

靶向调控大鼠海马 CNN3 基因表达载体的构建及鉴定

孙俊梅¹, 龙晶晶¹, 韩雁冰¹, 蔡雪梅², 陆地³, 边立功³, 郭家智³, 李梅¹

(昆明医科大学第一附属医院 1. 神经内科; 2. 检验科, 昆明 650031;
3. 昆明医科大学生物医学工程研究中心, 昆明 650500)

【摘要】 目的 建立可调控大鼠局部脑区 CNN3 基因表达的技术, 为进一步研究 CNN3 基因参与脑内病理生理过程奠定基础。**方法** 设计并合成针对 CNN3 基因的全长编码序列 cDNA 和 3 条 shRNA 干扰靶点序列, 利用基因工程技术构建 CNN3-OE 和 3 个 CNN3-shRNA 慢病毒载体, 在立体定位仪引导下注入大鼠海马, 采用蛋白免疫印迹技术筛选 CNN3 基因的最佳沉默序列, 并找出重组表达和沉默慢病毒载体调控海马 CNN3 基因的变化规律。**结果** CNN3-OE 和 3 个 CNN3-shRNA 慢病毒干扰载体均构建成功, 转染后 8 周内对海马 CNN3 基因水平有一定调控作用, 其中 CNN3-shRNA2 载体组在转染后的 8 周内海马 CNN3 基因编码蛋白 calponin-3 水平显著性下调, 最高抑制率为 73.26%; CNN3-OE 慢病毒载体组中海马 calponin-3 蛋白水平具有统计学意义的升高仅在转染后第 14 天, 上调率为 93.88%。**结论** 通过定位注射 CNN3-OE 和 CNN3-shRNA 慢病毒载体可在体调控局部脑区 CNN3 基因表达, 为后续的机制研究和开拓疾病防治新途径奠定基础。

【关键词】 CNN3; 基因; 沉默; 重组; 慢病毒载体

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 02-0055-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.02.012

Construction and identification of lentivirus-mediated vectors targeting CNN3 gene in the rat hippocampus

SUN Jun-mei¹, LONG Jing-jing¹, HAN Yan-bing¹, CAI Xue-mei², LU Di³, BIAN Li-gong³, GUO ia-Zhi³, LI Mei¹

(1. Department of Neurology, 2. Department of Clinical Laboratory,

First Affiliated Hospital of Kunming Medical University, Kunming, 650031, China;

3. Biomedical Engineering Research Center, Kunming Medical University, Kunming, 650500)

【Abstract】 Objective To establish a method focusing on regulation of CNN3 gene in the rat hippocampus and help to explore the role of CNN3 gene played in the brain physiology and pathology. **Methods** One cDNA sequence and three shRNAs targeting CNN3 gene were designed and synthesized. The recombinant lentivirus-mediated expressing and three short hairpin RNA (shRNA) vectors targeting CNN3 gene in the rats were constructed with engineering technology. All recombinant vectors were intravenously injected into rats hippocampi guided by stereotaxic apparatus. Western blot was performed to explore the best shRNA and to study the changes of CNN3 gene in the rat hippocampus after transfection with the silence and over-expressed vectors. **Results** The lentivirus-mediated vector expressing CNN3-OE and three shRNA vectors targeting CNN3 gene were successfully constructed. Within eight weeks after transfection, the vectors of CNN3-OE and three CNN3-shRNAs changed the expression of CNN3 gene in the rat hippocampus, in particular, all the protein levels

【基金项目】 国家自然科学基金地区基金(81260199); 云南省科技厅-昆明医科大学联合基金(2012FB030); 云南省卫生科技计划项目(2012WS0002)。

【作者简介】 孙俊梅(1989-), 女, 研究生, 专业: 神经病学。E-mail: 675181708@QQ.com。

【通讯作者】 韩雁冰(1972-), 女, 副主任医师, 硕士生导师, 研究方向: 癫痫的发病机制和临床防治。E-mail: ynhyb@163.com。

of calponin-3 encoded by CNN3 gene were significantly down-regulated along with the time, with the highest inhibitory rate of 73.6% in the CNN3-shRNA2 group. Significant up-regulation of calponin-3 protein level by 93.88%, was found only on the 14th day after transfection. **Conclusions** Lentivirus-mediated vectors of CNN3-OE and CNN3-shRNAs may regulate in vivo the CNN3 gene level in the local brain region of rats via stereotactic injection. The study lays a foundation for disease prevention and treatment in the future.

【Key words】 CNN3; Gene; Silencing; Recombination; Lentiviral vector

1995 年 Maguchi 等^[1]首次分离出 CNN3 基因,其编码的 calponin-3 蛋白可与肌动蛋白、钙调蛋白、肌钙蛋白和原肌球蛋白结合,不仅分布在肝、肺、肾、肌肉、皮肤、卵巢^[2-5],还是 calponin 家族中唯一分布在中枢神经系统的一个亚型,在大脑、小脑和脑血管均有表达^[6-8],尤其是近年来研究显示 CNN3 基因及 calponin-3 蛋白异常可能改变大脑海马内神经元形态,甚至导致突触重塑^[9,10]。本课题组前期研究也观察到 CNN3 基因和 calponin-3 蛋白在癫痫患者及大鼠大脑海马组织和脑脊液内表达水平显著升高,提示可能参与癫痫发生,但具体机制尚未阐明^[11]。其中的一个重要原因就是目前尚未建立可靶向沉默或过表达活体动物局部脑区的 CNN3 基因可靠技术。倘若能定向定量在体调控实验动物脑内 CNN3 基因表达水平,将对阐明 CNN3 基因功能、深入研究其在突触重塑及癫痫等脑内病理生理过程中的确切作用及开辟新的治疗途径等具有重要意义。因此我们将构建针对大鼠 CNN3 基因的 shRNA 及过表达 (OE) 慢病毒载体,再通过活体定位局部注射靶向沉默或上调大鼠海马 CNN3 基因表达水平,并进行验证。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

感受态细胞 DH5 α 、pGMLV-sc5 RNAi 慢病毒载体、293T 细胞(上海吉满基因技术有限公司);PCR 用试剂 primer(上海生工生物工程有限公司);Taq polymerase(美国 NEB 公司);Qiagen 质粒大抽试剂盒(德国 Qiagen 公司);LB 培养基(Alpha Aeser);BSA、DMSO、MgSO₄、CaCl₂(美国 Sigma 公司);胎牛血清、DMEM、胰酶(美国 Gibco 公司);琼脂糖(美国 Bio-Rad 公司);T4 DNA ligase、T4 DNA ligase buffer、DNA ladder、BamH I、EcoR I、Xba I、Xho I (Fermentas);RIPA(强)裂解液、PMSF(100 mM)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 CNN3 过表达 (CNN3-OE) 慢病毒载体的制备:

1.2.1.1 引物设计与合成:在 NCBI 中找到 CNN3 基因序列并确定所用载体 pGMLV-PA6。引物序列上游为:5'-CCG GAATTC GCCACC ATGGAC TACAAGGACGATGACGACAAGACCCACTTCAACAA GGGCC-3',下游为:5'-CG GGATCC CTAGTAAT CGATGCCCTGGTCG-3',引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。

1.2.1.2 构建步骤:①利用 T4 连接酶在 22℃ 连接 pGMLV-PA6 载体与目的片段 60 min。②将连接产物转化入制备好的感受态细胞对长出的单克隆菌落先进行 PCR 鉴定,PCR 鉴定阳性菌落进行测序鉴定。

1.2.2 RNA 干扰 CNN3 慢病毒载体的制备:

1.2.2.1 CNN3 基因 shRNA 表达模板序列设计与合成:在 GenBank 网站中查询到目的基因 CNN3 的 mRNA,参考 RNA 干扰序列设计原则,根据我们的设计经验和设计软件进行评估测定,设计 3 个 RNA 干扰靶点序列,并合成 3 对 shRNA 寡聚单链 DNA,序列如下:CNN3-ShRNA1-1:5'-gatccGCAGACTGACAAACCCCTTTGATTCAAGAGATCAAAGGGTTTGTCA GTCTGCTTTTTTg-3',CNN3-ShRNA1-2:5'-aattcAAA AAAGCAGACTGACAAACCCCTTTGATCTCTTGAATCA AAGGGTTTGTCTAGTCTGCG-3';CNN3-ShRNA2-1:5'-gatccGGAGAACATCGGCAACTTTATAGAGAACTTAT AAAGTTGCCGATGTTCTCC TTTTTTg-3',CNN3-ShRNA2-2:5'-aattcAAAAAAGGAGAACATCGGCAAC TTTATAAGTTCTCTATAAAGTTG CCGATGTTCTCCg-3';CNN3-ShRNA3-1:5'-gatcc GGCCAAAGTGTAATCGGTTTAAACCGATTACACTTTGG CCTTTTTTg-3',CNN3-ShRNA3-2:5'-aattcAAAAA GGCCAAAGTGTAATCGGTTTAAAGTTCTCTTAAACC GATTACACTTTGGCCg-3'。

1.2.2.2 shRNA 慢病毒载体的构建与鉴定:①用无菌的 TE buffer 稀释引物使终浓度为 100 μ mol/L。分别吸取 10 μ L 的上下游引物混合并吹打均匀放入

PCR 管内, 94℃ 水浴缓慢退火冷却至室温。②质粒用 BamH I、EcoR I 双酶切, 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 回收大片段。③在 25℃ 中, 利用 T4 连接酶将退火产物和线性化质粒载体 pGMLV-SC5 连接过夜。④连接产物转化至感受态细胞 DH5 α , 经菌液 PCR 鉴定阳性菌落进行测序和比对分析。

1.2.3 慢病毒质粒的包装和滴度测定: 转染前 1 d, 将已经长好的 293T 细胞以合适的比例传代到 10 cm 培养皿中, 转染前 1~2 h 将需要转染的细胞换新鲜的培养基, 按 shRNA 转染体系: DMEM 1 mL、shRNA 10 μ g、Lenti-HGMix 10 μ L、HG transgene reagent 60 μ L; 过表达转染体系: DMEM 1 mL、过表达慢病毒质粒 10 μ g、Lenti-HGMix 10 μ L、HG transgene reagent 60 μ L 混合均匀, 室温放置 15~20 min, 将混合液分别滴入 293T 细胞中, 混匀后置于 CO₂ 培养箱中培养。转染 10~12 h 后加 100 * enhancing buffer 促进转染, 接着 8 h 后更换新鲜培养基, 继续培养 48 h 后, 收集富含慢病毒颗粒的细胞上清液。病毒浓缩纯化使用离心超滤装置(美国 Millipore 公司), 浓缩后得到高滴度的慢病毒浓缩液, 分装后保存于 -80℃。取其中 1 支使用逐孔稀释滴度测定法进行病毒生物学滴度测定, 并计算病毒滴度。

1.2.4 CNN3 基因沉默/过表达鼠模型的建立:

1.2.4.1 实验动物: 实验鼠购自成都达硕实验动物有限公司(动物生产许可证号: SCXK(川)2013-24), 均为 SPF 级、健康雄性 Sprague Dawley (SD) 大鼠, 6 周龄, 体重 180~220 g, 随机分为空 pGMLV-SC5 载体(shRNA 阴性对照)组, 干扰序列 1 的慢病毒载体简称为 shRNA1 组, 干扰序列 2 的慢病毒载体简称为 shRNA2 组, 干扰序列 3 的慢病毒载体简称为 shRNA3 组, 空 pGMLV-PA6 载体(过表达阴性对照)组, CNN3-OE 组简称 OE 组。

1.2.4.2 慢病毒载体转染: 通过立体定位注射方法将 3 个 CNN3-shRNA、CNN3-OE 慢病毒载体及各自对照的空载体转染至各组实验鼠海马。按 0.4 mL/100 g 剂量的 7.2% 的水合氯醛注入大鼠腹腔, 待麻醉生效后将大鼠头部固定在立体定位仪上, 备皮、暴露骨缝, 用 3% 的双氧水止血洗洁。参考大鼠立体定位图谱, 把前囟定为零点, 设定前囟后 3.6 mm、中线旁开 2 mm 处为海马穿刺靶点。将电钻自穿刺靶点处钻开颅骨, 用微量进样器抽取 2 μ L 慢病毒浓缩液并将其在立体定位仪上固定好, 自钻孔部位缓

慢进针至颅骨表面下 3.5 mm, 匀速缓慢(0.2 μ L/min)注入慢病毒载体, 注射完毕后针头留置 10 min, 再缓慢拔出。同样的方法进行对侧海马的注射结束后缝合切口, 手术后大鼠自由进食和休息。

1.2.5 检测慢病毒载体转染效率: 采用免疫印迹(Western blot)实验对各组慢病毒载体转染后实验鼠海马的 CNN3 基因调控蛋白 calponin-3 进行定量。首先在注射慢病毒载体后的第 1、3、7、10、14 天, 随机从 shRNA1、shRNA2、shRNA3、OE 及 2 个对照组中抽取实验鼠处死后分离出海马, 用 RIPA 裂解液(含 PMSF, 体积之比为 RIPA:PMSF = 100:1)按每 100 mg 组织加 1 mL RIPA 裂解液的比例, 在冰上匀浆约 30 min, 然后 4℃ 下 12 000 r/min 离心 15 min 取上清液, 用 BCA 法测定蛋白浓度, 使用 Image J 软件分析处理, 取 β -actin 作为内参, 用 calponin-3 与 β -actin 的光密度比值表示 calponin-3 蛋白的相对表达量。然后通过统计学方法将 3 个 CNN3-shRNA 组和 shRNA 阴性对照组的实验结果进行两两比较, 找出沉默大鼠海马 CNN3 基因的最佳 shRNA 干扰序列。

为明确 CNN3 基因沉默/过表达效果持续时长, 延长转染最佳 shRNA 干扰和过表达慢病毒载体的观察时间, 在第 1、2、4、6、8 周时处死取材, Western blot 定量检测各时间点中实验鼠海马 calponin-3 蛋白表达量。

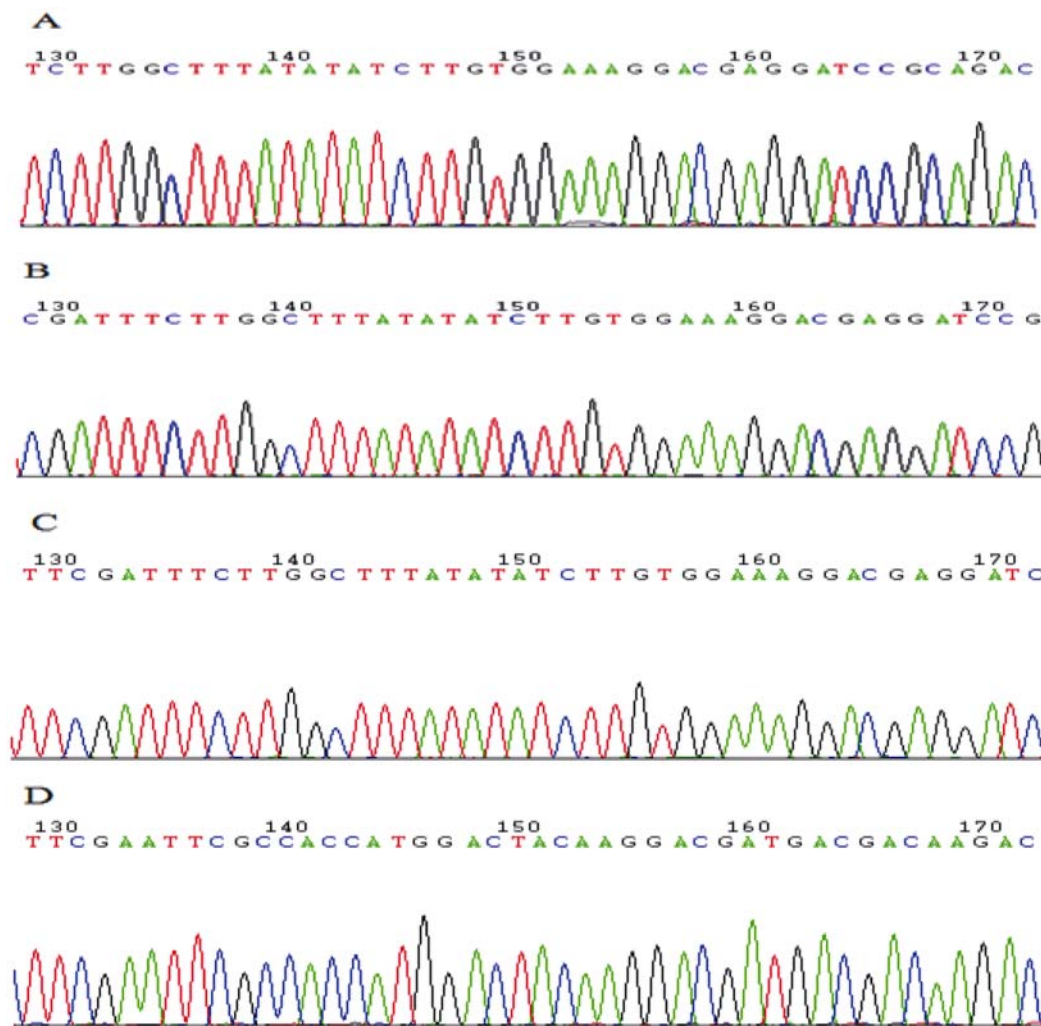
1.3 统计学方法

因所有试验都重复 3 次, 为避免每次 Western blot 实验曝光时造成的条带深浅不一干扰, 我们将 3 次实验结果进行归一化处理后再采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。多组多重比较使用 One-way ANOVA 单因素方差分析, 方差齐时使用 LSD 统计方法进行组间两两比较差异有无统计学意义, $P < 0.05$ 时判为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 基因测序分析

经过比对, 3 个 shRNA 重组克隆中插入的片段序列与设计的 oligo 序列完全一致, 无碱基缺失或错误(图 1A-C), 表明 CNN3-shRNA1、CNN3-shRNA2 和 CNN3-shRNA3 慢病毒载体均构建成功。CNN3-OE 慢病毒载体中插入片段序列与目的片段序列完全一致, 无碱基缺失或错误(图 1D), 表明过表达慢病毒载体也成功构建。



注: A 图为 CNN3-shRNA1 慢病毒载体, B 图为 CNN3-shRNA2 慢病毒载体,
C 图为 CNN3-shRNA3 慢病毒载体, D 图为 CNN3-OE 慢病毒载体。

图 1 慢病毒载体的测序结果

Note. A indicates CNN3-shRNA1 vector; B indicates CNN3-shRNA2 vector;
C indicates CNN3-shRNA3 vector; A indicates CNN3-OE vector.

Fig. 1 Sequencing results of the lentiviral vectors targeted CNN3 gene.

2.2 慢病毒滴度的测定

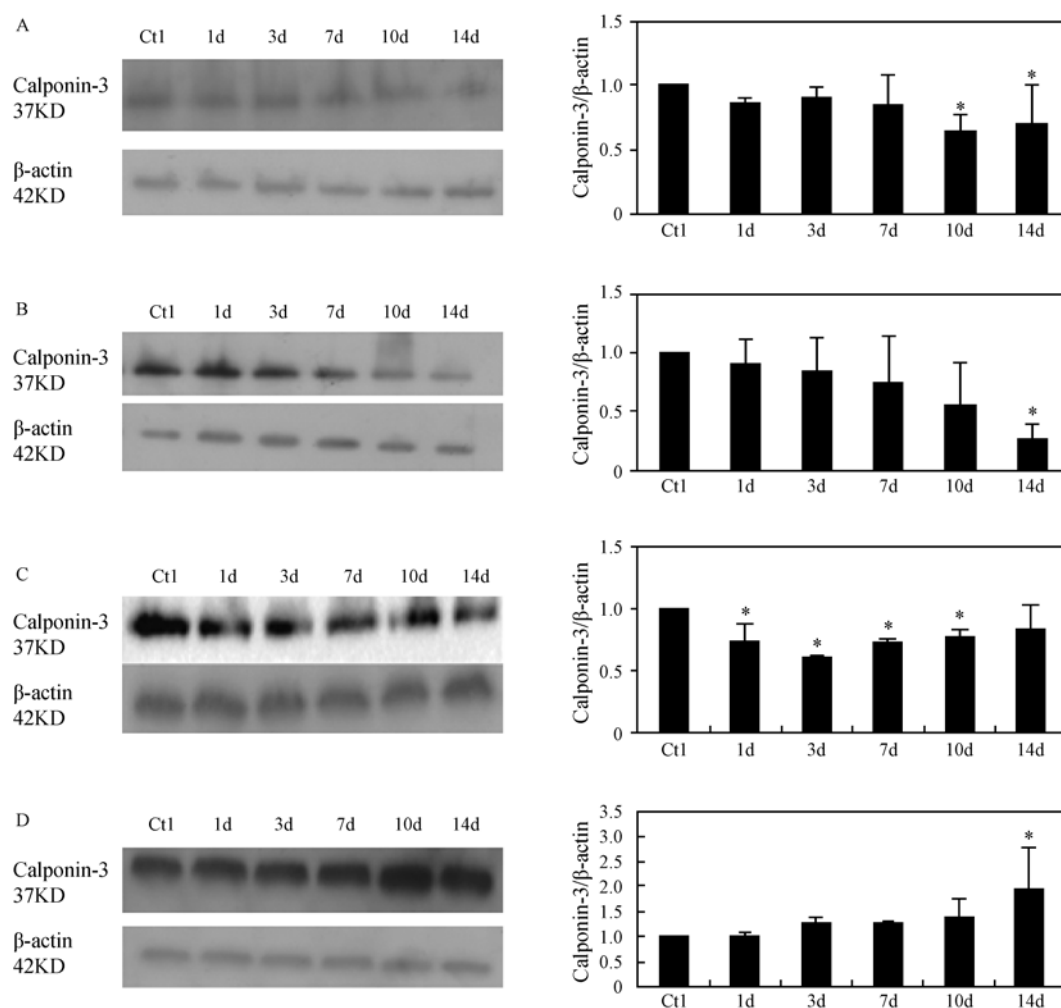
经荧光计数法测得重组慢病毒 CNN3-shRNA1、CNN3-shRNA2、CNN3-shRNA3 的滴度均为 2×10^9 TU/mL, 慢病毒 CNN3-OE 的滴度是 2×10^8 TU/mL, CNN3-shRNA 和 CNN3-OE 的阴性对照空载体病毒的滴度均为 2×10^8 TU/mL。

2.3 Western blot 实验结果

首先对比了 CNN3-shRNA1、CNN3-shRNA2、CNN3-shRNA3、CNN3-OE 慢病毒载体与相应的对照空载体分别被转染到 SD 大鼠海马后 1、3、7、10 和 14 d 的 calponin-3 与内参的光密度比值。结果显示: 与对照组相比, 转染后 14 d 内 3 个 shRNA 组海马的 calponin-3 蛋白水平均下调, 尤其是在转染后

第 10、14 和 3 天, shRNA1、shRNA2、shRNA3 对 calponin-3 表达的抑制程度最高, 分别达到 36.78%、73.26%、39.96%, 均具有统计学意义。此外, shRNA2 组海马的 calponin-3 蛋白水平在慢病毒载体转染后呈进行性降低, 而 shRNA1 和 shRNA3 组的 calponin-3 蛋白抑制反应不稳定(图 2A-C); 过表达的 OE 组的 calponin-3 蛋白在慢病毒转染后表达水平呈进行性升高, 在第 14 天时达到最高, 较对照组升高 93.88%, 两组间具有显著性差异 ($P < 0.05$)(图 2D)。

基于 14 d 内针对 CNN3 基因 ShRNA2 组和 OE 组的 calponin-3 蛋白降解/上调幅度最大, 均明显超过 50%, 而且此效应似与时长呈负/正相关(图 2B,



注: A 图为 CNN3-shRNA1 慢病毒载体组与空 pGMLV-SC5 载体转染组比较; B 图为 CNN3-shRNA2 慢病毒载体组与 pGMLV-SC5 载体转染组比较; C 图为 CNN3-shRNA3 慢病毒载体组与 pGMLV-SC5 载体转染组比较; D 图为 CNN3-OE 慢病毒载体组与空 pGMLV-PA6 载体转染组比较。左图均为代表性的 Western blot 结果图, 右图均为统计分析结果。Ctl: 阴性对照组; *: $p < 0.05$ 。

图 2 各种慢病毒载体转染 14 天内后实验鼠海马 calponin-3 蛋白的表达变化。

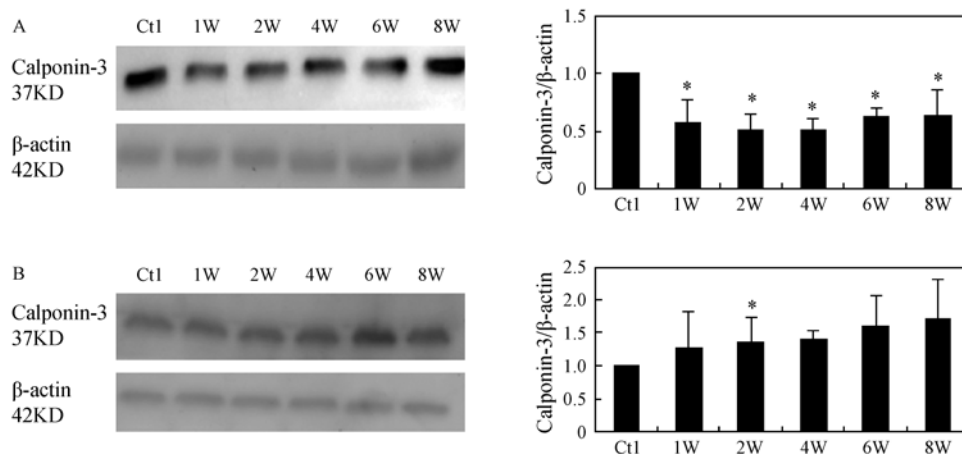
Note. (A) shows CNN3-shRNA1 vs. the control pGMLV-SC5 vector; (B) shows CNN3-shRNA2 vs. the control pGMLV-SC5 vector; (C) shows CNN3-shRNA3 vs. the control pGMLV-SC5 vector; (D) shows CNN3-OE vs. the control pGMLV-PA6 vector. The left figures show the representative results of Western blot. The right figures are the results of statistical analysis. Ctl: negative control; *: $P < 0.05$.

Fig. 2 Changes of the expression of calponin-3 protein in the hippocampus of rats within 14 days after transfection with various lentiviral vectors targeted CNN3 gene.

2D), 因此将这两组的观察时间延长至转染后 8 周。结果显示, CNN3-ShRNA2 慢病毒载体对 CNN3 基因的抑制效果可持续到 8 周, 且各时间点的 calponin-3 蛋白变化差异均具有显著性。CNN3-OE 慢病毒载体的过表达效果也可持续 8 周, 但统计学分析结果显示仅在第 14 天时过表达效应与对照组相比具有显著性差异 (图 3)。

3 讨论

自 CNN3 基因及其编码蛋白 calponin-3 被发现以来, 各国研究者开展了机制研究, 但除 Flemming 等采用基因敲除鼠研究 B 细胞发育^[5]外, 其余都是构建慢病毒载体后转染神经元、表皮成纤维母细胞、胎盘滋养层、肌原细胞等细胞模型^[2-4,10]。然而脑部结构相当复杂, 仅脑细胞就有上百亿, 脑细胞又分为神经元和神经胶质细胞两大类, 相互之间还



注:A 图为 CNN3-shRNA2 慢病毒载体组与空 pGMLV-SC5 载体转染组比较;B 图为 CNN3-OE 慢病毒载体组与空 pGMLV-PA6 载体转染组比较。左图均为代表性的 Western blot 结果图,右图均为统计分析结果。Ctl:阴性对照组;*: $P < 0.05$ 。

图 3 CNN3-shRNA2 和 CNN3-OE 慢病毒载体转染 1~8 周后 calponin-3 蛋白的表达变化。

Note. (A) shows CNN3-shRNA2 vs. the control pGMLV-SC5 vector; (B) shows CNN3-OE vs. the control pGMLV-PA6 vector. The left figures show the representative results of Western blot.

The right figures are the results of statistical analysis. Ctl: negative control; *: $P < 0.05$.

Fig. 3 Changes of the expression of calponin-3 protein in the hippocampus of rats from 1–8 weeks after transfection with the lentiviral vectors of CNN3-shRNA2 or CNN3-OE.

形成多种已知和未知的功能连接,所以仅有神经元模型远不能满足基因功能研究的需要,还需建立实验动物模型以模拟各种生理病理过程^[12,13]。在本研究中,我们设计、构建大鼠 CNN3 基因的沉默及过表达慢病毒载体后,在立体定位仪引导下进行活体定位注射,使大鼠海马 calponin-3 蛋白表达水平显著下降/上调 50% 以上,且这种高效的干扰效应一直持续到第 8 周,表明该技术完全适用于动物模型的基因功能研究。

脂质体法、电转法和以腺病毒或慢病毒为载体的感染法是将外源性基因导入体外培养细胞的 4 种常用方法。脂质体法、电转法和腺病毒载体感染法这 3 种方法在原代细胞、干细胞、悬浮细胞中的感染效率极低,而且仅能瞬时感染,无法使目的基因在目的细胞持久表达或维持干扰的效果,故不适用于体内实验。而慢病毒载体的出现较好地解决了上述问题:首先,慢病毒对神经元等非常难转染的细胞依旧有较高的转染效率;其次,慢病毒载体上含有抗生素标记基因,通过抗生素筛选即可获得稳定株,利于下游实验的进行;更为重要的是,慢病毒可将外源性基因有效地整合到宿主染色体上从而达到持久性表达,适合活体动物模型的基因操作,因此尽管我们选择的 CNN3 基因靶点序列和其他课题组报道的都不一样,但是将其克隆入 shRNA/过表

达慢病毒载体后,均成功沉默/上调大鼠脑内 CNN3 基因,而且在转染后 8 周基因沉默/过表达的效应仍持续存在,为后续实验提供稳定的 CNN3 基因干扰动物模型。此外,与基因敲除/敲入通过改变 DNA 序列来达到基因功能的“全或无”不同^[14],基因沉默/过表达技术不改变 DNA 序列,可将基因水平调控在更多水平,最重要的是该技术操作更简单、费用更低,对开展基因功能学的动物研究和开辟新的基因治疗方法更为实用。

参考文献:

- [1] Maguchi M, Nishida W, Kohara K, et al. Molecular cloning and gene mapping of human basic and acidic calponins [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 217(1): 238–244.
- [2] Shibukawa Y, Yamazaki N, Daimon E, et al. Rock-dependent calponin 3 phosphorylation regulates myoblast fusion [J]. *Exp Cell Res*, 2013, 319(5): 633–648.
- [3] Shibukawa Y, Yamazaki N, Kumasawa K, et al. Calponin 3 regulates actin cytoskeleton rearrangement in trophoblastic cell fusion [J]. *Mol Biol Cell*, 2010, 21(22): 3973–3984.
- [4] Daimon E, Shibukawa Y, Wada Y. Calponin 3 regulates stress fiber formation in dermal fibroblasts during wound healing [J]. *Arch Dermatol Res*, 2013, 305(7): 571–584.
- [5] Flemming A, Huang QQ, Jin JP, et al. A conditional knockout mouse model reveals that calponin-3 is dispensable for early B cell development [J]. *Plos ONE*, 2015, 10(6): e0128385.
- [6] Rozenblum G T, Gimona M. Calponins: adaptable modular

- regulators of the actin cytoskeleton [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2008, 40(10): 1990–1995.
- [7] Trabelsiterzidis H, Fattoum AA, Dessi F, et al. Expression of an acidic isoform of calponin in rat brain; western blots on one- or two-dimensional gels and immuno-localization in cultured cells [J]. *Biochem J*, 1995, 306: 211–215.
- [8] Kreipke CW, Rafols JA. Calponin control of cerebrovascular reactivity; therapeutic implications in brain trauma [J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13(2): 262–269.
- [9] Ferhat L, Esclapez M, Represa A, et al. Increased levels of acidic calponin during dendritic spine plasticity after pilocarpin-induced seizures [J]. *Hippocampus*, 2003, 13(7): 845–858.
- [10] Rami G, Caillard O, Medina I, et al. Change in the shape and density of dendritic spines caused by overexpression of acidic calponin in cultured hippocampal neurons [J]. *Hippocampus*, 2006, 16(2): 183–197.
- [11] Han Y, Yin H, Xu Y, et al. Increased expression of calponin-3 in epileptic patients and experimental rats [J]. *Exp Neurol*, 2012, 233(1): 430–437.
- [12] Tsai HH, Li HL, Luis C, et al. Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair [J]. *Science*, 2012, 337(6092): 358–362.
- [13] Molofsky AV, Kelley KW, Tsai HH, et al. Astrocyte-encoded positional cues maintain sensorimotor circuit integrity [J]. *Nature*, 2014, 509(7499): 189–194.
- [14] 石宏, 何伟, 王晓宇, 等. TRPV1 和 ASIC3 基因敲除小鼠的寿命观察 [J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(10): 78–81.

[修回日期]2015-11-23

(上接第 21 页)

- [34] Thomas ML, Morse BC, O' Malley J, et al. Gender influences infectivity in C57BL/6 mice exposed to mouse minute virus [J]. *Comp Med*, 2007, 57: 74–81.
- [35] Pritchett-Corning K, Shek WR, Henderson KS, et al. Companion guide to rodent health surveillance for research facilities [M]. Wilmington, MA: Charles River, 2009: 3–18.

[修回日期]2015-11-23

(上接第 47 页)

- [4] Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats, and rabbits and their effects on research [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1998; 11(2): 231–266.
- [5] Infectious Diseases of Mice and Rats Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council. Infectious Diseases of Mice and Rats [M]. National Academy Press, Washington, D. C. 1991. ISBN: 0–309–55692–9. <http://www.nap.edu/catalog/1429.html>.
- [6] Microbial and Phenotypic Definition of Rats and Mice: Proceedings of the 1998 US/Japan Conference [C]. International Committee of the Institute for Laboratory Animal Research, National Research Council. ISBN: 0–309–52018–5, (1999). <http://www.nap.edu/catalog/9617.html>.
- [7] 庞万勇, 贺争鸣. 实验用生物样品的啮齿类微生物污染的检测管理中国比较医学杂志 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(10): 94–98.
- [8] 范文平, 贺争鸣. 西方国家实验动物健康监测的理念 [J]. *实验动物科学*, 2011, 23(43): 62–67.
- [9] 佟巍, 乔红伟, 魏强, 等. 淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒在实验大鼠中的感染状况 [J]. *医学动物防治*, 2010, 27(4): 46–48.

[修回日期]2015-12-27

(上接第 54 页)

- [4] 李静蔚, 宋爱莉, 刘晓菲. DMBA 诱导大鼠乳腺瘤前病变动物模型研究概况 [J]. *中华肿瘤防治杂志*, 2009, 03: 234–237.
- [5] 陈玲, 武和明, 万飞. 二甲基苯丙蒽诱发大鼠颌下腺腺瘤的实验研究 [J]. *口腔医学研究*, 2009, 03: 267–270.
- [6] Subramanian V, Vellaichamy E. Atrial natriuretic peptide (ANP) inhibits DMBA/croton oil induced skin tumor growth by modulating NF- κ B, MMPs, and infiltrating mast cells in swiss albino mice. *Eur J Pharmacol*. 2014, 740: 388–397.
- [7] Roslida A, Fezah O, Yeong LT. Suppression of DMBA/croton oil-induced mouse skin tumor promotion by Ardisia Crispa root hexane extract [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2011, 12(3): 665–669.
- [8] Kunisada M1, Kumimoto H, Ishizaki K, et al. Narrow-band UVB induces more carcinogenic skin tumors than broad-band UVB through the formation of cyclobutane pyrimidine dimer [J]. *J Invest Dermatol*. 2007, 127(12): 2865–2871.
- [9] Bhattacharyya SS, Paul S, Dutta S, et al. 东莨菪亭(7-羟基-6-甲氧基香豆素)对 7,12-二甲基苯并蒽诱导的皮肤乳头状瘤小鼠相关关键信号蛋白的影响 [J]. *中西医结合学报*. 2010, 08(07): 645–654.
- [10] Aoi J, Endo M, Kadomatsu T, et al. Angiopoietin-like protein 2 is an important facilitator of inflammatory carcinogenesis and metastasis [J]. *Cancer Res*. 2011, 71(24): 7502–7512.

[修回日期]2015–12–25