

# 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3期(总第187期)

2021年6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 周年专题: 各地实验动物科学发展

#### 黑龙江省实验动物管理现状与发展对策

李宝龙, 王玉娥, 司昌德, 李昌文, 刘怀然, 郭守利, 韩凌霞,  
刘景利, 李永明, 陈洪岩 .....181

#### 山西省实验动物资源共享服务平台建设现状及发展对策

张锐虎, 王春芳, 宋国华, 陈朝阳 .....190

### 创刊 40 周年专题: 标准与指南

#### 2020 版美国兽医协会动物安乐死指南解析

卢 今, 张 颖, 潘学营, 王 剑, 严国锋, 周 晶, 朱 莲,  
陈学进, 李 垚, 庞万勇 .....195

### 论著: 实验动物与精神医学

#### 从脑胃 ghrelin 通路探讨应激对大鼠食欲的影响

赵怡玲, 高鹏飞, 肖 茜, 张 岚, 潘丹青, 徐月妹 .....207

### 论著: 人类疾病动物模型

#### 松果体损伤大鼠模型 3 种制备方法的比较研究

王丹妮, 宋美卿, 杨 铃, 冯玛莉 .....215

#### 人脑胶质瘤大鼠移植模型的初步建立

谭邓旭, 吴朋朋, 赵 勇, 师长宏, 葛 煦 .....220

#### 肝螺旋杆菌感染对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠慢性结肠炎模型的影响

吴志浩, 沈 宸, 殷 俊, 朱立麒, 张 泉 .....226

#### 慢性间歇性低氧模型大鼠的甲状腺功能分析

田 慧, 高 隆, 王泽辉 .....232

#### 高原多脏器功能障碍综合征藏麻猪模型 C 反应蛋白及炎性因子的变化

肖 攀, 牛廷献, 罗晓红, 王红义, 郭晓宇, 陆 璐, 冯小明 .....238

论著：实验动物与中医药

苦参素对实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠 Th1/Th2 细胞平衡及相关通路的影响  
姚 婷，高 原，曾芳馨 .....244

实验动物设施与技术

两种不同类型实验动物屏障设施的气流组织计算流体力学模拟技术分析  
周 斌，赵 勇，汪亚兵，刘吉宏 ..... 252

实验动物管理

人工繁育恒河猴的肺炎链球菌携带状况调查及分析  
刘 雨，李艳艳，张 伟，杨凤梅，刘 权，李咏洁，靳玮华，段素琴，王俊斌，陈丽雄，徐鸿界，  
赵 远，和占龙 ..... 259

教育教学实践

基于互联网交互平台三明治教学法在医学实验动物学教学中的应用  
魏 盛，耿希文，徐凯勇，胡明会，周苗苗，李自发 ..... 266

《实验动物与比较医学》杂志 2022 年征订启事 .....189  
致谢本刊支持单位 ..... 194  
祝贺本刊编委周洁研究员荣获第三十三届上海市优秀发明金奖 ..... 206  
《实验动物与比较医学》杂志有关实验动物福利伦理内容的说明 ..... 270  
《实验动物与比较医学》创刊四十周年献礼——封面集锦 .....英文目次页后插页  
广告 .....封二，前插 1～10，封三，封底

期刊基本参数: CN 31-1954/Q\*1981\*b\* 大 16\*90\*zh\*P\*¥ 10.00\*2000\*13\*2021-06

|        |     |     |     |           |     |     |     |
|--------|-----|-----|-----|-----------|-----|-----|-----|
| 本期执行编委 | 李 垚 |     |     |           |     |     |     |
| 本期审稿专家 | 陈 丽 | 傅江南 | 高 诚 | 郝智慧       | 何曼莉 | 侯 栋 | 李 舸 |
|        | 李 垚 | 庞万勇 | 施 恩 | 孙德明       | 孙 强 | 王建飞 | 王 婧 |
|        | 王可洲 | 王玉娥 | 吴宝金 | 姚 明       | 张 周 | 郑志红 | 周光兴 |
|        | 周正宇 |     |     | (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 3

June 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: bjb50793657@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: Development of Laboratory Animal Science Across China

Current Situation and Development Countermeasures of Laboratory Animal

Management in Heilongjiang Province

LI Baolong, WANG Yu'e, SI Changde, LI Changwen, LIU Huairan, GUO Shouli,

HAN Lingxia, LIU Jingli, LI Yongming, CHEN Hongyan .....181

Status and Development Countermeasures of Laboratory Animal Resource Sharing

Service Platform Construction in Shanxi Province

ZHANG Ruihu, WANG Chunfang, SONG Guohua, CHEN Zhaoyang .....190

### 40 Anniversary: Standards and Guidelines

A Brief Interpretation of AVMA Guidelines on Euthanasia of Animals: 2020 Edition

LU Jin, ZHANG Ying, PAN Xueying, WANG Jian, YAN Guofeng, ZHOU Jing,

ZHU Lian, CHEN Xuejin, LI Yao, PANG Wanyong .....195

### Original Article: Laboratory Animals and Psychologic Medicine

Effects of Stress on Appetite in Rats Through Hypothalamus and Stomach Ghrelin Pathway

ZHAO Yiling, GAO Pengfei, XIAO Qian, ZHANG Lan, PAN Danqing, XU Yuemei .....207

### Original Article: Animal Models of Human Diseases

Comparative Study of Three Pineal Gland Injury Model in Rats

WANG Danni, SONG Meiqing, YANG Qian, FENG Mali .....215

Establishment of a Xenograft Model of Human Glioma in Rats

TAN Dengxu, WU Pengpeng, ZHAO Yong, SHI Changhong, GE Xu .....220

Effect of *Helicobacter hepaticus* Infection on Chronic Colitis Induced by Dextran

Sulfate Sodium

WU Zhihao, SHEN Chen, YIN Jun, ZHU Liqi, ZHANG Quan .....226

Thyroid Function of Chronic Intermittent Hypoxia Rat Model

TIAN Hui, GAO Long, WANG Zehui .....232

Changes of C-reactive Protein and Inflammatory Factors in Juema Pig Model with

High Altitude Multiple Organ Dysfunction Syndrome

XIAO Pan, NIU Tingxian, LUO Xiaohong, WANG Hongyi, GUO Xiaoyu,

LU Lu, FENG Xiaoming .....238

### Original Article: Laboratory Animal and Traditional Chinese Medicine

Effects of Matrine on Th1/Th2 Balance and Related Pathways in Rats with

Experimental Autoimmune Thyroiditis

YAO Ting, GAO Yuan, ZENG Fangxin .....244

### Facilities and Techniques for Laboratory Animals

Analysis on Air Distribution by Computational Fluid Dynamics Simulation in Two

Types of Laboratory Animal Barrier Facilities

ZHOU Bin, ZHAO Yong, WANG Yabing, LIU Jihong .....252

### Laboratory Animal Management

Analysis on Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Captive Rhesus Macaques

LIU Yu, LI Yanyan, ZHANG Wei, YANG Fengmei, LIU Quan, LI Yongjie,

JIN Weihua, DUAN Suqin, WANG Junbin, CHEN Lixiong, XU Hongjie,

ZHAO Yuan, HE Zhanlong .....259





陈洪岩, 男, 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所研究员、博士生导师, 实验动物与比较医学创新团队资深首席、国家禽类实验动物资源库主任、兽药评价中心主任。兼任黑龙江省实验动物专业标准化技术委员会主任, 黑龙江省实验动物学会理事长, 农业农村部兽用生物制品 GMP、GCP 检查员。主持各类课题近百项, 发表论文百余篇, 主编、副主编著作 9 部, 授权专利 12 项、标准 16 项、软件著作权 2 项。获得省科技进步二、三等奖各 2 项。培育出具有独立知识产权的中国 SPF 鸡、鸭、猪资源, 应用于重大动物疫病如禽流感、非洲猪瘟等研究, 在疫病防控中发挥重要作用; 研制出实验室生物安全及实验动物相关设备近 20 种; 牵头制定的实验动物地方法规通过省人大立法。目前主要从事实验动物与比较医学研究, 以及兽药 GMP、GCP 研究, 承担国家重点研发计划项目“畜禽疫病防控专用实验动物开发”“生物安全型 IVC 的研发”“生物安全型换笼工作台的研发”等课题, 以及省自然科学基金重点项目“SPF 鸭种质资源创新与新品种选育”等研究工作。

李宝龙, 男, 教授, 医学博士, 药学博士后, 硕士生导师。现任黑龙江中医药大学药物安全性评价中心副主任、医学实验动物学教研室主任。主要从事医学实验动物学、药物安全性评价教学和科研工作。兼任黑龙江省实验动物学会副理事长, 黑龙江省实验动物专业标准化技术委员会副主任委员, 中国民族医药学会药理与毒理分会常务理事。主编专著《中药药物安全性评价》和规划教材《实验动物》, 副主编规划教材《食品毒理学》。以第一作者或通信作者发表 SCI 或核心期刊论文超 28 篇。



## 黑龙江省实验动物管理现状与发展对策

李宝龙<sup>1,2</sup>, 王玉娥<sup>1</sup>, 司昌德<sup>1</sup>, 李昌文<sup>1</sup>, 刘怀然<sup>1</sup>, 郭守利<sup>3</sup>, 韩凌霞<sup>1</sup>, 刘景利<sup>4</sup>, 李永明<sup>5</sup>, 陈洪岩<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院哈尔滨兽医研究所, 国家禽类实验动物资源库, 黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室, 哈尔滨 150069; 2. 黑龙江中医药大学药物安全性评价中心, 哈尔滨 150040; 3. 哈尔滨医科大学附属第二医院实验动物中心, 哈尔滨 150001; 4. 哈尔滨维科生物技术有限公司, 哈尔滨 150069; 5. 哈尔滨工业大学生命科学与技术学院, 哈尔滨 150001)

**[摘要]** 实验动物作为生命科学研究、医药发展不可替代的基础支撑条件及战略性生物资源, 其重要性日益显现。本文在总结国内实验动物行业发展的基础上, 重点分析、阐述了黑龙江省实验动物发展现状及管理上存在的问题, 并提出了发展对策。通过完善黑龙江省实验动物相关法规、规章, 加强行政许可管理, 改善生产条件, 提升质量, 保障运输与供应, 支持实验动物科学研究, 促进人才培养, 加强生物安全管控, 从而驱动实验动物行业发展, 提高其对生物医药行业的支撑保障能力, 为促进地方经济、社会、民生乃至科技发展作出应有的贡献。

**[关键词]** 黑龙江省; 实验动物; 管理; 对策

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-0181-09

## Current Situation and Development Countermeasures of Laboratory Animal Management in Heilongjiang Province

LI Baolong<sup>1,2</sup>, WANG Yu'e<sup>1</sup>, SI Changde<sup>1</sup>, LI Changwen<sup>1</sup>, LIU Huairan<sup>1</sup>, GUO Shouli<sup>3</sup>, HAN Lingxia<sup>1</sup>, LIU Jingli<sup>4</sup>, LI Yongming<sup>5</sup>, CHEN Hongyan<sup>1</sup>

(1. Harbin Veterinary Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, National Laboratory

**[基金项目]** 国家重点研发计划(2017YFDO501600)

**[作者简介]** 李宝龙(1973—), 男, 医学博士, 教授, 研究方向: 实验动物学教学与管理。E-mail: LB173@163.com

**[通信作者]** 陈洪岩(1963—), 男, 农学博士, 研究员, 研究方向: 实验动物与比较医学。E-mail: chenhongyan@caas.cn

*Poultry Animal Resource Database, Heilongjiang Provincial Key Laboratory of Laboratory Animals and Comparative Medicine, Harbin 150069, China; 2. Drug Safety Evaluation Center, Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 3. Laboratory Animal Centre, Second Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, China; 4. Harbin WeiKe Biotechnology Co., Ltd., Harbin 150069, China; 5. Life Science and Technology College, Harbin Institute of Technology, Harbin 150001, China)*

Correspondence to: CHEN Hongyan, E-mail: chenhongyan@caas.cn

**[Abstract]** As an irreplaceable basic support and strategic biological resource for the development of life science research and medicine, laboratory animals are becoming more and more important. Based on present domestic laboratory animal industry development, this review expounded the development status and management problems of laboratory animals in Heilongjiang Province. This article also provided development countermeasures, such as improving the local laws and regulations pertaining to laboratory animals, strengthening the administrative licensing management, improving production conditions and quality, ensuring transportation and supply, supporting laboratory animal scientific research, promoting talent training, and strengthening biosafety control. These measures are proposed to drive the development of the laboratory animal industry, improve its support and guarantee for the biomedical industry, and make contribution to local economy, society, people's livelihood, and even the development of science and technology.

**[Key words]** Heilongjiang Province; Laboratory animal; Management; Countermeasure

实验动物是支撑科技进步与创新不可或缺的战略生物资源,是国家科技基础条件平台建设的重要组成部分,是国家保持科技领先、提高国际科技竞争力的核心要素之一。目前,实验动物及其相关技术已经成为发达国家和地区科技界高度关注和大力投入的重要领域,实验动物科技发展水平也成为体现国家科技实力的表现之一。

## 1 我国实验动物行业现状

我国实验动物行业发展与管理正快速进步。现代分子生物学、基因组学、蛋白质组学、代谢组学、基因修饰技术、生物净化技术等先进技术的应用,以及多学科研究成果在实验动物领域的不断渗入,极大地推动了我国实验动物行业与管理水平的快速发展,在短时间内取得了令国际同行赞叹的发展速度和公认的成就;其中一些重要研究方向已与国际接轨,有些研究领域已与发达国家和地区处于相同水平。实验动物行业的发展有力支撑和保障了生物、医药等行业快速发展,成效巨大<sup>[1]</sup>。目前,我国实验动物管理基本实现了法制化与科学监管,政府高度重视,能够集中优势力量解决重要问题;常用实验动物生产能力稳步提升,区域性规模化生产特征明显;

实验动物资源新品种(品系)大幅度增加,硬件及技术积累比较扎实;质量标准体系与评价技术日臻完善;实验动物质量明显提升,开放共享不断推进;动物模型创新与利用快速发展,并迅速带动生物、医药等行业进步;实验动物福利与伦理受到广泛关注;数字化、信息化等大数据建设前景可期<sup>[2]</sup>;人才培养、培养及专业教育体系基本建成,人力资源储备及能力提升明显;受我国经济、社会、科技发展长期向好趋势影响,实验动物资源与动物实验市场需求潜力巨大,实验动物学科与实验动物资源优势明显。

然而,在科学研究的深度和广度呈现空前发展的态势下,我国实验动物科学及实验动物管理仍滞后于生物、医药等领域的创新研究及相关产业发展的需要,在诸多方面还需要改进、加强和提高。具体表现在:实验动物的管理、质量、技术标准及检测网络体系不够健全;实验动物及动物模型资源不够丰富,质量不高;生产供应商品化程度还需要进一步提高;种质资源平台及共享机制不健全;动物实验不规范;伦理福利研究重视不够;比较医学和转化医学研究潜力不足;人才培养、培养及专业继续教育体系不健全;数据和信息共享不佳;财政性投入不足等。

在实验动物管理方面,不同地区实验动物发展及实验动物管理还存在一定的差异。例如,在实验动物行政许可审批及质量监督管理方面,2010年云南省(云南省第十一届人民代表大会常务委员会公告[2010]第20号)将昆明市行政区域内的实验动物许可证的审批权下放至昆明市政府,由市科技行政部门负责行政区域内的实验动物许可证管理工作<sup>[3]</sup>;浙江省曾将省级机构以外的行政许可审批管理权下放到省内各地市,后又收回;2019年4月按照天津市人民政府(津政发[2019]6号)要求,市科技行政部门向滨海新区科技行政部门委托下放实验动物许可证核发事项权责(仍然由天津市科技行政部门发证)<sup>[4]</sup>;贵州省一度取消行政许可审批管理,为贯彻落实《贵州省人民政府关于调整行政许可事项的决定》(省政府令第198号)<sup>[5]</sup>,后又在省政务服务大厅增设行政许可事项;陕西、湖南、安徽等省依据本地特点也制定了相应的管理政策<sup>[6-8]</sup>。再如,在专项经费方面,全国很多省、自治区、直辖市对实验动物行业都有持续性的投入。北京市科技行政部门设立实验动物管理办公室(动管办),有固定的办公场所、专职人员和办公经费,并且每年投入专项经费用于实验动物科学研究和质量检测;上海市科技行政部门设立专门的实验动物行政许可管理、科学研究、检验检测机构,负责实验动物监督管理、科学研究、质量检测及实验动物期刊出版,经费比较充足、稳定;广东省设立专门的事业单位即实验动物监测所,每年投入经费用于办公运行、质量检测及科研专项;吉林省设立动管办,配备专职人员及专门经费。

## 2 黑龙江省实验动物行业现状

### 2.1 近年黑龙江省实验动物行业取得的重要成绩

近年来,黑龙江省实验动物行业在促进经济发展,服务社会与民生,支撑科技进步方面发挥了重要作用。同时,实验动物行业自身也取得了长足的进步。例如,中国农业科学院哈尔滨兽医研究所(简称哈兽研)在严重急性呼吸综合征、禽流感、高致病性蓝耳病、非洲猪瘟、新冠肺炎等病毒致病机制、动物模型建立以及疫苗研究中,均发挥了重要的支撑保障作用;黑龙江中医

药大学(简称中医大)实验动物中心为新药研发提供了有力支撑;哈尔滨医科大学(简称哈医大)实验动物学部为器官移植、心血管系统疾病研究、药理学研究提供了重要的条件保障。哈兽研建成了1.7万平方米的屏障、隔离环境国家禽类实验动物资源库(属于基础支撑与条件保障类国家科技创新基地,是我国7个国家实验动物资源库之一),建设了1.8万平方米的屏障、隔离环境疫病病原感染动物实验设施即生物安全2<sup>+</sup>级动物实验室(animal biosafety level 2<sup>+</sup>, ABSL-2<sup>+</sup>)和2.0万平方米的ABSL-3、ABSL-4实验室,建设了中国农业科学院实验动物与比较医学科技创新团队和农业农村部实验动物质量监督检验检测中心(哈尔滨)。中医大建成了0.4万平方米的药物GLP(good laboratory practice)实验室。哈医大累计建成了1.4万平方米的实验动物与动物实验中心。

黑龙江省在实验动物研究方面也取得了丰富成果,如自主培育出中国SPF鸡、鸭、猪等。特别是SPF猪,在重大动物疫病非洲猪瘟防控研究中发挥了重要作用;同时,研发出犬、猪等系列病毒学检测试剂盒,创制出兔、鸡、犬、猪、羊、牛等系列疫病病原感染动物模型,制作出转基因鸡、猪,研发出实验室生物安全及实验动物相关设备20余种。

### 2.2 实验动物法制化建设及管理稳步推进

黑龙江省在实验动物法制化方面也走在了全国的前列。继北京市、湖北省、云南省之后,黑龙江省是第4个对实验动物进行地方立法管理的省份<sup>[9]</sup>。

黑龙江省最早在1989年由省卫生行政部门发放“医学实验动物合格证”,1999年改由省科技行政部门发放“实验动物合格证”,2002年改为“实验动物许可证”(由省科技行政部门发放及管理)。根据本省经济、科研乃至教育发展的实际情况,许可证的管理工作本着首次“基本条件即通过”的原则,采取了“扶上马,送一程,再规范”的办法,使被许可单位的实验动物管理工作逐步走向规范化,增强了信心,发挥了示范作用,效果良好<sup>[10-11]</sup>。到2006年,完成了“扶上马,送一程”的过程。2007—

2008年经过“再规范”，黑龙江省的实验动物许可证管理工作与国内发达省份基本保持一致。自2009年1月起《黑龙江省实验动物管理条例》实施，实验动物发展进入第四阶段，即管理的法制化、规范化、标准化、科学化发展阶段。截至2020年底，黑龙江省共颁发“实验动物生产许可证”22个，“实验动物使用许可证”49个，涉及企事业单位50家，近十年总体平稳。尽管许可证数量不多，但农业实验动物（特指马、牛、羊、猪、貂、禽等来源于畜禽养殖，并主要应用于农业的实验动物）生产、使用、检验、研究特色突出，疫病病原感染动物实验设施（ABSL-2<sup>+</sup>）等占比大，单体建筑体量大，是行业内少见的，也成为黑龙江省实验动物行业的一个明显特色。

### 2.3 科技经费投入情况

在实验动物科技经费投入方面，黑龙江省科技行政部门2003—2012年设立实验动物专项经费，每年100万元，另有20余万元的实验动物管理经费。2013年实验动物专项经费增加到500万元，之后暂停。近15年来，地方科技攻关、自然科学基金、国家项目配套等科技经费累计支持实验动物方面约800万元，省、市两级政府支持实验动物与动物实验设施建设经费累计约1.2亿元。财政性专项科技经费对于推动全省的实验动物科技发展，以及促进人才培养发挥了积极作用。

## 3 黑龙江省实验动物管理存在的主要问题

### 3.1 法规、规章有待进一步完善

《黑龙江省实验动物管理条例》经黑龙江省第十一届人民代表大会常务委员会第六次会议通过，于2008年12月颁布，2009年1月实施<sup>[12-13]</sup>。条例实施之后经历过几次小修，又于2016年立项进行修订研究，2019年完成，但目前尚未启动人大修订程序。

### 3.2 应进一步规范实验动物行政许可管理

2014年3月，省科技行政部门将本省实验动物行政许可审批下放到省内13个市（行署）科技行政部门（黑科发[2014]24号）<sup>[14]</sup>。为切实做好本省实验动物行政许可审批与监督管理工作，应努力提高行政许可管理水平，进一步规范行政

许可管理工作。

### 3.3 黑龙江省实验动物生产与供应问题比较突出

黑龙江省实验动物生产与供应问题主要体现在：市场活力不足，实验动物生产与使用量不大；缺乏区域性生产供应中心，尤其是实验兔、豚鼠生产能力不足；远离省会地区的实验动物供应半径大的问题长期得不到解决等。

### 3.4 实验动物使用管理需要加强

在实验动物使用方面，部分企事业单位的实验动物质量控制、动物实验条件、管理水平下滑；一些单位不申领许可证，或以小范围、小规模动物实验设施的使用许可代表法人单位全部的动物实验行为许可，存在违规使用实验动物的情况；部分已申领许可证的重点单位管理不规范；使用的实验动物、环境设施、饲料、垫料质量不合格；从业人员培训不足等。

### 3.5 对实验动物质量检测及检测试剂标准化重视不够

实验动物质量检测科目偏少，质量检测人员业务水平有待提高，检测研究能力偏弱，质量检测机构业务优势不够突出等，这些均是目前质量检测机构存在的内在问题；而质量检测业务量不多，政府购买质量检测服务有限，检测试剂质量及标准化程度偏低等，是质量检测机构面临的外在问题。

### 3.6 地方标准研究与制定需要加强

实验动物行政许可管理主要依据检测机构出具的检测报告及组织专家现场检查。实验动物相关标准对实验动物及其设施各项指标进行了明确的规定，是检测机构出具报告的重要依据，也是专家现场检查的主要技术支撑。目前，国家标准、行业标准的制定和修订跟不上发展要求、标准总体覆盖面不全等问题仍非常突出，特别是农业实验动物标准缺乏，严重影响重大动物疫病、重要人兽共患病、外来疫病的防控技术研究以及生物制品的研发、生产及检验。加强地方标准的研究制定工作，是实验动物标准化工作的重要补充<sup>[15]</sup>。

### 3.7 生物安全管控需要进一步加强

当前在实验动物生物安全管理上仍存在很多问题，例如硬件、软件、人员、管理条件不达标，实验动物质量不合格，外环境管理不善致使

野生啮齿动物、昆虫等进入设施,基因修饰动物的使用在管理上存在薄弱环节,单位对实验动物质量自检能力不足,教学用动物存在质量不高、来源不清楚、缺少检测、管理不足等现象,使用实验动物单位不申领许可证或许可范围以小盖全,部分药企实验动物管理下滑等。这些问题说明,在实验动物管理上,生物安全隐患依然不少,需要加强生物安全管控。

### 3.8 人才培养工作需要继续加强

目前实验动物从业人员学历、专业素质对比生物医药等行业相对偏低,这仍然是影响实验动物行业发展的重要因素之一。因此,人才培养工作需要继续加强。

## 4 黑龙江省实验动物发展对策与建议

### 4.1 实验动物相关法规有待进一步完善

由于《黑龙江省实验动物管理条例》对本省实验动物管理及发展至关重要,为规范实验动物生产、使用管理,适应区域性经济、社会 and 科技发展对实验动物管理的更高要求,建议立即启动对地方条例的人大修订程序。

《黑龙江省实验动物许可证申请工作须知》、《黑龙江省实验动物许可证认证工作程序》和《黑龙江省实验动物许可证检查验收规则》(黑科发[2005]110号)施行了16年,已不适应当下管理的需要。建议立项开展《黑龙江省实验动物许可证检查验收规则》修订研究。本省实验动物有关专家已经对许可证验收规则中存在的问题进行了广泛、多次讨论,并取得了很多共识,启动修订工作的条件已经成熟。

### 4.2 进一步规范实验动物行政许可管理

为切实做好本省实验动物行政许可审批与监督管理工作,应努力提高行政许可管理水平,建议采取如下措施。

#### 4.2.1 加强监管

黑龙江省科技行政部门应加强对实验动物行业的管理,切实承担起行业主管及监督工作,统一组织专家队伍,重视质量检测和监督工作,指导各市(行署)做好行政许可管理,并应立足长远,把工作重点放在推动实验动物行业向更高、更好方向发展,以更好发挥其对本省经济、

社会、民生和科技的支撑保障作用。国内发达省、自治区、直辖市都高度重视实验动物工作,并从中获得了巨大的益处。国务院经过几轮的简政放权改革,实验动物行政许可依然保留,充分说明其重要性。因此,建议本省科技主管部门应在实验动物行政许可管理上常抓不懈,努力完善实验动物管理。

#### 4.2.2 提高实验动物质量监督管理水平

提高行政许可管理能力,保持人员稳定。提高质量检测水平,适当增加检测科目。在各实验动物机构很少开展自检的现实情况下,适当增加政府委托检测机构开展的检测频次。提高检查验收专家的业务水平。

#### 4.2.3 落实专项经费

《中华人民共和国行政许可法》第五十八条规定,行政机关实施行政许可和对行政许可事项进行监督检查,不得收取任何费用。行政机关实施行政许可所需经费应当列入本行政机关的预算,由本级财政予以保障,按照批准的预算予以核拨。因此,实施实验动物行政许可所需的监督管理、委托检测等经费,应当列入预算,由财政予以长期稳定保障。

#### 4.2.4 认真贯彻落实新标准、新规定

认真贯彻落实新标准、新规定,提升实验动物设施条件,提高设施管理水平,规范许可证管理,从而总体提高实验动物质量,跟上全国发展步伐,以切实保障实验动物与动物实验质量在时空上的一致性。

#### 4.2.5 实事求是,科学对待实验动物行政许可审批及质量监督管理

实验动物质量涉及微生物、寄生虫、遗传、病理、饲料营养和环境设施共6个方面,同时涵盖质量检测、种子管理、隔离检疫、运输管理、饲养管理等诸多环节,每一环节均有严格的质量控制要求。实验动物行政许可管理具有专业性和技术性强的特点,因此,需要专业的行政管理、质量检测及专家团队进行技术支撑。

黑龙江省实验动物行政许可审批数量少,地域分散。实验动物行政审批下放后,除哈尔滨市外,其他各市(行署)均没有具有资质的实验动物质量检测机构,缺少专家技术支撑,还要配

置专门的行政管理人员和专项经费。这实际上增加了行政成本与执行难度,造成行政资源浪费和管理水平不高,这几年的实践也证明了这一点。因此,应该本着实事求是的精神,科学对待实验动物行政许可审批及质量监督管理。由省科技行政部门统一管理,更有利于全省一盘棋,统筹、整合全省实验动物相关资源,通过不断加大对实验动物工作的资金支持力度,提高行政管理水平,才能真正为黑龙江省生物、医药研究及相关产业的发展提供坚实的条件支撑。

#### 4.2.6 加强监管,杜绝生物安全、动物福利与伦理方面存在的隐患

实验动物行业涉及生物安全、转基因生物安全、动物福利与伦理,尽管通过高技术条件、高水平管理可以基本避免不良乃至灾难性事故的发生,但也并不是绝对的安全。例如,有高校使用不合格实验动物造成科技人员感染流行性出血热病毒,某高校师生多人感染布氏杆菌等事件,教训深刻。这些均凸显了加强实验动物管理、保证实验动物质量、提高生物安全管控能力的重要性。实验动物行政许可审批下放,市(行署)科技行政部门负责许可证的发放和监管,地区之间的差异化管理也会使生物安全隐患加重。因此,进行全省实验动物的统一监管,加强日常管理,强化行政审批,更有利于杜绝生物安全、转基因生物安全、动物福利与伦理方面的隐患。

#### 4.2.7 施行实验动物许可证后补制度

国内部分地区为了鼓励实验动物有关单位申领许可证,杜绝无证生产、使用问题,激励实验动物管理优良单位和从业人员,施行实验动物许可证后补贴制度,收效很好,建议借鉴。

### 4.3 改善生产条件,扩大生产能力,提高实验动物质量,保障运输与供应

针对实验动物生产与供应存在的问题,应采取积极的引导政策,建立灵活的机制,以引导CRO(contract research organization)企业入驻等方式刺激医药企业复苏,聚拢医药企业进入,从而促进实验动物生产与使用;出台后补贴、奖励优秀等政策,鼓励实验动物生产企业改善条件、扩大生产能力、提高质量,进而满足供应;采取激励实验动物运输、减少远端实验动物使用

量等措施,缓解大半径运输困难的问题。

本省科研、疫苗生产与检验等对SPF鸡种卵需求量每年约350万枚。我国二十多家SPF鸡场每年用于种群更新的种卵约30万枚。未来五年SPF鸭种卵需求量每年约40~50万枚。按照目前非洲猪瘟疫情防控形势,推测疫苗免疫应是重要的防控手段。制作非洲猪瘟病毒基因缺失活疫苗需要使用60日龄左右的SPF仔猪长骨髓中的巨噬细胞,每头猪可生产6万份疫苗( $10^{6.5}$ 拷贝/mL)。全国每年按出栏生猪7亿头计算,每头猪免疫二次,需要使用SPF猪2.3万头,加上安全、有效性检验等用SPF猪,每年需要生产、检验用SPF猪约3.0万头,推算需要父母代SPF种猪2000头。因此,充分发挥位于哈尔滨的“国家禽类实验动物资源库”和相关设施的优势,生产供应种用SPF鸡/鸭卵、SPF种猪,并且扩大商用SPF鸡/鸭种卵、SPF仔猪,可以很好地提升实验动物的生产能力。

本省用于禽流感等禽用疫苗生产的非免疫(无抗)鸡种卵年需求量约1.8亿枚,东北地区年需求量约3.5亿枚;用于猪用疫苗生产与检验的非免疫(无抗)猪年需求量约1.4万头,东北地区年需求量约2.9万头。建设辐射东北地区的非免疫(无抗)鸡种卵及非免疫(无抗)猪生产设施,对于满足禽、猪用疫苗生产的原材料需求,提高疫苗质量,保障疫苗的生产非常重要,经济效益也会比较可观。由省科技行政部门牵头积极与省农业农村行政部门沟通,努力将用于兽用生物制品研究、生产、检验的非免疫(无抗)农用动物,例如猪、鸡等,纳入实验动物管理范畴,不仅可以提高标准化水平、保证质量,而且可以推动这些动物质量标准的制定,有利于动物疫苗企业顺利认证;更重要的是,可以在很大程度上扩大实验动物的生产与使用总量,使实验动物行业得到进一步发展。

### 4.4 加强实验动物使用管理

针对实验动物使用中存在的问题,应加强实验动物使用管理,规范实验动物使用行为,认真落实有关法规、规章及标准,推动改善动物实验条件,提高动物实验及管理水平,保障动物实验的质量。

落实在科研项目申报及结题、科研成果奖项评审、学位论文答辩等活动中涉及动物实验活动的“一票否决”制度,规定:“应用不合格的实验动物、使用未经许可的实验设施,或者主要从业人员没有经过相应的专业培训,或者忽视实验动物福利的单位和个人,取得的动物实验结果无效,科研项目不得申报、结题,科研成果评奖不予受理,学位论文答辩不得进行,论文不得发表,生产的产品不得出售,检验报告不得签发”。此项措施既能有效提高科技人员对实验动物的认识水平,进一步规范动物实验管理,又能有效遏制科研不端行为,还能使实验动物管理全面覆盖,会收到实实在在的效果。目前,国家自然科学基金、重点研发等项目已有相应规定,并有可能加强或进一步完善。

应重视、规范高校教学用动物的使用管理,规范采购,提高使用动物质量,加强检疫及质量检测,确保教学安全。昔日的教训历历在目,应引以为戒,并切实采取措施。

#### 4.5 重视实验动物质量检测,努力推进检测试剂标准化

针对实验动物质量检测存在的问题,检测机构应苦练内功,多参与比对和能力验证,积极开展检测技术研究,以此提升机构的整体业务能力,提高质检人员业务水平。充分挖掘并发挥农业农村部实验动物质量监督检验测试中心(哈尔滨)在农业实验动物质量检测方面的专业特长,积极拓展质量检测市场及质量检测科目,主动寻求与各省质量检测机构间的质量检测业务与科研合作,寻求与实验动物机构的委托检测合作,从而使质量检测机构自身得到发展。

实验动物质量检测试剂的标准化对于实验动物的标准化十分重要。我国对于实验动物质量检测试剂的需求量很大,目前部分进口,部分由各检测机构自行研制、少量生产。对于实验动物的微生物、寄生虫学检测技术来说,通过新兽药申报、获得生产权、生产出质量合格的检测试剂是非常值得期待的,但是新兽药申报难度大又使得很多机构望而却步。位于哈尔滨的动物用生物制品国家工程研究中心的产品研发、孵化、新药申报平台及诊断试剂 GMP (good manufacture

practice) 生产线具有先天优势,可以在实验动物创新团队、部省实验动物质量检测机构研究的基础上,联合国内其他实验动物研究团队,进行实验动物质量检测试剂的标准化研发、孵化、新兽药申报及 GMP 生产工作,为解决我国实验动物质量检测试剂质量不高、供应困难等问题打开一条新路,这既有社会效益、科学意义,又能产生较好的经济效益。

#### 4.6 提升实验动物科技水平,整体推动实验动物发展

科技创新是行业发展的驱动力,应高度重视实验动物科技的发展。实验动物科学研究的主线是不断丰富实验动物资源,核心工作是实验动物标准化、提高质量与服务水平,基础是实验动物科技共享平台,保障是实验动物管理体系(包括组织机构体系、政策法规体系、质量保障体系等)。实验动物行业的主要作用是支撑生物、医药行业的发展,长期默默无闻,在争取科研项目、人才发展方面都面临挑战。建议省科技行政部门恢复设立实验动物专项,并在省、市有关科技项目中设立实验动物专题,使实验动物行业呈现勃勃生机,以科技创新驱动实验动物行业整体发展,进而保障生物、医药行业的大发展。

#### 4.7 重视地方标准研究与制定工作

实验动物许可证是开展兽药实验室研究、药物非临床评价(即 GLP)、临床试验(即 good clinical practice, GCP)、生产(即 GMP)的前置条件。没有相关标准就没有发放实验动物许可证的技术依据,就不能很好地开展生物制品、中药、化学药的实验室研究,也就不能开展 GLP、GCP、GMP,产品无法生产上市。各省在颁发行政许可时面临无标准可依的现状,黑龙江省尤其突出,通过制定地方标准来弥补是目前通常的做法。北京市实施了实验动物地方标准发展 5 年计划,每年支持 200 万元用于 30~40 项地方标准的制定。吉林省近 5 年制定了实验动物地方标准 6 项,每项支持研究经费 5 万元。黑龙江省近几年已经制定并颁布了 12 项实验动物地方标准,还有 12 项地方标准在报批中,但这些地方标准都是在科研人员没有研究经费支持的情况下制定的。要继续鼓励和调动科研人员积极从事地

方标准的制定和修订研究,利用3~5年时间完成50~60项地方标准的制定修订,解决实验动物许可证发放中急需的标准问题。政府立项支持,或者采取后补贴形式支持是非常必要的。

#### 4.8 支持实验动物有关科技共享平台建设及运行

黑龙江省实验动物有关科技平台包括:国家禽类实验动物资源库、中国农业科学院实验动物与比较医学科技创新团队(即黑龙江省实验动物与比较医学重点实验室)、农业农村部实验动物质量监督检验测试中心(哈尔滨)(即黑龙江省实验动物质量监督检验站)、工业和信息化部基因编辑系统与技术重点实验室、动物用生物制品国家工程研究中心、黑龙江省遗传改变模式动物重点实验室、中医大药物安全性评价中心、哈兽研兽药评价中心等。建议支持国家平台继续做强,保持国内领先,迈向世界一流;支持检验检测机构加强能力建设,提高业务水平,参与实验室比对和国际能力验证;支持创新团队、省重点实验室、药物评价中心、工程中心开展创新性研究,切实保障和推动生物、医药科技与产业发展;同时,支持立项建立省级实验动物科技创新中心、药物评价动物实验技术标准化研究中心、基因修饰动物模型工程研究中心等。

#### 4.9 加强生物安全管控

我国生物安全法<sup>[6]</sup>已颁布实施,其中实验动物生产和使用的很多环节涉及生物安全。实验动物生物安全管理控制是对实验动物可能产生的潜在风险或现实危害的防范和控制,以及对环境产生的生物安全等问题和风险的控制。实验动物在生产、使用过程中存在被病原体感染、繁殖病原体的可能,以及病原体向环境扩散的危险。实验动物对人和环境产生的生物安全问题还包括基因修饰动物在制作、使用、交流过程中存在基因向环境扩散及污染的可能。主要生产环节包括引种、保种、繁育、饲养管理、运输、进出口;使用环节包括动物饲养管理、实验操作、废弃物处理,以及进行病原感染动物实验。另外,还有培育、研究、质量检测环节,以及基因修饰动物制作、使用和交流等<sup>[17]</sup>。在实验动物管理中,这些环节可能会存在许多生物安全隐患,应引起足够的重视,并切实采取措施,确保生物安全。

#### 4.10 鼓励实验动物相关企业发展

中医大、哈医大、哈兽研等单位的新药研发与评价水平在国内处于领先地位,完全可以中药、西药、兽药研发为引领,形成“三驾马车”的格局。

学习苏州工业园区生物纳米科技园、苏州太仓生物医药产业园、江苏泰州医药园区、上海张江高新技术产业开发区、浙江台州现代医药高新技术产业园区的经验,从实验动物角度支持医药研发与评价单位,再进一步完善高等级、稀缺实验动物与动物实验支撑平台,筑巢引凤,吸引医药CRO、兽药GLP及GCP企业,打造药物研发和评价“硅谷”,进而吸引众多医药企业入驻,形成医药产业集群,促进医药产业的大发展,使得实验动物产业的引领、聚拢效应得到充分体现。

#### 4.11 加强人才培养

培养和打造一支高水平实验动物专家队伍,切实加强本省实验动物从业人员培训,重视各类专业培训及继续教育。实验动物行业专业技术性强,人员素质要求高,从业人员培训不可忽视,培训力度和水平不可降低。有计划的培训可让从业人员在工作中不断进步,提升专业水平,从根本上保证实验动物行业的健康发展。

通过地方学会积极开展有关学术活动,激发青年学者的科研热情;通过实验动物行政许可检查示范锻炼青年学者;通过科技项目的实施,特别是通过设立青年专项促进人才培养等,都是实践已证明的好办法,应该继续坚持下去。

**致谢:** 李根平、褚晓峰、耿志宏和袁宝等学者为本文的撰写提供了帮助,在此一并致以感谢!

#### 参考文献:

- [1] 王锡乐, 巩薇, 胡建武, 等. 我国实验动物科技工作发展的政策支撑与思考[J]. 实验动物科学, 2020, 37(4):64-68. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2020.04.013.
- [2] 姜鲲, 刘聪林. 实验动物科技信息数据管理创新研究——以湖北省实验动物公共服务平台为例[J]. 科技创业月刊, 2020, 33(7):69-71. DOI:10.3969/j.issn.1672-2272.20200431.
- [3] 云南省第十一届人民代表大会常务委员会. 云南省人民代表大会常务委员会关于授予昆明市行使有关经济

- 社会行政管理权的决定:云南省第十一届人民代表大会常务委员会公告第 20 号[A].(2010-03-26).
- [4] 天津市人民政府. 天津市人民政府关于向滨海新区下放市级权力事项的通知:津政发[2019]6号[A]. (2019-02-28).
- [5] 贵州省人民政府. 贵州省人民政府关于调整行政许可事项的决定: 贵州省人民政府令第198号[A]. (2020-12-30).
- [6] 师长宏, 刘恩岐, 张海. 陕西省实验动物工作近 10 年发展历程[J]. 实验动物与比较医学, 2021, 41(1):14-16. DOI: 10.12300/j.issn.1674-5817.2021.011.
- [7] 刘聪林, 陈瑞, 姜鲲. 湖北省实验动物管理现状、问题及对策[J]. 科技创业月刊, 2021, 34(1):97-99. DOI:10.3969/j.issn.1672-2272.202007069.
- [8] 李舜, 童琳, 武昌俊, 等. 安徽省实验动物使用和生产单位管理现状调查和分析[J]. 科教文汇, 2020(27):111-113. DOI:10.16871/j.cnki.kjwhc.2020.09.048.
- [9] 巩和凌子, 孔琪, 刘江宁. 国内外实验动物法制化管理现状比较[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(9):71-75. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.09.013.
- [10] 陈洪岩, 周英玉, 夏长友, 等. 黑龙江省实验动物科技事业的未来发展(下)[J]. 畜牧兽医科技信息, 2005(1):46-47. DOI:10.3969/j.issn.1671-6027.2005.01.042.
- [11] 陈洪岩, 夏长友, 周英玉, 等. 探索黑龙江省实验动物发展中存在问题的解决方案[J]. 畜牧兽医科技信息, 2004(11):43-45. DOI:10.3969/j.issn.1671-6027.2004.11.036.
- [12] 黑龙江省第十二届人民代表大会常务委员会. 黑龙江省实验动物管理条例[A]. (2008-10-17).
- [13] 黑龙江省实验动物管理委员会办公室. 贯彻落实《黑龙江省实验动物管理条例》工作思路[J]. 畜牧兽医科技信息, 2008(12):49-50. DOI:10.3969/j.issn.1671-6027.2008.12.031.
- [14] 黑龙江省科学技术厅. 关于下放实验动物行政许可证申请工作须知: 黑科发〔2014〕24号[A]. (2014-03-30).
- [15] 贺争鸣, 李根平, 陈梅丽, 等. 实验动物地方标准的查新和确认机制的建立及地方标准的应用[J]. 实验动物科学, 2017, 34(2):44-50. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2017.02.010.
- [16] 第十三届全国人民代表大会常务委员会. 中华人民共和国生物安全法[A]. (2020-10-17).
- [17] 刘丽艳, 韩艳梅, 李文超, 等. 实验动物潜在生物安全威胁及降低风险的建议[J]. 实验技术与管理, 2020, 37(2): 264-266, 278. DOI:10.1679/j.cnki.sig.2020.02.064.
- (收稿日期: 2021-03-01 修回日期: 2021-04-21)

\*\*\*\*\*

## 《实验动物与比较医学》杂志 2022 年征订启事

iii

《实验动物与比较医学》(CN 31-1954/Q, ISSN 1674-5817)由上海科学院主管,上海市实验动物学会和上海实验动物研究中心联合主办,是我国实验动物与比较医学领域创刊最早的一本专业学术期刊。本刊目前是中国科技论文统计源期刊(即中国科技核心期刊),并被美国“Chemical Abstracts”、中国核心期刊数据库、中国科技期刊数据库、中国生物医学文献数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊网和万方医学网等收录,2020年入选中国医师协会发布的中国医药卫生“核心期刊”目录。

本刊兼顾理论与实践、普及与提高,刊登实验动物和比较医学领域的研究及应用新成果、新进展、新信息。期刊内容主要涉及人类疾病动物模型、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,以及以实验动物为基础的生物医药各领域基础与应用研究。设置栏目包括专家论坛、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、标准与指南、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。欢迎订阅!

本刊为双月刊,大16开,彩色铜版印刷;全年共6期,每期定价30元/本,全年共180元/套。读者可通过各地邮局订阅,邮发代号为4-789;也可以联系本刊编辑部购买,联系电话:021-50793657。E-mail:bjb50793657@163.com。编辑部地址:上海市浦东新区金科路3577号(邮编201203)。期刊官网地址: <http://www.slarc.org.cn/dwyx>。

《实验动物与比较医学》编辑部



陈朝阳, 教授, 硕士生导师, 山西医科大学实验动物中心副主任, 山西省实验动物学会常务理事、秘书长, 山西省环境诱变学会理事。兼任中国实验动物学会理事, 中国实验动物学会实验动物资源鉴定工作委员会委员, 《中国实验动物学报》和《实验动物科学》编委。主要从事实验动物资源的开发与利用、人类疾病动物模型的建立与评价等工作。先后参加国家科技支撑计划 2 项, 国家自然科学基金项目 5 项; 主持山西省科技基础条件平台项目 2 项, 承担山西省自然科学基金等省级课题 4 项。参编国家卫计委“十二五”规划教材 3 部; 发表论文 30 余篇, 其中 SCI 收录 6 篇; 获批国家专利 4 项。获山西省科技进步二等奖和三等奖各 2 项, 省教学成果二等奖 2 项; 获中国实验动物学会科学技术奖二等奖 1 项、三等奖 2 项; 获中国实验动物学会 2014 年度优秀青年人才奖。

## 山西省实验动物资源共享服务平台建设现状及发展对策

张锐虎<sup>1,2</sup>, 王春芳<sup>1,2</sup>, 宋国华<sup>1,2</sup>, 陈朝阳<sup>1,2</sup>

(1. 山西医科大学实验动物中心, 太原 030001; 2. 实验动物与人类疾病动物模型山西省重点实验室, 太原 030001)

[摘要] 本文从资源建设、共享服务和人才培养等方面, 对山西省实验动物资源共享服务平台的建设情况进行总结, 并结合国内先进发达地区的建设经验和未来的发展趋势, 对山西省实验动物资源共享工作中存在的问题进行了深入剖析, 为平台建设和发展提出对策和方向。

[关键词] 实验动物; 资源; 共享服务; 对策建议; 山西省

[中图分类号] Q95-33; R-332 [文献标志码] A [文章编号] 1674-5817(2021)03-0190-05

### Status and Development Countermeasures of Laboratory Animal Resource Sharing Service Platform Construction in Shanxi Province

ZHANG Ruihu<sup>1,2</sup>, WANG Chunfang<sup>1,2</sup>, SONG Guohua<sup>1,2</sup>, CHEN Zhaoyang<sup>1,2</sup>

(1. Experimental Animal Center of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China.; 2. Shanxi Key Laboratory of Experimental Animal Science and Animal Model of Human Diseases, Taiyuan 030001, China)

Correspondence to: CHEN Zhaoyang, E-mail: ccytycn@163.com

[Abstract] The construction of Shanxi Laboratory Animal Resource Sharing Service Platform was summarized in terms of resource development, sharing services and talent cultivation. Combining with the advanced construction experience of developed regions and future development trends, an in-depth analysis of the problems existing in the platform construction was carried out, and the countermeasures and directions were proposed for the construction and development of the platform.

[Key words] Laboratory animal; Resource; Sharing service; Countermeasures; Shanxi Province

实验动物资源平台包括动物资源、技术资源以及与之相配套的环境设施、仪器设备和专业人才等, 在促进生命科学研究和生物医药发展中具

有重要的支撑和保障作用, 对科技进步和社会经济发展有明显的推动作用<sup>[1]</sup>。我国从 1998 年开始, 陆续开展了实验动物种质资源开发、整合及

[基金项目] 山西省科技基础条件平台建设专项 - 山西省实验动物资源共享服务平台(201805D141008-3)

[作者简介] 张锐虎(1978 -), 男, 硕士, 实验师, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: 337119092@qq.com

[通信作者] 陈朝阳(1972 -), 男, 硕士, 教授, 研究方向: 人类疾病动物模型。E-mail: ccytycn@163.com

标准化研究,建立了国家级实验动物种子中心、特色动物与模式动物开发平台等,基本形成了实验动物资源专业化研发、集约化生产和社会化供应的运行体系,促进了实验动物资源的开发、使用和共享<sup>[2]</sup>。

山西省实验动物资源的建设和共享工作与国内发达省份相比,存在一些明显的不足,例如:基础设施条件差、缺少先进的科研设备以及高素质的专业人才;实验动物品系少、产量低、质量不稳定;缺乏共享意识和机制;信息化建设落后,查询渠道不畅等。这些问题严重制约了山西省实验动物学科和相关产业的发展<sup>[3]</sup>。为此,山西省科技厅自2016年起,以基础设施条件较好,具有生产供应传统,长期开展教学、科研及相关服务,拥有相对完善人才队伍的山西医科大学实验动物中心为依托,建立了一个集实验动物资源供应、模型资源研发与整合、动物实验与技术服务、人才教育与培养,以及信息搜集与查询为一体的实验动物资源共享服务平台(下文简称“平台”),为全省实验动物学科和相关科研与产业的发展提供了基础支撑条件。

## 1 平台建设现状

### 1.1 资源建设

#### 1.1.1 基础设施建设

标准的环境设施是生产高质量实验动物和开展高水平科学研究的基础条件。2017年起,平台在改造原有3 000 m<sup>2</sup>实验动物生产、实验设施的基础上,又增建了200 m<sup>2</sup>的清洁级大鼠、小鼠实验室和500 m<sup>2</sup>的普通级实验兔、豚鼠生产设施,具备了常用清洁级大鼠、小鼠、中国仓鼠和普通级实验兔、豚鼠等5类实验动物的生产供应能力以及开展相应动物实验的条件。为满足全省实验动物的供应和实验需求,平台从2018年开始在山西医科大学中都校区规划建设一个建筑面积达14 000 m<sup>2</sup>的实验动物设施,预计2021年底投入使用。

#### 1.1.2 资源开发与整合

从2007年开始,山西医科大学实验动物中心陆续研发制作了Gal、GFP、Mir31共3个基因

修饰动物。针对本中心自行培育的中国仓鼠近交系,宋国华教授团队根据颊囊的免疫逃避特性,从2014年开始研究建立了口腔颊囊黏膜癌模型<sup>[4]</sup>;陈朝阳教授团队自2016年起利用血糖筛选并通过定向培育的方法,初步建立了中国仓鼠自发性2型糖尿病动物模型<sup>[5-6]</sup>;张锐虎等<sup>[7]</sup>在2018年对中国仓鼠进行了生物净化,微生物、寄生虫控制达到了清洁级国家标准。另外,从2017年开始,平台与省药品检定所、省肿瘤研究所及中国辐射防护研究院等单位联合开发了37种人类疾病动物模型,制定了相应的操作规范、评价方法,并对模型的应用领域提出了建议。2018年与相关实验动物研究机构或使用单位签订合作框架协议,引入了B6/JNjuH11-em1Cin (Collal-iCre)、B6/JNju-H11-em1Cin (Cdh5-iCre)和B6/JNju-H11-em1Cin (KRT5-iCre)等27种工具鼠,进行保存与共享;根据科研需求与国内一家实验动物平台交换引进了C57BL/6-APOE<sup>-/-</sup>、C57BL/6-P53<sup>+/+</sup>等基因工程小鼠。

#### 1.1.3 能力建设

从2016年开始,平台陆续建立了与实验动物有关的环境、遗传、病理、营养、微生物和寄生虫检测实验室,配置了氨浓度检测仪、PCR仪、病理切片机、倒置显微镜、蛋白检测仪等检测设备,修订了操作规程。

#### 1.1.4 制度建设

2017年制定了屏障环境的设备使用与维护、人员物品进出、实验动物饲养繁育等管理制度和操作规程,为动物生产和实验提供了制度保障和操作细则。为有效整合资源、促进开放共享,建立了与平台运行有关的设施开放与使用、资源整合与共享、绩效考核与激励等一系列规章制度。

### 1.2 共享服务

#### 1.2.1 资源供应

自平台建设以来,通过加大常用实验动物品种品系的引进,制定科学合理的生产组织方案,维持合理年龄、性别结构的供应群体,提高了空间利用率,降低了生产成本,增加了供应数量。同时积极整合外部资源,拓宽采购渠道,丰富供应品种品系,平台的服务保障能力显著增强。2017—2019年的具体资源供应情况详见表1。

表 1 2017—2019 年山西省实验动物资源共享服务平台主要动物及相关物品供应和服务单位情况

Table 1 Supply of main animals and related articles and service agencies on the Shanxi Laboratory Animal Sharing Service Platform in 2017-2019

| 年度   | SD 大鼠 / 只 | ICR 小鼠 / 只 | 近交系动物 / 只 | 实验兔 / 只 | 饲料 / kg | 垫料 / kg | 服务单位 / 家 |
|------|-----------|------------|-----------|---------|---------|---------|----------|
| 2017 | 6 090     | 25 963     | 2 067     | 3 623   | 12 480  | 1 217   | 45       |
| 2018 | 9 669     | 31 252     | 6 553     | 4 005   | 17 379  | 2 026   | 53       |
| 2019 | 12 622    | 35 141     | 7 359     | 4 150   | 22 648  | 2 516   | 79       |

注：供应的近交品系动物主要指中国仓鼠、C57BL/6J 小鼠、BALB/c 小鼠等。

### 1.2.2 科研服务

通过开放接受、管家服务、技术跟踪等方式使在平台开展的实验能在较短时间内高质量地完成，显著提高了实验质量和实验室的利用率。通过招标、部门共享、有偿租用等方式丰富了平台的科研设备，提高了实验的科技含量和数据采集的准确性。2017—2019 年在平台完成和在研的实验项目共计 164 项，其中国家级资助 35 项、省级资助 47 项、其他类型资助 82 项，服务单位 66 家。从中国知网查询的数据显示，2017—2019 年度使用本平台开展实验发表的期刊论文数为 350 篇，博士、硕士论文数为 135 篇；而由 Scienedirect 搜索 “the Experimental Animal Center of Shanxi Medical University”，所得论文数量为 356 篇（表 2）。

### 1.2.3 信息共享

平台网站设立了管理制度、政策法规、质量标准、动物订购、资源信息、平台服务、许可证管理等模块，并与山西省科技基础条件平台、中国实验动物信息网、国家自然科技资源平台的实验动物资源库等链接，实现了学科建设、科研前沿和产业发展等内容的及时更新，以及基础数据、专业知识和供求信息的实时查询。借助

山西医科大学实验动物供应微信群将全省范围的实验动物使用者和全国相关的实验动物生产单位联系起来，为本地区实验动物资源供求信息、相关知识、操作技能和经验心得等方面的分享交流提供了平台。

### 1.2.4 质量检测

在完成对平台环境和动物质量自检的同时，还承担了对全省实验动物生产、使用单位环境和动物质量的相关检测工作，每年检测 20 多家，出具报告 40 余份。全省 37 家相关单位已有 23 家通过验收，取得了实验动物生产或使用许可证<sup>[3]</sup>。

## 1.3 人才培养与教育培训

### 1.3.1 平台人才建设

通过组织相关人员参加国家、区域性的学术、管理研讨会和实验技能培训，以及返岗后的汇报演示，为平台的建设和发展注入了新思想和新技术。近年来先后引进博士后 1 名、博士 2 名和硕士 1 名，他们在转录组学、胚胎移植、转基因、免疫学等方面的科研经历，使平台队伍的专业组成更加完善，为平台的创新发展注入了新活力。

### 1.3.2 从业人员培训

近年来，平台针对全省实验动物从业人员，从政策法规、管理制度、设施维护、饲养管理、实验技术和模型制作等方面每年组织 2 次培训。目前已举办 9 期，累计参加 370 余人次。对利用平台开展动物实验的人员，通过录像教学、现场示教以及网上课件等方式进行相关方面的培训，迄今已完成 458 人次。对在校师生，平台邀请国内外知名专家举办培训或专题讲座 6 期，累计参与 450 多人次。这些教育培训活动覆盖了全省的高校、科研院所、企事业单位等，促进了从业人员的交流沟通，拓宽了工作视野，提升了工作技能。

表 2 2017—2019 年山西省实验动物资源共享服务平台相关论文发表

Table 2 Papers related to Shanxi Laboratory Animal Sharing Service Platform published in 2017-2019

| 年度   | 期刊论文 / 篇 | 博硕论文 / 篇 | Scienedirect / 篇 |
|------|----------|----------|------------------|
| 2017 | 109      | 37       | 93               |
| 2018 | 107      | 39       | 103              |
| 2019 | 134      | 59       | 160              |
| 合计   | 350      | 135      | 356              |

## 2 影响资源共享的问题分析

经过数年的努力,基本建成了山西省实验动物生产供应基地、特色实验动物资源研发中心、实验动物人才培训基地和屏障环境检测机构,为山西省医学、生命科学研究和相关产业发展提供了资源、技术和人才支撑。但目前还存在一些影响平台建设和制约资源共享的因素。

### 2.1 硬件设施落后

标准化的生产、实验设施还比较缺乏,不能全面和及时地满足教学、科研、生产等需求。平台科研仪器配备不到位,动物资源的研发设备欠缺,尚不具备完整的动物活体实验体系及配套的科研设备,难以满足多样化、高水平的科研需求。

### 2.2 共享意识不强,共享机制落后

资源整合过程中各单位存在自我保护、占有意愿强等问题,对其社会属性认识不够,共享意识弱,在进行资源搜集、整理时有不配合现象,阻碍了平台对这些资源的整合以及后续联合开发的力度,导致利用率低,影响使用和推广。缺乏资源共享的管理经验、公开透明的信用评价机制,缺少必要的经费支持,以及重科研轻服务的考核体制,均使得平台工作人员促进资源整合和共享的意愿不强,不愿主动地去了解目标单位的基本情况与需求,不愿积极地去发掘自身的服务潜能,影响了资源共享的工作进展。

### 2.3 服务能力和水平有待进一步提升

平台工作人员接受继续教育和培训的机会较少,原有的知识结构、专业技能跟不上科技发展的需求。另外,尚缺乏相关的绩效激励机制和政策,容易造成人才流失,尤其是高水平技术人才紧缺。现有设备管理不到位、维护不及时、使用不规范,造成运行不稳定,影响了设备正常功能的发挥和数据采集的准确性。

## 3 发展对策

山西省实验动物资源共享服务平台的建设要坚持以促进共享为目的,通过基础设施建设、资源整合开发、共享机制完善和人才培养等途径,将平台建设成为区域性的资源保存、开发与供应基地,开展高水平科学研究的场所,以及科

研设备、技术服务、资源信息的共享中心。

### 3.1 加强体制、机制建设,促进共享

加大实验动物资源共享工作的宣传力度,通过网络、科普、论坛、消息推送等形式将实验动物资源的社会属性以及在科学研究、日常生活中的重要作用进行宣传。在落实接受委托、提供条件、协作整合等工作的基础上,积极探索更多适合平台实际的资源整合与共享的办法和途径,逐步形成集成式、个性化、管家式的实验动物资源共享服务体系。制定更加合理有效的运行机制,加强责任考核和绩效激励政策的执行,在充分整合资源和调研需求的基础上,畅通共享服务中的衔接、运行、保障等环节,切实推进共享服务工作有序运行<sup>[8]</sup>。

### 3.2 加强设施、设备的建设与整合

从设施建设、仪器配套、人才保障等方面持续加大平台的建设力度,借助新实验动物设施的建设,提前做好规划布局,引入市场化的经营管理理念,充分发挥设施的共享作用,提高使用效率。加大动物资源和模型资源的引进、开发和繁育工作,形成多品系、高标准的生产供应基地,满足全省实验动物使用需求。建设涵盖多学科、专业化的实验平台,加大科研设备尤其是动物活体科研设备的建设、整合力度,形成具备开展基因工程动物、模型动物研发和不同微生物控制级别、不同种类动物实验的在体科研,以及细胞、组织、分子生物学等离体实验的设备条件等。

### 3.3 加强信息化建设

加大对全省和平台服务单位的动物资源、设施设备、科研方向等信息的采集力度,搜集整理常用动物资源的遗传背景、基础数据和应用范围等基本信息,建立适合本区域的信息数据库。加大与全国尤其是周边省份实验动物生产和使用单位的信息交流,加强与省科技厅、教育厅等主管部门的沟通,及时汇总并发布,让广大从业人员及时了解相关信息。

### 3.4 加强技能培养,提升服务能力

在原有线下交易、现场办理结算的基础上,积极开辟网上导引、支付、物流配送等新的服务模式,扩大服务范围,提高服务效率和水平。通过多学科、高层次专业人才的引进和技能培训,

建立能够实现基础设施平稳运行、动物资源开发共享且实验操作技能娴熟的专业团队,满足科技发展对专业人才的需求。从全省科研院所、企事业单位中聘请理论功底深厚、专业技术过硬、工作经验丰富的人员组成平台学术委员会;同时建立培养基地,通过培训讲座、现场观摩、线上学习等形式,使从业人员在扩大知识面的同时,及时了解到最新的科研动态等。争取通过诸如国际实验动物评估与认可委员会(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care, AAALAC)、中国合格评定国家认可委员会(China National Accreditation Service for Conformity Assessment, CNAS)等对实验动物相关方面的资格认证/认可,以及符合药物非临床研究质量管理规范[又称良好实验室规范(good laboratory practice, GLP)]要求,扩大服务范围,提升服务能力。

## 4 结论

山西省实验动物资源共享服务平台经过几年的建设,基本完成了对全省实验动物和模型动物资源的搜集、整理工作,并进行了部分整合,建成了实验动物资源开发供应基地、动物实验平台和从业人员培训基地,为教学、科研和生产等活动提供了资源和技术支撑,促进了山西省科研水平的提升和相关产业的发展,也为中西部地区建设适合本地区发展需求的实验动物资源共享服务平台提供了一定的实践探索经验。

## 参考文献:

- [1] 李会萍,王晓明,杨锦淳,等. “互联网+”实验动物资源共享服务平台模式研究[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(9): 69-73. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2018.09.012.
- [2] 赵心刚,卢凡,程苹,等. 我国实验动物资源建设的问题与展望[J]. 中国科学院院刊, 2019, 34(12):1371-1378. DOI:10.16418/j.issn.1000-3045.2019.12.006.
- [3] 庞文彪,续国强,陈朝阳,等. 山西省实验动物工作现状及对策建议[J]. 实验动物与比较医学, 2019, 39(1):61-64. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2019.01.012.
- [4] 皇甫冰,庞文彪,张锐虎,等. 中国地鼠口腔颊囊黏膜癌模型的建立及癌变的动态观察[J]. 癌变·畸变·突变, 2016, 28(1):56-59,65. DOI:10.3969/j.issn.1004-616x.2016.01.012.
- [5] WANG L, WANG C, ZHANG R, et al. Phenotypic characterization of a novel type 2 diabetes animal model in a SHANXI MU colony of Chinese hamsters[J]. Endocrine, 2019, 65(1):61-72. DOI:10.1007/s12020-019-01940-x.
- [6] WANG C, YU J, ZHANG R, et al. Small intestine proteomics coupled with serum metabolomics reveal disruption of amino acid metabolism in Chinese hamsters with type 2 diabetes mellitus[J]. J Proteomics, 2020, 223:103823. DOI: 10.1016/j.jprot.2020.103823.
- [7] 张锐虎,王晨阳,王璐,等. 中国地鼠的剖宫产净化[J]. 实验动物科学, 2020, 37(4):1-4,9. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2020.04.001.
- [8] 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.

(收稿日期: 2020-12-10 修回日期: 2021-04-30)

\*\*\*\*\*

## 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



庞万勇, 博士, 中国实验动物学会常务理事, 兼中国实验动物学会实验动物医师工作委员会主任委员和实验动物福利伦理专业委员会秘书长, 中国合格评定国家认可委员会 (CNAS) 实验动物专业委员会委员; 美国实验动物医学学会认证的实验动物专科兽医 (DACLAM), 中国实验动物学会认证的实验动物高级医师和中国兽医病理学家分会认证的兽医病理学家, 国际实验动物评估和认可委员会 (AAALAC) 认证委员。毕业于中国农业大学动物医学院, 获得兽医病理学硕士学位; 随后于爱尔兰国立都柏林大学兽医学院获得博士学位, 并在丹麦哥本哈根大学从事实验动物医学博士后研究。2011 年加入赛诺菲公司全球研发中心, 负责公司在亚太区的动物实验和福利相关事务。

2016 年起隶属于赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台, 负责公司在全球范围内动物实验外包和合作业务的动物福利合规事务, 并于 2015 年 6 月起协调公司在中国的临床前安全评价事务。

## 2020 版美国兽医协会动物安乐死指南解析

卢 今<sup>1</sup>, 张 颖<sup>2</sup>, 潘学营<sup>3</sup>, 王 剑<sup>1</sup>, 严国锋<sup>1</sup>, 周 晶<sup>1</sup>, 朱 莲<sup>1</sup>, 陈学进<sup>1,4</sup>, 李 莹<sup>1</sup>, 庞万勇<sup>5</sup>

(1. 上海交通大学医学院实验动物科学部, 上海 200025; 2. 北京海关, 北京 100026; 3. 上海益诺思生物技术股份有限公司, 上海 201203; 4. 香港中文大学 (深圳) 生命与健康学院, 深圳 518172; 5. 赛诺菲公司全球研发中心转化体内模型研究平台, 北京 100022)

**[摘要]** 巴比妥酸盐及其衍生物的过量注射是绝大多数动物种类首选的安乐死方法, 然而在此类药物不能或很难获得时, 兽医可参考美国兽医协会现行版《动物安乐死指南》(AVMA Guidelines for the Euthanasia of Animals) (简称《指南》) 选用其他合适的安乐死方法。2020 版《指南》根据最新的研究文献, 对现有的安乐死方法、技术和药物进行补充及修改。本文总结了 2020 版《指南》的更新内容, 并在此基础上归纳列举了适用于常见实验动物种类的首选安乐死方法、条件性接受安乐死方法和不可接受的安乐死方法, 另外简述了实施动物安乐死的基本原则和注意事项。

**[关键词]** 实验动物; 安乐死; 可接受性安乐死方法; 条件性接受安乐死方法; 注意事项

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-0195-12

### A Brief Interpretation of AVMA Guidelines on Euthanasia of Animals: 2020 Edition

LU Jin<sup>1</sup>, ZHANG Ying<sup>2</sup>, PAN Xueying<sup>3</sup>, WANG Jian<sup>1</sup>, YAN Guofeng<sup>1</sup>, ZHOU Jing<sup>1</sup>, ZHU Lian<sup>1</sup>, CHEN Xuejin<sup>1,4</sup>, LI Yao<sup>1</sup>, PANG Wanyong<sup>5</sup>

(1. Department of Laboratory Animal Science, School of Medicine, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200025, China; 2. Beijing Customs District P.R.China, Beijing 100026, China; 3. Shanghai Innostar Biotechnology Co., Ltd., Shanghai 201203, China; 4. School of Life and Health Sciences, Chinese University of Hong Kong (Shenzhen), Shenzhen 518172, China; 5. Translational In Vivo Model Research Platform, Sanofi G&D, Beijing 100022, China)

Correspondence to: PANG Wanyong, E-mail: pang1yong@outlook.com

**[Abstract]** Overdose of injectable barbiturates or barbituric acid derivatives is the most preferred euthanasia method for the majority of animal species. However, these controlled drugs have limited access, and in this case or in any other scientific concerns, veterinarians may choose alternative, conditional acceptable methods as recommended by American Veterinary Medical Association (AVMA) Guidelines for the Euthanasia of Animals. In the newest 2020 Edition, existing euthanasia methods, techniques and agents of euthanasia are updated according to recently released articles. This article summarized the updated content of the new version of the AVMA Guidelines and on this basis, enumerated the most preferred methods of euthanasia,

**[作者简介]** 卢 今(1990—), 女, 兽医学硕士, 研究方向: 实验动物医学。E-mail: ashleelu@shsmu.edu.cn

**[通信作者]** 庞万勇(1974—), 男, 兽医学博士, 研究方向: 实验动物医学。E-mail: pang1yong@outlook.com

methods acceptable with conditions and unacceptable methods to euthanize different animal species. In addition, principles and precautions related to animal euthanasia were also briefly described.

**[Key words]** Laboratory animal; Euthanasia; Acceptable euthanasia methods; Euthanasia methods acceptable with conditions; Precautions

在实验动物研究领域,随着动物福利水平的总体提升,如何对实验动物实施安乐死正逐步引起人们的重视。一系列“指南”和“法规”的出台,使实验动物安乐死相关的定义及操作得到了规范。在实验动物饲养及使用机构对动物相关研究计划进行评估时,实验动物安乐死方法的选择以及具体实施方案是极为重要的部分。选择合适的动物安乐死方法不但要能最大限度地减少动物死亡过程中所承受的痛苦,而且还要考虑到对操作人员心理的影响。制定实验动物安乐死程序时,要从研究目标和种属特异性的角度选择适当的操作方法及药物,同时兼顾操作便利性及人员安全等多方面因素。

针对动物安乐死,美国兽医协会(American Veterinary Medical Association, AVMA)出版了一系列参考资料,对动物安乐死的相关内容进行了解析和阐述。现行的3部AVMA指南分别为2020年出版的《AVMA动物安乐死指南》、2019年出版的《AVMA动物群体扑杀指南》和2016年出版的《AVMA动物屠宰指南》。其中,涉及实验动物安乐死的指导性文件为2020年出版的《AVMA动物安乐死指南》,以下简称《指南》。该文件是世界范围内实验动物安乐死操作所普遍使用的指导性文件。第1版《指南》于1963年出版,当时的篇幅只有9页。2020年出版的《指南》为第9版。相较于上一版即2013版,2020版《指南》对一些安乐死方法、要求和流程做了更新和细化。2013版《指南》已有中文版发布,而2020版《指南》目前只有英文原版。本文拟对2020版《指南》进行相应的解读,以便实验动物从业人员,尤其是执行和监督动物安乐死操作的实验动物兽医能够快速了解最新版《指南》的更新内容并酌情践行之。

## 1 安乐死相关理论更新

### 1.1 胎儿的意识

关于是否需要已经对已经被安乐死的母体体内胎

儿单独实施安乐死操作,2020版《指南》(第62页)就胎儿意识新增了理论性的描述。哺乳动物胎儿在子宫中是无意识的。子宫内的低氧状态以及激素水平抑制了胎儿的意识。和人类相比,大鼠幼仔和小鼠幼仔出生时神经系统发育不成熟,并且它们的传入疼痛通路直到出生后5~7 d才发育完好,大脑皮质发育则更晚<sup>[1-4]</sup>。该理论解释了为何将母鼠安乐死后,无需再单独安乐死胎鼠。

### 1.2 安乐死后对动物死亡的确认

2013版《指南》(第49页)只提及通过吸入气体安乐死动物时“可进行死亡确认”这样的模糊建议,并未说必须进行死亡确认。而2020版《指南》(第60页)强调并明确:无论是使用吸入(麻醉)气体还是注射麻醉药物的安乐死方法,都应该通过体检或施以辅助的物理方法以确认或确保动物死亡;通过验证安乐死容器及操作程序的可靠性也可以免除死亡确认步骤。

### 1.3 啮齿类动物安乐死环境

2013版《指南》(第48页)指出:安乐死啮齿类动物前,会把它们从原先的饲养室和/或笼盒内取出,与不熟悉的动物混群一段时间<sup>[5]</sup>。但是,动物运输、抓取、群体混养以及改变熟悉的气味都会给啮齿类动物造成痛苦。因此,在实施安乐死前,应尽可能地避免以上会给动物造成痛苦的操作。2020版《指南》在同样段落删除了上述内容,并在第31页指出:如果可能的话,安乐死应该在动物原来所处的较暗的饲养笼内进行,以尽量减少动物的痛苦和焦虑<sup>[1]</sup>;同时也要能观察到动物的状态<sup>[1,5]</sup>。

## 2 安乐死方法更新

实验动物安乐死方法主要有吸入过量麻醉气体、注射过量麻醉药物以及物理性方法。以往曾采用的诸如空气栓塞、溺毙、饥饿、活体甲醛溶液注射等非人道的方法处死脊椎动物都是不可

接受的安乐死方法。在可采用的安乐死方法中,又分为可接受的安乐死方法和条件性接受安乐死方法。所谓可接受的安乐死方法是指通过单一方法即可保障人道地实施动物安乐死,通常为动物的首选安乐死方法。而条件性接受安乐死方法是指需要在满足一定的前提条件下,才能够保证人道地实施动物安乐死。例如:一些方法在应用时可能操作者失误率较高或存在安全隐患,也有一些可能是没有足够的科学文献支持的安乐死方法,或者某种需要辅助手段才能确保动物死亡的方法,均被称为条件性接受安乐死方法。当条件性接受方法所需的必要条件都满足时,条件性接受安乐死方法即等同于可接受的安乐死方法。2020版《指南》中安乐死方法的更新内容主要包括了二氧化碳充盈速率的改变,以及部分物理性安乐死方法实施条件的细化。

## 2.1 物理方法

### 2.1.1 颈椎脱臼

颈椎脱臼法即脱颈椎法,是一种条件性接受的安乐死方法。该安乐死方法可被接受的原则(即先决条件):被处死的动物体型较小,例如小于3 kg的禽类、体质量小于200 g的啮齿类和小于1 kg的兔,且操作人员要足够熟练。2013版《指南》曾经删除了对实验兔体质量的建议。

如采用直接脱颈椎法安乐死动物,动物的脑电活动还能够维持约13~30 s<sup>[6-7]</sup>。亦有研究认为,在动物脱颈椎后,其脑电图不足以证明动物仍然能感受到疼痛<sup>[8-11]</sup>,即动物在脱颈椎后会很快失去意识。因此,2020版《指南》(第44页)建议,如实验人员可熟练完成脱颈椎操作,可徒手对上述体型较小的动物实施脱颈椎法安乐死。技术生疏或力量不足的实验人员需在动物麻醉的前提下,对其实施脱颈椎安乐死。

对于体质量大于1 kg的兔,即使技术熟练的操作人员也很难徒手将其颈椎完全脱臼。但借助能够固定兔头部的特殊装置,操作人员通过拉拽兔的后肢也可完成兔颈椎脱臼安乐死<sup>[2]</sup>。该机械装置已被证明对刚离乳的动物、幼年动物和成年动物(兔)都有效<sup>[12]</sup>。2020版《指南》(第63页)也明确,该机械装置的有效率为96%<sup>[12]</sup>。因此,建议操作人员在正式使用该装置前,仍需

使用动物尸体先行练习,确保能熟练操作。

### 2.1.2 断头术

断头术也是一种条件性接受的安乐死方法。因科学研究需要,当使用麻醉气体或注射用麻醉药品会影响组织、血液、尿液等样本的分析结果时,断头术也是一种可被条件性接受的安乐死方法<sup>[1]</sup>。断头可以使动物在5~30 s即脑死亡<sup>[13]</sup>。操作人员可利用特制的断头装置(如闸刀<sup>[14]</sup>),实施动物断头操作。用于动物安乐死的闸刀,必须保持清洁,且刀片足够锋利<sup>[1]</sup>。因此,定期对断头装置进行维护保养是断头术作为可接受安乐死方法的必要条件之一。2020版《指南》(第61页)指出,如操作正确,大鼠和小鼠不会因为断头或处于其他大鼠或小鼠被断头的现场而产生下丘脑-垂体-肾上腺轴的应激反应。然而在2020版《指南》的第5、14和90页则建议,避免在安乐死场所出现别的动物,特别是对较敏感的种属,因为被安乐死的动物可能喊叫、释放出某种气味或外激素而影响到别的动物。笔者认为,一般要尽量避免在安乐死场所出现别的动物。与颈椎脱臼法一样,操作人员应该在正式使用断头装置前,先使用麻醉的动物或用动物尸体加以练习,确保能熟练操作。

### 2.1.3 穿透型系簧枪(penetrating captive bolt, PCB)

使用PCB击穿脑部是一种条件性接受的动物安乐死方法。2013版(第35页)和2020版(第41页)的《指南》都提及:使用PCB击打动物头部后,建议使用第2种方法如立即放血或刺毁脑脊髓来确保动物死亡;但又提及:如果使用已经上市的“强力PCB”,即可以不再实施辅助方法。2013版《指南》(第36页)对于此种安乐死方法的解释是:当动物脑半球和脑干被PCB充分破坏时,动物能够瞬间丧失意识并死亡。有些动物在丧失意识后,仍可有肢体活动的情况。对此,2020版《指南》(第41页)的解释是:动物在被PCB击中后,可能会出现肢体划船状的动作,这是由于在头部受到冲击时,与头骨连接的颈椎也同时受到冲击<sup>[2]</sup>。此时的动物已处于完全无意识状态<sup>[15-16]</sup>。

当使用PCB安乐死牛时,2020版《指南》(第41页)根据最新研究结果指出,如果从其

头部较高的位置击穿, 则能更有效地破坏牛的脑干组织<sup>[17]</sup>。2013 版《指南》(第 50 页) 未提及 PCB 法可用于安乐死实验兔。而 2020 版《指南》(第 63 页) 建议可将 PCB 作为兔的条件性接受安乐死方法使用。当使用 PCB 安乐死兔时, 动物的头部应被固定牢, 以防止击空。其他建议还包括: 动物应该被保定在防滑底面上; 最好放在上部开口的固定器中, 使动物后躯体顶着固定器的壁; 操作者用非惯用手按压肩胛骨保定动物, 拇指和食指轻轻环绕兔颈部<sup>[18]</sup>; 应选用适用于兔体型的系簧枪; 系簧枪应由经验丰富的操作人员使用, 并在使用后必须清洁以保证其功能的有效性; 击打位置也必须正确, 应位于额骨正中, 最靠近耳根的位置<sup>[18]</sup>。2020 版《指南》(第 63 页) 同时提及, 使用 PCB 的方法对患病动物安乐死, 可能会造成环境污染, 在实际操作中需额外注意。

#### 2.1.4 非穿透型系簧枪 (non-penetrating captive bolt, NPCB)

与 PCB 方法类似, NPCB 安乐死动物也是一种条件性接受安乐死方法。NPCB 一般不能单独用于安乐死动物, 因为此法只能击昏动物, 因此也称为 NPCB 击昏器。2013 版《指南》并未提及 NPCB 方法在实验兔安乐死中的应用, 而在 2020 版《指南》(第 63 页) 中 NPCB 方法被列为兔的条件性接受安乐死方法, 并给出了详细的使用指导和要求。实验兔专用的 NPCB 安乐死击昏器能够 100% 使动物失去知觉; 兔的固定方式与使用 PCB 安乐死时相同; NPCB 击昏器应放置在正确的解剖位置, 即兔的前额正中 (枪管位于耳的前方和眼睛的后方), 连续击打两次; 在操作时应根据兔的年龄和大小选择合适的压强: 离乳前的仔兔可用 55 psi 的压强, 幼年兔可用 70 psi 的压强, 成年兔可用 90 psi 的压强 (1 psi = 6.895 kPa)<sup>[12]</sup>。此外, 2020 版《指南》(第 41 页) 还提及, 新款气动型 NPCB 装置能够成功将重达 9 kg 的乳猪击晕安乐死<sup>[12]</sup>。

## 2.2 吸入性气体

吸入性气体广泛用于实验啮齿类动物、流浪动物和实验猪的安乐死<sup>[1,19-20]</sup>。然而, 所有通过吸入气体对动物实施安乐死的方法都有影响动物

福利的可能, 因为此类方法通常不能使动物立即失去意识<sup>[1]</sup>。动物从接触气体到丧失意识的时间长短取决于气体置换率、容器的容积以及气体浓度。给予动物的安乐死气体必须纯净、无杂质, 最好使用商业化的气体钢瓶作为气体来源, 这样也便于操作人员设定合适的气体置换率。另外, 用于安乐死的笼盒/空间须能使动物保持舒适状态, 即不过分拥挤且没有异味。新生动物、爬行动物、两栖动物、兔和禽类通常不适合用吸入气体的方式安乐死。也可使用挥发性麻醉气体来安乐死动物。2013 版《指南》(第 50 页) 提到: 兔在闻到使其不愉快的异味时常常会屏住呼吸, 这就会导致麻醉气体瞬间过量而出现窒息痛苦。因此, 2020 版《指南》(第 63 页) 建议, 将兔从笼具中抓出之前, 可先用镇定剂, 这样做可以减少其屏住呼吸的行为<sup>[21-22]</sup>。

#### 2.2.1 一氧化二氮

在标准大气压下, 处于一氧化二氮气体中的动物不能有效地停止呼吸和心跳<sup>[5]</sup>。在 2013 版《指南》(第 21 页) 中, 一氧化二氮因其麻醉性较弱, 是最少被选择的吸入性安乐死气体。尽管一氧化二氮不能单独用于动物安乐死, 但是可以将其与其他麻醉剂联合使用, 从而减少动物失去意识所需要的时间。2020 版《指南》(第 25 页) 提到: 不同体积分数的一氧化二氮与 5% 异氟烷麻醉气体联用, 可以使小鼠更快地失去意识<sup>[23]</sup>。因此, 加入一氧化二氮, 也许能优化目前的麻醉气体安乐死方案。

#### 2.2.2 预充气体

通常, 当连续多次进行气体安乐死操作时, 安乐死容器内会有前次安乐死所遗留的气体。容器里遗留的气体会使动物紧张焦虑。在 2020 版《指南》(第 61 页) 中, 将 2013 版“在容器中预先充入气体是不可接受的”修改为“不建议在容器内预充入气体, 因为 (清醒) 动物吸入该 (浓度) 气体时可能会导致明显的疼痛”。

#### 2.2.3 开放式麻醉气体

如无其他方法安乐死啮齿类动物, 也可以用长时间吸入高浓度麻醉气体的方式使动物死亡。除使用专业的气体挥发罐 (vaporizer) 外, 将挥发性麻醉剂置于其他密闭容器内, 使气体在一

定空间内自由扩散,当动物过量吸入后也能起到安乐死的作用。2020版《指南》(第61页)对这种开放式麻醉气体吸入技术(open drop technique)进行了条件限定,即在操作过程中必须确保动物不会直接接触到麻醉剂。

#### 2.2.4 二氧化碳

实验动物设施常用压缩二氧化碳气体钢瓶向啮齿类动物笼盒内释放二氧化碳来使动物安乐死。二氧化碳和二氧化碳混合气体必须以精确的调节和净化的形式供应,不含污染物或杂质。然而只有合理地设置二氧化碳置换率(即充盈速率),才能在避免动物疼痛的前提下快速将动物安乐死。二氧化碳充盈速率过低会造成动物因呼吸困难而痛苦,二氧化碳流量过高则可能引起动物黏膜疼痛<sup>[1,20,24]</sup>。在2013版《指南》(第249页)建议的基础上,2020版《指南》(第61页)将二氧化碳最佳充盈速率从每分钟置换安乐死容器体积的10%~30%,修改为每分钟30%~70%。实验动物兽医应按照最新的充盈速率,调整实验动物设施内的安乐死流程。然而,没有数据显示哪个流速设置能最大程度减少不同物种、性别及遗传背景的动物的安乐死痛苦。因此,实验动物兽医在实际工作中,应根据设施设备的实际情况,以及对动物承受痛苦时表现出的临床体征进行专业判断,从而决定合适的二氧化碳置换率。此外,在两次安乐死操作之间,应将容器中残余的二氧化碳体积分数降至最低(尽量排空),避免将动物放进一个预充了纯二氧化碳的容器中。

#### 2.2.5 气体安乐死用于新生啮齿动物

在2013版《指南》(第50页)中只描述:新生的小鼠置于二氧化碳中可能50 min才会死亡,应保障充分的暴露时间,或使用辅助方法以确保动物的死亡。2020版《指南》根据最新的参考资料新增:新生的大鼠置于二氧化碳中可能需要35 min才会死亡<sup>[1,25]</sup>。并再次强调:若使用二氧化碳或挥发性麻醉气体安乐死新生啮齿类动物,必须确保动物足够长的暴露时间,直到动物对疼痛刺激再无反应<sup>[1]</sup>;或者使用辅助性方法,例如脱颈椎法或断头术来确保动物死亡<sup>[1]</sup>。

## 2.3 药物注射

静脉注射巴比妥酸盐和巴比妥酸衍生物是实验动物安乐死的首选方法<sup>[1,5]</sup>。绝大多数种类的动物都可以使用此药物注射实施安乐死。除此之外,Tributame(磷酸氯喹、安非他酮乙甲丁酰胺、利多卡因混合注射液)以及T-61(乙甲丁酰胺安布曲米、碘环己铵碘化美比溴铵、盐酸丁卡因混合注射液)也可作为可接受的注射用安乐死药物。然而此类药物很难获得,在无法获得相关药物时,需要寻求其他的方法安乐死动物。具体何种药物及给药手段最适合,兽医应根据动物的种类、药物药效、物理或化学方法对动物保定程度的要求、对操作人员的潜在危害以及药物残留等多方面综合考虑<sup>[5]</sup>。此外还应注意,大剂量的安乐死药物必须通过心内注射,或静脉给予,不可采用肌肉内注射、皮下注射其他方式给予,以避免药物引起的疼痛反应<sup>[5]</sup>。

安乐死实际操作时,常出现难以保定的动物、吸入安乐死气体容易屏气的动物以及无法或不便建立静脉通路的动物。对于这些动物,在正式安乐死操作前,应提前给予合适剂量的镇定剂或麻醉剂<sup>[5]</sup>。

#### 2.3.1 乙醇

乙醇类化合物能够改变细胞膜流动性,并改变神经细胞离子通路以及降低神经细胞活性<sup>[1,5]</sup>。乙醇通过腹腔注射后,能够使动物的神经和呼吸系统被抑制<sup>[1,5]</sup>,达到麻醉和安乐死的目的。对于用作抗体生产的动物,乙醇类注射是首选的安乐死方法<sup>[1,5,26]</sup>。2020版《指南》(第61页)根据最新的研究资料,对乙醇注射后会产生的临床症状以及小鼠日龄要求加以细化。给成年小鼠腹腔注射0.5 mL体积分数为70%~100%的乙醇溶液,小鼠在2~4 min内出现肌肉逐渐松弛、翻正反射丧失、呼吸和心跳停止等临床症状,随后死亡<sup>[1,27-28]</sup>。但是,如果给小于35日龄的小鼠注射乙醇溶液,小鼠不会很快死亡<sup>[1,28]</sup>。因此,乙醇不能用于小于35日龄的小鼠安乐死,也不能用于比小鼠体型更大的动物(如大鼠)安乐死(因为诱导死亡所需的乙醇量较大)。

#### 2.3.2 三溴乙醇

三溴乙醇也是乙醇类化合物的一种。目前尚

无商用的或药用级别的三溴乙醇。三溴乙醇虽然经常被用于实验啮齿类动物的麻醉,许多机构的福利伦理委员会如IACUC也会批准使用,但其使用是有争议的,因为三溴乙醇会对动物产生一些不良影响。2013版《指南》(第49页)将三溴乙醇列为条件性接受安乐死方法之一<sup>[5]</sup>。因为目前还没有报告显示三溴乙醇可单独用于安乐死,在2020版《指南》(第61页)推荐仅将其用作安乐死前麻醉,动物麻醉后还需实施辅助性的安乐死操作<sup>[1]</sup>。如果被用作麻醉剂,三溴乙醇溶液必须要正确配制、储存并确定正确的使用剂量。

### 2.3.3 乌拉坦

乌拉坦对于人类来说属于致癌类物质。与三溴乙醇类似,乌拉坦也不可单独用于安乐死<sup>[5]</sup>。在特定条件下,乌拉坦可被用作啮齿类实验动物麻醉剂<sup>[1]</sup>;但是没有报告显示乌拉坦可被单独作为安乐死药物使用。因此2020版《指南》(第62页)建议:在实施物理性安乐死操作前,可先使用乌拉坦麻醉动物<sup>[1]</sup>。

### 2.3.4 $\alpha$ 氯醛糖

$\alpha$ 氯醛糖不可单独用于动物安乐死。2020版《指南》(第62页)将 $\alpha$ 氯醛糖归为安眠药使用,并且其止痛效果也较差<sup>[1]</sup>。在使用 $\alpha$ 氯醛糖麻醉动物后,还需再实施辅助性的安乐死操作<sup>[1]</sup>。

## 3 动物种属特异性安乐死细节更新

### 3.1 二氧化碳气体用于兔安乐死

2013版《指南》(第51页)指出:当二氧化碳作为单一方法用于兔安乐死时,会给你带来痛苦,因此需对动物镇静后使用。在2020版《指南》(第63页)中进一步明确二氧化碳在兔安乐死时的使用细节。因为兔作为一种穴居的动物,对高浓度二氧化碳似乎有更高的耐受性,单独使用可能会导致痛苦。在高体积分数(70%、80%、90%和98%)的二氧化碳环境中,兔意识丧失前15 s内会表现出对气体的厌恶行为。在容器置换率为28%和58%时均未观察到任何痛苦表现,但是较高流速(58%)比较低流速(28%)明显更早期地使动物感觉丧失和死亡(40 s vs 99 s)。因此,2020版《指南》(第63页)推荐使用较高流速,即在对兔使用二氧

化碳进行安乐死时,容器置换率应设置为50%~60%容积/min;而且提前给予镇静剂可以减少动物对气体的潜在的厌恶行为<sup>[1]</sup>。

### 3.2 水生动物的安乐死

目前还没有经过美国食品药品监督管理局(FDA)批准的水生动物安乐死药物。当因种种原因不能使用物理手段安乐死水生动物时,可以将动物浸泡在过量的水生动物麻醉剂中一段时间,达到安乐死的目的<sup>[1,5]</sup>。因有斑马鱼浸泡于麻醉剂之后复苏的案例出现,2020版《指南》(第84页)建议:当观察到成年斑马鱼失去鱼鳃活动后,应将其再浸泡30 min,以确保动物死亡。

常用于水生动物的麻醉剂有苯佐卡因、二氧化碳饱和水、丁子香酚、异丁子香酚、丁香油、异氟烷、七氟烷、硫酸奎哪啶和甲磺酸三卡因(MS-222)。MS-222是美国FDA批准的用于鱼类、两栖类及其他水生动物和冷血动物的临时性保定剂(镇静、麻醉)。最近有研究表明,耐氧性的金鱼(*Carassius auratus*)以及丽鱼科鱼若浸入MS-222中,不足以死亡<sup>[29]</sup>。因此,需要采用辅助性的方法确保水生动物死亡,例如断头、脑脊髓刺毁法或冷冻法<sup>[1]</sup>。有些斑马鱼浸泡在MS-222中有痛苦的迹象,因此也建议采用第二种(物理)安乐死方法,以确保斑马鱼死亡<sup>[30]</sup>。此外,单独使用MS-222对于斑马鱼卵、胚胎或幼体(<14 d)实施安乐死是无效的,对在这些生命阶段的动物应采用其他安乐死方法<sup>[31]</sup>。

### 3.3 快速冷却法用于斑马鱼安乐死

快速冷却法(降温至2~4℃)可用于斑马鱼的安乐死。冷却使鱼鳃停止活动后,不同日龄的斑马鱼需要不同的延长冷却时间<sup>[1,5]</sup>。2020版《指南》(第64页)指出:当快速冷却幼年斑马鱼鱼苗(4~7日龄)时,在鱼鳃停止活动后,应再将其保持在低温环境至少20 min;对于成年斑马鱼,在鱼鳃停止活动后,应再将其保持在低温环境至少10 min<sup>[1,5]</sup>;快速冷却法对于小于3日龄的斑马鱼胚胎是无效的。2020版《指南》还强调,不大于7日龄的斑马鱼胚胎受精卵或幼鱼可用稀释的次氯酸钠或次氯酸钙溶液浸泡安乐死<sup>[1,32]</sup>;但2013版未做同样表述。在实施快速冷却及浸泡在MS-222溶液中安乐死各日龄的斑马鱼后,都应采用辅助方法确保动物的死亡<sup>[1,5]</sup>。

### 3.4 两栖类动物的安乐死

研究中常用的两栖动物包括非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*)、豹蛙 (leopard frog)、牛蛙 (bull frog) 和墨西哥钝口螈 (*Ambystoma mexicanum*)。对于这些动物的安乐死, 2013 版《指南》(第 51 页) 建议先将其完全麻醉后, 再使用物理方法安乐死<sup>[5]</sup>。而 2020 版《指南》(第 64 页) 新给出了一项可接受的安乐死方法以供选择。除物理性安乐死方法外, 向两栖动物的静脉、体腔内和淋巴间隙注射高剂量的戊巴比妥钠是可被接受的一种安乐死方法<sup>[1,33]</sup>。但是 2020 版《指南》也提到, 巴比妥类药物作用于两栖动物, 起效时间可能不一致<sup>[1,33]</sup>。

## 4 常用实验动物安乐死方法推荐

2020 版《指南》的附录表列出了根据动物品种选择的安乐死方法和药物, 详见表 1。同时列出了不作为安乐死首选的可接受的方法和药物, 详见表 2。下文重点介绍一些常用实验动物的首选安乐死方法和条件性接受安乐死方法, 以供参考。

### 4.1 小鼠及大鼠

#### 4.1.1 首选安乐死方法

啮齿类动物的安乐死应首选注射巴比妥类药物。此类药物对啮齿动物起效快速, 能使动物较平顺地进入无意识状态<sup>[1,5]</sup>。值得注意的是, 腹腔注射巴比妥类药物可能会造成动物疼痛<sup>[34-36]</sup>。

氯胺酮等分离型麻醉剂也可用作啮齿类动物的首选安乐死药物。但是, 如果动物尚处于清醒状态, 此类分离型麻醉剂必须与  $\alpha_2$  肾上腺受体激动剂联用, 例如甲苯赛酮或苯二氮唑类麻醉剂 (如: 地西洋)<sup>[1,5]</sup>。小鼠在注射氯胺酮与甲苯赛酮 (质量比为 10 mg : 1 mg 的混合溶液 100  $\mu$ L 后, 可在 3~5 s 死亡。

#### 4.1.2 条件性接受安乐死方法

当药物残留可能会影响到取材组织的分析结果时, 也可以选用吸入性气体安乐死动物。国内常用二氧化碳作为吸入性气体安乐死动物, 该方法一般需要辅以第二种物理性方法确保动物死亡, 或通过验证设备的有效性以免除第二种物理性方法确保动物死亡的过程。二氧化碳置换率应

设置在 30%~70% (2020 版《指南》, 第 61 页), 此置换率较 2013 版《指南》建议的 10%~30% 有所提高。然而, 还没有一个最佳的二氧化碳置换率可以完美地既减少动物因低流速引起焦躁, 又防止流速过高引起黏膜疼痛。因此, 各单位兽医还应根据自己的专业判断, 选择最适合该设施的二氧化碳流速。

使用二氧化碳安乐死方法应注意: 动物安乐死容器保持清洁, 动物在笼盒内不能过于拥挤, 笼盒内的气体应该清除干净才能进行下一次安乐死操作。二氧化碳气体需来源于气体钢瓶, 不应含污染物或杂质。该二氧化碳安乐死装置还应包含一个适当的减压阀和流量计, 以保证二氧化碳置换率能够符合《指南》的建议。

挥发性麻醉气体安乐死也可作为啮齿动物的条件性接受安乐死方法, 例如异氟烷、七氟烷和地氟醚。若使用挥发性麻醉气体法, 动物需要在气体中暴露足够的时间或采用辅助性安乐死方法, 以确保动物死亡<sup>[1,5]</sup>。

用于啮齿类动物的注射性安乐死药物有三溴乙醇和 70%~100% 乙醇溶液。使用三溴乙醇安乐死动物的条件是需辅以第二种辅助安乐死方法<sup>[1,5]</sup>。若使用乙醇溶液安乐死动物, 则要考虑动物年龄和体型等限制因素。乙醇用于小于 35 日龄的小鼠是存在争议的<sup>[1]</sup>。且不推荐将乙醇用于大鼠的安乐死<sup>[1]</sup>。

啮齿类动物的物理性安乐死方法有颈椎脱臼、断头和微波辐照。这些物理性安乐死方法可以防止动物组织被化学试剂污染<sup>[1,5]</sup>。颈椎脱臼常用于小鼠和小于 200 g 的大鼠<sup>[1]</sup>。且实施颈椎脱臼和断头操作的人员必须经过良好的训练<sup>[1,5]</sup>。此外, 对于需要立即固定脑部代谢物的研究, 可使用聚焦束微波辐射的方法 (需要特殊的设备) 对动物进行安乐死 (2020 版《指南》, 第 47 页)<sup>[1,5]</sup>。

#### 4.1.3 不可接受的安乐死方法

吸入氮气和氩气、单独注射氯化钾、单独注射神经肌肉阻断剂, 以及注射阿片类、乌拉坦和  $\alpha$ - 醛聚糖不可作为啮齿类动物的安乐死方法。

### 4.2 兔

兔安乐死方法的选择取决于其所在场所的设施及其条件。所选取的安乐死方法应尽可能地

表 1 根据动物种类选择安乐死方法和药物  
Table 1 Agents and methods of euthanasia by species

| 种 类     | 首选的安乐死方法                                                                               | 条件性接受的安乐死方法                                                                   |
|---------|----------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 水生无脊椎动物 | 浸泡在麻醉液体(镁盐、丁香油、丁子香酚、乙醇)中                                                               | 辅助方法(麻醉状态下): 70% 乙醇溶液、4% 中性甲醛溶液; 脑-脊髓穿刺; 冷冻; 煮沸                               |
| 两栖类动物   | 根据动物种类而定: 注射巴比妥类药物、解离型麻醉剂和麻醉药物; 外用或注射甲磺酸三卡因缓冲液(MS-222); 外用盐酸苯佐卡因                       | 根据动物种类而定: 根据指南吸入麻醉气体、二氧化碳; 系簧枪穿透; 枪击; 手持钝器击打头部; 快速冷冻(适用于体质量小于 4 g 的动物, 可快速致死) |
| 鸟类(同禽类) | 静脉注射巴比妥类药物                                                                             | 吸入麻醉气体、二氧化碳、一氧化碳、氮气、氩气; 颈椎脱臼(可用于小型鸟类或禽类); 断头(小型鸟类); 枪击(自由放养或野外鸟类)             |
| 猫       | 静脉注射巴比妥类药物; 过量注射丁甲乙酰胺(Tributame)或 T61 麻醉剂                                              | 巴比妥类药物注射(除静脉以外的途径给药); 过量给予吸入性麻醉气体一氧化碳*、二氧化碳*; 枪击*                             |
| 牛       | 静脉注射巴比妥类药物                                                                             | 枪击、系簧枪穿透                                                                      |
| 犬       | 静脉注射巴比妥类药物; 过量注射丁甲乙酰胺(Tributame)或 T61 麻醉剂                                              | 巴比妥类药物注射(除静脉以外的途径给药); 过量给予吸入性麻醉气体、一氧化碳*、二氧化碳*; 枪击*; 系簧枪穿透*                    |
| 鱼       | 浸泡在苯佐卡因缓冲液或盐酸苯佐卡因溶液、异氟烷、七氟烷、硫酸奎哪啶、甲磺酸三卡因缓冲液(MS-222)、2-苯氧乙醇中; 注射戊巴比妥; 快速冷却法(某些种类可用); 乙醇 | 丁香子酚、异丁子香酚、丁香油、饱和二氧化碳水; 断头/断颈/手持钝器击打头部后辅以脑脊髓穿刺或放血; 浸软(科研院所); 系簧枪(大型鱼类)        |
| 马       | 静脉注射巴比妥类药物                                                                             | 系簧枪穿透; 枪击                                                                     |
| 海洋哺乳动物  | 驯养动物: 巴比妥类药物注射。放养或野生动物: 巴比妥类药物注射或过量注射麻醉剂                                               | 驯养动物: 吸入麻醉气体。放养或野生动物: 枪击, 手持钝器击打头部, 颅内爆破                                      |
| 非人灵长类动物 | 巴比妥类药物注射或过量注射麻醉剂                                                                       | 视动物种类而定: 吸入麻醉气体、一氧化碳、二氧化碳                                                     |
| 禽类      | 巴比妥类药物注射或过量注射麻醉剂                                                                       | 二氧化碳、一氧化碳、氮气、氩气、低气压致晕; 颈椎脱臼(视解剖结构而定); 断头; 手持钝器击打头部; 电击; 枪击; 系簧枪               |
| 兔       | 静脉注射巴比妥类药物                                                                             | 吸入过量麻醉气体、二氧化碳; 颈椎脱臼(视解剖结构而定); 系簧枪穿透; 非穿透型系簧枪                                  |
| 爬行动物    | 根据动物种类酌情选择: 巴比妥类药物、甲磺酸三卡因(MS-222)注射; 解离型麻醉剂与辅助方法联用; 根据动物种类选择麻醉剂                        | 视动物种类而定: 吸入麻醉气体、二氧化碳; 系簧枪穿透或枪击; 手持钝器击打头部; 快速冷冻可使小于 4 g 的动物快速致死; 脊髓损毁/脑部破坏(鳄鱼) |
| 啮齿类动物   | 巴比妥类药物或巴比妥类药物组合剂; 解离型麻醉药组合                                                             | 吸入麻醉气体、二氧化碳、一氧化碳; 三溴乙醇; 乙醇; 颈椎脱臼; 断头; 聚焦束微波辐射                                 |
| 小型反刍动物  | 巴比妥类药物注射                                                                               | 二氧化碳(山羊羔); 枪击; 击昏器; 系簧枪穿透; 非穿透型系簧枪(山羊羔)                                       |
| 猪       | 巴比妥类药物注射                                                                               | 二氧化碳、一氧化碳、一氧化氮、氮气、氩气; 枪击; 电击; 系簧枪穿透; 非穿透型系簧枪(仔猪); 手持钝器击打头部                    |

注: \*代表该安乐死方法不是常规使用的方法。该表为 2020 版《指南》附录 1 的汉化。

减少动物应激。不管选用了哪种安乐死方式, 都要对死亡进行确认<sup>[1,5]</sup>。确认死亡的方法是观察兔的呼吸和心跳停止, 并且兔的瞳孔散大且固定<sup>[1,5]</sup>。对于拥有保定装置以及管制药品的单

位, 可以采用先镇静, 后过量给予麻醉气体的方式安乐死动物<sup>[1,5]</sup>。

#### 4.2.1 首选安乐死方法

兔安乐死首选巴比妥类药物注射。如果技术

表 2 不作为安乐死首选的可接受的方法和药物

Table 2 Agents and methods that are unacceptable as primary methods of euthanasia

| 药物或方法                         | 备注及说明                                                                                                                                                                                    |
|-------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 空气栓塞                          | 使用空气栓塞法安乐死的动物会出现抽搐、角弓反张、鸣叫等临床症状。如果必须使用该方法安乐死动物时,必须先将动物麻醉                                                                                                                                 |
| 窒息                            | 不可用机械手段(如闷死、绞死、脱水)阻止动物呼吸                                                                                                                                                                 |
| 烧伤                            | 化学或物理性烧伤是不可接受的安乐死方法                                                                                                                                                                      |
| 水合氯醛                          | 不可用作犬、猫和小型哺乳动物的安乐死                                                                                                                                                                       |
| 氯仿                            | 已知氯仿具有肝毒性,是疑似的致癌物。因此,对人有非常强的毒性                                                                                                                                                           |
| 氰化物                           | 氰化物对操作人员极度危险。用氰化物安乐死动物时,在观感上给人不适                                                                                                                                                         |
| 泄压(不包括已证明的可实现安乐死的低气压晕厥)       | 泄压是不可接受的安乐死方式,其有许多缺点: (1) 许多容器的设计泄压速率过高,是推荐速率的15~60倍,从而导致动物体腔内的气体膨胀,引起动物疼痛和不安; (2) 幼年动物对低氧耐受,因此在呼吸停止前,需要较长的泄压时间; (3) 意外恢复气压,即受伤的动物有复苏的情况; (4) 无意识的动物可能会出现出血、呕吐、抽搐、排尿、排便等症状,在观感上可能会引起人的不适 |
| 溺水                            | 溺水不是合适的安乐死方法,而且是不人道的                                                                                                                                                                     |
| 放血                            | 因为极端低血容量会引起动物焦躁,所以放血如果作为单一处死动物的方法使用时,只能用于无意识的动物                                                                                                                                          |
| 甲醛                            | 除海绵动物外,直接将动物浸泡在甲醛溶液中是不人道的                                                                                                                                                                |
| 日化品及溶剂                        | 丙酮、清洁剂、四元化合物(包括四氯化碳)、泻药、杀虫剂、二甲基酮、季铵盐类化合物、抗酸剂以及其他非专用于治疗或安乐死用途的有毒物质都不是可接受的安乐死方法                                                                                                            |
| 低温                            | 低温是一种不合适的安乐死方法                                                                                                                                                                           |
| 胰岛素                           | 胰岛素会引起低血糖症,动物因低血糖而昏厥前会出现明显的不适症状(如行为改变、应激反应、迷惑)。使用胰岛素不一定能有效安乐死动物                                                                                                                          |
| 硫酸镁和氯化钾                       | 此类化合物不可用于清醒脊椎动物的安乐死                                                                                                                                                                      |
| 手持钝器击打头部                      | 除仔猪和小型实验动物外,多数情况下是不可接受的安乐死方法。尽可能使用其他方法代替手持钝器击打头部的的方法                                                                                                                                     |
| 神经肌肉阻断剂(尼古丁、硫酸镁、氯化钾和全部的箭毒类药物) | 如果单独使用这些药物,动物失去意识前都会出现呼吸暂停。因此,动物在失去活动能力后,仍然能够感受到痛苦和不适                                                                                                                                    |
| 急速冷冻                          | 除用于体质量小于4 g的爬行动物、两栖动物和出生时间少于5 d的新生仔鼠的快速死亡外,急速冷冻法属于非人道的安乐死方法。除此以外,只有接近死亡状态或已经处于无意识状态的动物,才可以使用急速冷冻法。鱼的急速冷却不属于此方法                                                                           |
| 土的宁                           | 使用土的宁会造成动物抽搐和痛苦的肌肉收缩                                                                                                                                                                     |
| 胸廓压迫                          | 不可用于清醒的动物                                                                                                                                                                                |

注: 该表为 2020 版《指南》附录 2 的汉化。

熟练,推荐使用静脉给药方式<sup>[1,5]</sup>;腹腔注射会造成一定程度的疼痛。

4.2.2 条件性接受的安乐死方法

如果设施内具备气体装置,可以选用吸入性气体的方式安乐死兔。使用挥发性麻醉剂或二氧化碳气体均可。二氧化碳置换率应设置为 50%~60% 的容器体积/min<sup>[1]</sup>。但由于兔在应激状态以及闻到不适气体时,都会有屏气的生理现象出现<sup>[1,5]</sup>,因此在从饲养笼中将动物取出前,最好事先给予镇静药物。这样做的好处是可以减少动

物的屏气反应,防止麻醉气体“过量”。

可用于兔安乐死的物理性方法有颈椎脱臼、使用 PCB 或使用 NPCB。兔可被放置在专用的兔头部固定器中,操作人员只需拉拽兔后肢或髁部,即可完成兔颈椎脱臼<sup>[1]</sup>;这样做特别适用于颈部肌肉发达的成年兔<sup>[1]</sup>。如使用 PCB 安乐死兔,需先将兔头部固定,以防止未击中的情况发生。要根据兔的体型选择合适的 PCB<sup>[1]</sup>。不使用时,需要保持击昏器 PCB 的清洁。对于患病动物,使用 PCB 容易出现环境污染的问题,需特

别注意<sup>[1]</sup>。另外,操作人员需要经过专门的训练,方可使用 PCB 安乐死动物<sup>[1]</sup>。

已麻醉的兔也可使用静脉或心脏注射氯化钾、放血以及双侧胸腔打开等辅助性手段安乐死<sup>[1,5]</sup>。

### 4.3 犬和非人灵长类动物

犬和非人灵长类动物首选的安乐死方法是先镇静,后经静脉给予巴比妥类药物<sup>[1,5]</sup>。对于犬安乐死,如果无法获得巴比妥类药物,也可在动物镇静后,给予 Tributame (又称丁甲乙酰胺)安乐死<sup>[1,5]</sup>。当动物处于麻醉状态时,也可以使用例如双侧胸腔打开、放血、灌注、静脉或心脏注射氯化钾等方式安乐死<sup>[1,5]</sup>。

### 4.4 猪

猪的首选安乐死方法为静脉给予巴比妥类药物,或过量给予其他麻醉药物致死。如果无法获得巴比妥类药物,也可以选取包括高浓度二氧化碳、枪击、电击、PCB、NPCB (仅限于乳猪)以及钝击头部等条件性接受安乐死方法对动物实施安乐死<sup>[1,5]</sup>。兽医可根据动物体型及体质量、设备设施、操作人员的经验和健康要求、取材组织的需要来选择合适的安乐死方法<sup>[1,5]</sup>。

### 4.5 哺乳动物幼仔与胎儿

#### 4.5.1 首选安乐死方法

哺乳动物幼仔的痛觉系统未发育完全,且常常对低氧耐受<sup>[1,5]</sup>。因此,对于这些动物,首选的安乐死方式有注射巴比妥类药物,或巴比妥类药物与局部麻醉、抗痉挛药物联用,或分离型药物与 $\alpha 2$ 肾上腺受体激动剂或苯二氮卓类药物联用这3种方式<sup>[1]</sup>。哺乳动物胎儿在子宫内是无意识的。因此,对于胎儿,在母体安乐死后,只需将胎儿遗留在母体子宫内一段时间(15~20 min)<sup>[1]</sup>,胎儿即会自然缺氧死亡,无须单独对胎儿进行安乐死操作。

#### 4.5.2 条件性接受的安乐死方法

可条件性用于动物幼仔的安乐死方法有吸入挥发性麻醉气体法、低温法、快速冷却法、断头和颈椎脱臼法。

幼年动物在单纯二氧化碳中可存活较长时间<sup>[1,5]</sup>。因此,需要将动物放置于安乐死气体中较长时间,并结合辅助(物理性)安乐死方法,以确保动物死亡。小于10日龄的动物可使用低温

法安乐死,但也需要辅助方法确保动物死亡。在使用低温方式时,需注意动物不能接触到冰块,以防冻伤引起的疼痛<sup>[1,5]</sup>。小于5日龄的动物可浸泡于液氮中快速致死。

## 5 总结

对于绝大多数的脊椎动物来说,都可以将静脉注射巴比妥类药物作为安乐死的首选方法。若无法获取巴比妥类药物,或在动物难以保定的情况下,也可选取条件性接受安乐死方法。值得注意的是,一种方法是否定义为条件性接受的安乐死方法,与操作人员熟练程度、动物的生物学特性及操作环境等多方面因素有关,并不局限于方法本身。例如,采用吸入性麻醉气体安乐死动物时,实验人员必须要在确定动物失去反射后,辅以物理性方法确保动物死亡。因此,采用第二种方法确保动物死亡是使用吸入性麻醉法安乐死动物的前提条件。又如,对适用于颈椎脱臼法的啮齿类动物,如果操作人员可以保证瞬间将动物颈椎脱臼,则该方法是可被接受的。因此,采用颈椎脱臼法的前提条件是实验技术人员的操作足够熟练。再如,吸入性气体若要用于兔的安乐死,其前提条件是兔已经处于麻醉或镇静状态,以避免兔出现特有的屏气反应。由以上案例可以发现,所谓的条件性接受安乐死方法,其所要求的前提条件是不同的。当前提条件都被满足时,条件性接受的安乐死方法等同于首选安乐死方法。具体要选择何种安乐死方法,应由执行或监督安乐死操作的兽医根据操作人员的技术能力、动物种类、顺应程度、麻醉状态、实验终点要求和死亡确认步骤,选择适合的安乐死方法。

需要说明,实验动物的种类宽泛,饲养场所条件各有不同,而本文篇幅有限,未能全部涉及。读者可通过阅读2013版《指南》中文译本<sup>[37]</sup>或2020版《指南》原文,进一步了解实验动物安乐死详情。

## [参考文献]

- [1] LEARY S, UNDERWOOD W, ANTHONY R, et al. AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2020

- Edition[M]. Schaumburg: American Veterinary Medical Association, 2020.
- [2] DANNEMAN P J, MANDRELL T D. Evaluation of five agents/methods for anesthesia of neonatal rats[J]. *Lab Anim Sci*, 1997, 47(4):386-395.
  - [3] SILVERMAN J, HENDRICKS G. Sensory neuron development in mouse coccygeal vertebrae and its relationship to tail biopsies for genotyping[J]. *PLoS One*, 2014, 9(2): e88158. DOI:10.1371/journal.pone.0088158.
  - [4] FITZGERALD M. The development of nociceptive circuits [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2005, 6(7):507-520. DOI:10.1038/nrn1701.
  - [5] LEARY S, UNDERWOOD W, ANTHONY R, et al. AVMA Guidelines for the euthanasia of animals: 2013 Edition[M]. Schaumburg: American Veterinary Medical Association, 2013.
  - [6] HICKMAN D L, JOHNSON S W. Evaluation of the aesthetics of physical methods of euthanasia of anesthetized rats[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2011, 50(5):695-701.
  - [7] MAKOWSKA J, GOLLEDGE H, MARQUARDT N, et al. Sedation or inhalant anesthesia before euthanasia with CO<sub>2</sub> does not reduce behavioral or physiologic signs of pain and stress in mice[J]. *J Am Assoc Lab Animal Sci*, 2012, 51(4):396-397.
  - [8] HEWETT T A, KOVACS M S, ARTWOHL J E, et al. A comparison of euthanasia methods in rats, using carbon dioxide in prefilled and fixed flow rate filled chambers[J]. *Lab Anim Sci*, 1993, 43(6):579-582.
  - [9] HICKMAN D L, FITZ S D, BERNABE C S, et al. Evaluation of low versus high volume per minute displacement CO<sub>2</sub> methods of euthanasia in the induction and duration of panic-associated behavior and physiology[J]. *Animals (Basel)*, 2016, 6(8):E45. DOI:10.3390/ani6080045.
  - [10] BOIVIN G P, BOTTOMLEY M A, DUDLEY E S, et al. Physiological, behavioral, and histological responses of male C57BL/6N mice to different CO<sub>2</sub> chamber replacement rates[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2016, 55(4):451-461.
  - [11] POWELL K, ETHUN K, TAYLOR D K. The effect of light level, CO<sub>2</sub> flow rate, and anesthesia on the stress response of mice during CO<sub>2</sub> euthanasia[J]. *Lab Animal*, 2016, 45(10):386-395. DOI:10.1038/labani.1117.
  - [12] WALSH J, PERCIVAL A, TURNER P. Efficacy of blunt force trauma, a novel mechanical cervical dislocation device, and a non-penetrating captive bolt device for on-farm euthanasia of pre-weaned kits, growers, and adult commercial meat rabbits[J]. *Animals*, 2017, 7(12):100. DOI:10.3390/ani7120100.
  - [13] CARTNER S C, BARLOW S C, NESS T J. Loss of cortical function in mice after decapitation, cervical dislocation, potassium chloride injection, and CO<sub>2</sub> inhalation[J]. *Comp Med*, 2007, 57(6):570-573.
  - [14] Leica Biosystems. Decapitator Rodent[Z]. (2020-05-31). <https://www.leicabiosystems.com/research/neuroscience/sample-preparation/products/decapitator/>.
  - [15] POOLE G H, FLETCHER D L. A comparison of Argon, carbon dioxide, and nitrogen in a broiler killing system[J]. *Poult Sci*, 1995, 74(7):1218-1223. DOI:10.3382/ps.0741218.
  - [16] RAJ A B, WHITTINGTON P E. Euthanasia of day-old chicks with carbon dioxide and Argon[J]. *Vet Rec*, 1995, 136(12):292-294. DOI:10.1136/vr.136.12.292.
  - [17] CASEY-TROTT T M, MILLMAN S T, TURNER P V, et al. Effectiveness of a nonpenetrating captive bolt for euthanasia of 3 kg to 9 kg pigs[J]. *J Anim Sci*, 2014, 92(11): 5166-5174. DOI:10.2527/jas.2014-7980.
  - [18] SCHÜTT-ABRAHAM I, KNAUER-KRAETZL B, WORMUTH H J. Observations during captive bolt stunning of rabbits[J]. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr*, 1992, 105(1):10-15.
  - [19] MEYER R E, WHITLEY J T, MORROW W E M, et al. Effect of physical and inhaled euthanasia methods on hormonal measures of stress in pigs[J]. *J Swine Health Prod*, 2013, 21(5):261-269.
  - [20] VALENTIM A M, GUEDES S R, PEREIRA A M, et al. Euthanasia using gaseous agents in laboratory rodents[J]. *Lab Anim*, 2016, 50(4):241-253. DOI:10.1177/0023677215618618.
  - [21] HEDENQVIST P, ROUGHAN J V, ANTUNES L, et al. Induction of anaesthesia with desflurane and isoflurane in the rabbit[J]. *Lab Anim*, 2001, 35(2):172-179. DOI:10.1258/0023677011911561.
  - [22] FLECKNELL P A, ROUGHAN J V, HEDENQVIST P. Induction of anaesthesia with sevoflurane and isoflurane in the rabbit[J]. *Lab Anim*, 1999, 33(1):41-46. DOI:10.1258/002367799780578516.
  - [23] SHARP J L, ZAMMIT T G, AZAR T A, et al. Stress-like responses to common procedures in male rats housed alone or with other rats[J]. *Contemp Top Lab Animal Sci*, 2002, 41(4):8-14.
  - [24] BOIVIN G P, HICKMAN D L, CREAMER-HENTE M A, et al. Review of CO<sub>2</sub> as a euthanasia agent for laboratory rats and mice[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2017, 56(5): 491-499.
  - [25] PRITCHETT-CORNING K R. Euthanasia of neonatal rats with carbon dioxide[J]. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 2009,

- 48(1):23-27.
- [26] LORD R. Use of ethanol for euthanasia of mice[J]. Aust Vet J, 1989, 66(8):268. DOI:10.1111/j.1751-0813.1989.tb13590.x.
- [27] ALLEN-WORTHINGTON K H, BRICE A K, MARX J O, et al. Intraperitoneal injection of ethanol for the euthanasia of laboratory mice (*Mus musculus*) and rats (*Rattus norvegicus*)[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2015, 54(6):769-778.
- [28] DE SOUZA DYER C, BRICE A K, MARX J O. Intraperitoneal administration of ethanol as a means of euthanasia for neonatal mice (*Mus musculus*)[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2017, 56(3): 299-306.
- [29] BALKO J A, ODA A, POSNER L P. Use of tricaine methanesulfonate or propofol for immersion euthanasia of goldfish (*Carassius auratus*)[J]. J Am Vet Med Assoc, 2018, 252(12):1555-1561. DOI:10.2460/javma.252.12.1555.
- [30] WILSON J M, BUNTE R M, CARTY A J. Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS-222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*)[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2009, 48(6):785-789.
- [31] COLLYMORE C, BANKS E K, TURNER P V. Lidocaine hydrochloride compared with MS222 for the euthanasia of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2016, 55(6):816-820.
- [32] Office of Animal Care and Use. Guidelines for use of zebrafish in the NIH intramural research program[M]. Bethesda, Md: National Institutes of Health, 2009.
- [33] TORREILLES S L, MCCLURE D E, GREEN S L. Evaluation and refinement of euthanasia methods for *Xenopus laevis*[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2009, 48(5):512-516.
- [34] DUTTON J W 3rd, ARTWOHL J E, HUANG X C, et al. Assessment of pain associated with the injection of sodium pentobarbital in laboratory mice (*Mus musculus*)[J]. J Am Assoc Lab Anim Sci, 2019, 58(3):373-379. DOI: 10.30802/AALAS-JAALAS-18-000094.
- [35] KHOO S Y, LAY B P P, JOYA J, et al. Local anaesthetic refinement of pentobarbital euthanasia reduces abdominal writhing without affecting immunohistochemical endpoints in rats[J]. Lab Anim, 2018, 52(2):152-162. DOI:10.1177/0023677217721260.
- [36] SVENDSEN O, KOK L, LAURITZEN B. Nociception after intraperitoneal injection of a sodium pentobarbitone formulation with and without lidocaine in rats quantified by expression of neuronal c-fos in the spinal cord: a preliminary study[J]. Lab Animals, 2007, 41(2):197-203. DOI:10.1258/002367707780378140.
- [37] 卢选成. 美国兽医协会动物安乐死指南 2013 版 (翻译版)[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2019.
- (收稿日期: 2021-04-25 修回日期: 2021-05-31)

\*\*\*\*\*

## 祝贺本刊编委周洁研究员荣获第三十三届上海市优秀发明金奖

2021 年 6 月, 由上海市总工会、上海市知识产权局、共青团上海市委员会、上海市科学技术协会、上海发明协会等单位联合主办, 经上海市人民政府批准的科技奖励项目之一“上海市优秀发明选拔赛”的获奖项目名单正式揭晓。《实验动物与比较医学》编委、上海实验动物研究中心研究员周洁博士的发明项目《试验小鼠病毒标准化快速核酸检测平台的建立》一举摘得第三十三届上海市优秀发明金奖。



该发明项目的部分相关成果已发表于本刊。具体文献列表如下:

- [1] 周洁, 陶凌云, 赵丽娟, 等. 鼠痘病毒环介导等温扩增可视化检测方法的建立[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(5):343-349. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2018.05.004.
- [2] 周洁, 赵丽娟, 陶凌云, 等. 鼠痘病毒感染机制及其检测方法研究进展[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(2): 160-164. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2018.02.016.
- [3] 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.

《实验动物与比较医学》编辑部

## 从脑胃 ghrelin 通路探讨应激对大鼠食欲的影响

赵怡玲, 高鹏飞, 肖 茜, 张 岚, 潘丹青, 徐月妹

(复旦大学附属金山医院中医科, 上海 201508)

**[摘要]** 目的 从脑胃饥饿素(ghrelin)通路研究应激影响食欲的分子机制。方法 32只雄性Wistar大鼠随机分为对照组和应激组, 每组16只, 每笼2只。采用夹尾应激方法每日2次, 连续21d刺激大鼠, 监测各组大鼠的摄食量及体质量; 在实验第7、21天每组各选取8只大鼠, ELISA法检测血清酰基化 ghrelin 质量浓度; 蛋白质印迹法检测大鼠胃及下丘脑中 ghrelin 蛋白表达, 以及下丘脑中腺苷酸活化蛋白激酶  $\alpha 2$  (Amp-activated protein kinase  $\alpha 2$ , AMPK $\alpha 2$ ) 表达水平; 实时荧光定量 PCR 检测胃中 ghrelin、生长激素分泌素受体(growth hormone secretagogue receptor, GHSR)、瘦素(leptin), 以及下丘脑中 ghrelin、AMPK $\alpha 2$ 、神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY)、刺鼠基因相关蛋白(agouti-related protein, AgRP) mRNA 水平。结果 实验第7天应激组每笼大鼠的总摄食量多于对照组 ( $P < 0.05$ ), 第21天两组大鼠的总摄食量未见明显差异 ( $P > 0.05$ ); 在第7、21天, 两组大鼠的体质量均无明显差异 ( $P > 0.05$ )。应激可以明显上调血清中酰基化 ghrelin 水平 ( $P < 0.01$ ), 胃及下丘脑中 ghrelin 蛋白 ( $P < 0.05$ ) 以及下丘脑中 AMPK $\alpha 2$  蛋白 ( $P < 0.01$ ) 的表达也均明显上调。应激还能明显上调胃内 ghrelin 及 GHSR mRNA 水平 ( $P < 0.01$ ), 下调胃内 leptin mRNA 水平 ( $P < 0.01$ ); 同时上调下丘脑内 ghrelin、AMPK $\alpha 2$ 、NPY 及 AgRP mRNA 水平 ( $P < 0.01$ )。结论 夹尾应激能导致大鼠中枢及外周 ghrelin 水平的上调, 可能对大鼠食欲暂时性增加有影响。

**[关键词]** 应激; 摄食; 饥饿素; 大鼠

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-0207-08

## Effects of Stress on Appetite in Rats Through Hypothalamus and Stomach Ghrelin Pathway

ZHAO Yiling, GAO Pengfei, XIAO Qian, ZHANG Lan, PAN Danqing, XU Yuemei

(Department of Traditional Chinese Medicine, Jinshan Hospital of Fudan University, Shanghai 201508, China)

Correspondence to: XU Yuemei, E-mail: 18930817195@163.com

**[Abstract]** **Objective** To study the molecular mechanism of stress on appetite through hypothalamus and stomach ghrelin pathway. **Methods** Thirty-two male Wistar rats were randomly divided into a control group and a stress group with 16 rats in each group and 2 rats in each cage. Stress was induced by tail pinch for consecutive 21 days. Food intake and body weight of the rats in each group were recorded. Serum ghrelin concentrations of eight rats in each group were detected by ELISA on day 7 and day 21. Ghrelin protein expression in stomach and hypothalamus as well as Amp-activated protein kinase  $\alpha 2$  (AMPK $\alpha 2$ ) protein expression in hypothalamus of rats were measured by Western blotting. The mRNA levels of ghrelin, growth hormone secretagogue receptor (GHSR) and leptin in stomach as well as ghrelin, AMPK $\alpha 2$ , neuropeptide Y (NPY), agouti-related protein (AgRP) in hypothalamus were measured by real-time quantitative PCR. **Results** On day 7, the total food intake of rats in each cage in the stress group was higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ), and there was no significant difference in total food intake between the

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81473610); 第六周期金山区医学重点专科建设项目后备类(JSZK2019H06)

**[作者简介]** 赵怡玲(1991—), 女, 硕士, 中医科医师, 研究方向: 应激的中医药治疗及研究工作。

E-mail: 1032585335@qq.com

**[通信作者]** 徐月妹(1983—), 女, 硕士, 中医科副主任医师, 研究方向: 应激的中医药治疗及研究工作。

E-mail: 18930817195@163.com。

two groups on day 21 ( $P > 0.05$ ). On day 7 and day 21, there was no significant difference in body weight between the two groups ( $P > 0.05$ ). Stress upregulated the serum levels of acylated ghrelin ( $P < 0.01$ ), the ghrelin protein expression levels in stomach and hypothalamus ( $P < 0.05$ ), and the AMPK $\alpha$ 2 protein expression level in hypothalamus ( $P < 0.01$ ). Stress also upregulated the ghrelin and GHSR mRNA expression levels in stomach ( $P < 0.01$ ), downregulated the leptin mRNA expression level in stomach ( $P < 0.01$ ), and upregulated the ghrelin, AMPK $\alpha$ 2, NPY and AgRP mRNA expression levels in hypothalamus ( $P < 0.01$ ). **Conclusion** Tail pinch-induced stress can increase central and peripheral ghrelin levels in rats, and act as a temporary appetite enhancer.

**[Key words]** Stress; Appetite; Ghrelin; Rats

应激会引发一系列生理和行为反应, 显著改变人类和动物的新陈代谢以及行为状态<sup>[1]</sup>。例如, 大多数人在应激状态下摄食会发生变化, 大约有 40% 的人会表现为吃得更多, 40% 的人摄食量会少于平时<sup>[2]</sup>。既往一项针对 133 名患有暴食症女性的调查发现, 应激与暴食行为相关<sup>[3]</sup>。此外, 基于人群的数据表明, 应激状态会增加食物消耗量<sup>[4]</sup>。在一种束缚应激模型大鼠的研究中发现, 应激也可以导致大鼠摄取诸如脂肪及糖类混合物等“舒适”食物的量增加<sup>[5]</sup>。

Ghrelin 又称饥饿素或生长素, 是一种由 28 个氨基酸组成的内源性脑肠肽, 在 1999 年由日本科学家 Kojima 首先分离发现。Ghrelin 是生长激素促分泌素受体 (growth hormone secretagogue receptor, GHSR) 的内源性配体<sup>[6]</sup>, 主要由胃黏膜下层的 X/A 样细胞分泌, 具有改善能量代谢等多种生理功能<sup>[7]</sup>。目前, ghrelin 对食欲的调节作用越来越受到学者的关注。本研究观察应激对大鼠食欲的影响, 并从脑胃 ghrelin 通路探讨应激影响大鼠食欲的具体机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

大鼠酰基化 ghrelin 检测用 ELISA 试剂盒 (货号: #EZRGRA-90K) 购自德国 Merck 公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (货号: PICPI23223) 购自德国 Thermo 公司; 兔抗鼠 ghrelin 多克隆抗体 (货号: ab129383) 和兔抗鼠腺苷酸活化蛋白激酶  $\alpha$ 2 (Amp-activated protein kinase  $\alpha$ 2, AMPK $\alpha$ 2) 多克隆抗体 (货号: ab3760) 购自英国 Abcam 公司; 兔抗鼠 GAPDH 单克隆抗体 (货号: #5174) 购自美国 CST 公司; 辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗 (货号: A0208) 购自上海碧

云天生物技术研究所; RNA 抽提试剂盒 (货号: #K0223) 购自德国 Thermo 公司; 反转录试剂盒 (货号: #K1622) 购自加拿大 Fermentas 公司; 实时荧光 PCR 试剂盒即 qPCR SYBR Green PCR 试剂盒 (货号: 11203ES08) 购自翌圣生物科技 (上海) 有限公司; ghrelin、GHSR、瘦素 (leptin)、AMPK $\alpha$ 2、神经肽 Y (neuropeptide Y, NPY) 和刺鼠基因相关蛋白 (agouti-related protein, AgRP) 引物序列由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

Real-time PCR 仪为美国 ABI 公司产品 (型号: ABI-7300); 低温冷冻离心机为上海卢湘仪离心机仪器有限公司产品 (型号: TG-16M); 旋涡振荡器为青浦沪西仪器厂产品 (型号: K30); 电动匀浆机为德国 FLUKO 公司产品 (型号: PRO200); 电泳仪购自伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司 (型号: Mini Protean 3 Cell); 电转仪为大连竞迈科技有限公司产品 (型号: P S-9); 酶标仪为芬兰雷勃酶标仪 (型号: MK3); 成像系统为上海天能科技有限公司产品 (型号: Tanon-5200)。

### 1.2 实验动物与分组

选用 32 只 SPF 级雄性 6 周龄 Wistar 大鼠, 购自上海西普尔 - 必凯实验动物有限公司 [SCXK (沪) 2013-0016]。大鼠饲养于复旦大学公共卫生临床中心动物实验中心 [SYXK (沪) 2015-0008], 环境维持在  $(21 \pm 1)^\circ\text{C}$ , 12/12 h 光照 - 黑暗周期, 自由摄食与饮水。大鼠适应性饲养 7 d 后, 按照随机数字表法分为对照组和应激组, 每组 16 只, 每 2 只大鼠置于一笼 ( $45.5\text{ cm} \times 34.5\text{ cm} \times 20.0\text{ cm}$ )。每周 (即应激 7、14 和 21 d) 记录一次大鼠的体质量, 每天记录一次每笼大鼠的摄食量。在实验过程中, 实验动物的饲

养管理及使用均按照中华人民共和国科学技术部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》执行,按照3R原则给予实验动物人道关怀。

### 1.3 应激造模方法

应激组大鼠采用夹尾激怒法建立应激模型,具体方式参照文献[8]的方法,并做出部分修改:将2只大鼠装于同一鼠笼内,用纱布包裹止血钳尖端后轻夹大鼠尾巴近段1/3处,每次刺激30 min,每天刺激2次,间隔3 h,连续21 d;每次刺激后大鼠在笼内自由活动。造模过程中发现,夹尾刺激期间,大鼠被激惹,会尖叫,易与同笼大鼠打斗。对照组不进行其他干预。两组大鼠均给予普通饲料,自由摄食及饮水。

### 1.4 行为学观察

造模第1、7、21天,每组随机选取8只大鼠,观察其拒俘反应性。实验人员手戴全新的手套抓捕大鼠,观察大鼠的拒俘反应并记分。记分标准:很容易抓取动物,记0分;尖叫或回避,记1分;尖叫并回避,记2分;逃脱,记3分;逃脱并尖叫,记4分;咬或试图撕咬手套,记5分;主动跃起攻击,记6分。

### 1.5 ELISA法检测血清ghrelin水平

造模第7及第21天,每组随机取8只大鼠,用20%乌拉坦以5 mL/kg剂量腹腔注射麻醉大鼠后,心脏采血,收集于4 mL EDTA抗凝管中,以3 000 r/min转速离心15 min后,取上层血清,储存在-80℃冰箱中待检。已知ghrelin在血清中主要以高活性的酰基化和有限生物活性的去酰基化形式存在。因此,采用酰基化ghrelin的ELISA试剂盒测定大鼠血清中活性ghrelin蛋白水平。

### 1.6 蛋白质印迹法测定胃内ghrelin蛋白以及下丘脑组织内ghrelin和AMPK $\alpha$ 2蛋白的表达

造模第7及第21天,每组随机取8只大鼠,按1.5节方法行心脏采血后,取脏器标本胃及下丘脑组织。取一份组织先充分裂解后抽提蛋白,然后使用BCA蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。每孔按蛋白量25  $\mu$ g上样,进行10% SDS-PAGE。电泳结束后,将凝胶上的蛋白条带转移至纤维素膜上,5%脱脂奶粉溶液室温封闭1 h或4℃过夜。分别加入按照1:250稀释的ghrelin一抗、1:2 000稀释的AMPK $\alpha$ 2一抗和1:2 000稀释的

GAPDH一抗,4℃水平摇床上孵育过夜。TBST漂洗3次后,加入按照1:1 000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗,与膜37℃孵育1 h。继续用TBST洗涤3次,ECL化学发光法检测:取ECL发光液A和B等量混匀,加在膜的正面,暗室避光5 min,倒掉显色液,用纸吸取显色液,在上面盖上一层平整的透明纸,将其放入成像系统中进行扫描。

### 1.7 实时荧光定量PCR法检测胃及下丘脑内ghrelin通路相关mRNA表达

按照RNA试剂盒说明,从胃及下丘脑组织中提取总RNA。然后按照反转录试剂盒说明配制反转录反应体系,总体积为25  $\mu$ L,其中含RNA-Primer Mix 12  $\mu$ L、5 $\times$  RT Reaction Buffer 5  $\mu$ L、25 mmol/L dNTPs 1  $\mu$ L、25 U/ $\mu$ L RNase Inhibitor 1  $\mu$ L、200 U/ $\mu$ L M-MLV RTase 1  $\mu$ L、Oligo(dT)18 Primer 1  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O (DNase-free) 4  $\mu$ L。反转录反应条件为:37℃ 60 min,85℃ 5 min,4℃ 5 min。RNA反转录成cDNA后,取2  $\mu$ L cDNA模板,使用SYBR Green PCR试剂盒进行目的基因的PCR扩增。PCR体系总体积为25  $\mu$ L,其中含SYBR Green Mix 12.5  $\mu$ L、上下游引物各0.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 9.5  $\mu$ L和cDNA模板2  $\mu$ L。PCR反应条件:95℃初始化10 min;然后95℃ 15 s,60℃ 45 s,连续40个循环;最后60℃退火15 s。PCR所用引物的序列见表1。以GAPDH作为内参基因,测得循环阈值(cycle threshold, Ct),用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法[9]计算ghrelin、GHSR、leptin、AMPK $\alpha$ 2、NPY和AgRP mRNA的相对表达量。

### 1.8 统计分析

采用SPSS 22.0软件进行数据统计分析。计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示。组间比较采用独立样本 $t$ 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 应激对大鼠拒俘反应的影响

在实验过程中,观察到夹尾刺激会导致大鼠易于被激怒,出现互相打斗的现象。在造模第1、7、21天,每组随机选取8只大鼠观察其拒俘反应。结果显示:应激组大鼠在第1、7、21

表 1 PCR 引物序列  
Table 1 PCR primer sequences

| 基因名称            | 引物序列                                                               | 引物长度 /bp |
|-----------------|--------------------------------------------------------------------|----------|
| Ghrelin         | 上游: 5'-GGTGTCTTCAGCGACTATCTGC-3'<br>下游: 5'-TCCTCCTCTGCCTCTTCTGC-3' | 210      |
| GHSR            | 上游: 5'-ACCACCACCAACCTCTAC-3'<br>下游: 5'-CAGCTCTCGCTGACAAAC-3'       | 152      |
| AMPK $\alpha$ 2 | 上游: 5'-ATGAGGTGGTGGAGCAGAGG-3'<br>下游: 5'-AACGGGCTAAAGCAGTGATAAG-3' | 237      |
| Leptin          | 上游: 5'-TCACCCATTCTGAGTTTGTCC-3'<br>下游: 5'-TCTCGCAGGTTCTCCAGGTC-3'  | 120      |
| NPY             | 上游: 5'-TCGCTCTATCCCTGCTCGTG-3'<br>下游: 5'-GGGGCATTCTGTGCTTTC-3'     | 220      |
| AgRP            | 上游: 5'-GCTGACTGCAATGTTGCTGAG-3'<br>下游: 5'-GACTCGCGGTTCTGTGGATC-3'  | 228      |
| GAPDH           | 上游: 5'-GGAGTCTACTGGCGTCTTCAC-3'<br>下游: 5'-ATGAGCCCTTCCACGATGC-3'   | 237      |

注: Ghrelin 即饥饿素, AMPK $\alpha$ 2 即腺苷酸活化蛋白激酶  $\alpha$ 2, GHSR 即生长激素促分泌素受体, Leptin 即瘦素, NPY 即神经肽 Y, AgRP 即刺鼠基因相关蛋白。

天拒俘反应记分明显高于对照组 ( $P < 0.01$ , 图 1A), 表现为尖叫、回避、挣脱, 甚至有攻击和撕咬行为, 提示应激大鼠表现出明显的抵抗性。

## 2.2 应激对大鼠体质量与摄食的影响

在应激 7 d 后, 应激组每笼大鼠的总摄食量为  $(308.90 \pm 14.34)$  g, 较对照组的  $(296.55 \pm 7.54)$  g 明显增加, 两组之间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ , 图 1B); 而在应激 14 d 及 21 d 时两组大鼠的每笼总摄食量差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 1B)。每周对两组大鼠体质量进行监测, 结果显示应激 7、14、21 d 时的大鼠体

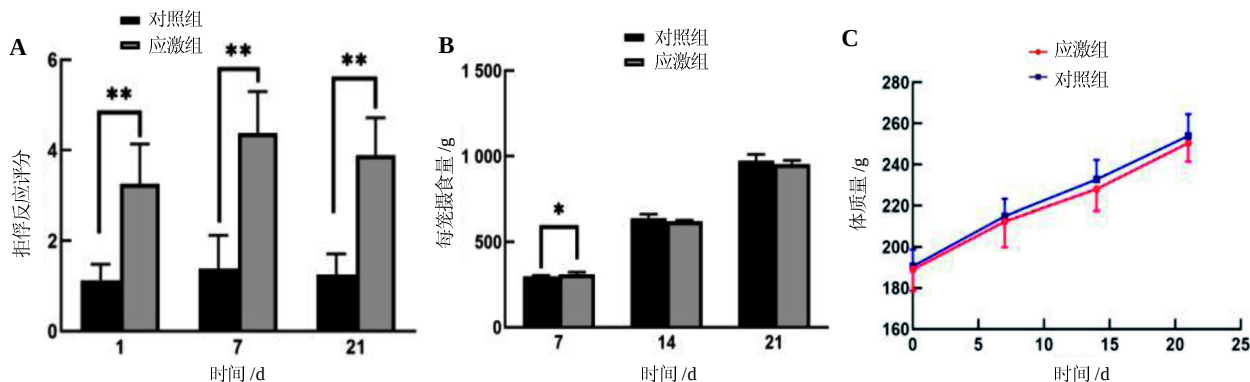
量与对照组相比, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ , 图 1C)。

## 2.3 应激对大鼠血清酰基化 ghrelin 水平的影响

用 ELISA 法测定两组大鼠第 7 及第 21 天时血清中酰基化 ghrelin 水平, 结果如图 2 所示。应激 7 d 及 21 d 时大鼠血清酰基化 ghrelin 水平均较对照组明显升高, 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

## 2.4 应激对大鼠胃内 ghrelin 蛋白表达及下丘脑内 ghrelin、AMPK $\alpha$ 2 蛋白表达的影响

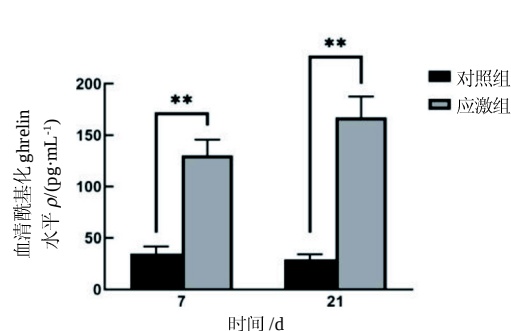
用蛋白质印迹法测定两组大鼠胃内及下丘脑



注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 每组 8 只大鼠。

图 1 各组大鼠拒俘反应 (A)、摄食量 (B) 和体质量 (C) 比较

Figure 1 Capture-resistance (A), food intake (B) and body weight (C) of rats in two groups



注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 每个时间点两组各取 8 只大鼠。

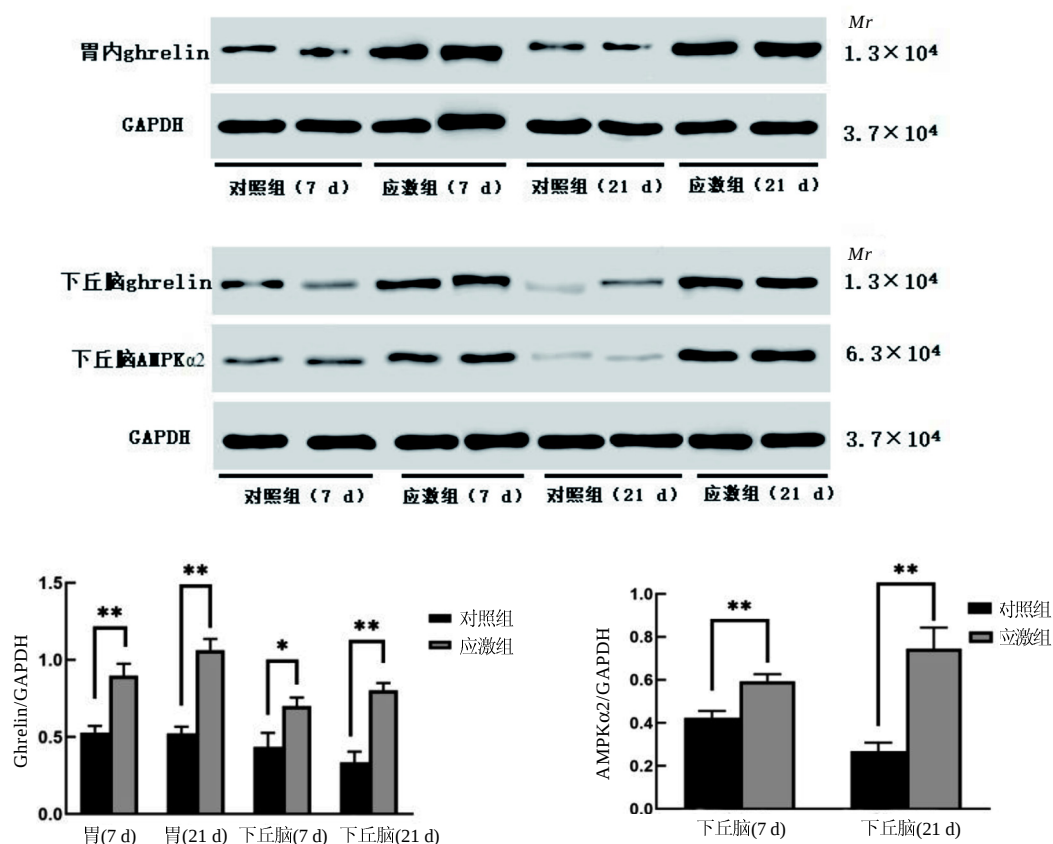
图 2 ELISA 法检测各组大鼠血清酰基化 ghrelin 水平  
Figure 2 Serum levels of acylated ghrelin in two groups of rats detected by ELISA

内 ghrelin 蛋白表达水平, 结果如图 3 所示。应激 7 d 和 21 d 时大鼠胃及下丘脑内总 ghrelin 蛋

白表达水平明显高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 而且下丘脑内 AMPK $\alpha 2$  蛋白表达水平也明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。

## 2.5 应激对大鼠胃内及下丘脑内食欲相关基因表达的影响

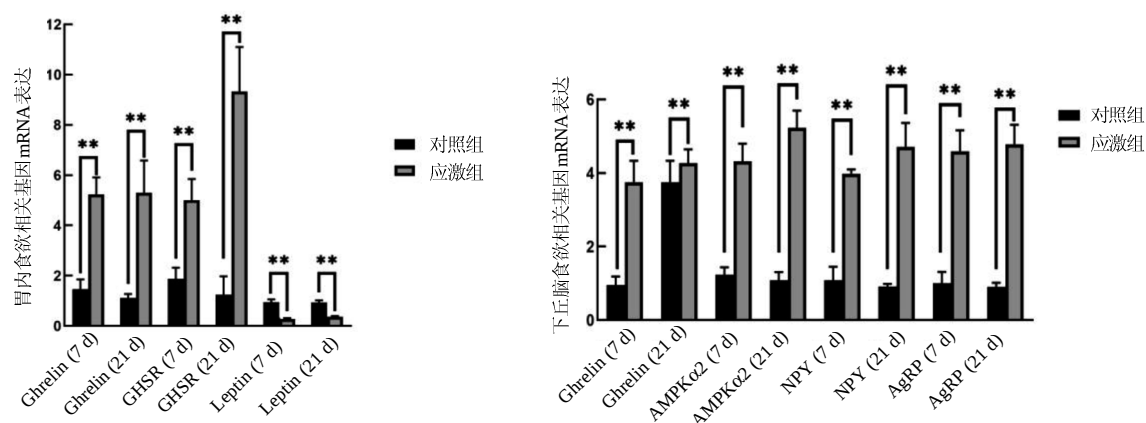
实时荧光定量 PCR 法检测两组大鼠食欲相关基因的表达水平, 包括胃内 ghrelin、GHSR、leptin 以及下丘脑内 ghrelin、AgRP、NPY、AMPK $\alpha 2$ 。结果如图 4 所示, 应激 7 d 和 21 d 后大鼠胃内 ghrelin 及 GHSR 的 mRNA 水平明显高于对照组 ( $P < 0.01$ ), 而应激组胃内 leptin 的 mRNA 水平明显低于对照组 ( $P < 0.01$ ); 另外, 应激组大鼠下丘脑中 ghrelin、AgRP、NPY、AMPK $\alpha 2$  的 mRNA 水平均明显高于对照组 ( $P < 0.01$ )。



注: Ghrelin 即饥饿素, AMPK $\alpha 2$  即下丘脑内腺苷酸活化蛋白激酶  $\alpha 2$ 。\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 每个时间点两组各取 8 只大鼠。

图 3 蛋白质印迹法检测两组大鼠胃及下丘脑内 ghrelin、AMPK $\alpha 2$  蛋白表达

Figure 3 Expressions of ghrelin and AMPK $\alpha 2$  proteins in stomach and hypothalamus in two groups of rats detected by Western blotting



注: Ghrelin 即饥饿素, GHSR 即生长激素分泌素受体, Leptin 即瘦素, AMPKα2 即下丘脑内腺苷酸活化蛋白激酶 α2, NPY 即神经肽 Y, AgRP 即刺鼠基因相关蛋白。\*P<0.05, \*\*P<0.01, 每个时间点两组各取 8 只大鼠。

图 4 实时荧光定量 PCR 法测定两组大鼠食欲相关基因 mRNA 表达水平

Figure 4 mRNA expressions of appetite-related genes in two groups of rats measured by real-time fluorescent quantitative PCR

### 3 讨论

Ghrelin 与食欲的调节相关。本研究中检测了大鼠血清酰基化 ghrelin 水平, 以及胃和下丘脑组织中 ghrelin 蛋白表达水平, 同时测定了食欲反馈通路上一些相关基因的表达, 如胃内 GHSR、leptin, 以及下丘脑内 AMPKα2、NPY、AgRP mRNA 水平。研究结果表明, 应激能上调大鼠血清酰基化 ghrelin 水平, 上调大鼠胃及下丘脑中 ghrelin 蛋白表达; 也能导致与食欲促进相关的胃内 ghrelin、GHSR mRNA 水平以及下丘脑内 ghrelin、AgRP、NPY、AMPKα2 mRNA 的水平明显升高, 下调与食欲抑制相关的胃内 leptin 水平。本研究也监测了大鼠摄食量及每周的体重。在 21 d 的实验过程中发现, 第 7 天应激组每笼大鼠总摄食量增加, 提示 7 d 应激状态下大鼠食物摄入量的增加可能与其血清酰基化 ghrelin、胃及下丘脑内 ghrelin 表达水平的升高相关。本研究结果提示, ghrelin 参与了应激大鼠食欲反馈通路的调节, 应激能上调大鼠体内 ghrelin 水平, 进而导致摄食量的增加。

既往研究已经证明, ghrelin 是一种参与食欲调节的因子, 能增加实验动物对食物摄入的渴望<sup>[10-11]</sup>。位于下丘脑的 ghrelin 神经元能通过激活下丘脑 NPY/AgRP 信号、阿片促黑素皮质激素原 (proopiomelanocortin, POMC) 和促肾上腺

皮质激素释放激素 (corticotropin releasing hormone, CRH) 神经元, 向大脑传递饥饿信号, 从而增强食欲, 进而调节机体能量自稳态<sup>[12]</sup>。而在食欲调节反馈通路上, NPY/AgRP 信号、AMPK 也是喂养-能量稳态控制系统的关键因素<sup>[13-15]</sup>。Ghrelin 具有促进胃酸分泌、调节胃肠运动、增进食欲等重要生理功能<sup>[16]</sup>, 在 GHSR 基因敲除小鼠中发现其胃排空时间延迟<sup>[17]</sup>, 提示 ghrelin 是一种内源性的食物摄入调节因子。在对人群纵向随访中也发现, 高水平的 ghrelin 与高度的食物渴望相关<sup>[18-19]</sup>。

本研究还检测了对食欲有抑制作用的胃内 leptin mRNA 水平。Leptin 是一种脂肪细胞来源的激素, 参与调节食物摄入与能量代谢, 具有抑制食欲、减少摄食的作用<sup>[20]</sup>。7 d 应激虽然会增加大鼠总食物摄入量, 但对其体重没有明显影响。本研究还发现大鼠 AMPK 水平上调。研究显示, 激活的 AMPK 通过对脂肪、蛋白质和糖类代谢的调控, 维持体内能量平衡<sup>[21]</sup>。笔者推测, 摄食增加, 而体重未增加, 可能与压力激活交感神经系统导致的代谢增加有关; 应激状态下, 交感神经系统的激活会增加呼吸频率、血压和心率, 并激活分解代谢通路, 这时糖原被水解, 葡萄糖异生作用被刺激, 为需要大量能量的组织 (主要是大脑、骨骼和心肌) 提供葡萄糖; AMPK 也对脂肪、糖类代谢进行调控, 以应对体

内平衡的威胁<sup>[22]</sup>。

除了促进食欲以外, ghrelin 具有减少胰岛素分泌、调节葡萄糖稳态<sup>[23]</sup>、抗肌肉萎缩<sup>[24]</sup>等作用。另外, ghrelin 与抑郁的相关性也是目前的研究热点之一。多项研究发现, 抑郁症患者的血清 ghrelin 水平较健康人升高, 在抗抑郁治疗后血清 ghrelin 水平下降<sup>[25-27]</sup>; 在抗抑郁药耐药患者中, 血清 ghrelin 水平也维持稳定<sup>[28]</sup>。编码 ghrelin 的核苷酸多态性已被证实与人类抑郁症发生风险有关<sup>[29]</sup>。在一些动物实验中发现, 食物剥夺、足部电击、社交失败、强迫制动或慢性不可预测温和应激等生理或心理应激源均能刺激啮齿类动物的 ghrelin 释放<sup>[30]</sup>; 这与本实验结果相吻合。因此, 笔者推测暴露于应激源下, 大鼠外周及中枢 ghrelin 的水平升高可能是为了应对压力的一种稳态适应, 与其负性情绪相关。

另一方面, 本研究还发现, 应激组大鼠虽然血清、脑、胃 ghrelin 水平持续高于对照组, 但至第 14、21 天统计两组大鼠的总摄食量无明显差异, 两组大鼠的体质量也无明显差异。已知啮齿类动物暴露于急性和慢性应激源对食物摄取量和体质量有影响, 而且胃 ghrelin 系统在应激相关的进食行为中发挥作用, 但这一机制尚未完全探明。在亚慢性和慢性束缚应激模型中, 食物摄入通常会受到负面影响, 同时伴随体质量下降或对体质量无影响<sup>[31-33]</sup>。已有研究证实, 慢性压力是人类抑郁形成的主要因素。对动物的慢性应激能够引起类似临床症状的行为变化, 如快感缺乏、体质量减轻和运动/活动不足。在 21 d 应激状态下, ghrelin 水平升高但摄食量并未增加, 推测可能与大鼠负性情绪相关。研究表明, 2 周慢性应激足以诱发类似抑郁的行为<sup>[34]</sup>。在持续性应激状态下, 大鼠摄食从以增加食物为代价来缓解类似焦虑和抑郁症状, 转变为逐渐摄食减少, 这可能与抑郁状态下行为绝望有关。

本研究尚存在一定的局限性, 如本次研究未观察大鼠行为学与应激及摄食的相关性。下一步研究拟结合动物行为学持续动态观察应激对大鼠脑胃 ghrelin 通路的影响, 进一步研究 ghrelin 异常与应激导致的负性情绪及摄食行为的相关性。

综上所述, 应激会导致大鼠外周及中枢

ghrelin 水平的升高, 以及 ghrelin 通路中食欲相关因子的异常表达, 但 ghrelin 系统在应激相关的进食行为中的作用及其机制尚待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] DALLMAN M F, PECORARO N, AKANA S F, et al. Chronic stress and obesity: a new view of "comfort food"[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(20):11696-11701. DOI:10.1073/pnas.1934666100.
- [2] OLIVER G, WARDLE J. Perceived effects of stress on food choice[J]. *Physiol Behav*, 1999, 66(3):511-515. DOI:10.1016/S0031-9384(98)00322-9.
- [3] KLATZKIN R R, GAFFNEY S, CYRUS K, et al. Stress-induced eating in women with binge-eating disorder and obesity[J]. *Biol Psychol*, 2018, 131:96-106. DOI:10.1016/j.biopsycho.2016.11.002.
- [4] SINHA R. Chronic stress, drug use, and vulnerability to addiction[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1141:105-130. DOI: 10.1196/annals.1441.030.
- [5] PECORARO N, REYES F, GOMEZ F, et al. Chronic stress promotes palatable feeding, which reduces signs of stress: feedforward and feedback effects of chronic stress[J]. *Endocrinology*, 2004, 145(8):3754-3762. DOI:10.1210/en.2004-0305.
- [6] KOJIMA M, HOSODA H, DATE Y, et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach [J]. *Nature*, 1999, 402(6762):656-660. DOI:10.1038/45230.
- [7] DATE Y, KOJIMA M, HOSODA H, et al. Ghrelin, a novel growth hormone-releasing acylated peptide, is synthesized in a distinct endocrine cell type in the gastrointestinal tracts of rats and humans[J]. *Endocrinology*, 2000, 141(11):4255-4261. DOI:10.1210/endo.141.11.7757.
- [8] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000.
- [9] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method[J]. *Methods*, 2001, 25(4):402-408. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.
- [10] CHAO A M, JASTREBOFF A M, WHITE M A, et al. Stress, cortisol, and other appetite-related hormones: Prospective prediction of 6-month changes in food cravings and weight[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2017, 25(4):713-720. DOI:10.1002/oby.21790.
- [11] CAHILL S, TUPLIN E, HOLAHAN M R. Circannual changes in stress and feeding hormones and their effect on food-seeking behaviors[J]. *Front Neurosci*, 2013, 7:140.

- DOI:10.3389/fnins.2013.00140.
- [12] STANLEY S, WYNNE K, MCGOWAN B, et al. Hormonal regulation of food intake[J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(4): 1131-1158. DOI:10.1152/physrev.00015.2004.
- [13] ANDREWS Z B, LIU Z W, WALLLINGFORD N, et al. UCP<sub>2</sub> mediates ghrelin's action on NPY/AgRP neurons by lowering free radicals[J]. *Nature*, 2008, 454(7206):846-851. DOI:10.1038/nature07181.
- [14] BLASIAK A, GUNDLACH A L, HESS G, et al. Interactions of circadian rhythmicity, stress and orexigenic neuropeptide systems: implications for food intake control [J]. *Front Neurosci*, 2017, 11:127. DOI:10.3389/fnins.2017.00127.
- [15] LIM C T, KOLA B, KORBONITS M. AMPK as a mediator of hormonal signalling[J]. *J Mol Endocrinol*, 2010, 44(2): 87-97. DOI:10.1677/JME-09-0063.
- [16] AKAMIZU T, KANGAWA K. The physiological significance and potential clinical applications of ghrelin[J]. *Eur J Intern Med*, 2012, 23(3):197-202. DOI:10.1016/j.ejim.2011.12.001.
- [17] YANG C G, WANG W G, YAN J, et al. Gastric motility in ghrelin receptor knockout mice[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 7(1):83-88. DOI:10.3892/mmr.2012.1157.
- [18] CHAO A, GRILO C M, WHITE M A, et al. Food cravings, food intake, and weight status in a community-based sample [J]. *Eat Behav*, 2014, 15(3):478-482. DOI:10.1016/j.eatbeh.2014.06.003.
- [19] VOIGT J P, FINK H. Serotonin controlling feeding and satiety[J]. *Behav Brain Res*, 2015, 277:14-31. DOI:10.1016/j.bbr.2014.08.065.
- [20] ZHANG Y, CHUA S. Leptin function and regulation[J]. *Compr Physiol*, 2017, 8(1):351-369. DOI:10.1002/cphy.c160041.
- [21] TAMARGO-GÓMEZ I, MARIÑO G. AMPK: regulation of metabolic dynamics in the context of autophagy[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(12):E3812. DOI:10.3390/ijms19123812.
- [22] LAMBERT G W, STRAZNICKY N E, LAMBERT E A, et al. Sympathetic nervous activation in obesity and the metabolic syndrome: causes, consequences and therapeutic implications[J]. *Pharmacol Ther*, 2010, 126(2):159-172. DOI:10.1016/j.pharmthera.2010.02.002.
- [23] VERHULST P J, DEPOORTERE I. Ghrelin's second life: from appetite stimulator to glucose regulator[J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(25):3183-3195. DOI:10.3748/wjg.v18.i25.3183.
- [24] PORPORATO P E, FILIGHEDDU N, REANO S, et al. Acylated and unacylated ghrelin impair skeletal muscle atrophy in mice[J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(2):611-622. DOI:10.1172/JCI39920.
- [25] BARIM A O, AYDIN S, COLAK R, et al. Ghrelin, paraoxonase and arylesterase levels in depressive patients before and after citalopram treatment[J]. *Clin Biochem*, 2009, 42(10-11):1076-1081. DOI:10.1016/j.clinbiochem.2009.02.020.
- [26] OZSOY S, BESIRLI A, ABDULREZZAK U, et al. Serum ghrelin and leptin levels in patients with depression and the effects of treatment[J]. *Psychiatry Investig*, 2014, 11(2):167-172. DOI:10.4306/pi.2014.11.2.167.
- [27] KURT E, GULER O, SERTESER M, et al. The effects of electroconvulsive therapy on ghrelin, leptin and cholesterol levels in patients with mood disorders[J]. *Neurosci Lett*, 2007, 426(1):49-53. DOI:10.1016/j.neulet.2007.08.018.
- [28] ISHITOBI Y, KOHNO K, KANEHISA M, et al. Serum ghrelin levels and the effects of antidepressants in major depressive disorder and panic disorder[J]. *Neuropsychobiology*, 2012, 66(3):185-192. DOI:10.1159/000339948.
- [29] NAKASHIMA K, AKIYOSHI J, HATANO K, et al. Ghrelin gene polymorphism is associated with depression, but not panic disorder[J]. *Psychiatr Genet*, 2008, 18(5): 257. DOI:10.1097/YPG.0b013e328306c979.
- [30] FRITZ E M, SINGEWALD N, DE BUNDEL D. The good, the bad and the unknown aspects of ghrelin in stress coping and stress-related psychiatric disorders[J]. *Front Synaptic Neurosci*, 2020, 12:594484. DOI:10.3389/fnsyn.2020.594484.
- [31] JEONG J Y, LEE D H, KANG S S. Effects of chronic restraint stress on body weight, food intake, and hypothalamic gene expressions in mice[J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2013, 28(4):288-296. DOI:10.3803/EnM.2013.28.4.288.
- [32] JIANG S Z, EIDEN L E. Activation of the HPA axis and depression of feeding behavior induced by restraint stress are separately regulated by PACAPergic neurotransmission in the mouse[J]. *Stress*, 2016, 19(4):374-382. DOI:10.1080/10253890.2016.1174851.
- [33] LI B, XU Y M, PAN D Q, et al. Effect of immobilization stress on the appetite and stomach ghrelin expression in maternal mice[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(12):15993-15999.
- [34] PATTERSON Z R, DUCHARME R, ANISMAN H, et al. Altered metabolic and neurochemical responses to chronic unpredictable stressors in ghrelin receptor-deficient mice [J]. *Eur J Neurosci*, 2010, 32(4):632-639. DOI:10.1111/j.1460-9568.2010.07310.x.

(收稿日期: 2020-11-14 修回日期: 2021-03-16)

# 松果体损伤大鼠模型 3 种制备方法的比较研究

王丹妮, 宋美卿, 杨 铃, 冯玛莉

(山西省中医药研究院中心实验室, 太原 030012)

**[摘要]** 目的 比较对氯苯丙氨酸 (para-chlorophenylalanine, PCPA)、电刺激应激及 PCPA 联合电刺激 3 种不同方法制备的松果体损伤模型, 评价松果体结构与功能变化, 为建立方法简便、建模时间短的松果体损伤模型提供依据。方法 40 只大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为空白对照组、PCPA 组、电刺激组及 PCPA 联合电刺激组。空白对照组不做任何处理; PCPA 组大鼠腹腔注射 PCPA 450 mg/kg, 连续 2 d; 电刺激组大鼠使用穿梭箱电刺激 (电压 30 V, 电流 0.8 A, 刺激时间 30 s, 间隔时间 30 s, 循环 60 次), 连续 5 d; PCPA 联合电刺激组大鼠使用电刺激第 4 天加用 PCPA, 操作同前。测试各组大鼠旷场活动、高架十字迷宫等行为学以及戊巴比妥钠协同睡眠等指标, ELISA 法检测血清褪黑素 (melatonin, MT) 水平, 镜下观察松果体病理组织结构。结果 3 个实验组大鼠旷场活动总距离和平均速度均显著低于空白对照组 ( $P < 0.01$ ), PCPA 组、PCPA 联合电刺激组旷场活动中央区时间显著长于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), PCPA 联合电刺激组进入开放臂次数显著多于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), PCPA 组、PCPA 联合电刺激组进入开放臂时间显著长于空白对照组 ( $P < 0.05$ )。PCPA 组入睡潜伏期显著长于空白对照组 ( $P < 0.05$ )。3 个实验组血清 MT 水平均显著低于空白对照组 ( $P < 0.01$ )。病理组织学变化: PCPA 组松果体细胞排列紊乱, 核固缩, 数目明显减少, 空泡变性增多; 电刺激组松果体排列紊乱, 核固缩, 细胞数目稍减少, 空泡变性稍增多; PCPA 联合电刺激组松果体细胞排列紊乱, 核固缩, 数目明显减少, 空泡变性增多。结论 3 种不同造模方法均可造成大鼠松果体不同程度的损伤, 可为制作松果体不同损伤模型提供参考。

**[关键词]** 松果体; 昼夜节律; 褪黑素; 病理; 大鼠

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-0215-05

## Comparative Study of Three Pineal Gland Injury Model in Rats

WANG Danni, SONG Meiqing, YANG Qian, FENG Mali

(Central Laboratory of Shanxi Academy of Traditional Chinese Medicine, Taiyuan 030012, China)

Correspondence to: FENG Mali, E-mail: fengmali1@163.com

**[Abstract]** **Objective** To compare pineal gland injury models established using para-chlorophenylalanine (PCPA), electrical stimulation stress, and PCPA plus electrical stimulation, to evaluate the structure and function changes of the pineal gland, and to establish a simple and effective method of pineal gland injury model with short modeling time. **Methods** Forty rats were adaptively reared for 1 week and randomly divided into blank control, PCPA, electrical stimulation, and PCPA + electrical stimulation groups. The control group was left untreated. The PCPA group was intraperitoneally injected with PCPA 450 mg/kg for 2 consecutive days. The electric stimulation group was given a shuttle box with electric stimulation (voltage 30 V, current 0.8 A, stimulation time 30 s, interval 30 s, 60 cycles) for 5 consecutive days. The rats in the PCPA + electrical stimulation group were given electrical stimulation plus PCPA on the 4th day. The operation was the same as before. The rats in each group were tested for open field activities, elevated plus maze and other behaviors, pentobarbital sodium for sleep and other indicators. ELISA was performed to detect serum melatonin

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81173574); 山西省自然科学基金(201901D111427)

**[作者简介]** 王丹妮(1993—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理与内分泌疾病研究。E-mail: wdn0125@163.com

**[通信作者]** 冯玛莉(1963—), 女, 主任医师, 研究方向: 中药药理与内分泌疾病研究。E-mail: fengmali1@163.com

(MT) levels, and the pathological structure of the pineal gland was observed under a microscope.

**Results** The total distance and average speed of the rats in the three experimental groups were significantly lower than those of the rats in the control group ( $P < 0.01$ ), and the central area time of the PCPA and PCPA + electrical stimulation groups was significantly higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The open arm number was significantly higher in the PCPA + electrical stimulation group than that the control group ( $P < 0.05$ ), and the open arm time ratios of the PCPA and PCPA + electrical stimulation groups were significantly higher than that of the control group ( $P < 0.05$ ). The latency period to falling asleep in the PCPA group was significantly higher than that in the control group ( $P < 0.05$ ). The serum MT levels in the three experimental groups were significantly lower than that of the control group ( $P < 0.01$ ). In the PCPA group, the pineal gland cells were disorderly arranged, nuclear pyknosis was evident, the number of cells was significantly reduced, and vacuolar degeneration was increased. In the electrical stimulation group, the pineal gland cells were disorderly arranged, nuclear pyknosis was evident, the number of cells was slightly reduced, and vacuolar degeneration was slightly increased. In the PCPA + electrical stimulation group, the pineal gland cells were disorderly arranged, nuclear pyknosis was evident, the number of cells was significantly reduced, and vacuolar degeneration was increased. **Conclusion** Different degrees of damage to the pineal gland in rats can be caused by three different methods of making model, which can provide reference for making different pineal gland injury models.

**[Key words]** Pineal gland; Circadian rhythm; Melatonin; Pathology; Rats

松果体是机体调控生物钟节律的重要组成部分,是维持内源性生物钟运作的核心元件<sup>[1-2]</sup>。松果体合成分泌的褪黑素(melatonin, MT)具有促进睡眠、调节时差、抗衰老、调节免疫和抗肿瘤等多种作用,因其可促进睡眠,被称为“生理性催眠剂”<sup>[3-5]</sup>。随着年龄增长,松果体细胞会变大,有空泡改变,合成分泌褪黑素的能力下降,其调节昼夜节律作用减退<sup>[6]</sup>。目前,松果体损伤动物模型有:通过分离左颈总动脉且永久性结扎,使新生大鼠出现缺氧缺血性脑病,研究松果体对机体昼夜节律的影响<sup>[7]</sup>,该手术操作复杂,成功率低;D-半乳糖致衰老大鼠松果体过氧化损伤模型,造模时间长<sup>[8]</sup>;对氯苯丙氨酸(para-chlorophenylalanine, PCPA)腹腔注射是目前公认的经典失眠动物模型,PCPA通过抑制色氨酸氨化酶合成,减少5-羟色胺(5-hydroxytryptamine, 5-HT)的生成,使睡眠-觉醒周期紊乱,该操作较简单,具有良好的可重复性<sup>[9]</sup>;电刺激应激模型可使昼夜节律紊乱,且操作简单,可重复性强<sup>[10]</sup>。本课题组在制备PCPA致失眠大鼠模型和电刺激致睡眠-觉醒周期紊乱时发现两者均对松果体有影响,为寻找方法简便、造模时间短的松果体损伤模型,开展了以下实验。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

清洁级雄性SD大鼠40只,体质量160~180 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司[SCXK(京)2014-0004]。动物饲养于山西省中医药研究院中心实验室(符合动物实验通用要求,可开展SPF级动物实验),温度:20~23℃,湿度:40%~50%。实验经本院伦理委员会审查批准(SZYLY2020KY-0401),实验中涉及处理动物的操作均符合国家相关法规要求。

### 1.2 主要仪器与试剂

穿梭视屏分析系统(DB079)购自北京智鼠多宝生物科技有限责任公司;大鼠小鼠旷场活动实验系统(OFT-100)购自成都泰盟科技有限公司;全自动全封闭脱水机(Excelsior)购自美国Thermo公司;石蜡包埋机(TKY-BMB)购自湖北康泰医疗设备有限公司;万能显微镜荧光成像系统(BX51+DPT2+IPE)购自日本Olympus公司;多功能微孔读板机(H1)购自美国BioTek公司;PCPA(批号:1002600696)购自美国Sigma公司;戊巴比妥钠(批号:57-33-0)购自美国Sigma公司;无水碳酸钠(批号:931103)和碳酸氢钠(批号:20070713)

均为北京化工厂产品。MT 检测用 ELISA 试剂盒 (批号: EME174) 购自德国 IBL 公司。

### 1.3 模型制备

大鼠适应性饲养 1 周后, 随机分为空白对照组、PCPA 组、电刺激组和 PCPA 联合电刺激组, 每组 10 只。空白对照组不予任何操作, 其余各组采用以下不同造模方法。PCPA 组: 在实验第 4 天开始腹腔注射 PCPA 混悬液 (分别称取无水碳酸钠及碳酸氢钠 3.392 g、1.512 g, 分别加蒸馏水 320 mL、180 mL, 搅拌均匀, 混合, 检测 pH 为 10.1, 将 PCPA 溶于碳酸盐缓冲液, 配制为 45 g/L 的混悬液, 80 °C 加热 30 min, 超声 5 min, 现用现配), 腹腔注射 10 mL/kg, 连续 2 d。电刺激组: 实验第 1 天将大鼠置于穿梭箱并给予电刺激, 电刺激方法为电压 30 V、电流 0.8 A、刺激时间 30 s、间隔时间 30 s、循环 60 次, 同一时间连续电刺激 5 d。PCPA 联合电刺激组: 电刺激方法同电刺激组, 电刺激第 4 天加用 PCPA, 方法同 PCPA 组。

### 1.4 指标检测

#### 1.4.1 旷场活动测试

旷场为 100 cm × 100 cm × 50 cm 的开口箱, 将大鼠置于旷场中适应 3 min, 接着记录 5 min 活动轨迹, 以检测其旷场活动。使用视频软件分析系统, 将其底部划分为 3 × 3 格子并记录其活动轨迹。检测大鼠活动总路程、平均速度及中央区停留时间。每次更换动物之前, 用 75% 乙醇溶液擦拭旷场及检测仪器, 以免上次动物残留信息影响下次测试结果。

#### 1.4.2 高架十字迷宫测试

分别将大鼠置于高架十字迷宫同一处 (作为起始位置), 视频分析观察其 3 min 内活动轨迹。每次测试结束后, 喷洒 75% 乙醇溶液, 清洁大鼠活动区域以祛除残留气味, 避免干扰下一只动物的测试结果。

进入开放臂次数 (open arm entry, OE): 大鼠四足均在开放臂内至任一足从该臂中完全退出的次数总和。进入封闭臂次数: 大鼠四足均在封闭臂内至任一足从该臂中完全退出的次数总和。进入开放臂次数百分比 (OE%):  $OE\% = \text{进入开放臂次数} / (\text{进入开放臂次数} + \text{进入封闭臂}$

次数) × 100%。进入开放臂的时间 (open arm time, OT): 大鼠四足均在开放臂中至任一足从该臂中完全退出的时间。进入封闭臂时间: 大鼠四足均在封闭臂中至任一足从该臂中完全退出的时间。进入开放臂时间百分比 (OT%):  $OT\% = \text{开放臂停留时间} / (\text{开放臂停留时间} + \text{封闭臂停留时间}) \times 100\%$ 。

#### 1.4.3 戊巴比妥钠协同睡眠实验

腹腔注射戊巴比妥钠 38 mg/kg, 睡眠以翻正反射消失为指标, 以大鼠背向下姿势保持 30 s 以上者, 判断为翻正反射消失。记录注射戊巴比妥钠后至大鼠翻正反射消失时间, 作为入睡潜伏期; 并观察记录翻正反射消失至觉醒的时间, 作为睡眠持续时间。

#### 1.4.4 血清 MT 检测

各组大鼠于第 6 天上午 10:00 腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 腹主动脉取血, 离心 3 000 r/min, 20 min, 取上层血清。采用 ELISA 双抗夹心法检测血清 MT, 按照试剂盒说明书进行操作。

#### 1.4.5 松果体病理组织学观察

取血后, 大鼠沿枕骨大孔开颅, 将大脑人字缝上部充分暴露, 见米粒大小松果体。完整取出松果体后, 脱颈椎处死大鼠。将剖取的松果体置于体积分数为 10% 的甲醛溶液中固定, 然后行常规脱水、石蜡包埋、切片、HE 染色, 最后置于光学显微镜下观察。

### 1.5 统计分析

实验结果数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 使用 SPSS 22.0 软件进行分析, 多组间比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD-*t* 检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 一般情况

空白对照组大鼠昼夜节律及行为活动正常, 被毛柔顺; PCPA 组大鼠白天夜晚活动不停, 易惊吓, 互相打斗, 被毛战栗; 电刺激组大鼠白天夜晚活动不停, 被毛战栗, 头部震颤, 放置穿梭箱时有对抗行为, 对穿梭箱有抵抗; PCPA 联合电刺激大鼠白天夜晚活动不停, 被毛战栗, 易惊吓, 互相打斗, 头部震颤, 对穿梭箱有抵抗。

## 2.2 旷场活动

PCPA 组、电刺激组和 PCPA 联合电刺激组大鼠旷场活动总距离和平均速度均显著低于空白

对照组 ( $P < 0.01$ ); PCPA 组、PCPA 联合电刺激组旷场活动中央区时间均显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ) (表 1)。

表 1 各组大鼠旷场活动比较

Table 1 Comparison of open field activities in each group of rats

| 组 别        | 总距离/cm        | 平均速度/(cm · s <sup>-1</sup> ) | ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )<br>中央区时间/s |
|------------|---------------|------------------------------|--------------------------------------|
| 空白对照       | 1 711 ± 271   | 11.82 ± 1.35                 | 1.98 ± 1.30                          |
| PCPA       | 1 007 ± 207** | 8.71 ± 1.08**                | 6.97 ± 5.76*                         |
| 电刺激        | 772 ± 294**   | 7.57 ± 1.86**                | 1.62 ± 2.02                          |
| PCPA 联合电刺激 | 983 ± 159**   | 8.52 ± 0.99**                | 7.25 ± 5.49*                         |

注: PCPA 为对氯苯丙氨酸。与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

## 2.3 高架十字迷宫

PCPA 联合电刺激组大鼠的 OE% 显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ); PCPA 组、PCPA 联合电刺激组的 OT% 均显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

表 2 各组大鼠高架十字迷宫实验比较

Table 2 Comparison of elevated cross-maze experiments in each group of rats

| 组 别        | OE%          | OT%          | ( $\bar{x} \pm s, n=10$ ) |
|------------|--------------|--------------|---------------------------|
| 空白对照       | 34.2 ± 23.6  | 25.4 ± 7.7   |                           |
| PCPA       | 52.1 ± 18.0  | 48.9 ± 24.1* |                           |
| 电刺激        | 48.8 ± 30.6  | 41.5 ± 39.2  |                           |
| PCPA 联合电刺激 | 65.6 ± 31.6* | 63.9 ± 30.3* |                           |

注: PCPA 为对氯苯丙氨酸, OE% 为进入开放臂次数百分比, OT% 为进入封闭臂次数百分比。与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ 。

## 2.4 戊巴比妥钠协同睡眠

PCPA 组大鼠入睡潜伏期显著高于空白对照组 ( $P < 0.05$ ), 而电刺激组及 PCPA 联合电刺激组与空白对照组比较无明显差异 ( $P > 0.05$ ); 睡眠持续时间在各组间无明显差异 ( $P > 0.05$ , 表 3)。

## 2.5 血清 MT

PCPA 组、电刺激组、PCPA 联合电刺激组大鼠血清 MT 水平均显著低于空白对照组 ( $P < 0.01$ ) (表 4)。

## 2.6 松果体病理组织学变化

松果体组织中有松果体细胞和胶质细胞, 前者占绝大多数。空白对照组松果体细胞和梭形胶质细胞排列紧密, 均匀分布, 清晰可见

表 3 各组大鼠戊巴比妥钠协同睡眠结果

Table 3 Synergistic sleep results of pentobarbital sodium administration in each group of rats

| 组 别        | 入睡潜伏期/min    | 睡眠持续时间/min  | ( $\bar{x} \pm s, n=10$ ) |
|------------|--------------|-------------|---------------------------|
| 空白对照       | 4.44 ± 0.84  | 78.9 ± 12.9 |                           |
| PCPA       | 5.21 ± 0.53* | 88.2 ± 18.4 |                           |
| 电刺激        | 4.78 ± 0.64  | 67.0 ± 11.9 |                           |
| PCPA 联合电刺激 | 4.95 ± 0.96  | 85.9 ± 14.8 |                           |

注: PCPA 为对氯苯丙氨酸。与空白对照组比较, \* $P < 0.05$ 。

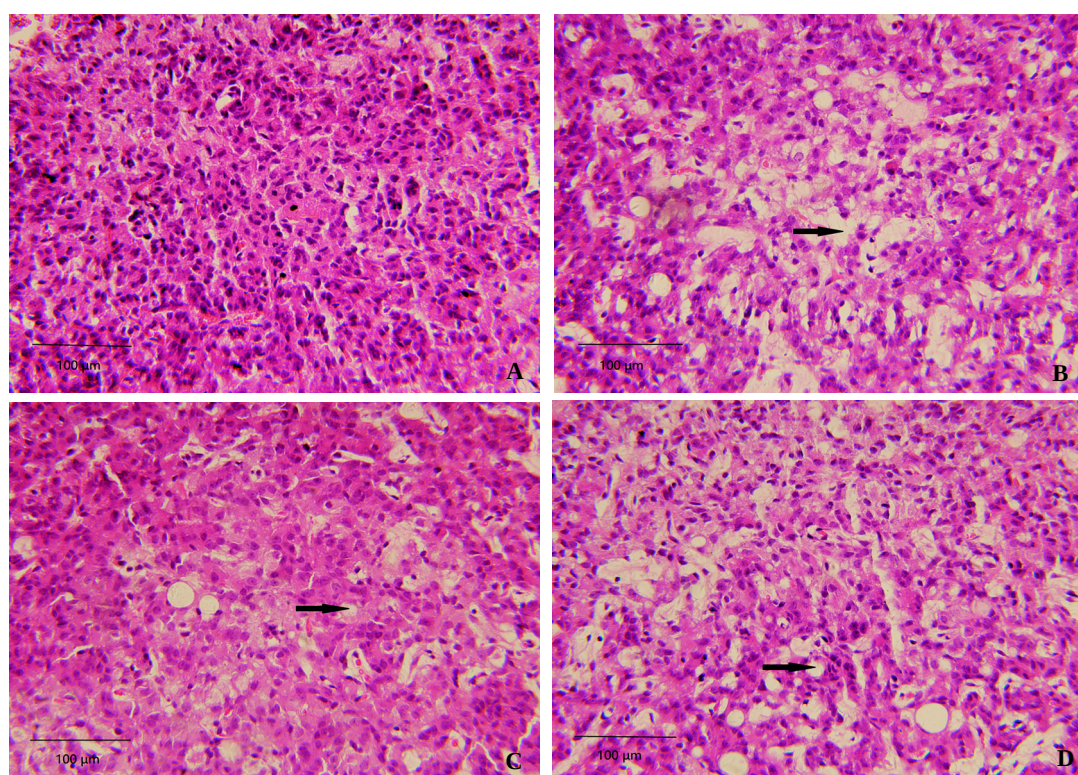
表 4 各组大鼠血清 MT 比较

Table 4 Comparison of serum MT levels in each group of rats

| 组 别        | MT/(ng · L <sup>-1</sup> ) | ( $\bar{x} \pm s, n=10$ ) |
|------------|----------------------------|---------------------------|
| 空白对照       | 165.9 ± 10.7               |                           |
| PCPA       | 144.6 ± 11.8**             |                           |
| 电刺激        | 129.1 ± 12.3**             |                           |
| PCPA 联合电刺激 | 153.2 ± 9.2**              |                           |

注: PCPA 为对氯苯丙氨酸, MT 为褪黑素。与空白对照组比较, \*\* $P < 0.01$ 。

(图 1A); PCPA 组松果体细胞排列紊乱, 数目明显减少, 空泡变性增多, 细胞核固缩且向周边移动, 细胞界限模糊 (图 1B); 电刺激组松果体排列紊乱, 细胞数目稍减少, 空泡变性稍增多, 细胞核固缩, 细胞核向周围移动, 细胞界限模糊 (图 1C); PCPA 联合电刺激组松果体细胞排列紊乱, 数目明显减少, 空泡变性增多, 细胞核固缩且向周边移动, 细胞界限模糊 (图 1D)。



注: A 为空白对照组, B 为对氯苯丙氨酸 (PCPA) 组, C 为电刺激组, D 为 PCPA 联合电刺激组; 图中箭头所指为空洞改变。

图 1 各组大鼠松果体病理组织学变化 (HE 染色,  $\times 100$ )

Figure 1 Histopathological changes of the pineal gland in each group of rats (HE staining,  $\times 100$ )

### 3 讨论

由于大鼠难以用人类所能理解的语言表达, 其行为通常以行为实验来评价。行为体现了机体适应新环境的一系列反应, 也体现了机体心理活动过程。心理活动在人、动物均有体现, 负面心理活动主要包括抑郁、焦虑、恐惧这 3 类<sup>[11]</sup>。松果体调控动物的昼夜节律生物钟, 也可能参与调控机体情绪。建立松果体损伤模型后, 可以通过旷场、高架十字迷宫检测其行为改变。

旷场实验反映动物紧张、兴奋、探索再到适应的一系列过程, 兴奋性的大鼠在适应的环境中表现为行动活跃, 四处走动<sup>[12]</sup>。本研究中, PCPA 组、电刺激组、PCPA 联合电刺激组大鼠兴奋性有下降趋势。高架十字迷宫是大鼠由于好奇心探索新环境 (开放臂), 同时有嗜暗的天性 (封闭臂), 两者之间发生“探究 - 回避”相冲突的行为, 产生焦虑心理<sup>[13]</sup>。本研究中, PCPA 组、电刺激组、PCPA 联合电刺激组大鼠均未表现出焦虑。

松果体作为调节昼夜节律的器官, 其结构功能的完整性具有重要意义。松果体组织病理学结果表明, 3 种造模方法均造成大鼠松果体细胞不同程度浓缩、空泡变性、核固缩、向周边移动, 表明细胞出现变性、凋亡和不同程度的坏死损伤, 其中 PCPA 联合电刺激最严重, PCPA 次之, 电刺激细胞损伤程度较轻。松果体细胞合成分泌 MT, 合成后并不储存于松果体细胞中, 而是被迅速地分泌到周围血液中。因此, 血液中的 MT 水平可以准确反映松果体合成分泌 MT 的能力<sup>[14]</sup>。松果体细胞受损, 血清中 MT 含量减少, 入睡潜伏期增加。

综上所述, 大鼠腹腔注射 PCPA、电刺激及 PCPA 联合电刺激, 这 3 种方法均可造成大鼠不同程度的松果体损伤, 可作为松果体损伤相关疾病研究时动物模型的建立方法, 但其具体机制尚待进一步研究。

(下转第 251 页)

# 人脑胶质瘤大鼠移植模型的初步建立

谭邓旭, 吴朋朋, 赵 勇, 师长宏, 葛 煦

(空军军医大学实验动物中心, 西安 710032)

**[摘要]** 目的 利用免疫抑制剂初步建立人脑胶质瘤大鼠异种移植模型, 为临床和基础研究提供理想的实验工具。方法 选择临床常用免疫抑制剂雷帕霉素 (rapamycin) 和环孢霉素 A (cyclosporin A), 于手术前 3 d 开始给 SD 大鼠灌胃, 分为雷帕霉素单药 (Rapa) 组、环孢霉素 A 单药 (CsA) 组、联合用药 (Rapa+CsA) 组及对照组。用人脑胶质瘤 U87-MG 细胞分别进行 SD 大鼠脑部原位移植和右侧背部皮下移植, 监测大鼠肿瘤体积和体质量的变化。当肿瘤生长至大约 600 mm<sup>3</sup> 时, 通过近红外荧光活体成像法检测大鼠原位脑胶质瘤生长情况; 然后处死大鼠, 分离组织标本, 采用 HE 染色和免疫组织化学法检测肿瘤组织学形态。结果 与 Rapa 组和 CsA 组相比, 联合用药 (Rapa+CsA) 在免疫抑制方面表现出明显优势, 模型成功率达到 100% (Rapa 和 CsA 单药的成模率分别为 0% 和 40%)。联合用药组大鼠体质量明显小于 Rapa 组、CsA 组和对照组。活体成像发现近红外荧光染料在大鼠脑部富集, 相应的组织病理分析确定为脑胶质瘤。用人线粒体 Mitochondria 抗体进行的免疫组织化学染色结果显示肿瘤部位为强阳性。结论 联合用药 (Rapa+CsA) 进行免疫抑制后接种人脑胶质瘤 U87-MG 细胞, 可成功建立人脑胶质瘤大鼠异种移植模型, 病理分析确认了人脑胶质瘤的组织形态。

**[关键词]** 人脑胶质瘤; 雷帕霉素; 环孢霉素 A; 活体成像; 异种移植

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-220-06

## Establishment of a Xenograft Model of Human Glioma in Rats

TAN Dengxu, WU Pengpeng, ZHAO Yong, SHI Changhong, GE Xu

(Laboratory Animal Center, Air Force Medical University, Xi'an 710032, China)

Correspondence to: GE Xu, E-mail: labaniz@fmmu.edu.cn

**[Abstract]** **Objective** To establish a rat xenograft model of human glioma and to provide ideal animal models for clinical and basic research by injecting immunosuppressants. **Methods** SD rats were divided into rapamycin (Rapa), cyclosporin A (CsA), Rapa+CsA, or negative control groups ( $n = 5$  each) for 3 days before surgery. Human glioma U87-MG cells were injected orthotopically into the rat brains and subcutaneously into the back, and the volume and weight of subcutaneous tumors were monitored regularly. Once the subcutaneous tumors had grown to approximately 600 mm<sup>3</sup>, the growth of the brain glial tumors *in situ* was detected by near-infrared fluorescence optical imaging. The rats were sacrificed and tissue samples were isolated, and hematoxylin and eosin and immunohistochemical (IHC) staining were performed to determine the modeling success rate. **Results** Compared with Rapa or CsA treatment, Rapa+CsA treatment showed an obvious immunosuppressive effect. The success rate of Rapa+CsA treatment model reached to 100%, while that of Rapa or CsA treatment model was only 0% and 40%, respectively. The mean body weight of the rats in the combination group was significantly lower than that in the other groups. A strong near-infrared fluorescent dye signal was detected in the rat brain by optical imaging and was further confirmed to be glioma tissue by histopathological analysis. The IHC staining was strongly positive for the human mitochondrial antibody at the tumor site. **Conclusion** A rat xenograft model of human glioma can be successfully established by the combined injection of immunosuppressants Rapa+CsA, and the morphology of

**[基金项目]** 基础加强计划重点基础研究项目(2017-JCJQ-ZD-051-04); 军队实验动物专项课题[SYDW(2017)02 号; SYDW(2018)01 号]

**[作者简介]** 谭邓旭(1991—), 男, 本科, 助理实验师, 从事肿瘤模型建立及评价相关工作。E-mail: 494117685@qq.com

**[通信作者]** 葛 煦(1973—), 男, 博士, 副教授, 从事动物模型研究。E-mail: labaniz@fmmu.edu.cn

human glioma can be conformed by pathological analysis.

**[Key words]** Human glioma; Rapamycin; Cyclosporin A; Optical image; Xenograft

胶质瘤是最常见的恶性脑肿瘤, 占恶性原发性中枢神经系统肿瘤的 80%<sup>[1-2]</sup>。其中, 预后最差的是多形性成胶质细胞瘤, 患者中位生存时间为 14.6 个月, 只有 26.5% 的患者存活持续 2 年<sup>[3]</sup>。神经胶质瘤具有极强的浸润性, 这不可避免地导致手术切除肿瘤不完全, 迫切需要更有效的肿瘤特异性疗法<sup>[4]</sup>。

建立有效、稳定的脑胶质瘤动物模型对人脑胶质瘤治疗研究具有重要意义。比如, 通过异种移植模型, 可以从少量可能导致肿瘤复发的干细胞中获得重要的耐药性信息。建立肿瘤移植模型的方法通常是采用小鼠或者大鼠来源的细胞系进行原位移植, 或者选取裸小鼠移植人的肿瘤细胞<sup>[5-7]</sup>。前者的鼠源性肿瘤细胞系与人体存在很大差别; 后者的裸小鼠体型较小, 并且生存期短, 在建立模型后进行肿瘤干预性治疗的窗口期短, 动物实验操作和饲养要求严格。已知大鼠相较于裸小鼠, 具有先天性的体质优势及较长的生存周期, 这在肿瘤干预性治疗中优势明显。因此, 利用免疫抑制剂建立人源性肿瘤细胞系大鼠异种原位移植模型, 操作方便, 饲养简单<sup>[8]</sup>。本研究通过使用不同免疫抑制剂探索人脑胶质瘤大鼠移植模型的建模条件和评估方法, 以期为人胶质瘤研究提供良好的实验工具。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

5~6 周龄 SPF 级雄性 SD 大鼠 20 只, 体重为 40~60 g, 购自中国人民解放军空军军医大学教研保障中心实验动物室[SCXK (陕) 2019-001], 动物质量检测符合国家 SPF 级标准 (编号为 SXLA-2020 第 11 号)。本研究通过空军军医大学动物伦理委员会审核, 伦理审查编号为 IACUC-20200602。实验动物饲养于空军军医大学屏障设施[SYXK (陕) 2019-001]。环境温度为 23~25 °C, 相对湿度为 40%, 12 h/12 h 昼夜交替, 饮用水经高压灭菌处理, 动物自由摄食和饮水。

### 1.2 主要试剂和设备

Caliper Lumina II 小动物活体光学成像系统购

自美国 Caliper 公司。细胞培养液和 CO<sub>2</sub> 培养箱购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司。脑立体定位仪、异氟烷麻醉剂和微型手持电钻购自深圳市瑞沃德生命科技有限公司。环孢霉素 A 购自北京索莱宝科技有限公司。雷帕霉素购自美国 MCE (MedChemExpress) 公司。胎牛血清购自浙江天杭生物科技股份有限公司。苏木精和伊红染色液均购自北京雷根生物技术有限公司。小鼠抗人 Mitochondria 单克隆抗体 (仅与人源细胞线粒体的非糖基化蛋白发生反应, 工作液稀释比例为 1:1 000) 购自英国 Abcam 公司; 相应二抗为生物素标记的山羊抗小鼠 IgG, 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。DAB 显色试剂盒和小鼠 SP 免疫组织化学检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。肿瘤靶向性近红外荧光染料 DZ-1 由北京泛博生物化学有限公司合成<sup>[9]</sup>。

### 1.3 人胶质瘤 U87-MG 细胞培养

人恶性脑胶质瘤 U87-MG 细胞购自美国模式培养物保藏中心, 由本实验室保存。U87-MG 细胞培养在 37 °C、5%CO<sub>2</sub> 的加湿培养箱中, 培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640, 其中加入 100 U/mL 青霉素和 100 μg/mL 链霉素。收集对数生长期肿瘤细胞, 经胰蛋白酶/EDTA 联合消化后, 用 PBS 重悬备用。

### 1.4 大鼠胶质瘤模型的构建

将 SD 大鼠随机分为 4 组, 每组 5 只, 分别为雷帕霉素单药组 (Rapa)、环孢霉素 A 单药组 (CsA)、雷帕霉素和环孢霉素 A 联合用药组 (Rapa+CsA), 以及空白对照组 (Control)。将雷帕霉素和环孢霉素 A 溶于 0.2% 羧甲基纤维素和 0.25% Tween-80 混合溶剂中, 其工作液质量浓度分别为 2 mg/mL 和 5 mg/mL。Control 组用 0.2% 羧甲基纤维素和 0.25% Tween-80 混合溶剂培养细胞。手术前 3 d, 连续口服给药对大鼠进行预处理, Rapa 组用药剂量为 4 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, CsA 组用药剂量为 10 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup>, Rapa+CsA 组用药剂量分别为 4 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 雷帕霉素联合 10 mg · kg<sup>-1</sup> · d<sup>-1</sup> 环孢霉素 A, Control 组用溶剂作对照。各实验组持续给药, 每天 1 次, 直至实验结束。大鼠吸入异氟烷麻醉后, 用

脑立体定位仪固定,手术部位备皮,消毒,切开暴露前卤,用手持微型钻于中线右 2 mm、冠状缝后 1 mm 处钻孔。用 1 mL 注射器吸取备好的肿瘤细胞,进针 2 mm,退针 0.5 mm,缓慢注射 20  $\mu$ L (约  $4 \times 10^6$  个细胞)的 U87-MG 细胞液。停针保持 5 min 后缓慢撤针,骨蜡封闭骨孔,缝合切口。同时,于大鼠右侧背部皮下注射 200  $\mu$ L (约  $1 \times 10^7$  个细胞)的 U87-MG 细胞液,用于反映免疫抑制剂的直接效果,间接判断原位脑胶质瘤的生长情况。

### 1.5 大鼠体质量和皮下肿瘤体积的变化

自开始给药,每周 3 次持续测量大鼠体质量,检测抑制剂对大鼠体质量增长的影响,绘制体质量变化曲线,间接反映免疫抑制剂的作用。待皮下肿瘤生长至 80~100 mm<sup>3</sup>,用游标卡尺测量肿瘤的长( $L$ )和宽( $W$ ),计算肿瘤体积  $V = 1/2 \times L \times W^2$ 。绘制肿瘤生长曲线,直观反映抑制剂效果。

### 1.6 近红外荧光活体成像检测原位肿瘤生长

基于实验室前期研究基础,近红外荧光染料 DZ-1 具有很强的肿瘤靶向性,借助活体成像设备检测大鼠脑胶质瘤的成瘤情况。当皮下肿瘤长至 600 mm<sup>3</sup> 时腹腔注射 0.1  $\mu$ mol 近红外荧光染料 DZ-1,24 h 后选择激发波长 745 nm、发射波长 845 nm 的条件自动曝光,进行近红外荧光活体成像。观察染料分布情况,以反映肿瘤生长状况。

### 1.7 肿瘤组织 HE 染色和线粒体免疫组织化学分析

建模结束后,用 CO<sub>2</sub> 对大鼠施行安死术,取皮下肿瘤和大脑组织,用 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h,石蜡包埋后取最大横截面多部位切片。二甲苯脱蜡后再依次进行梯度乙醇溶液脱水,苏木精对比染色,盐酸乙醇分化。然后进行伊红染色,脱水后二甲苯透明,封固,光学显微镜下观察 HE 染色结果。

切片脱蜡水化后,去除内源性过氧化物酶,山羊血清封闭。滴加 1:1 000 稀释的 Mitochondria 单克隆抗体,4  $^{\circ}$ C 反应过夜。PBS 冲洗后,再滴加生物素标记的山羊抗小鼠 IgG 工作液,37  $^{\circ}$ C 反应 30 min。滴加适量的辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素工作液,37  $^{\circ}$ C 反应 30 min。显色剂显色后,冲洗脱水,封固,光学显微镜下进行观察。

### 1.8 统计学方法

采用 SPSS 22.0 统计学软件进行统计分析。

所有实验结果数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析,组内两两比较采用 LSD- $t$  检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠体质量变化及皮下肿瘤生长情况

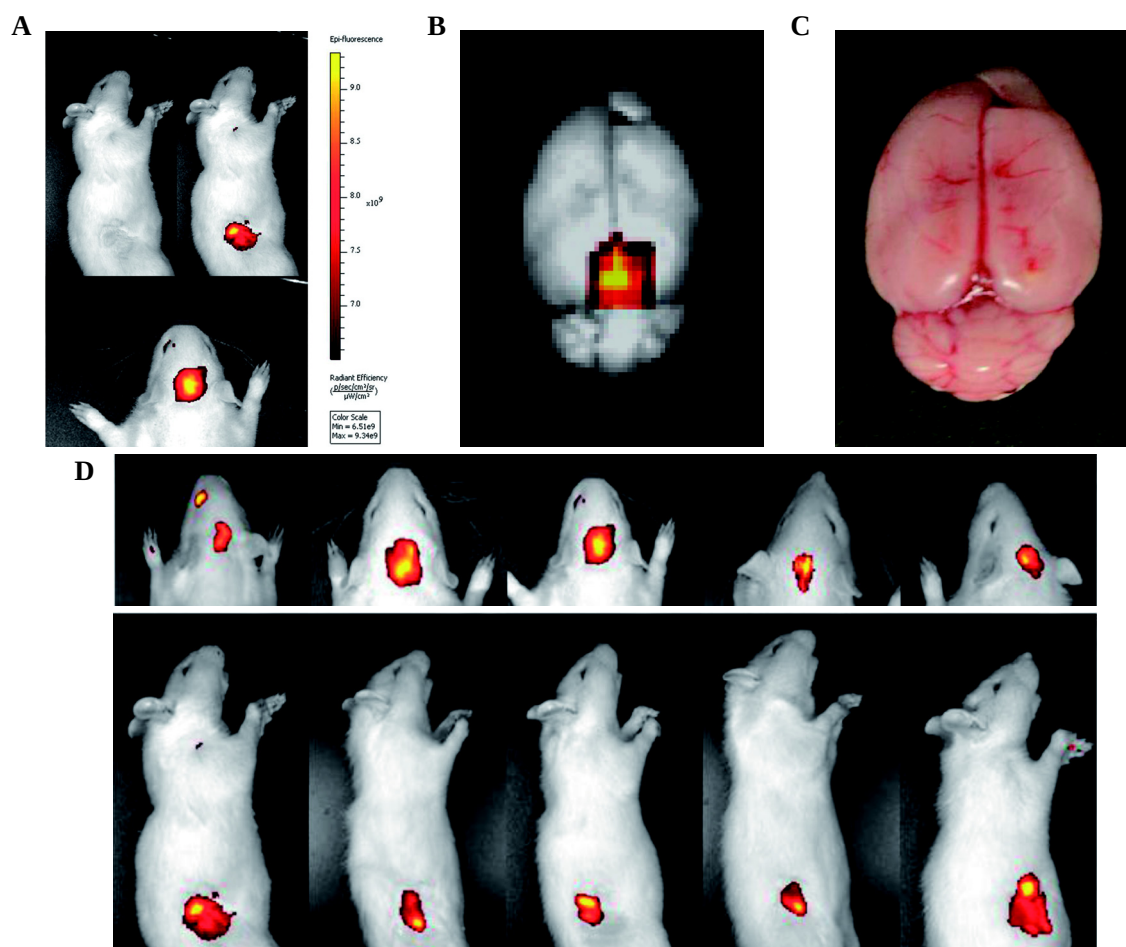
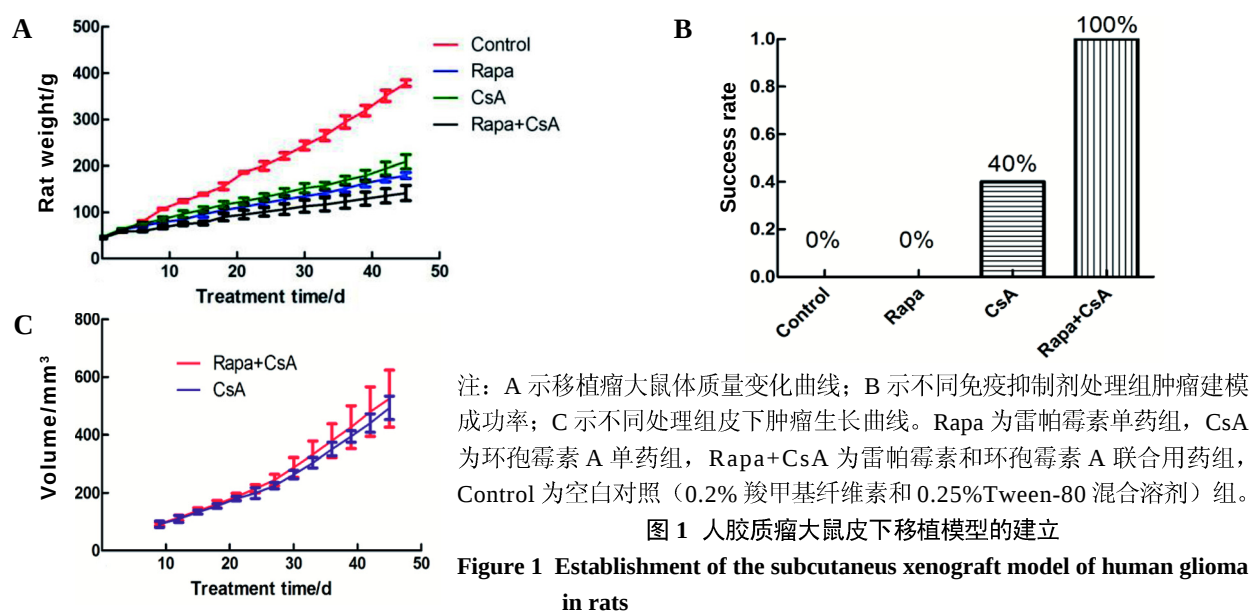
联合用药的 Rapa+CsA 组大鼠体质量较其他 3 组明显最轻,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ , 图 1A); Rapa 组和 CsA 组大鼠体质量较对照组增加缓慢,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ ); 其中 Rapa 组较 CsA 组大鼠体质量更轻,差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。皮下移植肿瘤细胞的对照组和 Rapa 组大鼠均未出现肿瘤生长(图 1B); 而 CsA 组的 5 只大鼠中有 2 只出现皮下肿瘤生长,并且与联合用药组的肿瘤生长速度相比无明显差异 ( $P = 0.748$ , 图 1C); Rapa+CsA 组 5 只大鼠皮下均见肿瘤生长。

### 2.2 大鼠脑部近红外荧光活体成像表现

待皮下肿瘤明显生长后,进行近红外荧光活体成像(图 2A 和 D),结果显示:对照组和 Rapa 组大鼠皮下和脑部均无荧光富集,而 CsA 组有 2 只大鼠的脑部荧光富集,联合用药组则有 5 只大鼠均有脑部荧光富集。处死大鼠后取脑组织,进行离体组织成像的结果(图 2B~C)显示:在大鼠脑部同样出现明显的荧光信号富集,但是肉眼观无明显的实质化肿瘤或脑组织局部凸起。

### 2.3 肿瘤组织的形态特征和人线粒体非糖基化蛋白的表达

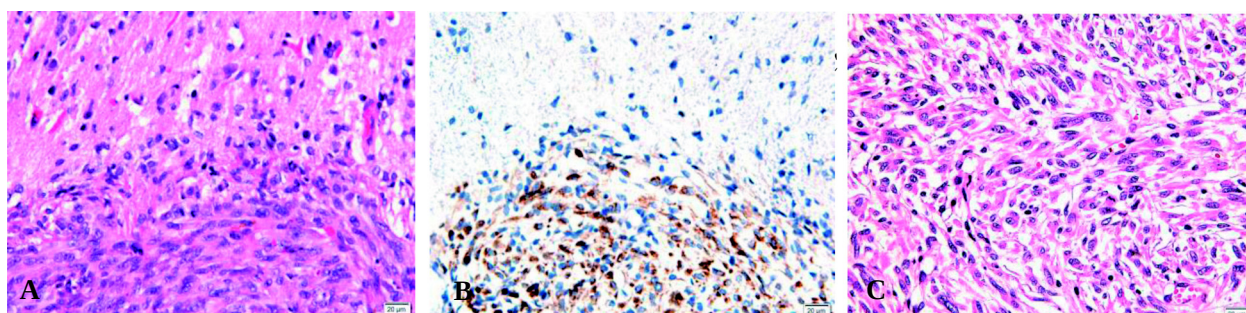
为确定大鼠脑胶质瘤原位移植是否成功,切取荧光富集区域的脑组织固定并取最大横截面切片,进行 HE 染色以筛查肿瘤生长情况,同时观察脑组织病理形态。结果显示, CsA 组 2 只和 Rapa 组 5 只大鼠的脑组织中均有肿瘤浸润生长(图 3A)。对筛查出有肿瘤细胞的大鼠脑组织切片用具有种属特异性的人线粒体 Mitochondria 抗体进行免疫组织化学染色,结果发现肿瘤部位表现强阳性,而大鼠脑组织部位呈现阴性(图 3B); 结合 HE 染色结果,证实了用人源化肿瘤细胞进行大鼠异种原位移植模型建立成功。同时对皮下肿瘤进行 HE 染色,发现组织病理形态为比较典型的胶质瘤形态(图 3C),并与脑胶质瘤原位移植瘤形态一致。



注：A 示移植瘤大鼠模型近红外荧光活体成像结果（上图左为肉眼皮下移植瘤，右为皮下移植瘤活体成像，下图为脑部原位移植瘤）；B 示移植瘤大鼠脑部组织离体活体成像；C 示移植瘤大鼠脑组织肉眼观图片；D 示联合组移植瘤大鼠模型近红外荧光成像结果（共 5 只，全部成瘤）。

图 2 近红外荧光活体成像检测人胶质瘤大鼠移植模型

Figure 2 Detection of human glioma xenograft formation in rats by near-infrared fluorescence optical imaging



注：A 示移植瘤大鼠脑肿瘤 HE 染色结果；B 示移植瘤大鼠脑肿瘤 Mitochondria 抗体免疫组织化学染色结果；C 示移植瘤大鼠皮下肿瘤 HE 染色结果。

图 3 人胶质瘤大鼠移植瘤的病理检测结果 (× 400)

Figure 3 Pathological results of xenograft tumors in rats (× 400)

### 3 讨论

使用免疫抑制剂处理 SD 大鼠，创建人源性细胞系异种原位移植模型，目前在国内外报道较少。与传统使用鼠源细胞系 C6 等建立大鼠脑胶质瘤原位模型<sup>[5, 7]</sup>相比，人源性细胞系异种原位移植模型避免了种属差异造成的缺陷。另外，相较于免疫缺陷小鼠，如裸小鼠和 NSG 小鼠 (Rag2 和 IL-2 rg 双基因敲除的 NOD-SCID 小鼠) 等，用免疫抑制剂构建的 SD 大鼠胶质瘤模型的优势主要表现在大鼠体型较大、手术易操作、建模后进行肿瘤干预性治疗的窗口期长；但该模型最大的障碍在于 SD 大鼠具有正常的免疫系统，对人源细胞系有免疫排斥和杀伤作用。本研究通过选择不同类型的免疫抑制剂有效降低了大鼠体内免疫应答水平，成功实现人源性细胞系的异种移植。

目前临床应用的免疫抑制剂基本可以分为五大类<sup>[10]</sup>，包括钙调磷酸酶抑制剂 (calcineurin inhibitor, CNI)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂、抗代谢类药物、糖皮质激素和抗淋巴细胞抗体。临床研究表明，有 97% 的肝移植患者在出院后使用 CNI 维持免疫治疗<sup>[11]</sup>；哺乳动物雷帕霉素靶蛋白抑制剂是毒性较小的新型强效免疫抑制剂；使用抗代谢药物的排斥反应发生率较高<sup>[12]</sup>；长期使用糖皮质激素容易引发不良反应；抗淋巴细胞抗体虽然可以降低早期急性排斥反应的发生风险，但增加了真菌、EB (Epstein-Barr) 病毒、BK 多瘤病毒和巨细胞病毒 (cytomegalovirus, CMV) 感染风险<sup>[13]</sup>。环孢霉素 A (CNI 代表药物

之一) 和雷帕霉素多用于器官移植和自身免疫疾病治疗<sup>[14-15]</sup>。环孢霉素 A 主要是通过选择性抑制 T 淋巴细胞活化而发挥免疫抑制作用<sup>[16]</sup>，具体是：抑制淋巴细胞在抗原或者分裂原刺激下的分化和增殖，阻断淋巴细胞生长周期，使其停滞在 G<sub>0</sub> 或者 G<sub>1</sub> 期，导致白细胞介素 -2 (interleukin-2, IL-2) 分泌受到抑制；同时通过抑制 T 淋巴细胞和促炎因子，影响巨噬细胞产生和释放 IL-1，进而达到免疫抑制的效果。雷帕霉素与细胞内 FK 结合蛋白 -12 (FK binding protein-12, FKBP-12) 结合后，阻断 T 淋巴细胞从 G<sub>1</sub> 期至 S 期的进程，在转录水平抑制蛋白合成<sup>[17]</sup>。雷帕霉素也可以抑制外源性细胞因子 (如 IL-2、IL-4、IL-5)，激发 T 淋巴细胞的活化、增殖和 B 淋巴细胞产生抗体，从而达到免疫水平的抑制。

临床研究和临床用药均发现，环孢霉素 A 和雷帕霉素联合使用能发挥更好的免疫抑制效果<sup>[16, 18]</sup>。基于此，本实验设计雷帕霉素和环孢霉素 A 单药以及联合用药进行大鼠免疫抑制，同时进行人源化细胞系移植，寻找稳定、可靠的建模方法。结果表明，联合用药组大鼠的体质量增长最慢，肿瘤移植成功率达到 100%，单药 CsA 组成功率达到 40%，其余两组成功率均为 0%。但是肿瘤在经过 45 d 的生长后，联合组最大肿瘤体积仅 624 mm<sup>3</sup>，属于生长缓慢且没有出现指数增长的趋势，可能与免疫排斥有关。肿瘤的生长与整个免疫环境有关，包括 T 细胞、B 细胞和自然杀伤 (natural killer, NK) 细胞等。从作用机制来看，环孢霉素 A 是通过选择性抑制 T 淋巴

细胞活化发挥免疫抑制作用；雷帕霉素除了抑制T细胞外，还可以抑制B淋巴细胞产生抗体，达到免疫抑制的效果。联合用药在T细胞和B细胞水平进行了免疫抑制，而环孢霉素A仅仅在T细胞水平进行免疫抑制，这可能是出现这一现象的主要原因。

鉴于原位肿瘤不易监测的特殊性，本研究对移植大鼠注射肿瘤靶向性近红外荧光染料DZ-1，通过活体成像技术监测脑内移植肿瘤的生长情况。发现脑部有很强的荧光富集后，进一步将荧光部位的瘤组织样本进行HE染色，确认其为胶质瘤。最后利用具有种属特异性的人线粒体Mitochondria抗体进行免疫组织化学染色，明确了肿瘤的人源性。结合活体成像结果以及病理和免疫组织化学染色结果，本研究确认了人源化肿瘤异种原位移植模型建立成功。

虽然免疫缺陷小鼠被广泛使用，但真正用于研究的体型较大的免疫缺陷动物种类较少。利用免疫抑制剂对较大动物免疫系统进行抑制，从而建立体型较大动物肿瘤异种移植模型是一种新的尝试。本研究使用不同免疫抑制剂成功建立的大鼠脑胶质瘤原位模型，将为后续开展较大体型动物肿瘤异种移植研究奠定了良好的实验基础。

#### 参考文献：

- [1] OSTROM Q T, GITTLEMAN H, FARAH P, et al. CBTRUS statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010[J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(Suppl 2): ii1-ii56. DOI:10.1093/neuonc/not151.
- [2] OSTROM Q T, BAUCHET L, DAVIS F G, et al. The epidemiology of glioma in adults: a “state of the science” review[J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(7):896-913. DOI:10.1093/neuonc/nou087.
- [3] POOLE A T, SITKO C A, LE C, et al. Examination of sulfonamide-based inhibitors of MMP3 using the conditioned media of invasive glioma cells[J]. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2020, 35(1):672-681. DOI:10.1080/14756366.2020.1715387.
- [4] 杨钰桢, 郝解贺, 万大海. 多形性胶质母细胞瘤的治疗现状分析[J]. *现代肿瘤医学*, 2019, 27(24):4480-4484. DOI:10.3969/j.issn.1672-4992.2019.24.038.
- [5] 王凯, 陈绪珠, 戴建平. 大鼠脑胶质瘤模型的研究进展[J]. *磁共振成像*, 2014, 5(1):74-80. DOI:10.3969/j.issn.1674-8034.2014.01.015.
- [6] 李雨莹, 罗凯伦, 邹宗幸, 等. 荧光素酶表达的脑胶质瘤小鼠模型的建立[J]. *湖北工业大学学报*, 2020, 35(5):75-77,87.
- [7] 史雪敬, 刘丽坤, 李耀程. Wistar 大鼠 C6 脑胶质瘤模型建立方法[J]. *中国药物与临床*, 2020, 20(6):904-905. DOI:10.11655/zgywylc2020.06.008.
- [8] 吴剑平, 杨斐, 胡樱. 常规实验操作对 Wistar 大鼠的影响[J]. *中国实验动物学报*, 2010, 18(4):312-317. DOI:10.3969/j.issn.1005-4847.2010.04.010.
- [9] AN J Z, ZHAO N N, ZHANG C Q, et al. Heptamethine carbocyanine DZ-1 dye for near-infrared fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(34):56880-56892. DOI:10.18632/oncotarget.18131.
- [10] EMRE S, RODRIGUEZ-DAVALOS M, UMMAN V, et al. Liver transplantation at Yale-new haven transplantation center[J]. *Clin Transpl*, 2011:187-201.
- [11] BERENGUER M, AGUILERA V, SAN JUAN F, et al. Effect of calcineurin inhibitors in the outcome of liver transplantation in hepatitis C virus-positive recipients[J]. *Transplantation*, 2010, 90(11):1204-1209. DOI:10.1097/TP.0b013e3181fa93fa.
- [12] 于兰, 吴谧, 王浩, 等. 西罗莫司应用的新进展[J]. *实用中西医结合临床*, 2014, 14(3):90-92. DOI:10.13638/j.issn.1671-4040.2014.03.062.
- [13] FISHER R A. Cytomegalovirus infection and disease in the new era of immunosuppression following solid organ transplantation[J]. *Transpl Infect Dis*, 2009, 11(3):195-202. DOI:10.1111/j.1399-3062.2009.00372.x.
- [14] 王伟霞, 张翠欣, 唐霄. 西罗莫司临床应用及药物相互作用的研究进展[J]. *临床合理用药杂志*, 2018, 11(31):173-177. DOI:10.15887/j.cnki.13-1389/r.2018.31.102.
- [15] 薛明伟, 郭更新, 刘爱翔, 等. 单用环孢霉素治疗特发性膜性肾病患者效果观察[J]. *山东医药*, 2019, 59(11):69-72.
- [16] 田普训, 敖建华, 李宁, 等. 器官移植免疫抑制剂临床应用技术规范(2019版)[J]. *器官移植*, 2019, 10(3):213-226.
- [17] SHIGETA K, KIKUCHI M, TANAKA M, et al. Development of a precise quantitative method for monitoring sirolimus in whole blood using LC/ESI-MS/MS[J]. *Biomed Chromatogr*, 2020, 34(8):e4853. DOI:10.1002/bmc.4853.
- [18] 朱兰, 丁韬, 王筱啸, 等. 肾移植受者西罗莫司联合小剂量环孢素转换治疗的五年临床观察[J]. *中华医学杂志*, 2016, 96(20):1556-1561. DOI:10.3760/cma.j.issn.0376-2491.2016.20.002

(收稿日期: 2020-07-14 修回日期: 2020-12-03)

# 肝螺旋杆菌感染对葡聚糖硫酸钠诱导小鼠慢性结肠炎模型的影响

吴志浩<sup>1</sup>, 沈 宸<sup>1</sup>, 殷 俊<sup>1</sup>, 朱立麒<sup>1</sup>, 张 泉<sup>1,2</sup>

(扬州大学兽医学院, 扬州 225009; 2. 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) 感染对葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导的小鼠慢性结肠炎的影响。方法 40 只雄性 IL-10<sup>-/-</sup> 小鼠随机分为 4 组, 分别为对照组、H.h 组、DSS 组和 H.h+DSS 组, H.h 组和 H.h+DSS 组经灌胃感染 H.h。H.h 感染 5 d 后, DSS 组和 H.h+DSS 组小鼠连续饮用 2% DSS 水 7 d, 然后恢复正常饮水 5 d, 再连续饮用 2% DSS 水 7 d; 其余组正常饮水。实验结束后处死各组小鼠, 取结肠并测量其长度, 然后分为 3 份, 分别用于组织病理学检查、细胞因子 mRNA 转录水平检测和蛋白表达水平检测。结果 病理学检查结果显示, 与 DSS 组相比, H.h+DSS 组小鼠的淋巴细胞浸润增多, 上皮缺失严重, 纤维化程度加重, 隐窝萎缩明显, 同时炎性细胞因子白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子  $\alpha$  转录水平上调, 信号转导和转录激活因子 3 蛋白表达水平升高。结论 H.h 感染会加剧 DSS 诱导的小鼠结肠炎。

**[关键词]** 肝螺旋杆菌; 慢性结肠炎; 葡聚糖硫酸钠; 小鼠

**[中图分类号]** R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-0226-06

## Effect of *Helicobacter hepaticus* Infection on Chronic Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium

WU Zhihao<sup>1</sup>, SHEN Chen<sup>1</sup>, YIN Jun<sup>1</sup>, ZHU Liqi<sup>1</sup>, ZHANG Quan<sup>1,2</sup>

(College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; 2. Affiliated Hospital of Yangzhou University, Yangzhou 225001, China)

Correspondence to: ZHANG quan, E-mail: zquan@yzu.edu.cn

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of *Helicobacter hepaticus* (H.h) infection on chronic colitis induced by dextran sulfate sodium (DSS). **Methods** Forty male interleukin (IL)-10<sup>-/-</sup> mice were randomly divided into control, H.h, DSS, and H.h + DSS groups. Mice in the H.h group and H.h + DSS group were infected with H.h by gavage. Five days later, the mice in DSS group and H.h + DSS group received two 7-day cycles of a 2% DSS drink with a 5-day withdrawal time between them, while the other groups received sterilized water. At the end of the experiment, all groups of mice were sacrificed and the colon of each mouse was excised, the colon length was measured, and the colon divided into three parts for histopathological examination, cytokine mRNA transcription detection, and phosphorylation detection of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3). **Results** The pathological results showed that lymphocytes infiltration, loss of epithelium, degree of fibrosis, and crypt atrophy were more obvious in the H.h + DSS group than those in the DSS group. In addition, the transcription levels of the cytokines IL-6 and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) were upregulated, while STAT3 was activated. **Conclusion** H.h infection can aggravate DSS-induced chronic colitis in mice.

**[Key words]** *Helicobacter hepaticus*; Chronic colitis; Dextran sulfate sodium; Mice

**[基金项目]** 江苏省重点研发计划 (社会发展 - 面上项目) (BE2020674)

**[作者简介]** 吴志浩(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: 1600998169@qq.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

肝螺杆菌 (*Helicobacter hepaticus*, H.h) 是一种革兰阴性菌, 在某些易感小鼠品系中感染率较高, 可引起肝脏和肠道疾病<sup>[1]</sup>, 对实验动物质量及实验动物疾病模型构建能造成一定影响。炎症肠病 (inflammatory bowel disease, IBD) 是一种复杂的肠道疾病, 可分为克罗恩病和溃疡性结肠炎, 罹患这两类 IBD 后患者通常因肠道长期过度的炎症反应出现便血和体质量减轻<sup>[2]</sup>。已知白细胞介素 10 (interleukin 10, IL-10) 敲除 (IL-10<sup>-/-</sup>) 小鼠能够感染 H.h 并引起结肠炎<sup>[3]</sup>, 常用于结肠炎模型的建立。使用葡聚糖硫酸钠 (dextran sulfate sodium, DSS) 诱导的结肠炎可作为 IBD 的疾病模型<sup>[4]</sup>。然而处于非无菌环境中的小鼠可能因感染 H.h 而对结肠炎模型造成一定影响。本研究旨在用 DSS 诱导感染 H.h 的小鼠制备 IBD 模型, 探究 H.h 感染对 DSS 慢性结肠炎模型的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物及菌株

IL-10<sup>-/-</sup> 小鼠 (B6.129P2-IL10tm1Cgn/J) 购自美国 Jackson 实验室, 饲养于扬州大学比较医学中心 SPF 级动物设施 [SYXK (苏) 2017-0044]。环境温度 (26 ± 2) °C, 相对湿度 40%~60%, 昼夜 12 h 更替。实验前小鼠 H.h 检测均呈阴性。H.h (ATCC51449) 购自美国模式培养物保藏中心, 保存于 -80 °C 备用。

### 1.2 主要试剂

DSS 购自上海翊圣生物科技有限公司; 苏木精和伊红购自国药集团化学试剂有限公司; TRIzol 购自美国 Invitrogen 公司; PrimeScript RT Regent Kit with gDNA Eraser 购自日本 TAKARA 公司; Universal SYBR Green Master 购自瑞士 Roche 公司; 白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)

的 PCR 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成; 信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、磷酸化 STAT3 (phosphorylation-STAT3, p-STAT3) 和 β-肌动蛋白 (β-actin) 抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 超敏化学发光试剂购自苏州新赛美生物科技有限公司。

### 1.3 实验动物分组与模型建立

5 周龄雄性 IL-10<sup>-/-</sup> 小鼠随机分为 4 组, 每组 10 只, 分别为对照组、DSS 组、H.h 组和 H.h+DSS 组。H.h 组和 H.h+DSS 组各 10 只小鼠使用 H.h 标准菌株 ATCC51449 菌液 0.2 mL (1 × 10<sup>9</sup> CFU/mL) 进行 3 次灌胃, 每次灌胃间隔 1 d, 最后一次灌胃后 5 d 经环介导等温扩增技术 (loop mediated isothermal amplification, LAMP) 快速检测证明 20 只小鼠均已感染 H.h<sup>[5]</sup>。在 H.h 组和 H.h+DSS 组确认感染后, DSS 组和 DSS+H.h 组小鼠饮用质量分数为 2% 的 DSS 溶液 2 个周期, 每个周期 7 d; 2 个周期间隔, 饮用无菌水 5 d。对照组和 H.h 组均正常饮用无菌水。观察小鼠及其粪便状态, 并记录小鼠体质量变化。

### 1.4 实验取材

小鼠经脱颈椎处死后, 分离小鼠结肠, 并用游标卡尺 (精度 0.05 mm) 测量长度。取结肠近端 1/3 用于制作病理切片, 中端及远端均分后分别用于提取相关 mRNA 和蛋白。

### 1.5 病理学检查

用质量分数为 4% 的多聚甲醛溶液固定结肠组织后, 梯度乙醇溶液脱水, 2 次 100% 正丁醇透明各 1 h, 然后于 60 °C 烘箱中浸蜡 30 min, 并进行包埋。连续切片, 切片厚度为 5 μm。然后分别进行 HE 染色与 Masson 染色。按照组织病理学活动指数 (histological activity index, HAI) 进行评分 (表 1), 比较各组病变差异。

表 1 小鼠结肠组织病理学活动指数评分表

Table 1 Grading scheme of the histological activity index (HAI) in the colon of mice

| 分值 | 炎症反应程度            | 上皮缺陷状况     | 肠腺萎缩程度  | 增生          |
|----|-------------------|------------|---------|-------------|
| 1  | 固有层淋巴细胞聚集         | 杯状细胞减少     | 5%~25%  | 1.5 倍正常隐窝高度 |
| 2  | 黏膜炎性反应            | 局部肠道上皮细胞破损 | 26%~50% | 2 倍正常隐窝高度   |
| 3  | 黏膜炎性反应伴随黏膜下层扩张    | 上皮糜烂       | 51%~75% | 3 倍正常隐窝高度   |
| 4  | 黏膜、黏膜下层及深层弥漫性炎性反应 | 溃疡         | > 75%   | > 4 倍正常隐窝高度 |

## 1.6 实时荧光定量 PCR 法检测结肠相关炎症因子转录水平

提取结肠总 RNA, 反转录成 cDNA, 以 GAPDH 为内参, 检测结肠组织中 IL-6 和 TNF- $\alpha$  的表达量。每个样本重复 3 次, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法进行分析。PCR 反应条件: 95 °C 10 min; 95 °C 15 s, 60 °C 30 s, 总计 40 个循环; 72 °C 20 s。PCR 引物序列包括: GAPDH 上游引物为 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3', 下游引物为 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG-3'; IL-6 上游引物为 5'-TAGTCCTTCTACCCCAATTTCC-3', 下游引物为 5'-TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC-3'; TNF- $\alpha$  上游引物为 5'-AACTAGTGGTGCCA-GCCGAT-3', 下游引物为 5'-CTTCACAGAGCAA-TGACTCC-3'。

## 1.7 蛋白质印迹法检测 STAT3 蛋白表达水平

RIPA 法提取结肠组织蛋白, BCA 法测定蛋白浓度后, 取等量蛋白用 10% 分离胶进行 SDS-PAGE 分离。电泳结束后转膜, 然后用 5% 脱脂奶溶液进行封闭, 分别使用稀释比例为 1 : 1 000 的  $\beta$ -actin、STAT3、p-STAT3 一抗孵育过夜, 再用稀释比例为 1 : 10 000 的二抗孵育 1 h, 使

用超敏化学发光试剂显影。以目的蛋白条带灰度值与内参  $\beta$ -actin 条带灰度值之比表示目的蛋白的表达水平。

## 1.8 统计方法

采用 Graphpad 7.0 统计学软件进行分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 并进行正态检验和方差分析; 组织切片参考 Two-way ANOVA 系统评级评分。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

# 2 结果

## 2.1 H.h 感染可加重 DSS 诱导的小鼠慢性结肠炎

DSS 组和 DSS+H.h 组在饮用 DSS 水 7 d 后小鼠体质量降低, 活动性下降, 有轻微便血。恢复正常饮水后, DSS 组小鼠体质量小幅回升; 而 DSS+H.h 组小鼠体质量持续下降, 精神萎靡, 腹泻, 便血。再次饮用 DSS 水后, DSS 和 DSS+H.h 组均出现更明显的体质量下降 (表 2)、腹泻与便血。H.h 组和对照组小鼠体质量保持稳定小幅上升, 且精神状态良好, 无腹泻和血便。H.h 组和对照组小鼠结肠长度无变化, DSS 和 DSS+H.h 组结肠长度均缩短, 且 DSS+H.h 组缩短情况更明显 (表 2)。

表 2 各组小鼠体质量变化和结肠长度

Table 2 Body weight of mice and their colon length in different groups

| 组别        | 体质量/mg             |                     |                              |                              | 结肠长度/cm                     |
|-----------|--------------------|---------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
|           | 实验前                | 饮用 DSS 水 7 d        | 正常饮水 5 d                     | 再次引用 DSS 水 7 d               |                             |
| 对照组       | 21.892 $\pm$ 1.207 | 22.870 $\pm$ 1.067  | 23.606 $\pm$ 1.018           | 24.125 $\pm$ 0.941           | 7.494 $\pm$ 0.078           |
| H.h 组     | 21.962 $\pm$ 1.614 | 23.134 $\pm$ 1.204  | 23.767 $\pm$ 1.340           | 24.333 $\pm$ 1.473           | 7.514 $\pm$ 0.053           |
| DSS 组     | 21.716 $\pm$ 1.472 | 21.136 $\pm$ 0.676* | 21.186 $\pm$ 1.194*          | 19.650 $\pm$ 1.755*          | 6.446 $\pm$ 0.111*          |
| H.h+DSS 组 | 22.056 $\pm$ 0.947 | 21.156 $\pm$ 0.947* | 19.954 $\pm$ 1.415* $\Delta$ | 17.809 $\pm$ 1.616* $\Delta$ | 4.760 $\pm$ 0.154* $\Delta$ |

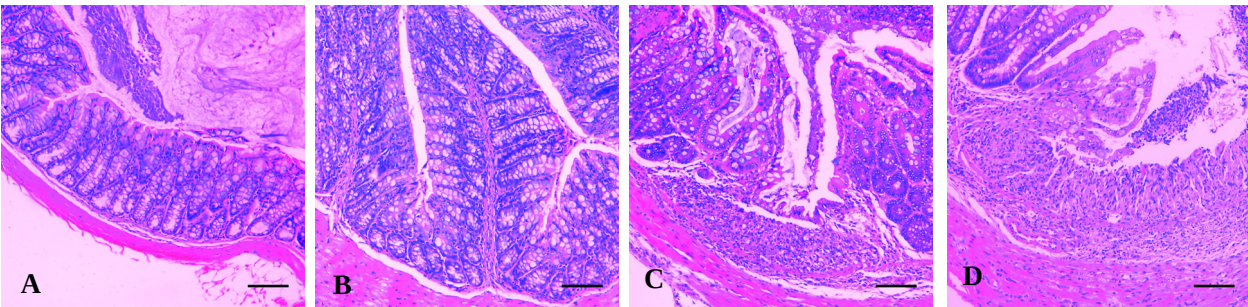
注: 与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 DSS 组比较,  $\Delta P < 0.05$ 。

## 2.2 H.h 感染可加重 DSS 慢性结肠炎小鼠病变

与对照组 (图 1A) 相比, H.h 组有少量淋巴细胞浸润, 肠绒毛完整, 杯状细胞无缺失 (图 1B)。DSS 组小鼠结肠固有层大量淋巴细胞浸润, 隐窝结构改变, 部分隐窝扩张、扭曲, 肠腺减少 (图 1C)。H.h+DSS 组黏膜全层炎性细胞浸润, 且延伸至黏膜下层, 正常隐窝结构消失 (图 1D)。HAI 评分 (表 3) 表明, H.h 主要通过促进炎症反应、上皮缺失、隐窝萎缩和增生, 加剧 DSS 诱导的慢性结肠炎。

## 2.3 H.h 感染可加重 DSS 慢性结肠炎小鼠纤维化程度

Masson 染色可用于指示胶原纤维沉积程度, 能用蓝色和红色区分胶原纤维和肌纤维, 因此常应用于肠纤维化的观察<sup>[6]</sup>。对照组和 H.h 组仅在黏膜下层有少量胶原纤维沉积 (图 2A、2B); DSS 组中纤维沉积已出现在固有层 (图 2C); H.h+DSS 组黏膜下层纤维沉积更为严重, 黏膜层全层纤维沉积, 且范围更大 (图 2D)。



注：A 为对照组，无明显病变；B 为 H.h 组，仅少量淋巴细胞浸润；C 为 DSS 组，固有层大量淋巴细胞浸润，隐窝结构改变，肠腺减少；D 为 H.h+DSS 组，黏膜下层大量淋巴细胞浸润，淋巴细胞浸润贯穿黏膜层，隐窝结构消失。图中比例尺大小均为 100 μm。

图 1 小鼠结肠组织病理学观察 (HE 染色, ×100)

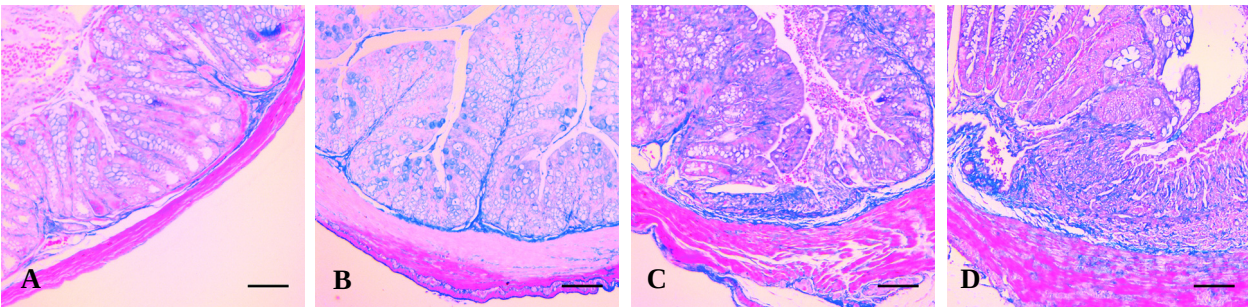
Figure 1 Pathological observation of the colon tissues of mice (HE staining, ×100)

表 3 小鼠结肠组织病理学活动指数评分

Table 3 The histological activity index (HAI) score of the colon tissues of mice

| 分 组       | 炎症反应                       | 上皮缺失                       | 腺体萎缩                       | ( $\bar{x} \pm s$ , n=10)<br>增生 |
|-----------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------------|
| 对照组       | 0                          | 0                          | 0                          | 0                               |
| H.h 组     | $0.8 \pm 0.422^*$          | $0.4 \pm 0.309$            | $0.5 \pm 0.516$            | $0.6 \pm 0.516$                 |
| DSS 组     | $1.7 \pm 0.483^*$          | $1.7 \pm 0.483^*$          | $2.0 \pm 0.667^*$          | $2.6 \pm 0.667^*$               |
| H.h+DSS 组 | $2.9 \pm 0.316^{**\Delta}$ | $2.8 \pm 0.422^{**\Delta}$ | $3.1 \pm 0.316^{**\Delta}$ | $3.5 \pm 0.527^{**\Delta}$      |

注：与对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；与 DSS 组比较， $\Delta P < 0.05$ 。



注：A 为对照组，黏膜下层仅出现少量胶原纤维；B 为 H.h 组，少量胶原纤维存在于黏膜下层；C 为 DSS 组，黏膜下层胶原纤维沉积增多，且在固有层中大量沉积；D 为 H.h+DSS 组，胶原纤维大量沉积，从黏膜下层贯穿到黏膜全层。图中比例尺大小均为 100 μm。

图 2 小鼠结肠组织 Masson 染色(×100)

Figure 2 Masson's trichrome staining of the colon tissues of mice (×100)

2.4 H.h 感染可增加 DSS 慢性结肠炎小鼠组织中炎性细胞因子转录水平

实时荧光定量PCR法检测结果如图3A所示。与对照组比较，H.h 感染促进了 IL-6、TNF- $\alpha$  的转录 ( $P < 0.05$ )。在 DSS 诱导的慢性结肠炎

中，IL-6 和 TNF- $\alpha$  转录水平明显上调 ( $P < 0.01$ )，而 H.h+DSS 组的 IL-6 和 TNF- $\alpha$  转录水平比 DSS 组明显升高 ( $P < 0.05$ )，提示 H.h 感染促进了 DSS 诱导的炎性细胞因子表达 (表 4)。

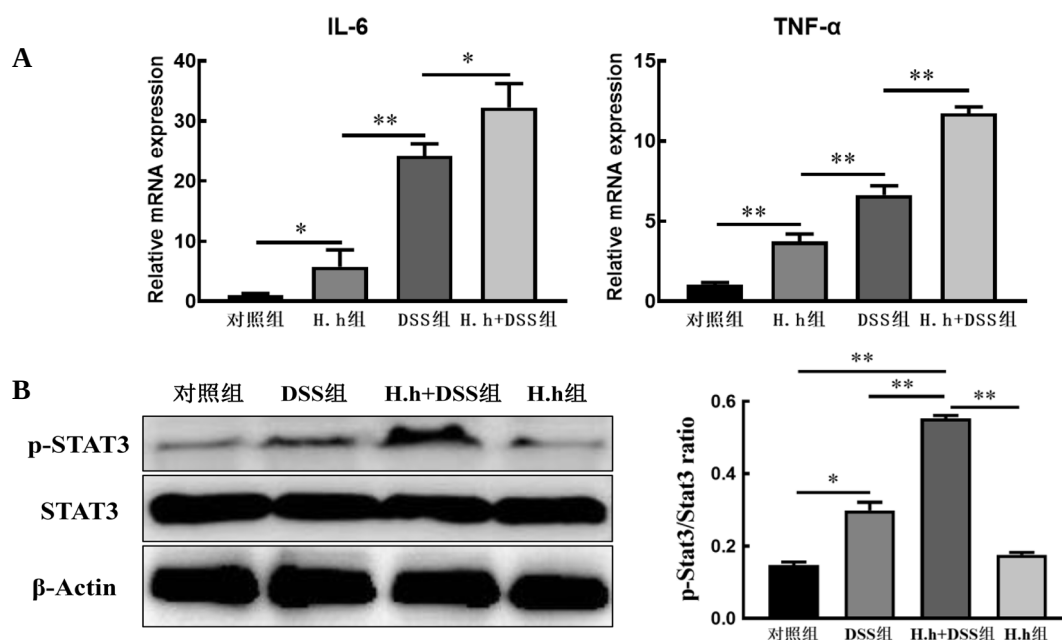
表4 小鼠结肠组织中 IL-6、TNF- $\alpha$  的 mRNA 转录水平  
Table 4 Transcriptional levels of IL-6 and TNF- $\alpha$  in the colon tissues of mice

| 分组        | IL-6                          | TNF- $\alpha$                       |
|-----------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 对照组       | 1.087 $\pm$ 0.180             | 1.044 $\pm$ 0.117                   |
| H.h 组     | 5.765 $\pm$ 2.304*            | 3.737 $\pm$ 0.371*                  |
| DSS 组     | 24.251 $\pm$ 1.644**          | 6.663 $\pm$ 0.469**                 |
| H.h+DSS 组 | 32.073 $\pm$ 3.307** $\Delta$ | 11.702 $\pm$ 0.282** $\Delta\Delta$ |

注：与对照组比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；与 DSS 组比较， $\Delta P < 0.05$ ， $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

## 2.5 H.h感染可激活DSS慢性结肠炎组织中STAT3磷酸化水平

JAK-STAT3 通路是炎症反应中 IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子表达的调节因子<sup>[7]</sup>。如图 3B 所示，DSS 组中的 STAT3 被激活，而 H.h+DSS 组中的 STAT3 则被大量激活，提示 H.h 感染显著增强了 DSS 慢性结肠炎组织中 STAT3 磷酸化程度，说明感染 H.h 可以加剧 DSS 诱导的慢性结肠炎严重程度。



注：IL-6 为白细胞介素 6，TNF- $\alpha$  为肿瘤坏死因子  $\alpha$ ，STAT3 为信号转导和转录激活因子 3，p-STAT3 为磷酸化信号转导和转录激活因子 3。组间比较，\* $P < 0.05$ ，\*\* $P < 0.01$ ；各组小鼠均 10 只。

图3 实时荧光定量PCR法(A)和蛋白质印迹法(B)检测小鼠肠道组织中相关分子表达

Figure 3 Detection of relative molecular expression in the colon tissues of mice by real-time fluorescent quantitative PCR (A) and Western blotting (B)

## 3 讨论

21 世纪以来，人类 IBD 发病率呈上升趋势，许多国家 IBD 的患病率达 0.3% 以上<sup>[8]</sup>。目前 IBD 的发病机制仍未明确。一些研究结果表明，细胞因子和趋化因子、肠道微生物、遗传和环境因素等参与了 IBD 的发病<sup>[9-12]</sup>。动物模型在 IBD 的发病机制及治疗手段研究中发挥重要作用。目前通常使用 DSS、三硝基苯磺酸和 H.h 等化学或生物方法建立小鼠 IBD 模型。研究发现，肠道菌群对小鼠的免疫系统有着一定的调节作用，如激活炎症因子释放和激活免疫细胞<sup>[13-14]</sup>；而不同饲养环

境中的小鼠肠道菌群有所差异，导致构建疾病模型时小鼠免疫状态不同。H.h 在易感小鼠中能够引起慢性活动性肝炎、肝细胞癌、结肠癌及 IBD<sup>[7]</sup>。感染 H.h 的小鼠用于构建肝脏、肠道疾病模型时容易引起误差，因此在进行该类研究时控制实验动物的微生物学质量尤其重要。

促炎细胞因子如 IL-6、TNF- $\alpha$  等在结肠炎性反应期间的失调会损害肠黏膜，在 IBD 的发病机制中起着关键作用<sup>[15]</sup>。IL-6 能够影响细胞的增殖、存活、分化与转移<sup>[16]</sup>。TNF- $\alpha$  通过促进黏附分子如血管细胞黏附因子 -1 和细胞间黏附分

子-1的表达,显著增加肠黏膜炎性细胞浸润<sup>[17]</sup>。STAT3能被多种因子激活,如IL-6和TNF- $\alpha$ ,进而导致大量炎性因子表达,调节细胞存活与增殖,参与炎症反应<sup>[18]</sup>。本研究发现,H.h感染影响了DSS诱导的慢性结肠炎模型小鼠的生理指标和病理变化;在构建结肠炎模型时,H.h感染促进了淋巴细胞浸润和炎性细胞因子释放,并进一步激活了炎症反应关键信号STAT3,提高了DSS诱导的慢性结肠炎发病过程中炎性细胞浸润及纤维化程度,说明感染H.h的小鼠会影响动物模型尤其是结肠炎模型的建立及评价,提示了实验动物质量控制的重要性。

综上所述,在构建IBD模型时,H.h通过促进炎性因子表达,激活STAT3通路而造成更加严重的结肠炎;这对研究IBD发病进程及评价带来一定影响。

#### 参考文献:

- [1] 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.
- [2] WEHKAMP J, GÖTZ M, HERRLINGER K, et al. Inflammatory bowel disease [J]. Dtsch Arztebl Int, 2016, 113(5):72-82. DOI:10.3238/arztebl.2016.0072.
- [3] KULLBERG M C, WARD J M, GORELICK P L, et al. *Helicobacter hepaticus* triggers colitis in specific-pathogen-free interleukin-10 (IL-10)-deficient mice through an IL-12- and gamma interferon-dependent mechanism[J]. Infect Immun, 1998, 66(11):5157-5166. DOI:10.1128/iai.66.11.5157-5166.1998.
- [4] 农辉,黄雪.葡聚糖硫酸钠诱导结肠炎模型的研究进展[J].世界华人消化杂志,2014,22(22):3245-3250. DOI: CNKI:SUN:XXHB.0.2014-22-013.
- [5] 冯洁,张泉,钱淼,等.肝螺旋杆菌LAMP快速检测方法的建立及初步应用[J].中国动物传染病学报,2019,27(4):50-55.
- [6] 王珏,朱礼国,唐幕湘,等.改良Masson三色染色法在胶原纤维中的应用[J].邵阳医学院学报,2006(1):44. DOI: 10.3969/j.issn.1006-9674.2006.01.020.
- [7] CAO S, ZHU C, FENG J, et al. *Helicobacter hepaticus* infection induces chronic hepatitis and fibrosis in male BALB/c mice via the activation of NF- $\kappa$ B, Stat3, and MAPK signaling pathways[J]. Helicobacter, 2020, 25(2): e12677. DOI:10.1111/hel.12677.
- [8] NG S C, SHI H Y, HAMIDI N, et al. Worldwide incidence and prevalence of inflammatory bowel disease in the 21st century: a systematic review of population-based studies [J]. Lancet, 2017, 390(10114):2769-2778. DOI:10.1016/s0140-6736(17)32448-0.
- [9] NI J, SHEN T-C D, CHEN E Z, et al. A role for bacterial urease in gut dysbiosis and Crohn's disease [J]. Sci Transl Med, 2017, 9(416):eaah6888. DOI:10.1126/scitranslmed.aah6888.
- [10] CĂȚANĂ S, BERINDAN NEAGOE I, COZMA V, et al. Contribution of the IL-17/IL-23 axis to the pathogenesis of inflammatory bowel disease[J]. World J Gastroenterol, 2015, 21(19):5823-5830. DOI:10.3748/wjg.v21.i19.5823.
- [11] BURKETT P R, MEYER ZU HORSTE G, KUCHROO V K. Pouring fuel on the fire: Th17 cells, the environment, and autoimmunity[J]. J Clin Invest, 2015, 125(6):2211-2219. DOI:10.1172/jci78085.
- [12] GATTU S, BANG Y J, PENDSE M, et al. Epithelial retinoic acid receptor  $\beta$  regulates serum amyloid A expression and vitamin A-dependent intestinal immunity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2019, 116(22):10911-10916. DOI:10.1073/pnas.1812069116.
- [13] BAIN C C, OLIPHANT C J, THOMSON C A, et al. Proinflammatory role of monocyte-derived CX3CR1 macrophages in *Helicobacter hepaticus*-induced colitis[J]. Infect Immun, 2018, 86(2): e00579-00517. DOI:10.1128/IAI.00579-17.
- [14] WANG Y, YIN Y, CHEN X, et al. Induction of intestinal Th17 cells by flagellins from segmented filamentous bacteria [J]. Front Immunol, 2019, 10:2750. DOI:10.3389/fimmu.2019.02750.
- [15] LUO C, ZHANG H. The role of proinflammatory pathways in the pathogenesis of colitis-associated colorectal cancer[J]. Mediators Inflamm, 2017, 2017:5126048. DOI: 10.1155/2017/5126048.
- [16] MATSUMOTO S, NAGAOKA M, HARA T, et al. Fucoidan derived from *Cladosiphon okamuranus* Tokida ameliorates murine chronic colitis through the down-regulation of interleukin-6 production on colonic epithelial cells [J]. Clin Exp Immunol, 2004, 136(3):432-439. DOI:10.1111/j.1365-2249.2004.02462.x.
- [17] ALA A, DHILLON A P, HODGSON H J. Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment in the liver and gut[J]. Int J Exp Pathol, 2003, 84(1):1-16. DOI:10.1046/j.1365-2613.2003.00235.x.
- [18] 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.

(收稿日期: 2020-11-09 修回日期: 2021-03-22)

## 慢性间歇性低氧模型大鼠的甲状腺功能分析

田 慧<sup>1</sup>, 高 隆<sup>2</sup>, 王泽辉<sup>3</sup>

(1. 榆林市第一医院内分泌科, 绥德 718000; 2. 榆林市第一医院呼吸内科, 榆林 719000; 3. 延安大学医学院基础医学院, 延安 716000)

**[摘要]** 目的 通过慢性间歇性低氧 (chronic intermittent hypoxia, CIH) 大鼠模型探索阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征与甲状腺函数的关系。方法 SD 大鼠分为对照 (control) 组、CIH 组和复氧 (reoxygenation, RH) 组, 利用低氧舱建立 CIH 动物模型, 并对 CIH 模型进行鉴定; 放射免疫检测各组大鼠血清中促甲状腺激素释放激素 (thyrotropin releasing hormone, TRH)、促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone, TSH)、三碘甲状腺原氨酸 (triiodothyronine, T3) 和甲状腺素 (thyroxine, T4) 的表达水平; HE 染色和甲苯胺蓝染色观察各组大鼠甲状腺组织的病理变化; 电子显微镜观察各组大鼠甲状腺组织超微结构的变化。结果 CIH 组和 RH 组大鼠的血氧饱和度为 70%~92%, 动脉氧分压为 60.7~80.1 mmHg, 接近阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征的病理生理特点, 因此 CIH 动物模型建立成功。与 control 组比较, CIH 组大鼠血清中 TRH、TSH、T3 和 T4 的表达水平明显降低 (均  $P < 0.05$ ), 甲状腺质量明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与 CIH 组比较, RH 组大鼠血清中 TRH、TSH、T3 和 T4 的表达水平明显增加 (均  $P < 0.05$ ), 甲状腺质量减少 ( $P < 0.05$ )。HE 染色和甲苯胺蓝染色显示, control 组大鼠甲状腺组织有完整的甲状腺滤泡; CIH 组大鼠甲状腺的正常滤泡结构丧失, 一些滤泡细胞显示空泡, 基核较暗; RH 组大鼠甲状腺组织显示正常的滤泡结构, 但是某些滤泡细胞仍呈空泡状, 带有深色核。电子显微镜观察发现, control 组大鼠的甲状腺具有正常的滤泡细胞; CIH 组大鼠甲状腺滤泡细胞的细胞核收缩, 异染色质增加, 基质损失; RH 组大鼠的甲状腺部分有完整的滤泡细胞结构。结论 CIH 可导致大鼠甲状腺功能调节紊乱, 恢复吸氧可使甲状腺功能部分恢复正常。

**[关键词]** 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征; 慢性间歇性缺氧; 甲状腺功能; 大鼠

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-0232-06

### Thyroid Function of Chronic Intermittent Hypoxia Rat Model

TIAN Hui<sup>1</sup>, GAO Long<sup>2</sup>, WANG Zehui<sup>3</sup>

(1. Department of Endocrinology, Yulin First Hospital, Suide 718000, China; 2. Department of Respiratory Medicine, First Hospital of Yulin City, Yulin 719000, China; 3. School of Basic Medicine, Yan'an University School of Medicine, Yan'an 716000, China)

Correspondence to: GAO Long, E-mail: 229303122@qq.com

**[Abstract]** **Objective** To establish a chronic intermittent hypoxia (CIH) rat model to explore the correlation of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome (OSAHS) with thyroid function and its mechanism. **Methods** SD rats were divided into control group, CIH group, and reoxygenation group (RH group). The CIH animal model was established using a hypoxic chamber and was identified. The expression levels of thyroid stimulating hormone (TRH), thyroid stimulating hormone (TSH), triiodothyronine (T3), and thyroxine (T4) in the serum of each group of rats were detected by radioimmunoassay. The pathological changes in the thyroid tissue in each group were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining and toluidine blue staining.

**[基金项目]** 陕西省重点研发计划(2019SF-14213)

**[作者简介]** 田 慧(1983—), 女, 主治医师, 主要从事内分泌疾病的诊治及相关研究。E-mail: z1336787@163.com

**[通信作者]** 高 隆(1981—), 男, 主治医师, 主要从事呼吸内科疾病的诊治及相关研究。E-mail: 229303122@qq.com

Changes in the ultrastructure of the thyroid tissue in rats were observed by electron microscopy. **Results** The CIH and RH rats had blood oxygen saturations of 70%-92%, and arterial oxygen partial pressures of 60.7-80.1 mmHg, which were close to the pathophysiology of OSAHS, therefore, the CIH animal model was successfully established. Compared with the expression levels of TRH, TSH, T3, and T4 in the serum of rats in the control group, those of rats in the CIH group were significantly reduced (all  $P < 0.05$ ), while the thyroid mass was significantly increased ( $P < 0.01$ ). Compared with the expression levels of TRH, TSH, T3, and T4 in the serum of the CIH group rats, those in the serum of the RH group rats increased significantly (all  $P < 0.05$ ), while the thyroid mass was decreased ( $P < 0.05$ ). The HE and toluidine blue staining results showed that the thyroid tissue of the control group had intact thyroid follicles, whereas the thyroid tissue of the CIH group showed normal follicular structure loss, some follicular cells with vacuoles, and a dark basal nucleus. The thyroid tissue of the RH group showed normal follicular structure, but some follicular cells were still vacuolar with dark nuclei. Electron microscopy showed that the thyroid tissue of the control group rats had normal follicular cells, while the follicular cells in the thyroid tissue of the CIH group showed nuclear contraction, increased heterochromatin, and matrix loss. The thyroid tissue of the RH group had complete follicular cell structure. **Conclusion** CIH can cause thyroid dysregulation in rats, and thyroid function partially returns to normal once hypoxia is resolved.

**[Key words]** Obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome; Chronic intermittent hypoxia; Thyroid function; Rats

阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征 (obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, OSAHS) 是一种病因不明的睡眠呼吸疾病, 临床表现为夜间睡眠打鼾伴呼吸暂停和白天嗜睡<sup>[1-2]</sup>。由于呼吸暂停引起反复发作的夜间低氧和高碳酸血症, 可导致高血压、冠心病、糖尿病和脑血管疾病<sup>[3-4]</sup>, 因此受到人们广泛关注。慢性间歇性低氧 (chronic intermittent hypoxia, CIH) 是 OSAHS 的主要病理特征, 其表现为睡眠中反复出现低氧情况, 而且它也是 OSAHS 导致心脑血管并发症的主要因素<sup>[5-6]</sup>。OSAHS 和甲状腺功能减退症均为内科常见的疾病, 它们在体征和症状方面有很多相似的临床表现, 如: 乏力、嗜睡、体质量增加、情绪低落等<sup>[7-8]</sup>。甲状腺、垂体等是高代谢器官, 而 OSAHS 可造成组织缺氧, 长此以往可能使这些组织器官 (甲状腺、垂体) 功能下降或异常<sup>[9]</sup>。因此, 进一步明确 OSAHS 与甲状腺功能之间的关系显得尤为重要。本实验通过建立与 OSAHS 病理生理特征相似的 CIH 大鼠模型, 检测各组大鼠血清中促甲状腺激素释放激素 (thyrotropin releasing hormone, TRH)、促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone, TSH)、三碘甲状腺原氨酸 (triiodothyronine, T3) 和甲状腺素 (thyroxine, T4) 的表达水平, 同时

观察各组大鼠甲状腺组织的病理变化和超微结构变化, 探讨 OSAHS 与甲状腺功能之间的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物饲养

30 只 SPF 级雄性 SD 大鼠, 7 周龄, 体质量 ( $200 \pm 20$ ) g, 购自延安大学实验动物中心 [SCXK (陕) 2019-0014]。大鼠适应环境 [SYXK (陕) 2019-0007] 2 周后进行实验, 动物实验经本单位动物福利伦理委员会批准 (201902005)。

### 1.2 试剂和设备

TRH、TSH、T3 和 T4 放射免疫分析试剂盒 (北京北方生物技术研究), HE 染色试剂盒 (北京索莱宝生物科技有限公司), 甲苯胺蓝染色试剂盒 (北京华威锐科化工有限公司), 电子分析天平 (日本 SHIMADZU 公司), 光学显微镜和 Leica 2065 切片机 (德国 Leica 公司), Hitachi-7500 电子显微镜 (日本 Hitachi 公司),  $\gamma$ -放射免疫分析仪 (众成机电技术公司), 动物低氧舱 (上海塔望智能科技有限公司, 型号: ProOx-810)。

### 1.3 动物分组和 CIH 模型制备

将 30 只 SD 大鼠随机分为对照 (control) 组、CIH 组和复氧 (reoxygenation, RH) 组,

每组 10 只。CIH 组和 RH 组大鼠每日 9:00~17:00 放入低氧舱内。低氧舱内循环, 先输入压缩空气 30 s, 后输入氮气 30 s, 以此循环<sup>[10]</sup>。实验过程中注意检测低氧舱内的氧浓度, 使舱内氧浓度控制在体积分数 8%~21%。实验过程中舱内产生的二氧化碳和水蒸气被生石灰和硅胶吸取。CIH 组大鼠连续进行实验 4 周, 其余时间均正常饮食饮水; RH 组连续进行低氧舱实验 4 周后正常饲养 4 周(复氧), 其余时间均正常饮食饮水; control 组大鼠不予任何处理, 正常饮食饮水 4 周。

#### 1.4 大鼠灌注与取材

实验结束后, 大鼠经腹腔麻醉后, 将其四肢固定于解剖板上, 并从颈静脉抽血约 5 mL, 于 4℃以 3 000 r/min 离心 15 min, 吸取上层血清(其中 TRH 采血管中预先加入 TRH 抗灭活剂硫酸 8-羟基喹啉、Tween-20 和乙二胺四乙酸二钠), 于一 80℃冰箱保存。接着打开大鼠胸腔, 由左心室插入静脉针头至升主动脉, 剪开右心房, 快速灌注 4% 多聚甲醛溶液, 约 30 min, 至大鼠尾变硬。迅速解剖大鼠颈部肌肉, 可看到甲状软骨和气管, 在甲状软骨和气管环两侧可看到一对长椭圆形深红褐色组织, 即甲状腺, 轻轻摘除双侧甲状腺组织, 用干纱布吸水后迅速置于电子天平上称重。甲状腺组织经戊二醛固定等步骤后制成切片, 染色并摄影观察。

#### 1.5 放射免疫分析

将一 80℃冰箱中的血清置于冰上进行溶解, 待其溶解后按照试剂盒上的说明书进行操作, 计算血清中 TRH、TSH、T3 和 T4 的含量。

#### 1.6 HE 染色

将甲状腺组织用 4% 多聚甲醛溶液固定 2~3 h; 然后对甲状腺组织进行包埋, 并切成 4 μm 切片; 切片放入苏木精染液中 5 min, 自来水清洗后, 置于 1% 的盐酸乙醇溶液分化数秒, 并用流水冲洗。切片放入伊红染液中染色 3 min, 流水清洗。之后切片置于梯度乙醇溶液(70%、80%、90%、100%)中脱水, 各 5 min, 再放入二甲苯 I、II 中透明, 分别 5 min。将切片取出, 用滤纸轻轻拭干切片上残余的二甲苯, 在组织上滴加中性树胶封固, 使用光学显微镜观察并摄影。

#### 1.7 甲苯胺蓝染色

将甲状腺组织用 4% 多聚甲醛溶液固定 2~3 h; 然后对甲状腺组织进行包埋, 并切成 4 μm 的切片; 将切片用含 30% 乙醇的甲苯胺蓝溶液染色 30 min; 用无水乙醇洗 10 min; 中性树脂封固, 光学显微镜下观察并摄影。

#### 1.8 电子显微镜观察

将甲状腺组织用戊二醛溶液固定 2~3 h, 漂洗后用 1% 锇酸溶液固定 2 h, 之后用丙酮溶液进行梯度脱水, 甲状腺组织块包埋在电子显微镜标本模板中, 置烤箱内加温烘干, 并切成厚片或半薄切片。将切片转移到滴有蒸馏水的洁净载玻片上, 展平, 等待其干燥后, 用甲苯胺蓝染剂染色, 光学显微镜下定位, 以确定观察区域。接着制作超薄切片, 并将超薄切片转到有聚乙烯醇缩甲醛支持膜的铜载网上, 将 3% 柠檬酸+0.1% 醋酸铀染色液滴于石蜡板上, 把贴有切片的铜网放在石蜡板上, 染色 15 min, 清水洗净。使用 Hitachi-7500 电子显微镜摄影观察。

#### 1.9 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件进行数据分析, 正态分布数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 CIH 模型的鉴定

实验过程中, CIH 组和 RH 组大鼠分别在低氧舱内氧最低浓度和氧最高浓度时, 随机对 CIH 组和 RH 组大鼠进行血氧饱和度和动脉血气分析检测, 其血氧饱和度为 70%~92%, 动脉氧分压为 60.7~80.1 mmHg, 接近 OSAHS 病理生理特点, 提示 CIH 动物模型建立成功。

#### 2.2 各组大鼠血清中 TRH、TSH、T3 和 T4 的含量

如表 1 所示, 与 control 组比较, CIH 组大鼠血清中 TRH、TSH、T3 和 T4 的表达水平明显降低(均  $P < 0.05$ ); 与 CIH 组比较, RH 组大鼠血清中 TRH、TSH、T3 和 T4 的表达水平明显升高(均  $P < 0.05$ )。

#### 2.3 各组大鼠甲状腺质量变化

与 control 组大鼠甲状腺质量[(43.67 ± 1.56)

表 1 各组大鼠血清中 TRH、TSH、T3 和 T4 的含量

Table 1 The serum levels of TRH, TSH, T3 and T4 in each group of rats

| 组别      | TRH/( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | TSH/( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | T3/( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) | T4/( $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) |
|---------|-------------------------------------------|-------------------------------------------|------------------------------------------|------------------------------------------|
| Control | 37.67 $\pm$ 2.45                          | 2.22 $\pm$ 0.56                           | 1.25 $\pm$ 0.47                          | 85.78 $\pm$ 3.24                         |
| CIH     | 24.56 $\pm$ 1.87*                         | 1.45 $\pm$ 0.31*                          | 0.66 $\pm$ 0.07*                         | 57.67 $\pm$ 2.54*                        |
| RH      | 32.45 $\pm$ 1.56 <sup>#</sup>             | 1.98 $\pm$ 0.35 <sup>#</sup>              | 1.22 $\pm$ 0.32 <sup>#</sup>             | 78.95 $\pm$ 2.38 <sup>#</sup>            |

注: TRH 为促甲状腺激素释放激素, TSH 为促甲状腺激素, T3 为三碘甲状腺原氨酸, T4 为甲状腺素。Control 为对照组, CIH 为慢性间歇性低氧组, RH 为复氧组。与 control 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 CIH 组比较, <sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

g] 比较, CIH 组[(71.78  $\pm$  1.67) g] 明显增加 ( $P < 0.01$ ); 与 CIH 组大鼠甲状腺质量比较, RH 组[(50.45  $\pm$  1.32) g] 明显减轻 ( $P < 0.05$ )。

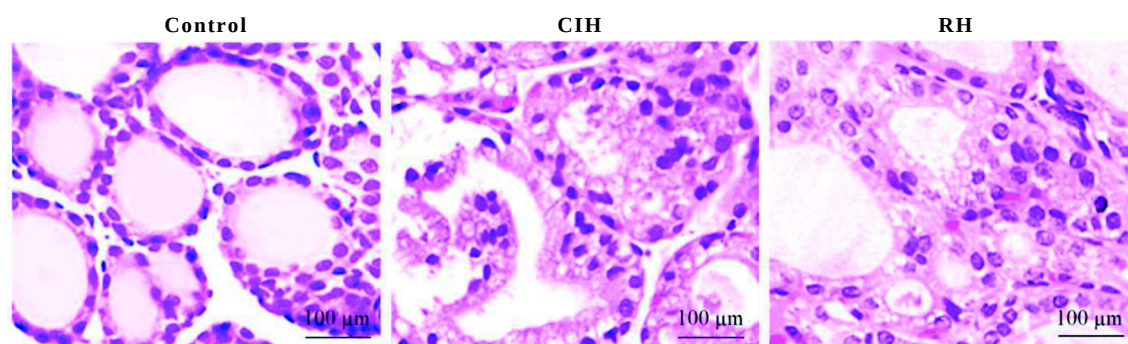
## 2.4 各组大鼠甲状腺组织的病理变化

HE 染色结果 (图 1) 显示, control 组大鼠甲状腺组织含有均质嗜酸胶体的滤泡, 并被具有中央核的简单立方嗜碱性滤泡细胞排列; CIH 组大鼠甲状腺组织的正常滤泡结构丧失, 其中胶体耗尽, 一些滤泡细胞出现空泡, 基核较暗; RH 组大鼠甲状腺组织显示正常滤泡结构, 但某些滤

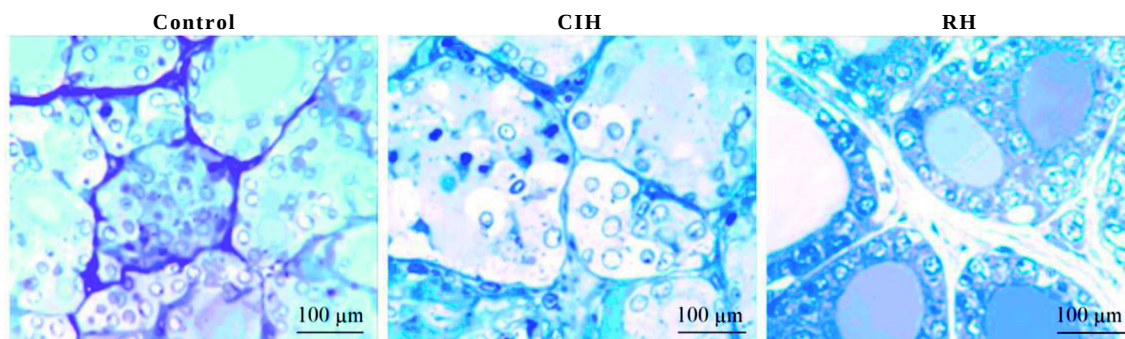
泡细胞仍呈空泡状, 胶体出现了变化。

## 2.5 各组大鼠甲状腺组织中甲状腺滤泡的变化

甲苯胺蓝染色结果 (图 2) 表明, control 组大鼠甲状腺组织有完整的甲状腺滤泡, 内衬滤泡细胞和轻滤泡旁细胞; CIH 组大鼠甲状腺显示不规则甲状腺滤泡, 腔内有脱落的滤泡和滤泡旁细胞; RH 组大鼠甲状腺组织表现出完整的甲状腺滤泡结构, 但有些滤泡细胞仍显示为空泡, 并带有深色核。



注: Control 为对照组, CIH 为慢性间歇性低氧组, RH 为复氧组。

图 1 HE 染色观察各组大鼠甲状腺组织的病理变化 ( $\times 100$ )Figure 1 HE staining to observe the pathological changes of thyroid tissue in each group of rats ( $\times 100$ )

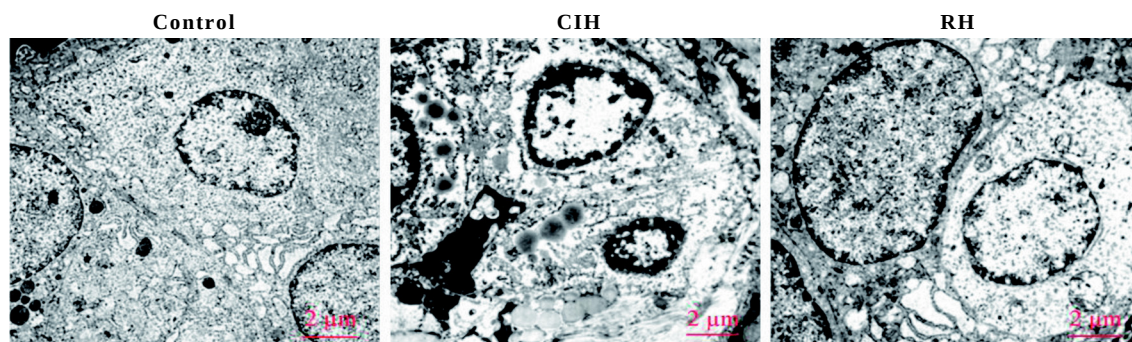
注: Control 为对照组, CIH 为慢性间歇性低氧组, RH 为复氧组。

图 2 甲苯胺蓝染色观察各组大鼠甲状腺的病理变化 ( $\times 100$ )Figure 2 Toluidine blue staining to observe the pathological changes of thyroid in each group of rats ( $\times 100$ )

## 2.6 各组大鼠甲状腺组织超微结构的变化

电子显微镜检查结果(图3)表明, control 组大鼠甲状腺具有正常的滤泡细胞, 滤泡细胞中具有常染色体、完整的溶酶体和内质网; CIH 组

大鼠甲状腺滤泡细胞出现细胞核收缩, 异染色质增加, 基质损失, 线粒体空泡, 溶酶体和脂质滴增加; RH 组大鼠甲状腺显示出或多或少完整的滤泡细胞结构, 其中有常染色体、内质网和溶酶体。



注: Control 为对照组, CIH 为慢性间歇性低氧组, RH 为复氧组。

图3 电子显微镜观察各组大鼠甲状腺超微结构变化(×5 000)

Figure 3 Electron microscopy observation of the ultrastructural changes of the thyroid gland in each group of rats (×5 000)

## 3 讨论

OSAHS 是一种常见疾病, 会导致呼吸中断, 吸氧时间减少(呼吸暂停或呼吸不足), 然后在患者入睡时迅速进行重新充氧<sup>[11]</sup>。氧气吸入的减少导致缺氧、高碳酸血症和胸腔内压力降低<sup>[12]</sup>。在 OSAHS 期间, 反复的低氧血症和高碳酸血症可能会导致神经功能障碍, 儿茶酚胺、内皮素和肾素-血管紧张素系统紊乱, 内分泌功能障碍, 以及血尿动力学改变<sup>[13]</sup>。OSAHS 与全身性疾病相关, 包括高血压、高脂血症、冠状动脉疾病、自身免疫性疾病和癌症<sup>[14-15]</sup>。

甲状腺功能减退是由多种原因引起的, 其机制是甲状腺激素合成及分泌减少, 或其生理效应不足所致机体代谢降低; 按其病因分为原发性甲状腺功能减退、继发性甲状腺功能减退及周围性甲状腺功能减退三类<sup>[16]</sup>。甲状腺功能的调节是复杂的神经内分泌调节过程, 受多种因素的影响。内分泌系统直接由下丘脑调控, 产生 TRH, 通过垂体门脉系统进入腺垂体, 促使腺垂体释放 TSH, TSH 可使甲状腺释放 T4 和 T3。其中腺垂体除受到下丘脑的调节外, 还受到甲状腺激素的负反馈调节<sup>[17]</sup>。

研究发现, OSAHS 患者血清中游离 T3、游

离 T4 水平均明显下降<sup>[18]</sup>。本实验结果表明, CIH 组较 control 组的血清 TRH、TSH、T3、T4 水平降低, 说明 OSAHS 可能会引起下丘脑受损, 使 TRH 的分泌减少, 从而使 TSH(腺垂体分泌)的分泌减少, 最终使 T3 和 T4 的分泌降低, 引起甲状腺功能减退症状。熊俊伟<sup>[19]</sup>研究表明, CIH 可引起大鼠甲状腺质量增加, 去除缺氧因素后甲状腺质量基本恢复正常。本研究中也对大鼠甲状腺进行了称量, 发现 CIH 组大鼠甲状腺质量明显增加, 说明 OSAHS 对甲状腺是有损伤作用的。从 HE 染色、甲苯胺蓝染色和电子显微镜观察结果可知, CIH 组大鼠甲状腺组织有一定程度的损伤; 然而, 进行 4 周复氧后 RH 组大鼠血清中 TRH、TSH、T3、T4 水平升高, 甲状腺质量减轻, 甲状腺组织的损伤程度减小。

综上所述, OSAHS 对甲状腺有一定的损伤作用, 但是复氧可以减轻其损伤, 因此在临床上可以对 OSAHS 患者给予持续正压通气治疗。在本实验中没有对下丘脑和垂体进行深入的研究, 因此 OSAHS 的病理机制还有待进一步研究。

## 参考文献:

[1] 唐旋, 杨立新, 周宁, 等. OSAHS 生物标记物的研究进展

- 及意义[J]. 临床耳鼻咽喉头颈, 2017, 31(19):1540-1544. DOI:10.13201/j.issn.1001-1781.2017.19.019.
- [2] 吴扬, 全悦, 邢宇轩, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征对成人听力影响研究[J]. 医学研究杂志, 2019, 48(9):114-117. DOI:10.11969/j.issn.1673-548X.2019.09.025.
- [3] HLA K M, YOUNG T, HAGEN E W, et al. Coronary heart disease incidence in sleep disordered breathing: the Wisconsin Sleep Cohort Study[J]. Sleep, 2015, 38(5):677-684. DOI:10.5665/sleep.4654.
- [4] ZHANG W D, ZHANG J W, WU K F, et al. Effect of aldosterone antagonists on obstructive sleep apnea in patients with resistant hypertension: a systematic review and meta-analysis[J]. J Hum Hypertens, 2017, 31(12):855-856. DOI:10.1038/jhh.2017.70.
- [5] 徐轶, 李向阳, 单琳. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征动物模型大鼠小脑和海马组织中谷氨酸水平的变化[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2018, 10(12):25-28. DOI:10.12037/YXQY.2018.12-06.
- [6] 张嘉宾, 戈艳蕾, 刘聪辉, 等. 慢性间歇低氧大鼠肺组织中C/EBP同源蛋白的表达变化及依达拉奉的干预作用[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2019, 18(4):327-330. DOI:10.7507/1671-6205.201809023.
- [7] 王国园, 方平, 汪东. 鼻腔扩容术对鼻塞伴OSAHS患者的主客观症状的影响[J]. 中国中西医结合耳鼻咽喉科杂志, 2020, 28(1):33-39. DOI:10.16542/j.cnki.issn.1007-4856.2020.01.008.
- [8] 于飞, 方海宁, 汪小霞, 等. 儿童甲状腺功能减退症的特殊临床表现及误诊分析[J]. 中国医药导报, 2018, 15(21):48-50,97.
- [9] 都建苹, 安振梅. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征与甲状腺功能减退症的关系[J]. 临床荟萃, 2016, 31(3):342-344,348. DOI:10.3969/j.issn.1004-583X.2016.03.028.
- [10] 马林沁, 张京春, 刘玥. 慢性间歇性低氧动物模型的比较[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(4):445-450. DOI:10.3969/j.issn.1001-1978.2016.04.001.
- [11] 罗淼, 李涛平, 冯媛, 等. 老年与中青年阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者临床表现和多导睡眠特征的差异[J]. 中国呼吸与危重监护杂志, 2012, 11(5):489-493. DOI:10.3969/j.issn.1671-6205.2012.05.015.
- [12] SNYDER B, SHELL B, CUNNINGHAM J T, et al. Chronic intermittent hypoxia induces oxidative stress and inflammation in brain regions associated with early-stage neurodegeneration[J]. Physiol Rep, 2017, 5(9):e13258. DOI:10.14814/phy2.13258. DOI:10.14814/phy2.13258.
- [13] SONG L, LIANG X, ZHOU Y. Estrogen-mimicking isoflavone genistein prevents bone loss in a rat model of obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome[J]. Int J Clin Exp Pathol, 2014, 7(4):1687-1694.
- [14] VAKIL M, PARK S, BRODER A. The complex associations between obstructive sleep apnea and auto-immune disorders: a review[J]. Med Hypotheses, 2018, 110:138-143. DOI:10.1016/j.mehy.2017.12.004.
- [15] MARTÍNEZ-GARCÍA MÁ, CAMPOS-RODRIGUEZ F, BARBÉ F. Cancer and OSA: current evidence from human studies[J]. Chest, 2016;150(2):451-463. DOI:10.1016/j.chest.2016.04.029.
- [16] 姚远, 汪蓓蕾, 王大玮, 等. Shh信号通路相关基因表达调控甲状腺功能减退的机制[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(1):49-51. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.01.022.
- [17] 洒晓亮, 张兰. 疏肝健脾方对肝郁脾虚证模型大鼠下丘脑-垂体-甲状腺轴的影响研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2019, 14(5):644-647. DOI: 10.13935/j.cnki.sjzx.190514
- [18] 梁燕, 徐家欢, 李文扬, 等. 阻塞性睡眠呼吸暂停低通气综合征患者下丘脑-垂体-甲状腺轴激素水平与抑郁状态的相关性研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2019, 42(8):591-595. DOI:10.3760/cma.j.issn.1001-0939.2019.08.006.
- [19] 熊俊伟. 慢性间歇性缺氧对下丘脑-垂体-甲状腺轴的影响[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2011. DOI:CNKI:CDMD:2.1011.173914.
- (收稿日期: 2020-09-25 收稿日期: 2020-12-22)

# 高原多脏器功能障碍综合征蕨麻猪模型 C 反应蛋白及炎症因子的变化

肖攀<sup>1</sup>, 牛廷献<sup>1</sup>, 罗晓红<sup>2</sup>, 王红义<sup>1</sup>, 郭晓宇<sup>1</sup>, 陆璐<sup>1</sup>, 冯小明<sup>1</sup>

(1. 联勤保障部队第九四〇医院基础医学实验室, 兰州 730050; 2 联勤保障部队第九四〇医院内分泌科, 兰州 730050)

**[摘要]** 目的 研究高原多脏器功能障碍综合征 (high altitude multiple organ dysfunction syndrome, H-MODS) 蕨麻猪模型肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 及 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 在炎症反应过程中的变化特点。方法 选用 3 个剂量 (0.25、0.35 和 0.50 mg/kg) 的内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导高原土生蕨麻猪成功建立 H-MODS 模型 (B、C、D 组), 同时设生理盐水对照组 (A 组)。检测不同时间点的血清 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  及 CRP 表达水平。结果 各组蕨麻猪泵入 LPS 后 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达量均急剧升高, 并在 6 h 升至最高, 在 3~12 h 时与同组 0 h 及同时间点 A 组相比均明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 12 h 后逐渐下降; B、D 组 TNF- $\alpha$  表达量在 24 h 后与同组 0 h 及同时间点 A 组相比均明显升高 ( $P < 0.05$ ), 在 72 h 后 B 组明显高于 A 组 ( $P < 0.05$ )。24 h 的 IL-1 $\beta$  表达量 D 组高于 0 h 和 A 组 ( $P < 0.05$ ), 之后其表达量逐渐下降, 在 48 h、72 h 时与 0 h 和 A 组相比均明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。静脉泵入 LPS 后, B、C、D 组 CRP 表达量开始升高, 并在 24~48 h 时表达量达到最大; 其各组 CRP 表达量在 6~72 h 时与 0 h 和 A 组相比均明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。结论 H-MODS 形成时机体产生严重的炎症反应, 炎症因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  表达量迅速升高, 但在免疫调节作用下其表达量迅速下调, 并在短时间内出现急剧波动而达到平衡状态; 而 CRP 表达量变化相对缓慢, 伴随于体内炎症反应的整个过程。**[关键词]** 高原多脏器功能障碍综合征; 蕨麻猪; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 白细胞介素-1 $\beta$ ; C 反应蛋白**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-0238-06

## Changes of C-reactive Protein and Inflammatory Factors in Juema Pig Model with High Altitude Multiple Organ Dysfunction Syndrome

XIAO Pan<sup>1</sup>, NIU Tingxian<sup>1</sup>, LUO Xiaohong<sup>2</sup>, WANG Hongyi<sup>1</sup>, GUO Xiaoyu<sup>1</sup>, LU Lu<sup>1</sup>, FENG Xiaoming<sup>1</sup>

(1. Department of Basic Medical Laboratory, Joint Service Support Unit Army No. 940 Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China; 2. Department of Endocrine, Joint Service Support Unit Army No. 940 Hospital of PLA, Lanzhou 730050, China)

Correspondence to: FENG Xiaoming, E-mail: fxm8006@163.com

**[Abstract]** **Objective** To investigate the changes of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\alpha$ ) and C-reactive protein (CRP) in the development of inflammation in the Juma pig model with high altitude multiple organ dysfunction syndrome (H-MODS). **Methods** Three doses (0.25, 0.35, and 0.50 mg/kg) of endotoxin lipopolysaccharide (LPS) were used to induce the H-MODS model (group B, C and D), and normal saline was used as control (group A). The serum levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CRP were detected at different time points. **Results** The expression levels of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  increased sharply after LPS infusion to the

**[基金项目]** 军队实验动物专项科研课题 (SYDW[2018]12 号)

**[作者简介]** 肖攀(1991—), 男, 本科, 技师, 主要研究方向: 实验动物质量控制及开发。E-mail: 997078955@qq.com

**[通信作者]** 冯小明(1980—), 男, 硕士, 主管技师, 主要研究方向: 实验动物质量控制及开发。E-mail: fxm8006@163.com

pigs, and reached the highest level at 6 h; the levels at 3-12 h of the pigs treated with LPS were increased compared with the level at 0 h of the pigs with the same treatment and the level of compared group A at the same time point ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), and then decreased gradually. The expression levels of TNF- $\alpha$  at 24 h in groups B and D were significantly higher than that in the same group at 0 h and group A at the same time point ( $P < 0.05$ ), and the expression level of TNF- $\alpha$  was significantly higher in group B than that in group A at 72 h ( $P < 0.05$ ). The expression level of IL-1 $\beta$  at 24 h in group D was higher than that at 0 h and that in group A at the same time point ( $P < 0.05$ ), and then decreased gradually. Compared with 0 h and group A, the expression levels of IL-1 $\alpha$  in group D decreased significantly at 48 h and 72 h ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). After intravenous infusion of LPS, the expression levels of CRP in groups B, C and D began to increase, and reached the maximum at 24-48 h; the expression levels of CRP in the other groups at 6-72 h were significantly higher than those in group A and at 0 h ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). **Conclusion** Severe inflammatory reaction occurs during the development of H-MODS, and the expressions of inflammatory factors TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  increase rapidly first and then decrease sharply under immune regulation, displaying large fluctuations in short time until achieving an equilibrium; the CRP expression changes slowly throughout the inflammatory reaction *in vivo*.

**[Key words]** High altitude multiple organ dysfunction syndrome; Juema pigs; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Interleukin-1 $\beta$ ; C-reactive protein

我国高原地区急性重型高原病并发多脏器功能障碍综合征 (multiple organ dysfunction syndrome, MODS) 的发病率较高<sup>[1-2]</sup>。高原多脏器功能障碍综合征 (high altitude multiple organ dysfunction syndrome, H-MODS) 在本质上与平原地区发生的 MODS 没有区别, 但是受低氧等高原特殊环境的影响, H-MODS 在病程及临床发病特征方面具有一定的高原特异性, 使其在临床治疗中显得更为复杂和危险<sup>[3]</sup>。本课题组前期采用具有高原特性的藏麻猪成功建立了 H-MODS 动物模型<sup>[4-6]</sup>, 并发现促肾上腺皮质激素 (adrenocorticotrophic hormone, ACTH)、皮质酮 (corticosterone, CORT)、血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 及低氧诱导因子-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 在 H-MODS 模型藏麻猪的病程发展过程中发生明显变化。本研究在此基础上进一步探讨内毒素脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导多脏器损伤后, 肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 及 C 反应蛋白 (C-reactive protein, CRP) 等炎症指标的变化特点, 以期了解 H-MODS 藏麻猪模型发病过程中机体炎症反应的变化特征。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物与试剂

高原藏麻猪 24 只, 雌雄各半, 体质量为 15 kg 左右。所有藏麻猪按雌雄各半随机分为 H-MODS 藏麻猪模型 LPS 高、中、低剂量组和对照组, 每组 6 只。藏麻猪为甘南地区散户饲养 (符合普通级实验动物要求), 检测实验在本实验室 [SYXK (军) 2017-0046] 进行, 严格遵照动物实验福利伦理各项要求进行操作。CRP 检测用 ELISA 试剂盒购自英国 Abcam 公司, IL-1 $\beta$  与 TNF- $\alpha$  检测用 ELISA 试剂盒均购自美国 R & D 公司。氯胺酮 (国药准字: H35020148) 购自福建古田药业有限公司, 地西洋注射液 (国药准字: H12020957) 购自天津金耀氨基酸有限公司, LPS (血清型为 O127: B8, 批号为 64H4010) 购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 H-MODS 模型建立方法

建模方法参考文献<sup>[4-7]</sup>。本实验在海拔 3 500 m 的甘南桑科草原进行, 将猪运到实验地点适应性饲养 3 d, 待动物状态稳定后进行实验。采用氯胺酮 (6 mg/kg) 联合安定 (0.5 mg/kg) 肌肉注射法进行动物麻醉, 同时肌肉注射阿托品 (0.05 mg/kg)。动物麻醉后经耳缘静脉泵入

LPS, 每组泵入时间均控制在 30 min 左右, 低、中、高剂量组的泵入剂量分别为 0.25 mg/kg (B 组)、0.35 mg/kg (C 组) 和 0.50 mg/kg (D 组), 对照组 (A 组) 以等量的生理盐水 (即 0.9%NaCl 溶液) 代替。经过前期实验发现, 采用 LPS 高、中、低这 3 个剂量来诱导藏麻猪多脏器损伤建立 H-MODS 模型, 都可以引起藏麻小型猪的生理生化指标发生变化, 同时中、高剂量组猪均出现死亡, 提示 3 个剂量的 LPS 都可以成功建立 H-MODS 模型。

### 1.3 MODS 的诊断标准

参照胡森等<sup>[7]</sup>提出的动物发生 MODS 时各个器官功能障碍分期诊断标准和评分标准, 在注射 LPS 后出现 2 个或 2 个以上器官或系统功能障碍时判定为 MODS。

### 1.4 血清采集

3 组猪分别于泵入 LPS 后 0 h、3 h、6 h、12 h、24 h、48 h 和 72 h, 经颈静脉采血, 分离血清, 保存于 -80 °C 备用。

### 1.5 ELISA 检测指标

IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  与 CRP 表达水平的检测由本实验室按照 ELISA 试剂盒说明书操作完成。

### 1.6 数据处理与统计

采用 SPSS 17.0 统计分析软件对检测结果进

行分析。计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 各组间差异比较采用单因素方差分析, 组内两两比较采用 LSD- $t$  检验, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 炎性因子 TNF- $\alpha$ 的变化

静脉泵入 LPS 后, B、C、D 组 TNF- $\alpha$  表达量急剧升高, 在 6 h 时升至最高, 之后逐渐下降; 在 3~12 h 时 B、C、D 组与同组 0 h 和同时间点 A 组相比明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 24 h 时 B、D 组与同组 0 h 和同时间点 A 组相比, 均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 72 h 时 B 组明显高于 A 组 ( $P < 0.05$ )。TNF- $\alpha$  表达量情况与走势详见表 1 和图 1。

### 2.2 炎性因子 IL-1 $\beta$ 的变化

低、中、高剂量组在注入 LPS 后, IL-1 $\beta$  表达量均开始上升, 并在 6 h 时达到峰值; 在 3~12 h 时 B、C、D 组与 0 h 和 A 组相比, 其表达量均有明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 24 h 时 D 组高于 0 h 和 A 组 ( $P < 0.05$ )。之后各组 IL-1 $\beta$  表达量逐渐降低, 在 48 h、72 h 时 B、C、D 组与 0 h 和 A 组相比, 均明显降低 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。从各剂量组的表达量来看, 高剂量组的 IL-1 $\beta$  表达水平高于低剂量组。IL-1 $\beta$  表达量情况与走势详见表 1 和图 1。

表 1 各组藏麻猪给予 LPS 不同时点的 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 CRP 水平比较

Table 1 Comparison of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CRP levels at different time points in Juema pigs after different LPS infusion treatments

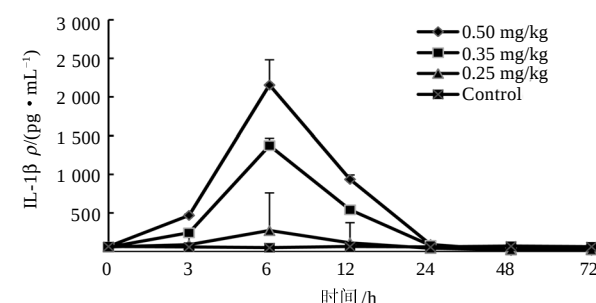
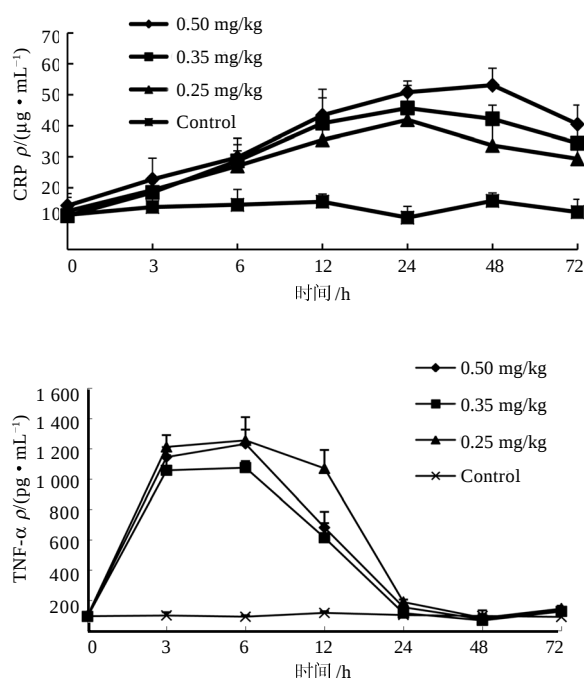
| 组别                                                   | $(\bar{x} \pm s, n=6)$ |                                       |                                        |                                       |                                   |                                   |                                  |
|------------------------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|----------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
|                                                      | 0 h                    | 3 h                                   | 6 h                                    | 12 h                                  | 24 h                              | 48 h                              | 72 h                             |
| TNF- $\alpha$ $\rho$ /(pg $\cdot$ mL <sup>-1</sup> ) |                        |                                       |                                        |                                       |                                   |                                   |                                  |
| A                                                    | 96.52 $\pm$ 10.21      | 101.84 $\pm$ 21.10                    | 93.24 $\pm$ 9.65                       | 118.35 $\pm$ 11.36                    | 105.28 $\pm$ 10.89                | 98.64 $\pm$ 12.25                 | 91.68 $\pm$ 9.32                 |
| B                                                    | 100.87 $\pm$ 9.95      | 212.54 $\pm$ 78.21** $\Delta\Delta$   | 1 255.91 $\pm$ 153.41** $\Delta\Delta$ | 1 071.01 $\pm$ 122.1** $\Delta\Delta$ | 190.61 $\pm$ 16.04* $\Delta$      | 86.12 $\pm$ 26.33                 | 147.39 $\pm$ 11.70* $\Delta$     |
| C                                                    | 94.98 $\pm$ 10.26      | 1 058.35 $\pm$ 99.68** $\Delta\Delta$ | 1 076.56 $\pm$ 42.89** $\Delta\Delta$  | 615.30 $\pm$ 96.11* $\Delta$          | 117.68 $\pm$ 14.40                | 69.36 $\pm$ 65.67                 | 128.56 $\pm$ 13.34               |
| D                                                    | 98.93 $\pm$ 7.20       | 1 145.73 $\pm$ 65.99** $\Delta\Delta$ | 1 233.61 $\pm$ 93.60** $\Delta\Delta$  | 681.92 $\pm$ 103.46* $\Delta$         | 156.35 $\pm$ 17.20* $\Delta$      | 76.71 $\pm$ 19.65                 | 133.66 $\pm$ 32.08               |
| IL-1 $\beta$ $\rho$ /(pg $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )  |                        |                                       |                                        |                                       |                                   |                                   |                                  |
| A                                                    | 66.25 $\pm$ 21.41      | 59.14 $\pm$ 16.32                     | 50.28 $\pm$ 22.81                      | 65.34 $\pm$ 19.64                     | 58.23 $\pm$ 28.25                 | 70.17 $\pm$ 11.25                 | 63.58 $\pm$ 31.35                |
| B                                                    | 60.43 $\pm$ 6.49       | 187.59 $\pm$ 16.34* $\Delta$          | 271.43 $\pm$ 94.95** $\Delta\Delta$    | 113.59 $\pm$ 22.58* $\Delta$          | 42.14 $\pm$ 17.17                 | 21.58 $\pm$ 5.57* $\Delta\Delta$  | 22.37 $\pm$ 8.35* $\Delta$       |
| C                                                    | 57.32 $\pm$ 4.05       | 243.33 $\pm$ 112.12** $\Delta\Delta$  | 1 373.57 $\pm$ 489.92** $\Delta\Delta$ | 542.14 $\pm$ 261.27** $\Delta\Delta$  | 80.71 $\pm$ 52.22                 | 31.42 $\pm$ 6.62* $\Delta$        | 28.70 $\pm$ 8.19* $\Delta$       |
| D                                                    | 65.71 $\pm$ 11.24      | 469.26 $\pm$ 17.86** $\Delta\Delta$   | 2 155.14 $\pm$ 328.30** $\Delta\Delta$ | 936.43 $\pm$ 57.58** $\Delta\Delta$   | 90.48 $\pm$ 19.20* $\Delta$       | 14.28 $\pm$ 8.08** $\Delta\Delta$ | 16.43 $\pm$ 5.91* $\Delta\Delta$ |
| CRP $\rho$ /( $\mu$ g $\cdot$ mL <sup>-1</sup> )     |                        |                                       |                                        |                                       |                                   |                                   |                                  |
| A                                                    | 11.23 $\pm$ 2.52       | 13.78 $\pm$ 3.45                      | 14.46 $\pm$ 4.98                       | 15.49 $\pm$ 2.47                      | 10.33 $\pm$ 3.64                  | 15.74 $\pm$ 2.58                  | 12.11 $\pm$ 4.14                 |
| B                                                    | 12.38 $\pm$ 4.51       | 19.26 $\pm$ 3.84                      | 27.02 $\pm$ 6.96* $\Delta$             | 35.44 $\pm$ 5.21** $\Delta$           | 41.93 $\pm$ 8.11* $\Delta$        | 33.67 $\pm$ 7.65* $\Delta$        | 29.32 $\pm$ 4.77* $\Delta$       |
| C                                                    | 10.91 $\pm$ 2.26       | 18.48 $\pm$ 4.01*                     | 28.69 $\pm$ 3.56** $\Delta$            | 40.79 $\pm$ 8.21* $\Delta\Delta$      | 45.72 $\pm$ 7.38** $\Delta\Delta$ | 42.22 $\pm$ 4.49* $\Delta\Delta$  | 34.36 $\pm$ 5.85* $\Delta$       |
| D                                                    | 14.23 $\pm$ 3.96       | 22.77 $\pm$ 6.86 $\Delta$             | 29.77 $\pm$ 6.65* $\Delta$             | 43.38 $\pm$ 8.31** $\Delta$           | 50.85 $\pm$ 3.81** $\Delta\Delta$ | 53.08 $\pm$ 5.50** $\Delta\Delta$ | 40.46 $\pm$ 6.35* $\Delta$       |

注: TNF- $\alpha$  即肿瘤坏死因子 - $\alpha$ , IL-1 $\beta$  即白细胞介素 -1 $\beta$ , CRP 即 C 反应蛋白。A 为对照组, 通过耳缘静脉注入等量的生理盐水; B~D 分别为低、中、高剂量组, 即分别经耳缘静脉泵入 0.25 mg/kg (B 组)、0.35 mg/kg (C 组)、0.50 mg/kg (D 组) 的脂多糖 (LPS)。与对照组相比, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ ; 与 0 h 相比,  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$ 。

## 2.3 CRP 的变化

静脉泵入 LPS 后, B、C、D 组 CRP 表达量开始升高, B、C 组在 24 h 时表达量达到最大, D 组在 48 h 时表达量达到最大, 之后各组表达量开始逐渐下降; B 组 6~72 h 时 CRP 表达量与 0 h 和 A 组相比, 均明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); C 组 6~72 h 时 CRP 表达量与 0 h 和 A 组相比均明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 其

中 3 h 时 CRP 表达量与 A 组相比明显升高 ( $P < 0.05$ ); D 组 6~72 h 时 CRP 表达量与 0 h 和 A 组相比明显升高 ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ), 其中 3 h 时 CRP 表达量与 0 h 相比明显升高 ( $P < 0.05$ )。从各剂量组的表达量来看, 高剂量组的 CRP 表达水平略高于低剂量组。CRP 表达情况与走势详见表 1 和图 1。



注: TNF- $\alpha$  即肿瘤坏死因子- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  即白细胞介素-1 $\beta$ , CRP 即 C 反应蛋白。Control 为生理盐水对照组; 0.25 mg/kg、0.35 mg/kg 和 0.50 mg/kg 分别为 LPS 低、中、高剂量组。Control 组的各时间点藏麻猪均为 6 只; 0.25 mg/kg 和 0.35 mg/kg 组的 0 h 和 3 h 时  $n=6$ , 12~72 h 时  $n=5$ ; 0.5 mg/kg 组的 0 h 时  $n=6$ , 3 h 时  $n=5$ , 12~72 h 时  $n=4$ 。

图 1 各组藏麻猪给予 LPS 后不同时间 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  和 CRP 表达的变化曲线

Figure 1 Change of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and CRP expressions in Juema pigs after different LPS infusion treatments

## 3 讨论

本研究通过 LPS 致藏麻猪多脏器损伤而建立 H-MODS 模型, 并在建立模型时选用高、中、低 3 个剂量。前期实验结果显示, 高、中、低剂量的 LPS 均可引起藏麻猪生理生化指标的变化, 且中、高剂量 LPS 可诱导藏麻猪发生多脏器损伤<sup>[5]</sup>。目前, IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  与 CRP 已广泛用来反映临床疾病发生时的炎症反应及病程变化程度<sup>[8-9]</sup>, 并且这些指标在全身炎症反应及多脏器损伤疾病的诊疗中具有临床指导意义<sup>[10-11]</sup>。因此, 本研究进一步利用藏麻猪 H-MODS 模型, 对藏麻猪发生 MODS 时的炎症因子 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  与 CRP 进行检测, 以期探讨 H-MODS 发生、发展中炎症反应的变化特点。

TNF- $\alpha$  由淋巴细胞和单核巨噬细胞分泌, 是典型的促炎性因子, 通过对细菌内毒素反应而参与炎症反应<sup>[12]</sup>, 导致组织细胞破坏。TNF- $\alpha$  可引起内皮损伤, 造成炎症反应发生, 同时可激活巨噬细胞和中性粒细胞, 增强其吞噬和杀伤性, 对相关炎症因子有介导作用, 从而引起器官组织的损伤<sup>[13]</sup>。IL-1 是一种前炎性细胞因子, 主要通过修饰基因达到对免疫炎症反应的调节作用。IL-1 的基因结构与其调节功能密切相关, 并且内皮损伤可刺激内皮细胞释放 IL-1<sup>[14]</sup>。研究发现, 大鼠 MODS 模型也会引起 TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  表达量出现上调<sup>[15-16]</sup>。本研究中 TNF- $\alpha$  与 IL-1 $\beta$  在 LPS 诱导 MODS 形成后表达量急剧升高, 在 6 h 时升至最高, 之后逐渐下降。本研究发现, 高剂量组藏麻猪出现死亡; 在藏麻猪形成 H-MODS 时,

其体内出现严重的应激感染状态；随着炎症反应逐渐增强，炎症因子  $\text{TNF-}\alpha$  与  $\text{IL-1}\beta$  的表达也出现不同程度的上调；随后机体进入动态免疫调节阶段，抑制过度炎症反应，维持机体的平衡；在 6 h 后  $\text{TNF-}\alpha$  与  $\text{IL-1}\beta$  表达水平开始慢慢降低，在 72 h 时  $\text{IL-1}\beta$  表达水平甚至低于对照组和 0 h。以上结果提示，机体发生炎症反应后出现免疫应激反应，通过迅速的免疫调节快速下调炎症因子表达。

CRP 是由肝细胞分泌的一种非特异性生化标志物的炎症因子，其表达量的增加与机体受到刺激引起的炎症反应关系紧密。同时，CRP 作为一种急性反应蛋白能够快速反映出机体的慢性或急性炎症状态<sup>[17]</sup>。CRP 会激活单核细胞，诱导血管内皮细胞功能紊乱，促进其他炎症因子的释放，最终诱导多脏器损伤。当机体受到外界 LPS 的作用时，多脏器出现不同程度的损伤，炎症反应开始加剧，CRP 表达量就会迅速升高。此外，CRP 能够诱导氧自由基产生，因此在炎症反应出现时  $\text{IL-6}$ 、 $\text{TNF-}\alpha$  等炎症因子开始大量释放；并且伴随着炎症反应的加剧，CRP 还能够诱导血小板激活，加重心肌组织、肾脏组织微循环障碍<sup>[18]</sup>，使得炎症反应持续加剧。本研究发现，蕨麻猪泵入 LPS 诱导多脏器出现损伤时，低、高、中剂量组的 CRP 表达量开始升高，并在 6 h 时与 0 h 和对照组相比明显升高；各组均在 24~48 h 表达量达到最大，在 72 h 后才缓慢降低。

目前，临床上广泛采用 CRP、 $\text{TNF-}\alpha$  及  $\text{IL-1}$  等炎症因子来评价患者疾病感染情况以及临床治疗效果，这些炎症因子已经成为临床评价病情及治疗效果的标志之一<sup>[19-22]</sup>。本研究中蕨麻猪经 LPS 诱导发生多脏器炎症反应后，其  $\text{TNF-}\alpha$  及  $\text{IL-1}\beta$  表达量在 6 h 达到最大，之后开始快速降低，到 48 h 已经接近恢复正常；而 CRP 在 6 h 时处于上升期，到 48 h 才达到顶峰，之后缓慢回落。由此可以看出，在 LPS 诱导蕨麻猪形成 H-MODS 时，炎症因子  $\text{TNF-}\alpha$  及  $\text{IL-1}\beta$  在体内表达量迅速上升再下降，相对而言，CRP 的表达持续时间长且变化比较缓慢，这可能是因为各个因子的分泌器官及场所不同。因此，在评价 H-MODS 炎症反应的发展变化时，应该对病程随时

监测，根据各检测指标的变化来评估炎症反应的程度，以便及时调整治疗方案。临床研究显示，脓毒症患者与 H-MODS 患者的  $\text{TNF-}\alpha$  及 CRP 具有相近的变化特点<sup>[23-24]</sup>。在 H-MODS 发生发展过程中，炎症反应及免疫反应贯穿整个疾病的发展始末，促炎细胞因子与抗炎细胞因子之间伴随着免疫反应调节，最终取得平衡以达到内环境的稳定，所以  $\text{TNF-}\alpha$  及  $\text{IL-1}\beta$  炎症指标的变化呈现迅速的抛物线形趋势，这种变化趋势使得机体的炎症反应及时得到调整，不会出现过度抗炎反应及免疫功能抑制。本研究发现，蕨麻猪模型 H-MODS 形成时机体产生严重的炎症反应，炎症因子  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$  表达迅速升高，这时免疫调节作用也迅速对炎症因子高表达进行反向调节，迅速下调  $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$  的表达水平，所以机体出现炎症反应时炎症因子的变化特点是短时间内出现急剧波动，且会经免疫调节快速达到平衡状态；相对而言，CRP 表达的变化比较缓慢，其表达量表征着机体炎症反应的整个过程。

综上所述，研究 H-MODS 发生、发展过程中炎症因子及 CRP 的变化特点，将有助于人们准确预判 H-MODS 的病程发展，为进一步深入探讨 H-MODS 的致病机制提供理论参考，并且对 H-MODS 的临床精准诊断及治疗具有重要的指导意义。

#### 参考文献:

- [1] 周其全, 刘福玉, 郑必海, 等. 白细胞与白细胞介素增高在急性高原病并发多器官功能障碍中的作用及临床意义[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(10):588-592. DOI: 10.3760/j.issn: 1003-0603.2007.10.004.
- [2] 周其全, 刘福玉, 郑必海, 等. 3184例重型急性高原病患者并发多器官功能障碍综合征的结果分析[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19(1):36-40. DOI:10.3760/j.issn: 1003-0603.2007.01.011.
- [3] 张世范, 刘毅, 高炜, 等. 高海拔地区多脏器功能障碍评分系统诊断的标准[J]. 中华急诊医学杂志, 2006, 15(4): 366-369.
- [4] 牛廷献, 郭晓宇, 申健, 等. 蕨麻小型猪与巴马小型猪高原多脏器功能障碍综合征模型的比较研究[J]. 中国比较医学杂志, 2015, 25(4):33-37. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2015.004.007.
- [5] 冯小明, 罗晓红, 王红义, 等. 高原多脏器功能障碍综合

- 征藏麻小型猪模型的建立及促肾上腺皮质激素与皮质酮的变化[J]. 实验动物与比较医学, 2016, 36(2):107-112. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2016.02.005.
- [6] 牛廷献, 王红义, 郭晓宇, 等. 藏麻猪与巴马小型猪脏器指数及低氧相关基因的比较[J]. 中国比较医学杂志, 2017, 27(4):9-13. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2017.04.002.
- [7] 胡森, 盛志勇, 周宝桐, 等. 双相迟发多器官功能不全综合征(MODS)动物模型的研究[J]. 中华创伤杂志, 1996, 12(2):102-106.
- [8] 罗南萍, 王显刚, 王瑞山, 等. 老年急性冠状动脉综合征患者CRP与TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 相关性研究[J]. 中国病理生理杂志, 2003, 19(10):1420-1421. DOI:10.3321/j.issn:1000-4718.2003.10.032.
- [9] 曹姣妃, 刘宁, 梁德胜, 等. 急性脑血管病患者血清hs-CRP、TNF- $\alpha$ 和IL-6的动态变化及临床意义[J]. 第四军医大学学报, 2004(2):173-175. DOI:10.3321/j.issn.1000-2790.2004.02.024.
- [10] 邵义明, 张良清, 邓烈华, 等. 乌司他丁对全身炎症反应综合征的治疗作用[J]. 中国危重病急救医学, 2005(4):228-230. DOI:10.3760/j.issn.1003-0603.2005.04.010.
- [11] 宋亚琪, 曾杉, 王晓春, 等. 乌司他丁对多发伤患者CRP、TNF、IL-1、2、6、8、10释放的早期干预[J]. 全科医学临床与教育, 2010, 8(3):324-326. DOI:10.13558/j.cnki.issn.1672-3686.2010.03.060.
- [12] 林梅, 张冬雪, 刘志强, 等. 慢性牙周炎患者血清IL-33、TNF- $\alpha$ 、IL-6的检测及意义[J]. 首都医科大学学报, 2016, 37(3):255-259. DOI:10.3969/j.issn.1006-7795.2016.03.001.
- [13] 侯湘德, 白剑, 谢开汉, 等. 腹腔镜胆囊切除术治疗急性结石性胆囊炎合并糖尿病59例[J]. 2016, 16(4):377-379. DOI:10.3969/j.issn.1009-6604.2016.04.023.
- [14] YANG Q P, LIU X G, LIU M, et al. Ulinastatin-mediated protection against zymosan-induced multiple organ dysfunction in rats[J]. *Biologicals*, 2010, 38(5):552-556. DOI:10.1016/j.biologicals.2010.05.001.
- [15] 陆璐, 冯小明, 王红义, 等. 血必净对大鼠多脏器功能障碍综合征炎症因子的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(3):26-30. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2013.03.007.
- [16] 冯小明, 王红义, 牛廷献, 等. 乌司他丁对大鼠多脏器功能障碍综合征炎症因子的影响及意义[J]. 实验动物与比较医学, 2014, 4(34):278-282. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2014.04.004.
- [17] 常春荣, 韩东, 孙尚敏, 等. 牙周基础治疗对慢性牙周炎患者龈沟液白细胞介素6、肿瘤坏死因子 $\alpha$ 及血清高敏C反应蛋白的影响[J]. 中国医科大学学报, 2013, 42(2):135-137. DOI:10.3969/j.issn.0258-4646.2013.02.010.
- [18] NURKIC J, LJUCA F, NURKIC M, et al. Biomarkers of plaque instability in acute coronary syndrome patients[J]. *Med Arh*, 2010, 64(2):103-106.
- [19] 秦胜利. 腹腔镜胆囊切除术对急性结石性胆囊炎患者术后TNF- $\alpha$ 、IL-8及CRP的影响[J]. 河南外科学杂志, 2017, 23(5):31-32. DOI:10.16193/j.cnki.hnwk.2017.05.017.
- [20] 许国梁. 腹腔镜辅助远端胃大部切除术与传统开胃胃癌切除术对老年胃癌患者血清TNF- $\alpha$ 、IL-6、CRP的影响及短期疗效比较[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(18):4581-4582. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.18.069.
- [21] 崔东锋. 前列地尔治疗慢性肾功能衰竭的疗效及对血清炎症因子水平的影响[J]. 泰山医学院学报, 2017, 38(9):1038-1039. DOI:10.3969/j.issn.1004-7115.2017.09.027.
- [22] 叶小彬. 瑞舒伐他汀钙对急性冠脉综合征患者血清炎症因子及内皮功能的影响[J]. 中国老年学杂志, 2017, 37(17):4245-4247. DOI:10.3969/j.issn.1005-9202.2017.17.036.
- [23] 康福新, 王小智, 刘润, 等. 血必净注射液对脓毒症的临床疗效以及对血清炎症因子水平和血液流变学的影响[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(9):2456-2458. DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2017.09.072.
- [24] 宋云峰, 胡英芳, 罗文娟, 等. 血必净治疗重症脓毒症和脓毒症休克的临床疗效分析[J]. 临床医学工程, 2014, 21(6):739-740. DOI:10.3969/j.issn.1674-4659.2014.06.0739.

(收稿日期: 2020-08-14 修回日期: 2021-01-14)

# 苦参素对实验性自身免疫性甲状腺炎大鼠 Th1/Th2 细胞平衡及相关通路的影响

姚 婷<sup>1</sup>, 高 原<sup>1</sup>, 曾芳馨<sup>2</sup>

(1. 成都医学院第二附属医院·核工业四一六医院内分泌科, 成都 610051; 2. 达州市中西医结合医院内分泌风湿免疫科, 达州 635000)

**[摘要]** 目的 探讨苦参素对实验性自身免疫性甲状腺炎(EAT)大鼠炎症反应、辅助性T淋巴细胞(Th)1/Th2、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)及细胞表面趋化因子受体2(CCR2)信号的影响。方法 将75只Lewis大鼠按随机数字表法分为对照组、模型组和苦参素低、中、高剂量组。用免疫猪甲状腺球蛋白(pTG)诱导建立EAT大鼠模型,苦参素低、中、高剂量组分别灌胃0.2、0.4和0.6 g/kg的苦参素,给药体积2 mL,对照组和模型组均给予等体积生理盐水,隔日1次,共4周。HE染色观察大鼠甲状腺组织形态学变化;ELISA法检测血清中促甲状腺激素(TSH)、抗甲状腺球蛋白抗体(TGAb)和甲状腺过氧化物酶抗体(TPOAb),以及细胞因子干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、白细胞介素(IL)-12、IL-4和IL-10水平;蛋白质印迹法检测甲状腺组织中MCP-1/CCR2信号轴。结果 与对照组相比,模型组TSH、TGAb、TPOAb、IFN- $\gamma$ 、IL-12、IFN- $\gamma$ /IL-4、IL-12/IL-10、NF- $\kappa$ Bp65及MCP-1、CCR2蛋白水平均明显升高,IL-4、IL-10水平明显降低(均 $P < 0.05$ );苦参素低、中、高剂量组大鼠TSH、TGAb、TPOAb、IFN- $\gamma$ 、IL-12、IFN- $\gamma$ /IL-4、IL-12/IL-10、NF- $\kappa$ Bp65及MCP-1、CCR2蛋白水平均明显降低,IL-4、IL-10水平明显升高(均 $P < 0.05$ ),且呈剂量依赖性。结论 苦参素能抑制甲状腺抗体生成,下调Th1型细胞因子,上调Th2型细胞因子,进而降低Th1和Th2比值,并抑制MCP-1/CCR2信号轴,发挥对自身免疫性甲状腺炎大鼠的保护作用。

**[关键词]** 苦参素;实验性自身免疫性甲状腺炎;Th1/Th2;MCP-1/CCR2信号;Lewis大鼠

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-0244-08

## Effects of Matrine on Th1/Th2 Balance and Related Pathways in Rats with Experimental Autoimmune Thyroiditis

YAO Ting<sup>1</sup>, GAO Yuan<sup>1</sup>, ZENG Fangxin<sup>2</sup>

(1. Department of Endocrinology, Second Affiliated Hospital of Chengdu Medical College • China National Nuclear Corporation 416 Hospital, Chengdu 610051, China; 2. Department of Endocrinology and Rheumatism & Immunology, Dazhou Integrated TCM & Western Medicine Hospital, Dazhou 635000, China)

Correspondence to: ZENG Fangxin, E-mail: 363464341@qq.com

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effects of matrine on inflammation, helper T lymphocytes (Th)1/Th2, and monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/cell surface chemokine receptor 2(CCR2) signaling in rats with experimental autoimmune thyroiditis (EAT). **Methods** Seventy-five Lewis rats were divided into control, model, and low-, medium-, and high-dose matrine groups using the random number table method ( $n = 15$  each). The EAT rat model was induced by immunization with porcine thyroglobulin (pTG). The low-, medium-, and high-dose groups were intragastrically administered 0.2, 0.4, and 0.6 g/kg matrine, respectively, at a volume of 2 mL. Rats in the control and model groups were given 2 mL of normal saline,

**[作者简介]** 姚 婷(1978—), 副主任医师, 研究方向: 糖尿病、甲状腺疾病。E-mail: yt416301@163.com

**[通信作者]** 曾芳馨(1978—), 副主任医师, 研究方向: 糖尿病、甲状腺疾病。E-mail: 363464341@qq.com

once every other day for 4 weeks. The histomorphological changes in the thyroid were observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. Serum levels of thyroid stimulating hormone (TSH), anti-thyroglobulin antibody (TGAAb), thyroid peroxidase antibody (TPOAb), cytokine interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), and interleukin (IL)-12, IL-4, and IL-10 were detected by ELISA. **Results** Compared with the TSH, TGAAb, TPOAb, IFN- $\gamma$ , IL-12, IFN- $\gamma$ /IL-4, IL-12/IL-10, nuclear factor-kappa B p65 (NF- $\kappa$ Bp65), MCP-1, and CCR2 protein levels in the control group, those in the model group were significantly increased, and the levels of IL-4 and IL-10 were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). After matrine treatment, TSH, TGAAb, TPOAb, IFN- $\gamma$ , IL-12, IFN- $\gamma$ /IL-4, IL-12/IL-10, NF- $\kappa$ Bp65, MCP-1, and CCR2 protein levels were significantly decreased, and IL-4 and IL-10 levels were significantly increased ( $P < 0.05$ ); the differences were statistically significant ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Matrine can inhibit the production of thyroid antibodies, downregulate Th1 cytokines, and upregulate Th2 cytokines, thus reducing the Th1/Th2 ratio and inhibiting the MCP-1/CCR2 signaling axis, thus playing a protective role in EAT.

**[Key words]** Matrine; Experimental autoimmune thyroiditis; Th1/Th2 cells; MCP-1/CCR2 signaling; Lewis rats

自身免疫性甲状腺炎 (autoimmune thyroiditis, AIT), 又称为桥本甲状腺炎 (Hashimoto's thyroiditis, HT)<sup>[1]</sup>, 是临床上常见的器官特异性自身免疫性疾病。目前, 临床上广泛采用免疫抑制剂、糖皮质激素等药物进行治疗, 上述药物虽能有效缓解患者症状, 但会严重损伤机体的免疫能力<sup>[2]</sup>。单核细胞趋化蛋白-1/细胞表面趋化因子受体2 (monocyte chemoattractant protein-1/cell surface chemokine receptor 2, MCP-1/CCR2) 信号通路是趋化因子 $\beta$ 和CC家族的重要成员, 可影响T细胞在体内的分化, 而AIT的发生与T细胞特别是辅助性T淋巴细胞 (helper T lymphocytes, Th) 1/Th2型细胞因子的表达有关, 因此MCP-1/CCR2信号通路影响着AIT的发生和发展<sup>[3]</sup>。

苦参素 (matrine) 是从传统药材苦参 (学名: *Sophora flavescens*) 的根中提取的生物碱, 对类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、多发性硬化症等多种自身免疫性疾病的自身免疫反应过程具有抑制作用<sup>[4]</sup>。近年来研究表明, 苦参素能降低甲状腺自身抗体, 抑制甲状腺自身免疫反应, 因而能对AIT发挥一定疗效<sup>[5]</sup>, 然而尚不完全清楚其作用机制。因此, 本实验通过建立与AIT具有相同病理特征的实验性自身免疫性甲状腺炎 (experimental autoimmune thyroiditis, EAT) 大鼠模型<sup>[5]</sup>, 探讨苦参素对EAT大鼠甲状腺功能及MCP-1/CCR2信号通路的影响, 初步阐述苦参素对EAT可能的作用机制, 进而为临床应用苦参素早期干预AIT提供可靠的理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和主要试剂

6~8周龄SPF级雄性Lewis大鼠75只, 购自四川大学实验动物中心[SCXK(川)2018-026], 在环境温度为(25±2)℃, 相对湿度(50±10)%, 12h循环光照设施[SYXK(川)2018-185]中适应性饲养1周, 自由饮食。苦参素注射液 (批号: 150422304), 0.3 g/mL, 购自江苏正大天晴药业有限公司, 以生理盐水 (即0.9% NaCl溶液) 稀释。猪甲状腺球蛋白 (porcine thyroglobulin, pTG)、不完全弗氏佐剂 (Freund's incomplete adjuvant, FIA)、完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA) 均购自美国Sigma公司。促甲状腺激素 (thyroid stimulating hormone, TSH)、抗甲状腺球蛋白抗体 (anti-thyroglobulin antibody, TGAAb) 和甲状腺过氧化物酶抗体 (thyroid peroxidase antibody, TPOAb) 检测试剂盒均购自美国MP Biomedicals公司。干扰素- $\gamma$  (interferon- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ )、白细胞介素-12 (interleukin-12, IL-12)、IL-4和IL-10检测试剂盒均购自上海酶联生物公司。MCP1抗体 (ab3827)、CCR2抗体 (ab34968)、核因子- $\kappa$ B亚基p65 (nuclear factor- $\kappa$ B, subunit p65, NF- $\kappa$ Bp65) 抗体 (ab194856), 以及辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG H&L (ab4091384) 和GAPDH抗体-Loading Control (ab33998) 均购自英国Abcam公司。

## 1.2 动物模型建立<sup>[6]</sup>

用 pH7.0 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 将 pTG 配制成 2 mg/L 的溶液, 将该溶液与 CFA 等量混合充分乳化制成油包水乳剂, 以 0.8 mg/ 只的剂量, 采取背部、腹部多点皮下注射对大鼠进行初次免疫。2 周和 4 周后取等体积 FIA 与 pTG 溶液进行乳化, 采取与首次免疫相同的剂量和方式注射, 构建 EAT 大鼠模型。造模后大鼠 TGAAb 和 TPOAb 均明显升高, 说明造模成功。本实验经成都医学院第二附属医院实验动物福利伦理委员会批准 (IACUC-2019-082)。

## 1.3 动物分组及干预方法

将大鼠按照随机数字表法分为对照组、模型组和苦参素低剂量组、中剂量组及高剂量组 5 组, 每组 15 只。对照组在建立 EAT 大鼠模型免疫时给予等体积的 PBS 与 CFA; 低、中、高剂量组每只大鼠分别灌胃 0.2、0.4、0.6 g/kg 的苦参素, 灌胃体积 2 mL; 对照组和模型组均给予等体积的生理盐水, 隔日 1 次, 共 4 周。造模过程中, 模型组大鼠死亡 3 只, 苦参素低剂量组死亡 1 只, 苦参素中、高剂量组大鼠各死亡 2 只, 最终各组大鼠均取 12 只用于后续实验。实验结束时各组大鼠心脏采血, 离心收集血清,  $-80^{\circ}\text{C}$  冰箱保存备用, 采用体积分数为 2% 的戊巴比妥钠麻醉各组大鼠<sup>[2]</sup>, 取甲状腺组织, 并置于体积分数为 10% 的中性甲醛溶液中固定。

## 1.4 甲状腺组织病理形态学检测

将固定保存的各组大鼠甲状腺组织依次进行脱水, 常规石蜡包埋, 切成 5  $\mu\text{m}$  的切片, HE 染色, 封固后光学显微镜下观察。

## 1.5 ELISA 法检测甲状腺功能、血清自身抗体和血清细胞因子

血清中 TSH、TGAAb、TPOAb 以及 IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-4、IL-10 水平, 均采用相应 ELISA 试剂盒, 参照试剂盒说明书进行测定。

## 1.6 免疫组织化学法检测甲状腺组织中 NF- $\kappa$ Bp65 的表达

取出经 10% 甲醛溶液固定的甲状腺组织, 经过脱水、透明、石蜡包埋、切片后, 常规脱蜡, 水化, 高压修复, 然后经一抗  $4^{\circ}\text{C}$  过夜孵育, 加稀释好的二抗, 室温孵育 30 min, PBS 洗涤。加适量 DAB 孵育 5 min, 苏木精对比染色 5 min, 无菌水冲洗后, 依次用不同浓度的梯度乙醇溶液脱水 2 h, 经二甲苯透明, 中性树胶封固。

每张切片随机选取 5 个高倍镜视野 ( $\times 200$ ), 在光镜下连续观察 10 个视野, 每个视野内计数 200 个细胞中的阳性细胞数, 根据染色强度和阳性细胞率综合评分。

## 1.7 蛋白质印迹法检测甲状腺组织中 MCP-1、CCR2 蛋白表达

采用美国 Invent 公司的动物细胞/组织总蛋白提取试剂盒收集甲状腺组织中总蛋白, 用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白含量。制备蛋白样品, 并进行 SDS-PAGE, 电泳结束后, 转移至 PVDF 膜, 并用含有体积分数 5% 的 BSA 的封闭液室温封闭 2 h。加入适当稀释比例的 MCP-1 和 CCR2 一抗, 于  $4^{\circ}\text{C}$  反应过夜。次日用缓冲液清洗 PVDF 膜 3 次, 加入二抗, 室温孵育 1 h 后, 加入显色液, 曝光显影。

## 1.8 统计学方法

采用 SPSS 19.0 软件对数据进行统计分析, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 单因素方差分析用于多组间比较, 独立  $t$  检验用于两组间比较; 甲状腺功能和抗体、细胞因子的关系采用逐步线性回归分析; 使用 GraphPad Prism 5 软件制图,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

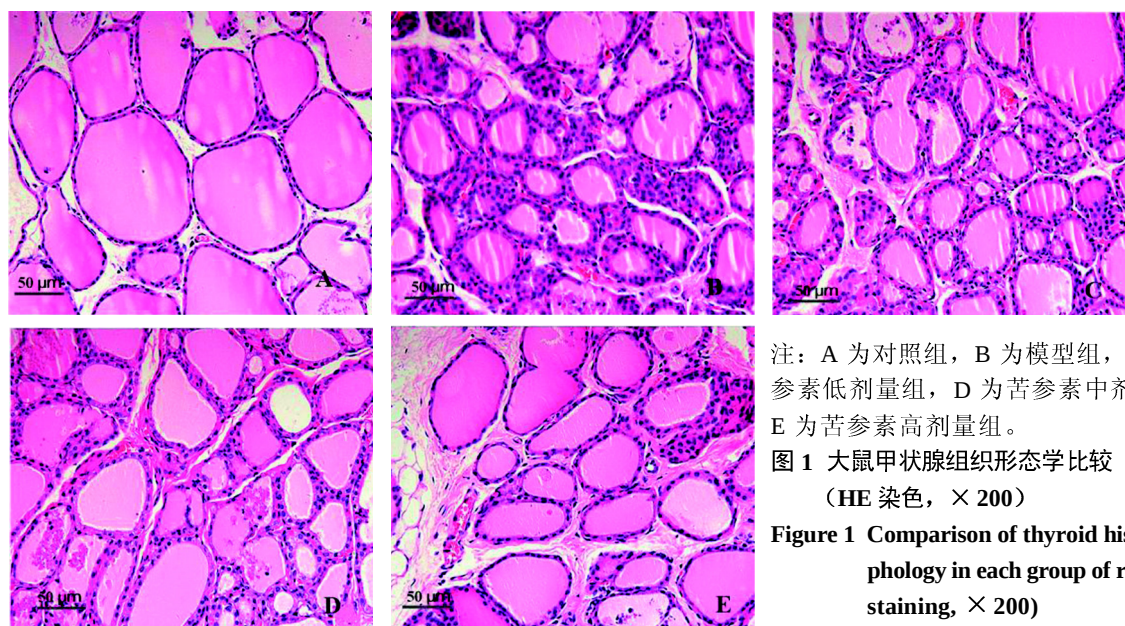
# 2 结果

## 2.1 各组大鼠甲状腺组织形态学比较

对照组大鼠有完整的甲状腺结构, 甲状腺滤泡分布均匀, 呈椭圆形或圆形的小叶状排列, 发育成熟, 淡红色胶质均匀分布于滤泡腔内, 少量血管分布于滤泡周围间质中, 未见纤维组织增生 (图 1A)。模型组甲状腺滤泡结构遭到不同程度破坏, 部分滤泡萎缩甚至消失, 滤泡腔内胶质稀少, 间质伴灶性淋巴细胞浸润以及水肿, 纤维组织增生 (图 1B)。低、中、高剂量组甲状腺滤泡结构较完整, 滤泡大小较一致, 上皮细胞排列趋于规则, 间质少量炎性细胞浸润, 水肿减轻, 且呈剂量依赖性 (图 1C、D、E)。

## 2.2 甲状腺功能和血清自身抗体水平

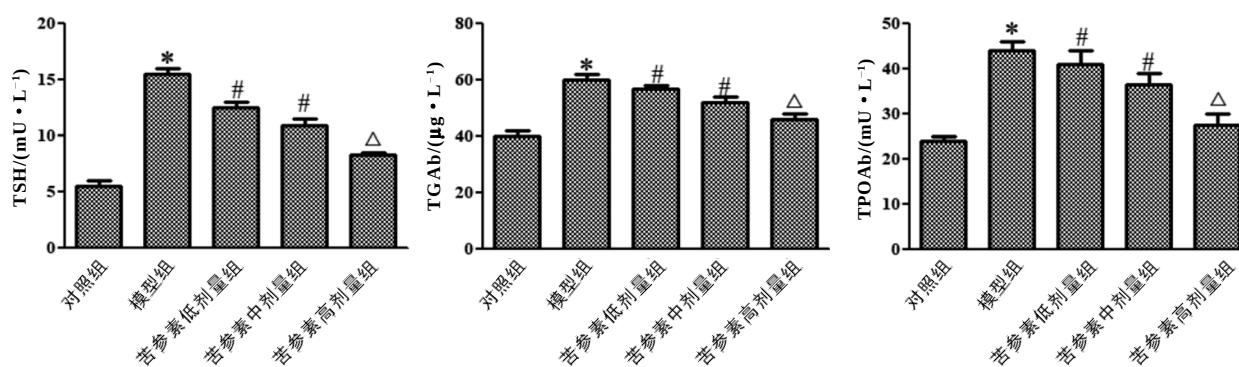
与对照组相比, 模型组中 TSH、TGAAb、TPOAb 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ ); 与模型组相比, 低、中、高剂量组 TSH、TGAAb、TPOAb 水平均明显降低 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖性 (图 2)。



注：A 为对照组，B 为模型组，C 为苦参素低剂量组，D 为苦参素中剂量组，E 为苦参素高剂量组。

图 1 大鼠甲状腺组织形态学比较 (HE 染色, × 200)

Figure 1 Comparison of thyroid histomorphology in each group of rats (HE staining, × 200)



注：TSH 为促甲状腺激素，TGAAb 为抗甲状腺球蛋白抗体，TPOAb 为甲状腺过氧化物酶抗体。与对照组比较，\* $P < 0.05$ ；与模型组比较，# $P < 0.05$ ， $\Delta P < 0.01$ 。

图 2 ELISA 检测大鼠甲状腺功能和血清自身抗体水平

Figure 2 Thyroid function and serum autoantibody levels detected by ELISA in each group of rats

### 2.3 血清细胞因子水平

与对照组相比，模型组 IFN- $\gamma$ 、IL-12 水平及 IFN- $\gamma$ /IL-4、IL-12/IL-10 均明显升高 ( $P < 0.05$ )，IL-4、IL-10 水平均明显降低 ( $P < 0.05$ )；与模型组相比，低、中、高剂量组 IFN- $\gamma$ 、IL-12 水平及 IFN- $\gamma$ /IL-4、IL-12/IL-10 均明显降低 ( $P < 0.05$ )，IL-4、IL-10 水平均明显升高 ( $P < 0.05$ )，且呈剂量依赖性 (图 3)。

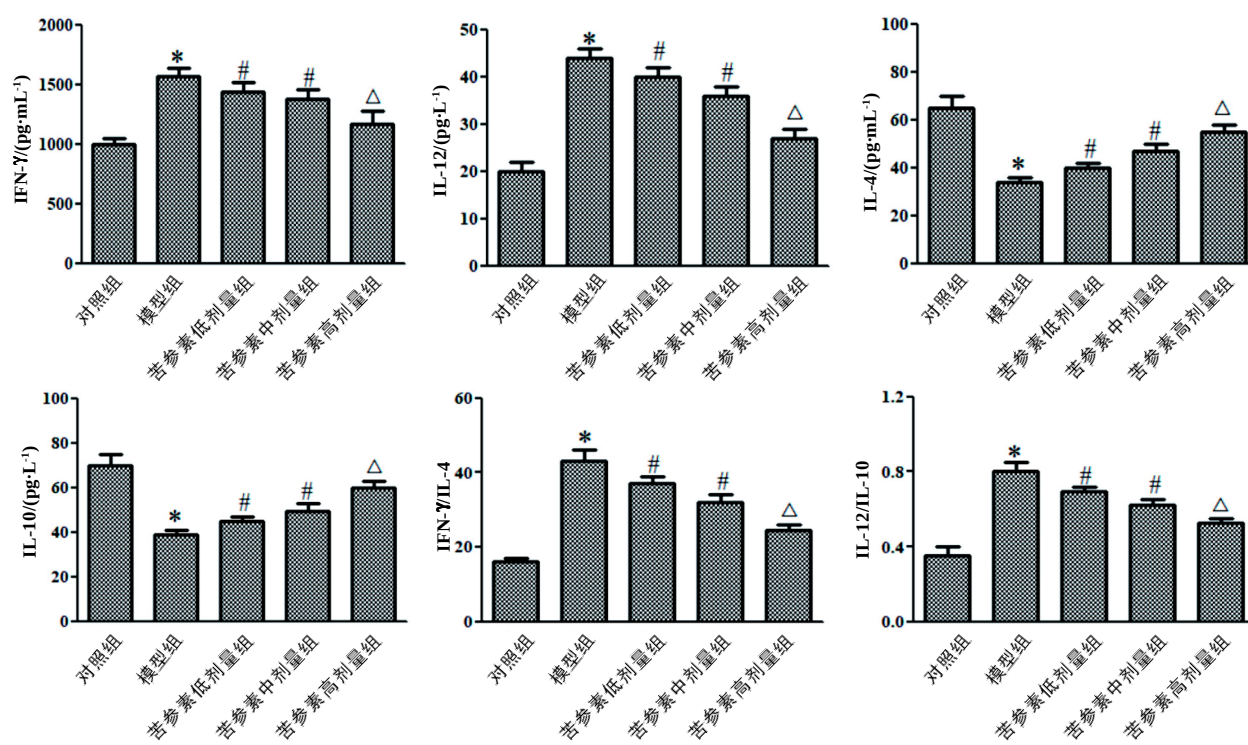
### 2.4 逐步线性回归分析

将 TSH 作为因变量，甲状腺抗体 (TGAAb、TPOAb) 和细胞因子 (IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-4 及 IL-10) 作为自变量。结果显示，抗体和细胞因子

均与 TSH 呈正相关性 ( $r^2$  分别为 0.786、0.696、0.875、0.855、0.685、0.596，均  $P < 0.001$ )。逐步回归方程决定系数 ( $R^2$ ) = 0.897,  $F = 176.495$ ,  $P < 0.001$ ，方程有统计学意义。其中，TGAAb、TPOAb、IL-10 与 TSH 有非常显著性关系，方程  $TSH = -3.485 + 0.203TGAAb + 0.115TPOAb + 0.037IL-10$  (均  $P < 0.001$ )。

### 2.5 甲状腺组织中 NF- $\kappa$ Bp65 蛋白表达

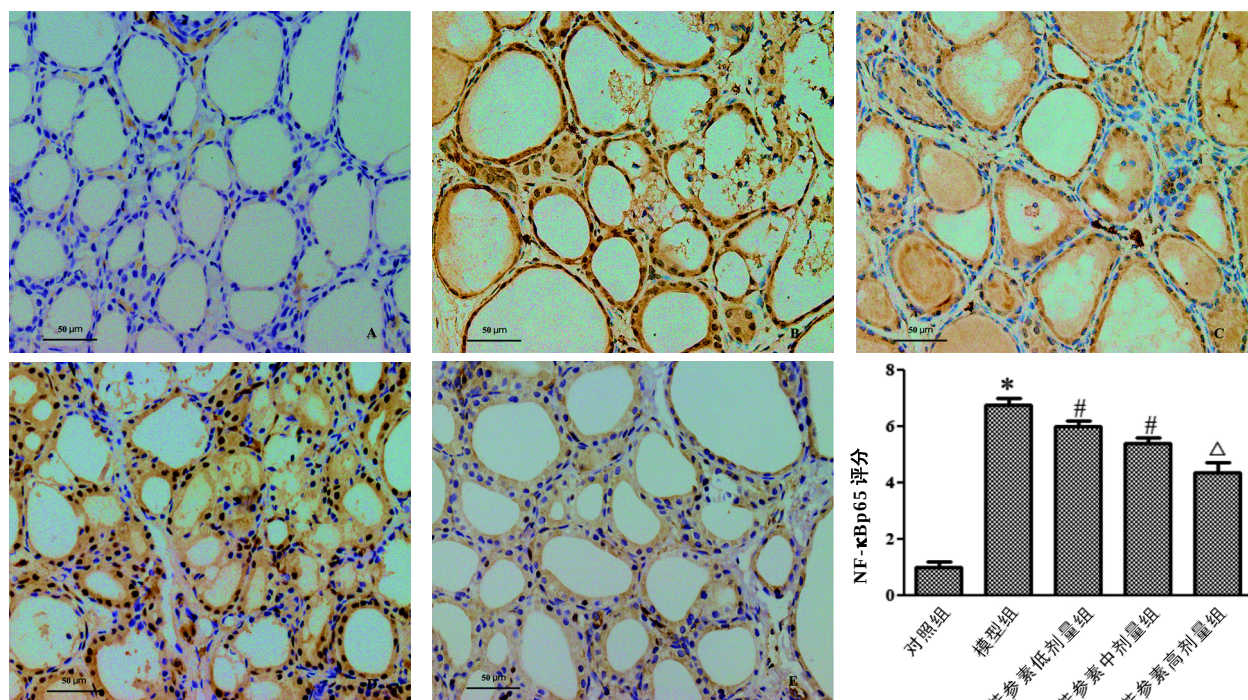
从图 4 可见，与对照组相比，模型组大鼠甲状腺组织中 NF- $\kappa$ Bp65 蛋白染色强度和阳性细胞率综合评分均明显升高 ( $P < 0.05$ )。与模型组比较，低、中、高剂量组 NF- $\kappa$ Bp65 水平明显下降 ( $P < 0.05$ )，且呈剂量依赖性。



注: IFN-γ 为干扰素-γ, IL-12 为白细胞介素-12, IL-4 为白细胞介素-4, IL-10 为白细胞介素-10。与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较, # $P < 0.05$ , Δ $P < 0.01$ 。

图3 ELISA 检测大鼠血清细胞因子水平

Figure 3 Serum cytokine levels detected by ELISA in each group of rats



注: NF-κBp65 为核因子-κB 亚基 p65 抗体。A 为对照组, B 为模型组, C 为苦参素低剂量组, D 为苦参素中剂量组, E 为苦参素高剂量组。与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较, # $P < 0.05$ , Δ $P < 0.01$ 。

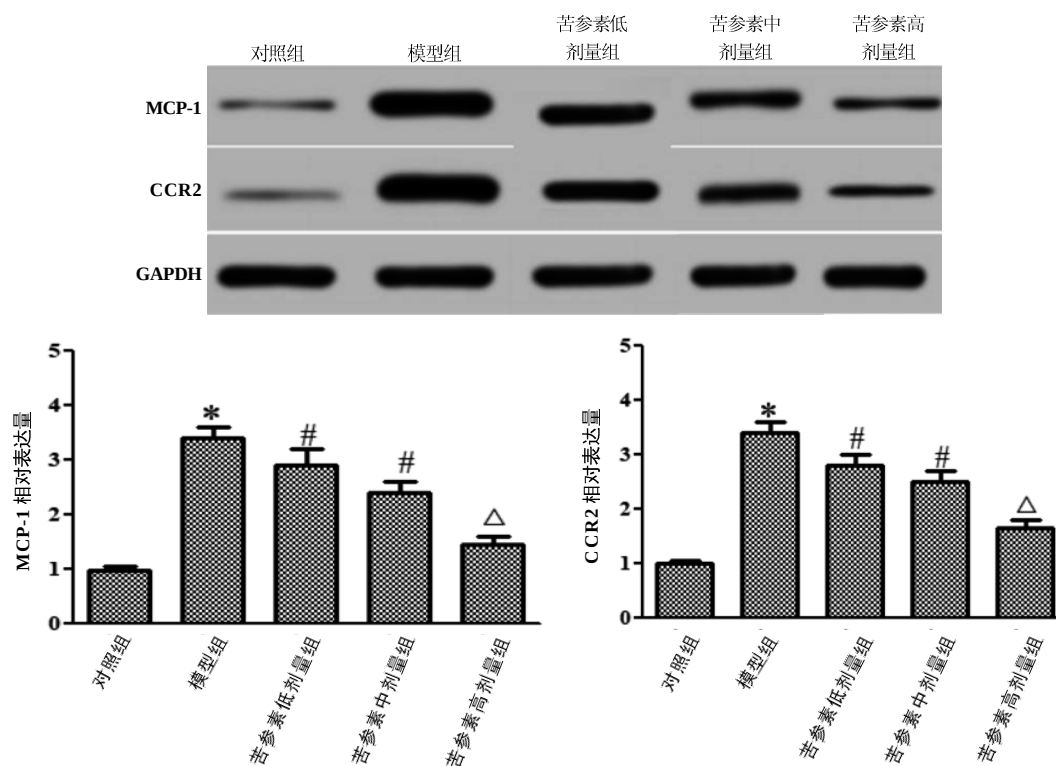
图4 免疫组织化学法检测大鼠甲状腺组织中 NF-κBp65 蛋白表达 (DAB, × 200) 及综合评分

Figure 4 NF-κBp65 protein expression detected by immunohistochemistry (DAB, × 200) in the thyroid tissues of rats in each group

## 2.6 甲状腺组织中 MCP-1、CCR2 蛋白水平

从图 5 可见, 与对照组相比, 模型组大鼠甲状腺组织中 MCP-1 和 CCR2 水平明显升高 ( $P <$

0.05)。与模型组比较, 低、中、高剂量组 MCP-1 和 CCR2 水平明显下降, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 且呈剂量依赖性。



注: MCP-1 为单核细胞趋化蛋白-1, CCR2 为细胞表面趋化因子受体 2。与对照组比较, \* $P < 0.05$ ; 与模型组比较, # $P < 0.05$ , △ $P < 0.01$ 。

图 5 蛋白质印迹法检测各组大鼠甲状腺组织中 MCP-1、CCR2 蛋白水平

Figure 5 MCP-1 and CCR2 protein levels detected by Western blotting in thyroid tissues of rats in each group

## 3 讨论

AIT 是人类较为常见的一种特异性自身免疫性疾病。作为内分泌类疾病, AIT 也是造成儿童获得性甲状腺功能减低的重要原因之一, 其发病率仅次于甲状腺功能亢进症, 在甲状腺疾病中占比为 20% 左右<sup>[7]</sup>。AIT 发病机制尚不明确, 一般认为可能与遗传、环境或 T 淋巴细胞介导的免疫反应引起甲状腺滤泡的破坏有关<sup>[8]</sup>, 而西医临床尚无有效的治疗方案, 这也是该病亟需解决的问题。

祖国医学认为, AIT 属于“瘰病”范畴, 其发病与先天禀赋不足、情志内伤、饮食及水土失宜有关, 导致气血运行不畅, 气滞、血瘀、痰凝等壅结于颈前而引起病发。中医药在治疗 AIT 上已经取得一定的效果<sup>[9]</sup>。苦参属于祛风湿

类中药, 有祛风除湿、活血化瘀、消肿止痛等功效, 具有良好的抗炎、免疫调节、抗菌等活性; 苦参素作为苦参提取物, 在如系统性红斑狼疮、自身免疫性脑脊髓炎病等自身免疫性疾病的治疗中均取得了满意效果<sup>[10-11]</sup>, 但其在 AIT 的研究中报告较少。目前常将 EAT 动物模型作为研究 AIT 的重要工具。本实验通过免疫 pTG 诱导 Lewis 大鼠建立 EAT 动物模型发现, 给予苦参素治疗后, 大鼠甲状腺组织病理变化改善明显, 炎性细胞浸润程度减轻, 炎症分级降低, 血清中 TSH、TGAb 和 TPOAb 水平升高幅度下降, 且呈剂量依赖性, 证实苦参素可减轻 AIT, 对 EAT 模型大鼠发挥一定的保护作用。

Th1 和 Th2 细胞因子在机体处于正常状态下互相调节, 以保证细胞免疫和体液免疫维持正常功

能<sup>[12]</sup>。其中 Th1 通过分泌 IFN- $\gamma$ 、IL-12、TNF- $\alpha$  等 Th1 型细胞因子介导细胞免疫。研究发现, IFN- $\gamma$ 、IL-12 作为促炎因子能够诱导 B 细胞分化、成熟, 促进 B 细胞记忆、抗体分泌<sup>[13]</sup>。而在 EAT 中上述炎性因子还可将 T 细胞募集到炎症部位以使甲状腺滤泡细胞的凋亡加速。Th2 细胞通过分泌 IL-4、IL-5、IL-6、IL-10 等 Th2 型抗炎细胞因子介导体液免疫, 抑制机体的免疫应答<sup>[14]</sup>。据报告, 甲状腺组织浸润的单核细胞和淋巴细胞内均有抗炎细胞因子的表达<sup>[15]</sup>, 但其表达水平随 EAT 免疫病程的进展逐渐下降。研究证实, 在实验性自身免疫脑脊髓炎、系统性红斑狼疮等以 Th1/Th2 类免疫失衡为主的器官特异性自身免疫疾病中, 苦参素可增强固有免疫反应, 在免疫系统的调节中发挥重要作用<sup>[16]</sup>。本实验发现, 经苦参素治疗后, EAT 大鼠 IFN- $\gamma$ /IL-4 和 IL-12/IL-10 值明显降低, 提示苦参素干预可能通过下调 Th1 型细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-12, 上调 Th2 型细胞因子 IL-4、IL-10, 恢复 Th1/Th2 细胞免疫平衡状态, 以减轻 AIT。逐步回归分析结果显示, TSH 与甲状腺抗体 TGAb、TPOAb 和细胞因子 IFN- $\gamma$ 、IL-12、IL-4 及 IL-10 均呈正相关, 说明苦参素可通过调节 EAT 大鼠的免疫反应保护其甲状腺功能。

研究发现, MCP-1/CCR2 信号通路能够趋化巨噬细胞、单核细胞、杀伤 T 淋巴细胞等多种炎症反应相关的细胞, 从而参与免疫调节作用<sup>[17]</sup>。MCP-1 可由成纤维细胞及单核巨噬细胞等间质细胞分泌, 对于 T 淋巴细胞具有较强的趋化作用; 而 CCR2 广泛表达于自然杀伤细胞、内皮细胞等单核细胞上, 是 G 蛋白的偶联受体。文献报告称, MCP-1 在 AIT 患者甲状腺滤泡上皮细胞中明显高于正常水平<sup>[18]</sup>。另有研究发现, 与结节性甲状腺肿患者相比, 手术切除的 AIT 患者甲状腺组织经过免疫组化检测发现 CCR2 的表达水平明显升高<sup>[19]</sup>。转录因子 NF- $\kappa$ B 作为 MCP-1/CCR2 信号通路下游启动炎性因子的靶因子, 正常情况下以 NF- $\kappa$ B 抑制蛋白激酶复合体的形式存在; 在组织损伤诱发炎症反应时, NF- $\kappa$ B 在酶的作用下发生解离, 导致促炎性因子大量表达<sup>[20]</sup>。本实验结果显示, 经苦参素治疗后, MCP-1、CCR2 和 NF-

$\kappa$ Bp65 蛋白水平明显下降, 提示苦参素可通过下调 MCP-1/CCR2 信号通路及下游 NF- $\kappa$ Bp65 蛋白表达, 有效减轻炎症反应细胞的聚集, 发挥对 EAT 的治疗作用。

综上所述, 苦参素能抑制甲状腺抗体生成, 下调 Th1 型细胞因子, 上调 Th2 型细胞因子, 进而降低 Th1/Th2 值, 并抑制 MCP-1/CCR2 信号轴, 发挥对 EAT 的保护作用。

#### 参考文献:

- [1] 杨成, 金剑虹, 唐成坤, 等. 自身免疫性甲状腺炎中西医结合研究进展[J]. 浙江中西医结合杂志, 2018, 28(4):335-338. DOI:10.3969/j.issn.1005-4561.2018.04.032.
- [2] RUGGERI R M, TRIMARCHI F, GIUFFRIDA G, et al. Autoimmune comorbidities in Hashimoto's thyroiditis: different patterns of association in adulthood and childhood/adolescence[J]. Eur J Endocrinol, 2017, 176(2):133-141. DOI:10.1530/eje-16-0737.
- [3] WANG S, WU Y, ZUO Z, et al. The effect of vitamin D supplementation on thyroid autoantibody levels in the treatment of autoimmune thyroiditis: a systematic review and a meta-analysis[J]. Endocrine, 2018, 59(3):499-505. DOI:10.1007/s12020-018-1532-5.
- [4] 陈俊先, 李作孝. 苦参素对实验性自身免疫脑脊髓炎大鼠的干预效果及其机制[J]. 广西医学, 2018, 40(3):306-308. DOI:10.11675/j.issn.0253-4304.2018.03.20.
- [5] MARENGO B, SPECIALE A, SENATORE L, et al. Matrine in association with FD-2 stimulates F508del-cystic fibrosis transmembrane conductance regulator activity in the presence of corrector VX809[J]. Mol Med Rep, 2017, 16(6):8849-8853. DOI:10.3892/mmr.2017.7736.
- [6] LIU H, TIAN Q, AI X, et al. Dihydroartemisinin attenuates autoimmune thyroiditis by inhibiting the CXCR3/PI3K/AKT/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Oncotarget, 2017, 8(70):115028-115040. DOI:10.18632/oncotarget.22854.
- [7] CIURLEO R, SESSA E, MARINO S, et al. Acute exacerbation of Hashimoto's thyroiditis in a patient treated with dimethyl fumarate for multiple sclerosis: a case report[J]. Medicine (Baltimore), 2019, 98(17): e15185. DOI:10.1097/md.00000000000015185.
- [8] CHOI Y M, KIM T Y, KIM E Y, et al. Association between thyroid autoimmunity and *Helicobacter pylori* infection[J]. Korean J Intern Med, 2017, 32(2):309-313. DOI:10.3904/kjim.2014.369.
- [9] 郑传铭, 李清林, 骆虹. 中医药在桥本甲状腺炎防治中的作用研究进展[J]. 中国医学创新, 2016, 13(17):136-138. DOI:10.3969/j.issn.1674-4985.2016.17.039.

- [10] 李自军, 刘文刚. 复方苦参汤对急性髓系白血病患者免疫调节机制[J]. 中医学报, 2019, 34(3):590-594. DOI: 10.16368/j.issn.1674-8999.2019.03.139.
- [11] 巴燕·艾克海提, 韩玲, 古洁乃特. 健脾滋肾汤治疗系统性红斑狼疮对患者血清炎症因子、凝血功能及免疫功能的影响[J]. 中国卫生检验杂志, 2018, 28(4):449-452.
- [12] 俞灵莺, 傅晓丹, 章晓芳, 等. 夏枯草干预实验性自身免疫甲状腺炎 Th1/Th2 失衡的研究[J]. 中华全科医学, 2018, 16(5):725-728,743. DOI:10.16766/j.cnki.issn.1674-4152.000197.
- [13] MARTINENAITE E, AHMAD S M, BENDTSEN S K, et al. Arginase-1-based vaccination against the tumor microenvironment: the identification of an optimal T-cell epitope[J]. Cancer Immunol Immunother, 2019, 68(11): 1901-1907. DOI:10.1007/s00262-019-02425-6.
- [14] CHEN Y F, ZHENG J J, QU C, et al. Inonotus obliquus polysaccharide ameliorates dextran sulphate sodium induced colitis involving modulation of Th1/Th2 and Th17/Treg balance[J]. Artif Cells Nanomed Biotechnol, 2019, 47(1):757-766. DOI:10.1080/21691401.2019.1577877.
- [15] 吴可人, 叶志鹏, 金法, 等. 大黄素对实验性自身免疫性甲状腺炎小鼠辅助型 T 细胞亚群的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2017, 22(6):633-639.
- [16] LIU P, ZHU L, ZOU G, et al. Matrine suppresses pancreatic fibrosis by regulating TGF- $\beta$ /smad signaling in rats[J]. Yonsei Med J, 2019, 60(1):79-87. DOI:10.3349/ymj.2019.60.1.79.
- [17] XU L, SHARKEY D, CANTLEY L G. Tubular GM-CSF promotes late MCP-1/CCR2-mediated fibrosis and inflammation after ischemia/reperfusion injury[J]. J Am Soc Nephrol, 2019, 30(10):1825-1840. DOI:10.1681/asn.2019010068.
- [18] 曾蓉, 牛恒, 张国桥, 等. MCP-1/CCR2 信号轴在甲状腺乳头状癌合并桥本氏甲状腺炎患者中的表达及意义[J]. 第三军医大学学报, 2017, 39(7):660-667. DOI:10.16016/j.1000-5404.201611184.
- [19] DUTTA P, SARKISSYAN M, PAICO K, et al. MCP-1 is overexpressed in triple-negative breast cancers and drives cancer invasiveness and metastasis[J]. Breast Cancer Res Treat, 2018, 170(3):477-486. DOI:10.1007/s10549-018-4760-8.
- [20] 王先海, 李珍斌, 李小妹, 等. 通经定晕丸阻断颈椎病大鼠 NF- $\kappa$ B 激活 MCP-1/CCR2 通路及 TNF- $\alpha$  及 IL-1 $\beta$ 、IL-6 表达的研究[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2018, 23(4):370-376. DOI:10.12092/j.issn.1009-2501.2018.04.002.
- (收稿日期: 2020-06-23 修回日期: 2020-11-16)

\*\*\*\*\*

(上接第 219 页)

#### 参考文献:

- [1] 杨颖, 陈黎, 卢立志. 松果体调控动物季节性繁殖概述[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(7):1086-1101. DOI:10.3969/j.issn.1674-7968.2017.07.006.
- [2] 汪秀衡, 刘垚, 吴洁, 等. 褪黑素对昼夜节律和脂质代谢的影响[J]. 基础医学与临床, 2020, 40(6):838-841. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2020.06.023.
- [3] 王国卿, 童建. 松果体昼夜节律生物钟分子机制的研究进展[J]. 生理科学进展, 2004, 35(3):210-214. DOI:CNKI: SUN:SLKZ.0.2004-03-004.
- [4] 卞宏生. 昼夜节律对大鼠的睡眠模式和能量代谢的影响及褪黑素的干预作用研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2015.
- [5] PEREIRA N, NAUFEL M F, RIBEIRO E B, et al. Influence of dietary sources of melatonin on sleep quality: a review[J]. J Food Sci, 2020, 85(1):5-13. DOI:10.1111/1750-3841.14952.
- [6] 朱俊德, 龚明. 老年大鼠松果体中褪黑素含量的测定[J]. 四川解剖学杂志, 2006(4):21-23. DOI:10.3969/j.issn.1005-1457.2006.04.006.
- [7] 冯星. 新生大鼠缺氧缺血性脑损伤对松果体功能的影响及外源性褪黑素的神经保护作用研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2009. DOI:10.7666/d.y1639242.
- [8] 梁欣. 艾灸对 D- 半乳糖致衰老大鼠松果体氧化损伤影响的实验研究[D]. 成都: 成都中医药大学, 2008. DOI: 10.7666/d.d166244.
- [9] 肖成荣, 马增春, 李海静, 等. PCPA 失眠大鼠模型的制作及其机制[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4):326. DOI:10.16421/j.cnki.1002-3127.2007.04.060.
- [10] 魏晓霞. 经皮电刺激与睡眠关系的研究[D]. 西安: 西安电子科技大学, 2014. DOI:10.7666/d.D727403.
- [11] 孙秀萍, 王琼, 石哲, 等. 动物行为实验方法学研究的回顾与展望[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(3):1-7. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.03.001.
- [12] 林晓春, 李云鹏, 卞艳芳, 等. 大鼠旷场实验指标检测及参考值的探讨[J]. 毒理学杂志, 2010, 24(3):224-225. DOI: 10.16421/j.cnki.1002-3127.2010.03.020.
- [13] 宗绍波, 魏盛, 苏云祥, 等. 焦虑大鼠模型高架十字迷宫实验的复测信度检验及参数相关性分析[J]. 中国医药导报, 2011, 8(30):5-7. DOI:10.3969/j.issn.1673-7210.2011.30.003.
- [14] KLEIN D C. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme"[J]. J Biol Chem, 2007, 282(7):4233-4237. DOI:10.1074/jbc.R600036200.
- (收稿日期: 2020-09-30 修回日期: 2020-12-24)

# 两种不同类型实验动物屏障设施的气流组织计算流体力学模拟技术分析

周 斌<sup>1</sup>, 赵 勇<sup>2</sup>, 汪亚兵<sup>1</sup>, 刘吉宏<sup>1</sup>

(1. 上海开纯洁净室技术工程有限公司, 上海 201233; 2. 上海实验动物研究中心, 上海 201203)

**[摘要]** 选取动物实验和生产两种不同类型屏障设施作为研究对象, 以余热排除效率、氨气排污效率、二氧化碳排污效率以及平均空气龄作为其气流组织的评价指标。采用计算流体力学 (computational fluid dynamics, CFD) 数值模拟技术, 对比分析了在不同换气次数、不同排风口位置情况下, 两种类型实验动物设施的气流组织优劣势。结果表明, 以上述指标评价时, 顶部送风、下侧排风辅助的送排风形式较为适合。此外, 对于饲养密度高的实验动物生产设施, 建议根据饲养室的热负荷程度调整最低换气次数。

**[关键词]** 动物实验; 动物生产; 屏障设施; 排污效率; 平均空气龄; 气流组织

**[中图分类号]** Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-00252-07

## Analysis on Air Distribution by Computational Fluid Dynamics Simulation in Two Types of Laboratory Animal Barrier Facilities

ZHOU Bin<sup>1</sup>, ZHAO Yong<sup>2</sup>, WANG Yabing<sup>1</sup>, LIU Jihong<sup>1</sup>

(1. Shanghai Kaichun Clean-Room Technology Co. Ltd., Shanghai 201233, China; 2. Shanghai Laboratory Animal Research Center, Shanghai 201203, China)

Correspondence to: LIU Jihong, E-mail: jsyzljh@163.com

**[Abstract]** Taking the removal efficiencies of waste heat, ammonia, and carbon dioxide, and the mean age of air as the evaluation indicators of air distribution, the pros and cons of air distribution in two different types of animal barriers, an experimental facility and a breeding facility, were analyzed at various air change rates and exhaust outlet positions by computational fluid dynamics (CFD) numerical simulation technology. The results of selected indicators showed that ceiling air supply plus bottom exhaust outlet were suitable for the laboratory animal barrier facilities. In addition, air change rate in high-density breeding facilities should be adjusted according to the room temperature.

**[Key words]** Animal experiment; Animal breeding; Barrier facility; Removal efficiency; Mean age of air; Air distribution

实验动物屏障设施用于清洁级或 SPF 级实验动物的饲养或实验, 是开展实验动物科学研究的硬件基础。实验动物屏障设施主要分两大类。一类是以进行动物实验为主的设施, 如大多数科研机构的动物实验设施, 其特点有: (1) 房间面积较小, 一般为 15~30 m<sup>2</sup>/间; (2) 房间内饲养密度相对较小, 一般为 10~15 笼/m<sup>2</sup>。另一类

是以实验动物生产为主的设施, 如大型实验动物供应商的动物生产饲养设施, 其特点是: (1) 房间面积大, 单间面积可达 200~300 m<sup>2</sup>; (2) 房间内饲养密度较大, 一般为 20~30 笼/m<sup>2</sup>。实验动物相关国家标准对室内温湿度、洁净度、气流速度、氨气浓度等指标均有严格的要求<sup>[1-2]</sup>。而气流组织形式对室内的污染物排除效率、温湿度

**[基金项目]** 上海市科学技术委员会科研计划项目: 实验动物设施与环境动态质量、运行能力的检测与评价(18140900600)

**[作者简介]** 周 斌(1989—), 男, 硕士, 研究方向: 暖通设计。E-mail: 18817367393@163.com

**[通信作者]** 刘吉宏(1982—), 男, 博士, 研究方向: 实验动物学与兽医学、实验动物设施建设与管理。E-mail: jsyzljh@163.com

均匀性、洁净度等环境条件起着重大影响。

气流组织形式不仅影响动物设施的空气质量,而且不同的设计方案对空气冷量或热量的需求也不同,因此也会影响能源利用效率。近年来,实验动物设施的气流组织形式已引起实验动物行业相关学者的重视。例如,何靖等<sup>[3]</sup>采用实验加计算流体力学(computational fluid dynamics, CFD)模拟的方法,对采用顶侧送风、下侧排风、20次/h左右全新风换气条件下的实验动物设施进行了温湿度、气流速度以及洁净度的研究,结果表明现行的气流组织形式基本能达到国家标准对实验动物设施环境控制的要求,但存在送风气流速度场不均匀、平均速度小的问题。蒋新波等<sup>[4]</sup>通过CFD模拟的方法分析比较了不同风口形式、不同换气次数情况下的实验动物设施室内环境,得出极限换气次数为24次/h,推荐的节能换气次数为12次/h。杨五强等<sup>[5]</sup>通过CFD模拟的方法分析了四角排风和双侧下排风的气流组织形式在实验动物设施中的应用情况,从气流产生的涡流尺寸分析认为后者更优。

随着计算机技术的深度应用,CFD数值模拟技术在优化实验动物设施的气流组织方面发挥着重要作用,它能够精确地反映实验动物设施室内环境参数。本文采用CFD模拟技术,对不同类型实验动物设施的气流组织进行模拟分析。已知在动物饲养过程中会产生大量的氨气和二氧化碳,这是实验动物设施内主要空气污染物。国家标准<sup>[1-2]</sup>对氨气浓度提出了严格的控制要求;而二氧化碳浓度对大鼠、小鼠的行为和生理均有明显的影响。另外,二氧化碳的密度比空气大,而氨气的密度比空气小,这有利于研究不同密度的污染物气体对气流组织的影响。本文采用氨气排污效率、二氧化碳排污效率、余热排除效率和室内空气龄<sup>[6]</sup>指标来评价气流组织的优劣,为今后类似的实验动物屏障设施气流组织的设计提供参考。

排污效率( $\varepsilon$ )<sup>[6]</sup>是衡量稳态通风性能的指标,它表示送风排除污染物的能力,定义为送风口污染物浓度和房间内平均浓度的比值,定义式为:

$$\varepsilon = \frac{c_e}{c} = \frac{\text{出风口平均浓度}}{\text{房间平均浓度}}$$

余热排除效率( $\eta$ )<sup>[6]</sup>用温度定义,用于考察气流组织形式的能量利用有效性,定义为排风口和送风口的平均温度差与工作区和送风口的平均温度差的比值,定义式为:

$$\eta = \frac{t_e - t_s}{t_a - t_s} = \frac{\text{排风口平均温度} - \text{送风口平均温度}}{\text{工作区平均温度} - \text{送风口平均温度}}$$

## 1 物理模型的建立

### 1.1 小型动物实验设施(A类)的几何模型

A类实验动物设施如6.3 m(长)×3.7 m(宽)×2.5 m(高)的某小鼠实验室。室内设有4台1.8 m(长)×0.5 m(宽)×2.0 m(高)的单面小鼠独立通气笼盒(individual ventilated cages, IVC)笼具,具体布置详见图1A。

### 1.2 大型动物生产设施(B)的几何模型

B类实验动物设施如15.0 m(长)×14.0 m(宽)×2.5 m(高)的某小鼠饲养室。室内设有36台1.8 m(长)×0.9 m(宽)×2.0 m(高)的双面小鼠IVC笼具,具体布置详见图1B。

## 2 边界条件

### 2.1 室内发热源边界条件

A类实验动物设施的每个单面有80个小鼠笼盒,每个笼盒按饲养4~5只小鼠计算。每只小鼠发热量为0.828 W<sup>[2]</sup>(1 W=3 600 J/h),每个笼架的发热量为331 W。

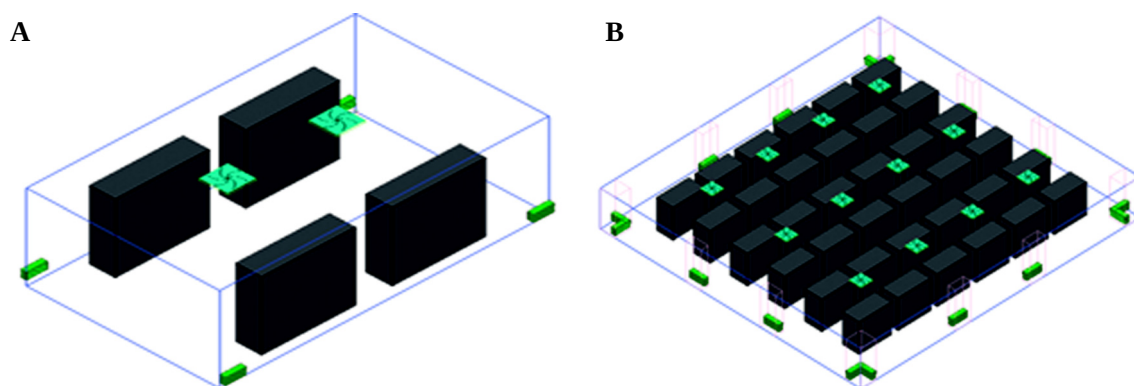
B类实验动物设施的每个双面有144个小鼠笼盒,每个笼盒按饲养4~5只小鼠计算,每只小鼠发热量为0.828 W<sup>[2]</sup>,每个笼架的发热量为596 W。

### 2.2 围护结构边界条件

由于动物屏障设施位于建筑内区,因此将墙面、吊顶、地面均简化成绝热边界。

### 2.3 氨气释放源边界条件

笼盒内的动物及脏垫料是氨气的释放源,其释放量与气流速度、换气次数、动物的饲养量以及垫料的更换频率密切相关。动物笼具的氨气释放量较难精确确定。蒋新波等<sup>[4]</sup>通过文献提供的数据计算出每只小鼠的氨气释放量为0.000 1 mg/s,得到结论:实验动物设施满负荷饲养小鼠的情况下,即使换气次数降低至2次/h,室内的氨气质量浓度也低于1 mg/m<sup>3</sup>;如果增大换气次数,室



注：A 为小型动物实验设施，B 为大型动物生产设施。

图 1 A 类和 B 类实验动物设施顶送风下侧排风模型

Figure 1 Ceiling air supply/bottom exhaust outlet model in type A and B facilities

内的氨气浓度平均值会更低。该结果与毕波等<sup>[7]</sup>及张鑫等<sup>[8]</sup>实测的实验动物设施中氨气浓度严重不符。毕波等<sup>[7]</sup>对第三军医大学实验动物中心的 4 个大鼠、小鼠实验动物设施中氨气浓度进行动态实测，结果表明在 17.2~18 次/h 换气全新风空调状况下，室内的氨气质量浓度为 5.7~7.6 mg/m<sup>3</sup>。张鑫等<sup>[8]</sup>对中国食品药品检定研究院实验动物资源中心平 5 号屏障设施的 4 个大鼠、小鼠饲养间进行动态实测，结果表明在 11~14 次/h 换气的全新风空调状况下，室内的氨气质量浓度为 5.08~7.86 mg/m<sup>3</sup>。

在国家标准规定的 15 次/h 换气的全新风空调状况下，常规实验动物设施卫生条件下的室内氨气质量浓度为 5~8 mg/m<sup>3</sup>。这是因为氨气的主要来源为笼盒内含动物粪尿的脏垫料，而通常实验动物设施中脏垫料的更换频率为 1 周 1 次，这导致氨气的释放量远大于通过理论计算的动物氨气释放量。本文重点探讨气流组织对实验动物设施内氨气浓度变化的影响，而不是具体的氨气浓度值。因此，为简化计算，将整个笼具作为体污染源，经反复模拟计算，在体污染源释放质量浓度为 0.55 mg·m<sup>-3</sup>·s<sup>-1</sup> 条件下，室内的氨气浓度值与毕波等<sup>[7]</sup>及张鑫等<sup>[8]</sup>的实测值接近，因此将该数值作为氨气释放源的边界条件。

#### 2.4 二氧化碳释放源边界条件

实验动物设施中二氧化碳的释放源主要是实验动物的呼吸。徐卫华<sup>[9]</sup>测定小鼠呼出与吸入气体容积差值，结果表明体质量为 20 g 左右的小鼠呼出气体量为 0.283 mL。孙泽等<sup>[10]</sup>通过小鼠呼气

末二氧化碳分压快速检测方法及其在气道阻力评估中的应用研究发现，鼠类呼出的气体中二氧化碳质量浓度为 102 164 mg/m<sup>3</sup>。此外，小鼠的呼吸频率约为 100 次/min。为简化计算，将整个笼具作为体污染源，经计算恒定释放质量浓度为 5.45 mg·m<sup>-3</sup>·s<sup>-1</sup>。

#### 2.5 风口边界条件之送风口模型

A 类和 B 类实验动物设施的送风均采用开孔率为 40% 的高效孔板风口。由于孔板风口送风射流由多股小孔射流汇聚而成，数值模拟时若要详细描述每个小孔的入流条件，必将导致计算区域内的网格节点数目巨大，超过了通用计算机的运算能力，因此需要对风口模型进行简化。赵彬等<sup>[8]</sup>使用 *N* 点风口模型来处理孔板风口入流边界条件，建模分析孔板风口的射流特性，并与实测数据对比，具有高度的吻合性。因此，本文采用 *N* 点风口模型理论，将孔板风口用一个外形尺寸相同的简单风口代替，并保证其入流的质量流量和动量流量符合实际场景。

A 类实验动物设施的基准换气次数为 15 次/h，总送风量为 876 m<sup>3</sup>/h。共有 2 个送风口，单个风口的外尺寸为 0.54 m × 0.54 m，风量为 438 m<sup>3</sup>/h，居中均匀布置；送风温度为 18 °C，送风的氨气浓度为 0，二氧化碳浓度为 391 mL/m<sup>3</sup><sup>[11]</sup> (=780.83 mg/m<sup>3</sup>)。

B 类实验动物设施的基准换气次数为 15 次/h，总送风量为 10 500 m<sup>3</sup>/h。共有 12 个送风口，单个风口的外尺寸为 0.63 m × 0.63 m，单个风口风量为 875 m<sup>3</sup>/h，均匀布置；送风的氨气浓度

为 0，二氧化碳浓度为 391 mL/m<sup>3</sup>[11]。

考虑到 B 类实验动物设施的饲养密度较高，需降低送风温度以满足室内的温度要求。但送风温度也不宜过低，否则离送风口较近的笼具上层的温度偏低，从而影响小鼠的正常活动。因此 A、B 类设施送风温度均选择为 16℃。

2.6 风口边界条件之排风口模型

A 类基准实验动物设施采用四角下侧排风，共 4 个。排风口的尺寸为 0.4 m × 0.2 m，距地 0.15 m，自由出流。

B 类基准实验动物设施采用四角下侧排风，共 8 个。排风口的尺寸为 0.8 m × 0.4 m，距地 0.15 m，自由出流。

3 数学模型

本模拟采用室内零方程模型。赵彬等[12]通过实验及模拟对比发现，在非等温流动的空调通风领域中，室内零方程比标准  $\kappa\text{-}\epsilon$  双方程模型的模拟结果精度更高，计算速度更快。为简化计算，做如下假设：将室内空气视为理想气体，符合 Boussinesq 假设，流动为稳态流动。送风口采用速度入口，新风出风口采用压力出口。采用有效容积法对求解区域进行离散，应用 SIMPLE 算法求解离散控制方程。

4 模拟结果分析

4.1 换气次数对气流组织的影响

为分析不同换气次数对室内气流组织的影响，对 A 类实验动物设施进行了以下 3 种不同工况的模拟分析（表 1）。对比工况 1、2、3 的模拟结果（表 2），再计算气流组织评价指标如余热排除效率、排污效率（表 3）。结果表明：通过气流组织评价指标可知，在提高换气次数后，室内空气龄降低，表明会提升室内空气质量，但几乎不影响余热排除效率、氨气排污效率和二氧化碳排污效率。

4.2 排风口位置对气流组织的影响

为分析不同的排风口位置对气流组织的影响，对 A 类实验动物设施进行了以下 3 种不同工况的模拟分析（表 4）。

表 1 A 类实验动物设施不同换气次数的模拟工况  
Table 1 Simulated conditions at different air change rates in type A facility

| 不同工况       | 换气次数 /<br>(次·h <sup>-1</sup> ) | 送排风形式   |
|------------|--------------------------------|---------|
| 工况 1       | 20                             | 顶送风下侧排风 |
| 工况 2(基准模型) | 15                             | 顶送风下侧排风 |
| 工况 3       | 10                             | 顶送风下侧排风 |

表 2 A 类实验动物设施不同换气次数的模拟结果  
Table 2 Simulated results at different air change rates in type A facility

| 不同工况   | 温度 /<br>℃ | 氨气 /<br>(mL·m <sup>-3</sup> ) | 二氧化碳 /<br>(mL·m <sup>-3</sup> ) | 空气龄 /<br>s |
|--------|-----------|-------------------------------|---------------------------------|------------|
| 工况 1   |           |                               |                                 |            |
| 室内平均值  | 22.0      | 6.58                          | 480                             | 161        |
| 排风口平均值 | 21.3      | 5.62                          | 467                             | —          |
| 工况 2   |           |                               |                                 |            |
| 室内平均值  | 23.2      | 7.49                          | 492                             | 215        |
| 排风口平均值 | 22.3      | 6.41                          | 478                             | —          |
| 工况 3   |           |                               |                                 |            |
| 室内平均值  | 25.3      | 8.79                          | 510                             | 314        |
| 排风口平均值 | 24.2      | 7.66                          | 495                             | —          |

注：温度指标的室内平均值指 0~2 m 高的工作区的平均温度，氨气、二氧化碳、空气龄的室内平均值是指全室的平均值。在一个标准大气压下，氨气 1 mL/m<sup>3</sup> = 0.771 mg/m<sup>3</sup>，二氧化碳 1 mL/m<sup>3</sup> = 1.997 mg/m<sup>3</sup>。

对比工况 2、4、5 的模拟结果（表 5），再计算气流组织评价指标如余热排除效率、排污效率（表 6）。结果表明：（1）相比于顶送风下侧排风的气流组织形式，采用以顶送风下侧排风为主、辅助顶风的方式，有利于降低室内空气龄，并提高氨气和二氧化碳的排污效率，以及提高余热排除效率；（2）相比于顶送风下侧排风的气流组织形式，采用顶送风顶排风的气流组织形式，虽然能提高氨气和二氧化碳的排污效率，以及提高余热排除效率，但室内空气龄上升明显，不利于室内下方污染物的及时排除；（3）仅从能源利用率、有效性而言，即采用余热排除效率以及室内平均温度进行分析，顶送风顶排风方式最优，顶送风下排风辅助顶排风方式次之，顶送风下侧排风最差。

综上所述，顶送风下侧排风辅助顶排风的形式较适合 A 类实验动物设施，一方面能提高氨气

表 3 A 类实验动物设施不同换气次数的气流组织评价指标

Table 3 Evaluation index of air distribution at different air change rates in type A facility

| 不同工况 | 余热排除效率 /% | 氨气排污效率 /% | 二氧化碳排污效率 /% | 全室空气龄 /s |
|------|-----------|-----------|-------------|----------|
| 工况 1 | 91.7      | 85.4      | 97.3        | 161      |
| 工况 2 | 89.6      | 85.6      | 97.2        | 215      |
| 工况 3 | 91.2      | 87.1      | 97.1        | 314      |

表 4 A 类实验动物设施不同排风口位置的模拟工况

Table 4 Simulated conditions at different exhaust outlet locations in type A facility

| 不同工况 | 换气次数 / (次·h <sup>-1</sup> ) | 送排风形式        | 备注       |
|------|-----------------------------|--------------|----------|
| 工况 2 | 15                          | 顶送风下侧排风      | 模型详见图 1A |
| 工况 4 | 15                          | 顶送风下侧排风辅助顶排风 | 模型详见图 2A |
| 工况 5 | 15                          | 顶送风顶排风       | 模型详见图 2B |

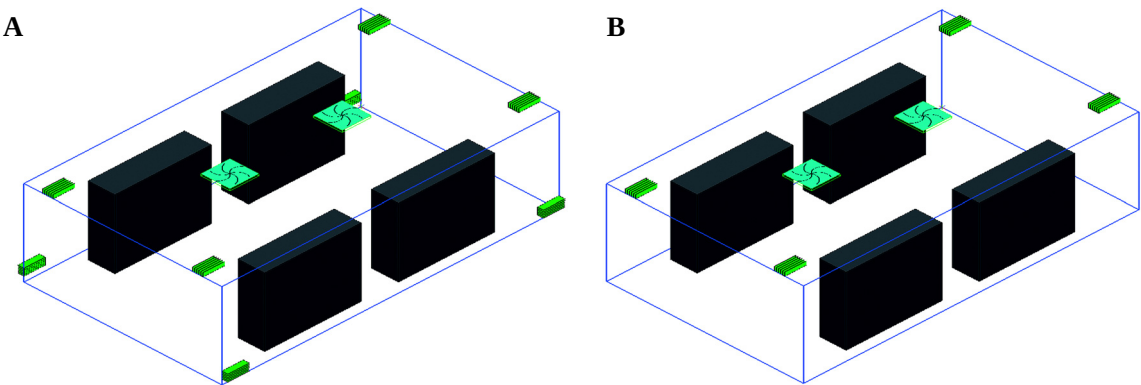


图 2 A 类实验动物设施顶送风下侧排风辅助顶排风模型 (A) 和顶送风顶排风模型 (B)

Figure 2 Ceiling air supply air/bottom exhaust outlet model (A) and ceiling air supply/ceiling exhaust outlet model (B) in type A facility

表 5 A 类实验动物设施不同排风口位置的模拟结果

Table 5 Simulated results at different exhaust outlet locations in type A facility

| 不同工况   | 温度 /<br>℃ | 氨气 /<br>(mL·m <sup>-3</sup> ) | 二氧化碳 /<br>(mL·m <sup>-3</sup> ) | 空气龄 /<br>s |
|--------|-----------|-------------------------------|---------------------------------|------------|
| 工况 2   |           |                               |                                 |            |
| 室内平均值  | 22.8      | 7.49                          | 492                             | 215        |
| 排风口平均值 | 22.3      | 6.41                          | 478                             | —          |
| 工况 4   |           |                               |                                 |            |
| 室内平均值  | 21.9      | 6.85                          | 484                             | 201        |
| 排风口平均值 | 22.4      | 7.04                          | 486                             | —          |
| 工况 5   |           |                               |                                 |            |
| 室内平均值  | 21.3      | 6.21                          | 475                             | 304        |
| 排风口平均值 | 22.4      | 7.50                          | 506                             | —          |

注：关于温度指标的室内平均值指 0~2 m 高的工作区的平均温度，氨气、二氧化碳、空气龄的室内平均值是指全室的平均值。

和二氧化碳的排污效率，也能提高能源利用率，同时又能保证较低的室内空气龄，提高室内空气的新鲜度。

4.3 不同类型实验动物设施的气流组织分析

为分析不同类型实验动物设施的气流组织，本文选取了换气次数均为 15 次/h 的 A 类实验动物设施和 B 类实验动物设施进行了模拟对比分析。同时也分析了换气次数为 20 次/h 的 B 类实验动物设施的模拟结果。模拟工况如表 7。

对比工况 2、6、7 的模拟结果（表 8），再计算气流组织评价指标余热排除效率、排污效率（表 9）。结果表明：由于 B 类实验动物设施的饲养密度较大，在相同的 15 次/h 的换气情况下，相比于 A 类实验动物设施，送风温度已从 18℃ 下降到 16℃，但室内温度仍然明显偏高，工作区的平均温度达到 25.4℃。

表 6 A 类实验动物设施不同排风口位置的气流组织评价指标

Table 6 Evaluation index of air distribution at different exhaust outlet locations in type A facility

| 不同工况 | 余热排除效率 /% | 氨气排污效率 /% | 二氧化碳排污效率 /% | 全室空气龄 /s |
|------|-----------|-----------|-------------|----------|
| 工况 2 | 89.6      | 85.6      | 97.2        | 215      |
| 工况 4 | 112.8     | 102.8     | 100.4       | 201      |
| 工况 5 | 133.3     | 120.8     | 106.5       | 304      |

表 7 不同类型实验动物设施的模拟工况

Table 7 Simulated conditions in different types of facilities

| 不同工况 | 换气次数 / (次·h <sup>-1</sup> ) | 送排风形式   | 备 注                 |
|------|-----------------------------|---------|---------------------|
| 工况 2 | 15                          | 顶送风下侧排风 | A 类实验动物设施, 模型详见图 1A |
| 工况 6 | 15                          | 顶送风下侧排风 | B 类实验动物设施, 模型详见图 1B |
| 工况 7 | 20                          | 顶送风下侧排风 | B 类实验动物设施, 模型详见图 2A |

选取工况 2 和工况 6 离地 1 m 高的室内温度进行对比分析 (图 3A~B), 结果表明工况 6 的 B 类实验动物设施离地 1 m 高的温度场分布较不均匀, 送风口下方及送风口 1.5 m 范围内的温度较低, 在 20~23 °C; 东西两侧无送风口的区域温度超过了 25 °C, 且大部分区域超过 26 °C, 该值已超规范推荐值的上限。计算其余热排除效率、氨气排污效率和二氧化碳排污效率, 两类实验动物设施的差值均较小。

为进一步分析 B 类实验动物设施的室内温度场的分布, 选取工况 7 的 B 类实验动物设施分析

离地 1 m 高的温度场分布, 具体如图 3C 所示。从整体温度分布来看, 除送风口正下方的区域, 其余区域的温度在 23 °C 左右, 这是实验动物设施较适宜的温度, 但整体温度场分布不均匀的问题仍较严重。建议可增加送风口的数量, 合理布置送风口的位置, 以提高室内温度场的均匀性。

对比分析工况 6 和工况 7 发现, 为满足实验动物设施的温度需求, 类似 B 类高饲养密度的实验动物设施的换气次数不宜过低。本次模拟中未考虑渗透风以及人员扰动。实际的室内温度可能更高, 因此需要根据室内温度的情况, 适时调整最低换气次数, 以降低室温。

表 8 不同类型实验动物设施的模拟结果

Table 8 Simulated results in different types of facilities

| 不同工况   | 温度 / °C | 氨气 / (mL·m <sup>-3</sup> ) | 二氧化碳 / (mL·m <sup>-3</sup> ) | 空气龄 / s |
|--------|---------|----------------------------|------------------------------|---------|
| 工况 2   |         |                            |                              |         |
| 室内平均值  | 22.8    | 7.49                       | 492                          | 215     |
| 排风口平均值 | 22.3    | 6.41                       | 478                          | -       |
| 工况 6   |         |                            |                              |         |
| 室内平均值  | 25.4    | 8.65                       | 508                          | 201     |
| 排风口平均值 | 24.0    | 7.55                       | 493                          | -       |
| 工况 7   |         |                            |                              |         |
| 室内平均值  | 23.2    | 8.02                       | 499                          | 155     |
| 排风口平均值 | 22.0    | 6.74                       | 482                          | -       |

## 5 小结

本文针对常见的小型实验动物实验设施和大型实验动物生产设施的各自特点, 采用 CFD 模拟技术<sup>[13]</sup>分别进行建模分析, 对比了在不同的换气次数、不同的排风口布置形式下的室内余热排除效率、氨气排污效率、二氧化碳排污效率和空气龄等指标, 得出如下结论:

(1) 提高动物饲养间的换气次数, 可以降低室内空气龄, 提升室内空气品质, 但几乎不影响余热排除效率、氨气和二氧化碳排污效率。

表 9 不同类型实验动物设施的气流组织评价指标

Table 9 Evaluation index of air distribution in different types of facilities

| 不同工况 | 余热排除效率 /% | 氨气排污效率 /% | 二氧化碳排污效率 /% | 全室空气龄 /s |
|------|-----------|-----------|-------------|----------|
| 工况 2 | 89.6      | 85.6      | 97.2        | 215      |
| 工况 6 | 85.1      | 87.3      | 97.0        | 201      |
| 工况 7 | 83.3      | 84.0      | 96.6        | 155      |

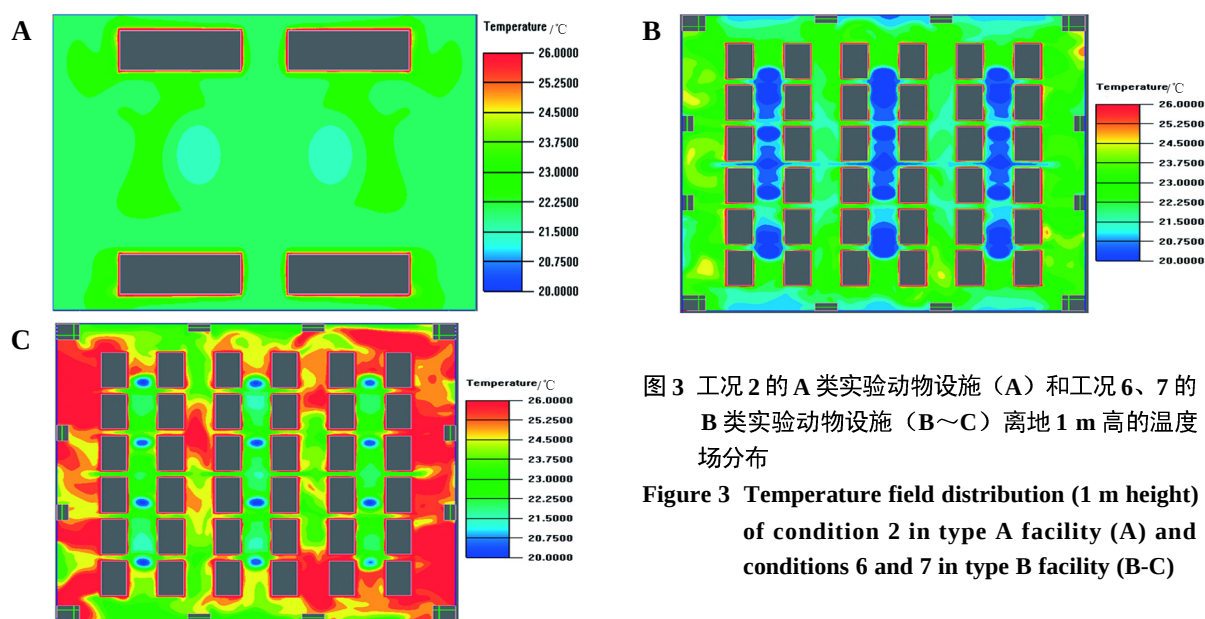


图3 工况2的A类实验动物设施(A)和工况6、7的B类实验动物设施(B~C)离地1 m高的温度场分布

Figure 3 Temperature field distribution (1 m height) of condition 2 in type A facility (A) and conditions 6 and 7 in type B facility (B-C)

(2) 从余热排除效率、氨气排污效率、二氧化碳排污效率及空气龄的气流组织评价指标来分析,顶送风下侧排风辅助顶排风的形式比顶送风下侧排风或者顶送风顶排风模式更适合实验动物设施,既能提高氨气和二氧化碳排污效率,又提高能源利用率,同时也能保证较低的室内空气龄,提高室内空气的新鲜度。

(3) 对于饲养密度较大的实验动物生产屏障设施,由于动物饲养间内热负荷较大,建议应根据房间实时温度调整换气次数的下限。此外,为提高室内温度场的均匀性,建议增加送风口的数量,同时合理布置送风口位置。需要注意,送风口不宜布置在笼具正上方,否则笼具附近的气流速度可能会超过规范 0.2 m/s 的限值。

#### 参考文献:

- [1] 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 环境及设施: GB 14925—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2011.
- [2] 中华人民共和国住房和城乡建设部, 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. 实验动物设施建筑技术规范: GB 50447—2008[M]. 北京: 建筑工业出版社, 2008.
- [3] 何婧. 大型实验动物房的环境控制[D]. 上海: 同济大学, 2003.
- [4] 蒋新波. 基于 CFD 实验动物房气流环境系统的优化研

- 究[D]. 衡阳: 南华大学, 2005.
- [5] 杨五强, 潘杰, 李勋. 屏障系统回风口布置方式对气流组织的模拟分析[J]. 实验动物与比较医学, 2010, 30(5): 384-387. DOI:10.3969/j.issn.1674-5817.2010.05.017.
- [6] 朱颖心. 建筑环境学[M]. 北京: 中国建筑工业出版社, 2015.
- [7] 毕波, 陈志鹏, 张聪, 等. 屏障环境设施指标动态变化的研究[J]. 实验动物科学, 2016, 33(6):55-58. DOI:10.3969/j.issn.1006-6179.2016.06.013.
- [8] 张鑫, 李萌, 王金恒. 实验动物生产设施动态环境指标测定与数据分析[J]. 中国药事, 2012, 26(8):859-861. DOI: 10.3969/j.issn.1002-7777.2012.08.018.
- [9] 徐卫华. 小鼠呼出与吸入气体容量差值的测定[J]. 浙江大学学报(医学版), 2010, 39(3):322-325. DOI:10.3785/j.issn.1008-9292.2010.03.018.
- [10] 孙泽, 罗明志, 陆云, 等. 小鼠呼气末 CO<sub>2</sub> 分压快速检测方法及其在气道阻力评估中的应用研究[J]. 生物医学工程研究, 2016, 35(3):151-156.
- [11] 沈永平, 王国亚. IPCC 第一工作组第五次评估报告对全球气候变化认知的最新科学要点[J]. 冰川冻土, 2013, 35(5):1068-1076. DOI: 10.7522/j.issn.1000-0240.2013.0120.
- [12] 赵彬, 李先庭, 彦启森. 用零方程湍流模型通风空调室内的空气流动[J]. 清华大学学报(自然科学版), 2001, 41(10):109-113. DOI:10.16511/j.cnki.qhdxxb.2001.10.030.
- [13] 欧少华, 周斌, 刘吉宏. 某 GLP 实验动物设施空调及通风系统设计研究[J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(4):110-116. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2020.04.017.

(收稿日期: 2021-04-06 修回日期: 2021-05-26)

# 人工繁育恒河猴的肺炎链球菌携带状况调查及分析

刘 雨, 李艳艳, 张 伟, 杨凤梅, 刘 权, 李咏洁, 靳玮华, 段素琴, 王俊斌, 陈丽雄, 徐鸿界, 赵 远\*, 和占龙\*

(中国医学科学院 / 北京协和医学院医学生物学研究所, 云南省重大传染病疫苗研发重点实验室, 昆明 650118)

**[摘要]** 目的 探究人工繁育的恒河猴群体中肺炎链球菌的自然感染状况, 为肺炎链球菌感染的临床诊断和治疗提供参考。方法 从恒河猴猴群中随机采集 20 只婴猴、30 只成年猴和 30 只老年猴的鼻拭子和咽拭子样本, 采用细菌培养和实时荧光定量 PCR 方法同时筛查样本中肺炎链球菌的携带情况, 并对筛查结果为阳性的婴猴的亲代母猴进行肺炎链球菌筛查。再结合革兰染色法、奥普托欣药敏试验、胆汁溶解试验、菊糖发酵试验和 PCR 扩增测序对样本进行进一步鉴定。结果 恒河猴婴猴携带肺炎链球菌的检出率为 20% (4/20), 而这 4 只阳性婴猴的亲代母猴检测结果均为阴性。成年恒河猴和老年恒河猴中肺炎链球菌的检出率均为 0%。细菌培养物在形态学上观测显示, 该菌为灰白色凸起状, 周围草绿色溶血环, 呈脐窝状, 为典型肺炎链球菌的菌落特征。革兰染色结果显示为阳性, 胆汁溶解试验和菊糖发酵试验结果均呈阳性, 并且该菌对奥普托欣敏感; 以上结果表明本次从婴猴鼻咽拭子分离到的 4 株菌落均为肺炎链球菌。结论 本调查发现在恒河猴中肺炎链球菌自然感染群体主要为婴猴, 婴猴携带率约为 20%, 其鼻、咽部均为该菌寄住场所, 且未发现母婴垂直传播情况。

**[关键词]** 恒河猴; 肺炎链球菌; 携带率; 婴猴

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-0259-07

## Analysis on Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in Captive Rhesus Macaques

LIU Yu, LI Yanyan, ZHANG Wei, YANG Fengmei, LIU Quan, LI Yongjie, JIN Weihua, DUAN Suqin, WANG Junbin, CHEN Lixiong, XU Hongjie, ZHAO Yuan\*, HE Zhanlong\*

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College; Yunnan Key Laboratory of Vaccine Research and Development on Severe Infectious Diseases, Kunming 650118, China)

Correspondence to: ZHAO Yuan, E-mail: zy-315@imbcams.com.cn; HE Zhanlong, E-mail: hzl612@126.com

**[Abstract]** **Objective** To explore the natural infection status of *Streptococcus pneumoniae* in captive bred rhesus macaques, and to provide reference for the clinical diagnosis and treatment of *Streptococcus pneumoniae* infection. **Methods** Twenty infant monkeys, 30 adult monkeys and 30 elderly monkeys were randomly selected from a rhesus macaques population, and the nasal swabs and pharynx swabs were collected and screened for *Streptococcus pneumoniae* simultaneously by bacterial culture and real-time fluorescent quantitative PCR. The mother monkeys of the positive infant monkeys were screened for

**[基金项目]** 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目 (2016-I2M-2-001; 2018-I2M-3-002); 云南省科技创新人才计划 (2015HC027); 昆明市科技创新和服务能力提升计划重点项目 (2016-2-R-07674)

**[作者简介]** 刘 雨 (1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 疾病动物模型。E-mail: 357074037@qq.com

**[通信作者]** 赵 远 (1974—), 男, 硕士, 主任技师, 研究方向: 实验动物微生物学。E-mail: zy-315@imbcams.com.cn  
和占龙 (1972—), 男, 研究员, 博士, 研究生导师, 研究方向: 非人灵长类疾病模型建立及机制研究。

E-mail: hzl612@126.com

\* 共同通信作者

*Streptococcus pneumoniae*. Gram staining method, Optochin drug sensitivity test, bile solubility test, inulin fermentation test and PCR amplification and sequencing were used to further identification. **Results** The positive rate of rhesus macaques carrying *Streptococcus pneumoniae* was 20% (4/20), and the mother macaques of the four positive infant macaques tested negative. The positive rate was 0% in both adult and elderly rhesus monkeys. The morphological observation results of the bacterial culture showed that the bacteria appeared gray and raised, and produced a surrounding green zone of hemolysis with a flattened center, indicating typical *Streptococcus pneumoniae* colony characteristics. The results of Gram dyeing, bile dissolution test, and inulin fermentation test were all positive, and the bacteria were sensitive to Optochin. The above results showed that the four strains isolated from the infant monkeys' nasopharyngeal swabs were *Streptococcus pneumoniae*. **Conclusion** The investigation findings show that *Streptococcus pneumoniae* is mainly found in the noses and throats of 20% infant monkeys among rhesus macaques, and no vertical transmission from mother to child is found.

**[Keywords]** Rhesus macaques; *Streptococcus pneumoniae*; Carrying rate; Infant monkeys

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 是一种似矛头状的革兰阳性双球菌, 成双或成短链状排列, 为人兽共患菌。肺炎链球菌是一种条件致病菌, 一般定植于健康人群和动物的鼻咽部, 致病因子为荚膜多糖<sup>[1-2]</sup>。当定植的环境发生变化, 如宿主体免疫力降低或有关呼吸道病原体感染宿主时, 肺炎链球菌会突破机体的黏膜防御体系, 进入下呼吸道引起肺炎, 或通过咽鼓管进入中耳引发中耳炎, 或穿过肺泡上皮细胞和血管引起菌血症, 或透过血脑屏障引发脑膜炎等<sup>[3-4]</sup>。上述由肺炎链球菌导致的疾病统称为肺炎链球菌性疾病 (pneumococcal disease, PD)。据 2017 年 WHO 数据统计, 全球儿童 PD 发病率高达 0.5 人次/年, 全球每年大约有 46 万的儿童死于肺炎链球菌感染<sup>[5]</sup>。可见, 肺炎链球菌是引起儿童发病和死亡的主要原因之一。

肺炎是人工饲养实验猴场内常见且多发的疾病之一<sup>[6-11]</sup>。在人类和动物中, 引起肺炎的病原体有细菌、支原体、病毒等, 其中细菌性肺炎大多由肺炎链球菌引起。肺炎链球菌主要寄居于鼻咽部, 是机体上呼吸道的一种正常定植菌, 当机体免疫功能受损时, 有毒力的肺炎链球菌入侵人体而致病。在规模化人工繁育猴场开展早期监测, 了解和快速确定病原体携带状况, 针对性地制定预防措施, 合理选择抗菌药物进行治疗, 是有效提高实验猴场疾病防控能力的重要工作。然而目前实验猴肺炎链球菌携带状况监测及快速检

测方法的研究报告较少, 因此开展此项工作对提高实验猴养殖水平, 确保实验猴质量和减少经济损失具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

普通级恒河猴 (rhesus macaque, 中国猕猴的一个指名亚种, 学名为 *Macaca mulatta mulatta*) 80 只 (包括婴猴 20 只, 3~4 月龄; 成年猴 30 只, 4~10 岁; 老年猴 30 只, 11~20 岁), 雌雄不限, 均来源于中国医学科学院医学生物学研究所医学灵长类研究中心[SCXK (滇) K2020-0005] 人工繁育超 20 代的恒河猴种群。这些受检猴是按照年龄组成结构随机抽样选取, 均饲养于普通环境[SYXK (滇) K2020-0008]。其中, 婴猴小笼饲养, 每笼 2 只; 成年猴和老年猴大笼饲养, 每笼 6~8 只; 均设置温度为 20~25 °C, 相对湿度为 40%~70%, 饲喂全价颗粒饲料[SCXK (滇) K2020-0006], 自由饮水。实验方案经本单位实验动物伦理审查委员会审核批准 (批准号: DWSP201902034), 实验过程严格遵循 3R 原则, 给予实验动物人道关怀。

### 1.2 主要试剂与仪器

实时荧光 PCR 法肺炎链球菌核酸检测试剂盒购自江苏硕世生物科技股份有限公司; 哥伦比亚血琼脂、葡萄糖肉浸汤、去氧胆酸钠和菊糖发酵管购自广东环凯微生物科技有限公司; 革兰染色

试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司；奥普托欣药片购自温州市康泰生物科技有限公司。高速冷冻离心机购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司；超净操作台购自中国苏净集团苏州安泰空气技术有限公司；荧光定量 PCR 仪器、PowerPac HC 高流电泳仪和凝胶成像自动分析系统 Image Lab 购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.3 样品采集

用无菌棉签将鼻、咽拭子各分成一式两份，2~8℃保存，分别做培养鉴定和实时荧光定量 PCR 检测。所有样本须在 2~3 d 内完成检测。

### 1.4 肺炎链球菌分离培养及生化鉴定<sup>[12]</sup>

鼻、咽拭子样品分别接种在哥伦比亚血培养基中，在 5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养 24 h 后，挑取单个灰白色、周围有草绿色溶血环、部分呈典型脐窝状的可疑菌落进行革兰染色。镜检显示形态呈矛头状，成双或链状排列，宽端相对，尖端相背，颜色为紫色，初步确定为肺炎链球菌。

奥普托欣药敏试验：挑取革兰染色阳性的菌落均匀密涂于哥伦比亚血培养基上，置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养 24 h。然后将 5.0 μg 奥普托欣药片紧压到平皿中央，置于培养箱中培养 24 h 后取出，观察并测量抑菌圈的直径大小，抑菌圈大于 14 mm 时判定为药敏阳性。

胆汁溶解试验：挑取革兰染色阳性的菌落，接种到含有 2~3 mL 葡萄糖肉浸汤的试管中培养 24 h。然后，一支加入 1~2 滴 10% 去氧胆酸钠，另一支加入 1~2 滴 0.9% 氯化钠溶液（即生理盐水）作为对照，置于 5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养 2 h。观察发现液体澄清透明，即确定为胆汁溶解阳性。

菊糖发酵试验：挑取革兰染色阳性的菌落，接种到菊糖发酵管中，在 5% CO<sub>2</sub>、37℃培养箱中培养 24 h 后，观察甲酚紫变为黄色，即确定为菊糖发酵阳性。

按照国家标准肺炎链球菌检测要求，以上 3 个试验均为阳性时，即可确定该样本为肺炎链球菌阳性。

### 1.5 肺炎链球菌核酸检测

肺炎链球菌核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）最低检测限值可达到 1 × 10<sup>3</sup> 拷贝/mL，与感染部

位相同或感染症状相似且常见的其他病原体如 B 族链球菌、肺炎克雷伯菌、A 组乙型溶血性链球菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌等细菌和人类白细胞的总核酸无交叉反应，特异性较好，并且检测精密度参考品的变异系数小于 5%。具体检测步骤：（1）新鲜采集的同一只恒河猴鼻、咽拭子样本混合后经葡萄糖肉浸汤培养；（2）取 1 mL 培养液于 1.5 mL 无菌离心管中，1 000 r/min 离心 3 min 后弃掉上清液，保留沉淀；（3）每管沉淀溶于 50 μL DNA 提取液，沉淀悬浮后 100℃煮沸 5 min；（4）1 000 r/min 离心 3 min，取 5 μL 上清液，即肺炎链球菌 DNA，用于实时荧光定量 PCR 检测。

实时荧光定量 PCR 反应体系总体积为 25 μL，包括 PCR 反应组分 5 μL、酶混合液 0.2 μL、肺炎链球菌反应液 4 μL、无酶水 10.8 μL 和 DNA 5 μL。PCR 反应条件：95℃ 5 min；95℃ 10 s，55℃ 40 s，40 个循环。结果判定：Ct ≤ 35 且曲线呈 S 型，判断为阳性感染；Ct > 38 或者未检出，判断为阴性感染。

### 1.6 PCR 扩增和测序

根据 GenBank 肺炎链球菌 DNA 基因序列，利用 Prime 5 软件设计引物，扩增目的片段长 258 bp。上游引物序列为 5'-GTTAAGATTGCTGATCGA-TTAATTGATATCC-3'，下游引物序列为 5'-GT-AATATGTCTTTAGGGCGTTTATGGCGATAG-3'。引物由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。利用 1.5 节中提取的肺炎链球菌 DNA 作为模板，进行 PCR 扩增。扩增体系包括上下游引物各 1 μL、PCR Mix 12.5 μL、模板 DNA 2 μL，dd H<sub>2</sub>O 补至总体积 25 μL。PCR 扩增程序：94℃预变性 3 min；94℃变性 30 s，56℃退火 30 s，72℃延伸 35 s，35 个循环；72℃延伸 10 min，12℃停止反应。取 5 μL PCR 扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶上进行电泳，用凝胶成像仪进行观察并拍照。PCR 扩增产物由广州擎科生物技术有限公司测序。

### 1.7 统计学分析

采用定性描述的方法，判断肺炎链球菌感染情况；然后用 Excel 软件录入整理阳性数据，计算不同年龄组的带菌率。

## 2 结果

### 2.1 肺炎链球菌的菌落形态特征

在哥伦比亚血琼脂平板上接种鼻、咽拭子样品,培养 24 h 后进行观察,发现 80 份样品有 4 份婴猴样品为阳性,菌落为灰白色湿润的凸起,且周围有草绿色溶血环,呈脐窝状,总体表现为

典型肺炎链球菌的菌落特征(图 1A)。革兰染色后镜检结果显示,该细菌为革兰阳性链球菌,菌体呈成双或短链状排列(图 1B),进一步确定为肺炎链球菌。对结果为阳性的 4 只婴猴对应的母猴(不包括在 30 只成年猴中)鼻咽拭子进行细菌培养,均未培养出肺炎链球菌。

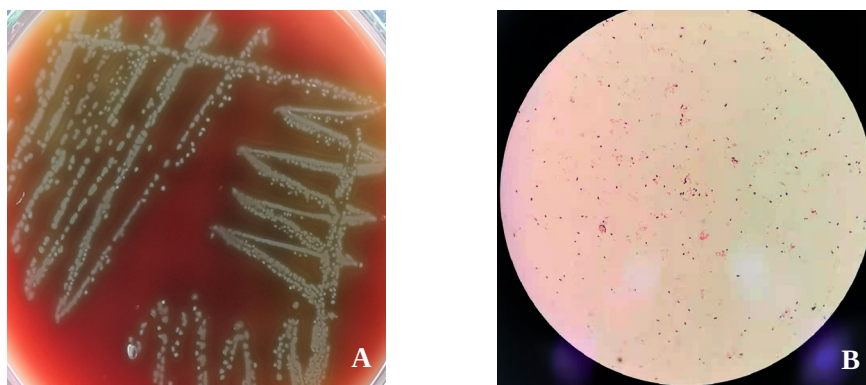


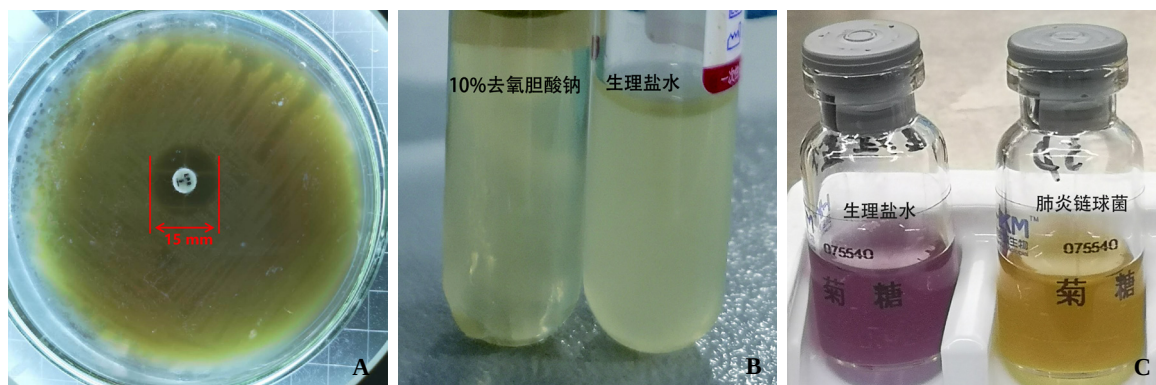
图 1 婴猴感染肺炎链球菌的菌落(A)及菌体(B)形态

Figure 1 The colony (A) and bacteria (B) morphology in infant rhesus macaques infected with *Streptococcus pneumoniae*

### 2.2 肺炎链球菌的生化特性

奥普托欣药敏试验测得抑菌圈直径大小为 16 mm (图 2A)。抑菌圈大于 14 mm 表明该菌对奥普托欣敏感,即可确定为阳性。胆汁溶解试验中,加入 10% 去氧胆酸钠溶液的试管液体澄清透明,加入生理盐水的试管液体浑浊(图 2B),

表明胆汁溶解试验为阳性。菊糖发酵试验中,接种菌落的菊糖发酵管中甲酚紫由紫色变为黄色,加入生理盐水的菊糖发酵管中液体颜色没有变化,表明该菌可发酵菊糖(图 2C),即菊糖发酵试验为阳性。通过以上试验可确定分离获得的菌落为肺炎链球菌。



注: A 为奥普托欣药敏试验; B 为胆汁溶解试验; C 为菊糖发酵试验。

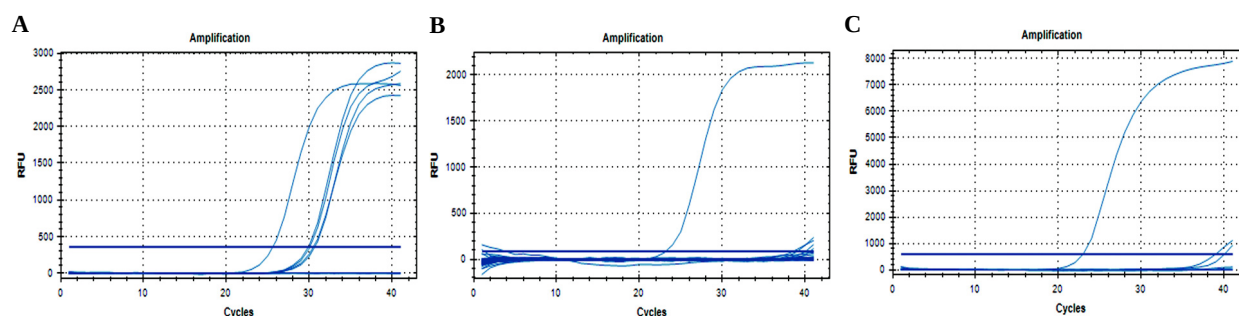
图 2 婴猴感染肺炎链球菌的生化鉴定

Figure 2 Biochemical identification of *Streptococcus pneumoniae* in infant rhesus macaques

## 2.3 肺炎链球菌实时荧光定量 PCR 筛查结果

鼻咽拭子样本通过提取DNA进行实时荧光定量 PCR 检测,发现婴猴中 4 份样本检测结果为阳

性,成年猴和老年猴检测结果均为阴性;对结果为阳性的婴猴的母亲(不包括在 30 只成年猴中)进行 PCR 检测,筛查结果均为阴性(图 3)。



注: A 为 3~4 月龄的婴猴, B 为成年猴和老年猴, C 为 4 只阳性婴猴所对应的母亲。阳性样品的循环数( $C_t$ )=29.49, 阳性对照的  $C_t$ =22.26, 3~4 月龄的婴猴、成年猴和老年猴样本的  $C_t$  分别为 30.22、30.58 和 30.27。

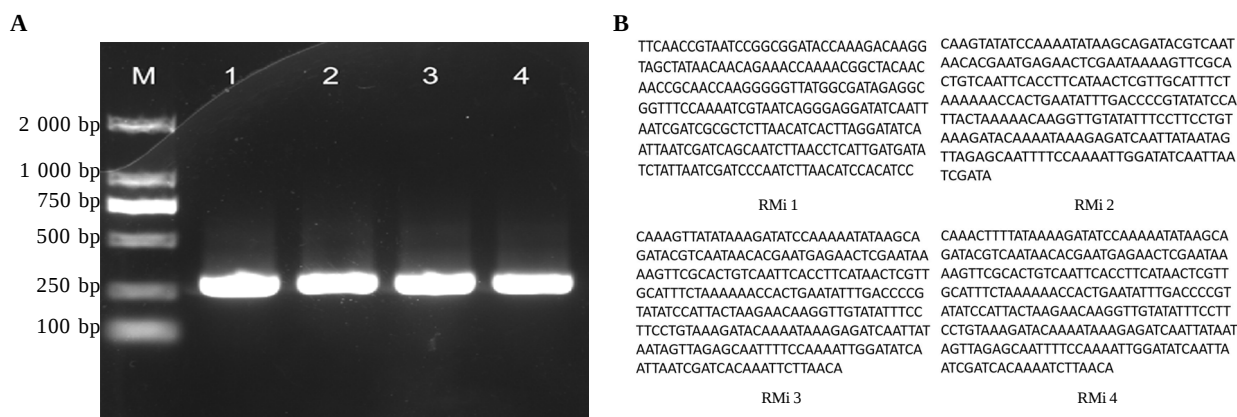
图 3 实时荧光定量 PCR 检测不同年龄组的恒河猴肺炎链球菌携带情况

Figure 3 Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in rhesus macaques at different ages detected by real-time fluorescent quantitative PCR

## 2.4 肺炎链球菌 PCR 扩增与测序结果

用根据肺炎链球菌DNA序列设计的引物进行 PCR 扩增,产物经凝胶电泳分离,目的片段长度为 258 bp (图 4A)。将扩增的 PCR 产物进

行测序,结果如图 4B 所示。扩增的目的片段序列与 GenBank 中的序列进行比对分析,发现与肺炎链球菌标准菌株 DNA 序列的同源性达 97.6% 以上。



注: M 为 DNA Marker, 1~4 分别为 4 只阳性婴猴鼻咽拭子的肺炎链球菌 DNA 样本。

图 4 婴猴肺炎链球菌感染阳性样本的 PCR 扩增(A)和测序(B)结果

Figure 4 PCR amplification (A) and sequencing (B) results in positive samples of *Streptococcus pneumoniae* infection in infant rhesus macaques

## 2.5 不同年龄组恒河猴的肺炎链球菌携带情况

在 3~4 月龄恒河猴婴猴的鼻、咽拭子中检测出肺炎链球菌,检出率为 20% (4/20)。另外对检测结果阳性的 4 只婴猴的母亲进行筛查,发现 4 只母猴(30 只成年猴中不包括这 4 只母猴)

并未携带肺炎链球菌。4~20 岁年龄组的恒河猴咽拭子、鼻拭子均未检测出肺炎链球菌。经过对比标号发现,细菌培养和 PCR 筛查的阳性结果均一致。不同年龄组恒河猴的肺炎链球菌携带情况见表 1。

表 1 不同年龄组恒河猴肺炎链球菌的携带情况  
Table 1 Carriage of *Streptococcus pneumoniae* in  
different age groups of rhesus macaques

| 组 别          | 例数 | 阳性例数 | 带菌率/% |
|--------------|----|------|-------|
| 婴猴组(3~4 月龄)  | 20 | 4    | 20    |
| 成年组(4~10 岁)  | 30 | 0    | 0     |
| 老年组(11~20 岁) | 30 | 0    | 0     |
| 合计           | 80 | 4    | 5     |

### 3 讨论

正常菌群是微生物与其宿主在共同的进化过程中形成的对人有益的微生物群,主要存在于人类体表和体腔部位,这些正常菌群大部分与细胞密切接触并参与人体能量供给、物质交换、遗传信息传递等生命活动<sup>[13]</sup>。研究发现在人体鼻腔的定植微生物以葡萄球菌为最多,其次是肺炎链球菌、奈瑟菌、嗜血流感杆菌等。鼻咽部链球菌与嗜血流感杆菌的数量大,肺炎链球菌占比较高。多年来人们主要关注口腔鼻咽部正常菌群的致病作用,即引起内源性感染的作用,忽视了这些菌群正常的生物拮抗、营养及免疫等生理作用。正常情况下,口腔鼻咽部正常菌群之间以及菌群中多种微生物之间,互相依存,互相制约,构成一种生态平衡,发挥着重要的生理作用。基于非人灵长类动物与人的生理结构和功能以及遗传信息具有相似性,本研究开展了正常猴群中肺炎链球菌在咽鼻部定植情况的筛查,为早期该病原体的检测提供一定的参考依据。从实验结果可以看出,在正常猴群中肺炎链球菌携带率相对较高,如环境、个体免疫力等因素一旦发生改变将会引起肺炎的发生。因此,在实践工作中检测肺炎链球菌的同时,应加强对动物口腔鼻咽部其他常见的正常菌群中多种微生物的监测和研究,建立一个完善的可检测多种微生物的技术方法,获得非人灵长类实验动物的咽鼻部微生物信息数据,从而指导饲养、质量检测和疾病防控等。

大量研究表明,在猪、羊、貂、兔等动物中均发现了PD<sup>[14-17]</sup>。有文献资料显示,导致猴呼吸系统疾病的常见且重要的病原菌为肺炎链球菌,死亡率高达82%<sup>[18]</sup>。郑振峰等<sup>[6]</sup>报告猴肺炎链球菌是导致呼吸道疾病的第二大病原菌。这

些文献资料的数据结果大多数是在实验猴出现临床症状或死亡的样本中获得,而在正常恒河猴群体中调查报告肺炎链球菌携带情况的文献较少。据报告,中国内地健康儿童鼻咽部肺炎链球菌的携带率为21.7%,其中幼儿园儿童(2~5岁)的携带率高达25.0%<sup>[19]</sup>。本研究分别从恒河猴群体的婴猴、成年猴和老年猴中随机抽取20只、30只、30只进行肺炎链球菌携带情况筛查,结果显示,20只3~4月龄的婴猴中有4只的鼻咽部肺炎链球菌为阳性,16只为阴性;但4只阳性婴猴的亲代母猴中并未检测出肺炎链球菌。因此,推测本研究中婴猴所携带的肺炎链球菌并非经垂直传播,而是自然感染状态。目前发现肺炎链球菌有96个血清型<sup>[20-22]</sup>,其中确定的致病性血清型约20~30种。本次检测结果为阳性的婴猴均未发生肺炎情况,推测所检测到的肺炎链球菌可能不属于致病性血清型,也有可能是由于携带(定植)载量较低,或者与动物机体抵抗力等因素有关。因此,本课题组后期将对分离到的肺炎链球菌进一步开展血清型鉴定,并跟踪观察动物健康状况。

陈文标等<sup>[23]</sup>和王哲等<sup>[24]</sup>发现,不同年龄、不同季节时人类肺炎链球菌感染的分布有一定差异性,但总体而言,小于5岁的儿童和大于50岁的老年人发病率较高。推测其原因主要是婴儿刚出生时会从母体获得一部分免疫力,而3个月后免疫力逐渐丧失,且3个月~2岁的儿童免疫系统发育不完善,容易受到病原菌感染;老年人由于机体功能逐渐退化,运动减少,多伴有基础疾病,抵抗力较弱,相对于年轻人更易感染。而本研究结果显示,3~4月龄的婴猴肺炎链球菌携带率达20%,但在成年猴、老年猴中未检测到肺炎链球菌。推测这可能与环境和饲养密度有一定关系。本次研究的婴猴饲养在饲养室内,提供保温、空气净化等设备,但每个笼内饲养2只,动物密切接触、饲养密度较高等因素可能导致肺炎链球菌携带率较高;而成年猴和老年猴饲养在室外大笼内,饲养密度低、空气流通和日光中紫外线照射等较好的环境因素不利于肺炎链球菌的定植,另外动物长期接触同一外界环境的过程中可能导致微生物菌群发生适应性的变化。需要说明:在生产实践中老年猴群的肺炎发病率相对较

高,因此尤其要做好确诊为肺炎或者因肺炎死亡的病例的病原体检测、分离和培养,才能积极有效地开展预防及治疗工作。

本次调查结合分子生物学手段和微生物学手段,对恒河猴群体中肺炎链球菌的携带情况进行筛查和鉴定,探究不同年龄阶段的恒河猴体内肺炎链球菌的携带率。结果发现自然状态下婴猴为肺炎链球菌的主要携带群体,其携带率约为20%,该结果与人类儿童中肺炎链球菌的感染情况相近。未来可进一步对所分离到的肺炎链球菌进行亚型鉴定和菌株毒理实验,为肺炎球菌感染的临床诊断和防治提供进一步的基础依据。

### [参考文献]

- [1] 王华庆,安志杰.肺炎球菌性疾病免疫预防专家共识(2017版)[J].中国预防医学杂志,2018,19(3):161-191. DOI:10.16506/j.1009-6639.2018.03.001.
- [2] PENNINGTON J E. Treating respiratory infections in the era of cost control[J]. Am Fam Physician, 1986, 33(2): 153-160.
- [3] 张雪梅.肺炎链球菌自然转化机制的研究进展[J].国外医学(临床生物化学与检验学分册),2002,23(6):348-350. DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2002.06.016.
- [4] 孟江萍,尹一兵.肺炎链球菌致病机理的最新研究进展[J].微生物学杂志,2002,22(2):39-41. DOI:10.3969/j.issn.1005-7021.2002.02.015.
- [5] WHO Publication. Pneumococcal vaccines WHO position paper: 2012 recommendations[J]. Vaccine, 2012, 30(32): 4717-4718. DOI: 10.1016/j.vaccine.2012.04.093.
- [6] 郑振峰,李秦,孙岩松,等.猴肺炎双球菌性败血症尸检分析[J].中国实验动物学杂志,1991,1(2):120.
- [7] 代解杰,谢晋,和占龙.人工饲养条件下恒河猴病理分析的研究[J].中国实验动物学杂志,1999,9(1):34-38. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.1999.01.008.
- [8] 程树军,黄韧,秦瑶,等.实验恒河猴肺自发病变的组织学观察[J].中国比较医学杂志,2003,13(4):197-199. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7856.2003.04.002.
- [9] 赵玺龙,杨举伦,王力,等.人工饲养条件下死亡恒河猴肺脏病理改变分析[J].中国比较医学杂志,2011,21(5): 1-4,9. DOI: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.05.001.
- [10] 王宏,陈智岗,张龙,等.猕猴链球菌性大叶性肺炎的诊断与防治[J].黑龙江畜牧兽医,2018(8):181-182,237. DOI: 10.13881/j.cnki.hljxmsy.2017.07.0223.
- [11] 李俊保,侯超鹏,韩笑.猕猴群链球菌和溶血性大肠杆菌混合感染的处置[J].野生动物学报,2020,41(2):439-442. DOI:10.19711/j.cnki.issn2310-1490.2020.02.024.
- [12] 周庭银,章强强.临床微生物学诊断与图解[M].4版.上海:上海科学技术出版社,2017.
- [13] 陈世钰.口腔鼻咽部正常菌群与健康[J].湖北民族学院学报(医学版),2007,24(2):72-73.
- [14] 刘杰,刘维康.一例猪肺炎链球菌病的诊断与防治[J].猪业科学,2017,34(3):73-74.
- [15] 薛锦.羊肺炎链球菌病的防治[J].湖北畜牧兽医,2020,41(8):13-14. DOI:10.16733/j.cnki.issn1007-273x.2020.08.004.
- [16] 商园园.貂源肺炎双球菌和金黄色葡萄球菌的毒力基因检测及其致病性研究[D].泰安:山东农业大学,2019.
- [17] 莫玲.兔肺炎双球菌病的病原分离与培养基优化及其流行病学调查[D].长春:吉林大学,2014.
- [18] Benirschke K, Garner F M, Jones T C. Pathology of laboratory animals[M]. New York: Springer, 1978.
- [19] 傅锦坚,丁燕玲,徐少林,等.中国内地健康儿童鼻咽携带肺炎链球菌及其血清型分布的系统评价[C]//第七届中国临床微生物学大会暨微生物学与免疫学论坛论文集.宁波,2016:255.
- [20] GRABENSTEIN J D, MUSEY L K. Differences in serious clinical outcomes of infection caused by specific pneumococcal serotypes among adults[J]. Vaccine, 2014, 32(21):2399-2405. DOI:10.1016/j.vaccine.2014.02.096.
- [21] AHL J, LITTORIN N, FORSGREN A, et al. High incidence of septic shock caused by Streptococcus pneumoniae serotype 3: a retrospective epidemiological study[J]. BMC Infect Dis, 2013, 13:492. DOI:10.1186/1471-2334-13-492.
- [22] GARCIA-VIDAL C, ARDANUY C, TUBAU F, et al. Pneumococcal pneumonia presenting with septic shock: host- and pathogen-related factors and outcomes[J]. Thorax, 2010, 65(1):77-81. DOI:10.1136/thx.2009.123612.
- [23] 陈文标,朱焱,黄东红,等.2013—2014年泉州地区肺炎链球菌感染的分布及耐药性分析[J].海南医学,2015,26(24):3655-3658.
- [24] 王哲,刘丹,于波心,等.某院肺炎链球菌感染的临床分布及耐药性分析[J].安徽医药,2019,23(6):1250-1253. DOI:10.3969/j.issn.1009-6469.2019.06.054.

(收稿日期: 2021-02-23 修回日期: 2021-05-31)

# 基于互联网交互平台三明治教学法在医学实验动物学教学中的应用

魏 盛, 耿希文, 徐凯勇, 胡明会, 周苗苗, 李自发

(山东中医药大学实验中心, 济南 250355)

**[摘要]** 医学实验动物学为生物医学研究的支撑学科, 实践性、应用性较强。为顺应医学院校人才培养战略、培育实用型及创新型人才, 如何改革教学模式、提高学生动手能力是目前医学实验动物学课程亟需解决的问题。本文旨在探讨“互联网交互平台+三明治教学法”在医学实验动物学中应用的教学优势及相关理念, 以期提升医学实验动物学课程教学质量。

**[关键词]** 互联网+三明治教学法; 医学实验动物学; 应用

**[中图分类号]** Q95-33; R-332 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 1674-5817(2021)03-0266-05

## Application of Sandwich Teaching Method Based on Internet Interactive Platform in Teaching of Medical Experimental Zoology

WEI Sheng, GENG Xiwen, XU Kaiyong, HU Minghui, ZHOU Miaomiao, LI Zifa

(Experiment Center of Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

Correspondence to: LI Zifa, E-mail: zifa\_0611@163.com

**[Abstract]** Medical experimental zoology is a supporting discipline for biomedical research with strong practicality and applicability. Adapting the talent training strategy of medical colleges, cultivating practical and innovative talents, reforming the teaching mode, and improving students' practical abilities are problems that urgently require solutions in the current course of medical experimental zoology. This article aims to explore the teaching advantages and related concepts of the internet interactive platform + sandwich teaching method in the course of medical experimental zoology to improve its teaching quality.

**[Key words]** Internet interactive platform + sandwich teaching method; Medical experimental zoology; Application

中医药现代化战略的实施要求中医院校培养和造就集实践、创新于一体的高素质人才, 但高校学生动手能力不强是一个不争的事实, 如何改变或逆转这种现象是目前各高等院校教学改革的重要课题。医学实验动物学作为教授实验动物学理论知识、传授动物实验相关技能的一门综合学科, 是学校师生运用相关技能进行医学实验研究必不可少的一部分, 在众多学科中最具有操作性及可行性。目前, 本课程已在医学相关专业开设, 但受课时及经费制约, 大部分院校仍采取以教师为主导的填鸭式教学模式, 且缺乏要求明确

的教学大纲, 教学资料(实验操作视频、标本等)短缺, 使学生的操作能力无法得到有效提高, 并且“满堂灌、说教式”的传统教学方法无法有效避免“低头族”、“瞌睡族”<sup>[1]</sup>。如何将“教师、教材”为核心的被动教育模式转变为“学生动脑、动嘴、动手”的主动模式, 是从事医学实验动物学研究的教育工作者在教学实践中从未停止探索和思考的一个问题。三明治教学虽能有效克服以上弊端, 提升教学效果, 但适合小班教学, 对教师教学素质、教室、教学大纲等要求极高, 教学难以体现个体差异性<sup>[2]</sup>。

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81974553); 山东中医药大学教育教学研究课题(ZYY2019077)

**[作者简介]** 魏 盛(1980—), 男, 副教授, 研究方向: 情志病证动物模型的构建技术及情志致病机制。E-mail: waysaint@163.com

**[通信作者]** 李自发(1977—), 男, 高级实验师, 研究方向: 动物模型与比较医学。E-mail: zifa\_0611@163.com

我们希望通过“互联网+三明治教学法”，以互联网的实时在线为依托，不拘于时间、地点的限制，因材施教，教学相长，完善教学过程，提升教学质量。

## 1 互联网+三明治教学法内涵

互联网+三明治教学法，即互联网与教师引导、学生自主学习（夹层）、教师指导的三明治教学模式<sup>[3]</sup>（即学习、实践、再学习）深度融合，充分发挥互联网资源和平台的高效、便捷优势和三明治教学中学生的参与优势，提升学生对医学实验动物学的课堂积极性及兴趣，增加满意度，达到 $1+1>2$ 的效果。此种教学模式是一种新型的任务驱动学，能充分体现“教师为主导，学生为主体，思维为核心，能力为目的”的教学思想<sup>[4]</sup>，可有效改变知识单向传递的现状，突破时间、空间限制实现适时沟通，使学生的知识、能力等变化得到密切关注，真正做到因材施教<sup>[5]</sup>。

## 2 互联网+三明治教学法的实施流程

### 2.1 三明治教学法培训

#### 2.1.1 确定教师的角色与任务

教师当转变角色，从传授者转变为组织者、引导者，在教学课程设计及课堂管理过程中应凸显教师组织者角色，适时引导，掌握课堂教学节奏，总揽大局。

课前，教师借助中国实验动物信息网等网络资源，紧扣教学大纲，兼顾教学水平、学生发展水平、教学知识框架等诸多因素，选取相关优质视频、科研案例转载到QQ群、微信群、公众号等网络共享平台，供学生提前预习，使学生明确课程总体布局。将医学实验动物学涉及到生命科学领域的动物福利、动物伦理、动物操作技术、动物模型融入到实验教学及操作中，同步讲授与讨论，串联知识点。根据课程内容难易程度设置问题，高质量的问题设计会使教学效果得到有效助力，故而问题设计不仅要求涉及本案例的全部知识点，而且要有层次感及逻辑性。此外，问题设计还应赋有挑战性，给予学生独立的思考空间，培养学生自发性提出问题、分析问题、解决问题的能力。教师应提前设计课后组卷，以“梅花试

题”形式呈现，保证答题客观性，答案可手动或者自动公布，方便教师进行课堂设计<sup>[6]</sup>。

课堂中，教师采取实名制签到及出勤记录有效管理学生。讨论环节以线上线下的方式同步进行，且允许课后的线上持续讨论，教师可随时参与和解答，以有效提高教学活动的持续性及活跃性。讨论环节中教师有针对性干预及提供反馈，确保主题的正确方向，带动学生探讨和辩论的气氛，使所有学生参与到小组讨论中，畅所欲言。培养学生的团队意识、责任感，并传递压力，防止个别学生控制讨论，促进沉默学生加入讨论。集中汇报时提供点评，避免直接给予答案；在教师的总结环节中，注重观点的提炼、重点的突出、缺漏的补充、知识的外延。

课后，保留线上全部教学参数（含学生信息、课堂设计、答题、讨论、课件等），制定恰当的课程评估方案对课堂活跃度、学生学习态度、知识与技能的提升等教学目标予以反馈，分析学生所需的能力与学生现有能力间的差距，灵活调整课程的问题设计及讨论，确保互联网+三明治教学法实施的流畅及多样化。

#### 2.1.2 确定学生的角色与任务

互联网+三明治教学法中，学生为教学的核心，居于主体地位。课前，学生当预习教师分享转载的教学资料，通过互联网查询相关资料以拓展知识和技能，为课堂讨论做好准备。课中，积极参与讨论，表达自己的想法，倾听不同的言论。学会分享、团队合作，并凝练集体的智慧，查缺补漏。课后，总结个人、团体、教师的观点，融会贯通，合理采纳吸收。

### 2.2 拟定适合三明治教学的内容

教研室组织主干教师讨论适合互联网+三明治教学法教学的授课内容，动物实验、实验动物等基本概念、相关政策法规及伦理知识等仍需以教师重点讲授为主，引导学生了解实验动物在生命科学领域中的重要性及医学实验动物学对生命科学领域的贡献度及应用，培养学生爱护动物、敬畏生命的意识及对本门课程的兴趣。而实验动物环境与设施标准，以及实验动物的抓取与固定、性别的鉴定、麻醉、给药、取材等常规操作方法和疾病模型建立等更适合进行实际操作训练，比单纯语言讲授更容易引起学生兴趣，且能

加深印象<sup>[7]</sup>。

### 2.3 拟定三明治教学过程中各部分内容的的问题

为防止教学过程中因教师个人素质及对教学内容理解偏差影响教学效果,各教研室集体讨论每堂课的问题设计并达成共识。为保证教学效果,授课教师可根据授课专业的不同进行微量调整。

### 2.4 建立互联网沟通平台

综合利用网络载体,合理规范利用BBS、E-mail、QQ群、微信公众号、微信群、腾讯网络会议等资源,建立学习资料共享及交流互助平台,对学生的兴趣点、话题参与度、师生间的交流进行整合。

### 2.5 充分利用互联网的资源优势

充分利用互联网信息资源的多元化、信息传递的多源化优势,结合三明治教学法搭建医学实验动物学的教学资源平台。针对网络资源的复杂性进行筛选再整合,保证信息资源的精准性,随后在平台共享、互动、交流,使医学实验动物学教育更为先进高效,为医学生提供数字化、网络化教学平台。

## 3 互联网+三明治教学法在医学实验动物学教学中的应用

### 3.1 研究对象

选择我校2019级五年制中医学专业200名学生为研究对象,将其随机分为对照组(传统三明治教学组)和试验组(互联网+三明治教学组),每组100人,所有学生对本研究课题均已知情同意。两组学生均选用男女各50人,平均年龄( $20 \pm 2$ )岁,全组在校成绩中理论成绩平均为( $75 \pm 5$ )分,性别、年龄等一般资料的差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

### 3.2 教学方法

传统三明治教学法<sup>[8]</sup>:①开场白:以经典案例或图片引出主题,罗列当前课时的学习重点和目标。②分组讨论:抽签方式,各小组成员围绕主题自由讨论,每组1名同学记录本组讨论结果。③小组汇报:每组派1名学生代表全部组员汇报,时间为3 min,汇报完毕,教师予以纠正、补充。④教师总结:根据课程目标及讨论结果,教师进行总结、归纳。⑤反馈:针对教

师总结内容,学生提出反馈意见,包含课程重点、难点,小组讨论结果。

互联网+三明治教学法:在传统三明治教学法基础上联合使用微信、QQ、腾讯网络会议平台等建立小组群讨论组。课前将相关资料、动物实验操作视频、实验设施的三维动画及图片提前共享到群讨论组,以供学生预习及讨论。课上随机选取学生现场演示课前预习的技能操作,由小组人员专门记录,采集视频。课后将视频共享到群讨论组,组织学生相互评议,纠正各自的错误,使其操作方法更合乎规范、科学。

### 3.3 评价和统计方法

实验周期结束后,采取理论+技能操作相结合的考核方式,以问卷调查形式对学生求知欲、自主学习能力、沟通表达能力、分析解决问题能力及融会贯通能力等进行评价。运用SPSS 22.0统计学软件,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 $t$ 检验;计数资料以百分比表示,组间比较采用 $\chi^2$ 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

### 3.4 结果与分析

#### 3.4.1 以考试成绩为教学效果的客观评价指标

医学实验动物学科目考试包括理论及技能操作考试两部分(满分各为100分),总成绩为(理论成绩+实践成绩) $\times 50\%$ 。结果如表1所示,试验组学生理论及实践考核成绩均优于对照组( $P < 0.05$ )。

#### 3.4.2 以问卷调查作为教学效果的主观评价指标

发放调查问卷(表2)200份,回收有效问卷200份,结果如表3所示,实验组各项能力的提升均高于对照组( $P < 0.05$ )。

#### 3.4.3 满意度比较

结果如表4所示,学生对互联网+三明治教学法的满意度为95%,明显高于对照组( $P < 0.05$ )。

表1 成绩考核比较

Table 1 Comparison of performance assessment

| 组别  | ( $\bar{x} \pm s$ , 分值) |                  |
|-----|-------------------------|------------------|
|     | 理论成绩                    | 实践成绩             |
| 对照组 | $82.84 \pm 8.76$        | $85.00 \pm 5.89$ |
| 试验组 | $88.69 \pm 8.65$        | $90.00 \pm 3.52$ |
| $t$ | 4.752                   | 7.283            |
| $P$ | $<0.0001$               | $<0.0001$        |

注:每组均100人,男女各50人。

表 2 教学效果评价表(学生维度)样表  
Table 2 Teaching effect evaluation form (student dimension)

| 评价指标     | 分值  | 评价标准                 | 参考观测点                                                   | 分数 |
|----------|-----|----------------------|---------------------------------------------------------|----|
| 求知欲      | 100 | 课前预习, 课后复习           | 课前做了哪些预习? 有多少学生做了预习?<br>课后做了哪些复习? 有多少学生做了复习?            |    |
| 学习兴趣     | 100 | 学习态度积极, 兴趣浓厚, 精力集中   | 对学习内容有兴趣吗? 有多少学生有兴趣?<br>有多少学生认真倾听老师、同学的发言? 倾听多长时间?      |    |
| 自主学习能力   | 100 | 接受学习和自主学习方式相结合       | 自主学习的时间有多少? 是否充分?<br>自主学习的方式有哪些(阅读/思考/练习/笔记/探索)?        |    |
| 综合学习能力   | 100 | 学习活动有序、有效, 直接针对目标的达成 | 完成每项学习任务的时间如何? 是否体现出效率?<br>学习活动是围绕目标展开的吗? 有哪些证据表明有序、有效? |    |
| 沟通表达能力   | 100 | 课堂回答老师提问情况           | 有多少学生积极举手提问? 有多少学生对老师提问积极响应? 回答问题的科学性如何? 逻辑性如何?         |    |
| 分析解决问题能力 | 100 | 对课后布置的开放性问题作答情况      | 有多少学生独立思考? 思考的习惯是怎样的?<br>回答问题的结果如何(数量/深度/错误率)?          |    |
| 融会贯通能力   | 100 | 平时和期末表现综合判断          | 课堂中哪些证据(发言/练习/展示)证明学习目标达成?<br>课后哪些证据(作业/抽测/谈话)证明学习目标达成? |    |

表 3 教学效果评价  
Table 3 Evaluation of teaching effect

| 组别       | 求知欲   | 学习兴趣  | 自主学习能力 | 综合学习能力 | 沟通表达能力 | 分析解决问题能力 | 融会贯通能力 |
|----------|-------|-------|--------|--------|--------|----------|--------|
| 对照组      | 79    | 74    | 78     | 82     | 73     | 75       | 78     |
| 实验组      | 91    | 86    | 90     | 92     | 85     | 89       | 89     |
| $\chi^2$ | 5.647 | 4.500 | 5.357  | 4.421  | 4.340  | 6.640    | 4.391  |
| $P$      | 0.017 | 0.034 | 0.021  | 0.036  | 0.037  | 0.010    | 0.036  |

注: 每组均 100 人, 男女各 50 人。

表 4 学生满意度评价  
Table 4 Evaluation of student satisfaction

| 分组  | 满意/人 | 不满意/人 | 满意度/% | $\chi^2$ | $P$   |
|-----|------|-------|-------|----------|-------|
| 对照组 | 80   | 20    | 80    | 10.286   | 0.001 |
| 实验组 | 95   | 5     | 95    |          |       |

注: 每组均 100 人, 男女各 50 人。

## 4 小结

互联网+三明治教学法在教学设计上摒弃了教师的绝对优势地位, 最大限度给予学生自主学习空间, 环节设置有效遵循了学生的生理、心理需求, 取得的成绩显而易见, 两组学生的期末成绩及教学效果、满意度等均显示融入互联网的三明治教学优于传统三明治教学。

由于互联网+三明治教学法是一种新型的任

务驱动教学方式, 习惯于传统教授式的学生最初接触三明治教学时, 对于资料的搜集、讨论的角色分工会无所适从, 有限时间内可能处于无序低效状态。但一旦熟悉课程的流程设计, 高科技和网络的线上及线下学习的优势会逐步凸显, 有效克服学生的惰性, 变被动接受为主动探索, 教学过程会更加流畅化。在学习、讨论环节, 学生也会更加熟悉科研团队工作中不同角色的一般运作, 熟悉基本动物实验操作的流程和内容, 促进学生团队工作意识的建立。但若课程全部采用互联网+三明治教学法授课, 对于理论性较强的部分内容在教学设计过程中会增加难度, 一定程度上会降低学习效果, 故而不能完全摒弃传统教学方法, 应将互联网交互平台三明治教学法融入传统教学中, 实现教学模式的平稳过渡, 一方面使

学生易于接受, 锻炼思维切换的能力; 另一方面, 理论实践两手抓, 真正实现医学实验动物学人人可学、时时可学、处处可学, 为学生后续的专业知识积累奠定基础。

### 参考文献:

- [1] 黄林, 陈存武. 改进教学模式是应对高校课堂“低头族”现象的重要策略[J]. 黑河学院学报, 2018, 9(3):93-94. DOI:10.3969/j.issn.1674-9499.2018.03.045.
- [2] 曾霞, 王启辉, 唐深, 等. Sandwich 教学法在医学免疫学理论课课堂教学的应用及体会[J]. 教育现代化, 2020, 7(1):161-166.
- [3] 许瑜函, 朱慧, 谭梦晖, 等. “三明治”教学法设计下学生课堂参与分析[J]. 复旦教育论坛, 2016, 14(1): 107-112.
- [4] 王晓艳, 曲丽辉. “三明治”教学法在基础医学教学中的应用与效果评价体系的设计[J]. 中国高等医学教育, 2019(6):111-112. DOI:10.3969/j.issn.1002-1701.2019.06.058.
- [5] 胡尔西旦·阿布都米吉提, 乌都木丽, 阿仙姑·哈斯木. “互联网+”背景下病理学线上线下混合式教学实践[J]. 教育教学论坛, 2020(18):169-171.
- [6] 马钊, 黄海霞, 刘慧荣, 等. “互联网+”背景下的生理学网络教学[J]. 继续医学教育, 2018, 32(1):48-49. DOI: 10.3969/j.issn.1004-6763.2018.01.023.
- [7] 黄益玲, 韩莉, 何治, 等. 从学生视角看“三明治”教学法的效果和努力方向[J]. 教育教学论坛, 2019,(42): 189-190.
- [8] 马长玲, 袁竹青, 张雪雁, 等. “三明治”教学与传统教学相结合在病原生物学课程教学中的实践[J]. 广州医科大学学报, 2016, 44(1):80-82. DOI:10.3969/j.issn.1008-1836.2016.01.022.

(收稿日期: 2020-07-31 修回日期: 2020-10-30)

\*\*\*\*\*

## 《实验动物与比较医学》杂志有关实验动物福利伦理内容的说明

本刊是我国实验动物与比较医学领域的一本专业学术期刊, 严格遵守国家实验动物相关法律、法规和标准, 包括但不局限于《实验动物管理条例》(2017年3月1日修订版)和《实验动物 福利伦理审查指南》(GB/T 35892—2018)等, 同时参考借鉴国际生物医学期刊关于动物实验研究报告的相关指南共识(如ARRIVE 2.0、IGP 2012、IAVE Guidelines 2010等)。因此, 本刊对所有涉及动物实验的来稿均需审查实验动物福利与伦理相关内容。现将一些具体要求说明如下:

1. 涉及动物实验的来稿, 需提供实验动物生产许可证和质量合格证, 以及动物实验场所的实验动物使用许可证。以上证明须与使用动物种类及动物实验单位名称相匹配, 并在正文中列出其对应的许可证编号。

2. 涉及动物实验的来稿, 需在考虑3R(替代、减少和优化)原则的基础上设计动物实验, 并提供作者单位实验动物福利伦理委员会(或相关机构)出具的实验动物福利伦理审查批件。批件中所列内容须与投稿文章相吻合, 并在正文中列出对应的批准编号。

3. 实验动物的用药, 尤其是麻醉镇痛用药必须优先使用药用级麻醉剂, 特别是当涉及存活手术的动物实验时。鉴于无法确定非药用级麻醉剂(如三溴乙醇、水合氯醛等)的相关性状及对实验动物的影响, 从而不能保障实验动物福利及研究结果的可靠性, 而且目前已有更优的市售麻醉药剂可供选择, 因此本刊不建议使用上述试剂。如确需使用, 请提供充足理由说明及相应的批准文件。

4. 涉及肿瘤动物模型的研究, 本刊参考国内及国际通用准则, 建议单个肿瘤体直径不超过20 mm(小鼠)或40 mm(大鼠)且不出现明显的肿瘤溃疡。如投稿文章有超出上述标准的研究内容, 需提交作者单位相关肿瘤动物模型研究的指导原则文件, 以及从科学角度判断投稿文章中肿瘤体积合理性的依据材料。

《实验动物与比较医学》编辑部

2021年6月