

# 《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
- 编 委:

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
- 编 委:

王福金 王爱国 索 勋 杨利峰 刘树锋 张焕铃 刘 源 叶华虎
- 编 委:

吴建军 张艳霞 柳占彪 张静姝 王 磊 俞发荣 陈梅丽 刘志勇
- 编 委:

吴端生 王天琦 任文陟 吴宝金 褚 芳 吴德国 刘建勋 郑振辉
- 编 委:

童 英 冯书堂 石 晶 郑志红 孙德明 代解杰 陈清轩 李显华
- 编 委:

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 4 期

2019 年 8 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:荣瑞章

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

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

印刷:北京科信印刷有限公司

发行:河北省廊坊市邮政局

发行范围:国内外公开发行人

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

- 高糖高脂饲料诱导的小型猪肥胖模型 ..... 相磊,陈华,赵德明(1)
- 精神依赖药物成瘾模型建立及小脑 Bax 基因的表达 ..... 谢明仁,俞发荣(6)
- 不同时期绿色荧光裸鼠雌鼠血浆及组织中中性激素水平变化 ..... 尤金炜,董敏,刘彪,等(10)
- 微卫星与生化位点法对 BALB/c 小鼠遗传检测比较分析 ..... 覃辉艳,陈华凤,王芳,等(14)
- 兔膝关节关节炎模型的建立及评价 ..... 欧慧瑜,李瑞鹏,邵珍怡,等(18)
- DHEA 对小鼠超排卵和卵母细胞质量的影响 ..... 何岩,于洋,董婉维,等(22)
- 四氯化碳诱导近交系 C57BL/6 小鼠建立肝纤维化模型 ..... 刘甦苏,霍桂桃,王辰飞,等(28)
- 高脂血症食蟹猴模型的建立及分析 ..... 杨永立,李锋,汪云龙,等(31)
- I 型干扰素受体(*Ifnar*)基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定 ..... 陈亚坤,孙婧,蒋亚君,等(35)
- 过氧化氢酶-2 能力验证样品的制备及其均一性和稳定性测定 ..... 魏杰,王洪,贾松华,等(39)
- 病毒性心肌炎与人类主要组织相容性复合体多态性的相关性研究 ..... 刘媛媛,都鹏飞(44)
- 膨化对实验犬粮营养成分影响的研究 ..... 李慧贤,常银莲,卓志勇,等(51)
- 小动物 micro-CT 与超声及主动脉插管术评价左心室功能的比较研究 ..... 刘春蕾,李晨,李鑫,等(55)
- CMU/1 和 CMU/2 近交系长爪沙鼠脏器系数的比较 ..... 马兰芝,李迎,尚世臣,等(60)
- 西方膳食对载脂蛋白 E 敲除小鼠的影响 ..... 杨林,黎桂玲,刘科,等(63)

## 研究简报

- 抽取小鼠脑脊液简便易行的新方法 ..... 桂青,陈碧玉,刘翰琛,等(68)
- 独立通风笼盒系统内传热传质分析 ..... 张建平,傅江南(71)
- 实验动物设施运行中“三废”管理 ..... 卢静,孟霞,陈柏安(77)

## 研究进展

- 猫遗传多态性的研究进展 ..... 贾松华,岳秉飞(81)
- 重建人类免疫系统的人源化小鼠模型及其在血液系统疾病研究中的应用 ..... 龙杰,杨志刚(86)
- 声明 ..... (92)
- 广告 ..... (封三)
- 广告 ..... (封四)

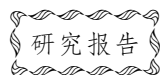
**LABORATORY ANIMAL SCIENCE**  
( Bimonthly , Started in 1984 )  
**Volume 36 Number 4    August 28 , 2019**

---

---

**CONTENTS   IN   BRIEF**

|                                                                                                                                |                                                            |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------|
| High Fat and High Sugar Diet Induced the Fat Model of Bama Miniature Pigs .....                                                | XIANG Lei, CHEN Hua, ZHAO Deming ( 9 )                     |
| Expression of Bax Gene in Cerebellum of Rats and Psychodependence Drug Addiction Model Copied .....                            | XIE Mingren, YU Farong ( 9 )                               |
| The Changes of Plasma and Tissue Levels of Sex Hormones in Nude Female Mice with Green Fluorescence at Different Stages .....  | YOU Jinwei, DONG Min, LIU Biao, <i>et al</i> (13)          |
| Genetic Analysis of BALB/c Mice by Using Microsatellite DNA Markers and Biochemical Markers .....                              | QIN Huiyan, CHEN Huafeng, WANG Fang, <i>et al</i> (17)     |
| Establishment and evaluation of a model of osteoarthritis in the rabbit knee .....                                             | OU Huiyu, LI Ruipeng, SHAO Zhenyi, <i>et al</i> (21)       |
| Effects of DHEA on Superovulation and Oocyte Quality of C57BL/6J Mice .....                                                    | HE Yan, YU Yang, DONG Wanwei, <i>et al</i> (27)            |
| Establishment of Hepatic Fibrosis Model Induced by CCl <sub>4</sub> in Inbred C57BL/6 Mice .....                               | LIU Susu, HUO Guitao, WANG ChenFei, <i>et al</i> (34)      |
| Establishment and Analysis of Hyperlipidemia Model in Cynomolgus Monkey .....                                                  | YANG Yongli, LI Feng, WANG Yunlong, <i>et al</i> (34)      |
| Breeding and Genotype Identification of <i>Ifnar</i> Gene Knockout Mice .....                                                  | CHEN Yakun, SUN Jing, JIANG Yajun, <i>et al</i> (43)       |
| Study on Preparation of Catalase-2 Samples Used for Proficiency Testing and Measurement for the Stability and Uniformity ..... | WEI Jie, WANG Hong, JIA Songhua, <i>et al</i> (43)         |
| Association between MHC Gene Polymorphism and VMC .....                                                                        | LIU Manman, DU Pengfei (50)                                |
| Effect of Puffing on Nutritional Components of Experimental Dogs .....                                                         | LI Huixian, CHANG Yinlian, ZHUO Zhiyong, <i>et al</i> (59) |
| Comparative Study of Small Animal Micro-CT, Ultrasound and Aortic Intubation in Evaluating Left Ventricular Function .....     | LIU Chunlei, LI Chen, LI Xin, <i>et al</i> (59)            |
| Comparison of the Viscera Coefficient of CMU/1 and CMU/2 Inbred Strains of Gerbil .....                                        | MA Lanzhi, LI Ying, SHANG Shichen, <i>et al</i> (67)       |
| The Effect of Western Diet on the Apolipoprotein E Gene Knock out Mice .....                                                   | YANG Lin, LI Guiling, LIU Ke, <i>et al</i> (67)            |
| A New Method is Simple and Easy to Extract the Cerebrospinal Fluid in Mice .....                                               | GUI Qing, CHEN Biyu, LIU Hanchen, <i>et al</i> (76)        |
| Analysis of Heat and Mass Transfer inside the Individual Ventilated Cage .....                                                 | ZHANG Jianping, FU Jiangnan (76)                           |
| Discussion of the Management for “three Wastes” Generated by Laboratory Animal Facility .....                                  | LU Jing, MENG Xia, CHEN Baian (80)                         |
| Research Progress of Genetic Diversity in Cat ( <i>feliscatus</i> ) .....                                                      | JIA Songhua, YUE Bingfei (85)                              |
| Humanized Mouse Model Reconstructing Human Immune System and Its Application in Study of Blood System Diseases .....           | LONG Jie, YANG Zhigang (92)                                |



# 高糖高脂饲料诱导的小型猪肥胖模型<sup>\*</sup>

相磊<sup>1,2</sup> 陈华<sup>2</sup> 赵德明<sup>1</sup>

(1. 中国农业大学动物医学院, 北京 100093) (2. 中国人民解放军总医院医学实验动物中心, 北京 100853)

**摘要:**目的 探讨高脂高糖饲料对巴马小型猪脂肪分布与血液生化指标的影响。方法 巴马小型猪 14 头, 实验组 8 头, 为本实验室培育的 2 型糖尿病易感小型猪, 饲喂高脂高糖饲料 30 周; 对照组 6 头饲喂正常饲料。30 周后测定体型系数、CT 扫描脂肪含量、采集血液检测生化指标, 比较实验组与对照组的差异。结果 高脂高糖饲料饲喂 30 周后实验组动物与对照组动物在体质量、体质指数 (BMI)、脂肪总含量差异显著 ( $P < 0.05$ ), 内脏脂肪含量差异极显著 ( $P < 0.01$ ); 血液生化指标中胰岛素、总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯与对照组相比差异极为显著 ( $P < 0.01$ ), 低密度脂蛋白胆固醇与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ )。此外, 实验组巴马小型猪血清蛋白、肌酐与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ); 尿酸、尿素与对照组差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 显示实验组小型猪呈现肾损伤。结论 高脂高糖饮食能够引起巴马小型猪脂肪堆积, 内脏脂肪堆积尤为明显, 血液生化指标呈高脂血症伴有肾功能的损伤。

**关键词:** 巴马小型猪; 脂肪分布; 血液生化; 2 型糖尿病

中图分类号: Q493

文献标识码: A

文章编号: 1006-6179(2019)04-0001-06

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.001

近年来, 肥胖与糖尿病的发病率逐年增高, 其中糖尿病已成为全球性疾病, 目前仅次于心脑血管病和癌症, 列为第三位大病。2017 年, 国际糖尿病联盟 (IDF) 发布了第八版全球糖尿病地图。新版地图显示, 目前全球有 4.25 亿糖尿病患者, 预计到 2045 年, 将会有近 7 亿糖尿病患者。我国原是糖尿病低发区, 但是近年来发病率也以惊人的速度激增。抽样调查显示, 我国糖尿病患者 9240 万 (2007-07—2008-05), 每年新增患者 680 万, 处于世界最高水平<sup>[1]</sup>。2 型糖尿病人占糖尿病人总数的 90%~95% 左右, 是糖尿病所有分型中的主要组成部分<sup>[2]</sup>。肥胖与 2 型糖尿病之间存在密切的关系, 一方面肥胖是 2 型糖尿病发生的一个独立危险因子; 另一方面 2 型糖尿病患者中约有三分之二超重或者肥胖。

由于维持费用低廉、基因组序列清楚而且便于用遗传工程手段修饰等特点, 啮齿类动物模型一直是糖尿病和肥胖研究的主要工具。啮齿类肥胖模型包括自发性动物模型如 C57BL/6J-ob/ob 小鼠、C57BL/KsJ-db/db 小鼠和 Zucker-fa/fa 大鼠; 诱发性

肥胖大鼠模型主要通过高能量饮食诱导, 一般高脂饲料诱导 3 个月可诱发出肥胖模型; 遗传修饰改造致动物肥胖模型如 Mc4RTGEM 大鼠、Agouti 基因突变小鼠、Tubby 基因突变小鼠等。然而, 由于人类和啮齿类动物之间存在明确的代谢和生理差异, 特别是在新陈代谢和脂肪组织生物学方面差异显著, 如脂肪酶在肥胖小鼠中含量低而在肥胖人群中含量较高; 小鼠中和 TNF- $\alpha$  作用可改善胰岛素抵抗而在人群中中和其作用则对胰岛素抵抗无影响; 肥胖小鼠中抵抗素水平损害糖耐量和胰岛素敏感性而在人群中水平的高低不反应胰岛素抵抗或肥胖<sup>[3]</sup>。这些差异无疑减缓了肥胖和糖尿病的研究成果向临床的转化。随着人们对猪与人类在生理和解剖方面相似性认识的不断深入, 尤其发现在代谢方面存在高度的一致性<sup>[4]</sup>, 现在普遍认为小型猪是基础医学研究成果向临床转化的桥梁。应用小型猪建立动物模型开展肥胖相关研究与啮齿类动物模型相比更能模拟人类疾病的发生与发展的过程。

本实验应用高脂高糖饲料饲喂动物, 同时限制

收稿日期: 2019-03-04

<sup>\*</sup> 基金项目: 国家自然科学基金 (No.31472057)

作者简介: 相磊 (1982—), 男, 主管技师, 研究方向: 实验动物学. E-mail: xianglei-322@163.com

通信作者: 赵德明 (1958—), 男, 教授, 研究方向: 动物病理学. E-mail: zhaodm@cau.edu.cn

陈华 (1964—), 男, 研究员, 研究方向: 动物模型. E-mail: chenhu@301hospital.com.cn

动物活动(单笼饲养),观察是否能够诱导小型猪肥胖,以及进一步发生糖尿病的情况,为小型猪在代谢性疾病研究领域的应用提供基础材料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

巴马小型猪 14 头,8 月龄,体质量 25~26 kg。其中实验组 8 头饲喂高糖高脂饲料,对照组 6 头饲喂常规饲料,连续饲喂 30 周。

1.2 实验仪器

飞利浦 64 排螺旋 CT (PHILIPS, 荷兰),Eppendorf 5180 冷冻离心机(Eppendorf,德国),东芝 120 型全自动生化分析仪(东芝株式会社,日本)。

1.3 实验方法

实验组 8 头巴马小型猪,连续饲喂高脂高糖饲料 30 周。高糖高脂饲料配方:蔗糖 35%、牛油 10%、基础饲料 55%。基础饲料配方:玉米 48%、小麦次粉 20%、大豆饼 15%、稻米糠 12%、鱼粉 5%。诱导饲料碳水化合物、脂肪和蛋白的能量占比分别为 73.6%、11.3% 和 15.1%。在饲喂至第 30 周,做以下检测:

体质量与体形系数:应用盐酸氯胺酮与陆眠宁(体积比 1:1)按照 0.3 mL/kg 肌肉注射,对小型猪实施全身麻醉后称重。量取胸围、腹围以及体长。并计算身体型指数(Body Mass Index, BMI)。BMI = BW (kg) / {  $\pi/3 \times \text{length} \times [ (TC/2\pi)^2 + (AC/2\pi)^2 + (TC/2\pi \times AC/2\pi) ] \}$  [5]。

CT 扫描:飞利浦 64 位 CT 扫描(层厚 10 mm,矩阵 512x512,窗宽 500HU,窗位 40HU,扫面参数 125 kV,50~100 mAS),比较对照与高脂高糖饲料诱导组巴马小型猪机体的脂肪含量、内脏脂肪的含量和胰腺的体积。

血清生化指标:巴马小型猪麻醉后,取后肢备

皮,小型猪大腿近心端绑扎止血带,75%医用酒精消毒,外侧隐静脉穿刺采血约 5 mL。血液置于促凝离心管内,应用 Eppendorf 5180 冷冻离心机(Eppendorf,德国),4℃,1 500 r/min 10 min,取上清液。东芝 120 型全自动生化分析仪(东芝株式会社,日本),进行血液生化指标检测。

2 结果

2.1 体型系数

高脂高糖饲料饲喂 30 周后,实验组动物与对照组动物体质量差异显著( $P<0.05$ ),BMI 差异显著( $P<0.05$ )(表 1),而动物的腹围、体长、胸围等指标差异不显著( $P>0.05$ )。

表 1 高脂高糖饲料饲喂巴马小型猪 30 周动物体质量与体型系数

Table 1 Body weight and BMI of Bama miniature pigs fed for 30 weeks by high-fat and high-sugar diets

| 项目     | 高脂高糖组          | 正常饮食组        |
|--------|----------------|--------------|
| 体质量/kg | 56.50± 1.50 *  | 51.00± 1.85  |
| 体形系数   | 808.26±10.17 * | 792.14±63.36 |
| 腹围/体张  | 1.12± 0.15     | 1.12± 0.11   |
| 腹围/胸围  | 1.10± 0.04     | 1.09± 0.10   |
| 体长/m   | 0.92± 0.07     | 0.91± 0.06   |
| 腹围/m   | 1.02± 0.06     | 1.02± 0.07   |
| 胸围/m   | 0.93± 0.03     | 0.94± 0.12   |

注:高脂高糖组与正常饮食组比较差异显著,\* $P<0.05$

Note: There was a significant difference between the high-fat and high-sugar group and the normal diet group, \* $P<0.05$

2.2 CT 扫描

CT 检查结果表明,高脂高糖饲料诱导组动物机体脂肪含量明显高于对照组( $P<0.05$ , $P=0.035$ );内脏脂肪占比实验组明显高于对照组( $P<0.01$ , $P=0.0028$ );CT 扫描实验组与对照组胰腺体积差异不显著( $P>0.05$ , $P=0.57$ )。

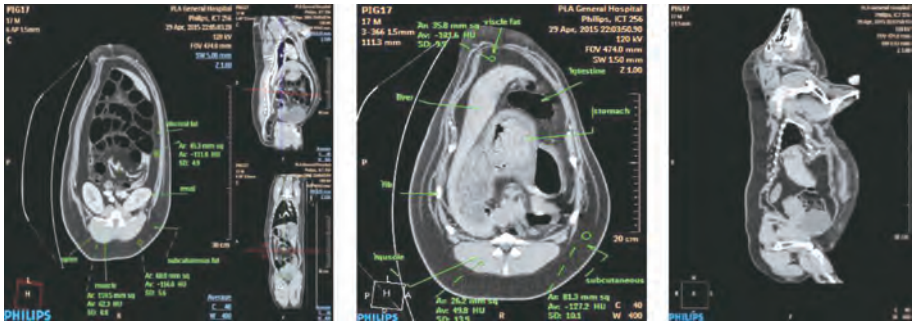


图 1 巴马小型猪 CT 扫描

Fig.1 CT scan of Bama miniature pig

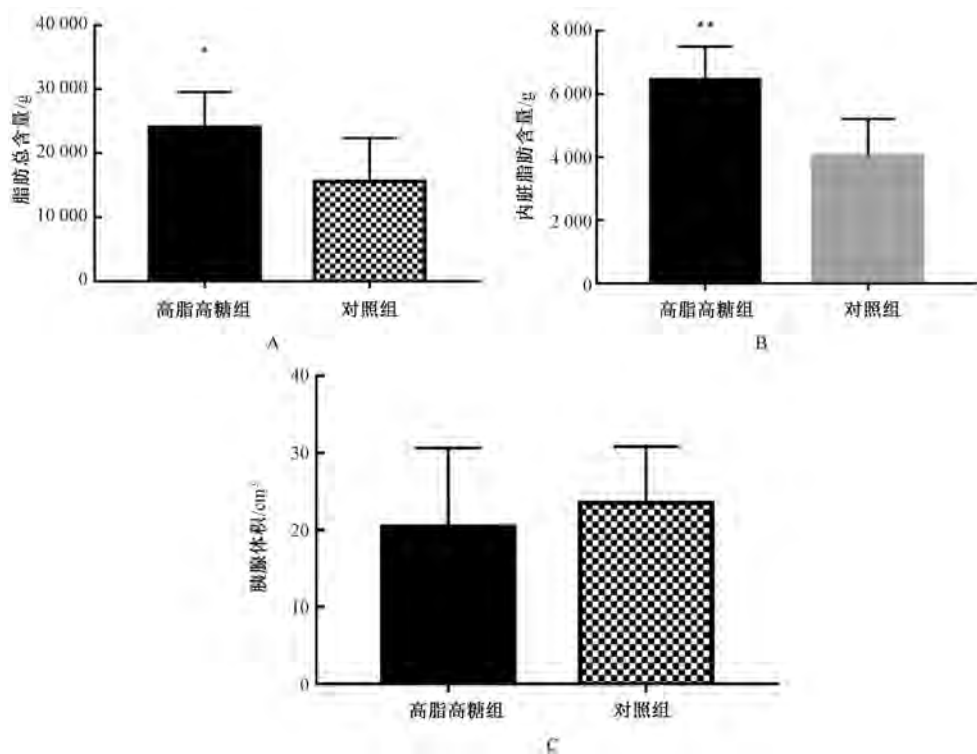


图 2 巴马小型猪 CT 扫描结果分析

注:A.巴马小型猪身体总脂肪含量 CT 扫描结果;B.巴马小型猪内脏脂肪含量 CT 扫描结果;C.巴马小型猪胰腺体积扫描结果

Fig.2 Analysis of CT scan results of Bama miniature pigs

Note:A.The results of body fat content by CT scan in Bama miniature pigs;B.The results of visceral fat content by CT scan in Bama miniature pigs;C.The results of pancreatic volume by CT scan in Bama miniature pigs

2.3 血液生化指标

高脂高糖饲料诱导 30 周后,实验组巴马小型猪与对照组相比血液生化指标存在显著性差异,表现为空腹血糖呈升高的趋势,胰岛素水平显著升高 ( $P<0.01$ ),HOMA-IR 指数显著升高 ( $P<0.01$ );总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯指标显著

升高 ( $P<0.01$ ),低密度脂蛋白胆固醇水平显著升高 ( $P<0.05$ )。其中,血清总胆固醇比对照组升高了 1.88 倍,HDL-C 升高了 2.69 倍,LDL-C 升高了 1.03 倍,甘油三酯升高了 3.2 倍;肾功能指标中,血清蛋白、肌酸肝水平明显升高,尤其以尿酸、尿素升高最为显著 ( $P<0.01$ ),显示肾功能也出现损伤。

表 2 对照组与高脂高糖饲料诱导组血液生化指标的检测

| 项目                 | 对照组          | 高脂高糖诱导组      |
|--------------------|--------------|--------------|
| 血糖/(mmol/L)        | 4.10± 0.42   | 5.54±0.78    |
| 胰岛素/(μIU/mL)       | 9.88± 1.08   | 24.13±4.50** |
| HOMA-IR            | 1.80± 0.36   | 5.94±0.87**  |
| 血清脂类               |              |              |
| 总胆固醇/(mmol/L)      | 1.98± 0.16   | 3.74±0.19**  |
| 高密度脂蛋白胆固醇/(mmol/L) | 0.84± 0.15   | 2.26±0.15**  |
| 低密度脂蛋白胆固醇/(mmol/L) | 1.14± 0.16   | 1.17±0.17**  |
| 甘油三酯/(mmol/L)      | 0.25± 0.06   | 0.79±0.21**  |
| 肾功                 |              |              |
| 总蛋白/(g/L)          | 73.74± 1.13  | 72.96±3.12   |
| 血清蛋白/(g/L)         | 45.94± 1.10  | 52.46±0.78*  |
| 肌酸酐/(μmol/L)       | 117.02±12.20 | 79.22±5.43*  |
| 尿酸/(mg/dL)         | 1.28± 0.35   | 2.53±0.64**  |
| 尿素/(mg/dL)         | 2.79± 0.23   | 17.00±0.19** |

注:高脂高糖诱导组与对照组相比,\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

Note:High-fat and high-sugar induction group compared with control group,\*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$

### 3 讨论

人体肥胖的发生是遗传基因、饮食生活习惯、代谢紊乱及神经系统调节等因素共同作用的结果,尤其是能量供需失衡,内分泌紊乱是造成肥胖的重要因素。肥胖与2型糖尿病、血脂异常关系最为紧密。中国超重与肥胖人群中罹患糖尿病患者比例分别为12.8%与18.5%,而在糖尿病患者中超重比例为41%、肥胖比例占24.3%<sup>[6]</sup>,由此可见肥胖与糖尿病之间存在紧密的联系。有研究者通过对993名不同种族人群的BMI、脂肪分布,肌肉发达程度,骨骼矿物质构成,腿长等指标进行了研究,表明机体每超重1 kg,罹患糖尿病的机率将增加4.5%~9%<sup>[7-8]</sup>。董明等通过高脂饮食诱导C57b/6 L小鼠1周出现体质量升高;4周后空腹血糖明显升高;5周后胰岛素水平明显升高;8周后体质量指数显著升高,血清总胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇显著升高;10周后甘油三酯、血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和高密度脂蛋白胆固醇均升高表明该小鼠诱导成为肥胖模型<sup>[9]</sup>。本研究中巴马小型猪连续饲喂高糖高脂饲料30周,动物明显肥胖,表现为体质量、BMI比对照组显著升高( $P<0.01$ ),这与啮齿类与人类研究结果相一致,小型猪在发展为肥胖的同时,也出现了胰岛素抵抗、血脂代谢紊乱和可能的肾损伤。因此,高糖高脂饲喂这种外源性的能量过剩,能够诱发小型猪肥胖,并适用于肥胖和胰岛素抵抗、代谢综合征的研究。

胰岛素抵抗(Insulin resistance, IR)是指对胰岛素代谢效应的抵抗,其中包括胰岛素对内源性葡萄糖产生的抑制性效应、胰岛素对外周组织(主要是骨骼肌)葡萄糖摄取和糖原合成的刺激性效应以及胰岛素对脂肪分解的抑制性效应。早期的2型糖尿病患者、肥胖的胰岛素抵抗患者以及代谢综合征的儿童中观察到胰岛素的降解减少是胰岛素代谢障碍的主要早期表现。胰岛素降解减少使循环的空腹和外周胰岛素水平长期升高,进一步加剧了胰岛素抵抗。Haffner等采用微小模型法评价胰岛素敏感性,对包括非洲裔、西班牙裔及非西班牙裔美国人3个不同种族在内共479例2型糖尿病人的研究结果表明,胰岛素抵抗者占92%,证实胰岛素抵抗在2型糖尿病中普遍存在<sup>[10]</sup>。Shirai等通过高脂饲料饮食诱导出了大鼠的2型糖尿病动物模型,通过该模型研究表明肥胖与高脂饲料的饮食是引起胰岛素抵抗与胰岛细胞损伤的重要因素<sup>[11]</sup>。在高脂饲料诱导

猪的肥胖模型中表明肥胖能够引起胰岛素敏感性的下降,主要表现为静脉葡萄糖耐量试验(IVGTT)、胰岛素耐性试验(ITT)以及胰岛素敏感指数(HOMA-IR)发生改变,然而值得注意的是猪的空腹胰岛素水平变化不大<sup>[12]</sup>。本研究中,小型猪连续饲喂高糖高脂饲料30周,空腹血糖呈现升高的趋势,但是还未达到失代偿的程度,而胰岛素却显著升高,HOMA-IR指数升高,表明已经出现胰岛素抵抗。

糖尿病与肥胖通常伴有机体组织的慢性炎症和脂肪组织的代谢障碍。腹内脂肪增加使胰岛素介导的葡萄糖非氧化代谢减弱,胰岛素刺激糖原合成能力减弱,同时抑制脂质氧化和游离脂肪酸的能力被制止。在此基础上机体为了维护体能糖平衡会分泌大量胰岛素,致使胰岛 $\beta$ 细胞衰竭,胰岛素分泌缺陷,最终导致2型糖尿病的发生<sup>[13]</sup>。脂肪组织是一种内分泌器官,研究发现胰岛素抵抗与脂肪沉积的部位有很大关系,内脏脂肪含量过高易导致胰岛素抵抗,进而发展成T2DM。研究发现,腹围与腹部总脂肪(TAV)、内脏脂肪体积(VAV)和皮下脂肪组织(SAV)均有相关性,胰岛素抵抗程度与VAV呈正相关,VAV的增高可加重胰岛素抵抗,从而产生高胰岛素血症,而SAV与胰岛素抵抗无相关性。医学研究机体脂肪含量的测定方法有CT、MRI、超声、双能X线吸收法以及人体测量法等。然而CT扫描具有准确、方便、可重复性高的特点,应用它对于腹部脂肪含量的精确判定是最为理想的方法<sup>[14]</sup>。FontiFurnols等研究表明通过CT横断层扫描分析不同品种猪的脂肪、肌肉与骨骼等能够准确评估机体成分的组成<sup>[15]</sup>。Lara Fernandez等通过83名男性与68名女性研究不同性别、不同年龄人群机体的脂肪沉积等状况比较了人体物理测量与CT扫描分析的对对应关系,对预测肥胖的判定提供了参考数据<sup>[16]</sup>。Sandeep等<sup>[17-18]</sup>研究表明脂肪分布模式是胰岛素抵抗发生的独立风险因子,而内脏脂肪与胰岛素抵抗呈现明显的正相关,减少机体腹部脂肪对有效预防胰岛素抵抗和炎症发生具有重要的意义。本研究通过CT检测分析了小型猪内脏脂肪与全身脂肪分布,结果表明,高糖高脂饲喂引起的小型猪肥胖全身脂肪增加( $P<0.05$ ),而内脏脂肪增加更显著( $P<0.01$ ),这种内脏脂肪的增高可能是引起胰岛素抵抗的重要诱因。

肥胖通常伴随着脂代谢紊乱,血脂升高,尤其HDL-C的升高为脂代谢紊乱的标志。血脂异常代

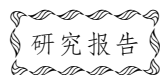
表着体内脂蛋白代谢异常引起的一种状态,血脂异常所形成的脂毒性可能在胰岛素抵抗的产生和发展中发挥着重要的作用,因这种脂毒性造成的胰岛素抵抗又反过来加重了脂代谢紊乱的产生,最终形成恶性循环<sup>[19]</sup>。周博等通过高脂饲料(蔗糖 10%、猪油 10%及胆固醇 5%)诱导 C57BL/6 小鼠 8 周构建成了小鼠肥胖模型,该模型表现为体质量、血糖以及血清胰岛素水平均升高,结果表明高脂饮食可诱发体内产生较多的 ROS,引起脂类代谢紊乱,从而产生胰岛素抵抗。此外,脂肪组织释放出的游离脂肪酸(FFA)通过血液循环沉积到骨骼肌及肝细胞中,能够使蛋白激酶 C(PKC)和 IKK- $\beta$  活性增强,从而导致 IRS-1 活性的降低、PI3K 活性下降, GLUT-4 表达减少,从而产生胰岛素抵抗<sup>[20]</sup>。本实验表明小型猪连续饲喂高糖高脂饲料,引起肥胖的同时,也存在明显的脂代谢紊乱。此外,从肾功能指标看,血清蛋白、尿酸、尿素均升高,尤其以尿素升高显著( $P < 0.01$ ),推测连续 30 周的高糖高脂饲喂,也可引起早期的肾功能损伤。这与当前肥胖与胰岛素抵抗关系的研究成果相一致。

综上所述,本研究通过高糖高脂饲料诱导法成功建立起小型猪肥胖模型,并对小型猪肥胖与胰岛素抵抗之间的关系做了初步探讨。肥胖发生的分子机制与其进一步发展为 2 型糖尿病的情况还需进一步研究。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Yang W Y, Lu J M, Weng J P, *et al.* Prevalence of diabetes among men and women in china[J]. New England Journal of Medicine, 2010, **362**(12): 1090-1101.
- [ 2 ] The Expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus[J]. Diabetes Care, 2003, **26**[supplement 1]: S5-S20.
- [ 3 ] Spurlock M E, Gebler N K. The development of Porcine Model of obesity and the Metabolic Syndrome[J]. The Journal of Nutrition, 2008, **138**: 397-402.
- [ 4 ] Miller E R, Ullrey D E. The pig as a model for human nutrition[J]. Annual review of nutrition, 1987, **7**: 361-382.
- [ 5 ] Barbero A, Astiz S, Lopez-Bote C J, *et al.* Maternal Malnutrition and offspring sex determine juvenile obesity and metabolic disorders in a swine model of leptin resistance[J]. Plos one, 2013, **8**(10): e78424.
- [ 6 ] 中华医学会内分泌学分会. 中国 2 型糖尿病合并肥胖综合管理专家共识[J]. 药品评价, 2016, **13**(17): 5-10.
- [ 7 ] Rush E C, Freitas I, Plank L D. Body size, body composition and fat distribution: comparative analysis of European, Maori, Pacific Island and Asian Indian adults[J]. The british journal of nutrition, 2009, **102**(4): 632-641.
- [ 8 ] Kim Y L, Kim T K, Cheong E S, *et al.* Relation of absolute or relative adiposity to insulin resistance, retinol binding protein-4, leptin, and adiponectin in type 2 diabetes[J]. Diabetes and metabolism journal, 2012, **36**(6): 415-421.
- [ 9 ] 董明, 刘东, 梁运海, 等. 高脂饮食喂养肥胖模型小鼠的构建: 分析营养因素和代谢综合征的干系[J]. 中国组织工程研究, 2015, **19**(40): 6542-6546.
- [ 10 ] Haffner S M, D'Agostino J R, Mykkanen L, *et al.* Insulin sensitivity in subjects with type 2 diabetes. Relationship to cardiovascular risk factors: the Insulin Resistance Atherosclerosis Study[J]. Diabetes Care, 1999, **22**(4): 562-568.
- [ 11 ] Shirai T, Shichi Y, Sato M, *et al.* High dietary fat-induced obesity in Wistar rats and type 2 diabetes in nonobese Goto-Kakizaki rats differentially affect retinol binding protein 4 expression and vitamin A metabolism[J]. Nutrition Research, 2016, **36**(3): 262-270.
- [ 12 ] Lee L, Alloosh M, Saxena R, *et al.* Nutritional model of steatohepatitis and metabolic syndrome in the Ossabaw miniature swine[J]. Hepatology, 2009, **50**(1): 56-67.
- [ 13 ] 赵俊, 隋忠国, 辛晓玮, 等. 腹型肥胖对成人 2 型糖尿病患者胰岛素抵抗、分泌功能的影响[J]. 中国生化药物杂志, 2016, **36**(7): 19-21.
- [ 14 ] Maurovich-Horvat P, Massaro J, Fox C S, *et al.* Comparison of anthropometric, area and volume based assessment of abdominal subcutaneous and visceral adipose tissue volumes using multi-detector computed tomography[J]. International journal of obesity, 2007, **31**(3): 500-506.
- [ 15 ] FontiFurnols M, Carabus A, Pomar C, *et al.* Estimation of carcass composition and cut composition from computed tomography images of live growing pigs of different genotypes[J]. Animal, 2015, **9**(1): 166-178.
- [ 16 ] Lara Fernandez A, Escolar Castellon J L, Aguilar Cuevas R, *et al.* Obesity and distribution of body fat. Correlation between anthropometric and tomographic data on areas at the abdominal level[J]. Revista clinica espaola, 1996, **196**(7): 437-435.
- [ 17 ] Sandeep S, Gokulakrishnan K, Velmurugan K, *et al.* Visceral & subcutaneous abdominal fat in relation to insulin resistance & metabolic syndrome in non-diabetic south Indians[J]. The indian journal of medical research Indian, 2010, **131**: 629-635.
- [ 18 ] Park Y M, Zhang J, Steck S E, *et al.* Obesity Mediates the Association between Mediterranean Diet Consumption and Insulin Resistance and Inflammation in US Adults[J]. The journal of nutrition, 2017, **147**(4): 563-571.
- [ 19 ] 付平, 冯春红, 杨超, 等. 血脂异常对 2 型糖尿病发生发展的影响[J]. 医科大学学报, 2018, **41**(3): 287-290.
- [ 20 ] 周博, 郭秦乐, 李会霞, 等. 成纤维细胞生长因子 21 通过抑制肥胖小鼠肝脏氧化应激改善胰岛素抵抗[J]. 西安交通(医学版), 2017, **28**(2): 161-165+187. (下转至第 9 页)





# 精神依赖药物成瘾模型建立及小脑 Bax 基因的表达<sup>\*</sup>

谢明仁 俞发荣

(甘肃政法大学 甘肃省证据科学技术研究与应用重点实验室, 兰州 730070)

**摘要:**目的 研究精神依赖药物(海洛因)对成瘾大鼠小脑 Bax 基因表达的影响。方法 采用剂量递增法建立成瘾大鼠模型,用酶联免疫吸附法(ELISA)检测小脑细胞 Bax 的基因的表达。结果 连续给大鼠注射海洛因 7 d 后,大鼠出现明显的戒断症状;小脑细胞 Bax、Caspase-3、Caspase-9 水平比对照组分别升高了 88.21%、94.21%、87.24%,与对照组比有显著性差异( $P<0.01$ )。结论 精神依赖药物(海洛因)对脑组织细胞的损伤作用可能通过诱导小脑 Bax 基因表达,激活 caspase 实现。

**关键词:**精神依赖药物;海洛因;Bax;小脑;大鼠

**中图分类号:** Q95-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0006-04

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.002

精神依赖物质(海洛因)的滥用与造成机体所有系统器官的毒性损伤作用有关。从偶尔的喜好活动过渡到长期的滥用和成瘾,大多数成瘾者的复发,即使经过长时间的禁欲,几乎没有有效和确定的治疗机会<sup>[1]</sup>。精神依赖药物成瘾不但危害成瘾者自身的身心健康,还会造成严重的社会问题<sup>[2]</sup>。有关海洛因成瘾对大脑组织的损伤作用方面研究较多<sup>[3]</sup>,小脑与大脑、脑干和脊髓之间丰富的传入和传出联系,参与躯体平衡和肌肉张力(肌紧张)的调节,以及随意运动的协调。小脑损伤,机体的肌肉张力就会减退,随意运动的协调性出现紊乱。因此,为了探索小脑在精神依赖药物(海洛因)成瘾和戒断中的作用,建立精神依赖药物成瘾动物模型,为进一步研究精神依赖药物成瘾机制,为戒毒制定新的、有效的治疗策略。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

动物:SPF 级 Wistar 大鼠,由甘肃中医药大学科研实验中心提供,实验动物生产许可证号[SCXK

(甘)2015—0001],实验在甘肃政法学院 SPF 级实验室进行,实验动物使用许可证号[SYXK(甘)2015—0006]。本实验所有操作均符合中华人民共和国《实验动物管理条例》规定,按 3R 原则给予实验动物以人道关怀(伦理委员会审批号码:GZF—2018—003)。

海洛因:为白色粉末,纯度为 86.8%,由兰州市公安厅禁毒办提供,实验时用灭菌蒸馏水配成所需要的浓度。盐酸纳洛酮,北京四环医药科技股份有限公司生产,批号:1806152;大鼠凋亡因子 Bax 试剂盒、大鼠 Caspase-9 试剂盒、大鼠 Caspase-3 试剂盒,购于上海纪宁实业有限公司;MK3-酶标仪,上海仪器有限公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 动物处理:**取 SPF 级 Wistar 大鼠 20 只(雄性),体质量 185~190 g。全部动物在 SPF 级实验室 IVC 饲养盒饲养,自由饮食进水,明暗周期 12 h,单笼饲养。动物房温度 22~24℃,湿度 55%~65%,适应 7 d。动物随机分为 2 组,每组 10 只。对照组:肌肉注射生理盐水 10 mL/kg,每天 2 次;海洛因组:给予海洛因、纳洛酮的方法、剂量以及持续时

收稿日期:2018-12-14

<sup>\*</sup> 基金项目:甘肃省高校科技创新团队项目(No.2016C-09);兰州市人才创新创业项目(No.2016-RC-85);甘肃省证据科学特色学科项目;甘肃省自然科学基金项目(No.17JR5RA158);兰州市科技计划项目(No.2015-3-80)

作者简介:谢明仁(1977—),男,副教授,研究方向:实验动物研究与应用.E-mail:xmr@gsl.edu.cn

通信作者:俞发荣(1959—),男,博士,研究员,研究方向:病理学、药理学和实验动物学,E-mail:Tim9898@163.com

间均按文献<sup>[4]</sup>操作。第 15 天腹腔注射盐酸纳洛酮(纳洛酮是吗啡样物质受体特异拮抗剂,能迅速翻转吗啡作用,采用该药的目的是观察是否出现戒断症状,判断成瘾模型建成与否),待观察完戒断症状后取样。

**1.2.2 取样:**实验第 15 天,动物经乙醚吸入无痛麻醉,打开胸腔,从左心室推注生理盐水 100 mL,冲去血液,用 4% 多聚甲醛-1.25% 戊二醛磷酸缓冲液 (pH7.4) 灌注固定,剥取大鼠小脑皮层组织 5 mg,研磨成匀浆,3 000 r/min 离心 20 min,取上清用,以标准物的浓度为横坐标,吸光度 (A) 为纵坐标,在 540 nm 波长下,绘出标准曲线和标准曲线的直线回归方程。分别将大鼠小脑组织 A 值代入直线回归方程,计算出样品的浓度。

表 1 海洛因成瘾戒断症状 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ ) 及评分标准

| 戒断症状 | 评分标准 |     |          | 对照组 (评分)     | 海洛因组 (评分)           |
|------|------|-----|----------|--------------|---------------------|
|      | 1 分  | 2 分 | 3 分      |              |                     |
| 扭体   | 1~3  | 4~6 | $\geq 7$ | 0            | $7.4\pm 1.2^{**}$   |
| 湿狗样抖 | 1~3  | 4~6 | $\geq 7$ | 0            | $113.2\pm 1.1^{**}$ |
| 跳跃   | 1~3  | 4~6 | $\geq 7$ | $2.2\pm 0.6$ | $10.2\pm 1.6^{**}$  |
| 咬牙   | 1~3  | 4~6 | $\geq 7$ | 0            | $5.2\pm 1.4^{**}$   |
| 站立   | 1~3  | 4~6 | $\geq 7$ | $3.1\pm 0.4$ | $21.6\pm 1.8^{**}$  |
| 清理皮毛 | 1~3  | 4~6 | $\geq 7$ | $4.2\pm 0.4$ | $24.1\pm 3.7^{**}$  |
| 上睑下垂 | 1~4  | 5~8 | $\geq 9$ | 0            | $8.2\pm 1.4^{**}$   |

注:与对照组比: \*\*  $P<0.01$   
Note:compared with the control group: \*\*  $P<0.01$

2.2 海洛因对大鼠小脑组织 Bax 水平的影响

Bax 标准曲线的直线回归方程为:  $Y=6.3\times 10^{-3}x+1.4\times 10^{-2}$ ,  $R^2=0.9979$ 。将大鼠小脑组织吸光度 (A) 代入方程,成瘾大鼠小脑组织 Bax 水平比对照组升高了 88.21%,图 1。

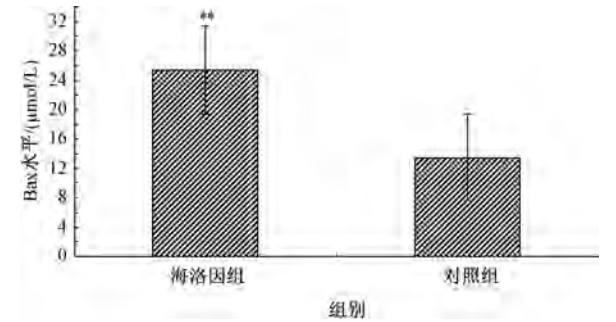


图 1 海洛因对大鼠小脑组织 Bax 水平的影响  
注:与对照组比: \*\*  $P<0.01$

Fig.1 Effect of heroin on Bax level in cerebellum tissue of rats

Note:compared with the control group \*\*  $P<0.01$

1.3 统计方法

实验数据采用 SPSS 17.0 软件进行统计学处理。组间差异采用单因素方差分析,用均数 $\pm$ 标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示,海洛因对大鼠小脑组织 Bax 水平的影响程度用百分比表示,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成瘾大鼠戒断症状

按 Maldonad 法评分,给予盐酸纳洛酮 1 h 后,大鼠出现扭体、湿狗样抖、咬牙、跳跃、站立、上睑下垂、清理毛发等戒断症状,成瘾动物模型建立成功,表 1。

表 1 海洛因成瘾戒断症状 ( $\bar{x}\pm s, n=10$ ) 及评分标准

| 戒断症状 | 评分标准 |     |          | 对照组 (评分)     | 海洛因组 (评分)           |
|------|------|-----|----------|--------------|---------------------|
|      | 1 分  | 2 分 | 3 分      |              |                     |
| 扭体   | 1~3  | 4~6 | $\geq 7$ | 0            | $7.4\pm 1.2^{**}$   |
| 湿狗样抖 | 1~3  | 4~6 | $\geq 7$ | 0            | $113.2\pm 1.1^{**}$ |
| 跳跃   | 1~3  | 4~6 | $\geq 7$ | $2.2\pm 0.6$ | $10.2\pm 1.6^{**}$  |
| 咬牙   | 1~3  | 4~6 | $\geq 7$ | 0            | $5.2\pm 1.4^{**}$   |
| 站立   | 1~3  | 4~6 | $\geq 7$ | $3.1\pm 0.4$ | $21.6\pm 1.8^{**}$  |
| 清理皮毛 | 1~3  | 4~6 | $\geq 7$ | $4.2\pm 0.4$ | $24.1\pm 3.7^{**}$  |
| 上睑下垂 | 1~4  | 5~8 | $\geq 9$ | 0            | $8.2\pm 1.4^{**}$   |

注:与对照组比: \*\*  $P<0.01$   
Note:compared with the control group: \*\*  $P<0.01$

2.3 海洛因对大鼠小脑组织 Caspase-9 水平的影响

Caspase-9 标准曲线的直线回归方程为:  $Y=1.4\times 10^{-3}x+4.43\times 10^{-2}$ ,  $R^2=0.998$ 。将大鼠小脑组织吸光度 (A) 代入方程,成瘾大鼠小脑组织 Caspase-9 水平比对照组升高了 87.24%,图 2。

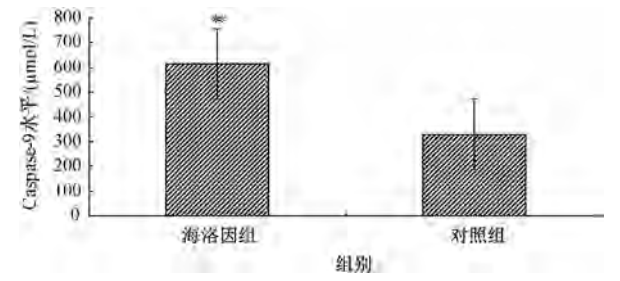


图 2 海洛因对大鼠小脑组织 Caspase-9 水平的影响  
注:与对照组比: \*\*  $P<0.01$

Fig.2 Effect of heroin on Caspase-9 level in cerebellum tissue of rats

Note:compared with the control group: \*\*  $P<0.01$

## 2.4 海洛因对大鼠小脑组织 Caspase-3 水平的影响

Caspase-3 标准曲线的直线回归方程为:  $Y = 5.0 \times 10^{-4}x + 5.2 \times 10^{-3}$ ,  $R^2 = 0.999$ 。将大鼠小脑组织吸光度(A)代入方程,成瘾大鼠小脑组织 Caspase-3 水平比对照组升高了 94.21%,图 3。

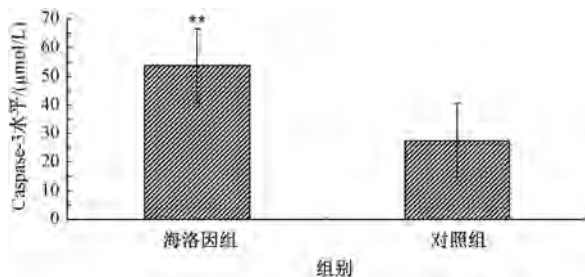


图 3 海洛因对大鼠小脑组织 Caspase-3 水平的影响

注:与对照组比: \*\*  $P < 0.01$

Fig.3 Effect of heroin on Caspase-3 level in cerebellum tissue of rats

Note: compared with the control group: \*\*  $P < 0.01$

## 3 讨论

海洛因成瘾者抑制控制功能受损是一种持久性的、不可逆的脑损伤<sup>[5]</sup>,海洛因成瘾致使大脑皮质下中枢灰质体积减少<sup>[6]</sup>。功能性磁共振成像(fMRI)研究证明,长期吸食海洛因的成瘾者大脑突显性网络功能连接异常增强<sup>[7]</sup>,从而引起脑默认网络结构连接和功能连接不同程度破坏<sup>[8]</sup>以及颌下腺神经内分泌功能异常<sup>[9]</sup>。Bax 基因是一种促进细胞凋亡的基因。人类 Bax 基因定位于染色体 19q13.3~19q13.4,含 6 个外显子,其 C 端含有疏水氨基酸组成的跨膜结构域,Bax 蛋白为整合膜蛋白<sup>[10]</sup>。细胞线粒体内外膜之间的通透性转换孔(PTP)具有调节线粒体通透性的作用。正常情况下,PTP 是关闭的。在凋亡诱导因素 Bax 作用下,线粒体跨膜电位降低,PTP 开放,导致线粒体膜通透性增大,使细胞凋亡的启动因子如:细胞色素 C,凋亡蛋白酶激活因子(Apaf)和凋亡诱导因子(AIF)等从线粒体内释放出来。细胞色素 C(Cytc)作为呼吸链中重要的电子传递体<sup>[11]</sup>,它从线粒体内膜上的释放阻断了电子向下游的传递,危及呼吸链的功能并导致超氧阴离子的加速产生,细胞色素 C 和 Apaf 相

互作用可激活 caspase-9,进而激活 caspase-3,导致细胞凋亡。给予海洛因后,免疫组化实验结果发现,大鼠小脑皮质细胞中 Bax 阳性细胞数明显增多<sup>[4]</sup>,酶联免疫吸附法(ELISA)检测发现,大鼠小脑皮质细胞中 Bax 表达水平显著升高,caspase-9 和 caspase-3 活性显著增强,与对照组比有显著性差异( $P < 0.01$ ),与前期实验结果相一致。免疫组化法和 ELISA 法检测结果相互验证实验结果。实验结果提示,海洛因成瘾不但与大脑神经中枢有关,而且小脑皮质也参与海洛因成瘾和戒断过程。海洛因可能通过诱导小脑皮质 Bax 基因表达,激活 caspase-9 和 caspase-3,引起小脑皮质细胞凋亡,导致小脑皮质细胞的损伤。本文的实验结果为进一步研究精神依赖药物成瘾机制和戒毒治疗提供新的参考依据。

## 参考文献

- [1] Kovatsi L, Fragou D, Samanidou V, et al. Drugs of abuse: epigenetic mechanisms in toxicity and addiction [J]. Curr Med Chem, 2011, 18 (12): 1765-1774.
- [2] Yuan J, Liu X D, Han M. Neuroreceptor and its transporters imaging by PET and SPECT in heroin addiction [J]. International Journal of Radiation Medicine and Nuclear, 2013, 1: 30-33, 41.
- [3] 俞发荣,连秀珍,张红梅,等.儿茶酚胺类激素在海洛因成瘾中的作用[J].中国应用生理学杂志, 2014, 30 (2): 124-126, 131.
- [4] 谢明仁,李作平,俞发荣,等.海洛因对小脑皮质 Bax 表达的影响[J].实验动物科学, 2013, 30 (5): 6-8.
- [5] 杨玲,张更生,赵鑫.海洛因依赖性抑制控制功能的损伤机制及其可逆性[J].心理科学进展, 2014, 22 (3): 439-447.
- [6] 朱佳,王亚蓉,李强,等.海洛因依赖性脑灰质体积的 VBM 研究[J].临床放射学杂志, 2012, 31 (2): 175-179.
- [7] 陈佳杰,刘洁荣,魏璇,等.海洛因成瘾者大脑突显性网络异常的独立成分分析[J].磁共振成像, 2017, 54 (2): 100-104.
- [8] 董健卫,陈艳美,杨水清,等.海洛因成瘾患者静息状态下脑默认网络功能及结构连接的变化[J].中山大学学报(医学科学版), 2015, 36 (6): 801-808, 796.
- [9] 胡赞,梁文妹,李一欣,等.海洛因依赖大鼠颌下腺 IL-1、TNF 表达的改变[J].实验动物科学, 2017, 34 (6): 1-5.
- [10] Oltvai Z N, Millman C L, Korsmeyer S J. Bcl-2 heterodimerize in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death[J]. Cell, 1993, 74: 609-619.
- [11] Urszula S H, Lilianna T L. Effect of platinum anticancer drugs on the cytochrome c conformation [J]. Inorganica Chimica Acta, 2017, 457 (1): 130-135.

# Expression of Bax Gene in Cerebellum of Rats and Psychodependence Drug Addiction Model Copied

XIE Mingren, YU Farong

(Key Laboratory of Evidence of Science and Technology Research and Application, Gansu Province, Gansu University of  
Political Science and Law, Lanzhou 730070, China)

**Abstract: Objective** To study the effects of psychotropic drug (heroin) on the expression of Bax gene in the cerebellar of addicted rats. **Method** An addictive rat model was used to establish with a dose-increasing method and the gene expression of Bax in the cerebellar cells was detected by ELISA. **Result** After injecting heroin for 7 days, the rats showed obvious withdrawal symptoms. The levels of Bax, Caspase-3, and Caspase-9 in cerebellar cells were increased 88.21%, 94.21%, and 87.24% respectively, which was significantly different compared with the control group ( $P<0.01$ ). **Conclusion** The damage effect of psychoactive drugs (heroin) on brain tissue cells may be achieved by inducing the expression of cerebellar Bax gene and activating caspase.

**Key words:** psychotropic drugs; Heroin; Bax; Cerebellum; rats

(上接第 5 页)

# High Fat and High Sugar Diet Induced the Fat Model of Bama Miniature Pigs

XIANG Lei<sup>1,2</sup>, CHEN Hua<sup>2</sup>, ZHAO Deming<sup>1</sup>

(1. College of veterinary medicine, china agricultural university, Beijing 100093, China)

(2. Laboratory animal center of PLA general hospital, Beijing 100853, China)

**Abstract: Objective** The effects of high fat and high sugar diet (HFHSD) on fat distribution and blood biochemical parameters in Bama miniature pigs. **Method** Fourteen Bama minipigs were divided into two groups. Experimental group pigs fed with high fat and high sugar diet for 30 weeks. Six Bama miniature pigs in control group were fed with normal feed. After 30 weeks, body mass index, fat distribution and biochemical indexes of blood were measured. **Result** The body weight, body mass index (BMI) and total fat content especially visceral fat content increased significantly in experimental group. Blood biochemical indicators of insulin, total cholesterol, high and low density lipoprotein cholesterol, blood creatinine, uric acid and urea were increased significantly compared with control group. **Conclusion** High fat and high sugar diet can cause fat accumulation in Bama miniature pigs, especially visceral fat. Blood biochemistry is characterized by hyperlipidemia and impaired renal function.

**Key words:** Bama miniature pig; fat distribution; blood biochemistry; type 2 diabetes mellitus

## 研究报告

不同时期绿色荧光裸鼠雌鼠血浆及组织中性激素水平变化<sup>\*</sup>尤金炜<sup>1</sup> 董敏<sup>1</sup> 刘彪<sup>1</sup> 赵志刚<sup>1</sup> 王丽娟<sup>2</sup> 马畅<sup>1</sup> 张旭亮<sup>1</sup> 刘捷<sup>1</sup> 恽时锋<sup>1</sup>

(1.东部战区总医院比较医学科,全军实验动物科普与伦理教育基地,全国科普教育基地,南京 210002)

(2.南京农业大学食品科技学院,南京 210002)

**摘要:**目的 了解不同妊娠期、泌乳期绿色荧光(Green Fluorescence Protein,简称GFP)裸鼠雌鼠血浆中雌激素、孕激素、泌乳素及各组织中泌乳素及泌乳素受体mRNA水平变化。方法 通过电化学发光法测定血浆中激素的水平,通过荧光定量PCR法测定泌乳素及泌乳素受体mRNA相对表达量。结果 GFP裸鼠雌鼠妊娠期内雌激素和泌乳素水平不断下降、孕激素的水平先升后缓慢下降、组织中泌乳素mRNA水平较低、泌乳素受体水平较高;而在泌乳期内雌激素、孕激素水平较稳定、组织中泌乳素mRNA水平较高,泌乳素受体水平较低。结论 不同时期GFP裸鼠雌鼠体内性激素的水平不同,参与裸鼠妊娠调控过程,为解决雌鼠不孕、易流产等问题提供了基础参考值和内分泌水平的解决思路。

**关键词:**绿色荧光裸鼠;雌激素;孕激素;泌乳素;泌乳素受体

**中图分类号:** Q956 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0010-04

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.003

GFP裸鼠是一种将绿色荧光蛋白稳定表达于裸鼠各个组织器官的转基因小鼠类型,其同时具有普通裸鼠的胸腺缺陷特性和稳定、系统表达绿色荧光的特性,在生物、医学研究中具有重大意义<sup>[1]</sup>。

本课题组自成功构建GFP裸鼠模型后,已将其多种生理生化指标检测完善,主要组织中绿色荧光分布特点也基本明确<sup>[2-4]</sup>。GFP裸鼠模型构建过程中,主要的难点在于该种系裸鼠繁殖能力低下,特别是雌鼠不孕情况多发。本课题组已检测该种系雌鼠的动情周期,发现GFP裸鼠雌鼠动情周期发生率明显低于BALB/c裸小鼠<sup>[5]</sup>。裸鼠动情周期发生率主要取决于其下丘脑-垂体-卵巢性腺轴分泌的激素水平,但此方面文献报道较少<sup>[6]</sup>。为确定雌性GFP裸鼠血清中性激素水平,明确其不孕的发生原因,本课题组将不孕、孕早期、孕中期、孕晚期、泌乳早期、泌乳中期、泌乳晚期共7种不同生殖阶段雌性绿色荧光裸鼠血清及生殖相关各组织(下丘脑、延髓、肾上腺、卵巢、子宫)中泌乳素水平加以对照,为后期研究GFP裸鼠的生殖功能铺平道路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

分别取不孕、孕早期(妊娠6d)、孕中期(妊娠12d)、孕晚期(妊娠18d)、泌乳早期(泌乳后6d)、泌乳中期(泌乳后12d)、泌乳晚期(泌乳后18d)SPF级雌性GFP裸鼠(GFP nu/nu)各10只,GFP裸鼠为本实验室提供[SCXK(军)2012-0014]。动物均在SPF级设施饲养[SYXK(军)2012-0047]。

### 1.2 妊娠时间确定方法

合笼后第二天早8点采用观察阴道栓的方法确定是否受精,如受精,则定该天为妊娠第1天;雌鼠产下新生鼠当日为产后第1天,第1天至第6天为泌乳早期,第7天至第12天为泌乳中期,第13天至第18天为泌乳晚期。

### 1.3 血清性激素水平检测

使用电化学发光法检测小鼠血清中雌二醇、泌乳素、孕激素水平,试剂提供商为德国罗氏诊断公司。

收稿日期:2019-02-21

<sup>\*</sup> 基金项目:中国人民解放军东部战区总医院科学研究课题(No.2016056)

作者简介:尤金炜(1983—),男,硕士,研究方向:医学实验动物研究与实验室管理.E-mail:jsyjw000@163.com

通信作者:恽时锋(1965—),男,教授,研究方向:医学实验动物研究与管理.E-mail:yunshifeng1@163.com

1.4 组织泌乳素水平检测

按照罗氏公司提供说明书进行反转录,获得

cDNA 后进行荧光定量 PCR 检测。试剂提供商为德国罗氏公司,引物序列见表 1。

表 1 荧光定量 PCR 引物序列  
Table 1 Quantitative PCR primer sequence

| 基因名    | 登录号          | 序列                       | 位置      |
|--------|--------------|--------------------------|---------|
| mPRL   | FJ424613     | F:GACGTGGCTTCTGTGCTTGCTG | 12-33   |
|        |              | R:GCAGCACTGTCTTCTCGAGCTG | 273-252 |
| mPRL-R | BC125651     | F:CTGGCCATCCTCCTGTCTTAC  | 715-735 |
|        |              | R:GTCCAGGTC TCGCAATAG    | 912-895 |
| GAPDH  | XM_001476723 | F:ACCACAGTCCATGCCATCAC   | 434-453 |
|        |              | R:TCCACCACCCTGT TGCTGTA  | 885-866 |

1.5 统计方法

应用 SPSS17.0 软件进行统计分析,各组数据均用平均值±标准差表示,多组间均数比较采用单因素方差分析法,两组间均数比较采用独立样本 t 检验。运用 Pearson Bivariate Correlation 进行双侧相关分析。以  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  作为有统计学差异的标准。

2 结果

2.1 各期 GFP 裸鼠雌鼠血清中雌二醇、孕激素、泌乳素水平

在 GFP 裸鼠雌鼠血清中,可以观察到,雌激素在妊娠早期达到高峰之后随妊娠进程不断下降,至泌乳晚期降至最低;孕激素在妊娠早期有一个幅度较大的下降,之后上升至未孕水平,泌乳期时孕激素水平不断缓慢下降;泌乳素与雌激素较为相似,但其在泌乳早期多了一个分泌高峰,见图 1、图 2、图 3。

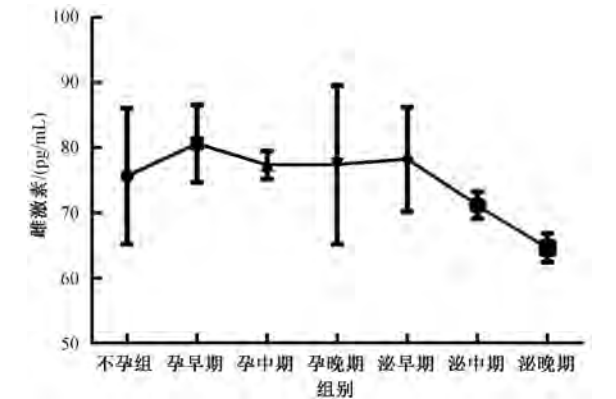


图 1 各组 GFP 裸鼠雌鼠血清中雌激素水平 (pg/mL)  
Fig.1 The levels of estrogen in the serum of female mice in each group

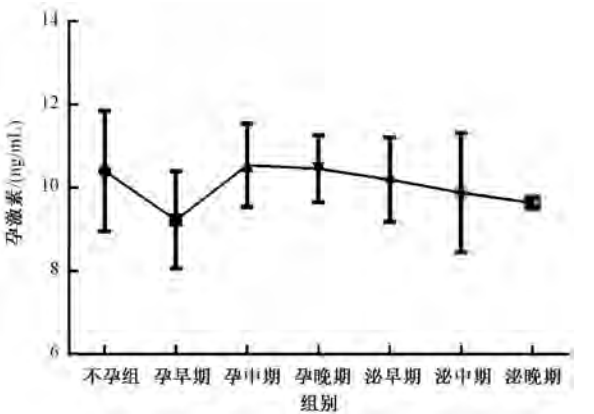


图 2 各组 GFP 裸鼠雌鼠血清中孕激素水平 (ng/mL)  
Fig.2 The levels of progesterone in the serum of female mice in each group

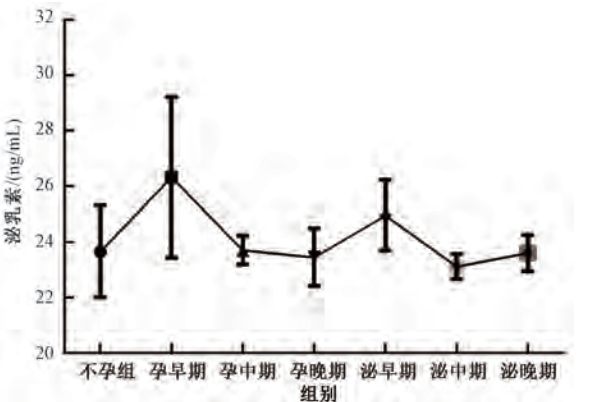


图 3 各组 GFP 裸鼠雌鼠血清中泌乳素水平 (ng/mL)  
Fig.3 The levels of prolactin in the serum of female mice in each group

2.2 各期 GFP 裸鼠雌鼠下丘脑、延髓、肾上腺、卵巢、子宫中泌乳素水平

泌乳素在延髓和肾上腺表达普遍较其他组织高,最高峰位于泌晚期,泌乳期整体较妊娠期 PRL 合成多;泌乳素受体与之相反,妊娠期整体较泌乳期表达高,且妊娠早期表达最高,随妊娠进行,泌乳素受体逐渐表达下降,见图 4 和图 5。

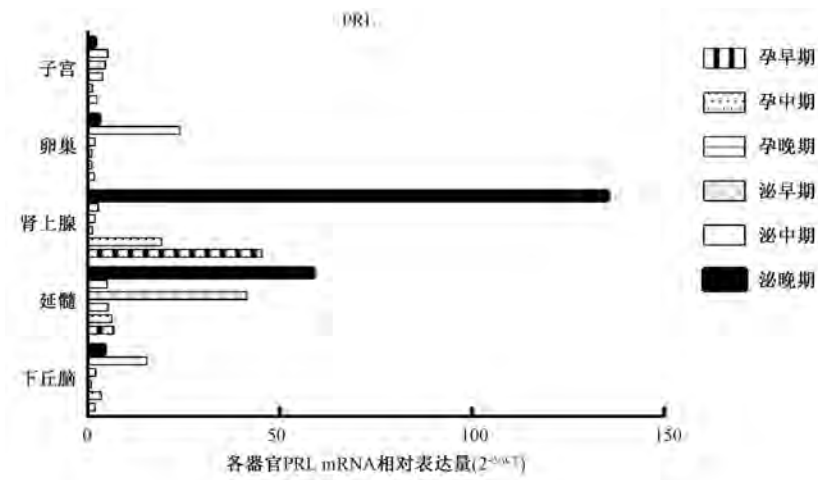


图 4 各期 GFP 裸鼠雌鼠下丘脑、延髓、肾上腺、卵巢、子宫组织中 PRL mRNA 水平对比  
Fig.4 Comparison of PRL mRNA levels in hypothalamus, medulla oblongata, adrenal gland, ovary and uterus in different stages

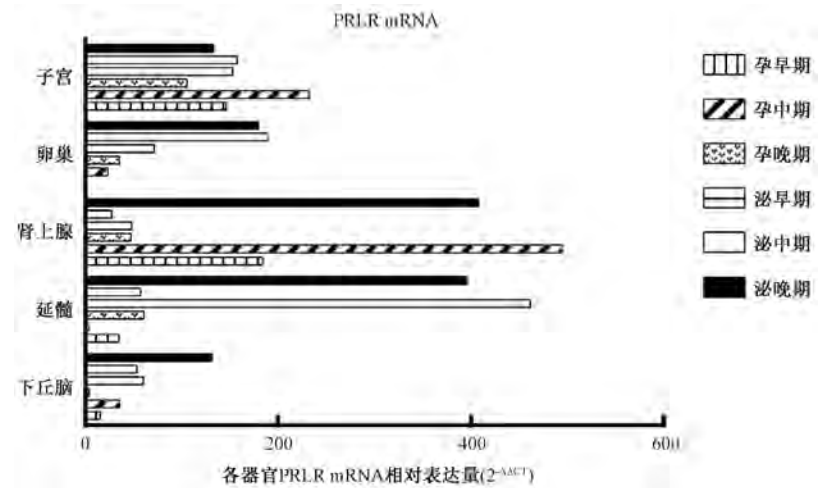


图 5 各期 GFP 裸鼠雌鼠下丘脑、延髓、肾上腺、卵巢、子宫组织中 PRLR 受体 mRNA 水平对比  
Fig.5 Comparison of PRLR mRNA levels in hypothalamus, medulla oblongata, adrenal gland, ovary and uterus in different stages

3 讨论

哺乳动物在妊娠时高剂量的孕激素对胚胎发育是有益且必须的,但高剂量雌激素会影响胚胎结构抑制胎儿生长<sup>[7]</sup>。我们在 GFP 裸鼠雌鼠妊娠血清中同样发现了相似的现象:雌激素在妊娠早期含量最高,随着妊娠进展不断下降;孕激素在妊娠早期没有明显升高,甚至比未孕鼠血清中含量还低,但随着妊娠发展,孕激素水平不断升高且直至泌乳晚期均维持在较高水平。

本课题组同时发现:GFP 裸鼠雌鼠血清中泌乳素水平在妊娠早期升至最高,以后不断下降。此结

果与前期其他课题组在普通小鼠血清中发现的妊娠期及泌乳期泌乳素水平变化趋势相同<sup>[8]</sup>。结合我们同期观察发现的表达于子宫的泌乳素受体含量在妊娠早期最高,说明与普通裸鼠相似,GFP 裸鼠雌鼠于妊娠早期同样需要大量泌乳素发挥生物学功能。

实验发现,GFP 裸鼠雌鼠在妊娠早期大量分泌泌乳素,泌乳素对神经系统的自身负反馈作用可能会抑制下丘脑合成泌乳素,而接下来的试验证实了此猜测。我们观察到妊娠早期的下丘脑、延髓、肾上腺组织中泌乳素 mRNA 含量均位于较低水平,同时各个器官中泌乳素受体的表达均较高。可能是由于

泌乳素在妊娠后期开始合成升高,各靶器官中空出大量泌乳素结合位点,为泌乳素在妊娠结束后发挥相应的生物学作用打下基础。

结合早期研究发现的 GFP 裸鼠模型主要存在的 不孕、易流产等问题,本课题组从内分泌水平提出解决思路:在未孕鼠合笼早期给与雌激素、泌乳素,而在妊娠全程提供孕激素,妊娠晚期至泌乳期结束提供泌乳素。此种思路结合不同阶段裸鼠不同生理需求,最大程度地模拟裸鼠自身内分泌周期,有较大应用前景。但仍存在一定不足,主要是各个阶段各种激素需求量不尽相同,具体定量工作仍未完成,且各个绿色荧光裸鼠不同个体可能需要激素量也不同,需要进一步研究确认。

参 考 文 献

[ 1 ] 张立波,刘彪,田小芸,等. 绿色荧光裸小鼠的选育初报[J].

实验动物与比较医学, 2013, **33**(4):306-309.  
[ 2 ] 尤金炜,董敏,刘彪,等. GFP 在绿色荧光裸鼠不同组织中的表达及分析[J]. 中国实验动物学报, 2014, **22**(5):67-70.  
[ 3 ] 尤金炜,刘彪,张旭亮,等. 绿色荧光裸鼠部分免疫学指标的测定及分析[J]. 实验动物科学, 2015, **32**(5):15-17.  
[ 4 ] 胡文娟,方天,刘彪,等. 绿色荧光裸小鼠睾丸组织学观察及精子质量检查[J]. 实验动物与比较医学, 2016, **36**(2):126-128.  
[ 5 ] 胡文娟,方天,陈莉,等. 绿色荧光裸小鼠动情周期的观察[J]. 实验动物与比较医学, 2017, **37**(4):109-113.  
[ 6 ] 杜纳纳,许丹丹,黄莉莉,等. 去卵巢和性成熟期 ICR 小鼠动情周期的观察[J]. 中国病理生理杂志, 2015, **31**(12):2301-2304.  
[ 7 ] 王沛华.孕早期血清 P、E<sub>2</sub> 监测与妊娠结局相关性的研究[J].山西大同大学学报(自然科学版),2018,**34**(3):51-54.  
[ 8 ] 朱河水,都军霞,刘涛,等. 不同时期小鼠血浆中催乳素的变化[J]. 贵州农业科学, 2008, **36**(2):123- 124.

The Changes of Plasma and Tissue Levels of Sex Hormones in Nude Female Mice with Green Fluorescence at Different Stages

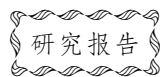
YOU Jinwei<sup>1</sup>, DONG Min<sup>1</sup>, LIU Biao<sup>1</sup>, ZHAO Zhigang<sup>1</sup>, WANG Lixian<sup>2</sup>, MA Chang<sup>1</sup>,  
ZHANG Xuliang<sup>1</sup>, LIU Jie<sup>1</sup>, YUN Shifeng<sup>1</sup>

(1.Department of Comparative Medicine, General Hospital of Eastern Theater Command, Army Education Base of Science and Ethics of Experimental Animal, National Sciene Education Base, Nanjing 210002, China)  
(2.College of Food Science and Technology of Nanjing Agricultural University 210002, China)

**Abstract:**To understand the changes in plasma levels of estrogen, progesterone, prolactin, and prolactin receptor mRNA in mice during pregnancy and lactation. Plasma levels of progesterone were measured by electrochemiluminescence and relative mRNA levels of prolactin and prolactin receptor were measured by fluorescence quantitative PCR. During the gestation period, estrogen and prolactin levels decreased continuously, progesterone levels increased first and then decreased slowly, prolactin mRNA levels were low in tissues, and prolactin receptor levels were high. During lactation, the levels of estrogen and progesterone are relatively stable, the levels of prolactin mRNA in tissues are relatively high, and the levels of prolactin receptors are relatively low. Different levels of sex hormones in nude mice with green fluorescence were different in different periods, and they participated in the process of pregnancy regulation in nude mice. It provides basic reference value and endocrine level for solving the problems of female mouse infertility and abortion.

**Key words:**Green fluorescent nude mice; Estrogen; Progesterone; Prolactin; Prolactin receptor





# 微卫星与生化位点法对 BALB/c 小鼠遗传检测比较分析<sup>\*</sup>

覃辉艳 陈华凤 王芳 杨慧 李彬 张洁宏

(广西壮族自治区疾病预防控制中心, 南宁 530028)

**摘要:**目的 应用微卫星 DNA 标记检测 BALB/c 小鼠的遗传质量,并与现行国家标准生化标记法进行比较,探讨其在近交系小鼠遗传监测中的应用,为建立微卫星 DNA 检测方法奠定基础。**方法** 采用 20 个微卫星基因位点和毛细管电泳技术对 BALB/c 小鼠进行遗传质量检测,同时采用现行国家标准生化标记法进行检测比较分析。**结果** 各样品 20 个微卫星基因位点 DNA 片段大小相同,没有新的等位基因出现;生化标记检测结果亦显示 Akp1 等 14 个生化标记基因均为纯合,个体间生化标记表型均一致,根据国家标准符合品系特征。微卫星 DNA 标记检测结果与生化标记检测结果一致。**结论** 微卫星 DNA 标记可准确可靠、方便快捷地检测近交系小鼠遗传质量,本研究所选的 20 个微卫星基因位点可用于 BALB/c 小鼠遗传质量监测。

**关键词:** BALB/c 小鼠;微卫星 DNA 标记;生化标记

**中图分类号:** Q956 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0014-04

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.004

实验动物在生命科学研究中占有重要地位,实验动物的质量,特别是遗传质量,直接影响实验结果的准确性、科学性和重复性。近交系小鼠因其在实验中所表现出的一致性、再现性和敏感性,在科学研究中尤其是遗传学、肿瘤学研究有着不可替代的重要地位<sup>[1]</sup>。一直以来,对近交系小鼠的遗传质量监测常以生化标记法、免疫标记法等为主,大多为以检测表型变异推测基因变异,存在一定局限性。随着生物技术的发展,对近交系小鼠直接进行基因检测,则能更直接更有效地反应其遗传质量。微卫星 DNA (microsatellite DNA), 又称短串联重复序列 (short tandem repeat, STR) 或简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR), 是均匀分布于真核生物基因组中的简单重复序列,由 2~6 个核苷酸的串联重复片段构成。具有分布广泛、多态性丰富、易于检测、呈共显性遗传、结果稳定可靠等特点,被认为是各类遗传标记检测中最有价值的一种。目前,国内已有学者利用微卫星标记检测技术开展近交系小鼠遗传质量分析研究,但与传统国家标准检测方法进行比较分析尚少见报道。因此,本研究应用 20 个微卫星位点对近交系 BALB/c 小鼠进行检测,同时采用现行国家标

准生化标记法进行检测比较分析,验证微卫星遗传检测方法的可靠性,为该技术的应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

BALB/c 小鼠共 10 只,为 BALB/cAn 亚系,雌雄各半,由广西医科大学实验动物中心繁殖,生产许可证号:SCXK(桂)2014-0002。

### 1.2 主要仪器与试剂

仪器:Sigma 高速冷冻离心机;Bio-Rad 电泳仪;GelDoc-It<sup>2</sup> 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 Taq<sup>TM</sup> Hot Start Version PCR 反应试剂盒;实验小鼠遗传检测试剂盒等。

### 1.3 方法

#### 1.3.1 微卫星 DNA 检测

1.3.1.1 核酸样品制备:用灭菌剪刀剪取小鼠长约 0.6 cm 的尾尖组织,剪碎,置于 1.5 mL 的无菌离心管中。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

收稿日期:2019-01-09

<sup>\*</sup> 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:覃辉艳(1981—),女,副主任技师,研究方向:实验动物质量检测.E-mail:qinhuaiyan123@sina.com

通信作者:张洁宏(1969—),男,主任技师,研究方向:实验动物质量检测.E-mail:Zhjh510@126.com



2.2 生化标记检测

Akp1 等 14 个生化标记基因均为纯合,个体间生化标记表型均一致,且根据国家标准,符合品系特征,见表 3。

表 3 各样品各生化标记位点检测结果  
Table 3 The biochemical marker results of each sample

| 检测位点 | 标记基因类型 |     |     |     |     |     |     |     |     |      |
|------|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
|      | 1 号    | 2 号 | 3 号 | 4 号 | 5 号 | 6 号 | 7 号 | 8 号 | 9 号 | 10 号 |
| Akp1 | b      | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b    |
| Car2 | b      | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b    |
| Ce2  | a      | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a    |
| Es1  | b      | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b    |
| Es3  | a      | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a    |
| Es10 | a      | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a    |
| Gpd1 | b      | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b    |
| Gpi1 | a      | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a    |
| Hbb  | d      | d   | d   | d   | d   | d   | d   | d   | d   | d    |
| Idh1 | a      | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a    |
| Mod1 | a      | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a    |
| Pep3 | a      | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a    |
| Pgm1 | a      | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a   | a    |
| Trf  | b      | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b   | b    |

注:a 表示:在 Ce2、Mod1、Pgm1 位点为快带,在 Es3、Es10、Gpi1、Idh1、Pep3 位点为慢带;b 表示:在 Car2、Gpd1 位点为快带,在 Akp1、Es1、Trf 位点为慢带;d 表示:在 Hbb 位点为慢带。

Note:a represent fast band at loci Ce2, Mod1 and Pgm1, and slow band at loci Es3, Es10, Gpi1, Idh1 and Pep3.b represent fast band at loci Car2 and Gpd1, and slow band at loci Akp1, Es1 and Trf. d represent fast band at locus Hbb.

3 讨论

近交系是经至少连续 20 代的全同胞兄妹或亲代与子代交配培育而形成的具有稳定性状特征和繁殖能力的实验动物品系。按照国家标准要求,近交系动物近交系数应大于 99%。BALB/c 小鼠是目前生命科学研究中最广泛应用的近交系之一,各国均有生产和应用。我国于 1985 年从美国 NIH 引进到中国医学科学院实验动物研究所,为 BALB/c 第 180 代,历经多年培育,至今已在国内形成几十个群体。因群体数量较多,对相应群体进行遗传检测分析,不仅可了解其遗传质量,建立其遗传背景资料,且可阐明使用不同 BALB/c 小鼠群体进行实验的重复性和可比性。

微卫星 DNA 标记是继 RFLP(限制性内切酶片

段长度多态性)技术之后发展起来的新一代分子遗传标记技术,自 20 世纪 80 年代以来,经过 30 年的不断发展,微卫星标记技术已被广泛应用于亲缘关系鉴定、人类疾病诊断、实验动物遗传质量分析、生物群体遗传结构与物种资源保护等多领域<sup>[3]</sup>。目前,微卫星 DNA 的 PCR 产物分型检测方法主要有琼脂糖凝胶电泳法、聚丙烯酰胺电泳法、荧光标记引物毛细管电泳法、基于扩增子测序的分型法等<sup>[4]</sup>。王洪等<sup>[1]</sup>、刘先菊等<sup>[5]</sup>与王越甲等<sup>[6]</sup>分别采用琼脂糖凝胶电泳法优选近交系小鼠微卫星基因位点分析了国内常用近交系小鼠的遗传概貌。陈振文等<sup>[7]</sup>、欧阳兆和等<sup>[8]</sup>与韩喜彬等<sup>[9]</sup>分别运用微卫星标记和聚丙烯酰胺电泳法对国内近交系小鼠进行了遗传质量分析。近年来,倪丽菊等<sup>[2]</sup>和李银银等<sup>[10]</sup>分别利用微卫星标记和毛细管电泳法分析了国内多个品系近交系小鼠的遗传状况。毛细管电泳又称高效毛细管电泳,是一种高效液相分离法,是经典电泳技术与现代微柱分离相结合的产物,离子或荷电粒子以电场为驱动力,在毛细管中按其淌度或和分配系数不同进行高效快速分离。与传统电泳法操作繁琐,分离率低、定量困难相比,毛细管电泳具有易自动化、分析速度快、分离效率高、定量准确、操作方便等优点。本研究采用 20 个多态性含量丰富的微卫星位点,采用荧光标记引物毛细管电泳法对 BALB/c 小鼠进行遗传质量分析,研究结果显示,各样品 20 个微卫星位点 DNA 片段大小相同,没有新的等位基因出现,生化标记检测结果亦显示 Akp1 等 14 个生化标记基因均为纯合,个体间生化标记表型均一致,且符合国家标准确定的品系特征。微卫星 DNA 检测结果与传统的生化标记检测结果一致,比对结果显示,微卫星 DNA 检测可应用于实验动物遗传质量评价,且微卫星 DNA 检测比生化标记检测覆盖面更广,荧光标记引物毛细管电泳法检测结果更准确,更能直接有效地反应实验动物的遗传质量。近年来的研究也表明微卫星 DNA 标记可区分近交系小鼠不同品系和亚系,可有效运用于近交系小鼠遗传检测<sup>[1-2,5-10]</sup>。但目前,微卫星 DNA 标记技术仍存在一些问题,如无效等位基因的出现,在纯合体个体上,无效等位基因表现为无可见的扩增条带,通常会被认为是因 PCR 技术或 DNA 模板质量问题而被忽视<sup>[11]</sup>;此外,由于使用引物的不同,有时会导致所得试验结果差异较大。因此,在行业内,选定相应引物,并形成相关标准非常必要。

## 参 考 文 献

- [1] 王洪,岳秉飞,刘双环,等.小鼠11个品系20个微卫星基因位点的遗传分析[J].中国比较医学杂志,2006,16(3):135-138.
- [2] 倪丽菊,赵丽亚,赵立虎,等.利用多重荧光STR技术分析上海地区7品系常用近交系小鼠核心群的遗传特性[J].中国实验动物学报,2016,24(1):72-79.
- [3] 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.
- [4] 方治伟,李论.SSR分型技术研究进展[J].生物化工,2018,4(1):118-121.
- [5] 刘先菊,王艳蓉,高子琪,等.近交系小鼠微卫星DNA引物的筛选和T<sub>m</sub>值优化研究[J].实验动物科学,2012,29(1):9-13.
- [6] 王越甲,杨炜峰,车路平,等.利用优选的微卫星标记建立常用大小鼠品系的遗传监测体系[J].实验动物科学,2014,31(3):5-9+14.
- [7] 陈振文,欧阳兆和,董罡,等.用微卫星标记技术对国内BALB/c小鼠遗传质量的分析[J].遗传,2004,26(6):845-848.
- [8] 欧阳兆和,陈振文,李瑞生,等.微卫星DNA多态性在十种近交系小鼠遗传监测中的应用研究[J].中国比较医学杂志,2004,14(2):11-14.
- [9] 韩喜彬,苏玉虹,王洪,等.辽宁省6种常用近交系小鼠10个微卫星位点的遗传质量检测报告[J].中国比较医学杂志,2011,21(5):22-25.
- [10] 李银银,吴绍亮,王洪,等.微卫星DNA分析国内24个近交系小鼠遗传状况[J].中国比较医学杂志,2017,27(8):43-49.
- [11] 文亚峰,韩文军,谢伟东,等.微卫星标记中的无效等位基因[J].生物多样性,2013,21(1):117-126.

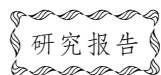
## Genetic Analysis of BALB/c Mice by Using Microsatellite DNA Markers and Biochemical Markers

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

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

**Abstract:** Microsatellite DNA marker is one of the most valuable genetic marker, in order to discuss it's applicability in genetic monitor of BALB/c mice, and lay the foundation for establishing STR genetic quality monitor method, 20 microsatellite DNA markers and capillary electrophoresis were adopted to genetic detect BALB/c mice, and compared with biochemical marker analysis in current national standards. The result showed that the DNA fragments of 20 microsatellite loci of each sample were the same, there were no new alleles. Biochemical marker analysis also showed that fourteen biochemical marker genes were homozygous, the phenotypes of biochemical markers were consistent, according to current national standards, the sample conformed to strain characteristics. The STR method result were coincident with that of Biochemical marker analysis. The microsatellite DNA marker method is more accurate, reliable, rapid and convenient, and the 20 microsatellite DNA markers selected in this study could be used to monitor genetic quality of BALB/c mice.

**Key words:** BALB/c mice; Microsatellite DNA marker; Biochemical marker



# 兔膝关节关节炎模型的建立及评价<sup>\*</sup>

欧慧瑜 李瑞鹏 邵珍怡 郭秋平

(广州医药研究总院有限公司药物非临床评价研究中心, 广州 510240)

**摘要:**目的 通过兔软骨缺损制备兔膝关节关节炎模型并进行评价。方法 将动物按体质量和性别随机分成3组:假手术组,模型组和阳性对照氨基葡萄糖组,每组12只。造模4周后开始灌胃给药,每天1次,连续给药4周。末次给药后,将动物处死,ELISA试剂盒检测血清及关节液中IL-1 $\beta$ 和TNF- $\alpha$ 水平,对关节软骨和滑膜进行HE染色,并对关节软骨进行Mankin's评分以评价其损伤情况。结果 与假手术组相比,模型组血清、关节液中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平明显升高,而给予氨基葡萄糖可降低血清、关节液中IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 水平。HE染色见模型组软骨结构改变、缺损,滑膜有炎细胞浸润;软骨评分明显高于假手术组。给予氨基葡萄糖可以减轻软骨缺损,减少滑膜炎细胞浸润,降低软骨评分。结论 关节软骨钻孔可建立兔膝关节关节炎模型,反映其主要特征,并能通过给予阳性对照药减轻损伤和炎症反应。该模型可用于治疗关节炎药物的评价和筛选。

**关键词:**软骨缺损;关节软骨;软骨下骨;兔

**中图分类号:** R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0018-04

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.005

骨关节炎(osteoarthritis, OA)是由机械和生物因素引起的以关节软骨退行性病变和滑膜炎性病变为主要特征的慢性疾病<sup>[1-2]</sup>,导致患者出现疼痛和功能障碍,严重影响其生活质量。建立一种能模拟OA发病过程的模型,对于筛选和评价治疗OA的药物非常重要。关节软骨的直接损伤可以引起骨关节炎病变或软骨再生,这主要取决于损伤的部位,损伤的大小和动物的年龄<sup>[3]</sup>。本研究中使用6月龄新西兰兔,通过关节软骨钻孔致软骨缺损成功制备了兔OA模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

盐酸氨基葡萄糖胶囊(浙江诚意药业股份有限公司);6%戊巴比妥钠;白介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) ELISA检测试剂盒(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司)。

### 1.2 实验动物

新西兰兔(雌雄各半,6月龄),由山东济南金丰

实验动物有限公司提供(许可证号SCXK(鲁)2014-0006)。动物饲养于普通级动物房,温度16~26℃,相对湿度40%~70%,12 h照明/12 h黑暗交替,动物自由摄食和饮水。本实验遵守广东省实验动物保护和指南,并经药物非临床评价研究中心的实验动物伦理委员会批准。

### 1.3 仪器与设备

电子天平(北京赛多利斯科学仪器有限公司);3-18k高速冷冻离心机(德国Sigma公司);Elx800酶标仪(美国Bio Tek公司);病理切片机(德国Leica公司),OLYMPUS BX41显微镜和DP71+IPP6.0图像采集系统。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 动物分组:**将检疫合格的动物,根据体质量和性别随机分成3组:假手术组,模型组和阳性对照氨基葡萄糖(剂量为0.034 g/kg)组,每组12只,雌雄各半。每天观察各组动物的食量、大小便、精神状态等。

**1.4.2 造模方法:**取36只新西兰兔,用6%戊巴比妥钠(0.7 mL/kg)耳缘静脉注射麻醉动物。左侧膝

收稿日期:2018-11-29

<sup>\*</sup> 基金项目:广州市科信局生物产业重大专项(No.201300000053)

作者简介:欧慧瑜(1976—),女,高级工程师,研究方向:药理毒理.E-mail:ohy\_76@126.com

通信作者:郭秋平(1978—),女,高级工程师,研究方向:新药安全性评价.E-mail:vipvivenguoguo@126.com

部内侧纵向切口,长约 2 cm,将髌骨翻向外侧,显露髌骨关节面。检查膝关节腔有无积液或粘连,关节软骨平坦,色泽正常后,先用直径 2 mm 钻头在膝关节屈曲 90°时髌骨所对应股骨内、外侧髁间关节面中部初步定位,钻出小凹陷,然后换 4.2 mm 的钻头在此基础上钻出直径 4.2 mm、深 3 mm 的关节软骨缺损区。将髌骨复位,逐层缝合关节囊和皮肤切口。术后立即肌肉注射青霉素钠以防止感染。假手术组的动物仅暴露髌骨不钻孔,其余操作方法与上述描述相同。造模 4 周后,各组动物开始灌胃给药,每天 1 次,连续给药 4 周。各组动物的给药体积均为 10 mL/kg。假手术组和模型组给予相同体积的 CMC-Na 溶液。

1.5 检测指标

1.5.1 血清和关节液中 IL-1β 和 TNF-α 检测:末次给药后,动物静脉采血,静置 2 h 后,分离血清,置于 -20 ℃ 冰箱保存待测。用注射器抽取 1 mL 生理盐水注入关节腔冲洗,抽出冲洗液,4 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液,置于 -20 ℃ 冰箱保存。按照 ELISA 试剂盒说明书,检测血清和关节液 IL-1β 和

TNF-α 水平。

1.5.2 组织病理学观察:采血结束后,处死动物,将各组动物造模侧的关节软骨和滑膜组织用 4% 甲醛溶液固定,脱水,包埋,切片后进行 HE 染色。参照 Mankin's 评分标准对关节软骨进行评分<sup>[4]</sup>,验证 OA 模型是否复制成功。

1.6 统计方法

结果以平均值±标准差表示,采用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。用单因素方差分析(ANOVA)进行总体比较,发现差异再用 Dunnett 法进行多个剂量组与阴性对照组间的两两比较, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清、关节液中 IL-1β 和 TNF-α 水平

造模 8 周后,模型组动物血清、关节液中 IL-1β、TNF-α 水平明显高于假手术组( $P<0.05$ );而连续 4 周给予氨基葡萄糖后,动物血清、关节液中 IL-1β、TNF-α 水平明显下降( $P<0.05$ ),结果见表 1。

表 1 动物血清、关节液中 IL-1β 和 TNF-α 水平 ( $\bar{x}\pm s, n=12$ )  
Table 1 L-1βbeta and TNF-α in the serum and joint fluid( $\bar{x}\pm s, n=12$ )

| 组别    | 剂量<br>/(g/kg) | 血清                      |                          | 关节液                   |                        |
|-------|---------------|-------------------------|--------------------------|-----------------------|------------------------|
|       |               | IL-1β/(pg/mL)           | TNF-α/(pg/mL)            | IL-1β/(pg/mL)         | TNF-α/(pg/mL)          |
| 假手术组  | —             | 87.8±17.3               | 124.7±45.4               | 16.9±1.1              | 45.6±3.5               |
| 模型组   | —             | 133.8±31.7 <sup>#</sup> | 242.8±102.4 <sup>#</sup> | 25.4±7.7 <sup>#</sup> | 77.4±32.2 <sup>#</sup> |
| 阳性对照组 | 0.034         | 95.7±21.3 <sup>*</sup>  | 151.6±41.1 <sup>*</sup>  | 17.7±3.0 <sup>*</sup> | 47.0±4.8 <sup>*</sup>  |

注:与假手术组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$   
Note: compared with model,<sup>#</sup> $P<0.05$ ; compared with sham,<sup>\*</sup> $P<0.05$

2.2 关节软骨 HE 染色

造模 8 周后,假手术组动物关节软骨及周围组织正常,关节面完整,无炎细胞浸润;模型组动物软骨表面不连续,交界处有裂隙,两端整合不良,潮线

模糊不清;氨基葡萄糖组动物损伤部位以纤维组织增生为主,内有多量软骨细胞,软骨表面连续,交界处无裂隙,两端整合良好,结果见图 1。

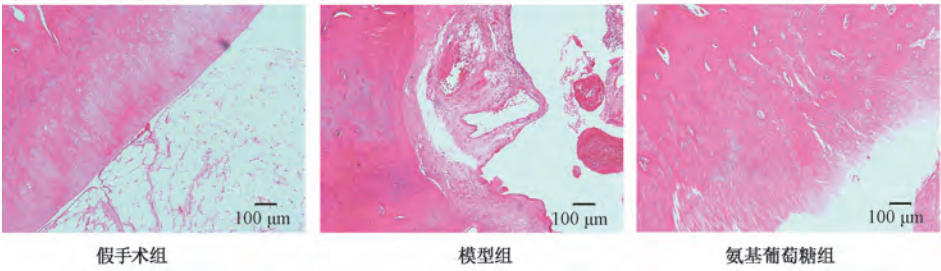


图 1 兔膝关节软骨病理图(HE 染色)  
Fig.1 Pathology of articular cartilage of Rabbit Knee Joint

### 2.3 关节软骨 Mankin's 评分

造模 8 周后,模型组动物软骨组织评分为 7.3 分,与假手术组相比明显升高( $P<0.05$ )。连续 4 周给予氨基葡萄糖后,动物软骨组织评分为 5.1 分,与模型组相比明显降低( $P<0.05$ ),结果见表 2。

### 2.4 滑膜组织 HE 染色

造模 8 周后,假手术组动物滑膜衬层细胞未见增生、肥大、炎细胞浸润;模型组动物滑膜衬层细胞增生、肥大,全层均有显著炎细胞浸润;氨基葡萄糖

组动物滑膜衬层细胞增生、肥大,伴有少量炎细胞浸润。结果见图 2。

表 2 关节软骨 Mankin's 评分 ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

Table 2 Mankin's score of articular cartilage ( $\bar{x}\pm s, n=8$ )

| 组别    | 剂量/(g/kg) | 软骨组织评分               |
|-------|-----------|----------------------|
| 假手术组  | —         | 0                    |
| 模型组   | —         | 7.3±1.2 <sup>#</sup> |
| 阳性对照组 | 0.034     | 5.1±1.0 <sup>*</sup> |

注:与假手术组比较,<sup>#</sup> $P<0.05$ ;与模型组比较,<sup>\*</sup> $P<0.05$

Note: compared with model,<sup>#</sup> $P<0.05$ ; compared with sham,

<sup>\*</sup> $P<0.05$

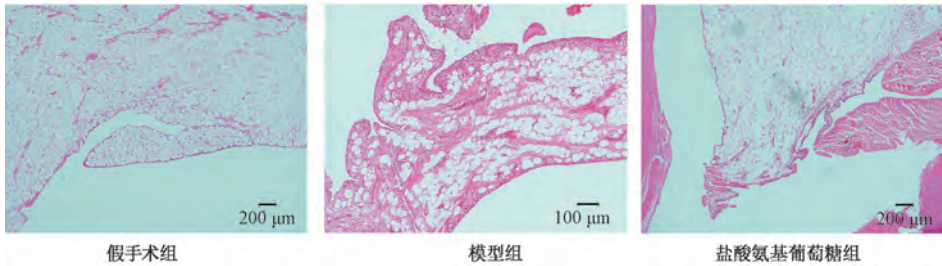


图 2 兔膝关节滑膜组织病理图(HE 染色)

Fig.2 Synovial Histopathology of Rabbit Knee Joint

## 3 讨论

骨关节炎(OA)是慢性、退变性的关节疾病,多发于中老年人群,导致患者的生活能力丧失甚至残疾。随着社会人口老龄化,每年的 OA 患者人数都在增加,给社会造成了沉重的经济负担<sup>[5]</sup>。目前临床上常用的药物如盐酸氨基葡萄糖、非甾体类抗炎药,仅能缓解症状,而且长期服用还会出现胃肠道不适等不良反应<sup>[6]</sup>。因此,迫切需要研究 OA 的发病机制,开发新的治疗药物。

理想的 OA 动物模型应该有大小、结构、软骨损伤、疾病进程等都与人类相似的关节,采用相同的诱导方法可成功复制模型,而且动物的年龄能模拟 OA 患者<sup>[7]</sup>。目前常用的 OA 模型制备方法有手术法和非手术法,非手术法有化学法、自发性、转基因模型等<sup>[8]</sup>。近年采用较多的方法是手术法,如 Hulth 模型<sup>[9]</sup>、改良的前交叉韧带切断模型<sup>[10]</sup>等,通过手术可迅速造成关节不稳而诱导 OA,损伤严重,不能模拟 OA 慢性疾病的发病进程,不利于表现药物的干预作用。化学法是在关节腔内注射木瓜蛋白酶、胶原酶等<sup>[11-12]</sup>,但是造模程度难以确定。自发性 OA 模型动物更接近 OA 的发病进程,但是耗费

时间较长,成本较高<sup>[13]</sup>。转基因模型通过编辑基因获得基因缺陷的动物,可用于研究特定基因在 OA 发病中的作用,但成本较高。

OA 最初是以关节软骨损伤为主,研究表明狗关节软骨缺陷(1.5 mm 直径,0.5 mm 深度)3 周后可形成温和的 OA 病变<sup>[14]</sup>。这种模型接近 OA 发病过程,损伤较轻,造模程度可以控制,也可用于其他种属动物,如啮齿类动物,兔,马等<sup>[3]</sup>。本研究采用兔关节软骨钻孔造成软骨缺陷(4.2 mm 直径,3 mm 深度),造模 8 周后,模型组出现软骨结构改变,缺损和滑膜炎细胞浸润等 OA 的特征,而且阳性药物可以改善模型的这些症状。因此,该模型可为治疗 OA 药物的评价提供参考。

## 参考文献

[1] Neogi T, Zhang Y. Epidemiology of osteoarthritis [J]. Rheum Dis Clin North Am, 2013, 39(1):1-19.  
[2] Neogi T. The epidemiology and impact of pain in osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2013, 21(9):1145-1153.  
[3] Ahern B J, Parvizi J, Boston R, et al. Preclinical animal models in single site cartilage defect testing: a systematic review [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2009, 17(6):705-713.  
[4] Rutgers M, van Pelt M J, Dhert W J, et al. Evaluation of histological scoring systems for tissue-engineered, repaired and



- osteoarthritic cartilage [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2010, **18**(1):12-23.
- [ 5 ] Litwic A, Edwards M H, Dennison E M. *et al.* Epidemiology and burden of osteoarthritis [J]. Br Med Bull, 2013, **105**:185-199.
- [ 6 ] Taruc-Uy R L, Lynch S A. Diagnosis and treatment of osteoarthritis [J]. Prim Care, 2013, **40**(4):821-836.
- [ 7 ] Abramson S B, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2009, **11**(3):227.
- [ 8 ] Kuyinu E L, Narayanan G, Nair L S, *et al.* Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes [J]. J Orthop Surg Res, 2016, **11**:19.
- [ 9 ] Mapp P I, Avery P S, McWilliams D F, *et al.* Angiogenesis in two animal models of osteoarthritis [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2008, **16**(1):61-69.
- [10] Elsaid K A, Zhang L, Shaman Z, *et al.* The impact of early intra-articular administration of interleukin-1 receptor antagonist on lubricin metabolism and cartilage degeneration in an anterior cruciate ligament transection model [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2015, **23**(1):114-121.
- [11] Patel D V, Sawant M G, Kaur G. Evaluation of anti-osteoarthritic activity of Vigna mungo in papain induced osteoarthritis model [J]. Indian J Pharmacol, 2015, **47**(1):59-64.
- [12] Adães S, Mendonça M, Santos T N, *et al.* Intra-articular injection of collagenase in the knee of rats as an alternative model to study nociception associated with osteoarthritis [J]. Arthritis Res Ther, 2014, **16**(1): R10.
- [13] Liu W, Burton-Wurster N, Glant T T, *et al.* Spontaneous and experimental osteoarthritis in dog: similarities and differences in proteoglycan levels [J]. J Orthop Res, 2003, **21**(4):730-737.
- [14] Mastbergen S C, Marijnissen A C, Vianen M E, *et al.* The canine 'groove' model of osteoarthritis is more than simply the expression of surgically applied damage [J]. Osteoarthritis Cartilage, 2006, **14**(1):39-46.

## Establishment and evaluation of a model of osteoarthritis in the rabbit knee

OU Huiyu, LI Ruipeng, SHAO Zhenyi, GUO Qiuping

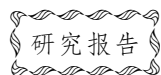
(Drug nonclinical evaluation and research center of Guangzhou pharmaceutical research institute, Guangzhou 510240, China)

**Abstract: Objective** To establish and evaluate a rabbit model of knee osteoarthritis induced by articular cartilage defect. **Method** The animals were randomly divided into 3 group, the sham group, the model group and the positive control glucosamine group, each group of 12 animals. After 4 weeks, the drugs were administrated intragastrically once daily for 4 weeks. After the last administration, the animals were executed. ELISA kits were used to detect the level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the serum and joint fluid. The articular cartilage and synovial membrane were stained by HE staining. Mankin's score was used to assess articular cartilage damage. **Result** Compared with the sham group, the level of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in the serum and joint fluid of the model group was significantly increased, while that of glucosamine decreased the level of these inflammatory cytokines. HE staining showed the structural changes and defects of cartilage, and the synovial membrane was infiltrated by inflammatory cells in the model group. The score of cartilage was significantly higher than that of the sham group. Glucosamine can reduce cartilage defects, reduce the infiltration of synovitis cells and reduce the score of cartilage. **Conclusion**

Articular cartilage drilling is able to establish the rabbit model of knee osteoarthritis, reflect the main features of osteoarthritis. The injury and inflammation induced by the model can be reduced by administrating with positive drug. Therefore, this model can be used for the evaluation and screening of arthritis drugs.

**Key words:** Osteochondral defect; Articular cartilage; Subchondral bone; Rabbit





# DHEA 对小鼠超排卵和卵母细胞质量的影响<sup>\*</sup>

何岩 于洋 董婉维 周生来 王惟 杨葳 郑志红

(中国医科大学实验动物部, 沈阳 110000)

**摘要:**目的 研究脱氢表雄酮(DHEA)对 C57BL/6J 雌鼠超排卵效果和卵母细胞质量的影响及其机制。方法 3 周龄 C57BL/6J 雌鼠 30 只随机分为 3 组, 分别为对照组、低剂量处理组(2 mg/kg·d<sup>-1</sup>)和高剂量处理组(5 mg/kg·d<sup>-1</sup>)。用 DHEA 灌胃 1 周, 再经超排卵后分别进行体外受精和收集卵丘细胞。提取卵丘细胞 RNA 进行 qRT-PCR 检测与胚胎质量相关基因 *Grem1*、*Has2*、*Ptgs1*、*Ptgs2* 和 *Vcan* 的 mRNA 水平以及凋亡相关基因 *Caspase3* 和 *Bcl2l10* 的 mRNA 水平。结果 经过 DHEA 处理的雌鼠超排卵后, 体外受精(IVF)显示实验组异型卵比例下降。实验组卵丘细胞中与胚胎质量相关基因 *Has2*、*Ptgs1* 和 *Vcan* 转录水平与对照组相比上调, 而 *Grem1* 和 *Ptgs2* 的 mRNA 水平下调。*Caspase3* 的 mRNA 水平下调, *Bcl2l10* 的 mRNA 水平上调。结论 经过 DHEA 处理后可以通过抑制卵丘细胞凋亡, 提高卵母细胞的质量。

**关键词:**脱氢表雄酮; 卵母细胞质量; 超排卵

中图分类号: Q956 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)04-0022-06

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.006

脱氢表雄酮(DHEA)及其硫酸盐(DHEAS)是一种 C19 类固醇激素, 由肾上腺与性腺(睾丸和卵巢)分泌, 是外周血睾酮和雌二醇的前体<sup>[1]</sup>。DHEA 在体内大部分以硫酸盐的形式存在, 并对生殖系统有重要的作用。已有研究证明, DHEA 可以显著改善临床妊娠率<sup>[2]</sup>, 出生率, 子宫内膜的厚度和恢复卵巢功能<sup>[3]</sup>。对于卵巢功能减退(diminished ovarian reserve, DOR)的患者, 体外补充 DHEA 可以改善体外受精的效果。有研究人员比较 DOR 患者使用 DHEA 治疗前后, 试管婴儿的胚胎数和分级显著升高<sup>[4]</sup>。因此, DHEA 可以提高怀孕率, 降低流产率<sup>[3]</sup>。此外, 对于生理性或者病理性卵巢功能减弱的女性, 体外补充 DHEA 可以恢复卵巢功能<sup>[4]</sup>。用 4-乙烯基环己烯二氧化二甲苯诱导大鼠的 DOR 模型中, 经过 DHEA 处理后, 卵巢组织中闭锁卵泡的数量明显减少<sup>[5]</sup>。在绵羊的 DOR 模型中, DHEA 可能通过调节 AMH 的表达促进卵泡的发育<sup>[6]</sup>。但是 DHEA 作用机制仍不清楚, 基于 DHEA 可以减少闭锁卵泡的数量, 恢复卵巢功能, 那么它是否可以作为一种辅助用药提升超排卵的效果, 目前尚无报道。

由于使用激素进行超排卵本身对于卵母细胞的质量有不良影响<sup>[7]</sup>, 本研究旨在以 C57BL/6J 雌鼠为研究对象, 探索 DHEA 是否能够提高 C57BL/6J 雌鼠的超排卵效果以及卵母细胞的质量, 以进一步探讨 DHEA 改善超排卵的机制。

卵母细胞的质量直接影响后续的实验效率以及实验结果, 过去对于卵母细胞的质量评价多通过形态学的方法, 现在越来越多的研究认为, 卵丘细胞可以作为一项指标来评价卵母细胞甚至是胚胎的质量。卵丘细胞是颗粒细胞包围卵母细胞形成的, 累积卵母细胞周围形成卵丘复合体(COC), 其在卵泡发育中起到促进卵母细胞发育和成熟的作用。卵丘复合物与卵母细胞通过特殊的连接间隙, 进行双向的传递信号。若除去卵丘复合物与卵母细胞之间的连接, 会导致卵母细胞质量降低, 胚胎发育不良, 妊娠失败<sup>[8]</sup>。因此, 可以通过鉴定卵丘细胞中某些基因的表达来评价卵母细胞的质量和体外受精的结果。许多相关研究报道, 卵丘细胞中 *Grem1*、*Has2*、*Ptgs1*、*Ptgs2* 和 *Vcan* 等基因的表达标志着卵母细胞的成熟能力<sup>[9]</sup>、胚胎质量及发育、妊娠的结果和活

收稿日期: 2019-01-11

<sup>\*</sup> 基金项目: 辽宁省教育厅重点实验室项目(No.LS201616)

作者简介: 何岩(1988—), 女, 助理实验师, 研究方向: 生殖学. E-mail: 814056800@qq.com

通信作者: 杨葳(1980—), 女, 讲师, 研究方向: 实验动物转基因与基因敲除研究. E-mail: yangwei5255@sina.com

产率的高低<sup>[10]</sup>。本研究试图用 DHEA 处理 C57BL/6J 雌鼠,然后诱导超排卵,检测 DHEA 作用后超排卵效果以及卵丘细胞中标志卵母细胞质量的基因表达水平,从而鉴定卵母细胞质量,并初步探索 DHEA 的作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物:近交系 3 周龄 C57BL/6J 雌鼠 30 只,雄鼠 5 只,所有 SPF 级小鼠均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,合格证号 SCXK(京)2016-0006。所有实验小鼠均饲养于中国医科大学实验动物部 SPF 级动物房,饲养条件:温度控制在(22±3)℃,自动光控(12 h/12 h)。

1.1.2 试剂:孕马血清促性腺激素(PMSG, C151214,宁波市激素制品有限公司),绒毛膜促性腺激素(HCG, S160113,宁波市激素制品有限公司),M16 培养液、HTF 培养液、KMSO 培养液、矿物油和透明质酸酶(Sigma 美国),单细胞 RNA 提取试剂盒(sigma 美国)。

1.1.3 仪器设备:体视显微镜(OLYMPUS 日本),胚胎移植管(自制),热台(OLYMPUS 日本),常规手术器械(瑞沃德 中国),电子天平(梅特勒 美国),发光仪 Roche LightCycler® 96(Roche 瑞士),电热恒温培养箱(Eppendorf 德国)。

1.2 方法

1.2.1 超排与取卵:C57BL/6J 雌鼠 30 只,腹腔注射 PMSG 5 IU/只,间隔 48 h 后再次腹腔注射相同剂量的 HCG,于腹腔注射 HCG 15 h 后取卵,动物经颈椎脱位法处死,取出壶腹膨大部显微镜下取卵。将每组的 10 只随机选取 5 只进行体外受精,另 5 只进行卵丘细胞的分离收集。

1.2.2 体外受精:按 Nakagata<sup>[11]</sup>的方法,取 3 月龄的 C57BL/6J 雄鼠 2 只,颈椎脱位法处死,分别取其附睾尾,沿与曲细精管垂直方向剪口,用灭菌的解剖针从附睾尾部挑取一滴浓密的精液,放入已预培养的 HTF 培养液中,于 CO<sub>2</sub> 培养箱 37 ℃ 条件下进行培养获能 1.5 h,并以血球计数板计数该精子悬浊液的浓度。将适量获能后的精子分别放入含未受精卵的培养液中,使其精子终浓度为 200 个/μL,然后放入 CO<sub>2</sub> 培养箱中受精 6 h。体外受精 6 h 后在实体显微镜下观察受精情况,将有二极体和双原核的卵判定为受精卵。计算受精率,次日纪录 2 细胞胚胎数、未受精卵数、异常卵数和卵总数,统计受精率和异常卵比例。

1.2.3 Real-time PCR:检测卵丘细胞中基因转录水平:通过 1.2.1 中的方法超排卵,经过透明质酸酶消化分离卵丘细胞和卵母细胞,收集卵丘细胞,按单细胞 RNA 提取试剂盒说明书步骤提取卵丘细胞总 RNA,采用 TAKARA 反转录试剂盒进行反转录,应用 Roche LightCycler® 96 进行 Real-time PCR(SYBR Green 荧光染料购自 TAKARA 公司)。表 1 为 qRT-PCR 引物序列。目的基因和内参基因  $\beta$ -actin 分别在同一批次的 96 孔板上、不同的 PCR 管中扩增。PCR 总反应体系为 20 μL,上、下游引物各 1 μL,1:100 稀释后的 cDNA 模版 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 7 μL, SYBR 10 μL。95 ℃ 预变性 30 s 后,再进行如下 40 个循环:95 ℃ 5 s,60 ℃ 30 s。每一份标本进行复管检测。得到各管标本的扩增曲线和目的序列的 Ct 值,以及检测该管标本内参基因  $\beta$ -actin 的 Ct 值,计算各管标本的待测序列的  $\Delta\Delta$ Ct 值[ $\Delta\Delta$ Ct=(待测目的基因 Ct 值-待测组内基因 Ct 值)-(对照组目的基因 Ct 值-对照组内参基因 Ct 值)],则该基因的 mRNA 相对表达为  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 。

表 1 qRT-PCR 引物序列 5'-3'  
Table 1 qRT-PCR primer sequence 5'-3'

| Gene symbol                     | Forward primer        | Reversed primer          | Amplicon length |
|---------------------------------|-----------------------|--------------------------|-----------------|
| <i>Grem1</i>                    | GAAAGGTTCCCAAGGAGCCA  | TCGCTTCAGATACTTGCGCT     | 196 bp          |
| <i>Has2</i>                     | TCAGCGAAGTTATGGGCAGG  | GATGAGGCAGGGTCAAGCAT     | 265 bp          |
| <i>Vcan</i>                     | AGCCACCTGTTTAAAGGCTC  | CCACCAAGACAGTCGTCTCC     | 172 bp          |
| <i>Ptgs1</i>                    | AGTCTCTCGCTCTGTTTCC   | TAGCCCGTGCGAGTACAATC     | 185 bp          |
| <i>Ptgs2</i>                    | GGGACTCTGGAACATTGTGAA | GCACATTGTAAGTAGGTGGACTGT | 110 bp          |
| <i>Bcl2l10</i>                  | AGTGACCCGAGACTGCT     | AGAAGCCGAGCGGTAAA        | 140 bp          |
| <i>Caspase3</i>                 | AGCTTCTTCAGAGGCGACT   | GGACACAATACACGGGATCT     | 381 bp          |
| <i><math>\beta</math>-actin</i> | GATGGTGGGAATGGGTCAGA  | TCCATGTCGTCCCAGTTGGT     | 120 bp          |

1.3 统计方法

采用 SPSS 19.0 统计软件包进行统计分析,采用独立样本 *t* 检验和卡方 $\chi^2$  检验, $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 超排卵和受精情况

3 周龄 C57BL/6J 雌鼠经过低剂量 (2 mg/kg·

d<sup>-1</sup>) 和高剂量 (5 mg/kg·d<sup>-1</sup>) DHEA 灌胃一周,经激素超排卵后,表 2 统计结果显示,总卵数:低剂量处理组与高剂量处理组排卵数量与对照组比较略升高。异形卵数及比率:实验组与对照组相比明显降低,差异有统计学意义, $P<0.05$ 。受精率:实验组与对照组比较没有明显差异。说明 DHEA 可以显著降低经过激素超排卵后异形卵比例,但对于超排卵总数量和受精率影响不大。

表 2 超排卵后卵母细胞形态以及受精率的变化

| Table 2 Changes of oocyte morphology and fertilization rate after superovulation |                                     |                                        |                                   |                                  |                                |                                    |
|----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|------------------------------------|
| 组别<br>Group<br>(每组 <i>n</i> = 5)                                                 | 2-cell 数/枚<br>No. of 2-cell embryos | 未受精卵数/枚<br>No. of unfertilized oocytes | 异常卵数/枚<br>No. of abnormal oocytes | 总卵数/枚<br>Total number of oocytes | 受精率/%<br>Fertiliza-tion rate/% | 异形卵比率/%<br>abnormal oocytes rate/% |
| 对照组                                                                              | 132                                 | 9                                      | 12                                | 153                              | 86.27                          | 7.84                               |
| 低剂量组                                                                             | 136                                 | 13                                     | 7                                 | 156                              | 87.17                          | 4.48 *                             |
| 高剂量组                                                                             | 142                                 | 18                                     | 5                                 | 164                              | 86.58                          | 3.05 *                             |

注:受精率=2-cell 数/总卵数,异常卵比率=异常卵数/总卵数.\*  $P<0.05$   
Note:Fertilization rate=No. of 2-cell embryos / total number of oocytes, abnormal oocytes rate=No. of abnormal oocytes / Total number of oocytes.  
\*  $P<0.05$

2.2 卵丘细胞中胚胎质量相关基因转录水平

图 1 中卵丘细胞中 mRNA 表达水平显示,DHEA 处理组 *Grem1* 表达水平与对照组相比降低,且高剂量组比低剂量组降低的倍数更大。DHEA 对于 *Ptgs2* 的 mRNA 水平与其对 *Grem1* 的表达水平有

相似的结果,即实验组 mRNA 水平比对照组降低。而另外的胚胎质量相关标记物 *Has2*、*Vcan* 和 *Ptgs1* 的 mRNA 水平如图 2 显示,实验组与对照组比较显著上调。*Has2* 上调最明显。以上差异均有统计学意义。

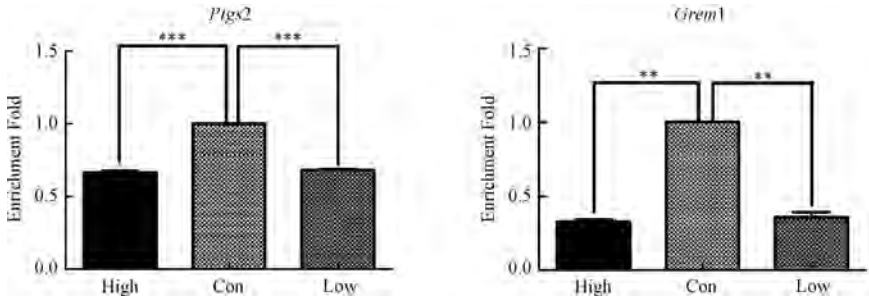


图 1 卵丘细胞中胚胎质量相关基因下调基因表达情况

注:横坐标中,High:高剂量处理组;Low:低剂量处理组;Con:对照组  
纵坐标表示基因 mRNA 表达水平的倍数.\*\*  $P<0.01$ ,\*\*\*  $P<0.001$

Fig.1 Downregulation of genes related to embryo quality in cumulus cells

Note:In abscissa, High: high dose group; Low: low dose group; Con: control group. Longitudinal coordinates represent multiple levels of gene expression. \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$

2.3 卵丘细胞中凋亡相关基因转录水平

图 3 中卵丘细胞中凋亡相关基因 *Caspase3* 表达水平显示,DHEA 处理组与对照组相比显著下调,高剂量组下调倍数比低剂量组更明显,即低剂量组下

调 0.8 倍,高剂量组下调 0.3 倍。*Bcl2/10* 的 mRNA 表达水平显示,实验组 mRNA 表达水平高于对照组。以上差异均有统计学意义。

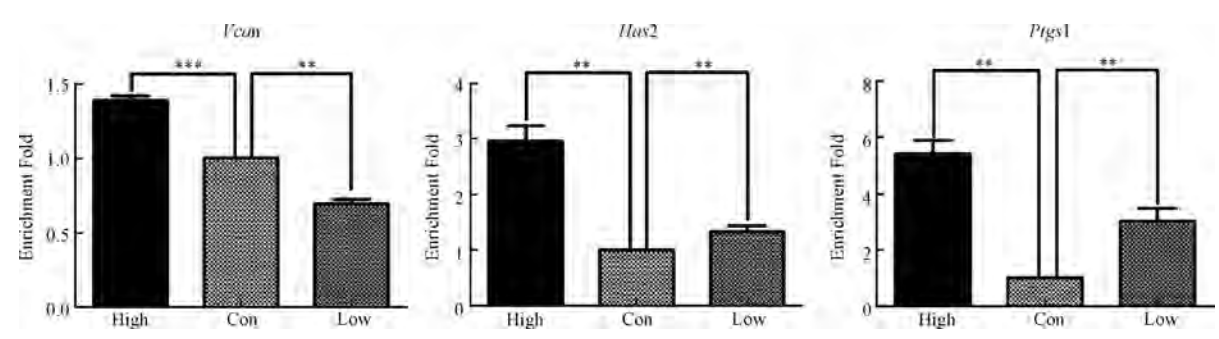


图 2 卵丘细胞中胚胎质量基因表达上调基因表达情况

注:横坐标中,High:高剂量处理组;Low:低剂量处理组;Con:对照组。纵坐标表示基因 mRNA 表达水平的倍数。\*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$

Fig.2 Upregulation of genes related to embryo quality in cumulus cells

Note:In abscissa, High: high dose group; Low: low dose group; Con: control group. Longitudinal coordinates represent multiple levels of gene expression. \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$

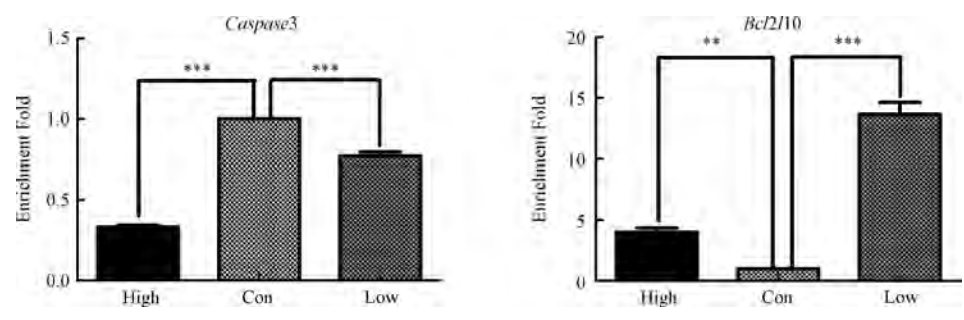


图 3 卵丘细胞中凋亡相关基因表达情况

注:横坐标中,High:高剂量处理组;Low:低剂量处理组;Con:对照组。纵坐标表示基因 mRNA 表达水平的倍数。\*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$

Fig.3 Expression of apoptosis-related genes in cumulus cells

Note:In abscissa, High: high dose group; Low: low dose group; Con: control group. Longitudinal coordinates represent multiple levels of gene expression. \*\*  $P<0.01$ , \*\*\*  $P<0.001$

### 3 讨论

*Has2* 是透明质酸合成酶,是卵丘细胞扩张的重要因素,能够促进卵母细胞成熟和排卵<sup>[12]</sup>。*Ptgs1*、*Ptgs2* 是前列腺素内过氧化物合酶 1 和 2,二者在排卵反应中参与细胞外基质的形成与信号传导,其表达水平的高低预示着卵母细胞的质量。*Vcan* 是多功能蛋白聚糖,是经过排卵刺激后产生的蛋白多糖,其 N' 端可以与蛋白质功能结构域结合,C' 端与 ERF 受体、整合素等细胞表面蛋白相互作用。其表达在卵母细胞成熟、排卵和受精过程中起重要作用<sup>[13]</sup>。*Grem1* 基因编码的蛋白属于分泌性蛋白,且具有高度保守性,是骨形态形成蛋白(BMP)拮抗剂家族成员,在胚胎发育的早期表达量高,并发挥重要作用<sup>[14]</sup>。有研究报道颗粒细胞中 *Has2*、*Ptgs1*、*Ptgs2* 以及 *Vcan* 的转录水平与卵丘的扩增有关,其表达水

平越高卵母细胞的质量越好<sup>[15]</sup>。

本研究发现,C57BL/6J 雌鼠经过 DHEA 灌胃一周,超排卵后,与对照组相比,排卵数量没有明显提升,但是异常卵比率明显下降。DHEA 可以提高颗粒细胞中 *Has2*、*Ptgs1* 和 *Vcan* 基因的转录水平,优化了卵母细胞的质量。因此,DHEA 可以作为一种辅助用药促进 C57BL/6J 青春期前雌鼠的超排卵质量。本研究中用 DHEA 处理后,卵丘细胞中 *Ptgs1* 的转录水平上调而 *Ptgs2* 的转录水平下调,这可能与 *Ptgs1* 与 *Ptgs2* 出现表达的时间有关,*Ptgs1* 的表达出现在超排卵后的 12 h,相当于排出第一级体后开始表达,而 *Ptgs2* 的表达出现较早,发生在超排卵后 4~8 h,排卵后表达随之降低。两种同源基因表达存在时空差可能是 *Ptgs1* 与 *Ptgs2* 存在功能互补的原因<sup>[13]</sup>。*Grem1* 也是较多研究者认为可以标志着卵母细胞和胚胎质量的基因<sup>[15]</sup>,但是 Myers 等人报道了 *Grem1* 在原始卵泡形成前起到重要的作用,

出生后 *Grem1* 的表达并不能代表胚胎质量和受精能力,本研究中 DHEA 使 *Grem1* 下调的机制可能是由于 *Grem1* 是 BMP4 信号通路的拮抗剂,应用 DHEA 处理时,激活 BMP4 信号通路,因此降低了 *Grem1* 的表达<sup>[14]</sup>。综上,DHEA 可以优化青春期前卵母细胞的质量,DHEA 对于成年 C57BL/6J 小鼠的作用效果还有待于进一步研究。

对于 DHEA 作用机制的研究,一方面的关注 DHEA 对相关激素的调节,例如 DHEA 可以通过增强抗缪勒管激素 (AMH)、抑制素 B,增加有腔卵泡的数量,改善 DOR 患者的卵巢功能<sup>[16]</sup>。但是也有研究者发现 DHEA 对于血清 AMH 和 FSH 并没有明显改变<sup>[17]</sup>。另一方面,DHEA 可能通过增加对胰岛素样生长因子-1 (insulin-like growth factor-1, IGF-1) 的表达从而增加卵巢的反应性<sup>[18]</sup>。此外,雌鼠缺乏雄激素受体 (AR) 表现出较长的发情周期和较低的生育能力<sup>[19]</sup>,因此有研究报道 DHEA 可通过诱导颗粒细胞中雄激素受体 (AR) 和 FSH 受体的表达增加,恢复卵巢的功能<sup>[20]</sup>。但是,也有文献报道,DHEA 可以增加 DOR 患者 AR 的表达,但并没有增加 FSH 受体的表达,相反 DHEA 可以降低 DOR 患者中高表达的 FSH 受体水平,表明 DHEA 调节 FSH 受体的机制可能存在其他方式<sup>[21]</sup>。近年还有研究报道,对于卵巢反应性低下的女性,DHEA 可以通过减少其卵丘细胞的凋亡,增加线粒体的功能,提高卵母细胞的质量和体外受精的结果<sup>[22]</sup>。在本研究用 DHEA 处理 C57BL/6J 小鼠并超排卵后,卵丘细胞中凋亡相关基因 *Bcl2l10* 与对照组相比表达上调,*Caspase3* 表达与对照组相比表达下调,与 Lin 等人的研究结果一致。本研究发现 DHEA 可以提高卵母细胞的质量,降低经过激素超排卵后异形卵的比例,并对 DHEA 影响卵丘细胞发育的机制做了初步探索,为后续 DHEA 的功能研究提供基础理论。

## 参考文献

- [ 1 ] Burger H G. Androgen production in women [J]. Fertil Steril, 2002, **77**(Suppl 4):S3-S5.
- [ 2 ] Kara M, Aydin T, Aran T, *et al.* Does dehydroepiandrosterone supplementation really affect IVF-ICSI outcome in women with poor ovarian reserve? [J]. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2014, **173**:63-65.
- [ 3 ] Wiser A, Gonen O, Ghetler Y, *et al.* Addition of dehydroepiandrosterone (DHEA) for poor-responder patients before and during IVF treatment improves the pregnancy rate; a randomized prospective study[J]. Hum Reprod, 2010, **25**(10): 2496-2500.
- [ 4 ] Barad D, Gleicher N. Effect of dehydroepiandrosterone on oocyte and embryo yields, embryo grade and cell number in IVF [J]. Hum Reprod, 2006, **21**(1): 2845-2849.
- [ 5 ] Hassa H, Aydin Y, Ozatik O, *et al.* Effects of dehydroepiandrosterone (DHEA) on follicular dynamics in a diminished ovarian reserve in vivo model [J]. Syst Biol Reprod Med, 2015, **61**(3):117-121.
- [ 6 ] Narkwichean A, Jayaprakasan K, Maalouf W E, *et al.* Effects of dehydroepiandrosterone on in vivo ovine follicular development [J]. Hum Reprod, 2014, **29**(1):146-154.
- [ 7 ] Lee M, Ahn J I, Lee A R, *et al.* Adverse Effect of Superovulation Treatment on Maturation, Function and Ultrastructural Integrity of Murine Oocytes [J]. Mol Cells, 2017, **40**(8):558-566.
- [ 8 ] Barrett S L, Albertini D F. Cumulus cell contact during oocyte maturation in mice regulates meiotic spindle positioning, enhances developmental competence [J]. J Assist Reprod Genet, 2010, **27**(1):29-39.
- [ 9 ] Shepel E A, Voznesenskaya T Y, Blashkiv T V, *et al.* Cumulus Cell Genes As Potential Biomarkers of Oocyte and Embryo Developmental Competence [J]. Fiziol Zh, 2016, **62**(1): 107-113.
- [ 10 ] Wathlet S, Adriaenssens T, Segers I, *et al.* New candidate genes to predict pregnancy outcome in single embryo transfer cycles when using cumulus cell gene expression [J]. Fertil Steril, 2012, **98**(2):432.e4-439.e4.
- [ 11 ] Nakagata N. Production of normal young following transfer of mouse embryos obtained by in vitro fertilization between cryopreserved gametes [J]. J Reprod Fertil, 1993, **99**(1): 77-80.
- [ 12 ] Ezzati M, Roshangar L, Soleimani Rad J, *et al.* Evaluating The Effect of Melatonin on HAS2, and PGR Expression, as Well as Cumulus Expansion, and Fertility Potential in Mice [J]. Cell Journa, 2018, **20**(1):108-112.
- [ 13 ] Adriaenssens T, Segers I, Wathlet S, *et al.* cumulus cell gene expression profile of oocytes with different nuclear maturity and potential for blastocyst formation [J]. Assist Reprod Genet, 2011, **28**(1):31-40.
- [ 14 ] Myers M, Tripurani S K, Middlebrook B, *et al.* Loss of Gremlin Delays Primordial Follicle Assembly but Does Not Affect Female Fertility in Mice [J]. Biology OF Reproduction, 2011, **85**(6): 1175-1182.
- [ 15 ] Wigglesworth K, Lee K B, Emori C, *et al.* Transcriptomic Diversification of Developing Cumulus and Mural Granulosa Cells in Mouse Ovarian Follicles [J]. Biology of Reproduction, 2015, **92**(1):23, 1-14.
- [ 16 ] Zhang H H, Xu P Y, Wu J, *et al.* Dehydroepiandrosterone improves follicular fluid bone morphogenetic protein-15 and accumulated embryo score of infertility patients with diminished

- ovarian reserve undergoing in vitro fertilization: a randomized controlled trial[J]. *Journal of Ovarian Research*, 2014, **7**:93.
- [17] Yeung T W, Chai J, Li R H, *et al.* A randomized, controlled, pilot trial on the effect of dehydroepiandrosterone on ovarian response markers, ovarian response, and in vitro fertilization outcomes in poor responders[J]. *Fertil Steril*, 2014, **102**(1): 108-15e101.
- [18] Sudo N, Shimizu T, Kawashima C, *et al.* Insulin-like growth factor-I(IGF-I) system during follicle development in the bovine ovary: relationship among IGF-I, type 1 IGF receptor (IGFR-1) and pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A)[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2007, **264**(1-2):197-203.
- [19] Sen A, Hammes R. Granulosa cell-specific androgen receptors are critical regulators of ovarian development and function[J]. *Mol Endocrinol*, 2010, **24**(7):1393-1403.
- [20] Hu Q, Hong L, Nie M, *et al.* The effect of dehydroepiandrosterone supplementation on ovarian response is associated with androgen receptor in diminished ovarian reserve women[J]. *J Ovarian Res*, 2017, **10**(1): 32.
- [21] Lin X F, Du J, Du Y, *et al.* Effects of dehydroepiandrosterone supplementation on mice with diminished ovarian Reserve[J]. *Gynecological Endocrinology*, 2018, **34**(4):357-359.
- [22] Lin L T, Wang P H, Wen Z H, *et al.* The Application of Dehydroepiandrosterone on Improving Mitochondrial Function and Reducing Apoptosis of Cumulus Cells in Poor Ovarian Responders[J]. *Int J Med Sci*, 2017, **14**(6):585-594.

## Effects of DHEA on Superovulation and Oocyte Quality of C57BL/6J Mice.

HE Yan, YU Yang, DONG Wanwei, ZHOU Shenglai, WANG Wei, YANG Wei, ZHENG Zhihong

(*Department of Laboratory Animal Science, China Medical University, Shenyang 110000, China*)

**Abstract: Objective** To investigate the effect and mechanism of DHEA on the quality of oocytes of C57BL/6J mice after superovulation. **Method** Thirty C57BL/6J mice at the age of 3 weeks were randomly divided into 3 groups, which were control group、low does group( $2\text{ mg/kg}\cdot\text{d}^{-1}$ ) and high does group( $5\text{ mg/kg}\cdot\text{d}^{-1}$ ), respectively. DHEA was administrated via the gastrointestinal tract for one week. Oocytes were collected after superovulation and underwent IVF. qRT-PCR was used to detect gene expression of *Grem1*、*Has2*、*Ptgs1*、*Ptgs2* and *Vcan*, the makers of cumulus cells collected after superovulation. Gene expression of *Caspase3* and *Bcl2l10* were also detected by qRT-PCR. **Result** After DHEA treated, IVF showed that the proportion of heterotypic eggs decreased in the experimental group. The transcription levels of *Has2*, *Ptgs1* and *Vcan* in cumulus cells of experimental group were up-regulated compared with those of control group, while the mRNA levels of *Germ1* and *Ptgs2* were down-regulated. The mRNA level of *Caspase3* was down regulated and the *Bcl2l10* mRNA level was unregulated. **Conclusion** After DHEA treatment, the apoptosis of cumulus cells can be inhibited, and the quality of oocytes can be improved.

**Key words:** DHEA; Quality of oocytes; Superovulation

## 研究报告

## 四氯化碳诱导近交系 C57BL/6 小鼠建立肝纤维化模型

刘甦苏<sup>1</sup> 霍桂桃<sup>2</sup> 王辰飞<sup>1</sup> 范昌发<sup>1</sup>

(1.中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所,北京 102629)(2.中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心,北京 100176)

**摘要:**目的 比较不同剂量四氯化碳诱导近交系 C57BL/6 小鼠肝纤维化模型的效果,以建立稳定的肝纤维化模型。

**方法** 选择 5 周龄的 C57BL/6 近交系小鼠,分别腹腔注射给予高、中、低剂量的四氯化碳诱导肝纤维化,实验结束后取血及肝脏组织,检测血浆丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)的水平及肝脏病理变化。**结果** 近交系 C57BL/6 小鼠药物诱导后,各剂量组动物均能存活到 8 周,高剂量组存活率仅为 20% 远低于中、低组;血清转氨酶含量升高程度、肝组织病理改变存在剂量时间效应关系。病理分析表明,各剂量组均可见肝细胞变性/坏死、中央静脉周围/汇管区混合细胞浸润及肝脏纤维化。**结论** 10% 四氯化碳给药 8 周后能诱导近交系 C57BL/6 小鼠形成较稳定的肝纤维小鼠模型,为后续肝纤维化机制研究及药物筛选工作奠定了基础。

**关键词:**近交系 C57BL/6 小鼠;四氯化碳;肝纤维化

**中图分类号:** R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0028-04

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.007

肝纤维化是机体对各种病因引起的慢性肝损伤后的一种损伤修复反应,呈现高发病率、高死亡率特征。四氯化碳(carbon tetrachloride, CCl<sub>4</sub>)诱导肝脏纤维化是目前常用的造模方法,本法建立的肝纤维化模型已广泛用于研究肝纤维化的细胞及分子机制、血清学标志物、组织病理及抗纤维化物质的药效评价<sup>[1-2]</sup>。

目前国内多采用 SD 大鼠和封闭群小鼠进行 CCl<sub>4</sub> 急性肝毒性实验,选取的给药途径、剂量、时间间隔等因素也多有不同<sup>[3-6]</sup>。近交系小鼠具有遗传背景均一、对药物反应的一致性好、可重复性强等特点,被广泛用于生命科学、医学等研究中<sup>[7-8]</sup>。建立稳定可靠的肝纤维化模型可以为肝纤维化发病机制研究、抗肝纤维化药物的筛选及评价提供工具。因此,本研究选择常用 C57BL/6 小鼠品系,摸索最适造模剂量和方法方式,建立稳定、个体差异小的近交系 C57BL/6 小鼠的肝纤维化模型,为肝癌致病机理及临床医学研究工作提供稳定的疾病模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物:**近交系 C57BL/6 小鼠,由中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所繁殖,动物生产许可证号为 SCXK(京)2017-0005。小鼠生产繁育在 SPF 级屏障设施内进行,动物实验在清洁级环境中进行,饲喂 SPF 级小鼠颗粒饲料,饮用灭菌自来水。

本实验在中国食品药品检定研究院实验动物伦理委员会监督下进行。

**1.1.2 主要仪器及试剂:**本实验主要仪器设备有全自动生化分析仪(URIT-8260),自动包埋机(日本樱花 TEC5EMJ-2 型)滑动式切片机(日本樱花 IVS-410 型)等;CCl<sub>4</sub>、橄榄油均购自国药集团化学试剂有限公司,AST、ALT 检测试剂均购自中生北控生物科技股份有限公司;其他常见生化试剂如乙醇、异戊醇、苯、氯仿购自北京化学工业集团有限公司。

收稿日期:2019-02-27

作者简介:霍桂桃和刘甦苏为共同第一作者

刘甦苏(1981—),女,副研究员,研究方向:模式动物.E-mail:liuss@nifdc.org.cn

霍桂桃(1978—),女,博士,副主任药师,研究方向:毒性病理诊断工作.E-mail:huoguitao@nifdc.org.cn

通信作者:范昌发(1970—),男,博士,研究员,主要从事模式动物研究.E-mail:fancf@nifdc.org.cn

1.2 方法

1.2.1 肝纤维化模型分组及给药剂量:选取 5 周龄的 C57BL/6 近交系小鼠,每组 5 只。CCl<sub>4</sub>和橄榄油根据体积比混合,配置成 20% (高剂量 10 μL/g 体重)及 10% (中剂量 10 μL/g、低剂量 5 μL/g)的 CCl<sub>4</sub>溶液,对实验组小鼠进行每周 2 次腹腔注射,连续注射 8 周,对照组给予同体积橄榄油。

1.2.2 观察指标

1.2.2.1 体质量及生存率观察

每周称量小鼠体质量,注射后注意观察一般情况并记录动物情况,例如精神状况和饮食量及小鼠体质量。

1.2.2.2 生化指标测定

各组小鼠分别在给药后 1 周、3 周、6 周、8 周,通过眼球内眦静脉丛取血,3 000 r/min 离心 10 min,分离血清后用全自动生化分析仪测定其 ALT、AST 的水平。

1.2.2.3 肝脏组织病理学检查

连续给药 8 周后处死小鼠,先眼内眦采血,待小鼠死亡,解剖,取肝脏置于 4% 的甲醛固定,切片厚度 3~5 μm,石蜡包埋,苏木精-伊红 (HE) 染色,光镜下观察肝脏病理学改变。

1.3 统计方法

应用 EXCEL 进行数据分析,计量资料以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,独立样本用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 近交系 C57BL/6 小鼠生存率的比较

为了获得近交系品系的肝纤维化模型,并验证给药剂量对成模率和生存率的影响,分别设置了高、中、低三个剂量组。给药 24 h,小鼠存活率 100%,未出现明显临床病理症状。高剂量组 1 周后,大量小鼠死亡,存活率仅为 20%,而中、低剂量组,以及对照组小鼠均存活到 8 周实验结束,仅对照组有 1 只小鼠注射后第 2 天死亡,该鼠大体剖检显示 XXX 地方有损伤迹象,推测其与给药操作不当有关。从以上实验结果分析,CCl<sub>4</sub> 给药剂量与小鼠模型生存率呈剂量效应,小鼠生存率结果 (见图 1)。

2.2 近交系小鼠肝纤维化形成过程中血清转氨酶水平的动态变化

本实验比较了各组各个时间点的 ALT 和 AST 含量,结果显示小鼠血清 ALT 和 AST 在给药后出现两头高、中间低的趋势,并未随造模时间的推进而逐

渐升高,分析原因造模后一周的 ALT 和 AST 含量急剧升高,可能与药物急性毒性有关,随后 8 周时高、中、低剂量组的转氨酶水平升高,说明肝功能的损伤程度与注射浓度成正比,并在一定程度上反映肝纤维化的程度。ALT 和 AST 升高,可能为肝细胞受损、微胆管梗阻所致。高剂量组指标与对照组相近,可能是存活的小鼠未造模成功。中、低剂量组的结果显示造模后 8 周,与对照组相比,小鼠血清中 ALT 和 AST 的水平升高明显,提示肝脏的合成功能受到了损害<sup>[9]</sup>。

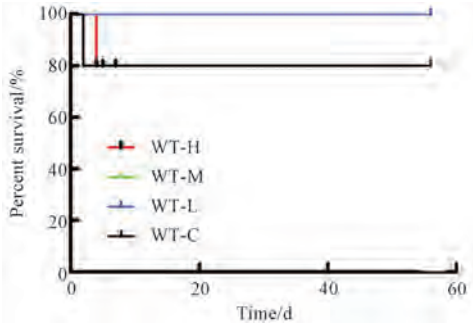


图 1 近交系 C57BL/6 小鼠各剂量组的生存率  
Fig.1 The survival rate of C57BL/6 mice in different each dosage group

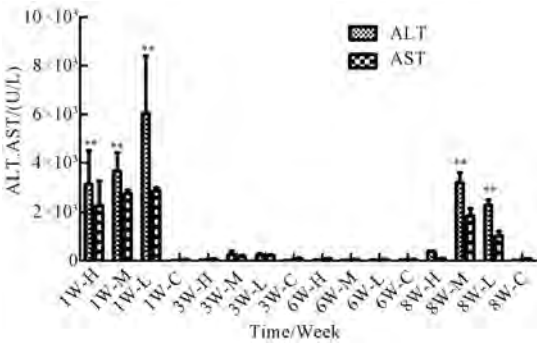


图 2 各剂量组近交系 C57BL/6 小鼠给药后不同时间血清转氨酶水平

注:纵坐标是各组小鼠血清 ALT、AST 的每 L 血清中水平,横坐标是给药时间;给药 1 周和 8 周,ALT、AST 含量升高,与对照组相比差异极显著 (\*\* *P*<0.01);3 周和 6 周差异不明显 (\*\* *P*>0.01),与对照组相比 (\*\* *P*<0.01)。

Fig.2 The serum examination results of C57BL/6 mice in different times after administration

Note:The vertical coordinate is the level of ALT and AST in each group, and the horizontal coordinate is the time of administration. After 1 and 8 weeks of administration, ALT and AST content increased, indicates (\*\* *P*<0.01) compared with the control group, while there was no significant difference between 3 weeks and 6 weeks (\*\* *P*>0.01), but indicates (\*\* *P*<0.01) compared with the control group.



### 2.3 小鼠肝纤维化病理学改变

给予 CCl<sub>4</sub> 8 周后,高剂量组小鼠肝脏的主要病理学改变为极轻度肝细胞变性/坏死,极轻度中央静脉周围/汇管区混合细胞浸润;极轻度肝脏纤维化。中剂量组小鼠肝脏的主要病理学改变为极轻度至轻度肝细胞变性/坏死,轻度中央静脉周围/汇管区混合细胞浸润;极轻度肝脏纤维化。低剂量组小鼠肝脏的主要病理学改变为极轻度至轻度肝细胞变性/坏死;轻度至中度中央静脉周围/汇管区混合细胞浸润;极轻度至肝脏纤维化(见图 3)。

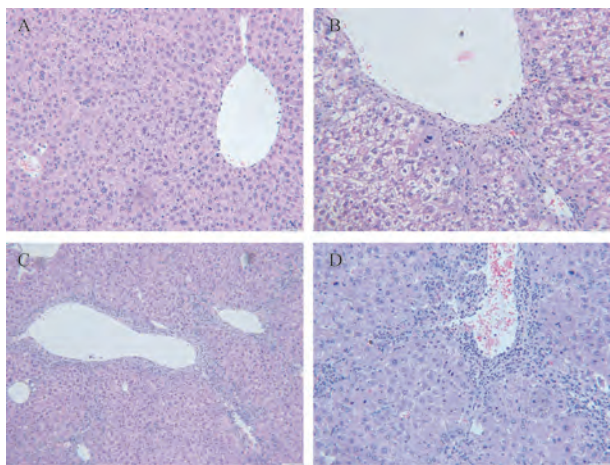


图 3 肝纤维化小鼠肝脏病理学改变(×200)

注:A:对照组肝脏未见明显的病理学改变;B、C、D:高、中、低剂量组小鼠肝脏可见中央静脉/汇管区混合细胞浸润、肝细胞变性/坏死及纤维化。

Fig.3 The liver pathology of fibrosis mice with HE stain(×200)

Note: A: There were no obvious pathological changes in the liver of the control group; B, C, D: mixed inflammatory cell infiltrate, hepatocellular degeneration/necrosis and fibrosis in the central vein/portal area were observed in the liver of the high, medium and low dose groups.

实验结果发现,高剂量动物组动物死亡率为 80%,剩余的一只动物镜检发现病变。低、中剂量组未出现动物死亡,但是镜检发现中剂量组的病变程度高于低剂量组,存在药物剂量效应。随着给药时间增长,肝脏的中央静脉周围/汇管区混合细胞浸润及肝脏纤维化程度加重。

### 3 讨论

肝纤维化动物模型的建立是研究肝纤维化发病机制的基础,本实验室尝试近交系 C57BL/6 小鼠作为研究对象,采用常用的诱导肝损伤模型的四氯化碳化学试剂通过给予小鼠高、中、低剂量,观察其对肝纤

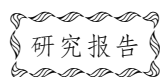
维化模型建立的影响,以探索建立小鼠肝纤维化模型的方法。结果显示,随 CCl<sub>4</sub> 浓度增高,高剂量组小鼠死亡率偏高,中、低剂量组小鼠 8 周后肝脏出现纤维化,中剂量组的肝组织病变程度高于低剂量组。

肝纤维化时常伴随肝功能损伤,检测谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)指标和肝脏组织病理学诊断方可确定是否发生肝纤维化。因此本实验检测了 AST、ALT 等反映肝功能变化的指标。重复结果表明,给药 8 周后小鼠血清 AST、ALT 水平升高,且中剂量组的含量高于低剂量组,说明肝功能的损伤程度与注射浓度成正比,并在一定程度上反映肝纤维化的程度<sup>[10-11]</sup>。

综上所述,通过注射 10%CCl<sub>4</sub>,10 μL/g,共 8 周能够明显地诱导小鼠肝纤维化形成,且死亡率较低,是一种较理想的制作肝纤维化模型的方法,这为研究肝纤维化的发病机制奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Lee C H, Park S W, Kim Y S, *et al.* Protective mechanism of glycyrrhizin on acute liver injury induced by carbon tetrachloride in mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2007, **30**:1898-1904.
- [2] Ye J F, Zhu H, Zhou Z F, *et al.* Protective mechanism of andrographolide against carbon tetrachloride-induced acute liver injury in mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2011, **34**:1666-1670.
- [3] 金毅,徐峰,鲁艺. 四氯化碳急性肝损伤毒性病理学诊断方法探讨[J]. *中国新药杂志*, 2014, **23**(19):2224-2227.
- [4] 杨开选,程薇波,王文冬,等. 40%四氯化碳大鼠慢性肝损伤模型的研究[J]. *现代预防医学*, 2005, **32**(1):20-21.
- [5] 王宇,程薇波,张银柱,等. 10% 四氯化碳致大鼠慢性肝损伤的研究[J]. *现代预防医学*, 2006, **33**(5):701-703.
- [6] 李珊,张珂,李国玉,等. 锁阳对四氯化碳诱导肝纤维化小鼠的防治作用[J]. *石河子大学学报(自然科学版)*, 2017, **33**(3):368-372.
- [7] 刘先菊,王艳荣.常用近交系小鼠微卫星 DNA 多态性的分析研究[J]. *实验动物科学*, 2010, **27**(5):1-4.
- [8] 李银银,吴绍亮,王洪,等.微卫星 DNA 分析国内 24 个近交系小鼠遗传状况[J]. *中国比较医学杂志*, 2017, **27**(8):43-49.
- [9] 刘发河,曾海莲,郑小江,等. 血清肝纤维化指标 AST、ALT 比值及血小板检测在肝纤维化诊断中的作用[J]. *实验与检验医学*, 2010, **29**(3):251-252.
- [10] Dong D, Zhang S, Yin L, *et al.* Protective effects of the total saponins from *rosa laevigata* michx fruit against carbon tetrachloride—induced acute liver injury in mice[J]. *Food Chem Toxicol*, 2013, **62**:120-130.
- [11] J Lee H S, Kim H H, Ku S K. Hepato protective effects of *Artemisia capillaris* herba and *Picrorrhiza* rhizome combinations on carbon tetrachloride—induced subacute liver damage in rats[J]. *Nutr Res*, 2008, **28**:270-277. (下转至第 34 页)



# 高脂血症食蟹猴模型的建立及分析

杨永立 李 锋 汪云龙 刘发琴 周国春 高仕平 徐子辰 徐永德

(昆明科灵生物科技有限公司, 昆明 650550)

**摘要:**目的 建立高脂血症食蟹猴模型。方法 采用高脂膳食饲料诱导食蟹猴,分别在4、8、12、18个月检测血清总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白(HDL)、低密度脂蛋白(LDL)、甘油三酯(TG)指标,对其血脂指标的变化趋势进行分析。结果 模型组在饲喂高脂膳食饲料4个月后,TC、HDL、LDL与实验前相比差异极显著( $P<0.01$ );TG在饲喂高脂膳食饲料8个月后明显升高,与实验前相比差异极显著( $P<0.01$ );造模后,高脂饲料组与正常对照组比较,TC、HDL、LDL、TG均高于对照组,差异极显著( $P<0.01$ )。结论 在本实验中,模型组TC、HDL、LDL、TG均呈现递增趋势,尤其是TC、LDL明显高于食蟹猴正常参考值水平,说明模型组食蟹猴具有高胆固醇和高、低密度脂蛋白血症的特征,初步建立了食蟹猴高脂血症动物模型。

**关键词:**高脂血症;动物模型;食蟹猴

**中图分类号:** R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0031-04

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.008

随着人们生活水平的提高,高脂血症(Hyperlipidaemia)和脂肪肝(fatty liver)的发病率在逐年增加。高脂血症,又称脂代谢紊乱,即血清总胆固醇(Total Cholesterol, TC),甘油三酯(Triglyceride, TG),低密度脂蛋白(Low-density lipoprotein, LDL)的增高以及高密度脂蛋白(high-density lipoprotein HDL)的降低,这不仅是脂代谢紊乱的标志,也是动脉粥样硬化、冠心病、脑卒中、高血压、心脏病、中风和脂肪肝等疾病的主要危险因素<sup>[1-4]</sup>。高脂血症已成为医药界研究的热点,理想的高脂血症动物模型不仅是研究人类高脂血症发病机理的有效工具,也是开展脂代谢异常及动脉粥样硬化研究的重要手段。

建立高脂血症模型的动物,要考虑造模动物对膳食脂质调节和代谢、生理功能反应以及高脂血症的各种症状等要与人类尽可能相似。非人灵长类动物因在遗传、生理以及生物学特性方面与人类十分相似,高脂血症动物所表现的病理特征和血脂变化规律与人类高脂血症患者的临床特征也十分相似<sup>[5]</sup>,故选用食蟹猴作为实验动物,用高脂膳食饲料诱导方法,初步建立高脂血症食蟹猴动物模型,本研究通过检测TC、HDL、LDL、TG的水平来衡量血脂变化情

况,同时对其血脂指标变化趋势进行分析,为筛选理想的高脂血症模型提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物:**正常饲养的健康成年雄性食蟹猴804只,由昆明亚灵生物科技有限公司提供,许可证号为SCXK(滇)K2015-0003;实验过程在生物医学动物模型国家地方联合工程研究中心昆明科灵生物科技有限公司动物实验设施中进行,实验动物使用许可证号为SYXK(滇)K2012-0002。

**1.1.2 实验饲料:**正常饲料由昆明亚灵生物科技有限公司提供,生产许可证号为SCXK(滇)K2018-0004。高脂饲料由广州市国龙科技有限公司提供,(加工配方:15%猪油、30%糖、0.5%胆固醇、5%无营养物质、49.5%基础饲料),生产许可证号为SCXK(粤)2014-0026。

**1.1.3 主要试剂及仪器设备:**胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇和甘油三酯检测试剂盒由罗氏诊断产品(上海)有限公司提供。使用罗氏全自动生化分析仪(c501)检测血清样品。

1.2 方法

1.2.1 动物分组及高脂血症动物模型的制备:随机挑选 435 只食蟹猴为模型组,饲喂高脂膳食饲料;369 只为对照组,饲喂正常饲料。模型组和对照组动物每天每只饲喂 200 g 饲料,分别在上午 08:00 和下午 16:00 各给予 100 g。每日中午 13:30 饲喂 150 g 水果,自由饮水。饲养环境温度 18~26 ℃,相对湿度 40%~70%,本试验分别在第 4 个月、第 8 个月、第 12 个月、第 18 个月采血进行血脂检测。

1.2.2 血液样品采集及血脂检测:动物空腹 12~14 h,前肢静脉采血 3 mL,3 000 r/min 离心 10 min 后收集血清。马上使用罗氏全自动生化分析仪(c501)检测 TC,HDL,LDL 和 TG。

1.3 统计方法

用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,差异性分析采用方差分析,数值以( $\bar{x}\pm s$ )表示,以  $P<0.05$  表示差异显著, $P<0.01$  为差异极显著。

2 结果

2.1 高脂膳食诱导组造模前、后血脂指标检测结果比较

高脂膳食诱导组血脂指标与造模前自身对照,TC、HDL、LDL 在饲喂高脂膳食饲料 4 个月后明显

升高,在 4~12 个月均维持在较高水平,18 个月略下降,但与实验前相比均极显著上升( $P<0.01$ );TG 在饲喂高脂膳食饲料 8 个月后明显升高,并维持在较高水平,与实验前相比差异极显著( $P<0.01$ )。

2.2 高脂膳食诱导组与正常饲料对照组血脂指标检测结果比较

造模后,高脂膳食诱导组与正常饲料对照组比较,TC、HDL、LDL、TG 均高于对照组,差异极显著( $P<0.01$ )。

2.3 对照组、模型组实验前后血脂指标检测结果比较

血脂各项指标的分析结果表明,在实验过程中,对照组血清 TC、HDL、LDL、TG 均无明显的变化。模型组 TC 水平有递增趋势,在饲喂高脂膳食饲料 4 个月后,与实验前相比呈现极显著性差异( $P<0.01$ ),并且 TC 明显高于食蟹猴血脂的正常参考水平,具备了高胆固醇血症特征;HDL 先增加后降低,但与实验前相比均极显著上升( $P<0.01$ );LDL 在饲喂高脂膳食饲料 4 个月后水平快速递增,虽然后期有下降,但都维持在较高水平,并且与实验前相比极显著上升( $P<0.01$ ),且明显高于食蟹猴血脂的正常参考水平,提示脂代谢紊乱导致了高脂血症;TG 水平呈现递增趋势,在 8 个月时极显著升高( $P<0.01$ ),见表 1。

表 1 食蟹猴高脂血症模型组与对照组血脂指标监测结果( $\bar{x}\pm s$ )  
Table 1 Indexes about lipids of the model group and the control group( $\bar{x}\pm s$ )

| 分组(Group)                       |       | 检测指标(Index) | TC                      | HDL                    | LDL                     | TG                     |
|---------------------------------|-------|-------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|------------------------|
| 模型组<br>model group<br>(n=435)   | 实验前   | Pre         | 2.60±2.13 <sup>a</sup>  | 1.48±0.48 <sup>a</sup> | 1.17±0.90 <sup>a</sup>  | 0.58±0.39 <sup>a</sup> |
|                                 | 4 个月  | 4 months    | 14.48±7.75 <sup>b</sup> | 2.17±0.47 <sup>b</sup> | 13.55±8.12 <sup>b</sup> | 0.69±0.59 <sup>a</sup> |
|                                 | 8 个月  | 8 months    | 12.51±6.20 <sup>b</sup> | 1.96±0.76 <sup>b</sup> | 11.63±6.82 <sup>b</sup> | 0.96±0.99 <sup>b</sup> |
|                                 | 12 个月 | 12 months   | 13.35±7.32 <sup>b</sup> | 1.86±0.69 <sup>b</sup> | 11.90±7.56 <sup>b</sup> | 1.25±1.40 <sup>b</sup> |
|                                 | 18 个月 | 18 months   | 10.71±5.74 <sup>b</sup> | 1.77±0.68 <sup>b</sup> | 9.78±5.96 <sup>b</sup>  | 1.22±1.72 <sup>b</sup> |
| 对照组<br>control group<br>(n=369) | 实验前   | Pre         | /                       | /                      | /                       | /                      |
|                                 | 4 个月  | 4 months    | /                       | /                      | /                       | /                      |
|                                 | 8 个月  | 8 months    | 2.25±0.53 <sup>a</sup>  | 1.31±0.46 <sup>a</sup> | 0.95±0.34 <sup>a</sup>  | 0.92±0.45 <sup>a</sup> |
|                                 | 12 个月 | 12 months   | /                       | /                      | /                       | /                      |
|                                 | 18 个月 | 18 months   | 2.42±0.54 <sup>a</sup>  | 1.34±0.42 <sup>a</sup> | 1.17±0.38 <sup>a</sup>  | 0.88±0.58 <sup>a</sup> |

注:TC, HDL, LDL, TG 单位均为 mmol/L。同列字母相同表示差异不显著( $P>0.05$ ),字母不同表示差异极显著( $P<0.01$ )  
Note:The units of TC, HDL, LDL and TG are all mmol/L, The same letter in the same trade means no significant difference( $P>0.05$ ), while different letter means significant difference or extremely significant( $P<0.05, P<0.01$ )

2.4 高脂膳食诱导组血脂检测指标 TG 水平

饲喂高脂膳食饲料动物的 TG 水平,个体间存在较大差异。TG 代谢极端异常的动物 TG 水

平可突然升高至 57.6 mmol/L,而饲喂相同时间高脂膳食饲料的动物 TG 水平最低的为 0.1 mmol/L。

### 3 讨论

非人灵长类动物是现代医学研究领域重要的实验动物,在遗传学、解剖学和生理学上都与人类高度相似。食蟹猴体型小,性情温顺,便于实验操作,且繁殖周期短,在医学研究中应用广泛,常应用于药理学、毒理学、药物安全性评价等方面的实验研究<sup>[6]</sup>。

本试验选择生长和代谢都较为稳定的成年食蟹猴作为实验猴<sup>[7]</sup>,通过饲喂高脂膳食饲料形成高脂血症动物模型,该模型形成时间相对较长,与人类长期高脂膳食导致的高脂血症相似。脂代谢紊乱是诱发高脂血症的关键原因,血清中 TC、HDL、LDL、TG 的含量可在一定程度反映机体脂肪代谢状况,是监测血脂变化的重要指标<sup>[8]</sup>。TC 体内含量过量时会导致高胆固醇血症,对机体产生不利的影响;HDL 主要功能是将肝外组织中过多的胆固醇运输到肝脏代谢,HDL 具有防止动脉粥样硬化、降低冠心病病死率作用;LDL 是所有血浆脂蛋白中首要的致动脉粥样硬化性脂蛋白,如果血液中 LDL 含量过高,就易沉积于动脉血管壁,会形成粥样斑块,导致血管狭窄或破裂可直接导致急性心梗、中风甚至猝死。本实验通过检测 TC、HDL、LDL、TG 的水平来衡量血脂变化情况。

本实验结果显示,在饲喂高脂膳食饲料 4 个月时,试验组 TC 和 LDL 水平极显著升高( $P<0.01$ ),在后期有所下降,但都稳定维持在一个较高的水平,且 TC 和 LDL 的水平明显高于食蟹猴血脂的正常水平<sup>[9-11]</sup>;HDL 和 TG 水平先增加后降低,虽然与实验前相比有极显著的上升( $P<0.01$ ),但均维持在食蟹猴血脂的正常水平;在实验 8 个月、18 个月时模型组 TC、HDL、LDL、TG 均明显高于对照组( $P<0.01$ )尤其是 TC 和 LDL 的水平,这一结果与杨凤梅等的实验结果一致<sup>[11]</sup>。造成这些结果的可能机制是因为高脂膳食饲料中含 15% 的猪油、30% 的糖和 0.5% 胆固醇,高脂肪、高糖和高 TC 的摄入使造模动物体内血液的 TC 含量急剧增加,出现 TC 代谢障碍从而导致机体内的血脂代谢紊乱,使 LDL 的代谢也出现障碍并在体内蓄积,从而使造模动物出现高 TC 和高 LDL 血症。通过分析 TG 的结果可知,饲喂高脂膳食饲料动物的 TG 水平,个体间存在较大差异,造成这一结果的原因可能是动物个体间基因存在差异,有些动物的基因在特定的身体条件和环境因素作用下会发生突变。有全基因组研究发现,TG 代谢

极端异常的 HTG 患者,脂蛋白(lipoprotein lipase, LPL)基因,载脂蛋白 C2 基因有突变聚集倾向<sup>[12]</sup>。脂蛋白脂肪酶的主要生理功能是水解血液中富含甘油三酯脂蛋白中的三脂酰甘油,生成的甘油和脂肪酸可供组织氧化分解并提供能量<sup>[13]</sup>。有些 LPL 自身变异并结合遗传因素或者环境因素时会产生严重的临床症状,比如妊娠后,LPL 基因发生突变,TG 由 3.4 mmol/L 升高至 22.5 mmol/L<sup>[14]</sup>。

本实验结果说明,采用高脂膳食饲料建立的食蟹猴高脂血症动物模型前期表现为 TC 和 LDL 迅速升高,后期虽有下降,但都维持在较高的异常水平,这一结果表明食蟹猴在造模过程中可能存在一个机体内适应的过程,通过体内代谢调节血脂水平,维持在一个稳定的水平;HDL 和 TG 水平先增加后降低,但都在正常范围内波动。通过各项指标分析,用高脂饲料建立的食蟹猴高脂动物模型符合高脂血症临床分类中的高胆固醇血症和高 LDL 血症的特征,并且在 18 个月的试验监测中,TC 和 LDL 都维持在较高水平,说明本试验已经初步建立了稳定的食蟹猴高脂血症动物模型。

### 参考文献

- [1] Szapary P O, Rader D J. The triglyceride-high-density lipoprotein axis: an important target of therapy[J]. American Heart Journal, 2004, **148**(2): 211-221.
- [2] 吴隰宏,方显明. 家兔实验性高脂血症模型的研究[J]. 广西中医药大学学报, 2004, **7**(2): 1-2.
- [3] Cannon C P. Mixed Dyslipidemia, Metabolic Syndrome, Diabetes Mellitus, and Cardiovascular Disease: Clinical Implications[J]. The American Journal of Cardiology, 2008, **102**(12): 5L-9L.
- [4] Wang S H, Sun Z L, Ruan X Z, et al. Dyslipidaemia among diabetic patients with ischemic stroke in a Chinese hospital [J]. 中华医学杂志(英文版), 2009, **122**(21): 2567-2572.
- [5] Carlsson H E, Schapiro S J, Farah I, et al. Use of primates in research: a global overview. [J]. American Journal of Primatology, 2004, **63**(4): 225-237.
- [6] 石巧娟,李巍,萨晓婴. 食蟹猴在医学研究中的应用进展[J]. 实验动物与比较医学, 2012, **32**(4): 358-365.
- [7] 李冰. 食蟹猴生长曲线[J]. 实验动物科学, 2006, **23**(3): 61-62.
- [8] Rodoman G V, Shalaeva T I, Dobretsov G E. Blood fatty acid transporters in acute pancreatitis[J]. Vopr Med Khim, 2001, **47**(47): 633-641.
- [9] 李岩,何君,孙井江,等. 实验用食蟹猴生物学指标的研究[J]. 现代预防医学, 2010, (13): 2503-2505.
- [10] 王冬平,隋丽华,洪宝庆,等. 食蟹猴与猕猴血液生理和生化指标的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2007(7): 400-402.
- [11] 杨凤梅,李艳艳,鲁帅尧,等. 实验性高脂血症恒河猴模型的

- 初步建立及分析[J]. 中国比较医学杂志, 2012, (9): 31-35.
- [12] Johansen C T, Wang J, Lanktree M B, *et al.* Excess of rare variants in genes identified by genome-wide association study of hypertriglyceridemia [J]. *Nature Genetics*, 2010, **42** (8): 684-687.
- [13] 穆云翔. 脂蛋白脂肪酶基因突变研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2002, (4): 358-362.
- [14] Ma Y, Liu M S, Ginzinger D, *et al.* Gene-environment interaction in the conversion of a mild-to-severe phenotype in a patient homozygous for a Ser172→Cys mutation in the lipoprotein lipase gene [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 1993, **91**(5): 1953-1958.

## Establishment and Analysis of Hyperlipidemia Model in Cynomolgus Monkey

YANG Yongli, LI Feng, WANG Yunlong, LIU Faqin, ZHOU Guochun,

GAO Shiping, XU Zichen, XU Yongde

(*Kunming Biomed International, Kunming 650550, China*)

**Abstract: Objective** To establish Cynomolgus monkey model of hyperlipidemia. **Method** Cynomolgus were feed by high fat diet, the levels of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein (HDL), low density lipoprotein (LDL), triglyceride (TG) of the Cynomolgus monkey were determined at 4, 8, 12, 18 months for analyzing the trend of each paramaters above. **Result** When it was 4 months, the level of TC, HDL, LDL were higher significantly than that before feeding the high fat diet ( $P < 0.01$ ). When it was 8 months, the level of TG was higher signifcantly than that before feeding the high diet ( $P < 0.01$ ). And the levels of TC, HDL, LDL and TG of model group were significantly different from that of the control group ( $P < 0.01$ ) at 8 months, 18 months. At this experiment, TC, HDL, LDL, TG all showed a increase trend, expecially the levels of TC and LDL much higher than the normal levels of Cynomolgus monkey. **Conclusion** Cynomolgus monkey of the model group has the feature of high total cholesterol and high low-density lipoprotein cholesterol, the method to establish Cynomolgus monkey model of experimental hyperlipidemia was feasible.

**Key words:** Hyperlipidemia; animal model; Cynomolgus monkey

(上接第 30 页)

## Establishment of Hepatic Fibrosis Model Induced by CCl<sub>4</sub> in Inbred C57BL/6 Mice

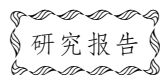
LIU Susu, HUO Guitao, WANG Chenfei, FAN Changfa

(*1. Institute for Laboratory Animal Resources National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 102629, China*)

(*2 National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100176, China*)

**Abstract: Objective** Compared the effects of different doses of carbon tetrachloride induced liver fibrosis in inbred C57BL/6 mice, in order to established a stable liver fibrosis model for the study of liver diseases and related drug mechanisms. **Method** The 5-week-old C57BL/6 mice were subjected to high, medium and low dose by CCl<sub>4</sub>, after the experiment collected blood and liver tissue to detect the levels of plasma alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and liver pathology. **Result** After the induction of inbred C57BL/6 mouse drug, the medium and low dose group could survive for 8 weeks, the increase of serum transaminase content and the pathological changes of liver tissues had a dose-time effect, and the mice with severe pathological changes had a large area of liver tissue necrosis and were wrapped by fibrous tissue. **Conclusion** Eight weeks after administration of 10% carbon tetrachloride, inbred C57BL/6 mice were induced to form a stable mouse model of liver fiber.

**Key words:** Inbred C57BL/6 mice; carbon tetrachloride; Liver fibrosis



# I型干扰素受体(*Ifnar*)基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定

陈亚坤<sup>1</sup> 孙婧<sup>1</sup> 蒋亚君<sup>1</sup> 王昕昉<sup>1</sup> 刘晓宇<sup>1</sup> 戴连攀<sup>2</sup> 卢选成<sup>1</sup> 李晓燕<sup>1</sup>

(1. 中国疾病预防控制中心, 北京 102206) (2. 中科院北京生命科学研究院, 北京 100101)

**摘要:**目的 对 *Ifnar* 基因敲除小鼠繁育及鉴定方法进行分析, 为多种病毒研究提供理想的动物模型。方法 将引进的纯合 *Ifnar* 基因敲除小鼠, 以 1 雄 2 雌的合笼方式进行饲养繁殖, 从仔鼠中提取鼠尾基因组 DNA, PCR 法扩增目的基因片段, 琼脂糖凝胶电泳进行基因型结果判定。结果 *Ifnar* 基因敲除小鼠繁育成功, 获得了一批基因敲除鼠, 使用 PCR 方法成功鉴定出 *Ifnar* 基因敲除纯合子小鼠。

**关键词:** I 型干扰素受体; 基因敲除; 小鼠; 繁育; 基因型鉴定

中图分类号: Q-33 文献标识码: A 文章编号: 1006-6179(2019)04-0035-05

DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.009

干扰素 (Interferon, IFN) 是能够干扰病毒在宿主细胞内增殖的一种蛋白, 1957 年由 Isaacs 与 Lindenmann 共同发现。干扰素分为 I 型干扰素和 II 型干扰素两大类<sup>[1]</sup>。I 型干扰素包括 IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$ , II 型干扰素也称为 IFN- $\gamma$ <sup>[2]</sup>。干扰素生物效应发挥的前提是, 必须要与细胞表面相应的信号受体结合<sup>[2-3]</sup>, 如果干扰素受体缺乏, 会导致干扰素无法与之结合, 进而无法发挥干扰素的生物学效应。干扰素受体 (IFNR) 分为 I 型干扰素受体 (结合 I 型干扰素) 和 II 型干扰素受体 (结合 II 型干扰素), 干扰素受体基因敲除小鼠属于免疫缺陷动物模型, 是多种病毒研究的敏感动物模型, 可用于病毒的致病机制研究以及抗病毒疫苗、药物研发。中国疾病预防控制中心实验动物中心通过引进 I 型干扰素受体 (*Ifnar*) 基因敲除小鼠, 并在负压屏障设施内以 1 雄 2 雌的合笼方式进行了饲养、保种繁育, 并对繁育的仔鼠基因型进行了鉴定, 结果获得了稳定的 *ifnar*<sup>-/-</sup> 基因型小鼠。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

*Ifnar* 基因敲除小鼠纯合子自重庆医科大学引进, 品系名: B6.129S2-*Ifnar*<sup>tm1Agt</sup>/Mmjax, 遗传背景:

C57BL/6, 基因型: *ifnar*<sup>-/-</sup>。

### 1.2 仪器和试剂

PCR 扩增仪 (杭州博日科技有限公司, 型号: TC-XP-D), 化学发光凝胶成像系统 (北京科创锐新生物科技有限公司, 型号: K8360), 核酸水平电泳仪 (北京六一生物科技有限公司, 型号: DYCP-31DN), 台式高速冷冻离心机 (艾本德中国, MiniSpin), 恒温水浴锅 (上海习仁, 型号: HH-12), 实验动物饮水机 (北京木牛流马精华工程技术有限公司, MN-LM200 J); 动物饮水专用灭菌器 (凌云博际北京科技有限公司, III 型)。

基因组 DNA 提取试剂盒 (北京全式金生物技术有限公司, 货号: EE101), 2 × EasyTaq PCR SuperMix (北京全式金生物技术有限公司, 货号: AS111), 2 K DNA Marker (北京全式金生物技术有限公司, 货号: BM101), Biotium Gelred 核酸染料 (10000×) (莱博斯特 (北京) 科技有限公司, 货号: 41003)。

### 1.3 *Ifnar* 基因敲除小鼠的饲养繁育

*Ifnar* 基因敲除小鼠饲养在中国疾病预防控制中心实验动物中心负压屏障设施内<sup>[4]</sup>, 在独立通风笼盒 (individually ventilated cages, IVC) 内饲养和繁殖, 饲养温度控制在 20 ~ 24 °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 自由饮食进水, 昼夜光照节律。按照 SPF 级动

收稿日期: 2019-02-21

作者简介: 陈亚坤 (1982—), 女, 硕士, 研究方向: 基因工程修饰动物模型。E-mail: yakunchen@163.com

通信作者: 李晓燕 (1977—), 女, 副研究员, 研究方向: 实验动物管理与动物模型。E-mail: lixy997606@163.com



物饲养标准进行饲养,垫料、鼠盒均经过 131 ℃、15 min 高压蒸汽灭菌后使用。饲料采用华阜康公司生产的 SPF 级小鼠饲料,小鼠饮水采用超滤净化水机生产后再高压灭菌处理。垫料每周更换 1 次,每日补充充足饲料及饮水。采用 1 雄 2 雌合笼方式进行繁殖。

对 14 笼合笼的纯合 *Ifnar* 基因敲除小鼠(5~10 个月月龄)的生产情况进行 4 个月的跟踪,对生产的仔鼠数量进行统计计算。

## 1.4 小鼠的基因型鉴定

**1.4.1** 鼠尾基因组 DNA 提取:剪取小鼠尾尖长 0.2~0.3 cm 的组织,放入容量 1.5 mL 离心管中,快速放入-20 ℃ 保存。用 DNA 提取试剂盒提取小鼠基因组 DNA 后,放于 4 ℃ 备用。

**1.4.2** PCR 扩增反应:鉴定引物序列由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,Common: CGAGGCGAAGTGTTAAAAG, Wild type Reverse: ACGGATCAACCTCATTCAC, Mutant Reverse: AATTCGCCAATGACAAGACG。以上 3 种引物按照 1:1:1 比例混合至 10  $\mu\text{mol/L}$ ,进行 PCR 反应。PCR 反应体系(20  $\mu\text{L}$ ):2 $\times$ PCR Mix 10  $\mu\text{L}$ ,引物混合物 1  $\mu\text{L}$ ,模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ ,灭菌 ddH<sub>2</sub>O 7  $\mu\text{L}$ 。采用 PCR 扩增仪进行 Touchdown 循环扩增,反应条件:预变性 94 ℃ 2min;变性 94 ℃ 20 s,复性 65 ℃ 15 s,复性温度每个循环下降 0.5 ℃,延伸 68 ℃ 10 s,循环 10 次;变性 94 ℃ 15 s;复性 60 ℃ 15 s,延伸 72 ℃ 10 s,循环 28 次;最后延伸 72 ℃ 2 min;10 ℃ 停留。

最后样品取出,4 ℃ 保存备用。

**1.4.3** 琼脂糖凝胶电泳:取 PCR 扩增产物 1  $\mu\text{L}$ ,在 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳分析,以 120v 由负极向正极电泳 30 min,于化学发光凝胶成像系统中拍照观察。

**1.4.4** 基因型结果判定:按条带不同鉴别出各个基因型小鼠。鼠尾基因组 DNA 经 PCR 扩增后,琼脂糖凝胶电泳基因型片段为:Common 和 mutant reverse 引物扩增产物长度为 250 bp 左右,为突变型(KO)小鼠;Common 和 Wild type reverse 引物扩增产物长度为 155 bp 左右,为野生型(WT)小鼠;250 bp 和 155 bp 两条电泳条带均存在的为杂合(HET)小鼠。

## 1.5 统计方法

统计数据用( $\bar{x} \pm s$ )表示,样本平均数和理论值每胎 8~15 只<sup>[5]</sup>最小值间比较,用单样本 *t* 检验统计学方法分析。所有数据用 excel 进行统计录入,用 SPSS 22.0 统计软件进行分析,以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠外形特征

C57BL/6(=B6)遗传背景的 *Ifnar* 基因敲除小鼠成年鼠的被毛为黑色,与野生型 B6 小鼠相同。*Ifnar* 基因敲除小鼠交配后产生的子代新生幼鼠,两眼紧闭,四肢蜷缩,皮肤无毛,呈肉红色,与野生型幼鼠外观形态上无明显差异。



图 1 基因敲除小鼠的成年鼠和仔鼠外形特征

注:A.成年小鼠 B.1 日龄仔鼠

Fig.1 Appearance of adult and neonatal knockout mice

Note:A. adult mouse B. neonatal mice

2.2 小鼠的繁育情况

*Ifnar* 基因敲除母鼠妊娠期为 20 d 左右,哺乳期为 21 d 左右,小鼠的性成熟期为 45~60 d,以上小鼠生理特性和野生型无明显差异。但在产仔数量上,大多在每胎 10 只以下,较野生型每胎 8~15 只低。对 14 笼 5~10 个月月龄小鼠的生产情况进行 4 个月的跟踪,对生产的仔鼠数量进行统计计算。在 4 个月期间 14 笼小鼠共计生产 41 胎,产仔数量总数为 225 只,平均每胎为  $(5.6\pm2.7)$  只,和野生型理论

值每胎 8~15 只相比较,差异极显著 ( $P < 0.01$ ),具有统计学意义。

2.3 小鼠基因型鉴定结果

部分小鼠鼠尾基因组 DNA 扩增产物鉴定结果如下图:N 为阴性水对照,未见条带。1 号样品条带在 155 bp 位置左右,为野生型,2~8 号样品条带在 250 bp 位置左右,为 I 型干扰素受体 (*ifnar*) 基因敲除小鼠。

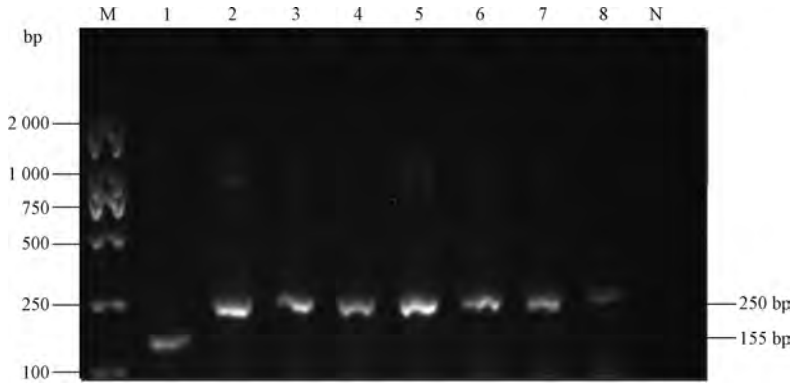


图 2 部分小鼠 PCR 基因型鉴定结果

注:M:Marker(2 kb DNA marker) 1:野生型样品 2~8:不同样品 N:阴性对照

Fig.2 Results of genotype identification of some mice by PCR

Note: M:Marker(2 kb DNA marker) 1:wild type 2~8: Different samples N: Negative control

3 讨论

在敲除小鼠的饲养过程中,其外观形态、性成熟时间、妊娠时间,哺乳时间等,与野生型小鼠相比未见明显差异。但在产仔数量上,敲除小鼠  $(5.6\pm2.7)$  只明显较野生型每胎产仔数量少,和理论值每胎 8~15 个存在极显著差异。当然,不排除饲养条件,环境因素等对小鼠的生殖能力造成影响,但经观察,同等条件下本中心其他小鼠具有和理论值相当的生殖能力。并且本研究中产仔数量的差异与王晓东等<sup>[6]</sup>的实验结果相一致,他们对三种品系的基因敲除小鼠产仔数量进行研究,结果表明,三种基因敲除小鼠平均每胎产仔数量与其背景小鼠相比均低,其中 II 型干扰素受体基因敲除小鼠平均每胎产仔数为  $(5.25\pm0.82)$  只。因此综合以上结果推测,某些基因的敲除可能会影响敲除小鼠的繁殖能力。本研究中 *Ifnar* 敲除小鼠产仔能力较低,可能是由于 I 型干扰素受体基因的敲除影响了某些基因的调控表达,使敲除小鼠的某些功能丧失,造成生殖功能障

碍。但这种差异是否确实与基因敲除有关,还需要进一步研究。

基因敲除小鼠繁育保种的一个重要环节就是基因型鉴定,方法主要包括 PCR 法和传统的 Southern bolt 法<sup>[7]</sup>。本研究采用试剂盒提取鼠尾组织基因组 DNA,参照 Jackson Laboratory 提供的引物序列,通过普通 PCR 扩增,凝胶电泳成功鉴定出 *Ifnar* 敲除鼠的基因型,与 southern bolt 鉴定法相比较,整个过程耗时较短、费用较低,该方法可以作为 *Ifnar* 基因敲除小鼠基因型检测的一种快速可靠方法。

1994 年 Müller 等首次成功制成 *Ifnar* 敲除小鼠<sup>[8]</sup>,属于基因修饰的免疫缺陷小鼠模型。小鼠由于性格温顺易饲养,便于操作,繁殖能力强,且对病毒易感等特性,广泛应用于各种病毒致病机理以及疫苗和药物评价的研究。但是免疫功能健全的小鼠对有些病毒耐受,不能建立病毒感染模型或模型不利于后续病毒各项研究,免疫缺陷小鼠模型的建立就显得尤为重要。例如,用寨卡病毒感染免疫功能健全的 C57B/6,BALB/C,CD1 小鼠,组织中未检测到病毒 RNA,小鼠也未出现疾病症状<sup>[9-11]</sup>。但



Lazear 等<sup>[12]</sup>用寨卡病毒接种 *Ifnar* 敲除小鼠,小鼠则高度易感,呈现后肢无力、瘫痪等典型的神经症状。因此,*ifnar*<sup>-/-</sup>免疫缺陷小鼠模型的建立和应用对某些特定病毒的研究至关重要。

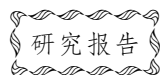
目前,*Ifnar* 敲除小鼠在人肠道病毒 71 型 (Enterovirus 71, EV71)<sup>[13-14]</sup>、登革热病毒 (Dengue virus, DENV)<sup>[15]</sup> 和寨卡病毒 (Zika virus, ZIKV)<sup>[16]</sup> 等的研究中都有应用。近年来,随着 zika 病毒研究成为热点问题,对于干扰素受体敲除小鼠的应用也随之日益增加。但这些前期的研究中应用的干扰素受体敲除小鼠多为 129 背景,如 I 型干扰素受体基因敲除的 A129,II 型干扰素受体基因敲除小鼠的 G129,以及以上两种鼠杂交得到的 AG129。基因敲除小鼠常见于 129 小鼠是因为其 ES 做打靶时,中靶效率高,囊胚注射后成功率也高。最初 Zika 病毒研究中,小鼠模型也多为 129 背景,但近来 B6 背景的 *Ifnar* 敲除小鼠模型也多有建立<sup>[12,17]</sup>。因为 B6 小鼠遗传背景和生理生化指标更清楚,当只有 129 背景品系小鼠时,可把 129 小鼠和 B6 小鼠回交,获得 B6 类似背景的小鼠,再进行试验。本实验中小鼠为 129 小鼠和 B6 小鼠回交后得到的 B6 背景 *Ifnar* 敲除小鼠。

为满足科学试验研究的需要,本中心引进 B6 背景的 *ifnar* 基因敲除小鼠,在负压屏障动物房饲养,通过一段时间的繁殖、鉴定,已获得一定数量的 *ifnar* 基因敲除小鼠,这为多种病毒的深入研究提供了一定的前期实验动物基础,并且相较于 129 品系的小鼠模型,遗传背景更清晰,生理生化指标更清楚,有助于得到重复性更好的实验结果。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Isaacs A, Lindermann J. Virus interference I. The Interferon [ J ]. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957, **147**(927): 258-267.
- [ 2 ] 张玲玲, 孟祥伟. 干扰素受体研究进展 [ J ]. 吉林医学, 2003, **24**(6): 492-493.
- [ 3 ] 汤华, 张灏. 干扰素的作用机制 [ J ]. 综述与讲座, 1989, **10**: 639-640.
- [ 4 ] 刘艳, 王珑, 赵赤鸿. 负压屏障实验动物设施空气落下菌数静态及动态监测结果分析 [ J ]. 实验动物科学, 2017, **34**(4): 25-31.
- [ 5 ] 孙德明, 李根平, 陈振文, 等. 实验动物从业人员上岗培训教材 [ M ]. 北京: 中国农业出版社, 2011. 8 第一版: 137.
- [ 6 ] 王晓东, 顾卫忠, 邢正弘, 等. 基因剔除小鼠的繁育初探 [ J ]. 实验动物与比较医学, 2006, **26**(4): 251-252.
- [ 7 ] Lee E G S, Lee K Y, Choi K C, et al. Phenotype of calbindin-D9k gene knockout is compensated for by the induction of other calcium transporter genes in a mouse model [ J ]. J Bone Mineral Res, 2007, **22**(12): 1968-1978.
- [ 8 ] Muller U, Steinhoff U, Reis L F, et al. Functional Role of Type I and Type II Interferons in Antiviral Defense [ J ]. Science, 1994, **6**(264): 1918-1921.
- [ 9 ] Torres J R, Martinez N, Moros Z. Microhematospermia in acute Zika virus infection [ J ]. Int J Infect Dis, 2016, **51**: 127.
- [ 10 ] Govero J, Esakky EScheaffer S M, Fernandez E, et al. Zika virus infection damages the testes in mice [ J ]. Nature, 2016, **540**(7633): 438-442.
- [ 11 ] Ma W, Li S, Ma S, et al. Zika Virus Causes Testis Damage and Leads to Male Infertility in Mice [ J ]. Cell, 2016, **168**(3): 1511-1524.
- [ 12 ] Lazear H M, Govero J, Smith A M, et al. Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis [ J ]. Cell Host Microbe, 2016, **19**(1): 720-730.
- [ 13 ] 刘岩, 陈丽琴. 肠道病毒 71 型感染所致手足口病神经系统并发症研究中采用的细胞系和小鼠模型 [ J ]. 微生物与感染, 2013, **8**(2): 98-103.
- [ 14 ] 周舒雅, 范昌发, 王佑春. EV71 病毒感染动物模型研究进展. 中国比较医学杂志, 2013, **23**(10): 67-70.
- [ 15 ] 周艳萍, 陈晓琦, 申硕. 登革热病毒动物模型的研究进展. 中华微生物学和免疫学杂志, 2017, **37**(9): 712-720.
- [ 16 ] 张娜娜. 寨卡病毒感染小鼠动物模型的建立及其应用 [ D ]. 南宁: 广西医科大学, 2017.
- [ 17 ] Mysorekar I U, Diamond M S. Modeling Zika Virus Infection in Pregnancy [ J ]. New Engl J Med, 2016, **375**: 481-484.

(下转至第 43 页)



# 过氧化氢酶-2 能力验证样品的制备及其均一性和稳定性测定

魏 杰 王 洪 贾松华 岳秉飞

(中国食品药品检定研究院,北京 100050)

**摘要:**目的 制备 a、b 两个型别的过氧化氢酶-2 能力验证样品,并对其均匀性和稳定性进行测定评价。方法 均匀性测定均按照 4% 比例随机抽样,冻融稳定性以 4 次冻融为测定终点;时间-温度稳定性以 4、20、37 ℃ 这 3 个温度为观测纵坐标,1、2、3、7、15、30 d 为观测横坐标,在每个坐标交点,a 型、b 型分别随机抽取 2 瓶,测定不同条件下各型别样品的稳定性。结果 a 型、b 型样品在均匀性测定中,均表现为各型别的清晰条带;4 次冻融后仍能稳定存在,且 30 d 内在 4、20 ℃ 和 37 ℃ 三种条件下均能稳定存在。结论 过氧化氢酶-2 样品均匀性和稳定性良好,适于能力验证样品的制备发放需求。

**关键词:**过氧化氢酶-2;样品;能力验证;均匀性;稳定性

**中图分类号:** Q95-3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0039-05

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.010

随着实验室认可制度的发展和实验室质量意识的不断提升,作为实验室评定重要部分的能力验证也在迅速发展;而加速这一发展的,正是中国合格评定国家认可委员会于 2002 年启动的能力验证提供者(PTP)认可计划<sup>[1-2]</sup>。能力验证提供者计划的实施,不仅能增强参与实验室对提供者的信任,也为计划的有效性、结果的承认与利用起到了积极作用。

对于提供者的认可,需要考察管理、技术等多方面因素来保证项目的顺利实施。而技术核心与出现问题的集中要素都是试样的均匀性与稳定性<sup>[2-3]</sup>。

中国食品药品检定研究院 2015 年在北京率先通过了实验动物检测项目的 PTP 认可,并组织全国范围的实验动物检测的能力验证活动。为满足能力验证认可要求,保障能力验证计划的顺利进行,本文即对 2018 年项目“NIFDC-PT-171 实验小鼠肾匀浆中过氧化氢酶-2 的检测”样品制备中的均匀性和稳定性进行研究,并对近几年样品制备工作进行回顾,为样品的研制发放提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物来源

a 型 BALB/c 小鼠 20 只,8 周龄,来自中国食品药品检定研究院;b 型 C3H 小鼠 20 只,8 周龄,来自北京维通利华实验动物技术有限公司。生产许可证号分别是 SYXK(京)2017-0013 和 SCXK(京)2016-0011。

### 1.2 仪器

海尔 BCD 冰箱, THERMO 恒温箱, Sartorius 酸度计, ML4002 电子天平, DY89-1 匀浆机, HITACHI 低温离心机, LABCONACO 冻干机, BIO-RAD 电泳仪。

### 1.3 试剂和耗材

7 mL 无菌离心管, 灭菌手术器械(剪刀, 镊子, 解剖板), 冰袋, CORNING 冻存管, 稳定保护剂、乙酸纤维素薄膜, 三羟甲基氨基甲烷, 柠檬酸、过氧化氢酶-2 染色试剂盒。

收稿日期:2019-02-27

作者简介:魏 杰与王 洪为共同第一作者

魏 杰(1982—),女,硕士.研究方向:免疫遗传检测.E-mail:jane3040320@163.com

王 洪(1977—),女,硕士.研究方向:免疫遗传检测.E-mail:littstar@163.com

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

1.4 标准样品的制备<sup>[4]</sup>及均匀性测定程序

1.4.1 观察动物外观及编号;

1.4.2 二氧化碳安乐死处理,解剖小鼠取肾脏,剥除脂肪等附着物。

1.4.3 按照品系,分别称取 BALB/c、C3H 小鼠肾脏总质量。

1.4.4 按照 W(肾):V(水)=1:2的比例,分别向装有 BALB/c、C3H 肾脏的 2 支管中加入蒸馏水,用匀浆机匀浆。

1.4.5 配平后置于离心机中离心匀浆液。15 000 r/min 离心 30 min,分别分离上清入新管,得到 a 型和 b 型肾匀浆各 1 份(BALB/c 及 C3H 分别为 a、b 型)。

1.4.6 分别向 2 新管中加入一定比例的稳定保护剂混匀,分装至冻存管中,置于冻干机中冻干。共制得 a 型样品 112 瓶,b 型样品 84 瓶。-20 ℃冻存待检。各样品取出实验时均需加入 70 μL 水还原后使用。

1.5 样品的均匀性测定

1.5.1 按照 4%的比例随机抽取 a、b 型样品试样,还原于微量加样器加样。醋纤膜点样电泳、染色,并判读条带。具体实验条件及判定标准参见 GB/T 14927.1—2008 过氧化氢酶-2 项目<sup>[4]</sup>。

1.5.2 如所得 a 型条带和 b 型条带均清晰可读,且与标准规定一致,即认为符合样品的均匀性要求。如未通过均匀性检测,则需重新制样并检测,直到符合标准规定。

1.6 样品的稳定性测定

1.6.1 冻融稳定性:a、b 型样品试样各取 3 管,首次测定于-20 ℃冰箱中取出加水还原测定。实验条件同 1.5.1。如所得条带清晰可读且与标准一致,

则认为 1 次冻融稳定性良好。初次冻融后,即将试样放入-20 ℃冰箱冷冻,每隔 2 h 再次取出,融化点样测定。结果判读依据与初次相同。如过程中发生拖带、弥散等情况,终止冻融测定并记录测定次数。如过程中一直稳定,也以 4 次冻融为测定终点。

1.6.2 时间-温度稳定性

1.6.2.1 制作一个测试计划表,拟定放置的时间和温度。分别将时间和温度设为观测的横、纵坐标,设定 4、20、37 ℃这 3 个温度观测点,1、2、3、7、15、30 d 为观测时间,在每个坐标交点,每个型别的样品分别随机抽取 2 瓶进行编号。

1.6.2.2 编号规则。标记顺序为:时间-温度-型别。如 4 ℃存放 a 型 1 d 样品标记为“1-4-a1”、“1-4-a2”,b 型 37 ℃存放 4 d 样品标记为“4-37-b1”、“4-37-b2”,等。

1.6.2.3 在取出日期,进行稳定性的检测。如所得条带清晰可读且与标准一致,则认为该温度时间坐标点稳定性良好。如所得条带中任何 1 条发生条带模糊不可读,则认为在该坐标点已经发生了样品的稳定性变化,记录不稳定坐标点。且当不稳定点出现后,其之后的时间温度观测点随之取消。但即使一直稳定,本测定的观测周期也仅为 30 d 时长。

1.6.3 汇总各型别稳定性结果,填写时间温度稳定性表格。稳定用“○”表示,不稳定用“×”表示。

2 结果

2.1 均匀性测定结果

本次抽样按照小样本 4%的比例抽取了过氧化氢酶-2 标准样品 a 型 4 管、b 型 3 管<sup>[4]</sup>。经过两次重复电泳染色所得结果一致,表现为 100% a 型和 100% b 型,见图 1。

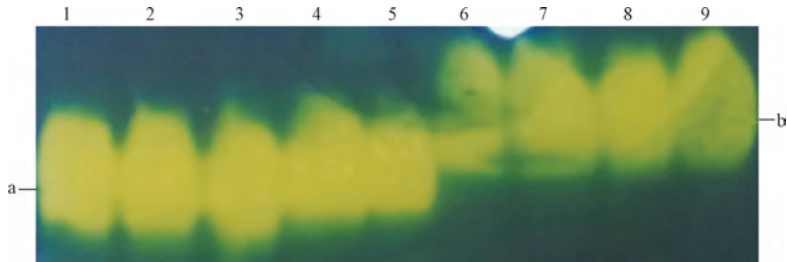


图 1 过氧化氢酶-2 均匀性抽样结果图

注:1~9 分别为 a1、a2、a3、a4、标准 a、标准 b、b1、b2、b3

Fig.1 Sampling results of catalase-2 uniformity

Note: 1~9 shows a1, a2, a3, a4, standard a, standard b, b1, b2, b3 respectively

2.2 冻融稳定性结果

经检验,冻融 1~4 次的 a、b 型过氧化氢酶-2 样品均表现稳定,所制样品的冻融稳定性良好,见图 2。

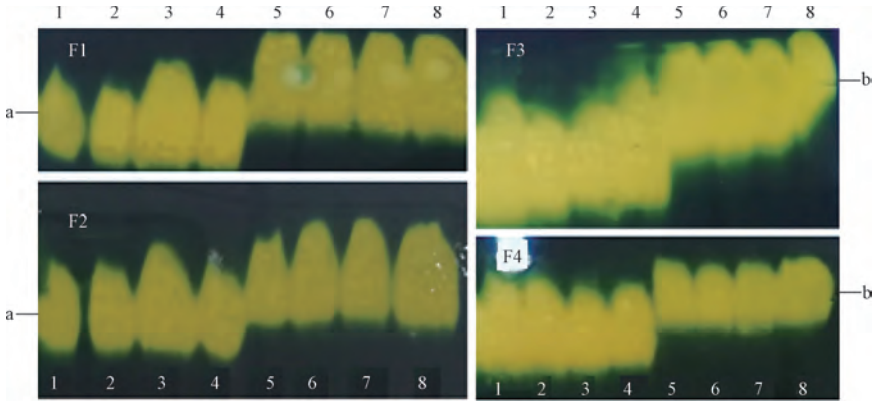


图 2 过氧化氢酶-2 四次冻融稳定性结果图

注:F1~F4 分别代表 1~4 次冻融;每组的 1~3 均为 a 型,4 为标准 a,5 为标准 b,6~8 为 b 型。

Fig.2 4-time freeze thawing stability results of catalase-2

Note: F1~F4 show the first to forth freeze thawing test results; number1 to 3 are the a type samples results, 4 and 5 are standard a and standard b results respectively, and 6 to 8 are the b type samples results.

2.3 时间-温度稳定性测定结果

a 型及 b 型标准样品在 4 ℃、20 ℃ 和 37 ℃ 条件下均可稳定存放至 30 d,不同个体之间没有显著差异,不同型别之间没有显著差异,见表 1。

当然,温度对酶的活性强度仍存在一定影响。4 ℃ 及室温条件下,样品表观颜色基本没有改变且电泳后染料着色度高。37 ℃ 条件下,样品的表观颜色变深,电泳后虽能分辨带型,但染料着色度降低。图 3 给出了 b 型样品 37 ℃ 存放 1~30 d 的加样和染色结果。

表 1 过氧化氢酶-2 样品不同温度时间稳定性结果

Table 1 Results of catalase-2 stability under different time and temperature condition

| 温度/℃ | 时间/d |   |   |   |    |    |
|------|------|---|---|---|----|----|
|      | 1    | 2 | 3 | 7 | 15 | 30 |
| 4    | ○    | ○ | ○ | ○ | ○  | ○  |
| 20   | ○    | ○ | ○ | ○ | ○  | ○  |
| 37   | ○    | ○ | ○ | ○ | ○  | ○  |

注:“○”表示样品稳定

Note: “○” means stable

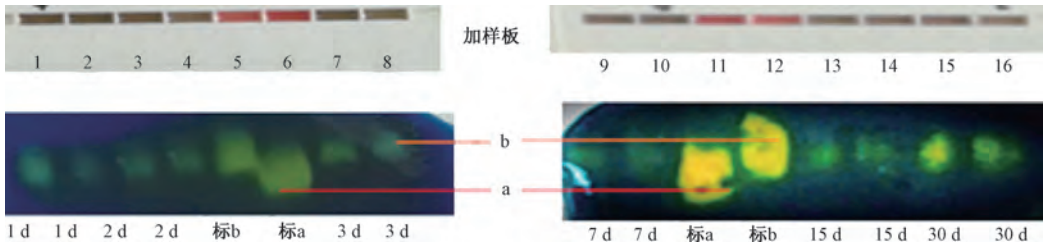


图 3 过氧化氢酶-2 b 型 37℃30 d 稳定性结果图

注:1~16 分别表示 1-37-b1,1-37-b2,2-37-b1,2-37-b2,标准 b,标准 a,3-37-b1,3-37-b2,7-37-b1,7-37-b2,标准 a,标准 b,15-37-b1,15-37-b2,30-37-b1,30-37-b2

Fig.3 30-day stability results of b type catalase-2 at 37 ℃

Note: 1~16 shows 1-37-b1,1-37-b2,2-37-b1,2-37-b2,standard b, standard a,3-37-b1,3-37-b2,7-37-b1,7-37-b2,standard a,standard b,15-37-b1,15-37-b2,30-37-b1,30-37-b2 respectively

3 讨论

3.1 过氧化氢酶与动物选择

过氧化氢酶是一类存在于动植物及微生物体内

的末端氧化酶,其同工酶在物种和组织特异性鉴别、药物毒物等损伤评价等方面有着广泛的应用<sup>[5-7]</sup>。不同来源的过氧化氢酶的特点存在差异,就小鼠而言,过氧化氢酶在肝、肾组织中更为丰富,且 1~4 月

龄的小鼠过氧化氢酶活性与年龄无明显相关性,大于4月龄后随年龄增长酶活性降低<sup>[8]</sup>。我们在选择动物时使用了2月龄的小鼠,考虑了这一特点,同时兼顾了饲养购买成本。

### 3.2 样品的型别设计方案

过氧化氢酶-2 是国标 GB/T14927.1—2008 中近交系小鼠检测常规项目之一,其常见带型为快带 a 型和慢带 b 型<sup>[4]</sup>。在之前的样品制备中,我们曾做过酯酶-3 的杂合型样品,并通过了均匀性和稳定性验证,对于实际检测也有杂合型的判读应用<sup>[9]</sup>。然而,基于文献对于过氧化氢酶-2 杂合型容易误判的研究,本研究仅设定了快带 a 型、慢带 b 型两个容易判读型别<sup>[10]</sup>。通过应用标准品比对条带泳动速度的快慢,进行定性判断。

### 3.3 样品稳定性方案设计

样品从制备到发放需经历存储、运输、实验等环节,温度、时间等因素都会对其品质产生影响。在近几年的样品制备中,我们曾研究过-20、4、20℃和37℃温度坐标以及1~90d时间坐标的存放稳定性,而对于冻融稳定性研究较少<sup>[9,11]</sup>。由于采用冷链运输,温度在运输过程中基本可控。但就近两年快递样品代签收的情况,使得部分样品存在冻融状态。为此,在过氧化氢酶-2 样品的制备过程中,我们加强了冻融稳定性研究,共测定了4次冻融结果,其稳定性较好。

生化标记电泳检测是国家标准规定的近交系大、小鼠遗传质量监测方法,也是目前进行近交系小鼠遗传质量检测的有效方法<sup>[12]</sup>。但目前所有生化标记检测项目均为定性项目,只能依据电泳快慢进行型别判读,以及通过条带有或无进行稳定性的判断。通过相关研究,我们发现过氧化氢酶在常温下稳定性较好,可以在25℃条件下稳定存在3个月<sup>[13]</sup>,而我们通常在1个月以内就会完成发放到结果回收。因此时间长度设定在30d以内,温度上也贴合运输和实验中可能存在的温度范围,选择了4、

20℃和37℃进行样品的测定。经测定,在已知的小鼠生化标记样品中,过氧化氢酶-2 在37℃稳定性最佳(酯酶-3 和肽酶-1 在37℃仅能稳定存在1d<sup>[9,11]</sup>),30d的样品虽然表现有变色,仍可检测出相应的带型。即能在37℃稳定存在30d,更适于作为样品满足能力验证项目的需求。

## 参 考 文 献

- [1] 翟培军. CNAL 对能力验证提供者的认可工作启动[J]. 现代测量与实验室管理, 2002, 4: 6.
- [2] 贾汝静, 赵炳南, 张传宝, 等. 医学检验能力验证提供者认可评审不符合项分析[J]. 检验医学, 2016, 31(5): 423-425.
- [3] ISO/IEC GUIDE 43-1: 1997, Proficiency testing by inter laboratory comparisons[S].
- [4] GB11/T 14927.1-2008. 实验动物 近交系小鼠、大鼠生化标记检测法[S].
- [5] 张坤生, 田荟琳. 过氧化氢酶的功能及研究[J]. 食品科技, 2007, (1): 8-11.
- [6] 谢寿安, 吕淑杰, 袁 锋, 等. 华山松大小蠹和红脂大小蠹过氧化氢同工酶酶谱的比较[J]. 西北林学院学报, 2003, 18(2): 61-62.
- [7] 郭国军, 弓飞龙, 唐国盘, 等. 甲苯咪唑对黄河鲤过氧化氢酶活性的影响[J]. 湖北农业科学, 2017, 56(24): 4830-4838.
- [8] 孔德胜, 王晓然, 李文君, 等. 小鼠组织中过氧化氢酶的活性与年龄的关系[J]. 生物学杂志, 2012, 29(3): 11-14.
- [9] 魏杰, 王洪, 李芳芳, 等. 实验室能力验证用酯酶-3 标准样品的均匀性和稳定性研究[J]. 中国药事, 2015, 29(3): 277-280.
- [10] 王洪, 刘双环, 王淑菁, 等. 近交系小鼠过氧化氢酶-2 遗传生化标记位点的研究[J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21(6): 12-15.
- [11] 王洪, 魏 杰, 冯育芳, 等. 能力验证项目“实验小鼠肾匀浆中肽酶-3 的检测”样本稳定性分析[A]. 中国药学会第四届药物检测质量管理学术研讨会资料汇编[C]. 厦门, 2017 年.
- [12] 王 洪, 刘双环, 王淑菁, 等. 近交系小鼠 8 个遗传生化标记杂合位点的研究[J]. 实验动物科学, 2011, 28(2): 10-14.
- [13] 冯卓林, 李江华, 刘龙, 等. 添加稳定剂提高过氧化氢酶的稳定性[J]. 工业微生物, 2013, 43(1): 41-45.

## Study on Preparation of Catalase-2 Samples Used for Proficiency Testing and Measurement for the Stability and Uniformity

WEI Jie, WANG Hong, JIA Songhua, YUE Bingfei  
(National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract: Objective** To prepare and evaluate catalase-2 sample ( a type, b type ) with good stability and uniformity. **Method** Extracting 4% samples randomly to finish the uniformity test. Samples were also extracted in the freeze thawing stability test for at most 4 times. As for the time-temperature uniformity, we used time( day ) and temperature(℃ ) as the coordinate value: 1, 2, 3, 7,15, 30 days were used as time coordinate, and 4, 20, 37℃ as temperature coordinate; and 2 bottles of each type samples were observed at every fixed point. **Result** A type and b type clearly performed a and b band on their own., and all of them were able to be stable after 4-time freeze thawing. And also the time-temperature stability test showed that standard samples of a type and b type could be present stable for 30 days at 4,20℃ and 37℃. **Conclusion** Catalase-2 samples behaved well in the uniformity and stability test, which were up for the requirements of proficiency testing.

**Key words:**Catalase-2; sample; proficiency testing; uniformity; stability

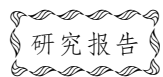
(上接第 38 页)

## Breeding and Genotype Identification of *Ifnar* Gene Knockout Mice

CHEN Yakun<sup>1</sup>, SUN Jing<sup>1</sup>, JIANG Yajun<sup>1</sup>, WANG Xinfang<sup>1</sup>, LIU Xiaoyu<sup>1</sup>,  
DAI Lianpan<sup>2</sup>, LU Xuancheng<sup>1</sup>, LI Xiaoyan<sup>1</sup>  
(1.Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206,China)  
(2.Beijing Institutes of Life Science, Chinese Academy of Science, Beijing 100101,China)

**Abstract: Objective** To analyze the identification and breeding method of *ifnar* knockout mice, and provide an ideal animal model for virus further studying. **Method** The introduced homozygous *ifnar* gene knockout mice were bred and reproduced in one cage with one male and two female mice together. The offspring mice genomic DNA was extracted from mice tail and amplified by PCR, and PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis for genotype identification. **Result** The homozygous *ifnar* knockout mice were breeding successfully in our facility, and the genotype can be identified by our established PCR method .

**Key words:***Ifnar*; knockout; mouse; breeding; genotype identification



# 病毒性心肌炎与人类主要组织相容性复合体多态性的相关性研究

刘嫚嫚 都鹏飞

(安徽医科大学第二附属医院儿科,合肥 230000)

**摘要:**目的 探索主要组织相容性复合体(major histocompatibility complex, MHC)等位基因与病毒性心肌炎(viral myocarditis, VMC)的关联性,以阐明 VMC 的免疫遗传学特征,并进一步探寻 VMC 发病中的保护基因,为可能的基因治疗提供靶基因探索新途径。**方法** 创建急性病毒性心肌炎的小鼠模型,通过血清炎症因子 IFN- $\gamma$  水平、心肌组织病理改变及心肌组织 MHC 基因表达水平的不同反映出病毒性心肌炎与 MHC 多态性之间有无相关性。**结果** 在 32 只病毒组小鼠中,MudoEb 5 检测阳性的共有 24 只(基因频率 37.5%),MudoEb 7 检测阳性的有 9 只(基因频率 14.1%),对照组中检测出 MudoEb5 阳性的有 6 只(基因频率 9.4%),MudoEb7 阳性共 2 只(基因频率 3.1%),两种等位基因的表达与对照组相比差异均有统计学意义(MudoEb 5  $\lambda^2 = 20.33$   $P = 0.00$   $OR = 13$ , MudoEb 7,  $\lambda^2 = 5.38$   $P = 0.02$   $OR = 5.7$ )。**结论** MudoEb5、MudoEb7 基因型表达水平与 COXB3 的感染小鼠的病理改变存在正相关,并根据统计学分析,两种等位基因型可能为 VMC 小鼠的易感基因,其中 MudoEb5 基因型与 VMC 的病理密切相关程度更高。

**关键词:**病毒性心肌炎;人类主要组织相容性复合;基因多态性;IFN- $\gamma$

**中图分类号:** R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0044-07

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.011

病毒性心肌炎是常见的儿童心血管疾病,可由多种病毒诱导,以柯萨奇 B 组 3 型病毒(coxsackievirus B<sub>3</sub>, COXB<sub>3</sub>)最为常见。研究表明,在病毒性心肌炎早期,心肌损伤的主要原因来自病毒对心肌的直接损伤,急性期之后则是以病毒介导的免疫损伤为主<sup>[1]</sup>,研究表明,其发病过程与宿主的自身遗传背景因素相关,不同个体对于病毒的易感性不同<sup>[2]</sup>,感染后也会出现不同结果,本研究首先建立病毒性心肌炎体外模型,在此基础上通过检测小鼠心肌组织中 MHC 基因的表达并以 IFN- $\gamma$  作为参照物,来探究对感染柯萨奇病毒的小鼠心肌细胞的 MHC 基因多态性的易感及保护作用,以阐明对 MHC 基因多态性对于病毒性心肌炎的作用机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

动物:SPF 级 4 周龄雄性 Balb/C 小鼠,购买于

安徽医科大学动物实验中心;

病毒:COXB3 Nancy 株由安徽医科大学教研实验室赠予,使用前进行病毒滴定半数致死量;

主要材料与试剂:人宫颈癌细胞(Hela 细胞)购买于南京凯基生物公司;Trizol 提取液、多聚甲醛、0.25%胰酶、DL2000marker、氯、TaKaRa One-Step RNA PCR Kit(AMV)、ELISA 试剂盒、RT 试剂、荧光定量 PCR 试剂 Sybr green I、苏木素-伊红染色、中性树脂等;

### 1.2 方法

**1.2.1 细胞实验部分:**将 Hella 细胞进行培养、传代处理,COXB3 病毒进行接种及毒力扩增,收集病毒上清液,进行毒力滴定并计算 TCID<sub>50</sub>;

**1.2.2 动物实验确定病毒感染量:**选取实验小鼠 40 只并随机分为 A、B、C、D 4 组,选取 D 组作为对照组,予以 TCID<sub>50</sub> 病毒浓度接种 A 组、10<sup>-1</sup>TCID<sub>50</sub> 浓度接种 B 组、10<sup>-2</sup>TCID<sub>50</sub> 浓度接种 C 组,3 种浓度病毒毒力的病毒液 0.1 mL/只,观察 4 组小鼠的活动

收稿日期:2019-01-08

作者简介:刘嫚嫚(1994—),女,硕士研究生,研究方向:儿童心血管.E-mail:lmek@qq.com

通信作者:都鹏飞(1957—),男,主任医师,教授,研究方向:儿童心血管.E-mail:dpf.ayfy.163.com

状况、精神状态及体质量变化等,于第 7 天处死小鼠,记录血清 CKMB 水平及心肌组织病理改变,选择合适的造模病毒感染量;

**1.2.3 观察血清 IFN- $\gamma$  水平:**选取 120 只小鼠,随机均匀分为病毒组及对照组,根据上述实验确定的病毒感染量进行腹腔接种病毒,建立宏观体征表,同时每天随机从 2 组中各选取两只小鼠进行取血解剖,ELISA 法检测血清 IFN- $\gamma$  浓度,按照对照组结果,记录 IFN- $\gamma$  的水平变化;

**1.2.4 检测基因表达:**选取病毒组及对照组小鼠各

40 只,分别于实验第 3、7、14 及 28 天分别处死两组小鼠各 8 只进行解剖处理,ELISA 法检测血清 IFN- $\gamma$  浓度,心肌组织 HE 染色观察,计算心肌病变积分;

**1.2.5 等位基因表达水平检测:**根据文献报道的 Balb/c 小鼠 H2-Eb 区第二个外显子的核酸序列设计 4 组序列特异性引物(分别称为 MudoEb1、MudoEb4、MudoEb5、MudoEb7),以 IFN- $\gamma$  基因作为内参照,RT-PCR 法检测心肌组织上述基因表达情况,引物序列见下表:

表 1 PCR 扩增采用的引物  
Table 1 Primers used in PCR amplification

| 引物名称    | 引物长度     | 引物序列                                   | PCR 产物长度 |
|---------|----------|----------------------------------------|----------|
| MudoEb1 | 上游 19mer | 5'ACA GCG ACT TGG GCG ATC A 3'         | 106 bp   |
|         | 下游 18mer | 5'TCC ACC TCG GCC CTC CTT 3'           |          |
| MudoEb4 | 上游 25mer | 5'TTA TGG AAC AAT TTA AAT ATG AGT G3'  | 83 bp    |
|         | 下游 20mer | 5'TCG GTT GTA GAT GAA CTC GA 3'        |          |
| MudoEb5 | 上游 19mer | 5'GGA GGA CCT GCG CTT CGA C 3'         | 109 bp   |
|         | 下游 18mer | 5'TCC ACC TCC GCC CTC CTT 3'           |          |
| MudoEb7 | 上游 25mer | 5'TTA TGG AAC AAT TTA AAT ATG AGT G 3' | 103 bp   |
|         | 下游 20mer | 5'TCG GTT GTA GAT GAT GAA TCT GA 3'    |          |

**1.2.6 感染病毒的检测及鉴别:**对心肌组织进行病毒分离与 RNA 提取并以实时荧光定量 PCR 法(real-time fluorescent quantitative PCR,Q-PCR)进行病毒鉴定:先用随机引物将 RNA 反转录成 cDNA,然后设计特异性的引物和 sybr green I 荧光染料进行荧光定量 PCR 检测。SYBR Green I 是一种能与双链 DNA 结合发光的荧光染料,其与双链 DNA 结合后,荧光大大增强。随着扩增循环数的增加,荧光信号不断积累,根据荧光信号检测出 PCR 体系存在的双链 DNA 数量。

病毒引物设计: B3F 5'GGA CCT GCT CAA ATC GGT AGA C 3'

B3R 5'CAA ATG TGG TCA ATG CCT GTA AG 3'

1.3 统计方法

采用 SPSS17.0 软件系统分析,VMC 组小鼠与对照组小鼠的心肌组织病理积分用 two-way ANOVA 检验法进行比较,基因频率=阳性基因数/(样本数 $\times$  2),等位基因的基因频率比较采用卡方检验,将含有易感基因及不含 VMC 有此基因的 VMC 组进行比较,采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 病毒 TCID<sub>50</sub> 计算

购买的 Hela 细胞排列紧密整齐,形态规则,包膜完整,折光度均匀,经 COXB3 Nancy 株感染后 72 h 后细胞明显皱缩变形,包膜破裂,排列紊乱,培养液中可见较多细胞碎片漂浮,通过观察细胞 CPE,运用 Reed-Muench 法计算 TCID<sub>50</sub>为 10<sup>-3</sup>。

2.2 造模病毒浓度合适量

A 组小鼠第 2~3 天开始出现活动量及体质量下降,进食水减少,反应迟钝,第 4 天出现后肢瘫痪并开始死亡,至第 7 天出现死亡高峰,血清 CKMB 为(4022.39 $\pm$ 260.56) U/L,高倍镜下显示心肌间质水肿,心肌纤维萎缩断裂,单核细胞及淋巴细胞大量浸润。B 组及 C 组小鼠第 4 天开始出现体质量及活动量下降,第 6 天开始体质量回升,无小鼠死亡,第 7 天小鼠血清 CKMB 水平: A 组(1085.78 $\pm$ 237.3) U/L、C 组(909.34 $\pm$ 187.25) U/L,心肌病理显示心肌细胞排列整齐,可见少量的炎性细胞浸润,对照组 D 组小鼠状态良好,饮食活动量无减少,体质量逐渐增加,无死亡病例,第 7 天血清 CKMB 为



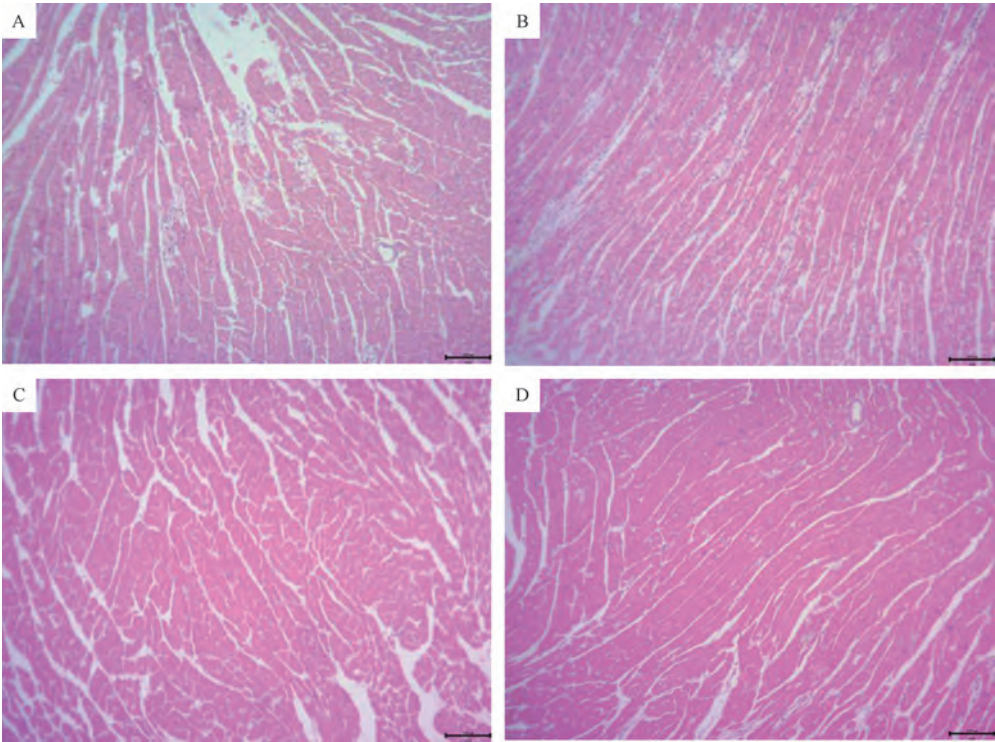


图 1 第 7 天 4 组小鼠心肌组织病理图片

Fig.1 The 7<sup>th</sup> day pathological image in four groups

(779.47±38) U/L,病理示心肌细胞排列整齐,间质内未见明显炎症细胞浸润表现。结合小鼠体质量变化、血清 CKMB 水平及心肌病理改变选择的造模合适病毒量为 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub>/mL 的 COXB<sub>3</sub> 液 0.1 mL/只。

2.3 血清 IFN-γ 水平变化

取血清后进行 IFN-γ 水平的 ELISA 检测,以标准物的浓度为横坐标,用酶标仪在 450 nm 下的波长

下测定吸光度 (A 值) 为纵坐标,测绘出标准曲线,计算出标准曲线的直线回归方程式为  $y = 0.002x + 0.0034$ ,计算样本实际浓度,并绘制血清 IFN-γ 水平变化图;及样本的实际浓度,并绘制折线图如下:

以上结果显示小鼠血清 IFN-γ 水平在接种病毒第 3 天开始升高,2 周达高峰,3 周开始慢慢降低。

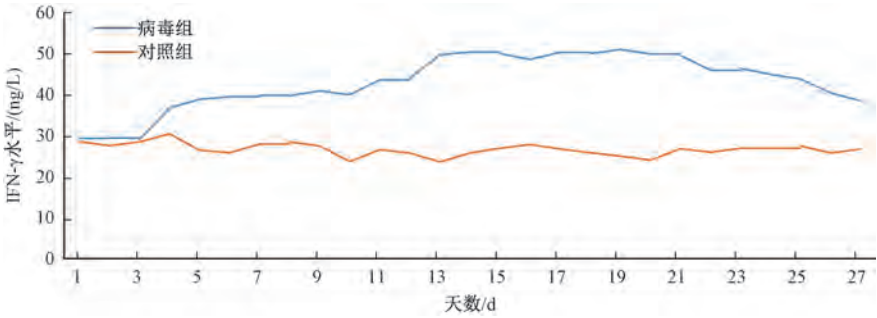


图 2 血清 IFN-γ 水平的变化趋势

Fig.2 The changing trend of IFN-γ level

2.4 两组小鼠心肌组织病理积分

经统计学分析,病毒组小鼠与对照组小鼠心肌

组织病理积分结果见表 2、图 3。

表 2 VMC 实验组与对照组小鼠的病理积分比较

Table 2 The pathological intergral comparison between VMC mice model and normal control group

| 组别  | 例数(只) | 第 3 天     | 第 7 天     | 第 14 天    | 第 28 天    | F 值    | P 值  |
|-----|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|--------|------|
| 病毒组 | 8     | 1.52±0.24 | 3.67±0.21 | 2.55±0.29 | 0.77±0.23 | 100.52 | 0.00 |
| 对照组 | 8     | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 | 0.00±0.00 |        |      |
| t 值 |       | 25.33     | 72.53     | 38.40     | 12.83     |        |      |
| P 值 |       | 0.00      | 0.00      | 0.00      | 0.00      |        |      |

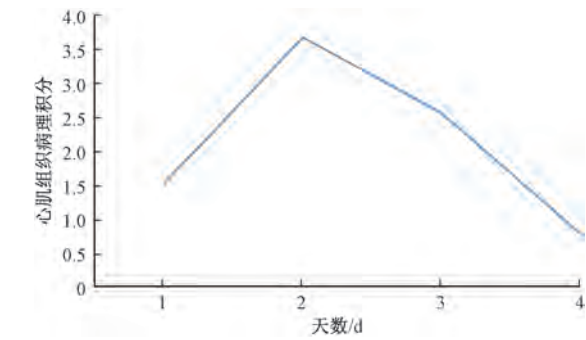


图 3 病毒组小鼠心肌组织病理积分变化趋势

注:1、2、3、4 代表第 3、7、14、28 天小鼠心肌组织病理积分平均值

Fig.3 The changing trend of pathological integral in VMC mice model group

Note:The number 1、2、3、4 represent pathological integral of the mice that anatomized at 3<sup>rd</sup>/7<sup>th</sup> 14<sup>th</sup>/28<sup>th</sup> day

2.5 基因表达测序结果

结合已研究过的有功能的多态性位点及 NCBI 数据库,并根据既往文献报道的 Balb/c 小鼠 H2-Eb 区第二个外显子核酸序列设计 5 组序列特异性引物

(分别称为 MudoEb1、MudoEb4、MudoEb5、MudoEb7)以及 IFN- $\gamma$  基因表达作为内参照,RT-PCR 技术检测上述基因表达水平,在 32 只病毒组小鼠中,MudoEb 5 检测阳性的共有 24 只(基因频率 37.5%),MudoEb 7 检测阳性的有 9 只(基因频率 14.1%),对照组中检测出 MudoEb5 阳性的有 6 只(基因频率 9.4%),MudoEb7 阳性共 2 只(基因频率 3.1%),两种等位基因的表达与对照组相比差异均有统计学意义(MudoEb 5  $\lambda^2 = 20.33$   $P = 0.00$   $OR = 13$ ,MudoEb 7,  $\lambda^2 = 5.38$   $P = 0.02$   $OR = 5.7$ )未测出其余 2 组等位基因阳性结果,同时与相应日龄的病理积分进行相关性分析,经计算第 3 天的病理积分与 MudoEb5 阳性的结果的相关系数  $r = 0.449$   $P < 0.05$ ,第 7 天, $r = 0.745$   $P < 0.05$ ,第 14 天  $r = 0.712$   $P < 0.05$ ,第 14 天  $r = 0.676$   $P < 0.05$ ,表明 VMC 小鼠病理积分与 MudoEb 5 表达水平之间存在正相关关系,同时进行 MudoEb 7 表达水平与病理积分的相关性分析表明,两者也存在正相关。

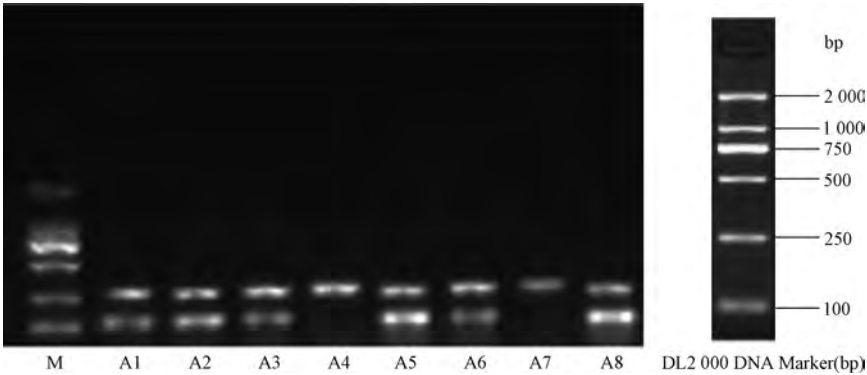


图 4 第 3 天 A 组病毒组小鼠 MudoEb 5 基因序列电泳结果

注:MudoEb 5 PCR 产物大小为 109 bp,A 组小鼠中有 6 只 MudoEb 5 基因检测阳性,其中 A1、A2、A3、A5、A6、A8 为阳性;A4、A7 为阴性;M: DNA Marker DL2 000

Fig.4 MudoEb 5 PCR expression in VMC model mice group in 3<sup>rd</sup> day

Note:PCR result of MudoEb 5 base number is 109 bp,6 mice MudoEb 5 gene is positive,Among group A, mice; A1、A2、A3、A5、A6 and A8 MudoEb5 gene is positive;A4 and A7 are negative;M:DNA Marker DL2 000

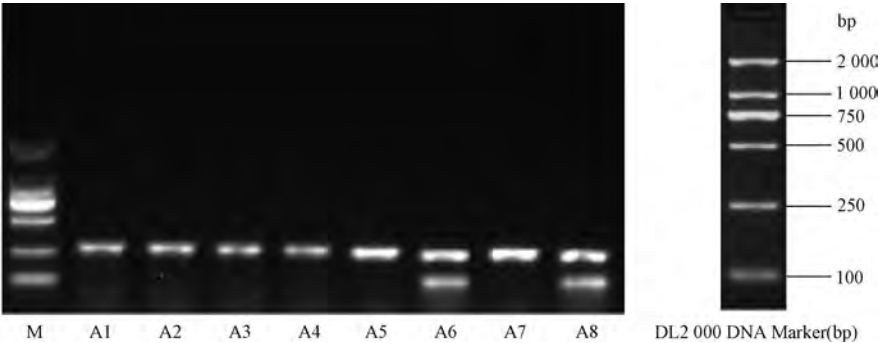


图 5 第 3 天 A 组病毒组小鼠 MudoEb 7 基因序列电泳结果

注:MudoEb 7 PCR 产物大小为 103 bp, A 组小鼠中 2 只 MudoEb 7 基因检测阳性, 其中 A6、A8 为阳性;余为阴性;M: DNA Marker DL 2000

Fig.5 MudoEb 7 PCR expression in VMC model mice group in 3<sup>rd</sup> day

Note:PCR result of MudoEb 7 base number is 103 bp,2 mice MudoEb 7 gene is positive, Among group A, A6 and A8 MudoEb 7 gene is positive;others are negative;M: DNA Marker DL2 000

2.6 实验小鼠感染病毒检测

Q-PCR 定量检测感染心肌小鼠病毒与设计的

COXB3 引物序列进行比对,表明实验组小鼠确实为 COXB3 嗜心型病毒引起,结果如图 6、图 7。

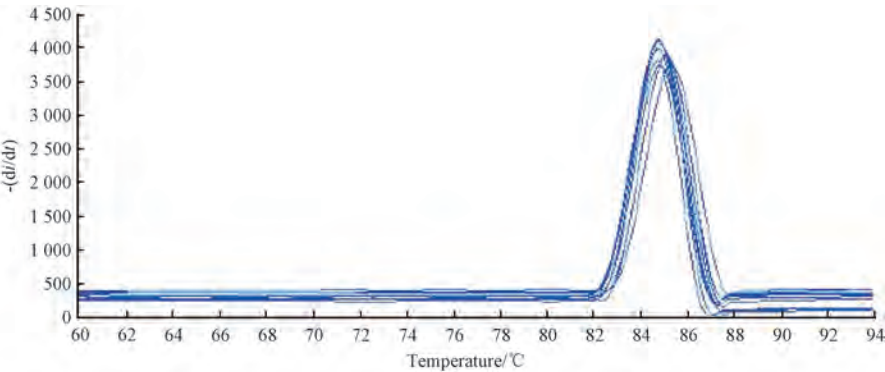


图 6 COXB3 的 Q-PCR 定量情况

Fig.6 Quantitative situation of Q-PCR in COXB3

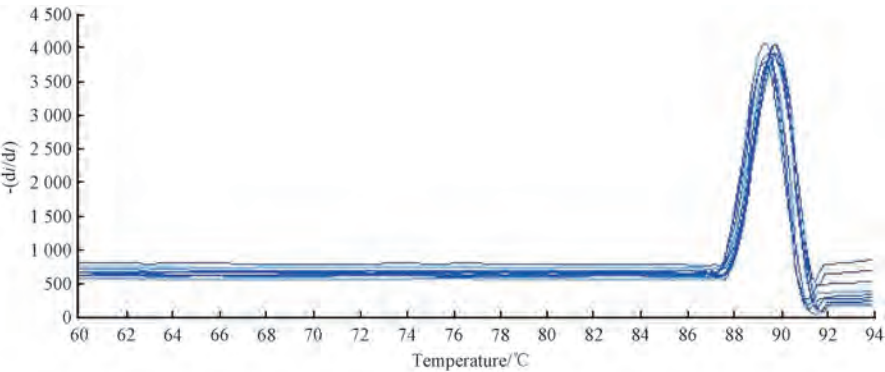


图 7 内参引物序列的 Q-PCR 定量结果

Fig.7 Q-PCR quantitative results of internal ginseng primer sequences

### 3 讨论

病毒性心肌炎是指由嗜心肌病毒感染引起心肌及其间质的炎性损伤,可导致心功能障碍和(或)心律失常,甚至猝死,多发于儿童。发病轻重程度不一,缺乏特异性诊疗方法,对患者的健康及生活质量影响较大。国内外学者通过血清学检测、原位杂交、反转录-聚合酶链式反应等分子生物学技术,证实可引起心肌炎的病毒常见有30余种<sup>[3]</sup>,包括柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒、埃可病毒、腺病毒、流感及副流感病毒等,以柯萨奇病毒最为常见,文献报道,VMC致死患者心内膜活检中,50%可检测出COXB<sub>3</sub>感染<sup>[4]</sup>。目前普遍认为VMC的发病机制主要包括:病毒的直接损伤;病毒介导的免疫损伤及多种致炎因子和NO等介导的心肌损害和微血管损伤<sup>[5]</sup>。其中以机体炎症反应最为主要,病毒入侵机体后心肌肌球蛋白等抗原暴露,此抗原与病毒表面抗原之间存在交叉作用,可直接作用于机体免疫细胞或间接通过信号转导分子促进病毒传播和激发T细胞,伴随着炎症细胞的浸润和炎症因子(TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-6、IL-12、IFN- $\gamma$ 等)表达量升高<sup>[6]</sup>;心肌组织的持续炎症反应导致了心肌组织损伤和心肌细胞的凋亡坏死,部分患者最终可演变为扩张性心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)和慢性心脏损伤,在人类中有很高的发病率和致死率<sup>[7]</sup>。

机体感染嗜心肌型病毒后需依赖T细胞对病毒抗原进行识别和清除,抗原的加工提呈过程又影响T细胞对抗原的识别,进而影响疾病的发展及转归,此外不同人群对于同一株病毒的易感性不同可引起不同的慢性化或自限性清除,而免疫反应的强弱与宿主的人类白细胞抗原(human leucocyte antigen, HLA)基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)有关,HLA受控于MHC基因簇,位于人类第6号染色体短臂(6p21.31-6p21.32),HLA基因编码表达的产物在免疫系统中主要负责细胞间相互识别以及诱导免疫反应,具有免疫应答的调节功能<sup>[8]</sup>。MHC基因包括I、II和III 3类基因。I类基因包括A、B、C、E、F、G等基因座,编码组织相容性抗原的基因,编码产物存在于所有有核细胞表面;II类基因含有DP、DQ、DR、DM、DO、DN 6个亚区,编码调节淋巴细胞增殖和相互作用及控制机体免疫反应强度的基因;III类

基因位于I、II类基因之间,编码控制某些补体成分和其受体产生的基因<sup>[9]</sup>。三者在常染色体上紧密连锁形成单倍型,表现共显性遗传,又有超基因(supergene)之称<sup>[10]</sup>。每类基因都有很多基因位点,而每个基因位点存在着大量的等位基因,使得MHC基因成为迄今所发现的结构最为复杂的遗传多样性系统,这些等位基因出现的频率具有显著的人种和地区差异。MHC的多样性由碱基的变化所形成<sup>[11]</sup>。碱基变化是人体适应外环境的调节方式,碱基变化导致氨基酸的变化,因此碱基突变如果发生在抗原肽结合区有可能对功能和抗原有所影响。在体液免疫反应中,有3方面的因素影响着病毒抗原递呈及抗原肽与MHC分子、TCR三元复合物之间的相互作用,包括抗原肽侧链和TCR之间的相互作用、肽骨架和MHC II类分子之间形成的序列非依赖性的氢键、抗原肽侧链和MHC II类分子抗原结合槽(antigen binding cleft)之间的相互作用<sup>[12]</sup>。根据已研究MHC的晶体结构:II类 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链的远膜区的抗原结合槽中分布与疾病密切相关的氨基酸序列,其由MHC等位基因编码<sup>[13]</sup>。因此,MHC II等位基因多态性可引起抗原结合槽的构象、结合及递呈抗原肽的效率不同,从而引起不同的MHC II类等位基因对疾病的易感性不同。Balb/c小鼠的主要组织相容性复合体位于17号染色体,又称为H-2复合体(Histocompatibility 2 complex, H-2 complex),与小鼠的特异性体液免疫应答相关的基因簇位于其I区内的E亚区,而E亚区的多态性又绝大部分体现在其 $\beta$ 座位(H2-Eb)的第二个外显子上<sup>[14]</sup>,既往研究表明,经过调控MHC II上的免疫原件可以改变VMC小鼠模型的症状表现及预后<sup>[15]</sup>,本实验通过利用小鼠H2-Eb基因位点多态性,采用PCR-SSP基因技术检测出H2-Eb位点上等位基因在小鼠机体感染同一COXB<sub>3</sub>病毒株之后的表达水平不同,结果显示:MudoEb5、MudoEb7基因型与COXB<sub>3</sub>的感染转归密切相关,同时VMC小鼠炎症水平与两种等位基因型的表达水平之间存在正相关性,MudoEb5基因型的VMC小鼠炎症反应更强烈,但由于缺乏H2-Eb在COXB<sub>3</sub>感染中确切作用机制,未来需要进一步探索H2-Eb等位基因,甚至HLA等位基因及其SNPs的分子生物学功能。

本研究存在着一些局限性,首先缺少明确的作用机制研究结论,其次实验研究对象为小鼠,关于人类的病毒性心肌炎与HLA基因多态性的关系尚待

研究。但本实验结果证实了 H2-Eb 基因多态性与病毒感染小鼠的相互关系,使之成为病毒性心肌炎发病机制的可能解释,但关于 HLA 基因多态性与 VMC 关系仍需大样本、不同民族、前瞻性及相关功能性研究中得到进一步验证,同时本实验为开展与机体免疫反应相关疾病的发病机制等研究提供新思路 and 方向。

综上所述,H2-Eb 基因多态性可显著影响小鼠机体对于 COXB3 的易感性以及感染后的免疫反应水平,但仍需要大样本的实验研究和严格设计的生物学研究进一步证实。

### 参考文献

- [ 1 ] 蔡悦,康永波,张宏,柯萨奇 B3 病毒性心肌炎的免疫抗炎症研究[J].生命科学研究志,2017,(1):14.
- [ 2 ] Li H S, Ligons D L, Rose N R. Genetic complexity of autoimmune myocarditis[J]. Autoimmun Rev, 2008, 7: 168-173.
- [ 3 ] 熊飞,万方方,钱乾,等.小鼠柯萨奇病毒性心肌炎模型的优化[J].现代免疫学,2014,3:183-189.
- [ 4 ] Blauwet L A, Cooper L T. Myocarditis[J]. ProCardiovasc Dis, 2010, 52: 274-288.
- [ 5 ] Fung G, Luo H, Qiu Y, et al. Myocarditis[J]. Circ Res, 2016, 118: 496-514.
- [ 6 ] 张艳,石搏,王元春,等.病毒性心肌炎患儿外周血中 TNF- $\alpha$ 、

TGF- $\beta$ 1 和 IFN- $\gamma$  细胞因子水平分析[J].中国妇幼保健, 2013, 5: 789-790.

- [ 7 ] Wang Q, Liao Y, Gong F. HLA-DRB gene polymorphism in patients with dilated cardiomyopathy[J]. Tongji Med Univ, 2000, 20: 141-142.
- [ 8 ] Yang Z M. Relationship study between hepatitis C virus infection and HLA-DQB1 gene polymorphism[J]. Chinese Journal of Health Laboratory Technology, 2018, (9): 1057-1059.
- [ 9 ] Tamori A, Kawada N. HLA class II associated with outcomes of hepatitis Band C infections[J]. World J Gastroenterol, 2003, 19: 5395-5401.
- [ 10 ] Pankuweit S, Ruppert V, Jónsdóttir T, et al. The HLA class II allele DQB1\*0309 is associated with dilated cardiomyopathy[J]. Gene, 2013, 531: 180-183.
- [ 11 ] Staab J, Ruppert V, Pankuweit S, et al. Polymorphisms in genes encoding nonsarcomeric proteins and their role in the pathogenesis of dilated cardiomyopathy[J]. Herz, 2012, 37: 836-841.
- [ 12 ] Parkes M, Cortes A, van Heel D A, et al. Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases[J]. Nat Rev Genet, 2013, 14: 8706-8707.
- [ 13 ] Zhai X, Bai B, Yu B, et al. Coxsackievirus B3 Induces Autophagic Response in Cardiac Myocytes in vivo[J]. Biochemistry (Mose), 2015, 80: 1001-1009.
- [ 14 ] 王淮,刘辉.小鼠 H2-Eb 位点的 PCR-SSP 检测及多态性[D].大连:大连医科大学,2002
- [ 15 ] Rose N R. Learning from myocarditis: mimicry, chaos and black holes[J]. F1000Prime Rep, 2014. doi: 10.12703/p6-25.

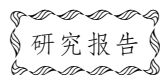
## Association between MHC Gene Polymorphism and VMC

LIU Manman, DU Pengfei

(The second hospital of Anhui Medical University, Hefei 230000, China)

**Abstract: Objective** To investigate the correlations between MHC gene polymorphism and the development of viral myocarditis and to identify the susceptibility genes for VMC for further elucidating the pathogenesis of VMC and providing the guidance for researches on further gene therapy for VMC. **Method** Few genotypes of H2-Eb (including MudoEb 5、MudoEb7) in 32 VMC mice and 32 normal control group were detected by using polymerase chain reaction, as the same time, the serum level of IFN- $\gamma$  and the pathological changes of VMC mice were monitored to reflect the relationship between VMC and MHC gene polymorphism. **Result** The frequencies of H2-Eb MudoEb5/Eb7 in VMC mice (37.5%/9.4%) were higher than those in normal control group (14.1%/3.1%) (MudoEb 5  $\chi^2 = 20.33$   $P = 0.00$   $OR = 13$ , MudoEb 7,  $\chi^2 = 5.38$   $P = 0.02$   $OR = 5.7$ ). **Conclusion** The genotypes MudoEb5、MudoEb7 might be the susceptibility genes for VMC in mice.

**Key words:** Viral myocarditis; MHC; polymorphism; IFN- $\gamma$



# 膨化对实验犬粮营养成分影响的研究

李慧贤 常银莲 卓志勇 张海峰 史良

(北京科澳协力饲料有限公司,北京 100107)

**摘要:**目的 犬是人类最早驯化的动物之一,20世纪40年代,犬开始作为实验动物用于研究,在生物医学中主要用于实验外科学、基础医学、药理、毒理学以及一些疾病研究中,对生物医学的发展具有重要意义。为实验犬提供稳定配方的标准化饲料,是提高实验科学性的重要环节。目前,实验犬粮的生产主要采用膨化工艺。本文则主要研究在特定膨化条件下,实验犬粮蛋白质、脂肪、氨基酸、维生素以及微量元素等指标检测值与配方值的差异情况。

**方法** 依据《中国饲料成分及营养价值表》(第28版)提供的数据,计算实验犬粮配方中各营养成分配方值,然后将成品实验犬粮送至实验室检测实际值,将二者进行对比。**结果** 实验犬粮经过膨化后,脂肪损失6%,组氨酸、赖氨酸、蛋氨酸分别损失8%、6%、2%,维生素E、维生素B2、烟酸、胆碱、维生素B6损失率分别为29%、65%、46%、1%、81%。**结论** 在本次研究中设定的膨化参数条件下,实验犬粮中各营养素损失如结果所示。因膨化参数不同,对营养素的影响不同,因此,建议同行可根据实际生产情况适当调整日粮配方。

**关键词:**实验动物;犬;犬粮;膨化

**中图分类号:** S816 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0051-05

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.012

实验动物是生命科学研究的基础和条件,是衡量一个国家或一个单位科研水平的重要标志<sup>[1]</sup>。作为活的“精密仪器”,实验动物的标准化程度直接影响研究成果的确立、研究水平的高低以及研究产品的质量等。而标准化的实验动物饲料则是保证实验动物质量标准化的重要条件之一<sup>[2]</sup>。

犬作为实验动物,在生命科学领域已应用多年。目前,实验犬粮的生产常采用膨化技术。挤压、膨化技术作为饲料加工方法起始于八十年代末,它是将粉状饲料采用加温、加压处理,挤出模孔或突然喷出压力容器,压力迅速降低、体积突然膨大而成<sup>[3]</sup>。根据膨化过程中是否进行水热处理,可将膨化分为干法膨化和湿法膨化两种,湿法膨化相对于干法膨化更具有优势,一方面生产效率大大提高,另一方面也降低了机器部件的磨损。较粉料和颗粒料来讲,膨化饲料具有适口性好和致病微生物杀灭量大等特点,还能有效破坏饲料中的抗营养因子。有利于动物对营养物质的消化吸收。但由于膨化会涉及到高温、高压的处理过程,会导致部分营养物质损失<sup>[4-7]</sup>。一般认为,膨化对饲料蛋白质的含量基本

没有影响,但是会使蛋白质发生变性,提高其在动物肠道中的消化和吸收率。而氨基酸的破坏程度与加工条件有关,在加工温度不是很高时,膨化对氨基酸的影响不大。但膨化温度升高后(170~200℃),对热敏感的氨基酸容易受到损失,如赖氨酸、胱氨酸等<sup>[8]</sup>。饲料中维生素含量受到膨化处理的影响较大,尤其是水溶性维生素损失率较高。而膨化对微量元素影响不大<sup>[9]</sup>。多数研究表明,生产饲料不同,膨化设定参数不同,如温度为100~200℃之间,压力为0.4~0.8 MPa之间,停留时间也是几十秒到几分钟不等,而生产参数设定的不同,膨化过程对营养物质损失率的影响差异也很大<sup>[10-11]</sup>。

目前,我国实验动物饲料主要参照的标准为实验动物配合饲料营养成分标准(GB 14924.3—2010),该标准对实验动物配合饲料及饲料原料的质量作了强制性要求,明确规定了每种饲料营养成分限值<sup>[12]</sup>,并规定了强制性指标以及推荐性指标。因此,要想生产出符合生长繁殖营养需要、安全可靠的犬粮,确定膨化条件下犬粮营养成分的变化则十分重要。本文则主要研究在固定生产条件下,实验



犬粮经膨化后蛋白质、脂肪、氨基酸、维生素以及微量元素的变化情况。以期为实验动物饲料生产企业设置合理配方比例,优化生产参数,为生产优质实验犬粮提供思路。

1 材料与方法

1.1 材料

实验犬粮由北京科澳协力饲料有限公司提供。

1.2 设备

MY135(SJPS135)单螺杆膨化机组,江苏牧羊集团有限公司。

1.3 工艺

原料粉碎→筛分→混合→调制(温度:105~115℃、压力为0.6~0.8Mpa、时间3~5min)→膨化→干燥→冷却→成品

1.4 方法

随机抽取2016、2017以及2018年6个批次实

验犬粮饲料送至美国Midwest Laboratories检测。分析方法采用美国分析化学家协会AOAC( Association of Official Chemists)规定的检测方法。水分测定采用AOAC 930.15,蛋白测定采用AOAC 990.03,脂肪测定采用AOAC 954.02,纤维测定采用AOCS Ba 6a-05,灰分测定采用AOAC 942.05,氨基酸测定采用AOAC 994.1,色氨酸测定采用(AOAC 988.15),微量元素测定采用AOAC 985.01,维生素检测采用AOAC 992.03。

2 结果

2.1 实验犬粮常规营养指标

本研究中选用的实验犬粮常规营养指标符合国标要求,经过膨化工艺后,与配方值对比,饲料中粗脂肪、钙、磷有损失,损失率分别为6%、20%、24%,见表1。

表 1 实验犬粮常规营养指标

Table 1 Common nutritional indicators of experimental dogs

| 营养指标*    | 配方值   | 配方值折算干物质 | 检测值        | 检测值折算干物质 | 损失率/% | 国标      |
|----------|-------|----------|------------|----------|-------|---------|
| 干物质 DM%  | 87.46 | 90.00    | 93.51±0.94 | 90.00    |       | ≥90.00  |
| 粗蛋白质 CP% | 30.16 | 31.03    | 33.28±1.47 | 32.03    | -3    | ≥26     |
| 粗脂肪 EE%  | 20.45 | 21.04    | 20.53±1.70 | 19.76    | 6     | ≥7.50   |
| 粗纤维 CF%  | 1.75  | 1.80     | 2.71±0.83  | 2.60     | -45   | ≤3      |
| 粗灰分 Ash% | 4.52  | 4.65     | 6.42±0.40  | 6.17     | -33   | ≤9      |
| 钙 Ca%    | 1.55  | 1.60     | 1.32±0.14  | 1.27     | 20    | 1~1.5   |
| 总磷 P%    | 1.13  | 1.16     | 0.92±0.08  | 0.88     | 24    | 0.6~0.8 |

注: \* 配方数据库采用《中国饲料成分及营养价值表》(第28版),下表同。  
损失率=(配方折算干物质-检测折算干物质)/配方折算干物质×100%,下表同。  
Note: \* the formula database is based on the table of feed ingredients and nutritional values of China (twenty-eighth Edition).  
Loss rate=(formula converted to dry matter-Detection converted to dry matter) / formula converted to dry matter × 100%, the same as in the following table.

2.2 实验犬粮氨基酸营养指标

本研究中选用的实验犬粮氨基酸营养指标符合国标要求,在该结果中,可以发现组氨酸、赖氨酸经

过膨化后会有部分损失,损失率分别为8%、6%。其余氨基酸不仅没有损失,相反其含量还有所增加,见表2。

表 2 实验犬粮氨基酸营养指标

Table 2 Amino acid nutritional indicators of experimental dogs

| 营养指标/%            | 配方值  | 配方值折算干物质 | 检测值       | 检测值折算干物质 | 损失率/% | 国标    |
|-------------------|------|----------|-----------|----------|-------|-------|
| 精氨酸 Arg           | 1.57 | 1.61     | 1.85±0.11 | 1.78     | -10   | ≥1.35 |
| 组氨酸 His           | 0.70 | 0.72     | 0.69±0.06 | 0.66     | 8     | ≥0.48 |
| 异亮氨酸 Ile          | 1.09 | 1.12     | 1.31±0.08 | 1.26     | -12   | ≥0.79 |
| 亮氨酸 Leu           | 2.54 | 2.62     | 3.07±0.14 | 2.95     | -13   | ≥1.60 |
| 赖氨酸 Lys           | 1.54 | 1.59     | 1.55±0.09 | 1.50     | 6     | ≥1.11 |
| 蛋氨酸+胱氨酸 Met+ Cys  | 1.18 | 1.22     | 1.71      | 1.66     | -36   | ≥0.72 |
| 苯丙氨酸+酪氨酸 Phe+ Tyr | 2.15 | 2.2      | 2.69      | 2.59     | -22   | ≥1.56 |
| 苏氨酸 Thr           | 1.04 | 1.07     | 1.31±0.28 | 1.26     | -18   | ≥0.78 |
| 色氨酸 Trp           | 0.24 | 0.25     | 0.27±0.05 | 0.26     | -4    | ≥0.23 |
| 缬氨酸 Val           | 1.28 | 1.32     | 1.81±0.27 | 1.74     | -32   | ≥1.04 |

2.3 实验犬粮维生素指标

膨化工艺对维生素指标影响较大,其中维生素 E、维生素 B<sub>2</sub>、烟酸、胆碱、维生素 B<sub>6</sub> 损失率分别为 29%、65%、46%、1%、81%。见表 3。

表 3 实验犬粮维生素指标

Table 3 Vitamin index of experimental dog food

| 营养指标                  | 配方值        | 配方值折算干物质   | 检测值               | 检测值折算干物质  | 损失率/% | 国标            |
|-----------------------|------------|------------|-------------------|-----------|-------|---------------|
| VA IU/Kg              | 15 004. 02 | 15 440. 05 | 2 858. 00±619. 57 | 2 750. 72 | 82    | 10 000~20 000 |
| VE mg/kg              | 185. 61    | 191. 00    | 141. 86± 49. 53   | 136. 54   | 29    | 50~100        |
| VB <sub>2</sub> mg/kg | 15. 89     | 16. 35     | 6. 03± 1. 74      | 5. 80     | 65    | 5~10          |
| 泛酸 mg/kg              | 33. 94     | 34. 93     | 37. 68± 20. 42    | 36. 27    | -4    | 27~54         |
| 烟酸 mg/kg              | 100. 33    | 103. 24    | 58. 22± 5. 36     | 56. 03    | 46    | 50~100        |
| 生物素 mg/kg             | 0. 44      | 0. 45      |                   |           |       | 0. 20~0. 40   |
| 叶酸 mg/kg              | 2. 28      | 2. 35      | 2. 56± 2. 50      | 2. 46     | -5    | 1~2           |
| 胆碱 mg/kg              | 2 806. 37  | 2 887. 92  | 2 964. 00±191. 65 | 2 852. 74 | 1     | 2 000~4 000   |
| B <sub>6</sub> mg/kg  | 13. 92     | 14. 32     | 2. 79± 0. 43      | 2. 68     | 81    | 6~12          |
| B <sub>12</sub> mg/kg | 0. 13      | 0. 13      | 0. 15± 0. 12      | 0. 14     | -4    | 0. 07~0. 14   |

2.4 实验犬粮微量元素指标

膨化对微量元素的影响不大,除铜元素膨化后较膨化前损失 31%外,其他微量元素检测值要显著高于配方值,其中铁、锰、锌、硒、碘分别高出 7%、171%、136%、62%、36%,见表 4。

表 4 实验犬粮微量元素指标

Table 4 Indicators of trace elements in experimental dogs

| 营养指标/(mg/kg) | 配方值     | 配方值折算干物质 | 检测值            | 检测值折算干物质 | 损失率/% | 国标          |
|--------------|---------|----------|----------------|----------|-------|-------------|
| 铁 Fe         | 256. 23 | 263. 68  | 292. 33±55. 16 | 281. 36  | -7    | 250~500     |
| 铜 Cu         | 25. 25  | 25. 99   | 18. 75± 1. 32  | 18. 05   | 31    | 14~28       |
| 锰 Mn         | 21. 07  | 21. 69   | 61. 03±19. 08  | 58. 74   | -171  | 60~120      |
| 锌 Zn         | 79. 06  | 81. 36   | 199. 17±25. 62 | 191. 69  | -136  | 60~120      |
| 硒 Se         | 0. 30   | 0. 30    | 0. 51± 0. 17   | 0. 49    | -62   | 0. 1~0. 4   |
| 碘 I          | 1. 95   | 2. 01    | 2. 83± 0. 75   | 2. 73    | -36   | 1. 70~3. 40 |

3 讨论

3.1 膨化对实验犬粮常规营养指标的影响

本研究中发现,经过膨化工艺后,实验犬粮蛋白质含量变化不大,粗脂肪、钙、磷分别损失 6%、20%、24%,而粗纤维和粗灰分较配方值比分别增加了 45%和 33%。甘振威等<sup>[8]</sup>报道,饲料经膨化后其粗脂肪含量较膨化前降低了 6. 46%,本研究结果与其一致。这可能是跟脂肪在挤压过程中发生了部分水解,产生的甘油和游离脂肪酸容易与淀粉、蛋白质形成复合物有关。大部分研究认为,饲料中钙、磷含量不会因为膨化加工而有所增减,但在该研究中,钙、磷有损失,与之前研究结果不符。这可能是由于该配方采用的数据库与原料之间存在差异导致的,粗纤维和粗灰分结果同理。

3.2 膨化对实验犬粮氨基酸营养指标的影响

一般认为,氨基酸的破坏程度与加工条件有关,

在较为温和的膨化条件下(温度 125~165 ℃、水分 12%~18%)赖氨酸的损失较小,在 9%以下<sup>[13]</sup>。在加工温度不是很高时,膨化对合成的赖氨酸和蛋氨酸稳定性影响不大。但膨化温度升高(170~210 ℃)时会降低氨基酸含量和利用率,限制性氨基酸的损失加剧。Björck 等<sup>[14]</sup>报道,膨化温度上升,赖氨酸损失加剧,其次是含硫氨基酸,如蛋氨酸、胱氨酸等,其他氨基酸损失较小。本研究中,检测值较配方值比组氨酸、赖氨酸损失分别为 8%、6%。损失相对较小,与前人研究结果一致。其余氨基酸不仅没有损失,相反其含量还有所增加。原因可能是部分蛋白原料中氨基酸含量丰富,而采用的数据库中不包括该部分数据造成的。总的来说,在该研究的膨化过程中,氨基酸损失可忽略不计。

3.3 膨化对实验犬粮维生素的影响

维生素是一类具有生物活性的化合物,对其所处的物理及化学环境相当敏感,其在膨化加工过程中的保存率一直是大家关注的焦点。膨化调制过程



中的高温处理以及较长时间的挤压所产生的强大压力使饲料与模孔以及饲料与饲料之间产生剧烈的摩擦,导致温度急剧上升,从而造成维生素生物活性下降<sup>[15]</sup>。本研究中,相较于其他营养素来讲,膨化对维生素的影响较大,其中维生素 E、维生素 B<sub>2</sub>、烟酸、胆碱、维生素 B<sub>6</sub> 损失率分别为 29%、65%、46%、1%、81%。这与王忠艳<sup>[16]</sup>之前的报道趋势相同,但结论稍有差异,他发现膨化对水溶性维生素影响较大,对脂溶性维生素影响较小,其中维生素 B<sub>1</sub>、维生素 B<sub>2</sub>、维生素 B<sub>6</sub> 损失最大,达 80% 以上,而脂溶性维生素的损失约为 12%~50%。不同的生产工艺及参数下,维生素的损失率也有所不同。在本研究中,没有分析维生素 A,这是由于 Midwest Laboratories 只分析了  $\beta$ -胡萝卜素的数据,不能完全代表维生素 A 含量,故维生素 A 的数据暂不做参考。

### 3.4 膨化对实验犬粮微量元素的影响

微量元素是饲料组分中含量较少,但这是所必需的物质,一般不会因为膨化加工而有所增减。在本研究中,膨化过后,除了铜元素有 31% 的损失率之外,其他微量元素指标较配方值相比,均有不同程度增加。其中锌元素和硒元素指标超出标准,但其配方值是控制在国标范围内的,这可能是因为犬粮使用的某些原料中含有大量的锌和硒元素,提示我们要监控一些原料当中的锌和硒的指标,及时调整配方。除此之外的其他微量指标都在国标范围内。从本研究结果中可知,设计配方时,微量元素指标的控制相对复杂,受原料干扰较大,因为不同种类或相同种类不同产区的原料中微量元素差异较大,此外生产、运输等环节也会造成微量元素之间的差异。在设计配方时,要考虑到这一方面因素。

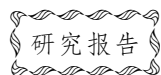
综上所述,在生产膨化实验犬粮时,膨化过程中实验犬粮营养素如脂肪、氨基酸、维生素等会有部分损失,在温度为 105~115 ℃,压力为 0.6~0.8 MPa 时,粗脂肪会损失 6%,维生素 E、维生素 B<sub>2</sub>、烟酸、胆碱、维生素 B<sub>6</sub> 分别损失 29%、65%、46%、1%、81%。膨化参数不同,对营养素的影响不同。因此,设计实验犬粮配方时,配方师应根据自身情况将该部分损失考虑在内,增加相应营养素的添加量,以保

证成品营养成分值。此外,对于粗纤维、粗灰分和矿物元素指标,建议配方师在采用原料时,应根据不同原料特性,对这些指标进行检测,以便更加精准地设计日粮配方。

## 参考文献

- [1] 吴晓松,刘广东,刘亮.大型医院实验动物中心建设与发展策略探讨[J].军医进修学院学报,2012,33(5):538-539.
- [2] 颜淑芹,杨淑萍,李贵才,等.执行实验动物饲料质量新标准的体会[J].中国比较医学杂志,2003,13(5):313-314.
- [3] 魏益民,蒋长兴,张波.挤压膨化工艺参数对产品质量影响综述[J].中国粮油学报,2005,20(2):33-36.
- [4] 张采.挤压膨化原理以及膨化对饲料中各种营养成分的影响[J].当代畜牧,2008,9:34-36.
- [5] 严宏祥.挤压膨化技术对饲料营养特性的影响[J].湖南饲料,2006,(5):34-36.
- [6] 张明秀,钟芳,李明等.挤压工艺参数对犬粮产品质量影响的研究[J].食品工业科技,2013,34(7):243-251.
- [7] 冯幼,许合金,张百赞,等.膨化工艺对饲料营养成分的影响[J].广东饲料,2014,23:34-36.
- [8] 甘振威,张大维,张亚婕,等.饲料膨化加工方法对其营养成分的影响[J].中国比较医学杂志,2009,5(19):38-39.
- [9] 柳序,田科雄,彭灿阳,等.饲料加工工艺对饲料营养成分及动物生产性能的影响[J].资源开发与利用,2016,22(14):52-56.
- [10] 程译峰,过世东.膨化参数对饲料淀粉糊化度和蛋白质体外消化率的影响[J].渔业现代化,2009,36(6):54-59.
- [11] 杜冰,梁淑茹,程燕峰,等.挤压膨化加工过程及其影响[J].食品与机械,2008,24(5):133-135.
- [12] 国家质量监督检验检疫总局.实验动物配合饲料营养成分标准:GB 14924.3—8 2001[S].
- [13] Cheftel J C. Nutritional effects of extrusion-cooking [J]. Food Chem, 1986,20(4):263-283.
- [14] Björck I, Asp N G, Dahlqvist A. Protein nutritional value of extrusion-cooked wheat flours [J]. Feed Chem, 1984,15(3):203-214.
- [15] Lobo P. Enzyme addition Q&A: Experts answer eleven common questions [J]. Feed management, 2001,52(2):25-27.
- [16] 王忠艳.颗粒料生产过程中调质器的正确使用[J].黑龙江畜牧兽医,2004,10:53-54.

(下转至第 59 页)



# 小动物 micro-CT 与超声及主动脉插管术评价左心室功能的比较研究

刘春蕾 李 晨 李 鑫 田亚平 何昆仑

(中国人民解放军总医院转化医学实验室 北京市慢性心衰精准医学重点实验室, 北京 100853)

**摘要:**目的 研究 micro-CT、主动脉插管术与超声心动图测量左心室功能参数的一致性与相关性,评价 micro-CT 评估左心室功能的科研应用价值。方法 利用 micro-CT、主动脉插管术、超声对 10 对正常及心衰大鼠进行心功能检测,应用心功能分析软件测量左心室功能参数:收缩末期容积、舒张末期容积及射血分数,将 micro-CT 结果与、主动脉插管术、超声心动图结果比较。结果 10 对大鼠检查均获得成果,micro-CT、主动脉插管术与超声心动图测量左心室功能参数具有良好的相关性。结论 micro-CT 可以用来评价左心室功能,是准确测量心室功能的可行性方案。

**关键词:** micro-CT; 超声心动图; 主动脉插管术; 射血分数

**中图分类号:** Q-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0055-05

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.013

左心室功能评价是对心衰等各种心脏疾病病情诊断、药物治疗效果评估的重要指标。超声心动图是目前应用最普遍的心室功能检查技术,但是超声作为一种间接手段,仍然存在缺陷,特别是对于心梗后心衰等前壁蠕动困难的病例,很难给出精确的结果。主动脉插管术可将导管直接由主动脉插入左心室,根据压力容积曲线计算左心室功能,但是其作为一种有创的手段,创伤极大。随着 micro-CT 的快速发展,CT 作为一种手段,可用来直接观察心室腔评价心室功能<sup>[1]</sup>。本文比较 micro-CT、主动脉插管术、超声心动图测量心衰病例的 EF 值探讨三者的准确性、相关性、一致性。

## 1 材料与方法

### 1.1 研究对象

SD 大鼠 20 只,体质量 180~200 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验设计通过中国人民解放军总医院伦理委员会认证。大鼠平均分为对照组和心衰组 2 组。其中心衰组行左冠状动脉前降支结扎,对照组行冠状动脉前降支只穿线不结扎。4 周后分别用超声心动图、micro-CT、主动脉插管评

价左心室功能。主动脉插管结束后,动脉取血,动物缺血致死。

### 1.2 超声心动图成像方法及图像分析

超声心动图仪为 Vevo® 2100 小动物超声成像平台,大鼠超高频电子线阵探头,1000fps 超高实时帧频。采用 M 型评价左室功能,取标准左室长轴(短轴)切面,收缩期和舒张期由上到下依次获取前壁、内径、后壁运动曲线,超声心动仪自动计算读出 EF 值。

### 1.3 micro-CT 成像方法及图像分析

micro-CT 为 PE 公司 Quantum GX microCT Imaging System,大鼠仰卧位,气麻维持呼吸频率,大鼠经静脉注射造影剂(20mgI/mL 血液),按 400 g 大鼠计算,大鼠血液量为 20 mL/100 g,80 mL 血液量 1 600 mgI,造影剂碘普罗胺(优维显)的浓度为 370mgI/mL,用量约 4.32 mL。电压 70 kV,电流 300 mA,使用心脏门控拍摄 4 min,造影剂按照 1.08 mL/min 注入静脉。扫描结束后,将矢状面、冠状面、水平面扫描结果重建,得到舒张期和收缩期心室内体积,计算所得射血分数。

### 1.4 经主动脉插管成像方法及图像分析

经主动脉插管成像使用 Powerlab 生理监测系

收稿日期:2018-12-10

作者简介:刘春蕾(1987—),女,助理研究员,研究方向:心肺损伤药物研发.E-mail:chunleiliu87@163.com

通信作者:何昆仑(1964—),男,博士,主任医师,教授,博士生导师,研究方向:慢性心衰.Email:hekunlun2002@163.com

统 (AD Instruments 公司),大鼠仰卧位,3%戊巴比妥钠麻醉(0.3 mL/100 g 体质量),颈部正中切开皮肤、分离肌层,暴露大鼠右侧颈静脉,结扎上端,下端穿线不结扎留后续使用,在下端穿线的前侧用动脉夹夹住,在动脉夹与上端结扎位置的中间做切口,将 millar 导管插入主动脉的同时撤出动脉夹并结扎。当压力显示为 110~120 mmHg 附近活动时表示导管位于颈动脉中。当压力显示为 0~120 mmHg 附近活动时表示导管进入心脏。分离左侧颈静脉,结扎上端,下端留线用于后续使用。颈静脉打入 30% 的高渗盐水,每次打入 0.02 mL。

1.5 统计方法

应用 SPSS 13.0 软件包对所得数据进行统计学处理,计量资料用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,采用配对  $t$  检验,超过 2 组的数据采用 ANOVA 进行检验,以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CT、超声、动脉插管计算射血分数值的比较

分别使用 CT、超声、动脉插管检测大鼠的心功能,结果显示,CT、超声、动脉插管检测假手术组大鼠的射血分数分别为 75%、70.5%、71.4%,心衰组大鼠射血分数分别为 46%、40%、45%,结果一致,见表 1。

表 1 CT、超声、动脉插管计算射血分数值的比较

Table1 Comparison of CT, ultrasound, and arterial cannula for calculating ejection fraction

|         | CT  | 超声    | 动脉插管  | $P$ | $r^2$ |
|---------|-----|-------|-------|-----|-------|
| EF(假手术) | 75% | 70.5% | 71.4% | 0.4 | 0.70  |
| EF(实验组) | 46% | 40%   | 45%   | 0.4 | 0.67  |

2.2 CT、超声、动脉插管计算射血分数图表比较

分别使用 CT、超声、动脉插管检测大鼠的心功能。假手术组及实验组大鼠的超声结果图比较显示,心衰组大鼠较假手术组前壁变薄、室腔扩大、射血分数减少,见图 1。

假手术组及实验组大鼠的血流动力学图比较显示,心衰组大鼠较假手术组室腔扩大、压力容积环缩小变形,见图 2。

假手术组及实验组大鼠的 CT 使用结果图比较显示,心衰组大鼠较假手术组室腔扩大、射血前后容积变化减小,见图 3。

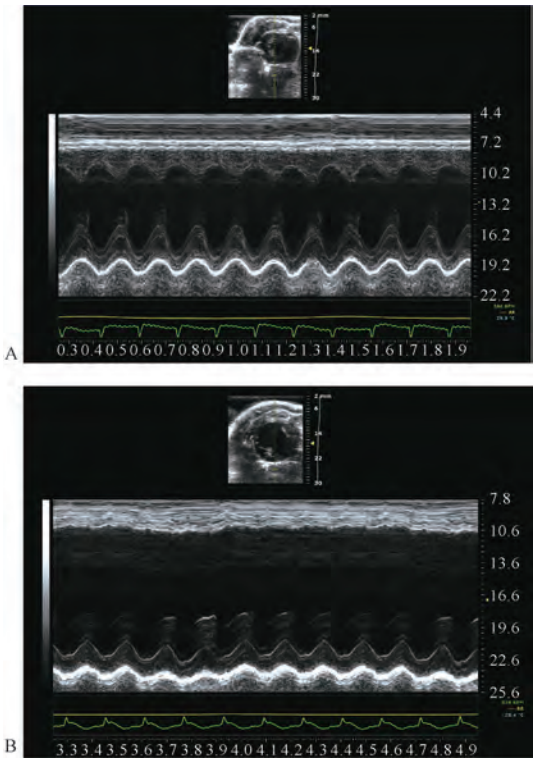


图 1 超声测得射血分数值

注:A 假手术组 B 实验组

Fig.1 Ultrasonic measurement of ejection fraction

Note: A sham B heart failure

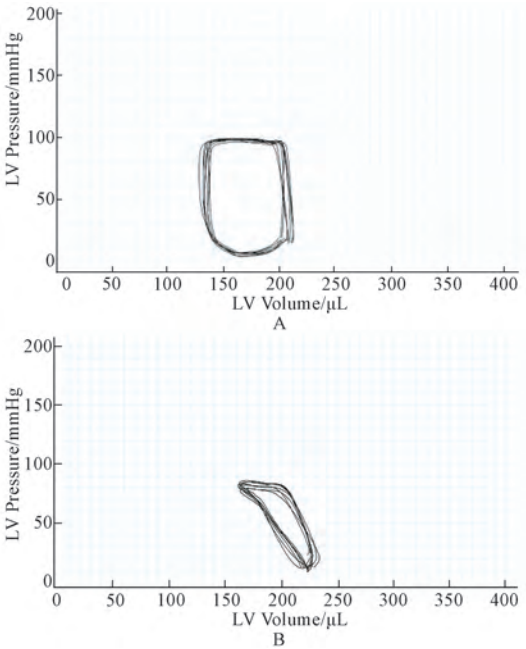


图 2 动脉插管测得射血分数值

注:A 假手术组 B 实验组

Fig.2 Arterial cannula measured ejection fraction

Note: A sham B heart failure

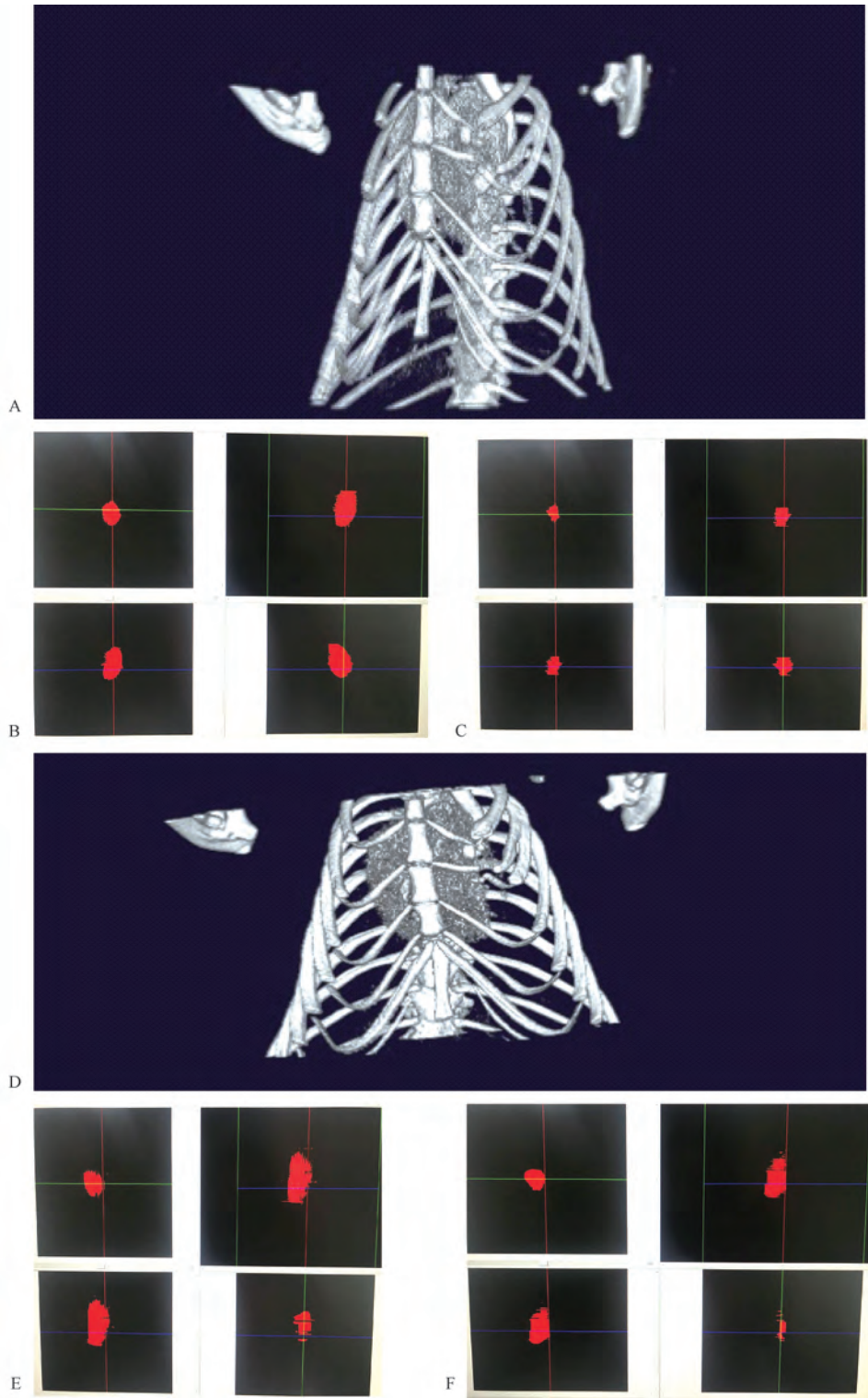


图 3 CT 检测测得射血分数值

注:A:3D 重构(假手术组); B:舒张期(假手术组); C:收缩期(假手术组);  
D: 3D 重构(心衰组); E:舒张期(心衰组); F:收缩期(心衰组)

Fig.3 CT detection of ejection fraction

Note: A: 3D reconstruction of sham B: diastolic of sham C: systole of sham  
D: 3D reconstruction of heart failure E: diastolic of heart failure F: systole of heart failure

### 3 讨论

心血管病是严重威胁人类健康和生命的疾病,全世界每年死于心脑血管疾病的人数高达 1500 万人,居各种死因首位。左心室的功能评价是心血管实践中关注的首要指标,左室射血分数  $EF = (\text{舒张末容积 EDV} - \text{收缩末容积 ESV}) / \text{舒张末容积 EDV}$ ,是评价心脏泵血功能的重要指标。对于缺血性心脏病,是评价心梗、冠心病、缺血性心脏病风险的指标, $EF$  可以预测其是否发生心衰,在临床上有重要地位<sup>[2]</sup>。

目前检测心功能的影像学检测方法为超声心动图,与临床上一致,在小动物心功能评价上也大多使用超声心动图,可用于评价左室容积、左室厚度和室壁运动等。但是对于心梗等室壁运动不均匀的小动物,M 型超声并不是用来评价  $EF$  的好方法,因为室壁运动不均匀,以点作为评估全心功能的方法结果可能导致它的不准确<sup>[3]</sup>。动脉插管是利用生理仪监测压力容积曲线,可以一次得到压力和容积的数据。它的缺点是需要导管从右动脉插入心脏,是一种有创的监测手段。利用导管的探头和高浓度盐水指示的容积变化,可以得到左室射血分数。它的数据会比超声的数据可靠,但仍然不是一种直接的监测手段,而且创伤性大<sup>[4]</sup>。随着小动物 CT 技术的发展,CT 检测在向着高清晰度和低辐射性能发展。Quantum GX microCT Imaging System 的准确度可以达到 4.5 微米,由于它具有很低的辐射剂量,大鼠在照射后不会因为辐射而影响健康<sup>[5]</sup>。我们在实验中第一次使用临床上普遍使用的造影剂进行检测,对大鼠完全没有损伤,价格是小动物造影剂百分之一。实验中从颈静脉插管打造影剂,与动脉插管相比较,创伤要小的多。当然,也可以从尾静脉给与造影剂,因为颈静脉离心脏更近、操作起来也比较方便,所以实验中选择了开颈静脉。CT 的结果是检测射血分数最准确的指标,通过 3D 重构,我们能直接得到心脏容积的大小。通过舒张期与收缩期的比较,我们可以得到直接的大鼠射血分数,准确性高。

超声、血流及 CT 三者的结果进行比较,实验结果显示:CT 得到的射血分数值与血流和超声相比较

略大。血流动力学得到的射血分数值比超声略大。三者所得  $EF$  值的差异无统计学意义,三者夺得  $EF$  值的相关性中等偏高。这种结果可能与三者数值计算的原理不同相关<sup>[6]</sup>。M 型超声是依赖于二维的数据,计算值与实际值存在差距。动脉插管与导管的准确性、盐水注入的速度等有相关性,也会存在一定的偏差,因此三者 in  $EF$  数据上有所差别。但是基本上相同,偏差不大。

本研究提供了一种全新的测量小动物射血分数的方法。利用小动物 CT 在心脏疾病应用中获得突破,全国首次利用临床造影剂应用于小动物心脏射血分数监测获得成功,结果准确。将来,可以代替心脏超声、动脉插管等手段,一次监测 CT 的同时可以得到  $EF$  的结果,为冠心病、心衰等疾病的监测提供了一种快捷、廉价、无创的影像学诊断方法,具有重要的应用价值。

### 参考文献

- [1] Wang G Z, Cheng X, Zhou B, *et al.* The chemokine CXCL13 in lung cancers associated with environmental polycyclic aromatic hydrocarbons pollution[J]. *eLife*, 2015, **4**: e09419.
- [2] Vourvouri E C, Poldermans D, Bax J J, *et al.* Evaluation of left ventricular function and volumes in patients with ischaemic cardiomyopathy: gated single -photon emission computed tomography versus two -dimensional echocardiography[J]. *Eur J Nucl Med*, 2001, **28**(11): 1610-1615.
- [3] Bhan A, Sirker A, Zhang J, *et al.* High-frequency speckle tracking echocardiography in the assessment of left ventricular function and remodeling after murine myocardial infarction[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, **306**(9): H1371-1383.
- [4] Hocking K M, Sileshi B, Baudenbacher F J, *et al.* Peripheral Venous Waveform Analysis for Detecting Hemorrhage and Iatrogenic Volume Overload in a Porcine Model[J]. *Shock*, 2016, **46**(4): 447-452.
- [5] Qina M, Luo Y, Meng X B, *et al.* Myricitrin attenuates endothelial cell apoptosis to prevent atherosclerosis: An insight into PI3K/Akt activation and STAT3 signaling pathways[J]. *Vascular Pharmacology*, 2015, **70**: 23-34.
- [6] Yamamuro M, Tadamura E, Kubo S, *et al.* Cardiac Functional Analysis with Multi-Detector Row CT and Segmental Reconstruction Algorithm: Comparison with Echocardiography, SPECT, and MR Imaging[J]. *Radiology*, 2005, **234**(2): 381-390.



Comparative Study of Small Animal Micro-CT, Ultrasound and Aortic Intubation in  
Evaluating Left Ventricular Function

LIU Chunlei, LI Chen, LI Xin, TIAN Yaping, HE Kunlun  
(Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100853, China)

**Abstract: Objective** To study the consistency and correlation of micro-CT, aortic intubation and echocardiography in measuring left ventricular function parameters, and to evaluate the value of micro-CT in evaluating left ventricular function. **Method** Cardiac function tests were performed on 10 pairs of normal and heart failure rats by micro-CT, aortic intubation, and ultrasound. Left ventricular function parameters were measured using cardiac function analysis software: end-systolic volume, end-diastolic volume, and ejection fraction. The micro-CT result were compared with the result of aortic intubation and echocardiography. **Result** All the rats were examined by micro CT, aortic catheterization and echocardiography. There was a good correlation between the parameters of left ventricular function measured by micro CT, aortic catheterization and echocardiography. **Conclusion** micro-CT can be used to evaluate left ventricular function and is a feasible solution for accurate measurement of ventricular function.

**Key words:** micro-CT; Echocardiography; Aortic intubation; Ejection fraction

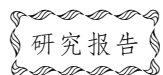
(上接第 54 页)

Effect of Puffing on Nutritional Components of Experimental Dogs

LI Huixian, CHANG Yinlian, ZHUO Zhiyong, ZHANG Haifeng, SHI Liang  
(Beijing Keao Xeli Feed Co., Ltd., Beijing 100107, China)

**Abstract: Objective** Dogs are one of the earliest domesticated animals of human beings. In the 1940a, dogs began to be used as experimental animals for research. They are mainly used in experimental surgery, basic medicine, pharmacology, toxicology and some diseases in biomedicine, which is of great significance to the development of biomedicine. Providing standardized formula feed for experimental dogs is an important step to improve the scientific nature of experiments. At present, puffing technology is used in the production of experimental dog food. This paper mainly studied the changes of protein, fat, amino acid, vitamin and trace elements in dog food before and after puffing. **Method** According to the Chinese Feed Composition and Nutrition Value Table (28th edition), the nutrient distribution formulas of experimental dog food were calculated, and then the finished experimental dog food was sent to the laboratory to test the actual value, and the two were compared. **Result** After puffing, fat loss was 6%, histidine, lysine, methionine loss was 8%, 6%, 2%, vitamin E, vitamin B2, nicotinic acid, choline, vitamin B6 loss rate was 29%, 65%, 46%, 1%, 81%, respectively. **Conclusion** Under the expansion parameters set in this study, the nutrient losses in the experimental dogs food are as shown in the result . The effect of extrusion parameters on nutrients is different. Therefore, it is suggested that peers can adjust dietary formulation appropriately according to actual production situation.

**Key words:** laboratory animals; dogs; dog food; puffing technology



# CMU/1 和 CMU/2 近交系长爪沙鼠脏器系数的比较<sup>\*</sup>

马兰芝<sup>1</sup> 李 迎<sup>1,3</sup> 尚世臣<sup>1</sup> 黄 斌<sup>1</sup> 尚玉璞<sup>1</sup> 王冬平<sup>1</sup> 陈振文<sup>2</sup>

(1. 军事医学研究院实验动物中心, 北京 100071) (2. 首都医科大学实验动物科学部, 北京 100069)

(3. 吉林农业大学动物科学技术学院, 长春 130118)

**摘要:**目的 对近交系 CMU/1 和 CMU/2 长爪沙鼠的体质量和主要脏器质量进行测定, 探索与建立长爪沙鼠主要脏器的生物学指标体系, 为动物实验提供必要参数。方法 选择 3~4 月龄近交系长爪沙鼠, 分别称体质量与脏器质量, 进行统计学分析。结果 CMU/1 和 CMU/2 近交系长爪沙鼠的肺脏器系数差异显著, 其它差异不显著; Kendall 和谐系数(W)接近 1, 其主要器官整体发育协调性较好; 直线回归方程, CMU/1 的胸腺  $P < 0.05$ , CMU/2 的肝、脾  $P < 0.05$ , 两样本间有线性关系。其中 CMU/1 的肝、脾、肾上腺、卵巢、胰腺和 CMU/2 的胸腺与体质量呈正相关。结论 CMU/1 及 CMU/2 近交系长爪沙鼠脏器系数中肺脏器系数差异显著, 基因型对近交系长爪沙鼠脏器系数无明显影响。

**关键词:**长爪沙鼠; 近交系; 脏器系数

**中图分类号:** R-33 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0060-04

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.014

长爪沙鼠(*Meriones unguiculatus*)具有独特的解剖特性, 由于具有明显的脑底动脉 Willis 环变异缺失即先天畸形而成为理想的脑缺血研究的实验材料<sup>[1]</sup>。首都医科大学以长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环变异缺失类型和单侧颈动脉结扎后的模型症状为指导, 通过同一血管类型和一致的表型为特征, 进行长爪沙鼠后代全同胞兄妹繁殖, 成功培育了脑缺血模型高发长爪沙鼠近交系群体 CMU/1 和 CMU/2<sup>[2]</sup>。实验动物内脏器系数是反映其生物学特性的一个重要指标, 本文就 CMU/1 和 CMU/2 近交系动物的脏器指标进行测试, 为其生物医学研究应用提供基础数据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

近交 F<sub>20</sub>~F<sub>23</sub>代的脑缺血模型近交系长爪沙鼠, 3~4 月龄, CMU/1 近交系长爪沙鼠 40 只(雌性 9 只, 雄性 31 只), CMU/2 近交系长爪沙鼠 13 只(雌

性), 首都医科大学实验动物中心提供[SCXK(京)-2013-0005]。动物饲养于普通级环境内, 室温为 20~24 ℃, 日常饲喂<sup>60</sup>Co 照射消毒饲料及饮用无菌水, 自由采食及饮水。本实验通过首都医科大学实验动物和动物实验伦理委员会批准(No.AEEI-2017-032)。

### 1.2 实验仪器

分析电子天平——赛多利斯(CP224S), 德国赛多利斯股份公司; 常规解剖器械。

### 1.3 方法

取 3~4 月龄成年动物称其体质量后处死, 解剖取心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胰腺、胸腺、睾丸、卵巢, 剥离结缔组织分析天平称重。

### 1.4 脏器系数

脏器系数又称脏体比, 即脏器质量与其体质量的比值。

### 1.5 统计方法

采用 SPSS 23.0 软件进行统计学处理, 先进行方差齐性检验后, 再使用独立样本 *t* 检验对测得的

收稿日期: 2019-01-22

<sup>\*</sup> 基金项目: 国家科技支撑计划课题(No.2015BAI09B01-04)

作者简介: 马兰芝(1969—), 女, 高级实验师, 研究方向: 动物实验和实验动物管理.E-mail: malanzhi2008@126.com

通信作者: 王冬平(1964—), 女, 副研究员, 研究方向: 实验动物生物学特性研究.E-mail: Wangdp6493@126.com

陈振文(1959—), 男, 教授, 研究方向: 实验动物遗传学.E-mail: czwen@ccmu.edu.cn

实验数据进行比较分析。长爪沙鼠各脏器发育的一致性用 Kendall 和谐系数描述。用 Pearson 相关系数和直线回归方程描述体质量与各脏器质量的相关性。 $\alpha\pm0.05$  为显著性水平。

2 结果

2.1 CMU/1 和 CMU/2 近交系长爪沙鼠的体质量和脏器质量测定

结果显示:CMU/1 和 CMU/2 近交系长爪沙鼠的体质量和脏器质量差异不显著( $P>0.05$ )(见表 1),通过方差齐性检验分析肾脏和肺脏的数据具有统计意义。

表 1 CMU/1 和 CMU/2 近交系长爪沙鼠的体质量和脏器质量比较  
Table 1 Comparison of body weight and organ weight of gerbil in CMU/1 and CMU/2 inbred lines

| 指标 index        | CMU/1/g        | CMU/2/g        | P     |
|-----------------|----------------|----------------|-------|
| 体质量 weight      | 56.3664±5.1381 | 54.3292±3.6087 | 0.097 |
| 肝 liver         | 1.6732±0.2157  | 1.6829±0.2609  | 0.648 |
| 脾 spleen        | 0.0397±0.0068  | 0.0329±0.0117  | 0.076 |
| 肾 kidney        | 0.4842±0.0563  | 0.5221±0.0605  | 0.472 |
| 肾上腺 renicapsule | 0.0317±0.0035  | 0.0289±0.0051  | 0.508 |
| 肺 lung          | 0.2650±0.0710  | 0.2898±0.0363  | 0.306 |
| 心 heart         | 0.2560±0.0169  | 0.2436±0.0283  | 0.165 |
| 卵巢 oarium       | 0.0493±0.0050  | 0.0428±0.0067  | 0.327 |
| 胰腺 pancreas     | 0.1183±0.0178  | 0.1212±0.0238  | 0.639 |
| 胸腺 thymus gland | 0.0253±0.0082  | 0.0278±0.0088  | 0.523 |
| 睾丸 testis       | 1.1808±0.0831  |                |       |

2.2 CMU/1 和 CMU/2 近交系长爪沙鼠的脏器系数测定

结果显示:CMU/1 和 CMU/2 近交系长爪沙鼠的肺脏器系数差异显著( $P<0.05$ ),其它差异不显著( $P>0.05$ ); $t$  值为负值表明 CMU/2 的主要脏器略小于 CMU/1(见表 2),通过方差检验分析脾脏、肾上腺和心脏的数据具有统计意义。

表 2 CMU/1 和 CMU/2 近交系长爪沙鼠的脏器系数比较  
Table 2 Viscera coefficient comparison of CMU/1 and CMU/2 inbred strain of gerbil

| 指标 index        | CMU/1         | CMU/2         | P              |
|-----------------|---------------|---------------|----------------|
| 肝 liver         | 2.9348±0.3175 | 3.0955±0.4411 | 0.355(1.373)   |
| 脾 spleen        | 0.0572±0.0183 | 0.0732±0.0125 | 0.249(2.798)   |
| 肾 kidney        | 0.9274±0.0605 | 0.8949±0.1117 | 0.233(-1.284)  |
| 肾上腺 renicapsule | 0.0514±0.0087 | 0.0585±0.0066 | 0.646(2.565)   |
| 肺 lungs         | 0.5159±0.0438 | 0.4940±0.1374 | 0.022*(-0.852) |
| 心 heart         | 0.4270±0.0415 | 0.4719±0.0277 | 0.123(3.483)   |
| 卵巢 oarium       | 0.0832±0.0073 | 0.0910±0.0094 | 0.394(2.042)   |
| 胰腺 pancreas     | 0.2232±0.0551 | 0.2179±0.0306 | 0.784(-0.315)  |
| 胸腺 thymus gland | 0.0499±0.0467 | 0.0467±0.0155 | 0.525(-0.589)  |
| 睾丸 testis       | 2.0248±0.0972 |               |                |

注: \*  $P<0.05$  表示差异显著。  
Note: \*  $P<0.05$  indicates significant difference.

2.3 Kendall 和谐系数

Kendall 和谐系数(W)是分析动物及动物群体主要器官发育和谐性的统计学指标。和谐系数(W)一般以 0-1 表示。W 接近 1 时,其主要器官整体发育协调性好,反之就差。本实验结果表明:W(CMU/1) = 0.967  $P = 0.000$ ; W(CMU/2) = 0.964  $P = 0.000$ 。

2.4 直线回归

2.4.1 CMU/1 近交系长爪沙鼠的直线回归方程:以体质量(X)为自变量,脏器系数(Y)为因变量,建立直线回归方程。结果表明,近交系长爪沙鼠 CMU/1 的胸腺  $P<0.05$ ,两样本间有线性关系。肝、脾、肾、肾上腺、肺、心、卵巢、胰腺、睾丸  $P>0.05$ ,两样本间无线性关系。其中肝、脾、肾上腺、卵巢、胰腺与体质量呈正相关,肾、肺、心、胸腺、睾丸与体质量呈负相关,见表 3。

2.4.2 CMU/2 近交系长爪沙鼠的直线回归方程:结果表明,近交系长爪沙鼠 CMU/2 的肝、肺  $P<0.05$ ,两样本间有线性关系。脾、肾、肾上腺、心、卵巢、胰腺、胸腺  $P>0.05$ ,两样本间无线性关系。其中肝、脾、肾、肾上腺、肺、心、卵巢、胰腺与体质量呈负相关,胸腺与体质量呈正相关。(见表 4)



表 3 CMU/1 近交系长爪沙鼠主要脏器系数与体质量的直线性关系

| Table 3 Relationship between main organ coefficient and body weight of gerbil in CMU/1 inbred line |                           |                                                |                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 项目<br>project                                                                                      | 直线回归<br>Linear regression | 相关系数 $r^2$<br>Correlation<br>coefficient $r^2$ | 相关系数 $P$<br>Correlation<br>coefficient $P$ |
| 肝<br>liver                                                                                         | $Y = 0.004X + 2.732$      | 0.003                                          | 0.735                                      |
| 脾<br>spleen                                                                                        | $Y = 0.051X + 0.000$      | 0.001                                          | 0.849                                      |
| 肾<br>kidney                                                                                        | $Y = -0.001X + 0.962$     | 0.003                                          | 0.759                                      |
| 肾上腺<br>renicapsule                                                                                 | $Y = 0.063X + 0.000$      | 0.016                                          | 0.468                                      |
| 肺<br>lungs                                                                                         | $Y = -0.001X + 0.581$     | 0.019                                          | 0.427                                      |
| 心<br>heart                                                                                         | $Y = -0.002X + 0.559$     | 0.083                                          | 0.088                                      |
| 卵巢<br>oarium                                                                                       | $Y = 0.067X + 0.000$      | 0.060                                          | 0.524                                      |
| 胰腺<br>pancreas                                                                                     | $Y = 0.001X + 0.165$      | 0.010                                          | 0.578                                      |
| 胸腺<br>thymus gland                                                                                 | $Y = -0.001X + 0.111$     | 0.114                                          | 0.044                                      |
| 睾丸<br>testis                                                                                       | $Y = -0.009X + 2.574$     | 0.134                                          | 0.061                                      |

表 4 CMU/2 近交系长爪沙鼠主要脏器系数与体质量的直线性关系

| Table 4 Relationship between main organ coefficient and body weight of gerbil in CMU/2 inbred line |                           |                                                |                                            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 项目<br>project                                                                                      | 直线回归<br>Linear regression | 相关系数 $r^2$<br>Correlation<br>coefficient $r^2$ | 相关系数 $P$<br>Correlation<br>coefficient $P$ |
| 肝<br>liver                                                                                         | $Y = -0.072X + 6.997$     | 0.345                                          | 0.045                                      |
| 脾<br>spleen                                                                                        | $Y = -0.001X + 0.108$     | 0.034                                          | 0.564                                      |
| 肾<br>kidney                                                                                        | $Y = -0.017X + 1.796$     | 0.287                                          | 0.073                                      |
| 肾上腺<br>renicapsule                                                                                 | $Y = -0.001X + 0.091$     | 0.109                                          | 0.294                                      |
| 肺<br>lungs                                                                                         | $Y = -0.004X + 0.751$     | 0.559                                          | 0.005                                      |
| 心<br>heart                                                                                         | $Y = -0.028X + 2.040$     | 0.206                                          | 0.138                                      |
| 卵巢<br>oarium                                                                                       | $Y = -0.001X + 0.148$     | 0.160                                          | 0.197                                      |
| 胰腺<br>pancreas                                                                                     | $Y = -0.001X + 0.258$     | 0.008                                          | 0.787                                      |
| 胸腺<br>thymus gland                                                                                 | $Y = 0.007X + 0.000$      | 0.010                                          | 0.756                                      |

3 讨论

实验动物主要脏器的质量及脏器系数是病理学、药理学、生理学、营养学、毒理学等研究中常用指标。易受动物品系、饲养条件、性别和年龄等因素的影响<sup>[3]</sup>，啮齿类动物脏器质量研究始于 20 世纪 60 年代，Klemml 和 Novd 首先报道了发育中的动物体质量与年龄存在正相关性<sup>[4-5]</sup>。

研究结果表明：Kendall 和谐系数  $W$  (CMU/1) = 0.967  $P$  = 0.000;  $W$  (CMU/2) = 0.964  $P$  = 0.000。两组动物  $W$  值均接近 1, 表明其主要器官整体发育协调性好, 和器官协调一致性很好; 近交系长爪沙鼠 CMU/2 的肝、肺  $P$  < 0.05, 两样本间有线性关系。脾、肾、肾上腺、心、卵巢、胰腺、胸腺  $P$  > 0.05, 两样本间无线性关系。其中肝、脾、肾、肾上腺、肺、心、卵巢、胰腺与体质量呈负相关, 胸腺与体质量呈正相关; 近交系长爪沙鼠 CMU/1 的胸腺  $P$  < 0.05, 两样本间有线性关系。肝、脾、肾、肾上腺、肺、心、卵巢、胰腺、睾丸  $P$  > 0.05, 两样本间无线性关系。其中肝、脾、肾上腺、卵巢、胰腺与体质量呈正相关, 肾、肺、心、胸腺、睾丸与体质量呈负相关。文献报道<sup>[3]</sup> 肝和脾的脏器系数为 (3.12±0.54)、(0.09±0.03), 本研究的近交系长爪沙鼠比封闭群的低; CMU/1 和 CMU/2 近交系的脏器系数除肺以外差异不显著, CMU/2 的体质量、肾、肺、胰腺、胸腺略小于 CMU/1。研究测试数据的方法和统计结果表述与文献报道<sup>[3]</sup> 的一致, 与戴丽军等<sup>[6]</sup> 的测试方法不同, 统计结果描述的一致。因此, 建立该近交系长爪沙鼠脏器系数和体质量与脏器的线性关系, 对提供必要的生物学背景材料具有重要意义。

参考文献

[ 1 ] 丁贤明, 钱宝珍. 长爪沙鼠在生物医学中的应用及其生理生化研究进展[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(5): 313-318.

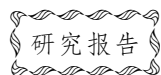
[ 2 ] 李迎, 陈振文, 马兰芝, 等. 近交系长爪沙鼠生化标记遗传监测方法的建立及其应用[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(6): 442-447.

[ 3 ] 王钊, 卢静, 陈振文, 等. 清洁级长爪沙鼠主要器官重量的测定[J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(4): 221-223.

[ 4 ] Klemml. Quantitative Vnt ersuchungen on apodermus sylvaticus [J]. Zool Anz, 1960, 165(7-8): 249.

[ 5 ] Nord H J. Quantitative Vntersuchungen on musculus chomesti cus [J]. Zool. Anz, 1963, 170(7-8): 311.

[ 6 ] 戴丽军, 韦永芳, 梁成结, 等. 长爪沙鼠脏器重量和含水量的性别差异分析[J]. 广东教育学院学报, 2003, 23(2): 52-55.



# 西方膳食对载脂蛋白 E 敲除小鼠的影响\*

杨林<sup>1,2</sup> 黎桂玲<sup>1</sup> 刘科<sup>1</sup> 代路路<sup>1</sup> 李金凤<sup>1</sup> 朱叶萌<sup>1</sup> 邝少松<sup>1</sup>

(1.广东省医学实验动物中心,佛山 528248)(2.华南农业大学,广州 510642)

**摘要:**目的 研究西方膳食和标准饲料对载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(ApoE<sup>-/-</sup>)血液学及病理学的影响。方法 用西方膳食饲料和标准饲料对3月龄 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠进行喂养,并于喂养3个月、4个月和5个月时,采集小鼠外周血和主动脉弓。用全自动血液分析仪检测其血脂水平,并通过切片及染色,观察其动脉粥样硬化斑块的形成情况。**结果** 血脂方面,西方膳食及标准饲料喂养的小鼠血清中总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)比对照组 C57 小鼠明显升高,除了经4个月喂养的小鼠 HDL-C 外,其他各月龄血脂指标西方膳食喂养组都显著高于标准饲料组;在主动脉弓病理切片及染色方面,相同月龄下,西方膳食组小鼠主动脉斑块明显并且 AS 发病率明显升高。**结论** 西方膳食饲料及标准饲料均可诱导 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠表现 AS 病症,西方膳食饲料的诱导效果更明显。

**关键词:**动脉粥样硬化;ApoE<sup>-/-</sup>小鼠;血脂

**中图分类号:** Q493 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0063-05

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.015

动物体内的脂类物质代谢异常时,多余的脂类物质会沉积在血管壁上,并逐渐形成斑块,使血管内皮增厚、变硬,是引起动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的重要原因之一。载脂蛋白 E (apolipoprotein E, apoE)主要存在于乳糜微粒(chylomicron, CM)、极低密度脂蛋白(very low density lipoprotein, LDL)等多种血浆脂蛋白中,可介导脂蛋白残粒的摄取,维持血浆胆固醇的平衡、促进泡沫细胞中胆固醇的外流以及具有抗氧化和消炎等作用,该基因缺陷将使体内脂代谢发生紊乱。ApoE 基因敲除的纯合小鼠(ApoE<sup>-/-</sup>)可正常存活和繁殖,当给予适当的高脂饮食时,可导致各种高脂蛋白血症<sup>[1-3]</sup>,并且其斑块分布与人类的动脉粥样硬化斑块的分布相似,在动脉粥样硬化的研究中发挥重要作用。本文使用西方膳食饲料和标准饲料两种不同脂肪和胆固醇含量的饲料喂养 ApoE<sup>-/-</sup>基因敲除小鼠,探究其血生化指标和动脉病理学的改变,为后续该模型小鼠的使用提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选取约3月龄的 SPF 级载脂蛋白 E 基因敲除小鼠(ApoE<sup>-/-</sup>)36只和 C57BL/6J 小鼠18只,其来源于广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2013-002],动物饲养环境条件为20~26℃,相对湿度40%~70%。36只 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠分为6组,每组6只,分别为:喂养西方膳食(主要成分见表1)3个月(H6)、4个月(H7)和5个月(H8)组,和标准饲料(主要成分见表2)3个月(M6)、4个月(M7)和5个月(M8)组。西方膳食饲料含21%脂肪、0.25%胆固醇;标准饲料含10%脂肪。18只 C57BL/6J 小鼠即对照组小鼠(所喂饲料见表2),共分3组,每组6只,分别为:6月龄(WT6)、7月龄(WT7)和8月龄(WT8)组,饲养期间自由饮水。

收稿日期:2018-11-06

\* 基金项目:广东省医学科研基金(C2018027)

作者简介:杨林(1985—),女,理学硕士,助理研究员,研究方向:基因工程动物及胚胎保种相关研究.E-mail:yanglin6060@sina.com.cn

通信作者:邝少松(1973—),女,农学博士,高级兽医师,研究方向:病理学、毒理学兽医学.E-mail:kuangss@126.com

表 1 西方膳食饲料主要组分及营养含量

Table 1 Main components and nutrient contents of Western diet

| 原料   | %     | 营养素   | 质量比/% |
|------|-------|-------|-------|
| 基础饲料 | 81.85 | 蛋白    | 15    |
| 猪油   | 18    | 碳水化合物 | 47    |
| 胆固醇  | 0.15  | 脂肪    | 21    |

表 2 标准饲料及 C57 小鼠饲料主要组分及营养含量

Table 2 Main components and nutrient contents of standard diet and C57 mice diet

| 原料 | 标准饲料/% | C57 小鼠饲料/% | 营养素   | 标准饲料质量比/% | C57 小鼠饲料质量比/% |
|----|--------|------------|-------|-----------|---------------|
| 玉米 | 31.5   | 26.5       | 蛋白    | 22        | 22            |
| 面粉 | 25     | 25         | 碳水化合物 | 52        | 48            |
| 豆粕 | 19     | 9          | 脂肪    | 6.5       | 10.5          |

1.2 主要试剂和仪器

试剂:溶血剂,DH-910,DH-680;清洗剂,DH-520,DH-620;稀释液,DH-640(东湖仪器试剂有限公司)

仪器:轮转切片机(德国 LEICA 公司 RM2135),生物组织全自动脱水机(湖北孝感医用仪器有限公司 TS-12C),生物组织包埋机及冷冻机(湖北孝感医用仪器有限公司 BM-VII),摊片烤片机(湖北孝感医用仪器有限公司 CS-VI),生物组织全自动染色机(湖北孝感医用仪器有限公司 RS-18),正置光显微镜(Olympus BX41),病理图像分析系统(Image-Pro Express 5.1.1.14),血液分析仪(NIHONKOH DEN)等。

1.3 血脂测定

9 组小鼠喂养到指定月龄后,称体质量并摘取眼球取血(不空腹),离心,分离血清,使用 NIHONKOH DEN 血液分析仪测定各组小鼠血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)。

1.4 样本取材及制备

动物处死后,取主动脉根部,4%中性甲醛固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片(4 μm)、烤片,常规 HE 染色,封片。在光学显微镜下观察主动脉弓有无动脉粥样硬化病变,并用 OLYMPUS BX41 显微镜拍照。

1.5 统计方法

使用 SPSS 21.0 统计软件处理,数值用平均值±标准误差( $\bar{x} \pm s$ )表示,多组间比较用单因素方差分

析(Oneway ANOV),两两比较用 Newman-Keuls 检验。

2 结果

2.1 血脂水平的变化

与同月龄的对照组小鼠相比,高脂日粮喂养的 H 组与普通日粮喂养的 M 组的 APOE 基因敲除小鼠在 TC 和 LDL-C 两方面显著升高,并且 H 组显著高于 M 组小鼠。在 HDL-C 方面,H6 组与 M6 组小鼠显著高于 WT6 组小鼠,并且 H6 组小鼠也显著高于 M6 组小鼠;同样 H8 组与 M8 组小鼠在 HDL-C 方面也显著高于同 WT8 组小鼠,H8 组小鼠也显著高于 M8 组;在 7 月龄组,H7 与 M7 组小鼠显著高于 WT7 组小鼠,但是 H7 组与 M7 组小鼠相比并没有显著性差异。各组血浆 TG 没显著性差异,无统计学意义。

表 3 6 月龄各组小鼠血清血脂水平比较

Table 3 Comparison of lipid levels in sera among the 6 months old mice

| 组别  | TC                      | TG        | HDL-C                  | LDL-C                  |
|-----|-------------------------|-----------|------------------------|------------------------|
| H6  | 21.30±0.86 <sup>a</sup> | 0.87±0.09 | 3.13±0.16 <sup>a</sup> | 5.16±0.75 <sup>a</sup> |
| M6  | 15.60±2.01 <sup>b</sup> | 0.92±0.25 | 2.34±0.33 <sup>b</sup> | 2.50±0.72 <sup>b</sup> |
| WT6 | 2.88±0.85 <sup>c</sup>  | 0.98±0.29 | 2.19±0.95 <sup>c</sup> | 0.16±0.06 <sup>c</sup> |

注:不同字母代表具有统计学差异( $P < 0.05$ )

Note: Different uppercase indicate significant statistical difference between at the significance level of 0.05

表 4 7 月龄各组小鼠血清血脂水平比较

Table 4 Comparison of lipid levels in sera among the 7 months old mice

| 组别  | TC                      | TG        | HDL-C                  | LDL-C                  |
|-----|-------------------------|-----------|------------------------|------------------------|
| H7  | 20.45±3.83 <sup>a</sup> | 0.96±0.21 | 2.82±0.25 <sup>a</sup> | 4.70±1.13 <sup>a</sup> |
| M7  | 15.30±1.61 <sup>b</sup> | 1.53±0.34 | 2.62±0.50 <sup>a</sup> | 2.30±0.31 <sup>b</sup> |
| WT7 | 1.61±0.25 <sup>c</sup>  | 0.83±0.15 | 0.96±0.23 <sup>c</sup> | 0.30±0.25 <sup>c</sup> |

注:不同字母代表具有统计学差异( $P < 0.05$ )

Note: Different uppercase indicate significant statistical difference between at the significance level of 0.05

表 5 8 月龄各组小鼠血清血脂水平比较

Table 5 Comparison of lipid levels in sera among the 8 months old mice

| 组别  | TC                      | TG        | HDL-C                  | LDL-C                  |
|-----|-------------------------|-----------|------------------------|------------------------|
| H8  | 27.33±5.23 <sup>a</sup> | 0.91±0.18 | 3.32±0.30 <sup>a</sup> | 7.75±2.81 <sup>a</sup> |
| M8  | 16.00±1.19 <sup>b</sup> | 0.95±0.26 | 2.25±0.27 <sup>b</sup> | 2.67±0.51 <sup>b</sup> |
| WT8 | 3.13±0.25 <sup>c</sup>  | 0.83±0.13 | 1.82±0.22 <sup>c</sup> | 0.40±0.07 <sup>c</sup> |

注:不同字母代表具有统计学差异( $P < 0.05$ )

Different uppercase indicate significant statistical difference between at the significance level of 0.05

2.2 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠主动脉弓 AS 病变的观察

在高倍镜下观察,WT6 组:6 只动物主动脉弓镜下均未见动脉粥样硬化(见图 1 A)。M6 组:4 只动

物(4/6)主动脉弓镜下见动脉粥样硬化,泡沫细胞聚集(见图 1B)。H6 组:5 只动物(5/6)主动脉弓镜下均见动脉粥样硬化(见图 1C)。

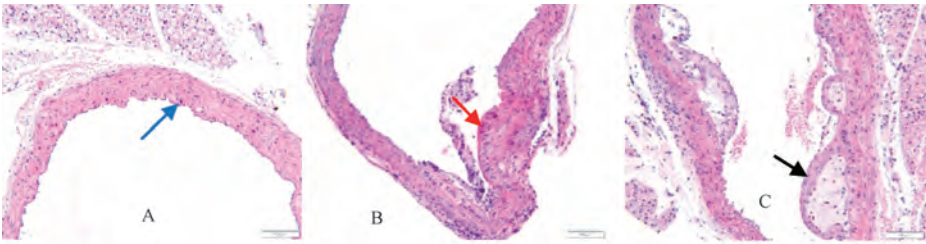


图 1 6 月龄小鼠的 HE 染色情况  
注:A.WT6 组主动脉弓未见病变;B.M6 组主动脉弓部分出现动脉粥样硬化;C.H6 组大多数出现动脉粥样硬化

Fig.1 HE staining of 6 months old mice

Note:A. no lesions of aortic arch in WT6 group; B. atherosclerosis in part of aortic arch in M6 group; C. atherosclerosis occurred mostly in H6 group

WT7 组:1 只动物(1/6)可见动脉粥样硬化,内膜下纤维斑块形成,斑块内可见泡沫细胞及胆固醇结晶。其余动物主动脉弓未见明显异常(见图 2A)。M7 组:3 只动物(3/6)可见动脉粥样硬化,主要表现为血管内膜下纤维斑块形成,斑块内可见泡沫细胞及胆固醇结晶,其中 1 只动物(1/6)斑块局

部可见坏死钙化灶。其余动物主动脉弓未见明显异常(见图 2B)。H7 组:6 只动物(6/6)均可见动脉粥样硬化,主要表现为血管内膜下纤维斑块形成,斑块内可见泡沫细胞,其中 5 只动物(5/6)斑块内可见胆固醇结晶(见图 2C)。

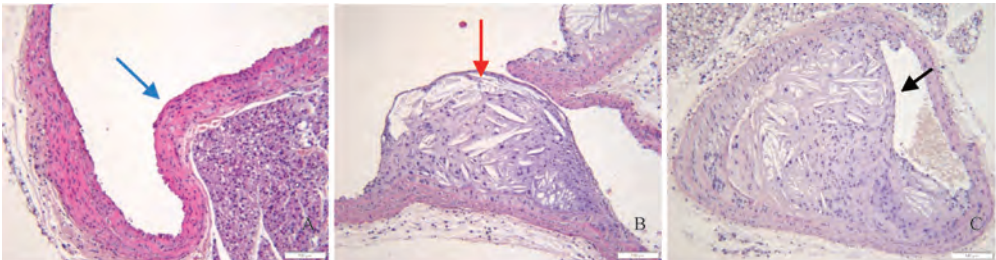


图 2 7 月龄小鼠的 HE 染色情况  
注:A.WT7 组主动脉弓未见病变;B.M7 组主动脉弓部分出现动脉粥样硬化;C.H7 组全部出现动脉粥样硬化

Fig.2 HE staining of 7 months old mice

Note:A. no lesions of aortic arch in WT7 group; B. atherosclerosis in part of aortic arch in M7group; C. atherosclerosis occurred mostly in H7 group

WT8 组:所有动物均未见动脉粥样硬化(见图 3A);M8 组:4 只小鼠(4/6)主动脉弓镜下可见动脉

粥样硬化(见图 3B);H8 组:5 只小鼠(5/6)主动脉弓镜下可见动脉粥样硬化(见图 3C)。

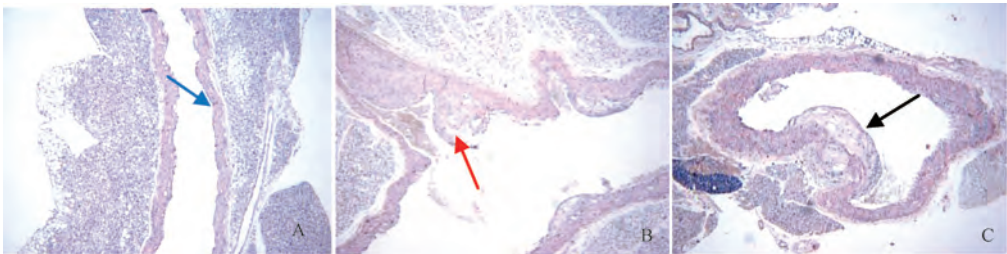


图 3 8 月龄小鼠的 HE 染色情况  
注:A.WT8 组主动脉弓未见病变;B.M8 组主动脉弓部分出现动脉粥样硬化;C.H8 组大多数出现动脉粥样硬化

Fig.3 HE staining of 8 months old mice

Note:A. no lesions of aortic arch in WT8 group; B. atherosclerosis in part of aortic arch in M8group; C. atherosclerosis occurred mostly in H8 group

### 3 讨论

以往的 AS 动物模型多采用极高含量的胆固醇、脂肪的饲料长期饲养制作,但由于小鼠、大鼠等动物先天具有胆固醇抵抗的特性,在制作模型时,胆固醇负荷往往是正常膳食的数十倍的急性过程,因此与人类的病症情况相差甚远<sup>[4-6]</sup>。ApoE 基因敲除小鼠是由美国洛克菲勒大学生化遗传与代谢实验室和北卡罗莱那大学病理遗传实验室于 1992 年应用胚胎干细胞基因敲除技术培育成功。有研究表明该小鼠用普通饲料喂养也可自发形成纤维斑块和复合斑块,高脂饲料喂养可以加速 AS,并且动脉粥样硬化斑块分布与人类的相似<sup>[7]</sup>。田枫等<sup>[8]</sup>研究发现普通饲养的 ApoE 敲除小鼠 12 个月时,其主要血管仍呈现明显的动脉粥样特征,表明 ApoE 敲除小鼠是动脉粥样硬化研究的可靠的动物模型。据报道 ApoE 敲除小鼠,15~20 周龄后逐渐出现纤维斑块,病变部位以主动脉根最为明显,其次为胸主动脉。

本研究中我们采用的是 21%脂肪、0.25%胆固醇的“西方膳食”饲料和标准饲料(中等脂肪含量)对 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠进行诱导,经过 3 个月、4 个月和 5 个月的诱导后发现,相同月龄下,在 TC 和 LDL-C 方面,西方膳食组和标准饲料组显著高于对照组(WT 组),同时西方膳食组也显著高于标准饲料组;在 HDL-C 方面,饲喂 3 个月与 5 个月表现出同样的结果。但是在饲喂 4 个月时,西方膳食组和标准饲料组都显著高于对照组(WT 组),两组无显著差异。在主动脉弓病理切片及染色方面,相同月龄下,西方膳食组主动脉斑块明显并且 AS 发病率明显升高。该小鼠可为 AS 的多方面研究提供有效的实验动物模型:药物筛选、分子干预等;以及 AS 病理学机制的相关研究等。

本研究用含有 21%脂肪和 0.25%胆固醇的西方膳食饲料(高脂饲料)和 10%脂肪的标准饲料饲养 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠,经 3 个月、4 个月及 5 个月的饮食

处理后,西方膳食饲料喂养的小鼠血浆总胆固醇、高密度脂蛋白指标(H6 和 H8)、低密度脂蛋白指标比标准饲料及对照组组(WT 组)明显升高,同时标准饲料组也明显高于对照组(WT 组);在主动脉弓病理切片及染色方面,西方膳食饲料组和标准饲料组都表现出血管内膜纤维斑块形成,斑块内可见泡沫细胞及胆固醇结晶的典型动脉粥样硬化病理特征。表明:西方膳食饲料及标准饲料均可诱导 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠表现 AS 病症,而且西方膳食饲料的诱导效果更明显。本研究观察动物经西方膳食饲料和标准饲料喂养后的血脂情况及 ApoE<sup>-/-</sup>主动脉弓的病变特点,为该模型在心血管疾病等老年病学研究的广泛应用提供了基础资料。

### 参考文献

- [1] 欧海龙,张礼林,何晓兰,等. ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化模型的建立[J]. 生命科学研究, 2015, **19**(2): 141-144.
- [2] Plump A S, Smith J D, Hayek T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells[J]. Cell, 1992, **71**(2): 343-353.
- [3] Nakashima Y, Plump A S, Raines E W, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree[J]. Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology, 1994, **14**(1): 133-140.
- [4] 程军,李金平,田卓,等. ApoE 基因敲除小鼠和 C57BL/CJ 小鼠血脂及主动脉组织病理学的对比观察[J]. 实验动物科学, 2008, **25**(2): 4-6.
- [5] Breslow J B. Mouse models of atherosclerosis[J]. Science, 1996, **272**(5262): 685-688.
- [6] 刘雪梅,吴符火. 几类高脂血症动物模型的比较[J]. 中西医结合学报, 2004, **2**(2): 132-134.
- [7] Nakashima Y, Plumb A S, Raines E W, et al. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1994, **14**(1): 133-140.
- [8] 田枫,康爱君,张阔,等. 12 月龄 ApoE<sup>-/-</sup>动脉粥样硬化小鼠主要动脉病理学变化[J]. 实验动物科学, 2010, **27**(1): 10-12.

## The Effect of Western Diet on the Apolipoprotein E Gene Knock out Mice

YANG Lin<sup>1,2</sup>, LI Guiling<sup>1</sup>, LIU Ke<sup>1</sup>, DAI Lulu<sup>1</sup>, LI Jinfeng<sup>1</sup>, ZHU Yemeng<sup>1</sup>, KUANG Shaosong<sup>1</sup>

(1. Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China)

(2. South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of western diet and standard diet on the blood fat and aortic arch pathology of apolipoprotein E gene knock out mice. **Method** We feed 3 months old ApoE<sup>-/-</sup> mice with western dietary or standard diet for 3 months, 4 months and 5 months, respectively, then collect peripheral blood and aortic arch. We use Automatic blood analyzer to detect lipid level in serum, and observe the formation of atherosclerotic plaque through sectioning and staining. **Result** On the blood lipids detection, total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) in serum of mice feeding western diet and standard diet were significantly higher than the control group. In addition to HDL-C mice 4 months feeding, the lipid index of western diet lipid groups are significantly higher than the standard diet group on the same age. On the stained sections, western diet aortic plaque and incidence of atherosclerosis are significantly increased. **Conclusion** Both Western dietary and standard diet can induce ApoE<sup>-/-</sup> mice showed AS symptoms, the effect of western dietary is more obvious.

**Key words:** Atherosclerosis; ApoE<sup>-/-</sup> mice; blood lipid

(上接第 62 页)

## Comparison of the Viscera Coefficient of CMU/1 and CMU/2 Inbred Strains of Gerbil

MA Lanzhi<sup>1</sup>, LI Ying<sup>1,3</sup>, SHANG Shichen<sup>1</sup>, HUANG Bin<sup>1</sup>,

SHANG Yupu<sup>1</sup>, WANG Dongping<sup>1</sup>, CHEN Zhenwen<sup>2</sup>

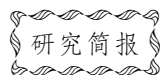
(1. Academy of Military Medicine Laboratory Animal Center of the Academy, Beijing 100071, China)

(2. Department of Laboratory Animal Science, Capital University Medical of Medical Sciences, Beijing 100069, China)

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

**Abstract: Objective** To determine the body weight and main organ weight of inbred CMU/1 and CMU/2 inbred *Mongolian gerbils*, and to explore and establish the biological index system of main organs of *Mongolian gerbils*. It provides the necessary parameters for animal experiments. **Method** The body weight and organ weight of the 3~4 month-old gerbil in the inbred line were analyzed statistically. **Result** The difference between lung coefficient CMU/1 and CMU/2 inbred gerbils significantly, other no significant difference; Kendall coefficient (W) close to 1, the main organs of the overall development of better coordination; linear regression equation, the CMU/1  $P < 0.05$ , CMU/2 in the liver, thymus, lung  $P < 0.05$ , two of the sample had a linear relationship between. The thymus of the liver, spleen, adrenal gland, ovary, pancreas and CMU/2 of CMU/1 was positively correlated with body weight. **Conclusion** There is significant difference in lung organ coefficient between CMU/1 and CMU/2 inbred strains of gerbil, and there is no obvious influence on the organ coefficient of the gerbil in the inbred line.

**Key words:** *Mongolian gerbil*; Inbred line; Organ coefficient



# 抽取小鼠脑脊液简便易行的新方法<sup>\*</sup>

桂 青 陈碧玉 刘翰琛 黄念来 陈贞磊 林焰华 周常文

(福建医科大学基础医学院,福州 350122)

**摘要:**目的 建立抽取小鼠脑脊液的一种简单易行,材料低廉,生存率与成功率高,为小鼠脑脊液的相关研究提供参考。**方法** 自制微量吸管。将小鼠头部固定与身体大约成120°角,对小鼠皮下组织和肌肉用镊子进行钝性分离,找到小鼠白色硬脊膜,进管抵达小脑延髓池,缓慢抽取小鼠脑脊液并将管退出,最后缝合小鼠伤口。**结果** 成功获得小鼠脑脊液2~5 μL,小鼠存活。**讨论** 目前,大多文献记载的是大鼠脑脊液的抽取方法或较为复杂的小鼠脑脊液抽取方法,而此种针对小鼠的脑脊液抽取方法不但简单易行,对仪器要求低,成功率高而且小鼠生存率高,可以反复抽取。

**关键词:**小鼠;脑脊液;方法

**中图分类号:** Q95-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0068-04

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.016

脑脊液(cerebrospinal fluid, CSF)是充满在各脑室、蛛网膜下腔和脊髓中央管内的无色透明的液体,其性质与血浆和淋巴液相似,略带黏性。它供应脑细胞一定的营养,运走脑组织的代谢产物,调节中枢神经系统的酸碱平衡,并缓冲脑和脊髓的压力,对脑和脊髓具有保护和支持作用<sup>[1]</sup>。由于血脑屏障的存在,中枢系统疾病或损伤,常常以脑脊液为观察对象,检测脑脊液中目的物含量变化。若中枢神经系统发生病变,神经细胞代谢紊乱,将使脑脊液的性状和成分发生改变。因此,小鼠脑脊液常被用于脑损伤机制、生物标记物、药物治疗等研究领域中<sup>[2]</sup>,如对脑脊液炎症因子敏感性的研究<sup>[3]</sup>,对脑脊液中蛋白含量的影响研究<sup>[4]</sup>,对脑脊液中去甲肾上腺素、五羟色胺的动态变化<sup>[5]</sup>及脑脊液中脑源性神经营养因子的研究<sup>[6]</sup>。课题组为了利用蛋白组学技术鉴定α分泌酶ADAM10的新底物,需利用已建立好的动物模型,抽取纯合子及野生型小鼠的脑脊液进行质谱分析<sup>[7]</sup>。文献记载中,尚未发现简单易行的小鼠脑脊液抽取方法。由于大鼠与小鼠大脑具有相似的解剖结构,通过参考抽取大鼠脑脊液的方法建立了一种抽取小鼠脑脊液的新方法<sup>[2]</sup>。

## 1 材料

### 1.1 实验动物

清洁级20~30 g健康C57BL/6小鼠,由福建医科大学动物实验中心提供,生产许可证号为:2015000519041。

### 1.2 实验材料

手术弯剪,弯镊,止血钳,体视显微镜,20 μL微量采血管,无菌棉球与棉签,75%酒精,4%水合氯醛(福州科诺生物技术有限公司),注射器,铁架台,烧瓶夹,手电筒或头灯,酒精灯,生理盐水,7号缝合针线,PCR管,封口膜。

## 2 实验方法与结果

### 2.1 微量吸管的制作

打开酒精灯,用手捏住微量采血管两端,将微量采血管中间部位对准酒精灯外焰,中间部位一旦融化即向两端平直外拉,这时可见两根管的头部为丝状,用剪刀稍作修剪,将其在体视显微镜下检查,内部通畅即可。两根微量吸管即制作成功。

收稿日期:2019-02-18

<sup>\*</sup> 基金项目:福建省自然科学基金(2017J01818);2016年福建医科大学大学生创新创业训练计划校级项目(No.C1630)

作者简介:桂 青(1995—),女,本科,专业:临床医学.E-mail:15859178008@163.com

通信作者:周常文(1956—),男,教授,硕士生导师,研究方向:功能基因组学.E-mail:zhouchangwen624@sina.com



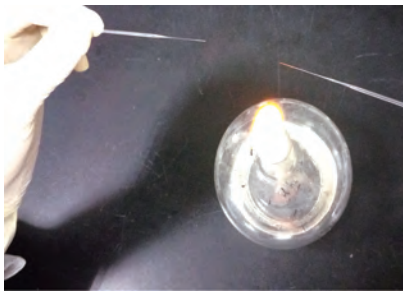


图 1 微量吸管的制作  
Fig.1 Micropipets production

2.2 麻醉及固定

腹腔注射 4% 水合氯醛麻醉小鼠。利用铁架台与烧瓶夹固定小鼠前肢,调整烧瓶夹到合适的高度,可将头部垫到一定高度使小鼠头部与身体大约成 120°角。可在固定小鼠前肢的烧瓶夹的上方加一个烧瓶夹固定手电筒,使整个视野更加明亮,有助于观察小鼠硬脊膜的位置(也可直接佩戴头灯)。

2.3 钝性分离

对小鼠头部皮肤进行消毒去毛处理,沿后正中中线切一纵行切口(约 1 cm)。用止血钳将皮肤夹住分开。用弯镊沿正中白线撕离表层肌肉,再用止血钳夹住分开。最深层附着在枕骨大孔的肌肉继续用

镊子沿正中线的方向纵向分开,方法为用力夹紧镊子,将镊子头部插入中线中间部,然后放松镊子以纵向撑开肌肉,如此反复操作几次(不易触破血管),可见只剩残留的少量肌肉。最后用镊子或棉签的末端刮开附着在硬脊膜的残留肌肉(以避免出血),直到完全暴露白色硬脊膜。

2.4 抽取

暴露白色硬脊膜后,将其用无菌棉签擦净。将事先准备好的微量吸管,轻轻旋入硬脊膜,一旦见到清亮的脑脊液沿吸管缓慢上升(颅内压的作用)应立刻稳住,直到管内脑脊液的液面高度停止上升,轻轻将吸管退出。可得到不带血的 2~5 μL 脑脊液。

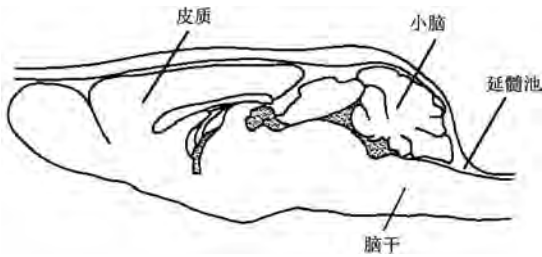
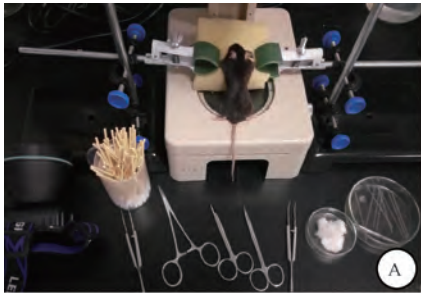


图 2 从延髓池抽取脑脊液  
Fig.2 CSF samples are taken from the cisterna magna



A 固定小鼠及所需器械  
A The fixed mouse and the required instruments



B 硬脊膜  
B The mouse was bluntly dissected to expose spinal dura mater



C 将微量吸管轻轻旋入硬脊膜可见脑脊液不断上升  
C Rising cerebrospinal fluid in the micropipete



D 缝合外层皮肤  
D The sutured mouse

图 3 抽取脑脊液操作次序

Fig.3 The operation sequence of CSF extraction

## 2.5 获取与保存

取经高压灭菌过的 PCR 管,将微量吸管尖部对着管口。将已充满空气的注射器对准微量吸管的另一头,一次性快速用力将注射器推到底,可将吸管内的脑脊液成功打入 PCR 管。封口膜密封好后,放入  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱保存。

## 2.6 缝合及饲养

抽到脑脊液后,缝合外层皮肤,缝合完毕后向缝合缺口注入约 1 mL 生理盐水,放回笼中并继续饲养,密切观察。可见小鼠逐渐恢复正常,待缝合线脱落后可再次抽取。

## 3 讨论

本文采用的改进方法,其新颖之处在于:①目前,大多文献记载的是大鼠脑脊液抽取方法<sup>[2,8]</sup>,尚未发现简单易行的小鼠脑脊液抽取方法。而小鼠脑脊液常被用于脑损伤机制、生物标记物、药物治疗等研究领域,更为简单易行的方法亟待被发现。②建立的方法简单易行,仪器低廉,成功率高。在许多实验室,脑脊液抽取多需昂贵的仪器和特定的小鼠固定装置<sup>[9]</sup>,而本方法则仅在普通的实验条件下用常见的实验材料即可达到高的成功率。例如,用铁架台及烧瓶夹代替小鼠固定装置,用酒精灯与微量采血管代替拉针仪与玻璃管。

另外,本文详细地介绍了如何抽取脑脊液不带血的同时也不易导致小鼠死亡的过程,如严格按照操作方法进行,能在短时间内十分顺利地抽取到脑脊液。如果不慎有微量血液进入,可将脑脊液在  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 2 min。取白色透明的上清液体即可<sup>[2]</sup>。③不易感染,生存率高。此方法只造成轻微脑组织损伤,不易出血,缝合后,小鼠的生存率极高。本实验对 100 只小鼠抽取脑脊液,麻醉死亡 3 只,直接伤及延髓死亡 2 只,缝合后感染死亡 2 只,存活率高达 93%。

在操作过程中应注意以下事项:

1) 钝性分离,切勿触及血管是成功的关键因素之一,由于小鼠脑部血管隐藏较深且细小,肉眼无法避免,故一定要采用钝性分离;

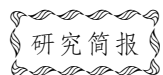
2) 旋针速度一定要缓慢,当有脑脊液涌出,此时应稳住,手尽量不要颤抖。如果抽取失败导致硬脊膜损伤,不应继续抽取。如继续抽取,血液易进入吸管。

综上所述,本文所建立的小鼠脑脊液抽取方法简单易行、结果稳定、重复性好,是一种有效、新颖,可以达到反复抽取实验对象目的的方法,为利用小鼠脑脊液的相关研究提供了良好的实验基础。

## 参考文献

- [1] 张升,辛艳飞,顾利强,等. Beagle 犬脑脊液(CSF)多次采集手术模型的建立[J].实验动物科学,2011,28(5):69-71.
- [2] 任长虹,高明清,曹金强,等. 大鼠脑脊液抽取的新方法[J].实验动物科学,2012,29(1):61-62,68.
- [3] 朱彦,王冬青,李月峰,等. 抑郁模型大鼠额叶及海马对脑脊液炎症因子敏感性的磁共振质子波谱研究[J].中华行为医学与脑科学杂志,2013,22(4):303-305.
- [4] 徐志秀,喻超,陈俊俊,等. 姜黄素对阿尔茨海默病模型大鼠学习记忆能力、海马结构及脑脊液中  $\text{A}\beta_{1-42}$  和 tau 蛋白含量的影响研究[J].军事医学,2016,40(2):113-116.
- [5] 杨澎湃. 递增负荷运动大鼠脑皮质神经元和脑脊液中去甲肾上腺素、5-羟色胺的动态变化[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(37):6972-6976.
- [6] 尹烈虎,李学成,陆地,等. 抑郁模型大鼠脑脊液、海马和皮层组织脑源性神经营养因子的变化[J].第三军医大学,2009,31(3):230-232.
- [7] Kuhn P H, Koroniak K, Hogg S, et al. Secretome protein enrichment identifies physiological BACE1 protease substrates in neurons[J]. The EMBO Journal, 2012,31(14):3157-3168.
- [8] 曹远东,章龙珍,王梅申. 两种采集 SD 大鼠脑脊液方法的比较[J].徐州医学院学报,2005,25(4):317-319.
- [9] Liu L, Duff K. A technique for serial collection of cerebrospinal fluid from the cisterna magna in mouse[J]. Journal of Visualized Experiments, 2008,(21). pii: 960. doi: 10.3791/960.

(下转至第 76 页)



# 独立通风笼盒系统内传热传质分析

张建平 傅江南

(暨南大学实验动物管理中心, 广州 510623)

**摘要:**目的 为了有效控制独立通风笼盒系统(individual ventilated cages, IVC)内环境的舒适性,保证笼盒内实验动物的生存和健康,对笼盒内的温度、湿度及氨浓度进行测试,并对笼盒内传热传质机理进行分析,同时为实验动物生存环境(密闭建筑空间、设备)控制提供参考。**方法** 小鼠75只,按数量递增顺序随机分为5组,饲养于同一架IVC设备内,分别对笼盒内的温度、湿度和氨浓度进行连续7 d的测试。**结果** 随着饲养天数的增加,笼盒内和房间内的温度差变化基本一致,相对湿度差和氨浓度差逐渐增大;同时笼盒内、外的氨浓度差同动物数量和时间均相关,有显著差异( $P < 0.05$ ),即动物只数越多,时间越长,氨浓度差越大。**结论** IVC笼盒内温度受设施内温度的影响较大;相对湿度主要与送风空气相对湿度和换气次数有关;氨浓度与换气次数和动物只数有关。

**关键词:**实验动物设施;IVC;温度;湿度;氨浓度

**中图分类号:** Q95-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0071-06

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.017

独立通风笼盒系统(IVC)是一种以饲养盒为单位的独立通风小型屏障设备,由主机、笼架、笼盒和独立送排风系统组成,无调节送风参数功能,故笼盒内微环境对室内环境和空调系统的依赖性较大。

目前国内外众多学者从笼盒更换频率<sup>[1-3]</sup>、换气次数<sup>[4]</sup>、CO<sub>2</sub>浓度特性<sup>[5]</sup>、氨浓度<sup>[6]</sup>、垫料种类、笼盒空间大小、饲养密度<sup>[7-9]</sup>等方面对笼盒内微环境进行了大量研究。研究发现,换笼周期为7~14 d,换气次数为40~120次/h,饲养密度为≤5只/盒,最适宜实验动物生存生长。以上研究均是基于设施内换气次数>15次/h(国内)、20次/h~25次/h(国外),环境参数满足相关法规标准要求的条件下进行的。如此大的换气次数使得实验动物设施空调系统能耗巨大,成为动物实验领域的一大难题。

目前IVC设备送风方式主要有两种:①主机从建筑空间内取风;②设备独立送风,即设施和设备是两套完全独立的空调通风系统<sup>[10-11]</sup>。以上两种方式在运行时,均可通过风机转速控制达到节能,无论哪种送风方式,IVC设备均放置在建筑空间内,并且笼盒的密封性较好,笼盒内的空气不易与室内的空

气进行交换,但是笼盒的材质大多是PPSU和PSU,易导热,故笼盒内、外存在传热。实验动物生长过程中持续散热散湿、散放氨气对笼盒内的微环境影响较大,因此探讨笼盒传热传质机理,可对笼盒内微环境和设施内环境及空调系统控制提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 相关规范及环境指标

目前国内关于IVC的标准有江苏省的产品地方标准, DB32/T972—2006《实验动物笼器具 独立通气笼盒(IVC)系统》<sup>[12]</sup>,关于实验动物设施的标准为:GB 14925—2010《实验动物 环境及设施》<sup>[13]</sup>和GB 50447—2008《实验动物设施建筑技术规范》<sup>[14]</sup>,以上标准对实验动物饲养环境指标做了要求,详见表1。

### 1.2 仪器和设备

国产IVC,90笼位二代小鼠独立通气笼盒;温湿度仪(海创高科)、氨浓度监测仪(MX6 IBRID),均经过独立第三方校准。

收稿日期:2018-12-17

作者简介:张建平(1987—),女,助理工程师,研究方向:实验动物环境工程与卫生学.E-mail: m18710509126@163.com

通信作者:傅江南(1959—),男,副教授,研究方向:实验动物环境工程与卫生学.E-mail: fujiangnan126@126.com

表 1 不同标准对环境指标的要求

Table 1 Environment parameters requirement of different standards

| 标准             | 换气次数/(次/h)                 | 温度/℃          | 相对湿度/%     | 气流速度/(m/s)      | 静压差/Pa      |
|----------------|----------------------------|---------------|------------|-----------------|-------------|
| Standard       | Air exchange rate/(rate/h) | Temperature/℃ | Humidity/% | Air speed/(m/s) | Pressure/Pa |
| DB32/T972—2006 | ≥10                        | ——            | ——         | ≤0.1 m/s        | ≥10         |
| GB 14925—2010  | ≥15                        | 20~26         | 40~70      | ≤0.2 m/s        | ≥10         |
| GB 50447—2008  | ≥15                        | 19~26         | 40~70      | ≤0.2 m/s        | ≥10         |

1.3 环境条件与控制

IVC 设备放置在实验动物屏障设施内[SYXK (粤) 2017-0174], 设施内的环境严格按照 GB 14925 要求进行控制,设备运行正常,笼盒的容积为 7.6 L,换气次数(50 次/h)及压差(+20 Pa)通过 IVC 控制面板进行控制,其中设备的测试笼盒放置在靠近主机的最下端。

1.4 实验方法

SPF 级基因工程小鼠 75 只,18~26 g,按 1 只、2 只、3 只、4 只、5 只进行随机分组,共 5 组,每组 5 笼。垫料为玉米芯,所有笼盒均放置于同一笼架,正常饲养。为减少对动物的干扰和保证笼盒的气密性,温湿度计的探头和氨浓度监测仪的软管均从笼盒现有放置水瓶瓶嘴的孔伸入笼盒内中层高度的位置进行检测。实验周期为 7 d,每天测定笼盒内温度、湿度、氨浓度 3 次,取平均值。

1.5 统计方法

采用 OriginPro7.5 软件进行统计分析,所有数据采用均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,样本均数的比较采用 *t* 检验, $P<0.05$  为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 笼盒内、外温度差随时间变化特性

IVC 设备换气次数设为 50 次/h,测试周期房间

表 2 笼盒内外温差变化情况( $\bar{x}\pm s$ )

Table 2 Temperature variation characteristics inside and outside the cage( $\bar{x}\pm s$ )

| 天数   | 笼盒内外温差/℃                                             |           |           |           |           |
|------|------------------------------------------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|      | Temperature difference inside and outside the cage/℃ |           |           |           |           |
|      | 1 只小鼠/笼                                              | 2 只小鼠/笼   | 3 只小鼠/笼   | 4 只小鼠/笼   | 5 只小鼠/笼   |
| Day1 | 0.00±0.00                                            | 0.44±0.00 | 1.00±0.00 | 1.42±0.00 | 1.66±0.00 |
| Day2 | 0.57±0.15                                            | 1.00±0.32 | 1.42±0.29 | 1.85±0.56 | 2.21±0.39 |
| Day3 | 0.81±0.25                                            | 0.83±0.21 | 1.03±0.13 | 1.90±0.33 | 2.19±0.25 |
| Day4 | 0.33±0.14                                            | 1.53±0.09 | 2.00±0.09 | 2.39±0.21 | 2.42±0.11 |
| Day5 | 0.39±0.14                                            | 0.84±0.07 | 1.41±0.17 | 1.94±0.14 | 2.19±0.03 |
| Day6 | 0.52±0.35                                            | 0.91±0.36 | 1.51±0.25 | 1.77±0.20 | 2.43±0.29 |
| Day7 | 0.52±0.40                                            | 0.76±0.35 | 1.18±0.27 | 1.27±0.35 | 1.73±0.35 |

内的温度控制在 21~23 ℃ 之间。测试结果如图 1 所示:笼盒内外温差均在 0~2.5 ℃ 之间变动,且随着动物只数的增多笼盒内外温差有微小增高。在测试时间内,笼盒内外温差在第 4 天达到最高。五组实验中,1 只小鼠/笼的温差变化趋势不同于其余四组,因为此组笼盒放置在笼架最上部,距设施的送风口较近。但任意两组相比,无统计学差异( $P>0.05$ )(表 2),即小鼠笼盒内外的温差受时间的影响较小。

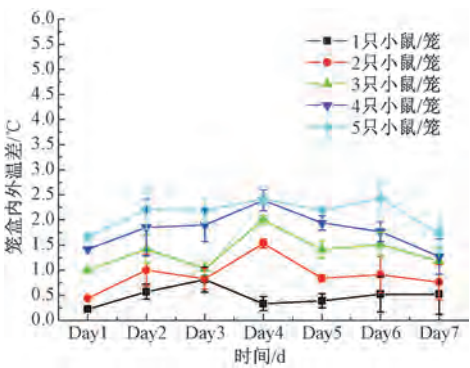


图 1 笼盒内外温差变化特性

Fig.1 Temperature variation characteristics inside and outside the cage

注:各组之间温差值比较, $P>0.05,n=21$   
Note:Consistency among the groups for temperature was evaluated,  $P>0.05,n=21$

2.2 相对湿度随时间的变化特性

IVC 设备换气次数为 50 次/h,测试周期房间内的相对湿度控制在 50%~57%之间。测试结果如图 2 所示:笼盒内的相对湿度均高于笼盒外设施内的相对湿度,且笼盒内外相对湿度差随着天数逐渐增大,在饲养第 7 天时,当笼盒内小鼠只数大于 4 只时,笼盒内外相对湿度差大于 15%。同时笼盒内小鼠越多,笼盒内外相对湿度差越大。任意两组相比,当相隔时间 = 1 d 时,无统计学差异 ( $P>0.05$ ),当相隔时间  $\geq 2$  d 时,有统计学差异 ( $P<0.05$ ) (表 3),即小鼠笼盒内外的相对湿度随着时间的增加等增大。

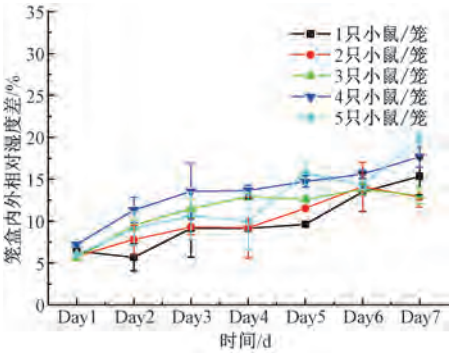


图 2 笼盒内外相对湿度差变化特性  
Fig.2 Humidity variation characteristics inside and outside the cage

表 3 笼盒内外相对湿度差变化情况 ( $\bar{x}\pm s$ )

| 天数   | 笼盒内外相对湿度差/%                                       |            |            |            |            |
|------|---------------------------------------------------|------------|------------|------------|------------|
|      | Humidity difference inside and outside the cage/% |            |            |            |            |
|      | 1 只小鼠/笼                                           | 2 只小鼠/笼    | 3 只小鼠/笼    | 4 只小鼠/笼    | 5 只小鼠/笼    |
| Day1 | 6.40±0.00                                         | 5.80±0.00  | 5.60±0.00  | 7.20±0.00  | 6.00±0.00  |
| Day2 | 5.67±1.63                                         | 7.80±1.73  | 9.53±0.58  | 11.33±1.53 | 9.13±2.00  |
| Day3 | 9.13±3.44                                         | 9.27±0.92  | 11.47±1.10 | 13.53±3.38 | 10.60±2.82 |
| Day4 | 9.13±3.56                                         | 9.20±3.65  | 12.93±0.42 | 13.67±0.61 | 10.00±3.47 |
| Day5 | 9.60±0.20                                         | 11.53±0.12 | 12.60±0.35 | 14.73±0.70 | 15.67±1.33 |
| Day6 | 13.47±2.34                                        | 14.13±2.91 | 13.80±0.60 | 15.60±0.53 | 14.30±0.46 |
| Day7 | 15.33±2.19                                        | 12.87±1.22 | 13.07±1.03 | 17.68±1.26 | 19.87±0.87 |

注:任意两组相比,当相隔时间 = 1 d 时,  $P>0.05$ ;当相隔时间  $\geq 2$  d 时,  $P<0.05$ ,  $n=21$   
Note: Consistency among the groups for humidity was evaluated,  $P>0.05$ , when the interval time was 1 day; while, when the interval time was equal or greater than 2 day,  $P<0.05$ ,  $n=21$

2.3 氨浓度随时间的变化特性

IVC 设备换气次数为 50 次/h,因笼盒具有密封性,测试周期内,设施内的氨浓度  $\leq 5$   $\text{mg}/\text{m}^3$ 。测试结果如图 3 所示:笼盒内外的氨浓度差在第 4 天之前较小,并且笼盒内的氨浓度也相对较低,  $<5$   $\text{mg}/\text{m}^3$ ,而且所有笼盒内的氨浓度相差较小。第 5 天笼盒内的氨浓度急速增高,之后缓慢增加,每组实验之间的氨浓度差异增大,并且在第 5 天时,饲养小鼠为 5 只的笼盒内氨浓度高于 15  $\text{mg}/\text{m}^3$ 。氨浓度测试结果与假定值(每组平均值)对比,均有统计学差异 ( $P<0.05$ ) (表 4),即小鼠笼盒内外的氨浓度与小鼠数量和时间均相关。

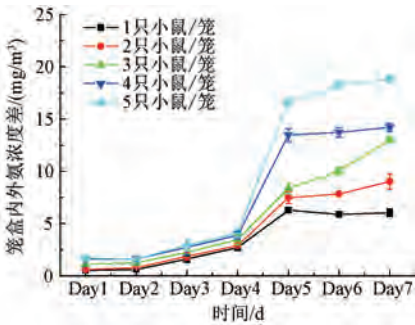


图 3 笼盒内外氨浓度差变化特性  
Fig.3 Ammonia concentration variation characteristics inside and outside the cage



表 4 笼盒内外氨浓度差变化情况 ( $\bar{x}\pm s$ )

Table 4 Ammonia concentration variation characteristics inside and outside the cage( $\bar{x}\pm s$ )

| 天数   | 笼盒内外氨浓度差/(mg/m <sup>3</sup> )                                          |           |            |            |            |
|------|------------------------------------------------------------------------|-----------|------------|------------|------------|
|      | Ammonia concentration inside and outside the cage/(mg/m <sup>3</sup> ) |           |            |            |            |
|      | 1 只小鼠/笼                                                                | 2 只小鼠/笼   | 3 只小鼠/笼    | 4 只小鼠/笼    | 5 只小鼠/笼    |
| 假定值  | 3.38±0.20                                                              | 4.35±0.26 | 5.64±0.28  | 7.32±0.39  | 9.15±0.28  |
| Day1 | 0.52±0.00                                                              | 0.60±0.00 | 1.12±0.00  | 1.60±0.00  | 1.71±0.00  |
| Day2 | 0.60±0.08                                                              | 0.77±0.06 | 1.25±0.17  | 1.61±0.22  | 1.60±0.14  |
| Day3 | 1.61±0.31                                                              | 1.87±0.36 | 2.25±0.26  | 2.74±0.73  | 2.94±0.52  |
| Day4 | 2.70±0.25                                                              | 2.90±0.03 | 3.46±0.46  | 3.88±0.35  | 4.09±0.43  |
| Day5 | 6.28±0.26                                                              | 7.48±0.56 | 8.36±0.52  | 13.47±0.60 | 16.64±0.38 |
| Day6 | 5.88±0.12                                                              | 7.83±0.09 | 10.01±0.38 | 13.72±0.46 | 18.24±0.18 |
| Day7 | 6.03±0.36                                                              | 9.02±0.72 | 13.04±0.18 | 14.20±0.39 | 18.81±0.29 |

注:各组氨浓度值与假定值相比, $P<0.05$

Note:Consistency among the groups for temperature was evaluated,  $P>0.05$

5 所示:

3 讨论

3.1 散热分析

不同国家标准给定的实验动物小鼠散热量如表

表 5 小鼠散热量

Table 5 Mouse's rate of heat emission

5 所示:

表 5 中最小的全热量 0.49 w(ASHRAE)为例,

假设通过笼盒壁面不传热或者传热量可忽略,小鼠

的散热量完全由送风承担,根据热平衡原理计算消

除小鼠散热所需的通风量<sup>[15]</sup>。

| 标准名称     |        | CIBSE GUIDE <sup>[15]</sup> |      |      | ASHRAE <sup>[16]</sup> |      |      | CCAC <sup>[17]</sup> |      |      |
|----------|--------|-----------------------------|------|------|------------------------|------|------|----------------------|------|------|
|          |        | 英国屋宇设备工程手册                  |      |      | 美国采暖、制冷与空调工程师学会        |      |      | 加拿大动物关怀委员会           |      |      |
| 实验动物     | 体质量/kg | 显热 W                        | 潜热 W | 全热 W | 显热 W                   | 潜热 W | 全热 W | 显热 W                 | 潜热 W | 全热 W |
| 小鼠 Mouse | 0.02   | 0.5                         | 0.3  | 0.8  | 0.33                   | 0.16 | 0.49 | —                    | —    | 0.8  |

注:每个笼盒的体积为 7.6 升,最多饲养 5 只小鼠,笼盒的导热系数为 0.35 W/m·K,笼盒表面积约 0.3 m<sup>2</sup>,笼盒的厚度 0.003 m。

Note:The volume of each cage is 7.6 L, maximum number of breeders is 5, the thermal conductivity of the cage box is 0.35 W/m·K, the surface area of the cage box is about 0.3 m<sup>2</sup>, and the thickness of the cage box is 0.003 m.

$$q_m = \frac{Q}{c(t_p - t_o)}$$

式中: $q_m$ —通风量(kg/s)

$Q$ —散热量(kJ/s)

$c$ —空气的质量热容,取  $c = 1.01\text{kJ}/(\text{kg}\cdot\text{K})$

$t_p$ —排出空气的温度(K)

$t_o$ —进入空气的温度(K)

由公式可知,送风量和送排风温差为反比例函

数的关系,送风量越大,温差越小,反之亦然。计算

结果如表 6 所示。

| 表 6 送风量和笼盒内外温差之间的关系                                                                                    |                                  |                          |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Table 6 The link with the air supply volume and the temperature difference inside and outside the cage |                                  |                          |
| 笼盒内换气次数/(次/h)                                                                                          | 送风量: $q_m$ /(kg/s)               | 笼盒内外计算温差/℃               |
| Air exchange rate/(rate/h)                                                                             | Air supply volume: $q_m$ /(kg/s) | Temperature difference/℃ |
| 40                                                                                                     | 0.000101                         | 24                       |
| 60                                                                                                     | 0.000152                         | 16                       |
| 80                                                                                                     | 0.000203                         | 12                       |
| 160                                                                                                    | 0.000404                         | 6                        |

根据以上计算结果可知,当 IVC 笼盒内外的温

差为 6℃时,笼盒内换气次数高达 160 次/h。计

算结果与实际实测值相悖,分析原因可能为:IVC 笼

盒内小鼠的散热量并不完全由送风量承担,其中大

部分热量是以传热和对流的形式通过笼盒壁传到笼

盒外即设施内。

3.2 散湿特性分析

根据湿平衡原理计算消除余湿所需的通风量计算式

$$q_m = \frac{W}{d_p - d_o}$$

式中: $q_m$ —通风量 (kg/s)

- $W$ —余湿量 (g/s) (小鼠散热量)
- $d_p$ —排出空气的含湿量 [g/kg(干空气)]
- $d_o$ —进入空气的含湿量 [g/kg(干空气)]

由公式可知,在小鼠散湿量一定时,笼盒内的相对湿度受通风量和送风相对湿度影响。

3.3 氨浓度扩散特性分析

根据风量平衡原理和污染物质量平衡原理计算稳定状态下所需全面通风量计算式

$$L = \frac{Kx}{y_2 - y_0}$$

- $L$ —全面通风量 ( $m^3/s$ )
- $K$ —安全系数
- $x$ —污染物散发量 (g/s)
- $y_o$ —送风中污染物浓度 ( $g/m^3$ )
- $y_2$ —室内污染物浓度 ( $g/m^3$ )

由上式可知,在小鼠氨气散发量一定时,笼盒内的氨浓度只与送风量有关。

3.4 结论

以上结果中,相对湿度和氨浓度随时间的变化与已公开发表的文献中变化趋势一致<sup>[16]</sup>。

通过实测和理论分析得知,为保证笼盒内的温度满足小鼠生长,需保证设施内的温度在 19~24 ℃ 之间,避免笼盒内温度过高或过低。为保证笼盒内的相对湿度<70%,设备送风的相对湿度建议不超过 55%,需通过控制换气次数来减小笼盒内的氨浓度。

参 考 文 献

[ 1 ] Burn C C, Mason G J. Effects of cage-cleaning frequency on laboratory rat reproduction, cannibalism, and welfare [ J ].

Applied animal behaviour science,2008,**11**( 114 ):235-247.

[ 2 ] Bean K, Nemelka K, Canchola P, *et al.* Effects of housing density on Long Evans and Fischer 344 rats [ J ]. Laboratory animal, 2008,**37**( 9 ):421-428.

[ 3 ] Castelhana-Carlos M J, Baumans V. The impact of light, noise, cage cleaning and in-house transport on welfare and stress of laboratory rats [ J ].Laboratory animals,2009,**43**:311-327.

[ 4 ] Krohn T C, Hansen A K, Dragsted N, *et al.* The impact of cage ventilation on rats housed in IVC systems [ J ]. Laboratory Animals,2003,**37**( 2 ):85-93.

[ 5 ] Krohn T C, Hansen A K. Carbon dioxide concentrations in unventilated IVC cages [ J ]. Laboratory Animals, 2002, **36**: 209-212.

[ 6 ] Krohn T C, Hansen A K, Dragsted N. Telemetry as a method for measuring impacts of housing conditions on rats [ J ].Anim Welf, 2003,**12**:53-62.

[ 7 ] Gaskill B N, Pritchett-Corning K R. Effect of Cage Space on Behavior and Reproduction in CrI: CD ( SD ) and BN/CrI Laboratory Rats [ J ]. Laboratory animal science, 2015,**54**( 5 ): 497-506.

[ 8 ] Reeb-Whitaker C K, Paigen B, Beamer W G, *et al.* The impact of reduced frequency of cage changes on the health of mice housed in ventilated cages [ J ]. Laboratory animal,2001,**35**( 1 ): 58-73.

[ 9 ] Barker T H, George R P, Howarth G S, *et al.* Assessment of housing density, space allocation and social hierarchy of laboratory rats on behavioural measures of welfare [ J ]. PLoS One, 2017,**12**(9):e0185135.

[ 10 ] 施正良,饶江宁.医学实验动物屏障环境内独立通气笼具的安放 [ J ].中国比较医学杂志,2008,**18**( 7 ):60-62.

[ 11 ] 季金星.独立通风笼具两种送风方式的解析 [ J ].中国比较医学杂志,2019,**29**( 1 ):95-100.

[ 12 ] DB32/T972—2006.《实验动物笼器具 独立通气笼盒 (IVC) 系统》[ S ].江苏:江苏省质量技术监督局,2006.

[ 13 ] B 14925—2010.《实验动物 环境及设施》[ S ].北京:中国标准出版社,2010.

[ 14 ] GB 50447—2008.《实验动物设施建筑技术规范》[ S ].北京:中国建筑工业出版社,2008.

[ 15 ] 孙一坚,沈恒根.工业通风 [ M ].北京:中国建筑工业出版社,2010.

[ 16 ] 赵维波,闵凡贵,刘香梅,等.外环境湿度和换气次数对独立通风笼盒微环境湿度和氨浓度的影响 [ J ].中国比较医学杂志, 2014,**24**( 8 ):36-40.



## Analysis of Heat and Mass Transfer inside the Individual Ventilated Cage

ZHANG Jianping, FU Jiangnan

(Institution of Laboratory Animals, Jinan University, Guangzhou 510623, China)

**Abstract: Objective** To effectively control the environmental comfort of in the individual ventilated cages (IVC), to ensure the survival and health of the experimental animals in the cage, to test the temperature, humidity and ammonia concentration in the cage, and to analyze the heat and mass transfer mechanism in the cage, and provide reference for the control of living environment (closed building space and equipment) of experimental animals. **Method** Seventy-five mice were randomly divided into 5 groups, and each group was randomly divided into 5 groups according to the number of 1 to 5 increments. They were kept in the same IVC equipment, and the temperature, humidity and ammonia concentration in the cage were tested for 7 consecutive days. **Result** With the increase of the number of days, the temperature difference between the cage and the room was basically the same, the relative humidity difference and the ammonia concentration difference gradually increased. At the same time, the ammonia concentration difference inside and outside the cage was significantly different from the number and duration of the animals ( $P < 0.05$ ), if the case have more animals and feed longer time, the greater the difference in ammonia concentration. **Conclusion** The temperature inside the IVC cage is greatly affected by the temperature in the facility. The relative humidity is mainly related to the relative humidity of the supply air and the number of air changes. The ammonia concentration is related to the number of air changes and the number of animals.

**Key words:** animal facilities; IVC; temperature; humidity; ammonia concentration

---

(上接第 70 页)

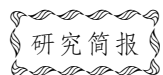
## A New Method is Simple and Easy to Extract the Cerebrospinal Fluid in Mice

GUI Qing, CHEN Biyu, LIU Hanchen, HUANG Nianlai, CHEN Zhenlei, LIN Zhaohua, ZHOU Changwen

(Fujian Medical University, Fuzhou 350122, China)

**Abstract: Objective** To establish a simple method for drawing out the CSF of mice and provide references for relative researches. **Method** First place the mouse in the position that the head forms  $120^\circ$ , shave the skin and separate the subcutaneous tissue and muscle bluntly. As a result, the dura mater of the cisterna magna appears clearly. Penetrate the white dura mater and then reach the cerebellomedullary cistern by the capillary tube. Obtain the CSF and withdraw the tube. Finally, suture the mouse. **Result** 2—5  $\mu\text{L}$  CSF samples can be collected successfully with mice survived. **Conclusion** Compared with others, the method we established is proved to be with cheaper material, higher success rate and survival rate.

**Key words:** mouse; Cerebrospinal fluid; method



# 实验动物设施运行中“三废”管理

卢 静 孟 霞 陈柏安

(首都医科大学实验动物部,北京 100069)

**摘要:**实验动物设施是指用于实验动物生产和实验的建筑物及设备的总和。实验动物设施运行过程中产生的废物、废水和废气(简称“三废”)等会污染环境,然而目前对“三废”进行合理有效管理的机制尚不完善。本文将对实验动物设施“三废”管理中涉及的问题进行探讨,以期能为建立合理的“三废”管理机制提供可行方案。

**关键词:**实验动物设施;“三废”;管理

**中图分类号:** Q95-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0077-04

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.018

实验动物设施是开展实验动物饲养和动物实验的建筑物及设备的总和。随着人民对美好环境的更高期待及国家对环保工作的高度重视,实验动物行业工作者应深入思考实验动物设施的建设规范及环保管理措施。实验动物设施运行过程中产生的废物、废水和废气(简称“三废”)以及噪声等会造成环境污染,然而如何对实验动物设施运行中产生的“三废”进行有效管理尚不完善。本文就实验动物设施运行管理过程中的“三废”管理进行初步探讨。

## 1 实验动物设施运行中“三废”处理现状

在实验动物设施建设和运行过程中已经注意到了环境保护的重要性,尤其是对于实验动物尸体的处理各单位都非常重视,基本能够做到统一收集并进行无害化处理。然而在其它方面虽然也有措施,但是处理方法和效果仍不理想。实验动物饲养过程产生大量的污垫料,一些设施能够做到像管理动物尸体一样交由专业机构进行无害化处理,但是由于需要较大的花费,因此有些设施采取掩埋等方式进行处理。对于废水,主要是排放到化粪池中,利用沉淀和厌氧发酵的原理去除污水中悬浮性有机物,然后排放到城市排污系统。对于废气,前些年有相当一批设施安装了活性炭吸附装置解决废气污染的问题,然而通过实践发现由于实验动物设施是全新风,

且换气次数多,排气量大,因此活性炭需要频繁更换,导致这种废气处理装置不能持续运行,很多都成为摆设。近几年有个别单位关注到废气排放对周围居民的影响,因而采用了生物除味技术等更有效和实用的设备。实验动物设施运行尽管考虑了“三废”处理,也已有一些经验和教训,但仍不能系统、标准和科学地解决实验动物设施运行的环保问题。

## 2 实验动物设施运行中“三废”分析及管理措施

### 2.1 固体废物

**2.1.1 污染源分析:**实验动物设施运行中固体废弃物主要有污垫料、粪便和动物尸体,还包括使用过的注射器针头、刀片等利器。

**2.1.2 标准及内容:**《中华人民共和国固体废物污染环境防治法》<sup>[1]</sup>规定:产生固体废物的单位和个人,应当采取措施,防止或者减少固体废物对环境的污染。收集、贮存、运输、利用、处置固体废物的单位和个人,必须采取防扬散、防流失、防渗漏或者其他防止污染环境的措施;不得擅自倾倒、堆放、丢弃、遗撒固体废物。禁止任何单位或者个人向江河、湖泊、运河、渠道、水库及其最高水位线以下的滩地和岸坡等法律、法规规定禁止倾倒、堆放废弃物的地点倾倒、堆放固体废物。从事畜禽规模养殖应当按照国

家有关规定收集、贮存、利用或者处置养殖过程中产生的畜禽粪便,防止污染环境。国家实行工业固体废物申报登记制度。产生工业固体废物的单位必须按照国务院环境保护行政主管部门的规定,向所在地县级以上地方人民政府环境保护行政主管部门提供工业固体废物的种类、产生量、流向、贮存、处置等有关资料。

**2.1.3 管理措施:** 固体废物应分类收集,动物尸体包装后放置在冰柜中贮存,动物尸体应有专用且便于使用的包装袋。尤其要注意两个重要的特性,一是包装袋应坚固耐用,避免搬运处理过程中袋体开裂;二是有隔水性,防止动物体液的渗漏。污垫料用医疗废物专用袋包装后放入废物运输箱,存放在远离动物饲养室的贮存室。口罩、帽子等一次性物品使用后装入垃圾袋。大动物室实验区的所有垃圾均属医疗废弃物范畴,采用统一的医疗废弃物垃圾袋装填。使用过的注射器针头、刀片等利器放入一次性利器盒。一并暂存在污物贮存室。贮存室中的所有固体废物交由专业机构处理,并将处理类别和数量登记备案。

感染动物实验室固体废物按生物安全实验室管理相关规定进行无害化处理后按上述方法管理。

2.2 废水

**2.2.1 污染源分析:** 主要是实验动物饲养的清洗废水,以及动物实验设施还有一些试剂或药物的废液。

**2.2.2 标准及内容:** 主要包括有北京市地方标准《水污染物排放标准》DB 11/ 307—2005、《医疗机构水污染物排放标准》GB 18466—2005<sup>[2]</sup>;针对畜禽养殖污染,我国先后发布了《畜禽养殖业污染物排放标准》(GB 18596—2001)、《畜禽养殖业污染防治技术规范》(HJ/T 81—2001)、《畜禽养殖污染防治管理办法》(国家环境保护总局令第 9 号)等文件。国家颁布的《畜禽养殖业污染物排放标准》(GB 18596—2001)文件中 针对养殖废水排放标准要求:畜禽养殖废水不得排入敏感水域和有特殊功能的水域。排放去向应符合国家和地方的有关规定。北京市污水排放的三类标准即:COD<sub>Cr</sub> ≤ 100 mg/L、BOD<sub>5</sub> ≤ 30 mg/L、pH:6~9、SS ≤ 80 mg/L、NH<sub>3</sub>-N ≤ 15 mg/L。

**2.2.3 管理措施:** 废水主要由洗刷污水、尿液、饲料残渣、夹杂粪便及圈舍冲流水,含有大量的污染物(包括微生物、悬浮物、有机物),直接排放到化粪池,

处理后集中排入城市排污管网。实验室废液分为一般化学废液、剧毒化学废液、废旧化学试剂、废旧剧毒化学试剂,由专职的管理人员按要求分类将废液收集统一存放管理,交由北京市指定的机构运走处理<sup>[3]</sup>。大动物实验室产生的废液包括实验过程中通过负压吸引器从动物体内吸取的血液、体液等废液,在冰柜内经过长期的尸体存储过程积存下的大量已冻结的尸体废液。这些废液可通过稀释倾倒至普通污水管道中。

生物安全二级感染动物实验室污水先加入 84 消毒液处理 24 h,排入集水坑池,集水坑池定期加入二氧化氯进行消毒处理,处理后的废液排入化粪池。

2.3 废气

**2.3.1 污染源分析:** 实验动物设施是饲养实验动物的场所,实验动物时刻都会向周围环境排放废气。这些废气不仅包括动物呼出的二氧化碳,也包括动物正常代谢所产生的氨、硫化氢等多种臭味气体。如果处理不当,这些废气就会给周围环境带来污染,轻者刺激人的嗅觉器官引起不悦,重者则可引发人的头痛、恶心、眼角膜和呼吸道炎症等,影响人的身心健康。

**2.3.2 标准及内容:**《恶臭污染物排放标准》(GB14554-93)

| 表 1 《恶臭污染物排放标准》(GB14554-93)                    |      |       |
|------------------------------------------------|------|-------|
| Table 1 Emission standards for odor pollutants |      |       |
| 单位:mg/m <sup>3</sup>                           |      |       |
| 序号                                             | 控制项目 | 一级    |
| 1                                              | 氨    | 1.0   |
| 2                                              | 三甲胺  | 0.05  |
| 3                                              | 硫化氢  | 0.03  |
| 4                                              | 甲硫醇  | 0.004 |
| 5                                              | 甲硫醚  | 0.03  |

**2.3.3 管理措施:** 按照实验动物国家标准合理安排实验动物饲养密度,室内排风口安装初效过滤,并定期清洁和更换。如果使用 IVC 饲养设备,需注意定期清洗更换机器所带滤材,在设施总排风口安装除味装置。

感染动物实验室负压饲养设备排风口和设施排风口安装高效过滤设施进行除菌<sup>[4]</sup>。

3 “三废”处理相关技术

3.1 活性炭吸附法

吸附是物质(主要是固体物质)表面吸住周围

介质(液体或气体)中的分子或离子现象。利用多孔性固体吸附剂处理气态污染物,使其中的一种或几种组分,在分子引力或化学键力的作用下,被吸附在固体表面,从而达到排除的目的。利用吸附原理最简单方便的材料是活性炭。活性炭具有较高的效率,但活性炭吸附到一定量时会达到饱和,就必须再生或更换,因此对于排气量大的实验动物设施,运行管理较繁琐。这种方法常用于低浓度废气和脱臭的后处理。

### 3.2 低温等离子体技术

等离子体是继固态、液态、气态之后的物质第四态,当外加电压达到气体的放电电压时,气体被击穿,产生包括电子、各种离子、原子和自由基在内的混合物。低温等离子体降解污染物是利用这些高能电子、自由基等活性粒子对废气中的污染物作用,使污染物分子在短时间内发生分解而去除污染物。该方法处理效果好,运行费用低、无二次污染。

### 3.3 紫外光催化氧化法

废气的紫外光解催化氧化机理包括两个过程:一是在产生高能离子群体的过程中,一定数量的有害气体分子受高能作用,本身分解成单质或转化为无害物质。二是含有大量高能粒子和高活性的自由基的离子群体,与分子气体(如  $\text{H}_2\text{S}$ 、甲苯等)作用,打开了其分子内部的化学键,转化为无害物质。紫外光催化是常温深度反应技术。光催化氧化可在室温下将水、空气和土壤中有有机污染物氧化成无毒无害的产物<sup>[5]</sup>。

### 3.4 混凝法

混凝法是化学沉淀法中最重要的一种方法,常用的混凝剂有硫酸铝、氯化铁和聚合氯化铝。混凝法是借助于混凝剂对胶体离子的静电中和、吸附、架桥等作用使胶体离子脱稳,在絮凝剂的作用下,发生絮凝沉淀以去除污水中的悬浮物和可溶性物质。混凝法具有工艺可靠、处理效率高、设备简单、运行稳定易管理等优点。混凝过程沉降受 pH 值影响较大,而且过程中产生大量的沉淀,需要定期处理污泥<sup>[6]</sup>。

### 3.5 复合紫外光催化氧化法

医药废水具有组成复杂、水量和水质变化大、色度高、需降解物质浓度高等特点。通过吸附—混凝—紫外光催化氧化相结合的方法处理医药废水,效果显著,其 COD (Chemical Oxygen Demand, 化学

需氧量)、色度去除率分别为 99.1%、100%,出水水质达到医药行业废水二级排放标准<sup>[7]</sup>。

### 3.6 生物除臭法

生物除臭法是通过微生物的生理代谢将具有臭味的物质加以转化,达到除臭的目的。目前国内外生物法处理废气的方法有很多,主要有土壤脱臭法、生物滤池法和生物滴滤塔等,治理效果较好。生物处理法包括三个步骤:第一, VOC (volatile organic compounds, 挥发性有机化合物) 废气中的污染物溶于水,迅速得到溶解;第二,当液态浓度较低时,液膜中的有机物会逐渐进行扩散,最终扩散到生物膜中,从而被生物膜中吸附的微生物吸收;第三, VOC 废气中的有机废气被微生物吸收后,通过微生物自身的生理过程,就会逐渐被降解与转化,最后转化为简单的无机物<sup>[8]</sup>。

### 3.7 厌氧-好氧生化法

针对规模化养殖设施,废水可以处理与利用相结合。废水处理的技术为:固液分离—水解酸化—厌氧消化—好氧生化—生化过滤四级处理过程,废水经过处理后,符合《畜禽养殖业污染物排放标准》GB18596—2001 标准,实现达标排放。从回收利用的角度,按此技术处理后的水也可以浇灌附近农田(满足《农田灌溉水质标准》GB5084—92);厌氧产生的沼气作燃料使用及综合利用,固液分离出的物质可以加工成颗粒肥料和液体肥料;亦可作景观水、冲洗水等综合利用,整个过程既解决废水治理问题,又综合利用有用资源,具有良好的环境效益和经济效益<sup>[9]</sup>。

### 3.8 二氧化氯发生器

二氧化氯 ( $\text{ClO}_2$ ) 是目前国际上公认的新一代广谱强力杀菌剂、高效氧化剂和优良漂白剂,为世界各国所广泛采用。世界卫生组织 (WHO) 将其定为 1A 级安全消毒剂。我国国家环保总局及原化工部等部门先后制定了《化学法二氧化氯发生器认定技术条件》、《稳定态二氧化氯溶液化工行业标准》、《食品添加剂稳定态二氧化氯溶液化工行业标准》。二氧化氯发生器反应原理:将一定浓度或饱和盐液加入电解槽阳极室,同时将清水加入电解槽阴极室,接通 12 V 直流电源开始电解,即可产生二氧化氯、氯气、双氧水等混合消毒剂,经水射器负压管将气体吸入水中消毒。

### 3.9 实验动物垫料回收系统

实验动物垫料回收系统是通过负压吸管将污

垫料通过密闭管道输送到设施外,在垫料回收容器内可安装消毒设备,防止污垫料中的微生物污染。

国务院《关于加快推进生态文明建设的意见》,进一步明确了生态文明建设的总体要求、目标愿景,指出“绿色”一词的理解,大力推进绿色发展,倡导绿色生活,推进绿色城镇化,发展绿色产业,实现生活方式绿色化等,与新型工业化、城镇化、信息化、农业现代化“四化”并提,形成“新五化”<sup>[10]</sup>。实验动物科学是生命科学研究不可或缺的组成之一,实验动物设施的建设与管理既是实验动物科学的重要内容,也是保障科学研究的必要条件,实验动物设施的管理应与时俱进,树立生态文明价值观和科学发展观,在保障生命科学发展的同时保障绿色环境。“三废”的科学管理不仅是为了实现“绿色化”,也是安全管理的范畴,是安全管理的重要内容之一。随着实验动物设施规模的扩大和对设施建设的投入不断增长,对实验动物设施运行的安全管理工作也提出了更高的要求。

## 参 考 文 献

- [1] 《中华人民共和国固体废物污染环境防治法》第四次修订,2016年11月7日第十二届全国人民代表大会常务委员会第二十四次会议通过
- [2] 《水污染物排放标准》DB11/307—2005.
- [3] 郭卫,王磊,赵志强,等.医学院校实验室危险有害废弃物的精细化管理实践[J].中国医疗设备,2015,**30**(12):160-162.
- [4] 薛康宁,李晓燕,荣蓉,等.动物生物安全二级实验室实验活动管理要点探讨[J].实验动物科学,2014,**31**(5):42-45.
- [5] 李佳,缪伟.医药车间废气的净化处理[J].化工与医药工程,2016,**37**(3):58-62.
- [6] 赵玉军,污水处理工艺方法的研究现状与进展[J].山东化工,2010,**39**(9):24-27
- [7] 黄新文,石建敏,何志桥,等.吸附—混凝—紫外光催化氧化法处理医药废水的研究[J].化工环保,2003,**23**(2):66-70.
- [8] 叶冬竹,对VOC废气处理技术的相关探讨[J].广东化工,2016,**43**(14):185-186.
- [9] 周立平,高程达,刘克锋.畜禽养殖废水处理技术的研究探讨[J].湖南饲料,2017,(2):28-30.
- [10] 周骥平,张键,何朝龙,等.综合性大学实验室“三废”治理探讨[J].实验技术与管理,2016,**33**(6):216-220.

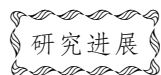
## Discussion of the Management for “three Wastes” Generated by Laboratory Animal Facility

LU Jing, MENG Xia, CHEN Baian

(Laboratory Animal Resource Center, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

**Abstract:** The laboratory animal facility is the sum of the buildings and equipment used for the production and research experiments of laboratory animals. The waste materials, waste water and waste gas (called “three wastes”) generated during the process of laboratory animal facility will pollute the environment, however, the mechanism of reasonable and effective management for the “three wastes” is still not developed yet. In this paper, we will discuss the problems involved in the management for “three wastes” of the laboratory animal facility, in order to provide a feasible plan for establishing a reasonable “three wastes” management mechanism.

**Key words:** laboratory animal facility; “three wastes”; management



# 猫遗传多态性的研究进展<sup>\*</sup>

贾松华 岳秉飞

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

**摘要:**实验用猫自 19 世纪末用于科学研究, 现已广泛用于医药研发等各个领域, 并作为人类遗传性疾病和感染性疾病的动物模型越来越受重视。猫的质量(尤其是遗传质量)对研究结果的准确性、重复性以及科学性有重要的影响。定期开展遗传质量检测, 可有效避免实验用猫的种质退化、遗传漂移, 减少实验结果误差等。随着生化标记和 DNA 分子标记的出现, 为了解猫的遗传结构提供了更为简便可靠的方法。本文主要就生化标记和 DNA 分子标记在研究猫的遗传结构和多态性中的研究现状以及存在的问题进行了探讨。

**关键词:**猫; DNA 分子标记; 生化标记; 遗传多态性

**中图分类号:** S829.3    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0081-05

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.019

猫(cat; *feliscatus*) 属于哺乳纲、食肉目、猫科、猫属动物。染色体数为  $2n=38$ 。据考古发现<sup>[1]</sup>, 人类对猫的驯化可追溯到大约 9500 年前; 之后, Driscoll 等<sup>[2]</sup> 和 Lipinski 等<sup>[3]</sup> 分别对猫的群体结构进行了分子遗传学分析, 发现人类对猫的驯化始于地中海东部沿岸地区。过去, 由于农业和交通运输的需要, 人类对牛、羊、马等进行了驯化。但对人类而言, 猫并没有直接的经济意义或者社会意义, 只是作为驱逐捕杀危害鼠类的工具。所以猫并没有被完全的驯化, 仍保留一定的野性<sup>[4-5]</sup>。直至一百多年前, 人类才根据猫的毛色、毛发长短、体型等特征进行人工筛选, 培育遗传背景明确的品种猫<sup>[6-7]</sup>。目前, 猫分为家猫和品种猫两大类。家猫是家庭豢养猫的统称, 一般是随机交配的猫。品种猫是指经培育而成, 每个品种猫都具有特定的遗传特征<sup>[8]</sup>。美国两个最大的猫网站系统 CFA (the Cat Fanciers' Association), TICA (The International Cat Association) 在 2018 年登记的品种猫种类分别为 42 种, 38 种。另外, 可将品种猫简单地分为长毛猫和短毛猫。其中短毛猫宜作为实验用猫, 因为长毛猫易污染实验环境、实验操作不便, 且体质较弱, 实验耐受性差<sup>[9]</sup>。

猫作为实验用动物始于 19 世纪末。在神经学、药理学、心血管系统等研究方面, 实验用猫具有其他实验动物无法比拟的优势<sup>[10]</sup>。比如, 猫有极其敏感的神经系统, 是研究脑神经生理学的绝好实验动物<sup>[8]</sup>; 它的血压最为稳定, 《中国药典》明确指出猫在药品检验中用于降压物质的检查<sup>[11]</sup>。与鼠科动物模型相比, 猫体型大, 长寿(一般为 12~30 年), 具有与人类更相似的生理学特征, 这些优点使猫更适合检测某些治疗方法的安全性和有效性<sup>[9, 12]</sup>。随着人类对品种猫的定向筛选培育, 越来越多与人类同源的猫遗传性疾病被发现。目前确定的猫遗传性疾病已超过了 250 种, 其中包括在波斯猫 (*Persian cats*) 中发现的多囊性肾病 (PKD), 以及在德文莱克斯猫 (*Devon Rex cats*) 中观察到的先天性肌肉萎缩症。猫为研究人类很多罕见的遗传疾病提供了宝贵的动物模型<sup>[13-16]</sup>。同时, 患有某些感染性疾病的猫是人类很好的自然动物模型。在研究人类获得性免疫缺陷综合征 (AIDS) 中, 转基因鼠和猫免疫缺陷是目前运用最多的非灵长类动物模型。感染有冠状病毒 (FeCoV) 的猫可用于研究 SARS 的临床症状<sup>[12, 17-20]</sup>。

综上所述, 猫用于科学实验具有一定的现实意

收稿日期: 2018-12-11

<sup>\*</sup> 基金项目: 北京市科技计划“实验用猫地方标准及相关检测技术标准研究”(No.D171100002717001)

作者简介: 贾松华 (1992—), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 分子遗传学。E-mail: 1870070105@qq.com

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

义。但与此同时,我国也面临着实验用猫紧缺的问题<sup>[21]</sup>。目前我国实验用猫多数购自市场,经隔离检疫、严格筛选后使用;目前为止,我国 90% 以上的教学科研实验用猫都是从商贩或“收购型饲养场”购买。其来源混杂,遗传背景模糊,所携带微生物不明等情况,对实验结果的准确性、科学性以及重现性都有直接影响<sup>[5, 21-22]</sup>。为了提高实验用猫的质量,使其更易于科研和生产,近年来我国一些单位对供实验使用的猫进行了专门的繁殖饲养。比如,华北制药厂定向培育成了虎皮猫<sup>[23]</sup>;自 2003 年大连医科大学也开始了猫的饲养繁育<sup>[24]</sup>。在对实验用猫进行专门饲养时,我们有必要对猫的遗传方面进行一定的检测。这样才能合理利用猫资源,为培育实用的实验猫群体提供科学的依据。本文主要就生化标记和 DNA 分子标记在猫的遗传检测中的现状以及存在的问题进行了探讨。

## 1 生化标记

生化标记是以生物在蛋白质水平上表现出的遗传多态性为依据,分析群体的遗传结构,进而反映生物的变异程度。此方法的特点是操作简单、成本低,方法成熟稳定。我国已将近交系大、小鼠的生化标记检测作为常规监测列入国家标准。

关于猫的生化标记研究最早始于 Thuline 等<sup>[25]</sup>,观察到 6-PGD(六磷酸葡萄糖脱氢酶)呈现多态性,并且 Kohn 和 Tamarin<sup>[26]</sup>验证了 Thuline 的研究结果。随后的科学研究发现:GPI(磷酸葡萄糖异构酶)、ESD(酯酶 D)在某些品种猫中也具有多态性<sup>[27-29]</sup>。Altunok 等<sup>[30]</sup>从 Van cats 和其他品种猫的对比分析中得到:Van cats 的平均杂合度为 0.33 ~ 0.49;并依据系统发生树的结果得出,该猫与暹罗猫、孟买猫存在明显不同;6-PGD、ME(苹果酸酶)和 ESD 在该研究的全部猫中均呈现多态性,其中 PGD 的多态性最强,而 ME 是该研究最新发现的多态性蛋白。

从上述研究现状看,在用生化标记分析猫的遗传多态性时,其多态性位点极其有限,易受发育状况、实验条件等影响,限制了其在猫中的应用。很有必要开发其他方法分析猫的遗传多态性。

## 2 DNA 分子标记

DNA 多态性是指不同物种或者同一物种不同

个体间核苷酸序列的变异,在自然界中广泛存在。以生物个体之间的 DNA 差异为标记,即分子生物学标记(简称分子标记)。目前,发现的 DNA 多态性包括限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)、微卫星 DNA(microsatellite DNA, STR)、单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)。分子标记已成了近年现代遗传标记学发展最快的领域之一。对 DNA 多态性的研究,让我们更加精确直接地分析群体的遗传多态性,同时弥补了蛋白质多态性位点不足的缺点。该研究为生物的物种鉴别、群体多态性分析、遗传图谱构建开辟了一条崭新的道路。下文对几种 DNA 多态性的研究现状进行了综述。

### 2.1 限制性片段长度多态性

20 世纪 80 年代初人们便开始了 RFLP 的研究,该技术以 DNA-DNA 为基础的 Southern 杂交为依托,是遗传检测早期应用比较多的方法。Suzuki 等<sup>[31]</sup>用 12 种限制内切酶分析了西表山猫和豹猫的 rDNA,与西表山猫属于西表岛本土猫的假说不同,他认为豹猫是从陆地迁至岛上的亚种,与 Masuda 等<sup>[32]</sup>的观点一致。Yuhki 和 O'Brien<sup>[33]</sup>利用鼠和人的分子探针对猫的 MHC 基因(即 FLA)进行内切酶分析,成功绘制了猫 B2 染色体上的 FLA 遗传图谱。Kuwahara 等借助 PCR-RFLP 将猫 FLA 中的 DRB 基因进行了分型,并以此作为参考标准进行猫的皮肤移植实验,发现 DRB 分型对猫移植免疫反应,自身免疫的易感性等研究具有重要的参考意义<sup>[34-35]</sup>。RFLP 技术的多态性位点丰富、重复性好且稳定性强,是进行群体遗传多态性分析的有效工具,但操作繁琐、需要的样本量大等缺点制约了它的应用。

### 2.2 微卫星多态性

微卫星 DNA(microsatellite DNA)又称为短串联重复序列(short tandem repeat, STR)由核心序列和两侧保守的侧翼序列两部分组成。在微卫星中存在的短串联重复序列(一般重复单位为 1~6 bp)构成了核心序列部分,这是 STR 具有高度多态性的遗传基础;而两侧保守的侧翼序列将 STR 特异性地定位于染色体的固定位置,从而使 STR 多态性用于遗传多态性分析具有可行性。有关微卫星的报道最早见于 1974 年 Skinner 等<sup>[36]</sup>对寄居蟹基因组的研究。科学家们之后的发现表明,微卫星 DNA 在真核生物基因组中广泛存在,并且几乎分布于染色体的所有区域。除此之外,STR 呈现丰富的 DNA 多态性,遵



循孟德尔共显性遗传,在相关的物种间具有一定的通用性和保守性。进而,微卫星 DNA 在犬,牛,马,猫等<sup>[37-40]</sup>动物的科学研究中得到了广泛应用。

Menotti-Raymond 等<sup>[41]</sup>筛选了 11 个 STR (四核苷酸重复,彼此无连锁关系,并呈现高度的杂合性)用于识别猫个体,鉴定亲子关系。Coomber 等<sup>[42]</sup>认为这组 STR 体系在法医鉴定中具有很好的稳定性和可信度。Lyons 等<sup>[43]</sup>在猫 B1 染色体上找到了 8 个与虎斑毛色连锁的 STR 位点,其中,FCA700 的连锁性最强。Filler 等<sup>[44]</sup>采用 38 个 STR 位点,对塞丝克猫群体的观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度  $H_e$ 、近交系数( $F_{is}$ )等进行了遗传分析。Filler 等认为,赛丝克猫属于波斯猫品系家族,且该种群的遗传多态性丰富。微卫星遗传标记的另一个重要用途即是:猫品系分类。Lipinski 等<sup>[3]</sup>通过 38 个 STR (两个四核苷酸重复,36 个二核苷酸重复)将所研究的猫分成了 20 个品系;但鉴于该组 STR 体系分析另外四个种群时缺乏充足的证据,因此本次实验有四个种群并未进行品系划分。而 Menotti-Raymond<sup>[45]</sup>用 11 个四核苷酸重复的 STR 将 1 040 只猫分成了 17 个品系,仍有 20 个种群因证据不足无法进行品系划分。不难发现,四核苷酸重复的 STR 没有二核苷酸重复的 STR 区分品系的效果好。近年来对 STR 的科学研究发现,用微卫星多态性分析遗传多态性是一种比较理想的方法,检测方法方便、省时,但微卫星 DNA 筛选和检测的复杂过程是研究中很大的制约因素。

### 2.3 单核苷酸多态性

单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphisms, SNPs)是继 RFLP、STR 之后的第三代 DNA 遗传标记。与之前研究的 RFLP、STR 不同,SNP 不再凭借 DNA 片段的长度差异反应 DNA 的多态性,而是根据基因组水平上单个核苷酸的变异表述 DNA 的多态性。SNP 是一种二等位基因标记,在群体中只有两个等位基因的基因,所以可通过简单的“+/-”进行基因分型,更易于实现其在检测、分析中的自动化。另外,它的分布密度以及数量都多于 STR、遗传稳定性强并具有代表性,从而可以得到更全面、详细的全基因扫描数据<sup>[46]</sup>。目前对 SNP 的研究仍处于探索阶段,其应用范围主要集中于法医、疾病和群体遗传学等方面。

Sato 等<sup>[47]</sup>借助不同动物毛发的结构特点以及动物的 SNP 多态性对不同的动物进行区分,为法医

鉴定和濒危物种的保护提供了新的思路。Peterschmitt 等<sup>[48]</sup>在研究挪威森林猫时,发现了一个与琥珀毛色连锁的 SNP。家猫对欧洲野猫的基因渗入问题一直备受关注。曾有研究用 STR 对家猫和野猫的遗传结构进行了对比分析,但 STR 在分辨它们的杂交后代时存在局限性<sup>[49-51]</sup>。Nussberger 等<sup>[52]</sup>利用 48 个 SNP ( $F_{st}>0.8$ ) 分析了家猫,野猫以及它们的杂种、回交后代的遗传结构。筛选的 48 个 STR 能有效地区分杂交的 F1, F2 代;并且对评价野猫的基因渗入率,理解杂交过程均有帮助。Mullikin 等<sup>[17]</sup>绘制了高密度的 SNP 图谱,并发现了 94 个新的 SNPs。

从近年对 SNP 的研究情况来看,有些 SNP 的检测方法成本低、但速度慢、不适合自动化分析;有些方法可实现自动化高通量检测、但制备探针昂贵、准确度不高。综上所述,目前我们距离灵敏准确、高通量、简单易行的 SNP 检测方法仍有一段距离要努力探索。

### 3 结语

猫在生物医学研究,制药业等研究领域具有举足轻重的分量。而猫的质量对研究结果的准确性,重复性以及科学性有着重要的影响。在控制实验用猫质量方面,遗传质量是最主要,最为本质性的影响因素。定期开展猫的遗传质量检测,可有效避免实验用猫的种质退化、遗传漂移,减少实验结果误差,指导群体的遗传育种,最大程度地应用猫资源。经历了 50 多年的发展历程,有关猫的遗传质量检测已从染色体水平提升到了 DNA 分子水平<sup>[16]</sup>。目前,国外开发了很多分析猫遗传性疾病和性状(比如毛色)的遗传检测方法,为猫的育种工作者和兽医提供了有效的指导意见。比如,宾夕法尼亚大学等<sup>[13]</sup>研究机构已将猫的遗传检测实现了商业化应用。但我国目前尚未出台实验用猫遗传质量的国家标准,各地方也没有成熟的实验用猫遗传质量地方标准。随着国内大专院校,药品生产企业以及检定机构对实验用猫使用量的增加,建立符合我国目前研究水平和应用要求的实验用猫遗传质量标准和遗传质量检测方法势在必行。随着分子生物学技术的快速发展,相信我国对猫遗传结构的检测分析将会更加完善,更多更有效的分子标记技术将会应用于猫的遗传质量检测中。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Vigne J D, Guilaïne J, Debue K, *et al.* Early taming of the cat in Cyprus [ J ]. Science ( New York, NY ), 2004, **304** ( 5668 ): 259.
- [ 2 ] Driscoll C A, Menottiraymond M, Roca A L, *et al.* The Near Eastern Origin of Cat Domestication [ J ]. Science ( New York, NY ), 2007, **317**(5837): 519-523.
- [ 3 ] Lipinski M J, Froenicke L, Baysac K C, *et al.* The ascent of cat breeds: genetic evaluations of breeds and worldwide random-bred populations [ J ]. Genomics, 2008, **91**(1): 12-21.
- [ 4 ] Spencer P B S, Yurchenko A A, David V A, *et al.* The Population Origins and Expansion of Feral Cats in Australia [ J ]. Journal of Heredity, 2015, **107**(2): 104-114.
- [ 5 ] 钟品仁. 哺乳类实验动物 [ M ]. 北京: 人民卫生出版社, 1987: 305.
- [ 6 ] Hasan A, Razib K, Grahm R A, *et al.* Extent of Linkage Disequilibrium in the Domestic Cat, *Felis silvestris catus*, and Its Breeds [ J ]. PloS one, 2013, **8**(1): e53537.
- [ 7 ] Morris D. Cat world: a feline encyclopedia [ M ]. 1997, England, Ebury Press.
- [ 8 ] 邹移海, 徐志伟, 苏钢强. 实验动物学 [ M ]. 北京: 科学出版社, 2004: 103.
- [ 9 ] 李凤奎. 实验动物学 [ M ]. 郑州: 郑州大学出版社, 2001: 49.
- [ 10 ] 衣帅. 猫微卫星 DNA 标记遗传检测方法的建立及对虎皮猫群体遗传结构的分析 [ D ]; 长春: 吉林大学, 2013.
- [ 11 ] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2010 年版. 二部 [ M ]. 北京: 中国医药科技出版社, 2010: 附录 103.
- [ 12 ] Menotti-Raymond M, O'brien S J. The Domestic Cat, *Felis catus*, as a Model of Hereditary and Infectious Disease [ M ]. Humana Press, 2008.
- [ 13 ] Traas A M, Casal M, Haskins M, *et al.* Genetic counseling in the era of molecular diagnostics [ J ]. Theriogenology, 2006, **66** ( 3 ): 599-605.
- [ 14 ] Narfström K, Deckman K H, Menottiraymond M. Cats: a gold mine for ophthalmology [ J ]. Annual review of animal biosciences, 2013, **1**(1): 157-177.
- [ 15 ] Malik R. Genetic diseases of cats [ J ]. Journal of Feline Medicine & Surgery, 2001, **3**(2): 109-113.
- [ 16 ] Lyons L A. Genetic testing in domestic cats [ J ]. Molecular & Cellular Probes, 2012, **26**(6): 224-230.
- [ 17 ] Mullikin J C, Hansen N F, Shen L, *et al.* Light whole genome sequence for SNP discovery across domestic cat breeds [ J ]. BMC genomics, 2010, **11**(1): 406.
- [ 18 ] Nicholas F W. Online Mendelian Inheritance in Animals (OMIA): a comparative knowledgebase of genetic disorders and other familial traits in non-laboratory animals [ J ]. Nucleic Acids Research, 2003, **31**(1): 275-277.
- [ 19 ] Pontius J U, Mullikin J C, Smith D R, *et al.* Initial sequence and comparative analysis of the cat genome [ J ]. Genome research, 2007, **17**(11): 1675-1689.
- [ 20 ] 夏祖昌, 魏征, 徐立然. 非灵长类艾滋病动物模型的研究现状 [ J ]. 中国组织工程研究, 2008, **12**(42): 8362-8365.
- [ 21 ] 刘明慧, 袁宝, 陈健, 等. 猫实验动物标准化的研究进展及探讨 [ J ]. 吉林畜牧兽医, 2015, **36**(2): 29-30.
- [ 22 ] 方远书, 何忠平, 裘颖儿. 实验用猫研究现状和发展趋势探讨 [ J ]. 山东畜牧兽医, 2017, **38**(10): 62.
- [ 23 ] 李锦铭, 刘继锋, 何梅英, 等. 虎皮品种猫的育成 [ J ]. 实验动物科学, 1990, **7**(3): 8-12.
- [ 24 ] 詹红微, 王爱国, 王福金, 等. 浅谈实验猫的一些饲养与管理体会 [ J ]. 实验动物与比较医学, 2012, **32**(6): 541-543.
- [ 25 ] Thuline H C, Morrow A C, Norby D E, *et al.* Autosomal phosphogluconic dehydrogenase polymorphism in the cat (*Felis catus* L.) [ J ]. Science ( New York, NY ), 1967, **157**( 3787 ): 431-432.
- [ 26 ] Kohn P K, Tamarin R H. Isozyme activities in the domestic cat (*Felis catus*) [ J ]. Animal Blood Groups and Biochemical Genetics, 1973, **4**(1): 59-62.
- [ 27 ] Auer L, Bell K. Phosphohexose isomerase polymorphism in the domestic cat [ J ]. Animal blood groups and biochemical genetics, 1981, **12**(2): 89-94.
- [ 28 ] O'Brien S J, Gail M H, Levin D L. Correlative genetic variation in natural populations of cats, mice and men [ J ]. Nature, 1980, **288**( 5791 ): 580-583.
- [ 29 ] Weghe A V D, Bouquet Y, Mattheeuws D, *et al.* Polymorphism in blood substances of the cat [ J ]. Comparative Biochemistry & Physiology Part B Comparative Biochemistry, 1981, **69**( 2 ): 223-230.
- [ 30 ] Altunok V, Yuksek N, Berkman C C, *et al.* Genetic structure and variation of Van cats [ J ]. Biochemical genetics, 2011, **49** ( 7-8 ): 511-522.
- [ 31 ] Suzuki H, Hosoda T, Sakurai S, *et al.* Phylogenetic relationship between the Iriomote cat and the leopard cat, *Felis bengalensis*, based on the ribosomal DNA [ J ]. Idengaku zasshi, 1994, **69** ( 4 ): 397-406.
- [ 32 ] Masuda R, Yoshida M C, Shinyashiki F, *et al.* Molecular phylogenetic status of the iriomote cat *Felis iriomotensis*, inferred from mitochondrial DNA sequence analysis [ J ]. Zoological science, 1994, **11**(4): 597-604.
- [ 33 ] Yuhki N, O'brien S J. DNA variation of the mammalian major histocompatibility complex reflects genomic diversity and population history [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, **87**( 2 ): 836-840.
- [ 34 ] Kuwahara Y, Kito K, Kobayash R, *et al.* Effects of genotype matching of feline major histocompatibility complex (FLA) class II DRB on skin-allograft transplantation in cats [ J ]. Journal of Veterinary Medical Science, 2001, **63**(10): 1097-1101.
- [ 35 ] Kuwahara Y, Kitoh K, Kobayashi R, *et al.* Genotyping of feline MHC (FLA) class II DRB by PCR-RFLP method using group-specific primers [ J ]. Journal of Veterinary Medical Science, 2000, **62**(12): 1283-1289.

- [36] Skinner D M, Beattie W G, Blattner F R, *et al.* Repeat sequence of a hermit crab satellite deoxyribonucleic acid is (-T-A-G-G-)n. (-A-T-C-C-)n [J]. *Biochemistry*, 1974, **13**(19): 3930-3937.
- [37] Thirstrup J P, Pertoldi C, Loeschcke V. Genetic analysis, breed assignment and conservation priorities of three native Danish horse breeds [J]. *Animal genetics*, 2008, **39**(5): 496-505.
- [38] Leroy G, Verrier E, Meriaux J C, *et al.* Genetic diversity of dog breeds: within - breed diversity comparing genealogical and molecular data [J]. *Animal genetics*, 2009, **40**(3): 323-332.
- [39] Gil-Sánchez J M, Jaramillo J, Barea-Azcón J M. Strong spatial segregation between wildcats and domestic cats may explain low hybridization rates on the Iberian Peninsula [J]. *Zoology*, 2015, **118**(6): 377-385.
- [40] Brennen R A, Chase C C Jr, Olson T A, *et al.* Genetic diversity among Angus, American Brahman, Senepol and Romosinuano cattle breeds [J]. *Animal genetics*, 2007, **38**(1): 50-53.
- [41] Menotti-Raymond M A, David V A, Wachter L L, *et al.* An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples [J]. *Journal of forensic sciences*, 2005, **50**(5): 1061-1070.
- [42] Coomber N, David V A, O'brien S J, *et al.* Validation of a short tandem repeat multiplex typing system for genetic individualization of domestic cat samples [J]. *Croatian medical journal*, 2007, **48**(4): 547-555.
- [43] Lyons L A, Bailey S J, Baysac K C, *et al.* The Tabby cat locus maps to feline chromosome B1 [J]. *Animal genetics*, 2006, **37**(4): 383-386.
- [44] Filler S, Alhaddad H, Gandolfi B, *et al.* Selkirk Rex: morphological and genetic characterization of a new cat breed [J]. *Journal of Heredity*, 2012, **103**(5): 727-733.
- [45] Menotti-Raymond M, David V A, Pflueger S M, *et al.* Patterns of molecular genetic variation among cat breeds [J]. *Genomics*, 2008, **91**(1): 1-11.
- [46] Landegren U, Nilsson M, Kwok P Y. Reading bits of genetic information: methods for single-nucleotide polymorphism analysis [J]. *Genome research*, 1998, **8**(8): 769-776.
- [47] Sato I, Nakaki S, Murata K, *et al.* Forensic hair analysis to identify animal species on a case of pet animal abuse [J]. *International journal of legal medicine*, 2010, **124**(3): 249-256.
- [48] Peterschmitt M, Grain F, Arnaud B, *et al.* Mutation in the melanocortin 1 receptor is associated with amber colour in the Norwegian Forest Cat [J]. *Animal genetics*, 2009, **40**(4): 547-552.
- [49] Say L, Devillard S, Léger F, *et al.* Distribution and spatial genetic structure of European wildcat in France [J]. *Animal Conservation*, 2012, **15**(1): 18-27.
- [50] Oliveira R, Godinho R, Randi E, *et al.* Hybridization versus conservation: are domestic cats threatening the genetic integrity of wildcats (*Felis silvestris silvestris*) in Iberian Peninsula? [J]. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 2008, **363**(1505): 2953-2961.
- [51] Hertwig S T, Schweizer M, Stepanow S, *et al.* Regionally high rates of hybridization and introgression in German wildcat populations (*Felis silvestris*, Carnivora, Felidae) [J]. *Journal of Zoological Systematics & Evolutionary Research*, 2009, **47**(3): 283-297.
- [52] Nussberger B, Greminger M P, Grossen C, *et al.* Development of SNP markers identifying European wildcats, domestic cats, and their admixed progeny [J]. *Molecular ecology resources*, 2013, **13**(3): 447-460.

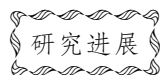
## Research Progress of Genetic Diversity in Cat (*feliscatus*)

JIA Songhua, YUE Bingfei

(National Institute for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

**Abstract:** Since the late 19th century, Cats (*feliscatus*) has been used for scientific research. Now, it is widely applied in various fields of medicine. In addition, cats are gaining more and more attention as animal models of human genetic and infectious diseases. The quality of cats (especially genetic quality) has a significant impact on the accuracy, reproducibility, and scientificity of the findings. It is comparatively vital to carry out genetic quality testing on a regular basis to avoid the deterioration of germplasm, genetic drift and the error of experimental result. With the advent of biochemical markers and DNA molecular markers, a more simple and reliable method for understanding the genetic structure of cats has been provided. In this paper, the current research status and existing problems of biochemical markers and DNA molecular markers in the study of cat genetic structure and polymorphism are discussed.

**Key words:** cat; DNA molecular markers; biochemical markers; genetic diversity



# 重建人类免疫系统的人源化小鼠模型及其在血液系统疾病研究中的应用\*

龙 杰<sup>1,2,3</sup> 杨志刚<sup>1,4</sup>

(1. 广东医科大学, 湛江 524023) (2. 广东医科大学附属医院, 湛江 524001)

(3. 广东省实验动物监测所, 广州 510663) (4. 广东医科大学附属湛江中心人民医院, 湛江 524045)

**摘要:**动物模型在人类疾病发病机制的研究及药理学实验研究治疗中发挥重要作用。小鼠是目前主要的实验动物,但其与人类背景存在差异,不能完全模拟人类免疫系统及疾病状态。研究人员通过将人类细胞或组织植入免疫缺陷小鼠体内,可构建免疫系统人源化小鼠模型及人源化小鼠疾病模型。人源化小鼠可通过优化人源造血干细胞来源等条件,可得到免疫系统人源化程度较高的小鼠模型。目前,GVHD人源化小鼠模型及白血病人源化小鼠模型已经应用在研究疾病发病机制及开发新型临床治疗药物等方面。

**关键词:**人源化小鼠;移植物抗宿主病;白血病;动物模型

**中图分类号:** R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)04-0086-07

**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.04.020

实验动物学在医学研究中发挥重要作用,实验动物模型可以用于模拟人类疾病发病以及药理学实验研究。其中灵长类动物在遗传学上与人类接近,曾在医学研究中有着举足轻重的地位,但由于灵长类动物价格昂贵及存在伦理学方面的限制,近年来逐渐减少在医学研究上的应用。小鼠作为实验动物的历史源远流长,但小鼠的遗传学背景与人类相差较大,为解决该问题,研究人员将人类细胞或组织植入免疫缺陷小鼠体内构建免疫系统人源化小鼠模型及人源化小鼠疾病模型,在这种人源化的小鼠动物模型中进行的研究更能模拟人类免疫系统及人类疾病实际情况。

## 1 免疫系统人源化小鼠模型的建立及优化

### 1.1 人源造血干细胞来源的选择

根据造血干细胞不同的起源部位,可分为胎肝造血干细胞、骨髓造血干细胞、粒细胞集落刺激因子(Granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF)动员的

外周血造血干细胞、脐带血造血干细胞。其中,胎肝造血干细胞来源于胎儿,人类胎儿肝脏在妊娠第10周至第20周的大部分时间里是主要的造血器官。Kuchma等<sup>[1]</sup>在免疫表型的研究中,发现胎肝比脐带血含有更丰富的人类造血干祖细胞。Roncarolo等<sup>[2]</sup>从胎肝中获得的HSC免疫原性较弱,植入人类白细胞抗原(Human leukocyte antigen, HLA)不匹配的胎儿中也不会产生移植物抗宿主病(Graft-versus-host disease, GVHD)。Lepus等<sup>[3]</sup>在几个不同品系的免疫缺陷小鼠身上比较胎肝、脐带血、成人外周血来源的造血干细胞的植入率,结果表明,胎肝来源的CD34<sup>+</sup>造血干细胞植入率最高。但胎肝来源于流产的胎儿,各项病原学阴性的流产胎儿的肝脏才成为收集的对象,另外,目前胎肝干细胞库极少,并且,胎肝的应用存在一些伦理相关的问题,使其在应用上受到较大的限制。

与胎肝相比,脐带血的来源更丰富、采集更方便,采集过程对母婴均无危害,也不存在应用胎肝造血干细胞所产生的伦理问题。脐血中T淋巴细胞

收稿日期:2019-01-25

\* 基金项目:广东省科技计划基金项目(No. 2014A020212300; 2016A020215149);湛江市财政基金科技专项竞争性分配项目(No. 2016A06003)

作者简介:龙 杰(1984—),男,在读硕士研究生,研究方向:人源化小鼠模型.E-mail:365591959@qq.com

通信作者:杨志刚(1965—),男,医学博士,教授,博士生导师,研究方向:血液病的免疫学机制研究.E-mail:yangzg@gdmu.edu.cn

数较少且较原始,使用 HLA 不匹配的脐带血造血干细胞移植后 GVHD 发生率低<sup>[4]</sup>。这些优点都是骨髓和外周血来源的造血干细胞所不具备的。

造血干细胞选择时,还要考虑 T 细胞的植入有产生 GVHD 的风险。但是,另一方面,适量的 T 细胞又具有促进移植植物植入的优点,这在人类造血干细胞移植领域已经得到了证实<sup>[5]</sup>。Hexner 等<sup>[6]</sup>分别在等剂量脐带血单个核细胞与去除 T 细胞的脐带血单个核细胞中,加入了抗 CD3/CD28 单克隆抗体刺激 T 细胞增殖,然后注入 NOD/SCID- $\beta 2m^{-/-}$  小鼠体内。结果表明,未去除 T 细胞组人源 CD45<sup>+</sup> 细胞的植入率明显比第二组高 (5.94%  $\pm$  1.65% VS 0.29%  $\pm$  0.79%),证明了在小鼠体内人源脐带血中 T 细胞有克服免疫屏障促进植入的作用。Hayakawa 等<sup>[7]</sup>用 CD34<sup>+</sup> 分选的脐带血单个核细胞与未分选的脐带血单个核细胞分别经白消安预处理后输入 NSG (NOD/SCID/IL-2R $\gamma^{null}$ ) 小鼠体内比较,发现 CD34<sup>+</sup> 分选的脐带血单个核细胞组植入率明显高于其他组,且植入率长期维持在高水平状态。所以,目前主要选择脐带血 CD34<sup>+</sup> 单个核细胞进行人源化小鼠模型的研究。

## 1.2 免疫缺陷小鼠的选择

小鼠的异种造血干细胞移植如同人类同种异基因造血干细胞移植一样,供者干细胞的植入需克服受者的免疫屏障,而这些免疫屏障就是受者本身的免疫状态,受者免疫缺陷程度越高,更利于供者的细胞植入<sup>[8]</sup>。基于上述理论,人源化免疫小鼠通常选择免疫缺陷小鼠。

利用免疫缺陷小鼠进行人源化小鼠的研究经历了几个阶段。最早发现的免疫缺陷小鼠是裸鼠,由于 foxn1 基因的缺陷导致该小鼠胸腺发育受损<sup>[9]</sup>,从而没有成熟 T 细胞产生导致该小鼠 T 细胞依赖的免疫排斥几乎消失。但人源免疫细胞依然无法在该小鼠体内生存<sup>[10]</sup>。

1983 年,研究人员发现 C.B-17 纯系小鼠 16 号染色体上的重症联合免疫缺陷 (Severe combined immunodeficiency, SCID) 基因发生隐性突变后,小鼠缺乏功能成熟的 T 和 B 淋巴细胞,由此得到了 SCID 小鼠<sup>[11]</sup>。1988 年,McCune 等<sup>[12]</sup>用 SCID 小鼠植入人胎肝干细胞、胎胸腺、胎淋巴结,可使人源 T 细胞和 B 细胞重建。但由于 SCID 小鼠的免疫缺陷程度不高,体内残留较多 NK 细胞及部分 T 细胞和 B 细胞,人源免疫细胞重建水平不高。由于 SCID 小鼠

对放射高度敏感,为降低放射敏感性,有学者通过敲除 Rag1<sup>[13]</sup> (Recombinant activating gene) 或 Rag2<sup>[14]</sup> 基因产生 Rag<sup>-/-</sup> 小鼠。Rag1 和 Rag2 基因在 TCR 的重排和抗体生成方面发挥重要作用,是 T 细胞和 B 细胞成熟所必需的基因,因此, Rag1<sup>-/-</sup> 小鼠及 Rag2<sup>-/-</sup> 小鼠均缺乏功能成熟的 T 细胞和 B 细胞,但是也因它们的高 NK 细胞活性阻碍了人源细胞的植入<sup>[15-16]</sup>。

随后通过 NOD (Non-obese diabetic) 背景小鼠与 SCID 小鼠回交得到免疫缺陷程度更高的 NOD/SCID 小鼠<sup>[17]</sup>。这种小鼠的特点除了 T 细胞和 B 细胞等免疫细胞的功能丧失以外,还影响了部分 NK 细胞的功能,所以免疫缺陷程度比前述的小鼠更高。杨海燕等<sup>[18]</sup>利用脐带血 CD34<sup>+</sup> 单个核细胞注入 TBI 预处理的 NOD/SCID 小鼠,在第 8 周行流式细胞术检测,发现人源 CD45<sup>+</sup> 细胞植入达到 (12.34  $\pm$  2.38)%,远高于 Lewis 等<sup>[19]</sup>定义的 0.5% 的植入标准。但 NOD/SCID 小鼠随着年龄的增长,会出现“免疫渗漏”,即部分 T 和 B 细胞的功能恢复,且本身仍有 NK 细胞功能残留,使得其植入效率不高。

在此基础上,使 NOD/SCID 小鼠编码白介素 2 受体  $\gamma$  链的基因发生无效突变,产生 NSG<sup>[20]</sup> (NOD/SCID/IL-2R $\gamma^{null}$ ) 小鼠。因为该受体的  $\gamma$  链是白介素 2、白介素 4、白介素 7、白介素 9、白介素 15、白介素 21 等细胞因子的共同受体,所以该基因的突变导致 NK 细胞成熟障碍和功能丧失,并且消除了 T 和 B 细胞的免疫渗漏现象,使得小鼠的免疫缺陷程度更高。McDermott 等<sup>[21]</sup>比较了 NSG 小鼠与 NOD/SCID 等品系的小鼠外周组织的人源细胞植入率,结果表明,NSG 小鼠和 NOG (NOD/Shi-scid /IL-2R $\gamma^{null}$ ) 小鼠明显比 NOD/SCID 等品系小鼠的人源细胞植入率要高,而 NSG 小鼠在骨髓中人源细胞的植入率比其它品系的小鼠要高,雌性尤甚,所以 NSG 小鼠是目前人源化小鼠模型的最佳受鼠。

## 1.3 预处理方式的选择

预处理是输入人源细胞前的附加处理方式,目的是:1.产生骨髓抑制从而腾空骨髓龛及负反馈刺激造血再生,促进造血干细胞归巢骨髓龛并自我更新、增殖及分化<sup>[22]</sup>;2.产生免疫抑制预防移植细胞被排斥,这些作用都有利于人源细胞植入。由于目前接受移植的小鼠主要为 NOD/SCID 小鼠等免疫缺陷鼠,本身由于缺乏 T 细胞和 B 细胞等免疫细胞已产生明显免疫抑制,所以预处理的策略主要是使小

鼠产生骨髓抑制<sup>[23]</sup>。

传统小鼠移植的预处理方式有全身射线辐照 (Total body irradiation, TBI) 等, 预处理后, 人源细胞植入率比没有接受预处理的组别要高。其主要原因是使受者体内基质细胞衍生因子 (Stromal cell-derived factor-1, SDF-1)、干细胞因子 (Stem cell factor, SCF) 等细胞因子水平的升高, SDF-1<sup>[24]</sup> 是 C-X-C 趋化因子受体 4<sup>[25]</sup> (C-X-C chemokine receptor type 4, CXCR4) 的配体, 在人鼠之间可以发生交叉反应<sup>[26]</sup>, 而人源造血干细胞表面表达 CXCR4 分子, 通过 CXCR4—SDF-1 轴可以使经尾静脉注入的人源造血干细胞定向归巢到骨髓里, 人源造血干细胞只有归巢到骨髓环境里才能自我更新、增殖及定向分化。SCF<sup>[27]</sup> 是干细胞生长因子, 主要生理作用是促进早期造血前体细胞的增殖和分化, Zheng 等<sup>[28]</sup> 利用重组人 SCF 与脐带血 CD34<sup>+</sup> 细胞体外培养植入 NOD/SCID 小鼠体内的植入率明显比未经处理的脐带血 CD34<sup>+</sup> 细胞的组别要高。这些细胞因子、趋化因子的水平的上升可以使外源性人源细胞的植入率增高。传统的以 TBI 为主要手段的预处理策略的弊端是小鼠的死亡率较高, 小鼠的生存条件要求苛刻, 需严格的无菌环境和配备独立通气笼 (Individual ventilated Cage, IVC), TBI 设备需远离小鼠饲养的场所等, 这些都使得人源化小鼠模型应用受到限制。

白消安是一种烷化剂, 较早前已应用在人类骨髓移植上, 它的特点是强烈的骨髓抑制作用但免疫抑制作用较弱<sup>[29]</sup>, 其作用与 TBI 相似, 但高剂量的 TBI 常导致高死亡率, 而低剂量的 TBI 导致人源细胞植入率不高。Robert-Richard 等<sup>[23]</sup> 在 NOD/SCID 小鼠回输人源造血干细胞前分别用白消安及 TBI 作预处理的比较, 结果表明 SRC (scid repopulating cells) 数目没显著差异。Choi 等<sup>[30]</sup> 发现接受 2.4Gy 剂量 TBI 的 NSG 小鼠组第 24 周的存活率只有 33%, 而接受 20 mg/kg 和 30 mg/kg 单剂量的白消安的 NSG 小鼠组第 24 周的存活率是 100%。接受 30 mg/kg 单剂量的白消安的 NSG 小鼠组重建人源 B 细胞亚群的程度比接受 2.4Gy 剂量 TBI 的 NSG 小鼠组高, 而接受 40 mg/kg 单剂量的白消安的 NSG 小鼠组在 7 周内全部死亡。也有研究报道相隔 24 h 给予两次 25 mg/kg 剂量的白消安预处理在 NOD/SCID 小鼠<sup>[31]</sup> 和在 NSG 小鼠<sup>[22]</sup> 上都达到最佳人源细胞植入率。使用白消安预处理的小鼠存活率高, 不需要极度严格要求的小鼠饲养环境, 操作简便, 近

年来逐渐取代 TBI, 成为小鼠移植研究的主要预处理方式。

#### 1.4 输注造血干细胞方式的选择

目前使用最广泛的输注造血干细胞的方式是小鼠尾静脉注射, 这种方式主要特点是便于操作, 但造血干细胞经尾静脉进入血液循环后大多数的造血干细胞都被滞留在外周器官, 仅有少数造血干细胞在各种趋化因子等介导下归巢骨髓。Yahata 等<sup>[32]</sup> 比较骨髓腔内输注与尾静脉输注两种方法, 发现经骨髓腔内注射产生的 SRC 是经尾静脉注射的 15 倍, 因为骨髓腔内输注造血干细胞避开了各种外周器官滞留及各种细胞因子、趋化因子等因素的影响而直接归巢骨髓。但骨髓腔内注射技术要求较高, 注射成功率不高, 目前在做人源化小鼠各方面研究时两种方法均有研究人员使用。

### 2 人源化小鼠模型在血液疾病上的应用

#### 2.1 人源化小鼠在研究 GVHD 上的应用

GVHD 是异基因造血干细胞移植后非复发死亡的主要原因之一, 目前 GVHD 的发病机制仍未完全明确及治疗手段有限<sup>[33]</sup>, 所以, 利用人源免疫细胞注入免疫缺陷小鼠, 并在此基础上诱导出 GVHD 对其发病机制的研究及指导临床治疗意义重大。

利用人源细胞注入免疫缺陷小鼠构建异种 GVHD 模型已有多年历史。大约 30 年前, Mosier 等<sup>[34]</sup> 率先利用人的外周血单个核细胞腹腔注射入经 TBI 预处理后的 SCID 小鼠体内, 成功诱导出类似 GVHD 样的症状。但这种方法诱导的 GVHD 的发病的异质性很大, 需大量的外周血单个核细胞诱导, 经腹腔注射的方式也不能模拟人类骨髓造血干细胞移植, 因为所有的骨髓造血干细胞移植都是经静脉输注的。

随着 Rag<sup>-/-</sup>γC<sup>-/-</sup>小鼠的出现, Van Rijn 等<sup>[35]</sup> 第一次利用静脉注射 30×10<sup>6</sup> 个人外周血单个核细胞到 Rag<sup>-/-</sup>γC<sup>-/-</sup>小鼠内诱导出 GVHD, 但仍需要大量的单个核细胞及 TBI 预处理。

Ito 等<sup>[36]</sup> 利用 NOG 小鼠、NOD/SCID 小鼠及 Rag2<sup>null</sup> IL-2Rγ<sup>null</sup> 小鼠进行比较, 结果表明, NOG 小鼠输注人源外周血单个核细胞后诱导 GVHD 的发病时间最快, 死亡的时间较统一, 当使用 10×10<sup>6</sup> 个人源外周血单个核细胞移植时, 只有 NOG 小鼠在没有使用 TBI 预处理的情况下能诱导出 GVHD。King

等<sup>[37]</sup>的研究发现,在使用  $5 \times 10^6$  个人源外周血单个核细胞情况下,所有 NSG 小鼠在 2Gy 剂量的 TBI 预处理后都能诱导出 GVHD 样的症状。

综上所述,通过将人源外周血注入预处理或未预处理的免疫缺陷小鼠体内,可诱导出 GVHD 样症状,小鼠的免疫缺陷程度越高,诱导出 GVHD 需要的人源外周血细胞数量就越少。

目前,人源化 GVHD 小鼠模型主要应用在研究 GVHD 的发病机制及开发临床新型治疗药物。Wu 等<sup>[38]</sup>通过尾静脉高压注射质粒的方法,把人类 IL-21 基因导入 BRG (BALB/c-Rag2<sup>-/-</sup> IL-2R $\gamma^{\text{null}}$ ) 小鼠的基因组中,然后分别利用人源外周血单个核细胞注入转基因表达人类 IL-21 的 BRG 小鼠和对照组的 BRG 小鼠,在移植后第 6 天发现转基因表达人类 IL-21 小鼠脾脏聚集大量的 CD19<sup>+</sup> 的细胞,并观察转基因表达人类 IL-21 的 BRG 小鼠死亡时间明显缩短;同时将去除供者 B 细胞单个核细胞注入 BRG 小鼠,长达 25 天内没有 GVHD 症状,结果表明 IL-21 和 B 细胞可能参与 GVHD 的发病,靶向供者 B 细胞的治疗有可能成为预防和治疗 GVHD 的一种新方法。也有 Ito 等<sup>[39]</sup>分别利用 CD4<sup>+</sup> 人源外周血 T 细胞和 CD8<sup>+</sup> 人源外周血 T 细胞注入 NOG 小鼠,结果发现,只有注入 CD4<sup>+</sup> 人源外周血 T 细胞的 NOG 小鼠发生严重的皮肤 GVHD;然后利用 CD8<sup>+</sup> 人源外周血 T 细胞与至少  $0.5 \times 10^6$  个 CD4<sup>+</sup> 人源外周血 T 细胞一起注入 NOG 小鼠,或者 CD8<sup>+</sup> 人源外周血 T 细胞直接注入转基因表达人类 IL-2 的 NOG 小鼠内,都能诱发严重的皮肤 GVHD,结果表明 CD4<sup>+</sup> 细胞可能通过 IL-2 的信号通路促进 CD8<sup>+</sup> 细胞植入和扩增,并证实皮肤 GVHD 的病理结果是由 TH17 细胞分泌的 IL-17 和 IFN $\gamma$  所介导的,使用抗 IL-17 抗体可明显减轻皮肤 GVHD。

虽然人源化 GVHD 小鼠模型为人类造血干细胞移植后产生的 GVHD 的发病机制和治疗提供了新思路。但由于种属差异性,异种移植产生 GVHD 的发病机制不完全等同于同种移植。于是, Covassin 等<sup>[40]</sup>将 HLA-DR4 阴性供者的人源 CD4<sup>+</sup> 外周血单个核细胞注入缺失小鼠 MHC 分子及转基因表达 HAL-DR4 的 NSG 小鼠中,可构建同种异基因 GVHD 模型。这种 GVHD 小鼠模型比异种 GVHD 小鼠模型,更好地模拟人类 GVHD 的发病。

## 2.2 人源化小鼠在研究白血病上的应用

白血病是血液系统最常见的肿瘤之一,该病的

预后与白血细胞的形态、免疫分型、遗传学、分子生物学等因素有很大的相关性,且异质性很大。因此建立一种稳定的人源化的白血病小鼠模型对于抗白血病药物研发及白血病的免疫治疗具有重要意义。

纵观白血病人源化小鼠模型的历史,最早使用裸鼠行白血病模型研究。Potter 等<sup>[41]</sup>使用 HL-60 细胞皮下注射经环磷酸胺预处理的裸鼠内,能够在裸鼠局部长出急性早幼粒细胞肉瘤。但这种动物模型的白血表现与人类白血病相差较大,应用意义不大。

1989 年, Kamel-Reid 等<sup>[42]</sup>使用急性淋巴细胞白血病细胞系注射入 SCID 小鼠内,成功重建白血病小鼠模型。这种小鼠模型中的白血病细胞在各器官的分布与儿童急性淋巴细胞白血病类似,基本重现了白血病细胞的生物学行为,对白血病的生长和发展的研究有一定帮助。但这种白血病细胞系无法保留肿瘤的异质性,为了体现出肿瘤的异质性, Uckun<sup>[43]</sup>使用患者来源的高危 B 细胞谱系急性淋巴细胞白血病细胞注入 SCID 小鼠内,结果表明,白血病细胞在 SCID 小鼠内生长越快,患者的预后就越差。

随后, Steele 等<sup>[44]</sup>将 19 例患者来源的急性 T 淋巴细胞白血病细胞注射入 SCID 小鼠内,只有 12 例白血病细胞能在小鼠内生长,且进展的速度与患者的预后相关;剩余未能在 SCID 小鼠内生长的 7 例白血病细胞,再次注射入 NOD/SCID 小鼠体内,均能在小鼠内生长,但进展与患者预后无相关性。结果表明,小鼠免疫缺陷程度越高,白血病细胞越容易植入,但白血病细胞在 NOD/SCID 小鼠内的进展不能作为患者预后的一项指标。

为了进一步提升人源白血病细胞的植入率,也随着免疫缺陷小鼠的发展,有学者逐渐使用 NSG 小鼠等新一代免疫缺陷小鼠行人源化白血病小鼠模型研究。Diamanti 等<sup>[45]</sup>利用 NOD/SCID 小鼠及 NSG 小鼠分别注入儿童患者的急性淋巴细胞白血病细胞,并比较了这两种品系小鼠之间的白血病细胞植入率,结果表明,不管患者的白血病亚型及危险度分层如何,NSG 小鼠的白血病细胞植入率是 NOD/SCID 小鼠的 1.2~7.7 倍。Woiterski J 等<sup>[46]</sup>将 200 多只 NSG 小鼠分别注入 54 名原发儿童急性白血病患者来源的骨髓细胞,结果表明,植入中位时间为 7~10 周,90% 的小鼠植入,雄性小鼠比雌性小鼠具



有显着更高的植入水平,NSG 小鼠的植入水平及总生存时间与患者白血病危险度分层有关。

人源化白血病小鼠模型主要应用在临床前药物试验及研究白血病的发病机制。Her 等<sup>[47]</sup>利用新生的 NSG 小鼠经肝内注入 FLT3 突变的急性髓系白血病细胞,成功建立白血病小鼠模型,并行索拉菲尼、瑞戈非尼临床前药物试验。Willmann 等<sup>[48]</sup>利用 NSG 小鼠植入 CD34<sup>+</sup>分选的慢性粒细胞白血病细胞,成功建立慢性粒细胞白血病动物模型,并在其基础上评价伊马替尼、尼洛替尼、维达列汀等药物疗效。这种疾病模型虽然可以行药物筛选实验,但不能反映人类白血病的发病情况。

为了解决这一问题,Trivial 等<sup>[49]</sup>和 Tezuka 等<sup>[50]</sup>以病毒为载体将白血病致病基因导入人类造血干细胞,进一步在免疫缺陷小鼠中诱发白血病的人源化小鼠模型逐渐发展起来。这种模型弥补了上述小鼠模型在白血病发病机制研究上的不足。

### 3 小结与展望

人源化小鼠是一种很好的反应人类的免疫系统及某些疾病状态的工具。通过对人源造血干细胞来源、免疫缺陷小鼠品系、预处理方式等各方面因素的优化,可能建立一种免疫系统人源化程度较高的小鼠模型。过去的 10 余年人源化小鼠在血液学、免疫学等方面取得了令人瞩目的进步,多种人源化小鼠模型可以直接对人类疾病进行模拟,这在以前的免疫缺陷动物身上是不可能完成的。

但是,目前的人源化小鼠模型仍有几方面的不足之处。首先,人源化小鼠模型的免疫缺陷小鼠的体内环境与人类的体内环境存在差异;其次,人源造血干细胞分化出来的各种免疫细胞存在不完整、不成熟、细胞间的接触不足等劣势。为了解决这些存在的问题,目前正在尝试研究出可以在免疫缺陷小鼠体内促进人源造血干细胞定向分化、成熟的基因工程方法,可能产生更适合应用于医学研究的人源化小鼠模型。

### 参考文献

- [1] Kuchma M D, Kyryk V M, Svitina H M, *et al.* Comparative Analysis of the Hematopoietic Progenitor Cells from Placenta, Cord Blood, and Fetal Liver, Based on Their Immunophenotype [J]. Biomed Res Int, 2015,2015:418752.
- [2] Roncarolo M G, Bacchetta R. T cell repertoire and tolerance after fetal stem cell transplantation [J]. Bone Marrow Transplant, 1992,9 Suppl 1:127-128.
- [3] Lepus C M, Gibson T F, Gerber S A, *et al.* Comparison of human fetal liver, umbilical cord blood, and adult blood hematopoietic stem cell engraftment in NOD-scid/gammac<sup>-/-</sup>, Balb/c-Rag1<sup>-/-</sup> gammac<sup>-/-</sup>, and C.B-17-scid/bg immunodeficient mice[J]. Hum Immunol, 2009,70(10):790-802.
- [4] Vyas R, Dudhat D, Navik P, *et al.* Clinical safety in using unmatched allogeneic umbilical cord blood mononuclear cells transplantations in non-haematopoietic degenerative conditions [J]. J Stem Cells, 2014,9(4):219-224.
- [5] Martin P J. The role of donor lymphoid cells in allogeneic marrow engraftment[J]. Bone Marrow Transplant, 1990,6(5):283-289.
- [6] Hexner E O, Danet-Desnoyers G A, Zhang Y, *et al.* Umbilical cord blood xenografts in immunodeficient mice reveal that T cells enhance hematopoietic engraftment beyond overcoming immune barriers by stimulating stem cell differentiation[J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2007,13(10):1135-1144.
- [7] Hayakawa J, Hsieh M M, Uchida N, *et al.* Busulfan produces efficient human cell engraftment in NOD/LtSz-Scid IL2Rgamma (null) mice[J]. Stem Cells, 2009,27(1):175-182.
- [8] Ye W, Jiang Z, Li G X, *et al.* Quantitative evaluation of the immunodeficiency of a mouse strain by tumor engraftments[J]. J Hematol Oncol, 2015,8:59.
- [9] Pantelouris E M, Hair J. Thymus dysgenesis in nude (nu nu) mice[J]. J Embryol Exp Morphol, 1970,24(3):615-623.
- [10] Ganick D J, Sarnwick R D, Shahidi N T, *et al.* Inability of intravenously injected monocellular suspensions of human bone marrow to establish in the nude mouse[J]. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1980,62(3):330-333.
- [11] Bosma G C, Custer R P, Bosma M J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse[J]. Nature, 1983,301(5900):527-530.
- [12] McCune J M, Namikawa R, Kaneshima H, *et al.* The SCID-hu mouse: murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function [J]. Science, 1988,241(4873):1632-1639.
- [13] Mombaerts P, Iacomini J, Johnson R S, *et al.* RAG-1-deficient mice have no mature B and T lymphocytes[J]. Cell, 1992,68(5):869-877.
- [14] Shinkai Y, Rathbun G, Lam K P, *et al.* RAG-2-deficient mice lack mature lymphocytes owing to inability to initiate V(D)J rearrangement[J]. Cell, 1992,68(5):855-867.
- [15] Chambers B J, Ljunggren H G. Unique features of NK cell development during ontogeny revealed in studies of RAG-1-deficient mice[J]. Immunol Cell Biol, 2010,88(2):105-106.
- [16] Andrews D M, Smyth M J. A potential role for RAG-1 in NK cell development revealed by analysis of NK cells during ontogeny [J]. Immunol Cell Biol, 2010,88(2):107-116.

- [17] Rohane P W, Shimada A, Kim D T, *et al.* Islet-infiltrating lymphocytes from prediabetic NOD mice rapidly transfer diabetes to NOD-scid/scid mice[J]. *Diabetes*, 1995, **44**(5):550-554.
- [18] 杨海燕, 胡文华, 贾潇潇, 等. 人源化 NOD/SCID 小鼠的细胞免疫重建[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2014, (5):533-536.
- [19] Lewis I D, Almeida-Porada G, Du J, *et al.* Umbilical cord blood cells capable of engraftment in primary, secondary, and tertiary xenogeneic hosts are preserved after ex vivo culture in a noncontact system[J]. *Blood*, 2001, **97**(11):3441-3449.
- [20] Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, *et al.* NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse; an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells[J]. *Blood*, 2002, **100**(9):3175-3182.
- [21] McDermott S P, Eppert K, Lechman E R, *et al.* Comparison of human cord blood engraftment between immunocompromised mouse strains[J]. *Blood*, 2010, **116**(2):193-200.
- [22] Chevalleyre J, Ducheze P, Rodriguez L, *et al.* Busulfan administration flexibility increases the applicability of scid repopulating cell assay in NSG mouse model[J]. *PLoS One*, 2013, **8**(9):e74361.
- [23] Robert-Richard E, Ged C, Ortet J, *et al.* Human cell engraftment after busulfan or irradiation conditioning of NOD/SCID mice[J]. *Haematologica*, 2006, **91**(10):1384.
- [24] Ma Q, Jones D, Borghesani P R, *et al.* Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95**(16):9448-9453.
- [25] Zou Y R, Kottmann A H, Kuroda M, *et al.* Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development[J]. *Nature*, 1998, **393**(6685):595-599.
- [26] Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, *et al.* Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene[J]. *Genomics*, 1995, **28**(3):495-500.
- [27] Brehm M A, Racki W J, Leif J, *et al.* Engraftment of human HSCs in nonirradiated newborn NOD-scid IL2rgamma null mice is enhanced by transgenic expression of membrane-bound human SCF[J]. *Blood*, 2012, **119**(12):2778-2788.
- [28] Zheng Y, Sun A, Han Z C. Stem cell factor improves SCID-repopulating activity of human umbilical cord blood-derived hematopoietic stem/progenitor cells in xenotransplanted NOD/SCID mouse model[J]. *Bone Marrow Transplant*, 2005, **35**(2):137-142.
- [29] Yeager A M, Shinn C, Pardoll D M. Lymphoid reconstitution after transplantation of congenic hematopoietic cells in busulfan-treated mice[J]. *Blood*, 1991, **78**(12):3312-3316.
- [30] Choi B, Chun E, Kim M, *et al.* Human B cell development and antibody production in humanized NOD/SCID/IL-2Rgamma(null)(NSG) mice conditioned by busulfan[J]. *J Clin Immunol*, 2011, **31**(2):253-264.
- [31] Hayakawa J, Hsieh M M, Uchida N, *et al.* Busulfan produces efficient human cell engraftment in NOD/LtSz-Scid IL2Rgamma(null) mice[J]. *Stem Cells*, 2009, **27**(1):175-182.
- [32] Yahata T, Ando K, Sato T, *et al.* A highly sensitive strategy for SCID-repopulating cell assay by direct injection of primitive human hematopoietic cells into NOD/SCID mice bone marrow[J]. *Blood*, 2003, **101**(8):2905-2913.
- [33] Zeiser R, Negrin R S. Introduction to a review series on chronic GVHD: from pathogenic B-cell receptor signaling to novel therapeutic targets[J]. *Blood*, 2017, **129**(1):1-2.
- [34] Mosier D E, Gulizia R J, Baird S M, *et al.* Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency[J]. *Nature*, 1988, **335**(6187):256-259.
- [35] Van Rijn R S, Simonetti E R, Hagenbeek A, *et al.* A new xenograft model for graft-versus-host disease by intravenous transfer of human peripheral blood mononuclear cells in RAG2-/-gammaC-/- double-mutant mice[J]. *Blood*, 2003, **102**(7):2522-2531.
- [36] Ito R, Katano I, Kawai K, *et al.* Highly sensitive model for xenogenic GVHD using severe immunodeficient NOG mice[J]. *Transplantation*, 2009, **87**(11):1654-1658.
- [37] King M A, Covassin L, Brehm M A, *et al.* Human peripheral blood leucocyte non-obese diabetic-severe combined immunodeficiency interleukin-2 receptor gamma chain gene mouse model of xenogeneic graft-versus-host-like disease and the role of host major histocompatibility complex[J]. *Clin Exp Immunol*, 2009, **157**(1):104-118.
- [38] Wu X, Tan Y, Xing Q, *et al.* IL-21 accelerates xenogeneic graft-versus-host disease correlated with increased B-cell proliferation[J]. *Protein Cell*, 2013, **4**(11):863-871.
- [39] Ito R, Katano I, Kawai K, *et al.* A Novel Xenogeneic Graft-Versus-Host Disease Model for Investigating the Pathological Role of Human CD4(+) or CD8(+) T Cells Using Immunodeficient NOG Mice[J]. *Am J Transplant*, 2017, **17**(5):1216-1228.
- [40] Covassin L, Laning J, Abdi R, *et al.* Human peripheral blood CD4 T cell-engrafted non-obese diabetic-scid IL2rgamma(null)H2-Ab1(tm1Gru)Tg(human leucocyte antigen D-related 4) mice; a mouse model of human allogeneic graft-versus-host disease[J]. *Clin Exp Immunol*, 2011, **166**(2):269-280.
- [41] Potter G K, Shen R N, Chiao J W. Nude mice as models for human leukemia studies[J]. *Am J Pathol*, 1984, **114**(3):360-366.
- [42] Kamel-Reid S, Letarte M, Sirard C, *et al.* A model of human acute lymphoblastic leukemia in immune-deficient SCID mice[J]. *Science*, 1989, **246**(4937):1597-1600.
- [43] Uckun F M, Sather H, Reaman G, *et al.* Leukemic cell growth in SCID mice as a predictor of relapse in high-risk B-lineage acute lymphoblastic leukemia[J]. *Blood*, 1995, **85**(4):873-878.
- [44] Steele J P, Clutterbuck R D, Powles R L, *et al.* Growth of human T-cell lineage acute leukemia in severe combined immunodeficiency(SCID) mice and non-obese diabetic SCID mice[J]. *Blood*, 1997, **90**(5):2015-2019.

- [45] Diamanti P, Cox C V, Blair A. Comparison of childhood leukemia initiating cell populations in NOD/SCID and NSG mice [J]. *Leukemia*, 2012, **26**(2):376-380.
- [46] Woiterski J, Ebinger M, Witte K E, *et al.* Engraftment of low numbers of pediatric acute lymphoid and myeloid leukemias into NOD/SCID/IL2R $\gamma$ mannull mice reflects individual leukemogenicity and highly correlates with clinical outcome [J]. *Int J Cancer*, 2013, **133**(7):1547-1556.
- [47] Her Z, Yong K, Paramasivam K, *et al.* An improved pre-clinical patient-derived liquid xenograft mouse model for acute myeloid leukemia [J]. *J Hematol Oncol*, 2017, **10**(1):162.
- [48] Willmann M, Sadovnik I, Eisenwort G, *et al.* Evaluation of cooperative antileukemic effects of nilotinib and vildagliptin in Ph (+) chronic myeloid leukemia [J]. *Exp Hematol*, 2018, 57: 50-59.
- [49] Trivai I, Ziegler M, Bergholz U, *et al.* Endogenous retrovirus induces leukemia in a xenograft mouse model for primary myelofibrosis [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, **111**(23): 8595-8600.
- [50] Tezuka K, Xun R, Tei M, *et al.* An animal model of adult T-cell leukemia: humanized mice with HTLV-1-specific immunity [J]. *Blood*, 2014, **123**(3):346-355.

## Humanized Mouse Model Reconstructing Human Immune System and Its Application in Study of Blood System Diseases

LONG Jie<sup>1,2,3</sup>, YANG Zhigang<sup>1,4</sup>

(1. *Guangdong medical university, Zhanjiang 524023, China*) (2. *Affiliated hospital of guangdong medical university, Zhanjiang 524001, China*)

(3. *Guangdong laboratory animals monitoring institute, Guangzhou 510663, China*)

(4. *Zhanjiang central people's hospital affiliated to guangdong medical university, Zhanjiang 524045, China*)

**Abstract:** Animal models play an important role in the study of human disease pathogenesis and experimental study of pharmacology. Mice are currently the main experimental animals, However, it is different from the human background, and it cannot fully simulate the human immune system and disease state. Researchers can build humanized mouse models of the immune system and humanized mouse disease models by implanting human cells or tissues into immunodeficient mice. Humanized mice can obtain a mouse model with a high degree of humanization of the immune system by optimizing conditions such as the source of human hematopoietic stem cells and other conditions. At present, the humanized mouse model of GVHD and the humanized mouse model of leukemia have been used in the study of disease pathogenesis and the development of new clinical therapeutic drugs.

**Key words:** humanized mouse; Graft versus host disease; leukemia; animal models

---

## 《实验动物科学》关于不再接收使用水合氯醛进行动物麻醉文章的说明

为进一步保障实验动物的福利,不断提升动物实验研究的水平并获得国际学术界同行的认可,根据我国和北京市实验动物有关法规和标准,在实验动物麻醉方法中,鉴于水合氯醛原属于镇静、催眠及抗惊厥药,作为麻醉剂效果较差,刺激性强、毒副作用较大,存在干扰实验结果、对实验动物不人道和有背实验动物福利伦理审查原则等问题,国外期刊普遍建议不再使用水合氯醛作为实验动物的麻醉剂。因此,本刊将于即日起,不再接收使用水合氯醛作为实验动物麻醉剂的文章,特此告知广大作者及读者。

《实验动物科学》编辑部

2019年8月18日