

《实验动物科学》协办单位

中国农科院哈尔滨兽医研究所

首都医科大学

大连医科大学

河北省实验动物中心

甘肃中医药大学

北京化工大学生命科学与技术学院

凌云博际(北京)科技有限公司

中国食品药品检定研究院

解放军总医院

中国农业大学

军事医学科学院实验动物中心

天津市实验动物管理办公室

北京海东蓝涛洁净工程技术有限公司

《实验动物科学》第七届编委会名单

(排名不分先后)

主 编:贺争鸣

常务副主编:余 铸

执行副主编:荣瑞章 卢胜明 郑 杰 陈 华 陈洪岩 杨果杰 牛屹东

副 主 编:王小珂 李根平 赵德明 张海峰 卢 静 法云智 喻长远 王靖宇

徐增年 张延英 耿志宏 程树斌 刁瑞国 李光鹏 李红良

编 委:韩凌霞 司昌德 岳秉飞 李保文 杜小燕 褚欣平 李瑞生 战大伟

王福金 王爱国 索 勋 杨利峰 刘树锋 张焕铃 刘 源 叶华虎

吴建军 张艳霞 柳占彪 张静姝 王 磊 俞发荣 陈梅丽 刘志勇

吴端生 王天琦 任文陟 吴宝金 褚 芳 吴德国 刘建勋 郑振辉

童 英 冯书堂 石 晶 郑志红 孙德明 代解杰 陈清轩 李显华

陈振文 刘 力 常 在 胡建武

编辑部主任:胡建武

实验动物科学

Shiyan Dongwu Kexue

(1984年创刊)

双月刊

第36卷第1期

2019年2月28日出版

主管:北京市科学技术研究院

100089 北京海淀区西三环北路27号

主办:北京实验动物研究中心

北京实验动物学学会

北京市实验动物管理办公室

主编:贺争鸣

执行副主编:陈洪岩

编辑出版:《实验动物科学》编辑部

地址:北京朝阳区北苑路28号院1号楼9层

邮编:100012

电话:(010)84922374

传真:(010)84922374

E-mail:sydwkx@sina.com

http://www.sydwkx.com

责任编辑:刘兰英

广告联系人:胡建武

广告经营许可:京朝工商广登字20170122号

中国标准连续出版物号:
ISSN 1006-6179
CN 11-5508/N

印刷:北京科信印刷有限公司

发行:河北省廊坊市邮政局

发行范围:国内外公开发行

国内邮发代号:18-131

定价:10.00元

订阅:全国各地邮局

研究报告

- 2011—2017年实验动物遗传质量评价能力验证结果分析 ……
…………… 王洪,魏杰,付瑞,等(1)
- 深Ⅱ度烫伤后小型猪皮肤愈合的组织病理学研究 ……
…………… 邱波,王艳,郑晓霞,等(5)
- GLP屏障环境动物实验室SD大鼠标准生物学指标的建立 ……
…………… 王丽芳,代宝强,谭余庆,等(10)
- 妇糜康阴道栓长期给药对家兔血液生理生化指标的影响 ……
…………… 孟莉,向绍杰,刘小虎,等(17)
- 行为箱形状对小鼠新物体识别实验结果的影响 ……
…………… 杜艳芳,杨洋,毕田田,等(22)
- RT-qPCR检测Wistar大鼠黄嘌呤脱氢酶/氧化酶基因转录水平方法的建立 ……
…………… 王陈芸,李哲丽,叶尤松,等(26)
- 六种核酸提取试剂盒对粪样中小鼠肝炎病毒核酸提取效率的比较 ……
…………… 桂飞,杨伟伟,俞利平,等(31)
- 新生鼠坏死性小肠结肠炎模型建立方法的改进及评价 ……
…………… 席世兵,杨敏,谢集建,等(36)
- 不同剂量异丙肾上腺素致小鼠慢性心肌缺血模型的制备及评价标准的建立 ……
…………… 朱竟赫,刘驰,刘禾,等(41)
- 大鼠与鲫鱼肠道内含物中微生物菌群的研究 ……
…………… 陈芳梅,李伟,刘蔚,等(48)
- 重组人干扰素内皮抑制肽融合蛋白抗肿瘤药效的研究 ……
…………… 刘贺煜,王莹,刘锦辉,等(52)
- 半夏泻心汤对衰老大鼠学习记忆能力的改善及分子机制 ……
…………… 彭旭,张晓梅,何学令,等(55)
- 不同功率532nm激光诱导棕色挪威大鼠脉络膜新生血管模型的实验研究 ……
…………… 孟梁,梁凤鸣,王莉,等(62)

研究简报

- 哺乳期小鼠人工喂养初探 …… 程如越,何方,石磊,等(68)
- 高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪肝模型简介及技术要点探讨 ……
…………… 朱满旭,段小花,王春霞,等(73)
- 昆明小鼠放射性肺炎病理观察 ……
…………… 杨铃,冯玛莉,朱丽娜,等(77)

研究进展

- 大鼠细小病毒检测技术研究进展 ……
…………… 吴定宇,吕瑞青,彭芳(80)
- 广告 …… (封三)
- 广告 …… (封四)

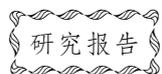
LABORATORY ANIMAL SCIENCE

(Bimonthly, Started in 1984)

Volume 36 Number 1 February 28, 2019

CONTENTS IN BRIEF

- Analysis of Proficiency Testing Results of Laboratory Animals' Genetic Quality during 2011—2017
..... WANG Hong, WEI Jie, FU Rui, *et al* (9)
- Histopathological Study on Skin Wound Healing of Minipig after Deep Second Degree Burn
..... QIU Bo, WANG Yan, ZHENG Xiaoxia, *et al* (9)
- Establish Standard Biological Indicators for Normal SD Rats in GLP Barrier Environment Animal Laboratory
..... WANG Lifang, DAI Baoqiang, TAN Yuqing, *et al* (21)
- Effect of Long Term Administration of Fumikang Vaginal Suppository on Hematology and Blood Biochemical Indexes
in Rabbits MENG Li, XIANG Shaojie, LIU Xiaohu, *et al* (21)
- Influence of the Shape of the Testing Environment on Novel Object Recognition Test in Mice
..... DU Yanfang, YANG Yang, BI Tiantian, *et al* (25)
- Establishment of Real-time Fluorescence Quantitative PCR for Detecting Stranscriptional-level of *XDH/XO* Gene in
Wistar Rats WANG Chenyun, LI Zheli, YE Yousong, *et al* (30)
- Comparation of Six Nucleic Acid Extraction Kits in the Extraction Efficiency of Hepatitis Virus Nucleic Acid in Fecal
Samples GUI Fei, YANG Weiwei, YU Lipin, *et al* (35)
- Improvement and Evaluation of Necrotizing Enterocolitis Models in Neonatal Rats
..... XI Shibing, YANG Min, XIE Jijian, *et al* (40)
- Preparation and Evaluation of Chronic Myocardial Ischemia Model Induced by Different Doses of Isoproterenol
in Mice ZHU Jinghe, LIU Chi, LIU He, *et al* (47)
- Study of Intestinal Flora in Rat and Crucian Carp CHEN Fangmei, LI Wei, LIU Wei, *et al* (51)
- Study on Antitumor Effect of Recombinant Human Interferon Endothelial Peptide Fusion Protein
..... LIU Heyu, WANG Ying, LIU Jinhui, *et al* (61)
- Improvement of Learning and Memory Ability of BXT on Aging Rats and it's Molecular Mechanism
..... PENG Xu, ZHANG Xiaomei, HE Xueling, *et al* (61)
- Experimental Study of Choroidal Neovascularization in Brown Norway Rats Induced by 532 nm Laser at Different
Power MENG Liang, LIANG Fengming, WANG Li, *et al* (67)
- Preliminary Study on Artificial Rearing of Lactating Mice CHENG Ruyue, HE Fang, SHI Lei, *et al* (72)
- Brief Introduction to High Fat Diet-Induced Rat Non-alcoholic Fatty Liver Model and Discussion on Technical
Points ZHU Xiaoxu, DUAN Xiaohua, WANG Chunxia, *et al* (76)
- Pathological Changes of Radiation Pneumonia in Kunming Mice
..... YANG Qian, FENG Mali, ZHU Lina, *et al* (84)
- Advances in Detection of Rat Parvovirus WU Dingyu, LU Ruiqing, PENG Fang (84)



2011—2017年实验动物遗传质量评价能力验证结果分析

王洪 魏杰 付瑞 巩薇 项新华 岳秉飞

(中国食品药品检定研究院,北京 102629)

摘要:目的 通过分析2011—2017年实验动物遗传质量评价能力验证计划的结果,旨在发现各实验室在实验动物遗传质量评价方面存在的问题,了解我国实验动物质量控制的发展趋势。**方法** 按照ISO/IEC17043实施6次能力验证计划,统计各实验室检测能力的变化,对所有参加实验室的能力给予评价。**结果** 全国各实验室累计57次参加了2011—2017年的6次能力验证活动,整体满意率为82.5%。6次能力验证活动的满意率分别为60.0%、80.0%、90.0%、80.0%、90.9%和81.8%,个别实验室出现多次不满意结果。**结论** 通过开展能力验证活动,全国实验动物检测实验室的检测能力得到提升,为我国实验动物质量检测评价体系的建设和发展提供了重要支撑。

关键词:能力验证;实验动物;遗传质量评价

中图分类号: G311 **文献标识码:** C **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0001-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.001

我国的实验动物质量检测体系已经基本形成,在实验动物质量评价领域发挥着积极的作用,为实验动物的质量控制提供保证。但是,在检测体系中,各实验室的检测能力却参差不齐,尤其是进行遗传质量检测的各实验室,少数实验室在设备、人员、管理、设施与环境方面存在严重缺陷,在检测水平以及对新方法的适应性等方面存在着诸多问题。如果长此以往,检测结果的可信度和准确性将受到质疑。因此,迫切需要组织实验动物领域的遗传质量控制实验室参加能力验证活动,来保证实验动物质量控制实验室检测结果的准确性、权威性、公正性和可比性^[1]。

一般通过以下两种方式对实验室的能力进行评价。一,由认可机构(如CNAS)派出评审员,依据ISO/IEC 17025^[2]的相关要求对实验室的能力进行现场评审;二,实验室通过参加能力验证活动来对其能力进行评价。能力验证活动包括能力验证和测量审核^[3]。通过实验室间检测结果的比对来确定或证明实验室的校准、检测能力的方式,即为实验室能力验证(Proficiency Testing,简称PT)。通过开展能

力验证活动有助于发现实验室存在的问题,进一步提高实验室的能力。根据行业发展的需要,中国食品药品检定研究院按照ISO/IEC 17043:2010《合格评定能力验证的通用要求》^[4]于2011—2017年组织实施了6个(含9个项目)实验动物遗传质量检测能力验证计划。能力验证计划的具体名称如下:2011年实验室比对(包括3个项目:酯酶-1,血红蛋白 β 链和酯酶-3),2013年NIFDC-PT-009实验小鼠肾匀浆中碱性磷酸酶-1检测,2014年NIFDC-PT-021实验小鼠肾匀浆中酯酶-3检测,2015年NIFDC-PT-038实验小鼠肾匀浆中苹果酸酶-1和异柠檬酸脱氢酶-1检测,2016年NIFDC-PT-086实验小鼠血清中酯酶-1检测和2017年NIFDC-PT-106实验小鼠肾匀浆中肽酶-3检测。

本研究通过比较各实验室在实验动物遗传质量控制方面的检测能力,旨在发现参加能力验证活动的实验室所存在的问题,深入分析全国省市质检机构的实验动物质量评价体系现状,探讨实验动物行业的实验室如何通过参与能力验证活动来促进检测水平的提升。

收稿日期:2018-08-20

作者简介:王洪、魏杰共同为第一作者

王洪(1977—),女,研究员,硕士,研究方向:动物遗传学.E-mail:littstar@163.com

魏杰(1982—),女,副研究员,硕士,研究方向:动物遗传学.E-mail:jane3040320@163.com

通信作者:岳秉飞(1960—),男,研究员,博士,研究方向:动物遗传学.E-mail:y6784@126.com

项新华(1970—),男,主任技师,研究方向:实验室质量管理工作.E-mail:xiangxh@nifdc.org.cn

1 方案与方法

1.1 能力验证方案设计

能力验证活动的两个关键环节是能力验证计划方案设计以及测试项目选择。2011—2017 年的能力验证计划,选择血红蛋白 β 链,碱性磷酸酶-1,酯酶-3(2 次),苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1,酯

酶-1(2 次)和肽酶-3 作为测试项目,测试项目的选择参考了实验动物遗传质量控制现状,所选项目均为检测实验室在日常检测工作中的必检项目、方法学稳定的项目以及难度较高的项目。这些项目的检测均依据国家标准 GB/T 14927.1-2008,旨在考察实验室对这些测试项目的检验能力以及对实验动物遗传质量的控制能力。具体各年份的项目详情见表 1。

表 1 能力验证项目

Table 1 Projects of Proficiency Testing

编码	计划名称	测试参数	样品数	方法
2011	实验室比对	酯酶-1/血红蛋白 β 链/酯酶 3	6	定性
NIFDC-PT-009	实验小鼠肾匀浆中碱性磷酸酶-1 检测	碱性磷酸酶-1	2	定性
NIFDC-PT-021	实验小鼠肾匀浆中酯酶-3 检测	酯酶-3	3	定性
NIFDC-PT-038	实验小鼠肾匀浆中苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1 检测	苹果酸酶-1/异柠檬酸脱氢酶-1	3	定性
NIFDC-PT-086	实验小鼠血清中酯酶-1 检测	酯酶-1	3	定性
NIFDC-PT-106	实验小鼠肾匀浆中肽酶-3 检测	肽酶-3	3	定性

1.2 样品制备,均匀性检验和稳定性检验

按照 ISO/IEC 17043 进行能力验证计划的样品制备、均匀性检验和稳定性检验。在样品发放前,组织专家对测试项目的选择、样品均匀性检验方案和稳定性检验方案、以及作业指导书进行审核,只有符合条件的项目才准予发放样品。

1.3 方法

本文讨论的 6 个能力验证计划,均制定了相应

的作业指导书,用于规范实验室对样品的检测、分析与保管,同时,推荐实验室采用常规的检测方法。

1.4 结果评价

本文中的 6 个能力验证计划均为定性结果。定性结果,采用与标准结果一致的方法进行分析。依据各年份实验室提交的检测结果,统计各实验室检测能力的变化^[5-10]。将 15 家实验室编号为:A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M、N 和 Q。详见表 2。

表 2 各实验室参加能力验证活动的频次

Table 2 Frequency of Laboratories Participating in the Proficiency Testing

序号	年份	项目名称	实验室名称														
			A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	Q
1	2011	酯酶-1/酯酶-3/血红蛋白			○				○		○		○				○
2	2013	碱性磷酸酶-1	○		○	○	○	○	○	○	○	○				○	○
3	2014	酯酶-3	○		○	○	○	○	○	○	○	○	○			○	
4	2015	苹果酸酶-1 异柠檬酸脱氢酶-1	○		○	○	○	○	○	○	○	○			○		
5	2016	酯酶-1		○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
6	2017	肽酶-3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○			
总计	-	-	4	2	6	5	5	5	6	3	6	5	4	1	3	1	1

2 结果

全国 15 家实验室累计 57 次参加了 6 个能力验证计划,累计发放样本数 176 份。参加实验室的地域分布主要集中在北京、上海、广州、辽宁、吉林、黑龙江、新疆、陕西、四川、广西、湖南、湖北和重庆等地区。行业分布主要集中在国家实验动物中心、省市

级实验动物质量检测机构和科研院所等领域。因为实验室自身原因未能及时提交检测结果,因此累计提交检测结果 54 份。详见表 2。

对参加实验室提交的检测结果进行了统计分析,总体满意率为 82.5%。各项目的满意率详见表 3。从各计划满意率来看,2 个计划的满意率高于总体满意率;3 个计划的满意率与总体满意率持平;1 个计划的满意率低于总体满意率。满意率最高的计

划出现在 2016 年,满意率最低的计划出现在 2011 年。不满意结果出现 10 次,涉及 8 个实验室。15 个实验室中有 9 个持续参加能力验证活动,其中 6 个实验室持续取得满意结果:G 实验室(6 次),I 实

验室(6 次),J 实验室(5 次)和 D 实验室(5 次),H 实验室(3 次),B 实验室(2 次)。此外,连续两次出现不满意结果的实验室是 K 实验室(2016 年和 2017 年)。

表 3 参加能力验证实验室能力评价结果

Table 3 Capability Evaluation on Laboratories Participating in the Proficiency Testing

年份	2017	2016	2015	2014	2013	2011
项目编号	NIFDC-PT-106	NIFDC-PT-086	NIFDC-PT-038	NIFDC-PT-021	NIFDC-PT-009	2011
不满意	2	1	2	1	2	2
总数	11	11	10	10	10	5
满意率	81.8%	90.9%	80%	90%	80%	60%

3 讨论

3.1 能力验证项目的选择

国家标准 GB/T 14927.1—2008 实验动物近交系小鼠、大鼠生化标记检测方法中包括 14 个生化标记位点的检测,2011—2017 年开展的能力验证计划选择了 7 个生化标记位点作为测试项目,包括:血红蛋白 β 链、碱性磷酸酶-1、酯酶-3、苹果酸酶-1、异柠檬酸脱氢酶-1、酯酶-1 和 肽酶-3,其中酯酶-3 和酯酶-1 分别开展了两次能力验证计划。并非所有 14 个位点都适于作为能力验证项目。样本制备后,需要进行均匀性检验和稳定性检验,必须选择稳定性高和可重复性高的项目。测试项目的选择,经过慎重分析实验动物遗传质量控制的现状,选择的 7 个项目均为质检机构日常检测工作中的必检项目,以及不合格率较高的项目。目的在于考察各实验室对这些测试项目的检验能力以及对实验动物遗传质量的控制能力。发放的样本类型包括小鼠全血、小鼠肾匀浆和小鼠血清。

3.2 实验室未提交检测结果的问题

能力验证是对实验室检测质量进行监控的重要手段,也是政府和社会了解实验室检测能力的重要方法^[11]。在 6 次能力验证活动中,共出现过 3 个实验室未提交检测结果的情况,分别出现在 2011 年,2013 年和 2017 年。实验室报名参加能力验证计划后,如果发现自身并不具备相应的检测能力,可以在样本发放前提出申请,退出能力验证计划;如果实验室在接收样品后未开始实验之前,由于自身原因无法开展相应检测,也可以提交退出申请,并原封退回相应样品;如果实验室已经接收样品并已开展检测工作,便不可以提出退出申请。实验室如果由于自

身原因不提交检测结果,根据评价原则,将判定为不满意结果。实验室由于自身原因没有反馈检测结果,说明实验室的质量管理体系存在一定的问题。出现不满意结果的实验室中有两个实验室(N 实验室和 Q 实验室)均为仅参加了一次能力验证计划,结果均为不满意,实验室便没有再参加过实验动物遗传质量检测的能力验证计划,分析其原因为发现自身不具备该项目的检测能力。因此,建议实验室根据自身条件(人员,设备,资质等)对能否完成能力验证计划的检测做出合理判断,并依据变化及时做出相应调整。能力验证计划的终极目的是提高实验室的质量管理水平和质量控制能力,为数据的准确性和可靠性提供外部的质量保证。

3.3 正确看待不满意结果,积极采取有效纠正措施

在 2011—2017 年的 6 次能力验证活动中,57 个结果的总体满意率为 82.5%,表明参加能力验证活动的实验室整体检测水平较高。全国共有 15 个实验室不同频次地参加过我们组织实施的能力验证计划。8 个实验室出现过不满意结果,其中 6 个实验室分别出现过 1 次不满意,2 个实验室各自出现过 2 次不满意。实验室应正确看待不满意结果,出现不满意结果,实验室可以采取有效的纠正措施,可以通过参加测量审核对不满意结果进行纠正。如果连续多次出现不满意结果,无疑是给实验室敲响警钟,提示应予以高度重视,采取措施完善质量管理体系,避免更严重问题的出现。能力验证工作的目的在于识别实验室存在的问题,促进实验室检测能力的提高。

3.4 能力验证工作的重要性

近年来,能力验证活动得到越来越多的实验室重视,2011 年,参加能力验证活动的实验室最少,仅有 5 个。之后逐年增加,2016 年和 2017 年达到最

多,均为 11 个。最近 3 年(2015—2017),持续参加的实验室达到最多。本研究发 现 C 实验室从 2011—2017 年连续 6 次参加能力验证计划,分别在 2011 年和 2014 年出现过两次不满意结果,实验室高度重视,采取应对措施,开展人员培训,检测能力得到提升,在 2015—2017 年连续 3 年取得满意结果。K 实验室没有持续参加能力验证计划,共参加 4 次能力验证计划,却连续两年(2016 年和 2017 年)出现不满意结果。分析结果发现,该实验室频繁调整检测技术人员,初步分析实验室未开展相关培训工作。值得关注的是,有 3 个实验室(C、G 和 I)连续 6 次参加我们组织实施的所有能力验证计划,其中有 2 个实验室(G 和 I)获得全部满意的结果。说明该两家实验室具有高水平的检测能力和完善的质量管理体系。另外,M 实验室在连续 3 次参加能力验证计划后,由于第三次出现了不满意结果,之后便没有再参加该项目的能力验证活动。F 实验室连续 5 年持续参加,仅在第一次为不满意结果,之后连续 4 次满意结果。应该重视能力验证活动对实验动物质量检测工作起到的督导作用。实验动物质量检测机构是通过国家技术监督部门的资质认定以及 CNAS 的认可,并依据国家科技部颁布的《实验动物质量管理办法》和相关规定,通过一定的程序而设立的。质检机构的实验室具有为社会提供公正、准确检验数据的责任和义务。实验动物质量检测机构对能力验证活动应给予高度重视,通过组织和参加能力验证活动,全面了解实验动物质量检测机构的能力状况,客观评价实验室的检验能力。

3.5 能力验证工作的社会效益和发现的问题

参加能力验证活动,为实验室提供了一个评价和证明其检测能力、出具可信数据和结果的重要机会;同时也为实验室提供了一种有效的外部质量监控的方式,为实验室提供了一个寻求改进的契机^[4]。通过 2011—2017 年 6 项能力验证计划的开展,我们发现:参加能力验证的实验室数量逐年增加;项目的满意率逐年上升;我们协助实验室解决问题,很多实验室的检测能力得到逐步提升;全国各实验室对于能力验证工作的重视程度逐年提高。另外,也发现检测工作中存在诸多问题:1,个别实验室的检测人员专业检测能力不足;2,检测人员对检测方法的掌握程度和理解判断水平不足;3,对能力验证作业指导书和国家标准理解不透彻;4,实验室检

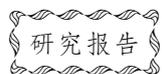
测人员频繁调动;5,缺乏相关技术培训。能力验证活动的开展,可以起到警示作用,促进实验动物行业的质检机构提高风险意识和忧患意识,及时发现问题,提高检测能力,同时提高实验动物质检机构的竞争力。1 次不满意结果不代表实验室不具备相应能力;1 次的满意结果也不代表实验室的检测水平一成不变。建议实验室能够持续参加能力验证活动,提升实验室检测能力。

综上所述,通过分析 2011—2017 年实验动物遗传质量评价能力验证计划的结果,发现各实验室存在的问题,促进了全国实验动物检测实验室检测能力的提升。我们应从整个实验室质量控制的角度,主动开展能力验证活动,充分认识能力验证工作的重要性,建立实验室能力验证的长效机制,做好能力验证工作,这对实验动物质量检测机构能力的持续改进和提高十分重要。

参 考 文 献

- [1] 贺争鸣,李根平.建立和完善全国实验动物质量抽查检验的新机制[J].实验动物科学,2011,28(4):43-45.
- [2] ISO/IEC 17025:2005 检测和校准实验室能力认可准则[S].2005.
- [3] 毛敏,项新华,肖镜.2013 年食品药品系统实验室能力验证结果分析[J].中国药事,2015,29(11):1145-1150.
- [4] 世界标准化组织.ISO/IEC 17043:2010 Conformity Assessment-General Requirements for Proficiency Testing[M].北京:中国计量出版社,2012.
- [5] 王洪,魏杰,李芳芳,等.实验动物质检机构碱性磷酸酶-1 测定能力验证评价[J].中国药事,2014,28(12):1339-1341.
- [6] 王洪,魏杰,于鹏丽,实验小鼠肾匀浆中苹果酸酶-1 和异柠檬酸脱氢酶-1 实验室检测能力验证结果评价[J],中国实验动物学报,2016,24(2):199-203.
- [7] 王洪,贺争鸣,魏杰,2013—2015 年实验动物质量检测机构实验室能力验证结果分析[J],实验动物科学,2016,33(1):45-48.
- [8] 魏杰,王洪,巩薇,等.实验小鼠肾匀浆中酯酶-3 的实验室测定能力验证结果评价[J],中国实验动物学报,2016,24(2):204-207.
- [9] 魏杰,王洪,李芳芳,等.实验室能力验证用酯酶-3 标准样品的均匀性和稳定性研究[J],中国药事,2015,29(3):277-280.
- [10] 魏杰,王洪,巩薇,等.实验小鼠血清中酯酶-1 的检测能力验证结果评价[J].中国比较医学杂志,2017,27(3):63-67.
- [11] ISO/IEC 17011:2004 合格评定认可机构通用要求[S].2004.

(下转至第 9 页)



深Ⅱ度烫伤后小型猪皮肤愈合的组织病理学研究*

邱波¹ 王艳² 郑晓霞¹ 张海静¹ 张鑫¹ 王凤乾¹ 胡建廷¹

(1. 山东省药学院, 山东省化学药物重点实验室, 济南 2501010)

(2. 山东英才学院, 济南 250104)

摘要:目的 建立猪深Ⅱ度烫伤模型, 观察皮肤在不同时间点修复的组织病理学变化。方法 通过使用恒温烫伤仪制备小型猪皮肤深Ⅱ度烫伤创面。分别在第1、3、7、14、21、28天观察皮肤创伤愈合的肉眼形态学变化并进行创面愈合率的测定, 根据皮肤组织愈合的规律及实验的可操作性, 选择性地第1、14、28天取样, 利用HE、Masson染色及免疫组化CD31染色的方法观察皮肤在不同时间点修复的动态病理学变化。结果 通过对创面愈合率的测定, 雄性猪与雌性猪相比, 雄性猪烫伤创面的愈合速率较快。烫伤后皮肤组织经不同染色方法证实损伤已累积到真皮深层, 达到深Ⅱ度烫伤的标准。在随后选择的第14天和28天, 损伤后皮肤组织分别进行了不同程度的组织修复。深Ⅱ度烫伤28d后, 小型猪皮肤已经基本愈合, 但皮肤组织还未完全成熟。除表皮各层相对成熟外, 真皮层内还未完全形成瘢痕组织。结论 雄性猪与雌性猪相比, 雄性猪烫伤创面的愈合速率较快。

关键词:小型猪; 深Ⅱ度烫伤; 皮肤; 组织病理学

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0005-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.002

烫伤是外科常见的创伤性疾病, 大多数烫伤多为Ⅱ度以下的中、小面积烫伤^[1]。为了更好地研究人类皮肤烫伤这一外科常见疾病, 选择符合临床发病过程和创面主要因素的动物模型至关重要^[2-4]。研究烫伤动物模型应选用与人体结构、功能、代谢及特征相似的动物。小型猪皮肤组织结构与人类很相似^[5], 包括体表毛发的疏密、表皮厚薄、皮下脂肪层、表皮形态学和增生动力学(猪30d, 人21d), 以及皮肤烧伤后的体液和代谢变化等均非常相似, 是进行各种皮肤创伤动物模型制备的理想选择。文献报道的烫伤模型制备方法有电热烫伤和恒温恒电压烫伤, 这些方法在运用当中各有其优缺点^[6-8]。本研究参考上述烫伤方法的条件, 使用恒温烫伤仪, 将恒温烫伤仪探头于110℃下, 持续接触20s, 压力约1000g, 于巴马小型猪背部脊柱侧制备深Ⅱ度烫伤创面, 每个烫伤创面面积约为20cm²。分别在第1、3、7、14、21、28天观察皮肤创伤愈合情况, 根据皮肤组织愈合的规律及实验的可操作性, 选择在第1、

14、28天取样, 利用HE、Masson染色及免疫组化CD31染色的方法观察皮肤在不同时间点修复的动态病理学变化。

1 材料与方法

1.1 动物来源与饲养环境

巴马小型猪普通级, 12只, 雌雄各半, 4~6月龄, 平均体质量14.6kg, 体长约65cm, 体高32cm左右, 胸围55cm; 由北京实创世纪小型猪养殖基地提供, 生产许可证号: SCXK(京)2013 0008, 实验动物质量合格证号: 111014000000241, 试验前适应性饲养1周以上。

饲养条件: 巴马小型猪置不锈钢笼中于普通级环境饲养, 每笼1只。室温19~26℃, 湿度40%~70%, 日温差≤4℃, 换气次数8~10次/h, 昼夜明暗交替时间12h/12h。实验动物使用许可证号: SYXK(鲁)2014 0008。

收稿日期: 2018-08-05

* 基金项目: 山东抗体类和疫苗类生物药物临床前评价公共服务平台的完善与运行(No.2015CXPT00001)

作者简介: 邱波(1983—), 男, 主管药师, 硕士, 研究方向: 药物的毒性病理学. E-mail: qiubo.1983@163.com

通信作者: 胡建廷(1979—), 男, 副主任药师, 硕士, 研究方向: 药物的毒性病理学. E-mail: jiantinghu@126.com

1.2 试剂及仪器

苏木素-伊红(HE)染色液由珠海贝索生物技术有限公司提供。SP-0023 Histostain™-Plus Kits 免疫组化试剂盒,规格:18 mL,批号:AG08164417,由北京博奥森生物技术有限公司提供。HT15-1KT Masson 染色试剂盒,规格:50 mL,批号:20170710,由美国 SIGMA-ALDRICH 公司生产。

YLS-5Q 台式超级温控烫伤仪,由济南益延科技发展有限公司生产。

1.3 方法

分别在烫伤后第 1、3、7、14、21、28 天观察皮肤创伤愈合的肉眼形态学变化并进行创面愈合率的测定。创面愈合率的测定方法为在巴马小型猪烫伤后第 1、3、7、14、21、28 天,分别对创面进行拍照,用 ImageJ 图像分析系统测算创面愈合残留面积(newarea at interval time, AI)与愈合面积百分率(healing rate, HR), $HR = (AO - AI) / AO \times 100\%$, AO (original incisional area) 为烫伤后第 1 天创面面积^[9]。选择在第 1、14、28 天的皮肤创面上分别切取约 1.5 cm×1.0 cm×1.0 cm 的皮肤组织,经 10% 甲醛液固定进行常规脱水、包埋、石蜡切片、HE 染色,并根据说明书步骤分别进行免疫组化 CD31 染色和

Masson 染色^[10]。

1.4 统计方法

采用 SPSS16.0 软件对数据进行统计分析。定量指标采用均数±标准差描述。用单因素方差分析(ANOVA)进行统计学检验;差异有统计学意义时($P \leq 0.05$),所有检验均为双侧检验 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 创面大体观察

烫伤制备后,创面呈现与烫伤探头形状相同的圆形,创面发白,无光泽,偶见轻微出血,烫伤创面与周围组织界限明显,略低于周围正常皮肤,质地较软,无渗出及分泌物。烫伤后第 1 天至 7 天,烫伤表面逐渐由白色转变为暗红色,无异味及分泌物,质地逐渐变硬,多数创面形成焦痂,触之皮革感。第 7 天至第 14 天,烫伤创面全部形成灰色焦痂,创面面积有收缩趋势,有少量创面焦痂部分脱落,脱落后皮肤呈粉红色,触之柔软。烫伤第 14 天至 28 天,烫伤伤口逐渐脱痂,完成再上皮化,脱痂后皮肤多数呈暗红色,少数与正常皮肤颜色相同。创面处有毛发生长。图 1 A-F 分别为烫伤后第 1、3、7、14、21、28 天后的肉眼形态学观察。

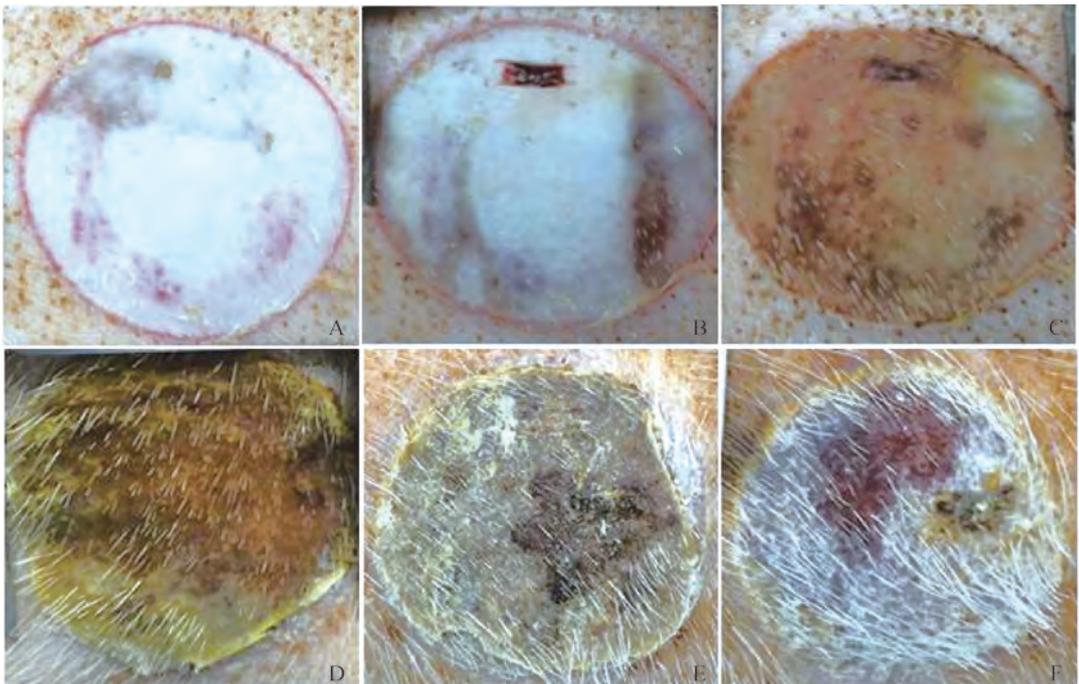


图 1 小型猪背部皮肤烫伤后不同时期的肉眼形态学观察

Fig. 1 The gross morphology of skin wound healing of Minipig after deep second degree burn at different times

2.2 创面愈合率

对不同时间点的创面进行拍照,用 ImageJ 图像分析系统测算创面愈合残留面积 (newarea at interval time, AI) 与愈合面积百分率 (healing rate, HR),巴马小型猪背部皮肤烫伤后不同时期的愈合率见表 1。由表 1 可见,雄性猪与雌性猪相比,雄性猪烫伤创面的愈合速率较快。

2.3 组织病理学

烫伤皮肤分别经 HE、Masson、CD31 染色方法进行组织病理学检查,图 2A-C 显示损伤已经累积到真皮深层,达到深 II 度烫伤的标准。图 2D-L 显示烫伤后皮肤组织分别在第 14 天和第 28 天修复的组织病理学变化。具体组织病理学变化见图 2。

表 1 巴马小型猪背部皮肤烫伤后不同时期的愈合率

Table 1 Healing rate at different periods after burn on the skin of Ba-Ma Minipig's back

烫伤天数	性别	愈合率/%
第 3 天	♀	2.970± 1.352
	♂	3.503± 2.788
第 7 天	♀	7.312± 1.540
	♂	7.642± 2.170
第 14 天	♀	19.992± 3.417
	♂	13.570± 4.397
第 21 天	♀	36.691± 7.865
	♂	60.965±19.776
第 28 天	♀	76.169±15.302
	♂	92.408± 4.814

注: n = 12, $\bar{x} \pm s$ Note: n = 12, $\bar{x} \pm s$

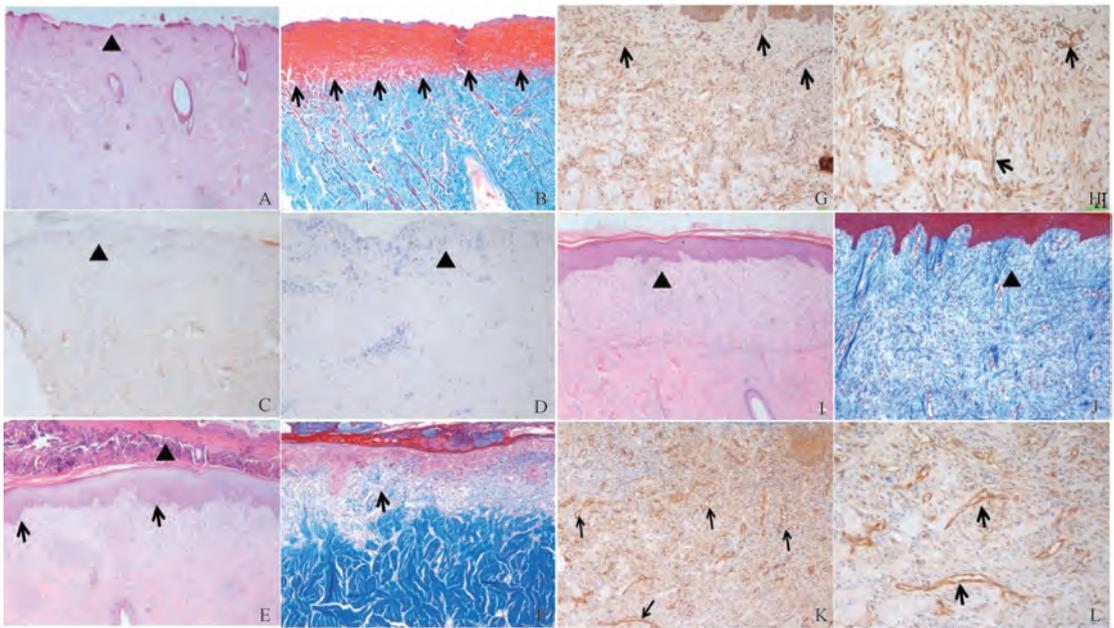


图 2 巴马小型猪深 II 度皮肤烫伤后的病理组织学观察

注:A:烫伤第 1 天:创面表皮全层变性坏死脱落(三角形所示),真皮深层呈凝固性坏死。(HE,×40);B:真皮层内胶原纤维肿胀变性呈均质红染条索状(箭头所示)。(Masson 染色,×100);C:真皮深层显示未见标记的血管内皮细胞(三角形所示)。(CD31 染色,×100);D:图 C 高倍镜下观察(三角形所示)。(HE,×200);E:烫伤第 14 天:创面由新生表皮覆盖,表皮局灶性上皮岛增生(箭头所示),还可见表皮上方的结痂(三角形所示)。(HE,×40);F:真皮深层内有少量淡染的胶原纤维(箭头所示)。(Masson 染色,×100);G:烫伤第 14 天:创面有少量血管(箭头所示)。(CD31 染色,×100);H:图 G 的高倍镜下观察(箭头所示)。(HE,×200);I:烫伤第 28 天:创面完全由新生表皮覆盖(三角形所示),真皮深层内含有较多的肉芽组织。(HE,×40);J:真皮深层内有多量淡染的胶原纤维(三角形所示)。(Masson 染色,×100);K:烫伤第 28 天,创面有大量血管(箭头所示)。(CD31 染色,×100);L:图 K 的高倍镜下观察(箭头所示)。(HE,×200)

Fig. 2 Histopathological observation on skin wound healing of minipig after deep second degree burn

Note: A: On the first after burn, The epidermis show degeneration, necrosis and exfoliation (triangle), dermal manifeste as coagulative necrosis. (HE,×40); B: Collagen fibers in the layer of the dermis show swelling and degeneration, stained homogeneous red dyed cords (arrow). (Masson,×100); C: CD31 staining showed there is no blood vessel (triangle) (CD31 staining,×100); D: Higher magnification of Figure C (triangle). (HE,×200); E: On the 14th post burn, the wound covered with the newly grown epithelium, epithelial islands hyperplasia (arrow) and scab (triangle). (HE,×40); F: A small amount of lightly stained collagen fibers in the deep dermis (arrow). (Masson,×100); G: On the 14th, a little of blood vessel can be seen in the wound. (CD31,×100); H: Higher magnification of Figure G (arrow). (HE,×200); I: On the 28th, The wound is completely covered by the new epidermis (triangle), the more granulation tissue is present in the deeper layer of the dermis. (HE,×40); J: Lightly stained collagen fibers in the deep dermis (triangle). (Masson,×100); K: On the 28th, a great many blood vessel can be seen in the wound. (CD31,×100); L: Higher magnification of Figure K (arrow). (HE,×200)

3 讨论

皮肤创伤愈合包括各种组织的再生和肉芽组织增生、瘢痕组织形成的复杂组合,表现出各种过程的协同作用。而不同层次和深度的皮肤烫伤引起的组织细胞变性坏死,会决定创面的修复方式,并直接影响皮肤的预后^[11]。对于人的皮肤来说:如 I 度烫伤因为基底细胞健在,无需特殊治疗,不影响预后,无疤痕;浅 II 度烧伤累积表皮全层和部分真皮浅层乳头层,真皮层中的毛囊、汗腺和皮脂腺等附属器健在,2 周内可以自愈;而深 II 度烧伤累积到真皮深层,真皮层中还有部分的毛囊、汗腺和皮脂腺等附属器健在,需要 3~5 周才能康复。

本试验通过对烫伤创面的组织学检查,证实损伤已经累积到真皮深层,建立了猪深 II 度烫伤模型。随后观察深 II 度烫伤的皮肤在不同时间点修复的病理学变化。肉眼形态学观察,烫伤后第 1 天至 7 天,烫伤表面逐渐由白色转变为暗红色,无异味及分泌物,质地逐渐变硬,多数创面形成焦痂,触之皮革感。第 7 天至第 14 天,烫伤创面全部形成灰色焦痂,创面面积有收缩趋势,有少量创面焦痂部分脱落,脱落后后的皮肤呈粉红色,触之柔软。烫伤第 14 天至 28 天,烫伤伤口逐渐脱痂,完成再上皮化,脱痂后皮肤多数呈暗红色,少数与正常皮肤颜色相同。创面处有毛发生长。愈合率结果显示,雄性猪烫伤创面的愈合速率较快。组织病理学变化显示,烫伤后第 1 天,烫伤早期时创面表皮全层变性坏死脱落,真皮深层组织呈凝固性坏死,坏死组织内的胶原纤维经 Masson 染色染为橘红色,也未见标记的血管内皮细胞。烫伤后第 14 天,以肉芽组织增生为主。创面基本由新生表皮覆盖,表皮中局灶性上皮岛增生,皮肤附件修复良好。真皮深层中可见新生的肉芽组织及少量的胶原纤维

生成,肉芽组织内血管数量相对较少。烫伤第 28 天,皮肤已经基本愈合。除表皮各层相对成熟外,真皮层内还含有肉芽组织及胶原纤维,肉芽组织内的血管数量及胶原纤维的含量均较烫伤后第 14 天增多,但该时期内皮肤组织还未完全成熟,此期内肉芽组织还是在向瘢痕组织进行转变,这一转变过程可能还需要一段时间来完成皮肤组织的完全修复。

参考文献

- [1] 钟志勇,谢超敏,严家荣,等.比较烫伤和烧伤致小型猪皮肤深二度损伤的异同[J].实验动物科学,2012, 29(4):29-33.
- [2] 孙同柱,付小兵,陈伟,等.防疤烧伤膏与京万红促进烫伤创面愈合作用的比较研究[J].中国临床康复,2002, 6(20):3106-3107.
- [3] 付小兵,程飏,盛志勇.创面愈合与瘢痕形成的分子学研究[J].中国临床康复,2002,6(4):464-466.
- [4] Somboonwong J, Thanamitramaness S, Jariyapongskul A, et al. Therapeutic effects of Aloe vera on cutaneous microcirculation and wound healing in second degree burn model in rats.[J] Journal of the Medical Association of Thailand, 2000, 83(4):417-425.
- [5] 张静,赵自刚主编.医学科研方法学[M].北京:军事医学科学出版社,2008:103-104.
- [6] 付小兵,王德文.现代创伤修复学[M]北京:人民军医出版社,1999:213-233.
- [7] 施新猷.医用实验动物学[M].西安:陕西科学技术出版社,1989:64-67.
- [8] Singer A, Thode H Jr, McClain S. The effect of octylcyanoacrylate on scarring after burns. [J]. Academic Emergency Medicine,2001,8:107-111.
- [9] 李学川,郇京宁,章雄,等.猪深 II 度烫伤早期磨结痂术后创面组织学改变及 CK 和 EGFR 表达[J].上海交通大学学报(医学版),2009,29(5):554-557.
- [10] 温馨蔚,崔瑜霞,余蓉.纤维结合蛋白复方制剂在创伤修复模型上的实验研究[J].华西药理学杂志,2011,26(5):463-465.
- [11] 李敏,姚梅宏,曾玲. PASM-Masson 染色法在肾穿刺活检特殊染色中的应用与体会[J].临床与实验病理学杂志, 2014, 30(6): 693-694.

Histopathological Study on Skin Wound Healing of Minipig after Deep Second Degree Burn

QIU Bo¹, WANG Yan², ZHENG Xiaoxia¹, ZHANG HaiJing¹, ZHANG Xin¹, WANG Fengqian¹, HU Jianting¹

(1. Shandong Pharmaceutical Academy, Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drug, Jinan 250101, China)

(2. Shan Dong Ying Cai University, Jinan 250104, China)

Abstract: Objective To establish the model of porcine deep second degree burn and observe the histopathological changes of the skin at different time points. **Method** Use the constant temperature scaler to prepare minipig deep second degree burn. The morphological changes of the wound were observed and the healing rate was measured on the 1st, 3rd, 7th, 14th, 21st and 28th day, respectively. According to the rule of skin tissue healing and the operability of the experiment, scalded tissue was sampled on the 1st, 14th and 28th day, respectively. The histopathological changes of the skin were observed at different time points by HE, Masson staining and immunohistochemical staining with anti-CD31 antibody on the 1st, 14th and 28th day. **Result** Postburn skin tissue has accumulated into the deep dermis and is confirmed to reach the standard deep second degree burn by using the different methods. On the 14th and 28th day of the postburn, different degrees of tissue repair is performed on the damaged skin respectively. On the 28th day of deep second degree burn, the skin has basically healed, but the skin tissue has not yet fully matured. In addition to the relatively mature layers of the epidermis, the dermis has not yet fully formed the scar tissue.

Conclusion The healing rate of male pigs is faster than female pigs.

Key words: minipig; deep second degree burn; skin; histopathology

(上接第4页)

Analysis of Proficiency Testing Results of Laboratory Animals' Genetic Quality during 2011—2017

WANG Hong, WEI Jie, FU Rui, GONG Wei, XIANG Xinhua, YUE Bingfei

(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China)

Abstract: Objective Proficiency testing (PT) during 2011—2017 were evaluated in order to find problems of laboratories and to understand the change of the testing capacity of laboratories. **Method** According to ISO/IEC 17043, six PT were carried on and the change of the testing capacity was analyzed. The capacity of all the laboratories was evaluated. **Result** Totally 57 laboratories participated in the six PT. The average satisfaction rate was 82.5%. The satisfaction rate of six PT was 60.0%, 80.0%, 90.0%, 80.0%, 90.9% and 81.8%, respectively. **Conclusion** PT can help laboratories to increase their testing capacity and strengthen the system construction of laboratory animals' quality monitoring.

Key words: proficiency testing; laboratory animal; genetic quality evaluation



GLP 屏障环境动物实验室 SD 大鼠标准生物学指标的建立

王丽芳 代宝强 谭余庆 刘婷 王洋

(中国中医科学院中药研究所,北京 100029)

摘要:目的 建立中药安全评价中心(GLP)屏障环境动物实验室的正常 SD 大鼠在长期毒性试验中的生物学指标,为以后研究人员提供参考指标。**方法** 收集长期毒性试验的 10 批次正常对照组 SD 大鼠,正常饲养,每周测定一次体质量增长及摄食量,在第 3、6 个月及恢复期结束时各测定一次脏器指数、血液和生化指标。**结果** 雄性 SD 大鼠的摄食量较高,体质量呈线性增长趋势,高于雌性,雄性大鼠的脏器指数有所下降,表明雄性大鼠生长发育、饲料利用率比雌性大鼠快,血液和生化指标无明显变化。**结论** 这些正常数据指标可为以后 GLP 屏障环境动物实验室的大鼠试验提供参考指标。

关键词: GLP;SD 大鼠;指标

中图分类号: Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0010-08

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.003

大鼠是实验室广泛使用的模型动物,在毒理学、药物、行为学、营养学和代谢疾病等多个研究中都有较为广泛的应用^[1-2],大鼠可作为许多疾病模型,如自发性高血压、抑郁症、子宫内膜炎、过敏性哮喘、神经性疼痛、糖尿病、大鼠高脂血症和房颤等^[3-10],马秀兰等^[11]探讨了成年大鼠脏器系数,陈长勋等^[12]测定了正常 SD 大鼠的部分生物数据,孙于兰等^[13]探讨了喂养 SD 大鼠 30 d 的食物利用率及脏器系数的正常值,由于样本数较小,环境不一,且统计数据较少,因此具有局限性,但是由于试验过程中大鼠的遗传、周龄、性别、个体差异、喂养环境、设施、测量仪器、来源等多项因素的差异,对一些应激产生的反映也各不相同,大鼠的组织、脏器等的生长发育、运行状态也不尽相同,对大鼠的血液及生理生化指标也会产生影响^[14-18],目前 GLP 屏障环境动物实验室正常 SD 大鼠的标准生物学指标尚未十分明确。本文统计分析 GLP 屏障环境动物实验室 10 批次长期毒性试验的正常对照组 SD 大鼠饲喂过程中的日常摄食量、体质量增长、脏器指数、血液指标及生化指标,建立正常 SD 大鼠的标准生物学指标数据,为以后 SD 大鼠长期毒性试验提供全面、可靠的正常值数据参照标准,和以后 GLP 屏障环境动物实验室的大鼠

试验提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物及饲养管理

实验在中国中医科学院中药安全评价中心屏障环境动物实验室进行,选取 SPF 级,体质量 120~140 g 健康 SD 大鼠,饲养在中国中医科学院中药研究所屏障环境动物实验室,使用许可证 SYXK(京)2013-0035,各组均正常给予饲料及饮水,饲料经⁶⁰Co 照射、饮水经反渗透净化处理、垫料均采用 125 ℃ 高压灭菌。雌 2 000 只,雄 2 000 只,分成 10 批次,每批次雌雄各 200 只,每组 10 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,许可证号 SCXK(京)2012-0001,饲料为大鼠维持饲料,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。分笼饲养,每 5 只一笼,雌雄分开,室温 20 ℃ 左右,雄性大鼠体质量达到 200 g 时再次分笼。

1.2 大鼠一般情况与行为学观察及摄食量、体质量检测

10 批次作为长期毒性试验的正常对照组 SD 大鼠适应性饲喂一周后,再饲养 7 个月,包括 6 个月测试时期和 1 个月恢复期,每天观察大鼠的一般情况与行为

收稿日期:2018-05-30

作者简介:王丽芳(1973—),女,主管技师,研究方向:专业公共事业(卫生事业)管理.E-mail:wanglifang73@163.com

通信作者:王洋(1989—),女,博士后,研究方向:中药药理学.E-mail:364271130@qq.com

学,包括精神状态,皮毛色泽,运动,对外界的反应是否灵敏,有无多饮多食,有无腹泻、便秘交替。每周精确称取一次大鼠的体质量与摄食量,并做好记录。

1.3 大鼠脏器指数、血液指标及血清生化指标检测

分别饲喂大鼠 3、6 个月后按照 48 mg/kg 体质量注射 0.8% 戊巴比妥钠麻醉各组大鼠,解剖检查及计算大鼠心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、脑、睾丸/卵巢、附睾/子宫系数等脏器系数。相对脏器系数计算公式为:脏器系数 = 脏器质量 (g)/体质量 (g) × 100%。

分别于 3、6、7 个月后采用腹主动脉采血,使用全自动生化分析仪 (东芝,40FR) 分析各组大鼠中血液指标,包括 RBC、HCT、MCV、RDW、HGB、MCH、MCHC、PLT、PCT、MPV、PDW、WBC、LYM%、NEUT%、EOS%、BASO%、MONO%、RET、PT、APTT。另取静脉血,3 000 g 离心 15 min 分离血清,测量血生化指标,包括:TP (g/L)、ALB (g/L)、TBIL (μmol/

L)、AST (U/L)、ALT (U/L)、ALP (U/L)、GGT (U/L)、CK (U/L)、CRE (μmol/L)、UREA (mmol/L)、GLU (mmol/L)、CHO (mmol/L)、TG (mmol/L)、A/G (mmol/L)、GLB (mmol/L) 和 O/P (mmol/L)。

1.4 统计方法

使用 SPSS20.0 统计软件对各组数据进行统计分析,采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 比较显著性差异,结果表示为 ($\bar{x} \pm s$),检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 一般行为学观察、体质量及摄食量观察

通过观察各组大鼠的一般行为学状态正常:精神状态良好,皮毛色泽洁白,有光泽,运动状态良好,对外界的反应灵敏,无多饮多食,无腹泻、便秘交替现象。同性别大鼠摄食量无显著差异,体质量呈增长迅速,雄性比雌性增长速度快,摄食量也多,说明雄性 SD 大鼠比雌性生长发育速度快 (表 1~4)。

表 1 10 批正常 SD 大鼠 (♂) 7 个月中的摄食量变化 (g, $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Dietary change of ten batches of normal SD rats (♂) during 7 months (g, $\bar{x} \pm s$)

时间	1 W	2 W	3 W	4 W	5 W	6 W	7 W	8 W	9 W	10 W
个数	40	40	40	44	44	65	76	76	76	76
平均值	21.49±2.66	25.40±1.79	26.33±2.66	27.25±2.71	28.42±2.50	26.69±5.35	29.14±2.33	28.90±2.54	29.29±2.62	28.81±2.48
最小值	16.60	19.91	18.12	18.85	20.00	11.30	23.40	22.80	23.40	21.70
最大值	26.10	28.15	30.90	33.80	32.80	34.07	35.60	35.36	34.72	34.50
时间	11 W	12 W	13 W	14 W	15 W	16 W	17 W	18 W	19 W	20 W
个数	76	76	74	55	55	55	55	55	55	55
平均值	28.90±2.69	28.89±3.22	28.37±2.43	27.55±2.22	28.70±4.04	28.52±3.10	28.95±2.99	28.47±2.15	28.63±1.71	28.47±2.26
最小值	21.50	23.17	22.50	22.83	21.33	19.30	23.00	21.90	25.14	24.48
最大值	41	42.2	35.9	32.6	47.9	39.3	38.5	32.24285714	32.76190476	34.8
时间	21 W	22 W	23 W	24 W	25 W	26 W	27 W	28 W	29 W	30 W
个数	55	55	55	55	55	55	20	20	20	20
平均值	28.40±2.68	27.91±2.21	28.55±1.85	28.02±2.03	28.92±1.87	28.49±1.96	28.41±2.06	28.63±1.77	29.05±1.52	29.32±2.21
最小值	23.50	23.93	24.19	22.96	25.50	23.80	22.00	24.90	25.36	25.70
最大值	39.50	34.40	33.40	33.20	32.60	32.10	30.75	31.78	31.83	33.10

表 2 10 批正常 SD 大鼠 (♀) 7 个月中摄食量变化 (g, $\bar{x} \pm s$)

Table 2 Dietary change of ten batches of normal SD rats (♀) during 7 months (g, $\bar{x} \pm s$)

时间	1 W	2 W	3 W	4 W	5 W	6 W	7 W	8 W	9 W	10 W
个数	40	40	40	40	40	40	40	40	40	40
平均值	17.53±2.37	17.97±1.16	18.32±1.46	19.54±1.61	19.77±1.94	18.86±2.48	19.44±1.66	18.74±1.70	18.72±2.15	18.55±2.26
最小值	10.40	14.80	15.10	16.90	14.30	11.80	16.60	14.90	13.40	13.10
最大值	23.80	20.10	20.82	26.60	25.21	24.65	25.67	25.59	26.32	27.56
时间	11 W	12 W	13 W	14 W	15 W	16 W	17 W	18 W	19 W	20 W
个数	40	40	39	30	30	30	30	30	30	30
平均值	18.89±1.54	18.79±1.61	18.11±2.03	17.88±1.79	18.18±1.77	18.11±1.37	18.27±1.34	18.37±1.84	18.26±1.58	18.72±1.60
最小值	16.00	15.71	13.90	12.20	13.50	13.80	15.80	13.10	14.10	13.40
最大值	24.22	25.25	22.74	20.57	21.35	20.30	21.17	21.28	22.94	21.70
时间	21 W	22 W	23 W	24 W	25 W	26 W	27 W	28 W	29 W	30 W
个数	30	30	30	30	30	30	10	10	10	10
平均值	18.82±1.88	18.70±1.67	18.44±1.67	18.42±1.75	18.94±2.08	19.08±1.67	18.12±1.96	18.78±3.05	18.95±1.63	19.61±2.34
最小值	13.80	13.30	14.80	14.80	14.10	15.20	15.90	13.50	17.12	16.80
最大值	22.74	22.50	21.92	23.07	22.29	21.51	21.80	22.42	21.68	22.57

表 3 10 批正常 SD 大鼠 (♂) 7 个月中体质量增长 (g, $\bar{x} \pm s$)

Table 3 Weight gain of ten batches of normal SD rats (♂) during 7 months (g, $\bar{x} \pm s$)

时间	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	5 W	6 W	7 W	8 W	9 W	10 W
个数	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
平均值	130.37±12.27		250.56±24.82		355.30±31.52		428.69±40.62		481.32±49.08		520.85±54.01
		188.17±24.25		309.49±27.54		392.59±36.96		456.50±44.46		502.36±52.11	
最小值	104.30	119.70	182.20	231.10	259.40	282.70	302.00	314.00	330.40	353.10	363.00
最大值	157.50	227.00	300.30	370.10	431.50	483.90	527.80	571.80	603.00	629.10	653.00
时间	11 W	12 W	13 W	14 W	15 W	16 W	17 W	18 W	19 W	20 W	
个数	200	200	190	150	150	150	150	150	150	150	
平均值	539.53±57.58		563.95±62.36		588.01±65.21		610.55±68.51		630.96±72.58		
		551.43±60.18		578.73±65.21		599.05±65.76		620.29±70.18		637.52±73.31	
最小值	375.80	392.80	393.30	399.60	410.10	418.50	426.90	438.00	447.00	464.00	
最大值	680.30	707.40	721.60	743.40	743.20	751.50	776.40	785.60	808.90	815.20	
时间	21 W	22 W	23 W	24 W	25 W	26 W	27 W	28 W	29 W	30 W	
个数	150	150	150	150	150	149	50	50	50	50	
平均值	646.09±76.47		661.24±77.85		677.94±80.74		682.61±72.72		696.36±75.39		
		653.21±76.71		670.05±79.00		683.31±82.01		690.89±72.86		702.86±76.03	
最小值	462.10	468.30	477.20	487.70	497.00	496.30	522.00	529.50	525.60	536.80	
最大值	834.30	840.10	854.00	866.90	882.40	883.00	882.70	878.90	894.10	904.10	

表 4 10 批正常大鼠 (♀) 7 个月中体质量增长 (g, $\bar{x} \pm s$)

Table 4 Weight gain of ten batches of normal SD rats (♀) during 7 months (g, $\bar{x} \pm s$)

时间	0 W	1 W	2 W	3 W	4 W	5 W	6 W	7 W	8 W	9 W	10 W
个数	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
平均值	121.06±10.17		185.34±15.08		228.05±18.74		257.03±22.13		271.97±23.59		284.59±24.57
		155.57±15.57		209.91±16.40		243.76±21.02		266.08±22.42		277.99±24.33	
最小值	93.90	115.60	148.00	168.70	180.80	180.30	193.70	201.70	200.90	211.70	214.00
最大值	146.30	191.50	234.10	262.30	289.60	313.30	335.10	345.70	377.30	405.20	388.00
时间	11 W	12 W	13 W	14 W	15 W	16 W	17 W	18 W	19 W	20 W	
个数	200	200	190	150	150	150	150	150	150	150	
平均值	290.09±26.17		299.28±27.93		308.33±30.52		315.87±32.43		323.44±33.77		
		294.83±27.80		303.39±29.62		311.02±31.72		319.11±33.37		326.18±34.92	
最小值	222.70	218.90	223.40	228.50	221.30	221.50	230.20	235.00	237.90	238.40	
最大值	396.70	413.10	440.80	460.60	462.00	461.10	463.90	467.60	475.40	480.60	
时间	21 W	22 W	23 W	24 W	25 W	26 W	27 W	28 W	29 W	30 W	
个数	150	150	150	150	150	150	50	50	50	50	
平均值	330.76±35.84		337.43±37.08		345.83±40.44		349.33±34.67		355.59±38.03		
		333.67±36.74		341.18±38.28		349.08±40.99		353.29±37.11		362.14±37.87	
最小值	246.70	250.60	250.40	244.80	251.90	254.00	292.20	292.10	290.10	283.40	
最大值	489.60	494.70	502.40	512.40	529.70	531.50	439.10	449.10	459.80	471.10	

2.2 大鼠脏器指数、血液指标及血清生化指标检测

第 3 个月、6 个月和 7 个月试验周期结束检测脏器指数、生化指标、血液指标 (表 5~13)。数据表明雄

性大鼠的脏器指数逐渐下降,雌性脏器指数无明显变化,表明大鼠的脏器质量随着体质量逐渐增加,各个时间段大鼠的血液和血清生化指标无明显差异。

表 5 10 批正常大鼠 6 个月中第 3 个月脏器系数 ($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Organ coefficients at 3 months of ten batches of normal SD rats during 6 months ($\bar{x}\pm s$)

性别	心系数/%	肝系数/%	脾系数/%	肺系数/%	肾系数/%	肾上腺系数/%	胸腺系数/%	脑系数/%	睾丸/卵巢系数/%	附睾/子宫系数/%
♂ 样本数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
♂ 平均值	0.32±0.04	2.60±0.18	0.17±0.02	0.34±0.03	0.64±0.06	0.013±0.02	0.08±0.02	0.42±0.042	0.68±0.08	0.29±0.04
♂ 最小值	0.26	2.22	0.13	0.19	0.534	0.01	0.04	0.320	0.49	0.23
♂ 最大值	0.40	2.95	0.23	0.41	0.78	0.02	0.13	0.52	0.820	0.39
♀ 样本数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
♀ 平均值	0.35±0.03	2.79±0.38	0.27±0.42	0.49±0.07	0.69±0.07	0.03±0.01	0.12±0.03	0.70±0.08	0.05±0.01	0.23±0.08
♀ 最小值	0.30	2.23	0.153	0.40	0.57	0.01	0.08	0.56	0.034	0.13
♀ 最大值	0.42	3.98	3.12	0.83	0.83	0.04	0.27	0.93	0.09	0.52

表 6 10 批正常大鼠 6 个月中第 6 个月脏器系数 ($\bar{x}\pm s$)

Table 6 Organ coefficients at 6 months of ten batches of normal SD rats during 6 months ($\bar{x}\pm s$)

性别	心系数/%	肝系数/%	脾系数/%	肺系数/%	肾系数/%	肾上腺系数/%	胸腺系数/%	脑系数/%	睾丸/卵巢系数/%	附睾/子宫系数/%
♂ 样本数	99	99	99	99	99	99	99	99	99	99
♂ 平均值	0.29±0.04	2.49±0.32	0.15±0.03	0.33±0.06	0.58±0.07	0.01±0.01	0.06±0.08	0.38±0.11	0.52±0.17	0.26±0.04
♂ 最小值	0.21	1.95	0.11	0.25	0.45	0.01	0.03	0.26	0.04	0.16
♂ 最大值	0.39	4.54	0.25	0.57	0.85	0.10	0.12	0.78	0.79	0.41
♀ 样本数	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
♀ 平均值	0.35±0.04	2.66±0.28	0.18±0.03	0.44±0.06	0.65±0.08	0.03±0.01	0.08±0.03	0.62±0.08	0.05±0.01	0.24±0.06
♀ 最小值	0.25	2.15	0.13	0.32	0.47	0.01	0.04	0.40	0.03	0.10
♀ 最大值	0.46	3.49	0.33	0.62	0.85	0.04	0.30	0.84	0.09	0.37

表 7 10 批正常大鼠 (♂) 恢复期脏器系数 ($\bar{x}\pm s$)

Table 7 Organ coefficients at recovery phase of ten batches of normal SD rats ($\bar{x}\pm s$)

性别	心系数/%	肝系数/%	脾系数/%	肺系数/%	肾系数/%	肾上腺系数/%	胸腺系数/%	脑系数/%	睾丸/卵巢系数/%	附睾/子宫系数/%
♂ 样本数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
♂ 平均值	0.28±0.03	2.49±0.30	0.15±0.02	0.32±0.03	0.58±0.05	0.01±0.00	0.06±0.01	0.34±0.03	0.56±0.07	0.25±0.03
♂ 最小值	0.24	0.77	0.11	0.22	0.49	0.01	0.03	0.26	0.39	0.19
♂ 最大值	0.35	2.97	0.21	0.39	0.69	0.02	0.10	0.41	0.74	0.34
♂ 样本数	50	50	50	50	50	50	50	50	50	50
♀ 平均值	0.34±0.04	2.65±0.28	0.18±0.03	0.43±0.05	0.63±0.07	0.03±0.01	0.08±0.02	0.60±0.07	0.05±0.01	0.22±0.07
♀ 最小值	0.28	2.04	0.14	0.33	0.48	0.02	0.03	0.47	0.03	0.04
♀ 最大值	0.42	3.32	0.25	0.55	0.76	0.04	0.12	0.76	0.08	0.37

表 8 10 批正常 SD 大鼠 6 个月中第 3 个月的血液指标 ($\bar{x}\pm s$)

Table 8 Blood indicators at 3 months of ten batches of normal SD rats during 6 months ($\bar{x}\pm s$)

项目	♂					♀				
	样本数	平均值	最小值	最大值	样本数	平均值	最小值	最大值		
1 RBC/(10^{12} /L)	50	8.40± 0.71	7.10	10.66	50	7.76± 0.71	6.56	10.01		
2 HCT/(%)	50	44.83± 3.19	36.90	53.00	50	43.02± 3.92	36.20	54.40		
3 MCV/(fL)	50	53.51± 2.54	49.20	61.00	50	55.52± 2.20	51.50	60.00		
4 RDW/(%)	50	12.60± 0.81	11.30	16.20	50	11.77± 0.74	10.70	14.80		
5 HGB/(g/L)	50	14.72± 1.16	11.80	17.80	50	14.33± 1.28	11.80	18.50		
6 MCH/(pg)	50	17.53± 0.88	15.90	19.10	50	18.49± 0.89	16.30	20.50		
7 MCHC/(g/L)	50	32.84± 1.40	30.90	36.70	50	33.35± 1.64	30.00	38.10		
8 PLT/(10^9 /L)	50	980.40±165.40	657.00	1374.00	50	918.00±225.50	504.00	1862.00		
9 PCT/(%)	45	0.66± 0.16	0.41	1.11	45	0.62± 0.18	0.34	1.33		
10 MPV/(fL)	45	7.11± 0.67	5.40	8.00	45	7.09± 0.71	5.50	8.60		
11 PDW/(%)	45	52.04± 5.75	41.00	66.00	45	50.19± 4.42	43.00	60.70		
12 WBC/(10^9 /L)	50	6.22± 3.20	2.05	20.65	50	21.72±121.78	0.51	865.24		
13 LYM/(%)	50	74.10± 7.35	54.50	91.00	50	73.78± 9.90	39.90	88.50		
14 NEUT/(%)	50	20.02± 8.98	2.20	41.70	50	19.36± 8.06	5.00	53.70		
15 EOS/(%)	25	1.64± 0.72	0.70	3.90	25	1.46± 0.55	0.30	2.60		
16 BASO/(%)	25	0.00± 0.00	0.00	0.00	25	0.00± 0.02	0.00	0.10		
17 MONO/(%)	50	3.49± 4.58	1.00	25.00	50	4.00± 5.65	0.90	25.00		
18 RET/(%)	25	1.97± 0.28	1.39	2.71	25	1.96± 0.46	1.10	2.55		
19 RET/(10^{12} /L)	50	0.17± 0.03	0.11	0.32	50	0.16± 0.04	0.08	0.23		
20 PT/(s)	50	15.02± 1.77	11.30	18.60	50	13.04± 1.36	8.00	16.60		
21 APTT/(s)	50	23.42± 4.96	14.10	35.20	50	20.40± 4.21	12.50	30.90		

表 9 10 批正常 SD 大鼠 6 个月中第 6 个月的血液指标 ($\bar{x}\pm s$)Table 9 Blood indicators at 6 months of ten batches of normal SD rats during 6 months($\bar{x}\pm s$)

项目	♂				♀			
	样本数	平均值	最小值	最大值	样本数	平均值	最小值	最大值
1 RBC/($10^{12}/L$)	98	8.59± 0.75	4.46	9.99	100	7.51± 0.46	6.56	8.85
2 HCT/(%)	98	44.57± 2.96	29.10	49.80	100	41.87± 2.58	37.00	47.80
3 MCV/(fL)	98	52.11± 3.66	46.90	79.20	100	55.82± 1.75	50.80	59.80
4 RDW/(%)	88	12.93± 0.83	11.20	16.50	90	11.34± 0.59	10.30	13.80
5 HGB/(g/L)	98	14.72± 1.02	9.80	17.00	100	14.09± 0.90	12.30	16.10
6 MCH/(pg)	98	17.22± 1.41	14.70	27.10	100	18.79± 0.82	16.10	21.60
7 MCHC/(g/L)	98	33.05± 1.19	30.20	36.70	100	33.67± 1.51	31.50	37.50
8 PLT/($10^9/L$)	98	931.50±159.60	282.00	1476.00	100	819.20±113.20	599.00	1188.00
9 PCT/(%)	88	0.57± 0.14	0.16	0.96	90	0.47± 0.091	0.32	0.84
10 MPV/(fL)	88	6.29± 0.89	4.90	9.20	90	5.97± 0.71	5.00	8.40
11 PDW/(%)	88	55.48± 6.06	38.60	73.90	90	52.42± 4.48	41.70	61.90
12 WBC/($10^9/L$)	98	6.09± 2.038	2.42	12.11	100	3.30± 1.176	1.15	6.97
13 LYM/(%)	98	66.32± 11.5	24.50	89.00	100	68.39± 8.93	44.40	88.40
14 NEUT/(%)	98	28.31± 11.19	5.40	62.10	100	25.41± 8.22	6.30	47.00
15 EOS/(%)	49	1.94± 0.71	0.70	4.40	50	2.19± 0.88	0.80	5.40
16 BASO/(%)	49	0.01± 0.03	0.00	0.10	50	0.01± 0.04	0.00	0.10
17 MONO/(%)	98	2.66± 2.94	0.80	30.10	100	3.02± 3.09	0.50	32.30
18 RET/(%)	49	1.88± 0.42	1.24	3.87	50	1.97± 0.38	1.10	2.86
19 RET/($10^{12}/L$)	98	0.17± 0.04	0.01	0.37	100	0.16± 0.032	0.05	0.24
20 PT/(s)	98	16.43± 3.35	11.40	27.50	100	13.05± 1.48	7.30	16.60
21 APTT/(s)	98	23.27± 7.19	10.30	72.00	100	18.72± 4.25	8.75	29.20

表 10 10 批正常 SD 大鼠 6 个月中恢复期的血液指标 ($\bar{x}\pm s$)Table 10 Blood indicators at recovery phase of ten batches of normal SD rats during 6 months($\bar{x}\pm s$)

项目	♂				♀			
	样本数	平均值	最小值	最大值	样本数	平均值	最小值	最大值
1 RBC/($10^{12}/L$)	50	8.50± 0.73	4.46	9.74	50	7.58± 0.36	6.56	8.30
2 HCT/(%)	50	44.52± 2.26	35.30	49.40	50	42.49± 2.17	37.00	47.50
3 MCV/(fL)	50	52.71± 4.39	48.00	79.20	50	56.08± 2.07	50.80	63.20
4 RDW/(%)	50	13.26± 0.80	11.20	15.40	50	11.51± 0.60	10.20	13.80
5 HGB/(g/L)	50	14.87± 1.03	12.10	18.00	50	14.34± 1.07	12.00	16.70
6 MCH/(pg)	50	17.61± 1.69	15.60	27.10	50	18.92± 1.15	16.10	21.90
7 MCHC/(g/L)	50	33.43± 1.83	31.10	38.50	50	33.77± 1.67	31.60	38.00
8 PLT/($10^9/L$)	50	952.20±180.40	282.00	1476.00	50	862.30±106.70	680.00	1078.00
9 PCT/(%)	45	0.56± 0.12	0.16	0.82	45	0.52± 0.09	0.38	0.74
10 MPV/(fL)	45	6.07± 0.92	4.90	9.20	45	6.24± 0.61	5.30	7.90
11 PDW/(%)	45	54.44± 8.31	38.60	101.10	45	52.32± 4.51	41.70	61.60
12 WBC/($10^9/L$)	50	5.42± 1.38	2.77	8.38	50	3.04± 0.90	1.09	4.96
13 LYM/(%)	50	65.22± 11.60	24.50	84.00	50	66.21± 8.07	48.90	84.70
14 NEUT/(%)	50	29.23± 10.93	13.20	62.10	50	28.26± 7.82	11.90	45.40
15 EOS/(%)	25	2.14± 0.67	0.80	3.80	25	2.23± 0.95	1.00	5.30
16 BASO/(%)	25	0.02± 0.04	0.00	0.10	25	0.02± 0.05	0.00	0.20
17 MONO/(%)	50	2.71± 1.12	0.90	6.30	50	2.72± 0.94	1.30	5.90
18 RET/(%)	25	1.99± 0.31	1.51	2.74	25	1.99± 0.42	1.42	3.16
19 RET/($10^{12}/L$)	50	0.18± 0.037	0.01	0.25	50	0.16± 0.04	0.11	0.25
20 PT/(s)	50	15.00± 1.41	13.00	18.80	50	14.09± 1.67	11.90	19.20
21 APTT/(s)	50	20.20± 4.83	11.60	29.20	50	19.25± 3.88	13.60	28.60

表 11 10 批正常 SD 大鼠 6 个月中第 3 个月的生化指标 ($\bar{x}\pm s$)Table 11 Biochemical indices at 3 month of ten batches of normal SD rats during 6 months($\bar{x}\pm s$)

项目	♂				♀			
	样本数	平均值	最小值	最大值	样本数	平均值	最小值	最大值
1 TP/(g/L)	50	56.56±3.38	50.20	65.20	50	63.59±5.80	49.20	77.30
2 ALB/(g/L)	50	35.33±2.33	30.30	39.90	50	41.00±3.82	32.60	51.50
3 AST/(U/L)	50	114.00±36.20	33.00	193.00	50	95.40±46.10	29.00	353.00
4 ALT/(U/L)	50	44.50±21.30	26.00	129.00	50	38.20±20.40	20.00	115.00
5 ALP/(U/L)	50	92.60±21.80	54.00	161.00	50	47.50±19.20	19.00	121.00
6 GGT/(U/L)	50	0.46±0.30	-0.35	1.08	50	0.70±0.35	0.06	1.96
7 BUN/(mmol/L)	50	5.70±0.78	3.70	7.18	50	6.57±1.52	3.63	11.46
8 CRE/(mmol/L)	50	29.40±4.40	20.00	39.00	50	33.60±6.10	23.00	50.00
9 GLU/(mmol/L)	50	8.33±1.76	5.73	12.50	50	8.02±2.32	5.88	17.86
10 TBIL/(mmol/L)	50	1.09±0.44	0.00	2.20	50	1.47±0.52	0.30	2.70
11 CHO/(mmol/L)	50	1.48±0.36	0.81	2.35	50	1.88±0.61	0.95	3.50
12 TG/(mmol/L)	50	0.56±0.30	0.14	1.35	50	0.36±0.14	0.12	0.70
13 CK/(U/L)	50	461.50±256.60	112.00	1277.00	50	368.70±284.10	48.00	1504.00
14 血 Na/(mmol/L)	50	142.78±3.77	129.30	150.10	50	143.55±3.70	133.60	154.20
15 血 K/(mmol/L)	50	4.22±0.44	3.29	5.24	50	3.81±0.46	2.85	5.22
16 血 Cl/(mmol/L)	50	104.39±4.65	97.50	114.60	50	104.47±3.69	96.70	112.00

表 12 10 批正常 SD 大鼠 6 个月中第 6 个月的生化指标 ($\bar{x}\pm s$)Table 12 Biochemical indices at 6 month of ten batches of normal SD rats during 6 months($\bar{x}\pm s$)

项目	♂				♀			
	样本数	平均值	最小值	最大值	样本数	平均值	最小值	最大值
1 TP/(g/L)	99	58.32± 3.99	48.60	68.20	99	67.80± 4.48	57.70	82.60
2 ALB/(g/L)	99	35.27± 2.36	29.20	42.50	99	43.07± 3.05	35.30	51.40
3 AST/(U/L)	99	95.70± 44.30	25.00	406.00	99	97.80± 56.40	20.00	339.00
4 ALT/(U/L)	99	45.70± 28.10	23.00	195.00	99	47.30± 27.80	17.00	166.00
5 ALP/(U/L)	99	67.20± 26.50	21.00	188.00	99	30.30± 11.30	9.00	65.00
6 GGT/(U/L)	99	0.74± 0.59	0.00	3.78	99	0.59± 0.39	0.00	2.19
7 BUN/(mmol/L)	99	5.46± 0.81	4.12	8.91	99	6.26± 1.16	4.20	10.97
8 CRE/(mmol/L)	99	31.80± 7.70	16.00	53.00	99	33.30± 9.10	10.00	56.00
9 GLU/(mmol/L)	99	8.97± 2.63	5.00	18.11	99	7.55± 2.04	4.89	15.36
10 TBIL/(mmol/L)	99	1.05± 0.54	0.10	3.00	99	1.49± 0.52	0.39	3.20
11 CHO/(mmol/L)	99	1.67± 0.44	0.80	3.44	99	2.28± 0.54	1.10	3.74
12 TG/(mmol/L)	99	0.73± 0.41	0.21	2.11	99	0.57± 0.39	0.13	2.22
13 CK/(U/L)	99	347.20±303.50	31.00	1589.00	99	291.40±266.20	38.00	1857.00
14 血 Na/(mmol/L)	99	143.21± 3.19	135.50	149.90	99	144.33± 8.77	118.50	215.00
15 血 K/(mmol/L)	99	4.25± 1.17	3.02	13.29	99	3.59± 0.54	2.64	5.74
16 血 Cl/(mmol/L)	99	104.11± 4.64	97.80	115.70	99	104.61± 7.67	84.80	161.40

表 13 10 批正常 SD 大鼠 6 个月中恢复期的生化指标 ($\bar{x} \pm s$)Table 13 Biochemical indices at recovery phase of ten batches of normal SD rats during 6 months ($\bar{x} \pm s$)

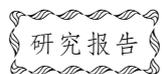
项目	♂				♀			
	样本数	平均值	最小值	最大值	样本数	平均值	最小值	最大值
1 TP/(g/L)	49	58.15± 3.29	50.00	66.10	50	68.24± 5.28	58.70	82.50
2 ALB/(g/L)	49	35.24± 2.08	31.30	39.60	50	43.04± 3.49	37.50	52.10
3 AST/(U/L)	49	101.50± 35.00	34.00	202.00	50	102.50± 134.40	20.00	1000.00
4 ALT/(U/L)	49	39.50± 15.90	23.00	113.00	50	47.30± 66.00	16.00	492.00
5 ALP/(U/L)	49	63.80± 18.20	18.00	113.00	50	27.00± 10.50	7.00	58.00
6 GGT/(U/L)	49	0.71± 0.33	0.25	1.86	50	0.69± 0.55	0.05	2.36
7 BUN/(mmol/L)	49	5.59± 0.92	3.10	7.71	50	5.94± 1.17	3.91	8.95
8 CRE/(mmol/L)	49	29.80± 6.00	17.00	44.00	50	32.80± 6.30	22.00	53.00
9 GLU/(mmol/L)	49	8.44± 1.38	6.30	11.41	50	6.97± 0.95	4.49	8.70
10 TBIL/(mmol/L)	49	0.98± 0.38	0.30	1.80	50	1.35± 0.47	0.30	2.70
11 CHO/(mmol/L)	49	1.80± 0.53	0.75	3.31	50	2.25± 0.71	0.70	4.23
12 TG/(mmol/L)	49	0.70± 0.30	0.11	1.43	50	0.51± 0.31	0.05	1.96
13 CK/(U/L)	49	375.20± 335.40	66.00	2319.00	50	196.10± 107.00	44.00	519.00
14 血 Na/(mmol/L)	49	141.92± 2.89	133.30	146.80	50	143.11± 1.79	140.50	147.50
15 血 K/(mmol/L)	49	4.20± 0.44	3.54	5.82	50	3.50± 0.40	2.94	4.89
16 血 Cl/(mmol/L)	49	102.83± 3.65	97.30	112.50	50	101.70± 12.81	16.30	112.20

3 讨论

本次试验统计结果的特点为:样本量大,误差小;实验地点固定:全部在中国中医科学院 GLP 中心屏障动物实验室进行;饲喂条件固定:SPF 级,给予充足饲料及饮水;品系、来源相同:同为 SD 大鼠,且雌雄分开;周龄固定;初始体重质量接近;各项指标均标准化;具有一定的代表性,能够为以后在中国中医科学院 GLP 中心屏障动物实验室进行的 SD 大鼠长期毒性试验提供良好的数据支持,结果表明 SD 大鼠的雄性生长发育较快,饲料利用率较高,脏器质量随着体质量的增长而逐渐增加,血液指标和生化指标在各个时期无明显变化。能够作为大鼠长期毒性试验的标准生物学指标,为以后中国中医科学院 GLP 中心屏障动物实验室 SD 大鼠的长期毒性试验及饲养提供参考标准。

参考文献

- [1] 王荫槐.实验动物与动物实验[M].北京:中国建材工业出版社,1999,43-59.
- [2] 魏泓.医学实验动物学[M].成都:四川科学技术出版社,74-92.
- [3] 高婷,刘健,樊小农,等.自发性高血压大鼠模型的应用概况[J].实验动物科学,2013,30(6):57-60.
- [4] 汤球,刘志学,崔淑芳,等.大鼠抑郁症模型的建立与评价[J].实验动物科学,2011,28(1):6-9.
- [5] 王瑞霞,俞超芹.大鼠子宫内膜异位症模型的建立及应用[J].上海实验动物科学,2004,24(1):55-58.
- [6] 崔龙苹,杨永清.过敏性哮喘大鼠模型的制备[J].上海实验动物科学,2000,20(2):69-71.
- [7] 任士飞,张林吉,汪鹏旭,等.大鼠 SNL 神经性疼痛模型的建立[J].实验动物科学,2014,31(2):29-31.
- [8] 洪丽莉,许冠荪,申国明,等.SD 大鼠 2 型糖尿病模型的建立[J].实验动物科学,2005,15(4):379-381.
- [9] 郭建,高福云,李宏.大鼠高脂血症建模的改进方法[J].实验动物科学,2008,25(6):52-53.
- [10] 陈春林,巩甜甜,依群,等.SD 大鼠房颤模型的建立[J].实验动物科学,2009,26(3):1-4.
- [11] 马秀兰,宋淑云,叶建新,等.对成年大鼠脏器系数的探讨[J].动物学杂志,1996,(3):25-26.
- [12] 陈长勋,金若敏,李仪奎,等.正常 SD 大鼠的部分生物数据测定[J].动物学杂志,1996,(4):19-22.
- [13] 孙于兰,赵安莎,周容,等.SD 大鼠 30 天喂养试验食物利用率及脏器系数正常值探讨[J].现代预防医学,2003,30(1):36-37.
- [14] 杜佳林,包玉龙,李显华,等.辽宁地区普通级和 SPF 级 SD 大鼠血液生理指标检测[J].中华中医药学刊,2008,26(9):1483-1485.
- [15] 杨锋,Wang H X,何永亮,等.清洁级、SPF 级 SD 大鼠血液生理、生化测定与比较[J].四川动物,2008,27(4):648-650.
- [16] 邓雯,陈莉莉,刘晶,等.SPF 级 SD 大鼠血液学及血清生化指标正常值探讨[J].毒理学杂志,2010,(2):174-174.
- [17] 胡雄飞,杨秀鸿,陈志莲.不同周龄雌雄 SD 大鼠血液生理生化指标比较分析[J].实用预防医学,2013,20(10):1173-1176.
- [18] 胡建廷,王韶艳,屈卉锦,等.禁食对 SD 大鼠血清生化指标的影响[J].实验动物与比较医学,2011,31(2):126-127.



妇糜康阴道栓长期给药对家兔血液生理生化指标的影响

孟莉¹ 向绍杰¹ 刘小虎¹ 宋达夫¹ 张慧颖¹ 贾天柱²

(1.辽宁省中医药研究院,沈阳 110034)(2.辽宁中医药大学药学院,大连 116600)

摘要:目的 观察妇糜康阴道栓长期给药对家兔血液生理生化学的影响,为临床安全用药提供科学依据。方法 妇糜康阴道栓浸膏粉以 8.586、2.856、0.952 g/kg 体质量剂量,每天阴道给药 1 次,连续 6 个月,对其进行血液生理生化指标检查。结果 妇糜康阴道栓给药 6 个月后,妇糜康阴道栓浸膏粉 8.568 g/kg 剂量组家兔红细胞数、血红蛋白含量及红细胞压积与赋形剂对照组比均明显增多($P < 0.05$),停药 4 周后,恢复正常。血液学其它指标与赋形剂对照组比差异不明显($P > 0.05$)。给药 6 个月及停药 4 周后,各给药组对血液生化学指标均无明显影响。结论 妇糜康阴道栓以 2.856 g/kg 长期给药对家兔血液生理生化学没有影响,提示妇糜康阴道栓安全剂量为 2.865 g/kg 以下,为临床成人拟用量的 20 倍(成人按 60 kg 体质量计)。

关键词:妇糜康阴道栓;血液学;血液生化学;家兔

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0017-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.004

妇糜康阴道栓是由川椒、白癣皮、地骨皮等几味中药组成,具有清热解暑,燥湿、杀虫止痒功效。用于治疗湿热下注所致的带下量多、外阴瘙痒,灼热疼痛等阴道炎。前期药理实验表明,妇糜康阴道栓对白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、绿脓杆菌有抑制作用,能提高磷酸组织胺所致豚鼠瘙痒反应的致痒阈。为进一步考察其安全性,以便更好地应用于临床,本实验根据《中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则》对妇糜康阴道栓进行家兔长期毒性实验研究^[1],观察其对血液生理生化指标的影响,为临床安全用药提供参考。

1 材料与方

1.1 实验动物

白色家兔 48 只,雌性,体质量 1.5~2.0 kg,由沈阳药科大学实验动物中心购进,许可证号:SCXK(辽)2009-0002。实验动物饲养于辽宁省中医药研究院实验动物中心,许可证号:SYXK(辽)2012-0003;实验温度 20~23 ℃,湿度 55%~60%。照明时间采用为 10 h(明)/14 h(暗)交替,颗粒饲料由北

京科澳协力饲料有限公司提供,许可证号:SCXK(京)2009-0012。

1.2 受试药物与试剂

妇糜康阴道栓浸膏粉,每克浸膏粉含 9.52 g 生药,批号:20120701-0。赋形剂为 PEG400 和 PEG4000 按重量比 1:1 混合。妇糜康阴道栓浸膏粉、赋形剂均由辽宁中医研究院提供。血细胞分析仪用稀释液,批号:120911H18;丙氨酸转氨酶试剂盒,批号 12-1023P;天门冬氨酸转氨酶试剂盒,批号 12-1024P;碱性磷酸酶试剂盒,批号 12-0912P;白蛋白试剂盒,批号 11-0926;总蛋白试剂盒,批号 11-0510;谷氨酰转氨酶试剂盒,批号 12-1114P;血清总胆红素测定通用试剂盒,批号 12-0915P;总胆固醇试剂盒,批号 12-1015P;甘油三酯试剂盒,批号 12-0828P;尿素氮试剂盒,批号 12-0922P;肌酐液体试剂,批号 12-1015;血糖试剂盒,批号 12-0926P;肌酸磷酸激酶试剂盒,批号 12-0905P,均由金斯尔提供;凝血酶原试剂盒,批号 STG20101,由北京世帝公司提供。

1.3 仪器

ABX Pentra 60 血细胞分析仪,上海科华卓越;

收稿日期:2018-08-12

作者简介:孟莉(1980—),女,副研究员,研究方向:中药新药研发。E-mail:mengli2003@126.com

通信作者:贾天柱(1951—),男,教授,从事中药新药研发及中药炮制。E-mail:jiazh@126.com

330 全自动生化分析仪,北京世帝科学仪器公司; LG-PABER 型血小板聚集凝血因子分析仪,美国双杰兄弟集团有限公司。

1.4 方法^[2-7]

1.4.1 分组与给药:健康雌性家兔 48 只,按体质量随机分成 4 组,赋形剂对照组及妇糜康阴道栓浸膏粉低、中、高 3 个剂量组,每组 12 只。妇糜康阴道栓浸膏粉按 0.952 g/kg、2.856 g/kg、8.586 g/kg 体质量(相当于临床拟给药剂量的 6、20、60 倍)阴道给药,每天 1 次,连续给药 6 个月。

1.4.2 观察指标:试验期间,每日观察受试家兔的行为体征、外观形态及药物可能产生的不良反应等。每周称家兔体质量 1 次,观察其体质量最快的变化情况。分别于给药 6 个月及停药 4 周后,各组分别取 6 只家兔,禁食不禁水 18 h,麻醉,腹总动脉采血,检测血液学及血液生化学指标。

1.5 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件处理数据,计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对家兔一般状况、体质量的影响

给药期间,各组受试家兔被毛光泽、口周、鼻黏膜无破溃、活动正常,摄食、饮水、大小便均未见异常,亦未发现因药物中毒引起的受试动物死亡或其它毒副反应发生。各给药组受试家兔体质量与赋形剂对照组比差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 对血液生理指标的影响

给药 6 个月及停药 4 周后,各组受试家兔血液生理指标测试,结果见表 1、2。由结果可知,妇糜康阴道栓浸膏粉低、中剂量组家兔血液生理指标与赋形剂对照组比差异无显著性($P > 0.05$)。妇糜康阴道栓浸膏粉高剂量组家兔红细胞数、血红蛋白含量及红细胞压积与赋形剂对照组比均明显增多($P < 0.05$),其它血液生理指标与赋形剂对照组比差异无显著性($P > 0.05$)。停药 4 周后,恢复正常。给药组对血液其它生理指标无明显影响($P > 0.05$)。

表 1 妇糜康阴道栓浸膏粉阴道给药 6 个月对家兔血液生理指标的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Effect of Administration of Bomixiao Vaginal Suppository on blood hematology indexes in rabbits after six months($\bar{x} \pm s, n = 6$)

血液学指标	赋形剂对照组	妇糜康阴道栓浸膏粉		
		0.952g/kg	2.856g/kg	8.586g/kg
白细胞计数/($\times 10^9/L$)	7.70 \pm 3.72	7.82 \pm 2.87	8.41 \pm 3.82	7.13 \pm 3.07
红细胞计数/($\times 10^{12}/L$)	6.39 \pm 0.36	6.69 \pm 0.46	6.34 \pm 0.30	7.23 \pm 0.67*
血红蛋白/(g/L)	135.33 \pm 8.87	136.83 \pm 10.76	134.33 \pm 9.60	154.17 \pm 14.73*
红细胞压积/%	41.22 \pm 2.83	41.88 \pm 3.29	40.97 \pm 2.80	46.88 \pm 3.97*
血小板计数/($\times 10^9/L$)	467.83 \pm 123.06	573.00 \pm 85.90	521.00 \pm 141.52	421.50 \pm 111.89
平均血细胞容积/fL	64.47 \pm 2.73	62.62 \pm 2.57	64.58 \pm 3.50	64.95 \pm 1.66
平均血红蛋白含量/pg	21.15 \pm 0.94	20.45 \pm 0.89	21.15 \pm 1.01	21.30 \pm 0.67
平均血红蛋白浓度/(g/dL)	328.17 \pm 4.75	326.50 \pm 1.87	327.83 \pm 4.83	328.00 \pm 4.69
淋巴细胞百分比/%	39.90 \pm 17.28	28.22 \pm 6.10	41.73 \pm 16.51	37.08 \pm 10.48
单核细胞百分比/%	9.43 \pm 3.31	7.47 \pm 1.40	8.35 \pm 3.80	6.95 \pm 1.38
中性粒细胞百分比/%	6.83 \pm 3.04	5.90 \pm 1.71	6.15 \pm 4.42	4.30 \pm 1.26
嗜酸性粒细胞百分比/%	42.80 \pm 19.96	57.58 \pm 4.25	42.90 \pm 19.41	50.53 \pm 10.63
嗜碱性粒细胞百分比(%)	1.03 \pm 0.21	0.83 \pm 0.22	0.87 \pm 0.18	1.13 \pm 0.15
网织红细胞/%	2.16 \pm 0.65	2.60 \pm 0.76	2.68 \pm 0.67	2.48 \pm 0.26
血浆凝血酶原时间/s	8.35 \pm 0.67	7.97 \pm 1.30	7.75 \pm 1.11	8.18 \pm 0.80

注:赋形剂与对照组比较: * $P < 0.05$

Note: vs. normal control group: * $P < 0.05$

2.3 对血液生化指标的影响

给药 6 个月及停药 4 周后,各组受试家兔血液生化学指标测试结果见表 3、4。由结果可知,各给

药组受试家兔血液生化学指标与空白对照组比,差异无显著性($P > 0.05$)。

表 2 妇糜康阴道栓浸膏粉阴道给药对停药 4 周后家兔血液生化指标的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)
 Table 2 Effect of Administration of Bomixiao Vaginal Suppository on blood hematology indexes in rabbits after drug withdrawal for 4 weeks($\bar{x}\pm s, n=6$)

血液学指标	赋形剂对照组	妇糜康阴道栓浸膏粉		
		0.952 g/kg	2.856 g/kg	8.586 g/kg
白细胞计数/($\times 10^9/L$)	10.02± 4.62	8.80± 4.79	6.60± 2.31	6.97± 4.73
红细胞计数/($\times 10^{12}/L$)	6.63± 0.50	6.04± 0.62	6.44± 0.77	6.60± 0.66
血红蛋白/(g/L)	143.50± 7.76	135.83± 9.17	136.83± 17.49	139.50± 15.27
红细胞压积/%	43.48± 2.39	41.22± 3.24	42.02± 5.49	42.57± 4.60
血小板计数/($\times 10^9/L$)	402.00± 111.82	428.17± 88.42	449.33± 119.52	465.17± 104.45
平均血细胞容积/fL	65.68± 2.33	65.62± 2.81	65.25± 2.28	64.52± 0.91
平均血红蛋白含量/pg	21.65± 0.94	21.70± 1.03	21.23± 0.74	21.17± 0.26
平均血红蛋白浓度/(g/dL)	329.33± 3.98	330.67± 4.55	325.67± 2.06	328.00± 1.67
淋巴细胞百分比/%	53.05± 3.60	44.57± 8.85	49.53± 12.29	40.83± 12.83
单核细胞百分比/%	5.90± 1.66	5.12± 1.37	4.55± 1.38	4.73± 0.66
中性粒细胞百分比/%	8.40± 6.58	13.73± 11.79	9.72± 8.95	15.52± 11.89
嗜酸性粒细胞百分比/%	31.42± 6.01	35.60± 5.93	35.30± 14.66	37.92± 9.49
嗜碱性粒细胞百分比/%	1.23± 0.40	0.98± 0.36	0.90± 0.35	1.00± 0.33
网织红细胞/%	1.43± 0.63	1.77± 0.72	1.50± 0.31	1.86± 1.02
血浆凝血酶原时间/s	8.42± 1.03	7.50± 0.40	8.28± 0.94	8.32± 1.03

表 3 妇糜康阴道栓浸膏粉阴道给药 6 个月对家兔血液生化指标的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)
 Table 3 Effect of Administration of Bomixiao Vaginal Suppository on blood biochemical indexes in rabbits after six months($\bar{x}\pm s, n=6$)

血液学指标	赋形剂对照组	妇糜康阴道栓浸膏粉		
		0.952 g/kg	2.856 g/kg	8.586 g/kg
丙氨酸氨基转移酶/(U/L)	54.33± 24.61	58.00± 32.37	78.83± 18.24	95.00± 99.58
天门冬氨酸氨基转移酶/(U/L)	41.83± 31.74	34.87± 9.71	49.00± 31.84	66.67± 57.18
谷氨酰转移酶/(U/L)	8.00± 2.10	9.67± 5.89	9.50± 1.87	12.17± 4.92
碱性磷酸酶/(U/L)	47.33± 22.77	46.33± 20.07	45.83± 11.62	41.83± 14.08
白蛋白/(U/L)	34.67± 2.73	34.00± 3.03	35.17± 2.64	36.67± 2.50
总蛋白/(g/L)	54.67± 8.45	63.50± 9.27	58.50± 7.87	60.00± 9.08
总胆红素/($\mu\text{mol}/L$)	1.78± 0.33	1.75± 0.29	1.97± 0.25	1.85± 0.26
总胆固醇/(mmol/L)	1.06± 0.25	1.11± 0.46	1.00± 0.37	1.30± 0.74
甘油三酯/(mmol/L)	1.30± 0.60	1.50± 0.52	1.06± 0.24	1.77± 0.67
尿素氮/(mmol/L)	6.87± 2.29	7.05± 1.86	7.51± 1.82	7.44± 1.65
肌酐/($\mu\text{mol}/L$)	138.67± 15.79	144.67± 23.12	127.33± 25.14	124.67± 8.76
肌酸激酶/(U/L)	3034.17± 1491.68	2117.50± 1291.56	2644.33± 1560.51	3692.83± 1932.18
钾/(mmol/L)	3.33± 0.31	3.08± 0.54	3.28± 0.37	3.06± 0.31
钠/(mmol/L)	140.00± 0.86	140.58± 0.72	138.93± 1.48	140.68± 1.87
氯/(mmol/L)	98.85± 2.43	99.83± 2.57	98.53± 0.74	99.23± 2.80
血糖/(mmol/L)	15.62± 3.37	14.23± 3.83	14.43± 2.71	15.73± 4.38

表 4 妇糜康阴道栓浸膏粉阴道给药停药 4 周后对家兔血液生物化学的影响 ($\bar{x}\pm s, n=6$)
 Table 4 Effect of Administration of Bomixiao Vaginal Suppository on blood biochemical indexes in rabbits after drug withdrawal for 4 weeks ($\bar{x}\pm s, n=6$)

血液学指标	赋形剂对照组		妇糜康阴道栓浸膏粉					
			0.952 g/kg		2.856 g/kg		8.586 g/kg	
丙氨酸氨基转移酶/(U/L)	64.83±	16.23	77.67±	23.23	80.33±	29.34	77.33±	16.21
天门冬氨酸氨基转移酶/(U/L)	59.00±	28.64	55.33±	17.19	85.00±	51.07	87.00±	25.57
谷氨酰转移酶/(U/L)	7.00±	2.53	7.83±	2.32	7.17±	3.25	7.67±	2.66
碱性磷酸酶/(U/L)	91.50±	51.80	83.33±	46.37	81.33±	55.40	107.00±	69.35
白蛋白/(g/L)	36.67±	2.94	36.67±	2.25	37.50±	3.83	37.33±	1.63
总蛋白/(g/L)	58.00±	10.37	60.50±	8.38	57.83±	7.36	57.83±	6.52
总胆红素/(umol/L)	1.40±	0.37	1.12±	0.97	0.95±	0.59	0.87±	0.43*
总胆固醇/(mmol/L)	1.35±	0.60	1.68±	0.60	1.11±	0.37	1.06±	0.31
甘油三酯/(mmol/L)	1.34±	0.52	1.28±	0.34	1.56±	0.43	1.90±	0.45
尿素氮/(mmol/L)	8.42±	1.29	8.47±	2.27	7.51±	1.47	7.02±	2.32
肌酐/(umol/L)	151.33±	16.94	164.00±	21.17	159.83±	24.36	147.67±	26.64
肌酸激酶/(U/L)	3179.17±	1141.76	2821.00±	683.18	3735.00±	2299.21	2334.67±	1377.79
钾/(mmol/L)	3.27±	0.32	3.42±	0.20	3.42±	0.41	3.65±	0.45
钠/(mmol/L)	138.05±	0.97	137.70±	1.14	139.25±	2.26	138.57±	1.68
氯/(mmol/L)	100.67±	2.06	100.67±	1.75	102.33±	2.58	99.33±	1.21
血糖/(mmol/L)	10.72±	3.12	11.26±	4.93	11.64±	7.25	15.11±	4.38

3 讨论

长期毒性试验是指试验动物连续多日接触较大剂量的药物所引起的中毒效应。它是药物非临床安全性研究的有机组成部分,是药物非临床毒理学研究中综合性最强、获得信息最多和对临床指导意义最大的一项毒理学研究,而血液学和血液生化检测是长期毒性试验重要的检测指标之一,对于判定毒性的剂量和靶器官都有重要意义^[8-9]。

本课题组前期进行了妇糜康阴道栓的急性毒性实验研究,未测得 LD₅₀,最大耐受量(MTD)8.568 g生药/kg,相当于拟临床日用量的 60 倍。为进一步探讨妇糜康阴道栓的安全性,本文考察了妇糜康阴道栓长期给药对家兔血液学及血液生物化学的影响。按照《中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则》^[1],本实验设低、中、高(0.952 g/kg、2.856 g/kg、8.586 g/kg)3 个剂量组,分别相当于人临床拟用量的 6 倍、20 倍和 60 倍。给药 6 个月及停药 4 周后,各给药组受试动物一般行为状态及体质量增长与赋形剂对照组相比差异无显著性($P>0.05$),妇糜康阴道栓浸膏粉高剂量组(8.568 g/kg)受试家兔比赋形剂对照组家兔的红细胞数、血红蛋白含量及红细胞压积增加($P<0.05$),停药 4 周后,恢复正常。说明妇糜康阴道栓浸膏粉高剂量组对受试家兔组红

细胞数、血红蛋白含量及红细胞压积的影响是可逆的,至于高剂量组为何引起这 3 个指标变化,还有待今后进一步研究。给药 6 个月及恢复 4 周后,各给药组受试家兔血液生化指标与赋形剂对照组比差异均无显著性($P>0.05$)。

综上所述,家兔阴道给予妇糜康阴道栓浸膏粉 2.856 g/kg,相当于临床拟用量的 20 倍,对家兔血液学及血液生理生化指标没有影响。提示妇糜康阴道栓家兔阴道给药安全剂量应低于 2.865 g/kg。

参考文献

- [1] 《中药、天然药物长期毒性试验技术指导原则》课题研究组. 中药、天然药物长期毒性研究技术指导原则[M].北京:国家食品药品监督管理局,2005:1-12.
- [2] 徐叔云,卞如濂,陈修.药理学实验方法学[M].3 版.北京:人民卫生出版社,2002:231-234
- [3] 陈奇.中药药理研究方法学[M].北京:人民卫生出版社,1993:119.
- [4] 兰艳丽,涂晓敏,谭正怀,等.甘桔冰梅片的急性毒性与长期毒性实验研究[J].中国药房,2014,25(27):2507-2509
- [5] 赵小倩,钱英,胡姗姗,等.复方莪术油乳膏外用对大鼠长期毒性实验研究[J].中国药房,2016,27(7):882-885
- [6] 杜洪志,农亨,董立莎,等.拔毒灸炎泡腾栓对大鼠血液生化及脏器重量的影响[J].中药药理与临床,2015,31(2):87-89.

[7] 王婷, 宋怀燕, 赵德明. 长期服用珍田胶囊对大鼠血液生化及血细胞成分的影响[J]. 实验动物科学, 2009, 26(2): 10-16.

标的统计处理[J]. 中国新药杂志, 2010, 19(4): 270-274.

[8] 张晓冬, 宗英, 陆国才, 等. 药物长期毒性试验血液和生化指

[9] 田辉, 樊柏林, 刘瑶, 等. SPF 级 Wistar 大鼠血液学及血生化指标正常值范围探讨[J]. 实验动物科学, 2007, 24(2): 1-4.

Effect of Long Term Administration of Fumikang Vaginal Suppository on Hematology and Blood Biochemical Indexes in Rabbits

MENG Li¹, XIANG Shaojie¹, LIU Xiaohu¹, SONG Dafu¹, ZHANG Huiying¹, JIA Tianzhu²

(1. Liaoning Traditional Chinese Medicine Institute, Shenyang 110034, China)

(2. College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

Abstract: Objective To observe the effect of long term administration of Fumikang vaginal suppository on hematology and blood biochemical indexes in rabbits, to provide the scientific basis for its clinical safe use. **Method**

Rabbits were vaginal administrated Fumikang vaginal suppository at dose of 8.586, 2.856, 0.952 g/kg respectively, once a day for 6 months. By the end of the test and 4 weeks after drug withdrawal, the hematology and blood biochemical examination were tested. **Result** Compared with excipient control group, the hemoglobin and hematocrit in 8.586 g/kg dose group were significantly increased ($P < 0.05$) after 6 months and were recovered to the normal level after drug withdrawal for 4 weeks. And other the hematology indexes were no significant differences ($P > 0.05$). In each group, the blood biochemical parameters for those administration for 6 months and 4 weeks after stopping medication and excipient control groups showed no significant difference. **Conclusion** There was no long-term toxicity on the hematologic and blood biochemical indicators in 2.856 g/kg of Fumikang vaginal suppository. The safe dose of Fumikang vaginal suppository given to rabbit is over 2.865 g/kg, it is equivalently 20 times of clinical dosage (according to 60 kg body weight of adult).

Key words: Fumikang vaginal suppository; hematology; blood biochemical; rabbit

(上接第 16 页)

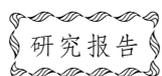
Establish Standard Biological Indicators for Normal SD Rats in GLP Barrier Environment Animal Laboratory

WANG Lifang, DAI Baoqiang, TAN Yuqing, LIU Ting, WANG Yang

(China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing institute of Chinese medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: Objective Establish the normal biological indicators of normal Sprague Dawley (SD) rats for long term toxicity test in barrier environment animal laboratory of center for safety evaluation of traditional Chinese medicine (GLP), to provide references for the future researchers. **Method** Breeding normally ten batches of normal SD rats in long term toxicity test, measured weight gains and food intakes once a week, measured organ indexes, blood and biochemical indicators at the end of 3, 6 months and recovery period. **Result** The result show that the food intakes of male SD rats were higher, increase linearly in body weights, higher than that in females, the organ indexes were declined in male rats. It showed that the growth and development, efficiency of feed utilization of male rats was faster than that in female rats. There were no significant changes in blood and biochemical indexes. **Conclusion** These normal data indicators can provide reference indexes for future GLP barrier environmental laboratory rat test.

Key words: GIP; SD rats; indicators



行为箱形状对小鼠新物体识别实验结果的影响*

杜艳芳 杨 洋 毕田田 毕玉莹 王 玥 李 婷 白云龙 王宇鑫

(哈尔滨商业大学药学院, 哈尔滨 150076)

摘要:目的 研究新物体识别实验在ICR小鼠学习记忆能力评价中的应用效果。方法 将40只ICR小鼠,雌雄各半,随机分为4组,方雌组(方形行为箱雌性小鼠组)、方雄组、圆雌组和圆雄组。按照相同的新物体识别实验流程,测定各组小鼠对物体的探索时间。结果 方雌组与方雄组,圆雌组与圆雄组比较,探索时间和对新物体的分辨比均无显著性差异($P>0.05$)。方组(方雌组+方雄组)与圆组(圆雌组+圆雄组)比较,对新物体的分辨比无显著性差异($P>0.05$),但圆组的总探索时间显著长于方组($P<0.01$)。结论 进行新物体识别实验时,性别不影响小鼠学习记忆能力的评价,选择圆形行为箱进行实验可更好地评价小鼠学习记忆能力。

关键词:行为箱形状;小鼠;学习记忆;新物体识别实验

中图分类号: Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0022-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.005

动物的认知功能需要通过对其学习记忆的情况进行评价,因此需要建立规范的行为学实验方法,从而准确判断其学习记忆的情况。根据啮齿类动物具有喜欢探索陌生事物的天性^[1], Ennaceur 和 Delacour^[2]于1988年报道了一种非奖赏性的、简单的认知记忆实验模型——新物体与新位置识别实验,用于检测啮齿类动物的记忆能力。该模型根据动物对见过的熟悉物体和没有见过的新物体的探究时间的长短来评价被测试动物的记忆能力,即当被测试动物未遗忘环境中见过的熟悉物体时,便会用更多的时间探究没有见过的新物体;当被测试动物遗忘了见过的熟悉物体,则动物对环境中没有见过的新物体和见过的熟悉物体的探究时间应基本相同。与其它动物行为学实验方法相比,新物体识别实验具有不需要外部推动力,只需要适当的训练即可完成,且具有实验时间短的优点^[3-4],受到越来越多的学者的关注。但由于新物体识别实验缺乏统一的实验标准,使其应用受到一定的限制。以往研究针对物体材质、时间间隔等具体检测条件进行^[5],但缺少对行为箱形状的研究,为了进一步规范该方法的实验标准,本研究针对新物体实

验方法中的实验行为箱形状对实验结果的影响进行考察。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养环境

健康ICR小鼠,8周龄,40只,雌雄各半,体重24~26g,购自长春亿斯实验动物技术有限责任公司[实验动物生产许可证号:SCXK(吉)-2011-0004]。遵照国家实验动物饲养和使用指南,将小鼠饲养在屏障环境中,控制温度在 (22 ± 1) ℃,12h明暗循环,自由采食和饮水,预饲期1周。

1.2 实验仪器

小鼠自主活动仪(ZZ-6型,成都泰盟科技有限公司),动物社会交互行为视频分析系统(Xeye SI V1.2,北京天鸣宏远科技发展有限公司)。

1.3 实验动物分组

ICR小鼠40只随机分为2组,每组20只,雌雄各半,即方组($n=20$)和圆组($n=20$)。各组按性别再次随机分为2组,即方雌组($n=10$)、方雄组($n=10$)、圆雌组($n=10$)和圆雄组($n=10$)。

收稿日期:2018-04-30

* 基金项目:省级大学生创新训练计划项目(No.201610240041)

作者简介:杜艳芳(1997—),女,本科生,研究方向:神经药理学.E-mail:1670723070@qq.com

通信作者:杨 洋(1985—),工程师,研究方向:神经药理学.E-mail:syzxyy213@163.com

1.4 新物体实验方法

实验前 5 d, 实验人员每天将小鼠放到手上抚触 5 min, 消除小鼠的紧张恐惧感。实验前, 通过小鼠自主活动仪筛选, 剔除活动异常的小鼠(活动过少、活动过多、转圈等)。实验当天, 先将小鼠放到实验室, 让其适应环境 1 h, 然后进行正式实验。

新物体识别实验包含三个阶段(图 1)。阶段 1 (T1): 分别将小鼠单独放入敞开的行为箱(底边长 44 cm×44 cm 的方形行为箱或半径为 25 cm 的圆形行为箱)中, 自由探索 5 min。探索完毕后将小鼠取出, 放回饲养笼中。清理行为箱中小鼠的粪尿, 75%

酒精擦拭, 消除异味。本阶段在实验第一天上午、下午分别进行一次。阶段 2 (T2): 分别在行为箱的两个相对的区域中放入 2 个完全相同的物体(物体 1 和 1'), 再次将小鼠放入行为箱中探索 5 min。每次实验结束后, 彻底清理行为箱。本阶段实验在第二天上午进行。阶段 3 (T3): 物体 1 不变(旧物体), 物体 1' 更换为物体 2(新物体), 再次将小鼠放入行为箱中探索 5 min。每次实验结束后, 彻底清理行为箱。本阶段实验在第二天下午进行。所有实验均在上午 8 点至下午 5 点之间进行。

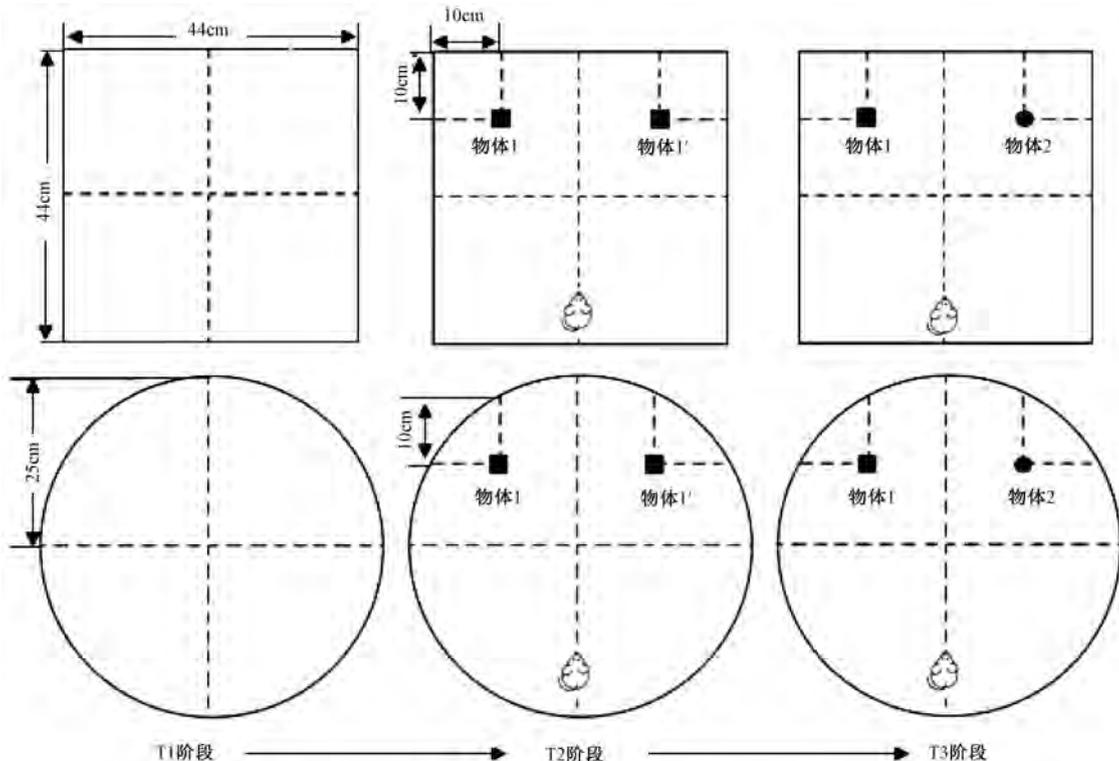


图 1 新物体识别实验示意图

Fig.1 The schematic diagram of novel object recognition test

采用动物运动轨迹跟踪系统记录分析 T2 和 T3 中小鼠分别探索 2 个物体的时间, 其中探索物体 1 的时间记为 F, 探索物体 1' 或 2 的时间记为 N, 探索两个物体的总时间记为 F+N, 计算小鼠对物体 1' 和 2 的分辨比(discrimination ratio, DR) [$DR = N / (N + F) \times 100\%$]。探索定义为小鼠面朝物体, 鼻子与该物体的距离 ≤ 2 cm。

1.5 数据统计分析

采用 SPSS 21.0 for windows 统计软件包分析。数据用平均值 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用单因素方

差分析进行多组间比较, 两两比较采用 LSD-t 检验; 组内比较用配对 Student t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠性别对新物体识别实验结果的影响

在 T2 阶段, 各行为箱中的实验动物对物体 1 和 1' 的探究时间: (31.16 ± 16.75) s, (30.97 ± 16.50) s; (30.37 ± 15.95) s, (31.73 ± 15.10) s; ($112.33 \pm$

48.26) s, (112.50±49.76) s; (112.61±47.93) s, (112.32±47.10) s 基本相同 ($P>0.05$), 在 T3 阶段, 各行为箱中的实验动物对物体 2 的探索时间显著长于对物体 1 的探索时间 ($P<0.05$) 见图 2, 但相同形状的行为箱(方形行为箱, 圆形行为箱)中不同性别小鼠对 2 号新物体的 DR 无显著性差异 ($P>0.05$), 见图 3。

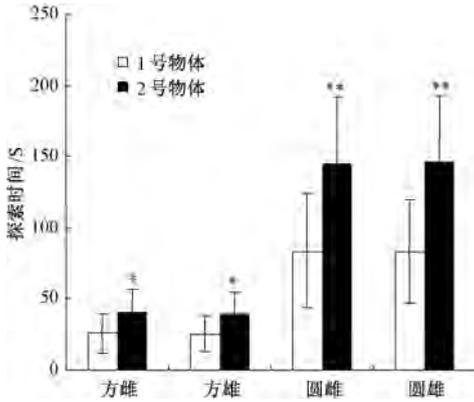


图 2 T3 阶段 4 组小鼠对 1 和 2 号物体的探索时间 (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

Fig.2 The exploration times of object 1 and 2 of mice in T3 period (* $P<0.05$, ** $P<0.01$)

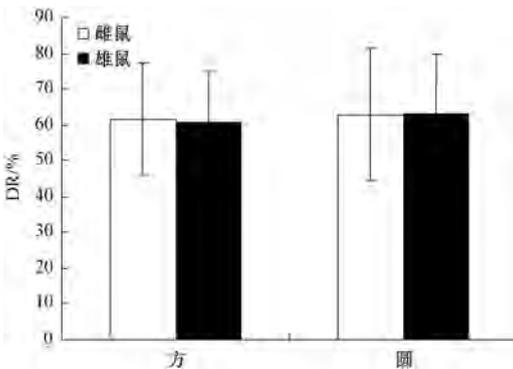


图 3 相同行为箱中雌雄小鼠的分辨比

Fig.3 The discrimination ratio of female and male mice in the same experimental condition

2.2 行为箱形状对新物体识别实验结果的影响

在 T2 阶段, 不同形状行为箱中小鼠对两物体在 5 min 内探索时间 (30.76±15.93) s, (31.35±15.40) s; (112.47±46.81) s, (112.41±47.16) s 的差异未达到显著水平 ($P>0.05$); 在 T3 阶段, 小鼠对 2 号物体的探索时间显著长于 1 号物体, 但两种形状行为箱中小鼠对新物体的分辨比无显著差异 ($P>0.05$) 见图 4。T2、T3 两阶段中, 圆形行为箱中

小鼠对两物体的探索总时间 (224.88±37.05) s, (229.15±33.38) s 显著长于方形行为箱中小鼠对两物体的总探索时间 (62.11±23.30) s, (65.58±22.40) s ($P<0.01$) 见图 5。

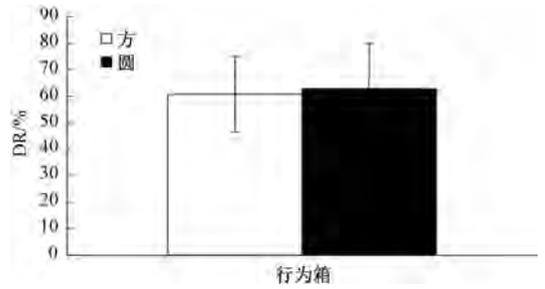


图 4 两种行为箱中小鼠对新物体的分辨比

Fig.4 The discrimination ratio of novel object in mice about two types of experimental conditions

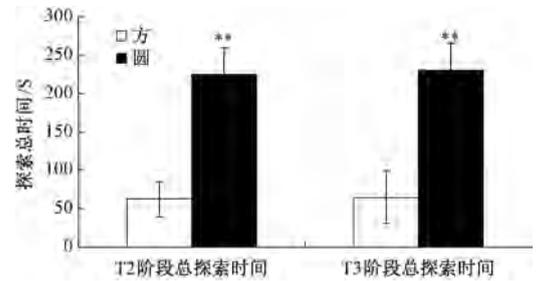


图 5 T2 和 T3 阶段各行为箱中的总探索时间 (** $P<0.01$)

Fig.5 The total exploration times of each experimental condition in T2 and T3 periods (** $P<0.01$)

3 讨论

新物体识别实验是在模仿测试人类失忆症的识别任务的基础上发展起来的, 评价的是啮齿动物对物体的识别记忆能力。该模型是建立在啮齿动物对新异物体的自发探索行为的基础上, 且该模型不像迷宫学习中必须剥夺动物饮食或在避免水淹动机下进行学习记忆^[6], 也不像被动回避测试中给予动物电击等负性强化让动物学习记忆^[7]。所以该模型最大的优点就在于可以让动物在完全自然的状态下进行学习记忆测试, 能够更好地模拟人类和灵长类动物的学习记忆行为^[8]。因此, 该模型越来越多地用在评估药物对记忆的作用研究上。

在新物体实验方法的使用中, 如何规范实验流程, 建立实验动物行为学评价标准成了实验的核心问题。本实验通过比较采用不同形状的行为箱进行新物体实验时结果的差异, 推断行为箱形状对实验

结果有一定的影响。本实验中,T2 阶段的两个物体完全相同,且对于小鼠来说均为首次接触,因此各组小鼠对物体的 DR 值均在 50%左右,表明实验动物无位置偏爱异常发生,即实验动物对两个不同位置上的相同物体兴趣相同。T3 阶段,小鼠对 2 号物体的探索时间显著长于 1 号物体,说明实验中选用的新物体引起了小鼠的探索兴趣,物体的选择正确。各行行为箱中,雌雄小鼠对新物体的分辨比无差异,表明不同性别的实验小鼠对新物体的分辨程度相同,即性别不影响对新物体识别实验结果。进一步的实验结果,在 T3 阶段中,不同形状的行为箱中的实验动物均能对新物体显示出积极的探索兴趣,分辨比相似,表明行为箱的形状差异不影响实验动物对新物体识别行为。但实验动物在两种形状的行为箱中的总探索时间存在差异,说明行为箱的形状对实验动物的活动程度有一定的影响。这可能是由于方形行为箱的角落效应造成的。

研究表明,虽然在两种不同形状的行为箱中进行的新物体识别实验,动物对新物体识别结果无差异,但为了避免角落造成的实验动物活动能力降低现象的发生,我们认为采用圆形行为箱进行新物体识别实验能够更准确地反应实验动物对新物体的识别能力。

Influence of the Shape of the Testing Environment on Novel Object Recognition Test in Mice

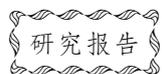
DU Yanfang, YANG Yang, BI Tiantian, BI Yuying, WANG Yue, LI Ting, BAI Yunlong, WANG Yuxin

(School of Pharmacy, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: Object To investigate the effects of the result of novel object recognition tests in different experimental conditions with ICR mice. **Method** Divided 40 ICR mice (half male and female) into 4 groups randomly, the square female group (the female mice group working in the square box), the square male group, the round female group and the round male group. According to the same experimental process of novel object recognition, the exploration time of mice in each group was measured. **Result** There was no significant differences between the square female group and the square male group, the round female group and the round male group in the total exploration time and the discrimination ratio of novel object ($P>0.05$). Compared the square group (the square female group+the square male group) with the round group (the round female group + the round male group), there was no significantly differences in the discrimination ratio of novel object ($P>0.05$), but the total exploration time of the round group was significantly longer than that of square group ($P<0.01$). **Conclusion** In the experiment of novel objects, the sex of mice did not affect the evaluation of learning and memory ability of mice, and the choice of round behavior box for experiments could better evaluate the learning and memory ability of mice. **Key words:** the shape of the testing environment; mice; learning and memory; novel object recognition test

参 考 文 献

- [1] Berlyne D E. Novelty and curiosity as determinants of exploratory behavior [J]. Br. J. Psychol. Gen., 1950, **41**(1-2): 68-80.
- [2] Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data [J]. Behav Brain Res, 1988, **31**(1): 47-59.
- [3] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications [J]. Cogn Process, 2012, **13**(2): 93-110.
- [4] Rajagopal L, Massey B W, Huang M, *et al.* The novel object recognition test in rodents in relation to cognitive impairment in schizophrenia [J]. Curr Pharm Des, 2014, **20** (31): 5104-5114.
- [5] 李盛建, 黄竹燕, 叶夷露. 物体材质与检测间隔时间对小鼠新物体识别实验结果的影响[J]. 浙江大学学报(医学版), 2014, **43**(3):346-352.
- [6] 齐越, 刘冉, 贾冬, 等. 温郁金挥发油对 $A\beta_{(25-35)}$ 致阿尔兹海默病小鼠模型行为学的影响[J]. 实验动物科学, 2017, **34** (5):27-31.
- [7] Esmailpour K, Sheibani V, Shabani M, *et al.* Effect of low frequency electrical stimulation on seizure-induced short- and long-term impairments in learning and memory in rats [J]. Physiology & Behavior, 2017, **168**: 112-121.
- [8] Lyon L, Saksida L M, Bussey T J. Spontaneous object recognition and its relevance to schizophrenia: a review of findings from pharmacological, genetic, lesion and developmental rodent models [J]. Psychopharmacology, 2012, **220** (4): 647-672.



RT-qPCR 检测 Wistar 大鼠黄嘌呤脱氢酶/氧化酶基因 转录水平方法的建立*

王陈芸¹ 李哲丽¹ 叶尤松¹ 蔡发晶² 肖涵² 谢季平³ 唐东红¹

(1. 中国医学科学院/北京协和医学院 医学生物学研究所, 昆明 650118) (2. 云南省中医学院, 昆明 650200)

(3. 昆明市科学技术情报研究所, 昆明 650600)

摘要:目的 建立实时荧光定量 (RT-qPCR) 检测 Wistar 大鼠黄嘌呤脱氢酶/氧化酶 (*XDH/XO*) 基因转录水平的方法, 以在转录水平上对 *XDH/XO* 基因进行定量检测。方法 提取 Wistar 大鼠肝脏组织中总 RNA, 经逆转录得到 cDNA, 以 10 倍为稀释因子稀释为 5 个浓度梯度, 使用设计的引物序列和内参基因进行 RT-qPCR 检测, 得到 *XDH/XO* 基因表达的标准曲线。进而检测 Wistar 大鼠高尿酸血症动物模型中 *XDH/XO* 基因转录水平的变化。结果 RT-qPCR 法检测得到的 *XDH/XO* 基因标准曲线溶解峰单一, R^2 接近 1, 能检测出高尿酸动物模型中 *XDH/XO* 基因转录水平的变化。结论 RT-qPCR 检测 Wistar 大鼠 *XDH/XO* 基因转录水平的方法具有定量准确, 重复性好的特点, 可应用于高尿酸血症的发病机理、新药研究等方面。

关键词: 实时荧光定量 (RT-qPCR); 嘌呤脱氢酶/氧化酶 (*XDH/XO*); Wistar 大鼠; 肝脏; mRNA

中图分类号: Q95-336 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0026-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.006

黄嘌呤脱氢酶/氧化酶 (xanthine dehydrogenase/oxidase, *XDH/XO*) 是一种嘌呤代谢的氧化过程中的限速酶, 在嘌呤代谢过程中催化嘌呤代谢的最后两步, 即催化次黄嘌呤和黄嘌呤形成尿酸。*XDH/XO* 基因的分布具有物种和组织特异性, 在人体中主要存在于肝脏、小肠和脑血管中, 其基因定位于 2 号染色体断臂上。灵长类体内尿酸氧化酶失活, 尿酸成为嘌呤代谢的终产物^[1-3]。当体内 *XDH/XO* 基因活性异常增高时, 则会生成大量尿酸造成尿酸的沉积, 导致血清尿酸浓度升高。女性血尿酸浓度 > 6.0 mg/dL, 男性血尿酸浓度 > 7.0 mg/dL, 即可诊断为高尿酸血症^[4]。高尿酸血症不仅是痛风的发病基础, 还可造成多种心血管疾病和代谢相关疾病, 且其发病率逐年上升, 因此备受关注。研究高尿酸血症就要研究其发病机理, 所以对 *XDH/XO* 基因的研究极其重要, 目前多有其组织分布, 活性等的研究^[5-6]。

polymerase chain reaction, real-time, RT-qPCR) 技术于 1996 年由美国 Applied Biosystems 公司推出, RT-qPCR 实现了 PCR 从定性到定量的飞跃, 而且与普通 PCR 相比, 它具有特异性更强、重复性好、灵敏度高、定量准确、全封闭反应、自动化程度高等优点成为分子生物学研究中的重要工具, 目前已得到广泛应用^[7]。Wistar 大鼠是实验大鼠 (*Rattus norvegicus*, *rat*) 的一个常用品系, 其繁殖力强、生长发育快、性情温顺、对传染病的抵抗力较强, 是生物医学方面研究的常用实验动物, 是目前高尿酸血症动物模型研究中最常用的实验动物。为研究高尿酸血症模型 Wistar 大鼠肝脏中 *XDH/XO* 基因转录水平的变化, 本文采集 Wistar 大鼠肝脏总 RNA, 逆转录为 DNA, 设计引物进行 RT-qPCR 扩增, 建立标准曲线, 以在转录水平上对 *XDH/XO* 基因进行定量检测。本方法的建立可用于研究高尿酸血症的发病机理以及药物筛选。

实时荧光定量 PCR (real-time quantitative

收稿日期: 2018-06-10

* 基金项目: 中国医学科学院医学与健康科技创新工程重大协同创新项目 (No. 2016-I2M-2-006)

作者简介: 王陈芸 (1990—), 女, 研究实习员, 硕士, 研究方向: 人类疾病动物模型. E-mail: 1034121466@qq.com

通信作者: 唐东红 (1966—), 女, 主任技师, 研究方向: 人类疾病动物模型. E-mail: tdh@imbcams.com.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 Wistar 大鼠 12 只,雌雄各半,由中国医学科学院医学生物学研究所小动物实验部提供,其生产许可证号:SCXK(滇)K2014-0002。使用许可证号:SYXK(滇)K2014-0007。实验程序符合中国医学科学院医学生物学研究所动物实验伦理委员会的要求,并遵守国际惯例,按照实验动物使用的 3R 原则给以关怀。

1.2 试剂及仪器

逆转录试剂盒 PrimeScript™ RT reagent Kit (Perfect Real Time), RT-qPCR 扩增试剂盒(SYBR Premix Ex TaqII (Tli RNaseH Plus)、RNA 提取液(Tripure),均购自 Roche 公司;氧嗪酸钾(oxonic acid potassium salt, OA),购自美国 Sigma 公司,纯度 $\geq 97\%$;别嘌呤醇(allopurinol, ALLO),购自南京都莱生物有限公司,纯度 $\geq 98\%$;羧甲基纤维素钠(Carboxy methyl cellulose sodium, CMC),购自昆明诚悦科技公司;Biowest 琼脂糖;DNA 分子量标准(DL 2000 bp),购自 TakaRa 生物工程有限公司。CFX 96 TM real-time system 荧光定量 PCR 仪,购自美国 Bio-Rad 公司;凝胶成像分析仪,美国 BioRad 公司;Power Pac Basic 电泳仪,购自北京六一生物工程有限公司;ND-1000 紫外分光光度计,购自美国 Dano Drop 公司;高速冷冻离心机,购自 Sigma 公司;SCIENTZ-48 高通量组织研磨器,购于宁波新芝生物科技股份有限公司。

1.3 引物设计及合成

引物设计以 NCBI 提供的大鼠 XDH/XO 核苷酸序列(017008.3)为参考,利用 Primer5.0 软件在 CDS 区域进行设计。管家基因 *GAPDH*:上游片段 5'-GGCACAGTCAAGGCTGAGAATG-3' 下游片段 5'-ATGCTGCTGAAGACGCCAGTA-3',基因片段大小为 143 bp;目的基因 *XDH/XO*:上游片段 5'-ATGCGGACCCTGAAACAACA-3' 下游片段 5'-TGTTCTGAAGACGCTCATACTTGA-3',基因片段大小为 114 bp,均由宝生物 TaKaRa 生物有限公司合成。

1.4 RNA 提取

脱颈处死 Wistar 大鼠,酒精棉球消毒腹部,迅速取出肝脏组织 0.1 g 于装有 1 mL tripure 的 5 mL EP 管中,放入适合大小钢珠,放入高速组织研磨器中充分研磨;静置 5 min,液体转移至 1.5 mL EP 管中静置

5 min,加入 200 μL $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的氯仿,漩涡震荡充分,静置 15 min 后 $4\text{ }^\circ\text{C}$, 12 000 $\times\text{g}$ 离心 25 min,吸取上清液 450 μL 于另一只 1.5 mL EP 管中,等体积加入 $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的异丙醇,充分混匀静置 10 min, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 12 000 $\times\text{g}$ 离心 10 min,弃上清液,待管内壁稍干,加 1 mL $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 预冷的 75%乙醇洗涤沉淀, $4\text{ }^\circ\text{C}$, 7 500 $\times\text{g}$ 离心 5 min,弃上清液,待管内壁稍干,加入 30 μL DEPC 水溶解沉淀, $65\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴 10 min,得总 RNA 样品。

1.5 RNA 完整性及纯度检测

移取总 RNA 样品 2 μL 于 1.5% 琼脂糖凝胶孔中,在 90 V, 400 mA 的条件下电泳 20 min,于凝胶成像分析系统下观察 28S、18S 和 5S RNA 条带,分析 RNA 的完整性;再取 1 μL 于 ND-1000 紫外分光光度计测定 RNA 浓度。

1.6 RNA 逆转录

测定浓度后每管按比例加 DEPC 水稀释至 1 000 ng/ μL ;总 RNA 按照逆转录试剂 PrimeScript™ RT reagent Kit 说明操作,每 10 μL 体系中依次加入 5 \times PrimeScript Buffer 2 μL , PrimeScript RT Enzyme Mix 0.5 μL , Oligo dT Primer 0.5 μL , Random 6 mers 0.5 μL , 总 RNA 1 μL , RNaseFree dH_2O 5.5 μL , 逆转录条件为: $37\text{ }^\circ\text{C}$, 15 min, $85\text{ }^\circ\text{C}$, 5 s; $4\text{ }^\circ\text{C}$, 10 min, 逆转录得到 cDNA。

1.7 Wistar 大鼠 *GAPDH* 基因及 *XDH/XO* 基因标准曲线的建立

以 Esidilution 为溶剂梯度稀释 mDNA, 分别稀释为 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} 倍浓度,以原始 cDNA 及稀释后的 cDNA 为模板,各做 2 个平行样进行 RT-qPCR 检测:反应体系为 25 μL 。分别加 *XDH/XO* 基因及 *GAPDH* 基因上、下游引物各 1 μL (10p) 再分别加 SYBR Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus) 12.5 μL 及灭菌去离子水 9.5 μL 、cDNA 1 μL 。反应条件为: $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 30 s, $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 5 s, $59\text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s, 40 个循环, $59\text{ }^\circ\text{C}$ 到 $94\text{ }^\circ\text{C}$ 每 5s 采集一次荧光。反应完成后根据荧光信号的数据,使用 CFXManager 软件,制作标准曲线,得到基因扩增效率,斜率及 R^2 值,当 *XDH/XO* 基因及内参基因 *GAPDH* 基因扩增效率在 80% 至 120% 之间, R^2 值接近 1, 说明结果可信度较高,符合荧光定量 PCR 要求。

1.8 OA 致 Wistar 大鼠高尿酸血症动物模型 *XDH/XO* mRNA 转录水平检测

6 只 Wistar 大鼠随机分成 3 组, 2 只/组, 第一组腹腔注射 300 mg/kg 剂量 37.5 mg/mL 浓度的 OA,

第二组腹腔注射 300 mg/kg 剂量 OA 和 22 mg/kg 剂量的 ALLO, 第三组腹腔注射 1% 的 CMC-Na 作为对照, 于给药 1.5 h 后脱颈处死动物, 各组取肝脏 0.1 g, 放入已加 1 mL tripure 的 5 mL EP 管中。提取 RNA, 逆转录获得 cDNA, 以 cDNA 为模板, 做两个平行样进行实时荧光定量检测, 得到 *XDH/XO* mRNA 转录水平变化。

2 结果

2.1 RNA 完整性及纯度

Wistar 大鼠肝脏组织提取总 RNA 进行电泳, 可观察到 28S、18S、5S 三条带, 见图 1, 说明所提取的总 RNA 无降解, 可进一步用于后续实验。所提取的总 RNA 样品经 Nanodrop-1000 超微量核酸测定仪测定波长 260/280 nm 的吸光度 A 值, A_{260}/A_{280} 值均介于 1.8~2.0 之间时, 说明纯度较高。

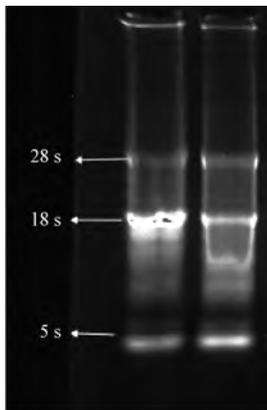


图 1 大鼠肝脏组织总 RNA 电泳图

Fig.1 The electrophoresis of total RNA from the liver tissue of rates

2.2 目的基因电泳结果

Wistar 大鼠肝脏组织 *XDH/XO* 基因 RT-qPCR 产物经 1.5% 的琼脂糖电泳, 结果扩增出的目的条带, 与所设计的片段大小一致, 且条带较亮, 表明扩增效率高, 可用于后续实验, 见图 2。

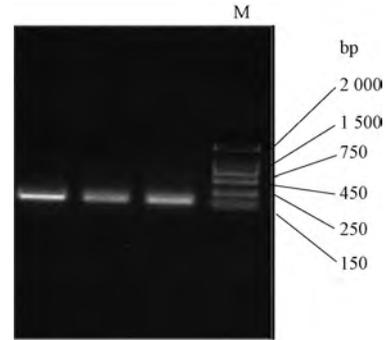


图 2 *XDH/XO* mRNA RT-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳图

Fig.2 The electrophoresis result of RT-PCR of *XDH/XO* mRNA from the liver tissue of rates

2.3 Wistar 大鼠肝脏 *GAPDH* 及 *XDH/XO* 基因标准曲线及溶解峰

由溶解峰图可知大鼠 *GAPDH* 及 *XDH/XO* 基因纯度较高, 由标准曲线 ct 值可得各稀释梯度 cDNA 的拷贝数, 其中 R^2 均接近 1, 说明以此标准曲线进行相对定量较准确, 由于荧光强度均较强, 故能保证荧光强度的增加与 PCR 的扩增相对同步, 能准确检测 PCR 的表达, 见图 3、4。

2.4 OA 致 Wistar 大鼠高尿酸血症动物模型 *XDH/XO* 基因转录水平的变化

以 *GAPDH* 为内源控制物, 得到 *XDH/XO* 基因转录水平的变化, Wistar 大鼠腹腔注射 300 mg/kg

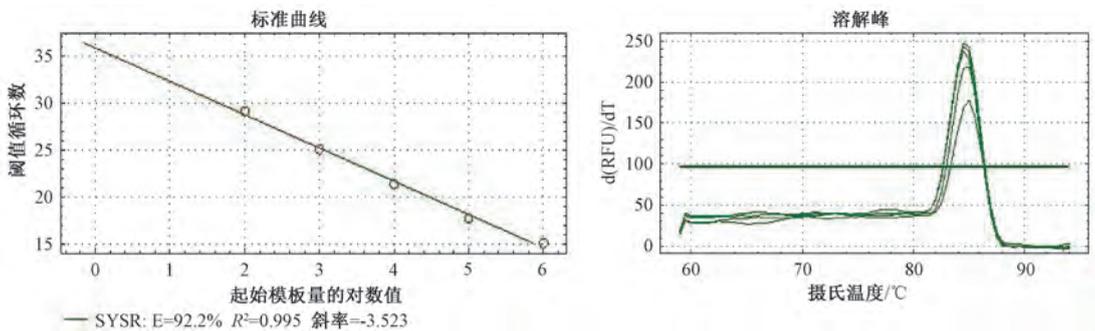
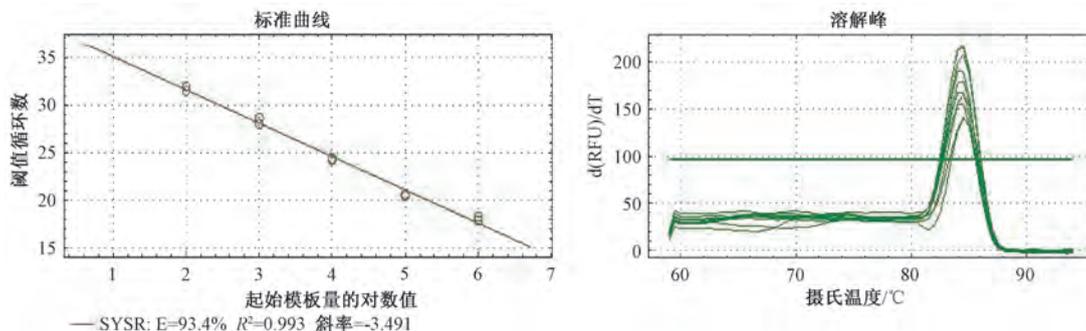
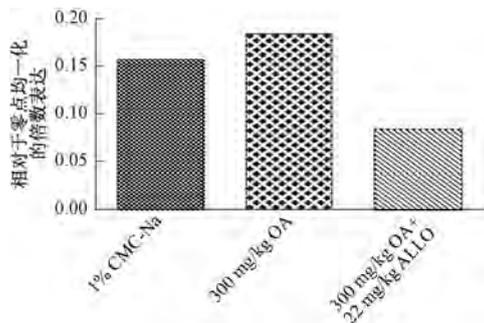


图 3 *GAPDH* 基因标准曲线及溶解峰

Fig. 3 The standard curves and melting curves of *GAPDH* gene

图 4 *XDH/XO* 基因标准曲线及溶解峰Fig.4 The standard curves and melting curves of *XDH/XO* gene

剂量的 OA 组,肝脏组织 *XDH/XO* 基因转录水平较对照组上调;同时注射 300 mg/kg 剂量 OA 和 22 mg/kg 剂量的 ALLO 组,肝脏组织 *XDH/XO* 基因转录水平较 300 mg/kg 剂量的 OA 组下调,见图 5。实验结果表明本文所建立方法能灵敏地检测出 Wistar 大鼠高尿酸血症动物模型 *XDH/XO* 基因转录水平的变化。

图 5 OA 致 Wistar 大鼠 *XDH/XO* 基因转录水平的变化Fig.5 The change of transcriptional-level of *XDH/XO* gene in Wistar rats after administration OA

3 讨论与结论

RT-qPCR 法是在 PCR 反应中可以结合于双链 DNA 的小沟处并释放出荧光信号。随着反应的进行,靶基因的载量和荧光信号强度相对应,二者成一定的线性关系。所以通过收集荧光信号的强度,就可以间接来定量实验中的双链 DNA 的拷贝数^[8-9],具有操作简单,造价便宜等优点,且荧光信号与 PCR 产物有相应的线性关系,所以可以实现实时监控、定量检测目的基因的目的,目前广泛用于基因方面研究,但也存在非特异性信号的干扰,所以选择合适的样品建立标准曲线对于检测基因的表达尤为重要,当标准曲线的扩增效率在 80% 至 120% 之间, R^2

值接近 1 时,结果可信度较高,符合 RT-qPCR 要求^[10]。本实验从健康 Wistar 大鼠新鲜肝脏组织中提取总 RNA,经逆转录获得 cDNA,梯度稀释后进行 RT-qPCR 扩增,建立 Wistar 大鼠 *GAPDH* 基因和 *XDH/XO* 基因的标准曲线,实验结果显示,*GAPDH* 基因和 *XDH/XO* 基因扩增效率分别为 92.2% 和 93.4%,在 80% 至 120% 之间; R^2 值分别为 0.995 和 0.993,接近 1;且溶解峰曲线单一无杂峰,可有效地排除非特异性型号的干扰,说明标准曲线可信度较高,符合 RT-qPCR 要求,表明我们成功地建立了 RT-qPCR 检测 Wistar 大鼠 *XDH/XO* 基因转录水平的 RT-qPCR 检测方法。

自 Johnson 等成功地用 OA 诱导大鼠高尿酸血症模型以来,因其灵敏、简便、重复性好等特点成为了国内外高尿酸血症造模的主要方法^[11-13]。所以本实验选用 OA 造模,诱导 Wistar 大鼠高尿酸血症模型。目前对 OA 诱导动物高尿酸血症模型的研究大多是代谢组学方面的研究^[14-15],本实验利用所建立方法对 OA 致 Wistar 大鼠高尿酸血症动物模型 *XDH/XO* 基因转录水平的变化进行了研究,实验结果表明 OA 会影响 *XDH/XO* 基因的转录水平,模型组的转录水平升高,与预期相符,同时也验证了我们所建立的 RT-qPCR 法测 Wistar 大鼠 *XDH/XO* 基因转录水平的方法是可行的,其可在转录水平上对高尿酸血症动物模型的 *XDH/XO* 基因进行分析。

本实验成功地建立了 Wistar 大鼠 *XDH/XO* 基因转录水平的 RT-qPCR 检测法,该方法特异性强,灵敏度高,具有很好的重复性,可用于 *XDH/XO* 基因的定性和定量检测,为高尿酸血症动物模型的研究和高尿酸血症发病机理以及新药开发提供了可靠的手段。

致谢

感谢中国医学科学院医学生物学研究所小动物实验部提供实验动物及动物实验饲养场地以及饲养动物。

参考文献

- [1] 王成华,邢新会.黄嘌呤氧化酶的研究进展及其发展前景[J]. 广西科学,2017,24(1):15-24.
- [2] 秦尤文.黄嘌呤脱氢酶研究进展[J]. 国外医学(临床生物化学与检验学分册),2002,9(4):218-219.
- [3] 唐东红,叶尤松,李哲丽,等.荧光定量 PCR 与半定量 PCR 检测猕猴不同器官组织中黄嘌呤脱氢酶/氧化酶基因的 mRNA 表达差异的比较[J]. 中国比较医学杂志,2015,25(12):47-53.
- [4] 王凯,夏德萌,郝晓伟,等.氧嗪酸钾诱导高尿酸血症小鼠血清代谢组学研究[J]. 药学服务与研究,2015,15(6):416-421.
- [5] 张罕,吕喆,李冬妹,等.实时定量 PCR 分析小鼠树突状细胞 TLR4 mRNA 表达及地塞米松的调节[J]. 细胞与分子免疫学杂志,2008,(3):221-224.
- [6] 李哲丽,叶尤松,彭波,等.猕猴不同组织器官中黄嘌呤脱氢酶/氧化酶基因的 mRNA 表达的半定量 RT-PCR 检测方法的建立[J]. 实验动物科学,2015,32(3):33-37.
- [7] 张培,苗志敏,李长贵,等.慢性高尿酸血症大鼠模型建立方法的探讨[J]. 青岛大学医学院学报,2010,46(3):219-221.
- [8] 展鹏,刘涛,刘新冰.以黄嘌呤氧化酶为靶点的新型非嘌呤类抗痛风及高尿酸血症药物研究进展[J]. 中国药物化学杂志,2012,22(5):403-415.
- [9] 杜江涛,宋晓明,周莎桑,等.小鼠腺病毒荧光定量 PCR 方法的建立及初步应用[J]. 实验动物科学,2017,34(3):49-54+65.
- [10] 张燕,马菱蔓.高脂高嘌呤饮食联合氧嗪酸钾诱导鹤鹑糖脂代谢紊乱及其并发症[J]. 中国比较医学杂志,2016,26(1):58-64.
- [11] Deodhar A. Update in rheumatology: evidence published in 2012 [J]. Ann Intern Med,2013,158(12):903-906.
- [12] Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, et al. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions [J]. Biotechnology,1993,11(9):1026-1030.
- [13] Johnson W J, Stavric B, Chartrand A. Uricase inhibition in the rat by s-triazines: an animal model for hyperuricemia and hyperuricosuria [J]. Proc Soc Exp Biol Med,1969,131(1):8-12.
- [14] 冯育芳,邢进,王吉,等.应用实时荧光定量 PCR 方法检测实验用猫巴尔通体的感染[J]. 实验动物科学,2018,35(4):56-60.
- [15] 王丽平,朱以良,陈芳,等.痛风模型动物的选择[J]. 实验动物科学,2017,34(5):70-72.

Establishment of Real-time Fluorescence Quantitative PCR for Detecting Stranscriptional-level of *XDH/XO* Gene in Wistar Rats

WANG Chenyun¹, LI Zheli¹, YE Yousong¹, CAI Fajin², XIAO Han², XIE Jiping³, TANG Donghong¹

(1. Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science/Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

(2. Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming 650200, China)

(3. Kunming institute of science and technology intelligence, Kunming 650600, China)

Abstract: Objective To establish Quantitative Real-time PCR (RT-qPCR) method for detecting the transcription level of xanthine dehydrogenase/oxidase (*XDH/XO*) gene in Wistar rats, to quantitatively detect *XDH/XO* gene at the transcriptional level. **Method** Total RNA was extracted from the liver tissue of Wistar rats. The cDNA was obtained by reverse transcription, and diluted to 5 concentration gradients with 10 dilution factors. RT-qPCR was performed using the designed primer sequences and reference genes to obtain *XDH/XO* gene standard curve. Furthermore, changes in the transcription level of *XDH/XO* gene in the animal model of hyperuricemia in Wistar rats were examined. **Result** The *XDH/XO* gene standard curve obtained by RT-qPCR method has a single dissolution peak and R^2 is close to 1. It can detect the change of *XDH/XO* gene transcription level in animal model of high uric acid. **Conclusion** RT-qPCR is a quantitative and accurate method for detecting the *XDH/XO* gene transcription level in Wistar rats. It can be applied to the pathogenesis of hyperuricemia and new drug research.

Key words: Real-time fluorescence quantitative PCR; *XDH/XO*; Wistar rats; liver; mRNA



六种核酸提取试剂盒对粪样中小鼠肝炎病毒核酸提取效率的比较*

桂 飞¹ 杨伟伟¹ 俞利平¹ 戴方伟² 杜江涛² 宋晓明¹

(1. 杭州师范大学实验动物中心, 杭州 310036)(2. 浙江省医学科学院实验动物中心, 杭州 310013)

摘要:目的 比较六种商品化试剂盒在小鼠粪便中提取小鼠肝炎病毒(MHV)RNA 的效率,筛选出效率高、耗时短的核酸提取方法。方法 采集感染 MHV 小鼠的新鲜粪便样本,分别用液氮研磨法、磁珠匀浆法以及 PBS 溶解离心法进行处理,通过同一核酸提取试剂盒比较病毒核酸提取效率,明确最佳样本前处理方法;之后,用 6 种试剂盒进行 RNA 提取,经反转录后进行 TaqMan 实时定量 PCR 检测,以 Ct 值评价 6 种试剂盒的提取效率,结合产物测序和血清抗体 ELISA 结果,筛选 MHV 的最佳核酸提取方法。结果 对于粪便样本的前处理,液氮研磨法的 RNA 提取效率显著高于磁珠匀浆法。对于 6 种试剂盒的提取效果,TIANGEN DP422[总 RNA 浓度:(549.70±52.38) ng/μL, Ct 值:(24.51±0.10)]核酸提取效率最高;TIANGEN SD101[总 RNA 浓度:(274.13±6.87) ng/μL, Ct 值:(2.39±0.017)]和 QIAGEN 52904[总 RNA 浓度:(288.13±15.11) ng/μL, Ct 值:(2.40±0.012)]用时最短;XS VRL[总 RNA 浓度:(348.80±15.85) ng/μL, Ct 值:(24.70±0.13)]操作最为方便。结论 粪便样本前处理建议采用液氮研磨法。针对粪便中 MHV RNA 的提取,TIANGEN DP422 提取效率最高,推荐用于小鼠肝炎病毒的分子生物学检测。

关键词:小鼠肝炎病毒;病毒 RNA 提取;TaqMan 探针;实时荧光定量 PCR

中图分类号: R115 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)01-0031-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.007

小鼠肝炎病毒(murine hepatitis virus, MHV)属于冠状病毒科、冠状病毒属,基因组为线性不分段的单股正链 RNA^[1]。MHV 感染是一种严重危害小鼠生产的病毒性传染病,不仅严重影响实验动物的质量,还对科学研究结果造成潜在的干扰,影响实验的准确性和重复性。正常情况下呈隐性感染,应激激发时会诱发致死性病变,是一种广泛传播且顽固的病原,也是国标 GB 14922.2《实验动物微生物等级及检测》^[2]中所需排除的病原之一。近年来,随着遗传工程小鼠制备技术的迅速发展,携带 MHV 的遗传工程小鼠在不同实验动物设施间被广泛交流和传播,且难于被发现和有效控制,MHV 已是遗传工程小鼠微生物控制中最难于生物净化的病原之一^[3],因此,快速准确地检测 MHV 是有效防治该病的前提,加强对 MHV 诊断的研究对提高实验动物质量具有重要意义。

MHV 的诊断方法有病毒分离与鉴定、血清学试验、组织病理学诊断和分子生物学诊断等,实时荧光定量 PCR 检测技术^[4-5]即为其中一种。该技术具有特异性强、灵敏度高、稳定性好等优点,但影响其检测效果的因素有很多,除引物序列、反应体系、扩增条件等,病毒 RNA 的提取效率也十分关键。本研究针对市售的 6 种病毒 RNA 提取试剂盒开展提取效率、操作简便性及重复性等比较,探索更有效的粪便病毒核酸提取方法,为提高 MHV 的分子生物学检测准确性提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 14 只 6~8 周龄 C57BL/6 小鼠,由杭州师范大学实验动物中心提供,生产许可证:

收稿日期:2018-07-02

* 基金项目:浙江省科技计划项目(No.2015C37107, 2016C37106)和杭州市重大科技专项(No.20142013A62)

作者简介:桂 飞(1990—),男,硕士研究生,研究方向:生物化学与分子生物学.E-mail: rainguifei@sina.cn

通信作者:宋晓明(1981—),男,博士,副研究员,从事实验动物管理和质量控制研究.E-mail: xmsong@hznu.edu.cn

SCXK(浙)2016-0004,经 PCR 鉴定为 MHV 阳性。小鼠饲养在隔离器中,每笼饲养 1 只,使用许可证:SYXK(浙)2016-0006,自由采食和饮水。

1.1.2 试剂: TIANamp RNA Kit for Virus Detection (TIANGEN SD101)、DNA/RNA Isolation Kit (TIANGEN DP422)核酸提取试剂盒以及 Fast Quant RT Kit(With gDNase)(TIANGEN KR106)反转录试剂盒购自天根生化科技有限公司;QIAamp Viral RNA Mini Kit(QIAGEN 52904)购自 QIAGEN 公司;Power Microbiomewer MicrobioNA Mini (MO BIO 26000)购自深圳安必胜生物技术有限公司;MagMAX 必胜生物技术有限公司;Mini Kit Detection 核酸提取方法 (ABI AM1840)以及 TaqMan © Gene Expression Master Mix(ABI 4369016)购自 ABI 公司;小鼠肝炎病毒实时荧光定量 PCR 检测试剂盒(XS VRL)购自苏州西山生物技术有限公司;Gel Extraction Kit (D2500-01)胶回收试剂盒购自 OMEGA 公司。

表 1 MHV TaqMan 荧光定量 PCR 引物及探针序列

Table 1 MHV TaqMan fluorescent quantitative PCR primers and probe sequences

引物名称 Primer	序列(5'-3') Sequences(5'-3')	退火温度 Annealing temp(°C)	扩增片段大小 Ampliconsize(bp)
MHV-F	AGGAAGGTCTGCACCTGCTA		
MHV-R	CCGAGCTTAGCCAAAACAAG	60	156
MHV-P	CGCTAGAAGCAGTTCCAACC(5'-TARMA,3'-FAM)		

1.2.2 样品的收集及前处理:连续无菌采集小鼠新鲜粪便,充分混匀,分别用液氮研磨法、磁珠匀浆法以及 PBS 溶解离心法 3 种前处理方法处理,重复提取 3 次。液氮研磨法:取新鲜粪便在液氮环境下充分研磨,20 mg/份分装,分装 3 份,加入 600 μ L 裂解液,涡旋混匀后,按试剂盒操作步骤提取。磁珠均浆法:取新鲜粪便 20 mg/份分装,分装 3 份,分别于磁珠混合后加入 600 μ L 裂解液,使用磁珠匀浆仪 55 Hz,10 min 充分研磨后,按试剂盒操作步骤提取。PBS 溶解离心法:取新鲜粪便 20 mg/份分装,分装 3 份,分别溶于 140 μ L 无菌 PBS 缓冲液,涡旋混匀后 12 000 r/min 离心 5 min 后,取上清液于另一 RNase-Free 的离心管中,加入 600 μ L 裂解液,充分混匀后,按试剂盒操作步骤提取。

同时采集血清样本,用于检测抗体情况。另取小鼠粪便,在液氮环境下充分研磨,20 mg 称量分装,用于固体组试剂盒提取;取 20 mg 粪便溶于 140 μ L RNase-Free 的 PBS 缓冲液中,充分混匀后,

1.1.3 主要仪器与设备:水平电泳仪(Tanon)、微量紫外分光光度计(Thermo Nanodrop 2000)、凝胶成像处理系统 Gel Image System(Tanon)、普通 PCR 扩增仪(Bio-RAD)、实时荧光 PCR 仪(ABI One step plus)、生物安全柜(Thermo)、全自动样品快速研磨仪(上海净信实验发展有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 引物与探针的设计:从 NCBI 的 FTP 中下载两株 MHV 基因组序列,分析比对结果,发现基因 28879-29145 Murine hepatitis virus strain JHM,29142-29828 Murine hepatitis virus strain JHM,29843-31210 Murine hepatitis virus strain JHM 有非常好的种内特异和种间的差异性。选择了此 3 个基因作为候选基因,用 Primer Premier 5.0 软件设计荧光定量 PCR 引物对和探针,经过筛选和验证,本研究最终选取 29843-31210 Murine hepatitis virus strain JHM 作为靶基因。引物、探针由上海捷瑞生物工程有限公司合成(见表 1)。

用于液体组试剂盒提取。

1.2.3 核酸提取:根据 6 种不同试剂盒所针对提取样本的差异,可将试剂盒分为固体样本提取组和液体样本提取组,TIANGEN DP422、MO BIO 26000、XS VRL 3 个试剂盒为固体样本提取组,TIANGEN SD101、QIAGEN 52904、ABI AM1840 3 个试剂盒为液体样本提取组。按照试剂盒说明书,手动提取病毒 RNA,并进行核酸浓度测定,常规方法反转录成 cDNA,-20 °C 保存备用,重复提取 3 次。

1.2.4 实时荧光定量 TaqMan-PCR 检测:用 TaqMan 试剂盒对不同方法提取的病毒 RNA 进行检测,反应体系如下:2 \times TaqMan Fast Advanced Master Mix 12.5 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 0.5 μ L,探针(5 μ mol/L)1 μ L,模板 cDNA 2.0 μ L,补水至 25 μ L。扩增程序为:50 °C 培育 2 min,95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 15 s,60 °C 退火延伸 1 min,共 40 个循环,收集荧光信号并读取数据。

1.3 统计方法

结果以平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)的方式表示。数据采用 SPSS statistics 22 软件处理分析, $P<0.05$ 为差异显著; $P<0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 样本前处理方法比较

分别用磁珠匀浆法、液氮研磨法以及 PBS 溶解离心法,对 3 份 MHV 阳性小鼠的粪便进行处理,使用 TIANGEN DP422 核酸提取试剂盒提取病毒 RNA,通过实时荧光定量 TaqMan-PCR 进行检测,结果显示,液氮研磨法对病毒 RNA 提取效率显著高于另外两种,见表 2。同时,实时荧光定量 TaqMan-PCR 检测结果显示,针对小鼠肝炎病毒,液氮研磨法提取效率也是最高的,见表 3。

表 2 3 种样本前处理方法比较的结果($\bar{x}\pm s$)

Table 2 Results of comparison of three sample pretreatment methods ($\bar{x}\pm s$)

前处理方法	Conc./($\text{ng}/\mu\text{L}$)	A_{260}/A_{280}
磁珠匀浆法	164.76±4.80	2.05±0.005
液氮研磨法	730.02±62.47**	2.14±0.009
PBS 溶解离心法	265.17±26.87	2.15±0.010

注:**表示差异极显著, $P<0.01$

Note:** indicates that the difference is extremely significant, $P<0.01$

表 3 TaqMan 荧光定量 PCR 对比结果

Table 3 Comparison results of TaqMan fluorescence quantitative PCR

前处理方法	Ct($\bar{x}\pm s$)
磁珠匀浆法	28.59±0.19
液氮研磨法	25.93±0.15**
PBS 溶解离心法	27.34±0.18
NC	Undetermined
PC	27.72±0.19

注:**表示差异极显著, $P<0.01$,Undetermined 表示未检出

Note:** indicates that the difference is extremely significant, $P<0.01$,Undetermined means not detected

2.2 6 种试剂盒提取 MHV 核酸效率的比较

利用 6 种试剂盒,分别提取 MHV 阳性小鼠的粪便样本,通过实时荧光定量 TaqMan-PCR 进行检测。结果显示,在提取效率上,TIANGEN DP422、MO BIO 26000、XS VRL、QIAGEN 52094、TIANGEN SD101 均具有较高的提取效率,其中 TIANGEN DP422 核酸提取效率最高,且显著高于其他各试剂

盒(见表 4)。荧光定量 TaqMan-PCR 检测, TIANGEN DP422、XS VRL、QIAGEN 52094、TIANGEN SD101 以及 ABI AM1836 5 种试剂盒均能得到特异性的扩增条带和曲线(见图 1),MO BIO 26000 试剂盒未检出 MHV, TIANGEN DP422 和 XS VRL 试剂盒的 Ct 值较低,针对小鼠肝炎病毒提取效果较好,其余 3 种试剂盒无显著差异。产物测序结果与 NCBI 的 FTP 中下载 2 株 MHV 基因组序列比对一致。同步开展的重复性试验表明, QIAGEN 52904 试剂盒(变异系数:0.02991)重复性最好, TIANGEN DP422 试剂盒(变异系数:0.03212)次之,详见表 5。

表 4 6 种试剂盒对粪便中病毒 RNA 提取效率比较结果

Table 4 Comparison of the efficiency of viral RNA extraction from feces in six kits

RNA 提取试剂盒	Conc. ($\text{ng}/\mu\text{L}$)	A_{260}/A_{280}
RNA extraction kits	($\bar{x}\pm s$)	($\bar{x}\pm s$)
TIANGEN DP422	549.70±52.38**	2.14±0.006
MO BIO 26000	459.33±44.58	2.13±0.006
XS VRL	348.80±15.85	2.15±0.010
TIANGEN SD101	274.13±6.87	2.39±0.017
QIAGEN 52904	288.13±15.11	2.40±0.012
ABI AM1836	107.37±8.85	2.13±0.040

注:**表示差异极显著, $P<0.01$

Note:** indicates that the difference is extremely significant, $P<0.01$

表 5 6 种试剂盒 TaqMan-qPCR 检测结果

Table 5 Results of six kits TaqMan-qPCR detection

RNA 提取试剂盒	Ct 值	变异系数
RNA extraction kits	($\bar{x}\pm s$)	CV/%
TIANGEN DP422	24.51±0.10	0.03212
MO BIO 26000	Undetermined	/
XS VRL	24.70±0.13	0.04354
TIANGEN SD101	27.85±0.11	0.03784
QIAGEN 52904	27.62±0.09	0.02991
ABI AM1836	27.44±0.26	0.08503
NC	Undetermined	/
PC	29.22±0.36	0.20648

3 讨论

针对小鼠肝炎病毒目前诊断的方法有病毒分离与鉴定、血清学试验、组织病理学诊断、分子生物学

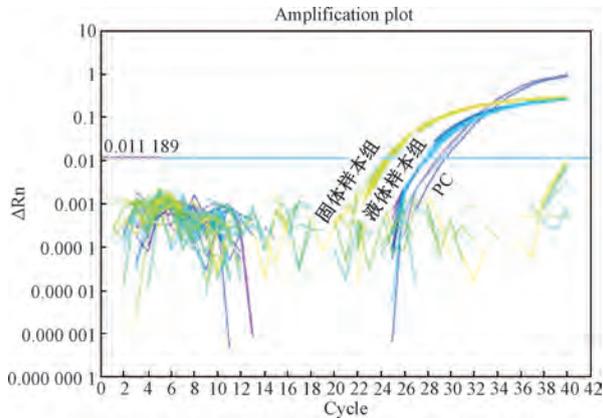


图 1 六种试剂盒检测的扩增曲线

Fig.1 Amplification curves detected by six kits

诊断等。实时荧光定量 PCR 检测技术即为其中一种。本实验从粪便中提取小鼠肝炎病毒 RNA 检测,遵循实验动物“3R”原则的同时,尽可能减少病原检测对本动物的应激刺激或牺牲。但粪便样本复杂,病毒 RNA 极易被降解,很大程度上影响了 MHV 核酸的提取效率,因此粪便样本的前处理尤为重要。本实验选用液氮研磨法、磁珠匀浆法和 PBS 溶解离心法进行比较,液氮研磨法需手动研磨且需近距离的接触液氮,耗时费力,具有一定的危险性;磁珠匀浆法使用磁珠匀浆仪自动匀浆处理,操作较为简便;PBS 溶解离心法操作最简便。考虑到提取效率的优势,选用液氮研磨法。与李冬民等^[6]、戴方伟等^[7]描述基本一致,可用于荧光定量 PCR 检测研究中。但针对大量样本的检测,建议使用磁珠匀浆法提取。刘香梅等^[8]在自然感染小鼠肝炎病毒的早期检测过程中,也从小鼠粪便中检测到 MHV,提示 PCR 法在早期诊断中的优势。

据相关研究表明,不同试剂盒的病毒核酸提取效率具有一定差异^[9-11]。因此,选择提取效率高、价格低、操作方便的试剂盒,以便快速有效地进行病原检测十分重要。本研究选用了市售的 6 种核酸试剂盒进行比较,6 种试剂盒均为手动提取,按试剂盒说明书进行操作,耗时按单个样本提取计。在提取效率上,固体样本组 3 种方法(TIANGEN DP422、MO BIO 26000、XS VRL)均具有较高的提取效率, TIANGEN DP422 提取效率最高,且与其他几个试剂盒具有显著差异。在重复性方面,6 种试剂盒均较好。从各试剂盒的提取方法、价格、提取时间、提取样本量以及所需自备试剂和辅助设备等因素综合分析,ABI AM1836 为磁珠法提取,需要辅助磁力架提

取,提取样本量受限于所选磁力架的规格,本实验室选用磁力架可同时提取 8 个样本,提取的样本量较小,不适宜大量样本提取。其余五种均为膜吸附法提取,其中 MO BIO 26000 试剂盒使用时,需额外附加涡旋仪适配器,以辅助提取过程,单次可提取样本量最大,但操作步骤比较繁琐,耗时较长,价格较贵(100 元/份样本),且针对小鼠肝炎病毒未能检出。QIAGEN 52094 和 TIANGEN SD101 主要针对液体样本,针对固体粪便样本操作则较 TIANGEN DP422 和 XS VRL 繁琐,且相比提取效率也具有显著差异,可能提取小鼠尿液更具优势。TIANGEN DP422 试剂盒价格较便宜(28 元/份样本)。

综合以上因素分析认为,粪便样本的前处理,液氮研磨法较好;粪便中小鼠肝炎病毒 RNA 的提取, TIANGEN DP422 效率最高,价格较便宜,推荐用于小鼠肝炎病毒的分子生物学检测。

参考文献

- [1] 田克恭,贺争鸣,刘群,等.实验动物疫病学[M].北京:中国农业出版社,2014:464-468.
- [2] 中国医学科学院医学实验动物研究所,中国质检出版社第一编辑室.GB 14922.2—2011 实验动物微生物学等级及监测[S].中国质检出版社,中国标准出版社,2011.
- [3] 罗琴芳,王静,张钰,等.遗传工程小鼠的监测体系初探[J].实用预防医学,2010,17(10):2050-2053.
- [4] 陈旭,齐凤坤,康立功,等.实时荧光定量 PCR 技术研究进展及其应用[J].东北农业大学学报,2010,41(8):148-155.
- [5] 杨弘华,宋燕燕,林晓波,等.实时荧光定量 PCR 技术应用研究[J].山东化工,2016,45(22):46-47.
- [6] 李冬民,任吴超,王璇,等.利用 TRIzol 试剂和液氮提取大鼠胰腺高质量总 RNA[J].西安交通大学学报(医学版),2009,30(5):639-642.
- [7] 戴方伟,宋晓明,周莎桑,等.大鼠肠内容物细菌基因组 DNA 提取方法的比较[J].中国实验动物学报,2011,19(3):246-249.
- [8] 刘香梅,赵维波,袁文,等.ICR 小鼠自然感染小鼠肝炎病毒后抗原抗体的变化[J].中国比较医学杂志,2014,24(7):37-40.
- [9] 吕艳,王静静,罗瑶瑶,等.五种核酸提取试剂盒对新城疫病毒 RNA 提取效率的比较[J].中国动物检疫,2017,34(6):98-101.
- [10] 王森,马学军.核酸提取方法的研究进展[J].中华实验和临床病毒学,2014,28(6):503-505.
- [11] 熊炜,蒋静,张强,等.小鼠肝炎病毒核酸快速检测方法的建立和应用[J].实验动物科学,2013,30(4):1-5.

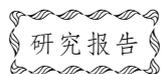
Comparison of Six Nucleic Acid Extraction Kits in the Extraction Efficiency of Hepatitis Virus Nucleic Acid in Fecal Samples

GUI Fei¹, YANG Weiwei¹, YU Lipin¹, DAI Fangwei², DU Jiangtao², SONG Xiaoming¹

(1.Center of Laboratory Animals, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

(2.Center of Laboratory Animals, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract: Objective In this study, six commercial kits were used to extract mouse hepatitis virus (MHV) nucleic acid from faeces, and screen for an extraction method with higher efficiency and shorter time. **Method** Fecal samples infected with MHV were collected immediately and treated with liquid nitrogen grinding method, magnetic beads homogenization and PBS dissolves centrifugation method, respectively. RNA of above samples were then extracted with the same nucleic acid extraction kit to identify the best pretreatment method; Based on which, the RNA was extracted using six kits and reverse transcribed into cDNA followed with TaqMan real-time PCR, respectively. Ct value of real-time PCR combined with sequencing and serum antibody ELISA test were used to evaluate and analyze the extraction efficiency of six kits. **Result** For the fecal sample pretreatment method, with liquid nitrogen grinding method had a significantly higher extraction efficiency than that with the magnetic bead homogenization method. For the RNA extraction efficiency among the six kits, TIANGEN DP422 concentration: $(549.70 \pm 52.38) \text{ ng}/\mu\text{L}$, Ct value: (24.51 ± 0.10) showed the highest extraction efficiency, TIANGEN SD101 concentration: $(274.13 \pm 6.87) \text{ ng}/\mu\text{L}$; Ct value: (2.39 ± 0.017) and QIAGEN 52904 concentration: $(288.13 \pm 15.11) \text{ ng}/\mu\text{L}$; Ct value: (2.40 ± 0.012) displayed the shortest extraction time, and XS VRL concentration: $(348.80 \pm 15.85) \text{ ng}/\mu\text{L}$, Ct value: (24.70 ± 0.13) turned out to be the most convenient. **Conclusion** Liquid nitrogen extraction method is more efficient in fecal sample pretreatment, and TIANGEN DP422 extraction kit with the highest MHV RNA extraction efficiency is recommended for the molecular biological detection of MHV in feces. **Key words:** Mouse Hepatitis Virus (MHV); viral RNA extraction; TaqMan probe; Real-time fluorescent quantitative PCR



新生鼠坏死性小肠结肠炎模型建立方法的改进及评价*

席世兵 杨敏 谢集建 景卫利 李兴朝 李涛

(湖北省十堰市太和医院儿童医疗中心儿科2病区, 十堰 420000)

摘要:目的 通过改进和比较国内、外常用的坏死性小肠结肠炎(Necrotizing Enterocolitis, NEC)动物模型建立方法,明确简便有效的NEC建模方法。**方法** 采用出生2 h内新生SD大鼠,随机分为5组,对照组10只,实验组每组20只。A组与代母鼠同笼鼠乳喂养,且未行任何干预;B组人工喂养+缺氧冷刺激+(脂多糖)LPS灌胃(5 mg/kg 体重质量);C组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS灌胃(10 mg/kg);D组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS腹腔注射(2 mg/kg);E组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS腹腔注射(5 mg/kg)。每日观察新生鼠的活动状况和体重变化。实验结束后取小肠组织行苏木素-伊红染色、评价小肠病理损伤程度;检测小肠组织内肿瘤坏死因子 α (TNF- α)水平。**结果** 实验组新生鼠均出现不同程度的活动减少,腹胀腹泻,黑便,体重减轻。病理评分显示实验组较对照组新生鼠病理损伤评分显著增高($P < 0.05$)。LPS腹腔注射组(D、E)较经口给药组(B、C)NEC发病率更高($P < 0.05$),但LPS大剂量(5 mg/kg)腹腔注射组较其他组,非NEC相关性致死率明显增高($P < 0.05$)。**结论** 在人工喂养、缺氧冷刺激的基础上结合小剂量LPS(2 mg/kg)腹腔注射建立NEC的方法更具有可操作性、稳定性。

关键词: 坏死性小肠结肠炎;模型建立;新生儿;大鼠;脂多糖

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)01-0036-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.008

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

低体重质量儿配方奶粉(特别能恩)由雀巢公司提供;脂肪乳注射液(C₁₄~C₂₄)由华瑞制药有限公司提供;汤臣倍健蛋白质粉购自朗臣健益公司;LPS(E.coli 055:B5)购自美国Sigma公司;喂养管由一次性使用静脉留置针(青岛,威高)改装;ZKY-4F智能控氧仪、XBS-01多功能小白鼠试验箱(杭州爱普仪器设备有限公司);保育箱由HW-1000超级恒温水浴箱改装(成都泰盟科技有限公司,成都);SM-3B手术显微镜(美国AmScope公司);尼康D5100照相机(日本,尼康)。

1.2 实验动物

SPF级出生2 h内未开奶新生SD大鼠90只,生产许可证:SYXK(E鄂)2011-0031,购自湖北医药学院动物中心。

1.3 方法与分组

1.3.1 分组:将体质量(5.6~8.5)g新生大鼠采用随机数字表法分组。分为5组,对照组10只,实验组每组20只。A组与代母鼠同笼鼠乳喂养,且未行任何干预;B组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS灌胃(5 mg/kg);C组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS灌胃(10 mg/kg);D组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS腹腔注射(2 mg/kg);E组人工喂养+缺氧冷刺激+LPS腹腔注射(5 mg/kg)。

1.3.2 鼠乳代乳品的配置及人工喂养:B、C、D、E组新生大鼠出生后即置于自制的保育箱内(温度37℃;湿度45%~55%),采用代乳品人工喂养,代乳品参考Auestad^[1]研究报道配制,每100 mL代乳品添加早产儿奶粉1.6 g,加朗蛋白粉8.7 g,脂肪乳48 mL,总热量约581 kJ,最终成分及热量如表1所示。喂养方法参考文献^[2]并适当改进,采用1 mL注射器连接威高静脉留置针作为喂养管,沿新生大鼠一侧口角缓慢、轻柔插入约会厌水平(深度0.8~

收稿日期:2018-05-13

* 基金项目:十堰市科学技术研究与开发项目计划(No.:16Y25)

作者简介:席世兵(1987—),男,博士,主治医师,研究方向:儿科心血管疾病及临床研究.E-mail:xishibing2009@163.com

通信作者:李涛(1964—),男,博士,主任医师,研究方向:新生儿及儿科心血管疾病.E-mail:317371983@qq.com

1.0 cm),当新生鼠出现张口、吞咽动作时,缓慢注入代乳品每 4 h 给予代乳品约 0.1 mL/次,每 12 h 增加 0.05 mL,第 2 天增至 0.3 mL/次,72 h 后,停止缺氧冷刺激,继续喂养 12 h、取材。

表 1 鼠乳成分及代乳品成分

Table 1 Rat milk and simulated milk ingredients

成分	鼠乳/L	代乳品/L
蛋白/g	73~77	75
脂肪/g	108~112	108
碳水化合物/g	23~27	26
能量/kJ	578~592	584

1.3.3 缺氧及冷刺激:实验组新生大鼠首次代乳品喂养后 1 h,预设 ZKY-4F 智能控氧仪氧浓度为 0%~0.5%,打开氮气罐阀门及流量表,控制氮气流量在 5 L/min 左右,待箱内氧浓度<0.5%,将新生大鼠置入缺氧箱内,缺氧 7 min,转置于 4 °C 冷藏室 7 min, D、E 组在冷刺激结束后分别接受 2 mg/kg、5 mg/kg LPS(LPS 均溶于 0.1 mL 生理盐水),注射结束后将所有新生鼠放回保育箱复温,上述操作每隔 12 h 一次,连续 3 d。

1.3.4 标本收集:正常对照组及实验处理组新生鼠在末次处理后 12 h 或自然死亡后,立即打开腹腔取近回盲部小肠 3 cm,近回盲 1 cm 置于 4% 甲醛中固定,剩余 2 cm 肠管置液氮中储存备用做生化分析。

1.3.5 组织病理学检查:近回盲部小肠于 4% 甲醛溶液中固定 24 h 以上,脱水、石蜡包埋,取冠状面、5 μm 切片,HE 染色后在光镜下观察各组织的形态学改变。参照文献^[3]的病理评分标准对回盲部进行肠组织损伤评分:0 分:肠黏膜绒毛完整,结构正常;1 分:绒毛轻度水肿,上皮脱落仅限于绒毛顶部;2 分:绒毛中部损伤坏死;3 分:绒毛缺失,隐窝仍可识别;4 分:黏膜上皮结构完全缺失,或透壁坏死。以取样品中观察到的最高分数确定为肠道的损伤程度,组织学评分≥2 分确认为 NEC。

1.3.6 炎症因子检测:根据试剂盒说明书操作方法,采用酶联免疫吸附法(ELISA)检测各组新生鼠小肠组织中肿瘤坏死因子-α(TNF-α)水平。

1.4 统计方法

用 SPSS 20.0 软件处理数据,计数资料采用单因素多组方差分析,多样本等级资料采用 kruskal-wallis 秩和检验结合 Nemenyi 法检验做两样本间分析,各组鼠存活情况采用 Kaplan-Meier 法进行生存分析; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般状况及生长状况

A 组活动度良好,进食及排便皆正常,无腹胀及腹泻,体质量增加良好;B、C、D、E 组在缺氧过程中,均有呼吸困难,紫绀,抽搐及大小便失禁。B、C 组造模后新生鼠均出现活动减少,反应稍迟钝,体质量减轻、腹胀腹泻,排黄绿色黏液便甚至血便情况。其中,D 组大鼠注射 LPS 后约 60~120 min 出现抖动、精神萎靡,活动减少,6~12 h 后开始腹胀、腹泻,活动减少,体质量减轻。E 组在 LPS 注射后 30 min 左右出现烦躁、尖叫、黏膜苍白、晦暗,进而活动减少、萎靡,活动迟缓,4~6 h 出现腹胀、黄绿稀便或黑便,3 h 开始陆续出现实验鼠自然死亡。

2.2 生存状况及体质量变化情况

根据各组实验鼠存活情况,通过生存分析显示,实验组较对照组均存在差异($P<0.05$),B、C、D 组间生存差异均无统计学意义($P_{BC}=0.68$ 、 $P_{CD}=0.44$ 、 $P_{BD}=0.24$),但 D、E 组间生存差异有统计学意义($P=0.04$),大剂量 LPS(5 mg/kg)腹腔注射较小剂量 LPS(2 mg/kg)腹腔注射可显著增加实验鼠的死亡率($P<0.05$)。A 至 E 组 NEC 发病率分别为 0/10、25%(5/20)、35%(7/20)、75%(15/20)、80%(16/20),死亡率分别为:0/10、15%(3/20)、20%(4/20)、35%(7/20)、60%(12/20)。对死亡新生鼠解剖、取材、病理评分,若 NEC 病理评分≥2 分,认为是 NEC 相关性死亡,<2 分认为是其他非 NEC 相关性死亡,A、B 组均无非 NEC 相关性死亡;C、D、E 组分别有 1、2、5 只出现非 NEC 相关性死亡。除 A 组外,实验组新生鼠均有不同程度体质量减轻,除 B、C 组间体质量减轻无差异外,C、D、E 组间体质量减轻均有明显差异(见图 1)。

2.3 肠组织病理改变

显微镜下可见正常大鼠肠道空肠呈乳白色、回结肠为淡黄色,红润有光泽;肠管轻度扩张、充血;肠壁积气变薄,呈紫黑色,轻度腹水;肠管大量积气,发黑、坏死,穿孔、变脆、大量腹水(如图 2A~E);根据 HE 染色结果进行病理评分:图 2F 至 J 分别代表 0 分、1 分、2 分、3 分、4 分。

2.4 病理评分结果

采用盲法由 3 名研究人员对 NEC 标本进行病理评分,评分不一致者,再由第 4 名研究人员介入讨

论确定病理评分。评分结果如图 1C,采用 Kruskal-Wallis *H* 检验提示 5 组间差别有统计学意义 ($P < 0.001$),进一步采用 Nenmenyi 法检验提示实验组间 NEC 病理评分均无显著性差异 ($P > 0.05$)。

2.5 小肠组织内炎症因子变化

建模后测得各组实验鼠小肠组织中肿瘤坏死因

子- α 结果(如图 1.D),结果显示 LPS 经胃肠道给药组,不同剂量组间较对照组,TNF- α 水平差异性显著 ($P < 0.05$);经腹腔注射给药组,大剂量组较小剂量组小肠组织内 TNF- α 水平差异也较显著 ($P < 0.05$),提示高剂量组系统性炎症反应更重。

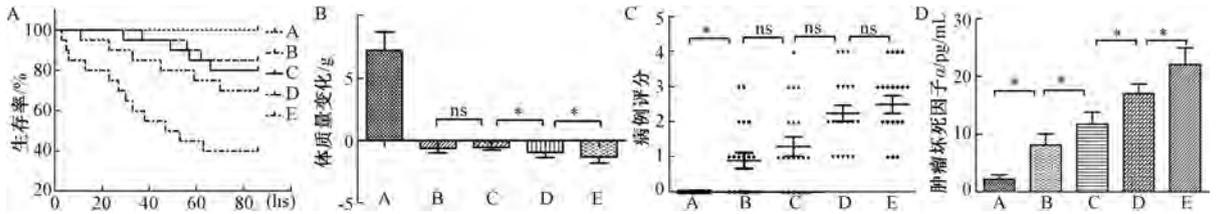


图 1 生存状况及体质量病例损伤程度及小肠组织内肿瘤坏死因子 α 浓度变化情况

注:A:实验鼠生存分析大剂量 LPS 腹腔注射组生存率显著降低 ($P < 0.05$);B:实验前后新生鼠体质量变化,正常对照组体质量增加良好,但 NEC 模型组体质量显著降低 ($P < 0.05$);C:病理学评分及统计结果 实验组损伤程度较正常组显著增高,但 LPS 口服组间无显著差异,LPS 腹腔注射组间无显著差异 ($P \geq 0.05$);D:小肠组织中 TNF- α 浓度 实验组较对照组显著升高,LPS 经腹腔注射组较口服组小肠组织中 TNF- α 水平显著较高 ($P < 0.05$),且 TNF- α 升高水平与 LPS 剂量呈正相关。

Fig.1 The survival analysis (A), change of body weight (B), pathogenic score(C) TNF- α concentration in intestine(D)

Note:A:The survival rate of Group E (large-dose LPS intraperitoneal injection) is decreased significantly ($P < 0.05$),but difference between Group B, Group C and Group D were not significant (Fig1A);B:The change of body weight during study.The body weight obtain in Group A is normal, but the decrease of body weight in NEC model(Group B, C, D and E) was significant ($P < 0.05$); C:The pathological scores of intestinal injury is increased significant in experimental groups($P < 0.05$),but the differences between Group B and Group C, Group D and Group E are not significant;D:The TNF- α concentration in intestine between control and trail groups were significant ($P < 0.05$), LPS intraperitoneal injection higher than oral administration, the TNF- α concentration is positive corrective with the dose of LPS($P < 0.05$).

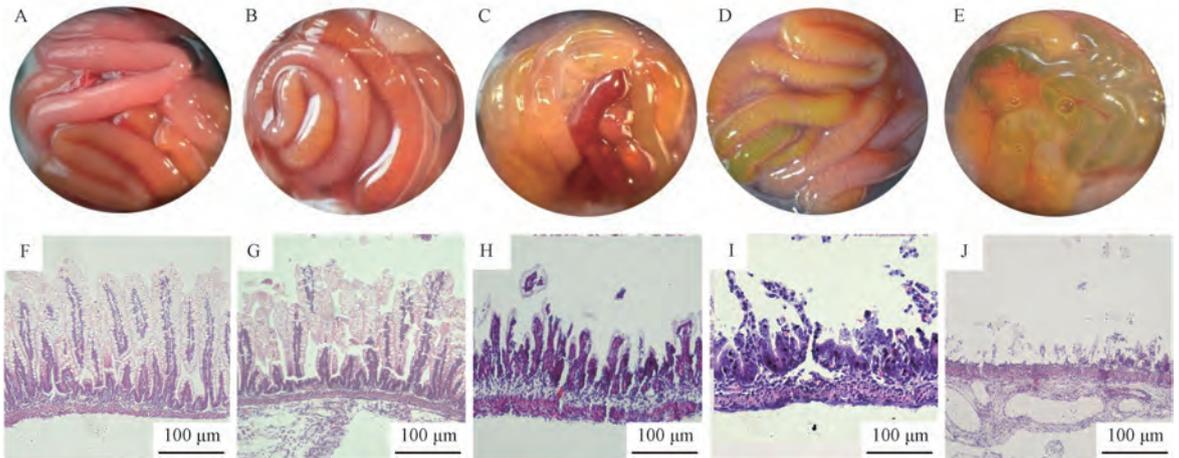


图 2 不同病理损伤程度的典型实体图及 HE 染色图 (HE 染色 $\times 200$)

注:A:0分,肠管呈粉红色、有光泽,瑞蠕动良;B:1分,轻度粘膜下肿胀和绒毛轻度受损;C:2分,肠管扩张,严重梗阻,肠壁积气;D:3分,肠管严重扩张,黑死;E:4分,严重坏死、肠穿孔、腹水;F:肠黏膜绒毛完整,结构正常;G:上皮脱落仅限于绒毛顶部;H:绒毛中部以上损伤坏死;I:绒毛缺失,隐窝仍可识别;J:黏膜上皮结构完全缺失,或透壁坏死

Fig.2 Typical characteristics of gross morphology and HE staining (0, 1, 2, 3, 4 points)

Note:A:NEC score 0, The normal intestinal tract was carnation and glossy, intestinal canal moved actively; B:1, Slightly congested disclosed; C:2, Slight dilatation, severe congested; D:3, Extensive dilatation, appeared black;E:4, Severe necrosis, extensive discoloration; F:NEC score 0, normal ileum; G:1, slight submucosal separation and villus tip injury; H:2, villas failed off; I:3, mucosa grew swelling and villus sever injury, severe separation of submucosa and/or lamina propria edema in submucosa; J:4,transmural necrosis

3 讨论

新生儿坏死性小肠结肠炎(NEC)是新生儿期常见的致死性疾病。自1967年首次报道并被普遍认识以来,尽管围产医学取得了很大发展,早产儿成活率明显提高,但NEC的发病及预后仍无明显改善。目前,出生体质量在500~1500g之间的新生儿NEC的发病率高达7%,NEC相关死亡率达20%~30%,严重NEC需手术治疗的患儿死亡率更高^[4]。目前研究认为早产、不适当的胃肠喂养、缺氧缺血损伤及肠道菌群失调、移位导致肠道异常的免疫反应是NEC发病的关键环节^[5]。NEC的确切病因、病理机制仍不明确,亟需进一步研究。

动物模型在NEC病因及病理机制的研究中起着非常重要的作用,许多学者探索不同的NEC模型建立方法,但该模型建立方法至今仍不统一^[6]。人工喂养、缺氧、复氧、冷刺激、LPS等单一的建模方法稳定性、可重复性较差;而综合早产、人工喂养、缺氧冷刺激、LPS灌胃或腹腔注射的造模方法应用越来越普遍^[7]。但各研究报道在缺氧时间(3~10min),4℃冷刺激时间(5~10min)、LPS用法(经胃肠道、腹腔注射)用量(2~10mg/kg)方面仍存在较大差异^[8-10]。故本实验参考目前普遍应用的建模方法,进一步改进、比较不同建模结果,以期优化建模条件。

新生大鼠是NEC模型最常用的实验动物,属“晚发育性动物”,1日龄新生鼠相当于22~24周早产儿、3日龄相当于28~32周早产儿发育水平^[11-12],故推测新生鼠可以模拟早产儿建立NEC模型,本实验鼠采用出生2h内未开奶新生SD大鼠作为实验鼠。喂养方面,新生鼠,尤其是早产鼠,食管插管灌胃操作难度极大,食管穿孔、气胸、胃穿孔等并发症发生率高,预实验中发现,食管插管明显增加实验鼠的死亡率。故本实验在此基础上做适当调整,利用喂养管刺激新生鼠口咽部,引出新生鼠的吞咽反射,缓慢注入代乳品,可达到喂养目的,同时可减少新生鼠因喂养所致的非NEC相关性死亡,提示试验的稳定性。

最新研究认为TLR4作为LPS受体,可促进异常强烈的严重反应、诱导肠上皮细胞自噬、凋亡并抑

制其增殖、迁移继而抑制小肠损伤修复能力,在NEC的发病过程中发挥着关键性作用^[8, 10, 13],LPS在NEC模型建立中的应用得到认可并普遍应用。但其用法、用量并不统一,本实验比较人工喂养、缺氧冷刺激结合口服或腹腔注射两种常用不同剂量LPS的造模方法,经胃肠道组(B、C)之间在死亡率、NEC发病率、NEC评分方面,差异并无统计学意义。D、E组比较发现,LPS5mg/kg腹腔注射,新生鼠在3~6h开始出现烦躁、尖叫,继而全身皮肤黏膜苍白、青紫等严重脓毒血症症状,且12h内死亡率为3/20,解剖后病理证实NEC评分均小于2分,故认为非NEC相关性死亡;既往有研究也发现,注射LPS(5mg/kg)可导致大鼠肝、肾、肺出现严重的出血坏死,导致实验鼠直接死亡^[14],本试验B、C、D组中新生鼠非NEC死亡分别为1、2、5只,虽无统计学差异($P_{DE}=0.2$),但不排除受样本量较小的影响;综合分析认为LPS高剂量腹腔注射,可能诱发全身性炎症反应综合征(SIRS)、肺出血、多器官功能衰竭(MODF),而NEC病变尚未充分显现,增加了非NEC致死率,导致NEC发生率及NEC病理评分呈“假性降低”,故D、E组间病理评分无差异,但死亡率($P=0.027$)、生存分析($P=0.04$)结果显示两组间差异有统计学意义,结果提示增加LPS腹腔注射剂量并不能提高NEC的发病率,而且由此诱发的并发症可能增加实验鼠的死亡率。

通过生存分析、NEC发生率、NEC相关性死亡率、NEC非相关性死亡率、NEC病理评分、小肠内炎症因子变化方面综合分析,认为新生鼠结合人工喂养、缺氧冷刺激、小剂量(2mg/kg)LPS腹腔注射是建立NEC较为理想的方法。在NEC模型建立及试验结果分析过程中应该重点评价小肠病理性损伤程度,同时纳入实验鼠的生存情况综合性分析,尽可能防止假阴性或假阳性结果出现。

目前坏死性小肠结肠炎的病因及病理机制仍不完全,不明确,部分研究认为消化系统黏膜屏障损伤后继发性感染和脓毒血症是主要的病理过程^[15],但目前所有的动物模型建立方法主要通过系统性刺激而建立肠坏死病变,经消化道给予LPS的结果稳定性较差,成功率较低,随着对NEC病理生理机制研究的不断深入,改模型的建立方法应需要进一步改进和完善,以更好地模拟临床病例生理过程。

参 考 文 献

- [1] Auestad N, Korsak R A, Bergstrom J D, *et al.* Milk-substitutes comparable to rat's milk; their preparation, composition and impact on development and metabolism in the artificially reared rat [J]. *Br J Nutr*, 1989, **61**(3):495-518.
- [2] Ozdemir R, Yurttutan S, Sari F N, *et al.* All-trans-retinoic acid attenuates intestinal injury in a neonatal rat model of necrotizing enterocolitis [J]. *Neonatology*, 2013, **104**(1):22-27.
- [3] Afrazi A, Sodhi C P, Good M, *et al.* Intracellular heat shock protein-70 negatively regulates TLR4 signaling in the newborn intestinal epithelium [J]. *J Immunol*, 2012, **188** (9) : 4543-4557.
- [4] Neu J, Walker W A. Necrotizing enterocolitis [J]. *N Engl J Med*, 2011, **364**(3):255-264.
- [5] Afrazi A, Sodhi C P, Richardson W, *et al.* New insights into the pathogenesis and treatment of necrotizing enterocolitis: Toll-like receptors and beyond [J]. *Pediatr Res*, 2011, **69**(3):183-188.
- [6] Sodhi C, Richardson W, Gribar S, *et al.* The development of animal models for the study of necrotizing enterocolitis [J]. *Dis Model Mech*, 2008, **1**(2-3):94-98.
- [7] Lu P, Sodhi C P, Jia H, *et al.* Animal models of gastrointestinal and liver diseases. Animal models of necrotizing enterocolitis: pathophysiology, translational relevance, and challenges [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, **306** (11) : G917-928.
- [8] Neal M D, Sodhi C P, Dyer M, *et al.* A critical role for TLR4 induction of autophagy in the regulation of enterocyte migration and the pathogenesis of necrotizing enterocolitis [J]. *J Immunol*, 2013, **190**(7):3541-3551.
- [9] Karatepe H O, Kilincaslan H, Berber M, *et al.* The effect of vascular endothelial growth factor overexpression in experimental necrotizing enterocolitis [J]. *Pediatr Surg Int*, 2014, **30** (3) : 327-332.
- [10] Good M, Siggers R H, Sodhi C P, *et al.* Amniotic fluid inhibits Toll-like receptor 4 signaling in the fetal and neonatal intestinal epithelium [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, **109** (28) : 11330-11335.
- [11] Hagberg H, Bona E, Gilland E, *et al.* Hypoxia-ischaemia model in the 7-day-old rat: possibilities and shortcomings [J]. *Acta Paediatr Suppl*, 1997, **422**:85-88.
- [12] Sangild P T. Gut responses to enteral nutrition in preterm infants and animals [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2006, **231**(11):1695-1711.
- [13] Sodhi C P, Shi X H, Richardson W M, *et al.* Toll-like receptor-4 inhibits enterocyte proliferation via impaired beta-catenin signaling in necrotizing enterocolitis [J]. *Gastroenterology*, 2010, **138**(1):185-196.
- [14] Zhou W, Zheng X H, Rong X, *et al.* Establishment and evaluation of three necrotizing enterocolitis models in premature rats [J]. *Mol Med Rep*, 2011, **4**(6):1333-1338.
- [15] Hackam D, Caplan M. Necrotizing enterocolitis: Pathophysiology from a historical context [J]. *Semin Pediatr Surg*, 2018, **27** (1) :11-18.

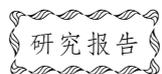
Improvement and Evaluation of Necrotizing Enterocolitis Models in Neonatal Rats

XI Shibing, YANG Min, XIE Jijian, JING Weili, LI Xinchao, LI Tao

(*Depth of pediatric, Shiyan Taihe Hospital, Hubei Medical University Affiliated Taihe Hospital, Shiyan 420000, China*)

Abstract: Objective The present study aimed to modify and evaluate necrotizing enterocolitis (NEC) models widely used in rats, and to determine the better method. **Method** Ninety rat pups were divided into five groups: Group A as control ($n = 10$). Group B to E ($n = 20$, respectively), rats were raised with simulated milk and subjected to hypoxia, cold stress, LPS with different ways and doses (Group B p.o. LPS 5 mg/kg; Group C p.o. LPS 10 mg/kg; Group D i.p. LPS 2.0 mg/kg; Group E i.p. LPS 5 mg/kg) per 12 hours for 72 hours. Followed by observing and recording body weight, survival time and sample collection, gross examination, HE staining, NEC injury scored, TNF- α levels in the intestine and kidneys were detected. **Result** We found that Group A rats were normal, but rats from groups B-E exhibited NEC clinical characteristics, but to varying degrees in different groups. The Group D (i.p. LPS 2.0 mg/kg) has comparatively lower mortality rate, no- NEC-associated death rate, higher morbidity rate and moderate TNF- α level in intestine and kidneys and NEC injury score when compared to other groups. **Conclusion** The modified method that through combination of formula feeding, hypoxia, cold stress, and low-dose LPS intraperitoneal injection is an optimal strategy of modeling rat pup NEC.

Key words: Necrotizing Enterocolitis; modeling; neonates; rat; Lipopolysaccharide



不同剂量异丙肾上腺素致小鼠慢性心肌缺血模型的制备及评价标准的建立*

朱竟赫¹ 刘 驰² 刘 禾¹ 武晓琳¹ 乔菊久¹ 李 森¹
范英兰¹ 包玉龙¹ 齐 越¹ 胡丽萍²

(1. 辽宁省中医药研究院, 沈阳 110034) (2. 辽宁中医药大学, 沈阳 110847)

摘要:目的 颈部皮下注射不同剂量异丙肾上腺素(ISO)建立小鼠慢性心肌缺血模型,通过比较确定最佳造模剂量,寻求较为客观可靠的指标,为相关模型制备及药效评价提供参考。**方法** 3个模型组分别皮下注射 ISO 32 mg/kg、16 mg/kg 和 8 mg/kg 体质量,连续3 d,描记造模后24 h、8 d 和 15 d 心电图(ECG);第8天和第15天时分别检测各组血液心肌损伤标志物并心脏取材,观察各组心肌形态学病理变化。**结果** ISO 32 mg/kg 和 ISO 16 mg/kg 剂量组在造模后的8 d 及 15 d 心电图 T 波均显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);心肌损伤标志物显著改变($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中 ISO 32 mg/kg 组产生病理改变,死亡率为42.5%,较适用于抗慢性心肌缺血药物较长期治疗给药的药效评价。ISO 16 mg/kg 的剂量死亡率为25%,相对较低,并且未导致心肌病理性损伤。**结论** 可根据不同试验预期选择性地采用 ISO 16 或 32 mg/kg 造模剂量建立小鼠慢性心肌缺血模型。

关键词:小鼠;异丙肾上腺素;慢性心肌缺血;评价标准

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0041-07

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.009

大、小鼠皮下大剂量注射异丙肾上腺素(ISO)能导致心肌缺血,与人的心肌缺血症状较为接近,是常用的、经典的抗心肌缺血作用评价模型,例如谭文明等^[1]和焦淑萍等^[2]分别利用 ISO 对大鼠和小鼠进行了心肌缺血模型的制备。但采用此法建立慢性心肌缺血模型的造模方法、造模剂量及评价指标尚缺少系统的试验研究,文献报道的方法繁多但无统一的、客观的标准和依据。

ISO 为 β 受体激动剂,可使心肌剧烈收缩而缺血缺氧,产生大量的 ONOO⁻ 和氧自由基,对心肌细胞造成损伤^[3]。Prabhu 等^[4]发现大剂量 ISO 可导致心肌线粒体组织蛋白酶-D 和 β 葡萄糖醛酸酶活性显著降低,心肌线粒体膜稳定性下降。当心脏负担过重时也可导致心肌微循环障碍,引发缺血性病损^[5]。大剂量注射 ISO 使肾素-血管紧张素-醛固酮系统被高度激活,可导致心功能进行性恶化并形成恶性循环^[6]。因此,ISO 成为使用频率较高的经典

的心肌缺血模型造模药物之一。

本文采用不同剂量 ISO 对小鼠进行颈部皮下注射,建立小鼠慢性心肌缺血模型,观测各模型组两周内的心电图、生化指标及病理指标的改变。通过比较确定最佳造模剂量,建立较为客观、可靠的慢性心肌缺血模型的评价标准,为相关模型制备及药效评价研究提供依据和参考。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 试剂:ISO:上海禾丰制药有限公司,产品批号:101101,规格:2 mL:1mg;水合氯醛:国药集团化学试剂有限公司,产品批号:20081120。

1.1.2 仪器:ML785 多导生理记录仪:澳大利亚 AD;AU5800 型全自动生化分析仪:美国 BECKMAN COULTER。

收稿日期:2018-04-30

* 基金项目:辽宁省自然科学基金资助项目(No. 2015020708)

作者简介:朱竟赫(1981—),男,硕士,副研究员,研究方向:中药药理与实验动物.E-mail: zjh-1981@163.com

通信作者:胡丽萍(1965—),女,研究员,研究方向:中药药理.E-mail huliiping705@163.com

1.1.3 动物:SPF 级雄性 KM 小鼠,体质量 18 ~ 22 g,购于辽宁长生生物技术有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(辽)2015-0001

1.1.4 饲养环境:小鼠饲养于辽宁省中医药研究院(辽宁中医药大学附属第二医院)实验动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(辽)2012-0003],屏障环境,温度:21~25℃,湿度 45%~60%;动物自由采食和饮水,垫料每 3 日更换一次。颗粒饲料及玉米芯垫料,均由北京科澳协力饲料有限公司提供[实验动物饲料生产许可证号:SCXK(京)2014-0010]。

1.2 方法

SPF 级雄性 KM 小鼠 160 只,随机分为 4 组,每组 40 只,分别为空白组(生理盐水)、高剂量组(ISO, 32 mg/kg 体质量)、模型中剂量组(ISO, 16 mg/kg 体质量)、模型低剂量组(ISO, 8 mg/kg 体质量)。适应性饲养 5 d 后,腹腔注射 4%水合氯醛,按每千克体质量 0.4 g 麻醉,II 导联描记各组小鼠造模前心电图。恢复性饲养 3 d。各组按每千克体质量 10 mL 给药,颈部皮下注射相应浓度的 ISO (0.32%、0.16%和 0.08%),每日 8:30 定时注射,每日一次,连续造模 3 d。末次注射 ISO 当晚禁食不禁水 16 h,第二天麻醉前统计小鼠死亡率,末次注射 ISO 后 24 h,每只小鼠腹腔注射 4%水合氯醛麻醉,II 导联描记造模 24 h 后心电图。恢复性饲养待到末次注射 ISO 后第 8 天,每只小鼠腹腔注射 4%水合氯醛麻醉,II 导联描记造模后 8 d 心电图,每组取 10 只小鼠眼眶采血 1 mL,3 000 r/min 离心 10 min,吸取血清,AU5800 型全自动生化分析仪检测肌酸激酶(CK)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、乳酸脱氢酶(LDH)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、肌钙蛋白 T(CTN-T)。引颈法处死后,摘取心脏甲醛固定,HE 染色,光学显微镜观察各组心肌形态学改变并拍照。其余小鼠恢复性饲养待到末次注射 ISO 后第 15 天,每只小鼠腹腔注射 4%水合氯醛麻醉,II 导联描记

造模后 15 d 心电图,每只小鼠眼眶采血检测生化指标;引颈法处死后,心脏 HE 染色并观察病变情况。

记录每只小鼠各个时间点的心电图,采用 LabChart8 读取 T 波高度,每只小鼠每个时间点连续 4 个波为 1 段取一个平均 T 波高度值,取 3 段的平均值作为该鼠该时间点的 T 波高度数值。

采用造模后 24 h、8d 及 15 d 心电图的 T 波高度分别与该鼠造模前心电图的 T 波高度做差并取其绝对值,得出造模后各时间点的 T 波变化量;然后以 T 波变化量除以该鼠造模前心电图的 T 波高度,得出造模后各时间点的 T 波变化率^[7]。

1.3 统计方法

数据采用 SPSS12.0 统计软件进行统计处理,试验数据用平均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 心电图

四组小鼠造模前、造模后 24 h、造模后 8 d 及造模后 15 d 心电图见图 1~4。各时间点 T 波高度、T 波变化量及 T 波变化率见表 1。

由表 1 可知,造模后各时间点 T 波高度均以自身造模前 T 波高度作为参照得出变化量及变化率,结果如下:各组造模后 24 h、8d 及 15 d 的 T 波高度较造模前均有所降低;中剂量组造模后 24 h 的 T 波高度显著低于空白组($P < 0.05$)。高剂量组造模后 15 d 的 T 波变化量显著高于空白组($P < 0.01$);中剂量组造模后 24 h、8d 及 15 d 的 T 波变化量显著高于空白组($P < 0.01$)。高剂量组造模后 15 d 的 T 波变化率显著高于空白组($P < 0.05$);中剂量组造模后 24 h、8d 的 T 波变化率显著高于空白组($P < 0.01$);中剂量组造模后 15 d 的 T 波变化率显著高于空白组($P < 0.05$)。

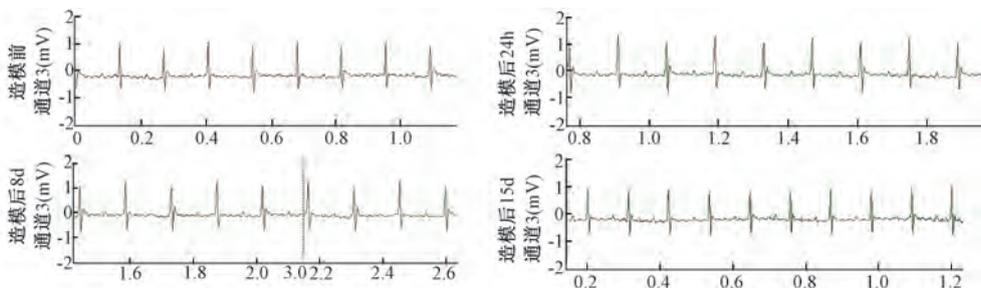


图 1 空白组心电图

Fig.1 Electrocardiogram of control group

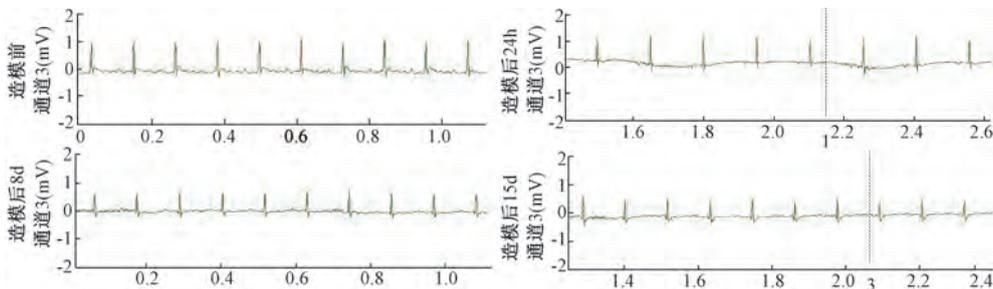


图 2 高剂量组心电图

Fig.2 Electrocardiogram of high dose group

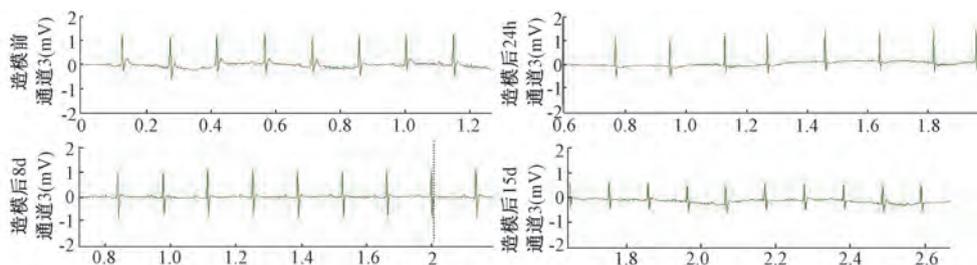


图 3 中剂量组心电图

Fig.3 Electrocardiogram of middle dose group

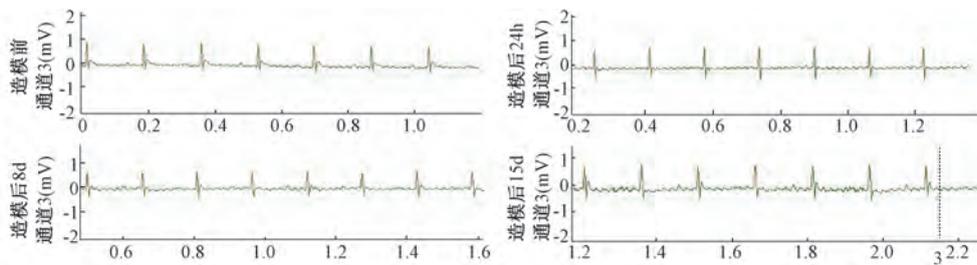


图 4 低剂量组心电图

Fig.4 Electrocardiogram of low dose group

表 1 造模前、造模后 24 h、8 d 及 15 d 心电图 (ECG) T 波高度、变化量及变化率

Table 1 The T Wave height, variation and change rate in ECG before/after 24 h, 8d and 15 d of animal models

项目		空白组	高剂量组	中剂量组	低剂量组
造模前	动物数/n	40	40	40	40
	T 波高度/mV	0.19±0.08	0.20±0.03	0.21±0.06	0.21±0.06
造模后 24 h	动物数/n	40	23	30	35
	T 波高度/mV	0.14±0.06	0.11±0.10	0.05±0.13*	0.10±0.11
	T 波变化量/mV	0.07±0.06	0.10±0.06	0.17±0.11**	0.13±0.09
造模后 8 d	T 波变化率/%	36.89±23.00	53.67±35.99	84.31±54.73**	64.94±39.19
	动物数/n	40	23	30	35
	T 波高度/mV	0.13±0.05	0.09±0.13	0.09±0.10	0.11±0.07
造模后 15 d	T 波变化量/mV	0.06±0.06	0.12±0.07	0.15±0.10**	0.11±0.06
	T 波变化率/%	34.19±22.64	62.53±42.16	77.02±51.92**	48.69±26.50
	动物数/n	30	13	20	25
	T 波高度/mV	0.09±0.05	0.04±0.07	0.07±0.11	0.12±0.07
	T 波变化量/mV	0.06±0.04	0.15±0.09**	0.15±0.08**	0.09±0.07
	T 波变化率/%	38.57±28.22	82.10±55.46*	71.55±37.00*	40.20±23.89

注:与空白组相比 * P<0.05, ** P<0.01

Note: Compared with the control group, * P<0.05, ** P<0.01

2.2 心肌损伤标志物

造模小鼠分别于造模后 8 d、15 d 进行眼眶采

血,血清中心肌损伤标志物的检测结果见表 2、表 3。

表 2 造模后 8 d 的 AST、CK、CK-MB、LDH 及 CTN-T 数据

Table 2 The data of AST、CK、CK-MB、LDH and CTN-T after 8 d of animal models

动物数/(n)	AST/(U/L)	CK/(U/L)	CK-MB/(U/L)	LDH/(U/L)	CTN-T/(ng/L)	
空白组	10	65.97±13.34	238.86±72.94	213.00±39.27	456.86±154.49	18.77±12.57
高剂量组	10	109.03±41.11*	436.40±185.71**	410.70±175.03**	765.62±174.36**	15.18±8.59
中剂量组	10	130.68±42.26**	1307.11±653.31**	452.78±98.04**	782.80±174.73**	27.33±14.08
低剂量组	10	86.29±16.38*	234.90±74.44	271.80±72.77*	617.38±133.62	11.68±5.90

注:与空白组相比 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Note: Compared with the blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

高剂量组、低剂量组 AST 显著高于空白组 ($P < 0.05$); 中剂量组 AST 极显著高于空白组 ($P < 0.01$)。中剂量组 CK 极显著高于空白组 ($P < 0.01$)。高剂量组、中剂量组 CK-MB 极显著高于空

白组 ($P < 0.01$); 低剂量组 CK-MB 显著高于空白组 ($P < 0.05$)。高剂量组、中剂量组 LDH 极显著高于空白组 ($P < 0.01$)。

表 3 造模后 15 d 的 AST、CK、CK-MB、LDH 及 CTN-T 数据 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 The data of AST、CK、CK-MB、LDH and CTN-T after 15 d of animal models ($\bar{x} \pm s$)

动物数(n)	AST/(U/L)	CK/(U/L)	CK-MB/(U/L)	LDH/(U/L)	CTN-T/(ng/L)	
空白组	30	102.16±26.17	369.78±209.13	216.40±52.33	992.40±252.16	18.72±14.14
高剂量组	13	157.20±87.31	343.08±153.20	319.31±319.31**	1351.91±181.18**	14.62±10.20
中剂量组	20	260.63±142.17**	762.53±473.90**	383.68±80.86**	1616.50±438.99**	19.63±10.38
低剂量组	25	149.80±40.49**	556.15±216.35	325.94±57.73**	1242.31±198.21*	19.88±198.21

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 空白组

Note: Compared with the blank control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

由表 3 可知,中剂量组、低剂量组 AST 极显著高于空白组 ($P < 0.01$)。中剂量组 CK 极显著高于空白组 ($P < 0.01$)。高剂量组、中剂量组、低剂量组 CK-MB 极显著高于空白组 ($P < 0.01$)。高剂量组、中剂量组 LDH 极显著高于空白组 ($P < 0.01$); 低剂量组 LDH 显著高于空白组 ($P < 0.05$)。

2.3 病理

小鼠心肌 HE 染色切片结果见图 5~8。空白组小鼠心肌纤维粗细均匀,排列整齐,横纹清楚,未见变性坏死,心肌间质亦无炎症反应(图 5);模型高剂量组各只小鼠心肌纤维大范围变性,表现为心肌细胞界限不清,胞浆溶解成粉染颗粒状,细胞核分布不均,核增大,可见核仁(图 6);其中 8 d 小鼠心肌纤维出现点灶状坏死,较多淋巴细胞为主的炎性细胞浸润(图 7);其中 15 d 小鼠心肌间散在多灶性坏死区,间质水肿,血管充血,较多淋巴细胞为主的炎性细胞浸润(图 8)。

2.4 死亡率

各组小鼠按相应剂量皮下连续 3 d 注射 ISO 后剩余动物数及死亡率见表 4。

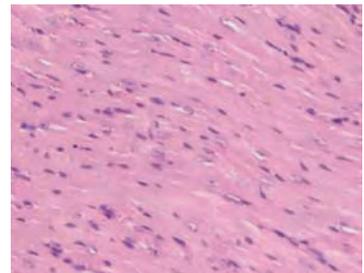


图 5 空白组小鼠心肌组织 (HE, ×400)
Fig.5 The cardiac tissue in mice of black comparison group (HE, ×400)

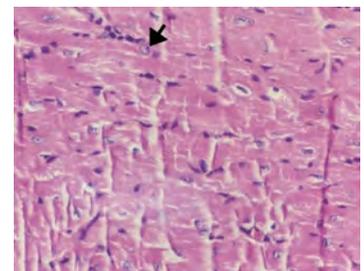


图 6 模型高剂量组小鼠心肌组织 (HE, ×400)
Fig.6 The cardiac tissue in mice of high dose group (HE, ×400)

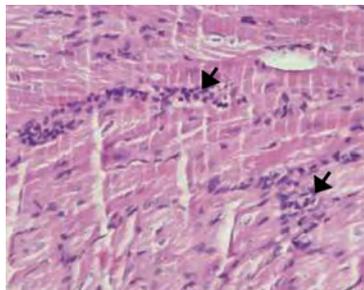


图 7 模型高剂量组造模后 8 d 小鼠心肌组织 (HE, ×400)

Fig.7 The cardiac tissue in mice of high dose group after 8 days(HE, ×400)

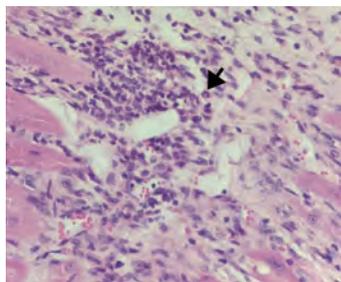


图 8 模型高剂量组造模后 15 d 小鼠心肌组织 (HE, ×400)

Fig.8 The cardiac tissue in mice of high dose group after 15 days(HE, ×400)

表 4 造模前后动物的剩余数量及死亡率

Table 4 The Remaining number and death rate of animals before/after animal models

	造模前动物数(只)	造模后剩余动物数(只)	死亡率(%)
空白组	40	40	0
高剂量组	40	23	42.5
中剂量组	40	30	25
低剂量组	40	35	12.5

由表 4 可知造模后高剂量组剩余动物 23 只,死亡率为 42.5%;中剂量组剩余动物 30 只,死亡率为 25%;低剂量组剩余动物 35 只,死亡率为 12.5%。

3 讨论

目前,大、小鼠慢性心肌缺血模型的造模方法、造模剂量及评价指标尚缺少系统的试验研究,文献报道的方法繁多但无统一的、客观的标准和依据。本文认为,慢性心肌缺血模型的是否成模标准,应根据其所应用的试验时间而定,此模型若能在受试药物较长的给药期间内维持稳定即可判断此模型成功。通过查阅文献^[8-10]很大一部分治疗心肌缺血的药效学试验给药时间均不超过 15 d,本试验针对此

情况设计观察 8 d 和 15 d,这个时间长度基本可以满足大部分治疗给药试验周期的需求。指标选择上采用 ECG、心肌酶谱、肌钙蛋白及病理观察,涵盖了很大一部分试验的常规需求^[11-14]。

本实验以小鼠作为试验对象,一般小鼠 ECG 特点为无明显 ST 段, S 波与 T 波直接平滑相连,人工测量 ST 段及 J 点主观性较强。故以 T 高度作为考察指标,影响因素较少,准确度较高,更加客观。结果显示连续 3 d 皮下注射 ISO 16 mg/kg 的剂量组在造模后 24 h、8 d、15 d ECG 的 T 波高度均发生较为显著的变化;连续 3 d 皮下注射 ISO 32 mg/kg 的剂量组在造模 15 d 时 T 波高度变化较为显著;而连续 3 d 皮下注射 ISO 8 mg/kg 的剂量组各个时间 T 波高度均无显著变化。这说明连续 3 d 皮下注射 ISO 32 mg/kg 和 16 mg/kg 的剂量都能造成小鼠较持久的心肌缺血症状。而 8 mg/kg 的剂量效果不显著。ISO 16 mg/kg 剂量组的 ECG 在 24 h、8 d 时 T 波高度变化较为显著,而 ISO 32 mg/kg 剂量组在 24 h、8 d 时 T 波高度变化反而不显著,可能是由于 ISO 32 mg/kg 剂量组死亡率较高,一些症状严重的个体死亡了,而 ISO 16 mg/kg 剂量组反而保留下一些症状严重的个体,导致 ECG 变化显著。三个剂量组在造模后 8 d、15 d 时,心肌酶谱相对空白组均有显著性差异,如果单纯考察心肌酶谱,这三个剂量均可使用;只有 ISO 32 mg/kg 的剂量组在造模后 8 d、15 d 出现可见的心肌病理变化。本试验采用 16 mg/kg 剂量的死亡率为 25%, 8 mg/kg 剂量的死亡率仅为 12.5%, 而相比其他文献报道^[15]使用 8 mg/kg 剂量的死亡率就已达到 33.3%。原因可能和操作有关。

目前常见一些实验采用大鼠尾静脉注射 ISO 或垂体后叶素(PIT)造成急性心肌缺血模型^[16-17],本实验旨在制备慢性心肌缺血模型,不追求使药物第一时间达到最大血药浓度,短时间血药浓度过高亦可以造成动物死亡率过高,因而未采用静脉注射,而是采用皮下注射的方式。大鼠皮下多点注射 ISO 是制备慢性心肌缺血的常用方法,但根据预实验发现,大鼠对 ISO 的耐受程度远低于小鼠,死亡率较高,有关大鼠的研究情况将在后续文章中进行报道。

心肌缺血的表现不仅在于 ECG 的异常,还涉及到一些酶学指标的变化。传统的心肌酶谱包括 AST(生物半衰期 20 h, 18~36 h 达峰, 3~4 d 恢复正常)、CK(生物半衰期 17 h, 12~24 h 达峰, 3~4 d 恢复正常)、CK-MB(生物半衰期 13 h, 12~24 h 达峰,

2~3 d 恢复正常)、LDH(生物半衰期 110 h,48~72 h 达峰,7~14 d 恢复正常)用以评估心肌细胞性损伤,其中 AST 和 LDH 广泛存在于全身各组织中,单独的 AST 或 LDH 升高并不能确认为心肌损伤,必须结合心电图以及 CK、CK-MB 等指标联合判断;CK 是心肌细胞中重要的能力调节酶,由 M 和 B 两个亚基组成,形成 CK-MM、CK-MB 和 CK-BB 三种同工酶;其中 CK-BB 主要存在于脑组织中,CK-MM 主要存在于骨骼肌中,而 CK-MB 主要存在于心肌中,故 CK-MB 特异性最高^[18]。CTN-T(生物半衰期 2 h,12~96 h 达峰,7~14 d 恢复正常)是收缩蛋白中调节蛋白的重要部分,是 CTN 与原肌球蛋白结合的部分,其在心肌中的含量较高,而正常人的血液中几乎检测不到 CTN-T,对急性心肌梗死有较高的分辨能力^[19]。本试验设计的考察时间为 8 d 和 15 d,其中 8 d 超过了 AST、CK、CK-MB 的恢复时间,15 d 超过了上述所有标志物的恢复时间。皮下注射 ISO 32 mg/kg、16 mg/kg 及 8 mg/kg,8 d 及 15 d 后动物血液中的 CK-MB 较空白组均有显著性差异,无论是 8 d 还是 15 d 均远超过了 CK-MB 的恢复时间,这说明这三个造模剂量均能造成心肌的持续损伤。而皮下注射 ISO 16 mg/kg 剂量组在 15 d 仍能够保持 AST、CK、CK-MB、LDH 显著升高,说明该剂量持续造成心肌损伤效果较好。

从心电图及心肌损伤标志物的结果来看,中剂量组的心电图改变和心肌损伤均比高剂量组严重,但其死亡率仅为 25%,较高剂量组的死亡率 42.5% 大幅降低。我们推测是由于高剂量组一些小鼠无法耐受而死亡,中剂量组则因为剂量相对较低死亡率大幅降低,因而保留的一部分症状较重的小鼠。中剂量组死亡率与心电图及心肌损伤标志物改变达到了相对较好的平衡。

从病理结果来看,高剂量组造模后 8 d 及 15 d 的小鼠心肌均出现明显病理变化,可见以 ISO 32 mg/kg 造模可在 8 d、15 d 内造成病理性损伤,形成心肌的坏死性炎症反应。中剂量组、低剂量组镜下均未发现明显病理改变。

综上所述,小鼠连续 3 d 皮下注射 ISO 32 mg/kg 或 ISO 16 mg/kg 均能造成慢性心肌缺血模型,可在心电图、心肌损伤标志物及病理形态三方面均产生显著改变。此模型造模方法简便,维持时间长,适合抗慢性心肌缺血药物较长期治疗给药的药效评价。而 ISO 16 mg/kg 的造模剂量死亡率较低并且

在心电图与心肌损伤标志物的指标上优于 ISO 32 mg/kg,但并未造成心脏明显病理性损伤。提示可根据不同试验预期选择性地采用 2 个不同造模剂量建立小鼠慢性心肌缺血模型。

参考文献

- [1] 谭文明,陈俊威,林卓辉,等.舒血宁注射液(银杏提取物)对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血大鼠的影响[J].中医临床研究,2017,9(24):27-29.
- [2] 焦淑萍,周玮,杜培革.野生山葡萄多酚对异丙肾上腺素诱发的小鼠心肌缺血的保护作用[J].中国地方病防治杂志,2006,21(3):146-147.
- [3] Ribeiro D A, Buttros J B, Oshima C T, et al. Ascorbic acid prevents acutemyocardial infarction induced by isoproterenol in rats: role of inducible nitric oxide synthase production [J]. MolHistol,2009,40(2):99-105.
- [4] Prabhu S,Narayan S,Devi C S.Mechanism of protective action of mangiferin on suppression of inflammatory response and lysosomal instability in rat model of myocardial infarction [J].PhytotherRes,2009,23(6):756-760.
- [5] Kubavat J B, Asdaq S M. Role of Sida cordifolia L leaves on biochemical and antioxidant profile during myocardial injury [J]. Ethnopharmacol,2009,124(1):162-165.
- [6] 修春江,刘凤岐,王怀泉,等.组织多普勒超声评价交感神经阻滞对扩张型心脏病左心室心肌收缩力的影响[J].中华超声影像学杂志,2005,14(5):338-341.
- [7] 徐叔云.药理学实验方法[M].第2版.北京:人民卫生出版社,1991:897.
- [8] 常厦云,朱凌鹏,王秋娟,等.红景天苷对异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌缺血的影响[J].中药药理与临床,2016,32(2):67-70.
- [9] 石孟琼,白彩虹,孙桂林,等.开口箭不同提取部位对异丙肾上腺素致小鼠心肌缺血损伤的影响[J].中国临床药理学与治疗学,2013,18(12):1344-1352.
- [10] 余保瑞,龙超良,夏云峰,等.哌罗芬他对异丙肾上腺素诱发的小鼠心肌缺血的保护作用[J].中国临床药理学与治疗学,2004,(6):637-640.
- [11] 王治宝,杨辉,闫早婴,等.蒙古口蘑水提物对异丙肾上腺素致小鼠心肌缺血小鼠的心肌保护作用[J].食用菌学报,2014,21(1):47-50.
- [12] 王宇卿,朱丹妮,张洁琼,等.生脉冻干粉口服对异丙肾上腺素致小鼠心肌缺血损伤的保护作用[J].中药药理与临床,2013,29(3):15-17.
- [13] 吕建英.曲马多对异丙肾上腺素所致小鼠心肌缺血损伤的抑制作用[J].华北煤炭医学院学报,2010,12(5):609-610.
- [14] 范英兰,胡丽萍,朱竟赫,等.心肌缺血动物模型实验研究进展[J].实验动物科学,2018,35(1):72-75.
- [15] 牛子冉,徐晓娜,陈俞材,等.丹酚酸 A 对异丙肾上腺素致小鼠心肌缺血的保护作用及其机制[J].中国药理学通报,

2015, (12):1667-1674.

- [16] 冷雪, 贾连群, 王莹, 等. 人参皂苷素 Rb1 预处理对异丙肾上腺素诱导大鼠急性心肌缺血心肌凋亡相关蛋白表达的影响[J]. 辽宁中医杂志, 2017, (1):184-186.
- [17] 雷健, 陶光利. 血脉灵组方对急性心肌缺血大鼠的保护[J]. 医药导报, 2017, 36(12):1359-1362.

- [18] 吴阿兰, 苏伟青, 胡荣权, 等. 心肌梗死及其预后与心肌酶谱、红细胞参数的相关性研究[J]. 临床医学工程, 2017, 24(1):75-76.
- [19] 胡娟娟, 郝晓柯, 周铁城, 等. 心肌损伤标志物联合检测在急性心肌梗死早期诊断中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2017, 38(11):1545-1547.

Preparation and Evaluation of Chronic Myocardial Ischemia Model Induced by Different Doses of Isoproterenol in Mice

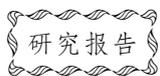
ZHU Jinghe¹, LIU Chi², LIU He¹, WU Xiaolin¹, QIAO Jujun¹, LI Miao¹,
FAN Yinglan¹, BAO Yulong¹, QI Yue¹, HU Liping²

(1. Liaoning Institute of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, China)

(2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, China)

Abstract: Objective To prepare chronic myocardial ischemia models in mice and determine the best molding dose, and to discuss the evaluation indexes of the model which could provide reference for the preparation of related models and the evaluation of their efficacy. **Method** Three model groups of different doses were treated with subcutaneous injection of isoproterenol (32 mg/kg, 16 mg/kg, 8 mg/kg) for three consecutive days, after 24 hours, 8 days and 15 days ECG were recorded. On the eighth day and the fifteenth day, markers of myocardial injury in the blood were detected and the morphological changes of myocardium were observed. **Result** The ECG, markers of myocardial injury and pathology were all markedly changed in the group of 32 mg/kg isoproterenol ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), and the mortality rate was in the acceptable range. The result could be used for evaluating the efficacy of the medicine for long-term treatment of chronic myocardial ischemia. The mortality rate of the group of 16 mg/kg isoproterenol was low, and indexes of ECG and markers of myocardial injury were better than that of the group of 32 mg/kg isoproterenol, and the dose did not cause irreversible pathological damage to the heart muscle. **Conclusion** The result showed that the chronic myocardial ischemia models in mice can be established by using two different molding dose according to different test expectation.

Key words: mice; chronic myocardial ischemia; isoproterenol; evaluation criterion



大鼠与鲫鱼肠道内含物中微生物菌群的研究*

陈芳梅 李伟 刘蔚 于源华 王子琛 张鹏宇 张贵林

(长春理工大学生命科学技术学院, 长春 130022)

摘要:目的 对生活环境差异较大的动物肠道内含物中微生物菌群分布规律进行研究。方法 通过提取SD大鼠与鲫鱼不同肠段的内含物菌液,用不同的选择性培养基进行分离培养,鉴定后进行平板计数。结果 大鼠肠道中乳酸杆菌所占比重高于鲫鱼肠道,其余菌落(双歧杆菌、肠球菌、大肠杆菌)比重明显小于鲫鱼肠道;大鼠和鲫鱼肠道厌氧的双歧杆菌沿肠道向下数量递增。需氧的肠球菌在鲫鱼、大鼠整个肠道中的数量级相当。结论 研究不同动物肠道的微生物信息可以为病理学、毒理学的研究提供理论信息。

关键词: 鲫鱼;大鼠;肠道微生物;分离;鉴定

中图分类号: Q93-33 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)01-0048-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.010

肠道菌群数量庞大,整个基因总数约为人类的150倍,近年来,随着“人类微生物组计划”、“肠道元基因组计划”等研究项目的开展,人类对肠道菌群的关注达到了空前的高度^[1-3]。随着对其结构和功能的不断探索,人们发现肠道菌群与宿主健康密切相关,被认为是人体的“微生物器官”^[4]。已有研究表明肠道微生物与肝硬化、肥胖、艾滋病,甚至是心理疾病的发生都有密切的关系^[5-8]。肠道微生物与宿主之间存在着肠道微生态平衡,这种平衡一旦被打破,宿主就极易遭受各种疾病的困扰^[9]。深入研究肠道微生物与肠道微生态平衡对促进人体健康以及人类和动物疾病防治等具有重要意义。

本实验研究生存环境差异极大的两种动物肠道不同部位中微生物的分布情况,为更深入地研究肠道健康与肠道微生物的关系以及为本课题组的毒理学实验研究提供相关的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

鲫鱼(423~490)g,成年雄鱼,夏季,气温15~30℃,研究对象与本课题组的肠道微生物组学研究

保持一致,购买自吉林省长春市新立城彦轩养殖场。

SD大鼠(144~164)g,7周龄,雄性,清洁级,购买自吉林大学实验动物中心(SCXK(辽)2015-0001)。

1.2 试剂

大肠杆菌选择培养基(EMB)、卡那霉素ELB选择培养基^[10]、乳酸杆菌选择培养基(Lbs)、双歧杆菌选择培养基,蛋白胨水培养基,胆汁-七叶苷培养基,快速革兰染色液等,购买自宝泰克生物科技有限公司。

1.3 仪器与设备

小型高速冷冻离心机(5424R)、电热恒温培养箱(DNP-9082)、电子显微镜(CX40)、气浴恒温振荡器(THZ-92A)、50 mL容量离心机(1736R)等。

1.4 方法

1.4.1 肠道内容物的获取和菌液制备:随机选取3只SD大鼠处死,消毒后置于超净台,取出空回肠、盲肠以及结肠的肠道内容物各1g,根据已发表文献^[11]制备肠道菌液。

随机选取3条鲫鱼处死,消毒后置于超净台,取出前肠、中肠以及后肠的肠道内容物各1g,根据已发表文献^[11]制备肠道菌液。

收稿日期:2018-06-24

* 基金项目:长春理工大学青年基金项目(No.XQNJJ-2016-16);吉林省大学生创新创业训练计划项目(No.2017S065)

作者简介:陈芳梅(1992—),女,硕士研究生,研究方向:微囊藻毒素对肠道微生物的影响。E-mail: 2360116552@qq.com

通信作者:李伟(1986—),女,博士,讲师,研究方向:微囊藻毒素的降解与代谢。E-mail: liwei5695084@163.com

1.4.2 菌液稀释与平板计数: 各段肠道每克内容物菌液稀释倍数分别是: 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} , 涂布于各选择培养基上, 每个浓度三个重复。37 °C 恒温培养, 双歧杆菌、乳酸杆菌 37 °C 厌氧培养 48 h, 肠球菌、大肠杆菌 37 °C 好氧培养 24 h。长菌后通过菌落形态、革兰染色、镜检以及各种生化反应等鉴定, 并进行菌落计数, 计算每克湿肠道内容物中的菌数, 即 CFU/g 标本。

公式: $\text{CFU/g 标本} = X \times 10 \times \text{稀释倍数}$, (X 表示计数平板菌落平均数)

1.5 统计方法

将计数结果换算成 $\log \text{CFU/g}$ 建库, 数据用“均数 \pm 标准差”($\bar{x} \pm s$)表示, SPSS 17.0 统计软件做 t 方差检验, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 菌落鉴定

通过对平板菌落特征、菌落形态、生化反应以及革兰染色后(如图 1 和图 2), 确定所培养菌群为双歧杆菌、乳酸杆菌、肠球菌和大肠杆菌。

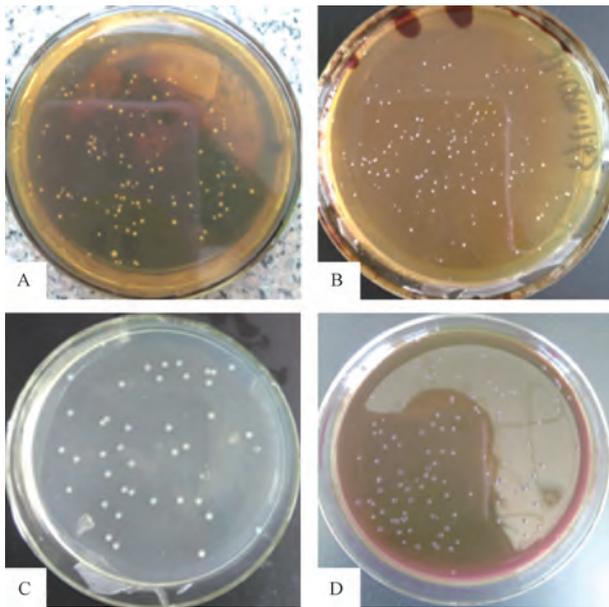


图 1 部分平板培养图

注: A: 双歧杆菌; B: 乳酸杆菌; C: 肠球菌; D: 大肠杆菌

Fig.1 Part of the plate culture diagram

Note: A: *Bifidobacterium*; B: *Lactobacillus*;

C: *Enterococcus*; D: *Escherichia coli*

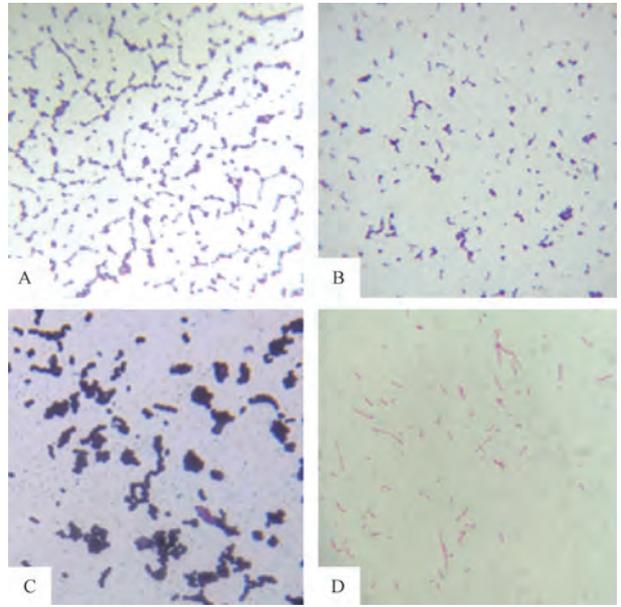


图 2 革兰染色结果 $\times 1000$

注: A: 双歧杆菌; B: 乳酸杆菌; C: 肠球菌; D: 大肠杆菌

Fig.2 Gram staining results $\times 1000$

Note: A: *Bifidobacterium*; B: *Lactobacillus*;

C: *Enterococcus*; D: *Escherichia coli*

2.2 数据分析

大鼠不同肠段的同种菌群相比, 厌氧菌(双歧杆菌、乳酸杆菌)沿肠道向下数量递增, 且有显著差异($P < 0.05$)。需氧菌(肠球菌、大肠杆菌)在盲肠内的数量较其它肠段多, 且有显著差异($P < 0.05$)。各肠段总菌数也沿肠道向下依次递增。表 1 中不同菌群的同肠段相比, 各肠段中, 厌氧双歧杆菌数量最多, 其次为厌氧乳酸杆菌, 二者与大肠杆菌、肠球菌数量相比有显著差异($P < 0.05$)。在整个肠道中厌氧的双歧杆菌、乳酸杆菌总数比肠球菌、大肠杆菌总数高 2~3 个数量级, 见表 1。

鲫鱼不同肠段的同种菌群相比, 双歧杆菌、肠球菌以及大肠杆菌数量沿肠道向下增加。各肠段总菌数沿肠道向下也依次递增。表 2 不同菌群的同肠段相比, 各肠段中, 厌氧的双歧杆菌数量最多, 比需氧的大肠杆菌、肠球菌数量高出 1~2 数量级, 有明显的统计学差异($P < 0.05$)。同为厌氧的乳酸杆菌数量却比需氧大肠杆菌小 1~2 个数量级, 与肠球菌相比, 除中肠段数量相差最小, 其余肠段也小 1~2 个数量级。整个鲫鱼肠道中各菌群总数从多到少依次为双歧杆菌、大肠杆菌、肠球菌以及乳酸杆菌, 且厌氧菌(双歧杆菌、乳酸杆菌)总数也大于需氧菌(肠球菌、大肠杆菌)总数, 见表 2。

表 1 SD 大鼠肠道菌群计数(菌落计数转换为 lg 值, $\bar{x} \pm s, n = 3 \times 3$)Table 1 Intestinal microflora count in SD rats (Colony count was converted to lg value, $\bar{x} \pm s, n = 3 \times 3$)

肠段	双歧杆菌	乳酸杆菌	肠球菌	大肠杆菌	总计
空回肠	7.452±0.047 ^a	6.513±0.154 ^b	5.350±0.053 ^c	5.151±0.196 ^d	7.508
盲肠	8.245±0.051 ^b	7.131±0.126 ^c	6.120±0.095 ^a	6.032±0.083 ^a	8.248
结肠	9.062±0.070 ^c	8.824±0.090 ^a	4.658±0.174 ^b	5.220±0.063 ^d	9.265
总计	9.136	8.841	6.206	6.148	9.315

注:如果数据在同一行或同一列中用不同的字母表示(a,b,c,d),则存在显著性差异($P < 0.05$),如果同一行或同一列中有相同的字母表示(a,b,c,d),则没有显著差异($P > 0.05$)

Note: There is significant difference ($P < 0.05$) if the data are labeled with different letters (a,b,c,d), and no significant difference ($P > 0.05$) if with the same letters (a,b,c,d) in the same line or in the same column

表 2 鲫鱼肠道菌群计数(菌落计数转换为 lg 值, $\bar{x} \pm s, n = 3 \times 3$)Table 2 Intestinal microflora count in crucian carp (Colony counts were converted to lg values, $\bar{x} \pm s, n = 3 \times 3$)

肠段	双歧杆菌	乳酸杆菌	肠球菌	大肠杆菌	总计
前肠	7.337±0.127 ^a	3.709±0.066 ^b	5.002±0.065 ^c	5.326±0.064 ^d	7.354
中肠	7.392±0.139 ^a	5.466±0.093 ^d	5.118±0.069 ^b	6.493±0.071 ^c	7.463
后肠	8.044±0.070 ^c	5.379±0.051 ^d	6.072±0.042 ^a	6.853±0.029 ^b	8.080
总计	8.203	5.733	6.151	7.021	8.235

注:如果数据在同一行或同一列中用不同的字母表示(a,b,c,d),则存在显著性差异($P < 0.05$),如果同一行或同一列中有相同的字母表示(a,b,c,d),则没有显著差异($P > 0.05$)

Note: There is significant difference ($P < 0.05$) if the data are labeled with different letters (a,b,c,d), and no significant difference ($P > 0.05$) if with the same letters (a,b,c,d) in the same line or in the same column

在大鼠、鲫鱼肠道中,厌氧的双歧杆菌所占比例最多,且在鲫鱼肠道中双歧杆菌所占比例(92.76%)远高于大鼠肠道中的相应比例(66.24%)。而同为厌氧菌的乳酸杆菌在鲫鱼肠道中的比例(0.32%)远低于大鼠肠道中的比例(33.61%)。鲫鱼肠道中的需氧菌(肠球菌和大肠杆菌)在肠道总菌中所占的比例也远高于大鼠肠道中的比例,见表3。

表 3 大鼠和鲫鱼肠道微生物分布比例(%)

Table 3 Distribution of intestinal microflora in rats and crucian carp (%)

实验动物	双歧杆菌	乳酸杆菌	肠球菌	大肠杆菌
大鼠	66.24%	33.61%	0.08%	0.07%
鲫鱼	92.76%	0.32%	0.82%	6.10%

3 讨论

已有研究表明肠道微生物在肠道不同区域的分布有所不同,以便适应不同肠段的环境或者促进其功能^[12-13]。因此将大鼠和鲫鱼肠道进行分段取样,发现大鼠空回肠及鲫鱼前肠段的各菌总数最少,盲肠及中肠次之,而结肠和后肠段各菌总数最高,这一结果与之前的研究是一致的,即肠道中微生物的密

度沿肠道向下是逐渐增加的^[14-15]。

实验将鲫鱼和大鼠肠道中各菌总数进行对比,发现大鼠肠道中乳酸杆菌所占比重远高于鲫鱼肠道,同时大鼠肠道中双歧杆菌、肠球菌以及大肠杆菌所占比重都明显小于鲫鱼肠道。这可能是乳酸杆菌引起的,乳酸杆菌作为肠道益生菌之一,有研究表明乳酸杆菌的分泌产物能改变革兰阳性菌细胞膜的通透性从而抑制阳性菌的生长,同时降低肠道 pH,抑制大肠杆菌及梭菌等的生长^[16]。实验结果中鲫鱼肠道中乳酸杆菌数量与尹军霞等^[17]发表的结果有一定差异,这可能因为温度的原因。已有研究表明鲫鱼肠道内的乳酸杆菌也会因季节变化而发生改变,主要是与温度有关。

无论陆生哺乳动物大鼠,还是淡水卵生动物鲫鱼,其各肠段中有益菌(乳酸杆菌和双歧杆菌)的总数量都要明显高于条件致病菌(肠球菌和大肠杆菌)的总数量。鲫鱼、大鼠整个肠道中需氧的肠球菌的数量级相当。大鼠、鲫鱼肠道中双歧杆菌的数量沿着肠道向下是逐渐增加的,肠道总菌数也沿肠道向下逐渐增加。大鼠肠道中只有乳酸杆菌所占比重高于鲫鱼肠道,其余菌落(双歧杆菌、肠球菌、大肠杆菌)比重都明显小于鲫鱼肠道。通过本实验揭示了不同动物的不同肠段中肠道微生物的分布呈现

各自的规律,为深入研究肠道健康与肠道微生物之间关系提供理论信息。

参考文献

- [1] 傅佑丽. 微生物:下一个人类基因组计划[J]. 世界科学, 2007,(6):7-8.
- [2] 魏晓,刘威,袁静,等. 人类肠道菌群与疾病关系的元基因组学研究进展[J]. 中国微生物学杂志, 2011, **23**(1):75-80.
- [3] Zoetendal E G, Rajilic-Stojanovic M, De-Vos W M. High-throughput diversity and functionality analysis of the gastrointestinal tract microbiota [J]. Gut, 2008, **57** (11): 1605-1615.
- [4] 翟齐啸,田丰伟,王刚,等. 肠道微生物与人体健康的研究进展[J]. 食品科学, 2013, **34**(15):337-341.
- [5] Liu J, Wu D, Ahmed A, *et al.* Comparison of the Gut Microbe Profiles and Numbers Between Patients with Liver Cirrhosis and Healthy Individuals[J]. Curr Microbiol, 2012, **65**(1):7-13.
- [6] 陈恒,叶盛,左延文,等. 肠道微生物与肥胖关系研究进展[J]. 现代预防医学, 2008, **35**(4):608-609.
- [7] 王腊梅,孔祥阳,王昆华. 肠道菌群与艾滋病关系的研究进展[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2016, **32**(6):859-862.
- [8] 蔡林彬,付轶群,李明阳,等. 肠道微生物群与精神疾病的关系[J]. 国际生物制品学杂志, 2014, **37**(5):232-237.
- [9] 梁效,彭喜春. 饮食、肠道微生物与人体健康[J]. 肠外与肠内营养, 2011, **18**(5):304-306.
- [10] 强华,王耿夏,谢蔓凌. 卡那霉素 ELB 选择培养基分离肠道肠球菌[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, **13**(2):145-145.
- [11] 蒋婕,郭抗萧,周赛男,等. 一种提取小鼠肠道中活体微生物的方法[J]. 中国微生物学杂志, 2013, **25**(5):512-515.
- [12] Liu J, Wu D, Ahmed A, *et al.* Comparison of the gut microbe profiles and numbers between patients with liver cirrhosis and healthy individuals[J]. Curr Microbiol, 2012, **65**(1):7-13.
- [13] Tian Y, Zhang L, Wang Y, *et al.* Age-related topographical metabolic signatures for the rat gastrointestinal contents. [J]. J Proteome Res, 2012, **11**(2):1397-411.
- [14] Goel A, Gupta M, Aggarwal R. Gut microbiota and liver disease [J]. J Gastroenterol Hepatol, 2014, **29**(6):1139-1148.
- [15] Mei W, Ahm  S, Jeppsson B, *et al.* Comparison of bacterial diversity along the human intestinal tract by direct cloning and sequencing of 16S rRNA genes[J]. Fems microbiol Ecol, 2005, **54**(2):219-231.
- [16] Hagi T, Tanaka D, Iwamura Y, *et al.* Diversity and seasonal changes in lactic acid bacteria in the intestinal tract of cultured freshwater fish. [J]. Aquaculture, 2004, **234**(1-4):335-346.
- [17] 尹军霞,陈瑛,孟丽丽. 益生菌剂对鲫鱼肠道菌群影响的初步研究[J]. 水产科学, 2007, **26**(11):610-612.

Study of Intestinal Flora in Rat and Crucian Carp

CHEN Fangmei, LI Wei, LIU Wei, YU Yuanhua, WANG Zichen, ZHANG Pengyu, ZHANG Guilin

(School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China)

Abstract: Objective The distribution of intestinal microflora in different parts of animals, intestine which living environment are quite different. **Method** With taking the contents of different intestinal segments of mice and crucian carp, extracting and culturing with different selective medium, and then carrying out the plate count. **Result**

It was found that the proportion of *Lactobacillus* in the intestine of rats was higher than that of crucian carp, and the proportion of other colonies (*Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Escherichia coli*) was significantly smaller than that of crucian carp. The distribution of intestinal anaerobic *Bifidobacterium* in rats and crucian carp increase in the downward direction along the gut. The magnitude of aerobic *Enterococcus* in the intestine of rats and crucian carp was almost same. **Conclusion** The inestinal microbiological information of different animals can provide some experimental basis for the study of pathology and toxicology.

Key words: crucian carp; rat; intestinal microbiology; isolation; identification



重组人干扰素内皮抑制肽融合蛋白抗肿瘤药效的研究

刘贺煜¹ 王莹² 刘锦辉¹ 姜媛媛² 黄炎² 李会成¹

(1. 哈药集团生物工程有限公司, 哈尔滨 150020) (2. 哈药集团技术中心, 哈尔滨 150020)

摘要:目的 考察融合蛋白 I30 肽抗肿瘤的效果, 为 I30 肽后续开发提供实验支持。方法 使用 NIH 小鼠, 取 4 只小鼠腹腔注射 H₂₂ 瘤株, 1 周时处死所有小鼠, 取腹水。另取 40 只小鼠, 每只腋下注射腹水 0.2 mL, 细胞浓度为 1×10⁶ 个/mL。接种后 4 h 开始给药。将腋下注射小鼠随机分为 4 组: IFN 组, 皮下注射干扰素 9×10⁵ IU/只; I30 高剂量组, 皮下注射 I30 80 μg/只; I30 低剂量组, 皮下注射 I30 30 μg/只; 阴性对照组, 皮下注射等体积生理盐水。连续给药 16 d。停药后 2 h, 处死所有动物, 再解剖皮下肿块称重。结果 I30 给药组具有明显的治疗效果, 且具有显著性差异 ($P < 0.05$)。结论 I30 肽具有抗肿瘤的作用。

关键词: 干扰素; 内皮抑素; 融合蛋白; 抗肿瘤

中图分类号: R73-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0052-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.011

肿瘤新生血管可为不断浸润生长的原发肿瘤提供营养, 它们在肿瘤的发展转移过程中起到重要的促进作用。IFN 具有抗肿瘤血管生成、抑制肿瘤转移的作用^[1]。

内皮抑素是由胶原蛋白 XIII 羧基末端的 184 个氨基酸组成的一种内源性血管生成抑素, 于 1997 年由 O' Reilly 等发现。它能特异性地抑制内皮细胞的增殖和血管的生成, 从而达到抑制肿瘤生长和转移的作用^[2]。本实验所使用的 30 肽, 是一种具有 30 个氨基酸的内皮抑素。已有研究证实, 内皮抑素活性区主要在 N 端的 1~27 个氨基酸上^[3]。而 30 肽是一种人工合成的人内皮抑素, 它保留内皮抑素的活性, 而分子量大大减少。

重组人干扰素内皮抑制肽融合蛋白(以下简称 I30), 是由干扰素(Interferon, IFN)和重组人内皮抑素(以下简称 30 肽)组成的一种融合蛋白。干扰素和 30 肽在抗肿瘤方面有着相近似的作用机理, 将它们制成融合蛋白, 有着协调作用, 增强抗肿瘤的效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物与饲养环境

实验动物: NIH 小鼠体质量 18~22 g, 雌性, 购

于北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2015-0001]。实验场所为本公司(哈药集团生物工程有限公司)实验室[SYXK(黑)2015-008]。⁶⁰Co 灭菌全价颗粒饲料, 购于北京科澳协力饲料有限公司[SCXK(京)2014-0010], 饮用水为灭菌水, 自由采食和饮水。

1.2 试剂与材料

肿瘤瘤株: H₂₂ 瘤株由本公司(哈药集团生物工程有限公司)实验室提供。

1.3 实验药品

干扰素 IFN(哈药集团生物工程有限公司生产), 干扰素 30 肽融合蛋白(I30)(哈药集团技术中心基因工程实验室制备), 30 肽(哈药集团技术中心基因工程实验室制备)。

1.3 实验方法

1.3.1 荷瘤小鼠模型制作: 取 4 只小鼠腹腔注射 H₂₂ 瘤株, 1 周后处死所有小鼠, 取腹水。

另取 40 只小鼠, 腋下注射腹水 0.2 mL/只, 细胞浓度为 1×10⁶ 个/mL。

1.3.2 实验动物分组与给药: 参考《细胞毒类抗肿瘤药物非临床评价的技术指导原则》等^[4-10]的实验方法设计实验方案, 接种后 4 h 开始给药。将腋下

收稿日期: 2018-05-24

作者简介: 刘贺煜(1981—), 男, 本科, 中级工程师, 研究方向: 新药研发药效实验。E-mail: hayaoshengwu@hotmail.com

通信作者: 李会成(1967—), 男, 博士, 研究员级高级工程师, 研究方向: 生物制药。E-mail: huichengli@hotmail.com

注射小鼠随机分为 4 组,每组 10 只:IFN 组,皮下注射干扰素 9×10^5 IU/只;I30 高剂量组,皮下注射 I30 $80 \mu\text{g}$ /只;I30 低剂量组,皮下注射 I30 $30 \mu\text{g}$ /只;阴性对照组,皮下注射等体积生理盐水。连续给药 16 d。

1.3.3 小鼠肿瘤质量测定:停药后 2 h,处死所有动物,取下瘤块称重。

1.4 抑瘤率 (%) 计算

参考《细胞毒类抗肿瘤药物非临床评价的技术指导原则》^[4]设计计算公式。抑瘤率公式:抑瘤率 = $(1-T/C) \times 100\%$ 。(T:治疗组;C:阴性对照组)。

1.5 统计方法

应用 SPSS18.0 对实验数据进行统计分析,结果均使用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$),组间差异比较使用秩和检验法,选取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

对照组小鼠平均瘤重为 1.605 g,大于 1 g,表明本次实验肿瘤生长良好^[11]。试验结果表明 I30 高剂量组和低剂量组抑瘤率均高于 40%^[4],且其效果优于干扰素。在试验结束时,所有小鼠虽体型消瘦,但精神状态良好,饮食饮水正常。提示该融合蛋白具有抗肿瘤作用,见表 1。

表 1 各组小鼠肿瘤质量

Table 1 Tumor weight of mice in each group

组别 Group	动物数 n	平均瘤重/g Average tumor weight	抑瘤率/% Tumor suppressor rate
阴性对照组 control group	10	1.605 \pm 0.415	
IFN 组 * IFN group *	10	0.702 \pm 0.545	56.98
IFN-30 (30 μg) 组 * IFN-30 (30 μg) group *	10	0.397 \pm 0.469	76.09
IFN-30 (80 μg) 组 * IFN-30 (80 μg) group *	10	0.368 \pm 0.408	77.09

注: * 表示与对照组比较, * $P < 0.05$

Note: * indicate compared with the control group, * $P < 0.05$

3 讨论

肿瘤一直是医学治疗的难题。目前已有多个通过抑制血管生成的抗肿瘤药物上市,如世界上首个上市的恩度,在临床上获得了不错的疗效。肿瘤的产生同时伴着新生血管的生成,肿瘤需要肿瘤血管为其提供营养成分和运输代谢物。肿瘤的扩散转移同样需要肿瘤血管。抑制了肿瘤血管的生成,将会抑制肿瘤的生长与扩散。目前关于内皮抑素的作用机制尚未完全定论。根据已有的研究表明,内皮抑素与整合素 $\alpha_5\beta_1$ 的结合在其活性机制中有着重要作用。内皮抑素通过其 N 末端与整合素 $\alpha_5\beta_1$ 结合,抑制 bFGF 诱导的 FAK/c-Raf/NAK1/2/p38/ERK1 丝裂活化蛋白激酶途径,从而发挥其活性作用^[2]。将内皮抑素 N-端的 27 个氨基酸核心序列,引入串联的 RGD 短肽,构成的新的肽链,命名为人血管内皮抑制肽。该肽在保持内皮抑素原有的抑制血管生成活性同时,由 RGD 序列赋予其抑制肿瘤细

胞生长与转移的活性,可增强其抗肿瘤效果,而且氨基酸序列较内皮抑素更为简单^[13]。而在成年人的身体中,几乎不会有新生血管生成,抑制血管生成的药物因此不会对人体产生副作用,其安全性远远高于细胞毒类抗肿瘤药物。抑制血管生成的药物药效好,副作用小,是未来抗肿瘤药物研发的一个重要的课题。

干扰素 α 虽然被广泛用于抗病毒,但美国 FDA 最早批准干扰素 α 的适应症却是毛细胞白血病(毛细胞白血病是一种淋巴系统的恶性肿瘤,由于此种白血病细胞在显微镜下,尤其在电子显微镜下其胞浆有明显的毛状突起,故称为毛细胞,因而命名为毛细胞白血病。广义上仍为一种特殊类型的慢性淋巴细胞白血病。毛细胞白血病主要见于老年男性,男女比例为 4:1)。研究表明,干扰素抗肿瘤作用机理中抑制肿瘤血管生成和 30 肽抗肿瘤的作用机理接近。IFN 可抑制 VEGF、b-FGF、MMP(基质金属蛋白酶)的表达,是其抗血管生成的重要机制之一。IFN 能够降低 VEGF、b-FGF 等血管形成因子的产生,减

少肿瘤新生血管形成^[14]。

细胞因子可以介导机体多种免疫反应,如肿瘤免疫、感染免疫、移植免疫、自身免疫及造血系统过程中发挥着重要的作用。细胞因子的作用具有多相性、网络性的特点,它们不仅可以单独地发挥生物学活性,而且不同的细胞因子之间还有相互协调和相互制约的作用,利用细胞因子的这一特点,人们可以根据自己的设想,通过基因融合等技术创造出自然界原本不存在的活性更佳的细胞因子融合蛋白^[16]。目前 FDA 已经批准了不少融合蛋白类药物上市。如 Enbrel(依那西普/etanercept),在治疗类风湿性关节炎已取得了很不错的临床效果。随着基因工程技术的成熟与应用,两个甚至多个不同基因之间很容易做到相互串联或彼此镶嵌,形成嵌合基因,一旦表达成产物则获得融合蛋白^[15]。

本次试验结束时,给药组和阴性对照组小鼠,均是体型消瘦,但状态良好,提示了 I30 的毒性较小。I30 的作用为抑制血管生成。在成年人的身体中,几乎不会有新生血管生成,抑制血管生成的药物因此不会对人体产生副作用。

本次实验没有采用裸鼠接种人源瘤株的方法。是因为本课题还处于前期研究的阶段,并没有进入到通过动物实验来筛选抗肿瘤谱的阶段。在后续研究中,采用通过把患者的肿瘤转移到免疫缺陷小鼠获得人源性肿瘤异种移植(PDX)的小鼠模型^[12]来进行筛选。

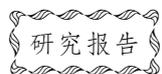
在接种瘤株后,并没有采用等小鼠肿瘤生长到一定程度后再给药的方式。因为小鼠肝癌 H₂₂ 细胞是一种鼠源的恶性肿瘤,在小鼠体内生长极快。和接种人源瘤株不同,H₂₂ 几乎均能成功生长。本次试验阴性对照组平均瘤重(1.605±0.415)g,也表明肿瘤生长良好。即便是细胞毒类药物也无法抑制肿瘤最后阶段的生长,此时已无法对供试品进行评价。所以需在肿瘤长至无法抑制之前,终止试验。鼠源瘤株大多会选择阴性对照组瘤重为 1g 时做为试验终至时间^[11]。而 H₂₂ 在 5~8 d 即可长到 1g。如果采用肿瘤体积达到 100~300 mm³ 后再给药,会导致给药时间短,有些药物可能会因为给药时间短而药效不理想。另一方面也打算将 I30 用于肿瘤的早期治疗,故采用了接种后马上给药的方式。

选择已上市药物作为阳性对照药,可以比对在研药物和已上市药物的药效的差异。为在研药物市场定位提供数据支持,也同时为将来的学术推广提

供试验数据。故本次试验选择了已上市的干扰素作为阳性对照药。IFN 抑制肿瘤血管生成和 30 肽抗肿瘤的作用机理接近,融合蛋白可以形成协同作用。I30 是利用基因工程的方法将干扰素和 30 肽通过接头序列(linker)连接起来的一种细胞因子重组融合蛋白,不仅可以提高两者的治疗效果。而且降低 IFN 的使用量,降低使用 IFN 带来的副作用。

参考文献

- [1] 阚奇伟,刘伦旭.干扰素抗肿瘤作用的研究[J].海南医学院学报 2010,16(9):1241-1244
- [2] O'Reilly M S, Boehm T, Shing Y, et al. Endostatin: An Endogenous Inhibitor of Angiogenesis and Tumor Growth [J]. Cell, 1997, 88(2):277-285.
- [3] 郭红艳,刘秀财,李淑艳.内皮抑素 30 肽对 HepG2 细胞黏附、侵袭能力影响的机制研究[J].中国现代医学杂志,2016,26(4):11-17.
- [4] 细胞毒类抗肿瘤药物非临床评价的技术指导原则[S], 2006 年.
- [5] 王洪坤,杨燕萍,贾友冀,等.胫骨内注射肿瘤细胞法构建骨肿瘤动物模型的研究进展[J].中国癌症防治杂志,2013,5(2):173-176.
- [6] 吴志平,石家齐,由慧娟,等.N-甲基亚硝基脲诱导大鼠膀胱肿瘤动物模型的实验研究[J].贵州医药,2012,36(3):205-208.
- [7] 朱建宁,吴开杰,贺大林,等.膀胱肿瘤动物模型比较及合理选[J].中华实验外科杂志,2013,30(6):1323-1324.
- [8] 刘俊勇,彭芳.多药耐药性肿瘤动物模型的评价[J].医学综述,2015(21):3905-3908.
- [9] 吕文岚,于美丽,薛钧尘,等.长效植入剂对膀胱肿瘤动物模型的抑制作用[J].医学信息旬刊,2013,26(15):478.
- [10] 韩成龙.基于肿瘤动物模型的临床前研究新模式初探[D].南京:南京大学,2012.
- [11] 徐叔云.药理实验方法学(第三版)[M].北京:人民卫生出版社,2005.
- [12] 邱业峰,赵志兵,法云智.人源性肿瘤异种移植的小鼠模型在肿瘤精准医学中的应用[J].实验动物科学,2016,33(4):78-83.
- [13] 李郑武,贾娜,张海涛,等.人血管内皮抑制肽抑制小鼠及裸鼠移植瘤术后残瘤生长的药效学研究[J].中国药理学杂志,2011,46(22):1715-1718.
- [14] 曾洁萍,余勤,梁茂植,等.干扰素抗肿瘤作用研究进展[J].现代预防医学,2008,35(18):3650-3652.
- [15] 闫璐颖,陈建华,张新国.融合蛋白连接肽的研究进展[J].生物技术,2008,18(3):92-94.
- [16] 刘岩,于涟.基因融合技术及其应用[J].农业生物技术学报,2006,14(2):273-278.



半夏泻心汤对衰老大鼠学习记忆能力的改善及分子机制*

彭旭 张晓梅 何学令 刘艳

(四川大学实验动物中心,成都 610041)

摘要:目的 以D-半乳糖致衰老大鼠为动物模型,研究半夏泻心汤(BXT)对衰老大鼠学习记忆能力的改善及大脑海马区ACh、NE、DA、5-HT受体mRNA表达的影响,探究BXT对改善大鼠学习记忆能力的相关作用机制。方法 结合Y型水迷宫测试的大鼠逃避潜伏时间,通过注射D-半乳糖建立老龄大鼠模型;随后将动物分为老龄对照组、石杉碱甲组、壮年对照组、BXT低剂量组、BXT中剂量组、BXT高剂量组,按组别不同进行灌胃给药。连续给药6周后,再次通过Y型水迷宫测试大鼠学习记忆能力改善情况,检测ACh、NE、DA、5-HT受体mRNA及抗体的表达,观察海马区病理学变化,由此探究BXT对衰老大鼠学习记忆能力改善的分子机制。结果 与老龄对照组比较,在训练后24 h、48 h和96 h,各剂量BXT给药组均能明显缩短老龄大鼠逃避潜伏期。大鼠海马区组织HE染色显示,与老龄对照组相比,BXT高剂量组海马神经元损伤有所改善,但BXT中剂量组和低剂量组未见明显改善;免疫组化结果显示BXT高剂量组与老龄对照组相比,其椎体细胞染色数量多,排列紧密度好,细胞颜色较深。结论 本研究发现BXT能改善老龄大鼠学习记忆能力,尤其是高剂量BXT改善效果最为明显,可能与增加老龄模型大鼠海马CHRM1、DRD2、HTR1a、ADRA2a mRNA的表达有关。

关键词:半夏泻心汤;衰老;学习记忆;神经递质受体

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0055-07

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.012

人在自然衰老过程中,随着年龄的增长会出现记忆力减退、反应迟钝、认知功能下降等脑功能障碍症状。学习记忆是大脑的重要功能之一,而学习记忆的作用机制与中枢胆碱能神经系统、单胺类神经递质NE、DA、5-HT密切相关,它们之间相互制约且处于一种平衡状态^[1]。半夏泻心汤(BXT)源自张仲景《伤寒杂病论》,本方攻补兼施、升降并用,其辛开、苦降、甘补的组方配伍,一直以来是基础研究及临床应用的热点复方之一^[2]。在我们的前期研究中发现,BXT及其拆方可通过影响脾虚大鼠下丘脑中NE、DA、5-HT神经递质的水平,调节大鼠的脾胃功能^[3]。渡边雄泰^[4]等研究表明BXT对应激性溃疡不仅直接作用于消化系统,而且通过介导脑内情感系统的中枢抑制作用而发挥治疗效果。张忠等^[5]研究BXT及其拆方对应激性胃溃疡大鼠胆碱能神经元的影响,结果显示BXT全方组及各拆方组除作用于胃黏膜本身引起胃黏膜本身分泌改变之

外,还影响到脑的分泌功能。上述研究表明,BXT的作用机制与脑内的神经递质有一定的关系。此外,根据中医理论,BXT是辛开苦降的代表方剂,对梳理脾胃气机之升降,调节全身气机之运行,非常合乎老年人精气不足的体质特点,因此推测BXT对于抗衰老有一定的作用。本研究旨在分子水平上研究半夏泻心汤对衰老大鼠大脑海马区ACh、NE、DA、5-HT受体mRNA表达的影响,对其可能的作用机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SD大鼠120只,SPF级,雌性,体质量(400±20)g,15月龄。另取10只SD大鼠,SPF级,雌性,体质量(200±100)g,6月龄,作为壮年对照组。实验动物均由四川省中医药科学院实验动物中心提供,

收稿日期:2018-06-20

* 基金项目:Wnt5a/PCP信号通路对软骨分化调节机制的研究(No. 2015SZ0075)

作者简介:彭旭(1987—),男,实验师,研究方向:模式实验动物的开发.E-mail: pengxu87@126.com

通信作者:刘艳(1981—),女,助理研究员,研究方向:实验动物学.E-mail: 13804416@qq.com

生产许可证号:SCXK(川)2013-19;动物实验在四川大学实验动物中心完成,实验动物使用许可证号:SYXK(川)2015-185。

1.2 药品与试剂

根据《伤寒论》BXT 全方组成为半夏 12 g,干姜 9 g,黄芩 9 g,黄连 3 g,人参 9 g,炙甘草 9 g,大枣 4 枚。以上中药饮片均购于四川省中药饮片有限责任公司,大枣自配。用蒸馏水常规煎煮 2 次,加热浓缩成每 1 mL 提取液中含 1 g 生药,置 4 °C 冰箱储存备用。石杉碱甲片(河南太龙药业股份有限公司,批号:130904)使用前用 0.5% 羧甲基纤维素钠配成 0.3% 的溶液备用。D-半乳糖(上海金穗生物科技有限公司);Trizol(Ambion 公司)、逆转录试剂盒(Thermo);CHRM1、DRD2、HTR1a、ADRA2a 基因引物(成都宝信生物有限公司);一抗,二步法抗兔/鼠通用型免疫组化检测试剂盒[基因科技(上海)有限公司]。

1.3 仪器设备

MultiGene Optimax PCR 仪(Labnet);JY600C 电泳仪(北京君意东方电泳设备有限公司);超纯水系统(Milipore);显微镜及图像采集系统(Olympus);切片机(Leica);Autostainer 480 s 全自动免疫组化仪(Thermo);Y 型水迷宫(自制)。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠衰老模型建立:将 120 只 15 月龄大鼠进行 Y 型水迷宫测试,记录大鼠平均逃避潜伏期(从入水起点至寻找到阶梯出水的时间)和正确反应次数(以 10 s 内直接抵达平台为正确反应)^[6],每次测定时间为 2 min,2min 后仍未找到安全通道者以 120 s 计算。每只大鼠每天训练 2 次,共训练 2 d。获得性训练结束后,正式进行测试,每只鼠每天测试 1 次,共 3 d。

根据大鼠的逃避潜伏时间由高到低,筛选出学习记忆能力明显较弱的动物 50 只,随后在大鼠颈部皮下注射 D-半乳糖 125 mg/kg 体质量^[7],每天 1 次,连续给药 4 周。4 周后再次进行 Y 型水迷宫测试,未通过测试大鼠,即为老龄模型大鼠。

1.4.2 实验动物分组及给药:将老龄模型大鼠随机平均分为 5 组,根据治疗药物类型和剂量,分别为老龄对照组(生理盐水)、石杉碱甲组(作为药物治疗的阳性对照组)、BXT 高剂量组、BXT 中剂量组、BXT 小剂量组。另选 10 只 6 月龄正常大鼠作为壮年对照组。

BXT 组大鼠根据不同 BXT 剂量进行灌胃给药,BXT 高剂量组 10 mL/kg、中剂量组 5 mL/kg、低剂量组 2.5 mL/kg,石杉碱甲组 30 mg/kg 体质量,壮年对照组和老龄对照组灌胃生理盐水 10 mL/kg。大鼠每周测体质量一次,按体质量调整给药剂量,连续给药 6 周。

1.4.3 病理学及免疫组化检测:行为学检测结束后,各组大鼠放入 4% 异氟烷的诱导盒中进行诱导麻醉。大鼠进入麻醉状态后迅速取出,并行眼眶放血处死,打开头盖骨,迅速取出脑组织,于冰上剥离左侧大脑皮层和海马,置于 4% 多聚甲醛中固定。将脑组织块冠状位连续切片,片厚 5 μm。每隔 5 张取 1 张,每例动物相邻切片分为 3 套,每套各 5 张,选取其中一套进行常规 HE 染色,树脂封片,进行组织病理学检测。另一套采用 Envision 二步法进行免疫组织化学染色。

1.5 Real-time PCR 检测 Ach、NE、DA、5-TH 受体 mRNA 表达

根据 GenBank 的序列,用 Goldkey 软件分别设计 CHRM1、DRD2、HTR1a、ADRA2a 基因的引物。根据 RNA 提取试剂盒说明书提取 RNA,然后根据 Thermo 的逆转录试剂盒合成 cDNA,最后进行 PCR 扩增。引物序列如下:

CHRM1 上游引物 5'-ATACAGTCAAGAGGC CCACC-3';

下游引物 5'-AGGAACACAGTCCTTGCAGA-3', 产物长度 218 bp;

DRD2 上游引物 5'-AAACCCGGACCTCC CTTAAG-3';

下游引物 5'-AGAGGACTGGTGGATGTTG-3', 产物长度 113 bp;

HTR1a 上游引物 5'-ACCTCTCTGTTGCTG GGTAC-3';

下游引物 5'-CGATAAACAGGTCCGAGGTG-3', 产物长度 719 bp;

ADRA2a 上游引物 5'-TTGGCCTTGTCGCGAT ATTG-3';

下游引物 5'-CCAGGGGACAGTTACCAGTT-3', 产物长度 75 bp;

1.6 图像分析及数据处理

使用 Olympus 显微镜及图像采集系统对海马区 Ach、NE、DA、5-TH 受体阳性细胞进行采图。应用凝胶成像分析软件 Gel-Pro-analyzer4.0 分析受体和

内参 β -Actin 的灰度值,并用 GraphPad Prism 软件做柱状图进行比较。

2 结果

2.1 Y 型水迷宫检测各组大鼠学习记忆能力

造模后,老龄对照组大鼠在 Y 型水迷宫中的逃避潜伏期较壮年对照组明显延长;与老龄对照组比较,在训练后 24 h、48 h 和 96 h,各剂量 BXT 给药组均能明显缩短衰老大鼠逃避潜伏期,结果见图 1。

2.2 海马区病理形态学观察

对各组大鼠海马区组织进行 HE 染色,结果如图 2 所示。壮年对照组海马组织各区显示清晰,神经元细胞丰富,数量较多,排列整齐,细胞形态正常,核大而圆,核仁明显,可见少量小胶质细胞,神经纤维清晰;老龄对照组可见海马各区神经元细胞不同

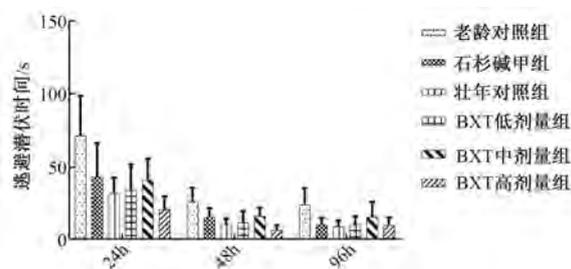


图 1 BXT 对大鼠逃避潜伏期的影响

Fig.1 Effect of BXT on escape latency of rats

程度减少,出现神经元萎缩(红色神经元),小胶质细胞增生、血管套以及噬神经现象;BXT 高剂量组和石杉碱甲组海马神经元损伤均有所改善,改善程度基本相同,但 BXT 中剂量组和低剂量组同老龄对照组相比未见明显改善。

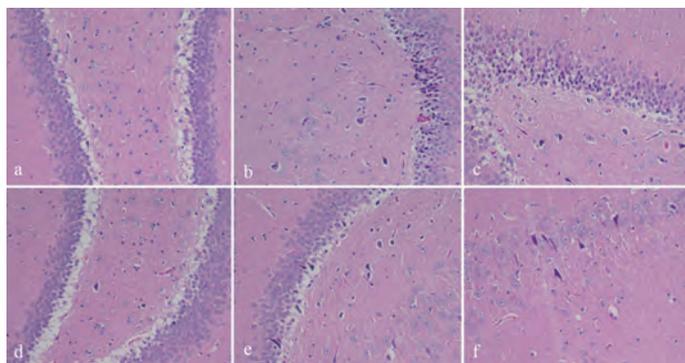


图 2 海马区 HE 染色观察 ($\times 200$)

注:a:老龄对照组;b:石杉碱甲组;c:壮年对照组;d:BXT 低剂量组;e:BXT 中剂量组;f:BXT 高剂量组

Fig.2 HE staining of hippocampus ($\times 200$)

Note:a:aging control group;b:huperzine A group;c:strong control group; d:BXT low dose group;e:BXT medium dose group;f:BXT high dose group

2.3 免疫组织化学染色结果

对大鼠海马区组织进行免疫组化染色,各组大鼠海马区 DRD2、CHRM1、HTR1 α 、ADRA2 α 的表达和分布情况如图 3~6 所示。椎体细胞的细胞膜和细胞质内出现了深棕色的阳性细胞染色反应,而椎体细胞周围未见其他细胞有着色。从形态结构看,壮年对照组海马区椎体细胞染色数量多且颜色深,排列紧密整齐,层次结构明显;老龄对照组海马区椎体细胞染色数量少且颜色很浅,排列疏松,细胞间隙较大,层次结构不明显;BXT 高剂量组和石杉碱甲组椎体细胞染色数量和颜色以及排列紧密度介于壮年对照组和老龄对照组之间,对受体的表达有明显的增强作用,结构层次也有改善,这说明高剂量 BXT

对海马区的损伤有一定的保护作用,保护程度与石杉碱甲组类似,但中剂量组和低剂量组椎体细胞的阳性反应程度与老龄对照组相比未见明显差异。

2.4 BXT 对大鼠海马区 CHRM1、DRD2、HTR1 α 、ADRA2 α mRNA 表达的影响

mRNA 表达结果显示,BXT 低剂量组和中剂量组的 CHRM1、DRD2、ADRA2 α mRNA 相对表达量均低于大剂量组,而 HTR1 α mRNA 相对表达量在 BXT 各组中表达量差异不明显;壮年对照组的 CHRM1、DRD2、HTR1 α 、ADRA2 α mRNA 相对表达量均高于其余五组,而老龄对照组偏低,尤其在 CHRM1 和 HTR1 α mRNA 表达量上显著低于其它组。见图 7 和图 8。

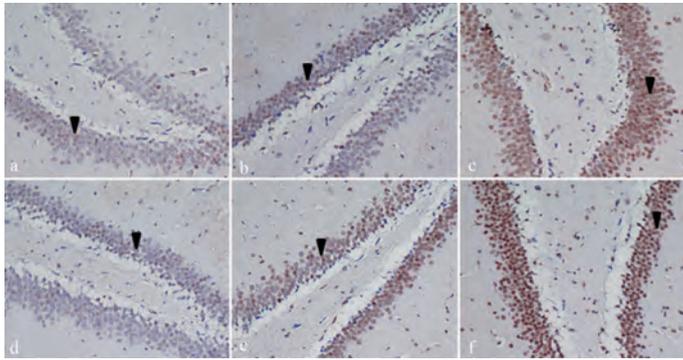


图 3 海马区 DRA2 表达情况 (深棕色, ×200)

注: a: 老龄对照组; b: 石杉碱甲组; c: 壮年对照组; d: BXT 低剂量组; e: BXT 中剂量组; f: BXT 高剂量组

Fig.3 Expression of DRA2 in hippocampus

(dark brown, ×200)

Note: a: Aging control group; b: Huperzine A group; c: Strong control group; d: BXT low dose group; e: BXT medium dose group; f: BXT high dose group

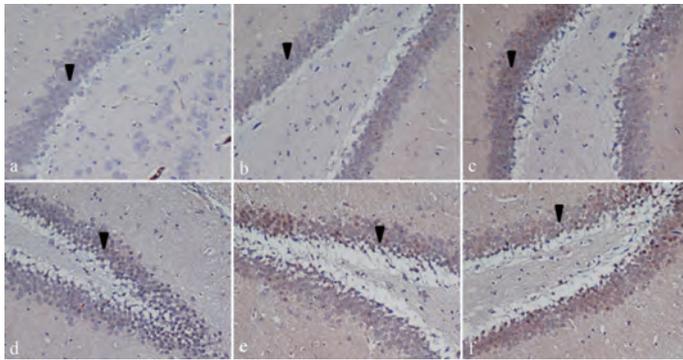


图 4 海马区 CHRM1 表达情况 (×200)

注: a: 老龄对照组; b: 石杉碱甲组; c: 壮年对照组; d: BXT 低剂量组; e: BXT 中剂量组; f: BXT 高剂量组

Fig.4 Expression of CHRM1 in hippocampus (×200)

Note: a: Aging control group; b: Huperzine A group; c: Strong control group; d: BXT low dose group; e: BXT medium dose group; f: BXT high dose group

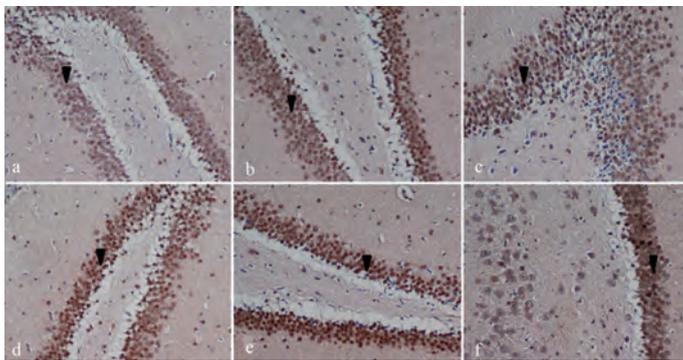


图 5 海马区 ADRA2α 表达情况 (×200)

注: a: 老龄对照组; b: 石杉碱甲组; c: 壮年对照组; d: BXT 低剂量组; e: BXT 中剂量组; f: BXT 高剂量组

Fig.5 Expression of ADRA2α in hippocampus

(dark brown, ×200)

Note: a: Aging control group; b: Huperzine A group; c: Strong control group; d: BXT low dose group; e: BXT medium dose group; f: BXT high dose group

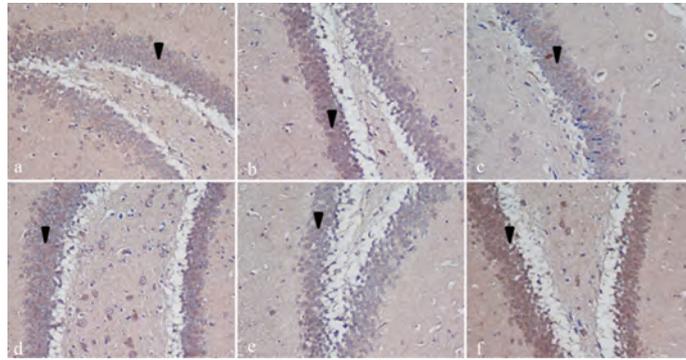


图 6 海马区 HTR1 α 表达情况 ($\times 200$)

注:a:老龄对照组;b:石杉碱甲组;c:壮年对照组;d:BXT 低剂量组;e:BXT 中剂量组;f:BXT 高剂量组

Fig.6 Expression of HTR1 α in hippocampus ($\times 200$)

Note:a;Aging control group;b;Huperzine A group;c;Strong control group; d;BXT low dose group;e;BXT medium dose group;f;BXT high dose group

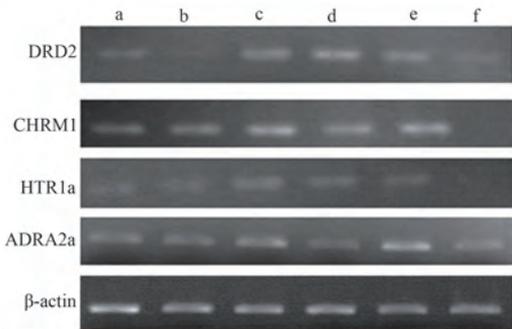


图 7 海马区 DRD2、CHRM1、HTR1 α 、ADRA2 α mRNA 表达的影响

注:a:BXT 低剂量组;b:BXT 中剂量组;c:BXT 高剂量组;d:石杉碱甲组;e:壮年对照组;f:老龄对照组

Fig.7 Expression of DRD2、CHRM1、HTR1 α 、ADRA2 α mRNA in hippocampus

Note: a;BXT low dose group; b;BXT medium dose group; c;BXT high dose group;d; Huperzine A group; e; Strong control group;f: Aging control group

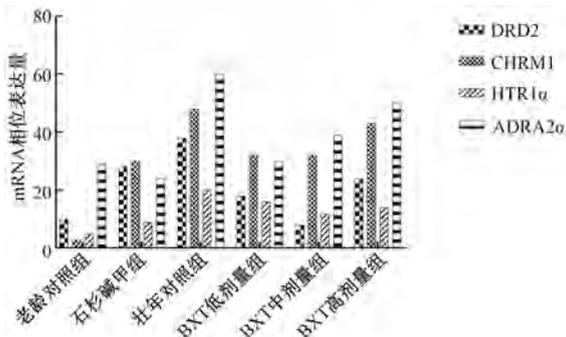


图 8 海马区 DRD2、CHRM1、HTR1 α 、ADRA2 α mRNA 相对表达量

Fig.8 Relative expression of DRD2、CHRM1、HTR1 α 、ADRA2 α mRNA in hippocampus

3 讨论

哺乳动物随着年龄的增加,海马区的形态结构、功能以及一些相关蛋白质分子发生改变,被认为是海马功能衰退的基础。在本次实验中通过大鼠行为学试验,我们发现经高剂量 BXT 治疗过的老年大鼠能够明显缩短逃避潜伏期,与老龄对照组相比,差异极显著($P < 0.01$)。HE 染色和免疫组化染色结果都显示,BXT 大剂量组的海马区受损的神经元也有所改善。这提示 BXT 对老年鼠的海马区受损部位有一定程度的改善作用。

NE 在记忆保持方面起重要作用,而改善记忆与促进 DA 的释放有关,5-HT 则与精神活动、感觉体温调节、高级认知功能有关。当机体逐渐衰老后,脑内单胺类神经递质亦发生代谢紊乱,表现为 NE、DA 和 5-HT 含量下降,其含量下降是造成学习记忆能力减退的重要原因^[6,8]。陈乔等用放射自显影方法研究表明,老年大鼠大脑皮质及海马部位 CHRM1 密度显著低于壮年对照鼠,并提出这 3 个脑区 CHRM1 受体密度的降低可能是衰老时学习、记忆、联想、认知等功能障碍的重要机制之一^[9]。Wilkerson and Levin^[10] 研究发现,腹侧海马注入 DRD2 激动剂可提高大鼠工作记忆的能力,相反注入 DRD2 受体拮抗剂则降低工作记忆的能力,故提示了 DRD2 参与记忆功能。梁发权和吕宝璋^[11] 采用放射性配基结合分析法发现老年大鼠(36 月龄)大脑皮质中 5-HT 受体的数目较成年大鼠(3 月龄)明显减少,提示老年鼠中枢 5-HT 系统的功能降低,

可能与老年期的一些表现如记忆力衰退、睡眠障碍有关。本实验观察到,模型组的 CHRM1、DRD2、HTR1 α 、ADRA2 α mRNA 表达明显弱于壮年组,甚至出现一些无表达现象,这与其他学者的研究结果是一致的,衰老时会出现中枢学习、记忆力以及认知等功能的下降,这与大脑海马区 Ach、NE、DA、5-TH 受体 mRNA 表达下降的现象有密切关系。

石杉碱甲是一种强效的可逆性胆碱酯酶抑制剂,并可增强大鼠海马 CA1 锥体神经元的兴奋性突触传递,其增强突触传递作用与 M 型乙酰胆碱受体激动有关^[12]。BXT 高剂量组与石杉碱甲组的 CHRM1、DRD2、ADRA2 α mRNA 表达趋于一致性,这说明高剂量 BXT 对海马区的损伤有一定的保护作用,保护程度与石杉碱甲组类似。另外,有研究报告表明胆碱酯酶抑制剂通过 M1 型胆碱能受体能够使行为大鼠 CA1 区的长时程增强^[13-14]。在我们之前的研究中发现,半夏泻心汤给药组可明显上调脑组织胆碱能受体 M1 的表达^[15-16],故我们推测 BXT 抗衰老的作用机制与 CHRM1、DRD2、HTR1 α 、ADRA2 α 基因表达有关,BXT 可以激活其 mRNA 的表达,从而对衰老大鼠脑组织中 Ach、NE、DA、5-TH 起到一定的调节作用。由于中药的作用是多靶点、多效应作用的结果,因此在接下来的工作中还要再进一步对 BXT 参与机体抗衰老的作用机制进行研究。

参 考 文 献

[1] 厚华刚,库保善.胆碱系统和其他神经递质/调质系统在学习记忆中的作用及相互作用[J].包头医学院学报,1998,14(3):79-81.

[2] 崔丽君,张艳,郑志娟,等.近六十年半夏泻心汤相关研究文献分析[J].西部中医药,2015,28(7):43-46.

[3] 张吉仲,李利民,黄利,等.半夏泻心汤及其拆方对脾虚大鼠下丘脑中多巴胺、去甲肾上腺素和 5-羟色胺的影响[J].华西药理学杂志,2014,29(3):286-288.

[4] 渡边泰雄,李璟,刘力,等.半夏泻心汤对水浸拘束诱发大鼠胃溃疡的抑制作用及对脑和胃的单胺调节.汉方最新治疗[J].1997,6(2):167-172.

[5] 张忠,司银楚,吴海霞,等.半夏泻心汤及其拆方对应激性胃溃疡大鼠胆碱能神经元的影响[J].中国中医基础医学杂志,2005,11(4):283-287.

[6] Li Y K. Experimental methodology of TCM pharmacology [M]. Shanghai: Shanghai science and Technology Publishing House, 1986:174.

[7] 朱亚珍,朱虹光.D-半乳糖致衰老动物模型的建立及其检测方法[J].复旦学报(医学版),2007,34(4):617-619.

[8] 龚国清,徐赓本.小鼠衰老模型研究[J].中国药科大学学报,1991,22(2):101-103.

[9] 陈乔,李征峰,李青,等.六味地黄丸对老年大鼠学习记忆及脑内 M1 胆碱受体阳性神经元的影响[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(3):205-208.

[10] Wilkerson A, Levin E D. Ventral hippocampal dopamine D1 and D2 systems and spatial working memory in rats[J]. Neuroscience, 1999, 89(3):743-749.

[11] 梁发权,吕宝璋.大鼠脑中 5-HT 受体的检定及其在衰老时的变化[J].中国应用生理学杂志,1991(2):113-116.

[12] 吴小未,王邦安,王萌芽.石杉碱甲增强大鼠海马脑片 CA1 锥体神经元的兴奋性突触传递[J].中国临床药理学与治疗学,2012,17(10):1091-1097.

[13] Doralp S, Leung L S. Cholinergic modulation of hippocampal CA1 basal-dendritic long-term potentiation [J]. Neurobiol Learn Mem, 2008, 90(2):382-388.

[14] 赵乔,焦守怒,王钜.阿尔茨海默病动物模型和治疗的相关进展[J].实验动物科学,2009,26(3):39-45.

[15] 李利民,宁楠,刘洁,等.半夏泻心汤对衰老大鼠学习记忆能力及乙酰胆碱酯酶的影响[J].中药药理与临床,2015,(4):9-11.

[16] 白杨,辛随成.阿尔兹海默病动物模型的研究进展[J].实验动物科学,2013,30(6):61-65.

Improvement of Learning and Memory Ability of BXT on Aging Rats and it's Molecular Mechanism

PENG Xu, ZHANG Xiaomei, HE Xueling, LIU Yan

(Laboratory Animal Center Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective Using D-galactose-induced aging rats as animal model to study the effect of Banxia Xiexin Decoction (BXT) on aged rat's learning and memory ability and the expression of Ach, NE, DA, 5-HT receptor mRNA in the hippocampus of the brain, explore the mechanism of BXT to improve the aged rat's learning and memory ability. **Method** According to Rat escape latency by Y water maze test, and D-galactose injection to establish aging rat model; Then the animals divided into Aging control group, Huperzine A group, Strong control group, BXT low dose group, BXT medium dose group, BXT high dose group, intragastric administration by different group. After 6 weeks of treatment, the learning and memory abilities of rats were tested by Y-type water maze again, and detect NE, DA, 5-HT receptor mRNA and antibody expression, observe the pathologic changes of hippocampus, therefore explore the molecular mechanism of BXT on aging rat's learning and memory ability.

Result The mean escape latency in the Y-type water maze test was shortened in BXT-treated group. The HE staining of the hippocampus showed that the damage of the hippocampus neurons in the high dose BXT group was improved compared with the model control group, but there was no significant improvement in the immunohistochemical result in medium and low dose BXT group. The result of immunohistochemistry showed that the BXT high dose group had more chromosomes than the model control group, and the cells were darker.

Conclusion This study found that BXT can improve aging rat's learning and memory ability, especially the high-dose BXT group. The possible mechanism is to increase the aging model hippocampus expression of CHRM1, DRD2, HTR1a, ADRA2a mRNA.

Key words: Banxia Xiexin Decoction; aging; learning ability; neurotransmitter receptor

(上接第 54 页)

Study on Antitumor Effect of Recombinant Human Interferon Endothelial Peptide Fusion Protein

LIU Heyu¹, WANG Ying², LIU Jinhui¹, JIANG Yuanyuan², HUANG Yan², LI Huicheng¹

(1. Harbin Pharmaceutical Group Bioengineering Co., Ltd, Harbin 150020, china)

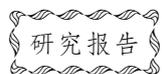
(2. Harbin Pharmaceutical Group R&D Center, Harbin. 150020, China)

Abstract: Objective To investigate the antitumor effect of I30 peptide, and to provide experimental result for the further development of I30 peptide. **Method** Using NIH mouse, 4 mice were injected intraperitoneally with H₂₂ tumor strain, and all mice were sacrificed at 1 week, and ascites was extracted. Another 40 mice were injected with 0.2 mL ascitic fluid, and the cell concentration was 1×10^6 个/mL. At 4 h after inoculation mice were treated in different groups. The mice were divided into 4 groups randomly, IFN group, subcutaneous injection of interferon 9×10^5 IU/mL; I30 high dose group, subcutaneous injection of 80 μ g/I30; I30 low dose group, subcutaneous injection of 30 μ g/I30; negative control group, subcutaneous injection of normal saline. Mice were continuous administrated for 16 d. After 2 h, all animals were sacrificed, and the subcutaneous tumor mass was dissected.

Result The treatment group had obvious therapeutic effect, and the difference was significant ($P < 0.05$).

Conclusion I30 has anti-tumor effect.

Key words: Interferon; Endothelial peptide; Fusion protein; anti-tumor



不同功率 532 nm 激光诱导棕色挪威大鼠脉络膜新生血管模型的实验研究*

孟梁¹ 梁凤鸣² 王莉² 黎红梅² 张欣桐²

(1. 天津市滨海新区中医医院, 天津 300340) (2. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300391)

摘要:目的 采用 532 nm 激光的不同功率诱导棕色挪威大鼠脉络膜新生血管模型,以探求成模率最高的激光功率。方法 将 45 只棕色挪威大鼠随机分为 3 个实验组,每组 15 只,激光功率依次为 400 mW、300 mW、200 mW,光斑直径 100 μm ,曝光时间 100 ms,每眼光凝 10~12 个点。对各实验组大鼠激光造模后的第 1 周、2 周、3 周、4 周行眼底彩照、荧光素血管造影和光学相干断层扫描,对实验数据进行统计。结果 眼底彩照可见激光诱导后的视网膜因玻璃膜的破坏呈现水肿状态;荧光血管造影显示功率 200 mW 的激光与 300 mW、400 mW 的激光诱导后第 1~4 周的渗漏率对比,差异有统计学意义($P<0.05$);功率为 300 mW 和 400 mW 在第 1、3 周时,其渗漏率差异无统计学意义($P>0.05$),第 2、4 周对比渗漏率有统计学意义($P<0.05$);功率为 200 mW 的激光诱导第 1、2 周的渗漏率差异无统计学意义($P>0.05$),而第 1、3 周和第 2、3 周的渗漏率差异有统计学意义($P<0.05$),功率为 300 mW 和 400 mW 激光诱导第 1、2、3 周的渗漏率两两对比差异有统计学意义($P<0.05$),3 组功率在第 3、4 周的渗漏率对比,差异均无统计学意义($P>0.05$)。光学相干断层扫描显示视网膜破坏后结果紊乱,然后诱发脉络膜新生血管形成,最终趋于稳定,部分视网膜结构萎缩变薄。结论 200 mW、300 mW、400 mW 的 532 nm 激光均可以诱导棕色挪威大鼠形成脉络膜新生血管模型,其中 300 mW 的成模率最高,脉络膜新生血管于 1 周后开始形成,第 3 周达到高峰,第 4 周趋于稳定。

关键词:脉络膜新生血管;532 nm 激光;激光功率;棕色挪威大鼠

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0062-06

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.013

脉络膜新生血管(choroidal neovascularization, CNV)是视网膜-脉络膜毛细血管复合体,其生成与(或)破裂是导致眼底渗出、出血的关键,也就是直接导致患者视力下降、视物变形、视野缺损的直接原因。因此各种造成脉络膜新生血管生成与破裂的相关疾病,如湿性黄斑变性,中心性渗出性脉络膜视网膜病变,高度近视性视网膜病变等,已成为人群致盲的主要原因之一^[1]。现阶段国内外对于激光诱导棕色挪威大鼠(Brown Norway, BN)产生 CNV 的机理已达成共识。唐坤用 532 nm 激光,功率 160~170 mW,光斑直径 50 μm ,曝光时间 0.1 s,围绕视盘约 2~3 个 PD 光凝 BN 大鼠,每眼 6~8 个点,证实 532 激光诱导 BN 大鼠 CNV 动物模型,且 CNV 模型

于 21 d 达到成熟^[2]。张舒阳等通过 532 nm 激光对 BN 大鼠造模,在曝光时间 0.1 s,光斑直径 100 μm 条件下,功率分别选择 100 mW、200 mW、300 mW,证实激光功率在 300 mW 时 CNV 成模率最高;CNV 形成面积、中央厚度最大,是激光诱导 BN 大鼠 CNV 模型较为理想的激光功率^[3]。任秉仪等通过 532 nm 激光对 40 只 BN 大鼠进行试验,每两个血管弓之间光凝 1~2 个激光斑,证实大鼠造模后 1 个激光斑比 2 个激光斑的成模率高^[4]。通过 532 nm 激光造模的实验研究,存在不同功率的选择,我们拟通过实验探讨不同功率激光诱导 BN 脉络膜新生血管模型的成功率,旨在选择合适的激光功率以提高 BN 大鼠的成模率。

收稿日期:

* 基金项目:国家自然科学基金(No.81373694)

作者简介:孟梁(1991—),女,硕士研究生,研究方向:中西医结合治疗眼底病.E-mail: 774961744@qq.com

通信作者:梁凤鸣(1966—),男,博士研究生,研究方面:中西医结合治疗眼底病.E-mail: liangfm66@163.com

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性棕色挪威大鼠 (BN) 45 只, 9~11 周龄, 体质量 200~250 g, 由北京维通利华实验动物有限公司提供, 生产许可证号: SCXK(京)2012-0001, 使用许可证号: SYXK(津)2014-0002。

1.2 实验仪器及药品

盐酸丙美卡因滴眼液 (商品名爱尔凯因, S. A. ALCON-COUVREUR N.V. 比利时) 用以表面麻醉, 复方托吡卡胺滴眼液 (沈阳兴齐眼药股份有限公司) 以散瞳; 1% 戊巴比妥钠 (上海泰瑞尔生物技术有限公司) 以腹腔麻醉; 10% 荧光素钠注射液 (广西梧州制药股份有限公司) 用于眼底荧光血管造影检查; 眼底彩照造影机 (日本 kowa) 用于拍摄眼底彩照和荧光素眼底血管造影术 (fluorescein fundus angiography, FFA) 检查; 光学相干断层扫描仪 (Optical coherence tomography, OCT) (海德堡) 以观察视网膜结构; 532 nm 绿光激光机 (法国光太) 用以不同功率激光进行造模。

1.3 CNV 造模及检查方法

动物实验通过了单位伦理委员会或管理委员会审批后, 对 45 只 BN 大鼠行双眼检查, 前节和眼底检查均未见明显异常, 在实验室喂养 1 周, 后随机将其分为 3 组, 每组 15 只, 激光功率依次为 400 mW、300 mW、200 mW。进行造模前, BN 大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠 (4 mL/kg 体质量) 进行麻醉, 均选择

表 1 不同功率激光同一时间 BN 大鼠的存活数量的组间比较

Table 1 Comparison of the survival numbers of BN rats at different power lasers at the same time

功率/mW	只数/只	1 周	2 周	3 周	4 周	存活率/%
Power/mW	Numbers	1week	2weeks	3weeks	4weeks	Survival rate/%
200	15	15	15	14	12	80.00
300	15	15	14	13	12	80.00
400	15	14	13	10	7	46.67

2.2 眼底彩照结果

通过 532 nm 激光破坏了正常的视网膜结构, 导致视网膜缺血缺氧, 诱发激光斑周围视网膜水肿, 呈灰白色, 实验结果如图 1。

2.3 FFA 检查结果

FFA 检查前, 对 BN 大鼠进行腹腔及表面麻醉、散瞳, 步骤同激光造模, 后予以腹腔注射 10% 的荧光素钠 (0.5 mL/kg), 用眼底彩照造影机进行检查。

2.3.1 同一时间段的不同功率激光光凝渗漏率的

左眼表面麻醉和散瞳后, 用不同功率的激光, 光斑直径 100 μm , 曝光时间 100 ms, 每眼光凝 10~12 个点, 光凝后视网膜以有气泡产生或轻度出血为准。

各实验组大鼠激光造模后的第 1 周、2 周、3 周、4 周行眼底彩照、荧光素血管造影 (fundus fluorescein angiography, FFA) 和光学相干断层扫描 (Optical Coherence Tomography, OCT)。FFA 显示光斑渗漏则表示造模成功, 并对激光斑渗漏部位进行分级, 标准如下^[2]: I 级, 注射荧光素 500~600 s 后, 眼底未见荧光素渗漏; II 级, 注射荧光素 500~600 s 后, 眼底存在轻度荧光素渗漏; III 级, 注射荧光素 500~600 s 后, 眼底存在中度荧光素渗漏; IV 级, 注射荧光素 500~600 s 后, 眼底可见大量荧光素渗漏。

1.4 统计方法

采用 SPSS19 软件, 对实验数据进行分析, 单向有序资料用秩和检验, 构成比用卡方检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 BN 大鼠存活情况

本实验采用 3 个不同功率的 532 nm 激光分别对 15 只 BN 进行造模研究, 从实验为期 4 周时间的存活率来看, 200 mW 和 300 mW 实验组的 BN 大鼠均有不同程度的死亡, 但是总的存活率维持着 80%, 而 400 mW 的实验组只有 46.67% 的存活率, 考虑与激光功率太大造成大鼠死亡率上升有关。

组间比较, 结果如下:

同一时间段的不同功率激光光凝渗漏率的组间比较, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。从实验数据分析来看同一时间段功率 200 mW 的与 300 mW 和 400 mW 渗漏率比较均有统计学意义 ($P < 0.05$), 说明 200 mW 的激光能量相对较小, 导致的荧光渗漏率都较低, 成模率相对较低, 而 300 mW 和 400 mW 相对比 200 mW 导致荧光渗漏率较高, 成模率较高; 功率为 300 mW 和 400 mW 在第 1、

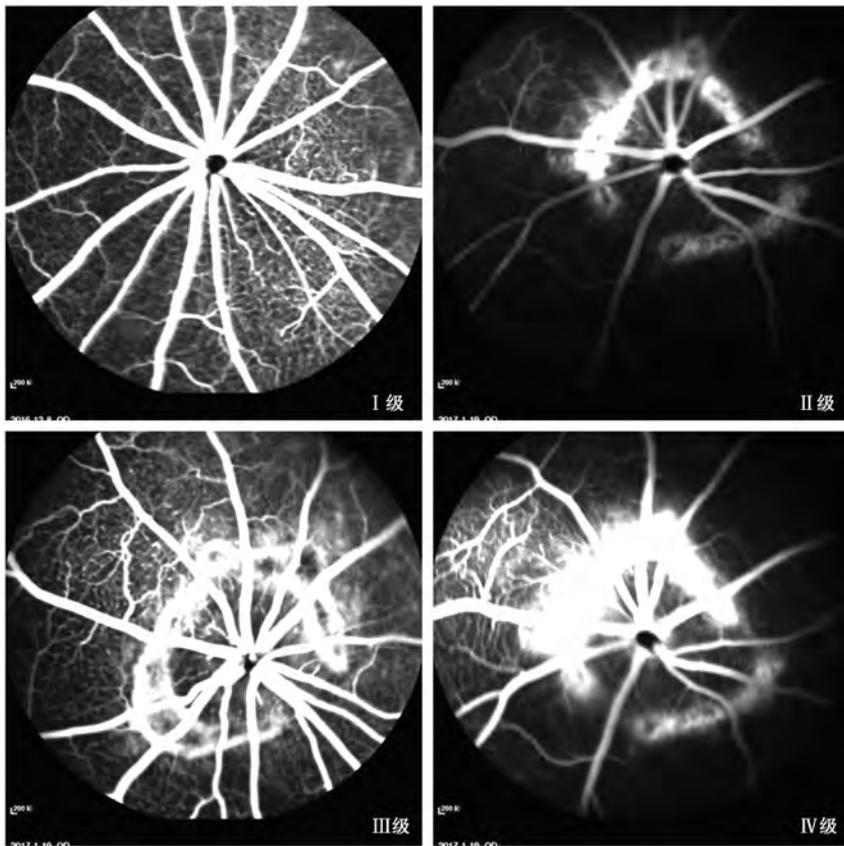


图 1 不同级别的荧光渗漏图

注: I 级:眼底未见荧光素渗漏; II 级:眼底存在轻度荧光素渗漏; III 级:眼底存在中度荧光素渗漏; IV 级:眼底可见大量荧光素渗漏

Fig.1 Different levels of fluorescence leakage

Note: I degree: non-fluorescein leakage; II degree: a little fluorescein leakage; III degree: moderate fluorescein leakage; IV degree: lager amount of fluorescein leakage

表 2 同一时间段的不同功率激光光凝渗漏率的组间比较

Table 2 Comparison between groups of different power laser about fluorescein leakage at the same time period

时间/周	功率/mW	光斑总数	I 级	II 级	III 级	IV 级	P
Time/week	Power/mW	Number of spots	I degree	II degree	III degree	IV degree	
1	200	180	87	76	17	0	0.000
	300	180	64	78	38	0 ^a	
	400	168	56	76	34	2 ^a	
2	200	170	74	68	26	2	0.000
	300	165	36	58	48	13 ^a	
	400	136	32	26	52	26 ^{ab}	
3	200	158	52	56	38	12	0.000
	300	148	12	22	46	68 ^a	
	400	108	8	25	32	43 ^a	
4	200	142	39	55	40	8	0.000
	300	130	11	30	36	53 ^a	
	400	76	2	12	21	41 ^{ab}	

注: 资料为单向有序资料, 同一功率组内总体比较用 Kruskal-Wallis H 检验; 组内两两比较用秩和检验。同一时间的不同激光功率光凝渗漏率的比较: 200 和 300 mW、200 和 400 mW 比较, ^aP<0.05; 300 和 400 mW 比较, ^bP<0.05

Note: The data is one-way ordered data. The overall comparison between the same power group is performed by Kruskal-Wallis H test; the two groups are compared by signed-rank test. Comparison between groups of different power laser about fluorescein leakage at the same time period: 200/300 mW、200/400 mW, ^aP<0.05; 300/400 mW, ^bP<0.05

3 周时,其渗漏率差异无统计学意义($P>0.05$),说明第 1、3 周时,两组的成模率无差异,第 2、4 周对比渗漏率有统计学意义($P<0.05$),第 2、4 周时两组的成模率有差异。而且从光斑数量可以看出 400 mW 的功率造模后,光斑大面积融合,甚至导致 BN 大鼠眼底出血或者后期死亡,所以实验数据中有效数据随着时间的变化在不断减少,可能与 400 mW 的激光能量太大有关,所以功率为 300 mW 的激光造模是最佳选择。

2.3.2 同一功率的激光在不同时间段光凝渗漏率比较,如下:

同一功率的激光在不同时间段光凝渗漏率的组内比较,差异有统计学意义($P<0.05$),见表 3。根据实验数据统计,200 mW 的激光功率,第 1 周和第

3 周、第 1 周和第 4 周、第 2 周和第 3 周、第 2 周和第 4 周比较,其造模的渗漏率差异有统计学意义($P<0.05$),而第 1 周和第 2 周、第 3 周和第 4 周,其造模的渗漏率差异无统计学意义($P>0.05$),可能为第 1、2 周因为功率太小,造成的眼底渗漏率变化不大,于第 3 周开始增加,逐渐到高峰,第 4 周维持在稳定状态;功率为 300 mW 和 400 mW 的激光功率进行造模,除第 3 周和第 4 周对比,其造模的渗漏率差异无统计学意义($P>0.05$),其余时间两两对比,其造模的渗漏率差异有统计学意义($P<0.05$),说明随着时间的推移,其眼底渗漏率在逐渐增加,第 3 周到达高峰并于第 4 周维持稳定,证实 532 nm 激光诱导眼底 CNV 的形成在第 3 周达到高峰,并在第 4 周维持稳定状态。

表 3 同一功率的激光在不同时间段光凝渗漏率的组内比较

Table 3 Comparison of fluorescein leakage rates of the same power laser at different time periods

功率/mW Power/mW	时间/周 Time/week	光斑总数 Number of spots	有渗漏 fluorescein leakage	无渗漏 Non-fluorescein leakage	渗漏率% Rates/%	<i>P</i>
200	1	180	93	87	51.67	0.000
	2	170	96	74	56.47	
	3	158	106	52	67.09 ^{ab}	
	4	142	103	39	72.54 ^{ab}	
300	1	180	116	64	64.44	0.000
	2	165	129	36	78.18 ^a	
	3	148	136	12	91.89 ^{ab}	
	4	130	119	11	91.54 ^{ab}	
400	1	168	112	56	66.67	0.000
	2	136	104	32	76.47 ^a	
	3	108	100	8	92.59 ^{ab}	
	4	76	74	2	97.37 ^{ab}	

注:资料为单向有序资料,同行×列的卡方检验。同一功率不同时间段荧光渗漏率的比较:第 1 周和第 2、3、4 周比较,^a $P<0.05$;第 2 周和第 3、4 周比较,^b $P<0.05$

Note: The data is one-way ordered data, the two groups are compared by chi-square test. Comparison of fluorescein leakage rates of the same power laser at different time periods: 1/2、1/3、1/4,^a $P<0.05$; 2/3、2/4,^b $P<0.05$

2.4 OCT 检查结果

OCT 显示:200 mW 的激光光凝后第 1、2 周 OCT 检查见光凝区视网膜神经上皮层开始断裂,呈现“凹”字改变;光凝后第 3 周见光凝区神经上皮层结构层次不清,呈白色高反射,从脉络膜突破 RPE 层进入神经上皮层,提示 CNV 已形成;光凝后第 4 周光凝区神经上皮层呈多层高反射信号,CNV 呈进展期。300 mW 的激光光凝后第 1 周 OCT 检查见光凝区视网膜神经上皮层断裂,呈现“凹”字改变;光凝后第 2 周见光凝区神经上皮层较前增厚,结构层次不清,呈白色高反射,从脉络膜突破 RPE 层进入神经上皮层,提示 CNV 已形成;光凝后第 3 周光凝

区神经上皮层明显增厚,呈多层高反射信号,CNV 达到高峰;光凝后第 4 周 OCT 显示视网膜结构与第 3 周相比无明显变化,CNV 达到稳定期。400 mW 的激光光凝后第 1 周 OCT 检查见光凝区视网膜神经上皮层断裂,部分神经上皮层较前增厚,呈白色高反射,光凝后第 2、3 周前期光凝区神经上皮层明显增厚,呈多层高反射信号,CNV 达到高峰,而光凝后第 3 周后期及第 4 周部分视网膜已经萎缩变薄。从 CNV 的形成时间来看,200 mW 组于第 4 周形成 CNV,而 300 mW 和 400 mW 组于第 3 周形成 CNV,但是 300 mW 组的 CNV 在第 4 周维持 CNV 的形态利于观察 CNV 的形态,而 400 mW 组第 4 周时神经

上皮层开始萎缩,不利于实验观察,考虑 200 mW 的能量相对较小,导致 CNV 的成模时间较晚,而 400 mW 的能量太大,造成了视网膜的损伤,所以还是 300 mW 的功率适合 CNV 的造模。任秉仪、Li、Fukuchi、Kim 等的研究结果也证实 OCT 可以观察 CNV 的动态进展^[4-7]。

3 讨论

因为 BN 大鼠的脉络膜组织与人的脉络膜结构相似,均含有大量的色素细胞,都可吸收大量光能量,造成视网膜和脉络膜的损伤,从而诱导 CNV 的形成。以及 BN 大鼠取材方便,存活率高,而且成熟周期短,成本较低,因此 BN 大鼠成为临床实验中 CNV 造模的主要动物来源^[8-11]。激光光凝可对老鼠视网膜光凝区产生热效应、光化学效应及器质性损伤效应。激光效应主要是因为激光的光能凝聚到视网膜上,冲破 Bruch 膜,到达 RPE 层及脉络膜细胞层面,周围细胞内的蛋白质结构遭到破坏,进而毛细血管的管壁通透性增加,血管内血浆及血细胞渗出,导致激光斑周围的视网膜缺血缺氧,诱导脉络膜滋生新生血管,最终形成 CNV。

从 FFA 实验数据可以看出,功率为 200 mW 激光的造模渗漏率明显低于 300 mW 和 400 mW,考虑 200 mW 的功率相对较小,对视网膜的损伤相对较小,所以诱导 CNV 的成模率较低;而 400 mW 的功率太大,造成 BN 大鼠死亡率太高。且从渗漏率可以看出,激光造模的成模率在第 3 周达到高峰,随后维持稳定,所以功率为 300 mW 的激光造模是最佳选择。张舒阳等也通过 532 nm 激光,功率分别选择 100 mW、200 mW、300 mW,证实激光功率在 300 mW 时 CNV 成模率最高,是激光诱导 BN 大鼠 CNV 模型较为理想的激光功率^[3]。

根据 OCT 对 CNV 的形态学观察所示,200 mW 的激光诱导的 CNV 于第 3 周开始形成,第 4 周呈上升趋势,逐渐增多,后期达到稳定期;300 mW 的激光诱导的 CNV 于第 2 周开始形成,第 3 周达到高峰,第 4 周趋于稳定;400 mW 的激光诱导的 CNV 于第 1 周后期形成,于第 2~3 周达到高峰,3~4 周趋于稳定,第 4 周后期部分视网膜因结构破坏而萎缩变薄,这一结果同 FFA 观察结果。唐坤、李学晶及王鑫等通过 532 nm 激光诱导 BN 大鼠 CNV 动物模型,进行切片、染色观察组织形态学的改变,也证实

了 CNV 模型于第 3 周达到成熟,第 4 周趋于稳定^[2,12-13],本实验通过观察 BN 大鼠的 FFA 和 OCT 的表现图也得出相关结论,而切片和染色相对 FFA 和 OCT 更为复杂,所以可以通过观察 FFA 和 OCT 的形态学变化对造模成果与否进行评估,可以节约实验成本并增强实验的可操作性。

综上所述,波长 532 nm、光斑直径 100 μm 、曝光时间 100 ms、每眼光凝 10~12 个点,功率为 300 mW 的激光诱导 BN 大鼠的成模率最高,且稳定性最好,值得进一步推广。

参考文献

- [1] Campa C, Costagliola C, Incorvaia C, *et al.* Inflammatory Mediators and Angiogenic Factors in Choroidal Neovascularization: Pathogenetic Interactions and Therapeutic Implications, *Mediators of Inflammation*, vol. 2010, Article ID 546826, 14 pages, 2010. doi:10.1155/2010/546826.
- [2] 唐坤. MIL60 治疗激光诱导 BN 大鼠脉络膜新生血管的实验研究[D].北京:中国人民解放军医学院,2014.
- [3] 张舒阳,刘颖,陈珂,等. Nd:YAG 激光诱导棕色挪威大鼠脉络膜新生血管模型的建立与评价[J].眼科新进展,2016,04:318-322.
- [4] 任秉仪,刘安,郑永征,等. 532nm 激光诱导棕色挪威大鼠脉络膜新生血管模型的研究与评价[J].上海医学,2013,04:358-360+269.
- [5] Li Q, Timmers A M, Hunter K, *et al.* Noninvasive imaging by optical coherence tomography to monitor retinal degeneration in the mouse [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2001, **42**(1):2981-2989.
- [6] Fukuchi T, Takahashi K, Shou K, *et al.* Optical coherence tomography (OCT) findings in normal retina and laser-induced choroidal neovascularization in rats [J]. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 2001, **239**(1):41-46.
- [7] Kim S G, Lee S C, Seong Y S, *et al.* Choroidal neovascularization characteristics and its size in optical coherence tomography [J]. *Yonsei Med J*, 2003, **44**(5):821-827.
- [8] Olson J L, Courtney R J, Mandava N. Intravitreal infliximab and choroidal neovascularization in an animal model [J]. *Arch Ophthalmol*, 2007, **125**(9):1221-1224.
- [9] 赵世红,何守志. 氩激光诱导的大鼠脉络膜新生血管模型研究[J].中华眼科杂志,2003,39(5):298-302.
- [10] 史雪辉,何守志,赵世红等. 色素上皮衍生因子在大鼠脉络膜新生血管中的表达及意义[J].中华眼科杂志,2004,40(6):404-408.
- [11] Fu Y, Ponce M L, Thill M, *et al.* Angiogenesis inhibition and choroidal neovascularization suppression by sustained delivery of an integrin antagonist EMD478761 [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2007, **48**(11):5184-5190.

[12] 李学晶,唐由之,王慧娟,等. 脉络膜新生血管动物模型的建立与评估[J]. 国际眼科杂志,2009,2:246-249.

[13] 王鑫. 实验性脉络膜新生血管中 Rap1 及相关因子表达的研究[D]. 石家庄:河北医科大学,2015.

Experimental Study of Choroidal Neovascularization in Brown Norway Rats Induced by 532 nm Laser at Different Power

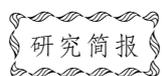
MENG Liang¹, LIANG Fengming², WANG Li², LI Hongmei², ZHANG Xintong²

(1. Binhai New Area Traditional Chinese Medicine Hospital, Tianjin 300340, China)

(2. First Teaching Hospital of Tianjin University of TCM, Tianjin 30039, China)

Abstract: Objective To induce the choroidal neovascularization model of Brown Norwegian rats with different power of 532 nm laser, we would explore the highest fluorescein leakage rate by the best laser power. **Method** Forty-five Norwegian rats were randomly divided into three experimental groups: 15 rats in each group. The laser power were 400 mW, 300 mW, 200 mW, the spot diameter was 100 μm , the exposure time was 100 ms, and each eye was lasered 10~12 points. The experimental datas were collected from the 1st~4th week after lasering Brown Norway. The experimental datas were statistically analyzed by fundus fluorescein angiography and optical coherence tomography. **Result** The retina of the fundus showed that the retina had edema due to the destruction of the vitreous membrane after fluorescence induction. FFA showed that the the leakage rate of the laser power of 200 mW compared with 300 mW and 400 mW at the 1st to 4th was statistically significant ($P < 0.05$). Compared 300 mW with 400 mW laser power, the leakage rate at the 1st and 3rd week was no statistically significant ($P > 0.05$), and the leakage rate at the 2nd and 4th weeks was statistically significant ($P < 0.05$). There was no significant difference in the leakage rate between the 1st and 2nd week of 200 mW laser power ($P > 0.05$). But there was significant difference between the 1st and 3rd week of 200 mW laser power ($P < 0.05$). It was significant difference between the 2nd and 3rd week of 200 mW laser power ($P < 0.05$). The leakage rates induced by 300 mW and 400 mW laser power were statistically significant at the 1st, 2nd and 3rd weeks ($P < 0.05$). The leakage rates of the three groups were no statistical significance at the 3rd and 4th weeks ($P > 0.05$). Optical coherence tomography showed retinal was disordered, then retinal begained to form choroidal neovascularization. The choroidal neovascularization was ultimately stabilized, and part of the retinal structure atrophy thinning. **Conclusion** 200 mW, 300 mW and 400 mW laser power of 532 nm laser can induce the formation of choroidal neovascularization model by Brown Norway. The formation rate of 300 mW laser power is the highest. The choroidal neovascularization begins to occur after the 1st week, reaching the peak in the 3rd week, and the choroidal neovascularization tends to be stable at the 4th week.

Key words: choroidal neovascularization; 532 nm laser; laser power; Brown Norway



哺乳期小鼠人工喂养初探*

程如越¹ 何方¹ 石磊² 李鸣¹

(1. 四川大学华西公共卫生学院, 成都 610041) (2. 四川大学华西医院临床营养科, 成都 610041)

摘要:目的 探索哺乳期小鼠的人工喂养方法,为进一步研究小鼠的营养需要与生长发育奠定基础。方法 5只孕龄10~12 d的SPF级近交系BALB/c孕鼠正常饲养至自然分娩,将3日龄27只新生小鼠随机分为人工喂养组和母乳喂养组,并分别哺乳至14日龄。结果 从3日龄到10日龄,人工喂养组小鼠生存率达100%,11日龄为92.9%,12日龄为78.6%,13日龄为50%,14日龄为35.7%,共5只人工喂养组小鼠成功地喂养至14日龄。但10日龄时,人工喂养组小鼠体质量显著低于母乳喂养组(3.02 ± 0.67 vs 9.00 ± 0.70 , $P < 0.01$)。结论 本实验采用自制的喂养乳头和小鼠人工乳在一定程度上实现了小鼠的人工喂养,但还需进一步探索提高哺乳期内人工喂养小鼠的生存率及增加体质量的方法。

关键词:小鼠;人工喂养;母乳喂养

中图分类号: Q95-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0068-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.014

新生动物的人工喂养是研究生命早期营养调控、生长发育的重要前提^[1]。大、小鼠是实验动物中常用的重要的品种,成功的大小鼠人工喂养模型是营养、代谢、免疫等研究领域的重要基础。在Reyniers等首次建立了无菌大鼠后^[1],Gustafsson、Pleasant等也建立了无菌大鼠^[2-3]。Messer等在1969年首次采用在大鼠胃中安置胃管的方法进行人工喂养^[4],而Hall在1975年改进了这一方法,并成功建立了大鼠人工喂养的模型^[5]。

相比之下,关于小鼠的人工喂养则起步较晚。近年来学者开始研究小鼠的人工喂养。West、Beierie等采用自制的喂养乳头实现了哺乳期内小鼠的人工喂养^[6-7]。Zeng等参考Hall的大鼠胃造瘘的方法在新生小鼠胃中安置胃管,并喂养至14日龄^[8]。尽管已有学者报道了哺乳期小鼠的人工喂养方法以及人工乳的配制,但由于新生小鼠的食管细小脆弱,哺乳工具难以制得,人工乳配方不适合等使得哺乳期小鼠的人工喂养方法仍需改进。为此,本研究的目的是通过总结前人的经验并进一步探索哺乳期小鼠人工喂养的方法,以期为后续的研究提供方法与思路。

1 材料与方法

1.1 材料

实验动物及饲养:5只SPF级近交系BALB/c孕鼠,孕龄10~12 d,购自四川省成都市达硕实验动物有限公司[许可证号:SCKY(川)2015-030]。BALB/c孕鼠均饲养于四川大学华西公共卫生学院实验动物中心[实验动物使用许可证号:SYXK(川)2013-011]IVC塑料笼中待产,由于孕鼠的营养需要较普通鼠高,故给予繁殖饲料^[9],自由摄食与饮水。环境温度:(24 ± 1)℃,湿度:(55 ± 10)%。

BALB/c孕鼠自然分娩所得新生小鼠,待其3日龄时,随机分为母乳喂养组(maternal rearing, MR)和人工喂养组(artificial rearing, AR)。MR组小鼠由母鼠带仔,饲养环境同母鼠。AR组小鼠由人工饲养,给予人工乳,环境温度:(32 ± 1)℃,随日龄增加每天降低1℃,直至26~28℃;湿度:70%~80%,随着日龄增加逐渐降低至50%。

收稿日期:2018-07-21

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(No.81372982)

作者简介:程如越(1993—),女,硕士研究生,研究方向:营养与食品卫生.E-mail:522139039@qq.com

通信作者:何方(1961—),教授,博士生导师,研究方向:肠道菌群与疾病.E-mail:hfl8602880124@163.com

1.2 实验方法

1.2.1 人工乳的配制:人工乳的配制参考了 BALB/c 鼠乳, Smart 等、Yajima 等采用的人工乳配方^[10-11], 由市售婴儿配方奶粉、乳清蛋白粉和中链甘油三酯(medium chain triglyceride, MCT)粉配制而成(见表 1)。

表 1 小鼠人工乳组成及营养水平

Table 1 Composition and nutrient levels of basal diets

营养素 Nutrients	含量 Content(g/100 mL)
蛋白质 Protein	9.4
-乳清蛋白 Whey protein	7.47
-水解乳清蛋白 Hydrolyzed whey protein	1.93
碳水化合物 Carbohydrate	7.3(无乳糖)
脂肪 Fat	16
-中链甘油三酯 MCT	12.97
-亚油酸 Linoleic acid	0.5
- α -亚麻酸 α -Linolenic acid	0.06
-二十二碳六烯酸 Docosahexaenoic acid	0.0054
-花生四烯酸 Arachidonic acid	0.0054
能量 Energy(kcal/100 ml)	211

1.2.2 人工乳头的制作:人工乳头以市售鱼肝油胶囊的外壳为原材料改造而成。该外壳遇水即变软,可保护小鼠口腔。制作方法:首先将外壳尖端剪开一小口,挤出鱼肝油;然后将 1 mL 注射器的针筒与灌胃针相接,吸取 30~40 °C 保温的人工乳,灌入胶囊外壳。这样便制成了一个简易的人工乳头。经试验,一个外壳可装 0.3 mL 的人工乳。

1.2.3 喂养方案:5 只孕鼠共分娩 27 只小鼠,将 3 日龄的所有小鼠随机分为 MR 组 13 只和 AR 组 14 只(见表 2)。MR 组由各自的母鼠哺乳,不做其他干预。AR 组采用自制的人工乳和人工乳头哺乳,一天 4 次,分别于 09:00, 12:00, 14:00, 16:00 时喂养。每天一只小鼠总的哺乳量为体质量的 20%,根据实际情况调整。哺乳过程是先挤一滴乳汁滴在小鼠嘴唇上,诱导其张口,后将外壳尖端送入小鼠口中,随吞咽动作轻轻挤压乳头底部,使小鼠吮吸乳汁并吞咽入胃。从 3 日龄开始每日称体质量并记录至 10 日龄,在 14 日龄时终止研究,在观察小鼠精神状态、体质量、生长发育、活动能力、排便、毛色等情况后,解剖受试小鼠,观察小鼠脏器的发育情况。

1.3 统计学方法

实验数据采用均值 \pm 标准差表示,并采用统计软件 SPSS 19.0 分析。两组间比较采用 Student's-t

检验;多组间比较采用方差分析,两两比较采用 Dunnett-t 检验。均为双侧概率检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

表 2 实验分组

Table 2 Pups grouped into AR and MR

乳鼠 Lactating mice	组名(编号) Group
1-1	AR1
1-2	AR2
1-3	MR1
2-1	AR3
2-2	AR4
2-3	MR2
2-4	MR3
3-1	AR5
3-2	MR4
4-1	AR6
4-2	AR7
4-3	AR8
4-4	AR9
4-5	AR10
4-6	MR5
4-7	MR6
4-8	MR7
4-9	MR8
4-10	MR9
5-1	AR11
5-2	AR12
5-3	AR13
5-4	AR14
5-5	MR10
5-6	MR11
5-7	MR12
5-8	MR13

注:小鼠编号指在喂养时的编号(1-1 表示孕鼠 1 号分娩的 1 号小鼠)

Note: The lactating mice No. refers to the No. at the time of rearing (1-1 indicates the pup No.1 delivered to the mother No.1).

2 结果

2.1 AR 组小鼠的生存率

本实验采用自制的喂养乳头和小鼠人工乳实现了哺乳期 BALB/c 小鼠的人工喂养。本实验共喂养 14 只 3 日龄小鼠,5 只小鼠成功喂养至 14 日龄。AR 组小鼠从 3 日龄到 10 日龄,生存率达 100%,11 日龄生存率为 92.9%,12 日龄为 78.6%,13 日龄为 50%,14 日龄为 35.7%。3~14 日龄哺乳期内 MR 组小鼠全部存活。

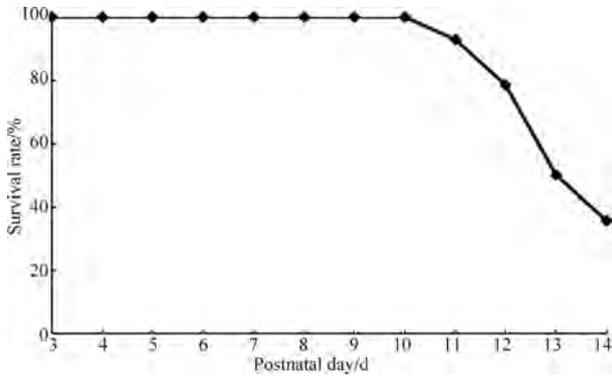


图 1 3~14 日龄内 AR 组小鼠的生存率曲线

Fig.1 Survival rate curves of 3 to 14 days of AR mice

2.2 喂养期间内两组小鼠体质量及其他指标的变化

AR 组和 MR 组小鼠在开始人工喂养时体质量无明显差异 (3.89 ± 0.87 vs 3.26 ± 0.32 , AR vs MR; $P > 0.05$)。4 日龄时, AR 组体质量低于 MR 组 (3.74 ± 0.83 vs 4.39 ± 0.42 , AR vs MR; $P < 0.05$)。到 10 日龄时, AR 组体质量仍低于 MR 组 (3.02 ± 0.67 vs 9.00 ± 0.70 , AR vs MR; $P < 0.01$)。AR 组喂养期间内体质量未增长,呈缓慢下降趋势,而 MR 组喂养期间内体质量持续增长。

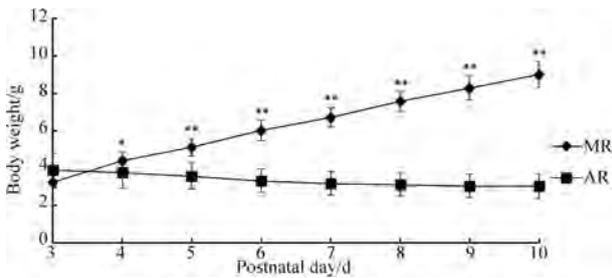


图 2 MR 组和 AR 组小鼠 3~10 日龄内的生长曲线

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Fig.2 The growth curves of the mice in the MR and AR groups during 3 to 10 days

Note: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

除体质量外, AR 组和 MR 组在长须、立耳、长牙、被毛、睁眼的日龄基本一致,但 AR 组睁眼的小鼠只有 2~3 只, MR 组全部睁眼(见表 3)。另外, AR 组小鼠的精神状态、活动能力与 MR 组相比均较差;粪便较黏稠(见图 3),但无腹泻、便秘等胃肠道不适症状;解剖死亡小鼠发现胃肠道有明显胀气,并充满整个腹部(见图 4);但毛色均为白色,系正常发育。

表 3 MR 组和 AR 组小鼠生长发育等情况(天)

Table 3 Growth and development of AR and MR mice(d)

组别 Groups	长须 beards	立耳 ears	长牙 teeth	被毛 hair	睁眼 eyes
MR	1~2	2~3	6~8	8~10	12~14
AR	1~2	2~3	7~9	9~11	13~15



图 3 AR 组小鼠粪便情况

Fig.3 Fecal condition of mice in AR group

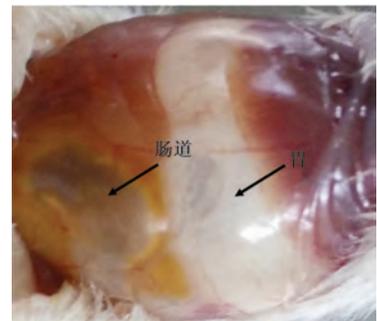


图 4 AR 组小鼠胃肠道胀气

Fig.4 Gastrointestinal flatulence of mice in AR group

3 讨论

正常生长发育的小鼠, 21 日龄左右断乳。睁眼后, 即 13~14 日龄, 可开始进食固体饲料, 后哺乳量逐渐下降, 直至完全断乳。哺乳期小鼠生长发育迅速, 对营养要求较高, 营养不良会影响体格、智能发育以及导致各种疾病的发生。本实验的目的是探索 14 日龄小鼠的人工喂养方法。本次实验通过采用自制的人工乳和人工乳头喂养 14 只自然分娩后 3 日龄的新生小鼠, 到 14 日龄时存活 5 只, 存活率为 35.7%, 在一定程度上实现了哺乳期小鼠的人工喂养, 为今后的研究打下了良好的基础并取得了珍贵的经验。

本次实验主要观察了哺乳期小鼠的生存率和体质量。生存率是评价小鼠在哺乳期内生存状况的重要指标,而体质量是衡量生长发育和营养状况的主要指标。本次实验中,小鼠从10日龄后生存率逐渐下降,到14日龄时为35.7%,与多数报道差距较大。最终存活至14日龄的5只小鼠中,3日龄时体质量均大于4g;而在14日龄前死亡的9只小鼠中,其中8只3日龄时的体质量小于4g。由此我们推测开始AR时的小鼠体质量可能影响AR组小鼠在喂养期间的生存率。Hoshiba也提到出生体质量越大的小鼠越易喂养^[12]。而4~10日龄内AR组小鼠体质量不增反减,低于MR组,差异有统计学意义。体质量的降低是生存率下降的重要因素。

我们推测本次实验中AR组小鼠人工乳营养组分不合理及哺乳量不足可能是导致其体质量降低,生存率下降的主要原因。本实验的人工乳是根据Yajima等的小鼠人工乳配方改进而来。Hussein等采用Yajima的配方实现了小鼠的人工喂养^[13]。同时该配方能量及三大营养素的含量及供能与BALB/c鼠乳接近。本次实验AR组小鼠在喂养期间内未出现腹泻、便秘、恶心、呕吐等胃肠道不适症状,但有明显的胃肠道胀气。涂新明等提到人工乳中的酪蛋白是必需的,可使人工乳到胃中并凝固,如果不含酪蛋白,人工乳到胃中后,很快排到肠道,充满肠管,导致消化不良^[14]。Yajima等也提出人工乳中酪蛋白和乳清蛋白的比例与大鼠肠道发育有关,坚硬的酪蛋白凝块可能是肠道黏膜肥大的重要因素^[15]。Kanno等提到如果小鼠奶中的酪蛋白和乳清蛋白比例为6:4时,其胃内乳凝块比较柔软,形态和质地与母乳类似^[16]。此次实验中自制的人工乳不含酪蛋白,推测这可能与小鼠胃肠道胀气有关。关于哺乳量的不足,主要由喂养方法与喂养频率所决定。喂养方法包括强饲法和吸吮法,两种方法均能成功哺育小鼠。本次实验采用的是吸吮法,即靠小鼠自己吸吮,而非强饲法。许多学者认为吸吮法给小鼠喂的人工乳太少而不提倡该法。涂新明等、易萍还提出吸吮法耗时长,小鼠可因吸入空气造成胃肠道胀气和呛咳,而采用了灌胃强饲法^[14,17]。王建国、仇慧敏则认为灌胃强饲法容易损伤小鼠食道上皮,甚至插破胃管致死,所以需要较高的技术经验。而吮吸是小鼠的本能反应,刚出生就会吮吸,只要耐心细致地调节人工乳的黏稠度、流速、饲喂姿势、小鼠的自身状态等便可达到每日的哺乳

量^[18-19]。Hoshiba采用自制的人工乳头和吸吮法,使1日龄的ICR小鼠成功喂养至14日龄,生存率达86.7%。Yasuda等也采用经Hoshiba自制的人工乳头改造而来的喂养装置进行人工喂养,使3日龄的小鼠全部存活至14日龄^[20]。本次实验中由于实验条件的限制,未能在夜间哺乳。两次喂养的时间间隔较短,往往是上一次喂养的人工乳还没消化完就要进行下一次的哺乳。小鼠没有足够的时间对人工乳进行消化,易导致腹胀及喂养量的下降,这样便形成了恶性循环,难以达到小鼠每日的计划哺乳量,导致体质量下降,生长发育迟缓,生存率降低。

本实验采用自制的喂养乳头和小鼠人工乳实现了哺乳期BALB/c小鼠的人工喂养,35.7%的人工喂养小鼠成功地存活至目标的14日龄。但哺乳期内AR组小鼠体质量低于MR组,其主要原因可能是人工乳营养水平不合理及哺乳量不足。故如何提高哺乳期内人工喂养小鼠的生存率及增加体质量还需进一步探索。

参 考 文 献

- [1] Reyniers J A, Trexier P C, Ervin R F. Rearing germfree albino rats[M]. *Lobund Rept*, 1946, **1**: 1-26.
- [2] Gustafsson B E. Germ-free rearing of rats[J]. *Acta pathologica et microbiologica Scandinavica; Supplement*, 1948, **73**: 1-130.
- [3] Pleasants J R. Rearing germfree cesarean-born rats, mice, and rabbits through weaning [J]. *Annals New York Academy of Sciences*, 1959, **78**: 116-126.
- [4] Messer M, Thoman E B, Terrasa A G, et al. Artificial feeding of infant rats by continuous gastric infusion [J]. *Journal of Nutrition*, 1969, **98**: 404-410.
- [5] Hall W G. Weaning and Growth of Artificially Reared Rats [J]. *Science*, 1975, **190**: 1313-1315.
- [6] West J R. Use of pup-in-a-cup model to study brain development [J]. *Journal of Nutrition*, 1993, **123**: 382-385.
- [7] Beierle E A, Chen M K, Hartwich J E, et al. Artificial rearing of mouse pups: development of a mouse pup in a cup model [J]. *Pediatric Research*, 2004, **56**(2): 250-255.
- [8] Zeng B, Yuan J, Li W, et al. The Effect of Artificial Rearing on Gut Microbiota in a Mouse Pup-in-a-Cup Model [J]. *Experimental Animals*, 2012, **61**(4): 453-460.
- [9] 刘甦苏, 陈昱凯, 吴敬红, 等. 两种不同商品饲料对BALB/c小鼠生长和繁殖性能的影响 [J]. *实验动物科学与管理*, 2006, **23**(2): 19-21.
- [10] Smart J L, Stepkens D N, Tonkiss J, et al. Growth and development of rats artificially reared on different milk-substitutes [J]. *British Journal of Nutrition*, 1984, **52**: 221-231.

- [11] Yajima M, Kanno T, Yajima T. A chemically derived milk substitute that is compatible with mouse milk for artificial rearing of mouse pups[J]. *Experimental Animals*, 2006, **55**: 391-397.
- [12] Hoshiba J. Method for hand-feeding mouse pups with nursing bottles[J]. *Contemporary Topics by the American Association for Laboratory Animal Science*, 2004, **43**(3): 50-53.
- [13] Hussein N, Fedorova I, Moriguchi T, *et al.* Artificial Rearing of Infant Mice Leads to n-3 Fatty Acid Deficiency in Cardiac Neural and Peripheral Tissues[J]. *Lipids*, 2009, **44**(8): 685-702.
- [14] 涂新明, 寿克让, 高虹, 等. 无菌小鼠的人工哺乳培育[J]. *中国实验动物学报*, 1999, **7**(1): 55-60.
- [15] Yajima T, Kanno T, Katoku Y, *et al.* Gut Hypertrophy in Response to the Ratios of Casein and Whey Protein in Milk Formulas in Artificially Reared Rat Pups[J]. *Biology of the Neonate*, 1998, **74**: 314-322.
- [16] Kanno T, Koyanagi N, Katoku Y, *et al.* Simplified preparation of a refined milk formula comparable to rat's milk: Influence of the formula on development of the gut and brain in artificially reared rat pups [J]. *Journal of the Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 1997, **24**(3): 242-252.
- [17] 易萍. 无菌大鼠模型的建立及相关生物学特性研究[D]. 浙江大学, 2013.
- [18] 王建国. 无菌大鼠的人工培育及相关实验研究[D]. 浙江大学, 2006.
- [19] 仇慧敏. 无菌大鼠的人工培育及生物学特性的测定及仙台病毒胶体金免疫层析方法的建立[D]. 中国医学科学院 & 北京协和医学院医学实验动物研究所, 2011.
- [20] Yasuda H, Harauma A, Kato M, *et al.* Artificially reared mice exhibit anxiety-like behavior in adulthood [J]. *Experimental Animals*, 2016, **65**(3): 267-274.

Preliminary Study on Artificial Rearing of Lactating Mice

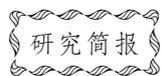
CHENG Ruyue¹, HE Fang¹, SHI Lei², LI Ming¹

(1. West China School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

(2. Department of Clinical Nutrition, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective This study aimed at developing a new experimental model for the artificially rearing of neonatal mice to lay the foundation for further study of the nutritional needs and growth of mice. **Method** Five pregnant BALB/c mice of 10—12 gestation days were kept until deliver. Total 27 neonatal mice were immediately randomized into two groups at postnatal day 3, one for maternal rearing and another for artificial rearing to postnatal day 14. **Result** 100% of the artificial rearing mice survived at 10 days, 92.9% at 11 days, 78.6% at 12 days, 50% and 35.7% at 13 days and 14 days, respectively. However, significant differences of body weight were found between the maternal reared mice and the artificial reared mice at postnatal day 10 (3.02 ± 0.67 vs. 9.00 ± 0.70 , $P < 0.01$). **Conclusion** The new formula and nipple at least successfully achieved the artificial rearing of neonatal mice to some extent, however, further study was needed to improve the survival rate and increase the body mass of artificially fed mice during lactation.

Key words: mice; artificial rearing; maternal rearing



高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪肝模型简介及技术要点探讨*

朱潇旭 段小花 王春霞 秦本单 张超

(云南中医学院民族医药学院,昆明 650500)

摘要: 饮食因素是导致非酒精性脂肪肝发生的最主要的环境因素。高脂饮食诱导非酒精性脂肪肝大鼠模型具有贴近临床、模型稳定的特点,故被广泛运用于非酒精性脂肪肝的研究中。本文简要介绍了非酒精性脂肪肝诱导模型中常用的大鼠脂肪肝模型,并探讨了制作高脂饮食诱导大鼠非酒精性脂肪肝模型的技术要点及体会。

关键词: 高脂饮食;非酒精性脂肪肝;大鼠模型

中图分类号: Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0073-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.015

非酒精性脂肪肝(non-alcoholic fatty liver disease,简称NAFLD)临床高发,正在迅速发展成为一个人类健康问题,经流行病学统计,普通成人的患病率为27%~33%,肥胖症患者的发病率则高达75%~92%^[1]。在我国北京、上海、广州、深圳等发达地区及城市NAFLD发病率达15%^[2],并呈低龄化趋势发展^[3]。为了进一步揭示非酒精性脂肪肝的发病机理,并为临床治疗提供有确切疗效的治疗方法和作用机制研究,充分利用动物模型成为NALFD研究的主要选择。因此,需要建立具有合理性、稳定性的病理动物模型,为NALFD的相关研究提供保障。

理想的NALFD动物模型应该达到的基本要求是能正确反映人NALFD的肝组织病理学和病理生理学特征^[4];模型需要具有一定病变发展过程、成型率高,死亡率低,且可重复性良好、造模方法简便易行的特点。目前,非酒精性脂肪肝动物模型主要分为五类:营养型脂肪肝模型、药物中毒引起的损伤型脂肪肝模型、由特殊基因导致的特定种系动物的脂肪肝模型、复合型模型以及根据中医证型分类的模型。其中营养型脂肪肝模型因为与人NALFD具有相似的致病因素和发病过程,所以认可度最高,是使用最为广泛的动物模型。

1 实验动物的选择

非酒精性脂肪肝是指除酒精及其他明确的损肝因素外,导致的脂肪在肝脏大量堆积,形成以弥漫性肝细胞大泡性脂肪变性为主要病变特征的临床病理综合征^[5]。营养型脂肪肝模型的造模思路是为实验动物提供过高能量的饲料,导致其营养过剩,机体无法完全吸收和利用,从而发生脂类在肝脏囤积,形成脂肪肝。

现用于建立营养型脂肪肝模型的动物种类主要有啮齿类动物、实验兔、鸡、鸭、猪等。因为啮齿类动物价格适中、易于购买、种源充足,能满足生理学、病理学、药代动力学、免疫组化和分子生物学等研究的要求,所以被大量研究使用。此外,在高达98%的大鼠基因与人类基因同源性的基础上,还具有旺盛的生命力和较强的抗感染力等诸多优点,使得大鼠被广泛运用于营养、代谢性疾病研究^[6]。李巍等^[7]用长爪沙鼠、大鼠和小鼠建立了NAFLD模型并进行了机制研究,发现这些模型在肝功能、脂质代谢和氧化应激等方面有所不同,其中大鼠模型形成了稳定的局灶性脂肪肝炎并伴有高脂血症。

经大量的临床调查、研究发现,男性的NALFD发生率超过了女性^[8-11],例如在深圳地区每三位

收稿日期:2018-05-27

* 基金项目:云南省傣医药与彝医药重点实验室(No.2017DG006)

作者简介:朱潇旭(1992—),女,研究生,研究方向:民族医学.E-mail:zhuxiaoxu19@163.com

通信作者:张超(1959—),男,主任医师,硕士生导师,研究方向:中医学、民族医学.E-mail:zhangc19@21cn.com

NALFD 患者中有两位为男性^[12]。为贴近临床、结合实际,所以营养型脂肪肝模型多选用雄性大鼠。

国内使用率较高的大鼠是 SD 大鼠和 Wistar 大鼠。随着微卫星(microsatellite & STRs)DNA 多态性分析方法的运用,商海涛等^[13]分析了北京和上海 2 个单位、王立辛等^[14]分析了辽宁 2 个单位的 Wistar 和 SD 大鼠封闭群的遗传质量,得出封闭群内部遗传多样性较好,群间遗传差异较大的结论。SD 大鼠 1925 年由 Wistar 大鼠培育而成,较 wistar 大鼠适应力和抗病能力更强。所以,我们选择健康的青壮年 SD 雄性大鼠进行 NALFD 的模型建造。

此外,动物在实验前血液中胆固醇 TC、甘油三酯 TG 的含量与构建模型是否成功密切相关,所以实验所用的大鼠血液中 TC、TG 的含量异常者予以排除,尽可能减少个体差异与实验误差。

因此,为了使动物模型贴近 NALFD 临床致病过程,满足生理学、病理学、药代动力学、免疫组化和分子生物学等的研究要求,并充分考虑患病率的性别差异,我们最终选择排除血液中 TC、TG 的含量异常的健康青壮年 SD 雄性大鼠,建造 NALFD 的模型。

2 营养型脂肪肝模型的建模方法

营养型脂肪肝模型建模方法较多,主要有高脂饮食法、高脂乳剂灌胃法、高糖饮食法、玉米油注射法和胆碱-蛋氨酸缺乏法等。

2.1 高脂饮食法

高脂饮食喂养主要是将油脂和胆固醇等混合物添加到大鼠的基础饲料中,进行喂养,大鼠自由摄食饮水,模型复制成功率可以达 100%^[15],但实验周期较高脂乳剂灌胃法稍长。高脂饮食法可以形成经典的 NAFLD 模型并伴有肥胖、高代谢综合征等表现。虽然该法形成肝脏纤维化和炎症的程度较轻,但可广泛运用于 NAFLD 的机制研究和药物的筛选干预实验。

2.2 高脂乳剂灌胃法

高脂乳剂灌胃法是将猪油、胆酸、胆固醇、吐温 80 和丙二醇等按比例混合后对大鼠进行灌胃。大鼠自由摄食饮水,饲料为普通基础饲料。大鼠死亡率为 2%,模型构建成功率达 98%^[16-17]。该试验方法需要每天进行灌胃,操作较为繁琐,若操作不当会导致大鼠窒息死亡。若造模同时予以药物治疗,且

给药方式仍为灌胃,则大大增加了大鼠的负担,易导致实验误差。

2.3 高糖饮食法

高糖饮食法是用蔗糖与基础饲料混合而成的高糖饲料对大鼠进行喂养,实验过程中大鼠自由摄食饮水^[18]。苏琳和刘玉兰^[19]将高脂饮食和高糖饮食建立 NALFD 大鼠模型进行对比,发现高脂组的脂肪浸润程度比高糖组的更显著,胰岛素抵抗(HOMA-IR)指数也更高。

2.4 其他建模方法

玉米油注射法^[20]现较少运用。胆碱-蛋氨酸缺乏(MCD)法优势在于造模时间短,但实验动物体质量下降显著,喂养 4 周后体质量降低 35%,且代谢特点与人非酒精性脂肪肝不同^[21]。后经苏冬梅等、张慧芹等^[22-23]研究发现 MCD 饮食法造模的原理主要是由于缺乏必需营养成分——蛋氨酸胆碱,导致肝细胞营养代谢障碍,TG 等脂质物质大量堆积在肝腺泡 1 区的细胞内,从而引起肝细胞脂肪性变、炎症坏死等损伤,所以用 MCD 法造模得到的脂肪肝是以腺泡 1 区肝损伤为先为重的。这与高脂饮食诱导等其他动物模型所表现的以腺泡 3 区炎症坏死为主不同^[24-25]。

经过上述比较,我们选择用高脂饮食法进行 NAFLD 大鼠的建模。

3 营养型脂肪肝动物模型中高脂饲料的选择与制作

通过调查研究得知,目前高脂饲料的制作方式主要为自行制作或请厂家代为加工。两种方式都以提供确定的高脂饲料配方为前提。现常用的高脂饲料配方为基础饲料与添加物(如:猪油、玉米油、鸡蛋、蛋黄粉、胆固醇、胆盐等)充分混合,经搅拌后压制成圆柱状颗粒,进行真空包装并于 -20℃ 保存。经过前期对比实验研究发现,加入过量高脂成分的饲料会出现松脆、易碎等问题,导致大鼠厌食,从而直接影响造模进程。较为成熟的高脂饲料配方主要为基础饲料加入猪油(10%~15%)和胆固醇(1%~2%),其中脂肪供能比例的不同是各个配方的主要区别^[26]。部分改良的高脂饲料中添加胆盐和丙基硫氧嘧啶,以此促进机体对胆固醇的吸收,并抑制胆固醇转化为胆汁酸,增加胆固醇含量^[27]。缺点是过

量的胆固醇会导致大鼠腹泻^[15],不利于实验。我们选用 79%基础饲料,将 10%猪油、10%鸡蛋和 1%胆固醇作为高脂饲料添加物。

4 营养型脂肪肝动物模型造模成功的标志或参考标准

现公认的营养型脂肪肝动物模型造模成功标志包括:肝脏湿重增加、体积明显增大。肝脏经肉眼观察可见,表面的包膜紧张,肝叶锋利的边缘消失,肝脏颜色变浅、整体发黄合并斑点状花纹,部分大鼠肝脏因局灶性脂肪沉积会出现浅黄色的斑块。触摸时其硬度接近泥块,并有油性感觉。参考临床 NAFLD 的血液生化参数,动物模型血液中这些相关标志物的变化表现为模型组中 TC 水平和 TG 水平增加,较正常组显著升高($P < 0.05$)。肝组织病理学 HE 染色切片结果是营养型脂肪肝动物模型造模成功标志的金标准,其中脂肪变性的肝细胞占单位面积的 1/3 以上^[28];或采用油红 O 染色后电镜观察细胞内的脂滴,细胞质内出现红色的脂滴的肝细胞为脂肪变性细胞,并对其进行计数。

经实验证实,完整造模周期(12 周)可得到稳定的 NAFLD 大鼠模型。

5 营养型脂肪肝动物模型技术要点及注意事项

NAFLD 模型是研究非酒精性脂肪肝的必备前提条件,模型复制中的各个细节均会对模型成功与否造成影响,从而直接导致相关机制研究和药效学研究的成败。通过比较研究得出:(1).实验选用雄性 SD 大鼠,其体质量应控制在 180~200 g 之间,适应性喂养(7 天),测定血液中甘油三酯和胆固醇的含量,排除异常者后,再进行随机分组。此法比适应性喂养后直接根据体质量进行随机分组更能减少实验误差,保证结果。(2).实验过程中保持实验动物自由摄食、饮水。因为高脂饮食中的油脂有润滑作用,可使大鼠粪便质软。大鼠的饮用水根据国家规定:清洁级大鼠使用 pH2.5~2.8 的酸化水或无菌水,SPF 大鼠使用灭菌水。(3).高脂饲料配方中猪油及胆固醇的含量不宜过高,否则大鼠每日进食量

会有所降低,影响造模进展。(4).若高脂饲料配方中加入胆盐,其含量最好控制在 1%左右,避免大鼠腹泻。(5).实验过程中为了方便实验人员对实验的动态把控,可计算大鼠每日进食量(进食量=大鼠给食量-饲料剩余量),并定时检测大鼠的体质量变化和血液中 TC、TG 含量。所以,尽可能优化 NAFLD 模型的制备条件,将实验步骤标准化、规范化,使建模方法简单、容易实现。这可以提供更高的模型成型率,降低大鼠死亡率,以获得具有良好的可重复性和典型可靠的 NAFLD 模型。

参 考 文 献

- [1] Chalasani N, Younossi Z, Lavine J E, *et al.* The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the american association for the study of liver diseases, American college of gastroenterology, and the American gastmentemological association [J]. *Hepatology*, 2012, **55** (6): 2005-2023.
- [2] Chiloiro M, Caruso M G, Cisternino A M, *et al.* Ultrasound evaluation and correlates of fatty liver disease: a population study in a Mediterranean area [J]. *Metab syndr Relat Disord*, 2013, **11** (5): 349-358.
- [3] 王小燕,刘志峰,金玉,等. 41 例学龄儿童非酒精性脂肪肝病代谢综合征分析. *儿科药学杂志*, 2016, **22**(1): 20-22.
- [4] Takahashi Y, Soejima Y, Fukusato T. Animal models of nonalcoholic fatty liver disease/nonalcoholic steatohepatitis [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2012, **18**(19): 2300-2308.
- [5] Pappachan J M, Antonio F A, Edavalath M, *et al.* Non-alcoholic fatty liver disease: a diabetologist's perspective [J]. *Endocrine*, 2014, **45**(3): 344-353.
- [6] 何诚. *实验动物学* [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2006.
- [7] 李巍,石巧娟,郭红刚,等. 三种啮齿类动物非酒精性脂肪肝形成及机制探讨 [J]. *中国实验动物学报*, 2012, **20**(1): 76-80+99.
- [8] 李秀池,阮改清,吕加恩,等. 某 IT 企业员工非酒精性单纯性脂肪肝和非酒精性脂肪性肝炎的初步调查及特征分析 [J]. *临床肝胆病杂志*, 2017, **33**(7): 1324-1327.
- [9] 张荫娥,崔立平,马艳波,等. 12729 例高校教职工高血压、脂肪肝及相关因素分析 [J/OL]. *中国医院药学杂志*, :1-2(2016-11-01). <http://kns.cnki.net/kcms/detail/42.1204.R.20161101.1436.568.html>.
- [10] 李雅丽,何鹏义,周晶,等. 乌鲁木齐地区非酒精性脂肪肝患病率及危险因素分析 [J]. *中国临床保健杂志*, 2017, **20**(5): 574-578.
- [11] 杨曦,梁红亮. 老年住院病人脂肪肝的流行病学特征及危险因素 [J]. *中国老年学杂志*, 2017, **37**(14): 3542-3545.
- [12] 邵桂霞,张献共,黄志平,等. 深圳地区 21671 例不同性别年龄体重指数与血脂、脂肪肝关系的探讨 [J]. *临床内科杂志*,

- 2003, (12):636-638.
- [13] 商海涛,魏泓,岳秉飞,等.应用微卫星 DNA 标记对 Wistar 和 SD 大鼠封闭群的遗传学研究[J].分子细胞生物学报,2008,(1):28-34.
- [14] 王立辛,苏玉虹,韩喜彬,等.Wistar 大鼠和 SD 大鼠的遗传特征分析[J].畜牧与兽医,2013,45(12):57-61.
- [15] 钟岚,范建高.非酒精性脂肪肝病动物模型[J].国外医学(消化系疾病分册),1999,(3):175-178.
- [16] 张瑜,李琳琳,张嫣之,等.非酒精性脂肪肝病大鼠模型的建立[J].新疆中医药,2007,(2):7-9.
- [17] 丁洁,王亮,李娟,等.高脂乳剂灌胃构建大鼠非酒精性脂肪肝病模型可靠性的再研究[J].临床肝胆病杂志,2012,28(7):531-534.
- [18] 韩然,于燕妮,杨丹.高糖饮食致大鼠非酒精性脂肪肝病模型的建立[J].胃肠病学和肝病杂志,2015,24(11):1354-1356+1360.
- [19] 苏琳,刘玉兰.高糖饮食及高脂饮食建立非酒精性脂肪肝病大鼠模型比较[J].实验动物科学,2009,26(3):14-17,23.
- [20] Terrazos-Luch J, Corona-Garcia S, Zentella-de Pina M, *et al.* Butylated hydroxytoluene prevents hepatic damage induced by food oil [J]. Proceedings of the Western Pharmacology Society. 1997,40:97-99.
- [21] Larter C Z, Yeh M M. Animal models of NASH: getting both pathology and metabolic context right [J]. J Gastroenterol Hepatol,2008,23(11):1635-1648.
- [22] 苏冬梅,诸葛丽,李健,等.蛋氨酸-胆碱缺乏饮食诱导的非酒精性脂肪性肝炎小鼠模型的建立及动态监测[J].世界华人消化杂志,2011,19(11):1122-1129.
- [23] 张慧芹,刘泽洲,续畅,等.小檗碱对胆碱-蛋氨酸缺乏饮食诱导非酒精性脂肪性肝炎小鼠肝组织巨噬细胞表型转化的调节作用[J].解剖学报,2014,45(5):633-638.
- [24] 王建青,李俊,邹宇宏,等.非酒精性脂肪性肝炎模型的建立[J].安徽医科大学学报,2006,(1):61-63.
- [25] 温秀梅,陈芝芸,严茂祥,等.大鼠非酒精性脂肪性肝炎形成中脂质代谢的变化[J].中华中医药学刊,2008,(9):1987-1989.
- [26] 黄海燕,辛永宁,姜曼,等.非酒精性脂肪性肝病动物实验模型研究进展[J].临床肝胆病杂志,2014,30(9):948-953.
- [27] 敬梦辉,蒋元焯,范伏岗,等.非酒精性脂肪性肝病动物实验模型最新研究进展[J].现代中西医结合杂志,2017,26(18):2049-2052.
- [28] 钱伯初,史红,吕燕萍.非酒精性脂肪肝病与脂肪性肝炎动物模型研究进展[J].中国比较医学杂志,2007(7):426-430.

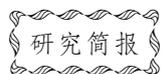
Brief Introduction to High Fat Diet-Induced Rat Non-alcoholic Fatty Liver Model and Discussion on Technical Points

ZHU Xiaoxu, DUAN Xiaohua, WANG Chunxia, QIN Bendan, ZHANG Chao

(School of Ethnic Medicine, Yunnan University of TCM, Kunming 650500, China)

Abstract: Dietary factors are the most important environmental factors leading to the occurrence of non-alcoholic fatty liver disease. The non-alcoholic fatty liver model induced by high-fat diet has the characteristics of being close to the clinical and stable model, so it is widely used in non-alcoholic fatty liver research. This article briefly introduced the model of fatty liver in rats commonly used in the non-alcoholic fatty liver inducing model, and discussed the technical points and experience of the non-alcoholic fatty liver model induced by high-fat diet.

Key words: high-fat diet; non-alcoholic fatty liver disease; rat model



昆明小鼠放射性肺炎病理观察

杨 铃 冯玛莉 朱丽娜 仝立国

(山西省中医药研究院临床药理研究室,太原 030002)

摘要:目的 阐明昆明小鼠放射性肺炎发生发展过程的病理变化。方法 采用6MV的X射线20Gy单次全胸照射造模,分别于照射后第7、14、28天取材进行HE染色、病理观察,并应用Image-Pro Plus图像分析系统对肺泡壁厚度、肺泡腔面密度、肺间质面密度进行定量测定分析。结果 辐照后随时间延长,肺泡萎缩、肺间隔增宽、炎细胞浸润程度加重,28 d后可见肺泡塌陷实变,轻度纤维化改变。肺泡壁厚度、肺泡腔面密度、肺间质面密度测量结果差异极显著。结论 采用上述方法复制的昆明小鼠放射性肺炎模型,病理变化过程符合放射性肺炎病程发展。

关键词:放射;肺炎;病理观察

中图分类号: R-332 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)01-0077-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.016

放射性肺损伤是胸部肿瘤放疗、骨髓移植等预处理后常见的并发症,严重时加速患者死亡^[1]。病程可分为早期急性肺炎和晚期放射性肺纤维化2期^[2]。本研究模拟临床放疗条件,制备昆明小鼠放射性肺炎模型,阐明疾病发生发展过程肺部病理变化,为中药治疗奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 样本(对象)选择及分组

昆明小鼠,雌雄各半,5周龄,体质量为(20±2)g,SPF级,购自北京华卓康生物科技股份有限公司,许可证号:[SCXK(京)2014-0004]。动物饲养条件:同时分笼饲养于山西省中医药研究院中心实验室,自然光照,自由进水,室内温度18~29℃,湿度36%~60%。

将实验小鼠随机分为4组:空白对照组以及模型组照射后7th、14th、28th 3组。每组10只,雌雄各半。

1.2 模型制备

动物经3%戊巴比妥麻醉后,采用6MV的X射线20Gy单次全胸照射(图1)造模,照射位置为头部下方、剑突以上,照射野面积2 cm×3 cm,剂量率:

2 Gy/min,放射源距皮100 cm。空白组不做任何处理。

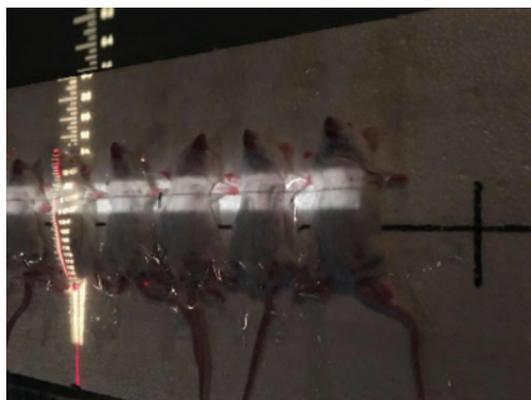


图1 6MV的X射线20Gy单次全胸照射,放射源距皮100 cm

Fig.1 20 Gy cumulative dose of 6MV X-ray irradiation of full chest once, and source-skin distance=100 cm

1.3 取材及常规病理观察

分别于照射后第7、14、28天后杀检取材,肺脏经宏观观察后,与心脏一起包入纱布中置于10%中性甲醛溶液进行固定。取左肺叶和右肺中叶,常规脱水、石蜡包埋、切片后,经HE染色后显微镜下观察肺脏组织病理学形态改变。

收稿日期:2018-06-03

作者简介:杨 铃(1990—),女,技师,研究方向:实验动物病理.E-mail: annieyang1990@163.com

通信作者:杨 铃(1990—),女,技师,研究方向:实验动物病理.E-mail: annieyang1990@163.com

1.4 HE 染色步骤

二甲苯 I-1 10 min→二甲苯 I-2 10 min→二甲苯 I-3 10 min→无水乙醇 I 5 min→95%乙醇 I 5 min→75%乙醇 I 5 min→苏木素 4 min→自来水清洗→0.5%盐酸 5 s→自来水清洗→1%氨水 5 s→自来水清洗→伊红 2 min→75%乙醇 II 5 s→85%乙醇 5 s→95%乙醇 II 5 s→无水乙醇 II 10 min→二甲苯 II-1 10 min→二甲苯 II-2 10 min→二甲苯 II-3 10 min^[3]。

1.5 图像分析

采用 Image Pro Plus 图像分析系统检测组织切片中肺泡壁厚度、肺泡腔面密度(肺泡腔面积/视野单位面积)、肺间质面密度(肺间质面积/视野单位面积)^[4]。每张切片随机选取 5 个视野测量。

1.6 统计方法

文中数据用统计软件 SPSS 22.0 进行分析,均

以($\bar{x}\pm s$)表示,采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 照射后 KM 小鼠临床表现

照射 3 d 后, KM 小鼠背部胸段照射野被毛脱落, 状态萎靡。

2.2 组织病理学形态变化

空白对照组肺实质与间质部分病理组织学结构均正常(图 2-A)。模型组照射 7 d 后可见轻度肺炎, 肺泡间隔增宽、少量炎细胞浸润(图 2-B)。照射 14 d 后表现为轻-中度肺炎, 肺泡塌陷, 炎细胞浸润肺泡间隔, 破坏肺泡结构, 轻度渗出(图 2-C)。照射 4 周后可见重度肺炎, 肺泡塌陷实变, 炎细胞大量浸润, 轻度纤维化改变, 毛细血管充血, 气管支气管上皮杂乱、脱落(图 2-D)。

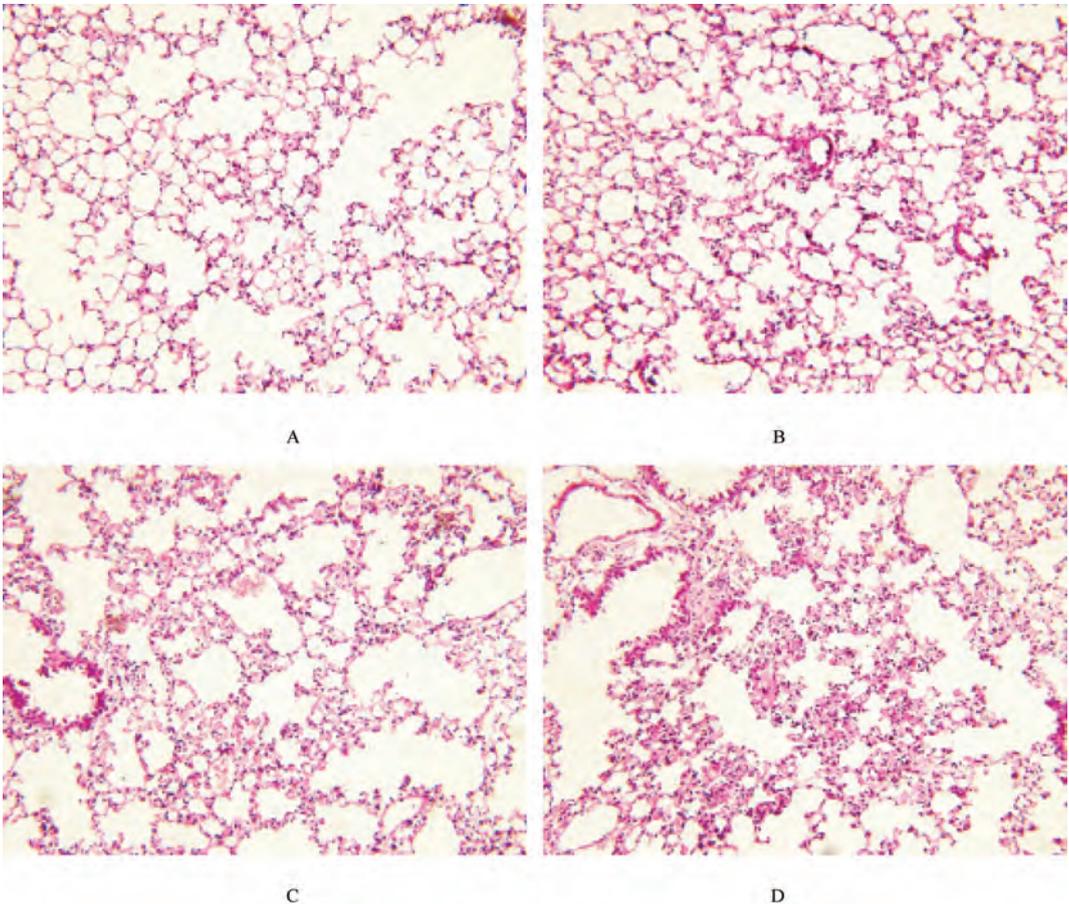


图 2 组织病理学形态变化 HE ×100

注:A: 空白对照组; B: 20Gy 照射后 7 d; C: 20Gy 照射后 14 d; D: 20Gy 照射后 4 周

Fig.2 Lung histopathological changes HE×100

Note:A: Blank control group; B: 7 d after 20Gy irradiation; C: 14 d after 20Gy irradiation; D: 4 weeks after 20Gy irradiation

2.3 定量测定

正常对照组与模型组肺泡壁厚度、肺泡腔面密

度、肺间质面密度变化见表 1。照射 20Gy 后, 随时间延长, 肺泡壁增厚, 第 7、14、28 天测量结果差异显

著 ($P < 0.01$); 肺泡腔萎缩, 面积减小, 第 7 天后差异显著 ($P < 0.05$), 第 14、28 天后差异极显著 ($P <$

0.01); 肺间质增宽, 面积增大, 第 14、28 天后测量差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 1 肺泡壁厚度、肺泡腔面密度、肺间质面密度测量结果

Table 1 The determination of thickness of alveolar walls and surface mass density of alveolar spaces and interstitial tissue

测量指标	正常对照组	模型组(照射后)		
		第 7 天	第 14 天	第 4 周
肺泡壁厚度	7.92 ± 0.72	14.01 ± 0.95 **	21.22 ± 1.82 **	32.33 ± 2.33 **
肺泡腔面密度	0.712 ± 0.176	0.604 ± 0.143 *	0.389 ± 0.123 **	0.132 ± 0.093 **
肺间质面密度	0.00204 ± 0.00178	0.00296 ± 0.00448	0.0107 ± 0.0220 **	0.0243 ± 0.047 **

注: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

Note: * $P < 0.05$ vs control, ** $P < 0.01$ vs control

3 讨论

放射性肺炎系由肺癌、食管癌、乳腺癌或胸部其他恶性肿瘤经放射治疗后, 在放射野内的正常肺组织受到损伤而引起的炎症反应, 该病的发生率为 5%~50%, 严重肺炎发生率为 10%~20%, 病死率高达 50%^[5]。尽管近年来治疗手段不断进步, 尤其是中医辨证治疗放射性肺炎具有较好的疗效^[6], 但是该病的发生率仍高达 30%。放射性肺炎的发生发展对机制研究及防治措施的优化至关重要, 综合遗传背景、研究费用及操作难易程度等因素, 选择昆明种小鼠作为实验动物^[7-8]。模拟临床放疗条件建立放射性肺炎模型, 阐明放射性肺炎发生发展过程的病理变化。

参照周仟等、白蕴红等^[9-10]方法, 采用 6MV 的 X 线单次大剂量 20Gy 照射复制小鼠放射性肺损伤模型, 分别于照射后第 7、14、28 天, 观察小鼠一般体征, 并进行病理 HE 染色观察。射线照射 3 d 后出现活动减少、精神萎靡、体质量减轻、胸背部脱毛等状况。此外, 随着观察时间的延长, 肺泡, 肺间质均出现进行性病变,

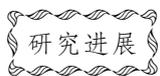
通过实验发现, 6MV 的 X 线 20Gy 辐照对肺部病变有明显影响。昆明小鼠辐照第 7 天后, 肺间质增宽, 炎细胞轻度浸润; 辐照第 14 天后, 肺泡塌陷, 肺间质进一步增厚, 炎细胞浸润明显, 红细胞轻度渗出, 表明肺部病变已初步出现; 而辐照第 28 天后, 肺泡萎缩实变, 炎细胞大量浸润, 毛细血管充血, 气管支气管上皮杂乱、脱落, 出现轻度纤维化改变, 表明肺部病变已经非常明显。此外, 通过统计学定量分析结果, 显示辐照第 14、28 天后肺泡壁厚度、肺泡腔面积、肺间质面积变化极显著 ($P < 0.01$)。本次实验主要偏向于从宏观、表观方向选择表征放射性肺炎

病变的关键指标, 如肺泡壁厚度、肺泡腔面积、肺间质面积等进行观察描述, 下一步应从分子生物学角度对放射性肺炎的病理机理予以进一步观察和验证。综上所述, 病理学研究结果符合放射性肺炎的病变规律^[8], 可用于进一步药理研究。

参考文献

- [1] 刘泰福. 现代放射肿瘤学[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2001.
- [2] 杜雪梅, 柳晓兰, 崔玉芳, 等. 放射性肺损伤小鼠动物模型的建立及其病变规律[J]. 中国体视学与图像分析, 2003, 8(4): 203-206.
- [3] 杨东, 仇玮祯, 张畅, 等. 地塞米松治疗 LPS 诱导急性肺炎模型小鼠病理学评价方法的建立[J]. 实验动物科学, 2013, 30(4): 9-12, 65.
- [4] 白蕴红, 王德文, 张震声, 等. 大鼠放射性肺纤维化病理过程的形态计量学研究[J]. 中国体视学与图像分析, 1997, 2(3): 147-150.
- [5] 戴芳芳, 崔勇, 李冠龙, 等. 放射性肺炎的发病机制及中西医结合治疗进展[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(6): 678-681.
- [6] 时美伶, 燕晓茹, 徐筱青, 等. 放射性肺炎的中医研究进展[J]. 吉林中医药, 2018, 38(12): 1476-1479.
- [7] Tucker S L, Liao Z X, Travis E L. Estimation of the spatial distribution, of target cells for radiation pneumonitis in mouse lung[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997, 38(5): 1055-1066.
- [8] Travis E L, Liao Z X, Tucker S L. Spatial heterogeneity of the volume effect for radiation pneumonitis in mouse lung[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1997, 38(5): 1045-1054.
- [9] 周芊, 王东, 李梦侠, 等. 小鼠放射性肺损伤动物模型的建立与鉴定[J]. 重庆医学, 2010, 39(19): 2553-2554, 2557.
- [10] 白蕴红, 王德文, 徐在海, 等. 放射性间质性肺炎病变规律及其机理研究[J]. 解放军医学杂志, 1993, 18(1): 14-16.

(下转至第 84 页)



大鼠细小病毒检测技术研究进展*

吴定宇¹ 吕瑞青² 彭芳³

(1. 大理大学实验动物中心,大理 671003)(2. 成都大熊猫繁育研究基地,成都 610081)

(3.大理大学药学与化学学院,大理 671003)

摘要:大鼠细小病毒是一种 DNA 病毒,存在多种血清型,分为不同毒株。该病毒可自然感染实验大鼠和野鼠,不同毒株感染后临床症状不一。该病毒可对大鼠的组织或器官造成影响,导致大鼠生理生化参数改变,直接影响实验结果。因此,对感染大鼠的筛选鉴定至关重要。本文旨在系统阐述大鼠细小病毒检测技术的研究情况,对比不同的方法,提出了问题和展望,为实验动物质量控制提供帮助。

关键词:大鼠细小病毒;ELISA;PCR;xTAG

中图分类号: R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)01-0080-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.01.017

实验动物是生命科学的基础和条件。其质量直接影响实验结果的准确性和可靠性。实验动物质量控制的核心是对实验动物携带的微生物和寄生虫进行严格控制。

大鼠细小病毒(Rat Parvovirus, RPV)属于细小病毒科、细小病毒属,单链负链 DNA 病毒,无囊膜,具有多种血清型。该病毒存在于实验大鼠、野生大鼠和自然环境中,严重危害实验大鼠健康,感染后可造成动物死亡和种群繁殖率下降,造成环境污染。大鼠排泄物和分泌物是主要的传染源。该病毒同时会污染血清、细胞培养物、胚胎等生物样品,尤其是该病毒某些毒株可以污染肿瘤细胞系,对肿瘤细胞造成抑制。为控制该病毒传播,确保实验动物质量,已建立了 RPV 的多种检测方法。本文就目前大鼠

细小病毒检测方法进行综述。

1 大鼠细小病毒毒株分类

RPV 分为三个血清型包括 RPV-1 (Rat Parvovirus Type 1), KRV (Kilham Rat Virus) 和 H-1 (Toolan's H-1)^[1]。根据我国实验动物微生物学检测的规定^[2], SPF 级实验大鼠须检测 RPV 的 KRV 株和 H-1 株。国外对 RPV 分类与检测范围和我国不同,美国查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)^[3],指出 RPV 病毒包括 RPV-1, RPV-2 (Rat Parvovirus Type 2), RMV (Rat Minute Virus), KRV, H-1。欧洲实验动物学会联合会(FELASA)^[4]要求检测 KRV, RMV, RPV 和 H-1。具体见表 1。

表 1 不同国家和地区 SPF 级实验大鼠 RPV 血清型的检测

Table 1 The Serological detection of RPV for SPF rat in different countries and regions

大鼠细小病毒毒株	中国实验动物国家标准	Charles River Laboratories	欧洲实验动物学会联盟 (FELASA)	日本实验动物中央研究所	台湾大学医学院实验动物中心
KRV	●	●	●	●	●
H-1	●	●	●	●	●
RPV		●	●		●
RMV		●	●		

注:●代表检测

Note: ●show detection

收稿日期:2018-04-24

* 基金项目:国家自然科学基金项目(No.81560600)

作者简介:吴定宇(1987—),男,讲师,研究方向:实验动物与比较医学.E-mail:fetoio@sina.com

通信作者:彭芳(1956—),女,教授,研究方向:抗肿瘤药物研究.E-mail:pengfang6556@aliyun.com

1959 年 Kilham 和 Olivier^[5] 发现在大鼠肿瘤细胞系中存在一种污染性物质,经分离发现该污染物为病毒,并称为 Kilham rat virus (KRV) 或 Rat Virus (RV)。1960 年 Toolan 等^[6] 总结前人研究,通过移植人类肿瘤的无细胞 (Cell-free) 游离成份,会导致仓鼠出现病变,认为这种可滤过性因子是病毒引起的,并从大鼠中分离该因子,移植到人肝癌细胞 1 (HEp-1) 中,最终鉴定为病毒,这种病毒称之为 Toolan 病毒,通常称之为 H-1 病毒。

1998 年 Ball-Goodrich 等^[7] 发现了一种新的大鼠细小病毒 PRV-1,通过克隆、DNA 序列分析来与其他细小病毒进行比对发现,PRV-1 的编码衣壳蛋白的 VP1 序列和其他细小病毒的 VP1 序列相似度不超过 69%,这就解释了 PRV-1 的抗原差异性。同时,Ball-Goodrich 进行抗体检测分析发现,其有别于 KRV 和 H-1 不同的血清型,是第三种血清型。2002 年 Wan 等^[8] 发现了之前三种大鼠细小病毒不同的 RMV 毒株,分别是 RMV-1a, RMV-1b, RMV-1c,通过基因组核苷酸序列分析和蛋白质氨基酸序列预测的方法,发现三种 RMV 毒株它们有着共同的启动子和剪切区域,转录起始密码子和终止密码子,它们基因序列的同源性约 97%,氨基酸序列的相似性约 95%,RMV 与 KRV 和 H-1 的基因序列差异性小,但是与 PRV-1 存在较大差异。通过 HAI 试验发现, RMV 有着与 KRV、H-1 和 RPV-1 不同的血清型。

2 大鼠细小病毒检测方法

2.1 毒株分离与鉴定

对疑似感染细小病毒的大鼠进行组织取材,取材部位根据可能感染毒株的不同而不同。将取材的组织进行培养,获取上清液,用滤膜过滤,滤过液接种特定细胞进行培养,然后进行病毒检测,如动物回归实验、分子生物学鉴定、血清学鉴定等。

国外一般采用 NB-324 K 细胞对 H-1 毒株进行分离培养^[9-11],如 Leuchs 等在研究如何高质量大规模纯化生产 H-1 毒株时,采用由 SV40 转化的新生儿肾细胞 NB-324 K,来提高 H-1 作为 DNA 病毒的复制扩增能力。对 KRV 株一般采用 DMEM 培养基培养大鼠肾细胞 (NRK 细胞)^[12-13],KRV 病毒在 NRK 细胞上会形成吞噬斑,所以可以通过病毒空斑实验检测 KRV 毒株。

刘先菊等^[14-15] 分别建立了大鼠细小病毒 KRV

株和 H-1 株的细胞培养方法。采用大鼠胶质瘤细胞系 (Rat glial cell line C6) 培养大鼠细小病毒 KRV 和 H-1,待细胞病变达到测定标准后,进行 FITC 鉴定所培养病毒的抗原,用 HA 测定培养物上清效价,用 DNA 测序鉴定所培养病毒,结果发现采用 C6 细胞系可以大量培养 KRV 和 H-1。

2.2 血清学检测

血清学检测是诊断和鉴定病毒的重要方法之一。我国实验动物标准规定了四种方法用于大鼠细小病毒的检测^[2]:血凝抑制试验 (HI)、免疫酶试验 (IEA)、免疫荧光试验 (IFA)、酶联免疫吸附试验 (ELISA)。

吴小闲等^[16] 采用 HI 方法检测大鼠细小病毒 RV 株 (也称 KRV) 和 H-1 株,均发现存在阳性感染的情况。贺争鸣等^[17] 采用 ELISA、IEA 和 HI 这三种方法进行比较,检测了大鼠细小病毒 RV 株,发现 ELISA 和 IEA 在重复性和抗体阳性检出率方面均优于 HI ($P < 0.05$)。王翠娥等^[18] 采用 ELISA 方法对 2012 年至 2013 年国内 36 家单位的大鼠和小鼠血清进行病毒抗体检测,检测出来的阳性样品再用免疫荧光试验 (IFA) 进行复检,大鼠细小病毒检测项目按照查尔斯河实验室的检测项目进行,发现大鼠细小病毒毒株 RPV、H-1、KRV、RMV 均呈阳性。李晓波等^[19] 报道,在 16 个实验动物质量检测实验室进行比对中,14 个实验室采用 ELISA,占 87.5%,3 个实验室采用 IFA 方法,另有 1 个实验室同时采用 IFA 和 ELISA 方法。目前,对大鼠细小病毒进行检测的进口 ELISA 试剂盒一般采用 Charles River、Biotech Trading Partners、XpressBio Life Science 等公司产品。国产 ELISA 大鼠细小病毒检测试剂盒主要采用中国食品药品检定研究院产品。付瑞等^[20] 建立了 H-1 细小病毒抗体 ELISA 检测方法,经试验发现与大鼠 KRV 病毒有交叉反应。

不同国家或地区检测大鼠细小病毒毒株类型不同,初检和复检的方法也有所差异。如美国查尔斯河实验室的动物诊断研究服务部^[21] 对近五年北美地区和西欧 (主要是法国) 的大鼠和小鼠流行病学情况进行研究。共收集了 50 万份小鼠样品和 8 万份大鼠样品。采用血清学方法检测大鼠细小病毒 (病毒毒株为 KRV、RMV、H-1 和 RPV)。初步检测采用多重免疫荧光方法 (Multiplexed Fluorometric Immunoenzyme Assay, MFIA) 或 ELISA,对于检测出的阳性样品复检采用 IFA 或 HAI,具体见表 2。

表 2 SPF 级大鼠细小病毒血清学检测(查尔斯河实验室)
Table 2 The Serological detection of rat parvovirus for
SPF rat in Charles River Laboratories

毒株	方法	
	初次检验	复检
Kiham rat virus (KRV, RV)	MFIA/ELISA	IFA, HAI
Rat minute virus (RMV)	MFIA/ELISA	IFA
Rat parvovirus (RPV)	MFIA/ELISA	IFA
Toolan's H-1 virus (H-1)	MFIA/ELISA	IFA, HAI

Manjunath 等^[22]对印度 26 个实验动物机构的大鼠和小鼠进行了血清学调查,每个机构分别采集 5 份大鼠和 5 份小鼠血样,在 130 份大鼠血样中用 ELISA 方法检测大鼠细小病毒 KRV 株和 RPV 株,发现 RPV 感染率在 5.38%,KRV 无感染。McInnes 等^[23]在 2004 年到 2009 年间从澳大利亚、新西兰和新加坡等国家的大学、研究中心、科研机构获取 SPF 级的大鼠和小鼠,采用过量 CO₂ 安乐死,在收集的血清和组织样品中检测出大鼠细小病毒,毒株包括 H-1, KRV, RMV 和 RPV。检测方法为首先进行 ELISA 检测,对于 ELISA 检测结果不确定或可疑的,再用 IFA 进行重测。Liang 等^[24]、Zenner 和 Reqnault^[25]以及 Schoondermark 等^[26]对不同国家或地区大鼠和小鼠进行病毒流行调查和血清学筛查,均采用 ELISA 作为大鼠和小鼠细小病毒的首选检测方法。

综上所述,国内外实验室在检测大鼠细小病毒毒株种类上存在差异,但普遍采用血清学检测方法,ELISA 使用最多。对于某些血清样品结果的不确定性,通常采用 IFA 或 HAI 进行复检,以对检测结果进行确认。

2.3 分子生物学检测

采用普通 PCR 检测大鼠细小病毒,如 Besselsen 等^[27]采用 PCR 技术来检测 H-1 和 KRV 毒株,通过设计引物来扩增 H-1 和 KRV 编码衣壳蛋白的 VP 基因为目的片段。Wan 等^[28]采用 PCR 检测 RPV 和 RMV 病毒,设计引物分别扩增 RPV 的 NS 区序列和 RMV 的 VP 区序列目的基因。

除普通 PCR 方法之外,我国学者还采用多重 PCR 方法进行大鼠细小病毒的分子生物学检测。李晓波等^[29]建立对大鼠 H-1 和 KRV 毒株检测的双重 PCR 方法,分别设计特异性引物,扩增目的片段是病毒的衣壳蛋白基因编码区(VP),并确定 2 对引物无交叉反应,实验结果发现能够高效检测大鼠细

小病毒的感染。饶丹等^[30]根据大鼠细小病毒基因特异性,采用双重 PCR 的方法,来检测 H-1、KRV、RMV 和 RPV 四种大鼠细小病毒,在 VP2 基因筛选一对用于特异扩增 RPV 毒株的引物,在 NS1 基因设计一对用于扩增 H-1、KRV 和 RMV 的引物,敏感实验表明,双重 PCR 的最低检测限可达 1 000 拷贝/ μ L。

以高通量测序方法为基础,可以进行不同毒株的大鼠细小病毒检测。传统的基因测序技术采用 Sanger 法,存在成本高、耗时及测序样品受限等不利因素,Life Sciences 公司发明了高通量测序技术又称第二代测序技术(next generation sequencing, NGS)可以对上百万 DNA 分子进行测序检测。查尔斯河实验室已经开展了商业化高通量试验—检测 DNA 病毒服务。Höfler 等^[31]针对啮齿类实验动物存在的病毒、细菌的监控,开发出一种新的高通量多重 PCR 分析方法,称之为 rDVF (rodent DNA virus finder),可以同时鉴定 24 种大鼠和小鼠 DNA 病毒感染情况,其中大鼠细小病毒包括 H-1、RPV、KRV 和 RMV。

Luminex 液相芯片分析技术可进行多种微生物和病毒的检测,其技术包括 xMAP 技术和 xTAG 技术。xTAG 技术使用专有通用标签系统,易于进行优化和核酸检测开发,Luminex 公司所提供的基于 xTAG 技术的核酸检测,包括感染性疾病和基因检测相关的临床诊断检测。如对多种肠道病原体 and 呼吸道病毒均可以采用 xTAG 技术进行检测^[32-33]。Xu 等^[34]发明一种阵列式 xTAG 检测方法,可同时检测大鼠细小病毒 KRV、H-1、RPV 和 RMV,并对这四种毒株予以区别,通过 xTAG 技术和常规 PCR 技术检查了 50 个临床样品,结果显示高度一致。

3 结语

病毒分离培养和观察鉴定被认为是病原微生物检测的“金标准”(Gold Standard),但缺点是检测周期长,速度慢,对操作要求较高且成本也高。

血清学检测是现行的实验动物国家标准规定的方法,目前各实验室普遍采用 ELISA 进行大鼠细小病毒初筛,复检时用 IFA 或 HIA 进行。虽然 ELISA 和 IFA 检测敏感性好,但是由于大鼠细小病毒毒株的非结构蛋白相对保守,导致抗体会产生交叉反应,因此 ELISA 和 IFA 检测的特异性较差,不易将不同

毒株的细小病毒区分开来。HIA 检测有一定特异性,但由于其只针对抗体直接作用于不同毒株的血细胞凝集素上,形成血凝抑制反应,因此敏感性较低。

以 PCR 为主的分子生物学技术具有高效、快速、灵敏的优点,但该技术也存在有假阳性和假阴性的缺点。目前该技术及衍生技术广泛应用于国内外啮齿类实验动物病毒检测中。多重 PCR 及液相芯片分析技术等方法可以快速区分不同毒株的大鼠细小病毒。

细小病毒是严重影响实验大鼠健康的病毒之一,因此建立起灵敏、准确、操作方便的检测方法,是准确检测和有效控制该病毒传播的重要手段。

参 考 文 献

[1] 田克恭,贺争鸣,刘群,等.实验动物疫病学[M].北京:中国农业出版社,2014.199-209.

[2] GB14922.2-2011.实验动物微生物学等级监测[S].

[3] Charles B C. Rat Parvoviruses Technical Sheet. http://www.criver.com/files/pdfs/infectious-agents/rm_ld_r_rat_parvoviruses.

[4] Mahler M, Berard M, Feinstein R, et al. FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit colonies in breeding and experimental units [J]. *Laboratory Animals*, 2014, **48**(3): 178-192.

[5] Kilham L, Olivier L J. A latent virus of rats isolated in tissue culture[J]. *Virology*, 1959, **7**:428-437.

[6] Toolan H W, Dalldorf G, Barclay M, et al. An unidentified filterable agent isolated from transplanted human tumors [J]. *National Acad Sciences*, 1960, **13**(1): 141-143.

[7] Ball-Goodrich L J, Leland S E, Johnson E A, et al. Rat parvovirus type 1: the prototype for a new rodent parvovirus serogroup[J]. *Journal of Virology*, 1998, **72**(4): 3289-3299.

[8] Wan C H, Sodelund-Venermo M, Pintel D J, et al. Molecular characterization of three newly recognized rat parvoviruses [J]. *Journal of General Virology*, 2002, **83**:2075-2083.

[9] Geletneky K, Leoni A L, Pohlmeier E G, et al. Pathology, Organ distribution, and Immune Response after Single and Repeated Intravenous Injection of Rats with Clinical-Grade Parvovirus H-1[J]. *Comparative Medicine*, 2015, **65**(1): 23-25.

[10] Leuchs B, Roscher M, Muller M, et al. Standardized large-scale H-1PV production process with efficient quality and quantity monitoring[J]. *Journal of Virological Methods*, 2016, **229**:48-59.

[11] Tattersall P, Bratton J. Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice [J]. *Journal of Virology*, 1983, **46**(3): 944-955.

[12] Zipris D, Lien E, Nair A, et al. TLR9-Signaling Pathways Are

Involved in Kilham Rat Virus-Induced Autoimmune Diabetes in the Biobreeding Diabetes-Resistant Rat [J]. *The Journal of Immunology*, 2007, **178**(2): 693-701.

[13] Zipris D, Hillebrands J L, Welsh R M, et al. Infections That Induce Autoimmune Diabetes in BBDR Rats Modulate CD4⁺ CD25⁺ T Cell Populations [J]. *The Journal of Immunology*, 2003, **170**(7): 3592-3602.

[14] 刘先菊,佟巍,张丽芳,等.大鼠细小病毒 H-1 株培养方法的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2011, **19**(6): 495-498.

[15] 刘先菊,佟巍,张丽芳,等.大鼠细小病毒 KRV 株培养方法的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2011, **28**(5): 12-14.

[16] 吴小闲,洪瑞珍,涂新明,等.实验小鼠和大鼠的病毒学监测(1984~1989)[J]. *中国实验动物学杂志*, 1993, **3**(1): 8-11.

[17] 贺争鸣,卫礼,张然,等.检测大鼠细小病毒抗体的 ELISA、IEA 和 HI 法比较[J]. *上海实验动物科学*, 1993, **13**(3): 132-134.

[18] 王翠娥,陈立超,周倩,等.实验大鼠和小鼠多种病毒的血清学检测结果分析[J]. *实验动物科学*, 2014, **31**(2): 20-24.

[19] 李晓波,王洪,付瑞,等.实验大鼠细小病毒 H-1 株抗体检测能力验证结果评价[J]. *中国药事*, 2014, **28**(9): 990-994.

[20] 付瑞,李晓波,王淑菁,等.H-1 细小病毒抗体 ELISA 检测方法的建立与应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2016, **26**(3): 75-80.

[21] Pritchett-Coring K R, Cosentino J, Clifford C B. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats [J]. *Laboratory Animals*, 2008, **43**(2): 165-173.

[22] Manjunath S, Kulkarni P G, Nagavelu K, et al. Sero-Prevalence of Rodent Pathogens in India [J]. *Plos one*, 2015, **10**(7): 1-11.

[23] McInnes E F, Rasmussen L, Fung P, et al. Prevalence of viral, bacterial and parasitological diseases in rats and mice used in research environments in Australasia over a 5-y period [J]. *Laboratory Animal*, 2011, **40**(11): 341-350.

[24] Liang C T, Shih A, Chang Y H, et al. Microbial contaminations of laboratory mice and rats in Taiwan from 2004 to 2007 [J]. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 2009, **48**(4): 381-386.

[25] Zenner L, Regnault J P. Ten-year long monitoring of laboratory mouse and rat colonies in French facilities: a retrospective study [J]. *Laboratory Animals*, 2000, **34**(1): 76-83.

[26] Schoondermark van de ven E M, Philippe-Bergmann I M, van der Logt J T. Prevalence of naturally occurring viral infec., Mycoplasma pulmonis and Clostridium piliforme in laboratory rodents in Western Europe screened from 2000 to 2003 [J]. *Laboratory Animals*, 2006, **40**(2): 137-143.

[27] Besselsen D G, Besch-Willford C L, Pintel D J, et al. Detection of H-1 Parvovirus and Kilham Rat Virus by PCR [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1995, **33**(7): 1699-1703.

[28] Wan C H, Bauer B A, Pintel D J, et al. Detection of rat parvovirus type 1 and rat minute virus type 1 by polymerase chain reaction [J]. *Laboratory Animals*, 2006, **40**(1): 63-39.

[29] 李晓波,付瑞,王吉,等.大鼠细小病毒 H-1 株和 KRV 株双重 PCR 检测方法的建立及应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, **25**(6): 46-52.

- [30] 饶丹,朱余军,伍秒梨等.大鼠细小病毒双重 PCR 检测方法的建立[J].实验动物与比较医学,2017,**37**(1):32-35.
- [31] Höfler D, Nicklas W, Mauter P, *et al.* A Bead-Based Multiplex Assay for the Detection of DNA Viruses Infecting Laboratory Rodents[J].Plos one,2014, **9**(5):e97525.
- [32] Popowitch E B, O' Neill S S, Miller M B. Comparison of the Biofire FilmArray RP, Genmark eSensor RVP, Luminex xTAG RVPv1, and Luminex xTAG RVP Fast Multiplex Assays for Detection of Respiratory Viruses [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2013,**51**(5):1528-1533.
- [33] Goldenberg S D, Bacelar M, Brazier P, *et al.* A cost benefit analysis of the Luminex xTAG Gastrointestinal Pathogen Panel for detection of infectious gastroenteritis in hospitalized patients[J]. Journal of Infection,2014, **70**(5):504-511.
- [34] Xu F, Yuan W, Zhang T, *et al.* Simultaneous detection of 4 prototypic rat parvoviruses using the lumniex xTAG assay in laboratory animal health monitoring [J]. Journal of Virological Methods, 2017, **248**:61-65.

Advances in Detection of Rat Parvovirus

WU Dingyu¹, LU Ruiqing², PENG Fang³

(1. Department of Experimental Animal, Dali University, Dali 671003, China)

(2. Chengdu Giant Panda Breeding Research Base, Chengdu 610081, China)

(3. College of Pharmacy and Chemistry, Dali University, Dali 671003, China)

Abstract: Rat parvovirus (RPV) is a DNA virus which contains variety of serotypes and can be divided into different strains. Both experimental rats and wild rodents can be naturally infected with RPV, but clinical disease and histological lesions have been observed different in rat infected with different strains. The RPV can have appreciable deleterious effects on research by contaminating rat tissues or organs and then result ing in changes in physiological and pharmacological parameters of rat. Therefore, it is critical to identify the infected experimental rat to minimize the impact on research. This paper aims to systematically expound the research of rat parvovirus detection technology, compare different method, and put forward problems and its prospects to provide reference of the experimental animal quality control.

Key words: rat parvovirus; ELISA; PCR; xTAG

(上接第 79 页)

Pathological Changes of Radiation Pneumonia in Kunming Mice

YANG Qian, FENG Mali, ZHU Lina, TONG Liguo

(Department of Clinical Pharmacology, Shanxi Traditional Chinese Medicine Institute, Taiyuan 030002 China)

Abstract: Objective To clarify development of the pathological process of radiation pneumonia. **Method** Using 6MV X-ray, of which the cumulative dose is 20Gy, irradiates the full chest once. The hematoxylin-eosin staining was conducted respectively on the 7th day, 14th day and 28th day after irradiation for pathological study. In addition, the Image-Pro plus analysis system was applied to quantitatively analyze thickness of alveolar walls, and surface mass density of alveolar spaces and interstitial tissue. **Result** Alveolar atrophy, alveolar septum widening and inflammatory cell infiltration were observed along with the development process. The collapsed or consolidated alveolus and mild pulmonary fibrosis were observed after 28 days. Furthermore, the differences of thickness of alveolar walls and surface mass density of alveolar spaces and interstitial tissue were very significant. **Conclusion** Radiation pneumonia model in Kunming Mouse could be replicated successfully by the mentioned method, of which the pathological changes are in accordance with the clinical course.

Key words: irradiation; pneumonia; pathological observation