

# Zmu-1;DHP 豚鼠部分生物学特性研究

刘迪文

(浙江大学医学院实验动物中心, 杭州 310031)

**摘要:** 为积累 Zmu-1;DHP 豚鼠的生物学特性资料, 本研究使用肥大细胞抗原攻击、补体溶血 CH50、流式细胞仪及病毒感染方法, 测定了豚鼠致敏肥大细胞对抗原的敏感性、血清总补体的活性、血液多形核白细胞的吞噬和呼吸爆发功能及对口蹄疫病毒的敏感性。结果显示, Zmu-1;DHP 豚鼠致敏肥大细胞的脱颗粒反应明显低于其它品系 ( $P < 0.01$ ), 血清补体含量大于其它品系 ( $P < 0.01$ ), 多形核白细胞的吞噬功能高于其它品系 ( $P < 0.05$ ), 而呼吸爆发功能低于其它品系 ( $P < 0.01$ ), 对口蹄疫病毒呈现 100% 的敏感性。表明 Zmu-1;DHP 豚鼠的生物学特征已不同于其它品系, 形成独特的遗传组成和生物学性状, 具有较高的应用优势及推广价值。

**关键词:** Zmu-1;DHP 豚鼠; 生物学特性; 肥大细胞; 补体; 多形核白细胞

中图分类号: R-332

文献标识码: A

文章编号: 0366-6964(2006)05-0492-04

## Study on Some Biological Characters of Zmu-1;DHP Guinea Pig

LIU Di-wen

(Laboratory Animal Centre, Medical College of Zhejiang University, Hangzhou 310031, China)

**Abstract:** To supply the biological data of Zmu-1;DHP guinea pig, the fragmentation reaction of the sensitized mast cell, the activity of total complement, the phagocytic and oxidative burst function of polymorphonuclear leukocytes, the sensitivity to FMDV in different guinea pig were studied by attacking mast cell by antigen, complement CH50, LCM and virus infection. The results showed that the fragmentation proportion of the mast cell in Zmu-1;DHP guinea pig was significantly lower than other strain ( $P < 0.01$ ), the content of complement of the strain was higher ( $P < 0.01$ ), the phagocytic rate of polymorphonuclear leukocytes of the strain was higher ( $P < 0.05$ ), but the oxidative burst activity of the strain was lower ( $P < 0.01$ ) than that of others. And 100% sensitivity to FMDV in Zmu-1;DHP guinea pig was presented. It is indicated that the strain appears the new biological character, and possesses the higher value in application.

**Key words:** Zmu-1;DHP guinea pig; biological character; mast cell; complement; polymorphonuclear leukocytes

豚鼠是免疫学和变态反应研究中常用的实验动物。随着生物医药科技及其产业的发展, 豚鼠使用量在不断增加。然而, 目前我国没有自主培育的豚鼠品系, 以往所用的豚鼠来源参差不齐, 遗传背景混杂, 影响了研究及试验结果。浙江大学医学院于 2000 年培育出 Zmu-1;DHP 豚鼠<sup>[1]</sup>, 克服了个体遗传差异大、试验反应不稳定等问题。经研究与 DHP 品系比较, 该豚鼠出现了某些特有的生物学性

状<sup>[2,3]</sup>, 在科研和药品生产中具有一定的优势。为了充分利用该动物资源, 扩大应用范围, 作者拟对 Zmu-1;DHP 豚鼠某些生物学特性进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

1.1.1 Zmu-1;DHP 豚鼠 普通级, 浙江大学医学

收稿日期: 2005-04-21

基金项目: 卫生部及浙江省卫生厅科研基金资助项目(98-2-323)

作者简介: 刘迪文(1958-), 男, 浙江杭州人, 副研究员, 主要从事实验豚鼠的遗传育种及生物学特性研究

院培育的全身白色毛豚鼠。培育过程:从中国医学科学院引进 DHP 白化豚鼠,与本中心 DHP 豚鼠(多数花毛)中挑选出的白毛个体杂交,而后每代采用近亲频密(同窝兄妹或亲子)繁殖,连续筛选白毛豚鼠、淘汰花毛豚鼠,培育至第 11 代时,群体内不再出现有色毛个体,表现毛色纯白、眼红、耳廓粉红色,以此组成新种群。以后采取随机(非近亲)交配法繁殖,培育出稳定遗传的白毛 Zmu-1:DHP 豚鼠。

1.1.2 DHP 品系 普通级,本校维持的花色毛豚鼠。1978 年引自于浙江北部农村,引进后长期封闭(非近亲)饲养繁殖。

1.1.3 复旦大学医学院实验动物科学部提供的 DHP 豚鼠(用于口蹄疫病毒攻毒试验)。在大部分呈现白色毛、少量花色毛的豚鼠群中,专门挑选白毛豚鼠用于本试验。

## 1.2 致敏豚鼠肥大细胞的脱颗粒反应

按文献[4]方法,收集用卵白蛋白 OVA 致敏豚鼠的腹腔肥大细胞,将每个样本分成 3 份细胞悬液,滴在载玻片上,分别加 0.25%、0.50% 和 1.00% 浓度的 OVA 抗原液攻击,混匀后 37 °C 置 15 min,使致敏肥大细胞充分破裂。然后在显微镜下随机计数 100 个肥大细胞,计算其中破裂(释放颗粒)肥大细胞的百分率。

## 1.3 正常豚鼠血清补体的 CH50

按文献[5]中试管法测定血清总补体 CH50 活性。其中溶血素由本校免疫研究所提供。

## 1.4 多形核白细胞的吞噬功能和呼吸爆发作用

在流式细胞仪专用圆底聚丙烯试管中加入 5  $\mu$ L DHR(罗丹明 123,购自 Sigma 公司)和 100  $\mu$ L 豚鼠抗凝血,37 °C 水浴振荡培养 5 min。然后以微球:白细胞数为 50:1 的比例,加入 25  $\mu$ L 桔黄色荧光乳胶微球(相当于  $2.5 \times 10^7$  个微球,购自 Poly-Science 公司),充分混合,37 °C 水浴振荡培养 60

min。对照管加同样剂量的 DHR、抗凝血和荧光微球,但不作 37 °C 孵育,置于冰浴中保存 60 min。

然后在试验管和对照管中加入 10 倍于反应液体积的含 0.02% EDTA 的 Tris(0.15 mol/L)-NH<sub>4</sub>Cl(0.16 mol/L)缓冲液(4 °C),放置 10 min,破裂红细胞。加入 3 mL PBS,1 000 g 离心 5min,去上清。再用 PBS 洗一次。在沉淀中加 200  $\mu$ L 含 0.02% EDTA 的 PBS 混悬细胞。用流式细胞仪(BD 公司)测定并计算样品中白细胞吞噬荧光微球的吞噬率及吞噬微球后产生的呼吸爆发力。每个样品共计数  $2 \times 10^5$  个白细胞。

## 1.5 对口蹄疫病毒(FMDV)的敏感性

取 Zmu-1:DHP 白毛及白爪豚鼠、DHP 花毛及白爪豚鼠、DHP 花毛及花爪豚鼠、复旦大学提供的 DHP 白毛及白爪豚鼠各 30 只,每种毛色豚鼠分成 3 组,每组 10 只。在中国农业科学院兰州兽医研究所(口蹄疫中心)和内蒙古金宇集团生物药厂 P3 实验室(农业部公认,符合国际标准的设施),用经过筛选毒力稳定的 3~5 代 FMDV SHF3 上海毒株进行攻毒。每组豚鼠分别按 1:10<sup>3</sup>、1:10<sup>4</sup>、1:10<sup>5</sup> 稀释的病毒培养液,每只豚鼠接种 0.2 mL 剂量的口蹄疫病毒,其中皮下注射 0.1 mL,蹠部划刺接种 0.1 mL。接种后 2~3 d 开始观察豚鼠发病情况,直至接种后 7~10 d。

## 2 结果

### 2.1 肥大细胞对抗原的敏感性

表 1 显示 2 种豚鼠腹腔肥大细胞对 OVA 攻击的脱颗粒反应性。从表 1 可见,OVA 的含量与肥大细胞脱颗粒率呈正相关的量效关系。在 OVA 同一水平上,Zmu-1:DHP 豚鼠肥大细胞的脱颗粒反应极显著地小于 DHP 品系豚鼠( $P < 0.01$ )。

表 1 豚鼠肥大细胞脱颗粒率

Table 1 Fragmentation proportion of the mast cell in sensitized guinea pig

豚鼠 Guinea pig	数量 Number	不同浓度 OVA 攻击后肥大细胞脱颗粒率 Fragmentation proportion of the mast cell/%		
		0.25%	0.50%	1.00%
Zmu-1:DHP	10	15.30±2.37*	21.50±2.66*	31.50±1.69*
DHP	12	29.92±1.66	38.00±1.68	49.83±2.27

同列数值,\*示  $P < 0.01$

The value in the same row,\*,  $P < 0.01$

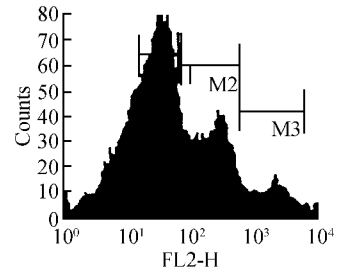
### 2.2 血清总补体活性

分别测定了两种豚鼠各 12 只样本的血清总补体活性 CH50。结果显示,Zmu-1;DHP 豚鼠血清补体 CH50 值为 (553±62) U/mL;DHP 豚鼠为 (413±98)U/mL,两者差异极显著( $P<0.01$ ),但各豚鼠性别间补体 CH50 活性无差异( $P>0.05$ )。另外,Zmu-1;DHP 豚鼠 CH50 值的变异系数小于 DHP 品系( $P<0.01$ )。

### 2.3 白细胞吞噬和呼吸爆发功能

图 1 显示流式细胞仪测定豚鼠多形核白细胞吞噬荧光微球的扫描图,从图 1 可见,1 个白细胞可以吞噬 1~3 个荧光微球,而吞噬微球的数量与吞噬相应微球的细胞数量呈反比,即吞噬微球量少的细胞数较多,吞噬微球量多的细胞较少。具体白细胞吞噬情况见表 2,Zmu-1;DHP 豚鼠白细胞总吞噬率大于 DHP

豚鼠,且主要表现吞噬 1 个微球的细胞数量较多。



M1、M2 和 M3 分别表示细胞吞噬和/或黏附 1、2 和 3 个微球,表 2、3 同

M1, M2 and M3 indicate respectively that phagocyte swallows and/or adheres 1, 2 and 3 microball, the same in table 2, 3

图 1 豚鼠多形核白细胞吞噬荧光微球示意

Fig. 1 Diagram of the polymorphonuclear leukocytes phagocytosis in guinea pig

表 2 豚鼠多形核白细胞的吞噬功能 (n=12)

Table 2 Phagocytic function of the polymorphonuclear leukocytes

豚鼠 Guinea pig	白细胞总吞噬率 Total phagocytic rate	白细胞吞噬不同数量微球的吞噬率 Phagocytic rate of the leukocytes engulfing various quantity of microballs		
		M1	M2	M3
Zmu-1;DHP	76.94±5.50*	50.82±4.61**	16.27±3.23	7.06±3.53
DHP	69.70±6.92	44.77±6.23	15.80±4.86	7.37±2.49

两种豚鼠间比较, \* .  $P<0.05$ ; \* \* .  $P<0.01$ , 表 3 同

Comparison between the two kinds guinea pig, \* .  $P<0.05$ ; \* \* .  $P<0.01$ , the same in table 3

表 3 反映了豚鼠多形核白细胞吞噬微球产生的呼吸爆发功能。从中可见,白细胞吞噬微球的数量与之产生的呼吸爆发力成正比。Zmu-1;DHP 豚鼠

白细胞总呼吸爆发力显著小于 DHP 豚鼠,主要表现为吞噬 3 个微球时产生的呼吸爆发力较小。

表 3 豚鼠多形核白细胞呼吸爆发的荧光强度 (n=12)

Table 3 Oxidative burst activity of the polymorphonuclear leukocytes

豚鼠 Guinea pig	白细胞总呼吸爆发力 Total oxidative burst activity	白细胞吞噬不同数量微球产生的呼吸爆发力 Oxidative burst activity of the leukocytes engulfing various quantity of microballs		
		M1	M2	M3
Zmu-1;DHP	1 546.49±63.17*	32.76±1.19	143.35±18.52	1 370.38±68.28**
DHP	1 820.95±235.20	31.40±1.17	154.97±27.95	1 634.58±234.70

### 2.4 FMDV 对不同豚鼠的致病性

共进行了 10 批次豚鼠 FMDV 接种试验,结果 Zmu-1;DHP 白毛白爪豚鼠的发病率和死亡率最高,达 100%;DHP 花毛白爪豚鼠次之,为 90%~100%,且批次间差异大;复旦大学白毛白爪豚鼠第 3,为 90%;而 DHP 花毛花爪豚鼠对 FMDV 不敏感,发病率和死亡率为 0%。Zmu-1;DHP 豚鼠和 DHP 花毛花爪豚鼠发病率及死亡率在各批次间无

差异。说明 Zmu-1;DHP 豚鼠对 FMDV 呈现高敏感性,与 DHP 花毛花爪豚鼠的抵抗力形成两个极端。豚鼠发病的症状是发热、口蹄部出现水泡、精神萎靡、食欲废绝,直至死亡。

## 3 讨论

### 3.1 肥大细胞脱颗粒反应

肥大细胞是参与机体变态或过敏反应的炎性细

胞,细胞内富含引起机体过敏的组胺等介质。原则上讲,肥大细胞的脱颗粒率与机体产生过敏性反应的强弱有关。本研究结果显示,Zmu-1:DHP 豚鼠致敏肥大细胞释放内源性组胺的功能比 DHP 豚鼠低,产生过敏性反应可能较弱。

### 3.2 血清补体的 CH50

补体系统是非特异性免疫的重要因素之一,具有调节免疫细胞的功能。测定血清补体的含量,有助于评价机体天然免疫的能力。据报道,人血清总补体活性  $CH_{50} = 50 \sim 100 \text{ U/mL}$ 。本研究显示 Zmu-1:DHP 豚鼠的补体活性远高于人和其它品系豚鼠,表明该豚鼠补体系统的免疫功能可能较好。

### 3.3 多形核白细胞的吞噬及呼吸爆发功能

白细胞吞噬功能反映了机体非特异性防御功能。白细胞吞噬异物后释放大酶,产生氧化还原反应,用来消化和清除异物,该过程称为“呼吸爆发”。本研究以荧光微球代替标记的细菌作吞噬物,用流式细胞法测定白细胞的吞噬功能和呼吸爆发力。胡松华介绍了该方法<sup>[6]</sup>,并摸索出试验条件。本研究将该方法用于动物白细胞吞噬和呼吸爆发功能的指标定量,为今后研究白细胞免疫功能和免疫药物的药效作用打下基础。结果显示,Zmu-1:DHP 豚鼠白细胞吞噬功能显著大于 DHP 豚鼠。有学者指出补体起着调理素作用,能分别结合异物和白细胞,促进吞噬白细胞对异物的吞噬作用<sup>[7]</sup>。Zmu-1:DHP 豚鼠白细胞吞噬功能较强的特性,可能与该豚鼠血清补体活性较高有关。Zmu-1:DHP 豚鼠只有少数白细胞(吞噬 3 个微球)的呼吸爆发力较 DHP 豚鼠低,所以总的呼吸爆发功能两者差别不是很大。

### 3.4 不同豚鼠对口蹄疫病毒的敏感性

在研发和生产口蹄疫疫苗过程中,豚鼠是较佳的模型动物。但以前由于没有注意豚鼠毛色与 FMDV 敏感性关系的问题,在用豚鼠作口蹄疫疫苗保护性研究中,如果将白色毛和花色毛豚鼠混用,易引起疫苗保护组和阳性对照组豚鼠死亡率参差不齐,不能真实反映豚鼠对病毒的感染性,影响口蹄疫疫苗保护率等评价的准确性。具体地讲,由于花色豚鼠对 FMDV 不敏感,试验组疫苗即使效价很低或失效,起不到保护作用,豚鼠也不会发病死亡。另外,将致使阳性对照组豚鼠起不到阳性对照作用。这些问题可能导致对疫苗效果误判,造成严重的后果。

由此可见,培育并研究一种对 FMDV 呈 100% 敏感的动物模型,替代不敏感的花色毛豚鼠用于

FMDV 及其疫苗的研究是十分重要和必要的。本研究结果表明,Zmu-1:DHP 豚鼠个体对 FMDV 呈现 100% 敏感,用作 FMDV 阳性对照、检定口蹄疫疫苗的效果十分可靠,其检验结果完全能反映 FMDV 疫苗的保护率。作者用其他单位的白毛白爪豚鼠进行对照,发现其敏感性也只有 90% 左右,证明 Zmu-1:DHP 豚鼠经过近交培育,对 FMDV 的敏感基因得以纯合。因此,作者发现豚鼠毛色与 FMDV 敏感性之间关系的规律,并建立 Zmu-1:DHP 豚鼠对 FMDV 敏感的动物模型,解决了因动物而影响 FMDV 疫苗效价和活病毒毒力测试的问题,为检测 FMDV 疫苗提供了有效的实验材料和手段,对研究 FMDV 病毒的特性和相应疫苗的开发具有现实的意义。

Zmu-1:DHP 豚鼠对 FMDV 具有较高的敏感性,如何探索和应用这些病毒敏感或抵抗基因和基因产物需要进一步开展相关工作。据报道,主要组织相容性抗原基因与免疫反应基因 Ir 连锁,决定机体对疾病的敏感性或抵抗性<sup>[8]</sup>。由此推测,Zmu-1:DHP 豚鼠可能形成对 FMDV 高度敏感的主要组织相容性抗原 GLA 基因类型和免疫机制。

总之,Zmu-1:DHP 豚鼠的某许多特性已不同于其它品系豚鼠。在今后进行科学研究中某些特性是非常有用的。

### 参考文献:

- [1] 郭汉身,刘迪文,傅 军. DHP 白化豚鼠杂交后的生长与繁殖性能[J]. 上海实验动物科学,1994,14(1):34~36.
- [2] 刘迪文,郭汉身. 两个品系豚鼠对化学介质诱导产生气道反应的差异性研究[J]. 中国实验动物学报,2002,10(2):91~95.
- [3] 刘迪文,郭汉身,傅 军. Zmu-1:DHP 豚鼠生化基因位点多态性的研究[J]. 上海实验动物科学,1998,18(3,4):129~132.
- [4] 浙江医科大学平喘药物研究室. 平喘药实验方法学的研究(自编资料)[M]. 杭州:浙江省医学情报研究所.
- [5] 朱立平,陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京:人民军医出版社,2000.
- [6] 胡松华,Johannisson A. 流式细胞仪测定奶牛全血多形核白细胞的吞噬功能和呼吸爆发作用[J]. 中国兽医学报,2001,21(60):586~588.
- [7] 林学颜,张 玲. 现代细胞与分子免疫学[M]. 北京:科学出版社,2000.
- [8] 施新猷,王四旺,顾为望. 比较医学[M]. 陕西:陕西科学技术出版社,2003.