animal experimental program, especially in preliminary evaluation of exogenous toxic substances as a powerful complement for animal experiments. In this paper, the technique and research progress of *in vitro* culture of female reproductive developmental toxicity were summarized in this paper, the advances *in vitro* culture of female reproductive toxicity were summarized from cells and tissue culture in female reproductive system, embryonic cells and tissue culture, breast cell culture so as to provide references for the study of *in vitro* culture of reproductive and developmental toxicity in females.

[Key words] Female; Reproductive and development toxicity; Animal welfare; *In vitro* culture

兔 VX2 肿瘤模型的研究进展

米金霞^{1,2}, 方肇勤¹

(上海中医药大学 1. 基础医学院, 2. 科技实验中心, 上海 201203)

[摘要] 兔 VX2 肿瘤模型是目前比较常用的建立在较大动物身上的移植瘤模型, 因其体型大、容易复制, 在外科手术、影像学及介入治疗等研究中广泛应用。VX2 肿瘤模型的建立方法包括肿瘤细胞悬液接种和肿瘤组织块移植接种, 根据移植部位的不同可以建立多种类型的肿瘤模型, 研究人员可以根据自己的研究目的选用合适的类型。随着影像设备的普及和新兴局部治疗方法的应用, 采用兔 VX2 肿瘤模型的研究越来越多。本文从 VX2 细胞的来源及生物学特性、兔 VX2 肿瘤模型的建立方法及类型、研究应用等方面进行综述。

[关键词] 兔; VX2; 肿瘤; 动物模型

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)02-0163-06

我国最新癌症统计数据显示, 2015 年全国癌症新发病例为 429.2 万, 其中死亡人数达 281.4 万, 死亡率最高的肿瘤分别为肺癌、胃癌、食管癌和肝癌, 癌症因其高发病率和死亡率, 已经成为中国人口死亡的主要原因和公共健康问题^[1]。中国的抗癌形势非常严峻, 国家每年投入大量的人力财力进行肿瘤基础研究及药物的研发。目前在肿瘤研究中, 比较常用的是裸鼠人癌移植瘤模型, 但该类模型大多用于肿瘤药物的开发, 因体型小并不适合作为手术、介入等研究的模型。VX2 是一种常用的可在兔身上建立的模型, 易于复制, 在外科可操作性和影像学方面有较大优势, 容易实施血管介入、射频消融等操作, 应用广泛^[2]。本文通过文献检索和整理, 概括了以下几个方面的内容。

1 VX2 细胞的来源及生物学特性

VX2 细胞是由 Shope 病毒感染形成的兔乳头状

瘤, 经过 72 次移植传代, 建立的稳定的肿瘤细胞系, 最初由 Rous 等^[3,4]报道。该细胞是上皮细胞恶性肿瘤, 属于鳞状细胞癌, 可接种于多个部位建立原位肿瘤动物模型。利用 VX2 细胞建立的肿瘤模型具有生长迅速、血供丰富、容易侵袭周边组织和转移的特点。

2 VX2 细胞的形态和传代

2.1 VX2 细胞的形态

VX2 细胞系不同于一般的小鼠或人癌细胞系, 在体外培养的报道较少。将荷瘤兔的肿瘤组织在体外培养后, 可观察到 VX2 细胞的形态及其生物学特性。刘险峰等^[5]观察到 VX2 肿瘤细胞的形态为多角形、短梭形, 贴壁生长, 体外培养倍增时间为 34.5 h, 细胞周期测定 G1 期为 69.3%、G2 期为 5.6%、S 期为 25.1%。苏畅等^[6]采用类似的方法观察到 VX2 细胞多呈圆形、多角形的上皮细胞, 核大、核质比异常、异形性明显, 细胞倍增时间为 26.4 h, 细胞周期测定 G1 期为 74.61%、G2 期为 7.78%、S 期为 17.6%。

2.2 VX2 细胞的传代

VX2 细胞因在体外培养不易成功, 大多采用体内传代的方式。这可能与体外纯化的细胞经过多次传代后容易出现成瘤力下降及自发性消退现象有

[收稿日期] 2018-10-09

[基金项目] 上海中医药大学中医基础理论学科能力提升项目 (A1-Z183020111)

[作者简介] 米金霞, 女, 在读博士生, 讲师, 主要从事中医药防治肿瘤基础研究。E-mail: jinxiami@163.com

[通信作者] 方肇勤, 教授, 博士生导师;
E-mail: zqfang@sh163.net

关。目前, VX2 细胞传代一般以液氮冷冻组织块和动物活体传代两种方法结合的形式保存。

液氮冷冻的方法是将荷瘤兔的新鲜鱼肉样肿瘤组织洗净, 剪碎成体积较小的肿瘤块, 以细胞冻存的方式保存在液氮中, 需要时常规复苏即可。

活体传代大多采用兔后腿肌肉接种, 将肿瘤生长至 2~3 周的荷瘤兔麻醉后, 选取肿瘤生长旺盛的鱼肉样组织, 剪碎至 1~2 mm³ 大小的瘤块, 用眼科镊或注射器等接种至兔后腿肌肉内以保种传代。皮下方式一般不推荐, 因 VX2 肿瘤生长迅速, 极易发生表皮溃烂。

液氮冷冻保存占用空间少, 灵活方便, 节省了使用实验动物的各种费用, 但因肿瘤活性降低而影响到模型动物的成瘤率; 活体传代成瘤率高, 但需要长期饲养兔, 增加了实验成本。因此在研究过程中可以采取两种方法结合的形式, 在模型建立之前先将冻存的肿瘤接种至兔后腿肌肉, 经体内生长适应后, 再行大规模肿瘤模型的建立。

3 兔 VX2 肿瘤模型的建立

3.1 建立方法

目前建立兔 VX2 肿瘤模型常用的方法包括细胞悬液法和瘤块接种法。

3.1.1 细胞悬液法 将一定数量的 VX2 细胞注射至建模部位形成相应的肿瘤模型, 采用的细胞悬液根据其来源可分为两种情况。一种是体外培养的肿瘤细胞, 如赵中辛等^[7]用法国 Pasteur 研究所提供的 VX2 细胞悬液建立肝肿瘤模型; 王光大等^[8]采用同行惠赠的 VX2 细胞接种于脾脏建立肝转移瘤模型。但 VX2 细胞在体外培养时随着传代次数的增多, 使用的酶消化法破坏了肿瘤细胞与亲本细胞间的关系, 使细胞的侵袭性降低, 模型的成功率也受到了影响。因此有学者尝试另一种细胞悬液的制备: 将 VX2 荷瘤兔身上的新鲜肿瘤组织进行匀浆或研磨、过滤形成肿瘤组织细胞悬液, 这种方法制备的细胞悬液适应性强, 能够抵抗机体的免疫力, 成瘤率比采用体外培养的肿瘤细胞悬液更高。Li 等^[9]将 VX2 肿瘤组织制备的细胞悬液接种于肝脏, 3~4 周就可以在 B 超下观察到肿瘤的位置和大小。Ahn 等^[10]将 VX2 肿瘤细胞悬液接种于肾脏水平位置双侧脊椎旁的肌肉, 接种 10~12 d 后肿瘤体积为 (6.0 ± 2.9) cm³, 17~19 d

肿瘤体积为 (13.5 ± 5.3) cm³。丁玖乐等^[11]在研究中并未指明采用的细胞悬液属于哪一种。因此研究人员在参考时一定要仔细判断, 尽可能提高肿瘤模型的成功率, 减少验证的时间。

3.1.2 瘤块接种法 将生长了 2~3 周的荷瘤兔麻醉后, 选取边缘生长旺盛的鱼肉样瘤组织, 经磷酸缓冲液(PBS)或生理盐水清洗后, 去除坏死组织和结缔组织, 用手术剪刀剪成 0.5~2 mm³ 大小的肿瘤块, 用穿刺针或注射器将瘤块接种至建模部位, 借助明胶海绵或医用吻合胶可以起到封堵、提高成瘤率的作用。余梁等^[12]用肿瘤块接种、明胶海绵封堵的方式建立兔 VX2 肝癌模型, 大大提高了成模率, 且降低了肿瘤块从穿刺道掉落形成异位肿瘤的风险。于涛等^[13]将肿瘤组织块接种至胫骨骨髓腔内, 再用骨蜡封口, 建立兔 VX2 骨转移瘤模型。Tong 等^[14]预先将肿瘤块嵌入明胶海绵植入肝左叶, 再用明胶海绵封堵建立 VX2 肝癌模型, 不仅节约了手术时间, 而且减少了肿瘤渗漏和异位播散的发生。

肿瘤的大小和生长速度与接种瘤块的数目和大小有关, 并且随着肿瘤的逐渐增大, 兔也会出现相应的症状。张贵祥等^[15]在研究中观察到兔 VX2 肿瘤在 2 周时直径可达 1~2 cm, 兔活动减少, 食欲下降; 3 周时肿瘤可达 3~4 cm; 4 周达 5~7 cm, 出现后肢瘫痪、乳白色尿等症状; 5 周后肿瘤直径可超过 10 cm。一般肿瘤在 2 周后包膜形成, 肿瘤内坏死液化。

3.2 模型类型

根据移植部位的不同可以建立多种类型的兔 VX2 肿瘤模型, 如乳腺癌、肝癌、直肠癌、骨癌、肾癌等。Pascale 等^[16]将肿瘤组织小心挤压通过 200 μm 尼龙筛, 离心混悬, 取 0.2 mL 含有 5 × 10⁶ 个细胞注射至胸部乳腺的脂肪垫下建立兔 VX2 乳腺癌模型。Zhang 等^[17]将组织块接种在肝左叶建立兔 VX2 肝癌模型, 观察经肝动脉栓塞(TAE)和缺氧复制型溶瘤腺病毒的联合抗肿瘤效果。孙铁群等^[18]将瘤块接种至直肠壁内, 并用生物 OB 胶封闭进针口, 建立直肠癌淋巴结转移模型。许建东等^[19]接种瘤块至后腿肌肉建立兔 VX2 骨骼肌肿瘤模型, 并观察了蜂胶在免疫方面的抑瘤效果。马雅昌等^[20]建立兔 VX2 骨癌模型, 利用自制的高分子封堵栓封堵穿刺孔有效降低了骨肿瘤穿刺后瘤细胞早期扩散的发生。

随着各类影像设备的应用,研究人员亦可以借助先进仪器,快速、高效地在各个脏器建立 VX2 原位移植瘤模型。原位移植瘤模型可以采用开腹直视或经皮穿刺的方法。含笑等^[21]用开腹直视的方法,以腹正中偏左切口进入,先用 4F 扩张鞘管斜刺肝左叶,再用鞘管内芯推送肿瘤块,并用明胶海绵条封堵穿刺通道,建立兔 VX2 肝癌模型,大大降低了肿瘤在网膜及腹壁种植的机率。金光鑫等^[22]比较了核磁共振(MR)导引穿刺法和传统开腹法建立兔 VX2 肝癌模型的研究,成瘤率前者为 93.7%,后者为 87.5%,且 MR 经皮穿刺法具有创伤小,感染率低的特点。张强等^[23]采用计算机 X 射线断层扫描(CT)导引经皮穿刺的方法,将肿瘤块及明胶海绵预装在穿刺针内,建立兔 VX2 肝癌模型和肾癌模型,成瘤率为 100% 和 90%,手术方法简便省时,肿瘤有孤立单发的优势。

4 兔 VX2 肿瘤模型的研究应用

兔 VX2 肿瘤模型主要应用在磁共振成像(magnetic resonance imaging, MRI)、射频消融(radiofrequency ablation, RFA)、和 TAE 等方面的实验研究中,是目前用于影像研究最为理想的实验模型。

4.1 在 MRI 的应用

MRI 避免了使用对人体有害的 X 射线和易引起过敏反应的造影剂,且分辨力高,对全身各系统疾病,尤其是肿瘤的诊断有着重要的作用。Li 等^[24]借助动态增强磁共振成像(dynamic contrast enhanced magnetic resonance imaging, DCE-MRI)和微血管密度(microvessel density, MVD)评价兔 VX2 后肢肌肉肿瘤生长过程中血管生成情况,发现肿瘤新生血管是一个动态的过程,在接种后 2 周达到峰值,之后逐渐下降,对肿瘤抗血管生成药物的使用具有指导意义。潘江洋等^[25]利用 DCE-MRI 定量评估兔 VX2 肝癌模型经索拉非尼靶向治疗前后的血管生成变化,发现 K_{trans} 、 K_{ep} 值的下降具有统计学意义,且与 MVD、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)之间有线性关系, DCE-MRI 可以用于抗肿瘤血管生成的疗效评估。王攀鸽等^[26]用 MR 淋巴造影(MR-LG)显像兔 VX2 乳腺癌模型,发现 MR-LG 可以很好地区分内乳前哨淋巴结(SLN)及淋巴管。

4.2 在 RFA 的应用

局部消融治疗具有创伤小、疗效确切的特

点,使一些不耐受手术切除的肝癌病人获得治疗的机会。但 RFA 因治疗不足、残留肿瘤的存在以及治疗后局部肿瘤的复发和转移,影响了治疗效果^[27]。刘亚等^[28]观察 RFA 治疗兔 VX2 肝癌后针道区、热凝固区和消融交界区病理改变、VEGF 表达及凋亡情况,结果显示针道区肿瘤细胞大量坏死,核碎裂、固缩,一周后出现溶解液化及血栓,并随着时间的延长逐渐加重,热凝固区肿瘤坏死细胞和大量巨嗜细胞、中性粒细胞共存,消融边界区以炎性细胞为主;从手术操作区往外 VEGF 依次降低、细胞凋亡依次增加。邹孟达等^[29]观察环五肽 RGD(TyrRGD)靶向的纳米金颗粒(GNPs)耦联 VEGF 小干扰 RNA (TyrRGD-GNPs-VEGFsiRNA)复合物与 RFA 的协同效应,结果证实该复合物不仅可促进肿瘤细胞的凋亡,还能延长兔 VX2 肝癌模型的生存时间,最长生存时间达 90 d。赵艳萍等^[30]在 CT 导引下经皮穿刺单次 RFA,观察兔 VX2 肝癌在 RFA 后局部肿瘤进展(local tumor progress, LTP)的发生,发现其主要与射频范围不足有关,射频针周围更容易产生 LTP。明韦迪等^[31]利用兔 VX2 小腿肿瘤模型,射频干预 5 min, ELISA 法检测干预前后不同时间耳缘静脉血中热休克蛋白(HSP)70、白细胞介素(IL)-6 和 IL-8 的表达,结果显示 HSP70 及 IL-6 表达量升高, IL-8 的表达量降低,表明射频干预可以促进机体的抗肿瘤免疫反应。为了提高 RFA 的治疗效果,研究人员尝试 RFA 联合其他药物或局部操作的相关研究^[32],比如 Jiang 等^[33]联合抗免疫疗法抑制肿瘤的增殖及转移,李浩等^[34]联合 TACE 减少肿瘤周围血液的灌注。

4.3 在 TAE 的应用

Tomozawa 等^[35]通过兔 VX2 肝癌模型实验研究表明索拉非尼与 TAE 联合应用时,索拉非尼应在 TAE 操作之前或同时给药,能够更有效抑制肿瘤。Zhang 等^[36]通过研究表明,姜黄素脂质体可以抑制兔 VX2 肝癌模型经 TAE 引起的 HIF-1 α 和 survivin 表达水平的增高以及血管的生成,能够通过调节细胞增殖和凋亡相关分子起到抗肿瘤的作用。黄巧胜等^[37]研究显示,兔 VX2 肝癌模型在实施经肝动脉灌注雷替曲塞后,血浆中血药浓度降低,药物大多沉积在肿瘤区,对肿瘤发挥最大治疗效果的同时,降低了全身的不良反应。

4.4 在抗肿瘤药物研发中的应用

刘宇等^[38]用兔 VX2 肺癌模型观察多西他赛脂

质体的疗效和安全性。董胜利等^[39]建立兔 VX2 肝转移瘤模型,开发肿瘤耐药的相关药物,发现以 PII-nHAP 为载体的 P53 基因协同 Rb 基因的纳米靶向治疗,可通过调节肿瘤细胞多重耐药机制中的重要基因 PGP、BCRP 的表达,增强其对化疗药的敏感性, P53 基因联合 Rb 基因的纳米基因靶向治疗有可能成为针对肝转移灶多药耐药的有效治疗方法。梁琪等^[40]利用兔 VX2 肝癌模型评价超顺磁性氧化铁(superparamagnetic iron oxide, SPIO)纳米药物载体在 TACE 治疗中的效果,证实 SPIO 纳米药物载体联合 LIP 具有良好的 MRI 和 CT 可视性,可提高兔 VX2 肝癌的化学药物栓塞治疗的效果。传统药物在 TACE 后容易进入体循环,使肿瘤化疗不彻底,全身副作用大,戴海涛等^[41]成功制备阿霉素负载的叶酸靶向的磷酸胆碱修饰氧化石墨烯,表明在治疗后药物主要沉积在肿瘤区域内,提高了化疗效果,降低了副作用。

4.5 其他应用

兔 VX2 肿瘤模型在新兴治疗方法和仪器的开发中也广泛应用。高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)除了被用于疾病的常规诊断,也是一种新兴的肿瘤治疗手段,它通过将超声波聚集于人体靶组织,使得靶区局部温度迅速升高,继而导致靶区内细胞产生坏死、凋亡或其他热效应、空化效应,从而达到治疗目的。Sun 等^[42]在研究中采用兔 VX2 肌肉肿瘤模型,在 MRI 引导下利用 HIFU 明显增加了肿瘤组织的渗透性,使 24 h 药物吸收率增加 34.5%,为肿瘤药物的使用提供了新的思路。陈云卫等^[43]观察射频凝血器在兔 VX2 肝癌切除术中的作用,发现其可以减少出血量、降低并发症。宋春慧等^[44]利用兔 VX2 肝癌模型,研究经氩氦刀冷冻治疗后,增强 CT、增强 MRI 和超声造影等影像设备对疗效的评价。

5 总结

兔 VX2 肿瘤模型作为在较大动物身上复制的模型已经在影像、介入、外科操作等研究领域广泛应用。该模型因有较高的肺转移发生率^[45],有望成为抗肿瘤转移机制研究及药物开发的理想动物模型。此外,中医中药作为全身治疗的方法之一,能够改善症状,提高机体的抵抗力,减轻放疗化

疗不良反应,提高生活质量,在肿瘤的综合治疗中发挥着重要的作用^[46]。尤其是中药有很多免疫调节的有效成分,如姜黄素、多糖等联合 RFA 可以明显提高抗肿瘤作用^[47,48]。本课题组正在开展兔 VX2 肿瘤模型辨证论治及实体瘤中心变性粉碎引流术综合治疗方案的相关研究^[49],发现该模型有一定的局限性,比如缺乏可用的抗体,无法通过 FLISA 或免疫组织化学染色法测定特异性的生长因子和细胞因子,限制了进一步的机制研究^[50]。因此,研究人员在实验过程中需要结合研究目的,选用合适可行的评价方法,如影像学指标、病理学指标等,而且要不断优化建模方法,尽可能建立大小一致、位置统一的标准化肿瘤模型。

参考文献:

- [1] Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2):115-132.
- [2] Gehlot P, Shukla V, Gupta S, et al. Detection of ALDH1 activity in rabbit hepatic VX2 tumors and isolation of ALDH1 positive cancer stem cells[J]. J Transl Med, 2016, 14:49.
- [3] Rous P, Beard JW. The progression to carcinoma of virus-induced rabbit papillomas (Shope) [J]. J Exp Med, 1935, 62: 523-548.
- [4] Kidd JG, Rous P. A transplantable rabbit carcinoma originating in a virus-induced papilloma and containing the virus in masked or altered form[J]. J Exp Med, 1940, 71:813-838.
- [5] 刘险峰,任乐荣,苏广彦,等.兔 VX2 肿瘤细胞系的建立及其生物学特性的观察[J].中华病理学杂志, 2005, 34(10): 661-663.
- [6] 苏畅,张惠中,李文海,等.兔 VX2 肿瘤的离体培养及有关生物学特性[J].第四军医大学学报, 2006(9):844-847.
- [7] 赵中辛,杜竞辉,王学浩,等.吡喃霉素-碘油肝动脉灌注治疗兔 VX2 瘤的药代动力学研究[J].中华实验外科杂志, 1998, 15(3):244-245.
- [8] 王光大,吴勇超,李亚洲,等.兔 VX2 肝脏转移瘤血供来源分析[J].医学动物防制, 2017, 33(3):240-242+248+356.
- [9] Li JL, Ye WT, Liu ZY, et al. Comparison of microvascular perfusion evaluation among IVIM-DWI, CT perfusion imaging and histological microvessel density in rabbit liver VX2 tumors[J]. Magn Reson Imaging, 2018, 46:64-69.
- [10] Ahn SY, Goo JM, Lee KH, et al. Monitoring tumor response to the vascular disrupting agent CKD-516 in a rabbit VX2 intramuscular tumor model using PET/MRI: Simultaneous evaluation of vascular and metabolic parameters[J]. PLoS One, 2018, 13(2):1-14.
- [11] 丁玖乐,陈蕾,孙玲玲,等. VX2 瘤在不同 CT 机型下常规

- 腹部扫描的纹理分析差异及预处理评价[J]. 中国医学影像学杂志, 2018, 26(1):7-10.
- [12] 余梁, 含笑, 周丽芬, 等. 兔VX2肝癌模型改良制作及TAE前后CT与DSA影像学评估[J]. 中国CT和MRI杂志, 2017, 15(8):85-87.
- [13] 于涛, 魏然, 金宇, 等. 兔VX2骨转移瘤的适宜穿刺活检时间研究[J]. 中华实用诊断与治疗杂志, 2017, 31(6):530-532.
- [14] Tong H, Duan LG, Zhou HY, et al. Modification of the method to establish a hepatic VX2 carcinoma model in rabbits[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(4):5333-5338.
- [15] 张贵祥, 孙诚, 魏梦琦, 等. 介绍兔VX2转移瘤动物模型[J]. 实用放射学杂志, 1998, 14(2):59.
- [16] Pascale F, Bédouet L, Fazel A, et al. Lymphatic transport and lymph node location of microspheres subcutaneously injected in the vicinity of tumors in a rabbit model of breast cancer[J]. *Pharm Res*, 2018, 35(10):191.
- [17] Zhang H, Xiong F, Qian K, et al. Transcatheter arterial embolization combined with hypoxia-replicative oncolytic adenovirus perfusion enhances the therapeutic effect of hepatic carcinoma[J]. *Cancer Manag Res*, 2019, 11:981-996.
- [18] 孙铁群, 童彤, 毛健, 等. VX2移植性兔直肠癌淋巴结转移动物模型的建立及其生物学特性[J]. 中国癌症杂志, 2016, 26(10):840-847.
- [19] 许健东, 方利平. 蜂胶对兔骨髓肌VX2肿瘤生长抑制作用的研究[J]. 临床合理用药杂志, 2016, 9(33):134-136.
- [20] 马雅昌, 郭健, 朱雅文, 等. 一项新型封闭穿刺技术应用于骨肿瘤穿刺活检中的价值[J]. 遵义医学院学报, 2018, 41(01):53-57+62.
- [21] 含笑, 胡茂能, 吴鸿峰, 等. 建立改良法兔VX2肝癌模型及肝动脉联合门静脉插管的应用[J]. 中国介入影像与治疗学, 2017, 14(11):690-693.
- [22] 金光鑫, 王军, 仇晓霞, 等. MR导引经皮穿刺瘤块种植法构建兔VX2肝癌模型[J]. 介入放射学杂志, 2016, 25(11):980-983.
- [23] 张强, 李彬, 李晓光, 等. CT导引下“体外预装示踪一步植入技术”制作兔肝/肾肿瘤模型[J]. 介入放射学杂志, 2018, 27(03):252-256.
- [24] Li H, Yu L, Wang W, et al. Dynamics of angiogenesis and cellularity in rabbit VX2 tumors using contrast-enhanced magnetic resonance imaging and diffusion-weighted imaging[J]. *Oncol Lett*, 2018, 15(3):2978-2984.
- [25] 潘江洋, 时高峰, 王琦, 等. DCE-MRI评估索拉非尼抑制兔VX2肝种植瘤血管生成的实验研究[J]. 放射学实践, 2018, 33(1):13-19.
- [26] 王攀鸽, 谭红娜, 王博, 等. MR淋巴造影显影兔VX2乳腺癌模型内乳前哨淋巴结[J]. 中国医学影像技术, 2018, 34(5):641-645.
- [27] Chen X, Liu HP, Li M, et al. Advances in non-surgical management of primary liver cancer[J]. *World J Gastroenterol*, 2014, 20(44):16630-16638.
- [28] 刘亚, 吕维富, 朱先海, 等. 兔肝VX2肿瘤射频消融后不同区带VEGF的表达和细胞凋亡[J]. 中国介入影像与治疗学, 2017, 14(9):561-565.
- [29] 邹孟达, 熊青, 邓青松, 等. 环五肽RGD靶向的纳米金偶联VEGFsiRNA增强兔VX2肝肿瘤射频消融损伤效应的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2017, 26(1):43-49.
- [30] 赵艳萍, 齐玲俊, 刘文亚, 等. CT评价兔VX2肝癌射频消融后局部肿瘤进展模式及部位[J]. 中国医学影像技术, 2011, 27(3):474-478.
- [31] 明韦迪, 李晓光, 金征宇. 兔小腿VX2肿瘤射频消融前后血清HSP70、IL-6、IL-8水平的变化及意义[J]. 医学影像学杂志, 2017, 27(5):906-910.
- [32] Bimonte S, Leongito M, Piccirillo M, et al. Radio-frequency ablation-based studies on VX2 rabbit models for HCC treatment[J]. *Infect Agent Cancer*, 2016, 11:38.
- [33] Jiang T, Zhang X, Ding J, et al. Inflammation and cancer: inhibiting the progression of residual hepatic VX2 carcinoma by anti-inflammation drug after incomplete radiofrequency ablation[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(11):13945-13956.
- [34] 李浩, 段旭华, 韩新巍, 等. 经肝动脉化疗栓塞术联合射频消融治疗兔肝VX2肿瘤的效果分析[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(4):779-783.
- [35] Tomozawa Y, Nitta N, Ohta S, et al. Anti-tumor effects of sorafenib administered at different time points in combination with transarterial embolization in a rabbit VX2 liver tumor model[J]. *Cardiovasc Intervent Radiol*, 2017, 40(11):1763-1768.
- [36] Zhang X, Dai F, Chen J, et al. Antitumor effect of curcumin liposome after transcatheter arterial embolization in VX2 rabbits[J]. *Cancer Biol Ther*, 2019, 8:1-11.
- [37] 黄巧胜, 陈少锋, 钟泽龙, 等. 雷替曲塞经不同给药方式的药动学分析[J]. 介入放射学杂志, 2018, 27(2):157-162.
- [38] 刘宇, 张福军, 兰作平, 等. 基于兔VX2原位移植肺癌模型评价多西他赛脂质体疗效和安全性[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(14):1428-1434.
- [39] 董胜利, 李高鹏, 宋建, 等. 纳米颗粒介导的P53联合Rb基因靶向治疗对兔VX2肝转移癌多药耐药的影响及分子机制[J]. 中国药物与临床, 2017, 17(4):468-471+618.
- [40] 梁琪, 邓灵灵, 冯智超, 等. SPIO纳米药物载体联合碘化油经肝动脉栓塞治疗兔VX2肝癌[J]. 中南大学学报: 医学版, 2017, 42(11):1248-1256.
- [41] 戴海涛, 黄勇慧, 林润, 等. 磷酸胆碱修饰的氧化石墨烯经导管动脉化疗栓塞治疗肝癌[J]. 中山大学学报: 医学版, 2018, 39(1):18-25.
- [42] Sun Y, Xiong X, Pandya D, et al. Enhancing tissue permeability with MRI guided preclinical focused ultrasound system in rabbit muscle: From normal tissue to VX2 tumor[J]. *J Control Release*, 2017, 256:1-8.

- [43] 陈云卫, 宋晓雪, 吴堃, 等. 腹腔镜下射频凝血器对家兔 VX2肝癌模型的疗效研究[J]. 现代医药卫生, 2017, 33(23): 3546-3548.
- [44] 宋春慧, 赵伟, 李嫚, 等. 氩氦刀治疗兔 VX2 肝肿瘤的影像表现与病理分析[J]. 医疗装备, 2017, 30(9):1-3.
- [45] Oshiro H. The role of the lymphatic system in rabbit models for cancer metastasis research: a perspective from comparative anatomy[J]. Okajimas Folia Anat Jpn, 2014, 91(2): 25-28.
- [46] National Health and Family Planning Commission of the People's Republic of China. Diagnosis, management, and treatment of hepatocellular carcinoma (V2017) [J]. J Clin Hepatol, 2017, 33(8):1419-1431.
- [47] Urano M, Tanaka C, Sugiyama Y, et al. Antitumor effects of residual tumor after cryoablation: the combined effect of residual tumor and a protein-bound polysaccharide on multiple liver metastases in a murine model[J]. Cryobiology, 2003, 46:238-245.
- [48] Chandra D, Jahangir A, Cornelis F, et al. Cryoablation and Meriva have strong therapeutic effect on triple-negative breast cancer[J]. Oncoimmunology, 2015, 5:e1049802.
- [49] 米金霞, 卢涛, 方肇勤, 等. 实体瘤中心变性粉碎引流术在兔 VX2 移植瘤模型实施的可行性评价[J]. 上海中医药大学学报, 2018, 32(5):41-44.
- [50] Huisman F, van Lienden KP, Damude S, et al. A review of animal models for portal vein embolization[J]. J Surg Res, 2014, 191(1):179-188.

Research Progress of Rabbit VX2 Tumor Model

MI Jin-xia^{1,2}, FANG Zhao-qin¹

(1. School of Basic Medical Science, 2. Experiment Center for Science and Technology, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China)

[Abstract] The rabbit VX2 tumor model is commonly used as a xenograft tumor model in large animals, which is also widely used in surgical operation, imageology and interventional therapy because of its body type and easy replication. The methods of establishing rabbit VX2 tumor model include injection of cell suspension and inoculation of tumor tissue block. The tumor models can be established differently depending on the site of the transplant. Researchers can select suitable tumor models for their own purposes. With the popularity of imaging equipment and the application of the emerging local treatment methods, more and more studies have been conducted using the rabbit VX2 tumor model. This paper reviewed the source of VX2 cells, biological characteristics, methods of tumor models and research applications.

[Key words] Rabbit; VX2; Tumor; Model