

层流柜 & 隔离器

- ※ 独立送排风，形成与动物房隔离的动物饲养空间，有效控制病原微生物感染；
- ※ 可繁育饲养 SPF 级实验大小鼠、免疫缺陷动物、模式动物；
- ※ 隔离器 Isolator 采用传递桶、长袖操作手套实现物料传递和更换笼盒垫料、水瓶；
- ※ IVU 通过 PVC 密封拉链实现快捷换笼操作，提高工作效率；
- ※ 推荐管道式自动饮水系统，提高动物饲养密度，确保动物饮水安全；



苏州市苏杭科技器材有限公司

SUZHOU SUHANG TECHNOLOGY EQUIPMENT CO.,LTD.

开纯
KAICHUN

生物医药研发机构
大型制药企业/CRO企业/药物安全评价中心
全国知名高等院校
综合性大学/医药农林类大学及其他
生命科学研究机构
生命科学相关研究院/研究所
医疗卫生机构及其他
大型医院/疾控中心/出入境检测机构



KAICHUN



上海开纯洁净室技术工程有限公司

SHANGHAI KAICHUN CLEAN-ROOM TECH. CO., LTD.

【创新】 【卓越】 【达观】 【友善】

基于洁净室技术在现代社会发展中日益凸显的重要作用
始终专注于洁净室技术及其广阔的应用领域
并保持与国内知名高校和科研机构以及美、德、日等先进工业化国家知名企业的良好合作
密切跟踪国内外洁净室技术的最新发展并适时予以吸收和应用
使得公司始终保有充沛的技术活力
以其鲜明的技术特色服务于国内外广大客户



www.shkaichun.cn



SINCE 1965



上海斯莱克实验动物有限责任公司

Shanghai Slac Laboratory Animal Co., Ltd.



专注提供高品质实验动物

服务热线 4008207686

WWW.SLACCAS.COM

中国科学院上海实验动物中心
国家啮齿类实验动物中心（上海）
国家实验兔资源中心

上海灵畅生物科技有限公司
上海普路腾生物科技有限公司
湖南斯莱克景达实验动物有限公司



溶液式实验动物环境控制设备



精准控温调湿

日均温湿度控制精度：温度 $\pm 1^{\circ}\text{C}$ ，
相对湿度 $\pm 5\%$ 。



可节能50%

节能率高达50%，空调配电容量即可
下调50%。



低维护费用

减小中、高效过滤负担，延长使用
寿命达一倍以上；显著降低维护成本。



抑菌除尘

有效祛除可吸入颗粒物，并对常见
病菌杀灭率高达99%。

北京华创瑞风空调科技有限公司

官方网站：www.sinorefine.com.cn

联系电话：010-62662762/62662862

公司地址：北京市海淀区中关村东路清华科技园3号楼1005B



广告

苏净节能科技—空气净化与生物安全专家

科技成就梦想、创新引领未来



苏净集团

为您提供实验动物领域
空气净化 节能环保整体解决方案

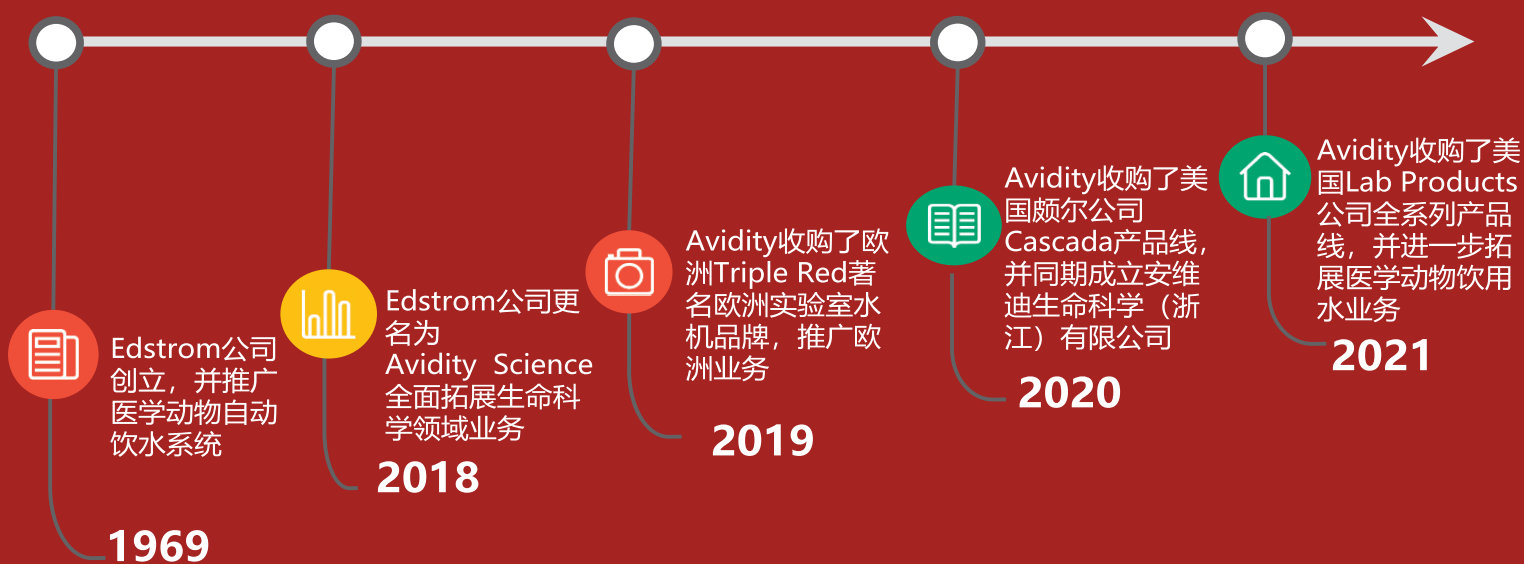
江苏苏净集团苏州苏净节能科技有限公司 网址：www.sujingjn.com

地址：苏州工业园区中新科技城唯新路2号 电话/传真：0512-62652919

AVIDITY

SCIENCE

我们拼尽全力，努力做到极致
只为
遇见更好的你



安维迪生命科学（浙江）有限公司

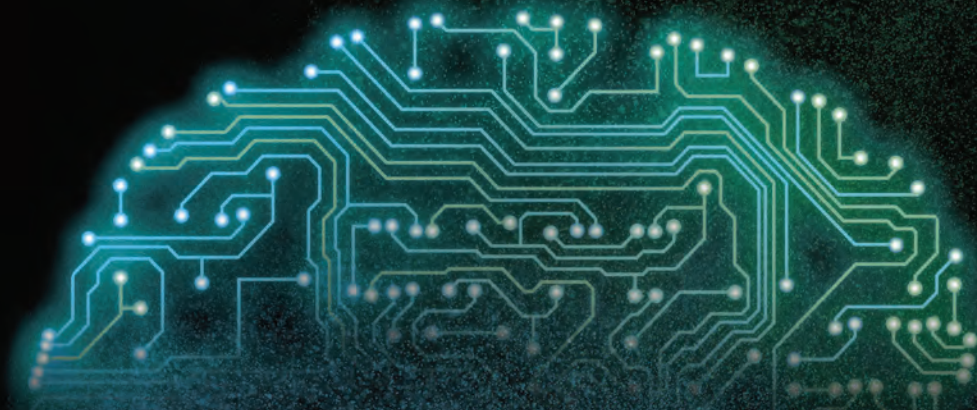
中国嘉兴经济技术开发区 万国路1332号F幢

www.avidityscience.com.cn

电话：0573-82828199



TECNIPLAST
innovation through passion



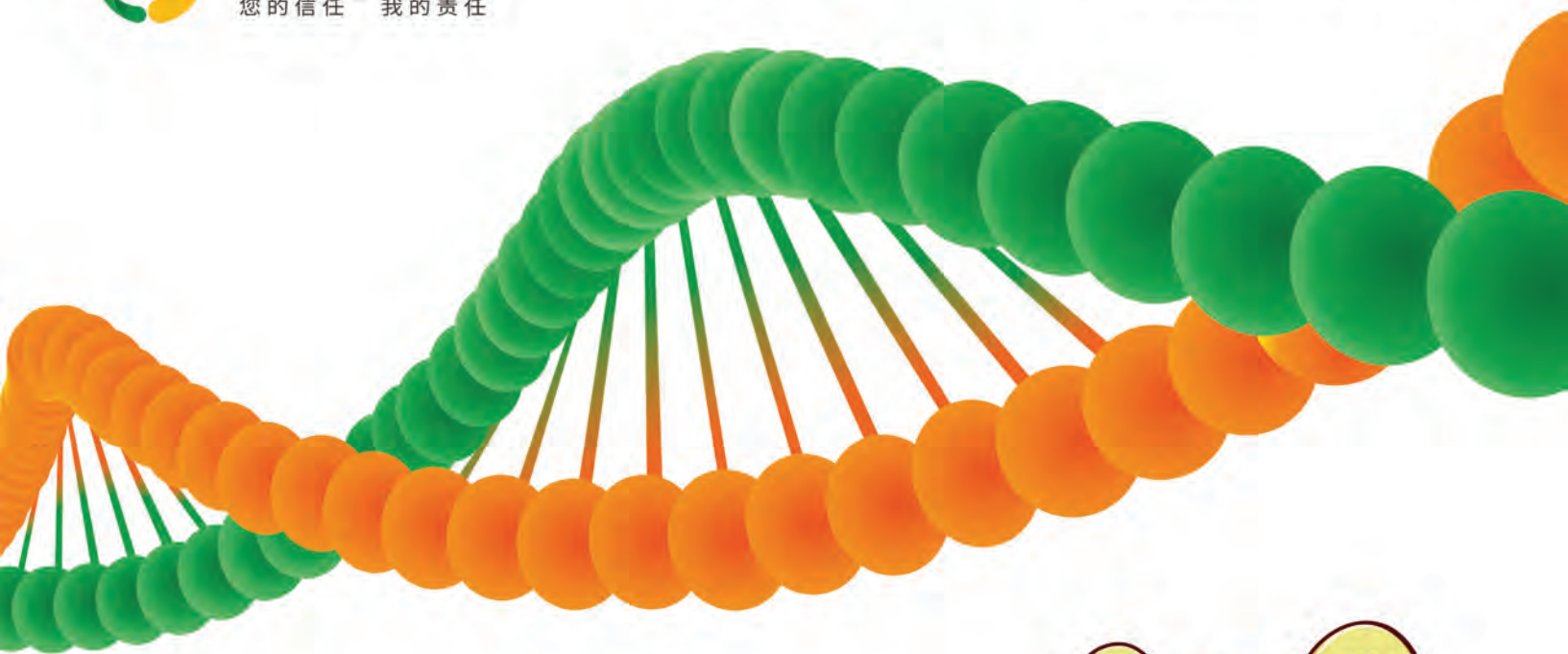
THE BRAIN FOR YOUR CAGES

Living in the Digital Cage.
Technology to transform cage data collection into improved animal care!

DVC™ is a Tecniplast trademark.



Find more on www.tecniplast.it



专注实验动物营养23年 您身边的实验动物营养师

秉承“为好客户做好产品”的经营理念
 专注实验动物食品的研发、生产、销售
 通过ISO9001:2015质量管理体系认证
 通过ISO14001:2015环境管理体系认证
 通过ISO22000:2005食品安全管理体系认证



免疫缺陷实验鼠饲料
(颗粒)



免疫缺陷实验鼠饲料 (双层包装)



免疫缺陷实验鼠饲料 (铝箔包装)

地址：江苏省南京市江宁区谷里街道谷里工业园聚缘路11号
 电话：025-87133770 QQ: 3620741353
 网址：www.jsxtsw.com



微信公众号



淘宝店铺

《实验动物与比较医学》第六届编辑委员会

The Editorial Board of *Laboratory Animal and Comparative Medicine*

顾问：(按姓氏汉语拼音为序)

窦如海 漆畹生 尹松林

主编：高 诚

副主编：(按姓氏汉语拼音为序)

陈洪岩 陈洛南 陈学进 代解杰 顾为望 富群华
高 翔 贺争鸣 黄 韧 李根平 刘恩岐 秦 川
徐 平 薛智谋 燕顺生 姚 明

编委：(按姓氏汉语拼音为序)

常 艳	陈国强	陈国元	陈 来	陈 丽	陈立军
陈民利	陈振文	褚 芳	崔淑芳	杜小燕	韩凌霞
胡 樱	冷 颖	李建军	李 娜	李善刚	李 珪
刘吉宏	刘忠华	卢 静	陆彩霞	陆嘉琦	马 璟
潘学营	邵义祥	师长宏	宋国华	宋晓明	孙兆增
唐利军	唐小江	唐 瑛	陶元清	王纯耀	王德军
王 刚	王福金	王靖宇	王玉娥	王可洲	王胜昌
汪思应	王 萧	王 勇	魏建军	魏 强	吴宝金
吴 强	夏长友	肖 杭	谢家骏	谢建云	邢凤英
邢正弘	徐 彭	徐艺玫	薛整风	闫明霞	杨 斐
杨建业	杨伟敏	应华忠	袁 进	恽时锋	张 泉
张永斌	张 钰	张 周	赵 静	赵四海	郑和平
郑志红	周光兴	周 洁	周文江	周正宇	朱顺星

王建飞 (加拿大) Kathryn Bayne (美国)

Judy MacArthur Clark (英国)

实验动物与比较医学



期刊网站

Shiyan Dongwu Yu Bijiao Yixue

双月刊 1981年9月创刊 第41卷 第2期(总第186期)

2021年4月25日出版

主 管

上海科学院

主 办

上海市实验动物学会

上海实验动物研究中心

编 辑

《实验动物与比较医学》编辑委员会

主 编

高 诚

出 版

《实验动物与比较医学》编辑部

地址: 上海市金科路3577号

邮编: 201203

电话: 021-50793657

E-mail: bjb50793657@163.com

网址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>

编辑部负责人

富群华

印 刷

上海新开宝商务印刷有限公司

发 行

上海市报刊发行局

范围: 国内公开发行

邮发代号: 4-789

零 售

《实验动物与比较医学》编辑部

201203, 上海市金科路3577号

电话: 021-50793657

联系人: 王伟民

定 价

每期10.00元, 全年60.00元

中国标准连续出版物号

ISSN 1674-5817

CN 31-1954/Q

版权声明

2021年版权归《实验动物与比较医学》编辑委员会所有, 未经授权, 不得转载、摘编本刊文章。

除非特别说明, 本刊刊出的所有文章

不代表上海市实验动物学会、上海实验动物研究中心和《实验动物与比较医学》编辑委员会的观点。

如有印刷或装订质量问题, 请向本刊编辑部调换。

目 次

创刊40周年专家论坛

基于能力提升的我国实验动物资源发展愿景

贺争鸣85

论著: 实验动物与医疗技术

利用基质胶阻断门静脉建立改良ALPPS手术小鼠模型

沈 皓, 陈 瑶, 沈 锋, 吴孟超91

大鼠尾椎间盘不同切片方式及染色方法的组织学观察比较

赵宇朋, 周平辉, 官建中100

论著: 人类疾病动物模型

免疫功能正常的HBV cccDNA小鼠模型用于苦参碱和青蒿素抑制

HBV的药效评价

伍 悦, 吕小琴, 刘 阳, 向 霞, 赵中华, 徐如青, 潘朔寒,

何明忠, 张华堂, 赖国旗108

皮肤光老化小鼠模型的构建及效果评估

孔 悦, 郭 砚116

肝螺旋杆菌感染促进高脂饲料诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝病进展

沈 宸, 吴志浩, 殷 俊, 朱立麒, 张 泉122

1型糖尿病早期大鼠空肠的神经功能及组织形态学变化

王 嫚, 祇明花, 耿旭芳, 佟苗苗, 梁红玉, 赵 丁131

五苓散对高脂血症模型贵州小型猪的治疗作用

张 慧, 吴延军, 姚 瑾, 陆涛峰, 王郭琦, 赵 海, 姚 刚,

吴曙光138

一种大鼠跑台抗阻训练模型的构建

蔺海旗, 王 震, 林文强143

论著: 实验动物资源

树鼩脊髓微血管内皮细胞的分离培养及EV71感染实验

施梅言, 王 璇, 王文广, 阮蕾颖, 代解杰148

几种常用免疫缺陷小鼠的血液学及血液淋巴细胞亚群的测定与比较分析

谈小倩, 瞿伟, 李亮, 钱珍, 顾坚忠, 徐平 155

实验动物设施与技术

溶液式环境控制设备在实验动物设施中的应用

张婷, 陈亮亮, 李海翔, 黄发洲, 蔡武凯 161

教育培训实践

医院科研工作中开展实验动物福利伦理教育的探索

余飞, 钱丽萍, 沙莉莉 166

创刊 40 周年专题: 期刊发展

《实验动物与比较医学》创刊40年重点文献回顾(续)

高诚 169

综 述

小鼠树突状细胞亚群分类及其比较研究进展

阮蕾颖, 孙晓梅 174

《实验动物与比较医学》第六届编辑委员会 前插 10

《实验动物与比较医学》首届优秀论文和优秀审稿人获奖名单 英文目次后插页

《实验动物与比较医学》稿约 附 1

《实验动物与比较医学》杂志有关作者投稿的说明 90

致谢本刊支持单位 99

广告 封二, 前插 1~9, 封三, 封底

期刊基本参数: CN 31-1954/Q*1981*b* 大 16*96*zh*P*¥10.00*2000*15*2021-04

本期执行主编 徐平

本期审稿专家 陈方明 陈国元 陈民利 高诚 高世乐 李焱 娄淑杰

倪士峰 钱帅伟 施恩 孙德明 孙侠 王丹 王玉珏

魏强 吴宝金 谢家骏 谢建云 徐平 姚明 张周

郑和平 周光兴 (以姓氏拼音排序)

本期责任编辑 张俊彦 富群华

责任排版 王伟民

中英文校对 丁宇菁 陶启辰 王安娜 朱德才

LABORATORY ANIMAL AND COMPARATIVE MEDICINE

Bimonthly

Established in September, 1981

Volume 41, Issue 2

April 25, 2021

Directed by

Shanghai Academy of Science and
Technology

Sponsored by

Shanghai Laboratory Animal Science
Association
Shanghai Laboratory Animal Research
Center

Edited by

Editorial Board of *Laboratory Animal
and Comparative Medicine*

Editor-in-Chief

GAO Cheng

Published by

Editorial Office of *Laboratory Animal
and Comparative Medicine*
3577 Jinke Road, Pudong District,
Shanghai 201203, China
Tel: 0086-21-50793657
E-mail: bj50793657@163.com
<http://www.slarc.org.cn/dwyx>

Managing Editor

FU Qunhua

Printed by

Shanghai Newcabo Business Printing
Co., Ltd.

Distributed by

Shanghai Postal Bureau of Press Issuing
Postal code: 4-789

Price

RMB 10.00 per issue

CSSN

ISSN 1674-5817

CN 31-1954/Q

Copyright© 2021 by the Editorial

**Board of *Laboratory Animal
and Comparative Medicine***

No content published by the journal of *Laboratory
Animal and Comparative Medicine* may be
reproduced or abridged without authorization.

All articles published represent the opinions of the
authors, and do not reflect the official policy of
the Editorial Board of *Laboratory Animal and
Comparative Medicine*, unless this is clearly
specified.

Executive Editors for This Issue

ZHANG Junyan, FU Qunhua

CONTENTS IN BRIEF

40th Anniversary Expert Forum

Development Vision of Laboratory Animal Resources in China Based on Ability
Improvement

HE Zhengming 85

Laboratory Animal and Medical Technology

A Modified ALPPS Mice Model Based on the Blockade of Portal Vein by Matrigel

SHEN Hao, CHEN Yao, SHEN Feng, WU Mengchao 91

Comparison of Different Slicing and Staining Methods of Caudal Intervertebral Discs
in Rats

ZHAO Yupeng, ZHOU Pinghui, GUAN Jianzhong 100

Original Article: Animal Models of Human Diseases

Application of Immunocompetent HBV cccDNA Mouse Model in the Efficacy
Evaluation of Matrine and Artemisinin on Inhibiting HBV

WU Yue, LÜ Xiaolin, LIU Yang, XIANG Xia, ZHAO Zhonghua, XU Ruqing,
PAN Shuohan, HE Mingzhong, ZHANG Huatang, LAI Guoqi 108

Construction and Evaluation of Skin Photoaging Mouse Model

KONG Yue, GUO Yan 116

Helicobacter hepaticus Infection Promotes High Fat Diet-induced Non-alcoholic
Fatty Liver Disease in Mice

SHEN Chen, WU Zhihao, YIN Jun, ZHU Liqi, ZHANG Quan 122

Jejunal Nerve Regulation and Histomorphological Changes in Rats with
Early Type 1 Diabetes

WANG Man, ZHI Minghua, GENG Xufang, TONG Miaomiao, LIANG Hongyu,
ZHAO Ding 131

Therapeutic Effect of Wuling Powder on Guizhou Mini-pigs of Hyperlipidemia Model

ZHANG Hui, WU Yanjun, YAO Jin, LU Taofeng, WANG Guoqi, ZHAO Hai,
YAO Gang, WU Shuguang 138

Establishment of a Resistance Training Model for Rats

LIN Haiqi, WANG Zhen, LIN Wentao 143

Development of Laboratory Animal Resources

Isolation and Culture of Spinal Microvascular Endothelial Cells of Tree Shrews and
Experimental Study on Infection with Enterovirus 71

SHI Meiyun, WANG Xuan, WANG Wenguang, RUAN Leiying, DAI Jiejie 148

Determination and Comparative Analysis of Hematological Indexes and Percentage of
Lymphocyte Subsets in Several Immunodeficient Mice

TAN Xiaoqian, QU Wei, LI Liang, QIAN Zhen, GU Jianzhong, XU Ping 155

Facilities and Techniques for Laboratory Animals

Application of Liquid Desiccant Environmental Control Equipment in Laboratory
Animal Facilities

ZHANG Ting, CHEN Liangliang, LI Haixiang, HUANG Fazhou, CAI Wukai 161

Review

Classification and Research Progress on Dendritic Cell Subsets in Mice

RUAN Leiying, SUN Xiaomei 174

《实验动物与比较医学》首届(2018—2020年)优秀论文获奖名单

一等奖(3篇)

《三类病毒性新发传染病动物模型的研发及应用进展概述》

李峰,等

《兔VX2肿瘤模型的研究进展》

米金霞,等

《不同浓度四氯化碳诱导小鼠肝纤维化模型的比较》

孙家昌,等

二等奖(6篇)

《慢性不可预知性温和应激致抑郁样大鼠模型的研究进展》

赵谦,等

《冈田酸对斑马鱼幼鱼神经行为功能的影响》

王雪,等

《医学院校实验动物学课程改革的几点建议》

肖春兰,等

《子宫内膜异位症大鼠模型研究进展》

纪莲,等

《灵芝多糖对脂多糖诱导的巨噬细胞TLR4/NF- κ B通路调控及下游炎症因子的影响》

杨燕燕,等

《肿瘤患者来源的异种移植(PDX)模型》

师长宏

优秀奖(20篇)

《骨性关节炎动物模型研究进展》

夏梦熊,等

《实验动物福利伦理审查与监管实践及探索》

鹿双双,等

《斑马鱼作为模式动物在人类眼睛疾病研究中的应用》

邸亚男,等

《一种改良大鼠颅骨缺损动物模型的构建及应用》

张雅雯,等

《骆驼奶对DSS诱导的小鼠急性肠炎的保护作用》

崔畅婉,等

《树鼩肺成纤维细胞的分离、鉴定和传代培养》

王文广,等

《两种小鼠肺癌模型的构建及Micro PET-CT观察》

沈艳,等

《不同浓度含铬垫料对小鼠血液学及脏器的毒性观察》

贾欢欢,等

《套环法和空气干燥法建立兔颈动脉粥样硬化斑块模型的比较分析》

王琮,等

《裸鼠与小鼠抗辐射能力比较研究》

陈超,等

《关于建设我国实验动物福利保障体系的思考》

刘晓宇,等

《内窥镜引导气管注入博来霉素建立小鼠肺纤维化模型》

余华军,等

《高等院校实验动物管理中面临的问题及对策》

李莉,等

《不同部位注射6-羟基多巴胺建立帕金森病大鼠模型比较分析》

黎民,等

《刺山柑果实精制提取物抗类风湿关节炎的实验研究》

周海凤,等

《肥胖大鼠的胰岛素抵抗指数与血脂的相关性观测》

盛译萱,等

《睡眠剥夺对小鼠生长发育影响初探》

张雅荃,等

《动物实验教学中贯彻动物福利理念措施分析》

金成文,等

《栀子苷类药物引起SD大鼠胆红素沉着的案例分析》

周飞,等

《大鼠放射性心脏损伤机制的比较医学意义》

马金柯,等

《实验动物与比较医学》首届(2019—2020年)优秀审稿人获奖名单

陈民利(浙江中医药大学动物实验研究中心)

魏强(中国医学科学院实验动物研究所)

郑和平(联勤保障部队第900医院)

刘月环[浙江省医学科学院(杭州医学院)]

谢家骏(上海中医药大学药物安全评价研究中心)

张钰(广东省实验动物监测所)

谢建云(上海实验动物研究中心)

李舸(广东省实验动物监测所)

白玉(北京诺和诺德医药科技有限公司)

金帆(浙江大学医学院附属妇产科医院)

周正宇(苏州大学实验动物中心)

郝智慧(中国农业大学动物医学院)

李静(复旦大学附属华山医院)

王玉娥(哈尔滨兽医研究所)

寿旗扬(浙江中医药大学)

刘颖(北京中医药大学北京中医药研究院)

魏盛(山东中医药大学)

闫明霞(复旦大学附属肿瘤医院)

陈方明(浙江中医药大学动物实验研究中心)

白玉(华北制药股份有限公司中央研究院)

陈国元(中国科学院分子细胞科学卓越创新中心动物实验技术平台)



贺争鸣 中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所原所长，博士，研究员（二级）。兼任国家实验动物专家委员会副主任委员、国家科技基础条件平台建设专家顾问组专家、第二届全国科技平台标准化技术委员会委员、国家食品药品监督管理局化妆品标准委员会委员、中国合格评定国家认可委员会（China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS）主任评审员，以及北京市实验动物专家委员会主任委员、北京市实验动物标准化技术委员会主任委员、北京实验动物学会理事长等。获全国优秀科技工作者荣誉称号，中国毒理学会联合利华毒理学替代法贡献奖；主持和参与国家和省部级科研项目 / 课题 51 项；获得 6 项国家发明专利。作为主要起草人，制（修）订 23 项国家标准、3 项认证认可行业标准、7 项北京市地方标准和 2 项团体标准；在国内外学术刊物上发表论文 337 篇，其中第一作者 88 篇；主编（或副主编、主审）学术著作 17 部，参编（译）学术著作 27 部。

基于能力提升的我国实验动物资源发展愿景

贺争鸣

（中国食品药品检定研究院，北京 102629）

[摘要] 实验动物是支撑生命科学和生物医药等领域科技创新的重要基础科研条件之一。在我国科技创新呈现出新的快速发展态势下，切实强化实验动物资源的战略地位，准确把握实验动物资源创制模式，进一步完善有利于实验动物资源创制发展的政策体系和运行机制，以及实验动物资源保藏与共享服务平台，对提升实验动物资源服务国家科技创新发展具有重要意义。

[关键词] 实验动物；科技资源；发展愿景

[中图分类号] Q95-33；R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0085-06

Development Vision of Laboratory Animal Resources in China Based on Ability Improvement

HE Zhengming

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

Correspondence to: HE Zhengming, E-mail: Zhengminghe57@163.com

[Abstract] Laboratory animal is one of the important basic scientific research conditions to support the science and technology innovation in the fields of life science and biomedicine. The new and rapid development trend of scientific and technological innovation in China calls for strengthening the strategic position of laboratory animal resources, accurately grasping the creation mode of laboratory animal resources, further improving the policy system and operation mechanism conducive to the creation and development of laboratory animal resources, as well as the service platform for the preservation and sharing of laboratory animal resources, aiming to improve the service level of laboratory animal resources for national scientific and technological innovation.

[Key words] Laboratory animal; Science and technology resources; Development vision

当今，一些发达国家为继续把持世界科技发展的主导权，引领未来科技发展方向，纷纷制定新的科学技术发展战略，而且均将基础科技条件建设作为提升科技创新能力的重要手段置于国家科技发展战略地位^[1]，其中作为基础科研条件之

一的实验动物资源建设受到高度重视。面对生物技术快速发展与广泛应用而带来的实验动物资源创制技术进步和产业化布局的变化，如何在做好我们自己工作的基础上，尽快赶超世界先进水平，这是值得深入思考的。

1 实验动物资源发展的战略定位

在当前大科学和大数据时代,实验动物作为科技创新和经济社会发展的战略性资源,对破解生命科学基础研究和大健康事业发展等领域中重大科学问题起着重要的支撑作用。反之,全面掌握与深入挖掘实验动物资源及其数据也是很多领域研究取得突破和进展的基本保障。欧美主要发达国家在实验动物资源的持续积累和开发利用方面有战略发展部署,政府相关机构支持建立了多个国家实验动物资源库,长期开展实验动物资源研究、资源积累与共享服务^[2]。与此同时,国外一些机构还加强对全球实验动物资源的建设布局 and 收集规划,以确保他们能在未来全球竞争中处于优势地位。因此,我们应深刻把握科技创新发展的新形势和新要求,面向世界科技前沿和国家重大需求,将实验动物资源建设、研究积累和开放共享作为一项根本性工作放在国家科技发展战略的重要地位。并且强化顶层设计和科学规划,加快建设和不断完善我国实验动物资源体系,促进优质实验动物资源综合集成,提升实验动物资源利用效率和开放共享水平,是我国实施创新驱动发展战略和建设世界科技强国的必然要求。

同时我们也应该看到,当前国际政治、经济环境严峻复杂,科研环境的安全性已成为现在和未来需要重点考虑的问题^[3]。拥有自主和完整的实验动物资源体系对国家科研安全将发挥重要作用。因此,实验动物作为科技资源之一业已成为国家科研基础安全体系的一部分。建立达到相当体量和能力并持续稳定发展的实验动物资源库,以及实现资源保藏与共享的国家网络,夯实实验动物资源建设战略安全基础,对维护国家科技创新具有重大意义。

2 实验动物资源发展的新态势

2.1 在生命科学研究和生物技术创新发展中,实验动物的核心要素特性更加凸显

实验动物用于研究人类生命现象,揭示人类生、老、病、死等生命活动规律和生命本质,是生命科学基础研究和现代医学发展的重要生物系统和实验研究载体。医学科学发展的历史是人

类与疾病作斗争的历史,特别是一些波及全球的重大公共卫生事件,如2002—2003年严重急性呼吸综合征(severe acute respiratory syndrome, SARS)疫情,2009—2010年甲型H1N1流感(猪流感)疫情,2014、2017、2018、2019年埃博拉(Ebola)疫情,2015、2016、2018年中东呼吸综合征(middle east respiratory syndrome, MERS)疫情,2015—2016年寨卡(Zika)病毒病和2017年甲型H7N9流感(禽流感)暴发,直至2020年由SARS-CoV-2引起的新型冠状病毒肺炎(coronavirus disease 2019, COVID-19)疫情,给人类健康和世界公共卫生安全带来巨大的威胁,也向人类提出了挑战——如何筛选和加速研发有效药物和疫苗,寻找有针对性的治疗方法,最终战胜疾病^[4]。其中,实验动物不仅作为“人类替身”直接参与到各项医学科研中,为彻底破解疾病之谜、解决人类之难而承受痛苦,而且已成为现代医学科学发展的核心要素,在医学研究成果转化与应用的关键环节扮演着重要角色。例如,研究揭示人类疾病的病因和发病机制、疾病发生发展过程、防控产品和技术,研究开发新药、疫苗、诊断试剂和器官移植等医疗制品,以及开展医学产品安全性评价等,都需要实验动物作为研究的物质基础和技术支撑,达到人类医学研究取得创新突破的目标;这也是现代实验动物科学的核心价值体现,以及实验动物对人类健康和经济社会发展的奉献所在^[5]。

2.2 新技术应用与研究主体融合,快速高效地推动了实验动物资源增量建设

回顾和总结我国实验动物资源发展所取得的成果,不难看出,资源增量与新技术应用的关联紧密。随着现代科学技术的发展,特别是分子生物学、基因组学和蛋白质组学等相关学科理论和技术的应用,实验动物资源研究的广度和深度均得到前所未有的拓展。主要表现为:一是基于动物种群生物学和种群基因组学理论体系的指导,开展资源动物实验动物化、遗传育种、资源保存和标准化等关键技术研究。针对具有重要应用潜质和我国优势资源的动物(野生动物、养殖动物),自主研发了多物种(陆生、水生、两栖等)、多层次(昆虫、鱼类、啮齿类到小型猪

等)的实验动物新资源。二是运用基因修饰、诱发突变、遗传育种、表观遗传学和比较医学等技术,建立系统和稳定的基因编辑动物模型研发体系,以基因组功能、疾病机制与防治、新药创制与安全评价等研究的相关基因为突破点,创建了数百种乃至上千种能够体现人类多基因复杂系统疾病某些特征的基因修饰动物模型。

与此同时,学科和研究领域的深度融合也极大地改变了以往传统的实验动物资源研发模式。主要表现在:一些药物和生物技术研发与评价机构根据自身发展需要,建立了实验动物和动物模型自主创新研发技术平台,在满足自身需要的同时提供模型资源共享和模型创制技术服务;一些以往单纯以实验动物和动物模型研究为主的实验动物生产机构也通过自身转型,或与相关领域研发机构联合的形式转向药物研发等相关领域,由动物模型的提供者逐渐演变为合作者,充分发挥在模型创制方面积累的技术优势,更加精准地推动了实验动物新资源、动物模型的创新及在靶向领域中的应用,从而搭建了基因编辑、动物生产、药物发现与筛选,以及体内外药理药效评价于一体的综合平台,加速了药物研发进程。由此可以看出,新技术应用与新型研究主体的形成催生了科技资源互通共享和成果双向转化的新思路。借助相关学科的研究成果来建立实验动物资源开发的新技术,创新建立新型的研发机构,并不断探索实验动物新资源和动物模型的研发模式,是推动实验动物资源增量发展,满足我国生命科学和生物技术创新发展的重要驱动力。

2.3 国家科技创新与国民健康事业发展,推动了实验动物资源保藏与共享服务平台的建设

面向健康中国战略和国家科技创新战略的重大需求,开发实验动物新资源和建立各种疾病动物模型,对推动我国生命科学和医学科学等相关领域基础研究及科技产业的跨越式发展是一项重要战略举措。近年来,在国家科技计划、重大专项和基金,以及省部会商项目和各地方科技计划项目的支持下,持续加大对实验动物资源平台(库)建设工作的财政投入,初步形成了多渠道、多层次的实验动物资源能力建设局面,有效推进了新品种实验动物开发,以支撑人类重大疾

病防治和新药研发为主的动物模型研究^[6]。

实验动物资源共享和充分利用是科技创新的基础和保障,也是科技创新和经济社会发展的必然要求。在人类重大疾病研究和突发疫情应急状态下,拥有实验动物资源的机构与需要使用实验动物来开展相关研究的机构容易发生“错位”,此时实验动物资源共享的重要性就尤为凸显,如SARS-CoV-2疫苗(简称新冠疫苗)研发与评价中使用的hACE2(human angiotensin-converting enzyme 2,是一种SARS-CoV-2病毒入侵受体)转基因小鼠就是一个实例。作为创建该小鼠模型的主要机构之一,中国食品药品检定研究院无偿为承担科技部新冠疫苗研发应急项目的10家科研机构提供了该小鼠模型,通过这种无条件共享服务,为新冠疫苗研制成功提供了根本保障^[7]。2019年科技部将6个国家实验动物资源库纳入国家科技资源共享服务平台,这些国家资源库承担着实验动物资源保藏与共享服务、管理与安全保障职能,同时开展实验动物新资源和相关技术研究等,不断提升实验动物资源使用效率和共享服务水平^[8]。有理由相信,实验动物资源共享不仅是目前,而且必将是今后国家科技创新发展中一项长远而重要的任务。

2.4 科学研究深度和广度不断拓展,推动了实验动物资源多样性的发展进程

利用高新生物技术和我国动物资源丰富的优势,加强和加快资源动物的开发和实验动物化,提升实验动物资源的丰富度,推动我国实验动物科学的发展,为生命科学等领域的研究提供有效支撑,这一工作非常迫切和重要。

美国、日本和欧洲等发达国家和地区已将实验动物资源建设作为一项基础性和战略性工作纳入国家科技发展规划,持续加大以基因功能研究、人类重大疾病诊断与治疗、药物研发为核心内容的实验动物新品种和动物模型研发、保藏及利用力度,使其成为提升本国科技创新能力的重要载体。自“九五”以来,我国为解决科技发展中的基础性、重大和前沿科学问题,通过科技立项支持开展了多项针对具有重要应用潜质和我国资源优势的动物(包括野生动物、农用动物等)的实验动物品种/品系培育研究。通过资源

动物实验动物化、遗传育种、资源保存和标准化等关键技术研究,创制了一批具有自主知识产权和独特生物学功能的新品种/品系实验动物,包括长爪沙鼠、树鼩、灰仓鼠、裸鼯鼠、狨猴、史宾格犬、高原鼠兔、布氏田鼠、大仓鼠、猫、东方田鼠、喜马拉雅旱獭、雪貂、中国仓鼠、牛、羊、果蝇、剑尾鱼、稀有鮎鲫、诸氏鲮鲤虎鱼、实验红鲫,以及多个品种小型猪、鸭和鸡等。这些自主研发的多物种(哺乳类、禽类、昆虫类、鱼类等)、多层次(昆虫、鱼类、啮齿类到小型猪等)的新品种实验动物,极大地推进了我国实验动物资源多样性的发展^[9]。

2.5 科技进步与国际接轨快速推进,赋予了实验动物质量控制新的内涵

随着科学技术的发展,相关研究不仅要求实验动物在种类和数量上满足需要,而且在质量上提出了更高的要求。美国、日本和欧洲等发达国家和地区已普及使用 SPF 级实验动物,依据国际组织(ICLAS 和 FELASA)标准、行业标准(如 USP 和 EP)和企业标准,有针对性地控制实验动物质量,并且在基因修饰动物模型评价方面,建立了一整套包括基因型鉴定、靶基因转录与翻译水平检测和表型分析等的技术,成为一个能够确认构建的动物模型符合设计要求、可有效模拟人类疾病、用于基因功能研究和新药研发的质量保障体系。

标准是国家对实验动物质量提出的技术法规,直接代表着国家对实验动物质量的要求。目前,我国已经发布实施的实验动物国家标准有 104 个,行业标准有 7 个,地方标准有 141 个。这些标准的发布实施对指导实验动物质量控制与评价工作等起到不可或缺的重要作用。但从总体水平上看,我国实验动物质量标准还存在诸多问题,其中之一就是在“国际化水平”上存在较大差距。目前,国际合作已成为科技发展的大趋势和主流方向,特别是生命科学和生物技术研究领域的国际合作带动了与其发展密不可分的实验动物科技合作与学术交流,我们必须重新审视实验动物质量标准和质量控制要求。质量标准不能仅限于微生物、寄生虫和遗传等内容,应将生物

信息学和系统生物学的内容和要求纳入标准体系;针对遗传修饰动物模型,则应将“模型组学”的概念和具体评价指标纳入标准。除了“身体健康”的理念和基本要求,也需要将满足“心情愉悦”的福利伦理作为评价动物质量不可或缺的内容纳入标准——这既是发达国家为提升科技竞争力而展示出的实验动物质量标准战略,也是国际上一直推崇和秉持的“全面健康”理念的具体实践。对于我国而言,积极跟踪国际先进标准发展动向,在全面分析的基础上开展先期研究,做好技术储备,制定具有“国际话语权”的标准非常重要,这不仅可以使我国实验动物标准走上国际舞台,并且可以为科技合作和成果互认保驾护航,同时也为全面提升我国实验动物质量发挥重要作用。

3 我国实验动物资源发展策略

立足我国科技创新发展的重大需求,凝练实验动物领域关键科学问题,梳理“卡脖子”技术背后的重大问题,强化政策管理和科学研究,全面布局具有战略意义和潜在引领作用、服务功能强大的实验动物资源保藏与开放共享服务体系。

3.1 完善科技资源政策体系,为实验动物资源建设、保藏与共享服务营造良好的发展环境

实验动物作为国家科技创新的重要战略资源,必须建立完整的政策法规体系,以保障实验动物科技与产业健康发展,支撑创新型国家建设的各项科技活动。例如,尽快修订《实验动物管理条例》和《实验动物许可证管理办法》等配套规章,并结合实验动物法制化管理需要,开展实验动物立法研究^[10]。近年来,《国务院关于国家重大科研基础设施和大型科研仪器向社会开放的意见》《科学数据管理办法》《国家科技资源共享服务平台办法》等相关政策制度的发布实施,也为我国实验动物资源共享立法夯实了基础。通过推动实验动物资源建设与共享相关政策制度的制定,明确国家财政投入形成的实验动物资源向社会提供服务的义务,为引导、鼓励全社会利用实验动物资源开展创新活动,并全面推进实验动物资源建设与共享,营造良好的社会环境

和提供有力的保障条件^[11]。

3.2 创新适应科技创新需求的理念, 构建有利于实验动物资源建设、保藏与共享服务的协调机制

为扫清在实验动物资源建设、技术研发、平台建设和共享服务等方面的障碍, 应从国家层面上建立实验动物资源开发与建设的科技管理体系。通过科技项目资助实验动物资源建设过程中一系列核心关键技术与产品的自主创新创制, 确保我国实验动物资源创制的创新能力。深度挖掘各区域的资源优势, 建立更加有效的区域协调发展新机制, 加强跨部门、跨行业、跨区域研发布局和协同创新, 优先支持具有明显应用价值的资源动物实验动物化研究, 形成有利于资金投入和成果产出的区域创新发展联盟和区域科技原创力。

根据实验动物资源特点和为实现资源共享而搭建的共享服务平台所应该发挥的作用, 从法律层面界定知识产权保护和社会开放功能的范围, 研究实验动物资源分级分类标准、共享模式和共享服务的鼓励机制。同时, 研究实验动物资源共享的基本原则和方式, 最大限度地释放实验动物资源共享效益。并且建立国家级实验动物资源库的共享服务管理体系与监督机制, 建立国家级、区域性和地方统筹衔接、有机融合的资源互补和共享服务联动机制, 探索建立由政府支持的国家级非营利模式动物资源保存和供应基地, 以及企业参与国家实验动物资源保藏与共享基地建设的机制, 鼓励社会优质资源参与共享。

3.3 遵循实验动物资源建设特点和发展规律, 建立以国家科技计划稳定支持的实验动物资源研发新模式

实验动物资源是支撑科技进步和创新, 提升国家科技竞争力的关键因素和根本保障, 是抢占科技制高点、引领前沿科技创新的先导, 具有公益性、基础性和战略性等特征。在其发展过程中具有超前部署、政策引导连续性强、国家科技战略投入为主、建设周期长、技术集成度高等规律。

实验动物资源服务于全社会的科技创新活动, 因此, 需要以市场为导向吸纳社会各方资源, 吸引社会资金来共同投资, 形成良性互动、

持续发展的局面^[12]。在坚持资源建设平台的非营利性机构定位和体现公共科研属性的同时, 建立市场化、专业化运作机制, 可尝试引入企业化管理模式。另外, 实验动物资源作为重要的科技资源, 集中体现了国家意志和社会公众的公益需求, 而且其建设和管理工作具有长期性、稳定性和连续性等特点, 因此, 应以国家财政资金支持为主。在国家重点研发计划中设立实验动物重点专项, 通过“人源化动物模型基础研究与应用”“新品种实验动物资源创新”等大科学计划, 着力解决制约我国在实验动物资源基础研究与推广应用中的深层次问题, 解决以往研究目标重复、研究团队分散和封闭、研究效能低下、评价与应用瓶颈多等问题, 形成符合实验动物资源建设的客观规律, 能更好地推动以科技创新为核心目标的实验动物资源创制与共享的发展模式。

3.4 以夯实科技创新的资源基础、提升服务质量和效能为导向, 全面推进实验动物资源库和实验动物国家技术创新中心的建设

遵循“顶层设计、超前部署、需求引导、自主创新”的原则, 面向基础研究和前沿技术领域超前部署一批重大的优质实验动物资源基础设施和创新基地, 把自主创新摆在实验动物资源建设的突出位置, 提升实验动物资源创制的持续创新能力。在此基础上, 以支撑国家科技创新体系发展为目标, 科学、全面地部署实验动物资源共享服务网络建设, 稳步提升实验动物资源服务科技创新和经济社会发展的能力。

在建设布局和部署方面, 准确把握国家科技创新的发展趋势和迫切需求, 统筹规划建立资源更为丰富、质量更加稳定的实验动物资源研发、保藏与共享基地, 大力加强国家实验动物资源库的技术能力, 提升存量资源和服务水平, 拓展新资源。并且, 发挥各方面的积极性, 建立多元投入机制, 部署建设国家级、区域性和地方统筹衔接、有机融合的实验动物国家技术创新中心和资源基地, 推动实验动物资源品种、品系保藏量大幅增加, 形成与国际接轨、达到国际先进水平的国家实验动物资源平台网络, 显著提升实验动物资源服务国家科技创新的水平。

参考文献:

- [1] 国家自然科学基金委员会生命科学部. 生命科学[M]. 北京: 科学出版社, 2017.
- [2] 国家科技基础条件平台中心. 中国实验动物资源调查与发展趋势[M]. 北京: 科学出版社, 2017.
- [3] 李峥. 美国推动中美科技“脱钩”的深层动因及长期趋势[J]. 现代国际关系, 2021(1):33-40,32,60.
- [4] 石云, 王宁, 邹全明. 新型冠状病毒疫苗研发进展与挑战[J]. 中华预防医学杂志, 2020, 54(6):614-619. DOI:10.3760/cma.j.cn112150-20200317-00366.
- [5] 贺争鸣, 李冠民, 荣瑞章, 等. 我国比较医学研究的开创、发展及在现代医学科学发展中的意义和作用[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(2):90-93. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2019.02.004.
- [6] 薛丽香, 张凤珠, 孙瑞娟, 等. 我国疾病动物模型的研究现状和展望[J]. 中国科学(生命科学), 2014, 44(9):851-860. DOI:10.1360/N052014-00186.
- [7] 新冠小鼠“催生”攻坚战[N/OL]. 北京科技报, 2020-05-18[2021-02-10]. <http://www.lascn.net/Item/84904.aspx>.
- [8] 科学技术部, 财政部. 关于发布国家科技资源共享服务平台优化调整名单的通知:国科发基[2019]194号[EB/OL]. (2019-06-11)[2021-02-10]. http://www.gov.cn/xinwen/2019-06/11/content_5399105.htm.
- [9] 贺争鸣, 李根平, 徐平, 等. 写在《实验动物管理条例》发布实施三十周年[J]. 实验动物科学, 2018, 35(4):1-13.
- [10] 程苹, 王锡乐, 卢凡, 等. 关于我国实验动物资源建设与发展的思考[J]. 中国科技资源导刊, 2018, 50(5):50-54, 76. DOI:10.3772/j.issn.1674-1544.2018.05.008.
- [11] 袁伟, 王祎, 石蕾. 科技基础条件共享平台运行服务模式创新与实践[M]. 北京: 科学技术文献出版社, 2015.
- [12] 李智毅, 游光荣, 闫州杰. 以建设新型研发机构为抓手探索科技体系融合创新模式[J]. 科技导报, 2020, 38(4):93-98.
- (收稿日期: 2021-02-20 修回日期: 2021-03-14)

《实验动物与比较医学》杂志有关作者投稿的说明

本刊是我国实验动物与比较医学领域创刊最早的专业学术性期刊, 执行严格的同行评议和三审三校制度。为提高稿件审理效率, 以及规范作者投稿行为, 本刊将加大初审力度。从即日起, 作者在网上投稿时, 均需提供以下必备材料和信息:

1. 所有署名作者的信息, 包括最高学历、职称、研究方向、E-mail 和电话等, 并在文末说明每位作者的贡献情况。
2. 第一作者单位盖章的论文审查表或介绍信扫描件, 需承诺本文符合科研诚信要求。
3. 涉及动物实验的研究性文章还须提供实验动物的生产许可证和质量合格证、实验场所的实验动物使用许可证、该研究的实验动物福利伦理审查表的扫描件。文中注明以上三证一表的准确编号。
4. 研究如有基金资助, 请提供与本文内容相符的基金立项证明。

以上材料请在投稿时作为附件, 一并上传本刊投审稿系统。对于材料不齐或信息造假的稿件, 编辑部初审将直接退稿。

《实验动物与比较医学》编辑部

2021 年 4 月



吴孟超 著名肝胆外科专家，中国科学院院士。曾任中国科学院学部委员，第二军医大学副校长，上海东方肝胆外科医院院长及研究所所长，曾兼任中华医学会副会长、中国癌症基金会副主席、中央和军委保健委员会委员、军队医学科学技术委员会常务委员、中德医学协会副理事长等学术职务。荣获国家最高科学技术奖、军队专业技术重大贡献奖、何梁何利医学药学奖、国际肝胆胰协会杰出成就金奖、“感动中国”人物等荣誉 78 项。主要学术成就包括：（1）创立了肝脏外科的关键理论和技术体系，创造性地提出了“五叶四段”的解剖学理论，建立了“常温下间歇肝门阻断”的肝脏止血技术，发现了“正常和肝硬化肝脏术后生化代谢规律”；（2）开辟了肝癌基础与临床研究的新领域，率先提出“肝癌复发再手术”和“局部根治性治疗”的观点，研制了细胞融合和双特异性单抗修饰两种肿瘤疫苗，发明了携带抗癌基因的增殖性病毒载体等；（3）创建了世界上规模最大的肝脏疾病诊疗和研究中心——东方肝胆外科医院和国家肝癌科学中心，培养了大批高层次专业人才。

沈 皓 博士研究生，东方肝胆外科医院国家肝癌科学中心主治医师。参与国家自然科学基金 2 项，主持浙江省消化系统肿瘤重点实验室课题 1 项。近 5 年发表 SCI 论文 4 篇，核心期刊论文 3 篇，刊于 *npj Precision Oncology*、*Journal of Gastrointestinal Surgery* 和《中华消化外科杂志》等期刊。参编参译专著 2 部。主要研究方向为肝脏恶性肿瘤的外科治疗及创伤条件下的肝脏再生。



利用基质胶阻断门静脉建立改良 ALPPS 手术小鼠模型

沈 皓，陈 瑶，沈 锋，吴孟超

（海军军医大学东方肝胆外科医院国家肝癌科学中心，上海 200438）

[摘要] 目的 建立一种不依赖显微外科技术的改良联合肝脏分隔和门静脉结扎的二步肝切除（ALPPS）手术小鼠模型，并验证其刺激肝再生的有效性。方法 75 只 C57BL/6 小鼠随机分为 ALPPS-显微手术（ALPPS-micro）组、ALPPS-基质胶（matrigel）封堵（ALPPS-matri）组和基质胶封堵对照（Control-matri）组。ALPPS-micro 组和 ALPPS-matri 组分别采用显微镜下结扎法和基质胶封堵法阻断门静脉；Control-matri 组作为对照，验证手术的有效性和安全性。记录各组手术时间、术中出血以及围手术期生存数据，并采集术后不同时间的血液和肝脏标本；通过计算肝脏质量与体质量比值（肝体比）以及检测增殖相关分子 Cyclin D1 和 Ki-67 的表达水平，比较 ALPPS-显微手术和 ALPPS-基质胶封堵手术对肝脏再生的刺激作用。结果 与 ALPPS-micro 组相比，ALPPS-matri 组手术操作时间短 $[(19.0 \pm 4.6) \text{ min} \text{ 比 } (37.5 \pm 9.3) \text{ min}, P < 0.05]$ ，术中出血量少 $[(153 \pm 39) \text{ mL} \text{ 比 } (317 \pm 124) \text{ mL}, P < 0.05]$ ，一期术后死亡率更低（4.0% 比 20.0%， $P < 0.05$ ）。肝体比数据和增殖相关分子检测结果提示，ALPPS-matri 组具有与 ALPPS-micro 组类似的刺激肝脏再生的效果。结论 利用基质胶的改良 ALPPS 模型与基于显微外科的传统 ALPPS 模型相比，具有相似的肝脏再生刺激效果，但手术时间更短，术中出血更少，围手术期死亡率更低。

[关键词] 肝切除术；肝再生；动物模型；联合肝脏分隔和门静脉结扎的二步肝切除；小鼠

[中图分类号] Q95-33；R61 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0091-09

[基金项目] 国家科技重大专项课题 (2018ZX10723204)

[作者简介] 沈 皓(1989—)，男，主治医师，博士研究生，研究方向：肝脏肿瘤的外科治疗。E-mail: shenhaochina@163.com

[通信作者] 吴孟超(1922—)，男，主任医师，教授，研究方向：肝胆疾病的临床治疗及基础研究。E-mail: mcwuehbbh@163.com

A Modified ALPPS Mice Model Based on the Blockade of Portal Vein by Matrigel

SHEN Hao, CHEN Yao, SHEN Feng, WU Mengchao

(National Center for Liver Cancer, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Navy Military Medical University, Shanghai 200438, China)

Correspondence to: WU Mengchao, E-mail: mcwuehbb@163.com

[Abstract] Objective To construct a modified mice model associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS) without relying on microsurgical techniques, and to verify its effectiveness in stimulating liver regeneration. **Methods** Seventy-five adult C57BL/6 mice were randomly divided into three groups: ALPPS-microsurgery (ALPPS-micro) group, ALPPS-matrigel blocking (ALPPS-matri) group and matrigel blocking control (Control-matri) group. The ALPPS-micro group and the ALPPS-matri group were treated with microscopic ligation and matrigel injection to block the portal vein blood flow, respectively. The Control-matri group served as a control group to verify the effectiveness and safety of this surgery. Data of operation time, intraoperative bleeding and perioperative survival were recorded, and blood and liver samples were collected at different time points after surgery. The effects of different operations on liver regeneration were compared by measuring the ratio of liver weight to body weight (LBR) and detecting the expression levels of proliferation-related molecules Cyclin D1 and Ki-67. **Results** Compared with the ALPPS-micro group, the ALPPS-matri group had shorter operation time [(19.0 ± 4.6) min vs (37.5 ± 9.3) min, $P < 0.05$], less intraoperative bleeding [(153 ± 39) mL vs (317 ± 124) mL, $P < 0.05$], and lower mortality of I stage surgery (4.0% vs 20.0%, $P < 0.05$). The detection results of LBR and the expression levels of proliferation-related molecules suggested that the ALPPS-matri group showed a similar effect on stimulating liver regeneration as the ALPPS-micro group. **Conclusion** Compared with the traditional microsurgery-based ALPPS model, the modified ALPPS model using matrigel has a similar effect on liver regeneration with shorter operation time, less intraoperative bleeding, and lower perioperative mortality.

[Key words] Hepatectomy; Liver regeneration; Animal model; Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy; Mice

联合肝脏分隔和门静脉结扎的二步肝切除 (associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy, ALPPS) 是近年来出现的一种肝切除手术的新策略, 主要适用于肿瘤切除术后剩余肝脏体积不足的患者, 被认为是“肝脏肿瘤外科极具前景的发现之一”^[1-2]。ALPPS 可刺激术后剩余肝脏快速再生, 然而其机制尚不明确。现有的 ALPPS 动物模型多来自猪、羊和大鼠等实验动物^[3-5]。目前仅瑞士苏黎世大学和日本帝京大学报道了基于显微外科技术建立的小鼠 ALPPS 模型^[6-7]。由于小鼠具有繁育周期短、饲养成本低且易于进行基因编辑等优势, 所以建立一种不依赖显微外科技术的简易 ALPPS 模型对于肝脏再生机制研究很有必要。本研究以 C57BL/6 小鼠为对象, 利用基质胶 (matrigel) 注射封堵门静脉技术, 成功建立了一种改良的 ALPPS 手术模型, 并验证了其刺激肝再生的有效性。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养

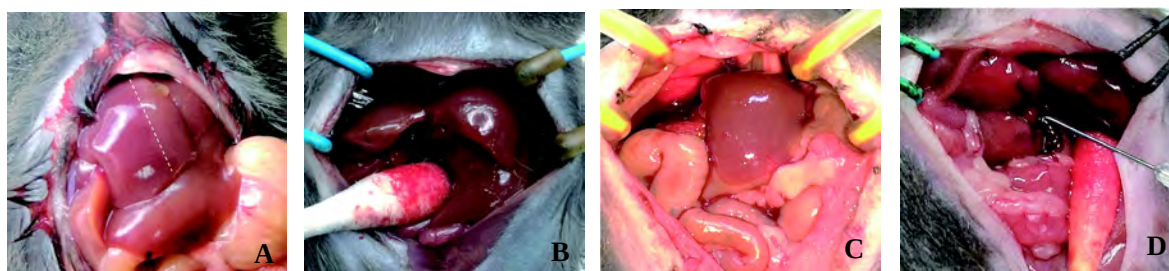
SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 75 只, 8~10 周龄, 体质量为 19~21 g, 购自上海南方模式生物科技有限公司[实验动物生产许可证号为 SCXK (沪) 2017-0012, 质量合格证号为 20190008530971]。实验动物的饲养及手术操作在国家肝癌科学中心屏障环境动物实验中心进行[SYXK (沪) 2020-0010]; 所有小鼠均用普通饲料喂养, 可自由获取食物和水。本研究通过东方肝胆外科医院动物实验伦理委员会批准 (EHBHACUC 2020-0031), 符合动物实验规范。

1.2 实验分组及 ALPPS 模型建立

75 只小鼠采用随机数字表法分为 3 组: ALPPS-显微手术组 (ALPPS-micro)、ALPPS-基质胶封堵组 (ALPPS-matri) 和基质胶封堵对照组 (Control-matri)。每组 25 只。

ALPPS-micro 组手术操作主要参照 Schlegel 等^[6]报告的方法。简要说来, ALPPS 一期手术包括以下步骤: (1) 离断镰状韧带, 上翻中肝叶, 游离并切除胆囊; (2) 显微镜下游离左中叶、左叶、右叶和尾状叶的门静脉分支并结扎, 注意保护以上肝叶的胆管及肝动脉, 并保留肝脏右中叶的所有脉管 (图 1 A); (3) 沿中肝叶缺血线处, 离断肝脏 (图 1 B)。一期术后 2 d 进行二期手术。二期手术包括以下步骤: (1) 分离黏连, 注意控制出血; (2) 切除萎缩的左中叶、左叶、右叶和尾状叶, 保留增大的右中叶 (图 1 C)。

ALPPS-matri 组的一期手术包括以下步骤: (1) 第一步同 ALPPS-micro 组。(2) 第二步有改良: 肉眼直视下找出左中叶门静脉分支, 胰岛素针抽取预冷至 4 °C 的基质胶 50 μ L, 沿门静脉分支入肝方向 30° 进针 (图 1 D), 进针时注意避开胆管和肝动脉; 针头进入血管即停止进针, 注意不要穿破对侧血管壁; 迅速注入 50 μ L 基质胶; 观察到进针处血管泛白, 对应肝叶颜色变暗后缓慢出针, 棉签适当压迫止血。按以上步骤依次阻断左叶、右叶和尾状叶的门静脉分支。(3) 第三步同 ALPPS-micro 组。二期手术操作均同 ALPPS-micro 组。



注: A 示结扎门静脉分支后出现缺血线; B 示沿缺血线劈离中肝叶; C 示二期手术仅保留中肝叶; D 示沿门静脉分支入肝方向进针。

图 1 ALPPS 手术示意图

Figure 1 Diagram of ALPPS operation

Control-matri 组处理方法如下。一期手术包括以下步骤: (1) 和 (2) 同 ALPPS-matri 组; (3) 不离断中肝叶, 直接关腹。二期手术包括以下步骤: (1) 同 ALPPS-micro 组; (2) 在中叶缺血线处离断中肝叶; (3) 切除萎缩的左中叶、左叶、右叶和尾状叶。Control-matri 组作为对照, 用于验证手术的有效性和安全性。

3 组小鼠一期及二期手术后接受同样的术后护理: 皮下补液 1 mL (500 μ L 质量分数为 10% 的葡萄糖注射液, 500 μ L 乳酸钠林格钠注射液, 8 000 U 青霉素); 30 °C 保温垫复温 24 h。所有手术操作均由同一术者完成, 术者接受过系统外科训练并有 100 h 以上的显微外科操作经验。

1.3 术中出血量评估

术中出血量根据棉签吸血情况估算。棉签吸血面积 < 30%, 失血量为 50 μ L; 吸血面积

占 30%~70%, 失血量为 100 μ L; 吸血面积 > 70%, 失血量为 200 μ L; 棉签被血浸透, 失血量为 300 μ L。

1.4 取材

分别于一期手术后第 0、2、4、6、8 天根据剩余存活小鼠数量及取材次数, 随机抽取 3~4 只小鼠, 异氟烷麻醉后称其体质量, 并通过眼眶后静脉丛取血 500 μ L。随后采用颈椎脱位法处死小鼠, 摘取肝脏并称其质量, 计算肝脏质量与体质量的比值 (即肝体比)。将静脉血离心所得的血清及部分肝脏冻存于 -80 °C, 其余肝脏经 4% 甲醛溶液固定后石蜡包埋。

1.5 生存情况观察

每日观察并记录小鼠术后生存情况。对死亡小鼠进行尸检, 探查并记录腹腔内是否有积血和腹腔积液。

1.6 血清学指标检测

血清解冻后,用全自动生化仪(购自深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司,型号:BS-200)检测丙氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)和天冬氨酸转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)水平。

1.7 实时荧光定量PCR检测 *Ccnd1* 基因转录水平

冷冻肝组织在TRIzol试剂(购自美国Invitrogen公司,批号:15596026)中充分振荡裂解后,采用乙醇沉淀法提取RNA。RNA在M-MLV体系(购自瑞士Roche公司)中反转录为cDNA。接着采用SYBR Green PCR Master Mix体系(购自瑞士Roche公司,批号:04913914001)和实时荧光定量PCR仪(购自瑞士Roche公司,型号:LightCycler 96)检测编码Cyclin D1蛋白的*Ccnd1*基因转录水平。*Ccnd1*引物序列如下:上游引物为5'-GCGTACCCTGACACCAATCTC-3',下游引物为5'-ACTTGAAGTAAGATACGGAGG-GC-3'。内参 β -actin引物序列如下:上游引物为5'-GTCGTACCACAGGCATTGTGATGG-3';下游引物为5'-GCAATGCCTGGGTACATGG-TGG-3'。PCR反应条件:95℃ 5 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 40 s, 循环40次; 72℃ 5 min。应用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算*Ccnd1*基因的相对表达量。

1.8 蛋白质印迹法检测 Cyclin D1 蛋白表达

冷冻肝组织在IP裂解液中充分振荡裂解后,通过BCA试剂盒(美国Thermo Fisher Scientific公司,货号:23227)测定蛋白浓度。采用12% SDS-PAGE将蛋白样品进行电泳分离,并湿转至硝酸纤维素膜上。分别孵育抗Cyclin D1(工作液体积稀释比例为1:100的兔抗鼠单克隆抗体,购自英国Abcam公司,批号:ab16663)和GAPDH(工作液体积稀释比例为1:5 000的兔抗鼠多克隆抗体,购自英国Abcam公司,批号:ab9485)的一抗及相应的荧光素偶联二抗(工作液体积稀释比例为1:5 000的驴抗兔单克隆抗体,购自上海臻诺生物科技有限公司,批号:926-68023)。使用荧光扫描仪(美国Li-Cor公司产品,型号:Odyssey 9120)采集图像。

1.9 免疫组织化学法分析 Ki-67 表达

将小鼠肝脏石蜡组织进行切片,切片厚度为

5 μ m。将切片常规脱蜡,过氧化氢封闭后,采用柠檬酸缓冲液高温高压法修复抗原。分别孵育抗Ki-67的一抗(工作液体积稀释比例为1:500的兔抗鼠单克隆抗体,购自英国Abcam公司,批号:ab92742)及相应的辣根过氧化物酶偶联二抗(工作液体积稀释比例为1:200的羊抗兔多克隆抗体,购自美国Boster公司,批号:BA1058)。经DAB(购自美国Boster公司,批号:AR1025)显色和苏木精染色细胞核后脱水封固。采用HALO数字病理图像分析平台(美国Indica Labs公司产品,版本:1.13)分析切片中Ki-67阳性细胞(细胞核呈棕黄色或棕褐色)所占比例。

1.10 统计学方法

应用SPSS 13.0统计学软件分析各实验结果数据。符合正态分布的连续性变量以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用单因素方差分析进行多组间差异比较;当结果具有统计学意义时,采用LSD-*t*检验进行两两比较。分类变量采用卡方检验或Fisher精确检验。采用Kaplan-Meier法绘制生存曲线,并计算生存率;因取材而处死的小鼠不计入死亡,按其取材时间计为删失病例;生存情况的组间比较采用log-rank检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术及生存情况

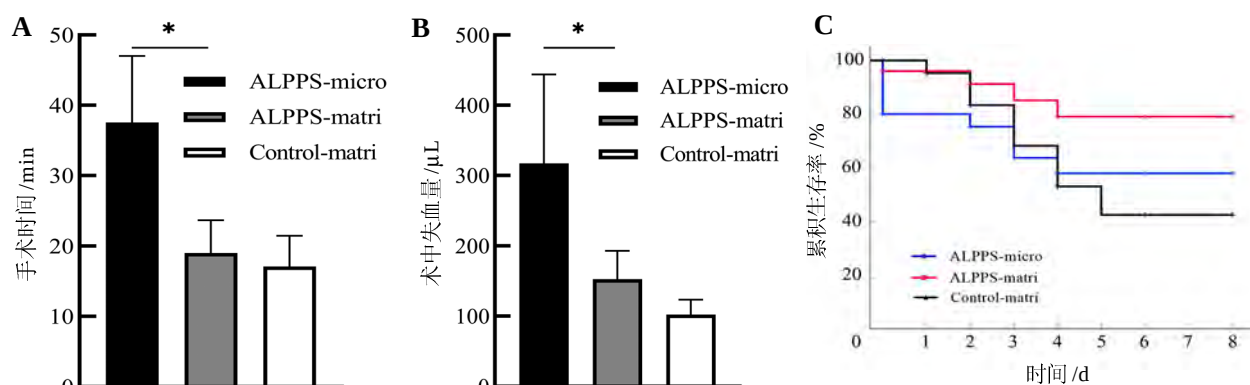
与ALPPS-matri组相比,ALPPS-micro组一期手术平均操作时间更长[(37.5 $\pm$ 9.3) min比(19.0 $\pm$ 4.6) min, $P < 0.05$](图2A),术中出血量更多[(317 $\pm$ 124) mL比(153 $\pm$ 39) mL, $P < 0.05$](图2B)。ALPPS-micro组一期手术的围手术期有5只小鼠死亡,其中3只术中损伤血管导致失血过多而死亡,2只于术后12 h内死亡。解剖术后死亡小鼠,可见腹腔大量血凝块,提示死亡原因是由于术中止血不彻底引起术后失血性休克。

ALPPS-matri组和Control-matri组一期手术后,各组仅1只小鼠死亡(表1)。ALPPS-micro组一期手术死亡率显著高于ALPPS-matri组(5/25比1/25, $P < 0.05$)。二期手术的围手术期ALPPS-micro组、ALPPS-matri组和Control-matri

组小鼠分别死亡4只、3只和7只,其中因手术操作导致术中出血引起的死亡分别为1只、1只和2只,其余小鼠均在二期手术24 h后死亡。

解剖死亡小鼠,腹腔未见明显血凝块,但

存在腹腔积液,提示死亡原因是由于肝功能衰竭(表1)。术后8 d内各组所有小鼠的生存曲线显示,ALPPS-matri组的围手术期生存率高于ALPPS-micro组($P < 0.05$,图2C)。



注: ALPPS-micro指ALPPS-显微手术组;ALPPS-matri指ALPPS-基质胶(matrigel)封堵组;Control-matri指基质胶封堵对照组。每组25只小鼠,* $P < 0.05$ 。

图2 不同实验组小鼠的手术时间(A)、术中出血量(B)和围手术期生存情况(C)

Figure 2 Operation time (A), intraoperative bleeding (B) and perioperative cumulative survival curves (C) of mice in different groups

表1 不同实验组小鼠的手术情况及围手术期生存情况

Table 1 Operation characteristics and perioperative survival of mice in different groups

变 量	ALPPS-micro (n=25)	ALPPS-matri (n=25)	Control-matri (n=25)
一期手术时间/min, $\bar{x} \pm s$	37.5 $\pm$ 9.3	19.0 $\pm$ 4.6	17.3 $\pm$ 4.4
一期手术出血量/ μ L, $\bar{x} \pm s$	317 $\pm$ 124	153 $\pm$ 39	55 $\pm$ 44
一期围手术期死亡, n (%)			
失血性休克	5 (20.0)	1 (4.0)	—
其他原因	—	—	1 (4.0)
二期手术时间/min, $\bar{x} \pm s$	17.4 $\pm$ 8.2	17.6 $\pm$ 9.2	26.8 $\pm$ 8.9
二期手术出血量/ μ L, $\bar{x} \pm s$	88 $\pm$ 27	92 $\pm$ 33	177 $\pm$ 68
二期围手术期死亡, n (%)			
失血性休克	1 (5.0)	1 (4.2)	2 (8.3)
肝衰竭	3 (15.0)	2 (8.3)	5 (20.9)

注: ALPPS-micro指ALPPS-显微手术组;ALPPS-matri指ALPPS-基质胶(matrigel)封堵组;Control-matri指基质胶封堵对照组。每组25只小鼠。

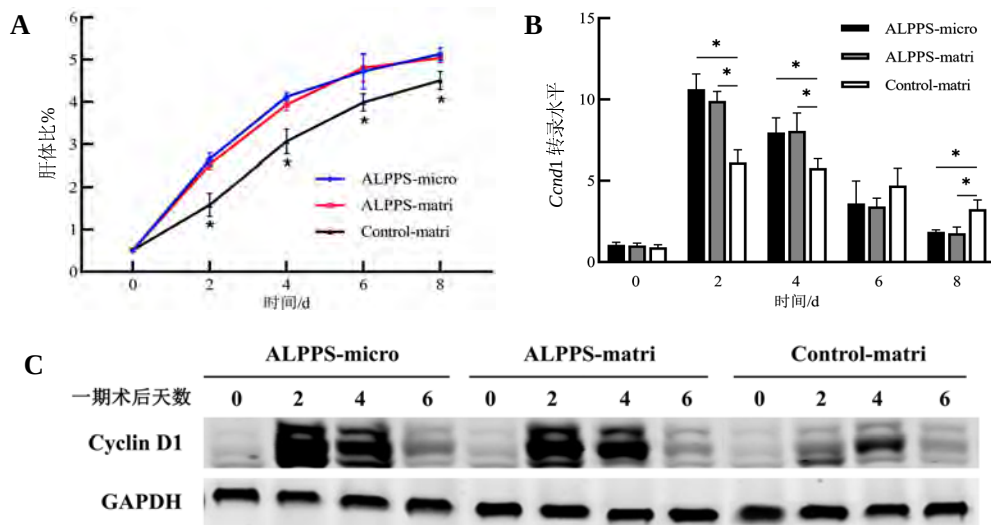
2.2 肝脏再生水平

ALPPS-micro组和ALPPS-matri组的术后肝体比差异没有统计学意义($P > 0.05$,图3A)。具体来说,两组ALPPS小鼠在一期术后均有一个肝体比快速恢复的过程,而Control-matri组一期术后肝体比恢复速率明显慢于前两组($P < 0.05$);二期术后两组ALPPS小鼠的肝再生速率虽有所减慢,但依然高于Control-matri组($P < 0.05$)。

以上结果表明,基质胶封堵门静脉法可以取得与显微手术结扎法近似的肝体比恢复速率。

2.3 肝功能恢复情况

ALPPS-micro组和ALPPS-matri组的血清ALT和AST水平在一期术后显著升高(均 $P < 0.05$),这可能与大面积的肝脏缺血导致肝细胞损伤有关;二期手术切除所有缺血肝脏以后,ALT和AST水平明显下降(均 $P < 0.05$),二期术后



注: ALPPS-micro 指 ALPPS- 显微手术组; ALPPS-matri 指 ALPPS- 基质胶 (matrigel) 封堵组; Control-matri 指基质胶封堵对照组。每组 25 只小鼠, 但在术后 0、2、4、6、8 d, 3 组小鼠取材进行实验分析的数量分别为 5、4、4、4、4 只 (ALPPS-micro 组), 5、5、4、4、4 只 (ALPPS-matri 组), 5、4、3、3、3 只 (Control-matri 组)。ALPPS-micro、ALPPS-matri 与 Control-matri 对照组相比, $P < 0.05$ 。Ccnd1 是编码 Cyclin D1 蛋白的基因。

图 3 不同实验组小鼠的肝体比恢复情况 (A)、术后肝组织中 *Ccnd1* 基因转录 (B) 和 Cyclin D1 表达 (C)

Figure 3 Liver weight to body weight ratio (A), *Ccnd1* gene transcription (B) and Cyclin D1 protein expression (C) in liver tissues of mice in different groups

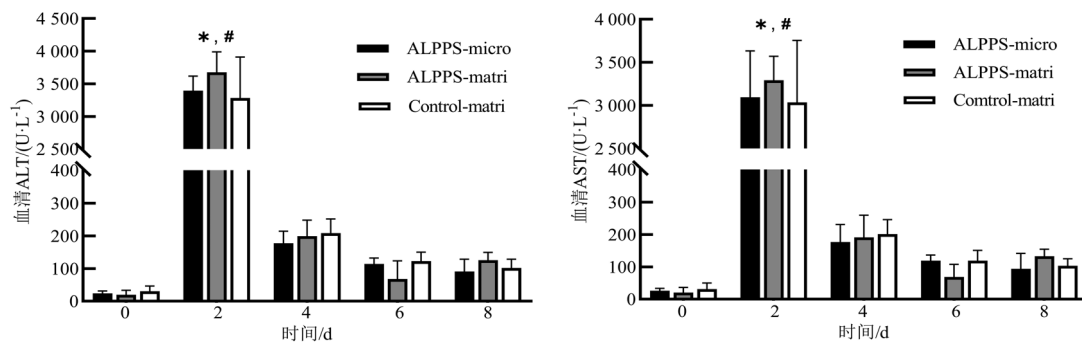
第 4 天即接近正常水平 (图 4)。

2.4 肝脏内细胞增殖水平

实时荧光定量 PCR 和蛋白质印迹结果显示, 反映细胞增殖状态的 *Ccnd1* 基因转录水平和 Cyclin D1 蛋白表达水平在 ALPPS-micro 组和 ALPPS-matri 组之间没有明显差异 ($P > 0.05$), 但均高于

Control-matri 组 (均 $P < 0.05$) (图 3B~C)。

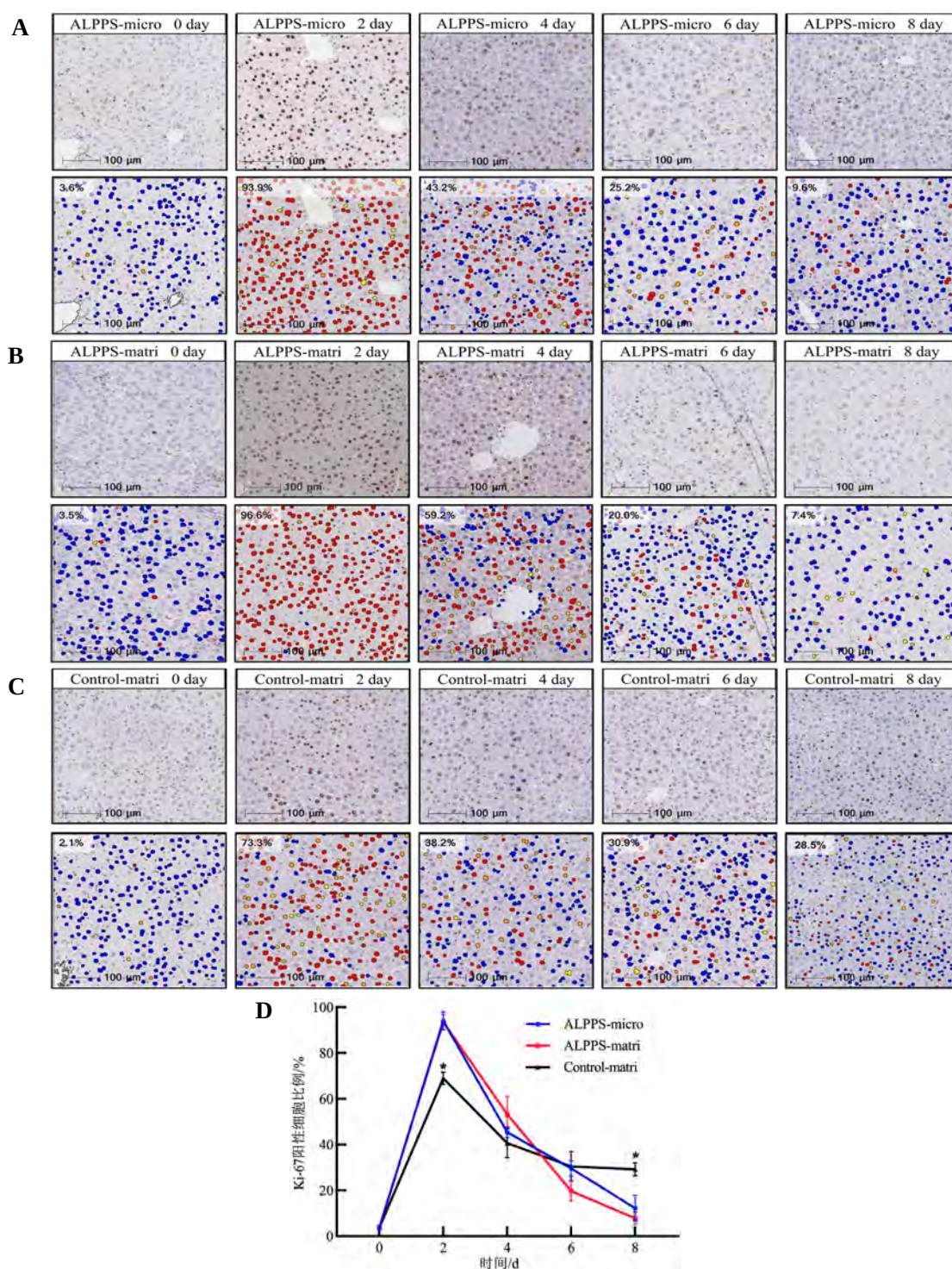
针对细胞增殖相关抗原 Ki-67 的免疫组织化学染色及其定量统计结果也显示, 两组 ALPPS 术后小鼠肝组织内增殖细胞的比例接近 ($P > 0.05$), 且均大于 Control-matri 组 (均 $P < 0.05$) (图 5)。



注: ALT 为丙氨酸转氨酶, AST 为天冬氨酸转氨酶。ALPPS-micro 指 ALPPS- 显微手术组; ALPPS-matri 指 ALPPS- 基质胶 (matrigel) 封堵组; Control-matri 指基质胶封堵对照组。每组 25 只小鼠, 在术后 0、2、4、6、8 d, 3 组小鼠取材进行实验分析的数量分别为 5、4、4、4、4 只 (ALPPS-micro 组), 5、5、4、4、4 只 (ALPPS-matri 组), 5、4、3、3、3 只 (Control-matri 组)。一期手术后 (2 d) 与手术前 (0 d) 相比, $*P < 0.05$; 一期手术后 (2 d) 与二期手术后 (4 d、6 d 和 8 d) 相比, $#P < 0.05$ 。

图 4 不同实验组小鼠术后血清 ALT 和 AST 的变化情况

Figure 4 Serum ALT and AST levels of mice in different groups



注: A~C 分别为 ALPPS- 显微手术 (ALPPS-micro) 组、ALPPS- 基质胶 (matrigel) 封堵 (ALPPS-matri) 组和基质胶封堵对照 (Control-matri) 组的免疫组织化学染色结果。每组上行图片为免疫组织化学染色原图; 下行是使用病理图像分析软件处理以后的标注图像, 其中红色的点为 Ki-67 阳性细胞, 黄色的点为 Ki-67 可疑阳性细胞, 蓝色的点为 Ki-67 阴性细胞; 标尺为 100 μm 。D 图为术后肝组织中 Ki-67 阳性细胞比例的定量分析结果。每组 25 只小鼠, 但在术后 0、2、4、6、8 d, 3 组小鼠取材进行实验分析的数量分别为 5、4、4、4、4 只 (ALPPS-micro 组), 5、5、4、4、4 只 (ALPPS-matri 组), 5、4、3、3、3 只 (Control-matri 组)。ALPPS-micro、ALPPS-matri 与 Control-matri 组相比, $*P < 0.05$ 。

图 5 不同实验组小鼠术后肝组织中 Ki-67 的免疫组织化学染色及定量分析结果

Figure 5 Immunohistochemical staining and Ki-67 positive rate in liver tissues of mice in different groups

3 讨论

基于中大型实验动物的ALPPS模型虽然在手术操作上较为简便,但其繁育周期长,饲养成本高;并且随着机制研究的深入,需要构建基因编辑动物模型以深入研究基因功能,这时中大型实验动物进行基因编辑的成本和难度非常大^[8-9]。而小鼠虽然在繁育周期、饲养成本、基因编辑成本和难度上相比于中大型实验动物具有显著优势,但其门静脉分支和肝动脉分支的直径分别仅为0.7~0.8 mm和0.05~0.08 mm^[10],必须借助手术显微镜等显微外科器械才能完成ALPPS手术中分离与结扎血管的操作,而且术中出血多,手术成功率较低,这大大限制了小鼠在ALPPS机制研究中的应用。

基质胶是近年来在类器官培养领域应用非常广泛的一种试剂^[11],其在0~4℃时为液态,>10℃又会聚合为固态。利用这一特点,将基质胶在液体状态下注射入门静脉分支。由于小鼠体温较高,进入血管的基质胶迅速聚合为固态,堵塞血管,造成事实上的血流阻断效果。并且,聚合后的基质胶凝固在进针口附近,还可起到阻止针道出血的作用。这一方法较传统的显微镜下分离结扎血管,操作更为简单,在缩短手术时间的同时,还可以减少术中出血,降低术后出血死亡风险。虽然基质胶在长期培养的环境下存在崩解的可能^[12],但是由于ALPPS一期和二期手术之间仅相隔2 d;就目前的实验数据来看,未发现2 d内基质胶在体内崩解的情况。国际上已经有将基质胶替代高岭土,用于诱导梗阻性脑积水的报道^[13]。本研究进一步扩展了基质胶在脉管阻塞相关动物模型中的应用。

ALPPS手术的两个要点分别为阻断单侧门静脉血流和离断肝组织。在ALPPS手术成熟前,已经有研究发现单纯阻断单侧门静脉血流的门静脉结扎(portal vein ligation, PVL)手术也可以加速肝脏的再生,但其肝体比恢复速率慢于ALPPS手术^[14]。目前的机制研究认为,PVL手术后肝再生速率较慢的原因是其仅仅改变了血流分布,而没有通过离断肝脏引起大面积的炎症反应^[2]。本研究中设置Control-matri组的目的有2

个:一是模拟PVL手术并将其作为对照组,进一步证实改良的ALPPS模型确实体现了ALPPS术后肝脏快速再生的两大驱动因素,即血流的重分布和大面积的炎症反应,且再生速率高于PVL;二是为了排除基质胶自身对肝再生的影响。目前尚没有研究探讨基质胶直接注入循环系统以后是否会对肝脏的生理功能产生影响,将Control-matri组作为对照,可以排除基质胶在体内除了物理封堵以外的其他因素对肝再生可能造成的影响。

肝体比数据和肝内细胞增殖水平检测结果提示,基质胶封堵门静脉法可以取得与显微手术结扎法近似的肝体比恢复速率及肝脏内细胞增殖水平。而且基质胶封堵法较显微结扎法可以明显减少ALPPS一期手术中出血量,缩短手术时间,降低一期手术后出血死亡风险;但是两种方法在术后肝功能衰竭死亡率上没有明显区别。ALT和AST的检测结果显示,两种手术方式对围手术期肝功能的影响具有一致性。这些结果说明,改良ALPPS手术可以模拟传统ALPPS手术对肝脏的影响,用于ALPPS手术中肝脏再生的机制研究。

利用基质胶封堵门静脉法建立的改良ALPPS手术小鼠模型也存在不足之处:(1)相较于结扎血管造成门静脉血流阻断的彻底性,基质胶封堵门静脉血流的彻底性有待证实;(2)大鼠实验表明,当血管内血流量较大时,进入血管的基质胶会被迅速稀释,无法形成有效的凝胶团堵塞血管。因此,该模型仅适用于小鼠,可能无法扩展至其他实验动物。

综上所述,本研究结果表明,采用基质胶封堵门静脉法建立的改良ALPPS小鼠模型,可以达到和基于显微手术的ALPPS小鼠模型近似的刺激肝脏再生的效果,并且改良ALPPS模型的手术时间更短,术中出血更少,围手术期死亡率更低。

参考文献:

- [1] DE SANTIBAÑES E, CLAVIEN P A. Playing Play-Doh to prevent postoperative liver failure: the "ALPPS" approach[J]. *Ann Surg*. 2012, 255(3):415-417. DOI:10.1097/SLA.0b013e318248577d.
- [2] LANG H, DE SANTIBAÑES E, SCHLITT H J, et al. 10th anniversary of ALPPS—lessons learned and quo vadis[J].

- Ann Surg, 2019, 269(1):114-119. DOI:10.1097/sla.0000000000002797.
- [3] CROOME K P, MAO S A, GLORIOSO J M, et al. Characterization of a porcine model for associating liver partition and portal vein ligation for a staged hepatectomy [J]. HPB (Oxford), 2015, 17(12):1130-1136. DOI:10.1111/hpb.12465.
- [4] BUDAI A, FULOP A, HAHN O, et al. Animal models for associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy (ALPPS): achievements and future perspectives[J]. Eur Surg Res, 2017, 58(3-4):140-157. DOI: 10.1159/000453108.
- [5] OTSUKA N, YOSHIOKA M, ABE Y, et al. Reg3 α and Reg3 β expressions followed by JAK2/STAT3 activation play a pivotal role in the acceleration of liver hypertrophy in a rat ALPPS model[J]. Int J Mol Sci, 2020, 21(11):4077. DOI:10.3390/ijms21114077.
- [6] SCHLEGEL A, LESURTEL M, MELLOUL E, et al. ALPPS: from human to mice highlighting accelerated and novel mechanisms of liver regeneration[J]. Ann Surg, 2014, 260(5):839-846. DOI:10.1097/SLA.0000000000000949.
- [7] KIKUCHI Y, HIROSHIMA Y, MATSUO K, et al. Impact of associating liver partition and portal vein occlusion for staged hepatectomy on tumor growth in a mouse model of liver metastasis[J]. Eur J Surg Oncol, 2018, 44(1):130-138. DOI:10.1016/j.ejso.2017.11.007.
- [8] YANG H Q, WU Z F. Genome editing of pigs for agriculture and biomedicine[J]. Front Genet, 2018, 9:360. DOI:10.3389/fgene.2018.00360.
- [9] KALDS P, ZHOUS W, CAI B, et al. Sheep and goat genome engineering: from random transgenesis to the CRISPR era [J]. Front Genet, 2019, 10:750. DOI:10.3389/fgene.2019.00750.
- [10] 黄大斌, 周玲. B 超检测小鼠正常肝脾的声像图及方法 [J]. 中国中西医结合影像学杂志, 2004, 2(3):167-168, 174. DOI:10.3969/j.issn.1672-0512.2004.03.002.
- [11] KAISER A, KALE A, NOVOZHILOVA E, et al. The effects of matrigel® on the survival and differentiation of a human neural progenitor dissociated sphere culture[J]. Anat Rec (Hoboken), 2020, 303(3):441-450. DOI:10.1002/ar.24131.
- [12] PENG W C, LOGAN C Y, FISH M, et al. Inflammatory cytokine TNF α promotes the long-term expansion of primary hepatocytes in 3D culture[J]. Cell, 2018, 175(6): 1607-1619.e15. DOI:10.1016/j.cell.2018.11.012.
- [13] SLOBODIAN I, KRASSIOUKOV-ENNS D, DEL BIGIO M R. Protein and synthetic polymer injection for induction of obstructive hydrocephalus in rats[J]. Cerebrospinal Fluid Res, 2007, 4:9. DOI:10.1186/1743-8454-4-9.
- [14] ARE C, IACOVITTI S, PRETE F, et al. Feasibility of laparoscopic portal vein ligation prior to major hepatectomy [J]. HPB (Oxford), 2008, 10(4):229-233. DOI:10.1080/13651820802175261.
- (收稿日期: 2020-12-02 修回日期: 2021-03-07)

致谢本刊支持单位

广东省实验动物监测所

苏州大学动物实验中心

上海西普尔-必凯实验动物有限公司

上海交通大学医学院实验动物科学部

广东省医学实验动物中心

上海斯莱克实验动物有限责任公司

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

南方医科大学实验动物中心

大连医科大学实验动物中心

新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心

扬州大学比较医学中心

浙江省实验动物中心

河南省实验动物中心

南通大学实验动物中心

复旦大学药学院

广州中医药大学实验动物中心

西安交通大学医学院实验动物中心

山东省实验动物中心

浙江中医药大学动物实验研究中心

海军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

华南农业大学实验动物中心

(排名不分先后)

《实验动物与比较医学》编辑部

大鼠尾椎间盘不同切片方式及染色方法的组织学观察比较

赵宇朋^{1,2}, 周平辉^{1,2}, 官建中^{1,2}

(1. 蚌埠医学院第一附属医院骨科, 蚌埠 233000; 2. 安徽省组织移植重点实验室, 蚌埠 233000)

[摘要] 目的 比较大鼠尾椎间盘不同切片方式及染色方法的优缺点, 为相应的临床诊断及实验研究奠定理论基础。方法 收集SD大鼠尾椎间盘, 制成冷冻切片及石蜡切片后, 分别行苏木精-伊红染色(HE染色)、番红-固绿染色、Masson染色、甲苯胺蓝染色, 以及针对一型胶原蛋白(type I collagen, COL-I)、二型胶原蛋白(type II collagen, COL-II)和糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)的免疫荧光染色, 对比观察椎间盘各层组织形态及蛋白表达的情况。结果 在染色方法中, 石蜡切片HE染色能清晰显示各层组织; Masson染色能清晰显示纤维环组织及髓核组织; 番红-固绿染色及甲苯胺蓝染色能较好地显示软骨各层及软骨下骨结构。冷冻切片的免疫荧光染色中, 纤维环组织的胶原蛋白多为COL-I, 髓核组织中胶原蛋白多为COL-II, 而GAG多由髓核细胞及髓核样细胞分泌。结论 观察椎间盘各层组织时, 选用HE染色及Masson染色等染色, 其中石蜡切片优于冷冻切片; 观察椎间盘各种蛋白的表达及分布时, 选用免疫荧光染色, 其中冷冻切片优于石蜡切片。

[关键词] 椎间盘; 石蜡切片; 冷冻切片; 免疫荧光; 特殊染色; 大鼠

[中图分类号] R-33; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0100-08

Comparison of Different Slicing and Staining Methods of Caudal Intervertebral Discs in Rats

ZHAO Yupeng^{1,2}, ZHOU Pinghui^{1,2}, GUAN Jianzhong^{1,2}

(1. Department of Orthopaedics, First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu 233000, China; 2. Key Laboratory of Tissue Transplantation of Anhui Province, Bengbu 233000, China)

Correspondence to: Guan Jianzhong, E-mail: jzguan2002@163.com

[Abstract] **Objective** To compare the advantages and disadvantages of different slicing and staining methods of caudal intervertebral disc in rats, so as to provide a theoretical basis for clinical diagnosis and experimental research. **Methods** The caudal intervertebral discs of SD rats were collected and made into frozen sections and paraffin sections. Hematoxylin-eosin staining (HE staining), safranin O-fast green staining, Masson staining, and toluidine blue staining of the caudal intervertebral disc sections, and immunofluorescence staining of type I collagen (COL-I), type II collagen (COL-II) and glycosaminoglycan (GAG) were performed to observe the tissue morphology and protein expression. **Results** Of the selected staining methods, HE staining of the paraffin sections clearly showed each layer structure of intervertebral discs; Masson staining results showed fibrous annulus tissues and nucleus pulposus tissues; safranin O-fast green staining and toluidine blue staining results showed cartilage layers and subchondral bone structures. In the frozen sections with immunofluorescence staining, COL-I was dominant in fibrous annulus, COL-II was dominant in nucleus pulposus, and GAG was mainly secreted by nucleus pulposus cells and nucleus

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(31700854); 蚌埠医学院科研创新团队(BYKC201910); 蚌埠医学院研究生创新计划(BYYCXZ1929)

[作者简介] 赵宇朋(1995—), 男, 硕士研究生, 从事骨组织工程学研究。E-mail: 15255222891@163.com

[通信作者] 官建中(1971—), 男, 硕士, 主任医师, 教授, 从事修复医学与骨组织工程学研究。E-mail: jzguan2002@163.com

pulposus-like cells. **Conclusion** When observing the layer structure of intervertebral discs, staining techniques such as HE staining and MASSON staining should be chosen, and paraffin sections are better than frozen sections. When observing the expression and distribution of various proteins of intervertebral discs, immunofluorescence should be selected, and frozen sections are superior to paraffin sections.

[Key words] Intervertebral disc; Paraffin section; Frozen section; Immunofluorescence; Special staining; Rats

椎间盘疾病是引起下腰痛的最常见原因之一。在全球范围内,椎间盘疾病的终生患病率高达总人口的84%,而且严重的椎间盘疾病致残率较高,易导致巨大的医疗/社会成本。最新研究表明,全美国每年用于诊断和治疗椎间盘退行性变的费用高达859~1 000亿美元^[1-2]。

大鼠是骨科研究常用的实验动物之一,因其尾椎与人体椎间盘有相似的解剖构造,研究者常用大鼠尾椎间盘模拟正常的人体椎间盘^[3-4]。而组织形态学观察常用于椎间盘退行性变的临床诊断及基础研究,在深入探讨其发病机制及治疗方法上起着重要的作用^[5-6]。椎间盘切片方法包括石蜡切片和冷冻切片。因切片方法及染色步骤的不同,椎间盘染色结果在大体形态学、免疫组织化学和免疫荧光等方面均存在差异^[7]。笔者查阅文献发现,很少有研究者探究大鼠尾椎间盘不同切片方式及染色方法得到的观察结果的差异性。因此,本研究拟制作横切及纵切的SD大鼠尾椎间盘石蜡切片标本及冷冻切片标本,并分别行苏木精-伊红染色(HE染色)、Masson染色、番红-固绿染色、甲苯胺蓝染色及免疫荧光染色,观察椎间盘骨性结构、软骨终板、纤维环组织、髓核组织四层结构的组织学特点,以及一型胶原蛋白(collagen type I, COL-I)、二型胶原蛋白(collagen type II, COL-II)和糖胺聚糖(glycosaminoglycan, GAG)在椎间盘组织中的表达及分布情况,从而分析对比2种切片方法和5种染色方法对病理检测结果的影响,为椎间盘相关研究提供理论及实践数据^[6]。

1 材料与方法

1.1 实验动物

清洁级雄性SD大鼠12只,平均体质量为250 g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司

[SCXK(鲁)2019-0003],饲养于蚌埠医学院科研楼组织工程学实验室[SYXK(皖)2017-001]。本研究经蚌埠医学院实验动物福利伦理委员会审查批准,编号为伦动科批字2019第100号。

1.2 实验试剂及实验仪器

HE染色试剂盒、Masson染色试剂盒、番红-固绿染色试剂盒及甲苯胺蓝染色试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司;兔抗鼠COL-I多克隆抗体(工作液体积稀释比例为1:200)、兔抗鼠COL-II多克隆抗体(1:200)和兔抗鼠GAG多克隆抗体(1:200)均购自美国Affinity公司;羊抗兔Cy3抗体(1:150)购自武汉三鹰生物技术有限公司;Hoechst 33342(4 μg/mL)、质量分数为4%的多聚甲醛溶液、PBS平衡盐溶液和EDTA脱钙液(pH7.2)均购自北京兰杰柯科技有限公司。

荧光显微镜(型号Obsever Z1)购自德国ZEISS公司;冷冻切片机(型号CM3050 S)购自德国Leica公司;石蜡切片机(型号EM2245)购自北京盛科信德科技有限公司。

1.3 实验取材

腹腔麻醉后以颈椎脱臼法处死SD大鼠,然后于动物手术室依次剥离大鼠尾部皮肤、筋膜、肌层,取出圆环状尾椎间盘标本,放置于4%多聚甲醛溶液中浸泡12 h后取出。用PBS冲洗标本3次,最后放置于EDTA脱钙液(pH7.2)中脱钙30 d,每隔24 h更换一次新鲜的脱钙液。

1.4 切片方法

分别采用冷冻切片法和石蜡切片法进行组织切片(均包括横切和纵切),两种切片制作方法的对比如表1所示。无论冷冻切片还是石蜡切片,均需经过梯度乙醇溶液脱水及包埋机处理。相比冷冻切片而言,石蜡切片的操作步骤繁琐,须经高温处理,但组织切片较薄,不易脱片。

表 1 大鼠尾椎间盘冷冻切片及石蜡切片的方法对比

Table 1 Comparison of preparation methods for frozen sections and paraffin sections of caudal intervertebral discs in rats

	冷冻切片	石蜡切片
准备	取出尾椎间盘, 修剪多余组织; PBS 浸泡 3 次, 每次 5 min	操作同冷冻切片
脱水	乙醇溶液梯度脱水(70%、80%、95% 和 100% 乙醇溶液依次脱水 30 min)	乙醇溶液梯度脱水(70%、80%、95% 和 100% 乙醇溶液依次脱水 1 h)
透明	—	正丁醇透明过夜
浸蜡	—	石蜡浸泡过夜
包埋	用 OCT 包埋剂置换标本中残余乙醇, 并于包埋盒中进行包埋	将浸蜡后的标本移入包埋机石蜡中, 以利于切片
切片	用冷冻切片机—21℃常规冷冻切片, 切片厚度为 9 μm	用石蜡切片机切成 4 μm 左右的石蜡带, 随后进行摊片及烤片。

1.5 染色方法

1.5.1 HE 染色

石蜡切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇溶液脱水后, 用苏木精浸染 6 min, 随后经盐酸乙醇溶液分化数秒, 用伊红浸染 10 min, 最后用梯度乙醇溶液脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。冷冻切片无需二甲苯脱蜡及梯度乙醇溶液处理, 于常温下晾干后直接行 HE 染色。

1.5.2 Masson 染色

石蜡切片脱蜡脱水同 HE 染色, 随后用苏木精染色细胞核 5 min, 经盐酸乙醇溶液分化数秒后, 用温水返蓝 4~6 min; 用 Masson 试剂盒中丽春红试剂温染及冰醋酸浸洗后, 将切片浸入 2% 苯胺蓝液复染, 最后行二甲苯透明及中性树胶封固。冷冻切片无需二甲苯脱蜡及梯度乙醇溶液处理, 于常温下晾干后直接依上述步骤行 Masson 染色。

1.5.3 番红-固绿染色

石蜡切片经二甲苯脱蜡及梯度乙醇溶液脱水后, 用 1% 番红染液浸染 2 min, 用 1% 固绿染液对比染色 1 min; 经体积分数 95% 的乙醇溶液分化数秒后, 用番红染色 3 min; 再经体积分数为 95% 的乙醇溶液分化数秒后, 自然晾干, 二甲苯透明, 中性树胶封固。冷冻切片无需二甲苯脱蜡及梯度乙醇溶液脱水, 其余操作同石蜡切片。

1.5.4 甲苯胺蓝染色

石蜡切片经二甲苯脱蜡后, 梯度乙醇溶液

脱水, 用甲苯胺蓝染色约 30 min, 随后用自来水冲洗, 冰醋酸分化至细胞核清晰, 再用乙醇脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封固。冷冻切片无需二甲苯脱蜡及梯度乙醇溶液脱水, 其余操作同石蜡切片。

1.5.5 免疫荧光染色

将 4℃ 保存的石蜡切片置于 25℃ 复温, 然后转移至 60℃ 烤箱中烘片 2 h; 进行二甲苯脱蜡, 梯度乙醇水化, PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min; 经枸橼酸钠缓冲液沸水浴 15 min 行抗原修复, PBS 洗涤 15 min; 经透膜液透膜, 用免疫组织化学笔将切片四周画一圈, 加入正常山羊血清封闭 20 min; 加入一抗(分别为兔抗鼠 COL-I、COL-II 和 GAG 多克隆抗体, 工作液体积稀释比例均为 1:200), 孵育过夜; PBS 洗涤后, 加入二抗(Cy3 标记的羊抗兔抗体, 工作液体积稀释比例为 1:150), 孵育 2 h; 经 PBS 漂洗 3 次, 每次 5 min, 随后用 Hoechst 33342 (2.5 μg/mL) 染色细胞核, 并用甘油封固; 切片干燥后, 置于荧光显微镜下观察。冷冻切片无需二甲苯脱蜡, 也不需要行抗原修复, 其余操作同石蜡切片。

1.6 实验观察指标

主要通过荧光显微镜于明场及荧光状态下观察骨、软骨终板、椎间关节、纤维环组织和髓核组织的形态完整性, 以及 COL-I、COL-II 和 GAG 蛋白在上述尾椎间盘组织结构中的分布情况, 放大倍数分别为 100 倍及 200 倍。

2 结果

2.1 组织学染色

2.1.1 尾椎间盘石蜡切片标本染色

大鼠尾椎间盘石蜡切片标本用不同方法染色的结果如图 1 所示。HE 染色可见：椎间盘纵切面上骨、软骨终板、纤维环组织和髓核组织四层结构清晰；纤维环组织呈环状排列，纤维蛋白排列柔和规整，纤维环组织与髓核界限较为清晰；纤维环细胞与髓核细胞呈梭形，核质分明，红蓝颜色适度；软骨下骨及骨小梁结构完整。Masson 染色可见：椎间盘形态结构完整、清晰；胶原纤维呈蓝色，胶原纤维层与肌层红蓝相间，界限明显，可见明显的胶原纤维网；椎间盘纤维环排列规整柔顺，与髓核组织分界清晰明显，能较好地反映纤维组织的形态。番红 - 固绿染色可见：纵切面上，椎间盘四层结构清晰可见，红绿对比明显，软骨基质呈均匀红色；纤维环 - 髓核组织分界线大致清晰，但不如 Masson 染色界限明显，能较好地呈现椎间盘结构的正常形态。甲苯胺蓝

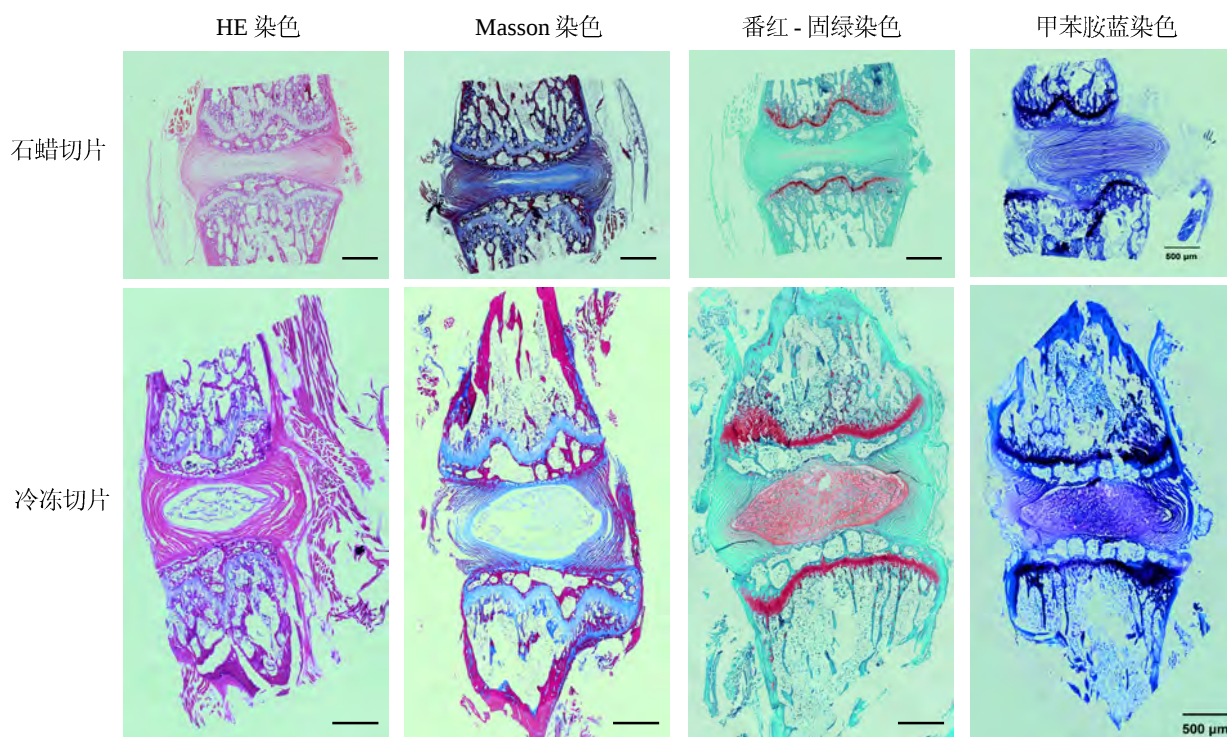
染色可见：纵切面上，椎间盘形态大致清晰，上下软骨终板呈蓝紫色；软骨细胞核染色清晰，与纤维环分界清楚，能够较好地呈现椎间软骨形态。

2.1.2 尾椎间盘冷冻切片染色

大鼠尾椎间盘冷冻切片标本用不同方法染色的结果如图 1 所示。HE 染色、Masson 染色、番红 - 固绿染色和甲苯胺蓝染色结果均显示：整个冷冻切片大致能表现出髓核组织、纤维环组织、上下软骨终板及椎骨；但是整体而言，相对于石蜡切片，整张冷冻切片破碎感明显，髓核组织不能完全呈现；另外，用同样的染色液染色时，冷冻切片比石蜡切片的颜色更为艳丽。

2.2 免疫荧光染色

大鼠椎间盘石蜡切片的免疫荧光染色效果很差（图略），可能与制片过程中高温导致结合抗原脱落有关；而冰冻切片的免疫荧光染色结果良好，如图 2 和图 3 所示。其中，免疫荧光试剂 Hoechst 将纤维环细胞及髓核细胞的细胞核染成蓝紫色，COL- I、COL- II 和 GAG 经 Cy3 试剂交联后被染成明显的红色荧光。100 倍视野下



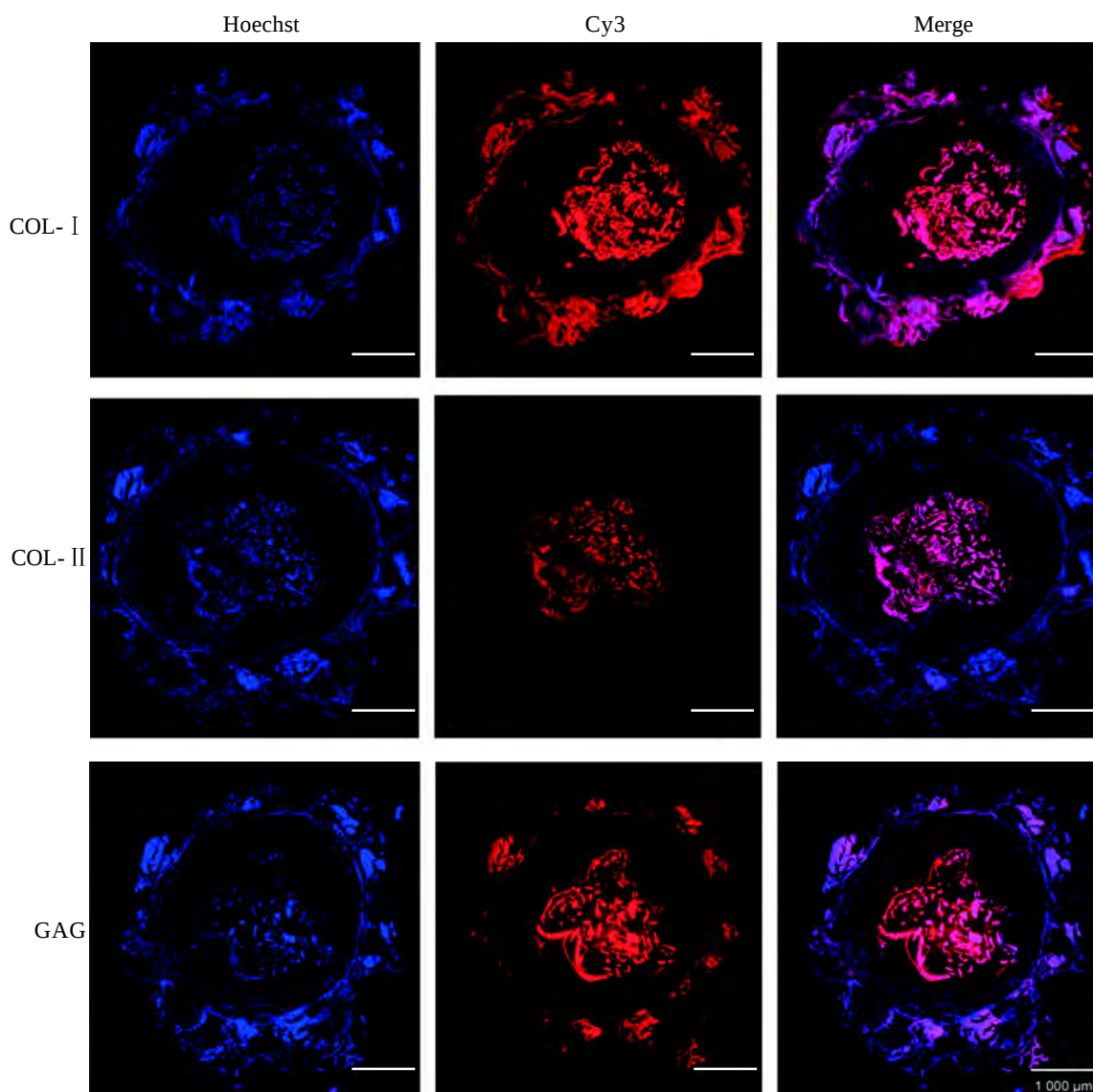
注：各图放大倍数相同，标尺均为 500 μm 。

图 1 大鼠尾椎间盘石蜡切片（纵切）和冷冻切片（纵切）不同方法染色的结果对比（ $\times 100$ ）

Figure 1 Comparison of different staining results of longitudinal paraffin sections and longitudinal frozen sections of caudal intervertebral discs in rats ($\times 100$)

可观察到椎间盘组织的宏观形态,以明确髓核组织与纤维环组织的形态分布(图2)。由图2可见,在椎间盘横切面上,纤维环组织与髓核组织界限分明;COL-I在纤维环组织中显著表达;COL-II在髓核及纤维环中均表达,但在髓核中表达较多;GAG多由髓核细胞及髓核样细胞分泌,广泛存在于髓核组织中,而在纤维环组织中几乎不表达。

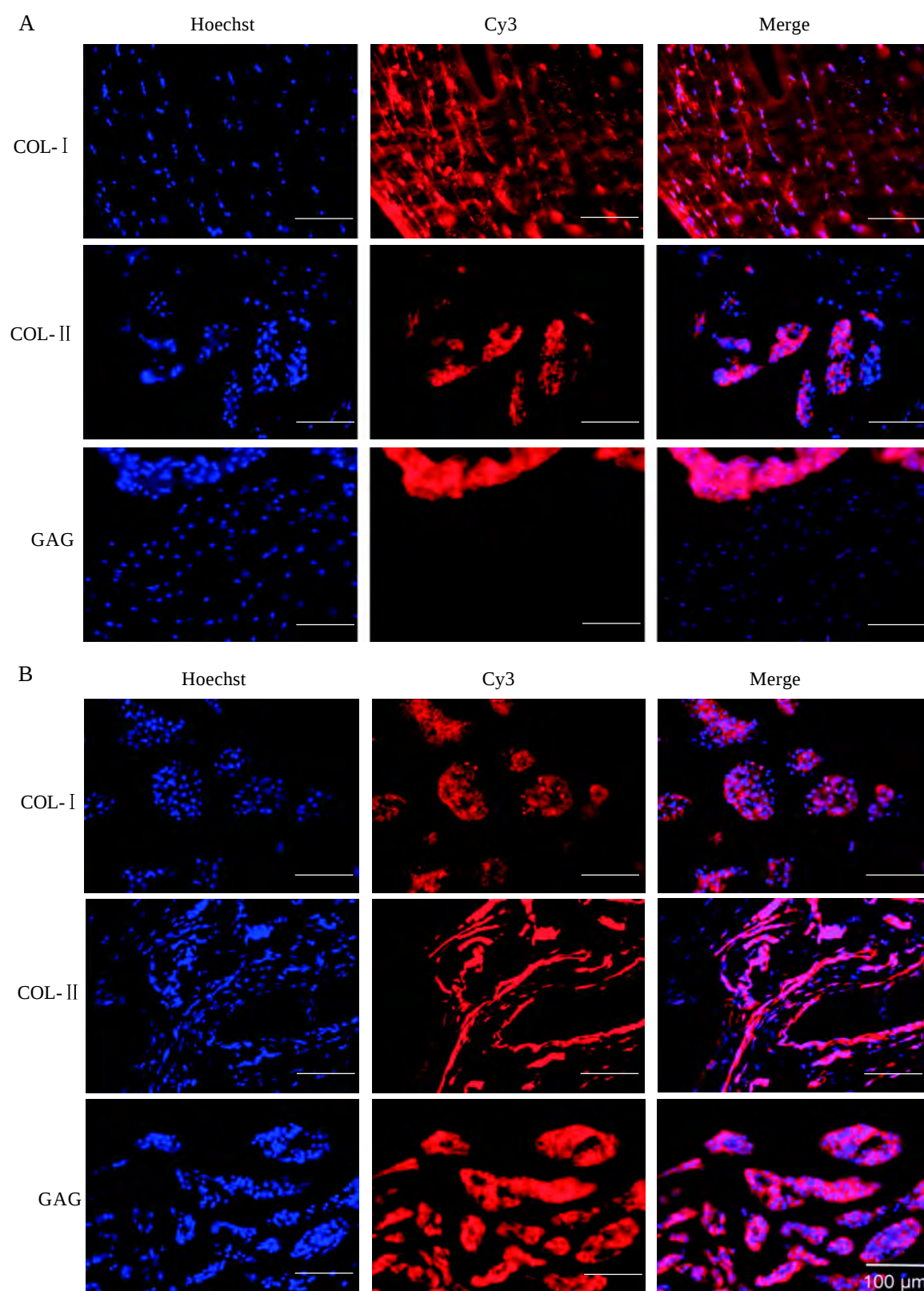
进一步提高观察倍数,在200倍视野下更清晰地观察椎间盘组织中形态蛋白的表达分布差异(图3),A为纤维环的免疫荧光结果,B为髓核组织的免疫荧光结果。由图3可见,COL-I在纤维环组织中较多表达;COL-II在纤维环组织及髓核组织中均表达,但在髓核组织中表达较多;GAG在髓核组织中荧光明亮饱满,在纤维环组织中仅有少量伪影存在。



注:免疫荧光试剂Hoechst染色细胞核,Cy3标记的二抗结合目的蛋白一抗,Merge为两者的集合。COL-I为一型胶原蛋白,COL-II为二型胶原蛋白,GAG为糖胺聚糖。各图放大倍数相同,标尺均为1 000 μm 。

图2 大鼠尾椎间盘冷冻切片(横切)的免疫荧光结果($\times 100$)

Figure 2 Immunofluorescence results of cross frozen sections of caudal intervertebral discs in rats ($\times 100$)



注：A 为纤维环的免疫荧光结果；B 为髓核组织的免疫荧光结果；COL- I 为一型胶原蛋白，COL- II 为二型胶原蛋白，GAG 为糖胺聚糖。各图放大倍数均相同，标尺均为 100 μm。

图 3 大鼠尾椎间盘横切面上 COL- I、COL- II 和 GAG 的局部表达情况 (× 200)

Figure 3 Local expressions of COL- I , COL- II and GAG in cross sections of caudal intervertebral discs in rats (× 200)

3 讨论

椎间盘退行性疾病是我国乃至世界范围内最为常见的骨科疾病之一,是胸腰背疼痛的主要原因,给社会带来很大的健康隐患和经济负担。正常人体椎间盘位于上下椎体之间,其包括内侧的髓核、外侧的纤维环及上下软骨终板^[8]。正常的椎间盘具有一个密闭的微环境,营养物质供应依赖于椎间盘上下软骨终板的细小毛细血管,使椎间盘拥有分散应力、维持椎体高度和正常运动的功能,正常的椎间盘微环境具有低氧、高乳酸、低pH及高渗的特点^[9]。纤维环组织是非均一性的组织,其由20~25层同心圆环状结构组成。大体上,纤维环组织由内向外可分为内、中、外3个区域,各区域的细胞类型、微观结构和生化组成各不相同。纤维环组织中含有丰富的I型胶原纤维,其与椎间韧带一起维持了脊柱前屈后伸等运动。纤维环的破裂是椎间盘退行性变发生的病理生理机制^[10]。髓核组织呈胶冻样,包括细胞及细胞外基质,细胞包括髓核间充质干细胞及终末分化的髓核细胞,细胞外基质包括聚集蛋白聚糖、蛋白多糖,以及包绕成核状的II型胶原纤维^[8]。

正常状态下细胞外基质的合成与分解处于动态平衡,而炎症因子诱导的髓核细胞外基质稳态的打破是发生椎间盘退行性变的最主要原因^[11]。病理学诊断能在宏观形态和微观结构上反映炎症因子、细胞质蛋白等在椎间盘组织中的表达水平,同样,特殊染色方法在辨认椎间盘骨、软骨终板、纤维环组织和髓核组织四层结构的完整性上有不可忽视的作用^[12-13]。

HE染色是最常用的染色方法之一^[14],能清晰地显示椎间盘各层组织,在分辨骨及软骨终板的形态方面具有参考意义。Masson染色对于椎间盘胶原纤维的分辨及髓核组织与纤维环组织的分辨明显优于HE染色,可见明显的胶原纤维网,能较好地反映纤维组织的形态,是检测椎间盘组织较为适合的染色方法之一。番红-固绿染色及甲苯胺蓝染色在椎间盘各层结构的显色及组织形态学方面都不及Masson染色,但是可以明显看到骨与软骨的分布及各层结构,对于椎间盘椎小关节失衡和软骨终板炎的诊断有临床价值^[15]。

相对于上述染色方法,免疫荧光技术在组织胶原蛋白定位的研究上具有敏感度高、特异度高和精确度高的特点,可用于微量蛋白的检测,以及COL及GAG分布的定量分析^[16-17]。本研究中,免疫荧光染色结果如图2所示,纤维环组织中胶原蛋白大部分为COL-I,伴有少量COL-II;髓核组织中胶原蛋白大部分为COL-II,少量为COL-I;GAG多由髓核细胞及髓核样细胞分泌。

石蜡切片及冷冻切片均是检测椎间盘组织病理形态学的常规方法^[18]。本研究发现,石蜡切片操作复杂,经过高温、浸蜡等操作时,椎间盘组织表面的待测抗原极易脱落,荧光染色结果很不理想^[19]。相反,冷冻切片无需高温操作,制片方法简单易行;而且椎间盘横切片荧光蛋白完整,层次分明;免疫荧光结果清亮通透,荧光层次分明,纤维环及髓核组织中的COL-I、COL-II和GAG等成分荧光明显,有良好的临床基础及实验价值。但是对于椎间盘形态学检测,石蜡切片的效果要优于冷冻切片。石蜡切片所制的椎间盘标本经染色后软骨基质损伤较少,切片染色较好,纤维环组织及髓核组织细胞形态良好,细胞核染色清晰可见,整个切片经染色后几乎无脱片;而且染色步骤顺利,所需染色时间短。对于冷冻切片而言,其切片厚度约为9 μm,厚于石蜡切片的5 μm;即使使用防脱载玻片,经染色后,整个切片仍明显脱片,染色情况较差;而且染色过程耗时较长,切片着色结果较差。

本研究还对比了大鼠尾椎间盘横向及纵向切片情况,发现对于石蜡切片而言,因骨、软骨终板、纤维环组织和髓核组织的组织密度不同,在本实验条件下很难制作出椎间盘横向切片;但是对于冷冻切片而言,因为包埋剂的软化作用,可以制作出厚度约为9或10 μm的椎间盘横向或纵向切片。进一步观察椎间盘的组织学形态,发现纵向的椎间盘切片包括了骨、软骨终板、纤维环组织及髓核组织四层结构,有良好的临床价值;但对于观察椎间盘髓核组织是否膨出,纤维环组织的完整性,COL-I、COL-II及GAG的分布情况而言,横向的椎间盘切片有组织学优势^[20]。

病理学检测是研究椎间盘退行性变的实验基

础,但大多数实验人员在判断及选择切片形式及染色方法上耗费了大量的时间与精力。本研究比较了大鼠尾椎间盘不同切片方式及染色方法的组织学观察结果差异性,为相应的基础研究者提供了一定的理论依据及实验经验。

参考文献:

- [1] GOUBERT D, OOSTERWIJCK J V, MEEUS M, et al. Structural changes of lumbar muscles in non-specific low back pain: A systematic review[J]. *Pain Physician*, 2016, 19(7): E985-E1000.
- [2] CHOI H, TESSIER S, SILAGI E S, et al. A novel mouse model of intervertebral disc degeneration shows altered cell fate and matrix homeostasis[J]. *Matrix Biol*, 2018, 70: 102-122. DOI:10.1016/j.matbio.2018.03.019.
- [3] VINCENT K, MOHANTY S, PINELLI R, et al. Aging of mouse intervertebral disc and association with back pain [J]. *Bone*, 2019, 123:246-259. DOI:10.1016/j.bone.2019.03.037.
- [4] CHEN T, CHENG X F, WANG J C, et al. Time-course investigation of intervertebral disc degeneration induced by different sizes of needle punctures in rat tail disc[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24:6456-6465. DOI:10.12659/MSM.910636.
- [5] JI H Z, LI J Y, SHAO J, et al. Histopathologic comparison of condylar hyperplasia and condylar osteochondroma by using different staining methods[J]. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2017, 123(3):320-329. DOI:10.1016/j.oooo.2016.10.027.
- [6] SCHWAN S, LUDTKA C, FRIEDMANN A, et al. Long-term pathology of ovine lumbar spine degeneration following injury via percutaneous minimally invasive partial nucleotomy[J]. *J Orthop Res*, 2019, 37(11):2376-2388. DOI:10.1002/jor.24402.
- [7] YU J S, YANG T, DAI J W, et al. Histopathological features of condylar hyperplasia and condylar Osteochondroma: a comparison study[J]. *Orphanet J Rare Dis*, 2019, 14(1): 293. DOI:10.1186/s13023-019-1272-5.
- [8] LAWSON L Y, HARFE B D. Developmental mechanisms of intervertebral disc and vertebral column formation[J]. *Wiley Interdiscip Rev: Dev Biol*, 2017, 6(6): e283. DOI: 10.1002/wdev.283.
- [9] LAMA P, ZEHRA U, BALKOVEC C, et al. Significance of cartilage endplate within herniated disc tissue[J]. *Eur Spine J*, 2014, 23(9):1869-1877. DOI:10.1007/s00586-014-3399-3.
- [10] BOWLES R D, SETTON L A. Biomaterials for intervertebral disc regeneration and repair[J]. *Biomaterials*, 2017, 129: 54-67. DOI:10.1016/j.biomaterials.2017.03.013.
- [11] IRIUCHISHIMA T, RYU K. Bicruciate substituting total knee arthroplasty improves stair climbing ability when compared with cruciate-retain or posterior stabilizing total knee arthroplasty[J]. *Indian J Orthop*, 2019, 53(5):641-645. DOI:10.4103/ortho.IJOrtho_392_18.
- [12] 袁维, 周小小, 蔡攀, 等. 终板下椎体缺血诱导兔椎间盘退行性变模型的建立及终板中内皮素1的表达[J]. *脊柱外科杂志*, 2020, 18(2):118-124. DOI:10.3969/j.issn.1672-2957.2020.02.010.
- [13] XIAO Z F, HE J B, SU G Y, et al. Osteoporosis of the vertebra and osteochondral remodeling of the endplate causes intervertebral disc degeneration in ovariectomized mice[J]. *Arthritis Res Ther*, 2018, 20(1):207. DOI:10.1186/s13075-018-1701-1.
- [14] CHLIPALA E, BENDZINSKI C M, CHU K, et al. Optical density-based image analysis method for the evaluation of hematoxylin and eosin staining precision[J]. *J Histotechnol*, 2020, 43(1):29-37. DOI:10.1080/01478885.2019.1708611.
- [15] CHEN C, ZHOU T J, SUN X J, et al. Autologous fibroblasts induce fibrosis of the nucleus pulposus to maintain the stability of degenerative intervertebral discs[J]. *Bone Res*, 2020, 8:7. DOI:10.1038/s41413-019-0082-7.
- [16] 王玉芳, 徐晓艳, 武彦. 常用特殊染色在病理诊断中的应用[J]. *实用医技杂志*, 2013, 20(12):1357-1358.
- [17] CHEN D, JIANG X. Correlation between proteolytic enzymes and microangiogenesis in degenerative intervertebral disc nucleus[J]. *J Invest Surg*, 2019:1-6. DOI:10.1080/08941939.2019.1679921.
- [18] LIU S, YANG S D, HUO X W, et al. 17 β -Estradiol inhibits intervertebral disc degeneration by down-regulating MMP-3 and MMP-13 and up-regulating type II collagen in a rat model[J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2018, 46(Suppl 2):182-191. DOI:10.1080/21691401.2018.1453826.
- [19] 吕俊耀, 于晓军, 刘卯阳. 常规组织切片染色制作中常见问题及其解决方法[J]. *法医学杂志*, 2008, 24(1):51-53. DOI:10.3969/j.issn.1004-5619.2008.01.014.
- [20] PFANNKUCHE J J, GUO W, CUI S B, et al. Intervertebral disc organ culture for the investigation of disc pathology and regeneration—benefits, limitations, and future directions of bioreactors[J]. *Connect Tissue Res*, 2020, 61(3/4): 304-321. DOI:10.1080/03008207.2019.1665652.

(收稿日期: 2020-07-23 修回日期: 2020-11-18)

免疫功能正常的HBV cccDNA小鼠模型用于苦参碱和青蒿素抑制HBV的药效评价

伍悦¹, 吕小琴², 刘阳^{2,3}, 向霞², 赵中华⁴, 徐如青², 潘朔寒², 何明忠², 张华堂⁴, 赖国旗²

(1. 重庆医科大学附属第二医院, 重庆 400010; 2. 重庆医科大学实验动物中心, 重庆 400016; 3. 泸县第二中学, 泸州 646106; 4. 重庆市科学技术研究院, 重庆 401123)

[摘要] 目的 应用免疫功能正常的乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 小鼠模型评价中药苦参碱和青蒿素的作用效果, 同时为模型应用奠定基础。方法 体外合成 HBV 共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA), 通过尾静脉高压注入 8~10 周龄的雄性 CBA/CaJ 小鼠体内, 然后分别在急性感染期和慢性感染期腹腔注射苦参碱或青蒿素。定量 PCR 法检测小鼠血清及肝组织中 HBV DNA 和 cccDNA 含量, 酶联免疫吸附法检测血清中 HBV 表面抗原 (HBV surface antigen, HBsAg) 的含量, 免疫组织化学法检测肝组织中 HBsAg 和 HBV 核心抗原 (HBV core antigen, HBcAg) 的表达。结果 在 HBV 急性感染期, 注射苦参碱和青蒿素第 4 周即能够明显抑制小鼠血清中 HBsAg 的分泌 (均 $P < 0.05$), 降低血清中 HBV DNA 的表达 (均 $P < 0.01$)。在 HBV 慢性感染期, 苦参碱和青蒿素对小鼠血清和组织中 HBsAg 的抑制作用不明显 (均 $P > 0.05$), 但是血清中 HBsAg 相对降低水平 (ΔHBsAg) 明显大于生理盐水对照组 (均 $P < 0.05$); 而且苦参碱能降低小鼠血清或组织中 HBV DNA ($P < 0.05$, $P < 0.01$) 和组织中 HBV cccDNA 的拷贝数 ($P < 0.05$); 青蒿素仅能明显抑制小鼠血清中 HBV DNA 拷贝数 ($P < 0.01$), 而对组织中 HBV DNA 和 HBV cccDNA 的作用不明显 (均 $P > 0.05$); 另外, 苦参碱对肝组织中 HBcAg 的作用不明显 ($P > 0.05$), 而青蒿素对 HBcAg 有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。结论 免疫功能正常的 HBV cccDNA 小鼠模型能够用于治疗急性期和慢性期乙型肝炎的药物疗效评价。

[关键词] 乙型肝炎病毒; 慢性感染; 药效评价; 苦参碱; 青蒿素; CBA/CaJ 小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0108-08

Application of Immunocompetent HBV cccDNA Mouse Model in the Efficacy Evaluation of Matrine and Artemisinin on Inhibiting HBV

WU Yue¹, LÜ Xiaoqin², LIU Yang^{2,3}, XIANG Xia², ZHAO Zhonghua⁴, XU Ruqing², PAN Shuohan², HE Mingzhong², ZHANG Huatang⁴, LAI Guoqi²

(1. Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 2. Laboratory Animal Center of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Luxian No.2 High School, Luzhou 646106, China; 4. Chongqing Academy of Science and Technology, Chongqing 401123, China)

Correspondence to: LAI Guoqi, E-mail: laiguoqi@163.com

[Abstract] **Objective** To evaluate the effects of matrine and artemisinin on immunocompetent hepatitis B virus (HBV) infected mouse model, and to lay a foundation for the application of the model. **Methods** HBV covalently closed circular DNA (HBV cccDNA) was synthesized in vitro. Male CBA/CaJ mice aged 8 to 10 weeks were injected with HBV cccDNA at high pressure through tail vein, and then intraperitoneally injected

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81570541); 重庆市科委社会民生项目(cstc2017shmsA130097); 重庆医科大学大学生研究与创新实验项目(SRIEP202049)

[作者简介] 伍悦(1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 肝胆外科。E-mail: truth1105@qq.com

[通信作者] 赖国旗(1964—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 实验动物模型建立及其应用研究。E-mail: laiguoqi@163.com

with matrine or artemisinin in acute or chronic infection periods, respectively. Quantitative PCR was used to detect HBV DNA and cccDNA in serum or liver tissues of mice. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to measure the content of HBV surface antigen (HBsAg) in serum. Immunohistochemistry was used to determine HBsAg and HBV core antigen (HBcAg) in liver tissues. **Results** In HBV acute infection period, matrine and artemisinin injection at week 4 significantly inhibited the secretion of HBsAg in serum of mice (both $P<0.05$), and reduced the expressions of HBV DNA (both $P<0.01$). In HBV chronic infection period, matrine and artemisinin had no significant inhibitory effects on HBsAg in serum and liver tissues (all $P>0.05$), but the decrease of HBsAg in serum in the group administered with matrine or artemisinin was significantly higher than that in the normal saline control group (both $P<0.05$). Moreover, matrine decreased the copy number of HBV DNA in serum and liver tissues ($P<0.05$ and $P<0.01$, respectively) and the copy number of HBV cccDNA in liver tissues ($P<0.05$). Artemisinin only inhibited the copy number of HBV DNA in serum of mice ($P<0.01$), but had no significant effect on HBV DNA and HBV cccDNA in liver tissues (both $P>0.05$). In addition, matrine had no significant effect on HBcAg in liver tissues ($P>0.05$), but artemisinin did the opposite ($P<0.05$). **Conclusion** The immunocompetent HBV cccDNA mouse model can be used to evaluate the efficacy of drugs for the treatment of acute and chronic hepatitis B.

[Key words] Hepatitis B virus; Chronic infection; Efficacy evaluation; Matrine; Artemisinin; CBA/CaJ mice

近年来, 90% 以上的丙肝患者能够实现临床治愈, 但乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 感染仍是一个困扰全球的健康问题。虽然自 1982 年预防性 HBV 疫苗应用以来, 儿童的 HBV 感染率显著下降, 但是世界卫生组织数据显示全球仍有约 2.5 亿人为慢性乙型肝炎 (简称乙肝) 患者。中国是全球慢性乙肝中高度流行地区, 据统计中国慢性乙肝发病人数约 930 万, 其中约 10%~20% 会发展成为肝硬化, 1%~5% 可演变成成为肝癌^[1-2]。消灭 HBV 或已成为全球实现“2030 全面消灭病毒性肝炎目标”的头等大事^[3-4], 也是中国医疗卫生事业面临的一个重大挑战^[5]。目前, 乙肝防控仍存在不少难点, 其中, 缺乏合适的实验动物模型一直是 HBV 研究领域病毒学、免疫学和新药评价研究的瓶颈。

CBA/CaJ 小鼠的 B 细胞、T 细胞、自然杀伤细胞和粒细胞均正常^[6]。与 BALB/cJ、C57BL/6J 和 C3H/HeN 等 6 个品系小鼠相比, HBV 感染 CBA/CaJ 小鼠的效率不受鼠龄的影响, 同时, 病毒携带时限可以超过半年以上^[7]。本课题组前期利用分子生物学技术体外合成 HBV 共价闭合环状 DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA), 并通过尾静脉高压水动力注射至 CBA/CaJ 小鼠体内, 自主研发建立了免疫功能正常的 HBV cccDNA 小鼠模型^[8-10]。尽管已经证明这一模型具有建模方便、免疫健全、携带病毒时限超过半年, 且肝

细胞中含有 HBV cccDNA 等优点^[11-14], 但是该模型是否能很好地用于药物评价尚不清楚。

中药是我国医学瑰宝。已有文献报道, 中药苦参碱 (matrine) 及青蒿素 (artemisinin) 在体外及体内均具有一定的抑制 HBV 的作用^[14], 但因无理想的动物模型, 其药效评价指标有限。本研究应用 HBV cccDNA CBA/CaJ 小鼠模型, 观察苦参碱和青蒿素对模型小鼠体内 HBV 的治疗作用, 并以此评价该小鼠模型的应用价值, 为应用该模型进行药效学评价研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级的 8~10 周龄雄性 CBA/CaJ 小鼠 37 只, 体质量为 22~25 g, 购自重庆医科大学实验动物中心 [SCXK (渝) 2018-003]。动物实验操作在重庆医科大学实验动物中心屏障设施内完成, 实验动物使用许可证号为 SYXK (渝) 2018-003。本实验方案得到重庆医科大学伦理委员会的批准 (No. 2015019)。

1.2 药品与主要试剂

苦参碱 (批号: CAS#519-02-8) 购自上海源叶生物科技有限公司; 青蒿素 (批号: CAS#63968-64-9) 购自北京索莱宝科技有限公司; 病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒 (批号: Cat.#DP315) 购自天根生化科技 (北京) 有限

公司; HBV 表面抗原 (HBV surface antigen, HBsAg) 诊断试剂盒 (国药准字 S10910113) 购自上海科华生物工程股份有限公司; HBsAg 质控标准品[批号: GBW(E)090072]购自北京康彻思坦生物技术有限公司; 马抗 HBsAg 多克隆抗体 (ab9193) (批号: Lot. GR207325-21) 和山羊抗兔 IgG H&L (ab6717) (批号: A20180314314) 购自英国 Abcam 公司; 兔抗 HBV 核心抗原 (HBV core antigen, HBcAg) 抗体 (GTX40523) (批号: Lot No.82180026) 购自美国 GeneTex 公司; 辣根过氧化物酶标记的兔抗马多克隆抗体 (批号: SAA544Eq09) 购自美国 Cloud-Clone Crop 公司; T₅ 核酸外切酶试剂盒 (批号: M0363S) 购自新英格兰生物 (北京) 有限公司; Blaze iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix 试剂盒 (批号: Cat.#1725124) 购自美国 Bio-Rad 公司。定量 PCR 检测引物均由重庆茂百科技有限公司合成。

1.3 实验仪器

酶标检测仪 (1510-00783) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 核酸浓度检测仪 (NanoDrop 2000) 购自香港基因有限公司; CFX Connect™ Real-Time System 定量 PCR 检测仪 (788BR05039) 购自美国 Bio-Rad 公司。

1.4 药物配制

苦参碱和青蒿素分别用二甲基亚砷溶解为无色透明的储存液 (250 μg/μL), 于 -80 °C 保存。使用时按如下体积比配制药物使用质量浓度 (5 μg/μL): 2% 药物储存液, 40% 聚乙二醇 300, 2% 吐温 80, 最后用 ddH₂O 补足至 2 mL; 依次加入溶剂, 每加入一种溶剂后, 先充分振荡混匀, 再加入下一种溶剂。

1.5 动物模型的建立与鉴定

按照本课题组之前建立的方法^[8-10]制备 HBV cccDNA, 然后从尾静脉一次性高压注射质量浓度为 1 μg/mL 的 HBV cccDNA 于每只 CBA/CaJ 小鼠中, 注射量为小鼠体质量的 8% (约 2 mL), 注射时间控制在 6~8 s。高压注射后第 1 周和第 8 周分别采集小鼠血清, 按照 HBV 表面抗原诊断试剂盒说明检测血清中 HBsAg 含量, 并判断 HBsAg 阳性结果。第 1 周血清 HBsAg 阳性者 (样本光密度值与阴性对照孔平均光密度值 +0.100 的比值 ≥ 1.0), 初步判断为 HBV 小鼠感染成功;

第 8 周检测血清 HBsAg 阳性, 同时 HBV DNA 载量大于 10⁵ 拷贝/mL 者, 判断为 HBV cccDNA 模型阳性, 并用于后续的药物评价研究。

1.6 药物实验

成功转染 HBV cccDNA 后第 8 周 (处于急性期) 和第 26 周 (处于慢性期) 的小鼠分别随机分为苦参碱组、青蒿素组和生理盐水对照组。每组小鼠 6 只, 按小鼠体质量分别腹腔注射 50 μg/g 苦参碱、50 μg/g 青蒿素或同体积的 0.9% 氯化钠溶液 (此时记为给药第 0 周), 每 3 d 给药 1 次, 连续给药 9 次, 共 27 d (约 4 周)。给药过程中定期进行尾静脉采血, 急性期小鼠的具体采血时间点为给药前和开始给药后第 1、2、3、4 周, 慢性期小鼠的采血时间点为给药前和开始给药后第 2、4 周。在最后一次收集血清后, 急性期和慢性期所有小鼠经麻醉后以脱颈椎法无痛处死, 收集肝组织。

1.7 实时定量 PCR 法检测 HBV DNA 和 HBV cccDNA

用病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒提取小鼠血清或肝组织中 HBV 总 DNA。使用 CFX Connect™ Real-Time System 定量 PCR 检测仪和 Blaze iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix 试剂盒进行 HBV DNA 和 HBV cccDNA 的定量 PCR 检测。HBV DNA 的上游引物 (1493) 序列为 5'-TTCTCCGCCTGTCGTACC-3', 下游引物 (1638) 序列为 5'-GGTTTCTGTGGGCGTTCC-3'; HBV cccDNA 的上游引物 (1559) 序列为 5'-CTTCTCATCTGCCGACC-3', 下游引物 (1864) 序列为 5'-CACAGCTTGGAGGCTTGA-3'。

在进行 HBV cccDNA 荧光定量 PCR 检测之前, 用核酸外切酶 T₅ 处理样品, 去除线性和有缺口的 DNA, 仅保留 cccDNA, 以避免细胞基因组、HBV rcDNA 对 cccDNA 的影响, 使定量检测结果更加准确。按照 T₅ 核酸外切酶试剂盒说明书, 37 °C 处理 1 h 后, 再 72 °C 20 min, 酶切结束后的产物置于 -20 °C 保存备用。定量检测 HBV DNA 和 cccDNA 的 PCR 扩增条件如下: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 10 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min, 并读取熔解曲线。定量 PCR 检测时使用合成的已知拷贝数的标准品 (5 × 10⁸ 拷贝) 以

绘制标准曲线, 检测得到样本的 HBV DNA 或 cccDNA 拷贝数, 然后统计学分析两个药物组与生理盐水对照组的差异。

1.8 酶联免疫吸附法检测血清中 HBsAg 水平

按照HBV表面抗原诊断试剂盒操作说明书步骤, 采用酶联免疫吸附法检测用药后各组小鼠血清中 HBsAg 的水平。检测有效值的判断标准: 阴性对照孔平均光密度值 $NCx \leq 0.01$, 阳性对照孔平均光密度值 ≥ 1 , 判断为检测操作有效无误; 样本光密度值与 COV 值 ($COV = NCx + 0.100$) 的比值 ≥ 1.0 , 判断为样本 HBsAg 阳性。样本 HBsAg 表达量的计算: 用 HBsAg 标准质控品建立的标准曲线, 按照样本光密度值和 HBsAg 标准曲线得到的公式计算 HBsAg 含量; HBsAg 标准质控品的含量为 4 U/mL, 样本 HBsAg 检测时对样本进行 100 倍稀释, 因此计算得到的样本 HBsAg 含量不超过有效范围, 单位计为 10^2 U/mL。

1.9 免疫组织化学法检测肝组织中 HBsAg 和 HBcAg 水平

将小鼠肝脏组织固定在 4% 多聚甲醛溶液中, 随后进行石蜡包埋和切片。切片经过脱蜡和水化、抗原修复、抗体孵育等操作后, 用 DAB 染色并封固, 置于光学显微镜下评估。免疫组织化学法检测肝组织中 HBsAg 和 HBcAg 所使用的抗体 (工作液稀释比例) 分别为: 马抗 HBsAg (1:100) 和兔抗 HBcAg (1:200) 一抗, 兔抗马 IgG (1:200) 和山羊抗兔 IgG H&L (1:50) 二抗。免疫组织化学检测结果可示 HBsAg 表达在细胞质, HBcAg 表达在细胞核; 相应定位若在显微镜下观察到棕褐色, 则为抗原阳性信号。

1.10 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行实验结果数据分析。所有实验至少独立重复 3 次, 结果数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用方差分析, 组内两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 动物模型建立成功

一共注射 37 只 CBA/CaJ 小鼠, 尾静脉高压注射 HBV cccDNA 后第 8 周检测小鼠血清中 HBsAg

和 HBV DNA 含量。将 HBsAg 阳性且 HBV DNA 载量大于 10^5 拷贝者, 判定为 HBV cccDNA 模型阳性。结果显示, HBV cccDNA 模型阳性小鼠有 36 只, 建模阳性率为 97.30% (36/37)。

2.2 HBV 感染急性期苦参碱和青蒿素的抑制作用

2.2.1 急性期给药过程中小鼠血清 HBsAg 的表达

HBV 感染急性期 (即转染 HBV cccDNA 后第 8 周) 小鼠在苦参碱和青蒿素给药前 (第 0 周) 及给药后第 1、2、3、4 周, 酶联免疫吸附法检测小鼠血清中 HBsAg 的表达水平 (图 1A)。结果显示, 苦参碱和青蒿素对 HBV cccDNA 模型小鼠急性期 HBsAg 具有明显的抑制效果, 但前 3 周与生理盐水对照组相比差异没有统计学意义, 仅在第 4 周 HBsAg 水平才明显降低 ($P < 0.05$)。

2.2.2 急性期给药过程中小鼠血清 HBV DNA 的拷贝情况

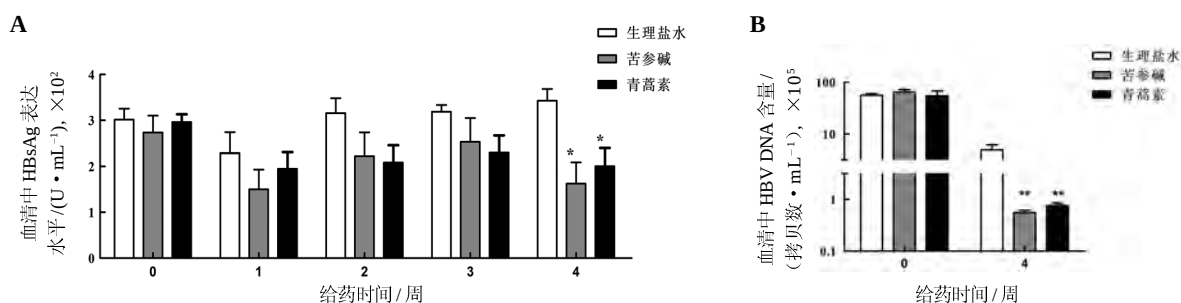
对 HBV 感染急性期小鼠, 采用实时定量 PCR 法检测苦参碱和青蒿素给药前及给药后第 4 周的小鼠血清中 HBV DNA 含量 (图 1B)。结果显示, 用药后第 4 周, HBV cccDNA 模型小鼠血清中 HBV DNA 拷贝数比生理盐水对照组明显减少 ($P < 0.01$)。

2.3 HBV 感染慢性期苦参碱和青蒿素的抑制作用

2.3.1 慢性期给药过程中小鼠血清 HBsAg 的表达

小鼠转染 HBV cccDNA 后第 26 周即携带 HBV 至 26 周, 进入 HBV 感染慢性期, 这时用同样的浓度和方法给予小鼠苦参碱和青蒿素治疗, 并在给药前及给药后第 2 周和第 4 周各进行一次尾静脉采血, 然后采用酶联免疫吸附法检测小鼠血清中 HBsAg 水平 (图 2A)。结果显示, 无论是第 2 周或第 4 周, 与相应的生理盐水对照组相比, HBsAg 变化均不明显 (均 $P > 0.05$)。

同时, 分析用药前 HBsAg 绝对值与用药后第 4 周 HBsAg 绝对值之差, 计算出相对降低水平 (即 Δ HBsAg), 其结果如图 2B 所示。结果表明, 用药后第 2 周, 两个药物组和生理盐水对照组的 Δ HBsAg 无明显差异 (均 $P > 0.05$); 但是, 用药后第 4 周, 与生理盐水对照组的 Δ HBsAg 相比, 苦参碱组和青蒿素组的 Δ HBsAg 均存在明



注: HBV cccDNA 转染后第 8 周即急性期, HBsAg 是乙型肝炎病毒表面抗原, HBV 是乙型肝炎病毒。与生理盐水对照组相比, 各用药组 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 每组 6 只小鼠。

图 1 急性期 CBA/CaJ 小鼠经苦参碱或青蒿素治疗后血清 HBsAg (A) 和 HBV DNA 水平 (B) 的变化

Figure 1 Serum HBsAg (A) and HBV DNA (B) levels in CBA/CaJ mice during acute phase after matrine or artemisinin treatment

显差异 (均 $P < 0.05$)。

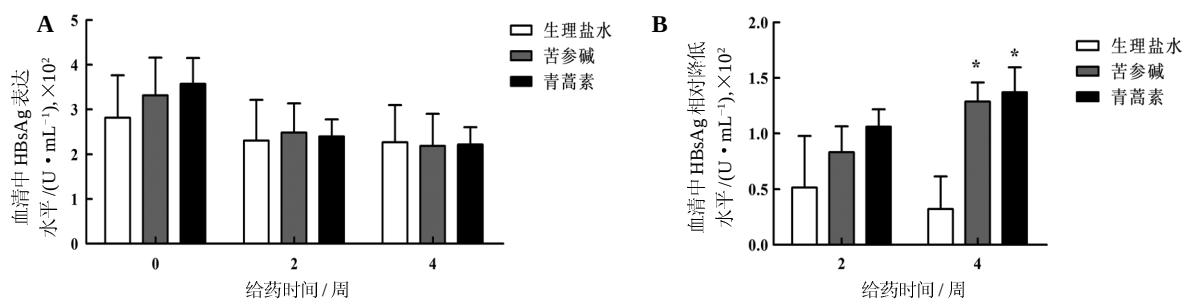
2.3.2 慢性期给药过程中小鼠血清及肝脏 HBV DNA 和 HBV cccDNA 拷贝数变化

在 HBV 感染慢性期, 给药后第 4 周收集小鼠血清及肝脏等样本, 分别提取病毒基因组 DNA, 采用实时定量 PCR 法检测各组小鼠血清中 HBV DNA (图 3A) 以及肝组织中 HBV DNA 和 HBV cccDNA (预先进行 T₅ 酶切处理) 的拷贝情况 (图 3B)。结果表明, 苦参碱能明显降低小鼠血清或肝组织中 HBV DNA 的拷贝数 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 也能明显降低小鼠肝组织中 HBV cccDNA 的拷贝数 ($P < 0.05$); 但是, 青蒿素仅对血清中 HBV DNA 有明显抑制作用 ($P < 0.05$), 而对肝组织中 HBV DNA 和 HBV cccDNA 作用均无明显影响 (均 $P > 0.05$)。

2.3.3 慢性期给药过程中小鼠肝组织 HBsAg 和 HBcAg 的表达

免疫组织化学法检测给药后 HBV 感染慢性期小鼠肝组织中 HBsAg 和 HBcAg 的表达情况, 结果显示, 生理盐水对照组和苦参碱、青蒿素给药组中均能观察到 HBsAg 和 HBcAg 阳性表达 (图 4A)。对观察到的阳性信号数量进行统计分析, 结果 (图 4B) 显示, 苦参碱对 HBsAg 和 HBcAg, 以及青蒿素对 HBsAg 作用均不明显 (均 $P > 0.05$); 但是, 青蒿素对 HBcAg 表达有明显的抑制作用 ($P < 0.05$)。

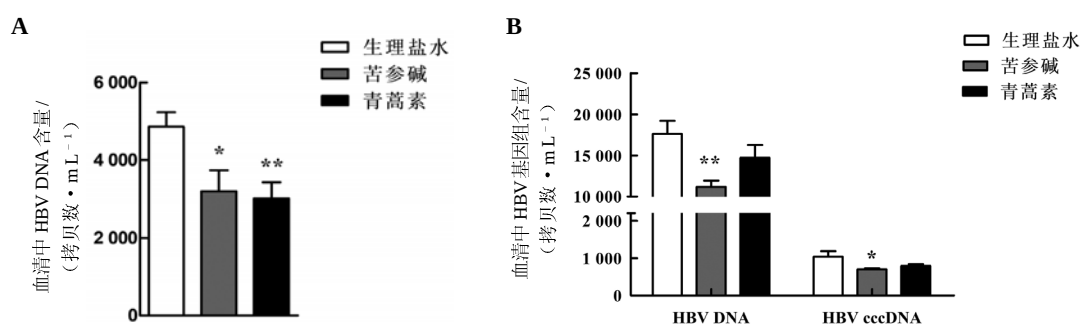
综上, HBV cccDNA 转染后 HBV 感染急性期和慢性期小鼠模型经苦参碱和青蒿素治疗后, 各药物对 HBV 主要标志物有不同程度的抑制效果 (表 1)。



注: HBV cccDNA 转染后第 26 周即慢性期。HBsAg 是乙型肝炎病毒表面抗原, HBV 是乙型肝炎病毒。与生理盐水对照组相比, 各用药组 * $P < 0.05$; 每组 6 只小鼠。

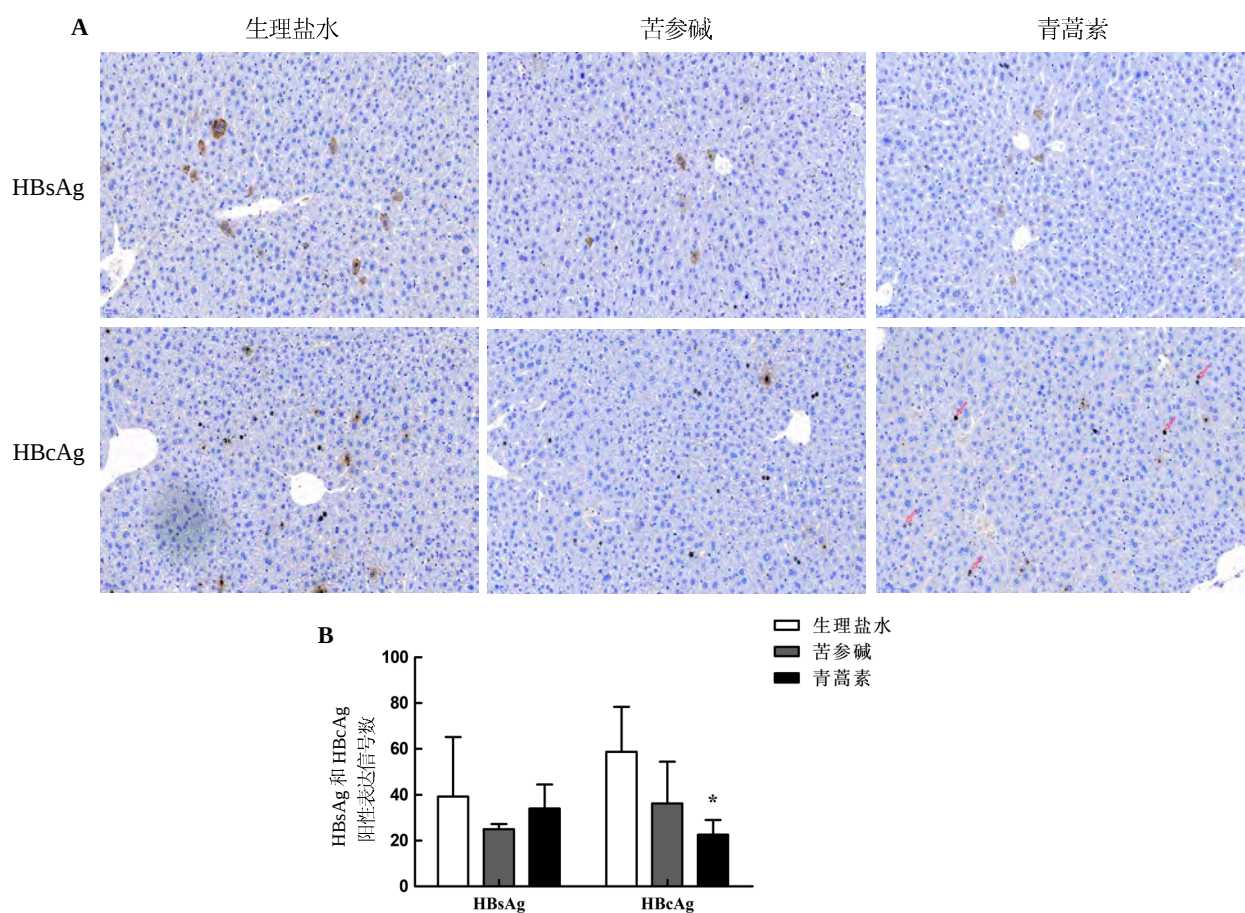
图 2 慢性期 CBA/CaJ 小鼠经苦参碱或青蒿素治疗后血清中 HBsAg 水平变化 (A) 及相对降低水平 (B)

Figure 2 Serum HBsAg level (A) and decrease (B) in CBA/CaJ mice during chronic phase after matrine or artemisinin treatment



注: HBV cccDNA 转染后第 26 周即慢性期。HBV 是乙型肝炎病毒, cccDNA 指共价闭合环状 DNA。与生理盐水对照组相比, 用药组 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 每组 6 只小鼠。

图 3 慢性期 CBA/CaJ 小鼠经苦参碱或青蒿素治疗后血清 (A) 及肝脏 (B) 中 HBV DNA 或 HBV cccDNA 拷贝数
Figure 3 The copy number of HBV DNA or cccDNA in serum (A) and liver tissues (B) of CBA/CaJ mice during chronic phase after matrine or artemisinin treatment



注: HBV cccDNA 转染后第 26 周即慢性期。HBsAg 为乙型肝炎病毒 (HBV) 表面抗原, HBcAg 为 HBV 核心抗原。与生理盐水对照组相比, 用药组 * $P < 0.05$; 每组 6 只小鼠。

图 4 免疫组织化学法检测慢性期 CBA/CaJ 小鼠经苦参碱或青蒿素治疗后肝组织中 HBsAg 和 HBcAg 的表达水平 (DAB 染色, ×200) (A) 及其阳性信号数量统计结果 (B)

Figure 4 Immunohistochemical detection of the expression levels (DAB staining, ×200) (A) and the number of positive signals (B) of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and hepatitis B virus core antigen (HBcAg) in liver tissues of CBA/CaJ mice during chronic phase after matrine or artemisinin treatment

表 1 HBV cccDNA 转染小鼠模型给药 4 周后苦参碱和青蒿素对 HBV 的抑制效果评价

Table 1 Inhibitory effects of matrine and artemisinin on HBV in HBV cccDNA mouse model after 4 weeks of administration

药物	急性期		慢性期						
	血 清		血 清			组 织			
	HBsAg	HBV DNA	HBsAg	ΔHBsAg	HBV DNA	HBsAg	HBcAg	HBV DNA	HBV cccDNA
苦参碱	*	**	—	*	*	—	—	**	*
青蒿素	*	**	—	*	**	—	*	—	—

注: * 表示 $P<0.05$; ** 表示 $P<0.01$; — 表示 $P>0.05$; HBsAg 为乙型肝炎病毒 (HBV) 表面抗原, HBcAg 为 HBV 核心抗原, ΔHBsAg 表示 HBV 相对表面抗原表达水平。

3 讨论

苦参碱是从豆科槐属植物苦参中分离出来的一种单体化合物,有效成分为生物碱,具有抗炎、抗病毒及抗肿瘤等药理作用^[12-13]。迄今,在抑制 HBV 作用方面,临床试验结果显示,苦参碱单独或联合其他药物能抑制肝细胞表达和分泌 HBsAg,并抑制 HBV DNA 复制^[6, 15-17]。尽管苦参碱已被应用于慢性乙肝治疗,但其更多的功能并不清楚。而来源于黄花蒿的青蒿素,在抑制 HBV 的作用方面目前报道较少。Romero 等^[11]利用 HepG2 2.2.15 细胞模型,初步证明青蒿素与拉米夫定联合使用具有协同抗 HBV 的作用。因此,青蒿素作为抗 HBV 感染的抗病毒药物值得进一步评价。

HBV 的 HBsAg 和 (或) HBV DNA 在动物体内存在时间超过 6 个月时,即由急性 HBV 感染转为慢性 HBV 感染^[18]。另外,HBV 感染免疫系统发育完善的成年人后,90% 的成年人只是一过性感染,即表现为急性感染。而母婴传播导致新生儿 HBV 感染时,由于新生儿免疫功能尚未发育完善,不能清除母亲传染给的 HBV,90% 的新生儿会在感染超过 6 个月时发展成为慢性乙肝^[19]。因此,探索不同时期的药物作用效果,对指导临床用药具有十分重要的意义。

近年来,HBsAg 定量检测已在临床中被广泛应用,其水平可以反映疾病分期与疾病进展风险。HBV DNA 定量主要用于评估 HBV 感染者体内的病毒复制水平,是抗病毒治疗适应症选择及疗效判断的重要指标。另外,HBcAg 在区分疾病分期、预测肝细胞癌发生风险方面是一个重要

的相关性指标^[18]。同时,cccDNA 是 HBV 进入细胞、建立感染后进行复制和增殖的直接模板^[20],是现有的抗病毒药物治疗亦难以清除的主要遗传物质^[21],也是乙肝药物研究的“终极”靶点^[22]。因此,检测上述指标可有效评估药物的作用效果。

本研究首先应用课题组前期建立的技术体系,高压注射体外合成的 HBV cccDNA 于 37 只免疫功能正常的 CBA/CaJ 小鼠尾静脉后,发现 HBsAg 阳性且 HBV DNA 大于 1×10^5 拷贝/mL 的小鼠有 36 只,模型成功率达 97.30%。随后的实验结果证实,该模型的 HBV 标志物,尤其是 HBV cccDNA 均能表达,病毒携带时限可长达半年以上,与前期实验结果^[8-10]一致。该模型的成功建立,为后续药效评价奠定了基础。

随后,本课题组将 36 只 HBV cccDNA 阳性小鼠模型分成 HBV 感染急性期和 HBV 感染慢性期,系统观察苦参碱和青蒿素对 HBV 主要标志物的抑制效果。在感染急性期,苦参碱和青蒿素既能够明显抑制血清中 HBsAg 的分泌,又能降低血清 HBV DNA 的复制;结果提示,苦参碱和青蒿素对 HBV 感染急性期的患者作用明显。在感染慢性期,苦参碱和青蒿素能明显降低血清中 ΔHBsAg 及 HBV DNA 水平;前者结果未见报道,而后者与以往文献报道的体外实验结果及临床结果^[6, 11, 22-24]基本一致。同时本研究还发现,在感染慢性期,苦参碱和青蒿素对血清和肝组织中 HBsAg 的抑制作用不明显;这与已报道的临床结果^[6, 22-24]有一定差异,可能是本研究中生理盐水对照组与两个药物组的起始 HBsAg 水平不一致所致。进一步观察苦参碱和青蒿素对肝组织中 HBV 标志物的作

用, 结果发现, 苦参碱和青蒿素对 HBsAg 均无明显作用。更有趣的是, 本研究还发现苦参碱和青蒿素对 HBV 的作用效果是不同的: 苦参碱能有效抑制 HBV DNA 和 HBV cccDNA, 而对 HBcAg 无明显抑制作用; 相反, 青蒿素能有效抑制 HBcAg, 而对 HBV DNA 和 HBV cccDNA 无明显抑制作用。以上研究结果提示: 苦参碱和青蒿素在小鼠体内对肝组织中的 HBV 有一定程度的抑制作用, 同时两种药物的抗 HBV 作用机制可能存在一定差异。

综上所述, 本研究首次应用免疫正常的 HBV cccDNA 转染小鼠模型在急性感染期和慢性感染期进行了苦参碱和青蒿素抗 HBV 有效性评价的示范研究, 结果发现苦参碱和青蒿素对 HBV 均有不同程度的抑制作用, 这一结果与以往文献报道^[23-24]基本一致。除此之外, 本研究结果还丰富了苦参碱和青蒿素对 HBV 感染慢性期肝组织中标志物 cccDNA、HBcAg 等的的作用功效评价数据, 为使用苦参碱和青蒿素进行抗 HBV 治疗提供了新的理论依据。后续本课题组还将充分利用该小鼠模型的优势进一步开展药物作用机制, 尤其是免疫机制的研究, 以期对 HBV 急性感染期和慢性感染期药物评价提供更多数据支持。

参考文献:

- [1] JIA L Y, GAO Y N, HE Y W, et al. HBV induced hepatocellular carcinoma and related potential immunotherapy[J]. *Pharmacol Res*, 2020, 159:104992. DOI:10.1016/j.phrs.2020.104992.
- [2] European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(2): 370-398. DOI:10.1016/j.jhep.2017.03.021.
- [3] LIU J, LIANG W N, JING W Z, et al. Countdown to 2030: eliminating hepatitis B disease, China[J]. *Bull World Health Organ*, 2019, 97(3):230-238. DOI:10.2471/BLT.18.219469.
- [4] SMITH S, HARMANCI H, HUTIN Y, et al. Global progress on the elimination of viral hepatitis as a major public health threat: an analysis of WHO Member State responses 2017[J]. *JHEP Rep*, 2019, 1(2):81-89. DOI:10.1016/j.jhepr.2019.04.002.
- [5] CHEN Z C, ENGLE R E, SHEN C H, et al. Distinct disease features in chimpanzees infected with a precore HBV mutant associated with acute liver failure in humans[J]. *PLoS Pathog*, 2020, 16(8):e1008793. DOI:10.1371/journal.ppat.1008793.
- [6] 王冠蕾, 富大智. 苦参碱与恩替卡韦联合介入治疗乙型肝炎的临床疗效分析[J]. *贵州医药*, 2018, 42(4):420-422. DOI:10.3969/j.issn.1000-744X.2018.04.013.
- [7] CHOU H H, CHIEN W H, WU L L, et al. Age-related immune clearance of hepatitis B virus infection requires the establishment of gut microbiota[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2015, 112(7):2175-2180. DOI:10.1073/pnas.1424775112.
- [8] CAO M, ZHAO Z H, TANG Y W, et al. A new hepatitis B virus e antigen-negative strain gene used as a reference sequence in an animal model[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(2):502-507. DOI:10.1016/j.bbrc.2018.01.081.
- [9] LIU Y, ZHAO Z H, LV X Q, et al. Precise analysis of the effect of basal core promoter/precore mutations on the main phenotype of chronic hepatitis B in mouse models[J/OL]. *J Med Virol* (2020-05-19) [2021-01-02]. <https://doi.org/10.1002/jmv.26025>.
- [10] WANG L, CAO M, WEI Q L, et al. A new model mimicking persistent HBV e antigen-negative infection using covalently closed circular DNA in immunocompetent mice [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4):e0175992. DOI:10.1371/journal.pone.0175992.
- [11] ROMERO M R, EFFERTH T, SERRANO M A, et al. Effect of artemisinin/artesunate as inhibitors of hepatitis B virus production in an "in vitro" replicative system[J]. *Antiviral Res*, 2005, 68(2):75-83. DOI:10.1016/j.antiviral.2005.07.005.
- [12] SHI J F, HAN X, WANG J F, et al. Matrine prevents the early development of hepatocellular carcinoma like lesions in rat liver[J]. *Exp Ther Med*, 2019, 18(4):2583-2591. DOI:10.3892/etm.2019.7875.
- [13] GONG X B, GAO Y, GUO G Q, et al. Effect of matrine on primary human hepatocytes *in vitro*[J]. *Cytotechnology*, 2015, 67(2):255-265. DOI:10.1007/s10616-013-9680-1.
- [14] BLAZQUEZ A G, FERNANDEZ-DOLON M, SANCHEZ-VICENTE L, et al. Novel artemisinin derivatives with potential usefulness against liver/colon cancer and viral hepatitis[J]. *Bioorg Med Chem*, 2013, 21(14):4432-4441. DOI:10.1016/j.bmc.2013.04.059.
- [15] 唐超, 马军伟, 刘辉, 等. 恩替卡韦联合苦参碱对慢性乙型肝炎的疗效及对炎症因子水平的影响[J]. *西北药学杂志*, 2019, 34(5):673-676.
- [16] 孔李远, 孔维环, 赵莉. 苦参碱联合恩替卡韦对慢性乙型肝炎肝纤维化的影响[J]. *中国实用医刊*, 2020, 47(8):108-110. DOI:10.3760/cma.j.cn115689-20191218-09088.

(下转第 130 页)

皮肤光老化小鼠模型的构建及效果评估

孔悦¹, 郭砚²

(1. 青海大学研究生院, 西宁 810001; 2. 青海大学附属医院医学美容科, 西宁 810001)

[摘要] 目的 建立中波紫外线诱导小鼠皮肤光老化动物模型, 为皮肤光老化的研究提供参考。方法 30 只雄性 KM 小鼠分为对照组和模型组, 对照组接受正常光照, 模型组使用 D-半乳糖皮下注射联合中波紫外线每日照射 40 min, 每次辐射量为 120 mJ/cm², 持续 40 d。通过小鼠背部脱毛皮肤表面肉眼观察, 皮肤组织 HE 染色和 Masson 染色病理学观察, 皮肤组织匀浆中谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量测定, 以及采用蛋白质印迹法检测小鼠背部脱毛皮肤中基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、c-fos 和 c-jun 的表达水平, 进行建模效果评估。结果 与对照组相比, 模型组小鼠的皮肤颜色加深、松弛、干燥、粗糙, 且褶皱加深; 组织病理染色观察发现, 模型组的表皮增厚, 真皮层纤维减少、断裂、排列杂乱。模型组的皮肤中 GSH-PX 和 SOD 活性降低, HYP 含量降低, MDA 含量增加, 而且 MMP-1、c-fos 和 c-jun 表达水平明显升高, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。结论 皮下注射 D-半乳糖联合中波紫外线照射后, 小鼠产生的皮肤损伤与光老化的皮肤损伤一致; 该模型可作为一种有效的皮肤光老化小鼠模型。

[关键词] 皮肤光老化; 动物模型; 中波紫外线; D-半乳糖; 小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0116-06

Construction and Evaluation of Skin Photoaging Mouse Model

KONG Yue¹, GUO Yan²

(1. Graduate School of Qinghai University, Xining 810001, China; 2. Department of Medical Cosmetology, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining 810001, China)

Correspondence to: GUO Yan, E-mail: qhguoyan@163.com

[Abstract] **Objective** To establish a mouse model of skin photoaging induced by ultraviolet B (UVB) radiation, and to provide a reference for the study of skin photoaging. **Methods** Thirty male KM mice were divided into a control group and a model group. The control group received normal light, while the model group was subcutaneously injected with D-galactose combined with narrow-band UVB daily irradiation for 40 min at a dose of 120 mJ/cm² for 40 d. The skin appearance of mice with fur on the back being removed was observed. Skin tissue pathology was observed after HE staining and Masson staining. Biochemical indexes of skin tissue homogenate including glutathione peroxidase (GSH-PX), superoxide dismutase (SOD), hydroxyproline (HYP), and malondialdehyde (MDA) were measured by enzymatic analysis. The expressions of matrix metalloproteinase-1 (MMP-1), c-fos, and c-jun were determined by Western blotting. **Results** The skin of the model group was darker, looser, drier, more rough, and deeper than that of the control group. Pathological observation revealed that the epidermis thickened and the dermis fibers were reduced, broken, and disorderly arranged in the model group. In the model group, the activities of GSH-PX and SOD decreased, the content of MDA increased, the content of HYP decreased, and the expression levels of MMP-1, c-fos and c-jun of the model group increased (all $P < 0.01$). **Conclusion** The skin damage of mice induced by subcutaneous injection of D-galactose combined with UVB irradiation is consistent with photoaging, so it is an effective mouse model of skin photoaging.

[Key words] Skin photoaging; Animal model; Ultraviolet radiation B; D-galactose; Mice

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81760781)

[作者简介] 孔悦(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 皮肤光老化的防治。E-mail: 516924741@qq.com

[通信作者] 郭砚(1968—), 女, 教授, 从事皮肤病的临床与基础研究以及防治工作。E-mail: qhguoyan@163.com

皮肤是人体最浅表且最大的器官,在保护人体免受环境损害和进行物质交换方面发挥了重要作用。皮肤衰老是一个由基因和外界环境因素等共同导致的复杂过程。皮肤老化分为内源性老化和外源性老化。内源性老化是指由基因决定的随着时间推移产生的自然老化。外源性老化是指环境因素如紫外线辐射、吸烟、毒害化学品等影响下产生的皮肤损害积累,其中紫外线辐射是导致外源性老化最主要的因素^[1]。因此,外源性老化又称为皮肤光老化。建立有效的皮肤光老化动物模型,是研究及防治人体皮肤光老化的基础。

日光中的紫外线 (ultraviolet, UV) 分为 3 个波段: 短波紫外线 (UVC, 190~290 nm)、中波紫外线 (UVB, 290~320 nm) 和长波紫外线 (UVA, 320~400 nm)^[2]。其中 UVC 几乎全被臭氧层吸收,到达地面的主要为 UVA 和 UVB; UVA 的活性很低,而 UVB 活性是 UVA 活性的 1 000 倍^[3]。UVB 主要导致皮肤表皮层和真皮浅层的损伤^[4],可引起皮肤松弛、干燥、粗糙、皱纹加深、色素沉着等,甚至可以导致皮肤癌^[5]。另一方面, D- 半乳糖是生物体内一种生理性的营养成分,在正常代谢中可以转化为葡萄糖。有研究发现,持续给动物注射大剂量 D- 半乳糖可引起与自然衰老相似的生理生化改变^[6-8]。因此,本实验采用窄谱 UVB (311~312 nm) 辐射联合 D- 半乳糖皮下注射的方法建立小鼠皮肤光老化模型,并评估其建模效果。

1 材料与方法

1.1 实验动物和饲养环境

SPF 级雄性 KM 小鼠 30 只,45 日龄,体质量为 22~25 g,购自西安交通大学医学部实验动物中心[SCXK (陕) 2018-001]。实验小鼠饲养及造模在青海大学医学院高原医学研究中心 SPF 级实验室[SYXK (青) 2020-001]进行,实验期间小鼠自由摄食饮水。本研究获得青海大学附属医院科研伦理委员会的审核批准(编号为 P-SL-2017066)。

1.2 主要试剂

D- 半乳糖和强效 RIPA 裂解液均购自北京索莱宝科技有限公司,HE 染色试剂盒和 Masson 三色染色试剂盒购自南京建成生物工程研究所,聚氰基丙

烯酸正丁酯 (butyleanoacrylate, BCA) 蛋白定量试剂盒购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司,超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-PX) 检测试剂盒、羟脯氨酸 (hydroxyproline, HYP) 检测试剂盒及丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所,兔抗鼠基质金属蛋白酶 1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、c-fos、c-jun 单克隆抗体购自英国 Abcam 公司,兔抗鼠 β -actin 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 购自北京索莱宝科技有限公司,电化学发光试剂 (electrochemiluminescence, ECL) 购自德国 Merck Millipore 公司。

1.3 主要仪器

40 W UVB 灯 (311~312 nm, TL 40W/01-RS) 为德国 Philips 公司产品,UVB 辐照度监视器 (UV-340A) 为中国台湾路昌电子企业股份有限公司产品,电泳仪 (PowerPac HC) 和化学发光成像仪 (ChemiDoc XRS) 为美国 Bio-Rad 公司产品,全波长酶标仪 (Multiskan GO) 为美国 Thermo Fisher 公司产品。

1.4 动物分组处理

在 22~25 °C、相对湿度为 60% 的环境下,实验小鼠自由饮水进食,适应性饲养 1 周后,通过随机数字表法分为对照组和模型组,每组 15 只。所有小鼠背部使用 4% 硫化钠溶液除去表面毛发,暴露大小约 4 cm × 4 cm 的皮肤,间隔 5 d 脱毛一次。模型组每日于颈背部皮下注射 5% D- 半乳糖 10 mg/kg; 并且将 UVB 灯置于小鼠上方 40 cm 垂直高处,照射前测辐射强度,每次辐射剂量为 120 mJ/cm²,持续 40 d。对照组每日于颈背部皮下注射 0.9% 氯化钠溶液 (即生理盐水) 10 mg/kg,但正常光照饲养。

1.5 皮肤肉眼观察及组织病理学观察

造模过程中,肉眼观察比较对照组和模型组照射后小鼠皮肤的光泽、光滑度等变化情况。实验第 42 天,所有小鼠经腹腔麻醉后颈椎脱臼法处死,剪取颈背部的脱毛皮肤约 4 cm × 4 cm 大小,送至青海大学附属医院中心实验室进行后续操作。去除皮下多余脂肪,取部分皮肤标本摊平

后,用4%多聚甲醛溶液固定,梯度乙醇溶液脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,4 μm 厚切片,然后行常规HE染色及Masson染色。余下皮肤组织保存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 待用。

1.6 酶生化法检测皮肤组织中SOD、MDA、HYP和GSH-PX含量

取出部分冷冻的小鼠皮肤组织,用眼科剪剪碎后,按照组织质量(g):试剂体积(mL)为1:9的比例加入0.9%氯化钠溶液,置于冰水浴中匀浆,2 000 $\times g$ 低温离心10 min。取上清液,用0.9%氯化钠溶液稀释成1%的皮肤组织匀浆液,然后按照试剂盒说明书操作,测定SOD、GSH-PX活性和MDA、HYP含量。

1.7 蛋白质印迹法检测皮肤组织中MMP-1、c-fos和c-jun的表达

取小鼠背部皮肤,眼科剪剪碎后加入RIPA裂解液,4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 $\times g$ 离心5 min后,取上清液。采用BCA法测定上清液中蛋白浓度,进行SDS-PAGE,然后将电泳分离的条带转移至PVDF膜;用1% BSA封闭1 h后,加入1:2 000稀释的一抗(兔抗鼠MMP-1、c-fos、c-jun和 β -actin单克隆抗体),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜;再加入1:10 000

稀释的二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG),室温孵育50 min;然后用ECL发光液显色,应用Image J软件进行显色条带分析。

1.8 统计学方法

使用GraphPad Prism 7.0软件进行统计学分析。每个样本重复检测3次,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

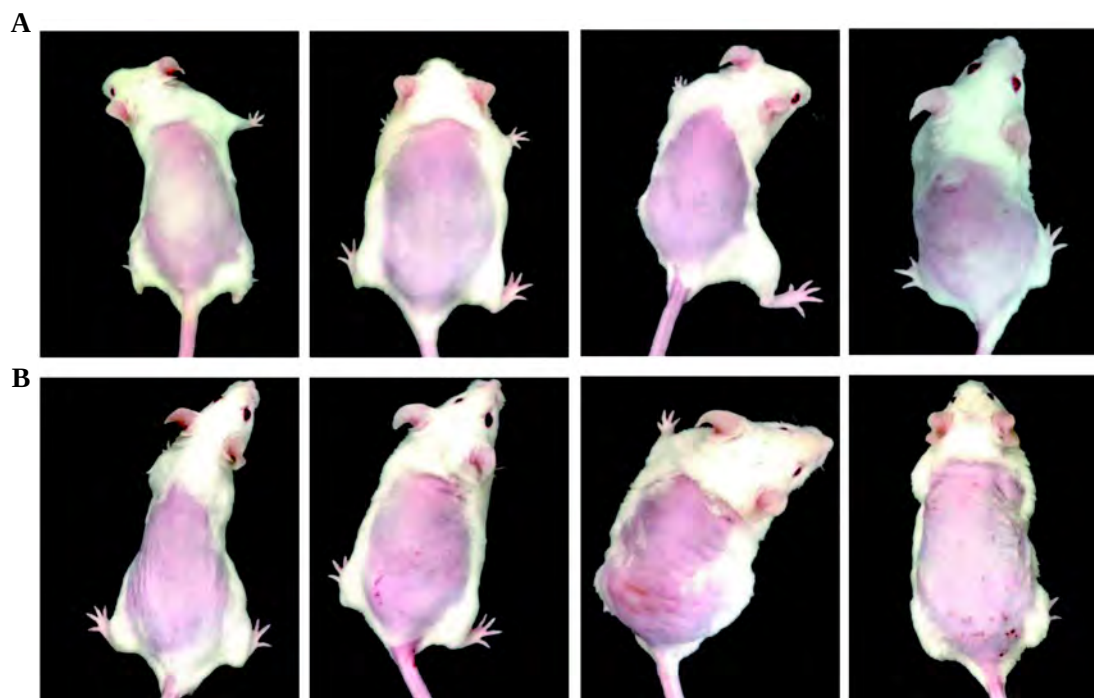
2 结果

2.1 两组小鼠皮肤的肉眼观察

在造模第10、20、30及40天对两组小鼠背部裸露皮肤拍照,肉眼观察结果如图1所示。可发现同一时间,与对照组相比,模型组小鼠经UVB照射后皮肤颜色变红,变松弛,并且明显干燥、脱屑、粗糙,甚至出现皱纹。

2.2 两组小鼠皮肤组织的HE染色

HE染色结果如图2A所示,低倍镜($\times 10$)下,与对照组相比,模型组小鼠UVB照射后表皮变厚,真皮胶原纤维疏松;高倍镜($\times 40$)下,与对照组相比,模型组小鼠经UVB照射后真皮层胶原纤维及弹力纤维缺失、断裂、卷曲,



注: A 为正常对照组, B 为 UVB 照射模型组; 从左到右, 依次为造模第 10、20、30 和 40 天。

图 1 两组小鼠皮肤肉眼观察

Figure 1 Visual inspection of skin of mice in two groups

结构松散, 排列紊乱。

2.3 两组小鼠皮肤组织的 Masson 染色

Masson 染色结果如图 2B 所示, 低倍镜(光镜 $\times 10$)下可发现, 与对照组相比, 模型组的表皮角质层变薄, 真皮层胶原纤维含量减少。高倍镜(光镜 $\times 40$)下可见, 对照组胶原纤维分布均匀, 排列紧密整齐; 而模型组胶原纤维分布不均, 含量减少, 出现断裂, 排列紊乱。

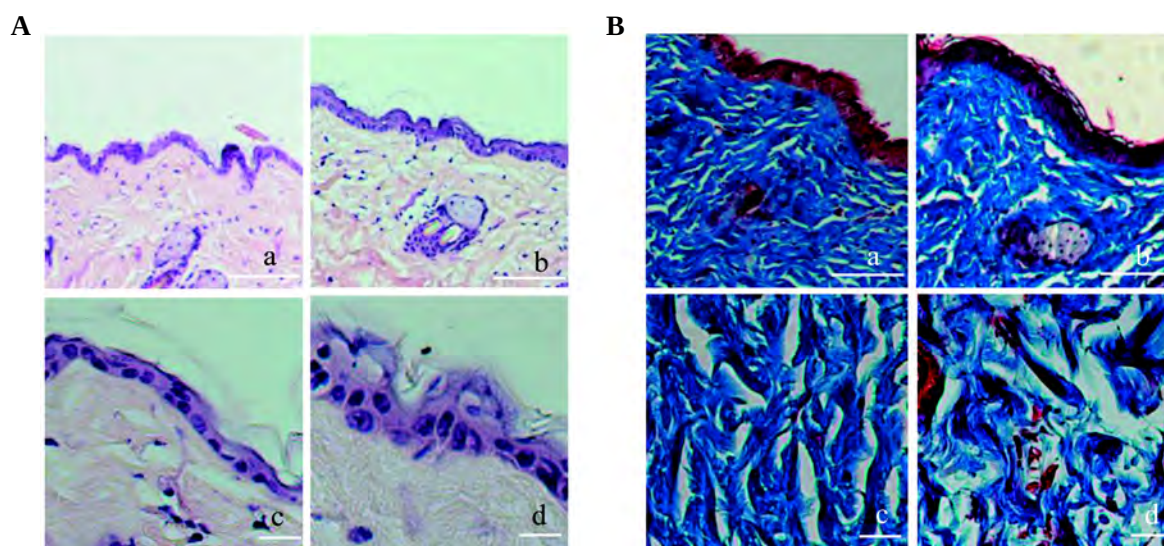
2.4 小鼠皮肤组织的生化指标检测

两组小鼠皮肤组织中各生化指标的检测结果如图 3 所示。与对照组相比, 模型组小鼠皮肤组

织中 SOD 和 GSH-PX 活性明显降低, HYP 含量明显减少, MDA 含量明显增多, 差异均具有统计学意义(t 值分别为 24.578、22.803、14.477 和 18.260, P 值均 < 0.01)。

2.5 小鼠皮肤组织中 MMP-1、c-fos 和 c-jun 蛋白的表达

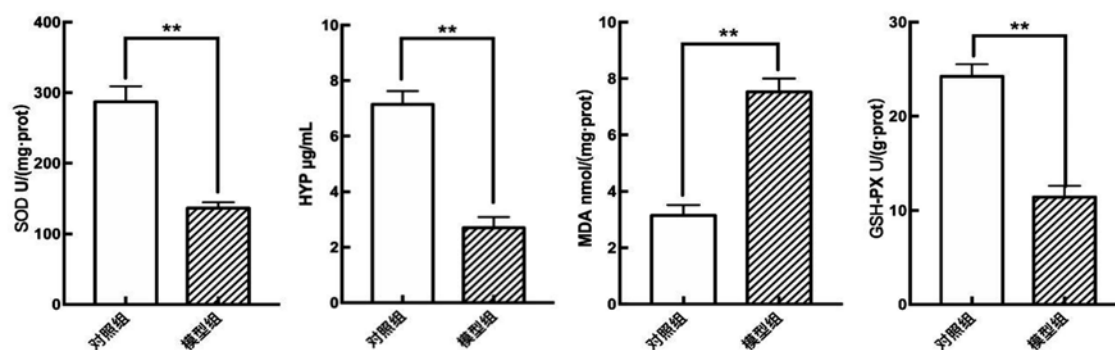
两组小鼠皮肤组织蛋白质印迹法检测结果见图 4。与对照组相比, 模型组小鼠皮肤组织中 MMP-1、c-fos、c-jun 表达水平明显升高, 差异均具有统计学意义(t 值分别为 11.814、10.786 和 7.717, P 值均 < 0.01)。



注: a 和 c 为正常对照组, b 和 d 为 UVB 照射模型组。a、b 图为低倍镜视野($\times 10$), 标尺为 $500\ \mu\text{m}$; c、d 图为高倍镜视野($\times 40$), 标尺为 $125\ \mu\text{m}$ 。

图 2 两组小鼠皮肤组织的 HE 染色(A)和 Masson 染色(B)结果

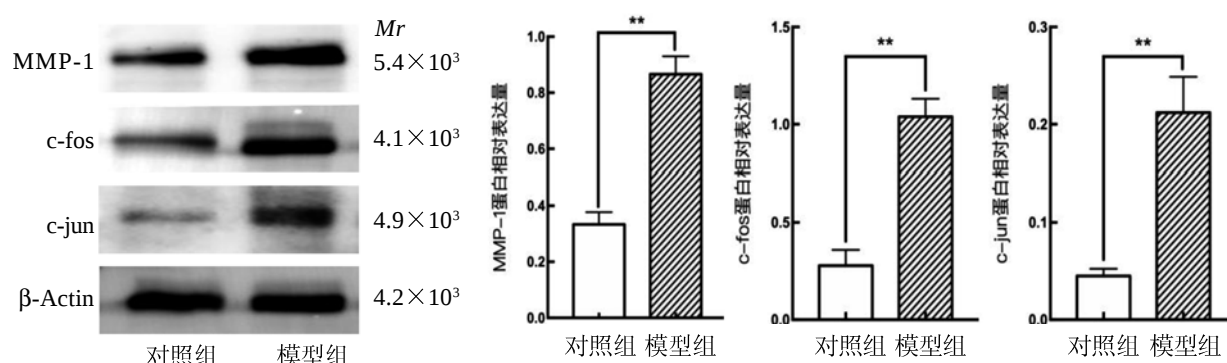
Figure 2 HE staining (A) and Masson staining (B) results of skin tissues of mice in two groups



注: SOD 为超氧化物歧化酶, HYP 为羟脯氨酸, MDA 为丙二醛, GSH-PX 为谷胱甘肽过氧化物酶。** $P < 0.01$, 每组 15 只。

图 3 两组小鼠皮肤组织中 SOD、HYP、MDA 和 GSH-PX 含量

Figure 3 Contents of SOD, HYP, MDA and GSH-PX in skin tissues of mice in two groups



注: MMP-1 为基质金属蛋白酶 1, c-fos 和 c-jun 为快速反应蛋白。** $P < 0.01$, 每组 15 只。

图 4 两组小鼠皮肤组织中 MMP-1、c-fos 和 c-jun 蛋白的表达量

Figure 4 Expressions of MMP-1, c-fos and c-jun in skin tissues of mice in two groups

3 讨论

随着社会老龄人口的增加,人们对皮肤衰老的关注度日益提高。皮肤衰老中 80% 都是光老化,因此有关光老化的研究具有重要意义,而建立简单有效的光老化动物模型可为光老化相关研究提供基础。在实验动物方面,有研究证实,无毛鼠可以直接用于光老化造模,且其发生的皮肤损伤与人类皮肤光老化极为相似^[9];但是由于无毛鼠的价格昂贵,国内学者多选择人工脱毛后的实验鼠来构建皮肤光老化的动物模型^[10-12]。

在光老化造模的光源方面,目前人们常用的是 UVB 和 UVB + UVA 辐射。而本研究选用的是 UVB 照射,同时联合 D-半乳糖皮下注射,成功建立了小鼠皮肤光老化模型。与 UVB 辐射模型和 UVB + UVA 辐射模型相比,本研究的造模时间更短,并且兼顾内源性老化和外源性老化,更加符合实际;而且本研究建模小鼠的皮肤光老化情况更加符合自然状态下受 UV 辐射和内环境共同影响的皮肤状况。另外,与 UVB + UVA 联合辐射模型相比,虽然本研究的 UVB 光源较单一,但其活性远高于 UVA,是导致皮肤光老化的主要因素;为了使造模更加经济、简便,故本研究选用 UVB 联合 D-半乳糖皮下注射的方法建立小鼠皮肤光老化模型。

氧化应激是皮肤光老化的机制之一^[13]。UV 辐射可诱导机体产生大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS),从而导致组织损伤,细胞内酶抗氧化系统中的 SOD 和 GSH 被大量消耗,氧

化的终产物 MDA 增多,间接反映了机体细胞的氧化损伤程度^[2]。基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 是一类需要钙、锌等金属离子作为辅助因子的蛋白水解酶,几乎可以水解细胞外基质中的全部蛋白成分^[14]。UV 辐射可以激活丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路和核因子- κ B (nuclear factor-kappa B, NF- κ B) 通路,从而增加 MMPs 的表达^[15-16]。MMPs 参与皮肤光老化、皮肤创伤修复等过程的细胞外基质重构^[17]。而且 MMPs 可以破坏皮肤胶原蛋白,这是皮肤老化的直接原因^[18]。其中, MMP-1 可降解 I 型和 III 型纤维胶原蛋白,引起胶原纤维的碎裂,在细胞外基质的修复过程中起到重要作用^[19]。细胞核内原癌基因 c-fos 和 c-jun 属于伤害性信息与即刻早期基因,其编码的蛋白为转录因子,可诱导下游基因的转录和表达,在细胞增殖和凋亡中起到重要的调节作用^[20]。

本实验结果显示,模型组小鼠的皮肤肉眼可见变红、松弛、粗糙、色素沉着、皱纹增加等;病理观察可发现表皮增厚,胶原纤维含量减少,排列紊乱。而且,模型组小鼠的皮肤组织中 SOD 和 GSH 活性降低, HYP 含量减少,而 MDA 含量增多, MMP-1 和 c-fos、c-jun 表达也明显增多,与自然光老化皮肤的损伤机制一致^[21-22]。因此,本研究的造模方法可用于复制有效的小鼠皮肤光老化模型。

需要说明的是,本研究未对皮肤光老化损伤程度与 UVB 辐射强度和 D-半乳糖注射剂量之间的

关系做深入分析,今后拟通过设置不同的UVB辐射强度和不同的D-半乳糖剂量组,进一步探讨造模过程中UVB辐射强度及D-半乳糖剂量对光老化损伤程度的影响。

参考文献:

- [1] GARRE A, NARDA M, VALDERAS-MARTINEZ P, et al. Antiaging effects of a novel facial serum containing L-Ascorbic acid, proteoglycans, and proteoglycan-stimulating tripeptide: *ex vivo* skin explant studies and *in vivo* clinical studies in women[J]. Clin Cosmet Investig Dermatol, 2018, 11:253-263. DOI:10.2147/CCID.S161352.
- [2] 吴斯敏, 杨慧龄. 紫外线引起皮肤光老化机制及防治的研究进展[J]. 医学综述, 2018, 24(2):341-346. DOI:10.3969/j.issn.1006-2084.2018.02.025.
- [3] OLIVEIRA M M, RATTI B A, DARÉ R G, et al. Dihydrocaffeic acid prevents UVB-induced oxidative stress leading to the inhibition of apoptosis and MMP-1 expression via p38 signaling pathway[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019:2419096. DOI:10.1155/2019/2419096.
- [4] SKLAR L R, ALMUTAWA F, LIM H W, et al. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review[J]. Photochem Photobiol Sci, 2013, 12(1):54-64. DOI:10.1039/c2pp25152c.
- [5] 龚婕, 马良娟. 皮肤光老化和抗氧化剂研究进展[J]. 中国麻风皮肤病杂志, 2019, 35(11):692-695.
- [6] 龚国清, 徐赓本. 小鼠衰老模型研究[J]. 中国药科大学学报, 1991, 22(2):101-103.
- [7] AZMAN K F, ZAKARIA R. D-Galactose-induced accelerated aging model: an overview[J]. Biogerontology, 2019, 20(6):763-782. DOI:10.1007/s10522-019-09837-y.
- [8] FOLCH J, BUSQUETS O, ETTCHETO M, et al. Experimental models for aging and their potential for novel drug discovery[J]. Curr Neuropharmacol, 2018, 16(10):1466-1483. DOI:10.2174/1570159x15666170707155345.
- [9] LIM J Y, KIM O K, LEE J, et al. Protective effect of the standardized green tea seed extract on UVB-induced skin photoaging in hairless mice[J]. Nutr Res Pract, 2014, 8(4):398-403. DOI:10.4162/nrp.2014.8.4.398.
- [10] 郭鲁义, 李春雨, 张宁, 等. 实用光老化动物模型建立方法的探讨[J]. 中国美容医学, 2008, 17(2):235-237. DOI:10.3969/j.issn.1008-6455.2008.02.031.
- [11] 张璃, 梁虹. 小白鼠皮肤光老化模型的建立[J]. 广东医学, 2005, 26(12):1642-1643. DOI:10.13820/j.cnki.gdyx.2005.12.026.
- [12] 杨汝斌, 万屏, 刘玲, 等. SD大鼠光老化模型中氧化性损伤及灯盏花素的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(6):1180-1182. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2012.06.031.
- [13] 刘媛, 李福民, 廖金凤, 等. 皮肤光老化机制研究进展[J]. 临床皮肤科杂志, 2016, 45(6):479-481. DOI:10.16761/j.cnki.1000-4963.2016.06.029.
- [14] KIM J, LEE C W, KIM E K, et al. Inhibition effect of Gynura procumbens extract on UV-B-induced matrix-metalloproteinase expression in human dermal fibroblasts[J]. J Ethnopharmacol, 2011, 137(1):427-433. DOI:10.1016/j.jep.2011.04.072.
- [15] MUTHUSAMY V, PIVA T J. The UV response of the skin: a review of the MAPK, NFkappaB and TNFalpha signal transduction pathways[J]. Arch Dermatol Res, 2010, 302(1):5-17. DOI:10.1007/s00403-009-0994-y.
- [16] VICENTINI F T, HE T Y, SHAO Y, et al. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF- κ B pathway[J]. J Dermatol Sci, 2011, 61(3):162-168. DOI:10.1016/j.jdermsci.2011.01.002.
- [17] YU W, YING H H, TONG F D, et al. Protective effect of the silkworm protein 30Kc6 on human vascular endothelial cells damaged by oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL)[J]. PLoS One, 2013, 8(6): e68746. DOI:10.1371/journal.pone.0068746.
- [18] TAKAHASHI Y, FUKUSHIMA Y, KONDO K, et al. Facial skin photo-aging and development of hyperpigmented spots from children to middle-aged Japanese woman[J]. Skin Res Technol, 2017, 23(4):613-618. DOI:10.1111/srt.12380.
- [19] 顾振华, 汪俊军. 基质金属蛋白酶-1的研究进展[J]. 医学研究生学报, 2006, 19(11):1028-1031. DOI:10.16571/j.cnki.1008-8199.2006.11.022.
- [20] FISHER G J, TALWAR H S, LIN J, et al. Molecular mechanisms of photoaging in human skin *in vivo* and their prevention by all-trans retinoic acid[J]. Photochem Photobiol, 1999, 69(2):154-157. DOI:10.1562/0031-8655(1999)0690154: mmopih>2.3.co;2.
- [21] 邓映, 杜宇, 刘萍, 等. 氧化应激在皮肤光老化中的作用[J]. 中国医疗美容, 2020, 10(8):117-122. DOI:10.19593/j.issn.2095-0721.2020.08.030.
- [22] 林芳. 金属蛋白酶在皮肤光老化信号通路中的研究进展[J]. 临床与病理杂志, 2018, 38(11):2502-2507. DOI:10.3978/j.issn.2095-6959.2018.11.033.

(收稿日期: 2020-11-10 修回日期: 2021-03-05)

肝螺旋杆菌感染促进高脂饲料诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝病进展

沈 宸^{1,2}, 吴志浩^{1,2}, 殷 俊^{1,2}, 朱立麒^{1,2}, 张 泉^{1,2,3}

(1. 扬州大学兽医学院, 扬州 225009; 2. 江苏高校动物重要疫病与人兽共患病防控协同创新中心, 扬州 225009; 3. 扬州大学附属医院, 扬州 225001)

[摘要] 目的 探讨肝螺旋杆菌 (*Helicobacter hepaticus*, H.h) 感染对高脂饮食 (high fat diet, HFD) 诱导非酒精性脂肪性肝病的影响。方法 20 只 6 周龄雄性 BALB/c 小鼠随机分为 4 组, 每组 5 只, 分别为空白对照组、HFD 组、H.h 组和 H.h+HFD 组。H.h+HFD 组感染 H.h 后喂养高脂饲料。各组饲喂 12 周后处死小鼠, 检测各组小鼠血清中三酰甘油 (triglyceride, TG)、丙氨酸转氨酶 (alanine transaminase, ALT) 和天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST) 的含量, 并采用油红 O 染色、天狼猩红染色、苏木精-伊红染色、实时荧光定量 PCR 和免疫组织化学法评估肝脏病变情况。结果 H.h+HFD 组小鼠血清中 TG、ALT 和 AST 水平均明显高于空白对照组 (均 $P < 0.05$), 且高于 H.h 组和 HFD 组 (均 $P < 0.05$)。H.h+HFD 组小鼠的肝脏组织出现脂肪沉积、肝细胞气球样变性和点状坏死灶, 胶原纤维大量沉积; H.h 组出现炎性细胞聚集和少量胶原纤维沉积; HFD 组出现脂滴堆积和脂肪样变, 以及少量胶原纤维沉积。H.h+HFD 组小鼠肝脏中白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) mRNA 转录水平比其他 3 组明显升高 (均 $P < 0.05$), 而且 α -SMA 和 Collagen I 蛋白也出现大量表达。结论 H.h 感染可以促进高脂饲料诱导的小鼠非酒精性脂肪性肝病发展。

[关键词] 肝螺旋杆菌; 非酒精性脂肪性肝病; 高脂饲料; 肝纤维化; 小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0122-09

Helicobacter hepaticus Infection Promotes High Fat Diet-induced Non-alcoholic Fatty Liver Disease in Mice

SHEN Chen^{1,2}, WU Zhihao^{1,2}, YIN Jun^{1,2}, ZHU Liqi^{1,2}, ZHANG Quan^{1,2,3}

(1. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Collaborative Innovation Center for Prevention and Control of Important Animal Epidemics and Zoonoses in Jiangsu Universities, Yangzhou 225009, China; 3. Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Corresponding author: ZHANG Quan, E-mail: zquan@yzu.edu.cn

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of *Helicobacter hepaticus* (H.h) on non-alcoholic fatty liver disease induced by a high fat diet (HFD). **Methods** Twenty 6-week-old male BALB/c mice were randomly divided into four groups: control group, H.h group, HFD group and H.h+HFD group. The H.h+HFD group was fed a HFD after H.h infection. After 12 weeks of feeding, the levels of triglyceride (TG), alanine transaminase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) were measured. Besides, the liver index was calculated, and oil red O staining, Sirius red staining, hematoxylin-eosin staining, real-time fluorescence quantitative PCR (RT-PCR) and immunohistochemistry were conducted to evaluate liver pathological changes in the liver samples. **Results** The serum levels of TG, ALT and AST in the H.h+HFD group were significantly higher

[基金项目] 江苏省重点研发计划(社会发展)项目(BE2020674)

[作者简介] 沈 宸(1996—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 实验动物病原学与比较医学。E-mail: sc875053794@163.com

[通信作者] 张 泉(1979—), 男, 博士, 教授, 研究方向: 实验动物病原学与比较医学。E-mail: zquan@yzu.edu.cn

than those in the control group, H.h group and HFD group (all $P < 0.05$). The livers of mice in the H.h+HFD group showed multiple lesions, fat accumulation, ballooning degeneration and necrosis, collagen fiber deposition. The livers of mice in the H.h group exhibited inflammatory cell aggregation and a small amount of collagen fiber deposition, whereas the livers of mice in the HFD group showed lipid droplets accumulation, steatosis and a small amount of collagen fiber deposition. Moreover, the mRNA levels of interleukin (IL)-6, IL-1 β , transforming growth factor- β (TGF- β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were significantly elevated in the livers of mice in the H.h+HFD group compared to the other three groups (all $P < 0.05$). The expressions of alpha-smooth muscle actin (α -SMA) and collagen type I (Collagen I) were significantly increased in the H.h+HFD group. **Conclusion** H.h infection can promote non-alcoholic fatty liver disease induced by feeding HFD to mice.

[Key words] *Helicobacter hepaticus*; Non-alcoholic fatty liver disease; High-fat diet; Liver fibrosis; Mice

非酒精性脂肪性肝病 (non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD) 是一种较为常见的慢性肝病, 在全球包括亚洲人群的患病率均约为 25%^[1-2]。而且随着肥胖及糖尿病患者的不断增加, NAFLD 患病率可能将持续升高。虽然大多数 NAFLD 患者早期仅有较轻微的症状, 但仍有部分患者可能向非酒精性脂肪性肝炎及肝纤维化进展, 最终发展为肝硬化, 甚至是肝癌。然而, 目前 NAFLD 的发病机制尚不完全清楚, 也无特异性治疗方法及特效药物。另一方面, 肠道菌群被认为是一个内源性的致病因子, 参与肥胖、胰岛素抵抗和 NAFLD 等代谢疾病的发生与发展^[3-4]。肝螺旋杆菌 (*Helicobacter hepaticus*, H.h) 是肠道菌群的一种, 可以感染多种品系的小鼠, 引起肝脏和肠道疾病^[5], 在人类肝脏中也有检出^[6]。本文旨在模拟人类肝脏复杂的内环境, 研究 H.h 感染对高脂饲料诱导小鼠 NAFLD 发生的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物及菌株

6 周龄 SPF 级雄性 BALB/c 小鼠 20 只, 体质量为 17~18 g, 购自上海灵畅生物科技有限公司 [SCXK (沪) 2018-0003], 饲养于扬州大学比较医学中心 SPF 级设施房 [SYXK (苏) 2017-0044]。环境温度为 (24 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$, 相对湿度为 (40~60) %, 光照周期为明暗时间各 12 h。实验前 H.h 检测呈阴性。H.h 细菌 (ATCC 51449) 购自美国标准菌种保藏中心, 保存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 主要试剂及仪器

苏木精 (货号 M1051740500) 和伊红 (货号 71014160) 购自国药集团化学试剂有限公司; 天狼猩红染液购自北京索莱宝科技有限公司 (货号 S8060); 饱和油红 O 染液 (货号 G1015) 购自武汉塞维尔生物科技有限公司; 三酰甘油 (triglyceride, TG) (货号 A110-1-1)、丙氨酸转氨酶 (glutamic-pyruvic transaminase, ALT) (货号 C009-1-1)、天冬氨酸转氨酶 (glutamic-oxaloacetic transaminase, AST) 检测试剂盒 (货号 C010-1-1) 购自南京建成科技有限公司; 多聚甲醛 (货号 30525-89-4) 购自上海麦克林生化科技有限公司; RNAiso PLUS (TRIzol) (货号 108-95-2) 和 PrimeScript RT Regent Kit with gDNA Eraser (货号 R323-01) 购自日本 TAKARA 公司; Universal SYBR Green Master (货号 4913850001) 购自上海罗氏制药有限公司; PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 兔抗鼠 α -平滑肌肌动蛋白 (alpha-smooth muscle actin, α -SMA)、胶原蛋白 I 型 (collagen type I, Collagen I) 抗体购自上海塞维尔生物科技有限公司; 链霉亲和素生物素标记的羊抗兔二抗购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒 (货号 DP302) 购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 高脂饲料 (脂肪含量为 70%) 购自南京君科生物工程有限公司; 酶标仪购自美国 BioTek 公司。

1.3 实验动物分组

20 只小鼠随机分为 4 组, 每组 5 只, 分别为空白对照组、高脂饮食 (high fat diet, HFD)

组、H.h组和H.h+HFD组。各组小鼠虽饲养于同一设施环境中,但通过分区域饲养避免组间交叉感染。H.h组和H.h+HFD组一次性灌胃H.h标准菌株菌液0.2 mL (1×10^8 CFU/mL)。H.h灌胃后饲养5 d,提取小鼠粪便DNA,PCR法检测16 S rRNA和*cdtB*基因以确认感染。PCR引物序列如下:16 S rRNA的上游引物为5'-GCATTTGAACTGTTACTCTG-3',下游引物为5'-CTGTTTTTCAAGCTCCCC-3';*cdtB*基因的上游引物为5'-ATGAAAGAGACTTTATTGCTTCA-3',下游引物5'-AGCCTGTGCATACCCTCATA-3'。确认感染成功后,HFD组和H.h+HFD组开始饲喂高脂饲料(此时记为造模开始),高脂饲料每天进行更换;空白对照组和H.h组饲喂常规饲料。各组小鼠均饲养12周,动物饲养及实验操作遵循实验动物伦理及福利要求。

1.4 血清生化指标检测

各组小鼠于造模开始当天及此后的第4、8、12周(本文中第*n*周均指第*n*周末)麻醉后颌下取血,每次取400 μ L/只。血液于室温条件下放置1 h后,置于4 $^{\circ}$ C冰箱过夜,然后于4 $^{\circ}$ C条件下1 000 r/min离心15 min,收集血清。根据试剂盒使用说明书检测各组小鼠血清中生化指标TG、ALT和AST的含量,用酶标仪读取数据。

1.5 代谢及肝指数检测

造模期间每周称量一次小鼠体质量,并记录。于造模开始后的第12周,用颈椎脱臼法处死小鼠。小鼠处死前12 h禁食,临处死前称量小鼠体质量,并摘眼球放血;处死后迅速取出肝脏,肉眼观察其颜色、外形,并称取肝脏质量,计算肝指数(肝指数=肝脏质量/体质量)。

1.6 肝脏组织病理学检测

分离肝脏后,取相同部位的部分肝组织,分别制作冰冻切片和石蜡切片。冰冻切片用于油红O染色,石蜡切片用于天狼猩红染色和HE染色,具体染色步骤根据各染色试剂说明书进行。然后在普通光学显微镜下观察肝脏脂肪堆积、胶原沉积和形态学变化,并进行肝组织病理学的等级评分。每只小鼠选取3张切片,200倍镜下随机观察20个视野,采用2005年美国非酒精性脂肪性肝炎临床研究工作组(Clinical Research Network,

CRN)提出的标准^[7]进行NAFLD活动度积分(NAFLD activity score, NAS)和肝纤维化评定,用于反映非酒精性脂肪性肝炎的严重程度。

NAS评定从3个方面分别进行评分:①显微镜下估计肝脂肪变性的面积,<5%为0分,5%~32%为1分,33%~65%为2分, $\geq 66\%$ 为3分;②显微镜下计数有肝小叶炎症反应的视野数,0个为0分,<2个为1分,2~3个为2分, ≥ 4 个为3分;③肝细胞气球样变性,无为0分,少见为1分,多见为2分。3项得分相加,总和为1~2分可排除非酒精性脂肪性肝炎,3~4分为非酒精性脂肪性肝炎可能,5~8分确诊非酒精性脂肪性肝炎。

采用CRN标准对肝纤维化进行评定时,根据逐渐发展的纤维化进程分为5级。①0期:无纤维化。②1期:窦周纤维化或门脉周围纤维化。1期又被细分为肝腺泡3区窦周纤维化轻度(仅在中央静脉边缘出现)(1A期)、肝腺泡3区窦周纤维化重度(1B期)和仅汇管区窦周纤维化(1C期)。③2期:窦周纤维化合并汇管区周围纤维化。④3期:纤维桥形成。⑤4期:肝硬化。

1.7 实时荧光定量PCR法检测肝脏组织中相关细胞因子表达

采用TRIzol法提取肝脏组织中总RNA,验证纯度后使用反转录试剂盒将其反转录成cDNA。然后使用GAPDH作为内参,采用实时荧光定量PCR法检测白细胞介素6(interleukin-6, IL-6)、IL-1 β 、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的相对转录水平。PCR反应条件:95 $^{\circ}$ C 10 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s,共40个循环。PCR引物序列如下:IL-1 β 上游引物为5'-GCAACTGTTCTGAACTCAACT-3',下游引物为5'-ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT-3';IL-6上游引物为5'-TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC-3',下游引物为5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3';TNF- α 上游引物为5'-AACTAGTGGTGCCAGCCGAT-3',下游引物为5'-CTTCACAGAGCAATGACTCC-3';TGF- β 上游引物为5'-TGCGCTTGCGAGAGATTAAAA-3',下

游引物为 5'-CTGCCGTACAACCTCCAG-TGA-3'; *GAPDH* 上游引物为 5'-CCATCACCATC-TTCCAGGAG-3', 下游引物为 5'-CCTGCTTCA-CCA-3'。每个样本做 3 次重复, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行结果分析。

1.8 免疫组织化学法检测肝脏组织中相关蛋白表达

选取各组小鼠肝脏组织的石蜡切片, 经过枸橼酸盐抗原修复后, 用 5% BSA 封闭, 然后加入兔抗鼠 α -SMA 和 Collagen I 一抗 (工作液体积稀释比例均为 1:400), 4 °C 反应 16 h。加入链霉亲和素生物素标记的羊抗兔二抗复合物, 37 °C 反应 30 min, 最后使用 DAB 显色液显色。光学显微镜下定性观察目的蛋白表达情况, 棕色标记即为蛋白表达阳性。

1.9 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件进行各实验结果数据分析, 并用 GraphPad Prism 8.0 软件制作统计图。各实验均独立重复 3 次, 结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较先进行方差分析, 再采用 Bonferroni 法进行两两比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

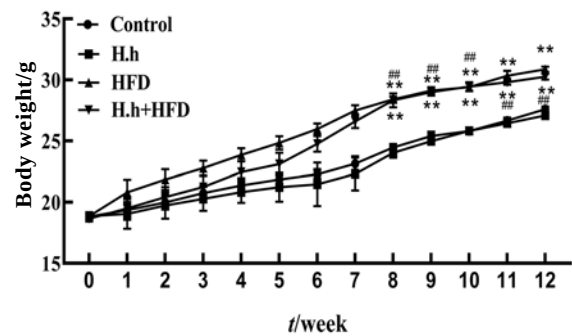
2 结果

2.1 小鼠一般情况

在造模饲养过程中, 空白对照组小鼠生长及生活习性正常, 毛色光泽; H.h 组小鼠被毛日渐粗乱; HFD 组和 H.h+HFD 组小鼠随着高脂饮食时间的延长, 被毛日渐疏松且油腻, 精神萎靡。各组小鼠体质量均逐渐增加, 其中 HFD 组和 H.h+HFD 组体质量增幅较大, 与空白对照组和 H.h 组相比的差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$, 图 1)。

2.2 小鼠血清生化指标变化

小鼠血清生化指标检测结果显示, 随着造模时间延长, 各组小鼠血清中 ALT、AST 及 TG 含量均增高。与空白对照组相比, HFD 组和 H.h+HFD 组 ALT 和 AST 值出现明显升高; H.h+HFD 组升高幅度更大, HFD 组次之; H.h 组也出现升高, 但幅度相对较缓 (均 $P < 0.05$, 图 3)。与空白对照组相比, H.h 组 TG 值增加不明显, 但 HFD 组和 H.h+HFD 组血清中 TG 值均明显升高, H.h+HFD 组升高幅度较 HFD 组更大, 差异具有统计学



注: Control 指空白对照组, H.h 指肝螺旋杆菌灌胃组, HFD 指高脂饮食组, H.h+HFD 指肝螺旋杆菌灌胃联合高脂饮食组。与 Control 相比, ** $P < 0.01$; 与 H.h 组相比, ## $P < 0.01$; 每组小鼠各 5 只。

图 1 各组小鼠体质量变化

Figure 1 Body weight of mice in different groups

意义 (均 $P < 0.05$, 图 2)。

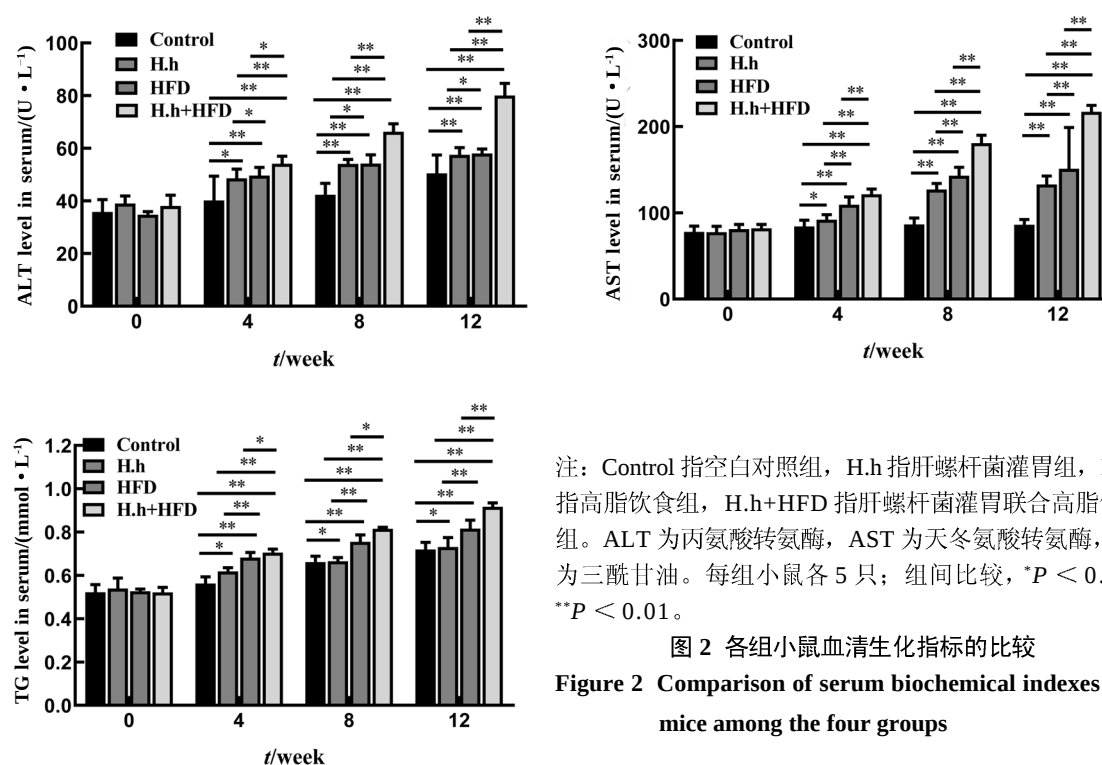
2.3 小鼠肝脏外形变化及肝指数情况

肝脏大体观察可见: 空白对照组小鼠肝脏表面光滑, 色泽鲜红, 质韧, 边缘锐利; H.h 组小鼠肝脏表面光泽变差, 颜色较暗淡; HFD 组小鼠肝脏表面颜色偏黄白, 有油腻感, 边缘变钝; H.h+HFD 组小鼠肝脏颜色偏黄且暗淡, 出现皱缩现象 (图 3)。称量肝脏质量后计算肝指数, 结果显示, HFD 组和 H.h+HFD 组肝指数分别为 (0.044 ± 0.003) 和 (0.048 ± 0.002) , 较空白对照组 (0.038 ± 0.005) 和 H.h 组 (0.036 ± 0.003) 均明显增加, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.4 小鼠肝脏组织病理学变化

HE 染色结果 (图 4A) 显示: 空白对照组小鼠肝细胞呈多边形, 细胞质丰富, 细胞核位于细胞中央, 小叶结构清晰, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列, 除有少量细胞出现小泡性脂肪变性外, 无气球样变性炎症细胞浸润; H.h 组有少量炎症细胞浸润, 呈聚集状, 肝小叶结构稍有紊乱, 肝细胞有少量脂肪变性; HFD 组肝小叶结构紊乱, 肝细胞脂肪变性较为明显, 以小泡性脂肪变性为主; H.h+HFD 组肝细胞脂肪变性更加严重, 为大、小泡混合型脂肪变性, 夹杂部分气球样变肝细胞, 且可见不同数量的炎症细胞浸润及点状坏死灶。

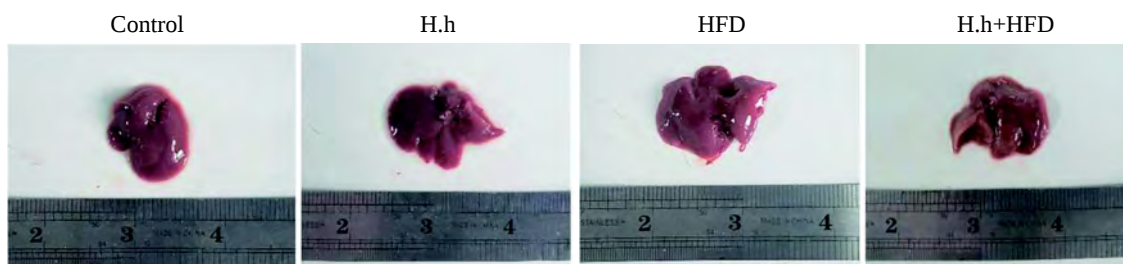
小鼠肝脏组织冰冻切片经油红 O 染色后观察



注: Control 指空白对照组, H.h 指肝螺旋杆菌灌胃组, HFD 指高脂饮食组, H.h+HFD 指肝螺旋杆菌灌胃联合高脂饮食组。ALT 为丙氨酸转氨酶, AST 为天冬氨酸转氨酶, TG 为三酰甘油。每组小鼠各 5 只; 组间比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图 2 各组小鼠血清生化指标的比较

Figure 2 Comparison of serum biochemical indexes in mice among the four groups



注: Control 指空白对照组, H.h 指肝螺旋杆菌灌胃组, HFD 指高脂饮食组, H.h+HFD 指肝螺旋杆菌灌胃联合高脂饮食组。

图 3 各组小鼠肝脏照片

Figure 3 Photographs of the livers of mice in the four groups

肝脏细胞中脂肪堆积情况 (图 4B)。结果显示: 空白对照组肝细胞质中脂滴小且极少; H.h 组肝细胞质中脂滴小且分布较为分散; HFD 组肝细胞质内含大量红色脂滴; H.h+HFD 组肝细胞质内含脂滴量最多。

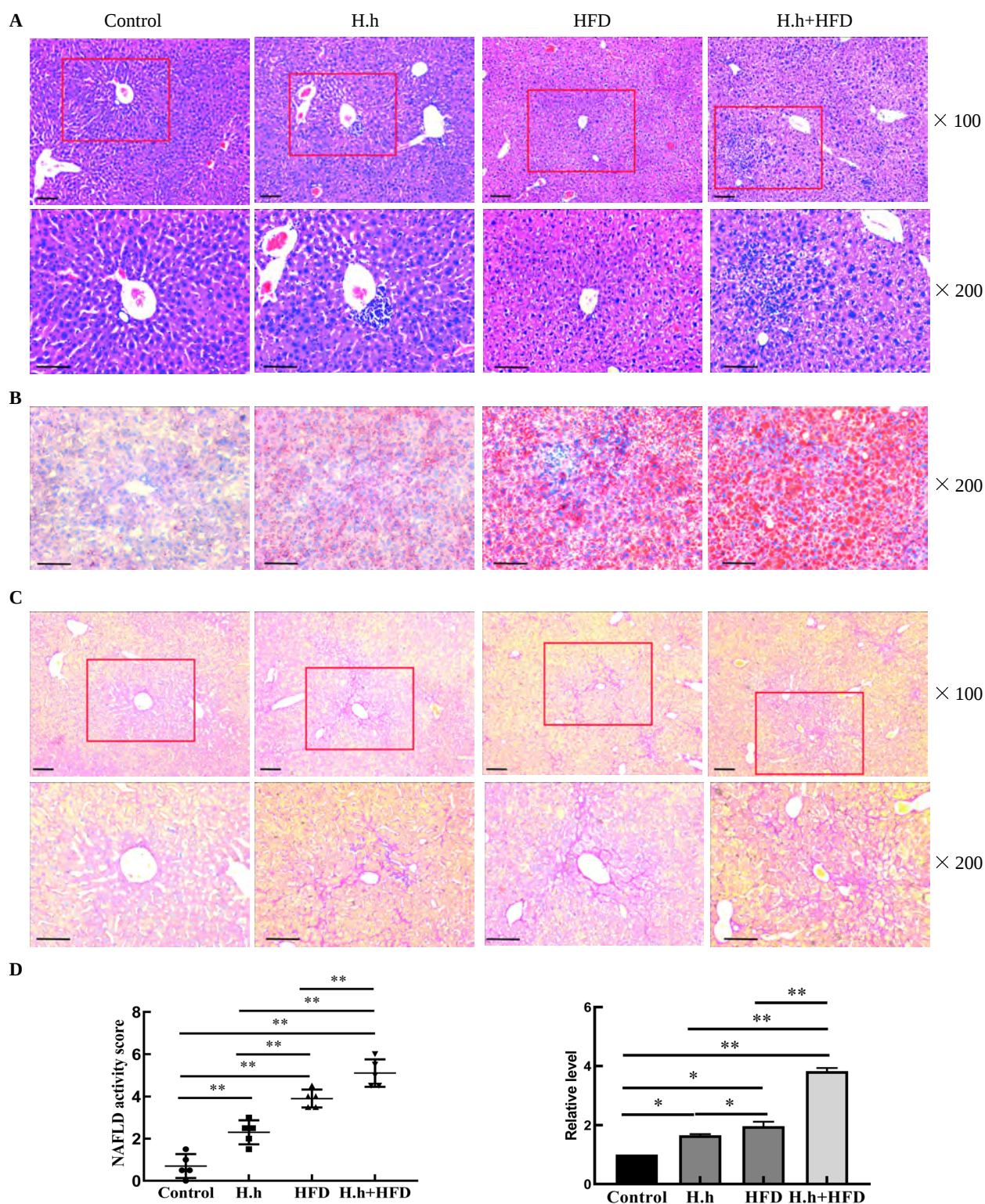
小鼠肝脏组织石蜡切片经天狼猩红染色后, 镜下观察肝脏组织中胶原沉积情况 (图 4C)。结果显示: 空白对照组小鼠肝组织中未见肝纤维化; H.h 组仅有窦周纤维化或汇管区周围纤维化 (1 期); HFD 组出现窦周纤维化合并汇管区/汇管区周围纤维化 (2 期); H.h+HFD 组可见纤维

桥形成 (3 期)。

NAS 和肝纤维化评定结果均显示, HFD 组和 H.h+HFD 组评分均明显高于空白对照组及 H.h 组, 各实验组间差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$, 图 4D), 且 HFD 组和 H.h+HFD 组的 NAS 评分值均 > 4 分, 提示这两组的小鼠出现非酒精性脂肪性肝炎及肝纤维化。

2.5 小鼠肝脏组织中相关细胞因子转录水平

实时荧光定量 PCR 法检测结果显示, 相比空白对照组, H.h 感染和饲喂高脂饲料均可以促进小鼠肝脏组织中 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 TGF- β



注：A 为 HE 染色，B 为油红 O 染色，C 为天狼猩红染色，标尺均 =100 μ m；D 为小鼠非酒精性脂肪性肝病（NAFLD）活动度积分（NAS）评分和纤维化相对评分。Control 指空白对照组，H.h 指肝螺旋杆菌灌胃组，HFD 指高脂饮食组，H.h+HFD 指肝螺旋杆菌灌胃联合高脂饮食组。每组小鼠各 5 只；组间比较，* P < 0.05，** P < 0.01。

图 4 各组小鼠肝脏组织的病理学变化

Figure 4 Hematoxylin-eosin staining (A), oil red O staining (B) and Sirius red staining (C) of liver tissues as well as the non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) activity score and liver fibrosis relative level (D) in mice of the four groups

转录; 其中, H.h+HFD 组的 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和 TGF- β 转录水平均明显高于空白对照组, 且高于 H.h 组和 HFD 组 (图 5); 各实验组间差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

2.6 小鼠肝脏组织中相关蛋白表达

小鼠肝脏组织的免疫组织化学检测结果显

示: 空白对照组小鼠肝组织中 α -SMA 和 Collagen I 蛋白基本不表达; H.h 组仅在窦周或汇管区有少量 α -SMA 和 Collagen I 蛋白表达; HFD 组在窦周合并汇管区 / 汇管区周围均有少量的 α -SMA 和 Collagen I 蛋白表达; 而 H.h+HFD 组小鼠肝组织中 α -SMA 和 Collagen I 蛋白大量表达 (图 6)。

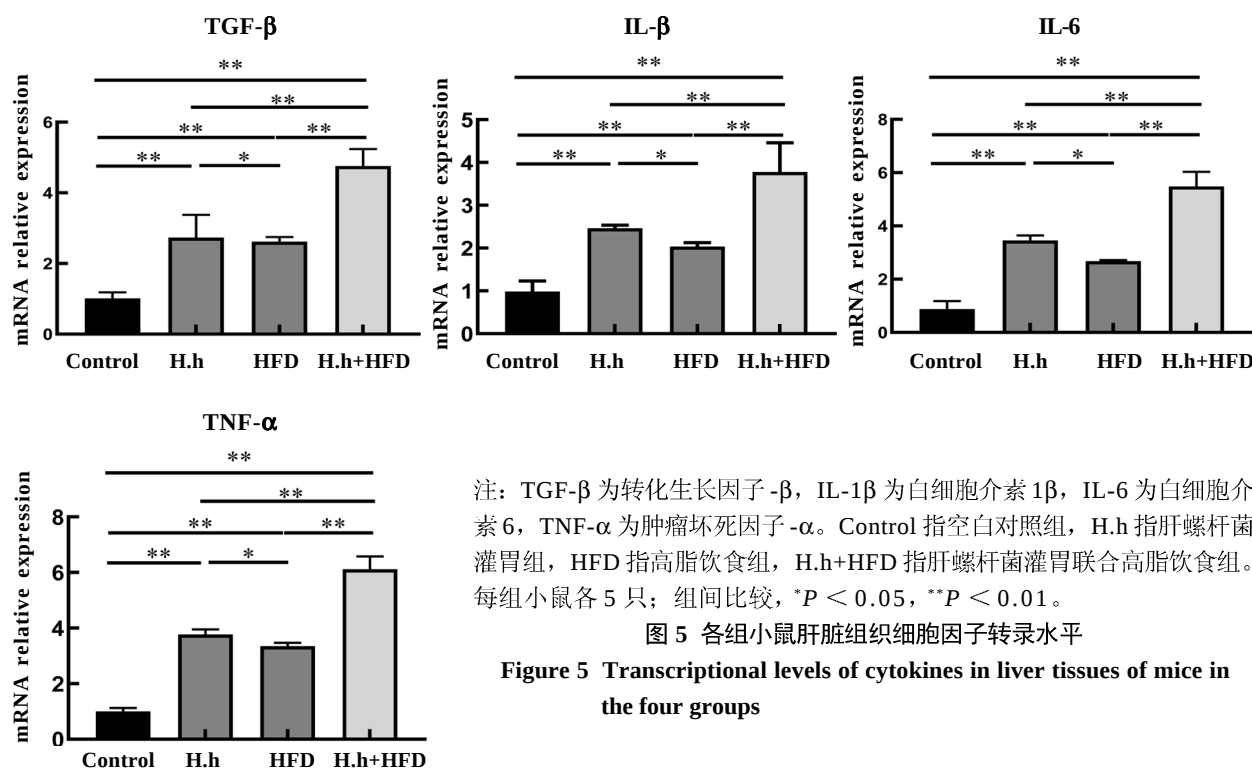
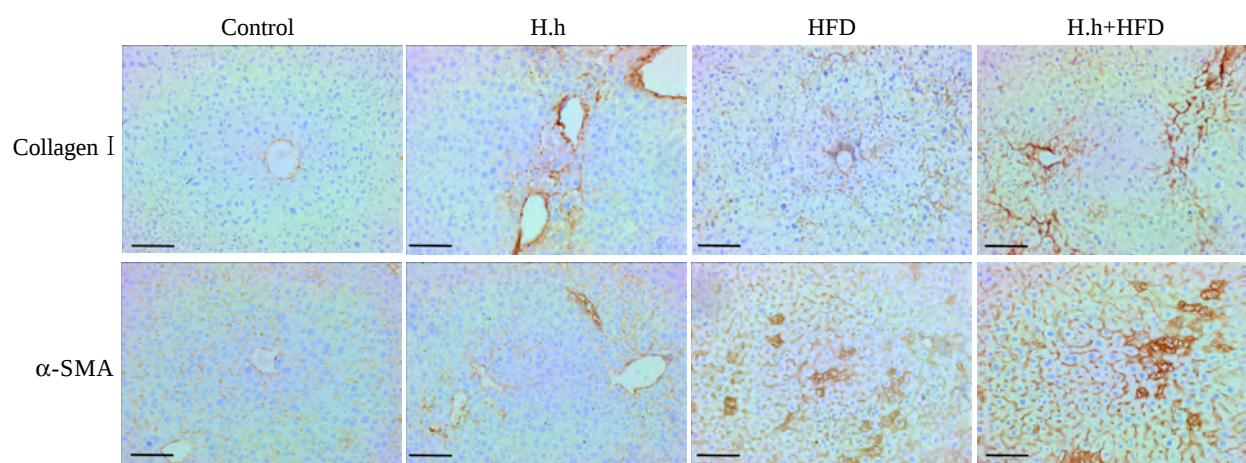


图 5 各组小鼠肝脏组织细胞因子转录水平

Figure 5 Transcriptional levels of cytokines in liver tissues of mice in the four groups



注: Collagen I 为胶原蛋白 I 型, α -SMA 为 α -平滑肌肌动蛋白。Control 指空白对照组, H.h 指肝螺旋杆菌灌胃组, HFD 指高脂饮食组, H.h+HFD 指肝螺旋杆菌灌胃联合高脂饮食组。图中标尺均 = 100 μ m。

图 6 各组小鼠肝脏组织中 α -SMA 和 Collagen I 的免疫组织化学结果 (DAB 显色, $\times 200$)

Figure 6 Immunohistochemical results of α -SMA and Collagen I in liver tissues (DAB staining, $\times 200$)

3 讨论

近年来,随着人类饮食结构和生活方式的改变,NAFLD的发病率不断攀升。据统计,中国成人NAFLD患病率为6%~27%,NAFLD年发病率为3.4%~9.1%^[8-10]。根据肝组织脂肪变性是否伴有炎症反应和纤维化,NAFLD可分为非酒精性脂肪肝、非酒精性脂肪性肝炎和非酒精性脂肪性肝炎相关性肝硬化3个阶段^[11]。NAFLD发生过程较为复杂,包括遗传和环境等因素^[12]。利用高脂饲料建立小鼠非酒精性脂肪肝模型,可有效模拟人类非饮酒类脂肪肝的病理状况。本研究中血清学与病理学结果显示,随着高脂饲料饲喂时间延长,小鼠肝组织中脂滴数量增多,TG水平上升,提示高脂饲料引起肝组织形态学改变,NAFLD模型建立成功。

近年来,肠道菌群在肝脏相关疾病,尤其是NAFLD中的作用备受关注。相关文献^[13-14]证实,在临床和动物实验中,肠道菌群失调参与了NAFLD的发病。肠道菌群主要通过影响机体代谢、增加肠道通透性和参与宿主免疫反应,以及调节炎症反应、脂肪及胆汁酸代谢等信号通路相关基因的表达等,促进NAFLD的发生^[15-17]。H.h是肠道菌群的一种,可感染多种哺乳动物。H.h的自然宿主是鼠类,在大鼠和小鼠中检出率较高,在人类肝脏组织中也有检出报告,推测其致病机制是一种细菌-肝炎-肝癌的发病模式^[18]。同时有研究表明,H.h感染可以导致并加快肝纤维化的形成^[19]。与此同时,高通量测序技术的发展及无菌实验动物的应用也为研究H.h对NAFLD发病的影响机制提供了有效手段。

本研究中通过H.h感染和高脂饲料喂养联合构建NAFLD模型,在造模过程中发现,小鼠肝组织中TNF- α 、IL-6和IL-1 β 等因子的转录水平明显升高;推测H.h感染可以通过激活相关蛋白通路(如信号转导与转录激活因子3通路等),促进大量炎症因子表达,从而调节细胞存活与增殖,参与炎症反应^[20]。另外,随着NAFLD的发展,大量积聚的活性氧使肝星状细胞活化,从而释放出TGF- β ;TGF- β 可以刺激 α -SMA和Collagen I等蛋白的分泌,使细胞外基质增多,胶原酶表达受到抑制,从而导致胶原合成增加而

降解减少,最终引起胶原沉积和纤维化^[21]。在本研究中,本课题组初步探究了H.h感染对高脂饲料诱导NAFLD模型小鼠的影响,发现在构建NAFLD模型时,H.h感染可促进淋巴细胞浸润和炎症细胞因子释放,并进一步增加TGF- β 的分泌,加重了NAFLD模型的纤维化和胶原纤维沉积程度,说明小鼠感染H.h可以促进NAFLD的发展。

综上所述,本研究结果显示,在构建NAFLD模型时,H.h能上调小鼠肝脏组织中炎症因子表达,加快TGF- β 分泌,从而促进NAFLD发展;提示H.h感染会对NAFLD的发病进程及评价带来一定影响。

参考文献:

- [1] LONARDO A, BYRNE C D, CALDWELL S H, et al. Global epidemiology of nonalcoholic fatty liver disease: Meta-analytic assessment of prevalence, incidence, and outcomes [J]. *Hepatology*, 2016, 64(4):1388-1389. DOI:10.1002/hep.28584.
- [2] FAN J G, KIM S U, WONG V W. New trends on obesity and NAFLD in Asia[J]. *J Hepatol*, 2017, 67(4):862-873. DOI:10.1016/j.jhep.2017.06.003.
- [3] ZHAO L P. The gut microbiota and obesity: from correlation to causality[J]. *Nat Rev Microbiol*, 2013, 11(9):639-647. DOI:10.1038/nrmicro3089.
- [4] BOULANGÉ CL, NEVES A L, CHILLOUX J, et al. Impact of the gut microbiota on inflammation, obesity, and metabolic disease[J]. *Genome Med*, 2016, 8(1):42. DOI:10.1186/s13073-016-0303-2.
- [5] 季尚玮,王颂,王江滨,等.我国不同品系实验室小鼠肝螺旋杆菌感染状况调查[J]. *中华消化杂志*, 2010, 30(9):597-601. DOI:10.3760/cma.j.issn.0254-1432.2010.09.006.
- [6] MURAKAMI K, TAKAHASHI R, ONO M, et al. Serodiagnosis of *Helicobacter hepaticus* infection in patients with liver and gastrointestinal diseases: western blot analysis and ELISA using a highly specific monoclonal antibody for H. hepaticus antigen[J]. *J Gastroenterol*, 2011, 46(9):1120-1126. DOI:10.1007/s00535-011-0414-x.
- [7] KLEINER D E, BRUNT E M, VAN NATTA M, et al. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatology*, 2005, 41(6):1313-1321. DOI:10.1002/hep.20701.
- [8] FAN J G. Epidemiology of alcoholic and nonalcoholic fatty liver disease in China[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(Suppl 1):11-17. DOI:10.1111/jgh.12036.

- [9] WANG F S, FAN J G, ZHANG Z, et al. The global burden of liver disease: the major impact of China[J]. *Hepatology*, 2014, 60(6):2099-2108. DOI:10.1002/hep.27406.
- [10] FAN J G, ZHU J, LI X J, et al. Prevalence of and risk factors for fatty liver in a general population of Shanghai, China [J]. *J Hepatol*, 2005, 43(3):508-514. DOI:10.1016/j.jhep.2005.02.042.
- [11] 中华医学会肝病学会脂肪肝和酒精性肝病学组, 中国医师协会脂肪性肝病专家委员会. 非酒精性脂肪性肝病防治指南(2018 更新版)[J]. *传染病信息*, 2018, 31(5): 393-402,420. DOI:10.3969/j.issn.1007-8134.2018.05.002.
- [12] SOOKOIAN S, PIROLA C J. Nonalcoholic fatty liver disease and metabolic syndrome: Shared genetic basis of pathogenesis[J]. *Hepatology*, 2016, 64(5):1417-1420. DOI:10.1002/hep.28746.
- [13] KOLODZIEJCZYK A A, ZHENG D P, SHIBOLET O, et al. The role of the microbiome in NAFLD and NASH[J]. *EMBO Mol Med*, 2019, 11(2):e9302. DOI:10.15252/emmm.201809302.
- [14] BRANDL K, SCHNABL B. Intestinal microbiota and nonalcoholic steatohepatitis[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2017, 33(3):128-133. DOI:10.1097/mog.0000000000000349.
- [15] SAFARI Z, GÉRARD P. The links between the gut microbiome and non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(8):1541-1558. DOI:10.1007/s00018-019-03011-w.
- [16] WAHLSTRÖM A, SAYIN S I, MARSCHALL H U, et al. Intestinal crosstalk between bile acids and microbiota and its impact on host metabolism[J]. *Cell Metab*, 2016, 24(1):41-50. DOI:10.1016/j.cmet.2016.05.005.
- [17] HE X Y, JI G, JIA W, et al. Gut microbiota and nonalcoholic fatty liver disease: Insights on mechanism and application of metabolomics[J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(3):300. DOI: 10.3390/ijms17030300.
- [18] FOX J G, LI X, YAN L, et al. Chronic proliferative hepatitis in A/JCr mice associated with persistent *Helicobacter hepaticus* infection: A model of *Helicobacter*-induced carcinogenesis[J]. *Infect Immun*, 1996, 64(5):1548-1558. DOI:10.1128/iai.64.5.1548-1558.1996.
- [19] 曹舒扬. 肝螺旋杆菌感染致BALB/c小鼠肝纤维化及其致病机制的初步探究[D]. 扬州: 扬州大学, 2019.
- [20] YU H, LEE H, HERRMANN A, et al. Revisiting STAT3 signalling in cancer: new and unexpected biological functions [J]. *Nat Rev Cancer*, 2014, 14(11):736-746. DOI:10.1038/nrc3818.
- [21] GALLI A, SVEGLIATI-BARONI G, CENI E, et al. Oxidative stress stimulates proliferation and invasiveness of hepatic stellate cells via a MMP2-mediated mechanism [J]. *Hepatology*, 2005, 41(5):1074-1084. DOI:10.1002/hep.20683.
- (收稿日期: 2020-11-02 修回日期: 2021-03-10)

(上接第 115 页)

- [17] 陈俊平. 苦参素注射液联合恩替卡韦治疗乙型肝炎肝硬化患者的疗效评价[J]. *内蒙古医学杂志*, 2020, 52(9):1095-1096. DOI:10.16096/J.cnki.nmgyxzz.2020.52.09.049.
- [18] 王贵强, 王福生, 庄辉, 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)[J]. *中国病毒病杂志*, 2020, 10(1):1-25. DOI:10.16505/j.2095-0136.2019.0097.
- [19] INDOLFI G, EASTERBROOK P, DUSHEIKO G, et al. Hepatitis B virus infection in children and adolescents[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4(6):466-476. DOI: 10.1016/S2468-1253(19)30042-1.
- [20] POLLICINO T, CAMINITI G. HBV-integration studies in the clinic: role in the natural history of infection[J]. *Viruses*, 2021, 13(3):368. DOI:10.3390/v13030368.
- [21] YANG H C, KAO J H. Persistence of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in hepatocytes: molecular mechanisms and clinical significance[J]. *Emerg Microbes Infect*, 2014, 3(9): e64. DOI:10.1038/emi.2014.64.
- [22] AHMED M, WANG F, LEVIN A, et al. Targeting the Achilles heel of the hepatitis B virus: a review of current treatments against covalently closed circular DNA[J]. *Drug Discov Today*, 2015, 20(5):548-561. DOI:10.1016/j.drudis.2015.01.008.
- [23] LAM W Y, LEUNG K T, LAW P T, et al. Antiviral effect of *Phyllanthus Nanus* ethanolic extract against hepatitis B virus (HBV) by expression microarray analysis[J]. *J Cell Biochem*, 2006, 97(4):795-812. DOI:10.1002/jcb.20611.
- [24] CUI X, WANG Y, KOKUDO N, et al. Traditional Chinese medicine and related active compounds against hepatitis B virus infection[J]. *Biosci Trends*, 2010, 4(2):39-47.
- (收稿日期: 2021-01-16 修回日期: 2021-03-11)

1 型糖尿病早期大鼠空肠的神经功能及组织形态学变化

王 嫚, 祗明花, 耿旭芳, 佟苗苗, 梁红玉, 赵 丁

(河北医科大学药学院, 石家庄 050017)

[摘要] 目的 探讨 1 型糖尿病早期大鼠空肠平滑肌的氮能神经和胆碱能神经功能, 以及空肠组织形态学变化。方法 将雄性 SD 大鼠随机分为正常对照组和糖尿病模型组, 通过腹腔注射链脲佐菌素 (streptozocin, STZ) 60 mg/kg 建立糖尿病大鼠模型。4 周后运用电场刺激诱发神经源性收缩反应, 并采用离体器官肌张力分析方法观察离体空肠平滑肌的收缩反应, 以及氮能神经和胆碱能神经功能的改变; 石蜡组织切片行 HE 染色及免疫组织化学检测, 观察空肠组织形态学变化。结果 与正常大鼠相比, STZ 诱导的糖尿病早期大鼠的空肠肌间胆碱能神经功能受损, 而氮能神经功能未见明显变化; 糖尿病大鼠空肠组织绒毛杂乱无序且断裂, 肌层增厚, 杯状细胞减少, 绒毛长度与肠隐窝深度之比 (绒腺比) 减小。结论 在 STZ 诱导后 4 周的 1 型糖尿病早期大鼠模型中, 空肠组织的神经功能和形态学均发生了明显变化, 提示肠道作为糖尿病敏感器官, 在糖尿病早期诊断及预防中具有重要的临床参考意义。

[关键词] 糖尿病大鼠; 空肠; 氮能神经; 胆碱能神经; 组织形态学

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0131-07

Jejunal Nerve Regulation and Histomorphological Changes in Rats with Early Type 1 Diabetes

WANG Man, ZHI Minghua, GENG Xufang, TONG Miaomiao, LIANG Hongyu, ZHAO Ding

(School of Pharmacy, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China)

Correspondence to: ZHAO Ding, E-mail: zhaodingd@163.com

[Abstract] **Objective** To investigate functional changes of nitrergic and cholinergic nerves in the jejunum smooth muscle, and to observe jejunal histomorphology in rats with early type 1 diabetes. **Methods** Male Sprague Dawley (SD) rats were randomly divided into a normal control group and a diabetic model group. Rats in the diabetic model group were administered 60 mg/kg streptozotocin (STZ) by intraperitoneal injection. After 4 weeks, neurogenic contractile responses were induced by electric field stimulation, and functional changes in nitrergic and cholinergic nerves were observed in the isolated jejunum of diabetic rats. Histomorphological changes in the jejunum were observed by hematoxylin and eosin staining of paraffin-embedded tissue sections and immunohistochemistry. **Results** Compared with that in the normal rats, the jejunal intermuscular cholinergic nerve rats with early diabetes was damaged, whereas the nitrergic nerve did not exhibit a such lesions. The villi of the jejunum were disrupted and disorderly, the muscularis was thickened, goblet cell numbers were decreased, and the ratio of villus length to intestinal crypt depth was diminished in diabetic rats. **Conclusion** In the early stage (4 weeks) of STZ-induced type 1 diabetes in rats, the neurological function and morphology of jejunal tissues were significantly changed. It suggests that the intestine is a sensitive organ in diabetes and has important clinical implications for the early prevention and detection of diabetes.

[Key words] Diabetic rats; Jejunum; Nitrergic nerves; Cholinergic nerves; Histomorphology

[基金项目] 河北省重点基础研究项目(17967753D)

[作者简介] 王 嫚(1994—), 女, 硕士, 助理实验师, 从事天然药物抗糖尿病实验研究。E-mail: wangman0319@126.com

祗明花(1992—), 女, 硕士, 药师, 从事天然药物抗糖尿病实验研究。E-mail: zhiminghua@126.com

[通信作者] 赵 丁(1965—), 女, 博士, 教授, 主要从事天然药物治疗糖尿病、肥胖等相关研究。E-mail: zhaodingd@163.com

糖尿病是一类以体内血糖水平过高为特征的代谢性疾病,可伴有腹泻、便秘、腹痛和大便失禁等胃肠并发症^[1-2]。糖尿病肠病是糖尿病胃肠并发症的主要表现之一,占糖尿病并发神经病变的10%~20%^[3];且随着病程进展,此类患者可能出现严重腹泻,甚至脂肪泻。尽管糖尿病的发病率很高,容易引起多种器官的功能障碍,但是到目前为止,糖尿病肠病的发病机制仍未阐明;其可能的诱发因素包括高血糖、胃肠神经病变、胃肠平滑肌变化和肠道菌群失调等^[4-5]。由于肠道功能在糖尿病发病过程中至关重要,很可能是糖尿病使动因素,因此越来越多的学者开始关注糖尿病进程中肠道的改变,以探索早期干预糖尿病的新方法。

肠神经系统在胃肠功能调节方面起重要作用,主要包括肌间神经丛和黏膜下神经丛。肠肌间神经丛通过释放兴奋性和抑制性神经递质调控肠道运动功能,如乙酰胆碱(acetylcholine, ACh)、P物质、血管活性肽和一氧化氮(nitric oxide, NO)等^[6]。其中兴奋性神经递质ACh和抑制性神经递质NO是两种支配胃肠运动的重要神经递质,两者的主要功能分别是促进和抑制胃肠蠕动。通过链脲佐菌素(streptozocin, STZ)诱导建立糖尿病大鼠模型的大部分研究均采用16~24周造模大鼠,最早的也是造模8周^[7-10]。本实验室曾研究发现,造模4周的糖尿病大鼠存在胃排空异常现象,并且大鼠胃底环形肌和纵行肌的神经支配功能受损,主要涉及胆碱能神经和氮能神经^[11]。本研究在此基础上,同样采用STZ诱导的大鼠模型,重点探讨早期糖尿病大鼠空肠组织形态和神经调节功能的改变,以期对糖尿病的预防和治疗提供更多实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本实验用清洁级雄性SD大鼠,体质量为180~220 g,鼠龄6~8周,由河北省实验动物中心[SCXK(冀)2013-1003]提供。动物实验在河北医科大学[SYXK(冀)2013-1004]进行,大鼠保持12 h昼夜模式,适应性喂养4 d,每天更换饮用水、饲料和垫料。本研究的动物实验

通过河北医科大学伦理委员会审查(批准号为1603024)。

1.2 试剂与仪器

STZ购自美国Cayman Chemical公司。N'-硝基-L-精氨酸甲酯(N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride, L-NAME)、河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)和阿托品购自美国Sigma公司。甲基硫酸新斯的明(neostigmine methylsulfate)购自上海信谊金朱药业有限公司。乙酰胆碱转移酶JA67-11购自杭州华安生物技术有限公司。兔链霉卵白素-生物素法免疫组织化学检测试剂盒SP-9001和DAB显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。JZ101型张力换能器购自高碑店市新航机电设备有限公司。S48型电子刺激器购自美国Grass Technologies公司。MedLab-U/4cs生物信号采集处理系统购自南京市美易科技有限公司。

1.3 动物模型的建立及取材

大鼠共20只,采用单纯随机抽样法分为正常对照组8只和糖尿病模型组12只。糖尿病模型组大鼠造模前禁食不禁水12 h,然后腹腔注射1% STZ(用0.1 mol/L的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液配制,使用剂量为60 mg/kg)建立糖尿病模型^[8, 11-12];正常对照组大鼠腹腔注射等容积缓冲液。STZ注射3 d后,尾静脉采血,并检测空腹血糖水平,每周1次,连续4周。以空腹血糖值 ≥ 16.7 mmol/L^[13]时认为大鼠造模成功,血糖值低于该值时不计入实验结果。最终12只大鼠成模8只,成模率为66.6%。

造模后4周以颈椎脱臼法处死大鼠,并迅速打开腹腔,找到蔡氏韧带^[14]。每次实验均在蔡氏韧带附近截取空肠约5 cm。空肠标本沿肠系膜处切开,在改良的K-H液(含碳酸氢钠16.3 mmol/L、氯化钠133 mmol/L、葡萄糖7.8 mmol/L、硫酸镁0.61 mmol/L、氯化钙2.52 mmol/L、磷酸二氢钠1.35 mmol/L和氯化钾4.7 mmol/L)中反复漂洗。一部分肠组织用于电生理实验,余下部分用于HE染色。

1.4 电场刺激诱发大鼠空肠平滑肌收缩反应变化

取长8 mm $\times$ 宽2 mm的空肠环形肌标本,小心去除黏膜层。将去黏膜的肌条连接张力换能

器,固定于盛有 37℃ 的 K-H 液中,并持续通入含 95% O₂ 和 5% CO₂ 混合气体的恒温浴槽中,用电生理记录仪记录肌条的等长收缩活动。实验前给予肌条 1 g 的前负荷,每 15 min 更换一次营养液,平衡 1 h 待肌条活动平稳后,开始电场刺激实验,结果以法码定标(g 为单位)反映收缩反应强度。实验结束前加入 0.1 μmol/L TTX,孵育 30 min 后再次给予电场刺激,确认电场刺激诱发的反应为神经源性反应。另外,空肠肌条电场刺激诱发的收缩反应若能被 1 μmol/L 阿托品完全阻断,表明引起平滑肌收缩的兴奋性神经递质为乙酰胆碱。

收缩反应的电场刺激参数:电压为 100 V,频率为 20 Hz,波宽 1 ms,刺激时程 10 s,刺激间隔 100 s,刺激 20 min^[15]。在进行电场刺激 10 min 后,于浴槽内分别加入 100 μmol/L L-NAME 或 1 μmol/L 新斯的明,继续进行电场刺激 10 min。记录肌张力变化,观察一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)抑制剂及胆碱酯酶(cholinesterase, AChE)抑制剂对电场刺激诱发大鼠空肠环形肌收缩反应的影响,前者显示氮能神经功能,后者显示胆碱能神经功能。每组抽取 5 只大鼠用于电场刺激实验。

1.5 空肠组织 HE 染色

空肠组织不剔除黏膜,用固定液固定 24 h 后,进行常规脱水,二甲苯透明,石蜡包埋。然后制成 5 μm 切片,进行 HE 染色。接着观察并测量内环肌和外纵肌的肌层厚度,计算绒毛比。绒毛比即绒毛长度(绒毛与肠腺连接处到绒毛顶端的距离)与肠隐窝深度(绒毛与肠腺连接处到肠腺基底的距离)的比值。营养生理学研究表明,绒毛比可反映小肠的消化吸收功能^[16]。该值越大表明消化吸收功能越强,动物生长发育迅速;反之,该值越小,表明消化吸收功能越弱,动物生长发育缓慢。

1.6 免疫组织化学染色

将空肠组织切片进行脱蜡、水化后,浸入组织抗原修复液中进行抗原热修复,自然冷却至室温;在组织上滴加过氧化氢溶液、山羊血清封闭液,减少非特异性染色;滴加乙酰胆碱转移酶抗体(工作液稀释比例为 1:100),阴性对照滴

加 PBS 代替抗体,之后 4℃ 反应过夜;滴加生物素二抗工作液和辣根过氧化物酶标记的链卵白素工作液,DAB 显色液显色;苏木精染色细胞核;脱水,透明,中性树脂封固,光学显微镜下观察免疫组织化学染色情况,目的蛋白阳性表达呈褐色。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 21.0 软件进行统计学分析。各组实验结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间均数比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠体质量和血糖值的变化

与同周期正常对照组大鼠相比,糖尿病模型组大鼠的饮水量和排尿量明显增多,毛色暗淡无光泽,尾部皮肤的颜色明显变深。在饲养期间,正常对照组大鼠的体质量持续增加,而糖尿病模型组大鼠的体质量逐渐下降;与同周期正常对照组大鼠相比,糖尿病模型组大鼠的体质量明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$,图 1A)。

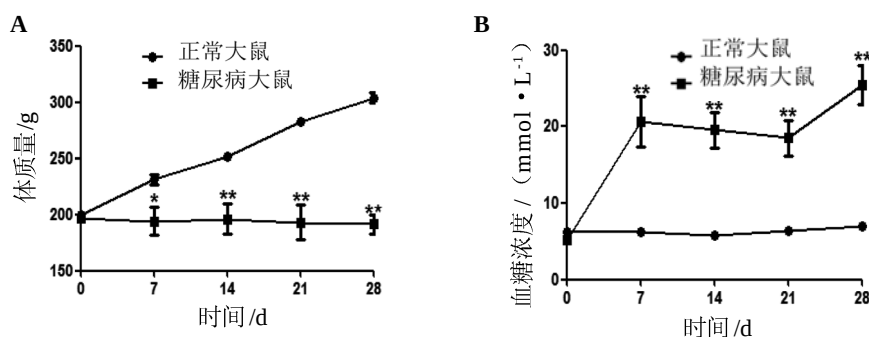
正常对照组大鼠血糖水平正常且稳定,糖尿病模型大鼠的血糖浓度则 > 16.7 mmol/L,并且在整个饲养期间血糖浓度均保持在 16.7 mmol/L 以上;与同周期正常对照组大鼠相比,糖尿病模型组大鼠的血糖水平明显升高($P < 0.01$,图 1B)。

2.2 NOS 抑制剂及 AChE 抑制剂对电场刺激诱发大鼠空肠平滑肌收缩反应的影响

100 μmol/L L-NAME 或 1 μmol/L 新斯的明经浴槽内给药,电场刺激实验结果显示,新斯的明能明显增加电场刺激诱发正常及糖尿病大鼠空肠环形肌的收缩反应($P < 0.01$,图 2A),而 L-NAME 对电场刺激诱发的正常及糖尿病大鼠空肠环形肌收缩反应无明显作用($P > 0.05$,图 2B);且新斯的明引起的糖尿病空肠环形肌收缩反应增加百分比明显低于正常大鼠($P < 0.01$,图 2C)。结果说明,与正常大鼠相比,糖尿病早期大鼠空肠的胆碱能神经功能受损,而氮能神经功能未见明显变化。

2.3 空肠组织形态结构观察

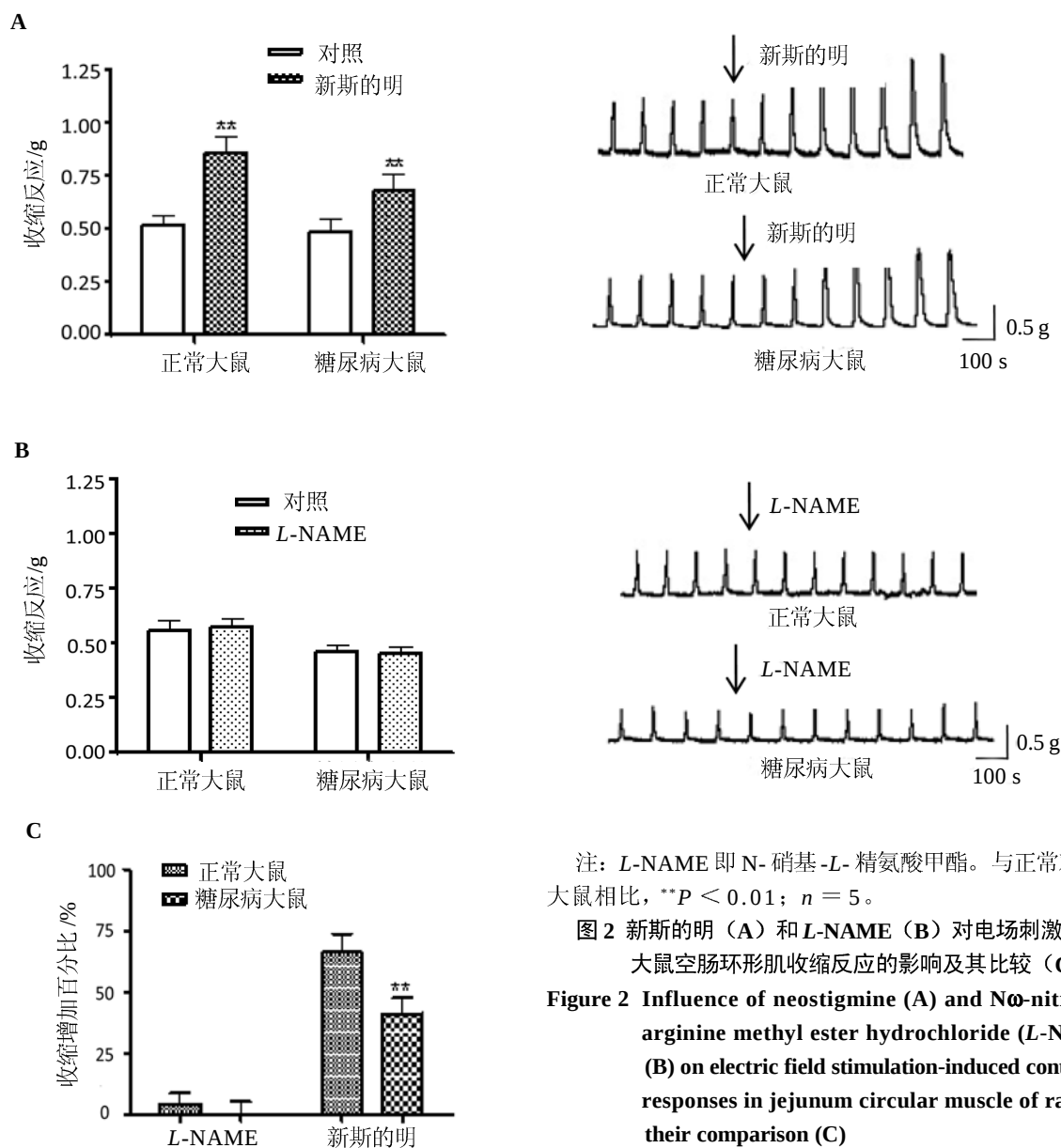
HE 染色结果显示,正常大鼠绒毛排列整齐



注：与正常对照组大鼠相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ ； $n = 8$ 。

图1 正常对照组大鼠和糖尿病模型组大鼠的体重(A)和血糖浓度(B)比较

Figure 1 Comparison of body weight (A) and blood glucose concentration (B) in normal and diabetic rats



注：L-NAME 即 N-硝基-L-精氨酸甲酯。与正常对照组大鼠相比，** $P < 0.01$ ； $n = 5$ 。

图2 新斯的明(A)和L-NAME(B)对电场刺激诱发大鼠空肠环形肌收缩反应的影响及其比较(C)

Figure 2 Influence of neostigmine (A) and N ω -nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) (B) on electric field stimulation-induced contractile responses in jejunum circular muscle of rats and their comparison (C)

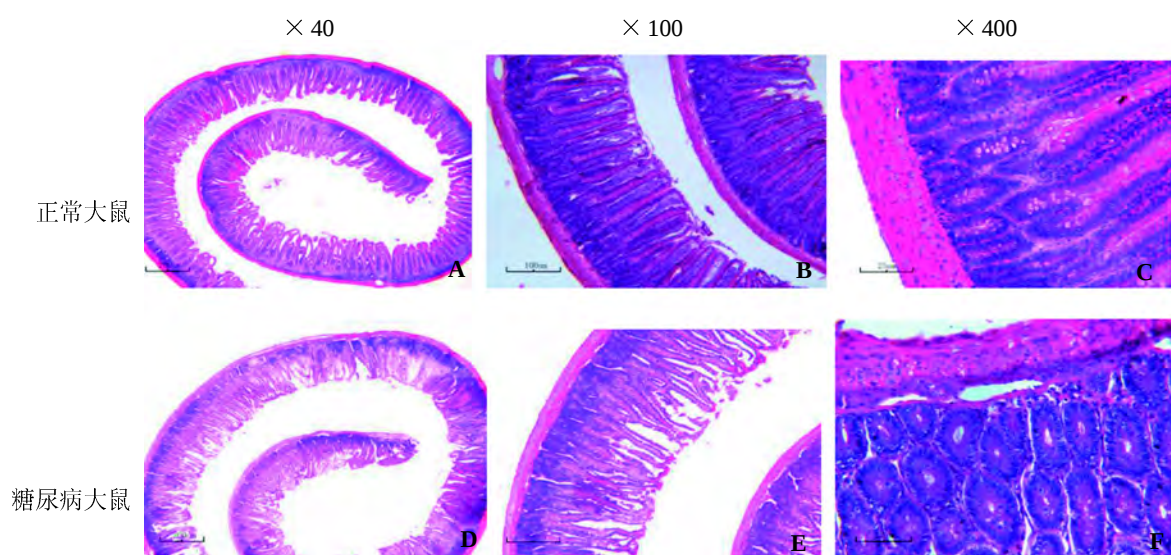
(图 3A), 绒毛结构完整(图 3B), 空肠黏膜下层与黏膜肌层连接紧密(图 3C); 而糖尿病大鼠绒毛杂乱无序且较稀疏, 有断裂(图 3D~E), 常见黏膜下层与黏膜肌层分离现象, 且肌层增厚, 杯状细胞减少(图 3F)。

2.4 空肠组织中乙酰胆碱转移酶表达及绒毛比

免疫组织化学染色结果显示, 与阴性对照组相比, 目的蛋白的阳性表达显示为褐色, 且褐色越多越深表明蛋白表达越多。正常对照组大鼠空肠中, 在黏膜肌间和黏膜下观察到更多的褐色表达, 即乙酰胆碱转移酶表达较多(图 4A);

而糖尿病模型组大鼠则表达较少(图 4B)。结果表明, 糖尿病早期大鼠空肠的胆碱能神经递质合成减少。

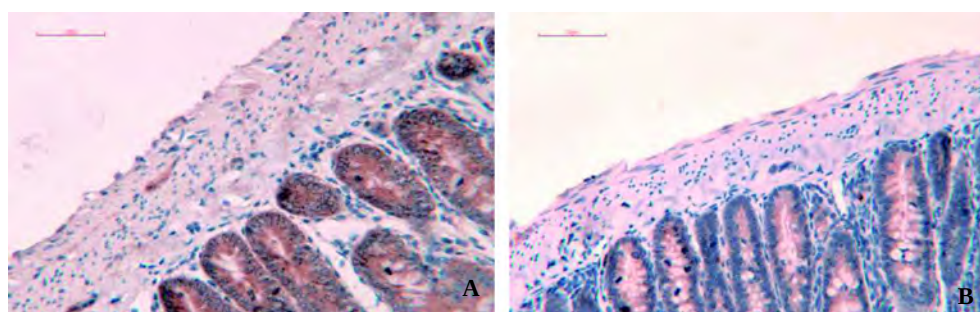
HE染色后测量空肠内环肌和外纵肌的肌层厚度, 计算绒毛比大小。与正常对照组大鼠相比, 糖尿病模型组大鼠的内环肌[(43.43 ± 1.47) μm vs (22.90 ± 1.59) μm]和外纵肌肌层厚度[(19.67 ± 1.33) μm vs (12.89 ± 0.60) μm]增加, 绒毛比减小[(2.43 ± 0.20) vs (3.67 ± 0.53)], 差异均有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结果提示, 糖尿病大鼠的空肠消化吸收功能减弱。



注: A 和 D、B 和 E、C 和 F 图中标尺大小分别为 200、100、25 μm。

图 3 HE 染色后不同放大倍数光学显微镜下观察的大鼠空肠组织形态

Figure 3 Histomorphology of the jejunum in rats observed microscopically under different magnifications after HE staining



注: A, 正常对照组大鼠; B, 糖尿病模型组大鼠。图中标尺大小为 50 μm。

图 4 免疫组织化学法检测两组大鼠空肠组织中乙酰胆碱转移酶的表达 (DAB 染色, × 400)

Figure 4 Expression of acetylcholine transferase in the jejunum of two groups of rats, as detected by immunohistochemistry (DAB staining, × 400)

3 讨论

胃肠道被称为“人体的母亲河”，其在人体健康中的重要性越来越受到重视。糖尿病肠病的发病可能与内脏植物神经病变、电解质失衡、肠道激素分泌失调和胃肠功能障碍等因素有关^[17-19]，但其与糖尿病的关系至今仍不甚清楚。病程较长的糖尿病患者的胃肠功能障碍症状明显，但逆转已形成的严重病变十分困难。为了探讨糖尿病早期小肠的变化，本实验室对 STZ 诱导 4 周的 1 型糖尿病大鼠小肠进行离体平滑肌电生理研究和组织形态学观察，以期对疾病的早期预防和早期干预提供参考。

肠神经系统中，肌间神经丛主要调控肠运动功能。电场刺激诱发大鼠空肠的收缩反应可以被 0.01 $\mu\text{mol/L}$ TTX 完全阻断，表明观察到的收缩反应为神经源性反应；另外，肠收缩反应也能被阿托品完全阻断，提示引起收缩的兴奋性神经递质主要为 ACh。乙酰胆碱转移酶为 ACh 合成酶，而 AChE 为 ACh 水解酶，二者均与胆碱能神经功能直接相关；NOS 为氮能神经递质 NO 合成酶。有研究表明，电刺激可同时激活兴奋性神经和抑制性神经，NOS 抑制剂可引起兴奋性神经释放乙酰胆碱^[20]。本实验通过电场刺激诱发空肠平滑肌收缩反应，发现 AChE 抑制剂能使糖尿病大鼠反应降低，而 NOS 抑制剂未引起明显改变。免疫组织化学实验也表明，糖尿病大鼠空肠中乙酰胆碱转移酶表达量减少。这些结果均提示，糖尿病大鼠空肠平滑肌的胆碱能神经受损，而氮能神经损伤滞后。候宁宁等^[9]通过组织化学染色发现，STZ 诱导后 16 周糖尿病大鼠小肠胆碱能神经元明显减少；氮能神经元有减少趋势，但差异无统计学意义。本研究提示，小肠胆碱能神经功能在 STZ 诱导糖尿病后 4 周时已发生明显改变，而氮能神经受损可能发生在疾病较晚的时期。

有研究报道，硫化氢对大鼠肠缺血再灌注后离体回肠收缩活动的保护作用也主要是减轻肠神经，尤其是兴奋性神经的损伤，表明大鼠肠神经中兴奋性神经胆碱能神经为敏感神经^[21]。另有一些研究显示，在 STZ 引起的以及自发性糖尿病大鼠模型中，NO 介导的不同部位的胃肠道平滑肌

缓慢抑制性电位和机械性舒张受损；且外源性加入 NO 供体可恢复氮能神经功能，表明功能受损可能是节前神经 NO 合成减少所致^[22-24]。其中，Xue 等^[22]利用细胞微电极技术研究 STZ 诱发后 6 周糖尿病大鼠模型，发现大鼠胃窦平滑肌的自发性活动电位受损，兴奋性连接电位缺失，ACh 诱导的膜去极化敏感性增强等，表明糖尿病引起神经肌肉传递功能损害，而这些平滑肌性质的改变可能与糖尿病引起的胃肠病变有关。而 Cellek 等^[23]研究了不同病程（4、8、12、16 和 20 周）的 STZ 糖尿病大鼠胃幽门神经元型 NOS（neuronal NOS，nNOS）蛋白含量，发现随着病程的发展，nNOS 含量逐渐下降。但 Chaudhury 等^[10]研究发现，STZ 诱发后 16 周糖尿病大鼠空肠神经末梢肌球蛋白 Va 减少，而并非 nNOS 减少。由此可见，糖尿病胃肠道功能受损十分复杂，不同部位神经病变的情况不同，随着病程的延长，神经病变会更加复杂且难以纠正，因此早期诊断和早期干预尤为重要。

本研究中 HE 染色后观察空肠组织学形态，结果发现，与正常大鼠相比，糖尿病大鼠的空肠绒毛排列杂乱，有断裂，绒毛比明显降低，表明糖尿病大鼠空肠的消化吸收功能减弱，导致大鼠生长发育缓慢；这与糖尿病大鼠体质量增长缓慢的现象相符。观察还发现，空肠黏膜与黏膜下层之间疏松结缔组织出现较多裂隙，而该部位是黏膜下神经丛分布的区域，提示糖尿病大鼠空肠黏膜下神经丛功能可能受到影响。2018 年有文献报道，人类间质是在人体许多部位都广泛存在的受到间歇性或节律性压迫的组织，包括整个胃肠道和膀胱组织的黏膜下层、动脉周围软组织和筋膜等；并且这些流体丰富的解剖结构可能对肿瘤转移、水肿、纤维化，以及许多或所有组织和器官的机械功能有重要作用^[25]。

另外，与正常大鼠相比，糖尿病大鼠的空肠杯状细胞数目减少，提示诱发后 4 周早期糖尿病大鼠的肠道黏膜屏障受损，可能有炎症反应发生^[26]；而且糖尿病大鼠空肠各肌层厚度明显增厚，提示可能与糖尿病大鼠的消化和吸收功能减弱，肠道发生代偿性增厚而增强收缩，以弥补对营养物质吸收运化的不足有关。肌层厚度变化与

神经调节改变之间有怎样的关联, 本研究尚未能给出解释, 有待后续深入探讨。

综上所述, 本研究发现在 STZ 诱发后 4 周的 1 型糖尿病早期大鼠模型中, 空肠组织在神经功能和形态学上均发生明显变化, 提示肠道作为糖尿病敏感器官, 对糖尿病的病程发展, 以及早期发现和早期预防均有重要的临床参考意义。

参考文献:

- [1] MALO M S. A high level of intestinal alkaline phosphatase is protective against type 2 diabetes mellitus irrespective of obesity[J]. *EBioMedicine*, 2015, 2(12): 2016-2023. DOI: 10.1016/j.ebiom.2015.11.027.
- [2] D'ADDIO F, FIORINA P. Type 1 diabetes and dysfunctional intestinal homeostasis[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2016, 27(7):493-503. DOI:10.1016/j.tem.2016.04.005.
- [3] 张博纶, 李敬林. 从“脾失健运”认识糖尿病肠病病机[J]. *中医药临床杂志*, 2016, 28(11): 1532-1533. DOI: 10.16448/j.cjcm.2016.0537.
- [4] 张观坡. 谷氨酸兴奋毒性在糖尿病大鼠选择性 nNOS 神经元减少及胃轻瘫中的作用[D]. 上海: 第二军医大学, 2014.
- [5] 王晓青. 糖尿病性胃肠功能紊乱的回顾性分析[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2016.
- [6] 刘燕平, 范一宏, 吕宾. 肠壁神经丛损伤和修复因素研究进展[J]. *胃肠病学*, 2013, 18(5):313-316. DOI:10.3969/j.issn.1008-7125.2013.05.014.
- [7] BAGY NSZKI M, B DI N. Diabetes-related alterations in the enteric nervous system and its microenvironment[J]. *World J Diabetes*, 2012, 3(5):80-93. DOI:10.4239/wjd.v3.i5.80.
- [8] BELAI A, LEFEBVRE R A, BURNSTOCK G. Motor activity and neurotransmitter release in the gastric fundus of streptozotocin-diabetic rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 1991, 194(2/3): 225-234. DOI:10.1016/0014-2999(91)90109-4.
- [9] 侯宁宁, 王朝迅, 雒榕, 等. STZ-糖尿病大鼠小肠动力与肠神经胆碱能和氮能神经元关系的研究[J]. *天津医科大学学报*, 2007, 13(2): 165-167, 170. DOI:10.3969/j.issn.1006-8147.2007.02.008.
- [10] CHAUDHURY A, DE MIRANDA-NETO M H, FERNANDES PEREIRA R V, et al. Myosin Va but not nNOS α is significantly reduced in jejunal musculomotor nerve terminals in diabetes mellitus[J]. *Front Med (Lausanne)*, 2014, 1: 17. DOI:10.3389/fmed.2014.00017.
- [11] 郝璋森, 梁红玉, 侯聪聪, 等. 1 型糖尿病大鼠模型早期胃平滑肌功能的改变研究[J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(11):52-58. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2015.11.012.
- [12] 张远远, 杨志伟. 啮齿类动物糖尿病模型[J]. *中国实验动物学报*, 2011, 19(3):269-274. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2011.03.020.
- [13] 陆英杰, 连至诚, 钟毅, 等. 糖尿病 30 周大鼠胃肌间丛神经元尼氏体的变化[J]. *中国糖尿病杂志*, 2010, 18(4): 303-305. DOI:10.3969/j.issn.1006-6187.2010.04.020.
- [14] 马辉. 凉血愈肠汤对大鼠放射性肠炎肠黏膜修复机制研究[D]. 锦州: 辽宁医学院, 2013.
- [15] AFSHIN S, KESHAVARZ M, SALAMI M, et al. Effect of indomethacin on electrical field stimulation-induced contractions of isolated transverse and longitudinal rat gastric fundus strips[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(34): 5358-5361. DOI:10.3748/wjg.v11.i34.5358.
- [16] 常兰, 张鹏飞, 陈付菊, 等. 藏羚羊和藏绵羊小肠黏膜结构和黏膜免疫相关细胞的比较[J]. *中国病理生理杂志*, 2012, 28(9):1658-1664. DOI:10.3969/j.issn.1000-4718.2012.09.021.
- [17] 刘荣莉. 糖尿病肠病[J]. *实用全科医学*, 2005, 3(6):488. DOI:10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.2005.06.017.
- [18] REGALIA J, CAI F, HELKE C. Streptozotocin-induced diabetes and the neurochemistry of vagal afferent neurons[J]. *Brain Res*, 2002, 938(1-2):7-14. DOI:10.1016/S0006-8993(02)02456-3.
- [19] CHANDRASEKHARAN B, SRINIVASAN S. Diabetes and the enteric nervous system[J]. *Neurogastroenterol Motil*, 2007, 19(12):951-960. DOI:10.1111/j.1365-2982.2007.01023.x.
- [20] BACCARI M C, IACOVIELLO C, CALAMAI F. Nitric oxide as modulator of cholinergic neurotransmission in gastric muscle of rabbits[J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(2 Pt 1): G456-G463. DOI:10.1152/ajpgi.1997.273.2.G456.
- [21] 张观坡, 高峻, 李桂香, 等. 硫化氢对大鼠肠缺血再灌注后回肠收缩活性的保护作用[J]. *胃肠病学*, 2012, 17(2): 119-123. DOI:10.3969/j.issn.1008-7125.2012.02.014.
- [22] XUE L, SUZUKI H. Electrical responses of gastric smooth muscles in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Am J Physiol*, 1997, 272(1 Pt 1):G77-G83. DOI:10.1152/ajpgi.1997.272.1.g77.
- [23] CELLEK S, FOXWELL N A, MONCADA S. Two phases of nitrergic neuropathy in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. *Diabetes*, 2003, 52(9):2353-2362. DOI:10.2337/diabetes.52.9.2353.
- [24] IMAEDA K, TAKANO H, KOSHITA M, et al. Electrical properties of colonic smooth muscle in spontaneously non-insulin-dependent diabetic rats[J]. *J Smooth Muscle Res*, 1998, 34(1):1-11. DOI:10.1540/jsmr.34.1.
- [25] BENIAS P C, WELLS R G, SACKEY-ABOAGYE B, et al. Author correction: Structure and distribution of an unrecognized interstitium in human tissues[J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 7610. DOI:10.1038/s41598-018-25732-x.
- [26] 董文道, 曹海龙, 王邦茂. 杯状细胞在肠道疾病发病中作用的研究进展[J]. *国际消化病杂志*, 2015, 35(4): 244-246, 269. DOI:10.3969/j.issn.1673-534X.2015.04.005.

(收稿日期: 2020-06-02 修回日期: 2020-07-15)

五苓散对高脂血症模型贵州小型猪的治疗作用

张 慧¹, 吴延军¹, 姚 瑾¹, 陆涛峰¹, 王郭琦², 赵 海¹, 姚 刚¹, 吴曙光¹

(1. 贵州中医药大学实验动物研究所, 贵阳 550025; 2. 重庆市巫山县中医院, 重庆 404700)

[摘要] 目的 研究五苓散对高脂饮食诱导的高脂血症模型贵州小型猪的治疗作用。方法 取12只健康贵州小型猪, 其中4只为正常组, 饲喂普通饲料; 另8只饲喂高脂饲料, 连续24周, 建立高脂血症模型。造模成功后, 分为模型组和五苓散治疗组, 均继续喂高脂饲料。治疗组饲料中每日加入五苓散0.55 g/kg。连续给药8周后, 监测各组体质量、体尺、腹围、血脂和主要中医证候体征变化。结果 造模完成后, 模型组小型猪较正常组体质量指数和腹围均值有所增加, 但差异不显著(均 $P > 0.05$); 模型组主要血脂指标血清总胆固醇(TC)、三酰甘油(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)明显升高(均 $P < 0.05$), 血清高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)明显降低($P < 0.05$); 模型组动物表现出肥胖臃肿、腹部膨大、被毛稀少脱落、神疲乏力、好静懒动和粪便色淡稀软不成形等高脂血症表征。经五苓散干预后, 治疗组较模型组的体质量指数和腹围有所下降($P > 0.05$), 中医证候综合评分明显降低, 主要血脂指标TC、TG、LDL-C明显降低(均 $P < 0.05$), HDL-C明显升高($P < 0.05$)。结论 成功构建了高脂血症贵州小型猪模型, 五苓散干预能明显改善高脂血症模型的血脂代谢紊乱情况。

[关键词] 五苓散; 高脂血症; 痰湿证; 贵州小型猪

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0138-05

Therapeutic Effect of Wuling Powder on Guizhou Mini-pigs of Hyperlipidemia Model

ZHANG Hui¹, WU Yanjun¹, YAO Jin¹, LU Taofeng¹, WANG Guoqi², ZHAO Hai¹, YAO Gang¹, WU Shuguang¹
(1. Institute of Laboratory Animals, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China; 2. Chongqing Wushan Hospital of Traditional Chinese Medicine, Chongqing 404700, China)

Correspondence to: WU Shuguang, E-mail: 243099502@qq.com

[Abstract] **Objective** To study the therapeutic effect of Wuling powder on hyperlipidemia induced by a high-fat diet in Guizhou mini-pigs. **Methods** Twelve healthy Guizhou mini-pigs were selected, 4 pigs fed a standard diet (normal group), and 8 pigs fed a high-fat diet for 24 weeks to establish a hyperlipidemia model. Further, the model pigs were divided into model group and Wuling powder treatment group, and fed a high-fat diet for 8 weeks. Wuling powder (0.55 g/kg) was added to the diet of the treatment group every day. Body weight, body size, abdominal girth, serum lipid parameters, and main syndromes and signs were measured and recorded. **Results** After the animal model was established successfully, body weight and body mass index (BMI) of the model group were found to be higher than that of the normal group, although the difference was not significant ($P > 0.05$). The levels of the following main blood lipid parameters: total cholesterol (TC), triglyceride (TG), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) increased significantly (all $P < 0.05$) in the model group, but high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) level decreased significantly ($P < 0.05$) as compared with the normal group. The pigs in the model group showed obesity, abdominal enlargement, hair thinning, tiredness and fatigue, and light or soft stool, which are syndromes of hyperlipidemia. After Wuling powder treatment, body weight and BMI of the mini-pigs in the treatment group were lower than those in the model group ($P > 0.05$); the comprehensive score of traditional Chinese medicine syndrome was significantly reduced, in addition to the TC, TG, and LDL-C levels ($P < 0.05$);

[基金项目] 贵州省科技计划项目(黔科合支撑[2020]1Y035)

[作者简介] 张 慧(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中医学、实验动物学。E-mail: mofans318@163.com

[通信作者] 吴曙光(1971—), 女, 正高级实验师, 研究方向: 实验动物学、中药药理学。E-mail: 243099502@qq.com

HDL-C levels were significantly increased ($P<0.05$). **Conclusion** The hyperlipidemia model is successfully established in Guizhou mini-pigs, and lipid metabolism disorder can be improved to a certain degree after intervention treatment with Wuling powder.

[Key words] Wuling powder; Hyperlipidemia; Phlegm dampness syndrome; Guizhou mini-pigs

高脂血症 (hyperlipidemia) 是由多种原因导致脂代谢紊乱的一种病理状态, 临床表现为血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 升高及血清高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 降低。高脂血症是引发心脑血管病变及其他脏腑病变的主要病因之一^[1]。因此, 降低和控制高脂血症, 对降低心血管疾病的发病风险和保护相关脏腑具有重要意义。

经典方剂五苓散来源于《伤寒论》、《金匱要略》, 由白术、猪苓、茯苓、桂枝、泽泻 5 种药物组成, 具有利尿湿、温阳化气的药用功效。近年来, 中医药治疗高脂血症的研究发现, 高脂血症的发病机制多指向痰湿积聚, 包括脏腑虚弱及其病因、偏爱高脂饮食等。《医学正传》云: “津液稠粘, 为痰为饮, 积久渗入脉中, 血为之浊。” 现代中医理论认为, 西医所说的高脂血症是由于身体痰浊不畅, 堵塞血脉, 血流不畅, 长时间陷入血瘀而致病^[2], 即该病的基本病机是痰瘀互结^[3]。在临床应用中, 五苓散的治疗范围很广^[4], 包括腹泻、水肿、眩晕、尿潴留等, 主要适应证为脾虚湿困, 以湿为主, 与高脂血症的基本病机非常契合。因此, 本实验探讨五苓散对贵州小型猪高脂血症模型的治疗作用。

现代研究发现, 血清中 TG、TC、LDL-C 和 HDL-C 等血脂生化指标的变化, 是高脂血症发生的主要表现, 也被认为是痰湿证的微观辨证指标^[5]。为了探讨五苓散对中医痰湿证所致高脂血症的影响, 本研究拟通过分析五苓散对贵州小型猪高脂血症模型体质量指数 (body mass index, BMI)、腹围、中医证候和主要血脂指标的变化, 进一步研究和确定痰湿证的定量指标。

1 材料与方法

1.1 实验动物

12 头成年普通级贵州小型猪, 1.5~2 岁, 体

质量为 (28 ± 3) kg, 从贵州中医药大学实验动物研究所自主培育的贵州小型猪种群 (经本单位长期进行遗传学和微生物学质量控制及监测, 符合普通级实验动物要求^[6-7]) 中随机挑选, 饲养于贵州中医药大学实验动物研究所普通级设施专门的小型猪笼具中。饲养期间各组动物自由饮水。所有实验操作均符合贵州中医药大学实验伦理福利要求 (审批号: 20190017)。

1.2 饲料、药品和试剂

实验组动物饲喂高脂饲料配方为 3.0% 胆固醇、0.5% 胆盐、0.2% 丙硫氧嘧啶、10.0% 猪油、86.3% 基础饲料; 对照组饲喂基础饲料, 基础饲料由重庆腾鑫生物技术有限公司配制加工。

五苓散由泽泻、茯苓、猪苓、白术、桂枝 5 种药材分别加工成粉状, 按质量比例 (茯苓 18.75%, 泽泻 31.25%, 猪苓 18.75%, 桂枝 12.5%, 白术 18.75%) 均匀混合而成, 药材购自贵州同济堂药店。TC (批号: D799800-0100)、TG (批号: D799796-0100)、LDL-C (批号: D711063-0048)、HDL-C (批号: D711214-0048) 试剂盒均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.3 实验仪器

电子地磅 (分度值 0.1 kg, 型号 XK3190-A12, 上海耀华体重系统有限公司); 纤维皮卷尺 (分度值 1 mm, 型号 SJ-440050, 海宁上匠工具有限公司); 电子天平 (型号 JYI001, 上海精密仪器有限公司); 离心机 (型号 TDL50-2B, 上海安亭科学仪器厂); Axio Lab.A1 系统显微镜德国 Carl Zeiss 公司; 全自动生化检测仪 (AU680, 美国 Beckman Coulter 公司)。

1.4 动物造模、分组及实验干预

选择 4 只贵州小型猪为正常组, 饲喂普通饲料。另外 8 只饲喂高脂饲料, 连续 24 周造模。造模成功后, 8 只高脂血症模型猪分为模型组 4 只和五苓散治疗组 4 只, 继续饲喂高脂饲料; 其中, 五苓散治疗组饲料中添加五苓散, 连续给

药 8 周。五苓散按照 $0.55 \text{ g}/(\text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1})$ 的剂量, 混入少量饲料中, 使模型猪主动采食, 待采食完混药饲料后再补充核定量的高脂饲料。各组动物饲料总量相同, 每日饲喂 2 次。各组动物均自由饮水。

1.5 BMI 及腹围测定

分别在造模完成后 (24 周) 和用药干预结束后 (32 周), 测量各组动物的体质量 (WP, kg)、体长 (LP, m) 和腹围 (AC, cm), 计算体质量指数 (BMI) 值 ($\text{BMI} = \text{WP}/\text{L}^2$)。体长, 是指从两耳根中点连线的中部起, 用卷尺沿背脊量到尾根为止。腹围, 是指从中轴线背部最高处起, 用卷尺沿腹部量到第三乳头为止。

1.6 中医证候评分

观察各组动物中医证候变化, 参照《中药新药临床研究指导原则 (试行)》^[8] 的相关规定对肥胖程度、腹部大小、被毛状况、神疲乏力程度、好静懒动程度、气短气喘程度、粪便形态 7 个典型症状表现 (表 1), 赋以分值来显示其症状的轻重程度, 分值设为 0~10 分, 总评分 0~70 分。在造模完成后的第 24 周和用药结束后的第 32 周, 分别对各组动物进行打分, 总分 $\leq$ 总分值的 30% (即 21 分) 为正常生理性表现, 总分 $>$ 总分值的 30% 即为痰湿证; 得分越高说明病情越严重。

1.7 血脂指标测定

分别在造模完成后的 24 周和用药结束后的 32 周, 于次日空腹采集各组动物的前腔静脉抗凝血, 检测血清中四项血脂指标。血脂指标在贵州省人民医院临床检验中心检测。

1.8 统计学分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。所有数据均用 GraphPad Prism 5 软件处理, 多组间比较使用单因素方差分

表 1 贵州小型猪中医证候评分表

Table 1 Chinese medicine syndrome rating scale for Guizhou mini-pigs

症状表现	评分	评分说明
肥胖臃肿	0~10	肥胖程度越大, 分值越高
腹部膨大	0~10	腹部膨大程度越大, 分值越高
被毛稀少脱落	0~10	被毛稀少程度越大, 分值越高
神疲乏力	0~10	神疲乏力越严重, 分值越高
好静懒动	0~10	越不好动, 分值越高
气短气喘	0~10	气喘越严重, 分值越高
粪便色淡不成形	0~10	粪便不成形程度越大, 分值越高

析, 两组间比较采用独立样本 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 BMI 及腹围的变化

造模完成后, 模型组 BMI 和腹围均值均较正常组有所增加, 但差异无统计学意义 ($P=0.52$, $P > 0.05$) (表 2), 这可能与贵州小型猪对高脂饮食的耐受程度有关。

造模完成后, 治疗组给予五苓散治疗 8 周, 32 周用药结束后测定 BMI 和腹围的变化, 结果显示, 模型组 BMI 和腹围均值均较正常组有所增加, 但差异无统计学意义 ($P=0.45$, $P > 0.05$); 治疗组 BMI 和腹围均值较模型组有所下降, 但差异无统计学意义 ($P=0.65$, $P > 0.05$)。治疗组与正常组相比, BMI 和腹围均值也有所增加, 但差异无统计学意义 ($P=0.73$, $P > 0.05$), 结果如表 2 所示。结果表明, 经过五苓散治疗 8 周的治疗组, BMI 和腹围均值有一定程度的改善, 但各组之间差异没有统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 血脂水平变化

正常组饲喂普通饲料, 模型组和治疗组动物

表 2 贵州小型猪 BMI、腹围、血脂指标和证候评分

Table 2 BMI, abdominal circumference, blood lipid and syndrome scores in Guizhou mini-pigs

组别	实验时间	BMI	腹围	TG	TC	LDL-C	HDL-C	证候评分
正常组	24 周($n=4$)	36.34 ± 7.76	56.97 ± 8.12	0.28 ± 0.07	1.71 ± 0.38	0.72 ± 0.17	0.78 ± 0.04	12.05 ± 0.97
	32 周($n=4$)	37.78 ± 7.65	57.32 ± 9.16	0.29 ± 0.09	1.58 ± 0.53	0.79 ± 0.09	0.73 ± 0.16	12.42 ± 1.02
模型组	24 周($n=8$)	42.55 ± 7.92	69.15 ± 8.32	$0.64 \pm 0.05^{**}$	$2.59 \pm 0.27^{*}$	$1.19 \pm 0.06^{*}$	$0.39 \pm 0.06^{*}$	$58.28 \pm 1.39^{**}$
	32 周($n=4$)	43.23 ± 8.36	$69.98 \pm 8.09^{*}$	$0.64 \pm 0.07^{**}$	$2.56 \pm 0.30^{**}$	$0.40 \pm 0.09^{**}$	$1.14 \pm 0.07^{**}$	$59.73 \pm 2.64^{**}$
治疗组	32 周($n=4$)	40.07 ± 7.55	64.56 ± 5.30	$0.39 \pm 0.06^{##}$	$1.89 \pm 0.30^{##}$	$0.69 \pm 0.19^{##}$	$0.83 \pm 0.25^{#}$	$31.79 \pm 3.57^{***}$

注: BMI 即体质量指数, TG 即三酰甘油, TC 即总胆固醇, LDL-C 即低密度脂蛋白胆固醇, HDL-C 即高密度脂蛋白胆固醇。与相同时间点正常组比较, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$; 与相同时间点模型组比较, $^{#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ 。

饲喂高脂饲料,连续饲喂 24 周后,模型组较正常组血清中 TG、TC、LDL-C 水平均显著升高 ($P < 0.05$),而 HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$) (表 2)。结果表明,高脂饲料饲喂 24 周能引起模型组贵州小型猪主要血脂指标明显改变。

造模完成后,治疗组给予五苓散治疗 8 周,各组饲料同前继续饲喂。第 32 周用药结束后,治疗组较模型组血清中 TG、TC、LDL-C 水平均显著降低 ($P < 0.05$),而 HDL-C 水平显著升高 ($P < 0.05$);治疗组与正常组相比,各项指标差异不显著 ($P > 0.05$) (表 2)。结果表明,经过五苓散治疗 8 周后,模型组贵州小型猪主要血脂指标能明显改善,并能基本恢复至正常组水平。

2.3 中医证候评分

连续饲喂高脂饲料 24 周后,模型组动物表现出肥胖臃肿、腹胀膨大、被毛稀少脱落、神疲乏力、身体困重、好静懒动、动则气短气喘和粪便色淡稀软不成形等表症。高脂血症模型猪经过五苓散治疗 8 周后,此类症状表现逐渐开始好转,身形渐转向匀称健壮,被毛光泽柔顺,活动量增多,呼吸频率均匀。

根据表 1 中的中医证候指标评分标准,对实验 24 周和 32 周各组动物表现予以评分,统计结果见表 2。造模完成时,模型组中医证候评分显著性增加 ($P < 0.01$);经过五苓散治疗 8 周后,治疗组较模型组中医证候评分显著性下降 ($P < 0.01$);但治疗组评分仍然显著高于正常组 ($P < 0.01$)。结果表明,给小型猪饲喂高脂饲料 24 周,可以表现出明显的痰湿证;经过五苓散治疗 8 周后,痰湿程度显著减轻,但尚未恢复至正常水平。

3 讨论

在中医理论体系中,高脂血症属于“痰浊”、“痰湿”、“湿浊”范畴。长期暴食膏粱厚味会损伤脾胃,导致脾阳不振、水湿内停、精谷不化,故脾虚湿困是本病最基本的病理基础^[9]。脾脏失运,不能正常运化水谷精微,导致“痰浊、水湿”等,不仅阻碍了脾运水化湿的功能,而且直接浸没血管,引起血管疾病。治疗高脂血症往往是从痰瘀互结入手,以化痰祛瘀

为主^[10]。五苓散的成分主要是温药,整个方剂具有较强的温经利湿作用,主要由茯苓、猪苓、泽泻、桂枝、白术组成。白术具有利尿、益气、健脾的作用,它可以加强水和津液正常分布,保持水的湿润而不积聚,适用于湿邪所致之病,可治痰湿之患^[11]。

有研究表明加味三才五苓散治疗脾虚痰湿型非酒精性脂肪性肝病患者具有良好的效果,能有效改善患者的中医症状、血脂等,并能降低 BMI,临床疗效确切^[12]。蔡小荣^[13]的研究成果表明,茵陈五苓散能降低高脂血症大鼠血清 TC、TG 和 LDL-C 的含量,提高 HDL-C 含量。刘婷等^[14]研究结果表明,在动物模型中使用五苓散的主要成分泽泻能有效抑制脂肪肝,不仅能促进肝脏脂肪代谢,而且能改善上焦的湿浊。因此,选用五苓散治疗高脂血症,其健脾降脂作用更为显著。临床研究显示,痰湿内阻型高脂血症观察组总有效率高于对照组, BMI、肥胖度及体质量百分率水平均低于对照组 ($P < 0.05$),表明五苓散加减联合中医治疗痰湿内阻型高脂血症效果较好,可提高临床疗效,改善患者体质量,减轻肥胖程度^[15]。王茜^[16]采用五苓散加减联合中医电针技术治疗高脂血症患者,有效率达到了 91.49%,较对照组显著提高,进一步证实了痰湿内阻型高脂血症患者采用五苓散加减联合中医电针技术治疗的有效性。另外,五苓散对脂代谢紊乱相关疾病有一定的治疗作用^[17],具有保肝和降血脂作用,并能降低丙氨酸转氨酶活性^[18]。

目前,已有多种动物(大鼠、小鼠、兔、豚鼠、斑马鱼等)的高脂血症模型的研究报告^[19],但小型猪高脂血症模型只有五指山猪有建模成功的报告^[20-21]。本研究以贵州小型猪为实验对象,采用饲喂高脂饲料的方法模拟了过食肥甘引起的痰湿内阻,建立了贵州小型猪高脂血症痰湿证候组合模型,并用经典名方五苓散治疗观察。结果显示,造模完成后,贵州小型猪模型组主要血脂指标 TC、TG、LDL-C 水平明显升高 ($P < 0.05$),HDL-C 水平明显降低 ($P < 0.05$),模型组也表现出高脂血症表征,经五苓散干预后,治疗组各项指标有所改善,与李芹等^[22]研究结果一致。

值得注意的是,本研究中高脂饲料饲喂 24 周

后模型组贵州小型猪TC明显低于五指山猪高脂模型^[20-21]。贵州小型猪另外一项高脂饲料诱导动脉粥样硬化的研究^[23]显示,高脂饲料饲喂14周后实验组TC含量能达到对照组的2.23倍,与本研究获得的结果基本一致。成人正常TC参考值为2.9~6.0 mmol/L,《中国成人血脂异常防治指南(2016年修订版)》指出,TC>7.2 mmol/L为血脂异常高危人群,高危人群TC较成人正常值改变仅有1.2倍,因此高脂饮食造成小型猪TC指标过高不一定能很好复制人高脂血症模型。本研究结果表明,高脂饮食能造成贵州小型猪主要血脂指标的明显改变,也能引起高脂血症表征,但血清TC指标的改变没有五指山小型猪明显,进一步揭示贵州小型猪具有较强的血脂调节能力,与人临床上的血脂改变更为接近,可能更适合作为人高脂血症的动物模型。

参考文献:

- [1] 刘晶晶,贾连群,吕美君,等.高脂血症中西医结合研究进展[J].中华中医药学刊,2017,35(4):815-818. DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2017.04.011.
- [2] 文颖娟.基于国医大师雷忠义痰瘀互结理论的临床思维启示[J].陕西中医,2020,41(7):948-950,998. DOI:10.3969/j.issn.1000-7369.2020.07.033.
- [3] 刘璐,李文杰.李文杰教授巧从痰瘀论治冠状动脉粥样硬化性心脏病合并高脂血症的经验撷萃[J].中医临床研究,2019,11(14):23-26. DOI:10.3969/j.issn.1674-7860.2019.14.008.
- [4] 鞠庆波.张静生活用五苓散临证经验[J].辽宁中医杂志,2020,47(11):47-49. DOI:10.13192/j.issn.1000-1719.2020.11.011.
- [5] 冯少玲,何采辉,李文纯,等.脾虚痰湿型单纯性肥胖症应用五苓散治疗的BMI及血脂变化观察[J].中国医药科学,2015,5(9):67-69.
- [6] 王思珍,郭闯,郭猛,等.巴马小型猪和贵州小型猪封闭群的遗传结构分析[J].中国兽医学报,2017,37(7):1389-1393. DOI:10.16303/j.cnki.1005-4545.2017.07.31.
- [7] 杨李厂,周文兵,丁隼,等.三品种实验用小型猪繁殖性能测定[J].实验动物与比较医学,2017,37(1):50-54. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2017.01.011.
- [8] 郑筱萸.中药新药临床研究指导原则:试行[M].北京:中国医药科技出版社,2002:92-94.
- [9] 吴俊.五苓散加减治疗高脂血症临床疗效观察[J/OL].中西医结合心血管病杂志(电子版),2018,6(2):174. DOI:10.3969/j.issn.2095-6681.2018.02.139.
- [10] 吴胜.中西医结合治疗痰瘀型高脂血症的疗效观察[J/OL].中西医结合心血管病杂志(电子版),2020,8(18):190,196. DOI:10.16282/j.cnki.cn11-9336/r.2020.18.158.
- [11] 刘春柳,胡玉英.胡玉英运用五苓散治疗痰湿内阻型躯体形式障碍经验[J].湖南中医杂志,2019,35(10):23-24,46. DOI:10.16808/j.cnki.issn1003-7705.2019.10.008.
- [12] 谭利莎.加味三才五苓散治疗非酒精性脂肪性肝病(脾虚痰湿型)的临床研究[D].成都:成都中医药大学,2019.
- [13] 蔡小蓉.中药复方茵陈五苓散的代谢组学研究[D].广州:广东药科大学,2018.
- [14] 刘婷,段刚峰.五苓散加减联合电针治疗痰湿内阻型高脂血症患者疗效研究[J].陕西中医,2018(3):307-309. DOI:10.3969/j.issn.1000-7369.2018.03.011.
- [15] 赵红杰.五苓散加减联合中医治疗痰湿内阻型高脂血症的临床分析[J].当代医学,2020,26(35):139-140. DOI:10.3969/j.issn.1009-4393.2020.35.060.
- [16] 王茜.五苓散加减联合中医治疗痰湿内阻型高脂血症的效果研究[J/OL].中西医结合心血管病杂志(电子版),2019,7(33):172. DOI:10.16282/j.cnki.cn11-9336/r.2019.33.145.
- [17] 林巧云.周仲瑛教授从“痰瘀”辨治高脂血症的临床经验及学术思想研究[D].南京:南京中医药大学,2017.
- [18] CHU H, PARK C, KIM C, et al. Effectiveness and safety of Injinoryung-San-Gagambang (Yinchen Wuling powder) decoction on stroke patients with elevated serum liver enzymes: Three case reports[J]. Medicine (Baltimore), 2018, 97(51):e13577. DOI: 10.1097/md.00000000000013577.
- [19] 王成,胡乃华,余琳媛,等.降脂模型研究进展[J].中国比较医学杂志,2020,30(4):121-130. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2020.04.019.
- [20] 谢忠忱,黄广勇,陈华,等.五指山小型猪高脂血症模型的建立[J].中国比较医学杂志,2006,16:537-540. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2006.09.006.
- [21] ZHAO Y, XIANG L, LIU Y, et al. Atherosclerosis induced by a high-cholesterol and high-fat diet in the inbred strain of the wuzhishan miniature pig[J]. Anim Biotechnol, 2018, 29(2):110-118. DOI:10.1080/10495398.2017.1322974.
- [22] 李芹,张会永,周鹤,等.健脾化痰方对高脂血症脾虚痰浊证模型小型猪血管内皮功能的影响[J].中医杂志,2020,61(10):886-889,895. DOI:10.13288/j.11-2166/r.2020.10.015.
- [23] 孙仁俊,梁荣贵,吴淑敏,等.贵州香猪(小型猪)实验性动脉粥样硬化模型的建立及形态学观察简报[J].上海实验动物科学,1991,11(4):214-215,204.

(收稿日期:2020-11-07 修回日期:2021-02-20)

一种大鼠跑台抗阻训练模型的构建

蔺海旗¹, 王震², 林文弢³

(1.华南理工大学体育学院, 广州 510641; 2.广东青年职业学院, 广州 510550; 3.广州体育学院, 广州 510500)

[摘要] 目的 构建一种大鼠跑台抗阻训练模型。方法 选用19月龄的雄性SD大鼠40只, 通过测试确定跑台放置的角度和速度, 并根据大鼠尾部负重负荷及全血乳酸的变化来确定抗阻训练模型的运动方案。结果 大鼠在坡度35°跑台, 以15 m/min跑速进行抗阻训练, 运动效果较好。运动8~15 s时, 全血乳酸浓度均值为3.8~5.2 mmol/L。根据能量代谢和全血乳酸半时反应情况, 设定大鼠抗阻训练跑15 s、间歇30 s为一次训练。每组4次训练后全血乳酸浓度较为稳定; 每组间歇3 min, 每天3组, 全血乳酸浓度为4~5 mmol/L。结论 通过设置跑台的坡度、速度和大鼠尾部负重等参数, 建立了一种大鼠跑台抗阻训练模型。

[关键词] 大鼠; 抗阻训练; 动物跑台; 模型

[中图分类号] Q95-33; R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0143-05

Establishment of a Resistance Training Model for Rats

LIN Haiqi¹, WANG Zhen², LIN Wentao³

(1. School of Physical Education, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China; 2. Guangdong Youth Vocational College, Guangzhou 510550, China; 3. Guangzhou Sports University, Guangzhou 510500, China)

Correspondence to: LIN Wentao, E-mail: gtwlin@126.com

[Abstract] **Objective** This study discusses the construction of a resistance training model for rats using a treadmill. **Methods** A total of 40 male SD rats aged 19 months were selected to determine the conditions for the establishment of a resistance training model. To this end, the angle and speed of the treadmill were measured, the changes of the rat tail load and lactic acid levels in their blood were tested. **Results** Rats underwent resistance training on the treadmill at an incline of 35° and a running speed of 15 m/min, the exercise regimen significantly improved. After exercising for 8-15 s, the average blood lactic acid concentration was 3.8-5.2 mmol/L. According to the energy metabolism and blood lactic acid half-time response, the resistance training of rats was performed as one training session for 15 s and 30 s intervals. After 4 training sessions in each group, the blood lactic acid concentration was relatively stable. The blood lactic acid concentration was 4-5 mmol/L after resistance training for 3 groups per day and 3 min intervals between groups. **Conclusion** A resistance training model in rats is established based on the incline, speed of the rat treadmill, and the tail load of rats.

[Key words] Rats; Resistance training; Treadmill; Model

抗阻训练是提高肌肉质量和体积的有效训练方法^[1-4]。近年来抗阻训练研究多数以大鼠建模为主^[5-8]。研究运动员力量训练所适应的生理机制、

机体康复和力量训练效果, 以及老年人力量训练的风险性和合理性时, 均采用抗阻训练作为研究手段。而且研究者常采用不同的实验方案, 模拟

[基金项目] 教育部人文社会科学研究青年基金项目(20YJCZH090); 广东省哲学社会科学“十三五”规划项目(GD19YTY01); 广东省教育科学“十三五”规划项目(2018GXJK001); 广州市哲学社会科学“十三五”规划2020年度项目(2020GZGJ37)

[作者简介] 蔺海旗(1985—), 男, 博士研究生, 实验师, 研究方向: 运动健康促进。E-mail: sphqlin@scut.edu.cn

[通信作者] 林文弢(1957—), 男, 学士, 教授, 研究方向: 运动生物化学与健康促进。E-mail: gtwlin@126.com

人体抗阻运动规律,建立大鼠抗阻训练模型^[9-13]。动物抗阻训练模型中常见有爬梯、跑台等方式,但爬梯抗阻模式时大鼠缺少运动的自主性,训练效果欠佳。同时,现有训练模型的运动量、负荷强度、间歇时间和运动频度等难以监控,影响抗阻训练研究的开展。因此,如何设计有效的抗阻训练模型是开展抗阻训练研究的首要任务,也是众多学者研究的焦点。本研究结合以往抗阻训练模型的优点与不足,利用跑台建立大鼠抗阻训练模型,以期抗阻训练研究提供简便、有效的训练手段和方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级19月龄雄性SD大鼠40只,购自广东省医学实验动物中心[SCXK(粤)2018-0002],体质量为 (780 ± 30) g。所有大鼠分笼饲养于华南理工大学医学院 SPF级动物实验中心[SYXK(粤)2017-0178],每笼4只,温度25℃左右,湿度50%~60%,昼夜节律光照。适应喂养后,随机挑选8只进行跑台坡度、速度和负重3个参数的抗阻训练联合实验,其余随机分为对照组、抗阻训练1组、抗阻训练2组和抗阻训练3组,每组8只。本研究经华南理工大学伦理委员会核准(编号:2018SDL012)。

1.2 试剂与仪器

德国EKF Biosen C-line 血糖/乳酸分析仪购自盼乐(上海)贸易有限公司。乳酸分析仪的酶膜、标准液和缓冲液购自深圳市格林斯仪器有限公司。医用棉布基胶带、纱布、沙袋、棉绳,以及改良的动物实验跑台(型号:DB030)均购自北京智鼠多宝生物科技有限责任公司。

1.3 实验方法

1.3.1 构建大鼠跑台抗阻训练模型

负重爬坡运动是运动训练中常见的抗阻训练模式,运动过程中不仅要克服自身体质量,而且要克服额外的负重。基于负重爬坡运动模式的启发,设计跑台抗阻训练模型:利用可升降支柱将跑台支撑距离地面高度约1 m,调节跑台坡度,跑道粘贴防滑纱布;利用跑台自有的电动装置,调节旋钮,进行配速;根据大鼠尾部最大负重制

作相应百分比的沙袋,作为抗阻训练的负重物,抗阻训练时用棉绳系于大鼠尾部(图1)。根据抗阻训练实验方案的需求,确定运动训练强度、负荷量、训练周期和间歇时间等运动要素。

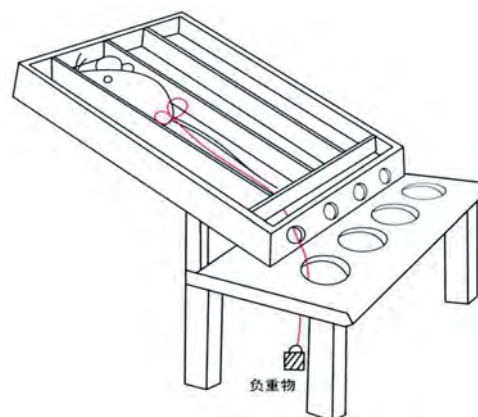


图1 大鼠跑台抗阻训练模型简图

Figure 1 Schematic diagram of resistance training model for rats using a treadmill

1.3.2 大鼠跑台抗阻训练联合实验

在跑台坡度分别为20°、25°、30°、35°和40°,跑台速度分别控制在10、15、20、25、30、35和40 m/min的条件下,大鼠进行抗阻训练。观察大鼠的运动表现,以确定抗阻训练模型的适宜坡度和跑台速度。

1.3.3 大鼠跑台抗阻训练负荷强度实验

在确定大鼠抗阻训练模型适宜坡度和跑速的基础上,分别进行1~6次,每次15 s,间歇30 s的斜坡跑;并在每次运动后90 s,用毛细血管于大鼠尾部取血10 μL,测试全血乳酸浓度,以确定每次适宜的组数及每组间歇时间。以大鼠尾部负重后仅能在跑台爬行为标准来确定大鼠最大负重量,并分别以各个大鼠最大负重的30%、70%作为负重量进行跑台抗阻训练,同时测试全血乳酸浓度以确定运动强度。

1.4 统计学分析

采用SPSS 18.0统计学软件对各实验结果数据进行统计分析。所有实验结果数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大鼠跑台抗阻训练的坡度与跑速

大鼠在不同的跑台坡度和速度下分别进行运

动，观察记录大鼠运动状态。由表 1 可见，跑台坡度为 30°、跑速< 15 m/min 时，大鼠可自主跑动且无需驱赶；跑速为 20~25 m/min 时，大鼠需驱赶才能进行短时间的跑动；跑速> 30 m/min 时，大鼠不能跟进跑台速度，无法进行有效运动。跑台坡度为 35°、跑速≤ 15 m/min 时，大鼠可自主跑动；跑速≥ 20 m/min 时，大鼠需驱赶才能进行运动。跑台坡度为 40°、速度≤ 15 m/min 时，驱赶下大鼠费力在跑台上跑动，伴有跳跃式奔

跑；在此坡度和速度下，额外增加负重时，大鼠将无法完成抗阻运动；速度≥ 20 m/min 时，多数大鼠自动从跑台上滑下，无法跑动，大鼠跑动效果很差。

根据抗阻训练实验的目的需求，即发展骨骼肌最大力量和爆发力，大鼠跑台抗阻训练模型的坡度和跑速需适宜。因此，综合考虑认为，跑台坡度 35°、跑速 15 m/min 为大鼠跑台抗阻训练模型较理想的坡度和速度。

表 1 不同坡度和跑速下大鼠运动状态
Table 1 The motion state of rats under different inclines and running speeds

坡度	运动时间 /min	跑速 / (m · min ⁻¹)					
		10	15	20	25	30	35
20°	2	①	①	②	③	④	⑤
	3	①	②	④	⑤	⑤	⑤
25°	2	①	①	②	③	④	⑤
	3	①	②	③	④	⑤	⑤
30°	2	①	②	③	④	⑤	⑤
	3	①	③	③	④	⑤	⑤
35°	2	①	②	③	④	⑤	⑤
	3	②	④	⑤	⑤	⑤	⑤
40°	2	④	⑤	⑤	⑤	⑤	⑤
	3	⑤	⑤	⑤	⑤	⑤	⑤

注：①轻松完成；②较费力完成；③费力完成；④驱赶完成；⑤驱赶不能完成。

2.2 大鼠跑台抗阻训练的运动方案

2.2.1 强度的确定

大鼠在跑台坡度 35°、跑速 15 m/min 条件下进行抗阻训练。通过测试抗阻训练运动后全血乳酸浓度的变化来确定训练强度。每次训练持续时间分别是 8、9、10、11、12、14、15、16 和 17 s，各运动时间后测试全血乳酸浓度。运动 8~15 s 时，全血乳酸浓度均值为 3.8~5.2 mmol/L；运动 16 s 和 17 s 后，全血乳酸浓度分别为 5.8 mmol/L 和 6.7 mmol/L。由此可见，每次训练 15 s 较为适宜，因为运动中全血乳酸浓度< 5 mmol/L，表明骨骼肌主要以磷酸原系统供能为主，糖酵解供能比例较低^[14]。同时，由于全血乳酸的半时反应时间为 30 s，确定大鼠抗阻训练跑 15 s、间歇 30 s 为一次训练。

为确定每组抗阻训练次数，分别测试大鼠抗阻训练前安静时以及分别进行 1~6 次训练后的全血乳酸浓度。由表 2 可见，大鼠跑 15 s、间歇

30 s，2 次训练后全血乳酸浓度开始升高，2~4 次训练后全血乳酸浓度较为稳定；训练 5 次后全血乳酸浓度大幅升高，超过 5 mmol/L，达到大鼠乳酸阈强度^[5]。因此，基于抗阻训练的实验目的，每组训练次数以 4 次为宜。

2.2.2 负重量的确定

以大鼠尾部负重后能沿跑台爬行为标准，测试大鼠最大负重量。然后分别以大鼠最大负重

表 2 不同次数抗阻训练后大鼠全血乳酸的变化
Table 2 Changes of blood lactic acid levels in rats after undergoing resistance training of different intensities

大鼠编号	训练次数	不同状态下血乳酸浓度 / (mmol · L ⁻¹)	
		安静状态	15 s 跑之后
1	1	1.54	2.05
2	2	1.62	4.11
3	3	1.96	4.19
4	4	2.01	4.18
5	5	1.73	5.67
6	6	1.84	7.33

的30%、70%来进行跑台抗阻训练,并检测全血乳酸浓度,方案同确定强度的测试。由表3可见,大鼠以最大负重的30%、70%进行尾部负重,跑15 s、间歇30 s为1次,在跑完4次后全血乳酸浓度均接近5 mmol/L,而在5次训练后全血乳酸浓度均超过5 mmol/L。结合骨骼肌能量

代谢特点^[14],分别以最大负重的30%、70%训练4次时主要以磷酸原系统供能为主。可见,大鼠跑台抗阻训练强度为跑15 s间歇30 s时,负重量以大鼠尾部最大负重的中低强度为宜;其他负重量可根据实验需要确定。表3结果进一步表明每组训练次数以4次为宜。

表3 不同负重训练后大鼠血乳酸的变化

Table 3 Changes of blood lactic acid levels in rats after undergoing different weight training

次数	尾部最大负重/g	30%最大负重/g	70%最大负重/g	以不同负重跑15 s后的血乳酸浓度/(mmol·L ⁻¹)	
				30%最大负重	70%最大负重
1	246	73.8	172.2	1.86	1.89
2	246	73.8	172.2	2.98	3.19
3	246	73.8	172.2	3.68	3.75
4	264	79.2	184.8	4.78	4.88
5	288	86.4	201.6	5.37	5.75
6	271	81.3	189.7	6.61	6.57

2.2.3 抗阻训练组数和间歇时间的确定

为确定本抗阻训练模型的训练组数和每组间歇时间,进一步设置间歇时间分别为1、3、5 min,各训练1~5组后检测大鼠全血乳酸浓度。结果表明,每组间歇1 min,抗阻训练1、2、3、4、5组后,大鼠全血乳酸浓度均在6.8 mmol/L以上,最高达18 mmol/L。每组间歇3 min,抗阻训练1、2、3组后,大鼠全血乳酸浓度逐渐升高,最高为5.35 mmol/L,而第4、5组后全血乳酸浓度下降。每组间歇5 min,抗阻训练1、2、3、4、5组后大鼠全血乳酸浓度均为4~5 mmol/L,变化不大。因此,大鼠跑台抗阻训练模型每天训练组数为3组,每组间歇3 min为宜。

2.2.4 每周训练次数的确定

根据抗阻训练的原理,力量训练一般是隔日训练,抗阻训练每周安排3~4次为宜^[15]。具体可根据实验设计需求,确定每周训练的次数。

2.2.5 大鼠跑台抗阻训练模型的确定

结合上述实验结果,确定本研究大鼠跑台抗阻训练模型方案:跑台坡度35°,跑速15 m/min;总体训练时间(含训练、休息)为37 min;尾部负重量以最大负重量的中低强度为宜,其余按需确定;跑速15 m/min训练15 s、休息30 s为1次,4次/组,3组/d,每组间歇3 min;隔日训练。

3 讨论

抗阻训练是有效改善机体肌肉和骨骼系统功能的运动方式之一^[1-2]。作为一种非药物治疗的康复运动策略与手段,抗阻训练已被用于改善老年人葡萄糖耐量和全身胰岛素敏感性^[16]。而且无论是运动员力量训练、疾病康复,还是少年、中年、老年人增强身体机能,较为有效的手段均是抗阻力量训练,但该训练需要有一定的科学性和严密的训练计划。

大鼠抗阻训练是研究肌肉骨骼功能改善机制的主要方式^[5-8],但大鼠抗阻训练与人体实际运动相比,存在不同之处。如何利用动物实验模拟、重现人体的抗阻训练是实验的难点。目前常见的大鼠抗阻训练模型主要有尾部负重爬高、身体负重跳跃/蹲起、神经肌肉电刺激及操作制约训练等四类^[3],而国内较为常用的是动物跑台尾部负重跑和尾部负重爬梯、爬网格模型。研究者开发了动物抗阻训练设备和系统,利用操作性条件反射系统,由声音和光建立条件反射,致使大鼠举重,但该训练条件不易控制,步骤多且繁琐,难以实现^[17]。而神经肌肉电刺激举重抗阻模型是通过不间断持续电刺激实验动物尾部以使大鼠伸腿举重^[18],大鼠非常痛苦,一定程度上违背伦理道德。

目前,大鼠抗阻训练模型存在仪器设备要求

苛刻、模型操作复杂、训练过程不易监控、费时费力、训练时大鼠应激过大、缺乏主动性等难以克服的缺点,致使实验研究时难以定量运动的强度、次数、组数以及每组间歇时间等,进而影响研究效果。鉴于此,本研究采用改良的实验动物跑台构建大鼠跑台抗阻训练模型。实验结果显示,本研究的大鼠跑台抗阻训练模型具有一定的优点:大鼠跑台训练技术成熟,易于操作,同时大鼠进行跑台爬坡运动更贴近鼠类的生活习性,抵触情绪较小,很好地解决了大鼠运动时的主动性,以及运动量和强度等因素无法控制的难点。

大鼠跑台抗阻训练模型的建立对于增龄性肌肉骨骼系统研究具有重要意义。而且大鼠尾部负重抗阻力量训练能促进大鼠骨骼肌蛋白质的合成,维持肌肉质量。本研究从大鼠训练过程中进行行为学观察和实验证实,利用跑台成功建立抗阻训练模型,适用于抗阻训练的实验研究^[19-20]。本研究中,大鼠跑台抗阻训练模型要求尾部包裹固定负重物的操作者具有较丰富的经验,能够很好地控制纱布包裹大鼠尾部的松紧程度,以防止尾套包裹过紧或过松:过紧易使尾部供血不足,损伤尾部;过松则粘贴不牢易脱落,影响造模成功率。另外,抗阻训练模型跑台坡度的设定应是大鼠能够在跑台上跑动的最大坡度,跑速为大鼠能够承受的最大速度。跑台坡度和速度的设置需结合大鼠跑动时的行为学观察表现来综合考虑。运动训练时要有足够的休息时间:组间休息不足,肌肉疲劳不能维持预定的训练量和负荷,影响训练效果;而每组间歇3~5 min能有效维持组间训练强度^[6]。

需要说明的是,如何结合实际研究需要,合理调整运动训练周数、次数、组数、间歇时间等,进而有效控制运动量和强度,改良大鼠跑台抗阻训练模型构建的其他因素,尽可能地降低研究过程中存在的偏倚,这些均有待进一步研究探讨。

参考文献:

- [1] KOO J H, KANG E B, CHO J Y. Resistance exercise improves mitochondrial quality control in a rat model of sporadic inclusion body myositis[J]. *Gerontology*, 2019, 65(3):240-252. DOI:10.1159/000494723.
- [2] BARBOSA M R, SHIGUEMOTO G E, TOMAZ L M, et al. Resistance training and ovariectomy: Antagonistic effects in mitochondrial biogenesis markers in rat skeletal muscle [J]. *Int J Sports Med*, 2016, 37(11):841-848. DOI:10.1055/s-0042-107247.
- [3] 胡敏, 邹亮畴, 刘承宜, 等. 大鼠抗阻训练模型的归类与分析[J]. *广州体育学院学报*, 2009, 29(5):91-96. DOI:10.13830/j.cnki.cn44-1129/g8.2009.05.001.
- [4] ATO S, KIDO K, SASE K, et al. Response of resistance exercise-induced muscle protein synthesis and skeletal muscle hypertrophy are not enhanced after disuse muscle atrophy in rat[J]. *Front Physiol*, 2020, 11:469. DOI:10.3389/fphys.2020.00469.
- [5] 闫万军, 赵斌, 刘丰彬, 等. 负重跑训练对老龄大鼠肌肉丢失的影响[J]. *中国体育科技*, 2009, 45(4):120-124. DOI:10.16470/j.csst.2009.04.001.
- [6] MARQUETI R C, DURIGAN J L Q, OLIVEIRA A J S, et al. Effects of aging and resistance training in rat tendon remodeling[J]. *FASEB J*, 2018, 32(1):353-368. DOI:10.1096/fj.201700543r.
- [7] 林文弢, 王震, 翁锡全, 等. 抗阻训练对衰老大鼠线粒体介导腓肠肌细胞凋亡通路相关因子表达影响的研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2014, 33(10):994-997. DOI:10.16038/j.1000-6710.2014.10.011.
- [8] 王震, 林文弢, 翁锡全, 等. 抗阻训练对老龄大鼠腓肠肌 Ca^{2+} 及线粒体膜电位的影响[J]. *广州体育学院学报*, 2014, 34(2):85-88. DOI:10.13830/j.cnki.cn44-1129/g8.2014.02.024.
- [9] WILLARDSON J M. A brief review: Factors affecting the length of the rest interval between resistance exercise sets [J]. *J Strength Cond Res*, 2006, 20(4):978-984. DOI:10.1519/R-17995.1.
- [10] SABIDO R, HERNÁNDEZ-DAVÓJ L, CAPDEPON L, et al. How are mechanical, physiological, and perceptual variables affected by the rest interval between sets during a flywheel resistance session?[J]. *Front Physiol*, 2020, 11:663. DOI:10.3389/fphys.2020.00663.
- [11] 冯钰, 程泽鹏, 史仍飞. 骨骼肌肥大动物模型的研究进展[J]. *中国体育科技*, 2017, 53(6):79-84. DOI:10.16470/j.csst.201706009.
- [12] 任飞, 胡敏, 潘慧文, 等. 一种新型大鼠抗阻训练模型的建立[J]. *实验动物科学*, 2011, 28(1):52-53, 59. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2011.01.016.
- [13] 苏艳红, 袁乾坤, 肖蓉, 等. 抗阻训练对增龄大鼠骨骼肌线粒体功能的影响[J]. *中国应用生理学杂志*, 2020, 36(2):165-170, 175. DOI:10.12047/j.cjap.5861.2020.037.
- [14] 林文弢. 运动生物化学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2019.

树鼩脊髓微血管内皮细胞的分离培养及 EV71 感染实验

施梅言, 王璇, 王文广, 阮蕾颖, 代解杰

(中国医学科学院 / 北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 昆明 650118)

[摘要] 目的 建立树鼩脊髓来源的微血管内皮细胞体外分离培养技术, 用 71 型肠道病毒 (enterovirus 71, EV71) 感染该细胞, 探讨其感染特性, 为 EV71 损伤中枢神经系统机制的研究提供基础。方法 采用 II 型胶原酶、分散酶、DNase I 三酶联合两次消化树鼩脊髓组织后, 获取微血管内皮细胞, 并进行纯化和鉴定。用 EV71 感染树鼩脊髓微血管内皮细胞, 测定感染不同时间点的细胞及其培养上清液中病毒载量。采用间接免疫荧光法检测细胞中 EV71 标志蛋白的表达, 以确定 EV71 对树鼩脊髓微血管内皮细胞的感染性。结果 分离培养获得的树鼩脊髓微血管内皮细胞呈典型的分支状和串珠状, 经过嘌呤霉素纯化培养后的传代细胞主要是不规则的多角状细胞; 细胞免疫荧光鉴定结果显示, 微血管内皮细胞标志蛋白 CD31 和血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 表达都呈阳性。用感染复数为 1 的 EV71 感染树鼩脊髓微血管内皮细胞, 可见典型的细胞病变, 且病毒滴度可达 3.2×10^6 TCID₅₀/mL, 表明 EV71 可成功感染树鼩脊髓微血管内皮细胞并有效增殖; 而且在 48 h 内, 细胞培养上清液中病毒载量呈线性升高, 而细胞中病毒载量在 12 h 到达顶峰。间接免疫荧光法在 EV71 感染后 12 h 的树鼩脊髓微血管内皮细胞质中可检测到病毒颗粒。结论 成功建立了树鼩脊髓微血管内皮细胞体外分离培养方法, 确定了 EV71 对树鼩脊髓微血管内皮细胞的感染性和病毒增殖特性, 为开展 EV71 入侵中枢神经系统的机制研究提供了一定基础。

[关键词] 脊髓微血管内皮细胞; 分离培养; EV71; 病毒增殖; 树鼩

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0148-07

Isolation and Culture of Spinal Microvascular Endothelial Cells of Tree Shrews and Experimental Study on Infection with Enterovirus 71

SHI Meiyang, WANG Xuan, WANG Wenguang, RUAN Leiying, DAI Jiejie

(Tree Shrew Germplasm Resource Center, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences & Peking Union Medical College, Kunming 650118, China)

Correspondence to: DAI Jiejie, dj@imbcams.com.cn

[Abstract] **Objective** To establish an effective method of isolation and primary culture method for microvascular endothelial cells derived from the spinal cord of tree shrews *in vitro*. Enterovirus 71 (EV71) was used to infect these cells to explore its infectious characteristics and provide a reference for the study of the mechanism of EV71 induced damage to the central nervous system. **Methods** The spinal cord tissues were digested twice with type II collagenase, dispase, and DNase I, then the microvascular endothelial cells were obtained. EV71 was used to infect tree shrew spinal microvascular endothelial cells, and the virus titer at different time points was measured. The expression of EV71 in the infected cells was detected by immunofluorescence assay to determine the infectivity of EV71 to the spinal cord microvascular endothelial

[基金项目] 云南省应用基础研究计划项目(2018FB045); NSFC- 云南联合基金重点支持项目(U1702282); 云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019); 昆明市科技创新团队(2019-1-R-24483)

[作者简介] 施梅言(1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 人类疾病动物模型建立及相关研究。E-mail: 1758651731@qq.com

[通信作者] 代解杰(1961—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 人类疾病动物模型建立与应用研究。E-mail: dj@imbcams.com.cn

cells of tree shrews. **Results** The microvascular endothelial cells were typically branched and beaded, and the passage cells obtained after puromycin purification and culture were mainly irregular polygonal cells. The cellular immunofluorescence results showed that CD31 and vWF expressions were positive. The spinal microvascular endothelial cells of tree shrews were infected with EV71 at a multiplicity of infection of 1, the cells showed typical cytopathic appearance, and the virus titer was approximately 3.2×10^6 TCID₅₀/mL. This proved that EV71 infected and proliferated in the tree shrew spinal cord microvascular endothelial cells, and within 48 h, the viral load in the supernatant increased linearly, reaching its peak at 12 h. The indirect immunofluorescence method detected virus particles in the cytoplasm of the cells 12 h after infection.

Conclusions The isolation and purification methods of spinal cord microvascular endothelial cells from tree shrews are successfully established, and the infectivity to the obtained cells and proliferation of EV71 in the cells are confirmed, providing a basis for the study of the mechanism of EV71 invading the central nervous system.

[Key words] Spinal cord microvascular endothelial cells; Isolation and culture; Enterovirus 71; Virus proliferation; Tree shrews

71型肠道病毒(enterovirus 71, EV71)是小核糖核酸家族的一员,由无包膜单链RNA病毒组成。EV71能侵入中枢神经系统,引起神经系统疾病。越来越多的证据表明, EV71可直接感染神经元,而且中枢神经系统的先天免疫反应在限制病原体感染中发挥重要作用^[1]。但是EV71感染中枢神经的致病机制尚不明确。

微血管内皮细胞是构成血-脊髓屏障与血-脑屏障的主要成分,与其他类型的细胞如星形胶质细胞或周细胞一起,通过紧密连接的方式形成神经血管单位^[2],专门调节体液、分子和细胞在外周血和中枢神经系统之间的交换。脊髓微血管内皮细胞(spinal cord microvascular endothelial cells, SCMECs)与脑微血管内皮细胞相似,也参与了许多与神经系统疾病相关的病理过程^[3],是血-脊髓屏障的重要组成部分。在脊髓损伤和实验性自身免疫性脑脊髓炎中,内皮细胞通过调节巨噬细胞浸润、病理性血管生成和纤维化,发挥了髓鞘清除之外的重要功能,从而促进脱髓鞘疾病的进展^[4]。推测EV71可能通过血液跨越血-脊髓屏障引起脊髓内皮细胞损伤,最终导致中枢神经系统疾病,但其相关机制的研究需要建立血-脊髓屏障感染细胞模型。

树鼩是一种新型的实验动物,已广泛应用于人类疾病模型的研究,包括病毒感染模型、肿瘤模型、呼吸系统疾病模型和神经系统疾病模型等^[5]。例如Tong等^[6]利用慢病毒感染,成功地在树鼩中生成恶性胶质瘤;与相应的小鼠胶质瘤相比,树鼩胶质瘤在基因表达谱上与人类成

胶质细胞瘤更为相似。王文广等^[7]发现EV71能感染幼龄中缅树鼩,并建立了树鼩EV71手足口病的疾病动物模型。本研究在此基础上探索一种操作简便、经济可行的原代SCMECs分离培养方法,并用EV71感染树鼩SCMECs,初步探究EV71的感染性及增殖活性,为利用树鼩开展EV71入侵中枢神经系统的致病机制研究提供重要的实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物与病毒

取1只3月龄的雄性滇西亚种中缅树鼩(*Tupaia Belangeri Chinensis*),由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心提供,生产许可证号为SCXK(滇)K2018-0002,使用许可证号为SYXK(滇)K2018-0002。本研究遵循实验动物使用的3R和福利伦理原则。

EV71标准毒株(FY-23-KB株)由中国医学科学院医学生物学研究所病毒免疫室分离馈赠。非洲绿猴肾细胞(Vero细胞)由中国医学科学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心保存。

1.2 主要仪器与试剂

生物安全柜和CO₂恒温培养箱均购自美国Forma公司。台式高速冷冻离心机购自美国Beckman公司。ECLIPSE Ti倒置显微镜购自日本Nikon公司。D-Hank's液、DNase I、HEPE缓冲液和II型胶原酶购自北京索莱宝科技有限公司。分散酶和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自美国Sigma公司。嘌呤霉素和胰岛素铁

硒转运蛋白 (insulin-transferrin-selenium, ITS) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。表皮细胞生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 和碱性成纤维细胞生长因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF) 均购自美国 PeproTech 公司。胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS)、0.25% Trypsin-EDTA、DMEM/F12 培养液和双抗 (青链霉素混合液) 均购自美国 HyClone 公司。鼠源性抗 CD31 单克隆抗体、兔源性抗血管性血友病因子 (von Willebrand factor, vWF) 单克隆抗体、荧光标记的羊抗兔或羊抗鼠 IgG 购自英国 Abcam 公司。兔源性抗 EV71 抗体购自美国 GeneTex 公司。CCK-8 购自日本 Dojindo 公司。一步法荧光定量 PCR 试剂盒 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit 购自日本 TaKaRa 公司, 病毒 RNA 提取试剂盒 QIAamp® Viral RNA Mini Kit 购自德国 Qiagen 公司, 荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司。

1.3 树鼩 SCMECs 的分离

本实验借鉴苑晓晨等^[8]的分离方法, 并做了一些改进。取 3 月龄左右的树鼩, 行安乐死 (腹腔注射 3% 的戊巴比妥 0.4 mL) 处死后, 迅速取出整段脊柱, 浸入 75% 的乙醇溶液中消毒 3 min, 无菌 PBS 漂洗 3 次。无菌操作取出中段脊髓组织, 在体视镜下去除脊膜和血管, 用 D-Hank's 漂洗 3 次, 转入无菌培养皿中, 加入 1 mL DMEM/F12 培养液。将脊髓组织剪为 1 mm³ 的小块, 分别加入 II 型胶原酶 (2 mg/mL) 和 DNase I (60 U/mL) 各 2 mL, 37 °C 消化 1 h, 每 15 min 轻摇混匀一次。将消化液转至 15 mL 离心管中, 4 °C 207 × g 离心 8 min, 弃上清液。用 22% BSA-DMEM/F12 培养液重悬后, 4 °C 下 824 × g 离心 20 min, 弃上清液。加入 II 型胶原酶 (2 mg/mL)、分散酶 (2 mg/mL) 和 DNase I (60 U/mL) 各 1 mL, 混匀后 37 °C 消化 30 min。室温下 207 × g 离心 8 min, 弃上清液后获得微血管片段, 用 DMEM/F12 培养液漂洗, 再 207 × g 离心 8 min, 弃上清液, 重复 3 次。用 DMEM/F12 培养液 (含 20% FBS、1% ITS、10 ng/mL EGF、10 ng/mL bFGF、1% 双抗和 1% HEPE 缓冲液) 重悬后, 接种于 T25 培养瓶中, 72 h 后换液, 之后每隔 1 d 换液一次。

1.4 SCMECs 的纯化

倒置显微镜下观察细胞长满瓶底后, 用 0.25% 的 Trypsin-EDTA 消化传代 2 次。待细胞铺满瓶底的 70%, 换用含嘌呤霉素 (5 ng/mL) 的 DMEM/F12 培养液培养 9~12 h。去除培养液, PBS 漂洗 2 次, 用不含嘌呤霉素的 DMEM/F12 培养液继续培养至细胞长满瓶底。然后用 0.25% Trypsin-EDTA 消化传代, 重复纯化 3 次。

1.5 SCMECs 的形态学观察及免疫荧光鉴定

取不同培养时期的 SCMECs, 用倒置显微镜观察细胞生长情况, 并拍照。

将纯化后第 3 代的细胞接种于 24 孔板中, 待细胞长满 80% 左右, 用 PBS 浸洗 3 次, 每次 2~3 min; 用体积分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定 10 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 2~3 min; 用体积分数为 5% 的山羊血清封闭 30 min; 弃山羊血清, PBS 漂洗 3 次, 每次 2~3 min; 分别在不同的孔板中滴加稀释好的鼠源性抗 CD31 一抗 (工作液稀释比例为 1:400) 和兔源性抗 vWF 一抗 (1:400), 对照孔加 PBS 代替, 4 °C 过夜孵育; PBS 漂洗 3 次, 每次 2~3 min; 分别滴加羊抗鼠、羊抗兔荧光二抗 (1:400), 37 °C 孵育 1 h; PBS 漂洗 3 次, 每次 2~3 min; DAPI 染核 2 min, PBS 漂洗 3 次, 每次 2~3 min; 加入抗荧光淬灭剂 (1:500), 在荧光显微镜下观察拍照。

1.6 CCK-8 法测定细胞生长曲线

细胞纯化培养后, 将单层生长的细胞用培养液制成细胞悬液, 并稀释至 5×10^4 个细胞/mL。每孔接种 100 μ L 细胞液于 96 孔板, 设 1~8 d 共 8 组, 每组 3 个实验孔、3 个空白调零孔; 其中空白调零孔不接种细胞, 只加培养液。置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中培养细胞, 分别在第 1、2、3、4、5、6、7、8 d 吸去培养液, 每孔加入 100 μ L 含 CCK-8 试剂的混合培养液 (90 μ L 培养液、10 μ L CCK-8 试剂), 继续培养 30 min。选择波长 450 nm, 在酶标仪上测定各孔吸光度 (A 值)。

1.7 EV71 滴度的测定

病毒样品用含 2% FBS 的 DMEM/F12 培养液连续 10 倍梯度稀释, 将稀释好的病毒液加入含 Vero 细胞的 96 孔板中, 在 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养, 连续观察 8 d。使用病毒半数组织

培养感染量 (median tissue culture infective dose, TCID₅₀) 检测病毒滴度, 在倒置显微镜下每天观察细胞病变 (cytopathic effect, CPE) 情况, 用 Karper 法计算病毒的滴度。

1.8 EV71 感染细胞与病毒增殖活性的测定

用滴度为 3.2×10^6 TCID₅₀/mL 的 EV71, 以最佳感染复数 (multiplicity of infection, MOI) 为 1 感染 SCMECs。待病毒吸附 1.5 h 后, PBS 洗去未吸附的病毒, 加入含 2% FBS 的 DMEM/F12 培养液 1 mL, 在 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中继续培养。分别在感染 0、12、24、36、48、72、96 h 收集样品, 检测病毒载量。

采用 QIAamp®Viral RNA Mini Kit, 提取上述收集到的病毒感染后细胞样品中的 RNA。使用 One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit, 采用 TaqMan 荧光定量 PCR 法检测细胞培养上清液、细胞中的病毒载量。EV71 上游引物序列为 5'-CAGTCATC-GATTGGATAC-3', 下游引物序列为 5'-CTCTG-CTGAAGAACTATC-3', 荧光探针序列为 5'-FAMCAAGGTTCCAGCACTCCAAGC-BHQ1-3'。反转录程序: 42 °C 5 min, 95 °C 10 s。PCR 反应程序: 95 °C 5 s, 60 °C 45 s, 45 个循环。根据标准品浓度来计算上清液和细胞中的病毒载量。

1.9 EV71 感染细胞后的间接免疫荧光观察

取纯化后的 SCMECs, 接种病毒感染 12 h 后, 参照 1.5 节的方法进行免疫荧光实验; 其中一抗为兔源性抗 EV71 抗体 (工作液稀释比例为 1:1 000), 二抗为羊抗兔荧光二抗 (1:400)。反应结束后, 置于荧光显微镜下观察并拍照。

1.10 统计学方法

采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。各实验

均独立重复 3 次, 结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组比较采用单因素方差分析, 组间两两比较用 LSD-*t* 检验。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 树鼩 SCMECs 形态学观察

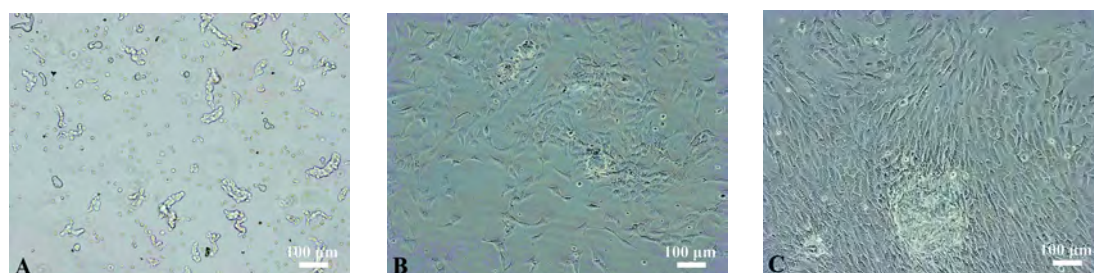
在显微镜下可见, 原代培养 24 h 的树鼩脊髓微血管片段主要呈现分支状和串珠状 (图 1A); 72 h 后有细胞从微血管段中爬出, 呈现多角状和不规则形态 (图 1B); 培养至第 5 天, 细胞逐渐铺满瓶底, 大部分呈“铺路石”状 (图 1C)。加入嘌呤霉素 (5 ng/mL) 进行细胞纯化时, 可观察到杂细胞脱落死亡; 嘌呤霉素处理 9 h 左右, 大部分杂细胞已经脱落死亡 (图 2A、2B); 而经嘌呤霉素纯化培养后的细胞主要是不规则的多角状细胞 (图 2C)。

2.2 树鼩 SCMECs 细胞免疫荧光鉴定

CD31 (又称为血小板内皮细胞黏附分子 1) 和 vWF (又称为 VIII 因子相关抗原) 在主要的器官和血管内皮细胞中都有表达, 可作为鉴定微血管内皮细胞的特异性标志蛋白。使用抗 CD31 和抗 vWF 抗体对纯化培养后的内皮细胞进行免疫荧光染色, 结果显示 CD31 阳性细胞激发红色荧光, vWF 阳性细胞激发绿色荧光, 细胞核为蓝色 (图 3), 证明纯化的细胞为 SCMECs。

2.3 SCMECs 的生长曲线

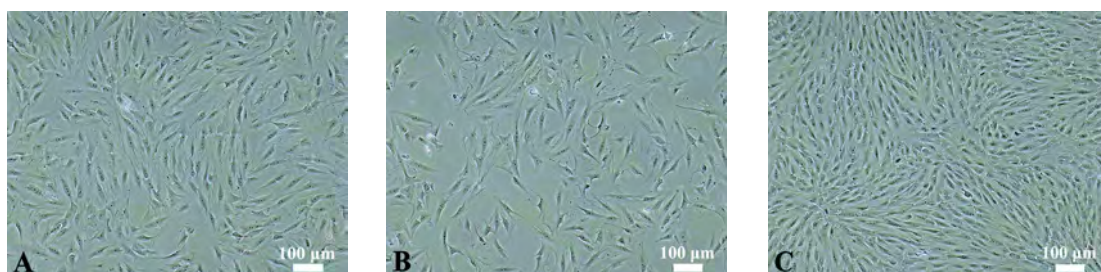
根据细胞生长每天测得的 A_{450 nm}, 取平均值, 绘制细胞生长曲线 (图 4A)。统计分析显示, SCMECs 在第 2 天、第 3 天生长较快, 第 3 天时已长满培养瓶底部; 在 1~3 d 细胞增殖明



注: A 为脊髓微血管段, B 为培养第 3 天, C 为培养第 5 天。标尺=100 μm。

图 1 树鼩原代脊髓微血管内皮细胞

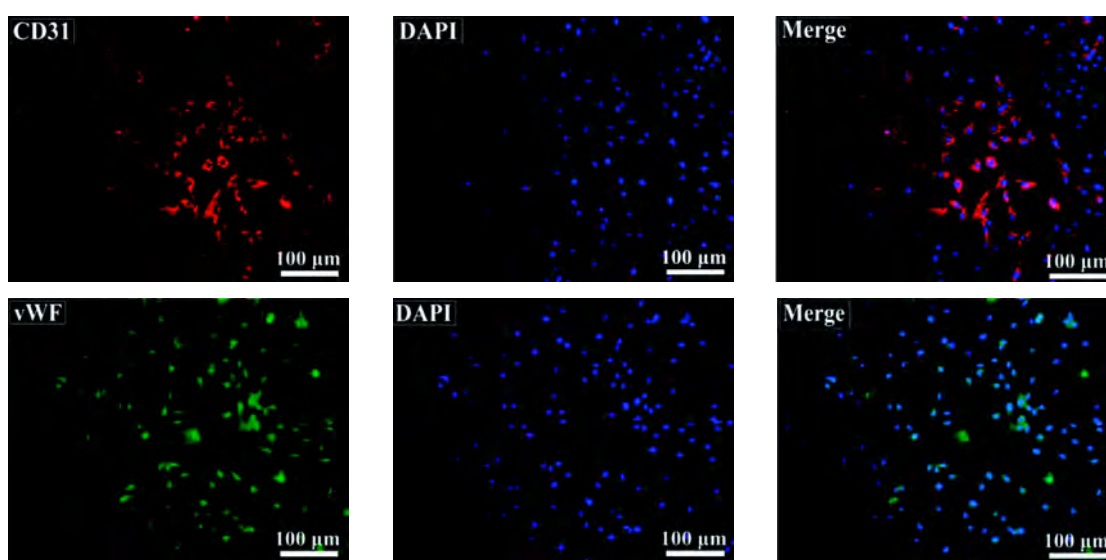
Figure 1 Primary cultured spinal cord microvascular endothelial cells derived from tree shrews



注：A 为嘌呤霉素处理 2 h，B 为嘌呤霉素处理 9 h，C 为纯化后第 4 代细胞。标尺=100 μm。

图 2 纯化后的树鼯脊髓微血管内皮细胞

Figure 2 Tree shrew spinal cord microvascular endothelial cells after puromycin purification



注：CD31 为血小板内皮细胞黏附分子 1，vWF 为抗血管性血友病因子（又称为Ⅷ因子相关抗原），DAPI 为 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶（可特异性染色细胞核 DNA），Merge 为 CD31（或 vWF）和 DAPI 二者的集合。标尺=100 μm。

图 3 树鼯脊髓微血管内皮细胞中 CD31 和 vWF 的免疫荧光染色结果

Figure 3 Immunofluorescence staining of CD31 and vWF in spinal cord microvascular endothelial cells isolated from tree shrews

显，细胞处于对数生长期；4 d 后，细胞增殖变缓，细胞数量逐渐减少；随着培养时间的增加，细胞增殖的速度先加快后降低（ $P < 0.05$ ）。

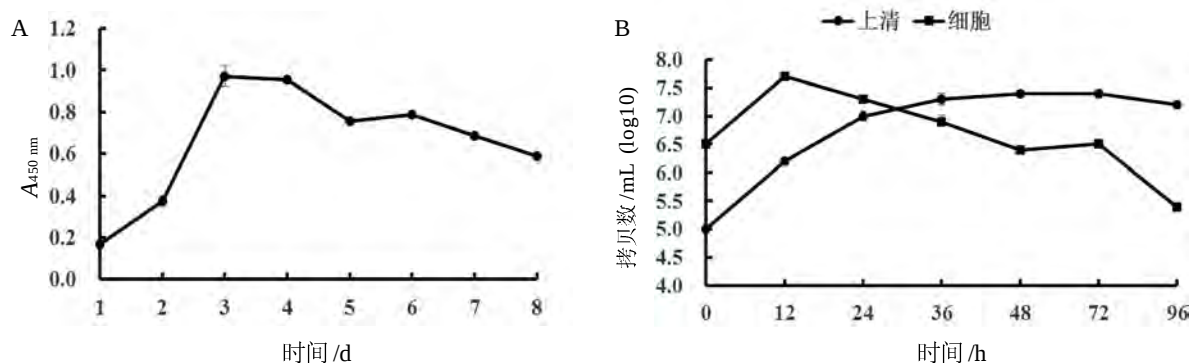
2.4 EV71 感染树鼯 SCMECs 的病毒增殖曲线

检测不同时间点的病毒载量，绘制病毒增殖曲线（图 4B）。结果显示，EV71 感染 SCMECs 48 h 内，细胞培养上清液中的病毒载量呈线性上升的趋势，且在感染 48 h 达到顶峰（ $P < 0.05$ ），48 h 后缓慢降低；细胞中的病毒载量在 12 h 达到顶峰，12 h 后病毒载量逐渐降低，且在 24 h

发现细胞开始死亡，96 h 时细胞已完全脱落死亡（ $P < 0.05$ ）。这一结果初步说明 EV71 能感染 SCMECs，并在细胞内有效增殖。

2.5 EV71 感染细胞后的免疫荧光观察

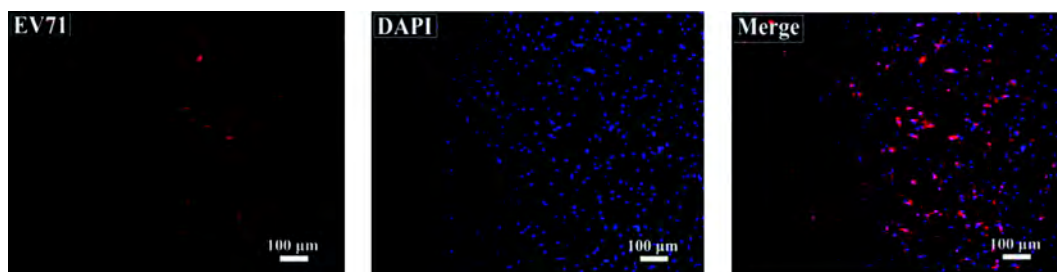
将 EV71 感染纯化后的 SCMECs 12 h 后，使用兔源性抗 EV71 抗体进行间接免疫荧光检测。结果显示，EV71 感染的细胞可见红色荧光，且大部分红色荧光都围绕在细胞核周围。这一结果进一步说明，EV71 能感染 SCMECs，且 EV71 颗粒主要分布于被感染细胞的细胞质（图 5）。



注: A 图中, 第 2、3、4、5、6、7、8 天与第 1 天比较, $F=525.818$, $^*P < 0.05$ 。B 图中, 细胞培养上清液(简称上清)的病毒载量在 12、24、36、48、72、96 h 与 0 h 比较, $F=187.389$, $^*P < 0.05$; 细胞中病毒载量在 12、24、36、48、72、96 h 与 0 h 比较, $F=152.704$, $^*P < 0.05$ 。

图 4 树鼯脊髓微血管内皮细胞生长曲线 (A) 和 EV71 感染后的病毒增殖曲线 (B)

Figure 4 Growth curve of spinal cord microvascular endothelial cells (SCMECs) (A) and the proliferation curve of enterovirus 71 (EV71) in EV71-infected SCMECs of tree shrew (B)



注: EV71 为 71 型肠道病毒抗原, DAPI 为 4',6-二脒基-2-苯基吡啶(可特异性染色细胞核 DNA), Merge 为二者集合。标尺=100 μm。

图 5 EV71 感染后脊髓微血管内皮细胞中的免疫荧光观察

Figure 5 Immunofluorescence staining in microvascular endothelial cells infected with enterovirus 71 (EV71)

3 讨论

EV71 是一种嗜神经性病毒, 能够引起严重的神经系统疾病, 使患者出现明显的临床综合征; 研究发现, 病毒主要集中在患者的脊髓和脑干^[9]。然而, EV71 感染的确切发病机制, 特别是引起严重神经症状的机制, 尚不清楚。SCMECs 是构成血-脊髓屏障的重要细胞成分, 许多神经系统疾病相关的病理过程都与 SCMECs 相关, 包括创伤、缺血、辐射、感染和炎症反应等^[10-12]。本实验采用树鼯的 SCMECs 进行 EV71 体外感染特性的研究, 以期探讨 EV71 致病机制提供新的实验模型。

目前, 微血管内皮细胞的体外分离培养主要来源于动物的脑组织, 而鲜有脊髓来源的微血管内皮细胞分离培养的文献报告。本实验主要采用

苑晓晨等^[8]报告的 SCMECs 培养方法, 并做了以下改良: (1) 借鉴部分学者选用 4~6 周小鼠的研究经验^[13], 本实验采用 3 月龄树鼯的脊髓中段组织分离微血管内皮细胞, 此年龄段树鼯的脊髓和血管容易分离, 后期培养时不易混入成纤维细胞和周细胞; 且我们的预实验表明, 相比于使用 1~2 周的树鼯, 使用 3 月龄树鼯进行细胞分离获得的微血管内皮细胞纯度更高, 数量更多。(2) 借鉴 Browning 等^[14]培养微血管内皮细胞时采用 MEM 培养液的经验, 本实验采用 DMEM/F12 基础培养液并补充生长因子, 成本更低, 且细胞增殖快, 活性高。本研究分离的原代细胞在第 3 代完成纯化, 该细胞分离培养能持续 13 代, 且能传代培养, 满足本次实验要求。第 14 代时, 细胞增殖缓慢, 活性降低。另外, 据报告, Wang 等^[15]和苑晓晨等^[8]分别采用内皮细胞特异性

标志物 CD31 及 vWF 进行免疫荧光染色鉴定; 本实验也采用这两种特异性标志物进行荧光染色以鉴定树鼩微血管内皮细胞, 结果显示分离的细胞均能被荧光标记, 此结果与之前文献报告一致。细胞生长曲线结果显示, 在体外培养 1~3 d 时, 细胞快速增殖进入对数期; 3~4 d 后达到平台期, 细胞生长状态良好, 提示分离的 SCMECs 能够充分满足体外 EV71 感染实验的要求。

马娜^[16]用 EV71 感染中枢神经系统的重要细胞——星形胶质细胞后, 发现感染 6~8 h 时病毒滴度达到峰值, 然后随细胞破坏的增多而逐渐下降。本研究用 EV71 感染树鼩 SCMECs 后, 分别检测不同时间点细胞及其培养上清液中的病毒载量, 发现细胞中病毒载量在 12 h 到达顶峰后逐渐降低, 与 EV71 感染星形胶质细胞的病毒增殖动力曲线相似, 表明 EV71 能在 SCMECs 中有效复制、增殖。为进一步确定 EV71 的感染情况, 本研究用间接免疫荧光法检测 EV71 颗粒的定位情况, 结果在感染 12 h 后能明显检测到红色荧光, 且主要围绕在细胞核周围, 表明 EV71 颗粒主要分布于被感染细胞的细胞质中。一般认为, 病毒能够在细胞内复制即表明病毒培养成功。因此, 以上结果证明 EV71 可感染 SCMECs, 提示 SCMECs 有望成为研究 EV71 感染的体外细胞模型。

综上所述, 本研究成功分离了树鼩原代 SCMECs 并优化培养条件, 通过嘌呤霉素纯化结合自然传代的方法得到较纯且生长状态良好的 SCMECs; 并且在体外用 EV71 感染 SCMECs 后, 定量检测细胞中病毒增殖情况, 免疫荧光法鉴定病毒蛋白表达, 结果证明 EV71 可成功感染 SCMECs。这些结果为今后进行体外血-脊髓屏障功能及相关研究奠定了一定基础, 也为利用树鼩进行 EV71 体内感染模型的研究提供了理论支持。

参考文献:

- [1] HUANG H I, LIN J Y, CHEN S H. EV71 infection induces IFN β expression in neural cells[J]. *Viruses*, 2019, 11(12): E1121. DOI:10.3390/v11121121.
- [2] RUCK T, BITTNER S, EPPING L, et al. Isolation of primary murine brain microvascular endothelial cells[J]. *J Vis Exp*, 2014(93):e52204. DOI:10.3791/52204.
- [3] ZHANG B, GENSEL J C. Is neuroinflammation in the injured spinal cord different than in the brain Examining intrinsic differences between the brain and spinal cord[J]. *Exp Neurol*, 2014, 258:112-120. DOI:10.1016/j.expneurol.2014.04.007.
- [4] ZHOU T, ZHENG Y M, SUN L, et al. Microvascular endothelial cells engulf myelin debris and promote macrophage recruitment and fibrosis after neural injury[J]. *Nat Neurosci*, 2019, 22(3):421-435. DOI:10.1038/s41593-018-0324-9.
- [5] 黄晓燕, 徐娟, 孙晓梅, 等. 树鼩在人类疾病动物模型中应用研究进展[J]. *实验动物科学*, 2013, 30(2):59-64. DOI: 10.3969/j.issn.1006-6179.2013.02.014.
- [6] TONG Y H, HAO J J, TU Q, et al. A tree shrew glioblastoma model recapitulates features of human glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(11):17897-17907. DOI:10.18632/oncotarget.15225.
- [7] 王文广, 黄晓燕, 徐娟, 等. EV71 可感染幼龄中缅树鼩 [J]. *动物学研究*, 2012, 33(1):7-13. DOI:10.3724/SP.J.1141.2012.01007.
- [8] 苑晓晨, 李炳蔚, 秦伟伟, 等. 大鼠脊髓微血管内皮细胞的分离培养与鉴定[J]. *基础医学与临床*, 2013, 33(10): 1112-1113. DOI:10.16352/j.issn.1001-6325.2013.10.012.
- [9] TEOH H L, MOHAMMAD S S, BRITTON P N, et al. Clinical characteristics and functional motor outcomes of Enterovirus 71 neurological disease in children[J]. *JAMA Neurol*, 2016, 73(3):300-307. DOI:10.1001/jamaneurol.2015.4388.
- [10] SAIDA K, SAIDA T, KAI K, et al. Central nervous system lesions in rats infected with Friend murine leukemia virus-related PVC441: ultrastructural and immunohistochemical studies[J]. *Acta Neuropathol*, 1997, 93(4):369-378. DOI:10.1007/s004010050628.
- [11] NAIDU K A, FU E S, SUTTON E T, et al. The therapeutic effects of epidural intercellular adhesion molecule-1 monoclonal antibody in a rabbit model: involvement of the intercellular adhesion molecule-1 pathway in spinal cord ischemia[J]. *Anesth Analg*, 2003, 97(3):857-862. DOI:10.1213/01.ane.0000072800.66277.cc.
- [12] NORDAL R A, WONG C S. Intercellular adhesion molecule-1 and blood-spinal cord barrier disruption in central nervous system radiation injury[J]. *J Neuropathol Exp Neurol*, 2004, 63(5):474-483. DOI:10.1093/jnen/63.5.474.
- [13] GE S J, PACHTER J S. Isolation and culture of microvascular endothelial cells from murine spinal cord[J]. *J Neuroimmunol*, 2006, 177(1-2):209-214. DOI:10.1016/j.jneuroim.2006.05.012.
- [14] BROWNING A C, GRAY T, AMOAKU W M. Isolation, culture, and characterisation of human macular inner choroidal microvascular endothelial cells[J]. *Br J Ophthalmol*, 2005, 89(10):1343-1347. DOI:10.1136/bjo.2004.063602.
- [15] WANG J M, CHEN A F, ZHANG K Z. Isolation and primary culture of mouse aortic endothelial cells[J]. *J Vis Exp*, 2016(118):52965. DOI:10.3791/52965.
- [16] 马娜. EV71 对星形胶质细胞的感染及其病理意义的研究[D]. 昆明: 昆明医科大学, 2013.
(收稿日期: 2020-12-14 修回日期: 2021-03-11)

几种常用免疫缺陷小鼠的血液学及血液淋巴细胞亚群的测定与比较分析

谈小倩, 瞿伟, 李亮, 钱珍, 顾坚忠, 徐平

(上海吉辉实验动物饲养有限公司, 上海 201103)

[摘要] 目的 测定与比较分析几种常用免疫缺陷小鼠的血液学(血常规与血清生化)指标和血液淋巴细胞亚群百分率, 为肿瘤、免疫学等研究和应用提供基础数据。方法 (1) BALB/cA-nude、SCID、NOD-SCID 和 NPSG 共 4 个免疫缺陷小鼠品系, 每品系取 6 周龄小鼠各 20 只(雌雄各半), 同周龄近交系 BALB/cA 小鼠作对照, 采血后测定血常规(30 项)和血清生化(25 项)指标; (2) 4 种免疫缺陷小鼠 6 周龄, 每品系雌雄随机各取 2 只, 用流式细胞仪检测分析淋巴细胞亚群, 同周龄近交系 BALB/cA 小鼠作对照。结果 (1) 免疫缺陷小鼠的白细胞数(WBC)、淋巴细胞数(LYMPH)、淋巴细胞百分率(LYMPH%)和中性粒细胞数(NEUT)低于 BALB/cA 小鼠($P < 0.01$), 中性粒细胞百分率(NEUT%)和网织红细胞数高于 BALB/cA 小鼠($P < 0.05$, $P < 0.01$); SCID、NOD-SCID、NPSG 小鼠的 WBC、LYMPH 和 LYMPH% 显著低于 BALB/cA-nude 小鼠($P < 0.05$), NEUT% 高于 BALB/cA-nude 小鼠($P < 0.05$)。 (2) NOD-SCID 和 NPSG 小鼠的血糖、三酰甘油水平低于 BALB/cA 小鼠($P < 0.01$), 而尿酸水平相对偏高($P < 0.05$)。 (3) BALB/cA-nude 小鼠 T 细胞严重缺失, B 细胞和自然杀伤(NK)细胞活性降低; SCID 和 NOD-SCID 小鼠 T 细胞缺失, B 细胞和 NK 细胞活性降低更加明显; NPSG 小鼠 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞均表现为缺失。结论 BALB/cA-nude、SCID、NOD-SCID 和 NPSG 小鼠的血液学性状和血液淋巴细胞亚群的百分率均符合相应免疫缺陷小鼠的品系特征。

[关键词] 免疫缺陷小鼠; 血液学; 血清生化学; 淋巴细胞亚群

[中图分类号] Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0155-06

Determination and Comparative Analysis of Hematological Indexes and Percentage of Lymphocyte Subsets in Several Immunodeficient Mice

TAN Xiaoqian, QU Wei, LI Liang, QIAN Zhen, GU Jianzhong, XU Ping

(Shanghai Jihui Laboratory Animal Care Co., Ltd, Shanghai 201103, China)

Correspondence to: TAN Xiaoqian, E-mail: xiaoqian_tan@163.com

[Abstract] **Objective** To determine and compare the hematological indexes (blood biochemical and physiological indexes) and the percentage of lymphocyte subsets in immunodeficient mice, providing basic data for tumor and immunology research applications. **Methods** (1) A total of 4 immunodeficient mouse strains, BALB/cA-nude, SCID, NOD-SCID, and NPSG, were included. Twenty mice (6-week-old, half male and half female) were analyzed. Blood biochemical (25 items) and physiological indexes (30 items) were determined and compared with those of BALB/cA-nude mice of the same age. (2) Four strains of immunodeficient mice, 4 mice (6-week-old, half male and half female) were randomly selected and analyzed with flow cytometry. Their lymphocyte subsets were compared with those of BALB/cA-nude mice of the same age. **Results** (1) The white blood cell (WBC) count, lymphocyte (LYMPH) count, lymphocyte percentage (LYMPH%), and neutrophil count of immunodeficient mice were lower than those of BALB/cA mice ($P < 0.01$). In contrast, the neutrophil percentage (NEUT%) and reticulocyte count were higher than those of BALB/cA mice ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Furthermore, the levels of WBC, LYMPH and LYMPH% of SCID, NOD-SCID, and NPSG mice were significantly lower than those of BALB/cA-nude mice, while NEUT% was higher than that

of BALB/cA-nude mice ($P<0.05$). (2) The blood glucose and triglyceride levels in NOD-SCID and NPSG mice were lower than those in BALB/cA mice ($P<0.01$), while uric acid level was higher than that of BALB/cA mice ($P<0.05$). (3) BALB/cA mice had no T cells and low activity of B cells and natural killer (NK) cells. SCID and NOD-SCID mice had no T cells and lower activity of B cells and NK cells than BALB/cA-nude mice. NPSG mice had no T, B, and NK cells. **Conclusion** The blood biochemical and physiological indexes and the percentage of blood lymphocyte subsets in BALB/cA-nude, SCID, NOD-SCID and NPSG mice are consistent with the characteristics of corresponding immunodeficient mouse strains.

[Key words] Immunodeficient mice; Hematology; Serum biochemistry; Lymphocyte subsets

免疫缺陷小鼠已广泛应用于肿瘤学、免疫学、细胞生物学和遗传学等研究。随着生命科学研究的不断发展、免疫缺陷机制研究的深入和重度免疫缺陷动物研发的进展,免疫缺陷动物在研究中发挥越来越重要的作用^[1]。临床血液学、血清生化指标和淋巴细胞亚群分析不仅对免疫缺陷动物遗传质量控制、正常生理状态的判定以及动物饲养管理有指导意义,而且也是相关医学研究,尤其是人的免疫系统重建、肿瘤组织及骨髓细胞移植、干细胞研究,以及抗肿瘤药物研发和安全性评价等应用中的重要参考指标和依据。本研究旨在通过测定、分析常用的几种免疫缺陷动物的血液学指标、血清生化指标和淋巴细胞亚群,为不同免疫缺陷小鼠在医学研究中的恰当选择、应用和比较医学研究提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级近交系BALB/cA小鼠(作为对照)和4种免疫缺陷型BALB/cA-nude (BALB/cA^{Shjh^{nu/nu}})、SCID (C.B17/Icr-*Prkdc^{scid/scid}*/Shjh)、NOD-SCID (NOD.CB17/Icr-*Prkdc^{scid/scid}*/Shjh)、NPSG (NOD-*Prkdc^{scid}*IL-2 γ g^{null})小鼠,由上海吉辉实验动物饲养有限公司提供[SCXK(沪)2017-0012]。饲养环境为隔离器环境,温度20~24℃,相对湿度50%±10%,12h明暗交替光照,饲喂上海吉辉JH-M01配方全价饲料(⁶⁰Co辐照处理,辐照剂量为35kGy);饮用水为灭菌过滤水(121℃,30min高压灭菌),自由采食和饮水。

1.2 主要仪器和试剂

Sysmex XT-2000i全自动血液分析仪,购自希森美康医用电子(上海)有限公司,使用配套试剂测定血常规;Hitachi 7180型自动生化分析仪及

配套试剂盒,购自日本日立公司;BD FACS Aria II流式细胞仪及配套试剂,购自美国BD公司。

1.3 临床血液学、血清生化指标测定

5种品系的6周龄小鼠各20只(雌雄各半),禁食16h后小鼠眼眶采血800μL/只。取150μL全血加入EDTA-K2抗凝测血常规。650μL血液静置30min后放入离心机,以10000r/min离心2min,取血清用于生化指标测定。

1.3.1 血常规测定

采用全自动血液分析仪检测白细胞(WBC)、红细胞(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞压积(HCT)、红细胞平均压积(MCV)、平均血红蛋白量(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC)、血小板(PLT)、红细胞分布宽度标准差(RDW-SD)、红细胞分布宽度差异(RDW-CV)、血小板体积分布宽度(PDW)、平均血小板体积(MPV)、大型血小板比率(P-LCR)、血小板压积(PCT)、中性粒细胞数(NEUT)、淋巴细胞数(LYMPH)、单核细胞数(MONO)、嗜酸性细胞数(EO)、嗜碱性细胞数(BASO)、中性粒细胞百分率(NEUT%)、淋巴细胞百分率(LYMPH%)、单核细胞百分率(MONO%)、嗜酸性细胞百分率(EO%)、嗜碱性细胞百分率(BASO%)、网织红细胞数(RET)、网织红细胞百分率(RET%)、低分化网织红细胞百分率(LFR)、中分化网织红细胞百分率(MFR)、高分化网织红细胞百分率(HFR)、未成熟网织红细胞(IRF)等30项指标。

1.3.2 血清生化检测

采用自动生化分析仪检测血清生化指标:包括丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球

蛋白 (GLOB)、白蛋白球蛋白比 (A/G)、总胆红素 (TBIL)、碱性磷酸酶 (ALP)、葡萄糖 (GLU)、尿素氮 (Urea)、肌酐 (Crea)、尿酸 (UA)、钙 (Ca)、磷 (P)、总胆固醇 (CHOL)、三酰甘油 (TG)、高密度脂蛋白 (HDL-C)、低密度脂蛋白 (LDL-C)、肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、钾 (K)、钠 (Na)、氯 (Cl)、血清胆碱酯酶 (CHE)、游离脂肪酸 (NEFA) 等 25 项指标。

1.4 血液淋巴细胞亚群分析

6 周龄小鼠各 2 只, 采血后用流式细胞仪分

析各品系小鼠 CD45⁺、CD11b⁺、CD3⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁺、NK1.1、B220 等淋巴细胞亚群的含量。通过设门的方式, 读取其含量, 并与近交系 BALB/cA 小鼠进行比对。

1.5 统计分析

采用 SPSS1 6.0 统计学软件进行统计分析。统计数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用 *t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床血液学指标比较

从表 1 可见, 4 种免疫缺陷小鼠的 WBC、

表 1 几种免疫缺陷小鼠血液学指标比较

Table 1 Comparison of hematological indexes among immunodeficient mice

项 目	BALB/cA	BALB/cA-nude	SCID	NOD-SCID	NPSG
WBC/(10 ⁹ · L ⁻¹)	7.87 ± 0.99	4.89 ± 1.69**	0.44 ± 0.08***	0.85 ± 0.16***	0.48 ± 0.10***
RBC/(10 ¹² · L ⁻¹)	10.65 ± 0.39	10.62 ± 0.32	10.46 ± 0.26	9.18 ± 0.28	7.31 ± 0.22
HGB/(g · L ⁻¹)	162.20 ± 5.16	162.70 ± 4.64	160.20 ± 4.57	146.90 ± 4.15	125.00 ± 3.39
HCT/%	45.92 ± 1.20	46.02 ± 1.06	42.94 ± 1.01	43.03 ± 1.27	41.16 ± 1.22
MCV/fL	43.14 ± 0.43	43.35 ± 0.68	41.04 ± 0.59	46.88 ± 0.67	56.26 ± 1.04
MCH/pg	15.24 ± 0.13	15.31 ± 0.22	15.31 ± 0.27	16.01 ± 0.26	17.10 ± 0.23
MCHC/(g · L ⁻¹)	353.20 ± 3.03	353.50 ± 3.29	373.10 ± 6.33	341.40 ± 6.10	303.60 ± 4.61
PLT/(10 ⁹ · L ⁻¹)	1 267.00 ± 59.71	1 348.80 ± 97.35	1 609.50 ± 73.78	1 695.10 ± 208.11	1 767.60 ± 168.24
RDW-SD/fL	28.46 ± 0.40	28.45 ± 0.77	27.80 ± 1.14	29.02 ± 0.69	38.38 ± 3.45
RDW-CV/%	22.10 ± 0.45	22.13 ± 0.52	22.77 ± 0.69	20.32 ± 0.29	20.10 ± 1.15
PDW/fL	8.86 ± 0.77	9.14 ± 0.56	8.84 ± 0.39	8.08 ± 0.20	7.16 ± 0.08
MPV/fL	7.22 ± 0.34	7.46 ± 0.24	7.32 ± 0.16	7.45 ± 0.11	7.04 ± 0.11
P-LCR/%	9.10 ± 2.86	10.72 ± 1.79	9.02 ± 1.65	8.77 ± 0.81	6.18 ± 0.48
PCT/%	0.91 ± 0.05	1.00 ± 0.06	1.17 ± 0.05	1.26 ± 0.16	1.24 ± 0.10
NEUT/(10 ⁹ · L ⁻¹)	1.28 ± 0.14	0.60 ± 0.04**	0.30 ± 0.12**	0.54 ± 0.14**	0.42 ± 0.12**
LYMPH/(10 ⁹ · L ⁻¹)	6.48 ± 0.85	3.19 ± 1.29**	0.13 ± 0.07***	0.27 ± 0.05***	0.06 ± 0.02***
MONO/(10 ⁹ · L ⁻¹)	0.01 ± 0.01	0.03 ± 0.03	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
EO/(10 ⁹ · L ⁻¹)	0.08 ± 0.02	0.06 ± 0.05	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
BASO/(10 ⁹ · L ⁻¹)	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
NEUT/%	16.42 ± 1.17	34.07 ± 4.80**	65.93 ± 17.39***	62.32 ± 7.80***	86.10 ± 7.92***
LYMPH/%	82.28 ± 0.91	64.14 ± 5.00*	32.10 ± 16.94***	33.44 ± 8.62***	13.46 ± 7.39***
MONO/%	0.22 ± 0.14	0.66 ± 0.81	0.24 ± 0.72	0.12 ± 0.36	0 ± 0
EO/%	1.08 ± 0.27	0.93 ± 0.63	1.73 ± 1.14	4.12 ± 1.56	0.44 ± 0.98
BASO/%	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
RET/(10 ⁹ · L ⁻¹)	300.66 ± 37.29	564.78 ± 82.31**	479.34 ± 80.67**	594.82 ± 76.66**	593.02 ± 57.88**
RET/%	2.82 ± 0.33	5.30 ± 0.79**	4.57 ± 0.71**	6.49 ± 0.91**	6.72 ± 2.28**
LFR/%	76.16 ± 2.67	57.72 ± 3.97	67.68 ± 7.41	59.46 ± 4.49	45.00 ± 3.90
MFR/%	14.32 ± 1.49	12.65 ± 1.19	17.09 ± 2.45	16.06 ± 0.93	13.78 ± 0.63
HFR/%	9.52 ± 1.42	29.62 ± 3.60**	15.23 ± 5.60*	24.48 ± 4.56**	41.22 ± 3.74**
IRF/%	23.84 ± 2.67	42.27 ± 3.97	32.32 ± 7.41	40.54 ± 4.49	55.00 ± 3.90

注: 与 BALB/cA 小鼠相比 **P* < 0.05, ***P* < 0.01; 与 BALB/cA-nude 相比, +*P* < 0.05, ***P* < 0.01; 与 SCID 小鼠相比, #*P* < 0.05; 与 NOD-SCID 相比, ≈ *P* < 0.05。n=20。

LYMPH、LYMPH% 和 NEUT 水平均明显低于 BALB/cA 小鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), NEUT%、RET、RET% 和 HFR 则高于 BALB/cA 小鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 另外, 免疫缺陷小鼠的 PLT 也相对偏高, LFR 偏低, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。与 BALB/cA-nude 小鼠相比, SCID、NOD-SCID 和 NPSG 小鼠的 WBC、LYMPH、LYMPH%、NEUT% 变化有统计学意义 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 与 SCID 小鼠相比, NOD-SCID 和 NPSG 小鼠的 LYMPH 变化明显 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 而 NOD-SCID 和 NPSG 小鼠相比, LYMPH、LYMPH% 和 NEUT% 存在差异 ($P < 0.05$)。

2.2 血清生化学指标比较

从表2可见, NOD-SCID和NPSG小鼠的AST

水平稍高于BALB/cA小鼠, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 4种免疫缺陷小鼠的TG水平明显低于BALB/cA小鼠 ($P < 0.01$); NOD-SCID和NPSG小鼠的GLU水平低于BALB/cA小鼠 ($P < 0.05$), UA水平则高于BALB/cA小鼠 ($P < 0.05$); 与BALB/cA-nude小鼠相比, SCID和NPSG小鼠的UA水平变化明显 ($P < 0.05$); 与SCID小鼠相比, NOD-SCID和NPSG小鼠的UA水平明显降低 ($P < 0.05$); 与NOD-SCID小鼠相比, NPSG小鼠的UA水平明显降低 ($P < 0.05$)。NOD-SCID和NPSG小鼠的CK、LDH水平明显高于BALB/cA、BALB/cA-nude和SCID小鼠 ($P < 0.05$)。

2.3 淋巴细胞亚群分析

从表3可见, BALB/cA小鼠T细胞、B细胞

表2 几种免疫缺陷小鼠血清生化学指标比较

Table 2 Comparison of biochemical parameters among immunodeficient mice

项 目	BALB/cA	BALB/cA-nude	SCID	NOD-SCID	NPSG
ALT/(U · L ⁻¹)	46.94 ± 3.41	42.03 ± 6.44	30.49 ± 4.62	35.96 ± 6.60	30.76 ± 5.75
AST/(U · L ⁻¹)	101.70 ± 17.89	121.49 ± 25.67	119.40 ± 36.56	141.38 ± 20.66	170.62 ± 27.01
TP/(g · L ⁻¹)	50.58 ± 2.13	53.13 ± 3.25	52.46 ± 1.11	53.77 ± 1.66	53.44 ± 1.80
ALB/(g · L ⁻¹)	29.28 ± 0.98	30.63 ± 1.26	32.26 ± 1.57	32.20 ± 0.95	31.48 ± 1.92
GLOB/(g · L ⁻¹)	21.29 ± 1.16	22.50 ± 3.35	20.20 ± 1.61	21.56 ± 1.53	21.96 ± 1.82
A/G	1.37 ± 0.03	1.38 ± 0.20	1.61 ± 0.19	1.50 ± 0.12	1.44 ± 0.17
TBIL/(μmol · L ⁻¹)	1.01 ± 0.29	1.10 ± 0.34	1.46 ± 0.19	2.85 ± 0.94	2.17 ± 0.60
ALP/(U · L ⁻¹)	174.28 ± 16.56	132.07 ± 18.34	140.96 ± 6.22	136.92 ± 23.45	175.00 ± 33.50
GLU/(μmol · L ⁻¹)	7.40 ± 0.44	6.11 ± 0.5	6.28 ± 0.38	4.93 ± 0.96*	4.47 ± 1.21*
Urea/(μmol · L ⁻¹)	6.22 ± 0.32	7.27 ± 0.82	7.90 ± 0.56	7.87 ± 0.44	8.03 ± 0.73
Crea/(μmol · L ⁻¹)	10.90 ± 0.53	11.07 ± 1.42	10.18 ± 1.66	12.02 ± 1.12	9.57 ± 1.14
UA/(μmol · L ⁻¹)	87.92 ± 7.14	149.32 ± 30.86*	172.26 ± 12.81* ⁺	140.85 ± 16.42* [#]	105.12 ± 17.54* ^{##} ≈
Ca/(μmol · L ⁻¹)	2.35 ± 0.03	2.38 ± 0.05	2.35 ± 0.06	2.55 ± 0.04	2.42 ± 0.04
P/(μmol · L ⁻¹)	3.30 ± 0.17	2.84 ± 0.35	2.67 ± 0.38	2.92 ± 0.24	3.47 ± 0.15
CHOL/(μmol · L ⁻¹)	2.82 ± 0.16	2.26 ± 0.37	2.58 ± 0.18	2.49 ± 0.55	2.39 ± 0.34
TG/(μmol · L ⁻¹)	1.25 ± 0.20	0.45 ± 0.18**	0.43 ± 0.18**	0.77 ± 0.18**	0.61 ± 0.10**
HDL-C/(μmol · L ⁻¹)	2.43 ± 0.14	1.86 ± 0.36	2.19 ± 0.18	2.05 ± 0.42	1.76 ± 0.28
LDL-C/(μmol · L ⁻¹)	0.10 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.09 ± 0.00	0.23 ± 0.16	0.20 ± 0.02
CK/(U · L ⁻¹)	1 273.52 ± 328.71	1 234.17 ± 554.20	1 078.44 ± 165.84	1 750.83 ± 485.75* ^{##}	2 640.32 ± 566.5* ^{##} ≈
LDH/(U · L ⁻¹)	677.74 ± 196.56	596.40 ± 71.49	583.24 ± 43.30	1 362.96 ± 108.08* ^{##}	1 055.74 ± 103.38* ^{##} ≈
K/(μmol · L ⁻¹)	7.09 ± 0.18	6.58 ± 0.17	6.62 ± 0.23	7.58 ± 0.33	6.94 ± 0.23
Na/(μmol · L ⁻¹)	158.52 ± 0.52	165.59 ± 1.24	166.44 ± 0.81	163.63 ± 1.40	163.95 ± 1.52
Cl/(μmol · L ⁻¹)	109.56 ± 0.88	113.46 ± 0.78	113.45 ± 0.70	111.20 ± 2.14	111.08 ± 1.04
CHE/(U · L ⁻¹)	8 266.20 ± 365.38	8 388.70 ± 1 513.90	7 006.8 ± 685.99	9 189.30 ± 2 122.08	10 149.40 ± 2 818.02
NEFA/(μmol · L ⁻¹)	1.19 ± 0.25	1.33 ± 0.26	1.27 ± 0.30	1.56 ± 0.36	1.67 ± 0.30

注: 与BALB/cA小鼠相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与BALB/cA-nude相比, * $P < 0.05$; 与SCID小鼠相比, * $P < 0.05$; 与NOD-SCID相比, ≈ $P < 0.05$ 。n=20。

和自然杀伤（NK）细胞发育正常。BALB/cA-nude 小鼠 T 细胞缺失（CD3⁺CD4⁺ 和 CD3⁺CD8⁺ 占比均为 0%）、NK 细胞活性降低；SCID 小鼠 T 细胞缺失，B 细胞和 NK 细胞活性低下；NOD-SCID 小鼠 T 细胞缺失，B 细胞（B220 占比 0.2%）和 NK 细胞（NK1.1 占比 0.1%）几乎无活性；NPSG 小鼠 T 细胞缺失，B 细胞和 NK 细胞也几乎无活性。

表 3 几种免疫缺陷小鼠和 BALB/cA 小鼠的淋巴细胞亚群
Table 3 Lymphocyte subsets in immunodeficient mice and BALB/cA inbred mice

项 目	BALB/cA	BALB/cA-nude	SCID	NOD-SCID	NPSG
CD45 ⁺	26.80	10.70	10.20	2.20	5.40
CD11b ⁺ CD19 ⁺	18.20	5.40	7.60	1.60	3.20
CD3 ⁺ CD4 ⁺	13.50	0	0	0	0
CD3 ⁺ CD8 ⁺	5.80	0	0	0	0
NK1.1	5.20	0.40	0.40	0.10	0.10
B220	15.20	4.40	0.20	0.20	0.10

注: CD45⁺ 为白细胞共同抗原, CD11b⁺CD19⁺ 为树突状细胞, CD3⁺CD4⁺ 和 CD8⁺ 为 T 细胞。

3 讨论

免疫缺陷动物本身的研究发展经历了漫长而复杂的过程。从 20 世纪 60 年代发现无毛小鼠表型^[1]，到发现胸腺发育不全，再到目前一些重度免疫缺陷小鼠的构建，免疫缺陷动物的发展史本身就是科学研究进步的缩影。由于缺失正常的免疫功能^[2]，免疫缺陷小鼠容易受到外界病原体的感染，在较高程度上接受外来移植物，在免疫、感染、肿瘤和干细胞研究中有很高的应用价值。裸小鼠由于 *Foxn1*^{nu} 基因纯合，导致小鼠的毛杆不能从表皮中长出，出现无毛表型，同时导致胸腺发育不良，T 细胞缺失；它是先天性胸腺缺陷的突变小鼠，由于第Ⅷ连锁群内无毛位点基因发生纯合而形成的突变小鼠^[3]，特别是在肿瘤学、免疫学、药品与生物制品的安全性评价及有效药品的筛选等实验方面有着特殊的价值。由于 *nu* 基因有独特的遗传特性，经过世界各国实验动物遗传育种学家的努力，已将 *nu* 基因导入不同近交系动物，成为系列动物模型。由于它们具有不同的遗传背景和 *nu* 基因的遗传特性，使医学生物学研究者获得了一种极其宝贵的试验材料。SCID 小鼠是 *Prkdc* 基因位点突变导致蛋白翻译提前终止，无法产生功能正常的抗原受体蛋白^[4]，导致 B 细胞和 T 细胞功能缺失，因而可以广泛应用于人类

免疫学和病毒学、肿瘤学、生理学、病理学等方面研究及单克隆抗体的制备等^[5]。然而并非所有 SCID 小鼠都缺乏功能性淋巴细胞，有 2%~23% 的个体具有有限数量的 T 细胞和 B 细胞，并可恢复部分免疫功能，即所谓的 SCID 小鼠渗漏现象^[6]。而用血糖代谢异常、存在包括 NK 细胞功能和补体（C5）功能在内的多种免疫缺陷的 NOD 小鼠与 SCID 小鼠杂交后，再连续用 NOD 小鼠回交（10 代以上）后得到 *scid* 突变纯合的同源导入近交系（congenic inbred strain）NOD-SCID 小鼠^[7]，*Prkdc* 位点缺失，T 细胞和 B 细胞缺失，NK 细胞功能缺陷，还具有支持更高水平人体造血细胞植入的能力，成为人源化小鼠的一个很好的模型，现已广泛应用于同种和异种肿瘤移植、血液学研究、免疫学及炎症研究，以及糖尿病和肥胖研究等^[8]。人源化小鼠经历了 40 多年的发展，现已经在诸如造血功能、感染性疾病、自身免疫病以及肿瘤学研究^[9]等多领域显现出其独特作用，显示出用于体内研究人类生理及病理的优势。NPSG 小鼠以 NOD 近交系小鼠为背景，在 *Prkdc* 基因上进行点突变，制成重度联合免疫缺陷的 NOD-SCID 小鼠（T、B 淋巴细胞和部分 NK 细胞都有缺陷），在此基础上再将具有重要免疫调节功能的 IL2 受体的 γ 链基因敲除，使得 NK 细胞也基本失去功能，同时造成部分免疫

因子(白细胞介素、补体等)功能缺陷,是人源化研究的重要模型之一。

本实验使用的动物均饲养在隔离器环境,自由采食饮水,饲料一致,饲养人员稳定,环境可控。因此,所测试的动物血液常规、血生化以及血液淋巴细胞亚群分析数据均能体现其自然状态下的正常情况,而不同品系动物因为免疫缺陷程度不同存在着某些与免疫力相关指标的差异。从血常规指标测定分析结果可以看出,免疫缺陷动物的WBC极显著低于正常动物,而SCID、NOD-SCID、NPSG小鼠的WBC显著低于BALB/cA-nude ($P < 0.05$);由此可见,上述指标与免疫缺陷程度有关,免疫缺陷程度越高,WBC越低。白细胞五分类中,免疫缺陷小鼠的LYMPH、LYMPH%和NEUT也显著低于BALB/cA小鼠 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);而NEUT%、RET%和RET则明显高于BALB/cA小鼠 ($P < 0.01$)。

血清生化分析发现,免疫缺陷与免疫正常的动物除GLU、TG、UA、CK和LDH外,其他指标差异没有统计学意义,且与免疫缺陷程度无关。流式细胞分析结果验证免疫缺陷动物的血液淋巴细胞亚群的发育情况,发现:裸小鼠的T细胞缺失,NK细胞活性降低;SCID小鼠的T细胞缺失,B细胞和NK细胞活性下降;NOD-SCID小鼠的T、B细胞缺失,NK细胞活性低下;而NPSG小鼠除T、B细胞缺失外,NK细胞几乎无活性。另外,根据本公司对外提供的小鼠生长发育数据比较发现,同周龄BALB/cA小鼠体质量高于NOD-SCID、NPSG小鼠^[8]。

本研究分析了几种常见免疫缺陷小鼠的血液生理、血清生化和血液淋巴细胞亚群的相关数据,后续将对这些品系小鼠的血清免疫学以及脏器等基础数据进行持续性测试和比较分析,形成各品系的系统基础数据,为科学研究提供支撑保障。

参考文献:

- [1] PANTELOURIS E M. Absence of thymus in a mouse mutant[J]. *Nature*, 1968, 217(5126):370-371. DOI:10.1038/217370a0.
- [2] RYGAARD J, POVLSEN C O. The mouse mutant nude does not develop spontaneous tumours[J]. *Acta Pathol Microbiol Scand Sect B Microbiol Immunol*, 2009, 82B(1):99-106. DOI:10.1111/j.1699-0463.1974.tb02299.x.
- [3] SEGREG J A, NEMHAUSER J L, TAYLOR B A, et al. Positional cloning of the nude locus: Genetic, physical, and transcription maps of the region and mutations in the mouse and rat[J]. *Genomics*, 1995, 28(3):549-559. DOI: 10.1006/geno.1995.1187.
- [4] 范文平, 李冠民. SCID小鼠几个特性的检测及其初步应用[J]. *北京实验动物科学与管理*, 1994(4):12-14.
- [5] QI L, KOGISO M, DU Y, et al. Impact of SCID mouse gender on tumorigenicity, xenograft growth and drug-response in a large panel of orthotopic PDX models of pediatric brain tumors[J]. *Cancer Lett*, 2020, 493:197-206. DOI: 10.1016/j.canlet.2020.08.035.
- [6] 杨红, 刘建兴, 周泽平, 等. 应用SCID和NOD/SCID小鼠构建急性髓系白血病模型成瘤率的比较[J]. *中国实验血液学杂志*, 2015, 23(2):328-334. DOI:10.7534/j.issn.1009-2137.2015.02.007.
- [7] 石桂英, 白琳. 免疫缺陷小鼠和人源化小鼠模型在干细胞质量控制中的应用[J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(10):132-137. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2020.10.020.
- [8] PALUCKA A K, GATLIN J, BLANCK J P, et al. Human dendritic cell subsets in NOD/SCID mice engrafted with CD34⁺ hematopoietic progenitors[J]. *Blood*, 2003, 102(9): 3302-3310. DOI:10.1182/blood-2003-02-0384.
- [9] BILLERBECK E, BARRY W T, MU K, et al. Development of human CD4⁺FoxP3⁺ regulatory T cells in human stem cell factor-, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-, and interleukin-3-expressing NOD-SCID IL2R γ (null) humanized mice[J]. *Blood*, 2011, 117(11):3076-3086. DOI: 10.1182/blood-2010-08-301507.

(收稿日期: 2020-08-19 修回日期: 2021-03-01)

溶液式环境控制设备在实验动物设施中的应用

张 婷, 陈亮亮, 李海翔, 黄发洲, 蔡武凯

(北京华创瑞风空调科技有限公司, 北京 100084)

[摘要] 近年来溶液式环境控制设备在实验动物设施建设中逐渐得到了应用和推广。本文实测和分析了溶液式环境控制设备在实验动物设施中的应用情况, 从环境控制效果、系统配电、运行能耗、排气处理、安装条件以及使用维护等方面, 将其与传统环境控制设备进行了对比, 为进一步促进溶液式环境控制设备在实验动物设施中的应用提供参考。

[关键词] 实验动物设施; 溶液式环境控制设备; 传统环境控制设备

[中图分类号] R-331; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0161-05

Application of Liquid Desiccant Environmental Control Equipment in Laboratory Animal Facilities

ZHANG Ting, CHEN Liangliang, LI Haixiang, HUANG Fazhou, CAI Wukai

(Sinorefine Air Conditioning Technology Co., Ltd, Beijing 100084, China)

Correspondence to: ZHANG Ting, E-mail: zt@sinorefine.com.cn

[Abstract] In recent years, liquid desiccant environmental control equipment has been gradually applied in the laboratory animal facility settings. This study measured and analyzed the application of liquid desiccant environmental control equipment in laboratory animal facilities and compared it with traditional systems for environmental control, power distribution, energy consumption, exhaust air treatment, installation conditions, use and maintenance, in order to provide a reference for promoting the application of liquid desiccant environmental control equipment in laboratory animal facilities.

[Key words] Laboratory animal facilities; Liquid desiccant environmental control equipment; Traditional environmental control equipment

近年来, 实验动物设施建设发展迅速, 实验动物设施的能耗和环保问题也得到越来越多学者和建设者的关注^[1]。为保证医学实验的精密性和药物试验的可靠性, 实验动物设施对环境控制的要求较高^[2]。实验动物设施普遍采用全新风系统, 全年 24 h 昼夜运行, 传统环境控制设备运行能耗大, 且对排气的环保处理能力较弱^[3]。溶液式环境控制设备 (liquid desiccant environmental control system) 利用盐溶液 (氯化钙、氯化锂等溶液) 的吸湿、放湿特性, 实现新风和排风之间热量和水分的传递过程^[4]; 其具有强控湿、低能耗、高效除氨等多方面的优势, 近年来在实验动物设施建设中得到广泛应用, 并取得了良好的环境控制、节约能量和排气处理效果^[5]。

本文以北京某实验动物设施为例, 从环境控

制效果、系统配电量、运行能耗、排气处理效果和安装条件等方面, 对溶液式环境控制设备与传统环境控制设备进行了对比分析, 为促进溶液式环境控制设备在实验动物设施中的应用提供参考。

1 实验动物设施概况

1.1 基本信息

北京某生物科技有限公司新建实验动物设施约 3 262 m², 其中小动物屏障区面积约 2 600 m²。项目采用溶液式环境控制设备, 于 2020 年投入运行。设计要求参照 GB 14925—2010《实验动物环境及设施》, 室内设计温度 20~26℃, 相对湿度 40%~70%, 换气次数≥15 次/h, 空气洁净度 7 级, 氨浓度≤14 mg/m³。作者对溶液式环境控制设备进行了测试, 并以厂区内另一栋具有相

同设计要求的旧设施作为对照,比较新旧设施的运行效果。旧设施于2009年投入运行,大鼠、小鼠屏障区面积约2140 m²,采用传统环境控制设备。

1.2 溶液式环境控制设备

新建设施采用溶液式环境控制设备,设备集冷热源、风机、全热回收^[6]、初中效过滤、排风除臭等功能为一体,系统形式如图1所示。送风侧空气处理过程:室外新风—初效过滤段—溶液全热回收和溶液除湿段—风机段—中效过滤段—送入室内。排风侧空气处理过程:室内排风—初效过滤段—溶液除臭段—溶液全热回收和溶液再生段—风机段—排至室外。

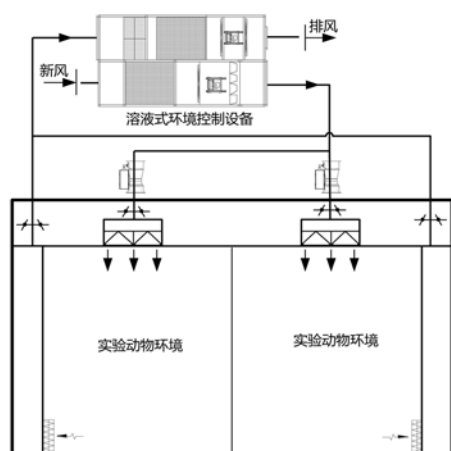


图1 溶液式环境控制系统示意图

Figure 1 Schematic diagram of liquid desiccant environmental control system

溶液式环境控制设备由溶液空调段和溶液除臭段两部分组成。溶液空调段采用氯化钙盐溶液作为工作介质,来自室外的新风进入除湿塔与溶液逆流接触,进行热湿传递,被冷却除湿到送风状态点;机组采用回风再生,来自室内的回风先经过喷淋酸溶液去除氨气,之后进入再生塔与溶液接触,带走溶液中水分,从而完成溶液的浓缩再生,吸水后的再生空气被排放到室外;溶液空调段内置热泵系统,热泵系统蒸发器为溶液提供冷量,用于对空气的降温 and 除湿,热泵系统冷凝器为溶液提供热量,用于溶液的浓缩再生。实验动物设施排气的主要有害成分为氨气。针对氨气,溶液除臭段采用磷酸稀溶液作为工作介质,利用喷淋酸性溶液高效吸收排风中的氨气。设备原理如图2所示。

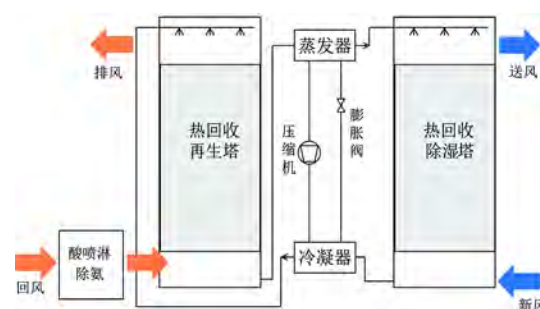


图2 溶液式环境控制设备原理示意图

Figure 2 Principle of liquid desiccant environmental control equipment

1.3 传统环境控制设备

旧设施采用传统环境控制设备,由风冷热泵制取冷冻水提供给组合式空调机组,由空调机组将室外新风处理至适宜的温湿度状态后送入室内。组合式空调机组包含初效过滤段、两级表冷段、蒸汽加湿段、电加热段、中效过滤段和风机段。排风经过水喷淋塔除臭后排至高空。系统形式如图3所示。

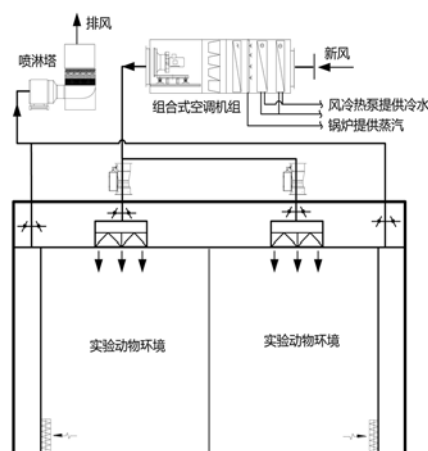


图3 传统环境控制系统示意图

Figure 3 Schematic diagram of traditional environmental control system

2 测试结果比较

2.1 室内温湿度环境控制效果

选取2020年8月份新设施与旧设施室内温湿度环境控制参数进行比较(图4)。从图中可以看出,新旧设施都很好满足了20~26℃的温度控制要求,但旧设施室内的空气相对湿度偏高,部分时段旧设施室内的相对湿度甚至超过了70%。

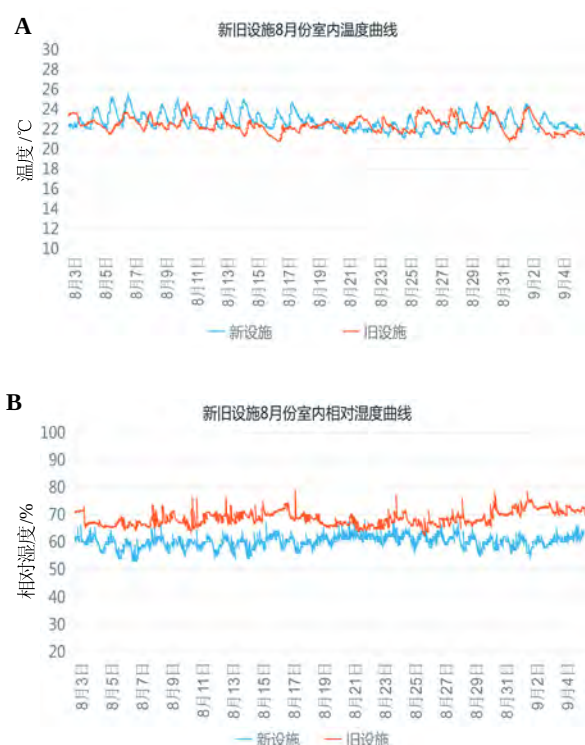


图4 新旧设施室内温度曲线(A)和相对湿度曲线(B)
Figure 4 Indoor temperature curve (A) and relative humidity curve (B) of new and old facilities

2.2 配电量

计算同等面积和风量下新旧设施的配电量。从表1~2可以看出,旧设施配电量为1 300 kW,其中空调配电量为1 198 kW;新设施配电量为654 kW,其中空调配电量为552 kW,即新设施比旧设施整体配电量节约50%,其中空调配电量节约54%。

2.3 运行能耗

选取2020年8月3日至9月4日电表实测数据,对比新旧设施的耗电量,详见表3。由于实验动物设施的能耗与新风量相关,在能耗比较时采用单位风量、单位时间的能耗指标。测试时,设备风量均未满负荷运行,实际运行风量小于设计风量。从表3可以看出,新设施的运行能耗明显低于旧设施,单位风量、单位时间的能耗指标下降50%,效果显著。

2.4 排风氨浓度

旧设施采用了水喷淋塔除臭的方式,将排风通过水喷淋后高空排放,主要利用氨易溶于水的原理进行除氨。新建设施采用了溶液喷淋除氨的

表1 旧设施的配电量

Table 1 Power distribution of old facility

用电设备组名称	功率/kW
照明	67
空调机组(30 000 m ³ /h, 共4台)	
送风机(共2台, 其中1台备用, 每台30 kW)	120
排风机(共2台, 其中1台备用, 每台22 kW)	88
电再热(每台89 kW)	356
螺杆式风冷热泵机组(共3台, 每台156 kW)	468
冷冻水泵(共3台, 每台22 kW)	66
轴流风机(共4台, 每台15 kW)	60
除臭设备(共4台, 每台10 kW)	40
高压灭菌器(共4台, 每台5 kW)	20
动物饮水机(共2台, 每台4 kW)	8
弱电设备预留	7
合计	1 300

表2 新设施的配电量

Table 2 Power distribution of new facility

用电设备组名称	功率/kW
照明	67
溶液式环境控制设备 (30 000 m ³ /h, 共4台, 每台123 kW)	492
轴流风机(共4台, 每台15 kW)	60
高压灭菌器(共4台, 每台5 kW)	20
动物饮水机(共2台, 每台4 kW)	8
弱电设备预留	7
合计	654

表3 新旧设施运行能耗对比

Table 3 Comparison of energy consumption between two facilities

项 目	旧设施	新设施
运行风量/(m ³ ·h ⁻¹)	64 000	87 000
运行时间/h	768	768
总电耗/kWh	199 400	136 457
单位时间电耗/(kWh·h ⁻¹)	260	178
单位风量单位时间 电耗/(kWh·10 ⁴ m ⁻³ ·h ⁻¹)	40.6	20.4
新设施单位风量节能率/%		50

方式,利用氨气水合物呈碱性的特征,采用酸性溶液进行喷淋吸收。含氨排风进入溶液除臭段后,与磷酸稀溶液充分进行反应,空气中的氨气(NH₃)以铵根(NH₄⁺)的形式进入吸收液中,反应生成磷酸二氢铵,空气中的氨气含量大幅减

少,降低至国家排放标准允许范围后排至室外。吸收液中的磷酸二氢铵通过结晶生成固体沉淀,最终过滤去除,实现彻底除氨。磷酸二氢铵属于一般固废,收集后交由物资回收公司利用。

采用氨浓度计对两种除氨方式进行测试对比,结果见表4。从实测结果可以看出,酸溶液喷淋的除氨效果优于水喷淋塔的除氨效果,酸溶液喷淋的除氨效率可以达到90%以上。

表4 两种设备除氨方式效果对比

Table 4 Comparison of ammonia removal effect between two equipments

除氨方式	区域	设备进口空气氨气含量/(mg·m ⁻³)	设备出口空气氨气含量/(mg·m ⁻³)	除氨率/%
喷淋塔	动物饲养区	4.18	2.88	31
	SPF级动物区	3.80	3.58	6
溶液喷淋	车间一	4.70	0.42	91
	车间二	4.30	0.34	92
	车间三	3.50	0.24	93

注:动物饲养区、SPF动物区以及车间一~三均为屏障环境实验动物生产间。

2.5 设备安装条件

溶液式环境控制设备集成了冷热源、除臭装置、输配系统等于一体,因此单机设备体积较大,以30 000 m³/h设备为例,设备尺寸为10.6 m(长)×5 m(宽)×4.2 m(高)。以本项目为例,共选用4台30 000 m³/h设备,机房面积约为300 m²。同时,由于设备集成度较高,因此设备安装较为简单,只需连接风管、电源、补水管即可。

若采用传统环境控制系统,设备数量相对较多,施工安装相对复杂,但单机设备体积较小,且设备高度一般不超过2.5 m,同样设施条件下,所需机房总面积约为260 m²。相比溶液式环境控制设备,传统环境控制设备所需机房占地面积更小,对机房层高要求低。

2.6 系统造价对比

溶液式环境控制设备的造价高于传统环境控制设备。综合考虑设备费用的增加,水系统安装和配电费用的减少等,通常初投资增加20%左右,投资回收期在1~2年。

2.7 使用维护

溶液式环境控制设备集成度较高,相对传统环境控制系统而言,设备少,系统简单,因此,实际使用中更易操作,管理更为方便。但溶液式环境控制设备对于大多数用户尚属于新技术,可能对设备缺乏了解,操作经验不足。

溶液式环境控制设备与传统环境控制系统相比,压缩机及氟系统、风机、过滤器等主要部件维护工作基本相同,不同的是前者增加了溶液系统的维护,减少了水系统的维护。对于溶液空调段,氯化钙盐溶液长期使用后不需要补充和更换,溶液中氯化钙含量不变则其空气处理能力不会衰减,但需定期过滤清洁溶液,去除空气带入溶液中的灰尘和颗粒物。对于溶液除臭段,需定期补充机组磷酸溶液用于除氨,需定期处理产生的固废磷酸二氢铵。

由于氯化钙盐溶液具有腐蚀性,因此溶液式环境控制设备内部与溶液接触的部件必须采用耐腐蚀型材料,对设备耐腐蚀性、防泄漏性等生产工艺要求较高。同时,设备须严格满足国家标准GB/T 27943—2011《热泵式热回收型溶液调湿新风机组》中对送风携带溶液离子量的要求,保证不会对环境造成不良影响^[7]。溶液式环境控制设备虽然在民用及工业行业中应用时间已有20余年,但近10年才开始应用于实验动物设施中,目前项目最长应用时间为8年,机组使用寿命初步得到验证。

3 结语

本研究实测了溶液式环境控制设备在实验动物设施中的应用效果,从室内环境控制、配电

量、运行能耗、排风除氨效果、安装条件和使用维护等方面,与传统环境控制设备进行了对比分析。研究表明:①溶液式环境控制设备由于除湿能力强,在湿度控制方面体现出明显的优越性,在高湿度地区可能有较大应用价值。②采用溶液式环境控制设备的实验动物设施配电量明显下降,设施整体配电量可下降 50% 左右,空调配电量可下降 54% 左右。③采用溶液式环境控制设备的设施,运行能耗显著下降,单位风量、单位时间的节能率达到 50%,节能效果显著。④排风采用酸溶液喷淋除氨的效果优于水喷淋塔,酸溶液喷淋除氨率可达到 90% 以上。⑤溶液式环境控制设备集成度高,安装简单,但单机设备体积较大,机房占地面积增加,对机房层高要求高。⑥与传统环境控制设备相比,溶液式环境控制设备初投资增加 20% 左右,投资回收期一般为 1~2 年。⑦溶液式环境控制设备操作简单,但用户对新技术缺乏了解,操作经验不足;除溶液系统外,主要部件的维护与传统设备基本相同;设备对溶液的耐腐蚀性和防泄漏性要求较高,目前该

设备在实验动物设施最长的运行时间为 8 年左右,机组使用寿命初步得到验证。

参考文献:

- [1] 王一航. 实验动物房投资现状及减少运行费用的探讨[J]. 中国实验动物学杂志, 2001,11(3):188-190. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2001.03.017.
- [2] 何婧,沈晋明,汪亚兵. 实验动物房环境特点与空调设计[J]. 洁净与空调技术, 2003(1):32-37. DOI:10.3969/j.issn.1005-3298.2003.01.006.
- [3] 丁德,杨毅,曹志刚,等. 浙江大学动物实验中心空调设计[J]. 暖通空调, 2013, 43(9):19-23.
- [4] 江亿,李震,陈晓阳,等. 溶液式空调及其应用[J]. 暖通空调, 2004, 34(11):88-97.
- [5] 李海翔,张婷,从琳,等. 溶液式空调系统在实验动物中心的应用[J]. 暖通空调, 2017, 47(3):85-89.
- [6] 韩俊召,裴清清. 溶液全热回收装置在 SPF 实验动物环境中的应用分析[J]. 洁净与空调技术, 2007(1):46-48. DOI:10.3969/j.issn.1005-3298.2007.01.014.
- [7] 吴蔚兰,王蕊. 溶液调湿空调系统在电子厂房中的应用分析[J]. 暖通空调, 2012, 42(12):75-80.

(收稿日期: 2020-11-23 修回日期: 2021-01-18)

(上接第 147 页)

- [15] NETO W K, CIENA A P, ANARUMA C A, et al. Vertical climbing for rodent resistance training: a discussion about training parameters[J]. Int J Sports Sci, 2016, 2016(61A): 36-49. DOI:10.5923/s.sports.201601.07.
- [16] CONSITT L A, DUDLEY C, SAXENA G. Impact of endurance and resistance training on skeletal muscle glucose metabolism in older adults[J]. Nutrients, 2019, 11(11):2636. DOI:10.3390/nu11112636.
- [17] NICASTRO H, ZANCHI N E, DA LUZ C R, et al. An experimental model for resistance exercise in rodents[J]. J Biomed Biotechnol, 2012, 2012:457065. DOI:10.1155/2012/457065.
- [18] DOS SANTOS J L, DANTAS R E, LIMA C A, et al. Protective effect of a hydroethanolic extract from Bowdichia

virgilioides on muscular damage and oxidative stress caused by strenuous resistance training in rats[J]. J Int Soc Sports Nutr, 2014, 11(1):58. DOI:10.1186/s12970-014-0058-3.

- [19] TAKEGAKI J, OGASAWARA R, KOTANI T, et al. Influence of shortened recovery between resistance exercise sessions on muscle-hypertrophic effect in rat skeletal muscle[J]. Physiol Rep, 2019, 7(13): e14155. DOI:10.14814/phy2.14155.
- [20] TAVASSOLI H, HEIDARIANPOUR A, HEDAYATI M. The effects of resistance exercise training followed by detraining on irisin and some metabolic parameters in type 2 diabetic rat model[J]. Arch Physiol Biochem, 2019:1-8. DOI:10.1080/13813455.2019.1673432.

(收稿日期: 2020-06-26 修回日期: 2020-11-13)

医院科研工作中开展实验动物福利伦理教育的探索

余 飞¹, 钱丽萍¹, 沙莉莉²

(南京大学医学院附属鼓楼医院 1. 动物实验中心, 2. 医学伦理委员会办公室, 南京 210008)

[摘要] 动物实验是临床前研究的重要环节。实验动物作为直接的实验材料和人类的替难者, 具有不可替代的地位和作用。然而在医学生教育体系中, 普遍缺乏实验动物学和实验动物福利伦理的教育。为进一步提升科研人员包括医学研究生的伦理素养, 加强实验动物福利伦理知识教育, 我们探索在医院内开展系列实验动物福利伦理教育方法, 较好地规范了医学科研人员在使用实验动物时的行为准则。

[关键词] 实验动物; 动物福利; 实验动物伦理; 教育

[中图分类号] Q95-33; R-33 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0166-03

在生命科学、临床医学和实验医学研究中, 实验动物具有不可替代的地位和作用。据统计, 在生物医学研究领域内约有 60% 的项目涉及动物实验; 20 世纪以来, 大约 70% 的诺贝尔生理学或医学奖的获奖者使用了实验动物^[1]。南京大学医学院附属鼓楼医院作为三级甲等综合性医院, 所研究的课题内容涵盖了诸多医疗领域, 每年有 140 余项国家、省市级科研课题在医院动物实验中心开展。由于实验动物福利和医学研究质量有着重要的联系, 保障实验动物福利是得到可靠实验结果的一个先决条件, 而动物实验的操作者直接决定着实验动物福利能否得到及时有效的维护和保障。所以培养医学科研人员的实验动物福利观念, 加强实验动物福利伦理教育是必不可少的^[2]。

1 医院科研人员(包括医学研究生)维护实验动物福利的意义

维护实验动物福利对提高科研结果准确性、可重复性具有重要意义。与福利相关的因素比如生存环境、营养状况、麻醉及护理手段等都会影响实验数据。比如当环境温度变化过大过急时, 动物机体就不能适应, 抗病能力急剧下降, 极易

感染各种疾病^[3]; 当噪声过大时, 大鼠和小鼠生育力减退, 会造成妊娠障碍、流产甚至出现食仔现象^[4]等。因此, 要想获得客观、真实、可重复性的实验数据, 在动物实验实施过程中务必要重视实验动物福利伦理问题。

调查发现, 在动物实验过程中, 只有 24% 的医学研究生会考虑到动物福利^[5]。而近年的另一项调查发现科研人员对动物福利概念及相关内容了解者仅为 50% 或以下, 非常了解者不超过总数的 5%^[6]。这说明很多科研人员包括医学研究生对实验动物福利伦理意识淡薄, 缺乏对实验动物福利的科学认知以及相关知识储备。

2 本院实验动物福利伦理教育工作实践与探索

本院实验动物福利伦理工作的开展主要由两个委员会(实验动物管理委员会、实验动物伦理委员会)和一个部门(动物实验中心)协同完成。实验动物管理委员会在分管院长的领导下指导、规划、监督和协调全院实验动物管理工作。实验动物伦理委员会具体负责审查全院实验动物相关研究项目, 维护实验动物福利, 规范实验动物伦理审查和实验动物从业人员的职业行为等。

[基金项目] 南京市医学科技发展青年科技人才启动项目(QYK09176); 南京市卫生青年人才培养工程(11SA-024)

[作者简介] 余 飞(1982—), 女, 硕士, 主要研究方向: 实验动物学。E-mail: yufei0802@yeah.net

[通信作者] 沙莉莉(1978—), 女, 硕士, 主要研究方向: 医学伦理学。E-mail: jackysa123@163.com

动物实验中心主要为医院科研、教学提供标准化实验动物饲养和实验场所,对实验动物质量负责,对实验人员进行培训管理,配合实验动物伦理委员会做好实验动物福利伦理保障工作。医院对科研人员及医学研究生的实验动物福利伦理教育和监管就融入在这些工作中。

2.1 严格动物实验伦理审查,提升实验人员依法实验的意识

实验动物伦理委员会根据其章程和实验动物福利伦理国家标准 GB/T 35892—2018《实验动物福利伦理审查指南》建立了科学、合理的审查程序,对涉及动物实验的项目逐一进行伦理审查。

在审查工作中,各委员以 GB/T 35892—2018 中规定的审查原则(必要性原则、保护原则、福利原则、伦理原则、利益平衡性原则、公正性原则、合法性原则、符合国情原则等)为准则^[7],重点审查动物实验的必要性,对实验目的预期利益与造成动物的伤害、死亡进行综合的评估;确保研究计划最大限度地保证动物的各项基本权利,实验操作符合技术规程,有效避免和减少动物的紧张与痛苦,并确保从业人员的福利与安全。

2.2 加强实验人员管理,督促实验人员持卡实验

动物实验中心制定了严谨的实验人员管理制度,要求实验人员开展动物实验期间必须严格遵守。制度规定实验人员必须考取实验动物从业人员上岗证,即持有“江苏省实验动物专业技能培训记录卡”或其他省市的相关培训证明(需在有效期内)方可开展实验。新进实验人员履行完所有手续后须参加动物实验中心组织的“新进人员培训”,培训内容主要包括动物实验中心概况介绍,人员、物品、实验动物进出屏障环境和普通环境的流程,实验动物福利伦理相关知识和要求,动物尸体、废弃物处理规范,突发事件应急处理措施等。整个培训包括三个部分:理论培训、现场培训和培训后考核。只有参加完前两部分培训且考试合格的实验人员方可开展实验。

2.3 提高实验人员实验素养,切实保障实验动物福利

动物实验中心对实验人员的前期教育培训,使得实验人员已经储备了部分实验动物学和福利伦理知识,为独立开展动物实验打好理论基础。

动物实验中心在实验人员第一次开展实验时会提供基本动物实验操作如抓取与固定、麻醉、灌胃、采血等的带教和指导,保证每位实验人员均能掌握常用动物实验操作要领,减少或避免不规范的操作对实验动物生理和心理的伤害,为动物实验的正常开展提供了保障。同时动物实验中心工作人员每天都会在实验室巡视,对于在实验过程中出现的违规操作会进行及时制止并教育,若有2次及以上违规即取消其实验资格。此外,动物实验中心建立了实验人员 QQ 群,定期在群内发布实验动物相关资讯及基本实验操作(灌胃、尾静脉注射、皮下注射、腹腔注射等)小视频,供科研人员反复观看、学习。

2.4 工作人员以身作则,潜移默化影响实验人员

动物实验中心工作人员包括实验动物管理、技术人员(含专业兽医)和实验动物饲养人员。GB/T 35892—2018 中规定实验动物从业人员,应通过专业技术培训,获得从业人员相关资质和技能^[7]。

动物实验中心管理和技术人员均具有实验动物相关专业研究生学历,熟练掌握实验动物基本实验操作技能,熟知各类实验动物基本生物学特性,每年均参加国家级、省级实验技术和实验动物福利伦理教育培训,如中国实验动物学会组织的“实验动物医师岗位培训班”“实验动物专业技术等级培训班”“中英实验动物福利伦理国际论坛”等。实验动物管理和技术人员分别持有江苏省实验动物专业技能培训记录卡-管理类和实验类,他们在带教动物实验操作和辅助科研人员实验过程中注重实验动物福利,动作熟练、轻柔、规范,准确使用麻醉剂和止痛药,实验过程中注意保温,尽量减少实验动物痛苦,能够在保护实验动物福利的基础上很好完成各项实验操作的带教工作。

饲养人员均持证(江苏省实验动物专业技能培训记录卡-饲养繁殖类)上岗。在饲养工作中严格按照中心制定的标准操作规程操作,给实验动物提供清洁卫生的住所,营养和质量保证的饮食,以及玩具和筑巢、遮蔽物等环境丰富材料。饲养过程中绝不粗暴对待实验动物,充分保证实验动物福利。

动物实验中心工作人员的专业素养为科研人员尊重实验动物,保障实验动物福利发挥了很好的示范和带头作用,实验人员也在潜移默化中受到了影响,在实验过程中更加注重动物福利。¹

2.5 丰富实验动物环境,提高实验动物生存质量和健康水平

虽然环境丰富化目前在行业内并没有统一标准,但不可否认丰富化的环境可使实验动物表现正常生理,防止动物产生异常的行为与不正常的身心发展,避免内分泌或免疫系统异常,对它们表达天性和改善福利水平起到积极作用^[8]。

动物实验中心在环境丰富化方面也做了一些尝试,根据不同物种的特性和实验人员具体实验需求对实验动物环境进行丰富,目的是使环境丰富化的应用更加科学合理。比如给小鼠和妊娠大鼠准备了筑巢纸,满足它们的天性;给喂食高脂饲料的大鼠、小鼠准备了咀嚼棒,防止因高脂饲料较松软不能满足它们啃咬磨牙的需要;给需繁殖的大鼠、小鼠饲喂专用的繁殖饲料,满足它们妊娠期和生产期的高营养需求;给犬准备小玩具,饲养员定时看望互动,满足他们互动玩耍的需要等。另一方面,对于准备实验之前和实验结束后的动物,也要尽可能采取措施增加它们的福利^[9]。对于术后的实验动物,工作人员尽可能做好术后护理和营养给予工作,主要包括术后提供保温垫保温、镇痛、抗感染、喂食适口性好的食物或补充营养液等。总之,实验之外的时间可视为改善实验动物的整体福利的一个特殊机会。

动物实验中心在进行环境丰富之前都会联系实验人员,征求实验人员意见,避免环境丰富给某些实验造成不利的影响。在进行环境丰富时,操作人员会做好记录,以便实验人员在论文撰写时说明。这些细节操作也使科研人员明白,只有在保障实验动物福利的前提下,动物实验结果才会更加科学有效。

2.6 培养实验人员福利伦理保护意识,激发其履行福利伦理义务热情

2.6.1 加强实验动物福利伦理科普宣传

实验动物管理委员会在医院建立了实验动物纪念碑,祭奠为科学研究献身的实验动物。动物实验中心工作人员在纪念碑附近显著位置张贴了宣

传标语和宣传画,时刻警示科研人员在动物实验过程中要做到关爱实验动物,注重实验动物福利。

实验动物伦理委员会在动物实验中心广场开设科普专栏,定期展示实验动物福利伦理相关内容,广泛宣传实验动物的基本知识和法律法规。伦理委员会自制了《实验动物福利伦理学习手册》,将实验动物福利相关知识凝练其中,发放给各位科研人员供业余自学。

2.6.2 每年在实验动物纪念日或纪念周组织开展活动

实验动物伦理委员会每年在实验动物纪念日或纪念周期间都会组织本院实验动物相关工作人员及科研人员在实验动物纪念碑前举行庄重而简朴的纪念仪式,感谢在科学研究中献出生命的实验动物。

纪念仪式程序一般包括全体人员向实验动物纪念碑献花并默哀。医院医学伦理委员会主任、实验动物伦理委员会主任委员、动物实验中心主任分别介绍实验动物福利相关内容。科研人员代表发言讲述动物实验过程中和实验动物和谐相处的故事,以及在保护实验动物福利方面的心得或困惑。最后全体参加人员在签名墙签名承诺,表达尊重实验动物,爱护实验动物的决心。

2.6.3 每年组织实验动物开放日(即科普日)活动

动物实验中心每年都会举行实验动物开放日(即科普日)活动,邀请医院科研人员及其青少年亲属参观实验动物设施,让孩子们了解实验动物的分类、习性、特点、用途等,并聆听科普知识讲解,学习和操作实验设备。

开放日活动程序一般为动物实验中心工作人员讲解实验动物相关科普知识及保护实验动物福利伦理的措施等。组织孩子们给提前准备好的豚鼠、兔喂食蔬菜,引导大家观察大鼠、小鼠在笼内的生活,带领小朋友参观实验动物手术室,介绍仪器设备,教他们使用显微镜观察标本等。组织孩子们集体向实验动物纪念碑献花默哀,向为人类医疗卫生事业做出牺牲的实验动物表示敬意。

2.6.4 进行相关法规学习

实验动物伦理委员会和动物实验中心为了更好地推进实验动物工作规范化管理,保障实验动

(下转第180页)

《实验动物与比较医学》创刊 40 年重点文献回顾 (续)

高 诚

1. 上海实验动物研究中心, 上海 201203; 2. 上海市实验动物学会, 上海 200025; 3. 《实验动物与比较医学》编辑部, 上海 201203

[关键词] 文献回顾; 实验动物与比较医学; 创刊 40 周年; 饲料; 饲养设备; 标准化

[中图分类号] Q95-33; R-332 [文献标志码] B [文章编号] 1674-5817(2021)02-0169-05

Important Literature Review for the 40th Anniversary of *Laboratory Animal and Comparative Medicine*

GAO Cheng^{1,2,3}

(1. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China; 2. Shanghai Laboratory Animal Science Association, Shanghai 200025, China; 3. Editorial Office of *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, Shanghai 201203, China)

[Key words] Literature review; Laboratory animal and comparative medicine; 40th Anniversary; Diet; Raising equipment; Standardation

3 饲料

饲料关乎实验动物质量和福利。从实验动物全价饲料研发、耐高温高压配方, 到营养全面且适口性好、特殊实验动物模型饲料的研制应用, 历经了两代实验动物科学工作者的共同努力。本节简述刊登在本刊的相关论文。

1981 年, 王楠田等^[141]对青紫蓝实验兔的饲料配方中应用脱水蔬菜的饲养效果进行了观察比较 (颗粒或混合粉料), 探讨了饲料中粗纤维和蛋白质的比例; 此后对饲料配方进行改进, 饲养青紫蓝和大耳白的育成兔, 初步获得了满意效果^[142]; 然后用不同配方饲养繁殖雌兔, 肯定了脱水蔬菜在饲料中的作用并推广应用^[143]。1982 年, 胡开元^[144]采用该饲料饲养实验兔获得满意的效果。经过两年多的努力, 集上海实验动物行业之力的实验兔颗粒饲料终获成功, 生产 200 余万斤, 大大降低了幼兔死亡率 (小于 1.5%), 并且节约原料, 降低成本, 提高了实验兔的质量^[145]。1983 年, 李锦铭等^[146]、薛逸祯等^[147]和王志荣^[148]

也确认了饲喂全价颗粒饲料的效果, 并分别对成本、加工工艺、储存、饲喂方式等方面的进一步完善等提出了评价和建议。另外, 林吉强等^[149]和舒家模等^[150]用颗粒饲料对新西兰兔的生长和繁殖进行了详细和长期的观察, 均获得满意的结果。蔡亚^[151]还就家兔骨折实验中使用全价营养颗粒料的重要性, 从骨折修复、增重和对麻醉药的反应做了评价; 邱志方等^[152]对实验兔饲喂颗粒饲料前后进行了比较, 提出需要专业生产和检测以保证质量。从 1979 至 1981 年, 上海实验动物科学界前辈历时两年, 协力攻关, 初步研制成功具有划时代意义的实验兔全价颗粒饲料, 其中的艰辛和喜悦, 唯有亲历者才深有体会。1984 年, 王楠田等^[153]对不同日龄家兔消化加有脱水蔬菜的颗粒料的效能进行了比较。至此, 实验兔的全价饲料研制基本完成, 并开始了饲料的标准化、社会化和为特殊模型制作, 结束了长期以来实验兔饲养需要饲喂青绿饲料的历史, 解决了实验兔饲养中经常发生腹泻等难题。

在实验兔颗粒饲料研制的基础上, 1983 年,

舒家模等^[154]初报了犬用颗粒料的研制,解决了适口性和因水分含量高不易保存的问题。3年后,舒家模等^[155]研制了犬全价营养膨化颗粒饲料(SDF系列产品),试验17个月,对消化试验的育成犬进行了胃镜检查,比较了繁殖效果,检测了公犬的精液品质,分析了母犬的乳汁营养成分,比较了仔犬的生长和体质量,测定了犬的血液生化指标,详细分析了原料和膨化料的营养成分;1986年7月该饲料通过成果鉴定。至1986年,上海地区主要实验动物大鼠、小鼠、仓鼠、兔和犬均有了标准化饲料^[156]。1987年,朱钦龙^[157]报告猕猴全价膨化饲料通过部级鉴定。由于地区发展的不平衡,且科学发展永无止境,后续还有一些相关报道。1990年,长春生物所唐静敏等^[158]对两种不同配方的金黄仓鼠饲料进行了繁育效果的实验观察,发现饲料配方中加入苜蓿粉并停喂蔬菜可以解决因腹泻造成的死亡。1991年,上海生物所刘连生等^[159]用全价颗粒饲料对普通级、清洁级和SPF金黄仓鼠的生产、繁殖进行了观察比较,获得了满意的结果;小鼠、仓鼠全价营养颗粒饲料及其标准通过专家鉴定^[160]。1994年,江西医学实验动物中心罗厚良等^[161]研制了实验大鼠、小鼠全价颗粒饲料。

1987年,王兆绰等^[162]比较了高压灭菌和⁶⁰Co辐照灭菌饲料的微生物、营养成分和饲喂效果,认为辐照饲料好于高压灭菌饲料。1988年,王四旺等^[163]分析比较了8个剂量辐照对饲料营养成分的影响,认为剂量小于1Mrad(100rad=1Gy)较好。1995年,张周等^[164]用⁶⁰Co- γ 射线辐照灭菌大鼠与小鼠饲料,对辐照后饲料营养成分、有效保存期和饲喂效果进行了比较,结果认为辐照灭菌饲料的方法值得推广。2000年,梁永利等^[165]用0.5Mrad⁶⁰Co辐照饲料与高压灭菌饲料、不辐照不高压处理饲料进行比较,观察了3种饲料对新西兰兔繁育生长的影响,结果表明辐照饲料最好。同年,陈国强^[166]报告了标准化的⁶⁰Co辐照灭菌实验动物系列全价颗粒饲料。2001年,周正宇等^[167]比较了7个剂量⁶⁰Co辐照对大鼠、小鼠饲料的影响,认为25kGy剂量以上的辐照饲料可保存120d。辐照技术在实验动物饲料灭菌中的应用减轻了高温高压灭菌对饲料营养成分(特别是维生素类成分)的破坏程度。

4 笼器具和饲养设备

1982年,薛逸祯等^[168]以塑料饲养盒和土制瓦罐对小鼠的繁殖效果进行了12个月的比较观察,结果表明,塑料饲养盒能够耐高温高压,耐腐蚀,在人工控制普通环境中可保持高产繁殖性能。土制瓦罐缺点很多,如笨重易碎、清洁消毒不方便、吸异味(时间久了很臭)、不能套叠存放占空间、操作者劳动强度大且易患手指和腕关节肌腱炎等。

1984年,陈天培等^[169]研制了塑料薄膜无菌隔离器,并对工艺的关键点做了阐述,将国产塑料薄膜与日本相应产品、国产过滤材料与美国的做了比较;在隔离器无菌隔离性能测试的基础上,饲养SPF裸小鼠和纯种小鼠、无菌小鼠一年多,经微生物学监测,均符合无菌要求。国产塑料薄膜隔离器的研制成功,为随后我国的无菌动物和悉生动物研究奠定了基础。

之后,随着国内对高质量实验动物的要求迫切,各机构转而研发成本相对较低、操作方便,又能一定程度上满足微生物控制要求的层流架。1988年,杨祖循等^[170]详细介绍了超净空气层流架的研制和应用,包括主要技术和部件、与国外同类产品的比较、实用性能数据、微生物检测等。同年,姚明等^[171]开展了层流架生物学检测和应用研究;姚一康等^[172]探讨了层流架饲养SPF小鼠的可行性;王沅等^[173]观察了层流架饲养小鼠的生物学指标;刘全海^[174]报告,双面中立式层流架通过了鉴定。1989年,陆志刚等^[175]对无菌小鼠微生物污染做了监控,发现传递窗开启频度导致的污染率为12.4%,而使用空气预过滤器后污染率仅占1.32%。由于层流架在微生物控制等方面存在缺陷,该设备未能推广使用。

1980年代,美国Thoren Maximiser公司研发并生产了首台独立通风换气笼(individual ventilated cages, IVC)。21世纪初,实验大鼠、小鼠IVC开始在国内逐步得到应用并发展。2003年,丁隽等^[176]对IVC和层流架中2个品系的小鼠生长发育性能进行了比较,结果显示IVC优于层流架。同年,顾锋等^[177]测试不同浓度过氧乙酸对IVC的灭菌效果,结果是0.5%的过氧乙酸处理IVC12h以上即可达到要求。2004年,Bantin^[178]比较了塑

料薄膜隔离器和 IVC 的应用效果,认为隔离器有其优势。同年,施正良等^[179]报告,采用国产 IVC 饲养裸小鼠并进行了停电 24 h 试验,结果显示 4 只/盒均存活。高文婷等^[180]对 IVC 环境下的裸小鼠繁育、生长发育进行了观察,效果良好。敖红等^[181]在 IVC 建立大鼠肝脏诱癌模型获得成功。2013 年,梁春南等^[182]对 IVC 的兼容性、品质和服务与价格进行了较为系统的评估。2015 年,孔丽娟等^[183]对高校的 IVC 动物实验室的管理制度作了初步的探讨。2017 年,王贵平等^[184]对排气通风笼具(exhaust ventilated closed-system cage rack, 简称 EVC)的微环境进行了物理参数和化学参数(氨浓度)的动态检测。IVC 在国内的广泛应用,使国内实验大鼠、小鼠的生产和动物实验更加高效和安全。

5 标准化和实验动物管理

1983 年,皇甫在^[185]详细探讨了 SPF 小鼠质量标准,侧重于微生物学的病原体检测。1992 年,上海市技术监督局发布上海市地方标准《实验动物全价营养饲料》(标准号:DB31/67-92),这是我国实验动物科学领域的第一个地方标准^[186]。1994 年,杂志简介了上海市地方标准《实验动物环境及设施标准》^[187]。1995 年,上海市科委颁布并实施了《上海市实验动物合格证管理暂行办法》^[188]。1996 年,穆正明等^[189]探讨了江苏省实验动物笼器具质量标准和现状,对笼具、笼架、水瓶、层流架和检测方法做了详细的阐述。1995 年上海市地方标准《实验用犬微生物学质量标准》颁布实施^[190]。2019 年,续国强等^[191]详细探讨了以微卫星位点为检测方法,建立近交系中国仓鼠遗传质量标准。2020 年,陶凌云等^[192]总结比较了现阶段国内外大鼠、小鼠病原体检测标准。

1980 年代末,国内实验动物学界就开始关注信息技术(IT)与实验动物科学的结合。1988 年,陈灵等^[193]探讨了实验动物管理计算机化,对近交系小鼠的基因位点和下颌骨形态测量值进行电脑处理。1990 年,孙鲁洪等^[194]编制了专用程序,建立实验动物繁殖资料数据库,并编制遗传谱系。同年,李小青^[195]探讨了微机用于 SPF 大鼠、小鼠生产管理的可行性。黄帼英等^[196]编制了“近交系小鼠繁殖谱系管理”程序,为选

种提供数据。2000 年,薛成等^[197]采用 ASP(active serve page)技术实现广东省实验动物信息网的技术更新。2008 年,贺争鸣等^[198]按照科技部要求,提出了实验动物生物学特性数据化表达的规范化数据共享。2009 年,和占龙等^[199]开发了灵长类动物生产管理信息系统软件。2011 年,孙琪华等^[200]尝试将实验动物动态信息与财务管理一体化。2014 年,陈颖等^[201]将大鼠、小鼠、豚鼠、兔、犬和猴六种常用实验动物多种光镜下的组织图片建立了共享数据库。2015 年,陈继猛等^[202]较详细地介绍了已开发的实验动物管理系统软件,包括模块、技术特点和应用体会。2016 年,顾祖曦等^[203]介绍了已开发的动物实验信息化管理系统软件,侧重于模块分布。2017 年,余琛琳等^[204]初步探索了实验动物从业人员远程培训考核体系,指出这一体系还有待于进一步细化和完善。另外,2017 年,邓威等^[205]采用 3D 打印多孔钛材料修复兔股骨髁骨缺损,具有良好的生物相容性,为临床应用奠定了基础;芮敏等^[206]用 3 月龄和 6 月龄新西兰兔桡骨经 CT 扫描后进行三维重建并对参数测量,探讨兔桡骨解剖学参数间的相关性。2019 年,徐孝平等^[207]开发了基于浏览器/服务器模式架构的高校动物实验管理系统。

国内实验动物机构国家认可始于 2018 年,迄今已有 10 家机构获得认可(北京 7 家,成都、昆明和上海各 1 家);实验动物机构认可工作的依据文件始于 2011 年的科技部项目。2012 年,史光华等^[208]比较了国内外管理现状,深刻思考了我国实验动物机构认可的工作,为实验动物机构管理水平接轨国际奠定了基础。

时值杂志创刊 40 周年之际,本文梳理了在本刊已发表的、具有一定创新性的论文。由于笔者考虑的方方面面与部分读者可能不一,肯定还有遗漏或没有选中的创新性论文。凡事没有绝对,但我已尽力,至少引用的每篇论文均已仔细拜读过。所以,撰写此文一方面是回溯、整理和分享,另一方面也是致敬为我国 40 年实验动物科学发展做出贡献的学者和作者!

致谢:感谢同事张俊彦、富群华和王伟民提供了杂志的总目录和相关论文资料,徐平教授审阅了本稿并提出宝贵意见,谨致谢意!

参考文献:

- [141] 王楠田, 郑铭钰, 徐国宝, 等. 实验用家兔饲料配方的研究 II: 脱水蔬菜类饲料饲养效果的观察[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1981, 1(1):2-8.
- [142] 王楠田, 顾文清, 颜龙春, 等. 实验用家兔饲料配方的研究 III: 不同配方颗粒料饲喂成兔的效果[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1981, 1(2):64-67.
- [143] 王楠田, 颜龙春, 顾文清, 等. 实验用家兔饲料配方的研究 IV: 雌兔喂以不同配方饲料后的繁殖效果[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1981, 1(2):72-75.
- [144] 胡开元. 家兔喂颗粒料的饲养效果[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1982, 2(1):26-27.
- [145] 上海市畜牧兽医学会实验动物专业组. 组织协作研制实验动物颗粒饲料[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1982, 2(1):52, 51.
- [146] 李锦铭, 黄自芬. 全价营养颗粒饲料饲喂家兔的效果[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1983, 3(1):11-14.
- [147] 薛逸祯, 王月明. 实验兔喂用全价营养颗粒料, 提高了药检质量[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1983, 3(1):14.
- [148] 王志荣. 对家兔全价营养颗粒饲料的评价[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1983, 3(2):103-104.
- [149] 林吉强, 钱开明. 实验用新西兰白兔的饲育 I: 生长及繁殖[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1981, 1(2):59-63.
- [150] 舒家模, 庄金根. 新西兰白兔在无空调环境中一年来喂颗粒料的繁殖效果观察[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1982, 2(2):73-74, 76.
- [151] 蔡亚. 家兔骨折实验中使用全价营养颗粒料的重要性[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1982, 2(2):57-59.
- [152] 邱志方, 张凤兰, 汪敦发. 实验用家兔饲喂颗粒料前后的情况比较[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1982, 2(3):135-136.
- [153] 王楠田, 钱景伦, 姚凤生. 加有脱水蔬菜的颗粒料对不同日龄家兔表观消化率效能的比较观察[J]. 上海实验动物科学, 1984, 4(1):13-17.
- [154] 舒家模, 孙鲁洪. 犬用颗粒料研制初报[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1983, 3(1):30-32.
- [155] 舒家模, 林远夫, 孙鲁洪, 等. 犬全价营养膨化颗粒饲料(SDF 系列产品)的研制和应用[J]. 上海实验动物科学, 1986, 6(4):209-216.
- [156] 本刊通讯员. 犬用全价营养膨化颗粒饲料系列产品研制成功[J]. 上海实验动物科学, 1986, 6(4):36.
- [157] 朱钦龙. 猕猴全价膨化饲料通过部级鉴定[J]. 上海实验动物科学, 1988, 8(4):248.
- [158] 唐静敏, 薄文学, 王玉玺, 等. 金黄仓鼠全价营养饲料配方的研究 I: 两种不同配方饲料繁育效果的实验观察[J]. 上海实验动物科学, 1990, 10(2):75-78, 105.
- [159] 刘连生, 余康敏, 朱梅芬, 等. 金黄仓鼠全价营养颗粒饲料的研究[J]. 上海实验动物科学, 1991, 11(2):65-67.
- [160] 马东林. 小鼠、仓鼠全价营养颗粒饲料的研究及其标准通过专家鉴定[J]. 上海实验动物科学, 1991, 11(1):44.
- [161] 罗厚良, 褚芳. 实验大鼠和小鼠全价颗粒饲料研究初报[J]. 上海实验动物科学, 1994, 14(3):160-162.
- [162] 王兆焯, 肖旭光, 马丽, 等. 裸小鼠饲料灭菌方法的探讨[J]. 上海实验动物科学, 1987, 7(4):219-222.
- [163] 王四旺, 施新猷, 娄清林. 实验动物饲料 ^{60}Co - γ 线辐照后营养成分分析[J]. 上海实验动物科学, 1988, 8(3):147-149.
- [164] 张周, 张素胤, 杨秋龙, 等. ^{60}Co - γ 射线辐照消毒大鼠与小鼠饲料的效果[J]. 上海实验动物科学, 1995, 15(4):201-205.
- [165] 梁永利, 樊如海, 李志彦, 等. ^{60}Co 辐照饲料对新西兰兔繁育生长的影响[J]. 上海实验动物科学, 2000, 20(4):235-237.
- [166] 陈国强. “ ^{60}Co 辐照灭菌实验动物系列全价颗粒饲料”通过科技创新基金项目论证[J]. 上海实验动物科学, 2000, 20(1):39.
- [167] 周正宇, 薛智谋. 实验动物饲料 ^{60}Co 辐射灭菌剂量的研究[J]. 上海实验动物科学, 2001, 21(2):100-102. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2001.02.010.
- [168] 薛逸祯, 邱志方. M-1 型小鼠塑料饲育盒的繁殖效果观察[J]. 上海畜牧兽医通讯: 实验动物科学专辑, 1982, 2(1):12-14.
- [169] 陈天培, 皇甫在, 洪美玉, 等. 塑料薄膜无菌隔离器的研制与应用[J]. 上海实验动物科学, 1984, 4(1):3-7.
- [170] 杨祖循, 王长江, 殷世申, 等. 超净空气层流架的研制与应用[J]. 上海实验动物科学, 1988, 8(2):87-89, 70.
- [171] 姚明, 江华, 邵龙琪. ZPCJ-1 型层流架的生物学检测和应用研究[J]. 上海实验动物科学, 1988, 8(2):106, 104.
- [172] 姚一康, 徐美珍, 曾若望. 国产 ZPCJ-1 型层流架饲育 SPF 小鼠的可行性探讨[J]. 上海实验动物科学, 1988, 8(2):93-95.
- [173] 王运, 潘漪清, 甘耀舫, 等. 用国产 SSJ-CJ 型层流架饲育小鼠时几项生物学指标的观察[J]. 上海实验动物科学, 1988, 8(1):15-17.
- [174] 刘全海. 双面中立式空气层流架通过鉴定[J]. 上海实验动物科学, 1988, 8(2):113.
- [175] 陆志刚, 周玮, 陈天培. 无菌小鼠微生物污染的监控[J]. 上海实验动物科学, 1989, 9(1):26-27, 17.
- [176] 丁隼, 姚一康, 杨伟敏, 等. 独立通气笼盒与层流架中小鼠生长发育性能比较[J]. 上海实验动物科学, 2003, 23(2):109-110. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2003.02.013.
- [177] 顾锋, 王国强, 沈志明, 等. 独立通气笼盒过氧乙酸灭菌效果初探[J]. 上海实验动物科学, 2003, 23(2):111-113. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2003.02.014.
- [178] Bantin G C. A comparison between the application of

- flexible film isolators and individual ventilated cages [J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(1):3-6. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2004.01.001.
- [179] 施正良, 仲晓萍, 饶江宁. IVC应用研究初报[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(2):109-110. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2004.02.015.
- [180] 高文婷, 邱泽文, 尹金星, 等. IVC环境中裸小鼠的繁育及生长[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(2):111-112. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2004.02.016.
- [181] 敖红, 黄爱民, 管生, 等. IVC中大鼠肝脏诱癌模型的建立[J]. 上海实验动物科学, 2004, 24(4):243-256. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2004.04.016.
- [182] 梁春南, 刘巍, 赵明海, 等. 独立通风笼系统评估及检测机构在其中的角色[J]. 实验动物与比较医学, 2013, 33(5):369-372. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2013.05.010.
- [183] 孔丽娟, 王欣丽, 王成, 等. 浅谈高校IVC动物实验室的管理制度[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(4):328-329. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2015.04.017.
- [184] 王贵平, 薛智谋, 周正宇, 等. 排气通风笼具微环境的动态检测[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(2):150-154. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2017.02.013.
- [185] 皇甫在. 实验动物微生物学监测: SPF 小鼠质量标准问题的探讨[J]. 上海畜牧兽医通讯:实验动物科学专辑, 1983, 3(3):154-159.
- [186] 本刊编辑部. 上海市技术监督局发布上海市地方标准《实验动物全价营养饲料》[J]. 上海实验动物科学, 1992, 12(2):82.
- [187] 上海市地方标准《实验动物环境及设施标准》[J]. 上海实验动物科学, 1994, 14(2):120.
- [188] 上海市动管办. 上海市科委颁发《上海市实验动物合格证管理暂行办法》[J]. 上海实验动物科学, 1995, 15(3):191.
- [189] 穆正明, 张荣军, 黄旭荃. 江苏省实验动物笼器具质量的参考标准及现状[J]. 上海实验动物科学, 1996, 16(1):47-52.
- [190] 本刊编辑部. 上海市地方标准《实验用犬微生物学质量标准》(DB31/T159-95) 简介[J]. 上海实验动物科学, 1996, 16(2):129.
- [191] 续国强, 高继萍, 刘茂林, 等. 近交系中国仓鼠遗传质量标准的建立[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(4):305-309. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2019.04.009.
- [192] 陶凌云, 周洁, 胡建华, 等. 国内外大鼠和小鼠微生物、寄生虫检测标准的比较[J]. 实验动物与比较医学, 2020, 40(2):166-172. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2020.02.014.
- [193] 陈灵, 陈天培, 王燕祖. 实验动物管理计算机化的研究 I: 近交系列小鼠遗传品质监测系统[J]. 上海实验动物科学, 1988, 8(3):129-131.
- [194] 孙鲁洪, 程鸿, 杨幼明. 微电脑系统在实验动物管理中的应用 II: 实验动物繁殖资料数据库建立与遗传系谱的编制[J]. 上海实验动物科学, 1990, 10(1):17-20.
- [195] 李小青. SPF 大、小鼠管理信息系统(模拟)[J]. 上海实验动物科学, 1990, 10(2):84-85.
- [196] 黄帼英, 周玮. 近交系小鼠谱系的计算机管理[J]. 上海实验动物科学, 1990, 10(4):219,221.
- [197] 薛成, 程树军, 杨丰华, 等. 用 ASP 实现实验动物信息网的功能改进与扩增[J]. 上海实验动物科学, 2000, 20(1):54-57.
- [198] 贺争鸣, 邢瑞昌, 岳秉飞, 等. 实验动物生物学特性数据化表达的规范化与数据共享[J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(1):43-45. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2008.01.013.
- [199] 和占龙, 夏文财, 赵远, 等. 灵长类动物生产管理信息系统的开发与应用[J]. 实验动物与比较医学, 2009, 29(3):201-203. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2009.03.016.
- [200] 孙琪华, 王婧, 顾静, 等. 实验动物动态信息管理与财务信息管理一体化初探[J]. 实验动物与比较医学, 2011, 31(1):69-72. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2011.01.015.
- [201] 陈颖, 潘华, 周光兴. 六种常用实验动物比较组织学共享数据库的初步建立[J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(6):463-466. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2014.06.006.
- [202] 陈纪猛, 王训立, 郑和平, 等. 实验动物管理系统的开发和应用[J]. 实验动物与比较医学, 2015, 35(1):37-41. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2015.01.008.
- [203] 顾祖曦, 张超超, 蔡贞贞, 等. 动物实验信息化管理系统的开发和应用[J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(3):219-225. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2016.03.013.
- [204] 余琛琳, 崔淑芳. 实验动物从业人员远程培训考核指标体系初探[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(1):71-75. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2017.01.016.
- [205] 邓威, 郑欣, 谌业帅, 等. 3D 打印多孔钛材料修复兔股骨髁骨缺损的实验研究[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(4):266-272. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2017.04.002.
- [206] 芮敏, 郑欣, 李成宇, 等. 基于数字化三维重建技术的新西兰兔桡骨解剖学观测及研究[J]. 实验动物与比较医学, 2017, 37(4):273-277. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2017.04.003.
- [207] 徐孝平, 张利棕, 潘永明, 等. 基于浏览器/服务器模式架构的高校动物实验管理系统开发与应用[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(3):239-243. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2019.03.012.
- [208] 史光华, 吕京, 程树军. 关于实验动物机构认可工作的思考[J]. 实验动物与比较医学, 2012, 32(1):73-77. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2012.01.018.
- (收稿日期: 2020-11-27 修回日期: 2020-12-26)

小鼠树突状细胞亚群分类及其比较研究进展

阮蕾颖, 孙晓梅

(中国医学科学院/北京协和医学院医学生物学研究所树鼩种质资源中心, 中国医学科学院医学生物学研究所实验树鼩标准化与应用研究省创新团队, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118)

[摘要] 以小鼠为代表的啮齿类实验动物一直以来作为人类探索树突状细胞(dendritic cells, DCs)系统的有力工具活跃在各个研究平台。早期人们对于DCs的了解主要来源于对小鼠模型的研究, 并根据其表面标志、细胞形成和迁移特性等进行初步分类。目前, 小鼠不同DCs亚群的分类方法还没有完全统一, 这大大阻碍了人们对DCs的进一步研究与利用。因此需要深入开展小鼠DCs亚群的基础研究, 寻找科学、有效、公认的DCs分类方法定义不同的亚群。本文从小鼠DCs细胞亚群分类方法、常见细胞类型、特性及与人类DCs的比较等方面进行综述, 阐述目前小鼠DCs亚群分类及特性的研究现状, 同时总结了目前待解决的问题。为深入了解DCs亚群的功能及特性提供参考, 并期望通过总结亚群相关的问题提出研究方向。

[关键词] 树突状细胞; 细胞亚群; 分类; 小鼠

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)02-0174-07

Classification and Research Progress on Dendritic Cell Subsets in Mice

RUAN Leiying, SUN Xiaomei

(Center of Tree Shrew Germplasm Resources, Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science and Peking Union Medical College; Yunnan Innovation Team of Standardization and Application Research in Tree Shrew; Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, China)

Correspondence to: SUN Xiaomei, E-mail: sxm@imbcams.com.cn

[Abstract] Mouse, a representative rodent laboratory animal, has always been a powerful tool for studying dendritic cell (DC) systems. Our current knowledge of DCs has been largely derived from studies of murine models, and according to surface markers, cell development, and migratory characteristics, DCs can be categorized with respect to their subsets. To date, there is no uniform classification scheme for mouse DC subsets, which has greatly hindered research involving DCs. Thus, we believe that basic studies to define murine DC subsets are still needed, and it is crucial to seek scientific, effective, and recognized methods to establish categorical definitions. This review proposed a schema incorporating the classification, phenotypes, and characteristics of murine DC subsets, and compares them with human DC counterparts. The aim is to clarify the classification and characteristics of the current status of DC subsets in mice and summarize the existing challenges. This would be beneficial for gaining an in-depth understanding of the function of DC subsets and would provide novel research directions for DC subset categorizations.

[Key words] Dendritic cells; Cell subsets; Classification; Mice

树突状细胞(dendritic cells, DCs)是免疫系统的前哨, 由于它将先天性免疫和适应性免疫联系

在一起, 被认为是最有效的抗原呈递细胞。在许多免疫系统疾病的发生、发展过程中发挥极为重

[基金项目] 云南省科技人才和平台计划项目(2017HC019); 昆明市科技创新团队项目(2019-1-R-24483)

[作者简介] 阮蕾颖(1994—), 女, 硕士研究生, 专业: 动物学。E-mail: rly1116@126.com

[通信作者] 孙晓梅(1963—), 女, 主任技师, 主要从事疾病动物模型研究。E-mail: sxm@imbcams.com.cn

要的作用^[1]。DCs 包含不同的细胞类型, 它们的区别主要表现在细胞起源、成熟状态、免疫应答等方面。据此可以将 DCs 分为不同的亚群。各亚群处理抗原的能力不同, 并且激活不同效应的淋巴细胞^[2-4]。目前, DCs 转录组学方向的研究成为 DCs 亚群新的研究方向^[5-7]。对 DCs 的研究主要集中在以小鼠为代表的啮齿类实验动物^[2-3, 8-9]。但目前 DCs 亚群仅在个别分类上基本达成共识, 总的来说其分类还没有统一^[3, 10]。由于对 DCs 亚群的类型和功能了解不足, 阻碍了人们对它的认知。因此, 有必要在小鼠模型上确定不同 DCs 亚群的身份, 为了解和应用小鼠 DCs 亚群提供参考。

1 小鼠 DCs 亚群分类

1.1 DCs 亚群的分类现状与方法

大量的研究发现 DCs 是由多个亚群组成的。目前, 已经根据其表型和功能将小鼠 DCs 亚群进行了初步分类, 而其他啮齿类暂无相关报道。小鼠 DCs 的细胞形成研究表明, DCs 源自独立的造血细胞系统^[4, 11]。即使不同的 DCs 也都由唯一的一套 DCs 转录谱来调控, 并且区别于其它细胞^[12]。这套转录谱在哺乳动物中是非常保守的^[12-13]。因此, 我们可以通过不同的表面标记为依据, 对 DCs 进行亚群分类^[4]。在 DCs 亚群的研究中还发现了一些控制 DCs 发育的重要转录因子, 例如: 干扰素调节因子 8 (interferon regulatory factor 8, IRF8)、含锌指和 BTB 结构域蛋白 46 (zinc finger and BTB domain containing 46, ZBTB46) 和碱性亮氨酸拉链 ATF 样转录因子 3 (basic leucine zipper ATF-like transcription factor 3, Batf3)^[14-17]。

当前用于 DCs 分类的表面标记类型取决于所研究的组织类型和动物物种, 并且甚至在实验室之间表面标记也有所不同, 这是 DCs 亚群定义混乱的重要原因。针对该问题, 近年来研究者建立了个体发育学和基因表达谱分析的方法, 作为定义 DCs 亚群身份的非常严格且有效的方法, 这样可以弥补仅以表面标记来区分亚群的不足^[2, 18-20]。不同物种之间从相同前体细胞进化而来的细胞, 即同源细胞, 其基因表达图谱和基因表达程序紧密关联。特定的基因表达程序不仅可以调控不同细胞的发育, 还决定了细胞的功能, 所以, 用

表达图谱来鉴定细胞是可靠的^[21]。因此, 我们有可能通过借助基因表达图谱分析来实现鉴定其他物种的 DCs 细胞亚群^[10, 18, 20, 22]。

1.2 小鼠的 DCs 亚群

根据位置不同, 常见的小鼠 DCs 亚群可分为常驻 DCs (resident dendritic cells) 和迁移 DCs (migratory dendritic cells) 两大类^[2, 8, 23-24]。根据个体发育的不同, 以上两个大类又可以细分为: 朗格汉斯细胞 (Langerhans cells, LCs)、浆细胞样 DCs (plasmacytoid dendritic cells, pDCs)、经典 DCs (classical dendritic cells, cDCs) 和单核细胞衍生 DCs (monocyte-derived dendritic cells)。

LCs 是一种位于表皮的抗原呈递细胞。与其他迁移 DCs 不同, 它的发育与巨噬细胞的个体发育方式相似。LCs 可自我更新, 它起源于胚胎单核细胞前体细胞^[2, 18, 25]。

pDCs 是在全身性感染时 I 型干扰素 (type I interferon, IFN-I) 的主要生产者^[26], 除了产生 IFN-I 外, 还通过募集和激活其他白细胞例如 cDCs 和自然杀伤细胞 (natural killer cells, NKs) 的方式参与抗病毒免疫防御^[18, 25, 27]。

cDCs 表达整联蛋白 CD11c 和 MHC II 类分子^[18]。在小鼠的 cDCs 中, 已鉴定出两个主要亚型, 分别为 cDC1s 和 cDC2s^[19, 24]。cDC1s 高表达 IRF8, 并依赖于 *Irf8* 基因、*Batf3* 基因、DNA 结合抑制剂 2 基因 (inhibitor of DNA binding 2, *Id2*)、白介素 3 调控的核因子基因 (nuclear factor, interleukin 3 regulated, *Nfil3*) 和 BCL6 转录阻截蛋白基因 (BCL6 transcription repressor, *Bcl6*) 的表达, 这些基因具体的作用机制目前还有待阐明; cDC2s 表达干扰素调节因子 4 (interferon regulatory factor 4, IRF4) 和 IRF8^[4, 8, 17, 28]。

单核细胞衍生的 DCs 包含不同的细胞类型。有的类型只有在炎症条件下才能观察到, 它们被称为炎症 DCs (inflammatory dendritic cells, INF-DCs)。有的类型在不发生炎症的外周组织中, 例如肠、肌肉和皮肤^[29]。单核细胞衍生的 DCs 可以看作是一个独立系统。在人和小鼠中均发现单核细胞衍生的 DCs 表达转录因子 ZBTB46, 该转录因子的作用机制目前尚不清楚^[2, 30]。

2 小鼠与人类 DCs 亚群比较

相对于小鼠模型 DCs 亚群的研究,我们对人类 DCs 亚群的了解十分有限。而随着研究的不断推进,人类 DCs 亚群的研究也时常得到新的突破,反过来又促进小鼠 DCs 的研究发展,如 pDCs 的研究。目前,物种之间的 DCs 还没有实现亚群和功能的完全对应。为深入了解 DCs,一些研究者致力于将已经研究的小鼠 DCs 亚群与人类 DCs 亚群进行比较,为促进 DCs 亚群的研究提供参考。

2.1 LCs 的比较

LCs 是唯一一种同时具有 DCs 和巨噬细胞特性的细胞,因此有的人将它划分为巨噬细胞^[19]。小鼠和人类的 LCs 主要存在于表皮和黏膜组织中。用于鉴定 LCs 的典型标志物是朗格汉斯蛋白(Langerin),另一个重要的鉴定指标是 Birbeck 颗粒^[31]。LCs 在人和小鼠中具有相似的功能,它可以有效活化 CD4⁺ T 细胞,并且可以诱导辅助型 T 细胞 2 型(T helper 2 cell, Th2)极化^[2]。二者的 LCs 差别在于:人类 LCs 表达高水平的 CD1a, CD1a 是 CD1 蛋白的成员,可以向 T 细胞呈递微生物脂质抗原。TGF β 1 是一种在上皮细胞中高表达的细胞因子,人类 LCs 的 CD1d 蛋白的表达受转化生长因子 TGF β 1(transforming growth factor beta 1, TGF β 1)的影响下调。在小鼠中未发现以上的特点^[32]。最初, Langerin 被认为仅在 LCs 中表达,这个理论至今在人类 DCs 中仍然成立;在小鼠中却发现 Langerin 也在皮肤的其他 DCs 以及淋巴组织 CD8⁺ DCs 中表达。目前只在 LCs 群体中发现 Birbeck 颗粒;因此 Birbeck 颗粒被认为是 LCs 特异的标志^[33]。

2.2 pDCs 的比较

人类 pDCs 的研究引发了人们对小鼠 pDCs 的研究^[27, 34]。人类和小鼠的 pDCs 最主要的功能是产生 IFN-I^[2]。尽管它们存在表型分子差异,但他们的功能和核心基因表达程序都十分相似。在人类中已经发现的一些 pDCs 特异表面标志有: C 型凝集素结构域家族 4 成员 C(C-type lectin domain family 4 member C, CLEC4C)、白细胞免疫球蛋白样受体 A4(leukocyte immunoglobulin like

receptor A4, LILRA4)、白介素 3 受体亚基 α (interleukin 3 receptor subunit alpha, IL-3R α)、神经纤毛蛋白 1(neuropilin 1, NRP1),白介素 3 受体亚基 α (interleukin 3 receptor subunit alpha, IL-3R α)。其中, IL-3R α 和 NRP1 特异性较弱。小鼠的特异性标志有唾液酸结合 Ig 样凝集素 H(sialic acid binding Ig-like lectin H, SiglecH)、骨髓基质细胞抗原 2(bone marrow stromal cell antigen 2, Bst2)、淋巴细胞抗原 6 复合体-C 抗原(Ly6-C antigen, Ly6C)、杀伤细胞凝集素样受体, A 亚族 17 成员(killer cell lectin-like receptor, subfamily A, member 17, Klra17),其中 Ly6C 和 Ly49Q 特异性较弱^[35]。研究者通过比较基因组学方法发现人类和小鼠的 pDCs 共享基因标记,表明它们有密切的同源性。人类和小鼠的 pDCs 表达编码 IL-3R α 、Spi-B 转录因子(Spi-B transcription factor, Spi-B)、干扰素调节因子 7(interferon regulatory factor 7, IRF7)和 IRF8 的基因,这些基因对于这类细胞的发育或存活至关重要。所有这些基因在小鼠和人类 pDCs 中的表达具有保守性^[16, 17, 36]。此外,还发现了在小鼠和人 pDCs 中具有高度特异性和保守性的其他细胞因子受体亚基,如集落刺激因子 2 受体 β 亚基(colony stimulating factor 2 receptor subunit beta, CSF2RB),干扰素 α 和 β 受体 2 亚基(interferon alpha and beta receptor subunit 2, IFNAR2);以及一些转录因子,如转录因子 4(transcription factor 4, TCF4)和 RUNX 家族转录因子 2(RUNX family transcription factor 2, RUNX2)^[30],其中 TCF4 在小鼠和人 pDCs 的发育或功能发挥中起到关键作用^[16, 30, 37]。神经元 1 蛋白激酶 C 和酪蛋白激酶底物(protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 1, PACSIN1)是一个新发现的基因,在小鼠和人 pDCs 中选择性高表达,对于 pDCs IFN-I 的产生可能发挥特别重要作用^[18]。事实上,人类和小鼠的 pDCs 也存在比较明显的差异,比如小鼠 pDCs 可以高效触发各种 toll 样受体(toll-like receptors, TLRs)或在病毒刺激时产生高水平的 IL-12,而人类 pDCs 不表达或只表达极低水平的 IL-12。人和小鼠的这种差异可能是相关转录因子的表达差异导致的^[38]。在小鼠中,

由于 NKs 和 pDCs 具有一些相同的表型和功能,从而增加了在白细胞亚群中准确区分 pDCs 的难度^[12, 18, 24, 39]。

2.3 cDCs 的比较

在人类和小鼠中 cDCs 被分为两个亚型。人类 cDCs 通常分为 CD1C⁺ DCs 和 CD141⁺ DCs, 分别与小鼠的 cDC2s 和 cDC1s 相对应^[2, 8, 12, 15, 30, 40-41]。小鼠和人类 cDCs 的转录具有保守性, 它们的遗传等效性得到了证明^[15, 39]。小鼠的 cDC2s 可以活化 CD4⁺ T 细胞和促进体液免疫防御, 它的 MHC II 类抗原加工和呈递能力比人类 CD1C⁺ DCs 强。人类 CD1C⁺ DCs 的主要功能是外源病原体的识别以及下游反应的激活^[30]。在人类和小鼠中一些表型标记是保守的, 例如: 体外实验表明, 人类 CD141⁺ DCs 的发育和小鼠 cDC1s 一样依赖于 Batf3^[15, 16, 42]。转录因子在这类发育中发挥着重要作用。这里特别列举 RELB 原癌基因 (RELB proto-oncogene, *RelB*), RELB 是第一个与 cDC2s 发育有关的转录因子。小鼠中 RelB 的缺失会导致多种结果, 包括脾肿大、髓外造血、多器官炎症、髓样增生以及胸腺和脾脏 cDCs 发育受阻等^[43]。人类 cDCs 转录特点可能与小鼠不同, 具有 IRF8 突变的患者会出现两个 cDCs 亚型缺失的情况^[2, 8, 44]。

2.4 单核细胞衍生 DCs 的比较

稳态情况下 DCs 通常来源于前体 cDCs, 但某些 DCs 亚群来源比较特殊, 如肠道 CD103⁺ CD11b⁺ DCs 起源于单核细胞^[29]。单核细胞衍生的细胞群体包含不同类型的细胞, 其中包括巨噬细胞^[5]。在骨骼肌中发现了一些单核细胞来源的 DCs, 这些细胞在稳态下不迁移到淋巴结^[2, 44]。在人和小鼠中研究较多的是 INF-DCs。在小鼠中, INF-DCs 不存在于稳态组织和淋巴器官中, 主要是指 MHC II⁺ CD11b⁺ CD11c⁺ F4/80⁺ Ly6C⁺ DCs, 在炎症过程中可以同其他单核细胞区分开^[45-46]。它还表达 CD206、CD115/ 粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体 9 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor 9, GM-CSFR9)、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子受体 12 (granulocyte-macrophage colony stimulating factor receptor 12, GM-CSFR12)、溶酶体相关膜蛋白 2 (lysosomal-

associated membrane protein 2, Lamp2) / CD107b、IgE 高亲和力受体 (demonstration of the high-affinity IgE receptor, FcεRI) 和 CD64。由于这些标志物也在髓样细胞群上表达, 所以特异性不强。人类 INF-DCs 表达人类白细胞 II 类抗原 (major histocompatibility complex, class II, HLA-DR)、CD11c、BDCA1、CD1a、FcεRI、CD206、CD172a、CD14 和 CD11b^[45, 47]。与小鼠类似, 人类 INF-DCs 也表达巨噬细胞集落刺激因子受体 (macrophage-colony stimulating factor receptor, M-CSFR) 和 ZBTB46^[44, 46]。

3 DCs 亚群中一些尚未解决的问题

由于 DCs 的复杂性和异质性导致不同团队的研究结果不同, 因此 DCs 亚群的来源、分化和功能还不十分明确。

3.1 关于 LCs 的问题

很多文献表明, LCs 具有巨噬细胞和 DCs 的双重特点^[2, 9, 19, 29, 48]。但也有人认为, 这可能是 LCs 同那些类 LC 细胞混淆所致。因为研究发现小鼠和人类在炎症状态下产生了类 LC 细胞^[48]。与 LCs 形态相似的炎性树突状表皮细胞 (inflammatory dendritic epidermal cells, IDECs) 的发现也支持了这种观点。在炎症状态下, LCs 的缓慢迁移可能会使 IDECs 和它同时进入到引流淋巴结中, 这增加了区分 LCs 和类 LC 细胞的难度^[48]。

3.2 关于 pDCs 的问题

多数的 pDCs 来源于 DCs 祖细胞, 然而研究者发现了一群表达细胞因子受体 Flt3、M-CSFR、KIT 原癌基因和受体酪氨酸激酶 (KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase, c-Kit) 的一种前体细胞, 它可以分化成 pDCs, 但同样具有淋巴祖细胞的特点。通过进一步追踪, 定位了这种细胞群, 它们的位置基本和 DCs 祖细胞重叠^[49]。那么, pDCs 是否起源于一种具有 DCs 或淋巴细胞分化潜能的特殊的祖细胞还有待证实^[35]。

pDCs 与 NKs 表型混合的现象, 使 pDCs 难以同其他白细胞亚群区别开。例如在小鼠中发现一种表现为 pDCs 和 NKs 的混合表型的新的细胞类型, 这是由于细胞本身特性还是 pDCs 与其他细胞混淆导致的结果, 值得进一步探索^[30, 39]。

3.3 关于 cDCs 的问题

Irf8, Batf3, Nfil3, Id2 和 Bcl6 的单一缺失都与 cDC1s 在淋巴和非淋巴组织中的缺失相关, 具体机制仍有待研究^[8]。cDC2s 的免疫特异性目前尚不清楚, 这可能是该群体包含不同类型的细胞, 导致难以总结其特性^[9]。

3.4 关于单核细胞衍生 DCs 的问题

目前对于如何刺激单核细胞分化成为 INF-DCs 的具体机制, 以及参与的关键转录因子知之甚少。近期的研究虽然已经掌握了稳态 DCs 亚群和巨噬细胞的分子标志, 但对 INF-DCs 的分子标志的了解仍十分匮乏^[46]。

4 结语

早期人们对小鼠 DCs 亚群的研究大大推进了对 DCs 系统的认知, 并为研究人类 DCs 亚群提供了宝贵的经验。随着对 DCs 亚群研究的深入, 人类 DCs 研究的一些突破同样推动了对小鼠 DCs 亚群研究的进程, 两者相互促进。目前人们对小鼠 DCs 亚群的分类仍然存在分歧, 并且对各个亚群的表型、发展演化、功能方面的认识还比较有限, 需要解决的关键问题是找到普遍认同且科学有效的系统分类方法; 对已分离的亚群进行身份确认并进一步进行发育和功能特点的研究。从已知的 DCs 亚群研究中可以看出, 目前 DCs 亚群的研究已经由表面分子进一步走向转录方面, 从而能够更深入的探究 DCs 这一庞大的免疫家族及其分化发育过程。

参考文献:

- [1] WAISMAN A, LUKAS D, CLAUSEN B E, et al. Dendritic cells as gatekeepers of tolerance [J]. *Semin Immunopathol*, 2017, 39(2): 153-163. DOI:10.1007 / s00281-016-0583-z.
- [2] SEGURA E. Review of mouse and human dendritic cell subsets[J]. *Methods Mol Biol*, 2016, 1423:3-15. DOI:10.1007/978-1-4939-3606-9_1.
- [3] SCHRAML BU, REIS E SOUSA C. Defining dendritic cells [J]. *Curr Opin Immunol*, 2015, 32: 13-20. DOI:10.1016/j.coi.2014.11.001.
- [4] RODRIGUES P F, ALBERTI-SERVERA L, EREMIN A, et al. Distinct progenitor lineages contribute to the heterogeneity of plasmacytoid dendritic cells[J]. *Nat Immunol*, 2018, 19(7):711-722. DOI:10.1038/s41590-018-0136-9.
- [5] BRISE OCG, HALDAR M, KRETZER N M, et al. Distinct transcriptional programs control cross-priming in classical and monocyte-derived dendritic cells[J]. *Cell Rep*, 2016, 15(11):2462-2474. DOI:10.1016/j.celrep.2016.05.025.
- [6] SICHIE D, SCOTT C L, MARTENS L, et al. IRF8 transcription factor controls survival and function of terminally differentiated conventional and plasmacytoid dendritic cells, respectively[J]. *Immunity*, 2016, 45(3): 626-640. DOI:10.1016/j.immuni.2016.08.013.
- [7] LIN Q, CHAUVISTRE H, COSTA I G, et al. Epigenetic program and transcription factor circuitry of dendritic cell development [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(20): 9680-9693. DOI:10.1093/nar/gkv1056.
- [8] ANDERSON D A, 3RD, MURPHY K M, BRISENO C G. Development, diversity, and function of dendritic cells in mouse and human [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(11): 1-19. DOI:10.1101/cshperspect.a028613.
- [9] HANIFFA M, COLLIN M, GINHOUX F. Ontogeny and functional specialization of dendritic cells in human and mouse[J]. *Adv Immunol*, 2013, 120:1-49. DOI:10.1016/b978-0-12-417028-5.00001-6.
- [10] VU MANH TP, BERTHO N, HOSMALIN A, et al. Investigating evolutionary conservation of dendritic cell subset identity and functions [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 2601-17. DOI:10.3389/fimmu.2015.00260.
- [11] SCHLITZER A, ZHANG W, SONG M, et al. Recent advances in understanding dendritic cell development, classification, and phenotype [J]. *F1000Res*, 2018, 7:1-9. DOI:10.12688/f1000research.14793.1.
- [12] MILLER J C, BROWN B D, SHAY T, et al. Deciphering the transcriptional network of the dendritic cell lineage[J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(9):888-899. DOI:10.1038/ni.2370.
- [13] SHAY T, JOJIC V, ZUK O, et al. Conservation and divergence in the transcriptional programs of the human and mouse immune systems[J]. *PNAS*, 2013, 110(8):2946-2951. DOI:10.1073/pnas.1222738110.
- [14] MURPHY K M. Transcriptional control of dendritic cell development[J]. *Adv Immunol*, 2013, 120:239-267. DOI: 10.1016/b978-0-12-417028-5.00009-0.
- [15] AMON L, LEHMANN CHK, BARANSKA A, et al. Transcriptional control of dendritic cell development and functions [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2019, 349:55-151. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2019.10.001
- [16] NUTT S L, CHOPIN M. Transcriptional networks driving dendritic cell differentiation and function[J]. *Immunity*, 2020, 52(6):942-956. DOI:10.1016/j.immuni.2020.05.005.
- [17] VILLAR J, SEGURA E. Recent advances towards deci-

- phering human dendritic cell development[J]. *Mol Immunol*, 2020, 122:109-115. DOI:10.1016/j.molimm.2020.04.004.
- [18] DURAI V, MURPHY K M. Functions of murine dendritic cells[J]. *Immunity*, 2016, 45(4):719-736. DOI:10.1016/j.immuni.2016.10.010.
- [19] GUILLIAMS M, GINHOUX F, JAKUBZICK C, et al. Dendritic cells, monocytes and macrophages: a unified nomenclature based on ontogeny[J]. *Nat Rev Immunol*, 2014, 14(8):571-578. DOI:10.1038/nri3712.
- [20] ACHIM K, ARENDT D. Structural evolution of cell types by step-wise assembly of cellular modules [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2014, 27: 102-108. DOI:10.1016/j.gde.2014.05.001.
- [21] ARENDT D. The evolution of cell types in animals: emerging principles from molecular studies[J]. *Nat Rev Genet*, 2008, 9(11):868-882. DOI:10.1038/nrg2416.
- [22] VU MANH T P, ELHMOUZI-YOUNES J, URIEN C, et al. Defining mononuclear phagocyte subset homology across several distant warm-blooded vertebrates through comparative transcriptomics[J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 299. DOI:10.3389/fimmu.2015.00299.
- [23] GUILLIAMS M, HENRI S, TAMOUTOUNOUR S, et al. From skin dendritic cells to a simplified classification of human and mouse dendritic cell subsets [J]. *Eur J Immunol*, 2010, 40(8): 2089-2094. DOI:10.1002/eji.201040498.
- [24] BALAN S, SAXENA M, BHARDWAJ N. Dendritic cell subsets and locations[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2019, 348: 1-68. DOI:10.1016/bs.ircmb.2019.07.004.
- [25] NAIK SH. Demystifying the development of dendritic cell subtypes, a little [J]. *Immunol Cell Biol*, 2008, 86(5): 439-452. DOI:10.1038/icb.2008.28
- [26] GILLIET M, CAO W, LIU Y J. Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases[J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8(8):594-606. DOI: 10.1038/nri2358.
- [27] LEYLEK R, IDOYAGA J. The versatile plasmacytoid dendritic cell: Function, heterogeneity, and plasticity[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2019, 349:177-211. DOI:10.1016/bs.ircmb.2019.10.002.
- [28] WATCHMAKER P B, LAHL K, LEE M, et al. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice[J]. *Nat Immunol*, 2014, 15(1):98-108. DOI:10.1038/ni.2768.
- [29] MILDNER A, JUNG S. Development and function of dendritic cell subsets [J]. *Immunity*, 2014, 40(5):642-656. DOI:10.1016 / j.immuni.2014.04.016.
- [30] Crozat K, Guiton R, Guilliams M, et al. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets [J]. *Immunol Rev*, 2010, 234(1): 177-198. DOI:10.1111/j.0105-2896.2009.00868.x.
- [31] ROMANI N, CLAUSEN B E, STOITZNER P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin[J]. *Immunol Rev*, 2010, 234(1):120-141. DOI:10.1111/j.0105-2896.2009.00886.x.
- [32] MERAD M, GINHOUX F, COLLIN M. Origin, homeostasis and function of Langerhans cells and other langerin-expressing dendritic cells [J]. *Nat Rev Immunol*, 2008, 8 (12): 935-947. DOI:10.1038/nri2455.
- [33] DOEBEL T, VOISIN B, NAGAO K. Langerhans cells - the macrophage in dendritic cell clothing [J]. *Trends Immunol*, 2017, 38(11): 817-828. DOI:10.1016/j.it.2017.06.008.
- [34] KAPLAN D H. Ontogeny and function of murine epidermal Langerhans cells[J]. *Nat Immunol*, 2017, 18(10):1068-1075. DOI:10.1038/ni.3815.
- [35] REIZIS B, BUNIN A, GHOSH H S, et al. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions[J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29:163-183. DOI:10.1146/annurev-immunol-031210-101345.
- [36] KUROTAKI D, KAWASE W, SASAKI H, et al. Epigenetic control of early dendritic cell lineage specification by the transcription factor IRF8 in mice[J]. *Blood*, 2019, 133 (17):1803-1813. DOI:10.1182/blood-2018-06-857789.
- [37] CISSE B, CATON M L, LEHNER M, et al. Transcription factor E2-2 is an essential and specific regulator of plasmacytoid dendritic cell development[J]. *Cell*, 2008, 135(1): 37-48. DOI:10.1016/j.cell.2008.09.016.
- [38] ITO T, KANZLER H, DURAMAD O, et al. Specialization, kinetics, and repertoire of type 1 interferon responses by human plasmacytoid predendritic cells[J]. *Blood*, 2006, 107(6):2423-2431. DOI:10.1182/blood-2005-07-2709.
- [39] ROBBINS SH, WALZER T, DEMBELE D, et al. Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling [J]. *Genome Biol*, 2008, 9(1): R171-7. DOI:10.1186/gb-2008-9-1-r17.
- [40] STEINMAN R M. Decisions about dendritic cells: past, present, and future [J]. *Annu Rev Immunol*, 2012, 30:1-22. DOI:10.1146/annurev-immunol-100311-102839.
- [41] SCHLITZER A, MCGOVERN N, TEO P, et al. IRF4 transcription factor-dependent CD11b+ dendritic cells in human and mouse control mucosal IL-17 cytokine responses [J]. *Immunity*, 2013, 38(5): 970-983. DOI:10.1016 / j.immuni.2013.04.011.

- [42] POULIN L F, REYAL Y, URONEN-HANSSON H, et al. DNGR-1 is a specific and universal marker of mouse and human Batf3-dependent dendritic cells in lymphoid and nonlymphoid tissues[J]. *Blood*, 2012, 119(25):6052-6062. DOI:10.1182/blood-2012-01-406967.
- [43] WEIH F, CARRASCO D, DURHAM S K, et al. Multiorgan inflammation and hematopoietic abnormalities in mice with a targeted disruption of RelB, a member of the NF-kappa B/Rel family[J]. *Cell*, 1995, 80(2):331-340. DOI: 10.1016/0092-8674(95)90416-6.
- [44] COLLIN M, MCGOVERN N, HANIFFA M. Human dendritic cell subsets [J]. *Immunology*, 2013, 140(1): 22-30. DOI:10.1111/imm.12888.
- [45] SEGURA E, AMIGORENA S. Inflammatory dendritic cells in mice and humans[J]. *Trends Immunol*, 2013, 34(9): 440-445. DOI:10.1016/j.it.2013.06.001.
- [46] LEÓN B, LÓPEZ-BRAVO ÍM, ARDAVÁN C. Monocyte-derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against *Leishmania*[J]. *Immunity*, 2007, 26(4):519-531. DOI:10.1016/j.immuni.2007.01.017.
- [47] GUTTMAN-YASSKY E, LOWES M A, FUENTES-DUCULAN J, et al. Major differences in inflammatory dendritic cells and their products distinguish atopic dermatitis from psoriasis[J]. *J Allergy Clin Immunol*, 2007, 119(5):1210-1217. DOI:10.1016/j.jaci.2007.03.006.
- [48] OTSUKA M, EGAWA G, KABASHIMA K. Uncovering the mysteries of Langerhans cells, inflammatory dendritic epidermal cells, and monocyte-derived Langerhans cell-like cells in the epidermis[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1768. DOI:10.3389/fimmu.2018.01768.
- [49] LIU K, VICTORA G D, SCHWICKERT T A, et al. *In vivo* analysis of dendritic cell development and homeostasis[J]. *Science*, 2009, 324(5925):392-397. DOI:10.1126/science.1170540.
- (收稿日期: 2020-05-06 修回日期: 2020-09-01)

(上接第 168 页)

物质质量和实验动物福利, 给科研人员制作并发放了《实验动物管理条例》《江苏省实验动物管理办法》《实验动物福利伦理审查指南》等宣传学习手册, 并以向科研人员宣讲实验动物相关知识、组织知识问答等多种形式, 在科研人员和广大医护工作中普及实验动物法律法规。另一个, 抓住重要契机开展特别活动, 如在《实验动物管理条例》颁布 30 周年之际开展以“纪念”为主题的科普宣传活动。

在今后的工作中, 为了更好地做好科研人员实验动物福利伦理教育工作, 动物实验中心需进一步完善新进科研人员实验动物技术培训及福利伦理教学实践制度, 提高科研人员动物实验素养, 进而达到既维护实验动物福利又得到准确可靠实验结果的目的。同时需进一步加强实验动物工作人员自身对动物福利内涵的认识和科研素养, 定期接受以实验动物福利规章制度、相关技术为主的培训, 通过言传身教影响科研人员, 也使得实验动物福利伦理教育、监督管理更加规范化、标准化。

参考文献:

- [1] 鹿双双, 师晓萌, 刘晓宇, 等. 实验动物福利伦理审查与

- 监管实践及探索[J]. *实验动物与比较医学*, 2020, 40(4): 339-343. DOI:10.3969/j.issn. 1674-5817.2020.04.011.
- [2] 鞠吉雨, 徐玉梅, 耿云峰, 等. 加强医学研究生实验动物福利教育的思考[J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(10): 94-97. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2018.10.016.
- [3] 王禄增, 李华, 王捷, 等. 通风、温度、湿度对实验动物福利的影响及控制[J]. *中国比较医学杂志*, 2004, 14(4):234-236.
- [4] 史小平, 李华, 王捷, 等. 噪声、光照和空气质量对实验动物福利的影响[J]. *实验动物科学与管理*, 2006, 23(3): 63-64.
- [5] 梅志强, 王琮, 邓莉. 动物福利在研究生实验动物学教学中的应用初探[J]. *中国比较医学杂志*, 2012, 22(3):76-78. DOI:10.3969/j.issn.1671.7856.2012.003.017.
- [6] 陈丽娟, 贾连群, 袁东超, 等. 医务工作者对实验动物福利认知的调查和分析[J]. *实验动物科学*, 2018, 35(4):74-78. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2018.04.014.
- [7] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物 福利伦理审查指南: GB/T 35892 — 2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.
- [8] 李军延, 刘帅. 实验动物环境丰富化[J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(3):327-330. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.03.020.
- [9] LEWEJOHANN L, SCHWABE K, H?GER C, et al. Impulse for animal welfare outside the experiment[J]. *Lab Anim*, 2020, 54(2):150-158. DOI:10.1177/0023677219891754.
- (收稿日期: 2020-07-22 修回日期: 2021-01-20)

《实验动物与比较医学》稿约

《实验动物与比较医学》创刊于 1981 年,系国内第一本实验动物科技领域的专业学术性刊物。本刊兼顾普及与提高,刊登实验动物和比较医学领域的研究新成果、新进展和各种信息,内容主要涉及人类疾病动物模型构建、实验动物资源开发与利用、实验动物管理、实验动物福利与伦理、动物实验技术与方法、实验动物医学、比较医学方法研究,以及实验动物应用于生物医药各领域的基础与应用研究,栏目包括专家论坛、研究论著、综述、经验交流、实践与探索、技术与平台、政策与法规、人物、简报、动态与书讯等。读者对象为生物学、医学、药学、动物学和农学等各领域从事实验动物生产、繁育、检测和管理以及应用实验动物进行比较医学研究的广大科技工作者、教育工作者和医学工作者。欢迎各方作者投稿。

1 稿件写作要求和注意事项

1.1 研究论著的内容必须构思有据、设计严密、材料标准(所用实验动物要注明品种、品系、等级、性别、年龄、体质量、来源、饲养环境,以及生产许可证、使用许可证和质量合格证编号)、方法可靠(动物实验需符合 3R 原则,并通过科研伦理审查)、数据精确且运用恰当的统计学方法分析处理,应在前人工作基础上有所发展,提供新知。

1.2 研究论著的内容一般按下列顺序分节排列:中文的标题、作者姓名及单位名称、结构式摘要和关键词,英文的文题、作者姓名及单位名称、摘要和关键词,引言,材料与方法,结果,讨论,参考文献。基金项目、第一作者和通信作者简介放在首页脚注位置,致谢等信息放在讨论之后。正文中各级标题层次按 1、1.1、1.1.1、…的形式排列。

1.3 论文题目力求简明、具体、确切,应能概括出文章要旨。中文题目字数一般以少于 20 个汉字为宜,尽量不使用非公知的缩略词。英文标题内容应尽可能与中文对应一致,且各个实词的首字母大写。中英文摘要应具有独立性和自明性,尽量完整、准确地呈现论文的主要内容。研究类论文的摘要撰写应采用 IMRAD 结构,即分目的、方法、结果和结论四部分。

1.4 正文中方法部分应介绍清楚,尤其是改进和创

新的方法及操作步骤,以便他人可重复。研究中所用试剂应注明生产厂家和批次,仪器应注明制造商和型号。实验分组应详细说明,应设空白对照、阴性对照及阳性对照。正文中结果叙述应与之前的方法称述相对应,并包含具体的统计学分析数据。有关实验结果的讨论性文字应放在讨论部分。

1.5 应用恰当的统计学方法,统计学符号按 GB/T 3358—2009《统计学词汇及符号》的有关规定书写。如:(1)正态分布的计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,非正态分布时用中位数 M (四分位数)表示;(2)计数资料的卡方检验应给出 χ^2 值;(3)两组比较的独立样本 t 检验应给出 t 值;(4)多组比较的 F 检验应给出 F 值,然后组内两两比较应用 LSD- t 检验和 SNK- q 检验等,给出相应的 t 值或 q 值;(5)相关性分析应给出相关系数 r 值;(6)差异是否有统计学意义应给出具体的 P 值范围。

1.6 图表分别按其在正文中出现的先后次序连续编码。每幅图表应有中英文对照的图(表)题,图表内容及注解文字是中文。整个图表及其注解应具有自明性。照片图要求有足够的清晰度和对比度,单张陈列。组织病理学照片还需注明放大倍数(或给出标尺)和染色方法。

1.7 计量单位按《中华人民共和国法定计量单位》要求书写,并以单位符号表示。数字执行 GB/T 15835—2011 标准中关于出版物上数字用法的规定,公历世纪、年代、年、月、日、时刻和计数、计量均采用阿拉伯数字表示。

1.8 科技名词应规范使用正确术语,药品名应用通用名(非商品名)。非常用缩略语需要在首次出现时按照“中文全称(英文全称,英文缩略词)”的格式介绍,后面直接用缩略语即可。

1.9 参考文献按 GB/T 7714—2015《信息与文献 参考文献著录规则》采用顺序编码制著录,依照其在正文中出现的先后顺序用阿拉伯数字加方括号上标在相应文字之后。文后参考文献的书写格式举例如下:

(1) 期刊:

[1] 顾祖曦,张超超,蔡贞贞,等. 动物实验信息化管理系统的开发和应用[J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36 (3):219-225. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2016.03.013.

[2] ZOU H, LIU M, LUAN Y, et al. Pattern of novel object exploration in cynomolgus monkey *Macaca fascicularis* [J]. *J Med Primatol*, 2017, 46(2):19-24. DOI:10.1111/jmp.12251.

(2) 专著:

[3] 邓小明, 姚尚龙, 于布为, 等. 现代麻醉学[M]. 4版. 北京: 人民卫生出版社, 2014:476-483, 503-509.

[4] DICKEY R P, BRINSDEN P R, PYRZAK R. 宫腔内人工授精与促排卵[M]. 全松, 陈雷宁, 译. 北京: 人民卫生出版社, 2011:19-30.

(3) 电子公告:

[5] 国家食品药品监督管理总局药品审评中心. 药物安全药理学研究技术指导原则[EB/OL]. (2014-05-13)[2020-05-01]. <http://www.cde.org.cn/zdyz.do?method=largePage&id=d281d6b63f249a51>.

(4) 标准:

[6] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 实验动物 福利伦理审查指南: GB/T 35892—2018[S]. 北京: 中国标准出版社, 2018.

(5) 学位论文:

[7] 张观坡. 谷氨酸兴奋毒性在糖尿病大鼠选择性 nNOS 神经元减少及胃轻瘫中的作用[D]. 上海: 第二军医大学, 2014.

(6) 专利:

[8] 邓欣, 白璐, 李森, 等. 一种小鼠卵巢分离及卵母细胞培养装置: CN201711455059.X[P]. 2017-12-28.

(7) 报纸:

[9] 黄辛. 写在人类基因组南方中心成立10周年之际[N]. 科学时报, 2008-11-19 (A2). <http://news.sciencenet.cn/htmlnews/2008/11/213385.html>.

(8) 会议论文集:

[10] 曾桂英, 金成, 任东青, 等. 电磁脉冲辐照引起小鼠免疫功能及脾脏超微结构的变化[C]. 宁波: 第七届全军防原医学专业委员会第五届中国毒理学会放射毒理专业委员会学术会议, 2004.

2 投稿要求及注意事项

2.1 请通过本刊官网 (<http://www.slarc.org.cn/dwyx>) 的在线投稿系统(官网首页左上角“作者投稿”)进行投稿, 投稿前请仔细阅读官网首页的“投稿指南”中相关说明。投稿时按照系统要求步骤填写所有正确信息。

2.2 来稿须是作者独立取得的原创性成果, 无抄袭、泄密、一稿多投和署名争议问题, 且保证文稿涉及的所有实验材料、方法和结果数据均真实可信。本刊杜绝第三方代投、代写行为。如发现来稿涉及学术不端行为, 将撤稿处理, 并通报作者单位。

2.3 作者署名及单位信息需在投稿时确认, 后期不再接受调整与修改。在线投稿时请填写所有署名作者的完整信息, 并在文稿末尾说明所有署名作者的贡献情况。

2.4 本刊严格施行三审三校制度。作者投稿后可在线查询审稿进度, 若有疑问可直接联系编辑部。作者如欲改投他刊, 请先与本刊联系说明。退修稿件逾期3个月作者未回复时, 视作自动撤稿。

2.5 依照《著作权法》有关规定, 本刊可对录用稿件做文字方面的编辑加工(修改或删节)。凡有涉及原意的修改, 会请作者审核; 送印前, 还会请作者认真校对清样。逾期未回复者视为同意修改。

2.6 本刊为中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊), 并入编国内外多个重要数据库。作者向本刊投稿, 即视为愿意将著作财产权(包括但不限于复制权、发行权、翻译权、汇编权、改编权、信息网络传播权等)授予本刊, 而且本刊有权将上述权利转授给第三方, 不同意入编或上网者请预先声明。

2.7 本刊对所有来稿免收审稿费, 但需要作者按要求提交必要材料, 如单位审核同意后的投稿介绍信、科研伦理审查表等。稿件确认录用后, 需付论文发表费, 并签署版权转让协议书。稿件刊出后, 编辑部一次性支付稿酬(包含所有版权转让的报酬), 并赠当期杂志2册。

2.8 本刊官网可实现网络首发及优先在线出版, 作者如有需要可在投稿时说明。新刊出版后, 作者可通过本刊官网、中国知网、万方、维普和超星等多家数字平台进行文献检索。本刊官网上还可免费下载所有过刊文献。

2.9 本刊联系地址: 上海市金科路3577号,《实验动物与比较医学》编辑部(邮政编码: 201203)。电话: (021) 50793648-81018, 50793657。E-mail: bjb50793657@163.com。投稿咨询QQ群号: 750879769。

《实验动物与比较医学》编辑部