

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3期

2019年6月

目次

• 专家论坛 •

基因修饰家兔研究进展薛莹, 范江霖, 刘恩岐(169)

• 论 著 •

树鼩 *Mfsd2a* 基因的克隆分析和不同组织表达量的检测王文广, 匡德宣, 李娜, 等(178)

新生乳兔右心室超负荷模型的初步构建和分析丁雷, 王守宝, 荆辉, 等(187)

Myh13 敲除小鼠表型的初步分析何一旻, 顾鸣敏(193)

循环内皮微粒相关 microRNA 在巨噬细胞炎症反应

诱发小鼠动脉粥样硬化发生的机制孙理华, 张颖, 曹桂秋, 等(201)

套环法和空气干燥法建立兔颈动脉粥样硬化斑块模型的比较分析王琮, 陈筱雪, 杨少玲, 等(208)

B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞增殖、凋亡及迁移能力实验研究景瑾, 张海骏, 杜利莉, 等(213)

小鼠脾淋巴细胞对人 HepG2 细胞杀伤活性检测方法的建立陈丽玲, 钟友宝, 刘璇, 等(220)

应用于行为学研究中八臂迷宫实验方法的改良刘波, 王杨, 李志杰(226)

用吖啶橙-流式细胞仪技术检测间苯二胺、对苯二胺

诱导的小鼠骨髓细胞微核率陈秀娟, 江漪, 李敏, 等(231)

• 经验交流 •

一例食蟹猴肠套叠诊断与治疗李良顺, 潘世友, 支元芳, 等(236)

基于浏览器/服务器模式架构的高校动物实验管理系统开发与应用徐孝平, 张利棕, 潘永明, 等(239)

• 综 述 •

视网膜母细胞瘤斑马鱼模型及 *rb1* 基因研究进展王俐梅, 张建, 刘忠华, 等(244)

大鼠自发性及药物相关性胰岛纤维化研究进展周飞, 王浩安(249)

期刊基本参数: CN31-1954/Q*1981*b* 大 16*84*zh*P* ¥10.00*2000*14*2019-06

协办单位(排名不分先后)

上海西普尔-必凯实验动物有限公司

扬州大学比较医学中心

苏州大学动物实验中心

广东省医学实验动物中心

中国科学院上海药物研究所实验动物室

上海市实验动物质量监督检验站

上海交通大学医学院实验动物科学部

浙江省实验动物中心

上海斯莱克实验动物有限责任公司

南通大学实验动物中心

上海市公共卫生临床中心

上海儿童医学中心

山东省实验动物中心

浙江中医药大学动物实验研究中心

第二军医大学实验动物中心

哈尔滨兽医研究所

杭州师范大学实验动物中心

复旦大学药学院

Laboratory Animal and Comparative Medicine

Vol.39 No.3

Jun. 2019

Main Contents

- Genetically Modified Rabbit Models for Medical Sciences.....XUE Ying, FAN Jiang-lin, LIU En-qi(169)
- Cloning and Analysis of Tree Shrew *Mfsd2a* Gene and
Detection of Its Expression in Different Tissues.....WANG Wen-guang, KUANG De-xuan, LI Na, LU Cai-xia, et al(178)
- Preliminary Construction and Analysis of Right Ventricular
Overload Model in Newborn Rabbits.....DING Lei, WANG Shou-bao, JING Hui, et al(187)
- Preliminary Phenotypic Analysis of *Myh13* Knockout MouseHE Yi-min, GU Ming-min(193)
- Mechanism of Circulating Endothelial MicroRNA Related to Atherosclerosis Induced by
Inflammatory Response of Macrophages in MouseSUN Li-hua, ZHANG Ying, CAO Gui-qiu, et al(201)
- Comparative Analysis of Rabbit Carotid Atherosclerosis Models
Established by Collar And Air-drying MethodWANG Cong, CHEN Xiao-xue, YANG Shao-ling, et al(208)
- Experimental Study on Proliferation, Apoptosis and Migration
of Eyelid Fibroblasts in B6-Co Mice.....JING Jin, ZHANG Hai-jun, DU Li-li, et al(213)
- Development of a Method for Determination of Cytotoxicity Activity
of Mouse Splenic Lymphocytes on Human HepG2 CellsCHEN Li-Ling, ZHONG You-Bao, LIU Xuan, et al(220)
- An Modified Eight-arm Maze Experiment Method in Behavioral Research.....LIU Bo, WANG Yang, LI Zhi-jie(226)
- Detection of Micronucleus Rate of Mouse Bone Marrow Cells Induced by M-phenylenediamine
and P-phenylenediamine with Acridine Flow CytometryCHEN Xiu-juan, JIANG Yi, LI-Min, et al(231)
- Diagnosis and Treatment for Intussusceptions in One Case
of Cynomolgus MonkeyLI Liang-shun, PAN Shi-you, ZHI Yuan-fang, et al(236)
- Research Progress on Zebrafish Model of Retinoblastoma and *rb1* GeneWANG Li-mei, ZHANG Jian, LIU Zhong-hua, et al(244)
- Review of Spontaneous and Drug-related Islet Fibrosis in RatsZHOU Fei, WANG Hao-an(249)

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3期 2019年6月

主 编 高 诚
编辑出版 《实验动物与比较医学》编辑部
主管单位 上海科学院
主办单位 上海市实验动物学会 上海实验动物研究中心
印 刷 上海宝山译文印刷厂
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.3 Jun. 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

基因修饰家兔研究进展

薛莹^{1,2}, 范江霖³, 刘恩岐^{1,2}

(1. 西安交通大学医学部实验动物中心, 西安 710061;

2. 西安交通大学心血管研究中心, 西安 710061;

3. 日本山梨大学医学部分子病理学系, 日本山梨 409-3898)

[摘要] 基因修饰(GM)家兔是生物医学研究极其重要的动物模型, 过表达人类基因的家兔模型已经广泛用于人类心血管疾病、艾滋病和肿瘤等研究领域。到目前为止, 制作转基因家兔模型绝大多数使用显微注射的方法, 使外源基因随机插入到家兔基因组中。基于胚胎干细胞(ES 细胞)的基因打靶技术是实现基因敲除(KO)、研究基因功能最有效的方法之一, 然而, 家兔缺乏稳定、可商业化使用的 ES 细胞系, 所以利用 ES 细胞对家兔基因组进行编辑修饰是不可能实现的。近年来, 新发展起来的以 CRISPR-Cas9 为代表的新的基因编辑技术, 使得我们对家兔基因定点打靶突变和基因定点导入成为可能, 并且利用这些技术已经成功培育了一批基因敲除家兔模型。基于我们的研究经历, 本文简要回顾了 GM 家兔模型发展历史、研究进展以及在生物医学研究领域的应用。

[关键词] 基因修饰(GM); 家兔; 动物模型; 生物医学

[中图分类号] R392.33 Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2019)03-0169-09

家兔(*Oryctolagus cuniculus*)是最常用的实验动物之一, 由于其体型大小适中、繁殖周期短、容易进行各种手术, 因而被广泛用于生物医学研究^[1]。家兔对高胆固醇饮食敏感, 是第一个用于研究人类动脉粥样硬化的动物模型^[2]。由于心脏肌原纤维蛋白(sarcomeric protein)组成与人类相似, 家兔也用于研究人类心肌疾病发病机理^[3]。与其他体型较大的实验动物(如, 猪、犬、非人灵长类动物)相比, 家兔价格低廉, 而且容易培育成无特定病原体(SPF)和近交系家兔。另外, 家兔在进化上比啮齿类动物更接近人类^[4], 家兔也有足够血容量(100~150 mL/成年兔)来完成多个生化分析和反复测试^[1]。

自 1980 年起, 基因修饰(genetically modified, GM)动物研究和应用发展迅速。1985 年, 首例利

用显微注射技术制作成功转基因家兔^[5]。然而, 直到 1990 年代, 才开始使用转基因家兔研究脂蛋白代谢、动脉粥样硬化和肥厚性心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)等, GM 家兔人类疾病模型进入新时代^[1]。

作为人类疾病动物模型, GM 家兔显得尤为珍贵。因为家兔是介于小型啮齿动物类实验动物(如, 小鼠和大鼠)和大型哺乳动物(如, 犬和家畜)之间的重要物种, 不仅可以作为实验动物模型来研究一些人类特定的疾病, 而且可以作为生物反应器(bioreactor)生产用于实验或医药工业的重组蛋白(recombinant proteins)^[6]。

基于我们在 GM 家兔制作、应用研究中一些体会, 本文将简要描述 GM 家兔制作基本过程、讨论 GM 家兔模型在生物医学领域的应用价值, 以期为大家介绍 GM 家兔作为人类疾病模型最新进展。

1 GM 家兔培育历史

GM 动物是指对动物基因进行人为修饰并且这种修饰可以稳定遗传的一类动物品系, 包括转基因

[收稿日期] 2019-05-27

[基金项目] 国家自然科学基金(81070250, 81270348)、国家科技支撑计划项目(2012BAI39B02)、陕西省科技统筹创新工程计划项目(2014FWPT-07)

[作者简介] 薛莹(1987-), 硕士, 助理研究员。

E-mail: xueying@xjtu.edu.cn

[通信作者] 刘恩岐, 博士, 教授。E-mail: liueniq@mail.xjtu.edu.cn

(transgenic)、基因敲除(knock-out, KO)、基因敲入(knock-in, KI)和敲低(knock-down)动物。

1980年, Gordon等利用DNA显微注射技术培育了世界上第一个转基因小鼠^[7]。1985年, 更大体型的转基因哺乳动物(包括家兔、绵羊、猪)也被制作出来^[5]。体型较大的转基因动物具有特定的价值, 不仅可以用作人类疾病动物模型, 还可以作为生物反应器(如家兔、山羊、猪和牛)生产药用重组蛋白^[6]。1980年代后期, 两个实验独立地将一个突变体次黄嘌呤磷酸核糖转移酶(hypoxanthine phosphoribosyltransferase)基因导入到小鼠胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES细胞), 再将被修饰ES细胞注射到囊胚培育成功KO小鼠^[8,9]。核糖核酸干扰(RNA interference, RNAi)是一种内源性基因沉默机制, 通过双链RNA序列介导mRNA降解原理, 使用RNAi技术获得*ski*基因敲低小鼠^[10], 表型与KO小鼠类似, 使得利用RNAi技术构建基因敲低家兔成为可能。近年来, 随着锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFNs)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription-activator like effector nucleases, TALENs)和RNA介导的规律成簇间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas9等基因操作技术的诞生, 为培育新一代KO家兔模型提供了新契机。已经证实, 利用ZFNs、TALENs技术、特别是CRISPR/Cas9基因组编辑技术培育KO家兔模型是可行的。如, Flisikowska等^[11]采用ZFNs技术敲除了家兔IgM, 赖良学课题组^[12,13]用ZFNs、TALENs技术分别敲除了家兔*apoCIII*、*RAG 1*和*RAG 2*基因, 建立了一个高效CRISPR/Cas9系统, 同时敲除了家兔*CD36*、*LDLR*, *RyR2*和*apoE*等4个基因^[14]。

1985年, 世界上第一例转基因家兔模型培育成功, 该转基因家兔表达人生长激素基因^[5]。在开始培育GM家兔时, 虽然蛋白质表达水平低、外源基因无功能或作用, 但这些最初研究却为利用GM家兔作为替代模型研究人类疾病(如, 代谢疾病、动脉粥样硬化、HCM等)奠定了基础^[15]。

2 GM家兔模型建立

2.1 转基因家兔

常规转基因家兔培育方法包括显微注射法、

转基因ES细胞囊胚注射法、基因转移到精子和卵母细胞、转染体细胞核移植以及病毒介导转基因技术等, 这些方法在我们以前的文献已有详细阐述^[1,16], 这里不再赘述。DNA原核显微注射是制作转基因家兔最成功、也最常用方法。

利用显微注射方法制作转基因家兔与同样方法制作转基因小鼠过程相似, 差异之处在于家兔受精卵直径约为小鼠受精卵的2倍, 但原核大小相似, 家兔受精卵有一个厚厚的透明带, 家兔细胞核对外源DNA的纯度似乎更敏感^[11]。转基因家兔培育不仅耗时, 而且受很多条件限制。首先, 外源DNA制备、供体胚胎产量、注射后胚胎存活率、妊娠率、产仔数等都是非常重要影响因素, 这些因素容易人为控制和改进^[17]。其次, 人们对转基因家兔阳性率、嵌合体(mosaic)、外源基因不表达以及异位表达(ectopic expression)缺乏足够的了解, 影响制作效率^[18]。根据我们的经验, 通过原核显微注射DNA培育转基因家兔效率(转基因仔兔数/总仔兔数)在0.5%~5%^[19-24]。也有人^[25]提出雌、雄原核同时注射外源DNA可以增加转基因兔的生产效率, 但有待进一步验证。总体来说, 利用显微注射方法制作转基因家兔方法自诞生以来, 没有大的改进, 对影响家兔转基因效率的因素缺乏系统研究^[1]。

“睡美人”(sleeping beauty, SB)转座子(transposons)是第一个证明能够在脊椎动物细胞中有效换位的转座子, SB转座子基因传递具有许多优点, 如, 简单、安全、廉价、受体基因永久插入, 还可以转更大、更复杂的外源基因。SB转座子原核显微注射法成为转基因家兔构建的新方法^[26]。

除了上述方法, 也可通过精子介导法培育转基因家兔^[27-29], 逆转录病毒载体介导的转基因方法也有报道^[30]。精子和逆转录病毒载体介导的基因转移似乎比显微注射更容易、更有效, 但是, 这些技术仅仅被应用于方法验证上, 在人类疾病GM家兔模型建立和研究上还未见其应用。

2002年, 利用体细胞核移植技术获得第一只克隆家兔^[31], 此后, 李善刚等^[32]也成功克隆了家兔, 但克隆效率偏低, 需要提高家兔核移植效率^[33-35], 以利通过体细胞核移植培育转基因和KO家兔^[36-39]。

2.2 KO和KI家兔

1980年代初, 由于ES细胞分离、培养成功,

使得利用其制作 KO 动物模型成为可能。ES 细胞来自囊胚内细胞团,具有分化成各个组织的能力,但在体外可以保持不分化。根据同源重组的原理,利用分子生物学和组织培养技术可以定点敲除 ES 细胞中一个感兴趣的基因,构建一个修饰后的 ES 细胞,然后将 ES 细胞注入早期胚胎的囊胚腔中,胚胎移植,可以获得嵌合体子代动物。经过修饰的 ES 细胞有可能分化成精子或卵子,修饰后的 DNA 则被传递到下一代^[40]。1987 年, KO 小鼠培育成功^[8]。小鼠、大鼠、绵羊、山羊、猪和牛等动物的 ES 或 ES 样细胞已经分离培养成功,然而,除了小鼠和大鼠外,目前还没有其他物种 ES 细胞可以稳定传代的报告,因此,利用 ES 细胞打靶突变培育 KO 动物仅仅局限于小鼠。显然,依靠 ES 细胞获得 KO 家兔是不可能的。1998 年,科学家们发现在动物细胞内存在一种基因表达调节机制,称为 RNAi (RNA interference)。利用 RNAi 技术已经成功培育基因敲低小鼠模型^[10],因此利用该技术制作基因敲低家兔模型理论上也是可行的^[41]。

近年来,一些新的、具有划时代意义的 DNA 编辑工具出现,可以完全不依赖于 ES 细胞而实现基因特异性敲除。依靠特定核酸酶识别特定 DNA 序列,然后像“分子剪刀”(molecular scissors)一样在动物基因组中产生高效的双链断裂(double-strand breaks, DSB),使靶基因功能性消失或用于基因组 DNA 序列特定位点的整合。ZFNs、TALENs 和 CRISPR-Cas9 正是基于以上原理发展起来并带来革命性变化的新技术^[40, 41]。

ZFNs 由两部分组成,首先是 3~6 个 Cys2-His2 锌指蛋白串联组成的 DNA 识别域,另一部分是非特异性的核酸内切酶 FokI 的催化结构域。通过 DNA 识别域识别特定 DNA 序列后将催化结构域定位到目标位点从而通过核酸内切酶的作用切断 DNA 形成双链断裂,通过非同源末端连接(non homology end joining, NHEJ)进行基因突变^[41]。Flisikowska 等^[11]设计了两对针对家兔 IgM 外显子 1 和 2 的 ZFNs,并将构建好的 ZFNs 基因显微注射到家兔受精卵原核,成功抑制了家兔 IgM 基因。Yang 等^[12]在研究中将 ZFNs mRNA、家兔靶向 apo-CIII 基因注射于对家兔受精卵胞质中,发现 ZFNs 是产生 KO 家兔的有效方法。由于 ZFNs 采用较短的识别序列以及专利保护等导致 ZFNs 在靶序列选择和应用上受到限

制。将效应子蛋白与 FokI 核酸酶催化域融合表达产生 TALENs,通过分别识别靶位点上下游序列两条 TALENs 将其定位至特定基因靶位点,酶切产生 DSB,诱发 NHEJ 导致基因插入或删除突变,从而制作出 KO 动物,是 TALENs 技术基本原理^[41]。Song 等^[13]设计了一对针对家兔 RAG 基因第 1、2 外显子 TALENs,通过胚胎显微注射 TALENs mRNA,成功地获得 RAG KO 家兔模型。CRISPR 位点是由一串连续排列的短指向性重复序列中间夹杂一些短间隔序列(spacer),CRISPR 通过产生 RNA(CRISPR-derived RNA, crRNA)与 CRISPR-associated protein (CRISPR/Cas9)相结合形成识别催化结构,可识别基因组特定 DNA 序列并切除。基于 CRISPR/Cas9 原理,研究者们设计了一套用于 GM 编辑的工具,利用 single guide RNA (sgRNA)代替互补的 crRNA,与 Cas9 一起发挥作用产生 DSB。利用 CRISPR/Cas9 系统,研究者已经成功在多种哺乳动物(包括非人灵长类)中实现了基因突变,在 Cas9 和 gRNA 共同作用下成功诱导特异性 DNA 识别、产生 DSB、诱导 NHEJ 发生^[41]。Yang 等^[14]利用该技术同时敲除 4 个基因位点(CD36, LDLR, RyR2, apoE),是使用 CRISPR/Cas9 构建 KO 家兔的第一例成功报道。

CRISPR/Cas9、ZFNs 和 TALENs 在制作 KO 动物效率上差距并不明显,但 CRISPR/Cas9 基因编辑系统更加简单、高效,成为动物基因编辑最常用工具,而 ZFNs 和 TALENs 鲜有应用^[40]。CRISPR/Cas9 基因编辑系统虽然提高了 KO 及定点修饰(如,定点突变、基因插入)的效率,但是基于同源重组机制的基因定点突变效率仍然较低。2016 年,Komor 等^[42]报告了一种新的单碱基编辑系统,利用该系统可以在不产生双链 DNA 断裂的情况下,利用 sgRNA 将 Cas9-胞嘧啶脱氨酶-尿嘧啶糖基化酶抑制子三者构成的融合蛋白,sgRNA 通过与靶位点互补配对,引导融合蛋白结合到靶位点发挥作用。融合蛋白中的胞嘧啶脱氨酶能够使非互补链中相应的胞嘧啶 C 经脱氨基作用转变为尿嘧啶 U,而 DNA 复制进一步使得 U 被 T 代替,而互补链上原来与 C 互补的碱基鸟嘌呤 G 将会变成腺嘌呤 A,而尿嘧啶糖基化酶抑制子则能够抑制 U 的切除,最终实现非互补链上的 C 替换为 T 和互补链上 G 替换为 A 的精确编辑。基于该技术,赖良学团队^[43]建立了一个高效单碱基编辑系统,在国际上率先在家兔上改变

单个碱基,精确地模拟出人类单碱基突变遗传病中的无义突变、错义突变和RNA错误剪切,成功培育出白化病、早衰症、双肌臀等疾病模型兔。

很显然,得益于新近发展的DNA编辑技术(特别是CRISPR/Cas9),不依靠ES细胞也可以轻易制作KO、KI家兔模型,用于生物医学研究。可以预见,在不久的将来,依靠这些新技术,组织特异性KO家兔模型也将培育成功,大大丰富GM家兔模型资源。

3 GM家兔在心血管研究中的应用

采用我们曾经使用的检索策略^[15],我们发现从1985年开始,每年发表的GM家兔相关论文数量一直在增加,上世纪末、本世纪初达到高峰,近年来略有下降(图1)。GM家兔主要应用领域集中在生

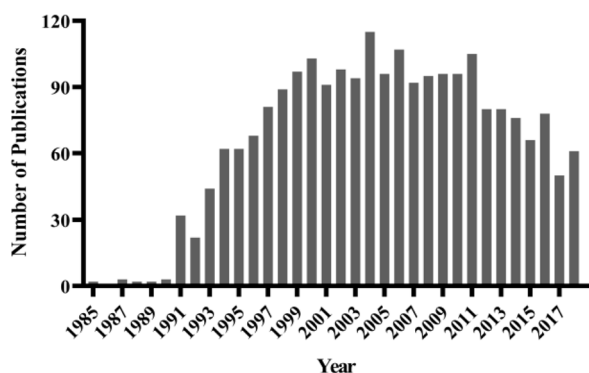


图1 不同年份GM家兔相关论文数量

化分子生物学和心血管系统(图2)。下面简要介绍一下在GM家兔作为人类疾病动物模型的研究进展。

因为KO、KI家兔模型培育成功历史相对较短,目前GM家兔在生物医学研究中应用成果大多数来自转基因家兔模型。

全世界每年死亡人数的30%是由于心血管疾病(cardiovascular vascular disease, CVD),我国CVD病死亡率更是世界平均水平的1.5倍,是危害人类健康名副其实的第一杀手^[44]。CVD病理基础是动脉粥样硬化,脂代谢异常可引起动脉粥样硬化发生和发展^[45]。因此,研究动脉粥样硬化、脂代谢对预防和治疗人类CVD有重要意义。

3.1 脂代谢和动脉粥样硬化

利用转基因家兔模型开展人类相关疾病研究起始于1994年,Fan等^[47]报道了家兔过表达人肝酯酶(hepatic lipase, HL)影响血脂和动脉粥样硬化以来,过表达人类15-lipoxygenase、ABCG 1、apo(a)、apoA-I、apoA-II、apoB-100、apoC-III、apoE2、apoE3、CETP、CRP、LCAT、LPL、MMP-12、PLTP、VEGF、U-II以及过表达家兔apoB mRNA编辑蛋白等基因的转基因家兔模型相继培育成功。通过杂交育种技术,已成功将人类apo(a)、LCAT、LPL、MMP-12等基因转移到低密度脂蛋白(LDL)受体缺陷的家族性高脂血症(Watanabe heritable hyperlipidemic, WHHL)家兔背景下。此外,双表达人HL和apoE、apo(a)和apoB、HL和apoB基因的双转基因家兔及同时表达apoA-I/C-III/A-IV的3

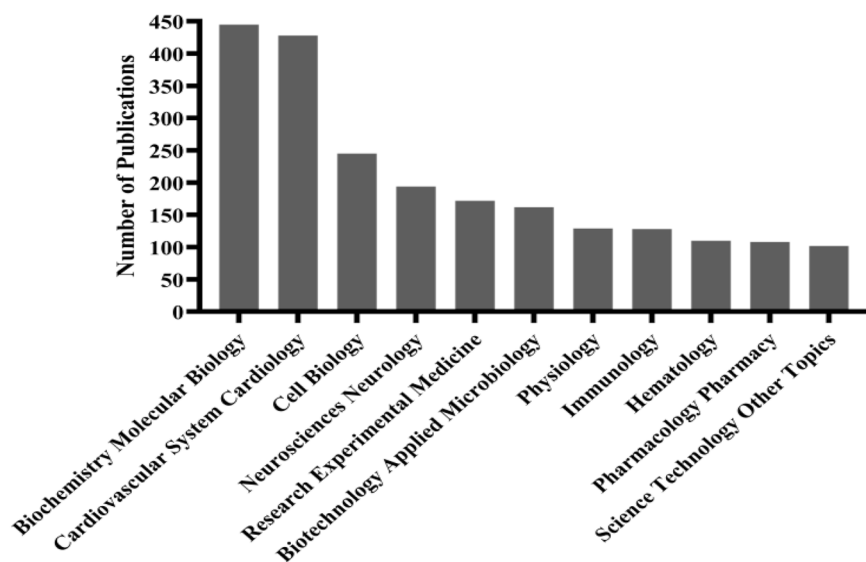


图2 GM家兔不同应用领域论文数量

个基因转基因家兔模型也培育成功,用于研究这些基因在人类脂质代谢和动脉粥样硬化疾病发生和发展中的作用。

转基因家兔模型在解析以上基因在脂代谢和动脉粥样硬化作用做出了重要贡献,由于篇幅限制,具体每个 GM 家兔贡献和相应文献可参照我们已发表相关综述^[1, 46, 47]。

3.2 心脏病

在心脏病研究方面,两个研究小组^[48, 49]分别构建转基因家兔模型来研究心血管生理、模拟 HCM。其中一个研究小组构建了 β 肌球蛋白重链 (β -myosin heavy chain, MyHC) 缺陷的转基因兔模型,发现其表型与表达人类 MyHC 突变型患者几乎相同:心肌肥大、肌细胞和肌原纤维排列紊乱、间质纤维化、过早死亡。MyHC 转基因家兔模型也被用来评价药物对 HCM 和心肌纤维化影响^[48, 50-54]。另一个小组的 James 等使用小鼠 α 和 β MyHC 作为启动子、制作了过表达肌球蛋白轻链突变体(m149v)的转基因家兔,来探讨这种突变与 HCM 关系^[49, 55]。最近,该研究小组^[55-60]还构建了在心室表达心肌钙蛋白 I(ctTnI-146Gly)、 α -MyHC、心脏 G 蛋白 α (GS α)等转基因家兔模型研究人类心脏衰竭。ctTnI-146Gly 转基因家兔再现了人 HCM 表型^[56], α -MyHC 转基因家兔肌原纤维蛋白异常^[57, 58], GS α 转基因家兔心率加快、收缩增强^[59, 60]。此外, Brunner 等^[61-63]成功构建表达人类钾通道突变基因 KCNQ1 和 KCNH2 转基因家兔,表现长心室复极延长(QT)综合征表型。

3.3 其它领域

除了 CVD 以外, GM 家兔在免疫学研究中也具有重要应用。如,家兔对 HIV-1 感染敏感、但进程缓慢,主要是由于人类和家兔 CD4 结合位点的病毒蛋白 HIV gp20 不同,有鉴于此,两个实验室建立了表达人 CD4 转基因家兔模型,发现来源于 CD4 转基因家兔淋巴细胞感染 HIV-1 后容易凋亡,表明用转基因家兔模型研究 HIV 可行^[64-66]。此外,基于新一代基因编辑技术,免疫缺陷家兔模型也已经培育成功^[4],拓展了 GM 家兔模型在免疫、肿瘤等的应用,也为未来人类肿瘤预防、诊断和治疗提供了独特的模型。

从图 2 可以看出, GM 家兔模型在生物医学研究中应用极其广泛,这里不再赘述。另外,转基

因家兔模型可以成为生物反应器,生产实验或医药工业用重组蛋白,家兔具有小动物(小鼠、大鼠)和大动物(山羊、绵羊、牛)无法比拟的优越性,该领域不属于人类疾病动物模型范畴,故这里也不作详细讨论,有兴趣读者可阅读我们相关综述^[6]。

4 家兔与小鼠

家兔脂蛋白代谢和心血管特性与人类相似,而与生物医学研究中使用最广泛的小鼠模型不同:①家兔与人类脂蛋白谱(低密度脂蛋白丰富)相似,与小鼠(高密度脂蛋白丰富)不同;②家兔的肝脏不能编码 apoB48 mRNA,像人的肝脏一样只能合成 apoB2100,而小鼠肝脏既能产生 apoB2100,又可以合成 apoB48。因此,小鼠的 apoB48 既存在于肝源性极低密度脂蛋白中,也存在于肠源性乳糜微粒之中,而人类的 apoB48 只存在于人的乳糜微粒之中;③家兔与人类血浆中有丰富胆固醇脂转运蛋白,而小鼠缺乏固醇脂转运蛋白;④胆固醇饮食可以容易诱导家兔动脉粥样硬化,而大多数小鼠品系对此抵抗;⑤与小鼠相比,家兔缺乏与人相似的 apoA-II 且具有较低的 HL 的活性^[41, 46]。家兔与小鼠的以上差异,暗示在研究脂蛋白代谢与动脉粥样硬化方面,家兔是一个独特的动物模型。

家兔也是心脏病研究独特的模型:①与小鼠相比,家兔心脏体积较大和心率缓慢,更利于清醒状态下的生理分析(如,超声、心脏导管插入);②人类和家兔间肌原纤维蛋白的相似性高。如, β -MyHC 蛋白是人和家兔心室肌细胞主要亚型,超过肌原纤维中肌球蛋白总数 80%,而 α -MyHC 是小鼠亚型,超过 95%;③与家兔和人类心脏相比,小鼠没有表现出明显的正收缩-频率关系(positive force-frequency relationship);④家兔 β 肾上腺素能受体信号转导途径的分子变化与人类心衰患者相似^[40, 41]。

动物物种间表型差异、同种动物个体差异受遗传背景和环境因素双重影响。即使同一 GM 的家兔和小鼠模型,因其遗传背景不同,表型也可能不同。如,过表达人 LCAT 家兔具有抗动脉粥样硬化作用、而在小鼠却促进动脉粥样硬化^[67, 68];转基因小鼠 LPL 高表达引起肌病(myopathies),家兔则不出现疾病^[69, 70]; ctTnI-146Gly 转基因家兔心肌肥厚,转基因小鼠却不出现心肌肥厚^[56, 71]。可能是由

于家兔脂蛋白代谢、心血管特性与小鼠不同,基因导入后可能产生不同甚至完全相反的表现型。因此,对于研究诸如动脉粥样硬化、心脏衰竭、HCM、肥胖、糖尿病等复杂的疾病发病机理,寻找预防或治疗策略时,家兔模型可能是小鼠模型重要补充,因为家兔模型可能更近似于人类复杂的生理状况(如,脂代谢和心血管特征)。再如,我们知道心血管疾病的病理基础是动脉粥样硬化,而动脉粥样硬化是一个慢性炎症过程^[45]。最新研究^[72]表明,小鼠炎症反应过程与人类不同,提示单纯使用小鼠模型研究人类炎症性疾病可能有缺陷。也许,家兔模型正好可以弥补这个缺陷。

当然,GM家兔模型制作和应用也有一些不足之处(主要是家兔这个物种本身造成),如,SPF和近交系家兔模型不常见、没有广泛使用;构建和维持GM家兔需要更高成本;解析GM家兔模型表型需要花费更长时间;条件性KO家兔和“工具”家兔制作和维持成本高;缺乏种类足够多抗体用于组织学和分子生物学研究;缺乏精细家兔基因组序列信息(https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/316?genome_assembly_id=203429)。还有,家兔是草食性动物,食性特征与人不一致;高脂饲料诱导和WHHL等家兔动脉粥样硬化发生部位与人不一致^[73];诱导家兔心肌梗死和脑梗模型困难;等等,限制了家兔或GM家兔模型在生物医学研究中广泛使用。

5 展望

GM家兔在研究人类疾病发生和发展过程中有独特的、小鼠无法替代的作用,特别是在研究人类诸如高脂血症、动脉粥样硬化、心脏病、免疫学、肿瘤等复杂疾病方面,GM家兔模型为探讨其发病的分子机制开辟了新的途径。经过20多年的发展,GM家兔为我们认识许多人类疾病做出了宝贵的贡献。

动物转基因技术的一个重大缺陷是外源基因整合位点的随机性,相对于转基因技术而言,基因打靶(包括KO、KI和基因敲低)是研究基因功能更强大的手段。随着ZFNs、TALENs,特别是CRISPR/Cas9等新的基因编辑技术的出现,给家兔基因打靶带来了重大突破。随着这些新技术不断改进和优化,更多、更新、更精确的GM基因家兔模型将会产生。不编码蛋白质的小RNA(microRNA, miRNA),

或是长非编码RNA(long noncoding RNA, lncRNA)也将被引入到GM家兔研究中,培育miRNA或lncRNA KO或KI家兔将成为可能。此外,使用新GM技术可以建立拟人化家兔模型,将会使对人类疾病的研究更加深入。我们相信,未来GM家兔将成为生物医学研究不可或缺的动物模型,必将为研究人类疾病发生发展的分子机制、寻找切实可行预防、诊断和治疗措施提供帮助。

参考文献:

- [1] Fan J, Kitajima S, Watanabe T, et al. Rabbit models for the study of human atherosclerosis: from pathophysiological mechanisms to translational medicine[J]. *Pharmacol Ther*, 2015, 146:104-119.
- [2] Finking G, Hanke H. Nikolaj Nikolajewitsch Anitschkow (1885-1964) established the cholesterol-fed rabbit as a model for atherosclerosis research[J]. *Atherosclerosis*, 1997, 135 (1): 1-7.
- [3] Marian AJ. On mice, rabbits, and human heart failure[J]. *Circulation*, 2005, 111(18):2276-2279.
- [4] Graur D, Duret L, Gouy M. Phylogenetic position of the order Lagomorpha (rabbits, hares and allies) [J]. *Nature*, 1996, 379 (6563):333-335.
- [5] Hammer RE, Pursel VG, Rexroad Jr, et al. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection[J]. *Nature*, 1985, 315(6021):680-683.
- [6] Wang Y, Zhao S, Bai L, et al.. Expression systems and species used for transgenic animal bioreactors[J]. *Biomed Res Int*, 2013, 2013:580463.
- [7] Gordon J, Scangos G, Plotkin D, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77(12):7380-7384.
- [8] Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells[J]. *Cell*, 1987, 51(3):503-512.
- [9] Koller BH, Hagemann LJ, Doetschman T, et al. Germ-line transmission of a planned alteration made in a hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene by homologous recombination in embryonic stem cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(22):8927-8931.
- [10] Shinagawa T, Ishii S. Generation of Ski-knockdown mice by expressing a long double-strand RNA from an RNA polymerase II promoter[J]. *Genes Dev*, 2003, 17(11): 1340-1345.
- [11] Flisikowska T, Thorey IS, Offner S, et al. Efficient immunoglobulin gene disruption and targeted replacement in rabbit using zinc finger nucleases[J]. *PLoS One*, 2011, 6(6):e21045.
- [12] Yang D, Zhang J, Xu J, et al. Production of apolipoprotein C-

- III knockout rabbits using zinc finger nucleases[J]. *J Vis Exp*, 2013,(81):e50957. doi: 10.3791/50957.
- [13] Song J, Zhong J, Guo X, et al. Generation of RAG 1- and 2-deficient rabbits by embryo microinjection of TALENs[J]. *Cell Res*, 2013, 23(8):1059-1062.
- [14] Yang D, Xu J, Zhu T, et al. Effective gene targeting in rabbits using RNA-guided Cas9 nucleases[J]. *J Mol Cell Biol*, 2014, 6(1):97-99.
- [15] Zhao S, Wei K, Yu Q, et al. Applications of transgenic rabbits in biomedical research-based on the literature search[J]. *World Rabbit Sci*, 2010, 18(3):159-167.
- [16] Kitajima S, Liu E, Fan J. Rabbit Transgenesis. In: Houdebine LM, Fan J (eds). *Rabbit Biotechnology*[M]. Netherlands: Springer, 2009:37-47.
- [17] 刘恩岐, 郑华东, 赵四海, 等. 转基因家兔的制作[J]. *动物学杂志*, 2006, 41(3):64-71.
- [18] Murakami H, Fujimura T, Nomura K, et al. Factors influencing efficient production of transgenic rabbits[J]. *Theriogenology*, 2002, 57(9):2237-2245.
- [19] Liu E, Kitajima S, Higaki Y, et al. High lipoprotein lipase activity increases insulin sensitivity in transgenic rabbits[J]. *Metabolism*, 2005, 54(1):132-138.
- [20] Liu E, Morimoto M, Kitajima S, et al. Increased expression of vascular endothelial growth factor in kidney leads to progressive impairment of glomerular functions[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(7):2094-2104.
- [21] Ding Y, Wang Y, Zhu H, et al. Hypertriglyceridemia and delayed clearance of fat load in transgenic rabbits expressing human apolipoprotein CIII[J]. *Transgenic Res*, 2011, 20(4):867-875.
- [22] Wang Y, Niimi M, Nishijima K, et al. Human apolipoprotein A-II protects against diet-induced atherosclerosis in transgenic rabbits[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2013, 33(2):224-231.
- [23] Zhao S, Li Y, Gao S, et al. Autocrine human urotensin II enhances macrophage-derived foam cell formation in transgenic rabbits[J]. *Biomed Res Int*, 2015, 2015:843959.
- [24] Gao S, Wang X, Cheng D, et al. Overexpression of cholesteryl ester transfer protein increases macrophage-derived foam cell accumulation in atherosclerotic lesions of transgenic rabbits[J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017:3824276.
- [25] Chrenek P, Vasicek D, Makarevich AV, et al. Increased transgene integration efficiency upon microinjection of DNA into both pronuclei of rabbit embryos[J]. *Transgenic Res*, 2005, 14(4):417-428.
- [26] Ivics Z, Hiripi L, Hoffmann OI, et al. Germline transgenesis in rabbits by pronuclear microinjection of Sleeping Beauty transposons[J]. *Nat Protoc*, 2014, 9(4):794-809.
- [27] Shen W, Li L, Pan Q, et al. Efficient and simple production of transgenic mice and rabbits using the new DMSO-sperm mediated exogenous DNA transfer method[J]. *Mol Reprod Dev*, 2006, 73(5):589-594.
- [28] Li L, Shen W, Min L, et al. Human lactoferrin transgenic rabbits produced efficiently using dimethylsulfoxide-sperm-mediated gene transfer[J]. *Reprod Fertil Dev*, 2006, 18(6):689-695.
- [29] Kuznetsov AV, Kuznetsova IV, Schit IY. DNA interaction with rabbit sperm cells and its transfer into ova in vitro and in vivo[J]. *Mol Reprod Dev*, 2000, 56(2 Suppl):292-297.
- [30] Moreno R, Rosal M, Cabero L, et al. Feasibility of retroviral vector-mediated in utero gene transfer to the fetal rabbit[J]. *Fetal Diagn Ther*, 2005, 20(6):485-493.
- [31] Chesne P, Adenot PG, Viglietta C, et al. Cloned rabbits produced by nuclear transfer from adult somatic cells[J]. *Nat Biotechnol*, 2002, 20(4):366-369.
- [32] Li S, Chen X, Fang Z, et al. Rabbits generated from fibroblasts through nuclear transfer[J]. *Reproduction*, 2006, 31(6):1085-1090.
- [33] Liu Y, Wang H, Lu J, et al. Rex rabbit somatic cell nuclear transfer with In vitro-matured oocytes[J]. *Cell Reprogram*, 2016, 18(3):187-194.
- [34] Sugimoto H, Kida Y, Oh N, et al. Production of somatic cell nuclear transfer embryos using in vitro-grown and in vitro-matured oocytes in rabbits[J]. *Zygote*, 2015, 23(4):494-500.
- [35] Zhang S, Xiang S, Yang J, et al. Optimization of parthenogenetic activation of rabbit oocytes and development of rabbit embryo by somatic cell nuclear transfer[J]. *Reprod Domest Anim*, 2019, 54(2):258-269.
- [36] Skrzyszowska M, Smorag Z, Slomski R, et al. Generation of transgenic rabbits by the novel technique of chimeric somatic cell cloning[J]. *Biol Reprod*, 2006, 74(6):1114-1120.
- [37] Liu JL, Sung LY, Du F, et al. Differential development of rabbit embryos derived from parthenogenesis and nuclear transfer[J]. *Mol Reprod Dev*, 2004, 68(1):58-64.
- [38] Yin M, Jiang W, Fang Z, et al. Generation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase gene knockout rabbits by homologous recombination and gene trapping through somatic cell nuclear transfer[J]. *Sci Rep*, 2015, 5:16023.
- [39] Zakhartchenko V, Flisikowska T, Li S, et al. Cell-mediated transgenesis in rabbits: chimeric and nuclear transfer animals[J]. *Biol Reprod*, 2011, 84(2):229-237.
- [40] Liu E, Fan J. *Fundamentals of Laboratory Animal Science*[M]. CRC:Taylor & Francis Group, 2017.
- [41] 刘恩岐. 人类疾病动物模型[M](第2版). 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [42] Komor AC, Kim YB, Packer MS, et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage[J]. *Nature*, 2016, 533:420-424.
- [43] Liu Z, Chen M, Chen S, et al. Highly efficient RNA-guided

- base editing in rabbit[J]. *Nat Commun*, 2018, 9:2717.
- [44] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要[J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(3):209-220.
- [45] 刘恩岐, 范江霖. 动脉粥样硬化转化医学研究进展[J]. *西安交通大学学报: 医学版*, 2014, 35(5):565-575.
- [46] 刘恩岐, 范江霖. 转基因兔在动脉粥样硬化研究中的应用及进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2003, 11(4):371-375.
- [47] Fan J, Chen Y, Yan H, et al. Principles and applications of rabbit models for atherosclerosis research[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2018, 25(3):213-220.
- [48] Marian AJ, Wu Y, Lim DS, et al. A transgenic rabbit model for human hypertrophic cardiomyopathy[J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(12):1683-1692.
- [49] James J, Sanbe A, Yager K, et al. Genetic manipulation of the rabbit heart via transgenesis[J]. *Circulation*, 2000, 101(14):1715-1721.
- [50] Nagueh SF, Kopelen HA, Lim DS, et al. Tissue Doppler imaging consistently detects myocardial contraction and relaxation abnormalities, irrespective of cardiac hypertrophy, in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Circulation*, 2000, 102(12):1346-1350.
- [51] Nagueh SF, Chen S, Patel R, et al. Evolution of expression of cardiac phenotypes over a 4-year period in the beta-myosin heavy chain-Q403 transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2004, 36(5):663-673.
- [52] Ripplinger CM, Li W, Hadley J, et al. Enhanced transmural fiber rotation and connexin 43 heterogeneity are associated with an increased upper limit of vulnerability in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Circ Res*, 2007, 101(10):1049-1057.
- [53] Patel R, Nagueh SF, Tsybouleva N, et al. Simvastatin induces regression of cardiac hypertrophy and fibrosis and improves cardiac function in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Circulation*, 2001, 104(3):317-324.
- [54] Senthil V, Chen SN, Tsybouleva N, et al. Prevention of cardiac hypertrophy by atorvastatin in a transgenic rabbit model of human hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Circ Res*, 2005, 97(3):285-292.
- [55] James J, Zhang Y, Wright K, et al. Transgenic rabbits expressing mutant essential light chain do not develop hypertrophic cardiomyopathy[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34(7):873-882.
- [56] Sanbe A, James J, Tuzcu V, et al. Transgenic rabbit model for human troponin I-based hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Circulation*, 2005, 111(18):2330-2338.
- [57] James J, Martin L, Krenz M, et al. Forced expression of alpha-myosin heavy chain in the rabbit ventricle results in cardioprotection under cardiomyopathic conditions[J]. *Circulation*, 2005, 111(18):2339-2346.
- [58] Stanley BA, Graham DR, James J, et al. Altered myofilament stoichiometry in response to heart failure in a cardioprotective α -myosin heavy chain transgenic rabbit model[J]. *Proteomics Clin Appl*, 2011, 5(3-4):147-158.
- [59] Nishizawa T, Vatner SF, Hong C, et al. Overexpressed cardiac Gsalpha in rabbits[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2006, 41(1):44-50.
- [60] Nishizawa T, Shen YT, Rossi F, et al. Altered autonomic control in conscious transgenic rabbits with overexpressed cardiac Gsalpha[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292(2):H971-H975.
- [61] Brunner M, Peng X, Liu GX, et al. Mechanisms of cardiac arrhythmias and sudden death in transgenic rabbits with long QT syndrome[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(6):2246-2259.
- [62] Odening KE, Hyder O, Chaves L, et al. Pharmacogenomics of anesthetic drugs in transgenic LQT1 and LQT2 rabbits reveal genotype-specific differential effects on cardiac repolarization[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2008, 295(6):H2264-H2272.
- [63] Major P, Baczkó I, Hiripi L, et al. A novel transgenic rabbit model with reduced repolarization reserve: long QT syndrome caused by a dominant-negative mutation of the KCNE1 gene [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(12):2046-2061.
- [64] Dunn CS, Mehtali M, Houdebine LM, et al. Human immunodeficiency virus type 1 infection of human CD4-transgenic rabbits[J]. *J Gen Virol*, 1995, 76(Pt6):1327-1336.
- [65] Snyder BW, Vitale J, Milos P, et al. Developmental and tissue-specific expression of human CD4 in transgenic rabbits[J]. *Mol Reprod Dev*, 1995, 40(4):419-428.
- [66] Leno M, Hague BF, Teller R, et al. HIV-1 mediates rapid apoptosis of lymphocytes from human CD4 transgenic but not normal rabbits[J]. *Virology*, 1995, 213(2):450-454.
- [67] Hoeg JM, Santamarina-Fojo S, Berard AM, et al. Overexpression of lecithin:cholesterol acyltransferase in transgenic rabbits prevents diet-induced atherosclerosis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(21):11448-11453.
- [68] Mehlum A, Muri M, Hagve TA, et al. Mice overexpressing human lecithin:cholesterol acyltransferase are not protected against diet-induced atherosclerosis[J]. *APMIS*, 1997, 105(11):861-868.
- [69] Levak-Frank S, Radner H, Walsh A, et al. Muscle-specific overexpression of lipoprotein lipase causes a severe myopathy characterized by proliferation of mitochondria and peroxisomes in transgenic mice[J]. *J Clin Invest*, 1995, 96(2):976-986.
- [70] Koike T, Wang X, Unoki H, et al. Increased expression of lipoprotein lipase in transgenic rabbits does not lead to abnormalities in skeletal and heart muscles[J]. *Muscle Nerve*,

- 2002, 26(6): 823-827.
- [71] James J, Zhang Y, Osinska H, et al. Transgenic modeling of a cardiac troponin I mutation linked to familial hypertrophic cardiomyopathy[J]. *Circ Res*, 2000, 87(9):805-811.
- [72] Seok J, Warren HS, Cuenca AG, et al. Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, 110(9):3507-3512.
- [73] Zhang C, Zheng H, Yu Q, et al. A practical method for quantifying atherosclerotic lesions in rabbits[J]. *J Comp Pathol*, 2010, 142(2-3):122-128.

Genetically Modified Rabbit Models for Medical Sciences

XUE Ying^{1,2}, FAN Jiang-lin³, LIU En-qi^{1,2}

(1. Laboratory Animal Center, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an, Shaanxi 710061, China;

2. Cardiovascular Research Center, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710061, China;

3. Department of Molecular Pathology, Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering, University of Yamanashi, Yamanashi 409-3898, Japan)

Address correspondence to:

LIU En-qi, PhD, Professor and Director,

Laboratory Animal Center, Xi'an Jiaotong University School of Medicine, Xi'an, Shaanxi 710061, China

Tel/Fax: 86-29-82657057

E-mail: liuenqi@mail.xjtu.edu.cn

[Abstract] Genetically modified (GM) rabbits have been proved to be excellent animal models for biomedical research. GM rabbits expressing human genes have been widely used as models for cardiovascular disease, AIDS, and cancer research. So far, GM rabbits were almost generated by pronuclear microinjection, which randomly leads to additive genes integrated in the rabbit genome. Compared to this technology, gene targeting in ES cells is more powerful tool for deepening understanding of gene function. However, the rabbit lack stable ES cell lines. Thus, gene targeting, dependent on ES cells, is not possible used in rabbit. Instead, RNA interference is quickly becoming a valuable experimental tool that allows investigators to knock down the expression of specific genes, and makes it possible to create GM rabbit models. Recently, with the advent of novel genetic technologies, such as Zinc-finger nucleases, transcription-activator like effector nuclease, the RNA-guided CRISPR-Cas endonuclease, there have been a significant breakthroughs in gene targeting of rabbit. Researchers have successfully created some gene knock out rabbits using Zinc-finger nucleases, or transcription-activator like effector nuclease, or the RNA-guided CRISPR-Cas endonuclease. Based on our study in the area of GM rabbits, in this paper, we review the progress of GM technology in rabbits during the past years and emphasize their applications as a model in biomedicine.

[Key words] Genetically modified (GM); Rabbit; Animal model; Biomedicine

树鼩 *Mfsd2a* 基因的克隆分析和 不同组织表达量的检测

王文广, 匡德宣, 李 娜, 陆彩霞, 罕园园, 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、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 对树鼩主要促进因子超家族成员 2a(Mfsd2a)基因进行克隆、测序和生物信息学分析, 并定量检测其组织表达量。方法 从树鼩脑和脊髓中提取总 RNA, RT-PCR 扩增 *Mfsd2a* 基因片段, 测序后利用生物信息学软件对其序列特征、系统进化、编码蛋白的结构和理化性质进行分析; 以树鼩 β -actin 为内参, qPCR 检测树鼩 *Mfsd2a* 基因在不同组织中的表达情况。结果 克隆获得 *Mfsd2a* 基因片段全长 1 796 bp, 与 NCBI 上公布的树鼩 *Mfsd2a* 基因预测序列高度一致, 比对显示其与 MFS 转运蛋白超家族同源。其编码区全长 1 464 bp, 编码 488 个氨基酸。预测结果显示树鼩 *Mfsd2a* 蛋白具有明显的疏水性区域, 无信号肽, 二级结构元件由 α 螺旋、 β 折叠、无规卷曲和延伸链组成。OCTOPUS 分析发现 *Mfsd2a* 存在 12 个跨膜结构, 修饰结构预测发现 *Mfsd2a* 蛋白存在两处 N 糖基化位点, 亚细胞定位发现其可能主要分布于细胞膜和内质网。qPCR 检测树鼩不同组织的 *Mfsd2a* 表达, 结果显示各组织均有表达, 在大脑、脊髓中的表达水平相对较高。结论 成功克隆了树鼩 *Mfsd2a* 基因, 建立了该基因表达定量检测方法, 为今后利用树鼩神经系统疾病模型深入开展 *Mfsd2a* 基因功能研究提供了理论和技术支持。

[关键词] 树鼩; 主要促进因子超家族成员 2a(Mfsd2a); 克隆; 分析; 表达

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)03-0178-09

主要促进因子超家族成员 2a(major facilitator superfamily domain containing 2a, *Mfsd2a*), 是一种膜转运蛋白, 属于次级转运蛋白的主要促进因子超家族^[1]。研究表明, 它与血脑屏障(BBB)的跨膜运输功能相关, 可抑制脑微血管内皮细胞跨膜胞吞转运^[2], 可作为受体介导二十二碳六烯酸(DHA)进入 BBB^[3],

此外还可能与机体生长发育相关^[4]。*Mfsd2a* 是神经系统尤其是 BBB 中的一个重要角色, 进行 *Mfsd2a* 的功能探讨对神经系统疾病的机制研究和临床治疗具有重要意义。

树鼩与人有较近的亲缘关系, 先后被用于免疫系统^[5]、消化系统^[6]、泌尿系统^[7]和生殖系统^[8]等方面的研究, 实际上树鼩的中枢神经系统也相当发达, 脑体重比与人极为接近^[9], 比较适合神经科学方面的研究, 已经先后有人用树鼩开展神经系统疾病的研究, 如树鼩脑缺血可导致海马 BBB 通透性增高, 而海马微环境紊乱对 BBB 通透性具有促进作用^[10], 而银杏内酯 B(GB)对异常微环境中的海马神经元具有一定的保护作用^[11]。Ma 等^[12]对树鼩注射 1- 甲基 -4- 苯基 -1,2,3,6- 四氢吡啶(MPTP)后发现, 树鼩表现出了类似人类帕金森病的各种症状, 显示

[收稿日期] 2019-04-19

[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

树鼩可用于研究帕金森病发病机制研究。欧阳铁强等^[13]采用腹腔注射D-氨基半乳糖胺(D-gal)、双侧海马注射 β -淀粉样肽1-42(A β 1-42)和鹅膏蕈氨酸(IGO)混合液的方法,探索建立阿尔茨海默病树鼩模型,可以造成树鼩学习记忆能力下降,并出现神经胶质细胞增生和神经纤维缠结。也先后有人对树鼩的海马神经干细胞^[14]和多巴胺神经细胞^[15]进行了成功的分离培养,以便开展体外实验研究。

上述研究显示树鼩在神经系统疾病研究方面有很大的应用潜能,本研究通过克隆测序和生物学信息学分析以及不同组织表达量的检测,对树鼩的*Mfsd2a*基因结构、定位及表达进行分析,为深入研究其在血脑屏障相关神经系统疾病中的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

1岁龄雄性树鼩,体质量130 g,由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心提供[SCXK(滇)K2018-0002],在本中心实验室解剖取材[SYXK(滇)K2018-0002]。

1.2 主要试剂和仪器

总RNA提取试剂RNAiso Plus、逆转录试剂盒PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PCR扩增试剂盒Premix Taq™ (LA Taq™ Version 2.0)和一步法qPCR试剂盒One Step TB Green™ PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit均购自日本TaKaRa公司,分子量标准RealBand DNA Marker (100~10000 bp)购自我国BBI公司。

CFX 96实时荧光定量PCR仪、MyCycler PCR仪、Gel Doc XR+凝胶成像系统、PowerPac Universal电泳仪和Sub-Cell水平电泳槽均购自美国Bio-Rad公司;NanoDrop ND1000紫外可见分光光度计购自美国Thermo公司。

1.3 方法

1.3.1 引物设计与合成 根据NCBI上公布的树鼩*Mfsd2a*基因预测序列(XM_027766873.1、XM_014582722.2、XM_027766873.1、XM_027766875.1、XM_027766876.1)设计引物,目的片段预期全长1796 bp,交由宝生物公司合成。

正向:5'-GAACCRAAAAAGAAGAAACAACAGT-3'

反向:5'-ACAGACATATACATACACACAYATTGCT-3'

1.3.2 总RNA的提取和cDNA的合成 参考文献报道的*Mfsd2a*在中枢神经系统中分布较高的特性^[2],目的基因的克隆选择树鼩的脑和脊髓组织,按RNAiso Plus试剂说明提取组织中的总RNA,采用分光光度计及电泳法检测RNA纯度和完整性,按照PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明进行反转录反应。

1.3.3 目的基因的扩增和测序 以1.3.2反转录的cDNA为模板,按Premix Taq™ (LA Taq™ Version 2.0)说明进行PCR反应,扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。PCR产物经过电泳鉴定合格后,送上海生工生物公司测序。

1.3.4 测序结果的生物信息学分析 测序结果应用NCBI的在线BLAST程序和CDD工具进行同源性分析;应用Mega 7.0软件构建系统进化树;应用EXPASY的Protaram软件在线分析编码蛋白的氨基酸组成、理论分子质量和等电点;利用NPS@MLRC对蛋白的二级结构进行预测;利用TMHMM和OCTOPUS在线分析蛋白的跨膜分布情况;利用SMART程序和InterProScan扫描分析可能存在的蛋白结构域;利用SignalP程序进行蛋白质N-末端信号肽预测;利用Expasy的ProtScale预测蛋白的亲疏水性;利用SWISS-MODEL预测蛋白的三级结构;利用NetNGlyc 1.0在线软件分析糖基化位点;利用PSORT II中k-NN程序预测蛋白的亚细胞定位。

1.3.5 不同组织中*MFSD2A*基因表达量的检测 按RNAiso Plus试剂说明提取树鼩心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、大脑和脊髓8种组织的总RNA,以树鼩 β -actin为内参,按照One Step TB Green™ PrimeScript™ PLUS RT-PCR Kit说明进行实时荧光定量PCR,各组织中*Mfsd2a*的相对表达量以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计。树鼩 β -actin的引物根据NCBI上公布的序列(KC215183.1)设计,*Mfsd2a*的引物根据测序结果设计。

β -actin正向 β -Qpcr-f:

5'-CGGGAAATTGTGCGTGACAT-3'

β -actin反向 β -Qpcr-r:

5'-AGATTCCATGCCAGGAAAGA-3'

*Mfsd2a*正向M-Qpcr-f:

5'-GGATACGCCTTGTCTCCAGG-3'

*Mfsd2a*反向M-Qpcr-r:

5'-TGCGTTTTGCGTGTCTTTGA-3'

2 结果

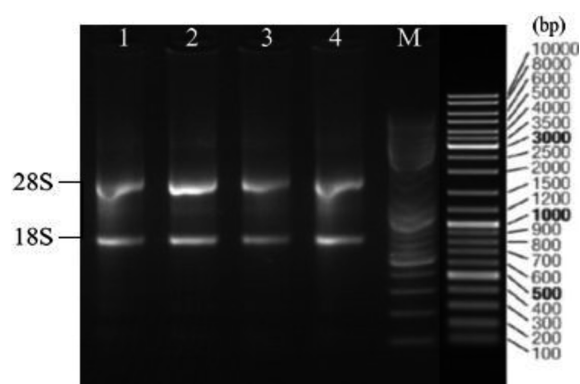
2.1 目的基因的克隆与鉴定

提取树鼩的脑和脊髓组织的总 RNA, 经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测合格(图1); 特异性扩增后的产物大小 1 500~2 000 bp(图 2), 与预期的 1 796 bp 吻合。

2.2 树鼩 *Mfsd2a* 基因的同源性分析和系统进化树构建

对克隆的目的基因测序, 拼接后获得 1 796 bp 的序列(图 3), 与预期长度一致。将所得树鼩 *Mfsd2a* 基因序列在 NCBI 上进行比对, BLAST 结果显示, 其与树鼩 *Mfsd2a* 预测序列(XM_027766876.1)

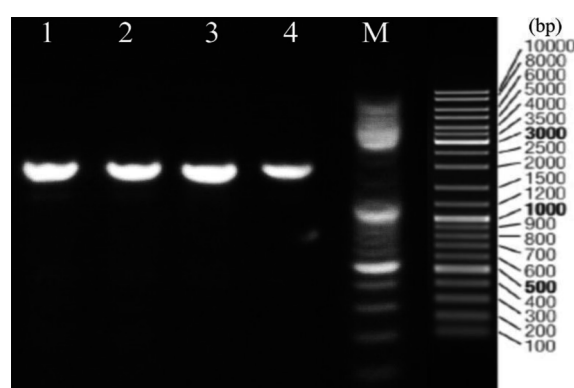
高度一致(99.35%), 与人(BC092414.1)、猕猴(XM_011763623.1)、兔(XM_017346426.1)、大鼠(NM_001106683.1)和小鼠(NM_029662.2)的相似度分别为 85.80%、85.96%、88.21%、83.84% 和 83.72%; 将序列经 NCBI 的 CDD 工具分析, 成功匹配到 MFS 超家族(图 4); 该序列编码区全长 1 464 bp, 编码 488 个氨基酸, 将其蛋白序列通过 NCBI 进行 BLAST, 选取同源性较高的几个不同物种的蛋白序列, 通过 Mega 7.0 的 NJ 法构建系统进化树(图 5), 树鼩 *Mfsd2a* 编码蛋白序列与 NCBI 中的树鼩序列(ELV12385.1)同属一支, 与人和猕猴的遗传距离比兔、大鼠和小鼠更为接近。



1、2 来自大脑组织; 3、4 来自脊髓组织; M 为 Marker (BBI-B600032)

图 1 树鼩脑和脊髓总 RNA 电泳结果

Figure 1 Electrophoresis results of the total RNA from the brain and spinal cord of tree shrew



1、2 来自大脑组织; 3、4 来自脊髓组织; M 为 Marker (BBI-B600032)

图 2 树鼩 *Mfsd2a* 基因 PCR 结果

Figure 2 PCR results of the tree shrew *Mfsd2a* gene

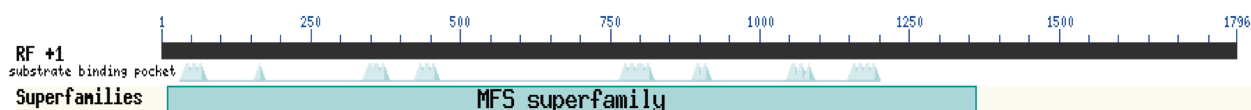
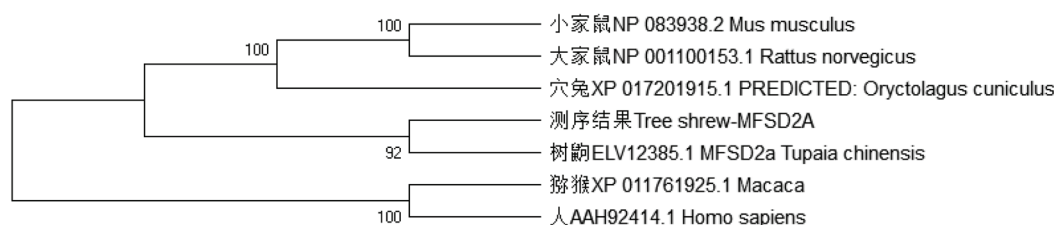
```

1  I S D A Q L C Y A V G G A P Y Q V T G C A L G F F L Q I Y L L D V A Q V
2  1 TCAGATGCACAGCTTGTCTATGCAGTTGGGGGGCCCTACACAGGTGACCGGCTGTGCCCTGGGTTCTTCTGCAGATCACTGTTGGATGTGGCTCAGGT
3  36 D P F S A S I I L F V G R A W D A F T D P L V G F C I S K S S W T R L
4  106 GACCCCTTCTGCTCCATCATTCTGTTGTGGGCGAGGCTGGGATGCCTTCACAGACCCCTGTGGGCTTCTGCATCAGCAAGTCATCTGGACCCGCTG
5  71 G R L M P W I I F S T P L A I I A Y F L I W F V P D F P Q G Q A L W Y
6  211 GGCCGCTCATGCCCTGGATCATCTTCTCCACGCCCTGGCCATCATTGCCTACTTCTCATCTGGTTCGTGCCGACTTCCACAGGGCCAGGCCCTTTGGTAC
7  106 L L F Y C L F E T L V T C F H V P Y S A L T M F I S T E Q S E R D S A
8  316 CTGCTATTCTAGCTCTTTGAGACGCTAGTCAAGTGTTCACAGTGCCTACTCGGCTCTCACCATTGTTTCATCAGCAGAGCAGAGCGAGCGGACCTCGGC
9  141 T A Y R M T V E V L G T V V G T A I Q G Q I V G Q A D T P C L Q D P N
10  421 ACTGCTATCGGATGACTGTGGAGGTGCTGGGACGGTGGTGGGCACTGCAATCCAGGGGCAATCGTGGGCAAGCGGATACGCTTGTCTCCAGGACCCCAAC
11  176 G S E A A M E G A N H T H S I A S L K D T Q N A Y L L A A G V I A S I
12  526 GGCTCTGAGCGGCCATGGAAGGTGCAATCACACACAGCATCGCTCGCTCAAAGACAGCAAAACGCATACCTGCTGGCAGCAGGATCATCGGCTCCATC
13  211 Y V I C A V I L T L G V R E Q R E P Y E T Q Q A E P M S F F R G L R Q
14  631 TATGTCATTGTGGCTCATCTGACCTGGGCGTGGGAGCAGAGAAACCTACGAGACTCAGCAGGCTGAGCCATGTCTCTTCCGGGGCTCGGGCAG
15  246 V M S H G P Y V K L I A G F L F T S L A F M L V E G N F A L F C T Y T
16  736 GTGATGAGCCAGCCGCTACGTCAAGCTCATCGCGGCTTCTCTTCACTCCCTGGCTTCATGCTGGTGGAGGGAACTTCGCTTGTTCGACCTACACC
17  281 L G F R N E F Q N L L L A I M L S A T F T I P I W Q W F L T R F G K K
18  841 TTGGCTTCCGCAAGAAITCCAGATCTACTCTGGCATCATGCTCTCGGCCAGCTTCCATTCCTGCTGAGTGGTCTTCTAAGCCGTTTGGCAAGAAG
19  316 T A V Y V G I S S A V P F L I L V A L M E S N L I V T Y V V A V A G
20  946 ACAGCTGTATACGTTGGCATCTCATCGGCAGTGCCATTTCTCATCTTGGTGGCTCTCATGGAGAGCAACCTAATCGTCAGTATGTGTAGCCGTGGCGCCG
21  351 I S V A A S F L L F W S M L P D V I D D F H L K Q P H S R G T E P I L
22  1051 ATCAGTGTGGCAGCTTCTTCTTACTACTTGGTTCATGTTGCGACAGCTCATTGACGACTTCCACCTGAAGCAGGCCCACTCCCGGGCAGGAGCCCATCTTG
23  386 F S L Y V F F T K F A S G V S L G I S T L S L D F A G Y Q T R G C S Q
24  1156 TTCTCTTGTACGCTTCTTCAACAGTTCGCTCCGGGCTCTCGGCTGATCTCCACCTCAGTCTCGACTTTCGCGGTACAGACCCGGGCTGCTCCAA
25  421 P A R V K F T L K M L V T M A P I A L I L V G L L L F K L Y P I D E E
26  1261 CCGGACGAGTCAAGTTCACGCTGAAGATGCTAGTGACCATGCGGCCATCGCCCTCATCTGGTGGTCTGCTGCTCTTCAAGCTTACCCCATTCAGCAGGAG
27  456 K R R Q N K K A L Q A L R D E A S S G C S D T D S T E L A S I L *
28  1366 AAGCGGGCAGAAATAAGAGGCCCTCGAGCGCTGAGGATGAAGCCAGCAGCTCGGCTGCTGACACGAGCTCCACAGAGCTGGCCAGCATCTTCAAGG
29
30  1471 CCGCTGGTTCGCTGAGGTACACAGCAGAGCGGCTGGTACCAGGCCACACCGAGCAGGAGGACCTGTTTGTCTGCTCGCAACCGGCTGGTGTCCAGGTT
31
32  1576 CCAGGAAGGAAACAGAAGAGTGAAGGCCAGAGCCAGCCCATCCGTGCTCACTGTGGGCGCGCCACTCTGGGCTTCCGCTAGCCCTCGCCCTGCCT
33
34  1681 CCGGGCCAGCTTGGGCGAGTACTGTGACTATGCAAGAGTATCGGGCTAGCCCGGAACACTAATGTAGAAAGCTTTTATACAGAGACTAATTAATAACT
35
36  1786 TAATGACCTAT

```

图 3 树鼩 *Mfsd2a* 基因序列及编码氨基酸序列

Figure 3 Tree shrew *Mfsd2a* gene sequence and the predicted coding amino acid sequence

图4 树鼯 *Mfsd2a* 基因序列的CDD分析Figure 4 CDD analysis of tree shrew *Mfsd2a* gene sequence图5 *Mfsd2a* 蛋白序列在不同物种中的系统进化树Figure 5 Phylogenetic tree of *Mfsd2a* protein sequence in different species

2.3 树鼯 *Mfsd2a* 蛋白氨基酸组成分析

利用 ExPASy 中的 Protaram 在线软件分析树鼯 *Mfsd2a* 蛋白氨基酸序列, 推测其蛋白分子量为 53 803.75 Da, 氨基酸种类 20 种, 等电点为 5.58, 亲水性的平均值(GRAVY)为 0.511。其氨基酸种类的含量相对比较均匀, 其中亮氨酸(12.5%)、丙氨酸(9.8%)、丝氨酸(7.8%)、苯丙氨酸(7.4%)、缬氨酸(7.4%)、苏氨酸(6.8%)、异亮氨酸(6.6%)和甘氨酸(6.4%)的含量相对较高。

2.4 树鼯 *Mfsd2a* 蛋白信号肽分析和跨膜结构预测

利用 SignalP 程序进行蛋白质 N-末端信号肽预测, 如图 6 所示, 该蛋白无信号肽; 跨膜结构分别通过 TMHMM 和 OCTOPUS 在线预测, 其中 TMHMM 预测有 10 个跨膜结构(图 7A), OCTOPUS 在线预测有 12 个跨膜结构(图 7B), 两种软件预测的结果存在差异, 提示其跨膜结构可能存在一定的

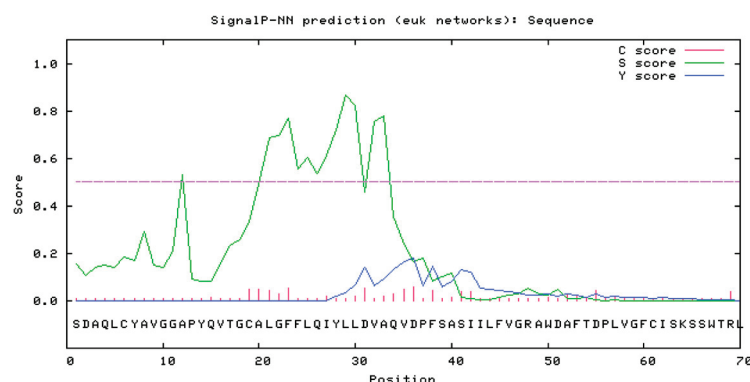
变数, 但仍然与 MFS 超家族通常有 10~12 个跨膜结构域的特性相符。

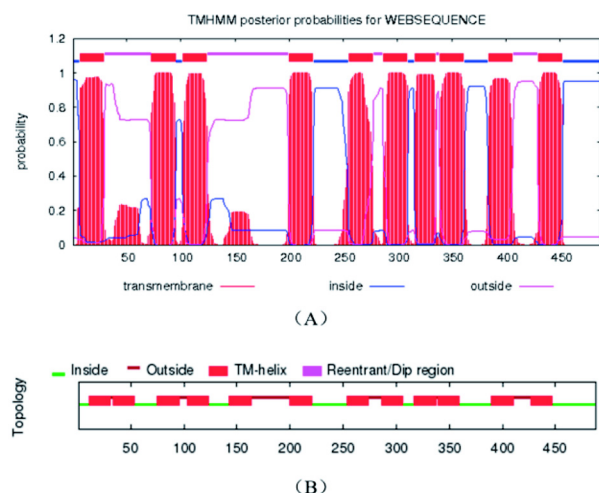
2.5 树鼯 *Mfsd2a* 蛋白的亲疏水性分析

应用 ExPASy Protoscale 在线分析软件, 预测树鼯 *Mfsd2a* 蛋白的亲疏水性, 结果如图 8 所示, 其中正值表示疏水性, 而负值表示亲水性。从图中可以看出, 正负区域均有相当的氨基酸分布, 其中正区分布稍多, 与此前 ExPASy Protaram 预测其亲疏水性的平均值(GRAVY)为 0.511 一致, 表明树鼯 *Mfsd2a* 蛋白具有较强的疏水性。

2.6 树鼯 *Mfsd2a* 蛋白的二级结构预测

蛋白的二级结构利用 NPS@MLRC 在线分析系统预测(图 9), 结果显示, 树鼯 *Mfsd2a* 蛋白中 α -螺旋(h 表示)占 51.02%, β -折叠(t 表示)占 1.84%, 氨基酸残基构成的延伸链(e 表示)占 15.37%, 无规卷曲(c 表示)占 31.76%。

图6 树鼯 *Mfsd2a* 蛋白的信号肽预测Figure 6 Signal peptide prediction of tree shrew *Mfsd2a* protein



A: TMHMM 分析; B: OCTOPUS 分析

图 7 树鼯 Mfsd2a 蛋白的跨膜结构

Figure 7 Transmembrane structure of tree shrew Mfsd2a protein

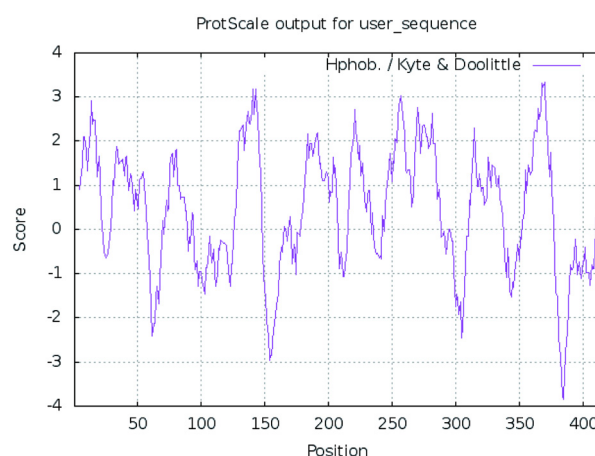


图 8 树鼯 Mfsd2a 蛋白的亲疏水性分析

Figure 8 Analysis of the hydrophobicity of tree shrew Mfsd2a protein



图 9 树鼯 Mfsd2a 蛋白的二级结构预测

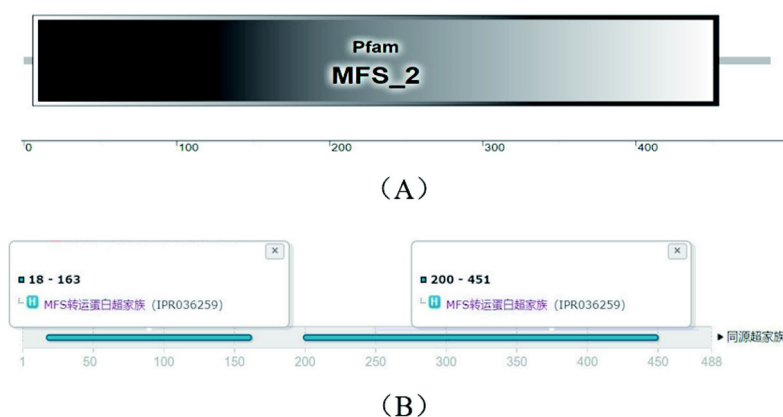
Figure 9 Secondary structure prediction of tree shrew Mfsd2a protein

2.7 树鼯 Mfsd2a 蛋白的结构域和三级结构预测

使用 SMART 程序预测了树鼯 Mfsd2a 蛋白的结构域, 结果显示蛋白存在主要促进调解超家族特有的结构域 Pfam MFS_2(图 10A), 通过 InterProScan 工具扫描序列以匹配 InterPro 蛋白质签名数据库, 也发现其与 MFS 转运蛋白超家族同源(图 10B)。进一步利用 SWISS-MODEL 在线分析平台进行蛋白三级结构预测, 树鼯与人 Mfsd2a 蛋白的三级结构基本相似, 存在 4 处细微差异(图 11)。

2.8 树鼯 Mfsd2a 蛋白修饰结构的预测和亚细胞定位分析

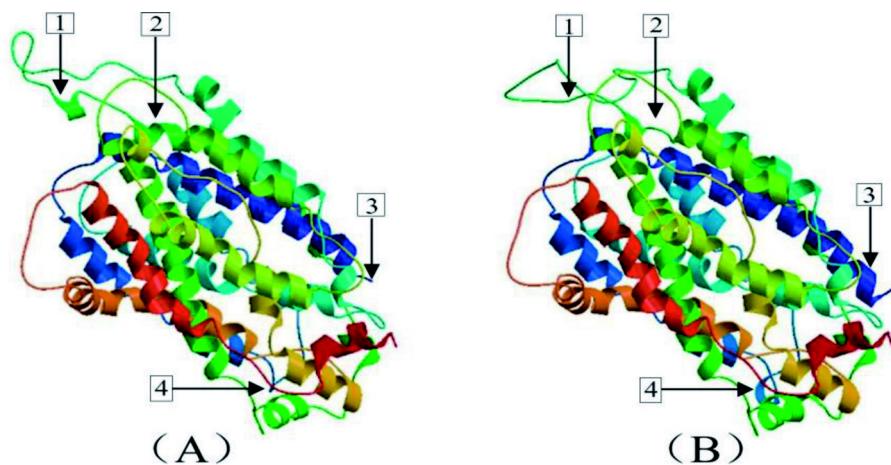
通过 NetNGlyc 1.0 软件在线分析, 预测到树鼯 Mfsd2a 蛋白在第 175、185 位氨基酸处分别存在 1 个 N 糖基化位点(图 12)。利用 PSORT II 的 k-NN 分析程序预测该蛋白亚细胞可能分布情况, 结果显示 65.2% 分布于细胞膜, 26.1% 分布于内质网, 4.3% 分布于线粒体, 4.3% 分布于高尔基体。



A: SMART 预测; B: InterProScan 扫描

图 10 树鼯 Mfsd2a 的蛋白结构域预测

Figure 10 The protein domain prediction of tree shrew Mfsd2a



A: 树鼯; B: 人; 1~4: 四处差异

图 11 Mfsd2a 蛋白的三级结构预测

Figure 11 Tertiary structure prediction of Mfsd2a protein

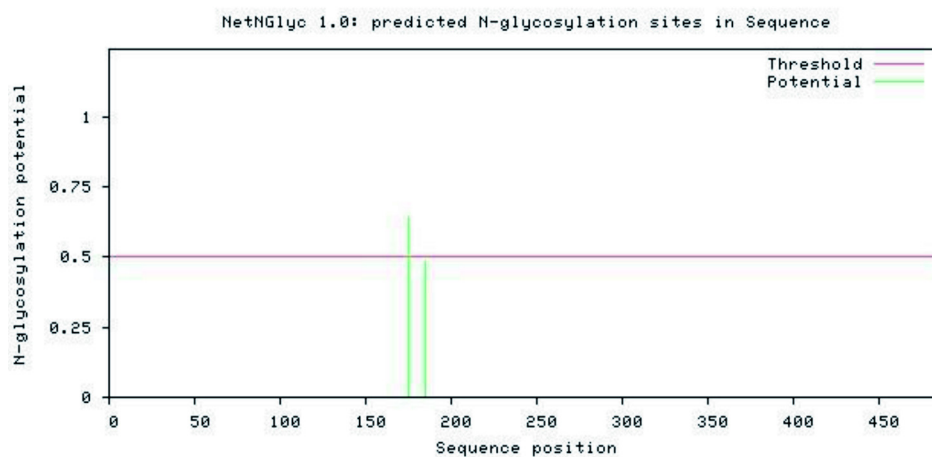


图 12 树鼯 Mfsd2a 蛋白 N 糖基化位点分析

Figure 12 N-glycosylationsites analysis of tree shrew Mfsd2a protein

2.9 树鼩不同组织中 *Mfsd2a* 基因的表达情况

以 β -actin 基因为内参基因, qPCR 方法检测 *Mfsd2a* 基因在树鼩心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、大脑和脊髓中的表达情况, qPCR 结果如图 13 所示, 扩增曲线均呈现典型的“S”型, 表明反应体系和扩增程序合适, 熔解曲线分析显示

引物特异性好, 其中 β -actin 在 86 °C 出现均一的单峰, *Mfsd2a* 在 85 °C 出现均一单峰结果。均一化处理后的结果显示 *Mfsd2a* 基因在 8 种组织中的表达存在较大差异, 其中在大脑、脊髓中的表达量较高, 肝脏、肾脏、肺脏、脾脏、心脏次之, 肌肉中最低(图 14)。

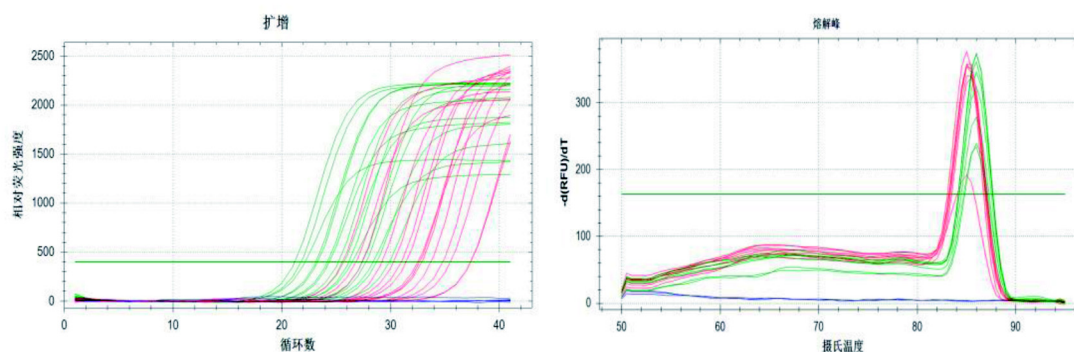
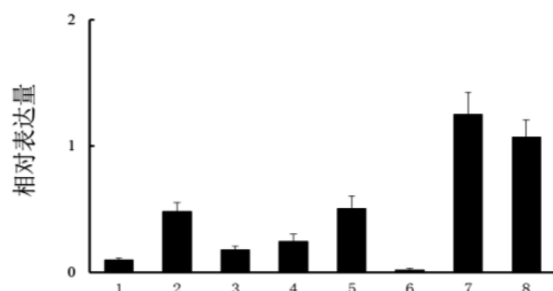


图 13 qPCR 的扩增曲线和熔解曲线

Figure 13 Amplification curve and melting curve of qPCR



1: 心脏; 2: 肝脏; 3: 脾脏; 4: 肺脏; 5: 肾脏; 6: 肌肉; 7: 大脑; 8: 脊髓

图 14 树鼩不同组织中 *Mfsd2a* 基因表达情况

Figure 14 Expression of *Mfsd2a* gene in different tissues of tree shrew

3 讨论

Mfsd2a 属于主要促进因子超家族(MFS)成员, 这个超家族是一个庞大且多样化的运输群体, 包括单向转运者、同向转运者和反向转运者。单向转运者运输单个基质, 而同向转运者和反向转运者分别以相同或相反的方向跨膜运输两个基质。MFS 蛋白可促进多种底物的跨膜转运, 包括离子、糖、药物分子、神经递质、氨基酸和肽。MFS 蛋白的长度通常为 400~600 个氨基酸, 并且大多数含有 10~12 个跨膜螺旋结构, 并拥有其独特的折叠方式(MFS 折叠)^[16]。

本研究克隆了树鼩的 *Mfsd2a* 基因, 经测序获得了 1 796 bp 的预期全长序列, 利用 NCBI 的 CDD 分析工具成功匹配到 MFS 超家族。经 NCBI 的 BLAST 分析以及系统进化树构建, 发现树鼩的 *Mfsd2a* 基因和蛋白与人、猕猴以及大、小鼠等具有较高的同源性, 显示其在不同物种具有较高的保守性。其序列的 1~1 464 bp 可连续编码 488 个氨基酸, 使用 SMART 程序预测发现该蛋白存在主要促进调控超家族特有的结构域 Pfam MFS_2, 通过 InterProScan 工具扫描也发现其与 MFS 转运蛋白超家族同源。二级结构预测树鼩 *Mfsd2a* 蛋白含较多的 α -螺旋(51.02%), TMHMM 预测树鼩 *Mfsd2a* 有 10 个跨膜结构, OCTOPUS 在线预测有 12 个跨膜结构, 虽然两种软件结果不一致, 但仍与 MFS 超家族普遍存在 10~12 个跨膜结构的特性相符。预测发现该蛋白具有较强的疏水性, 但亲水区和疏水区均有相当的蛋白分布, 预示着其膜蛋白的特性与其存在较多跨膜结构一致。预测树鼩与人 *Mfsd2a* 蛋白的三级结构大体相似, 存在细微差别。此外预测树鼩 *Mfsd2a* 蛋白存在 2 个 N 糖基化位点, 翻译后的糖基化修饰可能与其转运功能相关。亚细胞定位预测显示, 该蛋白主要分布于细胞膜(65.2%)和内质网(26.1%), 也与其功能相符。以上实验数据和分析结果表明, 本研究已成功完成树鼩 *Mfsd2a*

基因的克隆和生物信息学分析。

Mfsd2a 功能的探索最早开始于胚胎发育中, 研究证明 Mfsd2a 是人类 syncytin-2 的受体^[17]; Nguyen 等^[2]揭示了 Mfsd2a 能以溶血磷脂酰胆碱 (lysophosphatidylcholine, LPC) 的形式向脑运输 ω -3 脂肪酸; Ben-Zvi 等^[3]确定了 Mfsd2a 通过抑制中枢神经系统内皮细胞的胞吞作用, 从而调节脑血浆成分向大脑转移的机制。Yang 等^[18]通过小鼠颅内出血模型研究, 发现 Mfsd2a 能通过抑制囊泡转胞吞作用, 减轻由血脑屏障破坏引起的脑出血。Berger 等^[4]通过 Mfsd2a 基因敲除小鼠模型研究发现, Mfsd2a 还是一个营养调节基因, 在身体生长发育、运动功能和脂质代谢中发挥着重要的作用。

通过对组织分布情况研究表明, Mfsd2a 可在肝脏、脑桥、脑胼胝体、脊髓、小脑等组织中表达, 尤其高表达于构成 BBB 的脑微血管内皮细胞中^[2]。本研究以 β -actin 为内参, 对 8 种不同的树鼩组织中 Mfsd2a 基因的表达量进行了 qPCR 检测, 结果显示 Mfsd2a 基因在树鼩的心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肌肉、大脑和脊髓中均有表达, 其中在大脑、脊髓中的表达量相对较高, 与文献报道基本一致。鉴于树鼩在神经系统疾病模型方面有着巨大的开发潜力, 本研究的实验数据和检测方法可为树鼩 Mfsd2a 的功能探索提供参考。

参考文献:

- [1] Ethayathulla AS, Yousef MS, Amin A, et al. Structure-based mechanism for Na(+)/melibiose symport by MelB[J]. Nat Commun, 2014, 5:3009.
- [2] Nguyen LN, Ma D, Shui G, et al. Mfsd2a is a transporter for the essential omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid[J]. Nature, 2014, 509(7501):503-506.
- [3] Ben-Zvi A, Lacoste B, Kur E, et al. Mfsd2a is critical for the formation and function of the blood-brain barrier[J]. Nature, 2014, 509(7501):507-511.
- [4] Berger JH, Charron MJ, Silver DL, et al. Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFS2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism [J]. PLoS One, 2012, 7(11):e50629.
- [5] Oppelt C, Wutzler R, von Holst D. Characterisation of MHC class II DRB genes in the northern tree shrew (*Tupaia belangeri*) [J]. Immunogenetics, 2010, 62:613-622.
- [6] Zhang L, Zhang H, Zhu W, et al. Energy metabolism, thermogenesis and body mass regulation in tree shrew (*Tupaia belangeri*) during subsequent cold and warm acclimation[J]. Comp Biochem Physiol: A Mol Integr Physiol, 2012, 162: 437-442.
- [7] Ping S, Wang F, Zhang Y, et al. Cryopreservation of epididymal sperm in tree shrews (*Tupaia belangeri*) [J]. Theriogenology, 2011, 76: 39-46.
- [8] Brack M. Malignant Leydig cell tumour in a *Tupaia belangeri*: case report and literature review of male genital tumours in non-human primates[J]. Lab Anim, 1988, 22:131-134.
- [9] 周顺长, 蔡红琳. 树鼩中枢神经系统的某些解剖学特点[J]. 上海实验动物科学, 1993(3):176-177.
- [10] 唐代彬, 李树清. 树鼩脑缺血时海马微环境与血脑屏障通透性改变的可能机制[J]. 中国微循环, 2008, 12:76-80,64.
- [11] 张颖, 李树清, 李凡. 树鼩海马微灌流谷氨酸和钙所致线粒体应激及银杏内酯 B 的影响[J]. 中国微循环, 2007, 11: 158-162, 219.
- [12] Ma KL, Gao JH, Huang ZQ, et al. Motor Function in MPTP-Treated Tree Shrews (*Tupaia belangeri chinensis*)[J]. Neurochemical Research, 2013, 38(9):1935-1940.
- [13] 欧阳轶强, 胡冰, 张莹, 等. 阿尔茨海默病树鼩模型建立的探索[J]. 四川动物, 2016, 35(2):270-274.
- [14] 吴元桢, 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, 34:257-260.
- [15] 李娟, 曾晓峰, 杨根梦, 等. 新生树鼩多巴胺神经元的体外培养[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(7):82-86.
- [16] 李纯, 孙春玉, 陈静, 等. 主要协同转运蛋白超家族的研究进展[J]. 生物技术通报, 2018, 34(8):43-49.
- [17] Esnault C, Priet S, Ribet D, et al. A placenta-specific receptor for the fusogenic, endogenous retrovirus-derived, human syncytin-2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(45): 17532-17537.
- [18] Yang YR, Xiong XY, Liu J, et al. Mfsd2a (major facilitator superfamily domain containing 2a) attenuates intracerebral hemorrhage-induced blood-brain barrier disruption by inhibiting vesicular transcytosis[J]. J Am Heart Assoc, 2017, 6(7):e005811.

Cloning and Analysis of Tree Shrew *Mfsd2a* Gene and Detection of Its Expression in Different Tissues

WANG Wen-guang, KUANG De-xuan, LI Na, LU Cai-xia,

HAN Yuan-yuan, 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; The Key Laboratory of Yunnan Province for Ophthalmic Research and Disease Control; Yunnan Innovation Team of Standardization and Application Research in Tree Shrew, Kunming 650118, China)

[Abstract] Objective To clone and sequence the major facilitator superfamily domain containing 2a (*Mfsd2a*) gene of tree shrew and analyze its bioinformatics characteristics, and quantitatively detect its expression in different tissues. **Methods** Total RNA was extracted from the brain and spinal cord of tree shrews, *Mfsd2a* gene was amplified by RT-PCR. Bioinformatics software was used to analyze its sequence characteristics, system evolution, phylogenetics, structure and physicochemical properties of the encoding proteins. The expression of *Mfsd2a* gene in different tissues were detected by qPCR using β -actin as an internal reference. **Results** The full-length of *Mfsd2a* gene fragment was 1 796 bp, which was highly consistent with the tree shrew *Mfsd2a* gene sequence published on NCBI. The coding sequence was 1 464 bp, which encoded 488 amino acids. It was also homologous to the MFS transporter superfamily. The tree shrew *Mfsd2a* protein had a distinct hydrophobic region, but no signal peptide, and its secondary structural elements were consist of alpha helix, beta sheet, random coil and extended strand. Twelve transmembrane structures were found by OCTOPUS analysis. Two N-glycosylation sites were predicted by modified structure. Subcellular localization revealed that it may be mainly distributed in cell membrane and endoplasmic reticulum. qPCR results showed that *Mfsd2a* were expressed in different tissues of tree shrew, and the it was relatively high in brain and spinal cord. **Conclusion** The *Mfsd2a* gene was successfully cloned, and a quantitative detection method for the expression of *Mfsd2a* was established, which might provide theoretical and technical support for further study of *Mfsd2a* gene function using tree shrew neurological disease model in the future.

[Key words] Tree shrew; Major facilitator superfamily domain containing 2a (*Mfsd2a*); Clone; Analysis; Expression

新生乳兔右心室超负荷模型的初步构建和分析

丁 雷¹, 王守宝¹, 荆 辉¹, 李 焱²

(1. 上海儿童医学中心, 上海 200127; 2. 上海交通大学医学院, 上海 200025)

[摘要] 目的 探讨构建新生乳兔右心室(RV)超负荷模型的方法, 以便研究先天性心脏病患儿 RV 后负荷增加的病理生理重塑过程和机制。方法 选取出生当日乳兔 30 只, 随机分为肺动脉环缩(PAB)组和假手术(Sham)组, 每组各 15 只。PAB 组于左侧第二、三肋间隙开胸, 打开心包, 暴露肺动脉, 然后用 6-0 丝线环缩肺动脉; 除环缩步骤外, Sham 组操作同 PAB 组。在术后 14 d 进行超声心动图检测以明确肺动脉的环缩程度, 通过心导管检测 RV 收缩压和舒张压, 尔后处死动物, 取心脏组织行病理学检查, 以评估两组动物心脏结构大体变化和右心室游离壁厚度。结果 环缩乳兔肺动脉可以显著增加 RV 后负荷。术后 14 d 时 PAB 乳兔存活率为 80%, 相对于 Sham 组, PAB 组 RV 的收缩期峰值压力梯度、收缩压、舒张压和 RV 游离壁厚度均显著增加($P<0.01$)。结论 通过新生乳兔 PAB 手术可成功构建 RV 超负荷模型。

[关键词] 肺动脉环缩(PAB); 乳兔; 右心重塑

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)03-0187-06

右心室(RV)后负荷增加和随后出现的功能障碍, 多见于伴有左心室水平左向右分流的肺动脉高压、右室流出道梗阻性疾病(如法洛四联症等)和 RV 作为循环心室的疾病(如左心室发育不良)等先天性心脏病患儿。后负荷增加早期可导致 RV 代偿性或适应性肥大, 但持续的后负荷增加则使 RV 出现失代偿性或适应不良性肥大, 最终导致 RV 功能障碍, 临床上表现为 RV 充盈不良或射血功能减退。虽然 RV 超负荷导致心室重塑的过程和机制, 在成年动物模型中已得到广泛研究^[1-3], 但由于缺乏合适动物模型, 目前对新生哺乳动物 RV 肥厚和衰竭的过程和机制知之甚少。

众所周知, 未成熟和成熟的心肌细胞在许多生理、生化特性方面存在差异^[4]。未成熟心肌细胞

内含有丰富的糖原颗粒, 其更依赖于糖酵解产生的三磷酸腺苷; 同时未成熟心肌细胞亦更依赖于细胞外钙离子触发兴奋-收缩耦联和维持细胞内钙稳态^[5-8]。最近研究^[9,10]表明, 哺乳动物心脏可以在出生后 1 周内通过心肌细胞增殖再生, 应对物理损伤和缺血性损伤。鉴于未成熟心肌细胞的上述生物学特征, 成年动物模型所获得的实验结论并不适合直接应用在未成熟心肌细胞上。因此, 构建新生哺乳动物 RV 超负荷模型具有重要的临床意义。

目前常见的幼年 RV 超负荷模型包括: 缺氧/野百合碱诱导肺动脉高压, 进而导致 RV 超负荷或幼年猪肺动脉环缩(PAB)模型^[11-13]。上述这些方法均不能在出生后立即导致 RV 超负荷。前者需要数周才能发展为肺动脉高压, 而后者从未报道在新生大型动物上实施手术。考虑到乳兔体型小、花费少及饲养简便, 本研究试图对乳兔实施 PAB 术, 探讨环缩新生乳兔肺动脉是否能成功构建出新生兔 RV 超负荷模型; 同时通过术后超声心动图、血流动力学测量以及组织学染色, 对所建立的 RV 超负荷模型进行了病理学及病理生理学分析评价。

[收稿日期] 2019-03-20

[基金项目] 上海市自然科学基金(128ZR1437800), 上海市科委实验动物研究计划(17140900104)

[作者简介] 丁 雷(1984-), 男, 实验师。

E-mail: dingleipang@163.com

[通信作者] 李 焱(1979-), 男, 助理研究员。

E-mail: yao.li@shsmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级新西兰孕兔 5 只, 由上海市松江区松联实验动物场提供[SCXK(沪)2017-0008]。孕兔分娩后, 从 5 窝新生乳兔(不区分雄性和雌性)中随机选择 30 只分成 2 组: PAB 组 15 只实施 PAB 手术, 而假手术(Sham)组 15 只乳兔除肺动脉环缩步骤外, 其余操作与 PAB 组相同。动物饲养于上海交通大学医学院[SYXK(沪)2018-0027]。动物实验方案经过上海交通大学医学院实验动物饲养与管理委员会审核通过, 并严格按照申请的实验方案执行。

1.2 主要实验试剂和仪器设备

4-0 丝线、6-0 丝线购自宁波医用缝线有限公司; 异氟烷购自上海玉研科学仪器有限公司; 苏木素 & 伊红(HE)染色试剂盒购自武汉百奥斯生物科技有限公司; 小动物彩色超声成像系统(Vevo 2100)购自加拿大 Visual Sonic 公司; 电敏加热板(PhysioSuite)购自美国 Kent Scientific 公司; 小动物麻醉诱导系统(Matrx VIP3000)购自美国 Midmark 公司; 显微镜(BX60)购自日本 Olympus 公司; 压力-容积检测系统及 4.5 mm 右心导管(MPV5 Ultra)购自美国 Millar Instruments 公司。

1.3 麻醉和止痛方法

将新生乳兔置于麻醉诱导箱中使用体积分数 5% 异氟烷(0.2 L/min 氧气)诱导麻醉。随后转移到手术台上, 面罩吸入体积分数 1.5%~2.0% 异氟烷(0.2 L/min 氧气)维持麻醉, 将动物以仰卧位固定于手术显微镜下方、加热板上直至手术完成。术后通过给哺乳母兔注射曲马多(5 mg/kg), 经过乳汁分泌对手术动物进行止痛(参考美国 FDA 盐酸曲马多使用指南)。

1.4 手术方法

体积分数 75% 乙醇消毒颈胸部皮肤后, 于左胸侧第二、三肋间隙处切开皮肤, 剪断部分胸大、胸小肌和肋间肌进入胸腔, 并用眼睑撑开器撑开肋间隙, 此过程注意保护左侧胸廓内动脉。随后在立体显微镜下用显微器械分离胸腺组织, 打开心包, 将左心耳翻向左侧后, 即可暴露出肺动脉主干, 用显微剪将肺动脉和主动脉之间的间隙分开以便穿过环缩线。将 6-0 丝线从肺动脉和主动脉之间的间隙进入, 从肺动脉下方穿过, 在肺动脉

与左心耳之间穿出, 形成完整的闭环。最后将 23G 针头(直径 0.63 mm)平行置于肺动脉上, 然后将肺动脉和针头一起打结, 并快速移除针头, 至此环缩后的肺动脉直径约等于针头的直径。打开的肋间隙用 4-0 丝线缝合。新生乳兔脱离麻醉, 加热板上缓慢苏醒, 完全苏醒后转移回母兔身边。整个过程持续约 16 min。除环缩步骤外, Sham 组操作同 PAB 组。

1.5 超声心动图检测

为明确肺动脉狭窄情况, 于术后 14 d 行经胸超声心动图检查。Sham 组和 PAB 组各随机选取 6 只乳兔, 使用体积分数 5% 异氟烷(0.2 L/min 氧气)诱导麻醉后, 将动物仰卧位固定于检测平台上, 四肢与导联电极贴合, 面罩吸入体积分数 1.5%~2.0% 异氟烷(0.2 L/min 氧气)维持麻醉。检测时, 在肺动脉长轴视图下测量肺动脉收缩期峰值压力梯度(PPG)。所有测量结果均由经验丰富的超声仪器操作技师从 3 次连续心动周期中获得。为排除人为偏倚, 对送检人员和超声仪器操作技师采用双盲。

1.6 血流动力学检测

为明确 RV 血流动力学情况, 于术后 14 d 行心导管检测。具体检测方法: 经同上麻醉方案后, 行胸骨正中切开术和心包切开术, 用 27G 针刺破 RV。将心导管插入孔中并定位于流出道。用配套的 Power Lab 系统记录数据, 并通过 LabChart 7.0 软件进行分析。

1.7 组织病理学观察

在术后 14 d 完成超声心动图和血液动力学检测后, 通过穿刺针抽取血液并迅速切除心脏, 置于质量分数 4% 多聚甲醛固定过夜。然后, 常规组织切片, 行 HE 染色。染好切片用 CaseViewer 扫描系统扫描并记录。RV 游离壁厚度(RVWT)测量位置选择三尖瓣下缘处。

1.8 统计分析

所有统计学分析采用 SPSS17.0 统计软件进行。定量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间及两组间比较分别采用单因素方差分析(One way-ANOVA)及 Student *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 存活率

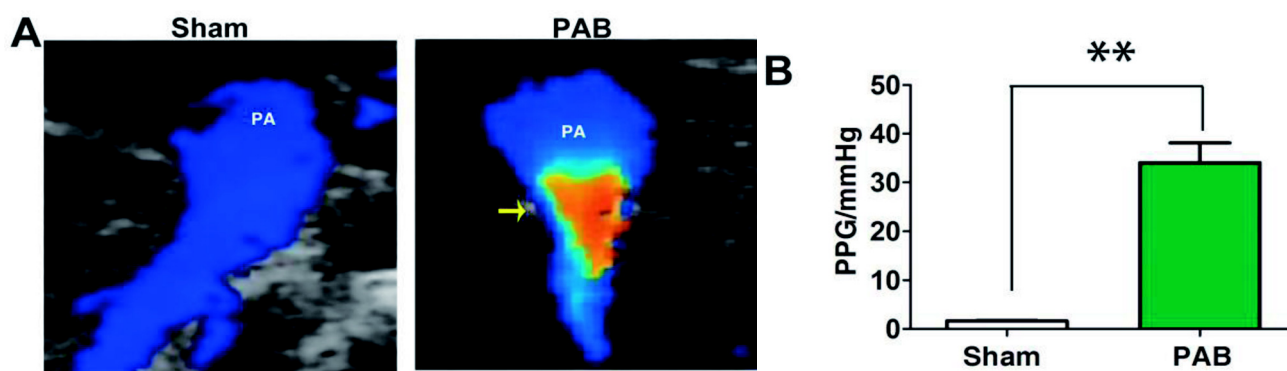
3 只乳兔(PAB 组 2 只, Sham 组 1 只)术后未能苏

醒,手术成功率为86.67%。随后2 d内有2只乳兔(PAB组与Sham组各1只)死于母兔踩踏。术后14 d,Sham组有13只存活,而PAB组有12只存活,Sham组和PAB组的存活率分别为86.67%和80.00%。

2.2 超声心动图结果

PAB术后14 d,即可检测到乳兔肺动脉的缩窄(图1A,黄色箭头)。在环缩部位和狭窄后区域,

可观察到不规则的彩色图案,表明狭窄可导致血液出现湍流(图1A)。在肺动脉长轴视图下通过连续波多普勒测量肺动脉收缩期PPG,结果显示,PAB组的PPG比Sham组平均增加21倍(图1B)。PAB组的PPG在术后14 d为(34.05 ± 5.66) mmHg,Sham组仅为(1.62 ± 0.21) mmHg(图1B),表明在PAB手术后RV的后负荷显著增加($P < 0.01$)。



A: 黄色箭头表示肺动脉中的收缩部位; B: 肺动脉收缩期PPG图形比较; ** $P < 0.01$

图1 乳兔假手术(Sham)和PAB手术后14 d超声心动图像观察

2.2 血流动力学结果

相较Sham组,PAB组乳兔在术后14 d右室收缩压显著增加,PAB组的RV收缩压为(45.25 ± 5.26) mmHg,显著高于Sham组的(10.43 ± 1.27) mmHg ($P < 0.05$),PAB组的RV舒张压为(8.74 ± 1.29) mmHg,也明显高于Sham组的(3.86 ± 0.61) mmHg ($P < 0.05$)。

2.3 组织学观察

HE染色显示,PAB组心脏在术后14 d显著增大(图2A)。此外,高倍镜下可观察到PAB组心脏心肌纤维稍紊乱,心肌细胞核增大(图2C),说明乳兔PAB后心肌细胞出现了重塑。

术后14 d对Sham组和PAB组RVWT进行测量,Sham组在三尖瓣下缘处的RVWT为(0.73 ± 0.12) mm,PAB组对应位置的厚度增加至(1.42 ± 0.27) mm ($P < 0.05$)。

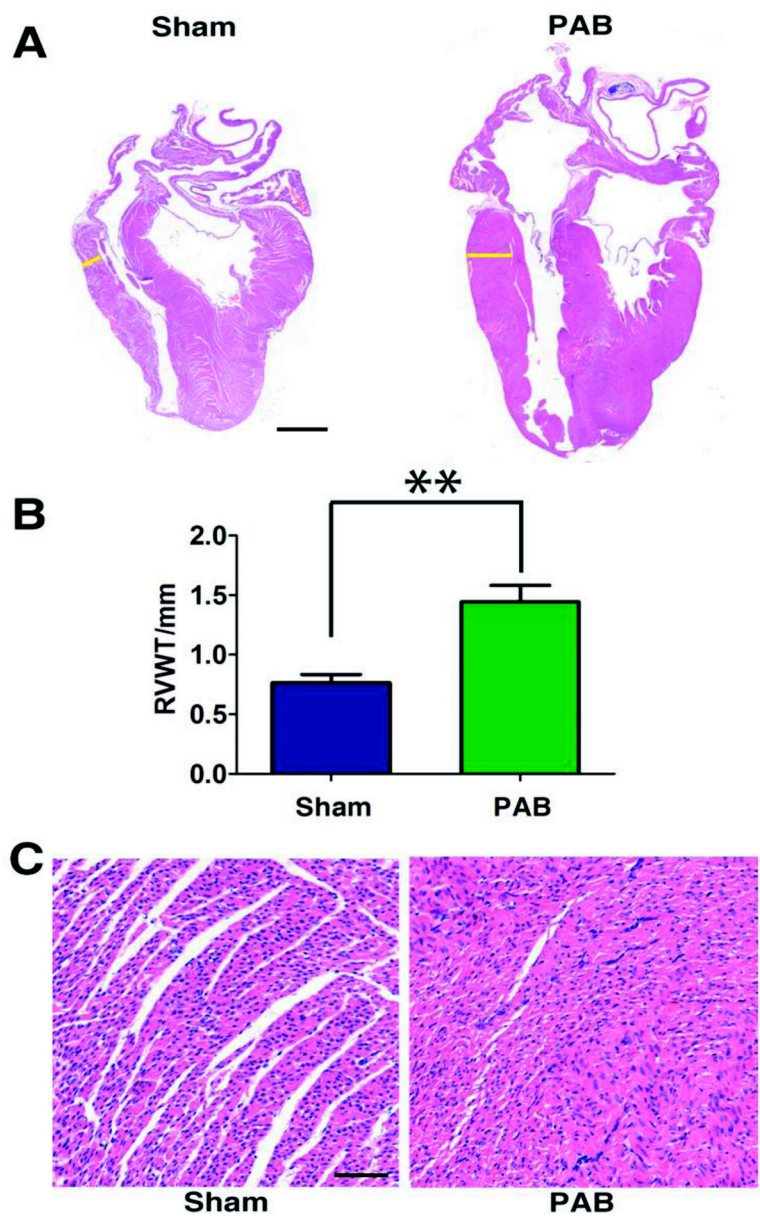
3 讨论

许多先天性心脏病患儿在出生后即存在RV超负荷,如肺动脉高压、右室流出道梗阻以及RV作为循环心室的疾病。出生后随着肺的膨隆,肺循

环外周阻力显著降低,并导致动脉导管和卵圆孔关闭。而患有上述疾病的患儿出生后即承受持续的RV高压或容量超负荷。考虑到未成熟心肌和成熟心肌之间细胞和分子特征差异,本研究试图构建新生乳兔的RV超负荷模型,以便更好地模拟出生后即刻出现的RV超负荷。

术后14 d PAB和Sham组的存活率分别为80%和86.67%,表明新生乳兔对PAB手术具有相当的耐受性。尽管如此,在PAB期间也应特别小心,避免损伤大血管,因此,建议在显微镜下进行手术操作。与成年PAB模型相比,新生乳兔PAB模型的RV重塑进展要更迅速。术后14 d所有经过PAB的动物均发生显著的RV肥大,而成年PAB模型^[14-24]要在4周之后才能观察到显著的RV肥厚。乳兔PAB后RV血流动力学变化程度也更为显著,与成年PAB动物RV舒张压约2倍的增加相比^[14-20],新生PAB兔的RV舒张压平均增加了约4倍。乳兔PAB术后RVWT的变化也更加明显,成年动物PAB术后RVWT较术前约增加1倍,而新生兔PAB术后RVWT较术前增加了约2倍^[14-20]。

综上所述,本实验通过新生乳兔PAB手术成



A: 手术后 14 d 四腔心切面图(比例尺: 1.5 mm); B: 手术后 14 d RVWT 对比, ** $P<0.01$;
C: 手术后 14 d 右心室组织(HE $\times 20$)(比例尺: 50 μm)

图 2 乳兔术后 14 d 心脏组织病理学观察

功构建了RV超负荷模型。所建立的新生乳兔RV模型与成年动物PAB术后RV重塑的进展和程度存在着某些差异,表明新生哺乳动物RV重塑的分子调节机制可能与成年不同,具体病理生理机制尚有待于进一步研究来证实。

参考文献:

[1] Voelkel NF, Quaife RA, Leinwand LA, et al. Right ventricular

function and failure: report of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group on cellular and molecular mechanisms of right heart failure[J]. Circulation, 2006, 114 (17):1883-1891.

[2] Bartelds B, Borgdorff MA, Smit-van Oosten A, et al. Differential responses of the right ventricle to abnormal loading conditions in mice: pressure vs. volume load[J]. Eur J Heart Fail, 2011, 13(12):1275-1282.

[3] Bogaard HJ, Natarajan R, Henderson SC, et al. Chronic pulmonary artery pressure elevation is insufficient to

- explain right heart failure[J]. *Circulation*, 2009, 120(20): 1951-1960.
- [4] Yamamoto F. Metabolic characteristics of immature myocardium[J]. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 2010, 58(4): 171-173.
- [5] Rolph TP, Jones CT. Regulation of glycolytic flux in the heart of the fetal guinea pig[J]. *J Dev Physiol*, 1983, 5(1):31-49.
- [6] Lopaschuk GD, Spafford MA, Marsh DR. Glycolysis is predominant source of myocardial ATP production immediately after birth[J]. *Am J Physiol*, 1991, 261(6 Pt 2):H1698-1705.
- [7] Grosso MA, Banerjee A, Cyr JAS, et al. Cardiac 5'-nucleotidase activity increases with age and inversely relates to recovery from ischemia[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1992, 103(2): 206-209.
- [8] Bolling SF, Olszanski DA, Bove EL, et al. Enhanced myocardial protection during global ischemia with 5'-nucleotidase inhibitors[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1992, 103(1):73-77.
- [9] Porrello ER, Mahmoud AI, Simpson E, et al. Transient regenerative potential of the neonatal mouse heart[J]. *Science*, 2011, 331(6020):1078-1080.
- [10] Haubner BJ, Adamowicz-Brice M, Khadayate S, et al. Complete cardiac regeneration in a mouse model of myocardial infarction[J]. *Aging*, 2012, 4(12):966-977.
- [11] Tatebe S, Miyamura H, Sugawara M, et al. Induction of right ventricular hypertrophy in neonatal guinea pigs by monocrotaline[J]. *Jpn Circ J*, 1996, 60(8):604-608.
- [12] Ambalavanan N, Nicola T, Hagood J, et al. Transforming growth factor-beta signaling mediates hypoxia-induced pulmonary arterial remodeling and inhibition of alveolar development in newborn mouse lung[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 295(1):86-95.
- [13] Abduch MC, Assad RS, Rodriguez MQ, et al. Reversible pulmonary trunk banding III: assessment of myocardial adaptive mechanisms-contribution of cell proliferation[J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2007, 133(6):1510-1516.
- [14] Kapur NK, Paruchuri V, Aronovitz MJ, et al. Biventricular remodeling in murine models of right ventricular pressure overload[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e70802.
- [15] Novoyatleva T, Schymura Y, Janssen W, et al. Deletion of Fn14 receptor protects from right heart fibrosis and dysfunction[J]. *Basic Res Cardiol*, 2013, 108(2):325.
- [16] 张森, 祁磊, 马凯, 等. 新型的紫绀大鼠肺动脉环缩及肺动脉瓣反流模型的建立[J]. *中国循环杂志*, 2016, 31(z1):33.
- [17] 鲁亚南, 丁文祥, 陈恩, 等. 大鼠右室肥厚模型的制作及右心导管法测定大鼠右室压[J]. *中国比较医学杂志*, 2004, 14(1):31-34.
- [18] 陈泽锐, 王德, 吴信, 等. 应用自体心包为材料制作肺动脉狭窄模型[J]. *中华实验外科杂志*, 2012, 29(8):1458-1459.
- [19] 赵艳君, 张玉奇, 张志芳, 等. 速度向量成像技术评估猪右室压力负荷对左室短轴收缩同步性的影响[J]. *医学影像学杂志*, 2012, 22(4):658-661.
- [20] 彭博, 王强, 蒋显超, 等. 自主研发的可调节环缩装置对肺动脉血流约束效果的初步实验研究[J]. *中国医药*, 2018, 13(3):372-375.
- [21] 周志文, 赵莉芳, 曹佳齐, 等. 兔心内电生理检查及多种心律失常效应微创方法的初探[J]. *实验动物与比较医学*, 2018, 38(5):365-371.
- [22] 张晓玉, 张修彦, 詹纯列. SPF级新西兰兔脏器参数、血液指标、心率、颈动脉血压、心室压的测定与比较[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(8):37-43.
- [23] Vanden Eynden F, El-Oumeiri B, Bové T, et al. Proximal pressure reducing effect of wave reflection in the pulmonary circulation disappear in obstructive disease: insight from a rabbit model[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2019, 316(5):H992-H1004.
- [24] Roldan Ramos S, Pieleš G, Hui W, et al. A rabbit model of progressive chronic right ventricular pressure overload[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2018, 26(4):673-680.

Preliminary Construction and Analysis of Right Ventricular Overload Model in Newborn Rabbits

DING Lei¹, WANG Shou-bao¹, JING Hui¹, LI Yao²

(1. Shanghai Children's Medical Center, Shanghai 200127, China;

2. Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] **Objective** To construct a neonatal rabbit model of right ventricular overload for studying the pathophysiological remodeling of right ventricle in congenital heart disease patients with right ventricular overload. **Methods** Thirty neonatal rabbits were selected and randomly divided into two groups. According to different surgical procedures, they were divided into surgery of pulmonary artery banding (PAB) group and sham surgery group, each group with 15 rabbits. The surgical methods of the PAB group were as follows: horizontal thoracotomy was performed through dissecting intercostal muscles and splitting the sternum along the intercostal space. Pulmonary artery was banded by a 6-0 silk thread. At 14 days after surgery, the constriction of pulmonary artery was confirmed by echocardiography. The right ventricular systolic and diastolic pressures were measured by cardiac catheterization. The histological changes of the hearts from sham and PAB group were evaluated after Hematoxylin and Eosin staining. **Results** Right ventricular overload was successfully established by constriction of the pulmonary artery in neonatal rabbits with the survival rate 73.33% at 14 days after surgery. Relative to a sham operation group, the peak pressure gradient across pulmonary artery constriction, right ventricular systolic and diastolic pressures, and free wall thickness were significantly increased in PAB group at 14 days after surgery ($P<0.01$). **Conclusion** The right ventricular overload model was successfully established through pulmonary artery banding in neonatal rabbits, which may be used for studying the pathophysiological changes of congenital heart disease with right ventricular overload.

[Key words] Pulmonary artery banding(PAB); Neonatal Rabbit; Right ventricular remodeling

Myh13 敲除小鼠表型的初步分析

何一旻, 顾鸣敏

(上海交通大学医学院医学遗传学实验室, 上海 200025)

[摘要] 目的 对 *Myh13* 基因敲除小鼠模型进行初步的表型分析, 探讨 *Myh13* 的生物学功能。方法 利用 qRT-PCR 和 Western blotting 技术检测小鼠中 *Myh13* 的表达情况; 采用基因测序、qRT-PCR 和 Western blotting 法验证 *Myh13* 敲除小鼠; 统计杂合子小鼠自交产生的子代小鼠中各基因型比例; 观察小鼠体质量变化趋势, 并检测血液生化指标; 对小鼠眼外肌进行 HE 染色和透射电子显微镜观察。结果 在小鼠模型中, *Myh13* 特异性高表达于眼外肌组织。经 DNA、RNA 和蛋白水平验证, *Myh13* 敲除小鼠中目的基因成功剔除。杂合子小鼠子代中各基因型小鼠比例符合孟德尔遗传规律。*Myh13* 敲除对小鼠的体质量、血生化指标无明显影响。HE 染色结果提示, 与野生型小鼠相比, 杂合子和纯合子小鼠的眼外肌均无明显异常。电子显微镜下, 杂合子和纯合子小鼠眼外肌中可见散在脂滴, 并且纯合子小鼠还可见肌质网扩张的现象。结论 *Myh13* 的敲除可改变小鼠眼外肌的微观结构, 可能会影响眼外肌的功能。

[关键词] *Myh13*; 小鼠模型; 眼外肌

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)03-0193-08

肌球蛋白超家族(myosin superfamily)是一类高度保守且广泛存在于真核细胞中的家族蛋白, 通过水解三磷酸腺苷(ATP), 将化学能转化为机械能, 在胞质流动、物质运输和肌肉收缩等多种生理活动中发挥重要的作用。在该蛋白家族中, 肌球蛋白 II 类是横纹肌、平滑肌和非肌细胞中肌丝的重要组成部分^[1]。肌球蛋白重链(myosin heavy chain, MyHC)是肌球蛋白 II 类分子的关键亚基。迄今为止, 在哺乳动物中已发现约 13 种 MyHC 亚型, 分别由 MYH 家族基因不同成员编码。其中, 编码骨骼肌 MyHC 亚型的有 6 种, *MYH13* 基因为其中之一^[2]。

小鼠 *Myh13* 基因定位于第 11 号染色体, 由 39 个外显子组成, 开放阅读框全长 5 817 bp, 编码产物为 MyHC-eo 亚型, 由 1 933 个氨基酸组成。MyHC-

eo 蛋白序列在不同种属之间高度保守, 经比对, 小鼠的 MyHC-eo 蛋白序列与人 MyHC-eo 蛋白序列相似度约为 96%。在生理状态下, MyHC-eo 与其他 MyHC 亚型一样, 由 2 条 MyHC 和 2 对不同的轻链组成一个完整的肌球蛋白分子。MyHC 蛋白包含 2 个关键的结构域: N 端的头部结构域, 含肌动蛋白和 ATP 结合位点, 即所谓的横桥; C 端的杆状结构域, 参与粗肌丝的形成^[3]。

在人类中, MyHC-eo 特异性高表达于眼外肌(extraocular muscle, EOM)纤维中^[4], 为一类具有超高速率、低张力、耐疲劳特点的肌纤维^[5]。体外研究^[6]结果表明, 在横桥周期动态变化过程中, 与其他骨骼肌中的 MyHC IIa、MyHC IIb 和 MyHC IIx 亚型相比, MyHC-eo 结合肌动蛋白后与二磷酸腺苷(ADP)的亲和力最低, 与肌动蛋白的结合和解离速率最快, 横桥周期最短, 导致肌肉收缩超快。然而, 迄今为止, 仍缺乏解释 MyHC-eo 与眼外肌超高速率、低张力、耐疲劳特点相关的体内实验依据, 更不清楚 *MYH13* 在眼外肌纤维中所发挥的生物学作用。

本研究首先分析了 *Myh13* 在小鼠中的表达情

[收稿日期] 2019-01-04

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号: 31571295)

[作者简介] 何一旻(1990-), 女, 硕士研究生, 专业方向: 遗传病基因的定位和功能研究。

E-mail: heyim_sky@163.com

[通信作者] 顾鸣敏, 教授, 研究方向: 遗传病的基因定位和功能研究。E-mail: gummm@sjtu.edu.cn

况,证明在小鼠中 *Myh13* 同样特异性高表达于眼外肌中。随后,对 *Myh13* 敲除小鼠进行表型初步分析。结果显示, *Myh13* 的敲除对小鼠的生长发育、基础代谢等没有明显影响,但会引起小鼠眼外肌纤维微观结构的改变,为后续研究 *MYH13* 在眼外肌中的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立的 *Myh13* 敲除小鼠,该工作由上海南方模式生物科技有限公司完成,所用小鼠品系为 C57BL/6J[SCXK(沪)2017-0010]。所得小鼠后续均饲养于 SPF 环境中,该环境维持恒温(21~22 °C)恒湿(55%~65%),光照明暗交替 12 h/d[SYXK(沪)2017-0012]。

1.2 主要仪器与试剂

基因组 DNA 抽提试剂盒、Taq DNA 聚合酶、动物组织总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒 Quantscript RT 试剂盒、qPCR 试剂盒 SuperReal PreMix Plus(SYBR Green)均购自天根生化科技有限公司;引物由金唯智生物科技有限公司合成;蛋白抽提试剂 RIPA 裂解液(强)和蛋白酶抑制剂 Cocktail 购自翊圣生物科技有限公司;MyHC-eo 抗体由上海友科生物科技公司制备;GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶(HRP)标记羊抗兔二抗均购自美国 Proteintech 公司;ECL 化学发光试剂盒购自美国 Thermo Fisher 公司。实时荧光定量 PCR 分析仪 ABI 7500 购自美国 Biosystems 公司;Western blotting 专用电泳槽、转膜槽和变压器购自美国 Bio-Rad 公司;化学发光信号检测仪 Lumi-Phos 购自美国 Thermo Fisher 公司;梯度 PCR 扩增仪购自德国 Eppendorf 公司;轮转式石蜡切片机和光学显微镜购自日本 Olympus 公司;透射电子显微镜超薄样本切片机购自德国 Leica 公司;透射电子显微镜购自日本 Hitachi 公司。

1.3 *Myh13* 在不同组织中的表达情况

取 8 周龄的野生型 C57BL/6J 小鼠(WT),分别取眼球、肝脏、肾脏、脾脏、胃、肠、睾丸等 14 种器官和血液,以及眼外肌、咀嚼肌、膈肌、腹直肌等 8 种不同部位肌组织,分别使用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA,利用反转录试剂盒反转录成 cDNA,利用引物 *Myh13*-F 和 *Myh13*-R(引物

序列见表 1),以 *Gapdh*(引物见表 1)为内参基因,采用 qRT-PCR 检测 *Myh13* mRNA 在小鼠各组织中的表达情况。同时提取各组织的蛋白成分,采用 Western blotting 法检测 MyHC-eo 蛋白在小鼠各组织中的表达情况。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	引物序列(5' → 3')
Myh13-F	CAGAACCGCCCATTCGACTC
Myh13-R	CCGGTCGTCTAGGGTCTTG
Gapdh-F	TGGCCTTCCGTGTTCTAC
Gapdh-R	GAGTTGCTGTTGAAGTCGCA
P1	ACTGTGGGCCATCTTAGGTGTCT
P2	AAGTGGCGTTGGGCATAGTGAT
P3	AAAGAAGCCGATATGAACAGGACA
P4	GGTAGGCGCGGCATAGTGAGATA
P5	AAGCCGATATGAACAGGACACAG
P6	ACCCCCACCCCCAGAAAT

1.4 gRNA 设计

gRNA 靶基因设计原则:①靶序列 20 bp 后含 NGG 模式的 PAM 序列;②靶序列在基因组水平具有高度唯一性,以避免脱靶效应。后利用网站(<http://crispr.mit.edu>)设计 gRNA,用于 CRISPR/Cas9 构建 *Myh13* 敲除小鼠。经筛选,选择两条分别在 *Myh13* 的第 2 外显子上游和第 3 外显子下游的 gRNA,序列和位置分别为:

gDNA1(1670-1692): 5'-CTAGAATCAGGTAA-CCAAGGGG-3';

gDNA2(2317-2339): 5'-AGTAGCAGCCAG-CATGAACTTGG-3'。

1.5 *Myh13* 敲除小鼠基因型鉴定

小鼠 3 周龄时,提取鼠尾基因组 DNA。对于 F0 代小鼠使用引物 P1 和 P2(引物序列见表 1)进行 PCR 扩增, P1 和 P2 分别位于敲除片段前后。PCR 产物送至苏州金唯智生物科技有限公司进行 Sanger 测序以筛选 *Myh13* 移码突变的小鼠。对后续子代小鼠使用引物对 P3 和 P4、P5 和 P6 分别进行 PCR 扩增(引物序列见表 1)。P3 是位于靶基因敲除片段上游的正向引物, P4 是敲除片段中的反向引物。P5 同样是位于靶基因敲除片段上游的正向引物, P6 是敲除片段下游的反向引物。反应体系: 10 μL Taq DNA 聚合酶、0.5 μL 正向引物、0.5 μL 反向

引物、1 μL DNA 模板、8 μL 去离子水。反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物进行质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.6 qRT-PCR 验证

选取 8 周龄的 WT、Myh13^{+/+} 和 Myh13^{-/-} 小鼠, 根据 Stuelsatz 等^[7]描述的方法分离眼外肌组织, 提取组织总 RNA, 反转成 cDNA, 以 *Gapdh* 为内参, 利用引物 Myh13-F 和 Myh13-R(引物序列见表 1), 根据试剂盒 SuperReal PreMix Plus 要求, 采用 qRT-PCR 法检测各基因型小鼠眼外肌中 Myh13 mRNA 的表达情况。反应体系如下: 10 μL SuperReal PreMix、1 μL cDNA 模板、0.5 μL 正向引物、0.5 μL 反向引物和 8 μL 无核酸酶去离子水。定量 PCR 反应条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 20 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 32 s, 40 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 10 min。结果采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析。

1.7 Western blotting 验证

选取 8 周龄的 WT、Myh13^{+/+} 和 Myh13^{-/-} 小鼠, 使用含有蛋白酶抑制剂 Cocktail 的 RIPA 强裂解液提取 3 种基因型小鼠眼外肌中的蛋白, 并用 BCA 定量试剂盒检测蛋白浓度, 随后加入 5 $\times$ 上样缓冲液, 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水中煮 15 min, 使蛋白充分变性。随后通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离, 再转膜至硝酸纤维素(NC)膜, 含质量分数 5% 奶粉的封闭液室温封闭 1 h, 加入一抗(MyHC-eo 抗体或 GAPDH 抗体) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 加入 HRP 标记的羊抗兔二抗室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次。最后, 经 ECL 显影液在化学发光仪中显影成像, 分析 MyHC-eo 蛋白的表达情况。

1.8 Myh13 敲除小鼠繁殖情况

统计 Myh13^{+/+} 小鼠自交繁育的子代 3 种基因型小鼠存活的个体数量, 分析各基因型 WT、Myh13^{+/+} 和 Myh13^{-/-} 小鼠数量是否符合 1:2:1 的比例, 进行孟德尔遗传分析; 统计子代中不同基因型小鼠中各性别的数量; 分析出生性别比例是否存在偏差。

1.9 Myh13 敲除小鼠体质量监测和血生化检测

取 WT、Myh13^{+/+} 和 Myh13^{-/-} 雄鼠各 10 只, 雌鼠各 10 只, 正常饮食喂养, 在 4~12 周龄期间每周称量一次小鼠体质量, 并做体质量变化曲线图。取 8 周龄雄性 WT、Myh13^{+/+} 和 Myh13^{-/-} 小鼠各 6 只, 空腹 12 h 后, 摘取眼球血, 室温静置 30 min, 离心收

集血清, 采用希森美康(Sysmex) BX3010 检测血糖(GLU)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(TCHO)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、尿素氮(BUN)、肌酐(CREA)、乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)。

1.10 Myh13 敲除小鼠眼外肌 H&E 染色

选取 8 周龄的 WT、Myh13^{+/+} 和 Myh13^{-/-} 小鼠各 3 只, 提取眼外肌组织, 用 PBS 清洗后于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h, 低浓度至高浓度乙醇脱水, 二甲苯处理后石蜡包埋, 采用轮转式切片机切片。对切片进行 HE 染色, 用中性树胶封固, 于显微镜下观察各基因型小鼠眼外肌病理学形态, 并采用 CellSens Entry 图像分析软件测量高倍镜下眼外肌眶层(orbital layer)和球层(global layer)肌纤维横截面积。

1.11 Myh13 敲除小鼠眼外肌透射电镜观察

在无菌条件下取 8 周龄的 WT、Myh13^{+/+} 和 Myh13^{-/-} 小鼠各 3 只, 提取眼外肌组织, 后立即置于质量分数为 2.5% 戊二醛中固定 24 h, 随后取出组织块, 用 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液冲洗后, 10 mg/L 锇酸固定 1.5 h, 经生理盐水彻底冲洗干净后进行乙醇梯度脱水, 再转入丙酮中, 包埋, 制作超薄切片, 饱和醋酸铀和枸橼酸铅双重染色, 于透射电子显微镜下观察。

1.12 统计分析

使用 SPSS Statistics 17.0 软件进行数据分析。结果采用 χ^2 检验(Chi-square test)或单因素方差分析(one-way ANOVA)进行统计分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

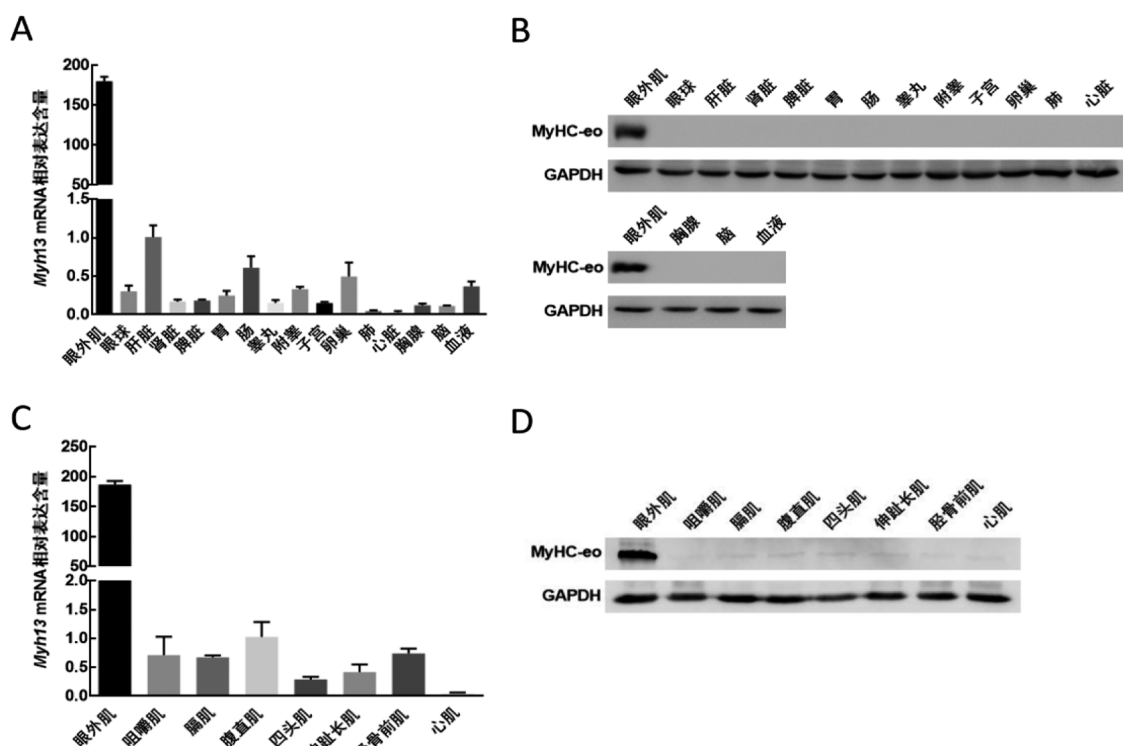
2 结果

2.1 不同组织中 Myh13 的表达水平

结果表明, Myh13 特异性高表达于眼外肌中, 而在眼球、肝脏、肾脏、脾脏和胃等各个器官中未检测到表达(图 1A 和 1B), 在咀嚼肌和腹直肌等其他肌肉组织中也未检测到表达(图 1C 和 1D)。

2.2 Myh13 敲除小鼠 DNA、RNA 和蛋白水平验证

Myh13 敲除小鼠中, 纯合移码突变的 F0 代小鼠原始测序序列为: CGTCCCTTGACTTTAGC — ATGAACTTGGGAGC, 与 WT 小鼠序列比对, 删除 769 bp。子代小鼠的基因型鉴定显示, 在 WT 小鼠中, 仅扩增出 361 bp 未敲除的基因片段; Myh13^{-/-}



A: qRT-PCR 检测各脏器组织和血液中 *Myh13* mRNA 的相对表达水平, 均以 *Gapdh* 作为内参, 下同; B: Western blotting 检测各脏器组织和血液中 MyHC-eo 蛋白的表达水平; C: qRT-PCR 检测各肌肉组织中 *Myh13* mRNA 的相对表达水平; D: Western blotting 检测各肌肉组织中 MyHC-eo 蛋白的表达水平

图 1 小鼠 *Myh13* 在不同组织中的表达水平

Figure 1 Expression of *Myh13* in different tissues of mice

小鼠中, 仅扩增出 270 bp 的切除后基因片段。在 *Myh13*^{+/+} 小鼠中, 均可见上述两个位置的条带(图 2A)。与 WT 相比, *Myh13*^{+/+} 小鼠眼外肌中 *Myh13* mRNA 表达减少, *Myh13*^{-/-} 小鼠眼外肌中 *Myh13* mRNA 不表达(图 2B)。并且, *Myh13*^{+/+} 小鼠眼外肌中, MyHC-eo 蛋白表达下降, *Myh13*^{-/-} 小鼠眼外肌中几乎检测不到 MyHC-eo 蛋白的表达(图 2C)。以上结果表明, *Myh13* 敲除小鼠中该基因成功剔除, 可用于后续分析。

2.3 *Myh13* 敲除小鼠繁殖情况

结果表明, 杂合子小鼠的子代中 WT、*Myh13*^{+/+} 和 *Myh13*^{-/-} 小鼠占总体比例分别为 23.9%、50.5% 和 25.7%, 接近 1:2:1, 符合孟德尔遗传规律, 说明 *Myh13* 的敲除并不会影响胚胎发育, 也不会导致胚胎致死的现象发生(表 2)。各个基因型小鼠的性别比接近 1:1, 无明显的性别偏移现象(表 3)。

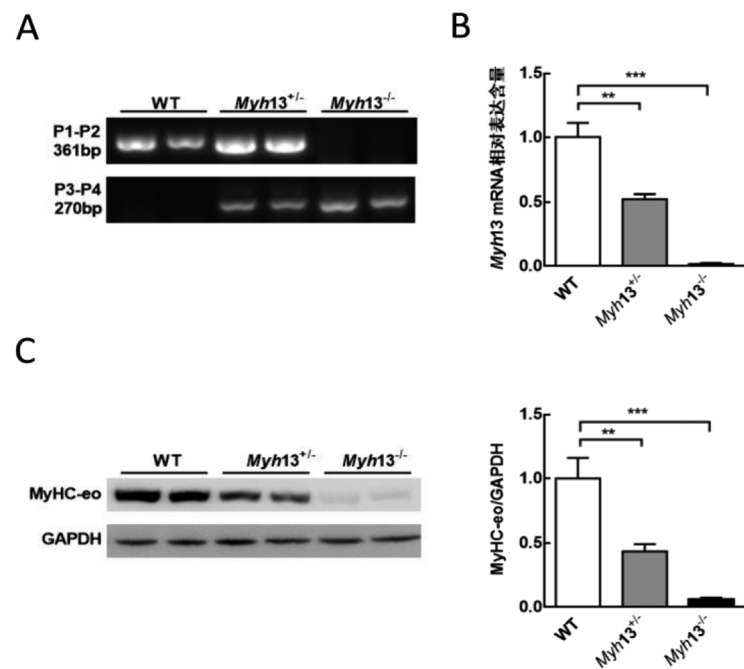
2.4 *Myh13* 敲除小鼠体质量及血清生化检测

WT、*Myh13*^{+/+} 和 *Myh13*^{-/-} 三种基因型小鼠体质量变化曲线图显示, 雌性小鼠和雄性小鼠的体质量

在不同基因型之间差异无统计学意义(图 3)。同时, 也未检测到 8 周龄小鼠的空腹血糖、血脂等血清生化指标存在明显异常(表 4)。上述结果提示, *Myh13* 基因敲除对于小鼠的基础代谢、肝功能、肾功能和心脏功能均没有明显影响。

2.5 *Myh13* 敲除小鼠眼外肌 H&E 染色分析及电子显微镜观察

光镜下, *Myh13*^{+/+} 和 *Myh13*^{-/-} 小鼠的眼外肌中未见明显的病理改变, 无结缔组织或脂肪组织增加的现象, 也无炎症或肌肉萎缩的现象(图 4A)。经计数, WT、*Myh13*^{+/+} 和 *Myh13*^{-/-} 小鼠眼外肌眶层肌纤维数量分别为(526 ± 49)条、(515 ± 44)条和(519 ± 50)条; 眼外肌球层肌纤维数量分别为(348 ± 29)条、(339 ± 43)条和(356 ± 36)条; 眼外肌眶层横截面积分别为(183.04 ± 23.15) μm²、(187.10 ± 25.76) μm² 和(179.67 ± 23.36) μm²; 眼外肌球层横截面积分别为(374.34 ± 38.00) μm²、(390.51 ± 35.41) μm² 和(387.91 ± 34.87) μm², 差异均无统计学意义(*P* > 0.05)。电子显微镜下, 三种基因型小鼠眼外肌纤维的细胞



A: PCR 鉴定子代小鼠基因型; B: qRT-PCR 检测 WT、*Myh13*^{+/-} 和 *Myh13*^{-/-} 小鼠眼外肌 *Myh13* mRNA 的表达水平, 以 *Gapdh* mRNA 作为内参; C: Western blotting 检测 WT、*Myh13*^{+/-} 和 *Myh13*^{-/-} 小鼠眼外肌中 MyHC-eo 蛋白的表达水平(左)及其灰度分析统计图(右), 以 GAPDH 蛋白作为内参。结果采用单因素方差分析, ***P*<0.01, ****P*<0.001

图 2 *Myh13* 敲除小鼠的基因型鉴定及其眼外肌中 *Myh13* 的表达水平

Figure 2 Genotype identification of *Myh13* knockout mouse and the expression of *Myh13* gene in extraocular muscles

表 2 杂合子小鼠自交产生的子代各基因型数量

Table 2 Genotypic ratio in the offsprings from the self-cross of heterozygotes

基因型	实际数量及比例	期望值及比例
WT	26(23.9%)	27.25(25.0%)
<i>Myh13</i> ^{+/-}	55(50.5%)	54.50(50.0%)
<i>Myh13</i> ^{-/-}	28(25.7%)	27.25(25.0%)
总计	109(100%)	109(100%)

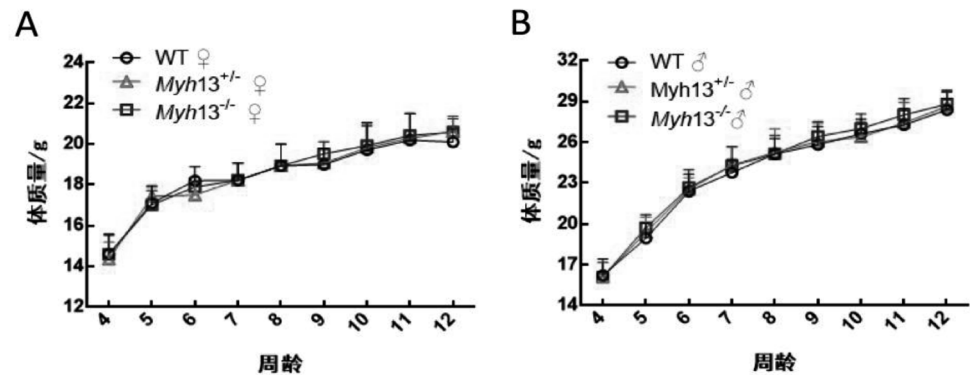
注: 经 χ^2 检验, *P*>0.05

表 3 子代 3 种基因型小鼠的性别比

Table 3 Analysis of sex ratio in three genotypes of offsprings

基因型	雄鼠	雌鼠	性别比
WT	14	12	1.17
<i>Myh13</i> ^{+/-}	26	29	0.90
<i>Myh13</i> ^{-/-}	14	14	1.00

注: 各基因型小鼠的性别比经 χ^2 检验, 结果均为 *P*>0.05



A: WT、*Myh13*^{+/-} 和 *Myh13*^{-/-} 雌性小鼠体质量变化趋势; B: 雄性小鼠体质量变化趋势; 结果采用单因素方差分析, *P*>0.05

图 3 三种基因型雄鼠和雌鼠的体质量比较

Figure 3 Comparison of body weight among three genotypes of male and female mice

膜完整,肌原纤维排列整齐,肌节结构清晰,线粒体和细胞核正常。但与 WT 小鼠相比, *Myh13*^{+/-} 眼外肌中可见散在脂滴沉积, *Myh13*^{-/-} 可同时观察到散在脂滴沉积和肌质网扩张的现象(图 4B)。由此

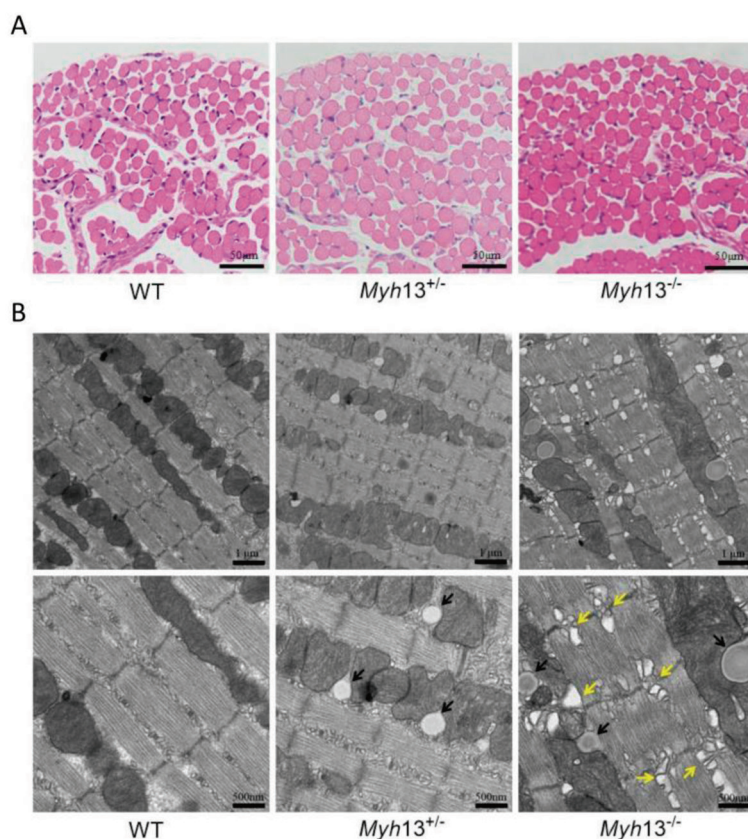
提示, *Myh13* 的敲除对小鼠的眼外肌虽然并不会引起光学显微镜下的病理变化,但是会影响肌纤维内部的超微观结构,可能会对小鼠的眼外肌功能产生影响。

表 4 三种基因型小鼠血清生化检测

Table 4 Serum biochemical analysis in three genotypes of mice

指 标	WT	<i>Myh13</i> ^{+/-}	<i>Myh13</i> ^{-/-}
GLU/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	9.62 ± 0.62	8.89 ± 0.73	9.28 ± 0.85
TG/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	1.38 ± 0.12	1.42 ± 0.16	1.36 ± 0.18
TCHO/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	2.36 ± 0.16	2.52 ± 0.20	2.31 ± 0.23
LDL-C/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	0.34 ± 0.04	0.35 ± 0.05	0.36 ± 0.06
HDL-C/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	3.26 ± 0.10	3.34 ± 0.15	3.29 ± 0.10
ALT/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	60.67 ± 9.75	58.67 ± 11.22	60.17 ± 8.42
AST/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	189.17 ± 19.71	195.17 ± 21.04	193.67 ± 22.04
BUN/ $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$	11.64 ± 1.34	11.86 ± 1.79	12.03 ± 1.75
CREA/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	22.89 ± 2.64	21.57 ± 2.13	23.15 ± 2.21
LDH/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	485.17 ± 88.53	508.50 ± 123.86	521.50 ± 112.87
CK/ $\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$	779.83 ± 141.80	743.67 ± 187.35	797.17 ± 135.93

注: $n=6$, 采用单因素方差分析, 差异均无统计学意义, $P>0.05$



A: WT、*Myh13*^{+/-} 和 *Myh13*^{-/-} 小鼠眼外肌切片 HE 染色; 标尺: 50 μm 。B: WT、*Myh13*^{+/-} 和 *Myh13*^{-/-} 小鼠眼外肌电镜观察, *Myh13*^{+/-} 和 *Myh13*^{-/-} 小鼠眼外肌中可见散在脂滴(黑色箭头所指), *Myh13*^{-/-} 小鼠眼外肌中还可可见肌质网扩张(黄色箭头所指); 标尺: 1 μm (上)和 500 nm (下)

图 4 三种基因型小鼠眼外肌 HE 染色和电镜观察

Figure 4 HE staining and electron microscopic observation for extraocular muscles from mice with three genotypes

3 讨论

人类 *MYH13* 定位于 17p13.1, 与 *MYH1*、*MYH2*、*MYH3*、*MYH4* 和 *MYH8* 相邻。但是, *MYH13* 与位于同一基因簇的其他 *MYH* 有两点不同: *MYH13* 的全长约为 64 kb, 是其他 *MYH* 基因的 2 倍; *MYH13* 中外显子的分布和其他 *MYH* 中外显子的分布没有相似性^[8]。然而, 该基因所发挥的生物学功能与 *MYH* 家族其他成员相比有何特殊性尚不清楚, 并且, *MYH13* 与眼外肌超高速率、低张力、耐疲劳特点的相关性尚不明确。

本研究中, 在 WT 小鼠中检测了 *Myh13* 在不同组织中的表达水平, 小鼠中 *Myh13* 特异性高表达于眼外肌中, 与该基因在人类各个组织中的表达谱一致。经验证, *Myh13* 敲除小鼠的目的基因发生移码突变, 实现了基因组水平的基因剔除。进一步验证发现, *Myh13*^{-/-} 小鼠眼外肌中 *Myh13* 表达减少, *Myh13*^{-/-} 小鼠眼外肌中 *Myh13* 不表达。至此说明, 可利用该 *Myh13* 敲除小鼠研究人类 *MYH13* 的生物学功能。

与 *MYH* 家族相关的整体动物研究^[9]表明, *MYH* 多个成员的突变与人类疾病密切相关, 例如, *MYH6* 和 *MYH7* 的突变与人类多种心肌疾病相关。在人类中, *MYH6* 和 *MYH7* 分别在心房肌纤维和心室肌纤维中表达, 而在啮齿类动物如小鼠中, 心房肌纤维和心室肌纤维均表达 *Myh6*。*Myh6* p.R403Q 突变的杂合子小鼠在出生 12~25 周出现心肌纤维化、肌节异常和心功能异常的表型, 敲除心肌 *Myh6* 也同样可以使小鼠发生严重的心肌疾病^[10], 而 *Myh6* 纯合突变的小鼠呈现胚胎致死^[11]。*MYH9* 相关性疾病(*MYH9*-related disease, *MYH9*-RD)是一类由 *MYH9* 突变引起的遗传性血小板减少症, 有时突变还可引起非血液系统的症状如肾小球肾炎、神经性耳聋和白内障等^[12]。*Myh9* 敲除小鼠模型显示, *Myh9*^{-/-} 并没有出现与人类类似的 *MYH9*-RD 的症状, 而 *Myh9*^{+/-} 小鼠呈现胚胎致死^[13]。Zhang 等^[14]建立了 3 种 *Myh9* 突变(p.R702C、p.D1424N 和 p.E1841K)敲入小鼠模型, 发现 p.D1424N 和 p.E1841K 突变的纯合子小鼠和三种突变的杂合子小鼠均出现血小板减少的症状, 而 p.R702C 纯合突变小鼠出现胚胎致死。迄今尚无文献报道与 *MYH13* 相关的动物模型, 故本研究是首次对 *Myh13* 敲除小鼠进行表型分析。

在表型分析中, 本研究发现 *Myh13* 的敲除不会导致小鼠发生胚胎致死的现象, 对小鼠的体质量、基础代谢等也没有明显影响, 说明 *Myh13* 在小鼠的胚胎发育、生长发育等过程中并不是一个至关重要的基因。Altick 等^[15]和田亮等^[16]均发现斜视患者的眼外肌中 *MYH13* 表达显著减少。HE 染色的结果提示, 斜视患者的眼外肌纤维横截面积减少, 数量减少、排列紊乱、结缔组织增加等^[17]。本研究对 *Myh13* 敲除小鼠的眼外肌也进行了观察, HE 染色结果显示, 与 WT 小鼠相比, *Myh13*^{+/-} 和 *Myh13*^{-/-} 小鼠的眼外肌横截面积和肌纤维数量没有明显变化, 且未见明显病理改变; 电子显微镜观察显示, 敲除 *Myh13* 后, 小鼠眼外肌中可见散在肌质网扩张和脂滴沉积的现象。以往研究^[18, 19]表明, 在先天性肌病和肌肉萎缩小鼠模型的骨骼肌组织中, 也可见肌质网扩张和脂滴沉积。本研究表明, 在小鼠中, *Myh13* 的敲除可导致眼外肌微观结构改变, 这一改变是否对眼外肌功能、眼球运动等产生影响, 有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D. New insights into myosin evolution and classification[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(10):3681-3686.
- [2] Weiss A, Leinwand LA. The mammalian myosin heavy chain gene family[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996, 12(1):417-439.
- [3] Clark KA, McElhinny AS, Beckerle MC, et al. Striated muscle cytoarchitecture: an intricate web of form and function[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2002, 18(1):637-706.
- [4] Pedrosa-Domellof F, Holmgren Y, Lucas CA, et al. Human extraocular muscles: unique pattern of myosin heavy chain expression during myotube formation[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2000, 41(7):1608-1616.
- [5] Canepari M, Pellegrino MA, D'Antona G, et al. Skeletal muscle fibre diversity and the underlying mechanisms[J]. Acta Physiol (Oxf), 2010, 199(4):465-476.
- [6] Bloemink MJ, Deacon JC, Resnicow DI, et al. The superfast human extraocular myosin is kinetically distinct from the fast skeletal IIA, IIB, and IID isoforms[J]. J Biol Chem, 2013, 288(38):27469-27479.
- [7] Stuelsatz P, Yablonka-Reuveni Z. Isolation of mouse periorbicular tissue for histological and immunostaining analyses of the extraocular muscles and their satellite cells[J]. Methods Mol Biol, 2016, 1460(1): 101-127.
- [8] Schachat F, Briggs MM. Phylogenetic implications of the

- superfast myosin in extraocular muscles [J]. *J Exp Biol*, 2002, 205(15):2189-2201.
- [9] England J, Loughna S. Heavy and light roles: myosin in the morphogenesis of the heart [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(7): 1221-1239.
- [10] Carroll KJ, Makarewich CA, McAnally J, et al. A mouse model for adult cardiac-specific gene deletion with CRISPR/Cas9 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(2):338-343.
- [11] Teekakirikul P, Eminaga S, Toka O, et al. Cardiac fibrosis in mice with hypertrophic cardiomyopathy is mediated by non-myocyte proliferation and requires TGF-beta [J]. *J Clin Invest*, 2010, 120(10):3520-3529.
- [12] Eichel Y, Tormos LM, Squires JE. Preoperative use of platelets in a 6-year-old with acute appendicitis and a myosin heavy chain 9-related disorder: a case report and review of literature [J]. *Transfusion*, 2016, 56(2):349-353.
- [13] Matsushita T, Hayashi H, Kunishima S, et al. Targeted disruption of mouse ortholog of the human MYH9 responsible for macrothrombocytopenia with different organ involvement: hematological, nephrological, and otological studies of heterozygous KO mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 325(4):1163-1171.
- [14] Zhang Y, Conti MA, Malide D, et al. Mouse models of MYH9-related disease: mutations in nonmuscle myosin II-A [J]. *Blood*, 2012, 119(1):238-250.
- [15] Altick AL, Feng CY, Schlauch K, et al. Differences in gene expression between strabismic and normal human extraocular muscles [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2012, 53(9): 5168-5177.
- [16] 田亮, 邓大明, 申煌煊. 共同性内斜视患者眼外肌中肌球蛋白重链表达的研究 [J]. *眼科新进展*, 2011, 31(6):508-510.
- [17] 罗琪, 周炼红, 易贝茜, 等. 共同性斜视眼外肌的病理变化及肝细胞生长因子表达研究 [J]. *中华眼视光学与视觉科学杂志*, 2015, 17(10):621-624,630.
- [18] Papizan JB, Garry GA, Brezprozvannaya S, et al. Deficiency in Kelch protein Klhl31 causes congenital myopathy in mice [J]. *J Clin Invest*, 2017, 127(10):3730-3740.
- [19] Deguise MO, Boyer JG, McFall ER, et al. Differential induction of muscle atrophy pathways in two mouse models of spinal muscular atrophy [J]. *Sci Rep*, 2016, 6(1): 28846-28860.

Preliminary Phenotypic Analysis of *Myh13* Knockout Mouse

HE Yi-min, GU Ming-min

(Medical Genetics Lab, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200025, China)

[Abstract] Objective A preliminary phenotypic analysis of the *Myh13* knockout mouse model was performed in order to investigate the biological function of *Myh13*. **Methods** Expression of *Myh13* in mice was determined by qRT-PCR and Western blotting. Validation of *Myh13* knockout mouse was analyzed by gene sequencing, qRT-PCR and Western blotting. Genotypic ratio in the offsprings from the self-cross of heterozygotes was calculated. Changes in body weight and serum biochemistry parameters were measured. Histopathological features of mouse extraocular muscles were displayed by H&E staining and transmission electron microscopy examination. **Results** In mice, *Myh13* is specifically expressed in extraocular muscle. It was verified that the target gene in *Myh13* knockout mouse was successfully deleted at DNA, RNA and protein levels. Genotypic ratio of heterozygotes in the offsprings was consistent with Mendel's law. No significant differences existed among different genotypes in body weight or serum biochemical analysis. HE staining revealed no remarkable change in homozygous and heterozygous mouse extraocular muscles compared to wild-type mouse extraocular muscles. Electron microscopy of mouse extraocular muscles showed that fat droplets deposited in heterozygotes and homozygotes. Sarcoplasmic reticulum dilation was also identified in homozygotes. **Conclusions** Knockout of *Myh13* can alter the microstructure of extraocular muscles in mice, which may affect the function of extraocular muscles.

[Key words] *Myh13*; Mouse model; Extraocular muscle

循环内皮微粒相关 microRNA 在巨噬细胞炎性反应诱发小鼠动脉粥样硬化发生的机制

孙理华, 张 颖, 曹桂秋, 李 鹏, 胡 强, 张雅玲, 幸世峰
(新疆医科大学第五附属医院心血管内科, 乌鲁木齐 830011)

[摘要] 目的 研究循环内皮微粒(EMPs)相关 microRNA 在巨噬细胞炎性反应诱发动脉粥样硬化(AS)发生的作用机制。方法 SPF 级雄性 ApoE^{-/-}小鼠 206 只, 对照组 50 只, 实验组随机分为动脉粥样硬化模型(AS 模型)组、NC-miRNA 组和 miRNA-19b 抑制剂组, 每组 52 只。采用油红染色对 AS 病变小鼠的组织学进行观察, 计算斑块面积相对比例; 检测生化指标的表达水平, 主要包括小鼠血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和甘油三酯(TG); ELISA 检测血管炎症因子肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素 1(IL-1)、IL-6 和 IL-10 的变化; Western blot 检测凋亡相关蛋白 B 细胞淋巴瘤因子(Bcl-2)、细胞凋亡的标志蛋白 PARP 降解产物(cleaved-PARP)和 B 细胞淋巴瘤因子相关 X 蛋白(Bax)表达的变化, 实时荧光定量 PCR 检测 miR-19b 表达; 流式细胞法检测巨噬细胞的凋亡率。结果 miRNA-19b 抑制剂组可减少由于 AS 引起的血管厚度增加, 减少 AS 斑块面积比例; 使血脂中的 TC、TG 和 LDL-C 水平降低, HDL-C 水平则有升高; Bax、cleaved-PARP 促相关的凋亡蛋白表达量下调, 同时 Bcl-2 抗凋亡蛋白表达上调; 血管中促炎症因子 IL-1、IL-6 和 TNF- α 水平降低, 抗炎因子 IL-10 的水平则升高; 同时使血管内巨噬细胞的凋亡率下降。结论 EMPs 相关 miRNA-19b 的存在可以减少巨噬细胞的凋亡, 并且通过上调促炎因子促进组织周围炎症的发生, 进而促进 AS 的发展进程。

[关键词] 内皮微粒(EMPs); miRNA-19b; 巨噬细胞; 炎症因子; 动脉粥样硬化(AS)

[中图分类号] R562.2+1 Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)03-0201-07

心血管疾病是世界范围内导致患者死亡的主要原因, 而动脉粥样硬化(AS)性炎症是心血管疾病和进一步急性并发症的主要因素^[1-3], AS 影响大动脉和中动脉的内膜, 特别是在动脉分支部位。炎症反应的作用是心血管疾病研究的重要内容, 目前许多心血管疾病的治疗方法, 包括他汀类药物和血管紧张素转换酶(ACE)抑制剂, 都与抗炎特性有关^[4,5]。细胞间粘附分子-1(ICAM-1)和血管细胞粘附分子

(VCAM-1), 吸引淋巴细胞和单核细胞与内皮结合并浸润动脉壁内膜介质层, 经修饰的低密度脂蛋白(LDL), 如氧化的 LDL(oxLDL), 被证明能刺激促进炎症的产生, 加速 AS 斑块的形成^[6]。在内膜中单核细胞会向吞噬 oxLDL 沉积物的巨噬细胞分化, 因胆固醇流出物和 oxLDL 清除功能受损^[7], 树突状细胞(dc)、中性粒细胞、肥大细胞和自然杀伤细胞(NK)细胞等免疫细胞也参与细胞内炎症的反应^[8]。所以, 单核细胞和 T 细胞在 AS 发病机制中的重要作用得到广泛认识和研究。Zernecke 等^[9]研究指出, 由于动脉区域受到异常剪切应力, 导致内皮微粒(EMPs)的促炎症激活, EMPs 内存在内源性的非编码 MicroRNAs(miRNAs), 在细胞间起着重要作用。有研究表明, 冠状动脉疾病患者的循环 miR-19b 水平明显高于阴性对照组患者, 而 miR-19b 主要存在于

[收稿日期] 2018-11-30

[基金项目] 新疆维吾尔自治区自然科学基金项目
(项目编号: 2018D01C308)

[作者简介] 孙理华(1979-), 男, 硕士, 主治医师, 研究方向: 心血管疾病临床及基础研究。

E-mail: sunxxlan@sohu.com

[通信作者] 幸世峰, E-mail: xinjiang@163.com

EMPs 中^[10-12]。EMPs 是 miR-19b 在血管内皮细胞和其他细胞之间的通信中的重要载体,然而 miR-19b 对 AS 进展的影响尚不清楚,因此该研究主要探讨 miR-19b 在 AS 中对炎症反应的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级雄性 ApoE^{-/-} 小鼠,5 周龄,体质量 15~20 g,共 206 只,实验组 156 只,对照组 50 只,均购自南京天邦生物科技有限公司[SCXK(苏)2015-0018],在 SPF 条件下饲养[SYXK(新)2018-0003]。所有的实验动物程序都符合动物管理和使用委员会的审查和批准。

1.2 仪器与试剂

EzRIPA 裂解试剂盒(ATTO,Tokyo,日本);线粒体分离试剂盒(BioChain Institute Inc., Gibbstown, NJ, 美国);Pierce BCA Protein Assay Reagent 试剂盒、DAB 显色试剂盒(迈新生物技术有限公司);miR-19b 特异性逆转录引物及逆转录试剂盒(上海生工工程有限公司);水合氯醛(北京百顺化学科技有限公司);甲醛、异丙醇和氨水(无锡市亚泰联合化工有限公司);苏木素(北京索莱宝科技有限公司),Immobilon-P Transfer Membrane 过滤器(Millipore Co., Bedford, MA, 美国);离心机(上海安亭离心机厂);罗氏全自动免疫组化仪(上海罗氏制药有限公司);酶标仪(美国 Bio-Tek 公司);PCR 仪(赛飞中国有限公司)。

1.3 建立 AS 小鼠模型和分组

实验组 ApoE^{-/-} 小鼠 156 只随机分为 3 组,患有 AS 模型组,NC-miRNA 组及 miRNA-19b 抑制剂组,每组 52 只。对照组小鼠给予正常饮食饮水饲养。实验组 3 组行 AS 造模,喂脂胆固醇饮食(1.25% 胆固醇和 21% 脂肪),8 周后,3 组中分别随机解剖小鼠 2 只,3 000 r/min 离心 10 min,检测血脂水平,取小鼠主动脉,HE 染色观察主动脉组织结构,确认造模成功。NC-miRNA 组造模成功后尾静脉注射 miRNA 抑制剂构建 AS 模型小鼠为阴性对照;miRNA-19b 抑制剂组构建 AS 小鼠模型后尾静脉注射 miRNA-19b 抑制剂,80 mg/kg,1 次/d,连续注射 3 d。摘眼球取血,腹腔注射质量分数 10% 水合氯醛,处死后解剖取胸主动脉,置于质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定,进行病理染色,部分放

于 -80℃ 冻存,备用。

1.4 观测指标及方法

1.4.1 AS 病变的组织学评价 将主动脉组织固定后进行梯度蔗糖脱水,组织沉底后取出,投入包埋剂中浸泡使气泡排尽,包埋,-20℃ 恒温环境下进行冰冻切片,体积分数 60% 异丙醇浸泡,油红染色液浸染,苏木素复染,氨水返蓝后甘油封片。在光学显微镜下对组织进行观察,将测量出的斑块面积除以计算所得的主动脉面积,则得出斑块面积百分,并对各组的斑块面积百分比进行统计、比较分析。

1.4.2 小鼠血脂水平检测 取眼球血分离血清(离心条件 3 000 r/min 10 min),检测血清中胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)指标。

1.4.3 ELISA 血管炎症性因子浓度检测 BCA 法测定提取的蛋白浓度。按照试剂盒说明书进行肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素 1(IL-1)、IL-6 和 IL-10 检测,然后用酶标仪检测各孔的吸光度(A)值。EzRIPA 裂解试剂盒裂解细胞,使用线粒体分离试剂盒分离线粒体,均按照制造商的说明书进行操作。使用 Pierce BCA Protein Assay Reagent 试剂盒测定蛋白质浓度。在 Laemmli 样品缓冲液中裂解蛋白质,进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转移到 Immobilon-P Transfer Membrane 过滤器上。

1.4.4 Western blot 检测小鼠血管组织中相关蛋白表达变化 取适量动脉组织样品置于 1~2 mL 匀浆器中球状部位,组织块尽量剪碎后加 400 μ L 单去污剂裂解液[含苯甲基磺酰氟(PMSF)]进行匀浆,重复几次使组织尽量破碎。裂解 30 min 后,在 4℃ 下 12 000 r/min 离心 5 min,取上清进行 BCA 检测蛋白浓度;加入一抗(1:200),摇床震荡 2 h;用 TBST 在室温下脱色摇床上洗 2 次,每次 10 min;再用 TBS 洗一次,10 min,二抗孵育 2 h,用 0.01 mol/L PBS 洗膜 3 次,电化学发光(ECL)底物发光表示蛋白的相对表达量。

1.4.5 实时荧光定量 PCR 检测 miR-19b 表达及细胞凋亡实验 取液氮保存中的主动脉组织于预冷研钵内,使其一直处于液氮中研磨,最后用勺子收集粉末,放入含 1 mL trizol 的 1.5 mL 无酶离心管中,混匀测定总 RNA 浓度及纯度,采用 miR-19b 特异性逆转录引物及逆转录试剂盒合成 cDNA(上海生工工程有限公司),随后以 cDNA 为模版进行荧光定量

PCR 反应, PCR 仪设置条件为 37 ℃ 保持 15 min、85 ℃ 保持 5 s、4 ℃ 至最终。取各组动脉组织检测细胞的凋亡情况, 根据 Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡试剂盒进行检测。

1.5 统计数据

数据表示以 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过 Shapiro-Wilk 检验证实了数据的正态性。采用单因素方差分析和 Fisher 最小显著性差异后自适应检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AS 病变的组织学比较

如图 1 所示, 对照组小鼠内皮细胞排列整齐(图 1A), AS 组和 NC-miRNA 组小鼠血管内皮细胞的排列较乱, 内膜厚度增加(图 1B、C), miRNA-19b

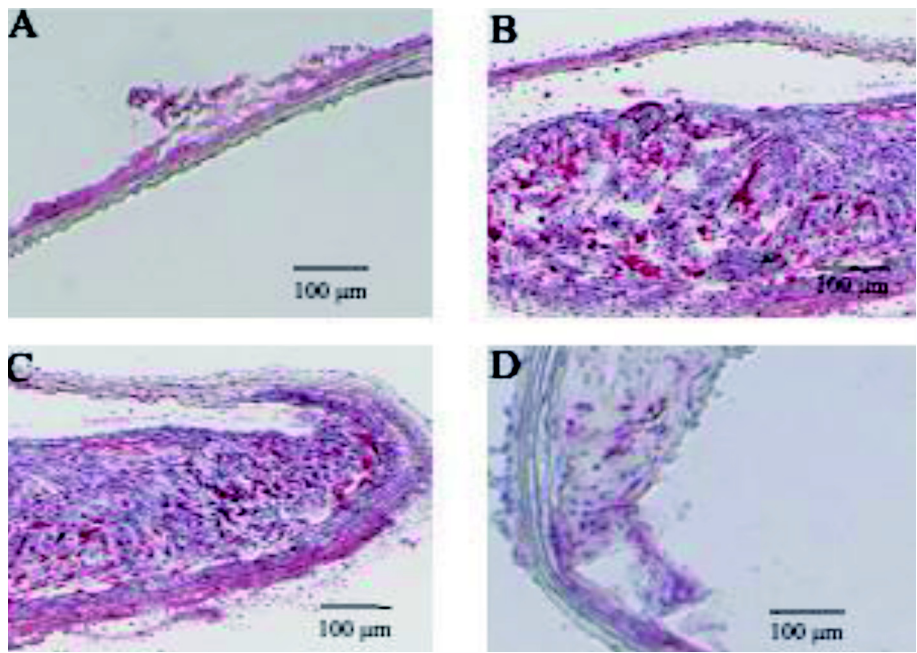
抑制剂组小鼠组织病变程度大大减轻(图 1D)。小鼠的主动脉斑块面积百分比比较分析表明, 对照组小鼠主动脉检测出粥样斑块为无, 其它各组小鼠主动脉粥样斑块面积百分比大小顺序分别为: AS 模型组 > NC-miRNA 组 > miRNA-19b 抑制剂组(表 1)。miRNA-19b 抑制剂组显著高于对照组, 但显著低于模型组与 NC-miRNA 组 ($P < 0.05$)。

2.2 血脂相关指标

与对照组比较, AS 模型组、NC-miRNA 组及 miRNA-19b 抑制剂组 TC、TG 和 LDL-C 水平明显升高, 而 HDL-C 水平含量降低; 与模型组和 NC-miRNA 组比较, miRNA-19b 抑制剂组 TC、TG 和 LDL-C 水平降低, HDL-C 水平则有升高 ($P < 0.05$)(表 2)。

2.3 血管炎症性因子的表达水平

如表 2 所示, AS 模型组与对照组相比, IL-1、



A: 对照组; B: AS 模型组; C: NC-miRNA 组; D: miRNA-19b 抑制剂组
图 1 各组小鼠动脉血管组织病理变化 (Oil-red 染色 × 600)

表 1 各组小鼠胸腔动脉斑块面积百分比	
组 别	斑块面积比 /%
对照组	0.00 ± 0.00
AS 模型组	9.59 ± 6.53 ^a
NC-miRNA 组	8.96 ± 3.47 ^a
miRNA-19b 抑制剂组	3.21 ± 2.03 ^{abc}
F	20.572
P	0.004

注: 与对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 AS 模型组比较, ^b $P < 0.05$; 与 NC-miRNA 组比较, ^c $P < 0.05$; $n = 50$; 下表同

IL-6 和 TNF- α 的水平升高, 而 IL-10 水平则有比较明显降低; NC-miRNA 组各指标也有相同的变化趋势; miRNA-19b 抑制剂组 IL-1、IL-6 和 TNF- α 水平低于 AS 模型组和 NC-miRNA 组, IL-10 的水平则高于两组 ($P < 0.05$)。

2.4 血管组织中凋亡因子 Bcl-2 cleaved-PARP 和 Bax 的表达水平

如表 4、图 2 所示, 与对照组比较, NC-miRNA、AS 模型组的 Bax 和 cleaved-PARP 表达量升高, 但

表 2 各组小鼠血脂相关性指标比较

组 别	TC	TG	HDL-C	LDL-C
对照组	0.79 ± 0.16	0.09 ± 0.02	0.31 ± 0.08	0.35 ± 0.23
AS 模型组	3.26 ± 0.21 ^a	0.25 ± 0.06 ^a	0.08 ± 0.09 ^a	1.65 ± 0.11 ^a
NC-miRNA 组	3.13 ± 0.14 ^a	0.21 ± 0.02 ^a	0.08 ± 0.05 ^a	1.59 ± 0.27 ^a
miRNA-19b 抑制剂组	1.85 ± 0.06 ^{abc}	0.15 ± 0.03 ^{abc}	0.11 ± 0.05 ^{abc}	1.21 ± 0.10 ^{abc}
<i>F</i>	15.386	12.811	16.592	10.287
<i>P</i>	0.002	0.011	0.006	0.004

表 3 各组小鼠血清 IL-1、IL-6、IL-10 和 TNF-α 含量比较

组 别	IL-1	IL-6	IL-10	TNF-α
对照组	23.51 ± 5.01	45.23 ± 7.36	25.64 ± 5.33	32.29 ± 5.39
AS 模型组	34.06 ± 3.58 ^a	92.57 ± 31.97 ^a	16.86 ± 1.29 ^a	63.01 ± 15.65 ^a
NC-miRNA 组	33.56 ± 4.59 ^a	89.26 ± 21.07 ^a	17.34 ± 1.53 ^a	60.91 ± 7.61 ^a
miRNA-19b 抑制剂组	24.85 ± 6.21 ^{bc}	53.29 ± 17.15 ^{abc}	24.94 ± 4.72 ^{bc}	34.51 ± 6.47 ^{bc}
<i>F</i>	13.671	17.592	13.675	20.362
<i>P</i>	0.002	0.005	0.008	0.000

Bcl-2 表达水平下调($P<0.05$)。与模型组和 NC-miRNA 组相比, miRNA-19b 抑制剂组的促细胞凋亡的蛋白 Bax 和 cleaved-PARP 表达水平下调, Bcl-2 的表达水平上调。

表 4 各组小鼠 BCL-2、cleaved-PARP 和 Bax 的蛋白相对表达量

组别	BCL-2	cleaved-PARP	Bax
对照组	1.21 ± 0.03	1.35 ± 0.05	1.04 ± 0.01
AS 模型组	0.67 ± 0.02 ^a	2.47 ± 0.05 ^a	3.39 ± 0.01 ^a
NC-miRNA 组	0.64 ± 0.02 ^a	2.53 ± 0.04 ^a	3.27 ± 0.01 ^a
miRNA-19b 抑制剂组	1.05 ± 0.01 ^{bc}	1.91 ± 0.04 ^{abc}	2.16 ± 0.02 ^{abc}
<i>F</i>	12.585	13.226	26.910
<i>P</i>	0.013	0.009	0.000

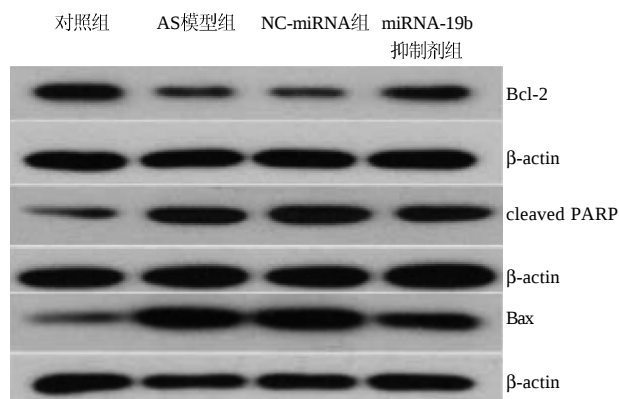


图 2 Western blot 检测各组 BCL-2、cleaved-PARP 和 Bax 蛋白表达

2.5 miRNA-19b 的表达

如表 5 和图 3 所示, 与对照组比较, AS 模型组(2.71 ± 0.02)和 NC-miRNA 组(2.43 ± 0.02)d 的 miRNA-19b 的蛋白表达明显增加 ($P<0.05$); 与 AS 模型组和 NC-miRNA 组比较, miRNA-19b 抑制剂组 (1.52 ± 0.01)蛋白表达显著下降 ($P<0.05$)。

表 5 各组小鼠 miRNA-19b 表达量比较

组 别	miRNA-19b 基因表达量
对照组	1.02 ± 0.03
AS 模型组	2.71 ± 0.02 ^a
NC-miRNA 组	2.43 ± 0.02 ^a
miRNA-19b 抑制剂组	1.52 ± 0.01 ^{bc}
<i>F</i>	15.353
<i>P</i>	0.002

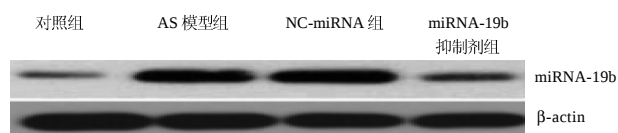


图 3 Western blot 检测各组 miRNA-19b 表达

2.6 各组巨噬细胞的凋亡率检测结果

与对照组比较, AS 模型组、NC-miRNA 组及 miRNA-19b 抑制剂组细胞凋亡率均升高 ($P<0.05$); 与 AS 模型组和 NC-miRNA 组比较, miRNA-19b 抑制剂组细胞凋亡率显著降低 ($P<0.05$)(表 6 和图 4)。

表 6 各组巨噬细胞的凋亡率检测结果比较

组 别	细胞凋亡率/%
对照组	4.41 ± 0.18
AS 模型组	7.16 ± 0.73 ^a
NC-miRNA 组	6.29 ± 0.24 ^a
miRNA-19b 抑制剂组	5.01 ± 0.11 ^{abc}
<i>F</i>	12.889
<i>P</i>	0.008

3 讨论

在 AS 进程中, 免疫和非免疫的血管细胞会释放多种促炎信使, 包括细胞因子、趋化因子、生物活性脂类化合物和粘附分子, 这些分子可以维持和增强局部炎症和 AS 病变的发展^[11]。AS 是一种慢性疾病, 导致心力衰竭和死亡的最主要原因, AS

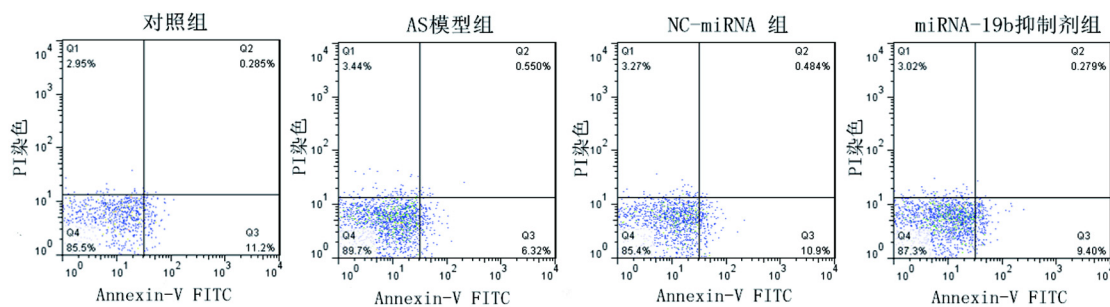


图 4 流式细胞仪检测各组巨噬细胞凋亡率

的病理生理机制包括脂质代谢紊乱、慢性炎症血管和血细胞中促炎信号通路的上调促进了 AS 的发生, 炎症在 AS 所有阶段的重要作用目前已为人所知, 目前研究主要关注一些关键的促炎调节剂在 AS 过程中的作用, 如 IL-1、IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 等关键因素促炎细胞因子^[12]。Qamar 等^[13]在临床研究发现, IL-1 在抑制治疗慢性炎症性疾病方面有效果, 暗示 IL-1 作为抗炎治疗 AS 的目标, 炎症涉及多种难以靶向治疗的调节和补偿机制, 抑制这些细胞因子的过度血管生成可能对抗炎治疗 AS 具有重要意义。

本研究表明, 抑制 miRNA-19b 能够较明显改善内皮细胞损伤, 缓解由于 AS 引起的血管厚度增加, 减少 AS 斑块的面积比例。与本文结果类似, Souilhol 等^[14]研究同样表明, miRNA-19b 与 AS 发展具有相关性, miRNA-19b 抑制剂组血脂指标 TC、TG 和 LDL-C 水平降低, HDL-C 水平则有升高, 可以解释抑制小鼠体内的 miRNA-19b 可以缓解 AS。研究^[15]表明, miRNA-19b 能够减少吞噬免疫细胞的凋亡率, 相关蛋白的表达量变化检测亦支持该结果。miRNA-19b 经抑制后, 作为细胞凋亡的标志蛋白 Bax 和 cleaved-PARP 的表达量下降, 同时具有抑制细胞凋亡作用的相关蛋白 Bcl-2 的表达量上升。Naugler 等^[16]研究表明, IL-6 是急性炎症的关键介质, 可视为炎性生物标志物, IL-6 是由巨噬

细胞和 T 细胞在感染或损伤后的最初阶段产生, 以诱导免疫反应和炎症, 血管平滑肌细胞也会分泌 IL-6 来应对炎症刺激和损伤, 因为这种细胞因子是这种细胞类型的有丝分裂因子, IL-1 产生的促炎症细胞因子^[17], 广泛激活巨噬细胞。Canakinumab 等^[18]对人类特异性 IL-1 β 单克隆抗体初步临床试验结果显示, IL-1 在急性心肌梗死、中风和 AS 等疾病中的疗效。TNF- α 是一个有效的促炎细胞因子, 主要在巨噬细胞和参与系统性炎症和传播的急性期反应^[19,20], TNF- α 有不同的免疫调节功能, 如抑制病毒复制和致癌作用, 诱导细胞凋亡和炎症, 启动防御反应应对脓毒症等等^[21], 生产过剩的 TNF- α 与急性和慢性炎症有关, 会对免疫介导的组织产生破坏, 因此抑制这些细胞因子的过度血管生成可能对抗炎治疗 AS 具有重要的治疗意义。本研究结果中通过抑制 miRNA-19 导致 IL-1、IL-6 和 TNF- α 水平降低, IL-10 的水平升高, 表明抑制 miRNA-19b 可以下调促炎因子, 同时上调抗炎因子表达, 减轻 AS 小鼠动脉血管组织中的炎症反应。Sun 等^[22]认为, 抑制 miRNA-19b 可调节巨噬细胞的增殖凋亡, 从而抑制 AS 的发展进程。miRNA-19b 微粒广泛存在于血液、组织和细胞中, 与机体多种病理生理过程有关。miRNAs 是一种内源性的、长度为 19~25 个核苷酸的非编码 RNA, 在细胞间的相

互作用中起着至关重要的作用,关于 miRNAs 的研究已经成为生命科学领域研究的热点,miRNAs 与人类多种疾病密切相关。

综上所述,循环 EMPs 相关 miRNA-19b 的存在可以减少巨噬细胞的凋亡,并且通过上调促炎因子促进组织周围炎症的发生,进而促进 AS 的发展进程。

参考文献:

- [1] Chrysoshoou C, Kollia N, Tousoulis D. The link between depression and atherosclerosis through the pathways of inflammation and endothelium dysfunction[J]. *Maturitas*, 2018, 109(5):1-5.
- [2] Jung YY, Kim KC, Park MH, et al. Atherosclerosis is exacerbated by chitinase-3-like-1 in amyloid precursor protein transgenic mice[J]. *Theranostics*, 2018, 8(3):749-766.
- [3] Katakami N. Mechanism of development of atherosclerosis and cardiovascular disease in diabetes mellitus[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2018, 25(1):27-39.
- [4] Bornfeldt KE, Kramer F, Batorsky A, et al. A novel type 2 diabetes mouse model of combined diabetic Kidney disease and atherosclerosis[J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(2):343-346.
- [5] He PP, Jiang T, Ouyang XP, et al. Lipoprotein lipase: Biosynthesis, regulatory factors, and its role in atherosclerosis and other diseases[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 480:126-137.
- [6] Clément C, Vafadarnejad E, Arampatzis P, et al. Single-cell RNA-Seq reveals the transcriptional landscape and heterogeneity of aortic macrophages in murine atherosclerosis[J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 125(12):126-137.
- [7] Richardson G, Sage A, Bennaceur K, et al. Telomerase mediates lymphocyte proliferation but not the atherosclerosis-suppressive potential of regulatory T-cells [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2018, 38(6):1283-1296.
- [8] Zhong X, Ma X, Zhang L, et al. MIAT promotes proliferation and hinders apoptosis by modulating miR-181b/STAT3 axis in ox-LDL-induced atherosclerosis cell models[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97(1):1078-1082.
- [9] Zernecke A, Haring B, Selvin E, Liang M, et al. Dietary protein sources and risk for incident chronic kidney disease: results from the atherosclerosis risk in communities (ARIC) study [J]. *J Ren Nutr*, 2018, 27(4):233-242.
- [10] Kim H J, Cha G S, Kim H J, et al. Porphyromonas gingivalis accelerates atherosclerosis through oxidation of high-density lipoprotein[J]. *J Periodontal Implant Sci*, 2018, 48(1):60-68.
- [11] Li C, Li S, Zhang F, et al. Endothelial microparticles-mediated transfer of microRNA-19b promotes atherosclerosis via activating perivascular adipose tissue inflammation in apoE^{-/-} mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 495(2):1922-1929.
- [12] Huang Y, Qi Y, Du J Q, et al. Protosapannin A protects against atherosclerosis via anti- hyperlipidemia, anti-inflammation and NF-κB signaling pathway in hyperlipidemic rabbits[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2018, 21(1): 33-38.
- [13] Qamar T, Norby F L, Aguilar D, et al. Galectin-3 and incidence of atrial fibrillation: The atherosclerosis risk in communities (ARIC) study[J]. *Am Heart J*, 2018, 192(11):19-25.
- [14] Souilhol C, Goodspeed L, Wang S, et al. Deficiency of invariant natural killer T cells does not protect against obesity but exacerbates atherosclerosis in Ldlr^{-/-} mice[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(2):pii:E510.
- [15] Feng M, Xu D, Wang L. miR-26a inhibits atherosclerosis progression by targeting TRPC3[J]. *Cell Biosci*, 2018, 8:4.
- [16] Naugler C, Harmsen MC, Evans PC, et al. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2018; 114(4):565-577.
- [17] Tabib A, Leroux C, Mornex J F, et al. Accelerated coronary atherosclerosis and arteriosclerosis in young human-immunodeficiency-virus-positive patients[J]. *Coron Artery Dis*, 2018, 11(1):41-45.
- [18] Canakinumab A, Macfadyen JG, Thuren T, et al. Effect of interleukin-1β inhibition with canakinumab on incident lung cancer in patients with atherosclerosis: exploratory results from a randomised, double-blind, placebo-controlled trial[J]. *Lancet*, 2017, 390(10105):1833-1837.
- [19] Yuan N, Zhang HF, Wei Q, et al. Expression of CD4+CD25+Foxp3+ Regulatory T cells, interleukin 10 and transforming growth factor β in newly diagnosed type 2 diabetic patients[J]. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*, 2018, 126(2):96-101.
- [20] Souilhol C, Harmsen MC, Evans PC, et al. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis[J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4):565-577.
- [21] Ling QQ, Zhao J, Zheng CG, et al. Roles of notch signaling pathway and endothelial-mesenchymal transition in vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(19):6485-6491.
- [22] Sun L, Dou F, Chen J, et al. Salidroside slows the progression of EA.hy926 cell senescence by regulating the cell cycle in an atherosclerosis model[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1):257-263.

Mechanism of Circulating Endothelial MicroRNA Related to Atherosclerosis Induced by Inflammatory Response of Macrophages in Mouse

SUN Li-hua, ZHANG Ying, CAO Gui-qiu, LI Peng, HU Qiang, ZHANG Ya-ling, XING Shi-feng
(Department of Cardiovascular Medicine, Fifth Affiliated Hospital of
Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China)

Corresponding author: XING Shi-feng, E-mail: sunxxlan@sohu.com

[Abstract] Objective To study the mechanism of microRNA related to circulating endothelial particulates (EMPs) on atherosclerosis (AS) induced by inflammatory response of macrophages. **Methods** There were 206 male ApoE^{-/-} mice of SPF grade and 50 control groups. The experimental group was randomly divided into three groups: AS model (AS) group, NC-miRNA group and miRNA-19b inhibitor group with 52 in each group, using oil red staining of atherosclerotic lesions in the histology were observed, calculated plaque area ratio, and detect the serum cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low density lipoprotein cholesterol (LDL-C) biochemical index expression level of TNF alpha ELISA to detect vascular inflammation factors, IL-1, the change of IL-6 and IL-10, bcl-2, cleaved-PARP and Bax expression were detected by Western blot, mir-19b expression was detected by real-time quantitative PCR, and the apoptosis rate of macrophages was detected by flow cytometry. **Results** Micornas-19b inhibitor group can decrease due to the increase in the thickness of the blood vessels of AS, reduce atherosclerotic plaque area percentage, the blood lipid level of TC, TG and LDL-C in the lower, HDL-C level has increased, promoting apoptosis related proteins Bax, cleaved - PARP expression decreased, and resistance to apoptosis related proteins increased the expression of Bcl-2 and proinflammatory factor in vascular IL-1, IL-6 and TNF- α level will be significantly lower, anti-inflammatory factor of IL-10 level is higher, At the same time, the apoptosis rate of endovascular macrophages decreased. **Conclusion** The presence of circulating endothelial microcore-related mirna-19b can reduce the apoptosis of macrophages, and promote the development of peripheral inflammation by up-regulating pro-inflammatory factors, thus promoting the development of AS. **[Key words]** Cyclic endothelial particles(EMPs); Micornas-19b; Macrophages; Inflammat-ory factors; Atherosclerosis (AS)

套环法和空气干燥法建立兔颈动脉粥样硬化斑块模型的比较分析

王 琮, 陈筱雪, 杨少玲, 王凤翎, 范林艳, 贺倩倩

(安徽理工大学附属上海市奉贤区中心医院, 上海 201400)

[摘要] 目的 比较颈动脉内膜空气干燥法及套环法建立兔粥样硬化斑块模型的优劣。方法 20只新西兰白兔随机分为空气干燥法组(A组)和套环法组(B组), 分别行颈动脉内膜空气干燥术及颈动脉外膜硅胶套环术, 术后高脂喂养。术后0周、4周、8周采用ELISA检测血浆中总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)及低密度脂蛋白(LDL)浓度; 术后4周、8周、12周采用常规二维超声检查兔颈总动脉情况。术后12周完成超声检查后, 对2组兔颈总动脉斑块行HE染色, 病理学观察。结果 高脂饮食4周后血清TG、TC、LDL的浓度升高($P<0.05$), 并持续升高, 而同一时间点A组与B组间上述指标未见明显差别; 高脂喂养8周后超声检查见2组兔的损伤段颈总动脉内中膜增厚, 管壁现斑块强回声; 病理学观察见大量泡沫细胞, 且套环组上述病变较空气组更早更显著。结论 颈总动脉套环法使兔颈总动脉在更短时间内出现部位明确预定的斑块, 安全性和有效性优于内膜空气干燥法。

[关键词] 兔; 动物模型; 颈动脉粥样硬化斑块; 套环法; 空气干燥法

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2019)03-0208-05

脑血管意外是全球发病率和死亡率最高的疾病之一, 研究^[1]表明易损斑块和急性脑血管意外有明显关联, 是脑缺血高发生率的重要原因。多数的急性脑血管意外是动脉粥样硬化易损斑块破裂和继发血栓所致。因此, 易损斑块的特性及干预斑块破裂导致的一系列病理生理过程成为当前的研究热点。有关粥样硬化易损斑块的组织学研究主要依赖动物模型, 由于兔在脂蛋白代谢方面与人有相似之处, 且对血脂的清除能力低, 进食含高胆固醇饲料后, 短时间内可形成高胆固醇血症, 容易产生动脉粥样硬化斑块。因此, 兔常用于构建动脉粥样硬化易损斑块动物模型。但有研究^[3,4]指出单纯给予兔高脂饮食, 其产生的动脉斑块更偏向于黄瘤病, 而

非类似于人动脉粥样硬化斑块。所以我们试图通过不同方法来建立兔颈动脉粥样硬化模型, 寻找更高效的方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

普通级雄性新西兰白兔20只, 3~5月龄, 体重2.0~2.5 kg, 购自上海奉贤腾达兔业[SCXK(沪)2014-0003], 饲养于上海市奉贤辉煌实验动物养殖场[SYXK(沪)2013-0047]。高脂饲料购自上海灵朴生物科技有限公司[苏饲证(2014)01008], 配方(OC30002)如下: 普通饲料74.5%, 猪油10%, 胆固醇0.5%, 蛋黄粉10%, 蔗糖5%。动物房温度18~24℃、自然光照, 昼夜交替12 h, 每只兔喂饲料100 g/d, 自由饮水, 单笼喂养。按实验动物使用3R原则对实验兔给予人道关怀。

1.2 主要试剂与仪器

Vivid E9超声诊断仪购自美国GE公司; 酶标仪(450 nm)购自美国伯腾仪器公司, 兔低密度脂蛋白

[收稿日期] 2018-11-20

[基金项目] 上海市卫生与计划生育委员会课题面上项目(201740053)和上海市科学技术委员会引导项目(18411970000)

[作者简介] 王 琮(1988-), 女, 生物医学工程硕士研究生。
E-mail: 516983145@qq.com

[通信作者] 杨少玲(1969-), 女, 博士。E-mail: drysl@163.com

(LDL)、甘油三酯(TG)和总胆固醇(TC)酶联免疫分析试剂盒均购自上海江莱生物有限公司。

1.3 方法

1.3.1 模型制备及分组 随机分成2组, 每组各10只。A组行颈总动脉内膜空气干燥法: 麻醉后(质量分数10%水合氯醛, 3~3.5 mL/kg)备皮、消毒, 颈部正中切口切开, 充分暴露左侧颈总动脉。动脉夹夹闭血管近心端及远心端。4号头皮针沿血管长轴刺穿, 生理盐水冲管后通气(120 mL/min) 5 min, 随后再次往管腔内注入生理盐水, 松开动脉夹, 按压止血。待出血停止后, 缝合皮肤。B组行颈总动脉外膜套环法: 准备工作如前, 充分暴露左侧颈总动脉, 将内径1.0 mm的薄壁硅橡胶管套住颈总动脉外膜, 硅胶管均长5 mm。硅橡胶开口处使用粘合剂封闭。术后高脂饲料喂养12周。

1.3.2 观测指标 ①ELISA法测量血浆TC、TG及LDL: 术后高脂饲料喂养0周、4周及8周, 分别经耳中动脉用EDTA真空抗凝管取血2 mL, $1118 \times g$ 离心5 min, 取血浆弃红细胞, 再 $6440 \times g$ 离心3 min, 取上清-80℃保存。待血样收集完毕按ELISA试剂盒说明书操作。②兔颈动脉超声检查: 术后高脂饲料喂养4周、8周及12周, 分别使用GE vivid E9超声诊断仪检查2组兔颈动脉。兔备皮后仰卧位固定于实验台, 沿着气管两侧找到颈总动脉, 探头选用9L, 频率8~10 MHz, 调节至图像清晰, 先长轴再短轴, 自上而下地检查颈总动脉, 观测颈总动脉内膜、管径及斑块形态。③兔颈总动脉病理学观察: 实验结束时, 空气栓塞法处死全部动物。取有斑块的颈总动脉段, 送医院病

理科行HE染色后做病理学观察。

1.4 统计学分析

应用SPSS23.0统计学软件对数据进行统计分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 同一组高脂饲料前后的血脂水平比较采用配对 t 检验, 两组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血脂水平

高脂饮食4周后血清TG、TC、LDL的浓度升高($P < 0.05$), 并持续升高。而同一时间A组与B组间上述指标未见明显差别($P > 0.05$)(表1)。

2.2 超声检测颈总动脉

A、B组白兔颈总动脉内中膜在8周左右明显增厚, 且B组颈总动脉狭窄处内中膜增厚较明显, 血流速度也较快(表2、表3)。4周时两组实验兔管壁均未见明显斑块, 管腔内血流信号充盈良好。而8周时硅胶环组部分实验兔颈总动脉内可见小斑块突向管腔, 彩色多普勒血流图(CDFI)可见斑块处血流绕行, 未见明显狭窄(图1)。12周时, 两组实验兔颈总动脉内均见斑块回声。

2.3 病理学检查

12周时A、B两组兔未手术侧颈动脉仅可见内膜不规则增厚, 内皮细胞连续性尚好(图2A和图2B)。而手术侧可见内皮细胞形态不规整, 伴有不同程度的连续性中断, 病灶内膜下见泡沫细胞, 表层纤维帽结构断裂, 弹力纤维破坏变薄, 平滑肌细胞向内膜增生, 可见斑块突向管腔(图2C、图2E), 且B组(图2C、图2D)病变较A组(图2C、图2E)更为明显。

表1 兔血清TG、TC、LDL的浓度

mmol · L⁻¹

时间	TG		TC		LDL	
	A组	B组	A组	B组	A组	B组
0周	1.82 ± 0.41	2.07 ± 0.37	2.33 ± 0.39	2.37 ± 0.51	1.76 ± 0.32	1.6 ± 0.57
4周	5.59 ± 0.59**	5.56 ± 0.42**	6.11 ± 0.5**	6.28 ± 0.43**	5.79 ± 0.75**	6.22 ± 0.65**
8周	9.69 ± 0.86***	9.59 ± 0.60***	9.11 ± 0.77***	9.60 ± 0.38***	8.69 ± 0.31***	9.38 ± 0.34***

注: 与0周比较, ** $P < 0.01$; 与4周比较, *** $P < 0.01$; 同一时间点手术侧与未手术侧比较, $P > 0.05$

表2 空气干燥法兔颈总动脉超声检测

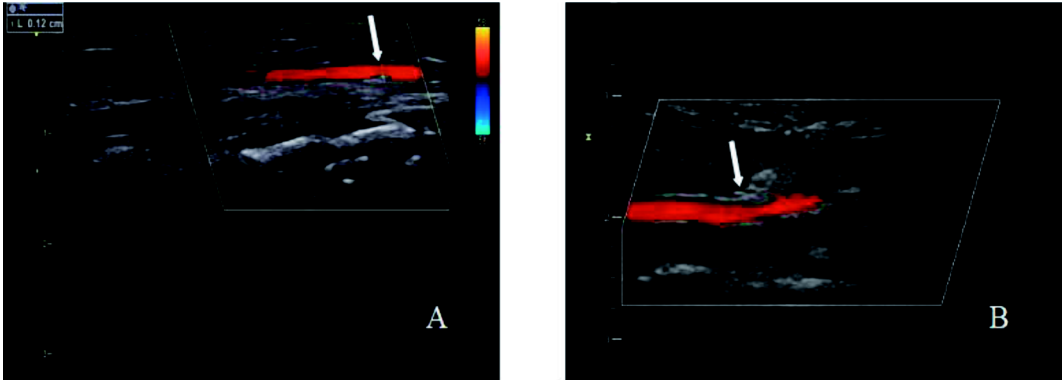
时间	n	内径/mm		内中膜/mm		流速/cm · s ⁻¹	
		手术侧	未手术侧	手术侧	未手术侧	手术侧	未手术侧
4周	7	1.66 ± 0.32	1.51 ± 0.09	0.10 ± 0.06	0.10 ± 0.05	81 ± 11	79 ± 10
8周	5	1.65 ± 0.25	1.55 ± 0.17	0.33 ± 0.05*	0.30 ± 0.09*	58 ± 20	66 ± 17
12周	4	1.94 ± 0.29	1.94 ± 0.21	0.50 ± 0.12**	0.36 ± 0.05*	103 ± 22	74 ± 16

注: 与4周比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与8周比较, * $P < 0.05$; 同一时间手术侧与未手术侧比较, $P > 0.05$

表 3 套环法兔颈总动脉超声检测

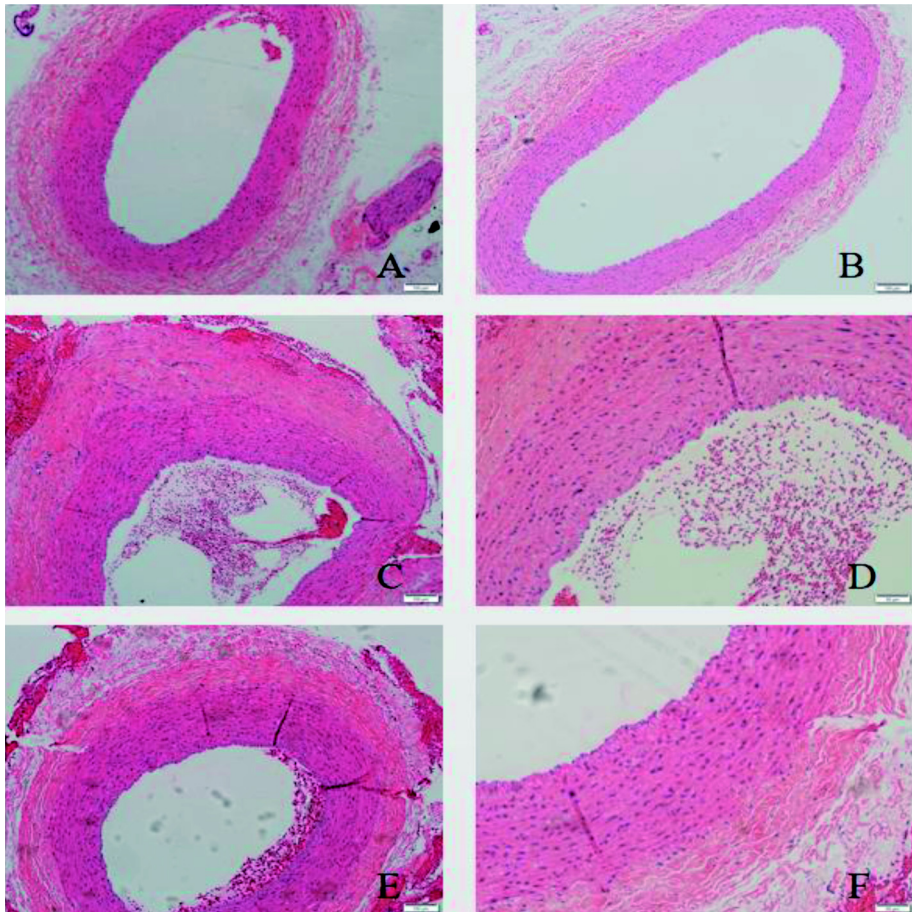
时间	n	内径 / mm		内中膜 / mm		流速 / cm · s ⁻¹	
		远心端	狭窄处	远心端	狭窄处	远心端	狭窄处
4 周	9	1.51 ± 0.24	1.21 ± 0.15	0.10 ± 0.14	0.10 ± 0.07	67 ± 10	79 ± 16
8 周	6	1.63 ± 0.41	1.10 ± 0.09	0.32 ± 0.08*	0.40 ± 0.10**	78 ± 16	120 ± 14
12 周	5	1.73 ± 0.31	1.11 ± 0.04	0.50 ± 0.54***	0.47 ± 0.05**	100 ± 24	108 ± 10

注: 与 4 周比较, **P*<0.05, ***P*<0.01; 与 8 周比较, #*P*<0.05; 同一时间点远心端与狭窄处比较, *P*>0.05



均来自 B 组, 常规二维超声检查示颈总动脉壁上有稍高回声团突向管腔, 未致明显管腔狭窄, CDFI 示该处血流绕行

图 1 二维超声兔颈动脉斑块



A: 12 周 A 组未手术侧兔颈动脉 (HE × 100); B: 12 周 B 组未手术侧兔颈动脉 (HE × 100); C、D: 12 周 B 组兔颈动脉 (2C, HE × 100, 2D, HE × 200); E、F: 12 周 A 组兔颈动脉 (2E, HE × 100, 2F, HE × 200)

图 2 兔颈动脉病理学观察

3 讨论

高胆固醇血症是动脉粥样硬化的始动因素,实验中兔在高脂高胆固醇饮食后,4周即可测得血TG、TC和LDL浓度升高,并随时间推移持续升高。但是单纯高脂喂养建模有一定的局限性,比如动脉粥样硬化斑块出现位置不可控,其次兔的动脉粥样硬化斑块主要为纤维增生性病变为稳定性斑块,不似人类的易损斑块^[5]。

LeVeen等^[6]在1982年首次采用通入干燥气体直接损伤血管内壁,结合高脂饮食,制备兔股动脉粥样硬化斑块模型。此方法对颈总动脉损伤仅局限于内膜,不会影响中膜,虽然内皮细胞修复与内膜增殖的过程更加接近颈动脉疾病的生理过程,但是影响因素较单一^[7]。1997年,Booth等^[8-10]报道在高脂血症兔的颈动脉外膜植入硅橡胶圈(套环法),以得到颈动脉斑块模型,套入硅橡胶一方面人为造成颈总动脉狭窄,改变局部血流动力学,另一方面硅橡胶套的机械刺激可引发血管局部炎性反应,促进动脉斑块形成。故套环法可以缩短颈动脉斑块建模时间。本研究超声结果显示,同样饲养条件下,A、B两组兔中未受人为破坏侧的动脉,内中膜变化出现时间晚,亦未见斑块形成。两组手术侧颈总动脉均在喂养4周见内中膜增厚(表2和表3)并在8周和12周时可陆续扫查到颈总动脉斑块。B组手术侧颈总动脉斑块形成较A组早,多数在8周即可发现凸向管腔的斑块回声。术后12周B组存活5只兔(存活率50%),其中3只检出颈动脉斑块,且斑块多发生在狭窄处近心端颈动脉段。A组存活4只兔(存活率40%),仅2只建模成功。

病理学观察也证实了超声检查结果。当颈总动脉出现斑块时,HE染色光学显微镜下见动脉内膜形态不规整、不连续,内弹力膜中断,显示不清,平滑肌细胞向内膜增生,可见斑块凸向管腔。

在实验过程中我们发现,术后1周B组兔存活率为90%,A组兔存活率为70%,实验结束时B组存活率50%,而A组为40%。这可能与A组手术时间较长,术中血流阻断时间过长有关,或许可以推测套环法较空气干燥法安全简便。

参考文献:

- [1] Kim BJ, Kim JS. Ischemic stroke subtype classification: an asian viewpoint[J]. J Stroke, 2014, 16:8-17.
- [2] 王晓花, 章建程. 动脉粥样硬化动物模型研究进展[J]. 海军医学杂志, 2007(2):175-177.
- [3] 何新群, 岳增辉, 常小荣, 等. 动脉粥样硬化兔模型的建立及评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2010, 30(9):27-29.
- [4] Xiangdong L, Yuanwu L, Hua Z, et al. Animal models for the atherosclerosis research: a review[J]. Protein Cell, 2011, 2(3):189-201.
- [5] Ni M, Chen WQ, Zhang Y. Animal models and potential mechanisms of plaque destabilisation and disruption[J]. Heart, 2009, 95(17):1393-1398.
- [6] LeVeen RF, Wolf GL, Villanueva TG. New rabbit atherosclerosis model for the investigation of transluminal angioplasty [J]. Invest Radiol, 1982, 17(5):470-475.
- [7] Chen X, Ren S, Ma MG, et al. Hirulog-like peptide reduces restenosis and expression of tissue factor and transforming growth factor-beta in carotid artery of atherosclerotic rabbits[J]. Atherosclerosis, 2003, 169(1):31-40.
- [8] 金海燕, 冬毕华, 彭旷, 等. 动脉粥样硬化发生中高脂血症与动脉狭窄的作用比较[J]. 中国动脉硬化杂志, 2006(12):1020-1024.
- [9] De Meyer GR, Van Put DJ, Kockx MM et al. Possible mechanisms of collar-induced intimal thickening[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997, 17(10):1924-1930.
- [10] Booth RF, Martin JF, Honey AC, et al. Rapid development of atherosclerotic lesions in the rabbit carotid artery induced by perivascular manipulation[J]. Atherosclerosis, 1989, 76(2-3):257-268.

Comparative Analysis of Rabbit Carotid Atherosclerosis Models Established by Collar And Air-drying Method

WANG Cong, CHEN Xiao-xue, YANG Shao-ling, WANG Feng-ling, FAN Lin-yan, HE Qian-qian
(Shanghai Fengxian Central Hospital Affiliated to AnHui University
of Science and Technology, Shanghai 201400, China)

[Abstract] **Objective** To compare the effect of air-drying and collar method on establishment of carotid atherosclerotic plaque in rabbits. **Methods** Rabbits were randomly divided into two groups: an air-drying group and a collar group with 10 subjects each. After operations, they were fed with fat-rich diet. The plasma levels of total cholesterol (TC), triglyceride (TG) and low density lipoprotein (LDL) were measured by ELISA in the 0th, 4th, 8th week, and the carotid artery was scanned by ultrasound in the 4th, 8th, 12th week. All rabbits were sacrificed at the end of experiment time. The morphology of the plaques was observed after HE staining. **Results** With high fat diet, the injured carotid of both groups were thickened and attached by strongly echoed plaques. HE staining showed a large number of foam cells, and all of these phenomenon showed earlier and more serious in the silicone collar group when compared with the air-drying group. **Conclusion** Carotid artery silicone collar method is safer and more effective than air-drying way in leading to the formation of atheromatous plaque.

[Key words] Rabbit; Animal models; Atherosclerosis plaque; Collar; Air-drying

B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞增殖、 凋亡及迁移能力实验研究

景 瑾¹, 张海骏^{1,2}, 杜利莉², 姬桂青², 邵义祥¹

(1. 南通大学比较医学研究所, 南通 226001;

2. 南通大学江苏省神经再生重点实验室, 南通 226001)

[摘要] 目的 探讨 B6-Co 小鼠出生时眼睑闭合不全的形成机制。方法 分离、培养并鉴定 B6-Co 小鼠及其背景品系 C57BL/6J(B6)眼睑成纤维细胞, CCK8 法检测 B6-Co、B6 小鼠眼睑成纤维细胞的增殖水平, Annexin V-FITC 法检测 B6-Co、B6 小鼠眼睑成纤维细胞的凋亡水平, Transwell 检测 B6-Co、B6 小鼠眼睑成纤维细胞的迁移能力。结果 成功培养出 B6-Co、B6 小鼠眼睑成纤维细胞, B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞的增殖能力和迁移能力极显著低于 B6 小鼠($P<0.01$), B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞的凋亡水平极显著高于 B6 小鼠($P<0.01$)。结论 B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞的增殖能力、凋亡水平及迁移能力均与 B6 小鼠有极显著差异。

[关键词] B6-Co 小鼠; 成纤维细胞; 细胞增殖; 细胞凋亡; 细胞迁移

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)03-0213-07

眼睑有保护眼球的作用。任何可能造成眼睑发育障碍、组织缺损、位置异常和眼睑启闭功能障碍的病变, 都可影响眼睑的正常生理功能, 以致失去保护眼球的作用, 危及眼球的安全^[1]。眼睑功能异常会导致眼睛的各种疾患, 如角膜炎、角膜混浊、上睑下垂等。而导致这些眼病的因素有感染、遗传、营养不良、外伤等多种因素^[2]。要研究这些因素对视觉功能的影响, 以及各因素的叠加影响、相互作用等等, 都必须借助疾病动物模型来深入研究。

南通大学实验动物中心^[3]用 C57BL/6J(B6)背景品系小鼠自主培育建立的遗传稳定的 C57BL/6J-corneal opacity (B6-Co) 突变系小鼠, 与国内^[4]和国际^[5]上

研究的出生时眼睑开放(eye open at birth, EOB)表型的模型小鼠相似, 即在出生时眼睑闭合不全。正常 B6 小鼠胚胎在妊娠 16.5~18.5 d 时完成眼睑融合, 出生时眼睑闭合, 出生后 12~14 d 睁眼。而 B6-Co 突变系小鼠在妊娠期胚胎未能顺利完成眼睑的融合, 并保持开放状态直至出生, 即呈典型的 EOB 表型^[6]。Wu 等^[7]研究表明, B6-Co 小鼠眼睑角质形成细胞伪足形成受到影响, 使得该突变系小鼠胚胎妊娠 16.5~18.5 d 未能完成眼睑融合, 导致了 EOB 表型。卢泽艳等^[8]首次成功培养 B6-Co 小鼠眼睑角质形成细胞, 发现其迁移能力显著降低, 形成细胞迁移障碍, 引起了 EOB 表型。但眼睑组织中的另一类型的主要细胞是成纤维细胞, 该类型细胞在 B6-Co 小鼠眼睑形态建成中有何变化与影响呢? 本实验拟通过培养正常 B6 小鼠和 B6-Co 小鼠成纤维细胞, 对小鼠眼睑成纤维细胞增殖、凋亡及迁移能力进行比较研究, 从而为阐明先天性眼睑发育异常的形成机制提供实验依据, 也可为人类遗传性眼睑疾病、角膜病的早期诊断、预防和治疗提供理论依据。

[收稿日期] 2018-12-13

[基金项目] 江苏省自然科学基金(编号: BK2010279); 江苏省研究生科研创新计划(编号: KYCX17-1909)

[作者简介] 景 瑾(1991-), 女, 硕士, 助理实验师, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: 15051277939@163.com

[通信作者] 邵义祥(1956-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 实验动物培育与应用, 人类疾病动物模型。

E-mail: shaoyx@ntu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级B6、B6-Co小鼠由南通大学实验动物中心提供[SCXK(苏)2014-0001];饲养在SPF级屏障动物房内,室内温度(21 ± 1)℃,相对湿度(55 ± 5)%,自由采食和饮水,昼夜明暗交替时间12 h/12 h,定期更换笼具、垫料[SYXK(苏)2015-0016]。B6雄性与B6雌性小鼠以1:2比例配对,共10笼;B6-Co雄性小鼠与B6雌性或B6雄性与B6-Co雌性小鼠以1:2比例配对,共10笼。每日上午8点之前检查小鼠阴道栓。见栓当日胎龄记为0.5 d。

1.2 主要仪器及试剂

CO₂细胞培养箱购自美国Thermo公司;倒置相差显微镜购自德国Leica公司;抗菌素、体积分数0.25%胰蛋白酶-EDTA和体积分数0.25%胰蛋白酶均购自美国Gibco公司;胎牛血清和DMEM基础培养基均购自美国Hyclone公司;CCK8试剂盒和Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒均购自中国碧云天生物技术公司;Vimentin一抗购自英国Abcam公司。

1.3 方法

1.3.1 小鼠眼睑成纤维细胞的分离和培养 取妊娠18.5 d的母鼠,颈椎脱臼处死后放入体积分数75%的乙醇溶液浸泡5 min消毒待用;剖开孕鼠腹部,取出胎鼠(B6-Co小鼠需判断其眼部开合状态,开则为EOB表型小鼠,闭眼则弃去);用镊子取下小鼠的眼睑组织,剪刀剪碎;加2 mL胰酶,于37℃消化5 min;100目网筛过滤,PBS冲洗;离心,弃上清;完全培养基重悬沉淀,于37℃、体积分数5% CO₂培养箱培养;待原代细胞长满后,细胞1:2传代。

1.3.2 小鼠眼睑成纤维细胞的鉴定 在细胞培养至第3代时,取部分细胞于圆玻片上进行细胞爬片培养;待细胞长至适当密度时,吸除培养基,PBS轻洗细胞2次×3 min,再加入质量分数4%多聚甲醛固定20 min,PBS轻洗细胞3次×3 min;体积分数0.5% Triton X-100通透20 min,PBS轻洗细胞3次×3 min;体积分数3% H₂O₂室温15 min,PBS轻洗细胞3次×3 min;5% BSA封闭0.5 h;滴加一抗(1:100),4℃孵育过夜,PBS轻洗细胞3次×3 min;滴加二抗(1:200),37℃反应30 min,PBS轻洗细胞3次×3 min;二氨基联苯胺(DAB)底物显色,室温下避光孵育10 min,纯水洗细胞;苏木

精染核2 min。纯水轻洗细胞4次×5 min;依次放入体积分数70%乙醇溶液2 min、体积分数90%乙醇溶液2 min、无水乙醇2 min、二甲苯酒精5 min、二甲苯5 min,封固。

1.3.3 小鼠眼睑成纤维细胞增殖水平的检测 取对数生长期细胞,胰酶消化后离心收集,重悬细胞,细胞计数调整为 2×10^4 /mL。将制备好的细胞悬液边轻轻混匀边加入96孔板,每孔加入100 μL;将接种好的细胞培养板放入培养箱中培养过夜,空白对照组只加入培养基不加细胞,每组设6个复孔取均值,实验重复3次。在培养1 d、2 d、3 d和4 d、5 d后CCK8法测细胞活力;不同时间组及对照组每孔加入10 μL CCK8溶液,培养箱继续孵育约2 h,在酶标仪450 nm处测量各孔的吸光度(A)值。

1.3.4 小鼠眼睑成纤维细胞凋亡水平的检测 取对数生长期细胞,种于6孔板中,待细胞长至约80%时,将6孔板内各孔的培养基收集至相应离心管中;用PBS洗涤细胞两遍,洗涤液也回收至离心管内;加入100 μL不含EDTA的胰酶,消化4~5 min,镜下看见细胞变圆时加入适量完全培养基终止消化,吹打数次;吸取细胞消化液至上述离心管,1 200 r/min,离心5 min;小心倒去上清液,加入适量PBS洗涤,离心,重复2次;去除上清液,各离心管加入100 μL缓冲液,重悬细胞,然后依次加入两种染液AV和PI各5 μL,并设3个对照组,分别为空白单染PI、空白单染AV、及全空白组,分别加入PI、AV及缓冲液5 μL;各组细胞轻微混匀,室温下避光反应20 min;各加入400 μL缓冲液,通过400目细胞滤网过滤,上机检测;以右上象限为晚期凋亡细胞和右下象限为早期凋亡细胞,每组细胞3个复孔,重复3次。

1.3.5 小鼠眼睑成纤维细胞迁移能力的检测 本实验选用直径6.5 mm、孔径8 μm的Transwell小室;0.25%胰酶将处于对数生长期的细胞消化,以DMEM基础培养基重悬并调整细胞密度至 5×10^5 /mL;加100 μL细胞悬液至Transwell上室,加入500 μL DMEM培养基(含5%胎牛血清)至Transwell下室,于CO₂培养箱中培养24 h;取出Transwell小室,吸尽培养基,PBS清洗3次;放入质量分数4%多聚甲醛溶液中固定20 min;弃固定液,PBS摇床洗10 min;放入结晶紫中室温染色10 min;PBS轻洗2次,每次5 min;用脱脂棉擦去小室上表面细胞,显

显微镜下取 5 个视野拍照计数, 以备后续统计、分析。

1.4 统计分析

所有实验计量数据均采用 STATA V 10.0 统计学软件进行处理, 应用 GraphPad Prism 5 统计分析软件进行统计作图。数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用配对 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠眼睑成纤维细胞的形态

倒置相差显微镜下观察, B6-Co、B6 小鼠眼睑所取细胞外形上无明显差异(图 1), 细胞均多为梭形, 核大多位于胞质中央, 且大小均一, 细胞集落性生长, 呈涡旋样或平行样排列, 符合成纤维细胞特征。

2.2 小鼠眼睑成纤维细胞的鉴定

成纤维细胞的标志蛋白是波形蛋白(Vimentin), 因此通过免疫组织化学染色法鉴定所分离的细胞及其纯度。B6-Co、B6 小鼠眼睑组织胰酶消化所得的细胞 100% 表达成纤维细胞特征蛋白 Vimentin(图 2), Vimentin 表达于胞质中且呈棕黄色, 苏木精染核呈蓝色, 细胞呈梭形, 符合成纤维细胞特征。本实

验成功培养出 B6-Co、B6 小鼠成纤维细胞, 且没有杂细胞污染。

2.3 CCK-8 法检测小鼠眼睑成纤维细胞增殖能力

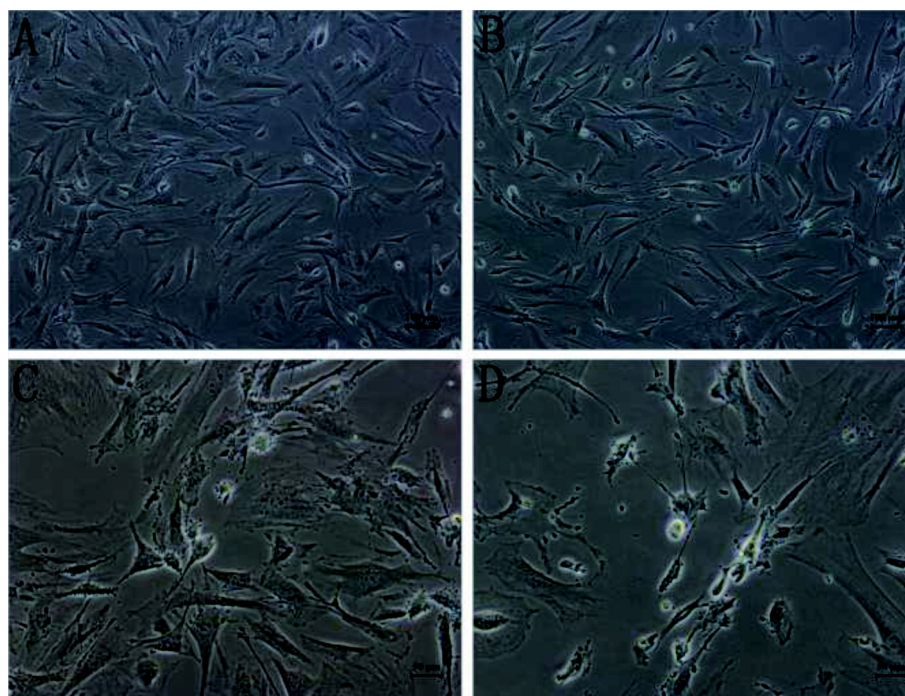
B6-Co 组成纤维细胞在培养 1 d、2 d、3 d、4 d 和 5 d 后细胞增殖水平(A450 值)显著低于 B6 组($P < 0.01$)(表 1)。这表明 B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞增殖能力有显著缺陷。

2.4 Annexin V-FITC 法检测小鼠眼睑成纤维细胞的凋亡能力

通过流式分析检测 B6 组、B6-Co 组成纤维细胞的凋亡情况, 以右上象限代表晚期凋亡细胞, 以右下象限代表早期凋亡细胞, 根据细胞所占比例计算凋亡率(图 3), 与 B6 组成纤维细胞相比, B6-Co 组的早期凋亡比例极显著上升($P < 0.01$), 这说明 B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞更易凋亡。

2.5 Transwell 检测小鼠眼睑成纤维细胞迁移能力

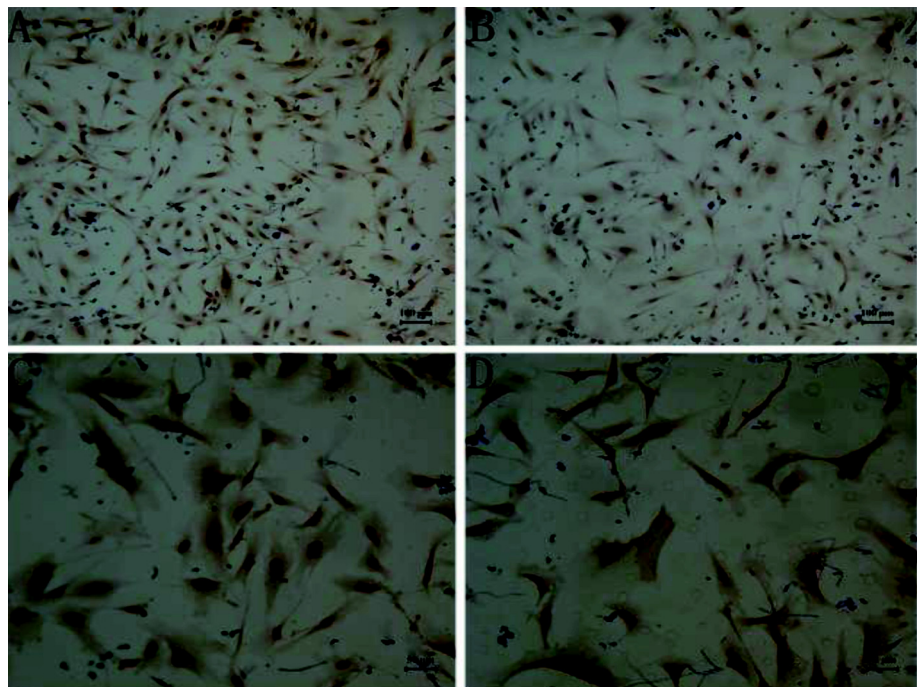
通过 Transwell 迁移实验来测定 B6-Co、B6 成纤维细胞的迁移能力, 结果(图 4)显示, B6-Co 组的成纤维细胞在 Transwell 小室接种培养 24 h 后, 其穿过小室的细胞数量极显著低于 B6 组($P < 0.01$), 这表明 B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞迁移能力受到严重影响。



A、C: B6 小鼠眼睑成纤维细胞; B、D: B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞

图 1 B6-Co、B6 小鼠眼睑成纤维细胞形态观察

Figure 1 Morphology of eyelid fibroblasts in B6-Co and B6 mice



A、 C: B6 小鼠眼睑成纤维细胞; B、 D: B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞
图 2 B6-Co、B6 小鼠眼睑成纤维细胞的鉴定
Figure 2 Identification of eyelid fibroblasts in B6-Co and B6 mice

表 1 B6-Co、B6 小鼠眼睑成纤维细胞增殖能力的检测
Table 1 Detection of proliferation ability of eyelid fibroblasts in B6-Co and B6 mice

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
B6	0.749 ± 0.038	1.476 ± 0.043	1.962 ± 0.087	2.039 ± 0.068	2.302 ± 0.116
B6-Co	0.408 ± 0.150**	0.751 ± 0.035**	0.909 ± 0.057**	1.068 ± 0.078**	1.531 ± 0.100**

注: 与 B6 组的成纤维细胞比较, **P<0.01

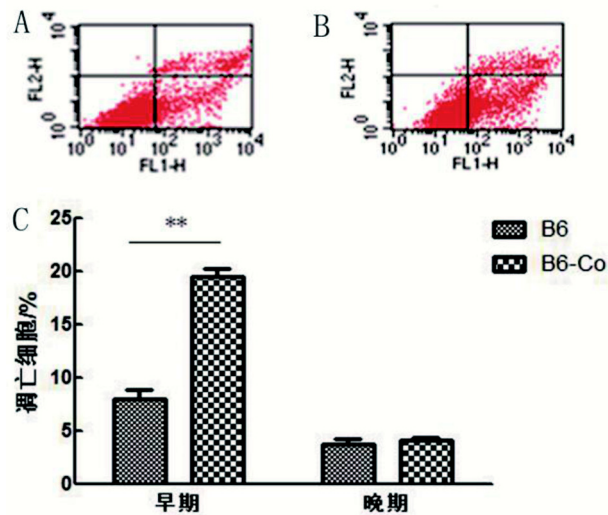
3 讨论

先天性角膜混浊^[9]是人类较为常见的眼部疾病之一, 多为眼睑发育缺陷所引起^[10]。角膜混浊可以发生在角膜中央或周边部, 甚至弥漫于全角膜, 并伴有眼部其他发育异常, 最终引发失明^[11]。因此, 眼睑发育机制一直受到发育生物学、眼科学研究者的高度关注。本研究所采用的角膜混浊表型的 B6-Co 小鼠, 在胚胎发育后期, 上下眼睑融合失败, 导致小鼠出生时眼睑闭合不全, 出生后极易发生角膜炎, 并逐步发展为角膜混浊, 其病理发展过程与人类角膜混浊的病理发展过程极为相似, 是研究人类角膜病的良好动物模型, 也是研究眼睑发育生物学及其分子调控机制的极好动物模型。

成纤维细胞是疏松结缔组织的主要细胞成分^[12],

其功能活动旺盛, 细胞质嗜弱碱性, 表现为明显的蛋白质合成和分泌活动。成纤维细胞是皮肤真皮网织层中最重要的细胞, 常附着在胶原纤维上, 能合成和分泌大量胶原蛋白, 对维持皮肤的功能具有重要作用。此外, 成纤维细胞还对不同程度的细胞变性、坏死和组织缺损的修复有着重要作用^[13]。而细胞增殖是细胞的重要生理功能之一, 是生物体的重要生命特征。细胞的增殖是生物体生长、发育、繁殖以及遗传的基础。本实验研究表明, B6-Co 小鼠的眼睑成纤维细胞增殖能力极显著低于 B6 小鼠, 是造成该突变系小鼠出生时眼睑不能闭合的重要原因之一。与 Curtain 等^[14]曾报道的成纤维细胞影响小鼠眼睑发育, 引发眼睑融合失败的结果相一致。

细胞凋亡是为维持内环境稳定, 生物体细胞



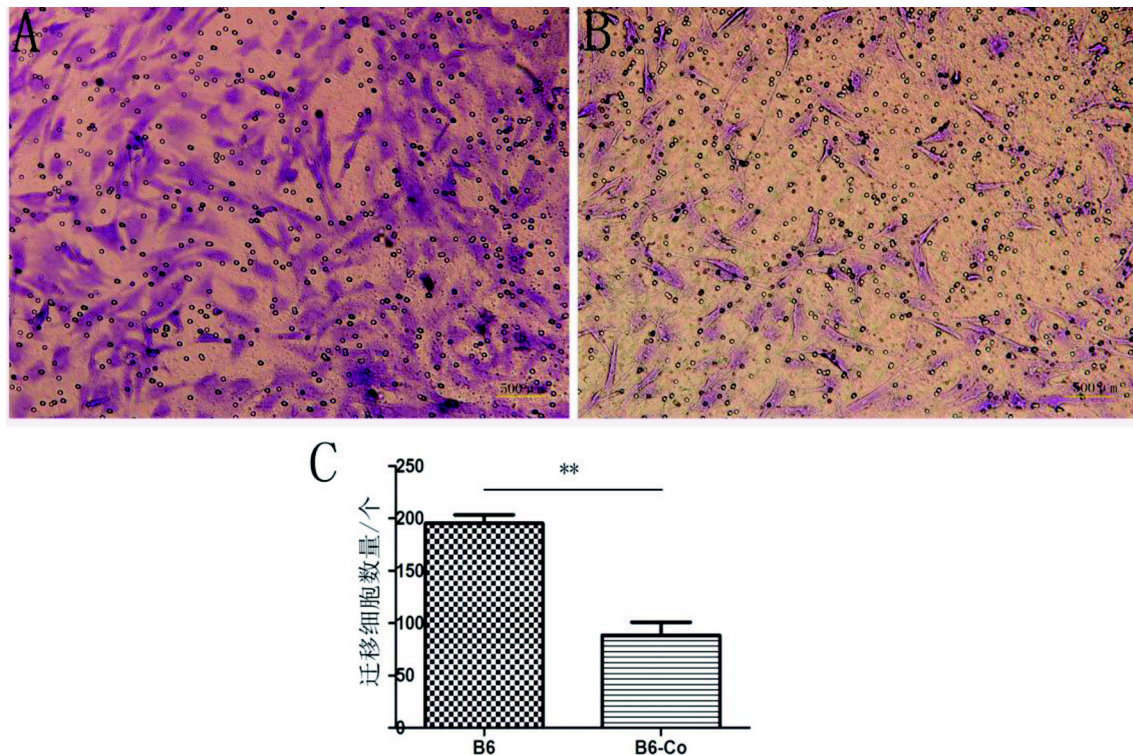
A: B6 凋亡流式图; B: B6-Co 凋亡流式图; C: A、B 的统计图; 组间比较, ** $P<0.01$

图 3 B6-Co、B6 小鼠眼睑成纤维细胞凋亡能力的检测

Figure 3 Detection of apoptosis of eyelid fibroblasts in B6-Co and B6 mice

主动消亡的过程, 是细胞生物体维持机体平衡的关键。细胞凋亡在多细胞生物去除不需要的或异常的细胞中起着必要作用^[15], 在生物体进化、内环境稳定以及多个系统发育中发挥重要作用, 但过度凋亡则会引起机体发育缺陷等一系列问题。在本实验中, B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞的早期凋亡比例比 B6 小鼠极显著上升。

细胞迁移也称细胞爬行, 是指细胞在接收到迁移信号或感受到某些物质的梯度后产生的移动。细胞迁移为细胞头部伪足的延伸、新的黏附建立、细胞体尾部收缩在时空上的交替过程。细胞迁移是正常细胞的基本功能之一, 是机体正常生长发育的生理过程, 在胚胎发育、伤口愈合、免疫反应等生理过程中发挥重要作用^[16]。本研究分析比较了 B6-Co 小鼠与 B6 小鼠眼睑成纤维细胞迁移能力的差异, 发现 B6-Co 小鼠的眼睑成纤维细胞迁移能力极显著低于 B6 小鼠, 迁移能力受到严重阻碍。



A: B6 组穿过 Transwell 小室的成纤维细胞; B: B6-Co 组穿过 Transwell 小室的成纤维细胞;

C: A、B 的统计图, 与 B6-Co 组比较, ** $P<0.01$

图 4 B6-Co、B6 小鼠眼睑成纤维细胞迁移能力的检测

Figure 4 Detection of migratory ability of eyelid fibroblasts in B6-Co and B6 mice

实验结果表明, B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞虽然在形态上与 B6 小鼠眼睑成纤维细胞没有明显差异, 但是增殖和迁移能力都显著下降, 且凋亡水平显著上升。结果提示, B6-Co 小鼠出生时眼睑闭合不全与其胚胎发育期间眼睑成纤维细胞的增殖能力、凋亡水平及迁移能力的改变有一定的关联, 但其关联程度及影响 B6-Co 小鼠眼睑成纤维细胞增殖、凋亡、迁移的分子调控机制仍有待深入研究。

参考文献:

- [1] Lee A, Karamichos D, Onochie OE, et al. Hypoxia modulates the development of a corneal stromal matrix model[J]. *Exp Eye Res*, 2018, 170:127-137.
- [2] 陈家祺. 我国角膜病的研究现状和展望[J]. *现代医院*, 2002, 2(3): 6-8.
- [3] 邵义祥, 吴宝金, 薛整风, 等. 遗传性角膜基质变性小鼠及其突变基因的定位[J]. *南京师范大学学报: 自然科学版*, 2006, 29(2):99-102.
- [4] 尹依恒. 乙烷基亚硝基脲诱变眼睑开放小鼠模型角膜组织学及突变基因研究[D]. 扬州: 扬州大学, 2018.
- [5] Tao H, Ono K, Kurose H, et al. Exogenous FGF10 can rescue an eye-open at birth phenotype of Fgf10-null mice by activating activin and TGF α -EGFR signaling[J]. *Dev Growth Differ*, 2006, 48(5):339-346.
- [6] 吴刘成, 刘春, 蒋荧梅, 等. 角膜混浊小鼠突变候选基因 Map3k1 克隆与序列分析[J]. *动物医学进展*, 2011, 32(4): 1-5.
- [7] Wu LC, Liu C, Jiang MR, et al. Defective eyelid leading edge cell migration in C57BL/6-corneal opacity mice with an "eye open at birth" phenotype[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(3). doi: 10.4238/gmr.15036741.
- [8] 卢泽艳, 郑良凤, 李瑶, 等. B6-Co与B6小鼠眼睑角质形成细胞的原代无血清培养及比较研究[J]. *湖北农业科学*, 2013, 52(2):393-397.
- [9] Cressey A, Jacobs DS, Remington C, et al. Improvement of chronic corneal opacity in ocular surface disease with prosthetic replacement of the ocular surface ecosystem (PROSE) treatment[J]. *Am J Ophth Case Rep*, 2018, 10:108-113.
- [10] Bozkurt B, Yildirim MS, Okka M, et al. GAPO syndrome: Four new patients with congenital glaucoma and myelinated retinal nerve fiber[J]. *Am J Med Genet A*, 2013, 161A(4): 829-834.
- [11] Chen VM, Shelke R, Nystrom A, et al. Collagen VII deficient mice show morphologic and histologic corneal changes that phenotypically mimic human dystrophic epidermolysis bullosa of the eye[J]. *Exp Eye Res*, 2018, 175:133-141.
- [12] Binelli A, Magni S, La Porta C, et al. Cellular pathways affected by carbon nanopowder-benzo(alpha)pyrene complex in human skin fibroblasts identified by proteomics.I[J]. *Ecotox Environ Safe*, 2018, 160:144-153.
- [13] Sano K, Someya T, Hara K, et al. Effect of traditional plants in Sri Lanka on skin fibroblast cell number[J]. *Data Brief*, 2018, 19:611-615.
- [14] Curtain M, Heffner CS, Maddox DM, et al. A novel allele of Alx4 results in reduced Fgf10 expression and failure of eyelid fusion in mice[J]. *Mamm Genome*, 2015, 26(3-4):173-180.
- [15] Lee CC, Hsieh TS. Wuho/WDR4 deficiency inhibits cell proliferation and induces apoptosis via DNA damage in mouse embryonic fibroblasts[J]. *Cell Signal*, 2018, 47:16-26.
- [16] Liu Y, Geng YH, Yang H, et al. Extracellular ATP drives breast cancer cell migration and metastasis via S100A4 production by cancer cells and fibroblasts[J]. *Cancer lett*, 2018, 430:1-10.

Experimental Study on Proliferation, Apoptosis and Migration of Eyelid Fibroblasts in B6-Co Mice

JING Jin¹, ZHANG Hai-jun^{1,2}, DU Li-li², JI Gui-qing², SHAO Yi-xiang¹

(1. Research Institute of Comparative Medicine of Nantong University, Nantong 226001, China;

2. Jiangsu Key Laboratory of Neuroregeneration of Nantong University, Nantong 226001, China)

[Abstract] **Objective** To explore the mechanism of eyelid incomplete closure at birth in C57BL/6J-corneal opacity (B6-Co) mice. **Methods** The eyelid fibroblasts of B6 and B6-Co mice were isolated, cultured and identified. CCK8 method was used to detect the proliferation of eyelid fibroblasts in B6 and B6-Co mice. Apoptosis of eyelid fibroblasts in B6 and B6-Co mice was detected by Annexin V-FITC. Transwell was used to detect the migration ability of eyelid fibroblasts in B6 and B6-Co mice. **Results** The eyelid fibroblasts of B6 and B6-Co mice were successfully cultured. The proliferation and migration of eyelid fibroblasts from B6-Co mice were significantly lower than those of B6 mice ($P<0.01$). The apoptosis of eyelid fibroblasts in B6-Co mice was significantly higher than that of B6 mice ($P<0.01$). **Conclusion** The proliferative capacity, apoptosis level and migration ability of eyelid fibroblasts in B6-Co mice were significantly different from those of B6 mice. **[Key words]** B6-Co mouse; Fibroblast; Cell proliferation; Cell apoptosis; Cell migration

小鼠脾淋巴细胞对人 HepG2 细胞 杀伤活性检测方法的建立

陈丽玲, 钟友宝, 刘 璇, 陈 来, 袁可望, 黄丽婷, 李姗姗
(江西中医药大学, 南昌 330004)

[摘要] 目的 在建立既能保留人肿瘤生物学特性的, 且免疫功能相对正常的人肿瘤异种移植动物模型的过程中, 为保证小鼠脾淋巴细胞对人肿瘤细胞杀伤作用的考察效率, 摸索建立基于流式细胞术的评价小鼠脾淋巴细胞对人 HepG2 细胞杀伤活性的方法。方法 用羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记人 HepG2 细胞, 利用无水乙醇模拟杀伤人 HepG2 细胞, 用碘化丙啶(PI)染色, 流式细胞仪检测, 确定 CFSE 和 PI 的浓度及作用时间。以小鼠脾细胞为效应细胞, 人 HepG2 细胞为靶细胞, 从效靶作用时间和效靶比方面进行优化, 确定试验方法的最佳条件。结果 采用 CFSE/PI 双标记将细胞分为 CFSE⁺PI⁻、CFSE⁺PI⁺、CFSE⁻PI⁺ 和 CFSE⁻PI⁻ 4 个组群, 可有效区分活细胞和被杀伤细胞。CFSE 标记靶细胞的浓度采用 2.5 $\mu\text{mol/mL}$, 效靶作用时间为 12 h, 效靶比 10:1。结论 建立了基于流式细胞术的评价小鼠脾淋巴细胞对人 HepG2 细胞杀伤活性的方法, 该方法的建立可为评价动物脾淋巴细胞对异种细胞的杀伤作用提供参考。

[关键词] 小鼠; 脾淋巴细胞; 人 HepG2 细胞; 羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE); 碘化丙啶(PI); 细胞毒活性

[中图分类号] R392.33 Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)03-0220-06

从动物模型与临床实际肿瘤的相近性而言, 现有肿瘤动物模型中, 人肿瘤的异种移植模型是最具有应用价值和前景的。而现有成熟的以免疫缺陷动物作为载体的人源肿瘤模型存在短板: 无胸腺裸小鼠的 T 细胞生成障碍导致其无法用于移植肿瘤与特异性免疫系统相互作用的研究^[1,2]。因此, 建立既能保留人源肿瘤生物学特性, 又具有正常免疫功能的动物模型是肿瘤研究, 尤其是肿瘤免疫研究急需解决的问题。我们拟利用“获得性免疫耐受”的机制, 即“在胚胎时期, 体内已有的针对多种抗原具有免疫活性的淋巴细胞克隆, 若与某种抗原(包括自身的或人工导入

的)相遇, 与其对应的淋巴细胞克隆即被破坏或抑制, 出生后只对胚胎期曾接触过的抗原形成耐受, 而对胚胎时期从未接触过的抗原仍有免疫应答^[3]”, 在具有完善免疫系统的 KM 小鼠基础上, 建立适用于人来源的、且免疫功能相对正常的人肿瘤异种移植动物模型, 以达到为肿瘤研究, 尤其是肿瘤免疫研究提供新的临床前研究模型的目的。在模型建立初期, 我们拟向孕鼠子宫内的胎鼠注射人肝癌 HepG2 细胞, 之后在成功出生且存活的胎鼠肝脏原位移植人肝癌 HepG2 细胞, 评价成瘤效果, 并考察荷瘤小鼠的免疫功能和对 HepG2 细胞及其他人肿瘤瘤株的排斥情况。在考察小鼠脾淋巴细胞对人肝癌 HepG2 细胞杀伤作用的过程中, 计划检测样本量较大, 因此需要建立一种操作方便、快速的检测方法。目前经常使用的细胞杀伤活性检测方法中, 经典的⁵¹Cr 释放法存在自然释放率较高、放射性会对细胞及操作人员造成伤害等不足; 乳酸脱氢酶(LDH)释放法因影响因素较多和背景信号的干扰等问题, 应用有限^[4]; 酶联

[收稿日期] 2018-12-24

[基金项目] 江西省青年科学基金(20161BAB215214); 江西省教育厅科学技术研究项目基金(GJJ14623)

[作者简介] 陈丽玲(1983-), 女, 硕士, 主要从事动物营养及免疫研究。E-mail: 465993116@qq.com

[通信作者] 李姗姗(1982-), 女, 博士, 主要从事肿瘤药理、安全性药理和毒理研究。E-mail: 704596948@qq.com

免疫斑点(Enzyme-linked immunospot, ELISPOT)检测技术、主要组织相容性复合体(Major histocompatibility complex, MHC)四聚体显示T细胞受体的染色技术和胞内细胞因子染色等技术,只能通过间接检测T细胞表面受体或细胞因子的水平反应细胞毒性T淋巴细胞(Cytotoxic T lymphocytes, CTL)活性^[5]。

羧基荧光素二乙酸盐琥珀酰亚胺酯(Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)是一种本身不发荧光的活体染料,它可穿透细胞膜,被胞内酯酶转化成具有绿色荧光的氨基反应性羧基荧光素琥珀酰亚胺酯,同时失去自由透过细胞的能力,可稳定标示活细胞^[6-8]。碘化丙啶(Propidium iodide, PI)是一种可对DNA染色的细胞核染色试剂,其不能通过活细胞膜,但却能穿过破损的细胞膜,嵌入双链DNA后释放红色荧光。在效应细胞与靶细胞混合前,先将靶细胞用CFSE染色,染色后的靶细胞与效应细胞混合作用后,再用PI染色,采用流式细胞术即可区分被杀伤靶细胞及存活靶细胞,并体现效应细胞的死亡情况,测定效应细胞对靶细胞的杀伤活性,且检测速度较快。

本实验拟建立基于流式细胞术的评价小鼠脾淋巴细胞对人HepG2细胞杀伤活性的方法,以准确检测模型小鼠脾细胞对人肿瘤细胞的杀伤作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级KM小鼠,4周龄,体质量18~22 g,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司[SCXK(湘)2013-0004]。饲养于江西中医药大学实验动物科技中心[SYXK(赣)2017-0004]。实验获得江西中医药大学实验动物伦理委员会的批准(伦理审查证号:JZLLSC207-0021),并按实验动物使用的3R原则给予人道主义关怀。

1.2 细胞株

人肝癌HepG2细胞由江西中医药大学中药资源与民族药研究中心惠赠(购自中国科学院上海细胞库)。

1.3 药品及主要试剂

CFSE(批号为S8269)购自美国Selleck生物科技有限公司;PI(批号为2018/12)购自合肥新恩源生物技术有限公司;磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffer saline, PBS)(批号为20171108)、DMEM高糖培养

基(含双抗,青霉素100 U/mL,链霉素100 µg/mL)(批号为20170812)和胎牛血清(批号为RY3201)均购自天津市灏洋生物制品科技有限责任公司;红细胞裂解液(批号为20170731)、胰蛋白酶(批号为T1300)和台盼蓝染液(批号为:20161122)均购自北京索莱宝科技有限公司。

1.4 主要仪器

CO₂培养箱(型号为C150)购自德国宾德有限责任公司,流式细胞仪(型号为FACSVerse)购自美国BD医疗器械有限公司。

1.5 实验方法

1.5.1 靶细胞人肝癌HepG2细胞的培养 人肝癌HepG2细胞置于含体积分数10%胎牛血清、100 U/mL青霉素和100 µg/mL链霉素的DMEM高糖培养基中,移入CO₂培养箱,于37℃、体积分数5%CO₂及饱和湿度条件下培养。

1.5.2 效应细胞小鼠脾淋巴细胞的制备 摘眼球取血后,将小鼠浸泡在体积分数75%乙醇中3 min,移至超净台中无菌取脾脏,开左侧腹部皮肤,分离皮下组织和肌肉,暴露并小心分离脾脏,放入预冷PBS中。将脾脏置于200目不锈钢网上,用注射器内芯头研磨成单细胞,收集后1 000 r/min离心5 min,弃上清,加入3倍量红细胞裂解液,4℃静置15 min,其间轻轻涡旋混匀2次,1 000 r/min离心10 min,弃上清,预冷PBS冲洗,含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基调整细胞悬液至不同浓度备用^[18]。

1.5.3 靶细胞人肝癌HepG2细胞的标记

1.5.3.1 CFSE及PI对靶细胞的区分效果 6孔板接种HepG2细胞,贴壁,至汇合度约为80%,用5 µmol/mL的CFSE标记10 min, PBS洗1次,加入含10%胎牛血清的DMEM高糖培养基及无水乙醇,使无水乙醇的终浓度分别为0.4 mol/L、0.8 mol/L、1.6 mol/L^[9],培养6 h后,收集细胞, PBS冲洗,加入PI至终浓度为12.5 µg/mL,上流式细胞仪检测。

1.5.3.2 CFSE标记对人肝癌HepG2细胞的毒性 24孔板接种HepG2细胞,贴壁,至汇合度约为80%,分别以2.5 µmol/mL、5.0 µmol/mL、10 µmol/mL的CFSE标记10 min,每隔1 h收集细胞, PBS冲洗,加入PI至终浓度为12.5 µg/mL,上流式细胞仪检测细胞存活率,至第18 h结束。未经CFSE标记的细胞作为对照。

1.5.3.3 CFSE标记人肝癌HepG2细胞荧光强度的

时间动力学分析 24孔板接种HepG2细胞,贴壁,至汇合度约为80%,分别以2.5 $\mu\text{mol/mL}$ 、5.0 $\mu\text{mol/mL}$ 、10 $\mu\text{mol/mL}$ 的CFSE标记10 min,每隔1 h收集细胞,PBS冲洗,上流式细胞仪检测荧光值(Median fluorescent intensity, MFI),至18 h结束。

1.5.4 CFSE及PI对靶细胞的区分效果 24孔板接种HepG2细胞,贴壁,至汇合度约为80%,此时HepG2细胞数约为 $4 \times 10^5/\text{孔}$ 。以2.5 $\mu\text{mol/mL}$ 的CFSE标记10 min,PBS洗1次,加入1 mL浓度为 $4 \times 10^6/\text{mL}$ 的小鼠脾淋巴细胞悬液,以效靶比10:1作用6 h,收集细胞,PBS冲洗,加入PI至终浓度为12.5 $\mu\text{g/mL}$,上流式细胞仪检测。

1.5.5 效靶作用时间及效靶比对试验结果的影响 24孔板接种HepG2细胞,贴壁,至汇合度约为80%,此时HepG2细胞数约为 $4 \times 10^5/\text{孔}$ 。以2.5 $\mu\text{mol/mL}$ 的CFSE标记10 min,PBS洗1次,分别加入1 mL浓度为 $2 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $4 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $8 \times 10^6/\text{mL}$ 、 $1.6 \times 10^7/\text{mL}$ 、 $3.2 \times 10^7/\text{mL}$ 、 $4 \times 10^7/\text{mL}$ 的小鼠脾淋巴细胞悬液,以效靶比5:1、10:1、20:1、40:1、80:1、100:1分别作用6 h、12 h和18 h,收集细胞,PBS冲洗,加入PI至终浓度为12.5 $\mu\text{g/mL}$,上流式细胞仪检测细胞的存活率,并按下式计算杀伤率。

杀伤率(%)=(阴性对照靶细胞存活率-试验组靶细胞存活率)/阴性对照靶细胞存活率 $\times 100\%$

1.6 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用SPSS17.0软件包

分析,组间比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA)评价整体性差异,并进行方差齐性检验。采用 χ^2 检验、 t 检验进行统计学分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CFSE标记对人肝癌HepG2细胞的作用

2.1.1 CFSE及PI对靶细胞的区分效果 流式细胞术检测结果表明,采用CFSE/PI双标记能有效分离各菌群:CFSE⁺PI⁻、CFSE⁺PI⁺、CFSE⁻PI⁺、CFSE⁻PI⁻,其中CFSE⁺PI⁻为未被乙醇杀伤的靶细胞,CFSE⁺PI⁺为被乙醇杀伤的靶细胞,CFSE⁻PI⁺为CFSE标记前死亡的效应细胞。随着无水乙醇的浓度逐渐增加,CFSE⁺PI⁺细胞,即被乙醇杀伤的靶细胞的比例逐渐增加(图1)。

2.1.2 CFSE标记人肝癌HepG2细胞的毒性 流式细胞术检测结果表明,1~18 h,各浓度CFSE标记的人肝癌HepG2细胞的存活率无明显下降,表明在18 h以内,CFSE对人肝癌HepG2细胞的存活无明显影响(图2)。

2.1.3 CFSE标记人肝癌HepG2细胞荧光强度的时间动力学 流式细胞术检测结果表明,1~18 h,随着时间的推移,各浓度CFSE标记的人肝癌HepG2细胞的MFI值均逐渐下降,6 h后趋于稳定,12 h后又有较小范围波动。在6~12 h,以2.5 $\mu\text{mol/mL}$ 和5.0 $\mu\text{mol/mL}$ 的CFSE标记后的MFI值更为稳定

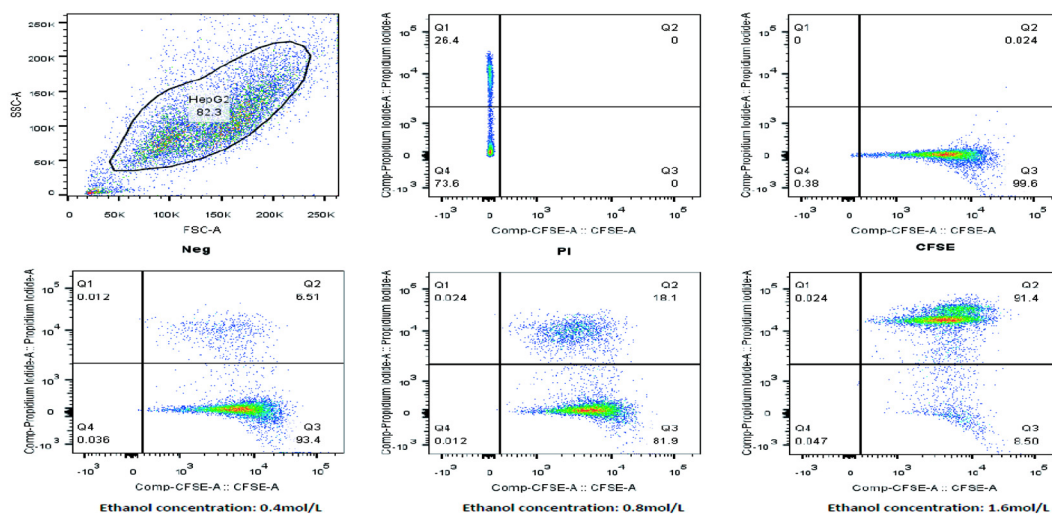


图1 CFSE及PI对靶细胞区分效果

Figure 1 The differentiating effect of CFSE and PI on target cells

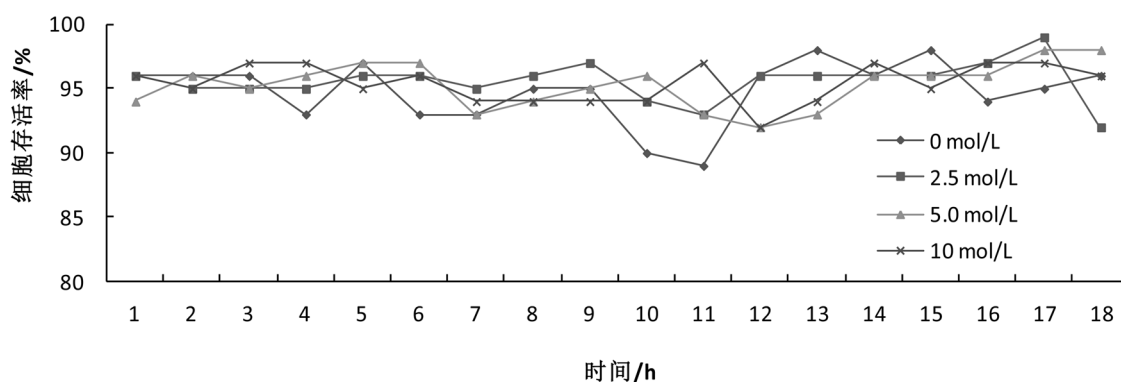


图2 CFSE 对人 HepG2 细胞的毒性

Figure 2 The cytotoxicity of CFSE to human HepG2 cells

(图3),表明后续测定细胞杀伤活性时,效应细胞和靶细胞的作用时间以6~12 h为宜。

2.2 CFSE 及 PI 对效应靶细胞的区分效果

流式细胞术检测结果表明,采用CFSE/PI双标记能有效分离杀伤实验所需各组群:CFSE⁺PI⁻、CFSE⁺PI⁺、CFSE⁻PI⁺、CFSE⁻PI⁻,其中CFSE⁺PI⁻为未被杀伤的靶细胞,CFSE⁺PI⁺为被杀伤的靶细胞,CFSE⁻PI⁺为效应靶相互作用过程中死亡的效应细胞和CFSE标记前死亡的效应细胞,CFSE⁻PI⁻为效应靶相互作用过程中存活的效应细胞(图4)。

2.3 效应靶作用时间及效应靶比对试验结果的影响

流式细胞术检测结果表明,效应靶比在5:1至40:1时,效应靶作用时间为12 h的细胞杀伤率较

18 h及6 h高;效应靶比在40:1以上时,则杀伤率随效应靶作用时间的延长而增加。其中效应靶比为10:1时,效应靶作用时间为12 h与作用时间为6 h的杀伤率相比有极显著性差异($P<0.01$),效应靶比为100:1时,效应靶作用时间为12 h与作用时间为6 h的杀伤率相比有显著性差异($P<0.05$)(表1)。

效应靶作用时间相同时,细胞杀伤率总体随效应靶比的增加而增加,但效应靶比在10:1至80:1间无显著性差异,直至效应靶比上升至100:1时,杀伤率才有明显增加:效应靶作用时间为12 h时,效应靶比100:1与10:1相比有显著性差异($P<0.05$),效应靶作用时间为6 h时,效应靶比100:1与10:1相比有极显著性差异($P<0.01$)(表1)。

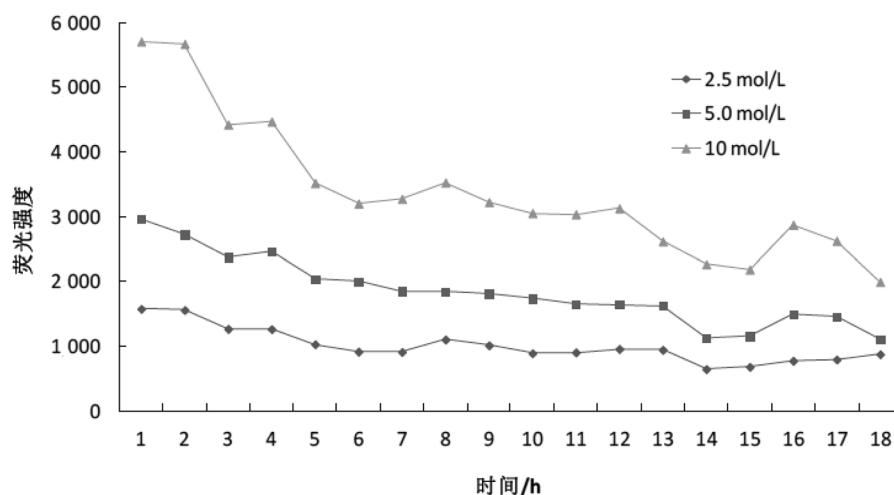


图3 CFSE 对人 HepG2 细胞荧光强度的时间动力学曲线

Figure 3 The time dynamics of fluorescent density of CFSE-labeled human HepG2 cells

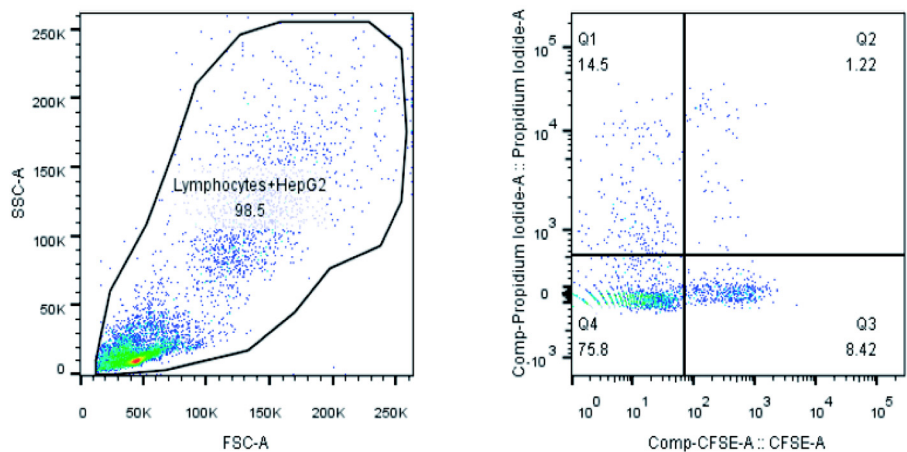


图 4 CFSE 及 PI 对效靶细胞区分效果

Figure 4 The differentiating effect of CFSE and PI on effector cells and target cells

表 1 效靶作用时间及效靶比对细胞杀伤率的影响

Table 1 The effect of action time between effector and target cells and the effector to target cell ratios on the specific cellular killing activity						
效靶作用 时间/h	效 靶 比					
	5 : 1	10 : 1	20 : 1	40 : 1	80 : 1	100 : 1
6	34.61 ± 2.29	35.32 ± 1.80	39.74 ± 5.67	39.93 ± 7.39	44.34 ± 6.63	50.41 ± 3.53 ^{△△}
12	38.64 ± 0.05	48.78 ± 2.49 ^{**}	48.86 ± 6.23	43.65 ± 4.54	50.52 ± 13.12	63.60 ± 4.95 ^{*△}
18	36.90 ± 9.06	45.79 ± 8.49	43.39 ± 2.51	43.58 ± 5.31	63.72 ± 7.62	65.49 ± 8.11

注: 同效靶比间, 与效靶作用时间 6 h 比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 同效靶作用时间, 与效靶比 10 : 1 比较, $\Delta P<0.05$, $\Delta\Delta P<0.01$

3 讨论

在建立既能保留人体肿瘤生物学特性, 且免疫功能相对正常的人肿瘤异种移植动物模型的过程中, 我们需要找到一种方便操作的检测小鼠脾细胞对人肿瘤细胞杀伤作用的方法以应对较大的检测需求^[10]。经典的⁵¹Cr 释放法、LDH 释放法、ELISPOT 技术和 MHC 四聚体染色等技术由于各种原因, 不能完全满足本实验对杀伤作用检测的要求。

流式细胞术是利用流式细胞仪进行的一种高速单细胞定量分析和分选技术, 能对检测的每个细胞进行多个参数的检测。本实验通过采用适当的不同荧光染料, 即可有效区分多种细胞及其存活状态, 而流式细胞术这种基于单细胞水平上的检测手段也保证了多种细胞共检测时各种细胞间数量差距较大时检测的准确性和可靠性。

本文对流式细胞术检测小鼠脾细胞对人 HepG2 细胞杀伤活性的方法进行了初步的标准化探讨: CFSE 和 PI 双染可有效区分各细胞群, 实验中采用

的各浓度 CFSE 对人肝癌 HepG2 细胞未见明显毒性。CFSE 标记人肝癌 HepG2 细胞荧光强度的时间动力学分析表明, 2.5 $\mu\text{mol/mL}$ 和 5.0 $\mu\text{mol/mL}$ 的 CFSE 标记的 MFI 值在 6~12 h 更为稳定, 且效靶作用时间为 12 h 的杀伤率较 6 h 高, 所以确定效靶作用时间为 12 h。在对效靶比的考察中, 结果表明 10 : 1 和 100 : 1 为适宜效靶比, 但考虑在模型建立过程中, 需对新生小鼠的脾细胞进行特异杀伤活性检测, 可能存在采集的脾细胞数量较少的情况, 故确定效靶比为 10 : 1。最终确定的实验方法为: 24 孔板接种 HepG2 细胞, 贴壁, 至细胞汇合度约 80% 时, 以 2.5 $\mu\text{mol/mL}$ 的 CFSE 标记 10 min, PBS 洗 1 次, 加入含 10% 胎牛血清 DMEM 高糖培养基调整浓度的小鼠脾淋巴细胞悬液, 以效靶比 10 : 1 相互作用 12 h, 收集细胞, PBS 冲洗, 加入 PI 至终浓度为 12.5 $\mu\text{g/mL}$, 上流式细胞仪检测细胞的存活率, 并计算杀伤率。

本方法可有效、精确评价小鼠脾淋巴细胞对人肝癌 HepG2 细胞的杀伤作用, 为后续模型的建立打下了基础。

参考文献:

- [1] Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models [J]. *Nat Rev Cancer*, 2015, 15(5):311-316.
- [2] Desmond-Hellman S, Rosen ST. China plans large center for PDX models [J]. *Cancer Discov*, 2014, 4(2):136-137.
- [3] Ada GL, Nossal G. The clonal-selection theory [J]. *Sci Am*, 1987, 257(2):62-69.
- [4] 王甫厚, 陈绍先, 郭彩云, 等. LDH释放法测NK细胞毒的方法学研究[J]. *中国免疫学杂志*, 1990 (2):115-117.
- [5] 童骁, 沈弢, 梁华, 等. 利用流式细胞术测定CTL活性方法在EIAV免疫学中的应用[J]. *中国病毒学*, 2005. 20(6): 642-646.
- [6] 卫江波, 徐然然, 付志浩, 等. 疫苗诱导的特异性细胞杀伤活性检测方法的建立[J]. *中国生物制品学杂志*, 2012, 25(12):1680-1683.
- [7] 包晶晶, 林海霞, 马璟. CFSE标记技术的研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2010, 5:461-464.
- [8] Bocharov G, Luzyanina T, Cupovic J, et al. Asymmetry of cell division in CFSE-Based lymphocyte proliferation analysis [J]. *Front Immunol*, 2013, 4:264.
- [9] 刘英杰, 李景华. 低浓度乙醇对人肝癌 HepG2 细胞的杀伤作用[J]. *解剖学报*, 2016, 47(2):228-233.
- [10] 李姗姗, 舒昀, 陈来, 等. 妊娠小鼠子宫内胎鼠腹腔注射人肿瘤 HepG2 细胞对胎鼠生长发育的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(7):33-42.

Development of a Method for Determination of Cytotoxicity Activity of Mouse Splenic Lymphocytes on Human HepG2 Cells

CHEN Li-Ling, ZHONG You-Bao, LIU Xuan, CHEN Lai, YUAN Ke-Wang, HUANG Li-Ting, LI Shan-Shan
(Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004, China)

[Abstract] Objective To develop a method for evaluation of the cytotoxicity activity of mice splenic lymphocytes to human HepG2 cells based on flow cytometry(FCM), in addition to ensure the efficiency of evaluation of the cytotoxicity activity of mice splenic lymphocytes to human HepG2 cells in the process of establishing an animal model of human tumor xenotransplantation, which can preserve the biological characteristics of human tumors, meanwhile, has relatively normal immune function.

Methods Human HepG2 cells were labeled with CFSE (carboxyfluorescein diacetate, succinimidyl ester) and treated with anhydrous ethanol to mimic the cytotoxic effect of cytotoxic killer cells, then determined by FCM after propidium iodide(PI) staining, based on which the concentrations of CFSE and PI and time for treatment were optimized. The lymphocytes were isolated from spleen of mice as effector cells and human HepG2 cells were target cells. A procedure was developed based on the optimization of conditions including the action time and ratio between effector and target cells. **Results** The cells were divided into CFSE⁺PI⁻, CFSE⁺PI⁺, CFSE⁻PI⁺ and CFSE⁻PI⁻ groups by CFSE/PI staining, and the survival and killed cells were well distinguished. The concentration of CFSE was 2.5μmol/mL, the optimal action time between effector and target cells was 12 h, and the effector to target cell ratios of 10 : 1 was adopted. **Conclusions** A method for evaluation of the killing activity of mice splenic lymphocytes to human HepG2 cells based on FCM was successfully developed, which provided a reference for evaluating the killing effect of animal splenic lymphocytes on xenogeneic cells.

[Key words] Mouse; Splenic lymphocytes; Human HepG2 Cells; Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester(CFSE); Propidium iodide(PI); Flow cytometry(FCM); Cytotoxicity activity

应用于行为学研究中八臂迷宫实验方法的改良

刘 波^{1,2}, 王 杨³, 李志杰^{1,2}

(1. 中国医科大学附属盛京医院实验研究中心, 沈阳 110004;

2. 辽宁省环境与代谢疾病动物模型研究与应用重点实验室, 沈阳 110004;

3. 辽宁省肿瘤医院结直肠外科, 沈阳 110042)

[摘要] 目的 探讨一种简易有效的新型八臂迷宫实验方法。方法 选用 20 只雄性成年 SD 大鼠, 分为传统方法组即对照组和改良电加热方法组即实验组, 每组 10 只。于对照组食饵臂末端放置食饵, 非食饵臂不放置食饵。实验组在非食饵臂末端放置加热装置作为错误惩罚外, 其他条件与对照组相同。记录并比较实验大鼠于两种迷宫探索移动距离、时间、速度、进臂次数指标。结果 与对照组相比, 实验组大鼠移动距离和探索时间明显缩短且进入错误臂次数明显减少。结论 使用改良电加热八臂迷宫实验方法能在训练 7 d 后更准确有效评估大鼠空间记忆学习能力, 可作为一种有效的实验新方案。

[关键词] 八臂迷宫; 学习记忆检测; 行为学; 动物实验

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)03-0226-05

八臂迷宫是一种研究动物空间记忆的迷宫模型, 主要用于不同药物处理以及疾病模型下动物学习、记忆、觅食策略、空间认知等多方面的研究^[1]。它由八边形中央区和与其连接的八条工作臂组成。实验者通过在特定食饵臂末端放入食饵作为对进入该臂的奖赏, 而在其余臂内不放食饵或通过刺激手段惩罚实验动物的方式对实验动物进行迷宫觅食训练。动物在饥饿驱使下探索迷宫寻找食饵, 通过一定时间的训练后, 可对迷宫各臂进行自由探索并成功躲避没有食饵的工作臂完成觅食。通过水, 电等刺激-应答模块建立完整的条件、非条件环境刺激, 配合视频采集系统记录实验动物觅食或逃避策略, 提供灵敏且易于操作的技术以分析不同药物处理或疾病模型损伤对记忆相关脑区的影响, 用于评估发育神经损伤处理对啮齿类动物空间学习记忆认知的影响^[2]。

目前大多文献采用的传统八臂迷宫实验方法在实际操作中的训练周期长达 2~4 周。实验动物成功躲避无诱饵臂端快速找到食饵臂端概率较低, 且单次探索时间长或是训练次数过多, 不能在短时间合理训练频率下有效评估空间学习记忆能力, 无法方便服务于实验者快速有效完成实验^[2]。为此本实验应用改良电加热条件刺激八臂迷宫装置探索新型八臂迷宫实验方法。

1 材料与方法

1.1 动物

选取清洁级雄性 SD 大鼠 20 只, 体质量(200 ± 10)g, 由辽宁长生生物技术股份有限公司提供[SCXK(辽)2015-0001], 随机分为 2 组, 对照组 10 只按照传统八臂迷宫方法进行训练, 实验组 10 只按照改良方法进行训练。实验开始前一周所有大鼠开始控制摄食量, 每日定时投喂饲料 10 g/只, 控制体质量保持在原体质量的 80%~85%, 饮水不限[SYXK(辽)2017-0004]。并于固定时间对将要进行实验的大鼠实施抚摸安抚以适应环境, 并于实验开始前禁食 12 h。

[收稿日期] 2019-02-27

[作者简介] 刘 波(1986-), 男, 助理实验师。

E-mail: 18940257719@189.cn

[通信作者] 李志杰(1968-), 女, 教授, 研究员, 博士生导师。

E-mail: lizhijie68@hotmail.com

1.2 仪器设备

视频追踪系统: Ethovision XT 小动物视频轨迹行为学分析系统, 购自荷兰 Noldus 公司; 箱体: 标准大鼠八臂迷宫箱体, 尺寸为单臂长 425 mm, 宽 145 mm, 高 225 mm, 购自北京众实科技有限公司; 奖励食饵: 经⁶⁰Co 辐照灭菌的市售生瓜子仁; 惩罚装置: 4 个电辅助加热装置, 尺寸 100 mm × 100 mm, 购自江苏省东台市正龙电热电器厂; 参考物: 各臂内贴不同形状参考物(以加强实验过程中动物对周围环境的记忆)。

1.3 实验方法

第 1 日: 让大鼠适应迷宫环境。将禁食 12 h 的 2 组大鼠随机各再分为 5 组, 每组 2 只。将迷宫闸门同时打开并在各臂末端及中央区域各投放 5 个瓜子仁作为食饵, 2 只大鼠同时放入迷宫中央区域, 让其自由摄食、探究 10 min, 每日训练 2 次。以大鼠后肢完全进入臂门记为进入该臂 1 次。

第 2 日: 重复第 1 日的训练。实验人员于训练开始前轻柔安抚动物 5~10 min, 使其放松地自由探索迷宫环境。

第 3 日: 迷宫及食饵位置保持不变, 每只大鼠单独进入迷宫训练, 使其大胆独自探索迷宫环境。每只鼠在单次训练结束后用体积分数 75% 酒精喷洒擦拭箱体以去除气味滞留。

第 4 日: 为对照组大鼠设定特定食饵臂以及空食饵臂, 例如 1 号动物食饵臂 1, 3, 5, 6; 空食饵臂为 2, 4, 7, 8。实验组大鼠设定固定食饵臂及电加热惩罚臂, 例如: 1 号动物食饵臂为 2, 4, 5, 8; 电加热惩罚臂为 1, 3, 6, 7。在每个食饵臂投放 1 颗瓜子仁作为食饵。电加热惩罚装置温度设定为 60 °C。电加热惩罚臂末只放置电加热装置而不放食饵。实验者将大鼠轻柔地放入至八臂迷宫中央, 适应环境 30 s 后同时打开闸门让其自由探究直至吃完食饵或总探索时间达 10 min 结束训练, 每日训练 2 次。

第 5 至第 7 日: 重复第 4 日的训练。

第 8 日: 连接视频轨迹跟踪采集系统, 设定大鼠编号及采集信息, 只在对应编号的食饵臂放置 1 颗瓜子仁作为食饵, 而在其他臂中不做任何处理。每只鼠在实验结束后用体积分数 75% 乙醇喷洒擦拭箱体以去除气味滞留。实验者轻柔地将大鼠放置于迷宫中央, 适应环境 30 s 后同时打开闸门并开始记录其自由探究运动轨迹。软件分析 2 组大鼠移动距离、移动速度、总体耗时、参考记忆错误以及工作记忆错误等实验指标, 以评估两种方法对大鼠空间学习记忆探索能力。工作记忆错误(working memory errors), 即在同一次实验中大鼠再次进入已经吃过食饵的臂; 参考记忆错误(reference memory errors), 即在一次实验中动物进入非食饵臂。

1.4 统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用统计软件 SPSS 22.0 进行统计分析, 组间均数比较使用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 平均移动距离、探索时间和移动速度

分析第 8 日采集的视频轨迹可知, 与对照组相比, 实验组完成实验的平均移动距离和平均探索时间差异有统计学意义($P < 0.01$), 而平均移动速度差异无统计学意义($P > 0.05$)(表 1), 表明本实验中使用的加热装置不会对其运动能力造成影响。

2.2 参考记忆错误和工作记忆错误百分比

分析 2 组大鼠第 8 日采集视频轨迹可知, 与对照组相比, 实验组完成实验的参考记忆错误百分比存在极显著差异($P < 0.01$)且小于 15% 达到训练标准。而工作记忆错误百分比无显著差异($P > 0.05$)(表 2)。

2.3 第 7 日训练结果

在训练第 7 日, 2 组大鼠均能在 10 min 内成功完成探索任务。但对照组大鼠完成探索所需时间明显长于实验组。

表 1 平均移动距离、探索时间和移动速度

组别	<i>n</i>	平均移动距离/cm	平均探索时间/s	平均移动速度/cm · s ⁻¹
对照组	10	887.80 ± 55.99	145.30 ± 19.73	9.21 ± 1.68
实验组	10	451.30 ± 16.38*	66.92 ± 7.68*	7.51 ± 0.82

注: 与对照组比较, * $P < 0.01$

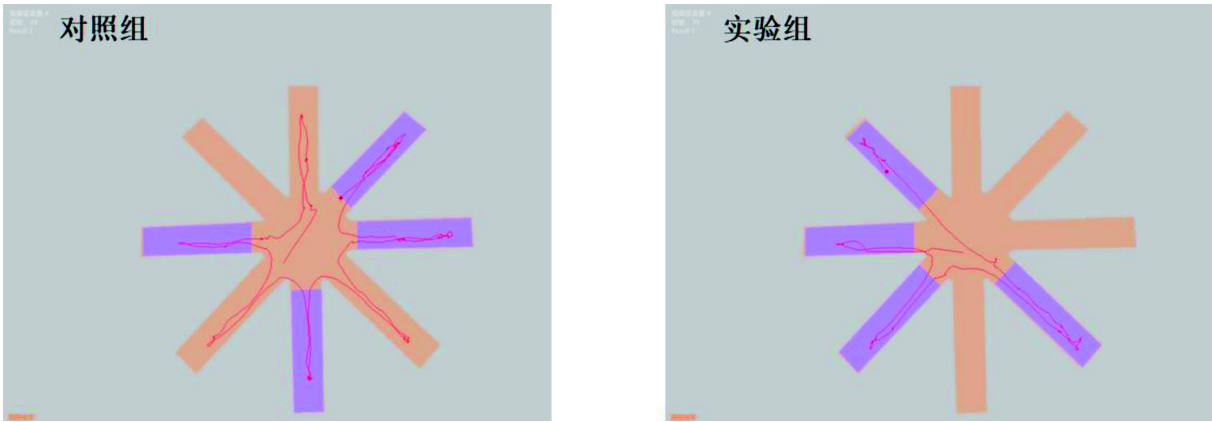
表 2 探索过程的参考记忆错误和工作记忆错误百分比

组 别	<i>n</i>	参考记忆错误 百分比 /%	工作记忆错误 百分比 /%
对照组	10	41.56 ± 1.83	3.25 ± 2.24
实验组	10	4.00 ± 2.67**	4.00 ± 2.66

注: 与对照组比较, ***P*<0.01

2.4 运动轨迹图

通过视频轨迹跟踪系统轨迹(图 1)可见, 对照组大鼠在传统方式训练 7 d 后无法达到八臂迷宫实验追踪测试标准, 而实验组大鼠在改良实验方法训练 7 日后均达到八臂迷宫实验追踪测试标准。



红色线为大鼠运动轨迹, 橙色区域为非食饵臂及迷宫中央区, 紫色区域为食饵臂
图 1 两组实验动物运动轨迹图

3 讨论

八臂迷宫又称放射性迷宫, 该装置已广泛应用于检测药物作用或疾病模型损伤下啮齿类动物大脑空间学习记忆能力^[3]。八臂迷宫实验准确敏感地反映脑空间学习记忆功能, 使其成为检测啮齿类动物空间记忆的重要实验方法之一。空间记忆又分为参考记忆和工作记忆。工作记忆属于程序性记忆范畴, 是在皮层 - 纹状体系统调控下完成的对进行中工作任务的重要信息的短期存储; 参考记忆则是空间定位物体本身以及物体与食饵的相对关系^[4]。海马结构在短期记忆向长期记忆转变和空间学习记忆功能中发挥至关重要的作用^[5]。

实验者可通过分析实验动物运动轨迹参数, 客观反映实验动物在不同处理条件下特定脑区空间分离记忆能力^[6]。然而参考国内外诸多文献^[2,3,11]表明, 八臂迷宫实验操作目前没有标准统一的工作流程。想要达到最终追踪测试标准即工作记忆错误和参考记忆错误均小于 15%, 通常需要 2~4 周甚至更长时间。本实验中, 对照组大鼠在训练 7 d 后虽然能在 10 min 内完成实验探索, 但参考记忆错误(平均值 41.56%)远超 15% 的要求。证明传统训练方式

无法在 7 d 内使大鼠达到最终测试标准。所以非常需要针对大鼠行为特点的新型训练设备和相对规范的操作流程。

本实验创新性采用在无食饵臂增加电加热设备刺激大鼠足底的改良八臂迷宫实验方案。并且通过实验证明相对于传统方法, 此方案能在连续 7 d 的训练过程中使大鼠在八臂迷宫中快速准确完成觅食活动。实验结果对比中表明, 两组大鼠均能对陌生的八臂迷宫环境进行自主探索觅食。在分析觅食策略中发现, 应用改良实验方法在相同训练时间内能显著缩短觅食运动平均移动距离和探索时间, 更好体现动物进化中优先选择食饵策略。分析两组大鼠平均运动速度可知, 改良实验中 60 ℃ 的足底热刺激对大鼠运动能力无明显影响。证明相对于其他水、光、电强刺激, 合理温度的热刺激更能降低受试动物的应激概率, 以免出现实验动物因过于恐惧停止探索或强刺激作用下的恐惧情绪对空间记忆形成影响等所致实验失败现象^[2]。除此之外, 与对照组相比, 实验组大鼠参考记忆错误百分比有极显著降低, 证明改良实验方法有利于增强大鼠对食饵臂和非食饵臂空间记忆。有趣的是, 两组实验结果中工作记忆错误百分比无统计学意义, 提示改良实验

方法对实验动物短时记忆无显著影响,再次表明此方案中的热刺激条件不会造成实验动物的应激反应。

综上所述,本实验采用改良电加热八臂迷宫设备配合参考诸多国内外权威文献及多次实验的改进,形成的实验操作流程能在训练7 d后完成检测大鼠空间学习记忆的八臂迷宫实验。相比于传统实验方法,改良迷宫设备造价低廉,价格优势明显,且操作流程简单易学,并能显著缩短迷宫训练周期,为更好评价实验动物空间分离记忆功能检测提供新方案。

参考文献:

- [1] Penley SC, Gaudet CM, Threlkeld SW. Use of an eight-arm radial water maze to assess working and reference memory following neonatal brain injury[J]. *J Vis Exp*, 2013(82): 50940. doi: 10.3791/50940.
- [2] Clelland CD, Choi M, Romberg C, et al. A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation [J]. *Science*, 2009, 325(5937):210-213.
- [3] Hall BJ, Cauley M, Burke DA, et al. Cognitive and behavioral impairments evoked by low-level exposure to tobacco smoke components: comparison with nicotine alone[J]. *Toxicol Sci*, 2016, 151(2):236-244.
- [4] 夏猛, 张丽萍, 李庆和. 加味温胆汤对抑郁模型大鼠八臂迷宫空间学习记忆能力的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2013, 40(4):611-613.
- [5] Soellner DE, Grandys T, and Nunez JL. Chronic prenatal caffeine exposure impairs novel object recognition and radial arm maze behaviors in adult rats[J]. *Behav Brain Res*, 2009, 205(1):191-199.
- [6] 周赛君, 何金彩, 陈江帆, 等. 腺苷A2A受体基因敲除对小鼠的空间参考记忆和工作记忆的影响[J]. *中国行为医学科学*, 2008, 17(6):517-519.
- [7] Pan YW, Chan GC, Kuo CT, et al. Inhibition of adult neurogenesis by inducible and targeted deletion of ERK5 mitogen-activated protein kinase specifically in adult neurogenic regions impairs contextual fear extinction and remote fear memory[J]. *J Neurosci*, 2012, 32(19):6444-6455.
- [8] Hwang L, Choi IY, Kim SE, et al. Dexmedetomidine ameliorates intracerebral hemorrhage-induced memory impairment by inhibiting apoptosis and enhancing brain-derived neurotrophic factor expression in the rat hippocampus[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(5):1047-1056.
- [9] 景波, 吕程, 于建, 等. 苜蓿总黄酮对记忆障碍模型小鼠学习记忆能力的影响[J]. *华西药理学杂志*, 2016, 31(3):239-242.
- [10] Alzoubi KH, Mayyas FA, Mahafzah R, et al. Melatonin prevents memory impairment induced by high-fat diet: Role of oxidative stress[J]. *Behav Brain Res*, 2018, 336:93-98.
- [11] Cauley M, Hall BJ, Abreu-Villaca Y, et al. Critical developmental periods for effects of low-level tobacco smoke exposure on behavioral performance[J]. *Neurotoxicology*, 2018, 68:81-87.
- [12] 张菲菲, 程艳伟, 于敏敏, 等. 大鼠癫痫持续状态后认知功能变化模式及海马脑红蛋白表达水平的实验研究[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2017, 44(5):501-506.
- [13] Olton DS and Papas BC. Spatial memory and hippocampal function[J]. *Neuropsychologia*, 1979, 17(6):669-682.
- [14] Leutgeb JK, Leutgeb S, Moser MB, et al. Pattern separation in the dentate gyrus and CA3 of the hippocampus[J]. *Science*, 2007, 315(5814):961-966.
- [15] Hussein AM, Aher YD, Kalaba P, et al. A novel heterocyclic compound improves working memory in the radial arm maze and modulates the dopamine receptor D1R in frontal cortex of the Sprague-Dawley rat[J]. *Behav Brain Res*, 2017, 332: 308-315.
- [16] van Praag H, Schinder AF, Christie BR, et al. Functional neurogenesis in the adult hippocampus [J]. *Nature*, 2002, 415(6875):1030-1034.
- [17] Allen RJ, Vargha-Khadem F, Baddeley AD. Item-location binding in working memory: is it hippocampus-dependent? [J]. *Neuropsychologia*, 2014, 59:74-84.
- [18] Nakashiba T, Young JZ, McHugh TJ, et al. Transgenic inhibition of synaptic transmission reveals role of CA3 output in hippocampal learning[J]. *Science*, 2008, 319(5867): 1260-1264.
- [19] 朱乔, 于建云, 曹珍珍, 等. 一次性与三重性脑震荡鼠八臂迷宫逆行性遗忘变化研究[J]. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2010, 9(2):105-108.
- [20] Levin ED. Learning about cognition risk with the radial-arm maze in the developmental neurotoxicology battery[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2015, 52(Pt A):88-92.
- [21] Sebastian V, Diallo A, Ling DS, et al. Robust training attenuates TBI-induced deficits in reference and working memory on the radial 8-arm maze[J]. *Front Behav Neurosci*, 2013, 7:38.

An Modified Eight-arm Maze Experiment Method in Behavioral Research

LIU Bo^{1,2}, WANG Yang³, LI Zhi-jie^{1,2}

(1. Medical Research Center, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang 110004, China;

2. Liaoning Key Laboratory of Research and Application of Animal Models
for Environmental and Metabolic Diseases, Shenyang 110004, China;

3. Department of Colorectal Surgery, Liaoning Cancer Hospital and Institute, Shenyang 110042, China)

[Abstract] **Objective** To identify a simple and effective experimental method for eight-arm maze study. **Methods** Twenty adult male SD rats were divided into a traditional method group (control group) and a modified electric heating pad method group (test group) ($n=10$). The bait was only placed at the end of feeding arm in control group. The test group had the same conditions as control group except that the heating pad was placed at the end of the non-predator arm as a punishment tool. Recorded and compared the moving distance, time, speed and the entrance times of rat in the arms via software. **Results** Compared with the control group, the test group rats shortened the movement distance and explored time significantly, and reduced the errors times into the wrong arm significantly as well. **Conclusion** Compared with the traditional method, the modified electric heating pad method can evaluate the spatial memory learning ability of rats after 7-days-training more accurately and effectively, which can be used as an effective experimental method.

[Key words] Eight-arm maze; Spatial learning and memory; Behavior; Animal experiment

用吖啶橙-流式细胞仪技术检测间苯二胺、对苯二胺诱导的小鼠骨髓细胞微核率

陈秀娟, 江 漪, 李 敏, 李培宁, 孙 侠, 陈梓灵, 丘智峰, 黄宇锋
(广州质量监督检测研究院, 广州 511447)

[摘要] 目的 利用吖啶橙-单激光流式细胞仪(AO-FCM)检测间苯二胺(MPD)、对苯二胺(PPD)的小鼠骨髓细胞微核发生率, 建立 AO-FCM 微核自动化检测方法, 探讨 FCM 在化妆品原料致突变性检测中应用的可行性。方法 分别用剂量为 25.0 mg/kg、12.5 mg/kg、6.25 mg/kg 和 3.12 mg/kg 的 MPD 及 PPD 对小鼠进行处理。采用 FCM 检测小鼠骨髓中的嗜多染红细胞微核与传统显微镜检测的结果进行比较。结果 受试物组小鼠骨髓含微核的嗜多染红细胞数量均有相应的增多, 且微核率均随着浓度的增加而增高, 呈良好的量效关系。FCM 与传统显微镜检测所得的微核率呈良好的相关性 ($r=0.956$, $P<0.01$)。结论 FCM 具有客观性、特异性、高效性, 可代替传统显微镜用于检测化妆品原料对小鼠骨髓细胞微核的发生率, 评价其致突变性。

[关键词] 吖啶橙-流式细胞仪(AO-FCM); 微核试验; 骨髓细胞微核率; 间苯二胺(MPD); 对苯二胺(PPD); 致突变性; 化妆品原料

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)03-0231-05

微核(Micronucleus)也叫卫星核, 是真核类生物细胞中的一种异常结构, 是染色体畸变在间期细胞中的一种表现形式。应用小鼠骨髓红细胞微核试验 (Micronucleus test) 是一种能获得大量客观数据的遗传毒性试验方法之一, 该方法简便、易行、经济, 因而被广泛采用, 但传统的微核计数是实验人员借助显微镜完成的, 方法枯燥、耗时, 易受实验者主观因素影响, 而且 Giemsa 染色法特异性较差, 非特异着色颗粒有时很难与微核相区别, 影响实验结果判断。近年来流式细胞术在细胞学、临床医学、生物学、制药学和微生物学等多个领域中得到广泛应用^[1-4], 本文参照有关文献^[5-7], 利用小鼠骨

髓细胞经吖啶橙(acridine orange, AO)荧光染色, 采用单激光流式细胞仪(flow cytometer, FCM)检测骨髓细胞中含微核的嗜多染红细胞(micronucleated polychromatic erythrocytes)和含微核的成熟红细胞(micronucleated normochromatic erythrocytes), 通过与传统 Giemsa 人工显微镜检测法(Giemsa 人工法)比较, 建立 AO-FCM 自动化微核试验, 探讨 FCM 在化妆品原料致突变性检测中的应用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 雌性 KM 小鼠 50 只, 体质量 20~25 g, 由山东省济南朋悦实验动物繁育有限公司提供 [SCXK(鲁) 2014-0007]。饲养于本单位屏障环境动物设施 [SYXK(粤)2014-0137]。实验小鼠检疫合格后随机分组, 每组 5 只。实验过程中所有动物在同等条件下饲养, 自由饮水、摄食。

1.2 试剂与仪器

间苯二胺(MPD)、对苯二胺(PPD)^[3]均购自阿

[收稿日期] 2019-01-07

[基金项目] 广东省质监局科研项目(No.2017CZ04)

[作者简介] 陈秀娟, 女, 高级工程师, 研究方向: 化妆品、食品及其原料的遗传毒性。

E-mail: clover0815@foxmail.com

[通信作者] 黄宇锋, 男, 高级工程师/副主任, 研究方向: 化妆品、食品安全性评价。E-mail: 78649403@qq.com

拉丁试剂(上海)有限公司,其中PPD规格:100 g/瓶,纯度>99%,批号:H1829001,MPD规格:100 g/瓶,纯度>99.0%,批号:J1815296。环磷酰胺(CP)和(AO均购自上海源叶生物科技有限公司;TritonX-100购自美国Sigma公司;小牛血清购自美国Gibco公司;0.9%氯化钠溶液(NS)购自山东化鲁制药有限公司;其余均为国产市售分析纯试剂。

CytoFLEX FCM购自美国Beckman公司;Axio Lab A1显微镜购自德国蔡司公司;KDC-1044低速大容量离心机购自安徽中科中佳科学仪器有限公司。

1.3 试剂配制

固定液:十二烷基硫酸钠(SDS)3 mg + 0.05 mol/L, pH 6.8 Sorensen's 缓冲液 99 mL + 戊二醛 1 mL。

溶液A: Triton X-100 0.05 mL + 1.0 mol/L HCl 4.0 mL + NaCl 0.4385 g, 加水至 50.0 mL。

溶液B: 0.1 mol/L 柠檬酸溶液 37 mL + 0.2 mol/L Na_2HPO_4 溶液 63 mL + NaCl 0.877 g + EDTA- Na_2 0.034 g + 1 mg/mL AO 0.6 mL。

1.4 药物处理

受试物剂量组分别以 25.0 mg/kg、12.5 mg/kg、6.25 mg/kg 和 3.12 mg/kg 剂量^[7]腹腔注射 MPD 或 PPD。阳性对照组腹腔注射 40 mg/kg 的 CP, 阴性对照组给予同等容量生理盐水(NS)。注射量均为 10 mL/kg, 24 h 后以同样的剂量进行第 2 次染毒。

1.5 AO-FCM 法

于末次染毒 6 h 后处死小鼠,分离双侧股骨,用注射器吸取 400 mL 小牛血清将骨髓冲出,反复冲洗吹打,制成细胞悬液。取 2.5 mL 固定液于离心管中,在振荡混悬仪下边振荡边加入 100 mL 细胞悬液,固定 5 min, 1 250 r/min 离心 5 min, 去上清,细胞沉淀重新混悬于 100 mL 0.06 mol/L、pH 7.2 的 Sorensen's 缓冲液中。溶液 A 与溶液 B 在使用前置于 0 °C 冰箱放置 2 h,使溶液保持低温,加入 200 mL 溶液 A 与 800 mL 溶液 B,混匀,置于冰上避光染色 30 min。1 250 r/min 离心 5 min, 去上清,细胞沉淀重新混悬于 2.5 mL 0.06 mol/L、pH 7.2 Sorensen's 缓冲液中,用 FCM 进行测定。

FCM 的主要参数:前置角(0°)散射光(FSC),侧向角(90°)散射光(SSC)。DNA 荧光(FL1, 绿色, 525 nm), 刻度设置为对数; RNA 荧光(L4, 红色, 675 nm), 刻度设置为线性。采集速度控制在 1 500

± 500 个细胞/秒。每个样本采集 200 000 个细胞进行分析。利用 FCM 自带软件 CytExpert 2.2 的分区功能,去除有核细胞(Nucleated cells, NC),把 PCE、MNPCE、成熟红细胞(NCE)、MNNCE 划分为 4 个区,计算骨髓嗜多染红细胞微核率(fMNPCE)、骨髓成熟红细胞微核率(fMNNCE)、PCE/NCE。

1.6 Giemsa 人工法

对传统的 Giemsa 染色法进行了适当的改进:把上述剩余的骨髓细胞悬液以 1 000 r/min 离心 5 min, 去上清,细胞沉淀重新混悬于 40 mL 血清中,取 15 mL 制成骨髓细胞涂片,凉干后,甲醇固定 15 min,以 pH 6.8 Sorensen's 缓冲液配成浓度为 10% 的 Giemsa 染液,常温下染色 40 min,用纯净水冲洗,再用 0.004 % 柠檬酸润洗数秒后,马上用纯净水冲洗,凉干,用环保封片剂进行封片,镜检。每只小鼠分别记数 1 000 个 PCE,计数 MNPCE,计算 fMNPCE,以千分率表示。同时计数 200 个 PCE 时所见的 NCE 数,计算 PCE/NCE。

1.7 统计方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 22.0 统计软件进行统计分析,两个独立样本的非参数检验进行组间分析,并对两种方法进行相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 AO-FCM 法检测小鼠骨髓 fMNPCE、fMNNCE、PCE/NCE

用 FCM 前置角散射光(Forward angle scatter, FSC)和 DNA 荧光(DNA fluorescence, FL1)作二维散点图,可以明显看到细胞样本区分为 5 个群: NC(P1)、PCE(P2)、MNPCE(P3)、NCE(P4)、MNNCE(P5)。NC 与红细胞分界清楚, PCE 与 NCE 分界也较为清楚, PCE 与 MNPCE、NCE 与 MNNCE 的分区有明显的分界趋势。与阴性对照组比较, CP 处理组的有核细胞密度下降, MNPCE 及 MNNCE 区域的细胞密度明显增加,而阴性对照组的 MNPCE 及 MNNCE 所在区域未见明显的细胞群。CP 处理组与阴性对照组比较, fMNPCE、fMNNCE 升高有显著性差异 ($P < 0.01$)。MPD 和 PPD 各剂量的 MNPCE 及 MNNCE 区域的细胞密度明显增加,而且细胞密度随着浓度的加大而增加,有剂量 - 反

应关系(图1)。且MPD和PPD各剂量的fMNPCE、fMNNCE与阴性对照组比较有显著升高($P<0.01$)。PCE/NCE >1.0 ,显示MPD和PPD未对小鼠骨髓有抑制作用(PCE/NCE >1.0)(表1)。

2.2 Giemsa人工法检测小鼠骨髓fMNPCE、fMNNCE

细胞涂片Giemsa染色后,经0.004%柠檬酸润洗数秒,在显微镜下观察,PCE为灰蓝色,NCE呈淡黄或橘黄等鲜艳明亮的颜色,MN呈圆形或椭圆形,边缘光滑整齐,呈紫红色或蓝紫色。玻片

的背景清楚,PCE与NCE有明显的颜色差别,易于辨认。MPD和PPD各剂量的fMNPCEE、fMNNCE有明显有升高,与阴性对照组比较有显著性差异($P<0.01$)。PCE/NCE >1.0 ,显示MPD和PPD未对小鼠骨髓有抑制作用(表2)。

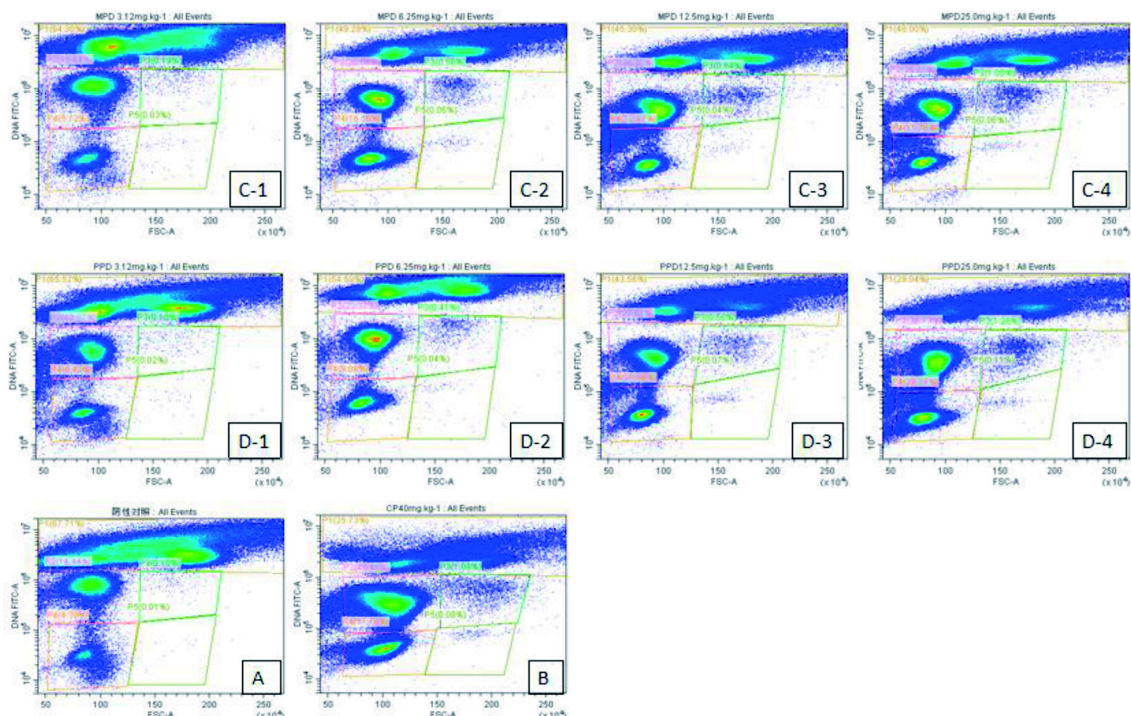
2.3 AO-FCM法与Giemsa人工法检测小鼠骨髓微核结果的比较

分析比较两种方法的fMNPCE,无论是AO-FCM法还是Giemsa人工法均显示MPD、PPD诱发小鼠骨

表1 用AO-FCM法检测小鼠骨髓的fMNPCE、fMNNCE、PCE/NCE

受试物	剂量/ $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	PCE/%	MNPCE/%	NCE/%	MNNCE/%	fMNPCE/%	fMNNCE/%	PCE/NCE
阴性对照	—	68.41 ± 2.05	0.24 ± 0.03	31.30 ± 1.97	0.04 ± 0.01	3.47 ± 0.39	1.41 ± 0.32	2.20 ± 0.20
CP	40	60.26 ± 4.69	2.01 ± 0.24	37.76 ± 4.76	0.13 ± 0.03	$32.46 \pm 4.41^{**}$	$3.38 \pm 0.96^{**}$	1.68 ± 0.32
MPD	3.12	64.96 ± 2.19	0.51 ± 0.08	34.08 ± 2.67	0.04 ± 0.02	$7.79 \pm 2.34^{**}$	1.16 ± 0.36	2.44 ± 0.25
	6.25	65.26 ± 3.39	1.36 ± 0.08	33.10 ± 3.51	0.08 ± 0.02	$20.38 \pm 1.16^{**}$	$2.32 \pm 0.41^{**}$	2.03 ± 0.31
	12.5	66.57 ± 2.80	1.84 ± 0.37	31.56 ± 3.18	0.08 ± 0.01	$26.83 \pm 4.22^{**}$	$2.60 \pm 0.22^{**}$	2.19 ± 0.35
	25.0	65.34 ± 3.37	2.36 ± 0.30	31.92 ± 3.52	0.11 ± 0.03	$34.82 \pm 3.39^{**}$	$3.49 \pm 1.00^{**}$	2.14 ± 0.32
PPD	3.12	70.67 ± 2.18	0.61 ± 0.64	28.09 ± 3.60	0.08 ± 0.02	$8.63 \pm 1.31^{**}$	$2.84 \pm 0.44^{**}$	2.46 ± 0.19
	6.25	68.98 ± 3.59	1.23 ± 0.15	29.54 ± 3.60	0.09 ± 0.02	$17.56 \pm 3.35^{**}$	$3.04 \pm 0.62^{**}$	2.41 ± 0.42
	12.5	64.56 ± 5.22	1.35 ± 0.24	33.87 ± 5.43	0.11 ± 0.03	$20.46 \pm 2.19^{**}$	$3.27 \pm 0.66^{**}$	2.01 ± 0.54
	25.0	65.04 ± 4.24	2.09 ± 0.11	32.84 ± 4.11	0.13 ± 0.02	$31.13 \pm 3.25^{**}$	$3.94 \pm 0.85^{**}$	2.07 ± 0.40

注:与阴性对照组比较, $^{**}P<0.01$



C-1、C-2、C-3、C-4: 分别表示3.12、6.25、12.5、25.0 mg/kg的间苯二胺;

D-1、D-2、D-3、D-4: 分别表示3.12、6.25、12.5、25.0 mg/kg的对苯二胺

A: 阴性对照(NS); B: 阳性对照(CP 40 mg/kg); P1: NC; P2: PCE; P3: MNPCE; P4: NCE; P5: MNNCE

图1 小鼠骨髓细胞群在FCM检测窗口的分布图

表2 用 Giemsa 人工法检测小鼠的骨髓 fMNPCE, PCE/NCE

受试物	剂量/mg • kg ⁻¹	PCE/个	MNPCE/个	NCE/个	MNNCE/个	fMNPCE/%	PCE/NCE [△]
阴性对照	—	5000	10	5000	1	2.00 ± 0.71	1.76 ± 0.19
CP	40	5000	144	5000	4	28.80 ± 3.19**	1.04 ± 0.05
MPD	3.12	5000	28	5000	1	5.60 ± 1.14**	4.39 ± 6.15
	6.25	5000	89	5000	1	17.80 ± 2.49**	1.58 ± 0.15
	12.5	5000	127	5000	2	25.40 ± 2.51**	1.21 ± 0.17
	25.0	5000	160	5000	3	32.00 ± 2.55**	1.09 ± 0.05
PPD	3.12	5000	34	5000	0	6.80 ± 1.30**	1.65 ± 0.12
	6.25	5000	79	5000	0	15.80 ± 2.68**	1.62 ± 0.10
	12.5	5000	95	5000	1	19.00 ± 2.55**	1.48 ± 0.10
	25.0	5000	141	5000	2	28.20 ± 3.11**	1.15 ± 0.07

注: 与阴性对照组比较, ** $P < 0.01$; [△]计算 200 个 PCE 时所见 NCE 个数之比; $n=5$

髓嗜多染红细胞微核率的升高, 结果一致。AO-FCM 法检测结果略高于 Giemsa 人工法检测结果, 但经 SPSS 22.0 分析显示, 二者间具有良好的相关性, 相关系数为 $r = 0.956$, $P < 0.01$ ^[10]。

3 讨论

苯胺类物质作为氧化型染发剂中最常见的染料, 其中常用的 MPD 和 PPD 均会对人体产生一定的危害^[10-12], 是国际公认的一种致癌物质^[13]。

随着 FCM 检测技术的完善, 流式细胞术在微核试验的检测方面有了长足的进步。国内外研究报道, 目前已建立了大鼠、小鼠的骨髓嗜多染红细胞微核的 FCM 检测方法。本实验在以往文献报道的研究基础上, 用 AO 染色, 采用单激光 FCM 检测了小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率, 探讨此方法用于化妆品原料的遗传毒性筛选和遗传毒性评价的可能性。经 AO 染色, PCE 含 RNA 被染成橘红色, 含 DNA 的细胞核及微核被染成黄绿色, 而 NCE 不含 DNA 也不含 RNA, 不被染色, 所以显示为暗影。理论上, 可利用 FL1(黄绿色荧光, 指示 DNA) 或者 FL4(红色荧光, 指示 RNA) 区分 PCE 与 NCE。本实验发现, FL4 不能把 PCE 与 NCE 区分开, 而 FL1 则能很好地对其进行区分, 但 FL1 不能把含微核的细胞与不含微核的细胞区分出来, 本实验利用 FL1 结合 FSC(指示细胞大小), 则能把细胞样本区分为 5 个群: NC、PCE、MNPCE、NCE、MNNCE。本实验结果显示: FCM 在检测 fMNPCE 的同时可检测 fMNNCE, 从 FCM 检测窗口的分布图可见 MNNCE 区域的细胞密度, 随着剂量升高

也有不同程度的增加, 且有剂量 - 反应关系。fMNNCE 是否也可能作为监测遗传损害的生物学指标之一呢? 非常值得今后更进一步深入研究。

本实验采用 AO-FCM 法检测出的小鼠骨髓 fMNPCE 稍高于 Giemsa 染色人工显微镜检测值。初步分析原因如下: ①可能是个别红细胞产生了较强的自发荧光, 造成结果偏高; ②可能是部分体积较大的 PCE 被误认为含微核的 PCE, 而导致假阳性的出现; ③可能是 Giemsa 人工法只计数 1 000 个 PCE, 样本量少而容易出现漏判, 导致假阴性结果。虽然用 AO-FCM 检测存在有假阳性的可能, 但流式细胞术检测的细胞数是几十万个甚至是更多的细胞, Giemsa 人工法一般只是计数 1000 至 2000 个 PCE, 流式细胞术检测细胞数量巨大, 对最终检测结果的影响仍是有限的。Giemsa 人工法中, 实验人员在显微镜中依靠细胞显示的染色判别 PCE、NCE、MNPCE 和 MNNCE, 理论上 PCE 呈灰蓝色, NCE 呈桔红色, MN 呈紫红色, 但是 Giemsa 复合染料中往往含有嗜天青颗粒, 很难与 MN 区别, 而且 PCE 与 NCE 细胞之间并没有明显的区分界限, 显微镜下仍难以将两者完全区分; 同时不同的实验人员或不同的实验室之间并无一致的评判标准, 这些因素都会影响结果的判断。

综上所述, 本实验结果表明 AO-FCM 自动化微核检测体系可替代人工显微镜, 用于小鼠骨髓嗜多染红细胞微核的检测。

参考文献:

- [1] 曹佳, 林真(日本), 余争平. 微核实验——原理、方法学

- 及其在人群监测和毒性评价中的应用[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000:12-39.
- [2] 赵书涛, 武晓东, 王策, 等. 流式细胞仪的原理、应用及最新进展[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(22):4378-4381.
- [3] 杨莉婷, 何丽, 何海宁, 等. 流式细胞术对生乳中微生物检测的应用研究[J]. 广西师范大学学报: 自然科学版, 2017, 35(2):112-116.
- [4] 李文华, 胡茂志, 严秋香, 等. 流式细胞术在营养和食品卫生评价中的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2015, 43(11):279-281.
- [5] 刘仕杰, 方展强. 流式细胞仪筛选环磷酰胺诱导骨髓嗜多染红细胞微核的技术方法[J]. 中国比较医学杂志, 2015(3): 53-59.
- [6] 王碧薇, 王利, 刘铁强, 等. 流式细胞仪检测 γ 射线照射后小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的研究[J]. 解放军医学杂志, 2011, 36(7):717-720.
- [7] 周长慧, 常艳, 王征, 等. 流式细胞术在微核实验中的应用[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2010, 24(6):548-551.
- [8] 徐燕英, 陈跃进, 汪雪生, 等. 国产氧化型染发剂对小鼠皮肤的亚慢性毒作用[J]. 环境与职业医学, 2004, 21(4):291-294.
- [9] 谭壮生, 李芳, 张懿. 氧化型染发剂毒性的初步研究[J]. 毒理学杂志, 2015(6):479-482.
- [10] Corbett JF, Sharma RK, Dressler WE. Cosmetic toxicology [M]. San Diego: Academic Press, 1999: 899-912.
- [11] 袁慧, 浦跃, 尹立红, 等. 对苯二胺氧化产物对小鼠经皮肤染毒的亚慢性毒性[J]. 环境与职业医学, 2002, 19(5):290.
- [12] 赵赞梅, 郭利霞. 职业性急性间苯二胺中毒的临床分析 [C]. 泰安: 全国劳动卫生与职业病学术会议[11], 2014.
- [13] 李旭东, 么鸿雁, 阚坚力, 等. IARC 公布的化学物质和混合物及暴露环境对人致癌性的综合评价(续二)[J]. 环境与健康杂志, 2009, 26(2):171-174.
- [14] Criswell KA, Krishna G, Zielinski D, et al. Use of acridine orange in: flow cytometric assessment of micronuclei induction[J]. Mutat Res, 1998, 414(1-3):63-75.
- [15] 胡冰冰, 杨录军, 周燕虹, 等. 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核单激光流式细胞仪自动化检测[J]. 癌变·畸变·突变, 2006, 18(1):19-22.
- [16] 张园园, 张吉, 刘仕杰, 等. 基于单激光流式细胞仪的微核自动化检测方法研究[J]. 中药新药与临床药理, 2012, 23(6):687-689+695.
- [17] 冯晓青, 杭学宇, 汪怡, 等. 流式细胞仪检测小鼠骨髓嗜多染红细胞微核方法的改进[J]. 毒理学杂志, 2015, 29(2): 106-109.

Detection of Micronucleus Rate of Mouse Bone Marrow Cells Induced by M-phenylenediamine and P-phenylenediamine with Acriding Organe- Flow Cytometry

CHEN Xiu-juan, JIANG Yi, LI-Min, LI-Peining, SUN-Xia, CHEN Zi-ling, Qiu Zhi-feng, HUANG Yu-feng
(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute, Guangzhou 511447, China)

[Abstract] Objective To detect the micronucleus rate of m-phenylenediamine and p-phenylenediamine in mouse bone marrow cells using the single-laser flow cytometry, and an automated experimental method for rapid detection of micronucleus rate in the laboratory was established to investigate the mutation detection of flow cytometry in cosmetic raw materials. **Methods** Mice were treated with m-phenylenediamine and p-phenylenediamine at doses of 25.0mg/kg、12.5mg/kg、6.25mg/kg、3.12 mg/kg respectively. Flow cytometry was used to detect the polychromatic erythrocyte micronucleus in mouse bone marrow compared with the results of traditional microscopy. **Results** The number of Micronucleated polychromatic erythrocytes in the test group was increased correspondingly, and the micronucleus rate was increased with the concentration, showing a good dose-effect relationship. Flow cytometry showed a good correlation with the micronucleus rate obtained by conventional microscopy ($r = 0.956$, $P < 0.01$). **Conclusions** Flow cytometric analysis is objectivity, specificity and high efficiency. It can replace the traditional microscope to detect the incidence of cosmetic raw materials on the micronucleus of mouse bone marrow cells and evaluate its mutagenicity.

[Key words] Flow cytometry; Micronucleus test; Frequency of micronucleated; M-phenylenediamine; P-phenylenediamine; mutagenicity; Cosmetic raw materials

一例食蟹猴肠套叠诊断与治疗

李良顺¹, 潘世友², 支元芳³, 白帅州³, 孙建华³, 宫丽崑³, 任进³

(1. 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201203;

2. 上海喜乐缘宠物医院, 上海 201299;

3. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203)

[摘要] 长期毒性试验中, 一只食蟹猴发生肠套叠, 结合临床症状、血液生化指标检测、触诊和B超等方法确诊, 采用体外按摩法复位套叠肠段, 复位后采取补充能量、解痉、限食等护理措施, 动物恢复良好, 毒性试验如期进行。结果表明, 触诊和B超相结合的方法, 可准确诊断早期肠套叠; 采用体外按摩法可有效治疗早期肠套叠, 且不影响长期毒性试验开展。

[关键词] 肠套叠; 食蟹猴; 非手术治疗; B超诊断

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)03-0236-03

肠套叠系指部分肠管及其肠系膜套入临近肠腔所致的一种肠梗阻^[1]。食蟹猴发生肠套叠时, 前期临床表现个体差异较大, 临床症状明显的个体, 表现为少食, 少动, 独自蹲坐于角落, 偶见弓背, 呕吐, 粘液便等。造成肠套叠的因素很多, 疾病或强烈的应激, 或剧烈疼痛, 都可导致肠套叠的发生^[2]。对幼龄猴而言, 母猴营养不良, 泌乳不足或品质下降; 突然受冷、乳温不足、乳头不洁等也会导致肠套叠的发生^[3]。肠套叠发生后, 如不及时干预治疗, 会导致动物死亡^[4]。手术是肠套叠最常用的治疗手段, 优点在于能够直接观察到套叠的肠段, 治疗彻底, 缺点在于动物术后恢复时间较长, 不适用于毒理试验过程中的动物, 因为手术会导致试验中断。在治疗肠套叠的报道中, 使用体外按摩法^[5]复位肠套叠的报道很少, 尤其在毒理试验过程中更为少见。2018年5月, 本中心发生一起长期毒理试验中食蟹猴肠套叠案例, 在使用B超确诊后使用体外按摩法复位, 动物恢复良好, 未影响试验进度, 现将该病例报告如下。

1.1 发病动物

患病动物为雌性食蟹猴, 约3.5岁, 饲养于中国科学院上海药物研究所动物房[SYXK(沪)2015-0027], 采用群养模式饲养(3只/笼), 笼具大小为2 m × 1.5 m × 2 m。毒性试验通过本所IACUC(实验动物管理和使用委员会)批准。饲料由北京科奥协力饲料有限公司提供, 垫料由苏州竹灵贸易有限公司提供。动物室控制温度20~26℃, 相对湿度在40%~70%, 控制光照/黑暗各12 h循环。

1.2 临床症状

2018年5月9日, 观察到该食蟹猴在笼舍内精神稍差, 不愿活动, 独自蹲坐于角落。随即将动物抓取保定, 检查发现其肛门附近少量红色分泌物, 体温37℃, 心率180次/分, 呼吸频率36次/分, 皮肤弹性降低, 轻度脱水。

1.3 诊断

1.3.1 腹部触诊 发病当日触摸动物腹部, 发觉腹部肌肉紧张, 动物抗拒行为明显, 发声, 提示疼痛。为了解该动物饮食和排便情况, 将该动物从群体中隔离, 单笼饲养。次日早上检查笼内未见粪便, 触摸腹部时, 动物反应同前日。用氯胺酮(8 mg/kg)肌肉内注射麻醉动物后, 腹部触诊, 可触及左上腹一段类香肠样硬物, 初步诊断为肠套叠。

1.3.2 采样检查 取少量肛周红色分泌物进行涂片镜检, 可见大量红细胞和白细胞。采集血样, 进

[收稿日期] 2018-08-08

[作者简介] 李良顺(1984-), 男, 兽医, 主要从事实验动物学研究。E-mail: lsli@cdser.simm.ac.cn

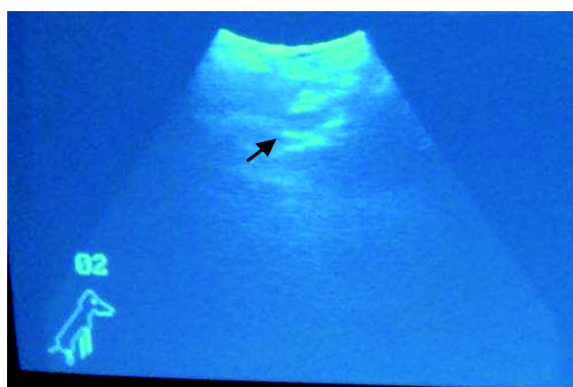
[通信作者] 任进(1958-), 女, 教授, 主要从事药物的毒性病理学研究。E-mail: Jren@cdser.simm.ac.cn

行血液学和血清生化分析,显示套叠后肌酸激酶(1 965 IU/L)明显高于正常水平,提示动物有强烈应激。

1.3.3 B超检查 将食蟹猴仰卧保定在专用手术操作台,使用TY-6858A-1 数字化型B超仪(手持式B超机),探头水平或垂直腹部来回缓慢移动,在左上腹探查同心圆结构,定位套叠部位(图1)。

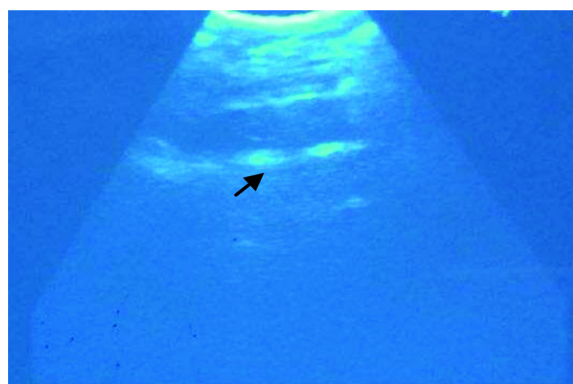
1.4 治疗

复位方法:通过腹部触诊找到套叠部位后,一手轻轻挤压套叠后段,另一手对套叠前端肠断进行捋压按摩,注意操作轻柔,避免造成损伤。复位后,触诊腹部,类香肠样硬物消失,使用B超仪确认(图2)。



箭头所指为同心圆结构,为横断面扫描

图1 肠套叠B超影像



箭头所指为复位后肠段矢状断面扫描

图2 肠套叠解套后B超影像

1.5 护理

复位后,对该动物进行如下护理:①单笼饲养;复位当日禁食不禁水;②补充适量新鲜果汁,连续

3 d;③补充维生素B6(0.5 mL : 50 mg),三磷酸腺苷(1 mL : 10 mg),溶于30 mL生理盐水中,静脉滴注,每日1次,连续3 d;④盐酸消旋山莨菪碱,4 mg,肌肉内注射,每日1次,连续3 d。

1.6 术后恢复情况

复位次日下午,动物开始排便。复位后第3日,添加少量颗粒料,动物精神食欲良好。复位7 d后,动物精神和采食恢复正常,兽医体检确认动物健康状况后,还原原笼群养。

该肠套叠食蟹猴,经体外按摩复位套叠肠段、合理护理后,在一周后恢复正常,整个治疗护理未影响毒理试验进程。

1.7 发病原因分析

本所食蟹猴为群养模式,符合欧洲动物福利标准,但食蟹猴群体内等级划分明显,常有因等级关系发生争斗现象。本案例中,该动物为弱势个体,发生肠套叠可能与争斗中强烈应激有关。根据本设施近5年统计数据,群养食蟹猴肠套叠的发生率约为0.2%。实践中,我们尝试通过控制动物个体差异、饲养密度和环境丰容等措施,尽量降低肠套叠的发生。

1.8 诊断和治疗注意事项

临床上比较常用的肠套叠诊断方法有触诊、X光和B超。X光诊断,能在早期发现肠套叠病例方便及时介入治疗^[6],准确率可达80%^[7]。但该方法用时较长,仪器相对昂贵,不易移动,很多实验室不具备使用条件。B超诊断肠套叠敏感性与特异性高,准确率可达98%以上^[8],且具有直观、重复性好、简便快速、无损伤、无疼痛和无副作用等优点^[9],实践中具有较高的应用价值。本案例中,采用触诊和B超相结合的方法,实现了肠套叠快速和准确诊断。

肠套叠发生后,常用的治疗方法为手术治疗,必要时需进行肠管截断。本案例中,食蟹猴后续仍需继续采集毒理试验数据,手术对动物影响大,恢复时间长,不宜采用。在早期发现前提下,采用体外按摩法复位,影响小,恢复快,适用于毒理试验中发病动物。

1.9 动物护理注意事项

肠套叠复位后,容易复发,因此复位后的护

理非常重要。实际操作中需要注意以下几点:①减少应激,复位后的食蟹猴应饲养于安静的环境中,避免群体中其它动物对其造成应激。②控制饮食,禁食颗粒料 48 h 以上,此间给予适量动物喜好的水果,果汁等。禁食期间密切关注动物排便及腹部鼓胀的情况,若观察到动物可正常排便且未见腹部鼓胀,可逐渐添加颗粒料至恢复正常饲喂,否则考虑套叠复发的可能。③辅助治疗,根据动物状况补充能量及营养,给予解痉药,防止套叠反复,如有必要给予抗生素治疗。

1.10 早期发现早期控制的重要性

早期发现是体外按摩复位疗法的前提条件,临床观察人员需熟练掌握实验动物的生活习性,行为特点等基础知识,当动物出现任何异常情况时,能够及时发现,并第一时间汇报兽医。

本案例中,兽医触诊初步诊断为肠套叠后,立即采取对动物禁食饲料的措施。次日一早,即将动物麻醉后进行确诊和治疗,有效控制了病情发展。本案例为体外按摩法治疗食蟹猴早期肠套叠的成功案例,对试验中早期肠套叠治疗具有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 李伟燎,唐华建,周小渔,等. 肠套叠空气灌肠前应用解痉药物的疗效评价[J]. 海南医学, 2018, 29(17):2480-2482.
- [2] Matsuo K, Inoue M, Shirai Y, et al. A rare case of primary small bowel de-differentiated liposarcoma causing intussusception: A case report [J]. 2018, 97(24):A251.
- [3] 许定泽, 赛白. 猕猴肠套叠 86 例[J]. 上海实验动物科学, 1990, 10(4):237.
- [4] 陈静. 一例川金丝猴肠套叠的病例报告[J]. 畜牧与饲料科学, 2011, 32(5):94.
- [5] 崔春生, 崔伟, 麻山河, 等. 犬肠套叠的病因与诊治[J]. 兽医临床, 2016, 4(324):91-93.
- [6] 杨德吉, 范涤, 尚学东. 犬的人工肠套叠初期钡灌肠影像观察[J]. 中国兽医科技, 1996, 26(7):31-32.
- [7] Martinez Sanz N, González Valverde FM. Intussusception after bariatric surgery[J]. J Gastrointest Surg, 2019, 23(3): 597-598.
- [8] 吴艳艳, 陈琴, 李治熹, 等. 超声引导下生理盐水灌肠复位治疗小儿肠套叠的临床价值研究[J]. 西南医科大学学报, 2018, 41(4):317-321.
- [9] 匡德宣, 叶尤松, 罗志武, 等. 恒河猴肠套叠的B超诊断与手术治疗[J]. 中国比较医学杂志, 2010, 20(9):79-82.

Diagnosis and Treatment for Intussusceptions in One Case of Cynomolgus Monkey

LI Liang-shun¹, PAN Shi-you², ZHI Yuan-fang³, BAI shuai-zhou³,
SUN Jian-hua³, GONG Li-kun³, REN Jin³

(1. Shanghai Jiao Tong University School of Agriculture and Biology, Shanghai 201203, China;

2. Shanghai Xi Le Yuan Pet Hospital, Shanghai 201299, China;

3. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China)

[Abstract] Intussusception occurred in a cynomolgus during a repeat dose toxicity study. Intussusception of cynomolgus was diagnosed by using the methods of clinical observation, hematology and plasma chemistry analysis, palpation and bultrasonic. Reset the intussusceptions by manually *in vitro*. The actions of supplying energy and antispasmodic drug and dietary restriction were performed for nursing. The animal recovered very well, and the toxicity study proceeded as scheduled. The results indicated that the inchoate intussusception could be correctly diagnosed by using the methods of palpation and bultrasonic; and the inchoate intussusceptions could be effective treated by manually *in vitro*, and the repeat dose toxicity study wouldn't be influenced.

[Key words] Intussusception; Cynomolgus monkey; Non-surgical therapy; Bultrasonic diagnostic

基于浏览器 / 服务器模式架构的高校 动物实验管理系统开发与应用

徐孝平, 张利棕, 潘永明, 周卫民, 蔡月琴, 王德军

(浙江中医药大学动物实验研究中心 / 比较医学研究所, 杭州 310053)

[摘要] 高校实验动物中心每日会产生大量的业务数据, 数据处理的效率直接体现了机构的管理水平和服务能力。本文简要介绍了浙江中医药大学动物实验研究中心动物实验管理系统的整体需求、总体架构、主要模块的操作流程和功能。系统开发结合了高校实验动物管理实际业务流程, 实现了实验动物福利伦理审批、实验动物订购、动物实验申请、饲养管理以及费用结算等工作的计算机信息化管理。

[关键词] 实验动物; 动物实验; 管理系统; 浏览器 / 服务器模式(B/S)架构

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)03-0239-05

实验动物是生命科学研究的重要支撑条件, 高校实验动物工作主要为医学、药学、生物、食品等学科的教学、科研提供服务, 其主要职责包括实验动物的代购和供应、实验动物的饲养和繁育、动物实验技术服务、功能实验室和动物实验仪器预约使用管理等^[1,2]。通过梳理、整合和优化实验动物中心(或动物实验中心)业务流程, 建立符合高校实验动物实际管理流程的计算机管理系统, 将有效提升管理水平和工作效率, 从而更好地为教学和科研工作服务。浙江中医药大学动物实验研究中心(以下简称“中心”)和南京语意生物科技有限公司合作开发了“动物实验管理系统”, 运行两年来, 极大地促进了中心管理工作的智慧化、规范化, 高效、便捷的服务赢得了科研人员的好评。现介绍如下。

1 动物实验管理系统的整体需求

动物实验管理系统包括科研人员的登记分类、

科研人员实验室准入的在线培训、实验动物福利伦理审查和批准、课题负责人进行研究课题的设立和相应实验负责人的授权等实验前信息的初始化功能, 以及实验动物代购、实验动物代饲养、动物实验技术服务、实验室和仪器使用的申请预约、审核等实验服务工作流程, 实验结束后需要对开展课题研究产生的动物费、饲养费、技术服务费进行结算。

2 动物实验管理系统总体架构(图 1)

本系统采用浏览器 / 服务器模式(B/S)架构, 基于 J2EE/XML 规范和技术标准创建, 使用 Apache OFBiz 框架实现实体、服务、消息、工作流和规则等引擎。管理系统兼容多种主流数据库(My sql、Oracle); 客户端实现跨平台支持多种操作系统(Windows、Linux、Mac OS), 支持 IE、Chrome 和 Firefox 等浏览器; 系统服务器也同时支持 Windows、Linux、Mac OS 等操作系统。

系统服务器要求: 主频 2.00 GHz 以上的酷睿 i5 或同级别处理器、4G 以上内存、500 GB 或以上硬盘。

3 动物实验管理系统的主要模块

3.1 会员管理模块

会员管理模块具有工作人员权限、工作小组设

[收稿日期] 2019-02-12

[作者简介] 徐孝平(1978-), 男, 高级实验师, 研究方向为实验动物与比较医学。E-mail: xxp@zcmu.edu.cn

[通信作者] 王德军(1975-), 男, 高级实验师, 研究方向为实验动物与比较医学。E-mail: wdj@zcmu.edu.cn

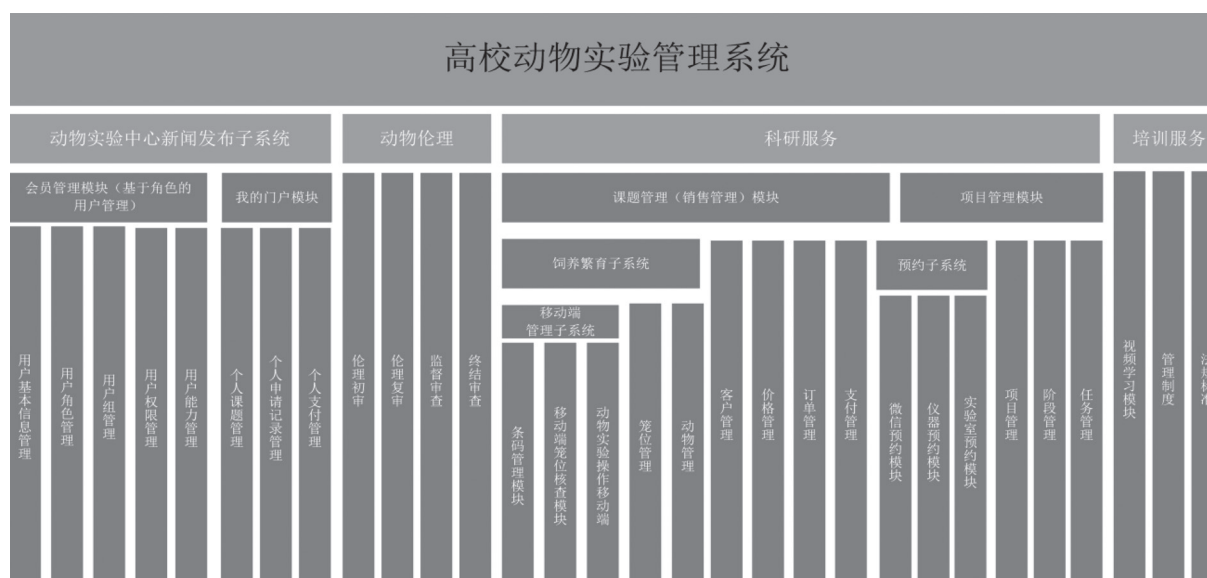


图1 高校动物实验管理系统架构图

置和网站用户审核等功能,设职员管理、内部会员组、审核客户等子模块。

“职员管理”用于中心内部员工用户名的设立和相关操作权限的设置;“内部会员组”用于设立中心各工作小组,并设立相应小组长,赋予小组长相应的权限;“审核客户”用于审核系统注册用户。

3.2 动物伦理模块

在中心开展涉及动物实验的课题研究,进行实验动物福利伦理审查是前置条件,因此在管理系统上也做了相应设置,科研人员在管理系统上进行各类动物实验申请需首先通过动物伦理审批。动物伦理模块设:我的申请、待初审的申请、未通过初审的申请、待复审的申请、未通过复审的申请、通过复审的申请、监督审查、终结审查、设置等子模块,子模块可按工作人员权限不同来设置。

“我的申请”用于科研人员进行“实验动物伦理申请”的在线填写,提交后可以在“我的申请”查看伦理申请的审核状态。工作人员在“待初审的申请”里查看还未初审的申请,负责初审人员审查科研人员填写内容的符合情况,决定是否通过初审,并给予相应的审核意见。参与复审的IACUC成员在“待复审的申请”里进行审查,决定是否通过复审,并给予相应的审核意见。IACUC成员在“通过复审的申请”里可查看所有已通过复审的“实验动物伦理申请”,并给予相应的编号。在动物实验实施过程中,兽医师对科

研人员的动物实验过程进行抽查监督,并在“监督审查”里填写相应意见。动物实验结束,经科研人员提出申请,IACUC成员对该项目进行伦理“终结审查”,生成动物实验伦理审查合格证明^[3]。工作人员在“设置”里可以添加填表说明,可以设置参与伦理审查复查的人数,伦理审查复审通过的比例标准。

3.3 我的门户模块

“我的门户”设:我主持的课题、我授权的课题、我的申请记录、我的支付记录等子模块。在“我主持的课题”里,课题负责人角色的科研人员可以新设课题,并将课题授权给其他科研人员,能查看正在进行的课题、已结束的课题,以及课题产生费用的明细记录。课题负责人授权的实验负责人能查看“我授权的课题”的相应信息。“我的申请”记录了通过系统申请的动物代购、饲养、技术服务等内容。科研人员在“我的支付”内可查看课题的账单、支付经费的记录。

3.4 销售管理模块

销售管理模块具有客户管理、价格管理、订单审核、经费结算等功能,设置:客户单位、客户管理、订单管理、课题管理、支付记录、结账管理、产品与价格、参数与配置等子模块,子模块可按工作人员权限不同来设置。

“客户单位”用于设立科研人员所属单位,由工作人员先编辑建立并分类,供科研人员注册用

户名时选择。“客户管理”用于编辑已通过审核的用户信息如联系信息、所属单位,赋予课题负责人角色,可进行重置密码,停用该用户等操作。“订单管理”用于审核科研人员的动物、饲养、实验技术服务、实验室和仪器使用的在线申请预约,所有的订单经选择后可自动生成确认单供科研人员签字确认。“课题管理”用于查看每个课题实时产生的费用,对于已完结的课题给予结束标记,结束的课题不允许进行任何实验申请。“支付记录”用于记录每个课题负责人已支付的费用情况。“结账管理”用于实时统计每位课题负责人已产生的费用和已付的费用,定期监测科研人员费用的清欠情况。“产品与价格”用于设置动物、饲养、饲料、技术服务等的价格。“参数与配置”用于设置产品的基础信息。

3.4 项目管理模块

由于动物实验技术服务的完成过程会存在工作任务的分配、实验数据的上传、实际服务数量与预约数量有出入等问题,销售管理模块无法完全支持,因此设立了项目管理模块。项目管理模块设置:所有项目、所有任务、工作组任务、我的任务、我已完成的任务、人力资源、基础设置等子模块,子模块可按工作人员权限不同来设置。

项目等同于课题负责人在系统中设立的研究课题,项目阶段等同于工作小组,任务等同于科研人员申请的技术服务,“所有项目”、“所有任务”显示的是工作人员能参与的所有项目和任务信息,可通过搜索选项进行筛选,每个项目里还能查看该项目的所有任务。工作小组组长能在“工作组任务”看到本小组需要完成的技术服务任务,并可对任务向本组成员进行分配。我的任务是组长分配下达的任务,该模块还显示属于本小组的任务,小组成员可以自己领用任务。“我已完成的任务”显示该工作人员之前已完成的所有任务。“人力资源”用于添加服务于项目的人员,并可设置组长和组员的角色,只有添加进人力资源的工作人员,才能被分配任务、领用任务。“基础设置”有设置项目阶段类型、关联项目阶段和工作小组的功能。

3.5 实验室和仪器预约管理模块

实验室和仪器预约管理模块用于实验室和仪器的增加和信息更新、预约的查看、预约的确认

等。模块分为预约和管理两个子模块,“实验室和仪器预约”可查看实验室和仪器的状态、预约情况,工作人员也可以替实验人员进行预约。“实验室和仪器管理”可添加、删除、暂停的实验室和仪器,更新实验室和仪器的信息。

3.6 饲养繁育管理模块

饲养繁育管理模块用于记录每个课题负责人每批动物的饲养情况,明确动物所在位置,记录动物进驻、处理以及非正常死亡而产生的饲养动物数量的减少和转基因动物繁育而产生的饲养动物数量增加(可按笼或按只计算),以此为依据来计算产生的饲养费用。饲养繁育管理模块设:参数与设置、品系管理、笼架管理、我的笼架、未导入订单和已导入订单等子模块,子模块可按工作人员权限不同来设置。

“参数与设置”用于系统内饲养设施、饲养房间、饲养笼架、饲养笼盒的创建和删除,设置动物的种类并链接对应的饲养工作组。“品系管理”用于设置动物品系名称,动物进入饲养设施时标记品系时使用。“笼架管理”用于把建立好的笼架授权给对应的饲养人员。“我的笼架”可展示饲养人员获授权管理的笼架内动物存栏情况,以及科研人员姓名、动物数量和性别等信息,饲养人员可以对存栏动物进行增减和移笼操作。“未导入订单”显示已通过审核的饲养申请,包含课题负责人和受权实验负责人的信息,饲养人员通过搜索相关动物种类,即可看到所在饲养组需导入的动物信息,选择导入动物即可将动物导入相应的饲养笼内,系统即日开始计算饲养情况。“已导入动物”显示已进入饲养设施的每批动物饲养数量存栏情况,可以查看每批动物数量增减情况。

4 动物实验管理系统的操作

4.1 科研人员的操作

科研人员登陆系统后,需先进行实名注册,由工作人员进行审核,分课题负责人和实验负责人两种角色。对于有科研经费的申请人员给予课题负责人角色,具有设立课题的权限,并可设立授权的实验负责人,实验负责人角色无设立课题的权限。所有通过审核的科研人员,需接受在线视频培训,培训结束得到在中心进行动物实验资格证书后,才能进行相关的申请预约。课题负责人需先

进行伦理申请,通过初审、复审后,在“我的门户”-“我主持的课题”内设立课题,并授权相应的实验负责人,一个伦理申请对应一个课题,可同时设立多个课题。课题设立后课题负责人和被授权的实验负责人,均能在线进行动物代购、动物饲养、技术服务申请和实验室和仪器的预约,如同时有两个以上课题同时进行,在申请和预约时需选择相应的课题,以便分别记录不同课题产生的实验申请。

4.2 销售管理人员的操作

销售管理分销售管理员和销售员两种角色,销售管理员有销售员的所有权限,销售员在“订单管理”里对动物代购、饲养、技术服务等的申请进行审核,可批量汇总导出动物订购的信息;在“课题管理”能查看每个课题订单明细,按日期导出每个账单的账单文件,对已结束的课题更改状态。销售管理员在“客户单位”添加或编辑客户单位信息,在“客户管理”编辑客户的基础信息,在“支付记录”里记录科研人员的经费支付情况,在“产品价格”里进行产品的添加和价格的更新,在“结账管理”里查看每个客户的费用清欠情况。

4.3 饲养人员的操作

饲养人员分饲养员、饲养组组长、饲养管理员三种角色,后一种角色权限包括前一种角色的所有权限。饲养员在“未导入订单”里选择导入属于自己饲养小组动物饲养订单;在“已导入订单”里查看每批动物饲养数量变化记录,可对笼内动物进行增减、移笼的操作;饲养组组长可以向饲养员授权饲养笼架,饲养员只能操作经过授权的饲养笼架;饲养管理员能在系统上添加饲养设施、房间、笼架、饲养笼,添加动物的类型包括品种品系并关联对应的饲养组,饲养员导入动物时可选择标注进入饲养笼架动物的品系。

4.4 实验技术人员的操作

实验技术人员分工作小组成员、工作小组组长两种角色,后一种角色权限包括前一种角色的所有权限。组员在项目管理模块“我的任务”里可看到自己正在承担的任务,任务主要由组长分配,也可在“我的任务”下方去搜索属于本小组的任务并点击领取。在完成任务后,点“提交数据”可上传该任务的实验数据,当实际服务数量与预约

数量有差异时在“提交数据”里可更改成实际服务数量,勾选完成任务并保存,该任务变成完成状态,实际数量直接在订单管理中变更,数据固化;如服务数量与预约无出入,直接点“把状态设为完成”,该任务变成完成状态。组长在工作组任务里,对任务按工作需要分配给组员。

4.5 伦理审查人员操作

伦理审查人员分为伦理审查初审员、伦理审查管理员两种角色,后一种角色权限包括前一种角色的所有权限。伦理审查初审员,主要针对伦理申请的格式进行审查,不符合要求的,填写修改意见后,勾选不通过审核,待科研人员修改后再提交;符合要求的,勾选通过审核,进入待复审阶段。伦理审查管理员对“待复审的申请”里的伦理申请,根据伦理审查的要求做出是否通过复审的决定,如不通过,填写相应意见,系统设立了2/3伦理审查管理员同意即通过复审的规则。不通过复审的伦理审查再次退回到科研人员,通过复审的伦理申请,伦理审查管理员进行伦理审查编号。

5 动物实验管理系统的优势

5.1 动物实验申请方便快捷

动物实验管理系统运行后,所有的申请均可通过在线提交,且不受时间空间的限制,一些必要的信息录入后不必重复提交,提高了工作效率。

5.2 内部管理高效有序

在实验动物伦理审查实现了在线审查,不必每次审查需召集伦理委员会成员开会审查。系统可汇总导出动物订购的信息,解决了订购信息出错的问题;对饲养情况和技术服务数量实时进行汇总,信息流更加通畅;预约情况在系统可实时展现,无需工作人员参与;动物实验的费用实现日清结算,工作效率得到了明显的提高^[4]。

5.3 信息记录查询全面便捷

通过系统查询,能快速导出所需的数据报表。随着系统的运行,产生的各类数据可以永久保存,经过统计分析后对于动物实验中心的管理决策具有十分重要的作用。

6 结语

目前中心的动物实验管理系统基本满足了实验

动物伦理在线申请审查、动物订购和饲养以及动物实验技术服务申请、实验室和仪器使用预约和动物饲养繁育的数据登记、动物实验费用实时结算等功能,中心内部员工的考核也更加量化。通过两年的运行,有效促进了中心管理的规范和高效,同时提升了中心的服务满意度。

我们认为,动物实验进行信息化、智慧化管理很有必要,但每个单位有不同的功能与流程,在建立信息管理系统时,一定要基于本单位的实际,优化服务流程、明确需求并在运行过程中不断改进,才能使信息管理系统发挥其应有的作用^[5,6]。

参考文献:

- [1] 张永斌,傅江南,刘忠华,等.高校实验动物中心的定位和创新发展[J].实验室研究与探索,2015,34(7):228-230.
- [2] 宋琳亮,傅江南.大学实验动物中心管理模式初探[J].实验动物科学,2011,28(3):60-61.
- [3] GB/T35892-2018.实验动物福利伦理审查指南[S].
- [4] 邹岩柏,刘福生,赵明海,等.动物实验管理系统的特点分析[J].中国比较医学杂志,23(8):72-74.
- [5] 顾祖曦,张超超,蔡贞贞,等.动物实验信息化管理系统的开发和应用[J].实验动物与比较医学,2016,36(3):219-225.
- [6] 王贵平,薛智谋,周正宇,等.高校公共服务实验动物管理系统的开发与应用[J].江苏科技信息,2014,8(15):26-29.

视网膜母细胞瘤斑马鱼模型 及 *rb1* 基因研究进展

王俐梅^{1,2,4}, 张 建³, 刘忠华², 杨 威^{1,4}

(1. 广东省生物资源应用研究所, 广东省动物保护与资源利用重点实验室,

广东省野生动物保护与利用公共实验室, 广州 510260;

2. 华南农业大学兽医学院, 广州 510642; 3. 广州医科大学基础医学院, 广州 511436;

4. 广东莱恩医药研究院有限公司, 广东省药物非临床评价

研究企业重点实验室, 广州 510990)

[摘要] 视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma, RB)是一种常见的发生于婴幼儿眼内的原发恶性肿瘤, 大量的研究表明, *rb1* 基因的改变是导致 RB 发生的主要原因。新型模式生物斑马鱼最近几年被开发成为研究 RB 的动物模型, 本文在介绍 *rb1* 基因与 RB 疾病相关研究新进展的同时, 综述了已有报道的 RB 斑马鱼模型建立方法, 包括异种移植法、基因突变法和 TALEN 基因编辑法, 并进一步将 RB 斑马鱼模型与已有报道的小鼠、大鼠、兔、非洲爪蟾 RB 动物模型进行了对比。

[关键词] 视网膜母细胞瘤(RB); 斑马鱼; *rb1* 基因

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)03-0244-05

视网膜母细胞瘤(Retinoblastoma, RB)是一种常见的发生于婴幼儿眼内的原发恶性肿瘤^[1,2]。目前 RB 发病的机制主要包括染色体遗传、染色体突变、病毒感染等。对于 RB 发生的共识性观点是: 由视网膜母细胞中 *rb1* 双等位基因突变引发 RB 蛋白磷酸化缺陷, RB 蛋白活性的丧失导致细胞周期受损和细胞增殖失控引起的^[3], RB 蛋白是参与细胞周期发展、终末分化和 DNA 复制的主要肿瘤抑制基因^[4-6]。世

界卫生组织^[7]统计表明, RB 发病率较低, 全世界平均每 16 000~18 000 新生儿中只有 1 例发生 RB, 但我国 RB 患儿的生存率仅为 63%, 远低于发达国家 95% 的生存率, 因此我国对于 RB 的研究亟待加强。

虽然 RB 的发病率较低, 但 RB 的治疗在世界范围内仍然是一个难题, 为保住患者生命, 往往只能采取眼球摘除或者眼眶内容剜出术。尽管大多数 RB 患儿存活下来, 但他们通常会永久失去视力, 因此如何在治愈肿瘤的同时保住眼球和视力成为研究目标, 早发现、早诊断是避免手术治疗 RB 疾病的最佳途径。近几年基因检测和编辑技术快速发展, 共识性的观点是在不远的未来, 人类有可能通过基因编辑的方法治疗疾病。最近研究^[7-11]表明, 现有分子生物学及分子遗传学方法已经能够实现 *rb1* 基因突变检测。我国在相关研究方面也有明显进展, 孟庆娉等^[12]利用基因捕获技术成功筛选出了视网膜母细胞瘤患者的 *rb1* 突变基因, 兰小平等^[13]采用 Sanger 测序与多重连接探针扩增技术相结合的策略探索了母系遗传性视网膜母细胞瘤家系 *rb1* 基因分析与产前诊断。

[收稿日期] 2018-11-16

[项目基金] 广东省科学院创新药物安全性评价研究团队 (2016GDASRC-0104), 国家自然科学基金青年项目(11704082), 广东省药物非临床评价研究企业重点实验室(2018B030323024), 广东省生物资源应用研究所研究生和博士后研究人员培养基金 (GIABR-pyj201605)

[作者简介] 王俐梅(1986-), 女, 硕士研究生, 执业兽医师, 主要从事建立动物模型研究。E-mail: door20@126.com

[通信作者] 杨 威(1978-), 男, 教授级高级工程师/博导, 主要研究方向新药药理毒理。

E-mail: yangwei0719@163.com

成功构建 RB 动物模型是进一步开展相关研究的必备条件,传统的模式动物在发挥重要作用的同时,基因编辑相关的科学研究从实验便利性、繁殖率、繁殖速率和成本等方面对模式动物提出了新的需求,在这样的背景下斑马鱼以其独特的优点,已经成为了一种引发广泛关注的新兴模式动物。

1 RB 斑马鱼模型与其他动物模型 比较分析

斑马鱼(Zebrafish, *Danio rerio*)与人类基因同源性高达 85%,其信号传导通路与人类基本近似,生物结构和生理功能与哺乳动物高度相似,且斑马鱼具有饲养成本低、体积小、发育周期短、体外受精、透明易观察和单次产卵数较高等优点^[14]。目前斑马鱼已被美国国家卫生研究院(NIH)列为继人和小鼠之后的第三大模型动物。基于以上显著优点,斑马鱼已经应用于以下几个癌症研究领域:①使用化学致癌,遗传和异种移植的方法建立癌症模型;②用评估肿瘤血管生成;③研究肿瘤转移;④抗肿瘤药物

筛选和药物毒性评价^[15,16]。RB 发病机制研究及治疗药物的研发都需要合适的动物模型。已经报道^[17-25]可以用于构建 RB 模型的动物有小鼠、大鼠、兔、非洲爪蟾、斑马鱼等,以上动物模型存在各自的优缺点。本文对现有 RB 动物模型的总结见表 1。

虽然斑马鱼 RB 模型研究尚处于起步阶段,但已经有了较多的发现。最近研究^[29]表明,通过斑马鱼模型可以从单个细胞水平上监测到标记后的RB 细胞的侵袭和转移过程,且实现了实时动态监测,从而为肿瘤侵袭、转移和药物作用的相关研究提供了一个新的思路。本文将综述现有的 RB 斑马鱼模型的建立方法以及基于这些模型取得的研究进展,以促进 RB 相关的研究。

2 构建 RB 斑马鱼模型的方法

2.1 异种移植 RB 斑马鱼模型

Hyun 等^[25]建立了一种异种移植RB斑马鱼模型,具体做法是:在斑马鱼卵受精 48 h 后,将 RB 细胞注入斑马鱼胚胎的玻璃体腔。由于斑马鱼胚胎很小且

表 1 RB 动物模型建模方法和特点分析

Table 1 Modeling methods and characteristics of animal models of retinoblastoma		
模型动物	建模手段	特点总结
小鼠	> 转基因动物模型 ^[17]	> 应用最多
	> 基因敲除动物模型 ^[18]	> 转基因模型的建立较异种移植操作上复杂、困难,造模成本高。转基因机制尚未完全阐明,缺乏特异性,造模的同时常常伴有其他肿瘤
	> 新生小鼠异种移植 ^[19]	> 基因敲除模型因基因调控机制复杂仍需要突破大量难点
	> 裸鼠异种移植 ^[20]	> 异种移植周期短,成本低,眼底和光谱域光学相干断层扫描成像等技术能够监测眼内肿瘤生长,但在发生机制研究中稍显劣势
大鼠	> 新生大鼠异种移植 ^[21]	> 应用较少,由于与小鼠有大量共同点,鉴于周期与成本问题,相较于小鼠优势不足
兔	> 免疫抑制兔的异种移植 ^[22]	> 应用较多,兔眼便于操作和观察,成本高,周期长
	> 成年兔的异种移植 ^[23]	> 兔眼体积最接近于人眼,其眼内移植肿瘤有利于影像学研究
非洲爪蟾	> 基因敲除方法和癌症综合征模型 ^[24]	> 应用较少,非洲爪蟾动物模型是第一个非哺乳动物中的遗传性 RB 模型,符合动物福利与伦理“3R”原则中的替代原则 > 非洲爪蟾具有真正的二倍体基因组,有助于模拟人类癌症 > 非哺乳动物模型可以在药物发现的早期阶段和快速治疗目标识别中提供一定优势
斑马鱼	> 异种移植 ^[25,26]	> 近年来发展的一种动物模型,应用较多,周期较小鼠短,成本较小鼠低,可以最大限度地模拟人类 RB 的微环境,且肿瘤细胞的增殖特性与人类 RB 相似
	> 基因突变动物模型 ^[27]	> 具备免疫特权和斑马鱼胚胎的透明性质,同时可以从单个细胞水平上监测标记后的 RB 细胞的侵袭和转移过程,在高通量筛选药物方面具有优势
	> 转基因动物模型 ^[28]	> 水不溶性药物难以应用 > 只有少数多功能工具和经过验证的试剂适用于斑马鱼,分子和细胞机制探索的部分细节难以实现 > 斑马鱼含有许多重复的基因,使遗传操作复杂化 > 符合动物福利与伦理“3R”原则中的替代原则

具有光透明性,在胚胎期可以利用共聚焦激光显微镜对斑马鱼的眼球成像,进而能够通过图像中绿色荧光蛋白(GFP)的强度定量地分析肿瘤细胞群。在不使用药物的情况下随着注射的RB细胞数量增加,眼球中GFP强度增强,预示着肿瘤群体变大。将斑马鱼模型饲养在含有药物Carboplatin和Melphalan的林格氏液中,结果显示特定浓度的药物Carboplatin和Melphalan能够分别降低GFP的表达强度30%和28%,这个结果预示斑马鱼模型可以用于筛选抗癌药物。

Chen等^[26]建立了另一种类型的异种移植RB斑马鱼模型,方法是:将红色染料标记的人RB细胞(RB355)和小鼠(SJmRBL-8)细胞植入斑马鱼胚胎的玻璃体内,所使用的斑马鱼的血管内皮细胞能够表达GFP。由于采用了双色标记,能够看到肿瘤细胞和周围微血管之间的相互作用,肿瘤细胞附着于血管形成簇,先是关联增强,然后关联减少,说明微血管系统可能是肿瘤侵袭的结构基础。进一步使用药物Vegf-aamorpholino和Sunitinib对含有RB的斑马鱼胚胎进行了治疗,结果表明药物Vegf-aamorpholino和Sunitinib能够显著降低转移细胞的数量和头部肿瘤直径,说明这两种药物显著减弱了肿瘤细胞的侵袭和转移。以上结果预示着斑马鱼模型可以用于侵袭性疾病的治疗研究。

2.2 基因突变RB斑马鱼模型

Gyda等^[27]报道了一种自发性rb1基因突变的斑马鱼。他们首先对基因突变斑马鱼使用PCR方法进行基因序列分析,然后用染料DiI或DiO对视网膜神经节细胞进行标记,接着通过免疫组织化学方法判断视网膜神经节细胞在细胞周期中的延迟情况。由于视网膜神经节细胞中可以表达GFP荧光,因而通过共聚焦显微镜观察视网膜构造轨迹,可以推断出轴突发展的情况。通常情况下,新生野生型斑马鱼胚胎视网膜神经节细胞的轴突先于视网膜引背盖形成,而本研究结果显示rb1突变后的斑马鱼,视网膜神经节细胞分化周期出现了延迟,导致视网膜神经节细胞短暂不足,进一步导致视网膜神经节细胞的轴突缺陷,从而引发视网膜连接异常和趋势行为缺陷,使视神经发育不全。尽管rb1突变的斑马鱼,能够最终建立基本的网膜连接,但是行为学分析表明,这些发生了rb1突变体的斑马鱼表现出明显的视觉行为障碍。该研究表明这种罕见的rb1基因突变的斑马鱼会形成RB模型,从

一种新的视角建立了一种rb1基因的功能通路。

2.3 TALEN基因编辑RB斑马鱼模型

Solin等^[28]使用TALEN基因编辑法构建RB斑马鱼模型,具体方法是:将靶向rb1基因外显子2和3的TALEN mRNA注入胚胎,经过编辑的部分斑马鱼胚胎,在3.5个月时开始生长肿瘤。研究者先通过组织病理学染色对不同的肿瘤进行特点分析,进一步通过免疫组织化学法对肿瘤进行鉴定。结果显示肿瘤发生部位不同,主要出现在大脑中并非视网膜,表现出了神经外胚层样和胶质样肿瘤的特征。该研究验证了斑马鱼rb1失活会导致癌症,突出了位点特异性核酸酶对于创建基因嵌合斑马鱼的作用,便于研究癌症中的rb1功能。

Zhang等^[29]使用TALEN基因编辑法建立了RB斑马鱼模型,用于研究rb1在T细胞发展过程中的作用机制。他们开发的TALEN mRNA能够高效的靶向rb1基因的外显子2,注射入斑马鱼胚胎后导致了F0代80%的等位基因丢失,F1代中得到了缺乏rb1蛋白的突变体。研究表明rb1基因通过抑制E2F1保护T细胞成熟免于过早凋亡。此外,Schultz等^[30]也使用TALEN基因编辑法制作斑马鱼模型,并进一步选用诱导产生的大脑肿瘤用于研究,研究表明表观遗传调控因子Rbbp4和Hdac1在斑马鱼rb1胚胎脑肿瘤模型中过表达,是神经祖细胞生存和增殖所必需的。

3 小结

由于我国仍然面临RB疾病较低的治愈率和生存率,对于RB疾病的治疗仍有很大的瓶颈,药物的研发与评价显得尤为重要,而斑马鱼作为新型RB模型为药物研发与评价提供了新的选择和思路。斑马鱼的选择能够大大提高药物研发与评价工作效率,因此斑马鱼应用于RB模型中有极大的竞争力。

从以上内容可以看出:①异种移植法构建原位RB斑马鱼模型,优于其他方法,且操作可行性较高,能够获得确切目标的肿瘤模型,评价指标简便;使用荧光染色等方法能够活体监测肿瘤,有利于进一步用于药物筛选研究。但是在肿瘤发生机制等研究中没有进行深入研究。②基因突变法构建肿瘤模型,揭示了rb1在调节视网膜神经节细胞轴突和视觉行为中的新作用,为鉴定难以捉摸的RB细

胞起源提供新的潜力,但是基因突变极少数能获得RB斑马鱼模型,需要进一步研究其机制,此方法目前不适用于RB斑马鱼模型的构建。③TALEN基因编辑法构建肿瘤模型,成瘤不确定,在动物体内多个部位成瘤,但在视网膜未获得肿瘤,需要进一步研究其机制,不适用于RB斑马鱼模型的构建,但是研究证明了使用基因编辑核酸酶有助于快速大规模筛选斑马鱼中肿瘤抑制因子。

综上所述,RB斑马鱼模型可以为开发防治RB药物的成药性评价提供关键支撑,有助于推进一线治疗药物的转化。同时RB斑马鱼模型的研究工作可以为RB的侵袭、转移及发病机理提供新见解,有助于推进标准化动物模型并建立相应治疗方法。此外,从实验动物福利和3R原则角度来看,斑马鱼模型作为低等动物能更好替代高等动物,有利于对斑马鱼模型进行深入研究,建立更好模型评价标准和药物标准。然而目前RB斑马鱼模型研究尚刚刚起步,异体移植的方法相对比较成功的建立模型和评价指标,TALEN方法操作较为复杂,模型构建的成功率不是很高,仍需要进一步深入研究。目前最新的基因编辑技术CRISPR/Cas9还未有用于建立RB斑马鱼模型的研究报道,但我们相信该技术将在基因修饰RB斑马鱼模型的制备及研究中发挥作用。

参考文献:

- [1] Zhang Q, Cheng Y, Huang L. Inhibitory effect of carboplatin in combination with bevacizumab on human retinoblastoma in an *in vitro* and *in vivo* model[J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(5): 5326-5332.
- [2] 邹宏密,周希媛. 视网膜母细胞瘤疾病模型研究综述[J]. *科学咨询*, 2018, 19:48-50.
- [3] Soliman SE, Racher H, Zhang C, et al. Genetics and molecular diagnostics in retinoblastoma-an update[J]. *Asia Pac J Ophthalmol*, 2017, 6(2):197-207.
- [4] Bai S, Ren R, Li B, et al. Delay in the diagnosis of retinoblastoma in China[J]. *Acta Ophthalmol*, 2011, 89(1):e72-e74.
- [5] Corson TW, Samuels BC, Wenzel AA, et al. Multimodality imaging methods for assessing retinoblastoma orthotopic xenograft growth and development[J]. *PLoS One*, 2014, 9(6):e99036.
- [6] Fuller TS, Alvi RA, Shields CL. Optical coherence tomography of cavitory retinoblastoma[J]. *Jama Ophthalmol*, 2016, 134(5):e155355.
- [7] Guadalupe QS, Mercedes DS, Félix RT, et al. Monoallelic germline methylation and sequence variant in the promoter of the RB1 gene: a possible constitutive epimutation in hereditary retinoblastoma[J]. *Clin Epigenetics*, 2016, 8:1.
- [8] Price EA, Kolkiewicz K, Patel R, et al. Detection and reporting of RB1 promoter hypermethylation in diagnostic screening [J]. *Ophthalmic Genet*, 2018, 39(4):526-531.
- [9] Dehainault C, Golmard L, Millot GA, et al. Mosaicism and prenatal diagnosis options: insights from retinoblastoma[J]. *Eur J Hum Genet*, 2017, 25:381-383.
- [10] Tomar S, Sethi R, Sundar G, et al. Mutation spectrum of RB1 mutations in retinoblastoma cases from Singapore with implications for genetic management and counselling[J]. *PLoS One*, 2017, 12(6):e0178776.
- [11] Nguyen HH, Nguyen HTT, Vu NP, et al. Mutational screening of germline RB1 gene in Vietnamese patients with retinoblastoma reveals three novel mutations[J]. *Mol Vis*, 2018, 24: 231-238.
- [12] 孟庆娉,黄旅珍,王斌,等. 基因捕获技术在视网膜母细胞瘤患者RB1基因突变筛选的应用[J]. *中华眼科杂志*, 2017, 53(06):455-459.
- [13] 兰小平,许无恨,汤晓君,等. 母系遗传性视网膜母细胞瘤家系RB1基因分析与产前诊断[J]. *解放军医学杂志*, 2018, 43(6):534-536.
- [14] Berghmans S, Jette C, Langenau D, et al. Making waves in cancer research: new models in the zebrafish[J]. *Biotechniques*, 2005, 39(2):227-237.
- [15] Laurie NA, Gray JK, Zhang J, et al. Topotecan combination chemotherapy in two new rodent models of retinoblastoma [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(20):7569-7578.
- [16] 张勇,贺剑辉,刘洪翠,等. 斑马鱼在药物临床前毒理学研究中的应用进展及现状[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2013, 3:482-483.
- [17] Wenzel AA, O'Hare MN, Shadmeh M, et al. Optical coherence tomography enables imaging of tumor initiation in the TAg-RB mouse model of retinoblastoma[J]. *Mol Vis*, 2015, 21:515-522.
- [18] Alessio N, Capasso S, Ferone A, et al. Misidentified human gene functions with mouse models: the case of the retinoblastoma gene family in senescence[J]. *Neoplasia*, 2017, 19(10):781-790.
- [19] 伊世芹,李彦珊,苗丽霞,等. 视网膜母细胞瘤小鼠模型的建立[J]. *武警医学*, 2014, 25(12):1248-1251.
- [20] Lemaitre S, Poyer F, Marco S, et al. Looking for the most suitable orthotopic retinoblastoma mouse model in order to characterize the tumoral development[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2017, 58(7):3055-3064.
- [21] Nassr M, Wang X, Mitra S, et al. Treating retinoblastoma in tissue culture and in a rat model with a novel isoquinoline derivative[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2010, 51(7):3813-3819.

- [22] 白海霞, 李彬. 视网膜母细胞瘤动物模型的研究进展[J]. 中华眼科杂志, 2014, 50(10):793-797.
- [23] 郑嵩山, 吴中耀, 杨华胜, 等. 兔眼前房视网膜母细胞瘤动物模型的建立[J]. 中华实验眼科杂志, 2008, 26(1):35-38.
- [24] Naert T, Colpaert R, Van Nieuwenhuysen T, et al. CRISPR/Cas9 mediated knockout of *rb1* and *rb1l1* leads to rapid and penetrant retinoblastoma development in *Xenopus tropicalis* [J]. Sci Rep-uk, 2016, 6:35264.
- [25] Hyun JD, Dain S, Na Y, et al. Orthotopic transplantation of retinoblastoma cells into vitreous cavity of zebrafish for screening of anticancer drugs[J]. Mol Cancer, 2013, 12(1): 71.
- [26] Chen X, Wang J, Cao Z, et al. Invasiveness and metastasis of retinoblastoma in an orthotopic zebrafish tumor model [J]. Sci Rep-uk, 2015, 5:10351.
- [27] Gyda M, Wolman M, Lorent K, et al. The tumor suppressor gene retinoblastoma-1 is required for retinotectal development and visual function in zebrafish[J]. PLoS Genet, 2012, 8(11):e1003106.
- [28] Solin SL, Shive HR, Woolard KD, et al. Rapid tumor induction in zebrafish by TALEN-mediated somatic inactivation of the retinoblastoma1 tumor suppressor *rb1*[J]. Sci Rep-uk, 2015, 5:13745.
- [29] Zhang Z, Liu W, Zhao L, et al. Retinoblastoma 1 protects T cell maturation from premature apoptosis by inhibiting E2F1 [J]. Development, 2018, 145(1):dev158139.
- [30] Schultz LE, Haltom JA, Almeida MP, et al. Epigenetic regulators *Rbbp4* and *Hdac1* are overexpressed in a zebrafish model of *RB1* embryonal brain tumor, and are required for neural progenitor survival and proliferation[J]. Dis Model Mech, 2018, 11(6):pii: dmm034124.

Research Progress on Zebrafish Model of Retinoblastoma and *rb1* Gene

WANG Li-mei^{1,2,4}, ZHANG Jian³, LIU Zhong-hua², YANG Wei^{1,4}

(1. Guangdong Institute of Applied Biological Resources, Guangdong Key Laboratory of Animal Conservation and Resource Utilization, Guangdong Public Laboratory of Wild Animal Conservation and Utilization, Guangzhou 510260, China;

2. College of Veterinary Medicine of South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China;

3. School of Basic Medical Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China;

4. Guangdong Lewwin Pharmaceutical Research Institute Co., Ltd., Guangdong Provincial Key Laboratory of Drug Non-clinical Evaluation and Research, Guangzhou 510990, China)

[Abstract] Retinoblastoma (RB) is a common primary malignant tumor that occurs in the eyes of infants and young children. A large number of studies have shown that the change of *rb1* gene is the main cause of RB occurrence. The zebrafish RB model is a novel animal model for studying RB. In this paper, the latest research results of *rb1* gene, as well as the zebrafish RB model produced by xenograft method, gene mutation method, and TALEN gene editing method are reviewed. Furthermore, the RB zebrafish model was compared with the four kinds of reported RB animal models that were raised on mice, rat, rabbit or xenopus.

[Key words] Retinoblastoma (RB); Zebrafish; *rb1* gene

大鼠自发性及药物相关性胰岛纤维化研究进展

周 飞^{1,2}, 王浩安^{1,2}

(1.四川大学华西医院 国家成都新药安全性评价中心, 成都 610041;

2. 成都华西海圻医药科技有限公司, 成都 610041)

[摘要] 胰岛纤维化是大鼠常见的自发性疾病, 随着年龄的增长, 病变发生率逐渐升高, 且雄性发生率高于雌性。该病的发病原因及机制目前尚未定论。许多药物也能引起或加重大鼠胰岛纤维化, 胰岛血管损伤被认为与该病变的发生相关。本文综述了大鼠自发性及药物相关性胰岛纤维化的研究, 为实验动物研究及毒性病理学家提供一定的参考。

[关键词] 大鼠; 胰岛纤维化; 自发性; 药物相关

[中图分类号] Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)03-0249-04

胰腺为大鼠重要的消化和内分泌器官, 由外分泌部和内分泌部构成。胰腺外分泌部主要分泌消化酶, 参与机体对食物的消化; 内分泌部由具有内分泌功能的细胞组成胰岛, 胰岛细胞分泌的激素对葡萄糖的代谢具有重要作用^[1,2]。然而随着年龄的增长, 大鼠胰岛发生 β 细胞增生、胰岛纤维化、肿瘤等自发性病变的发生率逐渐增高^[3]。在毒性病理实际工作中, 胰岛纤维化虽然是大鼠中较为常见的自发性疾病, 但许多药物也能引起或加重此改变^[4-7]。关于大鼠胰岛 β 细胞增生及一些肿瘤性病变于国内外均可见报道, 但自发性胰岛纤维化国外仅有少量报道, 而国内未见有相应报道。故本综述就关于大鼠自发性及药物相关性的胰岛纤维化进行了归纳及总结, 为实验动物研究、药物研发及药物安全性评价提供参考。

1 胰岛纤维化的病理学改变

胰岛纤维化的镜下改变可分为胰岛毛细血管扩张、出血和炎症、色素沉着和纤维化 4 种典型病理学改变^[3-12]。胰岛毛细血管的扩张是病程的起始

阶段胰岛出血、炎症、色素沉着为病理进程的发展阶段, 纤维化是病理进程后期阶段。出血表现为胰岛中心或周边可见红细胞漏出血管并伴有色素沉着或/和吞噬有色素的巨噬细胞浸润^[10-13]。透射电子显微镜观察可见出血的胰岛毛细血管周边有迁移出并吞噬有红细胞的巨噬细胞, 大量成熟的胶原纤维包裹血管, 毛细血管内皮未见明显改变。色素为含铁血黄素, Perl's blue 特殊染色为阳性, 部分胰岛中可见色素沉着但未见出血。偶可见胰岛中或周边炎细胞浸润及水肿等进行性反应。纤维化的胰岛体积增大, 胰岛被增生的纤维结缔组织分隔成多个细胞小团, 镜下表现为细胞团块像岛屿样漂浮于纤维组织中, 即所谓的漂浮现象。胰岛的上述病理改变在胰腺 3 个区域(头、体、尾)的分布上未见差异^[10]。

2 大鼠自发性胰岛纤维化

2.1 病变分布谱

胰岛纤维化可见于多种啮齿类动物中。Homo-Delarchei 等^[8]在 4 月龄的糖尿病非肥胖 Goto-Kakizaki (GK) 大鼠中描述了“大胰岛”的存在, 这些“大胰岛”的内分泌细胞被纤维组织破坏。自发性糖尿病 Torii 大鼠 (SDT) 在疾病的发生过程中, 胰岛内或胰岛周围同样会出现纤维化并伴有炎症^[9]。Hayden 等^[10]在 Ren2 高血压转基因大鼠中发现存在胰岛早期纤维化的超微病理学改变。毒理学试验中, 老龄 SD

[收稿日期] 2018-11-30

[作者简介] 周 飞(1987-), 男, 工程师, 硕士, 中国兽医病理学家。E-mail: feika110@hotmail.com
并列第一作者: 王浩安(1986-), 男, 工程师, 硕士, 中国兽医病理学家

大鼠也可见局限于胰岛且对周围腺泡组织影响较小的出血、纤维化和增生的自发性改变^[4]。

Imaoka 等^[11]研究表明, 大鼠胰岛毛细血管扩张最早可见于 8 周龄, 而胰岛出血、色素沉着和纤维化最早可在 12 周龄中出现。Dillberger^[3]报道,

3.5 月龄雄性 SD 大鼠胰岛纤维化的发生率为 20%。然而, 也有报道^[14]显示在 102 周龄时, SD 大鼠胰岛部分纤维组织被重新吸收, 从而使纤维化的发病率降低。Imaoka 等^[11]应用线性回归算出以上病理改变的发生率与时间的关系方程式, 详见表 1。

表 1 SD 大鼠胰岛纤维化病变发生率与时间的关系方程式

病理改变	雄 性	雌 性
出血	$y=4.402x-30.435$ ($r^2=0.977$)	$y=1.033x-9.022$ ($r^2=0.872$)
色素沉着	$y=5.054x-32.120$ ($r^2=0.918$)	$y=3.098x-19.565$ ($r^2=0.954$)
纤维化	$y=5.326x-41.467$ ($r^2=0.937$)	$y=0.978x-9.402$ ($r^2=0.655$)

注: y = 发生率 (%), x = 年龄 (周龄), 该表格由 Imaoka 等总结而来, 详见参考文献^[11]

2.2 病变的性别差异性

大鼠自发性胰岛纤维化在各报道中均为雄性发生率及严重程度高于雌性^[11-15]。Dillberger^[3]报道, 14 月龄的雄性 SD 大鼠, 其胰岛纤维化的发生率可高达 90%; 而雌性 SD 大鼠在 14 月龄时, 发生率仅为 20%。有研究^[16]认为胰岛纤维化雌雄差异性是由于雌雄动物新陈代谢不同所致, 因雄性大鼠体质量增长快于雌性大鼠, 故雄性大鼠的新陈代谢较雌性旺盛, 从而对供血量及氧的消耗多于雌性, 雄性大鼠胰岛因血氧供应问题而产生纤维化。报道^[17,18]显示雌激素具有血管内皮保护作用, 故 Imaoka 等^[11]认为, 老龄雄性大鼠较低的血清雌二醇水平意味着缺乏血管保护功能, 从而引起红细胞漏出胰岛毛细血管(即微出血), 进而引起一系列炎性改变, 最终导致胰岛纤维化。Hajdu 等^[7]给予阉割的 SD 大鼠雌激素, 可减少胰岛体积增大和纤维化的发生率。Shinohara 等^[19]研究表明, 当对自发性糖尿病大鼠做卵巢切除术后, 胰岛内及周边炎细胞浸润, 色素沉着及纤维化等病理改变的发生率要高于假手术组, 而这种现象可以通过注射雌激素得以缓解。Imaoka 等^[15]进一步研究表明, 皮下注射 β -雌二醇 3-苯甲酸酯(EB)26 周能够抑制雄性大鼠胰岛炎症的发生、降低纤维化的发生率, 但不能抑制各年龄段大鼠胰岛出血的病变。所以他们认为细胞核内的雌激素受体信号通路可能并没有直接参与对胰岛炎症/纤维化的抑制过程, 而 EB 的作用可能是抑制肌成纤维细胞的出现, 从而抑制胰岛纤维化^[14]。

3 药物相关性胰岛纤维化

Kaduk 等^[20]通过脂肪乳溶解的 Busulfan

(Myleran[®], Busulfex[®])(白消安, 马利兰[®], 一种烷基化抗肿瘤药)饲喂雄性 Wistar 大鼠, 见大鼠胰岛周边出血及纤维化。推测可能为 Busulfan 沉积于毛细血管周细胞中导致胰岛内及周边的有孔毛细血管损伤加重。而持续性毛细血管损伤引起出血, 最终导致胰岛纤维化, 萎缩及高血糖症。但该药在人身已使用多年, 未见像大鼠胰岛毒性的报道。

大鼠静脉注射给予凝血因子 Xa 抑制剂 Rivaroxaban(利伐沙班)后, 在有效剂量范围内除导致机体低凝状态异常引发多处器官出血外, 还见胰岛周边出血、炎症、纤维化以及含铁血黄素沉着的病理学改变^[21]。

脾酪氨酸激酶(Spleen tyrosine kinase, Syk)是一种非受体类酪氨酸激酶, 是包含有免疫受体酪氨酸激活基序的免疫受体的一种重要下游信号酶。在对脾酪氨酸激酶抑制剂的研究中, Long 等^[22]对 SD 大鼠、CD-1 小鼠、Beagle 犬和食蟹猴分别经口灌胃给予一种脾酪氨酸激酶抑制剂, 表明该抑制剂可引起 SD 大鼠胰岛周边出血及纤维素沉积。而其余种属的实验动物均未见该病理学改变。引起 SD 大鼠胰岛出现上述病变的原因可能是脾酪氨酸激酶抑制剂破坏了胰岛处血小板-内皮细胞的稳态。

Bruton's 酪氨酸激酶(Btk)是有关于 B 细胞和骨髓细胞信号转导通路中的关键激酶。Erickson 等^[23]通过经口灌胃给予 SD、Wistar 和 F344 大鼠以及 Beagle 犬包括 Ibrutinib 和 Spebrutinib 在内的多种 Bruton's 酪氨酸激酶抑制剂后, 3 个品系的大鼠均出现胰岛出血、色素沉着和胰岛纤维化的改变, 但 SD 大鼠最为敏感, 而在 Beagle 犬中未见胰岛出现类似改变。作者推测该病理学改变是由于大鼠的胰岛微血管受损所致。

Brenneman 等^[4]分享了一系列其公司未上市的受试物对大鼠胰岛损伤的毒性机制,病变主要发生在胰岛周围的内外分泌部交界处(endocrine-exocrine interface, EEI)。由这些受试物诱导的胰岛纤维化未见性别差异性。胰岛素产生和/或释放的改变可能继发于胰岛的损伤。病变表现为轻微受损的胰岛周围出现充有血液的扩张间隙,然后混合性炎细胞浸润、血浆渗出、出血以及纤维素沉着使得内外分泌部交界处的边界消失。更长期受影响的胰岛则出现纤维化以及偶见的含有含铁血黄素的巨噬细胞。他们认为可能是受试物增加了胰岛部位的血流,加之大鼠胰岛 EEI 血管为薄壁有孔毛细血管,这些血管更加容易受损或漏出血液成分。

4 结语

综上所述,无论是自发性还是药物相关性的胰岛纤维化均与胰岛血管损伤有关。老龄大鼠胰岛血管受损而导致自发性胰岛纤维化的具体机理至今未见定论^[11]。药物相关性的大鼠胰岛纤维化在其他种属相应的药物研究试验中均未见相应胰岛改变,可能因为种属间胰岛解剖结构的差异性所致:多数哺乳动物中,胰腺的主要血液流向为供应胰岛的血液出胰岛后通过腺泡门脉系统扩散到周边外分泌部;然而在大鼠中,供应外分泌部和胰岛的血管为两条不同的血管,最终于胰岛周边的腺泡门脉系统汇合^[4,24]。大鼠胰岛采用分支血管独立供血的体系可能是导致高新陈代谢胰岛的有孔毛细血管更易受损的原因。故在大鼠毒理学试验中,若胰岛纤维化为药物相关性改变,其在犬、猴等的毒理学试验及药物临床研究中可能不会出现,这对于药物的毒性研究及风险评估具有重要意义。

大鼠自发性胰岛纤维化与年龄相关,以老龄大鼠多见,发生率可参考 Imaoka 等^[11]的线性回归方程,且存在性别差异性,即主要以雄性多见。而药物相关性的胰岛纤维化不具有年龄相关性,于各年龄段可见,且不具有性别差异性。再者,药物及其代谢产物是否对血管有影响也可用于判定大鼠胰岛纤维化为自发性或药物相关性的一个提示性指标。

参考文献:

- [1] Pour PM, Standop J, Batra SK. Are islet cells the gatekeepers of the pancreas?[J]. *Pancreatol*, 2002, 2(5):440-448.
- [2] Elayat AA, Naggar MM, Tahir M. An immunocytochemical and morphometric study of the rat pancreatic islets [J]. *J Anat*, 1995, 186(Pt 3):629-637.
- [3] Dillberger JE. Age-related pancreatic islet changes in Sprague-Dawley rats [J]. *Toxicol Pathol*, 1994, 22(1):48-55.
- [4] Brenneman KA, Ramaiah SK, Rohde CM, et al. Mechanistic investigations of test article-induced pancreatic toxicity at the endocrine-exocrine interface in the rat [J]. *Toxicol Pathol*, 2014, 42(1):229-242.
- [5] Boorman GA, Hollander CF. Spontaneous lesions in the female WAG-Rij (Wistar) rat [J]. *J Gerontol*, 1973, 28(2):152-159.
- [6] Spencer AJ, Andreu M, Greaves P. Neoplasia and hyperplasia of pancreatic endocrine tissue in the rat: an immunocytochemical study [J]. *Vet Pathol*, 1986, 23(1):11-15.
- [7] Hajdu A, Rona G. Morphological observations on spontaneous pancreatic islet changes in rats [J]. *Diabetes*, 1967, 16(2):108-110.
- [8] Homo-Delarche F, Calderari S, Irminger J, et al. Islet inflammation and fibrosis in a spontaneous model of type 2 diabetes, the GK rat[J]. *Diabetes*, 2006 55(6):1625-1633.
- [9] Fuse M, Yokoi N, Shinohara M, et al. Identification of a major locus for islet inflammation and fibrosis in the spontaneously diabetic Torii rat [J]. *Physiol Genomics*, 2008, 35(1): 96-105.
- [10] Hayden MR, Karuparthi PR, Habibi J, et al. Ultrastructural islet study of early fibrosis in the Ren2 rat model of hypertension. Emerging role of the islet pancreatic pericyte-stellate cell [J]. *JOP*, 2007, 8(6):725-738.
- [10] Imaoka M, Satoh H, Furuhashi K. Age- and sex-related differences in spontaneous hemorrhage and fibrosis of the pancreatic islets in Sprague-Dawley rats [J]. *Toxicol Pathol*, 2007, 35(3):388-394.
- [12] Reaven EP, Reaven GM. Structure and function changes in the endocrine pancreas of aging rats with reference to the modulating effects of exercise and caloric restriction [J]. *J Clin Invest*, 1981, 68(1):75-84.
- [13] Nugent DA, Smith DM, Jones HB. A review of islet of Langerhans degeneration in rodents models of type 2 diabetes [J]. *Toxicol Pathol*, 2008, 36(4):529-551.
- [14] Imaoka M, Jindo T, Takasaki W. The process and development mechanism of age-related fibrosis in the pancreatic islets of Sprague-Dawley rats: immunohistochemical detection of myofibroblasts and suppression effect by estrogen treatment [J]. *J Toxicol Pathol*, 2013, 26(1):1-10.
- [15] Imaoka M, Kato M, Tago S, Gotoh M, et al. Effects of estradiol treatment and/or ovariectomy on spontaneous hemorrhagic lesions in the pancreatic islets of Sprague-Dawley rats [J]. *Toxicol Pathol*, 2009, 37(2):218-226.
- [16] Hayakawa K, Mimura Y, Tachibana S, et al. Study for

- collecting background data on Wistar Hannover [CrI:WI (Han)] rats in general toxicity studies – comparative data to Sprague Dawley rats[J]. *J Toxicol Sci*, 2013, 38(6):855-873.
- [17] Arnal JF, Bayard F. Vasculoprotective effects of oestrogens [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2001, 28(12):1032-1034.
- [18] Schwartz DW, Penckofer S. Sex differences and the effects of sex hormones on hemostasis and vascular reactivity[J]. *Heart Lung*, 2001,30(6):401-426.
- [19] Shinohara M, Oikawa T, Sato K. Effect of ovariectomy and estrogen treatment on diabetic pathogenesis in spontaneously diabetic Torii (SDT) rats [J]. *Reprod Immunol Biol*, 2005, 20:5-9.
- [20] Kaduk B, Husslein EM, Siegfried A. Morphology of the chronic toxicity of busulfan on the islets of Langerhans in the rat [J]. *Hepatogastroenterology*, 1987, 34(3):108-112.
- [21] Harlow PP. Pharmacology review(s) (Application Number: 202439Orig1s000)[EB/OL]. Center for Drug Evaluation and Research, FDA, 2011. https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2011/202439Orig1s000PharmR.pdf.
- [22] Long AJ, Sampson E, McCarthy RW, et al. Syk inhibition induces platelet dependent peri-islet hemorrhage in the rat pancreas [J]. *Toxicol Pathol*, 2016, 44(7):998-1012.
- [23] Erickson RI, Schutt LK, Tarrant JM, et al. Bruton's tyrosine kinase small molecule inhibitors induce a distinct pancreatic toxicity in rats [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017, 360(1):226-238.
- [24] Murakami T, Hitomi S, Ohtsuka A. Pancreatic insulo-acinar portal systems in humans, rats, and some other mammals: scanning electron microscopy of vascular casts [J]. *Microsc Res Tech*, 1997, 37(5-6):478-488.

Review of Spontaneous and Drug-related Islet Fibrosis in Rats

ZHOU Fei^{1,2}, WANG Hao-an^{1,2}

(1. West China Hospital of Sichuan University, National Chengdu Center for Safety Evaluation of Drugs, Chengdu, 610041, China;

2. West China Frontier PharmaTech Co.,Ltd., Chengdu 610041, China)

[Abstract] Islet fibrosis is a common spontaneous disease in rats. The incidence increased with age as well as that of male was higher than female. The pathogenesis and mechanism of this disease have not been conclusive yet. Many drugs could also induce or increase fibrosis in pancreatic islets in rats. Vascular injury in islet was considered to be associated with the occurrence of the disease. This article summarizes the research of spontaneous and drug related pancreatic islet fibrosis in rats, and provides some references for experimental animal research and toxicological pathologists.

[Key words] Rats; Islet fibrosis; Spontaneous; Drug-related

《实验动物与比较医学》原《上海实验动物科学》

稿 约

本刊系实验动物科技领域的专业性学术刊物, 兼顾普及与提高, 刊登实验动物和比较医学领域的研究论文, 内容主要包括人类疾病动物模型、动物实验技术、动物生物学、实验动物医学、实验动物技术与管理和其他文章(文献综述、经验交流、检测报告、病例报告、简报、动态与书评等), 报道实验动物硬科学工作和实验动物软科学工作的各方新进展和各种信息。读者对象为生物医学、动物学、农学等各领域从事实验动物生产、繁育、检测、管理等工作者和应用实验动物的众多学科与行业的动物实验研究、测试和检定工作者。欢迎各方作者投稿。

1 对来稿要求和注意事项

- 1.1 研究论著的内容必须构思有据、设计严密、材料标准(所用实验动物要注明品种、品系、等级、性别、年龄、体重、来源以及生产或使用许可证的编号)、方法可靠、数据精确且经过统计学处理, 应在前人工作基础上有所发展, 提供新知。
- 1.2 研究论著的内容一般按下列顺序分节排列: 文题、作者及其单位、中文摘要和关键词、引言、材料和方法、结果、讨论、结论、参考文献和英文的文题、作者姓名、单位名称、摘要与关键词。论文标题层次按 1, 1.1, 1.1.1, ... 的形式排列。
- 1.3 **文题:**力求简明、醒目, 反映出文章的主题。中文文题一般以 20 个汉字以内为宜。**图表:**分别按其在正文中出现的先后次序连续编码。每幅图表应冠有图(表)题。图表题及栏目文字内容需中英文对照。**计量单位:**按《中华人民共和国法定计量单位》书写, 并以单位符号表示。**数字:**执行 GB/T15835 — 1995, 关于出版物上数字用法的规定。**统计符号:**按 GB3358-82《统计学名词及符号》的有关规定书写, 常用如下: (1)样本的算术平均数用英文小写 $\bar{x}$ (中位数仍用 M); (2)标准差用英文小写 s ; (3) t 检验用英文小写 t ; (4) F 检验用英文大写 F ; (5)卡方检验用希腊文小写 χ^2 ; (6)相关系数用英文小写 r ; (7)自由度用希腊文小写 ν ; (8)概率用英文大写 P (P 值前应给出具体检验值, 如 t 值、 χ^2 值、 q 值等)。以上符号均用斜体。**缩略语:**于首次出现处先叙述其全称, 然后括号注出中文缩略语或英文全称及其缩略语, 后两者间用“,” 分开(如该缩略语已共知, 也可注出其英文全称)。缩略语不得移行。
- 1.4 **参考文献:**按 GB7714-97(文后参考文献著录规则)采用顺序编码制著录, 依照其在文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号标出。参考文献书写格式举例如下:
期刊: [序号]作者姓名(不超过 3 人者全部写出, 超过者只写前 3 名, 后加“等”或“et al.”). 文题[J]. 期刊名(外文期刊可用标准缩写, 不加缩写点), 年, 卷(期): 起讫页。
书籍: [序号]作者姓名. 书名[M]. 版次(第 1 版不写). 出版地: 出版单位(国外出版单位可用标准缩写), 出版年. 起讫页。
国际、国家标准: [序号] 标准编号, 标准名称[S]。
- 1.5 论文所涉及的课题应脚注于文题页左下方, 如基金项目: $\times\times$ 基金资助项目(基金编号 $\times\times\times\times$)”。
- 1.6 投稿请先在本刊在线系统网站(<<http://211.144.119.130:8080/jweb/CN/volumn/current.shtml>>)注册后再按系统要求步骤投稿。
- 1.7 来稿请写明第一作者的出生年份、性别、籍贯、最高学位、技术职称(或职务)、目前所从事的专业、通讯地址、邮政编码、电话号码和 E-mail。
- 2 根据《著作权法》, 并结合本刊具体情况, 凡来稿在接到本刊回执后 3 个月内未接到稿件处理通知者, 系仍在审阅中。作者如欲投他刊, 请先与本刊联系, 切勿一稿两投。
- 3 依照《著作权法》有关规定, 本刊可对来稿做文字修改、删节, 凡有涉及原意的修改, 则提请作者考虑。作者在寄回终修稿须附电子文档。修改稿逾 3 个月不寄回者, 视作自动撤稿。
- 4 来稿须交稿件处理费 100 元。稿件确认刊载后需付版面费。稿件刊登后酌致稿酬, 并赠当期杂志 2 册。
- 5 本刊为《中国学术期刊(光盘版)》的入编期刊, 并已入编《中国期刊网》, “万方数据——数字化期刊群”、“中国知网”“中国核心期刊(遴选)数据库”、中文科技期刊数据库和中文电子期刊服务等。作者向本刊投稿, 视为作者已将著作权保护期内的复制权、发行权、翻译权、汇编权以及信息网络传播权授权给本刊, 而且本刊有权将上述权利转授给第三方, 不同意入编或上网者请预先声明。本刊所付稿酬包含文章内容入编光盘版和入网的报酬, 不再另付。

来稿请挂号邮寄: 上海市张江高科技园区金科路 3577 号, 《实验动物与比较医学》编辑部

邮政编码: 201203 电话: (021)50793648-81018, 50793657 传真: (021)50793648-81019

E-mail: bjb50793657@163.com

<http://med.wanfangdata.com.cn/Journal/shsydwkx.aspx>

《实验动物与比较医学》刊务理事会

《实验动物与比较医学》(原名《上海实验动物科学》)是我国实验动物科学领域第一本学术性刊物,主要报道实验动物与比较医学的最新研究成果、实验方法。为加强实验动物和比较医学领域有关单位及相关企事业单位的横纵向联系和交流,充分发挥社会力量办刊,不断提高刊物的学术质量,特成立《实验动物与比较医学》杂志刊务理事会。

一、理事长

刘瑞三 教授

《实验动物与比较医学》编辑委员会

二、副理事长

黄 韧	教授	广东省实验动物监测所
顾为望	教授	南方医科大学实验动物中心
周正宇	教授	苏州大学动物实验中心
王靖宇	教授	大连医科大学实验动物中心
卢 静	教授	首都医科大学实验动物科学部

三、理事

王 萧	教授	广州中医药大学实验动物中心
王纯耀	教授	河南省实验动物中心
燕顺生	教授	新疆实验动物研究中心
赵四海	教授	西安交通大学医学院实验动物中心
刘忠华	教授	华南农业大学实验动物中心

本理事会秘书长由《实验动物与比较医学》杂志编辑部主任富群华担任,秘书长在理事会领导下负责日常工作。秘书处设在《实验动物与比较医学》杂志编辑部。本会以自由参加和退出自由为原则,随时接纳新的申请单位。

联系人: 富群华 地 址: 上海市浦东金科路 3577 号 邮 编: 201203
电 话: 021-50793648-81018, 50793657, 13818563185 E-mail: bjb50793657@163.com