

NOD/SCID 小鼠主要脏器重量、血生理生化指标和免疫细胞的测定

王怀远, 吴旭颖, 张文明, 田玉书, 吴金峰, 王 宇, 张亚静, 杨志伟

(北京华阜康生物科技股份有限公司, 北京, 102200)

【摘要】 目的 测定 NOD/SCID 小鼠的主要脏器重量、血生理生化指标和免疫细胞比例。**方法** 选取 5 周龄和 10 周龄的 NOD/SCID 小鼠, 测定主要脏器重量和血液生理生化指标; 选取 6 周龄的 NOD/SCID 小鼠, 利用流式细胞仪检测其 T 细胞及其亚群(T 细胞-CD3 +、T 细胞亚群-CD4 + T 细胞、CD8 + T 细胞)、B 细胞(CD19 + 或 B220 +)、NK 细胞(NK1.1 +)和粒细胞(CD11b +)。**结果** 同性别 NOD/SCID 小鼠, 不同周龄的双肾、肝脏、心脏和肺脏重量, 血生理指标 RBC、HGB、HCT、MCV、MCH 和 RDW, 血生化指标 TP、ALB、ALP、CHO 和 TBIL 具有显著差异; 同周龄的雌雄相比, 血生理指标 HCT, 血生化指标 GLOB、A/G、CHO、TG、TBIL 和 UN 有显著差异。NOD/SCID 小鼠无 T 细胞(0.37 ± 0.26)%、CD4 + T 细胞(0.35 ± 0.13)%、CD8 + T 细胞(0.47 ± 0.10)%、CD19 + B 细胞(0.13 ± 0.05)%、B220 + B 细胞(1.20 ± 0.44)%, 有低水平 NK 细胞(6.90 ± 0.82)%, 粒细胞比例为(47.88 ± 15.54)%。**结论** NOD/SCID 小鼠表现为 T、B、NK 细胞联合免疫功能缺陷, 周龄和性别对其脏器重量、血生理生化指标有一定影响。本研究的 NOD/SCID 小鼠品系的生理生化指标与国外生产的相同品系基本一致。

【关键词】 NOD/SCID 小鼠; 脏器重量; 血生理生化指标; 免疫细胞

【中图分类号】 332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 05-0047-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.005.010

The study on organ weights, blood physiological and biochemical parameters and immune cells in NOD/SCID mice

WANG Huai-yuan, WU Xu-ying, ZHANG Wen-ming, TIAN Yu-shu, WU Jin-feng, WANG Yu, ZHANG Ya-jing, YANG Zhi-wei
(Beijing HFK Bioscience Co., LTD, Beijing 102200, China)

【Abstract】 Objective To measure the organ weights, physiological and biochemical parameters and immune cells of NOD/SCID mice. **Methods** Mice at five and ten weeks of age were selected. The organ weights, blood physiological and biochemical parameters were observed. The percentages of CD3 +, CD4 +, CD8 +, CD19 +, B220 +, NK1.1 +, and CD11b + were checked by FCM in NOD/SCID mice at six week of age in terms of its T, B lymphocyte function and NK cell activity. **Results** Among the same sex group of NOD/SCID mice, the weights of kidney, liver, heart and lung, and the blood physiological indexes of RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, RDW, and the blood biochemical indexes of TP, ALB, ALP, CHO, TBIL show significant difference between 5 and 10 weeks. At the same age, HCT, GLOB, A/G, CHO, TG, TBIL and the UN are significantly different between male and female NOD/SCID mice. NOD/SCID mice lack T cells (0.37 ± 0.26)%、CD4 + T cells (0.35 ± 0.13)%、CD8 + T cells (0.47 ± 0.10)%、CD19 + B cells ($0.13 \pm$

【基金项目】 科技部“重大新药创制”科技重大专项—啮齿类研发平台—创新药物研究开发技术平台建设(2011ZX09307-302-03)。

【作者简介】 王怀远(1988 -), 男, 助理研究员, 硕士, 生物化学与分子生物学。

【通讯作者】 杨志伟(1969 -), 男, 博士, 研究员, 生理学专业。Email: yangzhiwei@hfkbio.com。

0.05)%、B220 + B cells (1.20 ± 0.44)%。The percentage of NK cells is (6.90 ± 0.82)%, and the percentage of granulocytes is (47.88 ± 15.54)%。 **Conclusions** The study indicates that NOD/SCID mice show the deficiency of T, B and NK cells function. The organ weights, blood physiological and biochemical parameters are affected by age and gender. The studied parameters of NOD/SCID mice are similar with the same strain in other countries.

【Key words】 NOD/SCID mice; Organ weights; Blood physiological and biochemical parameters; Immune cells

非肥胖糖尿病/严重联合免疫缺陷(NOD/SCID)小鼠是由 Jackson 实验室用 NOD/Lt 鼠与 C. B-17-scid 鼠杂交获得的^[1]。NOD/SCID 小鼠除保有 C. B-17-scid 鼠 T、B 淋巴细胞缺陷的特性外,还具有 NK 细胞活性低、无补体溶血活性、巨噬细胞功能下降、渗漏现象少、不能发生自发免疫性糖尿病等特点^[2]。NOD/SCID 小鼠常用于肿瘤研究、糖尿病和肥胖研究、免疫学研究、胚胎干细胞研究、艾滋病及肝炎研究,为 T、B、NK 细胞缺陷的严重联合免疫缺陷动物模型。NOD/SCID 小鼠自 Jackson 实验室引入国内后,经过多代繁殖,同时饲养环境、营养水平等方面也发生了一定的改变,小鼠的遗传性状、生理生化等生物学特征需进一步进行验证和探讨。因此我们对本公司 NOD/SCID 小鼠的主要脏器重量、血液生理生化指标和免疫功能等进行了测定,为利用该品系进行生物医药方面研究提供基础的生物学资料。

1 材料和方法

1.1 动物来源

实验所需 SPF 级 NOD/SCID 小鼠 5、10 周龄各 24 只(雌雄各半),共计 48 只,免疫功能检测所需 6 周龄的 NOD/SCID 小鼠 4 只,雌雄各 2 只,均由北京华阜康生物科技股份有限公司提供,生产许可证号为:SCXK(京)2009-0004。

1.2 饲养管理及环境

实验用 NOD/SCID 小鼠均饲养在北京华阜康生物科技股份有限公司 SPF 车间的隔离器内,隔离器内的洁净度为 5 级标准,温度控制在 $24 \pm 2^\circ\text{C}$,相对湿度 $50\% \pm 10\%$,换气次数每小时为 20 次,明暗照明周期为 12 h:12 h,动物自由采食与饮水。

实验用饲料为北京华阜康生物科技股份有限公司生产的辐照灭菌的⁶⁰Co 鼠繁殖料 1035(SCXK(京)2009-0008)。主要营养指标为:粗蛋白 23.82%、粗脂肪 5.16%、粗灰分 7.19%、粗纤维 4.62%、水分 8.81%、钙 1.25%、磷 0.97%、赖氨酸 1.55%、蛋氨酸+胱氨酸 0.91%。饮用水为酸化过滤自来水($\text{pH} = 2.7 \sim 3.0$)并经 121°C 、30 min 高压蒸汽灭菌。使用的垫料等经过 132°C 、30 min 高压

蒸汽灭菌,每周更换一次垫料,进出隔离器的物品均进行消毒处理,严格遵守隔离系统操作规程。

实验环境为中国医学科学院医学实验动物研究所解剖实验室,实验室使用许可证号:SYXK(京)2013-0019。

1.3 仪器及试剂

法国 ABX Pentra DX 120 血细胞分析仪和配套试剂、日立 7100 全自动生化分析仪和配套试剂、美国贝克曼 Allegra 64R 台式高速冷冻离心机、美国 BD 公司流式细胞仪(FACS)、红细胞裂解液(碧云天生物技术研究所以)。

1.4 实验方法

1.4.1 体重和脏器质量的测定:实验前禁食 12 h,禁水 1 h,用电子天平称取 5、10 周龄小鼠体重,眼眶采血后脱颈椎处死,立即剖取脾脏、肝脏、肾脏、心脏、肺脏、脑,并用滤纸吸干组织表面的水分,称取质量。

1.4.2 血生理指标测定:从小鼠眼眶后静脉丛采血,取 0.2 mL 血液到 EDTA2k 抗凝管内,进行血生理测定。12 项血生理指标为:血红蛋白(HGB)、红细胞(RBC)计数、白细胞(WBC)计数、淋巴细胞(LYM)、血小板(PLT)、平均血小板体积(MPV)、血小板压积(PCT)、红细胞压积(HCT)、平均红细胞体积(MCV)、红细胞平均血红蛋白(MCH)、平均血红蛋白浓度(MCHC)、红细胞体积分布宽度(RDW)。

1.4.3 血生化指标测定:将剩余的全血取 0.8 mL 到离心管内,3000 r/min,离心 10 min 后取血清,进行血生化测定。15 项血清生化指标为:总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLOB)、白蛋白/球蛋白(A/G)、谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、血糖(GLU)、总胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、总胆红素(TBIL)、尿素氮(UN)、肌酐(CREA)、血钙(Ca)、无机磷(P)。

1.4.4 免疫功能检测方法:采用小鼠摘眼球取血法取 300 μL 外周血,经红细胞裂解液去除红细胞后,将细胞用 1% BSA/PBS 洗两次后分为两管备用。其中一管用 PerCP-Cy5.5-CD3、APC-Cy7-CD4、FITC-CD8 和 PE-Cy7-NK1.1 染色 30 min,另一管用 PerCP-

Cy5.5-CD3、FITC-B220 和 APC-Cy7-CD11b 染色 30 min,洗后用流式细胞仪(FACS, Aria)检测并用 FCS Express V3.0 软件分析数据。免疫细胞测定:T 细胞(CD3+、CD4+、CD8+)、B 细胞(CD19+、B220+)、NK 细胞(NK1.1+)、粒细胞(CD11b+)。

1.5 结果处理

实验数据用软件 SPSS 19.0 进行单因素方差分析,数值以平均值 ± 标准差表示,显著水平为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 NOD/SCID 小鼠脏器质量测定结果

表 1 可见,同周龄 NOD/SCID 雌鼠的体重比雄鼠小。10 周龄雌鼠的双肾、肝脏和肺脏重量低于雄鼠。不同周龄的同性别 NOD/SCID 小鼠相比,5 周龄小鼠的双肾、肝脏、心脏和肺脏重量小于 10 周龄小鼠。脾脏的重量自 5 周龄后不随周龄的增长而增大,雌雄之间也无显著差异。

表 1 NOD/SCID 小鼠脏器重量(单位:g)
Tab.1 The organ weights of NOD/SCID mice(unit:g)

指标(Index)	5 周龄(5 weeks)		10 周龄(10 weeks)	
	雌(Female) (n = 12)	雄(Male) (n = 12)	雌(Female) (n = 12)	雄(Male) (n = 12)
体重(Weight)	12.76 ± 0.55	13.85 ± 0.51 *	18.91 ± 1.60 #	23.17 ± 1.46 * #
脾脏(Spleen)	0.021 ± 0.004	0.023 ± 0.004	0.022 ± 0.005	0.022 ± 0.004
肾脏左(Left kidney)	0.079 ± 0.005	0.089 ± 0.007	0.118 ± 0.017 #	0.186 ± 0.019 * #
肾脏右(Right kidney)	0.080 ± 0.007	0.089 ± 0.008	0.120 ± 0.014 #	0.180 ± 0.019 * #
肝脏(Liver)	0.608 ± 0.057	0.617 ± 0.040	0.819 ± 0.084 #	1.018 ± 0.085 * #
心脏(Heart)	0.101 ± 0.010	0.111 ± 0.011	0.145 ± 0.041 #	0.144 ± 0.019 #
肺脏(Lung)	0.079 ± 0.012	0.068 ± 0.008	0.101 ± 0.015 #	0.126 ± 0.016 * #
脑(Brain)	0.406 ± 0.037	0.395 ± 0.020	0.424 ± 0.036	0.422 ± 0.033 #

注:同周龄小鼠雌雄相比,“*”表示 $P < 0.05$;同性别、不同周龄小鼠相比,“#”表示 $P < 0.05$,下同。

Note: compared with male and female mice of the same age, “*” means $P < 0.05$; compared with the different ages of the same gender, “#” means $P < 0.05$. The same below.

表 2 NOD/SCID 小鼠血生理指标

Tab.2 The blood physiological parameters of NOD/SCID mice

指标(Index)	5 周龄(5 weeks)		10 周龄(10 weeks)	
	雌(Female) (n = 12)	雄(Male) (n = 12)	雌(Female) (n = 12)	雄(Male) (n = 12)
血红蛋白(HGB) g/L	141.27 ± 4.34	132.00 ± 11.22 *	154.50 ± 5.93 #	156.50 ± 7.10 #
红细胞(RBC) $10^{12}/L$	7.79 ± 0.33	7.31 ± 0.78 *	8.99 ± 0.38 #	9.34 ± 0.61 #
白细胞(WBC) $10^9/L$	1.36 ± 0.34	1.10 ± 0.37	1.58 ± 0.23	1.78 ± 0.69 #
红细胞积数(HCT) L/L	0.42 ± 0.01	0.40 ± 0.03 *	0.45 ± 0.02 #	0.47 ± 0.02 * #
红细胞平均体积(MCV) fL	54.45 ± 0.69	55.17 ± 1.85	49.92 ± 0.67 #	50.50 ± 1.51 #
红细胞平均血红蛋白量(MCH) pg	18.15 ± 0.33	18.15 ± 0.52	17.20 ± 0.23 #	16.85 ± 0.59 #
平均血红蛋白浓度(MCHC) g/L	332.73 ± 3.69	329.67 ± 7.19	344.08 ± 3.58 #	334.00 ± 3.91 * #
红细胞体积分布宽度(RDW) %	14.72 ± 0.73	14.96 ± 0.96	13.83 ± 0.41 #	14.19 ± 0.35 #
血小板(PLT) $10^9/L$	1479.55 ± 51.65	1425.25 ± 43.48	1241.00 ± 70.26 #	1355.75 ± 287.46
平均血小板体积(MPV) fL	5.09 ± 0.14	5.05 ± 0.09	5.25 ± 0.19 #	5.06 ± 0.17 *
血小板压积(PCT) %	0.75 ± 0.04	0.72 ± 0.02	0.65 ± 0.05 #	0.68 ± 0.13
淋巴细胞(LYM) $10^9/L$	0.92 ± 0.27	0.79 ± 0.20	1.06 ± 0.21	1.08 ± 0.44 #

2.2 NOD/SCID 小鼠血生理测定结果

NOD/SCID 小鼠血生理指标测定结果如表 2 所示。5 周龄雌鼠的 HGB、RBC 和 HCT 高于雄鼠。10 周龄雌鼠的 MCHC 和 MPV 值高于雄鼠,HCT 值低于雄鼠。同性别 NOD/SCID 小鼠相比,10 周龄的 RBC、HGB 和 HCT 高于 5 周龄小鼠,而 MCV、MCH 和 RDW 低于 5 周龄小鼠。同周龄的异性间,WBC、MCV、MCH、RDW、PLT、PCT 和 LYM 均无显著差异。

2.3 NOD/SCID 小鼠血生化测定结果

表 3 的血生化结果显示,5 周龄 NOD/SCID 小鼠雌性的 A/G、GLU 和 UN 高于雄性,而 TP、GLOB、ALP、CHO、TG 和 TBIL 低于雄性。10 周龄 NOD/SCID 小鼠雌性的 A/G、ALP 和 TG 高于雄性,GLOB、AST、CHO、TBIL、UN 和 P 低于雄性。同性别 NOD/SCID 小鼠相比,5 周龄的 TP、ALB 和 TBIL 低于 10 周龄小鼠,而 ALP 和 CHO 高于 10 周龄小鼠。同周龄的异性间,ALB、ALT、CREA 和 Ca 无显著差异。

表 3 NOD/SCID 小鼠血生化指标
Tab.3 The blood biochemical parameters of NOD/SCID mice

指标 (Index)	5 周龄 (5 weeks)		10 周龄 (10 weeks)	
	雌 (Female) (n = 12)	雄 (Male) (n = 12)	雌 (Female) (n = 12)	雄 (Male) (n = 12)
总蛋白 (TP) g/dL	40.90 ± 1.88	44.43 ± 3.64 *	46.63 ± 1.62 [#]	47.82 ± 3.55 [#]
白蛋白 (ALB) g/dL	30.54 ± 1.25	30.26 ± 1.47	33.73 ± 1.12 [#]	32.51 ± 2.26 [#]
球蛋白 (GLOB) g/dL	10.36 ± 0.69	14.17 ± 2.70 *	12.90 ± 0.68 [#]	15.31 ± 1.36 *
血红蛋白/球蛋白 (A/G)	2.96 ± 0.11	2.21 ± 0.43 *	2.62 ± 0.12 [#]	2.13 ± 0.08 *
谷草转氨酶 (AST) U/L	169.36 ± 21.86	205.36 ± 60.16	163.17 ± 71.72	229.83 ± 121.04 *
谷丙转氨酶 (ALT) U/L	59.45 ± 33.93	50.45 ± 23.96	45.08 ± 19.45	57.75 ± 35.14
碱性磷酸酶 (ALP) U/L	150.18 ± 13.72	170.36 ± 17.95 *	94.83 ± 7.63 [#]	85.00 ± 4.51 * [#]
血糖 (GLU) mmol/L	6.00 ± 2.07	3.70 ± 0.77 *	4.44 ± 1.22 [#]	3.89 ± 1.02
胆固醇 (CHO) mmol/L	2.41 ± 0.26	2.74 ± 0.26 *	1.93 ± 0.12 [#]	2.44 ± 0.27 * [#]
甘油三脂 (TG) mmol/L	1.06 ± 0.24	1.46 ± 0.26 *	1.89 ± 0.27 [#]	1.50 ± 0.32 *
总胆红素 (TBIL) umol/L	0.99 ± 0.27	1.40 ± 0.42 *	1.53 ± 0.28 [#]	2.07 ± 0.31 * [#]
尿素氮 (UN) mmol/L	14.94 ± 1.48	12.57 ± 1.88 *	8.99 ± 0.60 [#]	12.36 ± 1.48 *
肌酐 (CREA) umol/L	13.25 ± 1.63	12.65 ± 1.16	13.84 ± 1.38	13.80 ± 1.81
血清钙 (Ca) mmol/L	2.15 ± 0.08	2.14 ± 0.14	2.08 ± 0.09	2.09 ± 0.09
血清磷 (P) mmol/L	3.34 ± 0.31	3.56 ± 0.27	2.77 ± 0.40 [#]	3.89 ± 0.60 *

2.4 NOD/SCID 小鼠免疫细胞测定结果

图 1 为一只 NOD/SCID 小鼠外周血中 T 细胞及其亚群、B 细胞、NK 细胞和粒细胞的百分比。由图 2 可知,NOD/SCID 小鼠无 T 细胞(0.37 ± 0.26)%、CD4 + T 细胞(0.35 ± 0.13)%、CD8 + T 细胞(0.47 ± 0.10)%、CD19 + B 细胞(0.13 ± 0.05)%、B220 + B 细胞(1.20 ± 0.44)% ,有低水平 NK 细胞(6.90 ± 0.82)% ,粒细胞比例为(47.88 ± 15.54)%。

3 讨论

体重和脏器质量是最基本的生物学特征,是衡量 NOD/SCID 小鼠生长状况的最直观的数据。NOD/SCID 小鼠 6 ~ 7 周龄时达到性成熟,9 ~ 10 周龄左右时达到体成熟,本研究选择 5 周龄和 10 周龄两个阶段的 NOD/SCID 小鼠进行对比研究^[3]。本研究发现不同周龄和性别的 NOD/SCID 小鼠体重的有显著性差异,不同周龄的同性别 NOD/SCID 小鼠的双肾、肝脏、心脏和肺脏重量也存在差异。5、10

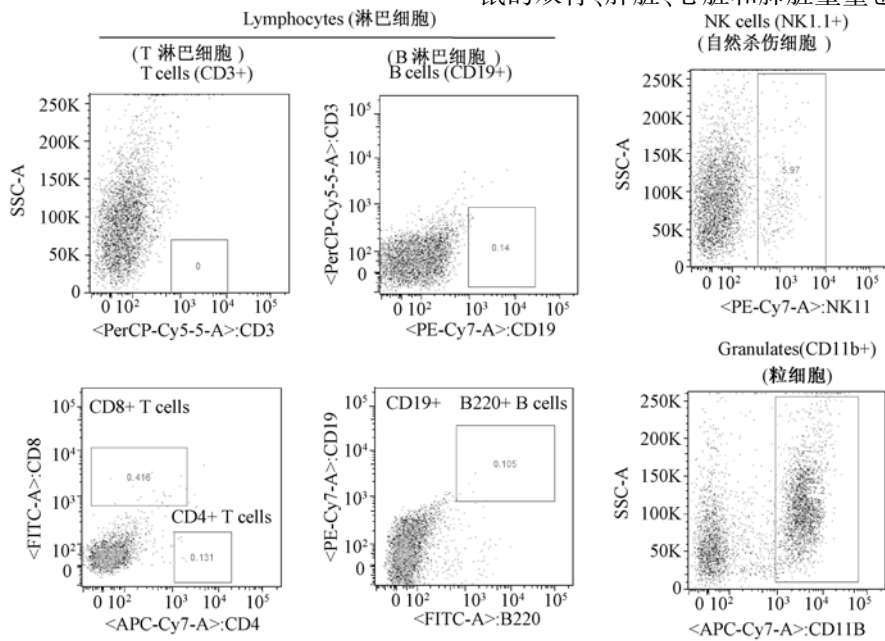


图 1 NOD/SCID 小鼠外周血免疫细胞百分比
Fig.1 Percentage of immune cells of NOD/SCID mice peripheral blood

周龄的 NOD/SCID 小鼠与 Jackson 实验室^[4]、Charles River 公司^[5]的 NOD/SCID 小鼠相比体重稍轻。

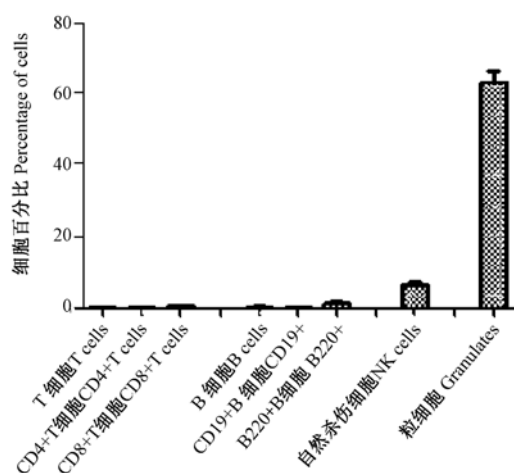


图 2 NOD/SCID 小鼠免疫细胞百分比

Fig. 2 Percentage of immune cells of NOD/SCID mice

不同周龄的同性别 NOD/SCID 小鼠的血生理指标 RBC、HGB、HCT、MCV、MCH 和 RDW, 血生化指标 TP、ALB、ALP、CHO 和 TBIL 具有显著差异; 同周龄的雌雄相比, 血生理指标 HCT 有显著差异, 血生化指标 GLOB、A/G、CHO、TG、TBIL 和 UN 有显著差异。这些差异提示研究人员, 在进行相关研究时, 需要考虑到周龄和性别对于相应数据的影响, 以便获得更加严谨可靠的实验结果。与 Charles River 公司公布的 2011 年 1 月至 12 月的 8~10 周龄 NOD.CB17-*Prkdc*^{scid}/NcrCrI 小鼠数据相比, 血生理指标无显著差异; 血生化指标 AST 数值稍高, GLU、CHO、TBIL 和 CREA 数值稍低^[6]。AST 数值的测定容易受到众多因素的影响, 如样品放置时间^[7]、检测仪器与方法等, 故 AST 数值波动范围较大。GLU 和 CHO 数值偏低可能与动物营养有关。TBIL 主要来源于衰老红细胞降解后产生出来的血红蛋白, 而与 Charles River 公司的小鼠相比 MCV、MCH 和 MCHC

数值很接近, 因此 TBIL 数值偏低与贫血无关。CREA 是肌肉代谢的产物, 与肌肉总量密切相关, 偏低可能与本公司 NOD/SCID 小鼠体重相对较轻有关。

NOD/SCID 小鼠作为 T、B、NK 细胞缺陷的严重联合免疫缺陷动物模型, 被广泛用于肿瘤、糖尿病和免疫学等研究。NOD/SCID 小鼠在 2~3 周龄时离乳, 故本研究选择 6 周龄 NOD/SCID 小鼠进行免疫细胞的测定, 能反映出其免疫细胞的真实水平。本研究证实了 NOD/SCID 小鼠为 T、B、NK 细胞缺陷, 尽管如此, 通过流式细胞术仍能检测出一定量的残存 NK 细胞活性。这与 Shultz^[8]报道的结果一致, NOD/SCID 小鼠内源的和 poly I:C 诱导的 NK 细胞活性均远低于 C. B-17-scid 鼠, 是一种更易于异种移植成功的动物模型。

参考文献:

- [1] Prochazka M, Gaskins H R, Shultz L D, *et al.* The nonobese diabetic SCID mouse: model for spontaneous thymomagenesis associated with immunodeficiency[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 1992, 89(8): 3290-3294.
- [2] 孙冰, 吴世凯, 宋三泰. NOD/SCID 小鼠平台上的肿瘤实验研究进展[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2008, 15(4): 307-310.
- [3] 李厚达. 实验动物学(2)[M], 中国农业出版社, 2003: 100-103.
- [4] <http://jaxmice.jax.org/strain/001303.html>.
- [5] <http://www.criver.com/products-services/basic-research/find-a-model/nod-scid-mouse#widgetTab1>.
- [6] http://www.criver.com/files/pdfs/rms/nod-scid/rm_rm_r_nod_scid_mouse_clinical_pathology_data.aspx.
- [7] 高建忠. 血液样本放置时间对血常规及生化检测的影响研究[J]. 当代医学, 2013, 19(35): 90-91.
- [8] Shultz L D, Schweitzer P A, Christianson S W, *et al.* Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice[J]. J Immunol, 1995, 154(1): 180-191.

[修回日期]2014-04-02