



阿尔茨海默病与PRNP突变体小鼠动物模型

赵进¹, 蔡兆伟², 管峰^{1*}

(1. 中国计量大学生命科学学院, 杭州 310018; 2. 浙江中医药大学动物实验研究中心, 杭州 310053)

【摘要】 阿尔茨海默病是由 β 淀粉样蛋白造成的人类神经损伤性痴呆病之一, 目前尚无治疗办法。朊蛋白是 β 淀粉样蛋白的受体, 是阿尔茨海默病发病过程的关键蛋白之一, 具有传递神经毒性和保护神经细胞的双重作用。人朊蛋白编码基因(PNRP)多态性影响阿尔茨海默病的潜伏期和临床症状, 而PRNP突变体小鼠的发现提升了动物模型在朊蛋白疾病研究中的应用价值, 在一定程度上弥补了现有阿尔茨海默病动物模型的不足。本文总结了朊蛋白在阿尔茨海默病病理中的作用及PRNP突变对阿尔茨海默病的影响, 并详细总结了PRNP突变体小鼠的发现及在蛋白沉淀样病变研究中的应用和价值, 旨在为阿尔茨海默病动物模型研究提供理论参考。

【关键词】 阿尔茨海默病; 朊蛋白编码基因; 基因突变; 小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)05-0541-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.05.019

Alzheimer's disease and PRNP mutational mouse models

ZHAO Jin¹, CAI Zhao-wei², GUAN Feng^{1*}

(1. China Jiliang University, College of Life Sciences, Hangzhou 310018, China;

2. Zhejiang Chinese Medical University, Laboratory Animal Research Center, Hangzhou 310053)

【Abstract】 Alzheimer's disease (AD) is one of the most common dementia of neurodegenerative disorders, which results from the deposition of amyloid-beta ($A\beta$) and there are no curative treatments for this disease at present. It had been proved that prion protein is the receptor for $A\beta$ and it plays a key role in the progress of AD with dual-side effects. Prion protein can not only transfer neurotoxicity to neurons but also protect them from neurotoxicity of $A\beta$. The polymorphisms of prion protein encoding gene (PRNP) affect the AD incubation period and clinical symptoms in humans and other animals. The discovery of PRNP mutational mouse fills the gaps of existing AD mouse models in this research area, which is potential for the studies of pathogenesis, new drugs design and testing aspects. The role and effects of prion protein in AD pathogenesis were summarized in this paper, furthermore, the discovery and utility of PRNP gene mutational mouse in research on AD and/or amyloid diseases were reviewed, and in order to provide some guidance for AD animal model study.

【Key words】 Alzheimer's disease (AD); Prion protein encoding gene (PRNP); Gene mutation; Mouse model

Corresponding author: GUAN Feng. E-mail: guanfengzgj@163.com

1 阿尔茨海默病与朊蛋白

人类的阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 又称老年性痴呆, 是一种常见的以中枢神经尤其以大脑组织 β 淀粉样沉淀为主要病理症状的疾病, 也是一种神经退行性疾病。目前全世界大约有4400万AD患者, 已经成为一项严重的社会负担, 预

计将来20年内这一数字还将会增加一倍^[1, 2], 该病也是引起全球人类死亡的第四大疾病。目前已知的具有类似 β 淀粉样沉淀症状的疾病还有朊蛋白疾病, 该病是由朊蛋白 (prion protein, PrP) 空间结构变异引起的一类人畜共患病, 包括人克雅氏病 (CJD)、格斯特曼综合症 (GSS)、家族致死性失眠综合症 (FFI) 和新型克雅氏病 (vCJD) 以及羊的痒

[基金项目] 浙江省科技厅公益技术应用研究(实验动物)项目(项目编号:2016C37114)。

[作者简介] 赵进, 男, 博士, 高级实验师, 从事蛋白结构与功能研究。E-mail: zhaojin@cjlu.edu.cn

[通讯作者] 管峰, 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 主要从事动物分子遗传研究。E-mail: guanfengzgj@163.com

病 (scrapie)、牛海绵状脑病 (BSE, 即“疯牛病”)、鹿慢性消耗性疾病 (CWD) 等^[3-5], 但至今对于这些疾病的发病机制尚不完全清楚, 也没有特异性治疗药物^[6, 7]。在发病机制方面, 不溶性的 β 淀粉样沉淀一直被认为是 AD 发病的根源, 但最新研究表明可溶性 β 淀粉样蛋白单体的毒性才是造成神经细胞死亡的根源^[7]。而朊蛋白疾病如疯牛病则是细胞型朊蛋白 (PrP^C) 空间结构变异生成致病性朊蛋白 (PrP^{Sc}) 所引起的^[8, 9]。尽管 AD 与朊蛋白疾病病原不同, 但 PrP^C 被证实是 AD 发病中的必备“两面性”受体, 在发病中 PrP^C 既可以直接传递并调节 β 淀粉样蛋白的毒性, 破坏突触传导造成神经损伤, 也具有保护并修复损伤的神经纤维、延缓并清除 β 淀粉样沉淀的作用^[2, 10, 11], 这可能是位于细胞膜上的不同配体或细胞因子与 PrP^C 结合后作用不同的表现^[12], 因此 PrP^C 与 AD 具有直接关系, 诸多研究也表明 PrP^C 是 AD 发病过程必不可少的关键蛋白^[7, 13-15]。另一方面, 通过改变 PrP^C 的结构以及表达量可以有效降低患者的 β 淀粉样蛋白沉淀, 缓解阿尔茨海默病症状, PrP^C 已成为 AD 治疗与药物开发的重要靶标^[11, 14, 16, 17], 在 AD 研究中具有重要作用。

2 阿尔茨海默病与 PRNP 突变

朊蛋白是多种动物体内正常表达的一种蛋白质, 主要在神经系统高度表达, 具有保护神经细胞、抗氧化应激、转运金属离子等方面的功能^[18, 19]。朊蛋白存在两种空间结构不同的构象, 即正常朊蛋白 (PrP^C) 和致病朊蛋白 (PrP^{Sc}), 二者一级结构完全相同, 但空间结构不同, 理化性质也有很大差异, 后者具有感染性, 但无免疫性, 在宿主细胞内以 PrP^C 为反应底物进行复制, 从而导致朊蛋白疾病^[20]。PrP^C 由朊蛋白基因 (prion protein gene, PRNP) 编码, 小鼠的 PRNP 位于 2 号染色体, 含有三个外显子, 开放阅读框 (ORF) 全部位于第三个外显子^[21]。PRNP 在哺乳动物中具有高度保守性, 所有动物的 ORF 都编码一个大小约为 250 个氨基酸的蛋白^[21, 22]。PRNP 多态性与物种对于朊蛋白疾病的易感性、临床表现和潜伏期等有着密切关系^[23]。目前已经阐明绵羊 PRNP 的多个突变与羊对痒病易感性有关, 这些研究成果已经用于绵羊抗病育种实践^[24, 25], 牛 PRNP 多态性也与疯牛病的易感性相关^[26]。人类 PRNP 第 129 位氨基酸存在甲硫氨酸 (Met) 和缬氨酸 (Val) 两种多态性, 该位点与 AD 潜伏期和临床症状相关, 但在不同人群中存在差异^[27-30], 这一多

态位点也和人类其他朊蛋白疾病的抗性相关^[5]。另外, 还发现人 PRNP 的 G127V 和 E219K 与抗病性相关, 而诸多突变点如 P102L、P105L、A117V、G131V、N171S、D178N、V180I、T183A、E196K、F198S、E200K、D202N、V203I、R208H、V201I、E211Q、Q212P、Q217R 和 M232R 则表现为易感性增加^[31], 而 I215V、S97N、F198V 和 R208C 等突变也可能与 AD 相关^[32, 33]。越来越多的证据表明, PRNP 突变与 AD 存在关联性且影响 AD 的进程, PRNP 突变或许通过影响 PrP^C 的结构而影响 AD 的进程^[17], 但其具体机制尚不清楚。

3 阿尔茨海默病现有动物模型的研究概况

目前关于 AD 等类似疾病的发病机制尚不完全清楚, 发病病例存在散发性、遗传性和传染性的特点, 这些因素在很大程度上制约了 AD 治疗药物的筛选, 而主要障碍之一是缺少合适的动物模型^[34]。现代医学通过建立动物模型复制出人类的疾病并开展病理学、药物开发和预防治疗等多方面的研究。目前人类 AD 动物模型总体上分为常规模型和转基因动物模型。常规动物模型主要有快速老化小鼠模型、D-半乳糖 (D-gal) 损害模型、胆碱损害模型、铝元素中毒模型、注射模型等^[35-39], 但这些模型存在不足^[40-43], 如价格昂贵、寿命短、不适于做长期实验, 且个体差异大, 不能很好的模拟人类的病理变化等缺点, 不能很好地满足在病理机制和药物筛选研究方面的需要, 此类动物模型逐渐被转基因动物模型所取代。转基因动物模型是近年来随着转基因技术和遗传学发展而来的, 主要通过对其发病具有重要影响的基因进行沉默或超表达等手段改造而来, 目前已有多个 AD 转基因动物模型, 在病理学研究中发挥了重要作用^[6, 34, 38-40, 44-48]。转基因动物模型相比复杂的病理过程来说还有一定差距, 难以很好地呈现人类疾病中的病理变化; 其次转基因动物模型还存在制作困难、成本高等缺点; 最后, 转基因动物还存在近交衰退、繁殖率和存活率低等不足, 这也是制约转基因动物模型应用的一个重要因素^[34, 49]。总之, 现有的 AD 动物模型在发挥其病理学研究的同时还存在与人类发病机制的差异, 因此尚不能很好的满足在 AD 病理学研究和药物开发中的应用。

4 PRNP 突变体小鼠与阿尔茨海默病研究

小鼠 AD 动物模型在人类 AD 和朊蛋白疾病研

究中的应用已有 30 多年的历史。随着对朊蛋白疾病的深入研究,在小鼠和人类基因组中发现了多个与朊蛋白疾病和 AD 有关的 PRNP 突变,其中人 PRNP 第 129 位氨基酸突变与 AD 和克雅氏病易感性均相关^[28, 30, 50]。同时,研究人员也发现小鼠 PRNP 基因多态性影响小鼠对 β 淀粉样蛋白及朊蛋白疾病的易感性且与之存在高度相关^[8, 51-54]。最初采用仓鼠和小鼠的 cDNA 探针在近交系 I/LnJ 小鼠家系中发现了一个限制性酶切片长度多态性 (RFLP) 位点,即用内切酶 Xba I 酶切小鼠 DNA 后分别得到 3.8 kb 和 5.5 kb 两个不同长度的片段,这一多态性把 I/LnJ 小鼠分成易感性显著不同的两个群体:潜伏期分别为 (113 ± 2.8) d 和 $(200 - 385)$ d, 定义为 Prnp^a 和 Prnp^b 等位基因^[52, 55], 此前也发现具有同样酶切多态位点的 C57BL 和 DBA 小鼠具有类似差异的潜伏期^[51]。后来 DNA 测序证明这个多态性位点为 L108-T189 和 F108-V189 等位基因^[53, 56, 57], 最近还在该位点发现了基因型为 F108-T189 的小鼠^[56]。对于小鼠 Prnp^a 和 Prnp^b 两种多态性位点影响不同潜伏期的分子机制,体外研究表明二者形成的蛋白在二级结构及物理特性上几乎完全一致,但在蛋白结构转变过程中 Prnp^b 结构的迟滞期明显长于 Prnp^a 型蛋白(平均为 140 h 和 36 h), 尽管这种转化的时间受到病原种类特异性的影响,但推测转换的时间是由宿主本身的 PrP^C 一级结构决定的^[54], 且小鼠 PrP^C 的 100 - 104 位氨基酸对 PrP^{Sc} 生成具有重要影响^[58]。在目前研究的实验小鼠中已发现 5 个具有抗性的小鼠家系,即 I/LnJ、R III S/J、P/J、MA 和 MyJ,而易感性的小鼠家系主要有 21 个,包括 NZW/LacJ、BALB/cJ、BUB/BnJ、CBA/J、CE/J、C3H/HeSn、C57BL/6J、C57BL/10Sn 和 DBA/2J 等; 杂交及回交实验证明这些突变体小鼠的易感性受到单一基因 PRNP 控制,且具有抗性的 Prnp^b 等位基因为显性基因,这些 PRNP 突变体小鼠为 AD 和朊蛋白疾病研究提供了新的平台和材料^[52, 56, 59, 60], 在病理学研究、临床症状研究和医药开发等领域逐步发挥出其不可替代的作用。

PRNP 突变体小鼠模型的发现和应用对 AD 治疗和药物开发研究提供了全新的参考依据,但是其不同突变品种(系)的易感性不同,限制了小鼠模型的规范化使用。Shirai 等^[61] 对小鼠不同的 PRNP 突变做了系统的研究和易感性评价。结果表明最易导致蛋白构象转变的 PRNP 突变点位于 PrP 氨基酸的 K103-A119 和 S131-M137 两个区域,这两个区域均为 PrP^C 结构中 N-端的核心区。细胞模型研究显示,

最易于改变三维结构的突变点 V121I 大大增加了 PrP^C 向致病性 PrP^{Sc} 结构转换的概率(提高了 23.3 倍),其他影响转变的依次还有 K105R (17.1 倍)、A115S (16.5 倍)、H176R (15.6 倍)、A115W (15.5 倍)、A117V (14.8 倍)、Y127I (13.4 倍)、A115N (12.7 倍)、P104T (12.1) 和 A115Y (10.6 倍)。这一研究结果对 PRNP 突变体小鼠模型在 AD 研究中的应用提供了重要参考。

5 小结与展望

AD 是全球老年性痴呆病的代表性疾病,约占痴呆病患者的 70%, 严重危害人类健康,世界多国因此开展了病理和治疗方面的研究,但至今尚无治疗办法。遗传学和病理学方面的研究部分揭开了 AD 的发病机制,同时也创制了多种动物模型,尤其是基因突变体小鼠的发现丰富了现有动物模型的多样性,为 AD 及相关疾病的研究提供了一些新型材料,推动了 AD 的研究进程。另外,在 AD 小鼠模型的研究中发现了牛磺脱氧胆酸(TUDCA)和熊去氧胆酸(UDCA)可以有效治疗 AD 症状^[62], 而苔藓提取物和肝素类物质以及干细胞在治疗 AD 方面也已显现出良好的前景。随着更加丰富多样的 AD 动物模型的开发应用以及新品种培育,必将推动在病理学及药物开发治疗等方面的进展。但同时还有许多尚需解决的问题,如何有效控制这些疾病的跨物种传播以及如何克服耐药性问题都将是科研工作者面临的难题,不过随着研究的进展人们必将全面了解 AD 等疾病并能通过掌握的知识造福于人类的健康和发展。

参 考 文 献

- [1] 倪嘉纘,陈平,刘琼,等. 阿尔茨海默病的防治策略研究进展 [J]. 深圳大学学报理工版, 2013, 30(4): 331 - 348.
- [2] Wortmann M. Dementia: a global health priority - highlights from an ADI and World Health Organization report [J]. *Alzheimers Res Ther*, 2012, 4(5): 1 - 3.
- [3] Collinge J, Clarke AR. A general model of prion strains and their pathogenicity [J]. *Science*, 2007, 318(5852): 930 - 936.
- [4] Imran M, Mahmood S. An overview of human prion diseases [J]. *Virology*, 2011, 8: 559.
- [5] Jeong BH, Kim YS. Genetic studies in human prion diseases [J]. *J Korean Med Sci*, 2014, 29(5): 623 - 632.
- [6] Comoy EE, Mikol J, Luccantoni-Freire S, et al. Transmission of scrapie prions to primate after an extended silent incubation period [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 11573.
- [7] Zhou J, Liu B. Alzheimer's disease and prion protein [J]. *Intractable Rare Dis Res*, 2013, 2(2): 35 - 44.
- [8] Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie [J]. *Science*, 1982, 216(4542): 136 - 144.

- [9] Hadlow WJ, Prusiner SB, Kennedy RC, et al. Brain tissue from persons dying of Creutzfeldt-Jakob disease causes scrapie-like encephalopathy in goats [J]. *Ann Neurol*, 1980, 8(6):628-632.
- [10] Schmitz M, Wulf K, Signore SC, et al. Impact of the cellular prion protein on amyloid-beta and 3PO-Tau processing [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 38(3):551-565.
- [11] Um JW, Strittmatter SM. Amyloid-beta induced signaling by cellular prion protein and Fyn kinase in Alzheimer disease [J]. *Prion*, 2013, 7(1):37-41.
- [12] Watt NT, Griffiths HH, Hooper NM. Lipid rafts: linking prion protein to zinc transport and amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2014, 2:41.
- [13] Morales R, Bravo-Alegria J, Duran-Aniotz C, et al. Titration of biologically active amyloid-beta seeds in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease [J]. *Sci Rep*, 2015, 5:9349.
- [14] Wiseman FK, Cancellotti E, Piccardo P, et al. The glycosylation status of PrPC is a key factor in determining transmissible spongiform encephalopathy transmission between species [J]. *J Virol*, 2015, 89(9):4738-4747.
- [15] Gimbel DA, Nygaard HB, Coffey EE, et al. Memory impairment in transgenic Alzheimer mice requires cellular prion protein [J]. *J Neurosci*, 2010, 30(18):6367-6374.
- [16] Lauren J. Cellular prion protein as a therapeutic target in Alzheimer's disease [J]. *J Alzheimers Dis*, 2014, 38(2):227-244.
- [17] Xia M, Cheng X, Yi R, et al. The binding receptors of abeta: an alternative therapeutic target for Alzheimer's disease [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(1):455-471.
- [18] Mouillet-Richard S, Vilotte JL. Promiscuous functions of the prion protein family [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2015, 3:7.
- [19] Allais-Bonnet A, Pailhoux E. Role of the prion protein family in the gonads [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2014, 2:56.
- [20] Saijo E, Kang HE, Bian J, et al. Epigenetic dominance of prion conformers [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(10):e1003692.
- [21] Sparkes RS, Simon M, Cohn VH, et al. Assignment of the human and mouse prion protein genes to homologous chromosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, 83(19):7358-7362.
- [22] Passet B, Halliez S, Beringue V, et al. The prion protein family: looking outside the central nervous system [J]. *Prion*, 2013, 7(2):127-130.
- [23] Cortez LM, Sim VL. Implications of prion polymorphisms [J]. *Prion*, 2013, 7(4):276-279.
- [24] 朱庆丰, 刁俊超, 潘磊, 等. 湖羊 PRNP 多态性及其对产羔数影响和抗痒病风险评价 [J]. *中国预防兽医学报*, 2012, 34(10):802-806.
- [25] 管峰, 潘磊, 石国庆, 等. 绵羊 PRNP 遗传多样性与抗病育种研究进展 [J]. *遗传*, 2009, 31(2):137-141.
- [26] 管峰, 潘磊, 石国庆, 等. 牛朊蛋白基因多样性与抗病性研究进展 [J]. *草食家畜*, 2008(2):7-10.
- [27] Smid J, Landemberger MC, Bahia VS, et al. Codon 129 polymorphism of prion protein gene in is not a risk factor for Alzheimer's disease [J]. *Arq Neuropsiquiatr*, 2013, 71(7):423-427.
- [28] Nystrom S, Mishra R, Hornemann S, et al. Multiple substitutions of methionine 129 in human prion protein reveal its importance in the amyloid fibrillation pathway [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(31):25975-25984.
- [29] 钱海蓉, 王鲁宁, 朱明伟. 朊蛋白基因 129 密码子多态性与阿尔茨海默病的关系 [J]. *中华内科杂志*, 2006, 45(11):922-925.
- [30] He J, Li X, Yang J, et al. The association between the methionine/valine (M/V) polymorphism (rs1799990) in the PRNP gene and the risk of Alzheimer disease: an update by meta-analysis [J]. *J Neurol Sci*, 2013, 326(1-2):89-95.
- [31] Lee JH, Bae SE, Jung S, et al. Discriminant analysis of prion sequences for prediction of susceptibility [J]. *Exp Mol Med*, 2013, 45:e48.
- [32] Munoz-Nieto M, Ramonet N, Lopez-Gaston JI, et al. A novel mutation I215V in the PRNP gene associated with Creutzfeldt-Jakob and Alzheimer's diseases in three patients with divergent clinical phenotypes [J]. *J Neurol*, 2013, 260(1):77-84.
- [33] 刘峥, 贾建平. 162 例散发性阿尔茨海默病朊蛋白基因突变的研究 [J]. *脑与神经疾病杂志*, 2008, 16(4):273-276.
- [34] 董贤慧, 柴锡庆. 阿尔茨海默病转基因动物模型: 如何更接近病理特征? [J]. *中国组织工程研究*, 2013, 17(46):8075-8082.
- [35] 柯行, 吴铁, 刘义. 老年性痴呆动物模型研究进展 [J]. *科技导刊*, 2013, 3:159-161.
- [36] 赵波, 张新宇, 付学锋. 阿尔兹海默病动物模型的研究进展 [J]. *神经解剖学杂志*, 2012, 28(1):102-104.
- [37] 章志宏. 重组朊病毒的体外制备及动物模型研究 [D]. 华东师范大学: 2012.
- [38] 李岚, 刘爽, 于燕, 等. 阿尔茨海默病复合动物模型的构建 [J]. *中国老年学杂志*, 2015, 33(23):6685-6688.
- [39] 董雯, 王蓉. 阿尔兹海默病动物模型研究进展 [J]. *中国现代神经疾病杂志*, 2015, 15(8):610-614.
- [40] 杨翠翠, 李林, 张兰. 常用阿尔兹海默病动物模型制备方法及其评价 [J]. *成都医学院学报*, 2013, 8(4):374-380.
- [41] 宋春未, 戴雪伶, 姜招峰. 阿尔兹海默病实验动物模型研究进展 [J]. *生物学杂志*, 2013, 30(5):85-89.
- [42] Woldemeskel M. A concise review of amyloidosis in animals [J]. *Vet Med Int*, 2012, 2012:427296.
- [43] Fernandez-Borges N, Elezgarai SR, Erana H, et al. Animal models for testing anti-prion drugs [J]. *Curr Top Med Chem*, 2013, 13(19):2504-2521.
- [44] Gong HS, Tian C, Zhang BY, et al. Establishment of hamster and human-PRNP transgenic mice [J]. *Biomed Environ Sci*, 2011, 24(6):608-616.
- [45] Badhwar A, Lerch JP, Hamel E, et al. Impaired structural correlates of memory in Alzheimer's disease mice [J]. *Neuroimage Clin*, 2013, 3:290-300.
- [46] Gotz J, Ittner LM. Animal models of Alzheimer's disease and frontotemporal dementia [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2008, 9(7):532-544.
- [47] Cao Z, Robinson RA. Proteome characterization of splenocytes from an AbetaAPP/ps-1 Alzheimer's disease model [J]. *Proteomics*, 2014, 14(2-3):291-297.
- [48] Wadsworth JD, Asante EA, Collinge J. Review: contribution of transgenic models to understanding human prion disease [J]. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2010, 36(7):576-597.

- [49] 靳森, 安红梅. 阿尔茨海默病的动物模型制备及药物治疗 [J]. 神经药理学报, 2011, 1(06): 28-36.
- [50] 罗曼, 李天骄, 孙逊沙, 等. 7 例散发性 Creutzfeldt-Jakob 病患者的 PRNP 和 APOE 基因突变/变异检测及其临床意义 [J]. 中风与神经疾病杂志, 2012, 29(8): 729-731.
- [51] Kingsbury DT, Kasper KC, Sites DP, et al. Genetic control of scrapie and Creutzfeldt-Jakob disease in mice [J]. J Immunol, 1983, 131(1): 491-496.
- [52] Carlson GA, Kingsbury DT, Goodman PA, et al. Linkage of prion protein and scrapie incubation time genes [J]. Cell, 1986, 46(4): 503-511.
- [53] Westaway D, Goodman PA, Mirenda CA, et al. Distinct prion proteins in short and long scrapie incubation period mice [J]. Cell, 1987, 51(4): 651-662.
- [54] Cortez LM, Kumar J, Renault L, et al. Mouse prion protein polymorphism Phe-108/Val-189 affects the kinetics of fibril formation and the response to seeding: evidence for a two-step nucleation polymerization mechanism [J]. J Biol Chem, 2013, 288(7): 4772-4781.
- [55] Westaway D, Prusiner SB. Conservation of the cellular gene encoding the scrapie prion protein [J]. Nucleic Acids Res, 1986, 14(5): 2035-2044.
- [56] Lloyd SE, Thompson SR, Beck JA, et al. Identification and characterization of a novel mouse prion gene allele [J]. Mamm Genome, 2004, 15(5): 383-389.
- [57] Moore RC, Hope J, McBride PA, et al. Mice with gene targeted prion protein alterations show that Prnp, Sinc and Prni are congruent [J]. Nat Genet, 1998, 18(2): 118-125.
- [58] Hara H, Okemoto-Nakamura Y, Shinkai-Ouchi F, et al. Mouse prion protein (PrP) segment 100 to 104 regulates conversion of PrP(C) to PrP(Sc) in prion-infected neuroblastoma cells [J]. J Virol, 2012, 86(10): 5626-5636.
- [59] Akhtar S, Wenborn A, Brandner S, et al. Sex effects in mouse prion disease incubation time [J]. PLoS One, 2011, 6(12): e28741.
- [60] Lee YH, Sohn HJ, Kim MJ, et al. Experimental chronic wasting disease in wild type VM mice [J]. J Vet Med Sci, 2013, 75(8): 1107-1110.
- [61] Shirai T, Saito M, Kobayashi A, et al. Evaluating prion models based on comprehensive mutation data of mouse PrP [J]. Structure, 2014, 22(4): 560-571.
- [62] Cortez LM, Campeau J, Norman G, et al. Bile acids reduce prion conversion, reduce neuronal loss, and prolong male survival in models of prion disease [J]. J Virol, 2015, 89(15): 7660-7672.

[收稿日期] 2016-03-08

(上接第 528 页)

未经染色时,阴道涂片可见结晶,固定染色后,结晶消失。动情前期,可见到云雾状结晶。动情期,未见典型结晶。动情后期及动情间期的阴道涂片,除了见到细胞形态外,还可见到大量金鱼草样结晶,考虑是由于粘液导致的。这与人类排卵期出现的羊齿状结晶不同,仅凭看到规则结晶,尚不能确定 NOD/SCID 小鼠处于动情期,这与文献报道一致^[4]。对于无规律动情期的 NOD/SCID 小鼠,非动情期也可出现羊齿状结晶,这一特点和普通 KM 小鼠有相似之处^[4]。卵巢切除术后 3~7 d 的阴道涂片,除了少量有核上皮细胞,大量白细胞,亦可见到大量规则金鱼草状结晶,这与排卵与否无关。

在本实验中,动情周期阴道口状态与动情周期无明显相关,通过阴道口无法判断 NOD/SCID 小鼠处于动情周期的哪一个阶段,这与相关研究一致^[6]。在 36 只 SD 大鼠的研究中,15 只动情期大鼠外阴出现肿胀,相符率达到 42%^[7]。而本研究中,阴道口呈张开状态的 NOD/SCID 小鼠不一定处于动情期,还可能是动情后期、动情间期。有 2 只 NOD/SCID 小鼠在动情期出现阴道口湿润,分泌物清稀。

一般在观察动物动情期持续时间时,需要严格按照每隔几小时进行一次阴道涂片。本实验由于受实验室条件限制,每日进行阴道涂片两次,具体动情

期持续时间无法严格判断。

在本实验中,卵巢切除术后进行连续阴道涂片,可确认卵巢去势是否成功。去卵巢 NOD/SCID 小鼠在国外文献中应用较多,一般配合补充雌孕激素缓释片,用于建立移植异体子宫肌瘤的模型^[8]。

参 考 文 献

- [1] Fiebitz A, Fritsch M, Reichelt U, et al. Optimized culture conditions for tissue explants of uterine leiomyoma [J]. ClinLab, 2012, 58: 1153-1164.
- [2] 张欣,于亮. NOD/SCID 小鼠-白血病模型在白血病研究中的应用现状及进展 [J]. 临床血液学杂志, 2015, 28(03): 451-454.
- [3] Shultz LD, Schweitzer PA, Christianson SW, et al. Multiple defects in innate and adaptive immunologic function in NOD/LtSz-scid mice [J]. J Immunol, 1995, 154(1): 180-191.
- [4] 李靖,李炫诚,吴云霞. 确定小鼠动情周期的三种方法 [J]. 实验动物科学, 2007, 24(03): 63-64.
- [5] 孙艳浮,李瑞玉. 中医药治疗子宫肌瘤的现状与展望 [J]. 中国民间疗法, 2015, 23(09): 96-97.
- [6] 杜纳纳,许丹丹,黄莉莉. 去卵巢和性成熟期 ICR 雌性小鼠动情周期的观察 [J]. 中国病理生理杂志, 2015, 31(12): 2301-2304.
- [7] 肖尚杰,慧敏,秋明. 大鼠阴道涂片的观察 [J]. 广州医学院学报, 2007, 35(4): 54-56.
- [8] Wang G, Ishikawa H, Sone K, et al. Nonobese diabetic/severe combined immunodeficient murine xenograft model for human uterine leiomyoma [J]. Fertil Steril, 2014, 101(5): 1485-1492.

[收稿日期] 2016-05-11