文章编号:1000-5404(2014)02-0105-05

论著

Core 2 和 Core 4 O-型糖链参与大肠杆菌对肠上皮细胞的黏附与侵袭

刘 韵,叶 钧,宋丽丽,田 音,潘 琼,彭志红,汪荣泉 (400038 重庆,第三军医大学西南医院全军消化病研究所)

[摘要] **目的** 探讨大肠杆菌对 Core 2 和 Core 4 O-型糖链合成障碍的肠上皮细胞的黏附和侵袭的影响。**方法** 采用针对 C2GnT-2 的干扰质粒和对照质粒对结肠癌 HT-29 细胞进行转染,通过 G418 筛选建立稳定转染的细胞系,采用Real-time PCR 和 Western blot 方法检测干扰效率,选取干扰最有效的稳定细胞系与肠致病性大肠杆菌(enteropathogenic *Escherichia coli*,EPEC)和肠出血性大肠杆菌(EHEC O157:H7)37 ℃共培养。最后采用系列稀释克隆计数法观察干扰 Core 2 和 Core 4 O-型糖链合成的 C2GnT-2 的 HT-29 细胞对细菌黏附及侵袭的影响。**结果** 成功筛选获得 shRNA-C2GnT-2 及 shRNA-Ctr 稳定转染的 HT-29 细胞。Real-time PCR 和 Western blot 检测证实干扰质粒能够有效地抑制 HT-29 细胞内 C2GnT-2 的 mRNA 及蛋白水平表达($P<0.01$),黏附于 shRNA-C2GnT-2/HT-29 细胞表面的 EPEC 或 EHEC O157:H7的数量较对照细胞显著减少($P<0.01$,$P<0.05$),而侵袭入 shRNA-C2GnT-2/HT-29 细胞内的 EPEC 或 EHEC O157:H7的数量较对照细胞显著增加($P<0.01$,$P<0.05$)。**结论** Core 2 和 Core 4 O-型糖链参与了肠上皮细胞细菌的黏附与侵袭。

[关键词] 黏蛋白;大肠杆菌;O-型糖链;C2GnT-2;细胞黏附;侵袭
[中图法分类号] R322.45;R363;R378.21 [文献标志码] A

Core 2 and Core 4 O-glycan chains participate in adhesion and invasion of *E. coli* to intestinal epithelial cells *in vitro*

Liu Yun, Ye Jun, Song Lili, Tian Yin, Pan Qiong, Peng Zhihong, Wang Rongquan (Institute of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] Objective To determine the effect of mucin type Core 2 and Core 4 O-glycans on the *E. coli* adhesion and invasion to intestinal epithelial cells. Methods Colon cancer epithelial HT-29 cells were transfected with shRNA-C2GnT-2 interfering plasmid and shRNA-Ctr control plasmid, respectively. A stably-transfected cell line was established by G418 screening. C2GnT-2 interfering efficiency was confirmed by real-time PCR and Western blotting. The stably-transfected cell line having best interfering effects was incubated with enteropathogenic *E. coli* (EPEC) or enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC O157:H7). Serial dilution cloning counting was applied to evaluate the effects of Core 2 and Core 4 O-glycan deficiency on *E. coli* adhesion and invasion to intestinal epithelial cells. Results The shRNA-C2GnT-2 and shRNA-Ctr stably-transfected HT-29 cells were obtained by screening with G418. Real-time PCR and Western blot results displayed that C2GnT-2 interfering could effectively inhibit C2GnT-2 expression in HT-29 cells at both mRNA and protein levels ($P<0.01$). Adhesion of EPEC or EHEC O157:H7 to shRNA-C2GnT-2/HT-29 cells was significantly decreased as compared to shRNA-Ctr/HT-29 or HT-29 cells ($P<0.01$ or $P<0.05$), while the numbers of EPEC or EHEC O157:H7 invaded into the shRNA-C2GnT-2/HT-29 cells were significantly higher than those into shRNA-Ctr/HT-29 or HT-29 cells ($P<0.01$ or $P<0.05$). Conclusion Core 2 and Core 4 O-glycan chains participate in the adhesion and invasion of EPEC or EHEC O157:H7 to intestinal epithelial cells.

[**Key words**] mucin; *E. coli*; O-glycan; C2GnT-2; cell adhesion; invasion

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81170340). Corresponding author: Wang Rongquan, Tel: 86-23-68754124, E-mail: rongquanw@hotmail.com

肠道黏液屏障是机体胃肠道接触外部环境的一线防御屏障。黏蛋白是肠黏液屏障的重要组成部分,其分子特点之一是黏蛋白分子内随机重复序列(VNTR)内高丰度的丝氨酸、苏氨酸和脯氨酸位点上 O-型糖链。因此,高度 O 型-糖基化的 VNTR 成为胃肠道黏蛋白与胃肠腔内细菌、病毒、寄生虫和毒素接触的一线屏障。目前已有研究表明,部分特定的糖链可以成为病原微生物定植于黏液层的位点,成为联结细胞与环境

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81170340)
[通信作者] 汪荣泉,电话:(023)68754124,E-mail:rongquanw@hotmail.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20130922.1725.007.html(2013-09-22)

相互交通信号的一个生物平台[1-2]。某些O-型糖链是作为一些细菌表面的黏附素连接到细胞表面的配体[3]。肠道黏蛋白MUC2的O-糖基化的改变与炎症性肠病的炎症程度存在密切相关[4]。但是,黏蛋白上的O-型糖链与病原微生物之间的相互作用机制目前并不清楚。

O-型糖链根据连接在丝氨酸、苏氨酸和脯氨酸分子上的单糖分子及糖化模式的不同可以分为Core 1、Core 2、Core 3和Core 4四种不同的黏蛋白型的O-型糖链[5]。O-型糖链的合成是由特异的糖基转移酶(GalNAc-Ts)所决定。Core 2是由β1,6-N-乙酰氨基葡萄糖转移酶(C2GnTs)催化形成的,广泛表达于哺乳动物细胞中,C2GnTs包括3个同工酶,C2GnT-1、C2GnT-2及C2GnT-3,其中C2GnT-1存在于包括淋巴结和骨髓等各组织中,其有助于选择素配体形成,可通过调节中性粒细胞改变循环丰富的造血功能,C2GnT-3在结肠组织中几乎是检测不到的,它可以改变广泛存在于血液循环中甲状腺素(T4)的行为表型[4],C2GnT-2主要表达于胃、结肠和小肠中,它不仅是形成Core 2和Core 4最主要的酶,而且是形成分支糖链必不可少的。

本课题组前期应用benzyl-N-acetyl-α-D-galactosaminide (benzyl-α-GalNAc)来抑制黏蛋白O-型糖链的延长及其合成,但是它同时影响了Core 1、Core 2、Core 3和Core 4四种O-型糖链[6],不能鉴别是哪一种类型的O-型糖链赋予黏蛋白的生物学意义。因此,本研究对结肠癌HT-29细胞进行C2GnT-2的RNA干扰并建立稳定转染的细胞系,通过肠致病性大肠杆菌(enteropathogenic *Escherichia coli*,EPEC)和肠出血性大肠杆菌(EHEC O157:H7)对C2GnT-2干扰后的HT-29黏附及侵袭,来观察大肠杆菌对Core 2和Core 4 O-型糖链合成障碍的肠上皮细胞细菌的黏附和侵袭的影响。

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

人结肠癌细胞株HT-29购自上海中科院细胞库,庆大霉素购自西南药业股份有限公司;TritonX-100购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司;致病性大肠杆菌EPEC和出血性大肠杆菌EHEC O157:H7由第三军医大学医学检验系临床微生物与免疫学教研室毛旭虎教授赠送,Macoy's 5A培养基购自Sigma公司,胰蛋白酶(trypsase)、胎牛血清(FBS)均购自Hyclone公司,Lipofectamine 2000和Trizol试剂均购自Invitrogen公司,逆转录和荧光定量PCR试剂盒购自大连宝生物工程有限公司,抗C2GnT-2多克隆抗体购自Sigma公司,CO_2恒温培养箱购自美国Thermo公司,PCR仪和凝胶成像系统均购自美国Bio-Rad公司。

1.2 质粒构建与测序

shRNA-C2GnT-2/EGFP质粒以及对照质粒shRNA-control/EGFP由武汉市晶赛生物工程有限公司合成,C2GnT-2干扰序列分别为GCTTAGAAGAATACCTACGTT、AGTACTGTAGGAATATCTT、GCTGCTATTAGATTGTGGG,分别命名为C2GnT-2-sh1、C2GnT-2-sh2、C2GnT-2-sh3。然后将质粒进行测序,结果表明所获得的干扰质粒目的片段与预期完全相符 。

1.3 细胞培养、质粒转染以及稳定转染细胞系的建立

HT-29细胞培养、质粒转染及稳定细胞系筛选方法参照文献[7]报道,G418筛选并维持稳定转染细胞的培养(HT-29细胞:G418筛选浓度为700 μg/mL,维持浓度为400 μg/mL),筛选3~4周后,肉眼可见培养皿底部有细胞克隆形成,激光显微镜下观察克隆的绿色荧光蛋白表达情况,挑取阳性克隆并进行扩大培养,分别建立shRNA-C2GnT-2/HT-29、shRNA-Ctr/HT-29稳定转染的细胞系。

1.4 Real-time PCR验证干扰效果

shRNA-C2GnT-2/HT-29、shRNA-Ctr/HT-29及HT-29细胞RNA的提取及逆转录方法参照文献[7]。荧光定量PCR引物由大连宝生物生物工程有限公司合成,编码C2GnT-2的Gcnt3的正向引物为:5′-GCTTCCCGAGATTTCGTCCA-3′,反向引物为:5′-AACAGAGCCAGGCATCCACC-3′,产物长度138 bp;GAPDH的正向引物为:5′-GTAGAGGCAGGGATGATGTTCT-3′,反向引物为:5′-CTTTGGTATCGTGGAAGGACTC-3′,产物长度132 bp。荧光定量PCR采用两步法,反应条件为:95 ℃×2 min,95 ℃×5 s,60 ℃×20 s 40个循环。

1.5 Western blot验证干扰效果

shRNA-C2GnT-2/HT-29、shRNA-Ctr/HT-29及HT-29细胞蛋白的提取及BCA法定量蛋白浓度具体方法参照文献[7],各孔上样20 μg,电泳,电转,用含5% BSA的蛋白奶粉室温封闭2 h,加入兔来源的C2GnT-2一抗(1∶1 000),4 ℃过夜,用TBST洗膜3次,每次10 min,加人辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗(1∶1 000),室温孵育70 min,洗膜20 min×4次,免疫复合物经化学发光显色,凝胶成像仪成像。

1.6 黏附实验

将处于对数生长期的shRNA-C2GnT-2/HT-29、shRNA-Ctr/HT-29稳定转染的细胞系及HT-29细胞3种细胞接种于24孔板,直至细胞生长融合至单层时,PBS清洗3次,加入无血清的Macoy's 5A培养基,37 ℃培养1 h,使其适应无血清培养基,用将新鲜接种在MacConkey平板上的EPEC和EHEC O157:H7,分别挑取单克隆于Penassay肉汤培养基中37 ℃过夜培养增殖。将孵育好的EPEC和EHEC O157:H7细菌分别按10^6 CFU/0.1 mL PBS, pH=7.4加入24孔板各孔,37 ℃共孵育3 h。用冷PBS(pH=7.4)清洗共孵育的每孔细胞,以去除未黏附于细胞表面的细菌并抑制细菌的再黏附。然后将胰酶消化下来的每孔黏附细菌的细胞,按梯度稀释法在MacConkey琼脂板上37 ℃过夜。用菌落计数法定量黏附于细胞表面的细菌数目。

1.7 细菌侵袭实验

细胞侵袭实验参照文献[8]。将处于对数生长期的shRNA-C2GnT-2/HT-29、shRNA-Ctr/HT-29稳定转染的细胞系及HT-29细胞3种细胞消化、离心,接种于24孔培养板,当细胞融合至单层时,用PBS清洗3次,加入无血清的Macoy's 5A培养基,37 ℃培养2 h,使其适应无血清培养基,在每个培养孔中分别加入EPEC和EHEC O157:H7(10^6 CFU/0.1 mL PBS, pH=7.4),37 ℃共孵育2 h。用冷PBS(pH=7.4)清洗3次,以去除未黏附的EPEC、EHEC O157:H7,并抑制黏附的细菌进一

步生长繁殖;加入含 100 μg/mL 庆大霉素的培养基,37 ℃培养 2 h,以彻底杀灭细胞外及黏附于细胞表面的细菌,再用冷 PBS (pH=7.4)清洗 3 次,每次 5 min,然后每孔加入 200 μL 0.25% 的胰酶和 0.025% TritonX-100(1∶4),37 ℃孵育 10 min,以破裂单层细胞和释放出胞内的细菌。最后,按梯度稀释涂在 MacConkey 琼脂板上,37 ℃静置过夜,用菌落计数法定量侵袭入细胞内的细菌数目。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,各组间比较采用单因素方差分析。

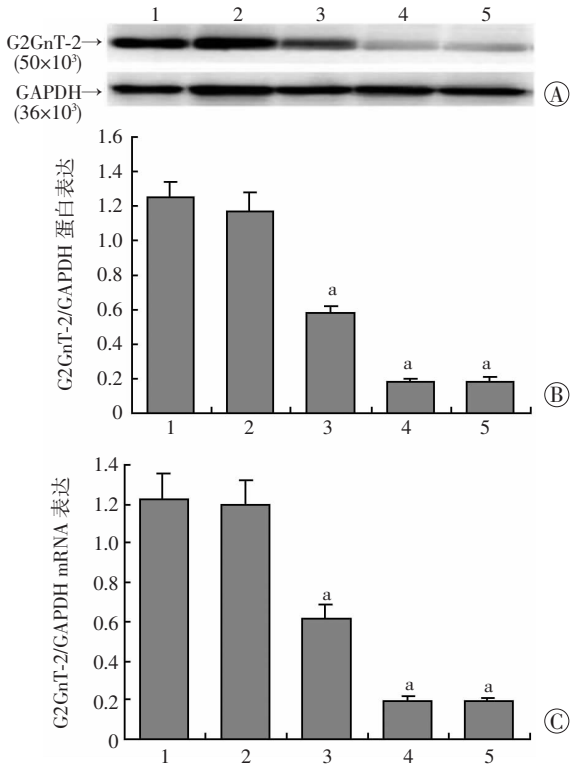
2 结果

2.1 质粒转染及稳定转染细胞系的建立

激光共聚焦显微镜观察结果显示:shRNA-C2GnT-2/EGFP 和 shRNA-control/EGFP 质粒转染 48 h 后,转染效率均低于 10%。进一步进行 G418 筛选稳定转染的细胞,4 周后形成稳定转染的单克隆细胞,挑选出阳性克隆后扩大培养,将流式分选出的阳性细胞进一步扩增培养。将得到的细胞分别命名为 shRNA-C2GnT-2/HT-29、shRNA-Ctr/HT-29。

2.2 C2GnT-2 干扰效果的检测

Real-time PCR 和 Western blot 结果(图 1)均显示,与未转染的(HT-29)和转染对照质粒(shRNA-Ctr/HT-29)细胞相比较,shRNA-C2GnT-2/HT-29 细胞内的 mRNA 和蛋白质的表达均明显减少($P<0.01$)。

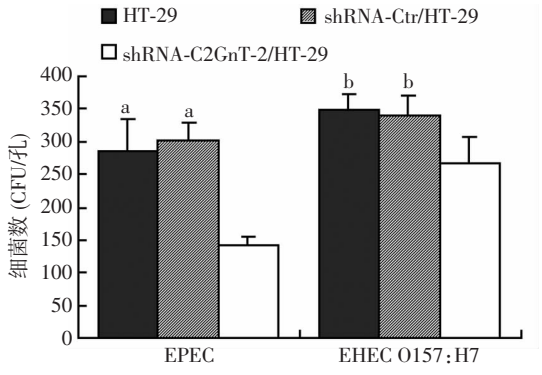


1:HT-29;2:shRNA-Ctr/HT-29;3:C2GnT-2-sh1;4:C2GnT-2-sh2;5:C2GnT-2-sh3;a:$P<0.01$,与 HT-29 及 shRNA-Ctr/HT-29 比较
A:Western blot 检测结果;B:C2GnT-2 蛋白半定量分析;C:Real-time PCR 定量分析 C2GnT-2 mRNA

图 1　HT-29 细胞经 C2GnT-2 干扰后细胞内 C2GnT-2 mRNA 及蛋白表达

2.3 细菌黏附实验

结果如图 2 所示,黏附于 shRNA-C2GnT-2/HT-29 细胞表面的大肠杆菌 EPEC 和 EHEC O157∶H7 的细菌数量明显少于 shRNA-Ctr/HT-29 和 HT-29 细胞($P<0.01$,$P<0.05$)。

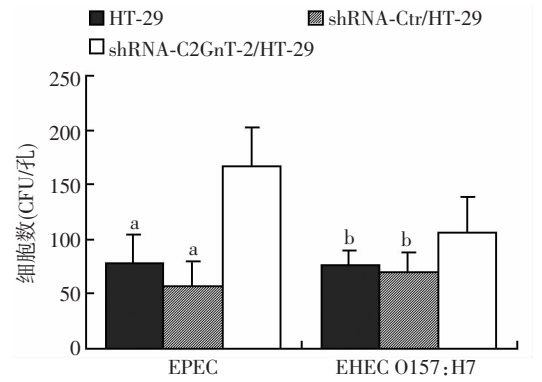


a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 shRNA-C2GnT-2/HT-29 比较

图 2　黏附于 shRNA-C2GnT-2/HT-29 细胞表面的 EPEC 及 EHEC O157∶EHEC 数量

2.4 细菌侵袭实验

结果如图 3 所示:侵袭入 shRNA-C2GnT-2/HT-29 细胞内的大肠杆菌 EPEC 或 EHEC O157∶H7 比侵袭入 shRNA-Ctr/HT-29 及 HT-29 细胞明显多($P<0.01$,$P<0.05$)。



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$,与 shRNA-C2GnT-2/HT-29 比较

图 3　侵袭入 shRNA-C2GnT-2/HT-29 细胞内的 EPEC 及 EHEC O157∶H7数量

3 讨论

人体肠道内栖息着大量正常的微生物,这些微生物在长期进化过程中和宿主形成了共生关系。正常情况下并不损害机体健康,这完全依赖于机体完整的肠黏膜屏障功能。黏蛋白是肠黏液屏障的主要组成部分,黏蛋白的功能与其分子上的 O-型糖链密切相关,该类分子的翻译后糖基化在调节真核生物的生物功能中起着关键的作用。黏蛋白 O-糖基化是一个翻译后修饰的过程,广泛存在于生理过程中,包括细胞黏附、交换、T 细胞凋亡、细胞信号转导、细胞内吞作用以及宿主与病原体的相互作用等[9-15]。黏液屏障受损将导致多种疾病的发生,如肠源性感染或非感染性的溃

疡性结肠炎等。

目前,关于O-糖基化的研究主要采用敲除动物模型,如敲除小鼠C2GnT-2后增加肠黏膜的通透性,导致患结肠炎的易感性增加[16]。又如敲除Core 1 β1-3-半乳糖转移酶(T-synthase)导致动物Core 1来源的O-Glycan的缺失,增加自发性肠炎的易感性[17]。虽然目前已经有敲除动物模型,但是O-糖基化涉及60%的真核生物的蛋白质,缺失各个相应的糖基转移酶所影响的蛋白质底物是非常庞大的,最终导致敲除基因的动物呈现出复杂的生物学行为改变,不完全局限在肠道黏液屏障,同时引起血液系统、免疫系统及其包括肝脏等脏器的结构和功能的改变,还有可以引起涉及蛋白质的修饰、转运、分泌的蛋白质也受O-糖基化改变的影响[18]。本研究在细胞水平观察黏蛋白上的O-型糖链与病原微生物之间的相互作用,克服了O-glycan缺陷动物模型的多器官、多细胞、多蛋白及其蛋白合成多阶段的影响。

本课题组前期的相关研究[8]发现用O-型糖链抑制剂对其延长及合成进行抑制后,大肠杆菌EPEC及EHEC O157:H7黏附于肠细胞的数目是明显减少的,而侵袭入细胞内的细菌数目是明显增加的,同时检测MUC2的表达水平也是减少的,表明O-型糖链在与病原微生物之间的相互作用上是发挥了重要作用的[8],但是,O-型糖链包括Core 1、Core 2、Core 3和Core 4四种,具体是哪个糖链分支起主要作用尚不清楚。因此,本研究就此探讨了Core 2和Core 4与EPEC或EHEC O157:H7相互作用的研究,对合成Core 2和Core 4 O-型糖链结构的关键糖基转移酶C2GnT-2进行干扰,从而抑制HT-29细胞内的Core 2和Core 4 O-型糖链的合成,我们发现,shRNA-C2GnT-2/HT-29与shRNA-Ctr/HT-29及HT-29细胞相比,大肠杆菌EPEC或O157:H7对干扰组细胞的黏附是明显减少的,而对其细胞内的侵袭是明显增加的,而黏附减少的细菌数量正好与侵袭入细胞内细菌数量相一致。上述结果提示Core 2和Core 4 O-型糖链参与了肠上皮细胞的细菌黏附与侵袭。

黏蛋白上的O-型糖链与病原微生物之间的相互作用机制尚未得到明确阐释,结合我们前期的研究结果考虑可能是Core 2和Core 4 O-型糖链缺失后,黏蛋白以及肠黏液屏障受到一定程度的损害,从而使细菌定植于细胞表面的位点减少,侵袭入细胞内的细菌增加。文献[4,19-20]指出,炎症性肠病包括溃疡性结肠炎与黏膜屏障功能下降相关,由C2GnT-2产生的Core 2 O-型糖链及Core4 O-型糖链所形成的上皮黏膜屏障减少了结肠炎的发生,说明C2GnT-2在形成或维持肠黏膜屏障中起着重要作用。MUC2是一种分泌性黏蛋白,是结肠黏液层的主要组成部分,合成Core 3的C3GnT的缺失会导致MUC2表达的减少,而缺失C2GnT-2后MUC2的表达并没有减少[4,21],这可能意味着炎症性肠病的易感性也许与MUC2的表达没有关系,而是与共生菌、致病菌以及改变免疫系统的稳态有关,或者说与其他黏蛋白表达相关,如MUC17,它是一种跨膜性黏蛋白。研究[22-23]表明,MUC17在大肠杆菌黏附和侵袭肠细胞系和维持肠上皮功能上都起了作用,它通过限制微生物对上皮细胞表面的黏附和侵袭,可以有效阻碍细菌和病毒侵入细胞内,阻止其蔓延至黏膜表面及限制微生物产生到黏膜细胞的毒素数量,从而减少跨上皮电阻的损失和增加细胞的通透性。

本研究通过细菌黏附和侵袭实验来探讨O-型糖链中的Core 2和Core 4糖链分支与大肠杆菌之间的相互作用,虽然目前这两种技术是比较常规的,但是应用于O-型糖链的研究还未见报道。如果能从组织学、粘液组织化学及电子显微镜技术等动态观察EPEC或EHEC O157:H7对结肠癌细胞HT-29的黏附、侵袭过程将会使结果更加精确。在未来的工作中我们将进一步完善相关研究,从而为其作用机制的探索提供更有力的证据。

参考文献:

[1] Celli J P, Turner B S, Afdhal N H, *et al*. Helicobacter pylori moves through mucus by reducing mucin viscoelasticity[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2009, 106(34): 14321-14326.

[2] Linden S K, Sheng Y H, Every A L, *et al*. MUC1 limits Helicobacter pylori infection both by steric hindrance and by acting as a releasable decoy[J]. PLoS Pathog, 2009, 5(10): e1000617.

[3] Larsson J M, Karlsson H, Crespo J G, *et al*. Altered O-glycosylation profile of MUC2 mucin occurs in active ulcerative colitis and is associated with increased inflammation[J]. Inflamm Bowel Dis, 2011, 17(11): 2299-2307.

[4] Stone E L, Ismail M N, Lee S H, *et al*. Glycosyltransferase function in core 2-type protein O glycosylation[J]. Mol Cell Biol, 2009, 29(13): 3770-3782.

[5] Lee S H, Yu S Y, Nakayama J, *et al*. Core2 O-glycan structure is essential for the cell surface expression of sucrase isomaltase and dipeptidyl peptidase-IV during intestinal cell differentiation[J]. J Biol Chem, 2010, 285(48): 37683-37692.

[6] Ricciuto J, Heimer S R, Gilmore M S, *et al*. Cell surface O-glycans limit Staphylococcus aureus adherence to corneal epithelial cells[J]. Infect Immun, 2008, 76(11): 5215-5220.

[7] 李晓桓, 朱蓉, 田音, 等. 干扰结肠癌上皮细胞Ascl2的表达致其向杯状细胞表型分化[J]. 第三军医大学学报, 2012, 34(19): 1936-1939.

[8] 叶钧, 宋丽丽, 刘韵, 等. 肠分化细胞黏蛋白O-型糖链合成抑制导致MUC2表达减低以及对细菌侵袭易感[J]. 第三军医大学学报, 2013, 35(19): 2056-2059.

[9] Altschuler Y, Kinlough C L, Poland P A, *et al*. Clathrin-mediated endocytosis of MUC1 is modulated by its glycosylation state[J]. Mol Biol Cell, 2000, 11(3): 819-831.

[10] Baum L G. Developing a taste for sweets[J]. Immunity, 2002, 16(1): 5-8.
[11] Kawakubo M, Ito Y, Okimura Y, *et al*. Natural antibiotic function of a human gastric mucin against Helicobacter pylori infection[J]. Science, 2004, 305(5686): 1003-1006.
[12] Lowe J B. Glycosylation, immunity, and autoimmunity[J]. Cell, 2001, 104(6): 809-812.
[13] Stanley P. Regulation of Notch signaling by glycosylation[J]. Curr Opin Struct Biol, 2007, 17(5): 530-535.
[14] Varki A. Nothing in glycobiology makes sense, except in the light of evolution[J]. Cell, 2006, 126(5): 841-845.
[15] Zachara N E, Hart G W. Cell signaling, the essential role of O-GlcNAc![J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1761(5/6): 599-617.
[16] Ismail M N, Stone E L, Panico M, *et al*. High-sensitivity O-glycomic analysis of mice deficient in core 2 {beta}1, 6-N-acetylglucosaminyltransferases[J]. Glycobiology, 2011, 21(1): 82-98.
[17] Fu J, Wei B, Wen T, *et al*. Loss of intestinal core 1-derived O-glycans causes spontaneous colitis in mice[J]. J Clin Invest, 2011, 121(4): 1657-1666.
[18] Fu J, Gerhardt H, McDaniel J M, *et al*. Endothelial cell O-glycan deficiency causes blood/lymphatic misconnections and consequent fatty liver disease in mice[J]. J Clin Invest, 2008, 118(11): 3725-3737.
[19] Mankertz J, Schulzke J D. Altered permeability in inflammatory bowel disease: pathophysiology and clinical implications[J]. Curr Opin Gasteroenterol, 2007, 23(4): 379-383.
[20] Marth J D, Grewal P K. Mammalian glycosylation in immunity[J]. Nat Rev Immunol, 2008, 8(11): 874-887.
[21] An G, Wei B, Xia B, *et al*. Increased susceptibility to colitis and colorectal tumors in mice lacking core 3-derived O-glycans[J]. J Exp Med, 2007, 204(6): 1417-1429.
[22] Hollingsworth M A, Swanson B J. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface[J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(1): 45-60.
[23] Lievin-Le Moal V, Servin A L. The front line of enteric host defense against unwelcome intrusion of harmful microorganisms: mucins, antimicrobial peptides, and microbiota[J]. Clin Microbiol Rev, 2006, 19(2): 315-337.

(**收稿**:2013-08-01;**修回**:2013-09-09)
(编辑 王 红)

(上接 104 页)

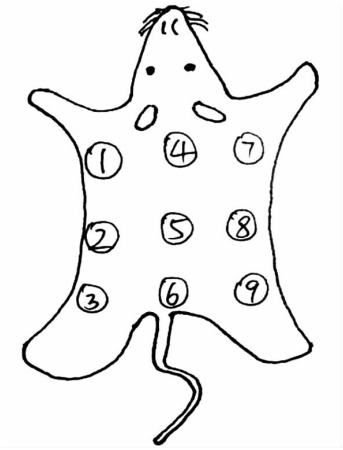


图 1 剪毛法标记实验大鼠分区示意图

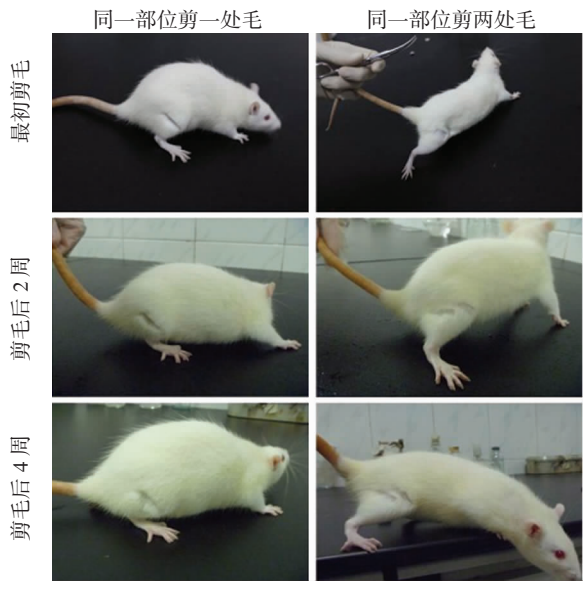


图 2 剪毛法标记实验大鼠不同时间标记效果

2 讨论

新型标记方法简单、方便、快捷。该方法在标记时所需材料仅为一把弯剪,无需其他耳标、金属编码打孔机等特殊器械、染色剂等。操作简便,大鼠依从性好,无需麻醉。在相应部位剪去适量的毛发就可以完成标记。且该方法特别适用于 10 只以下的大鼠的标记,值得应用。

新型标记方法易识别、持久。该方法标记的大鼠具有易识别的特点,且至少可以持续 4 周,仍然可以非常容易地识别大鼠的编号,减少了平时的工作量,且无需担心传统标记法如染色、标签等方法出现脱色、标签脱落而导致分组混淆等影响实验的情况。

新型标记方法标记量大。按照该标记方法的原则,可以标记 99 只大鼠。在此期间,我们还想到了采用每个部位只剪一处,通过剪的部位的不同和同时剪毛部位的数量来区分,这样可以达到 $C_9^0+C_9^1+C_9^2+C_9^3+C_9^4+C_9^5+C_9^6+C_9^7+C_9^8+C_9^9=(C_9^0+C_9^1+C_9^2+C_9^3+C_9^4)\times 2=512$ 只。但是,该方法复杂,实验大鼠数量越大,剪毛之处越多,最多时九处都剪毛。且动物编号复杂,需做好记录,大鼠编号难一眼识别,没有本文介绍的方法简便。

新型标记方法动物无痛苦。该方法对实验动物产生的影响非常小,不产生任何应激刺激和痛苦,符合实验动物伦理、福利原则,很好地保护了动物。

综上,剪毛法标记实验大鼠,符合动物福利的理念,简单、快速、易识别、经济、环保、持久、无痛苦、标记量大、对实验动物没有影响等优点,值得推广应用。本方法适用于体毛明显的大鼠,不适用于新生小鼠的标记。

参考文献:

[1] 赵寒昕,盛弘强. 实验小鼠标记识别系统的优化[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(12): 70-73.
[2] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2001: 187-190.

(**收稿**:2013-07-26;**修回**:2013-10-30)
(编辑 邓强庭)