

# 实验动物与比较医学 (原《上海实验动物科学》)

## Laboratory Animal and Comparative Medicine

第39卷第5期

2019年10月

### 目次

\*\*\*\*\*

#### • 专家论坛 •

七甲川萜类化合物在肿瘤模型活体成像研究中的应用 ..... 师长宏(337)

#### • 论 著 •

中国仓鼠口腔鳞癌 miR-504 的表达特征分析 ..... 卫佳宁, 续国强, 高继萍, 等(342)

牛棒状杆菌环介导等温扩增快速检测方法的建立及初步应用 ..... 冯 洁, 张 泉, 钱 淼, 等(349)

短发夹 RNA TRPV4 基因对脊柱侧弯大鼠模型椎间盘退变的抑制作用 ..... 李 琰, 孔建军, 陈子奇, 等(356)

山羊胎肝内人脐带间充质干细胞的存活与分化研究 ..... 鄢东海, 黄小昆, 向雪萍, 等(364)

乙酰胆碱合并氯化钙静脉注射致兔和大鼠房颤模型的比较 ..... 冯 凯, 杨蕾熙, 成祎琳, 等(371)

舒郁胶囊及其主要组份对经前期综合征肝气郁证大鼠海马中 Cav1.2 介导的

CaM/CaMK II 信号通路的影响 ..... 徐凯勇, 王杰琼, 李 芳, 等(377)

原花青素对大鼠放射性心脏损伤心肌组织 IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B

蛋白表达的影响 ..... 徐兴军, 吴 菲, 宋金熠, 等(383)

天竺葵对脓毒症小鼠肾功能保护作用观察 ..... 陈美玲, 陈 烨, 程玉梅, 等(390)

不同年龄 SD 大鼠脾脏组织显微结构观察 ..... 黄 静, 郭 洋, 项 涛, 等(394)

洗洁精对鸡胚绒毛尿囊膜血管的刺激性评价 ..... 陈梓灵, 徐颖愉, 刘香梅, 等(398)

#### • 经验交流 •

一例 SD 大鼠自发性心脏海绵状血管瘤的病理学观察 ..... 邱 波, 王 艳, 胡建廷(402)

一例小鼠自发性成熟型畸胎瘤 ..... 高亚奇, 陈伟盛, 梁 宁, 等(405)

头灯下经口直视的大鼠非暴露式气管滴注法的建立 ..... 龙 隆, 谭 红, 杨鸿波(408)

脉动真空灭菌器对鼠维持饲料灭菌效果和部分营养成分损失率的影响 ..... 薛来恩, 党 源, 温福利, 等(411)

不同抗凝剂对大鼠血液生化指标测定结果的影响 ..... 刘 颖, 王铁山, 刘珍清(415)

#### • 综 述 •

实验动物职业过敏症的研究进展 ..... 郑茂恩, 杨春红, 王可洲, 等(418)

期刊基本参数: CN31-1954/Q\*1981\*b\* 大 16\*84\*zh\*P\*¥10.00\*2000\*17\*2019-10

\*\*\*\*\*

#### 协办单位(排名不分先后)

上海西普尔-必凯实验动物有限公司

扬州大学比较医学中心

苏州大学动物实验中心

广东省医学实验动物中心

中国科学院上海药物研究所实验动物室

上海市实验动物质量监督检验站

上海交通大学医学院实验动物科学部

浙江省实验动物中心

上海斯莱克实验动物有限责任公司

南通大学实验动物中心

上海市公共卫生临床中心

上海儿童医学中心

山东省实验动物中心

浙江中医药大学动物实验研究中心

第二军医大学实验动物中心

哈尔滨兽医研究所

杭州师范大学实验动物中心

复旦大学药学院

# Laboratory Animal and Comparative Medicine

Vol.39 No.5

Oct. 2019

## Main Contents

- Expression Characteristics of miR-504 in Oral Squamous Cell  
Carcinoma of Chinese Hamster.....WEI Jia-ning, XU Guo-qiang, GAO Ji-ping(342)
- Development of a Loop-mediated Isothermal Amplification Assay  
for Detection of *Corynebacterium bovis*.....FENG Jie, ZHANG Quan, QIAN Miao, et al(349)
- Inhibitory Effect of shRNA TRPV4 Gene on Intervertebral Disc  
Degeneration in Scoliosis Rat Model.....LI Yan, KONG Jian-jun, CHEN Zi-qi, et al(356)
- Study on *in Vivo* Survival and Differentiation of Human Umbilical  
Cord Mesenchymal Stem Cells in Fetal Goat Liver.....YAN Dong-hai, HUANG Xiao-kun, XIANG Xue-ping, et al(364)
- Comparison on Rabbit and Rat Atrial Fibrillation Models Induced by  
Intravenous Injection of Acetylcholine-Calcium Chloride Mixed Solution .....FENG Kai, YANG Lei-xi, CHENG Yi-lin, et al(371)
- The Effects of Shu Yu Capsule and Its Main Composition on Cav1.2 Mediated CaM/CaMK II  
Signaling Pathway in Hippocampus of Rat with PMS Liver-qi Stagnation .....XU Kai-yong, WANG Jie-qiong, LI Fang, et al(377)
- Effects of Proanthocyanin on the expression of IL-1, TGF- $\beta$ 1 and NF-Kappa B  
Proteins in Rats with Radiation-induced Heart Disease.....XU Xing-jun, WU Fei, SONG, et al Jin-yi, et al(383)
- Observation of Protective Effect of Geranium on Renal Function in Sepsis Mice...CHEN Mei-ling, CHEN Ye, CHENG Yu-mei, et al(390)
- Observation on Microstructure of Spleen in Rats at Different Ages.....HUANG Jing, GUO yang, XIANG tao, et al(394)
- Study on Irritation of Dishwashing Liquid by Hen's Egg Test  
on Chorioallantotic Membrane .....CHEN Zi-ling, XV Yin-yu, LIU Xiang-Mei, et al(398)
- Establishment of Non-exposed Tracheal Instillation Method in Rats under Head Lamp...LONG Long, TAN Hong, YANG Hong-bo(408)
- Effects of Different Anticoagulants for Blood Sample Treatment Methods  
on Biochemical Indexes of Rats.....LIU Ying, WANG Tie-shan, LIU Zhen-qing(415)
- Research Progress on Occupational Allergy of Laboratory Animal.....ZHENG Mao-en, YANG Chun-hong, WANG Ke-zhou, et al(418)

## 实验动物与比较医学

SHIYAN DONGWU YU BIJIAO YIXUE

1981年9月创刊, 双月刊

第39卷第5期 2019年10月

主 编 高 诚  
编辑出版 《实验动物与比较医学》编辑部  
主管单位 上海科学院  
主办单位 上海市实验动物学会 上海实验动物研究中心  
印 刷 上海宝山译文印刷厂  
发 行 上海市报刊发行局  
订 购 全国各地邮局, 邮发代号 4-789  
地 址 上海市金科路3577号 201203  
电 话 (021)50793648-81018, 50793657  
电子函件 bjb50793657@163.com  
在线投稿 211.144.119.130:8080/jweb/CN/volumn/current.shtml  
网 址 med.wanfangdata.com.cn/Journal/shsydwkx.aspx  
(责任编辑 富群华)

## Laboratory Animal and Comparative Medicine

Established in September 1981, Bimonthly

Vol.39 No.5 Oct. 2019

Editor-in-Chief GAO Cheng  
Edited, Published and Distributed by  
Editorial Department of *Laboratory Animal and Comparative  
Medicine*, 3577 Jin Ke Road, Shanghai 201203, China  
Sponsored by  
Shanghai Laboratory Animal Science Association  
Shanghai Laboratory Animal Research Center  
Tel. (021)50793648-81018, 50793657  
E-mail bjb50793657@163.com  
Online submit 211.144.119.130:8080/jweb/CN/volumn/current.shtml  
http:// med.wanfangdata.com.cn/Journal/shsydwkx.aspx  
(Managing Editor: FU Qun-hua)

ISSN 1674-5817

CN 31-1954

公开发行

邮发代号: 4-789

每期定价: 10.00 元

# 七甲川菁类化合物在肿瘤模型 活体成像研究中的应用

师长宏

(空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

**[摘要]** 七甲川菁类化合物不仅具有近红外荧光(near-infrared fluorescence, NIRF)染料特征, 而且具有肿瘤靶向性, 不需要化学修饰, 可直接被肿瘤细胞吸收, 呈特异性聚集, 从而可用于肿瘤模型活体成像。该染料在人体肿瘤细胞系移植(cell-derived xenograft, CDX)模型、临床人源肿瘤组织异种移植(patient-derived tumor xenograft, PDX)模型和犬自发肿瘤模型中均显示出良好的特异性。其肿瘤靶向性由特异性有机阴离子转运肽(organic anion transporting peptides, OATP)调控, 并受到低氧条件控制, 这些特性将会拓展 NIRF 染料在肿瘤成像研究中的应用。

**[关键词]** 近红外荧光(NIRF); 七甲川菁染料; 肿瘤靶向性; 活体成像; 有机阴离子转运肽

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0337-05

近红外荧光(near-infrared fluorescence, NIRF)染料有着较高的体内消除率和较大的斯托克斯位移(Stoke's shift), 能够诱发产生 700~1 000 nm 的强荧光<sup>[1]</sup>, 为肿瘤诊断提供了可能性。该类染料应用于体内成像, 显示出诸多优势, 比如能够标记配体、产生信号强、组织吸收好、背景自发荧光低等<sup>[2-3]</sup>。吡咯菁绿(ICG)是目前唯一被美国 FDA 批准可用于临床诊断的 NIRF 染料, 被广泛应用于鉴别良性或恶性肿瘤<sup>[4]</sup>。常规 NIRF 染料一般需要与肿瘤细胞特异靶向配体结合才能用于肿瘤成像, 靶向配体包括代谢底物<sup>[5]</sup>、细胞表面肽<sup>[6]</sup>、生长因子<sup>[7]</sup>、抗体<sup>[8]</sup>以及肿瘤细胞表面特异性抗原等<sup>[9]</sup>。因为靶向配体不同, 而肿瘤细胞又具有异质性, 所以只有一些特异型肿瘤细胞才能被该类染料识别。另外, 配体与肿瘤细胞的化学结合可能会改变这类染料用于成像的靶向性。

七甲川菁(Heptamethine carbocyanine) NIRF 染

料兼具成像和肿瘤靶向的双重功能, 可用于肿瘤模型的活体成像。比如 IR-780<sup>[10]</sup>, IR-783<sup>[11]</sup>, IR-808<sup>[12]</sup>和 MHI-148<sup>[13]</sup>等。这些染料可直接被肿瘤细胞而不被正常细胞吸收, 并聚集于线粒体和溶酶体中, 不需要化学修饰便直接可识别肿瘤细胞。该类染料自发荧光低, 但当它们与生物分子结合时, 由于化学修饰便激发出较强的荧光。小鼠实验<sup>[14]</sup>已证实这些染料细胞毒性较低, 应用于临床具有较好的安全性。

## 1 七甲川菁染料的理化特性

七甲川菁染料是由多聚甲炔构成的一个共振结构, 两侧分别由一个氮原子参与形成共轭杂环<sup>[15]</sup>(图 1)。传统的花青染料光稳定性差, 有自聚集效应并且在水溶液中光量子产率低。为了解决这些问题, 人们尝试对这些染料进行结构修饰。比如, 在花青染料的多聚甲基炔链中引入环己烯基, 其光稳定性和荧光强度都有了显著提升。当引入了硫酸基团后, 不仅有效避免了荧光信号的减弱, 而且还可以减少染料的自聚集效应。结构中的多聚甲炔链可以抑制内部能量转换和二聚体化, 增加荧光信号的强度和稳定性<sup>[16]</sup>。

**[收稿日期]** 2018-04-09

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(31772546, 31572340)

**[作者简介]** 师长宏(1973-), 男, 博士, 教授, 博士生导师。主要从事肿瘤模型的制备及评价研究。

E-mail: changhong@fmmu.edu.cn

一般化学结构中多聚甲炔链越长其结构越不稳定,但是移入环类基团,就可以提升结构的强度,减少内部能量转化而增加内部量子的产率。

理想的 NIRF 染料不仅要能被肿瘤细胞直接靶向识别,而且还要有一定的水溶性和脂溶性,在体内清除效率适当,还易于进行结构修饰,如便于与标记探针、放射性核素和化疗药物等,从而提高识别肿瘤细胞的敏感性。比如一侧修改为磺酸基提高其水溶性,另一侧保持羧基结构,便于进行化学修饰。

## 2 NIRF 染料在肿瘤移植模型中应用

七甲川菁类染料已被证实<sup>[15, 17]</sup>能被多种不同类型肿瘤细胞而非正常细胞特异吸收,包括循环

肿瘤细胞(CTC)、异种移植肿瘤和原发性肿瘤等,也可直接被裸小鼠体内原发灶或继发灶中肿瘤细胞特异性摄取并聚集。在临床工作中,这些具有肿瘤成像和靶向定位双重特性的染料,为监测肿瘤生长和在外科手术中辨识肿瘤手术切缘提供了可能。通过实时 NIRF 成像,可以明确肿瘤组织病变边缘的精确位置,因而降低了漏检阳性位点的可能性,提升了肿瘤外科手术的治疗效果<sup>[18]</sup>。手术切除肝转移瘤时,通过 NIRF 成像,可以鉴别肝脏的良恶性病灶,尤其用于检测小于 5 mm 的转移瘤,具有明显的优势<sup>[19]</sup>。在兔 VX2 肝癌细胞原位移植模型中,注射肿瘤靶向性七甲川菁化合物 DZ-1 后,使用 NIRF 术中探测仪可清楚的探查至肝癌发生的部位及边缘(图 2),为手术切除提供依据<sup>[18]</sup>。

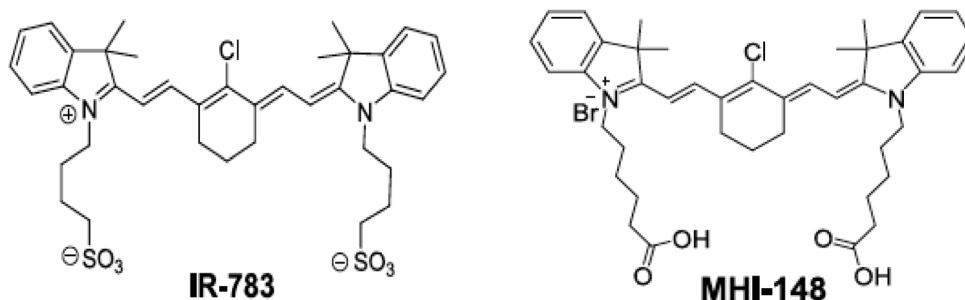


图 1 七甲川菁 NIRF 染料的基本化学结构

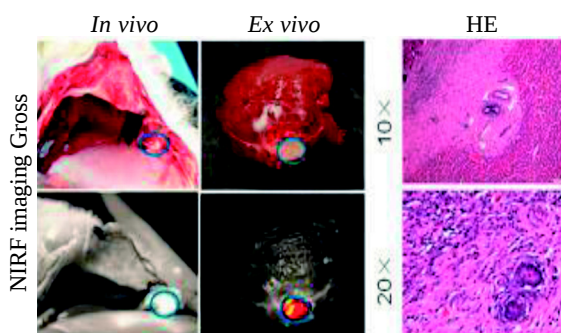
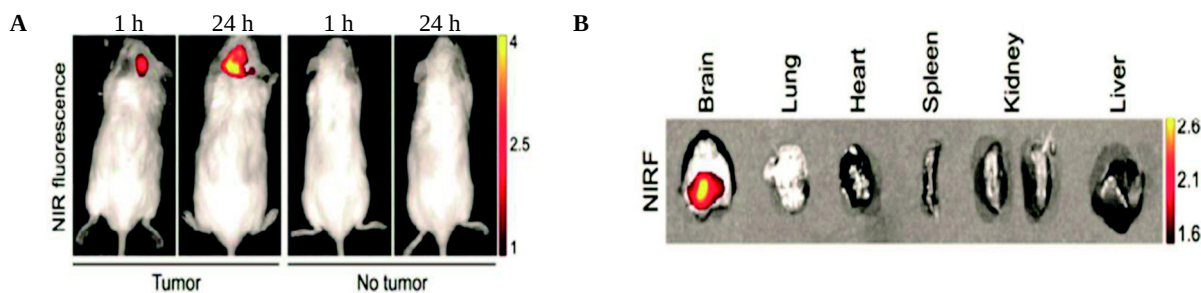


图 2 七甲川菁化合物 DZ-1 在兔 VX2 肝癌移植模型手术探查中的应用<sup>[18]</sup>

由于犬的原发和继发性肿瘤的发展过程和人体十分相似,为了评估七甲川菁染料在大型动物体内的肿瘤特异性靶向能力,选择自发性肿瘤犬作为模型,通过光学成像和正电子发射计算机断

层显像/X线计算机断层成像仪(PET/CT)扫描两种方式同时来判定 NIRF 染料的摄取和聚集特性<sup>[20]</sup>,为其临床应用提供了可行性。七甲川菁染料 IR-783 与化疗药物吉西他滨(NIRG)共轭结合成为 IR-783-NIRG,该染料作为药物载体能通过血脑屏障和血肿屏障(图 3),将药物转运至脑肿瘤部位,结果显示 IR-783-NIRG 能显著抑制颅内胶质瘤的生长<sup>[21]</sup>。上述结果为七甲川菁染料的临床应用和未来发展都提供了重要的实验依据。

将临床新鲜的肿瘤标本移植到裸小鼠肾包膜建立人源肿瘤组织异体移植(patient derived tumor xenograft, PDX)模型,可以使用七甲川菁染料进行活体成像确认该部位肿瘤的形成<sup>[22]</sup>。使用该方法,已经筛选出多个不同类型的 PDX 模型,包括胃癌、肝癌和肾癌等<sup>[17, 18, 22]</sup>。在移植部位均可



A: 脑胶质瘤小鼠原位移植模型注射 IR-783 后不同时间点 NIRF 活体成像; B: 分离荷瘤鼠主要脏器后 NIRF 成像

图 3 IR-783 通过血脑屏障与 SCID 小鼠颅内移植胶质瘤的靶向结合<sup>[21]</sup>

早期检测到较强的 NIRF 信号, 通过 HE 染色进一步确认了肿瘤组织的形态。

### 3 七甲川菁染料结合同位素用于 PET 成像

核素成像用于肿瘤的探查具有较多的优势, 但该类探针用于 PET 示踪时常表现出半衰期短、空间分辨率低和射线暴露等缺点, 而且高基础代谢率的组织如大脑会摄取较多的核素。七甲川菁染料可以直接靶向定位肿瘤细胞, 所以, NIRF 联合同位素成像将可能替代传统的核素成像用于肿瘤的早期诊断<sup>[23]</sup>。核素标记七甲川菁染料, 可以提升该类染料探查深层组织内肿瘤的敏感性。比如将高表达 RNKL 的人前列腺癌细胞 LNCaP 皮下接种裸小鼠制备移植模型, 使用七甲川菁染料 PC-1001 进行活体成像显示了裸小鼠体表的 2 处肿瘤, 而 PC-1001/PET 成像则还可以探查到一个更深部位的肿瘤<sup>[24]</sup>。多种 PET 示踪元素已经被应用在 NIRF 核素成像的实验性肿瘤模型上, 包括  $^{18}\text{F}$ 、 $^{11}\text{C}$ 、 $^{99}\text{mTc}$ 、 $^{64}\text{Cu}$  和  $^{111}\text{In}$ <sup>[25]</sup>等。

最近, 有人合成了一种用于乳腺癌 PET 成像的 PET/NIRF 探针 PC-1001/ $^{64}\text{Cu}$ , 该探针由七甲川菁染料 PC-1001 和  $^{64}\text{Cu}$  经化学修饰合成<sup>[24]</sup>, 在人乳腺癌细胞和裸小鼠移植模型中均表现出较高的肿瘤特异性摄取率和聚集特性, 而正常组织摄取率较低。也有报道<sup>[26]</sup>将七甲川菁染料 PC-1007 和  $^{99}\text{mTc}$  化学修饰合成, 这种探针在肿瘤细胞和移植模型上均表现出较好的靶向性, 并能在肿瘤部位特异性聚集。为了进一步评估七甲川菁染料在大型动物体内的肿瘤特异性靶向能力, PC-1001/

$^{68}\text{Ga}$  成功应用于自发肿瘤犬的 PET 和荧光成像, PET/CT 图像显示出了七甲川菁染料聚集部位, 病理分析确认了二者的一致性<sup>[20]</sup>。

### 4 七甲川菁染料靶向识别肿瘤细胞的机制

肿瘤组织缺氧环境是调控七甲川菁染料特异性识别肿瘤细胞的重要机制<sup>[27]</sup>, 而吲哚菁绿(ICG)染料识别肿瘤细胞主要通过血浆蛋白质的物理性结合来实现<sup>[28]</sup>, 尚无证据表明 ICG 特性吸收与肿瘤组织缺氧环境有直接关联。在裸小鼠肿瘤移植模型的活体成像中, ICG 只有相对较低的肿瘤组织/背景组织比率(tumor-to-background ratio), 24 h 时维持在 1.4~1.7<sup>[18]</sup>, 而七甲川菁染料 MHI-148 的比率却高达 9.1, 当与缺氧相关的低氧诱导因子  $1\alpha(\text{HIF}1\alpha)$  蛋白高表达时, 该比率可进一步提升 2 倍, 这也是七甲川菁类染料相比于其他 NIRF 染料在肿瘤成像中的优势所在。有机阴离子转运肽(OATPs)在转运七甲川菁染料进入肿瘤细胞的过程中也起到重要作用<sup>[27]</sup>。OATPs 介导两性化合物的细胞转运, 包括药物和其他一些外源性物质<sup>[16,29]</sup>。目前已报道<sup>[30]</sup>的人类 OATPs 有 11 种, 按其氨基酸序列的同源性被分成 6 个家族。其中 OATP1B3 可有效调控七甲川菁染料 IR-780 和 IR-783 在肿瘤细胞内的转运, 如果使用 OATP1B3 竞争性抑制药物—碘溴酞钠(bromsulphthalein sodium, BSP), 可明显减弱肿瘤细胞对七甲川菁的特异性摄取<sup>[15,20]</sup>。

缺氧是肿瘤组织普遍存在的现象, 通常与新陈代谢、血管形成、肿瘤转移和药物抗性的形成等密切相关, 文献<sup>[31]</sup>报道 HIF1 $\alpha$  直接促进了 OATP1B3

的表达。HIF1 $\alpha$ 的活性核蛋白与OATP1B3启动子中的HRE相互作用,增强了OATP1B3基因的转录功能。而在有氧的环境中(正常组织),HIF1 $\alpha$ 通过PHD/VHL途径迅速被降解而变得不稳定<sup>[32]</sup>,这也是正常组织OATP1B3处于较低水平的主要原因。因此,正常组织和细胞中HIF1 $\alpha$ /OATPs信号失活,转运和集聚七甲川菁染料的能力减弱。当使用HIF1 $\alpha$ 稳定剂(DMOG和氯化钴)时,可以促进肿瘤细胞内OATP1B3的转录,增强肿瘤细胞对七甲川菁染料的吸收;与此相反,当抑制肿瘤细胞内HIF1 $\alpha$ 水平时,OATP1B3和OATP2B1表达降低,对七甲川菁染料的吸收减弱<sup>[14,27]</sup>。尽管上述结论是从前列腺癌细胞和肿瘤移植模型中获得,但由于组织缺氧和HIF1 $\alpha$ /OATPs信号的活化是大部分肿瘤细胞中普遍存在的现象,可进一步测试七甲川菁染料结合其它肿瘤细胞的能力,将NIRF活体成像技术用于不同类型肿瘤模型的检测。

## 5 结论和展望

七甲川菁染料兼具肿瘤成像和靶分子的双重功能,基于该类染料的NIRF活体成像技术已成功应用于肿瘤模型的检测,但应用于临床前仍面临诸多问题。如:现有的七甲川菁染料通透性和敏感性需要进一步提升;还需要通过化学修饰来进一步增强它的靶向性;还需要调整染料的脂溶性和水溶性,使其能更有效地穿透细胞膜识别胞内分子;需要进一步降低染料与血液蛋白的非共价结合,以降低背景的干扰。未来的化学修饰将进一步提升七甲川菁类化合物在肿瘤细胞中靶向性,降低背景荧光信号。同时,随着多模态影像技术的应用,基于七甲川菁类化合物的多模态探针将会从分子、解剖结构和功能等方面呈现肿瘤模型的变化,并加速推动其临床应用。

### 参考文献:

- [1] Usama SM, Zhao B, Burgess K. A near-IR fluorescent dasatinib derivative that localizes in cancer cells[J]. *Bioconjug Chem*, 2019, 30(4):1175-1181.
- [2] 赖漪娆, 丁晔伟, 施琳俊, 等. 近红外荧光成像在头颈部鳞癌手术治疗中的应用[J]. *临床口腔医学杂志*, 2018, 34(8):506-509.
- [3] 张贺, 张彩勤, 赵勇, 等. 基于临床手术标本的胰腺癌原位移植模型建立及评价[J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(3):296-301.
- [4] Liberale G, Vankerckhove S, Galdon MG, et al. Fluorescence imaging after intraoperative intravenous injection of indocyanine green for detection of lymph node metastases in colorectal cancer[J]. *Eur J Surg Oncol*, 2015, 41(9):1256-1260.
- [5] Feng L, Yang Y, Huo X, et al. Highly selective NIR probe for intestinal  $\beta$ -glucuronidase and high-throughput screening inhibitors to therapy intestinal damage[J]. *ACS Sens*, 2018, 3(9):1727-1734.
- [6] Yang JA, Kong WH, Sung DK, et al. Hyaluronic acid-tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand conjugate for targeted treatment of liver fibrosis[J]. *Acta Biomater*, 2015, 12:174-182.
- [7] Keereweer S, Mol IM, Kerrebijn JD, et al. Targeting integrins and enhanced permeability and retention (EPR) effect for optical imaging of oral cancer[J]. *J Surg Oncol*, 2012, 105(7):714-718.
- [8] Xu M, Rettig MP, Sudlow G, et al. Preclinical evaluation of Mab CC188 for ovarian cancer imaging[J]. *Int J Cancer*, 2012, 131(6):1351-1359.
- [9] Tsuchimochi M, Yamaguchi H, Hayama K, et al. Imaging of metastatic cancer cells in sentinel lymph nodes using affibody probes and possibility of a theranostic approach [J]. *Int J Mol Sci*, 2019,20(2): pii: E427.
- [10] Yi X, Yan F, Wang F, et al. IR-780 dye for near-infrared fluorescence imaging in prostate cancer[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21:511-517.
- [11] Shao C, Liao CP, Hu P, et al. Detection of live circulating tumor cells by a class of near-infrared heptamethine carbocyanine dyes in patients with localized and metastatic prostate cancer[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2):e88967.
- [12] Yi X, Wang F, Qin W, et al. Near-infrared fluorescent probes in cancer imaging and therapy: an emerging field[J]. *Int J Nanomedicine*, 2014, 9:1347-1365.
- [13] Thomas RG, Moon MJ, Surendran SP, et al. MHI-148 cyanine dye conjugated chitosan nanomicelle with NIR light-trigger release property as cancer targeting theranostic agent[J]. *Mol Imaging Biol*, 2018, 20(4):533-543.
- [14] Yang X, Shi C, Tong R, et al. Near IR heptamethine cyanine dye-mediated cancer imaging[J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(10):2833-2844.
- [15] Shi C, Wu JB, Pan D. Review on near-infrared heptamethine cyanine dyes as theranostic agents for tumor imaging, targeting, and photodynamic therapy[J]. *J Biomed Opt*,

- 2016, 21(5):50901-50911.
- [16] Miranda D, Huang H, Kang H, et al. Highly-soluble cyanine J-aggregates entrapped by liposomes for *in vivo* optical imaging around 930 nm[J]. Theranostics, 2019, 9(2):381-390.
- [17] Zhao N, Zhang C, Zhao Y, et al. Optical imaging of gastric cancer with near-infrared heptamethine carbocyanine fluorescence dyes[J]. Oncotarget, 2016, 7(35):57277-57289.
- [18] Zhang C, Zhao Y, Zhang H, et al. The application of heptamethine cyanine dye HC and indocyanine green for imaging and targeting in xenograft models of hepatocellular carcinoma[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(6):pii:E1332.
- [19] van der Vorst JR, Schaafsma BE, Verbeek FP, et al. Near-infrared fluorescence sentinel lymph node mapping of the oral cavity in head and neck cancer patients[J]. Oral Oncol, 2013, 49(1):15-19.
- [20] Shi C, Wu JB, Chu GC, et al. Heptamethine carbocyanine dye-mediated near-infrared imaging of canine and human cancers through the HIF1 $\alpha$ /OATPs signaling axis[J]. Oncotarget, 2014, 5(20):10114-10126.
- [21] Wu JB, Shi C, Chu GC, et al. Near-infrared fluorescence heptamethine carbocyanine dyes mediate imaging and targeted drug delivery for human brain tumor[J]. Biomaterials, 2015, 67:1-10.
- [22] An J, Zhao N, Zhang C, et al. Heptamethine carbocyanine DZ-1 dye for near-infrared fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2017, 8(34):56880-56892.
- [23] Kim JS, Kim YH, Kim JH, et al. Development and *in vivo* imaging of a PET/MRI nanoprobe with enhanced NIR fluorescence by dye encapsulation[J]. Nanomedicine(Lond), 2012, 7(2):219-229.
- [24] Wu J, Pan D, Chung LW. Near-infrared fluorescence and nuclear imaging and targeting of prostate cancer[J]. Transl Androl Urol, 2013, 2(3):254-264.
- [25] Lutje S, Rijpkema M, Goldenberg DM, et al. Pretargeted dual-modality immuno-SPECT and near-infrared fluorescence imaging for image-guided surgery of prostate cancer [J]. Cancer Res, 2014, 74(21):6216-6223.
- [26] Zhang Y, Xiao L, Popovic K, et al. Novel cancer-targeting SPECT/NIRF dual-modality imaging probe (99m)Tc-PC-1007: synthesis and biological evaluation[J]. Bioorg Med Chem Lett, 2013, 23(23):6350-6354.
- [27] Wu JB, Shao C, Li X, et al. Near-infrared fluorescence imaging of cancer mediated by tumor hypoxia and HIF1 $\alpha$ /OATPs signaling axis[J]. Biomaterials, 2014, 35(28):8175-8185.
- [28] Hirche C, Murawa D, Mohr Z, et al. ICG fluorescence-guided sentinel node biopsy for axillary nodal staging in breast cancer[J]. Breast Cancer Res Treat, 2010, 121(2): 373-378.
- [29] Hagenbuch B, Stieger B. The SLCO (former SLC21) superfamily of transporters[J]. Mol Aspects Med, 2013, 34(2-3):396-412.
- [30] Liu T, Li Q. Organic anion-transporting polypeptides: a novel approach for cancer therapy[J]. J Drug Target, 2014, 22(1):14-22.
- [31] Yuan J, Yi X, Yan F, et al. Nearinfrared fluorescence imaging of prostate cancer using heptamethine carbocyanine dyes [J]. Mol Med Rep, 2015, 11(2):821-828.
- [32] Wang Y, Liu T, Zhang E, et al. Preferential accumulation of the near infrared heptamethine dye IR-780 in the mitochondria of drug-resistant lung cancer cells[J]. Biomaterials, 2014, 35(13):4116-4124.

# 中国仓鼠口腔鳞癌 miR-504 的表达特征分析

卫佳宁, 续国强, 高继萍, 王晓堂, 肖兰飞, 宋国华

(山西医科大学实验动物中心, 实验动物与人类疾病模型动物模型山西省重点实验室, 太原 030001)

**[摘要]** 目的 构建中国仓鼠口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)动物模型, 研究 miR-504 在中国仓鼠 OSCC 动物模型的癌组织和癌旁组织中的表达特征。方法 采用二甲基苯并蒽(DMBA)涂抹法诱导中国仓鼠 OSCC 模型, 对 OSCC 中 miR-504 的前体序列克隆分析; 提取癌组织颊囊和癌旁组织舌的总 miRNA, qRT-PCR 检测不同时间点(造模 0 周、6 周、12 周和 18 周)中国仓鼠颊囊和舌组织中 miR-504 的表达水平。结果 颊囊黏膜在造模 6 周时出现轻度的充血, 12 周时黏膜增厚, 18 周时局部有白斑样病变和糜烂。与正常对照组相比, 在 6 周、12 周和 18 周时, miR-504 在颊囊组织的表达水平分别增加约 0.83、0.33、0.23 倍( $P < 0.001$ ); 而在舌组织的表达水平变化分别约为正常舌组织的 0.92、0.84、0.27 倍( $0.001 < P < 0.01$ )。结论 DMBA 涂抹仓鼠颊囊组织建立的 OSCC 模型, 癌组织中 miR-504 的表达量显著增加, miR-504 与 OSCC 的发生发展密切相关, 可能调控其靶基因及其下游的信号通路。本结果有助于了解 miR-504 在中国仓鼠 OSCC 各个阶段的癌组织和癌旁组织的差异表达特征。

**[关键词]** 中国仓鼠; 口腔鳞状细胞癌(OSCC); miR-504 表达特征

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0342-07

口腔鳞状细胞癌(oral squamous cell carcinoma, OSCC)是头颈部最常见的恶性肿瘤之一, 约占头颈部恶性肿瘤的 90% 左右<sup>[1]</sup>, 其发病率在全球呈逐年上升趋势<sup>[2]</sup>。每年头颈部恶性肿瘤新发患者人数高达 60 万例<sup>[3,4]</sup>, 且患病人群趋向于年轻化<sup>[5]</sup>, 这对人类健康和生命构成了严重的威胁。

微小 RNA(microRNA, miRNA)是具有调控基因表达功能的非编码小分子单链 RNA, 在癌症以及其他疾病的发生、发展中发挥着重要作用, 参与了肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移等生物学特性的调控过程, 发挥类似癌基因或抑癌基因的作用。关于 miRNA 在 OSCC 方面的研究有: miR-29b-1-5p

诱导 OSCC 的上皮间充质转化<sup>[6]</sup>; miR-125b 通过靶向抗氧化因子过氧化物样酶 2A(peroxiredoxin-like 2A, PRXL2A)来抑制口腔致癌性<sup>[7]</sup>; miR-127-3p 靶向驱动蛋白(kinesin-like protein, KIF3B)以抑制 OSCC 的发展<sup>[8]</sup>; miR-199a-5p 通过靶向丝氨酸 - 苏氨酸激酶 / 核因子  $\kappa$ B (IKK $\beta$  / NF- $\kappa$ B)信号通路在 OSCC 中起肿瘤抑制剂的作用<sup>[9]</sup>等相关研究, miR-504 是我们课题组前期通过对中国仓鼠 OSCC 模型高通量测序筛选得到的, 目前其在 OSCC 方面的相关研究知之甚少。

中国仓鼠是我国具有特色的实验动物, 其口腔两侧各有一个伸缩性大的颊囊, 颊囊组织主要由纤维组织、鳞状上皮细胞及疏松结缔组织构成, 血供丰富, 微血管网密、颜色淡、透光性好, 是进行 OSCC 研究的理想动物模型<sup>[10]</sup>。本实验室完成了中国仓鼠口腔颊囊组织 miRNA 高通量测序和生物信息学分析, 鉴定得到差异表达的 miRNA 共有 268 个, 137 个表达上调, 131 个表达下调, 其中 miR-504 表达下调<sup>[11]</sup>。本文对 miR-504

**[收稿日期]** 2019-03-20

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31772551), 山西省自然科学基金(201701D121087)

**[作者简介]** 卫佳宁(1994-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: 823952957@qq.com

**[通信作者]** 宋国华(1973-), 女, 教授, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: ykdsgh@163.com

进行了克隆测序,并对其结构进行预测,采用 qRT-PCR 方法鉴定 miR-504 中中国仓鼠 OSCC 模型的癌组颊囊和癌旁舌组织的不同阶段的表达特征,为 OSCC 中 miR-504 下游相关通路研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物模型建立及分组

选取清洁级雄性中国仓鼠 90 只,8~10 周龄,体质量 30~40 g(误差不大于 10%),山西医科大学实验动物中心生产[SCXK(晋)2015-0001];90 只中国仓鼠分为 3 组:空白组 30 只、阴性对照组 12 只、实验组 48 只,空白组不做处理,阴性对照组涂抹丙酮,实验组涂抹丙酮溶解的 0.5% 二甲基苯丙蒽(9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracene, DMBA)。仓鼠分笼饲养在屏障动物实验设施中[SCXK(晋)2015-0001],饲养室温度 23~25 °C,环境相对湿度 40%。涂药后禁食禁水 2 h,其余时间自由进食和饮水,仔细观察每只鼠的生活状况,对外观产生病变的鼠及时进行标记。

### 1.2 样本采集及病理 HE 染色

模型建立开始,隔日涂一次 DMBA。定期在造模 6 周、12 周和 18 周解剖 13 只(8 只实验组+5 只对照组)仓鼠取样:取仓鼠的左右颊囊和舌组织,将采集的一部分颊囊组织和所有舌组织做好标记立即放入液氮中冷冻,然后于 -80 °C 冰箱中保存,以备提取 RNA;另一部分颊囊组织放入质量分数 4% 多聚甲醛溶液中固定 24~72 h,然后进行乙醇溶液梯度脱水、石蜡包埋、切片、伊红-苏木素(HE)染色、中性树脂封片。

### 1.3 RNA 提取及反转录

采用 Trizol 试剂(日本 TaKaRa 公司)提取组织中的 RNA,按照说明书操作。用酶标仪(FLX-8000 型,美国 Gene 公司)对 RNA 的浓度和纯度进行定量评估,参照 miRNA cDNA 第一链合成试剂盒(日本 TaKaRa 公司)说明书合成 cDNA,10 μL 反应体系: mRQ Buffer (2 ×) 5 μL,组织中提取的 miRNA (0.25~8 μg) 3.75 μL, mRQ Enzyme 1.25 μL。在 PTC-200PCR 仪上进行反转录反应程序设置:第一步在单引物的介导和反转录酶的催化下合成 RNA 的互补链 cDNA: 37 °C, 60 min; 第二步加热

后 cDNA 与 RNA 链解离: 85 °C, 5 min。最终生成 miRNA 对应的 cDNA 第一链, -20 °C 保存备用。

### 1.4 miR-504 前体序列的克隆

中国仓鼠中 miR-504 的成熟体序列来自 miRBase 数据库,将成熟体序列比对到 OSCC 基因组,得到 miR-504 前体的基因组序列,根据所获得的序列设计特异性 miR-504 引物(表 1),用于扩增 miR-504 的前体序列,克隆得到了符合预期结果的片段,连接到 GV268 载体上(GENE, 吉凯基因),转化质感受态细胞中,挑取单克隆,经过验证得到阳性克隆的序列,将测序结果在 miRBase(<http://www.mirbase.org/>)上进行 BLAST 分析,并使用 miRNA 前体二级结构在线预测软件 The mfold Web Server (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>)对 miR-504 前体进行二级结构预测。

### 1.5 颊囊和舌中 miR-504 实时定量分析

使用 RT-PCR 方法检测 miR-504 在中国仓鼠 OSCC 四个阶段中的表达特征。RT-PCR 实验正向引物基于 miRNA 成熟体序列设计,反向引物使用 miRcute miRNA qPCR (TaKaRa 公司,日本)检测试剂盒自带的引物。用 U6 基因作为内参,引物序列见表 1。RT-PCR 按照 TaKaRa 试剂盒说明书进行操作,25 μL 反应体系: 正向引物 0.5 μL,反向引物 0.5 μL, ROX Dye (50 ×) 0.5 μL, miRNA 第一链 cDNA 2.0 μL, SYBR Advantage Premix (2 ×) 12.5 μL, ddH<sub>2</sub>O 9 μL。在 Real time PCR 仪(美国 ABI 公司)上进行 RT-PCR 反应程序设定,反应条件,步骤 1: 95 °C 5 min; 步骤 2: 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 40 个循环,实验重复 3 次,每组设置 3 个重复, Ct 值取 3 个重复的平均值,结果以  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  相对表达量表示<sup>[12]</sup>。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$  计算方法:  $\Delta\Delta Ct = [(\text{样本 } Ct_{\text{目的基因}} - \text{样本 } Ct_{\text{内参基因}}) - (\text{对照组 } Ct_{\text{目的基因}} - \text{对照组 } Ct_{\text{内参基因}})]$ 。

表 1 荧光实时定量 PCR 引物序列

| 引 物          | 序列 (5' → 3')                                         |
|--------------|------------------------------------------------------|
| 内参引物 U6      | R: AACGCTTCACGAATTTGCGT<br>F: CTCGCTTCGGCAGCACA      |
| miR-504 定量引物 | F: AGACCCUGGUCUGCACUCUAUC                            |
| miR-504 前体引物 | F: CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG<br>R: TTATTAGGAAAGGACAGTGGG |

## 1.6 miR-504 的 qRT-PCR 数据统计分析

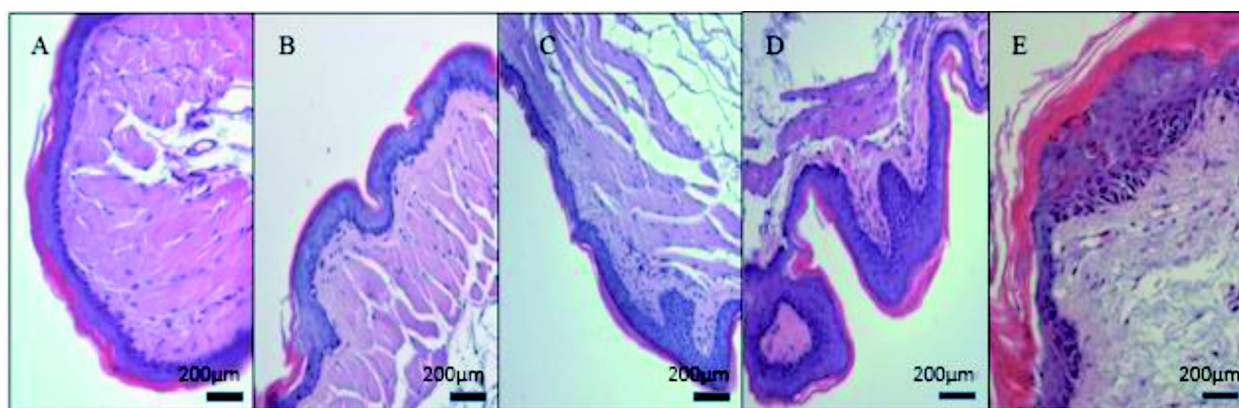
采用 SPSS 17.0 统计软件对 qRT-PCR 检测结果的数据进行分析,对 PCR 结果的数据采用  $\bar{x} \pm s$  表示,结果采用 *t* 检验,多组样本均数间的两两比较采用单因素方差分析法(ANOVA)中的 LSD 法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 中国仓鼠颊囊组织病理学观察

光学显微镜下,正常颊囊组织棘细胞层薄,

基底层细胞明显、排列整齐,钉突不明显,空白组和阴性对照组组织学观察一致,未出现异常改变(图 1A 和 B);模型组在 6 周时颊囊黏膜出现轻度充血,病理观察可见棘层细胞增厚,基底层细胞形态正常,相对于正常组略微增厚,极少数钉突形成(图 1C);12 周时黏膜增厚,病理观察见棘层细胞明显增厚,基底层细胞增生且呈明显改变,钉突较 6 周明显增宽(图 1D);18 周时局部有白斑样病变和糜烂,病理观察见棘层细胞呈单个或成团角化,基底层细胞增厚,大部分的基底层细胞异常增生,大量细胞极性消失,散乱排列(图 1E)。



A: 空白组; B: 阴性对照组; C: 模型组 6 周; D: 模型组 12 周; E: 模型组 18 周

图 1 中国仓鼠颊囊黏膜癌变的组织病理学观察 (HE × 200)

Figure 1 Histopathological observation of mucosal carcinogenesis in Chinese hamsters (HE × 200)

### 2.2 miR-504 前体序列的克隆及测序验证

测序结果去除载体后显示片段大小为 325 bp,将该序列在 miRBase(<http://www.mirbase.org/>)数据库进行 BLAST 分析,结果显示该序列与野猪、猕猴、黑猩猩、犬、牛、人、小鼠等的 miR-504 具有同源性。测序比对结果如下(红色为 miR-504 前体序列):

AGCAGAGCTCTCTGGCTAACTAGAGAACC  
CACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACT  
CACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTT  
AAACGGGCCCTCTAGACTCGAGAGTGGAATAAC  
TCAAAAGGAAAAGGTAACCAACGAGCCATCCA  
TTTCCCACATAGAATCACAACAGAAGACAGAAAA  
TATGGAGTGGAAATGTTGAATCAGCTGCTGTTGGG  
AGACCTGGTCTGCACTCTATCTGTATTCTTACTG  
AAGGGAGTGCAGGGCAGGGTTTCCCATACAGA

GGGCACAGACTACCACCGTATGGCAAATGTTGA  
CTGGAACCTCAACTTCAAAGCCATTTACCTGGA  
AATCTTACCCACACCCCAATGCTTCATGAAAA  
TTCAAGGTACCAAGCTTAAGTTTAAACCGCTGA  
TCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCC  
ATCTGTTGTTTGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTT  
GACCCCTGGAAGGTGCCACTCCCCTGTCTCTTT  
CCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCATGTCT  
GAGTAGGTGTCTATTCTATTCTGGGGGGTGGGGT  
GGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAG  
ACAATAGCAGGCATGC

### 2.3 miR-504 前体二级结构预测

通过 The mfold Web Server 分析,颊囊 miR-504 前体序列的二级结构有 6 个,其中由最小折叠自由能 ( $\Delta G = -76.40$  kcal/mol)形成的二级结构最稳定(图 2),可以看出口腔颊囊 miR-504 前体序列

二级结构具有典型的颈环结构特征。经二级结构分析和 miRBase 前体序列同源性分析,在前体序列中发现了 miR-504 的成熟体序列,确认克隆得到的序列为 miR-504 前体序列。

## 2.4 miR-504 在 OSCC 颊囊组织四个阶段表达量

采用 qRT-PCR 方法检测颊囊样本中 miR-504 的表达量,miR-504 和内参 U6 特异性扩增,熔解曲线均为单一峰,特异性较好。采用  $2^{-\Delta\Delta ct}$  法计算相对表达量,每周组织的个体数为 3 只,每个至少重复 3 次,可以准确反映 miRNA 的表达情况。经过统计学分析,miR-504 在颊囊组织中的表达特征如下:在 6 周、12 周和 18 周时,实验组的表达量约是空白组的 0.83、0.33、0.23 倍;12 周时的表达量显著低于前一个时间段 ( $P<0.001$ ),其余两组两两比较差异有显著性 ( $P<0.05$ );相对于空白组,实验组 miR-504 的表达水平均较低(图 3 左)。

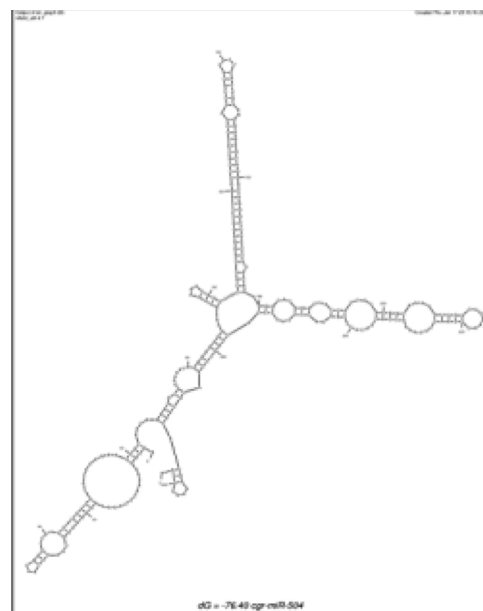
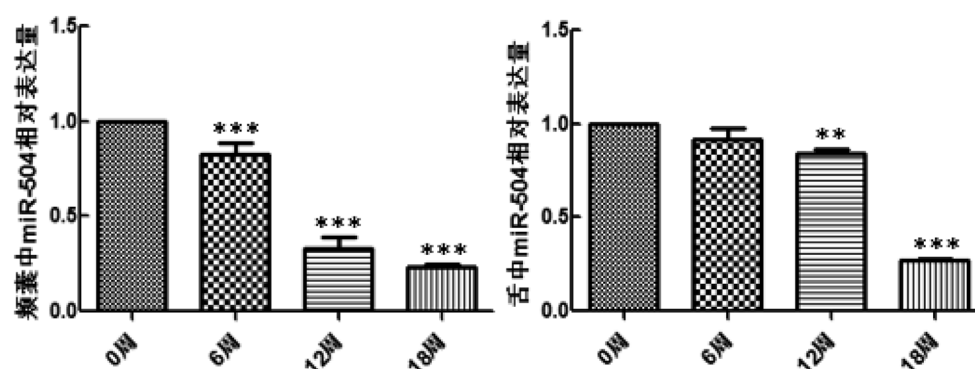


图 2 miR-504 前体序列形成的颈环结构

Figure 2 Hairpin structures formed by precursor sequences of miR-504



左: 颊囊, 右: 舌; \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$

图 3 中国仓鼠 OSCC 的 miR-504 相对表达量

Figure 3 Relative expression of miR-504 in OSCC of Chinese hamster

经过统计学分析,miR-504 在舌组织中的表达特征如下:在 6 周、12 周和 18 周时,miR-504 在舌组织的相对表达量约是正常舌组织的 0.92、0.84、0.27 倍,12 周和 18 周 miR-504 的相对表达量差异性极显著 ( $P<0.01$ ),相应的 miR-504 的表达水平不断降低(图 3 右)。

## 2.5 中国仓鼠 OSCC 模型中癌组织颊囊和癌旁组织舌中 miR-504 表达差异比较

结果显示,相对于正常组织,在 6 周、12 周、18 周的实验组颊囊和癌旁舌组织中 miR-504 的表达水平在不断下调,且差异有显著性(图 4)。

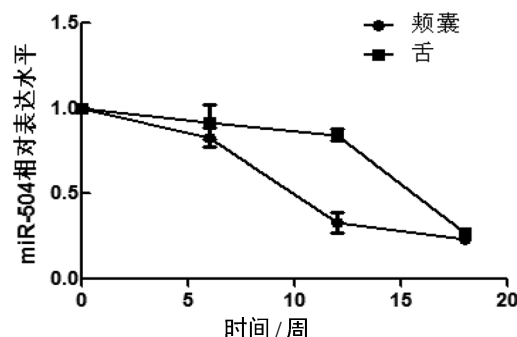


图 4 中国仓鼠 OSCC 的 miR-504 表达水平

Figure 4 Expression of miR-504 in OSCC of Chinese hamster

### 3 讨论

近年来,除了基于临床的对 OSCC 相关病因、诊断标准和预后的回顾性研究,研究人员越来越重视 OSCC 动物模型的建立,旨在进行 OSCC 发病机制与抗癌药物药理学研究。目前关于 OSCC 动物模型方面有注射法建立金黄仓鼠颊囊癌模型<sup>[13]</sup>,质量分数 0.002% 的 4-硝基喹林-1-氧化物(4-NQO)饮水法诱导 Wistar 大鼠舌白斑癌变动物模型<sup>[14]</sup>等。每种方法有各自的特点,相对于饮水法,涂抹法能有效避免 OSCC 癌变以外的并发症。本研究使用的中国仓鼠源于我国,具有中国特色的实验动物,利用其两侧大颊囊的特点制备 OSCC 动物模型具有显著优势。

前期的研究采用二代高通量测序技术筛选出与 OSCC 通路相关的差异表达的基因 miR-504<sup>[11]</sup>,本文研究了 miR-504 在中国仓鼠颊囊和舌组织中的表达特征。首先克隆得到中国仓鼠 miR-504 前体,经 The mfold Web Server 对前体进行二级结构预测,miR-504 能形成经典的颈环结构。初级 miR-504 经过 2 个步骤的剪切最终形成成熟的 miR-504。第一步在细胞核中,初级 miR-504 由 RNase III 内切酶家族的 Drosha 酶剪切成颈环结构的 miR-504 前体;第二步在细胞质中,由 RNase III 内切酶家族的 Dicer 酶剪切成 RNA 双链复合体,该复合体在 Dicer 酶作用下解旋,其中一条或者两条与 AGO 蛋白形成 RNA 的沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC)。包含 RNA 的 RISC 通过成熟 miRNA 识别沉默靶标,并与靶标基因的 mRNA 的 3' 非编码区域进行互补配对,引导 RISC 与靶标基因结合或将靶标基因降解,从而达到调控靶标基因表达的目的<sup>[15]</sup>。与人类基因组的其他区域或基因座相比,miRNA 基因的单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)较低<sup>[16,17]</sup>。此外, Han 等<sup>[18]</sup>通过 NCBI 和 UCSC 数据库挖掘数据和分析指出 miRNA 的保守性,概因二级结构及其功能的重要性影响了 miRNA 基因中 SNP 的积累。

目前,关于 miR-504 在其他疾病及相关信号通路中的研究有不少。如 miR-504 通过抑制 Frizzled-7 介导的 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号传导而在肝细胞癌中起肿瘤抑制剂的作用<sup>[21]</sup>; miR-504 通过在非小细胞

肺癌中靶向赖氨酰氧化酶样蛋白 2(LOXL2)来抑制细胞增殖和侵袭<sup>[22]</sup>; miR-504 通过靶向肿瘤蛋白 p53 诱导的核蛋白 1(TP53INP1)促进人骨肉瘤中的肿瘤生长和转移<sup>[23]</sup>; miR-504 还是一种肿瘤抑制性 microRNA,通过靶向人脑胶质瘤中的 FOXP1 来抑制细胞增殖并促进细胞凋亡<sup>[19]</sup>;结缔组织生长因子(CTGF)通过激活 miR-504 / FOXP1 信号传导来调节 OSCC 的侵袭性<sup>[24]</sup>。这些研究为探讨 miR-504 在 OSCC 发生发展中分子机制提供了借鉴。

本实验显示,DMBA 涂抹过的颊囊中 miR-504 的表达下调,而癌旁舌组织中 miR-504 的表达先降低后升高。有文献<sup>[19]</sup>报道,miR-504 在 FOXPI(FOX 家族基因)的相关通路中高表达并发挥促癌作用;在周期蛋白依赖性激酶 6(cyclin-dependent kinases 6, CDK6)的相关通路中低表达并发挥抑癌作用<sup>[20]</sup>。癌组颊囊和癌旁组舌中 miR-504 的表达出现的差异,可能与相关信号通路上的调控机制相关。

综上所述,DMBA 涂抹法建立的中国仓鼠 OSCC 动物模型为研究 OSCC 的发病机理提供了可靠的材料,显著下调的 miR-504 与 OSCC 的发生机制有关,可能是 OSCC 诊断的潜在标志物。因此,从 miR-504 对 OSCC 的致病机制及相关信号通路的研究具有重要意义,可为临床 OSCC 的早发现早治疗提供依据。

#### 参考文献:

- [1] 张华,杨蓉,叶贝贝,等. 389例口腔鳞状细胞癌预后影响因素分析[J]. 天津医科大学学报, 2018, 24(4):315-322.
- [2] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1):5-29.
- [3] Wang YF, Ma SR, Wang WM, et al. Inhibition of surviving reduces HIF-1 $\alpha$ , TGF- $\beta$ 1 and TFE3 in salivary adenoid cystic carcinoma [J]. PLoS One, 2014, 9(12): e114015.
- [4] Zhang L, Zhang W, Wang YF, et al. Dual induction of apoptotic and autophagic cell death by targeting survivin in head neck squamous cell carcinoma[J]. Cell Death Dis, 2015, 6:e1771.
- [5] He KF, Zhang L, Huang CF, et al. CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma [J]. Biomed Res Int, 2014:838632.
- [6] Kurihara-Shimomura, Sasahira T, Shimomura H, et al. The

- Oncogenic Activity of miR-29b-1-5p Induces the Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(2). pii:E273.
- [7] Chen YF, Wei YY, Yang CC, et al. miR-125b suppresses oral oncogenicity by targeting the anti-oxidative gene PRXL2A [J]. *Redox Biol*, 2019, 22:101140. doi: 10.1016/j.redox.2019.101140. [Epub ahead of print]
- [8] Ji L, Zhu ZN, He CJ, et al. MiR-127-3p targets KIF3B to inhibit the development of oral squamous cell carcinoma[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(2):630-640.
- [9] Wei D, Shen B, Wang W, et al. MicroRNA 199a 5p functions as a tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma via targeting the IKK $\beta$ /NF $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2019 Jan 29. doi: 10.3892/ijmm.2019.4083. [Epub ahead of print].
- [10] 皇甫冰, 庞文彪, 宋国华, 等. 中国仓鼠口腔颊囊黏膜癌模型的建立及癌变的动态观察[J]. *癌变·畸变·突变*, 2016, 28(1):56-65.
- [11] 李莉红, 庞文彪, 宋国华, 等. 中国仓鼠口腔颊囊黏膜癌中 miRNA 与 mRNA 表达谱的关联分析[J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(02):158-164.
- [12] 常凯, 高继萍, 宋晓娜, 等. miR-34c 在口腔鳞状细胞癌的表达及对 Tca8113 细胞生物学行为的影响[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(11):15-20.
- [13] 张宝平. 金黄仓鼠口腔颊囊癌动物模型在重离子放射治疗中的应用[D]. 兰州: 兰州大学, 2011.
- [14] 葛姝云. 4NQO 诱发大鼠舌白斑癌变的实验研究[C]. 上海: 上海第二医科大学口腔医学院、上海市口腔医学会. 中华口腔医学会第六届全国口腔黏膜病学术会议论文集, 2004:1.
- [15] 高伟. miRNA/miRNA\* 二级结构影响 miRNA169 调控靶基因 NFYA5 方式的研究[D]. 中国农业科学院, 2015.
- [16] Saunders MA, Liang H, Li WH. Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007, 104(9):3300-3305.
- [17] Duan S, Mi S, Zhang W, et al. Comprehensive analysis of the impact of SNPs and CNVs on human microRNAs and their regulatory genes[J]. *RNA Biol*, 2009, 6(4):412-425.
- [18] Han M, Zheng Y. Comprehensive analysis of single nucleotide polymorphisms in human MicroRNAs [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11):e78028.
- [19] Cui R, Guan Y, Sun C, et al. A tumor-suppressive microRNA, miR-504, inhibits cell proliferation and promotes apoptosis by targeting FOXP1 in human glioma [J]. *Cancer Lett*, 2016, 374(1):1-11.
- [20] Kikkawa N, Kinoshita T, Nohata N, et al. microRNA-504 inhibits cancer cell proliferation via targeting CDK6 in hypopharyngeal squamous cell carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(6):2085-2092.
- [21] Quan H, Li B, Yang J. MicroRNA-504 functions as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma through inhibiting Frizzled-7-mediated-Wnt/ $\beta$ -catenin signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 107:754-762.
- [22] Ye MF, Zhang JG, Guo TX, et al. MiR-504 inhibits cell proliferation and invasion by targeting LOXL2 in non small cell lung cancer [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 97:1289-1295.
- [23] Cai Q, Zeng S, Dai X, et al. miR-504 promotes tumour growth and metastasis in human osteosarcoma by targeting TP53INP1 [J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(5):2993-3000.
- [24] Yang MH, Lin BR, Chang CH, et al. Connective tissue growth factor modulates oral squamous cell carcinoma invasion by activating a miR-504/FOXP1 signalling [J]. *Oncogene*, 2012, 31(19):2401-2411.

## Expression Characteristics of miR-504 in Oral Squamous Cell Carcinoma of Chinese Hamster

WEI Jia-ning, XU Guo-qiang, GAO Ji-ping, WANG Xiao-tang, XIAO Lan-fei, SONG Guo-hua  
(Shanxi Medical University Laboratory Animal Center, Shanxi Key Laboratory of  
Experimental Animal Science and Human Disease Animal Model, Taiyuan 030001, China)

**[Abstract] Objective** An animal model was established to study the expression characteristics of miR-504 in the cancer and adjacent paracancerous tongue tissues of the Chinese hamster oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Methods** The OSCC model of Chinese hamster was induced by smear of 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracene (DMBA), cloning and analysis of the precursor sequence of miR-504 in OSCC. The total miRNAs in the cheek pouch and paracancerous tongue tissues were detected by qRT-PCR at different time points (0, 6, 12 and 18 weeks of modeling). **Results** The buccal mucosa showed mild hyperemia at 6 week, thickened at 12 week, local leukoplakia lesions and erosion at 18 week. Compared with the normal control group, the expression levels of miR-504 in the cheek pouch tissue increased by about 0.83, 0.33 and 0.23 times ( $P<0.001$ ) at 6, 12, and 18 weeks respectively. The expression level in the tongue tissue was about 0.92, 0.84 and 0.27 times compared with that of normal tongue tissue respectively ( $0.001<P<0.01$ ). **Conclusions** The expression of miR-504 was significantly increased in the OSCC model established by DMBA smear of the hamster cheek pouch tissue. miR-504 is closely related to the development of OSCC and may regulate its target gene and its downstream signaling pathway. The results of this study are helpful to understand the differential expression characteristics of miR-504 in the cancer and paracancerous groups of various stages of OSCC in Chinese hamsters.

**[Key words]** Chinese hamster; Oral squamous cell carcinoma (OSCC);  
MiR-504 expression characteristics

# 牛棒状杆菌环介导等温扩增快速检测方法 的建立及初步应用

冯洁<sup>1,2</sup>, 张泉<sup>1</sup>, 钱淼<sup>1</sup>, 谢建云<sup>2</sup>, 高诚<sup>2</sup>

(1.扬州大学兽医学院, 扬州 225009; 2.上海实验动物研究中心,  
上海市实验动物质量监督检验站, 上海 201203)

**[摘要]** 目的 建立牛棒状杆菌(*C. bovis*)环介导等温扩增(LAMP)快速检测方法。方法 根据牛棒状杆菌 16S rRNA 基因保守区域设计一组特异性引物, 对反应条件进行优化并对特异性和敏感性进行分析。结果 建立的 LAMP 扩增方法仅能检测出牛棒状杆菌, 其他常见细菌未见特异性扩增, 检出牛棒状杆菌的最低模板量为 118 fg/μL。结论 建立的牛棒状杆菌 LAMP 检测方法操作简单、快速高效, 结果易于观察, 对仪器设备要求低, 可用于牛棒状杆菌的快速检测。**[关键词]** 牛棒状杆菌(*C. bovis*); 环介导等温扩增(LAMP); 检测

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2019)05-0349-07

牛棒状杆菌(*Corynebacterium bovis*, *C. bovis*)是一种革兰氏阳性小杆菌, 条件性致病, 世界范围内广泛分布, 可感染多种动物, 可导致裸小鼠表皮角化过度, 俗称“鳞皮病”, 也是引起奶牛乳房炎的常见病原菌之一<sup>[1,2]</sup>。无毛鼠、免疫缺陷鼠一旦感染, 几乎终身携带。感染小鼠表现鳞屑状皮炎, SCID 小鼠则出现脱毛、形成秃块等症状。通常呈一过性感染, 感染后 7~10 d 出现“鳞屑”, 14~20 d 内自行消失, 但感染至少持续 30 d 左右。组织学检查可出现棘皮症、角化过度, 真皮层可观察到单核细胞浸润<sup>[3-5]</sup>。感染动物通常伴随体质量减轻、结膜充血、摄水量增加、异种移植物生长缓慢等现象。对实验动物质量和实验结果有较大影响, 因此已被全球众多实验动物机构列为实验大、小鼠尤其是免疫缺陷鼠的重点监测病原体之一。我国于 2010 年首次报

道该菌感染情况<sup>[6]</sup>, 但至今尚未列入国家标准规定的监测项目。仅在 2017 年颁布的团体标准<sup>[7]</sup>中规定了该菌的分离培养和 PCR 检测方法。本研究拟建立一种特异、敏感、高效的环介导等温扩增(loop-mediated isothermal amplification, LAMP)检测方法, 旨在为牛棒状杆菌的监测提供技术支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料、试剂及仪器

牛棒状杆菌 ATCC 7715(*C. bovis*)、嗜肺巴斯德杆菌 ATCC 35149(*P. pneumotropica*)、支气管鲍特杆菌 ATCC 14065(*B. bronchiseptica*)、金黄色葡萄球菌 ATCC 6538(*S. aureus*)、绿脓杆菌 ATCC 27853(*P. aeruginosa*)、啮齿柠檬酸杆菌 ATCC 51116(*C. rodentium*)均购自美国标准生物品收藏中心(American type culture collection, ATCC); 鼠伤寒沙门菌 CMCC50115(*S. typhimurium*)、福氏志贺菌 CMCC 51572(*S. flexneri*)、肺炎克雷伯杆菌 CMCC 46117(*K. pneumoniae*)均购自中国医学微生物细菌保藏管理中心。

脱氧核糖核酸扩增试剂盒(LAMP法)购自北京

[收稿日期] 2019-04-29

[基金项目] 上海市科技创新行动计划(17140900600)

[作者简介] 冯洁(1981-), 女, 副研究员, 主要从事实验动物质量控制研究。E-mail: moyifj@163.com

[通信作者] 高诚, E-mail: gaochengdgb@126.com

蓝谱生物科技有限公司, 细菌基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, DL2000 DNA Marker 购自日本 TaKaRa 公司, 琼脂糖购自西班牙 Bio-west 公司, GoldView™ 核酸染料购自上海赛百盛(SBS)基因技术有限公司。实时浊度仪 LA-320c, 购自日本荣研化学株式会社。

**1.2 方法**  
**1.2.1 引物设计与合成** 根据 GenBank 公布的牛棒状杆菌 16S rRNA 基因序列, 针对其保守区域利用 LAMP 在线设计软件设计一套 LAMP 引物, 包括外引物 F3 和 B3、内引物 FIP 和 BIP 和环引物 LB。引物序列如表 1, 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 LAMP 扩增引物序列  
Table 1 The sequences of LAMP primers

| 引物名称 | 引物序列 (5' → 3')                          |
|------|-----------------------------------------|
| F3   | CTTTTGTGACGGTACCTGCA                    |
| B3   | GCATTTCACCGCTACACCAG                    |
| FIP  | GGACAACGCTCGCACCTACGAAGCACCGGCTAACTACG  |
| BIP  | CGTCTGTGAAATCCCGGGGCCAGTCTCCCCTACAGCACT |
| LB   | GCAGGCGATACGGGCAT                       |

**1.2.2 基因组 DNA 提取** 按照 Tiangen 细菌基因组 DNA 抽提试剂盒说明书进行操作。提取的细菌基因组 DNA 经紫外分光光度计测定 A<sub>260/280</sub> 在 1.6~2.0 范围内方可使用。获得 DNA 样品于 -20 ℃ 保存备用。  
**1.2.3 LAMP 方法的建立与优化** 以牛棒状杆菌基因组为扩增模板, 灭菌纯净水为空白模板, 采用稀释好的 LAMP 引物, 参照 LAMP 扩增试剂盒说明, 采用表 2 体系进行预实验。将反应管置于实时浊度仪内反应并绘制曲线, 曲线上升表示发生扩增反应即为阳性。为确保反应精确性, 设置 60~66 ℃ 扩增温度范围、30~75 min 反应时间, 对反应条件进行优化。

表 2 LAMP 扩增体系  
Table 2 The Amplification system of LAMP

| 成分             | 用量        |
|----------------|-----------|
| 2 × 反应缓冲液      | 12.5 μL   |
| FIP(40 μmol/L) | 1 μL      |
| BIP(40 μmol/L) | 1 μL      |
| F3(5 μmol/L)   | 1 μL      |
| B3(5 μmol/L)   | 1 μL      |
| LB(20 μmol/L)  | 1 μL      |
| Bst DNA 聚合酶    | 1 μL      |
| 钙黄绿素           | 1 μL      |
| DNA 模板         | 1~2 μL    |
| 灭菌纯净水          | 补足至 25 μL |

**1.2.4 扩增产物检测** 经 2.0% 琼脂糖凝胶电泳检测或直接荧光染料目测观察。取 2 μL 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 若出现 LAMP 特征性的梯形带则判为阳性, 未出现扩增条带则判为阴性。在 LAMP 反应结束后目测, 反应管出现绿色荧光判为阳性, 橙色则判为阴性。  
**1.2.5 LAMP 特异性检测** 以牛棒状杆菌基因组 DNA 为阳性对照模板, 灭菌纯净水为阴性对照模板, 嗜肺巴斯德杆菌、支气管鲍特杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、鼠伤寒沙门菌、福氏志贺菌、啮齿柠檬酸杆菌、肺炎克雷伯杆菌基因组 DNA 为模板, 利用本文建立的 LAMP 检测方法分别进行扩增, 以评价该方法的特异性。  
**1.2.6 LAMP 灵敏度检测** 牛棒状杆菌基因组 DNA 模板按 10 倍梯度稀释成 11.8 ng/μL、1.18 ng/μL、118 pg/μL、11.8 pg/μL、1.18 pg/μL、118 fg/μL、11.8 fg/μL 共 8 个稀释度作为模板, 采用本文建立的 LAMP 检测方法进行扩增, 以确定其最低检测限。  
**1.2.7 临床应用验证** 无菌采集 52 只 SPF 级小鼠 (BALB/c 小鼠 17 只, 裸小鼠 35 只, 均为上海市实验动物生产许可证单位年检抽检样品) 回盲部内容物 0.2 g, 悬浮于 1 mL PBS(pH7.4) 中制成悬液, 按照细菌基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取 DNA。分别采用 LAMP 法和团体标准(T/CALAS 20-2017)实

验动物 牛棒状杆菌检测方法<sup>[7]</sup>进行检测,对检测结果进行分析。

2 结果

2.1 LAMP 检测方法的建立

为优化扩增条件,对不同反应温度和反应时间进行摸索。如图 1 所示,温度优化的结果显示

60~66 ℃都能将阳性核酸扩增,对照正常,其中 64 ℃ 的出峰时间最早,反应效率较高,故选择 64 ℃ 反应 60 min 为最佳反应条件。如图 2 所示,采用本研究建立的 LAMP 扩增体系对样品进行扩增,结果经电泳检测可见典型梯状条带,阴性对照未见条带。初步表明本研究建立的 LAMP 扩增方法可行。

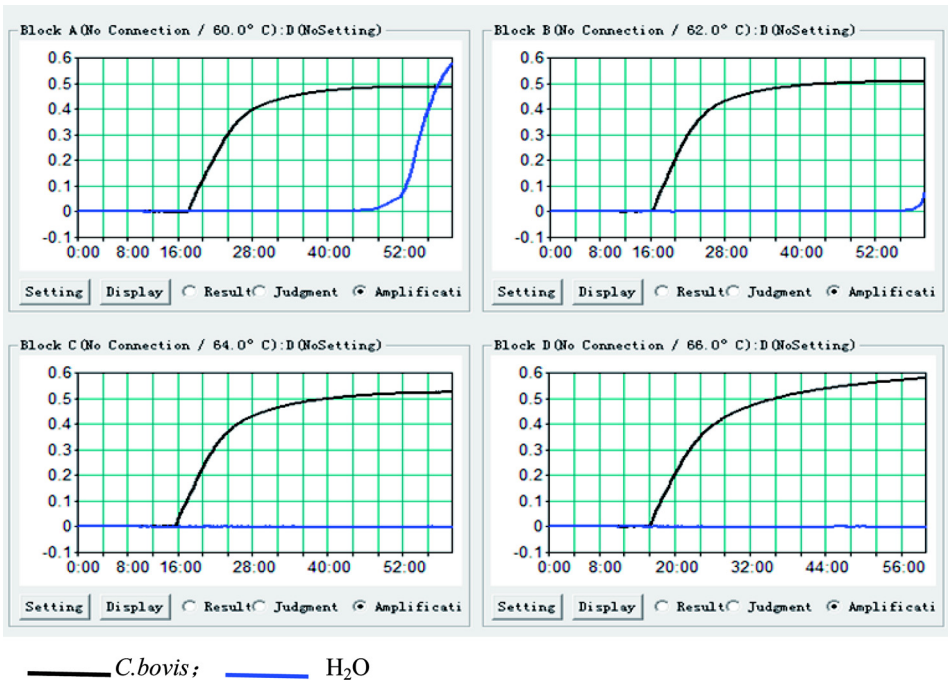
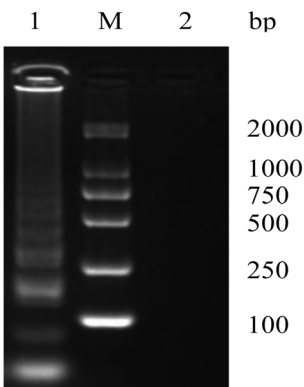


图 1 LAMP 反应温度的优化  
Figure 1 The optimization of the amplification temperature



1: 牛棒状杆菌 LAMP 扩增产物; 2: 阴性对照;  
M: DL2000 plus DNA marker

图 2 牛棒状杆菌 LAMP 扩增结果检测  
Figure 2 LAMP detection of *C. bovis*

2.2 LAMP 特异性检测

分别以嗜肺巴斯德杆菌、支气管鲍特杆菌、金黄色葡萄球菌、绿脓杆菌、鼠伤寒沙门菌、福氏志贺菌、啮齿柠檬酸杆菌、肺炎克雷伯杆菌的基因组 DNA 为模板进行 LAMP 扩增,牛棒状杆菌基因组 DNA 为阳性对照模板,灭菌纯净水为阴性对照模板。结果如图 3、图 4 所示,仅牛棒状杆菌出现上升性扩增曲线即特异性扩增,而其他菌株均未出现扩增,表明建立的 LAMP 检测方法特异性良好。

2.3 LAMP 灵敏度检测

以 11.8 ng/μL 的牛棒状杆菌基因组 DNA 为起

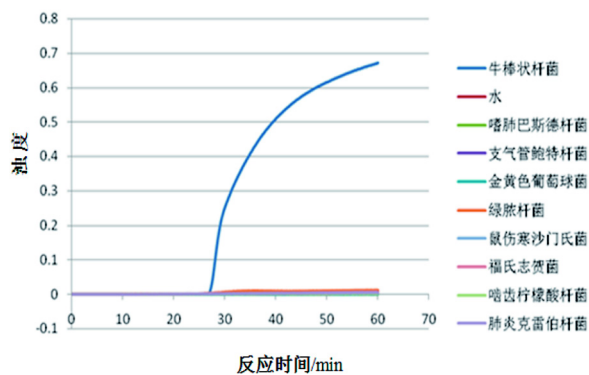


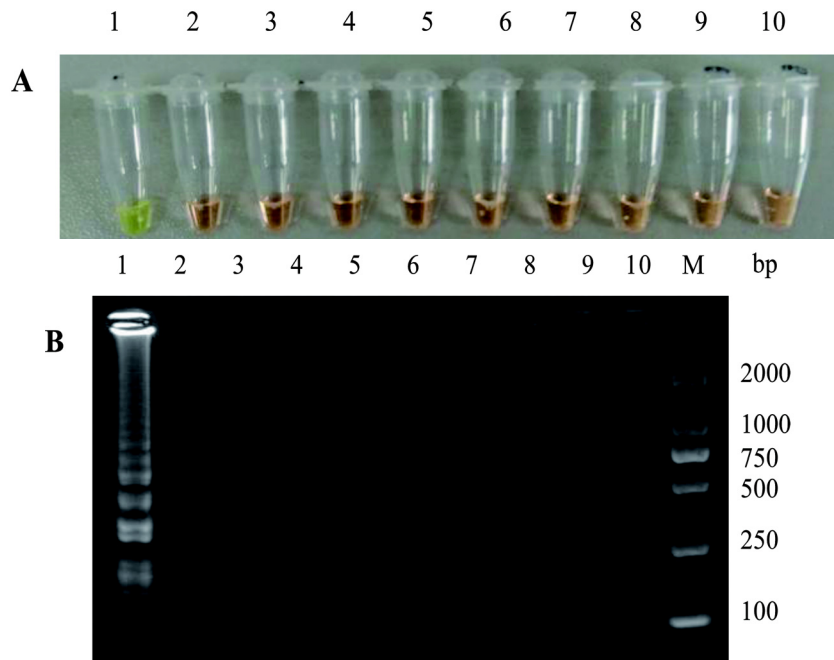
图3 特异性试验LAMP扩增图

Figure 3 LAMP amplification of specificity test

始浓度,按10倍梯度稀释后进行LAMP扩增,以验证LAMP检测体系的敏感性。结果显示本研究建立的LAMP方法能够检出的最低模板量为118 fg(图5)。

2.4 临床应用验证

应用本文建立的LAMP检测方法和团体标准推荐的PCR方法对52份样品进行检测。结果如表3所示,LAMP阳性检出率为98.08%(51/52),PCR阳性检出率为94.23%(49/52),LAMP方法的阳性检出率较PCR高3.85%,二者符合率为96.15%。



A: 特异性试验可视化检测; B: 特异性试验电泳检测

1: 牛棒状杆菌; 2: 水; 3: 嗜肺巴斯德杆菌; 4: 支气管鲍特杆菌; 5: 金黄色葡萄球菌; 6: 绿脓杆菌; 7: 鼠伤寒沙门氏菌; 8: 福氏志贺菌; 9: 啮齿柠檬酸杆菌; 10: 肺炎克雷伯杆菌; M: DL 2000 plus DNA Marker

图4 LAMP特异性试验

Figure 4 Specificity test of LAMP

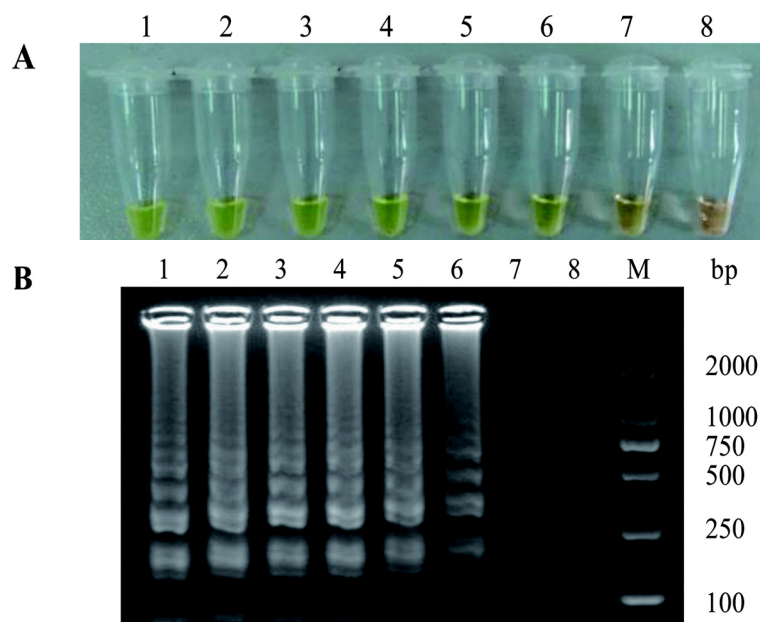
表3 LAMP和PCR方法的比较

Table 3 Comparison of LAMP and PCR

| 项目     | LAMP  | PCR   |
|--------|-------|-------|
| 样品数量   | 52    | 52    |
| 阳性数量   | 51    | 49    |
| 阳性率/%  | 98.08 | 94.23 |
| 共同阳性数量 | 49    |       |
| 共同阴性数量 | 1     |       |
| 符合率/%  | 96.15 |       |

3 讨论

牛棒状杆菌可寄居于感染小鼠的口腔、消化道,引起小鼠角化过度和体质量减轻,牛棒状杆菌感染可影响肿瘤生长、干扰异种移植、改变自然杀伤(NK)细胞活性等。因此感染了该菌的小鼠被认为不适用于科学实验<sup>[8-10]</sup>。近年来,国际上实验动物设施内牛棒状杆菌污染的案例时有发生



A: 敏感性试验可视化检测; B: 敏感性试验电泳检测

1: 11.8 ng/μL; 2: 1.18ng/μL; 3: 118 pg/μL; 4: 11.8 pg/μL; 5: 1.18 pg/μL; 6: 118 fg/μL;  
7: 11.8 fg/μL; 8: 1.18 fg/μL; M: DL 2000 plus DNA Marker

图5 LAMP敏感性试验

Figure 5 Sensitivity test of LAMP

生,牛棒状杆菌感染成为裸小鼠常见病原体之一<sup>[11-14]</sup>。实验动物设施内牛棒状杆菌感染控制非常困难,传播迅速,发病率高但死亡率低。携带牛棒状杆菌而无临床症状的裸小鼠是该病重要的传染源,可通过污染物如动物皮屑、垫料、笼具、手套及隔离衣等进行直接传播,还可经移植的肿瘤细胞系进行传播。已污染的设施内通过生物安全柜进行笼盒的更换及相关操作,并不能有效防止该菌的传播<sup>[15]</sup>。控制该病原体最有效的方法是减少饲养密度和大范围的环境净化。屏障系统、限制人员及物品进出、物品进入设施前充分消毒也是重要的保护手段。环境一旦被污染则很难清除。对于污染群体,一般建议全群淘汰,通过熏蒸重新净化环境,对于珍贵动物则需采用胚胎移植手段进行净化。

目前,该病可通过培养法和分子生物学方法进行诊断。牛棒状杆菌为革兰氏阳性小杆菌,菌体短小、一端或两端膨大呈棒状,无鞭毛、无荚膜、无芽孢,兼性厌氧。生长缓慢,分离困难,因裸小鼠皮肤表面的其他微生物生长速度快,直接从皮肤组织进行细菌分离培养,会出现

杂菌阻碍牛棒状杆菌生长,甚至将其覆盖,往往会造成漏检<sup>[9]</sup>,不适用于大规模流行病学调查。分子生物学检测方法具备高效快速、操作简便等优势,近年来应用十分广泛,尤其对于生长缓慢及苛养菌的检测尤为适用。LAMP技术是2000年Notomi等<sup>[16]</sup>报道的一种快速核酸扩增技术,该技术利用一种链置换DNA聚合酶(Bst DNA polymerase)和2对特殊引物,特异性识别靶序列上的6个独立区域,在等温条件下(65℃左右)保温数十分钟即可完成核酸扩增。反应结果可通过反应副产物焦磷酸镁白色沉淀直接进行肉眼观察判定,无需特殊、昂贵仪器。因具备简单、快速、灵敏、特异、易于推广等优势,尤其适合于现场使用,已广泛应用于病原体的快速检测和早期诊断。但是,LAMP的灵敏度高,一旦开盖容易形成气溶胶污染,分区不严格则易造成假阳性,在操作过程中应尽量避免。另外,该方法对引物设计要求比较高。

16S rRNA具有高度的保守性和特异性,已成为细菌基因分类理想的靶序列,可实现对细菌的快速、特异、灵敏检测,应用日益广泛。本研究根据牛棒状杆菌16S rRNA基因序列设计一组

LAMP 扩增特异性引物, 对新建 LAMP 检测体系进行条件优化、特异性和敏感性分析。实验结果显示, LAMP 扩增可在恒温条件下短时间内完成检测, 特异性好, 灵敏度较 PCR 高。检测结果可直接通过肉眼实现可视化观察, 无需开盖进行电泳, 操作简便、高效, 且避免了核酸污染检测场所。临床检测数据表明, PCR 和 LAMP 两种分子生物学检测方法相比, LAMP 方法敏感性较 PCR 方法高, 与敏感度检测结果一致, PCR 检测呈阳性的样品均能被 LAMP 方法检出。分子生物学检测方法具备精准、高效、便捷的优势, 可用于病原体的初步筛查, 但仍需结合分离培养等病原学检测金标准进行验证。

综上, 本研究建立了牛棒状杆菌 LAMP 快速检测方法, 与现有技术相比不受培养条件和检测仪器的限制, 具备简便、快捷、特异、灵敏的优势, 结果判定简单易行, 可用于实验动物、相关动物源性生物制品及实验动物环境中牛棒状杆菌的检测, 该方法的建立可为实验动物质量控制提供技术支撑。

#### 参考文献:

- [1] Ckufford CB, Walton BJ, Reed TH, et al. Hyperkeratosis in athymic nude mice caused by a coryneform bacterium microbiology, transmission, clinical signs, and pathology [J]. Lab Anim Sci, 1995, 45(2):131-139.
- [2] Duga S, Gobbi A, Asselta R, et al. Analysis of the 16S rRNA gene sequence of the coryneform bacterium associated with hyperkeratotic dermatitis of athymic nude mice and development of a PCR-based detection assay[J]. Mol Cell Probes, 1998, 12(4):191-199.
- [3] Scanziani E, Gobbi A, Crippa L, et al. Hyperkeratosis-associated coryneform infection in severe combined immunodeficient mice[J]. Lab Anim, 1998, 32(3):330-336.
- [4] Gobbi A, Crippa L, Scanziani E. *Corynebacterium bovis* infection in immunocompetent hirsute mice[J]. Lab Anim Sci, 1999, 49(2):209-211.
- [5] Scanziani E, Gobbi A, Crippa L, et al. Outbreaks of hyperkeratotic dermatitis of athymic nude mice in northern Italy[J]. Lab Anim, 1997, 31(3):206-211.
- [6] 张强, 熊炜, 李健, 等. 裸鼠过度角化症牛棒状杆菌的分离鉴定[J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33(8): 581-584.
- [7] 中国实验动物学会团体标准. T/CALAS 20-2017 实验动物 牛棒状杆菌检测方法[S]. 北京: 中国实验动物学会, 2017.
- [8] Hanna N, Davis TW, Fidler IJ. Environmental and genetic factors determine the level of NK activity of nude mice and affect their suitability as models for experimental metastasis [J]. Int J Cancer 1982, 30(3):371-376.
- [9] Sharkey FE, Fogh J. Considerations in the use of nude mice for cancer research [J]. Cancer Metastasis Rev, 1984, 3(4): 341-360.
- [10] Clifford CB, Walton BJ, Reed TH, et al. Hyperkeratosis in athymic nude mice caused by a coryneform bacterium: microbiology, transmission, clinical signs, and pathology [J]. Lab Anim Sci 1995, 45(2):131-139.
- [11] Dole VS, Henderson KS, Fister RD, et al. Pathogenicity and genetic variation of 3 strains of *Corynebacterium bovis* in immunodeficient mice[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2013, 52(4):458-466.
- [12] Pritchett-Corning KR, Cosentino J, Clifford CB. Contemporary prevalence of infectious agents in laboratory mice and rats[J]. Lab Anim, 2009, 43(2):165-173.
- [13] Tae-Hyoun Kim, Dong-Su Kim, Ju-Hee Han, et al. Detection of *Corynebacterium bovis* infection in athymic nude mice from a research animal facility in Korea[J]. J Vet Sci, 2014, 15(4):583-586.
- [14] 白玉, 尹良宏, 卢胜明. 牛棒状杆菌感染及其防治措施 [J]. 实验动物科学, 2015, 32(1):51-54.
- [15] Burr HN, Wolf FR, Lipman NS. *Corynebacterium bovis*: epizootologic features and environmental contamination in an enzootically infected rodent room[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2012, 51(2):189-198.
- [16] Notomi T, Okayama H, Tmita N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(12):e63.

## Development of a Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Detection of *Corynebacterium bovis*

FENG Jie<sup>1,2</sup>, ZHANG Quan<sup>1</sup>, QIAN Miao<sup>1</sup>, XIE Jian-yun<sup>2</sup>, GAO Cheng<sup>2</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

(2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai Quality  
Monitoring Center of Laboratory Animals, Shanghai 201203, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish a rapid and specific loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for *Corynebacterium bovis*(*C.bovis*). **Methods** A set of specific primers were designed based on the 16S rRNA of *C. Bovis*. The reaction parameters of LAMP assay were optimized and the specificity and sensitivity were determined. **Results** Among the tested bacteria, only *C.bovis* could be detected by the LAMP assay, no other bacteria were positive. The detection limit of the LAMP assay was 118 fg/μL genomic DNA of *C. bovis*. **Conclusions** The detection could be completed without expensive equipment and it was simple, specific, sensitive, and the result was ready to read-out. LAMP could be a good alternative method for a rapid detection and surveillance of *C. bovis*.

**[Key words]** *Corynebacterium bovis* (*C.bovis*); Loop-mediated isothermal amplification (LAMP);  
Detection

# 短发夹 RNA *TRPV4* 基因对脊柱侧弯大鼠模型椎间盘退变的抑制作用

李 琰<sup>1</sup>, 孔建军<sup>1</sup>, 陈子奇<sup>1</sup>, 祝聪聪<sup>2</sup>

(1. 冀中能源邢台矿业集团总医院骨科, 邢台 054000;

2. 邢台医学高等专科学校第二附属医院内科, 邢台 054000)

**[摘要]** 目的 探究短发夹 RNA(shRNA)瞬时感受器电位香草素 4(transient receptor potential vanilloid, *TRPV4*)基因对抑制 SD 大鼠脊柱侧弯动物模型椎间盘退变的机制。方法 采用经典的双足大鼠脊柱侧弯模型构建动物模型, 根据小干扰 RNA(siRNA)干扰原理, 构建短发夹 RNA(shRNA)-*TRPV4* 干扰载体, 根据实验目的大鼠分为对照组、模型组和 shRNA 组。采用影像学摄片观察大鼠脊柱侧弯的程度和 Cobb 角度; HE 染色观察退变椎间盘组织; 免疫组织化学染色检测髓核组织中 II 型胶原和多聚蛋白多糖(Aggregan)的表达; 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)和 Western blotting 从基因和蛋白两个层面检测诱导型一氧化氮合成酶(iNOS); 炎症相关因子环氧合酶 2(COX-2)和金属蛋白酶 9(MMP-9); 以及凋亡相关因子 B 淋巴细胞瘤-2 基因(Bcl-2), Bcl-2 家族抗凋亡因子(Bad), Bcl-2 家族相关 X 蛋白(Bax)以及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3), Caspase-6 和 Caspase-9 的表达水平。结果 0.011  $\mu$ L shRNA-*TRPV4* 慢病毒量转染效率较高, 为 90.3%; 对照组 SD 大鼠未发生侧弯; 模型组 SD 大鼠脊柱向左侧弯, Cobb 角为  $35.22^{\circ} \pm 2.18^{\circ}$ ; shRNA 组 SD 大鼠脊柱向左侧弯, Cobb 角为  $24.07^{\circ} \pm 3.09^{\circ}$ ; RT-PCR 结果显示, 模型组髓核组织中 iNOS, COX-2, MMP-9, Bad, Bax 和凋亡相关因子 Caspase-3, Caspase-6, Caspase-9 的 mRNA 表达水平均高于对照组( $P < 0.05$ ); 而抗凋亡因子 Bcl-2 的表达水平要低于对照组( $P < 0.05$ ); Western blotting 结果显示, 模型组髓核组织中 iNOS 和 MMP-9 的蛋白表达水平均高于对照组( $P < 0.05$ ); 而低于 shRNA 组( $P < 0.05$ ); 免疫组织化学染色结果显示, shRNA 组髓核组织中 II 型胶原蛋白和多聚蛋白多糖(Aggregan)蛋白的蛋白表达水平均低于对照组( $P < 0.05$ ); 而高于模型组( $P < 0.05$ )。结论 shRNA-*TRPV4* 可以抑制脊柱侧弯鼠模型中髓核细胞的凋亡, 降低髓核组织中 iNOS 以及炎症因子 COX-2 和 MMP-9 的表达, 对髓核组织的退变起到保护作用。**[关键词]** 髓核细胞; 脊柱侧弯; 凋亡; 机械敏感性离子通道; 瞬时感受器电位香草素 4(*TRPV4*)

[中图分类号] Q95-33 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2019)05-0356-08

青少年特发性脊柱侧弯(adolescent idiopathic scoliosis, AIS)是儿童骨科常见的疾病之一, 其特点是伴有椎体旋转和剃刀背<sup>[1]</sup>。AIS 不仅影响青

少年的身体发育, 还影响身体的美观, 对青少年的心理发育产生负面影响, 被称为青少年生长发育的“五大杀手”之一<sup>[2]</sup>。随着我国“晚婚晚育”基本国策的深入实施, 越来越多的高龄产妇出现, 儿童先天性疾病也相应增多<sup>[3]</sup>。其中 AIS 被认为是与松果体中褪黑素的水平密切相关<sup>[4]</sup>。有研究<sup>[5]</sup>表明, 我国 AIS 的发病率为 1.5%~3%, 女孩多见。因此, 寻找一种有效的早期干预手段

[收稿日期] 2019-03-28

[作者简介] 李 琰(1985-), 男, 硕士, 主治医师, 主要从事脊柱方面的研究。E-mail: x1e7ho@163.com

[通信作者] 祝聪聪(1987-), 女, 硕士, 从事预防医学方面的研究。E-mail: zhenyin252891@163.com

对青少年的发育具有重要意义。

瞬时感受器电位(transient receptor potential, TRP)超家族成员是机体内一类广泛分布的非选择性阳离子通道<sup>[6]</sup>,瞬时感受器电位香草素(transient receptor potential vanilloid, TRPV)是TRP通道中的一种亚型<sup>[7,8]</sup>。TRPV4是具有离子选择性的外向整流阳离子通道,能感受胞外渗透压的变化,与机械力学信号密切相关<sup>[9]</sup>。基因工程中的RNA干扰技术是针对特发性疾病比较有效的干预手段<sup>[10]</sup>。对于AIS的治疗,既往研究<sup>[11,12]</sup>大多集中于内分泌干预,而很少关注椎体本身的病理发展。本实验以机械激活性离子通道TRPV4为切入点,从脊椎生物力学角度探究短发夹RNA(shRNA)-TRPV4对于椎间盘髓核细胞的保护作用,以期对AIS的早期干预提供新的思路与方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及试剂

SPF级雌性离乳SD大鼠30只,体质量为 $(91.3 \pm 3.6)$  g,购自山东省实验动物中心[SCXK(鲁)2016-0893];DMEM培养液购自美国Gibco公司。鼠源性II型胶原,多聚蛋白多糖(Aggregan)人基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和诱导型一氧化氮合成酶iNOS抗体购自美国Abcam公司;白细胞介素1(IL-1)和IL-6 ELISA试剂盒购自北京碧云天试剂有限公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 实验对象 SD大鼠饲养于邢台医学高等专科学校实验动物研究中心 SPF级设施[SYXK(冀)2007-1193],室温为 $(22.9 \pm 4.2)$  °C,相对湿度为45%~55%,无菌饲料喂养。根据实验目的,将30只SD大鼠分成对照组,模型组和shRNA组3组,每组10只。

1.2.2 脊柱侧弯鼠模型的构建 采用经典的双足大鼠脊柱侧弯模型构建方法<sup>[13]</sup>。采用手术方法将SD大鼠截去前肢和尾巴,术中严格无菌操作,术后常规抗生素处理,应用6-巯基嘌呤腹腔注射,每月1次,构建SD大鼠脊柱侧弯模型。利用影像学资料检查SD大鼠脊柱侧弯模型的成功率。对照组大鼠常规饲养,不作任何处理;shRNA组:

SD大鼠构建脊柱侧弯鼠模型,每月摄片,CT定位下T12-L1椎体注射10  $\mu$ L shRNA-TRPV4慢病毒载体;模型组:SD大鼠构建脊柱侧弯鼠模型,CT定位引导下T12-L1椎体注射等量生理盐水。

1.2.3 ShRNA-TRPV4干扰载体构建 根据siRNA干扰原理, GeneBank数据库查询鼠源性TRPV4基因序列,针对TRPV4的开放阅读框(ORF)序列构建siRNA干扰序列,利用环状RNA构建shRNA-TRPV4干扰载体,人源胚胎肾(HEK)细胞筛选有效序列,所有构建和筛选工作由上海吉凯生物有限公司完成。

1.2.4 影像学摄片 利用本医疗中心影像科X线摄片机器,对上述3组动物进行摄片,并记录3组的cobb角度。

1.2.5 组织病理学染色 3组动物处理3个月后,处死大鼠,取T12-L1节段椎体和椎间盘,分别作石蜡包埋冰冻切片和直接冰冻切片,用于作HE染色和免疫组织化学染色。前者二甲苯脱蜡后,97%和80%乙醇溶液浸润30 min,自来水冲洗,HE染色封片。后者质量分数4%甲醛溶液固定,BSA孵育,孵育II型胶原蛋白一抗和Aggrecan蛋白一抗,放入湿盒,4 °C冰箱孵育过夜,PBS清洗3次,每次5 min;HRP二抗避光孵育30 min,PBS清洗3次,每次5 min,封片。切片用倒置显微镜观察。

1.2.6 RT-PCR检测大鼠髓核组织中相关因子的mRNA表达水平 处理3个月后处死大鼠,取T12-L1节段椎间盘髓核组织,研磨棒充分研磨。利用Trizol法提取RNA, TaKaRa荧光定量PCR试剂盒检测iNOS,炎症相关因子环氧合酶2(COX-2)、MMP-9、凋亡相关因子B淋巴细胞瘤-2基因(Bcl-2)、Bcl-2家族抗凋亡因子(Bad)、Bcl-2家族相关X蛋白(Bax),以及含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3), Caspase-6和Caspase-9的mRNA表达水平,根据反应体系的不同,加入各试剂。采用上海RT-PCR仪器进行分析,总时间设置为2 h。

1.2.7 Western-blotting检测iNOS, MMP-9的蛋白表达水平 处理3月后处死大鼠,取T12-L1节段椎间盘髓核组织,研磨棒充分研磨。RIPA细胞裂解液裂解细胞,提取总蛋白,95 °C金属浴煮沸后备用,同时按照Western blotting制胶说明

表 1 目的基因的引物序列  
Table 1 Primer sequence of target gene

| 引物名称             | 引物序列                                                                            |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------|
| <i>i</i> NOS     | 正义链 5'-CATGGCTTTGGATGGAGAGT-3'<br>反义链 5'-TGGGAGTTTGCTCTTCAAGG-3'                |
| <i>COX-2</i>     | 正义链 5'-CTTCCCAGTGGAGGTCC-3'<br>反义链 5'-GAGGGTTGCTTCTTTGC-3'                      |
| <i>MMP-9</i>     | 正义链 5'-AGACTCCAAGTGGCCGTTT-3'<br>反义链 5'-TCTGTGGGTTGCTTCTTTAA-3'                 |
| <i>Bcl-2</i>     | 正义链 5'-CTTTACGCTTAACGAGCGAACG-3'<br>反义链 5'-GAAGACGGTAATGCGTACGTGC-3'            |
| <i>Bad</i>       | 正义链 5'-CCGGTTAATTAGCGGCTCCGG-3'<br>反义链 5'-GCCTTTCCATTAGGTACGTTT-3'              |
| <i>Bax</i>       | 正义链 5'-CTATTCAATCGCGAAGCCGG-3'<br>反义链 5'-GCATTTGGGCCAATACGTTT-3'                |
| <i>Caspase-6</i> | 正义链 5'-GACTTCGTATTAAGCCGG-3'<br>反义链 5'-GCCGACCAATGCGTATTG-3'                    |
| <i>Caspase-3</i> | 正义链 5'-CGCGCGCGTTATAGCGTTATTGACGCG-3'<br>反义链 5'-TTTAAGCGCGATGCGTACGTTAATTTTC-3' |
| <i>Caspase-9</i> | 正义链 5'-GTGTGCGTATGTCTGTACGTAGTCATG-3'<br>反义链 5'-TGGCCGTAATTCCTGACCCGTAAATTA-3'  |
| <i>hGAPDH</i>    | 正义链 5'-GCGCGCTGATGTGTAATAATTGCG-3'<br>反义链 5'-TGTGTTTAGTCGTAGTCGTATGGA-3'        |

配置分离胶和浓缩胶，查询 *i*NOS 和 *MMP-9* 的分子量，根据分子量大小选择配置 10% 分离胶和 20% 浓缩胶。加入 20  $\mu$ L 上样蛋白，直流电电泳 100 min，交流电电泳 10 min。待蛋白电泳分离后，等离子转膜后，加入 *i*NOS 和 *MMP-9* 鼠源一抗 (Abcam 公司, 1 : 1 000 稀释), 4  $^{\circ}$ C 避光孵育过夜 (>12 h)。12 h 后 PBST 洗膜, 每次 20 min, 加入山羊抗鼠 IgG 二抗(艾美捷科技有限公司, 1 : 5 000 稀释), 避光孵育 1.5 h, PBST 洗膜, 每次 20 min, 重复 3 次, DAB 显影液处理。Image J 软件分析蛋白条带。

1.2.8 免疫组织化学染色 3 组动物处理 3 月后, 处死大鼠, 取 T12-L1 节段椎体和椎间盘, 冰冻切片机切片, 质量分数 4% 甲醛溶液固定, BSA 孵育, 孵育 II 型胶原蛋白一抗和 Aggrecan 蛋白一抗, 放入湿盒, 4 $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜, PBS 清洗 3 次, 每次 5 min; HRP 二抗避光孵育 30 min, PBS 清洗 3 次, 每次 5min; 封片后倒置显微镜观察。

1.3 统计学处理

应用 SPSS18.0 进行统计学分析, 结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。对照组、模型组和 shRNA 组比较采用单

因素方差分析方法, 组间差异采用 *q* 检验, *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 shRNA-TRPV4 慢病毒载体的构建和转染

以 HEK-293 细胞为检测细胞, 以绿色荧光蛋白(GFP)为荧光探针, 检测 shRNA-TRPV4 的慢病毒载体的构建。结果表明, 0.011  $\mu$ L 慢病毒量转染效率较高, 为 90.3%(图 1)。

2.2 影像学表现

对照组 SD 大鼠未发生侧弯; 模型组 SD 大鼠脊柱向左侧弯, cobb 角为 35.22 $^{\circ} \pm 2.18^{\circ}$ ; shRNA 组 SD 大鼠脊柱向左侧弯, cobb 角为 24.07 $^{\circ} \pm 3.09^{\circ}$  (图 2)。

2.3 模型大鼠髓核组织中相关因子的 mRNA 表达

模型组髓核组织中*i*NOS, *COX-2*, *MMP-9*, *Bad*, *Bax* 和凋亡相关因子 *Caspase-3*, *Caspase-6*, *Caspase-9* 的 mRNA 表达水平平均高于对照组(*P*<0.05), 而抗凋亡因子 *Bcl-2* 的表达水平要低于对照组(*P*<0.05)。shRNA 组髓核组织中 *i*NOS, *COX-2*, *MMP-9*,

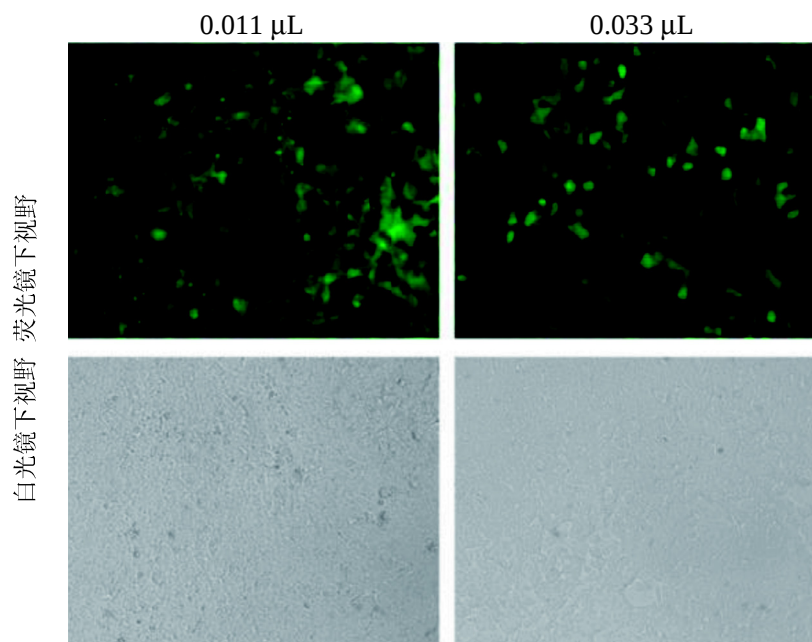
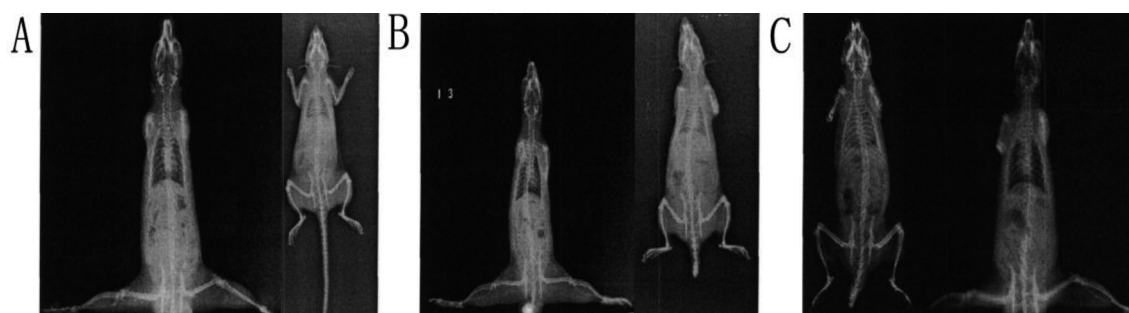


图1 shRNA-TRPV4 慢病毒载体的构建和转染(100 ×)

Figure 1 Construction and transfection of lentivirus vector shRNA-TRPV4 (100 ×)



A: 对照组; B: 模型组; C: shRNA 组

图2 组SD大鼠的影像学表现

Figure 2 Imaging findings of three groups in SD rats

*Bad*, *Bax* 和凋亡相关因子 *Caspase-3*、*Caspase6* 和 *Caspase-9* 的 mRNA 表达水平均高于对照组 ( $P<0.05$ ), 而抗凋亡因子 *Bcl-2* 的表达水平要低于对照组 ( $P<0.05$ )。shRNA 组髓核组织中 *iNOS*, *COX-2*, *MMP-9*, *Bad*, *Bax* 和凋亡相关因子 *Caspase-3*, *Caspase6*, *Caspase9* 的 mRNA 表达水平均低于模型组 ( $P<0.05$ ), 而抗凋亡因子 *Bcl-2* 的表达水平要高于模型组 ( $P<0.05$ )(图 3)。

## 2.4 Western blotting 表达

shRNA 组髓核组织中 *iNOS* 和 *MMP-9* 的蛋白表达水平均高于对照组 ( $P<0.05$ ), 而低于模型组 ( $P<0.05$ )(图 4)。

## 2.5 免疫组织化学染色观察

shRNA 组髓核组织中 II 型胶原蛋白和 Aggrecan 蛋白的蛋白表达水平均低于对照组 ( $P<0.05$ ), 而高于模型组 ( $P<0.05$ )(图 5, 图 6)。

## 3 讨论

### 3.1 青少年特发性脊柱侧弯与椎体的异常机械应力密切相关

到目前为止, AIS 病因学研究的重点在于动物模型的构建<sup>[14,15]</sup>。有学者<sup>[16]</sup>曾对 SD 大鼠采用切除大脑松果体和腹腔注射褪黑素抑制剂的方法构

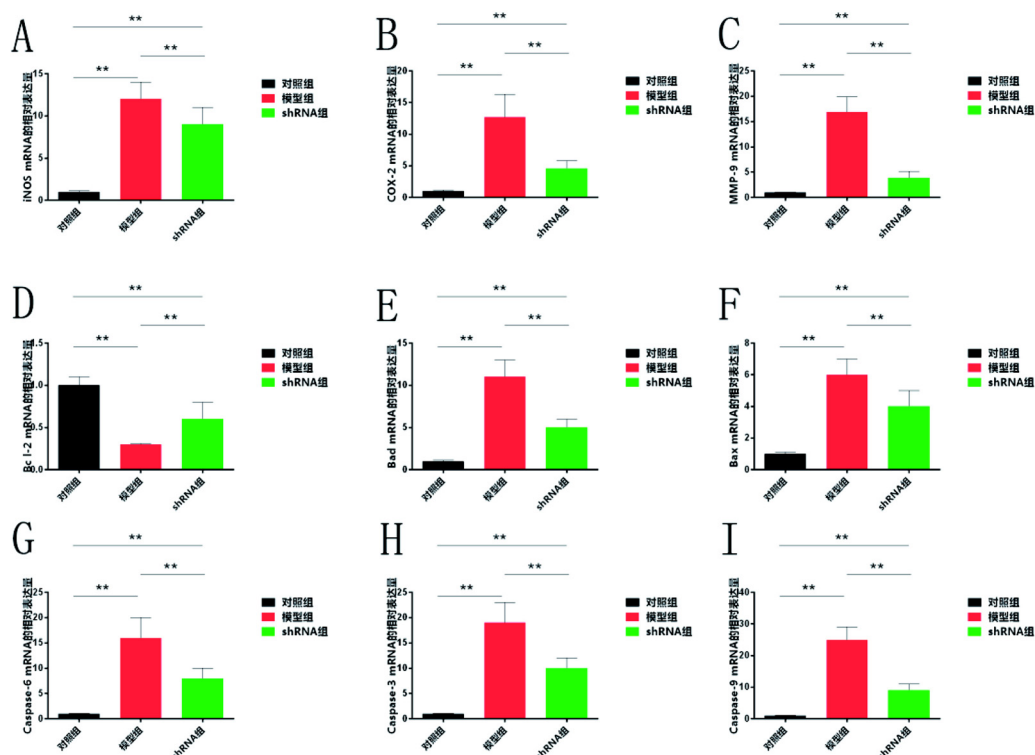


图3 大鼠髓核组织中相关因子的mRNA表达

Figure 3 The expression of related factors in nucleus pulposus of rats

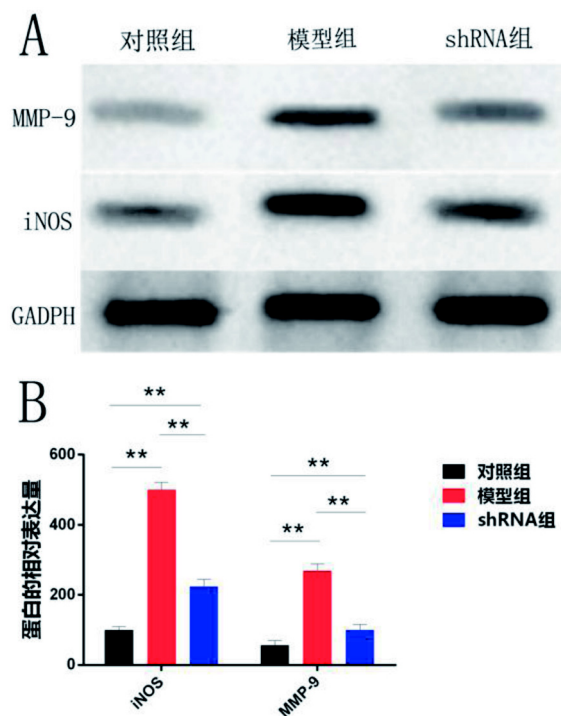
A: 蛋白条带; B: 表达量的统计分析; \*\* $P < 0.05$ 

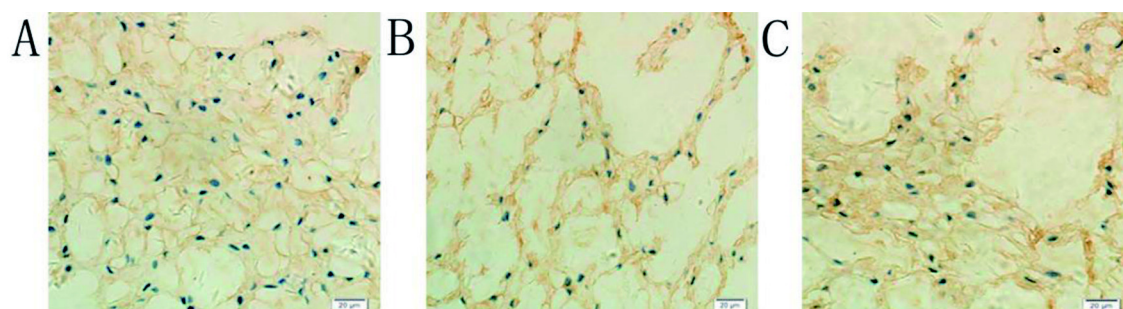
图4 大鼠髓核组中相关蛋白表达

Figure 4 The expression of iNOS and MMP-9 protein in nucleus pulposus of rats

建脊柱侧弯模型, 结果2组大鼠均未发生脊柱侧弯。而采用切除前足的方法, 即使不切除松果体或者腹腔注射褪黑素抑制剂, 也会导致大鼠发生脊柱侧弯。所以他们认为哺乳动物的脊柱侧弯与2足动物模型的构建有关。其原因可能是脊柱受力不均, 引起各椎体生物力学失衡, 进而导致在不同力学刺激下, 椎体发生旋转, 导致脊柱侧弯的形成。机械激活离子通道TRPV4与机械力学信号的传导密切相关。有研究<sup>[17]</sup>表明, TRPV4的过度表达可以促进软骨细胞凋亡, 加剧骨性关节炎进展。因此, 本实验以机械激活离子通道为切入点, 探究TRPV4对于脊柱侧弯SD大鼠模型中髓核细胞凋亡的作用机制。

### 3.2 shRNA-TRPV4可以抑制髓核细胞的凋亡且降低II型胶原和多聚蛋白多糖的流失

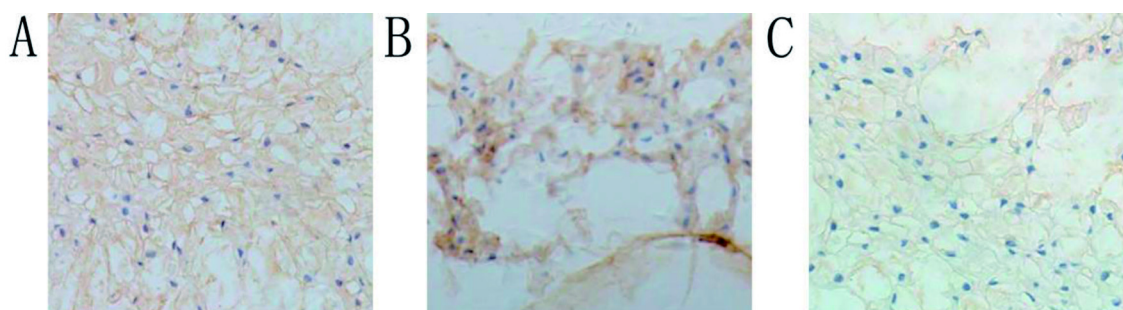
基因工程中的RNA干扰技术是针对特异性疾病比较有效的干预手段。shRNA技术可以特异性阻断靶基因的表达, 降低细胞中靶基因和靶蛋白的表达水平<sup>[18,19]</sup>。本实验通过构建shRNA-TRPV4载体, 借助慢病毒方法, 在CT引导下注射侧弯



A: 对照组; B: 模型组; C: shRNA 组

图 5 髓核组织中 II 型胶原蛋白免疫组织化学染色 (DAB × 200)

Figure 5 Immunohistochemical staining of type II collagen in nucleus pulposus (DAB × 200)



A: 对照组; B: 模型组; C: shRNA 组

图 6 髓核组织中 Aggrecan 蛋白免疫组织化学染色(DAB × 200)

Figure 6 Immunohistochemical staining of Aggrecan protein in nucleus pulposus (DAB × 200)

最明显的 T12-L1 节段, 结果显示 shRNA 组髓核组织中凋亡相关因子 Caspase-3、Caspase-6 和 Caspase-9 的表达量均低于模型组 ( $P < 0.05$ ), 表明 shRNA-TRPV4 可以抑制异常应力下髓核细胞凋亡。

II 型胶原蛋白和 Aggrecan 是髓核组织的主要组成部分, 对髓核组织正常形态的维持以及生物力学减震方面均具有重要意义, 而髓核组织退变的主要标志就是 II 型胶原蛋白和 Aggrecan 的流失<sup>[20]</sup>。免疫组织化学染色结果显示, shRNA 组 I 型胶原蛋白和 Aggrecan 的含量均高于模型组 ( $P < 0.05$ ), 表明 shRNA-TRPV4 可以抑制异常应力下 II 型胶原蛋白和 Aggrecan 的流失。

### 3.3 shRNA-TRPV4 可以抑制髓核组织中 iNOS 以及炎症因子 COX-2 和 MMP-9 的表达

在异常生物力学刺激下, 除了髓核细胞的过度凋亡, 炎症因子的表达量增多也是椎间盘变性的标志之一<sup>[21]</sup>, 其中诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS) 的表达水平与氧化自由基密切相关。氧化

自由基增多会激活炎症因子 COX-2 和 MMP-9 的表达, 从而增加髓核组织内的炎症因子表达, 加剧髓核组织的变性<sup>[22]</sup>。本实验结果表明, shRNA 组中 iNOS 以及炎症因子 COX-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达水平要明显低于模型组, Western blotting 再次验证了在蛋白水平上, shRNA 组中 iNOS 和 MMP-9 的蛋白表达水平要明显低于模型组, 提示 shRNA-TRPV4 可以抑制髓核组织中 iNOS 以及炎症因子 COX-2 和 MMP-9 的表达, 但是并不能完全抑制; 因为 shRNA 组中 iNOS 以及炎症因子 COX-2 和 MMP-9 的 mRNA 表达水平要明显高于对照组, 结果表明 shRNA-TRPV4 可以延缓脊柱侧弯大鼠模型的髓核细胞退变, 而不能完全阻止, 需要联合手术矫形等其他方法。

综上所述, shRNA-TRPV4 可以抑制脊柱侧弯鼠模型中髓核细胞的凋亡, 降低髓核组织中 iNOS 以及炎症因子 COX-2 和 MMP-9 的表达, 对髓核组织的退变起到保护作用。

## 参考文献:

- [1] Schwieger T, Campo S, Weinstein SL, et al. Body image and quality of life and brace wear adherence in females with adolescent idiopathic scoliosis[J]. *J Pediatr Orthop*, 2017, 37(8):e519-e523.
- [2] Watanabe K, Michikawa T, Yonezawa I, et al. Physical activities and lifestyle factors related to adolescent idiopathic scoliosis[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2017, 99(4): 284-294.
- [3] Samanta S, Jain K, Bhardwaj N, et al. Labor analgesia in parturients of fetal growth restriction having raised umbilical Doppler vascular indices[J]. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, 2018, 34(1):11-17.
- [4] Theologis AA, Sing DC, Chekeni F, et al. National trends in the surgical management of adolescent idiopathic scoliosis: analysis of a national estimate of 60 108 children from the national inpatient sample over a 13-year time period in the United States[J]. *Spine Deform*, 2017, 5(1): 56-71.
- [5] Kontodimopoulos N, Damianou K, Stamatopoulou E, et al. Children's and parents' perspectives of health-related quality of life in newly diagnosed adolescent idiopathic scoliosis[J]. *J Orthop*, 2018, 15(2):319-323.
- [6] Alawi KM, Russell FA, Aubdool AA, et al. Transient receptor potential canonical 5 (TRPC5) protects against pain and vascular inflammation in arthritis and joint inflammation[J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(1):252-260.
- [7] Rizopoulos T, Papadakipetrou H, Assimakopoulou M. Expression profiling of the transient receptor potential vanilloid (TRPV) channels 1, 2, 3 and 4 in mucosal epithelium of human ulcerative colitis[J]. *Cells*, 2018, 7(6):61-77.
- [8] Wen W, Que K, Zang C, et al. Expression and distribution of three transient receptor potential vanilloid(TRPV) channel proteins in human odontoblast-like cells[J]. *J Mol Histol*, 2017, 48(5/6):1-11.
- [9] Kittaka H, Yu Y, Tominaga M. Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) channel as a target of crotamiton and its bimodal effects[J]. *Pflugers Arch*, 2017, 469(10):1-11.
- [10] Nganvongpanit K, Chaochird P, Siengdee P, et al. *In vitro* suppression of the MMP-3 gene in normal and cytokine-treated human chondrosarcoma using small interfering RNA [J]. *J Orthop Surg Res*, 2009, 4(1):45.
- [11] Moreau A, Wang DS, Forget S, et al. Melatonin signaling dysfunction in adolescent idiopathic scoliosis[J]. *Spine*, 2004, 29(16):1772-1781.
- [12] Zhang A, Liu X, Liu Z, et al. Manufacture of customized orthosis in adolescent idiopathic scoliosis and comfort evaluation based on 3D printing[J]. *J Beijing University Tech*, 2017, 43(4):518-525.
- [13] Yang S, Zheng C, Jiang J, et al. The value of applying a melatonin antagonist (Luzindole) in improving the success rate of the bipedal rat scoliosis model[J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2017, 18(1):137-149.
- [14] 李鹏飞, 贾楠, 赵鹏, 等. 不同方法建立双足大鼠脊柱侧弯动物模型的特点比较[J]. *河北医科大学学报*, 2017, 38(2):154-158.
- [15] 梁义天, 张翠娟, 项明强. 预防青少年特发性脊柱侧弯的健康行为模型探析[J]. *当代体育科技*, 2015, 5(6):36.
- [16] 刘金钊, 陈晓亮, 胡有谷. 松果体切除小鼠脊柱侧弯动物模型的建立及意义[J]. *青岛大学医学院学报*, 2005, 41(3):200-202.
- [17] O'Connor CJ, Griffin TM, Liedtke W, et al. Increased susceptibility of Trpv4-deficient mice to obesity and obesity-induced osteoarthritis with very high-fat diet[J]. *Ann Rheum Dis*, 2013, 72(2):300-304.
- [18] 杨莎, 张彬, 韩焱, 等. 矮牵牛 PDS 基因的克隆及其在 shRNA 介导的基因沉默中的应用[J]. *园艺学报*, 2017, 44(2):315-322.
- [19] 王红娜, 孙洪新, 张英杰, 等. 腺病毒介导 shRNA 干扰绵羊 MSTN 基因效果及对生肌调节因子和干扰素反应基因表达的影响[J]. *畜牧兽医学报*, 2017, 48(10):1833-1842.
- [20] 白培鸿, 熊波, 房佐忠. 椎间盘退变的生物力学机制研究进展[J]. *现代医药卫生*, 2014(19):2939-2941.
- [21] 史红伟, 关晓明, 马迅. TNF- $\alpha$  诱导大鼠髓核细胞凋亡过程中 EMP-1 和 Caspase-3 基因表达及意义[J]. *长治医学院学报*, 2014, 28(1):1-5.
- [22] 林金贵, 叶君健, 傅冷西. 细胞因子与腰椎间盘突出髓核细胞凋亡的关系[J]. *福建医科大学学报*, 2005, 39(1):47-49.

## Inhibitory Effect of shRNA TRPV4 Gene on Intervertebral Disc Degeneration in Scoliosis Rat Model

LI Yan<sup>1</sup>, KONG Jian-jun<sup>1</sup>, CHEN Zi-qi<sup>1</sup>, ZHU Cong-cong<sup>2</sup>

(1. Department of Orthopaedics, General Hospital of Xingtai Mining Group of Central Hebei Energy, Xingtai City 054000, China;

(2. Department of Internal Medicine, Second Affiliated Hospital of Xingtai Medical College, Xingtai City 054000, China)

**[Abstract] Objective** To explore the mechanism of short hairpin (shRNA) transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) gene on intervertebral disc degeneration intervention in SD rat scoliosis model. **Methods** The classical scoliosis model of bipedal rats was used to construct the animal model. Based on the principle of siRNA interference, shRNA-TRPV4 interference vector was constructed. According to the purpose of the experiment, animals were divided into three groups, control group, model group and shRNA group. The degree of scoliosis and Cobb angle were observed by radiography, degenerative intervertebral disc tissue was stained by pathological HE, expression of collagen II and Aggrecan in nucleus pulposus tissue was detected by immunohistochemical staining, inducible nitric oxide synthase (iNOS) was detected by RT-PCR and Western Blotting at gene and protein levels as well as inflammatory related factors cyclooxygenase 2 (COX-2) and matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and the expression levels of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 antagonist of cell death (Bad), Bcl-2 associated X protein (Bax), cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3), Caspase-6 and Caspase-9. **Results** The transfection efficiency of 0.011  $\mu$ L shRNA-TRPV4 lentivirus was 90.3%. The control group had no scoliosis, the model group had left scoliosis, and the Cobb angle was  $35.22^{\circ} \pm 2.18^{\circ}$ , the shRNA group had left scoliosis, and the Cobb angle was  $24.07^{\circ} \pm 3.09^{\circ}$ . RT-PCR results showed that iNOS, COX-2, MMP-9, Bad, Bax and apoptosis-related factors such as Caspase-3, Caspase-6, Caspase-9 in the model group was higher than that of control group ( $P < 0.05$ ), while the expression of anti-apoptotic factor Bcl-2 was lower than that of control group ( $P < 0.05$ ). Western blotting showed that the expression of iNOS and MMP-9 in nucleus pulposus of model group was higher than that of control group ( $P < 0.05$ ), but lower than that of shRNA group ( $P < 0.05$ ). Immunohistochemical staining showed that the expression level of Type II collagen and Aggrecan protein was lower than that of control group ( $P < 0.05$ ), but higher than that of model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** ShRNA-TRPV4 can inhibit the apoptosis of nucleus pulposus cells in scoliosis rat model, reduce the expression of iNOS and inflammatory factors COX-2 and MMP-9 in nucleus pulposus tissue, and protect the degeneration of nucleus pulposus tissue.

**[Key words]** Nucleus pulposus cells; Scoliosis; Apoptosis; Mechanically sensitive ion channels; Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4)

# 山羊胎肝内人脐带间充质干细胞的存活与分化研究

鄢东海<sup>1,2</sup>, 黄小昆<sup>1</sup>, 向雪萍<sup>1</sup>, 卿德科<sup>1</sup>, 方伟<sup>1</sup>, 李自安<sup>1</sup>, 王强<sup>1</sup>, 王金祥<sup>1</sup>, 庞荣清<sup>1</sup>

(1. 联勤保障部队第920医院干细胞与免疫细胞生物医药技术国家地方联合工程实验室、

云南省细胞治疗技术转化医学重点实验室、云南省干细胞工程实验室, 昆明 650032;

2. 昆明医科大学920医院临床学院, 昆明 650031)

**[摘要]** 目的 观察人脐带间充质干细胞(hUCMSC)在胎羊肝脏内的存活与分化。方法 妊娠2个月时在胎羊肝脏实质区注射绿色荧光蛋白(GFP)转染标记的hUCMSC(GFP-hUCMSC), 出生1月龄时取羔羊肝脏组织, 制作切片后在荧光显微镜下观察GFP阳性细胞的分布, 采用PCR方法检测人雄性性别决定基因(SRY)的存在; RT-PCR方法检测人肝细胞特异基因的表达; 免疫组织化学染色检测人肝细胞特异蛋白的表达。注射同体积生理盐水的同月龄羔羊为对照。结果 在注射了GFP-hUCMSC的1月龄羔羊肝脏组织中可观察到绿色荧光的规则或散在分布, 并可检测到人SRY基因的存在。RT-PCR方法可检测到人肝细胞核因子4 $\alpha$ (HNF4 $\alpha$ )、肝细胞核因子3 $\beta$ (HNF3 $\beta$ )和白蛋白(ALB)基因的阳性表达; 免疫组织化学染色可检测到人ALB和HNF4 $\alpha$ 蛋白的阳性表达, 而对照羔羊肝脏检测不到绿色荧光阳性细胞和人SRY基因以及人肝细胞特异基因和蛋白的表达。结论 hUCMSC可以在胎羊肝脏内存活并分化为人肝细胞样细胞, 并可在胎羊出生后至少持续一个月。

**[关键词]** 人脐带间充质干细胞(hUCMSC); 山羊; 肝细胞; 分化

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0364-07

脐带间充质干细胞(umbilical cord mesenchymal stem cells, UCMSC)是一种取材方便、分化潜能较强的成体干细胞, 是再生医学研究常用的种子细胞。虽然UCMSC在体外一定的诱导条件下可以向脂肪、软骨和成骨组织分化<sup>[1]</sup>, 但在体内免疫监控的环境条件下是否可以向肝细胞分化?

其在体内究竟如何生存、迁移、分化以及组织锚定? 这些基本问题一直是再生医学研究关注的焦点和难点<sup>[2]</sup>, 需要可靠的科学实验进行验证研究。胚胎发育期由于免疫系统尚未发育成熟, 被认为是研究干细胞分化的理想环境<sup>[3]</sup>。运用胚胎发育期的特殊微环境, 研究UCMSC的基本科学问题, 可以为其转化应用提供科学依据, 并已经在细胞移植、免疫耐受研究和移植器官来源等诸多方面展示了无限的希望和潜在的应用价值<sup>[4]</sup>。本研究首次将人UCMSC(hUCMSC)注射到处于胚胎发育期的胎羊肝脏实质区域, 以构建人-山羊肝脏嵌合体, 观察hUCMSC在胎羊肝脏发育特定微环境内的生存和变化, 为hUCMSC用于人类肝病治疗甚至将来器官培育提供实验依据。

**[收稿日期]** 2019-01-16

**[基金项目]** 云南省重点项目(2015FA039); 云南省面上项目(2017FB042); 云南省后备人才项目(2018HB002)

**[作者简介]** 鄢东海(1987-), 男, 硕士研究生。

E-mail: 1072346722@qq.com

**[通讯作者]** 庞荣清(1971-), 男, 主任医师/教授, 硕士研究生导师, 主要研究方向: 干细胞与再生医学。

E-mail: pangrq2000@aliyun.com

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

**1.1.1 主要试剂** 培养液 DMEM/F12、新生牛血清和 trypsin-EDTA 均购自美国 Gibco 公司, 携带绿色荧光蛋白(Green Fluorescent Protein, GFP)基因的慢病毒载体购自吉满生物公司, DNA/RNA 提取、cDNA 合成、人雄性性别决定基因(SRY)等基因引物及 PCR Mix 试剂盒购自美国 Promega 公司, 免疫组织化学染色用抗人单抗[兔抗人肝细胞核因子 3 $\beta$ (HNF3 $\beta$ )、兔抗人 HNF4 $\alpha$  和兔抗人白蛋白 (ALB) 购自美国 Abcam 公司。

**1.1.2 实验动物** 2 只雌性妊娠山羊来源于医院实验动物中心, 用于胎肝内定位注射实验研究[SYXK(军)2012-0039]。

**1.1.3 人脐带组织** 经医院伦理委员会的批准[批件号 2017027], 来源于健康男婴的脐带用于分离 hUCMSC。

**1.1.4 实验仪器** Eclipse 80i 荧光显微镜为日本 Nikon 公司生产; BX41 生物显微镜为日本 Olympus 公司生产; C1000 PCR 扩增仪和 Gel Doc XR 凝胶成像仪均为美国 BIO-RAD 公司生产。

### 1.2 GFP 转染标记 hUCMSC 的准备

采用本课题组前期建立的 hUCMSC 分离培养及其转染标记方法<sup>[1,5]</sup> 制备男婴来源的 hUCMSC 并进行绿色荧光蛋白(GFP)转染标记。即剪碎的男婴脐带在含 10% 牛血清的 DMEM/F12 培养体系中扩增出贴壁生长的第三代细胞, 经流式细胞测定细胞免疫表型并进行体外成脂、成骨、成软骨诱导分化实验鉴定为间充质干细胞后, 按照转染复数 50 的剂量往生长良好的第三代 hUCMSC 培养液中加入携带 GFP 的慢病毒载体液共培养 48 h, 生理盐水漂洗后消化收集细胞, 荧光显微镜下观察确定标记成功的细胞, 即 GFP-hUCMSC, 用生理盐水重悬后调整细胞浓度为 10<sup>6</sup>/mL 用于胎肝内定位注射实验。

### 1.3 胎肝内细胞定位注射

采用本课题组前期建立的胎肝内定位注射方法<sup>[6]</sup>, 即选择交配后经超声探查确诊妊娠 2 个月的山羊, 固定并腹部消毒后, 在 B 超引导下穿刺至胎羊肝脏实质区域, 连接装有 1 mL 细胞悬液

(含 10<sup>8</sup> 个男性 GFP-hUCMSC)的注射器, 准确将 GFP-hUCMSC 悬液注射到 3 只孕龄 2 个月的胎羊肝脏实质区域。阴性对照为孕龄相同的胎羊, 以同样方式注射 1mL 生理盐水。

### 1.4 GFP 阳性细胞的观察

胎羊出生后 1 个月, 手术切取部分肝脏组织, 用 OTC(一种聚乙二醇和聚乙烯醇的水溶性混合物)包埋后制作冰冻切片, 滴加 DAPI 染色后直接在荧光显微镜下观察 GFP 阳性细胞的分布并拍照。

### 1.5 人雄性性别决定基因(SRY)基因的检测

切取适量肝脏组织, 快速加入液氮研磨后用 DNA 试剂盒提取 DNA, 以 PCR 方法扩增人 SRY 基因, PCR 扩增引物序列及扩增条件见表 1。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 于凝胶成像仪上观察目的条带并拍照。未注射细胞的羔羊肝脏为阴性对照, 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)基因为内参。

### 1.6 人肝细胞特异基因的检测

切取适量肝脏组织, 快速加入液氮研磨后用 RNA 提取试剂盒提取总 RNA, 用 first Strand cDNA Synthesis 试剂盒合成 cDNA, 以 RT-PCR 方法检测人肝细胞特异基因肝细胞核因子 3 $\beta$  (Hepatocyte nuclear factor 3 $\beta$ , HNF3 $\beta$ )、肝细胞核因子 4 $\alpha$ (Hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$ , HNF4 $\alpha$ )和白蛋白(albumin, ALB)的表达, RT-PCR 扩增引物序列及条件见表 1。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳后, 于凝胶成像仪上观察目的条带并拍照。未注射细胞的羔羊肝脏为阴性对照, GAPDH 为内参。

### 1.7 人肝细胞特异蛋白的检测

切取部分肝脏组织, 用体积分数 10% 甲醛溶液固定后制作石蜡切片, 经脱蜡、水化、抗原修复后, 检测人肝细胞特异蛋白细胞核因子 HNF3 $\beta$ 、HNF4 $\alpha$  和 ALB 的表达, 分别滴加相应的一抗(人抗兔 HNF3 $\beta$ 、HNF4 $\alpha$ 、ALB), 在湿盒内 4℃ 孵育过夜, 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次, 滴加抗兔生物素化二抗, 室温条件下孵育 30 min, 磷酸盐缓冲液漂洗 3 次后苏木素复染 2 min, 在显微镜下观察并拍照。

## 2 结果

### 2.1 GFP 阳性细胞的观察

肝脏组织用 OTC 包埋后制作冰冻切片, 在荧光显微镜下可观察到接受胎肝内细胞注射的山

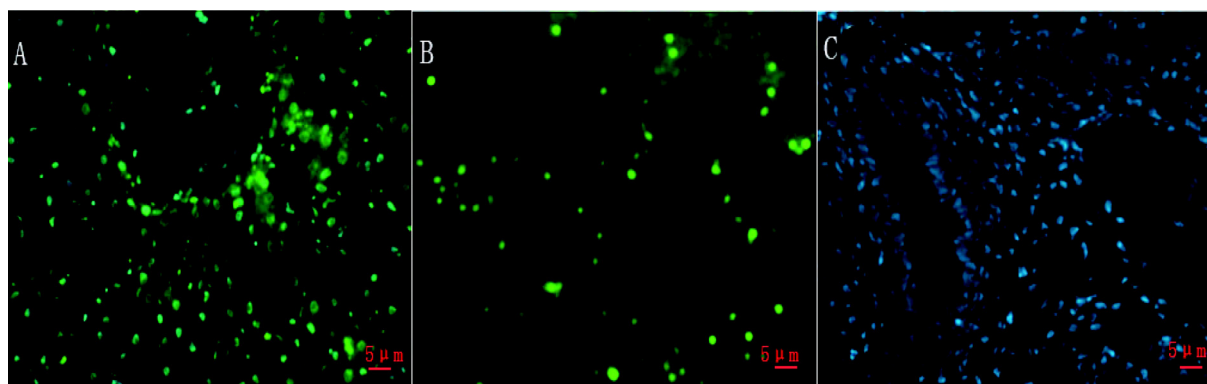
表 1 PCR 或 RT-PCR 扩增引物及其退火温度

| 引物名称          | 引物系列                          | 目的片段 /bp | 退火温度 /℃ |
|---------------|-------------------------------|----------|---------|
| SRY           | F5'-CGAAGACGAAAGGTGGCTCT-3'   | 120      | 55      |
|               | R5'-TATCGTGGCCCAGGTTTGTC-3'   |          |         |
| ALB           | F5'-TTTATGCCCCGGAACCTCTT-3'   | 245      | 57      |
|               | R5'-AGTCTCTGTTTGGCAGACGAA-3'  |          |         |
| HNF3 $\beta$  | F5'-AGACTCCGGCGGGCACCAG-3'    | 240      | 60      |
|               | R5'-GTGGTTGAAGGCGTAATGGT-3'   |          |         |
| HNF4 $\alpha$ | F5'-AGATCCATGGTGTTCAGGA-3'    | 113      | 57      |
|               | R5'-AGCTCGTCAAGGATGCGTAT-3'   |          |         |
| GAPDH         | F5'-GTCATCAATGGAAATCCCATCA-3' | 383      | 53      |
|               | R5'-CCAGTGGACTAAACGACGTAC-3'  |          |         |

羊肝脏内广泛存在绿色荧光信号,细胞核呈特有的蓝色,即有 GFP-hUCMSC 分布,有的集中分布并形成规则结构(图1A),有的以单个信号散在分布于肝脏组织(图 1B),而接受胎肝内注射相同体积生理盐水的对照山羊肝脏内观察不到 GFP-hUCMSC 分布(图 1C)。

## 2.2 人 SRY 基因 PCR 扩增

采用 PCR 检测方法,可以从接受胎肝内细胞注射的所有羔羊肝脏组织 DNA 中检测到人 SRY 基因的表达,即长度为 120 kb 的目的条带,而没有接受胎肝内细胞注射的对照组羔羊肝脏组织 DNA 中扩增不到目的条带(图 2)。



A: GFP 阳性细胞集中分布并形成规则结构; B: GFP 阳性细胞散在分布于肝脏组织; C: 阴性对照

图 1 羔羊肝脏组织内 GFP-hUCMSC 分布



M: Marker; 1、2、3: 实验性羔羊肝脏组织;  
4: 阴性对照; 5: 空白对照

图 2 羔羊肝脏组织人 SRY 基因 PCR 检测

## 2.3 人肝细胞特异基因在羔羊肝组织中表达

采用 RT-PCR 检测方法,可以从接受胎肝内细胞注射的山羊肝脏组织总 RNA 中检测到人 ALB 基因(长度为 245 kb 的目的条带)和 HNF3 $\beta$  基因(长度为 240 kb 的目的条带)(图 3)及 HNF4 $\alpha$  基因(长度为 113 kb 的目的条带)(图 4)的表达,而没有接受胎肝内细胞注射的对照组山羊肝脏组织中检测不到人肝细胞特异基因的表达。

## 2.4 人肝细胞特异蛋白在羔羊肝脏中表达

肝脏切片免疫组织化学染色,可以从接受胎肝内细胞注射的羔羊肝脏组织中检测到人 ALB 蛋白和人 HNF4a 蛋白的表达,却检测不到人 HNF3 $\beta$

蛋白的表达(结果未显示)。ALB 可规律地围绕肝小叶静脉周围集中分布而呈现棕黄色环状结构(图 5A)，或者散在分布而呈现棕黄色点状或片

状结构(图 5B)。HNF4 $\alpha$  多呈棕黄色环状结构分布(图 6A、B)。而没有接受胎肝内细胞注射的对照羔羊肝组织中未观察到棕黄色染色(图 5C)。



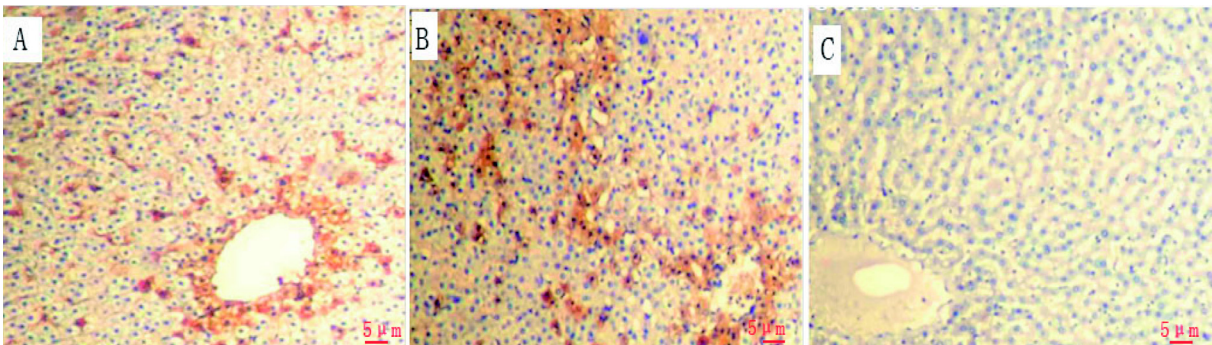
M: Marker; 1、2、3: 实验羔羊肝脏组织内人 *HNF3 $\beta$*  基因; 4: 阴性对照; 5、6、7: 实验羔羊肝脏组织内人 *ALB* 基因; 8: 空白对照。

图 3 羔羊肝脏组织人 *ALB* 基因和 *HNF3 $\beta$*  基因 RT-PCR 检测



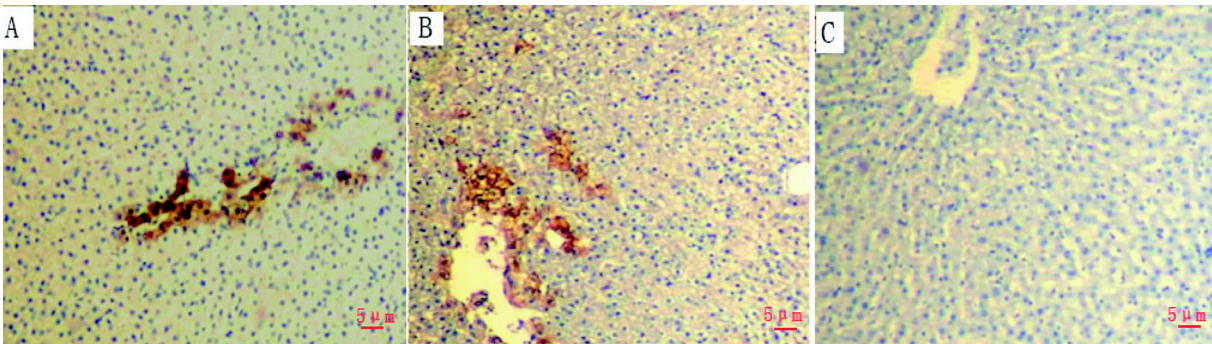
M: Marker; 0: 空白对照; 1、2、3: 实验羔羊肝脏组织内人 *HNF4 $\alpha$*  基因; 4: 阴性对照

图 4 羔羊肝脏组织人 *HNF4 $\alpha$*  基因 RT-PCR 检测



A: 人 ALB(棕色)分布于静脉周围; B: 人 ALB(棕色)散在分布于肝小叶; C: 阴性对照

图 5 羔羊肝脏组织人 ALB 免疫组织化学染色分析



A、B: 人 HNF4 $\alpha$ (棕色)集中分布于肝小叶中央静脉周围; C: 阴性对照

图 6 羔羊肝脏组织人 HNF4 $\alpha$  免疫组织化学染色

### 3 讨论

肝移植被认为是治疗终末期肝衰竭最有效的方法,但供肝短缺和免疫排斥问题在很长时期内很难解决。运用干细胞具有多项分化潜能的独特生物学特性获取功能性肝细胞,已成为近年来再生医学研究追求的主要目标之一<sup>[7]</sup>。体外研究<sup>[1]</sup>已经证实,UCMSC可以被诱导向脂肪、软骨及成骨组织分化,这为UCMSC的转化应用带来了新的希望。本研究将来源于男婴脐带并经基因转染标记的GFP-hUCMSC,定位注射于2月龄胎羊肝脏实质区域。母羊分娩后,手术切取出生1个月的羔羊肝脏组织,在荧光显微镜下可以在冰冻切片视野内找到GFP阳性的荧光信号,而且这些荧光信号可集中分布形成一定规则的结构,表明定位注射的GFP-hUCMSC不仅可以在免疫系统尚未发育成熟的山羊胚胎发育期的特殊生理环境条件下存活,而且获得了生长机会,与羔羊肝脏组织形成了两种来源细胞相互移居共存的嵌合状态。这与脐带血宫腔内移植和UCMSC治疗肝纤维化研究报道一致<sup>[2,8]</sup>。

为了进一步验证植入细胞在出生1个月的新生羔羊肝脏组织中的存在,本研究从分子水平检测了人类男性Y染色体上特定基因片段(SRY基因)的存在。Y染色体是雄性动物细胞特异性的基因结构,它不受细胞表型变化和移植时间的影响,追踪Y染色体细胞的存在,是鉴定嵌合细胞最可靠的方法,也是GFP转基因标记示踪技术的有效补充。结果证实,接受胎肝内定位注射来源于男婴的hUCMSC并顺利分娩生产的羔羊,包括雌性羔羊肝脏组织,其肝脏组织中均可扩增出人SRY基因片段,大小约为120 kb,而对照组未扩增出人SRY基因片段。结合绿色荧光信号分布的肝脏组织学观察,充分证明了所移植的来源于男婴的hUCMSC可以在羔羊肝脏组织内存活并形成嵌合状态定居。

为了追踪植入细胞的演变去向,本研究运用RT-PCR方法和免疫组织化学染色方法从分子和蛋白水平鉴定了人肝细胞相关基因和蛋白的存在。结果显示,接受胎肝内定位注射hUCMSC并顺利分娩生产的羔羊,出生1个月后其肝脏组织内可以检测到人HNF3 $\beta$ 、HNF4 $\alpha$ 和ALB基因的表达,

而没有接受细胞注射的阴性对照同龄羔羊肝脏检测不到这些基因的表达。运用抗人的单抗进行免疫组织化学染色,结果显示,注射过hUCMSC的实验羔羊肝脏组织中只可检测到HNF4 $\alpha$ 和ALB蛋白的表达,HNF4 $\alpha$ 主要位于静脉周围,ALB广泛分布于静脉周围等肝小叶很多区域。没有接受细胞注射的阴性对照羔羊肝脏组织中检测不到这些蛋白的表达。实验结果进一步证明,定位注射的hUCMSC不仅在胚胎发育期的胎羊肝脏内存活并获得了进一步生长发育的机会,而且在胎羊出生后,随着羔羊免疫系统的发育和成熟,免疫耐受也随之形成,植入的hUCMSC在胎肝生理微环境条件下分化为人类肝细胞样的细胞,至少在mRNA和蛋白水平表达了人类肝细胞的部分特异标志,在一定程度上形成了功能性人肝细胞样细胞,体现了人肝细胞的特定生物学功能。UCMSC具有向肝细胞分化的潜在在其它相关的体内外研究报道中也得到验证<sup>[8,9]</sup>。

肝富集转录因子(liver-enriched transcription factors)是一组主要存在于肝脏并调控肝特异基因表达的转录因子,在器官发育的调控中发挥着关键作用<sup>[10]</sup>,促进肝脏的代谢<sup>[11]</sup>,主要包括6个家族的因子,其中HNF3 $\beta$ 是参与肝脏发育过程的肝富集转录因子级联调控网络中最重要转录因子,在胚胎发育的早期表达,对HNF4 $\alpha$ 等转录因子有调控作用。HNF4 $\alpha$ 是一种锌指结构蛋白,其氨基酸序列在进化过程中高度保守,在肝细胞发育和分化过程中发挥重要作用<sup>[12]</sup>。在肝脏发育早期,HNF4 $\alpha$ 即可激活一些肝脏基因表达,如甲状腺激素结合蛋白等,但还是在成熟的肝细胞中表达量最高,是调控肝细胞分化和维护肝细胞生物学功能的重要转录蛋白,在肝脏的形成和成人肝脏许多基因的转录调节中起关键作用。本研究结果显示,接受细胞注射的新生1月龄羔羊肝脏组织中可以检测到人HNF3 $\beta$ 和HNF4 $\alpha$ 基因的表达,但免疫组织化学方法只能检测到人HNF4 $\alpha$ 蛋白的表达,检测不到人HNF3 $\beta$ 蛋白的表达,此结果可能提示,HNF3 $\beta$ 主要高表达于hUCMSC向肝细胞分化的早期过程,羔羊出生后其表达水平就大幅降低,致使本研究只能在mRNA水平上检测到其表达,而不能在蛋白水平检测到其表达。而由

于HNF4 $\alpha$ 主要高表达于成熟肝细胞,是维护肝细胞正常生物学功能的重要因子,因此,本研究可以在mRNA和蛋白水平上均可检测到其表达。白蛋白(ALB)主要由肝细胞合成分泌,是鉴定成熟肝细胞功能的经典指标,本研究可以在mRNA和蛋白水平上检测到人ALB的表达,表明HNF4 $\alpha$ 维持了hUCMSC向肝细胞样细胞分化的结果。

本研究结果初步表明,hUCMSC在胎羊肝脏发育的特定微环境内,可以存活并获得了进一步生长发育的机会,其在免疫系统逐步发育成熟的羔羊肝脏内维持至少一个月,这预示着免疫耐受基本形成,hUCMSC用于人类肝病治疗至少在婴幼儿或许是可行的。

#### 参考文献:

- [1] 庞荣清,何洁,李福兵,等.一种简单的人脐带间充质干细胞分离培养方法[J].中华细胞与干细胞杂志,2011,1(2):162-167.
- [2] Li T, Xia M, Gao Y, et al. Human umbilical cord mesenchymal stem cells: an overview of their potential in cell-based therapy[J]. Expert Opin Biol Ther, 2015, 15(9):1293-1306.
- [3] Abellanea JM, Ramis G, Martínez-Alarcón L, et al. Generation of human-to-pig chimerism to induce tolerance through transcutaneous in utero injection of cord blood-derived mononuclear cells or human bone marrow mesenchymal cells in a preclinical program of liver xenotransplantation: preliminary results[J]. Transplant Proc, 2012, 44(6):1574-1578.
- [4] Suchy F, Nakauchi H. Lessons from interspecies mammalian chimeras[J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2017, 33(1):203-217.
- [5] 余璞,龙海,霍金龙,等.体外传代对版纳微型猪骨髓间充质干细胞绿色荧光蛋白表达的影响[J].中华细胞与干细胞杂志,2016,6(6):363-368.
- [6] 黄小昆,龙海,苏锡雄,等.山羊胎肝内定位注射不同体积间充质干细胞对胎羊发育的影响[J].西南国防医药,2018,28(1):19-22.
- [7] Zakikhan K, Pournasr B, Vosough M, et al. *In vitro* generated hepatocyte-like cells: A novel tool in regenerative medicine and drug discovery[J]. Cell J, 2017, 19(2):204-217.
- [8] Zhang GZ, Sun HC, Zheng LB, et al. *In vivo* hepatic differentiation potential of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells: Therapeutic effect on liver fibrosis/cirrhosis[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(46):8152-8168.
- [9] Zhou X, Cui L, Zhou X, et al. Induction of hepatocyte-like cells from human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells by defined microRNAs[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(5): 881-893.
- [10] Schrem H, Klempnauer J, Borlak J. Liver-enriched transcription factors in liver function and development. Part I: The hepatocyte nuclear factor network and liver-specific gene expression[J]. Pharmacol Rev, 2002, 54(1):129-158.
- [11] Su Y, Chen Z, Yan L, et al. Optimizing combination of liver-enriched transcription factors and nuclear receptors simultaneously favors ammonia and drug metabolism in liver cells[J]. Exp Cell Res, 2018, 362(2):504-514.
- [12] Talaei-Khozani T, Khodabandeh Z, Jaberipour M, et al. Comparison of hepatic nuclear factor-4 expression in two- and three-dimensional culture of Wharton's jelly-derived cells exposed to hepatogenic medium[J]. Rom J Morphol Embryol, 2015, 56(4):1365-1370.

## Study on *in Vivo* Survival and Differentiation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells in Fetal Goat Liver

YAN Dong-hai<sup>1,2</sup>, HUANG Xiao-kun<sup>1</sup>, XIANG Xue-ping<sup>1</sup>, QING De-ke<sup>1</sup>,  
FANG Wei<sup>1</sup>, LI Zi-an<sup>1</sup>, WANG Qiang<sup>1</sup>, WANG Jin-xiang<sup>1</sup>, PANG Rong-qing<sup>1</sup>

(1. National and Local Joint Engineering Laboratory of Stem Cell and Immune Cell  
Biomedical Technology, Key Laboratory of Cellular Therapy and Translational

Medicine of Yunnan Province, Yunnan Provincial Stem Cell Engineering Laboratory,

The 920th Hospital of Joint Logistics Support Force, Kunming 650032, China;

2. The 920th Hospital Clinical College, Kunming Medical University, Kunming 650031, China)

**[Abstract] Objective** To observe the survival and differentiation of human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSC) in fetal goat liver. **Methods** Liver tissues of 1 month old lambs was harvest which was injected with GFP-hUCMSC into liver at 2 month fetal phase, and the distribution of green fluorescent protein (GFP)-positive cells were observed under fluorescence microscope. The presence of human sex-Determining Region Y (SRY) gene was detected by PCR, while the expression of human hepatocyte-specific genes were detected by RT-PCR, and the expression of human hepatocyte-specific proteins were detected by immunohistochemical staining. The same-month-old lambs injected with the same volume physiological saline during fetal phase as control. **Results** The regular or scattered distribution of green fluorescence and the presence of human SRY gene were observed in the liver tissue of 1 month old lambs injected with GFP-hUCMSC. The human hepatocyte nuclear factor 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ), HNF3 $\beta$  and albumin (ALB) gene were positive detected by RT-PCR, and the ALB and HNF4 $\alpha$  proteins were positive detected by immunohistochemical staining. No green fluorescence, human SRY genes, human hepatocyte specific genes and proteins were detected in the control lamb liver. **Conclusion** hUCMSC can survive and differentiate into human hepatocyte-like cells in fetal sheep liver, which can last for at least one month after birth.

**[Key words]** Human umbilical cord mesenchymal stem cells (hUCMSC); Goat; Hepatocyte; Differentiation

# 乙酰胆碱合并氯化钙静脉注射致兔和大鼠房颤模型的比较

冯 凯, 杨蕾熙, 成玮琳, 尉延春, 陶 如, 周童心, 汤依群  
(中国药科大学基础医学与临床药学院, 南京 211198)

**[摘要]** 目的 通过条件优选, 采用静脉注射乙酰胆碱合并氯化钙(Ach-CaCl<sub>2</sub>)混合溶液制备兔房颤(AF)模型。方法 静脉注射 Ach (66 μg/mL)-CaCl<sub>2</sub>(10 mg/mL)混合溶液诱发兔AF, 单因素实验筛选混合溶液最佳的注射体积和注射速度以及最适的麻醉药种类; 连续 10 d 尾静脉注射 Ach (66 μg/mL)-CaCl<sub>2</sub>(10 mg/mL)混合溶液建立大鼠AF模型。心电图记录AF持续时间, Masson染色和HE染色观察AF兔心房组织病理学改变, 并与大鼠AF模型进行比较。结果 体积分数0.5%戊巴比妥钠麻醉兔的效果较好。相对于大鼠模型, 混合溶液诱发的兔AF持续时间较长, 连续10 d造模, 兔AF持续时间波动较大, 代偿性拮抗作用明显, 延长造模时间, AF持续时间趋于平稳。造模28 d, AF持续时间可达80 s, 且心房组织纤维化更加明显。结论 Ach-CaCl<sub>2</sub>静脉注射, 可制备兔AF模型, 与大鼠AF模型相比, 兔AF持续时间较长, 房颤发作时f波和心室波混杂出现, 与临床心电图表现相近。

**[关键词]** 房颤(AF); 乙酰胆碱合并氯化钙(Ach-CaCl<sub>2</sub>); 纤维化; 兔; 大鼠

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0371-06

房颤(atrial fibrillation, AF)是临床最常见的心律失常类型。随着年龄的增加, 发病率不断升高。AF可引起心房功能障碍, 导致栓塞、心力衰竭、甚至猝死<sup>[1]</sup>。AF发生机制尚未完全清楚, 常用的AF模型以犬和羊等大型动物制备<sup>[2]</sup>, 成本昂贵且不易操作。本实验室通过条件优选, 建立了乙酰胆碱(Ach)合并氯化钙(CaCl<sub>2</sub>)(Ach-CaCl<sub>2</sub>)混合液静脉注射制备大鼠AF模型, 此模型操作相对简单, AF发生率高, 心电图典型, 对药物治疗敏感, 心房重构明显, 已被广泛采用<sup>[3-6]</sup>。

大鼠心房较小, 难以形成稳定多重折返波, 模型AF持续时间较短, AF发生时, 出现连续f波, 较少出现房颤发作时患者常见的f波心室波混杂的心电图。同时, 大鼠心房离子通道分布和种类, 如瞬时外向钾电流(Ito)等通道与人类差别较大<sup>[7]</sup>, 房颤诱发的心电重构与临床有较大差异。相对犬, 羊等实验动物, 兔易于获得, 饲养成本低, 其心脏离子通道种类和分布与人类接近, 注射给药容易操作。本研究主要目的为在大鼠AF模型的基础上, 制备兔AF模型。

**[收稿日期]** 2019-03-20

**[基金项目]** “重大新药创制”科技重大专项(2011ZX09401-021); 中国药科大学大学生创新创业训练计划校级项目(201710316225)

**[作者简介]** 冯 凯(1994-), 男, 硕士研究生, 专业: 临床药学。

E-mail: 15852926399@163.com

**[通信作者]** 汤依群(1966-), 女, 博士, 副教授。

E-mail: tyq@cpu.edu.cn

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

普通级3月龄雄性新西兰兔44只, 体重2~2.5 kg, 购自南京市江宁区青龙山动物繁殖场[SCXK(苏)2017-0011]。SPF级2月龄雄性SD大鼠16只, 体重250~300 g, 购自浙江省实验动物中心

[SCXK (浙) 2014-0001]。动物饲养和实验操作于中国药科大学实验动物中心[SYXK (苏) 2016-0011]进行。通过中国药科大学实验动物伦理委员会审查, 且实验过程中严格遵守 3R 原则。

## 1.2 主要试剂与仪器

Ach 购自美国 Sigma 公司 (批号: BCBR3675V); HE, Masson 染色试剂盒购自赛维尔生物科技有限公司 (批号: 170240);  $\text{CaCl}_2$  购自上海凌风化学试剂有限公司 (批号 20150914); 氯化钠购自西陇科学股份有限公司 (批号: 1708061); 戊巴比妥钠购自德国 Merck 公司 (批号: 09/2017); 水合氯醛购自国药集团化学试剂有限公司 (批号: 20110210)。

TE124S 电子天平 (万分之一) 购自德国 Sartorius 公司; BL-420S 生物信号采集与分析系统成都泰盟软件有限公司; 生物组织脱水染色机, 石蜡包埋机和石蜡切片机购自浙江省金华市科迪仪器设备有限公司; 数字病理切片扫描仪购自滨松光子学商贸 (中国) 有限公司; 大鼠固定器购自北京搏贝科技有限公司。

## 1.3 实验方法

1.3.1 大鼠 AF 模型制备<sup>[3]</sup> 心电图正常 SD 大鼠 16 只, 适应性喂养 1 周后, 随机分成 2 组: 对照组 6 只和模型组 10 只。模型组: SD 大鼠 ip 水合氯醛 (300 mg/kg) 麻醉。尾静脉注射 Ach (66  $\mu\text{g/kg}$ )- $\text{CaCl}_2$  (10 mg/kg) 混合溶液, 重复给药 10 d, 每日 1 次, 记录给药后大鼠的 AF 持续时间。对照组: 操作同模型组, Ach- $\text{CaCl}_2$  混合溶液用生理盐水代替。BL-420S 生物机能实验系统记录 II 导联心电图, 以 f 波出现和 p 波消失作为 AF 发生的标志, 以 f 波消失和 p 波出现作为窦性心律恢复的标志, 记录 AF 持续时间。

1.3.2 兔 AF 模型制备<sup>[3]</sup> 兔饲养 1 周后, 乙醚麻醉, 固定于操作台, 将 BL-420S 生物信号采集与分析系统的白色, 黑色和红色电极分别插入兔右前肢, 右后肢和左后肢皮下, 检测兔心电图, 选取心电图正常的兔进行造模条件优选, 麻醉剂使

用上, 选用戊巴比妥钠代替水合氯醛, 优选最佳麻醉剂量和浓度, 同时对 Ach- $\text{CaCl}_2$  混合溶液的浓度及静脉注射速度等进行优化, 以获得稳定的房颤为主要衡量标准。

1.3.3 心房组织病理学观察 实验结束后, 麻醉并处死动物, 取大鼠和兔的心房, 用生理盐水洗去血液, 分别放置在体积分数 10% 的甲醛溶液中固定 48 h, 脱水, 包埋, 切片, 之后进行 HE 染色和 Masson 染色, 在光学显微镜下观察组织病理学变化。

## 1.4 统计学方法

本实验采用 SPASS 11.0 操作系统对数据进行了统计分析, 所有的数据均以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较用单因素方差分析 (ANOVA), 两两比较采用 *t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 兔 AF 模型条件优选

2.1.1 麻醉剂 与体积分数 10% 水合氯醛组相比, 体积分数 0.5% 戊巴比妥钠麻醉兔维持时间较短 ( $P < 0.01$ ), 约 30 min (表 1), 且无死亡现象 (水合氯醛组第 2、第 3 日分别死亡 1 只和 2 只)。在本实验中, 选用 0.5% 戊巴比妥钠取代 10% 水合氯醛麻醉动物, 戊巴比妥钠给药剂量 30 mg/kg, 麻醉时间和效果均能满足实验要求 (表 1)。

2.1.2 给药剂量 与 0.7 mL/kg 相比, 耳缘静脉注射 Ach (66  $\mu\text{g/mL}$ )- $\text{CaCl}_2$  (10 mg/mL) 混合溶液 1 mL/kg, AF 持续时间较长 ( $P < 0.01$ ) (表 2)。

2.1.3 给药速度 实验结果显示, 15 s 注射组兔均死亡, 60 s 注射组, 兔 AF 持续时间较短, 30 s 注射组, AF 持续时间较长 ( $P < 0.01$ ) (表 3)。

通过上述实验, 我们采用以下条件制备兔 AF 模型: 耳缘静脉注射体积分数 0.5% 戊巴比妥钠 (6 mL/kg) 麻醉后, 1 mL/kg 的 Ach (66  $\mu\text{g/mL}$ )- $\text{CaCl}_2$  (10 mg/mL) 混合溶液以 30 s 匀速耳缘静脉注射诱发 AF。观察连续药物刺激不同时间 (10 d 和

表 1 不同麻醉药兔麻醉持续时间

| 组 别             | min                |                    |                    |
|-----------------|--------------------|--------------------|--------------------|
|                 | 第 1 日              | 第 2 日              | 第 3 日              |
| 体积分数 10% 水合氯醛   | 91.23 $\pm$ 5.62   | 85.77 $\pm$ 6.89   | 93.51 $\pm$ 6.54   |
| 体积分数 0.5% 戊巴比妥钠 | 35.12 $\pm$ 3.61** | 33.26 $\pm$ 2.35** | 28.81 $\pm$ 4.12** |

注: 与体积分数 10% 水合氯醛比较, \*\* $P < 0.01$ ;  $n = 3$

| 表 2 Ach -CaCl <sub>2</sub> 给药剂量对兔 AF 持续时间的影响 s |                |                |                 |  |
|------------------------------------------------|----------------|----------------|-----------------|--|
| 组 别                                            | 第 1 日          | 第 2 日          | 第 3 日           |  |
| 0.7 mL/kg                                      | 25.82 ± 5.62   | 15.91 ± 6.52   | 39.82 ± 5.1     |  |
| 1 mL/kg                                        | 56.12 ± 4.52** | 40.19 ± 5.89** | 112.18 ± 8.66** |  |

注: 与 0.7 mL/kg 组比较, \*\*P<0.01; n=3

| 表 3 不同给药速度兔 AF 持续时间 s |   |                |                |                |
|-----------------------|---|----------------|----------------|----------------|
| 组别                    | n | 第 1 日          | 第 2 日          | 第 3 日          |
| 15 s                  | 3 | -              | -              | -              |
| 30 s                  | 3 | 50.13 ± 5.28** | 35.46 ± 4.32** | 90.38 ± 3.56** |
| 60 s                  | 3 | 13.16 ± 3.12   | 8.15 ± 4.42    | 10.59 ± 2.84   |

注: 与 15 s 组比较, \*\*P<0.01

28 d)对 AF 持续时间以及心房结构的影响, 与大鼠模型进行比较。

2.2 兔和大鼠 AF 模型比较

2.2.1 心电图 实时监控给药时大鼠和家兔的 II 导

联心电图, 结果显示, 大鼠尾静脉注射 Ach(66 μg/kg)-CaCl<sub>2</sub>(10 mg/kg)混合溶液后, 均出现典型的 AF 波形 f 波, p 波消失, 且 R-R 间期不等。兔耳缘静脉注射 Ach(66 μg/kg)-CaCl<sub>2</sub>(10 mg/kg)混合溶液后, AF 波型与大鼠不同, 均出现大量的小波并夹杂不规则的心室波(图 1)。

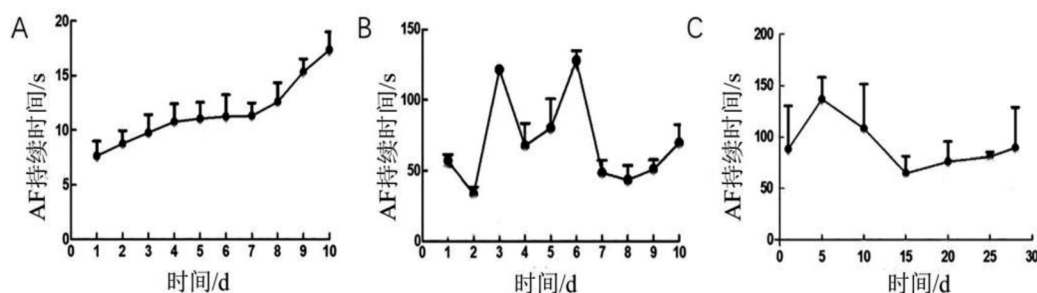
2.2.2 AF 持续时间 大鼠连续 10 d 给药后, AF 持续时间逐渐升高, 在第 4~7 日, 处于平台期, 约 11 s。之后逐渐升高, 第 10 日达到最高, 约 17 s。兔连续 10 d 给药, AF 持续时间起伏较大, 分别在第 3 日和第 6 日达到最大, 约 121 s。兔连续给药 28 d, AF 持续时间在造模前 15 d 波动明显, 15 d 后 AF 持续时间逐渐平稳(图 2)。

2.2.3 心房组织病理学改变 房颤模型建立成功之后, 每组分别取 3 只动物心房组织进行 HE 和



A: 正常大鼠; B: AF 大鼠; C: 正常兔; D: AF 兔; E: AF 大鼠从开始到结束给药; F: AF 兔从开始到结束给药

图 1 兔和大鼠给药后 II 导联心电图的改变



A: 大鼠造模 10 d; B: 兔造模 10 d; C: 兔造模 28 d

图 2 兔和大鼠 AF 持续时间

Masson 染色, 观察其病理结构改变。AF 大鼠心房组织 HE 染色结果显示, 正常组与 AF 造模 10 d 的大鼠均无明显差异, 其细胞结构完整, 轮廓清晰, 排列相对整齐, 无炎性浸润; Masson 染色结果显示: 正常组大鼠心肌细胞大小均匀, 胞质被染成红色, 心肌纤维间有轻微的胶原; AF 造模 10 d 大鼠, 纤维间均有大量胶原产生, 表明发生了严重的纤维化。AF 兔心房组织 HE 染色结果显示, 正常组、AF 造模 10 d 和 AF 造模 28 d 心房组织细胞结构均完整, 轮廓清晰; AF 造模 28 d 相对于正常组和 AF 造模 10 d, 均有较多的细胞核, 未观察到炎性浸润。AF 兔 Masson 染色结果显示, 正常组心房组织胞质被染成红色, 组织间含有少许胶原。AF 造模 10 d 和 28 d 心房组织间均含有大量的胶原, 但与 AF 造模 10 d 相比, AF 造模 28 d 兔心房组织组织间胶原含量更多, 心房组织纤维化更严重(图 3)。

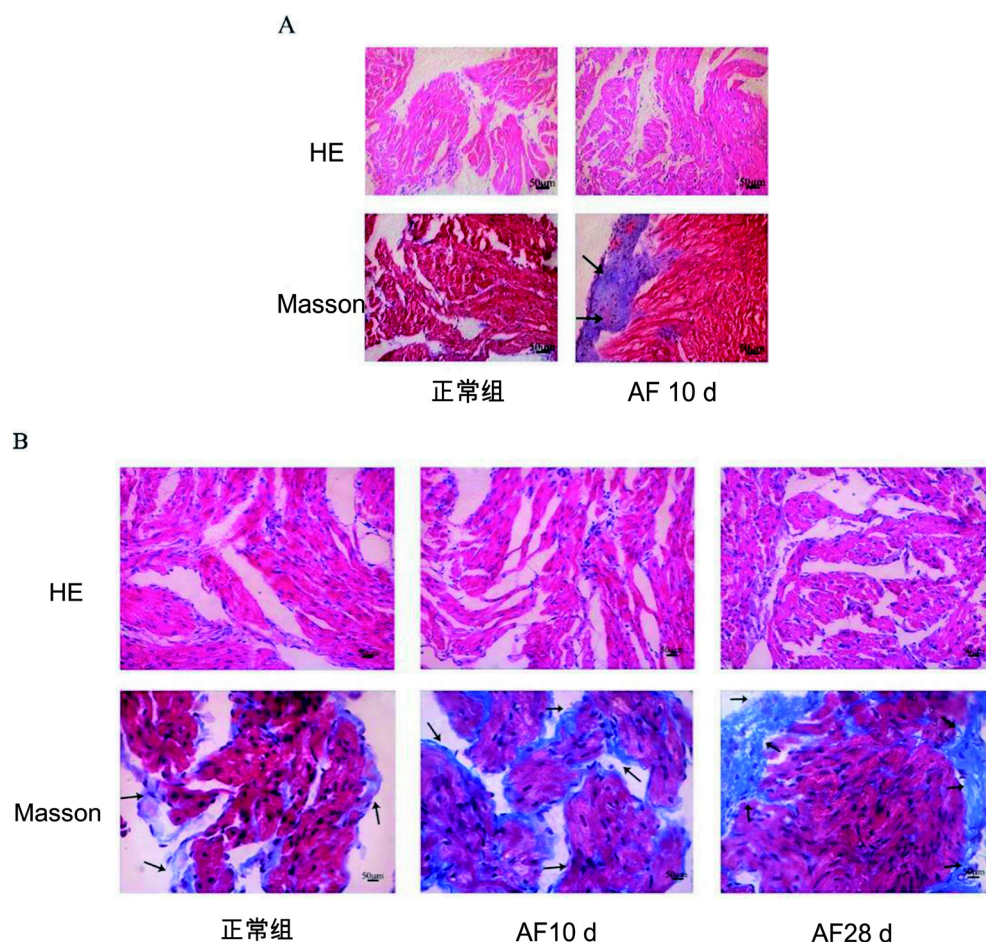
2.2.4 动物死亡率统计 大鼠造模过程中, 分别于第 2 日、第 9 日和第 10 日各死亡 1 只。兔造模过程中分别于第 20 日和第 25 日各死亡 1 只。

### 3 讨论

本实验室在探讨建立大鼠 AF 模型实验中, 曾对多种药物诱发 AF 进行筛选, 乌头碱, 强心苷等, 在大鼠等小动物, 很难诱发典型的 AF。给予  $\text{CaCl}_2$  可诱发多种心律失常, AF 发生不稳定且不规则, Ach 单独给予, 传导阻滞和心率减慢为最常见的心电异常类型。文献查阅结合实验条件选优, 我们将  $\text{CaCl}_2$  与 Ach 混合注射, 诱发动物 AF。AF 的诱发率高且重复性较好。Ach 能够

与大鼠心房肌细胞  $M_2$ (毒蕈碱受体  $M_2$  亚型)受体结合, 进而激活 Ach 依赖性钾通道(acetylcholine-dependent  $\text{K}^+$ -current,  $\text{I}_{\text{K}}\text{Ach}$ ), 缩短动作电位(Action potential, AP)时程和有效不应期(effective refractory period, ERP), 由于  $\text{I}_{\text{K}}\text{Ach}$  在心房不同部位分布密度不同, 致使心房电离散度增大, AF 的发生率增加, AF 持续时间延长<sup>[8, 9]</sup>。大量研究<sup>[10]</sup>表明 AF 的发生和维持与钙离子通道的改变有关。大鼠体内瞬时注入大量钙离子可使心房肌细胞外的钙离子浓度增加, 诱发心电异常。长时间的钙超载使心房肌细胞钙通道关闭, 甚至表达降低。L-型钙离子电流( $\text{I}_{\text{Ca-L}}$ )是动作电位平台期除极的主要电流。钙通道蛋白表达降低, 导致钙离子内流减少, 心房肌细胞动作电位除极减慢, ERP 缩短, 促使 AF 发生<sup>[11]</sup>。本实验在家兔上采用 Ach- $\text{CaCl}_2$  混合溶液诱导 AF 发生, 在预实验阶段分别对 Ach (33  $\mu\text{g/mL}$ , 66  $\mu\text{g/mL}$ , 132  $\mu\text{g/mL}$ )和  $\text{CaCl}_2$ (5  $\mu\text{g/mL}$ , 10  $\mu\text{g/mL}$ )的浓度进行调整, 结果显示 Ach(66  $\mu\text{g/mL}$ )- $\text{CaCl}_2$ (10  $\text{mg/mL}$ )诱导, AF 持续时间最长, 此结果与我们前期大鼠 AF 制备浓度相同。

生物机能实验系统全程监控 2 种动物造模过程中心电图变化。本实验条件下, 大鼠容易出现典型的 AF 波(p 波消失, f 波出现)。兔 AF 时, f 波和心室波混杂出现, 与人类 AF 时的心电图极为相似, 这可能是由于兔心脏较大, 对 Ach 和  $\text{CaCl}_2$  的敏感性和表面交感神经分布与大鼠不同所致<sup>[12]</sup>。在连续造模刺激反应性方面, 与大鼠相比, 兔每次 AF 持续时间长, 但日间波动较大。这可能是由于兔的心房组织较大, 微小的子波折返容易形成。同时兔对 AF 的代偿, 导致 AF 持续时间日间波动较大。为此我们延长兔造模时



A: 大鼠的 HE 染色和 Masson 染色; B: 兔的 HE 染色和 Masson 染色; 箭头指示组织纤维化; Bar = 50 μm

图 3 大鼠和兔 HE 和 Masson 染色结果

间,发现随着时间延长(28 d),AF 持续时间逐渐稳定。大鼠 AF 持续时间在造模 10~14 d 即达平台,延长造模时间,AF 持续时间未见明显延长(未发表数据)。

在麻醉剂的选择方面,本研究换用了戊巴比妥钠,在药物浓度的选择上,常用浓度为 3%,但安全范围较窄,高浓度注射给予,容易出现麻醉过深引起死亡,特别对于模型动物。我们参考刘为萍等<sup>[13]</sup>研究,麻醉药物浓度为 0.5%,给药体积 6 mL/kg。本实验条件下,动物麻醉时间约为 30 min 左右,符合实验需求。

Masson 染色结果显示,大鼠和兔在 AF10 d 后均出现显著的纤维化。AF 造模 28 d 后,兔心房的纤维化更为明显,这可能是 AF 持续时间延长的原因。为了观察兔 AF 模型对药物的敏感性,我们用模型兔,耳缘静脉注射胺碘酮(5 mg/kg),

观察治疗作用,结果显示胺碘酮能够显著降低兔 AF 持续时间,提示模型对药物敏感。在大鼠模型基础上,本实验建立了兔阵发性 AF 模型。此模型采用耳缘静脉给药,操作简单,容易掌握,通过调整麻醉剂,模型死亡率降低。相对于大鼠,兔与人类 AF 时心电图的改变和 AF 持续时间的波动性更为相似,离子通道种类和分布与人类更为接近,更适合于 AF 电重构机制的研究。兔心房组织较大,也为后续有效开展分子生物学实验提供保障。

#### 参考文献:

- [1] Gorter TM, Melle JPV, Rienstra M, et al. Right heart dysfunction in heart failure with preserved ejection fraction: the impact of atrial fibrillation [J]. J Card Fail, 2017, 35(48): 34-52.
- [2] 赵峰, 黄鑫, 李莉. 心房颤动物模型现状[J]. 实验动物

- 与比较医学, 2006, 26(4):257-260.
- [3] 陈春林, 巩田田, 汤依群, 等. 大鼠房颤模型的建立[J]. 实验动物科学, 2009, 26(3):1-4.
- [4] Yang QH, Wu GF, Han LM, et al. Taurine reverses atrial structural remodeling in Ach-CaCl<sub>2</sub> induced atrial fibrillation rats [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 831-841.
- [5] Qiao G, Sun J, Lu H, et al. Antioxidant and anti-atrial fibrillation effects of Guanfu base A [J]. J Chin Pharm Univ, 2015, 46(2):235-241.
- [6] Zou D, Geng N, Chen YL, et al. Ranolazine improves oxidative stress and mitochondrial function in the atrium of acetylcholine-CaCl<sub>2</sub> induced atrial fibrillation rats [J]. Life Sci, 2016, 156(2016):7-14.
- [7] 李贵荣. 心脏离子通道研究的进展 - 从小鼠到人类, 相似性与差异性[C]. 绵阳: 中国生理学会心血管生理学术研讨会论文集, 2011.
- [8] Juhász V, Hornyik T, Benák A, et al. Comparison of the effects of IK<sub>ACh</sub>, IK<sub>r</sub> and INa block in conscious dogs with atrial fibrillation and on action potentials in remodeled atrial trabeculae [J]. Can J Physiol Pharmacol, 2017, 96(1):18-25.
- [9] Yang Q, Wu G, Han L, et al. Taurine reverses atrial structural remodeling in Ach-CaCl<sub>2</sub> induced atrial fibrillation rats [J]. Adv Exp Med Biol, 2017, 97(5):831-841.
- [10] 刘爽, 岳传哲, 王东明. 房颤与钙离子通道的关系及其机制 [J]. 中国误诊学杂志, 2011, 11(15):3553-3554.
- [11] Greiser M, Schotten U. Dynamic remodeling of intracellular Ca<sup>2+</sup> signaling during atrial fibrillation [J]. J Mol Cell Cardiol, 2013, 58(5):134-142.
- [12] Chen LJ, Li GP. The research progress on sympathetic ganglions innervating function in the heart [J]. Chem Life, 2016, 36(4):482-486.
- [13] 刘为萍, 白梅. 戊巴比妥钠麻醉家兔的浓度探讨[J]. 华夏医学, 2013, 26(1):11-13.

## Comparison on Rabbit and Rat Atrial Fibrillation Models Induced by Intravenous Injection of Acetylcholine-Calcium Chloride Mixed Solution

FENG Kai, YANG Lei-xi, CHENG Yi-lin, WEI Yan-chun, TAO Ru, ZHOU Tong-xin, TANG Yi-qun  
(School of Basic Medicine and Clinical Pharmacy,  
China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

**[Abstract] Objective** To establish atrial fibrillation (AF) model in rabbit by intravenous injection of acetylcholine (Ach)-calcium chloride (CaCl<sub>2</sub>) mixture. **Methods** AF in rabbit was induced by the intravenous administration of Ach (66 µg/mL)-CaCl<sub>2</sub> (10 mg/mL) in a pilot experiment. Duration of AF was recorded by electrocardiogram. Anesthetics, administration volume and rate of the Ach-CaCl<sub>2</sub> mixture were optimized by single-factor test. AF in rat was established by intravenous injection of Ach (66 µg/mL)-CaCl<sub>2</sub> (10 mg/mL) solution for 10 days. Atrial pathological changes were examined by Masson's trichrome and HE staining after 10 days, which were compared with the rat AF model. **Results** Pentobarbital sodium (0.5%) was injected as an anesthetic through the ear vein. A mixture of Ach (66 µg/mL)-CaCl<sub>2</sub> (10 mg/mL) (1 mL/kg) was administrated at a constant speed over 30 seconds for 10 days and 28 days to establish the rabbit atrial fibrillation model. Compared with the rat AF model, the duration of AF in rabbits was longer and fluctuated greatly. Furthermore, the compensatory effect was more obvious in rabbits treated with the mixture for 10 days, and the duration tended to be stable over time. In the 28 day modeling group, the duration of AF was approximately 80 seconds and atrial fibrosis was observed. **Conclusions** The rabbit atrial fibrillation model can be induced by the intravenous administration of Ach (66 µg/mL)-CaCl<sub>2</sub> (10 mg/mL). Compared with the AF in rat, AF in rabbit has a longer AF duration time, and the f-wave and ventricular wave of II lead electrocardiogram appear in AF, which is more similar to clinical.

**[Key words]** Atrial fibrillation (AF); Ach-CaCl<sub>2</sub>; Fibrosis; Rabbit; Rat

# 舒郁胶囊及其主要组份对经前期综合征 肝气郁证大鼠海马中 Cav1.2 介导的 CaM/CaMK II 信号通路的影响

徐凯勇<sup>1</sup>, 王杰琼<sup>1</sup>, 李 芳<sup>2</sup>, 耿燕楠<sup>3</sup>, 夏小雯<sup>1</sup>, 宋春红<sup>1</sup>

(1. 山东中医药大学, 教育部中医药经典理论研究重点实验室,

山东省中医药基础研究重点实验室, 济南 250355;

2. 北京市丰台区妇幼保健院药剂科, 北京 100067)

**[摘要]** 目的 探讨 L 型钙通道(Cav1.2)下游信号通路中钙调蛋白 / 钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II (CaM/ CaMK II) 与经前期综合征(PMS)肝气郁证的关系以及舒郁胶囊的干预机制。方法 用舒郁胶囊、柴胡提取物、白芍提取物和阳性对照氟西汀+尼莫地平对慢性束缚应激法制备的 PMS 肝气郁证大鼠进行干预, 免疫印迹技术检测各组海马中 CaM, CaMK II 的磷酸化水平及脑源性营养因子(BDNF)蛋白表达。结果 慢性束缚应激可以成功复制 PMS 肝气郁证大鼠模型。蛋白表达结果显示, 模型组大鼠海马中 CaM 蛋白的表达量升高( $P<0.05$ ), CaMK II 磷酸化水平显著升高, BDNF 蛋白的表达量显著下降( $P<0.01$ )。与模型组相比, 氟西汀+尼莫地平组大鼠海马 CaM 蛋白表达量显著降低( $P<0.05$ ), 各给药组海马中 CaMK II 磷酸化水平显著下降( $P<0.01$ ), BDNF 的蛋白表达量均显著升高( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )。结论 海马脑区 Cav1.2 下游信号通路中 CaM/ CaMK II 的激活与 PMS 肝气郁证的发生有关, 舒郁胶囊及其有效组分可能是通过抑制 CaMK II 信号通路的激活发挥其治疗作用。

**[关键词]** 经前期综合征(PMS); 舒郁胶囊; 白芍提取物; 柴胡提取物; L 型钙通道 (Cav1.2)

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0377-06

经前期综合征(PMS)是典型中医情志病症, 肝气郁证为主要证型, 肝疏泄失常为其关键病机, 具体机制有待深入探索。有研究发现  $Ca^{2+}$  的浓度变化与 PMS 的发生有关<sup>[1,2]</sup>。L 型钙通道 (Cav1.2) 是细胞内  $Ca^{2+}$  浓度调节的重要通道, 细

胞内  $Ca^{2+}$  与钙调蛋白(CaM)结合可激活钙调蛋白依赖的蛋白激酶 II(CaMKII), 其作用底物参与调控与 PMS 发生有关的脑源性营养因子(BDNF)、五羟色胺(5-HT)、多巴胺(DA)和谷氨酸(Glu)等蛋白质和神经递质的合成和释放。我们前期研究<sup>[3]</sup>表明, PMS 肝气郁证大鼠血清可显著抑制海马神经元 L 型钙离子电流密度, 而舒郁胶囊及其有效组分含药血清则可抑制 L 型钙电流密度。Ehlinger 等<sup>[4]</sup>研究表明, 其 L 型钙离子通道可以通过色氨酸神经元系统来调控情绪障碍, 进一步证实了我们的前期研究。那么 PMS 肝气郁证大鼠海马中 Cav1.2 下游的 CaMK II / BDNF 信号通路是否有变化呢? 为进一步验证舒郁胶囊及主要组份对 PMS 肝气郁

**[收稿日期]** 2019-02-18

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473359), 山东省中医药科技发展计划项目(2017-087), 山东中医药大学大型仪器设备专项(2018yq02)

**[作者简介]** 徐凯勇(1980-), 男, 硕士, 中药药理研究。

E-mail: xkychina@163.com

**[通信作者]** 宋春红(1980-), 女, 博士, 副教授, 研究方向: 中药调肝方药药理研究。E-mail: sch-64552@126.com

证大鼠海马中Cav1.2介导的CaMK II /BDNF 信号通路的影响, 我们进行了如下研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雌性 Wistar 大鼠 130~150 g, 80 只, 由山东中医药大学实验动物中心提供[SCXK(鲁)2011-0003]。大鼠于昼夜颠倒环境(每日于 21:00 开灯, 9:00 关灯)饲养一周, 除实验期外自由饮食。实验操作在夜间、暗淡红灯(星光条件)下进行。

### 1.2 药品与主要试剂

舒郁胶囊由白芍、柴胡、香附、甘草有效成分配伍组成(新药临床批件 2008L11169); 柴胡提取物和白芍提取物, 青岛阳光海川医药科技发展有限公司生产(批号: 2011L06107、20110526 和 20110527), 是舒郁胶囊的两种有效成分, 其制备方法以及质控指标同舒郁胶囊中该药物的制备及检测; 氟西汀, 礼来苏州制药有限公司(批号 H20050463); 尼莫地平德国拜耳医药保健有限公司(批号: H20003010)。CaM 一抗(SAB4503194, 美国 Sigma 公司); CaM-PK II 一抗(4436, 美国 Cell Signal); p-CaMKII (Thr286) 一抗(3361, 美国 Cell Signal); BDNF 一抗(AV41970, 美国 Sigma); Tubulin 一抗(M2005, Ab-mart)。山羊抗兔二抗(SB200, 远达晶美); 蛋白 Marker(SM0671, Thermo Fermentas), 预染蛋白 marker(Thermo Fisher Scientific); Protease inhibitor cocktail(Sigma, P8340)。

### 1.3 实验仪器

Olympus 显微镜(日本 Olympus CX41); 大鼠旷场实验箱 (XR-XZ301, 北京天鸣宏远科技发展有限公司); SDS-PAGE 电泳仪、蛋白印迹转移装置(美国伯乐公司); 凝胶成像系统(Syngene, G: BOX chemi XR5)。

### 1.4 PMS 肝气郁证大鼠模型制备

利用慢性束缚应激法制备模型<sup>[5]</sup>, 旷场实验筛选得分相近大鼠, 阴道涂片镜检结合行为学观察方法确定大鼠动情周期。选择动情行为规则出现且处于动情周期非接受期的大鼠 60 只(非接受期相当于人经前期)。按随机数字表的方法将大鼠随机分为 6 组, 分别为正常对照组(简称正常组)、

PMS 肝气郁证模型组(简称模型组)、PMS 肝气郁证模型给予舒郁胶囊组(简称舒郁组)、PMS 肝气郁证模型给予柴胡提取物组(简称柴胡组)、PMS 肝气郁证造模给予白芍提取物组(简称白芍组)、PMS 肝气郁证造模给予氟西汀+尼莫地平组(简称氟西汀+尼莫地平组, 阳性对照)。给药组在造模的同时每日上午 8:30 灌胃给药 1 次, 直到造模结束。给药剂量每日分别为 0.41 g/kg、0.32 g/kg、36 mg/kg 和 2.7 mg/kg(氟西汀和尼莫地平), 均相当于人临床 8 倍剂量(柴胡和白芍提取物的剂量设计依据其在舒郁胶囊中所占的比例计算得出)。正常组和模型组大鼠灌胃等体积的灭菌饮用水。造模完成后大鼠断头处死, 冰上迅速剥离海马, -70 °C 冰箱备用。

### 1.5 免疫印迹(Western blotting) 检测 CAV1.2 下游信号通路蛋白表达水平

取出研磨好的大鼠脑组织, 冰浴中操作, 含有非离子型表面活性剂聚乙二醇辛基苯基醚的裂解液(RIPA 方法)提取总蛋白, 聚氰基丙烯酸正丁酯(BCA)试剂盒测定样品蛋白含量。以 50  $\mu$ g 总蛋白每泳道上样, 经 SDS-PAGE 电泳分离后, 湿法转移至 NC 膜上, 用含 5% 脱脂奶粉的三乙醇胺吐温缓冲盐水溶液(TBST)室温封闭 1 h, 分别与一抗(抗-CaM, 1:800; 抗-CaMK II, 1:1 000; 抗-pCaMK II, 1:1000; 抗-BDNF, 1:1 000; 抗-Tubulin, 1:2 000)室温摇床孵育 2 h(抗体均用 5% 脱脂奶粉的 TBST 溶液稀释), TBST 洗膜, 10 min/次, 共 3 次, 再与二抗(1:2 000)室温孵育 1 h, TBST 洗膜, 10 min/次, 共 3 次, ECL 化学发光试剂检测杂交信号, 显影于 X 线片上, 用扫描仪对 X 光片灰度扫描, 采用 Image J 软件对图像进行灰密度分析。目的蛋白的灰度值除以内参 Tubulin 的灰度值以校正误差, 所得结果代表样品的目的蛋白相对含量。

### 1.6 数据分析

利用 Xmaze 动物行为分析系统(XR-Xmaze)记录大鼠的旷场试验得分; 利用 GraphPad Prism 5 统计软件统计各组大鼠旷场试验得分, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 Image J 软件对图像进行灰度值分析, One-way ANOVA 进行分析,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 PMS 肝气郁证大鼠模型制备结果

2.1.1 造模前后行为学观察 实验前, 各组大鼠均精神状态为活泼好动, 被毛有光泽、眼角干净、粪便球形。第一天束缚时, 模型组和给药组大鼠表现为强烈反抗、嘶叫、双目圆睁、毛须竖立、粪便尿液明显增多; 造模结束后, 正常对照组大鼠的状态与前期相同, 模型组大鼠不活跃, 表现为精神萎靡, 毛发散乱直立、眼神呆滞, 大便变稀, 扎堆睡觉, 反抗能力明显降低; 解开束缚纱布时, 未见对峙, 大多跑到角落不动。而给药组大鼠在被抓时, 叫声较柔和, 毛发较整洁, 眼角干净, 与模型组相比活动明显较多。

#### 2.1.2 各组大鼠造模前后体质量

各组大鼠造模前后体质量比较结果见表 1, 造模前各组大鼠体质量比较, 差异无统计学意义, 造模后, 与正常组相比, 模型组大鼠体质量明显降低( $P<0.001$ )与模型组相比, 舒郁组、柴胡组、白芍组和阳性对照组大鼠体质量显著升高( $P<0.05$ ;  $P<0.05$ ;  $P<0.01$ ;  $P<0.05$ ); 与阳性对照组相比, 模型组大鼠体质量显著降低( $P<0.05$ )。

2.1.3 各组大鼠旷场实验得分 旷场试验得分是动物探索行为及兴奋性的总体反应, 本实验结果如表 2 所示, 造模前各组大鼠旷场试验得分无显著性差别; 造模后, 与正常组相比, 模型组大鼠旷场实验得分显著降低( $P<0.01$ ); 与模型组相比, 舒郁组、白芍组、阳性对照组旷场实验得分显著升高( $P<0.05$ ), 柴胡组也呈升高趋势; 与阳性对照组相比, 中药组无显著性差别, 模型组大鼠得分显著降低( $P<0.05$ )。

2.1.4 各组大鼠糖水偏好 糖水偏好实验结果如表 3 所示, 造模前各组大鼠糖水消耗量无差异无

表 1 造模前后各组大鼠体质量比较 g

| 组别    | 造模前           | 造模后                          |
|-------|---------------|------------------------------|
| 正常组   | 195.08 ± 2.77 | 202.31 ± 2.84                |
| 模型组   | 193.64 ± 4.44 | 180.63 ± 4.38**^             |
| 舒郁组   | 193.89 ± 1.78 | 195.08 ± 5.55 <sup>#</sup>   |
| 柴胡组   | 194.16 ± 3.82 | 197.97 ± 4.81 <sup>#</sup>   |
| 白芍组   | 195.08 ± 3.67 | 203.75 ± 5.18 <sup>###</sup> |
| 阳性对照组 | 194.23 ± 4.74 | 197.89 ± 6.12 <sup>#</sup>   |

注: 与正常组相比, \*\*表示  $P<0.01$ ; 与模型组相比, <sup>#</sup>表示  $P<0.05$ , <sup>###</sup>表示  $P<0.05$ ; 与阳性对照组相比, ^表示  $P<0.05$

表 2 造模前后各组大鼠旷场实验得分比较

| 组别    | 造模前                | 造模后                             |
|-------|--------------------|---------------------------------|
| 正常组   | 16 089.4 ± 2 567.5 | 14 129.9 ± 2 685.7              |
| 模型组   | 13 802.3 ± 3 311.2 | 8 734.7 ± 6 746.2**^            |
| 舒郁组   | 13 812.5 ± 4 584.0 | 13 068.9 ± 2 161.7 <sup>#</sup> |
| 柴胡组   | 14 633.1 ± 3 233.4 | 10 781.7 ± 2 297.4              |
| 白芍组   | 13 562.2 ± 3 908.7 | 12 548.7 ± 1 486.1 <sup>#</sup> |
| 阳性对照组 | 14 518.3 ± 1 206.1 | 12 963.9 ± 1 486.5 <sup>#</sup> |

注: 与正常组相比, \*\* $P<0.01$ ; 与模型组相比, <sup>#</sup> $P<0.05$ ; 与阳性对照组相比, ^ $P<0.05$

表 3 造模前后各组大鼠糖水偏好率比较 %

| 组别    | 造模前           | 造模后                         |
|-------|---------------|-----------------------------|
| 正常组   | 76.29 ± 24.78 | 86.01 ± 8.04                |
| 模型组   | 84.28 ± 7.37  | 60.51 ± 9.37***^^^          |
| 舒郁组   | 78.21 ± 8.70  | 88.59 ± 4.01 <sup>###</sup> |
| 柴胡组   | 82.84 ± 8.03  | 91.88 ± 4.02 <sup>###</sup> |
| 白芍组   | 75.43 ± 12.72 | 89.15 ± 7.37 <sup>###</sup> |
| 阳性对照组 | 81.43 ± 14.74 | 86.42 ± 6.7 <sup>###</sup>  |

注: 与正常组相比, \*\*\* $P<0.001$ ; 与模型组相比, <sup>###</sup> $P<0.001$ ; 与阳性对照组相比, ^^^ $P<0.001$

统计学意义; 造模后, 与正常组相比, 模型组大鼠糖水偏好率呈极显著性降低( $P<0.001$ ), 与模型组相比, 各给药组大鼠的糖水偏好率有极显著性升高( $P<0.001$ ); 与阳性对照组相比, 模型组大鼠糖水偏好率显著降低( $P<0.001$ )。

### 2.2 各组大鼠海马中 CaMK II /BDNF 信号通路中关键蛋白的蛋白及磷酸化水平

从图 1, 表 4 可以看出, 与正常组相比, 模型组大鼠海马中 CaM 蛋白表达量和 CaMK II 磷酸化水平显著升高( $P<0.05$ ), BDNF 蛋白的表达量显著下降( $P<0.01$ ), 各给药组大鼠差异无统计学意义。与模型组相比, 阳性对照组大鼠海马 CaM 蛋白的表达量显著降低( $P<0.05$ ), 舒郁组、柴胡组、白芍组和阳性对照组大鼠海马 CaMK II 磷酸化水平显著降低( $P<0.01$ ); 舒郁组、柴胡组、白芍组和阳性对照组大鼠海马, BDNF 水平显著升高( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ )。

## 3 讨论

CACNA1C 编码 Cav1.2 亚型的  $\alpha 1C$  亚基, 是 Cav1.2 的主要亚基, 作为跨膜的通道蛋白发挥作用, 并且含有二氢吡啶类药物的结合位点。近年

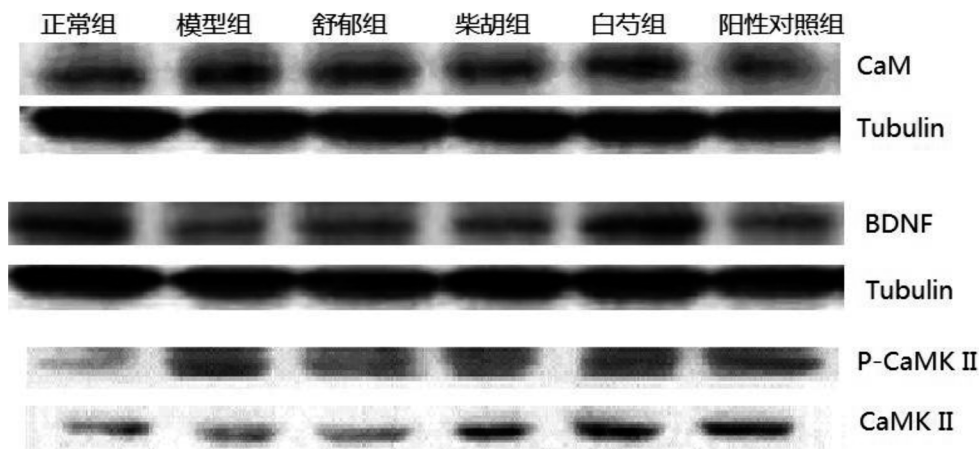


图1 各组大鼠海马中 CaM, CaMK II, BDNF 蛋白电泳图

表4 各组大鼠海马中 CaM, CaMK II, BDNF 蛋白及磷酸化表达水平

| 组别    | CaM            | P-CaMK II        | BDNF            |
|-------|----------------|------------------|-----------------|
| 正常组   | 0.291 ± 0.009  | 0.589 ± 0.063    | 0.640 ± 0.084   |
| 模型组   | 0.489 ± 0.027* | 1.154 ± 0.076**  | 0.284 ± 0.096** |
| 舒郁组   | 0.441 ± 0.033  | 0.690 ± 0.056### | 0.536 ± 0.044## |
| 柴胡组   | 0.366 ± 0.030  | 0.753 ± 0.038##  | 0.528 ± 0.016## |
| 白芍组   | 0.360 ± 0.054  | 0.746 ± 0.063##  | 0.568 ± 0.048## |
| 阳性对照组 | 0.338 ± 0.023# | 0.740 ± 0.030##  | 0.468 ± 0.012#  |

注: 与正常组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与模型组相比, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$

来 CACNA1C 与情感障碍性疾病的关系研究较多, 通过全基因组关联研究显示该基因的多态性与抑郁、精神分裂症、双向情感障碍性疾病密切相关, 是多种情感障碍性疾病的候选基因之一, 也被认为是未来治疗精神情感障碍性疾病的新靶点<sup>[6]</sup>。本研究在前期研究的基础上进一步探讨了 Cav1.2 介导的 CaM/CaMK II 钙通路与 PMS 肝气郁证发生的关系以及调肝方药的影响。

有研究表明<sup>[7]</sup>, 钙离子调节紊乱是 PMS 的病理生理特征, 并且钙离子在神经生长中起着至关重要的作用, 皮层发育在很大程度上依赖电压依赖性的钙<sup>[8]</sup>。通过 L 型钙通道的电流占细胞总电流的 30-50%, 此通道的开放与关闭能有效调节细胞浆内钙离子水平<sup>[9]</sup>。钙离子参与突触可塑性调节<sup>[10]</sup>, PMS 大鼠体内钙离子浓度降低影响突触可塑性调节, 因此我们认为对钙离子浓度的调节能够在 PMS 病理中起到一定的作用。本实验中我们利用慢性束缚应激的方法对动情周期处于非接受期的大鼠进行 PMS 肝气郁证模型复制, 造模完成后根据大鼠的宏观行为学表现以及旷场试验和糖水偏好实

验充分验证了模型复制是成功的。在此基础上我们检测了各组大鼠下丘脑中 Cav1.2 介导的 CaM/CaMK II 钙通路关键蛋白的表达。实验结果表明, Cav1.2 介导的 CaM/CaMK II 在模型组大鼠中关键蛋白 CaMK II 的磷酸化水平是升高的, 而 BDNF 蛋白表达降低; 造模同时给予舒郁胶囊以及有效组分后大鼠海马中上述蛋白无异常表达的现象。

CaMK II 磷酸化后作用的靶蛋白之一即是 CREB, p-CaMK II 可使 CREB 的两个位点发生磷酸化, 这两个位点分别是 Ser133 和 Ser142, Ser133 和 Ser142 位点的磷酸化分别能启动和抑制相关基因的转录。研究认为 CaMK II 主要是对 Ser142 发挥作用。本实验没有购买到检测 Ser142 位点磷酸化的 CREB 抗体, 所以我们直接检测了 CREB 调控的 BDNF 蛋白的表达。结果显示模型组 BDNF 表达降低。这说明 CaMK II 磷酸化后可能通过对 CREB Ser142 位点的磷酸化抑制了 BDNF 的表达, 因此结合本实验我们认为海马脑区中 CaM/CaMK II 的激活与 PMS 肝气郁证的发生有关。

舒郁胶囊是临床治疗肝气郁证的组份配伍新

药,由白芍、柴胡、甘草和香附有效组分配伍而成,临床疗效显著,其有效成分对中枢神经系统有明显的调理作用。柴胡是中医治疗肝气郁结的重要药物,柴胡皂苷具有抗炎、提高免疫力,抗惊厥的作用,还可以延长睡眠,对精神类疾病疗效显著<sup>[11]</sup>。研究认为雌激素和孕激素均可抑制 Cav1.2 电流<sup>[12]</sup>,而柴胡皂苷 d 被认为具有雌激素样的作用<sup>[13]</sup>。白芍的主要药效成分芍药苷具有促进皮层神经元生长,保护脑缺血后损伤的作用,可以改善神经行为学症状,增加血脑屏障通透性,增加大脑局部血流量。张广钦等<sup>[14]</sup>研究认为芍药苷可以阻断心肌细胞的 Cav1.2。Wang 等<sup>[15]</sup>发现芍药苷能通过抑制 PC12 细胞内 CaM/CaMK II 来发挥其神经保护的作用。多项研究<sup>[16,17]</sup>结果也表明芍药苷对神经系统的保护作用与抑制细胞内钙超载密不可分。由此可见,以上中药配伍既能提高中枢系统的兴奋性,又有一定的镇静作用,协调平衡中枢系统的功能,其有效成分还可能抑制 Cav1.2。因此我们推测 Cav1.2 信号通路可能是舒郁胶囊的部分作用靶点,白芍提取物和柴胡提取物中的有效成分主要作用至该通路。结合本实验结果,我们推测调肝方药可能通过抑制 Cav1.2 介导的 CaM/CaMK II 来发挥其治疗 PMS 肝气郁证的作用。但对其具体微观机制我们还将进一步深入研究。

本研究只是从整体动物水平上得出的结果,在下一步的研究中我们拟在离体细胞水平利用激光共聚焦显微镜结合荧光标记以及电生理膜片钳技术明确舒郁胶囊有效组分提取物或者其有效单体成分对该通道的作用。为该药物在治疗精神情感障碍类等情绪类疾病的应用提供理论基础。

## 参考文献:

- [1] Shamberger RJ. Calcium, magnesium, and other elements in the red blood cells and hair of normals and patients with premenstrual syndrome[J]. Biol Trace Elem Res, 2003, 94(2):123-129.
- [2] Rapkin AJ, Akopians AL. Pathophysiology of premenstrual syndrome and premenstrual dysphoric disorder[J]. Menop Int, 2012, 18(2):52-59.
- [3] 宋春红,李芳,郭英慧,等.舒郁胶囊及主要组份对PMS肝气郁证大鼠海马中CACNA1C蛋白表达和功能的影响[J].中国药理学通报,2014,30(10):1476-1477.
- [4] Ehlinger DG, Commons KG. Cav1.2 L-type calcium channels regulate stress coping behavior via serotonin neurons[J]. Neuropharmacology, 2019, 144:282-290.
- [5] 魏盛,王海苹,乔明琦.慢性束缚应激及居住入侵法制备经前期综合征肝气郁证大鼠模型的行为学观测与分析[J].世界科学技术:中医药现代化,2012,14(4):1848-1852.
- [6] Bigos KL, Mattay VS, Callicott JH, et al. Genetic variation in CACNA1C affects brain circuitries related to mental illness[J]. Arch Gen Psychia, 2010, 67(9):939.
- [7] Busse JW, Montori VM, Krasnik C, et al. Psychological intervention for premenstrual syndrome: a meta-analysis of randomized controlled trials[J]. Psychother Psychosomp, 2009, 78(1):6-15.
- [8] Parekh AB, Penner R. Store depletion and calcium influx [J]. Physiol Rev, 1997, 77(77):901-930.
- [9] Barrack DS, Thul R, Owen MR. Modelling the coupling between intracellular calcium release and the cell cycle during cortical brain development[J]. J Theor Biol, 2014, 347(9):17-32.
- [10] Ansah TA, Wade LH, Shockley DC. Effects of calcium channel entry blockers on cocaine and amphetamine-induced motor activities and toxicities [J]. Life Sci, 1993, 53(26):1947-1956.
- [11] 牛向荣,柴胡药理作用研究概述[J].中国药师,2009(9):1310-1312.
- [12] Wang P, Ren J, Tang J, et al. Estrogen-like activities of saikosaponin-d in vitro: A pilot study[J]. Eur J Pharmacol, 2010, 626(2):159-165.
- [13] Cairrão E, Alvarez E, Carvas JM, et al. Non-genomic vasorelaxant effects of 17  $\beta$  -estradiol and progesterone in rat aorta are mediated by L-type  $\text{Ca}^{2+}$  current inhibition[J]. Acta Pharmacol Sini, 2012, 33(5): 615-624.
- [14] 张广钦,郝雪梅,陈世忠,等.芍药苷对大鼠心肌细胞 L 钙通道的阻断作用[J].中国药理学通报,2003,19(8):863-866.
- [15] Wang D, Tan Q, Zhang Z. Neuroprotective effects of paeoniflorin, but not the isomer albiflorin, are associated with the suppression of intracellular calcium and calcium/calmodulin protein kinase II in PC12 cells[J]. J Mol Neurosci, 2013, 51(2):581-590.
- [16] 杨军,何丽娜,何素冰,等.芍药苷对沙土鼠皮层神经细胞钙超载损伤的保护作用[J].中国药理学与毒理学杂志,2001,15(3):164.
- [17] Zhong SZ, Ge QH, Li Q, et al. Peoniflorin attenuates A $\beta$  (1-42)-mediated neurotoxicity by regulating calcium homeostasis and ameliorating oxidative stress in hippocampus of rats[J]. J Neurol Sci, 2009, 280(1/2): 8.

## The Effects of Shu Yu Capsule and Its Main Composition on Cav1.2 Mediated CaM/ CaMK II Signaling Pathway in Hippocampus of Rat with PMS Liver-qi Stagnation

XU Kai-yong<sup>1</sup>, WANG Jie-qiong<sup>1</sup>, LI Fang<sup>2</sup>, GENG Yan-nan, XIA Xiao-wen, SONG Chun-hong<sup>1</sup>

(1. Lab of Traditional Chinese Medicine Classical Theory, Ministry of Education;

Key Laboratory of Basic Traditional Chinese Medicine Research in Shandong Province;

Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

2. Department of Pharmacy, Fengtai District Maternal and

Child Health Care Hospital, Beijing 100067, China;

3. The Affiliated Hospital of Shandong University of TCM Jinan 250355, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the relationship of L-type calcium channel (Cav1.2) mediated calmodulin/calmodulin-dependent protein kinase II (CaM/CaMKII) signaling pathway with premenstrual syndrome (PMS) with liver-qi stagnation, and elucidate the Shuyu capsule intervention mechanism. **Methods** The PMS model rats with liver-qi stagnation were induced by bondage stimulation, and the model rat were treated with Shuyu capsule, the extract from Radix Bupleuri and Radix Paeoniae, and fluoxetine+nimodipine as positive control. The experiment were divided into six groups: normal group, model group, Shuyu group, Radix Bupleuri, Radix Paeoniae group and fluoxetine+nimodipine group. The expression level of CaM, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and phosphorylation level of CaMKII were detected by Western blotting. **Results** Compared with the normal group, the protein expression level of p-CaMK II increased and BDNF decreased significantly in hippocampus of model rats. After treating with our medication the protein expression of CaM and CaMK II phosphorylation level decreased obviously, the expression level of BDNF increased markedly ( $P<0.05$ ;  $P<0.01$ ). **Conclusion** We hypothesized that the CaM/CaMK II calcium signal pathway mediated by Cav1.2 may play important role in the pathogenesis of PMS Liver-qi stagnation and maybe the molecular targets of Shuyu capsule to treatment PMS with Liver-qi stagnation.

**[Key words]** Premenstrual syndrome; Shuyu Capsule; Radix Bupleuri extract; Radix Paeoniae extract; L-type calcium channel (Cav1.2)

# 原花青素对大鼠放射性心脏损伤心肌组织 IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白表达的影响

徐兴军<sup>1</sup>, 吴 菲<sup>2</sup>, 宋金熠<sup>3</sup>, 高世乐<sup>1</sup>

(1.中国人民解放军联勤保障部队第 901 医院肿瘤四科, 合肥 230031;

2. 皖南医学院临床康复 2 班, 芜湖 241002;

3. 安庆医药高等专科学校临床 5 班, 安庆 246052)

**[摘要]** 目的 观察原花青素(OPC)对大鼠放射性心脏损伤(RIHD)心肌组织白细胞介素-1(IL-1)、转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)和核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)蛋白表达的影响, 探讨 OPC 在大鼠 RIHD 中的可能作用及作用机制。方法 60 只雄性 SD 大鼠, 随机分为 6 组, 每组 10 只, 分别为正常对照组, 单纯照射组 OPC 小剂量(50 mg/kg)组、中剂量(100 mg/kg)组、大剂量(150 mg/kg)组、蓝莓(200 mg/kg)组。除正常对照组外, 其余各组大鼠给予 6 MV X 线单次照射心脏, 剂量为 20 Gy。OPC 组和蓝莓组大鼠给予对应药物灌胃。苏木精-伊红(HE)染色观察大鼠心肌组织病理变化, 免疫组织化学(IHC)和免疫蛋白印迹(WB)法检测大鼠心肌组织 IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白表达。结果 大鼠心肌组织免疫组织化学结果显示, 与正常对照组相比, IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白吸光度值升高( $P<0.05$  或  $P<0.01$ ); 与单纯照射组比较, IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白吸光度值降低( $P<0.05$ )。大鼠心肌组织 Western blotting 表达变化, 与正常对照组相比, IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白表达升高( $P<0.05$ ); 与单纯照射组比较, IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白表达下降( $P<0.05$ )。结论 OPC 可降低 RIHD 大鼠心肌组织 IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平, 防治放疗引起的 RIHD, 且疗效优于蓝莓。

**[关键词]** 原花青素(OPC); 蓝莓; 放射性心脏损伤(RIHD); 大鼠; 白介素-1(IL-1); 转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1); 核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0383-07

胸部放疗是肺癌、食管癌、乳腺癌、胸部淋巴瘤和纵隔肿瘤等疾病的主要治疗方法之一, 据统计, 50% 以上患者会在治疗的某一阶段接受胸部放疗<sup>[1]</sup>。随着肿瘤诊疗水平的提高, 越来越多的患者可以得到早期诊断, 及时治疗, 极大地提高了生存时间和预后。同时, 肿瘤科医师逐渐

意识到放疗所引起的正常组织损伤, 在增加疗效的基础上, 尽可能减少放疗并发症, 提高肿瘤患者生活质量。心脏位于纵隔, 在接受胸部肿瘤放疗的同时, 会不可避免接受一定剂量的照射, 由此引发的急慢性心包损伤、心肌病、心脏瓣膜功能损伤、心电传导系统损伤和冠状动脉损伤等临床表现, 统称为放射性心脏损伤(radiation-induced heart disease, RIHD)。有研究<sup>[2,3]</sup>报道, 接受胸部放疗的患者罹患冠心病、心力衰竭、瓣膜性心脏病和冠状动脉供血不足的风险显著增加, 重者猝死, 已成为胸部肿瘤患者非肿瘤死亡首要原因。目前在防治 RIHD 方面, 临床医师除了应用

**[收稿日期]** 2019-03-13

**[基金项目]** 原南京军区面上项目(15MS049)

**[作者简介]** 徐兴军(1986-), 男, 本科。

E-mail: 524294280@qq.com

**[通信作者]** 高世乐(1982-), 男, 医学硕士, 从事肿瘤精确放

疗研究。E-mail: gslhf0551@163.com

适形调强放疗、立体定向放射治疗等新技术,尽量减少心脏等正常组织受量外,尚无有效药物治疗<sup>[4,5]</sup>,RIHD一旦发生,无法逆转,因此研究RIHD的发生机制,早期干预,防治并重,具有重要意义。中医认为,放射之光,为“火热邪毒”,可导致灼津阴液、又伤气血、津液涸枯、血气不和,以虚、痰、热、瘀贯穿整个病程,可给予活血通络、益气养阴中药治疗<sup>[6]</sup>。有文献<sup>[7]</sup>报道,蓝莓花色苷是原花青素(oligomeric proanthocyanidins, OPC)和糖以糖苷键结合而成的黄酮多酚类化合物,有促进视红素再生、抗氧化、抗炎、抗肿瘤、延缓衰老和提高免疫力等多种药理作用,且蓝莓花色苷可降低心肌组织白细胞介素-1(IL-1)和转化生长因子- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1)表达,减轻放射性心肌损伤<sup>[8]</sup>,但花色苷极不稳定,且纯度低,目前研究多停留在粗提取物或体外实验,提取高效稳定的花色苷难度较大,因此需要寻找新的药物替代。OPC是一类在植物中广泛存在的多酚类化合物的总称,天然存在于多种植物的根、叶、花和皮壳中,其中以葡萄籽中含量最为丰富,具有舒张血管、抗氧化、抗肿瘤等多种作用<sup>[9]</sup>。OPC是不含糖苷键的花色苷,葡萄籽中的OPC含量、清除自由基能力和稳定性均高于蓝莓花色苷。本文通过建立大鼠RIHD,给予OPC预防性干预,检测治疗后不同组别大鼠心肌组织IL-1、TGF- $\beta$ 1和核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)蛋白表达变化,探讨OPC对RIHD的可能作用及作用机制,现报道如下。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

清洁级SD雄性大鼠60只,5~6周龄,体重(200 $\pm$ 25)g,购自安徽医科大学实验动物中心[SCXK(皖)2015-007],饲养于安徽医科大学药理学实验室[SYXK(皖)2015-036]。室温(20 $\pm$ 2) $^{\circ}$ C,相对湿度50% $\pm$ 10%,适应性饲养1周后实验。

### 1.2 主要药品及试剂

蓝莓花色苷(嘉迪欧公司,批号:GDL20100224A),OPC(上海阿拉丁试剂有限公司,UV>95%,批号:D1225014)。IL-1抗体试剂盒(批号:201701)、TGF- $\beta$ 1抗体试剂盒(批号:201706)和NF- $\kappa$ B抗体试剂盒(批号:201709)均购自美国Sigma公司。

### 1.3 实验仪器

直线加速器(美国瓦里安医疗器械公司,型号VARIN-21EX),电热恒温鼓风干燥箱(上海一恒公司,型号DHG-9070A),低温超速离心机(德国Eppendorf公司,型号Eppendorf 5427 R),垂直电泳槽及电泳仪(美国Bio-Rad公司,型号PowerPac 300),分光光度计(德国Eppendorf公司,型号BioPhotometer),电子显微镜(北京卓越公司,型号H-301),Nikon荧光显微镜(新飞达光学仪器公司,型号Nikon ACT-1中文版),等。

### 1.4 造模方法<sup>[10]</sup>及给药方法

按照随机数字分组法将60只大鼠分为正常对照组、单独照射组、OPC小剂量组(50 mg/kg)、OPC中剂量组(100 mg/kg)、OPC大剂量组(150 mg/kg)、蓝莓组(200 mg/kg),每组10只大鼠。所有大鼠照射前晚禁食禁水8 h,照射前给予10%水合氯醛0.35 mL/100g腹腔注射全麻,取仰卧位,头部及四肢固定在鼠板上,模拟机定位确定大鼠心脏轮廓,靶区面积(2~2.5 cm) $\times$ (2~2.5 cm),单次剂量20 Gy,源皮距100 cm。OPC组每日分别给予50 mg/kg、100 mg/kg、150 mg/kg三种剂量灌胃,蓝莓组每日给予蓝莓花色苷灌胃,剂量为200 mg/kg,正常对照组、单独照射组给予等体积生理盐水灌胃,放疗结束当日开始给药,直至放疗后4周结束。给药结束后,大鼠经麻醉处死,取心脏标本用10%水合氯醛溶液固定备用。

### 1.5 指标检测

1.5.1 大鼠心肌组织HE染色<sup>[11]</sup> 大鼠心肌组织用体积分数10%甲醛溶液固定,依次水洗、脱水、透明、浸蜡、包埋,制成蜡块,4  $\mu$ m切片;依次脱蜡、水化、HE染色、二甲苯封片,光镜下观察心肌及间质形态变化。对心肌组织改变按照Rona标准评分<sup>[12]</sup>: (1)心肌细胞有无肥大、变性、坏死; (2)间质细胞有无充血、水肿、炎症细胞浸润、结缔组织增生; (3)心外膜、心内膜有无充血、水肿、炎症细胞浸润。评分分值按照由轻到重分别为0分、1分、2分、3分和4分,0分为正常。

1.5.2 免疫组织化学法(IHC)<sup>[13]</sup>检测IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B蛋白 采用链霉亲和素生物素过氧化物酶复合物法(SABC法),心脏标本蜡块常规二甲苯脱

蜡、酒精水化、柠檬酸盐缓冲液抗原修复、自然冷却; 37 °C温箱孵育, 5% 山羊血清封闭, 加入 I 抗, 4 °C 过夜; 次日复温, 加入 II 抗, 加 SABC 液, DAB 显色, 苏木精复染, 二甲苯透明, 封片, 烤干。各心肌组织选取 10 个视野( $\times 200$ ), 细胞质、细胞膜、细胞浆出现淡黄色、棕黄色沉淀为阳性表达。

**1.5.3 免疫蛋白印迹(Western blotting)法检测 IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白<sup>[14]</sup>** 取各组大鼠心肌组织目标蛋白, SDS-PAGE 凝胶电泳, 湿转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 用对应第一抗体 4 °C 摇床孵育过夜, 然后用第二抗体室温孵育 1 h。洗膜后用 ECL 显像曝光, 采用磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)进行内参, 应用 Image J 软件分析条带积分吸光度值。

## 1.6 统计学方法

用 SPSS 20.0 统计分析软件进行数据处理, 实验数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组数据间采用单因素方差分析,  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠心肌组织 HE 染色病理表现和评分

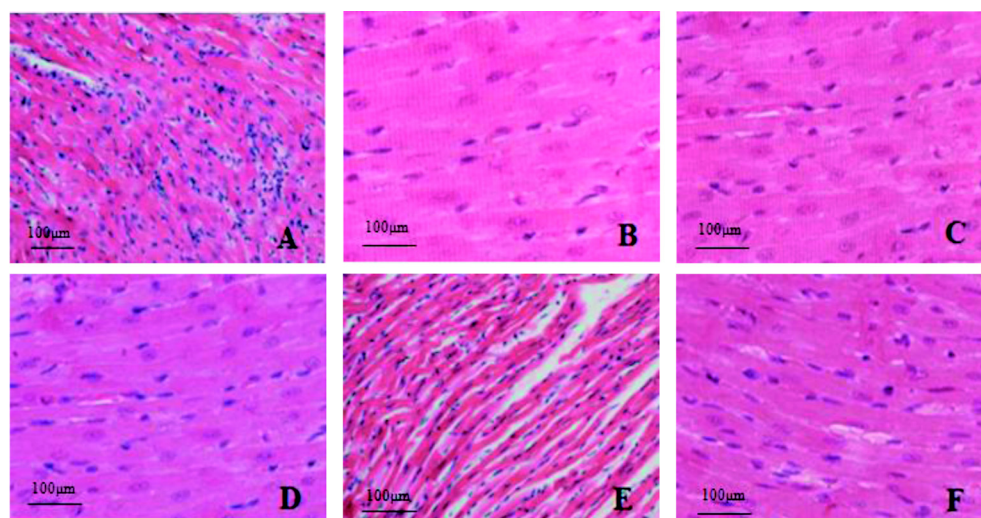
正常对照组大鼠心肌细胞形态正常, 心肌纤维排列整齐, 结构正常, 横纹清晰, 胞质均匀, 未见断裂、变性坏死, 间质未见炎性细胞浸润

(图 1A); 单纯照射组大鼠心肌细胞水肿显著, 出现广泛心肌缺血及心肌纤维坏死, 伴有大量炎性细胞浸润, 横纹消失, 核固缩或溶解(图 1B); OPC 小剂量组大鼠心肌细胞受损可见, 心肌大量小灶性缺血改变及部分心肌小灶性坏死, 边缘中等量炎性细胞浸润(图 1C); OPC 中剂量组心肌细胞受损减轻, 心肌小灶性缺血改变及罕见心肌小灶性坏死, 心肌组织可见少量正常心肌细胞, 边缘少量炎性细胞浸润(图 1D); OPC 大剂量组心肌细胞受损进一步较轻, 心肌组织可见更多正常心肌细胞, 细胞排列较规则, 边缘少量炎性细胞浸润(图 1E); 蓝莓组大鼠心肌细胞受损同 OPC 小剂量组类似, 可见明显小灶性缺血性改变及心肌小灶性坏死, 细胞排列欠规则(图 1F)。

各组大鼠 HE 染色病理评分, 与正常对照组相比, 单纯照射组、OPC 小剂量及中剂量组、蓝莓组病理评分显著升高( $P < 0.01$ ), OPC 大剂量组病理评分升高( $P < 0.05$ ); 与单纯照射组相比, OPC 中剂量及大剂量组病理评分显著升高( $P < 0.01$ ), OPC 小剂量组、蓝莓组病理评分升高( $P < 0.05$ )(表 1)。

### 2.2 大鼠心肌组织 IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白免疫组织化学表达

与正常对照组相比, IL-1 蛋白吸光度值在单纯照射组、OPC 小剂量组、OPC 中剂量组、蓝莓组升高( $P < 0.05$ ); TGF- $\beta$ 1 蛋白吸光度值在 OPC 小剂量组、OPC 中剂量组、OPC 大剂量组、蓝莓组



A: 正常对照组; B: 单纯照射组; C: OPC 小剂量组; D: OPC 中剂量组; E: OPC 大剂量组; F: 蓝莓组

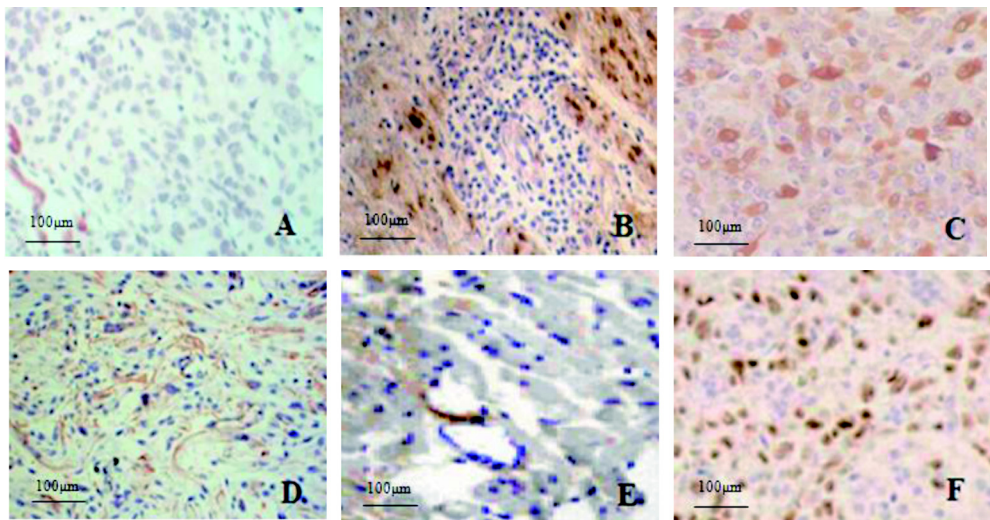
图 1 大鼠心肌组织 HE 染色病理改变 ( $\times 200$ )

表 1 大鼠心肌组织病理评分

| 组 别      | 剂量 /mg · kg <sup>-1</sup> | 病理评分             |
|----------|---------------------------|------------------|
| 正常对照组    | —                         | 0.25 ± 0.04      |
| 单纯照射组    | —                         | 3.26 ± 0.45 ▲▲   |
| OPC 小剂量组 | 50                        | 2.14 ± 0.33 ▲▲△  |
| OPC 中剂量组 | 100                       | 1.52 ± 0.29 ▲▲△△ |
| OPC 大剂量组 | 150                       | 1.06 ± 0.18 ▲△△  |
| 蓝莓组      | 200                       | 2.08 ± 0.32 ▲▲△  |

注: 与正常对照组比较, ▲*P*<0.05, ▲▲*P*<0.01; 与单纯照射组比较, △*P*<0.05, △△*P*<0.01; *n*=10; 下表同

升高(*P*<0.05), 在单纯照射组显著升高(*P*<0.01); NF-κB 蛋白吸光度值在 OPC 中剂量组、OPC 大剂量组、蓝莓组升高(*P*<0.05), 在单纯照射组、OPC 小剂量组显著升高(*P*<0.01)。与单纯照射组比较, IL-1 蛋白吸光度值在 OPC 大剂量组降低(*P*<0.05); TGF-β1 蛋白吸光度值在 OPC 中剂量组、OPC 大剂量组、蓝莓组降低(*P*<0.05); NF-κB 蛋白吸光度值 OPC 中剂量组、OPC 大剂量组降低(*P*<0.05)(图 2 和表 2)。



A: 正常对照组; B: 单纯照射组; C: OPC 小剂量组; D: OPC 中剂量组; E: OPC 大剂量组; F: 蓝莓组

图 2 大鼠心肌组织免疫组织化学染色改变 (× 200)

表 2 大鼠心肌组织 IL-1、TGF-β1、NF-κB 蛋白平均吸光度值

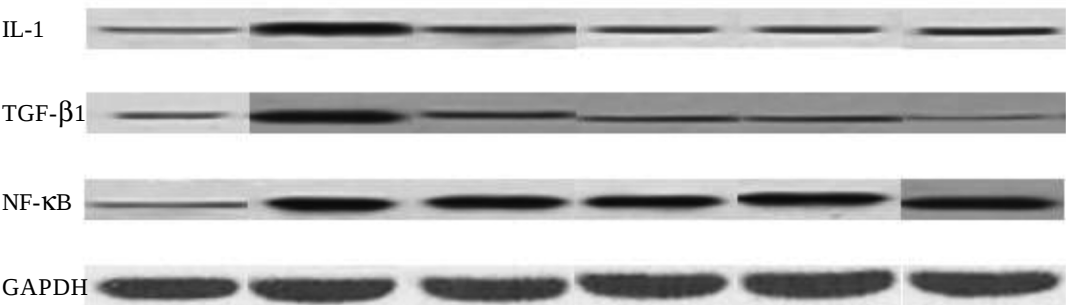
| 组 别      | 剂量 /mg · kg <sup>-1</sup> | IL-1            | TGF-β1           | NF-κB            |
|----------|---------------------------|-----------------|------------------|------------------|
| 正常对照组    | —                         | 0.370 ± 0.043   | 0.263 ± 0.085    | 0.285 ± 0.037    |
| 单纯照射组    | —                         | 0.535 ± 0.169 ▲ | 0.673 ± 0.115 ▲▲ | 0.516 ± 0.086 ▲▲ |
| OPC 小剂量组 | 50                        | 0.490 ± 0.032 ▲ | 0.591 ± 0.063 ▲  | 0.485 ± 0.071 ▲▲ |
| OPC 中剂量组 | 100                       | 0.475 ± 0.108 ▲ | 0.470 ± 0.076 ▲△ | 0.392 ± 0.082 ▲△ |
| OPC 大剂量组 | 150                       | 0.368 ± 0.128 △ | 0.385 ± 0.097 ▲△ | 0.419 ± 0.076 ▲△ |
| 蓝莓组      | 200                       | 0.506 ± 0.086 ▲ | 0.516 ± 0.088 ▲△ | 0.473 ± 0.074 ▲  |

2.3 大鼠心肌组织 IL-1、TGF-β1、NF-κB 蛋白 Western blotting 表达

与正常对照组比较, 单纯照射组、OPC 组(小剂量、中剂量、大剂量)、蓝莓组大鼠心肌组织 IL-1、TGF-β1、NF-κB 蛋白表达升高(*P*<0.05)。与单纯照射组比较, OPC 组(小剂量、中剂量、大剂量)、蓝莓组心肌组织 IL-1、TGF-β1、NF-κB 蛋白表达下降(*P*<0.05)(图 3 和表 3)。

3 讨论

心脏位于纵隔位置, 当胸部恶性肿瘤接受放射治疗时, 会不可避免接受电离辐射, 造成不同程度放射性损伤, 目前认为 RIHD 发生机制: 放射线破坏内皮细胞, 内腔闭塞, 发生微循环障碍、心肌缺血, 最后导致纤维化; 同时引起组织破坏及淋巴循环障碍, 合用细胞毒性药物均可加



A: 正常对照组; B: 单纯照射组; C: OPC 小剂量组; D: OPC 中剂量组; E: OPC 大剂量组; F: 蓝莓组

图 3 大鼠心肌组织 Western blotting 表达变化

| 表 3 大鼠心肌组织 IL-1、TGF-β1、NF-κB 蛋白相对表达量 |                           |                 |                 |                 |
|--------------------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 组 别                                  | 剂量 /mg · kg <sup>-1</sup> | IL-1            | TGF-β1          | NF-κB           |
| 正常对照组                                | —                         | 0.249 ± 0.038   | 0.193 ± 0.026   | 0.223 ± 0.035   |
| 单纯照射组                                | —                         | 0.431 ± 0.042▲  | 0.425 ± 0.018▲  | 0.491 ± 0.035▲  |
| OPC 小剂量组                             | 50                        | 0.342 ± 0.085▲△ | 0.352 ± 0.071▲△ | 0.382 ± 0.065▲△ |
| OPC 中剂量组                             | 100                       | 0.306 ± 0.065▲△ | 0.329 ± 0.061▲△ | 0.350 ± 0.051▲△ |
| OPC 大剂量组                             | 150                       | 0.292 ± 0.064▲△ | 0.315 ± 0.058▲△ | 0.326 ± 0.075▲△ |
| 蓝莓组                                  | 200                       | 0.335 ± 0.076▲△ | 0.341 ± 0.062▲△ | 0.372 ± 0.059▲△ |

重或诱发 RIHD<sup>[15]</sup>。1960 年代, 临床医师已经认识到胸部放疗可以引起 RIHD, 因 RIHD 多处于亚临床状态, 需经过相当长的潜伏期才出现临床症状, 不同部位在不同时间出现病变, 未引起足够临床重视。急性放射性心包炎发生于放疗期间或放疗结束后; 慢性心包炎发生于放疗结束 1 年内; 放射性心肌损伤短时间内可无明显临床症状, 多在随访中发现; 放射性心脏传导系统损伤可发生于放疗早期; 放射性瓣膜损伤发生较晚; 血液学及病理学改变较临床症状发生较早<sup>[16]</sup>, 因此, 早期发现、早期干预显得尤为重要<sup>[17]</sup>。本课题组前期通过实验大鼠模型制备<sup>[10]</sup>得出单次 20 Gy 照射大鼠心脏, 至第 4 周末, RIHD 发生。并在前期工作基础上, 对于雄性 SD 大鼠在放疗开始给予原花青素灌胃, 观察 RIHD 病理改变及相关细胞因子变化, 初步探讨 RIHD 的发生与细胞因子之间的关系。

近年来, 对 RIHD 的研究主要集中在细胞因子方面, 其中 IL-1 在 RIHD 的介导中起到一定作用, 当正常组织受辐射后, 细胞发生破裂, IL-1 等细胞因子被释放入血, 引起正常组织损伤;

TGF-β1 在细胞增殖中有双向调节作用, 在纤维化过程起关键作用, 在发生急性 RIHD 患者明显高于未发生急性 RIHD 患者, 参与心肌纤维化起始阶段, 在细胞损伤和愈合中有非常重要的地位<sup>[18]</sup>, 同时是器官纤维化的治疗靶标。NF-κB 是炎症过程关键调控因子, 已被证实在 RIDH 早期会出现 NF-κB 高表达<sup>[19]</sup>, 那么通过干预 RIHD, 能否下调 IL-1、TGF-β1、NF-κB 等细胞因子, 目前尚未报道。

本文结果表明, 给予雄性 SD 大鼠 20 Gy 单次大剂量照射心脏, 放疗第 4 周末结束时, 大鼠心肌组织 HE 病理染色结果提示正常对照组大鼠心肌细胞未见明显异常, 单纯照射组大鼠心肌细胞出现水肿、心肌缺血、心肌坏死, RIHD 形成, OPC 各剂量组大鼠心肌细胞损伤较正常对照组明显, 较单纯照射组减轻, 且随 OPC 给药剂量增加, 心肌细胞损伤程度减轻; 蓝莓组大鼠心肌损伤改变同 OPC 小剂量组, 心肌细胞 HE 染色病理评分也支持上述改变。

通过免疫组织化学及 Western blotting 两种不同方法分别检测大鼠心肌组织 IL-1、TGF-β1、NF-κB 蛋白表达情况, 结合 HE 染色结果, 提示

当 RIHD 发生时, IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白水平明显升高, 蛋白表达水平与心肌细胞损伤程度呈正比关系, 且免疫组织化学及 Western blotting 两种不同方法检测结果相一致。给予 SD 大鼠 OPC 及蓝莓对应药物干预, 在其作用机制可能与心肌细胞受到放射线损伤时, 心肌细胞水肿、缺血、坏死, 心肌组织 IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白应激性升高, 而 OPC 具有抗氧化和对心肌细胞具有保护作用, 下调 IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白表达, 逆转 RIHD 的发生有关。进一步分析 OPC 及蓝莓组不同剂量及药物之间各细胞因子关系表明, 随着 OPC 剂量增加, IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白水平下降越明显( $P < 0.05$ ), 蓝莓组表达水平同 OPC 小剂量组, 说明 OPC 可防治 RIHD 且疗效优于蓝莓组, 且随剂量增加, 疗效越明显, 再次证实了本课题的研究结果。

综上所述, 当 RIHD 发生时, SD 大鼠心肌组织 IL-1、TGF- $\beta$ 1、NF- $\kappa$ B 蛋白表达水平升高, 可作为 RIHD 发生的判断指标; OPC 可防治 RIHD 的发生, OPC 中剂量及大剂量组疗效优于蓝莓, 为临床防治 RIHD, 提供基础理论支持。

#### 参考文献:

- [1] 徐利明, 陈曦, 苑亚静, 等. 放射性心脏损伤的研究进展[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2017, 26(3):358-363.
- [2] 刘惠惠, 李险峰. 放射性心脏损伤诊断和防治的临床研究进展[J]. 国际放射医学核医学杂志, 2016, 40(5):374-378.
- [3] Chen J, Mehta JL. Angiotensin II-mediated oxidative stress and procollagen-1 expression in cardiac fibroblasts blockade by pravastatin and pioglitazone[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2006, 291(4):H1738-1745.
- [4] 沈伟生, 夏德宏, 高春恒, 等. 参松养心胶囊加红景天干预放射性心脏损伤的临床研究[J]. 南京中医药大学学报, 2016, 32(5):431-433.
- [5] 姚晔, 钟亚华, 谢从华. 放射性心脏损伤心肌纤维化发病机制研究进展[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 201, 26(5):598-602.
- [6] 储水鑫. 肺癌放疗并发症的中药治疗[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2011, 17(6):645-646.
- [7] 罗晓玲, 徐嘉红, 杨武斌, 等. 蓝莓花色苷抗氧化功能及稳定性研究进展[J]. 食品工业科技, 2018, 39(4):312-317.
- [8] 张玉彪, 柳云恩, 佟昌慈, 等. 蓝莓花色苷对放射性心脏损伤的保护机制研究[J]. 临床急诊杂志, 2014, 15(11):647-650.
- [9] 李聪, 周玉涛, 朱雪松, 等. 原花青素的提取分离及药理作用研究进展[J]. 国际中医中药杂志, 2017, 39(3):285-288.
- [10] 马金柯, 高世乐, 胡宗涛, 等. 大鼠放射性心脏损伤机制的比较医学意义[J]. 实验动物与比较医学意义, 2018, 38(3):188-193.
- [11] 刘丽娜, 武亚晶, 高光斌, 等. PDTC 通过抑制 NF- $\kappa$ B 及下游通路减轻大鼠急性 RIHD[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2018, 27(1):101-106.
- [12] 马欣, 王丽, 苟芳芳, 等. 伊马替尼对尿毒症心肌病大鼠纤维化的保护作用[J]. 重庆医学, 2016, 45(3):313-316.
- [13] 高世乐, 胡宗涛, 秦峰, 等. Smads 蛋白家族在大鼠放射性肝纤维化形成过程中的表达[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(3):188-194.
- [14] 李晓燕, 韩霞, 张红明, 等. 耐力运动训练通过 SIRT1 信号通路保护力竭运动大鼠心肌[J]. 中华心血管病杂志, 2017, 45(6):501-506.
- [15] Schwartz RS. Ionizing radiation and the coronary arteries the plot thickening![J]. Catheter Cardiovasc Interv, 2007, 70(3):366-367.
- [16] 刘阳, 高世乐, 胡宗涛, 等. 不同剂量单次照射下大鼠放射性心脏损伤模型的构建与评价[J]. 安徽医科大学学报, 2018, 53(5):716-721.
- [17] 武亚晶, 王军, 王媛, 等. 慢性间歇性低压低氧预处理可减轻大鼠放射性心脏损伤[J]. 中华放射肿瘤学杂志, 2017, 26(2):222-227.
- [18] 王伟, 王军, 程云杰, 等. 血清细胞因子 TGF- $\beta$ 1 和 IL-1 $\beta$  表达水平对急性放射性心脏损伤发生的影响[J]. 中华放射医学与防护杂志, 2012, 32(5):488-491.
- [19] 刘丽娜, 王升, 武亚晶, 等. NF- $\kappa$ B 及下游通路与大鼠急性期放射性心肌纤维化相关性研究[J]. 2017, 26(4):453-458.

## Effects of Proanthocyanin on Expression of IL-1, TGF- $\beta$ 1 and NF-Kappa B Proteins in Rats with Radiation-induced Heart Disease

XU Xing-jun<sup>1</sup>, WU Fei<sup>2</sup>, SONG Jin-yi<sup>3</sup>, GAO Shi-le<sup>1</sup>

(1. The Fourth Tumor Section, 901st Hospital of Chinese People's Liberation Army Joint Logistics Support Force, Hefei 230031, China;

2. Class 2 Clinical Rehabilitation of Southern Anhui Medical College, Wuhu 241002, China;

3. Clinical Class 5 of Anqing Medical College, Anqing 246052, China)

**[Abstract] Objective** To observe the effects of proanthocyanin (OPC) on the expression of interleukin-1(IL-1), transformation growth factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1) and nuclear factor-Kappa B(NF- $\kappa$ B) proteins in rats with radiation-induced heart disease (RIHD). To explore the possible role and mechanism of OPC in rats RIHD. **Methods** Sixty male Sprague-Dawley rats were randomly divided into 6 groups, 10 rats in each group, which were normal control group, the OPC low-dose (50 mg/kg) group, medium-dose (100 mg/kg) group, and large dose were used in the irradiation alone group, (150 mg/kg) group, blueberry (200 mg/kg) group. Except the normal control group, the rats in each group were given a single angi of 6 MV X-rays at a dose of 20 Gy. Rats in the OPC group and the blueberry group were given the corresponding drugs, and the pathological changes of myocardial tissue were observed by hematoxylin-eosin (HE) staining. The myocardial tissue was detected by immunohistochemistry (IHC) and westernblotting (WB). Interleukin-1(IL-1), transformation growth factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1), nuclear factor-Kappa B(NF- $\kappa$ B) protein expression. **Results** The immunohistochemical results of myocardial tissue in rats showed that the absorbance values of IL-1, TGF- $\beta$ 1 and NF- $\kappa$ B protein were higher than those of the normal control group ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ). Compared with the simple irradiation group, IL-1, TGF- $\beta$ 1, NF- $\kappa$ B protein absorbance decreased ( $P<0.05$ ). The expression of IL-1, TGF- $\beta$ 1 and NF- $\kappa$ B protein was increased in the myocardial tissue of rats compared with the normal control group ( $P<0.05$ ). Compared with the simple irradiation group, IL-1 and TGF- $\beta$ 1 were compared. NF- $\kappa$ B protein expression decreased ( $P<0.05$ ). **Conclusson** OPC can reduce the expression of IL-1, TGF- $\beta$ 1, NF- $\kappa$ B protein in myocardial tissue of RIHD rats, and prevent RIHD caused by radiotherapy, and the curative effect is better than blueberry. **[Key words]** Oligomeric proantho cyanidins (OPC); Blueberries; Radiation-induced heart disease (RIHD); Rat; Interleukin-1(IL-1); Transformation growth factor- $\beta$ 1(TGF- $\beta$ 1); Nuclear factor-Kappa B (NF- $\kappa$ B)

# 天竺葵对脓毒症小鼠肾功能保护作用观察

陈美玲<sup>1</sup>, 陈 烨<sup>1</sup>, 程玉梅<sup>2</sup>, 朱春玲<sup>1</sup>

(贵州医科大学附属医院 1. 肾内科, 2. 重症医学科, 贵阳 550004)

**[摘要]** 目的 探讨天竺葵在脓毒症小鼠模型中对于肾脏功能的保护作用, 并阐明其潜在机制。方法 盲肠结扎穿孔(CLP)手术制作小鼠脓毒症模型, 通过评估脓毒症小鼠模型中肾损伤、组织炎症和氧化应激指标, 判断天竺葵对于脓毒症小鼠肾功能的保护作用。结果 与模型组比较, 天竺葵治疗后脓毒症小鼠血尿素氮(BUN)、血肌酐、尿蛋白、乳酸脱氢酶(LDH)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)、视黄醇结合蛋白(RBP)及N-乙酰-β-D-葡萄糖苷酶(NAG)水平显著降低。天竺葵还降低了白细胞介素-6(IL-6)和肿瘤坏死因子(TNF-α)在小鼠血浆的水平, 降低了CLP诱导的脓毒症引起的致死率, 提高了血清脂质过氧化酶水平, 并通过恢复超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)和过氧化氢酶活性(CAT)水平显著增强了抗氧化防御系统能力, 使肾功能在脓毒症发作期间得以保护。结论 天竺葵可以有效保护脓毒症小鼠的肾功能。

**[关键词]** 天竺葵; 脓毒症; 盲肠结扎穿孔(CLP); 肾功能保护

**[中图分类号]** R365 Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0390-04

脓毒症是因严重感染而导致的全身炎症性反应类疾病, 即使在重症监护情况下其发病后的致死率仍然较高<sup>[1]</sup>。在被感染时细胞因子激活是宿主防御系统的一个重要环节。但是大量的细胞因子激活可能导致全身广泛损伤和多器官功能衰竭<sup>[2]</sup>。脓毒症可上调一氧化氮(nitric oxide, NO)和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生, 从而导致细胞毒性<sup>[3,4]</sup>。ROS的过量产生可引起因内源性抗氧化防御系统降低和脂质过氧化减少而导致的氧化应激反应。因此认为具有抑制ROS和炎症细胞因子产生的药物可以治疗严重的脓毒症或脓毒症性休克<sup>[5,6]</sup>。

天竺葵是可在部分蔬菜和水果中提取出的化合物, 主要化学成分为天竺葵素、天竺葵醇及精油等, 具有抗氧化、抗糖尿病和细胞保护作用<sup>[7]</sup>。已有关于天竺葵抗炎反应、抗癌症和预防糖尿

病的研究报道<sup>[8]</sup>, 但是天竺葵对脓毒症患者的肾功能保护作用尚无明确定论。因此本实验研究了天竺葵对脓毒症模型小鼠的肾保护作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF级雄性C57BL/6小鼠30只, (6.2 ± 1.4)周龄, 体质量(21.4 ± 4.1) g, 购自贵州医科大学[SCXK(黔)2018-0001], 饲养于贵州医科大学附属医院实验动物中心[SYXK(黔)2014-002]。

### 1.2 主要仪器设备和试剂

天竺葵提取物, 购自美国Sigma公司; 舒泰购自法国维克制药股份有限公司; 原发性人脐静脉内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)培养基购于美国生物科学公司; 白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor-α, TNF-α)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、总谷胱甘肽(glutathione, GSH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)和过氧

**[收稿日期]** 2019-03-13

**[作者简介]** 陈美玲(1986-), 主治医师, 研究方向: 临床医学。

E-mail: chenmlq@126.com

**[通信作者]** 陈 烨(1981-), 主治医师, 研究方向: 临床医学

化氢酶活性(catalase, CAT)试剂盒均购自南京建成生物有限公司;酶标仪购自美国BioTek公司;离心机购自上海安亭科学仪器厂;电泳仪购自美国Bio-rad公司。

### 1.3 小鼠脓毒症模型制作及实验处理

将30只小鼠随机分为3组,分别为对照组、模型组和天竺葵组,每组10只。对照组小鼠正常饲养,不做任何处理;模型组和天竺葵组小鼠制作脓毒症模型,造模成功后,天竺葵组分别于造模后12 h、60 h注射天竺葵提取物(0.4 mg/kg),共注射2次。在天竺葵第2次注射后48 h分别收集3组小鼠血液和器官样品用于功能测定。

造模方法:采用盲肠结扎后穿孔(cecal ligation plus puncture, CLP)手术制作脓毒症模型,即将小鼠行腹腔注射麻醉(舒泰30 mg/kg),在其腹壁正中切口,轻轻拉出盲肠,用无菌4号丝线在盲瓣于盲肠中点进行结扎,并用无菌针头在结扎部位于盲肠顶端的中点处贯穿刺盲肠壁,造成穿孔,轻轻挤压盲肠,挤出少许内容物确保穿孔通畅,然后把盲肠推回腹腔,逐层缝合。

### 1.4 肾损伤标志物检测

第2次注射天竺葵后48 h,提取小鼠血液、尿液及肾组织样本取样。分别检测3组小鼠的血尿素氮(blood urea nitrogen, BUN)、血肌酐、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(neutrophil gelatinase-associated lipocalin, NGAL)、视黄醇结合蛋白(retinol-binding protein, RBP)、N-乙酰- $\beta$ -D-葡萄糖苷酶(N-acetyl- $\beta$ -D-glucosidase, NAG)<sup>[9]</sup>及24 h蛋白尿水平(小鼠尿液收集方法,小鼠置于代谢笼中,禁食不禁水24 h收集尿液)。

### 1.5 组织炎症标志物检测

分别检测3组小鼠血浆中NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6及髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)水平。其中NO检测采用亚硝酸盐/硝酸盐测定,使用Griess

试剂和钒溶液测定血浆中亚硝酸盐和硝酸盐的水平。将每个样品(100  $\mu$ L)与钒溶液(100  $\mu$ L)混合并与Griess试剂一起孵育。半小时后,测量吸光度( $A_{540\text{ nm}}$ )值。使用亚硝酸钠标准品制备标准曲线以测量最终浓度。TNF- $\alpha$ 、IL-6及MPO均采用酶联免疫吸附法测定,严格按照试剂盒说明书操作。

### 1.6 氧化应激标志物检测

分别检测3组小鼠脂质内MDA、GSH、SOD、GSH-Px和CAT水平<sup>[9,10]</sup>。

### 1.7 统计学方法

应用SPSS20.0软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较的统计分析采用重复因素方差分析检验,方差不齐采用Dunnett's检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 三组小鼠肾脏损伤标志物水平比较

与对照组比较,模型组BUN、血肌酐、尿蛋白、LDH、NGAL、RBP及NAG水平均显著升高( $P < 0.05$ );天竺葵组BUN、血肌酐、NGAL、RBP及NAG水平显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,天竺葵组BUN、血肌酐、尿蛋白、LDH、NGAL、RBP及NAG水平显著降低( $P < 0.05$ )(表1)。

### 2.2 三组小鼠肾组织炎症标志物水平比较

与对照组比较,模型组及天竺葵组NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6及MPO水平均显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,天竺葵组NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6及MPO水平均显著降低( $P < 0.05$ )(表2)。

### 2.3 三组小鼠氧化应激标志物比较

与对照组比较,模型组MDA水平显著升高,GSH、SOD、GSH-Px及CAT水平均显著降低( $P < 0.05$ );天竺葵组MDA水平显著升高( $P < 0.05$ )。与模型组比较,天竺葵组MDA水平显著降低,GSH、SOD、GSH-Px及CAT水平均显著升高( $P < 0.05$ )(表3)。

表1 三组小鼠肾脏损伤标志物水平比较

| 组别   | <i>n</i> | BUN<br>/mmol · L <sup>-1</sup> | 血肌酐<br>/ $\mu$ mol · L <sup>-1</sup> | 尿蛋白<br>/mg · 24 h <sup>-1</sup> | LDH<br>/U · L <sup>-1</sup> | NGAL<br>/ $\mu$ g · L <sup>-1</sup> | RBP<br>/mg · L <sup>-1</sup> | NAG<br>/U · L <sup>-1</sup> |
|------|----------|--------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| 对照组  | 10       | 5.64 ± 1.34                    | 11.49 ± 2.32                         | 2.1 ± 0.17                      | 269 ± 22.76                 | 0.57 ± 0.05                         | 35.58 ± 7.06                 | 5.94 ± 1.02                 |
| 模型组  | 10       | 27.21 ± 5.92 <sup>a</sup>      | 40.66 ± 7.04 <sup>a</sup>            | 13.6 ± 1.15 <sup>a</sup>        | 327 ± 74.22 <sup>a</sup>    | 1.87 ± 0.52 <sup>a</sup>            | 82.18 ± 15.64 <sup>a</sup>   | 66.28 ± 13.25 <sup>a</sup>  |
| 天竺葵组 | 10       | 11.61 ± 3.13 <sup>ab</sup>     | 18.56 ± 4.02 <sup>ab</sup>           | 3.2 ± 0.31 <sup>b</sup>         | 245 ± 55.33 <sup>b</sup>    | 1.14 ± 0.36 <sup>ab</sup>           | 51.33 ± 9.37 <sup>ab</sup>   | 30.33 ± 9.26 <sup>ab</sup>  |

注:与对照组比较,<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;下表同

表 2 三组小鼠肾组织炎症标志物水平比较

| 组别   | n  | NO/ $\mu\text{mol}$             | TNF- $\alpha$ /ng $\cdot$ L $^{-1}$ | IL-6/ng $\cdot$ L $^{-1}$      | MPO/U $\cdot$ g $^{-1}$       |
|------|----|---------------------------------|-------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| 对照组  | 10 | 31.23 $\pm$ 2.10                | 118.52 $\pm$ 9.25                   | 0.72 $\pm$ 0.05                | 0.45 $\pm$ 0.05               |
| 模型组  | 10 | 235.37 $\pm$ 17.95 <sup>a</sup> | 559.68 $\pm$ 35.21 <sup>a</sup>     | 80.29 $\pm$ 4.95 <sup>a</sup>  | 3.52 $\pm$ 0.42 <sup>a</sup>  |
| 天竺葵组 | 10 | 98.36 $\pm$ 9.12 <sup>ab</sup>  | 205.36 $\pm$ 15.94 <sup>ab</sup>    | 20.65 $\pm$ 2.39 <sup>ab</sup> | 1.38 $\pm$ 0.13 <sup>ab</sup> |

表 3 三组小鼠氧化应激标志物比较

| 组别   | n  | MDA/nmol $\cdot$ mg $^{-1}$      | GSH/nmol $\cdot$ mg $^{-1}$   | SOD/U $\cdot$ mg $^{-1}$     | GSH-Px/U $\cdot$ mg $^{-1}$  | CAT/U $\cdot$ mg $^{-1}$     |
|------|----|----------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
| 对照组  | 10 | 190.27 $\pm$ 16.59               | 28.05 $\pm$ 2.62              | 1.03 $\pm$ 0.05              | 2.42 $\pm$ 0.17              | 4.37 $\pm$ 0.31              |
| 模型组  | 10 | 311.68 $\pm$ 21.29 <sup>a</sup>  | 17.25 $\pm$ 1.71 <sup>a</sup> | 0.69 $\pm$ 0.07 <sup>a</sup> | 1.42 $\pm$ 0.15 <sup>a</sup> | 2.87 $\pm$ 0.25 <sup>a</sup> |
| 天竺葵组 | 10 | 215.11 $\pm$ 19.17 <sup>ab</sup> | 25.35 $\pm$ 2.39 <sup>b</sup> | 0.97 $\pm$ 0.07 <sup>b</sup> | 2.03 $\pm$ 0.16 <sup>b</sup> | 4.02 $\pm$ 0.31 <sup>b</sup> |

### 3 讨论

对人类脓毒症的研究因复杂的病理生理学过程、人群的多样性、诊断标记物的不充足以及伦理限制等多重复杂原因而受到限制<sup>[11,12]</sup>。CLP 模型被认为是多菌脓毒症的金标准模型,可以模拟人类脓毒症<sup>[13]</sup>。

BUN、血肌酐、尿蛋白及 LDH 是肾损伤检测的基础指标。NGAL 是急性肾损伤的早期诊断标志物,可用于预测慢性肾脏疾病的进展;RBP 能早期发现肾小管的功能损害,并能灵敏反映肾近曲小管的损害程度,可作为肾功能早期损害和监护治疗的指标,还可作为肝功能早期损害和监护治疗的指标。NGAL 是一种细胞内溶酶体酶,以肾近曲小管含量最高,尿、血清和唾液中 NAG 活性变化与肾脏状态密切相关。检测三组小鼠肾损伤上述标志物,结果表明,天竺葵注射治疗能够显著降低造模后小鼠 BUN、血肌酐、尿蛋白、LDH、NGAL、RBP 及 NAG 水平。说明天竺葵能够对脓毒症肾损伤起到保护作用。党璇等<sup>[14]</sup>对天竺葵的药理活性研究表明,其具有肾保护作用。

对三组小鼠肾组织炎症标志物及氧化应激标志物检测表明,天竺葵注射治疗能够显著降低造模后小鼠炎症标志物 NO、TNF- $\alpha$ 、IL-6 及 MPO 水平;提高氧化应激标志物 GSH、SOD、GSH-Px 及 CAT 水平,降低氧化应激标志物 MDA 水平。基因编码三种抗氧化酶(SOD, CAT 和 GSH-Px, 被认为是主要的氧化防御基因<sup>[15]</sup>)。小鼠 CLP 手术后降低了肾脏 SOD, CAT 和 GSH-Px 的表达,但是它们通过天竺葵的注射处理后表达水平较未处

理组显著增加,表明天竺葵具有针对 CLP 术后诱导的肾组织氧化损伤的细胞保护活性。CLP 还增加肾脏 MDA 浓度,肾脏 MDA 是作为主要的脂质过氧化产物和氧化应激标记物<sup>[16]</sup>。因此,天竺葵可以通过抑制脂质中的过氧化反应和活化抗氧化酶来保护免受脓毒症诱导的氧化应激和损伤。

综上所述,天竺葵或可用于脓毒症引发的肾性疾病的治疗。

### 参考文献:

- [1] 钱幸尔, 郑旻, 戴晓薇, 等. 脓毒症患者并发医院感染和死亡的危险因素分析[J]. 中华全科医学, 2018(2):232-235.
- [2] Chaudhry H, Zhou J, Zhong Y, et al. Role of cytokines as a double-edged sword in sepsis [J]. *Vivo*, 2013, 27(6):669.
- [3] Parratt JR. Nitric oxide in sepsis and endotoxaemia[J]. *J Antimicrob Chemother*, 1998, 41(Suppl A (1)):31.
- [4] Symeonides S, Balk RA. Nitric oxide in the pathogenesis of sepsis[J]. *Infect Dis Clin North Am*, 1999, 13(2):449-463.
- [5] Vincent J, Zhang H, Szabo C, et al. Effects of nitric oxide in septic shock[J]. *Am J Resp Crit Care Med*, 2000, 161(6):1781-1785.
- [6] Cadenas S, Cadenas AM. Fighting the stranger-antioxidant protection against endotoxin toxicity [J]. *Toxicology*, 2002, 180(1):45-63.
- [7] 许申鸿. 天竺葵抗氧化作用的研究[J]. 中国药学杂志, 2000, 35(4):234-236.
- [8] 孙伟, 瞿伟菁. 香叶天竺葵的药理研究进展[J]. 中药材, 2002, 25(8):600-602.
- [9] Lee W, Lee Y, Jeong GS, et al. Cudraticusxanthone A attenuates renal injury in septic mice [J]. *Food Chem Toxicol*, 2017, 106(Pt A):404.

- [10] Beutler E, Duron O, Kelly BM. Improved method for the determination of blood glutathione [J]. J Lab Clin Med, 1963, 61(3):882-888.
- [11] 师灵灵, 韩艳秋, 任慧娟. 脓毒症的病理生理机制研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(8):1914-1916.
- [12] 刘瑶, 黄勋. 脓毒症相关生物标记物的研究进展[J]. 中华医院感染学杂志, 2016, 26(18):4318-4320.
- [13] Nemzek J A, Hugunin KM, Opp MR. Modeling sepsis in the laboratory: merging sound science with animal well-being[J]. Comp Med, 2008, 58(2):120-128.
- [14] 党璇, 张晓珍, 姚默, 等. 香叶天竺葵药物研究概况[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(31):19095-19096.
- [15] Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, et al. Oxidative stress and antioxidant defense[J]. World Allergy Organ J, 2012, 5(1):9-19.
- [16] 陈孜, 胡剑卓, 邱细敏, 等. 人工虫草多糖对免疫抑制小鼠免疫调节作用的研究[J]. 湖南中医杂志, 2017, 33(12):134-136.

## Observation of Protective Effect of Geranium on Renal Function in Sepsis Mice

CHEN Mei-ling<sup>1</sup>, CHEN Ye<sup>1</sup>, CHENG Yu-mei<sup>2</sup>, ZHU Chun-ling<sup>1</sup>

(1. Department of Nephrology, 2. ICU, The Affiliated Hospital of  
Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the protective effect of geranium on renal function in a mouse model of sepsis and to elucidate its underlying mechanism. **Methods** The sepsis of mice model were established by cecal ligation and puncture (CLP), the protective effects of geranium on renal function of the model mice were evaluated by determination of indexes of the renal impairment, tissue inflammatory and oxidative stress. **Results** Compared with the model group, the levels of blood urea nitrogen (BUN), serum creatinine, urinary protein, lactate dehydrogenase (LDH), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL), retinol-binding protein (RBP) and N-acetyl- $\beta$ -D-glucosidase (NAG) in septic mice were significantly lower than those in the model group. Treatment with geranium also reduced interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) levels in mouse plasma, reduced lethal rate caused by toxicosis, increased serum lipid peroxidase levels and significantly enhanced the ability of the antioxidant defense system by restoring superoxide dismutase. The levels of glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase significantly enhanced the ability of antioxidant defense system and protected renal function during sepsis. **Conclusion** The application of geranium in sepsis mouse model can effectively protect the renal function of septic mice and provide an effective theoretical basis for the protection of renal function during sepsis.

**[Key words]** Geranium; Sepsis; Cecal ligation and puncture (CLP); Renal protection

# 不同年龄 SD 大鼠脾脏组织显微结构观察

黄 静<sup>1</sup>, 郭 洋<sup>2</sup>, 项 涛<sup>1</sup>, 吴大鹏<sup>1</sup>, 陈 丹<sup>1</sup>, 杨正伟<sup>2</sup>, 李阳友<sup>3</sup>

(川北医学院 1. 实验动物中心; 2. 形态定量研究室; 3. 动物发育研究室; 南充 637000)

**[摘要]** 目的 观察不同年龄 SD 大鼠脾脏组织显微结构特点。方法 从同群正常雄性 SD 大鼠在不同生长阶段(1 日龄、1 月龄、2 月龄、3 月龄、6 月龄、12 月龄、24 月龄和 36 月龄)随机抽选 7 只。取完整的脾脏, 切取组织块制作甲基丙烯酸树脂包埋切片, 经过碘酸-席夫试剂和苏木精染色后光学显微镜下观察脾脏组织显微结构。结果 1 日龄没有明显结构, 脾脏由密集细胞构成, 有脾索和动脉周围淋巴鞘; 1 月龄血窦普遍存在, 但与脾索界限不明显, 边缘区清楚, 巨核细胞数量多; 2 月龄出现脾小结, 主要结构发育完全, 被膜增厚; 3 月龄至 12 月龄, 红白髓结构比例相对稳定; 24 月龄至 36 月龄, 各种结构之间的界限模糊。结论 大鼠脾脏结构发育是一个不断建立、完善和消退的过程, 在 2 月龄前迅速发育完全。

**[关键词]** 大鼠; 脾脏; 组织学; 显微观察

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0394-04

脾脏具有造血、滤血、储血及免疫等重要功能。结构是功能的基础, 脾脏自身的结构, 随着年龄阶段的不同, 存在很大差异, 早期的大鼠脾脏结构不完整, 至 3 月龄时各种结构才具有典型组织学形态<sup>[1]</sup>。但是很少有老龄大鼠脾脏的组织结构特点报道。本文拟研究正常大鼠脾脏 3 年内的组织结构显微特点变化情况, 观察脾内各种结构的显微变化, 为未来相关研究提供方法和数据参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与脾脏取样

SPF 级新生雄性 SD 大鼠 228 只购自川北医学院实验动物中心(SCXK(川)2013-18)。分别在不同发育生长阶段(1 日龄、1 月龄、3 月龄、6 月龄、

12 月龄、24 月龄和 36 月龄)随机取 7 只, 称量大鼠体质量, 腹腔注射 3% 戊巴比妥(50 mg/kg)麻醉, 取下完整脾脏, 用电子天平(日本 A & D Company, HR-120 型, 精度 0.1 mg)称量脾脏的重量, 并用已知密度的不同浓度蔗糖或乙醇溶液测量脾脏的密度, 该动物脾脏的总体积可由所得脾脏的重量除以密度得到<sup>[2,3]</sup>。脾脏放入配置好的 Bouin 液内浸润固定 2 d 后, 放入体积分数 70% 乙醇溶液固定保存(4 °C 冰箱)备用。

### 1.2 切片制备

脾脏组织块经 Bouin 液固定, 乙醇和正丁醇脱水后, 包埋于甲基丙烯酸树脂中, 从包埋块中切取出 1 张 20 μm 厚的切片(半自动切片机-德国 Leica Biosystems GmbH 的 RM2235 型和钨钢刀), 最后用过碘酸-席夫试剂(PAS)和苏木精进行染色。采用日本 Olympus 的 BX53 型生物显微镜观察。

### 1.3 统计检验

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS13.0 统计软件, 组间比较采用单因素重复检测的方差分析, 并结合 Student-Newman-Keuls 法进行两两比较,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**[收稿日期]** 2019-02-27

**[基金项目]** 川北医学院科研发展计划项目

(CBY13-A-ZP09、CBY13-A-ZP05)

**[作者简介]** 黄 静(1987-), 女, 硕士, 动物发育研究方向。

E-mail: 406727448@qq.com

**[通信作者]** 李阳友(1977-), 男, 硕士, 副教授, 动物发育研究方向。E-mail: 112507879@qq.com

2 结果

2.1 大鼠体质量与脾脏的重量

本实验中大鼠1日龄到36月龄，整个饲养过程未出现异常情况，24月龄前出现零星死亡，原因不明；24至36月龄，年老大鼠出现不愿意走动，反应迟钝，个别年老鼠出现腹腔肿瘤，腹水，最后死亡。

随着年龄的增加，SD大鼠体质量不断增加，3月龄内增长迅速，是初生重的39倍，直到24月龄以后，才开始减轻。脾脏的重量在出生后2个月内不断增加，并基本发育完全，3月龄至12月龄基本稳定(表1)。

| 表1 不同月龄SD大鼠体质量以及脾脏重量 |   |               |             |
|----------------------|---|---------------|-------------|
| 年龄                   | n | 体质量/g         | 脾脏重量/mg     |
| 1日龄                  | 7 | 7.7 ± 1.1     | 32 ± 12     |
| 1月龄                  | 7 | 72.1 ± 7.0*   | 254 ± 53    |
| 2月龄                  | 7 | 191.5 ± 43.2* | 862 ± 3*    |
| 3月龄                  | 7 | 309.1 ± 73.4* | 841 ± 377   |
| 6月龄                  | 7 | 418.0 ± 84.0* | 840 ± 128   |
| 12月龄                 | 7 | 543.0 ± 47.2* | 980 ± 329   |
| 24月龄                 | 7 | 685.2 ± 37.3* | 1243 ± 298* |
| 36月龄                 | 7 | 610.0 ± 79.8* | 1125 ± 301  |

注: 与前一年龄段比较, \*P<0.05

2.2 脾脏组织学观察

1日龄大鼠脾脏组织可见动脉周围淋巴鞘和脾索结构，但主要由密集的细胞组成，细胞种类难以辨认，其中存在少量巨核细胞，没有明显的血管结构(图1A)。1月龄大鼠脾脏的结构较1日龄变化大，红髓结构发育完整，脾索清楚，大部分切片的脾血窦里已开始出现红细胞，被膜薄，脾小梁发达(图1B)。2月龄时，白髓出现脾小结，脾脏结构发育完成，红髓区域大于白髓区域，血窦出现大量红细胞，被膜增厚，有明显的血管结构(图1C)。3月龄时，红白髓结构明显，分界清楚，白髓区域增大，小结广泛存在，被膜较2月龄变薄(图1D)；6月龄至1年龄大鼠，脾脏组织红白髓结构分明，各自所在区域大致相同(图1E和图1F)；24月龄至36月龄，大鼠处于老龄阶段，脾脏组织红白髓界限模糊，结构不清

楚(图1G和图1H)。

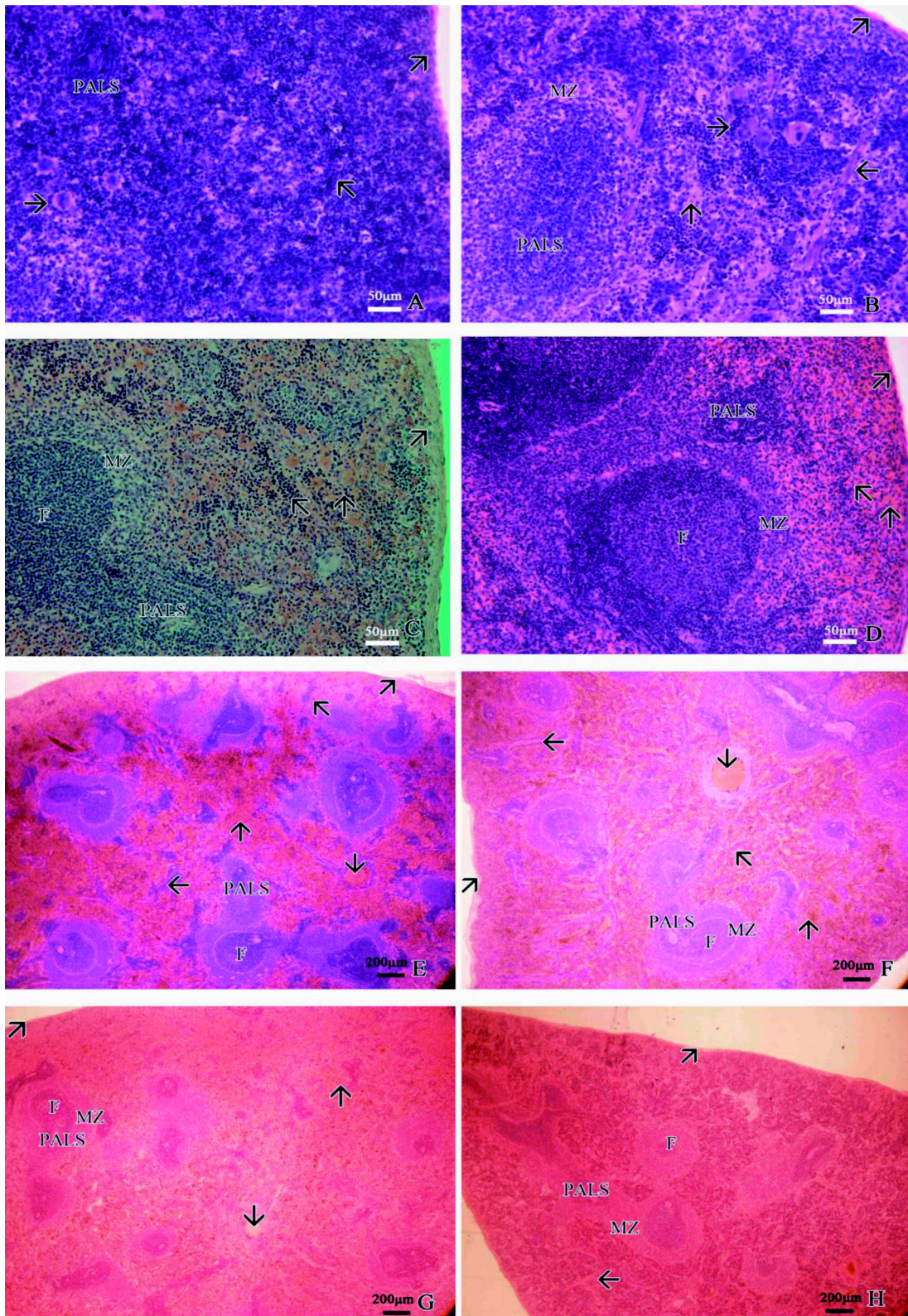
3 讨论

本文研究表明，SD大鼠从出生至24月龄，体质量呈现线性正相关增长，而从24月龄以后，体质量有所减轻，符合动物生长规律。

1日龄SD大鼠脾脏，有了动脉周围淋巴鞘结构<sup>[4]</sup>，该结构在大鼠妊娠19 d开始形成，20 d由高度发达的网状细胞，相互交结而形成三维的网状结构，为形成初期的脾索奠定了基础<sup>[5]</sup>。1月龄大鼠脾脏，红髓中的血窦富含大量血细胞，此时的造血功能旺盛，于3月龄后，造血功能才逐渐消失<sup>[6]</sup>；此时，边缘区结构明显，是白髓向红髓移走的区域，是最先接受抗原刺激的地方，充分发挥T、B淋巴细胞和巨噬细胞的功能，免疫功能发挥作用。

2月龄大鼠脾脏已形成所有结构，但是各结构界限不容易辨别。本实验方法采用甲基丙烯酸树脂包埋切片，由于切片厚度较厚，可能对结构观察有所影响<sup>[2]</sup>。血窦充满大量血液，白髓中形成小结，小结的B细胞增殖产生大量的效应B细胞，从而分化为浆细胞，产生抗体，免疫功能增强。并且被膜显著增厚，被膜延伸形成的小梁，通过收缩，将大量的血细胞释放到需要的特定位置<sup>[1]</sup>，这体现了脾脏储藏血液和作为血液通路上的作用。此时，脾脏的组织结构完全形成，功能完全建立<sup>[9-10]</sup>。

脾脏结构，不仅存在种间差异，而且同种动物在不同发育状态和不同生理状态，其结构也存在差异<sup>[4]</sup>。SD大鼠生长至3月龄，白髓区域增大，生发中心明显，免疫功能大大增强；6月龄至12月龄，红、白髓结构区域大致相同，此时在储藏血液和免疫功能上发挥重要作用；24月龄至36月龄，红髓和白髓结构变得模糊。大于22月龄大鼠脾内的生发中心数及其内的细胞数减少60%~95%<sup>[5]</sup>，24月龄以后，免疫功能急剧下降。本实验表明，脾脏的动脉周围淋巴鞘、脾小结、生发中心、边缘区及血窦等结构的发生、发展和消退的变化，反应在不同日龄阶段、脾脏功能结构的变化。



A: 1日龄, B: 1月龄, C: 2月龄, D: 3月龄, E: 6月龄, F: 12月龄, G: 24月龄, H: 36月龄; PALS: 动脉周围淋巴鞘; MZ: 边缘区; F: 脾小结; V: 血管腔; \: 脾索; ↑: 脾血窦; →: 巨核细胞; ←: 结缔组织小梁; /: 被膜

图 1 大鼠脾脏组织学观察

## 参考文献:

- [1] 李阳友, 黄静, 郭洋, 等. 大鼠脾脏主要结构的发育-从出生至12月龄的形态学定量[J]. 解剖学报, 2017, 18(3): 348-352.
- [2] 杨正伟. 体视学研究的辅助工具: 现状与展望[J]. 中国体视学与图像分析, 2013, 18(3):249-254.
- [3] 杨正伟. 生物组织形态定量研究基本工具: 实用体视学方法[M]. 北京: 科学出版社, 2012.
- [4] Cesta MF. Normal structure, function, and histology of the spleen[J]. Toxicol Pathol, 2006, 34(5):455-465.
- [5] Elmore SA. Enhanced histopathology of the spleen[J]. Toxicol Pathol, 2006, 34(5):648-655.
- [6] 葛百明, 郭仁强. 现代组织学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003:635-665.
- [7] 周成玥, 冯利杰, 沈玉君, 等. 大鼠出生后不同时期脾脏结构发育和浆细胞分化[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(7):796-799.
- [8] 康新华. 初生牦牛和成年牦牛脾脏结构比较观察[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [9] Parker GA, Picut CA, Swanson C, et al. Histologic features of postnatal development of immune system organs in the Sprague-Dawley rat[J]. Toxicol Pathol, 2015, 43(6):794-815.
- [10] Kleijmeer MJ, Ossevoort MA, Veen CJHV, et al. MHC class II compartments and the kinetics of antigen presentation in activated mouse spleen dendritic cells[J]. J Immunol, 1995, 154(11):5715-5724.

## Observation on Microstructure of Spleen in Rats at Different Ages

HUANG Jing<sup>1</sup>, GUO yang<sup>2</sup>, XIANG tao<sup>1</sup>, WU Da-peng<sup>1</sup>,

CHEN dan<sup>1</sup>, YANG Zheng-wei<sup>2</sup>, LI Yang-you<sup>3</sup>

(1. Laboratory Animal Center, 2. Morphometric Research Laboratory,

3. Research Unit of Animals Development, North Sichuan

Medical College, Nanchong 637000, China)

**[Abstract] Objective** To observe the microstructure characteristics of spleen at different ages of SD rats. **Methods** Seven rats were randomly sampled from a same cohort of normal male SD rats at different growing stages (1 day and 1, 2, 3, 6, 12, 24 and 36 months of age). The tissue blocks from whole spleens were taken to make the methyl acrylic resin embedded sections. After the sections were stained with periodic acid-Schiff's reagent and hematoxylin, the microstructure characteristics were observed. **Result** There was no obvious structure at 1 day, the spleen was composed of dense cells, including the splenic cord and the periarteriolar lymphoid sheath. At 1 month of age, the splenic sinus was formed generally and the boundary was not obvious with splenic cord, and the marginal zone was clearly and megakaryocytes were plenty. For the 2 months, the splenic follicle was formed, all key structures had been formed and the capsule was thickening. For the rats of 3 to 12 months, the percentages of the white pulp and the red pulp in the spleen became stable. For the rats of 24 to 36 months, all structure's boundary were blurred. **Conclusion** The development of structure in rat spleens is characterized of a continuous, establishing, improving and regressing process. The rat spleen grows fully before second month.

**[Key words]** Rat; Spleen; Histology; Microscopic observation

# 洗洁精对鸡胚绒毛尿囊膜血管的刺激评价

陈梓灵, 徐颖愉, 刘香梅, 刘冬虹, 庞增雄

(广州质量监督检测研究院, 广州 511447)

**[摘要]** 目的 探讨鸡胚尿囊膜试验(Het-Cam)在洗洁精刺激性评价中应用的可行性。方法 将5款洗洁精样品配制成1.5%的水溶液, 取100  $\mu$ L滴加在SPF级鸡胚尿囊膜上, 参照出入境检验检疫行业标准SN/T 2329-2009《化妆品眼刺激性/腐蚀性的鸡胚尿囊膜试验》的标准刺激评分(IS)法, 对样品的刺激性进行评分。结果 样品C和B刺激性评分较高, 分别为10.07和8.84, 而样品A和D刺激性评分较低, 分别为5.69, 6.75。上述4个样品相应的总活性物含量也分别为28.21%、15.34%和16.37%、17.14%。结论 洗洁精刺激性与洗洁精中总活性物含量具有一定的相关性。Het-Cam在洗洁精刺激性评价方面既具有可行性。

**[关键词]** 洗洁精; 鸡胚绒毛尿囊膜试验(Het-Cam); 刺激性

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0398-04

洗洁精作为一种重要的日常洗涤剂, 除清洁、去污以外, 近年来随着生活水平的提高, 大众对其提出了新的要求——绿色环保以及对皮肤的低刺激或者无刺激性。在3R原则和动物福利伦理日渐受到重视的今日, 多重替代动物试验的体外方法得到开发和应用<sup>[1,2]</sup>。其中鸡胚尿囊膜试验(hen's egg test on the chorioallantoic membrane, Het-Cam)作为化妆品兔眼刺激性试验的替代试验之一, 大多数评估结论认为Het-Cam在表面活性剂和以表面活性剂为基础的配方等物质的测试中与传统的Draize兔眼试验显示较好相关性<sup>[3]</sup>。本文旨在通过Het-Cam对市面上销售的几款洗洁精的刺激性进行研究, 比较Het-Cam刺激性评分与洗洁精中表面活性剂含量之间的关系, 进一步探讨Het-Cam在洗洁精刺激性研究以及洗洁精质量提升中的可行性。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

5种市售洗洁精样品, 均由广州质量监督检测研究院化工检验部监督抽样提供, 分别标为A、B、C、D和E。白来杭鸡0日龄鸡胚, 35个, 购自北京梅里亚维通实验动物技术有限公司[SCXK(京)2014-0002]。

### 1.2 主要试验仪器与试剂

LRH250F型生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司; Stemi 2000C型体视显微镜, 德国蔡司公司。氯化钠, 广州化学试剂厂, 批号为20140701-2; 氢氧化钠, 广州化学试剂厂, 批号为20141102-1。

### 1.4 实验方法

**1.4.1 Het-Cam** 将各洗洁精用去离子水配制成质量分数为1.5%的水溶液。参照出入境检验检疫行业标准SN/T 2329-2009《化妆品眼刺激性/腐蚀性的鸡胚尿囊膜试验》<sup>[4]</sup>, 由于受试物均为透明液体, 本次实验采用反应时间法。0日龄鸡胚于培养箱中37.5℃孵育至9日龄, 照蛋检查后用牙科锯齿弯镊剥去已标记气室位置的蛋壳部分。用镊子去除蛋内膜, 将100  $\mu$ L样品水溶液滴加于尿囊膜表面, 观察Cam反映情况, 并记录作用

**[收稿日期]** 2019-04-03

**[作者简介]** 陈梓灵, 女, 硕士研究生。研究方向: 食品与化妆品安全性评价。

E-mail: 107495302@qq.com

**[通信作者]** 刘香梅, 女, 副研究员。研究方向: 食品与化妆品安全性评价。E-mail: 283830090@qq.com

5 min 内出血、血管融解、凝血的毒性效应出现的时间, 并进行拍照。每种样品做 6 次平行试验, 以质量分数 0.9% NaCl 溶液为阴性对照, 质量分数为 0.4% NaOH 溶液为阳性对照。

参照文献<sup>[4]</sup>, 采用刺激评分法(irritation score, IS)对试验结果进行评分, 应用以下公式计算刺激评分(IS), 结果保留小数点后两位:

IS= 
$$\frac{(301-\text{secH}) \times 5}{300} + \frac{(301-\text{secL}) \times 7}{300} + \frac{(301-\text{secC}) \times 9}{300}$$

式中:

secH(出血时间)即尿囊膜上观察到开始发生出血的平均时间(s);

secL(血管融解时间)即尿囊膜上观察到开始发生血管融解的平均时间(s);

secC(凝血时间)即尿囊膜上观察到开始发生凝血的平均时间(s)。

1.4.2 总活性物含量测定 依据 GB 9985-2000《手洗餐具洗涤剂》中附录 A 总活性物质含量的检测方法<sup>[5]</sup>, 由本院化工检验部对各受试物进行总活性物含量测定。

1.4.2.1 活性物含量的测定 称取各受试物 2 g 于烧杯中置(105 ± 2)℃烘箱中 2 h 后取出, 冷却至室温后加入 50 mL 三氯甲烷, 置 50℃水浴上加热至完全溶解, 再冷却至室温静置沉降, 倾倒上清液至过滤漏斗进行抽滤, 再以三氯甲烷重复洗涤抽滤 3 次。将三氯甲烷溶液由抽滤瓶转入已恒重的底瓶中, 通过索氏抽提器在水浴锅上回收溶剂, 待底瓶内容物蒸干时加入 3 mL 丙酮, 待完全蒸发后将底瓶放入(105 ± 2)℃烘箱中 2 h 后取出放在干燥器内冷却 30 min, 称重。

1.4.2.2 尿素含量的测定 称取各受试物 0.5 g 至碘量瓶中, 加入 50 mL 蒸馏水溶解后加入 1 滴甲基橙指示剂, 用盐酸中和至橙色, 加入 0.2 g 尿素酶后加塞, 置于 50℃水浴中, 40 min 后取出冷却, 用 0.1 mol/L 盐酸标准溶液滴定至如同中和时出现的橙色。同时设置空白试验。

1.4.2.3 结果计算

活性物含量(%)= 
$$\frac{m_1}{m} \times 100$$

式中:

m<sub>1</sub> 为三氯甲烷溶解物质量(g);

m 为试验份的质量(g)

尿素含量(%)= 
$$\frac{(V_1-V_0) \times c \times 3}{m}$$

式中:

V<sub>1</sub> 为样品消耗 0.1 mol/L 盐酸标准溶液体积(mL);

V<sub>0</sub> 为空白试验消耗 0.1 mol/L 盐酸标准溶液体积(mL);

c 为 0.1 mol/L 盐酸标准溶液的浓度(mol/L);

m 为试验份质量(g)

2 结果

2.1 Het-Cam

根据 1.4.1 中的试验方法进行试验并根据公式计算 IS 值, 具体结果见表 1。由表可知, 与阴性对照相比, 5 种洗洁精样品的出血时间和血管融解时间均有不同程度缩短, 未出现凝血现象。样品中 IS 值最高为 C 款洗洁精, IS 值最低为 A 款洗洁精, 5 种样品 IS 值均未达到阳性对照 IS 值。5 种样品及对照组的鸡胚绒毛尿囊膜在 5 min 时血管及血管网的受损程度见图 1。

2.2 总活性物含量检测

根据 1.4.2 中的试验方法进行试验并根据公式计算总活性物含量, 5 种洗洁精样品中总活性物含量最高为 B 款洗洁精, 含量最低为 C 款洗洁精(表 1)。

表 1 5 款洗洁精 Het-Cam 与总活性物含量检测结果  
Table 1 The results of Het-Cam and total active matter content in 5 dishwashing liquids

| 样品名称 | SecH/s | SecL/s | SecC/s | IS    | 总活性物含量/% |
|------|--------|--------|--------|-------|----------|
| A    | 48     | 238    | 301    | 5.69  | 16.37    |
| B    | 32     | 114    | 301    | 8.84  | 28.21    |
| C    | 29     | 63     | 301    | 10.07 | 15.34    |
| D    | 36     | 201    | 301    | 6.75  | 17.14    |
| E    | 20     | 147    | 301    | 8.28  | 17.87    |
| 阴性对照 | 301    | 301    | 301    | 0     | —        |
| 阳性对照 | 5      | 33     | 54     | 18.60 | —        |

3 讨论

天然、安全和无刺激作为当今洗洁精等洗涤剂最大的卖点与未来发展方向, 需要对其对生物

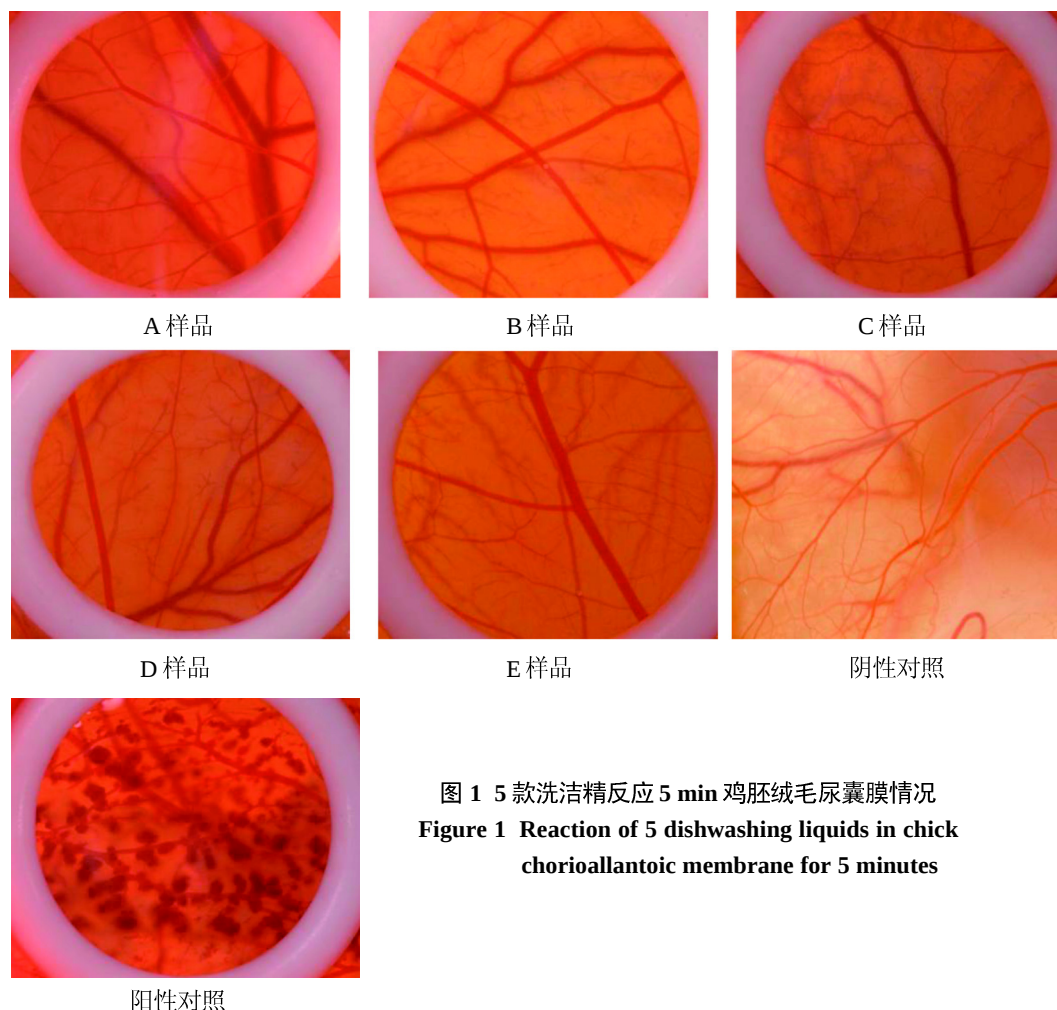


图 1 5 款洗洁精反应 5 min 鸡胚绒毛尿囊膜情况  
Figure 1 Reaction of 5 dishwashing liquids in chick chorioallantoic membrane for 5 minutes

机体的刺激性有更有效的评价方法。**Het-Cam** 试验作为传统 **Drauze** 兔眼试验的替代试验之一, 与皮肤刺激性试验对应的替代试验相比较, 有着试验所需设施设备少、操作简单、费用低廉以及对表面活性剂敏感的优势。由此可见, 利用 **Het-Cam** 试验对洗洁精的刺激性进行评分, 对洗洁精的配方和质量优化等有一定意义。

**Het-Cam** 结果显示, 样品 C 和 B 刺激性评分较高, 分别为 10.07 和 8.84, 而样品 A 和 D 刺激性评分较低, 分别为 5.69, 6.75。而相应的总活性物含量也分别为 15.34%、28.21% 和 16.37%、17.14%。由此可得, 洗洁精刺激性与洗洁精中总活性物含量具有一定的正相关性, 总活性物含量较高的洗洁精的刺激性评分大部分偏高。因此, **Het-Cam** 可以初步测定不同洗洁精产品的刺激性, 在研究洗洁精刺激性方面具有可行性。但

是洗洁精的刺激性评分并不严格随着总活性物含量升高而升高, 样品 C 的 **Het-Cam** 刺激性试验评分是 5 个样品中最高, IS 评分为 10.07, 但其总活性物含量在 5 款洗洁精中为最低, 分析原因, 可能与配方其他成分、原料品质、制作工艺或产品生产过程中产生的其他风险物质有关。在常规的洗洁精理化检测项目中, 检测项目一般为总表面活性物质或单一活性物质的含量, 仅从活性物的含量对洗洁精的刺激性进行判断, 容易忽视活性物质原料质量以及活性物质配方引起的洗洁精刺激性的变化。从 **Het-Cam** 结果可以看出, 在以总活性物种类和含量作为洗洁精质量高低的标同时, 也需要对其原料质量、配方等进行考量, 因此, 使用 **Het-Cam** 对洗洁精的刺激性进行评分, 也有助于洗洁精的质量优化。

表面活性剂对皮肤的刺激作用主要体现在当

它与皮肤角质层中的蛋白质和脂质相互作用后,会破坏角质层屏障,导致皮肤出现红斑、干燥和瘙痒症状<sup>[6]</sup>。例如十二烷基硫酸钠(SLS)作为表面活性剂中阴离子表面活性剂脂肪醇聚氧乙烯醚硫酸钠的一种,具有抗硬水性好,气泡性能、湿润性能好,与皮肤有良好的相容性的特点,被广泛应用于香波、沐浴用品、剃须膏等盥洗卫生用品和各种洗涤剂、清洁剂中<sup>[7]</sup>。但是实验表明 SLS 作用于角质层的脂质及蛋白结构,引起肿胀并破坏角质层,致使其屏障功能受到影响。低浓度的 SLS (低于 1%) 主要导致皮肤屏障的损伤,高浓度的 SLS (高于 1%) 引起强烈的炎症反应和皮肤屏障损伤的进一步增强<sup>[8]</sup>。本次试验也证明市售成品稀释至 1.5% 时,以表面活性剂为主要配方物质的洗洁精仍然对鸡胚绒毛尿囊膜有较大的刺激性。

综上所述, Het-Cam 在洗洁精刺激性评价方面既具有可行性,也具有试验意义。我们也将进一步探索 Het-Cam 在洗洁精刺激上的更详细具体的试验方法和等级划分方法。

#### 参考文献:

- [1] Balls M. Progressing toward the reduction, refinement and replacement of laboratory animal procedures: thoughts on some encounters with Dr Iain Purchase[J]. *Toxicol in vitro*, 2004, 18(2):165-170.
- [2] Jenkins ES, Langley G. Adoption of animal welfare principles by UK regulators[J]. *Toxicology*, 2002, 176(3): 245-251.
- [3] 程树军, 焦红. 实验动物替代方法原理与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2010:296.
- [4] SN/T2329-2009. 化妆品眼刺激性 / 腐蚀性的鸡胚绒毛尿囊膜试验[S].
- [5] GB 9985-2000. 手洗餐具洗涤剂[S].
- [6] 柴晨星, 赵莉, 周雅文, 等. 表面活性剂的性能与应用(XVIII)——表面活性剂在家用洗涤剂中的应用[J]. *日用化学工业*, 2015, 45(6):311-314+327.
- [7] 徐彬, 尹青春, 程燕, 等. 表面活性剂与皮肤的相互作用研究[J]. *日用化学品科学*, 2017, 40(02):55-57.
- [8] Aramaki J, Löffler C, Kawana S, et al. Irritant patch testing with sodium lauryl sulphate: interrelation between concentration and exposure time[J]. *Brit J Dermatol*, 2001, 145(5):704-708.

## Study on Irritation of Dishwashing Liquid by Hen's Egg Test on Chorioallantotic Membrane

CHEN Zi-ling, XV Ying-yu, LIU Xiang-mei, LIU Dong-hong, PANG Zeng-xiong  
(Guangzhou Quality Supervision and Testing Institute(GQT),  
Guangdong, Guangzhou 511447, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the feasibility of hen's egg test on the chorioallantotic membrane (Het-Cam) in evaluating the irritation of dishwashing liquid. **Methods** Five dishwashing liquid samples were allocated into 1.5% solution, then add 100  $\mu$ L to the chicken embryo allantoic membrane. Scored the irritation of the samples according to the irritation score (IS) of SN/T 2329-2009 Cosmetics ocular irritant and corrosive Het-Cam test. **Results** The irritation score of sample C and B are at the higher score for 10.07 and 8.84 respectively. The irritation score of sample A and D are at the lower score for 5.69 and 6.75 respectively. Their total active matter content are as follows: 15.34%, 28.21%, 16.37% and 17.14%. **Conclusion** There is a certain correlation between the irritation of dishwashing liquid and the total active matter content in dishwashing liquid. Het-Cam test is not only feasible but also significant in evaluating the irritability of dishwashing liquid.

**[Key words]** Sodium dodecyl sulfate; Hen's egg test on the chorioallantotic membrane (Het-Cam); Irritation

# 一例SD大鼠自发性心脏海绵状血管瘤的病理学观察

邱波<sup>1</sup>, 王艳<sup>2</sup>, 胡建廷<sup>1</sup>

(1. 山东省药学院 山东省化学药物重点实验室, 济南 250101;

2. 山东英才学院, 济南 250104)

**[摘要]** 在试验周期为26周的SD大鼠灌胃重复给药毒性试验结束后, 溶媒对照组(0.9%生理盐水)中出现一例心脏海绵状血管瘤病例。肉眼形态学观察, 该动物心脏肿大, 剖检可见病变位于室间隔, 与心壁间界限不清晰, 呈海绵样结构, 颜色为灰黄暗褐色, 大小约1.5 cm × 0.8 cm × 0.5 cm, 切面呈蜂窝状。HE染色显示, 心肌间由边界不清、扩张、充血、不规则形的血窦构成, 血管腔大小不等, 管壁常较薄, 内衬扁平的内皮细胞, 血管腔内有许多红细胞。免疫组织化学染色显示, 血管内皮细胞上CD31分子标记物为阳性。结果表明其符合心脏海绵状血管瘤的诊断特征。

**[关键词]** SD大鼠; 心脏; 海绵状血管瘤; 病理形态学

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2019)06-0402-03

大鼠心脏自发性原发性肿瘤罕见, 心脏的自发性原发性肿瘤包括心房间皮瘤、心脏副神经节瘤、心内膜神经鞘瘤和心壁内神经鞘瘤等<sup>[1-3]</sup>。海绵状血管瘤也是大鼠心脏自发性原发性肿瘤的一种类型, 但对于大鼠心脏自发性原发性肿瘤中的海绵状血管瘤的文献报道极为罕见。本文以空白对照组大鼠(试验周期为26周)出现的一例自发性心脏海绵状血管瘤为研究对象, 通过肉眼形态观察、HE染色及血管内皮细胞CD31阳性标记物的免疫组织化学染色方法, 对该病例进行病理形态学的初步探讨。

**[收稿日期]** 2019-04-24

**[基金项目]** 创新药物临床前评价公共服务平台  
(CXLC161906)

**[作者简介]** 邱波(1983-), 男, 硕士, 主管药师, 主要从事药物的毒性病理学研究。

E-mail: qiubo.1983@163.com

**[通信作者]** 胡建廷(1979-), 男, 硕士, 副主任药师, 主要从事药物的毒性病理学研究。

E-mail: jiantinghu@126.com

## 1 动物来源与饲养环境

6~8周龄SPF级SD大鼠160只, 雌雄各半, 购自北京维通利华实验动物有限公司[SCXK(京)2012-0001]。动物饲养于本中心SPF级动物房大鼠饲养间[SYXK(鲁)2014-0008], 分4组进行为期26周的灌胃重复给药毒性试验。

## 2 患病动物概况

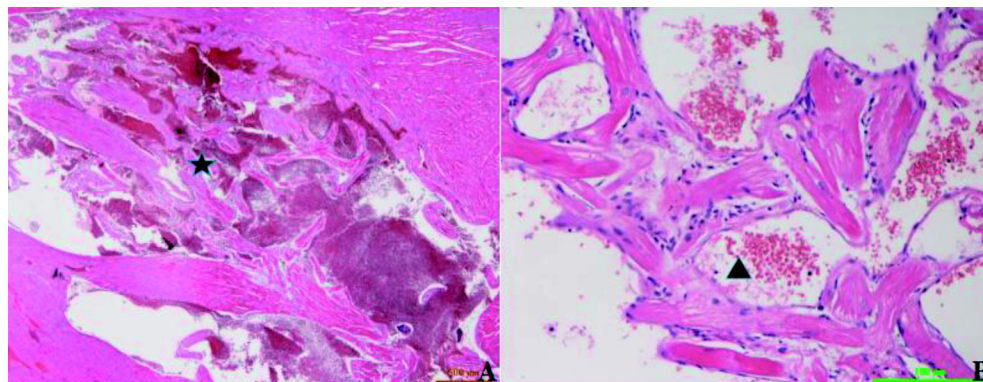
该患病动物为给药26周结束后的空白对照组(雌雄各10)雄性大鼠。肉眼观察, 该动物心脏肿大, 检查体表皮肤无破损, 眼、耳、鼻、口、外阴部等无出血或分泌物, 肛周无排泄物附着。大鼠经剖检后对心脏组织进行病理学和免疫组织化学观察。

## 3 肉眼形态学观察

剖检见病变位于室间隔, 与心壁间界限不清晰, 呈海绵样结构, 大小约1.5 cm × 0.8 cm × 0.5 cm, 切面呈蜂窝状(图1箭头所示)。



图1 心脏的肉眼形态学观察



A: 心肌间血管瘤成分, 血管腔大小不等, 血管腔内有許多红细胞(五角星)(HE × 20); B: 大量扩张、充血的血管, 管壁较薄, 内衬扁平内皮细胞(三角形)(HE × 200)

图2 心脏海绵状血管瘤的病理组织学观察

试剂盒, 规格: 18 mL, 批号: AG08164417, Rabbit Anti-CD31 单抗、DAB 染色试剂盒, 均由北京博奥森生物技术有限公司提供。

## 5.2 方法

CD31 免疫组织化学染色: (1)石蜡切片, 常规脱蜡至水; (2)蒸馏水冲洗, PBS 浸泡 5 min; (3)抗原修复: 将切片插到玻璃切片架上, 倒入 0.01 mol/L 的柠檬酸钠缓冲液, 微波炉中火加热 3 min 至沸腾后, 静置 5 min, 再加热 3 min 至沸腾, 自然冷却至室温, PBS 漂洗 3 次, 每次 2 min; (4) 3% 去离子水孵育 15~20 min; (5)添加试剂 A 室温孵育 15~20 min, 倾去, 勿洗; (6)添加适当比例稀释的一抗, 4 °C 过夜; (7)PBS 冲洗, 3 min × 3 次; (8)添加试剂 B, 室温孵育 15~20 min; (9)PBS 冲洗, 3 min × 3 次; (10)添加试剂 C, 室温孵育 15~20 min; (11) PBS 冲洗, 3 min × 3 次; (12)显色剂显色。(13)自来水充分冲洗; (14)复染: 苏木素轻度复染 1 min, 盐酸酒精分化, 自来水蓝化 5~10 min;

## 4 组织病理学检查

显微镜下, 观察到心肌组织间含海绵状血管瘤成分, 主要由边界不清、扩张、充血的血管构成, 血管腔大小不等, 血管腔内有許多红细胞, 管壁常较薄, 内衬扁平的内皮细胞, 内皮细胞未见异型性(图 2)。

## 5 CD31 免疫组织化学

### 5.1 试剂

SP-0023 Histostain™-Plus Kits 免疫组织化学

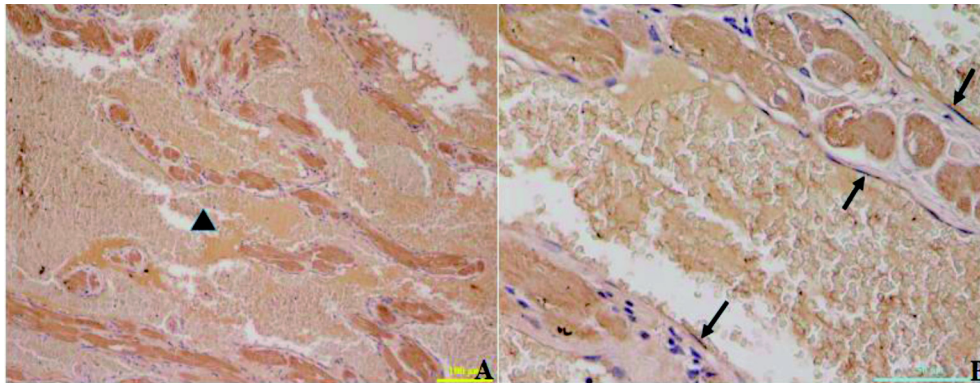
(15)高梯度系列酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 镜检。

### 5.3 结果

血管内皮细胞 CD31 的免疫组织化学染色结果显示, 低倍镜下(图 3A), 心肌间含海绵状血管瘤成分, 血管腔大小不等, 呈海绵状改变, 血管腔内有許多红细胞; 高倍镜下(图 3B), 毛细血管管壁较薄, 管腔扩大, 管腔内充满红细胞, 血管内皮细胞扁平, 阳性染色, 呈棕褐色。

## 6 讨论

在大鼠中, 大多数原发性肿瘤通常为低分化的间充质肿瘤, 由梭形细胞组成, 这些梭形细胞肿瘤通常被认为是神经鞘瘤, 这一观点已被 S100 蛋白免疫细胞化学染色阳性支持<sup>[4,5]</sup>。血管瘤也是大鼠心脏自发性原发性肿瘤的一种类型, 但人们对于大鼠心脏原发性肿瘤中的血管瘤的报道极为罕见。对大鼠来说, 血管瘤最常见于脾脏、肝



A: 心肌间海绵状血管瘤成分, 血管腔大小不等(三角形所示)(免疫组织化学 $\times 100$ ); B: 血管扩张、充血, 管壁较薄, 内衬扁平内皮细胞, CD31 染色阳性, 呈棕褐色(箭头所示)(免疫组织化学 $\times 400$ )

图 3 心脏海绵状血管瘤的免疫组织化学染色

脏和皮下组织<sup>[6]</sup>。血管瘤是相对边界清楚的血管肿瘤, 其特征是大小不一的血管轮廓, 内衬单层均匀、分化良好的内皮细胞, 其特征类似于正常的血管内皮。基质通常很少<sup>[7]</sup>。本病例镜下观察心肌间由大小不一的血管轮廓组成, 血管内衬单层均匀、分化良好的内皮细胞, 这与大鼠血管瘤的诊断标准相一致。

与大鼠相比, 人类心脏血管瘤报道的文献资料相对较多, 但是对于人类来说, 心脏血管瘤也是十分罕见的原发性良性肿瘤, 占心脏肿瘤的 0.8%<sup>[8]</sup>。据谷伯起<sup>[9]</sup>和 Basso 等<sup>[8]</sup>统计, 过去国外有文献报告只占 0.8%~2.8%。病理组织学上主要有两种: 毛细血管瘤和海绵状血管瘤。毛细血管瘤镜下主要为大量新生的毛细血管, 新生的毛细血管内皮细胞增生肥胖, 管腔大小不等, 管腔内几乎没有红细胞; 而海绵状血管瘤主要为增生的毛细血管是薄壁, 管腔扩大, 大小不等, 管腔内充满红细胞, 呈海绵状改变<sup>[10]</sup>。海绵状血管瘤是一种比较少见的血管源性肿瘤, 机体任何部位都可发生, 常见于皮肤、肌肉, 而发生在心脏的海绵状血管瘤极为罕见。本病例剖检肉眼观察血管瘤体积小、呈海绵样结构, 免疫组织化学染色显示血管内皮细胞上 CD31 分子为阳性; 镜下观察瘤体由不规则形的血窦构成, 瘤与心壁间界限不清晰, 瘤体中心部的血管窦纤维间隔可见散在的心肌细胞, 高倍镜下未见毛细血管内皮细胞增生肥胖, 而本病例血管管腔扩张, 管腔内充满红细胞, 呈海绵状改变。因此, 结合上述肉眼形态学观察、组织病理学及免疫组织化学血管内

皮细胞 CD31 分子染为阳性的方法, 本病例可诊断为心脏血管瘤类型中的海绵状血管瘤。

#### 参考文献:

- [1] Alison RH, Elwell MR, Jokinen MP, et al. Morphology and classification of 96 primary cardiac neoplasms in Fischer 344 rats[J]. Vet Pathol, 1987, 24(6):488-494.
- [2] Cho WS, Kim SY, Choi MN, et al. Malignant aortic body tumor in female Sprague-Dawley rat[J]. Lab Anim Sci, 2008, 24(3):429-431.
- [3] Goodall CM, Christie GS, Hurley JV. Primary epithelial tumour in the right atrium of the heart and inferior vena cava in NZR/Gd inbred rats; pathology of 18 cases[J]. J Pathol, 1975, 116(4):239-251.
- [4] Berman JJ, Rice JM, Reddick R. Endocardial schwannomas in rats. Their characterization by light and electron microscopy[J]. Arch Pathol Lab Med, 1980, 104(4):187-191.
- [5] Teredesai A, T W hrmann. Endocardial schwannomas in the Wistar rat[J]. J Vet Med A, 2010, 52(8):403-406.
- [6] Suttie AW, Leininger JR, Bradley AE. Boorman's Pathology of the Rat[M]. Cambridge, Massachusetts:Academic Press, 2014.
- [7] Thoolen B, Maronpot RR, Harada T, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system[J]. J Toxicol Pathol, 2010, 38 (7 Suppl):5S-81S.
- [8] Basso C. Surgical pathology of primary cardiac and pericardial tumors[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 1997, 12(5):730-738.
- [9] 谷伯起. 心血管病理学[M].北京: 人民卫生出版社, 1992: 239-249.
- [10] 骆利康, 李群锋, 项迪红. 心脏海绵状血管瘤一例报告[J]. 现代实用医学, 2014, 26(9):1190.

# 一例小鼠自发性成熟型畸胎瘤

高亚奇, 陈伟盛, 梁 宁, 詹纯列, 张修彦  
(南部战区总医院, 广州 510010)

**[摘要]** 在饲养群中发现一例小鼠腹部自发性肿瘤, 通过 Micro-CT 扫描观测肿瘤 CT 特征并取患病小鼠肿瘤进行病理检查。肿瘤大小为 1.7 cm × 1.1 cm × 0.7 cm, 重 1.079 g。扫描结果显示肿瘤密度不均匀, 多发结节状, 条状高密度骨化影, 初步判断为畸胎瘤。肿瘤病理学检查显示肿瘤内部有神经组织、肌组织、上皮组织及软骨组织, 判断为畸胎瘤。CT 和病理学观测表明, 在饲养中发现的是一例小鼠成熟型畸胎瘤。

**[关键词]** 小鼠; 畸胎瘤; CT

**[中图分类号]** R73-3, Q95-33 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0405-03

畸胎瘤源于原生殖细胞, 包含三个胚层的分化细胞以及多潜能干细胞<sup>[1]</sup>。畸胎瘤经常出现在性腺、骶尾部、纵膈和腹膜后腔<sup>[2]</sup>。饲养中在 B6129S4-Kras<sup>tm4Tyj/J</sup> 小鼠群发现一雌性小鼠(543 日龄), 腹部有一突出肿瘤<sup>[12]</sup>。按压发现肿瘤坚硬, 随后进行 CT 拍照, 继续饲养 1 个月, 每周 1 次 CT 拍照, 肿瘤未有进展, 1 个月后 CT 拍照并处死动物取肿瘤进行病理检查, 确定为成熟型畸胎瘤。小鼠自发性畸胎瘤甚少, 国外未见报道, 在国内仅见一例报道<sup>[3]</sup>, 但其没有 CT 方面介绍。

## 1 病例介绍

南京模式动物中心[SCXK(苏)2015-0001]提供的冷冻复苏胚胎 B6129S4-Kras<sup>tm4Tyj/J</sup> 小鼠 7 只, 3 只雌性, 4 只雄性, 4 周龄。饲养于南部战区总医院动物实验中心[SYXK(粤)2014-0100]。在整个实验过程中给予动物符合“3R”原则的人文关

怀(福利伦理审查号: 2018011705)。其中一只雌鼠交配 5 次, 均未产仔。以后与其它 2 只雌鼠同笼饲养至 543 日龄时, 发现腹部有一肿瘤。CT 扫描后继续饲养 1 个月, 未发现肿瘤有变大, CT 拍照后, 麻醉处死动物, 在超净工作台中取材(图 1)。其他 B6129S4-Kras<sup>tm4Tyj/J</sup> 小鼠未出现肿瘤。

## 2 诊断

### 2.1 大体观察

肿瘤位于前下腹部(图 1), 腹直肌后方, 大小 1.7 cm × 1.1 cm × 0.7 cm, 重 1.079 g, 边界清楚, 与周围脏器无粘连, 包膜光滑, 实性, 切面为棕色, 质地硬, 形状不规则。

### 2.2 CT 观察

发现肿瘤时至 1 个月后处死动物期间, 每隔 1 周拍 1 次 CT 照, 未发现肿瘤有进展。CT 扫描结果显示中下腹部见一不规则肿块影(图 2), 图中红色椭圆圈内为畸胎瘤, 边界尚清, 其内密度不均匀, 多发结节状, 条状高密度骨化影。

### 2.3 病理学观察

HE 染色结果如图 3。图 3A 显示肿瘤内有肌组织(黄色箭头)及上皮组织(红色箭头), 图 3B 显示肿瘤表面为纤维结缔组织, 肿瘤内可见分化成熟的神经组织(橙色箭头)、局部可见软骨组织(绿色箭头),

[收稿日期] 2018-10-29 [修回日期] 2019-06-19

[基金项目] 广东省科技计划项目(2017A030303058)

[作者简介] 高亚奇(1990-), 女, 技师, 研究方向: 疾病动物模型。E-mail: 1280457608@qq.com

[通信作者] 詹纯列(1963-), 主任医师, 研究方向: 实验动物标准化与疾病动物模型。

E-mail: zyh200521@qq.com

间质为疏松的结缔组织、伴随出血、坏死及矿化。图 3C 显示局部可见软骨样组织(箭头)。图 3D 显示局部可见分化成熟的神经组织, 伴随坏死及钙化(箭头)。图 3E 显示肿瘤边缘被膜外及被膜下均可见炎细胞(箭头)浸润。图 3F 显示间质为疏

松的结缔组织, 其内可见散在炎细胞(箭头)浸润。

### 3 讨论

畸胎瘤是先天性肿瘤, 包含所有三个胚层的组织: 外胚层、中胚层和内皮层, 组织学上,

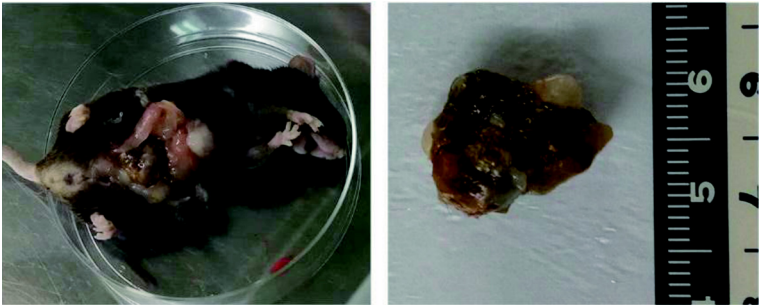
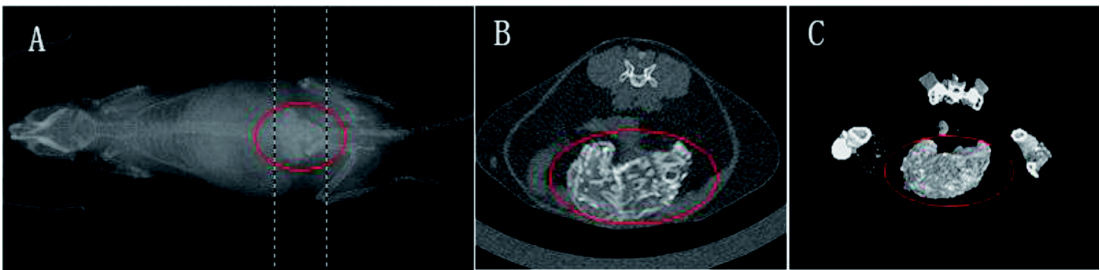
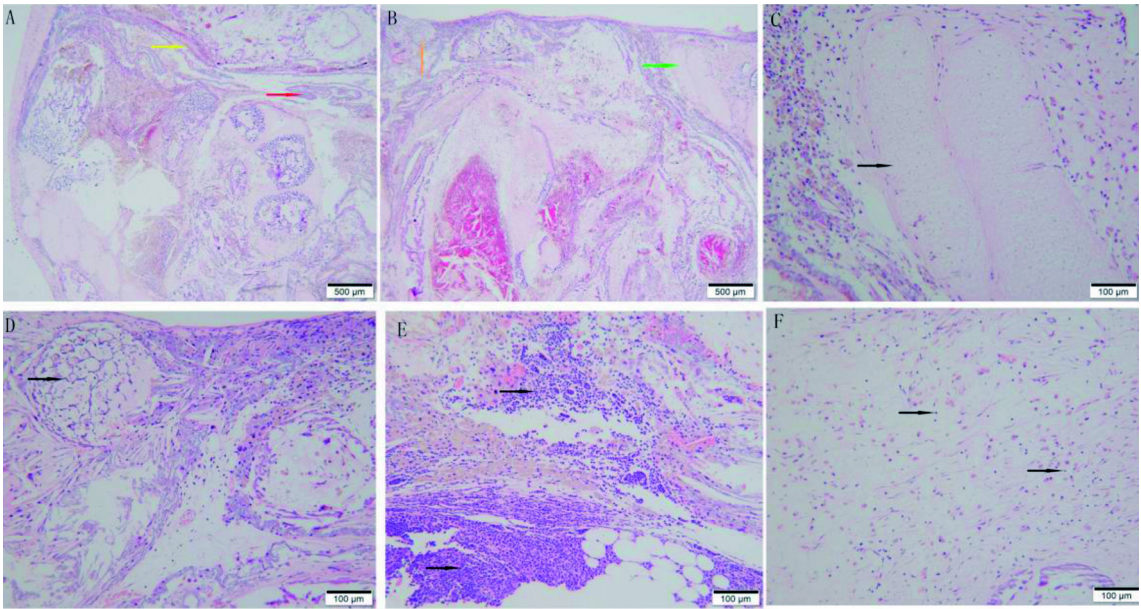


图 1 畸胎瘤大体解剖图



A: X 光平扫图; B: 断层扫描图; C: 三维重建图

图 2 畸胎瘤 CT 图



A、B: HE × 500; C、D、E、F: HE × 100

图 3 畸胎瘤 HE 染色图

这些病变分为成熟型和不成熟型<sup>[4]</sup>。畸胎瘤多为良性肿瘤，随年龄增加恶变率明显上升<sup>[5]</sup>。CT 及磁共振(MR)检查对于肿瘤定位较为准确<sup>[6]</sup>，小鼠畸胎瘤较少有文献报道。作者发现的畸胎瘤小鼠已 77 周龄，约相当于人类 56 岁，未发现畸胎瘤恶变倾向，经 CT 及解剖观察，发现畸胎瘤位于前下腹部，腹直肌后方。本文中病理结果显示，畸胎瘤内含神经组织、肌组织、上皮组织及软骨组织，判定该畸胎瘤为成熟畸胎瘤。

#### 参考文献：

- [1] Gu W, Mochizuki K, Otsuka K, et al. Dnd1-mediated epigenetic control of teratoma formation in mouse[J]. Biol Open, 2018, 7(1):bio032318.
- [2] García-Galvis OF, Stolnicu S, Muñoz E, et al. Adult extrarenal wilms tumor of the uterus with teratoid features[J]. Hum Pathol, 2009, 40(3):418-424.
- [3] 孙慧, 宁连胜, 韩宝国. 小鼠自发卵巢恶性畸胎瘤——例报告[J]. 北京实验动物科学, 1989, 6(2):8-9.
- [4] Beschorne R, Schittenhelm J, Bueltmann E, et al. Mature cerebellar teratoma in adulthood[J]. Neuropathol, 2009, 29(2):176-180.
- [5] Sam S, Yoon MD, Kenneth K, et al. Adult primary retroperitoneal teratoma[J]. Surgery, 2005, 137(6):663-664.
- [6] 陈志聪. 腹膜后畸胎瘤的 CT 诊断[J]. 使用医学影像学杂志, 2009, 10(4):234-235.

# 头灯下经口直视的大鼠非暴露式气管滴注法的建立

龙 隆<sup>1</sup>, 谭 红<sup>2</sup>, 杨鸿波<sup>2</sup>

(1. 中国铁路成都局集团有限公司重庆疾病预防控制中心, 重庆 400014;

2. 贵州省分析测试研究院, 贵阳 550000)

**[摘要]** 目的 探索建立一种操作便捷而高效的大鼠非暴露式气管滴注方法。方法 选用自制一次性静脉留置针在头灯的照射下行气管插管, 用 1 mL 注射器吸取 0.1 mL 生理盐水对 10 只 SD 雄性大鼠(体质量 200~350 g)以 2 日 1 次的频率重复操作。结果 共完成 40 次气管滴注的操作, 每只动物的操作耗时约 3 min, 整个实验操作安全顺利, 并未给动物造成创伤, 实验过程中及实验结束 3 d 后动物均无异常反应。结论 该气管滴注方法具有快捷、安全和高效的特点, 可广泛应用于大鼠呼吸道给药相关实验研究。

**[关键词]** 大鼠; 气管滴注; 实验技术

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0408-03

呼吸暴露是外界物质进入人体最主要途径之一, 气管滴注法在呼吸系统相关研究中因其具有稳定和精准等特点得到广泛应用<sup>[1,2]</sup>, 虽然近年来自然吸入染毒法的应用呈上升趋势, 但其成本较高, 还存在暴露仓内浓度分布不均, 均一性和稳定性都难以满足实验要求等诸多问题, 气管滴注法在国内仍然拥有较高的使用率。由于大鼠声门位置较高, 插管时声门暴露困难, 迅速而准确行气管滴注操作十分关键, 暴露式气管滴注方法虽然简便快捷, 但对动物机体损伤比较大, 在慢性或亚慢性实验中, 往往需要反复多次滴注, 组织反复损伤及术后感染都会对实验动物的机体造成损伤。本研究在总结了既往国内外相关研究和探索改良的基础上, 设计出一种兼顾安全和高效的非暴露式

气管滴注方法, 为今后相关实验研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与材料

SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只, 体质量 200~350 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)2012-0001], 常规饲养于贵州健安德科技有限公司实验动物中心屏障系统(IVC)中[SYXK(黔)2016-005]。12 h 明暗昼夜交替, 设施温度 22~24 ℃, 相对湿度 50%~70%, 正常饮食饮水。

将 22G Y 型静脉留置针针芯的针尖磨平去掉约 2 mm(以免插管时损伤气管)后回插入留置针套管, 但不完全插入, 针尖与套管前端保留大约 3 mm 的距离, 防止针尖对动物气道造成损伤(图 1)。强光变焦头灯(直径 65 mm, 深度 60 mm)(图 2)。其他材料包括棉签、纱布、胶带缠绕过的小夹子、解剖板、皮筋、丝线、1 mL 注射器。

### 1.2 方法

**1.2.1 麻醉与固定** 采用腹腔注射 1% 戊巴比妥钠按 30 mg/kg 体质量进行麻醉, 用丝线套住大鼠上切牙, 仰卧吊于 45~60° 倾斜的解剖板上固定, 用皮筋将大鼠四肢固定于解剖板, 并在动物颈后部垫一块纱布抬高气管位置, 便于后续插管。

**[收稿日期]** 2019-02-20

**[基金项目]** 遗传资源与进化国家重点实验室开放课题(GREKF17-15); 环境化学与生态毒理学国家重点实验室开放基金(KF2016-21); 中央引导地方科技发展专项, 黔科中引地[2016]4001 号

**[作者简介]** 龙 隆(1991-), 男, 硕士, 医师, 主要研究方向: 环境医学与卫生监督。E-mail: 497192979@qq.com

**[通信作者]** 谭 红, 女, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 食品安全、环境监测。E-mail: tan-hong@tom.com



图1 自制滴注装置



图2 强光变焦头灯

**1.2.2 气管插管和滴注** 实验人员带好头灯,将台灯发散的光源照进动物口腔,左手拇指和食指将动物舌体轻轻牵拉至一侧后用包裹了胶带的小夹子将舌体轻轻夹住,再用棉签擦拭动物咽部分泌物的同时轻压舌体并固定,左手中指用于调整动物体位,调整好操作手法以及头灯角度后可以清晰看见咽部和忽明忽暗的声门裂,右手持含有针芯的磨钝的自制静脉留置针套管在头灯的辅助下迅速插入气管口约 3 cm,轻轻将针芯从套管中抽出,并用胶带将套管固定,松开牵出的舌体,此时可以观察到导管内有呼吸所致蒸气贴壁现象,将细棉丝放置于套管的注射器接口,能够看见细棉丝伴随着大鼠呼吸而飘动,如若不然,则需重新插管。用 1 mL 注射器吸取 0.1 mL 生理盐水后连接套管并缓慢注入,再注入同体积空气。

**1.2.3 滴注后操作** 迅速拔出静脉留置针套管,关闭光源,悬挂约半分钟后平放于手术台上旋转,模拟真实给药染毒,使生理盐水在两肺内均匀分布。

## 2 结果

本实验采用隔日滴注,每只动物分 7 d 滴注 4 次,共进行 40 次大鼠气管滴注操作,全部一次性成功,滴注操作大约 3 min,每只实验动物在操作过程中没有出现呼吸急促等现象均能保持较平稳呼吸,没有出现窒息或死亡,动物苏醒后进食、饮水、活动等一般观察均无异常,解剖后检查也未见气管损伤等情况。

## 3 讨论

方法建立注意事项:①掌握合适的麻醉深度是完成气管插管的前提。麻醉过浅会导致实验动物

不能进入麻醉状态或进入麻醉状态较慢,甚至在气管滴注过程中出现强烈的应激反应,从而影响动物生理状态。麻醉剂量过大容易造成实验动物发生呼吸抑制而死亡,这就要求我们需要协调麻醉速度与气管滴注操作速度,使其稳步有序。经过前期的预实验和大量文献的收集,我们发现腹腔注射 1%戊巴比妥钠按 30 mg/kg 体质量进行麻醉能使动物较快、较好进入麻醉状态,并且用小镊子轻夹大鼠的四趾脚趾,大鼠无任何反应。②牵拉实验动物舌体时手法要轻柔,在保证撑开口腔的同时要避免损伤到动物。③行气管滴注操作前要对套管插入深度进行解剖观察,切勿盲插,减少对动物的损伤。④正式实验前需进行滴注液体体积的测试。在预实验中,使用不同的静脉留置针和注射器在行滴注操作过程时,实际的滴注剂量有所偏差,并且滴注时使用的注射器底部容易残留液体,导致实际给药往往小于理论给药,偏差大约在 0.01 mL 以内。因此在进行正式滴注染毒操作前需先测试其体积,反复充盈整个滴注装置,观察实际剂量与注射剂量的差值,确保染毒剂量的精准。⑤滴注完毕后可以适当补气,防止动物窒息,同时应注意控制补气速度和补气量。根据既往研究和预实验,我们在滴注完毕后将 1 mL 空气 1.5 s 内注入气道,达到分散染毒物质以及避免动物窒息等问题。⑥整个滴注操作过程应尽量迅速,笔者认为,滴注操作应控制在 2 min 以内为宜,若滴注时间较长容易发生缺氧或窒息。同时动物在麻醉期间体温容易下降,需要采取一定的保温措施。

现阶段与呼吸系统相关的研究呈逐年上升的趋势,但自然吸入法受到多种条件的限制并未广泛开展,目前国内外采用气管滴注法还是比较常

见,但操作方式并不一致<sup>[2-4]</sup>。本文介绍的气管滴注法与既往的滴注法相比具有更安全、廉价和更快捷、高效等特点。

早在1980年代就有学者采用盲探插管法成功率高达90%<sup>[5]</sup>,但插管耗时较长,同时还存在需反复试插,对动物咽喉部及气道造成损伤的缺点,该法对实验人员的技术要求较高,因此并未广泛开展,高效而精准的气管滴注法仍需借助其他设备。有学者<sup>[6,7]</sup>使用自制的光纤引入口腔内照明进行气管插管,成功率较高,但成本高、过程较慢。Fuentes等<sup>[8]</sup>使用电子内镜辅助操作,保证了成功率,但操作繁杂无法达到快速插管的缺点。有研究提出将显微导丝应用于气管滴注<sup>[9]</sup>,但也存在上述问题。据报道,在透射灯以及额镜下行气管滴注效果较好<sup>[10]</sup>。

本研究通过总结国内外气管滴注相关实验研究,探索出头灯下经口直视气管滴注法,事先将动物分批麻醉,然后使用头灯行气管滴注的操作,不仅廉价安全而且可靠,仅需一个实验人员便能完成整个滴注操作,与传统滴注需要两位实验人员相比,效率进一步提高。综上所述,应用头灯行气管滴注操作简单,快速,安全,廉价,可重复性强,可广泛应用于大鼠呼吸道给药染毒等相关研究。

#### 参考文献:

[1] Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, et al. Pulmonary toxicity

of well-dispersed cerium oxide nanoparticles following intratracheal instillation and inhalation [J]. J Nano Res, 2015,17(11):442.

[2] Wang B, Feng WY, Zhu MT, et al. Neurotoxicity of low-dose repeatedly intranasal instillation of nano- and submicron-sized ferric oxide particles in mice [J]. J Nano Res, 2009, 11(1):41-53.

[3] 彭子荷,魏艳杰,孙悦,等.气管滴注纳米二氧化硅在大鼠体内时间分布特征[J].中国职业医学,2017,44(5):562-567.

[4] 蔡全领,胡献刚,周启星.石墨烯纳米材料对哺乳动物的毒性及其作用机制[J].生态毒理学报,2017,12(6):1-10.

[5] Stark RA, Nahrwold ML, Cohen PJ. Blind oral tracheal intubation of rats [J]. J Appl Physiol Respir Environ Exerc Physiol, 1981, 51(5):1355-1356.

[6] Rivera B, Miller S, Brown E, et al. A novel method for endotracheal intubation of mice and rats used in imaging studies [J]. Contemp Top Lab Anim Sci, 2005, 44(2):52-55.

[7] MacDonald KD, Chang HY, Mitzner W. An improved simple method of mouse lung intubation [J]. J Appl Physiol, 2009, 106(3):984-987.

[8] Fuentes JM, Hanly EJ, Bachman SL, et al. Videoendoscopic endotracheal intubation in the rat: a comprehensive rodent model of laparoscopic surgery [J]. J Sur Res, 2004, 122(2): 240-248.

[9] Hamacher J, Arras M, Bootz F, et al. Microscopic wire guide-based orotracheal mouse intubation: description, evaluation and comparison with transillumination [J]. Lab Anim, 2008, 42:222-230.

[10] 王响英,吴淑燕,李苏安,等.大鼠直视气管插管方法[J].上海实验动物科学,2004,24(2):107-108.

## Establishment of Non-exposed Tracheal Instillation Method in Rats under Head Lamp

LONG Long<sup>1</sup>, TAN Hong<sup>2</sup>, YANG Hong-bo<sup>2</sup>

(1. Chongqing Institute for Disease Control and Prevention of Chengdu Railway Group Co., Ltd, Chongqing 400014, China; 2. Guizhou Academy of Testing and Analysis, Guiyang 550000, China)

**[Abstract] Objective** To explore a new method for the operation of a rat model of non-exposed tracheal instillation. **Methods** Tracheal intubation with a self made disposable intravenous indwelling needle in the irradiation under a strong light, 0.1 mL saline was administered repetitive operation to 10 SD male rats (200-350 g) by 1 mL syringe with the frequency of once per two days. **Results** A total of 40 operations were performed, each animal took about 3 minutes. The whole experiment was safe and smooth, and the animals were not injured. During the experiment and the end of the experiment, animals had no abnormal reaction after three days. **Conclusion** This method is rapid, safe and effective, it can be widely used in the experimental study of respiratory tract administration in rats.

**[Key words]** Rat; Intratracheal instillation; Experimental technique

# 脉动真空灭菌器对鼠维持饲料灭菌效果和部分营养成分损失率的影响

薛来恩, 党源, 温福利, 张诗兰, 郑和平

(联勤保障部队第九〇〇医院比较医学科, 福州 350025)

**[摘要]** 目的 研究脉动真空灭菌器对鼠维持饲料灭菌效果和饲料中主要营养成分、维生素和氨基酸损失率的影响, 寻找适合屏障系统中维持饲料的脉动真空灭菌方法。方法 采用灭菌参数(121 ℃、110 kPa、20 min)和(132 ℃、193 kPa、7 min)对鼠维持饲料样品进行灭菌。通过比较各组饲料营养成分、维生素和氨基酸的损失率及灭菌效果, 综合评价两种灭菌参数的差别, 探究脉动真空灭菌器对维持饲料的灭菌方法。结果 两种灭菌参数的灭菌效果确实, 除132 ℃、193 kPa、7 min组的维生素A低于国家标准, 其余组别的各营养指标都符合国家标准; 灭菌后的常规营养指标、维生素、氨基酸都有不同程度的损失, 除粗脂肪、天冬氨酸、丝氨酸和赖氨酸外, 121 ℃、110 kPa、20 min组鼠维持饲料中营养成分、维生素和氨基酸的损失率均低于132 ℃、193 kPa、7 min组。结论 屏障系统中脉动真空灭菌器灭菌参数121 ℃、110 kPa、20 min较为适合鼠维持饲料的灭菌。

**[关键词]** 脉动真空灭菌器; 鼠维持饲料; 灭菌效果; 营养成分

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0411-04

随着医学、生物学的不断发展, 清洁级以上的实验动物用量越来越大。根据国家标准的相关要求<sup>[1,2]</sup>, 饲养清洁级、SPF级和无菌动物需饲喂灭菌的配合饲料。秦川等<sup>[3]</sup>研究结果显示, 任何灭菌方式均对配合饲料中某些维生素和氨基酸成分造成一定程度的破坏, 降低饲料的营养价值, 若长期直接使用此类饲料, 将对动物的健康产生不同程度影响, 难以保证动物实验结果的可靠性。经过灭菌后的实验动物饲料应确保含有实验动物生长发育所需要的有效营养成分, 并严格控制饲料中有害的化学残留物和各种微生物。为

保障实验动物饲料达到无菌标准, 选择有效的灭菌方法显得尤为重要。

高压蒸汽灭菌法利用高温高压使菌体蛋白质凝固变性而达到灭菌目的。脉动真空灭菌器是屏障环境实验动物设施运行过程中使用频率最高的灭菌设备之一, 其灭菌效率直接影响屏障设施内实验动物的健康和质量, 其工作原理是采用真空泵将锅内的空气抽尽后变成真空状态, 然后通过蒸汽发生器导入蒸汽, 使蒸汽在锅内迅速扩散并渗透到物品的深部达到有效的灭菌<sup>[4]</sup>, 与普通高压蒸汽灭菌器比具有灭菌时间短<sup>[5]</sup>, 灭菌性能更可靠, 自动化程度高<sup>[6]</sup>, 灭菌后物品干燥好、损害轻微、灭菌彻底等优点<sup>[7]</sup>。目前, 采用普通高压蒸汽灭菌方法对饲料进行灭菌已有很多研究报道, 研究<sup>[8,9]</sup>表明, 饲料在普通高压蒸汽灭菌器的最佳温度为121 ℃, 灭菌时间为20 min; 脉动真空灭菌方法对饲料进行灭菌的研究报道少, 研究<sup>[10]</sup>指出对物品灭菌温度参数一般设置为132 ℃,

**[收稿日期]** 2019-03-01

**[基金项目]** 福建省科技平台建设(No.2014Y2010)和军队实验动物专项科研课题[No.SYDW(2016)007]

**[作者简介]** 薛来恩(1992-), 男, 技师, 主要从事实验动物营养学研究。E-mail: 137992781@qq.com

**[通信作者]** 郑和平(1962-), 男, 教授, 主要从事比较医学研究。E-mail: zhpzf@163.com

灭菌时间为 7 min。为此,文本以鼠维持饲料为研究对象,分别采用参数为 121 °C、110 kPa、20 min 和 132 °C、193 kPa、7 min 的脉动预真空压力蒸气灭菌方法对鼠维持饲料的灭菌效果及对饲料中部分营养成分含量的影响,分析探究更为理想的灭菌参数和营养成分保持方式。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 饲料来源和分组** 直径 12 mm 的鼠维持饲料,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。取鼠维持饲料随机分为 3 组:对照组、高压灭菌 I 组、高压灭菌 II 组,分别记作 DZ 组、I 组和 II 组,每组 3 份样品,每份样品 200 g,分别装于牛皮纸袋中,布敷料包裹。DZ 组 3 份样品无处理,I 组 3 份样品包内放入 121 °C 化学指示卡,II 组 3 份样品包内放入 132 °C 化学指示卡,一般放入灭菌包中央,3M 指示胶带粘住封口。

**1.1.2 主要仪器和试剂** 脉动真空灭菌器(山东新华医疗器械股份有限公司 XG1.-D 型)、121 °C 和 132 °C 化学指示卡(山东新华医疗器械股份有限公司 16G30 16L27)、3M 指示胶带(11140)。

### 1.2 方法

**1.2.1 灭菌处理** DZ 组饲料 3 份样品放在干燥饲料储藏室,将 I 组和 II 组包装好的饲料放入脉动真空灭菌器,分别采用灭菌参数 121 °C、110 kPa、20 min 和 132 °C、193 kPa、7 min 对 2 组鼠维持饲料样品进行处理。

**1.2.2 化学指示测试** 化学指示卡放置每个样品包的中心,灭菌结束后,马上观察指示卡颜色与标准色对比,颜色变黑超过标准色度,表示灭菌合格,如果化学指示卡颜色比标准色浅,则不合格。用 3M 指示胶带测试脉动真空压力蒸气灭菌器,根据暴露时间与饱和蒸汽的温度而产生不同程度的颜色变化,以灭菌后色泽的变化区别灭菌和未灭菌物品,不能说明灭菌是否合格。

**1.2.3 检测指标测定** 饲料中的主要营养成分、维生素、氨基酸和微生物指标的检测在福建省产品质量检验研究院完成。检测指标按国家标准 GB/T14924.2-2001 和 GB/T14924.3-2010 判断检测指标是否合格。测定饲料样品中常规指标(水

分、粗蛋白、粗脂肪、粗灰分、粗纤维、钙、磷)、氨基酸成分(赖氨酸、蛋氨酸、胱氨酸、精氨酸、组氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、苏氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)、维生素(A、E、B1、B2、B6、B12)及微生物指标项目(菌落总数、大肠杆菌、沙门氏杆菌、霉菌和酵母菌、黄曲霉毒素 B1)。

### 1.3 统计方法

应用 SPSS19.0 软件统计分析,数据均用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析 LSD 法,  $P < 0.05$  表示有统计学差异。

## 2 结果

### 2.1 压力蒸汽灭菌化学指示卡的判定

鼠维持饲料经脉动预真空压力蒸气灭菌后,所有包装内的压力蒸汽灭菌化学指示卡均变色,且颜色均能达到标准黑色以上。结果表示两个灭菌参数的脉动预真空压力蒸气灭菌后每个包装中心位置均达到灭菌条件。

### 2.2 饲料灭菌效果

从表 1 可见,经脉动预真空压力蒸气灭菌锅 121 °C、110 kPa、20 min 组和 132 °C、193 kPa、7 min 组灭菌后,鼠维持饲料的微生物指标项目均未检测出,灭菌效果确实。结果表示经脉动预真空压力蒸气灭菌锅的两组灭菌参数达到鼠维持饲料灭菌效果。

### 2.3 饲料常规营养指标

从表 2 可见,除了粗纤维和磷外,I 组的各常规营养成分损失率都低于 II 组。与 DZ 组比较,I 组粗蛋白、粗脂肪的含量显著下降( $P < 0.05$ );II 组水分、粗蛋白、粗脂肪的含量也有显著下降( $P < 0.05$ )。3 组各常规营养成分含量都符合国家标准,I 组各常规营养成分损失比 II 组少。

表 1 脉动真空灭菌器对鼠维持饲料灭菌效果的影响

| 参 数                            | DZ 组 | I 组 | II 组 |
|--------------------------------|------|-----|------|
| 细菌总数 /CFU · g <sup>-1</sup>    | 950  | —   | —    |
| 大肠菌群 /MPN · 100g <sup>-1</sup> | <30  | —   | —    |
| 沙门菌 /25 g                      | —    | —   | —    |
| 霉菌和酵母 /CFU · g <sup>-1</sup>   | <10  | —   | —    |
| 黄曲霉毒素 B1/μg · kg <sup>-1</sup> | <10  | —   | —    |

注:—表示未被检出。CFU 菌落形成单位指细菌、霉菌、酵母菌等微生物的群落总数,MPN 是指最大或然数来估算细菌浓度的方式

表 2 脉动预真空压力蒸气灭菌对鼠维持饲料常规营养成分含量的影响

| 组别  | DZ 组含量       | I 组           |       | II 组          |       | 国家标准    |
|-----|--------------|---------------|-------|---------------|-------|---------|
|     |              | 含量            | 损失率   | 含量            | 损失率   |         |
| 水分  | 9.59 ± 0.60  | 9.50 ± 0.26   | 0.94  | 8.29 ± 0.09*  | 13.56 | ≤ 10    |
| 粗蛋白 | 20.01 ± 0.27 | 19.08 ± 0.13* | 4.65  | 18.75 ± 0.15* | 6.30  | ≥ 18    |
| 粗脂肪 | 4.88 ± 0.08  | 4.61 ± 0.10*  | 5.53  | 4.40 ± 0.10*  | 9.84  | ≥ 4     |
| 粗纤维 | 4.72 ± 0.08  | 4.60 ± 0.10   | 2.54  | 4.61 ± 0.10   | 2.33  | ≤ 5     |
| 粗灰分 | 6.03 ± 0.35  | 6.07 ± 0.21   | -0.66 | 5.90 ± 0.27   | 2.16  | ≤ 8     |
| 钙   | 1.08 ± 0.16  | 1.08 ± 0.10   | 0.00  | 1.00 ± 0.03   | 7.41  | 1~1.8   |
| 磷   | 0.81 ± 0.04  | 0.79 ± 0.04   | 2.47  | 0.79 ± 0.04   | 2.47  | 0.6~1.2 |

注: 与 DZ 组比较, \* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ ; 下表同

## 2.4 饲料中维生素含量

从表 3 可见, I 组的各维生素损失率都低于 II 组, II 组的维生素 A 低于国家标准。与 DZ 组比较, I 组维生素(A、B1、B6、B12)的含量有显著下降( $P<0.05$ ), 维生素(E、B2)的含量差异不显著( $P>0.05$ ); II 组维生素(A、E、B1、B6、B12)的含量有显著下降( $P<0.05$ ), 维生素B2的含量差异不显著( $P>0.05$ )。I 组维生素含量损失比 II 组少。

## 2.5 氨基酸含量

从表 4 可见, 除了天冬氨酸、丝氨酸和赖氨酸, I 组的各氨基酸损失率都低于 II 组。与 DZ 组比较, I 组苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸的含量显著下降( $P<0.05$ ), II 组苏氨酸、亮氨酸、苯丙氨酸、赖氨酸、组氨酸的含量显著下降( $P<0.05$ )。I 组氨基酸含量损失比 II 组少。

## 3 讨论

压力蒸汽灭菌法是热力灭菌中使用最频繁、效果最可靠的一种灭菌方法, 其原理是在一定压力下利用饱和蒸汽杀灭一切细菌繁殖体、芽孢和病毒。饲料在高温、普通高压蒸汽灭菌过程中, 饲

料中水分损失随着温度升高增大, 导致饲料硬度大, 妨碍鼠的进食。蛋白质在湿、热和压力条件下, 其分子结构极易被打破, 原来的结构发生变化, 从而导致蛋白质变性<sup>[11]</sup>。维生素是具有一定生物活性的化学物质, 通常情况下, 水溶性维生素的稳定性要低于脂溶性维生素。在高温、高湿环境下, 维生素的不饱和碳原子、双键、羟基等结构极易被破坏, 从而导致活性降低, 失去应有的作用<sup>[6]</sup>。饲料中粗蛋白水平与氨基酸的含量是相互制约的, 蛋白质的高温变性将导致氨基酸有不同程度的减少。因此, 在饲料的消毒灭菌过程中, 应考虑到根据营养成分破坏程度采取相应添补问题, 使饲料成为有营养的全价颗粒料。

鼠维持饲料在灭菌参数为 121 °C、110 kPa 温度、压强下, 经 20 min 时间以及在 132 °C、193 kPa、温度、压强下, 经 7 min 时间灭菌后, 压力蒸汽灭菌化学指示卡的判定表明, 每一个包装内的灭菌参数均能达到所设定的灭菌参数; 经微生物指标项目检测表明, 包装内样品灭菌合格。说明在两种灭菌参数下, 灭菌器内所有包装的样品灭菌合格。

经脉动真空灭菌器灭菌后, 两组饲料中各营养指标都有明显变化, 除了粗纤维、磷、天冬

表 3 脉动预真空压力蒸气灭菌对维生素含量的影响

| 组别                                          | DZ 组含量        | I 组           |       | II 组          |       | 国家标准   |
|---------------------------------------------|---------------|---------------|-------|---------------|-------|--------|
|                                             |               | 含量            | 损失率/% | 含量            | 损失率/% |        |
| 维生素 A/10 <sup>4</sup> IU · kg <sup>-1</sup> | 1.08 ± 0.03   | 0.71 ± 0.03*  | 34.26 | 0.68 ± 0.03*  | 37.04 | ≥ 0.7  |
| 维生素 E/mg · kg <sup>-1</sup>                 | 117.00 ± 7.21 | 106.67 ± 7.23 | 8.83  | 95.33 ± 2.08* | 18.52 | ≥ 60   |
| 维生素 B1/mg · kg <sup>-1</sup>                | 48.67 ± 0.97  | 18.43 ± 1.25* | 62.13 | 18.35 ± 0.33* | 62.30 | ≥ 8    |
| 维生素 B2/mg · kg <sup>-1</sup>                | 25.63 ± 0.76  | 25.57 ± 0.78  | 0.23  | 24.57 ± 0.83  | 4.14  | ≥ 10   |
| 维生素 B6/mg · kg <sup>-1</sup>                | 31.53 ± 1.00  | 25.00 ± 0.30* | 20.71 | 24.10 ± 0.62* | 23.56 | ≥ 6    |
| 维生素 B12/mg · kg <sup>-1</sup>               | 15.10 ± 0.26  | 9.35 ± 0.11*  | 38.08 | 9.12 ± 0.13*  | 39.60 | ≥ 0.02 |

表4 脉动真空压力蒸气灭菌对鼠颗粒饲料中氨基酸含量影响

g/kg

| 组别   | DZ组含量        | I组           |       | II组           |       | 国家标准           |
|------|--------------|--------------|-------|---------------|-------|----------------|
|      |              | 含量           | 损失率/% | 含量            | 损失率/% |                |
| 天冬氨酸 | 17.67 ± 0.15 | 17.51 ± 0.21 | 0.91  | 17.58 ± 0.22  | 0.51  | —              |
| 苏氨酸  | 8.30 ± 0.10  | 8.28 ± 0.07  | 0.24  | 8.13 ± 0.06*  | 2.05  | ≥ 6.5          |
| 丝氨酸  | 9.23 ± 0.03  | 9.13 ± 0.09  | 1.08  | 9.16 ± 0.06   | 0.76  | —              |
| 谷氨酸  | 30.62 ± 0.16 | 30.28 ± 0.43 | 1.11  | 30.18 ± 0.31  | 1.44  | —              |
| 甘氨酸  | 9.14 ± 0.13  | 9.03 ± 0.09  | 1.20  | 8.97 ± 0.03   | 1.86  | —              |
| 丙氨酸  | 10.39 ± 0.08 | 10.37 ± 0.03 | 0.19  | 10.21 ± 0.20  | 1.73  | —              |
| 缬氨酸  | 8.52 ± 0.23  | 8.48 ± 0.12  | 0.40  | 8.44 ± 0.10   | 1.98  | ≥ 8.4          |
| 胱氨酸  | 2.53 ± 0.06  | 2.52 ± 0.05  | 0.47  | 2.48 ± 0.12   | 0.94  | (胱氨酸           |
| 蛋氨酸  | 5.40 ± 0.20  | 5.40 ± 0.18  | 0.00  | 5.25 ± 0.06   | 2.78  | + 蛋氨酸) ≥ 5.3   |
| 异亮氨酸 | 7.59 ± 0.03  | 7.61 ± 0.17  | -0.26 | 7.59 ± 0.07   | 0.00  | ≥ 7            |
| 亮氨酸  | 15.01 ± 0.10 | 14.90 ± 0.09 | 0.73  | 14.78 ± 0.03* | 1.53  | ≥ 14.4         |
| 酪氨酸  | 6.69 ± 0.25  | 6.68 ± 0.17  | 0.15  | 6.63 ± 0.11   | 0.90  | (酪氨酸           |
| 苯丙氨酸 | 8.74 ± 0.05  | 8.53 ± 0.13* | 2.40  | 8.47 ± 0.04*  | 3.09  | + 苯丙氨酸) ≥ 11.0 |
| 赖氨酸  | 9.93 ± 0.09  | 8.83 ± 0.09* | 11.08 | 8.85 ± 0.11*  | 10.88 | ≥ 8.2          |
| 组氨酸  | 6.27 ± 0.03  | 6.00 ± 0.08* | 4.31  | 5.97 ± 0.06*  | 4.78  | ≥ 4.0          |
| 精氨酸  | 11.90 ± 0.09 | 11.78 ± 0.08 | 1.01  | 11.78 ± 0.03  | 1.01  | ≥ 9.9          |
| 脯氨酸  | 13.27 ± 0.18 | 13.34 ± 0.09 | -0.53 | 13.19 ± 0.05  | 0.60  | —              |

注：“—”表示未出现在国家标准中

氨酸、丝氨酸和赖氨酸外，灭菌参数为 121℃、110 kPa、20 min 组各营养成分、维生素和氨基酸损失率相对较低；132℃、193 kPa、7 min 组虽然损失相对较高，但除维生素 A，其他指标含量都在国家标准范围内。

本实验结果说明，在实验动物屏障设施中采用脉动真空灭菌器对鼠维持饲料进行灭菌时，建议参数设置为 121℃、114 kPa、20 min，从而减少饲料各营养成分的损失，保证实验动物健康和动物实验数据的可靠性。

#### 参考文献：

- [1] GB14924.2-2001.实验动物配合饲料卫生标准[S].
- [2] GB 14924.3-2010.实验动物配合饲料营养成分[S].
- [3] 秦川. 医学试验动物学[M]. 北京: 人民卫生出版, 2008: 212-225.
- [4] 张希牧, 田永路, 朱德生, 等. 脉动真空灭菌器灭菌效果的评定[J]. 实验动物科学, 2009, 26(6):72-75.
- [5] 郭颖. 脉动真空压力蒸气灭菌应用于医疗器械消毒监测效果的探讨[J]. 临床医药文献杂志, 2018, 5(77):70.
- [6] 林妍. 两种医用蒸汽灭菌器的温度验证及性能比较[J]. 计量与测试技, 2017, 44(11):51-53.
- [7] 方玉萍. 脉动真空压力蒸气灭菌器灭菌效果监测[J]. 中国消毒学杂志, 2014, 31(5):513-514.
- [8] 王可洲, 郭中坤, 李志彦. 2 种灭菌方法对大/小鼠配合饲料中维生素和氨基酸的影响及灭菌效果比较[J]. 饲料研究, 2017, 40(15):41-44.
- [9] 石宝燕, 吴科锋, 李文德, 等. 普通高压灭菌和辐射灭菌对高脂饲料中多不饱和脂肪酸的影响[J]. 饲料研究, 2015, 38(6):68-70.
- [10] 徐龙进, 陆永平, 李志彦. 真空普通高压灭菌等方法在屏障环境实验动物设施灭菌中的应用效果观察[J]. 预防兽医学论坛, 2011, 17(3):234-236.
- [11] 张大维, 邴国强, 甘振威, 等. 不同灭菌方法对实验动物配合颗粒饲料营养成分的影响[J]. 饲料工业, 2012, 33(2):40-43.

# 不同抗凝剂对大鼠血液生化指标测定结果的影响

刘颖, 王铁山, 刘珍清

(北京中医药大学 北京中医药研究院, 北京 100029)

**[摘要]** 目的 观察大鼠血样处理过程中不同抗凝剂对其生化指标的影响。方法 取 21 只 SD 大鼠, 腹主动脉采血并分离得到血清、乙二胺四乙酸(EDTA)-K2 抗凝血浆、肝素钠抗凝血浆和柠檬酸钠抗凝血浆, 采用全自动生化分析仪分别对血清及 3 种血浆样品进行 12 项生化指标的测定, 并进行统计学分析和比较。结果 与血清生化检测值比较, 肝素钠抗凝血浆的肌酐(Cre)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、白蛋白(Alb)均明显降低( $P<0.05$ )、乳酸脱氢酶(LDH)明显升高( $P<0.05$ ), EDTA-K2 抗凝血浆的 AST、LDH、碱性磷酸酶(ALP)均明显降低( $P<0.05$ )、Alb 明显升高( $P<0.05$ ), 柠檬酸钠抗凝血浆的总胆固醇(CHO)、尿素氮(UREA)、Cre、AST、肌酸激酶(CK)、LDH、ALP、总蛋白(TP)、Alb 均明显降低( $P<0.05$ )。3 种抗凝血浆的生化检测值, 部分指标间存在差异。结论 药物临床前研究中, 不同抗凝剂对其生化指标的影响较大。只有部分生化指标的测定可采用肝素钠抗凝血浆和 EDTA 抗凝血浆代替血清。

**[关键词]** 抗凝剂; 血清; 血浆; 生化指标; 大鼠

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0415-03

在药物临床前药理实验、毒理试验中, 血液生化指标的检测结果往往是评判肝脏功能、肾脏功能、糖代谢和脂代谢等是否正常的客观而又灵敏的指标。大鼠, 作为临床前药理 / 毒理试验中的常规实验动物之一, 在中长期实验需要不同时间点采血或药效指标多需要血液量大时, 因其血液量有限而难以满足实验需求。采血液量越小对动物的损伤越小, 符合动物福利原则。因此,

如何采用最少量的血液来获取更多的可靠的检测结果就显得尤为重要。

在采血容器中预置抗凝剂等添加剂已成为血液标本处理的重要手段, 临床研究中常有报道<sup>[1-3]</sup>采用抗凝血浆进行血液生化指标的测定, 节省了分析时间, 改善了临床治疗的及时性。同样, 抗凝血浆的使用将解决临床前检测指标多而血液量少的问题<sup>[4]</sup>。影响大鼠血液生化检测结果的因素有很多<sup>[5]</sup>, 所用抗凝剂的种类将直接影响检验结果的可靠性和准确性。本研究针对正常 SD 大鼠的血清、EDTA-K2 抗凝血浆、柠檬酸钠抗凝血浆和肝素钠抗凝血浆的 12 种生化指标进行了比较, 为 SD 大鼠的血液生化指标检测中抗凝剂的选择提供了参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 21 只, 体质量(200.8 ±

**[收稿日期]** 2019-06-05

**[基金项目]** 北京中医药大学纵向发展基金(2019-ZXFZJJ-052); 北京中医药大学基本科研业务费青年教师项目(2018-JYBZZ-JS025)

**[作者简介]** 刘颖(1979-), 女, 博士, 副研究员, 主要从事中药分析与中药药效物质基础研究。

E-mail: liuyingmeta@163.com

**[通信作者]** 刘珍清, 女, 高级实验师, 主要从事医学检验和中药药效物质基础研究。

E-mail: lzq9876@sina.com

5.2)g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司[SCXK(京)-2016-0006]。同一环境下适应性饲养3 d, 温度( $24.0 \pm 1.0$ ) $^{\circ}\text{C}$ , 相对湿度55%~65%, 动物自由进食, 饮水, 12 h/12 h明暗循环饲养[SYXK(京)2016-0038]。实验开始前动物禁食不禁水12 h。

## 1.2 仪器试剂

AU-480全自动生化分析仪(COULTER)购自美国Beckman公司; DT5-2B低速台式离心机购自北京时代北利离心机有限公司。所有生化检测试剂均购自美国贝克曼库尔特有限公司。

## 1.3 检测指标

生化指标共计12项, 包括: 血糖(Glu)、甘油三酯(TG)、总胆固醇(CHO)、尿素氮(UREA)、肌酐(Cre)、总蛋白(TP)、白蛋白(Alb)、碱性磷酸酶(ALP)、乳酸脱氢酶(LDH)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、肌酸激酶(CK)。

## 1.4 实验方法

21只SD大鼠标号称体质量后, 采用10%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射进行麻醉后, 于腹主动脉取血液, 并采用市售的不含抗凝剂的采血管、涂有肝素钠、柠檬酸钠和EDTA-K2抗凝剂的2 mL的采血管(江苏宇力医疗器械有限公司), 充分混匀, 以3 000 r/min离心15 min, 取出上层血清、血浆并利用全自动生化分析仪分析每只大鼠四种样本的12个生化指标。

## 1.5 统计分析

采取SPSS 16.0统计学软件对于各项数据资料进行分析, 每项指标检测值使用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行配对 $t$ 检验,  $P < 0.05$ 的差异有统计学意义。

# 2 结果

表1数据显示, 与血清生化检测值比较, 肝素钠抗凝血浆的Cre、AST、Alb均明显降低( $P < 0.05$ )、LDH明显升高( $P < 0.05$ ); EDTA-K2抗凝血浆的AST、LDH、ALP均明显降低( $P < 0.05$ )、Alb明显升高( $P < 0.05$ ); 柠檬酸钠抗凝血浆的CHO、UREA、Cre、AST、CK、LDH、ALP、TP、Alb均明显降低( $P < 0.05$ )。

与柠檬酸钠抗凝血浆生化检测值比较, 肝素钠抗凝血浆的TG、CHO、UREA、AST、LDH、ALP、TP、Alb均明显升高( $P < 0.05$ ); EDTA-K2抗凝血浆的CHO、UREA、AST、ALT、CK、LDH、ALP、TP、Alb均明显升高( $P < 0.05$ )。

与EDTA-K2抗凝血浆的生化检测值比较, 肝素钠抗凝血浆的LDH、ALP均明显升高( $P < 0.05$ ), Alb明显降低( $P < 0.05$ )。

# 3 讨论

医学实验室检查是疾病诊治过程的一个重要环节, 其目的是通过各种离体成分的检测提供全

表1 血清和抗凝血浆的生化检测值比较

| 指 标                                      | 血清                 | 柠檬酸钠                        | EDTA-K2                     | 肝素钠                          |
|------------------------------------------|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|
| Glu/mm $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  | $3.35 \pm 1.12$    | $3.38 \pm 0.63$             | $3.40 \pm 0.65$             | $3.11 \pm 1.34$              |
| TG/mm $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$   | $0.71 \pm 0.26$    | $0.62 \pm 0.23$             | $0.66 \pm 0.25$             | $0.67 \pm 0.27^*$            |
| CHO/mm $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  | $1.85 \pm 0.30$    | $1.55 \pm 0.25^{\Delta}$    | $1.80 \pm 0.27^*$           | $1.80 \pm 0.26^*$            |
| UREA/mm $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | $5.26 \pm 0.97$    | $4.44 \pm 0.79^{\Delta}$    | $5.18 \pm 0.97^*$           | $5.18 \pm 1.04^*$            |
| Cre/ $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ | $14.74 \pm 2.76$   | $12.56 \pm 3.32^{\Delta}$   | $13.51 \pm 2.98$            | $12.53 \pm 3.34^{\Delta}$    |
| AST/U $\cdot \text{L}^{-1}$              | $143.47 \pm 17.43$ | $78.58 \pm 5.35^{\Delta}$   | $90.91 \pm 5.87^{\Delta}$   | $92.51 \pm 8.07^{\Delta}$    |
| ALT/U $\cdot \text{L}^{-1}$              | $40.95 \pm 9.31$   | $39.43 \pm 7.10$            | $43.10 \pm 8.34^*$          | $41.10 \pm 6.55$             |
| CK/U $\cdot \text{L}^{-1}$               | $265.42 \pm 55.26$ | $242.63 \pm 96.68^{\Delta}$ | $265.26 \pm 82.47^*$        | $257.81 \pm 86.43$           |
| LDH/U $\cdot \text{L}^{-1}$              | $179.48 \pm 37.40$ | $107.62 \pm 39.15^{\Delta}$ | $137.67 \pm 42.23^{\Delta}$ | $234.62 \pm 52.19^{*\Delta}$ |
| ALP/U $\cdot \text{L}^{-1}$              | $252.74 \pm 41.73$ | $211.31 \pm 40.05^{\Delta}$ | $2.32 \pm 1.13^{\Delta}$    | $251.18 \pm 46.68^{*\Delta}$ |
| TP/g $\cdot \text{L}^{-1}$               | $53.29 \pm 2.91$   | $47.98 \pm 2.12^{\Delta}$   | $53.98 \pm 2.53^*$          | $53.53 \pm 2.24^*$           |
| Alb/g $\cdot \text{L}^{-1}$              | $27.12 \pm 1.01$   | $24.73 \pm 0.73^{\Delta}$   | $27.82 \pm 1.21^{\Delta}$   | $26.41 \pm 0.99^{*\Delta}$   |

注: 与血清比较,  $^{\Delta}P < 0.05$ ; 与柠檬酸钠抗凝血浆比较,  $^*P < 0.05$ ; 与EDTA-K2抗凝血浆比较,  $^{*}P < 0.05$ ;  $n=21$

面、准确的机体状态信息。随着检验技术的不断进步,对血液标本的要求也越来越高。如何准确规范地使用抗凝剂是实验室全面质量管理的重要内容之一。2002 年 WHO 文件<sup>[6]</sup>《实验室检查中抗凝剂的使用》中强调:使用抗凝血浆可避免血液中待测成分的改变,与血清比较,其成分能更好反映机体状态,因此部分实验室检查推荐首选血浆。该文件中列举了血液标本 317 项指标,将血液标本分为推荐、可用、限制性使用和不宜使用 4 类。推荐使用血浆 56 项,其中肝素抗凝血浆 13 项,EDTA 抗凝血浆 17 项,柠檬酸盐抗凝血浆 26 项;推荐使用全血液 47 项,其中肝素抗凝全血液 7 项,EDTA 抗凝全血液 37 项,柠檬酸盐抗凝全血液 3 项;推荐使用血清的项目仅有 8 项;尚有 204 项血清或血浆均可使用。本研究中涉及到的 12 项生化指标,肝素抗凝血浆中除 Glu 为限制性使用全血液外,其余指标均为推荐或可用;EDTA 抗凝血浆中,除 Alb 和 ALP 为限制性使用或不宜使用, Glu 建议使用全血液外,其余指标均为可用。

抗凝剂因成分和抗凝机制的不同,对结果可产生不同的影响。ALP 是一种含锌的糖蛋白,柠檬酸盐和 EDTA 能够与锌产生络合物,从而抑制 ALP 的活性,造成本研究中 EDTA 抗凝血浆和柠檬酸钠抗凝血浆的 ALP 检测值偏低。

目前,临床前动物实验中仍普遍使用血清进行生化指标测定<sup>[7,8]</sup>。针对中药的多成分、多活性和多靶点的特点,临床前实验中,大鼠的药效指标设计较多而大鼠血液量相对较少,且大多药

效指标的检测需要抗凝血浆。因此,生化指标的检测若能用抗凝血浆代替血清,药效指标和生化检测指标采用同一份血浆,将解决实验指标多而血液量少的问题。当出现检测指标多而血液量不足时,依据《实验室检查中抗凝剂的使用》<sup>[6]</sup>和本研究的检测结果,部分检测项目可考虑采用肝素钠抗凝血浆和 EDTA 抗凝血浆代替血清进行生化指标测定。

### 参考文献:

- [1] 曹万惠,文建,饶绍琴,等. 常规生化检测项目血清与血浆的对比分析[J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(1):35-36.
- [2] 刘刚. 肝素抗凝血浆在急诊生化检验中的应用可行性分析[J]. 临床检验杂志:电子版, 2019, 8(1):139.
- [3] 程薇莉,丁茗敏,王春妮,等. 肝素钠抗凝血浆检测 10 项生化指标的结果比较[J]. 实用医药杂志, 2007, 24(9): 1065.
- [4] 张素才,安丰俊,彭霞,等. 不同血样处理方式对大鼠部分血生化指标的影响[J]. 中国新药杂志, 2017, 26(12): 1439-1442.
- [5] 李红,张维,敬海明,等. 大鼠血液生化检测结果的影响因素[J]. 医学动物防制, 2019, 35(6):567-569.
- [6] World Health Organization. Use of Anticoagulants in diagnostic laboratory investigations [S]. 2002.
- [7] Hall RL. Clinical pathology for preclinical safety assessment: current global guidelines [J]. Toxicol Pathol, 1992, 20(3): 472-476.
- [8] Weingand K, Brown G, Hall R, et al. Harmonization of animal clinical pathology testing in toxicity and safety studies[J]. Fundam Appl Toxicol, 1996, 29(2):198-201.

(下转第 422 页)

# 实验动物职业过敏症的研究进展

郑茂恩<sup>1,2</sup>, 杨春红<sup>1,2</sup>, 王可洲<sup>1</sup>, 刘涛<sup>1,2</sup>, 赵元东<sup>3</sup>

(1. 山东省实验动物中心, 济南 250002;

2. 济南朋悦实验动物繁育有限公司, 济南 250200;

3. 山东大学, 济南 250100)

**[摘要]** 实验动物过敏症(LAA)是实验动物行业面临的一种新的职业健康危机, 已经影响到实验动物从业人员的职业健康安全。本文从国内外对实验动物从业人员过敏症状, 研究方法, 影响因素和防护措施等方面进行简要综述。

**[关键词]** 实验动物过敏症(LAA); 防护; 职业健康; 生物安全

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2019)05-0418-05

实验动物过敏症(laboratory animal allergy, LAA)被认定为是一种职业病, 主要导致从业人员呼吸道、皮肤和眼部等的过敏性炎症反应, 实验动物的皮屑、毛发、唾液和粪便等均可成为过敏原, LAA已经影响到实验动物从业人员的职业健康安全, 成为影响健康安全的潜在因素<sup>[1]</sup>。

LAA是实验动物行业面临的一种新的职业健康危机, 直至 Sorrell 等<sup>[2]</sup>和 Rajka 等<sup>[3]</sup>分别报道了实验动物(小型猪、大鼠和小鼠)引起的过敏症后, 才开始引起人们对实验动物从业人员健康问题的关注。此后, 国外学者对 LAA 的患病率和常见症状, 与接触数量、接触时间和频率, 个体特异性等因素的关联性进行了大量的研究<sup>[4-8]</sup>。

## 1 国外研究概况

从实验动物应用至今, 获诺贝尔奖项的近 90 位科学家最关注的是实验结果及其在相应领域所取得的成就, 而对于实验动物从业人员的健康问题几乎不曾涉及, 美国“国家职业安全与健康

研究所”在 1989 年认为 LAA 对从业人员具有一定的危险性, 1998 年将 LAA 认定为一种职业病<sup>[9]</sup>。

国外研究<sup>[10,11]</sup>表明, 3/4 的实验动物从业人员有过敏症状, 1/3 的人员出现过职业性过敏, 约 1/10 的症状可能会发展成哮喘, 鼻炎和哮喘是实验动物从业人员中普遍存在, 每年 1 000 名实验动物从业人员中有 2.54 人和 1.56 人会患上鼻炎和哮喘<sup>[12]</sup>。LAA 已经成为波兰实验动物从业人员健康安全的一个重要问题, 有 20.5% 的人员出现过哮喘现象, 11.0% 的人员出现过眼睛过敏症状<sup>[13]</sup>。Jones 等<sup>[14]</sup>在日本通过问卷调查显示, LAA 的患病率为 17.6%, 主要表现为过敏性鼻炎、眼结膜炎和哮喘等症状。Muzembo 等<sup>[15]</sup>对 169 名日本高知医学院受试者进行问卷调查, 评估与实验动物接触的相关性, 结果显示 LAA 的患病率为 17.6%, 大多数为过敏性鼻炎和哮喘症状。Moghtaderi 等<sup>[16]</sup>对 100 名实验动物人员和 50 名对照人员进行了皮肤点刺试验(SPT)和肺部功能试验, 发现 36% 的实验动物从业人员 SPT 结果为阳性, 52 名 LAA 人员中 36 名 SPT 结果为阳性, 12 名肺功能异常的人员中 6 名为 SPT 为阳性。

D'Ovidio 等<sup>[9]</sup>和 Pomés 等<sup>[17]</sup>认为大多数过敏原是蛋白质超家族成员, 至少含 50 种结合或携带疏水性小分子胞外蛋白。随着分子技术的发展, 蛋白芯片技术、高效液相色谱和 X-射线晶体学可以

**[收稿日期]** 2019-04-11

**[作者简介]** 郑茂恩(1982-), 男, 助理研究员, 研究方向: 实验动物模型。E-mail: zhengmaoen@163.com

**[通讯作者]** 赵元东(1971-), 男, 工程师, 研究方向: 实验室设计建造与运行管理。E-mail: zyd@sdu.edu.cn

更好地测定和分析免疫球蛋白 E(IgE), 为过敏原分子反应机制提供详细信息、诊断治疗和预防控制措施。Hollander 等<sup>[18]</sup>对荷兰 8 个动物设施内的 540 名工作人员进行问卷调查, 并进行 SPT、总 IgE 和特异性 IgE 测定, 结果显示人对大鼠和小鼠的过敏率分别为 19% 和 10%, 胸闷症状和总 IgE 水平升高相关。Yoshimura 等<sup>[19]</sup>对北海道大学接触实验啮齿类和兔的 555 名学生和教师进行问卷调查和 IgE 测定, LAA 人员的 IgE 阳性率比其他人员显著升高。Palmberg 等<sup>[20]</sup>对医科大学实验动物的 70 名工作人员进行了 2 年跟踪研究表明, LAA 患病率为 19%。严重暴露 24 个月后会进一步造成肺功能的损伤, 同时嗜酸性细胞、白细胞介素 2(IL-2)和淋巴细胞显著增加, 血液 CD4<sup>+</sup> 细胞和特异性 IgE 蛋白比例降低, 总 IgE 蛋白出现偏高现象。Jennifer 等<sup>[21]</sup>对小鼠上皮细胞和特异性 IgE 小鼠上皮细胞(e71)和尿液(e72)进行了 SPT, 确定实验动物工作者的免疫致敏性, 93% 致敏患者对小鼠蛋白(上皮特异性 IgE 和/或尿特异性 IgE)具有 IgE 阳性, 还观察到 4 种未被鉴定的 IgE 蛋白, 单独的 LAA 诊断测试不能充分识别对小鼠过敏原的敏感性, 未鉴定的 IgE 结合蛋白为诊断测试之间的差异提供了一种可能的解释。在蛋白质印迹中, 观察到 IgE 与已知的小鼠过敏原(Mus m1、Mus m2 和小鼠白蛋白)的结合。

## 2 国内研究情况

国外对 LAA 的研究进展非常迅速, 而国内虽然也有机构专门研究职业过敏性疾病, 但对实验动物引起的职业性过敏症研究报告较少<sup>[22]</sup>, 国内主要通过问卷调查分析实验动物从业人员的健康安全和预防控制, 很少对 LAA 的测定和机制进行深入研究。2013 年, 徐鋈娴等<sup>[23]</sup>对 12 名实验动物从业人员进行了问卷调查和跟踪探访, 阐述了实验动物从业人员的健康安全不但要加强管理和职业教育, 更重要的是加强自我防护。

## 3 防护和控制

动物过敏症应该采取预防和控制方式来降低风险, 控制 LAA 风险主要包括合理的设计和运行

设施, 使用安全的仪器设备, 建立标准的操作规程, 提供个人防护设备, 加强员工培训, 个人卫生, 医学鉴定和预防医学等措施<sup>[24]</sup>。

Larese 等<sup>[25]</sup>研究里亚斯特大学 467 位接触到实验动物的科学人员过敏症的情况和预防措施效果, 发现暴露时间长短和过敏症没有必然的联系, 而经过采取预防措施, LAA 从 2001~2004 年的 25.6% 降低到 2013~2016 年的 8.2%。Lee 等<sup>[26]</sup>在 2016 年对韩国兽医学会 33 名受试者分为过敏组和非过敏组进行了暴露研究, 过敏组对小鼠、马、兔和豚鼠的致敏作用明显高于非过敏组, 对一些动物上皮过敏原的敏感性可能是人口统计学或职业因素, 与动物过敏有关。

职业健康安全等级由所使用的动物、设施安全、暴露强度、持续时间和频率、个人的易感性以及特殊工作场所职业病和职业伤害的历史来决定<sup>[27]</sup>。LAA 是实验动物工作者最普遍的职业健康问题, 通风、空气流动、湿度、清洁消毒等因素都可影响环境中过敏原<sup>[28,29]</sup>, Miller 等<sup>[30]</sup>研究显示, 实验动物设施对健康监测至关重要, 饲养在独立通风笼具(individually ventilated cage, IVC)系统中啮齿类动物可以防止病原体在笼间传播。Straumfors 等<sup>[31]</sup>研究实验动物设施中的 Mus m1(一种来源于小鼠的过敏因子)和 Rat n1(一种来源于大鼠的过敏因子)暴露情况, 发现 IVC 系统中的动物比开放笼中可以有效减少过敏因子水平。Feary 等<sup>[32]</sup>对英国 7 个机构 750 名实验动物工作者通过测量空气中 Mus m1 水平进行了调查, 结果显示 IVC 中 Mus m1 水平低于开放笼; 对接触小鼠低于 3 年的 216 名参与者的进行了统计, 显示 IVC 患者的致敏率(2.4%)相比常规笼养(9.8%)较低。Feistenauer 等<sup>[33]</sup>研究动物设施中的小鼠尿液空气过敏原的健康风险, IVC 房间中过敏原浓度最低, 使用密封的 IVC 可最大限度地减少过敏原暴露水平, 并降低动物设施人员的过敏症。

识别与动物相关的潜在风险并能将其降到最低的可接受程度, 对风险进行评估以建立控制和预防风险的策略。D'Ovidio 等<sup>[34]</sup>使用蛋白质组阵列技术研究环境和职业暴露过敏原的创新方法, 用于评估特定工作场所中对动物过敏原特异性 IgE 响应性的标准方法。Jones<sup>[35]</sup>通过脂质运载蛋白过

敏原如Mus m1作为免疫调节蛋白研究动物过敏原与LAA发展之间的关系表明,它可通过Toll样受体触发先天免疫受体并促进气道性LAA。Federica等<sup>[36]</sup>研究实验动物从业人员气道炎症的生物标志物,对呼出一氧化氮(FeNO)、冷凝物过氧化氢(EBC-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和血清表面活性蛋白A(SP-A)进行测定,结果显示FeNO水平与暴露、致敏和年龄相关,致敏人员的EBC-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>水平高于对照组,在症状中观察到较高(SP-A)水平,但不受暴露,致敏或年龄的影响。LAA暴露和FeNO高水平相关的临床症状的存在应促使实验动物人员进行进一步的医学评估,血清SP-A水平可用于监测从鼻炎到哮喘的进展。

人员化的管理制度和培训措施,加强个人防护装备的管理、管理制度的建设和从业人员培训才可能的减少LAA的发生<sup>[37,38]</sup>。加强实验动物员工培训,严格遵循安全操作程序。个人清洁和保护设备在实验的过敏症中起着至关重要的作用,无论是新入职还是已经入职的员工,个人清洁良好的卫生习惯都可以大大降低致敏的风险。符合规格要求的呼吸面罩、手套、头套、口罩、鞋套和防尘衣等保护设备同样对穿戴人起到有效保护作用,比如N95类防尘面罩等。以上给我们提供了科学的预防措施。

对于长期暴露于实验动物的工作人员,应进行年度筛查,检测出现过敏症状以便采取适当的干预措施<sup>[39]</sup>。预防是减少生物伤害最有效的方法,可以通过建立级别更高的动物安全实验室,比如生物安全水平四级(BL-4)实验室等,减少暴露机会,限制过敏原<sup>[40]</sup>。随着实验动物过敏原接触的减少,员工个体易感性的重要性将被放大。研究接触量与结果之间的关系,阈值接触量及如何控制这些接触量,以及个体易感性的组成部分等,并采取个性化的方法来预防疾病,这将对保护人员健康产生重大影响<sup>[27]</sup>。

## 4 结语

LAA被认定为是一种职业病,已经影响到实验动物从业人员的职业健康安全。美国国际实验动物许可与评估协会(AAALAC)、加拿大实验动物管理委员会(CCAC)以及欧洲实验动物联合会

(FELASA)等机构均把职业健康与安全计划(OHSP)作为一个实验动物饲养管理和使用机构能否被认可的重要评估内容,实验动物从业人员的职业安全与健康是AAALAC认证中的关键点之一。

实验动物从业人员职业健康安全涉及环境职业卫生、公共卫生、毒理学、流行病学、疾病学、健康社会学和科技与社会等诸多领域。鉴于国内实验动物科学快速发展,实验动物从业人员的数量越来越多,制定合理科学的诊断措施和治疗方法预防和控制LAA和传播途径。对于LAA,不仅要进行培训和风险评估,更重要的是进行预防<sup>[30]</sup>,有效控制过敏原和减少自身暴露是预防最有利的措施。职业健康安全不仅反映了整个单位的运行情况和责任,也反映了整个行业的健康发展,同时也反映了整个社会的经济效益和健康安全意识。

## 参考文献:

- [1] 田燕超,吕京,谢景欣,等.实验动物机构从业人员的职业健康安全要求[J].中国卫生工程学,2015,14(4):289-292.
- [2] Sorrel AH, Gottesman J. Mouse allergy: Case report[J]. Ann Allergy, 1957, 15:662-663.
- [3] Rajka G. Ten cases of occupational hypersensitivity to laboratory animals [J]. Acta Allergol, 1961, 15(2):168-176.
- [4] Beeson MF, Dewdney JM, Edwards RG, et al. Prevalence and diagnosis of laboratory animal allergy[J]. Clin Allergy, 1983, 13(5):433-442.
- [5] Venables KM, Upton JL, Hawkins ER, et al. Smoking, atopy, and laboratory animal allergy[J]. Occup Environ Med, 1988, 45(10):667-671.
- [6] Aoyama K, Ueda A, Manda F, et al. Allergy to laboratory animals: an epidemiological study[J]. Br J Ind Med, 1992, 49(1):41-47.
- [7] Kruize H, Post W, Heederik D, et al. Respiratory allergy in laboratory animal workers: A retrospective cohort study using pre-employment screening data[J]. Occup Environ Med, 1997, 54(11):830-835.
- [8] Ferraz E, Arruda LK, Bagatin E, et al. Laboratory animals and respiratory allergies: The prevalence of allergies among laboratory animal workers and the need for prophylaxis [J]. Clinics (So Paulo, Brazil), 2013, 68(6):750-759.
- [9] D'Ovidio MC, Martini A, Melis P, et al. Value of the microarray for the study of Laboratory Animal Allergy (LAA)[J]. G Ital Med Lav Ergon, 2011,33(2):109-116.

- [10] Gordon S, Preece R. Prevention of laboratory animal allergy [J]. *Occup Med*, 2003, 53(6):371-377.
- [11] Bush R K. Assessment and treatment of laboratory animal allergy[J]. *ILAR J*, 2001, 42(1):55-64.
- [12] Draper A, Newman Taylor A, Cullinan P. Estimating the incidence of occupational asthma and rhinitis from laboratory animal allergens in the UK, 1999-2000[J]. *Occup Environ Med*, 2003, 60(8):604-605.
- [13] Krakowiak A, Wiszniewska M, Krawczyk P, et al. Risk factors associated with airway allergic diseases from exposure to laboratory animal allergens among veterinarians[J]. *Int Arch Occup Environ Health*, 2007, 80 (6):465-475.
- [14] Jones M, Schofield S, Jeal H, et al. Respiratory protective equipment reduces occurrence of sensitization to laboratory animals[J]. *Occup Med*, 2014, 64(2):104-108.
- [15] Muzembo BA, Eitoku M, Inaoka Y, et al. Prevalence of occupational allergy in medical researchers exposed to laboratory animals[J]. *Ind Health*, 2014, 52(3):256-261.
- [16] Moghtaderi M, Farjadian S, Abbaszadeh Hasiri M. Animal allergen sensitization in veterinarians and laboratory animal workers[J]. *Occup Med*, 2014, 64(7):516-520.
- [17] Pomés A, Chruszcz M, Gustchina A, et al. 100 Years Later: celebrating the contributions of X-ray crystallography to allergy and clinical immunology[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2015, 136(1):29-37.e10.
- [18] Hollander A, Doekes G, Heederik D. Cat and dog allergy and total IgE as risk factors of laboratory animal allergy[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 1996, 98(3):545-554.
- [19] Yoshimura A, Musashi M, Kaneko T, et al. Sensitization to laboratory animal allergens among students and researchers exposed to laboratory rodents in Hokkaido university [J]. *Arerugi*, 2014, 63(8):1132-1139.
- [20] Palmberg L, Sundblad BM, Lindberg A, et al. Long term effect and allergic sensitization in newly employed workers in laboratory animal facilities[J]. *Respir Med*, 2015, 109 (9):1164-1173.
- [21] Canizales J, Feary J, Cullinan P, et al. Investigating discordance between diagnostic tests for laboratory animal allergy [J]. *J Allerg Clin Immunol*, 2019, 143(2), Supplement, Page AB193.
- [22] 白杰英, 姚晓兰, 曾林. 实验动物致敏研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2009, 27(2):153-156.
- [23] 徐盛娟, 马小琴. 实验动物从业人员职业伤害体验的质性研究[J]. *浙江中医药大学学报*, 2014(8):1027-1030.
- [24] National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (Eight Edition) [M]. Washington: National Academy of Sciences, 2011.
- [25] Larese Filon F, Drusian A, Mauro M, et al. Laboratory animal allergy reduction from 2001 to 2016: An intervention study[J]. *Respir Med*, 2018, 136:71-76.
- [26] Lee S M, Shim J W, Park H S, et al. Prevalence of animal allergy in Korean veterinarians and veterinary researchers [J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2017, AB155.
- [27] Feary J, Cullinan P. Laboratory animal allergy: a new world [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2016, 16(2):107-112.
- [28] 汪晖, 沈智, 庞万勇. 浅论与实验动物相关的职业健康安全与人畜共患病[J]. *中国比较医学杂志*, 2010, 20(4): 1-4.
- [29] 陆嘉琦, 王建飞. 《浅谈“员工职业健康和安全计划”在实验动物饲养管理和使用中的必要性》[J]. *实验动物与比较医学*, 2013, 33(4):365-370.
- [30] Miller M, Ritter B, Zorn J, et al. Exhaust air dust monitoring is superior to soiled bedding sentinels for the detection of *Pasteurella pneumotropica* in individually ventilated cage systems[J]. *J Amer Assoc Lab Anim Sci*, 2016, 55(6):775-781.
- [31] Straumfors A, Eduard W, Andresen K, et al. Predictors for increased and reduced rat and mouse allergen exposure in laboratory animal facilities[J]. *Ann Work Exposures Health*, 2018, 62(8):953-965.
- [32] Feary JR, Schofield SJ, Canizales J, et al. Laboratory animal allergy is preventable in modern research facilities[J]. *Eur Resp J*, 2019, 53(6).pii:1900171.
- [33] Feistenauer S, Sander I, Schmidt J, et al. Influence of 5 different caging types and the use of cage-changing stations on mouse allergen exposure[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2014, 53(4):356-363.
- [34] D'Ovidio MC, Wirz A, Zennaro D, et al. Biological occupational allergy: Protein microarray for the study of laboratory animal allergy(LAA) [J]. *AIMS Public Health*, 2018, 5(4):352-365.
- [35] Jones M. Laboratory animal allergy in the modern era[J]. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2015, 15(12):73.
- [36] Federica T, Luisella S, Matteo G, et al. Biomarkers of respiratory allergy in laboratory animal care workers: an observational study[J]. *Int Arch Occup Environ Health*, 2018, 91(6):735-744.
- [37] 邵奇鸣, 窦木林. 实验动物设施的职业健康管理体系的建立与实施初探[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(8):1-6.
- [38] 宋志刚, 刘芳, 任晓楠, 等. 实验动物从业人员环境健康安全管理体系中生物安全培训的重要性[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(8):7-11.
- [39] National Research Council. Occupational Health and Safety in the Care and Use of Research Animals [M]. Washington: National Academy of Sciences, 1997.
- [40] U.S. Department of Health and Human Services. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories [M]. Washington: U.S. Government Printing Office, 2007.

## Research Progress on Occupational Allergy of Laboratory Animal

ZHENG Mao-en, YANG Chun-hong, WANG Ke-zhou, LIU Tao, ZHAO Yuan-dong

(1. Shandong Province Laboratory Animal Center, Jinan 250002, China;

2. Jinan Pengyue Laboratory Animal Breeding Co., Ltd., Jinan 250200, China;

3. Shandong University, Jinan 250100, China)

**[Abstract]** Laboratory animal allergy is a new occupational health crisis in the laboratory animal industry, which has affected the occupational health and safety of laboratory animal practitioners. This article describes in detail the allergic symptoms, research methods, influencing factors and protection of laboratory animal practitioners.

**[Key words]** Laboratory animal allergy; Protection; Occupational health; Biosafety

\*\*\*\*\*

(上接第 417 页)

## Effects of Different Anticoagulants for Blood Sample Treatment Methods on Biochemical Indexes of Rats

LIU Ying, WANG Tie-shan, LIU Zhen-qing

(Beijing Institute of Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

**[Abstract] Objective** To investigate the impact on the biochemical indexes of SD rats through different anticoagulants for blood sample treatment. **Methods** Twenty-one SD rats were used for this study. Blood sample was collected from the abdominal aorta and isolated to obtain serum as control, and plasma samples with EDTA-K2 anticoagulant, heparin sodium anticoagulant, and sodium citrate anticoagulant. Twelve biochemical indexes were measured for all the samples by automatic biochemical analyzer. Statistical analysis were performed. **Results** Compared with control serum, creatinine (Cre), aspartate amino transferase (AST), albumin (Alb) in sodium citrate anticoagulant plasma were significantly lower ( $P<0.05$ ), lactate dehydrogenase (LDH) was increased significantly ( $P<0.05$ ), and AST, LDH, alkaline phosphatase (ALP) in EDTA-K2 anticoagulant blood plasma were significantly lower ( $P<0.05$ ), Alb was increased significantly ( $P<0.05$ ), and total cholesterol (CHO), urea nitrogen (UREA), Cre, AST, creatine kinase (CK), LDH, ALP, total protein (TP), and Alb were significantly decreased after treatment with sodium citrate ( $P<0.05$ ). There were differences in some biochemical indexes among the three anticoagulant plasmas. **Conclusion** In the preclinical study, different anticoagulants have a profound influence on their biochemical indexes. Therefore, only partial biochemical indexes can be determined by using heparin sodium anticoagulant plasma and EDTA anticoagulant plasma instead of serum.

**[Key words]** Anticoagulant; Serum; Plasma; Biochemical index; Rat