

联体小鼠在联体状态下的生理变化

张富祥, 杨亦彬, 柯贵宝, 陈颖, 徐鑫梅, 谭州科, 容松*

(遵义医学院 肾病中心器官移植实验室, 贵州 遵义 563003)

摘要: 该研究旨在建立联体小鼠模型并评估小鼠应对联体状态时的生理变化。选取 13 对同基因联体小鼠, 在两只小鼠肘关节远端 4~5 mm 处, 沿着肱骨和肋骨侧面直到腰围线末端, 连接皮肤和皮下组织, 建立联体模型, 术后观察联体小鼠运动变化、体重、粪便皮质酮活性及血液交换率等。结果发现: 术后联体小鼠出现兴奋、焦虑等特征性运动失常, 随后数周小鼠活动逐渐适应联体状态, 120 天内无一死亡; 术后三天体重下降, 术后一月恢复正常; 术后粪便中皮质酮代谢物水平快速升高, 至第 75 天降至正常; 检测术后其中三对联体小鼠之间的血液交换率, 结果基本正常, 第 12 周血液完全交换率分别为 63、46 和 107 min。该结果提示小鼠能够很好地适应联体状态, 该模型具有广泛的应用前景。

关键词: 粪便中皮质酮; C57BL/6 小鼠; 适应; 伊文思蓝; 联体小鼠模型

中图分类号: Q4; Q57 **文献标志码:** A **文章编号:** 0254-5853-(2012)05-0493-05

Mice cope with parabiosis — Assessment of their physiological changes of life

ZHANG Fu-Xiang, YANG Yi-Bin, KE Gui-Bao, CHEN Ying, XU Xin-Mei,
TAN Zhou-Ke, RONG Song*

(Department of Nephrology, Laboratory of Organ Transplantation, Zunyi Medical College, Zunyi Guizhou 563003, China)

Abstract: The purpose of this study was to establish a parabiotic mice model and assess the physiological changes of the mice under the parabiotic state. Thirteen pairs of isogenic partners were studied. The model was created by preparing a bridge of skin and subcutaneous tissues between the two mice starting distal of the elbow joint along the humerus along the lateral costal region until the end of the waist line. Physiological, social and affective qualities of life were studied in the mice through behavioural observations for 120 days following the parabiotic surgery. During the first 2–3 days following the operation, the animals suffered from severe pain and distress. During the following days and weeks, the physiological system began to recover and the animals displayed behavioral adaptations to the parabiotic condition. All animals survived at day 120. At three days post operation, the body weight began to decrease. Following this, the animals experienced a continual body weight recovery and reached pre-surgical measures at about 30 days post op. Forty-eight h post op., faecal corticosterone-metabolites were extremely elevated, but their levels returned to two to four times of levels in control females within 72 hours post op. The faecal corticosterone-metabolite levels decreased near to control values on day 75. Out of the 13 pairs, the blood exchange rate of three parabiotic partners was tested, with the result being normal post op. After 12 weeks, the total blood exchange between both partners needed 63 or 46 or 107 min, respectively. These results demonstrated that the animals could adapt behaviourally to the parabiotic situation. Therefore, this parabiosis mouse model may provide useful insights in many research areas, such as transplantation immunity, hematological system and metabolism, etc.

Key words: Faecal corticosterone; Mouse; Adaptation; Evans Blue; Parabiotic mice model

联体(parabiose)模型早在一百多年前就已建立 (Bauknecht, 1980; Sauerbruch & Heyde, 1908;

Schmidt, 1922), 即通过外科血管吻合术把两只动物的循环系统连接起来从而完成血液交换。Bunster &

收稿日期: 2012-02-28; 接受日期: 2012-05-20

基金项目: 国家自然科学基金(81160096)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: songrong@hotmail.com

Meyer (1932) 改良了这种模型，仅连接两只小鼠或大鼠的皮肤，从而明显减轻了动物术后的普遍性疼痛和不适，并减少了术后的照料。Hill (1932) 也发现两只动物在伤口愈合过程中，新生毛细血管会互相交叉生成，从而完成两者之间的血液交换。因此，这种改良的联体模型被广泛应用于内分泌、新陈代谢、血液系统、传染及移植等研究中。

与上述结果相反，英国实验动物科学协会 (LASA, 1990) 指出由于联体动物持续性的疼痛和伤害，死亡率可能会增加，但这仅仅是基于对预期的判断。Aicher et al (2007) 指出由于对联体动物的疼痛和痛苦评估的基本原则不同，阻碍了利用这种模型对研究项目的合理评价。Abe et al (2004) 则报道联体生活的小鼠有极好的健康状况，死亡率为零。

Broom (2001)、Knierim et al (2001)、Panksepp (1998)、UFAW (2006) et al 利用联体动物模型在其他领域进行了研究，如神经系统科学、实验心理学、动物生理学、兽医学和动物福祉。因此，本实验把观察的重点集中在小鼠应对联体状态下的生理变化，以进一步证实该模型创建的合理性，同时也为该模型在多领域研究中的应用提供生理依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

近交系 C57BL/6 雄/雌小鼠，70 d，体重 19~21 g，购自第三军医大学大坪医院实验动物中心(合格证号: ScXK 渝 20090103)，养殖于 37 cm×20 cm×18 cm 的聚碳酸酯鼠笼，室温 (21±2) °C，相对湿度~50%，7:00—19:00 给予光照。以耳朵打孔或蓝墨水涂抹颈部作为标记。

1.2 仪器

Beckman DU80 紫外分光光度计(美国)，Olympus cx21 光学显微镜(日本)，Multiskan Spectrum 全波长酶标仪(美国)。

1.3 健康评估

在手术前、后一周每天评估每只小鼠的健康状态；以后每周三次(9:00—12:00)测量体重，精确到 0.5 g；评估循环系统和呼吸系统疾病；清洁皮肤、毛发以及身体的所有开口，包括眼部、嘴巴以及肛门生殖器部位；观测粪便状况。

1.4 联体手术

1.4.1 术前，小鼠共同生活 2~3 周。选择 13 对体重和年龄相近，具良好健康状态，正常生物周期和

群居适应性的小鼠。

1.4.2 根据 Bunster & Meyer (1932) 的方法，用异氟烷麻醉小鼠，在肘关节远端 4~5 mm 处沿肱骨和腋下侧面剪开至腰围线末端，用 5/0 线连续缝合配对动物皮肤和皮下组织。与 Bunster & Meyer (1932) 方法不同的是：不固定肩胛区的肌肉和组织，仅利用前腿的有限固定防止联体小鼠的翻转。对照组小鼠只切开皮肤并缝合，不做联体。术后，两只联体小鼠肋骨区域的皮下组织缝合并保留~2 cm 的活动距离。这样，肩部的侧向运动可以弥补因前上肢的狭窄固定所导致的运动受限。这有利于联体小鼠之间的独立运动，如自我梳理、清洁肛门生殖器区域及食物摄取等。术后维持小鼠体温并一次性给予安乃近钠 10 mg 镇痛。

1.5 肾上腺皮质活性

10:00—12:00 收集粪便，通过酶免疫分析法测定粪粒中皮质酮代谢物的含量(Ambrée et al, 2006)。

1.6 联体小鼠观察及运动评估

通过摄像机及红外光对鼠笼进行 24 h 录像以评价小鼠的自然生理状态，并将录像时间压缩成 6:1 制成新片。由于时间被压缩，<0.3 s 的行为方式无法评估，因此原始时间 5 min 内的频繁行为需重新观看原始记录。通过目测法分析该录像记录，观察小鼠在手术后第 1~65 天的笼外自发活动，并记录联体小鼠交叉，站立和转圈频率的变化。

1.7 血液交换率

联体小鼠之间的血液交换率在术后第 12 周的 10:00—12:00 进行评估。实验 0 min 时，从联体左侧(俯卧位)小鼠尾静脉注入 4% 伊文思蓝溶液 150 μL，对照组做同样处理；在第 4、9、17、25 和 42 min 分别穿刺两只联体小鼠眼球后静脉取血 0.1 mL，离心分离出血清，甲酰胺 1:8 稀释，使用 620 nm 分光光度计测量血清中伊文思蓝的量；使用 Graphpad Prism 5.0 计算注入小鼠伊文思蓝溶液的相关系数(*r*)和回归斜率(*B*)，并基于伊文思蓝清除斜率估算联体小鼠之间的血液交换率。

2 结 果

2.1 联体小鼠的生理反应

手术后两天内，连体小鼠的自然生活质量严重受损。麻醉苏醒后数小时内高度兴奋，出现特征性呼吸及循环紊乱；术后 12~48 h，联体小鼠承受巨大的疼痛，无法正常睡眠、饮食，体重开始下降；术

后 48 h 下丘脑-垂体-肾上腺轴 (HPA-axis) 极其活跃, 粪便中的皮质酮代谢物增加; 术后 72 h 粪便中皮质酮代谢物水平达到对照组的 2~4 倍(表 1); 术

后 24 h 当小鼠拉伸皮桥清洁肛门生殖器区域时未出现疼痛迹象; 术后一周连接处皮肤愈合无并发症。

表 1 小鼠粪便皮质酮代谢物测定
Tab. 1 Faecal Excretion of Corticosterone-Metabolites

雌性成对小鼠粪便中皮质酮代谢物的量 (ng/50 mg) Faecal excretion of Corticosterone-Metabolites in female pairs	例数 N	平均数 Mean	标准差 SE	最大值-最小值 Max-Min
术后 24 小时排泄量 Excretion 24 h post op.	13	901	218	811-1225
术后 48 小时排泄量 Excretion 48 h post op.	13	834	165	677-1006
术后 72 小时排泄量 Excretion 72 h post op.	13	310	159	154-437
术后 96 小时排泄量 Excretion 96 h post op.	13	160	25	134-185
术后第 8 天排泄量 Excretion on day 8 post op.	13	320	107	198-400
术后 15 天到 75 天排泄量 Excretion between day 15 and 75 post op.	35	114	61	34-283
健康雌性对照组排泄量 Excretion in healthy control females	42	95	30	32-152

粪便中皮质酮代谢物含量于术后第 4 天减少至接近对照组水平(图 1); 术后第 8 天短暂升高(200~400 ng/50 mg 粪便); 术后第 15~75 天, 出现不规则浓度, 提示在此期间肾上腺轴的反复短暂活跃; 术后第 75 天, 与健康对照组小鼠比较, 已无显著性差异($P>0.05$)。

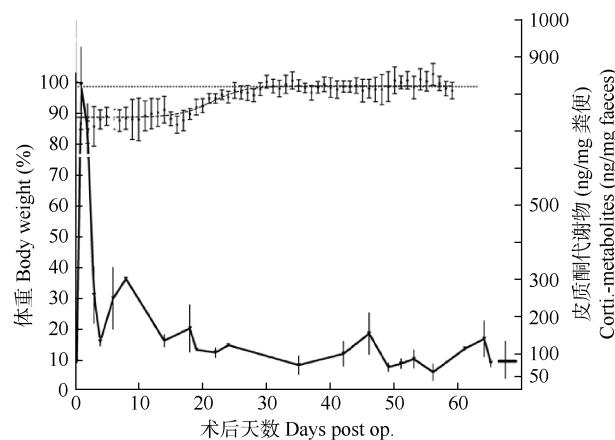


图 1 联体手术后小鼠体重(左)及粪便中皮质酮代谢物变化(右)

Fig. 1 Body weight (in % of weights before operation) of parabiotic mice pairs post op.(left) and corticosterone-metabolites (ng) in 50 mg of faeces (right)

2.2 联体小鼠体重变化

术后第三天, 小鼠出现体重减轻、脱水及较低频率短暂的疼痛; 术后第 8~15 天体重减轻达到最大(图 1); 术后第 10 天, 小鼠变得活跃和敏捷, 并开始恢复体重; 术后一月所有小鼠完全恢复体重并未表现明显的伤害标志。但是, 其中一只联体小鼠表

现苍白的耳朵和爪子, 提示该小鼠极有可能遭受了联体中毒(parabiotic intoxication)。

2.3 联体小鼠运动状况

术后 72 h, 小鼠已无疼痛及疾病表现, 但焦虑所致活动失常一直持续到术后第 10~15 天, 小鼠倾向于待在窝内, 绕着伙伴小心移动并频繁梳理, 且散步减少, 食欲减退。术后第 12~15 天, 焦虑基本消失, 小鼠运动频繁。术后第 1~65 天联体小鼠在笼外的自发活动, 如交叉, 站立和转圈频率变化见图 2。术后第 1~5 天, 频率变化极不明显, 随后达到低平台期, 直至术后第 10~15 天; 此后交叉、站立频率持续增加, 逐步达到满足其食物需求的运

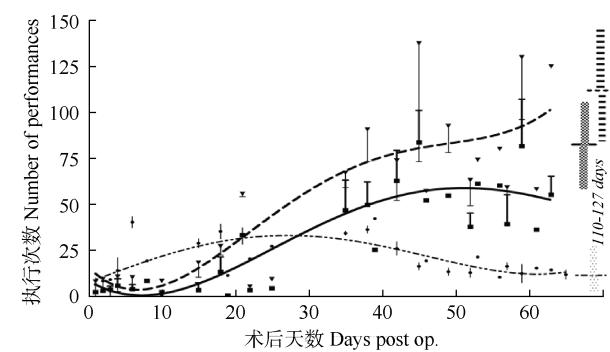


图 2 联体小鼠手术前、后在笼外的自发活动

Fig. 2 Total number of locomotion patterned movements performed by parabiotic pairs during a 12 min open field test

每次观察 12 min (mean±SE): ---站立; ——交叉; ···转圈。

The total number of locomotive movements observed on different days before and following parabiotic surgery in the parabiotic pairs (mean±SE): “Standing up” (---, ashed line), “crossed fields” (—, solid line), “turning around” (···, dotted line).

动量；术后第(24±12)天联体小鼠状态迅速恢复，转圈频率保持高位>20 天；术后第 40~60 天，转圈频率下降，而交叉、站立达到平台期，且在术后第 110~120 天之间也可观察到该情况。总体来说，连体小鼠的运动成功克服了其联体障碍。

2.4 联体小鼠之间的血液交换率

血液中的伊文思蓝在 3 只独立的假手术雌鼠(1,2,3)(表 2)中以单峰形式消失，而在联体小鼠中则以双峰形式消失，即在注射早期(4~25 min)，联体小鼠表现伊文思蓝的快速消失时相，随后(25~42 min)出现延迟消失时相，且该时相类似于对照组出现的单峰。回归方程($Y=A+Bx$)以及伊文思蓝在不同小鼠早期、晚期消失时相的半衰期见表 2。综合评

估 3 对联体小鼠(I, II, III)并计算相关系数(r)，其延迟时相的相关系数很低($r=0.58$)。注射伊文思蓝的联体小鼠，其伊文思蓝在早期时相消失很快，生物半衰期为 31~40 min，这是由于一部分伊文思蓝进入了未注入伊文思蓝小鼠的体内，而延迟时相伊文思蓝的消失则主要是由两只小鼠分解代谢和排泄引起的，其排泄速度与对照组相似。联体小鼠之间的血液交换率是根据伊文思蓝在第一时相(4~25 min)的清除率来估算的，扣除伊文思蓝晚期时相(25~42 min)的排泄率加以修正，即为由一只小鼠转移到另一只小鼠的那部分伊文思蓝的清除率。三对联体小鼠之间的血液完全交换分别需要 63、46 和 107 min。

表 2 对照组和联体左侧小鼠血清中伊文思蓝的消除

Tab. 2 The elimination of Evans-Blue in the serum of the left mouse of the parabiotic pairs and in controls

时相 Phase		I	II	III	1	2	3
早期时相 Early phase	$Y_{4-25}=A+Bx$	=235-3.46x	=296-4.74x	=258-2.83x	=231-1.52x	=239-1.52x	=294-1.69x
	相关系数 r	-0.99	-0.98	-0.96	-0.83	-0.82	-0.75
	交换率 hlt_{4-25} (min)	34	31	40	71	79	87
晚期时相 Late phase	$Y_{25-42}=A+Bx$		=215-1.57x			=244-1.38x	
	相关系数 r		-0.58			-0.45	
	交换率 hlt_{25-42} (min)	69	69	69	88	88	88
完全交换率 hlt (min)							
63							

通过回归方程式($Y=A+Bx$)、相关系数(r)、左侧联体小鼠(I, II, III)和假手术组小鼠(1, 2, 3)血清中伊文思蓝的半衰期来估算早期时相(注射后 4~25 min)和晚期时相(注射后 25~42 min)的消除量，联体小鼠间的血液交换率= $0.5 \times A / (B_{4-25} - B_{25-42})$ 。

Estimations of Evans Blue levels during the early disappearing phase (4~25 min. after infusion) or during the late disappearing phase (25~42 min. after infusion). Data represents the regression equations ($Y=A+Bx$), coefficients of correlation (r) and half-life times (hlt) of Evans Blue disappearance in the serum of the left mouse of the parabiotic pairs (I, II, III) and in three sham operated mice (1, 2, 3). Blood exchange rate between parabiotic partners (Blood-hlt) was calculated by $=0.5 \times A / (B_{4-25} - B_{25-42})$.

3 讨 论

早在一百年前，小鼠联体模型就已被应用于多个领域。然而自从 1990 年英国实验动物科学协会(LASA, 1990)提出联体模型对动物的伤害后，就影响了该模型的进一步使用。本实验重新建立并评估了小鼠联体改良模型，结果显示小鼠具备适应联体生活的能力。术后第 60 天，最迟第 110~140 天，联体小鼠即可以完全习惯联体过程并达到平衡状态，且小鼠健康活跃，并无任何生活质量降低的迹象，直至术后第 120 天，小鼠的死亡率均为零，这与 Pope (1968) 报道一致。

实验表明，联体小鼠术后的剧烈疼痛持续时间短暂，且不导致死亡。所有小鼠均能适应联体状态，

满足自身需要并协调与伙伴的关系，而 LASA 手册则忽视了这一观察结果。正如在本小鼠联体实验中所得到的，对于他们处理联体状态下生理反应能力的认识确实需要客观的观察。

从新陈代谢、内分泌系统或者神经免疫系统方面研究生理改变的实验(Panksepp, 1998; Broom, 2001; Knierim et al, 2001; UFAW, 2006)，都只得到一些大概的信息。然而，我们仍能够区分 3 不同时期，即最初时期，持续约 3 天，此间小鼠睡眠被剥夺，无法正常进食进水，体重减轻，粪便中皮质酮代谢物明显增加，这些都表明小鼠遭受手术创伤；随之而来的是第二个时期，持续一到两个月，此间小鼠体重逐渐恢复，皮质酮代谢物含量逐渐下降，性周期逐渐规则，表明联体小鼠经历了适应特异生

理的时期; 第三个时期大约至术后第 120 天左右, 此间这些适应过程进一步完善, 动物开始能够应付各种障碍。

在 10:00—2:00 可以检测到粪便中有大量的皮质酮代谢物, 这表明下丘脑-垂体-肾上腺轴(hpaxis)的激活 (Touma et al, 2003; Dallmann et al, 2006; Lepschy et al, 2007)。也通过不同的方法得到了类似的结果。经过联体手术, 粪便中皮质酮代谢物的含量明显升高, 是标准水平的 8 到 12 倍, 并持续了 48 h。Voigtländer et al (2006) 在进行 C56BL/6 雌鼠胱病毒病实验后也报道了类似的变化。然而, 72 h 后, 联体小鼠肾上腺轴的活动降低, 粪便中皮质酮代谢物水平迅速降到正常水平。这和 Ambrée et al (2006) 报道的相同。在术后第 15 天和 75 天之间, 只有 20% 的小鼠会显示出一个短期的肾上腺轴的激活。这些结果也与 Harris et al (1997) 得出的结论相符合, 同时他证实雌性 C57BL/6 联体小鼠术后 50

天时肾上腺的重量并没有减轻。但在金仓鼠雄性联体小鼠却不同, 术后 5 周, 它们肾上腺的重量比对照组高 25% (Seibel & Schweisthal, 1972)。

联体的两只小鼠之间完成全部的血液交换大约需要 1 个小时, Matsumoto et al (1972) 也证实了这个速度, 因此联体的动物会永远受另一方血液成分的影响。不过 Matsumoto 指出, 这个影响是非常细微的, 因为一种血液成分的生物半衰期远远小于所估计的联体生物之间的血液交换速率。对于生物半衰期较长的物质来说, 有可能与交换同时发生, 正如在雌-雄联体中所观察到的性周期。

本实验在 Bunster & Meyer (1932) 模型基础上进一步简化改良, 使小鼠有更大的自主活动能力, 能很好地适应联体状态, 模型对动物的伤害在合理范围, 完全符合各国制定的动物保护/福利法案。本实验为这种联体模型在内分泌、新陈代谢、血液系统、传染、移植等众多领域的应用提供了支持。

参考文献:

- Abe S, Boyer C, Liu X, Wen FQ, Kobayashi T, Fang Q, Wang X, Hashimoto M, Sharp JG, Rennard SI. 2004. Cells derived from the circulation contribute to the repair of lung injury [J]. *Am J Res Crit Care Med*, **170**(11): 1158-1163.
- Aicher A, Rentsch M, Sasaki K, Ellwart IW, Fändrich F, Siebert R, Cooke JP, Dimmeler S, Heeschen C. 2007. Nonbone marrow-derived circulating progenitor cells contribute to postnatal neovascularization following tissue ischemia [J]. *Circ Res*, **100**(4): 581-589.
- Ambrée O, Touma C, Götz N, Keyvani K, Paulus W, Plame R, Sachser N. 2006. Activity changes and marked stereotypic behavior precede Aβ-pathology in TgCRND8 Alzheimer mice [J]. *Neurobiol Aging*, **27**(7): 955-964.
- Bauknecht B. 1980. Parabiose, Geschichte und Bibliographie von den Anfängen bis zur Gegenwart [M]. Neumünster: Wachholz, Kieler Beiträge zur Geschichte der Medizin und Pharmazie 17, ISBN 3-529-06217-0.
- Broom MD. 2001. Coping with Challenge: Welfare in Animals Including Humans [M]. Berlin: Dahlem University Press.
- Bunster E, Meyer R. 1932. An improved method of Parabiosis [J]. *Anatomical Rec*, **57**(4): 339-343.
- Dallmann R, Tonma C, Palme R, Albrecht U, Steinlechner S. 2006. Impaired daily glucocorticoid rhythm in Per (Brd) mice [J]. *J Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol*, **192**(7): 769-775.
- Harris RBS, Zhou J, Weigle DS, Kuijper JL. 1997. Recombinant leptin exchanges between parabiosed mice but does not reach equilibrium [J]. *Am J Physiol*, **272**(6 Pt2): R1800-R1808.
- Hill RT. 1932. Blood exchange and hormonal reactions in parabiotic rats [J]. *J Exp Zool*, **63**(1): 203-234.
- Knierim U, Carter CS, Fraer D, Gärtner K, Lutgendorf SK, Mineka S, Panksepp J, Sachser N. 2001. Group report: Good welfare improving quality of life [M] // Broom MD. Coping with Challenge: Welfare in Animals Including Humans. Berlin: Dahlem University Press.
- LASA. 1990. The assessment and control of severity of the scientific procedures on laboratory animals [J]. *Laborat Anim*, **24**(2): 97-30.
- Lepschy M, Touma C, Hruby R, Palme R. 2007. Non-invasive measurement of adrenocortical activity in male and female rats [J]. *Laborat Anim*, **41**(3): 372-387.
- Matsumoto J, Sogabe K, Hori-Santiago Y. 1972. Sleep in Parabiosis [J]. *Experientia*, **28**(9): 1043-1044.
- Panksepp J. 1998. Affective Neuroscience, the foundations of human and animal emotions [M]. Oxford: Oxford University Press.
- Pope RS. 1968. Lifespan and weight of strain 129 mice in parabiotic union [J]. *Transplantation*, **6**(8): 934-938.
- Sauerbruch F, Heyde M. 1908. Über Parabiose künstlich vereinigter Warmblüter [J]. *Münchner Med Wochenschrift*, **55**(1): 153-156.
- Schmidt G. 1922. Stand und Ziele der Parabioseforschung, auf Grund eigener Untersuchungen [J]. *Dtsch Z Chir*, **171**(3-6): 144-282.
- Seibel HR, Schweisthal MR. 1972. Relationship between the pineal gland, other endocrine glands and reproductive organs of single and parabiotic golden hamsters [J]. *Acta Endocrinol*, **74**(3): 434-448.
- Touma C, Sachser N, Möstl E, Palme R. 2003. Effects of sex and time of day on metabolism and excretion of corticosterone in urine and feces of mice [J]. *Gen Comp Endocrinol*, **130**(3): 267-278.
- UFAW. 2006. Quality of Life: The Heart of the Matter. London: UFAW/BVA Ethics Committee Symposium, 13-14.
- Voigtländer T, Unterberge U, Touma C, Palme R, Polster B, Strohschneider M, Dorner S, Budka H. 2006. Prominent corticosteroid disturbance in experimental prion disease [J]. *Eur J Neurosci*, **23**(10): 2723-2730.