

结核病的巢式 PCR 方法,灵敏度达到 1.35 pg DNA 和 1.35 fg DNA。2007 年, Taylor G M 等^[6]建立了 IS1081 特异性 PCR 反应,对淋巴结有明显病灶的牛进行检测,结果检测的敏感性可达到 2.35 fg DNA。

6 抗原诊断

免疫机理的研究结果表明,结核病的保护性蛋白是细菌的分泌蛋白。不少学者对分泌蛋白组分进行了研究,然后对各组分进行 ELISA。Lyashchenko 等人采用几种高度纯化的分泌蛋白进行 ELISA,结果认为 6 种分泌蛋白,即 ESAT-6、MPB64、MPB70、MPB63、MBP51、MPB32 是主要的血清学反应抗原,并在此基础上建立了 MPB70-ELISA、ESAT-6-ELISA。2006 年, Trivedi S 等在对牛分枝杆菌分泌蛋白 CFPs 的诊断潜力进行研究时发现,CFPs 在结核菌素皮试阳性牛体内能够很好地被 T 细胞识别,并能与血清呈现反应。结果表明,CFPs 可以被用于结核病的诊断。2007 年, Cho Y S 等^[7]通过阴离子层析法从牛分枝杆菌培养上清液中提取 MPB70 蛋白建立 MPB70-ELISA。结果发现:在对 62 头皮试阳性牛进行检测时,MPB70-ELISA 的阳性率为 84%,PPD-ELISA 的阳性率为 52%,说明在 ELISA 中 MPB70 比 PPD 有更高的敏感性和特异性。

7 结语

综上所述,牛结核病的检测方法有很多种,每种方法都有其优缺点。因此,在临床普查中应多种方法联合应用,尽可能提高检测的敏感性和特异性,以达到净化牛场的目的。

参考文献:

- [1] GORMLEY E, DOYLE M B. Diagnosis of mycobacterium bovis infection in cattle by use of the gamma-interferon (bovigam) assay[J]. Vet Microbiol, 2006, 112 (2/4): 171-179.
- [2] PALUMBO E. New tests for diagnosis of latent tuberculosis[J]. Recent Prog Med, 2007, 98 (12): 629-632.
- [3] 张鹭,路福平.应用 PCR 技术检测牛乳中的结核分枝杆菌类病原菌[J].中国乳品工业,2007,35(5):56-58.
- [4] 刘思国,王春来,宫强,等.牛分枝杆菌特异性 PCR 检测方法的建立及初步应用[J].中国预防兽医学报,2006,28(1):80-83.
- [5] 元文宝,陈世灿,罗满林,等.牛结核病巢式 PCR 快速检测方法的建立[J].中国兽医科学,2006,36(10):815-819.
- [6] TAYLOR G M, WORTH D R. Rapid detection of mycobacterium bovis DNA in cattle lymph nodes with visible lesions using PCR[J]. BMC Vet Res, 2007(3): 12.
- [7] CHO Y S, JUNG S C. Enzyme-linked immunosorbent assay of bovine tuberculosis by crude mycobacterial protein 70[J]. J Immunol assay Immunochem, 2007, 28(4): 409-418. (011)

鹿茸骨化机制的研究进展

孙红梅,李春义,杨福合,褚文辉,赵海平,鲁小平

(中国农业科学院 特产研究所,吉林 吉林 132109)

中图分类号: S858.25

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2009)08-0026-03

鹿茸是鹿科动物头盖骨上的骨质性附属器官,为鹿科动物的第二性征。鹿茸的生长发育、钙化与长骨的钙化过程比较相似,因此鹿茸具有明显的作为骨钙化调节机制研究的潜在模型优势,主要表现:鹿茸上没有肌肉的附着,很容易观察和测量,适合进行活体检查;生长极迅速,并且每年都能够再生;两侧鹿茸呈镜像生长,为研究提供了非常科学的对照;鹿茸的组织学结构分化很细,既有成软骨细胞、成骨细胞,又有前成软骨细胞、前成骨细胞等的划分,可以呈现从骨髓干细胞分化到间充质细胞,进而分化成前成软骨细胞、成软骨细胞、软骨细胞、肥大软骨细胞及成骨细胞的替换等一系列完整的成骨过程,为研究不同阶段各种细胞的作用和分子机制提供了一个得天独厚的模

型。因此,探讨鹿茸骨化机制对医学上骨化及骨质疏松等方面的研究具有重要意义,可为鹿茸质量和产量的提高提供理论基础。

1 鹿茸的结构特点

1.1 鹿茸的结构

通过对白尾鹿、麋鹿、赤鹿、驯鹿等许多鹿科动物进行鹿茸组织学和组织化学方面的研究,根据细胞及其基质的不同,结合鹿茸的软骨形成,将鹿茸分成 6 个连续的带:增殖带、成熟带、肥大带、钙化带、初级松质带和次级松质带。

Szuwart T 等分别观察了鹿茸在软骨形成、钙化、软骨重吸收等过程中的超微结构变化。结果表明,鹿茸增生带的间充质细胞的细胞质最少,含有一个开放的常染色质核。前成软骨细胞的细胞质比间充质细胞多,细胞紧密地结合在一起,大多数位于基质的特定区域。从超微结构来看,前成软骨细胞含有大量膨胀的粗糙内质网、高尔基区,可见明显的核仁,细胞伸

收稿日期: 2008-10-17

作者简介:孙红梅(1978-),女,助理研究员,硕士。

通讯作者:李春义(1965-),男,研究员,博士。

长成为长梭形。增生带的基质中含有胶原纤维束、微纤丝和电子密度很高的物质,而细胞周缘的陷窝中不含这些物质,但含有少量的基质颗粒。在增生带的近端,有些成软骨细胞可以发育成特殊软骨细胞,这种细胞的边缘呈扇形,并有特殊的细胞突。成软骨细胞中的粗糙内质网不如前成软骨细胞大,但有特殊的高尔基体衍生分泌囊腔,囊腔内含有 RR 染色阳性颗粒。在钙化的过程中,羟基磷灰石晶体与基质泡膜相连,随着晶体化的扩大晶体呈辐射状,逐渐将基质泡取代。在初级松质带近端钙化软骨区的旧软骨基质上,可见到成骨细胞和破骨细胞。成骨细胞含有广泛的粗糙内质网、特殊的核仁,与邻近的新生成的骨基质排列成线。初级松质带的肥大软骨细胞完全被包围在骨基质中,这些细胞的细胞膜呈碎片状,细胞质中有许多开放的空隙及少量的细胞器。Newbrey J W 等也对鹿茸软骨基质的超微结构进行了研究,并分析了超微结构的改变与软骨钙化的联系,进一步充实和完善了鹿茸组织结构的研究。鹿茸组织结构的明确为后来鹿茸再生及发生机理、鹿茸取样技术、分子生物学等许多方面的研究打下了基础,李春义等在此基础上发明了鹿茸取样技术,为鹿茸各个领域的研究带来了极大方便。

1.2 茸骨的形成

鹿茸是一个骨质性器官,其组织的发生与骨骼骨质的发生是相同的,包括膜内成骨和软骨内成骨两种成骨形式,但茸骨组织的形成是膜内成骨还是软骨内成骨许多专家观点不一。有些专家认为是由膜内成骨而来;有些专家认为是由软骨内成骨而来;还有专家认为既有膜内成骨,又有软骨内成骨。Banks 等通过组织化学方法对此进行了详尽研究,得出茸骨组织是由不同于典型软骨内成骨的特殊软骨内成骨而来,其标志是角柄顶端软骨膜下出现连续的骨小梁。在整个生茸期内软骨膜持续存在,通过附加增生来实现鹿茸的生长。发育到一定程度的肥大软骨细胞向细胞间质中分泌 X 型胶原纤维等,引起间质的钙化,进而骨组织替换软骨组织。

2 鹿茸骨化的矿物质来源

鹿茸在快速生长过程中,每天生长 2 cm 左右,有些最终能生长到 120 cm,骨组织的生长需要大量的矿物质。在生茸骨化期内,体骨主要骨骼中的矿物质发生剧烈的变化。在 7 月份驯鹿鹿茸快速生长阶段,其肋骨是多孔的、活跃的,并有高的流通率,经历着骨损失,这些损失最后在鹿茸生长停止时得到补偿。鹿体内发生脱矿作用越大的骨骼,在茸角骨化后恢复过程亦发生得越强烈。Banks W J 发现黑尾鹿在鹿茸生长季节出现相似的情形,并将其描述为生理性骨质疏松。黑尾鹿在生茸、骨化期内,无论饲料中矿物质多么丰富,其肋骨、掌骨和胫骨的外层密质骨都经历

一次周期性的疏松变化。这些骨骼的重吸收点均随茸角骨化的加快而明显增多,骨质密度显著下降。茸角完全骨化后,黑尾鹿体骨骼又会重新沉积矿物质,使已变得疏松的密质骨重新恢复到正常状态。说明茸角中沉积的矿物质除来源于鹿体骨骼外,还要从饲料中提供一部分,在茸角骨化结束后能很快从饲料中得到补偿。因此,鹿茸茸骨密度及其矿物质组成也能反映鹿茸生长过程中鹿的生理状况。

3 鹿茸骨化的调控因子

3.1 睾酮及其衍生物对鹿茸骨化的调控

鹿体内睾酮含量的变化对茸角发生、生长、骨化、脱皮和脱落起着决定性作用,许多学者已经测定睾酮含量的年变化与茸角形成周期密切相关。在鹿角脱落、新生茸萌发和快速生茸期,鹿体内睾酮水平最低,茸角骨化和脱皮时睾酮水平逐渐上升,以后持续上升,到交配季节达到高峰。另外,许多学者还用去势公鹿研究了睾酮代谢物 19-羟-睾酮、5 α -氢睾酮、5 α -雄酮、5 β -雄酮、5 α -雄烷二醇、5 β -雄烷二醇等对鹿茸生长和骨化的作用,进一步揭示了睾酮对鹿茸骨化的作用机理。结果表明,19-羟-睾酮能诱发鹿茸骨化并形成正常的哈佛氏系统,但其所诱导的骨化是暂时的,不能诱导骨角脱落。少量的 19-羟-睾酮就能使茸骨组织成熟至形成骨板,而 5 α -氢睾酮的这种作用并不明显,但其能使茸皮发生明显变化。5 β -雄烷二醇能轻微减缓茸角的生长发育速度,导致茸角骨化,但作用效果与等量 19-羟-睾酮相比差得多。5 α -雄酮能使茸骨组织的发育和矿化进行得非常快,而 5 β -雄酮似乎对茸的骨化没有作用。

3.2 胰岛素样生长因子(IGF)

在鹿茸顶部非骨化部位存在大量的 IGF 及其受体,是软骨组织生长的调节因子。IGF 包括 IGF-1 及 IGF-2。取生长期的鹿茸进行体外培养,培养的细胞来自鹿茸远端顶部的 3 个部位:软骨膜内膜、间充质和软骨区,研究结果表明 IGF-1 可促进来自这 3 个部位细胞的分裂。向体外培养的鹿茸未分化区细胞及软骨区细胞中注入 IGF-1 和 IGF-2 可促进细胞的分裂,但 IGF-1 与 IGF-2 间无协同作用。

3.3 甲状腺激素(T₃、T₄)、甲状旁腺素及其受体

比较鹿茸与颈静脉、隐静脉等不同部位,以及生长、钙化等不同阶段 T₃、T₄ 含量的变化,得出在鹿茸生长过程中要利用 T₃,其利用比率与鹿茸生长强度有关。而 T₄ 在茸骨中不被利用。甲状旁腺素及其受体在生长鹿茸中也有表达,主要起到调节细胞分裂和分化的作用。

3.4 磷酸酶

在鹿茸生长期,钙化刚开始时会产生大量的碱性磷酸酶,但在钙化阶段其数量又显著降低。体外培

养来自鹿茸角顶部内软骨膜、残留间充质及软骨区的细胞,均发现有碱性磷酸酶的表达,其中来自肥大软骨区的体外培养细胞表达量最大,未分化的间充质细胞表达量最小。随着体外培养传代次数的增加,细胞逐渐失去表达碱性磷酸酶的能力。在这些细胞中,碱性磷酸酶的活性水平与该酶的表达形式和表达程度有关,磷酸二酯酶在鹿茸的近端含量最大,说明二者在鹿茸钙化过程中具有不同的功能。

3.5 细胞因子

在鹿茸角生长的第30、60、90天,分析外皮、间充质、前软骨及软骨区域时发现,有多种生长因子 IGF- α 、IGF- β 、TGF- β 1、TGF- β 2、C-fos、C-mys、 β -actin及原癌基因的表达,且在鹿茸角生长的各时期都表达。IGF- α 、TGF- β 2、C-mys与 β -actin相关,在外层的表达较其他区域要高,在鹿茸角生长的3个时期没有差异。用抗体进行免疫染色反应,依据染色结果可认为鹿茸角软骨细胞合成的TGF- β 可分泌到细胞外基质中发挥作用。

3.6 骨形成蛋白

对1月龄鹿茸角进行BMP-3b mRNA原位杂交,结果显示BMP-3b在鹿茸角中心的大多数分化细胞都有表达。在鹿茸发育过程中,软骨膜与鹿茸角柄骨膜相延续,在此进行膜内成骨。在软骨膜下是致

密的细胞区,又称增殖区,在该区域的细胞并非高度分化的细胞。增殖细胞核抗原染色证实,在该区域的许多间充质细胞处于分裂期,同时有许多细胞发生凋亡,这种高水平的细胞凋亡发生率可能是这些处于快速分裂期的细胞抵抗突变的方式,关于细胞增殖及细胞凋亡的局部调节因子有待于进一步证实,其中骨形成蛋白可能在这一过程中起重要的调节作用。

3.7 胶原蛋白 A、B、

胶原酶是鹿茸中主要的表达蛋白。通过原位杂交对鹿茸尖部胶原酶的表达研究结果表明,型原胶原 mRNA从外侧的皮层到软骨区都有分布,包括外皮、纤维的软骨膜及其下紧密的细胞区。这一区域之下的柱状排列的且与血管并存由软骨基质组成的细胞群表达 A、B和型胶原。在软骨区, A型胶原主要在前软骨细胞中表达, B和型胶原在整个软骨区均由成软骨细胞表达。

4 展望

鹿茸作为哺乳动物可以再生的骨质性器官分化较细,为骨化的研究提供了优秀的模型,但其研究主要集中在组织学、组织化学等方面,对于其调控机理的研究还有待进一步深入。可以预言,对鹿茸形成及骨化机制的研究不仅有助于提高鹿茸的质量及产量,而且为医学上骨再生的研究奠定了基础。(011)

RNA i技术抑制禽主要病毒感染的研究进展

嵇辛勤,段志强

(贵州大学 动物科学学院动物医学系,贵州 贵阳 550025)

中图分类号: S852.65

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2009)08-0028-03

RNA干扰(RNAi)是由内源性或外源性双链RNA(dsRNA)介导的特异性基因表达沉默现象。1998年,Fire首次发现dsRNA并将其注入线虫(*C. elegans*)体内可特异性抑制基因表达,将这种由dsRNA引发的抑制特定基因表达的现象称为RNAi。随后,RNAi的基础研究和应用迅速成为21世纪初生命科学的热点研究之一。RNAi技术作为基因沉默的有力工具,在医药开发、基因治疗和功能基因组研究等方面的应用得到了飞速发展。由于RNAi具有超越疫苗和抗病毒药物的诸多优点,并给人类及动物重要疾病的防治提供了新思路。文章对RNAi的作用机理、应用及其在抑制禽主要病毒感染方面的研究进行了阐述。

收稿日期: 2008-12-29;修回日期: 2009-02-02

作者简介: 嵇辛勤(1957-),女,副教授,本科。

1 RNA i的作用机理

不同领域的学者通过对线虫与植物的遗传学分析和果蝇提取物的生化研究发现,RNAi主要是转录后的基因沉默,包括起始阶段和效应阶段。

在起始阶段,由外源导入或由转基因、转座子转录、RNA病毒感染等各种方式引入细胞内的dsRNA可被Dicer酶切割成21~23 nt长的小分子干扰RNA片段(small interfering RNAs, siRNAs)。Dicer酶是RNA酶家族中特异性识别dsRNA的一员,能以一种ATP依赖的方式逐步切割引入dsRNA,切割后的每个siRNA 3'末端都有2个碱基突出,是参与基因沉默的标志性结构。

在效应阶段,小分子siRNA双链结合1个核酶复合物形成无活性的RNA诱导沉默复合体(RNA-induced silencing complex, RISC),每个RISC都包含1个siRNA和1个不同于Dicer的RNA酶。目前,