

《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3期

2019年6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:贺争鸣

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:国内外公开发售

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

- 补骨脂酚对去势导致雄性小鼠骨质疏松的治疗 张盼阳,王昭昕,袁晓美,等(1)
- 补骨脂的不同提取物对大鼠毒性的初步研究 王昭昕,杨莉,卢国彦,等(6)
- 不同垫料对SPF级KM小鼠学习记忆能力的影响 胡建武,李树梅,梁俊仕,等(13)
- 2018年5月北京市啮齿类实验动物质量抽查的病理检测 倪家敏,李森焯,张茜茜,等(18)
- 结肠杯状细胞染色的结果比较研究 高琛琛,薛晓伟,刘玥宏,等(25)
- 实验动物支气管鲍特杆菌氏菌检测能力验证结果与分析 邢进,冯育芳,王洪,等(30)
- 拉布拉多犬与金毛寻回猎犬基因组中与髋关节发育不良相关基因COL6A3、FN1的SNP位点检测 白静,马雪娜,陈舒婷,等(35)
- 导盲犬和淘汰犬肠道菌群的差异性研究 董建一,许尧,胡雨奇,等(40)
- 右美托咪定通过抑制NLRP3炎性体激活减轻高氧诱导的急性肺损伤 李刚,喻红彪,任思宏(48)
- 卵细胞体外成熟(IVM)在小鼠生物净化中的应用 杜江涛,武晓静,戴方伟,等(53)
- 维丙胺联合盐酸氟西汀对抑郁症小鼠的作用研究 伍锡栋,谢梦,寇光,等(58)
- 应用微卫星DNA标记对广西食蟹猴的遗传学研究 张洁宏,覃辉艳,李彬,等(63)
- 电凝法制作Balb/c小鼠局灶性脑缺血模型的实验研究 张雪梅,李兵,陈立杰,等(69)

研究简报

- 探讨药物GLP机构致癌试验中啮齿类动物的临床检查 李春令,刘增祥,刘金鑫,等(74)
- 屏障动物房书虱爆发、处置与风险评估 张金梅,康康,陈国元,等(77)

研究进展

- 抑郁症动物模型的研究进展 苗茸茸,曲显俊(80)
- 结直肠癌肝转移动物模型研究进展 乔大伟,李玉芳,李胜男,等(86)
- 广告 (封三)
- 广告 (封四)

LABORATORY ANIMAL SCIENCE

(Bimonthly, Started in 1984)

Volume 36 Number 3 June 28, 2019

CONTENTS IN BRIEF

- The Therapeutic Effect of Bakuchiol on Osteoporosis in Male Mice
..... ZHANG Panyang, WANG Zhaoxin, YUAN Xiaomei, *et al* (5)
- Preliminary Study on Toxicity of Psoralen from Different Extractions in Rats
..... WANG Zhaoxin, YANG Li, LU Guoyan, *et al* (12)
- Effect of Different Bedding on Learning and Memory Ability of Specific Pathogen-free KM Mice
..... HU Jianwu, LI Shumei, LIANG Junshi, *et al* (17)
- The Pathological Examination of Laboratory Rodents of Beijing in May 2018
..... NI Jiamin, LI Miaoxuan, ZHANG Xixi, *et al* (29)
- Comparative Investigation on the Colon Goblet Cell Staining
..... GAO Chenchen, XUE Xiaowei, LIU Yuehong, *et al* (29)
- Results and Analysis of Proficiency Testing of Detection of *Bordetella bronchiseptica* in Laboratory Animals
..... XING Jin, FENG Yufang, WANG Hong, *et al* (34)
- SNPs Detection for Canine Hip Dysplasia (CHD) Related Genes COL6A3 and FN1 in Labrador Retrievers and
Golden Retrievers BAI Jing, MA Xuena, CHEN Shuting, *et al* (39)
- Analysis of the Differences of Gut Microbiota between Guide Dogs and Eliminated Dogs
..... DONG Jianyi, XU Yao, HU Yuqi, *et al* (47)
- Dexmetomidine Reduces Hyperoxic Induction by Inhibiting NLRP3 Inflammatory Activation
..... LI Gang, YU Hongbiao, REN Sihong (52)
- Application of Oocytes *In Vitro* Maturation in Mice Biological Purification
..... DU Jiangtao, WU Xiaojing, DAI Fangwei, *et al* (57)
- The Effect Studying of Vinopropylamine Combined with Fluoxetine Hydrochloride on Depression Mouse Model ...
..... WU Xidong, XIE Meng, KOU Guang, *et al* (62)
- Genetic Study of Guangxi *Macaca fascicularis* Using Microsatellite DNA Markers
..... ZHANG Jiehong, QIN Huiyan, LI Bin, *et al* (73)
- The Establishment of Cerebral Ischemia Model by Electrocoagulation in Balb/c Mice
..... ZHANG Xuemei, LI Bing, CHEN Lijie, *et al* (73)
- Explore GLP Institutions Cancer Trials Rodents in Clinical Examination
..... LI Chunling, LIU Zengxiang, LIU Jinxin, *et al* (76)
- Outbreak, Disposal and Risk Assessment of Psocids in Animal Barrier Facility
..... ZHANG Jinmei, KANG Kang, CHEN Guoyuan, *et al* (85)
- Research Progress in Animal Models of Depression MIAO Rongrong, QU Xianjun (85)
- Research Progress in Animal Model of Liver Metastasis of Colorectal Cancer
..... QIAO Dawei, LI Yufang, LI Shengnan, *et al* (90)



补骨脂酚对去势导致雄性小鼠骨质疏松的治疗*

张盼阳¹ 王昭昕¹ 袁晓美¹ 毕亚男¹ 张玥^{1,2} 周昆^{1,2}

(1.天津中医药大学中医药研究院,天津 300193)(2.天津中医药大学方剂学教育部重点实验室,天津 300193)

摘要:目的 观察补骨脂酚对去势导致的雄性小鼠骨质疏松的治疗作用。方法 ICR 雄性小鼠随机分为5组,分别为对照组、去势模型组、阳性药组、补骨脂酚 10 mg/kg 和 20 mg/kg 体质量组,对照组做假手术,其余组均切除小鼠睾丸。造模成功6周后,小鼠给药8周取材,检测血清生化指标,取各组右腿胫骨进行 MicroCT 扫描,取各组小鼠股骨进行骨生物力学测定。结果 对照组、模型组、B10 和 B20 mg/kg 组的骨钙素 OC 值分别为(177.69±45.13), (220.35±25.08), (167.48±74.11)和(108.76±38.17);对照组、模型组、阳性药组、B10 和 B20 mg/kg 组的 Tb.N 分别为(3.53±0.49)、(1.71±0.16)、(2.51±0.35)、(2.14±0.23)和(2.45±0.42)。结论 补骨脂酚对去势导致雄性小鼠骨质疏松有治疗作用。

关键词:骨质疏松;补骨脂酚;雄性小鼠;去势

中图分类号: R285.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0001-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.001

补骨脂,复方制剂壮骨关节丸中的一味组方中药材,系豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* Linn. 的干燥成熟果实,始载于《雷公炮炙论》,又名破故纸。其性温,味辛、苦,用于补肾助阳,纳气平喘,温脾止泻。补骨脂中的主要活性成分有香豆素类、香豆酮苷、黄酮类化合物和单萜类^[1-2]。补骨脂酚在补骨脂中含量达3%以上,研究表明其具有抗癌、抗抑郁、降糖降血脂等多种药理活性^[3-5],补骨脂酚具有显著的雌激素样作用^[6],其在骨质疏松、围绝经期综合征等疾病的治疗具有良好的应用前景^[7],刘颖等^[8]实验表明补骨脂药渣对骨质疏松有良好的治疗效果,且优于补骨脂生药和水提物。但未见关于补骨脂酚对雄性骨质疏松疗效的研究,故本文就补骨脂中含量较高成分的补骨脂酚对雄性小鼠抗骨质疏松效果进行研究。

1 材料与方法

1.1 受试药

补骨脂酚,经 HPLC 检测纯度大于95%,购于天津月牙湖科技有限公司。

1.2 动物

雄性 ICR 小鼠,56只,SPF级,体质量20~22g,

6周龄,购自于北京华阜康生物科技股份有限公司(许可证号 SCXK(京)2014-0004),饲养于天津中医药大学实验动物中心。自由摄食和饮水,饲料来自于北京科澳协力饲料有限公司,饲养环境:温度20~25℃,湿度40%~60%。

1.3 试剂

阿仑膦酸钠片,批号:J20130085,Merck Sharp & Dohme Italia Spa;

试剂盒:骨钙素(OC)ELSIA,批号:L150401078,CUSABIO;抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)试剂盒,批号:P032G-4,碧云天生物技术研究所;碱性磷酸酶(ALP)测定试剂盒批号:140721,中生北控生物科技股份有限公司;注射用青霉素钠,批号:017140656,中诺药业(石家庄)有限公司产品;氯化钠注射液,批号:141128,安徽双鹤药业责任有限公司产品;75%酒精,批号:141002,德州格利洁消毒制品有限公司产品;无水乙醇,批号:20150131,天津市科密欧化学试剂有限公司产品;水合氯醛,批号:20130705,天津市光复精细化工研究所产品;甲醛溶液,批号:20141204,天津市人船化学试剂科技有限公司产品。

收稿日期:2018-10-26

* 基金项目:国家自然科学基金(No.81202991,81673826),国家中医药管理局行业专项(No.201507004)

作者简介:张盼阳(1995—),女,硕士研究生,研究方向:中药药理毒理研究.E-mail:zhangpanyang_l@163.com

通信作者:张玥(1984—),女,博士,实验师,研究方向:中药药理毒理研究.E-mail:zhangyue@tjucm.edu.cn

1.4 仪器

JA1003 电子天平(上海恒平科学仪器有限公司); VivaCT40 小动物活体断层扫描仪(瑞士, SCANCO MEDICAL); YLS-16A 小动物骨骼强度测定仪(济南益延科技发展有限公司); 7020 全自动生化仪(日本, Hitachi); EnSpire 多模式微孔板检测仪(美国, PerkinElmer); Legend Micro 17 微量台式离心机(Thermo); RM2135 转轮切片机(德国, LEICA); EG1150H 包埋机(德国, LEICA); CV5030 全自动封片机(德国, LEICA); ST5010 全自动染色机(德国, LEICA)。

1.5 方法

1.5.1 造模:小鼠进行适应性饲养 2 周后进行手术,术前 12 h 禁食,给药组和模型组动物进行手术去势,建立性激素缺乏的骨质疏松模型。腹腔注射 5% 水合氯醛(350 mg/kg 体质量)进行麻醉,置仰卧式平铺于手术台,将小鼠睾丸从腹腔推入阴囊中,在阴囊部切约为 1 cm 的切口,把睾丸结扎并剪去,之后缝合伤口;对照组做剪去睾丸周围一块脂肪的假实验。手术后,小鼠腹腔注射青霉素注射液 5 万单位/只,连续 3 d。

1.5.2 分组及给药:56 只 ICR 小鼠随机分为对照组 Con(假手术)、去势模型组 Mod、阳性药组 AS(阿仑膦酸钠 20 mg/kg)和补骨脂酚组 B10、B20(10 mg/kg 和 20 mg/kg),对照、模型和阳性药组与“壮骨关节丸对小鼠骨质疏松的治疗”实验^[9]共用。造模成功后饲养 6 周后给药,补骨脂酚使用注射用油配制,腹腔注射给药;阿仑膦酸钠灌胃给药,依据动物体质量给予药物体积 0.2 mL/10 g,每天给药一次,连续 8 周,对照组和模型组灌胃给予等体积的生理盐水。

1.5.3 动物样本处理:给药 8 周后,取材。取材前 12 h 禁食不禁水,眼内眦取血,血样放置离心管中,1 h 后离心 10 min,转速 3 000 r/min,吸取上清,贮存于-20 °C 冰箱中待测;取各组小鼠右腿胫骨,置于

75%乙醇中 3 d,每天换液,于第 4 天置于无水乙醇中保存用于骨密度检测;取各组小鼠左腿胫骨放置于甲醛中保存待测;取各组小鼠双腿股骨用于骨生物力学测定。

1.5.4 血清生化指标的检测:血清中 TRACP 按照试剂盒说明书进行检测;Osteocalcin 采用酶联免疫双抗夹心法进行检测;ALP 由全自动生化仪检测而来。

1.5.5 骨密度指标的检测:使用 VivaCT 40 扫描右腿胫骨,进行三维骨密度分析。从胫骨近心端的骨垢线消失处开始、向远心端进行扫描,每张厚度 10.6 μm,取 70 张进行分析。指标为骨体积分数 BV/TV、骨小梁数目 Tb.N、骨小梁厚度 Tb.Th、骨小梁分离度 Tb.Sp 和 DA。

1.5.6 骨最大荷载的检测:小鼠股骨的最大荷载由 YLS-16 A 小动物骨骼强度测定仪检测,最大荷载用 Mode 1 折断模式检测。

1.5.7 病理学观察:取左腿胫骨固定于 10% 甲醛溶液中,甲醛液固定的膝关节,经过 8% 的盐酸和 8% 的甲酸混合液脱钙后用 LEICA EG1150H 包埋机石蜡包埋,用 RM2135 转轮切片机进行 5 nm 切片, H & E 染色,光镜下对骨关节进行病理组织学评价。

1.6 统计方法

实验数据使用软件 SPSS19.0 进行统计分析,采用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 具有统计学差异。

2 结果

2.1 对血清生化指标的影响

与对照组相比,模型组骨钙素 OC 值显著升高, B10、B20 剂量组与模型组相比显著下降;小鼠的 ALP、TRACP 和 ALP/TRACP 各组间的值无显著性差异性,见表 1。

表 1 给药 8 周去势小鼠血清生化指标($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Serum biochemical indicators of castrated mice at 8 weeks of administration($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg/kg)	<i>n</i>	ALP/(U/L)	TRACP/(U/L)	ALP/TRACP	Osteocalcin/(pg/mL)
对照	—	10	27.30±9.10	19.87±7.22	1.46±0.57	177.69±45.13
模型	—	12	30.92±8.98	21.96±7.28	1.53±0.63	220.35±25.08 [#]
阿仑膦酸钠	20	12	35.17±11.19	23.58±6.88	1.54±0.48	245.75±28.82
补骨脂酚	10	11	27.58±9.62	26.86±12.22	1.14±0.55	167.48±74.11 [*]
补骨脂酚	20	11	35.50±18.67	23.21±8.33	1.68±0.93	108.76±38.17 ^{**}

注:与对照组相比,[#] $P < 0.05$;与模型组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$

Note: compared with control group, [#] $P < 0.05$; compared with model group, ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

2.2 对骨密度相关指标的影响

CT 扫描的 3D 结构显示,模型组动物的骨小梁

明显减少、断裂较多、间隙较大,而经过给药治疗之后骨小梁数量有了明显增加,见图 1。

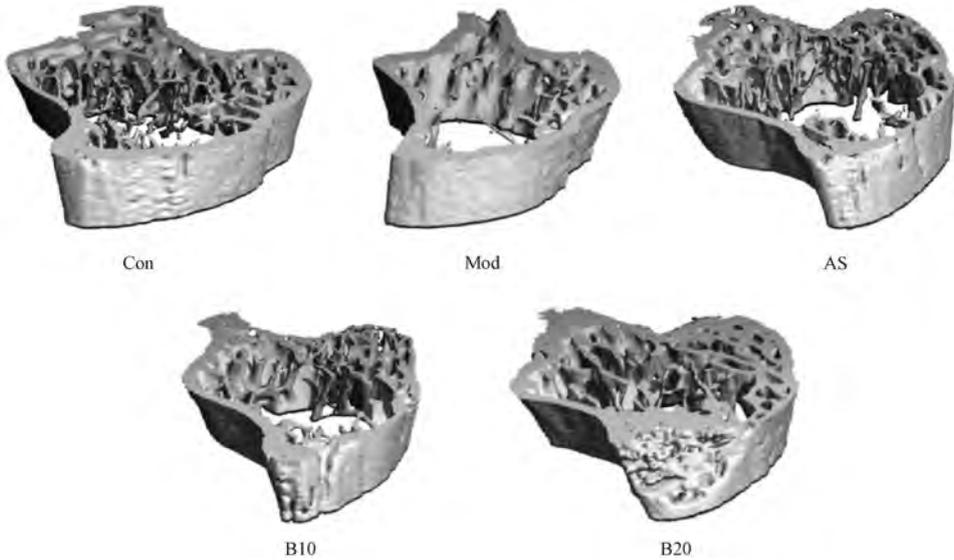


图 1 小鼠骨 CT 扫描典型图片

注:Con 对照组、Mod 去势模型组、AS 阿仑膦酸钠组、B10 和 B20 为补骨脂酚 10 和 20 mg/kg 组

Fig.1 Typical picture of mouse bone CT scan

Note: Con, control group; Mod, model group; AS, Alendronate Sodium group; B10 and B20 are bakuchiol 10 and 20 mg/kg groups

相对照组,小鼠模型组相对骨体积和骨小梁数量显著性降低,骨小梁厚度和分离度显著升高;给药后,各给药组与模型组相比骨小梁数量显著升高,

阳性药组和 B20 组骨小梁分离度和各向异性的程度显著降低,阳性药组骨小梁厚度显著性降低,见表 2。

表 2 给药 8 周去势小鼠骨密度相关指标 (x±s)

Table 2 Correlation index of bone mineral density in ovariectomized mice at 8 weeks(x±s)

组别	剂量/(mg/kg)	n/只	BV/TV	Tb.N	Tb.Th	Tb.Sp	DA
对照	—	10	0.34±0.06	3.53±0.49	0.10±0.02	0.19±0.03	1.82±0.29
模型	—	12	0.26±0.07 [#]	1.71±0.16 ^{###}	0.15±0.04 ^{##}	0.44±0.06 ^{###}	1.98±0.14
阿仑膦酸钠	20	12	0.28±0.03	2.51±0.35 ^{***}	0.11±0.02 ^{**}	0.29±0.05 ^{***}	1.72±0.21 ^{**}
补骨脂酚	10	11	0.26±0.03	2.14±0.23 ^{***}	0.12±0.02	0.42±0.22	1.90±0.17
补骨脂酚	20	11	0.29±0.04	2.45±0.42 ^{***}	0.12±0.03	0.30±0.05 ^{***}	1.78±0.15 [*]

注:与对照组相比,[#]P<0.05,^{##}P<0.01,^{###}P<0.001;与模型组相比,^{*}P<0.05,^{**}P<0.01,^{***}P<0.001

Note: compared with control group,[#]P<0.05,^{##}P<0.01,^{###}P<0.001; compared with model group,^{*}P<0.05,^{**}P<0.01,^{***}P<0.001

2.3 对骨最大荷载的影响

与对照组相比,模型组小鼠胫骨的最大荷载能力明显降低(P<0.01)。经过 8 周给药治疗后,各给药组较模型组相比,胫骨最大荷载均显著增高,见图 2。

多,粗壮、饱满,壁较厚,形态结构完整,排列紧密有序呈网状,密度、面积正常,间隙较小。模型组动物骨小梁数目明显减少,呈团块状,骨小梁间隙增大,关节面骺板下过渡骨小梁数目减少,其余未见明显变化。给药后,阳性药补骨脂酚治疗组与模型组相比,各组骨小梁数目均有所增多,膜下生骨增多,骨小梁间隙减小。

2.4 骨组织学检测

如图 3,对照组动物胫骨上端骺板软骨细胞柱状排列整齐,无软骨细胞坏死区存在,骨小梁形成较

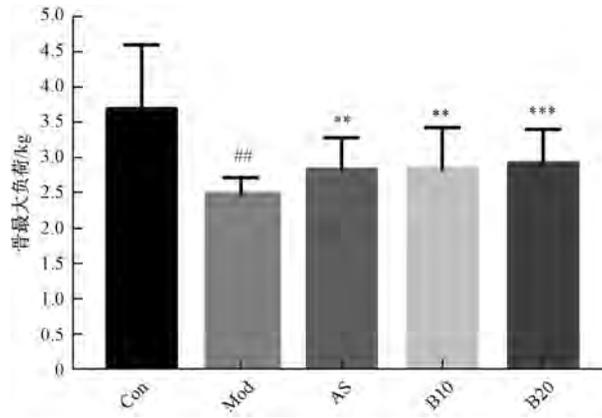


图2 给药后雄小鼠的骨最大荷载

注:Con 对照组、Mod 去势模型组、AS 阿仑膦酸钠组、B10 和 B20 为补骨脂酚 10 和 20 mg/kg 组, 与对照组相比,## $P<0.01$; 与模型组相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

Fig.2 Maximum bone load of male mice after administration

Note: Con, control group; Mod, model group; AS, Alendronate Sodium group; B10 and B20 are bakuchiol 10 and 20 mg/kg groups. compared with control group, ## $P<0.01$; compared with model group, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$

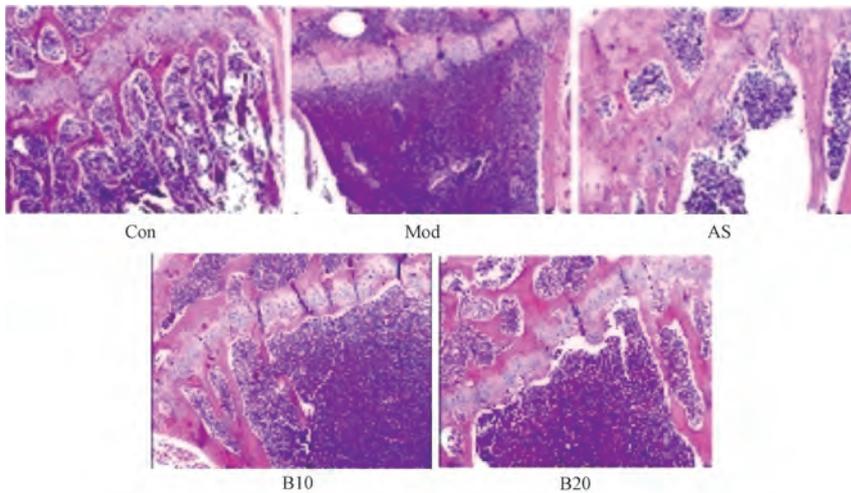


图3 雄性小鼠典型胫骨病理图片

注:Con 对照组、Mod 去势模型组、AS 阿仑膦酸钠组、B10 和 B20 为补骨脂酚 10 和 20 mg/kg 组

Fig.3 Typical tibia pathology pictures of male mice

Note: Con, control group; Mod, model group; AS, Alendronate Sodium group; B10 and B20 are bakuchiol 10 and 20 mg/kg groups.

3 讨论

骨质疏松症是一种以骨量低下、骨微结构破坏、导致脆性增加、易发生骨折为特征的全身性骨病。目前大多使用雌性动物进行骨质疏松研究,忽视了男性骨质疏松的研究,但是随着人口老龄化,男性性腺功能减退,雄激素分泌减少,65 岁以上的男性普遍存在程度不等的骨质疏松,病情的严重性和骨折

后死亡率高于女性。骨组织对性激素很敏感,男性体内的睾酮主要来自于睾丸,故本实验采用将睾丸切除,建立雄性小鼠骨质疏松模型^[10]。

双磷酸盐类是临床上应用广泛的抗骨质疏松症药物,但随着双磷酸盐类药物抑制破骨细胞时间的延长,造骨细胞也会受到影响,可能导致下颌骨坏死、肾脏毒性等副作用。而中药有着多年的临床应用,相对安全性较好,因此从中药中寻找抗骨质疏松有效成分是一个可行的途径。本研究表明,补骨脂

酚对于去势导致的雄性小鼠骨质疏松有较好治疗作用,提示其可以作为男性骨质疏松治疗的潜在有效化合物,进而作为候选化合物进行后续优化和开发研究。

参考文献

[1] Lim S H, Ha T Y, Kim S R, *et al.* Ethanol extract of *Psoralea corylifolia* L. and its main constituent, bakuchiol, reduce bone loss in ovariectomised Sprague-Dawley rats [J]. *Br J Nutr*, 2009, **101**(7): 1031-1039.

[2] 杨荣平, 寿清耀, 涂永勤, 等. 补骨脂提取物对体外培养新生大鼠颅骨成骨细胞的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2007, **18**(1): 32-34.

[3] 林汉钦, 丁秀玉, 张温良, 等. 包含补骨脂酚的用于治疗妇女乳腺癌的医药组合物. 中国: 200510051551 [P]. 2006-09-06.

[4] 郭礼和, 赵刚, 王雪松. 补骨脂酚类化合物的应用. 中国:

CN101088498A [P]. 2007-12-19.

[5] Kim Y C, Oh H, Kim B S, *et al.* In vitro protein tyrosine phosphatase 1 B inhibitory phenols from the seeds of *Psoralea corylifolia* [J]. *PLanta Med*, 2005, **71**(1): 87-89.

[6] Xin D, Wang H, Yang J, *et al.* Phytoestrogens from *Psoralea corylifolia* reveal estrogen receptor-subtype selectivity [J]. *Phytomedicine*, 2010, **17**(2): 126-131.

[7] Tsai M H, Huang G S, Hung Y C, *et al.* *Psoralea corylifolia* extract ameliorate experimental osteoporosis in ovariectomized rats [J]. *Am J Chin Med*, 2007, **35**(4): 669-680.

[8] 刘颖, 袁晓美, 毕亚男, 等. 补骨脂对维甲酸诱导的大鼠骨质疏松的治疗 [J]. *实验动物科学*, 2018, **35**(1): 44-47.

[9] Yuan X M, Bi Y N, Yan Z M, *et al.* The Osteoprotective Effect of Zhuanggu-Guanjie Pill in Orchidectomized Mice [P]. *International Conference on Biomedical and Biological Engineering*, 2016.

[10] Antonia Sophocleous and Aymen I Idris. Rodent models of osteoporosis [R]. *BoneKEy Reports*, 2014, **614**(3): 1-9.

The Therapeutic Effect of Bakuchiol on Osteoporosis in Male Mice

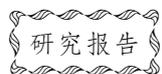
ZHANG Panyang¹, WANG Zhaoxin¹, YUAN Xiaomei¹, BI Yanan¹, ZHANG Yue^{1,2}, ZHOU Kun^{1,2}

(1. Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China)

(2. Key Laboratory of Prescriptions, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin, 300193, China)

Abstract: Objective To observe the therapeutic effect of bakuchiol on osteoporosis in male mice caused by castration. **Method** ICR male mice were randomly divided into five groups: control group, castration model group, positive drug group, bakuchiol 10 mg/kg and 20 mg/kg group. The control group was sham operated, and the other groups were resected small mice testicles. After 6 weeks of successful modeling, the mice were administered for eight weeks, serum biochemical parameters were measured, and the right leg tibia of each group was taken for MicroCT scanning. The femur of each group was used for bone biomechanical determination. **Result** The osteocalcin OC values of the control group, model group, B10 and B20 mg/kg group were (177.69±45.13), (220.35±25.08), (167.48±74.11) and (108.76±38.17); The Tb.N values of the control group, model group, positive drug group, B10 and B20 mg/kg group were (3.53±0.49), (1.71±0.16), (2.51±0.35), (2.14±0.23), and (2.45±0.42). **Conclusion** Bakuchiol has a therapeutic effect on ovariectomy leading to osteoporosis in male mice.

Key words: Osteoporosis; Bakuchiol; male mice; castration



补骨脂的不同提取物对大鼠毒性的初步研究*

王昭昕 杨莉¹ 卢国彦¹ 王跃飞¹ 张玥^{1,2} 周昆^{1,2}

(1.天津中医药大学中医药研究院,天津 300193)(2.天津中医药大学方剂学教育部重点实验室,天津 300193)

摘要:目的 研究不同提取物的补骨脂大鼠口服给药的毒性,为其临床应用提供安全依据。方法 112只SD大鼠雌雄各半,按性别、体质量随机分为8组:对照组,补骨脂生药组,补骨脂下层渗漉液高、低剂量组,补骨脂上层渗漉液高、低剂量组,补骨脂渗漉药渣高、低剂量组[生药组剂量(生药量)为3g/kg体质量,其他给药组高、低剂量(生药量)均分别为6和3g/kg体质量],每组14只。连续给药4周,给药周期结束后,禁食不禁水12h,取血进行相关血生化指标检测,解剖取脏器称重计算脏器系数并测定肝脏组织中MDA,组织病理学检查。结果 与对照组相比,补骨脂生药组肝脏脏器系数、ALP、MDA显著升高,胸腺脏器系数、T-AOC显著降低;补骨脂下层渗漉液剂量组肝脏脏器系数、T-AOC、ALT显著升高;补骨脂渗漉药渣高剂量组肝脏脏器系数、MDA显著升高而雌性大鼠T-AOC值显著降低,药渣低剂量组并没有明显的肝、肾毒性;补骨脂上层渗漉液组无显著差异。结论 补骨脂上层渗漉液的安全性优于补骨脂下层渗漉液,但基于有效成分测定结果提示,下层渗漉液更合适入药。

关键词:补骨脂;肝毒性;不同提取物

中图分类号:R285.5 文献标识码:A 文章编号:1006-6179(2019)03-0006-07

DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.002

补骨脂是传统中药材,为豆科植物补骨脂 *Psoralea corylifolia* L.的干燥成熟果实,含香豆素类、黄酮类和单萜酚类等化合物^[1],具有补肾助阳、纳气平喘、温脾止泻的功能,外用可治牛皮癣、斑秃、银屑病等皮肤病;补骨脂应用广泛,仅药典中收录的含补骨脂的中成药就有30余种,其他标准和临床医师处方中就更多。补骨脂最早见于《雷公炮灸论》云:“性本大燥,毒。”后世医家对补骨脂也有论述,《开宝本草》云:“治五劳七伤,风虚冷,骨髓伤败,肾冷精流及妇人血气堕胎。”但对其毒性记载甚少。近年来,随着医药科学的发展,人们对补骨脂的研究也越来越深入,临床不良反应以及毒性研究的报道也越来越多,补骨脂药材乃至水提物对动物的肝毒性也被不同的实验证实^[2-6],但是中药的提取方式众多,获取的提取物的成分和安全性也会有差别,我们对补骨脂的三种不同提取物进行了口服给药4周的大鼠毒性实验研究,以评价不同提取物的安全性,为后续补骨脂提取工艺的改进和入药的选择提供前期研究基础。

1 材料与方法

1.1 受试样品

补骨脂药材(原药材)、补骨脂生药粉、补骨脂下层渗漉液、补骨脂上层渗漉液、补骨脂渗漉药渣:均为天津中医药大学中医药研究院王跃飞副研究员团队制备提供,产品批号:20120920。

补骨脂生药粉:补骨脂药材直接粉碎,制成的棕色补骨脂生药粉;

补骨脂下层渗漉液(每克提取物折合生药2.66g):补骨脂原药材经70%乙醇浸泡后渗漉,渗漉液减压回收,静置分层,稠浸膏与环糊精混合制得补骨脂提取物;

补骨脂上层渗漉液(每克提取物折合生药18.43g):补骨脂原药材经70%乙醇浸泡后渗漉,渗漉液减压回收,静置分层,上层60℃减压烘干,制得渗漉上层干膏提取物。

补骨脂渗漉药渣(每克提取物折合生药

收稿日期:2018-12-10

* 基金项目:国家科技重大专项项目(No.2014ZX09304307-001-005, No.2011ZX09201-201-21)

作者简介:王昭昕(1996—),女,硕士,研究方向:中药药理学研究。E-mail:1604145294@qq.com

通信作者:周昆(1978—),男,副研究员,硕士,研究方向:中药毒性和配伍减毒。E-mail:z.k.ken@263.net

1.18 g):补骨脂原药材经70%乙醇浸泡后渗漉,渗漉药渣再次水提,60℃减压烘干,制得渗漉药渣提取物。各受试样品成分含量如下(表1)。

表1 受试样品成分含量

Table 1 Contents of the components of the test sample

(样品)	补骨脂素/%	异补骨脂素/%	补骨脂苷/%	异补骨脂苷/%	补骨脂酚/%	补骨脂甲素/%	补骨脂乙素/%
生药粉	5.01	4.14	14.23	14.23	62.52	2.26	4.37
下层渗漉液	2.69	2.19	—	—	58.72	1.84	3.60
上层渗漉液	0.11	0.09	0.10	0.07	2.25	0.12	0.20
渗漉药渣	1.84	1.61	13.57	9.38	0.85	—	—

1.2 动物及饲养

SPF级SD大鼠112只,雌雄各半,购自北京华阜康生物科技股份有限公司,生产许可证号:SCXK(京)2009-0015。动物饲养于天津中医药大学实验动物中心,使用许可证号:SYXK(津)2014-0002。所用饲料为全价颗粒饲料,天津市华荣实验动物科技有限公司生产。

1.3 试剂与仪器

TBA(总胆汁酸)、CRE(血清肌酐)、TC(总胆固醇)、TG(甘油三酯)、TP(总蛋白)、ALT(天冬氨酸氨基转氨酶)、ALP(碱性磷酸酶)、ALB(白蛋白)、BUN(尿素氮)以及AST(丙氨酸氨基转换酶)试剂盒均由中生北控生物科技股份有限公司生产。

丙二醛(MDA)测定试剂盒(TBA法)、总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(比色法)均由南京建成生物工程研究所生产。

离心机(赛默飞,Legend Micro17型);恒温培养振荡器(上海世平实验设备有限公司,SPH-103B型);全自动封闭脱水机(Leica,ASP300S型),切片机(Leica,RM2135型);显微镜(OLYMPUS,BX51型);包埋机(天津航空机电公司,BMJ-1型);多功能酶标仪(Tecan,InfiniteM200型);全自动生化分析仪(日立,7020型)。

1.4 方法

具体实验方法参考了文献^[4]中描述的中药长期毒性实验方法。

1.4.1 分组与给药:将大鼠按体质量、性别随机分为8组:对照组(对照组与补骨脂水提取物与水提药渣的毒性比较研究相同)、补骨脂生药3g生药/kg剂量组,补骨脂下层渗漉液6g生药/kg、3g生药/kg剂量组,补骨脂上层渗漉液6g生药/kg、3g生药/kg剂量组,补骨脂渗漉药渣6g生药/kg、3g生药/kg剂量组,每组14只,连续灌胃给药4周,最大

给药剂量为2015版药典规定给药剂量的6倍。

1.4.2 一般状况观察:给药期间,每周称体质量一次,并根据体质量调整给药剂量;每天给药前后观察动物的毛色、进食、活动等情况。

1.4.3 血清生化检测:给药期结束,动物禁食不禁水12h,腹腔注射水合氯醛进行麻醉。由腹主动脉取血,3000r/min离心10min,分离得到血清,通过自动生化仪检测TBA、CRE、TC、TG、TP、ALT、ALP、ALB、BUN、AST。

1.4.4 MDA和T-AOC的含量测定:肝脏加生理盐水研磨制备10%的匀浆,用南京建成T-AOC和MDA试剂盒测定大鼠肝脏中T-AOC和MDA的含量。

1.4.5 脏器系数及组织病理学检查:剖腹小心摘取心脏、肝脏、肾脏、脾脏、胸腺称重,计算脏器系数(脏器质量/体质量)。切取大鼠肝脏一叶、左肾于10%中性甲醛溶液中固定,固定液为组织体积的5~10倍,固定48h,石蜡切片,常规HE染色,光镜下观察组织病变。

1.5 统计方法

采用Spss 17.0软件进行单因素方差分析进行统计学处理^[7],以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P < 0.05$,为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 对大鼠一般情况和体质量的影响

给药期间,大鼠进食、活动情况正常,毛色无异,各组动物均无死亡。补骨脂不同提取物灌胃给药4周对大鼠体质量的影响如下(表2,表3):与对照组相比,雄性大鼠下层渗漉液高剂量组在第2周体质量显著降低;雌性大鼠渗漉药渣高剂量组第4周的体质量显著升高,其他组无显著变化。

表 2 不同提取物的补骨脂对雄性大鼠体质量的影响

Table 2 Effects of Psoralen from different extractions on Body Weight of Male Rats

组别	剂量 g 生药/kg	n	第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
对照	—	7	161.5±20.5	203.0±27.3	231.4±32.4	261.0±38.3	284.3±42.8
生药	3	7	154.1±19.8	201.8±23.9	232.3±28.1	243.0±31.7	274.3±41.6
下层渗漉液	6	7	166.7±14.8	193.4±13.1	200.5±12.0*	238.3±13.6	248.4±15.4
	3	7	151.2±11.1	204.4±12.4	239.8±18.6	259.3±20.8	285.9±24.7
上层渗漉液	6	7	163.2±17.9	198.9±13.7	232.5±13.4	258.4±12.7	280.9±16.2
	3	7	162.4±19.8	203.2±16.5	218.5±18.8	260.1±26.0	281.6±29.5
渗漉药渣	6	7	161.3±14.4	201.3±23.1	223.7±29.6	245.8±39.9	268.7±44.0
	3	7	155.9±11.8	215.9±14.1	243.4±17.4	271.4±15.9	298.6±19.0

注:与对照组比较,* $P<0.05$ Note: * $P<0.05$ vs control group

表 3 不同提取物的补骨脂对雌性大鼠体质量的影响

Table 3 Effects of Psoralen from different extractions on Body Weight of Female Rats

组别	剂量 g 生药/kg	n	第 0 周	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
对照	—	7	158.6±14.8	175.7±16.8	188.6±20.0	197.4±19.8	207.7±20.9
生药	3	7	154.1±12.4	171.9±9.9	193.7±7.8	204.8±6.9	214.0±8.3
下层渗漉液	6	7	148.2±7.32	165.8±6.0	182.3±7.9	191.2±10.3	198.9±13.7
	3	7	149.6±9.9	167.1±10.3	183.4±7.2	197.9±9.2	210.4±11.8
上层渗漉液	6	7	142.2±18.9	172.9±15.5	182.9±11.0	198.0±15.2	203.2±13.4
	3	7	154.2±10.9	174.1±10.0	191.3±12.4	200.8±10.3	211.1±10.5
渗漉药渣	6	7	150.7±16.6	176.2±16.0	192.2±16.3	212.7±19.4	231.3±17.1*
	3	7	149.6±9.7	159.8±7.1	175.7±8.2	190.2±7.7	198.5±6.6

注:与对照组比较,* $P<0.05$ Note: * $P<0.05$ vs control group

2.2 对大鼠血清生化影响

与对照组比较,雄性大鼠生药组 ALT、ALP、TBA、T-CHO、ALB 显著降低;下层渗漉液高剂量组 ALT、BUN 显著升高,T-CHO、ALB 显著降低;下层渗漉液低剂量组 TBA、TG、T-CHO 显著降低;渗漉药渣低剂量组 ALT、TBA、ALB 显著降低;上层渗漉液高、低剂量组、渗漉药渣高剂量组无显著性差异。雌性大鼠生药低剂量组 ALP 显著升高;下层渗漉液高剂量组 BUN 显著升高,ALB 显著降低;下层渗漉液低剂量组 ALT 显著升高,CRE 显著降低;上层渗漉液高剂量组 BUN 显著升高;渗漉药渣高剂量组 ALT、

AST 显著降低,TBA、T-CHO、BUN 显著升高;渗漉药渣低剂量组 TP 显著升高(表 4,表 5)。

2.3 对大鼠肝脏 MDA 和 T-AOC 的影响

与对照组比较,雄性大鼠生药低剂量组,渗漉药渣高剂量组 MDA 显著升高;下层渗漉液高、低剂量组,渗漉药渣低剂量组 T-AOC 显著升高。雌性大鼠生药低剂量组,渗漉药渣高剂量组 MDA 显著升高,T-AOC 显著降低;下层渗漉液高剂量组 T-AOC 显著降低;渗漉药渣低剂量组 MDA 显著降低,T-AOC 显著降低(见表 6,表 7)。

表 4 不同提取物的补骨脂对雄性大鼠血清生化指标的影响(一)

Table 4 Effects of Psoralen from different extractions on serum biochemical parameters in Male Rats(1)

组别	剂量 g 生药/kg	n	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	ALP/(U/L)	TBA/(μ mol/L)	TG/(mmol/L)
对照	—	7	35.33±6.65	99.83±24.37	172.00±36.69	27.50±19.87	0.53±0.29
生药	3	7	27.86±4.26*	88.00±13.64	122.43±27.23*	4.00±2.45**	0.33±0.12
下层渗漉液	6	7	61.57±23.15*	112.71±19.28	210.14±110.69	21.86±14.28	0.39±0.16
	3	7	33.29±5.62	98.29±18.20	188.57±33.60	9.57±4.28*	0.27±0.05*
上层渗漉液	6	7	34.57±6.19	78.57±7.68	180.29±17.09	21.43±8.30	0.48±0.26
	3	7	33.29±4.39	86.14±9.19	161.14±32.41	20.29±12.83	0.62±0.41
渗漉药渣	6	7	29.67±11.16	89.17±17.65	156.50±24.06	20.67±20.74	0.44±0.30
	3	7	27.00±3.32*	88.14±10.21	142.57±26.81	7.71±3.90*	0.35±0.14

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$ vs control group

表 4 不同提取物的补骨脂对雄性大鼠血清生化指标的影响(二)

Table 4 Effects of Psoralen from different extractions on serum biochemical parameters in Male Rats(2)

组别	剂量 g 生药/kg	n	T-CHO/(mmol/L)	BUN/(μmol/L)	CRE/(μmol/L)	TP/(g/L)	ALB/(g/L)
对照	—	7	1.77±0.24	8.66±1.67	26.50±3.33	60.97±2.44	33.65±0.84
生药	3	7	1.26±0.21**	8.69±1.89	28.57±3.95	62.51±3.40	31.46±0.95**
下层渗漉液	6	7	1.05±0.31***	11.70±1.80**	26.14±2.91	61.37±4.93	31.70±1.93*
	3	7	1.42±0.18*	7.89±0.54	25.57±4.31	60.85±2.18	32.44±1.17
上层渗漉液	6	7	1.67±0.36	9.02±1.20	25.57±1.90	60.74±2.56	32.59±0.98
	3	7	2.03±0.51	8.20±1.14	27.00±3.60	59.13±1.80	32.36±1.29
渗漉药渣	6	7	1.52±0.28	10.02±2.11	24.83±2.56	62.23±2.59	32.72±0.66
	3	7	1.45±0.31	9.80±1.48	29.86±5.64	62.40±3.80	31.47±0.97**

注:与对照组比较,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001

Note: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs control group

表 5 不同提取物的补骨脂对雌性大鼠血清生化指标的影响(一)

Table 5 Effects of Psoralen from different extractions on serum biochemical parameters in Female Rats(1)

组别	剂量 g 生药/kg	n	ALT/(U/L)	AST/(U/L)	ALP/(U/L)	TBA/(μmol/L)	TG/(mmol/L)
对照	—	7	31.71±3.45	94.42±10.26	86.14±23.08	14.14± 5.34	0.40±0.15
生药	3	7	28.83±6.59	87.50±15.23	143.67±55.65*	14.00±11.40	0.40±0.18
下层渗漉液	6	7	33.86±5.30	90.71±14.75	96.29±22.45	16.43± 8.66	0.39±0.14
	3	7	40.86±10.09*	97.57± 8.42	96.71±25.56	14.86± 9.60	0.27±0.06
上层渗漉液	6	7	33.67±5.05	89.50±11.08	105.50±41.96	17.67±14.35	0.33±0.08
	3	7	30.57±3.26	98.57± 9.96	81.00±18.08	13.29± 3.77	0.40±0.09
渗漉药渣	6	7	23.83±3.71**	74.17± 8.04**	94.00±26.10	32.00±17.20*	0.46±0.19
	3	7	38.67±13.92	83.83±10.74	111.33±51.47	26.00±18.51	0.41±0.10

注:与对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

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

表 5 不同提取物的补骨脂对雌性大鼠血清生化指标的影响(二)

Table 5 Effects of Psoralen from different extractions on serum biochemical parameters in Female Rats(2)

组别	剂量 g 生药/kg	n	T-CHO/(mmol/L)	BUN/(μmol/L)	CRE/(μmol/L)	TP/(g/L)	ALB/(g/L)
对照	—	7	1.50±0.57	8.90±0.69	30.71±1.60	63.16±2.51	34.24±0.99
生药	3	7	1.33±0.70	8.41±1.35	28.00±4.43	65.20±4.05	33.78±1.37
下层渗漉液	6	7	1.29±0.46	11.56±2.38*	28.43±3.78	60.96±1.98	32.80±0.90*
	3	7	1.54±0.46	8.67±1.52	26.71±2.56**	63.69±2.59	33.20±1.91
上层渗漉液	6	7	1.90±0.41	9.85±0.79*	31.33±0.82	62.42±2.83	33.98±1.83
	3	7	1.93±0.40	9.11±1.32	29.71±1.80	57.24±11.43	33.63±0.95
渗漉药渣	6	7	2.31±0.52*	10.67±1.73*	28.50±3.39	65.92±3.39	34.52±1.57
	3	7	2.11±0.40	9.61±0.75	28.67±3.01	66.82±1.58*	34.32±0.76

注:与对照组比较,*P<0.05,**P<0.01

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

表 6 不同提取物的补骨脂对雄性大鼠 MDA 的影响

Table 6 Effects of Psoralen from different extractions on MDA in Male Rats

组别	剂量 g 生药/kg	n	MDA/(nmol/mgprot)	T-AOC 含量/(U/mgprot)
对照	—	7	0.94±0.37	0.11±0.06
生药	3	7	2.77±0.98***	0.12±0.04
下层渗漉液	6	7	1.11±0.41	0.27±0.04***
	3	7	1.06±0.38	0.19±0.08*
上层渗漉液	6	7	0.77±0.14	0.16±0.05
	3	7	0.67±0.11	0.12±0.05
渗漉药渣	6	7	1.98±0.70**	0.14±0.04
	3	7	1.06±0.26	0.18±0.07*

注:与对照组比较,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001

Note: *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 vs control group

表 7 不同提取物的补骨脂对雌性大鼠 MDA 的影响

Table 7 Effects of Psoralen from different extractions on MDA in Female Rats

组别	剂量 g 生药/kg	n	MDA/(nmol/mgprot)	T-AOC 含量/(U/mgprot)
对照	—	7	1.56±0.34	0.32±0.05
生药	3	7	3.51±0.83***	0.22±0.06**
下层渗漉液	6	7	1.40±0.90	0.21±0.04***
	3	7	2.33±1.12	0.34±0.10
上层渗漉液	6	7	1.98±0.38	0.32±0.05
	3	7	1.70±0.38	0.27±0.10
渗漉药渣	6	7	3.18±0.79***	0.21±0.04***
	3	7	0.98±0.26**	0.18±0.04***

注:与对照组比较,**P<0.01,***P<0.001

Note: **P<0.01, ***P<0.001 vs control group

2.4 对大鼠脏器系数及组织病理学的影响

与对照组相比,雄性大鼠生药低剂量组胸腺系数显著降低而肝、肾系数显著升高;下层渗漉液高剂量组,渗漉药渣高、低剂量组肝、肾系数显著升高而胸腺系数显著降低。雌性大鼠下层渗漉液低剂量组,渗漉药渣低剂量组肝、肾系数显著升高而胸腺系数显著降低;生药低剂量组,渗漉药渣高剂量组肝、

肾系数显著升高;下层渗漉液高剂量组肝系数显著升高而胸腺系数显著降低;上层渗漉液低剂量组肝系数显著升高,其他各组的值比较差异不具有统计学意义(见表 8,表 9)。

光镜下观察,给药组大鼠的肝脏、肾脏和生殖器官未见明显的组织病变,与对照组无明显差别。

表 8 不同提取物的补骨脂对雄性大鼠脏器系数的影响

Table 8 Effects of Psoralen from different extractions on organ coefficient in Male Rats

组别	剂量/(g 生药/kg)	n	心	肝	脾	肾	胸腺
对照	—	7	0.304±0.046	2.780±0.718	0.193±0.037	0.620±0.114	0.172±0.058
生药	3	7	0.318±0.024	4.239±0.380*	0.172±0.022	0.764±0.080*	0.111±0.022*
下层渗漉液	6	7	0.322±0.042	4.050±0.185***	0.183±0.028	0.746±0.072*	0.118±0.036
	3	7	0.327±0.026	3.354±0.221	0.200±0.033	0.719±0.045	0.129±0.024
上层渗漉液	6	7	0.313±0.011	2.870±0.175	0.177±0.016	0.688±0.044	0.119±0.027
	3	7	0.315±0.027	2.864±0.229	0.211±0.034	0.659±0.100	0.167±0.053
渗漉药渣	6	7	0.317±0.050	4.695±0.841**	0.175±0.040	0.755±0.086*	0.123±0.017
	3	7	0.327±0.019	4.190±0.393***	0.189±0.013	0.765±0.070*	0.156±0.076

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs control group

表 9 不同提取物的补骨脂对雌性大鼠脏器系数的影响

Table 9 Effects of Psoralen from different extractions on organ coefficient in Female Rats

组别	剂量/(g 生药/kg)	n	心	肝	脾	肾	胸腺
对照	—	7	0.366±0.031	3.096±0.119	0.234±0.029	0.707±0.037	0.207±0.039
生药	3	7	0.385±0.024	5.093±0.214***	0.237±0.021	0.822±0.051***	0.192±0.025
下层渗漉液	6	7	0.348±0.010	4.268±0.254***	0.211±0.033	0.821±0.146	0.155±0.017**
	3	7	0.379±0.016	3.838±0.267***	0.231±0.023	0.815±0.070**	0.170±0.015*
上层渗漉液	6	7	0.364±0.026	2.987±0.135	0.206±0.028	0.717±0.031	0.189±0.046
	3	7	0.410±0.098	3.307±0.182*	0.244±0.064	0.745±0.038	0.222±0.066
渗漉药渣	6	7	0.387±0.046	4.935±0.376***	0.243±0.023	0.897±0.075***	0.181±0.038
	3	7	0.403±0.033	3.869±0.336***	0.239±0.035	0.839±0.068***	0.149±0.017**

注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

Note: * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ vs control group

3 讨论

本实验为研究不同提取物补骨脂大鼠口服给药毒性,分别设立对照组、补骨脂生药组,补骨脂下层渗漉液低、高剂量组,补骨脂上层渗漉液低、高剂量组,补骨脂渗漉药渣低、高剂量组。实验所需补骨脂生药和不同提取物的最大给药量为 2015 版药典规定的 6 倍。实验结果表明:与对照组相比,补骨脂生药组肝脏脏器系数、ALP、MDA 明显升高,胸腺脏器系数、T-AOC 显著降低,再次证明补骨脂生药给药 4 周即对大鼠肝脏有一定的损伤。补骨脂下层渗漉液组肝脏脏器系数、T-AOC、ALT 也显著升高,表明补骨脂下层渗漉液也对肝脏有一定的损伤,但雄性大

鼠 T-AOC 值明显升高;补骨脂渗漉药渣高剂量组肝脏脏器系数、MDA 显著升高而雌性大鼠 T-AOC 值显著降低;表明补骨脂渗漉药渣高剂量给药 4 周对肝脏有一定的损伤,而渗漉药渣低剂量组并没有肝、肾毒性指标出现显著性,表现出较好的剂量相关性;补骨脂上层渗漉液没有明显毒性。总结实验结果也显示三种不同提取物中渗漉药渣的肝毒性最大,其次为下层渗漉液,上层渗漉液的安全性最高。

对三个不同提取物中有效成分的含量测定结果显示,补骨脂上层渗漉液中有效成分的含量极少,其中含量最多的补骨脂酚也只有 2.26%,渗漉药渣中含有较多的补骨脂苷和异补骨脂苷,而补骨脂酚含量极少仅 0.58%,因此二者不适合用作药用;而下层渗漉液中没有检测到补骨脂苷和异补骨脂苷,补

骨脂素、异补骨脂素的含量也不多,但补骨脂酚的含量高达 58.72%,有研究认为,补骨脂苷、异补骨脂苷、补骨脂素、异补骨脂素是补骨脂中的主要毒性成分^[4]。白茹玉等^[8]研究结果表明,大剂量补骨脂素给予小鼠时,引起药物急性毒性反应;异补骨脂素可引起 HepG2 细胞内胆汁酸升高和细胞毒性^[9];还有研究表明异补骨脂素和补骨脂素对小鼠肝功能有一定影响^[10];补骨脂乙素可抑制 Tca8113 细胞的增殖并诱导细胞凋亡^[11]。同时,已有研究证实补骨脂素和异补骨脂素对小鼠骨质疏松有较好的治疗作用^[12],刘颖等^[13]的研究表明,补骨脂对维甲酸诱导的大鼠骨质疏松有治疗作用。而补骨脂酚是毒性相对较小有效成分,有抗菌、抗肿瘤、降糖降血脂、抗氧化、消炎、雌激素样等作用^[14-18]。综上,下层渗漉液更合适入药。当然,这一结论尚需更多的药效和安全性评价研究来支持。

参 考 文 献

[1] 梁建军,徐亚莉,田树喜,等.补骨脂研究现状及前景[J].河北中医,2013,35(12):1904-1906.

[2] Nam S W, Baek J T, Dong S L, *et al.* A case of acute cholestatic hepatitis associated with the seeds of (Boh-Gol-Zhee) [J]. Clin Toxicol, 2005, 43(6):589-591.

[3] 谭沛,赵超,周昆,等.补骨脂灌胃 30 天对大鼠肝毒性的实验研究[J].新疆中医药,2010,28(2):11-13.

[4] 周昆,代志,柳占彪,等.补骨脂水提取物引起的大鼠肝损害[J].天津中医药大学学报,2013,32(4):221-224.

[5] 毕亚男,李震,卢国彦,等.补骨脂水提取物对小鼠的肝毒性及

胆汁酸转运的影响[J].药物评价研究,2015,38(3):267-270.

[6] 彭莉,张林,李品,等.潜在毒性中药探讨[J].中国实验方剂学杂志,2017,23(2):227-234.

[7] 牟文波,李慧,安会苹,等.幼年 SD 大鼠生化指标背景数据的建立和结果分析[J].中国药物警戒,2017,14(11):641-645.

[8] 白茹玉,张盼阳,毕亚男,等.补骨脂素和异补骨脂素的急性毒性和相互作用[J].药物评价研究,2018,41(6):1068-1072.

[9] 周昆,毕亚男,史红.异补骨脂素抑制 MRP2、MRP3 所致的 HepG2 细胞内胆汁酸蓄积和毒性[J].中国药理学通报,2015,31(8):1112-1116.

[10] Wang X, Lou Y J, Wang M X, *et al.* Furocoumarins affect hepatic cytochrome P450 and renal organic ion transporters in mice [J]. Toxicol Lett, 2012, 209(1):67-77.

[11] 史毅,金晓红,吴伟忠,等.补骨脂乙素对舌鳞状细胞癌 Tca8113 细胞增殖的抑制作用和凋亡诱导作用及其机制[J].吉林大学学报(医学版),2016,42(4):725-730.

[12] 渠海波,张朝.骨质疏松的研究进展[J].包头医学院学报,2013,29(3):119-121.

[13] 刘颖,袁晓美,毕亚男,等.补骨脂对维甲酸诱导的大鼠骨质疏松的治疗[J].实验动物科学,2018,35(1):44-47.

[14] 于悦,王亚静,皮佳鑫,等.补骨脂酚研究进展[J].山东中医药大学学报,2013,37(2):174-176+177+178.

[15] 关丽杰,赵礼慧,邵双,等.补骨脂抑菌活性成分分析及鉴定[J].中国生物防治学报,2013,29(4):655-660.

[16] 苗琳,马尚伟,樊官伟,等.补骨脂酚拮抗 AR 转录活性抑制雄激素诱导的前列腺癌细胞 LNCaP 的增殖[J].天津中医药,2013,30(5):291-293.

[17] 柴丽娟,王安红,徐金虎,等.补骨脂 4 种组分对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞炎症因子的影响[J].中药新药与临床药理,2013,24(4):360-363.

[18] 寿清耀,杨荣平,王宾豪,等.补骨脂雌激素样作用的有效成分研究[J].中药新药与临床药理,2007,(6):425-427.

Preliminary Study on Toxicity of Psoralen from Different Extractions in Rats

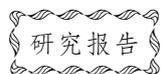
WANG Zhaoxin¹, YANG Li¹, LU Guoyan¹, WANG Yuefei¹, ZHANG Yue^{1,2}, ZHOU Kun^{1,2}

(1. *Institute of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China*)

(2. *Key Laboratory of Prescriptions, Ministry of Education, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China*)

Abstract: Objective To study the toxicity of oral administration of rats in different extractions of psoralen, and provide a safe basis for its clinical application. **Method** One hundred and twelve SD rats were divided into 8 groups according to gender and body weight: control group, psoralen drug group, high and low dose group of osmotic lower osmosis, high osmium osmium permeation, In the low-dose group, the high-and low-dose group of psoralen osmosis drug slag (the dose of the crude drug group was 3 g/kg (raw dose), and the high and low doses of other drug-administered groups were 6 and 3 g/kg, respectively. (raw dose)), 14 in each group. After 4 weeks of continuous administration, after the end of the drug-administered period, the rats were fasted for 12 hours, and blood was taken for blood biochemical indicators. The organ was weighed and the organ coefficient was calculated and the MDA in the liver tissue was determined. Histopathological examination was performed. **Result** Compared with the control group, the liver organ coefficient, ALP and MDA of the psoralen crude drug group were significantly increased, the thymus organ coefficient and T-AOC were significantly decreased; the visceral osmosis liquid lower layer extract group was characterized by liver organ coefficient, T-AOC and ALT were significantly increased; the liver organ coefficient and MDA of the high-dose group of psoralen and sputum slag were significantly increased while the T-AOC value of female rats was significantly decreased, while the low-dose group of drug residue did not have liver or kidney. The toxicity index was significant; there was no significant difference in the upper layer of psoralen permeation. **Conclusion** The safety of the upper osmotic liquid of psoralen is better than that of the lower osmotic liquid of psoralen. However, based on the result of the determination of active ingredients, the lower layer of osmotic solution is more suitable for the drug site.

Key words: Psoralen; hepatotoxicity; different extractions



不同垫料对 SPF 级 KM 小鼠学习记忆能力的影响*

胡建武 李树梅 梁俊仕 余光祯 李亮 武会娟 陈禹保

(北京实验动物研究中心, 北京 100012)

摘要:目的 探讨非专业加工制作的麦秸垫料、玉米芯垫料、刨花垫料和纸质垫料对 SPF 级昆明小鼠(KM)学习记忆能力的影响差异,以及不同垫料对小鼠行为学的影响。**方法** 选用 SPF 级 KM 小鼠 24 只,分别使用麦秸垫料、刨花、玉米芯和纸质垫料饲养 8 周后,开展 MORRIS 水迷宫行为学实验,考察其行为学的变化和学习记忆能力的差异。**结果** 麦秸组学习记忆能力增加明显高于刨花组($P < 0.05$);水迷宫实验期间,各组增重差异不显著。定位航行实验结果显示,麦秸组第 5 d 的逃避潜伏期显著低于其余三组($P < 0.05$),其余时间段差异无显著性;空间探索实验结果显示麦秸组小鼠穿过原平台位置的次数、游泳时间均多于其余三组。**结论** 不同垫料对水迷宫实验中 KM 小鼠的体质量影响较小,麦秸垫料对 KM 小鼠学习记忆能力的影响优于刨花垫料和玉米芯垫料,建议将麦秸垫料作为实验动物接触性垫料推广使用。

关键词:垫料;KM 小鼠;水迷宫实验;学习记忆

中图分类号: Q95-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0013-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.003

垫料是实验动物生存环境中的接触性基础材料,不同的垫料生存环境直接影响实验动物的生理活动,进而影响动物实验结果的准确性,选择不同垫料也是体现动物福利的重要内涵。因此,实验动物国家及地方标准对实验动物垫料的物理性状、化学及生物特性都有明确的规定和要求。目前所知实验动物品种、品系、年龄、性别等对实验动物记忆能力均有不同程度的影响,但未知不同垫料饲养环境对实验动物记忆认知能力是否有影响。为了进一步探索新型麦秸垫料的安全性及其对啮齿类实验动物接触环境的影响,本实验采用 SPF 级昆明小鼠为研究对象,应用 MORRIS 水迷宫行为学实验方法,比较、开发利用新型麦秸垫料和其他 3 种垫料(刨花垫料、玉米芯垫料和纸质垫料)在工作状态下对小鼠学习记忆能力和血液生化指标的影响。为今后开展与改善学习记忆能力相关药物研究的实验动物垫料选择提供参考,也为新型麦秸垫料的安全使用和大力推广提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠(孕 13 d) 8 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2016-0006],饲养在北京实验动物研究中心屏障设施内[SYXK(京)2015-0046],小鼠自由进食、进水,温度:18~26℃,湿度:38%~50%。维持 12/12 h 明暗交替光照。所有实验操作遵循动物使用相关伦理要求,福利伦理审查批准号:BLARC-2017112401。

1.2 垫料及主要仪器

1.2.1 新型麦秸垫料:利用蒸汽爆破工艺对麦秸秆原料进行爆破,做进一步处理后,进行⁶⁰Co 照射及真空包装后获得新型麦秸垫料。玉米芯垫料、刨花垫料均购自北京科澳协力饲料有限公司;纸质垫料购自北京美绿洲生物科技有限公司。

1.2.2 主要仪器:超净工作台(苏杭);电子天平(Sartorius,BSA220ZS 型);水迷宫(ZS-001MORRIS),ZS-001 MORRIS 水迷宫动物行为分析系统(众实迪

收稿日期:2018-12-17

* 基金项目:北京市科学技术研究院青年骨干项目,项目编号:201626

作者简介:胡建武(1976—),男,兽医师,从事实验动物管理工作。E-mail:hujianwu@blarc.com.cn

通信作者:陈禹保(1963—),男,副研究员,研究方向:生物大数据、生物信息学、免疫组学。E-mail:chenyubao@blarc.com.cn

创,购自北京美绿洲生物科技有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 实验分组:8 只 KM 孕鼠单笼饲养,2 只/笼,分别饲养在麦秸垫料、玉米芯、刨花和纸质 4 种垫料中。选取离乳后仔鼠 24 只,随机分为 4 组,每组 6 只,雌雄各半,分别按照使用垫料的不同分为麦秸垫料组、玉米芯组、刨花组和纸质垫料组。每周更换一次垫料,常规饲养。在相同环境条件下继续饲养 8 周后,观察各组小鼠的相应指标。

1.3.2 适应性观察:观测 KM 小鼠分别对 4 种垫料饲养适应情况,观察小鼠行为反应、身体清洁度、有无外伤及过敏、嚼食垫料等情况。

1.3.3 水迷宫行为学测试:应用 ZS-001 MORRIS 水迷宫实验装置,开展隐藏平台实验和空间探索实验,检测小鼠在水迷宫装置中的学习和记忆能力。

1.3.3.1 定位航行实验:连续 6 d 分别对麦秸、刨花、玉米芯及纸质垫料饲养的 4 组小鼠进行入水训练和测试,每天训练 4 次,确保 4 个象限每天只用 1 次。第一天为适应性训练,将小鼠放入不含平台的水池中自由游泳 120 s,每次训练完成后,迅速用干净的干毛巾将小鼠擦拭干净后放回笼盒,并保证其饮水和食物供应,便于小鼠提前适应环境,减少应激反应。其余 5 d 为正式试验,每天固定时间训练 4 次,每次训练间隔 15~20 min。训练时间设置为 90 s,90 s 内小鼠未找到站台,则由实验人员将其引导至站台,并在站台上停留 10 s,逃避潜伏期记为 90 s。将逃避潜伏期均值作为参数进行数据统计。

1.3.3.2 空间探索实验:实验时间为 1 d,去除平台中心支架,任选一个象限入水点将 KM 小鼠放入水中,测试 60 s 小鼠在恒温池中的游泳时间以及穿越

目标(原平台位置)的次数。

1.3.4 体质量的检测:实验期间,每天实验前对所有小鼠进行称重并记录。

1.4 统计方法

采用 SPSS 22.0 软件进行统计学分析,实验数据均用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间逃避潜伏期和体质量的比较采用 LSD 方差分析;各组间穿越站台次数采用单因素方差分析, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 动物适应性研究

通过实验观察,麦秸垫料对小鼠无刺激作用,小鼠行为、反应正常。同其他 3 种垫料相比,换垫料 1 周后,麦秸垫料相对干燥度良好;相比玉米芯垫料,没有尿液集中渗漏的情况;相比纸质垫料,没有排泄物裸置的情况。

2.2 定位航行实验

逃避潜伏期结果如表 1 所示。在 5 d 的定位航行实验中,各组小鼠的潜伏期均随着训练天数的增加而缩短,由此可知,在 4 种垫料饲养环境下的 KM 小鼠经过训练后均可获得一定的空间学习能力。由图 1 可见,自第 2 天起,麦秸组、玉米芯组和纸质组的潜伏期呈下降趋势,其中麦秸组较其他 3 种垫料组具有明显的优势。进一步对组内各时间点的潜伏期进行两两比较,结果显示,第 5 天的潜伏期麦秸组显著低于其他 3 组($P<0.05$),其余各组间两两比较差异不显著,由此可见经麦秸垫料饲养下的 KM 小鼠在空间学习能力可得到明显的提高。

表 1 KM 小鼠水迷宫实验结果(定位航行)($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Results of Morris water maze(place navigation) test in KM mice

组别	1 d	2 d	3 d	4 d	5 d
麦秸组	89.64±17.61	81.85±17.23	74.92±29.08	71.68±29.42	64.84±35.07*
刨花组	86.87±15.33	87.75±11.02	81.45±23.51	81.97±19.93	84.74±17.82
玉米芯组	87.35±12.96	82.09±20.15	87.42±12.66	72.99±26.09	85.94±13.83
纸质组	90.00±0.00	83.48±17.21	82.30±19.34	83.79±19.14	81.95±22.11

注: * $P<0.05$

Note: * $P<0.05$

2.3 空间探索实验

实验结果如图 2 所示,各组小鼠穿过目标象限次数、目标象限游泳时间经统计无显著性差异

($P>0.05$)。但麦秸组的小鼠在穿过目标象限的总次数、游泳时间上均表现出一定的优势,其中穿台次数方面:麦秸组(3、2)最高、刨花组(1、2)、玉米芯组

(1、2), 纸质组(1); 游泳时间方面: 麦秸组(17.09 s)、刨花组(11.22 s)、玉米芯组(12.21 s)、纸质组(16.33 s)。这说明在麦秸垫料饲养条件下的 KM 小鼠可获得良好的空间学习记忆能力, 其对空间定位的准确性明显高于其他 3 组。

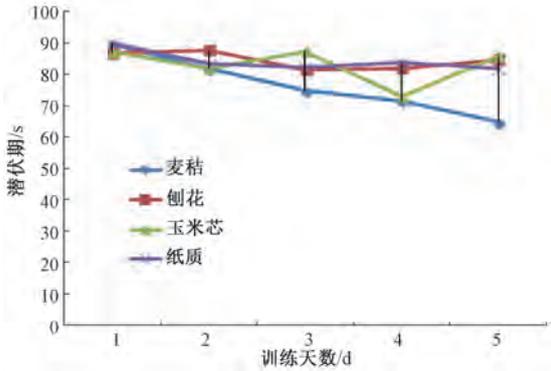


图 1 不同垫料组小鼠定位航行实验结果
Fig.1 Results of the place navigation test in different bedding groups of mice

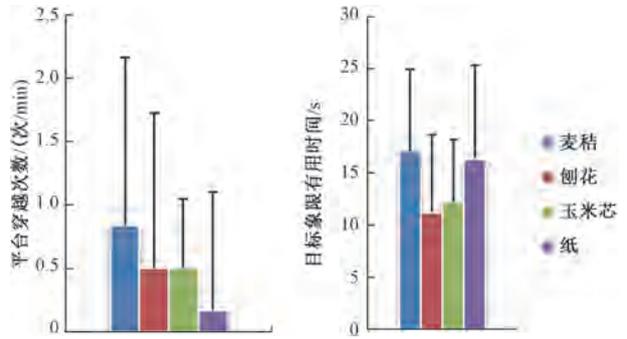


图 2 KM 小鼠空间探索实验结果
Fig.2 Results of the spatial probe test in KM mice

2.4 垫料对 KM 小鼠体质量的影响

KM 小鼠经四种不同垫料相同饲养环境下饲养 8 周后, 体质量均逐渐增加, 结果见表 2。其中麦秸组增重最大, 刨花组增重最小, 两组间变化差异显著 ($P < 0.05$); 水迷宫测试期间, 各组增重两两比较无统计学差异 ($P > 0.05$), 结果如图 3 所示。

表 2 不同垫料对 KM 小鼠体质量的影响 ($n = 6, \bar{x} \pm s, g$)
Table 2 Effects of different beddings on body weight of KM mice

组别	麦秸组	刨花组	玉米芯组	纸质组
初始体质量	17.92±0.58	17.93±0.48	17.85±0.46	17.82±0.58
8 周后体质量	41.43±6.30*	35.28±4.31*	38.93±3.82	38.02±5.06
平均体质量增加	23.52	17.35	21.08	20.21

注: * $P < 0.05$

Note: * $P < 0.05$

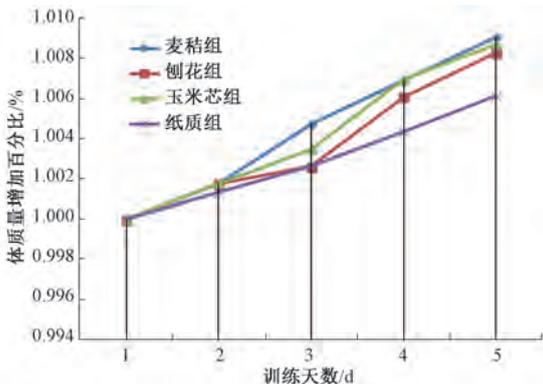


图 3 各组小鼠水迷宫试验期间体质量增加百分比
Fig.3 The increased body weight percentage of each group during the water maze test

3 讨论

功能、学习记忆机制、衰老、药物对学习记忆障碍的改善、某些疾病对学习记忆功能的影响以及新药的研发、药物机型筛选、疗效评价、衰老模型评价、康复医学以及药物毒理学研究等领域^[1]。根据 MORRIS 水迷宫实验原理可知, 小鼠的自身生理因素和环境因素均会对实验结果产生一定影响。李爱萍等^[2]报道, 受动物品系及遗传背景的影响, 在 MORRIS 水迷宫中不同品系的小鼠学习记忆能力差异较为明显。Wahlsten 等^[3]选用 8 个近交品系小鼠进行水迷宫实验, 发现 C57BL/6 和 DBA/2 J 在迷宫试验中表现良好, 薛丹等^[4]报道, C57BL/6 小鼠、KM 小鼠和 ICR 小鼠都能完成 MORRIS 水迷宫的定位航行实验、空间搜索实验和工作记忆实验, 且非空间因素对 C57BL/6 小鼠学习记忆能力的评价干扰较小。诸多学者以 C57BL/6 小鼠为研究对象, 应用 MORRIS 水迷宫实验开展了神经退行性疾病、中枢神经系统与脑认知系统的相关研究方面。如 Huang 等^[5]研

目前, MORRIS 水迷宫实验广泛用于开展海马

究脂多糖对记忆检索的影响,探讨免疫激活与学习记忆功能的相互作用。Stackman 等^[6]研究小鼠定向反应与前丘脑神经元之间的关联。范琳犀等^[7]研究发现皮质酮慢性注射可诱导 C57 小鼠抑郁行为发生改变并损害学习记忆功能。刘港等^[8]研究表明,采用雄性 KM 小鼠侧脑室注射 AB_{25-35} 可快速成功制备阿尔茨海默病(AD)小鼠模型。在定位航行实验中,KM 小鼠的逃避潜伏期随着训练次数的增加而减少,这与本研究的结果一致。王南溪等^[9]用水迷宫实验测试不同剂量的黄粉虫油脂对 KM 小鼠增重及学习记忆能力的影响。胡华等^[10]探讨活血荣络片治疗阿尔茨海默病的机制。在 MORRIS 水迷宫实验过程中,其测试结果不仅与动物种类有关,MORRIS 水迷宫的实验设备、实验环境(光照、噪声)等许多因素均会影响实验结果。周海东等^[11]发现平台颜色可以改变大鼠的水迷宫成绩,蓝色平台的大鼠学习能力提升速度快于白色平台组。黄明^[12]发现 90 dB 的噪声(2 h/天)可以导致 KM 小鼠空间性学习记忆能力和情绪性记忆能力受损。

众所周知,垫料作为啮齿类实验动物生存环境中的重要组成部分,其原料、形状、大小等因素均会对实验动物及动物实验结果有不同程度的影响^[13]。越来越多的研究表明,丰富环境可以对小鼠脑损伤具有复苏的作用,可以改善其记忆和运动能力,认为环境丰富化对啮齿类动物脑功能改善、减轻老龄化带来的空间认知和运动缺陷等具有重要生物学意义^[14-15]。

唐莉莉^[16]研究发现丰富环境组的 KM 小鼠表现活跃,探索主动性增加,丰富环境强化小鼠的情绪学习记忆;而贫瘠环境组小鼠活动减少、情绪烦躁不安,氧化应急水平下降,使机体抵抗外界不良环境的能力下降。吴冰洁等^[17]通过对近交系衰老模型 SAMP8 小鼠的研究也发现并证实了环境丰富能刺激、提高动物体内促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质醇(Cor)水平,能减轻精神行为异常及显著提高小鼠的学习及记忆能力。李春禄等^[18]通过对野生小家鼠和 KM 小鼠对丰富环境(锯末垫料为主,普通环境基础上添加玩具)的学习记忆能力影响实验,发现早期的丰富环境饲养显著缩短野生小家鼠的潜伏期,KM 小鼠没有显著影响,而经过学习训练野生小家鼠和 KM 小鼠的潜伏期都显著缩短。野生小家鼠更有良好的可塑性和应变能力,而实验 KM 小鼠

经过驯化后对环境变化更容易适应。因此,本实验选用 KM 小鼠作为研究对象,这与我们的研究结果一致。但是,在刨花与玉米芯等常规垫料饲养中,结果显示在 4 种垫料饲养环境下的 KM 小鼠经过训练后均可获得一定的空间学习能力,自第 2 天起,麦秸组、玉米芯组和纸质组的潜伏期呈下降趋势,其中麦秸组较其他 3 种垫料组具有明显的优势,但差异不显著。

据报道,大小鼠的迷宫实验认知和行为评价的差异也可能和应激反应有关^[19],应激状态下人类和动物释放的肾上腺皮质激素影响记忆的形成,损害记忆的获得和再现。在水迷宫浸水游泳的环境应激下,除了因整体环境因素如垫料富集,增加小鼠的幸福感等对小鼠形成的保护作用,也应该考虑到小鼠个体差异。我们在试验中发现,雌性小鼠的认知能力显著高于雄性,这与宿瑞敏^[20]研究结果相一致。

本实验发现,新型麦秸垫料可促进 KM 小鼠体质量增加,且增加情况要优于玉米芯和纸质垫料组,与刨花垫料组相比较差异显著($P < 0.05$);舒畅等^[21]曾报道普通刨花垫料对 KM 小鼠体质量的增加缓慢,本次结果与之相一致。水迷宫实验显示,4 种垫料饲养下的小鼠差异不显著,但结合实际饲养环境来看,纸质垫料组的小鼠表现欠佳,不建议完全用纸质垫料饲养或开展相关研究。麦秸垫料组表现则明显优于刨花垫料和玉米芯垫料组,因此麦秸垫料可以作为实验动物接触性垫料推广使用。

参考文献

- [1] 武海霞,吴志刚,刘红彬. Morris 水迷宫实验在空间学习记忆研究中的应用[J]. 神经药理学报,2014,4(5):30-35.
- [2] 李爱萍,赵慧,李韶,等. 不同鼠种在 Morris 水迷宫学习记忆行为中的种属差异[J]. 中国行为医学科学,2005,14(1):29-31.
- [3] Wahlsten D, Cooper S F, Crabbe J C. Different rankings of inbred mouse strains on the Morris maze and a refined 4-arm water escape task [J]. Behavioural Brain Research, 2005, 165(1):36-51.
- [4] 薛丹,徐淑萍,刘进修,等. 水迷宫实验中三种品系小鼠学习记忆能力的比较[J]. 中国实验动物学报,2010,18(2):149-152.
- [5] Huang Z B, Wang H, Rao X R, et al. Effects of immune activation on the retrieval of spatial memory [J]. Neurosci Bull, 2010,26(5):355-364.
- [6] Stackman R W Jr, Lora J C, Williams S B. Directional

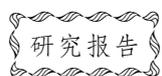
- responding of C57BL/6J mice in the Morris water maze is influenced by visual and vestibular cues and is dependent on the anterior thalamic nuclei [J]. *J Neurosci*, 2012, **32** (30): 10211-10225.
- [7] 范琳犀,姜宁,陈远伟,等.皮质酮诱导小鼠抑郁伴发的学习记忆损伤[J].*中国比较医学杂志*,2018,**28**(4):59-64.
- [8] 刘港,胡增蛟,杨胜.BALB/c 和昆明小鼠 A13 侧脑室注射建立阿尔茨海默病小鼠模型比较[J].*军事医学科学院院刊*,2009,**33**(6):554-557.
- [9] 王南溪,杨伟,杨春平,等.黄粉虫油脂对小鼠体质量及学习记忆能力的影响[J].*食品工业科技*,2015,**36**(1):356-360.
- [10] 胡华,李彩云,苏丽清,等.活血荣络片对 APP/PS1 双转基因小鼠认知能力及 A β 沉积的影响[J].*中华中医药学刊*,2016,**34**(4):879-881.
- [11] 周海东,陈益君,朱洁.平台颜色对大鼠 Morris 水迷宫训练成绩的影响[J].*中国现代医生*,2018,**56**(13):25-27.
- [12] 黄明.噪声对小鼠学习和记忆的影响及其相关机制的研究[D].*武汉:华中师范大学*,2008.
- [13] 李树梅,胡建武.啮齿类实验动物垫料的研究进展[J].*实验动物科学*,2018,**35**(1):76-82.
- [14] Faverjon S, Silveira D C, Fu D D, *et al*. Beneficial effects of enriched environment following status epilepticus in immature rats [J]. *Neurology*,2002,**59**(11):1357-1364.
- [15] Bennett J C, Mcrae P A, Levy L J, *et al*. Long-term continuous, but not daily, environmental enrichment reduces spatial memory decline in aged male mice [J]. *Neurobiology of Learning and Memory*,2006,**85**:139-152.
- [16] 唐莉莉.丰富和贫瘠环境对老龄雌性小鼠空间学习和记忆的影响[D].*武汉:华中师范大学*,2009.
- [17] 吴冰洁,刘敏,岳巍,等.丰富环境刺激对快速老化小鼠精神行为学的影响[J].*中华物理医学与康复杂志*,2012,**34**(5):325-328.
- [18] 李春禄,张佳靖,王冬梅,等.丰富环境对野生小家鼠和昆明小鼠空间学习记忆能力的影响[J].*中华行为医学与脑科学杂志*,2011,**20**(7):624-626.
- [19] Salldi C. The role and mechanisms of action of glucocorticoid involvement in memory storage [J]. *Neural Plast*,1998,**6**:41-52.
- [20] 宿艳敏.Morris 水迷宫实验中三种小鼠的学习能力及其性别差异[D].*石家庄:河北医科大学*,2013.
- [21] 舒畅,张延英,蔡兴,等.凹土玉米芯垫料对 KM 小鼠安全性影响的研究[J].*实验动物科学*,2014,**31**(3):23-25.

Effect of Different Bedding on Learning and Memory Ability of Specific Pathogen-free KM Mice

HU Jianwu, LI Shumei, LIANG Junshi, YU Guangzhen, LI Liang, WU Huijuan, CHEN Yubao

(*Beijing laboratory Animal Research Center, Beijing 100012, China*)

Abstract: Objective To investigate the differences of bedding materials consisted of wheat straw, wood shavings, corn and the paper on the body weight and the learning and memory ability of SPF KM mice. **Method** Twenty-four KM mice were feeding with wheat straw, wood shavings, corn and the paper beddings for 8 weeks. The MORRIS water maze behavior experiment was performed to determine the learning and memory skills and the body weight. **Result** Comparing with animals used the shavings bedding, the weight of the KM mice in the wheat straw bedding group was raised, significantly, $P < 0.05$; The MWM result showed: the weight gain of each group was not significant. In the place navigation test, the wheat straw group was significantly lower than the other three groups ($P < 0.05$) on the 5th day; in the spatial probe test, KM mice used the wheat straw bedding spent more time in the target quadrant than other groups. **Conclusion** Different bedding material has little effect on body weight of KM mice in Morris water maze test, KM mice used the wheat straw bedding performed better than wood shavings and corn bedding in learning and memory ability, and the wheat straw bedding can be safely used in KM mice breeding. **Key words:** bedding; KM mice; Morris water maze (MWM) test; learning and memory



2018 年 5 月北京市啮齿类实验动物质量抽查的病理检测*

倪家敏 李森焯 张茜茜 赖梦雨 吴晓倩 杨东明 宋银娟
廖轶 姚娇 董浩迪 张凯 杨利峰 赵德明 周向梅

(中国农业大学动物医学院, 国家动物海绵状脑病实验室, 北京 100193)

摘要:目的 2018 年 5 月本实验室对北京地区 22 家实验动物机构送检的 400 只啮齿类实验动物进行病理检测。根据检测结果对实验动物的饲养管理提出合理建议。**方法** 采取心脏、肝脏、肾脏、肺脏、脾脏、大肠、小肠, 制成石蜡切片或冰冻切片, 经 H.E. 染色、PAS 染色或油红 O 染色后置于光学显微镜观察, 采集数码图像, 记录结果。**结果** 大鼠、小鼠、豚鼠有少数病例表现为肝细胞肿胀, 肺脏、心脏局灶性炎性细胞浸润, 大肠出现疑似球虫感染的病变; 地鼠组织脏器等未见明显异常。**结论** 本次病理学抽检中的实验动物基本为健康状态, 但需要加强和改善饲养管理条件。

关键词: 实验动物; 病理检测; 病变

中图分类号: Q95-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0018-08

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.004

实验动物的质量直接影响着科学实验结果的可靠性和准确性^[1]。随着生命科学和生物技术的飞速发展, 对实验动物质量的要求越来越高, 定期对实验动物质量进行抽查是非常必要的。

本文主要是对北京 22 家实验动物繁育机构 2018 年 5 月送检的 400 只啮齿类实验动物的病理检测结果进行总结, 然后根据检测结果对啮齿类实验动物的饲料、饲喂方式、饲养环境等提出改进方法, 以确保啮齿类实验动物的质量。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2018 年 5 月, 由中国食品药品检定研究院从北京市 22 家实验动物机构抽检的 400 只啮齿动物, 包括 SPF 级、清洁级、普通级三个级别; 小鼠、大鼠、豚鼠、金黄地鼠、地鼠五个品种。具体种类、级别、数量见表 1。

1.2 实验方法

动物经二氧化碳窒息法处死后, 采取心脏, 肝

表 1 2018 年 5 月啮齿类实验动物采样情况

Table 1 Classification of samples in May 2018

种类	SPF 级/只	清洁级/只	普通级/只	总数/只
小鼠	150	30	0	180
大鼠	60	20	0	80
豚鼠	30	10	90	120
金黄地鼠	0	10	0	10
地鼠	0	10	0	10
合计	230	80	90	400

脏、肾脏、肺脏、脾脏, 大肠, 小肠, 甲醛钙液(10% 甲醛+1% 氯化钙)固定, 一周后修块。常规病理组织学制片, 石蜡包埋, 5 μm 切片, 经 H.E. 染色后置于光学显微镜观察, 采集数码图像, 记录结果。对 H.E. 染色结果显示细胞异常肿胀的肝脏, 制作冰冻切片进行油红 O 染色和石蜡切片进行 PAS 染色, 同样置于光学显微镜观察, 采集数码图像并记录。

2 结果

2.1 小鼠检查结果

包括 SPF 级 150 只, 清洁级 30 只。检出清洁级

收稿日期: 2018-10-22

* 基金项目: 国家重点研发计划(No.2017YFD0500901)

作者简介: 倪家敏(1993—), 女, 硕士生, 研究方向: 基础兽医学. E-mail: 1475339500@qq.com

通信作者: 周向梅(1973—), 女, 教授, 博士生导师. 研究方向: 病理学教学和研究. E-mail: zhouxm@cau.edu.cn

小鼠病变数 1 例(病变率 3.3%);其中肝脏异常 1 例(检出率 3.3%),表现为肝细胞肿胀,经油红 O 和 PAS 染色确诊为脂肪变性。检出 SPF 级小鼠病变数 4 例(病变率 2.7%);其中肝脏异常 1 例(0.7%),表现为肝脏局灶性炎性细胞浸润;另检出化脓性肺炎 1 例,大肠局灶性炎性细胞浸润 1 例,肾脏集合管充满粉染物质,即肾管型 1 例。

2.1.1 肝脏病变:与正常肝脏相比(如图 1 A 所示),肝脏局灶性炎性细胞浸润可见局灶性、孤岛样炎灶,与周围正常组织界限清晰,炎性细胞呈圆形、

卵圆形,胞浆为粉色、紫色,胞核清晰,为圆形、多角形(如图 1B 所示);肝细胞肿胀可见肝小叶结构不清晰,未见明显肝索结构,肝血窦变窄,肝细胞体积变大,胞质中有不同程度的空泡出现(如图 1C 所示);对肝细胞肿胀的样本进行油红 O 染色和 PAS 染色,显示肝脏脂肪变性,可见肝细胞轮廓和由苏木素蓝染的细胞核,并且可见较多红色大小不一的圆形小滴分布在肝细胞胞浆中,有的围绕在细胞核周围,有的聚集呈大脂滴(如图 1D 所示)。

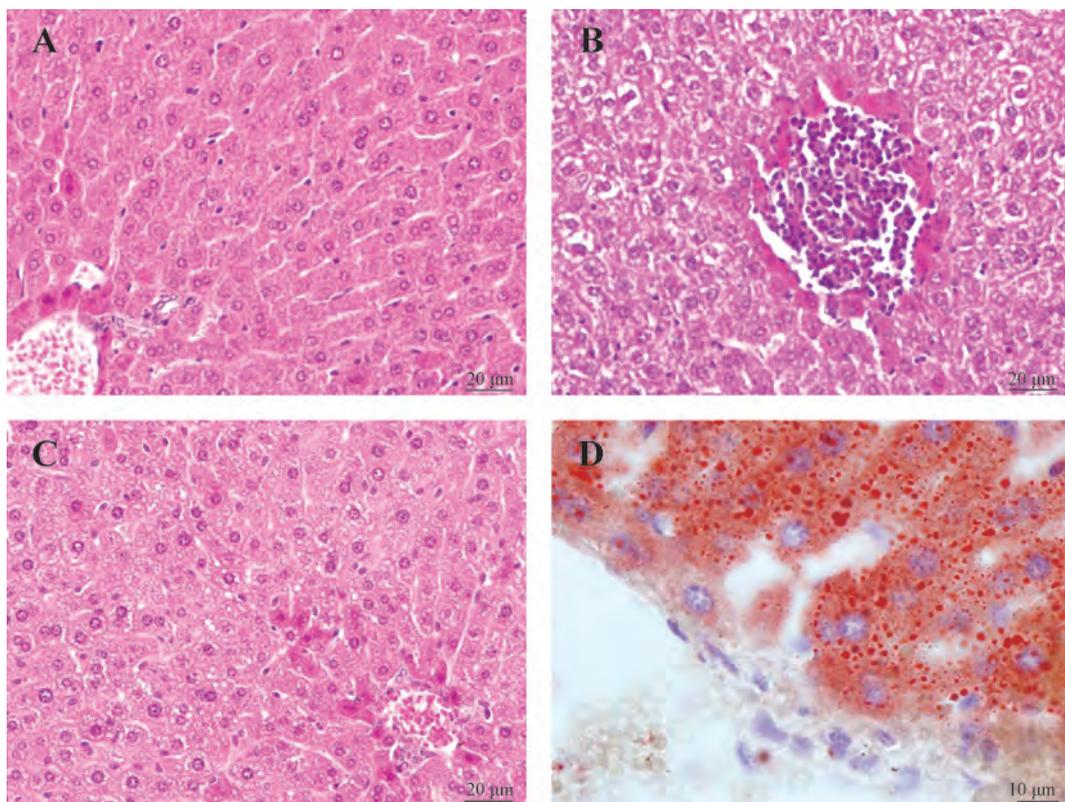


图 1 小鼠肝脏病变情况

注:A:正常肝脏;B:肝脏局灶性炎性细胞浸润;C:肝细胞肿胀;D:肝脏脂肪变性;A、B、C 为 H.E. 染色($\times 400$);D 为油红 O 染色阳性($\times 1000$)

Fig.1 Pathological changes of livers in mice

Note:A.Normal liver; B. Focal inflammatory cells infiltration of liver; C. Hepatocellular swelling;

D. Hepatic steatosis;A、B、C is H.E. staining($\times 400$); D is Oil Red-O staining, ($\times 1000$)

2.1.2 肺脏病变:与正常肺脏相比(如图 2A 所示);化脓性肺炎可见多个呈团块状或岛屿状的蓝染局灶性区域,肺泡腔结构基本消失,病变区域以大量的淋巴样细胞浸润为主,也可见较多分叶核的嗜中性粒细胞(如图 2B 所示)。

2.1.3 肾脏病变:与正常肾脏相比(如图 3A 所示),肾管型中可见集合管扩张,管内有均质粉染的

物质,较小的集合管也可见均质粉染的物质(如图 3B 所示)。

2.1.4 大肠病变:与正常大肠相比(如图 4A 所示),大肠局灶性炎性细胞浸润可见黏膜层中存在一明显的局限性炎灶,与周围组织界限清晰,炎性细胞成分多样,散在排列(如图 4B 所示)。

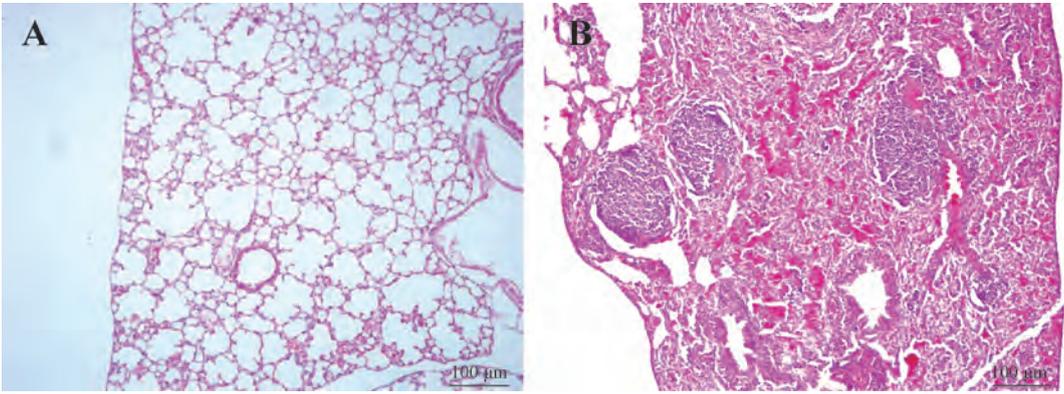


图 2 小鼠肺脏病变情况 (H.E.×100)

注:A:正常肺脏;B:化脓性肺炎

Fig.2 Pathological changes of lungs in mice (H.E.×100)

Note:A.Normal lung; B. Suppurative pneumonia

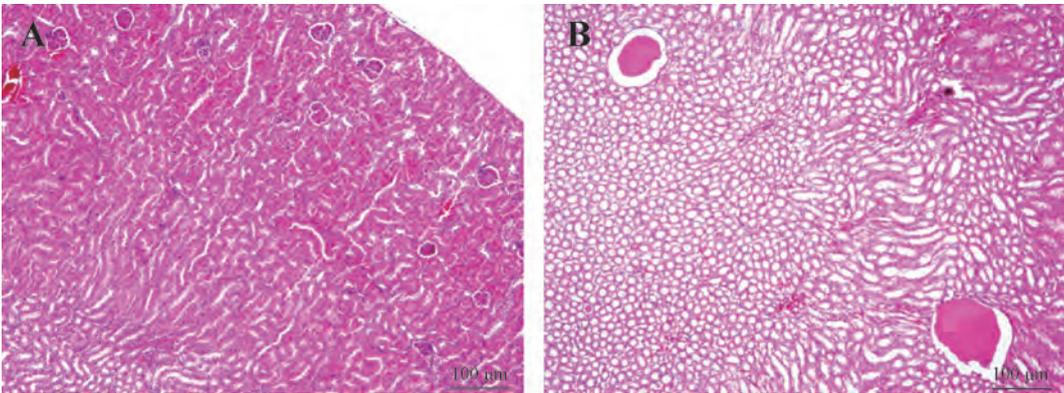


图 3 小鼠肾脏病变情况 (H.E.×100)

注:A:正常肾脏;B:肾管型

Fig.3 Pathological changes of kidneys in mice (H.E.×100)

Note:A.Normal kidney; B. Renal cast

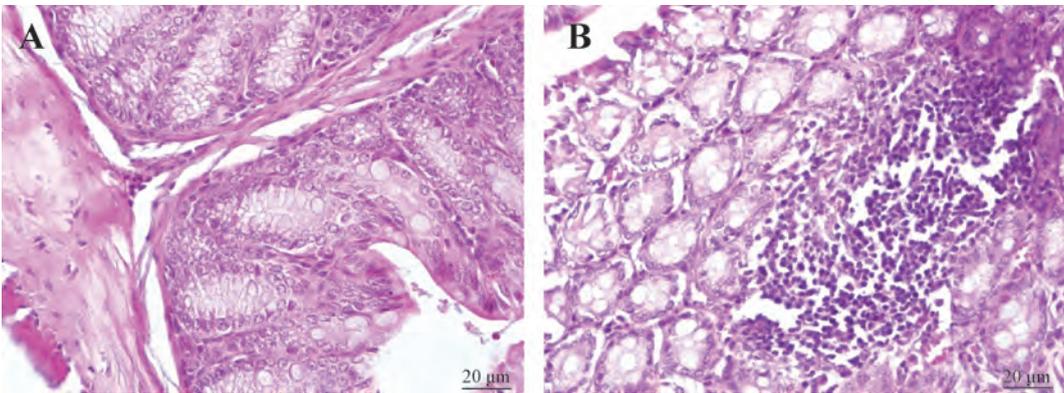


图 4 小鼠大肠病变情况 (H.E.×400)

注:A:正常大肠;B:大肠局灶性炎性细胞浸润

Fig.4 Pathological changes of intestinum crassum in mice (H.E.×400)

Note:A.Normal intestinum crassum; B. Focal inflammatory cells of intestinum crassum

2.2 大鼠检查结果

包括 SPF 级 60 只,清洁级 20 只。检出清洁级大鼠病变数为 2 例(发病率 10%),为肝脏异常,表现为肝细胞肿胀,经油红 O 染色和 PAS 染色,均为脂肪变性;检出 SPF 级大鼠病变数为 7 例(病变率 11.7%);其中肝脏异常 5 例(检出率 3.3%),表现为肝细胞肿胀 3 例,经油红 O 染色和 PAS 染色全为阴性,肝脏局灶性炎性细胞浸润 2 例。另检出 2 例嗜酸性粒细胞性心肌炎。

2.2.1 肝脏病变:与正常肝脏相比(如图 5 A 所示),肝脏局灶性炎性细胞浸润中可见炎性细胞结节,与周围界限清晰,聚集的炎性细胞为胞核圆形、嗜碱性深蓝染的淋巴样细胞(如图 5B 所示);肝细胞肿胀中可见肝索界限不清晰,肝细胞体积变大,内有大小不等、数量不等的空泡,有些空泡融合成大的空泡,桔否氏细胞明显(如图 5C 所示);挑取肝细胞肿胀的样本进行油红 O 染色和 PAS 染色,显示肝脏脂肪变性,可见较多红色、大小不一的圆形小滴分布在肝细胞胞浆中(如图 5D 所示)。

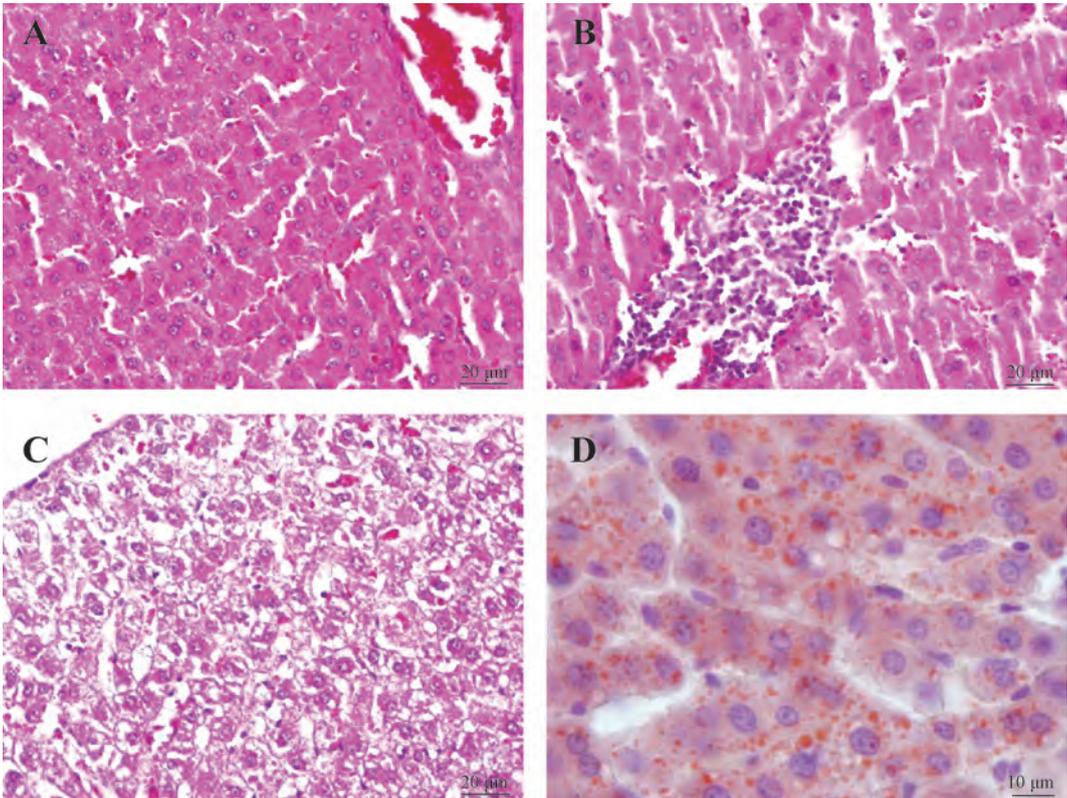


图 5 大鼠肝脏病变情况

注:A:正常肝脏;B:肝脏局灶性炎性细胞浸润;C:肝细胞肿胀;D:肝脏脂肪变性;

A、B、C 为 H.E.染色($\times 400$);D 为油红 O 染色阳性($\times 1000$)

Fig.5 Pathological changes of livers in rats

Note:A.Normal liver; B. Focal inflammatory cells infiltration of liver; C. Hepatocellular swelling;

D. Hepatic steatosis; A、B、C is H.E. staining($\times 400$); D is Oil Red-O staining($\times 1000$)

2.2.2 心脏病变:与正常心脏相比(如图 6 A 所示),嗜酸性粒细胞性心肌炎可见局部区域心肌纤维出现断裂、排列紊乱,其间有大量胞核呈圆形、蓝染,胞浆较少的淋巴样细胞和少量胞核蓝染呈分叶核,胞浆红染的嗜酸性粒细胞以及胞核呈圆形、胞体较大的巨噬细胞浸润(如图 6B 所示)。

2.3 豚鼠检查结果

包括 SPF 级 20 只,清洁级 10 只,普通级 90 只。

发生病变主要是普通级豚鼠,共 13 例(病变率 14.4%)。其中肝脏异常以肝细胞肿胀为主,共 8 例(病变率 8.9%),经油红 O 和 PAS 染色确诊为脂肪变性 1 例;检出肝脏局灶性增生 1 例、肉芽肿性肺炎 1 例、支气管肺炎 1 例;检出大肠疑似有数量不等的各种发育阶段的球虫 2 例。

2.3.1 肝脏病变:与正常肝脏相比(如图 7A 所示),肝脏空泡变性中肝细胞排列较紊乱,中央静脉

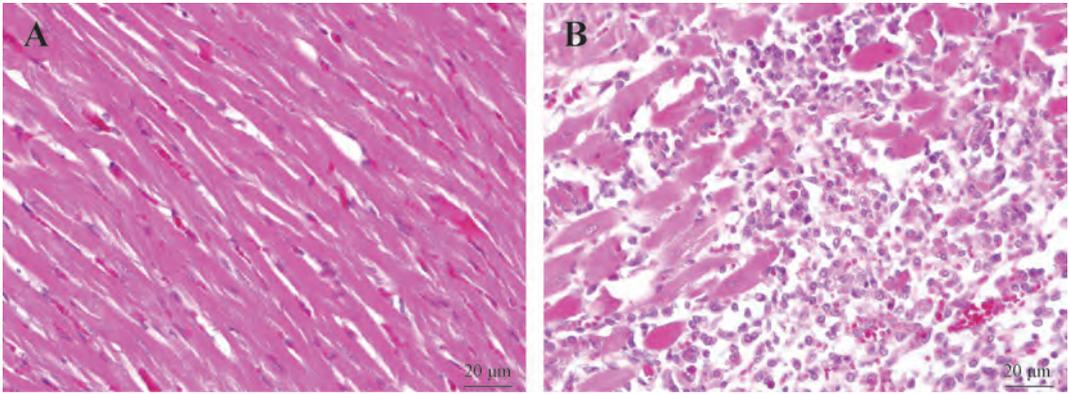


图 6 大鼠心脏病变情况 (H.E.×400)

注:A:正常心脏;B:嗜酸性粒细胞性心肌炎

Fig.6 Pathological changes of hearts in rats(H.E.×400)

Note: A.Normal heart; B. Eosinophilic myocarditis

及肝血窦红细胞聚集,可见肝细胞体积变大,胞质粉染且内部存在大量大小不等的圆形空泡,可见较多的枯否氏细胞(如图 7B 所示);对肝细胞肿胀的样

本进行油红 O 染色和 PAS 染色,显示肝脏脂肪变性,可见较多红色、大小不一的圆形小滴分布在肝细胞胞浆中(如图 7C 所示)。

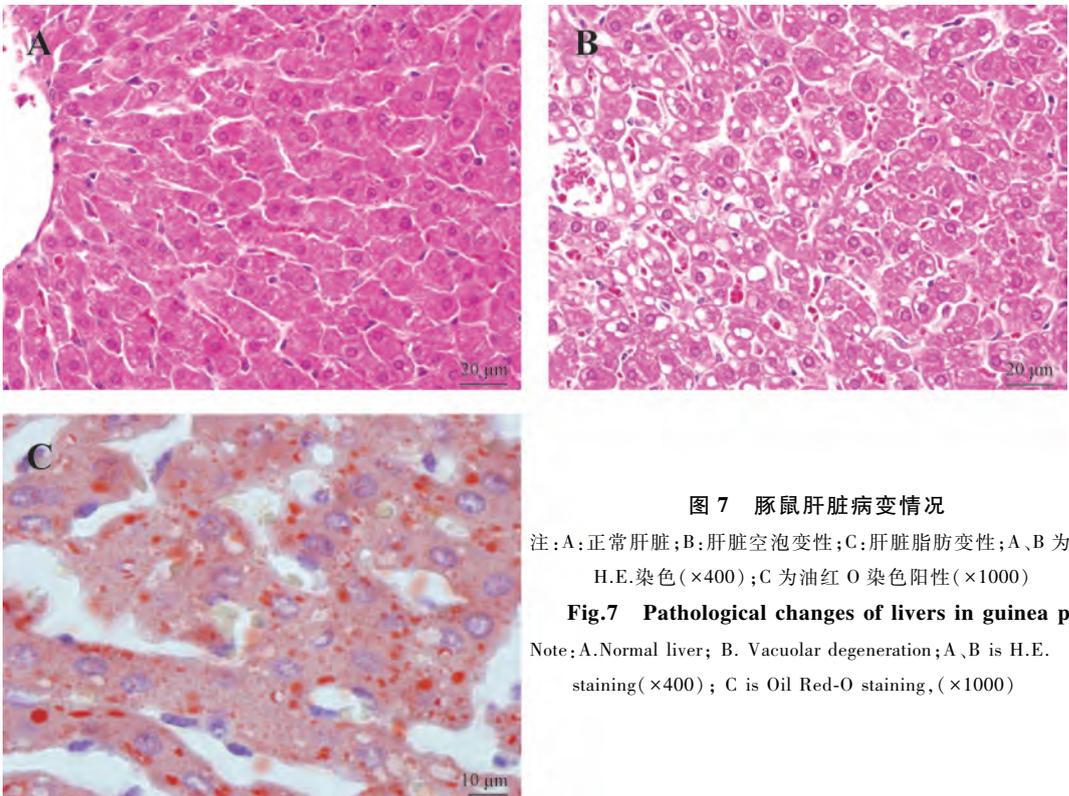


图 7 豚鼠肝脏病变情况

注:A:正常肝脏;B:肝脏空泡变性;C:肝脏脂肪变性;A、B 为 H.E.染色(×400);C 为油红 O 染色阳性(×1000)

Fig.7 Pathological changes of livers in guinea pigs

Note: A.Normal liver; B. Vacuolar degeneration; A、B is H.E. staining(×400); C is Oil Red-O staining, (×1000)

2.3.2 肺脏病变:与正常肺脏相比(如图 8A 所示),局灶性增生可见肺脏局部出现增生,增生区域肺泡结构消失,与周围组织界限清楚,增生的细胞大小不等,胞核呈椭圆形至不规则形、蓝染,胞浆红染;其间可见较多红细胞散布(如图 8B 所示);支气管肺炎可见细支气管中有大量中性粒细胞浸润,形成

脓性渗出,肺泡隔有不同程度的增厚(如图 8C 所示);肉芽肿性肺炎可见局部区肺泡腔结构消失,细胞成分增多,间质不同程度的淤血或出血,增多的细胞成分以胞核为分叶核,胞浆粉红染的嗜中性粒细胞为主,还有可见淋巴细胞、浆细胞、巨噬细胞以及少量成纤维细胞等(如图 8D 所示)。

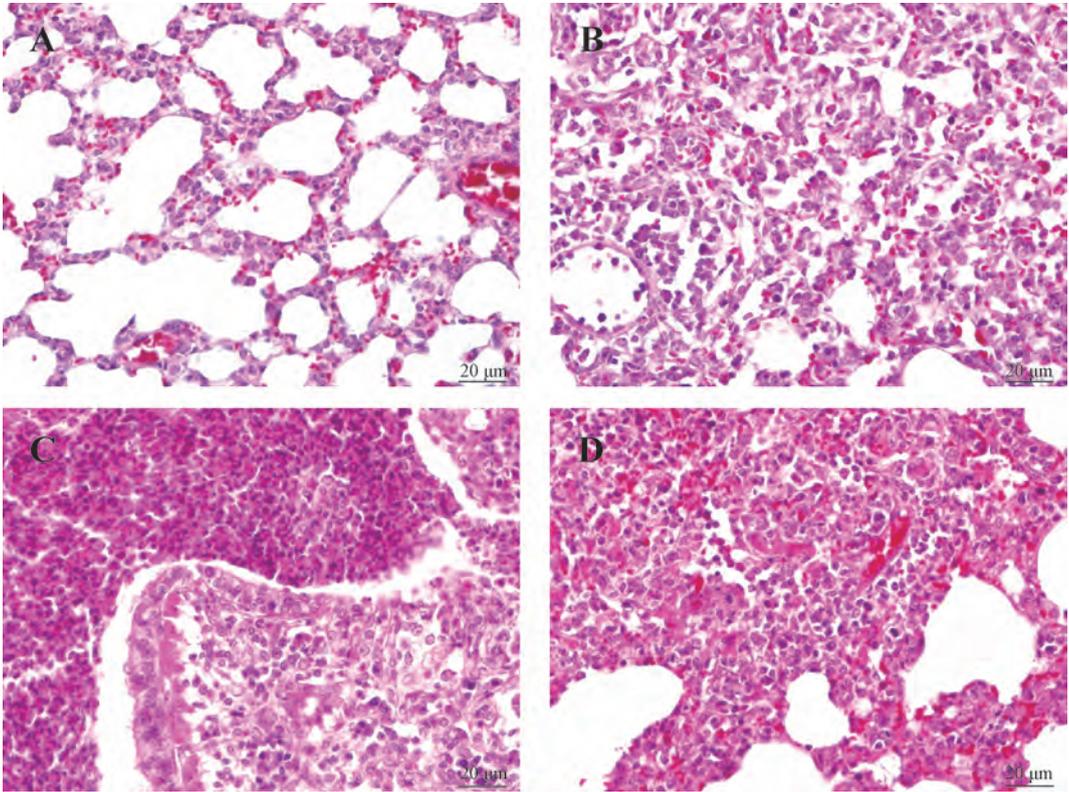


图 8 豚鼠肺脏病变情况 (H.E.×400)

注:A:正常肺脏;B:肺脏局灶性增生;C:支气管肺炎;D:肉芽肿性肺炎

Fig.8 Pathological changes of lungs in guinea pigs(H.E.×400)

Note:A.Normal lung; B. Focal hyperplasia; C. Bronchopneumonia; D. Granulomatous pneumonia

2.3.3 大肠病变:与正常大肠相比(如图 9A 所示),病变大肠中在肠黏膜的固有层可见数量不等的各个发育阶段的球虫,肠黏膜固有层破坏,小血管

充血,也可见出血,肠黏膜固有层可见淋巴小结(如图 9B 所示)。

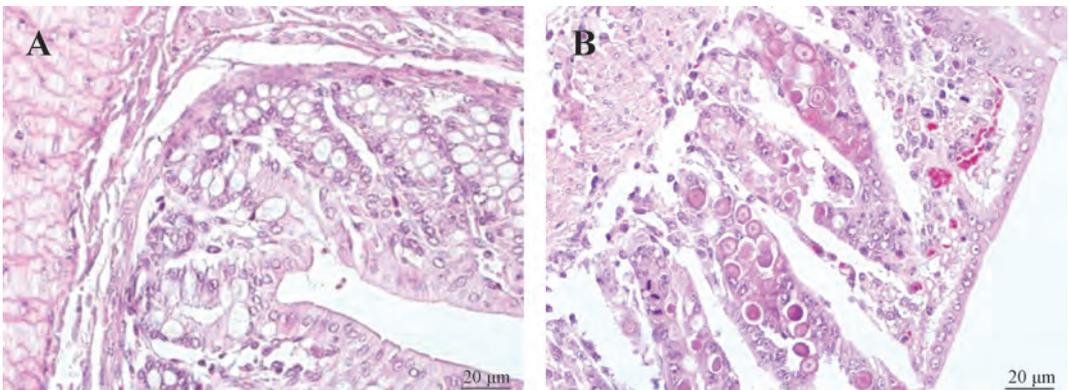


图 9 豚鼠大肠病变情况 (H.E.×400)

注:A:正常大肠;B:大肠中有数量不等的不同发育阶段的球虫

Fig.9 Pathological changes of intestinum crassum in guinea pigs(H.E.×400)

Note:A.Normal intestinum crassum; B. Some coccidia in intestinum crassum

2.4 地鼠检查结果

金黄地鼠、地鼠分别取材 10 只,皆为清洁级。各组织未见明显病理变化。

3 讨论

3.1 肝脏病变的分析

肝脏病变主要表现为肝细胞肿胀和局部炎性细胞浸润,与 2017 年两次抽检结果相比基本杜绝了肝脏坏死的情况^[2-3]。在肝细胞肿胀的样本中,仅检出油红 O 染色阳性,PAS 染色全为阴性,可能原因是实验动物饲料配方不合理所造成。肝脏局部炎性细胞浸润则可能是由于饲料、饮水灭菌不彻底而导致微生物感染。

肝脏病变一般反应实验动物的饮食情况,因此,在实验动物的繁育过程中,饲料应选用优质的原料、合理恒定的配方及适宜的灭菌方法,动物饮水也应使用灭菌的自来水^[4]。

3.2 肺脏病变的分析

肺脏病变比例仅次于肝脏,且显著高于 2017 年两次抽检结果中的肺脏病变比例^[2-3]。肺脏病变主要表现为增生和炎症,可能与垫料质量不达标或饲养密度过大有关系,从而导致实验动物生活环境空气质量差而发生病变。本次结果中肺脏病变高于 2017 年则可能与 2017 年北京市空气质量提高,雾霾天数在近几年中最低,而 2018 年上半年雾霾天气频频出现。因此,实验动物的繁育过程中应选用符合标准的垫料,饲养密度要合理,定期检查动物房的通风系统。

3.3 其他脏器的病变分析

除肝脏、肺脏外,本次检测结果还显示普通级豚

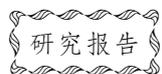
鼠在大肠中疑似有球虫感染的现象,这是在 2017 年抽检中所没有的。球虫感染会对科学实验结果产生干扰,其感染原因可能是因为垫料未经消毒直接使用;笼养空间狭小,排泄物易污染垫料和空气,而饲养员没有勤换垫料;饲料质量不合格;直接饮用未经处理的自来水。该实验动物繁育机构的普通级豚鼠的饲养管理制度有必要查找不足,以期改善实验动物质量^[5]。

从检测结果来看,本次病理学抽检中的实验动物基本健康。检测结果显示,大鼠、小鼠肝脏有少数病例表现为肝细胞肿胀,几例肺脏、心脏局灶性炎性细胞浸润;豚鼠病变主要集中在普通级,病变包括肝细胞肿胀,肉芽肿性肺炎、支气管肺炎、肺脏局灶性增生,对大肠出现疑似球虫感染的现象,应与寄生虫检测结果综合诊断;地鼠的组织脏器均未见明显异常。

参 考 文 献

- [1] 刘艳,王珑.浅述实验动物质量控制[J].中国公共卫生管理,2011,27(1):25-27.
- [2] 宋银娟,张茜茜,陈合花,等.2017 年北京地区啮齿类实验动物健康状况的病理学调查和分析[J].实验动物科学,2018,35(1):20-25.
- [3] 张茜茜,孙欣,宋银娟,等.2017 年 10 月北京市啮齿类实验动物的病理检测[J].实验动物科学,2018,35(2):27-32+37.
- [4] 范薇.浅述实验动物标准化[J].青海科技,2007,14(1):43-45.
- [5] 郭海宁,高宝荷,肖秋萍,等.南昌实验小鼠肠道寄生虫调查[J].中国兽医杂志,2016,52(8):117-119.

(下转至第 29 页)



结肠杯状细胞染色的结果比较研究*

高琛琛¹ 薛晓伟² 刘玥宏³ 李利生⁴ 徐敬东¹

(1. 首都医科大学基础医学院生理学与病理生理学系, 北京 100069) (2. 北京协和医院病理科, 北京 100005)

(3. 首都医科大学宣武医院, 北京 100054) (4. 首都医科大学基础医学院机能实验中心, 北京 100069)

摘要:目的 通过对大鼠结肠切片标本染色对比卡诺液与甲醛固定液处理标本的区别。方法 将正常大鼠与便秘模型大鼠的结肠组织标本分别用卡诺液与甲醛固定液处理,制成石蜡切片标本后,用HE染液和高碘酸希尔法阿尔新蓝染液分别进行染色,统计杯状细胞的数量和着色度对比两种固定液所固定标本的区别。结果 与甲醛固定液相比,同组标本用卡诺液固定的杯状细胞数量无显著性差异($P>0.05, n=10$),着色度显著增强($P<0.01, n=10$),但结肠组织其他细胞着色度无显著性差异($P>0.05, n=10$)。结论 在杯状细胞的形态学观察中,用卡诺液处理标本明显优于甲醛固定液。在不同实验的标本制备中,固定液的选择应根据实验研究对象的特性而确定。

关键词:卡诺液;甲醛固定液;杯状细胞;便秘模型

中图分类号: R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0025-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.005

组织学评价和免疫组织化学特征在生理学研究
中非常重要,因而在保持组织标本完整性和紧密性
的基础上选择适当的固定方法很关键。常用的组织
固定液有卡诺液, Susa液, Helly干液, 4%多聚甲醛,
Bouin液等^[1]。研究表明,结肠杯状细胞内含有大
量的黏液颗粒,内含黏蛋白分泌入肠腔,并在黏膜
表层形成一层致密黏液层,作为肠道重要黏膜屏
障之一,与其它细胞及不同机制共同参与维持肠
道稳态^[2]。基于此,本实验通过对大鼠结肠杯状
细胞的数量、着色度的观察与分析来对比不同标
本分别用卡诺液与甲醛固定液对黏液固定和着色
度的区别。

1 材料与方法

1.1 实验动物

正常SD大鼠与便秘模型大鼠,6周龄,体质量
220~250 g, SPF级,购于首都医科大学实验动物中
心,实验动物许可证号:SCXK(京)2016-0001。

1.2 主要试剂

卡诺液, 甲醛固定液, HE染液, 高碘酸希尔法
阿尔新蓝染液。

1.3 便秘模型大鼠的制备

在常规饮食、环境、周龄等其他条件相同的基
础上,将用于模型制备的大鼠以地酚诺酯(长春长
红制药有限公司,国药准字H22022037)70 mg/kg
体质量的浓度溶于1 mL生理盐水,灌胃,每日1次,
持续2周,致使其出现大便秘结,粪便数量减少,
含水量减少等便秘症状。

1.4 大鼠结肠标本的制作

将大鼠麻醉后取结肠组织,立即投入固定
液,分别用卡诺液与甲醛固定液处理后通过脱
水、透明、浸蜡、包埋等步骤得到组织蜡块,经
修整切片(4 μm)后,分别用HE染液、高碘酸
希尔法阿尔新蓝染液染色固封得到结肠石蜡切
片标本,使用NikonDS-U3观察结肠杯状细胞和
黏液细胞的形态学;取结肠放入质量分数为2.5%
的戊二醛(pH7.2)中固定5 min后取出组织,切

收稿日期:2018-06-27

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 81274173, 81673671 和 81270443);北京市自然科学基金资助项目(No. 7122017);北京市
教委自然科学基金资助项目(No. 201110025004, 201310025004);首都医科大学基础与临床基金资助项目(No. 2015JL1, 2014JL15)。

作者简介:高琛琛(1994—),女,硕士研究生,研究方向:结肠黏膜分泌及其调节.E-mail:chenchenir@163.com

通信作者:徐敬东(1966—),女,博士,副教授,硕士生导师,研究方向:消化道平滑肌与黏膜分泌.E-mail:xujingdong@163.com

1 mm³ 组织块继续固定。常规乙醇脱水, Epon812 环氧树脂包埋, 超薄切片(50 nm), 醋酸双氧铀硝酸铅染色, 透射电镜(Hitachi, HT7700 日本)观察结肠杯状细胞和黏液细胞的超微结构并拍片。

1.5 结肠组织标本的观察与杯状细胞指标统计

1.5.1 杯状细胞的形态学观察:通过 Nikon DS-U3 显微镜分别以×20、×100 视野观察正常大鼠与便秘模型大鼠的结肠标本, 并对比两种固定方法和染色技术处理后杯状细胞形态和杯状细胞内黏液颗粒及黏蛋白的分泌情况。通过电镜进一步观察结肠黏液层的结构特点。

1.5.2 统计指标的统计:用 NIS-Elements BR4.10 软件, 通过颜色强度设定统计 8 个不同视野下杯状细胞的数量和着色度, 所有结果均使用 prism6.0 软件进行分析, 数据表示为均数±标准误(Mean±SEM), P<0.05 为有显著性差异。

2 结果

2.1 杯状细胞的形态学观察

光镜下, 高碘酸希尔法阿尔新蓝染液染色结肠标本上皮组织中充满大量杯状细胞, 边界清晰, 胞内布满红染的黏液颗粒, 亦可见被喷向肠腔的黏液(见图 1, A1、A2 和 B1、B2); 用卡诺液固定、高碘酸希尔法阿尔新蓝染液染色的标本杯状细胞着色度明显强于甲醛固定液处理标本的杯状细胞(见图 1, B1、B2 和 C1、C2); 甲醛固定液处理、HE 染色标本的杯状细胞成空泡状, 胞核被染成深蓝色, 位于细胞底部,(见图 1, D1、D2)。电镜下, 便秘模型大鼠相比于正常大鼠, 结肠黏膜表层黏液层变薄, 分子筛样^[3]作用减弱, 细菌易位, 接近甚至直接接触肠道黏膜上皮细胞, 提示便秘模型的结肠黏液层与正常相比变薄且不完整(见图 2, A、B)。

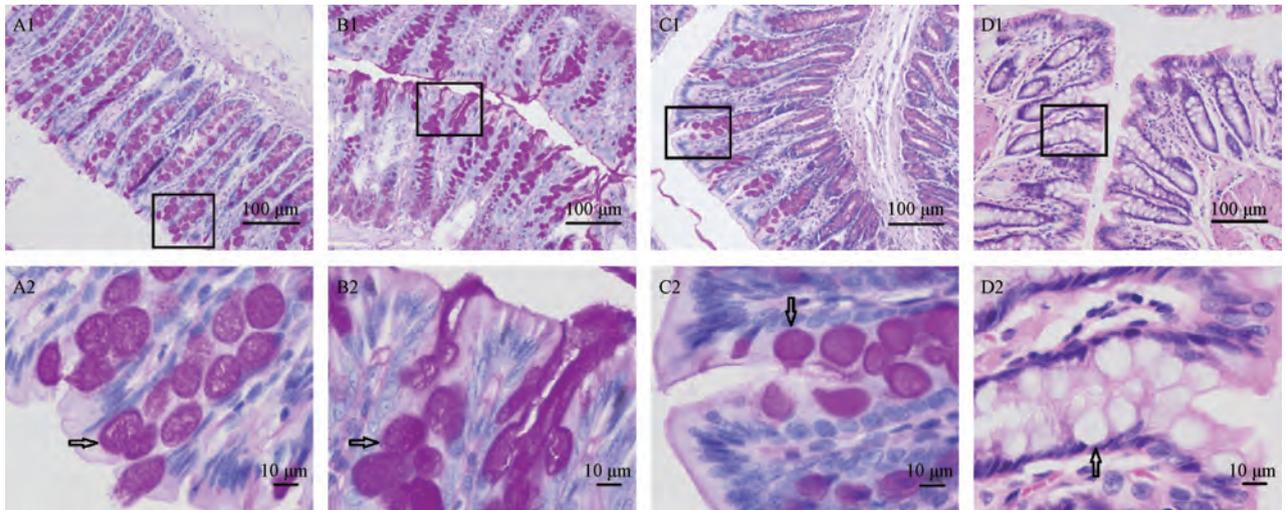


图 1 光镜下各组大鼠结肠杯状细胞形态学比较

注: A、D 和 B、C 分别为正常大鼠与便秘模型大鼠的结肠标本, A、B 和 C 为高碘酸希尔法阿尔新蓝染色, D 为 HE 染色。

A1、A2. 卡诺液固定的标本, 图示红染的黏液颗粒; B1、B2. 卡诺液固定的标本, 图示杯状细胞着色度;

C1、C2. 甲醛固定液处理的标本, 图示杯状细胞着色度;

D1、D2. 甲醛固定液处理的标本, 杯状细胞成空泡状。箭头示杯状细胞。

Fig.1 Morphological comparison of colonic goblet cells in rats under light microscope

Note: A, D and B, C were control rats and constipation model rats colon specimens, respectively. A, B and C were samples of

PAS/Alcian Blue stained, and D was HE stained specimen. A1、A2. The specimens fixed with Carnoy's fixative. The drawing

shows red stained mucus particles fixed with Carnoy's fixative. B1、B2. The specimens fixed with Carnoy's fixative.

The drawing shows the color intensity of the goblet cells. C1、C2. The specimens fixed with formaldehyde fixative.

The drawing shows the color intensity of the goblet cells. D1、D2. The specimens fixed with formaldehyde fixative.

The drawing shows vacuolar goblet cells. The arrows show the goblet cells.

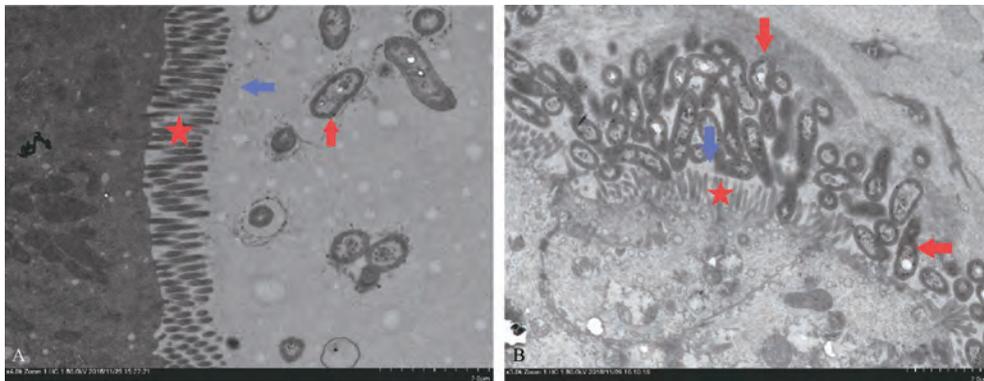


图 2 电镜下结肠黏膜和黏液层的超微结构

注:A.正常大鼠结肠标本;B.便秘模型大鼠结肠标本。★示结肠绒毛,红色箭头示细菌,蓝色箭头示结肠黏液层。

Fig.2 Ultrastructure of colon epithelial and mucin layer by electron microscope

Note: A. The tissue of control. B. The tissue of constipation. The position of colon villous is marked with red star, and the bacteria marked with the red arrows, the colon mucin layer marked with blue arrows

2.2 杯状细胞数量及着色度的比较

高碘酸希尔法阿尔新蓝染色标本中,如图 3,4 和表 1 所示,与正常大鼠相比,便秘模型大鼠的杯状细胞数量减少 13.81% ($P < 0.05$, 见图 3A),而其着色度显著性增强 ($P < 0.001$, 见图 3B)。便秘模型大鼠结肠标本中,卡诺液处理与甲醛固定液处理的标

本相比,杯状细胞数量无显著性差异 ($P > 0.05$, 见图 4A),但着色度明显增强 ($P < 0.05$, 见图 4B)。结果提示,卡诺液处理与甲醛固定液处理的正常大鼠结肠标本的杯状细胞数量及着色度对比结果无显著性差异,而便秘模型组杯状细胞数量无显著性差异,但是着色度有显著性差异。

表 1 正常与便秘模型大鼠结肠杯状细胞数量和着色度比较 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the number and color intensity of normal and constipation models colon goblet cells ($\bar{x} \pm s$)

Goblet cell	Control	Model	Model	
			Formalin	Carnoy
Number/(N/mm ²)	1 547±84.00	1 293±51.48 *	1 244±87.52	1 346±51.24
Color Intensity/%	99.76± 2.66	120.30± 1.53 ***	100.00± 0.82	107.20± 2.05 **

注:与正常组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.与甲醛固定液处理组比较, ** $P < 0.01$

Note: compared with the control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$. Compared with the formaldehyde fixative fixed group, ** $P < 0.01$

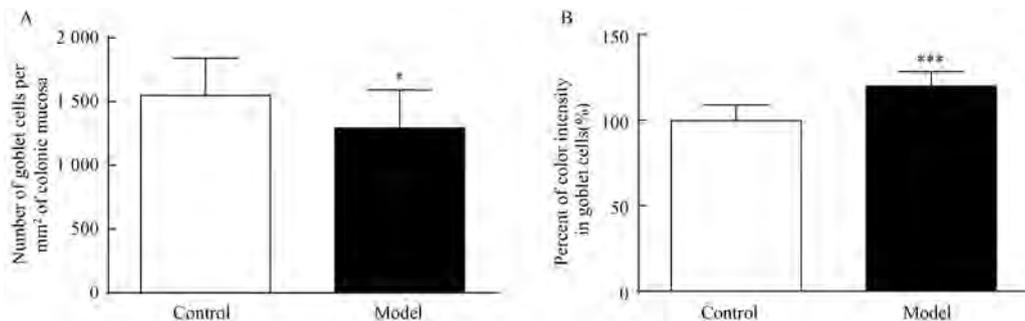


图 3 正常与便秘模型大鼠结肠杯状细胞的特征比较 ($\bar{x} \pm s$)

注:A.结肠陷窝内含有杯状细胞的数量对比;B.杯状细胞着色度的对比。与正常组比较, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ 。

Fig.3 Comparison of the characteristic of colon goblet cells of normal and model rats ($\bar{x} \pm s$)

Note: A. Comparison of the number of goblet cells along colonic depth. B. Comparison of percent of color intensity in goblet cells.

Compared with the control group, * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$.

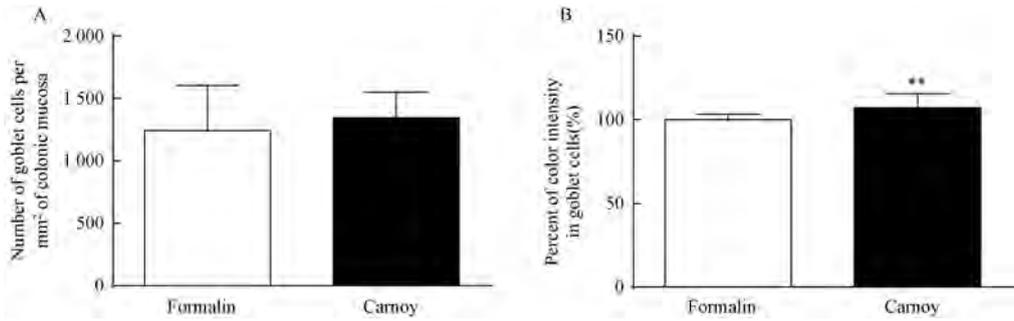


图4 不同固定液处理的组织杯状细胞特性比较($\bar{x}\pm s$)

注:A.杯状细胞数量的对比;B.杯状细胞着色度的对比,与正常组比较,** $P<0.01$ 。

Fig.4 Comparison of the characteristic of colon goblet cells treated with different fixative ($\bar{x}\pm s$)

Note:A. Comparison of the number of goblet cells. B. Comparison of the percent of color intensity in goblet cells.

Compared with the control group, ** $P<0.01$.

3 讨论

肠黏膜与免疫屏障、肠道共生菌群、营养和代谢产物等相互作用共同维持肠道稳态^[4]。由肠道杯状细胞分泌的黏蛋白是肠道固有免疫第一防线黏液层的主要组成部分^[5],其中由杯状细胞分泌的黏蛋白和一些其他活性物质构成的肠道黏液层,为肠道抵御内源或外源性的刺激和微生物的侵袭提供了保障^[6],并有助于维持肠道共生菌群的平衡^[7]。因此,杯状细胞是维持肠道健康必不可少的保护者。研究表明^[8],杯状细胞黏液必须伴随水分的扩散分泌入肠腔,本实验用以制备便秘模型大鼠的地芬诺酯,可以阻滞肠黏膜上的水通道,消除肠黏膜的蠕动反射而减弱肠蠕动,并使肠内容物通过延迟,肠腔内水分的吸收增加,肠道内的水分减少,所以,便秘模型大鼠结肠杯状细胞与正常大鼠相比,不仅数量减少,而且黏液分泌减少,胞内黏液颗粒密度增高,着色度加深,结肠黏液层厚度变薄,容易引起细菌易位(如图2所示)。由此可见,杯状细胞分泌的黏蛋白对于维持肠道稳态不可或缺。另有研究表明^[9],结肠肠道杯状细胞分泌的黏蛋白主要为MUC2黏蛋白,实质为高度糖基化的糖蛋白,具有水溶性,这可能就是因为用4%多聚甲醛处理标本,致使表层黏液蛋白溶解其中,导致组织标本中的黏蛋白含量降低,使其着色度降低;而卡诺液是由无水乙醇:氯仿:冰醋酸(6:3:1)组成,其不含蒸馏水^[1],可以完整地保存了标本杯状细胞及结肠黏液层中黏液蛋白含量,因而能够看到黏膜表面红染的黏液层。因此,在

杯状细胞的形态学及黏液分泌的观察中,用卡诺液处理标本优于甲醛固定液。

综上所述,本实验通过对杯状细胞形态学观察以及数量与着色度的统计,结果提示卡诺液与甲醛固定液处理标本的差异性。从而应该注意的是,在不同实验,不同标本的制备中,对于固定液的选择应根据实验研究对象的特性而确定,同时,不可忽视应用不同固定剂处理标本,实验得到的数据可能有差异性。因此,要观察结肠黏液分泌的标本时,相较于甲醛固定、HE染色方法,卡诺液固定、高碘酸希尔夫法阿尔新蓝染色处理标本的方法更为合适。

参考文献

- [1] 唐军民,李英,卫兰,等.组织学与胚胎学彩色图谱:实习用书[M].北京:北京大学医学出版社,2003.2-3.
- [2] Kurashima Y, Kiyono H. Mucosal Ecological Network of Epithelium and Immune Cells for Gut Homeostasis and Tissue Healing[J]. *Annu Rev Immunol*, 2017,35:119-147.
- [3] Gustafsson J K, Ermund A, Johansson M E, *et al*. An ex vivo method for studying mucus formation, properties, and thickness in human colonic biopsies and mouse small and large intestinal explants[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2012,302(4):G430-G438.
- [4] 刘小伟,孙瑞娟,董尔丹.肠道稳态及相关疾病研究现状与趋势[J].*生理科学进展*, 2013,44(3):206-212.
- [5] Geremia A, Biancheri P, Allan P, *et al*. Innate and adaptive immunity in inflammatory bowel disease[J]. *Autoimmun Rev*, 2014,13(1):3-10.
- [6] 巫全胜,钱宁,吴曙光.药物依赖性便秘大鼠大肠杯状细胞及5-HT变化的实验研究[J].*实验动物科学*, 2008,25(3):11-13.
- [7] 刘宏宏,徐敬东.内黏液层与溃疡性结肠炎发病机制研究进展[J].*世界华人消化杂志*, 2017,25(1):77-83.

[8] Garcia M A, Yang N, Quinton P M. Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion [J]. *J Clin Invest*, 2009, **119** (9):2613-2622.

[9] Lang T, Hansson G C, Samuelsson T. Gel-forming mucins appeared early in metazoan evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, **104** (41):16209-16214.

Comparative Investigation on the Colon Goblet Cell Staining

GAO Chenchen¹, XUE Xiaowei², LIU Yuehong³, LI Lisheng⁴, XU Jingdong¹

(1. Department of Physiology and Pathophysiology, Capital Medical University, Beijing 100069, China) (2. Department of Pathology, Peking Union Medical College Hospital, Beijing 100005, China) (3. Xuanwu Hospital, Capital Medical University, Beijing 100054, China)

(4. Capital Experimental Center for Basic Medical Teaching, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective In order to compare the difference between Carnoys and formaldehyde fixation solution on goblet cell in rat colon, we stained the colon specimens. **Method** The rat colon specimens of normal and constipation model rats were fixed with Carnoys or 4% formaldehyde fixative to prepare paraffin sections respectively. By means of staining with HE or PAS/Alcian Blue individually according to its protocol and counting the number and color intensity of goblet cells, we compare the difference between the two fixatives fixed specimens. **Result** The results indicate that the number of goblet cells fixed with Carnoys and the formaldehyde fixative group has no significantly different ($P > 0.05$, $n = 10$), while the color intensity of the goblet cell stained with PAS/Alcian Blue was notable enhancement compared with the formaldehyde fixative group ($P < 0.01$, $n = 10$). But the color intensity of other cells in rat colon has no significantly different ($P > 0.05$, $n = 10$). **Conclusion** These results confirmed that the treatment with Carnoys fixative was superior to formaldehyde fixative in the morphological observation of goblet cells. In the preparation of different experiments and specimens, we should choose the fixative solution depend on the characteristics of the experimental study object.

Key words: Carnoys fixative; formaldehyde fixative; goblet cell; constipation model

(上接第 24 页)

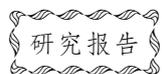
The Pathological Examination of Laboratory Rodents of Beijing in May 2018

NI Jiamin, LI Miaoxuan, ZHANG Xixi, LAI Mengyu, WU Xiaoqian,
YANG Dongming, SONG Yinjuan, LIAO Yi, YAO Jiao, DONG Haodi, ZHANG Kai,
YANG Lifeng, ZHAO Deming, ZHOU Xiangmei

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100193, China)

Abstract: Objective To conduct pathological examination on 400 rodent laboratory animals submitted in May 2018, and make reasonable suggestions for the management of laboratory animals based on the test result. **Method** We collected hearts, livers, kidneys, lungs, spleens and intestinal tracts of 400 laboratory rats. Then we made these organs into paraffin sections or frozen sections. After HE staining, PAS staining or oil red O staining, these sections were placed under optical microscope to collect digital images and record the result. **Result** A few cases of rats, mice and guinea pigs showed hepatocellular swelling, focal inflammatory cell infiltration in lungs and hearts, and coccidia infected in intestinum crassum; no visible pathological changes in golden hamsters and hamsters. **Conclusion** The laboratory animals in this pathological examination are basically in a healthy state. A few animals need to be strengthened and improved the feeding and management conditions to ensure the laboratory animals meet the standards.

Key words: laboratory animals; pathological examination; pathological changes



实验动物支气管鲍特杆菌检测能力验证结果与分析

邢进 冯育芳 王洪 岳秉飞

(中国食品药品检定研究院, 实验动物资源研究所, 北京 102629)

摘要:目的 开展 2017 年能力验证活动, 评价国内实验动物检测实验室对支气管鲍特杆菌的检测能力。方法 依据 CNAS 相关文件, 中国食品药品检定研究院作为能力验证提供者, 制备含有支气管鲍特杆菌及产气巴斯德杆菌和大肠杆菌为干扰菌的比对样品, 提供给参加实验室, 要求在规定时间内反馈检测结果及报告。结果 所制备三种样品的平均含菌量均大于 1×10^8 CFU/mL, 37 °C 加速稳定性时间不少于 20 d, 符合比对要求。全国共有 18 个省市的 25 个实验动物检测实验室参加, 均按时反馈结果和报告, 满意率 88%。结论 本次能力验证为实验动物呼吸道细菌比对项目的进一步开展奠定了基础。大部分参加实验室具备一致可靠的支气管鲍特杆菌检测能力。

关键词:实验动物; 支气管鲍特杆菌; 能力验证; 中国合格评定国家认可委员会

中图分类号: Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0030-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.006

能力验证 (Proficiency Testing) 是利用实验室间比对, 按照预先制定的准则评价参加者的能力。作为重要的外部质量评价活动, 寻求并参加能力验证是合格评定机构的责任和义务。合格评定机构应结合自身需求参加能力验证以证明其技术能力^[1]。中国食品药品检定研究院 (以下简称中检院) 作为 CNAS 能力验证提供者 (Proficiency Testing Provider, PTP) 已在实验动物质量检测领域开展了包括病毒^[2-4]、细菌^[5-7]和遗传^[8-9]在内的多项能力验证活动。我们通过此前的能力验证活动积累了一些经验, 得到了全国实验动物质量检测机构的支持。2017 年, 中检院依据 CNAS-RL02《能力验证规则》和 CNAS-RL03《能力验证提供者认可准则》(ISO/IEC 17043:2010)^[10] 运作 NIFDC-PT-107“实验动物呼吸道样品中支气管鲍特杆菌检测”的能力验证工作。支气管鲍特杆菌是感染实验动物的一种重要的呼吸道病原菌^[11], 大鼠、豚鼠和兔等易感, 引起支气管肺炎症状^[12], 在实验用猪中是引发猪萎缩性鼻炎的主要病原之一^[13]。通过对支气管鲍特杆菌的检测能力验证, 初步评价参与实验室对实验动物呼吸道细菌的检测能力。现将本次验证的总体情况报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌种

支气管鲍特杆菌 (*Bordetella bronchiseptica*) ATCC 19395, 产气巴斯德杆菌 (*Pasteurella aerogenes*) ATCC 27883, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) CMCC 44110 分别购自美国模式培养物保藏中心 (ATCC) 和中国医学菌种保藏中心 (CMCC), 三株标准菌株用作本次能力验证菌株, 本实验室保存。

1.2 培养基及试剂

血琼脂培养基 (Oxiod), DHL 琼脂 (北京三药科技开发有限公司), 葡萄糖-蔗糖-三糖铁-靛基质-尿素-半固体等生化鉴定培养基 (北京三药科技开发有限公司), API 20E 生化鉴定条 (梅里埃), 革兰阴性细菌鉴定板 (BD, Vitek), 无菌脱纤维羊血 (北京路桥技术股份有限公司)。

细菌保护液基础液 (本院食品化妆品检定所提供) 加入 10% 无菌脱纤维羊血制成此次比对样品保护液。

DNA 提取试剂盒 (Qiagen), DNA 聚合酶 (TAKARA), 琼脂糖 (TAKARA)。革兰氏染色液

收稿日期: 2018-04-30

作者简介: 邢进 (1979—), 男, 副研究员, 研究方向: 实验动物微生物检测. E-mail: xjvet@nifdc.org.cn

通信作者: 岳秉飞 (1960—), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 比较医学. E-mail: yuebingfei@nifdc.org.cn

(梅里埃);兔抗支气管鲍特杆菌免疫血清由本实验室制备。

1.3 主要仪器

生物安全柜(Thermo Scientific A2)、恒温培养箱(Thermo Scientific Heratherm)、全自动细菌鉴定仪(BD Phoenix-100、梅里埃 VITEK 2 Compact)、冷冻离心机(Hettich)、冻干机(Labconco)。

1.4 菌株的培养与鉴定

三株验证用菌种分别划线接种于血琼脂平皿(5%脱纤维羊血)复苏,至36℃培养24h。挑取初代培养物中单个菌落再分别转种于血琼脂平皿,相同条件培养后备用。

根据伯杰氏系统细菌学手册^[14]和国家标准^[15]对三株验证用标准菌株进行生化鉴定。

同时提取三种菌株的基因组DNA,扩增其16S rDNA^[16],经测序后与Genbank数据库比对,验证菌株的准确性。

1.5 样品制备

将支气管鲍特杆菌、产气巴斯德杆菌和大肠杆菌分别用无菌生理盐水制成菌悬液,与保护液按1:10比例均匀混合,制成1份阳性和2份阴性样品。样品中菌含量约为 10^7 CFU/mL。三种样品分装于螺口1.5mL无菌冻存管中,冷冻干燥,最终每管内固体含量约为50~120mg/管。三种能力验证样品通过“国家认证认可监督管理委员会实验室能力验证平台”(http://nlyz.cnca.cn/lab/index.jsp)随机分组编号,每组3管样品,包含1管阳性和2管阴性样品,即包括支气管鲍特杆菌(阳性)、产气巴斯德杆菌(干扰阴性)和大肠杆菌各1管。实验室无法通过样品编号识别组别,可防止实验室间对结果的相互自行比对。

1.6 样品检验

1.6.1 均匀性检验:在已制备的三种样品中分别随机抽取10管样品进行均匀性检验,每管样品重复测试2次。参照作业指导书和国家标准,在样品管中加入500μL灭菌水,充分混匀。取10μL样品悬液用灭菌生理盐水10倍梯度稀释至 10^{-6} ,取稀释至 10^{-5} 和 10^{-6} 的样品液各100μL均匀涂布于血琼脂平皿。36℃培养24h,观察并计算菌落数。

1.6.2 稳定性检验:设置五个温度条件(37℃、23℃室温、4℃、-20℃和-80℃),每种温度放置20组样品,检测样品在各温度下的稳定性。37℃和23℃室温中样品每天取样,4℃中样品每3天取样,

-20℃中样品每周取样,-80℃中样品每月取样。参照作业指导书和国家标准,将样品管中加入500μL无菌水,用10μL接种环接种一满环菌液涂布于血琼脂和DHL琼脂上,36℃培养24h,观察是否有足量的可见典型菌落生长。

1.6.3 样品中杂菌的鉴定:制备样品所用组分未经过灭菌处理,除比对用标准菌株外,其中可能含有其他环境中的细菌。将空白细菌保护液接种于血琼脂平皿,36℃培养24h,对生长出的杂菌进行鉴定。

1.7 样品的包装和运输

1.5mL螺口样品管外层用封口袋包装,置于适宜大小的干冰泡沫箱中,冷链快递至参加实验室。

1.8 参加实验室

全国共25家实验室报名参加本次能力验证计划,均如期反馈结果。其中各级实验动物检测机构16家,省级疾病预防控制中心实验室1家,药检系统实验室1家,科研院校实验室6家,企业实验室1家。实验室所在地区分布见表1。

表1 参加实验室所在地区分布

Table 1 Region of participating laboratories

省/市	数量(家)	省/市	数量(家)
北京	3	吉林	1
广东	2	江苏	3
上海	2	江西	1
重庆	1	山东	1
黑龙江	1	陕西	1
河北	1	四川	3
河南	1	新疆	1
湖北	1	浙江	1
辽宁	1		

1.9 检测方法和报告

本次能力验证未规定测试方法,可参考标准中的检测方法^[13,15]。要求在收到样品后10个工作日内反馈结果,并在规定期限内提交完整的检测报告。

1.10 结果评价原则

本次计划中,每个实验室得到3份样本,3份样本的测定结果与标准结果完全一致时,即判定为满意结果;任何1份样品的测定结果与标准结果不一致时,即判定为不满意结果;实验室如未按时限反馈结果,亦判定为不满意结果。

2 结果

2.1 菌株鉴定

三株验证用菌株的菌落和菌体形态均符合各

自特征。支气管鲍特杆菌在血琼脂上形成 1 mm 左右、灰白色、长时间培养可见轻微 α 溶血的菌落;革兰氏阴性短杆菌;在 DHL 培养基上能够生长,形成约 2 mm 无色半透明菌落。大肠杆菌在血琼脂上形成 1~1.5 mm 左右,灰白色略扁的菌落,不溶血;革兰氏阴性小杆菌,两端钝圆浓染;在 DHL 培养基上形成粉红色中等大小菌落。产气巴斯德杆菌在血琼脂上形成 1.5 mm 左右,灰白色圆

润的菌落,不溶血;革兰氏染色阴性小杆菌,两极钝圆浓染;在 DHL 培养基上生长,形成粉红色中等菌落。

采用国家标准中的鉴定方法、API 20E、BD 和 Vitek 细菌鉴定仪的鉴定结果准确、一致。血清凝集实验仅支气管鲍特杆菌与诊断血清发生凝集。16S rDNA 序列比对结果与设定菌株相符。鉴定结果见表 2。

表 2 三种菌株鉴定结果

Table 2 Identification result of three tested strains

鉴定项目 Identification item	支气管鲍特杆菌 ATCC 19395 <i>B. bronchiseptica</i>	产气巴斯德杆菌 ATCC 27883 <i>P. aerogenes</i>	大肠杆菌 CMCC 44110 <i>E. coli</i>
DHL 生长	+	+	+
血平皿溶血	W	—	—
半固体	W	—	+
葡萄糖	—	+	+
蔗糖	—	+	—
氨基酸	—	—	+
尿素	+	—	—
硫化氢	—	—	—
葡萄糖产气	—	+	+
三糖铁(斜面/底层)	K/K	A/A	A/A
血清平板凝集试验	+	—	—
API 20E 结果码	021100451	121522617	710457257
BD Phoenix-100 鉴定	√	√	√
VITEK 2 Compact 鉴定	√	√	√
16S rDNA 测序比对的 Genbank 编号	HE965807.1	NR_118746.1	CP017446.1

注:A 产酸(黄色),K 产碱(红色);W 弱反应

Note: A: acid (yellow); K: alkaline (red); W: weak reaction

2.2 均匀性

三种样品在血琼脂皿上的菌落数均达到 1×10^7 以上的预期指标,满足均匀性要求。见表 3。

表 3 三种样品均匀性验证结果

Table 3 The homogeneity verification results of three kinds of samples

测试管序号	样品中细菌浓度(CFU/mL)		
	支气管鲍特杆菌	产气巴斯德杆菌	大肠杆菌
1	8.29×10^7	4.24×10^7	7.00×10^7
2	6.76×10^7	3.36×10^7	1.16×10^8
3	8.10×10^7	6.30×10^7	1.04×10^8
4	1.37×10^8	5.10×10^7	1.44×10^8
5	1.10×10^8	1.27×10^8	2.46×10^8
6	9.59×10^7	1.80×10^8	1.72×10^8
7	2.98×10^8	7.60×10^7	2.84×10^8
8	1.30×10^8	4.90×10^7	2.65×10^8
9	1.29×10^8	2.17×10^8	1.32×10^8
10	1.17×10^8	2.14×10^8	8.00×10^7
平均值	1.25×10^8	1.05×10^8	1.61×10^8

2.3 稳定性

三种样品在不同存放温度下定期取样,所制备样品在 37 °C 条件下可稳定存放 20 d,23 °C 室温下可稳定存放 40 d,4 °C 下至少可稳定存放 60 d,-20 °C 下至少可稳定存放 180 d,-80 °C 条件下至少可稳定存放 240 d。

2.4 杂菌鉴定

空白细菌保护液经培养后,在血琼脂上可见有两种杂菌生长,一种为 1 mm 左右白色菌落,不易乳白;革兰氏阳性短杆菌,呈梭形。另一种为 1 mm 左右黄色菌落,革兰氏阳性双球菌。经 BD 细菌鉴定仪鉴定,分别为格氏乳球菌(*Lactococcus garvieae*)和变异库克菌(*Kocuria varians*)。

2.5 结果反馈

根据结果评定标准,获满意结果的实验室 22 个,占参加单位的 88%;不满意结果有 3 个,占参加单位的 12%。不满意结果中,两个实验室漏检阳性

样本结果,结果全部为阴性;另一个实验室将阴性干扰样品检为阳性。

3 讨论

3.1 方法的选择

在依据国家标准检测支气管鲍特杆菌时,血琼脂上初代菌落的 α 溶血现象常不甚明显,因此初代培养时以培养至40 h以上为宜。在初代培养时,同时接种DHL琼脂平皿有助于可疑菌落的筛选。采用培养法时,根据CNAS-CL09^[17]要求需对购置的或自制的培养基进行质量控制。即用标准菌株验证相关培养基和试剂的有效性,避免培养基和试剂原因导致的培养和鉴定失败。

如不采用国家标准中的分离培养方法,PCR方法可以快速得出结果^[18-20]。PCR方法已经写入猪病检测的行业标准,用于检测传染性萎缩性鼻炎中支气管鲍特杆菌的诊断^[13],效果优于分离培养法^[21]。本次能力验证参加实验室主要采用的仍是分离培养和生化鉴定的方法。两个实验室采用了PCR方法,且其中一个为荧光定量PCR方法,均获得了准确的结果。

3.2 不满意结果原因分析

通过查验不满意实验室原始记录和报告,检测错误的主要原因可能为操作时污染、可疑菌挑取错误、生化鉴定错误和原始记录记录不祥等几个方面。对样品的检测操作应在生物安全柜中操作,避免各种污染引入。处理样品时,应分装保留部分样品以备复检。熟知阳性菌落的形态和特征对挑取可疑菌至关重要,根据血琼脂和DHL琼脂培养基中的特征形态,充分挑取足够数量的可疑菌落,可以避免漏检。对于可疑菌的生化鉴定,本次比对中有19家单位采用的是手工生化检测,其中9家实验室在原始记录中未注明所使用生化试剂的品牌或来源,使用质量不稳定的生化试剂很可能误导检测结果的判断。有三个实验室采用自动生化鉴定仪,一个采用梅里埃API生化鉴定条,结果均准确。与此前能力验证情况相似,相比纯手工生化鉴定,采用自动细菌鉴定仪或鉴定条可以获得更准确、稳定的结果。值得注意的是支气管鲍特杆菌检测可能得出动力阴性的结果。主要原因是支气管鲍特杆菌在半固体培养基中延穿刺线生长缓慢,培养至7 d比较稳妥^[22]。原始记录是反映实验结果的第一手资料,是对检测

活动的客观反映,有助于检测结果的追溯。原始记录不详或者错误,可直接导致错误结论。

3.3 总结

一次能力验证的结果只能证明参加者在本次能力验证活动的情况,不能说明其正常的检测水平,只有持续参加同一项目的能力验证活动,其总体结果才能反映实验室的检测能力状况^[1]。截止到本次能力验证,连续参加4次及以上的有14家单位,表明实验动物细菌能力验证活动已经得到了全国业内的认可。

本次验证中出现一例样品管破碎情况。经确认后对样品进行了补寄。样品破碎原因可能是由于干冰致使样品管变脆后受挤压导致。提示对样品管的材质应有更高的要求,也督促我们进一步完善和改进实验动物能力验证计划,努力提高能力验证样品的质量,促进实验动物质量检测事业更好发展。

参考文献

- [1] CNAS-RL02. 能力验证规则[S].中国合格评定国家认可委员会. 2016.
- [2] 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.
- [3] 王吉,付瑞,李晓波等. 实验小鼠呼肠弧病毒Ⅲ型抗体的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):183-187.
- [4] 付瑞,王洪,王淑菁,等. 兔出血症病毒抗体的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):188-190,198.
- [5] 邢进,冯育芳,王洪,等. 实验动物中绿脓杆菌检测能力验证的结果与分析[J].中国药事,2014,28(9):986-989.
- [6] 冯育芳,邢进,付瑞,等. 实验动物金黄色葡萄球菌的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):195-198.
- [7] 邢进,冯育芳,王洪,等. 实验动物中沙门菌的实验室检测能力验证的结果与分析[J].中国实验动物学报,2016,24(2):191-194.
- [8] 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.
- [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,2014,28(9):990-994.
- [10] CNAS-RL03. 能力验证提供者认可准则[S].中国合格评定国家认可委员会. 2010.
- [11] 范薇,隋丽华,刘永梅,等. 普通级啮齿类实验动物部分细菌携带情况的初步调查[J].实验动物科学与管理,2001,18(2):18-20.

- [12] 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, 2005.
- [13] NY/T 546-2015. 猪传染性萎缩性鼻炎诊断技术[S]. 2015.
- [14] Brenner D J, Krieg N R, Staley J T, *et al.* Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol 2: The Proteobacteria, Part C: The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria [M]. 2nd ed. New York: Springer, 2005: 662-670.
- [15] GB/T 14926.6-2001 实验动物支气管鲍特杆菌检测方法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [16] Weisburg W G, Barns S M, Pelletier D A, *et al.* 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study[J]. J Bacteriol. 1991; **173**(2): 697-703.
- [17] CNAS-CL09. 检测和校准实验室能力认可准则在微生物检测领域的应用说明[S]. 中国合格评定国家认可委员会. 2014.
- [18] Coutinho T A, Bernardi M L, de Itapema Cardoso M R, *et al.* Performance of transport and selective media for swine *Bordetella bronchiseptica* recovery and its comparison to polymerase chain reaction detection[J]. Braz J Microbiol, 2009, **40**(3): 470-479.
- [19] Canonne A M, Billen F, Tual C, *et al.* Quantitative PCR and Cytology of Bronchoalveolar Lavage Fluid in Dogs with *Bordetella bronchiseptica* Infection[J]. J Vet Intern Med. J Vet Intern Med, 2016, **30**(4): 1204-1209.
- [20] Tizolova A, Brun D, Guiso N, *et al.* Development of real-time PCR assay for differential detection of *Bordetella bronchiseptica* and *Bordetella parapertussis* [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2014, **78**(4): 347-351.
- [21] Hozbor D, Fouque F, Guiso N, *et al.* Detection of *Bordetella bronchiseptica* by the polymerase chain reaction [J]. Res Microbiol, 1999, **150**(5): 333-341.
- [22] Simpson W, Simmons D J. Problems associated with the identification of *bordetellabronchiseptica*[J]. Lab Anim, 1976, **10**(1): 47-48.

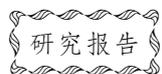
Results and Analysis of Proficiency Testing of Detection of *Bordetella bronchiseptica* in Laboratory Animals

XING Jin, FENG Yufang, WANG Hong, YUE Bingfei

(National Institutes for Food and Drug Control, Department of Laboratory Animal Quality Testing, Beijing 102629, China)

Abstract: Objective To carry out 2017 proficiency testing (PT) activities, and evaluate the detection capability of the domestic quality testing institute of laboratory animals for *Bordetella bronchiseptica*. **Method** As the proficiency testing provider (PTP), National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC) made animal respiratory tract samples with *B. bronchiseptica*, *Pasteurella aerogenes* and *Escherichia coli* as confusing bacteria samples which were provided to the participating laboratories. The laboratories must be feed back result and reports within the prescribed time limit. **Result** The average amount of bacteria prepared in the three kinds of samples were more than 1×10^8 CFU / mL, and the 37 °C acceleration stability was greater than 20 d. The prepared samples met the PT requirements. A total of 25 laboratories of 18 provinces participated in this PT that returned the result and report on time. Three laboratories result were not satisfactory. The overall satisfaction rate was 88%. **Conclusion** This PT laid the foundation for the further development of laboratory animal respiratory bacteria. Most of the participating laboratories had consistent and reliable detection capability to *B. bronchiseptica*.

Key words: laboratory animal; *Bordetella bronchiseptica*; proficiency testing; CNAS



拉布拉多犬与金毛寻回猎犬基因组中与髌关节发育不良相关基因 COL6A3、FN1 的 SNP 位点检测*

白 静 马雪娜 陈舒婷 周子娟 王福金 王爱国 王靖宇

(大连医科大学实验动物中心,大连 116044)

摘要:目的 检测拉布拉多犬与金毛寻回猎犬基因组 DNA 中与髌关节发育不良密切相关的 COL6A3 基因、FN1 基因中的 3 个 SNP 位点,以期对拉布拉多犬与金毛寻回猎犬幼犬的选育提供有效的遗传学诊断方法。**方法** 全国范围内募集经过影像学诊断的髌关节发育不良的拉布拉多犬 8 只、金毛寻回猎犬 5 只,中国导盲犬大连培训基地提供经影像学诊断的健康的拉布拉多犬 23 只、金毛寻回猎犬 7 只作为实验对象,静脉采血,提取血细胞的基因组 DNA 样本,采用 PCR/测序方法对 COL6A3 基因上的 2 个 SNP 位点(CFA25: 51031100,51040259)和 FN1 基因的 1 个 SNP 位点(CFA37: 25095511)进行基因型检测,并统计分析 SNP 位点的基因型与髌关节发育不良的关联度。**结果** COL6A3(CFA25: 51031100,51040259)和 FN1(CFA37: 25095511)SNP 位点的基因型与犬的髌关节发育不良没有显著相关性($P>0.05$)。**结论** COL6A3(CFA25: 51031100,51040259)和 FN1(CFA37: 25095511)SNP 位点均不能成为拉布拉多犬与金毛寻回猎犬髌关节发育不良的实用性遗传学诊断指标。

关键词:髌关节发育不良;拉布拉多犬;金毛寻回猎犬;COL6A3;FN1

中图分类号: R394.8 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0035-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.007

犬髌关节发育不良(Canine Hip Dysplasia, CHD)是一种受多基因调控的先天性遗传疾病,多见于大型或特大型犬,如拉布拉多犬、金毛寻回猎犬等。患有 CHD 的犬因关节磨损疼痛而行走困难^[1-2]。CHD 不能通过药物治疗痊愈,临床手术是唯一有效的治疗途径^[1]。但这方面的医疗资源紧缺,手术费用昂贵。因而在育种时期对 CHD 犬的筛选尤为重要,不仅可减少疼痛犬,也可节省大量的社会资源。其中,采用遗传学基因诊断的方法淘汰具有 CHD 倾向的繁育犬,是有效避免出现 CHD 犬的理想方法。

髌关节发育不良的成因尚不明确,目前认为有两种主要原因:关节松弛(包括韧带、肌肉、关节囊)和软骨内成骨障碍,或者这两个过程的综合作用^[2-3]。COL6A3 基因与 FN1 基因分别参与了肌肉

组织、软骨基质的组成^[4-5],特别是,有报道称 COL6A3 基因的 2 个 SNP 位点(CFA25: 51031100, 51040259)和 FN1 基因的 1 个 SNP 位点(CFA37: 25095511)与 CHD 显著相关^[3, 6-7]。但这两个基因的 SNP 位点能否成为有效预测髌关节发育不良的实用性遗传学诊断指标,还有待进一步的实验验证。

培育成本高和培训成功率低是导盲犬事业目前面临的两大难题^[8-9],犬只的淘汰主要包括性情和健康两方面原因,而 CHD 是健康原因中的首要因素。因而筛选有 CHD 患病倾向的犬对提高导盲犬的培训成功率、降低导盲犬的培育成本具有重要意义。本实验通过对与 CHD 显著相关的 COL6A3 和 FN1 基因上的 3 个 SNP 位点的多态性进行检测,验证其能否成为 CHD 的实用性遗传学诊断指标,以期对导盲犬的选育提供有效的筛选方法。

收稿日期:2018-05-25

* 基金项目:国家自然科学基金(No.31272392)

作者简介:白 静(1992—),女,硕士,研究方向:分子遗传学.E-mail:429027993@qq.com

通信作者:王靖宇(1964—),男,教授,研究方向:动物行为学.E-mail:wangjingyus@163.com

王爱国(1970—),男,教授,研究方向:分子遗传学.E-mail:wangaiguotl@hotmail.com

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:髌关节发育不良(X光片诊断)的拉布拉多犬 8 只、金毛寻回猎犬 5 只;健康的拉布拉多犬 23 只、金毛寻回猎犬 7 只。部分犬(8 只)为全国范围内募集所得,其余犬(37 只)均由中国导盲犬大连培训基地提供。

1.1.2 主要试剂与仪器:EDTA-K2 真空采血管,购于江苏宇力医疗器械有限公司;Blood Extraction Kit 试剂盒,购于宝生物(大连)生物技术有限公司;主要仪器包括动物 X 光机(AVChoice 400, 代尔公司),PCR 仪(美国 Thermo 公司);电泳仪(北京百晶

生物技术有限公司);Gel Doc™ EZ 成像仪(BioRAD 公司)等。

1.2 方法

1.2.1 影像学诊断:采用动物 X 光机对犬的髌关节进行影像学诊断,髌关节发育不良的发病程度采用 Norberg 角来度量,方法为在一张标准的 OFA (Orthopedic Foundation for Animal) 片子上,在两股骨头中心作一连线,再由股骨头中心向髌臼前侧缘作直线,这两线夹角为 Norberg 角,Norberg 角的范围一般在 50°~120°之间,大于等于 105°被认定为健康犬(图 1A 所示),股骨头没有脱节但 Norberg 角小于等于 90°(图 1B 所示)或股骨头完全脱出髌臼(图 1C 所示)被认定为重度 CHD。

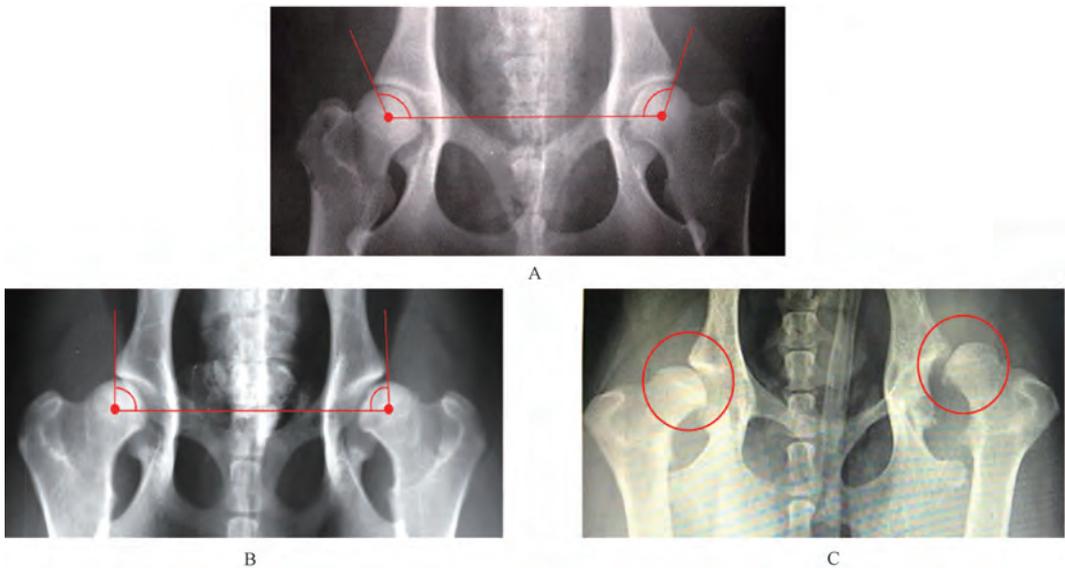


图 1 犬髌关节 X 光影像图

注:A:健康犬;B、C:重度髌关节发育不良犬

Fig.1 X ray image of the dog hip joint

Note: A: normal; B、C: CHD

1.2.2 基因组 DNA 的提取:从犬的前肢静脉采血 3~5 mL,置于含 EDTA 抗凝剂的真空采血管中。采用 Blood Extraction Kit 试剂盒提取血细胞中的基因组 DNA,具体操作步骤按试剂盒说明书进行。

1.2.3 引物设计:依据文献中已报的与犬髌关节发育不良相关的 COL6A3 和 FN1 基因的 3 个 SNP 位点^[3, 6],在 NCBI 数据库(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)上进行基因位点确认,以 SNP 位点为中心选取 DNA 序列,应用 Primer 3.0 软件(<http://primer3.ut.ee/>)进行引物设计,并对设计的引物进行 PCR 验证和条件优化。基因的 SNP 位点信息及引物序列

详见表 1。

表 1 COL6A3 和 FN1 基因 SNP 位点的生物学信息及引物序列

Table 1 The bioinformation and primer sequences of SNPs of COL6A3 and FN1 genes

CFA	Gene	SNP	location	Primer Sequences (5'-3')
25	COL6A3	A>G	51031100	Forward: tctgtacttacgggtccacc Reverse: gctctatcaaaggaacgggg
25	COL6A3	A>G	51040259	Forward: cgtccttgcgatgtaaat Reverse: tatcttcaagaggcccctgg
37	FN1	T>A	25095511	Forward: tccccttatgtagtacctgca Reverse: ccctatctgcctttctca

1.2.4 测序及 SNP 位点分型: DNA 样本经 PCR 扩增后,委托宝生物(大连)生物技术有限公司进行测序。通过对测序数据的分析,确认 SNP 位点的多态性类型(图 2)。

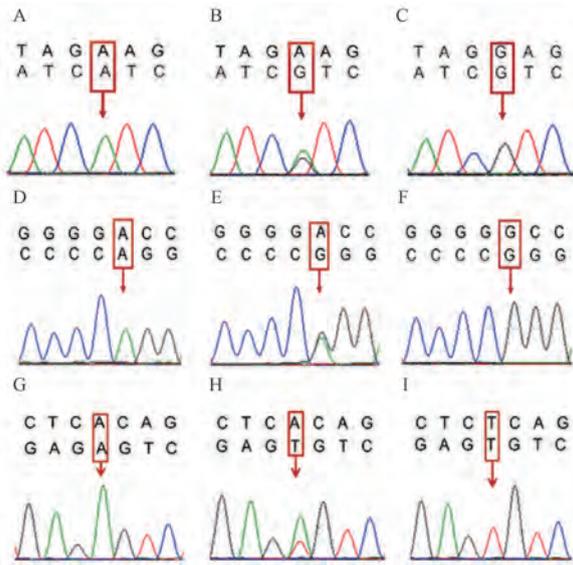


图 2 COL6A3 及 FN1 基因的 SNP 位点的测序检测
注:A、B、C 为 COL6A3CFA25 : 51040259 SNP 位点上的 A/A 型, A/G 型, G/G 型;D、E、F 为 COL6A3CFA25 : 51031100 SNP 位点上的 A/A 型, A/G 型, G/G 型;G、H、I 为 FN1 CFA37 : 25095511 SNP 位点上的 A/A 型, A/T 型, T/T 型。

Fig.2 SNP loci of COL6A3 and FN1 analyzed by DNA sequencing

Note: A, B, C: COL6A3 CFA25 : 51040259 SNP loci;
D, E, F: COL6A3 CFA25 : 51031100SNP loci;
G, H, I: FN1CFA37 : 25095511 SNP loci

1.3 统计方法

采用 SPSS19.0 统计学软件,应用 χ^2 检验对基因的 SNP 位点多态性与髌关节发育不良进行关联度分析, $P < 0.05$ 为显著相关。

2 结果

2.1 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的多态性检测及分析

以 13 只髌关节发育不良犬与 30 只健康犬为研究对象,对 COL6A3 基因的 CFA25 : 51040259 位点进行 PCR、测序和统计学分析,结果如表 2 所示:A/A、A/G、G/G 型在健康犬和髌关节发育不良犬中所占比例均没有显著差异($P > 0.05$)。

表 2 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的检测及分析

Table 2 The detection and analysis of COL6A3 CFA25 : 51040259 SNP loci

COL6A3	健康犬	髌关节发育不良犬	χ^2 值	P 值
A/A	6 (20%)	5 (38.46%)	1.62	0.20
A/G	18 (60%)	5 (38.46%)	1.69	0.19
G/G	6 (20%)	3 (23.08%)	0.05	0.82
总计	30	13		

2.2 拉布拉多犬中 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的检测及分析

以 8 只髌关节发育不良的拉布拉多犬与 23 只健康的拉布拉多犬为研究对象,对 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 位点进行 PCR、测序和统计学分析,结果如表 3 所示:A/A、A/G、G/G 型在健康拉布拉多犬和髌关节发育不良的拉布拉多犬中所占比例均没有显著差异($P > 0.05$)。但 A/A 型所占比例呈现出有差异的趋势($P = 0.07$)。

表 3 拉布拉多犬中 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的检测及分析

Table 3 The detection and analysis of COL6A3 CFA25 : 51040259 SNP loci in the Labrador retriever

COL6A3	健康犬/只	髌关节发育不良犬/只	χ^2 值	P 值
A/A	4 (17.39%)	4 (50%)	3.30	0.07
A/G	14 (60.87%)	4 (50%)	0.29	0.59
G/G	5 (21.74%)	0 (0%)	2.07	0.15
总计	23	8		

2.3 金毛寻回犬中 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的检测及分析

以 5 只髌关节发育不良的金毛寻回猎犬与 7 只健康的金毛寻回猎犬为研究对象,对 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 位点进行 PCR、测序和统计学分析,结果如表 4 所示:A/A、A/G、G/G 型在健康的金毛寻回猎犬和髌关节发育不良的金毛寻回猎犬中所占比例均没有显著差异($P > 0.05$)。但 G/G 型在髌关节发育不良的金毛寻回猎犬中有占主要基因型的趋势($P = 0.1$)。

表 4 金毛寻回猎犬中 COL6A3 基因的 CFA25:51040259 SNP 位点的检测及分析

Table 4 The detection and analysis of COL6A3 CFA25 : 51040259 SNP loci in the Golden retriever

COL6A3	健康犬/只	髌关节发育不良犬/只	χ^2 值	P 值
A/A	2 (28.57%)	1 (20%)	0.11	0.74
A/G	4 (57.14%)	1 (20%)	1.66	0.20
G/G	1 (14.29%)	3 (60%)	2.74	0.10
总计	7	5		

2.4 COL6A3 基因的 CFA25:51031100 SNP 位点的多态性检测及分析

以 14 只髌关节发育不良犬与中国导盲犬大连培训基地的 21 只健康犬为研究对象,对 COL6A3 基因的 CFA25:51031100 位点进行 PCR、测序和统计学分析,结果如表 5 所示:A/A、A/G、G/G 型在健康犬和髌关节发育不良犬中所占比例均没有显著差异 ($P>0.05$)。

表 5 COL6A3 基因的 CFA25:51031100
SNP 位点的检测及分析

Table 5 The detection and analysis of COL6A3 CFA25:
51031100 SNP loci

COL6A3	健康犬/只	髌关节发育不良犬/只	χ^2 值	P 值
A/A	14(66.67%)	9(64.29%)	0.02	0.88
A/G	3(14.29%)	4(28.57%)	1.07	0.30
G/G	4(19.05%)	1(7.14%)	0.97	0.32
总计	21	14		

2.5 FN1 基因的 CFA37:25095511 SNP 位点的多态性检测及分析

以 12 只髌关节发育不良犬与 30 只健康犬为研究对象,对 FN1 基因的 CFA37:25095511 位点进行 PCR、测序和统计学分析,结果如表 6 所示:A/A、T/A、T/T 型在健康犬和髌关节发育不良犬中所占比例均没有显著差异 ($P>0.05$)。

表 6 FN1 基因的 CFA37:25095511
SNP 位点的检测及分析

Table 6 The detection and analysis of FN1
CFA37:25095511 SNP loci

FN1	健康犬/只	髌关节发育不良犬/只	χ^2 值	P 值
A/A	6(20%)	4(33.33%)	0.84	0.36
T/A	17(56.67%)	6(50%)	0.15	0.70
T/T	7(23.33%)	5(41.67%)	1.41	0.24
总计	30	12		

3 讨论

CHD 是一种受多基因调控、性状复杂并和多个染色体区域相关联的障碍疾病,其遗传方式尚不明确。目前研究表明,可能有 2 种遗传体系影响 CHD 的发生,一是控制髌关节周围关节囊松弛的基因,二是控制髌臼发育不良的多基因系统,或两者的单独或协同作用^[10]。其中髌关节松弛具有较高的遗传率^[11],已有研究表明,COL6A3 与 FN1 基因均与髌

关节松弛相关^[3,6-7]。

COL6A3 基因编码胶原蛋白 VI 中的 $\alpha 3$ 链,如发生纯合突变将导致胶原蛋白 VI 的减少,而胶原蛋白是软骨细胞、软骨纤维的主要成分,与关节松弛密切相关^[4]。有研究报道其 SNP 位点(CFA25:51040259)的 A/A 型在正常和髌关节发育不良的拉布拉多犬的比例有极显著性差异^[12]。但我们的实验结果表明,COL6A3 基因的 SNP 位点 CFA25:51040259 及 CFA25:51031100 的三种基因型(A/A、A/G、G/G)在健康犬和髌关节发育不良犬中所占比例均没有显著差异(表 2,表 5)。由于本研究的对象包括拉布拉多犬与金毛寻回猎犬,考虑到可能存在的不同品种犬之间的遗传差异,我们又分别对这两种犬的测序结果进行了单独分析。结果表明,拉布拉多犬与金毛寻回猎犬中患 CHD 犬的 COL6A3 基因 SNP 位点(CFA25:51040259)的基因型趋向不同,拉布拉多犬趋向于 A/A 型,而金毛寻回猎犬趋向于 G/G 型,但并无显著差异(表 3,表 4)。虽然本研究的样本量相对较少,但也充分说明 COL6A3 基因的 SNP 位点 CFA25:51040259 及 CFA25:51031100 不能作为 CHD 实用性的诊断指标。

FN1 基因与软骨细胞外基质的组分以及软骨基质组织的功能密切相关^[5]。有报道表明 FN1 基因的 SNP 位点 CFA37:25095511 与伯恩山犬、德国牧羊犬的 CHD 疾病显著相关^[6-7]。但本研究结果表明,FN1 基因的该 SNP 位点基因型在健康犬和髌关节发育不良犬中的比例没有显著差异(表 6),并且在拉布拉多犬与金毛寻回猎犬犬种内部的独立分析也不存在显著差异,说明该 SNP 位点不能作为 CHD 实用性的诊断指标。

本次研究没有检测出差异的原因主要有以下几点:第一,CHD 的致病原因和遗传体系尚未明确,关节松弛与 CHD 发生的具体联系尚不清楚,导致关节松弛的基因是否直接影响 CHD 的产生还需更多的实验验证;第二,CHD 倾向于多基因遗传调控,COL6A3 和 FN1 基因可能与 CHD 疾病有关联,但可能不是与 CHD 显著相关的主效基因,或是这 3 个 SNP 位点并不能代表 COL6A3 及 FN1 基因的影响作用;第三,本次研究对象的样本量较小,有待扩大样本进行进一步验证。

综上所述,COL6A3 和 FN1 基因的 CFA25:51031100,51040259 和 CFA37:25095511 SNP 位点均不能作为拉布拉多犬与金毛寻回猎犬髌关节发育

不良的实用性遗传学诊断指标。我们将继续检测其他与 CHD 相关候选基因的可能性遗传标记,以期为拉布拉多犬与金毛寻回猎犬幼犬的选育探寻有效的 CHD 遗传学诊断方法。

参考文献

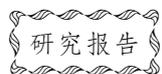
- [1] 郝志香,李乐,鲁毅,等.浅谈犬髋关节发育不良[J].农家科技旬刊,2016,(7):174.
- [2] Morgan J P, Wind A, Davidson A P. Hereditary bone and joint diseases in the dog: osteochondroses, hip dysplasia, elbow dysplasia[J]. *Veterinary Journal*, 2002, **164**(1): 79-80.
- [3] Lavrijsen I C, Leegwater P A J, Martin A J, *et al.* Genome wide analysis indicates genes for basement membrane and cartilage matrix proteins as candidates for hip dysplasia in Labrador Retrievers[J]. *Plos One*, 2014, **9**(1): e87735.
- [4] Demir E, Sabatelli P, Allamand V, *et al.* Mutations in COL6A3 Cause Severe and Mild Phenotypes of Ullrich Congenital Muscular Dystrophy [J]. *AM J HUM GENE*, 2002, **70**(6): 1446-1458.
- [5] Macleod J N, Burton W N, Gu D N, *et al.* Fibronectin mRNA splice variant in articular cartilage lacks bases encoding the V, III-15, and I-10 protein segments [J]. *J BIOL CHEM*, 1996, **271**(31): 18954-18960.
- [6] Pfahler S, Distl O. Identification of quantitative trait loci (QTL) for canine hip dysplasia and canine elbow dysplasia in Bernese mountain dogs [J]. *Plos One*, 2012, **7**(11): 49782.
- [7] Fels L, Distl O. Identification and Validation of Quantitative Trait Loci (QTL) for Canine Hip Dysplasia (CHD) in German Shepherd Dogs [J]. *Plos One*, 2014, **9**(5): e96618.
- [8] 王福金,王爱国,王亮,等. 偏侧性测试在预测成功导盲犬中的应用[J]. *实验动物科学*, 2012, **29**(3): 57-60.
- [9] 俞剑熊,张雅丽,周子娟,等. 犬毛色、毛色基因型及性别与导盲犬培训成功率的相关性研究. *实验动物科学*, 2014, **31**(6): 32-35.
- [10] 王迎松,胡侦明,劳汉昌. 髋关节发育不良的分子遗传学研究进展[J]. *中国矫形外科杂志*, 2004, **12**(7): 540-543.
- [11] Ohlerth S, Lang J, Busato A, *et al.* Estimation of genetic population variables for six radiographic criteria of hip dysplasia in a colony of Labrador Retrievers [J]. *American Journal of Veterinary Research*, 2001, **62**(6): 846-852.
- [12] 赵明媛,韩芳,李雅婵,等. 拉布拉多犬髋关节发育不良相关基因的 SNP 位点的检测 [J]. *实验动物科学*, 2015, **32**(4): 21-25.

SNPs Detection for Canine Hip Dysplasia (CHD) Related Genes COL6A3 and FN1 in Labrador Retrievers and Golden Retrievers

BAI Jing, MA Xuena, CHEN Shuting, ZHOU Zijuan, WANG Fujin, WANG Aiguo, WANG Jingyu
(Laboratory Animal Center, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract: Objective To provide possible genetic markers for Labrador Retrievers and Golden Retrievers, 3 SNPs in canine hip dysplasia (CHD) related genes COL6A3 and FN1 were detected. **Method** Eight typical CHD in Labrador Retrievers and 5 typical CHD in Golden Retrievers confirmed by imaging diagnosis were collected from everywhere of China, 23 normal Labrador Retrievers and 7 normal Golden Retrievers were provided by China Guide Dog Training Centre. The vein blood was sampled and the genomic DNA was isolated from white blood cells. The PCR/sequencing method was used to analyze the variants of 2 SNPs in COL6A3 (CFA25: 51031100, 51040259), and 1 SNPs in FN1 (CFA37: 25095511). In addition, the association between the SNP variants and CHD was analyzed by Chi-square Test. **Result** The SNPs variants of COL6A3 (CFA25: 51031100, 51040259), and FN1 (CFA37: 25095511) were not significantly associated with CHD ($P>0.05$). **Conclusion** The SNPs of COL6A3 (CFA25: 51031100, 51040259) and FN1 (CFA37: 25095511) cannot be used as a practical genetic detection index for CHD diagnostics in Labrador Retrievers and Golden Retrievers.

Key words: CHD; Labrador Retrievers; Golden Retrievers; COL6A3; FN1



导盲犬和淘汰犬肠道菌群的差异性研究*

董建一¹ 许尧² 胡雨奇² 张利龙²
龙尚琴² 李鹏飞² 王靖宇¹ 李明³

(1. 大连医科大学实验动物中心, 大连 116044)(2. 大连医科大学第二临床学院, 大连 116044)

(3. 大连医科大学基础医学院微生物学教研室, 大连 116044)

摘要:目的 探究导盲犬和淘汰犬之间肠道菌群的差异,分析两者特征性差异菌群。方法 收集16只导盲犬和10只淘汰犬的新鲜粪便样本,按照犬品种和性别分为拉布拉多雄性导盲犬(GD-ML)和淘汰犬(ED-ML)、拉布拉多雌性导盲犬(GD-FL)和淘汰犬(ED-FL)、金毛雄性导盲犬(GD-MG)和淘汰犬(ED-MG),另外从中随机抽取9只导盲犬和4只淘汰犬分为导盲犬组(GD)和淘汰犬组(ED),共分为4组配对。提取粪便样本总DNA,应用PCR-DGGE技术获得肠道菌群图谱,应用相关软件和统计学方法对每组配对进行差异性分析。结果 聚类分析结果显示,GD和ED,GD-ML和ED-ML,GD-FL、ED-FL和GD-MG均各归为一类,表明导盲犬和淘汰犬之间肠道菌群存在差异。肠道菌群多样性、丰富度和均匀度分析结果显示,每两个配对组之间多样性指数、丰富度指数和均匀度指数存在差异,但差异均无统计学意义。差异性条带测序分析结果显示:与ED相比,GD *Megamonas funiformis* YIT 11815菌株增多;与ED-ML相比,GD-ML *Succinatimonas hippei* YIT 12066、*Lactobacillus vaginalis* DSM 5837、*Lactobacillus acidophilus* NCFM、*Faecalibacterium prausnitzii* A2-165菌株增多,*Collinsella aerofaciens* ATCC 25986和*Prevotella copri* DSM 18205菌株减少;与ED-FL相比,GD-FL *Ruminococcus gnavus* AGR2154、*Fusobacterium russii* ATCC 25533菌株减少;与ED-MG相比,GD-MG *Tropheryma whipplei* str. Twist菌株增多。结论 本研究发现导盲犬和淘汰犬肠道菌群存在差异,未来对差异菌群的进一步研究可能有助于辅助导盲犬的早期筛选。

关键词:导盲犬;肠道菌群;PCR-DGGE技术

中图分类号: S852.6 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)03-0040-08

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.008

导盲犬是辅助视障人士出行的工作犬。我国导盲犬事业与欧美国家相比起步较晚^[1],导盲犬培训成功率低、成本高、周期长是各国导盲犬培训机构都面临的问题^[2]。导盲犬培训共分为寄养期、培训期、服役期三个阶段,其中寄养期和培训期是导盲犬的早期筛选阶段^[3],筛选的主要方式是通过动物行为学测试对犬的行为反应和认知功能进行评判^[4]。但是,此评估方法具有一定的主观性、局限性和未知性^[1,3],所以采用客观评估数据辅助犬的早期筛选具有重要意义。肠道菌群是许多哺乳动物重要的

“微生态器官”,可通过多种途径影响哺乳动物的行为、情绪和认知功能^[5-6]。本研究通过PCR-DGGE技术分析导盲犬和淘汰犬之间的差异性肠道菌群,进而在动物行为学测试基础上为导盲犬的早期筛选提供一种新的辅助手段。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:选择身体健康、无消化道疾病及

收稿日期:2018-12-11

* 基金项目:大学生创新创业训练计划项目(No.2017101610100129)

作者简介:董建一与许尧为共同第一作者。

董建一(1979—),女,硕士研究生,实验师,研究方向:实验动物学.E-mail:beedream@126.com

许尧(1997—),男,本科生,研究方向:微生物学.E-mail:18340810518@163.com

通信作者:李明(1979—),女,副教授,硕士生导师,研究方向:微生物学.E-mail:vivianmarat@163.com

王靖宇(1964—),男,教授,博士生导师,研究方向:实验动物学.E-mail:wangjingyus@163.com

其他疾病的导盲犬 16 只和淘汰犬 10 只,动物均由中国导盲犬大连培训基地提供,所有导盲犬经中国导盲犬大连培训基地行为学测试并通过,符合《导盲犬》国家标准(GB/T 36186—2018),所有淘汰犬经测试后均不通过,不符合《导盲犬》国家标准。

1.1.2 主要试剂:DNA 提取:E.Z.N.A.[®] Stool DNA kit 购于美国 Omega 公司;PCR 体系:2×Easytaq PCR SuperMix(+dye)、引物 338F 和 518R 等购于宝生物工程(大连)有限公司;DGGE 体系:尿素、丙烯酰胺、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺、过硫酸铵、四甲基乙二胺、去离子甲酰胺等均为国产分析纯。

1.1.3 实验分组:随机抽取部分导盲犬(GD,9 只)和淘汰犬(ED,4 只)分为两组,并且将全部导盲犬和淘汰犬按照犬的品种和性别进一步分为拉布拉多雄性导盲犬(GD-ML,7 只)和拉布拉多雌性淘汰犬(ED-ML,6 只),拉布拉多雌性导盲犬(GD-FL,6 只)和拉布拉多雌性淘汰犬(ED-FL,2 只),金毛雄性导盲犬(GD-MG,3 只)和金毛雄性淘汰犬(ED-MG,2 只)。导盲犬和淘汰犬之间进行对比分析,相同品种和性别的导盲犬和淘汰犬之间进行对比分析,共分为 4 组相互平行的配对。

1.2 方法

1.2.1 样本收集和 DNA 提取:收集粪便样本前一个月内,导盲犬和淘汰犬均统一饲食,犬饲食由中国导盲犬大连培训基地提供。分别收集各组犬新鲜粪便 5~10 g,取样后加入粪便 DNA 保护剂,-80 ℃ 保存。对各组犬粪便样本进行 DNA 提取,DNA 提取方法按照 E.Z.N.A.[®] Stool DNA kit 试剂盒说明书进行。

1.2.2 PCR 扩增:PCR 扩增肠道菌群多样性变化采用 16S rDNA 基因 V3 区特异性序列作为靶标进行 PCR-DGGE 分析。引物序列为:上游引物(338F)和下游引物(518R)。反应体系总体积为 50 μL:内含 25 μL 2×Easytaq PCR SuperMix(+dye),1 μL 518R(10 pmol/μL),1 μL 338F(10 pmol/μL),3 μL DNA 模板,20 μL dddH₂O。反应条件为:93 ℃ 预热,93 ℃ 变性 5 min,93 ℃ 30 s,54.5 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 进行 30 次循环,72 ℃ 延伸 5 min,4 ℃ 10 min。反应完成后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物并保存于-20 ℃ 备用。

1.2.3 变性梯度凝胶电泳(DGGE):(1)配胶:使用 8% 聚丙烯酰胺凝胶,25%~55% 平行变性梯度。25% 变性梯度凝胶由 0.4 mL 50×TAE buffer,2 mL

去离子甲酰胺,4 mL 40% 丙烯酰胺,2.1 g 尿素,11.5 mL ddH₂O 制成;55% 变性梯度凝胶由 0.4 mL 50×TAE buffer,4.4 mL 去离子甲酰胺,4 mL 40% 丙烯酰胺,4.62 g 尿素,6.55 mL ddH₂O 制成。(2)灌胶:灌胶前分别向 25% 低梯度胶和 55% 高梯度胶中加入 80 μL 过硫酸铵,混合均匀,再分别加入 18 μL 四甲基乙二胺,迅速混合,将高、低梯度胶平行匀速推入预先装好的玻璃架中,室温凝固。(3)点样:微量进液器点样。(4)电泳:于 60 ℃ 恒温条件下,200 V 电压下,电泳 10 min。150 V 电压下,电泳约 4 h。(5)染色:溴化乙锭染色 8 min,去离子水漂洗。(6)凝胶成像分析:凝胶成像仪成像,image lab 软件进行数字化处理,并进行分析,切胶后进行回收纯化,再送至大连赛拓生物科技有限公司测序,利用 NCBI 数据库对测序结果进行对比分析。

1.3 统计方法

采用 Quantity One 软件对 DGGE 菌群图谱进行相似性聚类分析及多样性、丰富度和均匀度分析,采用 GraphPad.Prism.v5.0.分析软件进行统计学数据分析。计量资料用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用配对 *t* 检验及方差分析, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 导盲犬(GD)和淘汰犬(ED)肠道菌群差异

GD 和 ED 粪便菌群 PCR-DGGE 图谱如图 1-1 所示,同一泳道不同条带代表不同的肠道菌群,条带灰度体现了肠道菌群的相对含量。相似性聚类分析结果如图 1-2 所示,1~4 泳道相似度较高,归为一类,5~13 泳道相似度较高,归为一类,表明 GD 和 ED 肠道菌群存在差异。肠道菌群多样性、丰富度和均匀度分析结果如表 1 所示,GD 与 ED 的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数分别为 2.786 ± 0.189 和 2.641 ± 0.445 、 17.800 ± 2.859 和 16.500 ± 6.021 、 0.9720 ± 0.0114 和 0.9738 ± 0.0044 ,且与 ED 相比,GD 多样性指数($t = 0.7579$, $P = 0.4644$)、丰富度指数($t = 0.4770$, $P = 0.6427$)和均匀度指数($t = 0.2868$, $P = 0.7796$)差异均无统计学意义。如图 1 所示,GD 中差异性条带 1 所代表的菌株相对含量高于 ED,条带测序结果(表 2)显示该菌株为 *Megamonas funiformis* YIT 11815,则表明与 ED 相比,GD *Megamonas funiformis* YIT 11815 菌株增多。

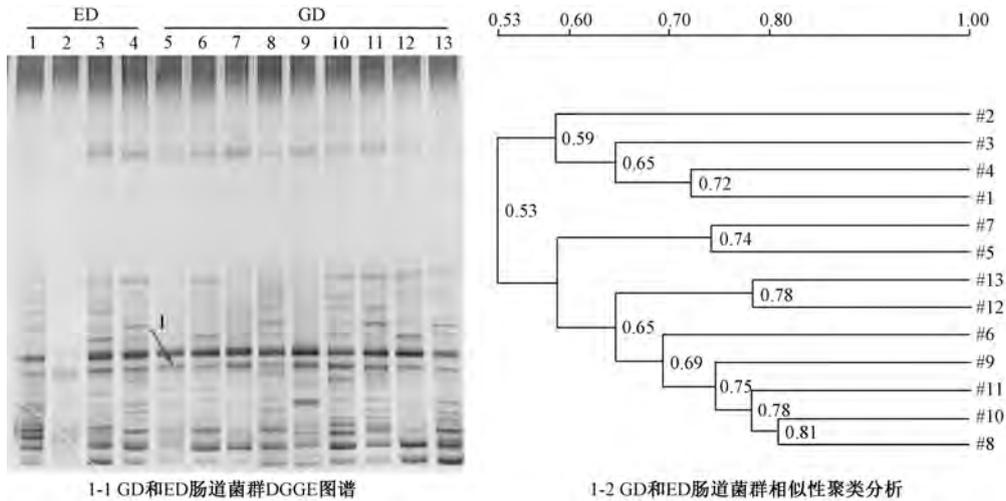


图 1 GD 和 ED 肠道菌群 DGGE 图谱分析和相似性聚类分析

注:同一泳道不同条带代表不同的肠道菌群,条带灰度体现了肠道菌群的相对含量,红色箭头为差异性测序条带

Fig.1 DGGE analysis and similarity cluster analysis of gut microbiota between GD and ED

Note: Different bands in the same lane represent different gut microbiota, the gray scale of the bands reflects the relative content of the gut microbiota, and the red arrow represents the differential sequencing band

表 1 肠道菌群多样性、丰富度和均匀度分析 ($\bar{x}\pm s$)

Table 1 Analysis of diversity index, richness index and evenness index of gut microbiota ($\bar{x}\pm s$)

组别	样本数	多样性指数	丰富度指数	均匀度指数
Groups	Number of samples	Diversity index	Richness index	Evenness index
ED	4	2.641±0.445	16.500±6.021	0.9738±0.0044
GD	9	2.786±0.189	17.800±2.859	0.9720±0.0114
<i>t</i> 检验		<i>t</i> = 0.7579	<i>t</i> = 0.4770	<i>t</i> = 0.2868
Student's <i>t</i> test		<i>P</i> = 0.4644	<i>P</i> = 0.6427	<i>P</i> = 0.7796
ED-ML	6	3.277±0.116	29.143±3.270	0.9737±0.0016
GD-ML	7	3.309±0.186	30.333±6.074	0.9756±0.0027
<i>t</i> 检验		<i>t</i> = 0.3553	<i>t</i> = 0.4124	<i>t</i> = 1.4540
Student's <i>t</i> test		<i>P</i> = 0.7291	<i>P</i> = 0.6880	<i>P</i> = 0.1738
ED-FL	2	2.883±0.145	19.500±2.500	0.9731±0.0068
GD-FL	6	2.786±0.230	18.000±4.320	0.9735±0.0064
<i>t</i> 检验		<i>t</i> = 0.4870	<i>t</i> = 0.4033	<i>t</i> = 0.0720
Student's <i>t</i> test		<i>P</i> = 0.6435	<i>P</i> = 0.7007	<i>P</i> = 0.9449
ED-MG	2	2.283±0.592	12.500±6.500	0.9603±0.0161
GD-MG	3	2.637±0.094	15.700±1.886	0.9617±0.0125
<i>t</i> 检验		<i>t</i> = 0.7881	<i>t</i> = 0.6159	<i>t</i> = 0.0859
Student's <i>t</i> test		<i>P</i> = 0.4882	<i>P</i> = 0.5815	<i>P</i> = 0.9370

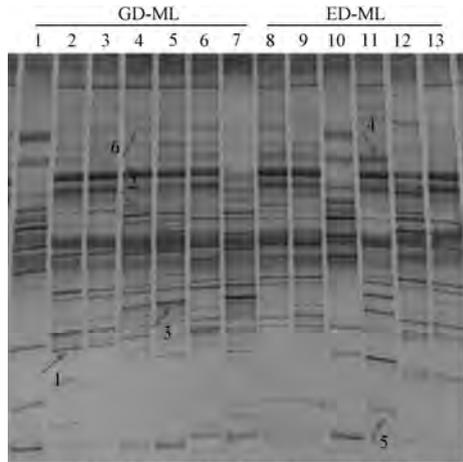
2.2 相同品种及性别的导盲犬和淘汰犬肠道菌群差异

2.2.1 拉布拉多雄性导盲犬 (GD-ML) 和淘汰犬 (ED-ML) 肠道菌群差异分析: GD-ML 和 ED-ML 粪便菌群 PCR-DGGE 图谱如图 2-1 所示。相似性聚类分析结果如图 2-2 所示, 1 和 10 泳道相似度较高, 11 和 12 泳道相似度较高, 均单独归为一类; 2-6 泳道相似度较高, 归为一类; 7~9、13 泳道相似度较

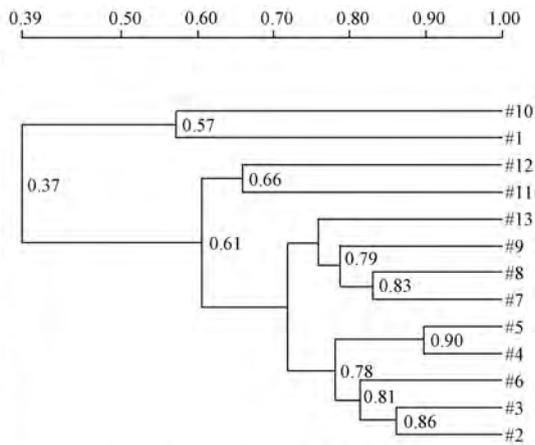
高, 归为一类, 表明 GD-ML 和 ED-ML 肠道菌群存在差异。肠道菌群多样性、丰富度和均匀度分析结果如表 1 所示, GD-ML 与 ED-ML 的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数分别为 3.309±0.186 和 3.277±0.116、30.333±6.074 和 29.143±3.270、0.9756±0.0027 和 0.9737±0.0016, 且与 ED-ML 相比, GD-ML 多样性指数 (*t* = 0.3553, *P* = 0.7291)、丰富度指数 (*t* = 0.4124, *P* = 0.6880) 和均匀度指数 (*t* =

1. 4540, $P = 0.1738$) 差异均无统计学意义。如图 2-1 所示, GD-ML 中差异性条带 1、2、3 和 6 所代表的肠道菌株相对含量高于 ED-ML, 差异性条带 4 和 5 所代表的肠道菌株相对含量低于 ED-ML, 条带测序结果(表 2) 显示条带 1~6 分别为 *Succinatimonas hippei* YIT 12066、*Lactobacillus acidophilus* NCFM、*Lactobacillus vaginalis* DSM 5837、*Prevotella copri* DSM

18205、*Collinsella aerofaciens* ATCC 25986、*Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 菌株, 则表明相比于 ED-ML, GD-ML *Succinatimonas hippei* YIT 12066、*Lactobacillus vaginalis* DSM 5837、*Lactobacillus acidophilus* NCFM 和 *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 菌株增多, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986 和 *Prevotella copri* DSM 18205 菌株减少。



2-1 GD-ML和ED-ML肠道菌群DGGE图谱



2-2 GD-ML和ED-ML肠道菌群相似性聚类分析

图 2 GD-ML 和 ED-ML 肠道菌群 DGGE 图谱分析和相似性聚类分析

Fig.2 DGGE analysis and similarity cluster analysis of gut microbiota between GD-ML and ED-ML

表 2 DGGE 差异性条带测序分析

Table 2 DGGE differential strip sequencing analysis

组别 Groups	条带编号 Strip number	同源菌株名称 Name of homologous strains	同源性 Identity	门类 Phylum
GD and ED	1	<i>Megamonas funiformis</i> YIT 11815	93%	Firmicutes
	1	<i>Succinatimonas hippei</i> YIT 12066	94%	Proteobacteria
GD-ML and ED-ML	2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	99%	Firmicutes
	3	<i>Lactobacillus vaginalis</i> DSM 5837	100%	Firmicutes
	4	<i>Prevotella copri</i> DSM 18205	98%	Bacteroidetes
	5	<i>Collinsella aerofaciens</i> ATCC 25986	100%	Actinobacteria
GD-FL and ED-FL	6	<i>Faecalibacterium prausnitzii</i> A2-165	99%	Firmicutes
	a	<i>Ruminococcus gnavus</i> AGR2154	92%	Firmicutes
	b	<i>Fusobacterium russii</i> ATCC 25533	90%	Fusobacteria
GD-MG and ED-MG	A	<i>Tropheryma whipplei</i> str. Twist	94%	Actinobacteria

2.2.2 拉布拉多雌性导盲犬 (GD-FL) 和淘汰犬 (ED-FL)、金毛雄性导盲犬 (GD-MG) 和淘汰犬 (ED-MG) 肠道菌群差异分析: GD-FL 和 ED-FL、GD-MG 和 ED-MG 粪便菌群 PCR-DGGE 图谱如图 3-1 所示。相似性聚类分析结果如图 3-2 所示, 12、13 泳道各单独归为一类; 1~6 泳道相似度较高, 归为一类, 7~8 泳道归为一类; 9~11 泳道归为一类, 结果表明 GD-FL 和 ED-FL、GD-MG 和 ED-MG 肠道菌群

存在差异。肠道菌群多样性、丰富度和均匀度分析结果如表 1 所示, GD-FL 和 ED-FL 的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数分别为 2.786 ± 0.230 和 2.883 ± 0.145 、 18.000 ± 4.320 和 19.500 ± 2.500 、 0.9735 ± 0.0064 和 0.9731 ± 0.0068 , 且与 ED-FL 相比, GD-FL 多样性指数 ($t = 0.4870$, $P = 0.6435$)、丰富度指数 ($t = 0.4033$, $P = 0.7007$) 和均匀度指数 ($t = 0.0720$, $P = 0.9449$) 差异均无统计学意义。GD-

MG 和 ED-MG 的多样性指数、丰富度指数和均匀度指数分别为 2.637 ± 0.094 和 2.283 ± 0.592 、 15.700 ± 1.886 和 12.500 ± 6.500 、 0.9617 ± 0.0125 和 0.9603 ± 0.0161 , 且与 ED-MG 相比, GD-MG 多样性指数 ($t = 0.7881, P = 0.4882$)、丰富度指数 ($t = 0.6159, P = 0.5815$) 和均匀度指数 ($t = 0.0859, P = 0.9370$) 差异均无统计学意义。如图 3-1 所示, GD-FL 中差异性条带 a 和 b 所代表的肠道菌株相对含量低于 ED-

FL, GD-MG 中差异性条带 A 所代表的肠道菌株相对含量高于 ED-MG, 条带测序结果 (表 2) 显示条带 a、b 和 A 分别为 *Ruminococcus gnavus* AGR2154、*Fusobacterium russii* ATCC 25533 和 *Tropheryma whipplei* str. Twist 菌株, 则表明与 ED-FL 相比, GD-FL *Ruminococcus gnavus* AGR2154、*Fusobacterium russii* ATCC 25533 菌株减少; 与 ED-MG 相比, GD-MG *Tropheryma whipplei* str. Twist 菌株增加。

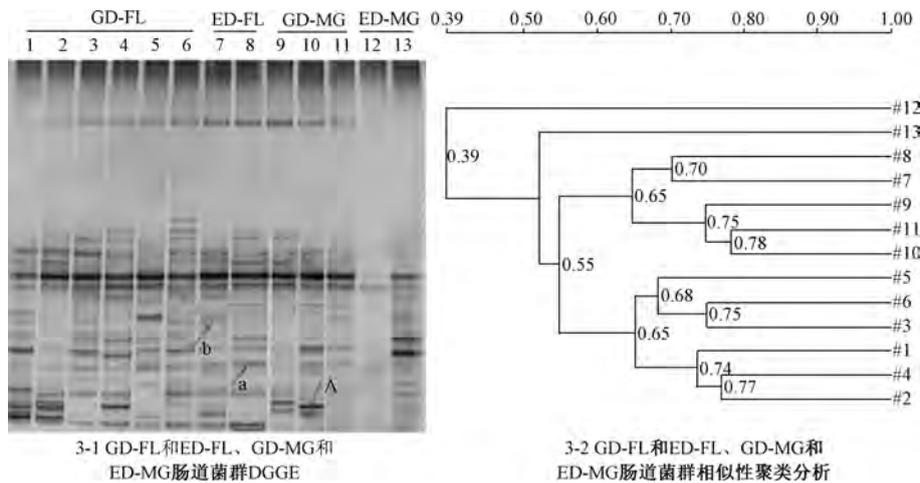


图 3 GD-FL 和 ED-FL、GD-MG 和 ED-MG 肠道菌群 DGGE 图谱分析和相似性聚类分析

Fig.3 DGGE analysis and similarity cluster analysis of gut microbiota between GD-FL and ED-FL, GD-MG and ED-MG

3 讨论

3.1 结果分析

已有研究发现肠道菌群与哺乳动物的行为、情绪和认知功能密切相关,可直接调控其中枢神经系统功能,例如,大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 可损害小鼠的学习能力并导致记忆障碍,而约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsonii*) 可减轻 2,4,6-三硝基苯磺酸处理小鼠的结肠炎和记忆障碍症状^[7]; Crumeyrolle-Arias 等研究发现无菌大鼠相比于 SPF (Specific pathogen Free) 大鼠具有更多焦虑样行为^[8]。因此,导盲犬的肠道菌群可能与犬的行为和情绪等气质特征密切相关,有利于辅助导盲犬的早期筛选。

本研究应用 PCR-DGGE 技术分别分析 GD 和 ED 以及相同品种和性别导盲犬和淘汰犬肠道菌群差异。相似性聚类分析结果显示, GD 和 ED 各分为一类 (图 1-2); GD-ML 和 ED-ML 各分为一类 (图 2-2), 1 和 10 泳道相似度较高, 单独归为一类, 但是两者为不同组别, 可能是由于个体差异造成的影响;

GD-FL、ED-FL 和 GD-MG 各归为一类 (图 3-2), 12、13 泳道各单独归为一类, 可能存在个体差异, 7~8 和 9~11 泳道归为同一大类, 但两组为不同犬种, 可能是由于犬品种及性别不同所造成的影响。肠道菌群多样性、丰富度和均匀度分析结果显示, 每两个配对组之间多样性指数、丰富度指数和均匀度指数差异均无统计学意义。差异性条带测序分析结果显示, 与 ED 相比, GD 中 Firmicutes 门的 *Megamonas funiformis* YIT 11815 菌株增多; 与 ED-ML 相比, GD-ML 中 Proteobacteria 门的 *Succinatimonas hippei* YIT 12066、Firmicutes 门的 *Lactobacillus acidophilus* NCFM、*Lactobacillus vaginalis* DSM 5837 和 *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 菌株增多, Actinobacteria 门的 *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986、Bacteroidetes 门的 *Prevotella copri* DSM 18205 菌株减少; 与 ED-FL 相比, GD-FL 中 Firmicutes 门的 *Ruminococcus gnavus* AGR2154、Fusobacteria 门的 *Fusobacterium russii* ATCC 25533 菌株减少; 与 ED-MG 相比, GD-MG 中 Actinobacteria 门的 *Tropheryma whipplei* str. Twist 菌株增多。

3.2 展望与意义

3.2.1 肠道菌群调节犬行为、情绪和认知功能的可能途径:肠道菌群可通过多种途径影响哺乳动物的行为、情绪和认知功能,脑-肠轴是其中重要的作用途径之一。脑-肠轴是大脑和胃肠道之间紧密连接的双向通路,在调节机体行为反应、认知功能等方面起到了重要作用^[6]。研究发现肠道菌群可调节5-羟色胺(5-HT)^[9]、多巴胺(DA)^[10-11]、 γ -氨基丁酸(GABA)^[12]等多种神经递质的合成和代谢活动,从而参与调控和影响宿主的行为和功能;免疫途径^[13]、短链脂肪酸(SCFAs)代谢途径^[14]等也可能是肠道菌群参与调节的作用途径。

已有研究从神经递质途径、免疫途径、SCFAs代谢途径等脑-肠轴的角度阐述了本导盲犬和淘汰犬之间部分差异菌株的功能和作用。自闭症谱系障碍(Autism spectrum disorder, ASD)是一种以社交和认知功能缺陷为特征的神经疾病,目前认为肠道菌群与脑-肠轴的相互作用是ASD发生发展的一个重要因素^[15],已有研究发现相比于正常儿童,ASD儿童粪便中 *Prevotella copri* 和 *Feacalibacterium prausnitzii* 菌属相对丰度减少,且ASD儿童粪便中GABA浓度较低^[16]。有趣的是,本实验结果表明相比于ED-ML, GD-ML中 *Prevotella copri* 菌属丰度减少而 *Feacalibacterium prausnitzii* 菌属丰度增多,因此这两种菌属是否可能通过脑-肠轴神经递质途径影响犬的行为、情绪和认知功能有待于进一步研究。*Lactobacillus acidophilus* NCFM菌株是一种益生菌,研究表明该菌可刺激肠上皮细胞系中细胞因子和趋化因子的产生^[17]; *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165菌株对人类和小鼠树突状细胞产生IL-10具有较强的诱导能力,并能够调节T细胞反应^[18];另有研究发现 *Ruminococcus gnavus* 菌属同样具有对多种免疫因子的调节作用^[19-20],本研究结果表明相比于ED-ML, GD-ML中 *Lactobacillus acidophilus* NCFM、*Faecalibacterium prausnitzii* A2-165菌株丰度增多,与ED-FL相比, GD-FL中 *Ruminococcus gnavus* AGR2154菌株减少,因此这些差异菌株可能通过脑-肠轴免疫途径产生调节作用。广泛性焦虑症(generalized anxiety disorder, GAD)与GABA、5-HT和去甲肾上腺素(NE)等多种神经递质失调有关^[21],研究发现GAD患者肠道菌群丰富度和多样性显著降低,而 *Ruminococcus gnavus* 等产SCFAs细菌过度增多,经抗抑郁药物治疗后GAD患者症状有

所改善,但肠道菌群失调并未好转或恢复^[22],本研究结果表明与ED-FL相比, GD-FL中 *Ruminococcus gnavus* AGR2154菌株丰度减少,则该菌也可能通过SCFAs代谢途径影响犬的情绪和认知功能。除此之外,与ED相比, GD中 *Megamonas uniformis* YIT 11815菌株增多,与ED-ML相比, GD-ML中 *Succinatimonas hippei* YIT 12066和 *Lactobacillus vaginalis* DSM 5837菌株增多, *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986菌株减少;与ED-FL相比, GD-FL中 *Fusobacterium russii* ATCC 25533菌株减少;与ED-MG相比, GD-MG中Actinobacteria门的 *Tropheryma whipplei* str. Twist菌株增多,目前还没有相应的研究阐明上述差异菌群在脑-肠轴方面的功能和作用。肠道菌群与脑-肠轴存在广泛而深刻的联系,因此,研究导盲犬的特征性优势菌群与神经递质和其他代谢产物之间的联系有助于探索肠道菌群的可能作用机制。

3.2.2 肠道菌群调节幼犬的气质类型:广泛的实验研究和临床实践证明益生菌和益生元治疗在改善哺乳动物焦虑、抑郁等异常行为和情绪方面具有明显的积极作用^[23-24],例如, Gareau等发现服用乳酸菌能够明显改善由母子分离刺激导致的大鼠应激反应^[25]。因此,益生菌和益生元用于幼犬的早期发育阶段可能改善其肠道菌群结构和组成,促使幼犬的气质类型朝向有利于导盲犬筛选的预期方向发展。

3.3 不足之处

本研究首次就导盲犬和淘汰犬肠道菌群的差异进行分析和研究,但仍存在以下几点不足之处:①目前尚未阐明两者差异菌群的具体功能以及作用机制和途径,仍有待于后续实验的进一步研究;②由于部分组别犬数量有限,实验结果无疑会受到个体差异的影响;③本实验中应用的PCR-DGGE技术只能作定性分析,存在一定的主观性和局限性,而肠道菌群的高通量测序技术是目前用于肠道微生物研究最前沿、最常见的检测技术^[26],利用高通量测序技术有助于发现丰度较低的微生物或未知微生物,可全面、准确地获取肠道菌群的定量化信息^[27];④肠源细菌物质可能是调节脑-肠轴的关键,以代谢组学结合高通量测序技术探索可能机制是更好的选择。

综上所述,本研究发现导盲犬和淘汰犬肠道菌群存在差异,有文献表明两者特征性的差异菌群可通过脑-肠轴影响宿主的行为、情绪和认知功能。但限于当前研究水平,本研究尚未对两者差异菌群的

功能及作用途径展开深入研究。值得肯定的是,对肠道菌群的深入分析可能会成为导盲犬早期筛选的有效补充手段,有助于缩短培训周期,节约培训成本。

参考文献

- [1] 李慧玲,王亮,董建一,等.动物行为学应用——导盲犬的培训与应用情况简介[J].实验动物科学,2010,27(4):81-82.
- [2] 王福金,王爱国,王亮,等.偏侧性测试在预测成功导盲犬中的应用[J].实验动物科学,2012,29(3):57-60.
- [3] 袁野,唐芳索.导盲犬的选择及其训练方法[J].中国工作犬业,2008,(11):23-25.
- [4] 王爱国,王福金,王亮,等.气质测试在导盲犬培育中的应用[J].畜牧与兽医,2012,44(2):45-47.
- [5] Yano J M, Yu K, Donaldson G P, *et al.* Indigenous bacteria from the gut microbiota regulate host serotonin biosynthesis [J]. Cell, 2015, 161(2):264-276.
- [6] Carabotti M, Scirocco A, Maselli M A, *et al.* The gut-brain axis: interactions between enteric microbiota, central and enteric nervous systems [J]. Annals of Gastroenterology Quarterly Publication of the Hellenic Society of Gastroenterology, 2015, 28(2):203-209.
- [7] Jang S E, Lim S M, Jeong J J, *et al.* Gastrointestinal inflammation by gut microbiota disturbance induces memory impairment in mice [J]. Mucosal Immunology, 2017, 11(2):369-379.
- [8] Crumeyrolle-Arias M, Jaglin M, Bruneau A, *et al.* Absence of the gut microbiota enhances anxiety-like behavior and neuroendocrine response to acute stress in rats [J]. Psychoneuroendocrinology, 2014, 42(2):207-217.
- [9] Golubeva A V, Joyce S A, Moloney G, *et al.* Microbiota-related Changes in Bile Acid & Tryptophan Metabolism are Associated with Gastrointestinal Dysfunction in a Mouse Model of Autism [J]. Ebiomedicine, 2017, 24(C):166-178.
- [10] 范文涛,闫咏梅,别玉龙,等.大鼠卒中后肠道菌群紊乱与抑郁的关系[J].中国脑血管病杂志,2016,13(12):644-649.
- [11] 杨絮,唐岚,单伟光.三生合欢饮抗抑郁作用及其对肠道菌群影响的实验研究[J].浙江中西医结合杂志,2017,27(7):554-557.
- [12] Lyte M. Microbial Endocrinology in the Microbiome-Gut-Brain Axis: How Bacterial Production and Utilization of Neurochemicals Influence Behavior [J]. Plos Pathogens, 2013, 9(11):e1003726.
- [13] Dantzer R, Konsman J P, Bluthé R M, *et al.* Neural and humoral pathways of communication from the immune system to the brain: parallel or convergent? [J]. Autonomic Neuroscience Basic & Clinical, 2000, 85(1):60-65.
- [14] Schroeder F A, Lin C L, Crusio W E, *et al.* Antidepressant-like effects of the histone deacetylase inhibitor, sodium butyrate, in the mouse [J]. Biological Psychiatry, 2007, 62(1):55-64.
- [15] Li Q, Zhou J M. The microbiota-gut-brain axis and its potential therapeutic role in autism spectrum disorder [J]. Neuroscience, 2016, (324):131-139.
- [16] Kang D W, Ilhan Z E, Isern N G, *et al.* Differences in fecal microbial metabolites and microbiota of children with autism spectrum disorders [J]. Anaerobe, 2017, 49:121-131.
- [17] Jiang Y, Lü X, Man C, *et al.* Lactobacillus acidophilus induces cytokine and chemokine production via NF- κ B and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways in intestinal epithelial cells [J]. Clinical & Vaccine Immunology, 2012, 19(4):603-608.
- [18] Rossi O, Berkel L A V, Chain F, *et al.* Faecalibacterium prausnitzii A2-165 has a high capacity to induce IL-10 in human and murine dendritic cells and modulates T cell responses [J]. Scientific Reports, 2016, 6:18507.
- [19] Sundin J, Rangel I, Repsilber D, *et al.* Cytokine Response after Stimulation with Key Commensal Bacteria Differ in Post-Infectious Irritable Bowel Syndrome (PI-IBS) Patients Compared to Healthy Controls [J]. Plos One, 2015, 10(9):e0134836.
- [20] Chang S E, Mishima Y, Bo L, *et al.* 315 Induction of Bacterial Antigen-Specific Colitis by a Simplified Human Microbiota Consortium in Gnotobiotic IL-10 $^{-/-}$ Mice [J]. Infection & Immunity, 2014, 144(5):2239-2246.
- [21] Ballenger J C. Overview of different pharmacotherapies for attaining remission in generalized anxiety disorder [J]. J Clin Psychiatry, 2001, 62 (Suppl 19):11-19.
- [22] Jiang H Y, Zhang X, Yu Z H, *et al.* Altered gut microbiota profile in patients with generalized anxiety disorder [J]. Journal of Psychiatric Research, 2018, 104:130-136.
- [23] Aitbelgnaoui A, Colom A, Braniste V, *et al.* Probiotic gut effect prevents the chronic psychological stress-induced brain activity abnormality in mice [J]. Neurogastroenterology & Motility, 2014, 26(4):510-520.
- [24] Desbonnet L, Garrett L, Clarke G, *et al.* Effects of the probiotic Bifidobacterium infantis in the maternal separation model of depression [J]. Neuroscience, 2010, 170(4):1179-1188.
- [25] Gareau M G, Jury J, MacQueen G, *et al.* Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation [J]. Gut, 2007, 56(11):1522-1528.
- [26] Qin N, Li D, Yang R. Next-generation sequencing technologies and the application in microbiology—a review [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2011, 51(4):445-457.
- [27] 郑艺,张家超,郭壮,等.基于高通量测序技术分析肠道菌群及其影响因素的研究进展[J].中国食品报,2014,14(11):157-164.

Analysis of the Differences of Gut Microbiota between Guide Dogs and Eliminated Dogs

DONG Jianyi¹, XU Yao², HU Yuqi², ZHANG Lilong², LONG Shangqin²,

LI Pengfei², WANG Jingyu¹, LI Ming³

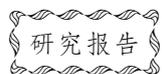
(1.Laboratory Animal Center of Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

(2.The Second Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

(3.College of Basic Medical Sciences, Dalian Medical University, Dalian 116044, China)

Abstract: Objective To explore the differences of gut microbiota between Guide Dogs and Eliminated Dogs, and analyze the characteristic differential gut microbiota of two groups. **Method** Fresh feces from 16 Guide Dogs and 10 Eliminated Dogs were collected. On the one hand, according to dogs' breed and gender, dogs were divided into Male Labrador retriever Guide Dog (GD-ML) and Eliminated Dog (ED-ML), Female Labrador retriever Guide Dog (GD-FL) and Eliminated Dog (ED-FL), Male Golden retriever Guide Dog (GD-MG) and Eliminated Dog (ED-MG). Nine Guide Dogs and 4 Eliminated Dogs randomly selected from all dogs were divided into Guide Dog (GD) and Eliminated Dog (ED). All dogs were totally divided into 4 matching groups. The genomic DNA was extracted from the fresh feces. The fingerprints of the gut microbiota were obtained by PCR-DGGE. The differences were analyzed by relevant software and statistical method. **Result** The result of cluster analysis showed that GD and ED, GD-ML and ED-ML, GD-FL, ED-FL and GD-MG were all classified into one class, indicating that there were differences of gut microbiota between Guide Dogs and Eliminated Dogs. There were also differences in diversity index, richness index and evenness index between each two paired groups, but the differences were not statistically significant. The result of differential strip sequencing analysis showed that compared with ED, *Megamonas funiformis* YIT 11815 were increased in GD; compared with ED-ML, *Succinatimonas hippei* YIT 12066, *Lactobacillus vaginalis* DSM 5837, *Lactobacillus acidophilus* NCFM, *Faecalibacterium prausnitzii* A2-165 were increased and *Collinsella aerofaciens* ATCC 25986, *Prevotella copri* DSM 18205 were decreased in GD-ML; compared with ED-FL, *Ruminococcus gnavus* AGR2154, *Fusobacterium russii* ATCC 25533 were decreased in GD-FL; compared with ED-MG, *Tropheryma whipplei* str. Twist were increased in GD-MG. **Conclusion** This study found that there were differences of gut microbiota between Guide Dogs and Eliminated Dogs. Further research on differential microbiota in the future may help to assist early screening of Guide Dogs.

Key words: Guide Dog; gut microbiota; PCR-DGGE technology



右美托咪定通过抑制 NLRP3 炎性体激活减轻高氧诱导的急性肺损伤

李 刚 喻红彪 任思宏

(南充市中心医院麻醉科,南充 637000)

摘要:目的 探讨右美托咪定减轻高氧诱导的急性肺损伤的效果及机制。方法 雄性 SD 大鼠 30 只随机分为 3 组,即对照组,模型组与右美托咪定组,每组各 10 只,模型组与右美托咪定组构建高氧肺损伤模型。右美托咪定组在造模同时注射右美托咪定,对照组与模型组注射等量生理盐水。造模 1 周后取出肺部组织测定其干湿重比例。应用 ELISA 法检测大鼠血清中的 IL-6、iNOS、VEGF 和 bFGF 蛋白表达量。应用 RT-PCR 法测定 IL-2 和 TNF α 表达量。应用免疫印迹 Western blot 法测定 NLRP3 和 Cav-1 蛋白表达量。结果 模型组肺组织干湿重比为 (4.82 \pm 0.26),高于对照组 (2.29 \pm 0.51) 和右美托咪定组 (3.11 \pm 0.53), $P<0.05$ 。在造模 1 周以后,右美托咪定组平均呼吸频率为 (72.75 \pm 6.74) 次/min,低于模型组 ($P<0.05$),血清 VEGF 和 bFGF 水平分别为 (0.368 \pm 0.079) ng/L 和 (24.85 \pm 2.36) ng/L,高于模型组 ($P<0.05$)。右美托咪定组 IL-6 和 iNOS 显著低于模型组,NLRP3 和 Cav-1 则显著高于模型组 ($P<0.05$)。结论 右美托咪定可以抑制 NLRP3 炎性体激活减轻高氧诱导的急性肺损伤。

关键词:右美托咪定;NLRP3 炎性体;高氧性;肺损伤

中图分类号: R563 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0048-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.009

高浓度的氧对严重的呼吸衰竭有良好的治疗作用,一般在重症监护室应用较多^[1]。但是长时间地吸入高浓度的氧气却会造成肺损伤^[2]。高氧造成的肺损伤的原因主要是线粒体产生的活性氧,活性氧可活化炎症细胞,以及释放炎症介质,引起肺组织结构的重建与上皮细胞死亡,是急性肺损伤的原因^[3]。右美托咪定是一种高选择性的肾上腺素受体激动剂^[1-2],近年来在临床上的使用已经越来越广泛。右美托咪定对血流动力学影响轻微^[3],已被广泛应用于外科手术。右美托咪定可以通过抑制凋亡和抗炎作用从而保护机体的大脑,肝脏,肠胃,心脏以及肺部组织^[4]。炎症小体是调节先天性免疫的多蛋白复合物^[4],中枢神经系统中存在大量与脑损伤有关的炎症小体^[5]。目前国内外在众多的炎症小体的研究中,NLRP3 是研究的热点^[6]。炎症小体和肺损伤机制关联研究则相对较少。本研究探究右美托咪定对炎症小体 NLRP3 抑制作用以及肺损伤的恢复机制,为右美托咪定预防及治疗肺损伤方面提供数据支持。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取成年雄性 SD 大鼠 30 只,体质量为 (285.67 \pm 8.3)g,购自中科院上海实验动物中心(实验动物合格证:SCXK 沪 2002-0010);盐酸右美托咪定购自江苏恩华药业(批号:20131768);兔源抗 β -actin 单克隆抗体来自碧云天公司;兔抗鼠 Cav-1 和 NLRP3 抗体均来自美国 CST 公司;基因的相关引物设计来自天津赛默飞公司。

1.2 方法

1.2.1 实验动物分组及造模:将大鼠编号,随机分为空白对照、模型组及右美托咪定组,各组 10 只。各组大鼠新环境适应期 3 d,空白对照组呼吸正常室内空气,模型高氧组大鼠放置于密闭氧气环境内,舱内连接有输氧管和测氧仪,实验组高氧浓度为 100%,高氧呼吸时间为 1 周,期间不断检测测氧气浓度。右美托咪定组大鼠在高氧舱内期间,尾静脉单次注射右美托咪定溶液,剂量为 0.6 μ g/kg 体质量,

注射时间 30 s。各组大鼠摄食饮水正常,饲养温度 23~25 ℃。

1.2.2 生化指标检测

1.2.2.1 大鼠呼吸频率检测:应用成都仪器厂生产的 DHX-150 动物呼吸机来监测大鼠呼吸频率,将各组 SD 大鼠麻醉以后,套上呼吸机,潮气量:4 mL/100 g,呼吸比:1:1 参数下检测大鼠呼吸次数,记录对比。

1.2.2.2 大鼠血清中 IL-6、iNOS 等含量检测:完成呼吸频率监测后 1 h 取大鼠尾静脉外周血 5 mL。应用酶联免疫 ELISA 法监测血清中的可溶性 IL-6、iNOS 等含量,将抗凝剂加入到提前准备好的洁净试

管中以后,于 1 000 r/min 离心,20 min,4℃ 条件下收取血清,在超低温下冷冻保存。解冻以后使用试剂盒测定其浓度。绘制标准曲线,测定值代入标准曲线,计算各组的血清中 IL-6、iNOS 浓度。

1.2.2.3 大鼠肺组织干湿重比例测定:SD 大鼠在高氧仓饲养 1 周后,麻醉处死大鼠,取其肺部组织,精准称量右肺组织湿重,称量之后立即放入到 100 ℃ 的烘箱中,鼓风干燥 48 h 后称量质量,所称得为组织干重。肺组织含水量=(湿重-干重)/湿重×100%。

1.2.2.4 大鼠基因引物设计:IL-2, TNF α 以及 β -actin 引物设计见表 1。

表 1 RT-PCR 过程中引物序列 ($n=16$)

Table 1 Primer sequences in RT-PCR ($n=16$)

基因名称	上游	下游	长度(bp)
IL-2	CGCTAGCTCGATGCTGCATCA	CGATGCTACGCTTAGCGTATG	136
TNF α	CATGAGCGCTGAAGTGCTGA	CGATCGATAATGGTGAGACC	149
β -actin	CGATAGTTGGCACGCTCCTGG	GTACTCGAGTGCCGATGACA	121

1.2.2.5 RT-PCR 法测定 SD 大鼠血清中 VEGF 和 bFGF 表达量:使用软件设计小鼠 β -actin, TNF- α 和 IL-2 上下游引物序列,选取长度小于 150 bp 的片段。RNA 的提取:将各组 60 mg 的肺部组织置入离心管以后,加入 Trizol 试剂,研磨后离心取上清,后加入氯仿继续离心取上清,加入异丙醇,吸取上清取沉淀,后用 DEPC 水溶解,于 PCR 扩增仪中扩增。

上样:将 50 \times 的 TAE 稀释为 1 \times TAE 溶液作为溶剂,称取 0.52 g 琼脂糖,加入到 1 \times TAE 溶液当中,之后微波炉加热煮沸,后加入 4 μ L 的核酸染料,摇晃混匀。最后将琼脂糖凝胶水平放入电泳槽,依次加入 6 μ L 的 DNA Marker 以及目的基因 PCR 扩增产物。

1.2.2.6 Western Blot 法测定大鼠 IL-2、TNF α 、NLRP3 和 Cav-1 蛋白含量:取各组大鼠左肺组织 60 mg,剪碎后置到离心管中,加 RIPA 裂解液和 PMSF 研磨 1 min,后离心 15 min 取上清。用考马斯法检测各管吸光值,将各组蛋白调至同样浓度后进行蛋白上样。把 NC 膜放入到平皿后在容器中添加脱脂奶粉并在摇床上暗处封闭 0.5~1.5 h。弃去奶粉后取出 NC 膜置于 TBST 中冲洗 3 次以后加入兔抗鼠 Cav-1, β -actin 和 NLRP3 抗体,4 ℃ 下孵育过夜。第 2 天取出 NC 膜,于 TBST 溶液中洗涤 4 次后加入 2 抗孵育,发光液 a 液和 b 液按 1:1 的比例现用现配,由左至右缓慢滴加到膜上,转移到暗室进行胶片冲洗。

1.3 统计方法

应用 SPSS 20.0 软件统计分析,计量数据用均数 \pm 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,方差齐性检验后,组间比较应用 LSD 检验,用 Pearson Correlation 进行相关性检验,检验水准 $\alpha=0.05$;计数资料比较应用 χ^2 检验; $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠肺组织干湿重比和呼吸频率

造模前,各组大鼠呼吸频率比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$);造模后,与对照组比较,模型组和右美托咪定组大鼠呼吸频率显著降低;与模型组比较,右美托咪定组大鼠呼吸频率显著降低,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。与对照组比较,模型组肺组织干湿重比例显著升高;与模型组比较,右美托咪定组肺组织干湿重比例显著降低,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见表 2。

2.2 血清 VEGF 和 bFGF 含量结果比较

在造模 1 周后,与对照组比较,模型组和右美托咪定组血清中 VEGF 和 bFGF 水平显著降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与模型组比较,右美托咪定组血清中 VEGF 和 bFGF 水平显著升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 3。

表 2 各组大鼠肺组织干湿重和呼吸频率结果 ($\bar{x}\pm s, n=10$)

Table 2 Results of dry and wet weight and respiratory rate of lung tissue in each group ($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	例数	造模前呼吸频率/(次/min)	造模后呼吸频率/(次/min)	肺组织干湿重比例/(W/D)
对照组	10	85.34±3.56	86.50±4.50	2.29±0.51
模型组	10	83.00±2.57	54.50±5.76*	4.82±0.26*
右美托咪定组	10	87.53±5.00	72.75±6.74*#	3.11±0.53#

注:与对照组相比较, * $P<0.05$;与模型组相比较, # $P<0.05$

Note: compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the model group, # $P<0.05$

表 3 各组大鼠血清中 VEGF 和 bFGF 含量比较 ($n=16$)

Table 3 Comparison of serum VEGF and bFGF levels in each group of rats ($n=16$)

组别	VEGF/(ng/L)	bFGF/(ng/L)
对照组	0.491±0.011	27.17±1.19
模型组	0.126±0.014*	12.28±1.26*
右美托咪定组	0.368±0.079*#	24.85±2.36*#

注:与对照组相比较, * $P<0.05$;与模型组相比较, # $P<0.05$

Note: compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the model group, # $P<0.05$

2.3 血清 IL-6 和 iNOS 蛋白含量比较

在造模 1 周以后,与对照组比较,模型组和右美托咪定组 IL-6 和 iNOS 水平均显著升高,差异有统计学意义 ($P<0.05$);与模型组比较,右美托咪定组 IL-6 和 iNOS 水平均显著降低,差异有统计学意义 ($P<0.05$),见表 4。

表 4 各组大鼠血清中 IL-6 和 iNOS 含量比较 ($n=16$)

Table 4 Comparison of serum IL-6 and iNOS ($n=16$)

组别	IL-6/ $\mu\text{g}/\text{mL}$	iNOS/ $\mu\text{g}/\text{mL}$
对照组	2.01±0.32	2.25±0.94
模型组	4.46±0.53*	6.03±0.98*
右美托咪定组	2.89±0.73*#	3.68±1.27*#

注:与对照组相比较, * $P<0.05$;与模型组相比较, # $P<0.05$

Note: compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the model group, # $P<0.05$

2.4 IL-2 和 TNF α 表达情况

RT-PCR 结果显示,与对照组比较,模型组 IL-2 和 TNF α 的表达量显著升高 ($P<0.05$)。右美托咪定组的 IL-2 和 TNF α 表达量与模型组相比降低,与对照组相比略有升高,但差异无统计学意义 ($P>0.05$),见表 5,图 1。

表 5 各组大鼠 IL-2 和 TNF α 表达量比较 ($n=16$)

Table 5 Comparison of IL-2 and TNF α expression ($n=16$)

组别	IL-2(灰度值)	TNF α (灰度值)
对照组	2.25±0.49	4.13±0.25
模型组	6.26±0.75*	7.36±0.97#
右美托咪定组	3.99±0.75	5.47±0.37

注:与对照组相比较, * $P<0.05$;与模型组相比较, # $P<0.05$

Note: compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the model group, # $P<0.05$



图 1 RT-PCR 检测 IL-2 和 TNF α 表达情况

Fig.1 RT-PCR detection of IL-2 and TNF α expression

2.5 NLPR3 和 Cav-1 蛋白表达情况

蛋白质免疫印记检测结果显示,与对照组比较,模型组和右美托咪定组的 NLPR3 和 Cav-1 蛋白表达量显著升高,差异均有统计学意义 ($P<0.05$)。与模型组比较,右美托咪定组 NLPR3 和 Cav-1 蛋白表达量显著降低,差异均有统计学意义 ($P<0.05$),见表 6,图 2。

表 6 各组大鼠 NLPR3 和 Cav-1 蛋白表达量比较 ($n=16$)

Table 6 Comparison of NLPR3 and Cav-1 protein expression ($n=16$)

组别	NLPR3(灰度值)	Cav-1(灰度值)
对照组	0.23±0.02	0.43±0.08
模型组	0.98±0.11*	0.99±0.12*
右美托咪定组	0.72±0.19*#	0.65±0.09*#

注:与对照组相比较, * $P<0.05$;与模型组相比较, # $P<0.05$

Note: compared with the control group, * $P<0.05$; compared with the model group, # $P<0.05$

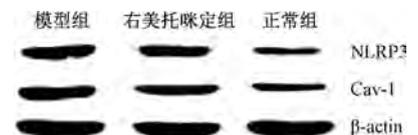


图 2 Western Blot 检测 NLPR3 和 Cav-1 蛋白表达情况

Fig.2 Western Blot detection of NLPR3 and Cav-1 protein expression

3 讨论

急性肺损伤指的是直接或者间接因素引起的肺泡及毛细血管细胞的损伤^[7-8],导致肺部间质水肿以及急性呼吸功能不全,呼吸窘迫。由高氧引起的

急性肺损伤案例目前已有报道^[9],一方面氧气量的保障对不能自主呼吸的病人十分重要,另一方面长时间的吸入高纯度的氧又会造成肺损伤,所以寻求合适的方式治疗或预防由高氧引起的急性肺损伤十分重要。

VEGF 和 bFGF 在血管生成作用中占有重要的位置,可改善组织的缺氧状态,研究表明血清中 VEGF 和 bFGF 的含量与肺损伤严重程度相关^[10-11]。本研究显示,大鼠在高氧仓饲养 1 周造模以后,模型组和右美托咪定组血清中 VEGF 和 bFGF 含量整体变低。右美托咪定组 SD 大鼠 VEGF 和 bFGF 含量与正常相比略有变化,与模型组相比恢复明显。此外,SD 大鼠在实验期间肺组织的干湿重比例结果显示,模型组的肺组织干湿重比明显高于空白对照组和右美托咪定组,呼吸也变缓慢甚至衰竭,当给药以后各项指标均大幅恢复接近空白对照组,此结果初步探讨了右美托咪定对肺损伤的恢复作用。综合以往研究结果显示^[3,6],右美托咪定对大鼠呼吸频率及其它指标恢复更显著,但其作用机制尚不明确。

白介素的表达量会直接引起炎症反应^[12-13]。本实验结果显示,在构建高氧模型以后,血清中的 IL-6 和 IL-2 表达量升高,高于空白对照组,经过右美托咪定干预后,IL-2 和 IL-6 表达量降低,接近正常水平,结果显示,右美托咪定可以降低肺损伤,减少白介素的过度表达。TNF- α 是肿瘤坏死因子,肿瘤坏死因子是炎症反应过程中直接相关的炎症因子^[14]。报道显示,TNF- α 的表达量升高直接反应机体炎症程度。本实验结果显示,在构建高氧模型以后,模型组的 TNF- α 的表达量明显高于空白对照组,但是经过右美托咪定干预后,TNF- α 表达量降低,肺损伤程度也对应降低,提示右美托咪定对急性肺损伤的治疗可能与炎症因子调控相关。

NLRP3 是细胞凋亡的重要蛋白^[15-16],本研究发现,建模以后,NLRP3 的蛋白表达量明显升高,注射右美托咪定之后,NLRP3 蛋白表达量降低,此结果验证右美托咪定阻遏高氧引起的急性肺部损伤有 NLRP3 的参与。Cav-1 是重要的结构与调节蛋白,会参与到各组通路信号的转导当中,调节细胞的跨膜和转运,研究表明,Cav-1 所在通路的激活会调控炎症因子的表达,使肺损伤加重^[17]。本实验结果显示,模型组 Cav-1 的蛋白表达量与空白对照组相比呈升高趋势,进一步提示右美托咪定可以通过降低 Cav-1 蛋白表达量来缓解急性肺损伤。本研究显

示,右美托咪定可降低由高氧引起的肺损伤导致的呼吸频率降低,肺组织干湿重比例变大。此外,右美托咪定还可以降低血清中的白介素 IL-6, iNOS, VEGF 和 bFGF 的表达,同时下调 IL-2 和 TNF- α 等促炎因子的表达水平。蛋白表达检测结果显示,右美托咪定可降低 NLRP3 和 Cav-1 蛋白的表达量,因此我们认为右美托咪定治疗急性肺损伤可以通过下调 NLRP3 炎症小体,激活 Cav-1 所在通路,进而实现肺高氧损伤保护。既往相关机制研究主要集中于 TLR 通路调控,本研究为右美托咪定肺部保护机制提供了新的方向。

综上,右美托咪定可通过抑制 NLRP3 的异常表达,减少下游关键蛋白 Cav-1 等的表达,抑制重要的炎症相关因子 IL-2, IL-6, TNF- α 等炎症因子的表达,缓解急性肺损伤。

参考文献

- [1] Girgin N K. Dexmedetomidine sedation for the treatment of tetanus in the intensive care unit[J]. *Br J Anaesth*, 2017, **99** (4): 599-600.
- [2] Wang X W. Effect of perioperative dexmedetomidine on the endocrine modulators of stress response: a meta-analysis[J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, **42**(8): 828-836.
- [3] Miya K. Efficacy of concomitant use of dexmedetomidine and propofol in tetanus[J]. *Am J Emerg Med*, 2015, **33**(12): 1848.e3-4.
- [4] Shang J, Yamashita T, Zhai Y, *et al.* Acceleration of NLRP3 inflammasome by chronic cerebral hypoperfusion in Alzheimer's disease model mouse[J]. *Neuroscience Research*, 2018, pii: S0168-0102(18)30202-5.
- [5] Chen A, Xu Y, Yuan J. Ginkgolide B ameliorates NLRP3 inflammasome activation after hypoxic-ischemic brain injury in the neonatal male rat [J]. *Intern J Neurosci*, 2018, **69** (2): 106-111.
- [6] Xu X, Yin D, Ren H, *et al.* Selective NLRP3 inflammasome inhibitor reduces neuroinflammation and improves long-term neurological outcomes in a murine model of traumatic brain injury [J]. *Neurobiol Dis*, 2018, **117**(15): 15-27.
- [7] Badshah H, Ali T, Kim M O. Osmotin attenuates LPS induced neuro inflammation and memory impairments via the TLR4/NFkappaB signaling pathway [J]. *Sci Rep*, 2016, **6** (13): 24493.
- [8] Mukherjee R, Wen L, Zhang X, *et al.* A novel digital method to assess air space loss associated with acute lung injury in experimental acute pancreatitis [J]. *Pancreatol*, 2018, **18** (5): 513-515.
- [9] Huang Z, Liu H, Zhang X, *et al.* Transcriptomic analysis of lung

- tissues after hUC-MSCs and FTY720 treatment of lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mouse models [J]. *Intern Immunopharm*, 2018, **63**: 26-34.
- [10] Szubert S, Moszynski R, Michalak S, *et al.* The associations between serum VEGF, bFGF and endoglin levels with microvessel density and expression of proangiogenic factors in malignant and benign ovarian tumors [J]. *Microvascular Res*, 2016, **107**(1): 91-96.
- [11] Wang X H, Long Z W. Correlations of EGF G1380A, bFGF C754G and VEGF T460C polymorphisms with malignant melanoma susceptibility and prognosis: A case-control study [J]. *Gene*, 2017, **617**(1): 44-53.
- [12] Bariş S, Akyürek O, Dursun A, *et al.* The impact of the IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-6 and IL-10 gene polymorphisms on the development of Behcet's disease and their association with the phenotype [J]. *Medicina Clínica*, 2016, **146**(9): 379-383.
- [13] Fan M F, Low J S, Tanimine N, *et al.* Differential Roles of IL-2 Signaling in Developing versus Mature Tregs [J]. *Cell Rep*, 2018, **25**(5): 1204-1213.
- [14] Fang T, Di Y, Li G, *et al.* Effects of telmisartan on TNF- α induced PPAR- γ phosphorylation and insulin resistance in adipocytes [J]. *Biochem Biophys Res Communications*, 2018, **503**(4): 3044-3049.
- [15] He Q, Li Z, Wang Y, *et al.* Resveratrol alleviates cerebral ischemia reperfusion injury in rats by inhibiting NLRP3 inflammasome activation through Sirt1-dependent autophagy induction [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, **50**: 208-215.
- [16] Yu C, He Q, Zheng J, *et al.* Sulforaphane improves outcomes and slows cerebral ischemic/reperfusion injury via inhibition of NLRP3 inflammasome activation in rats [J]. *Int Immunopharmacol*, 2017, **45**: 74-78.
- [17] Wang D X, Pan Y Q, Liu B, *et al.* Cav-1 promotes atherosclerosis by activating JNK-associated signaling [J]. *Biochem Biophys Res Communications*, 2018, **503**(2): 513-520.

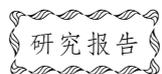
Dexmedetomidine Reduces Hyperoxic Induction by Inhibiting NLRP3 Inflammatory Activation

LI Gang, YU Hongbiao, REN Sihong

(Department of Anesthesiology, Nanchong Central Hospital, Nanchong 637000, China)

Abstract: Objective To investigate the effect and mechanism of dexmedetomidine on hyperoxia-induced acute lung injury. **Method** Thirty male SD rats were randomly divided into blank control group, model group and dexmedetomidine group, and the hyperoxic lung injury model was constructed. The dexmedetomidine group was injected with dexmedetomidine daily while the control group and model group were injected with saline. The dry-wet weight proportion of lung tissue was measured. The expression levels of IL-6, iNOS, VEGF and bFGF in serum of rats were detected by ELISA. The expression levels of IL-2 and TNF were detected using semi-quantitative PCR. The Western blot was used to determine the protein expression of NLRP3 and Cav-1. **Result** The dry-wet weight proportion of lung tissue in the model group was (4.82 \pm 0.26), which was higher than that of the blank control group (2.29 \pm 0.51) and dexmedetomidine group (3.11 \pm 0.53), $P < 0.05$. After 1 week of modeling, the mean respiratory rate of the dexmedetomidine group was (72.75 \pm 6.74)/min, which was lower than that of model group ($P < 0.05$), and serum VEGF and bFGF levels were (0.368 \pm 0.079) ng/L and (24.85 \pm 2.36) ng/L, higher than those in model group ($P < 0.05$). The levels of IL-6 and iNOS in the dexmedetomidine group were significantly lower than those in the model group, and NLRP3 and Cav-1 were significantly higher than those in the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** Dexmedetomidine can inhibit NLRP3 inflammatory activation and alleviate acute lung injury induced by high oxygen.

Key words: Dexmedetomidine; NLRP3 inflammatory body; hyperoxia; lung injury



卵细胞体外成熟(IVM)在小鼠生物净化中的应用*

杜江涛¹ 武晓静² 戴方伟¹ 卢领群¹ 周莎桑¹ 应华忠¹ 郭红刚¹

(1.浙江省医学科学院浙江省实验动物中心,杭州 310013)(2.杭州市中医院,杭州 310007)

摘要:目的 在小鼠生物净化中,从超排后未排卵的卵巢,取卵泡内未成熟卵采用卵母细胞体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)使之在体外成熟并具备受精能力,以提高卵子利用率和作为常规促超排失败的一种补救措施。**方法** 在小鼠生物净化中,取注射PMSG和HCG后未排卵卵巢,在实体显微镜下划破卵泡挑选卵丘卵母细胞复合物(COCs),置于成熟液滴中在体外发育成熟。同时以注射PMSG和HCG后正常超排卵、只注射PMSG后取未成熟卵体外成熟和注射PMSG和HCG后取疑似成熟卵和裸卵体外成熟作为对照。经体外受精、体外胚胎发育后,将2-细胞胚移植到受体输卵管,使其在受体内发育成为成熟的个体。**结果** 注射PMSG和HCG后未排卵组(A组),卵细胞体外成熟率为87.0%±3.2%,二胞率为55.1%±12.3%,囊胚率为23.1%,移植41枚二细胞胚至2只受体鼠,出生5只幼崽,产仔率12.2%。只注射PMSG,48h后取未成熟卵组(B组),体外成熟率为83.9%±3.9%,二胞率为51.8%±9.3%,囊胚率为38.5%±13.9%。注射PMSG和HCG正常超排组(C组),其二胞率为78.9%±0.6%,囊胚率为78.0%±3.8%。注射PMSG和HCG未排卵卵巢,取裸卵和疑似成熟卵(D组),体外成熟培养0h,6h和16~18h,其成熟率、二胞率和囊胚率与其它三组相比均较低且有极显著性差异。A组和B组与正常对照C组相比,二胞率均有显著性差异,囊胚率均有极显著性差异。**结论** 卵母细胞体外成熟(IVM)可以作为小鼠生物净化中促超排失败的一种补救措施,并且可以提高珍稀品系小鼠的卵子利用率。

关键词:小鼠;卵母细胞;体外成熟(IVM);生物净化

中图分类号: Q813 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0053-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.010

随着生命科学和医学研究的不断深入,越来越多的转基因小鼠应用到科学研究中。而在转基因小鼠制备、饲养、运输及品系共享等过程中,极易造成病原微生物的感染,生物净化是目前去除病原微生物感染的有效途径^[1]。

生物净化主要有剖宫取胎和体外受精-胚胎移植两种方法。剖宫取胎操作相对简单,但存在净化不彻底和难以计算最佳剖宫时间等弊端;而体外受精-胚胎移植则需要掌握扎实的胚胎移植技术^[2]。

体外受精-胚胎移植法在实际应用中需要大量的成熟卵子,但在超排过程中,由于小鼠年龄、品系、激素用量等许多因素的影响,常常会出现超排失败或只有少量成熟卵子排出的现象,造成净化失败。这对于转基因小鼠,特别是一些珍稀转基因品系来说,是一种巨大的资源浪费。本文旨在利用卵母细

胞体外成熟技术(*in vitro* maturation, IVM),深度挖掘未排卵小鼠卵巢内未成熟卵的发育潜力,以提高珍稀转基因小鼠的卵子利用率,同时也作为常规促排卵失败的一种补救措施。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

实体显微镜(LEICA, S8AP0);二氧化碳培养箱(Thermo);超净工作台(苏州佳宝净化工程设备有限公司)。

α-MEM基础培养液(M4526, Sigma);胎牛血清(22011-8612,浙江天杭生物科技股份有限公司);丙酮酸钠(P4562, Sigma);M2培养液(M1250,南京爱贝生物科技股份有限公司);获能液/体外受精液(MR-070-D, Millipore);胚胎发育液(MR-121, Millipore);PMSG

收稿日期:2018-10-25

* 基金项目:浙江省医药卫生科技计划项目(No.2015KYB093; No.2017KY037);浙江省公益技术应用研究(实验动物)项目(No.2016C37134)

作者简介:杜江涛(1986—),男,实习研究员,硕士,研究方向:实验动物学.E-mail: djtao1986@126.com

通信作者:郭红刚(1976—),男,助理研究员,研究方向:实验动物学.E-mail: sxguohonggang@163.com

(160926)和 HCG(160820)均购自宁波第二激素厂。

1.2 实验动物

待净化转基因小鼠,雌鼠 4~6 周龄,雄鼠 8 周龄,来源于科研用小鼠。

清洁级 ICR 小鼠,雌鼠 4~6 周龄,雄鼠 6~8 周龄。来源于上海斯莱克实验动物公司,使用许可证号:SCXK(沪)2017-0005。

以上动物均饲养于浙江省医学科学院实验动物中心屏障系统隔离包内,动物饲养合格证号:SYXK(浙)2014-0008。自由采食饮水,光照 12 h/d(7:00-19:00)。

1.3 结扎小鼠的制备

6~8 周龄 ICR 雄鼠,1%戊巴比妥钠麻醉后切开后腹部皮肤和肌肉,暴露两侧输精管,无菌弯镊在酒精灯火焰上烧烫后迅速将输精管夹断。将断开的输精管小心放置原位,撒上少许青霉素粉后缝合肌肉皮肤,1 个月后使用。

1.4 小鼠超排

实验分组:A 组:注射 PMSG 和 HCG 后未排卵卵巢,取卵泡内未成熟卵体外培养;B 组:只注射 PMSG,48 h 后取卵泡内未成熟卵体外培养;C 组:注射 PMSG 和 HCG 后,输卵管内取成熟卵(正常超排组)直接进行体外受精;D 组:注射 PMSG 和 HCG 后未排卵卵巢,取卵泡内裸卵和疑似成熟卵体外培养。下文均简称 A 组、B 组、C 组和 D 组。

下午 5 点,小鼠 4 周龄 5 IU/只,5~6 周龄 7.5 IU/只,腹腔注射 PMSG,48 h 后注射相同剂量 HCG,16~18 h 后收集成熟卵母细胞、未成熟卵母细胞、裸卵和疑似成熟卵。只注射 PMSG 组则在注射 PMSG 46~48 h 后取未成熟卵,体外成熟培养 16~18 h 后进行体外受精与体外胚胎培养(具体方法详见 1.6)。

1.5 培养基准备

体外成熟培养液按参考文献配制,主要成分为: α -MEM 基础培养液,5%胎牛血清(FBS),3ng/mL EGF,50mIU/mL rhFSH,0.25 mmol/L 丙酮酸钠,青霉素与链霉素各 0.5%^[3],0.2 μ m 滤膜过滤后分装冷冻备用。

采卵前一天,用直径 35 mm 培养皿分别做 IVM 液、获能液/受精液、KSOM 培养液等液滴,上覆石蜡油,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内过夜孵育。

1.6 精子获能、体外受精与未成熟卵 IVM

1.6.1 精子获能:采卵前 1 h,颈椎脱臼处死雄鼠,在 1:200 稀释万洁消毒液中浸泡消毒,置于干净卫

生纸上吸干液体。无菌手术器械取其两侧附睾尾,剔除多余脂肪组织,在无菌滤纸上回来回滚动数次除去血渍,放入提前过夜孵育的获能皿的石蜡油中。用无菌镊夹住附睾尾使其绷紧,并用 1 mL 无菌注射器针头刺破附睾尾,将溢出的精液移到获能液滴中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中获能 1 h。

1.6.2 体外受精:净化用转基因雌鼠,HCG 注射 16~18 h 后,颈椎脱臼处死,1:200 稀释万洁消毒液中浸泡消毒,取其两侧卵巢和输卵管,将其置于提前预热至 37 $^{\circ}$ C 的 M2 培养液中。M2 培养液中再次清洗后,放在无菌滤纸上吸干液体,然后转到提前过夜孵育的受精液滴皿的石蜡油中。靠近受精液滴,找到输卵管膨大部,用 1 mL 无菌注射器划破膨大部,将卵子移到受精液滴中。未见膨大部的卵巢则置于 M2 培养液中,37 $^{\circ}$ C 保温备用。

取在培养箱中获能 1 h 的获能液滴皿,显微镜下检查精子活力和精子数量。用移液器吸取获能液滴周边精子 10 μ L(约含精子 200 个/ μ L),加入到已移入卵子的受精液滴中(50~100 个)。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中受精 4 h,然后将所有卵子转至胚胎发育液 KSOM 中。

1.6.3 未成熟卵 IVM:取 M2 中保存的未超排卵巢,实体显微镜下用镊子将卵巢周边的脂肪及输卵管剥离干净,M2 中清洗 2~3 次后,转入事先 37 $^{\circ}$ C 预热的 α -MEM 中。用 1 mL 注射器针头划破卵泡,释放卵丘卵母细胞复合体(COCs)。无菌玻璃管在酒精灯火焰上烤热熔化后迅速拉至直径比 COCs 稍粗的玻璃针(提前准备),用口吸管吸取至少有 3 层颗粒细胞包裹的 COCs,转至另一皿干净的 α -MEM 中。捡卵结束后将所有的 COCs 转至事先在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱过夜孵育的 IVM 液滴中,清洗 2~3 次后转至 200 μ L 大液滴,37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱内培养 16~18 h,然后进行体外受精。精子获能、体外受精方法同上。体外受精 4 h 后转至胚胎发育液 KSOM 中。

取注射 PMSG 和 HCG 后未排卵卵巢卵泡内的裸卵和疑似成熟卵(卵丘颗粒细胞已扩散),分为三组进行实验:直接受精;体外成熟培养 6 h 后受精和体外成熟培养 16~18 h 后受精。受精 4 h 后转至胚胎发育液 KSOM 中。

1.7 受体小鼠的挑选、合笼与胚胎移植

体外受精当天下午 5 点左右,挑取阴门红肿发情的 ICR 雌鼠,与结扎雄鼠 1:1 合笼交配。于次日早上挑取有阴栓的小鼠(即受体小鼠),无菌环境下

从隔离包转至超净工作台。

受体小鼠 1% 戊巴比妥钠麻醉,背部剃毛,75% 酒精,碘酊再 75% 酒精消毒。在卵巢位置剪一纵向小口,依次剪开皮肤、肌肉、腹膜后,用镊子找到脂肪垫,将其和卵巢、输卵管一起拉出。用脂肪夹夹住脂肪垫,固定好卵巢和输卵管,在显微镜下找到输卵管膨大部并将其调整至最高位。玻璃针最前端吸取 3 个气泡,然后吸取 20~30 个 2-细胞胚,在输卵管膨大部前端进针,将 2-细胞胚吹至膨大部。当三个气泡均吹至膨大部时,说明全部 2-细胞胚已经移植到输卵管膨大部内。

2 结果

2.1 A 组和 B 组与 C 组卵细胞体外成熟率、二胞率、囊胚率及出生率

注射 PMSG 和 HCG 后,未排卵卵巢(A 组),取卵泡内未成熟卵体外培养,3 次重复实验,其成熟率为:88.6% (62/70), 83.3% (45/54), 89.2% (66/74)。二胞率为:67.1% (47/70), 42.6% (23/54), 55.4% (41/74)。13 枚二细胞胚胎体外发育,有 3

枚发育至囊胚,囊胚发育率为 23.1% (3/13)。将 41 枚二细胞胚胎移植到 2 只受体鼠体内,其中 1 只生出 5 只幼崽,产仔率为 12.2% (5/41)。

只注射 PMSG,48 h 后取卵泡内未成熟卵(B 组),4 次体外成熟培养,其成熟率为:79.3% (65/82), 88.1% (140/159), 82.4% (131/159), 86.0% (92/107)。二胞率为:59.8% (49/82), 44.0% (70/159), 43.4% (69/159), 59.8% (64/107)。囊胚率为:36.7% (18/49), 58.6% (41/70), 30.4% (21/69), 28.1% (18/64)。

注射 PMSG 和 HCG 后,输卵管内取成熟卵(C 组),直接进行体外受精,受精后二胞率为:79.5% (167/210), 79.0% (233/295), 78.3% (195/249)。囊胚率为:73.7% (123/167), 79.8% (186/233), 80.5% (157/195)。见表 1。

A 组与 B 组相比,其成熟率和二胞率均无显著性差异($P>0.05$)。A 组二胞率与 C 组相比,有显著性差异($P<0.05$)。B 组二胞率与 C 组相比,有极显著性差异($P<0.01$)。A 组和 B 组与 C 组相比,囊胚率均有极显著性差异($P<0.01$)。

表 1 A 组、B 组和 C 组卵细胞体外发育结果

Table 1 Oocytes *in vitro* development results of group A, B and C.

组别	处理方法	实验次数	成熟率/%	二胞率/%	囊胚率/%	移植二胞数	产仔率/%
A	注射 PMSG 和 HCG 后,取卵泡内未成熟卵	3	87.0±3.2	55.1±12.3	23.1	41	12.2
B	只注射 PMSG,48 h 后取未成熟卵	4	83.9±3.9	51.8± 9.3	38.5±13.9	/	/
C	注射 PMSG 和 HCG 后,取输卵管内成熟卵	3	/	78.9± 0.6	78.0± 3.8	/	/

2.2 D 组不同成熟培养时间卵细胞体外成熟率、二胞率及囊胚率

注射 PMSG 和 HCG 后未排卵的卵巢,取卵泡内裸卵和疑似成熟卵(D 组),体外成熟培养时间分为三组:成熟培养 0 h(即直接进行体外受精);成熟培养 6 h 和成熟培养 16~18 h。受精后成熟培养 0 h 两次重复实验二胞率为 10.2%、15.6%,囊胚率为 0.0%、22.7%;成熟培养 6 h 二胞率为 5.7%,囊胚率为 0.0%;成熟培养 16~18 h 两次重复实验二胞率为 1.3%、18.6%,囊胚率为 0.0%、3.3%。(详见表 2)。

表 2 D 组卵细胞体外发育结果

Table 2 Oocytes *in vitro* development results of group D

总卵数	成熟培养时间/h	受精后二胞率/%	体外发育囊胚率/%
141	0	15.6(22/141)	22.7(5/22)
49	0	10.2(5/49)	0(0/5)
53	6	5.7(3/53)	0(0/3)
161	16~18	18.6(30/161)	3.3(1/30)
79	16~18	1.3(1/79)	0(0/1)

D 组中体外成熟培养 0 h、6h 和 16~18 h,其二胞率和囊胚率与组 A、B、C 相比均有极显著性差异。

3 讨论

3.1 超数排卵

通过超数排卵获得大量整齐优质的卵子是生物净化、转基因、克隆等研究的基础之一。影响超排的因素有很多,如:供体雌鼠的品系、年龄与体质量、激素的注射剂量和注射时间、环境因素(温度、湿度和噪声)等^[4]。

我们在试验中,对不同品系小鼠一律采用:3~4 周腹腔注射 5 IU PMSG 和 HCG;5~6 周注射 7.5 IU PMSG 和 HCG;而对 7 周及以上则注射 10 IU PMSG 和 HCG,两种激素注射间隔时间均为 48 h。结果表明,C57BL/6 J 小鼠超排效果最好且稳定。宋绍征等^[5]研究发现在相同剂量激素条件下,ICR 小鼠和 C57BL/6 J 小鼠的超排效果显著优于 BALB/c 小鼠

和 FVB 小鼠,我们试验结果与其相一致,原因可能是近交系的遗传因素导致 BALB/c、FVB、129 等小鼠的繁殖能力较差。

3~4 周小鼠相较于其它周龄小鼠,可获得最好的超排效果,这与徐平^[6]的研究结果相一致,这可能是性成熟后的小鼠固有的性周期和性激素对外源性的超排激素(PMSG 和 HCG)有影响。

关于小鼠超排最合适的激素用量,目前国外多采用 eCG/PMSG 和 HCG 各 5IU 或各 7.5IU 剂量^[3, 7-9],国内有的采用 PMSG 和 HCG 各 5IU 或各 10IU 剂量。而我们在试验过程中,则根据小鼠年龄体质量的不同做了适当调整。

年龄较大雌鼠和一些近交系小鼠(BALB/c、FVB、129 等)的超排效果一直较差,甚至无排卵,正是这些问题的存在,迫使我们寻找一种新的方法来提高卵子利用率,卵母细胞体外成熟则为解决这一问题提供了新的途径。

3.2 卵母细胞体外成熟

卵母细胞体外成熟(*in vitro* maturation, IVM)是一项重要的辅助生殖技术和研究工具。因其可以生产成熟卵子被广泛应用于各研究领域,如:人类不孕症治疗、家畜人工育种中的胚胎生产、克隆、干细胞和转基因技术等^[9]。

小鼠卵母细胞体外成熟一般是在注射 eCG/PMSG 44 或 48 h 后直接从卵泡中取未成熟卵体外培养^[10-12],而我们在生物净化中则是针对注射 PMSG 和 HCG 后未排卵的卵巢。为了比较注射 HCG 对卵巢卵泡内未成熟卵体外发育的影响,我们设置了两组试验:注射 PMSG 和 HCG 后未排卵组(A 组)和只注射 PMSG,48 h 后取未成熟卵组(B 组),同时以注射 PMSG 和 HCG 后正常超排卵组(C 组)作为对照。结果发现:注射 HCG 对卵泡内未成熟卵体外成熟、体外受精、体外胚胎发育等并无影响,A 组与 B 组的成熟率、二胞率均无显著性差异($P>0.05$)。因 A 组体外受精后大部分二细胞胚胎用于移植,只有很少一部分(13 枚)用来做体外胚胎发育,所以 A 组与 B 组的囊胚率并无可比性。A 组的二细胞胚胎做了 3 次移植试验,分别移植 34、23 和 41 枚二细胞胚,但因受体等各种因素的影响,只成功了一次。41 枚二细胞胚移植到两只受体小鼠输卵管内,其中一只成功受孕生出 5 只小鼠(2 雄 3 雌),5 只小鼠性成熟后相互交配可产下正常的后代,说明通过 IVM 技术出生的小鼠是健康可育的^[13]。

但是,注射 HCG 可导致超排后的卵巢质地松软,卵巢表面缺少较好的卵泡,卵泡内部大部分为裸卵或卵丘颗粒细胞已经扩散的卵(疑似成熟卵)。与只注射 PMSG 相比,注射 HCG 后获得的质量较好的卵丘卵母细胞复合物(COCs,至少有三层颗粒细胞包裹)大大减少。但是只要有颗粒细胞包裹的 COCs,在体外成熟培养 16~18 h 后,颗粒细胞均会扩散,经体外受精后大部分可卵裂至二细胞胚胎,其成熟率和受精率均较理想。

A 组、B 组与正常超排卵对照组(C 组)相比,卵细胞成熟率、二胞率和囊胚率均有显著性差异,说明在现有的技术条件下,卵细胞体外成熟仍不能完全模拟其体内发育环境和条件,对卵细胞成熟的机理有待进一步研究。

PMSG 和 HCG 注射后未排卵卵巢,卵泡内有大量裸卵和疑似成熟卵(卵丘颗粒细胞已扩散卵),为了进一步挖掘这部分卵子的利用价值,我们分三组进行试验:体外成熟培养 0 h(直接进行体外受精)、体外成熟培养 6 h 后体外受精和体外成熟培养 16~18 h 后体外受精。直接进行体外受精组,两次重复实验,受精后二胞率分别为 15.6%(22/141)和 10.2%(5/49),囊胚率分别为 22.7%(5/22)和 0%(0/5)。说明在这些裸卵和疑似成熟卵中,有真正的成熟卵,但只是占很少一部分比例。体外成熟培养 6 h 组二胞率为 5.7%(3/53),囊胚率为 0%(0/3);体外成熟培养 16~18 h 组,两次重复实验,二胞率分别为 18.6%(30/161)和 1.3%(1/79),囊胚率分别为 3.3%(1/30)和 0%(0/1)。说明在这些裸卵和疑似成熟卵中,只有很少一部分可以在体外成熟培养后获得受精能力。不管是直接进行体外受精,还是体外成熟培养 6 h、16~18 h 后进行体外受精,裸卵和疑似成熟卵受精后的二胞率、囊胚率都不尽如人意。分析其原因可能是这部分卵子,由于没有卵丘颗粒细胞的包裹,所以在体外成熟培养中不能很好地接受成熟因子的调控^[8]。然而,只注射 PMSG(B 组)的卵泡中,大部分是有颗粒细胞包裹的未成熟卵,裸卵只有很少一部分,并且未见到有疑似成熟卵。由此得出结论:注射 PMSG 和 HCG 后未排卵卵巢卵泡内大量的裸卵和疑似成熟卵是 HCG 作用的结果,至于为什么没有排出原因尚不清楚。

综上所述,卵母细胞体外成熟(IVM)可以作为生物净化中小鼠促排卵失败的一种补救措施,并且可以提高一些珍稀转基因品系小鼠的卵子利用率。

参考文献

- [1] 杜江涛,宋晓明,戴方伟,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.
- [2] 李娜,杨秋龙,李思璧,等. 模型动物生物净化方法的探讨[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2014, **32**(5): 84-88.
- [3] Zhang Y, Shao L, Xu Y, *et al.* Effect of anti-Mullerian hormone in culture medium on quality of mouse oocytes matured in vitro [J]. PLoS One, 2014, **9**(6): e99393.
- [4] 刘丽均,郁丽丽,朱权凤,等. 生物工程技术在实验小鼠生物净化上的应用[J]. 中国比较医学杂志, 2009, **19**(11): 63-66.
- [5] 宋绍征,王怡,王宝珠,等. 激素剂量、小鼠品系及周龄对超数排卵的影响[J]. 实验动物科学, 2011, **28**(4): 5-8.
- [6] 徐平. 不同日龄和品系小鼠超排卵、体外受精及受孕率的比较研究[J]. 中国实验动物学杂志, 2001, **11**(2): 78-81.
- [7] Zeng H T, Richani D, Sutton-McDowall M L, *et al.* Prematuration with cyclic adenosine monophosphate modulators alters cumulus cell and oocyte metabolism and enhances developmental competence of in vitro-matured mouse oocytes [J]. Biol Reprod, 2014, **91**(2): 47.
- [8] Sugiura K, Pendola F L, Eppig J J. Oocyte control of metabolic cooperativity between oocytes and companion granulosa cells: energy metabolism [J]. Dev Biol, 2005, **279**(1): 20-30.
- [9] Richani D, Wang X, Zeng H T, *et al.* Pre-maturation with cAMP modulators in conjunction with EGF-like peptides during in vitro maturation enhances mouse oocyte developmental competence [J]. Mol Reprod Dev, 2014, **81**(5): 422-435.
- [10] Gilchrist R B, De Vos M, Smitz J, *et al.* IVM media are designed specifically to support immature cumulus-oocyte complexes not denuded oocytes that have failed to respond to hyperstimulation [J]. Fertil Steril, 2011, **96**(2): e141.
- [11] Frank L A, Sutton-McDowall M L, Russell D L, *et al.* Effect of varying glucose and glucosamine concentration in vitro on mouse oocyte maturation and developmental competence [J]. Reprod Fertil Dev, 2013, **25**(8): 1095-1104.
- [12] Albus F K, Sasseville M, Lane M, *et al.* Simulated physiological oocyte maturation (SPOM): a novel in vitro maturation system that substantially improves embryo yield and pregnancy outcomes [J]. Hum Reprod, 2010, **25**(12): 2999-3011.
- [13] Eppig J J, O'Brien M J, Wigglesworth, K, *et al.* Effect of in vitro maturation of mouse oocytes on the health and lifespan of adult offspring [J]. Hum Reprod, 2009, **24**(4): 922-928.

Application of Oocytes *In Vitro* Maturation in Mice Biological Purification

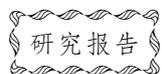
DU Jiangtao¹, WU Xiaojing², DAI Fangwei¹, LU Lingqun¹, ZHOU Shasang¹, YING Huazhong¹, GUO Honggang¹

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

(2. Hangzhou Chinese Medicine Hospital, Hangzhou 310007, China)

Abstract: Objective In mice biological purification, ovaries that did not ovulate after ovarian stimulation, were dissected and immature oocytes were isolated from follicles, then subjected to *in vitro* maturation for the ability of fertilization. By IVM, our aim was to improve oocytes utility ratios and as a remedial measure when conventional hyperstimulation fails. **Method** In mice biological purification, COCs were isolated by puncturing of ovarian follicles with a needle, that did not ovulate after PMSG and HCG stimulation, then subjected immediately to maturation in IVM culture. At the same time, the normal superovulation after PMSG and HCG injection, the immature oocytes *in vitro* maturation after PMSG injection, and suspected matured oocytes and nude oocytes *in vitro* maturation after PMSG and HCG injection were used as controls. After IVM and IVF, the 2-cell embryos were introduced to oviducts of the pseudo-pregnant foster mothers, and developed matured individuals *in vivo*. **Result** Ovaries that did not ovulate after PMSG and HCG injection (group A), the mature rate of immature oocytes was 87.0%±3.2%, 2-cell rate was 55.1%±12.3%, blastocyst rate was 23.1%, 41 2-cell embryos were introduced to oviducts of two pseudo-pregnant foster mothers, and 5 cubs were born, the birth rate was 12.2%. PMSG injection only, immature oocytes were obtained 48 h later (group B), *in vitro* maturation rate was 83.9%±3.9%, 2-cell rate was 51.8%±9.3%, blastocyst rate was 38.5%±13.9%. The normal superovulation after PMSG and HCG injection (group C), 2-cell rate was 78.9%±0.6%, blastocyst rate was 78.0%±3.8%. The suspected matured oocytes and nude oocytes were obtained from ovaries that did not ovulate after PMSG and HCG injection (group D), matured *in vitro* 0 h, 6h and 16~18 h, the mature rate, 2-cell rate and blastocyst rate were all lower than the other three groups and had significant differences. The 2-cell rate of group A and group B had significant differences, and blastocyst rate had extremely significant differences compared with group C. **Conclusion** Oocytes IVM can be used as a remedial measure when conventional hyperstimulation fails, and also can be used to improve rare strains of mice oocytes utility ratios.

Key words: mice; oocyte; IVM; biological purification



维丙胺联合盐酸氟西汀对抑郁症小鼠的作用研究*

伍锡栋¹ 谢梦² 寇光³ 丁琦¹ 张芸¹ 张五萍³

(1. 江西省医疗器械检测中心, 南昌 330029) (2. 江西省人民医院体检科, 南昌 330006)

(3. 江西省人民医院药学部, 南昌 330006)

摘要:目的 考察研究维丙胺胶囊联合盐酸氟西汀胶囊对小鼠抑郁症的作用效应。方法 采用慢性应激加孤养的方法建立小鼠抑郁症模型。随机分为5组:空白对照组、模型组、维丙胺组、盐酸氟西汀组及维丙胺联合盐酸氟西汀组(联合用药组),每组10只,并连续30 d灌胃给药,观察各组小鼠的体质量变化、糖水偏爱率、强迫游泳不动时间及悬尾不动时间进行比较分析,综合评价联合用药对抑郁症小鼠的作用效果。结果 建模完成时(给药第0天),各抑郁症模型组与空白对照比较,糖水总消耗量、糖水偏爱率及体质量均极显著性的降低($P < 0.01$)。灌胃给药后,各给药实验组动物体质量均有增长,第30天,与模型组比较,联合用药组体质量增长具有显著性差异($P < 0.05$),第39天,维丙胺组体质量增长具有显著性差异($P < 0.05$),第46天,联合给药组与盐酸氟西汀组比较,体质量增长具有显著性差异($P < 0.05$)。第50天,各给药实验组糖水总消耗量及糖水偏爱率均有不同程度升高,与模型组比较,维丙胺组糖水总消耗量及糖水偏爱率均具有显著性差异($P < 0.05$),与模型组比较,联合用药组糖水总消耗量具有显著性差异($P < 0.05$),联合用药组糖水偏爱率具有极显著性差异($P < 0.01$)。维丙胺组、联合用药组强迫游泳不动时间及悬尾不动时间显著减少,与模型组比较,维丙胺组游泳和悬尾不动时间均具有显著性差异($P < 0.05$),联合用药组悬尾不动时间具有极显著性差异($P < 0.01$),与盐酸氟西汀组比较,联合用药组悬尾不动时间具有显著性差异($P < 0.05$)。结论 通过实验提示维丙胺具有抗抑郁作用,且联合盐酸氟西汀效果更佳,本研究将为临床抑郁症的临床用药提供实验依据与参考。

关键词:维丙胺;联合;盐酸氟西汀;抑郁症

中图分类号: R961 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0058-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.011

抑郁症表现为显著而持久的心境低落,具有发病率高、死亡率高、持续性久^[1-2]以及年轻化的特点。全世界每年约有85万的患者选择自杀^[3],抑郁症还可以增加心脑血管等患病风险,影响体内脂类代谢,已经严重影响了人类的健康。盐酸氟西汀是临床常用的选择性5-HT再摄取抑制剂,具有神经保护、抗炎、抗肿瘤等药理作用^[4],在体内可代谢为诺氟西汀,其半衰期更长,是相比其他抗抑郁药的劣势所在,临床实验已经证明盐酸氟西汀治疗抑郁症的可靠性和安全性;维丙胺为维生素C衍生物,临床上主要用于急性肝炎及高血脂等症,不良反应轻少,可促进肝细胞再生,降低血清氨基酸转移酶活性,改善肝功能,对肝脏具有解毒和保护作用及调节

脂类代谢作用。目前临床上治疗抑郁症主要采用诸如选择性5-羟色胺再摄取抑制剂(SSRIs)、选择性5-羟色胺及去甲肾上腺素(NE)再摄取抑制剂(SNRIs)、NE及特异性5-羟色胺能抗抑郁剂(NaSSA)等的西药抗抑郁药治疗,疗效单一。应激模型是抗抑郁药物评价应用最为广泛的模型,主要包括绝望模型、LH模型和慢性不可预见应激模型等,本研究结合抑郁症的独特发病机制—肝脑同病^[5],给予肝脏辅助治疗可以减轻抑郁症症状作为研究的切入点,采用慢性轻度不可预见性应激加孤养建立慢性应激抑郁症小鼠模型^[6],将维丙胺胶囊与盐酸氟西汀联合用药,旨在观察其对抑郁症的治疗效果,为临床维丙胺用于抗抑郁治疗提供实验依据。

收稿日期:2018-11-16

* 基金项目:江西省卫生和计划生育委员会(No.20187087)

作者简介:伍锡栋(1986—),男,硕士,助理研究员。研究方向:抑郁症联合用药研究。E-mail:wuxidong1986@163.com

通信作者:张五萍(1989—),女,硕士,主管药师。研究方向:临床药学。E-mail:zhangwupingbest@163.com

1 材料与方法

1.1 材料

维丙胺胶囊(0.1 g/片,华润双鹤药业股份有限公司),盐酸氟西汀胶囊(20 mg/片,Patheon France),蔗糖(食用级500 g/袋,河南浩金生物科技有限公司),ICR小鼠,6~8周龄雄性50只,体质量18~22 g,SPF级,购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号SCXK(湘)2016-0002。饲料、饮水与垫料先经121℃高压蒸汽灭菌20 min,垫料取出后放入电鼓风干燥箱干燥后使用,实验动物自由取食饮水,饲养于江西省医疗器械检测中心IVC动物实验室,许可证号SYXK(赣)2016-0002,实验动物许可证No.43004700043118。

1.2 方法

1.2.1 孤养配合慢性应激小鼠抑郁症动物模型的建立^[6]:每只小鼠均单笼饲养,温度(26±2)℃,湿度60%~80%。刺激条件:禁食24 h,冰水游泳(4℃、水深10 cm,5 min),禁饮24 h,热水游泳(45℃、水深10 cm,10 min),直流电击足底(电流1.0 mA、电压50 V,每隔1 min刺激1次,每次刺激10 s,持续30次),夹尾1 min,摇晃(高速水平摇晃1次/s,持续15 min),行为限制2 h,(鼠笼45°倾斜24 h)、潮湿垫料(100 g垫料加入200 mL水)10 h,空瓶放置1 h,昼夜颠倒(6:00~18:00光照刺激,次日18:00~6:00光照刺激)。实验过程中每种刺激至少给予2次,每天随机给予1种刺激,同种刺激不能连续出现,使小鼠不能预料刺激的发生,每次应激实验均在另一个独立的实验室进行。连续给予21 d刺激,造成慢性轻度不可预见性应激刺激抑郁模型。

1.2.2 实验动物分组及给药方法:空白对照组(10只/笼喂养,不给予任何刺激,正常取食饮水),按照1.2.1方法建立抑郁动物模型,并随机分为4组,每组10只,即模型组(给予生理盐水并正常喂养)、盐酸氟西汀组(给予氟西汀20 mg/片)、维丙胺组(给予维丙胺0.1 g/片)、联合用药组(给予氟西汀联合维丙胺),各组动物均在模型建立后,开始灌胃给予相应药物,每天1次,灌胃量0.2 mL/10 g(根据人卫版《药理学实验方法》第三版中按人体表面积折算的等效剂量),根据单味药的临床用药方法,连续给药30 d。

1.2.3 行为学表现评价指标

1.2.3.1 小鼠体质量的变化:记录分2部分,第1

部分记录前21 d建立抑郁症模型,即空白对照组与模型组(模型组、盐酸氟西汀组、维丙胺组、联合用药组)的比较分析,第2部分记录灌胃给药30 d,每3 d测量体质量1次,并对各组动物进行比较分析。

1.2.3.2 糖水偏爱试验(Sucrose preference test, SPT):每笼同时放置2个水瓶,第1个24 h,2瓶均装有质量浓度为1%的蔗糖溶液;第2个24 h禁食禁水,随后每只小鼠笼随机放置2个水瓶,分别装1%蔗糖溶液及纯水,记录小鼠在4 h内消耗的糖水量,计算第1天、第21天及第50天小鼠的糖水偏爱率。糖水偏爱率(%)=蔗糖水消耗总量/(蔗糖水消耗总量+纯水消耗总量)×100%。

1.2.3.3 强迫游泳试验(Forced swim test, FST):将小鼠分别放置于水深14 cm玻璃烧杯中^[7](杯高24 cm,直径13 cm),游泳2 min后,持续记录4 min内小鼠累计不动时间。不动时间:指小鼠在水中停止挣扎、呈漂浮状态,仅有细小肢体运动以保持头部悬浮在水面。

1.2.3.4 悬尾试验(Tail suspension test, TST):参照Steru等^[8]建立的方法,使用医用胶布将小鼠尾部距尾尖2 cm处固定在悬尾箱(25 cm×25 cm×35 cm)顶部,持续6 min,记录后4 min持续不动累计时间。

1.3 统计方法

应用SPSS 20.0统计软件对实验数据进行统计学处理,各组数据结果组间比较用单因素方差分析(One-way ANOVA),数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,以 $P > 0.05$ 无显著性差异, $P < 0.05$ 有显著性差异, $P < 0.01$ 有极显著性差异,检验水平 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 动物体质量的变化

各组动物体质量均有不同程度减轻,第9天,与空白对照组比较,具有显著性差异($\Delta P < 0.05$),第21天具有极显著性差异($\Delta\Delta P < 0.01$);给药后,各给药组体质量均有增长,第46天,与盐酸氟西汀组比较,联合用药组具有显著性差异($\# P < 0.05$),见表1,表2。

2.2 小鼠糖水总消耗量及糖水偏爱率的比较

第21天,与空白对照组比较,各组小鼠糖水总消耗量及糖水偏爱率均有显著性差异($\Delta P < 0.05$);第50天,与模型组比较,联合用药组糖水总消耗量具有显著性差异($* P < 0.05$),糖水偏爱率具有极显著性差异($** P < 0.01$);与盐酸氟西汀组比较,联合用药组糖水偏爱率具有显著性差异($\# P < 0.05$),空

表 1 模型建立期动物体质量的变化情况 ($g, \bar{x} \pm s, n = 10$)Table 1 The changes condition of the animal weight in model establishment period ($g, \bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	第 1 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天	第 15 天	第 18 天	第 21 天
空白对照组	19.7±0.6	21.2±0.7	22.3±0.7	23.5±0.7	24.6±0.6	25.8±0.7	27.2±0.5	28.5±0.5
模型组	19.5±0.5	21.1±0.6	21.9±0.8	21.4±0.6 [△]	21.1±0.5 [△]	20.7±0.4 ^{△△}	20.2±0.5 ^{△△}	20.0±0.4 ^{△△}
盐酸氟西汀组	19.7±0.4	21.2±0.5	22.2±0.7	21.6±0.6 [△]	21.2±0.5 [△]	21.0±0.2 ^{△△}	20.8±0.4 ^{△△}	20.5±0.2 ^{△△}
维丙胺组	19.5±0.3	21.2±0.8	22.8±0.9	21.7±0.8 [△]	21.4±0.5 [△]	21.1±0.3 ^{△△}	20.8±0.3 ^{△△}	20.4±0.2 ^{△△}
联合用药组	19.7±0.5	21.5±0.9	22.1±0.7	21.3±1.0 [△]	21.0±0.8 [△]	20.2±0.6 ^{△△}	20.0±0.3 ^{△△}	19.5±0.2 ^{△△}

注:与空白对照组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$

Note: Compared with the control group, [△] $P < 0.05$, ^{△△} $P < 0.01$

表 2 给药期动物体质量的变化情况 ($g, \bar{x} \pm s, n = 10$)Table 2 The changes condition of the animal weight in administering drug period ($g, \bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	第 21 天	第 24 天	第 27 天	第 30 天	第 33 天	第 36 天	第 39 天	第 42 天	第 46 天	第 50 天
空白对照组	28.5±0.5	29.5±0.3	30.7±0.7	31.9±0.6	33.0±0.3	34.6±0.4	35.7±0.2	36.8±0.4	38.3±0.3	39.4±0.2
模型组	20.0±0.5	20.0±0.3	19.8±0.5	19.7±0.2	19.6±0.2	19.4±0.1	18.8±0.3	19.3±0.2	19.4±0.2	19.5±0.2
盐酸氟西汀组	20.5±0.3	21.0±0.5	21.6±0.3	22.2±0.7*	22.7±0.2*	23.4±0.2*	23.9±0.2*	24.4±0.2**	25.0±0.3**	25.6±0.3**
维丙胺组	20.4±0.3	20.5±0.3	20.8±0.3	21.3±0.4	21.6±0.2	22.0±0.5	22.3±0.2*	22.6±0.2*	22.9±0.2*#	23.5±0.2**
联合用药组	19.5±0.2	20.1±0.3	20.8±0.3	21.7±0.3*	22.5±0.5*	23.6±0.2*	24.4±0.2*	25.4±0.3**	26.4±0.2**#	27.3±0.3**#

注:①与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与盐酸氟西汀组比较,# $P < 0.05$ 。②第 21 天为给药第 0 天

Note:①Compared with the model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;Compared with the Fluoxetine hydrochloride group,# $P < 0.05$ 。②The 21st day was the 0th day of administration

表 3 小鼠糖水总消耗量及糖水偏爱率的比较 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Table 3 The comparison of total sugar water consumption and preference rate of sugar in mice ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	糖水消耗量(g)			糖水偏爱率($\%$)		
	第 1 天	第 21 天	第 50 天	第 1 天	第 21 天	第 50 天
空白对照组	65.0±2.0	70.4±1.2	64.2±1.7	80	81	82
模型组	67.9±1.8	49.9±1.0 [△]	38.3±1.8	76	60 ^{△△}	51
盐酸氟西汀组	74.2±2.5	49.2±1.3 [△]	59.5±2.7*	79	57 ^{△△}	69* [△]
维丙胺组	70.2±3.3	44.0±1.4 [△]	50.1±1.5*	74	54 ^{△△}	60* ^{△△}
联合用药组	75.6±2.8	53.0±2.2 [△]	58.6±2.0*	75	58 ^{△△}	75* ^{**#△}

注:①与空白对照组比较,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,与盐酸氟西汀组比较,# $P < 0.05$ 。②第 21 天为给药第 0 天

Note:①Compared with the control group,[△] $P < 0.05$,^{△△} $P < 0.01$;Compared with the model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$,Compared with the Fluoxetine hydrochloride group,# $P < 0.05$ 。②The 21st day was the 0th day of administration

白对照组糖水总消耗量及糖水偏爱率在给药期前后自身比较均无显著性差异($P > 0.05$),见表 3。

2.3 给药对小鼠强迫游泳不动时间与悬尾不动时间的比较

给予抑郁症小鼠药物治疗后,给药组小鼠强迫游泳不动时间和悬尾不动时间均有减少,与模型组比较,维丙胺组强迫游泳和悬尾不动时间具有显著性差异(* $P < 0.05$),联合用药组悬尾不动时间具有极显著性差异(** $P < 0.01$),与盐酸氟西汀组比较,联合用药组悬尾不动时间也具有显著性差异($P < 0.05$),见表 4。

表 4 给药对小鼠强迫游泳与悬尾不动时间的比较 ($s, \bar{x} \pm s, n = 10$)Table 4 The comparison of the fixed time that forced swimming and suspension immobility in mice by drug administration ($s, \bar{x} \pm s, n = 10$)

组别	强迫游泳不动时间/ s	悬尾不动时间/ s
空白对照组	45±9	41±5
模型组	92±10	125±15
盐酸氟西汀组	54±12**	62±8**
维丙胺组	82±10*	106±12*
联合用药组	50±7**	51±6**# [△]

注:与空白对照组比较,[△] $P < 0.05$;与模型组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与盐酸氟西汀组比较,# $P < 0.05$

Note:①Compared with the control group,[△] $P < 0.05$;Compared with the model group,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;Compared with the Fluoxetine hydrochloride group,# $P < 0.05$

3 讨论

各种药物有不同药理作用和治疗靶点的差异性,研究表明单药治疗抑郁症的痊愈率仅为 20%~30%,约一半病人易复发,2/3 治疗无效的病人必须更改治疗方案^[9-11]。单一抗抑郁药疗程至少持续 6 周,换药后需要 3 个月,无疑延长了治疗时间,故临床上逐渐采用联合两种或两种以上不同作用机理的抗抑郁药物^[12]。姚琳和潘丽红^[13]联合焦虑药起效时间缩短了 1/4,薛僖峰和姜涛^[14]联合心境稳定剂总有效率提高了 30%,多数文献综述联合用药并没有增加不良反应,综上所述对抑郁症联合用药具有必要性和优越性。抑郁症的病因尚不明确,文献综述其病因与生物、生理及社会环境等因素有关,诸如生物学因素神经生化、神经内分泌改变、神经再生等因素有关。在特有脑区与平滑肌(脑-平滑肌轴)之间存在一个双向影响、反馈的通路,通过神经内分泌网络进行调节,脑-平滑肌(Brain-Smooth Muscle, B-SM)轴存在 3 个靶点:脑、内脏平滑肌与血管平滑肌,3 靶点与肝脏疏泄藏血点对点关联,脑-平滑肌轴是抑郁症共病的生物学及发病学机制等^[15]。田进文等^[16]认为平滑肌系统是肝贮藏和疏泄血液的生理解剖基础,提示肝脏血液供应影响平滑肌系统,进而对脑病具有影响,岳广欣等^[17]提出边缘系统是肝主疏泄的高级中枢,(血管)平滑肌是肝疏泄藏血的效应器,进一步说明肝脑具有同病机制。医学概述久病必伤及肝脏,导致肝阴血亏虚,及脑等脏器没有充足的血液供应,神经生化活动不能正常。肝体疏泄和藏血,血上供于脑,血足则脑髓充盈,能够正常发挥其精神主宰的功能^[18],提示保护肝脏、改善肝脏造血功能,提高肝体疏泄藏血,促使脑髓营养充盈,能减轻抑郁症状。维丙胺化学成分单一,剂量易控制,为维生素 C 衍生物,不良反应轻少,可促进肝细胞再生,改善肝功能,对肝脏具有解毒和保护作用,故本研究结合肝脑同病机制,考察其对抑郁症效果。

糖水偏爱率作为评价抑郁症小鼠快感缺乏的有效客观指标^[19],研究表明模型建立第 21 天,模型组小鼠糖水偏爱率下降 20%,体质量减轻、明显,与空白对照组比较均具有显著性差异,表明小鼠抑郁症模型制造成功。小鼠悬尾试验和强迫游泳试验属于行为绝望模型,利用动物在恶劣的环境下逃脱无望时出现“行为绝望”的原理对药物潜在的抗抑郁作

用进行评价与筛选。研究发现多数抗抑郁药都可增加小鼠糖水偏爱率,减少小鼠悬尾和强迫游泳的不动时间,而对自发活动不产生影响^[20]。本研究给药后(第 39 天),与模型组比较,维丙胺组(药物剂量为 45.5 mg/kg)体质量增长具有显著性差异,第 50 天,与模型组比较,维丙胺组糖水总消耗量及糖水偏爱率均具有显著性差异,提示维丙胺可以增加小鼠体质量、小鼠糖水消耗总量及糖水偏爱率,减少小鼠强迫游泳不动时间和悬尾不动时间,具有抗抑郁作用,其与盐酸氟西汀联合用药,对小鼠糖水消耗总量、糖水偏爱率及减少小鼠强迫游泳不动时间和悬尾不动时间效果更显著,与模型组比较,具有显著性差异,综上所述维丙胺联合盐酸氟西汀在抑郁症动物模型上具有显著的抗抑郁作用,为临床抑郁症的临床用药提供实验依据。维丙胺抗抑郁机制可能与其临床降低肝脏 S-GDT,促进肝细胞再生,改善肝脏造血功能的作用,以及 B-SM 轴 3 靶点相互调节作用有关,具体的抗抑郁分子机制有待进一步探索。

参考文献

- [1] Thompson S M, Kallarackal A J, Kvarita M D, *et al.* An excitatory synapse hypothesis of depression[J]. *Trends Neurosci*, 2015, **38**(5):279-294.
- [2] 高雪松,王永志,李丽,等.利血平致抑郁样啮齿类动物模型的研究进展[J]. *实验动物科学*, 2017, **34**(2):57-61.
- [3] Lang U E, Borgwardt S. Molecular mechanisms of depression: perspectives on new treatment strategies [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, **31**(6):761-777.
- [4] Lee J Y, Lee H E, Kang S R, *et al.* Fluoxetine inhibits transient global ischemia-induced hippocampal neuronal death and memory impairment by preventing blood-brain barrier disruption [J]. *Neuropharmacology*, 2014, **79**(1):161-171.
- [5] 郭晓冬,许二平,李琳,等.加味丹栀逍遥散对抑郁模型大鼠海马内盐皮质激素受体和糖皮质激素受体的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, **20**(11):119-122.
- [6] 王建醒,周丽,徐华锋等.慢性应激大鼠抑郁模型的建立及评价[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2006, **27**(6):644-645.
- [7] Petit-Demouliere B, Chenu F, Bourin M, *et al.* Forced swimming test in mice: a review of antidepressant activity [J]. *Psychopharmacology*, 2005, **177**(3):245-255.
- [8] Steru L, Chermat R, Thierry B, *et al.* The tail suspension test: a new method for screening anti-depressants in mice [J]. *Psychopharmacology*, 1985, **85**(3):367-370.
- [9] Blier P, Ward H E, Tremblay P, *et al.* Combination of antidepressant medications from treatment initiation for depressive disorder: a double-blind randomized study [J]. *Am J Psychiatry*, 2010, **167**(3):281-288.

- [10] 黄飞,姜祥智,徐勇,等.联合用药治疗抑郁症的效果和安全性[J].齐鲁医学杂志,2016,2(31):79-81.
- [11] 高新雅,漆仲云,高瑞丽,等.自拟柴青解郁汤对抑郁症小鼠的抗抑郁作用[J].新乡医学学报,2014,3(31):170-173.
- [12] 贾福军.抗抑郁剂的联合使用[J].中华精神科杂志,2012,45(2):243-244.
- [13] 姚琳,潘丽红.坦度螺酮辅助治疗难治性抑郁症疗效及安全性观察[J].海南医学,2015,26(5):637-640.
- [14] 薛僖峰,姜涛.艾司西酞普兰合并丙戊酸镁缓释片治疗难治性抑郁症的对照研究[J].中国农村卫生,2015,(6):79.
- [15] 黄熙,王杨,张英进,等.脑-平滑肌轴:其与肝藏象/抑郁症共病的关系[J].世界科学技术,2011,13(2):221-225.
- [16] 田进文,巧荣,韩成仁,等.论平滑肌是肝藏调节性生理的解剖基础[J].安徽中医学院学报,2014,23(5):1-3.
- [17] 岳广欣,陈家旭,王竹风.肝主疏泄的生理学基础探讨[J].北京中医药大学学报,2015,28(2):1-4.
- [18] 寇冠军,郑偕扣,徐强,等.从“脑-肝-血管”轴初步探讨肝藏血、主疏泄的机制[J].天津中医药,2015,32(2):124-128.
- [19] West C H, Boss-Williams K A, Weiss J M, *et al.* Effects of fenfluramine, 8-OH-DPAT, and tryptophan-enriched diet on the high-ethanol in-take by rats bred for susceptibility to stress [J]. Alcohol, 2011, 45(8):739-740.
- [20] 丁振春,薛瑞,张亭亭,等.白芷冰片方对小鼠抑郁样行为的影响[J].中国药理学与毒理学杂志,2018,32(3):168-174.

The Effect Studying of Vinopropylamine Combined with Fluoxetine Hydrochloride on Depression Mouse Model

WU Xidong¹, XIE Meng², KOU Guang³, DING Qi¹, ZHANG Yun¹, ZHANG Wuping³

(1. Jiangxi Institute of Materia Medica of the Fourth Detection, Nanchang 330029, China)

(2. Jiangxi Provincial People's Hospital, Department of Medical Examination, Nanchang 330006, China)

(3. Jiangxi Provincial People's Hospital, Department of Pharmacy, Nanchang 330006, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of vinopropylamine capsules combined with fluoxetine hydrochloride on depression mice; **Method** The depression model was established by the method of chronic stress and isolation; Randomly divided rroup and vinopropyla mine combined with fluoxetine hydrochloride group (combination drug group), each group ten mice and were administered drug by gavage for 30 days, the weight change, sugar water preference rate, the fixed time of forced swimming and suspended tail, and were compared and analyzed, and was comprehensively evaluated the effect of the combined drug on depression mice; **Result** When the moding was established (the 0th day of administration), the total consumption of sugar water, the preference rate of sugar water and the weight of mice in each group were extremely significant reduction ($P < 0.01$); After intragastric administration, the weight of mice were increased in each experimental group, on the 30th day, compared with the model group, the combined treatment group was significant ($P < 0.05$), on the 39th day, the vinopropylamine group was significant ($P < 0.05$), and compared with the fluoxetine hydrochloride group on the 46th day, the ponderal growth of combined treatment group was significant ($P < 0.05$); On the 50th day, each dose group of sugar water consumption and sugar preference rate were different extent increased, compared with model group, the sugar water consumption and sugar preference rate of vinopropylamine group were significant ($P < 0.05$), and the combination drug group of sugar water consumption had significance ($P < 0.05$), the sugar water preferred rate had a extremely significant difference ($P < 0.01$); The immobility time of forced swimming and suspension tail were significantly reduced of the vinopropylamine group and the combined drug group, compared with the model group, the immobility time of forced swimming and suspension tail of the vinopropylamine group were significant ($P < 0.05$), the immobility time of suspension tail of the combined drug group had extremely significant differences ($P < 0.01$), and the immobility time of the suspension tail of the combined drug group had significance ($P < 0.05$) compared with the fluoxetine hydrochloride group; **Conclusion** The results of this studying suggest the vinopropylamine had antidepressant effect and combined fluoxetine hydrochloride was more effective, this studying will provide experimental basis and reference for clinical depression combination drug.

Key words: Vinopropylamine; combined; Fluoxetine hydrochloride; Depression



应用微卫星 DNA 标记对广西食蟹猴的遗传学研究*

张洁宏 覃辉艳 李彬 杨慧 王芳 陈华凤

(广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 530028)

摘要:目的 对广西食蟹猴不同生产繁殖群进行遗传检测,分析广西不同繁殖群食蟹猴的遗传背景,为建立广西食蟹猴遗传质量检测方法和种群资源库提供基础资料。**方法** 应用 20 个微卫星基因位点和毛细管电泳技术对广西 3 个不同生产群食蟹猴进行遗传检测,并计算群体内和群体间的遗传变异参数。**结果** 共检测到等位基因 237 个,其观察等位基因数(N_a)为 5~19 个,平均 11.85 个;平均期望杂合度(H_e)为 0.85;平均多态信息含量(PIC)为 0.817。3 个不同生产群(F、N 和 W)分别检测到等位基因 158、158 和 173 个,平均期望杂合度(H_e)分别为 0.8371、0.8318 和 0.8642;平均多态信息含量(PIC)分别为 0.7692、0.7653 和 0.8001,3 个不同生产群存在较高的遗传多态性。3 个生产群 Hardy-Weinberg 平衡检验多数位点处于 H-W 平衡。群内近交系数 F_{is} 均值为 0.0235,总群体近交系数 F_{it} 均值为 0.0628,遗传分化系数 F_{st} 均值为 0.0402,基因流 N_m 均值为 5.9616,表明 3 个生产群基本处于随机交配状态,群体间遗传分化很小。3 个生产群遗传距离为 0.2556~0.3223,遗传相似度为 0.7245~0.7745,聚类分析显示 F 群体和 N 群体先聚为一类,再和 W 群体聚为一类,符合 3 个繁殖猴场各自关联引种历史特征。**结论** 本研究有效分析了广西食蟹猴的遗传多态性和群体间的遗传关系,所选的 20 个微卫星基因位点可用于食蟹猴遗传质量检测。

关键词:食蟹猴;微卫星 DNA 标记;遗传检测

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0063-07

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.012

食蟹猴又称长尾猴,属于猴科,猕猴亚科,猕猴属,食蟹猴种,因其喜欢在退潮后到海边觅食螃蟹及贝类而得名,主要分布在亚洲东南部老挝、越南、印度尼西亚、马来西亚等国家地区,国内主要为人工饲养种群。因其体型较小,适应性强,容易驯养繁殖,在生物进化上与人类的遗传物质有 98.5% 的同源性,组织结构,生理代谢等与人类较接近,在生物学、心理学、医学等多种生命科学研究中有着其他实验动物无法替代的重要地位^[1]。特别是在心脑血管疾病、神经系统疾病、生殖系统疾病、内分泌系统疾病、艾滋病、结核等恶性传染病、器官移植等研究中食蟹猴有着极高的应用价值^[2-3]。目前,食蟹猴已成为生命科学研究最常用的大型实验动物之一,我国也是全世界作为实验动物使用和出口食蟹猴最多的国家,检测食蟹猴遗传质量,建立遗传背景清楚的

食蟹猴种群,提供标准化的实验食蟹猴,将有力保障研究结果的准确性、科学性和有效性。但目前我国食蟹猴遗传背景研究较少。因此,本研究应用 20 个微卫星位点对广西食蟹猴进行遗传检测,探讨广西食蟹猴的遗传背景,并为建立广西食蟹猴遗传质量检测方法和种群资源库提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

选取广西 3 家最大最具有代表性的食蟹猴养殖公司(以下分别简称为 F、N 和 W)进行无关个体随机采样,共采样成年食蟹猴 30 只,每个公司各 10 只,雌雄各半,年龄为 3~4 岁,体质量为 3~4 kg, F、N 和 W 3 家食蟹猴养殖公司目前的种猴数量均为 4

收稿日期:2018-10-17

* 基金项目:广西科学研究与技术开发计划(桂科能 1598025-25)

作者简介:张洁宏与覃辉艳为共同第一作者

张洁宏(1969—),男,主任技师,主要从事实验动物质量检测工作.E-mail:Zhjh510@126.com

覃辉艳(1981—),女,副主任技师,主要从事实验动物质量检测工作.E-mail:qinhuiyan123@sina.com

千只左右,总存栏猴数量均为 1~1.2 万只,为避免选择的个体相互间存在父子、母子、同胞关系,本研究根据养殖公司给定的记录谱系,从育成待发猴群的不同栏舍进行无关个体随机抽样,空腹自上肢静脉抽取全血 2 mL,EDTA 抗凝。

1.2 主要仪器与试剂

仪器:Sigma 高速冷冻离心机、Bio-Rad 电泳仪、UVP GelDoc-It² 凝胶成像分析仪、ABI 梯度 PCR 仪、ABI 3730XL 测序仪等。

试剂:Qiagen DNeasy Blood & Tissue Kit 核酸提取试剂盒、Takara Premix Ex TaqTM Hot Start Version PCR 反应试剂盒等。

1.3 实验方法

1.3.1 核酸样品制备:全血样品使用 Qiagen 公司货号为 69504 的试剂盒 DNeasy Blood & Tissue Kit (50) 提取核酸。核酸提取后采用 ND-1000 紫外分光光度计分析提取核酸的纯度和浓度。采用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 样品是否含有主带。

1.3.2 微卫星位点选取与引物合成:根据文献^[1,4-8]和 GenBank 数据库提供的信息,选择等位基因数、多态性含量丰富、尽可能分布于多条不同染色体的 20 个微卫星位点,其中位点 D1S533、D10S611、D2S146、D3S1768、D3S3045、D4S1645、D5S1466、D6S311、D8S1106、D9S934、D11S1352、D12S67、D13S797、D15S644、D18S536、DXS6810 选取于文献 1~6,位点 D12S375、D16S409、D17S800、D22S419 选取于 GenBank 数据库。20 个微卫星位点序列均在 GenBank 数据库查找。各位点引物使用 FAM 标记,由华大基因合成。引物编号和序列见表 1。

1.3.3 PCR 反应:PCR 反应体系为:Premix Ex Taq Hot Start Version 10 μ L、模板 1 μ L、10 μ mol/L 正向引物 0.5 μ L、10 μ mol/L 反向引物 0.5 μ L、无酶水补足至 20 μ L。扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min、94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,最佳退火温度(见表 1) 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 保持 10 min。

1.3.5 毛细管电泳:将甲酰胺与分子量内标按 100:1 的体积比混匀后,取 9 μ L 加入上样板中,再加入 1 μ L 稀释 10 倍的 PCR 产物,使用 ABI 3730XL 测序仪进行毛细管电泳。利用 Genemarker 中的 Fragment(Plant) 片段分析软件对测序仪得到的原始数据进行分析,将各泳道内分子量内标的位置与各样品峰值的位置做比较分析,得到片段大小。

表 1 20 个食蟹猴微卫星位点的扩增条件和染色体分布
Table 1 Amplifying condition and chromosome distribution of 20 microsatellite DNA loci in *Macaca fascicularis*

基因位点 Locus	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	染色体 Chromosome	退火温度 Temp/ $^{\circ}$ C
D1S533	CATCCCCCAAAAAATATA TTGCTAATCAAATAACAATGGG	1	55
D3S3045	ACCAAATGAGACAGTGGCAT ATGAGGACGGTTGACATCTG	2	56
D3S1768	GGTGTGCTGCCAAAGATTAGA CACTGTGATTTGCTGTGGGA	3	61
D6S311	ATGTCCTCATTGGTGTGTGTG GATTCAGAGCCCAGGAAGAT	4	58
D4S1645	CAACTTCTCAATAAAATTTGGC CAGACACTGTCTGTGTGTGG	5	56
D5S1466	GTATCAGAACCTCATGTGTACACC GGCACCTAGGTTTGTCTGA	6	54
D15S644	CCTTCATTGGCAGACTCACT GCAGACACCAAGATGATAACG	7	55
D8S1106	TTGTTTACCCTGCATCACT TTCTCAGAATGTCTCATAGTGC	8	61
D10S611	CATACAGGAACTGTGTAGTGC CTGTATTTATGTGTGTGGATGG	9	51
D22S419	GGCTCAGGACTCTGGGA GGCCAATCGGTAGGTCA	10	58
D12S375	TTGTTGAGGCTCTTTCTCCA TCTTCTATTTGGAAAAGTAACCC	11	55
D12S67	GCAACAGTTTATGCTAAAAGC GCCTATGCAGTTCAAATCTA	12	52
D2S146	TCATCCTTACTCTAAGCAAAGATCC CACCACATTTCAAATGCCTCC	13	58
D11S1352	CGGTGAGTTTTTTTGTCC ATATCCTTCATATCCTGAATCTCTG	14	58
D9S934	TTTCCTAGTAGCTCAAGTAAAGAGG AGACTTGGACTGAATTACACTGC	15	60
D17S800	GGTCTCATCCATCAGGTTTT ATAGACTGTGTACTGGCATTGA	16	55
D13S797	GGTTTGTGCGCATCTGTATT TGCTCGGAGGCTTTTCAGTC	17	56
D18S536	ATTATCACTGGTGTAGTCTCTG CACAGTTGTGTGAGCCAGTC	18	51
D16S409	TGAATCTTACATCCCATCCC AGTCAGTCTGCCAGAGGTG	20	58
DXS6810	ACAGAAAACCTTTTGGGACC CCCAGCCTGAATATTATCA	X	58

1.4 统计方法

采用 POPGENE32 和 NTSYS 软件对样品进行遗传多样性分析。计算各引物的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、香隆信息指数、Nei's 基因多样性以及多态信息含量等群体内的遗传变异和遗传距离、遗传相似系数、F-统计量、

基因流等群体间遗传关系。

2 结果

2.1 20 个微卫星位点片段大小

30 个样品 20 个检测位点毛细管电泳片段大小范围见表 2。

2.2 群体遗传多态性分析

由表 3 可见,30 个样本共检测到等位基因 237 个,其观察等位基因数 N_a 为 5~19 个,平均为 11.85 个,其中最多的位点是 D12S67,高达 19 个,最少的位点是 D18S536,有 5 个等位基因。有效等位基因数 N_e 为 3.2374~12.3288 个,平均为 6.9473 个;观察杂合度 H_o 为 0.3~1,平均为 0.7833,期望杂合度 H_e 为 0.8508~0.9345,平均为 0.85,平均期望杂合度 H_e 略高于平均观察杂合度 H_o ;Nei's 基因多样性 H 为 0.6911~0.9189,平均为 0.8358;香隆信息指数 I 为 1.3914~2.7085,平均为 2.0954;多态信息含量 PIC 为 0.6609~0.9135,平均为 0.817,均大于 0.5;表明广西食蟹猴总群体在微卫星水平上表现出较高的遗传多态性。分别对 3 个群体进行遗传多态性分析(见表 4),3 个群体(F、N 和 W)分别检测到等位基因 158、158 和 173 个,平均期望杂合度 H_e 分

表 2 20 个微卫星 DNA 检测位点片段大小

Table 2 DNA fragment size of 20 microsatellite DNA loci

基因位点 Locus	染色体 Chromosome	片段大小/bp size
D1S533	1	182~253
D10S611	9	168~222
D2S146	13	191~217
D3S1768	3	184~242
D3S3045	2	175~219
D4S1645	5	251~303
D5S1466	6	278~320
D6S311	4	208~250
D8S1106	8	130~160
D9S934	15	178~224
D11S1352	14	215~248
D12S67	12	121~231
D12S375	11	164~189
D13S797	17	178~206
D15S644	7	184~258
D16S409	20	120~140
D17S800	16	160~198
D18S536	18	146~159
D22S419	10	255~281
DXS6810	x	169~197

别为 0.8371、0.8318 和 0.8642;平均多态信息含量 PIC 分别为 0.7692、0.7653 和 0.8001,3 个群体亦存在较高的遗传多态性。

表 3 30 个样品 20 个微卫星位点遗传多态性检测结果

Table 3 Genetic polymorphism measured at 20 microsatellite loci in 30 samples

基因位点 Locus	观察等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	香隆信息 指数 I	观察杂合度 H_o	期望杂合度 H_e	Nei's 基因 多样性 H	多态信息含量 PIC
D1S533	15	7.7922	2.3692	0.8667	0.8864	0.8717	0.8620
D10S611	13	8.4906	2.3113	0.8333	0.8972	0.8822	0.8714
D2S146	14	9.3750	2.4169	0.7333	0.9085	0.8933	0.8841
D3S1768	15	9.9448	2.4757	0.9667	0.9147	0.8994	0.8915
D3S3045	16	8.2569	2.3772	1.0000	0.8938	0.8789	0.8679
D4S1645	14	6.1224	2.1590	0.8000	0.8508	0.8367	0.8204
D5S1466	11	6.6421	2.0932	0.9667	0.8638	0.8494	0.8333
D6S311	14	7.4380	2.2852	0.8000	0.8802	0.8656	0.8536
D8S1106	9	7.3171	2.0679	0.7000	0.8780	0.8633	0.8479
D9S934	9	5.5385	1.8993	0.8333	0.8333	0.8194	0.7967
D11S1352	13	9.0909	2.3740	0.9000	0.9051	0.8900	0.8807
D12S67	19	12.3288	2.7085	0.9333	0.9345	0.9189	0.9135
D12S375	7	3.4091	1.4612	0.6333	0.7186	0.7067	0.6609
D13S797	10	3.2374	1.6089	0.7000	0.7028	0.6911	0.6674
D15S644	14	8.6538	2.3331	0.8333	0.8994	0.8844	0.8735
D16S409	9	4.2353	1.6793	0.7667	0.7768	0.7639	0.7294
D17S800	14	6.3158	2.215	0.8000	0.8559	0.8417	0.8293
D18S536	5	3.5785	1.3914	0.6000	0.7328	0.7206	0.6731
D22S419	8	5.0562	1.7857	0.7000	0.8158	0.8022	0.7773
DXS6810	8	6.1224	1.8954	0.3000	0.8508	0.8367	0.8155
Mean	11.85	6.9473	2.0954	0.7833	0.8500	0.8358	0.8170

表 4 3 个群体遗传多态性检测结果

Table 4 Genetic polymorphism in 3 groups

群体	平均观察等位 基因数 Na	平均有效等位 基因数 Ne	平均香隆信息 指数 I	平均观察 杂合度 Ho	平均期望杂 合度 He	平均 Nei's 基因 多样性 H	平均多态信 息含量 PIC
F	7.90	5.2913	1.8081	0.8000	0.8371	0.7952	0.7692
N	7.90	5.4833	1.8073	0.7650	0.8318	0.7902	0.7653
W	8.65	6.1483	1.9333	0.7850	0.8642	0.8210	0.8001

2.3 Hardy-Weinberg 平衡检测

Hardy-Weinberg 平衡检测结果表明(见表 5), 多数位点处于 H-W 平衡, 只有 F 群体在位点 D6S311、DXS6810 上, N 群体在位点 D13S797、DXS6810 上, W 群体在位点 D1S533、D9S934、D22S419 上存在不平衡, $P < 0.05$ 。

表 5 Hardy-Weinberg 平衡检测结果

Table 5 Result of Hardy-Weinberg equilibrium

基因位点	F	N	W
D1S533	0.903377	0.752751	0.000001
D10S611	0.792705	0.139474	0.579454
D2S146	0.212060	0.407048	0.986612
D3S1768	0.268277	0.831254	0.132370
D3S3045	0.980810	0.946567	0.819639
D4S1645	0.878646	0.108238	0.912992
D5S1466	0.969303	0.994836	0.778743
D6S311	0.029447	0.993789	0.912852
D8S1106	0.090710	0.482902	0.311840
D9S934	0.943579	0.217280	0.013699
D11S1352	0.742654	0.316495	0.136463
D12S67	0.547980	0.944297	0.198845
D12S375	0.956015	0.958273	0.072630
D13S797	0.974022	0.027371	0.246763
D15S644	0.540312	0.056310	0.418932
D16S409	0.898896	0.917553	0.053780
D17S800	0.629342	0.284919	0.946755
D18S536	0.278820	0.785314	0.347983
D22S419	0.568866	0.947878	0.005625
DXS6810	0.000050	0.000001	0.761166

2.4 遗传距离和遗传相似系数

表 6 星号上方是遗传相似系数, 下方是遗传距离。由表 6 可见, 3 个群体遗传距离变化范围为 0.2556~0.3223, 遗传相似度范围为 72.45%~77.45%。

表 6 Nei's 遗传距离和遗传相似系数检测结果

Table 6 Nei's unbiased measures of genetic distance and genetic identity

群体	F	N	W
F	***	0.7745	0.7378
N	0.2556	***	0.7245
W	0.3041	0.3223	***

2.5 聚类分析

利用 Nei's 遗传距离进行 UPGMA 聚类分析,

得到 2 大类, 结果见图 1。F 群体和 N 群体先聚为一类, 再和 W 群体聚为一类。

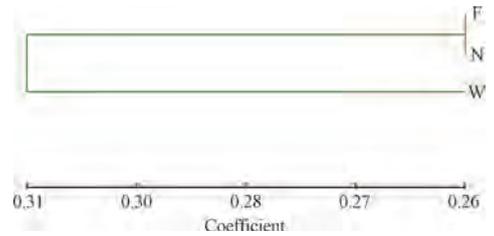


图 1 基于 Nei's 遗传距离的 UPGMA 聚类图

Fig.1 UPGMA dendrogram based on Nei's genetic distance

2.6 F-统计量和基因流

由表 7 可见, F_{is} 均值为 0.0235, F_{it} 均值为 0.0628, 表明群体受近亲交配和人工选择影响小。 F_{st} 均值为 0.0402, N_m 均值为 5.9616, 表明群体间遗传分化小。

表 7 F-统计量和基因流检测结果

Table 7 Result of F-statistics and gene flow

基因位点 Locus	群内近交系数 Fis	总群体近交系数 Fit	遗传分化系数 Fst	基因流 Nm
D1S533	-0.0297	0.0057	0.0344	7.0139
D10S611	0.0119	0.0554	0.0441	5.4214
D2S146	0.1252	0.1791	0.0616	3.8106
D3S1768	-0.1006	-0.0747	0.0235	10.4013
D3S3045	-0.1605	-0.1378	0.0196	12.5081
D4S1645	0.0264	0.0438	0.0179	13.6944
D5S1466	-0.1861	-0.1380	0.0405	5.9153
D6S311	0.0419	0.0757	0.0353	6.8318
D8S1106	0.1429	0.1892	0.0541	4.3750
D9S934	-0.0526	-0.0169	0.0339	7.1250
D11S1352	-0.0465	-0.0112	0.0337	7.1667
D12S67	-0.0646	-0.0157	0.0459	5.1908
D12S375	0.0865	0.1038	0.0189	13.000
D13S797	-0.0606	-0.0129	0.0450	5.3036
D15S644	-0.0040	0.0578	0.0616	3.8112
D16S409	-0.0502	-0.0036	0.0444	5.3852
D17S800	0.0144	0.0495	0.0356	6.7639
D18S536	0.1262	0.1673	0.0470	5.0656
D22S419	0.0948	0.1274	0.0360	6.6923
DXS6810	0.6146	0.6414	0.0697	3.3357
Mean	0.0235	0.0628	0.0402	5.9616

3 讨论

实验动物遗传质量检测是评价实验动物质量的一个重要手段,其目的是为了确定被检动物是否符合该品系或种群的生物学特性以及检测该种群动物的近交程度等。随着生物技术的发展,现遗传标记研究主要集中在 DNA 分子水平上。微卫星是由 2~6 个核苷酸的串联重复片段构成的 DNA 序列,因其具有分布广泛、多态性丰富、易于检测、结果稳定可靠等特点,现已被广泛应用于亲缘关系鉴定、人类疾病诊断、实验动物遗传质量检测、生物群体遗传多样性遗传结构与物种资源保护等多领域^[9]。2007 年 Kikuchi 等^[10]从人类基因库中选取 148 个微卫星位点首次研究报道了食蟹猴的微卫星标记。近年来, Nikzad 等^[11]应用 18 个微卫星位点评估了马来西亚 6 个岛屿野生食蟹猴的遗传多样性和种群结构,结果显示总群体平均观察杂合度为 0.497,平均期望杂合度为 0.803, Sunggala 和 Penang 岛食蟹猴群体具有较高的遗传多样性,马来西亚食蟹猴遗传距离和地理位置之间没有较大关联。Smith 等^[12]应用 15 个微卫星位点比较分析了菲律宾食蟹猴与印度尼西亚、新加坡、毛里求斯、柬埔寨食蟹猴的遗传特性,菲律宾、毛里求斯食蟹猴遗传多样性较印度尼西亚、新加坡和柬埔寨低,群体间存在较大遗传分化。国内李瑞生等^[1]、刘欢^[8]分别应用 20 个微卫星位点、18 个微卫星位点有效分析了国内食蟹猴群体的遗传多样性,国内饲养食蟹猴的遗传多样性高于东南亚地区。

本研究采用 20 个微卫星位点探讨广西食蟹猴的遗传质量,多个基因位点的遗传参数平均值是衡量群体遗传变异大小和群体遗传多样性常用的指标,其中多态信息含量 PIC 是反应微卫星位点多态性的理想指标,当 $PIC > 0.5$ 时,微卫星位点具有高度多态性。杂合度是衡量群体内遗传变异最直接和最有效的指标,其值越高群体的遗传多样性越丰富^[13]。本研究结果显示 20 个微卫星多态信息含量 PIC 均大于 0.5,为 0.6609~0.9135,平均为 0.817,表明 20 个微卫星位点均为高多态性位点,能较好地反应广西食蟹猴的遗传多样性,与文献^[1,4,8]报道的微卫星位点多态性相同。30 个样品 20 个微卫星位点观察等位基因数 N_a 为 5~19 个,平均观察等位基因数 N_a 为 11.85 个,平均有效等位基因数 N_e 为

6.9473 个,亦与文献^[1,4,8]检测到的观察等位基因数大致相同。总群体平均观察杂合度 H_o 为 0.7833,平均期望杂合度 H_e 为 0.85,且 Nei's 基因多样性 H 和香隆信息指数 I 均较高,表明广西食蟹猴猴群等位基因数多、杂合度大,遗传多样性丰富。分别对 3 个生产群(F、N 和 W)进行遗传多态性分析,3 个生产群杂合度 H 、多态信息含量 PIC、Nei's 基因多样性 H 和香隆信息指数 I 均较高,表明 3 个生产群亦存在较高的遗传多态性。3 个群体平均观察杂合度接近平均期望杂合度,Hardy—Weinberg 平衡检测每个生产群在 2~3 个位点处于不平衡外,多数位点处于 H-W 平衡, F —统计量 F_{is} 均值和 F_{it} 均值均较低,表明各群体受人工选择和近亲交配影响小,基本处于随机交配状态,3 家养殖公司开展的遗传繁育方式较合理。种群的基因多样性与群体来源的复杂程度、群体大小及繁育方式有着直接的关联,广西 F、N 和 W 3 家食蟹猴养殖公司食蟹猴基本以来源于越南、柬埔寨、缅甸和老挝等多个国家的野生群体为主,经过多次引种和本场育种形成,引种来源覆盖面广,且时间跨度大,存栏数量大,开展的遗传繁育方式较合理,故本次检测广西食蟹猴杂合度较高。皮道元等^[14]采用 11 个微卫星位点分析了广西引种回来的柬埔寨、越南和老挝食蟹猴群体的遗传多样性,共检测到平均等位基因数 N_a 为 11.82 个,平均有效等位基因 8.15 个,总群体期望杂合度为 0.8562。刘欢^[8]采用 18 个微卫星位点对我国广东、广西、云南和海南 4 省饲养的食蟹猴进行遗传多样性分析亦显示,广西群体平均观察杂合度分别为 0.6546、0.6299、0.6948,平均期望杂合度分别为 0.8390、0.8135、0.8326,与本研究杂合度相似。李瑞生等^[1]的研究结果亦表明食蟹猴个体间均呈现高度的多态性,基因多样性为 0.7832~0.8801,香隆信息指数为 1.5651~2.1592,且雌雄个体间无差异。

对 3 个生产群的群体间遗传关系分析可见,群体间的遗传分化系数 F_{st} 均值为 0.0402,依据 Wright^[15]建议,当 F_{st} 在 0~0.05 之间说明种群间遗传分化很小,0.05~0.15 之间中等遗传分化,0.15~0.25 之间遗传分化大,大于 0.25 遗传分化极大。本研究 3 个生产群间的遗传分化很小,平均 95.98% 的遗传变异存在于群体之内,只有 4.02% 的遗传变异存在于群体之间,群体内的遗传变异是主要的变异来源。群体间的遗传分化水平与基因流密切相关,Wright 认为若基因流 $N_m < 1$,有限的基因流是促

使群体发生遗传分化的主要原因,若 $Nm > 1$, 基因流能防止不同地区亚群体间发生遗传分化^[16]。本研究 Nm 均值为 5.9616, 群体间基因流动较频繁, 可防止群体间产生遗传分化。对 3 个生产群的遗传距离和亲缘关系分析亦可见, 3 个群体的遗传距离较小, 亲缘关系较近, F 群体和 N 群体遗传距离最近, 为 0.2556, 遗传相似度最高, 达 77.45%, N 群体和 W 群体的遗传距离最远, 为 0.3223, 遗传相似度为 72.45%。聚类分析也显示, F 群体和 N 群体先聚为一类, 再和 W 群体聚为一类, 符合 3 个繁殖猴场各自关联引种历史特征。刘欢^[6]对国内广西等 4 省笼养的食蟹猴进行遗传多样性研究, 结果亦表明广西群体遗传距离为 0.2126 ~ 0.3571, 遗传相似度为 69.97% ~ 80.85%, 与本研究相似。

本研究运用微卫星 DNA 标记技术有效分析了广西食蟹猴的遗传多态性和群体间的遗传关系, 为今后建立广西食蟹猴遗传背景资源库, 指导食蟹猴的生产繁殖, 建立遗传背景清楚的食蟹猴种群提供了理论依据。同时也为在广西建立食蟹猴微卫星 DNA 遗传质量监测奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] 李瑞生, 李晓娟, 高蓉, 等. 食蟹猴微卫星 DNA 标记遗传监测及多态性分析[J]. 中国比较医学杂志, 2011, **21**(8): 27-30.
- [2] 江鹏亮, 汤球, 余琛琳, 等. 非人灵长类动物模型在医学研究中的应用概况[J]. 实验动物科学, 2010, **27**(6): 59-64.
- [3] 高建峰, 滕利, 周立, 等. 恒河猴和食蟹猴在结核病研究中的应用进展[J]. 实验动物科学, 2014, **31**(6): 51-55.
- [4] 季芳, 饶军华, 刘晓明. 应用微卫星标记对海南和广西恒河猴遗传多样性的研究[J]. 实验动物科学与管理, 2006, **23**(2):

26-30.

- [5] 张卉, 李进华, 赵健元, 等. 皖南山区猕猴种群的形态特征与微卫星遗传多样性初步分析[J]. 实验动物与比较医学, 2008, **28**(4): 225-229.
- [6] 李瑞生, 赵爽, 高蓉, 等. 恒河猴与食蟹猴微卫星 DNA 多态性的比较分析[J]. 中国实验动物学报, 2009, **17**(1): 57-60.
- [7] 周建华, 李志雄, 杨燕燕, 等. 基于微卫星 DNA 标记分析福建猕猴与河南猕猴的遗传多样性[J]. 福建中医药, 2017, **48**(5): 30-34.
- [8] 刘欢. 我国笼养食蟹猴种群遗传多样性与亲子鉴定研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010: 1-43.
- [9] 瞿陆峰, 潘伟荣, 曾养志. 微卫星 DNA 标记及其应用[J]. 畜牧与饲料科学, 2010, **31**(4): 6-8.
- [10] Kikuchi T, Hara M, Terao K. Development of a microsatellite marker set applicable to genome-wide screening of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) [J]. Primates, 2007, **48**(2): 140-146.
- [11] Nikzad S, Tan S G, Yong S Y C, et al. Genetic diversity and population structure of long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*) populations in Peninsular Malaysia [J]. J Med Primatol, 2014, **43**(6): 433-444.
- [12] Smith D G, Ng J, George D, et al. A genetic comparison of two alleged subspecies of Philippine cynomolgus macaques [J]. Am J Phys Anthropol, 2014, **155**(1): 136-148.
- [13] 李芳芳, 魏杰, 王洪, 等. 应用微卫星标记对两个豚鼠封闭群的遗传学研究[J]. 中国比较医学杂志, 2014, **24**(12): 33-38+46.
- [14] 皮道元, 谢莉萍, 卢晟盛, 等. 利用微卫星标记分析 4 个食蟹猴群体的遗传多样性[J]. 中国兽医学报, 2011, **31**(3): 444-448.
- [15] Wright S. Evolution and the Genetics of Populations Variability within and among Natural Populations [M]. 1st edn. Chicago, University of Chicago Press, 1978, 395-486.
- [16] 曲若竹, 侯林, 吕红丽, 等. 群体遗传结构中的基因流[J]. 遗传, 2004, **26**(3): 377-382.

(下转至第 73 页)



电凝法制作 Balb/c 小鼠局灶性脑缺血模型的实验研究

张雪梅¹ 李兵¹ 陈立杰¹ 焦卓敏¹ 黄山¹ 尚宏²

(1. 哈尔滨医科大学附属第二医院神经内科, 哈尔滨 150086)

(2. 哈尔滨医科大学附属第四医院神经内科, 哈尔滨 150080)

摘要:目的 观察电凝法电凝小鼠大脑中动脉,引起大脑中动脉闭塞,建立小鼠脑缺血模型的可行性。方法 采用电凝法直接闭塞大脑中动脉(Middle cerebral artery, MCA)制作成年雄性 Balb/c 小鼠脑缺血模型(模型组, $n = 20$ 只);同时,同批次 Balb/c 小鼠经相同部位开颅,但不电凝闭塞大脑中动脉的小鼠作为假手术组(假手术组, $n = 20$ 只)。于术后第 24 h、72 h 采用神经功能缺损评分(modified neurological function severity score, mNSS)评估模型组及假手术组小鼠神经功能损伤情况。结果 术后第 24 h 取模型组 Balb/c 小鼠损伤区域脑组织切片,行苏木素-伊红染色,镜下显示缺血脑组织间质水肿,同时伴有空腔形成,局部脑组织结构变得疏松,且着色较淡,神经细胞数量明显减少,神经细胞胞体缩小,部分细胞轮廓欠清晰,可以见到不同程度的细胞变性坏死,核固缩,核仁消失现象。模型组在术后第 24 h 神经功能缺损评分明显低于假手术组($P < 0.05$),且这种差别可维持到术后第 72 h。结论 电凝法可以在 Balb/c 小鼠中成功制作小鼠局灶性脑缺血模型。

关键词:脑缺血模型; Balb/c 小鼠; 电凝法; 实验研究

中图分类号: R-33 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)03-0069-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.013

全球每年约有 9% 的死亡病例由脑卒中引起,而缺血性脑卒中的比例在其中约占 80%,其发病率仅次于缺血性心脏疾病。因此对缺血性脑卒中中进行有效防治具有重要的医学意义和社会贡献。现经临床证实唯一能缩小梗死体积、减轻神经损伤的治疗药物是重组组织型纤溶酶原激活物(recombinant tissue plasminogen activator, rt-PA),且其有效治疗时间窗只有 4.5 h,因而临床应用受到一定限制。其他药物如抗凝、应用神经保护剂等,都不能对受损脑组织产生修复作用。因此,卒中的治疗及预防成为当前神经科学研究的热点之一,特别是其发病机制、临床转归、新治疗手段等成为目前卒中的基础与临床研究的热点科学问题。在基础研究中如何简便,快速地建立卒中的动物模型成为一个较为棘手的问题。Balb/c 小鼠是白变种实验室老鼠,与众多常用亚系一样,起源于小家鼠 *Mus musculus*。Balb/c 小鼠的遗传背景为近交系,因而它们之间的个体差异较小,遗传基因更纯,整体素质更好。如果能够在

Balb/c 小鼠中成功地复制出卒中模型将为卒中的研究提供较好的动物模型。为此,本课题组拟采用电凝方法,通过阻断大脑中动脉(middle cerebral artery occlusion, MCAO)的血流来成功复制 Balb/c 小鼠的局灶性脑缺血模型。为下一步进行脑缺血发病过程中脑保护、神经修复及发病机制等后续研究提供新的实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

健康成年雄性 Balb/c 小鼠 40 只,体质量 22~25 g/只(哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心提供),动物质量合格证号:SCXK-(黑)2013-001,实验中对动物处置均符合中华人民共和国科学技术部 2016 年发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[1]。实验过程中对动物的处置符合动物伦理学标准。

收稿日期:2018-12-03

* 基金项目:黑龙江省教育厅科学技术研究项目(No. 12511259)

作者简介:张雪梅(1976—),女,副主任医师、副教授,研究方向:神经发育与再生,阿尔兹海默病,脑血管病. E-mail: zxmjsz198@126.com

通信作者:张雪梅(1976—),女,副主任医师、副教授,研究方向:神经发育与再生,阿尔兹海默病,脑血管病. E-mail: zxmjsz198@126.com

主要试剂与仪器:2% 氯化三苯四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride, TTC),显微镜(BX41, Olympus, Japan)。

1.2 实验方法

1.2.1 小鼠大脑中动脉闭塞(MCAO)模型的制作:步骤同以往实验方法^[2],小鼠适应性喂养1周,术前12 h 禁食不禁水,称重后用10%的水合氯醛按450 mg/kg 腹腔麻醉小鼠,保持小鼠麻醉1.5~2.0 h,将小鼠侧卧固定于无菌手术台上,术中应用保温毯保持小鼠直肠温度在36.5~37.5℃。于小鼠左侧眼裂至左耳外耳道之间切口,剥离颞肌,于梨状骨与下颌骨交汇点向头侧1 mm,背侧3.5 mm 处用电钻钻一个直径为1.0~2.0 mm 的小孔。剥离硬脑膜暴露大脑中动脉,用电凝刀电凝阻断大脑中动脉近端以确保持久的破坏,然后用牙科粘合剂封闭小孔,缝合切口。术后将小鼠置于27~28℃恒温箱中饲养。

1.2.2 模型制作成功评价方法采用Longa的5级4分法标准^[3]:0分:无神经功能缺损症状;1分:轻度局灶性神经功能缺损,即提尾不能伸展右侧前爪;2分:中度局灶性神经功能缺损,即行走向右侧转圈;3分:重度局灶性神经功能缺损,即行走困难,并向右侧侧倒;4分:不能自发行走,意识水平下降。手术后神经功能评分为1~3分的小鼠入选本次研究。术后第2天随机取2只小鼠,1只取出脑组织放入切脑模具中,间隔2.0 mm 连续冠状切片,再将脑片放入含2%氯化三苯四氮唑(2,3,5-Triphenyltetrazolium Chloride, TTC)的磷酸盐缓冲液中(PBS, pH=7.4),37℃恒温避光孵育30 min 后可见正常组织呈粉红色,梗死灶呈白色。另1只小鼠取缺血区域脑组织进行切片,经HE染色确定缺血情况。

1.2.3 神经功能损伤评分:小鼠的神经功能损伤情况采用神经系统疾病严重程度评分(mNSS)进行评估^[4]。实验前按评分方法对小鼠进行一定的训练,选取评分为0分的正常小鼠,造模后24 h、72 h 采用双盲法分别进行mNSS评分评估各组动物神经功能损伤状况。mNSS包括运动试验和平衡木试验,根据所能完成任务的分值统计得分。mNSS总分为12分,评分越高表明神经功能损伤越严重。

1.2.4 实验脑组织的提取:10%的水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠,迅速开胸暴露心脏,行主动脉插管,剪开右心耳为灌注液流出口,在10~20 min 内经左心

室用37℃生理盐水200 mL 快速冲洗,然后用4%多聚甲醛/0.01 mol/L 磷酸盐缓冲液(4℃, pH=7.4)300 mL 灌注固定,40 min 内灌注完,迅速断头取脑,放入4%的多聚甲醛固定液,在4℃环境中放置24 h。然后将脑组织进行冲洗、脱水、透明、浸蜡、包埋,以前囟为起始,切成等厚(15 μm)冠状切面脑片,每10张取1张进行HE染色。染色后显微镜下观察组织形态学变化。

1.3 统计方法

采用SPSS12.0进行统计学处理,神经功能缺损平分结果以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 χ^2 检验分析, $P<0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 MCAO 模型评估

MCAO 术后小鼠出现右侧前肢屈曲内收,前进不能,向右绕圈,站立不稳,平衡能力明显减弱,表明造模成功。

2.2 小鼠脑缺血区组织病理学检测

术后24 h 小鼠脑组织切片TTC染色,假手术组织染成粉红色,未见梗死灶(见图1,H-L),模型组左侧大脑皮质梗死灶呈白色(见图1,C-G),显示手术半球明显缺血。取小鼠损伤区域脑组织切片行HE染色以确定损伤情况(见图1,M-O),结果显示梗死病灶及周围组织结构变得疏松,间质水肿伴随空腔形成,且着色较浅,神经细胞数量明显减少,胞体皱缩,部分细胞轮廓欠清,有程度不等的神经细胞变性坏死,核固缩,核仁消失现象。证实脑缺血模型制作成功。

2.3 行为学观察结果

如表1所示,局灶性脑缺血后存活动物均有不同程度的神经功能缺损。随着存活时间的延长,神经功能在短时间内并没有得到恢复。模型组在术后第24 h 神经功能缺损评分明显高于假手术组,且这种差别可维持到术后第72 h ($P<0.05$)。

表1 电凝法对小鼠MCAO后神经学评分
Table 1 Evaluate the Neurological Scores of MCAO Mice using the Electrocoagulation Method

组别	假手术组		模型组	
时间	24 h	72 h	24 h	72 h
评分	2.35±0.14	1.98±0.18	10.35±0.21	10.22±0.16

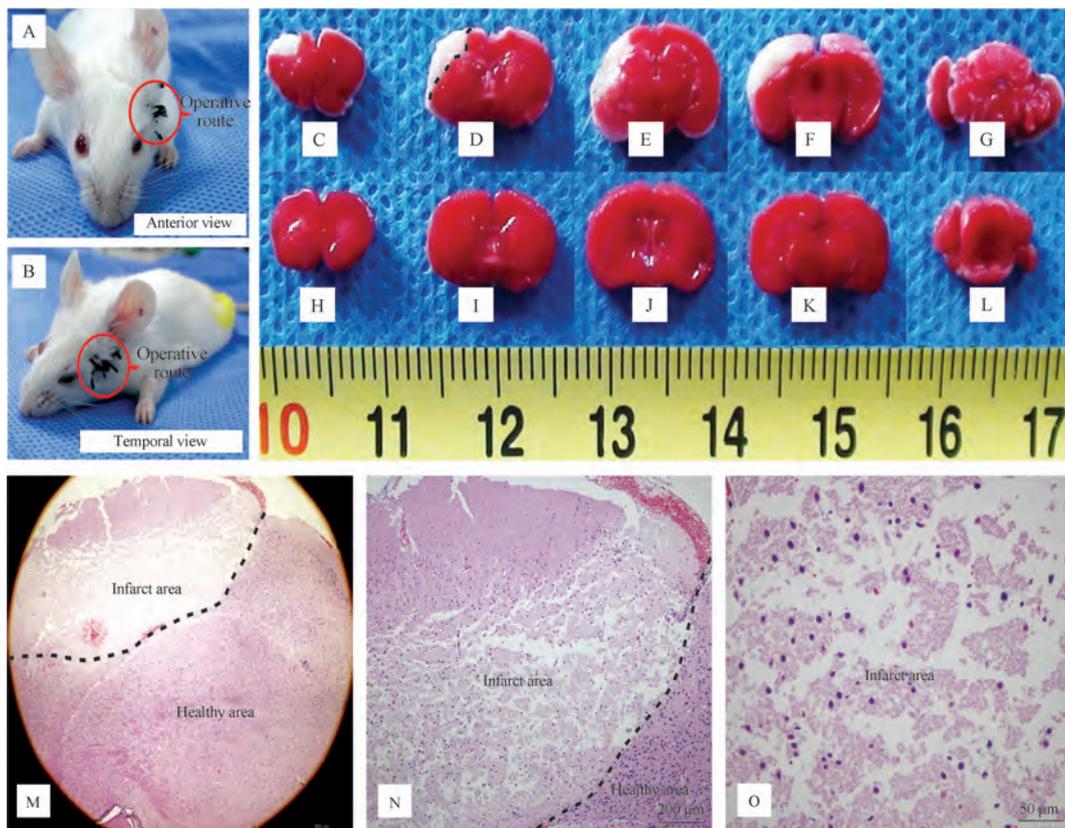


图 1 小鼠脑缺血区组织病理学检测

注:A-B,活体观察;C-L,TTC染色;M-O,HE×10

Fig.1 Histopathological examination of cerebral ischemic tissue in rats

Note:A-B, somatoscopy; C-L, TTC staining; M-O, HE×10

3 讨论

在发达国家,随着人口的逐步老龄化,卒中成为发病率和死亡率都较高的疾病之一。缺血性卒中是由于脑血管(主要为大脑中动脉)或其分支的血栓性或栓子性阻塞所致,约占所有类型卒中的80%^[5]。药物或是机械再灌注治疗是缺血性发作急性期最有效的治疗方法,其中50%~70%患者都有很好的愈后。然而因为治疗时间窗短等各种严格的限制,这些治疗方法仅适用于不到10%的患者中^[6]。卒中的治疗及预防成为当前神经科学研究的热点之一,特别是其发病机制、临床转归、新治疗手段等成为目前卒中的基础与临床研究的热点科学问题。而建立一种可靠的模拟人类缺血性脑血管病的实验动物模型对脑缺血的发病机制研究至关重要。

在各项研究中,鼠实验性急性脑缺血模型使用

最为广泛^[7],其中大脑中动脉阻塞(MCAO)模型是目前最常用的模拟人类缺血缺氧性脑病的实验动物模型。目前较为常用的方法有Tamura等在1981^[8]年提出的电凝法和Longa等^[9]于1989年提出的线栓法,其他方法还有光化学法^[10],微栓子栓塞法^[11]等。目前线栓法是应用最多的造模方法^[12],但是其缺点是模型之间梗死面积差异较大,均一性较低,梗死面积大,死亡率高^[9]。电凝法也是应用较多的一种造模方法,它具有均一性高,术后死亡率低,模型存活时间较长等优点^[8]。

目前MCAO模型的制备多采用大鼠,但是随着脑缺血研究逐步向基因领域的延伸,并鉴于大多数转基因实验动物来源于小鼠,因此迫切需要建立一种小鼠的局灶性脑缺血模型,以便于在基因水平进行脑缺血损伤的病理生理改变的机制,预后及药物治疗作用的研究。但由于小鼠颈总动脉较细,线栓插入困难,模型制作成功率低,小鼠死亡率高。我们采用开颅机械闭塞大脑中动脉法在直视下操作准确

可靠,与人类缺血性卒中的病理改变较为接近,即 MCA 阻断而侧支循环尚存,受累脑组织包括严重缺血的中心区(梗塞灶)、缺血受损伤的周围区(半暗带)及接近正常的外围带,梗死模型成功率较高,梗死范围稳定,梗死效果较好,动物存活时间长。

因此本研究采用小鼠,小鼠体质量差异小,并且电凝法建立小鼠 MCAO 缺血模型操作简便,手术时间短,提高了模型制作的成功率,减少了术后动物死亡率,提高了模型制作的稳定性,缩短了模型制作的操作时间。为系统地研究脑缺血的病理生理及观察药物的治疗作用提供了一个较接近临床的、重现性好、可控的脑缺血模型。

脑组织厚片 TTC 染色是研究脑缺血梗死灶常用的染色方法。TTC 与完整的线粒体氧化酶系反应,诱发产生深红色产物而使正常组织染色;缺血组织的线粒体损伤^[13],不能诱导染色反应而呈白色,容易鉴别,因此我们采用此方法来观察脑组织梗死灶。术后 24 h 小鼠脑组织切片 TTC 染色,可见大脑皮质梗死灶呈白色,手术半球明显缺血。由于卒中引起的脑损伤通常与运动、感觉和认知功能受损等相关,很多实验室的研究集中于评估与动物模型的脑缺血相关的认知和行为学改变。到目前为止,没有单一的一种评价标准被普遍承认,大多数研究室都采用多种不同的评价标准来评价缺血效果。多种神经行为学评分系统被用于评价神经功能障碍的严重程度^[14-15]。在本研究中,我们采用的神经行为学观察性评分指标包括运动试验和平衡木试验,对小鼠总体神经行为学评分的分析显示,缺血损伤可明显增加缺血后小鼠的神经行为学评分。此结果与 TTC 染色和镜下病理组织变化结果相一致。

以上结果提示,我们采用的电凝法可以在 Balb/c 小鼠中成功制作小鼠局灶性脑缺血模型。

参 考 文 献

[1] 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意

- 见(2006),306052006025,北京:科学出版社.2006-09-30
- [2] Mutsuki K T F. Direct experimental middle cerebral artery induces high reproducibility of brain ischemia in mice[J]. *Exp Anim*,2009,**58**(1): 19-29.
- [3] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989,**20**(1): 84-91.
- [4] Mahmood A L D, Wang L. Treatment of traumatic brain injury in female rats with intravenous administration of bone marrow stromal cells[J]. *Neurosurgery*,2001,**49**: 1196-1204.
- [5] Warlow C P. Epidemiology of stroke [J]. *Lancet*, 1998, **352** (Suppl3): SIII1-SIII4.
- [6] Tomsick T A, Khatri P, Jovin T, *et al.* Equipoise among recanalization strategies [J]. *Neurology*, 2010, **74** (13): 1069-1076.
- [7] 杨慧,董小黎. 脑缺血动物模型研究进展[J]. *实验动物科学*, 2007, **24**(1):38-40.
- [8] Tamura A, Graham D I, McCulloch J, *et al.* Focal cerebral ischaemia in the rat: 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion [J]. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism Official Journal of the International Society of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 1981, **1**(1):53-60.
- [9] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. *Stroke*, 1989, **20**(1):84-91.
- [10] 杨渊,郭瑞友,张苏明,等. 光化学诱导老年大鼠局灶性脑梗塞模型的研究[J]. *中国老年学杂志*,2001,**21**(1): 35-38.
- [11] 郑冲. 局灶性脑缺血动物模型制作方法的概述[J]. *中国卒中杂志*,2008,**3**(8): 603-607.
- [12] 翟小虎,王斌,宋亚刚,等. 线栓法制备大鼠脑缺血模型的研究进展与思路[J]. *实验动物科学*, 2015, **32**(5):55-58.
- [13] Anderson M F, Sims N R. Mitochondrial respiratory function and cell death in focal cerebral ischemia[J]. *J Neurochem*, 1999, **73** (3):1189-1199.
- [14] Corbett D N. The problem of assessing effective neuroprotection in experimental cerebral ischemia[J]. *Prog Neurobiol*, 1998, **54**: 531-548.
- [15] DeVries A C, Nelson R J, Traystman R J, *et al.* Cognitive and behavioral assessment in experimental stroke research will improve useful [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2001, **25**(4): 325-342.

The Establishment of Cerebral Ischemia Model by Electrocoagulation in Balb/c Mice

ZHANG Xuemei¹, LI Bing¹, CHEN Lijie¹, JIAO Zhuomin¹, HUANG Shan¹, SHANG Hong²

(1. Department of Neurology, Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

(2. Department of Neurology, Forth Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150080, China)

Abstract: Objective To investigate the feasibility of establishment of focal cerebral ischemia model in Balb/c mice by electrocoagulation. **Method** The model of mice about focal cerebral ischemia was mimicked with direct MCA occlusion. Forty adult male Balb/c mice were randomized into experimental group and control group. Twenty-four hours and 72 hours after middle cerebral artery occlusion, the neurological function was evaluated according to the modified neurological function severity score (mNSS). **Result** At 24 hours, the neurological function scores in the experimental group were decreased compared with control group, the difference could sustain to 72 hours later. Specifically, in the experimental group we can find the interstitial edema, cavitation, partly architecture become rarefaction, the number of nerve cells was decreased, the pigmentation of nerve cells was fairly tasteless, and the cell degeneration, karyopyknosis, nucleoli abolition could be found in ischemia brain tissues. **Conclusion** Modified electrocoagulation method mimicked with direct MCA occlusion can help us establish focal cerebral ischemia model in experimental research.

Key words: Ischemic brain injury; Balb/c mice; electrocoagulation approach; experimental research

(上接第 68 页)

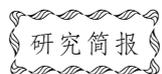
Genetic Study of Guangxi *Macaca fascicularis* Using Microsatellite DNA Markers

ZHANG Jiehong, QIN Huiyan, LI Bin, YANG Hui, WANG Fang, CHEN Huafeng

(Guangxi Autonomous Regional Center for Disease Control and Prevention, Guangxi, Nanning 530028, China)

Abstract: Objective To genetic monitoring of Guangxi *Macaca fascicularis* from different breeding groups, and analyze their genetic background, provide basic information for establishing the genetic quality monitoring method and population repository of Guangxi *Macaca fascicularis*. **Method** Twenty microsatellite DNA markers and capillary electrophoresis were adopted to genetic detect Guangxi *Macaca fascicularis* from three different breeding groups, and the genetic variation parameters within and between populations were calculated. **Result** A total of 237 alleles were detected in the Guangxi *Macaca fascicularis*, the observed allelic number was ranging from 5 to 19, with a mean of 11.85. The mean expected heterozygosity was 0.85, and the mean polymorphism information content was 0.817. In the three different breeding groups (F, N and W), respectively, 158, 158 and 173 alleles were detected, the mean expected heterozygosity was 0.8371, 0.8318 and 0.8642, and the mean polymorphism information content was 0.7692, 0.7653 and 0.8001. The three breeding groups showed the high genetic diversity. The Hardy-Weinberg equilibrium test for 3 breeding groups showed that most loci were in H-W equilibrium. Respectively, the average F_{is} , F_{it} , F_{st} of all loci was 0.0235, 0.0628, 0.0402, the index of gene flow was 5.9616, which implied that 3 breeding groups was nearly under the random mating system and had low genetic differentiation. The genetic distance was ranging from 0.2556 to 0.3223, the genetic similarity was 0.7245 to 0.7745. Cluster analysis showed that F population first clustered with N population, after that clustered with W population, it is conformed to their historical introduction. **Conclusion** The study effectively analyzed the genetic diversity and genetic relationship of Guangxi *Macaca fascicularis*, and the 20 microsatellite DNA markers selected in this study could be used to detect genetic quality of *Macaca fascicularis*.

Key words: *Macaca fascicularis*; Microsatellite DNA markers; Genetic monitoring



探讨药物 GLP 机构致癌试验中啮齿类动物的临床检查

李春令¹ 刘增祥¹ 刘金鑫² 孙昌华²

(1.山东省医疗器械产品质量检验中心,济南 250101)(2.山东省食品药品检验研究院,济南 250101)

摘要: 致癌性试验主要用于评价新药潜在的致癌性风险,是药物 GLP 机构安全性评价的重要内容之一。致癌试验的实验周期较长,动物的临床检查是整个试验的一项重要内容,临床检查结果为动物人道终点、临床病理学检测、组织病理学检查提供直接参考依据,本文总结并归纳了 2 年来大鼠背景数据的临床检查经验,探讨在致癌试验中的应用,以便于为检验人员提供更加全面的动物信息。

关键词: GLP;致癌试验;临床检查

中图分类号: R73 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0074-03

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.014

随着我国医药工业的迅猛发展,药物研发状况也由之前的仿制性研究逐步过渡为创新性研究。尤其是随着我国重大新药创制专项的实施,新增加的需要评价的药物数量呈逐年递增趋势,愈来愈多的创新药物需要进行致癌风险的评价^[1]。致癌性试验是创新药物安全性评价和上市风险控制的重要组成部分。新药上市申请时通常需要提供必要的完整的动物致癌性试验结果^[2]。在国际上,ICH、EMA、FDA 等药物管理机构已经制定并实施了相关指南^[3]。2007 年国家食品药品监督管理局发布实施的《药品注册管理办法》中,规定“致突变试验结果为阳性”的化合物需要进行致癌性试验^[4]。2010 年 4 月国家食品药品监督管理局又颁布了《药物致癌试验必要性》的指导原则,明确规定预期长期使用的药物需要进行啮齿类动物致癌试验^[5]。在药物非临床研究领域,综合实力较强的 GLP 机构均已申报或现已开展致癌性试验。致癌性试验周期长,花费高,试验设计和结果比较复杂^[6],使用动物数量多,对研究人员业务能力要求高。试验周期通常情况下应进行为期 2 年的终生暴露,中短期致癌试验期限一般均<1 年(通常为 3~6 个月)^[1]。在致癌实验的动物(尤其是大鼠)选择中,针对不同的药物可以更好地更合理地挑选动物品种、品系和性别(如果需要)^[7]。致癌试验进行半年后开始出现体表肿

块,试验进行 1 年后动物自发死亡率明显升高^[8]。所以详细的临床检查显得尤为重要,每周至少一次,记录可见、可触肿物的生长情况及动物出现的临床体征,其检查结果为动物人道终点、临床病理学检测、组织病理学检查提供直接参考依据,现总结并归纳了 2 年来大鼠背景数据的临床检查方法,探讨其在致癌试验中的应用。

临床检查法是为诊断的目的而应用于临床实际的各种检查方法^[9]。基本的临床检查方法主要包括:问诊及一般称为物理检查法的视诊、触诊、叩诊、听诊和嗅诊。动物临床检查之前主要是对病畜进行客观的观察与检查,主要应用于大动物。随着生命科学、医药产业的快速发展,临床检查也逐步应用于被称为“活的试剂”、“活的精密仪器”的实验动物,实验动物与大动物的临床检查相比较各不相同,具有其自身的特点。

1 问诊

问诊是临床检查的第一步,通过问诊可获得第一手资料,对其他诊断具有指导意义^[10]。利用知识与经验进行一系列有目的、有重点的询问,通过询问饲养员及相关实验人员了解和掌握动物的日常管理情况,动物的饮食、饮水情况以及更换垫料时动物的

收稿日期:2018-10-11

作者简介:李春令(1982—),女,兽医硕士,畜牧师,研究方向:医疗器械生物学安全性评价.E-mail:20015676@163.com

通信作者:孙昌华(1984—),男,兽医博士,兽医师,研究方向:食品药品安全性评价.E-mail:sunchanghuavip@163.com

精神状态、粪便、尿液等情况,以便进行下一步有针对性的检查。

2 视诊

视诊是检查者用视觉直接观察动物群体和个体的整体概况或局部表现的诊断方法,也称为望诊。视诊是临床诊断中最简单、最易行的首选方法,经常可以搜集到很重要的症状和资料^[9]。视诊的适应范围包括群体检查和个体检查^[10]。啮齿类动物的群体检查通常选择隔笼观察法,检查者进入饲养室后,在安静的状态下观察每笼动物的整体状态,被毛状态,精神及体态、姿势与运动、行为。个体检查通常与触诊等检查相结合进行。尽管视诊是临床检查中最简单易行的方法,但它需要检查者熟悉动物的生物学特性,同时要具有丰富的医学知识和临床经验,否则会出现视而不见的情况。

3 触诊

触诊是检查者通过触觉及实体感觉进行检查的一种方法。即检查者用手触摸按压动物体的相应部位,判定病变的位置、大小、形状、硬度、湿度、温度及按压敏感性等,以推断疾病的部位和性质^[10]。触诊的适用范围广,可遍及动物躯体各个部位。在致癌试验过程中动物半年后便开始出现体表肿物,所以触诊成为主要的临床检查方法。

3.1 触诊方法

触诊的方法分为浅部触诊和深部触诊等^[9-13]。

3.1.1 浅部触诊:辅助人员将动物从笼内取出放置于检查台后,首先观察动物的精神及被毛状态,然后将动物保定,检查者按照从头至尾的顺序抚摸躯体,主要检查体表的温湿度、皮肤弹性、浅表淋巴结、局部肿物位置、肿物大小、肿物软硬程度及敏感性。

3.1.2 深部触诊:深部触诊时辅助人员将动物呈仰卧姿势保定,主要检查腹腔内脏器及腹部的肿物,因实验动物个体较小,所以触诊时动作要轻柔,当检查到某部位敏感性时,应本着先健区后病区,先周围后中心,先轻触后重触的原则进行,并注意与对应部位或健区进行比较。深部触诊通常分为:按压触诊、切入触诊和冲击触诊。其中,按压触诊适用于检查实验动物胸腹壁的敏感性及腹腔器官与内容物的性状;切入触诊、冲击触诊适用于大动物的临床检查。

触诊虽然是一种常用、简便的方法,但要做到判断准确,也须经过长时间的锻炼。显然,触诊也并不单纯是用手去摸,而必须是同时手、脑并用,做到边触诊边思索。有句口诀总结的好,“触诊方法常用到,手脑并用细琢磨;体表光滑无肿物,温凉润燥手感觉”^[14]。

3.2 触感分类

3.2.1 捏粉感(面团感):感觉稍柔软,如按压生面团,指压留痕,除去压迫后慢慢复平,常见于皮下水肿,表明皮下组织内有浆液浸润。

3.2.2 波动感:柔软而有弹性,指压不留痕,进行间歇性压迫时有波动感。常见于血肿、组织液外渗、脓肿等。

3.2.3 坚实感:感觉质地致密,硬度如肝。见于组织发生细胞浸润或结缔组织增生。

3.2.4 硬固感:感觉组织坚硬如骨。见于骨瘤等。

3.2.5 气肿感:感觉柔软而有弹性,并随触压而有气体向邻近组织传动感,同时可听到捻发音。多为皮下气肿的特征。

4 叩诊

叩诊是用手指或器械对动物体表进行叩击,使之振动而产生音响,根据振动和声响的特点,来判断被检部位的脏器状态有无异常的一种检查方法。声音现象是叩诊的理论基础。动物的各个器官、组织有不同程度的弹性,当叩诊时可产生不同性质的音响。叩诊通常分为直接叩诊法和间接叩诊法,结合触诊实验动物常使用直接叩诊法来检查腹部是否可见胃肠鼓气。

5 听诊

听诊是借助听诊器或直接用耳朵听取机体内脏器官活动过程中发出的自然或病理性声音,再根据声音的性质特点,判断其有无病理改变的一种方法。听诊的方法可分为直接听诊法和间接听诊法,因听诊多适用于大动物,故较小实验动物较少使用。

6 嗅诊

嗅诊是用嗅觉发现、辨别动物的呼出气体、口腔臭味、排泄物及病理性分泌物异常气味与疾病之间

关系的一种检查方法^[10]。异常气味大都来自皮肤、黏膜、呼吸道、胃肠道、泌尿生殖道呕吐物、排泄物或脓液等。实验动物经常用嗅诊检查的主要有呼出气体、粪便、尿液、脓液味等。嗅诊通常情况下会结合动物更换垫料时或与视诊、触诊等临床检查进行。

动物临床检查过程中,物理检查法(视诊、触诊、叩诊、听诊和嗅诊)是用检查者的视觉、触觉、听觉和嗅觉器官去感知外界现象的。感觉器官的灵敏程度是不同的,人们感官精确程度的顺序是视觉,触觉,听觉,嗅觉和味觉,因此,视诊是最可靠的检查方法,触诊次之,而依靠听觉的叩诊和听诊则更次之。临床检查过程中应详细记录每只动物的临床状态,如有异常应结合上次检查进行仔细比较分析,及时汇报给实验专题负责人及相关实验人员。总结动物的临床检查方法,有个口诀概括的更为全面,即“临床检查方法多,摸问视听叩常做;粪尿气味用鼻闻,六大方法莫记错;先整体后个别,系统检查加思索;大小症状均罗列,蛛丝马迹莫放过”^[14]。

目前我国新药创制能力不断增强,如何更好地进行致癌性研究评价是我们面临的紧迫性课题。我国 GLP 机构起步较晚,与国外先进水平存在一定差距,但是在国内管理机构及毒理学家的共同努力下,相信与国外的差距会越来越小,并逐步实现与国际接轨。

参考文献

[1] 高羚喻,吴纯启,廖明阳,等.药物中、短期致癌试验的研究进

展[J].中南药学,2011,9(3):231-233.

- [2] ICH, S1A: The need for long-term rodent carcinogenicity studies of pharmaceuticals [EB/OL]. (1995-11-29). <http://www.ich.org>.
- [3] 王庆利,王海学,冯毅等.我国药物致癌试验必要性技术指导原则及相关技术问题[J].中国新药杂志,2010,19(17):1508-1511.
- [4] 国家食品药品监督管理局.药品注册管理办法[EB/OL].(2007-07-10). <http://www.sfda.gov.cn>.
- [5] 国家食品药品监督管理局.药物致癌试验的技术指导原则[EB/OL].(2010-04-01). <http://www.sfda.gov.cn>.
- [6] 王海学,王庆利,彭健,等.国际上新药致癌性试验技术要求介绍[J].药物评价研究,2010,33(5):329-331.
- [7] 黄明珠,富欣.有关开展致癌试验的现状[J].中国药理学与毒理学杂志,2013,27(3):590.
- [8] 张晶璇,崔艳君,王爱平,等.新药致癌性实验研究实施体会[J].中国药理学与毒理学杂志,2013,27(3):582-583.
- [9] 陆承平.兽医硕士专业学位兽医基础知识全国统一(联合)考试大纲及复习指南[M].北京:中国农业大学出版社,2004:316-323.
- [10] 执业兽医资格考试应试指南(下册)[M].中国兽医协会.北京:中国农业出版社,2010:891-898.
- [11] 李国江.动物普通病[M].北京:中国农业出版社,2001,8:10-13.
- [12] 刘伟亮,张彦军.家畜临床检查的基本方法[J].养殖技术顾问,2013,(12):104.
- [13] 徐世文.兽医临床诊疗基础[M].北京:中国农业出版社,2012,3:3-10.
- [14] 谷撑贤.兽医临床检查歌[J].畜牧兽医杂志,2011,30(5):36.

Explore GLP Institutions Cancer Trials Rodents in Clinical Examination

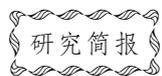
LI Chunling¹, LIU Zengxiang¹, LIU Jinxin², SUN Changhua²

(1.Shandong Quality Inspection Center For Medical Devices, Jinan 250101, China)

(2.Shandong Institute for Food and Drug Control, Jinan 250101, China)

Abstract: The carcinogenic test is mainly used to evaluate the potential carcinogenic risk, and it is one of the important contents of the safety evaluation of the drug GLP mechanism. The cycle of carcinogenicity test is very long, and the animal clinical examination involved is an important part of the whole test, and the clinical examination result provide a direct reference for animal humane endpoint, clinical pathology examination, histopathological examination. Thus, we summarized two years of the experience about the rat background data, and explored the application in cancer experiment, so that the experimentalists can get a more comprehensive animal information.

Key words: GLP; carcinogenicity test; clinical examination



屏障动物房书虱爆发、处置与风险评估

张金梅 康 康 陈国元 张笑瑞 唐 蔚 朱怡琴 吴宝金

(中国科学院上海生物化学与细胞生物学研究所动物实验技术平台, 上海 200031)

摘要:书虱属啮虫目虱科昆虫,是粮仓、图书馆及家居生活中较常见的一类昆虫,较少出现在实验动物屏障环境中。本单位在屏障动物房 IVC 排风管道中发现书虱爆发,经采取管道清洗、敌敌畏消杀及降低湿度等措施,控制了书虱爆发,清除了病原威胁。本文对书虱爆发的经过、处置方法及效果进行了介绍,并对书虱的来源、处置方法的选择及书虱对实验动物屏障设施的潜在风险进行了探讨。

关键词:书虱;屏障设施;独立通风笼具(IVC);敌敌畏

中图分类号: Q969.98 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0077-04

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.015

书虱属啮虫目虱科昆虫,是粮仓、图书馆及家居生活中较常见的一类害虫,国内有 20 余种,以嗜卷书虱和嗜虫书虱最多见,两者均身体扁平、个体微小(约 1 mm),外部形态极其相似,喜欢生活在温暖潮湿的环境中。书虱生活史因种属及环境温湿度不同而有较大差异,在条件适合时可快速繁殖而造成危害。书虱以饲料粉尘为食,不吸食动物血液,对动物的直接威胁不大,但其本身是多种病原微生物的媒介^[1-3]。书虱的存在会引起工作人员的心理不适,书虱尸体碎屑也是常见的过敏原^[3-4]。以上几方面原因,决定了书虱不可在屏障环境中存在。国外学者零星介绍过书虱可能出现在屏障动物房内^[5],而国内则未见类似报道,书虱问题尚未引起实验动物从业者的关注。

近年来,随着独立通风笼具(individual ventilated cages, IVC)的普及,屏障加 IVC 已经逐步取代屏障加开放笼架而成为大小鼠饲养的普遍模式,但 IVC 本身存在一些无法避免的结构缺陷,比如通风管道长、内部死角多,回风管道内饲料粉尘残留、湿度较大等,这些运行特征为书虱的快速繁殖创造了条件,并成为威胁实验动物及从业人员健康的潜在因素之一。我单位屏障动物设施五年来一直维持在 SPF 级别,此次书虱爆发,规模较大,给动物房

管理工作带来了新的考验。现将我单位书虱爆发,处置过程介绍如下,希引起广大同行的重视。

1 书虱爆发及处置过程

2017 年 8 月中旬,本部门工作人员在例行更换 IVC 排风过滤网时,发现 IVC 主机的粉尘收集盒及排风连接管中出现活体小虫,约 1 mm 大小,经过分类学鉴定,确认此种小虫为书虱(见图 1)。随后对整个设施进行了详细排查,发现该屏障内的每个饲养间都不同程度出现了书虱。该屏障内 8 个饲养间共 27 台 IVC 设备中,13 台设备的书虱数量较多,其中 4 台的书虱数量在 5 000 头以上;另外 14 台设备的书虱数量较少,其中 11 台的数量在 100 头以下,3 台未发现。书虱出现的位置集中在 IVC 设备的排风管、排风过滤网、粉尘收集盒等处,动物体表及笼盒内未发现。书虱数量与粉尘集聚程度相关,书虱数量较少或没有发现书虱的 14 台设备,其粉尘集聚的程度比较轻微,而书虱数量较多的 13 台设备,均表现出较为严重的粉尘集聚情况。

平台管理人员综合考虑了书虱的生物特性、屏障环境正常运行需求及 IVC 设备的特点,在保证小鼠安全的前提下,采取了药物喷洒灭虫、IVC 笼具清

收稿日期:2018-09-19

* 基金项目:中国科学院模式与特色实验动物平台建设项目

作者简介:张金梅(1976—),女,实验师,研究方向:实验动物饲养管理.E-mail: jmzhang01@sibcb.ac.cn

通信作者:吴宝金(1969—),男,教授,研究方向:人类疾病动物模型与小鼠遗传学.E-mail: baojin.wu@sibcb.ac.cn



图 1 书虱

注:左为光镜照片,右为扫描电镜图片

Fig.1 psocids

Note: The left picture of psocids is under light microscopy, and the right one is a scanning electron microscopic image

洗及降低湿度等措施。(1)药物杀灭:针对 IVC 排风管道及屏障环境采取了不同的方法。针对 IVC 排风管道的消杀处理,使用 1:200 的敌敌畏,现配现用。操作过程中不关闭 IVC 主机,保证饲养间内无杀虫剂气味,不影响在养动物。将所有笼架的排风管由上端盲端用注射器注入 1.25 mL/管,总排风管盲端注入 5 mL/管,粉尘收集盒注入 1 mL/个,排风过滤网经药物浸泡后使用,以上工作每周 2 次,持续 3 周。针对屏障内外环境的消杀处理,采用双甲脞(12.5%原液 1:500 稀释),对屏障内外喷洒药液,每日 1 次,持续 3 周;随后针对屏障外区域每周 1 次,持续 3 个月,屏障内不再处理。(2)IVC 笼架及主机的清洗:在进行药物杀灭的同时,以房间为单位,将笼架和主机逐一拆洗并更换。对笼架和主机进行除尘、清洗、杀虫、充分晾干、熏蒸消毒后重新启用;对所有可以进行高温高压灭菌的 IVC 配件如进风嘴、排风嘴、排风过滤网等,经清洗、晾干、高压灭菌后传入屏障;27 台笼架在 10 d 内完成一轮清洗。对于清洗后启用的笼架及主机,同样进行药物消杀处理。(3)降低湿度:房间湿度由 60%~70% 调整为 40%~50%,但经过笼盒后的 IVC 排风管内空气的湿度仍接近 60%。该方法是否能有效抑制书虱生长尚不清楚。

在实施上述处理措施后,我们详细观察了书虱数量的变化。对未清洗的笼架,在第一次使用敌敌畏消杀 3 d 后仍可观察到少量活体书虱存在,但数量大大减少,每个笼架都在 50 头以下;在第二次用

药后,只发现有零星活体书虱。在 10 d 后完成第一轮 IVC 清洗时,敌敌畏消杀已经进行了 3 次,此后再未发现书虱。

2 讨论分析

2.1 书虱的来源

由于书虱在同一时间同一个屏障内大面积发现,而不是局限在某台 IVC 设备或者某个饲养间,我们判断这次爆发应该是 1 个系统性工作漏洞,而不是个别员工或实验人员操作带进的污染。据笔者分析,有 3 个途径可导致书虱出现在屏障内:(1)辐照饲料质量不合格。饲料的辐照处理具有直接使用、操作方便、营养成分保存较好等优势逐渐取代高压灭菌处理的方法,但饲料在生产、仓储和运输过程中很容易被原料及环境中的书虱污染,如果某批次饲料的辐照时间、剂量不达标或者包装不严密,就可能将书虱带入屏障动物房内。(2)IVC 排风过滤网处理措施不彻底。该屏障的过滤网每两周清洗更换一次,在屏障外用自来水洗刷后,经 5% 过氧乙酸浸泡,再用紫外灯杀菌、风淋、晾干备用。由于反复使用,有可能将屏障环境外的书虱带入。我单位已将清洗后的过滤网通过高压灭菌方式引入屏障。(3)上海夏秋季节的气温及湿度普遍偏高,书虱也较活跃,自屏障外爬入也存在可能。相对于细菌病毒等病原体,防范有移动能力的虫体更加困难,故对屏障周围环境的消杀处理需引起重视。

2.2 处置依据

书虱对杀虫剂具有一定的抵抗能力,且在实施喷洒的过程中会出现死角,导致无法利用药物彻底灭杀书虱,一旦条件有利,仍然可能会造成书虱的再次爆发。对爆发书虱的笼架进行清洗,不仅去除了书虱赖以生存的饲料粉尘,还可以去除绝大部分虫体及虫卵。只有同时进行清洗及消杀的笼架才能彻底杀灭虫体。

多种药物对书虱均有杀灭作用,本次使用两种不同类型的药物,一种是针对环境消杀使用了双甲脒,该种药物气味低,对动物的影响小,可用于对动物的药浴^[6-7]。另外一种是针对 IVC 排风管道的消杀,采用了强效药物敌敌畏。根据程伟霞等的研究,嗜卷书虱和嗜虫书虱对有机磷类杀虫剂(敌敌畏、毒死蜱、对氧磷)和氨基甲酸酯类杀虫剂(丁硫克百威)敏感性研究显示,敌敌畏是首选药物^[8-9]。在使用过程中,我们首先进行了试验性杀虫,由于药物注入 IVC 排风管中,挥发性气味随 IVC 笼盒内空气排出屏障系统,饲养间无味道,动物未受影响。

书虱最适宜的生存条件是 25~30℃ 及 70%~80% 的相对湿度,但书虱种类不同、环境温度及湿度差异会影响生活史的长短。据报道,在 32℃、75% RH,书虱的卵期约为 5 d,在 25℃、53% RH 条件下,卵的孵化期为 11.9 d,而在 30℃、76% RH 条件下,孵化期为 7.6 d^[2]。我们将药物消杀过程设计为 3 周,主要的考虑因素是虫卵对敌敌畏的抵抗力较虫体强,3 周时间可保证所有虫卵孵化并被杀灭。因书虱对湿度敏感,相对湿度低于 60% 可抑制群体生长繁殖,我们也采取了降低湿度的措施,但此方法效果有限,仅可作为辅助措施。

2.3 书虱的潜在威胁及风险评估

书虱是粉食性生物,在传统的平板架饲养方式时,即使发生书虱入侵,由于笼盒与饲料的定期更换、平板架的定期清洁,没有饲料粉尘堆积的条件,这导致书虱因食物匮乏而无法长期生存,不具备大规模繁殖爆发的条件。但是 IVC 设备的工作原理与结构特点决定了粉尘不可避免地聚集在排风管道中,这就为书虱的爆发式繁殖创造了条件。通过这次事件的警示,我们计划将笼架清洗周期由半年调整为三个月,尤其是夏季开始前的六月底,确保对所有 IVC 笼架及管道进行一次清理;同时,防止饲料

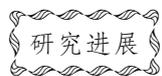
粉尘进入 IVC 设备排风管道的措施需要得到重视,国内有单位在笼盒的排风口增加过滤网,可以有效减少饲料、垫料粉尘进入排风管道,这一装置值得推广。

国外学者注意到书虱偶尔在屏障动物房出现的问题^[4]。据笔者所知,数年前,某科研机构运行不久的屏障动物房 IVC 管道中出现过书虱爆发。尽管书虱本身对动物不致病,但是书虱是一个能自由活动的载体,可以携带多种病原,如绿脓杆菌、金黄色葡萄球菌等环境菌,这对动物房病原微生物的控制是巨大的威胁。对粮食仓储单位而言,书虱是工作人员最重要的过敏原之一,这一问题对实验动物工作者同样重要。书虱的出现不仅仅会造成工作人员的心理不适,更是屏障动物房管理工作缺陷的表现。本单位屏障环境管理严格,运行 5 年仍保持 SPF 级别,如此严格管理的屏障系统却发生了书虱爆发的情况,这一教训应该引起广大从业人员的重视。

参考文献

- [1] 李志红. 中国虱啮属昆虫分类学研究[S]. 北京, 中国农业大学:1994.
- [2] 祁正亚, 阙岳辉, 黄晓霞. 书虱的特性及储粮中的防治策略[J]. 粮食储藏, 2014, (5): 28-32.
- [3] 丁伟, 赵志模, 王进军. 储粮环境中书虱猖獗发生的因子分析[J]. 粮食储藏, 2003, (3): 12-17.
- [4] Clemmons E A, Taylor D K. Booklice (*Liposcelis* spp.), Grain Mites (*Acarussiro*), and Flour Beetles (*Tribolium* spp.): 'Other Pests' Occasionally Found in Laboratory Animal Facilities[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(6): 737-743.
- [5] Stejskal V 1, Hubert J. Risk of occupational allergy to stored grain arthropods and false pest-risk perception in Czech grain stores[J]. Ann Agric Environ Med, 2008, 15(1): 29-35.
- [6] 何绍江, 罗锦定, 蒋进明. 双甲脒对鸡虱的防治试验[J]. 四川畜牧兽医, 1993, 2: 16.
- [7] 闫宝珠, 杨景梅, 张庆余, 等. 双甲脒乳油治疗犬疥螨病试验[J]. 中国兽医杂志, 1996, 3: 30.
- [8] 劳传忠, 刘芳芳, 洗庆, 等. 几种杀虫剂对嗜虫书虱的触杀作用[J]. 昆虫天敌, 2007, 29(1): 16-20.
- [9] 程伟霞, 王进军, 赵志模, 等. 四种杀虫剂对两种书虱羧酸酯酶和乙酰胆碱酯酶的抑制作用[J]. 动物学研究, 2004, 25(4): 321-326.

(下转至第 85 页)



抑郁症动物模型的研究进展*

苗茸茸 曲显俊

(首都医科大学基础医学院药理系,北京 100069)

摘要:近年来,抑郁症的发病率不断上升,但是抑郁症的病理生理学机制仍有许多未知之处。抑郁动物模型可以模拟人类抑郁症的临床症状且这些症状可被有效的药物逆转,这对于抑郁症的发病机制及抗抑郁药物研发、临床疗效评价都有着重要的应用价值。目前,常见的抑郁动物模型主要通过给予应激、手术、药物、改造基因来构建。本文综合近年来国内外文献对于常用抑郁动物模型的建立方法和评价体系进行分析总结,以期对抑郁症的相关研究提供参考。

关键词:抑郁症;动物模型;发病机制

中图分类号: R749 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0080-06

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.016

抑郁症是一种常见的精神情志障碍性疾病,其典型的症状主要包括情绪低落、思维迟缓、兴趣减退、饮食睡眠障碍、认知功能损害以及其他各种躯体性症状^[1]。近年来抑郁症的发病率不断升高,并且已成为常见影响人类身心健康的疾病之一。世界卫生组织曾指出,抑郁症将在2020年成为全球仅次于心脏病的第二大疾病^[2]。尽管形势如此严重,迄今我们对于抑郁症的病因以及发病机制并未完全了解。所以,虽然单胺类药物的发现从根本上改变了抑郁症治疗方法,然而临床研究发现,目前的一线抗抑郁药物对抑郁症患者的治疗效果并不理想^[3],而且起效至少需要几周甚至几个月的时间,这就迫切地需要研究人员发现抑郁症新的发病机制并研发出起效更快,疗效更好的药物,而这些均需要建立在基础研究中的更加理想的抑郁动物模型上。然而,目前并没有一个抑郁动物模型能够包括人类所有抑郁的特点。因此,我们需要对现有的抑郁动物模型进行分类和评价,以期对相关研究者提供有用信息。目前,常见的抑郁动物模型主要通过给予应激、手术、药物、基因敲入或敲除来构建,本文将按照上述分类方式,综合近年来国内外文献对常用的抑郁症动物模型的建立方法以及认知学评价方法进行分析

总结和评价。

1 实验动物

目前用于构建抑郁症动物模型的动物主要包括天生对应激敏感的Wistar Kyoto (WKY)大鼠^[4]、具有遗传抑郁的Flinder Resistant Line (FSL)大鼠^[5]、Sprague dawley (SD)大鼠^[6]、天生嗜酒的Fawn-Hooded (FH)大鼠^[7]、脑内5-羟色胺受体活力低下的Tryon Maze Dull (TMD)大鼠、小鼠^[8]、灵长类动物^[9]、小鸡等。在理想情况下,一个恰当的人类抑郁症的动物模型应该尽量满足以下两个条件:第一点是病理生理学现象与人类抑郁症尽可能高度相似,第二点是与人类抑郁症类似的发病原因和治疗方法相关^[10]。

2 抑郁症动物模型的分类及评价

2.1 应激造模

引起人类抑郁症的主要因素之一就是应激,且由应激引起的抑郁症可以被一线临床抗抑郁药物所逆转,所以通过人为给予应激来制作抑郁症模型是

收稿日期:2018-10-19

* 基金项目:国家自然科学基金(No. 81373436)

作者简介:苗茸茸(1995—),女,本科,研究方向:结肠癌、抑郁症研究.E-mail:13552338873@163.com

通信作者:曲显俊(1961—),男,博士,教授,研究方向:结肠癌研究.E-mail:quxj@cemu.edu.cn

目前常用的主要方法之一,其主要包括以下几种方法:

2.1.1 习得性无助模型:最初由 Seligman 和 Maier 提出的习得性无助模型目前多用于研究抑郁症的病理生理学机制以及筛选抗抑郁药物,这是众多抑郁症病理生理学理论概念的来源^[11]。习得性无助模型是指将动物暴露在无法控制且无法预测的应激(如噪声)后导致动物在之后的学习活动行为欠缺,包括自发性活动减少、逃避行为障碍等,与此同时,模型动物还将出现一些如体质量减轻、食欲减退、攻击性降低、运动性活动减少等行为改变^[12],而这些活动行为欠缺可以被抗抑郁药物所逆转,这些特点与人类抑郁症状相似,因此习得性无助抑郁模型是一个很好的模型^[13]。研究表明,习得性无助动物模型体内的血清素转运点和大脑前叶的谷氨神经递质系统发生了改变^[14],细胞内信号通路也发生了异常变化。此外,对习得性无助抑郁动物的前额皮层以及海马区的突触体进行蛋白质组学分析发现,这些位点的能量代谢以及细胞重建都发生了异常^[15]。Zhou 等^[16]经过代谢组学分析发现习得性抑郁模型动物体内的谷氨酸盐、半胱氨酸,蛋氨酸,精氨酸、脯氨酸的代谢以及脂代谢、糖代谢都发生了紊乱,这可能是另一种抑郁症的发病机制,但仍需进一步确证。

2.1.2 行为绝望模型:行为绝望模型是指将动物置于一定的环境之中,直至动物出现绝望状态,主要包括大小鼠强迫游泳模型(forced swimming test, FST)和小鼠悬尾模型(tail suspension test, TST),二者均为经典的抗抑郁药筛选、评价模型,具有敏感度高、操作简单、时间相对较短的特点。

2.1.2.1 大、小鼠强迫游泳模型:将大鼠或小鼠放置在盛水的透明玻璃或树脂缸中,动物会在水里不断挣扎并试图逃脱,多次逃逸失败后便放弃挣扎漂浮在水面上,表现为不动的姿势,此时即为绝望状态^[17]。此方法经济方便、操作简单、可信度高,是多数抗抑郁药物初筛的首要方法之一。但实际上抑郁症是慢性病,强迫游泳模型是利用急性应激使得动物具有抑郁样作用,所以该模型无法完全模拟人类的抑郁症,再者,该实验除了受到操作者主观判断影响外,还会受到水温、水深、周围环境以及动物品系的影响,所以会有一定的假阳性及假阴性结果,实验人员要加以区分和判断。

2.1.2.2 小鼠悬尾模型:在实验过程中,从尾巴处将实验动物吊起,使其悬挂于半空,动物为了克服非

正常体位不断挣扎,经过多次无效的挣扎后,小鼠会表现为间断性不动的“绝望”状态^[18]。TST 是与 FST 相似的经典实验,但 FST 由于将小鼠置于水中可能会引起小鼠体温过低等身体状况的改变从而影响实验结果。然而,由于大鼠的体型、体质量等因素难以控制,TST 仅适用于小鼠。

2.1.3 社会心理应激模型:一般来说,抑郁症多是由于患者对于社会应激产生不良反应所导致的,当人类长期多次暴露在过多的压力或创伤事件后,就可能会产生自我评价降低、社会功能下降、焦虑、寂寞、以及其他抑郁症状。基于以上发病原因,目前主要有三种动物模型:早期应激-孤养抑郁模型、群居社会模型和社会失败应激模型。

2.1.3.1 早期应激-孤养抑郁模型:临床研究发现,如果在出生早期将幼儿与母亲分离会导致幼儿罹患抑郁症,早期应激-孤养抑郁模型便基于此原理^[19]。目前常用的实验方法包括将群养小鸡孤养、分离灵长类动物的幼崽与母亲,分离配对的仓鼠、分养群居大鼠等,这些方法可以作为由社会交往减少或异常导致孤独感增加,从而诱发抑郁障碍的动物模型^[20]。前期研究发现,当幼儿与母亲分离后,会出现玩耍时间减少、面部悲伤、抑郁样蜷缩等行为^[21],动物的神经内分泌会有显著的变化且可持续数月^[22],这些症状可被抗抑郁药物所逆转,也就证明了孤养模型的可靠性,但是这种由于早年剥夺母爱而导致的幼儿抑郁样症状的具体机制尚不明确,仍需进一步确证。

2.1.3.2 社会失败应激模型:社会失败应激模型是指将动物反复多次的暴露于另一更强壮的有侵略性的同种动物之下从而导致实验动物出现快感缺失、情绪低落等症状^[23]。Rose 等人发现若将天生好斗的蟋蟀与另一更好斗的同类同笼,当它在 48 h 内被连续打败五次后,间隔 24 h,再次将它与体型相近的蟋蟀同笼,该蟋蟀在接下来超过 24 h 的时间内都表现出斗争消极状态^[24],这些表现与人类的抑郁症状有许多相似之处。

2.1.3.3 群居社会模型:群居社会模型是利用一个更具侵略性的同种动物对整个和谐稳定的群体产生社会压力,从而导致这些动物长期的行为和精神社会学的改变。

2.1.4 慢性不可预知温和性模型(chronic unpredictable mild stress, CUMS):该模型是指在一定的时间段将实验动物连续暴露于多种不可预测的温

和性刺激下(如光照、隔离、剥夺食物或者水、噪声等),从而更好地模拟实际生活中抑郁症的发病环境,制造出在长期慢性低水平刺激下所构建的抑郁模型。该模型可靠性强,与人类抑郁症状拟合度高,效果可持续数月,在抗抑郁药物的治疗下抑郁症状可缓解,最重要的是治疗的时间进程及效果都与临床治疗情形相似,所以 CUMS 对于研究抗抑郁药的药效机制及抑郁症的病理生理学机制具有一定的应用价值。但是由于该模型耗时长、工作量巨大,使得其应用受到了一定的限制。目前的研究表明,长期给予实验动物慢性不可预知温和性刺激会导致动物出现兴趣减退、活动减少、好奇心降低等抑郁样症状。Schmelting 等^[25]研究发现,CUMS 模型动物的夜间体温较对照组有所升高,Pechlivanova 等^[26]的研究结果也表明,在高架十字迷宫实验中,CUMS 模型动物的焦虑指数与体温也较对照组有所升高,而且实验动物体温升高的现象可被抗抑郁药物地昔帕明逆转,由此认为实验动物的体温升高与焦虑指数是一致的。目前 CUMS 模型应用较多,且有很多的优化模型可供选择,信欣等^[27]将慢性轻度不可预知应激与孤养动物模型相结合,在建模 28 d 后即可观察到小鼠的正常水平活动与垂直活动都有所减少,且此症状至少可以维持到建模结束的 35 d 时,而且氟西汀可以有效缓解该症状,此模型可以根据研究目标药物的可能作用机制、药物起效快慢或疗程来确定 CUMS 周期和适宜的给药时间。

2.2 手术造模

2.2.1 嗅球切除 (olfactory bulbectomized, OB) 模型:最常用的手术造模方法即为嗅球切除模型法。嗅球位于端脑前端,与边缘系统的相关功能有关,可以影响情绪、行为和内分泌。去除大鼠双侧嗅球会使其产生复杂的行为、神经化学、神经内分泌和免疫系统的改变,主要表现在其被动回避学习能力下降,应激反应和攻击行为增强,强迫游泳实验中静止时间延长,这些症状可被长期应用抗抑郁药所纠正,这与抑郁患者身上观察到的现象一样^[28],所以也是模拟人类抑郁症很有效的一种模型,但是 OB 模型对实验室条件、操作人员技术、操作时间要求较高,目前常用于探索细胞因子介导的免疫反应对抑郁症患者神经系统发生的影响^[29]。Depeciuch 和 Parlinska-Wojtan^[30]发现双侧嗅球切除导致大鼠嗅觉缺失可能会导致不可逆的磷脂结构损伤从而导致抑郁的发生。在 2017 年,Yurtasa 等^[31]发现大鼠双侧嗅球切

除后虽然有明显的行为、神经以及神经内分泌方面的变化,但是抗抑郁药物氟西汀却不能逆转手术造成的海马区域的损伤。因此,他认为 OB 模型并不适用于抗抑郁药物的药理学活性筛选。

2.2.2 卒中后抑郁 (post-stroke depression, PSD) 模型:卒中后抑郁模型目前应用较少,张高才和徐兴顺^[32]联合大脑中动脉阻塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 和空间行为限制建立了卒中后抑郁动物模型,即用 60 min 缺血辅以 7 d 的空间限制后,小鼠的活动明显减少,神经功能恢复变慢,体质量减少,脑源性神经生长因子以及 5-HT、DA 的含量明显降低,而血清中皮质醇的含量则明显增加。实验结果表明,实验组小鼠的 HPA 轴系统被激活,而这些抑郁症状均可被丙米嗪逆转,符合抑郁模型的标准。该模型理想地模拟了临床卒中病人由于肢体瘫痪行动受限所导致的抑郁状态,为卒中后抑郁症的病理学机制研究和临床治疗提供了基础。

2.3 药物诱导造模

此类模型是基于临床观察到的药物之间的相互作用而产生的,主要用于筛选针对专一靶点的抗抑郁药。这类模型主要基于抑郁症的单胺假说而构建,如长期给予糖皮质激素可以导致大鼠活动减少、糖水偏好程度降低、海马脑区,尤其是 DG 区 BDNF 表达量降低,从而构建出理想的抑郁大鼠模型^[33]。利血平、去甲肾上腺素等药物也可用于抑郁动物造模,如 Leith 和 Barrett^[34]发现利血平可以非选择性地耗竭脑内的单胺类神经递质,从而诱导啮齿类动物体温下降及运动不能症状。Khadrawy 等^[35]利用利血平构建了小鼠的抑郁模型,并且尼古丁可以通过影响小鼠皮质和海马的单胺类神经递质从而发挥其抗抑郁作用。除此之外,精神兴奋剂的戒断模型也会诱发抑郁样的改变,使得啮齿类动物在强迫游泳实验及悬尾实验中不动时间延长^[36]。但是,由于药物造成的动物抑郁模型与人类抑郁症的发生机制之间存在一定的差距,故而限制了其广泛应用。

2.4 遗传型造模

抑郁具有一定的遗传倾向,Levinson 等分析认为 40%~50% 的抑郁风险是由基因决定的,而且目前研究已经发现多个潜在遗传位点,因此,利用转基因技术对可能相关基因进行敲入或者敲除建立转基因抑郁动物模型对于研究基因位点相关的抑郁发生具有重要意义。目前相关抑郁动物模型主要有以下几种:

2.4.1 Flinder Sensitive Line (FSL) 大鼠模型: Overstreet 和 Wegener^[37] 最初研究 FSL 大鼠模型,但是后来发现该模型动物表现出快动眼睡眠延长,并且在游泳测试中不动时间延长,且这些行为可以被抗抑郁药物所逆转,Overstreet 和 Wegener 发现抗抑郁治疗 14 d 后,FSL 大鼠出现抗抑郁药样行为。FSL 大鼠很显著的一个特征是对很多种药理机制不同的药物都非常敏感。因此 FSL 大鼠可以作为抑郁症的基因动物模型。

2.4.2 Wistar-Kyoto(WKY)大鼠模型: WKY 大鼠模型本来是用于构建原发性高血压动物模型,但是由于其在造模期间表现出一些行为学、神经内分泌等抑郁样现象,故而也用作抑郁动物模型的构建。Nam 等^[38] 发现该模型动物在强迫游泳实验中的不动时间延长,活动减少,HPA 轴功能亢进血清皮质醇含量增多,前额叶皮质及中缝背核的五羟色胺水平异常^[39],脑与血清的 BDNF 含量较低^[40] 等现象,故也用于抑郁动物模型。

2.4.3 糖皮质激素受体基因突变小鼠模型: 近年来有科学家发现,下丘脑-垂体-肾上腺(HPA)轴的功能障碍(高或低活性)在重度抑郁发展中发挥突出作用,主要涉及三个因子:神经肽促肾上腺皮质激素释放因子(corticotropin-releasing factor, CRF)及其下游靶标 5-羟色胺和去甲肾上腺素^[41]。Chadi 等构建了能够模拟神经内分泌紊乱的动物模型,并以此来揭示应激反应增加或减少的机制。结果表明,高反应性,中反应性和低反应性小鼠之间 HPA 轴的反应性有显著差异。此外,这些差异在所有后代中都有发现,并且可以通过选择性育种来增加,这表明了各自表型的遗传基础。除此之外,在应激情况下高反应性的小鼠出现坐立不安、烦躁、糖皮质激素浓度升高等现象,且观察到的焦虑有关行为,探索性驱动,运动活动和抑郁样行为均与人类的抑郁症状相似,因此这种小鼠可以用来构建抑郁症动物模型^[42]。

3 小结

综上所述,抑郁动物模型的建立对于抑郁发病机制以及抗抑郁药物研发、临床评价都有着重要的作用。然而目前还并没有一个动物模型能够完全涵盖所有的抑郁症状,因此,可以联用多种造模方法以建立较为全面、与人类抑郁症状更为相似的动物模型,从而提高实验结果的可信度。一方面,我们应该

掌握不同模型动物的特点,从而选择出最适合自己的课题的模型动物;另一方面,我们还应该继续研究新的抑郁模型,以构建出更为完善的研究工具,为未来完全理解抑郁发病机制以及尽快提高抗抑郁药物研发水平提供更有价值信息。

参考文献

- [1] Kupfer D J, Frank E, Phillips M L. Major depressive disorder: new clinical, neurobiological, and treatment perspectives [J]. *Lancet*, 2012, **379**: 1045-1055.
- [2] Global Burden of Disease Study 2013 Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 301 acute and chronic diseases and injuries in 188 countries, 1990-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*, 2015, **386**: 743-800.
- [3] Trivedi M H, Rush A J, Wisniewski S R, *et al.* Evaluation of outcomes with citalopram for depression using measurement based care in STA R * D: implications for clinical practice [J]. *Am J Psychiatry*, 2006, **163**: 28-40.
- [4] Malkesman O, Weller A. Two different putative genetic models of childhood depression-a review [J]. *Prog Neurobiol*, 2009, **88**: 153-169.
- [5] Overstreet D H, Wegener G. The flinders sensitive line rat model of depression-25 years and still producing [J]. *Pharmacological Reviews*, 2013, **65**: 143-155.
- [6] 徐旺芳, 姜劲峰. 尾静脉放血对 CUMS 模型大鼠行为学和海马 NOS 变化的影响 [D]. 南京: 南京中医药大学针灸推拿学系, 2016.
- [7] Pettinati H M. Antidepressant treatment of co-occurring depression and alcohol dependence [J]. *Biol Psychiatry*, 2004, **56**: 785-792.
- [8] McGirr A, LeDue J, Chan A W, *et al.* Cortical functional hyperconnectivity in a mouse model of depression and selective network effects of ketamine [J]. *Brain*, 2017, **140** (8): 2210-2225.
- [9] 郑琼飞, 尹勇, 秦冬冬, 等. 非人灵长类抑郁模型研究进展 [J]. *Medical Recapitulate*, 2017, **23**: 3415-3423.
- [10] 严华成, 曹雄, Manas Das, 等. 抑郁症动物模型的研究进展 (英文) [J]. *Neuroscience Bulletin*, 2010, **4**: 327-337.
- [11] Seligman M E, Maier S F. Failure to escape traumatic shock. [J]. *J Exp Psychol*, 1967, **74** (1): 1-9.
- [12] Pryce C R, Azzinnari D, Spinelli S, *et al.* Helplessness: a systematic translational review of theory and evidence for its relevance to understanding and treating depression [J]. *Pharmacol Ther*, 2011, **132**: 242-267.
- [13] Ho Y C, Wang S. Adult neurogenesis is reduced in the dorsal hippocampus of rats displaying learned helplessness behavior [J]. *Neuroscience*, 2010, **171**: 153-161.

- [14] Muneoka K, Shirayama Y, Horio M, *et al.* Differential levels of brain amino acids in rat models presenting learned helplessness or non-learned helplessness [J]. *Psychopharmacology*, 2013, **229**: 63-71.
- [15] Mallei A, Giambelli R, Gass P, *et al.* Synaptoproteomics of learned helpless rats involve energy metabolism and cellular remodeling pathways in depressive-like behavior and antidepressant response [J]. *Neuropharmacology*, 2011, **60**: 1243-1253.
- [16] Zhou X Y, Liu L X, Zhang Y P, *et al.* Metabolomics identifies perturbations in amino acid metabolism in the prefrontal cortex of the learned helplessness rat model of depression [J]. *Neuroscience*, 2017, **343**: 1-9.
- [17] 杨福中, 施慎逊. 强迫游泳实验研究应用及进展 [J]. *上海精神医学*, 2009, **3**: 188-190
- [18] Cryan J F, Mombereau C, Vassout A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: review of pharmacological and genetic studies in mice [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, **29**: 571-625.
- [19] 王雀良, 潘集阳, 刘亚平, 等. 抑郁症动物模型的回顾与展望 [J]. *广东医学*, 2011, **32**(7): 932-935.
- [20] 郑金炽, 林贤浩. 慢性应激动物模型研究进展 [J]. *四川精神卫生*, 2010, **23**(2): 131-133.
- [21] Henn F A, Vollmayr B. Stress models of depression: Forming genetically vulnerable strains [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, **29**: 799-804
- [22] Maalkesman O, Maayan R, Weizman A, *et al.* Aggressive behavior and HPA axis hormones after social isolation in adult rats of two different genetic animal model for depression [J]. *Behav Brain Res*, 2006, **175**: 408-414.
- [23] Donahue R J, Muschamp J W, Russo S J, *et al.* Effects of striatal Δ FosB overexpression and ketamine on social defeat stress induced anhedonia in mice [J]. *Biol Psychiatry*, 2014, **76**: 550-558.
- [24] Rose J, Rillich J, Stevenson P A. Chronic social defeat induces long-term behavioral depression of aggressive motivation in an invertebrate model system [J]. *PLOS one*, 2017, **12**(9): e0184121.
- [25] Schmelting B, Corbach-Sohle S, Kohlhaue S, *et al.* Agomelatine in the tree shrew model of depression: effects on stress-induced nocturnal hyperthermia and hormonal status [J]. *Eur Neuropsychopharmacol*, 2014, **24**(3): 437-447.
- [26] Pechlivanova D M, Tchekalarova J D, *et al.* Effect of long-term caffeine administration on depressive-like behavior in rats exposed to chronic unpredictable stress [J]. *Behav Pharmacol*, 2012, **23**: 339-347.
- [27] 信欣, 韦彩川, 毕文鹏, 等. 慢性应激刺激对抑郁模型小鼠构建的行为学研究 [J]. *Journal of Medical Science Yanbian University*, 2017, **40**: 92-96.
- [28] Yuan T F, Slotnick B M. Roles of olfactory system dysfunction in depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 2014, **54**: 26-30.
- [29] Song C, Wang H. Cytokines mediated inflammation and decreased neurogenesis in animal models of depression [J]. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, *Brain Research Bulletin*, 2011, **35**(3): 760-768.
- [30] Depciuch J, Parlinska-Wojtan M. Qualitative and quantitative changes in phospholipids and proteins investigated by spectroscopic techniques in olfactory bulbectomized animal depression model [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, **148**: 24-31.
- [31] Yurttas C, Schmitz C, Turgut M *et al.* The olfactory bulbectomized rat model is not an appropriate model for studying depression based on morphological/stereological studies of the hippocampus [J]. *Brain Res Bull*, 2017, **134**: 128-135.
- [32] 张高才, 徐兴顺. 卒中后抑郁小鼠模型的建立及评价 [D]. 苏州: 苏州大学附属第二医院神经病学系, 2016.
- [33] 薛楠, 张策, 李建国. 抑郁模型大鼠海马区神经元 BDNF 基因选择性转录的研究 [D]. 太原: 山西医科大学基础医学院神经生物学系, 2016.
- [34] Leith N J, Barrett R J. Effects of chronic amphetamine or reserpine on self-stimulation responding: animal model of depression [J]. *Psychopharmacology (Berl)*, 1980, **72**: 9-15.
- [35] Khadrawy Y A, El-Shamy K A, Mohamed S I. Nicotine restores monoamine neurotransmitter changes in the cortex and hippocampus of reserpinized rats as a model of depression [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2011, **15**: 863-870.
- [36] Barr A M, Markou A. Psychostimulant withdrawal as an inducing condition in animal models of depression [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2005, **29**: 675-706.
- [37] Overstreet D H, Wegener G. The flinders sensitive line rat model of depression-25 years and still producing [J]. *Pharmacological Reviews*, 2013, **65**: 143-155.
- [38] Nam H, Clinton S M, Jackson N L, *et al.* Learned helplessness and social avoidance in the Wistar-Kyoto rat [J]. *Front Behav Neurosci*, 2014, **8**: 109.
- [39] Jacobsen J P, Medvedev I O, Caron M G. The 5-HT deficiency theory of depression: perspectives from a naturalistic 5-HT deficiency model, the tryptophan hydroxylase 2Arg 439His knock-in mouse [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2012, **367**: 2444-2459.
- [40] Kyeremanteng C, James J, Mackay J, *et al.* A study of brain and serum brain-derived neurotrophic factor protein in Wistar and Wistar-Kyoto rat strains after electroconvulsive stimulus [J]. *Pharmacopsychiatry*, 2012, **45**: 244-249.
- [41] Bale T L. Stress sensitivity and the development of affective disorders [J]. *Horm Behav*, 2006, **50**: 529-533.
- [42] Touma C, Bunck M, Glasl L, *et al.* Mice selected for high versus low stress reactivity: a new animal model for affective disorders [J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2008, **33**: 839-862.

Research Progress in Animal Models of Depression

MIAO Rongrong, QU Xianjun

(*Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China*)

Abstract: Recently, the incidence of depression has been gradually increasing. However, the pathogenesis of it hasn't been fully clarified. Animal models can mimic the clinical symptoms of depression in human beings, thus they are widely used for studies of the pathogenesis of depression, as well as in research and development of new antidepressants. We usually establish animal models by giving stress, surgery, drugs, and genetic modification. In this article, we summarize currently most used animal models so as to provide the opinion for future use in basic and clinical research.

Key words: Depression; animal model; pathogenesis

(上接第 79 页)

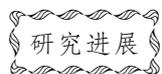
Outbreak, Disposal and Risk Assessment of Psocids in Animal Barrier Facility

ZHANG Jinmei, KANG Kang, CHEN Guoyuan, ZHANG Xiaorui, TANG Wei, ZHU Yiqin, WU Baojin

(*Animal Core Facility of Shanghai Institute of Biochemistry and Cell Biology, CAS, Shanghai 200031, China*)

Abstract: As one of the Corrodentia Liposcelididae *Liposcelis* insects, psocids is a common kind of insects often appearing in granary, library and home, and less found in experimental animal barrier environment. The psocids was observed in the IVC exhaust pipeline of the barrier animal facility in our institute. The threat was then controlled by means of IVC pipeline cleaning, dichlorvos disinfection and reducing humidity of barrier environment. In this paper, we present the onset process of psocids, several measures to eliminate psocids and their effects. The possible routes of psocids transmission, the reason or basis of disposal method, and the potential risks caused by psocids to a laboratory animal barrier facility are discussed also.

Key words: psocids; animal barrier facility; independent ventilation cages(IVC); dichlorvos



结直肠癌肝转移动物模型研究进展*

乔大伟^{1,2} 李玉芳^{1,2} 李胜男^{1,2} 肖云^{1,2} 姜礼双^{1,2} 孔桂美¹ 卜平^{1,2,3}

(1. 扬州大学医学院,扬州 225001)(2. 江苏省中西医结合老年病重点防治实验室,扬州 225001)

(3. 江苏省苏北人民医院消化内科,扬州 225001)

摘要:肝脏是结直肠癌转移最主要的靶器官,结直肠癌肝转移也是结直肠癌患者死亡的主要原因。目前,结直肠癌肝转移动物模型构建的方法主要包括原位种植模型,用于研究结直肠癌发生肝转移过程及其相关机制;异位种植模型,用于评价各种治疗方案;异种植模型,用于对患者个体化治疗方案的筛选;转基因动物模型用于准确地引导患者进行靶向治疗。

关键词:结直肠癌;结直肠癌肝转移;动物模型

中图分类号: R735.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)03-0086-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.03.017

结直肠癌(colorectal cancer, CRC)是全球第三大癌症和癌症死亡的第四大原因^[1]。近年来我国结直肠癌发病率和死亡率呈逐步上升趋势,结直肠恶性肿瘤在肿瘤发病率中占据第5位^[2]。肝脏是CRC最常见的远处转移部位,结直肠癌肝转移(colorectal cancer liver metastases, CRLM)严重影响CRC预后。约15%~25%CRC病人在确诊时即合并有肝转移,另有15%~25%病人在行CRC原发灶根治术后发生肝转移,其中80%~90%肝转移灶无法获得根治性切除。且只有15%~20% CRLM患者适合手术切除,术后5年存活率仅为20%~40%。因此选择合适的CRLM动物模型,对研究CRC发生发展及肝转移的机制及正确评价各种治疗方案的疗效,提供与临床应用相关的证据等有重要作用。现将CRLM动物模型的构建方法综述如下。

1 原位种植模型

CRC的原位种植模型根据植入的位置分为原位盲肠种植模型和原位直肠种植模型。

1.1 原位盲肠种植模型

原位盲肠种植模型包括癌细胞直接种植、直接

缝合原位植入、盲肠接种OB医用胶粘贴法、盲肠造瘘原位接种法及结肠造口移植法等。Goodwin和Huang^[3]通过盲肠壁植入CT-26 FL3细胞建立原位CRLM模型,来评估药物的抗癌功效,发现此种造模方法具有高侵袭性和高转移性。Tao等^[4]通过原位盲肠植入HCT-116细胞,建立原位盲肠种植模型,研究胃肠安(WCA)和5-氟尿嘧啶(5-FU)对肠癌和肝转移的影响。结果单独WCA治疗降低转移率(50%vs 100%, $P<0.05$)。WCA+5-FU联合治疗最有效,转移率(40%vs 100%, $P<0.01$)。表明WCA与5-FU联合治疗会显著抑制结肠肿瘤生长和肝转移。癌细胞直接种植盲肠,与临床CRC血道和淋巴播散过程相近;直接缝合比较方便,能够从整体上观察CRC成瘤及转移的情况,该模型是一种研究CRC发展及转移的可靠、有效的观察模型;盲肠接种OB医用胶粘贴,癌组织和肠壁的吻合度较直接缝合先进,应用前景大;盲肠造瘘接种法操作简单,成功率高,受其他脏器及肿瘤细胞影响较小,此法较少缝合到肠壁血管,避免肠坏死以及造成肠瘘等缺点;结肠造口种植模型的实验动物生存周期较长,观察时间充裕,但增加了感染的机会,容易影响实验数据。

收稿日期:2019-09-24

* 基金项目:国家自然科学基金(No.81272537)

作者简介:乔大伟(1993—),男,硕士在读,研究方向:消化道肿瘤.E-mail:782285296@qq.com

通信作者:卜平(1955—),男,博士,教授,研究方向:消化系统疾病.E-mail:boping@yzu.edu.cn

1.2 原位直肠种植模型

原位直肠种植模型包括非手术经肛门直肠注射法、肛门切开直肠注射法及肛门直肠癌组织块种植模型。非手术经肛直肠注射法:麻醉后使实验动物直肠脱垂,在10×和100×显微镜下将0.1 mL(2.5×10^4 个/mL)的鼠源性肠癌细胞CT26注入距肛门>5 cm(超出肛管近端1~2 mm)的远端直肠黏膜内,进针深度为黏膜层下约1 mm,避免穿透肠壁。肛门切开直肠黏膜层注射法:用两个金属夹夹紧小鼠肛门部直肠的前壁,在金属夹之间剪开长6~7 mm直肠壁,再将肿瘤细胞悬液注射到直肠黏膜层内。肛门直肠癌组织块法:主要步骤用缝针轻轻破坏直肠壁,用6/0吸收线缝针把肿块缝于该处。Wang等^[5]采用自制接种器将0.1 mL细胞密度为 2×10^7 个/mL的结肠癌细胞HCT116接种于BALB/c裸鼠直肠上,成功建立原位移植性直肠动物模型,直肠原位接种18只成瘤率为100%,未发现肝转移灶。优点:种植操作简单,创伤较小,能更好地模拟结直肠癌的临床生物学行为,比如肿瘤的局部生长、肿瘤的浸润、癌细胞原位脱落穿过血管壁进入门静脉循环血运转移等过程。缺点:直肠壁较薄种植成功率较低,不易操作,远处转移少,影响实验结果。

2 异位种植模型

异位种植模型按植入位置不同可以分为脾脏种植、门静脉/肠系膜种植、肝脏种植及腹腔扩散种植。

2.1 脾脏种植模型

脾脏种植法是目前CRLM模型公认的最佳模式之一。肿瘤细胞从脾内种植,植入的细胞能避开大量免疫细胞攻击,通过血管浸润而发生肝转移。因此,能较好模拟人体内CRC切除后肝脏转移。根据是否切除脾脏分为脾脏保留法和脾脏切除法。

2.1.1 脾脏保留法:在显微外科镜下,于小鼠左侧腋后线肋缘下纵行切开长约0.5~1 cm创口,进腹后找到柳叶状脾脏并牵出腹腔外,用1 mL注射器吸取混悬好的单细胞液0.2~0.5 mL(细胞数约为 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL),从脾下极进针,缓慢注射(约2~3 min)入脾内,注射区可见脾被膜变白隆起。缓慢拔针后酒精棉球按压针眼,使瘤细胞得经脾静脉进入肝脏,防止肿瘤外溢。查无出血后依次间断缝合肌肉、皮肤,关腹。Fleten等^[6]通过脾脏注射HT细胞株HT29和HCT116,在裸鼠中建立实验性肝转

移。注射后,HCT116和HT29细胞在所有动物中产生肝肿瘤。Xu等^[7]为了观察ART1对体内肿瘤生长或肝转移的影响,成功构建了BALB/c小鼠CT26细胞的脾移植肿瘤模型。优点:操作简单,易于实施,且保留了脾脏部分免疫功能即保存了宿主固有的抗肿瘤免疫功能。缺点:肝脏转移瘤形成的同时发生脾脏肿瘤,转移灶常为散在癌结节,影响小鼠的存活时间,且脾脏肿瘤通常在肝转移瘤前发生,会影响实验的准确性,不适于验证周期较长的药物实验。

2.1.2 脾脏切除法:脾脏注入肿瘤细胞后,约5~10 min,待注射区苍白隆起消失后结扎脾血管及胃短动静脉,切除脾脏,检查无出血后逐层关腹。Fu等^[8]和Márquez等^[9]将CT-26细胞注入BALB/c小鼠脾囊并切除脾脏,成功建立了CRLM模型。Oshima等^[10]建成了一组用荧光素酶和tdTomato稳定标记的HCT116人CRC细胞的单克隆衍生物,并具有不同的生长特性。脾脏注射及脾切除术后,大部分克隆能够产生肝转移。该模型提供定量可视化肝脏中个体肿瘤克隆的发展的能力,并估计其生长动力学和定殖效率。优点:更好地模拟了CRC根治术后因血行转移而发生肝转移的过程,肝转移率高,模型稳定,转移瘤向各个肝叶呈弥漫性转移。可以满足各种检测方法的取材需要。缺点:肿瘤分泌降解酶降解细胞外基质,形成伪足,浸润血管后进入血液等关键步骤不能模拟。一定程度上令免疫系统受损,术后动物死亡率高,操作较复杂,对实验者技术要求较高。主要应用于研究肿瘤形成和分析新的治疗效果及宿主免疫机能与癌细胞的关系。

2.1.3 半脾模型:半脾模型为脾脏保留和脾脏全切的改良造模方法。Bai等^[11]利用裸鼠脾脏特殊解剖结构,建成CRLM半脾模型。用一次性钛夹夹闭脾脏中央并切断,分成两个带血管蒂的半脾。将HT29细胞接种到近端半脾被膜下,而远端半脾埋入皮下备治疗。一共分6组制模,30 d后观察肝转移评分、淋巴结转移及血性腹水等情况。结果HT29细胞建立的CRLM半脾模型成瘤率为100%。优点:既保留了脾脏的部分免疫功能,又大大降低模型建立时脾脏肿瘤的干扰率。且此模型可以经静脉给药,更加贴近于临床,可应用于CRLM的生物学机制和预防性肝转移治疗的实验设计及抗肿瘤药物的筛选。缺点在于动物实验手术操作相对复杂,对试验者技术要求极高。

2.2 门静脉/肠系膜种植模型

门静脉/肠系膜种植模型是将结直肠癌细胞悬液直接注射入门静脉/肠系膜静脉,随静脉回流至肝脏后发生转移。操作要点:取正中切口,使用小的盐水纱条将肠管放至腹腔左侧,显露门静脉或者回结肠静脉,将浓度为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^7$ 个/mL 肿瘤悬液 0.1 mL 经门静脉缓慢注入,用棉签压迫注射部位数分钟,防止注射部位出血及癌细胞外渗,造成小鼠死亡或腹腔种植。Bocuk 等^[12]通过小鼠门静脉注射 CMT-93 细胞,成功构建门静脉小鼠肠癌肝转移动物模型,肝转移率约 70%~80%。优点:肿瘤转移速度较快,肝转移发生率较高,有效模拟肠癌术后肝转移,适用于肿瘤药物的筛选。缺点:不能模拟肿瘤转移全过程,减少原发瘤最初侵袭周围组织及穿入血管等步骤,且手术操作难度大,手术中死亡率高。

2.3 肝脏种植模型

肝脏种植模型是将 CRC 细胞直接注射到肝脏中,或者在肝脏表面做一小切口,将大小为 2 mm^3 左右的癌组织植入肝实质内。White 等^[13]用 29 号针头将密度为 5×10^6 个/mL CC-531 细胞悬液注射入同基因 WAG/Rij 大鼠中肝叶的囊下,成功建立大鼠 CRLM 模型,发现 24 h 内,所有植入细胞的大鼠肝脏都生长肿瘤。优点:肿瘤生长速度快,转移率高。操作简单,重复性好。适用于药物效果的评价。缺点:大部分在注射部位成瘤,周围很少有转移卫星结节,不符合临床上 CRLM 多发转移的特点。且只涉及 CRC 转移的晚期过程,没有涉及 CRC 原位生长的演进过程,与人体内 CRC 转移观察模拟度较差,不适合 CRC 通过血道及淋巴道为主要转移途径的肿瘤模型制作。

2.4 腹腔扩散种植模型

腹腔扩散种植模型是将 CRC 细胞通过微型注射器直接注射入动物腹腔内,使其播散性生长,引起腹水,解剖后观察肝脏转移或其他脏器转移。若将带瘤腹水移植到下一代动物,则构建腹水瘤动物模型。Miyoshi 等^[14]通过将 miR-139-5p 转染的 Caco-2 细胞注射入小鼠腹腔,结果具有较高的肝脏腹膜转移率,成功建立 CRC 腹膜转移小鼠模型。优点:操作简单,肝脏转移率高。转移周期短,短期内可复制大量模型。缺点:没有专一性器官转移,仅仅模拟晚期肿瘤患者转移途径,对于淋巴转移及血行转移意义不大。该模型常用于癌症晚期腹腔广泛转移和 CRC 术后腹腔种植播散的病理生理研究。

3 源于患者原代肿瘤组织的异种移植 (Patient-derived tumor xenograft, PDX) 模型

PDX 模型指在手术期间获得患者肿瘤组织直接移植或组织经原代培养制成细胞悬液注射到免疫缺陷小鼠来构建。由于该模型能保留原发肿瘤生物学特性,在抗肿瘤药物机制研究发挥了重要作用^[15]。常用于 PDX 模型小鼠类型是裸鼠,SCID 小鼠,NOD/SCID 小鼠和 NSG 小鼠。最新报道 B-NSG 小鼠,综合了 NOD-SCID-IL2rg 背景特征,具有重度免疫缺陷表型,与 NOD/SCID 小鼠相比寿命更长,平均长达 1.5 年;对人源细胞和组织几乎没有排斥反应;少量细胞即可成瘤,依赖于细胞系或细胞类型;无 B 淋巴细胞泄漏,B-NSG 小鼠是目前国际公认的免疫缺陷程度最高、最适合人源细胞或组织移植的工具小鼠。Bettenworth 等^[16]使用内窥镜,在 NOD/SCID 小鼠结肠黏膜下注射 HT-29 细胞,注射后 12 d 发现明显的肿瘤生长,且肝转移率 28.6%,腹腔转移率 14.3%。Ye 等^[17]用 TLR4 scramble 或 TLR4 siRNA 转染的 SW480 细胞通过注射到裸鼠皮下,成功建立裸鼠异种移植模型,肝转移率较低。Leuci 等^[18]用患者肝转移切除术获得转移性 CRC 样品。处理后并植入 2 只不同的 4 至 6 周龄雌性 NOD/SCID 小鼠中。肿瘤形成后,传代并扩增 2 代,直到产生 32 只小鼠。成功建立了患者来源的 CRLM 小鼠肿瘤移植模型,认为 PDX 模型可能为预测癌症进展提供有效的临床前工具,可用于进一步进行个性化治疗的基因组学和药理学研究。Prall 等^[19]从手术室收到肠癌新鲜的标本,将小立方体(约 3 mm^3)从皮下异种移植入 NSG 小鼠,研究 CRC 转移性相关的肿瘤出芽和足底形成。优点:更准确地反映肿瘤生物学,细胞复合物和结构,包括基质细胞,更好地反映了原始肿瘤的特征和遗传多样性,可以反映每个患者的特征,有个性化药物的前景,并且可用于预测对新疗法的反应。为临床前药效的评估以及生物标志物的鉴定提供了有效的研发资源。已被证明适用于研究转移和药物反应^[20]。因此,这些模型是测试药物反应的最佳临床前模型,特别是难治性癌症患者。缺点:费用高,建模周期长,且移植率和肝转移率较低。患者组织中通常存在的坏死区域使移植成功更具挑战性,缺乏在肿瘤发展和转移

过程中起重要作用的先天和适应性免疫系统。

4 遗传修饰小鼠模型

遗传修饰小鼠模型包括两类:转基因小鼠模型和基因敲除小鼠模型。转基因小鼠指通过实验导入方法将外源目的基因导入小鼠早期胚胎细胞或受精卵,使之与小鼠本身基因组结合,产生携带外源目的基因小鼠品系,且可以通过生殖细胞将外源目的基因传递给后代。基因敲除又称基因打靶,指将外源DNA与受体细胞染色体DNA上的同源序列之间进行重组,使之整合到预定位点,并代替原有基因,改变细胞遗传性的方法。遗传修饰小鼠模型通过基因组表达的改变,提供对整个致癌进展和特定癌症相关基因的研究机制,可替代PDX模型,用于了解人类癌症进展^[21]。然而,它们通常不能完全模拟人的遗传复杂性肿瘤。Roper等^[22]通过CRISPR-Cas9的编辑结肠上皮细胞中Apc和Trp53肿瘤抑制基因并通过原位移植Apc编辑的结肠组织诱导自体肿瘤形成。Apc Δ/Δ ;Kras^{G12D/+};Trp53 Δ/Δ (AKP)小鼠结肠组织和人类CRC组织移植到远端结肠并转移到肝脏。证实建立的结肠腺瘤中癌基因的顺序激活,并重现整个肿瘤进展和转移。O'Rourke等^[23]使用基因工程小鼠模型组织的细胞,原位移植快速构建CRC转移性小鼠模型。在这个模型中,描述了CRC从腺瘤(6周)到局部播散性疾病(11~12周)和自发转移(>20周)的基因型和时间依赖性进展。因此,该模型提供了快速和灵活的手段用于遗传和临床前研究。Atlasi等^[24]使用不同的转基因和基因敲除小鼠模型分析了S100a4在肠肿瘤起始和进展中的体内作用。发现在Apc和Smad4突变小鼠中,S100a4的基因切除或过表达不影响肠道中的肿瘤起始。相反,Apc^{1638 N/+}/KRAS^{V12G}小鼠中的S100a4上皮基因过表达增加了肠肿瘤细胞向肝脏的传播,与其在肿瘤转移中的作用一致。优点:提供肿瘤发生过程中特异性基因突变影响的信息,与可移植模型相比,该模型更准确地表现肿瘤发展的自然过程和肿瘤细胞与组织微环境之间的相互作用,用于评估肿瘤发生的早期步骤,有望引导CRLM患者进行靶向治疗以延长其生命。随着基因操作技术的不断开发与改进^[25],遗传修饰小鼠模型在研究CRC及其转移发病机理和筛选预防或治疗药物中扮演着越来越重要的角色。缺点:价格昂贵,费力,肝转移率

较低,造模时间长,不利于评估药物疗效,特异性基因的突变可导致胚胎致死性,严重的发育缺陷或发生转移之前的不育。

本文仅概述了结直肠癌肝转移建模的常用方法,这些动物模型为探究人结直肠癌肝转移的各种特征提供了一定的方便,笔者认为理想的CRLM模型是具有可预测性和可重复性,能有效地代表人类CRLM微环境,并且能用于验证患者新的治疗方案。目前研究人类CRLM动物模型比较常用且易操作的是种植模型,具有一定研究前景的是PDX模型和遗传修饰小鼠模型。

参考文献

- [1] Gong C, Long Z, Yu Y, *et al.* Dietary factors and polymorphisms in vitamin D metabolism genes: the risk and prognosis of colorectal cancer in northeast China[J]. *Sci Rep*, 2017, **7**:8827.
- [2] Chen W, Zheng R, Baade P D, *et al.* Cancer statistics in China [J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, **66**(2):115-132.
- [3] Goodwin T J, Huang L. Investigation of phosphorylated adjuvants co-encapsulated with a model cancer peptide antigen for the treatment of colorectal cancer and liver metastasis[J]. *Vaccine*, 2017, **35**(19):2550-2557.
- [4] Tao L, Yang J K, Gu Y, *et al.* Weichang'an and 5-fluorouracil suppresses colorectal cancer in a mouse model [J]. *World J Gastroenterol*, 2015, **21**(4):1125-1139.
- [5] Wang J, Ren L, Yan L, *et al.* Establishment of animal model of transplanted human colorectal cancer [J]. *Cancer Research and Clinic*, 2017, **29**(4):223-226.
- [6] Fleten K G, Bakke K M, Mælandsmo G M, *et al.* Use of non-invasive imaging to monitor response to aflibercept treatment in murine models of colorectal cancer liver metastases [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2017, **34**(1):51-62.
- [7] Xu J X, Xiong W, Zeng Z, *et al.* Effect of ART1 on the proliferation and migration of mouse colon carcinoma CT26 cells *in vivo* [J]. *Mol Med Rep*, 2017, **15**(3):1222-1228.
- [8] Fu M, Song Y, Wen Z, *et al.* Inositol Hexaphosphate and Inositol Inhibit Colorectal Cancer Metastasis to the Liver in BALB/c Mice [J]. *Nutrients*, 2016, **8**(5):E286.
- [9] Márquez J, Mena J, Hernandez-Unzueta I, *et al.* Ocoxin[®] oral solution slows down tumor growth in an experimental model of colorectal cancer metastasis to the liver in Balb/c mice [J]. *Oncol Rep*, 2016, **35**(3):1265-1272.
- [10] Oshima G, Stack M E, Wightman S C, *et al.* Advanced Animal Model of Colorectal Metastasis in Liver; Imaging Techniques and Properties of Metastatic Clones [J]. *J Vis Exp*, 2016. doi: 10.3791/54657
- [11] Bai J, Wang J, Zhao X. Nude mice hemispleen method in hepatic

- metastases of colon cancer model[J]. Journal of Dalian Medical University, 2015, **37**(5):447-450
- [12] Bocuk D, Wolff A, Krause P, *et al.* The adaptation of colorectal cancer cells when forming metastases in the liver: expression of associated genes and pathways in a mouse model [J]. BMC Cancer, 2017, **17**(1):342.
- [13] White S B, Procissi D, Chen J, *et al.* Characterization of CC-531 as a Rat Model of Colorectal Liver Metastases [J]. PLoS One, 2016, **11**(5):e0155334.
- [14] Miyoshi J, Toden S, Yoshida K, *et al.* MiR-139-5p as a novel serum biomarker for recurrence and metastasis in colorectal cancer [J]. Sci Rep, 2017, **7**:43393.
- [15] 胡斌权, 陈城明, 张同弟, 等. 人体肿瘤 PDX 移植模型的优与劣[J]. 2015, **5**(32):59-62
- [16] Bettenworth D, Mücke M M, Schwegmann K, *et al.* Endoscopy-guided orthotopic implantation of colorectal cancer cells results in metastatic colorectal cancer in mice [J]. Clin Exp Metastasis, 2016, **33**(6):551-562.
- [17] Ye K, Wu Y, Sun Y, *et al.* TLR4 siRNA inhibits proliferation and invasion in colorectal cancer cells by downregulating ACAT1 expression[J]. Life Sci, 2016, **155**:133-139.
- [18] Leuci V, Maione F, Rotolo R, *et al.* Lenalidomide normalizes tumor vessels in colorectal cancer improving chemotherapy activity[J]. J Transl Med, 2016, **14**(1):119.
- [19] Prall F, Maletzki C, Hühns M, *et al.* Colorectal carcinoma tumour budding and podia formation in the xenograft microenvironment [J]. PLoS One, 2017, **12**(10):e0186271.
- [20] Van Marion D M, Domanska U M, Timmer-Bosscha H, *et al.* Studying cancer metastasis: Existing models, challenges and future perspectives[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2016, **97**:107-117.
- [21] Oh B Y, Hong H K, Lee W Y, *et al.* Animal models of colorectal cancer with liver metastasis[J]. Cancer Lett, 2017, **387**:114-120.
- [22] Roper J, Tammela T, Cetinbas N M, *et al.* *In vivo* genome editing and organoid transplantation models of colorectal cancer and metastasis[J]. Nat Biotechnol, 2017, **35**(6):569-576.
- [23] O'Rourke K P, Loizou E, Livshits G, *et al.* Transplantation of engineered organoids enables rapid generation of metastatic mouse models of colorectal cancer[J]. Nat Biotechnol, 2017, **35**(6):577-582.
- [24] Atlasi Y, Noori R, Marolin I, *et al.* The role of S100a4 (Mts1) in Apc- and Smad4- driven tumour onset and progression [J]. Eur J Cancer, 2016, **68**:114-124.
- [25] Clark C R, Starr T K. Mouse models for the discovery of colorectal cancer driver genes [J]. World J Gastroenterol, 2016, **22**(2):815-822.

Research Progress in Animal Model of Liver Metastasis of Colorectal Cancer

QIAO Dawei^{1,2}, LI Yufang^{1,2}, LI Shengnan^{1,2}, XIAO Yun^{1,2}, JIANG Lishuang^{1,2}, KONG Guimei¹, BO Ping^{1,2,3}

(1. School of Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225001, China) (2. Jiangsu Key Laboratory of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine for Geriatrics, Yangzhou 225001, China) (3. Department of Gastroenterology, Jiangsu Subei People's Hospital, Yangzhou 225001, China)

Abstract: Liver is the main target of colorectal cancer metastasis, colorectal cancer liver metastasis is also the main cause of death in patients with colorectal cancer. At present, the method of constructing liver metastasis model of colorectal cancer mainly includes *in situ* planting model, which is used to study the process of liver metastasis and its related mechanism in colorectal cancer; Heterosis planting model, which is used to filter the individualized treatment programs of patients; Transgenic animal model, which is used to accurately guide patients with targeted therapy.

Key words: Colorectal cancer; Colorectal cancer liver metastasis; animal model