



中国科技论文统计源期刊

中文核心期刊要目总览

ISSN 1671-7856

CN 11-4822/R

ZHONGGUO BIJIAO YIXUE ZAZHI

中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

原名《中国实验动物学杂志》



2016 **7**

邮发代号：82-917

第26卷（第7期）Vol.26 No.7

ISSN 1671-7856

主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所



9 771671 785145

07>

主管 中国科学技术协会
主办 中国实验动物学会
中国医学科学院医学实验动物研究所
主编 秦川
编辑 《中国比较医学杂志》编辑部
出版 中国实验动物学会
发行 《中国比较医学杂志》编辑部
100021,北京市朝阳区潘家园南里5号
电话:(010)67779337
传真:(010)67770690
E-mail:bjb@cnilas.org
http://zgswdw.alljournal.ac.cn/
zghjxzz/ch/index.aspx
广告经营许可证
京朝工商广字第8131号
照排 同方知网(北京)技术有限公司
印刷 北京市百善印刷厂
邮发代号 82-917
定价 每期20.00元,全年240元
中国标准连续出版物号
ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R
2016年版权归中国实验动物学会所有
本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊全文数据库、中国实验动物信息网、中国实验动物学会网站和世界卫生组织西太平洋地区医学索引等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。编辑部支付的稿酬已包含上述网站著作权使用费。
本刊电子版出版发行合作伙伴:中邮阅读网:www.183read.com
本期执行主编 肖杭
本期责任编辑 金剑

目次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

专题研究

- The genetic reference population “The Collaborative Cross” is a powerful resource for genetic discoveries and understanding complex genetic traits * Grant Morahan(1)
- 复杂性状遗传 CC 小鼠信息资源及研究应用 * 孔琪,夏霞宇,秦川(11)

研究报告

- 矢车菊素-3-葡萄糖苷对 APP^{swe}/PS1^{ΔE9}阿尔茨海默病模型小鼠糖脂代谢的影响 宋楠,张玲,陈巍,等(15)
- 发光二极管光源照射日本大耳白兔皮肤的安全性评价 李彦红,张继刚,徐艳峰,等(24)
- 真核表达载体 GV394-Nurr1 的构建及鉴定 樊秀双,郭军堂,陈安琪(31)
- bcl-2 基因修饰神经干细胞移植修复大鼠脊髓损伤 张梅,王跃新,侯晓华,等(35)
- 丙泊酚干预对大鼠视神经损伤的影响及机制研究 李学东,陈家康,覃军,等(42)
- 地佐辛后处理对大鼠肠缺血再灌注致急性肺损伤的影响 李娟,蔡垣星,王彬,等(48)
- MicroRNA-137 与 Ang II 在自发性高血压大鼠心脏重构中的作用 侯永兰,李石林,刘玲玲(52)
- miR-126 对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡的影响 高威,钟锋(57)

技术方法

- 一种用于观察小鼠后足趾类实验固定装置的研制 石佳,陈静,冉小庠,等(64)

研究进展

- 大鼠行进行为的评价及其应用研究现状 季苇,刘晓莉,乔德才(67)
- 外周 P2X3 受体在不同炎性痛模型中的作用比较 肖婷,杜俊英,乐小琴,等(74)
- 50 余种 miRNA 在神经胶质瘤中的表达水平及作用靶点 刘太奇,陈思羽,李文德,等(79)
- 认知功能相关的动物行为学实验研究进展 郑前敏,徐平(85)

继续教育

- 实验动物学教学改革:课程学习与从业证书培训相结合 周智君,俞远京,苏志杰(90)
- * 复杂性状遗传 CC 小鼠专题

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 26 Number 7 July 30 2016

Responsible Institution

China Association for Science and Technology

Sponsor

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
Institute of Laboratory Animal Science,
Chinese Academy of Medical Sciences

Editing

Editorial Board of Chinese Journal of Comparative Medicine
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: (010)67779337
Fax: (010)67770690
E-mail: bjb@cnilas.org
<http://zgsydw.alljournal.ac.cn/zgbjyzzz/ch/index.aspx>

Editor-in-Chief

QIN Chuan (秦川)

Publishing

Chinese Association for Laboratory Animal Sciences
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: (010)67779337
Fax: (010)67770690
E-mail: bjb@cnilas.org

Printing

The Baishan Printing House of Changping, Beijing

Distributor

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine
5 Pan Jia Yuan Nan Li, Chaoyang District, Beijing 100021
Tel: (010)67779337
Fax: (010)67770690
E-mail: bjb@cnilas.org

Mail-order

Editorial Office of Chinese Journal of Comparative Medicine

CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2016 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- The genetic reference population "The Collaborative Cross" is a powerful resource for genetic discoveries and understanding complex genetic traits *Grant Morahan* (1)
- The Collaborative Cross mice resource information and application *KONG Qi, XIA Xia-yu, QIN Chuan* (11)
- Effect of cyaniding-3-glucoside on glucose and lipid metabolism in the APP^{swe}/PS1^{ΔE9} mouse model of Alzheimer's disease *SONG Nan, ZHANG Ling, CHEN Wei, et al.* (15)
- The safety assessment on the light emitting diode (LED) resource through irradiating the skin of Japanese big-ear white rabbits *LI Yan-hong, ZHANG Ji-gang, XU Yan-feng, et al.* (24)
- The construction and identification of eukaryotic expression vector GV394-Nurr1 *FAN Xiu-shuang, GUO Jun-tang, CHEN An-qi* (31)
- bcl-2 gene-modified neural stem cell transplantation for spinal cord injury in rats *ZHANG Mei, WANG Yue-xin, HOU Xiao-hua, et al.* (35)
- Neuroprotective mechanisms of propofol to retinal ganglion cells in a partial optic nerve crush rat model *LI Xue-Dong, CHEN Jia-Kang, QIN Jun, et al.* (42)
- Effect of dezocine post conditioning on acute lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats *LI Juan, CAI Yuan-xing, WANG Bin* (48)
- Effects of MicroRNA-137 and Ang II on cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats *HOU Yong-lan, LI Shi-lin, LIU Ling-ling* (52)
- Effect of miR-126 on apoptosis of myocardial cells in rats with acute myocardial infarction *GAO Wei, ZHONG Feng* (57)
- Development of fixture device in rear paws experiments for holding mice *SHI Jia, CHEN Jing, RAN Xiao-ku, et al.* (64)
- Research status of evaluation and application of locomotion in rats *JI Wei, LIU Xiao-li, QIAO De-cai* (67)
- Comparison of the effects of periphery P2X3 receptors in different inflammatory pain models *XIAO Ting, DU Jun-ying, LE Xiao-qin, et al.* (74)
- Expression levels and targets of more than fifty miRNAs in glioma *LIU Tai-qi, CHEN Si-yu, Li Wen-de, et al.* (79)
- Research of animal behavior assessment about cognitive functions *ZHENG Qian-min, XU Ping* (85)
- Reform of the laboratory animal science teaching: combination of course teaching and certificate training *ZHOU Zhi-jun, YU Yuan-jing, SU Zhi-jie* (90)

编者按:在常用实验动物中,小鼠资源最为丰富,具有各种不同特点的近交品系、突变品系、封闭群以及基因工程小鼠等,然而,随着对疾病的深入研究,发现采用单一遗传背景的小鼠无法有效复制人类多基因、多因素的相互作用引起的复杂性疾病,如高血压、糖尿病、心脏病、肿瘤等。实验动物育种专家培育了一种能够很好的模拟人群多基因、多因素作用的复杂性状特点的小鼠资源,复杂性状遗传 CC(Collaborative Cross, CC)小鼠。CC 小鼠由八种纯系的实验室常用小鼠品系重组近交而来,这八种品系小鼠的多样性等位基因可覆盖小鼠全基因组 90% 的区域,品系间总共存在 36M 的单核苷酸多态性(SNPs)。该小鼠资源能体现不同小鼠亚种的遗传学变异,具有高度遗传多样性、大种群规模等可以模拟人群的重要特征。每种小鼠品系可以通过软件进行基因组溯源,经过系统遗传学的基因连锁分析,有望鉴定与人群复杂性状疾病相关的遗传学基础,潜在靶点分析,为临床精准医疗提供强有力的工具。

本刊将陆续推出系列文章,介绍 CC 小鼠,和它的应用情况。敬请读者关注。

The genetic reference population “Collaborative Cross” is a powerful resource for genetic discoveries and understanding complex genetic traits

Grant Morahan

Centre for Diabetes Research, The Harry Perkins Institute of Medical Research,
Centre for Medical Research, University of Western Australia, WA, Australia

【Abstract】 The Collaborative Cross(CC) is a powerful genetic resource with a wide range of applications in medical research. It is a multiparental genetic reference population, composed of 200 recombinant inbred mouse strains. It was designed to be a resource for rapid mapping of genes that mediate complex traits. The CC has been produced following an intense breeding program that had taken over ten years to complete. It is now becoming available to the research community. While advances in human genetic technologies over the last decade have been substantial, the CC provides the ability to make discoveries not possible with other methods or resources. It can be applied to any subject that can be measured or modelled in the mouse. Here, we discuss a range of applications for which the CC can be used, with examples taken from the early characterization of this powerful resource.

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0001-10
doi: 10.3969.j.issn.1671-7856.2016.07.001

Introduction

Diseases such as cancer, cardiovascular disease, diabetes and dementias pose the greatest public health challenges the world currently faces. These diseases arise from complex interactions between numerous genetic, developmental and environmental factors. Tremendous progress has been made over the last decade in identifying thousands of genetic variants that affect the risk of developing these and other complex genetic diseases (Welter, 2014). However, the mechanisms by which these variants affect disease are mostly unknown, and their detailed examination is difficult, especially in humans. Furthermore, while genome-wide association studies have been successful in finding disease genes, the costs of these studies put them beyond the reach of individual researchers, or for diseases or traits that cannot attract millions of dollars in research support. Gene discovery would be much more rapid and economical if we could circumvent some of the essential tasks that all genetic studies require: 1) recruiting (e. g. patients) or breeding (e. g. F2 animals) a cohort of subjects; 2) characterizing subjects for traits of interest; 3) purifying their DNA samples; 4) typing DNA at informative genetic markers genome-wide; 5) and analyzing the data to find genetic markers that segregate with the trait more often than expected by chance.

Over a decade ago, the groundwork was laid to develop a carefully planned experimental resource that modelled the genetic structure of human populations better than existing resources and that would circumvent the need for repetitive breeding programs, DNA sampling and genotyping (i. e. steps 1, 3, and 4 above). In doing so, it has the potential to trim years of work and hundreds of thousands of dollars from research programs. This resource is a genetic reference population based on a leading model organism, the mouse; it was dubbed The Collaborative Cross (CC) (Churchill 2004).

The concept behind the CC was to exploit the power of Recombinant Inbred (RI) strains, bringing these to state-of-the-art refinement. In the first description of RI strains, Don Bailey wrote that “genetic seg-

regation and recombination provide the very foundation of classical genetics but inbreeding engenders their antithesis though providing great utility... RI strains uniquely exploit these processes concomitantly” (Bailey, 1971). RI strains are produced by crossing two or more inbred strains, and subsequent full sib mating is followed to derive independent parallel strains. Genetic segregation and recombination is achieved in early generations, and recombinant chromosomes are “archived” in later generations as inbreeding proceeds.

Since this insightful paper, RI strains had proven an ideal resource for genetic, immunological and behavioural studies. Providing a virtually unlimited number of genetically identical individuals, they offer key advantages of reproducibility, reduction of genotyping efforts, and wealth of phenotypic characterization. Reproducibility is vital in studying effects of different environmental factors, and conditions with either large variation in responsiveness or with low heritability. RI strains provide the opportunity for reliably testing responses of the same genotype to different environmental conditions. In contrast to most other genetic studies, RI strains need only be genotyped once; these data can be accessed over years, integrating with increased amounts of phenotypic data. In the case of the BXD RI strains, there is now a massive amount of phenotypic and gene expression data available. These data and those for other RI sets are curated and are publicly accessible at the GeneNetwork website (Williams et al., 2001, Chesler et al., 2003).

The rationale for the CC has been discussed extensively (Threadgill 2002, Churchill 2004). The CC was designed to overcome the main limitations of existing RI strain sets: constraints on genetic variability and mapping power. Genetic variability was limited by deriving RI strains from two parental strains; moreover, these parental lines were usually derived from common ancestors, further limiting the genetic repertoire of the derived strains. Mapping power depends on the number of strains available for testing. The resolution of the most widely used sets was typically on the order of 2 – 4 cM (~4 to 8 Mb); this was not sufficient for efficient candidate gene analyses in the post-genome era.

The first problem could be overcome by using eight founder strains, rather than two, and by including wild-derived strains from different continents as founders. The second problem could be overcome by producing larger sets of RI strains. It was envisaged that by increasing the number of CC strains to 1,000, over 135,000 recombination events could be captured, providing a huge increase in mapping resolution, even allowing down-to-the-gene mapping accuracy.

Production of the CC

The CC founder strains were chosen to maximize genetic diversity. Strains whose genomes had just been sequenced (C57BL/6J, A/J, 129S1/Sv1mJ) were selected, as were strains originating from Japan and New Zealand, and which provided models for autoimmunity and obesity (NOD/LtJ and NZO). These were supplemented with wild-derived strains from all three major *Mus* subspecies: PWK/PhJ a *Mus musculus musculus* strain sourced from Prague; WSB/EiJ, a *Mus musculus domesticus* strain derived from Baltimore; and the *Mus musculus castaneus*-derived CAST/EiJ originating from Thailand. Selection of these founders captured over 90% of the common allelic diversity of the mouse species and across all 1Mb intervals of the genome (Roberts et al. 2007). With the sequencing of the founder strains' genomes, we now know that on average three non-synonymous polymorphisms are found in over 16,000 genes (Yalcin et al. 2011; Keane et al., 2011). Furthermore, the ECCO database, which integrates the mouse ENCODE data with the CC genomic data has defined over 300,000 variable transcriptional regulatory elements; the eight CC founder strains have more variable sites than the other nine strains that had been sequenced (Nguyen et al. 2013). Thus, natural genetic variation among the strains is a unrivalled source of phenotypic diversity and unlike mutagenesis or knockout programs does not generate debilitating mutations.

An overview of the breeding program is shown in Fig 1. The eight founders were crossed in 56 reciprocal combinations. F1 mice from these crosses were bred at The Jackson Laboratory and used to initiate independent breeding "funnels" at three sites. The breeding

scheme was carefully designed to ensure that the strains were derived independently, and that potential genomic interactions between strains were minimized. Each CC strain originated from unique matings of pairs of G2 mice; i. e. no G2 mouse was the ancestor of more than one CC strain.

The three production sites for the CC were in Australia, USA, and Kenya. A total of 916 funnels were established in the Australian site (Morahan, 2008). These strains are currently being moved to Beijing. At ORNL, 650 funnels were initiated; these were later moved to UNC (Chessler, 2008). Supported by the Wellcome Trust, a total of ~120 strains were bred in Kenya, and later moved to Tel Aviv University, Israel (Iraqi, 2008). Although it was anticipated that there would be loss of lines as a result of inbreeding depression, the extent of the loss was unexpected, with less than 200 strains available worldwide. The excessive loss of lines was due in part to lack of funds constraining the number of breeding boxes available for each strain. Nevertheless, a combined total of ~200 CC strains provides a very powerful resource, as discussed below.

The strains were genotyped (Collaborative Cross Consortium, 2012) at 7,500 SNPs using the "Mouse Universal Genotyping Array" (MUGA); the current version of this array provides greater resolution by typing 76,000 SNPs. For each chromosomal segment, founder haplotypes were imputed from the SNP genotypes using tools such as HAPPY (Mott, 2000) or based on normalized intensity values from the genotyping array (Collaborative Cross Consortium, 2012). An example of an imputed genome is shown in Fig 2.

Key findings from studying genotypes of 350 independent CC strains from all three sites were as follows. Founder haplotypes were inherited across strains from all three sites at the expected frequencies, and the decay of linkage disequilibrium was also as expected. Importantly, there was no evidence of gametic disequilibrium in 500 kb windows across the genome. In contrast, common inbred strains showed high and pervasive gametic disequilibrium (i. e. alleles of loci on separate chromosomes could be co-inherited from these

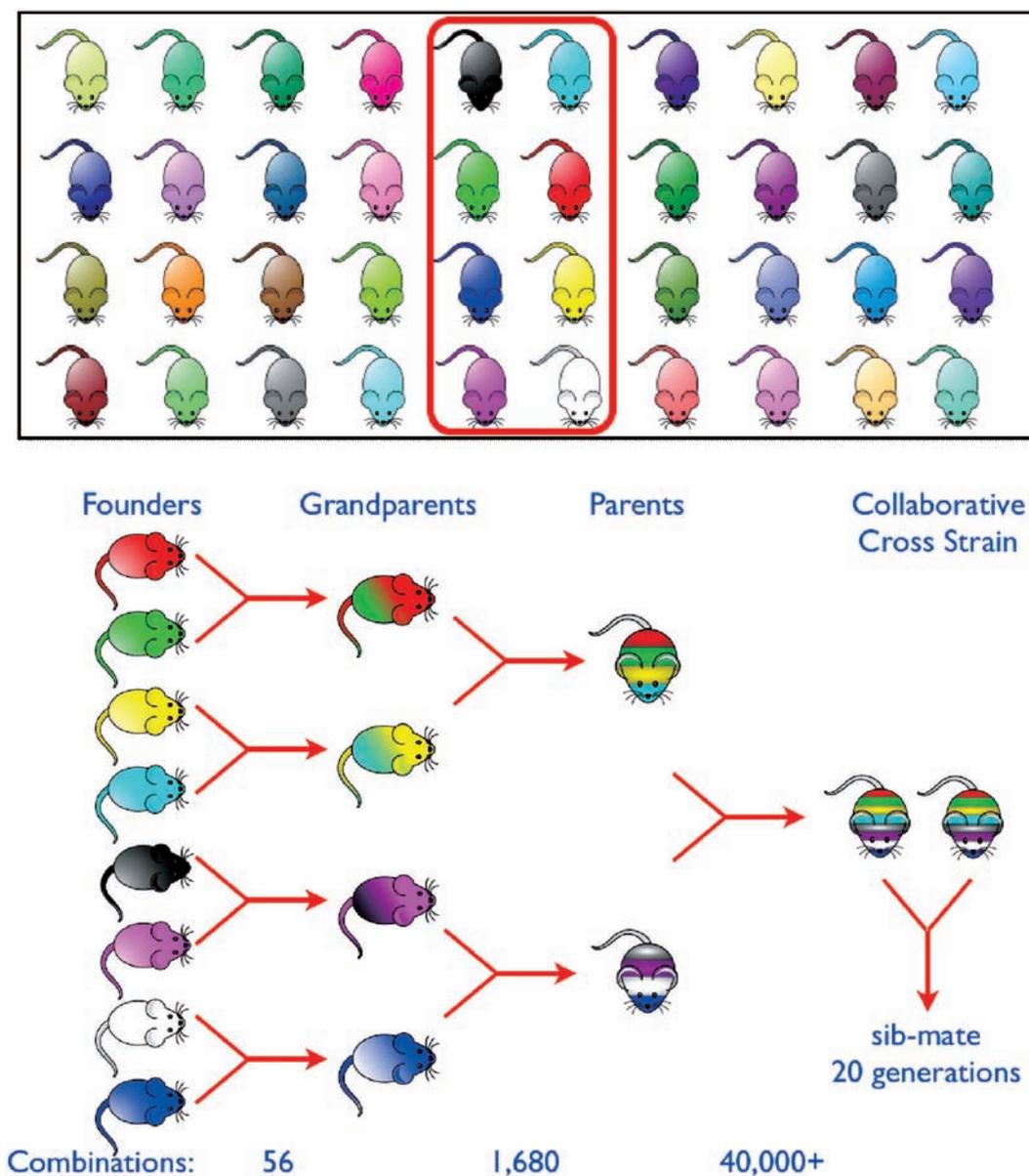


Fig. 1 Production of The Collaborative Cross. Upper panel: Founder strains were selected from over 100 inbred strains (colored to indicate diversity of their genomes) to maximize genetic diversity. Lower Panel: This panel shows the breeding strategy to produce one of a potential ~40,000 “funnels” that would lead to a Recombinant Inbred CC strain. The founder strains could be considered as “great-grandparents” of each of the “cousin” CC strains that are produced.

strains) that likely resulted from the limiting founder populations from which these strains were derived. Among the inbred strains, no 500 – kb window could be guaranteed not to have at least one SNP with very high LD (over 0.75) with unlinked loci in the panel, meaning that association mapping in inbred strains would have high false positive rates. The observed independent inheritance of all genomic intervals vindicated the design of the CC breeding program and indi-

cates that the CC provide an ideal resource for association studies (Collaborative Cross Consortium, 2012).

Capturing extensive genetic diversity results in a wide range of phenotypic variation. The strains are widely variable in the vast majority of all traits examined. This was evident even in the “Pre-CC” i. e. mice characterized during the early phases of the breeding program.

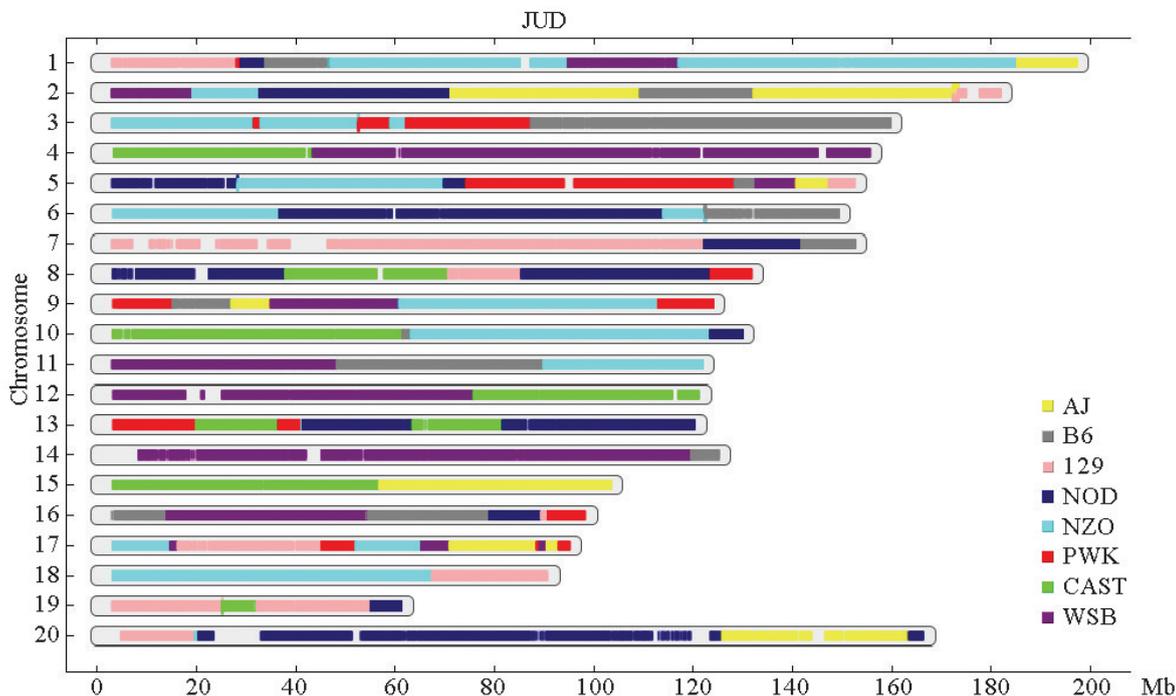


Fig.2 Genetic Constitution of CC strains. Strains have been genotyped at 76,000 SNPs. Founder haplotypes are inferred genome-wide, and colour-coded according to inheritance from the original founder strain. Top panel; genome of one strain shown with chromosome segments inherited from all eight founders. Bottom panel; genomes of 30 CC strains illustrate the mosaic genomes of the CC strains.

Uses For Rapid Gene Mapping

The CC resource comprises around 200 strains. Will this number be sufficient to meet the aim of not only mapping genes, but doing so with sufficient resolution to identify the causative genetic variants? Simulation studies had been performed using 500 strains, and suggested this could map to within 0.96 cMa single additive locus accounting for 5% of phenotypic variation (Valdar, 2006). It was important to establish whether a smaller number of strains could provide sufficient power for gene mapping. Ram et al. performed a proof-of-principle study, using coat colour data for 120 strains (Ram et al. 2014). Using either a SNP-based approach or an approach based on QTL mapping using founder-derived haplotypes, all four genes mediating six coat colour phenotypes could be mapped. Furthermore, the causative SNP could be identified for three of these genes (the fourth was due to a retroviral insertion). This ability to identify causative variants within minutes of obtaining phenotype data is unprecedented and one of the most powerful features of the CC.

Modifier Genes

Perhaps the most powerful and unique aspect of the CC is its potential to identify genes that protect against diseases. Genes which do not predispose to a disease but which can influence its course or severity are known as “modifier genes”; these are notoriously difficult to identify (Nadeau, J. 2001). However, RI mice are very useful for identification of modifier genes. An outstanding example of this approach comes from a study of modifier genes of breast cancer metastasis. A relevant transgenic mouse was crossed with each of 27 RI lines derived from two parental strains (Lifsted 1998). Despite the smaller size and lower genetic heterogeneity of this panel compared to the CC, this work discovered a gene named “*Diasporin*” with further work uncovering a set of interacting genes that marked a metastasis-promoting pathway (Crawford 2008). When alleles of human *Diaspora* orthologues were investigated in breast cancer patients, differential survival outcomes were successfully found based on patients’ genotypes of these *Diaspora* genes (24). These results indicate that modifier genes discovered in the

mouse can be directly relevant to human disease.

Ferguson et al. (2013) applied the CC to reveal genes that modified the melanoma-causing effects of two mutant human oncogenes. By careful characterization of various stages of melanoma development, they showed that each step of the pathway was subject to genetic regulation. Some CC strains had median survival times four times higher than the susceptible strains: their naturally occurring genetic variants could prevent the action of multiple copy number mutant transgenes together with the UV mutagen. The CC has the potential for finding protective modifier genes in the many other diseases for which there are established transgenic or otherwise genetically modified mouse models, including a wide range of cancers and neurological diseases. This is another powerful application of the CC, and one that is difficult if not impossible to perform in other systems.

Novel Animal Models

Many researchers would have heard someone declare “the mouse is not a good model” for a particular disease, or that it differs from humans because it does not develop some disease endophenotype. These claims are based on a fallacy: insofar as mice do not display a particular phenotype, this would usually have been ascertained on a small panel of closely related strains. An example of the fallacy is that mice “do not develop type 1 diabetes” but the discovery of the NOD/Lt mouse strain in the 1980s (Makino et al. 1980) has led directly to many insights into the genetics and biology of Type 1 diabetes (reviewed in Driver et al. 2012) reported in over 10,000 publications.

By bringing over 90% of the common genetic repertoire into a single population, and allowing these variants to combine in many different ways, the CC is likely to contain particular combinations of alleles that will predispose to diseases for which there were no previous models. There are already two good examples of novel animal disease models arising from the CC: ulcerative colitis (Rogala et al., 2014) and diabetic retinopathy (Weerasekeraet al. 2015). Other CC strains have been observed to display right ventricular cardiomyopathy, aortic stenosis, achalasia, hypertension and

several other conditions (Arnolda, Nguyen, Morahan, unpublished). It should be emphasized that these diseases occur from the interaction of naturally occurring genetic variants, just as common human diseases do, and not from the introduction of crippling genetic modifications. When researchers with expertise in specific disorders characterize more CC strains, doubtless more animal models will be recognized.

New Biological Insights

A unique feature of the RI strains is that each represents a genetically defined individual who is effectively immortal. Unlike outbred populations, phenotypic

data can be obtained from any tissue at any developmental stage, under any environmental condition, or induced disease state. The CC can facilitate integration of data for as wide a range of traits as can be ascertained in the mouse—including but not limited to physiology, immunology, behaviour, immune responses, metabolism, pharmacokinetics, proteomics, developmental variation, disease endophenotypes, epigenetic modifications, microbiome variation, gene expression, etc. Data can be compiled for the same individuals and compared across decades and by researchers around the world. In this respect, the CC facilitates collaborations

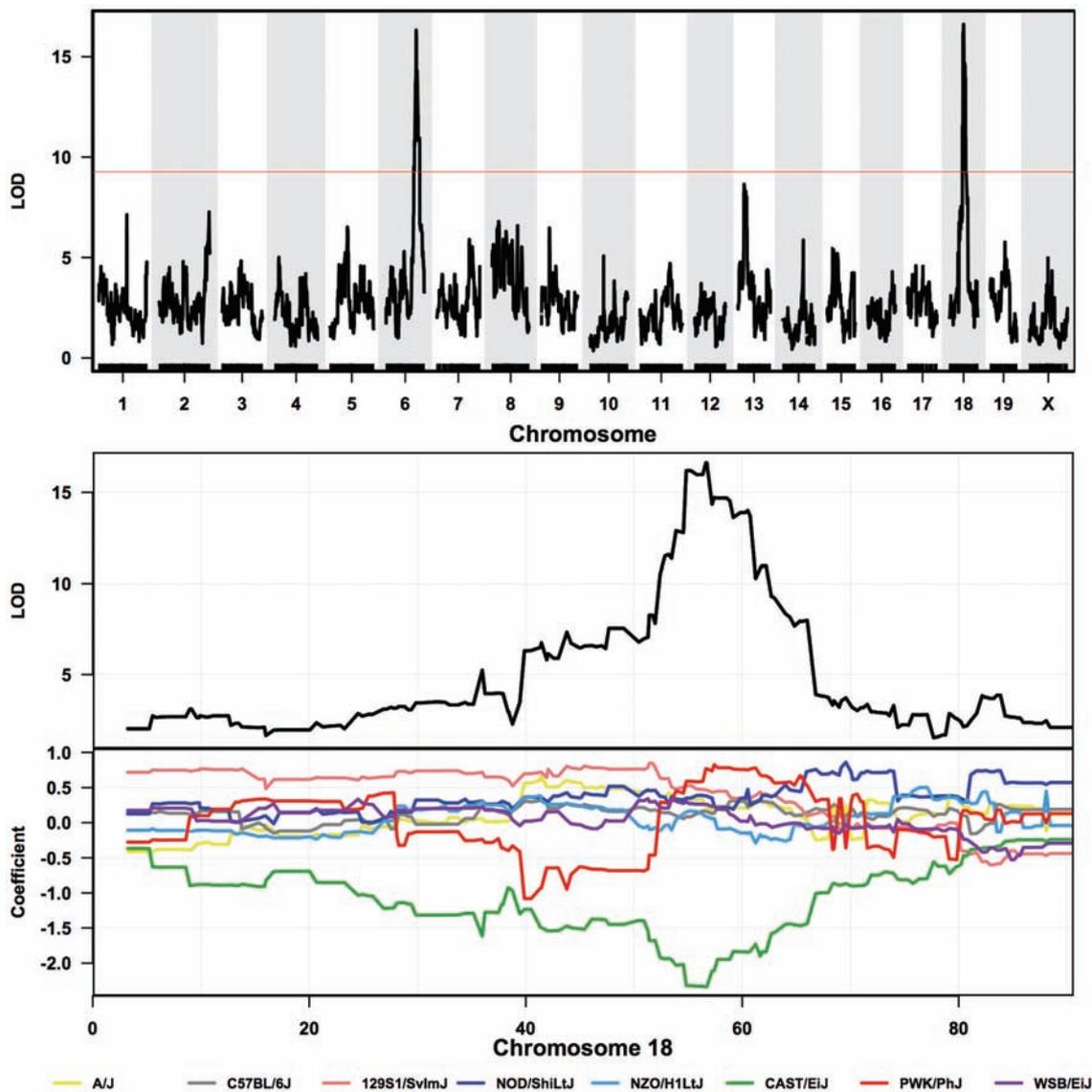


Fig. 3 Gene Mapping in The Collaborative Cross. Simulated gene expression data were used to map QTLs. Top panel: genome-wide linkage analysis indicates two significant peaks. Mid panel: LOD Score over chromosome 18. Bottom panel: Contribution of founder strains' alleles to the chromosome 18 QTL. This analysis shows that the CAST allele differs from all the other founders in mediating the trait of interest. Figures were kindly provided by Dr Ramesh Ram (University of Western Australia).

across time and space. As phenotypic data accumulate in extensive databases, the opportunity arises for observations made by different groups at different times to be correlated and trigger new biological insights.

The largest current dataset is of the BXD RI strain set, and it currently comprises approximately 5,000 phenotypic measurements, including gene expression data for over 30 tissues and cell types. Tools implemented in the WebQTL suite at the GeneNetwork website allow extensive exploration of these data, including mapping genes regulating each of these phenotypes (Williams et al., 2001 and Chesler et al., 2003). For more details, see www.genenetwork.org.

While characterization of the CC is still in its earliest phases, correlation of data has already revealed surprising observations. As an example, bone density measurements of CC strains revealed that, although there was an overall correlation of bone density between male and female mice of the same strain, there were some strains in which the males were osteoporotic and the females osteopetrotic, and vice versa (Figure 3). Obviously, results such as this would not be possible from human studies. Strains which show such strong departure from the expected pattern will provide the basis for further investigations into the molecular basis of the trait of interest, in this case, bone density.

Bioinformatics/Systems Genetics

Systems Genetics (Morahan et al. 2008) analyses integrate gene expression and higher order phenotypic data with underlying genetic variation to define genes and genetic networks that mediate complex traits. The GeneNetwork site has WebQTL tools that allow extensive systems genetics analyses on archived datasets from mouse and other species.

We have integrated the founder strains' genome sequence variation with data from the ENCODE consortium. The resulting Encode Collaborative Consortium Omnibus (ECCO) database permits interrogation of specific chromosome regions, providing custom displays of genetic variation in ENCODE-defined regulatory elements in user-specified sets of strains including the CC founders (Nguyen et al. 2013). This is a useful tool for exploration if a trait has been mapped to a

particular locus that contains no nonsynonymous polymorphisms. Complex genetic diseases like type 1 diabetes appear to be mediated by variants that affect transcription of nearby genes rather than changing amino acids in encoded proteins (Ram et al. 2016).

Software tools have been developed for mapping genes and identifying the founder(s) haplotypes that contribute to the trait of interest among CC strains (Ram et al., 2015). Further tools are in development. These include selection of strains with specific founder haplotypes in a region of interest, and integration with the Sanger database of founder genome sequences (www.sysgen.org/GeneMiner). The CC will provide challenges to incorporate new data and inspire further bioinformatic developments.

The Diversity Outcross

A limitation of the CC is the resolution of gene mapping it currently supports: the projected target of 1,000 strains was not reached and the opportunity for recombination events became limiting in the first few generations of inbreeding. This resulted in most strains having large founder haplotypes on most chromosomal regions. A way to increase gene resolution while maintaining the genetic contribution of the same founder strains was to establish a colony of outbred mice derived from CC strains. These "Diversity Outcross" (DO) mice have the advantage over other mouse outcross populations that the only segregating polymorphisms come from the same founders as the CC. This means that the genome sequences of each mouse can be imputed (Svenson, 2012). Compared to the CC strains, they have a high degree of heterozygosity and will harbour shorter founder haplotypes. This feature makes the DO mice useful for high resolution gene mapping applications. They will provide a useful tool to complement studies of the CC. For example, if a QTL is mapped to a region containing many candidate genes, DO mice with recombination events in that region can be selected and tested. This will allow further localization and discrimination of the candidate gene.

The CC as a forerunner of Multi-parental Populations in other species

Recognizing the power of The Collaborative Cross,

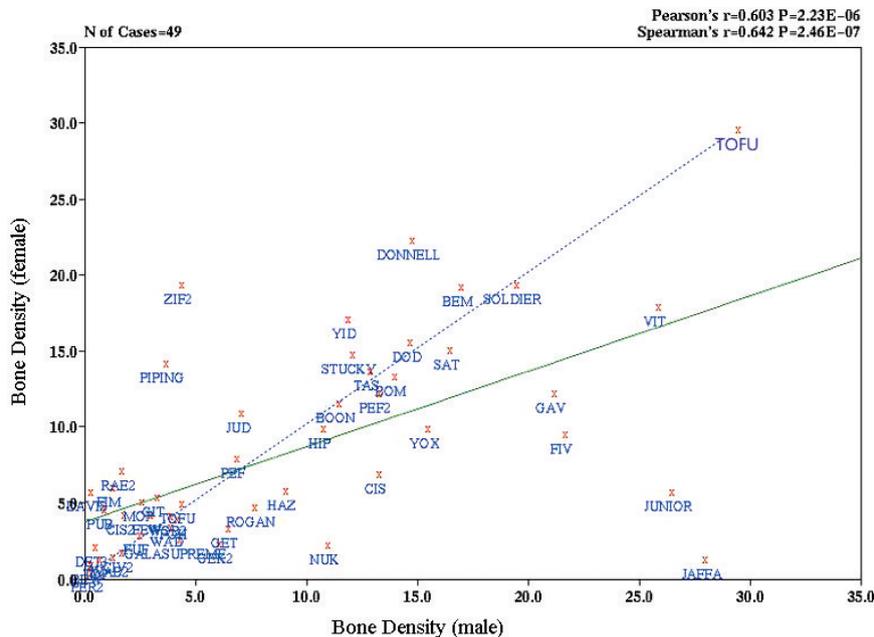


Fig. 4 Correlation of Bone Density in Male and Female Mice of CC strains.

Femurs from 60 CC strains were characterized by micro-CT and average bone density measurements were calculated for male and female mice for each CC strain from the Australian colony. Data were entered into a modified WebQTL database and traits were correlated. The dotted blue line indicates expected correlation if male and female mice had the same bone density; the green line indicates the actual correlation. Though the overall correlation is significant, it is reduced from the expected due to outlier strains such as JAFFA and ZIP2. These strains have osteopetrotic males but osteoporotic females, and osteopetrotic females but osteoporotic males, respectively. Bone density data were kindly provided by Prof Jiakexu and Jinbo Yuan (University of Western Australia).

researchers began production of multiparental populations in other model species. Having the advantage of shorter generation times, these crosses were finished in advance of the CC. Multiparental populations of RI lines have been produced for *Drosophila*, (King et al., 2012) and many plant species including *Arabidopsis*, maize, wheat, rice, and chickpea (see review by Huang et al. 2015). Plant versions of the CC are commonly referred to as Multi-parent Advanced Generation Intercrosses (MAGIC) and by rapidly identifying genes of agricultural importance, they offer the prospect of improved yields of many crop species.

Concluding Remarks

The CC will be especially valuable to study traits that can only be ascertained by studying the whole animal, in vivo. The 200 extant RI strains provide the opportunity to generate ~ 40,000 genotype combinations each fully defined, reproducible and isogenic within an F1 animal. Such F1 mice will provide even greater opportunities for discovery because unlike the parental CC strains, they will be heterozygous at most loci, pro-

viding the opportunity for investigating effects of heterosis, which is rarely observed at the molecular level (Morahan et al. 2002), and the genetic architecture of particular traits. There is also the prospect of obtaining mice with specific combinations of genes to create custom genotypes (e.g. heterozygous at loci A, B and C but homozygous for a certain founder strain at loci D and E).

The CC is an extremely powerful and valuable resource. It is not limited to the example applications presented here; its applications are limited by the imagination (and budget!) of researchers. It will provide an enormous amount of data that can be interrogated systematically to enable new insights into mammalian biology that would not be feasible in other systems.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am grateful to Prof Jiakexu, Mr Jinbo Yuan and Dr Ramesh Ram for permission to use their bone density data and simulation figures, respectively. The Collaborative Cross strains used for these data were generously provided by Geniad (www.geniad.com). GM's

research is supported by the National Health and Medical Research Council of Australia (Program 1037321 and Project 1069173) and by Diabetes Research Western Australia.

REFERENCES

Bailey DW. Recombinant-inbred strains. An aid to finding identity, linkage, and function of histocompatibility and other genes. *Transplantation*. 1971 11;325–7.

Chesler EJ, Wang J, Lu L, Qu Y, Manly KF, Williams RW. Genetic correlates of gene expression in recombinant inbred strains: a relational model system to explore neurobehavioral phenotypes. *Neuroinformatics*. 2003;1:343–57.

Chesler, E. et al. (2008) The Collaborative Cross at Oak Ridge National Laboratory: developing a powerful resource for systems genetics. *Mamm Genome*. 19:382–9.

Churchill G and The Collaborative Cross Consortium (2004) The Collaborative Cross: a community resource for the genetic analysis of complex traits. *Nature Genetics*, 36: 1133–1137.

Collaborative Cross Consortium. The genome architecture of the Collaborative Cross mouse genetic reference population. *Genetics*. 2012 Feb;190: 389–401.

Crawford NP, et al. (2008) The Diasporin Pathway: a tumor progression-related transcriptional network that predicts breast cancer survival. *ClinExp Metastasis* 25;357–69.

Driver JP, Chen YG, Mathews CE. Comparative genetics: synergizing human and NOD mouse studies for identifying genetic causation of type 1 diabetes.

Rev Diabet Stud. 2012 9;169–87

Ferguson B, Ram R, Handoko HY, Mukhopadhyay P, Muller HK, Soyer HP, Morahan G, Walker GJ. Melanoma susceptibility as a complex trait: genetic variation controls all stages of tumor progression. *Oncogene*. 2015 34;2879–86.

Huang BE, Verbyla KL, Verbyla AP, Raghavan C, Singh VK, Gaur P, Leung H, Varshney RK, Cavanagh CR. MAGIC populations in crops: current status and future prospects. *TheorAppl Genet*. 2015 128;999–1017.

Iraqi FA, Churchill G, Mott R. (2008) The Collaborative Cross, developing a resource for mammalian systems genetics. *Mamm Genome*. 19: 379–81.

Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, et al. Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation. *Nature*. 2011;477:289–294.

King EG, Merkes CM, McNeil CL, Hooper SR, Sen S, Broman KW, Long AD, Macdonald SJ. Genetic dissection of a model complex trait using the Drosophila Synthetic Population Resource. *Genome Res*. 2012 Aug;22(8):1558–66.

Lifsted T, et al. (1998) Identification of inbred mouse strains harboring genetic modifiers of mammary tumor age of onset and metastatic progression. *Int J Cancer*. 77:640–4.

Makino S, Kunimoto K, Muraoka Y, Mizushima Y, Katagiri K, Tochino

Y. Breeding of a non-obese, diabetic strain of mice. *JikkenDobutsu*. 1980 29:1–13.

Morahan G, Huang D, Wu M, Holt BJ, White GP, Kendall GE, Sly PD, Holt PG. Association of IL12B promoter polymorphism with severity of atopic and non-atopic asthma in children. *Lancet*. 2002 360;455–9.

Morahan G, Peeva V, Mehta M and Williams R (2008) Systems genetics can provide new insights into immune regulation and autoimmunity. *J Autoimmun*. 31: 233–236.

Morahan G, Balmer L and Monley D (2008) Establishment of ‘The Gene Mine’: a resource for rapid identification of complex trait genes. *Mamm Genome*. 19: 390–393.

Mott et al. (2000) A new method for fine-mapping quantitative trait loci in outbred animal stocks *ProcNatlAcadSci USA*, 97;12649–12654.

Nadeau, J. (2001) “Modifier genes in mice and humans” *Nature Rev Genet* 2: 165–174

Nguyen C, Baten A, Morahan G. Comparison of sequence variants in transcriptomic control regions across 17 mouse genomes. *Database (Oxford)*. 2014 Mar 18;2014:bau020. doi: 10.1093/database/bau020

Ram R, Mehta M, Balmer L, Gatti DM, Morahan G. Rapid identification of major-effect genes using the collaborative cross. *Genetics*. 2014 Sep; 198(1):75–86.

Roberts A, Pardo-Manuel de Villena F, Wang W, McMillan L, Threadgill DW (2007) The polymorphism architecture of mouse genetic resources elucidated using genome-wide resequencing data: implications for QTL discovery and systems genetics. *Mamm Genome* 18;473–481

Rogala AR, Morgan AP, Christensen AM, Gooch TJ, Bell TA, Miller DR, Godfrey VL, de Villena FP. (2014) The Collaborative Cross as a resource for modeling human disease: CC011/Unc, a new mouse model for spontaneous colitis. *Mamm Genome*. 2014 25;95–108.

Svenson KL, Gatti DM, Valdar W, Welsh CE, Cheng R, Chesler EJ, Palmer AA, McMillan L, Churchill GA. High-resolution genetic mapping using the Mouse Diversity outbred population. (2012) *Genetics*. 190: 437–47.

Threadgill DW, Hunter KW, Williams RW (2002) Genetic dissection of complex and quantitative traits: from fantasy to reality via a community effort. *Mamm Genome* 13;175–178

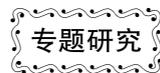
Weerasekera LY, Balmer LA, Ram R, Morahan G. Characterization of Retinal Vascular and Neural Damage in a Novel Model of Diabetic Retinopathy. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2015 Jun;56(6):3721–30.

Valdar W., Flint J., Mott R., 2006. Simulating the collaborative cross: power of quantitative trait loci detection and mapping resolution in large sets of recombinant inbred strains of mice. *Genetics* 172: 1783–1797

Welter D, MacArthur J, Morales J, et al. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations. *Nucleic Acids Res*. 2014; 42 (Database issue). D1001–6. doi, 10.1093/nar/gkt1229.

Williams RW1, Gu J, Qi S, Lu L. The genetic structure of recombinant inbred mice: high-resolution consensus maps for complex trait analysis. *Genome Biol*. 2001;2(11):RESEARCH0046. Epub 2001 Oct 22.

Yalcin B., Flint J., Mott R., 2005. Using progenitor strain information to identify quantitative trait nucleotides in outbred mice. *Genetics* 171: 673–681



复杂性状遗传 CC 小鼠信息资源及研究应用

孔 琪, 夏霞宇, 秦 川*

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心; 卫生部人类疾病比较医学重点实验室;
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 北京 100021)

【摘要】 复杂性状遗传 CC 小鼠(CC 小鼠)由不同遗传背景的小鼠品系杂交后, 近交培育而成, 用于研究人类复杂性状疾病和疾病的遗传差异。CC 小鼠能体现不同小鼠亚种的遗传差异, 其单核苷酸多态性是传统近交系小鼠的四倍。CC 小鼠在生命科学与医学研究领域的应用越来越广泛。本文通过信息检索等方式对 CC 小鼠相关信息资源进行梳理, 阐述了 CC 小鼠的起源、数据库、应用工具, 以及研究领域等, 以推动 CC 小鼠资源在中国得到广泛应用。

【关键词】 复杂性状遗传 CC 小鼠, 小鼠品系, 资源, 数据库, 人类疾病

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0011-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.002

The Collaborative Cross mice resource information and application

KONG Qi, XIA Xia-yu, QIN Chuan*

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences & Comparative Medical Center,
Peking Union Medical College, Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health;
Key Laboratory of Human Diseases Animal Model, State Administration of Traditional Chinese Medicine, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Collaborative Cross mice (CC mice) are series of inbred mice strains generated from hybrid strains of mice with different genetic background which used for human complex diseases and genetic diversity diseases studies. Genetic diversity of CC mice can reflect different mouse subspecies, the single nucleotide polymorphism is four times than traditional inbred mice. CC mice are more and more widely used in the field of life science and medical research. Based on information retrieval of CC mice, we introduced the related information resources of CC mice origin, database, application tools, and research results, to promote CC mice resources to be used widely in China.

【Key words】 Collaborative Cross mice; Mouse strain; Resource; Database; Human disease

小鼠(mice, *Mus musculus*)是研究人类疾病理想而且常用的模式动物。随着基因工程技术的发展, 使得小鼠品系资源愈加丰富, 在人类疾病研究中的应用也更广泛。复杂性状疾病, 即多基因病, 是指由多个基因共同参与, 且和环境因素相互作用决定表型的遗传病, 如高血压、冠心病、糖尿病、哮

喘和某些癌症等。

采用单一遗传背景的小鼠已无法有效复制人类多基因相互作用引起的复杂性状疾病。复杂性状遗传 CC 小鼠(Collaborative Cross mice, CC 小鼠)应运而生, 成为模拟人类复杂性状疾病的利器, 具有更丰富的性状差异, 更丰富的遗传多态性, 能够

[基金项目] 中央科研院所基本业务费(DWS200709, DWS201208, DWS201512); 传染病科技重大专项(2009ZX10004-503)。

[作者简介] 孔琪(1978-), 助理研究员, 博士, 研究方向: 实验动物学。E-mail: infor@cnilas.org。

[通讯作者] 秦川, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 实验病理学。E-mail: qinchuan@pumc.edu.cn。

体现不同人群对病因敏感的差异性,可应用于精准医疗、基因功能发现、疾病模型建立和人类复杂性状疾病等方面研究。

本文通过信息检索、文献查阅、数据库搜索等方式对 CC 小鼠相关信息资源进行梳理,阐述了 CC 小鼠的概述、数据资源、应用工具,以及研究应用等,以使我国科研人员深入了解和更好的使用 CC 小鼠,支撑人类复杂性状疾病研究和精准医疗等相关领域发展。

1 概述

CC 小鼠来源于复杂性状联盟 (Complex Trait Community, CTC) 启动的一个项目。其目的是发展一种更适用于研究复杂性状或复杂病因疾病的研究工具,以模拟人群基因多样性进行复杂性状相关研究^[1]。包括数百种不同基因型的小鼠品系,来自多个原始种系。截止到 2016 年 3 月美国北卡大学 (University of North Carolina, UNC) 共对外提供 72 个 CC 小鼠品系^[2]。

研究人员采用 CC 小鼠进行正常肝组织的表达数量性状基因座 (expression Quantitative Trait Loci, *eQTL*)^[3,4], 过敏性鼻炎 (allergic airway inflammation)^[5], 黑色素瘤易感性^[6], 流行性感与埃博拉等病毒易感性^[7,8] 基因型与性状相关研究。CC 小鼠名声大噪源于 Science 杂志在线发表的一篇《Host genetic diversity enables Ebola hemorrhagic fever pathogenesis and resistance》文章^[8]。作者在 47 个 CC 小鼠品系中测试了埃博拉病毒引发的宿主应答。病毒感染对不同品系小鼠造成的影响不同,揭示了人类对埃博拉易感性不同源于其存在的遗传学差异。与此同时,以 CC 小鼠为基础的数据库以及研究工具也逐步建立起来,极大程度地丰富了科研人员的研究资源。

2 数据资源

2.1 UNC CC 小鼠数据库

UNC 数据库介绍了 CC 小鼠项目的发展历程,并提供了当前发布的 72 个 CC 小鼠品系的相关数据,包括名称、八种初始品系的基因组组成、杂合比例、健康状况、饲养环境、图片等基础信息,毛色、眼睛色、繁殖能力等生理数据,以及相应的基因型、单倍型等多种数据,供研究人员下载使用。

UNC 同时也提供了一系列的可视化工具对 CC 小鼠的基因型等数据进行展示。通过 UNC 的 CC 小鼠浏览器 2.0 (<http://csbio.unc.edu/CCstatus/>

<http://csbio.unc.edu/gecco/>), 研究人员可以获取其基因型、单倍型及系统进化等信息。通过 CC 小鼠表达谱浏览器 (<http://csbio.unc.edu/gecco/>), 研究人员可直观了解不同 CC 小鼠中基因表达水平异同。除发布的 CC 小鼠品系信息,UNC 还整合了部分其它相关数据。

UNC 系统遗传学中心负责 CC 小鼠项目后期的繁殖,保种与信息发布。其数据库包含了最全面的 CC 小鼠品系相关信息,并通过官网 (<http://csbio.unc.edu/CCstatus/index.py>) 提供给相关科研人员。

2.2 Sanger 小鼠基因组数据库

CC 小鼠作为研究复杂性状疾病分子机制的工具,通过其基因图谱定位可以找出决定性状的关键因素。而根据 CC 小鼠的来源,可以将其基因组近似表征为八种纯系小鼠基因组的嵌合体。因此,这八种纯系小鼠的基因组数据是所有后续相关研究的基础。

这些基因组数据均可以通过 Sanger 小鼠基因组项目获得。自 2011 年开始,Sanger 小鼠基因组数据库 (<http://www.sanger.ac.uk/resources/mouse/genomes/>) 便发布了所有八种纯系小鼠以及其它九种常见的实验小鼠品系的高通量全基因组重测序数据^[9]。与此同时发布的还有各实验小鼠品系与小鼠参考基因组 (C57BL/6J, CRCm38 版) 的比对及变异,包括单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, SNP)、短片段插入/删除 (Insertion/Deletion, Indel), 以及结构变异 (Structural variation) 等数据信息。其中,SNP 及短片段 Indel 均已通过 Ensembl Variant Effect Predictor 加以注释^[10], 研究人员可通过基因组位置、基因名称、小鼠品系、变异类型及预测功能等关键词进行相关信息的检索及可视化浏览。截止 2016 年 3 月,数据库中所包含的实验小鼠品系数已增加至 36 种,其中有 19 种 (包括构建 CC 小鼠所采用的八种) 已整合进 UNC 数据库中。

2.3 MDA 小鼠基因型数据库

美国 Jackson 实验室建立的小鼠 MDA 基因型数据库 (<http://cgd.jax.org/datasets/diversityarray.shtml>) 已收录了包括 UNC CC 小鼠在内的 1,902 份实验小鼠的原始及处理后芯片数据,可供研究人员下载使用。

小鼠多样性芯片 (Mouse Diversity Array, MDA) 是最早针对实验小鼠发明的高密度基因分型芯片^[11]。MDA 芯片基于 Affymetrix 平台,包含了 60 余万种实验小鼠全基因组范围的 SNP,及另外 90 余

万种用于检测拷贝数变异的功能性保守标签信息^[11]。虽然不如全基因组测序精度高,MDA 小鼠分型芯片仍被广泛应用于 CC 前期(G2;F1 代)及后期(前 CC)基因分型及功能研究中^[3, 5, 7, 12]。

2.4 MUGA 及 MegaMUGA 基因型数据库

MUGA 和 MegaMUGA 是另外两种专门针对 CC 小鼠所设计的基因分型芯片,基于 Illumina Infinium 平台,主要用于确定各 CC 小鼠品系中八个纯系小鼠基因组的贡献,以及繁殖过程中不同 CC 小鼠品系间的剩余杂合率^[13]。MUGA 芯片包含 7,851 种 SNP 分型标记,其升级版 MegaMUGA(第二代小鼠基因分型芯片)则是其 10 倍。MUGA 及 MegaMUGA 芯片是 UNC 推荐使用的小鼠基因分型工具。

CC 小鼠构建过程中部分样本的 MUGA 或 MegaMUGA 基因型检测数据均已有 UNC 收录。其中,MUGA 数据共计 626 份,包括 168 份八种纯系及 F1 代的参考基因型数据,以及另 458 份其它样本检测数据;MegaMUGA 数据共计 792 份,包括 72 种成熟 CC 小鼠品系基因型数据,以及 720 份其它样本的检测数据。MUGA/MegaMUGA 数据库,以及芯片相关的分析工具,均可通过 UNC 官方网站获取。

2.5 小鼠表型数据库

美国 Jackson 实验室建立的小鼠表型数据库(Mouse Phenome Database,MPD)旨在为研究人员提供一个近交系实验小鼠基因组变异信息分类集的 Web 接口^[14]。其 Genotype 模块(<http://phenome.jax.org/db/q? rtn = snp/home>)包含了 Sanger 实验小鼠基因组及 Jax-UNC 小鼠的 MDA 变异信息,以及部分其它的结构变异数据集。

研究人员可通过基因组位置、基因名称、小鼠品系、变异类型及预测的功能等关键词进行相关信息的检索。此外,Genotype 模块还提供了不同小鼠品系的两两基因型比较,基因型数据获取等功能。

2.6 小鼠基因型重估数据库

经典近交系小鼠通常由单一品系近交培育而成,遗传相似度在 99% 以上。每个近交系小鼠个体的基因组可近似认为是由祖先株单倍型片段组成的嵌合体。Yang 等人对 100 种经典小鼠品系的 MDA 基因型数据进行了四配子检验,以界定家鼠(*M. m. domesticus*)的单倍型域^[15]。随后,Wang 等人结合这些单倍型域,以及 12 个品系的全基因组重测序数据,对 1.2×10^{10} 个位点进行了高置信度基因型重估^[16]。所有单倍型域及重估数据可以通过 UNC 的模块(<http://msub.csbio.unc.edu/>和

<http://csbio.unc.edu/imputation/>)获取。这些结果对于后续 CC 小鼠相关的数量性状遗传位点(Quantitative trait location, QTL)分析研究工作至关重要。

3 应用工具

3.1 单倍型重构工具

CC 小鼠是由多个纯系小鼠重组而来,其基因组中不同祖先株的单倍型域组成极大程度影响了后续的 QTL 分析与研究。单倍型重构是应用 CC 小鼠进行 QTL 分析研究的第一步。以 CC 小鼠基因型芯片数据为基础,研究人员通常采用 HAPPY^[17] 与 GAIN^[18] 软件包来实现。

HAPPY 与 GAIN 均以隐马尔可夫模型(Hidden markov model,HMM)为基础,并根据基因型芯片数据的观测值估算每个位点祖先株相应的概率^[19]。HAPPY 是一个 R 软件包,起源较早,包括一系列针对封闭群进行 QTL 分析的函数。GAIN 函数主要是针对 CC 小鼠所设计,通过结合 HMM 算法与系谱相关知识有效推断祖先株的概率。HAPPY 软件包及相关数据可通过 Wellcome Trust 人类遗传中心网站(<http://mus.well.ox.ac.uk/CC/>)在线获取。

所有已发布的 CC 小鼠品系的单倍型重构数据信息可以通过 CC 小鼠浏览器(<http://csbio.unc.edu/CCstatus/index.py? run = CCV>)进行浏览与下载。

3.2 QTL 定位工具

BAGPIPE(<http://valdarlab.unc.edu/software/bagpipe>)^[20] 及 BAGPHENOTYPE(<http://valdarlab.unc.edu/bagphenotype.html>)^[21] 是两种针对 CC 小鼠进行 QTL 定位研究的软件包。两个软件包均以 HAPPY 的固定效应模型(fixed-effects model)为基础,模拟加性效应与显性效应,通过八种原始株的单倍型概率矢量对表型值进行拟合。其它如实验(如:批次)及生物学(如:性别)等协变量可采用固定或随机效应模型。统计显著性程度可通过非限制性排列进行估算。

BAGPIPE 及 BAGPHENOTYPE 均以小鼠的单倍型概率矩阵为输入值,通过命令行进行操作。BAGPIPE 通常适用于群体结构未知的正态分布性状的单位点定位,而 BAGPHENOTYPE 则采用了重采样模型平均及多位点模型。此外,BAGPHENOTYPE 也可以根据广义线性模型对非正态分布性状(如:枚举、二元性状等)进行定位。

3.3 高通量测序分析工具

高通量测序读段与参考基因组的比对是测序相关研究的第一步。其保真度与有效性随着测序物种与参考基因组的基因距离增大而降低,将导致杂合样本的研究产生误差。理想的参考基因组可以尽可能地融合更多的待测样本信息,包括二倍性等,以减少误差。以此为核心,美国北卡大学的 McMillan 团队,以及美国 Jackson 实验室的 Churchill 团队先后研发了两个等位基因特异性比对流程^[22, 23]。两种方法的原理较为相似,均首先以一个参考基因组及另一个个体特异性的变异位点(相对于参考基因组)列表为输入值,构建一个改进的、重构的、二倍体参考基因组(伪基因组),测序读段继而与伪基因组进行比对。对比质量改进,以及等位基因特异性,有利于后续的分析。

4 研究应用

以“Collaborative cross mice”为关键词对 Web of Science™核心合集数据库进行检索(截止 2016 年 3 月),共得到 206 条记录,其中研究类文献共计 152 篇,出版年份为 2006 年至今,呈现逐年递增趋势。其中,121 篇(79.6%)研究文献来源于美国的研究机构。

对研究方向进行统计分析表明,超过 50.0% (80 篇)CC 小鼠相关的科学研究均为基因遗传领域,其次为分子生物学(37, 24.3%)、生物技术应用微生物学(31, 21.4%),神经生物学(11, 7.2%)等。此外,CC 小鼠在细胞生物学、行为科学、微生物学、毒理学及生理学等领域均有所应用。

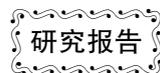
5 总结

CC 小鼠项目自 2004 年正式启动至今已经经历了 12 年,三个繁殖中心已建立起了百余种 CC 小鼠品系,并逐渐开始广泛应用于生命科学研究中。与此同时,相关的小鼠基因组与遗传数据也逐渐得以积累,在一定程度上推动了相关数据库与分析工具的构建。

UNC 等数据库已整合了多种 CC 小鼠相关的数据资源,供科研人员浏览和下载使用。诸如 HAPPY、GAIN 等针对 CC 小鼠而发展的分析工具也已逐步发展。对 Web of Science™数据库中收录的 CC 小鼠为主题的科研论文进行统计分析也表明近年来呈现出了高速增长的态势。可以预期,未来随着人们对复杂性状疾病的日益重视,以及 CC 小鼠项目在中国医学科学院医学实验动物研究所落地,将进一步推动其在中国范围内的广泛应用。

参考文献:

- [1] Churchill GA, Airey DC, Allayee H, *et al.* The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits [J]. *Nat Genet.* 2004,36:1133 – 1137.
- [2] UNC Systems Genetics. [OL][2016 – 03 – 26]. <http://www.csbio.unc.edu/CCstatus/index.py>.
- [3] Aylor DL, Valdar W, Foulds-Mathes W, *et al.* Genetic analysis of complex traits in the emerging Collaborative Cross [J]. *Genome Res.* 2011, 21:1213 – 1222.
- [4] Weiser M, Mukherjee S, Furey TS, *et al.* Novel distal eQTL analysis demonstrates effect of population genetic architecture on detecting and interpreting associations [J]. *Genetics* 2014, 198: 879 – 893.
- [5] Kelada SNP, Carpenter DE, Aylor DL, *et al.* Integrative genetic analysis of allergic inflammation in the murine lung [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2014, 51:436 – 445.
- [6] Ferguson B, Ram R, Handoko HY, *et al.* Melanoma susceptibility as a complex trait: genetic variation controls all stages of tumor progression [J]. *Oncogene.* doi: 10.1038/onc.2014.227.
- [7] Ferris MT, Aylor DL, Bottomly D, *et al.* Modeling host genetic regulation of influenza pathogenesis in the Collaborative Cross [J]. *PLoS Pathog.* 2013,9:e1003196.
- [8] Rasmussen AL, Okumura A, Ferris MT, *et al.* Host genetic diversity enables Ebola hemorrhagic fever pathogenesis and resistance [J]. *Science.* 2014, doi:10.1126/science.1259595
- [9] Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, *et al.* Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation [J]. *Nature.* 2011, 477:289 – 294.
- [10] McLaren W, Pritchard B, Rios D, *et al.* Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP effect predictor [J]. *Bioinformatics.* 2010, 26:2069 – 2070.
- [11] Yang H, Ding Y, Hutchins LN, *et al.* A customized and versatile high-density genotyping array for the mouse [J]. *Nat Methods.* 2009, 6:663 – 666.
- [12] Liu EY, Morgan AP, Chesler EJ, *et al.* High-resolution sex-specific linkage maps of the mouse reveal polarized distribution of crossovers in male germline [J]. *Genetics.* 2014,197:91 – 106.
- [13] Collaborative Cross Consortium, The Genome Architecture of the Collaborative Cross Mouse Genetic Reference Population [J]. *Genetics.* 2012, 190, 2:389 – 402.
- [14] Maddatu TP, Grubb SC, Bult CJ, Bogue MA. Mouse Phenome Database (MPD) [J]. *Nucleic Acids Res.* 2012, Jan; 40 (Database issue):D887 – 94.
- [15] Yang H, Wang JR, Didion JP, *et al.* Subspecific origin and haplotype diversity in the laboratory mouse [J]. *Nat Genet.* 2011, 43:648 – 655.
- [16] Wang J, Moore KJ, Zhang Q, *et al.* Genome-wide compatible SNP intervals and their properties. In: *Proceedings of the first a CM international conference on bioinformatics and computational biology—bCB’10* [M]. ACM Press, New York. 2010. 43



矢车菊素-3-葡萄糖苷对 APP^{swe}/PS1^{ΔE9} 阿尔茨海默病模型小鼠糖脂代谢的影响

宋楠, 张玲, 陈巍, 张倩, 韩云林, 秦川*

(北京协和医学院比较医学中心, 中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 探讨矢车菊素-3-葡萄糖苷(Cy3G)对阿尔茨海默病(AD)模型小鼠糖脂代谢的影响。方法 将7月龄 APP^{swe}/PS1^{ΔE9}(PAP)的AD模型小鼠随机分为AD模型组(PAP)、Cy3G治疗组(PAPCy, 5mg/kg/d)及同窝阴性对照组(nPAP);另外选择相同月龄的正常野生型C57BL/6J小鼠分别作为空白对照组(WT)和Cy3G干预组(WTCy, 5mg/kg/d);每组12只,雌雄各半。Cy3G灌胃8周后,用MicroPET/CT检测脑葡萄糖代谢率;血生化方法检测小鼠肝肾功能及脂代谢相关指标;取全脑称重并计算脏器系数,HE染色进行组织病理学检查;透射电镜观察海马中老年斑沉积情况;Western-blot分析Jun氨基末端激酶(JNK)和蛋白激酶B(AKT)的表达情况。结果 MicroPET/CT结果显示,与WT组相比,PAP组小鼠脑¹⁸F-FDG的摄取率显著降低($P < 0.05$),尤其在额叶和海马区降低尤为明显;与PAP组相比,PAPCy组小鼠额叶和海马区的¹⁸F-FDG的摄取率显著升高($P < 0.05$)。血生化结果显示,与WT组相比,PAP组小鼠血清中天冬氨酸转氨酶(AST)和乳酸脱氢酶(LDH)水平显著升高($P < 0.05$),脂代谢指标相对正常;与PAP组相比,PAPCy组血清LDH水平显著降低($P < 0.05$)。脑组织HE染色未发现异常,但是在脑系数比较中,与WT组相比,PAP组小鼠脑系数显著降低($P < 0.05$);与PAP组相比,PAPCy组小鼠大脑的脑系数显著升高($P < 0.05$)。透射电镜下观察发现,WT组、WTCy组及nPAP组海马中未见有老年斑沉积,PAP组小鼠海马可观察到有老年斑沉积,而PAPCy组小鼠海马中老年斑沉积有所减少。Western blot结果显示,与WT组相比,PAP组JNK蛋白水平显著降低($P < 0.05$)、AKT蛋白水平显著升高($P < 0.05$);与PAP组相比,PAPCy组JNK蛋白水平显著升高($P < 0.05$),而AKT蛋白水平显著降低($P < 0.05$)。结论 Cy3G可以有效改善AD模型小鼠脑葡萄糖代谢障碍,但对脂代谢调节并不显著,同时还能抑制大脑海马中老年斑的沉积。提示,Cy3G可能是通过JNK/AKT通路调节胰岛素抵抗和炎症反应。

【关键词】 阿尔茨海默病;矢车菊素-3-葡萄糖苷;葡脂代谢

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0015-09

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.003

Effect of cyaniding-3-glucoside on glucose and lipid metabolism in the APP^{swe}/PS1^{ΔE9} mouse model of Alzheimer's disease

SONG Nan, ZHANG Ling, CHEN Wei, ZHANG Qian, HAN Yun-lin, QIN Chuan*

(Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College (PUMC); Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Science (CAMS); Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health, Beijing 100021, China)

【基金项目】 国家自然科学基金(81500938);协和青年基金(3332015151)。

【作者简介】 宋楠,女,博士研究生,研究方向:病理学与病理生理学,神经退行性疾病的机制研究。E-mail:nannanjwstu@163.com。

【通讯作者】 秦川,女,研究员,教授,博士生导师,研究方向:病理学与病理生理学。E-mail:qinchuan@pumc.edu.cn。

[Abstract] Objective To investigate the effect of cyaniding-3-glucoside (Cy3G) on glucose and lipid metabolism in the APP^{swc}/PS1^{ΔE9} mouse model of Alzheimer's disease (AD). **Methods** Seven-month-old APP^{swc}/PS1^{ΔE9} (PAP) mice were randomly divided into model group (PAP), Cy3G treatment group (PAPCy, 5 mg/kg/d) and negative-control group (nPAP). In addition, age-matched and normal wild-type of C57BL/6J mice were selected and divided into vehicle group (WT), Cy3G intervention group (WTCy, 5 mg/kg/d). Each group containing 12 mice, with equal number of male and female mice. After 8-week Cy3G supplementation, microPET/CT was used to measure cerebral glucose metabolism rate of mice in each group. Biochemical methods were used to detect the liver / kidney function as well as indicators associated with lipid metabolism. After weighting brain tissue, the brain coefficient was tested and pathological examination was used to observe tissues changes. Transmission electron microscope was used to observe neuropathological amyloid plaques deposition. Western-blot was used to determine protein levels of AKT and JNK. **Results** Compared with the WT group, PAP mice had low levels of ¹⁸F-FDG uptake rates, especially in the regions of the frontal lobe and hippocampus accompanied by the decreased brain coefficient and amyloid plaques deposition in hippocampus. And levels of aspartate transaminase (AST) and lactic dehydrogenase (LDH) were also increased in PAP mice, but lipid metabolism index was relatively normal. In addition, the expression of JNK was decreased and AKT was increased in mice of PAP. However, in the PAPCy group, ¹⁸F-FDG uptake rates were obviously increased in the regions of the frontal lobe and hippocampus compared with those in the PAP mice. And the reduction of brain atrophy and amyloid plaques deposition, normal lipid metabolism and no obvious liver/kidney toxicity were also observed. Cy3G also could reverse the changes of JNK and AKT protein. **Conclusions** Cy3G can improve glucose metabolism disorders instead of lipid metabolism, inhibit the senile plaques deposition in hippocampus and regulate insulin resistance and inflammatory reaction associated with JNK/AKT pathway. Thus, Cy3G has a good safety profile and may be used as an ideal alternative to traditional disease-modifying treatments against AD.

[Key words] Alzheimer's disease; Cyaniding-3-glucoside; Glucose and lipid metabolism

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 作为常见的神经退行性疾病的一种,特征性的病理学表现有:β 淀粉样肽 (β amyloid peptides, Aβ) 沉积形成的老年斑和 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结^[1, 2]。临床上常伴有进行性认知功能障碍、人格和行为改变等^[3, 4]。越来越多的研究均证实,随着 AD 病程的发展,大脑葡萄糖代谢障碍是 AD 一个典型的病理生理特征,比认知功能障碍和其他病理改变早出现几十年^[5-8],并对 AD 病程的发展起着重要作用^[4]。因此,如何有效预防 AD 是关键。

矢车菊素-3-葡萄糖苷 (cyaniding-3-glucoside, Cy3G) 是酚类化合物中矢车菊色素 (cyanidin, Cy) 的一种糖苷形式,是植物中常见的且含量较为丰富的花色苷糖苷单体。研究发现, Cy3G 具有神经保护作用^[9, 10],其发挥神经保护作用的机制也主要是涉及抗氧化作用和调节神经细胞间信号转导^[2, 11]。此外,在非酒精性脂肪肝和 2-型糖尿病的研究中发现, Cy3G 可改善胰岛素抵抗、调节脂代谢及缓解氧化应激损伤^[9, 12, 13]。但其是否通过调节糖脂代谢进而改善 AD 尚未有文献报道。本研究拟用 APP^{swc}/PS1^{ΔE9} (PAP) 转基因 AD 模型小鼠,观察 Cy3G 对 AD 模型小鼠糖脂代谢的影响及其相关生

化、病理指标的改变,初步探讨可能的分子机制,以期能为 Cy3G 改善 AD 认知的机制研究及潜在临床应用提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

实验所采用的 APP^{swc}/PS1^{ΔE9} (PAP) 双转基因阿尔茨海默病小鼠模型由本所遗传中心构建培育。该模型以 C57BL/6J 小鼠为背景,含有人 APP 瑞典突变位点 (K595N/M596L) 和人 PS1 第九外显子敲除 (ΔE9) 突变位点。用于繁殖的野生雌性 C57BL/6J 小鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK-(京)2014-0004】,实验在中国医学科学院医学实验动物研究所开展【SYXK-(京)2011-0022】。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

1.1.2 实验药物和试剂

Cy3G 购自 (纯度 ≥ 99%) 购自芬兰 Polyphenols AS 公司; RIPA 裂解液 (强) 购于江苏碧云天公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS)、过硫酸胺 (APS)、Tris-HCl、甘氨酸、TEMED、Tween-20 购自美国 Sigma 公司; N,

N'-亚甲基双丙烯酰胺和丙烯酰胺购自美国 Bio-Rad 公司;磷酸酶抑制剂购自美国 Thermo 公司;苯甲基磺酰氟(PMSF)购自美国 Amresco 公司;丽春红、溴酚蓝购自北京鼎国生物技术公司; β -巯基乙醇购自美国 Biotech 公司;二硫苏糖醇(DTT)购自北方同正科技发展有限公司;BCA™ Protein Assay Kit、蛋白 Marker 与 ECL 发光试剂盒购于美国 Pierce 公司;脱脂奶粉购自伊利公司;兔抗小鼠的 JNK 多克隆抗体和 AKT 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司;小鼠单克隆抗体 GAPDH 和 HRP 标记的羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;Micro-PET 示踪剂(^{18}F 标记的脱氧葡萄糖, ^{18}F -FDG)由中国医学科学院肿瘤医院提供。

1.1.3 仪器和设备

MicroPET/CT 及 INVEON 分析系统(Siemens, 美国);全自动生化分析仪(日立 7100, 日本);透射电镜(JEOL JEM-1400, 日本)及倒置显微镜(Olympus, 日本);电泳电源、垂直电泳仪、湿式转印槽(北京凯元信瑞仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组与处理

将 7 月龄 PAP 模型小鼠分为 AD 模型组(PAP)、Cy3G 治疗组(PAPCy, 5 mg/kg/d)及同窝阴性对照组(nPAP);另外选择相同月龄的正常野生型 C57BL/6J 小鼠分别作为空白对照组(WT)和 Cy3G 干预组(WTCy, 5 mg/kg/d);小鼠体重(23~25)g, 每组 12 只,雌雄各半;Cy3G 灌胃 8 周,灌胃体积为 0.2 mL/只,溶剂对照为等体积无菌水。

1.2.2 MicroPET/CT 检测脑葡萄糖代谢水平

干预结束后,随机从各组中选择 3 只小鼠(雄性)并提前禁食不禁水 12 h,实验前提前适应周围实验环境。

1)小鼠吸入含 1.5%~2% 异氟烷的纯氧进行吸入麻醉(1~2 L/min),待小鼠麻醉完全后,腹腔注射放射性示踪剂 ^{18}F -FDG,注射量在 14.5~21.9 MBq 之间,活度 ≥ 0.5 mCi。

2)注射 1 h 后,将小鼠俯卧位固定在扫描床上,使其头部长轴与扫描器长轴保持平行且在扫描器视野内。

3)利用 PET/CT 进行图像采集,整个扫描过程中小鼠头部固定,并使小鼠一直处于麻醉状态。

4)Micro-PET 影像重建。采用滤波后投影算法和 CT 光子衰减校正重建影像,得到 10min 的单帧

图像。

5)感性兴趣区(region of interest, ROI)的选取。通过三维感兴趣区(3DROI)技术,在小鼠脑部横断面、矢状面和冠状面手动选取除小脑外的立体全脑 3DROI,计算 ROI 内平均每克脑组织 ^{18}F -FDG 的摄取率(%ID/g)。

1.2.3 血生化及脂代谢指标检测

于实验结束时,各组小鼠经眼眶静脉采血,按照试剂盒相关说明,并使用全自动生化分析仪进行血液生化检测。血液生化指标包括谷丙转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST);脂代谢指标包括乳酸脱氢酶(LDH)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白(HDL)及低密度脂蛋白(LDL)。

1.2.4 脏器系数及病理学检查

将小鼠眼眶静脉取血后,颈椎脱臼处死,称全脑重量并根据当日体重计算脏器指数。脏器系数=(脏器重量/体重) $\times 100\%$;沿脑横断面从中切开,入恒冷冰冻切片机行 10 μm 连续横断面切片,隔 3 取 1,切片于 4% 多聚甲醛溶液中固定 20 min,再在 0.01 mol/L PBS 中放置 30 min,最后经纯乙醇脱水 2 min 入蒸馏水,进行 HE 染色,封固镜检。

1.2.5 透射电镜观察老年斑沉积

取小鼠海马 CA1 区,将组织修成 1 mm \times 1 mm \times 1 mm 大小的长条形,在含 2.5% 戊二醛的固定液中 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h,0.1 mol/L PBS 洗三次,每次 10 min;1% 锇酸 4 $^{\circ}\text{C}$ 固定 2 h,双蒸水冲洗三次,每次 10 min;梯度酒精脱水(50%, 70%, 90%)各 10 min,100% 酒精 2 次,各 15 min;环氧树脂 Epon812 包埋,超薄切片用醋酸双氧铀及枸橼酸铅双染色,透射电镜观察(JEOL JEM-1400)。

1.2.6 Western-blot 检测 JNK 和 AKT 蛋白表达的变化

提取脑组织蛋白并测定蛋白浓度。取含有 60 μg 蛋白的样品(用生理盐水调成等体积)加入 5 \times 上样缓冲液,100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴变性 5 min,置于冰上骤冷后进行 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳、湿转法转膜并用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,分别加入稀释好的抗体 JNK(1:500)、AKT(1:500)和 GAPDH(1:15 000);于摇床孵育,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日弃去一抗,TBST 摇床上洗膜 3 次,10 min/次,加入稀释好的二抗(1:15 000),室温孵育 1 h。加入化学发光试剂并置于天能化学发光成像系统(Tannon 5500)中成像,并用 Image J 进行条带灰度值分析,利用

目的蛋白与内参蛋白条带的光密度比值衡量目的蛋白的相对表达量。

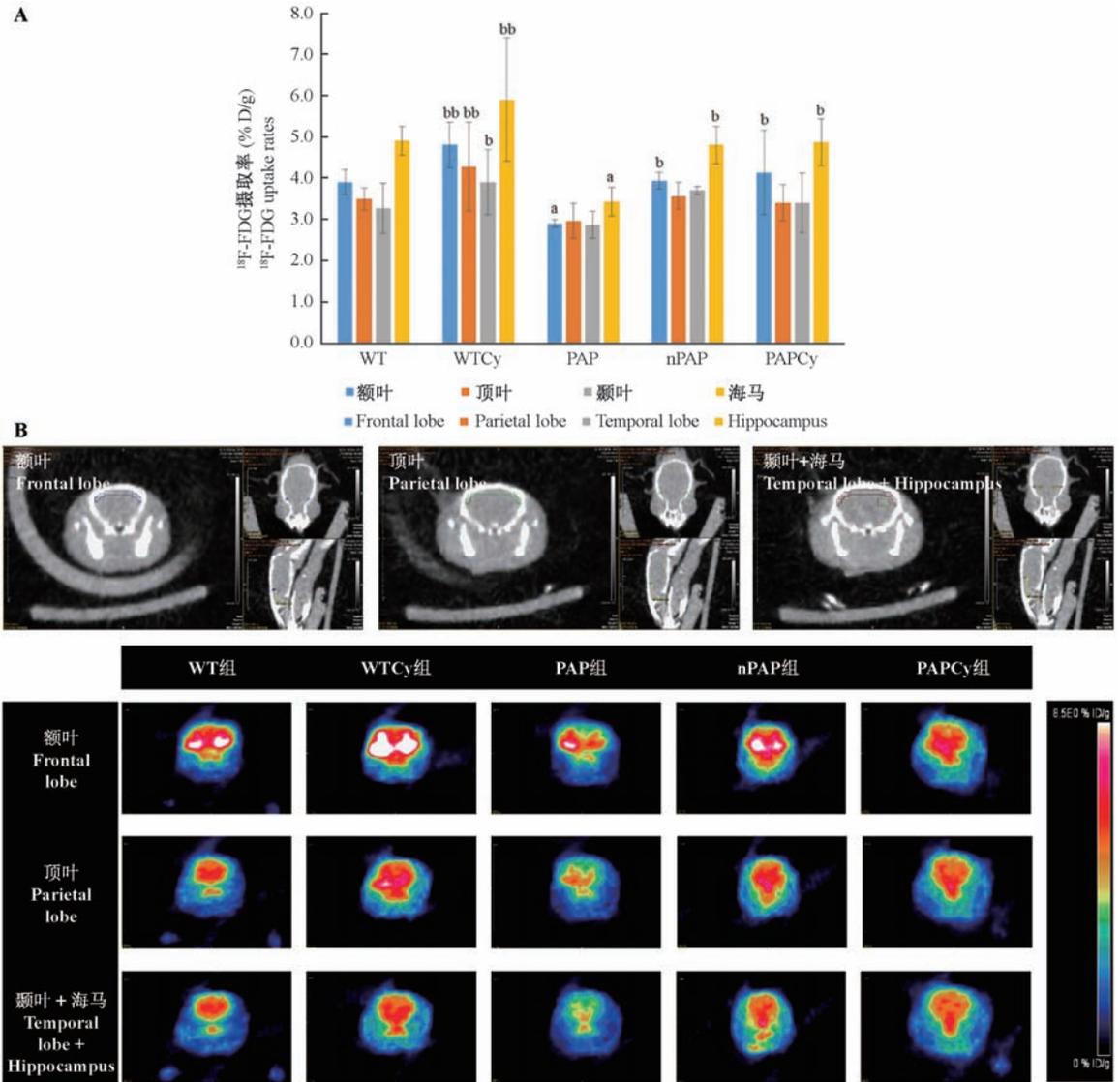
1.2.7 数据分析

数据若无说明均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用统计软件 SPSS 20.0 进行统计分析。结果采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), t 检验, wilcox 秩和检验和 Tukey 检验分析组间差异是否显著, $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Cy3G 对 PAP 小鼠脑葡萄糖代谢的影响

如图 1A 所示, MicroPET/CT 检测小鼠额叶 (frontal lobe)、顶叶 (parietal lobe)、颞叶 (temporal lobe) 和海马 (hippocampus) 区对 ^{18}F -FDG 摄取率的变化。结果显示, 各组间不同 ROI 内的平均每克脑组织 ^{18}F -FDG 的摄取率 (% ID/g) 存在显著差异。即



注: (A) Cy3G 对 PAP 小鼠不同 ROI 内平均每克脑组织 ^{18}F -FDG 的摄取率 (% ID/g) 的影响,

与 WT 组比较, $^aP < 0.05$, $^{aa}P < 0.01$; 与 PAP 组比较,

$^bP < 0.05$, $^{bb}P < 0.01$; (B) 各组小鼠脑不同区域横断面 MicroPET/CT 影像。

图 1 Cy3G 对 PAP 小鼠脑葡萄糖代谢的影响 ($n = 3$)

Note. (A) Comparison of ^{18}F -FDG uptake rates in the ROI of mice brains after Cy3G supplementation for 8 weeks ($n = 3$; closely age-matched). Compared with WT group, $^aP < 0.05$, $^{aa}P < 0.01$; Compared with PAP group, $^bP < 0.05$, $^{bb}P < 0.01$.

(B) MicroPET/CT imaging of mice after Cy3G supplementation for 8 weeks.

Fig. 1 Effects of Cy3G on cerebral glucose metabolism in PAP mice.

与 WT 组相比, PAP 组小鼠脑¹⁸F-FDG 的摄取率显著降低($P < 0.05$), 尤其在额叶和海马区降低尤为明显; 与 PAP 组相比, PAPCy 组小鼠额叶和海马区的¹⁸F-FDG 的摄取率显著升高, P 值分别为 0.019 和 0.036。

在横断面 PET 影像中% ID/g 使用相同阈值, 色标从上到下分别代表高、中、低¹⁸F-FDG 摄取水平, 相应为高、中、低脑葡萄糖代谢水平。结果显示(图 1B), WT 组和 WTCy 组小鼠大脑感兴趣区(额叶、顶叶、颞叶和海马区)¹⁸F-FDG 的摄取率较高, PAP 组小鼠¹⁸F-FDG 摄取率较低, 而 PAPCy 组小鼠则有所

缓解。

2.2 Cy3G 对 PAP 小鼠血生化及脂代谢的影响

结果如表 1 所示, 与 WT 组相比, PAP 组小鼠血清中 AST 和 LDH 水平显著升高($P < 0.05$), 而 LDL 尽管有升高趋势, 但差异不显著; 与 PAP 组相比, PAPCy 组血清 LDH 水平显著降低($P < 0.05$)。此外, 血清中 ALT 水平在各组小鼠中均无显著性差异。提示: PAP 组小鼠存在肝肾功能障碍, 但脂代谢相对正常; Cy3G 干预的各组小鼠无明显的肝肾损伤, 并且脂代谢正常。

表 1 各组间小鼠血生化检测

Tab. 1 Blood biochemical tests among groups of mice

组别 Group	ALT(U/L)	AST(U/L)	LDH(U/L)	TG(mmol/L)	HDL(mmol/L)	LDL(mmol/L)
WT	59.7 ± 13.8	136.0 ± 23.2	711.3 ± 122.1	0.807 ± 0.204	1.31 ± 0.229	0.308 ± 0.060
WTCy	60.4 ± 7.5	137.9 ± 29.4 ^b	720.3 ± 323.4 ^{bbb}	0.810 ± 0.176	1.35 ± 0.173	0.304 ± 0.056
PAP	64.7 ± 22.3 ↑	178.1 ± 53.9 ^{aaa}	1337.9 ± 104.3 ^{aaa}	0.848 ± 0.192 ↑	1.12 ± 0.206 ↓	0.332 ± 0.075 ↑
nPAP	53.9 ± 14.3	144.4 ± 20.7 ^b	1105.0 ± 291.8 ^{aaa}	0.818 ± 0.254	1.34 ± 0.248	0.312 ± 0.037
PAPCy	56.6 ± 15.6	149.5 ± 21.4	1115.9 ± 204.7 ^{aaa}	0.781 ± 0.088	1.23 ± 0.389	0.301 ± 0.039

注: 与 WT 组比较, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, ^{aaa} $P < 0.001$; 与 PAP 组比较, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$, ^{bbb} $P < 0.001$ 。

Note. Compared with WT group, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, ^{aaa} $P < 0.001$; Compared with PAP group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$, ^{bbb} $P < 0.001$ 。

2.3 Cy3G 对 PAP 小鼠脑系数的影响及病理学检查

脑系数结果显示(表 2), 与 WT 组相比, PAP 组小鼠脑系数显著降低, 差异具有统计学意义($P < 0.001$); 与 PAP 组相比, PAPCy 组小鼠脑系数显著升高, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。HE 染色结果表明, 各组小鼠脑组织病理检查未见明显异常, 细胞形态和结构规则、完整(图 2)。

表 2 各组间小鼠脑系数

Tab. 2 Body weight and brain index among groups of mice

组别 Group	脑 Brain
WT	0.0213 ± 0.0022
WTCy	0.0207 ± 0.0004 ^{bbb}
PAP	0.0158 ± 0.0022 ^{aaa}
nPAP	0.0204 ± 0.0013 ^{bb}
PAPCy	0.0186 ± 0.0021 ^{bb}

注: 与 WT 组比较, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, ^{aaa} $P < 0.001$; 与 PAP 组比较, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$, ^{bbb} $P < 0.001$ 。

Note. Compared with WT group, ^a $P < 0.05$, ^{aa} $P < 0.01$, ^{aaa} $P < 0.001$; Compared with PAP group, ^b $P < 0.05$, ^{bb} $P < 0.01$, ^{bbb} $P < 0.001$ 。

2.4 Cy3G 对 PAP 小鼠海马老年斑生成的影响

细胞外 A β 沉积形成的老年斑是 AD 的主要病理特征之一。通过透射电镜观察不同处理组小鼠海马中老年斑的生成情况, 如图 3 所示, 野生小鼠(包括 WT 组和 WTCy 组)及同窝阴性对照组

(nPAP)海马内未见有老年斑形成, 周围分布的线粒体结构正常; 而 AD 模型小鼠(PAP 组)小鼠海马中可观察到有老年斑沉积, 其周围还有大量聚集在一起的自噬小体。而 PAPCy 组小鼠海马中老年斑沉积有所减少。

2.5 Cy3G 对 PAP 小鼠脑组织 JNK 和 AKT 蛋白表达的影响

结果如图 4 所示, JNK 蛋白主要介导炎症反应, 与 WT 组比, PAP 组 JNK 蛋白水平显著降低, 差异具有统计学意义($P < 0.01$); 与 PAP 组相比, PAPCy 组 JNK 蛋白显著升高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。AKT 是调节胰岛素抵抗的蛋白, 与 WT 和 WTCy 组相比, PAP 组 AKT 蛋白水平显著升高, 差异具有统计学意义($P < 0.05$); 与 PAP 组相比, PAPCy 组 AKT 蛋白水平显著降低, 差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨论

阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)作为世界上最常见的一种老年痴呆症, 在中国患者数也已超过 600 万, 60 岁人群中 AD 的患病率为 3%~5%, 并随着人口老龄化其患病率呈上升趋势, 影响着我国经济和社会发展^[14]。临床用于治疗 AD 的主要药物如胆碱酯酶抑制剂只能减轻部分症状,

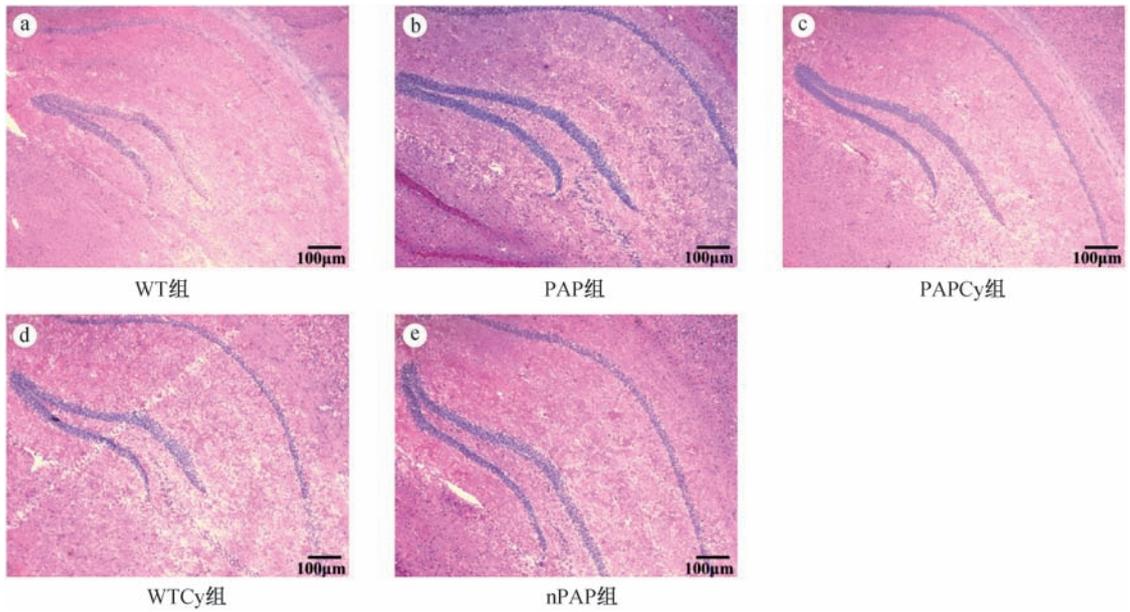


图2 脑组织病理学检查($\times 40$, bar = 100 μm , $n = 6$)

Fig.2 Pathological examination on tissue of mice.

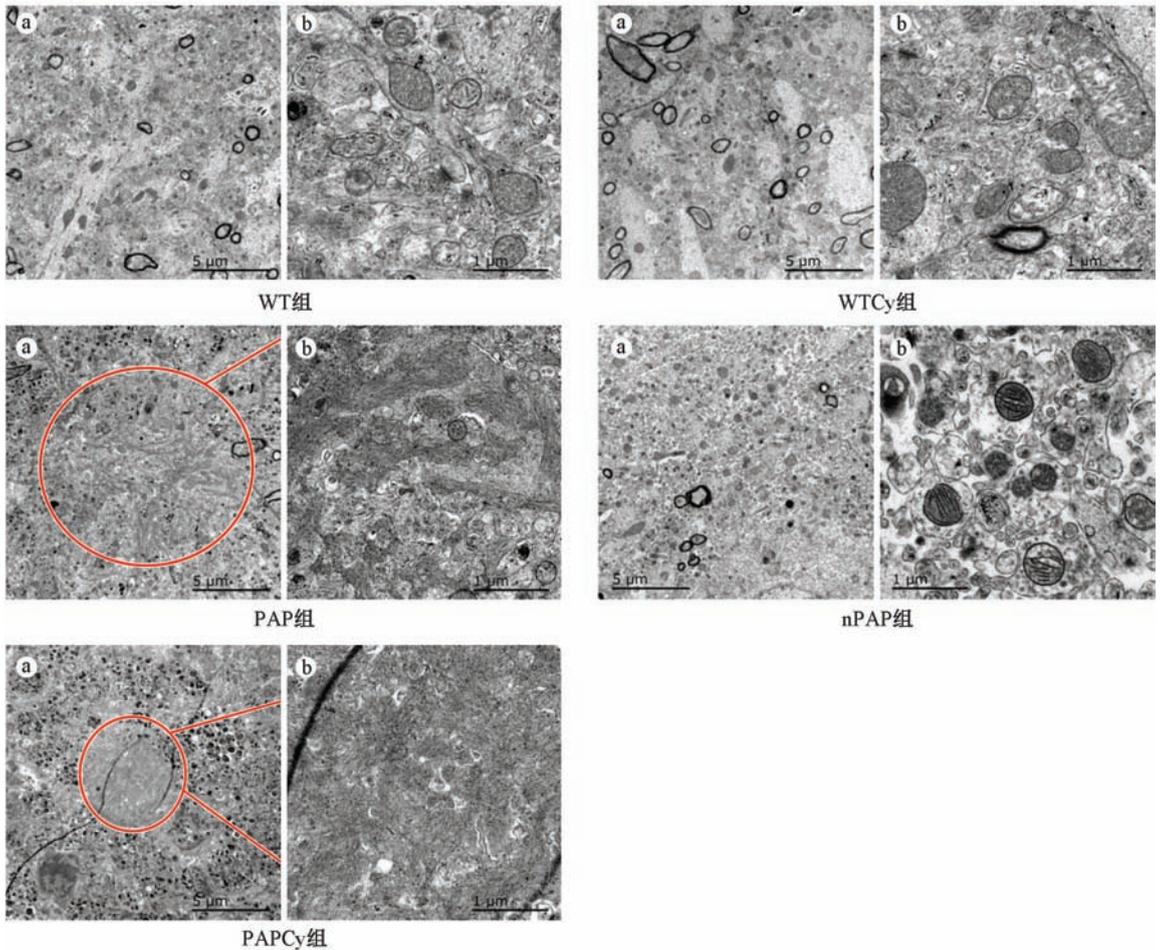
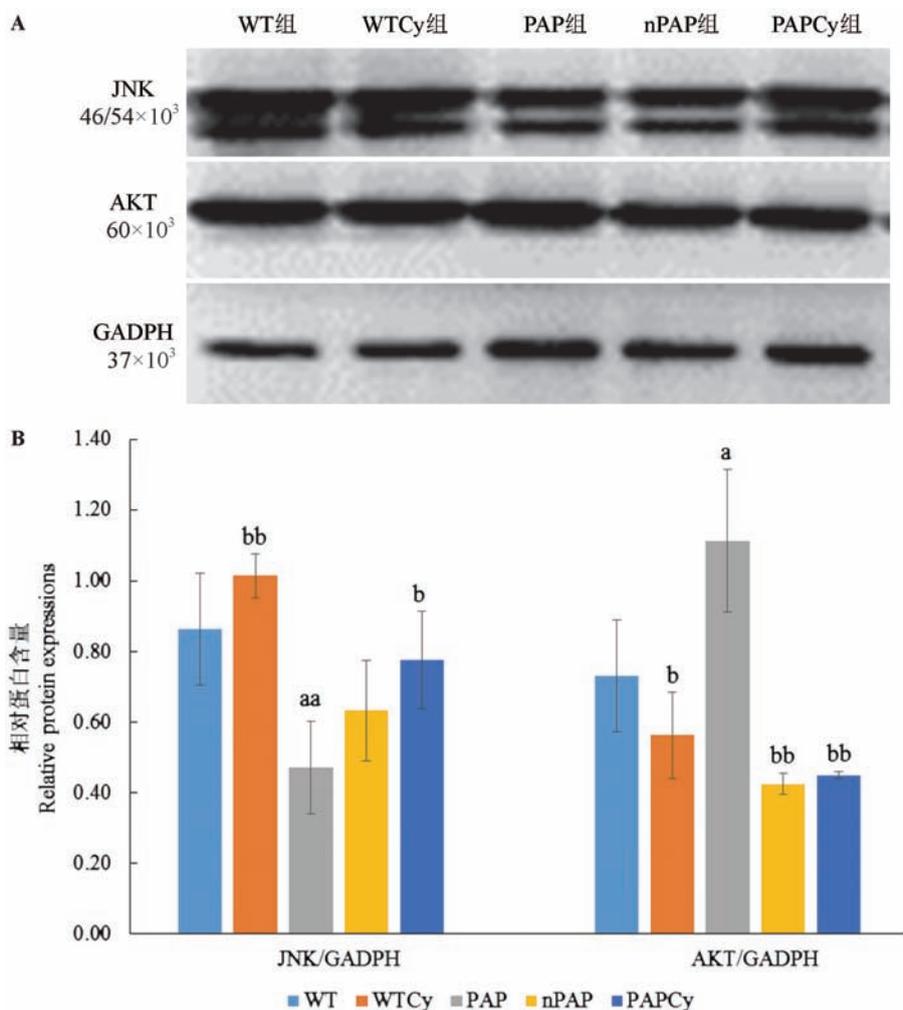


图3 透射电镜下海马区老年斑及其周围组织的超微结构(A: $\times 600$, bar = 5 μm ; B: $\times 3000$, bar = 1 μm ; $n = 3$)

Fig.3 Representative electron microscopy of senile plaques surrounded by dystrophic neuritis and autophagic vacuoles in hippocampus of each group



注：(A)为脑组织中 JNK 和 AKT 蛋白表达条带；(B)JNK 和 AKT 蛋白表达灰度分析结果；与 WT 组比较，^a*P* < 0.05, ^{aa}*P* < 0.01；与 PAP 组比较，^b*P* < 0.05, ^{bb}*P* < 0.01。

图 4 Cy3G 对 PAP 小鼠 JNK 和 AKT 蛋白表达的影响 (*n* = 3)

Note. (A) The immunoreactive bands (JNK, 46/54 kDa; AKT, 60 kDa) were detected using chemiluminescence reagents. (B) The relative density of the detected bands was measured and calculated by an automatic chemiluminescence imaging analysis system; Compared with PAP group, ^a*P* < 0.05, ^{aa}*P* < 0.01; Compared with PAP group, ^b*P* < 0.05, ^{bb}*P* < 0.01.

Fig. 4 Effect of Cy3G on the expression of JNK and AKT in different groups.

对患者脑内的主要病理变化并无明显改善作用,不能用于早期 AD 病理事件的干预或控制病情的发展,病人的生活质量无法有效改善,且药物毒副作用大^[15]。此外,葡萄糖代谢功能障碍可增加老年人认知损伤的风险。而葡萄糖代谢动态平衡的失调,会引起大脑慢性代谢性疾病,其中也包括 AD。即 AD 也是一种葡萄糖摄取和利用障碍的退行性代谢疾病。^[16]

越来越多的研究证实,Cy3G 除了具有清除自由基,抗氧化、抗炎,防止内皮功能紊乱,调节胆固醇代谢,改善胰岛素抵抗,预防癌症、糖尿病和心血管等疾病等作用外,还具有神经保护作用^[9-11, 17]。体外

实验发现,用 Cy3G 活性单体预处理 PC12 (大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤)细胞可有效改善 H₂O₂ 造成的氧化损伤,也可显著抑制缺氧缺糖 (oxygen glucose deprivation, OGD) 所致的 PC12 细胞存活率降低^[18]。Tarozzi 等^[19] 研究还发现,该活性物质对 Aβ 致人神经母细胞瘤 (SH-SY5Y) 细胞损伤也具有保护作用,即细胞存活率升高、细胞凋亡和坏死率降低、ROS 生成量减少、细胞膜完整性得到保护。而 Aβ 可以通过扩散方式进入大脑实质,是 AD 发生的主要致病因素。体内研究发现,Cy3G 可以降低大脑缺血损伤,对短暂中脑动脉阻塞 (MCAO) 造成的脑损伤模型小鼠具有神经保护作用^[11]; Shih 等^[2] 研究发现,

给快速老化(SAMP)小鼠饲喂富含 Cy3G 的提取物 12 周,可使大脑中过氧化氢酶及谷胱甘肽过氧化物酶活性升高,脂质过氧化水平降低, A β 生成减少,学习记忆能力提高,即 Cy3G 能改善衰老小鼠的认知和行为能力^[20]。体内外实验均证实: Cy3G 可以透过血-脑屏障,在与学习和记忆相关的脑区发挥其神经保护功能^[10, 21-23],因此,研究 Cy3G 对 AD 的预防或缓解作用具有现实意义。

本研究发现, Cy3G 还能有效改善 AD 小鼠大脑中不同脑区的葡萄糖利用率,即补充 Cy3G 的 AD 小鼠其脑葡萄糖代谢率显著升高,尤其以海马区最为显著,其次是额叶、颞叶和顶叶。因此,推测 Cy3G 具有安全的胰岛素样活性,可调节大脑胰岛素敏感区的葡萄糖/能量代谢, Cy3G 这种生物学效用与 Shih 和 Scazzocchio 等^[9, 13]观点一致,即他们在非酒精性脂肪肝、2-型糖尿病的研究中发现, Cy3G 可以通过活化过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 通路改善胰岛素抵抗、缓解氧化应激。 Cy3G 在脑中发挥其生物活性的机制可能与其在生理 pH 下化学性质不稳定、易分解有关,并且能迅速降解成酚酸(如原儿茶酸),这可能是其在体液中半衰期相对较短的原因;另一种可能是,在肠道中花青素首先通过肠道微生物将其糖苷键部分水解,生成花青素的糖苷配基(Cy)^[24]。同时, Fleschhut^[25]研究也已经证实,肠道菌群具有潜在的水解 Cy3G 的能力,即将 Cy3G 水解成 Cy 和 PA,而后者可到达不同组织中,其中也包括脑组织^[26]。此外,通过血生化检测并结合病理学检查,来评价 Cy3G 干预期间各组小鼠肝肾功能及脂代谢情况。结果显示: PAP 小鼠存在肝肾功能紊乱,但是脂代谢相对正常;而 Cy3G 干预的各组小鼠均无明显的肝肾损伤,并且脂代谢正常。但是, Jia 等^[12]研究发现,在脂肪组织和肝脏中 Cy3G 可显著降低脂肪变性的肝细胞的脂质浓度,其激活肝细胞脂代谢的效果类似于降血脂药物。提示,在本研究中 Cy3G 可能对 AD 小鼠糖代谢方面发挥重要作用,而在脂代谢调节中的作用并不显著,这可能是因实验对象不同所致, Jia 等是基于细胞水平上的研究,而本研究是从整体水平检测。为进一步研究 Cy3G 通过调节脑葡萄糖代谢改善 AD 的可能机制,在 Cy3G 干预期间,我们检测了脑系数并结合透射电镜观察海马区发现,尽管病理检查未发现异常,但是 PAP 小鼠脑系数明显减小。提示, AD 模型小鼠可能出现了脑萎缩,同时海马区可观察到老

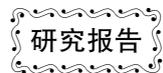
年斑沉积;而补充 Cy3G 的 PAP 小鼠其脑萎缩趋势有明显改善,老年斑沉积也有所缓解。结合上述脑糖代谢紊乱的情况,应用免疫印迹法检测了 AKT/JNK 蛋白的变化。因为,根据文献报道,使用罗格列酮干预三转基因(APP^{swE}/PS1^{ΔE9}/TAU) AD 模型小鼠 4 个月,观察其对认知功能和 AD 相关病理变化的影响,发现这种长期治疗改善了空间学习能力与 AKT 信号通路改变有关,进而可缓解 tau 蛋白磷酸化和神经炎症^[27]。而 JNK 的磷酸化水平升高可以导致胰岛素受体底物-1 (IRS-1, 第 307 位的丝氨酸)磷酸化,使 AKT 去磷酸化,进而出现胰岛素抵抗^[28]。 Shih 等^[13]研究进一步证实, Cy3G 及曲格列酮分别或共同处理人类肝母细胞瘤 HepG2 细胞后,一方面 Cy3G 通过其代谢产物 Cy (cyanidin) 通过调控细胞外信号调节激酶 (ERK) 和 JNK 信号通路,发挥抗氧化作用;另一方面,两者可发挥协同效应,抑制由 H₂O₂ 诱导的脂代谢相关基因的表达水平下调、ROS 的生成和细胞的凋亡,缓解氧化应激介导的肝毒性。此外, A β 能引起 JNK 信号转导通路的改变,导致海马神经元损伤^[29, 30]。本研究发现 PAP 小鼠脑组织中 AKT 蛋白表达水平上调、JNK 蛋白表达水平下调,而 Cy3G 干预后则逆转了上述蛋白的变化。提示 Cy3G 可能通过对 AKT/JNK 通路的调节进而改善了 AD 小鼠脑胰岛素抵抗及炎症反应^[28],可进一步解释 Cy3G 干预的 AD 小鼠脑葡萄糖代谢率升高的原因。

综上所述, Cy3G 改善 AD 的神经保护作用机制可能与其改善脑葡萄糖代谢,调节胰岛素抵抗和缓解炎症反应有关,因此 Cy3G 可能具有潜在胰岛素增敏剂的活性。

参考文献:

- [1] S. Y. Hong, W. S. Jeong, M. Jun. Protective effects of the key compounds isolated from Corni fructus against beta-amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells[J]. *Molecules*, 2012, 17 (9): 10831 - 10845.
- [2] PH Shih, YC. Chan, J. W. Liao, *et al.* Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (*Morus atropurpurea* L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease[J]. *J Nutr Biochem*, 2010, 21 (7): 598 - 605.
- [3] Z Chen, C. Zhong. Decoding Alzheimer's disease from perturbed cerebral glucose metabolism: implications for diagnostic and therapeutic strategies[J]. *Prog Neurobiol*, 2013, 108: 21 - 43.
- [4] S. M. de la Monte. Brain insulin resistance and deficiency as therapeutic targets in Alzheimer's disease[J]. *Curr Alzheimer Res*, 2012, 9 (1): 35 - 66.

- [5] R. J. Caselli, K. Chen, W. Lee, *et al.* Correlating cerebral hypometabolism with future memory decline in subsequent converters to amnesic pre-mild cognitive impairment[J]. *Arch Neurol*, 2008, 65 (9): 1231 – 1236.
- [6] L. Mosconi, A. Pupi, M. J. De Leon. Brain glucose hypometabolism and oxidative stress in preclinical Alzheimer's disease[J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2008, 1147: 180 – 195.
- [7] L. Mosconi, R. Mistur, R. Switalski, *et al.* FDG-PET changes in brain glucose metabolism from normal cognition to pathologically verified Alzheimer's disease[J]. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2009, 36 (5): 811 – 822.
- [8] J. B. Langbaum, K. Chen, R. J. Caselli, *et al.* Hypometabolism in Alzheimer-affected brain regions in cognitively healthy Latino individuals carrying the apolipoprotein E epsilon4 allele [J]. *Arch Neurol*, 2010, 67 (4): 462 – 468.
- [9] B. Scazzocchio, R. Vari, C. Filesi, *et al.* Cyanidin-3-O-beta-glucoside and protocatechuic acid exert insulin-like effects by upregulating PPARgamma activity in human omental adipocytes [J]. *Diabetes*, 2011, 60 (9): 2234 – 2244.
- [10] A. Tarozzi, F. Morroni, A. Merlicco, *et al.* Neuroprotective effects of cyanidin 3-O-glucopyranoside on amyloid beta (25 – 35) oligomer-induced toxicity [J]. *Neurosci Lett*, 2010, 473 (2): 72 – 76.
- [11] T. H. Kang, J. Y. Hur, H. B. Kim, *et al.* Neuroprotective effects of the cyanidin-3-O-beta-d-glucopyranoside isolated from mulberry fruit against cerebral ischemia [J]. *Neurosci Lett*, 2006, 391 (3): 122 – 126.
- [12] Y. Jia, J. Y. Kim, H. J. Jun, *et al.* Cyanidin is an agonistic ligand for peroxisome proliferator-activated receptor-alpha reducing hepatic lipid[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1831 (4): 698 – 708.
- [13] P. H. Shih, S. L. Hwang, C. T. Yeh, *et al.* Synergistic effect of cyanidin and PPAR agonist against nonalcoholic steatohepatitis-mediated oxidative stress-induced cytotoxicity through MAPK and Nrf2 transduction pathways[J]. *J Agric Food Chem*, 2012, 60 (11): 2924 – 2933.
- [14] Alzheimer's Association. Alzheimer's 2015 Alzheimer's disease facts and figures [J]. *Alzheimers Dement*, 2015, 11 (3): 332 – 384.
- [15] T. Sobow. Combination treatments in Alzheimer's disease: risks and benefits[J]. *Expert Rev Neurother*, 2010, 10 (5): 693 – 702.
- [16] S. C. Correia, R. X. Santos, C. Carvalho, *et al.* Insulin signaling, glucose metabolism and mitochondria; major players in Alzheimer's disease and diabetes interrelation[J]. *Brain Res*, 2012, 1441: 64 – 78.
- [17] A. Castañeda-Ovando, M. d. L. Pacheco-Hernández, M. E. Pérez-Hernández, *et al.* Chemical studies of anthocyanins: A review [J]. *Food Chemistry*, 2009, 113 (4): 859 – 871.
- [18] W. H. Shin, S. J. Park, E. J. Kim. Protective effect of anthocyanins in middle cerebral artery occlusion and reperfusion model of cerebral ischemia in rats [J]. *Life Sci*, 2006, 79 (2): 130 – 137.
- [19] A. Tarozzi, A. Merlicco, F. Morroni, *et al.* Cyanidin 3-O-glucopyranoside protects and rescues SH-SY5Y cells against amyloid-beta peptide-induced toxicity [J]. *Neuroreport*, 2008, 19 (15): 1483 – 1486.
- [20] P. C. Bickford, T. Gould, L. Briederick, *et al.* Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats [J]. *Brain Res*, 2000, 866 (1 – 2): 211 – 217.
- [21] C. Andres-Lacueva, B. Shukitt-Hale, R. L. Galli, *et al.* Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory [J]. *Nutr Neurosci*, 2005, 8 (2): 111 – 120.
- [22] L. Qin, J. Zhang, M. Qin. Protective effect of cyanidin 3-O-glucoside on beta-amyloid peptide-induced cognitive impairment in rats [J]. *Neurosci Lett*, 2013, 534: 285 – 288.
- [23] J. Min, S. W. Yu, S. H. Baek, *et al.* Neuroprotective effect of cyanidin-3-O-glucoside anthocyanin in mice with focal cerebral ischemia [J]. *Neurosci Lett*, 2011, 500 (3): 157 – 161.
- [24] A. Tarozzi, F. Morroni, S. Hrelia, *et al.* Neuroprotective effects of anthocyanins and their in vivo metabolites in SH-SY5Y cells [J]. *Neurosci Lett*, 2007, 424 (1): 36 – 40.
- [25] J. Fleschhut, F. Kratzer, G. Rechkemmer, *et al.* Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro [J]. *European Journal of Nutrition*, 2006, 45 (1): 7 – 18.
- [26] M. A. El Mohsen, J. Marks, G. Kuhnle, *et al.* Absorption, tissue distribution and excretion of pelargonidin and its metabolites following oral administration to rats [J]. *Br J Nutr*, 2006, 95 (1): 51 – 58.
- [27] Y. Yu, X. Li, J. Blanchard, *et al.* Insulin sensitizers improve learning and attenuate tau hyperphosphorylation and neuroinflammation in 3xTg-AD mice [J]. *J Neural Transm (Vienna)*, 2015, 122 (4): 593 – 606.
- [28] C. J. Chang, C. S. Lin, C. C. Lu, *et al.* *Ganoderma lucidum* reduces obesity in mice by modulating the composition of the gut microbiota [J]. *Nat Commun*, 2015, 6: 7489.
- [29] S. Mandrekar-Colucci, J. C. Karlo, G. E. Landreth. Mechanisms underlying the rapid peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-mediated amyloid clearance and reversal of cognitive deficits in a murine model of Alzheimer's disease [J]. *J Neurosci*, 2012, 32 (30): 10117 – 10128.
- [30] M. Ahmadian, J. M. Suh, N. Hah, *et al.* PPARgamma signaling and metabolism: the good, the bad and the future [J]. *Nat Med*, 2013, 19 (5): 557 – 566.



发光二极管光源照射日本大耳白兔 皮肤的安全性评价

李彦红¹, 张继刚², 徐艳峰¹, 韩云林¹, 黄 澜¹, 江彬彬², 朱 华¹,
徐玉环¹, 杨维玲^{2*}, 秦 川^{1*}

(1. 中国医学科学院, 北京协和医学院, 医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室, 新发再发传染病动物模型研究北京市重点实验室, 北京 100021; 2. 中国人民解放军火箭军总医院, 北京 100088)

【摘要】 目的 通过LED白色光源照射日本大耳白兔皮肤组织, 对LED光源照射的安全性进行初步的评价。方法 动物随机分成照射组和对照组。照射组动物剔除背部毛发, LED光源照射, 强度为50 mw/cm², 对照组动物以普通日光灯光源照射, 两组均每天照射5 h, 连续3个月。观察动物皮肤有无红肿, 测量动物进食、体重、体温等改变情况; 照射完毕采集外周血测量常规、生化指标; Elisa分析免疫细胞及细胞因子改变情况; 脏器组织病理检测, 及分析皮肤弹力纤维变化情况; 皮肤免疫组织化学分析C-myc、P53、细胞周期蛋白D1(CCND1)等癌基因及抑癌基因的表达变化。**结果** 照射组兔皮肤未见红肿表现, 体重在6周后稍高于对照组, 体温3周、6周有差别, 进食未见异常; 血常规有白细胞增多, 生化检测尿素、肌酐水平有增高, 但在正常范围内; ELISA分析血免疫细胞CD3T细胞、细胞因子IL-6、TNF- α 、IFN- γ 水平在两组无明显差别, 照射组动物CD19B细胞, IL-4水平升高; 照射组动物脏器组织病理未见明显异常结构改变, 皮肤弹力纤维分布无异常; 皮肤组织内细胞周期蛋白(CCND1)、C-Myc蛋白, P53蛋白表达与对照组相比没有差异。**结论** LED光源照射日本大耳白兔3个月后, 未引起体内明显的组织病理学改变, 也未引起皮肤肿瘤相关因子的改变。

【关键词】 发光二极管; 日本大耳白兔; 皮肤; 安全评价

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0024-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.004

The safety assessment on the light emitting diode (LED) resource through irradiating the skin of Japanese big-ear white rabbits

LI Yan-hong¹, ZHANG Ji-gang², XU Yan-feng¹, HAN Yun-lin¹, HUANG Lan¹,
JIANG Bin-bin², ZHU Hua¹, XU Yu-huan¹, YANG Wei-ling^{2*}, QIN Chuan^{1*}

(1. Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Beijing key Laboratory for Animal Models of Emerging and Reemerging infectious Disease; Peking Union Medicine College, Beijing 100021, China; 2. The General Hospital of the PLA Rocket Force, Beijing 100088, China)

【基金项目】 十二五重大科技专项(2012ZX10004-501); 国家高技术研究发展计划(863计划)课题子任务(2003AA123310)。

【作者简介】 李彦红(1983-), 女, 硕士, 研究方向: 病理学与病理生理学。E-mail: liyanhong8408@163.com; 张继刚, 男, 副主任医师。Email: jigang_zhang@sina.com。

【通讯作者】 秦川, 女, 教授。Email: qinchuan@pumc.edu.cn; 杨维玲, 女, 主任医师。Email: ywlderma@sina.com。

[Abstract] Objective To evaluate the safety of Light emitting diode (LED) source through irradiating the skin of Japanese big-ear white rabbits. **Methods** Animals were randomly divided into irradiated group and control group. Animals in the two groups were irradiated with LED light source after eliminating back hair ($50\text{mw}/\text{cm}^2$) and the ordinary fluorescent lamp, respectively. The animals were irradiated for 5 hours every day for 3 months. The changes of animal skin symptoms, feeding, body weight, and temperature were observed and detected; the blood routine and biochemical indexes were tested; the changes of haematological immune cells and cytokines were analyzed by ELISA; histopathology and elastic fibers of skin were detected; the levels of C-myc, P53, and cyclin D1 in skin were tested by immunohistochemistry. **Results** The skin of rabbits in irradiated group showed no abnormal change; the weight was higher than the control group animals at the 6th week, and the temperature had difference at the 3rd and 6th week, the diet showed no abnormal. Blood routine showed white blood cells increased; biochemical detection manifested urea and creatinine levels increased, but the indexes are in normal range; the hematological CD3T cells, cytokines IL-6, TNF- α and IFN- γ in the two group animals had no significant difference. The levels of CD19B cell and IL-4 level increased in irradiated group; The viscera histopathology structure and skin elastic fibers distribution in irradiated group animals showed normal; the expression of cell cycle protein 1 (CCND1), c-myc protein and P53 protein in skin of irradiated group had no difference with control. **Conclusions** After irradiating 3 months, the LED light source had not caused the obvious pathology damage of tissues and change of skin tumor related factors to the rabbits.

[Key words] Light emitting diode; Japanese big-ear white rabbit; Skin; Safety assessment

发光二极管(light emitting diode, LED)为半导体固体发光器件,两端加压后,注入半导体中的载流子发生复合,引起光子发射而产生光^[1]。随着半导体工艺的快速发展,新型 LED 光源不断推出,而且技术日益成熟,功率、发光效率不断提高,光谱从紫外到红外均已实现。LED 光源具有冷光源、工作电压低、功耗低、波长可调、绿色环保、寿命长等特点,已广泛应用于信号指示、装饰照明、液晶背光灯领域,而且在医学方面也开始应用,如医用照明、医学诊断和医学治疗等方面^[1]。但是关于 LED 光源的安全性问题研究的并不是很多,而且长时间照射是否会对机体造成潜在性的危害,均未见有明确报道。本文拟用 LED 光源照射日本大耳白兔 3 个月,观察其生理生化及病理指标,对 LED 光源照射的安全性进行初步的评价。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级日本大耳白兔,6~8 周龄,体重 2.4~2.6 kg,雌雄各 6 只,购自北京富龙腾飞养殖中心[SCXK(京)2013-0004],动物在中国医学科学院医学实验动物研究所新药安全评价中心普通级动物房[SYXK(京)2010-0030]饲养及管理,每天光照明暗各 12 h,相对湿度 40%~60%,温度 18~25℃,每笼 1 只,自由摄食和饮水。实验操作已经过实验动物研究所实验动物使用管理委员会批准(ILAS-PL-2014-005)。

1.2 实验材料

LED 白色光源(GY225 型,由山西光宇半导体照明股份有限公司提供),功率 $50\text{mw}/\text{cm}^2$,光通量 4.51 m,距离 2~2.5 m,光源可悬吊屋顶相当于普通照明的方式连续照射。

1.3 实验方法

1.3.1 光源照射

动物随机分成两组:实验组:接受 LED 光源照射;对照组:以普通日光灯光源照射作为对照。动物剔除背部毛发,LED 光源照射,距离 2~2.5 m,每天 5 h,连续 3 个月;对照组动物以普通日光灯光源照射。每天 5 h,连续 3 个月。

1.3.2 临床观察

照射过程中观察动物局部皮肤有无红肿情况;观察进食,每周记录动物体重、体温的改变,并比较。

1.3.3 动物血液免疫学检测

照射结束后,耳源静脉采集动物外周血,检测血常规(Rayto RT-7600S, USA)、生化(谷丙转氨酶-ALT,尿素,血肌酐,胆固醇,甘油三脂,葡萄糖)^[2];ELISA 分析兔外周血免疫细胞 CD3(cluster differentiation 3)(QT-T98065, Qiyibio) T、CD19(MI027955, Mlbio) B 细胞;细胞因子 IL(interleukin)-4(CSB-E08745Rb, Cusabio)、IL-6(CSB-E06903Rb, Cusabio)、IFN(interferon)- γ (ER5400, solarbio)、TNF(tumor necrosis factor)- α (CSB-E06998Rb, Cusabio)等水平以明确动物免疫状态的变化。

1.3.4 病理及免疫组织化学分析

照射结束后,动物用戊巴比妥钠(30 mg/kg)过量麻醉并放血致死,解剖取皮肤及其它组织,10%福尔马林溶液固定,石蜡包埋切片,进行病理检测;皮肤弹性纤维染色分析真皮内弹力纤维变化情况;免疫组织化学分析 C-myc、P53、细胞周期蛋白 D1 (CCND1) 等癌基因及抑癌基因的表达变化。

苏木素-伊红(HE)染色:切片脱蜡至水,经苏木素染色,盐酸酒精分化,氨水反蓝后伊红染色,脱水透明封片,观察组织病理改变。

皮肤弹性纤维染色(Gomori's 醛品红):切片脱蜡至水,经高锰酸钾溶液氧化,草酸漂白,水洗入染液(配制:碱性品红 1 g,70%酒精 98 mL,三聚乙醛 1 mL,浓盐酸 1 mL)15 min,70%酒精分化,0.5%橙黄 G 对比染色后脱水透明封片。

免疫组织化学染色:切片脱蜡至水,抗原修复,封闭后加一抗 C-myc (MD645-B, MDL), P53

(ab194404, abcam), CCND1 (ARP33370 _ P050, AVIVA SYSTEM BIOLOGY), 4℃ 过夜,加相应二抗 (PV9001, PV9002, 购自中杉金桥), DAB 显色,苏木素复染,流水冲洗后,脱水透明封片。观察这些因子在两组动物皮肤的表达水平。

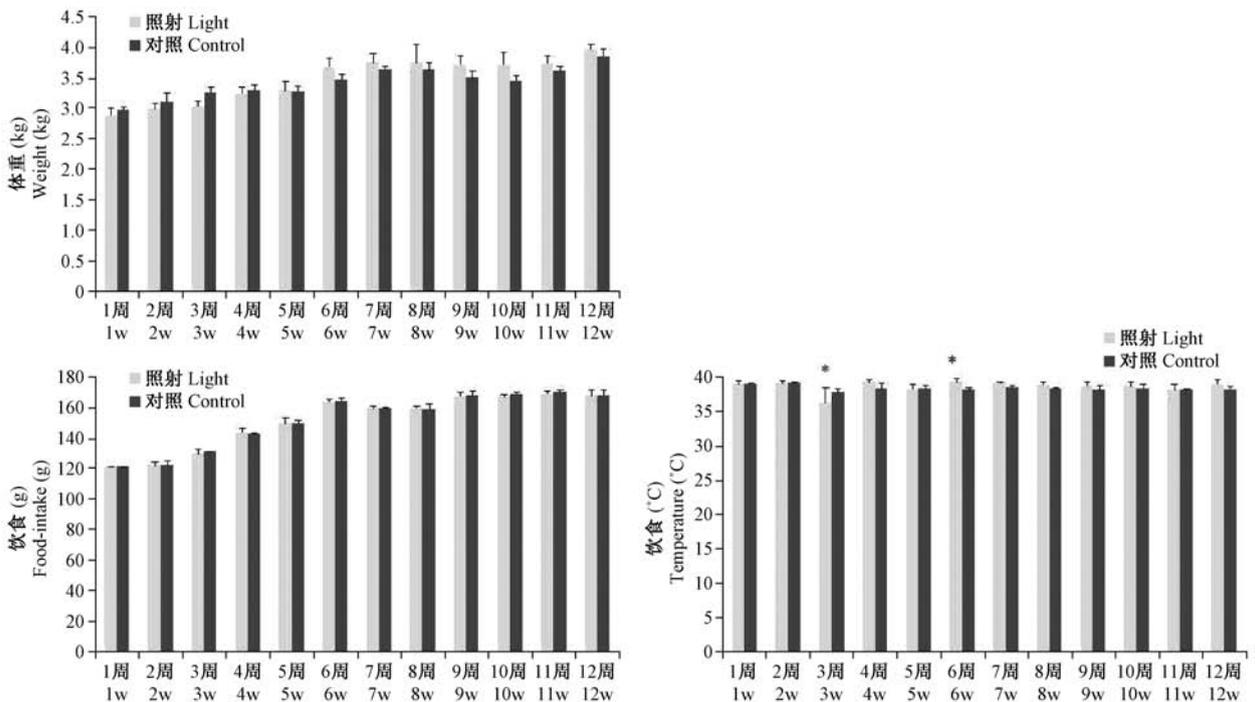
1.4 数据分析

染色切片应用 Image-pro-plus 软件进行图像结果分析,数据经 Microsoft Excel 处理,实验数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组数据比较用 *t* 检验方法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 临床观察

动物在照射过程中,皮肤未见红肿异常表现。两组动物的进食、体重测量结果未见明显异常;动物的体温除第 3 周、6 周改变有差异 ($P < 0.05$) 外,其余时间段比较无差异。(图 1)



注: * : $P < 0.05$, 与对照组相比。

图 1 动物体重、饮食和体温随时间改变

Note. * : $P < 0.05$, compared with control group.

Fig. 1 The weight, diet and body temperature of animals changed with time

2.2 常规生化检测

血常规检测照射组白细胞较对照组增多 ($P < 0.05$), 中间细胞(白细胞中的嗜酸、嗜碱、单核细胞)、淋巴细胞、中性粒细胞也增多,但差别无统计学意义。平均红细胞血红蛋白量(MCH)和平均红

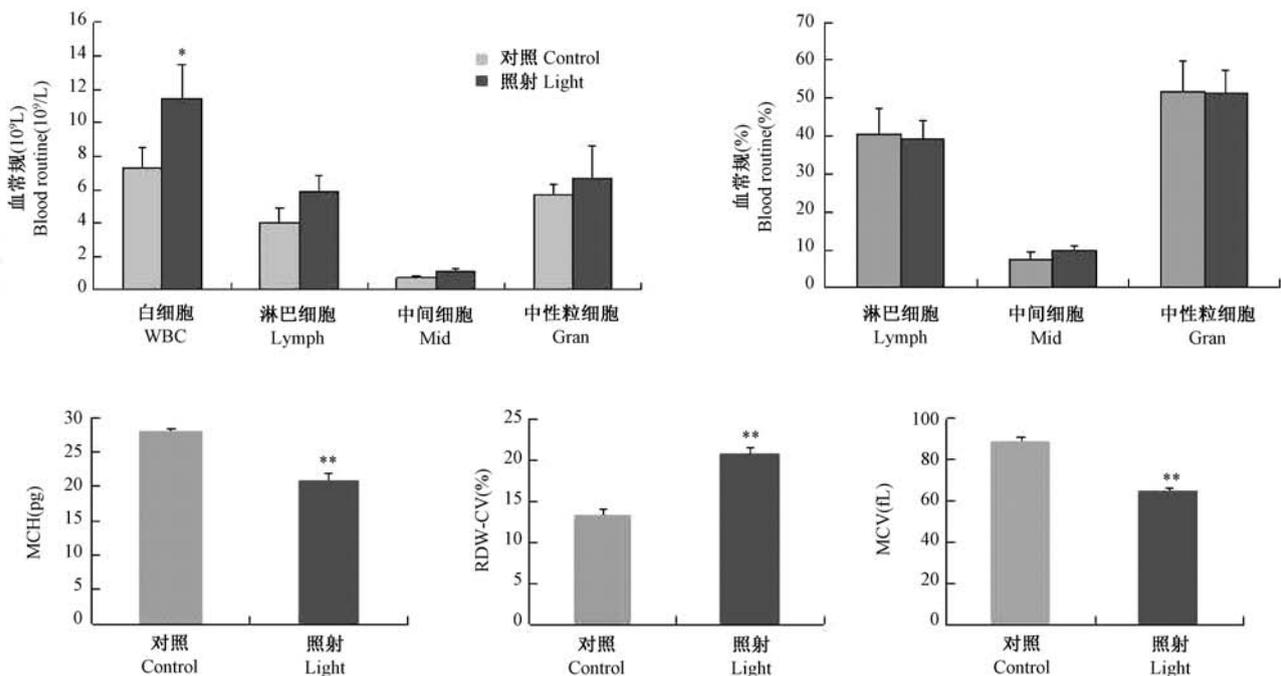
细胞容积(MCV)有所下降 ($P < 0.01$), 但平均红细胞血红蛋白浓度并没有异常改变,红细胞分布变异系数(RDW-CV)升高 ($P < 0.01$)。其余均未见异常改变。(图 2)

血生化检测两组动物血清谷丙转氨酶(ALT),

血糖 (GLU)、甘油三酯 (TG)、胆固醇 (TC) 没有明显差异; 血清尿素 (UREA) 和肌酐 (CR) 水平在照射组有所升高 ($P < 0.01$)。(图 3)

2.3 血液免疫学检测

动物血液学检测免疫细胞 CD3T 细胞含量两组无差异, CD19B 细胞在照射组升高 ($P < 0.05$); 细胞因子检测 IL-4 水平在照射组升高 ($P < 0.01$), IL-6, TNF- α , IFN- γ 水平在两组无明显差别。(图 4)

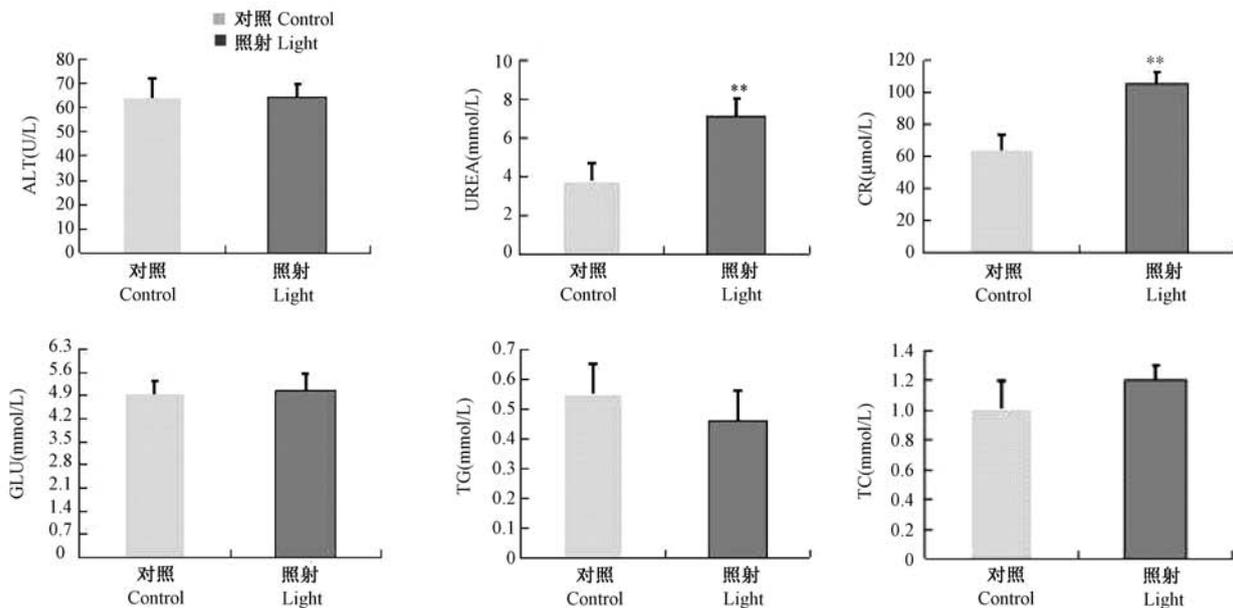


注: * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$, 与对照组相比。

图 2 血常规检测

Note. * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$, Compared with control group.

Fig. 2 Blood routine test

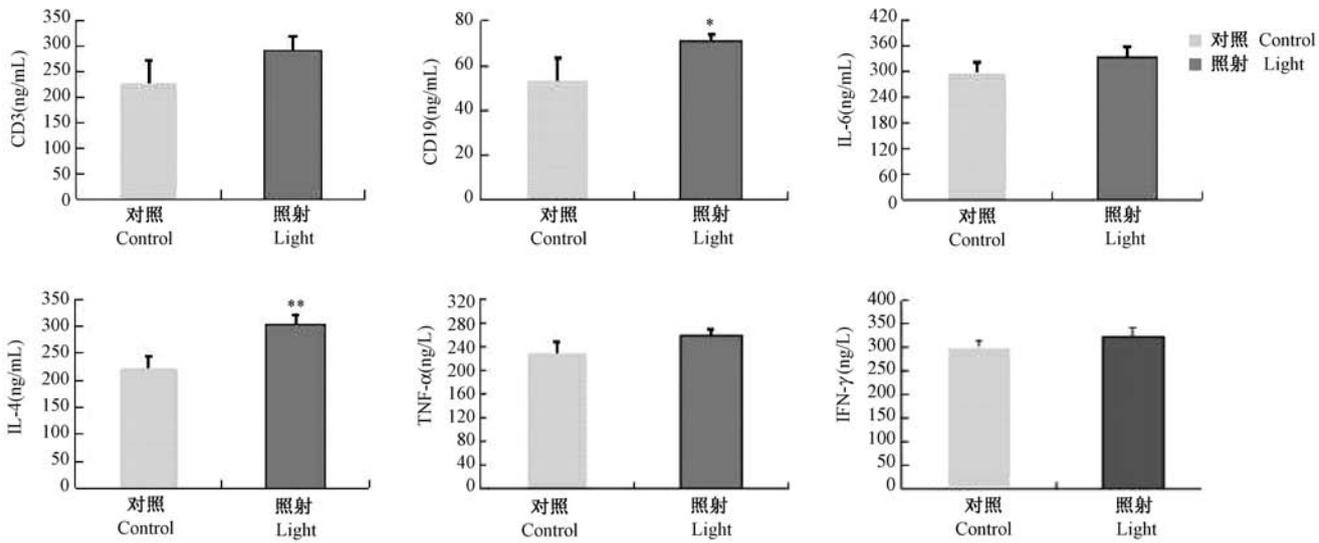


注: * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$, 与对照组相比。

图 3 血生化检测

Note. * : $P < 0.05$; ** : $P < 0.01$, Compared with control group.

Fig. 3 Hemorheological biochemical detection



注: *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, 与对照组相比。

图 4 血液免疫学改变

Note. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$, Compared with control group.

Fig. 4 Hemorheological immunologic changes

2.4 病理检测

组织病理苏木素-伊红染色显示,两组动物皮肤各层结构未见异常改变,层次清楚,少数皮肤真皮少量炎细胞浸润;皮肤弹性纤维染色显示分布无异常(图 5);其余各脏器病理改变未见异常。

皮肤免疫组化检测结果为细胞周期蛋白
照射 Light

(Cyclin D1, CCND1), C-Myc 癌基因蛋白, P53 抑癌基因表达蛋白两组均无明显差异。(图 6,7)

3 讨论

LED 光源目前已在某些领域被广泛应用,甚至未来会替代传统照明光源用于室内照明,但我们应
对照 Control

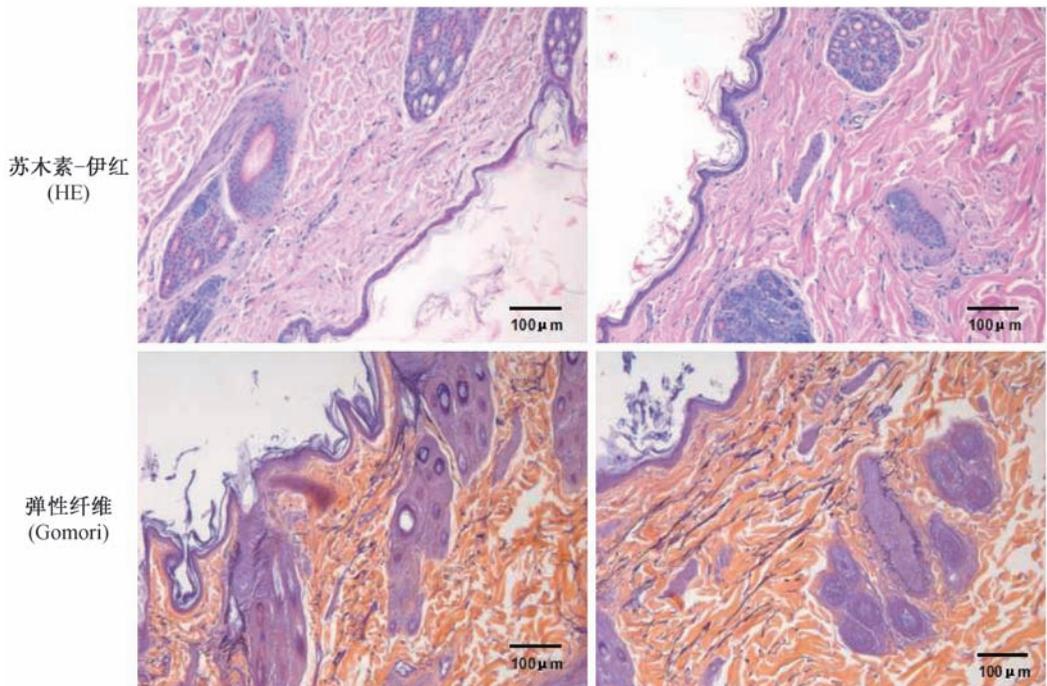


图 5 皮肤苏木素-伊红(HE)和弹性纤维染色(Bar = 100 μm)

Fig. 5 The htoxylin-eosin(HE) and elastic fiber staining of skin

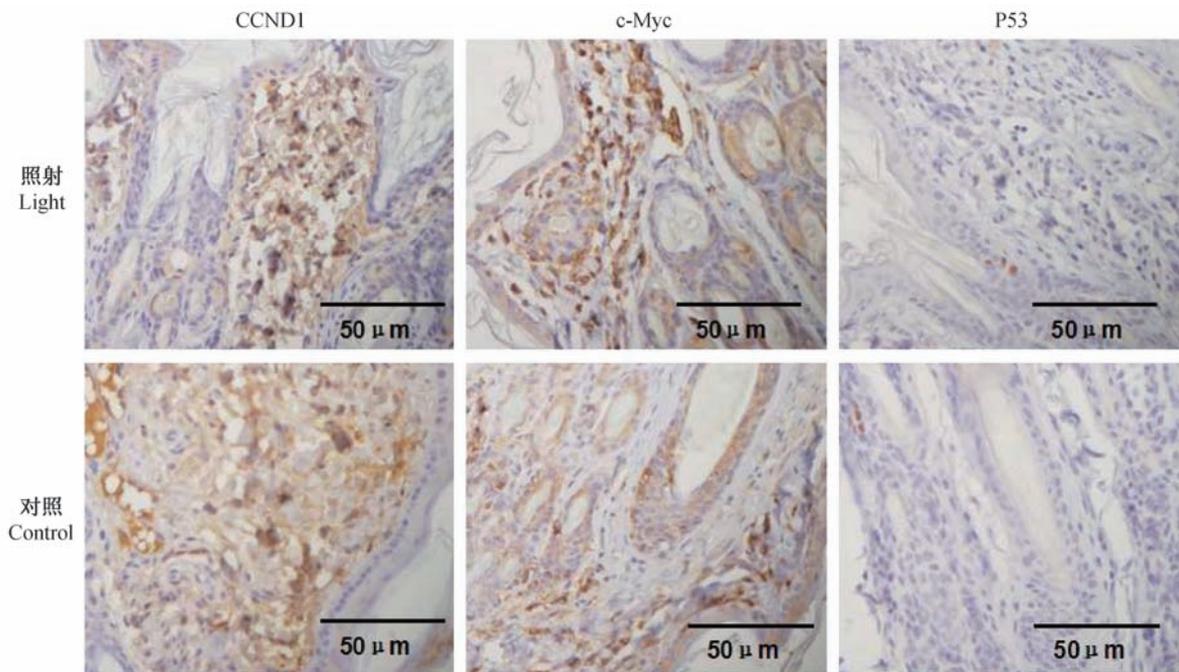


图 6 皮肤免疫组化染色(Bar = 50 μm)

Fig. 6 The immunohistochemical staining of skin

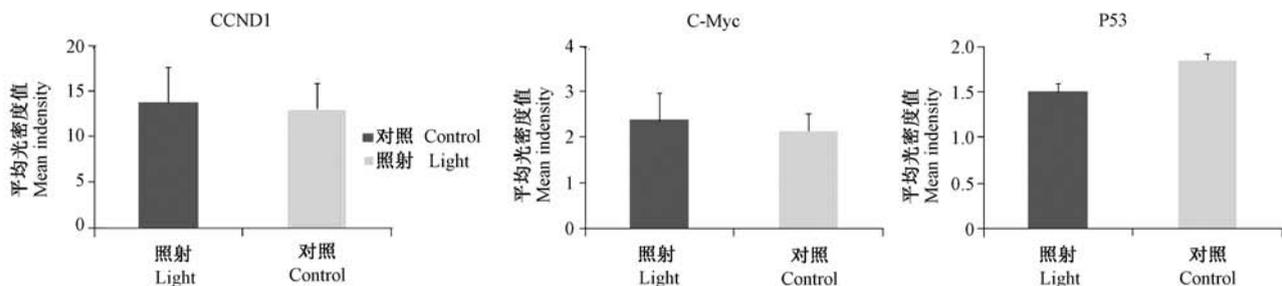


图 7 皮肤免疫组化染色统计结果

Fig. 7 The statistical results of immunohistochemical staining in skin

该对 LED 光源的长时间使用的安全性进行初步的认识和评价。本研究用 LED 白光照射日本大耳白兔 3 个月,观察其生理、生化、免疫、病理指标及致癌作用等方面进行初步观察,或以后进行更长时间,更深入、系统的检测来确定其使用系数的绝对安全性。

实验组动物在照射过程中,LED 光源对其体重、进食未引起明显异常改变,体温虽在某个阶段与对照组存在差别,但体温的测量值均在兔的体温波动正常范围内^[3],因此改变无意义。

血常规检测照射组动物白细胞增多,但据文献报道兔的血白细胞正常值变化范围为(5.5~12.5) × 10⁹/L^[4],所测结果包含在此范围内,属于正常。血常规中平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、平均红细胞血红蛋白量(MCH)

是反映红细胞形态特征的指标,独立的指标改变不能作为疾病诊断的依据,需结合红细胞体积分布宽度(RDW)相互参照才能用来判断机体生理生化状况^[5],而本研究中 MCHC 并未发现异常,MCV, MCH, RDW 虽然两组比较后有差异,但根据文献^[3,5]报道的这些指标的参考值范围,本实验所测结果基本正常,所以改变的意义不大。照射 3 月后的实验组兔血生化检测肌酐、尿素氮水平较对照组增高,但文献^[5-7]报道的这些指标参考值范围均包含该实验所测结果,因此兔的这些常规生化指标的改变虽波动范围大但正常。血液免疫细胞及细胞因子检测结果 CD19B 淋巴细胞增多,IL-4 增多,其余检测指标结果与对照组无差别。B 淋巴细胞主要作用是产生抗体,参与体液免疫应答并清除抗原,而 IL-4 可以促进 B 淋巴细胞增殖^[8],这说明动物体

内可能存在 B 细胞免疫反应,该免疫反应是机体的一种适应和防御反应。结合组织病理学结果,对照及实验组动物均有皮肤、肺脏等少数组织出现轻度炎症反应,考虑原因可能为实验操作、动物的应激^[9]、加之动物的个体差异,而引起动物机体的不同程度的炎症反应及表现。例如动物接受毛发修剪的过程中,固定架对动物身体的固定,及剃毛器对皮肤的刺激等,虽手法和其它条件一致,但不可避免会引起动物不同程度的挣扎、损伤及生理反应改变,进而造成机体不同程度的免疫功能紊乱及炎症反应。

病理学检测对照及实验组动物除皮肤、肺脏等少数组织出现轻度炎症反应外,其余脏器均未见明显异常器质性病变。皮肤肿瘤相关因子的免疫组化检测显示两组动物无明显差别。细胞周期蛋白 Cyclin D1 是细胞周期中短暂出现的原癌基因表达产物,具有严格的周期顺序性,主要功能是促进细胞增殖,其过度表达可致细胞增殖失控而恶性化^[10],实验证明在照射组和对照组表达无明显差别,照射并未引起其过度表达;C-Myc 癌基因是 myc 基因家族的重要成员之一,c-myc 基因既是一种可易位基因,又是一种多种物质调节的可调节基因,C-myc 基因的表达一般与细胞的生长状态有关,C-myc 与许多恶性肿瘤的发生、发展密切相关,其蛋白高表达在细胞恶性转化和增殖中起到重要作用^[11],实验表明两组动物 C-myc 癌基因的表达也无明显差异;P53 是最重要的抑癌基因,对肿瘤细胞的凋亡具有促进作用,还具有帮助细胞基因修复缺陷的功能^[12]。正常条件下,P53 蛋白在细胞内的含量维持在一个较低的水平,当细胞发生 DNA 损伤或原癌基因突变激活时,细胞内含量随即升高,引发一系列下游段应激反应^[13]。在各种肿瘤及细胞转化过程中会高表达,P53 突变和过度表达对肿瘤的发生发展起到一定的作用^[14]。本实验研究表明两组动物皮肤 P53 蛋白均低表达或不表达。

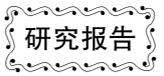
综上,LED 白色光源照射日本大耳白兔 3 个月,某些常规生化指标较对照组有差别,但不具有生理学意义;血液免疫指标部分也存在差别,但不

能排除动物因个体差异、操作及应激致炎性病变后引起的免疫反应,而且属于轻度炎性反应;组织学观察未见明显的病理性损伤;皮肤肿瘤学观察未见相关肿瘤分子相对的异常表达;这些实验表明 LED 光源照射 3 个月,未对动物身体造成明显的病理损伤。但是将 LED 灯取代照明灯后更长时间的照射安全性问题,仍需进行深入系统的实验研究。

参考文献:

- [1] 侯珏,刘陈. LED 在医学中的应用及展望[J]. 光学仪器, 2010, 32(1): 90-94.
- [2] 谢连志,曾秀雅,王前明,宋秀宇. 临床生化检验测量不确定度的探究[J]. 中国医学创新,2013,10(28): 90-91.
- [3] 病理生理学教研组. 我国兔体温,白血球总数及分类的正常值[J]. 北京大学学报:医学版,1960(3):209.
- [4] 施新猷. 现代医学实验动物学[M]. 人民军医出版社. 2000, 第 1 版.
- [5] 丁雷. 新西兰兔血液学参数的研究[D]. 东北林业大学, 2010.
- [6] 岳秉飞,程水生,杨果杰,等. 不同周龄大耳白兔血液生理生化指标的测定[J]. 中国兽药杂志,2000,35(3):17-21.
- [7] 张秋桂,何科明,杨柞升,等. 实验兔常用血清生化指标参考值测定[J]. 陕西医学检验,1993,8(4):215-216.
- [8] 何维. 医学免疫学[M]. 人民卫生出版社. 2010, 第 2 版.
- [9] 董齐. 危重病人代谢与营养支持[J]. 中国实用外科杂志, 2010,30(11):914-915.
- [10] Iosiya T, Matsushime H, Valentine M, et al. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human Cyclin D genes[J]. Genomics, 1992,13(3):565-574.
- [11] Studzinski GP, Brelvi ZS, Feldman SC, et al. Participation of C-myc protein in DNA synthesis of human cells [J]. Science, 1986, 234(4775): 467-470.
- [12] 李文娟,潘庆杰,李美玉. P53 基因及其功能研究进展[J]. 生物技术通讯, 2014,25(2):282-285.
- [13] 魏永水,侯静,唐文如,等. P53 与 Ras 协同及其在肿瘤发生中的作用[J]. 遗传, 2012, 34(12):1513-1521.
- [14] Klemi PJ, Pylkaner L, Kilhoma P, et al. P53 protein detected by immunohistochemistry as a prognostic factor in patients with epithelial ovarian carcinoma [J]. Cancer, 1999, 76(1):120-127.

[修回日期]2016-01-06



真核表达载体 GV394-*Nurr1* 的构建及鉴定

樊秀双, 郭军堂, 陈安琪*

(潍坊医学院临床学院, 山东 潍坊 261053)

【摘要】 目的 构建含人源性 *Nurr1* 基因真核表达载体 GV394-*Nurr1*, 检测其瞬时表达对细胞内活性氧类物质(ROS)水平的影响。方法 PCR 扩增人 *Nurr1* 基因, 克隆至 T 载体, 测序正确后与真核载体 GV394 一起, 经 BamHI 和 XhoI 双酶切, T4 DNA 连接酶连接, 构建 GV394-*Nurr1*; 采用脂质体将 GV394-*Nurr1* 瞬时转染神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞, RT-PCR 检测 *Nurr1* 基因 mRNA 水平, 通过 DCFH-DA 染色检测 *Nurr1* 对细胞内 ROS 水平的影响。结果 PCR 及测序证实人 *Nurr1* 基因正确克隆至真核表达载体 GV394; RT-PCR 显示 *Nurr1* 基因 mRNA 水平在瞬时转染的细胞中明显增高; DCFH-DA 染色显示瞬时转染 *Nurr1* 的神经母细胞瘤细胞的细胞内的 ROS 水平峰值较对照组明显左移。结论 成功构建人源性 *Nurr1* 真核载体, 可在 SH-SY5Y 细胞中表达并减少细胞内 ROS 水平, 为进一步在体外研究 *Nurr1* 的功能及其与多巴胺能神经元的保护作用的关系提供了基础。

【关键词】 *Nurr1*; 真核表达载体; 帕金森氏病; 细胞活性氧;

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0031-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.005

The construction and identification of eukaryotic expression vector GV394-*Nurr1*

FAN Xiu-shuang, GUO Jun-tang, CHEN An-qi*

(Clinical College, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

【Abstract】 Objective To construct the eukaryotic expression vector GV394-*Nurr1* containing human *Nurr1* gene and to study the effects of transient transfection of *Nurr1* on intracellular reactive oxygen species level. **Methods** The full-length of human *Nurr1* gene amplified by PCR was subcloned into T vector and sequenced. GV394-*Nurr1* vector was constructed by BamHI and XhoI double digestion and then T4 DNA ligase conjunction. GV394-*Nurr1* was transfected into SH-SY5Y cells by liposome transfection technique; The mRNA of *Nurr1* was detected by RT-PCR; The effect of *Nurr1* expression on intracellular reactive oxygen species (ROS) was detected by (DCFH-DA) staining. **Results** PCR and sequencing confirmed that the *Nurr1* gene was correctly cloned into eukaryotic expression vector GV394. The RT-PCR results showed that the *Nurr1* mRNA expression in the neuroblastoma SH-SY5Y cells transiently transfected *Nurr1* was higher than that in the control group. DCFH-DA staining showed that the level of reactive oxygen peak in neuroblastoma cells transiently transfected *Nurr1* obviously shifted to the left compared to the control group. **Conclusions** The human *Nurr1* gene eukaryotic expression vector was successfully established and its high expression in the neuroblastoma SH-SY5Y cell line significantly decreased the ROS level. This provide the basis for further study on the function of *Nurr1* in vitro and its relationship with the protective effect of dopaminergic neurons.

【Key words】 *Nurr1*; Eukaryotic expression vector; Parkinson disease; Reactive oxygen species

【基金项目】 山东省自然科学基金(ZR2011HM014)。

【作者简介】 樊秀双(1990-),女,硕士研究生,研究方向:帕金森病发病机制的研究。Email: Fanxiushuang0314@163.com。

【通讯作者】 陈安琪(1981-),女,医学硕士,研究方向:帕金森病发病机制。Email: chen安琪_1981@163.com。

帕金森氏病(Parkinson disease, PD)是与年龄相关的中枢神经系统退行性疾病,临床上主要表现为静止性震颤、肌强直、动作徐缓、姿态异常等运动功能障碍和自主神经功能障碍。多巴胺代谢异常是 PD 发病的核心机制,几乎每一种有关调控多巴胺代谢基因的多态及突变都能影响多巴胺代谢酶的含量,共同最终导致多巴胺神经元的应激损伤,多巴胺能神经元数目上相应的减少^[1]。孤核受体 *Nurr1* 广泛表达于胚胎和成体中脑黑质腹侧被盖区,作为转录调控蛋白在多巴胺能神经元发育和存活过程中起到了重要的作用^[2]。基因敲除 *Nurr1*^(-/-) 的小鼠细胞免疫荧光显示 DA 神经元前体细胞凋亡,最终导致中脑多巴胺能神经元发育不全^[3]。本研究通过构建 *Nurr1* 真核表达载体,研究其过表达细胞内的 ROS 水平的影响,为研究 *Nurr1* 参与 PD 神经元变性的保护作用关系奠定基础,为临床指导 *Nurr1* 有可能作为帕金森病基因治疗提供了实验理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

大肠杆菌 DH5 α 为本实验保存;质粒 GV394、限制性内切酶,人脑 cDNA 文库购自上海吉凯基因有限公司;Liptap 脂质体、小量质粒抽提试剂盒购自碧云天公司;PCR 引物、平端 DNA 加 A 试剂盒、T 载体均自上海生工;Trizol 试剂、PrimeScriptTM II 1st Strand cDNA Synthesis Kit、PrimeSTAR HS DNA polymerase 试剂盒均购自宝生物工程大连有限公司;DCFH-DA 染色试剂盒购自于 Sigma 公司;其余化学试剂为进口或国产化学分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 真核表达载体 GV394-*Nurr1* 的构建与鉴定

依据 NCBI NM_006186.3 NR4A2 基因信息设计引物,5'-TTGGTACCGAGCTCGGATCCCGCCACC ATGCCTTGTGTTACAGCGCAG-3',下游引物 5'-ACGGGCCCTCTAGACTCGAGTTAGAAAGGTAAG TGTCCA GG-3'。以人脑 cDNA 文库为模板,进行 PCR:98℃ 预变性 5 min,98℃ 变性 10 s,57℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 90 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 8 min。胶回收后的 PCR 产物利用平端 DNA 加 A 试剂盒进行加“A”后与 pUCm- T 载体连接并转化 DH5 α 感受态细菌。小量提取质粒 DNA 进行 PCR 及 BamHI 和 XhoI 双酶切鉴定并送上海生工进行测

序,正确克隆命名为体 pCum-T- *Nurr1*。BamHI 和 XhoI 双酶切载体 GV394 质粒及 pCum-T- *Nurr1*,将纯化回收的 1541bp 大小的目的片段与酶切后线性化的 GV394 质粒用 T4DNA 连接酶进行连接并转化 DH5 α 感受态细胞,PCR 反应鉴定挑选正确的克隆,命名为 GV394-*Nurr1*。

1.2.2 瞬时转染

培养神经母细胞瘤细胞 SH-SY5Y 密度达到 80% 左右时,胰酶消化细胞,使每孔细胞密度达到 $2-6 \times 10^5$,均匀接种到 6 孔板中,置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养,确保第二天细胞密度能达到 70-80%。按照脂质体转染试剂说明书,将 GV394-*Nurr1* 转染 SH-SY5Y 细胞,同时设空载 GV394 为对照组。转染 24 h 后,用 Trizol RNA 提取试剂盒抽提总 RNA,通过 RT-PCR 检测 *Nurr1* mRNA 的表达。*Nurr1* 的 PCR 条件同 1.2.1。内参 β -actin 引物:上游引物:5' GACCCAGATCATGTTTGA 3' 下游引物:5' GCTTGCTGATCCACATCTGC3', PCR 循环:98℃ 预变性 5 min,98℃ 变性 10 s,55℃ 退火 10 s,72℃ 延伸 60 s,共 30 个循环,最后 72℃ 延伸 8 min。

1.2.3 DCFH-DA 染色法检测 *Nurr1* 对细胞内 ROS 水平影响

胰酶消化实验组及对照组细胞,吹打成细胞悬液,1000 rpm 离心 5 min,离心 2 次,500 μ L 的 PBS 轻轻重悬沉淀,加入工作液 10 μ mol/L 的 DCFH-DA 荧光染料 1 μ L,室温避光孵育 15 min,流式细胞仪上机检测,用激发波长 488 nm,发射波长为 525 nm 来检测荧光强度。每组设置三个复孔,重复三次独立实验。

1.3 统计学处理

所有实验数据采用统计软件 SPSS17.0 分析,均采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 $P < 0.05$ 表示有统计学意义。

2 结果

2.1 全长人 *Nurr1* 的 PCR 扩增

如图 1A 所示,PCR 扩增出与预期产物大小一致的 1541 bp 人 *Nurr1* DNA 片段。

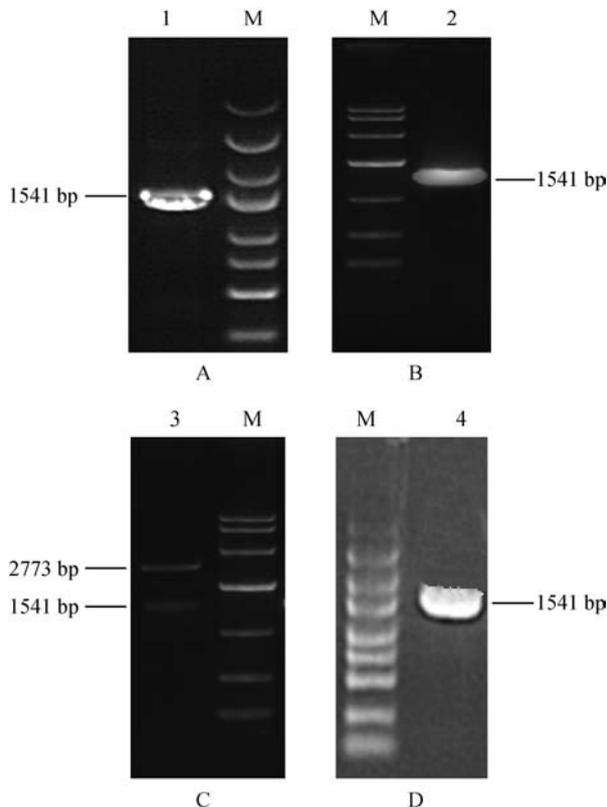
2.2 pCum-T- *Nurr1* 的鉴定

如图 1B 所示,小量提取质粒后,PCR 扩增后得到一条 1541 bp 左右的条带,与预期大小一致。如图 1C 所示,质粒经 BamHI 和 XhoI 限制性内切酶酶切得到一条 1500 bp 左右的目的条带和 2700 bp 左

右大 pCUM-T 载体条带,与预期大小一致。对 PCR 和酶切鉴定成功的 pCUM-T-Nurr1 克隆送上海生工进行测序,测序结果与 Genbank 碱基序列完全一致。

2.3 GV394-Nurr1 的鉴定

重组质粒 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果,如图 1D 所示,在 1.5 kb 左右呈现与 Nurr1 分子量大小相符 DNA 条带,结果证实人 Nurr1 基因成功插入真核 GV394 载体中。



注:(M) DNA Marker;(1)Nurr1 PCR 产物;

(2)pCUM-T-Nurr1 PCR 产物;

(3)pCUM-T-Nurr1 经 BamH I 和 XhoI 酶切产物;

(4)GV394-Nurr1 PCR 产物。

图 1 琼脂糖凝胶电泳鉴定

Note. (M) DNA Marker; (1)Nurr1 PCR products;

(2)pCUM-T-Nurr1 PCR products; (3)pCUM-T-Nurr1

by I BamH and XhoI enzyme digestion products;

(4)GV394-Nurr1 PCR products.

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis

2.4 RT-PCR 检测 Nurr1 mRNA 表达

逆转录聚合酶链式 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果,如图 2A 所示,实验组与对照组均见特异性条带,大小为 1541 bp,实验组较对照组条带亮些,图像经 IPP 图像系统分析,如图 2B 在内参灰度值大致相同的情况下,实验组 Nurr1/内参的灰度值之比

(0.754 ± 0.02)较对照组 Nurr1/内参的灰度值之比(0.347 ± 0.03)明显增高,两组差异比较有统计学意义($t = 19.55, P < 0.01$),提示表达载体 GV394-Nurr1 在 SHSY5Y 细胞中能够瞬时表达。

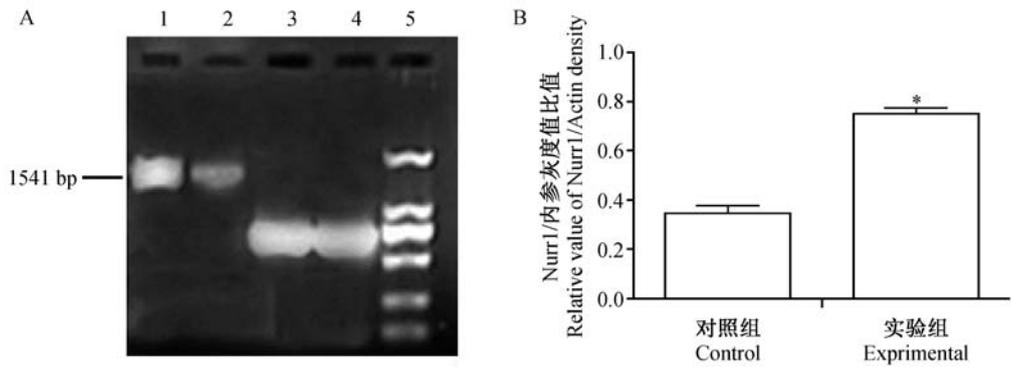
2.5 DCFH-DA 染色法检测瞬时表达 Nurr1 对细胞内 ROS 水平影响

本实验采用 DCFH-DA 染色,通过流式细胞仪检测 ROS 峰值的变化精确反应细胞内活性氧含量变化,ROS 峰值左移提示抑制细胞内 ROS 表达,如图 3 所示,瞬时表达 Nurr1 的细胞内的 ROS 峰值较对照组明显左移,表明过表达 Nurr1 抑制了 SHSY5Y 细胞内活性氧的产生。

3 讨论

PD 是常见的一种中老年人常见的中枢神经锥体外系统疾病,其主要病理学特征是中脑黑质多巴胺能神经元选择性丧失和路易氏小体(Lewy Body)的形成^[4]。迄今为止,对选择性多巴胺神经元缺失的确切病因和发病机制尚未完全阐明。研究认为,众多因素都参与了 PD 的发病机制,但其最终的结局是中枢神经内多巴胺含量减少,使多巴胺能神经元应激性损伤敏感性增加。因此,对中脑多巴胺能神经发育分化基因调节机制的研究有助于了解帕金森氏疾病的发病机制。

Nurr1 又称孤核受体因子,定位于染色体 2q22-q23^[5],由 598 个氨基酸组成,分子量大约为 66KD,主要分布于中脑黑质和腹侧被盖区,作为转录蛋白因子对多巴胺的发育和存活有着重要的作用。Nurr1 作为配体诱导转录因子包含 DNA 结合区域(DBD),配体结合区域(LBD),N 端可变区,在外界环境的刺激激活 MAPK 通路,调控下游基因的表达^[6]。Kaoru 等^[7]发现在小神经胶质细胞和星型胶质细胞中 Nurr1 能够募集 CoREST([co] repressor for element-1-silencing transcription factor)复合物形成反式通路对神经毒素物质致炎效应表现出较强的防御反应,同时通过实验性研究证实在中枢神经系统中 Nurr1 可以保护多巴胺神经元免受 LPS 和 A30P α -Synuclein 产生的毒害反应。实时定量 PCR 显示在过表达 α -Synuclein 大鼠中 Nurr1 基因表达量减少,给予体外帕金森病动物模型 Nurr1 及类视黄醇 X 受体配体的刺激后结果显示 α -Synuclein 表达下降^[8]。因此,可以推测 Nurr1 蛋白表达抑制了 α -Synuclein 对多巴胺能神经元的毒性作用。体外研



注:(A)RT-PCR 图;(B)灰度扫描分析图(1)实验组 *Nurr1*; (2)对照组 *Nurr1*; (3)实验组 β -actin;(4)对照组 β -actin;(5)DNA Marker。与对照组比较, * $P < 0.05$ 。

图 2 *Nurr1* mRNA 表达

Note. (A)RT-PCR image;(B)The result of gray scale analysis;(1)Experimental group;(2)Control group;(3)Experimental group(β -actin);(4)Control group(β -actin);(5)DNA Marker. * $P < 0.05$, Compared with control group.

Fig. 2 The expression of *Nurr1* mRNA

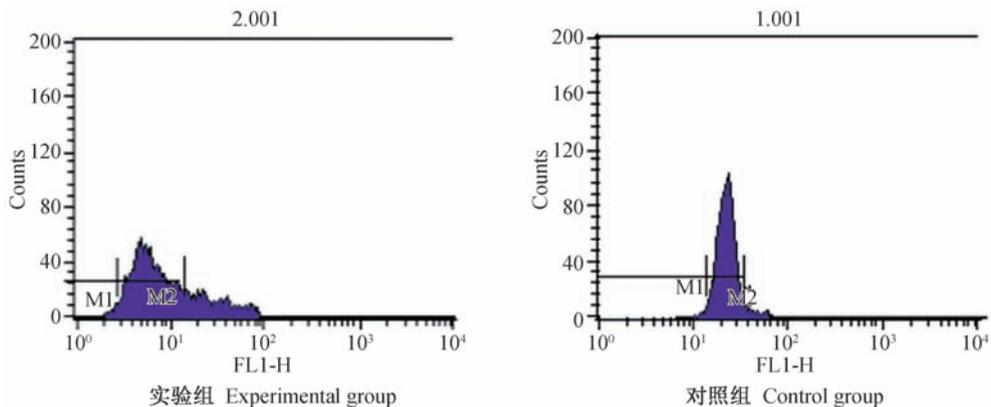


图 3 流式细胞仪检测瞬时表达 *Nurr1* 对细胞内 ROS 水平的影响

Fig. 3 Flow cytometry detection the effect of transient expression of *Nurr1* on the intracellular

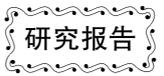
究证明, *Nurr1* 在转录因子 *Lmx1b* (LIM homeobox transcription factor 1 beta) 和 *EN* (Engrailed) 蛋白的共同参与下, 通过 *Lmx1b* 驱动 *Pitx3* (paired-like homeodomain transcription factor 3) 介导调控多巴胺神经元的发育、存活^[9, 10]。通过基因敲除技术, 缺失 *Nurr1* 基因表达的小鼠实时定量 PCR 结果显示, 其体内酪氨酸羟化酶 (TH) 的表达含量下降, 活性水平降低, 多巴胺含量减少, 多巴胺能神经元数量减少, 小鼠表现出对 MPTP 毒素的敏感性增加, 表明降低 *Nurr1* 表达及其活性, 失去了对多巴胺能神经元的保护作用^[11, 12]。*Nurr1* 表达促进多巴胺能神经元发育、存活、成熟方面起到了重要的作用, 但是 *Nurr1* 如何参与调控尚存在争议。

本研究以人脑 cDNA 文库为模板, 成功扩增出人全长 *Nurr1* 基因, 并构建了真核细胞表达载体

GV394-*Nurr1*, 利用阳离子脂质体转染技术将其转染到 SH-SY5Y 细胞内, 发现该基因能够在 SH-SY5Y 细胞内表达, 且能够降低了细胞内的 ROS 水平, 这为进一步研究 *Nurr1* 对多巴胺能神经元的分化、成熟的机制提供了基础。

参考文献:

- [1] Wise RA. Dopamine, learning and motivation [J]. Nat Rev Neurosci, 2004, 5(6):483-494.
- [2] Simon HH, Bhatt L, Gherbassi D, et al. Midbrain dopaminergic neurons; determination of their developmental fate by transcription factors[J]. Ann N Y Acad Sci, 2003, 991:36-47.
- [3] 张振. *Nurr1* 基因激活剂在帕金森病模型中的神经保护机制研究[D]. 博士. 山东大学; 2012.
- [4] Kosaka K. Latest concept of Lewy body disease[J]. Psychiatry Clin Neurosci, 2014, 68(6):391-394. (下转第 63 页)



bcl-2 基因修饰神经干细胞移植修复大鼠脊髓损伤

张梅¹, 王跃新^{1*}, 侯晓华¹, 洪军¹, 殷胜春¹, 李岩¹, 刘庆阳²

(1. 唐山市工人医院, 河北唐山 063000; 2. 煤炭总医院, 北京 100028)

【摘要】 目的 探讨 bcl-2 基因修饰神经干细胞移植对脊髓损伤大鼠损伤神经功能恢复的影响。方法 体外培养大鼠神经干细胞, 经 Ad-EGFP 为载体介导端 B 淋巴细胞瘤-2 基因(bcl-2) 基因转染神经干细胞, 分为 3 组: 对照组、阴性转染组、bcl-2 转染组。Western-blot 检测神经干细胞在转染前后 bcl-2 蛋白的表达。成年雌性 SD 大鼠 85 只, 造模成功 72 只, 随机分为对照组、NSCs 组、bcl-2-NSCs 组, 24 只/组, 按照改良的 Allen 打击法建立大鼠急性脊髓损伤模型。通过 BBB 评分、斜板试验进行运动功能评定。造模后 7 d 通过 RT-PCR 及 Western-blot 检测检测脊髓损伤区周围 HSP27、c-fos 基因的表达, TUNEL 法检测细胞凋亡情况。造模后 4 周取材行病理切片 HE 染色及荧光显微镜观测 EGFP 标记的 NSC 存活及分布情况, 通过 SEP 和 MEP 观察大鼠神经电生理恢复情况。**结果** bcl-2 基因转染大鼠神经干细胞后, bcl-2 转染组与对照组、阴性转染组相比 bcl-2 基因和蛋白水平均有表达($P < 0.05$); 大鼠下肢运动功能评价 bcl-2-NSCs 组优于 NSCs 组, NSCs 组优于对照组。造模后 72 h, bcl-2-NSCs 组细胞凋亡数均明显低于对照组和 NSCs 组($P < 0.05$)。造模后 7 d, 与对照组和 NSCs 组相比, bcl-2-NSCs 组 HSP27 基因和蛋白的表达均较显著升高($P < 0.05$), bcl-2-NSCs 组 c-fos 基因和蛋白的表达较显著降低($P < 0.05$)。造模后 4 周, HE 染色对照组可见脊髓组织缺失及脊髓空洞形成, 无神经轴索通过。NSCs 组损伤区可见少量神经轴索样结构, 脊髓空洞较小, bcl-2-NSCs 组可见较多神经轴索样结构, 未见脊髓空洞。EGFP 标记的阳性细胞数: bcl-2-NSCs 组最多, NSCs 组次之, 对照组未见, 且各组之间差异有显著性($P < 0.05$)。造模后 4 周, SEP 和 MEP 的潜伏期: bcl-2-NSCs 组 < NSCs 组 < 对照组, 且各组之间差异有显著性($P < 0.05$); 波幅: bcl-2-NSCs 组 > NSCs 组 > 对照组, 且各组之间差异有显著性意义($P < 0.05$)。**结论** 通过 Ad-EGFP 为载体介导端 B 淋巴细胞瘤-2 基因(bcl-2) 基因转染使神经干细胞能够促进体外培养的大鼠神经干细胞增殖。bcl-2 基因修饰神经干细胞移植可促进脊髓损伤大鼠神经突触的再生, 升高脊髓损伤区 HSP27 表达, 降低脊髓损伤区 bcl-2 基因的表达和神经细胞凋亡, 改善大鼠的肢体运动功能和电生理功能。

【关键词】 脊髓损伤; bcl-2 基因; 修饰; 神经干细胞; 移植; 修复; 大鼠; 神经功能

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0035-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.006

Bcl-2 gene-modified neural stem cell transplantation for spinal cord injury in rats

ZHANG Mei¹, WANG Yue-xin^{1*}, HOU Xiao-hua¹, HONG Jun¹, YIN Sheng-chun¹, LI Yan¹, LIU Qing-yang²
(1. Tangshan Worker's Hospital, Tangshan 063000, China; 2. Coal General Hospital, Beijing 100028, China)

【Abstract】 Objective To investigate the bcl-2 gene modification on neurological function recovery in rats with

【基金项目】 唐山市科技计划项目(15130254a)。

【作者简介】 张梅(1980-), 女, 本科, 研究方向: 脊柱脊髓损伤及其护理。E-mail: zhangmeiwang1@163.com。

【通讯作者】 王跃新(1979-), 男, 硕士, 研究方向: 脊髓脊柱损伤。E-mail: m13102643830@163.com。

spinal cord injury in neural stem cell transplantation. **Methods** Cultured rat neural stem cells by Ad-EGFP as vector-mediated side B-cell lymphoma 2 gene (bcl-2) gene transfection of neural stem cells were divided into 3 groups: control group, negative transfection group, bcl-2 transfection group. Use western-blot to detect the expression of bcl-2 protein in neural stem cells before and after transfection. 85 adult female SD rats, successful model 72, were randomly divided into control group, NSCs group, bcl-2-NSCs groups, 24/group, rat acute spinal cord injury model in accordance with a modified Allen's method. Assess the motor function by BBB rating and the swash plate test. 7 days after modeling by RT-PCR and Western blot detection of spinal cord injury around HSP27, c-fos gene expression, TUNEL assay apoptosis. Four weeks after model drawn line HE staining and fluorescence microscopy EGFP-labeled NSC survival and distribution of the rats neurophysiological recovery by SEP and MEP. **Results** bcl-2 gene transfection of rat neural stem cells, bcl-2 transfection group and control group, negative transfection group compared to bcl-2 mRNA and protein levels were expressed ($P < 0.05$); lower extremity motor function in rats evaluation of bcl-2-NSCs group than NSCs group, NSCs group than the control group. 72 hours after modeling, bcl-2-NSCs number of apoptotic cells were significantly lower than the control group and NSCs group ($P < 0.05$). 7 days after modeling, compared with the control group and NSCs group, bcl-2-NSCs group HSP27 gene and protein expression was significantly higher than that ($P < 0.05$), bcl-2-NSCs group c-fos mRNA and protein expression was significantly reduced compared ($P < 0.05$). 4 weeks after modeling, HE staining control group showed spinal cord tissue loss and the formation of syringomyelia, no axonal through. NSCs group damage zone few of neuraxis-like structures, syringomyelia smaller, bcl-2-NSCs group showed more nerve axon-like structure, no syringomyelia. EGFP-positive cells labeled: bcl-2-NSCs group the most, NSCs group followed, no control group, and the difference between the groups was statistically significant ($P < 0.05$). After the 4th week, SEP and MEP latency period: bcl-2-NSCs group < NSCs group < control group, and between groups difference was significant ($P < 0.05$); Volatility: bcl-2-NSCs group > NSCs group > control group, and between the groups was significant difference ($P < 0.05$). **Conclusions** By Ad-EGFP as vector-mediated side B-cell lymphoma 2 gene (bcl-2) gene transfection make neural stem cells can promote cultured rat neural stem cells. bcl-2 gene-modified neural stem cell transplantation can promote the regeneration of spinal cord injury synaptic elevated HSP27 expression after spinal cord injury, reduced expression and neural cell apoptosis after spinal cord injury bcl-2 gene and improve limb movement in rats function and electrophysiological function.

【Key words】 Spinal cord injury; Bcl-2 gene; Modification; Neural stem cells; Transplantation; Repair; Rat; Nerve function

脊髓损伤 (spinal cord injury, SCI) 是一种常见的严重创伤, 可导致创伤部位以下区域感觉和运动功能的不可逆损伤, 且缺乏有效的治疗方法。在创伤区内抑制细胞凋亡对脊髓保护是非常重要的^[1]。然而, 由于 SCI 的病理生理机制的复杂性及多变性, 还没有令人满意的药物或外科手术来治愈 SCI^[2], 因此, 对 SCI 潜在治疗方法的发掘仍迫在眉睫。

神经干细胞 (NSC) 是指具有分化为神经元, 少突胶质细胞和星型胶质细胞能力, 且能够自我更新并形成神经组织的细胞^[3]。NSC 具有的定向迁移、组织融合及免疫豁免性, 使其在损伤移植后可以很好的存活。且研究已证实 NSC 移植安全有效, 对小鼠的正常生长发育无明显影响。

B 淋巴细胞瘤-2 在神经系统及其他多种组织均有表达。SCI 后, Bcl-2 蛋白在幸存神经元中表达量明显增加, 提示它是一种神经系统重要的保护性因子。有学者发现, Bcl-2 的过表达能够使中枢神经

继发性损伤减轻, 改善预后, 但是有关机制尚未阐明。本文将 Bcl-2 基因转染 NSC 细胞, 检测 NSC 细胞的生物学特性, 并进一步探讨 Bcl-2-NSC 对大鼠 SCI 功能恢复的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 大鼠 85 只, 1 月龄, 体重 (230 ~ 270) g。购自唐山恒安生物工程有限公司【SCXK (冀) 2010-0-055】, 唐山工人医院 SPF 级实验动物室常规饲养【SYXK (冀) 2011-0012】。

1.2 主要试剂与仪器

胰蛋白酶 (美国 Santa Cruz 公司); PBS 缓冲液粉剂 (福州迈新); Western-blot 蛋白检测试剂盒 (美国 Santa Cruz 公司); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Beyotime 公司); 细胞培养箱 (美国 Thermo Forma 公司); 化学发光检测试剂盒 (美国 Pierce); Bcl-2 单

克隆抗体(北京中山试剂公司);TUNEL 染色试剂盒(Promega);Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司);QuantiTect 逆转录试剂盒(德国 QIAGEN 公司);HSP-27(美国 Abcam 公司);KEYPOINT 4 诱发电位仪(北京市康泰医疗器械有限公司);扫描分析软件系统(Labworks Analysis Software,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 神经干细胞培养、鉴定标记、NSC 及 bcl-2-NSC 悬液的制备

取孕 14 d 的 SD 大鼠处死,75% 的酒精浸泡消毒。切取胎鼠大脑,浸泡在 DMEM/F12 液中,去除脑膜和血管。将去除脑膜和血管的胎脑浸泡于 DMEM/F12 液中,用吸管反复吹打成悬液,过 100 目孔筛网,过滤的悬液接种于培养瓶中,加 EGF, bFGF, N2 添加剂,37℃,5% CO₂ 培养箱中培养。72 h 后换液。培养神经干细胞 3 d 后接种到涂布多聚赖氨酸的盖玻片上,以一抗 Brdu 1:400 的比例,进行免疫细胞化学染色,并用 DAB 显色。对形成的神经球行 nestin 免疫组织化学染色,进行鉴定。将移植前 2 d 呈对数生长期的 NSC 进行离心,添加培养液,反复吹打至单细胞悬液并进行计数,将种植密度调整为 1×10^6 /mL。在培养瓶中加入感染复数(MOI)为 200PFU/细胞浆含 bcl-2-Ad-EGFP 颗粒的储存液,于培养箱中温育 48 h 后离心,并弃去上清液,再次吹打至单细胞悬液并进行计数,将种植密度调整为 2×10^7 个/ μ L。同时制备单纯 NSC 悬液(浓度为 2×10^7 个/ μ L)。

1.3.2 Western-blot 检测 Bcl-2 蛋白表达

转染后 48 h,按照 3 组细胞,提取总蛋白,5% 浓缩胶 40 V 衡压 1 h,10% 分离胶 60 V 恒压 3.5 h,湿转 14 V 恒压 14 h,37℃ 摇床封闭 2 h,洗膜 10 min,3 次,兔抗鼠抗体 Bax 或 BCL-2(1:800)4℃ 过夜;抗鼠 β -actin(1:1 000)4℃ 过夜。TBST 洗膜 5 min \times 4 次,山羊抗兔抗体 1:700,37℃ 摇床孵育 1.5 h,TBST 洗膜 5 min \times 4 次。再次运用 TBS 洗膜 10 min 后 DAB 显色,BCL-2 与 β -actin 的灰度积分的比值进行分析,作为 BCL-2 蛋白表达的量。

1.3.3 大鼠 SCI 模型的制备及干预

将 SD 大鼠进行麻醉、固定并剃毛,暴露大鼠棘突和椎板,将 T8-9 的棘突及部分椎板切除,并将黄韧带切除,显露出硬脑膜。按照改良 Allen 操作方法依次设计打击锤重量为 10 g,打击高度为 2.5 cm 进行脊髓打击,鼠尾及双后肢可见痉挛性伸直片

刻后又松弛表示造模成功,参考 Zlokovic 等^[4]的方法将造模成功后 3 d 动物再次麻醉后进行细胞移植,随机分为 3 组,每组 24 只,单独放于 3 个笼子里。保持动物良好的卫生条件,允许其自由采食,并给与供水。其中,对照组:SCI 后注入 5 μ L 生理盐水溶液;NSCs 组:注入等量 NSC 悬液;bcl-2-NSCs 组:注入等量 bcl-2-NSC 悬液(细胞数均为 2×10^7 个/ μ L)。

1.3.4 运动功能评价

3 组大鼠均于 SCI 后的不同时期采用 BBB 评分、斜板试验评价运动功能。BBB 评分^[5]:共 22 级,0 级:后肢完全瘫痪,21 级:功能正常,主要观察指标包括关节活动次数,运动负荷、范围,前肢、后肢及前爪、后爪、尾巴的协调程度。斜板试验:大鼠放置在光滑的木板上,体轴垂直于板的垂直轴,每个试验斜板的角度增加 5 度,当最大角度时大鼠可停留 5 秒,则认为有功能价值。

1.3.5 RT-PCR 及 Western-blot 检测 HSP-27、c-fos 基因的表达

取各组大鼠损伤区的脊髓组织 50 mg,Trizol 法提取总 RNA,用 RT-PCR 两步法试剂盒将 mRNA 逆转录成 cDNA,将 cDNA 行 PCR 扩增。HSP27 的引物序列:上游 5' -GGCGCTCAACCGGCAACTCA-3',下游 5' -CTCAGGGACAGGGAAGAG-3',GAPDH:上游 5' -ACCTGACCTGCCGTCTAGAA-3',下游:5' -TCCACCACCCTGTGTGCTGTA-3',c-fos:上游 5' -GAC AGC CTT TCC TAC TAC CAT TTC C-3',下游 5' -CCA TCT TAT TCC TTT CCC TTC-3' 反应条件:94℃ 5 min 之后,94℃ 变性 30 s,56℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,23 个循环后再 72℃ 延伸 10 min。PCR 产物采用琼脂糖凝胶电泳。RT-PCR 提取后的剩余物经 1500 r/min 离心 30 min 后,取上清为粗体蛋白,Bradford 法测定总的蛋白浓度。5% 浓缩胶 40 V 衡压 1 h,10% 分离胶 60 V 恒压 3.5 h,湿转 14 V 恒压 14 h,37℃ 摇床封闭 2 h,洗膜 10 min,3 次,兔抗鼠抗体 HSP-27 或 c-fos(1:800)4℃ 过夜;抗鼠 GAPDH(1:1000)4℃ 过夜。TBST 洗膜 5 min \times 4 次,山羊抗兔抗体 1:700,37℃ 摇床孵育 1.5 h,TBST 洗膜 5 min \times 4 次。再次运用 TBS 洗膜 10 min 后 DAB 显色,HSP-27、c-fos 与 GAPDH 的灰度积分的比值进行分析,为 HSP-27、c-fos 蛋白表达的量。

1.3.6 TUNEL 法检测细胞凋亡率

取脊髓组织进行石蜡切片处理。TUNEL 法检测按德国 Roche 公司试剂盒购操作。待水化、37℃ 条件下蛋白酶 K 消化 10 min, 进行标记液标记后, 37℃ 下, 经生物素化的地高辛反应 30 min, 加 SABC, DAB 显色。封片后对胞核含棕黄色颗粒的细胞计数。

1.3.7 HE 染色及荧光显微镜观察 EGFP 标记的 NSC 存活及分布

3 组各随机取 5 只大鼠, 取脊髓组织, 固定用 4% 多聚甲醛, 冲洗用生理盐水。从病变部位取长约 1 cm 的完整脊髓, 经分级系列酒精脱水, 纵向切片, 厚约 20 μm , 进行 HE 染色。随机取 10 个视野, 用高倍荧光显微镜 ($\times 20$) 观察 EGFP 标记的 NSC 的存活及分布情况。

1.3.8 检测运动诱发电位和体感诱发电位

每组随机取 5 只大鼠, 用 KEYPOINT 4 诱发电位仪检测后肢体感及运动诱发电位。将大鼠进行麻醉、固定, 并准确安放参考及记录电极。直流波电脉冲刺激参数设计: 3 Hz 的频率, 0.2 ms 的波宽, 5 ~ 15 mA 的电流强度, 50 ~ 60 倍的叠加次数, 后肢有轻微抽搐为参数设计良好。观察并记录数值变化。同样的方法检测运动诱发电位并记录。

1.4 统计学方法

采用 SPSS17.0 进行分析, 实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 单因素方差分析进行不同组之间

差异的比较, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NSCs 体外培养、鉴定及标记

脑组织单细胞悬液接种于培养瓶后 1 h, 大部分细胞沉积在瓶底, 呈圆形、无突起, 同时可以观察到小的细胞团, 其中 NSCs 细胞数量较少。1 d 后 NSCs 增多、较小、形状不规则, 小部分细胞团贴壁; 5 d 后 NSCs 增多, 为较大、形状规则的球形。免疫组化染色显示, NSCs 球呈 Nestin 强阳性表达。

2.2 Western-blot

基因在转染 3 d 及 14 d 后, bcl-2 转染组的神经干细胞检测到 bcl-2 蛋白表达明显, 而对照组和阴性转染组 bcl-2 蛋白无表达, 说明了 bcl-2 基因已稳定整合入 bcl-2 转染组神经干细胞中, 且可以行目的蛋白的稳定表达, 如图 2A-B 所示。

2.3 运动功能评定结果

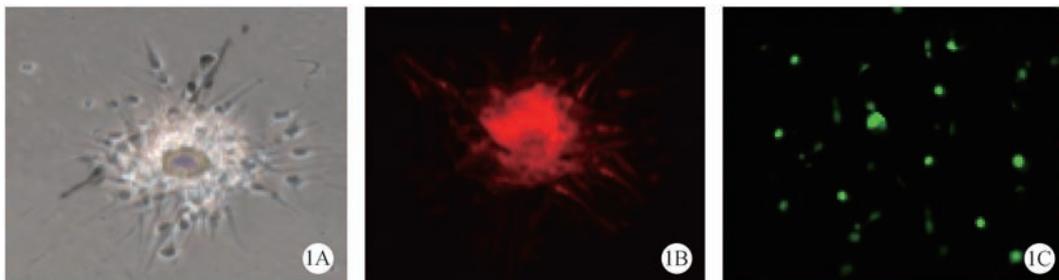
造模前所有大鼠的 BBB 评分、斜板试验评分差异均无显著性意义 ($P < 0.05$)。移植后 4 周, NSCs 组, bcl-2-NSCs 组两项评分在损造模后 2 ~ 4 周较对照组都明显增加, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。bcl-2-NSCs 组两项评分在损造模后 2 ~ 4 周较 NSCs 组明显增加, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 各组大鼠运动功能评定结果 ($n = 5$)
Tab.1 Evaluation results of motor function of rats in each group

组别 (group)	损伤前 (prior to the injury)	造模后 (After modeling)					
		1 天 (1 day)	3 天 (3 day)	1 周 (1 weeks)	2 周 (2 weeks)	3 周 (3 weeks)	4 周 (4 weeks)
BBB 评分 (Basso, Beattie & Bresnahan locomotor rating scale, BBB scale)							
对照组 (Comparison group)	21.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	1.41 \pm 0.27	2.71 \pm 0.81	8.30 \pm 1.52	11.29 \pm 2.26	13.60 \pm 1.26
NSCs 组 (NSCs group)	21.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	2.63 \pm 0.22 ^a	4.52 \pm 0.34 ^a	10.3 \pm 2.42 ^a	12.68 \pm 1.87 ^a	15.61 \pm 1.12 ^a
bcl-2-NSCs 组 (bcl-2-NSCs group)	21.00 \pm 0.00	0.00 \pm 0.00	3.88 \pm 0.34 ^b	6.91 \pm 0.38 ^b	12.88 \pm 2.53 ^b	15.52 \pm 2.20 ^b	17.53 \pm 0.30 ^b
斜板试验 (Swash plate test)							
对照组 (Comparison group)	42.37 \pm 2.20	15.60 \pm 2.30	16.7 \pm 2.39	20.27 \pm 3.41	23.46 \pm 4.23	26.44 \pm 2.76	28.37 \pm 2.47
NSCs 组 (NSCs group)	42.42 \pm 3.75	15.77 \pm 2.66 ^a	19.33 \pm 3.17 ^a	25.11 \pm 4.85 ^a	30.31 \pm 6.38 ^a	32.88 \pm 3.16 ^a	36.52 \pm 2.44 ^a
bcl-2-NSCs 组 (bcl-2-NSCs group)	42.38 \pm 3.34	15.86 \pm 3.28 ^b	23.70 \pm 3.45 ^b	29.31 \pm 6.27 ^b	33.75 \pm 5.11 ^b	36.52 \pm 4.39 ^b	40.30 \pm 3.36 ^b

注: 与对照组相比, ^a $P < 0.05$; 与 NSCs 组相比 ^b $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; Compared with NSCs group ^b $P < 0.05$.

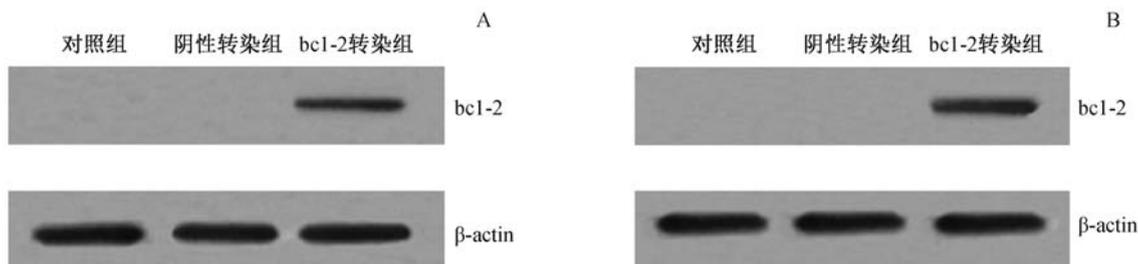


注: (1A) 倒置显微镜下观察培养的原代神经干细胞形态(×40);
(1B) 神经干细胞 Nestin 免疫荧光化学染色阳性(×40); (1C) EGFP 标记的 NSCs(×100)。

图 1 神经干细胞的培养、鉴定及标记

Note. (1A) primary neural stem cell morphology was observed under inverted microscope cultured(×40);
(1B) neural stem cells Nestin immunofluorescence staining(×40); (1C) EGFP-labeled NSCs(×100).

Fig. 1 Culture, identification and labeling of neural stem cells

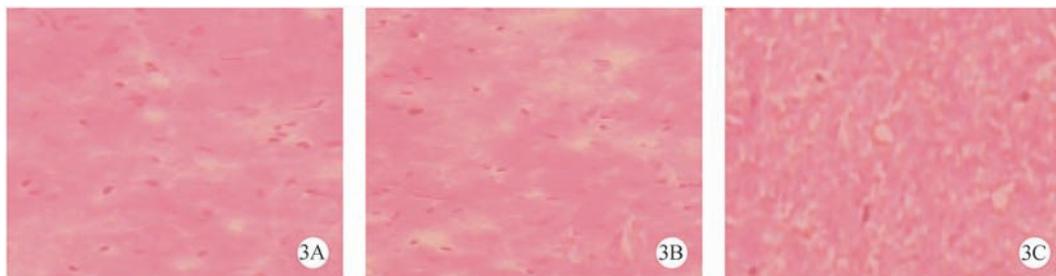


注: (A) 转染 3 d; (B) 转染 14 d。

图 2 bcl-2 蛋白在神经干细胞中的稳定表达

Note. (A) Transfection 3 days; (B) Transfection 14 days.

Fig. 2 Bcl-2 protein was stably expressed in neural stem cells

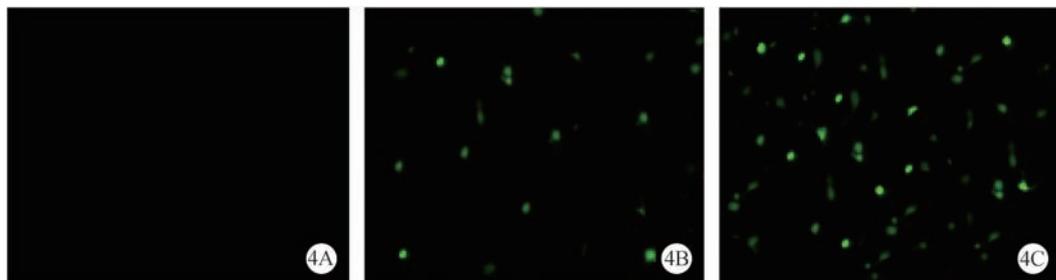


注: (3A) 对照组; (3B) NSCs 组; (3C) bcl-2-NSCs 组。

图 3 HE 染色观察各组神经细胞样形态学(×40)

Note. (3A) The control group; (3B) NSCs group; (3C) bcl-2-NSCs group.

Fig. 3 HE staining in each group of neural cell-like morphology



注: (4A) 对照组; (4B) NSCs 组; (4C) bcl-2-NSCs 组。

图 4 荧光显微镜观察 EGFP 标记的绿色荧光细胞(×20)

Note. (4A) The control group; (4B) NSCs group; (4C) bcl-2-NSCs group.

Fig. 4 Fluorescence microscopy of GFP-tagged green fluorescent cells

2.4 HE 染色和荧光显微镜观察

伤后 4 周, HE 染色对照组可见损伤处脊髓组织断裂, 为瘢痕连接, 有明显空洞形成 (图 3A)。NSCs 组在移植部位组织空洞较对照组小, 较 bcl-2-NSCs 组大 (图 3B)。bcl-2-NSCs 组空洞消失 (图 3C)。NSCs 组及 bcl-2-NSCs 组切片中均可见散在的 EGFP 标记的阳性的绿色荧光 (图 4A-C); 对照组为 (0 ± 0.00) 个/高倍视野, NSCs 组为 (12.15 ± 3.24) 个/高倍视野, bcl-2-NSCs 组为 (27.34 ± 4.41) 个/高倍视野, 各组之间差异显著 ($P < 0.01$)。

2.5 HSP-27、c-fos 基因和蛋白的表达

造模后 7 天, 与对照组和 NSCs 组相比, bcl-2-NSCs 组 HSP27 基因的表达显著升高, $P < 0.05$, c-fos 基因的表达显著降低 $P < 0.05$; 与对照组比较, NSCs 组 HSP27 蛋白的表达显著升高, $P < 0.05$, c-fos 蛋白的表达显著降低 $P < 0.05$, 见图 5。

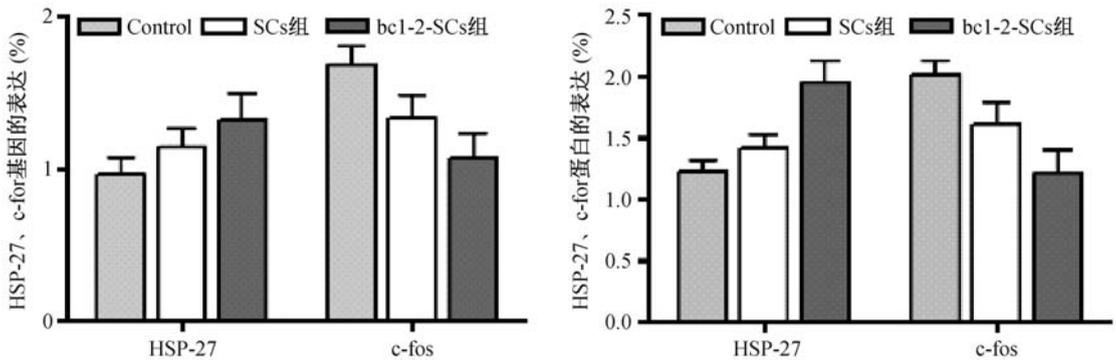
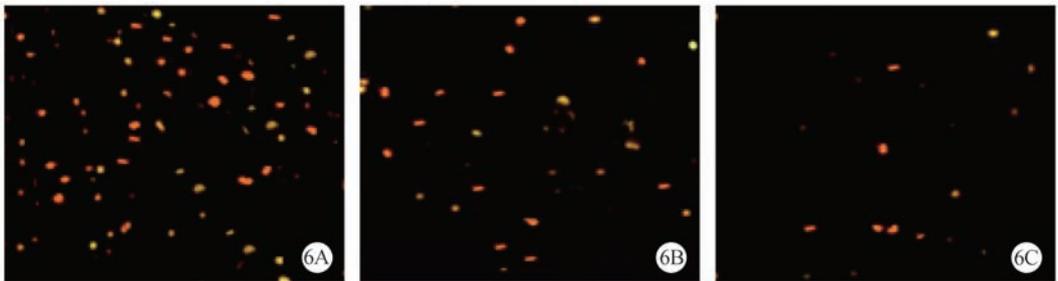


图 5 脊髓损伤区 HSP-27、c-fos 基因与蛋白的表达

Fig. 5 Expression of HSP-27、c-fos gene and protein in spinal cord injury



注: (6A) 对照组; (6B) NSCs 组; (6C) bcl-2-NSCs 组。

图 6 TUNEL 检测各组细胞凋亡 (×20)

Note. (6A) The control group; (6B) NSCs group; (6C) bcl-2-NSCs group.

Fig. 6 TUNEL staining of each group

2.6 TUNEL 检测细胞凋亡

凋亡神经细胞的细胞核内可见特异性棕黄色颗粒, TUNEL 法测定, NSCs 组中, 免疫组化呈棕黄色颗粒的凋亡细胞数 (20.41 ± 4.38) 明显少于对照组 (30.12 ± 3.44) ($P < 0.05$), bcl-2-NSCs 组凋亡细胞最少 (9.57 ± 2.31)。见图 6。

2.7 体感诱发电位和运动诱发电位

移植后 4 周, 对照组体感诱发电位和运动诱发电位少量恢复, bcl-2-NSCs 组感诱发电位和运动诱发电位明显恢复, 波幅增高。各组大鼠体感诱发电位潜伏期和波幅, 见表 2。NSCs 组与对照组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$)。bcl-2-NSCs 组与对照组比较差异有非常显著性意义 ($P < 0.01$)。NSCs 组与 bcl-2-NSCs 组比较差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 表明 bcl-2-NSCs 组电信号从后肢到头皮传导时间比其他组都短, 传导通路已经畅通, 恢复较好。

表 2 移植后 4 周各组大鼠体感诱发电位和运动诱发电位检测 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Tab. 2 Somatosensory evoked potentials and motor evoked potentials in rats at 4 weeks after transplantation

组别 (group)	体感诱发电位 (somatosensory evoked potential, SEP)		运动诱发电位 (motor evoked potentials, MEP)	
	潜伏期(ms)	波幅(μ V)	潜伏期(ms)	波幅(μ V)
对照组 (comparison group)	32.241 \pm 2.457	1.236 \pm 0.116	16.227 \pm 0.347	1.635 \pm 0.121
NSCs 组 (NSCs group)	26.821 \pm 2.530 ^a	1.727 \pm 0.117 ^a	12.436 \pm 0.244 ^a	2.447 \pm 0.319 ^a
bcl-2-NSCs 组 (bcl-2-NSCs group)	17.237 \pm 1.418 ^b	2.231 \pm 0.125 ^b	8.741 \pm 0.329 ^b	3.738 \pm 0.445 ^b

注:与对照组相比,^a $P < 0.05$;与 NSCs 组相比^b $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the control group, ^a $P < 0.05$; Compared with NSCs group, ^b $P < 0.05$.

3 讨论

SCI 的病理损伤分为原发性 SCI 和继发性 SCI^[5]。发生前者时,损伤的脊髓组织会经历神经元凋亡、炎症反应、氧自由基损伤等破坏性及轴突再生等修复性过程,属于不可逆性损伤。后者则是由前者引发的一系列神经病理变化,给予积极的治疗手段可减慢其发生、发展,属于可控性损伤,所以目前将继发性 SCI 作为研究的焦点^[6]。近来,Bcl-2 减轻继发性 SCI 的作用越来越引起关注,除了抗凋亡功能外,一些研究提示,过表达的 Bcl-2 能够阻止由中毒、缺氧、缺乏生长因子等诱发的神经元死亡^[7],提示 Bcl-2 对神经功能的保护作用是多方面的^[8]。

Bcl-2 基因家族包括促进 (Bax) 和抑制 (Bcl-2) 细胞凋亡的两大类成员,是 SCI 后细胞凋亡的重要调控基因。研究认为,Bcl-2 与 Bax 以二聚体的形式在体内发挥作用,二者的比例是决定细胞存亡的关键^[9]。燕景峰等^[10]研究发现,Bcl-2 组表达在各个时间点上较 SCI、NSC 组明显增多,凋亡率降低。本实验运用多项技术,研究了 Bcl-2-NSC 治疗小鼠 SCI 后机体的恢复情况。通过 Ad-EGFP 为载体介导 Bcl-2 基因转染使神经干细胞能够明显抑制细胞凋亡、促进神经干细胞增殖及修复,与前人的研究结果一致。

HSP 是其中重要的一员,主要参与稳定细胞骨架。路艳等^[11]发现,HSP (heat shock proteins, 热休克蛋白,简称为 HSP) 可与 APaf-1 结合,阻止形成 APaf-1/Cyt-c/casPase-9 凋亡复合体,进而阻止细胞凋亡,起到保护神经系统损伤的作用。在实验中我们观察到,Bcl-2 高表达小鼠的脊髓标本上 HSP 的表达明显升高,对提高脊髓的应激性、耐受缺血缺氧等损伤明显是有利的。

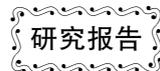
本实验仅对部分内容进行了探索,尚存在许多不足之处,还需要更进一步的探究。但本实验中涉及到转基因技术已引起了研究人员的极大兴趣,也

许在不久的将来会有更广阔的前景。因此继续探索并完善基因修饰 NSC 移植治疗 SCI 的理论水平和分子机制,从而使基因治疗早日应用于临床,是我们进一步研究的课题和努力的方向。

参考文献:

- [1] Wang Y, Wang H, Tao Y, et al. NecroPtosis inhibitor necrostatin-1 Promotes cell Protection and Physiological function in traumatic sPinal cord injury[J]. Neuroscience, 2014, 266: 91 - 101.
- [2] David S, LoPez-Vales R, Wee Yong V. Harmful and beneficial effects of inflammation after sPinal cord injury: Potential therapeutic implications[J]. Handb Clin Neurol, 2012, 109: 485 - 502.
- [3] Karimi - Abdolrezaee S, EftekharPour E. Stem cells and sPinal cord injury rePair[J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 760: 53 - 73.
- [4] Zlokovic BV, APuzzo ML. Cellular and molecular neurosurgery: Pathways from concePt to reality-Part II: vector systems and delivery methodologies for gene therapy of the central nervous system[J]. Neurosurgery, 1997, 40(4): 805 - 813.
- [5] 晔英, 范广宇, 朱悦. 脊髓干细胞移植对脊髓损伤后神经功能的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(10): 1257 - 1258.
- [6] Rahman F, Bhargava A, TiPPu SR, et al. Analysis of the immunoexPression of Ki - 67 and Bcl - 2 in the Pericoronal tissues of analysis[J]. Dent Res J (Isfahan), 2013, 10(1): 31 - 37.
- [7] Schulman JJ, Wright FA, Kaufmann T, et al. The Bcl - 2 family member Bok binds to the couPling domain of inositol 1, 4, 5 - trisPhate recePtors and Protects them from Proteolytic cleavage [J]. J Biol Chem, 2013, 288(35): 25340 - 25349.
- [8] Kontos CK, Fendri A, Khabir A, et al. Quantitative exPression analysis and Prognostic significance of the Bcl - 2 - associated X gene in nasoPharyngeal carcinoma: a retrosPective cohort study [J]. BMC Cancer, 2013, 13: 293.
- [9] 张强, 熊婷, 张其梅, 等. 缺血后适应对大鼠脑缺血再灌注损伤 Bcl - 2 和 Bax 蛋白表达的影响[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2011, 27(3): 329 - 330.
- [10] 燕景峰, 岳长波. BDNF 基因修饰神经干细胞移植治疗脊髓损伤的实验研究[J]. 中国临床神经外科杂志, 2006, 11(9): 547 - 550.
- [11] 路艳, 陈莹, 李宗斌, 等. 老龄大鼠心脏缺血预处理后热休克蛋白 27 的变化研究[J]. 中国全科医学, 2011, 14(12): 1308 - 1310.

[修回日期] 2016-01-12



丙泊酚干预对大鼠视神经损伤的影响及机制研究

李学东, 陈家康*, 覃 军, 麦用军, 肖振勇

(柳州市工人医院, 广西 柳州 545000)

【摘要】 目的 探讨大鼠视神经损伤后丙泊酚干预对损伤视神经及视网膜神经节的影响及机制。方法 SD大鼠67只,随机取20只为正常组,不予任何处理。余行视神经钳夹法造模,造模成功42只纳入实验。随机分为:模型对照组和丙泊酚组,各21只/组。造模后4d,以TUNEL法检测大鼠视网膜和视神经细胞凋亡,造模后7d,RT-PCR、Western-blot检测视网膜和视神经节细胞组织Caspase-3、BCL-2基因和蛋白表达。造模后14d,行闪光视觉诱发电位检测,处死大鼠取眼球,观察各组大鼠视网膜和视神经的病理形态,行视网膜神经节细胞计数。结果 造模后4d,丙泊酚组视网膜神经节细胞凋亡数量明显低于模型对照组($P < 0.05$),造模后7d与模型对照组相比,丙泊酚组Caspase-3的表达显著降低($P < 0.05$);BCL-2的表达显著升高($P < 0.05$)。造模后14d,荧光金阳性RGC数:模型对照组最少,丙泊酚组较多,正常组最多,且各组之间差异有统计学意义($P < 0.05$)。丙泊酚组大鼠闪光视觉诱发电位伏期较模型对照组大鼠短($P < 0.05$)、波幅明显高于模型对照组($P < 0.05$)。结论 丙泊酚干预通过减少大鼠视神经钳夹后RGCs的凋亡,降低视网膜Caspase-3的表达,升高BCL-2的表达,对视神经损伤起到保护作用。

【关键词】 大鼠;视神经损伤;丙泊酚;视网膜神经节细胞;Caspase-3;BCL-2

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0042-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.007

NeuroProtective mechanisms of Propofol to retinal ganglion cells in a Partial optic nerve crush rat model

LI Xue-Dong, CHEN Jia-Kang*, QIN Jun, MAI Yong-Jun, XIAO Zhen-Yong
(Liuzhou Worker's Hospital, Liuzhou 545000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the Protective effect of propofol on the retinal ganglion cells of the rat optic nerve crush model. **Methods** 67 SD rats. Randomly selected 20 rats, don't do any processing for the normal group. With more than 47 rats optic clamps for optic nerve contusion model, legal system building 5 failure, success of 42 rats were randomly divided into the optic nerve damage and propofol group, 21 / group. Will not be any treatment after optic nerve injury group building, 4 hours after propofol group for propofol therapy. After 4 days of successful modeling, the apoptosis of retinal ganglion cells were detected by TUNEL staining. After 7 days of successful modeling, the expression of Caspase-3, BCL-2 in retina and optic nerve cells of rats were detected by RT-PCR and Western-blot. After 14 days of successful modeling, The amplitude and latent period of P1 wave of flash visual evoked potential were detected. The animals were sacrificed and the optic nerve was taken to observe the pathological morphology of retina and optic nerve in rats, and the retinal ganglion cells (RGC) were counted. **Results** After 4 days of successful modeling, the apoptosis of the propofol

[作者简介]李学东(1970-),男,学士学位,研究方向:神经外科。E-mail:lixuedonggx@163.com。

[通讯作者]陈家康,E-mail:LXDDOCTORLG@163.com。

group was significantly lower than that of the optic nerve injury group ($P < 0.05$). After 7 days of successful modeling, the expression of Caspase-3 in the propofol group was significantly lower than that in the propofol group ($P < 0.05$), the expression of BCL-2 in the propofol group was significantly higher than that in the propofol group ($P < 0.05$). After 14 days of successful modeling, FG Positive RGC numbers; normal group > propofol group > optic nerve injury group and between groups difference was statistically significant ($P < 0.05$). The flash visual evoked potential of the rats in propofol group was significantly shorter than that in the optic nerve injury group ($P < 0.05$) and the amplitude of the visual evoked Potential was significantly higher than that of the optic nerve injury group ($P < 0.05$). **Conclusions** Propofol treatment can through an early reduction in rats after optic nerve crush RGCs apoptosis, decreased Caspase-3 expression, increased BCL-2 expression and improve number of optic nerve crush of RGCs survival.

【Key words】 Rats; Optic nerve damage; Propofol; Retinal ganglion cells; Caspase-3; BCL-2

视神经损伤发病率逐年增高,可能是交通事故发生率上升所致。视神经损伤导致的患者不可逆的视力丧失明显增多,给患者的生活带来极大的痛苦和不便^[1-2]。属于中枢神经系统的视神经及神经节细胞损伤后具有修复和再生困难的特点。视神经损伤早期采取有效手段进行干预,以挽救损伤的视神经和神经节细胞意义重大。近年来,丙泊酚在中枢神经系统损伤的康复治疗过程中的应用也越来越受到临床及科研工作者的重视^[3-4]。研究表明丙泊酚对脑缺血再灌注损伤有较强的保护作用,对多种细胞的凋亡均有一定的抑制作用。它能突显大鼠脑缺血再灌注时 TNF 的抑制作用。同时丙泊酚还具有作用时间短、苏醒完全而迅速、起效快、持续输注后无蓄积等优点。目前已有研究表明丙泊酚对损伤的视神经及视网膜亦有一定的保护作用^[5-6],然而丙泊酚治疗是怎样改善视神经损伤区及视网膜的微环境,进而起到保护视神经的作用的,具体保护效果如何,仍需进一步探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 SD 雌性大鼠 67 只,1 月龄,体重(250~270)g 购于广西医科大学实验动物中心[SCXK(桂)20090006];动物饲养于柳州市工人医院标准动物饲养室[SYXK(桂)20100014]。所有大鼠均在 12 h 明光(7:00~19:00)/12 h 暗光、温度为 22℃~25℃ 的环境下饲养。按实验动物使用的“3R”原则给以人道主义关怀。

1.2 主要试剂与仪器

GAPDH、Caspase-3、BCL-2 兔抗大鼠多克隆抗体(美国 Sigma 公司);耐热性 TaqDNA 聚合酶、RT-PCR 试剂盒(TaKaRa 公司);M-MLV 逆转录酶(美国 Promega 公司产品);100 bPDNA ladder(华美生

物工程公司);荧光金(美国 Biotium 公司);TUNEL 凋亡试剂盒(德国 Roche 公司);丙泊酚(20 mL:200 mg 乐山裕恒药业有限公司);BCL-2 和 Caspase-3 物根据 Genebank 资料,利用 Primer 5.0 引物设计软件确定最优引物,然后经 Blast 比对,由上海生工生物有限公司合成;眼科手术显微镜(上海轶德医疗设备有限公司);立体定位仪(日本成茂);眼科视觉电生理仪(德国 Roland 公司);血管夹(创生医疗器械有限公司);光学显微镜(奥林巴斯公司)。

1.3 实验方法

1.3.1 视神经损伤大鼠造模及丙泊酚干预

依据参考文献采用目前国内外最常用的视神经夹挫伤模型造模^[7],67 只大鼠眼部经裂隙灯和检眼镜检查屈光间质清晰,眼底无病变。随机取 20 只大鼠为正常组,不予任何处理。余 47 只进行视神经钳夹法造模(右眼),过程如下:10%的水合氯醛腹腔注射麻醉后(0.3 mL/kg),乙醇消毒右眼上睑后,垂直于睑缘方向剪开。于上方巩膜缘处将大鼠球结膜剪开,钝性分离。眼球向下方牵拉后,钝性分离肌锥,避免血管损伤,逐渐暴露出视神经。于球后 2.5 mm 处动脉瘤夹持视神经 6 s。观察术眼瞳孔散大且无视网膜出血,逐层缝合后于结膜囊内及上眼睑涂红霉素眼膏。大鼠清醒后,观察术眼出现瞳孔散大,眼底无视网膜出血,且大鼠无眼球突出及眼睑闭合不全,表明造模成功,纳入实验。5 只大鼠造模失败,予以剔除,余 42 只纳入实验。将其随机分为:模型对照组 21 只,丙泊酚组 21 只。模型对照组大鼠无治疗,常规饲养,丙泊酚组大鼠造模后 4 h 予以丙泊酚治疗,通过尾静脉留置针泵注丙泊酚注射液(2 mL/kg/h)持续 4 h,连续治疗 2 d。

1.3.2 凋亡细胞检测

造模后第 4 天各组大鼠分别随机取 5 只,按前述方法麻醉满意后剖胸,行左心室主动脉插管,以

4%的多聚甲醛灌注进行固定。摘取眼球作石蜡切片, TUNEL 法检测计数, 按德国 Roche 公司试剂盒购操作。待水化、37℃条件下蛋白酶 K 消化 10 min, 行标记液标记后, 37℃下, 经生物素化的地高辛反应 30 min, 加 SABC, DAB 显色。封片, 损伤区周围随机选取不重复的 6 个高倍视野, 对胞核含棕黄色颗粒的细胞计数。

1.3.3 RT-PCR 检测

造模后第 7 天各组大鼠分别随机取 5 只, 迅速

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

引物 (Primers)	序列 (sequence)	产物长度 (bp)	反应温度 (℃)
BCL-2	上游 5'-TGAACCGGCATCTGCACAC-3' 下游 5'-CGTCTTCAGACAGCCAGGAG-3'	115	56
Caspase-3	上游 5'-AGAGCTGGACTGCGGTATTGAG-3' 下游 5'-GAACCATGACCCGTCCTTG-3'	148	56
GAPDH	上游 5'-ATCTTCCAGGAGCGAGAT-3' 下游 5'-TAAGCACTTGGTGGCA-3'	248	56

1.3.4 Western-blot 检测

RT-PCR 提取后的剩余物经 1500 r/min, 离心 30 min 后, 取上清为粗体蛋白, Bradford 法测定总的蛋白浓度。5% 浓缩胶 40 V 衡压 1 h, 10% 分离胶 60 V 恒压 3.5 h, 湿转 14 V 恒压 14 h, 37℃摇床封闭 2 h, 洗膜 10 min, 3 次, 兔抗鼠抗体 Caspase-3 或 BCL-2(1:800)4℃过夜; 抗鼠 GAPDH(1:1000)4℃过夜。TBST 洗膜 5 min × 4 次, 山羊抗兔抗体 1:700, 37℃摇床孵育 1.5 h, TBST 洗膜 5 min × 4 次。再次运用 TBS 洗膜 10 min 后 DAB 显色, 按 Quantity one 图像进行分析研究, Caspase-3、BCL-2 与 GAPDH 的灰度积分的比值进行分析, 作为 Caspase-3、BCL-2 蛋白表达的量。

1.3.5 逆行荧光金标记

造模后第 9 天各组大鼠分别随机取 5 只, 按前述方法麻醉满意后, 立体定位仪固定(日本成茂)大鼠的头部, 正中纵行切开头皮, 分离皮下组织, 暴露颅骨, 以前颅后为标志用手持式电动骨钻在颅骨表面相应位置(前颅后方 6.0 mm, 旁开 1.4 mm, 深度 4.0 mm)钻开颅骨并暴露硬脑膜, 于每点各注射 3% 的荧光金 3 μL。造模后 14 天, 以颈椎脱臼法处死每组经荧光金标记的大鼠, 迅速取出右眼眼球, 将眼球于 4% 多聚甲醛磷酸中固定 2 h, 生理盐水冲洗, 将其眼前节和玻璃体去除, 将眼杯剪开放射状切口 4 个, 使其视网膜剥离, 将分离后的视网膜于载玻片上平铺, 玻璃体面朝上。在空气中自然干燥

取出右眼眼球, 分离出视网膜, 以 Trizol 说明书法提取视网膜的总 RNA, 总 RNA 含量测定采用紫外分光光度计法, 用 RT~PCR 两步法试剂盒(TaKaRa 公司)将 mRNA 逆转录成 cDNA, 接着再将 cDNA 行 PCR 扩增。用以下引物见表 1, 取扩增产物行电泳, 电泳结果通过凝胶图像分析系统进行光密度分析, 计算 BCL-2, Caspase-3 与 GAPDH 的光密度积分的比值, 作为 BCL-2, Caspase-3 mRNA 表达的指标。

后, 待视网膜加盖玻片并滴荧光增强剂进行封片。使用荧光显微镜与距离视乳头中心 2 mm 处, 分别上下左右各拍摄一张照片, 并代表 4 个象限的 RGC 情况。本研究经盲态人工 RGC 进行计数测量。

1.3.6 闪光视觉诱发电位检查

参照 ISCEV 标准^[8], 并且使用 Roland 视觉电生理检查仪(德国), 各组随机取 5 只大鼠于夹伤后第 14 天进行 F-VEP 检查。10% 的水合氯醛腹腔注射麻醉后(0.3 mL/kg), 大鼠皮肤备皮后, 安尔碘消毒, 将电极银针刺入皮下, 两耳尖连线中点处为记录电极, 右眼同侧颊部处为参考电极, 置右侧耳郭为地电极, 阻抗标准 5 Ω 以下, 经适应 15 min 后, 左眼完全被不透光黑眼罩遮盖, 通过电生理仪, LED 眼罩闪烁刺激, 光强: 3.93 cd/m², 频率: 1.9 Hz, 通频带宽: 1~100 Hz, 分析时间: 250 ms, 叠加: 100 次, 连续测量 5 次。取均值为闪光视觉诱发电位 P1 的波幅及潜伏期。

1.3.7 视网膜病理组织学观察

以上检测均完成后, 剩余大鼠以颈椎脱臼法处死, 摘出整个眼球及 5 mm 长的视神经, 向眼球中注射少量固定液后于 FAA 固定液中固定 48 h, 经梯度乙醇脱水后, 剪开眼球前段去掉晶状体后, 二甲苯透明处理, 石蜡行定向包埋, 行视网膜冠状面连续 4 μm 切片, 常规 HE 染色, 光镜观察。

1.4 统计方法

经 SPSS12.0 软件分析, 实验数据以均数 ± 标准

差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间单因素的比较用单因素方差分析,进行两组间的比较用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TUNEL 检测细胞凋亡

凋亡神经细胞的细胞核内可见特异性棕黄色颗粒,光镜下可见正常组视网膜均未见棕黄色颗粒着染的 RGCs(图 1A);模型对照组可见较多棕黄色颗粒着染的 RGCs(白箭所指)(图 1B);丙泊酚组可见少量的棕黄色颗粒着染的 RGCs,其数量较模型对照组少(图 1C)。具体见表 2,经两两比较后,差异显著($P < 0.01$)。

2.2 Caspase-3、BCL-2 基因表达

结果(图 2,表 3)显示视神经造模损伤后第 7 天,丙泊酚组大鼠视网膜的 Caspase-3 基因表达较正常组高,BCL-2 基因表达较正常组低,差异有显著性意义($P < 0.05$);视网膜 Caspase-3 基因的表达丙泊酚组与模型对照组相比明显降低,BCL-2 基因的表达

明显升高,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.3 Caspase-3、BCL-2 Protein 表达

结果(图 3、表 3)显示视神经造模损伤后第 7 天,丙泊酚组大鼠视网膜的 Caspase-3 蛋白因表达较正常组高,BCL-2 蛋白表达较正常组低,差异有显著性意义($P < 0.05$);视网膜 Caspase-3 蛋白的表达丙泊酚组与模型对照组相比明显降低,BCL-2 蛋白的表达明显升高,差异有显著性意义($P < 0.05$)。

2.4 大鼠 FG 阳性 RGCs 计数

三组大鼠的平均 FG 阳性 RGCs 数有显著差异($P < 0.05$)。正常对照组 FG 阳性 RGCs 数均较丙泊酚组和模型对照组多($P < 0.05$),丙泊酚组 FG 阳性的 RGCs 数较模型对照组多($P < 0.05$)。模型对照组视网膜组织 FG 阳性 RGCs 计数(图 4A,红箭所指);丙泊酚组视网膜组织 FG 阳性 RGCs 计数(图 4B,红箭所指);正常组视网膜组织 FG 阳性 RGCs 计数(图 4C,红箭所指),具体见表 2,各组间比较均有统计学意义($P < 0.05$)。

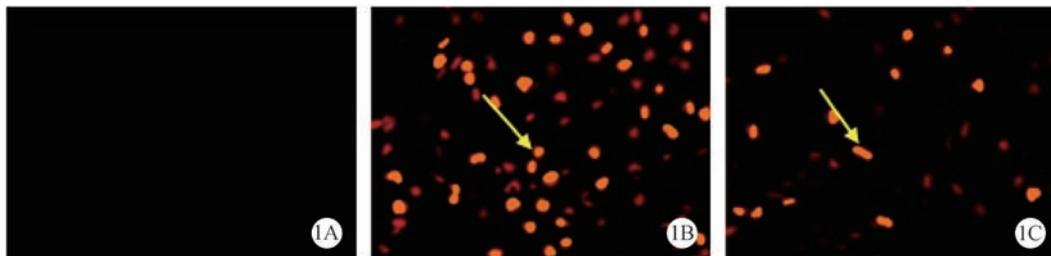
表 2 各组大鼠 TUNEL 细胞凋亡及 FG 阳性 RGCs 计数($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab.2 Number of apoptosis cells and FG positive RGCs number in each group

组别(Group)	细胞凋亡数(Cell apoptosis)	FG 阳性 RGCs 计数(Positive RGCs counting)
模型对照组(Model control group)	31.23 ± 5.74 [#]	9.8 ± 2.2 [#]
丙泊酚组(Propofol group)	14.65 ± 3.86 [*]	23.6 ± 3.4 [*]
正常组(Normal group)	00.00 ± 0.00	36.8 ± 4.8

注:与模型对照组相比,^{*} $P < 0.05$;与正常组相比[#] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the model control group, ^{*} $P < 0.05$ compared with the normal group [#] $P < 0.05$.



注:(1A)正常组;(1B)模型对照组;(1C)丙泊酚组。

图 1 TUNEL 检测各组细胞凋亡($\times 20$)

Note. (1A) Normal group; (1B) Model control group; (1C) Propofol group.

Fig.1 TUNEL staining of each group

表 3 各组大鼠 Caspase-3、BCL-2 基因及蛋白表达情况($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab.3 Rats Caspase-3, BCL-2 gene and protein expression

组别(Group)	Caspase-3 BCL-2mRNA		Caspase-3、BCL-2 Protein	
	Caspase-3	BCL-2	Caspase-3	BCL-2
模型对照组(Model control group)	2.34 ± 0.46	0.21 ± 0.04 [#]	3.46 ± 0.34 [#]	0.36 ± 0.10 [#]
丙泊酚组(Propofol group)	1.26 ± 0.27 [*]	0.57 ± 0.12 [*]	2.38 ± 0.26 [*]	0.83 ± 0.19 [*]
正常组(Normal group)	0.65 ± 0.11	0.94 ± 0.13	0.96 ± 0.08	1.38 ± 0.24

注:与模型对照组相比,^{*} $P < 0.05$;与正常组相比[#] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the model control group, ^{*} $P < 0.05$ compared with the normal group [#] $P < 0.05$.

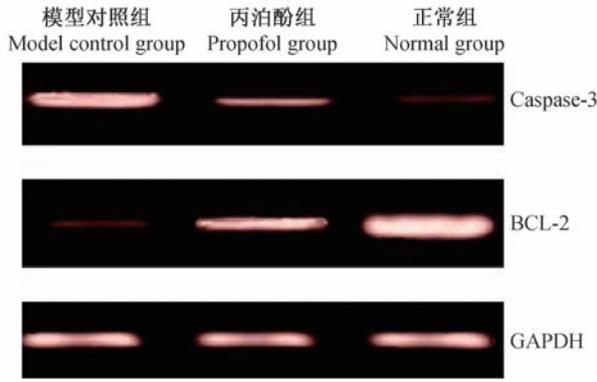


图 2 各组大鼠 Caspase-3、BCL-2 mRNA 的表达

Fig. 2 The rats Caspase-3, BCL-2 mRNA of expression

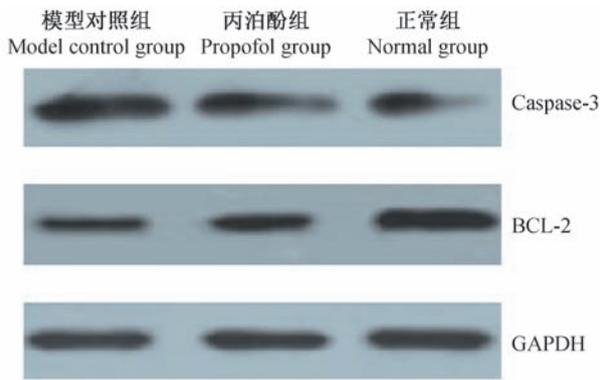
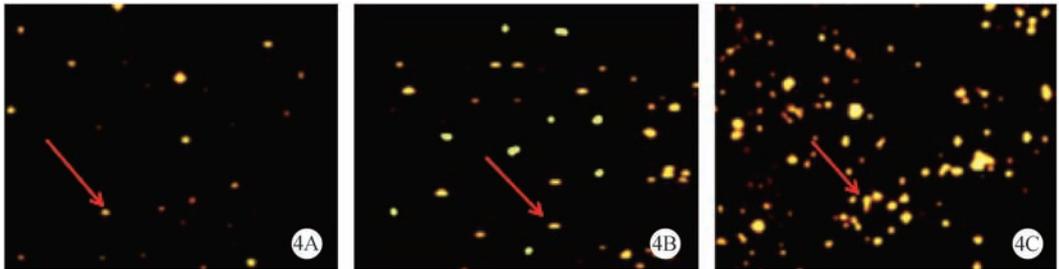


图 3 各组大鼠 Caspase-3、BCL-2 蛋白的表达

Fig. 3 The rats Caspase-3, BCL-2 Protein of expression

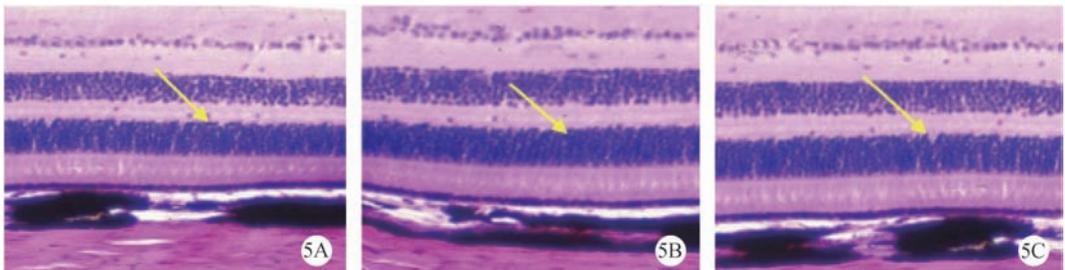


注: (4A) 模型对照组; (4B) 丙泊酚组; (4C) 正常组。

图 4 各组大鼠 FG 阳性 RGCs 计数比较 ($\times 20$)

Note. (4A) Model control group; (4B) Propofol group; (4C) Normal group.

Fig. 4 The rats FG-positive RGCs count comparator



注: (5A) 正常组; (5B) 丙泊酚组; (5C) 模型对照组。

图 5 各组大鼠造模后 14 d 视网膜组织 ($\times 20$)

Note. (5A) Normal group; (5B) Propofol group; (5C) Model control group.

Fig. 5 Rats 14 d after modeling Retinal tissue

2.5 各组大鼠 F-VEP 检查结果

在造模后 14 d, 3 组各随机取大鼠 5 只, 进行 F-VEP 检查, 结果表明丙泊酚组大鼠 P1 波的波幅与模型对照组相比增大, 其潜伏期较模型对照组明显缩短。丙泊酚组与模型对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。即模型对照组大鼠的视觉诱发电位由视网膜传导枕部脑组织的时间较丙泊酚组长, 表明了丙泊酚组的传导通路较模型对照组畅通, 视神经损伤恢复较好 (见表 4)。

2.6 视网膜 HE 染色观察

正常组 (5A) 大鼠视网膜 HE 染色可见 3 层结构, 由图片下方向上依次是感光细胞层、双极细胞层及 RGC 层, 多层排列的是感光细胞层和双极细胞层, RGC 层的细胞则呈单层排列。造模后 14 d, 模型对照组 (5C) 的视网膜结构破坏严重, 视网膜的厚度明显变薄, 感光细胞的数量显著下降, 细胞的内外节几乎消失, 胞核大而浅染, 而 RGC 层细胞的胞核亦明显稀疏。丙泊酚组 (5B) RGC 胞体与正常组大小无明显区别, 但数目略少, 感光细胞的内外节存在, 外核层细胞有轻度的水肿与空泡变性, 其排列稍紊乱 (图 5)。

表 4 各组大鼠 P1 波波幅和潜伏期比较($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Tab. 4 Rats in each group P1 wave amplitude and latency comparison

组别 (Group)	潜伏期 (ms)	波幅 (μV)
模型对照组 (Model control group)	115.34 \pm 6.82 [#]	3.04 \pm 0.48 [#]
丙泊酚组 (Propofol group)	76.48 \pm 5.46 [*]	8.75 \pm 1.12 [*]
正常组 (Normal group)	64.26 \pm 2.53	14.30 \pm 2.36

注:与模型对照组相比, * $P < 0.05$;与正常组相比[#] $P < 0.05$ 。

Note. Compared with the model control group, * $P < 0.05$ compared with the normal group, [#] $P < 0.05$.

3 讨论

为了研究丙泊酚对大鼠视神经损伤的影响及相关机制,本文采用了国内外最常用的视神经夹挫伤模型,据目前研究表明该视神经夹挫伤模型较为精确,其具有可直视视神经的损伤部位,可控性较强。损伤的性质具体化且定量等优点,为相关丙泊酚干预大鼠视神经损伤的相关研究提供了可靠的动物实验模型,能充分的模拟并体现出临床丙泊酚干预对于视神经损伤作用的病理生理过程^[8-10]。因为在临床上各种原因所致的视神经损伤中,以外力及周围组织水肿压迫引起者较为常见,以间接损伤为主,多为视神经被急性挤压伤所致,根据以上情况,沽通常采用挤压、钳夹视神经等方法建立视神经损伤的动物模型^[10-11]。

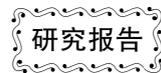
视神经损伤后导致继发性的视网膜细胞的缺血、缺氧,通过是视网膜细胞的 Caspase-3 表达升高, BCL-2 的表达降低导致了视神经及视网膜节细胞的继发性凋亡。相关实验研究表明,神经系统损伤后予以丙泊酚干预能够使是损伤后的 Caspase-3 表达受到抑制,促进损伤后 BCL-2 的表达,从而起到了抑制神经细胞凋亡的作用^[12-14],本研究同样表明了丙泊酚通过降低视网膜 Caspase-3 基因和蛋白的表达,促进 BCL-2 基因基因和蛋白的表达,对视神经损伤起到保护作用,减少了视网膜节细胞的凋亡。造模后 4 d 丙泊酚组细胞凋亡数均明显较模型对照组少 ($P < 0.05$),丙泊酚组大鼠闪光视觉诱发电位伏期较模型对照组大鼠短 ($P < 0.05$)、波幅明显高于模型对照组 ($P < 0.05$)。表明了视神经细胞凋亡减少的同时视觉功能得到了一定程度的恢复。同时丙泊酚已被证明具有抗氧化活性,它可能还可以通过以下途径起到视神经保护作用:降低代谢率、减少神经组织耗氧;抑制线粒体通透性转换孔,抗脂质过氧化反应;激活细胞外调节蛋白激酶转导的通路;抑制细胞钙超载及炎性细胞因子表达等。以上机制的研究有待将来相关实验进一步验证。

总之本研究对丙泊酚干预治疗大鼠视神经损

伤就细胞凋亡及 Caspase-3、BCL-2 等指标的的表达变化进行了研究,初步进行了有益的探讨,取得了一定的实验成果,具体更深入及详尽的研究有待进一步探讨。

参考文献:

- [1] 郭建,付研,丁宁,等. 机动车事故致间接性视神经损伤的临床研究[J]. 中华急诊医学杂志, 2014, 23(1): 84-88.
- [2] 尹丹萍,柳林. 视神经损伤后修复与再生的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2013, 13(6): 1152-1156.
- [3] 陈君,王国林. 丙泊酚预处理或后处理对缺氧鼠脑神经元保护效应的研究[J]. 中国麻醉与镇痛, 2004, 6(2): 109-112.
- [4] 李庆凯. 急性重型颅脑损伤术中丙泊酚静脉麻醉的脑保护作用分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2014, 2(14): 62-63.
- [5] 孙海燕,路红,赵平,等. 丙泊酚对急性高血压大鼠视神经保护作用研究[J]. 中国实用眼科杂志, 2014, 32(03): 379-382.
- [6] 杨明,朱彧. 丙泊酚对体外培养小鼠视网膜细胞抗氧化应激的作用[J]. 临床麻醉学杂志, 2013, 29(12): 1222-1225.
- [7] 刘晓坤,罗钢,赵平. 重组人促红细胞生成素对大鼠视神经挫伤后 GAP-43mRNA 影响[J]. 中国实用眼科杂志, 2014, 32(06): 789-792.
- [8] Yoles E, Muller S, Schwartz M. NMDA-receptor antagonist Protects neurons from secondary degeneration after Partial optic nerve crush[J]. J Neurotrauma, 1997, 14(9): 665-675.
- [9] 刘德林,吴小影,罗瑜琳,等. 不同剂量左旋多巴对形觉剥夺性弱视鼠闪光视觉诱发电位的影响[J]. 眼视光学杂志, 2009, 11(04): 246-253.
- [10] 刘晓坤,杨伊帆,卞晓芸,等. 大鼠视神经损伤后一氧化氮合酶的变化及牛磺酸的影响[J]. 中华眼外伤职业眼病杂志, 2013(11): 801-804.
- [11] 朱夏茹,陈晓明. 大鼠外伤性视神经损伤模型建立的研究进展[J]. 国际眼科杂志, 2014, 14(12): 2182-2184.
- [12] Vucetic M, lensen PK, Jansen EC, et al. Diameter variations of retinal blood vessels during and after treatment with Propofol[J]. Br J Ophthalmol, 2004, 88(6): 771-775.
- [13] 张蔚,于金国,王兴,等. 周围神经损伤神经脊细胞 Caspase-3 的表达与病理变化[J]. 中华眼科杂志, 2010, 46(12): 1084-1089.
- [14] 章静,吴香丽,刘丽霞,等. 银杏叶提取物对大鼠视神经损伤后 Bcl-2 和 Bax 表达的影响[J]. 河北医科大学学报, 2014, 35(03): 336-338.



地佐辛后处理对大鼠肠缺血再灌注致急性肺损伤的影响

李娟, 蔡垣星, 王彬*

(煤炭总医院麻醉科, 北京 100028)

【摘要】 **目的** 探讨地佐辛后处理对大鼠肠缺血再灌注所致急性肺损伤的影响以及可能的机制。**方法** 选取健康成年雄性SD大鼠32只,采用随机数字表法分为4组:CON组为假手术组;II/R组制备肠缺血再灌注模型;Dez组于缺血1h经股静脉注射地佐辛3mg 0.6mL,再灌注1h;5-HD组于缺血前30min腹腔注射5-羟基萘酸钠10mg/kg,随后制备肠缺血再灌注模型,后续处理同Dez组。再灌注1h即刻,取部分肠组织,观察肠粘膜形态并进行肠粘膜损伤评分;取左肺组织,观察肺组织形态并进行肺损伤评分;取右肺组织测定丙二醛MDA的含量、超氧化物歧化酶SOD活性及髓过氧化物酶MPO的活性,取动脉血检测血清中TNF- α 和IL-6的水平。**结果** 地佐辛后处理能减轻肠缺血再灌注引起的远隔脏器肺的损伤,降低肠粘膜损伤评分、肺损伤评分,使肺组织丙二醛MDA的含量降低,超氧化物歧化酶SOD活性上升,髓过氧化物酶MPO的活性下降,血清TNF- α 和IL-6的浓度明显下降。使用线粒体ATP敏感钾通道抑制剂5-羟基萘酸钠处理后可以减弱地佐辛对肺损伤的保护效应。**结论** 地佐辛后处理可改善大鼠肠缺血再灌注对远隔脏器肺的损害,激活线粒体ATP敏感钾通道可能是保护机制之一。

【关键词】 地佐辛;缺血再灌注;肠;急性肺损伤;线粒体ATP敏感钾通道;氧化应激

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0048-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.008

Effect of dezocine post conditioning on acute lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats

LI Juan, CAI Yuan-xing, WANG Bin*

(Department of Anesthesiology, China Meitan General Hospital, Beijing 100028, China)

【Abstract】 **Objective** To explore dezocine post conditioning on acute lung injury induced by intestinal ischemia and reperfusion induced in rats. **Methods** According to the random number seed, the healthy male SD rats were randomly divided into 4 groups: Rats in Control group (CON group) were subjected to separate the superior mesenteric artery without being obstructed. Rats in intestinal ischemia-reperfusion group (II/R group) were set intestinal ischemia-reperfusion model and administered saline 0.6 mL intravenously after occlusion. In dezocine post conditioning group (Dez group) rats were administered dezocine 0.6 mL 3 mg intravenously after occlusion. In 5-hydroxydecanoate sodium group (5-HD group) rats were administered 5-hydroxydecanoate sodium (10 mg/kg) by peritoneal injection 30min before occlusion then operated as group Dez. The animals were killed at 1 h of reperfusion with the intestinal tissue removed to calculate the index of quantitative assessment of intestinal mucous membrane injury. Tissues of left lung were obtained for observation of

[作者简介] 李娟(1985-)女,硕士研究生,研究方向:麻醉与循环。Email: huoniaolijuan@sina.com。

[通讯作者] 王彬(1978-)女,硕士研究生,研究方向:麻醉与免疫。Email: 13911836447@163.com。

histopathology with light microscope and the index of quantitative assessment of histologic lung injury was calculated. The concentrations of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) activation and myeloperoxidase level in each group were detected via tissues of left lung. The concentrations of TNF- α and IL-6 were also examined. **Results** Acute lung injury induced by intestinal ischemia and reperfusion induced in rats was improved by dezocine post conditioning. Chiu score, lung injury score, malondialdehyde (MDA) content, myeloperoxidase (MPO) level and the concentrations of TNF- α and IL-6 were descended while superoxide dismutase (SOD) activation was rised. The protective effects of dezocine post conditioning were attenuated by injecting 5-hydroxydecanoate sodium via peritoneal cavity which was a selective mitochondrial ATP-sensitive potassium channel antagonist. **Conclusions** Dezocine post-conditioning protects against lung injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in rats. One of the protective effects may be related to opening mitochondrial ATP-sensitive potassium channel.

【Key words】 Dezocine; Ischemic preconditioning; Intestines; Acute reperfusion injury; Mitochondrial ATP-sensitive potassium channel; Oxidative stress

前期实验研究证明^[1], 肠缺血再灌注确实可以导致远隔脏器肺的损伤。舒芬太尼预处理可减轻肺损伤, 并且 κ 受体参与了舒芬太尼预处理的保护作用。根据文献^[2] 报道, 远隔脏器肺损伤发生较早, 主要表现在肺微血管内皮细胞通透性增高以及肺泡巨噬细胞浸润这两方面。近年来地佐辛作为强效镇痛剂广泛应用于临床, 通过激动 κ 受体产生与吗啡相似的镇痛作用^[3]。临床试验证明, 通过激活 ATP 敏感钾通道抑制钙离子内流, 增强机体抗氧化能力抑制氧化应激反应, 预先给予地佐辛可对下肢缺血再灌注引起心肌损伤起到保护作用^[4]。动物实验研究也证实缺血后给予地佐辛可以减轻大鼠再灌注引起的脑组织损伤^[5]。而线粒体 ATP 敏感钾通道是组织缺血再灌注损伤保护效应中多种措施和药物作用的触发点。本研究皆在探讨地佐辛后处理能否对肠缺血再灌注模型所致的肺损伤的有影响作用, 以及线粒体 ATP 敏感钾通道是否为地佐辛的作用靶点。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要药品及试剂

地佐辛(批号: 14082041, 扬子江药业, 中国); 丙二醛 MDA、超氧化物歧化酶 SOD 及髓过氧化物酶 MPO 测定试剂盒(北京中杉金桥生物科技有限公司); 免疫组化试剂盒和酶联免疫吸附试剂盒(南京建成生物研究所); 5-羟基萘酸钠(上海组培贸易有限公司)。

1.1.2 实验动物

实验动物由山西医科大学动物实验中心【SCXK(晋)2015-0001】提供, 动物使用许可证: 【SYXK(晋)2015-0004】, 所有动物试验通过了煤

炭总医院伦理委员会的批准(批件号: K14-27)。选取 SPF 级雄性 SD 大鼠(42~49 日龄)32 只, 体重(220~240)g。术前禁食 8 h, 不禁水。参照文献^[6]提供的实验步骤制备 II/R 模型。20% 乌拉坦 0.5 mL/100g 腹腔注射麻醉大鼠, 规范消毒, 取腹正中切口, 待分离出肠系膜上动脉后用微创动脉夹夹闭, 关腹。缺血 1 h 后再次开腹, 松开动脉夹, 恢复血供 1 h。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组与处理

采用随机数字表法, 将 32 只大鼠随机分为: 对照组(CON 组)、肠缺血再灌注组(II/R 组)、地佐辛后处理组(Dez 组)、和 5-羟基萘酸钠组(5-HD 组), 共 4 组, 每组 8 只。CON 组分离出 SMA 不用动脉夹夹闭; II/R 组制备肠缺血再灌注模型, 缺血 1 h 经股静脉注射生理盐水 0.6 mL 后再灌注 1 h; Dez 组于缺血 1 h 经股静脉注射地佐辛 3 mg 0.6 mL, 再灌注 1 h; 5-HD 组于制备模型前 30 min 经腹腔注射 5-HD 10 mg/kg, 后续处理同 Dez 组。

1.2.2 肠黏膜损伤评分

再灌注 1 h 即刻处死大鼠, 取大鼠肠组织, 常规石蜡切片, HE 染色, 采取改良 Chiu 评分法^[7] 在光镜下观察组织形态学改变评价肠黏膜损伤程度。

1.2.3 肺组织损伤评分

取左肺组织, 切片, HE 染色, 光镜下每张切片分为 9 个视野, 随机选择 3 个视野, 按照文献^[8], 通过累加各指标相应分数计算肺组织学损伤评分。

1.2.4 肺组织丙二醛 malondialdehyde (MDA) 含量及超氧化物歧化酶 superoxide dismutase (SOD) 及髓过氧化物酶 myeloperoxidase (MPO) 活性的检测

取 100 mg 左肺组织制备匀浆, 严格按试剂盒(北京中杉金桥生物科技有限公司)说明书测定。

1.2.5 血浆肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 及白细胞介素-6 (interleukin-6) 水平的检测

处死前采集大鼠动脉血按照酶联免疫吸附法试剂盒(南京建成生物研究所)操作说明测定。

1.3 统计学处理

应用 SPSS16.0 进行数据分析,实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。方差齐性组间比较采用单因素方差分析;方差不齐进行 Kruskal-Wallis 秩和检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

与 CON 组比较, II/R 组、Dez 组、5-HD 组三组肠黏膜损伤评分、肺损伤评分明显升高 ($P < 0.05$); 与 II/R 组比较, Dez 组肠黏膜损伤评分、肺损伤评分降低, ($P < 0.05$); 与 Dez 组比较, 5-HD 组肠黏膜损伤评分、肺损伤评分升高 ($P < 0.05$), 但与 II/R 组比较, 肠黏膜损伤评分、肺损伤评分降低 ($P < 0.05$) (表 1 所示)。各组肠黏膜和肺组织光镜图片见图 1、图 2。

与 CON 组比较, II/R 组、Dez 组、5-HD 组三组肺组织 MDA 的含量升高, SOD 活性下降, MPO 的活性升高, 血清 TNF- α 和 IL-6 的浓度明显升高 ($P <$

0.05); 与 II/R 组比较, Dez 组肺组织 MDA 的含量降低, SOD 活性上升, MPO 的活性下降, 血清 TNF- α 和 IL-6 的浓度明显下降 ($P < 0.05$); 与 Dez 组比较, 5-HD 组肺组织 MDA 的含量升高, SOD 活性下降, MPO 的活性升高, 血清 TNF- α 和 IL-6 的浓度明显升高 ($P < 0.05$), 但与 II/R 组比较, 肺组织 MDA 的含量降低, SOD 活性下降, MPO 的活性下降, 血清 TNF- α 和 IL-6 的浓度下降 ($P < 0.05$) (表 2 所示)。

3 讨论

本研究以及前期研究^[1]均按照文献^[6]提供的步骤制备大鼠肠缺血再灌注的模型, 实验表明, II/R 组的肠黏膜损伤评分、肺损伤评分均较 CON 组增高, 提示肠缺血再灌注确实诱发了急性肺损伤。前期实验研究证明^[1], 舒芬太尼预处理可通过激动 μ 、 δ 和 κ 三种阿片受体来减轻大鼠肠缺血再灌注引起的急性肺损伤。本研究中使用的地佐辛是阿片受体部分激动拮抗剂, 既可以激动 κ 受体也是 μ 受体的拮抗剂, 其镇痛效果强成瘾性小, 广泛应用于术前、术中和术后的镇痛, 尤其是术后痛、内脏及癌性疼痛。

与 II/R 组比较, Dez 组肠黏膜损伤评分、肺损伤评分降低, 研究结果提示地佐辛后处理可以减轻大鼠肠缺血再灌注所致的急性肺损伤。Dez 组肺组

表 1 四组大鼠肠黏膜损伤评分、肺损伤评分比较

Tab.1 Chiu score and lung injure score of four groups

组别 group	CON 组 CON group	II/R 组 II/R group	Dez 组 Dez group	5-HD 组 5-HD group
肠黏膜损伤评分(分) Chiu score	0	8.16 \pm 1.31 ^a	2.93 \pm 1.06 ^b	5.81 \pm 1.07 ^{bc}
肺损伤评分(分) Lung injure score	1.2 \pm 0.3	17.2 \pm 0.4 ^a	10.4 \pm 0.3 ^b	12.5 \pm 0.4 ^{bc}

注: 与 CON 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 II/R 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 Dez 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

Note. ^a $P < 0.05$, compared with the group CON; ^b $P < 0.05$, compared with the group II/R; ^c $P < 0.05$, compared with the group Dez.

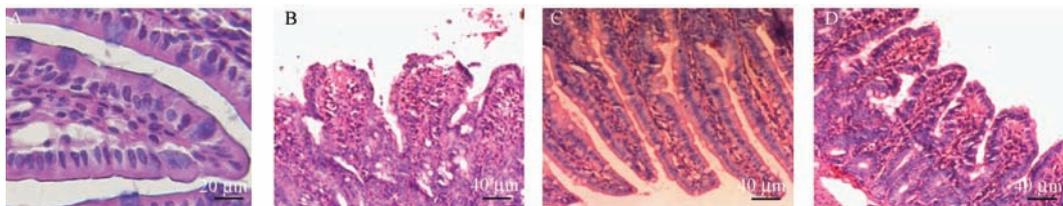
表 2 四组大鼠肺组织 MDA 含量、SOD 活性、MPO 活性、血清 TNF- α 和 IL-6 浓度的比较

Tab.2 Malondialdehyde (MDA) content, myeloperoxidase (MPO) level and the concentrations of TNF- α and IL-6 of four groups

组别 group	MDA ($\mu\text{mol/g}$)	SOD ($10^3 \mu\text{g}$)	MPO ($10^3 \mu\text{g}$)	TNF- α (ng/L)	IL-6 (ng/L)
CON 组 CON group	52.17 \pm 4.81	145.92 \pm 0.04	4.33 \pm 0.05	0.87 \pm 0.02	19.40 \pm 5.16
II/R 组 II/R group	73.65 \pm 3.21 ^a	75.13 \pm 0.38 ^a	11.09 \pm 0.27 ^a	2.13 \pm 0.19 ^a	63.23 \pm 4.31 ^a
Dez 组 Dez group	61.33 \pm 1.54 ^{ab}	99.80 \pm 0.16 ^{ab}	6.97 \pm 0.39 ^{ab}	1.15 \pm 0.06 ^{ab}	25.6 \pm 3.81 ^{ab}
5-HD 组 5-HD group	70.26 \pm 1.80 ^{abc}	62.43 \pm 0.90 ^{abc}	9.01 \pm 0.75 ^{abc}	1.94 \pm 0.22 ^{abc}	32.4 \pm 4.79 ^{abc}

注: 与 CON 组比较, ^a $P < 0.05$; 与 II/R 组比较, ^b $P < 0.05$; 与 Dez 组比较, ^c $P < 0.05$ 。

Note. ^a $P < 0.05$, compared with the group CON; ^b $P < 0.05$, compared with the group II/R; ^c $P < 0.05$, compared with the group Dez.

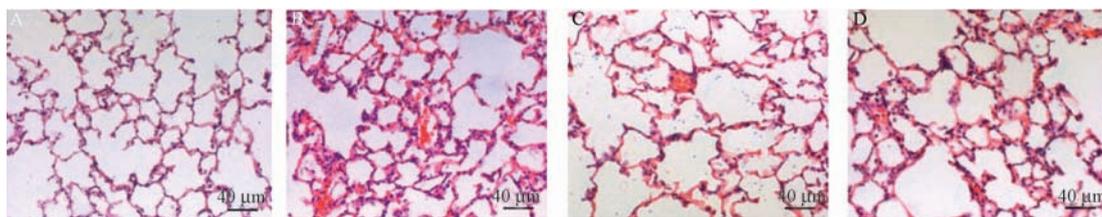


注:A 为 CON 组; B 为 II/R 组; C 为 Dez 组, 肠 HE; D 为 5-HD 组
(A: ×40, bar = 20 μm; B、C、D: ×20, bar = 40 μm)。

图 1 各组大鼠肠黏膜组织病理变化情况

Note. (A) CON group; (B) II/R group; (C) Dez group; (D) 5-HD group.

Fig. 1 Pathological changes of the intestinal tissue in four groups



注:A 为 CON 组; B 为 II/R 组; C 为 Dez 组; D 为 5-HD 组。

图 2 各组大鼠肺组织病理变化情况(×20, bar = 40 μm)

Note. (A) CON group; (B) II/R group; (C) Dez group; (D) 5-HD group.

Fig. 2 Pathological changes of the lung tissue in four groups

织 MDA 的含量降低, SOD 活性上升, MPO 的活性下降, 血清 TNF- α 和 IL-6 的浓度明显下降, 提示地佐辛后处理的保护机制可能是通过减少氧自由基生成、抑制炎性介质的释放和减少中性粒细胞的聚集发挥作用。与 Dez 组比较, 给予线粒体 ATP 敏感钾通道抑制剂 5-羟基癸酸钠后, 地佐辛后处理的保护作用减弱, 提示地佐辛后处理的保护作用与激活线粒体 ATP 敏感钾通道有关。实验表明 5-羟基癸酸钠并没有完全逆转只是减弱了地佐辛后处理的保护作用, 提示激活线粒体 ATP 敏感钾通道只是地佐辛作用机制之一。

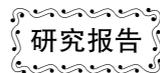
综上所述, 缺血后静脉给予地佐辛对大鼠肠缺血再灌注引起急性肺损伤有保护效应, 线粒体 ATP 敏感性钾通道可能是其作用位点之一。

参考文献:

[1] 李娟, 曹定睿, 张劲, 等. 舒芬太尼预处理对大鼠肠缺血再灌注致急性肺损伤的影响及阿片受体在其中的作用[J]. 中华麻醉学杂志, 2012, 32(2): 235 - 236
[2] Moraes L B, Mu rakami A H, Fontes B, *et al.* Gut ischemia /

reperfusion induced acute lung injury is an alveolar macrophage dependent event[J]. *Trauma*, 2008, 64 (5) : 1196 - 1200
[3] 张涛, 艾玲, 刘志恒, 等. 地佐辛静脉镇痛对肺叶切除术后 CD4⁺ 和 CD8⁺ T 淋巴细胞的影响[J]. 中国医师进修杂志, 2015, 8: 562 - 563
[4] 王贤东, 刘若兵, 康宏霞. 地佐辛与给药对下肢缺血再灌注诱发心肌损伤的保护作用[J]. 甘肃医药, 2014, 33 (9) : 651 - 653
[5] 孙岳枫, 李波, 吕国义. 地佐辛后处理对大鼠局灶性脑缺血再灌注损伤的影响[J]. 中风与神经疾病杂志, 2015, 2(32): 133 - 134
[6] Koike K, Moore FA, Moore EE, *et al.* Endotoxin after gut ischemia/reperfusion causes irreversible lung injury [J]. *Surg Res*, 1992, 52: 656 - 662.
[7] Liu KX, Rinne T, He W, *et al.* Propofol attenuates intestinal mucosa injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in the rat [J]. *Can Anesth*, 2007, 54, 366 - 374.
[8] Pirat A, Zeyneloglu P, Aldemir D, *et al.* Pretreatment with simvastatin reduces lung injury related to intestinal ischemia-reperfusion in rats [J]. *Anesth Analg*, 2006, 102: 225 - 232.

[修回日期] 2016-01-06



MicroRNA-137 与 Ang II 在自发性高血压大鼠心脏重构中的作用

侯永兰*, 李石林, 刘玲玲

(河南省新乡市中心医院心内一科, 河南 新乡 453000)

【摘要】 目的 探讨微小核糖核酸 195 (MicroRNA-137, miRNA-137)、TGF- β 1/Smads 信号转导通路及血管紧张素 II (Ang II) 在自发性高血压大鼠 (SHR) 心脏重构中的作用。**方法** 取雄性 SHR 大鼠 16 只, 随机分为 SHR 干预组 (卡托普利 10 mg/kg·d) 和 SHR 对照组 (蒸馏水) 各 8 只, 另取 Wistar 大鼠 8 只为正常对照组, 分别给予 SHR 大鼠卡托普利 10 mg/kg·d 和蒸馏水灌服, 共持续 8 周。造模前后测大鼠尾动脉血压, 8 周后股动脉放血处死大鼠, HE 染色观察大鼠心脏形态学改变, 实时荧光定量多聚酶链式反应 (qRT-PCR) 法检测大鼠心脏中 miRNA-137 的表达, Western-blot 检测转化生长因子 β 1 (transforming growth factor beta1, TGF- β 1)、血管紧张素 II (Ang II)、Smad 蛋白 3 (small mother against decapen-taplegic protein three, Smad3)、I 型胶原 (Col-I) 和 III 型胶原 (Col-III) 蛋白表达水平。**结果** SHR 大鼠心脏 miRNA-137、Ang II、TGF- β 1、Smad3、Col-I 及 Col-III 的表达量均高于 Wistar 大鼠 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), SHR 干预组大鼠心肌细胞较 SHR 对照组明显变小, 细胞排列较其紧密有序, miRNA-137、Ang II、TGF- β 1、Smad3、Col-I 及 Col-III 表达量均明显降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。**结论** miRNA-137 可能通过上调 Ang II 及 TGF- β 1/Smads 信号转导通路促进 SHR 心脏重构; 卡托普利干预可抑制 miRNA-137 表达。

【关键词】 心脏重构; miRNA-137; 自发性高血压大鼠; TGF- β 1/Smads 信号通路

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0052-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.009

Effects of MicroRNA-137 and Ang II on cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats

HOU Yong-lan*, LI Shi-lin, LIU Ling-ling

(Department of Cardiology, Xinxiang Central Hospital, Xinxiang 453000, China)

【Abstract】 Objective To investigate the role of small RNA 195 (MicroRNA-137), TGF- β 1/Smads signal transduction pathway and angiotensin II (Ang II) in cardiac remodeling in spontaneously hypertensive rats (SHR). **Methods** 16 SHR male rats were randomly divided into intervention group SHR (captopril 10 mg/kg·d) and SHR control group (distilled water), the other 8 Wistar rats were normal control group, rats were given captopril 10 mg/kg·d or distilled water for 8 weeks. Caudal arterial pressure was measured before and after the intervention, intervention after 8 weeks rats were killed by exsanguination, HE staining was used to observe the morphological changes of rat heart, qRT-PCR method was used to detect the expression of miRNA-137 in rat heart, Western-blot detection of TGF- β 1 and Ang II,

【通讯作者】侯永兰(1980-)女, 硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 高血压, 冠心病, 心力衰竭的药物治疗, 心律失常的介入治疗等。E-mail: houyonglan62@163.com。

Smad 3, Col- I and Col- III protein. **Results** Compared to the normal control groups, the miRNA-137, Ang II, TGF- β 1, Smad3, Col- I and Col- III were higher expressed in SHR treatment group and SHR control groups ($P < 0.01$ or $P < 0.05$); Compared to the SHR control group, the cardiomyocyte of SB group becomes smaller and arranged more closely and orderly, the miRNA-137, Ang II, TGF- β 1, Smad3, Col- I and Col- III were significantly lower expressed ($P < 0.01$ or $P < 0.05$).

Conclusions MiRNA-137 may promote SHR cardiac remodeling by up regulation of Ang II and TGF- β 1/Smads signaling pathway; the captopril intervention can inhibit miRNA-137 expression.

【Key words】 Heart Remodeling; miRNA-137; SHR; TGF- β 1/Smads signaling pathway

高血压等疾病是心内科最为常见的疾病,长期的高血压,心肌缺血会引起动脉硬化和心肌纤维化,对心肌功能影响甚大^[1-2]。近年来发现,微小核糖核酸(microRNA)通过对基因转录后调控而介导了一系列的基因表达调控方式。已有研究证实 miRNA 参与动脉硬化和心肌纤维化等一系列病理过程^[3-4]。miRNA-137 为 microRNA 重要成员之一,近年来,多种研究提示其与心肌重构关系密切,可能成为高血压、缺血性心脏病等疾病的一个新的治疗靶点^[5]。目前对于 miRNA-137 在心血管重构中的作用及机制尚未完全清。MicroRNA-137 在 SHR 大鼠心脏重构中的作用及其机制,及卡托普利干预对自发性高血压大鼠(spontaneously hypertensive rats, SHR)大鼠心脏形态结构及表达心血管重构相关因子的影响。现报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

8 周龄雄性 SHR 16 只和 Wistar 大鼠 8 只,均购自上海交通大学医学院实验动物中心[SCXK(沪)2013-0013],体重(215~245)g,所有大鼠均在新乡市中心医院动物实验室[SYXK(豫)2011-0076]的清洁环境下饲养观察,室温 20℃~24℃,普通饲料适应性喂养 1 周后使用。按实验动物使用的“3R”原则给人以人道主义关怀。

1.2 主要试剂及仪器

Trizol 和 Lipofectamine2000 转染试剂(Invitrogen 公司);10 × Annealing Buffer、蛋白裂解液和 SDS-PAGE 凝胶配置试剂盒购(上海碧云天生物技术公司);ABI-7500 型实时定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);PVDF 膜和蛋白发光液(美国 Millipore 公司);miR-137 inhibitor 和其对照剂(上海 GenePharma 有限公司);DMEM 培养基和胎牛血清(美国 Hyclone 公司);TGF- β 1 一抗、Angiotensin II 一抗、Smad3 一抗、Collagen I 一抗、Collagen III 一抗、二抗(美国 Assay Biotechnology 公司);ALC-NIBP 型无创大鼠血

压心率测定仪(上海奥尔科特生物科技有限公司);卡托普利片(中美上海施贵宝制药有限公司,国药准字 H20084569);ZH06-T16 型大鼠灌胃针(中西集团);RM2155 型超薄石蜡切片机(德国 LEICA 公司);Allegra™ 64R 台式低温高速离心机(德国 Beckman 公司);Image Pro plus 病理图像分析软件(美国 Media Cybernetics 公司)。

1.3 动物分组

雄性 SHR 大鼠 16 只,随机分为 SHR 干预组(卡托普利 10 mg/kg·d)和 SHR 对照组(蒸馏水)各 8 只,另取 Wistar 大鼠 8 只为正常对照组,分别给予 SHR 大鼠卡托普利(中美上海施贵宝制药有限公司)10 mg/kg·d 和蒸馏水灌服,共持续 8 周。

1.4 实验方法

1.4.1 血压测定及心脏样本获得

各组大鼠于干预前及干预 8 周后处死前测量鼠尾动脉血压,采用无创大鼠血压心率测定仪(ALC-NIBP,上海奥尔科特生物科技有限公司)按照仪器说明书的要求测定大鼠安静清醒状态下鼠尾动脉收缩压与舒张压(mmHg)。大鼠处死后立即取出心脏,分离室间隔和左心室游离壁,剪成小块,取部分左心室游离壁,常规脱水,石蜡包埋,HE 染色,待病理学检测。其余组织在 -80℃ 冰箱冷冻保存。

1.4.2 Western-Blot 检测 TGF- β 1、Ang II、Smad3、Col- I、Col- III 蛋白表达水平

提取大鼠心脏组织的总蛋白,根据测定的蛋白浓度算出上样蛋白量,保证各组总蛋白量一致,在 100℃ 加热 10 min 以使蛋白质变性。电泳,将蛋白转移至 PVDF 膜,5% 的脱脂奶粉封闭 2 h,加入 TGF- β 1、Ang II、Smad3、Col- I、Col- III 等一抗,4℃ 孵育过夜,选择 TGF- β 1、Ang II、Smad3、Col- I、Col- III 等酶标二抗和稀释浓度,孵育 1 h,洗膜后化学发光,得到胶片,拍照,阳性条带以 Gel-pro4.0 软件分析显影条带。

1.4.3 Real-time PCR 检测 miRNA-137 表达水平

根据其 mRNA 序列,设计引物。miRNA-137 引

物:上游:5' -AAT CAC ACT ACA ATC GGG CTC-3';
下游:5' -CAT CTT CCT CCT TTC TCG ATT-3';产物
长度:256 bp。扩增产物 2% , 琼脂糖凝胶电泳,凝
胶分析系统测定各条带积分光密度值。采用 2 -
 $\Delta\Delta C_t$ 方法对实时定量 PCR 结果进行分析,显示
miRNA-137 RNA 的表达。

1.5 统计学方法

使用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析,实验
数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,组间均数显著
性检验用多个样本均数比较的方差分析及 LSD-t 检

验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 干预前组间大鼠尾动脉血压比较

干预前,与 SHR 对照组比较,SHR 干预组大鼠
尾动脉收缩压及舒张压差别无统计学意义 ($P >$
0.05)。干预 8 周后,与 SHR 对照组相比,SHR 干
预组大鼠尾动脉的收缩压与舒张压降低更明显 ($P <$
0.05),两组与正常组相比,差异有统计学意义 ($P <$
0.01,表 1)。

表 1 卡托普利干预前后组间大鼠尾动脉血压比较 ($\bar{x} \pm s$, mmHg)

Tab. 1 Comparison of the blood pressure of the tail artery between the two groups before and after the intervention of captopril

分组 Group	干预前收缩压 Systolic blood pressure before intervention	干预前舒张压 Diastolic blood pressure before intervention	干预后收缩压 Systolic blood pressure after intervention	干预后舒张压 Diastolic blood pressure after intervention
正常对照组 Normal control group	135.7 \pm 8.2	82.6 \pm 6.5	133.7 \pm 6.2	84.2 \pm 4.1
SHR 对照组 SHR control group	214.7 \pm 8.6 ^a	156.7 \pm 6.6 ^b	215.3 \pm 8.6 ^b	157.2 \pm 9.2 ^b
SHR 干预组 SHR intervention group	214.2 \pm 7.9 ^a	156.7 \pm 6.4 ^b	148.3 \pm 6.9 ^{ac}	120.5 \pm 5.7 ^{bc}

注:a 为 $P < 0.05$, b 为 $P < 0.01$, 与正常对照组比较;c 为 $P < 0.01$, 与 SHR 对照组比较。

Note. a: $P < 0.05$, b: $P < 0.01$, compared with the normal control group; c: $P < 0.01$, compared with the SHR control group.

2.2 大鼠心脏形态结构比较

SHR 对照组大鼠心肌细胞数量减少,排列疏
松、紊乱,细胞肥大,胞核变圆畸形,SHR 干预组大
鼠心肌细胞体积变小,数量增加,细胞排列较紧密
有序,而正常对照组大鼠心肌细胞形态正常,排列
紧密有序,细胞核无畸形(图 1)。

2.3 心脏 miRNA-137 表达比较

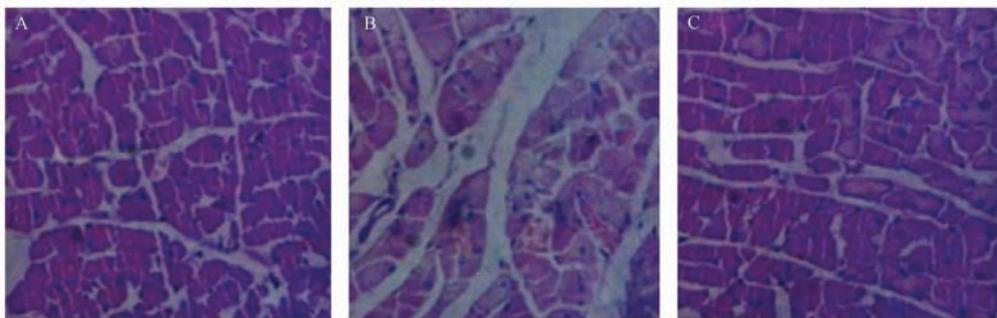
和 SHR 对照组相比,SHR 干预组大鼠心脏表达
miRNA-137 升高幅度较低 ($P < 0.01$,见图 2),两组
miRNA-137 表达都较正常对照组升高 ($P < 0.01$)。

2.4 Ang II 蛋白表达比较

和 SHR 对照组相比,SHR 干预组大鼠心脏表达
Ang II 蛋白表达升高幅度较低,两组 Ang II 蛋白表达
都较正常对照组升高 ($P < 0.01$,图 3)。

2.5 TGF- β 1/Smad3 蛋白表达比较

和 SHR 对照组相比,SHR 干预组大鼠心脏表达
TGF- β 1/Smad3 蛋白和 Col- I / Col- III 蛋白表达升
高幅度较低,两组 TGF- β 1/Smad3 蛋白和 Col- I /
Col- III 蛋白表达都较正常对照组升高 ($P < 0.01$,
图 4)。

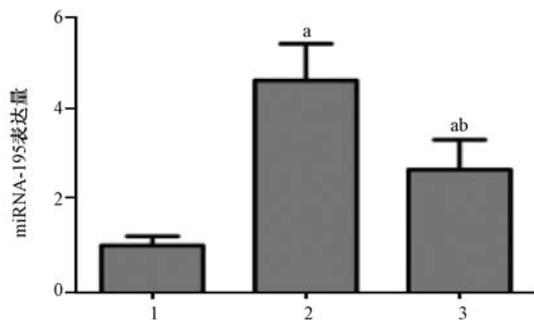


注:(A)正常对照组;(B)为 SHR 对照组;(C)为 SHR 干预组。

图 1 各组心脏组织形态学比较 ($\times 40$)

Note. (A) normal control group; (B) SHR control group; (C) SHR intervention group.

Fig. 1 Comparison of cardiac tissue morphology

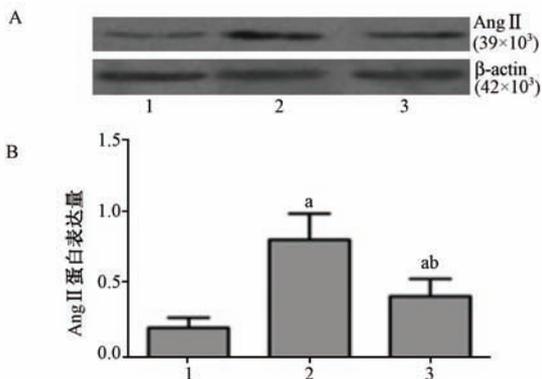


注: (1) 正常对照组; (2) SHR 对照组; (3) SHR 干预组。
a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较;
b: $P < 0.01$, 与 SHR 对照组比较。

图 2 干预后组间大鼠心脏 miRNA-137 表达量

Note. (1) normal control group; (2) SHR control group; (3) SHR intervention group. a: $P < 0.01$, compared with the normal control group; b: $P < 0.01$, compared with the SHR control group.

Fig. 2 miRNA-137 expression levels of cardiac in the rats after intervention



注: (A) Western-blot 检测 Ang II 蛋白表达情况;
(B) 干预后组间大鼠心脏 Ang II 蛋白表达分析图。
(1) 正常对照组, (2) SHR 对照组, (3) SHR 干预组。
a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较;
b: $P < 0.01$, 与 SHR 对照组比较。

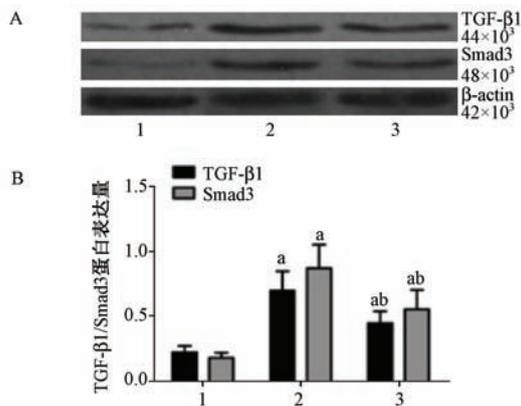
图 3 干预后组间大鼠心脏 Ang II 蛋白表达量

Note. (A) The expression of proteins Ang II determined by Western-blot analysis; (B) Ang II protein expression levels of Expression analysis. (1) normal control group; (2) SHR control group; (3) SHR intervention group. a: $P < 0.01$, compared with the normal control group; b: $P < 0.01$, compared with the SHR control group.

Fig. 3 Ang II protein expression profiles levels of cardiac in the rats after intervention

3 讨论

高血压是冠心病的主要危险因素之一 长期的高血压, 心肌缺血会引起动脉硬化和心肌纤维化,



注: (A) Western-blot 检测 TGF- β 1/Smad3

蛋白表达情况; (B) 干预后组间大鼠心脏 TGF- β 1/Smad3 蛋白分析图。 (1) 正常对照组, (2) SHR 对照组, (3) SHR 干预组。
a: $P < 0.01$, 与正常对照组比较;
b: $P < 0.05$, 与 SHR 对照组比较。

图 4 干预后组间大鼠心脏 TGF- β 1/Smad3 蛋白表达量。

Note: (A) The expression of proteins TGF- β 1/Smad3 determined by Western-blot analysis; (B) ATGF- β 1/Smad3 protein expression levels of Expression analysis. (1) normal control group; (2) SHR control group; (3) SHR intervention group. a: $P < 0.01$, compared with the normal control group; b: $P < 0.01$, compared with the SHR control group.

Fig. 4 TGF- β 1/Smad3 protein expression levels of cardiac in the rats after intervention

严重的影响了患者的生活质量^[6]。miRNA 为非编码 RNA, 通过调节相关基因的表达, 参与体内一系列生理病理过程^[7]。已有研究证明, miRNA 与心肌细胞的增殖分化密切相关^[8]。近年来, miRNA 在心肌缺血和心肌重构发生中的作用引起高度重视。

Liu 等^[9] 科学家研究结果表明, miR-195 与甲基化的 CpG 结合蛋白-1 结合, 负反馈调节心肌细胞的纤维化过程。此外, Zhao 等^[10] 研究者报道 miR-9 亦能影响心肌细胞的增殖与分化, 其作用靶点与 TLX 密切相关。研究新发现 miR-97a 通过 TLX 和周期蛋白 D1 调控心肌细胞增殖和分化^[11]。然而, miRNA 在心肌重构中的调节作用有待进一步研究。本实验的设计是为了探讨 miRNA-137 在心肌重构中的影响, 使之成为高血压、缺血性心脏病等疾病的一个新的治疗靶点。

RAAS 在高血压致心肌纤维化的发病机制中倍受关注。研究显示, TGF- β 是重要的致纤维化的细胞因子, 其中 TGF- β 1 是作用最强的一种^[12]。研究显示, TGF- β 1 在体内可明显减轻全身及局部炎症反应。其表达上调可促进心肌重构。血管紧张素 II (Ang II) 是生物活性最强的效应肽, Ang II 发挥作用

的一个重要途径就是通过调节 TGF- β 1 的表达^[13]。Ang II 通过激活细胞内的 MAPK 家族而引起 TGF- β 1 等细胞因子分泌和细胞外基质(如 Col- I 和 Col-III)的表达增加^[14]。本研究发现,卡托普利能有效减轻心室肥大,抑制成纤维细胞增殖及细胞外基质分泌增加,降低血压,逆转高血压所致的心血管重构。在本研究中,造模成功后的 SHR 干预组,其血压明显降低,HE 染色可见其心肌细胞数量增加,细胞体积变小,细胞排列较有序,证实卡托普利干预可以逆转高血压所致的心脏结构重构。

本研究结果显示,SHR 在未进行干预的情况下,其收缩压和舒张压显著升高,心肌细胞数量减少,排列紊乱,细胞肥大,胞核变圆畸形,证实 SHR 心脏存在典型的高血压心脏重构的特征性改变。在本研究中,SHR 对照组表达 Col- I /Col-III 等蛋白表达均升高,与正常对照组大鼠相比,差异具有统计学意义。说明 Ang II、TGF- β 1、Smad3 在 Col- I 和 Col-III 表达中起着正性的调节作用。与 Duisters 等^[14]研究结果相类似。

此外,本研究中未用药物干预的 SHR 大鼠心脏表达 miRNA-137 也显著升高,并且达到了血压正常的正常对照组大鼠心脏表达量的 4 倍以上,并显示出与 Ang II、TGF- β 1、Smad3、Col- I 和 Col-III 蛋白表达同向性的特征,且 Kawano^[15]的研究显示,特异高表达心脏 miRNA-137 可诱发心肌细胞肥大,结合 SHR 大鼠与人类同样的高血压发生机制,我们可以推测在高血压状态下,由于肾素-血管紧张素-醛固酮系统的激活,激活一系列细胞因子,通过 TGF- β 1/Smad 通路转导,使细胞外基质 Col- I 和 Col-III 大量增生和过度积聚,最终造成心肌顺应性下降,发生病理性重构^[6]。

综上所述,本研究提示,卡托普利通过抑制 miRNA-137 的表达而下调了 TGF- β 1/Smad 通路的转导,最终抑制了 Col- I 和 Col-III 蛋白的表达,进而抑制了成纤维细胞增殖,抑制了 SHR 大鼠的心脏重构。本研究将对高血压引起的心脏重构的发生机制和治疗策略上提供新的研究方向,为 miRNA-137 作为心脏重构的治疗靶点提供实验基础和理论依据,具有重要的临床意义^[17-18]。

参考文献:

[1] Latronico MV, Condorelli G. microRNAs in hypertrophy and heart failure[J]. *Exp Biol Med* (Maywood),2011,236(2):125-131.

[2] Bauersachs J. Regulation of myocardial fibrosis by microRNAs [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*,2010,56 (5):454-459.

[3] Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs; are the answers in sight? [J]. *Nat Rev Genet*,2008,9(2):102-114.

[4] Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs[J]. *J Cell Physiol*,2010,222(3):540-545.

[5] Van RE, Olson EN. Searching for miRNAs in cardiac fibrosis [J]. *Circ Res*,2009,104(2):138-140.

[6] 魏聪,胡兵,申愕. MicroRNAs 在心脏发育和疾病中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*,2011,27(3):611-615.

[7] Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. Transforming growth factor (TGF) - β signaling in cardiac remodeling [J]. *J Mol Cell Cardiol*,2011,51(4):600-606.

[8] Creemers EE, Pinto YM. Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart [J]. *Cardiovasc Res*,2011,89(2):265-272.

[9] Liu, Z. Q. Teng, A. L. McQuate, et al. An epigenetic feedback regulatory loop involving microRNA-195 and MBD1 governs neural stem cell differentiation [J]. *PLoS One*, 2013, 22 (8): e51436.

[10] C. Zhao, G. Sun, S. Li, et al. A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination [J]. *Nat Struct Mol Biol*, 2009,16(5)365-371.

[11] C. Zhao, G. Sun, S. Li, et al. MicroRNA let-7b regulates neural stem cell proliferation and differentiation by targeting nuclear receptor TLX signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2010, 107 (5) 1876-1881.

[12] Shan H, Zhang Y, Lu Y, et al. Downregulation of miR-133 and miR-590 contributes to nicotine-induced atrial remodeling in canines [J]. *Cardiovasc Res*,2009,83(3):465-472.

[13] Small EM, Thatcher JE, Sutherland LB, et al. Myocardial-related transcription factor-a controls myofibroblast activation and fibrosis in response to myocardial infarction [J]. *Circ Res*,2010,107 (2):294-304.

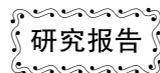
[14] Duisters RF, Tijssen AJ, Schroen B, et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling [J]. *Circ Res*, 2009,104(2):170-178.

[15] Kawano H, Do YS, Kawano Y, et al. Angiotensin II has multiplexed effects in human cardiac fibroblasts [J]. *Circulation*,2000,10 (1): 1130-1137.

[16] Castro-Chaves P, Cerqueira R, Pinalhao M, et al. New pathways of the renin-angiotensin system: the role of ACE2 in cardiovascular pathophysiology and therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*,2010,14 (5): 485-496.

[17] 张振辉,黎佼,刘本荣,等. 过表达 miR-29a 对大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. *中国动脉硬化杂志*,2012,20 (12):1079-1082.

[18] 陆细红,邓敏,贺洪辉,等. miR-125b 通过靶向抑制 Smad4 调控骨髓间充质干细胞成骨分化 [J]. *中南大学学报(医学版)*,2013,38(4):341-346.



miR-126 对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡的影响

高威, 钟锋*

(华中科技大学同济医学院附属普爱医院心胸外科, 武汉 430030)

【摘要】 目的 探讨 miR-126 对急性心肌梗死(AMI)大鼠心肌细胞凋亡的影响。方法 通过冠状动脉左前降支结扎大鼠建立 AMI 模型,随机分为 AMI 组、miR-126 mimics negative control (NC)组及 miR-126 组,其中 NC 组及 miR-126 组分别采用心肌组织局部注射慢病毒转染 miR-126 mimics NC 及 miR-126 mimics,另外假手术组采用冠状动脉左前降支穿线不结扎。记录大鼠心脏功能,TCC 法及原位末端凋亡法(TUNEL)检测心肌凋亡指数及梗死面积,比色法检测天冬氨酸蛋白水解酶(Caspase 3)及 Caspase 8 活性,Western-blot 法检测 Bax 及 Bcl-2 表达,同时 RT-PCR 法检测 Fas 及 Fas-L mRNA 表达。**结果** 与假手术组比较,AMI 组及 NC 组左室射血分数(LVEF)及左室长轴缩短分数(FS)升高,左室舒张末期内径(LVDd)及左室收缩末期内径(LVDs)降低,心肌凋亡指数提高,心肌梗死面积增大,Caspase 3 及 Caspase 8 活性上升,Bax 蛋白表达量上调,Bcl-2 蛋白表达量下调,Fas 及 Fas-L mRNA 水平上升,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与 AMI 组及 NC 组比较,miR-126 组能扭转此变化,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。**结论** miR-126 能显著抑制 AMI 大鼠心肌细胞凋亡,与调节细胞凋亡相关蛋白表达有关。

【关键词】 miR-126;急性心肌梗死(AMI);细胞凋亡

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0057-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.010

Effect of miR-126 on apoptosis of myocardial cells in rats with acute myocardial infarction

GAO Wei, ZHONG Feng*

(Department of Cardiothoracic Surgery, Puai Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China)

【Abstract】 Objective To explore effect of miR-126 on apoptosis of myocardial cells in rats with acute myocardial infarction (AMI). **Methods** AMI model was established by ligation of left anterior descending branch of coronary artery. The survivors were randomly divided into 3 groups: AMI group, NC group and miR-126 group. the NC group and miR-126 group were injection of lentiviral transfection of miR-126 mimics NC and miR-126 mimics. The sham operation group was left anterior descending coronary artery without ligation. The rats' cardiac function was recorded. Apoptosis index and infarct size of myocardium was detected by TCC method and in situ end method (TUNEL), respectively. The activity of cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (Caspase 3) and Caspase 8 were determined by colorimetry. The expression of Bcl-2, Bax was assayed by Western-blot. The expression of Fas and Fas-L mRNA was detected by RT-PCR. **Results** Compared with sham operation group, left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular long axis shortening fraction (FS) was increased, left ventricular end diastolic diameter (LVDd) and left ventricular end systolic diameter (LVDs) was decreased, apoptosis index was increased, myocardial infarction area increased, the activity of Caspase 3 and

[作者简介] 高威(1981-)男,硕士生,住院医师,研究方向:心胸外科疾病的基础与临床。E-mail: gw_0504@163.com。

[通讯作者] 钟锋(1968-)男,本科,副主任医师,研究方向:心胸外科疾病的基础研究及外科治疗。E-mail: zhongfeng871586@163.com。

Caspase 8 was increased, the expression of Bax protein was upregulated, the expression of Bcl-2 protein was downregulated, the expression of Fas and Fas-L mRNA was increased in AMI and NC group, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). Compared with AMI and NC group, miR-126 could reverse the change, the difference was statistically significant ($P < 0.01$). **Conclusions** miR-126 could inhibit apoptosis of myocardial cells in rats with AMI, which related to regulation of expression of cell apoptotic related protein.

[Key words] MiR-126; Acute myocardial infarction (AMI); Cell apoptosis

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是临床常见冠心病的一种, 主要表现为心肌极度缺血, 使得急性血栓从而导致了血管闭塞。近年来其发病率显著上升, 目前因 AMI 死亡人数占全球死于心血管疾病中人数的一半, 是危害人类死亡的头号杀手^[1]。AMI 起病急骤, 病情变化迅速, 在大多数老年人中心肌梗死容易导致心肌重构, 最终导致心力衰竭。目前研究显示, 在心肌梗死早期, 心肌细胞凋亡在心梗后所引起的心室重构及心力衰竭中起重要作用, 通过阻断 AMI 心肌梗死对于抑制心梗后心肌损伤具有重要意义^[2-4]。miRNAs 是一类进化上高度保守的非编码小分子 RNA, 以往对其研究主要集中于机体发育的调控及肿瘤形成中, 近些年研究陆续发现有数十种 miRNA 能特异性表达于心肌细胞, 并与心肌肥大, 心肌重塑, 心力衰竭, 心肌缺血再灌注, 心肌梗死等心血管疾病过程密切相关^[5-6]。如 Fichtlscherer 等^[7]发现 AMI 患者心肌来源 miRNAs 中包括 miR-126 表达量下调, 此观点也陆续被 Long 等^[8], Hsu 等^[9]证实。上述报道说明 miR-126 在 AMI 患者中低表达, 并与 AMI 的发生发展密切相关。此外研究也表明 miR-126 是一种内皮特异性 miRNA, 在内皮细胞中表达丰富, 同时过表达的 miR-126 对于 AMI 动物的血管再生具有显著促进作用, 从而修复心肌梗死损伤^[10-11]。而过表达 miR-126 是否可以通过抑制心肌细胞凋亡从而抑制心肌细胞凋亡尚未见报道, 因而本实验通过构建 AMI 大鼠心肌模型, 并通过慢病毒转染局部心肌组织注射 miR-126, 从而探讨 miR-126 过表达对于 AMI 大鼠心肌细胞凋亡的作用及相关机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD 清洁级雄性大鼠 52 只, 2 月龄, 体重 (180 ~ 220) g, 购于上海斯莱克实验动物有限责任公司 [SCXK(沪)2012-0002]。所有大鼠均在华中科技大学同济医学院 [SYXK(鄂)2013-0044] 的清洁环境下饲养观察, 室内温度控制在 (21 ~ 25) °C, 大鼠

自由饮食和饮水。并按实验动物 3R 原则给予人道的关怀。

1.2 试剂及仪器

兔抗 Bax 及 Bcl-2 单克隆抗体购自美国 Eptimics 公司; Caspase 3、Caspase 8 活性检测试剂盒, BCA 试剂盒购, 小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体自碧云天生物技术有限公司; TUNEL 检测试剂盒购自武汉博士德生物技术有限公司; miR-126 mimics 及 miR-126 mimics negative control (NC) 由广州市锐博生物科技有限公司订购合成。迷你双垂直电泳仪, 迷你转印电泳仪, ChemiDoc™ XRS 凝胶成像系统购自美国 Bio-Rad 公司; PHILIPS ATL-HDI5000 多普勒心脏彩超仪购自美国 ATL 公司; Tecan Infinite F200/M200 型多功能酶标仪购自瑞士 TECAN 集团公司。

1.3 AMI 模型建立与分组给药^[3, 12]

40 只大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛麻醉, 剔除大鼠颈部和胸部毛发并碘伏消毒颈部皮肤, 做切口 1 cm, 暴露颈部气管, 连接呼吸机。调整呼吸机参数为呼吸频率为 120 次/min, 潮气量为 7 ~ 8 mL, 呼吸时间比为 1:2。胸部皮肤碘伏消毒后, 以胸部左侧第 4 根肋骨为手术切口, 逐层剥离皮肤, 使心脏充分暴露, 在左心耳与肺动脉圆锥之间找到冠状动脉左前降支, 并结扎, 当观察到心电图记录仪上 ST 段背向上抬高, 心律较为缓慢, 同时左心室变白, 说明 AMI 制作成功, 最终 AMI 制作成功并存活大鼠 36 只, 即随机分为 AMI 组, NC 组, miR-126 组, 每组 12 只。而假手术组冠状动脉左前降支仅仅穿线但不结扎 (12 只)。其中 NC 组: 携带 GFP 的慢病毒空载体 (miR-126 mimics NC) 以 4×10^7 病毒数量进行心肌组织局部注射转染, miR-126 组: 携带 miR-126 mimics 慢病毒以 4×10^7 病毒数量进行心肌组织局部注射转染, 而 AMI 组与假手术组每天给予等量生理盐水。于第 7 天处死大鼠, 并将心肌组织置于 -80°C 冰箱待测。

1.4 心脏功能检测

大鼠治疗 2 周后, 腹腔注射 10% 水合氯醛进行

麻醉,进而对大鼠行心脏彩超检查,并记录相关指标:左室射血分数(LVEF),左室长轴缩短分数(FS),左室舒张末期内径(LVDd),左室收缩末期内径(LVDs)。

1.5 心肌梗死面积的测量

沿着心脏横轴方向在心尖到结扎点间进行切片,每片 1 mm,后经 1% TCC 进行染色,正常心肌染成红色,AMI 导致的缺血心肌染成白色。拍照后经 IMAGE PRO 图像分析,并计算得到心肌梗死面积占左心室的百分数。

1.6 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡

采用 TUNEL 试剂盒检测心肌组织凋亡,严格按照试剂盒说明书进行操作,在 200 倍光镜下随机选取 5 个视野进行观察,阳性细胞被染成棕黄色,凋亡细胞数与总细胞数的比值,并以百分比记做细胞凋亡指数。

1.7 Caspase 3 及 Caspase 9 活性检测

按照 Caspase 3 及 Caspase 9 活性检测试剂盒说明书进行操作,于酶标仪 405 nm 处检测 Caspase 活性。

1.8 Western-blot 检测心肌组织中 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达

取各组心肌标本,用匀浆器处理后,加入适量的 RIPA 裂解液裂解,获得总蛋白。采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度。蛋白变性,上样,进行 SDS 凝胶电泳,后湿法转膜。在一抗溶液(Bcl-2 及 Bax,稀释浓度为 1:100)4℃ 过夜孵育;次日二抗溶液中室温孵育 1~2 h。滴加曝光液,在凝胶成像系统中曝光。用“Quantity one”软件统计各抗体条带灰度值。

1.9 RT-PCR 检测检测心肌组织中 Fas 及 Fas-L mRNA 表达

参考 trizol 试剂盒说明书提取心肌组织中总 RNA,接着紫外分光光度计检测 RNA 纯度。进一步采用一步法 RT-PCR 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA,并扩增,扩增产物用于 2% 的琼脂糖胶电泳。反应体系为:变性 95℃,15 s,退火 60℃,20 s,延伸 70℃,60 s,共 36 个循环。引物如下。miR-126 上游引物:5'-GGCTTCGTACCGTGAGTAAT-3',下游引物:5'-GTGCAGGGTCCGAGGT-3',长度 145 bp,Fas 上游引物:5'-GTGAAACCGACAAC AACTGCT-3',下游引物:5'-CAAGGCTCAAGG ATGTCTCA-3',长度 349 bp;Fas-L 上游引物:5'-ATAGAGCTGTG GCTACCGGT-3',下游引物:5'-CTCCAGAGATCA

AAGCAGTTCC-3',长度 285 bp;GAPDH 上游引物:5'-GCTTCGGCAG CACATATAC TAAAAT-3',下游引物:5'-CGCTTCACGAATTTG CGTGTCA-3',长度 314 bp(基因由上海生工生物工程有限公司合成)。

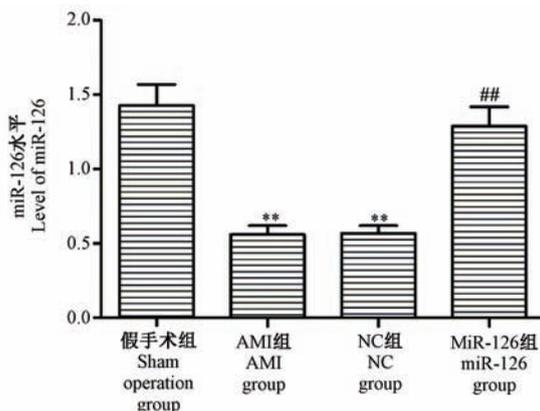
1.10 统计学分析

用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 代表差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠心肌组织中 miR-126 的表达

与假手术组比较,AMI 组及 NC 组中 miR-126 表达量显著降低,差异均具有统计学意义($P < 0.01$);与 AMI 组及 NC 组比较,miR-126 组中 miR-126 表达量显著提高,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。见图 1。



注:与假手术组比较,** $P < 0.01$;

与 AMI 组及 NC 组比较,## $P < 0.01$ 。

图 1 各组大鼠心肌组织中 miR-126 的表达

Note. Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$;

Compared with AMI group and NC group, ## $P < 0.01$.

Fig. 1 Expression of miR-126 in each group

2.2 miR-126 对 AMI 大鼠心脏功能的影响

与假手术组比较,AMI 及 NC 组中 LVEF 及 FS 明显降低,LVDd 及 LVDs 明显提高,差异均具有统计学意义($P < 0.01$);与 AMI 组及 NC 组比较,miR-126 组中 LVEF 及 FS 明显提高,LVDd 及 LVDs 明显降低,差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 1。

2.3 miR-126 对 AMI 大鼠心肌凋亡指数及梗死面积的影响

与假手术组比较,AMI 组及 NC 组中心肌凋亡指数提高,梗死面积增加,差异均具有统计学意义

($P < 0.01$); 与 AMI 组及 NC 组比较, miR-126 组中心肌凋亡指数显著降低, 梗死面积减少, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$), 见图 2, 表 2。

表 1 miR-126 对 AMI 大鼠心脏功能的影响
Tab. 1 Effect of miR-126 on heart function in rats with AMI

组别 Groups	左室射血分数(%) LVEF (%)	左室长轴缩短分数(%) FS (%)	左室舒张末期内径(mm) LVDd(mm)	左室收缩末期内径(mm) LVDs(mm)
假手术组 Sham group	78.68 ± 7.87	48.28 ± 4.83	4.88 ± 0.45	2.58 ± 0.26
AMI 组 AMI group	39.97 ± 3.95**	27.44 ± 2.74**	6.97 ± 0.70**	5.74 ± 0.57**
NC 组 NC group	40.02 ± 3.98**	27.43 ± 2.72**	6.95 ± 0.69**	5.76 ± 0.58**
miR-126 组 miR-126 group	65.73 ± 6.57##	39.99 ± 4.00##	5.47 ± 0.55##	3.18 ± 0.29##

注: 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与 AMI 组及 NC 组比较, ## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$; Compared with AMI group and NC group, ## $P < 0.01$.

表 2 miR-126 对 AMI 大鼠心肌凋亡指数及梗死面积的影响(×20)
Tab. 2 Effect of miR-126 on apoptosis index and myocardial infarction area in rats with AMI

组别 Groups	凋亡指数(%) apoptosis index (%)	梗死面积(%) infarction area (%)
假手术组 Sham group	2.37 ± 0.24	0.00 ± 0.00
AMI 组 AMI group	35.39 ± 3.35**	30.36 ± 3.31**
NC 组 NC group	35.38 ± 3.36**	30.38 ± 3.28**
miR-126 组 miR-126 group	14.63 ± 1.67##	20.43 ± 2.43##

注: 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与 AMI 组及 NC 组比较, ## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$; Compared with AMI group and NC group, ## $P < 0.01$.

2.4 miR-126 对 AMI 大鼠心肌组织中 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达量的影响

与假手术组比较, AMI 组及 NC 组中心肌组织中 Bax 表达量上调, Bcl-2 表达量下调, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$); 与 AMI 组及 NC 组比较, miR-126 组心肌组织中 Bax 表达量下调, Bcl-2 表达量上调, 见图 3。

2.5 miR-126 对 AMI 大鼠心肌组织中 Fas 及 Fas-L mRNA 水平的影响

与假手术组比较, AMI 组及 NC 组中心肌组织中 Fas 及 Fas-L mRNA 水平提高, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$); 与 AMI 组及 NC 组比较, miR-126 组心肌组织中 Fas 及 Fas-L mRNA 水平降低, 差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。见图 4。

2.6 miR-126 对 AMI 大鼠心肌组织中 Caspase 3 及 Caspase 8 活性的影响

与假手术组比较, AMI 组及 NC 组中心肌组织中 Caspase 3 及 Caspase 8 活性提高, 差异均具有统

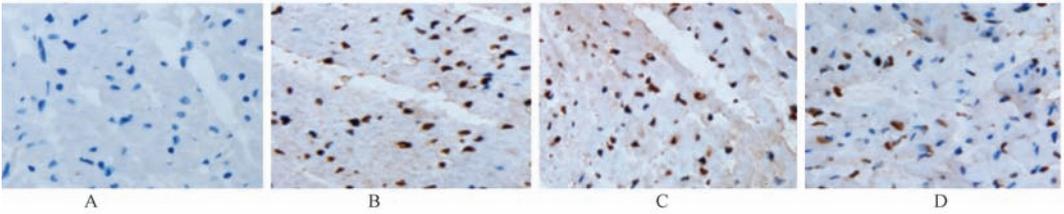
表 3 miR-126 对 AMI 大鼠心肌组织中 Caspase 3 及 Caspase 8 活性的影响

Tab. 3 Effect of miR-126 on the activity of Caspase 3 and Caspase 9 in myocardial tissue of rats with AMI

组别 Groups	Caspase 3 (U/mg)	Caspase 8 (U/mg)
假手术组 Sham group	0.78 ± 0.08	1.75 ± 0.18
AMI 组 AMI group	7.46 ± 0.75**	5.39 ± 0.54**
NC 组 NC group	7.45 ± 0.74**	5.38 ± 0.51**
miR-126 组 miR-126 group	3.63 ± 3.36##	2.65 ± 0.26##

注: 与假手术组比较, ** $P < 0.01$; 与 AMI 组及 NC 组比较, ## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$; Compared with AMI group and NC group, ## $P < 0.01$.

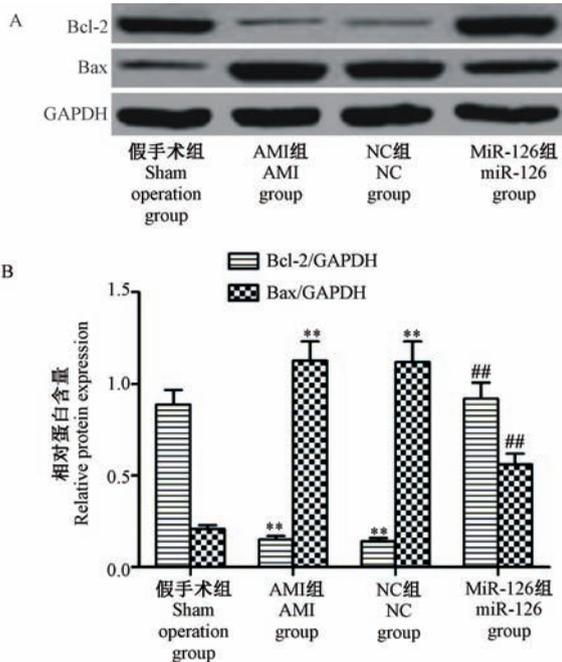


注：(A)假手术组；(B)AMI组；(C)NC组；(D)miR-126组。

图 2 miR-126 对 AMI 大鼠心肌凋亡指数及梗死面积的影响 (×20)

Note. (A) sham operation group; (B) AMI group; (C) NC group; (D) miR-126 group.

Fig. 2 Effect of miR-126 on apoptosis index and myocardial infarction area in rats with AMI (×20)



注：(A) Bax 及 Bcl-2 蛋白表达图谱；

(B) Bax 及 Bcl-2 蛋白表达分析图。

与假手术组比较，** $P < 0.01$ ；

与 AMI 组及 NC 组比较，### $P < 0.01$ 。

图 3 miR-126 对 AMI 大鼠心肌组织中 Bax 及 Bcl-2 蛋白表达量的影响

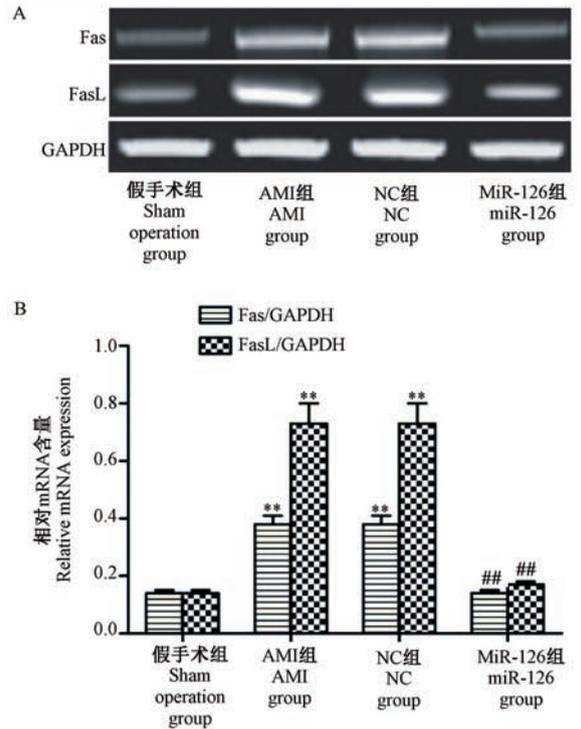
Note. (A) Bax and Bcl-2 protein expression profiles;

(B) Expression analysis of Bax and Bcl-2 protein.

Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$;

Compared with AMI group and NC group, ### $P < 0.01$.

Fig. 3 Effect of miR-126 on the expression of Bax and Bcl-2 in myocardial tissue of rats with AMI



注：(A) Fas 及 Fas-L mRNA 表达图谱；

(B) Fas 及 Fas-L mRNA 表达分析图。

与假手术组比较，** $P < 0.01$ ；

与 AMI 组及 NC 组比较，### $P < 0.01$ 。

图 4 miR-126 对 AMI 大鼠心肌组织中 Fas 及 Fas-L mRNA 水平的影响

Note. (A) Fas and Fas-L mRNA expression profiles;

(B) Expression analysis of Fas and Fas-L mRNA.

Compared with sham operation group, ** $P < 0.01$;

Compared with AMI group and NC group, ### $P < 0.01$.

Fig. 4 Effect of miR-126 on the expression of Fas and Fas-L in myocardial tissue of rats with AMI

计学意义($P < 0.01$)；与 AMI 组及 NC 组比较，miR-126 组心肌组织中 Caspase 3 及 Caspase 8 活性降低，差异均具有统计学意义($P < 0.01$)。见表 3。

3 讨论

miRNAs 是一类长度约为 18 ~ 25 nt 高度保守的小 RNA，能结合于其靶基因 3'-UTR 区域，进而抑

制靶基因的翻译,从而参与细胞生长,增值,分化与凋亡的调控。近些年研究发现 miRNAs 与心肌梗死,心力衰竭,心脏重构,心肌缺血再灌注等心血管疾病的发生发展密切相关。miR-126 不仅是心肌特异性 miRNA,也广泛表达于肺脏、心脏及肝脏等血管高度丰富的组织中^[11]。Hsu 等^[9]证实 ST 段抬高性心肌梗死患者血清中有 12 个 miRNA 表达量上调,13 个 miRNA 表达量下调,其中包括 miR-126, miR-26a, miR-191 等 miRNA。Long 等^[8]采用 ELISA 法也证实 AMI 患者血清中 miR-126 表达量下调。Fichtlscherer 等^[7]发现 AMI 患者心肌来源 miRNAs 中包括 miR-126 表达量下调。上述研究充分说明了 miR-126 在 AMI 患者中低表达,并与 AMI 的发生发展密切相关。此外 Huang 等^[10]发现过表达 miR-126 的骨髓干细胞能恢复 AMI 雌性 C57BL/6 小鼠心肌梗死血流,增加微血管密度,促进未成熟血管增生。Wang 等^[13]研究表明过表达 miR-126 能通过提高 VEGF 等血管生长因子表达,抑制 Spred-1 表达而促进血管生成,若敲除 miR-126 基因,新生小鼠血管增生及迁移受到限制。进而说明了 miR-126 对于 AMI 动物心肌梗死具有修复作用,不过是通过促进血管增生。而心肌细胞凋亡对于心梗后心肌重塑,心肌重构及心力衰竭等病理生理过程具有重要作用,因此本研究将探讨过表达 miR-126 对于 AMI 大鼠心肌细胞凋亡的影响及具体机制。

所以,本研究在此基础上,首先采用冠状动脉左前降支结扎构建 AMI 模型,通过检测大鼠心肌功能,证实有 36 只 AMI 大鼠构建成功并存活,成功率达 90%。接着通过参考相关文献及预实验^[3, 10],通过心肌组织局部注射慢病毒转染 miR-126 mimics NC 及 miR-126 mimics,结果发现 AMI 组及 NC 组心肌组织中 miR-126 表达量显著低于假手术组,与李国达等^[14]研究结果一致,而 miR-126 组较 AMI 组及 NC 组心肌组织中 miR-126 表达量上调。所以本研究接下来探讨过表达 miR-126 对于 AMI 心肌细胞凋亡的影响,首先通过检测心脏功能 miR-126 对 AMI 大鼠心肌功能的改善作用,结果表明过表达 miR-126 能显著提高 LVEF 及 FS,降低 LVDD 及 LVDs,从而说明 miR-126 能通过改善大鼠心脏功能,进而抑制 AMI 损伤。接着通过 TUNEL 法及 TCC 法检测心肌凋亡指数及心肌梗死面积,结果表明过表达 miR-126 能显著的降低 AMI 大鼠心肌凋亡指数及心肌梗死面积,说明过表达 miR-126 能通

过抵抗心肌细胞凋亡从而抑制大鼠 AMI 损伤。

细胞凋亡是一类由基因控制的程序性死亡方式,主要由内源性途径及外源性途径介导,其中外源性途径由细胞表面死亡受体 Fas 所介导,Fas/Fas-L 系统能直接启动凋亡信号,进而结合于 Fas 相关死亡区域(FADD),使 FADD 激活,并与 Caspase 8 激活,进而介导 Caspase 级联反应,最终将凋亡信号传递给凋亡执行者 Caspase 3,从而使 DNA 降解断裂,细胞凋亡。研究已经证实 AMI 大鼠心肌组织中凋亡指数提高的同时伴随着 Fas 及 Fas-L mRNA 水平及蛋白表达量显著上调^[2, 8]。Caspase 3 及 Caspase 8 在 AMI 大鼠心肌梗死区活性或蛋白表达量显著提高,当抑制 Caspase 3 及 Caspase 8 活性或下调其表达都能使心肌细胞凋亡受到抑制^[15-16]。所以本研究通过 RT-PCR 及比色法分别检测了 AMI 大鼠心肌组织中 Fas、Fas-L mRNA 水平及 Caspase 3 及 Caspase 8 活性,结果表明 AMI 组心肌组织中 Fas、Fas-L mRNA 水平及 Caspase 3 及 Caspase 8 活性显著提高,而 miR-126 组 Fas、Fas-L mRNA 水平及 Caspase 3 及 Caspase 8 活性显著降低,说明过表达 miR-126 能通过 Fas/Fas-L 介导的信号途径从而抑制心肌细胞凋亡。而细胞凋亡还受 Bcl-2 家族蛋白的调控,抑凋亡蛋白 Bcl-2 能与促凋亡蛋白 Bax 结合形成异二聚体,或者 Bax 自身形成寡聚体,从而将凋亡信号传递给 Caspase 3,使其发挥凋亡执行作用。研究表明 AMI 大鼠心肌组织中 Bax 表达量上调,而 Bcl-2 表达量下调,通过遏制此变化,能显著的抑制心肌细胞凋亡^[15-16]。所以本研究继续探讨各组心肌组织中 Bax 及 Bcl-2 表达,结果表明过表达 miR-126 能上调 Bcl-2 表达,下调 Bax 表达,从而抑制心肌细胞凋亡。

参考文献:

- [1] 张力俨,张翠丽,富路.急性心肌梗死药物治疗研究进展[J].心血管病学进展,2011,32(2):212-216.
- [2] 任宏强,赵利,王忠,等.复方丹参滴丸对急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡和凋亡相关蛋白的影响[J].中国动脉硬化杂志,2013,12(12):1084-1088.
- [3] 王珏,黄伟聪,郑亮承,等. MicroRNA-24 对心肌梗死后心肌细胞凋亡的调控作用[J].中国病理生理杂志,2013,29(4):590-596.
- [4] 马萍,纪中,纪长伟,等.蓝莓花色苷预处理对大鼠心肌梗死的保护作用[J].中国比较医学杂志,2013,23(6):49-52.
- [5] 余华东,余强.心肌梗死中微小 RNA 的研究进展及临床应用前景[J].重庆医学,2014,43(19):2514-2517.

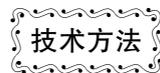
- [6] Sayed AS, Xia K, Salma U, *et al.* Diagnosis, prognosis and therapeutic role of circulating miRNAs in cardiovascular diseases [J]. *Heart Lung Circ*, 2014, 23(6): 503 - 510.
- [7] Fichtlscherer S, Zeiher AM, Dimmeler S. Circulating microRNAs: biomarkers or mediators of cardiovascular diseases? [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2011, 31(11): 2383 - 2390.
- [8] Long G, Wang F, Duan Q, *et al.* Human circulating microRNA - 1 and microRNA - 126 as potential novel indicators for acute myocardial infarction [J]. *Int J Biol Sci*, 2012, 8(6): 811 - 818.
- [9] Hsu A, Chen SJ, Chang YS, *et al.* Systemic approach to identify serum microRNAs as potential biomarkers for acute myocardial infarction [J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014(1): 418628.
- [10] Huang F, Zhu X, Hu XQ, *et al.* Mesenchymal stem cells modified with miR - 126 release angiogenic factors and activate Notch ligand Delta-like-4, enhancing ischemic angiogenesis and cell survival [J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(2): 484 - 492.
- [11] 杨东, 张红. MicroRNAs-126(miR-126)的生物学功能[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(14): 2773 - 2777.
- [12] Chen TL, Zhu GL, He XL, *et al.* Short-term pretreatment with atorvastatin attenuates left ventricular dysfunction, reduces infarct size and apoptosis in acute myocardial infarction rats [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2014, 7(12): 4799 - 4808.
- [13] Wang S, Aurora AB, Johnson BA, *et al.* The endothelial-specific microRNA miR - 126 governs vascular integrity and angiogenesis [J]. *Dev Cell*, 2008, 15(2): 261 - 271.
- [14] 李国达, 刘衍宇, 方凌燕, 等. miR - 126 及 VEGF 在大鼠心肌梗死交界区表达的动态变化[J]. 心脏杂志, 2015, 27(6): 639 - 644.
- [15] 杨文慧, 郭涛, 杨莉, 等. 体外心脏震波对大鼠心肌梗死后心肌凋亡的影响[J]. 中国老年学杂志, 2016, 36(2): 265 - 267.
- [16] 陈铁龙, 祝光礼, 赫小龙, 等. 冠心合剂减少急性心肌梗死大鼠凋亡及对 Bax、Bcl-2、p-BAD、Caspase - 8、Caspase - 3 蛋白表达的影响[J]. 中华中医药学刊, 2014, 32(11): 2720 - 2723.

[修回日期] 2016-04-06

(上接第 34 页)

- [5] Nolan YM, Sullivan AM, Toulouse A. Parkinson's disease in the nuclear age of neuroinflammation [J]. *Trends Mol Med*, 2013, 19(3): 187 - 196.
- [6] Nordzell M, Aarnisalo P, Benoit G, *et al.* Defining an N-terminal activation domain of the orphan nuclear receptor Nurr1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004, 313(1): 205 - 211.
- [7] Saijo K, Winner B, Carson CT, *et al.* A Nurr1/CoREST pathway in microglia and astrocytes protects dopaminergic neurons from inflammation-induced death [J]. *Cell*, 2009, 137(1): 47 - 59.
- [8] Volakakis N, Tiklova K, Decressac M, *et al.* Nurr1 and Retinoid X Receptor Ligands Stimulate Ret Signaling in Dopamine Neurons and Can Alleviate alpha-Synuclein Disrupted Gene Expression [J]. *J Neurosci*, 2015, 35(42): 14370 - 14385.
- [9] Vergano-Vera E, Diaz-Guerra E, Rodriguez-Traver E, *et al.* Nurr1 blocks the mitogenic effect of FGF - 2 and EGF, inducing olfactory bulb neural stem cells to adopt dopaminergic and dopaminergic-GABAergic neuronal phenotypes [J]. *Dev Neurobiol* 2015, 75(8): 823 - 841.
- [10] Hong S, Chung S, Leung K, *et al.* Functional roles of Nurr1, Pitx3, and Lmx1a in neurogenesis and phenotype specification of dopamine neurons during in vitro differentiation of embryonic stem cells [J]. *Stem Cells*, 2014, 23(5): 477 - 487.
- [11] Alavian KN, Jeddi S, Naghipour SI, *et al.* The lifelong maintenance of mesencephalic dopaminergic neurons by Nurr1 and engrailed [J]. *J Biomed Sci*, 2014, 21: 27.
- [12] 谭雪峰, 金国华. PD 模型大鼠黑质中 Nurr1 和 TH 的表达变化及其意义 [J]. 神经解剖学杂志, 2009. (01): 16 - 20.

[修回日期] 2016-03-31



一种用于观察小鼠后足趾类实验固定装置的研制

石佳, 陈静, 冉小库, 王晓彤, 窦德强*

(辽宁中医药大学药学院, 辽宁 大连 116600)

【摘要】 设计研制应用于观察小鼠后足趾类实验固定器, 如发汗、止汗等实验研究, 为其提供安全、方便、便于操作的实验工具。

【关键词】 小鼠; 后足趾; 固定器; 制作; 应用

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0064-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.011

Development of fixture device in rear paws experiments for holding mice

SHI Jia, CHEN Jing, RAN Xiao-ku, WANG Xiao-tong, DOU De-qiang*

(College of Pharmacy, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Dalian 116600, China)

【Abstract】 To design and make a simple fixture device for holding mice in rear paws experiments as a safe and convenient experimental tool for sweating and hidroschesis experiments.

【Key words】 Mice; Rear paws; Fixture device; Production; Application.

小鼠是一种医学研究常用的实验动物, 亦是医学生理学、病理学、病理生理学等学科实验的常用动物。小鼠体型较小, 但生性活泼, 因此在抓取小鼠时要谨慎, 既不能粗暴, 以免其受伤, 又要稳和准, 否则容易被其咬伤。在实验研究中, 我们常常运用一些辅助工具来固定小鼠, 以保证实验的正常进行同时能保护实验者自身安全。固定器的制作及应用有一些研究报道, 但一般多用于断尾取血、尾静脉注射、尾静脉取血、肌肉注射、辐射实验等实验研究^[1-6], 而适用于观察后足趾类实验的固定器尚未见报道。本文根据以往制作大、小鼠固定装置的优缺点以及相关实验要求, 选用铜片、铝块、革布等材料, 制成适用于后足趾类实验的特制小鼠固定器。

1 材料

1.1 实验动物

SPF级雄性昆明小鼠购自辽宁长生生物技术有限公司 [SCXK(辽)2010-0001], 体重(18~22)g。实验动物饲养于辽宁中医药大学实验动物中心 [SYXK(辽)2013-0009]。并按实验动物使用的3R原则给予人道的关怀。

1.2 制作材料和工具

铜片(长10.0 cm、宽9.5 cm和厚0.1 cm); 铝块(长3.0 cm、宽2.5 cm和高1.0 cm); 铝片(长10.0 cm、宽1.0 cm和厚0.1 cm); 铆钉; 细铁丝; 革布; 剪刀; 夹子(均购于大连开发区新玛特超市)。

【基金项目】 国家重点基础研究计划(973计划)项目(2013CB531803); 2013辽宁省高等学校创新团队课题(LT2013020); 辽宁省教育厅一般项目(L2013364); 辽宁中医药大学大学生创新创业训练计划资助(201510162000057)。

【作者简介】 石佳(1994-), 女, 本科, 专业: 中药学。E-mail: 1358227419@qq.com。

【通讯作者】 窦德强(1967-), 教授, 研究方向: 中药活性成分及新药研发。E-mail: deqiangdou@126.com。

2 方法

2.1 制作要求

发汗、止汗实验是观察小鼠汗液分泌的后足趾类实验,常用方法是着色法。因小鼠的小汗腺仅分布于足底,也就是在小鼠足跖部肉垫上有汗腺分布,其汗液分泌的多少,可利用碘与淀粉遇汗液产生紫色反应的原理,观察汗液分泌的变化。这需要观察后足趾且需维持一段时间,因此对于固定器有一定要求。具体要求如下:其规格、构形,应依动物大小和形态而定,尺寸可调;防止动物转身、逃逸,固定要严密;后足趾需暴露在外;固定器需四周透气,避免固定时间过长导致小鼠大量出汗对实验结果造成影响;坚固耐用,性能可靠。

2.2 制作方法

步骤一:在长方形铜片上面,依据铜片大小打数排大小以 0.3 cm 为直径的小圆孔。步骤二:取长 8.5 cm、宽 5.5 cm 的革,用剪刀剪成如图 1 所示,并剪两孔。步骤三:用铆钉将剪好的革布固定在铜片边沿 1.5 cm 左右。步骤四:按设计图 2,在打好孔的长方形铜片中心处用铆钉将其固定在铝块上面,再将其弯曲成圆柱状。在圆柱中间,用铝片将铜圆柱固定大小,再按上调节装置(如图 3),以调节固定装置的大小。

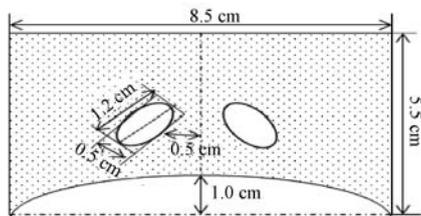


图 1 革布制作比例图

Fig. 1 The scale map of cloth production

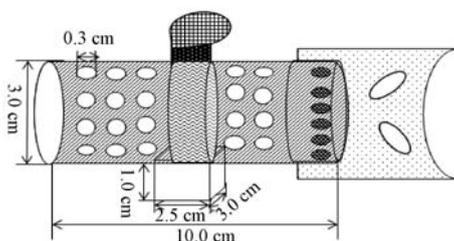


图 2 固定器制作模型比例图

Fig. 2 The scale map of model of fixture device

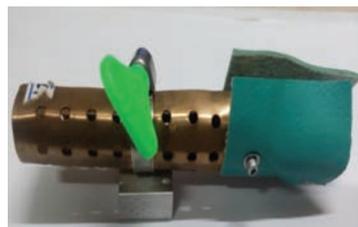


图 3 固定器成品图

Fig. 3 The map of finished product of fixture device

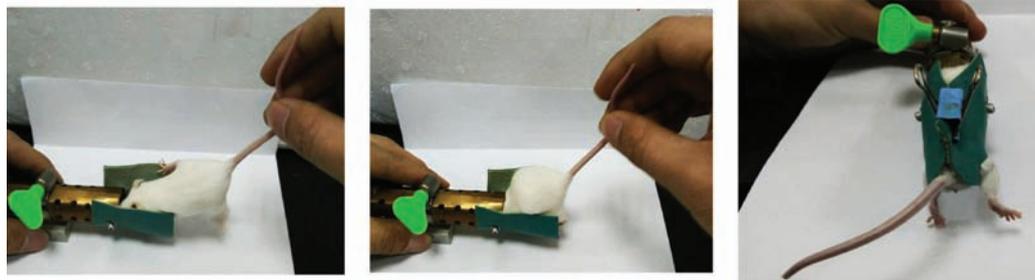


图 4 固定器使用示意图

Fig. 4 Schematic diagram of using fixture device

2.3 使用方法

制作好的固定器平放在实验台上。抓住小鼠尾部,让其头处于固定器末端,利用小鼠喜钻洞的特性,钻入固定器内(有个别不愿钻入者可用镊子将其引导入内);待小鼠进去之后,调节固定阀将小鼠固定圆筒内,再用革布封住,然后轻轻将小鼠两后肢,从两小孔拽出革外,再依据小鼠的身长在前端放置一带孔的瓶盖,用细铁丝固定,以防止小鼠从前端逃窜;最后用夹子将革布夹住从而固定小

鼠,并可调节松紧度(如图 4 所示)。对于尾静脉注射、肌肉注射等使用方法同发汗、止汗实验使用方法。

3 讨论

目前市面也有一些固定装置销售,与田顺亮、刘保新、刘辉、金永柱等^[1,2,4,5]人设计制作了适用于大鼠或小鼠断尾取血、尾静脉注射、尾静脉取血、肌肉注射等实验的固定装置相比,用途和构造基本相

同;自制固定装置多以塑料瓶设计制作,虽简易、价廉,但易损坏,使用寿命短;市售固定装置采用有机玻璃或不锈钢材质制作,虽不易损坏,但固定装置四周不能透气,对动物伤害较大,不能较长时间固定动物。同时笔者发现以往研究报道的固定装置均不适用于发汗、止汗实验研究中小鼠的固定,虽然,王艳宏等^[7]人通过自制小鼠固定装置固定小鼠研究了麻黄的发汗作用,但尚未对小鼠固定装置作相关报道。

笔者研发的用于观察后足趾类实验的小鼠固定器克服了现有固定装置的不足,同时也适用于尾静脉注射、断尾取血等实验操作,具有以下突出的优点:(1)材质为铜片,不易损坏;(2)固定器四周透气,不会因为固定时间太长易导致其出汗过多影响实验结果;(3)固定时不易对实验者或动物造成伤害;(4)使用方便;(5)固定装置结构简单,利于生产、易于推广,且所有材料均可清洗消毒处理,方便重复使用。本实验室首次设计制作适用于观察后

足趾类发汗、止汗实验等实验操作的固定器,为实验者提供简单、安全、携带实验工具。

参考文献:

- [1] 田顺亮, 钱学华. 大鼠断尾取血固定装置的设计及取血的方法[J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(7): 419-421.
- [2] 刘保新, 陈廖斌, 汪晖. 介绍一种简易的大鼠固定装置[J]. 中国比较医学杂志, 2008, 18(3): 75-77.
- [3] 孟荣. 小白鼠固定器的制作及其应用[J]. 衡阳医学院学报, 1985, 1(1): 51-54.
- [4] 刘辉, 康白. 小鼠固定器的制作与应用[J]. 临床和实验医学杂志, 2010, 9(3): 227-228.
- [5] 金永柱, 蒋作君. 简易小鼠固定器的制作[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2000, 1(1): 87-87.
- [6] 施文, 孙永强. 小鼠尾静脉注射和采血简易固定装置的制作和使用方法[J]. 免疫学杂志, 2011, 27(9): 807-808
- [7] 王艳宏, 王秋红, 夏永刚, 等. 麻黄化学拆分组分的性味药理学评价[J]. 中国中医药科技, 2011, 18(6): 489-491.

[修回日期]2015-12-14

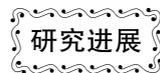
(下接第 78 页)

- [44] Oliveira MC, Pelegrini-da-Silva A, Tambeli CH. Peripheral mechanisms underlying the essential role of P2X₃/2/3 receptors in the development of inflammatory hyperalgesia[J]. Pain 2009, 141(1-2): 127-134.
- [45] Teixeira JM, Oliveira MC, Jr Nociti FH Jr, et al. Involvement of temporomandibular joint P2X₃ and P2X_{2/3} receptors in carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rats[J]. Eur J Pharmacol., 2010, 645(1-3): 79-85.
- [46] 杜璐, 张金海, 阮怀珍. 炎性痛大鼠脊髓和背根节 P2X₃ 受体的表达变化[J]. 第三军医大学学报, 2010, 32(2): 99-102.
- [47] Yiangou Y, Facer P, Baecker PA, et al. ATP-gated ion channel P2X₃ is increased in human inflammatory bowel disease[J]. Neurogastroenterol, 2001, 13(4): 365-369.
- [48] Shieh KR, Yang SC, Tseng HL, et al. Evidence for up-regulation of purinergic receptor genes associating with TRPV1 receptors and

neurotrophic factors in the inflamed human esophagus[J]. Curr Mol Med, 2014, 14(9): 1205-1214.

- [49] Chen Y, Zhang L, Yang J, et al. LPS-induced dental pulp inflammation increases expression of ionotropic purinergic receptors in rat trigeminal ganglion[J]. Neuroreport, 2014, 25(13): 991-997.
- [50] Wang S, Zhu HY, Jin Y, et al. Adrenergic signaling mediates mechanical hyperalgesia through activation of P2X₃ receptors in primary sensory neurons of rats with chronic pancreatitis[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2015, 308(8): G710-G719.
- [51] Su J, Gao T, Shi T, et al. Phenotypic changes in dorsal root ganglion and spinal cord in the collagen antibody-induced arthritis mouse model[J]. J Comp Neurol, 2015, 523(10): 1505-1528.

[修回日期]2015-12-28



大鼠行进行为的评价及其应用研究现状

季 苇, 刘晓莉, 乔德才*

(北京师范大学体育与运动学院运动生理学实验室, 北京 100875)

【摘要】 行进行为(locomotion)是大鼠基本且重要的运动方式,可反映诸多实验模型动物的运动行为(motion)表现与特征,制订大鼠行进行为评价方法与标准对于运动功能障碍程度评级和康复治疗效果评分具有重要的临床意义。本文通过文献查阅的方法,对近年来大鼠行进行为的评价方法及典型应用的研究现状进行综合分析并评述,以期对相关研究者提供必要的参考。

【关键词】 大鼠;行进行为;评价

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0067-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.012

Research status of evaluation and application of locomotion in rats

Ji Wei, Liu Xiao-li, Qiao De-cai*

(Exercise Physiology Laboratory, College of Physical Education and Sports, Beijing Normal University, Beijing 100875, China)

【Abstract】 Locomotion is one of the most vital and fundamental motor behaviors in rats, which can reflect the performance and characteristics of motion in various experimental animal models, it has an important clinical significance to motor dysfunction rating and rehabilitation effect evaluation grade for developing an evaluation method and standard of locomotion in rats. This article will comprehensively analysis and review the literatures of locomotion in rats on the evaluation methodology and typical application in order to provide necessary reference for researchers.

【Key words】 Rat; Locomotion; Evaluation;

大鼠是生命科学研究中最常用的模型生物之一,大鼠的运动行为(motion)主要包括行进、姿势维持、理毛、抓握、探索等。行进行为(locomotion,又译为“移动行为”)是运动行为的一种表现形式,特指从此处到达彼处的动作^[1],需要感觉系统和运动系统高度协调,大脑皮层、基底神经节、小脑等中枢和各种姿势反射共同参与才能完成^[2]。该行为作为一种评价指标被广泛用于中枢神经损伤、神经退行性疾病、运动性疲劳程度的判断等众多研究

领域^[3-6]。

1 大鼠行进行为的评价

大鼠在行进过程中,依靠四肢支撑起身体的重量,按照固定的步序模式进行运动,并随时根据外部环境调整步态来获得较好的落地位置,以便使重心投影恰好落在移动支撑点上以保持身体稳定。因此,四肢肌肉力量、步态控制能力、肢体协调能力、平衡能力等对完成行进行为非常重要^[7]。大鼠

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(31571221);北京自然科学基金资助项目(5142012)。

【作者简介】 季苇(1991-),女,硕士研究生,专业:运动人体科学。Email: jiwei6088833@163.com。

【通讯作者】 乔德才(1957-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向:运动与神经调控。Email: decaiq@bnu.edu.cn。

行进行为的评价方法正是基于上述诸方面的相关因素来设计与建立的,常用的方法有:运动评价量表、运动学测量、动力学测量、肌电信号测量、运动任务设计等几类。

1.1 运动评价量表

目前用于评价大鼠行进行为的量表较多,分类细致、功能各异^[8],其中 Tarlov 量表和 BBB 量表应用最为广泛,主要是用于评价脊髓损伤后动物的运动功能。Tarlov 量表始于上世纪 50 年代并沿用至今,内容主要包括关节活动度、能否行走、跑步等^[9],适合于灵长类哺乳动物的运动行为评价,对于啮齿类动物的适用度较低。之后有人对该量表进行了改良,改良后的 Tarlov 量表评价内容更加细化,评价标准分为 6 个等级,即:0 级,后肢无活动,不能负重;1 级,后肢可见活动,但不能负重;2 级,后肢活动频繁或有力,不能负重;3 级,后肢可支持体重,能走 1~2 步;4 级,可行走,仅有轻度障碍;5 级,行走正常^[10]。BBB 量表是一种可用于大鼠综合运动功能评价的量表,由 Basson、Beattie 和 Bresnahan 三人于 1995 年制定,主要内容涉及能活动的关节数目及其活动程度、能否支持体重、前后肢协调性、四肢活动情况、尾部位置和躯干稳定程度等^[11],共分为 22 个等级。随着计算机科学的发展,现已开发出专门的软件用来协助收集和计算 BBB 量表的数据,使实验数据的处理与分析过程更加简便准确^[12]。相对于 BBB 量表而言,Tarlov 量表具有分级少、评分标准简洁等优点,但在进行损伤恢复程度的评价时不能很好体现恢复的渐进性。

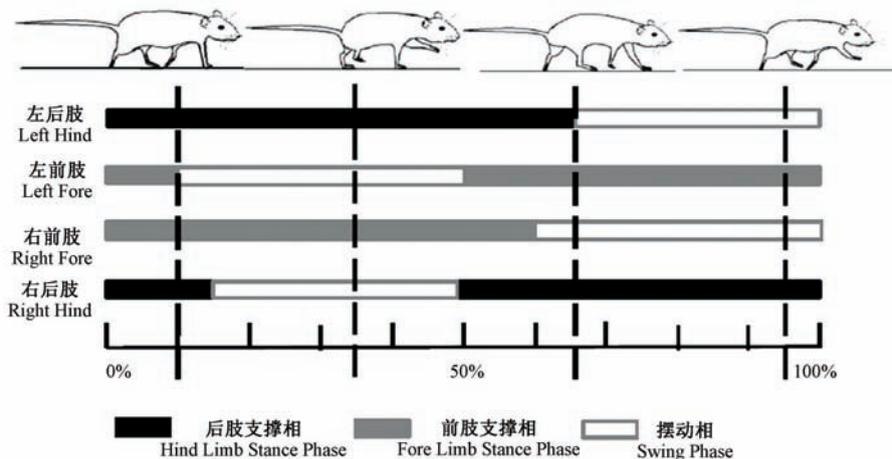
除上述量表外,还有联合行为评分量表(CBS)、均值结合量表(ACOS)以及前肢运动量表(FLS)等^[13-15]。总体来讲,运动量表的优点是所需时间短、测量仪器简单且能评价大鼠从损伤状态恢复到正常状态的绝大部分行进行为等级^[16];缺点是只能对大鼠行进行为作半定量描述。鉴于各类损伤对行进行为的影响存在较大的差异性,为弥补单一量表存在评价结果精确度偏低的不足^[17],建议将多种评分方法联合使用提高评价的准确性^[18]。此外,为了避免用眼睛观察容易忽略大鼠一些细微的行为变化以及实验人员观察对大鼠产生“二次应激”,在使用量表来评价行进行为时可先使用录像设备记录,再通过观看视频进行评分。

1.2 运动学测量

运动学测量是通过研究动物运动时的空间位

置变化来描述动物行进行为特征的,其本质是对动物行进行为的定量和详细描述。该方法是大鼠行进行为评价中常用且非常重要的研究手段之一,测量的主要参数包括:步态和肢体、躯干、肢段的距离与角度等^[19]。步态是构成大鼠行进行为的基本要素,步态指标多种多样,主要分为时间特征指标、空间特征指标以及时空特征指标;其中时间特征指标包括步态周期(gait cycle)、支撑相(stance phase)、摆动相(swing phase)以及支撑系数(duty factor)。步态周期意指大鼠同一只脚爪连续两次触地的时间过程。根据脚爪在步行时的位置可分为支撑相和摆动相^[20]。支撑相指单只脚爪在一个步态周期中与地面接触的持续时间;摆动相指单只脚爪在一个步态周期中离开地面的持续时间;支撑系数是指支撑相与步态周期之比,此值的增大或减小都表明存在步态代偿的情况。例如在单侧代偿的情况下,患侧肢体的支撑系数减小,对侧肢体的支撑系数增大(如跛行步态);在双侧代偿的情况下,两侧肢体的支撑系数均增大(如拖行步态);跛行和拖行步态都能减小患肢承受的压力^[21]。正常情况下,大鼠后肢的支撑相占步态周期的 65%,前肢的支撑相占步态周期的 60%(见图 1)。空间特征指标包括步幅(stride length)、步长(step length)和步宽(step width)。其中步幅为一脚爪着地至同一脚爪再次着地的距离;步长为一脚爪着地至对侧脚爪着地的距离;步宽指两脚爪中心点或重力点之间的水平距离^[22]。步幅与步长两者极易混淆,研究者要注意区别。步速是步态最重要的时空特征指标,它是影响步态周期的重要参数^[23]。大鼠在行进时随着步速增加,步态周期缩短,摆动相的时间基本不变,而支撑相的时间明显缩短,支撑相时间的改变又会对施于地面力和力的作用时间造成相应的影响^[24-25]。根据大鼠行进步速的不同,可将其基本步态分为行走(walking)、慢跑(trotting)和奔跑(galloping)三种形式。

最早人们是通过拍照的方式来进行步态测量,随着计算机、摄像、传感和多媒体同步技术的发展,录像法已成为运动学测量最常用的手段之一^[26]。当大鼠在地面上行进时,摄像机可放置在大鼠的侧面、后面或利用透明地面提供腹侧观,以便能清楚地观察大鼠落脚的位置^[27-28],并通过对视频进行逐帧分析获得步态参数(见图 2)。在对某些运动参数(如距离等)进行测定时,还可通过食物奖励等办



注:横坐标代表了大鼠步态周期的百分比。图中虚线表示步态周期中的某个瞬间,虚线上面有该时刻大鼠四肢位置的示意图。

图 1 一个步态周期中大鼠四肢的支撑相和摆动相比例及四肢位置变化情况

Note. The horizontal coordinate represents the percentage of gait cycle of rats. Dashed lines indicate a moment in time in the gait cycle, which is depicted by the rat drawing above each line.

Fig. 1 The distribution of stance phase and swing phase as well as the position of the limbs in a gait cycle

法训练动物沿直线行进,以便提高测量的准确性^[12],但也有人认为,该方法可能会因大鼠克服四肢功能紊乱或忍受疼痛来获得食物,而导致其行进行为的改变^[29]。步态分析法中也有将大鼠的前后肢分别用红绿墨水染色,令其通过一段长 100 cm、宽 7 cm 覆有白纸的跑道,记录 8 个以上连续脚印,并对大鼠爪印、步幅、脚间距等参数进行分析的方法^[30-31]。但由于墨汁的染色在每个实验中甚至每步中并不完全一致,导致爪印区域可变性很高,对实验结果产生一定影响。目前,已有很多设备(如 Catwalk、DigiGait 和 Treadscan 步态分析系统等)能够直接获取大鼠在行进过程中的多个步态指标,并进行自动处理和分析^[32],减少了主观因素对实验结果的影响,使测量的精准度和效率大大提高。以 Catwalk 步态分析系统为例,其主要由内置荧光灯泡的感应玻璃板、玻璃板下的高速摄像机、数据传输与转换系统以及含 Catwalk 数据分析软件的高性能计算机构成。当大鼠在玻璃板上行进时,其脚爪与玻璃板接触会使由荧光灯泡发出的荧光产生反射,玻璃板下的高速摄像机捕捉到大鼠脚爪产生的荧光反射(通常每秒 100 ~ 150 帧),并通过数据传输与转换系统传输到高性能计算机内,进行处理和分析^[33]。上述步态分析系统需要配备有高速摄像机、动物跑台和配套的软件分析系统,这些仪器设备价格昂贵,限制了其推广与应用。此外,用两种测量原理相似的步态分析系统对同一批大鼠相同指标进行测量时发现,所得结果并不一致,提示测量方

法的微小差异会对大鼠的运动学测量结果产生一定的影响^[34]。

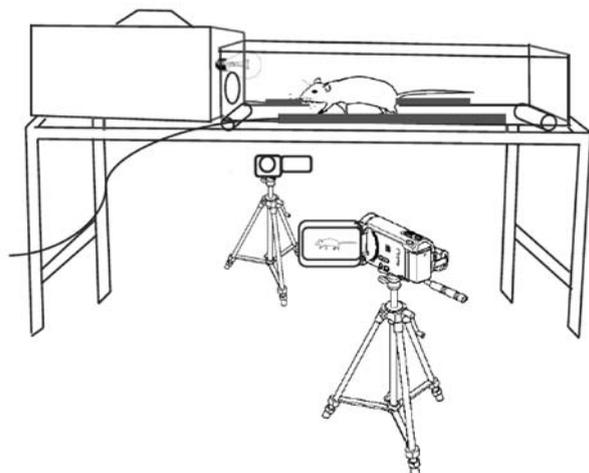


图 2 利用录像法捕捉大鼠行进过程中的步态参数

Fig. 2 Capturing the gait parameters during rat locomotion by digital camera

大鼠肢体和肢段的距离、角度的测量一般采用关节追踪系统,需预先在大鼠关节处皮肤上进行标记;但皮肤标记点容易随着关节相对位置的变化而移动,导致关节定位误差,尤其是当大鼠躯体蜷缩时会使相邻两个关节出现位置重合现象。因此,除踝关节的测量结果外,其他关节的测量结果均不准确。目前已有实验室用单一平面 X 射线摄影术捕捉大鼠的肢体、躯干、肢段的距离与角度等指标。利用该技术能清晰记录大鼠运动时四肢位置的变化情况^[35],但其不足之处在于只能获取大鼠行进过

程中矢状面的运动学参数。如果能应用多平面的 X 射线摄影术,就能显著提高测量的准确性,并能用来进行运动学的 3D 研究^[36]。

1.3 动力学测量

动力学测量主要通过分析各种力学特征的变化来评价大鼠行进行为,在运动障碍性疾病以及仿生学研究中运用较为普遍^[37-38]。在进行动力学测量前,可预先将肌力传感器或张力传感器植入大鼠的肌腱、骨表面或被放置在体表^[37],也可利用测力板测量大鼠行进中地面反作用力^[38]。早期的测力板只能提供一个方向的力^[39],现在已有可提供大鼠行进过程中 X、Y、Z 三个方向力的测力板^[40]。该方法能够精确地量化大鼠行进行为的力学变化参数,但需要与其他评估方法联用(如运动学测量)才能全面评价大鼠的行进行为。

在进行动力学测量时,大鼠在开放的环境中运动其行进行为最为自然,但常常需要等待较长时间大鼠才能正确的通过测力板,为此,研究者多将大鼠置于跑台或通道中进行动力学测量。但在跑台或通道中运动是否会对大鼠产生一定的压力?该压力是否又会对大鼠行进行为产生一定的影响,则需进一步的研究。

1.4 肌电信号测量

大鼠行进过程中可通过测量某些肌肉收缩时所产生的电信号来定量分析肌肉活动与行进行为之间的关系,这种方法也被称为肌电图(EMG)法,是评估神经肌肉活动能力常采用的一种方法^[41]。利用该方法可以识别损伤或恢复后的肌电模式与正常模式之间的偏差,以此作为评估治疗效果的依据,在研究行进过程中特定肌肉的激活程度和激活顺序方面也具有重要意义^[42]。在运动生理学研究此方法也可被用来评估肌肉活动水平、肌肉疲劳程度以及动作的协调性等。然而这种方法也存在某些局限或不足,如电极和相关设备植入时对肌肉造成的损伤会影响动物正常的行进行为;由于机体存在大量跨关节肌,同类别行进行为可以通过不同肌群的募集来实现,使参与活动的肌肉范围扩大;还有肌电图只能反映参与工作肌肉的激活程度,却不能反映肌肉收缩力量的大小等^[43]。近年来,研究者发明出可贴在记录肌肉表面皮肤上的电极片,用来测量整块肌肉的肌电活动,这种无创肌电的记录技术已被用于人体运动行为的研究之中^[44]。

1.5 运动任务设计

通过一定的技能训练让大鼠掌握某些运动技能,然后在其完成运动任务前后进行评价,该方法在行进行为的研究中也被广泛使用。例如,通过改变跑台的速度、坡度来进行运动任务的设计。由于跑台的速度和坡度可被随意控制,因此在跑台上实施大鼠行进行为的测量比在地面上更为精确、可控^[45]。此外,通过一定的技能训练,大鼠还可以执行更为复杂的运动任务,如爬梯、平衡木行走或爬绳等,也可通过改变两根梯柱间的距离和平衡木的宽度来提高运动任务的难度系数^[30,46];还可依据不同个体的运动潜能、不同的测试目的以及测量方法设计出不同的运动任务。常见的运动任务有网格测试(grid-walking test)、转棒测试(rota-rod test)、爬杆测试(pole test)、旷场行走测试(open field walking test)以及跑台测试(treadmill test)等。在大鼠执行运动任务时,也可同步进行力学与肌电的测量,对各种运动参数进行综合评分^[47]。

2 典型大鼠行进行为评价的应用举例

2.1 帕金森病模型大鼠的行进行为评价

帕金森病(Parkinson disease, PD)是一种神经系统退行性疾病,主要病理性改变为黑质致密部多巴胺(dopamine, DA)能神经元变性、坏死,纹状体 DA 投射减少,引发黑质-纹状体通路对基底神经节的调节功能紊乱^[48]。运动功能障碍是帕金森病人的临床特征之一,主要表现为静止性震颤、肌僵直、运动徐缓以及姿势步态异常等。行进行为评价常被用来判断 PD 动物模型运动功能障碍的程度,作为评估 PD 病理状态以及药物和康复治疗效果的依据^[49-52]。前文提到的各类大鼠行进行为的评价方法均可用于 PD 大鼠模型^[53]。运动学测量中多采用步态分析法检测 PD 大鼠姿势步态异常、步态控制能力和四肢协调性减弱等表现^[54]。运动任务设计法在 PD 模型大鼠行进行为评价中的运用更为普遍,如:网格测试、转棒测试、爬杆测试、旷场行走测试等;其中网格测试通过观察四肢滑落次数、脚步数、移动距离、启动时间等指标来评估 PD 大鼠肢体感觉运动功能^[55-56];转棒测试通过记录在转棒上停留的时间来评价 PD 大鼠的平衡能力和四肢控制能力;还可通过爬杆测试、旷场行走测试评价 PD 大鼠四肢协调能力和步态控制能力^[57]。

2.2 脊髓损伤模型大鼠的行进行为评价

脊髓损伤(spinal cord injury, SCI)是指由各种

原因引起的脊髓结构、功能的损害^[58]。运动、感觉和自主神经功能障碍是 SCI 后主要的临床表现,以上功能的恢复也是 SCI 康复最重要的目的,特别是行进行为功能的恢复对于患者生活自理程度和生活质量的提高至关重要^[59-60]。因此,对 SCI 病人行进行为障碍程度评级和康复后行进行为恢复程度评分具有重要的临床意义。运动评价量表在 SCI 模型大鼠行进行为的评价中应用最为普遍,主要包括 Tarlov 量表和 BBB 量表^[60-63]。Tarlov 量表通过检测体重支撑能力和四肢运动功能来评价 SCI 大鼠行进行为障碍;BBB 量表通过观察关节活动范围与幅度、能否支持体重、前后肢协调性、四肢活动情况、尾部位置和躯干稳定程度等来评估 SCI 大鼠肢体协调性、步态控制能力和四肢运动功能。步态分析法在 SCI 大鼠行进行为的评价中也在使用,主要通过检测大鼠步态周期、支撑相、摆动相等指标的变化来评价 SCI 大鼠行进行为障碍。此外,运动任务设计法中诸如网格测试、爬杆测试、旷场测试和跑台测试等在 SCI 的大鼠行进行为障碍评价中常被运用^[64]。SCI 大鼠行进行为障碍的评价中常常将几种方法结合使用,例如将大鼠置于旷场中进行 BBB 量表评分或将大鼠置于跑台上进行步态分析。

2.3 运动性疲劳模型大鼠的行进行为评价

运动性疲劳指身体机能生理过程不能持续在特定水平和/或整体不能维持预定的运动强度的一种现象^[65],其主要表现形式是运动能力下降。跑台运动是建立大鼠运动性疲劳模型常用的方法之一,通过行进行为评价(如:步速减慢、步态改变、身体稳定与协调性下降等)可以判断其疲劳程度;也可通过观察大鼠能否维持原强度运动、短时间休息或降低运动强度后大鼠能否继续运动、刺激频率、刺激时间等对运动疲劳程度进行评价^[66]。但这些评价方法存在着指标较单一、仅能定性、不能定量等不足,获得的信息也无法精确地反映大鼠的疲劳程度。如果能利用数理统计学方法,定量分析跑台运动过程中大鼠行进行为的变化规律,筛选出有效的指标,建立大鼠运动疲劳程度的评价标准,则能为实现大鼠运动疲劳行为学特征的量化评价提供更加有价值的参考。

3 小结

行进行为是大鼠运动行为的一种表现形式,由支撑相和摆动相组成的步态周期是行进行为的基

本构成。行进行为的评价方法较多,每种方法都有优势与不足,如:运动评价量表和运动任务设计法的优点是操作简单、成本低廉,其不足之处是所得结果只能定性或半定量;运动学测量法虽然能够精确定量,但所得结果数据庞大,给分析工作带来很多困难;动力学测量和肌电信号法分别从力学和生物电的角度精确地量化大鼠行进行为的变化参数,但还需要与其他评估方法联用才能从整体反映大鼠的行进行为。为此,研究者可根据自己的研究目的、研究内容以及实验条件等选择最合适的评价方法,建议采用 2~3 种方法联用,以利于提高行进行为评价结果的可靠性和科学性。

参考文献:

- [1] Blickhan R, Seyfarth A, Geyer H, *et al.* Intelligence by mechanics [J]. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci*, 2007, 365 (1850):199-220.
- [2] 周鹏. 德国牧羊犬步态分析及运动仿真[D]. 长春:吉林大学, 2007:3-4.
- [3] Karamia M, Bathaiea SZ, Tiraihib T, *et al.* Crocin improved locomotor function and mechanical behavior in the rat model of contused spinal cord injury through decreasing calcitonin gene related peptide [J]. *Phytomedicine*, 2013, 21(1):62-67.
- [4] De Santis M, Pan B, Lian J, *et al.* Different effects of Bifepunox, Aripiprazole, and Haloperidol on body weight gain, food and water intake, and locomotor activity in rats [J]. *Pharmacol Biochem Behav*, 2014, 124:167-173.
- [5] Antonioua K, Kafetzopoulou E, Papadopoulou-Daifoti Z, *et al.* Damphetamine, cocaine and caffeine: a comparative study of acute effects on locomotor activity and behavioural patterns in rats [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 1998, 23(2):189-196.
- [6] 魏翔, 刘晓莉. 帕金森病大鼠模型运动行为测评方法的研究进展[J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(2):209-215.
- [7] Grillner S. Locomotion in vertebrates: central mechanisms and reflex interaction [J]. *Physiol Rev.*, 1975, 55(2):247-304.
- [8] Singha A, Krisab L, Frederickb KL, *et al.* Forelimb locomotor rating scale for behavioral assessment of recovery after unilateral cervical spinal cord injury in rats [J]. *J Neurosci Methods*, 2014, 226:124-131.
- [9] Tarlov IM, Klingler H. Spinal cord compression studies. II. Time limits for recovery after acute compression in dogs [J]. *AMA Arch Neurol Psychiatry*, 1954, 71(3):271-290.
- [10] Cheng H, Cao Y, Olson L. Spinal cord repair in adult paraplegic rats: partial restoration of hind limb function [J]. *Science*, 1996, 273(5274):510-513.
- [11] Basso DM, Beattie MS, Bresnahan JC. A sensitive and reliable locomotor rating scale for open field testing in rats [J]. *J Neurotrauma*, 1995, 12(1):1-21.
- [12] Evans RM, Davies M. ScoreCentre: A computer program to assist with collection and calculation of BBB locomotor scale data

- [J]. *J Neurosci Methods*, 2010, 194(1):102-107.
- [13] Gale K, Kerasidis H, Wrathall JR. Spinal cord contusion in the rat: behavioral analysis of functional neurologic impairment [J]. *Exp Neurol*, 1985, 88(1):123-134.
- [14] Guertin PA. Semiquantitative assessment of hindlimb movement recovery without intervention in adult paraplegic mice [J]. *SpinalCord*, 2005, 43(3):162-166.
- [15] Singh A, Krisa L, Frederick KL, *et al.* Forelimb locomotor rating scale for behavioral assessment of recovery after unilateral cervical spinal cord injury in rats [J]. *J Neurosci Methods*, 2014, 226(8):124-131.
- [16] Wong JK, Sharp K, Steward O. A straight alley version of the BBB locomotor scale [J]. *Exp Neurol*, 2009, 217(2):417-420.
- [17] Popovich PG, Tovar CA, Wei P, *et al.* A reassessment of a classic neuroprotective combination therapy for spinal cord injured rats: LPS/pregnenolone/indomethacin [J]. *Exp Neurol*, 2012, 233(2):677-685.
- [18] 徐冬晨, 王红星, 王彤. 大鼠部分重量支撑平板训练新模型在不完全性脊髓损伤运动功能改善中的应用[J]. *中国康复医学杂志*, 2010, 25(8):721-724.
- [19] Eftaxiopolou T, Macdonald W, Britzman D, *et al.* Gait compensations in rats after a temporary nerve palsy quantified using temporo-spatial and kinematic parameters [J]. *J Neurosci Methods*, 2014, 232:16-23.
- [20] Whishaw IQ, Kolb B. The behavior of the laboratory rat: a handbook with tests [M]. New York: Oxford University Press, 2005. 150.
- [21] Kloefkorn HE, Jacobs BY, Loye AM, *et al.* Spatiotemporal gait compensations following medial collateral ligament and medial meniscus injury in the rat: correlating gait patterns to joint damage [J]. *Arthritis Res Ther*, 2015, 17(1):287.
- [22] Hildebrand M. The quadrupedal gaits of vertebrates [J]. *BioScience*, 1989, 39(11):766-775.
- [23] Koopmans GC, Deumens R, Brook G, *et al.* Strain and locomotor speed affect over-ground locomotion in intact rats [J]. *Physiol Behav*, 2007, 92(5):993-1001.
- [24] Gorska T, Zmysłowski W, Majczyński H. Overground locomotion in intact rats: interlimb coordination, support patterns and support phases duration [J]. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, 1999, 59(2):131-144.
- [25] Fischer MS, Schilling N, Schmidt M, *et al.* Basic limb kinematics of small therian mammals [J]. *J Exp Biol*, 2002, 205:1315-1338.
- [26] 田为军. 德国牧羊犬运动特性及其运动模型研究[D]. 长春: 吉林大学, 2011:3-4.
- [27] Monte-Raso VV, Barbieri G, Mazzer N, *et al.* A new treadmill-type motorized walking belt machine for video recording of the Rat's gait and sciatic functional index measurement. A comparative study with other methods [J]. *J Neurosci Methods*, 2010, 189(1):23-29.
- [28] Piesla MJ, Leventhal L, Strassle BW, *et al.* Abnormal gait, due to inflammation but not nerve injury, reflects enhanced nociception in preclinical pain models [J]. *Brain Res*, 2009, 1295:89-98.
- [29] Jacobs BY, Kloefkorn HE, Allen KD. Gait analysis methods for rodent models of osteoarthritis [J]. *Curr Pain Headache Rep*, 2014, 18(456):1-11.
- [30] Metz GA, Merkler D, Dietz V, *et al.* Efficient testing of motor function in spinal cord injured rats [J]. *Brain Res*, 2000, 883(2):165-177.
- [31] Ma SF, Chen Y J, Zhang J X, *et al.* Adoptive transfer of M2 macrophages promotes locomotor recovery in adult rats after spinal cord injury [J]. *Brain Behav Immun*, 2015, 45:157-170.
- [32] Hamers FP, Lankhorst AJ, van Laar TJ, *et al.* Automated quantitative gait analysis during overground locomotion in the rat: its application to spinal cord contusion and transection injuries [J]. *J Neurotrauma*, 2001, 18(2):187-201.
- [33] Zhou M, Zhang W, Chang J, *et al.* Gait analysis in three different 6-hydroxydopamine rat models of Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2015, 584:184-189.
- [34] Dorman CW, Krug HE, Frizelle SP, *et al.* A comparison of DigiGait™ and TreadScan™ imaging systems: assessment of pain using gait analysis in murine monoarthritis [J]. *J Pain Res*, 2014, 7:25-35.
- [35] Fischer MS, Schilling N, Schmidt M, *et al.* Basic limb kinematics of small therian mammals [J]. *J Exp Biol*, 2002, 205(9):1315-1338.
- [36] Tashman S, Anderst W. In-vivo measurement of dynamic joint motion using high speed biplane radiography and CT: application to canine ACL deficiency [J]. *J Biomech Eng*, 2003, 125(2):238-245.
- [37] Roland ES, Hull ML, Stover SM. Design and demonstration of a dynamometric horseshoe for measuring ground reaction loads of horses during racing conditions [J]. *J Biomech*, 2005, 38(10):2102-2112.
- [38] Johnson WL, Jindrich DL, Roy RR, *et al.* Quantitative metrics of spinal cord injury recovery in the rat using motion capture, electromyography and ground reaction force measurement [J]. *J Neurosci Methods*, 2012, 206(1):65-72.
- [39] Handley DE, Ross JF, Carr GJ. A Force Plate System for Measuring Low-Magnitude Reaction Forces in Small Laboratory Animals [J]. *Physiol Behav*, 1998, 64(5):661-669.
- [40] Zumwalta AC, Hamrick M, Schmitta D. Force plate for measuring the ground reaction forces in small animal locomotion [J]. *J Biomech*, 2006, 39(15):2877-2881.
- [41] Reaz MIB, Hussain MS, Mohd-Yasir F. Techniques of EMG signal analysis: detection, classification and applications [J]. *Biol Proced Online*, 2006, 8(1):11-35.
- [42] Muir GD, Whishaw IQ. Red nucleus lesions impair overground locomotion in rats: A kinetic analysis [J]. *Eur J Neurosci*, 2000, 12(3):1113-1122.
- [43] Basmajian JV, De Luca C. *Muscles alive: Their functions revealed by electromyography* [M]. Baltimore: Williams and Wilkins, 1985. 112.
- [44] Biedermann F, Schumann NP, Fischer MS, *et al.* EMG-

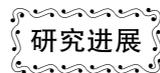
- recordings using a miniaturised matrix electrode: a new technique for small animals [J]. *J Neurosci Methods*, 2000, 97(1):69 – 75.
- [45] Canu MH, Garnier C, Lepoutre FX, *et al.* A 3D analysis of hindlimb motion during treadmill locomotion in rats after a 14 – day episode of simulated microgravity [J]. *Behav Brain Res*, 2005, 157(2):309 – 321.
- [46] Metz GA, Whishaw IQ. Cortical and subcortical lesions impair skilled walking in the ladder rung walking test: a new task to evaluate fore- and hindlimb stepping, placing, and co-ordination [J]. *J Neurosci Methods*, 2002, 115(2):169 – 179.
- [47] Riek – Burchardt M, Henrich-Noack P, Metz GA, *et al.* Detection of chronic sensorimotor impairments in the ladder rung walking task in rats with endothelin – 1 – induced mild focal ischemia [J]. *J Neurosci Methods*, 2004, 137(2):227 – 233.
- [48] Chou KH, Lin WC, Lee PL, *et al.* Structural covariance networks of striatum subdivision in patients with Parkinson’s disease [J]. *Hum Brain Mapp*, 2015, 36(4):1567 – 1584.
- [49] 余文娟, 彭蓉. 帕金森病冻结步态的研究进展[J]. *华西医学*, 2014, 29(1):155 – 159.
- [50] Nanhoe – Mahabier w, Snijders AH, Delval A, *et al.* Split-belt locomotion in Parkinson’s disease with and without freezing of gait [J]. *Neuroscience*, 2013, 236:110 – 116.
- [51] Tang WL, McDowell K, Limsam M, *et al.* Locomotion analysis of Sprague-Dawley rats before and after injecting 6 – OHDA [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 210(1):131 – 133.
- [52] Madete JK, Klein A, Dunnett SB, *et al.* Three-dimensional motion analysis of postural adjustments during over-ground locomotion in a rat model of Parkinson’s disease [J]. *Behav Brain Res*, 2011, 220(1):119 – 125.
- [53] 王军. 6 – 羟基多巴胺致偏侧帕金森大鼠的 CatWalk 行为学研究[D]. 深圳:南方医科大学, 2012:3 – 4.
- [54] Lakes EH, Allen KD. Gait analysis methods for rodent models of arthritic disorders: reviews and recommendations [J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 3:1 – 13.
- [55] Chao OY, Pum ME, Li JS, *et al.* The grid-walking test: assessment of sensorimotor deficits after moderate or severe dopamine depletion by 6 – hydroxydopamine lesions in the dorsal striatum and medial forebrain bundle [J]. *Neuroscience*, 2012, 202:318 – 325.
- [56] Chao OY, Wang AL, Nikolaus S. NK 3 receptor agonism reinstates temporal order memory in the hemiparkinsonian rat [J]. *Behav. Brain Res*, 2015, 285:208 – 212.
- [57] Asakawa T, Fang H, Sugiyama K, *et al.* Animal behavioral assessments in current research of Parkinson’s disease [J]. *Neurosci Biobehav Rev*, 2016, 65:63 – 94.
- [58] 潘钰, 郑淑燕. 脊髓损伤神经功能定量评价研究进展[J]. *中国康复医学杂志*, 2014, 29(4):379 – 385.
- [59] Oliveri RS, Bello S, Biering-Sørensen F. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: Systematic review with meta-analyses of rat models [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 62:338 – 353.
- [60] Wu M, Landry JM, Schmit BD, *et al.* Robotic resistance treadmill training improves locomotor function in human spinal cord injury: a pilot study [J]. *Arch Phys Med Rehabil*, 2012, 93(5):782 – 789.
- [61] Jin Y, Bouyer J, Shumsky JS, *et al.* Transplantation of neural progenitor cells in chronic spinal cord injury [J]. *Neuroscience*, 2016, 21(320):69 – 82.
- [62] Sun Y, Liu D, Su P, *et al.* Changes in autophagy in rats after spinal cord injury and the effect of hyperbaric oxygen on autophagy [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 618:139 – 145.
- [63] Lee SH, Kim Y, Rhew D, *et al.* Effect of the combination of mesenchymal stromal cells and chondroitinase ABC on chronic spinal cord injury [J]. *Cytherapy*, 2015, 17(10):1374 – 1383.
- [64] Redondo – Castro E, Torres-Espín A, García-Álías G, *et al.* Quantitative assessment of locomotion and interlimb coordination in rats after different spinal cord injuries [J]. *J Neurosci Methods*, 2013, 213(2):165 – 178.
- [65] Knuttgen HG, Vogel JA, Poortmans JR, *et al.* *Biochemistry of Exercise* [M]. Boston: Human Kinetics Publishers, 1983. 63 – 75.
- [66] 田野, 高铁群. 大鼠运动性疲劳模型的建立[J]. *北京体育大学学报*, 1995, 18(4):49 – 53.

[修回日期]2016-04-18

(上接第 14 页)

- [17] Mott R, Talbot CJ, Turri MG, *et al.* A method for fine mapping quantitative trait loci in outbred animal stocks [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000, 97:12649 – 12654.
- [18] Liu EY, Zhang Q, McMillan L, *et al.* Efficient genome ancestry inference in complex pedigrees with inbreeding [J]. *Bioinformatics*. 2010, 26:i199 – i207.
- [19] Baum, L. E.; Petrie, T. *Statistical Inference for Probabilistic Functions of Finite State Markov Chains* [J]. *The Annals of Mathematical Statistics*. 1966, 37(6):1554 – 1563.
- [20] Valdar W, Solberg LC, Gauguier D, *et al.* Genome-wide genetic association of complex traits in heterogeneous stock mice [J]. *Nat Genet*. 2006, 38:879 – 887.
- [21] Valdar W, Holmes CC, Mott R, Flint J, *et al.* Mapping in structured populations by resample model averaging [J]. *Genetics*. 2009, 182:1263 – 1277.
- [22] Huang S, Holt J, Kao C-Y, *et al.* A novel multi-alignment pipeline for high-throughput sequencing data [J]. *Database* 2014:bau057.
- [23] Munger SC, Raghupathy N, Choi K, *et al.* RNA-seq alignment to individualized genomes improves transcript abundance estimates in multiparent populations [J]. *Genetics*. 2014, 198:59 – 73.

[修回日期]2016-04-05



外周 P2X3 受体在不同炎性痛模型中的作用比较

肖婷, 杜俊英, 乐小琴, 俞婕, 潘宁芳, 房军帆, 方剑乔*

(浙江中医药大学第三临床医学院, 杭州 310053)

【摘要】 P2X3 亚单位是嘌呤受体 P2X 家族成员之一, 高度选择性的表达于伤害感受器上, 参与炎性痛病理过程。目前炎性痛的动物模型主要包括福尔马林炎性痛模型、弗氏佐剂炎性痛模型、角叉菜胶炎性痛模型、蜜蜂毒炎性痛模型等。不同的炎性痛模型具有不同的病理特征, 福尔马林模型的主要特点是双时相的自发痛, 由于炎症持续时间的不同, 角叉菜胶模型一般用于亚急性的炎症模型, 而弗氏佐剂模型和蜜蜂毒模型, 以及松节油模型则用于慢性炎性痛模型研究, P2X3 受体在其中的表达和功能可能有所不同, 本文就外周 P2X3 受体在不同炎性痛模型中的作用做一综述。

【关键词】 P2X3 受体; 炎性痛; 动物模型

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0074-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.013

Comparison of the effects of periphery P2X3 receptors in different inflammatory pain models

XIAO Ting, DU Jun-ying, LE Xiao-qin, YU Jie, PAN Ning-fang, FANG Jun-fan, FANG Jian-qiao*

(The Third Clinical Medical College, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

【Abstract】 P2X3 subunit was one of the P2X receptor family members, which highly selective expressed in the nociceptors, and involved in the pathological process of inflammatory pain. Currently, animal inflammatory pain models included formalin inflammatory pain model, Freund's adjuvant inflammatory pain model, the carrageenan inflammatory pain model, bee venom inflammatory pain model, et al. Different inflammatory pain model had different pathological features, the main features of the formalin pain model is double phase of spontaneous pain, due to different duration time of inflammation, carrageenan inflammatory pain model is commonly used in sub acute inflammation model, Freund's adjuvant inflammatory pain model, bee venom inflammatory pain model, and turpentine inflammatory pain model are for chronic inflammatory pain model research, the expression and function of P2X3 may be different. This paper focused on the effects of P2X3 receptors in different inflammatory pain models.

【Key words】 P2X3 receptors; Inflammatory pain; Animal models

疼痛作为人类第五大生命体征,也是临床上常见症状之一,严重困扰人类健康,其中炎性痛是最常见的病理类型之一,其他慢性疼痛大多与这类疼

痛有关。P2X3 亚单位是嘌呤受体 P2X 家族成员之一,高度选择性的表达于伤害感受器上,在伤害感受器中起重要作用,参与疼痛通路的传导^[1]。目前

【基金项目】 国家自然科学基金项目(81473772);浙江省医药卫生科技项目省部共建项目(WKJ-ZJ-1419);浙江省自然科学基金项目(LQ15H270003);浙江省医药卫生科技项目一般项目(2015KYB281)。

【作者简介】 肖婷(1991-),女,硕士生研究生,研究方向:针灸镇痛与免疫调节的相关性研究。E-mail:741409838@qq.com。

【通讯作者】 方剑乔(1961-),男,教授,研究方向:针灸镇痛与免疫调节的相关性研究。E-mail:fangjianqiao7532@163.com。

国内外很多研究都表明外周的 P2X3 受体参与炎性痛的产生,但其具体机制尚未完全清楚^[2,3]。由于疼痛机制复杂,利用动物模型研究疼痛机制迫切需要,目前有多种用于研究炎性疼痛的动物模型,并且每种模型的特性不同,不同的炎性痛模型中外周的 P2X3 受体的可能作用不同,目前尚未有研究对其进行总结,故本文将围绕不同炎性痛模型阐述 P2X3 受体的作用。

1 各类炎性痛模型的一般特点

1.1 福尔马林炎性痛模型

福尔马林模型是一种无菌性炎症模型,福尔马林又称甲醛,经过一定倍数的稀释后,注射于大鼠后足掌部皮下,产生一种明显的自发性痛行为反应,即注射足表现出缩腿、舔爪及颤抖等反应,此模型具有良好的重复性,操作简单,该模型所导致的疼痛行为反应分为两个时相,第一时相为急性疼痛期,持续约 3~5 min;之后是 10~15 min 的间歇期;第二时相为强直期,持续约 20~60 min^[4]。国内另有研究发现微量甲醛皮下注射,造成的炎性热痛敏可持续 7 d^[5]。

1.2 弗氏佐剂炎性痛模型

1.2.1 多发性佐剂关节炎模型

本模型一般采用动物足底皮内注射高浓度的弗氏佐剂,表现为多个关节的红肿,多数动物在 18~25 d 炎症最明显,由于弗氏佐剂是一种免疫佐剂,故此模型诱导的是免疫反应性炎症,其缺点是病变范围广泛,除炎症外,还伴有免疫系统疾病的产生,不利于单一的研究^[6]。

1.2.2 单发性佐剂关节周围炎模型

此模型克服了多发性佐剂关节炎模型的缺点,将弗氏佐剂注入足底皮下而非足内,造成局部组织周围炎症,注射 1 d 后即产生明显的红肿,运动障碍和自我保护,以及机械和热痛过敏,本模型痛敏持续时间一般是 1~3 周,随着时间延长,也会出现多发性关节炎模型的缺点。有研究发现大鼠后爪完全弗氏佐剂(CFA)皮下注射 3 h 后注射侧发生水肿和红斑等炎症反应,4~5 h 发生炎性痛觉过敏,1~4 d 达到高峰,可持续长达 14 d^[7]。

1.3 角叉菜胶炎性痛模型

角叉菜胶是从一种红藻类鹿角菜种提取的,具有过敏刺激的作用,最早开始一般与白陶土混合液注射,增强其致炎效果,之后则发展为直接单独角

叉菜胶皮下注射,一般在注射后 2 h 即出现红肿,皮肤温度显著升高,24~48 h 内出现自发痛,PWT 显著降低^[8]。亦有研究发现角叉菜胶皮下注入后,0.5 h 开始肿胀,2.5~3 h 肿胀达到高峰,8 h 后肿胀开始消退。此模型致炎强烈,一般用于亚急性炎症模型^[9]。

1.4 蜜蜂毒炎性痛模型

此模型是一种化学组织损伤性炎性痛模型,能够呈现多种疼痛表现型,包括持续性自发痛相关行为,与福尔马林试验自发痛相似,原发性热和机械痛敏以及镜像热痛敏,其优点是能够极大的避免个体间和实验间的差异^[10]。大鼠足底皮下注入蜜蜂毒溶液后,引起局部组织炎性红肿,并且引起单相自发痛反应和较长时间的热和机械性痛觉过敏。即注射侧足产生持续 1~2 h 单相性自发痛,诱发长达 3~4 d 热痛和机械痛敏^[11,12]。

1.5 松节油炎性痛模型

动物局部皮下注射松节油,可出现红肿、发热,出现明显的抽搐,并出现热痛觉过敏,至注射后第 5 d 最明显,随后逐渐增大,于第 13 d 左右后恢复到正常值,故此模型主要用于慢性炎性痛的研究^[13,14]。

2 P2X₃ 受体的发现、一般特性及分布特点

2.1 P2X₃ 受体的发现

1995 年,Chen 等^[1]首次用大鼠背根神经节的 cDNA 编码,克隆出 P2X3 亚基,发现其高度选择性表达于伤害性初级传入神经元上。之后在孤束核和三叉神经脊束核中检测到 P2X3 阳性细胞间接参与疼痛信号传导^[15]。

2.2 P2X₃ 受体的一般特性

P2X3 受体通过形成同源(P2X3)或异源(P2X2/3)三聚体而成为功能性通道^[16,17]。P2X3 受体亚基由两个跨膜区、胞内的 N 末端和 C 末端及细胞外环组成,细胞外环包含大多数的氨基酸,其中包含的 10 个氨基酸残基,以二硫键相互连接^[18]。细胞外环含有通道调控位点,有相应的激动剂、拮抗剂和调节剂的作用位点,其中的赖氨酸及精氨酸残基为激动剂结合位点^[19]。C 端 Src 抑制酶(Csk)可直接磷酸化 P2X3 受体酪氨酸 393 残基,并且抑制受体电流^[20]。跨膜区参与离子中心孔道的形成,并涉及离子通道开放控制^[21]。

P2X3 受体是配体门控非选择性阳离子通道,激

活时,能够通透 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} ,但对 Ca^{2+} 通透性较高,P2X₃ 受体激活时,通道开放,细胞内 Ca^{2+} 浓度升高^[22,23]。同聚 P2X₃ 受体对 pH 不太敏感,在分离的哺乳动物感觉神经元上,酸性 pH 值可以增加三磷酸腺苷(ATP)的兴奋性作用,在炎症局部的酸化环境中,感觉神经节上的异聚体 P2X_{2/3} 对伤害性刺激敏感性增加。低温能够显著下降 P2X₃ 受体的反应性,RhoA 激酶依赖性 P2X₃ 受体膜转运至细胞膜对温度高敏感^[24]。根据对 P2X 受体激动剂 $\alpha\beta$ -meATP 的敏感性和电流脱敏的速率,P2X 家族分为快速脱敏和 $\alpha\beta$ -meATP 敏感受体(P2X₁ 和 P2X₃);缓慢或乏脱敏和 $\alpha\beta$ -meATP 不敏感受体(P2X₂、P2X₄、P2X₇),而异聚体 P2X_{2/3} 属于乏脱敏但 $\alpha\beta$ -meATP 敏感受体^[25]。

2.3 P2X₃ 受体的分布特点

最初研究报道发现 P2X₃ 受体 mRNA 高度选择性的表达于大鼠背根神经节(DRG)和结状神经节(NG)的神经元上,且主要表达于大鼠 DRG 的中小直径神经元中^[1,26],后继研究表明也有 P2X₃ 受体选择性表达于三叉神经节(TG)上^[27]。P2X₃ 受体高度表达于对胶质细胞源性神经营养因子(GDNF)敏感的神经元细胞上,大鼠 DRG 中 P2X₃ 受体阳性细胞高度与凝集素 B4(IB4)、抗氟离子酸性磷酸酶(FRAP)、瞬时受体电位香草酸亚型 1(TRPV1)共表达,少量与降钙素基因相关肽(CGRP)共表达^[28-30]。亦有研究表明在 DRG 和 TG 上,P2X₃ 受体和 P 物质(SP)共表达^[31]。然而,有研究发现人类 DRG 中,P2X₃ 受体阳性细胞不表达酪氨酸激酶(TrkA)^[32]。

3 外周 P2X₃ 在不同类型炎性痛模型中的作用比较

3.1 福尔马林模型

足底注射活性蓝(一种 P2X₃ 和 P2X_{2/3} 受体活性变构增强子)增强福尔马林大鼠的痛反应^[33]。大鼠后肢足底注射福尔马林后,免疫荧光检测 L5-6DRG 中 P2X₃ 受体的表达,发现其主要表达于中小神经元的细胞质和膜上,DRG 中 P2X₃ 转录的表达在注射福尔马林后 30 min 和 1 h 时无改变,而在 12 h 后显著增加,注射后 24 h 发现 P2X₃ 受体功能上调。这些表明福尔马林注射可以引起 DRG 中 P2X₃ 受体的早期上调^[34]。亦有研究发现皮下注射福尔马林产生 60 min 自发痛行为反应(第一时相 0~6 min,第二时相 36~60 min),并且一种选择性 P2X₃

受体拮抗剂或反义寡核苷酸都可以减轻福尔马林产生的两个时相自发痛,运用反义寡核苷酸抗 P2X₃ 受体减少隐神经中 P2X₃ 受体表达,并且研究表明了通过调节外周炎症组织中瞬间受体电位离子通道亚型 A1(TRPA1)受体,5-羟色胺 3(5-HT₃)受体,5-羟色胺 1A(5-HT_{1A})受体调节 P2X₃ 受体的活化和 ATP 的释放导致了炎性痛产生^[35]。

3.2 完全弗氏佐剂模型

外周炎症损伤会引起 P2X₃ 受体表达的变化,大鼠足底注射 CFA 建立的外周慢性炎性痛模型中,发现 L4-6DRG 中 P2X₃ 受体表达增加,说明炎症可以上调 DRG 中 P2X₃ 受体的表达^[36],小鼠下唇 CFA 炎性痛模型可以引起须垫皮肤机械痛敏,并且支配须垫皮肤和下唇的 P2X₃ 受体 TG 神经元数量增加,研究表明 TG 中 P2X₃ 受体的过度表达是小鼠 CFA 炎性须垫皮肤异位机械痛敏的基础^[37]。大鼠前列腺 CFA 炎性模型中,检测模后第 3 d 和 10 d 的 L6-S1 DRG 神经元,发现 P2X₃ 受体表达和功能上调,促进了神经元敏化,从而导致了慢性前列腺炎性痛^[38]。大鼠颞下颌关节 CFA 单发性关节炎模型中,出现持续的口面部的深组织痛敏(持续至模后 15 d),并且模后第 15 d 时 TG 中的小型神经元细胞中 P2X₃ 阳性细胞数增加,而在中和大型神经元细胞中无改变,P2X₃ 受体参与大鼠颞下颌关节炎深组织痛的产生^[39]。而 Zhu 发现在 CFA 炎性痛模型大鼠中,P2X₃mRNA 的表达频率未发现改变,其可能原因是对 CFA 炎症反应的 P2X₃ 受体调节发生于蛋白表达或对配体的通道敏感性层面^[40]。

3.3 松节油炎性痛模型

大鼠足底注射松节油建立的慢性炎性痛模型中发现热痛阈下降,直至 14 d 后恢复正常,DRG 神经元中,中小型 P2X₃ 受体阳性细胞数增加,表明 P2X₃ 受体在中小型 DRG 神经元中的改变可能参与了炎性痛过敏的产生和维持^[41]。大鼠面部皮下注射松节油建立面部慢性炎性痛模型,发现 TG 中 P2X₃ 受体阳性神经元增多,其胞体上 P2X₃ 受体蛋白表达上调^[42]。

3.4 角叉菜胶炎性痛模型

有研究发现鞘内注射或足底注射 A-317491 不能减轻角叉菜胶炎性痛模型大鼠的热痛觉过敏,而能够缓解角叉菜胶致炎的机械性痛敏,说明可能是 P2X₃ 受体介导角叉菜胶炎性热痛敏和机械痛敏机制不同^[43,44]。亦有研究发现大鼠颞下颌关节角叉

菜胶炎性痛模型中, TNP-ATP(一种 P2X1, P2X3 和 P2X2/3 受体拮抗剂)显著减轻炎性痛敏, 而 P2X1 受体不参与此模型痛敏, 说明可能是 P2X3 和 P2X2/3 受体参与了大鼠颞下颌关节角叉菜胶模型的炎性痛敏^[45]。国内另有研究发现大鼠足底皮下注射角叉菜胶后, 患足出现热痛敏和机械性痛敏, 于 12 h 达最明显, 72 h 后恢复至正常。L4-6DRG 中 P2X3 受体阳性神经元细胞数于注射后 12 h 开始明显增加, 24 h 达到高峰, 然后逐渐下降, 于第 7 d 恢复正常水平^[46], 大鼠的痛阈在模后 3 d 恢复正常, 而 P2X3 受体的水平至模后 7 d 恢复正常, 其原因可能是 P2X3 受体去磷酸化失活, 即使表达量高于正常, 痛阈仍为正常水平, 具体机制有待进一步研究^[46]。

3.5 其他

有研究表明在人类肠道炎症疾病中发现肠道中 P2X3 受体阳性细胞增多, 说明 P2X3 受体可能参与肠道炎症和疼痛发病机制^[47]。亦有研究发现慢性食管炎增加 P2X3mRNA 表达并且伴随 TRPV1、NGF、GDNF 的上调, 该食管粘膜基因改变可能调节人类食管炎的敏化^[48]。脂多糖引起的大鼠牙髓炎模型中, 发现 V1-V2 TG 中 P2X3 受体表达增加, 并且主要表达于中小型神经元中, 上调的 P2X3 受体可能引起神经元敏化, 介导慢性炎性疼痛^[49]。三硝基苯磺酸(TNBS)性慢性胰腺炎模型大鼠中, TNBS 的注射显著上调胰腺 DRG 中 P2X3 受体的表达和功能, 并且研究表明通过初级感觉神经元中肾上腺素信号介导 P2X3 受体的敏化, 从而导致了胰腺炎的痛敏^[50]。胶原蛋白抗体关节炎模型(CAIA)大鼠中, 检测大鼠模后 15 d 和 47 d 的 DRG 发现 P2X3 受体表达显著增高^[51], 大鼠模后 15 d 是炎症的高峰期, 而模后 47 d 则是炎症消退, 疼痛持续期。所以可能 P2X3 受体不仅参与炎性痛, 而且还有后期的神经病理性痛, 此关节炎模型是一种神经化学损伤模型。

4 结语

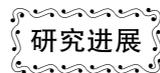
综上所述, 以上各种炎性痛模型特点不同, 一般福尔马林模型的主要特点是双时相的自发痛, 分为急性疼痛期和强直期。角叉菜胶模型一般用于亚急性的炎症模型, 而弗氏佐剂模型和蜜蜂毒模型, 以及松节油模型则用于慢性炎性痛的研究。配体门控非选择性通道 P2X3 受体在不同炎性痛中的

作用不同, 福尔马林炎性痛模型中, 主要是早期外周组织中小神经元的胞质和膜上 P2X3 受体表达和功能上调介导疼痛的产生。不同组织 CFA 慢性炎性痛模型中, 主要表现晚期外周 P2X3 受体表达和功能上调, 但 P2X3mRNA 层面却无改变。相比 CFA 模型, 角叉菜胶模型炎症持续时间较短, 并且外周 P2X3 受体主要参与机械痛敏, 而不参与热痛敏, 主要表现为较早期 P2X3 受体表达的上调, 但其具体机制有待进一步研究。松节油模型中, 主要是晚期外周 DRG 中小神经元 P2X3 表达增加。而目前尚未有研究涉及蜜蜂毒模型 P2X3 的改变, 需要进一步的探讨。

参考文献:

- [1] Chen CC, Akopian AN, Sivilotti L, *et al.* A P2X purinoceptor expressed by a subset of sensory neurons[J]. *Nature*, 1995, 337(6548): 428-431.
- [2] Hemmings-Mieszczak M, Dorn G, Natt FJ, *et al.* Independent combinatorial effect of antisenseoligonucleotides and RNAi-mediated specific inhibition of the recombinantRat P2X3 receptor[J]. *Nucleic Acids Res*, 2003, 31(8): 2117-2126.
- [3] Honore P, Kage K, Mikusa J, *et al.* Analgesic profile of intrathecal P2X(3) antisenseoligonucleotide treatment in chronic inflammatory and neuropathic painstates in rats[J]. *Pain*, 2002, 99(1-2): 11-19.
- [4] 黄浩, 丁明敏, 陈雅娟. 两种福尔马林试剂对大鼠炎性痛诱导的行为学比较[J]. *福建师范大学学报*, 2008, 24(5): 75-78.
- [5] 代小奇, 刘金锋, 都兴光, 等. 小鼠微量甲醛炎性痛模型的建立及其脊髓背角 c-fos 的表达[J]. *哈尔滨医科大学学报*, 2011, 45(5): 421-424.
- [6] 汪伟, 王文, 武胜昔, 等. 炎性痛和神经病理性痛模型[J]. *神经解剖学杂志*, 2007, 23(1): 93-98.
- [7] 冯继英. 脊髓 HMGB1 在大鼠炎性痛中的作用[D]. 苏州大学学位论文, 2014.
- [8] Yang LC, Marsala M, Yaksh TL. Characterization of time course of spinal amino acids, citrulline and PGE2 release after carrageenan /kaolin- induced knee joint inflammation: a chronic microdialysis study[J]. *Pain*, 1996, 67(2-3): 345-354.
- [9] 肖保全, 朱少璇, 杨威, 等. 角叉菜胶致大鼠足肿胀模型探讨及其机制研究[J]. *中国实用医药*, 2008, 3(23): 63-64.
- [10] Yang F, Yang Y, Wang Y, *et al.* Selective class I histone deacetylase inhibitors suppress persistent spontaneous nociception and thermal hypersensitivity in a rat model of bee venom-induced inflammatory pain[J]. *Sheng Li Xue Bao.*, 2015, 67(5): 447-454.
- [11] Chen HS, Lei J, He X, *et al.* Pivotal involvement of neurogenic mechanism in subcutaneous bee venom induced inflammation and allodynia in anesthetized conscious rats [J]. *Experimental Neurology*, 2006, 200(2): 386-391.

- [12] Chen HS, Lei J, He X, *et al.* Peripheral involvement of PKA and PKC in subcutaneous bee venom-induced persistent nociception, mechanical hyperalgesia, and inflammation in rats [J]. *Pain*, 2008, 135(1-2): 31-36.
- [13] Neumann S, Doubell TP, Leslie T, *et al.* Inflammatory pain hypersensitivity mediated by phenotypic primary sensory neurons. *Nature*, 1996, 384(6607): 360-364.
- [14] 刘羊. 大鼠面部慢性炎症痛导致三叉神经节表达 P2X3 神经元表型的转变[D]. 华中科技大学硕士学位论文, 2006.
- [15] Llewellyn-Smith IJ, Burnstock G. Ultrastructural localization of P2X3 receptors in rat sensory neurons[J]. *Neuroreport*, 1998, 9(11): 2545-2550.
- [16] Virginio C, North RA, Surprenant A. Calcium permeability and block at homomeric and heteromeric P2X2 and P2X3 receptors, and P2X receptors in rat nodose neurons [J]. *Physiol*, 1998, 510(1): 27-35.
- [17] Köles L, Gerevich Z, Oliveira JF, *et al.* Interaction of P2 purinergic receptors with cellular macromolecules [J]. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*, 2008, 377(1): 1-33.
- [18] North RA. Molecular physiology of P2X receptors [J]. *Physiol Rev*, 2002, 82(4): 1013-1067.
- [19] Fischer W, Zadori Z, Kullnick Y, *et al.* Conserved lysin and arginin residues in the extracellular loop of P2X(3) receptors are involved in agonist binding [J]. *Eur J Pharmacol*, 2007, 576(1-3): 7-17.
- [20] D'Arco M, Giniatullin R, Leone V, *et al.* The c-terminal src inhibitory kinase (Csk)-mediated tyrosine phosphorylation is a novel molecular mechanism to limit P2X3 receptor function in mouse sensory neurons [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(32): 21393-21401.
- [21] Burnstock G. Introduction: P2 receptors [J]. *Curr Top Med Chem*, 2004, 4(8): 793-803.
- [22] Bean BP. Pharmacology and electrophysiology of ATP-activated ion channels [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 1992, 13(3): 87-90.
- [23] Khakh BS, North RA. P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease [J]. *Nature*, 2006, 442(7102): 527-532.
- [24] Pryazhnikov E, Fayuk D, Nittytoski M, *et al.* Unusually strong temperature dependence of P2X3 receptor traffic to the plasma membrane [J]. *Front Cell Neurosci*, 2011, 5: 27.
- [25] Franklin C, Braam U, Eisele T, *et al.* Lack of evidence for direct phosphorylation of recombinantly expressed P2X2 and P2X3 receptors by protein kinase C [J]. *Purinergic Signalling*, 2007, 3(4): 377-388.
- [26] Wang L, Feng D, Yan H, *et al.* Comparative analysis of P2X1, P2X2, P2X3, and P2X4 receptor subunits in rat nodose ganglion neurons [J]. *PLoS One*, 2014, 9(5): e96699.
- [27] Burnstock G. P2X receptors in sensory neurons [J]. *BR J Anaesth*, 2000, 84(4): 476-488.
- [28] Bradbury EJ, Burnstock G, McMahon SB. The expression of P2X3 purinoceptors in sensory neurons; effects of axotomy and glial derived neurotrophic factor [J]. *Mol Cell Neurosci*, 1998, 12(4-5): 256-268.
- [29] Vulchanova L, Riedl MS, Shuster SJ, *et al.* Immunohistochemical study of the P2X2 and P2X3 receptor subunits in rat and monkey sensory neurons and their central terminals [J]. *Neuropharmacology*, 1997, 36(9): 1229-1242.
- [30] Guo A, Vulchanova L, Wang J, *et al.* Immunocytochemical localization of the vanilloid receptor 1 (VR1): Relationship to neuropeptides, the P2X3 purinoceptor and IB4 binding sites [J]. *Eur J Neurosci*, 1999, 11(3): 946-958.
- [31] 赵士洁, 殷光甫, 谷远征, 等. 大鼠初级感觉神经元 P2X3 受体的表达及其与 SP 的关系 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2006, 15(1): 91-94.
- [32] Yiangou Y, Facer P, Birch R, *et al.* P2X3 receptor in injured human sensory neurons [J]. *NeuroReport*, 2000, 11(5): 993-996.
- [33] Jarvis MF, Wismer CT, Schweitzer E, *et al.* Modulation of BzATP and formalin induced nociception [J]. *British Journal of Pharmacology*, 2001, 132(1): 259-269.
- [34] Pan AH, Lu DH, Luo XG. Formalin-induced increase in P2X(3) receptor expression in dorsal root ganglia: implications for nociception [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2009, 36(8): 6-11.
- [35] Krimon S, Araldi D, do Prado FC, *et al.* P2X3 receptors induced inflammatory nociception modulated by TRPA1, 5-HT3 and 5-HT1A receptors [J]. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 2013, 112: 49-55.
- [36] Xu GY, Huang LY. Peripheral inflammation sensitizes P2X receptor-mediated responses in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *J Neurosci*, 2002, 22(1): 93-102.
- [37] Yasuda M, Shinoda M, Kiyomoto M, *et al.* P2X3 receptor mediates ectopic mechanical allodynia with inflamed lower lip in mice [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 528(1): 67-72.
- [38] Zhang H, Liu L, Lu G, *et al.* Chemical irritation of the prostate sensitizes P(2)X(3) receptor-mediated responses in rat dorsal root ganglion neurons [J]. *NeuroUrol Urodyn*, 2011, 30(4): 612-618.
- [39] Shinoda M, Ozaki N, Asai H, *et al.* Changes in P2X3 receptor expression in the trigeminal ganglion following monoarthritis of the temporomandibular joint in rats [J]. *Pain* 2005, 116(1-2): 42-51.
- [40] Zhu H, Yu Y, Zheng L, *et al.* Chronic inflammatory pain upregulates expression of P2Y receptor in small-diameter sensory neurons [J]. *Metab Brain Dis*, 2015, 30(6): 1349-1358.
- [41] 杨友华, 杨荣, 黄丹, 等. 慢性炎症痛引起 DRG 感觉神经元 P2X3 受体表达的改变 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2009, 18(5): 515-520.
- [42] 林琳. 面部慢性炎症疼痛模型大鼠三叉神经节 CB1 和 P2X3 受体表达的改变 [D]. 华中科技大学硕士学位论文, 2011.
- [43] McGaraughty S, Wismer CT, Zhu CZ, *et al.* Effects of A-317491, a novel and selective P2X3/P2X2/3 receptor antagonist, on neuropathic, inflammatory and chemogenic nociception following intrathecal and intraplantar administration [J]. *Br J Pharmacol*, 2003, 140(8): 1381-1388.



50余种 miRNA 在神经胶质瘤中的表达水平及作用靶点

刘太奇¹, 陈思羽¹, 李文德², 黄 韧^{2*}

(1. 广东医学院, 广东天然药物研究与开发重点实验室, 广东 湛江 524023;
2. 广东省实验动物监测所, 广东省实验动物重点实验室, 广州 510663)

【摘要】 miRNAs 是一类内源性的非编码小分子 RNA, 它能降解靶 mRNAs 或阻遏其翻译过程。在神经胶质瘤中, 有些 miRNAs 表达水平是上调的, 而有些则是下调的; 有些 miRNAs 在肿瘤发生发展过程中起促进作用, 而有些则发挥着类似抑癌基因的功能。因此, 研究神经胶质瘤中 miRNAs 的表达概况, 既可以为临床上胶质瘤的早期诊断提供辅助依据, 还可以提供新的治疗策略。本文将就 miRNAs 在胶质瘤中表达水平及作用靶点的研究作一综述。

【关键词】 神经胶质瘤; miRNA; 靶点

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0079-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.014

Expression levels and targets of more than fifty miRNAs in glioma

LIU Tai-qi¹, CHEN Si-yu¹, LI Wen-de², HUANG Ren^{2*}

(1. Guangdong Key Laboratory for Research and Development of Natural Drugs, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China; 2. Key Laboratory of Guangdong Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animals Monitoring Institute, Guangzhou 510663)

【Abstract】 miRNAs are a class of small endogenous RNAs that degrade target mRNAs or repress their translation process. Several miRNAs in glioma are up-regulated, while some others down-regulated. Some miRNAs promote tumorigenesis; some others, however, play a similar function of tumor suppressor genes. Therefore, studies on the expression profiles of miRNAs in glioma may afford auxiliary basis for early clinical diagnosis and novel strategies for therapy of glioma. This paper will review on researches about the expression levels of miRNAs and their targets in glioma.

【Key words】 Glioma; miRNA; Target

1 miRNA 简介

miRNA 是一类长约 18~24 个核糖核苷酸的内源性非编码小分子 RNA。最早由 Lee 等人^[1]于 1993 年对秀丽隐杆线虫进行突变体遗传分析时发现, 至今人们在线虫、果蝇、动植物体内已发现 15000 多种 miRNA, 其中有 1 921 个成熟的 miRNA 调控人类约 1/3 编码蛋白的基因^[2]。成熟的

miRNA 由原始 miRNA 转录本 (primary miRNA transcripts, pri-miRNA) 经核酸酶 Drosha 剪切形成 60~70 个核苷酸的发卡状 miRNA 前体 (pre-miRNA)。再由 Ran-GTP 或 Exportin 5 转运至细胞质, Dicer 酶进一步将其修饰成约 18~24 个核苷酸长度的 miRNA 双链, 随后组装形成 miRNA 诱导的沉默复合体 (miRNA-induced silencing complex, miRISC)。双链 miRNA 的一条单链被降解, 另一条单链则通过

[基金项目] 抗肿瘤药物评价公共服务平台的建立 (2015A040404026)。

[作者简介] 刘太奇 (1990-), 女, 硕士在读, 研究方向: 小分子 RNA 与神经胶质瘤。E-mail: 1214298640@qq.com。

[通讯作者] 黄韧 (1959-), 男, 研究员, 研究方向: 实验动物学。E-mail: 1649405216@qq.com。

碱基互补配对的方式识别靶 mRNA,并根据互补程度的不同指导沉默复合体降解靶 mRNA 或阻遏其翻译过程^[3]。

2 miRNA 与胶质瘤的相关性

胶质瘤是人类最常见的原发性脑肿瘤,且有侵袭周围脑组织的倾向。轻度(I~II级)胶质瘤患者确诊后的5年存活率为30%~70%;而胶质母细胞瘤作为侵袭性肿瘤的典型,其瘤体生长快且易迅速渗入周围组织,患者预后差,平均存活期仅9~12个月^[4]。因此,寻找新的诊疗策略以改善患者预后,延长存活期是临床医学亟待解决的重大问题。

近年来,miRNAs与胶质瘤的相关性研究日益成为生命科学的一大研究热点。miRNAs在肿瘤发生与侵袭、血管生成以及肿瘤细胞凋亡等过程中扮演着重要角色。一些miRNAs与临床诊断及放化疗抗性密切相关。此外,它们对于靶向药物分子的疗效具有潜在的影响作用。miRNAs还可能与胶质瘤干细胞的性质相关,由此影响肿瘤的维持与生长^[5]。

3 胶质瘤中表达上调的 miRNAs 及其作用靶点

Li等^[6]通过qRT-PCR实验证实U251、U87、SHG44和A172四个神经胶质瘤细胞系中miR-222含量水平是HA(人星形胶质细胞系)的50到150倍,且以U251及U87细胞中miR-222含量最高。随后,研究者采用Target Scan在线预测软件对miR-222及其潜在靶基因Dickkopf-2(DKK2, NM_000633)的3'-UTR端进行了靶向预测分析并选出拟合度最佳的作用靶点(miR-222与DKK2 3'-UTR端可互补配对的碱基序列)。设计合成并PCR扩增含有潜在作用靶点的DKK2 3'-UTR序列及其突变型序列,将其分别与双荧光素酶报告基因载体连接构建重组质粒。实验者采用miR-222的模拟物(mimics)、抑制物(inhibitor)及阴性对照(control)分别与重组质粒共转染U251细胞及U87细胞,48h后裂解细胞并检测荧光素酶活性,结果表明miR-222可靶向调控DKK2的表达。MTT检测结果表明,与对照组相比,转染了miR-222模拟物的胶质瘤细胞存活率升高;而转染了miR-222抑制物的胶质瘤细胞存活率显著降低。裸鼠异位植瘤实验发现

对miR-222沉默处理可显著抑制肿瘤发生。

Wang等^[7]运用qRT-PCR和蛋白印迹等实验技术证实 β -catenin/TCF4与miR-30a-5p基因启动区的两个位点结合,从而促进miR-30a-5p的生成。miR-30a-5p可通过靶向作用于神经细胞黏附分子(neural cell adhesion molecule, NCAM)3'UTR的两个位点,从而抑制NCAM的表达。由此可知,Wnt/ β -catenin信号通路通过miR-30a-5p实现了对NCAM表达水平的调控,从而可以调节神经胶质瘤细胞的生长速率和侵袭活性。Wnt/ β -catenin-miR-30a-5p-NCAM这一新型调节轴在调控胶质瘤细胞侵袭活性及肿瘤发生等方面扮演了重要角色。

外囊泡以外泌体的形式转运胞内蛋白或核酸(包括各种miRNAs)来传递细胞间的信息。Rui Shi等^[8]检测了胶质瘤复发患者脑脊液中肿瘤相关的miRNAs水平,比较并评估了脑脊液、血清及外泌体中miR-21水平变化对患者预后的价值。其样本来源于70位胶质瘤(术后)患者,以脑外伤患者作为非肿瘤对照组。结果表明,实验组(胶质瘤患者)脑脊液外泌体中miR-21水平显著高于对照组,然而两组血清样本中miR-21水平则无显著性差异。脑脊液源外泌体中miR-21的含量水平不仅与肿瘤转移有关,还与肿瘤好发部位的复发几率有关。研究者从另外198个胶质瘤组织样本中证实miR-21含量水平与肿瘤诊断分级有关,且与患者总生存时间的中值呈负相关。用慢病毒抑制剂抑制U251细胞中miR-21的表达后,其靶基因PTEN、RECK和PDCD4所对应的蛋白表达水平均有提升。由此可知,外泌体中miR-21的含量水平可作为胶质瘤诊断和预后的一项可靠指标,特别是用于预测肿瘤复发和转移。神经胶质瘤中表达上调的miRNAs及其作用靶点,miRNA对胶质瘤的影响或其在诊疗中的应用详见表1。

上述miRNAs,如miR-222、miR-30a-5p、miR-21等在神经胶质瘤中的表达水平较正常脑组织是上调的,在肿瘤发生发展过程中起到了一定程度的促进作用。若患者血清或脑脊液中出现上述miRNAs表达水平升高,则可为临床上胶质瘤的确诊提供辅助依据。在治疗过程中,可考虑靶向导入该类miRNAs的抑制剂,使其表达水平趋于正常,从而改善患者预后。

表 1 胶质瘤中表达上调的 miRNAs 及其靶点
Tab. 1 Upregulated expression of miRNAs and their targets in glioma

miRNAs	靶点	miRNAs 对胶质瘤的影响/诊疗中的应用	参考文献
miR-9	SOX2, CAMTA1	增强胶质瘤干细胞对化疗药物的敏感性	9, 10
miR-10b	HOXD10	增强胶质瘤细胞侵袭活性	10
miR-10 family	CUB, SUSHI	增强胶质瘤细胞迁移和侵袭活性; 诱导疾病复发; 增加化疗耐药性	9
miR-17-92 cluster	CTGF, PTEN	表达水平与胶质瘤等级呈正相关;	9
miR-21	PTEN, PDCD4, RECK	胶质瘤复发的诱因之一; 表达水平与病理分型级别呈正相关, 与患者生存期中值呈负相关	8
miR-25	CDKN1C	促胶质瘤细胞增殖	11
miR-26a	PTEN	促进胶质瘤的发生; 表达水平与胶质瘤恶性程度呈正相关	3
miR-30a-5p	NCAM	诱导胶质瘤发生, 促进肿瘤细胞侵袭	12
miR-93	Integrin-β8, PTEN, PHLPP2, FOXO3, PI3K/Akt	促胶质瘤细胞增殖	10, 13
miR-196	Undefined	诊断上可用于区分间变型星形细胞瘤和胶质母细胞瘤	14
miR-196a	IkBα	促胶质母细胞瘤细胞增殖并抑制其凋亡	15
miR-221	STAT1/STAT2, p27 ^{KIP1} , p57	促进胶质瘤细胞生长与侵袭	3
miR-222	DKK2, p27 ^{KIP1} , p57, STAT1/STAT2	促进肿瘤发生	3, 6
miR-300	LZTS2	促进自我更新和抑制胶质瘤干细胞样细胞的分化	16
miR-330	ERK, PI3K/AKT, SH3GL2	促进细胞增殖, 迁移和侵袭, 并抑制细胞凋亡	17
miR-363/582-5p	Bim, Caspase 3, Caspase 9	促进胶质瘤干细胞生长	9
miR-1275	Claudin11	评估干细胞样细胞分化和组织的异质性, 尤其是在胶质母细胞瘤的少突胶质细胞成分之间的关系	9

4 胶质瘤中表达下调的 miRNAs 及其作用靶点

在人的 U251 细胞中, miR-125b 是最早被发现表达水平下调的 miRNA 之一。提高其含量水平时, 细胞周期调节蛋白 CDK6 和 CDC25A 的表达受到抑制, 导致胶质瘤细胞周期停滞在 G1/S 期, 从而抑制胶质瘤细胞的增殖^[18, 19]。另有文献报道^[20], 在 CD133 阳性的胶质瘤干细胞 (glioma stem cells, GSCs) 中, miR-125b 的下调会引起 E2F2 蛋白表达的升高, 从而调节肿瘤干细胞的新陈代谢及分化。Shi 等^[18]发现 miR-125b 对 CD133 阳性的 GSCs 侵袭活性的抑制是通过调节 MMP-2、MMP-9 及其相应的抑制物 RECK、TIMP3 的表达水平来实现的。miR-128 可靶向调节癌症相关的受体酪氨酸激酶, 如 EGFR 和 PDGFR^[21, 22]。近来有研究表明^[21], 伴随着组蛋白甲基化 (H3K27me) 和 Akt 磷酸化, miR-128 会出现过表达。此外, Bmi1 作为一种干细胞生物标志物同时又是癌基因, 受 miR-128 靶向调控^[22]。p70S6K1 是 mTOR 下游的一个关键靶点, 在胶质瘤血管生成过程中起到了重要重用。若提高 miR-128 水平, 可抑制 p70S6K1 的活性及其下游信号分子如 HIF-1 和 VEGF 的表达, 从而减缓细胞增殖、肿瘤生长及血管生成^[23]。另有文献报道^[24], 转

录因子 E2F3 亦是 miR-128 的作用靶点。

通用抗癌基因 p53 在 GSCs 中, 也与 MicroRNAs 有关联。与野生型 p53 胶质瘤相比较, 突变型 p53 胶质瘤中, miR-34a 的表达是下调的^[25]。转染了 miR-34a 的胶质瘤细胞, 其生存、增殖及侵袭活力均会受到抑制。胶质瘤异种移植后的体内实验表明, miR-34a 可抑制肿瘤生长并诱导 GSCs 分化^[25, 26]。此外, 最近一项研究^[27]证实, miR-34a 可通过调控 Akt 和 Wnt 信号通路来抑制 GSCs 的增殖及肿瘤生长。在 GSCs 中, miR-34a 还可靶向调控一些癌基因, 如 c-Met, Notch-1 及 Notch-2^[26]。miR-34 家族的其他成员, 如 miR-34c-3p 和 miR-34c-5p, 也能影响胶质瘤细胞的增殖及侵袭活力^[9]。神经胶质瘤中表达上调的 miRNAs 及其作用靶点、miRNA 对胶质瘤的影响或其在诊疗中的应用详见表 2:

miR-125b、miR-34a 等 miRNAs 在神经胶质瘤中的表达水平较正常脑组织是下调的, 在肿瘤发生发展过程中起到了一定程度的抑制作用。若患者血清或脑脊液中出现上述 miRNAs 表达水平降低, 则可为临床上胶质瘤的确诊提供辅助依据。在治疗过程中, 可考虑靶向导入该类 miRNAs 或其靶蛋白的抑制剂, 使其表达水平趋于正常, 从而改善患者预后。

表 2 胶质瘤中表达下调的 miRNAs 及其靶点
Tab. 2 Down-regulated expression of miRNAs and their targets in glioma

miRNAs	靶点	miRNAs 对胶质瘤的影响/诊疗中的应用	参考文献
miR-7	Akt, EGFR	抑制胶质瘤细胞的侵袭活性	9
miR-16	Bmi-1	抑制内皮细胞和肿瘤血管生成的功能	28
miR-26b	EphA2	表达水平与胶质瘤等级呈负相关;抑制内皮细胞和肿瘤血管生成的功能	29
miR-34a	Akt, Wnt pathway, c-Met, Notch-1, Notch-2	抑制胶质瘤细胞生长、增殖及侵袭活力	25-27
miR-101	EZH2, CPEB1, KLF6, LMO3	促胶质瘤细胞凋亡	10, 30-32
miR-106a	E2F1, SLC2A3	阻滞肿瘤细胞对葡萄糖的摄取并抑制其增殖	10, 33
miR-106a-5p	FASTK	抑制星形细胞瘤细胞的增殖和迁移,促进细胞凋亡	34
miR-107	MMP-12, Notch-2, VEGF	抑制胶质瘤干细胞生长及侵袭;抑制肿瘤血管新生	35-37
miR-124	CDK6, SNAI2, SLC16A1, N-Ras, R-Ras	减弱干细胞样特征;抑制神经胶质瘤细胞生长及侵袭;抑制肿瘤血管生成	3, 38-40
miR-125b	CDC25A, CDK6, E2F2, MMP-9, pRB, RECK, TIMP3	使胶质瘤细胞周期停滞在 G1/S 期,从而抑制其的增殖	18-20
miR-128	Akt, Bmi1, E2F3, HIF-1, RTKs	减缓细胞增殖、肿瘤生长及血管生成	21-24
miR-133	EGFR	抑制胶质母细胞瘤生长	41
miR-137	CDK6, Cox-2, CSE1L, Rac1, RTVP-1	抑制胶质瘤细胞生长;减弱胶质瘤干细胞的干性特征	3
miR-143	MAPK/ERK, N-RAS, PI3K/Akt	对替莫唑胺(诱导胶质瘤细胞凋亡)有协同作用;抑制肿瘤血管生成	9
miR-145	ABCG2	抑制胶质瘤干细胞迁移及侵袭活性	42
miR-146a	Notch-1	调节神经干细胞的增殖和分化,并减少胶质瘤干细胞样细胞的形成和迁移	43
miR-146b	MMPs	抑制胶质瘤细胞迁移及侵袭活性	44
miR-146b-5p	EGFR, MMP-16, TRAF6	抑制胶质瘤细胞迁移及侵袭活性;预测人脑胶质瘤患者的预后	45-47
miR-152	KLF4	抑制肿瘤侵袭及血管生成能力	9
miR-153	Mcl-1, Bcl-2, Irs-2	诱导胶质瘤细胞凋亡	9, 48
miR-181a	Bcl-2	增强人恶性胶质瘤细胞对放疗的敏感性	49
miR-181b	MDM2, MEK1, IGF-1R	增强神经胶质瘤细胞对替尼泊昔(药物)的敏感性	50-52
miR-181c	Notch-2	抑制胶质瘤细胞增殖、迁移、侵袭活性和自我更新能力	53
miR-182	Bcl2L12, c-Met, HIF2A	抑制肿瘤细胞生长并促其凋亡;表达水平与胶质瘤患者生存期呈正相关	54
miR-186	PAK7, XIAP	抑制胶质瘤干细胞增殖、迁移、侵袭活性;减弱干细胞样特征	55
miR-195	CCND3, cycD1, cycE1, E2F3	抑制胶质瘤细胞增殖及侵袭活性;降低神经胶质瘤细胞的锚地依赖性生长的能力	10
miR-199b-5p	HES1, CD15	抑制胶质瘤的生长	10
miR-200a	SIMZ-s	抑制胶质瘤细胞生长、迁移及侵袭活性	56
miR-200b	CREB1, RAB family, PROM1	抑制胶质瘤细胞生长及侵袭活性	57-59
miR-204-5p	RAB22A	抑制胶质瘤细胞生长、迁移及侵袭活性;抑制肿瘤恶化	60
miR-218	CDK6/cyclin D1/p21 ^{Cip1/Waf1} pathway, E2F2, IKK- β , Slit2-Robo1 pathway	减缓胶质瘤细胞生长及代谢速度;抑制其迁移及侵袭活性	3, 61-63
miR-326	Notch-1, Notch-2, PKM2, SMO	抑制胶质瘤生物学行为及干细胞样特性	9, 64
miR-367	undefined	与胶质瘤等级呈负相关	65
miR-622	ATF2	抑制胶质瘤细胞增殖、侵袭和迁移活性	9

5 展望

胶质瘤患者在接受传统的手术切除、放疗及化疗后,其预后仍然较差,因而寻找新的早期诊断指标或治疗靶标势在必行。在神经胶质瘤组织中,不

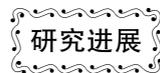
同的 miRNAs,表达水平及作用靶点亦有不同。将 miRNAs 作为神经胶质瘤早期诊断的生物标志物,以 miRNAs 及其抑制物为基础的疗法,引起众多研究者的关注。但如前文所述,miRNAs 具有复杂的网络作用机制,将具体的某种 miRNA 作为早期诊断

指标或治疗靶标时,有必要阐明其在肿瘤微环境中的具体生物学功能。且无论是肿瘤干细胞还是其后分化形成的肿瘤细胞,miRNAs 都需要借助传递系统以到达其分子靶标。因此,miRNAs 在胶质瘤临床应用的另一挑战在于透过血脑屏障和其它胞外基质组分以到达肿瘤组织,从而发挥其相应的生物学功能。

参考文献:

- [1] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14* [J]. *Cell*, 1993, 75(5): 843–854.
- [2] Weitz SH, Gong M, Barr I, *et al.* Processing of microRNA primary transcripts requires heme in mammalian cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(5): 1861–1866.
- [3] Odjele A, Charest D, Morin P. miRNAs as important drivers of glioblastomas: a no-brainer? [J]. *Cancer biomarkers*, 2012, 11(6): 245–252.
- [4] Ciafre SA, Galardi S, Mangiola A, *et al.* Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 334(4): 1351–1358.
- [5] Rolle K. miRNA Multiplayers in glioma. From bench to bedside [J]. *Acta Biochim Pol*, 2015, 62: 353–365.
- [6] Li Q, Shen K, Zhao Y, *et al.* MicroRNA-222 promotes tumorigenesis via targeting DKK2 and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *FEBS Lett*, 2013, 587(12): 1742–1748.
- [7] Wang Z, Dai X, Chen Y, *et al.* MiR-30a-5p is induced by Wnt/beta-catenin pathway and promotes glioma cell invasion by repressing NCAM [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465(3): 374–380.
- [8] Shi R, Wang PY, Li XY, *et al.* Exosomal levels of miRNA-21 from cerebrospinal fluids associated with poor prognosis and tumor recurrence of glioma patients [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(29): 26971–26981
- [9] Garg N, Vijayakumar T, Bakhshinyan D, *et al.* MicroRNA regulation of brain tumour initiating cells in central nervous system tumours [J]. *Stem Cells Int*, 2015, 2015: 141793.
- [10] 孙衍昶, 王洁, 张宗平, 等. MicroRNA 调节胶质瘤化疗耐药的靶点 [J]. *中国神经肿瘤杂志*, 2012, 10(4): 253–260.
- [11] Zhang J, Gong X, Tian K, *et al.* miR-25 promotes glioma cell proliferation by targeting CDKN1C [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, 71: 7–14.
- [12] Wang Z, Dai X, Chen Y, *et al.* MiR-30a-5p is induced by Wnt/beta-catenin pathway and promotes glioma cell invasion by repressing NCAM [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2015, 465(3): 374–380.
- [13] Jiang L, Wang C, Lei F, *et al.* miR-93 promotes cell proliferation in gliomas through activation of PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 8286–8299.
- [14] Guan Y, Mizoguchi M, Yoshimoto K, *et al.* MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance [J]. *Clin Cancer Res*, 2010, 16(16): 4289–4297.
- [15] Yang G, Han D, Chen X, *et al.* MiR-196a exerts its oncogenic effect in glioblastoma multiforme by inhibition of IkappaBalpha both in vitro and in vivo [J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(5): 652–661.
- [16] Zhang D, Yang G, Chen X, *et al.* Mir-300 promotes self-renewal and inhibits the differentiation of glioma stem-like cells [J]. *J Mol Neurosci*, 2014, 53(4): 637–644.
- [17] Yao Y, Xue Y, Ma J, *et al.* MiR-330-mediated regulation of SH3GL2 expression enhances malignant behaviors of glioblastoma stem cells by activating ERK and PI3K/AKT signaling pathways [J]. *PLoS One*, 2014(4), 9: e95060.
- [18] Shi L, Zhang J, Pan T, *et al.* MiR-125b is critical for the suppression of human U251 glioma stem cell proliferation [J]. *Brain Res*, 2010, 1312: 120–126.
- [19] Zhao B, Bian EB, Li J, *et al.* New advances of microRNAs in glioma stem cells, with special emphasis on aberrant methylation of microRNAs [J]. *J Cell Physiol*, 2014, 229(9): 1141–1147.
- [20] Wu N, Xiao L, Zhao X, *et al.* miR-125b regulates the proliferation of glioblastoma stem cells by targeting E2F2 [J]. *FEBS Lett*, 2012, 586(21): 3831–3839.
- [21] Papagiannakopoulos T, Friedmann-Morvinski D, Neveu P, *et al.* Pro-neural miR-128 is a glioma-tumor suppressor that targets mitogenic kinases [J]. *Oncogene*, 2012, 31(15): 1884–1895.
- [22] Godlewski J, Nowicki MO, Bronisz A, *et al.* Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(22): 9125–9130.
- [23] Shi ZM, Wang J, Yan Z, *et al.* MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(3): e32709.
- [24] Zhang Y, Chao T, Li R, *et al.* MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2009, 87(1): 43–51.
- [25] Guessous F, Zhang Y, Kofman A, *et al.* microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells [J]. *Cell Cycle*, 2010, 9(6): 1031–1036.
- [26] Li Y, Guessous F, Zhang Y, *et al.* MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes [J]. *Cancer Res*, 2009, 69(19): 7569–7576.
- [27] Rathod SS, Rani SB, Khan M, *et al.* Tumor suppressive miRNA-34a suppresses cell proliferation and tumor growth of glioma stem cells by targeting Akt and Wnt signaling pathways [J]. *FEBS Open Biol*, 2014, 4: 485–495.
- [28] Chen F, Chen L, He H, *et al.* Up-regulation of microRNA-16 in glioblastoma inhibits the function of endothelial cells and tumor angiogenesis by targeting Bmi-1 [J]. *Anticancer Agents Med Chem*, 2015, 16(5): 609–620
- [29] Wu N, Zhao X, Liu M, *et al.* Role of microRNA-26b in glioma development and its mediated regulation on EphA2 [J]. *PLoS One*, 2011, 6(1): e16264.
- [30] Pardridge WM. shRNA and siRNA delivery to the brain [J]. *Adv Drug Deliv Res*, 2007, 59(2–3): 141–152.
- [31] Yao YL, Ma J, Wang P, *et al.* miR-101 acts as a tumor suppressor by targeting Kruppel-like factor 6 in glioblastoma stem

- cells [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2015, 21(1): 40–51.
- [32] Liu X, Lei Q, Yu Z, *et al.* MiR-101 reverses the hypomethylation of the LMO3 promoter in glioma cells [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(10): 7930–7943.
- [33] Dai DW, Lu Q, Wang LX, *et al.* Decreased miR-106a inhibits glioma cell glucose uptake and proliferation by targeting SLC2A3 in GBM [J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 478.
- [34] Zhi F, Zhou G, Shao N, *et al.* miR-106a-5p inhibits the proliferation and migration of astrocytoma cells and promotes apoptosis by targeting FASTK [J]. *PLoS One*, 2013, 8(8): e72390.
- [35] Chen L, Chen XR, Chen FF, *et al.* MicroRNA-107 inhibits U87 glioma stem cells growth and invasion [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2013, 33(5): 651–657.
- [36] He J, Zhang W, Zhou Q, *et al.* Low-expression of microRNA-107 inhibits cell apoptosis in glioma by upregulation of SALL4 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(9): 1962–1973.
- [37] Chen L, Li ZY, Xu SY, *et al.* Upregulation of miR-107 Inhibits glioma angiogenesis and VEGF expression [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 36(1): 113–20.
- [38] Li KK, Pang JC, Ching AK, *et al.* miR-124 is frequently down-regulated in medulloblastoma and is a negative regulator of SLC16A1 [J]. *Hum Pathol*, 2009, 40(9): 1234–1243.
- [39] Shi Z, Chen Q, Li C, *et al.* MiR-124 governs glioma growth and angiogenesis and enhances chemosensitivity by targeting R-Ras and N-Ras [J]. *Neuro Oncol*, 2014, 16(10): 1341–1353.
- [40] Xia H, Cheung WK, Ng SS, *et al.* Loss of brain-enriched miR-124 microRNA enhances stem-like traits and invasiveness of glioma cells [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287(13): 9962–9971.
- [41] Xu F, Li F, Zhang W, *et al.* Growth of glioblastoma is inhibited by miR-133-mediated EGFR suppression [J]. *Tumour Biol*, 2015, 36(2): 9553–9558.
- [42] Shi L, Wang Z, Sun G, *et al.* miR-145 inhibits migration and invasion of glioma stem cells by targeting ABCG2 [J]. *Neuromol Med*, 2014, 16(2): 517–528.
- [43] Mei J, Bachoo R, Zhang CL. MicroRNA-146a inhibits glioma development by targeting Notch1 [J]. *Mol Cell Biol*, 2011, 31(17): 3584–3592.
- [44] Xia H, Qi Y, Ng SS, *et al.* microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs [J]. *Brain Res*, 2009, 1269: 158–165.
- [45] Katakowski M, Zheng X, Jiang F, *et al.* MiR-146b-5p suppresses EGFR expression and reduces in vitro migration and invasion of glioma [J]. *Cancer Invest*, 2010, 28(10): 1024–1030.
- [46] Li Y, Wang Y, Yu L, *et al.* miR-146b-5p inhibits glioma migration and invasion by targeting MMP16 [J]. *Cancer Lett*, 2013, 339(2): 260–269.
- [47] Liu J, Xu J, Li H, *et al.* miR-146b-5p functions as a tumor suppressor by targeting TRAF6 and predicts the prognosis of human gliomas [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(30): 29129–29142.
- [48] Xu J, Liao X, Lu N, *et al.* Chromatin-modifying drugs induce miRNA-153 expression to suppress Irs-2 in glioblastoma cell lines [J]. *Int J Cancer*, 2011, 129(10): 2527–2531.
- [49] Chen G, Zhu W, Shi D, *et al.* MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bel-2 [J]. *Oncol Rep*, 2010, 23(4): 997–1003.
- [50] Shi ZM, Wang XF, Qian X, *et al.* MiRNA-181b suppresses IGF-1R and functions as a tumor suppressor gene in gliomas [J]. *RNA*, 2013, 19(4): 552–560.
- [51] Sun YC, Wang J, Guo CC, *et al.* MiR-181b sensitizes glioma cells to teniposide by targeting MDM2 [J]. *BMC Cancer*, 2014, 14: 611.
- [52] Wang J, Sai K, Chen FR, *et al.* miR-181b modulates glioma cell sensitivity to temozolomide by targeting MEK1 [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2013, 72(1): 147–158.
- [53] Ruan J, Lou S, Dai Q, *et al.* Tumor suppressor miR-181c attenuates proliferation, invasion, and self-renewal abilities in glioblastoma [J]. *Neuroreport*, 2015, 26(2): 66–73.
- [54] Kouri FM, Hurley LA, Daniel WL, *et al.* miR-182 integrates apoptosis, growth, and differentiation programs in glioblastoma [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(7): 732–745.
- [55] Zheng J, Li XD, Wang P, *et al.* CRNDE affects the malignant biological characteristics of human glioma stem cells by negatively regulating miR-186 [J]. *Oncotarget*, 2015, 6(28): 25339–25355.
- [56] Su Y, He Q, Deng L, *et al.* MiR-200a impairs glioma cell growth, migration, and invasion by targeting SIM2-s [J]. *Neuroreport*, 2014, 25(1): 12–17.
- [57] Liu Q, Tang H, Liu X, *et al.* miR-200b as a prognostic factor targets multiple members of RAB family in glioma [J]. *Med Oncol*, 2014, 31(3): 859.
- [58] 彭彪, 胡骥, 秦明筠, 等. miR-200b 通过靶向 PROM1 抑制胶质瘤细胞侵袭 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2015, 37(1): 25–28
- [59] Peng B, Hu S, Jun Q, *et al.* MicroRNA-200b targets CREB1 and suppresses cell growth in human malignant glioma [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 379(1–2): 51–58.
- [60] Xia Z, Liu F, Zhang J, *et al.* Decreased expression of MiRNA-204-5p contributes to glioma progression and promotes glioma cell growth, migration and invasion [J]. *PLoS One*, 2015, 10(7): e0132399.
- [61] Gu JJ, Gao GZ, Zhang SM. miR-218 inhibits the migration and invasion of glioma U87 cells through the Slit2-Robo1 pathway [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(4): 1561–1566.
- [62] Jun GJ, Zhong GG, Ming ZS. miR-218 inhibits the proliferation of glioma U87 cells through the inactivation of the CDK6/cyclin D1/p21 pathway [J]. *Oncol Lett*, 2015, 9(6): 2743–2749.
- [63] Zhang Y, Han D, Wei W, *et al.* MiR-218 Inhibited growth and metabolism of human glioblastoma cells by directly targeting E2F2 [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2015, 35(8): 1165–1173.
- [64] Du W, Liu X, Chen L, *et al.* Targeting the SMO oncogene by miR-326 inhibits glioma biological behaviors and stemness [J]. *Neuro Oncol*, 2015, 17(2): 243–253.
- [65] Guan Y, Chen L, Bao Y, *et al.* High miR-196a and low miR-367 cooperatively correlate with unfavorable prognosis of high-grade glioma [J]. *Int J Clin and Exp Pathol*, 2015, 8(6): 6576–6588.



认知功能相关的动物行为学实验研究进展

郑前敏, 徐平*

(遵义医学院附属医院神经内科, 贵州 遵义 563000)

【摘要】 认知功能的行为学评估在相关疾病模型的生理机制研究、药物干预评估等实验研究中应用广泛。在众多的行为学实验中, 评估学习记忆功能的实验最为常见。本文就近年来动物模型中常用的认知行为学分析方法进行总结, 对评价内容、各个行为学实验的优势及局限性做简要介绍, 为认知功能障碍相关疾病模型的行为学分析提供参考。

【关键词】 认知功能, 行为学评估, 学习与记忆

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0085-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.015

Research of animal behavior assessment about cognitive functions

ZHENG Qian-min, XU Ping*

(Department of neurology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical College, Zunyi 563000, China)

【Abstract】 Behavior assessment of cognitive function has been widely used in related research on disease models, especially in physiological mechanism and drug intervention evaluation. Evaluating the function of learning and memory is the most common one in colourful behavioral experiments. The thesis summarizes the methods of analyzing the common cognitive behavior about animal models in recent years, briefly introduces the comment contents, advantages and limitations of each behavior test, and also provides a reference for behavior analysis mainly to the related diseases model of cognitive dysfunction.

【Key words】 Cognitive function; Behavior evaluation; Learning and Memory

认知是机体认识和获取知识的过程, 包括记忆、语言、视空间、计算、执行和理解判断等方面。认知功能障碍是指大脑高级智能加工过程出现异常而导致的学习、记忆障碍, 同时伴有失语、失用等改变的病理过程。随着人类寿命的不断延长以及人口老龄化的到来, 与认知功能障碍相关的神经退行性疾病(如阿尔茨海默病、帕金森病等)患病率不断升高, 给家庭和社会经济增加了沉重的负担。而其他非神经系统疾病引起的认知功能障碍, 如糖尿病、高血压等也严重影响患者的生活质量。研究认知功能障碍的病理机制对相关疾病的防治有着重要的意义。

动物行为学评估在神经科学的多个领域应用广泛, 特别是在认知功能障碍相关疾病的动物模型评估、生理机制研究等方面发挥着重要的作用^[1-3]。学习记忆力受损是认知功能障碍中较为常见的一种表现, 在众多的行为学实验中, 评估学习记忆功能的实验最为常见。其中工作记忆与参考记忆常用于实验动物的认知功能评估。工作记忆包括注意力、短时记忆和对信息的处理; 参考记忆则被认为是一种长期的、永久的记忆或习惯, 比工作记忆的容量更大、持续时间更长、抗干扰能力更强^[4]。

下面就认知功能相关的行为学实验研究方法、评价内容等方面作简要概述。

[作者简介] 郑前敏, 在读研究生, 研究方向: 认知功能障碍。

[通讯作者] 徐平, 教授, 研究生导师, 研究方向: 认知功能障碍, 中枢神经系统感染, E-mail: xuping527@sohu.com。

1 Morris 水迷宫 (Morris water maze, MWM)

Morris 水迷宫由英国心理学家 Morris 于 1981 年报道^[5],是目前行为神经科学中最常用的评估方法之一,广泛用于多种神经系统疾病的模型评估及药物干预研究^[1,2]。海马是与空间学习记忆密切相关的大脑区域,MWM 也被证明是与海马突触可塑性和 N-甲基-D-天冬氨酸(NMDA)受体功能密切相关的测试方法^[6]。实验动物被放置在一个圆形水池中,水中加入不透明的、无毒的白色颜料或奶粉,水池中包含一个隐藏的逃生平台。实验内容包括定位航行和空间探索。定位航行是随机的将动物从水迷宫的四个象限中放入,使其在水中游泳并找到逃生平台,用视频跟踪软件记录动物寻找到隐藏平台的时间(逃避潜伏期)及路径。空间探索是定位航行后撤去逃生平台,观察动物穿过原平台位置的次数和时间,考查动物对原平台的记忆^[1,2,7]。

MWM 主要用于评估啮齿类动物的空间学习记忆能力,评估对象大多为成年动物。MWM 的评价效能受实验动物的种类、性别、年龄、营养状态及是否感染等情况的影响^[8];水池大小、温度、隐藏平台的直径也是影响因素^[9]。Singh 等^[10]提出采用游泳路径的分形维数来评价 MWM 的空间学习和记忆,相较于逃避潜伏期的评价更加可靠,逃避潜伏期评价 MWM 存在游泳速度等非认知因素的影响。

MWM 不需要进行额外的训练,对动物数量的要求也不高,没有嗅觉信息的干扰,实验时不需要电击及食物剥夺。但动物在水中游泳存在压力的影响,且 MWM 对工作记忆的测试也不敏感^[9,11]。

2 放射臂迷宫与放射臂水迷宫

2.1 放射臂迷宫(radial arm maze, RAM)

RAM 是由 Olton 和 Samuelson 在 1976 年报道^[12],由一个中央枢纽和周围的放射臂组成,标准臂的数量有 8 个(八臂迷宫)。为避免动物逃跑,迷宫一般在地面上方。在实验前训练动物并限制饮食,在迷宫中央及周围臂中放入食物使其自由摄取及探索周围环境。实验开始后在每个臂末端或随机的 4 个臂末端放入诱饵(食物),记录动物进入每臂的次数、时间及路线等参数。每个臂只进入一次为完美的表现,进入之前访问过的臂则被认为错误^[13,14]。

RAM 可以评估工作记忆和参考记忆。与 MWM 相比,RAM 表现更多的是基于动物的选择进入装有

诱饵或食物的臂,该方法比较容易评估及操作,不需要跟踪软件。但 RAM 的动物必须要进行食物剥夺,以充分刺激它们在迷宫内觅食^[15]。由于使用了食物作为诱饵,动物可以利用嗅觉线索来探索迷宫^[4]。

2.2 放射臂水迷宫(radial arm water maze, RAWM)

为了避免 RAM 中食欲以及嗅觉信息的影响,利用 RAM 和 MWM 相结合建立了 RAWM^[16]。实验在一个圆形水池中进行,池中有一个开放的中心向外辐射的八个臂或游泳路径。将其中一个臂作为目标臂,臂中有一个隐藏在水下的逃生平台。动物被随机放入其余的 7 个游泳臂中,允许最多 120 s 来找到逃生平台,若未能逃脱则将其引导到逃生平台^[7,17]。实验数据用跟踪软件记录,包括找到逃生平台的时间、错误的次数及时间等。

RAWM 可用于测试工作记忆和参考记忆。它结合了复杂的空间环境,避免了嗅觉信息的干扰,无需食物剥夺^[11]。但一些动物在水中没有进行有效的搜索,且水中游泳存在压力的影响^[4]。

3 T 迷宫及多重 T 迷宫

3.1 T 迷宫(T-maze)

T 迷宫是由一个长的主干臂以及两个垂直的短臂组成的“T”型迷宫。首先对动物进行适应性训练 1 d,将其放入主干臂自由探索迷宫。随后 3 d 对动物进行训练,在其中一个短臂中放入诱饵(食物)作为目标臂,动物进入目标臂为正确反应,反之为错误反应,并记录其进入目标臂的时间(潜伏期)。最后第 5 天和第 12 天进行探测实验,将迷宫旋转 180°,其余条件保持不变。动物只允许进入一次诱饵臂或非诱饵臂,进入诱饵臂被认为使用“地方”的策略(有赖于迷宫外信号),进入非诱饵臂被认为使用“反应”策略(不依赖迷宫外信号)^[3]。

T 迷宫自发交替试验(spontaneous alternation test)用于评估空间工作记忆,实验原理是啮齿类动物具有探索陌生刺激环境的倾向。将动物放入 T 迷宫的主干臂,每次进入不同的短臂为一次交替,记为一次正确的选择,进入之前访问的臂为一次错误选择。试验后计算交替次数的百分比,低于 50% 被认为工作记忆受损^[18]。

T 迷宫主要用于评估实验动物的工作记忆。设备要求简单,不需要自动录像系统(需要实验者不

断观察),可以反复实验。但由于 T 迷宫只有一个选择点到达目标臂(默认情况下选择正确臂的概率为 50%),增加了成功的可能性^[4]。

3.2 多重 T 迷宫(multiple-T-maze, MTM)

MTM 是几个 T 迷宫组合成的复合迷宫,比 T 迷宫多了更多的选择,其复杂性也增加。在实验的多次探索中,动物要学会一个复杂稳定的路线到达目标臂,该过程需要空间参考记忆的参与。在实验中对动物进行食物剥夺,并要求其在规定的时间内找到迷宫中隐藏的诱饵(食物)。实验数据用计算机跟踪系统记录,包括正确或错误决定、路径长度、到达目标箱的时间等,在不同时间进行测试可以评估短期与长期记忆^[19]。

MTM 可用于测试工作记忆和参考记忆。其运用了更为复杂的选择系统,每次试验都包含有多个选择点。但对实验动物进行食物剥夺可能是一个潜在的问题^[4]。

4 巴恩斯迷宫(Barnes maze)

为了避免水迷宫中游泳压力的影响,Barnes 在 1979 年建立了巴恩斯迷宫^[20],是一个在地面上进行的迷宫实验。实验原理是啮齿类动物具有避光喜暗、逃避噪音的习性。实验由一个圆形平台构成,为防止动物逃脱,用支架将平台支撑到一定高度,在平台周边以一定间隔布满穿透平台的圆洞,其中一个洞与其下方的暗箱连接(目标箱)。实验前将动物放入平台中央使其自由探索 5 min,用强光或噪声刺激动物使其逃到圆洞下方的暗箱中,若没有找到目标箱则将其引导进入箱内停留 1 min。实验过程中用视频跟踪软件进行记录^[3,21],记录动物找到正确洞口的时间(最多 5 min)、进入错误洞口的时间及次数等。

巴恩斯迷宫适用于偏好黑暗环境的啮齿类动物,可以评估短期和长期记忆。实验时没有游泳压力的影响,也不需要食物剥夺,尤其适用于小鼠^[4]。但在实验中小鼠有时会缺乏探索迷宫的动力,如发现目标箱后没有进入、或在目标箱周围而没有进入。针对上述问题 Harrison 等^[22]提出采用计算原始潜伏期、原始路径及原始错误次数来解决。

5 星迷宫(star maze)

星迷宫是一种评估实验动物空间导航能力的行为学方法^[23]。由五个臂和一个中心五边形环组

成,臂内充满水以及不透明或惰性的无毒产品。实验动物不能从一个臂直接游泳到下一个臂,必须要在五边形周边游泳到达。实验包括训练阶段和探测阶段。在训练阶段,其中一个臂作为目标臂,有一个可见的逃生平台,迫使动物寻找逃生平台逃跑;随后进行探测实验,将逃生平台淹没,在每个臂的墙壁上装饰不同的设计以提供线索,当小鼠到达平台,允许其在上面对待 30 s。若在规定游泳时间内(60 s)没有找到逃生平台,将其放到平台上保持 30 s。实验数据通过视频数据采集系统收集,最后根据动物到达逃生平台的时间、路径及游泳速度等进行综合分析^[23,24]。

星迷宫主要用于小鼠空间导航能力的研究,实验中小鼠要通过学习来选择迷宫内的路线,其主要依赖于时间顺序记忆能力^[25]。该实验不需要食物的限制,也没有嗅觉信息的干扰,但其在评估空间学习记忆及大鼠学习记忆等方面还有待深入的研究^[26]。

6 新物体识别(novel object recognition, NOR)实验

利用啮齿类动物喜欢探索陌生事物的天性,Ennaceur 和 Delacour 于 1988 年报道了新物体与新位置识别实验^[27],用于检测啮齿类动物的空间记忆能力。将动物放置在一个装置里使其探索两个相同的物体,在规定的间隔之后再返回到装置中,使其探索一个熟悉的物体和一个新的物体,记录探索每一个物体的时间^[28,29]。

目前对 NOR 实验对象的探索评分有视觉观察和计算机 2D 视频分析。但前者依赖于实验者的观察能力,后者容易受实验以外对象行为的影响。为了克服上述问题,Junpei 等人建立了一种 3D 计算机视频分析系统运用于 NOR 实验的探索评分^[30],该系统为 NOR 实验提供了一个可重复性和比较准确的评估方法,并首次建立了实验对象探索线路的 3D 轨迹。

NOR 实验主要用于评估工作记忆、注意力以及焦虑等。其设备简单,无需外部奖励或惩罚作为动力,试验时间短,也不需要食物剥夺。但 NOR 实验中每个动物的探索水平有时不一致^[31,32]。

7 条件性恐惧(fear conditioning, FC)实验

FC 是一种基于经典的巴甫洛夫条件反射而建立起来的关联学习方法,通过对实验动物的训练将

条件刺激与非条件刺激联系起来^[11]。其中情景恐惧实验用于评估啮齿类动物的恐惧学习记忆。冻结行为是动物在恐惧条件下常见的反应,是一种除了呼吸完全不动的状态,该行为也是衡量恐惧相关的学习记忆的指标。在 FC 实验中,首先将动物放入训练装置中使其适应环境;随后进行 3 次恐惧环境训练,将动物暴露于一个和听觉线索(条件刺激)配对的足部电击(非条件刺激)环境,使实验动物在听觉线索与电击之间、电击与环境之间学会关联记忆;训练完成 48 小时后将动物放入原训练室,动物产生情景恐惧记忆,通过表现出冻结行为来应对恐惧环境。记录一定时间内动物出现冻结行为的次数,实验数据用相关公式计算为冻结百分比^[33]。

FC 实验的设备要求简单,动物训练时间少且不需要禁食。但电击刺激可能会对实验动物产生一定伤害。

8 主动回避任务与被动回避任务

8.1 主动位置回避任务(active place avoidance task)

主动位置回避任务是由位置回避任务改进而成^[34],用于评估啮齿类动物的空间学习记忆。实验在一个干燥光滑的可旋转圆形舞台上进行,周围由有机玻璃包围避免动物逃跑。圆形舞台上有一个 60°宽的避免区域,在舞台旋转时该区域位置保持不变,动物进入其中会有一个轻度的足部电击惩罚。舞台开始缓慢旋转后,动物为逃避电击而回避避免区域。实验数据由视频跟踪系统记录,包括进入避免区域的次数、回避所需的最大时间、第一次进入避免区域的时间及路径长度等^[35]。

主动位置回避任务可用于评估动物的短期变化,实验数据可以快速采集,动物不需要食物剥夺。但足部电击刺激可能会对动物身体产生伤害。

类似的主动回避任务还有穿梭箱回避、爬杆法、跑道回避等。

8.2 抑制性回避任务(inhibitory avoidance task)

抑制性回避任务属于被动回避任务,利用啮齿类动物偏爱黑暗环境的天性而建立,常用于啮齿类动物学习和记忆的研究。在进行实验训练时将动物放入一个回避装置,该装置由一个暗隔间和一个亮隔间组成,中间有门连接。打开两个隔室之间的门,当动物由亮隔间进入暗隔间时,遭遇一次足部电击。在训练后间隔 24 或 48 小时测量动物从亮隔

间到之前受到电击的暗隔间的时间(潜伏期),潜伏期越长表示记忆越好^[36]。

抑制性回避任务只需要对动物进行短期训练,避免了记忆获取与巩固的重叠。但厌恶刺激会对动物产生一定伤害。

类似的被动回避任务还有跳台实验、两室实验等。

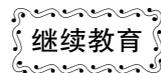
9 总结

随着人口老龄化进程的到来,年龄相关的认知功能障碍已经成为神经科学研究的热点。为了更好的研究认知功能相关的疾病机理,选择合适的行为学实验研究方法是有必要的。动物模型的认知功能评估可以为相关疾病的研究提供重要的依据。但也有其局限性,人类的认知功能是一个复杂的脑部高级神经活动过程,动物的行为学测试内容不完全类似于人类的认知,还有许多认知功能是人类独有的或不能在实验模型中充分表现出来的(例如语言或数学)。在实验中,仅通过动物的表现无法精确评估学习和记忆的相关信息,因为实验对象可能受其他与认知能力不相关的信息的干扰,比如感觉运动功能、焦虑及活动的应激反应等。而每种行为学实验的侧重点与使用条件不一样,具体应用时要根据不同的需求进行选择。必要时结合多种行为学方法进行综合分析,并与组织病理学、影像学及神经电生理技术等结合,为认知功能障碍相关疾病的研究提供科学可靠的依据。

参考文献:

- [1] Antunes MS, Goes ATR, Boeira SP, *et al.* Protective effect of hesperidin in a model of Parkinson's disease induced by 6-hydroxydopamine in aged mice[J]. *Nutrition*, 2014, 30(11-12): 1415-1422.
- [2] Cantarella G, Di Benedetto G, Puzzo D, *et al.* Neutralization of TNFSF10 ameliorates functional outcome in a murine model of Alzheimer's disease[J]. *Brain*, 2015, 138(1): 203-216.
- [3] Sharma S, Haselton J, Rakoczy S, *et al.* Spatial memory is enhanced in long-living Ames dwarf mice and maintained following kainic acid induced neurodegeneration [J]. *Mech Ageing Dev*, 2010, 131(6): 422-435.
- [4] Sharma S, Rakoczy S, Brown-Borg H. Assessment of spatial memory in mice[J]. *Life Sci*, 2010, 87(17-18): 521-536.
- [5] Morris. RGM. Spatial Localization Does Not Require the Presence of Local Cues[J]. *Learning and Motivation*, 1981, 12(2): 239-260.
- [6] Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory[J].

- Nat Protoc, 2006, 1(2): 848–858.
- [7] Talboom JS, West SG, Engler-Chiurazzi EB, *et al.* Learning to remember: cognitive training-induced attenuation of age-related memory decline depends on sex and cognitive demand, and can transfer to untrained cognitive domains [J]. *Neurobiol Aging*, 2014, 35(12): 2791–2802.
- [8] D'Hooge R, De Deyn PP. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory [J]. *Brain Res Brain Res Rev*, 2001, 36(1): 60–90.
- [9] Vorhees CV, Williams MT. Assessing spatial learning and memory in rodents [J]. *ILAR J*, 2014, 55(2): 310–332.
- [10] Singh S, Kaur H, Sandhir R. Fractal dimensions: A new paradigm to assess spatial memory and learning using Morris water maze [J]. *Behav Brain Res*, 2016, 299: 141–146.
- [11] Puzzo D, Lee L, Palmeri A, *et al.* Behavioral assays with mouse models of Alzheimer's disease: practical considerations and guidelines [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 88(4): 450–467.
- [12] DS. O, RJ. S. Remembrance of places passed: Spatial memory in rats [J]. *Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Processes*, 1976, 2(2): 97–116.
- [13] Aher YD, Subramanian S, Shanmugasundaram B, *et al.* A Novel Heterocyclic Compound CE-104 Enhances Spatial Working Memory in the Radial Arm Maze in Rats and Modulates the Dopaminergic System [J]. *Front Behav Neurosci*, 2016, 10: 20.
- [14] Mahmoud RR, Sase S, Aher YD, *et al.* Spatial and Working Memory Is Linked to Spine Density and Mushroom Spines [J]. *PLoS One*, 2015, 10(10): e0139739.
- [15] Murphy GG. Spatial Learning and Memory-What's TLE Got To Do With It? [J]. *Epilepsy Curr*, 2013, 13(1): 26–29.
- [16] Buresova O, Bures J, Oitzl MS, *et al.* Radial maze in the water tank: an aversively motivated spatial working memory task [J]. *Physiol Behav*, 1985, 34(6): 1003–1005.
- [17] Liu WC, Yang SN, Wu CW, *et al.* Hyperbaric Oxygen Therapy Alleviates Carbon Monoxide Poisoning-Induced Delayed Memory Impairment by Preserving Brain-Derived Neurotrophic Factor-Dependent Hippocampal Neurogenesis [J]. *Crit Care Med*, 2016, 44(1): 25–39.
- [18] Lainiola M, Procaccini C, Linden AM. mGluR3 knockout mice show a working memory defect and an enhanced response to MK-801 in the T- and Y-maze cognitive tests [J]. *Behav Brain Res*, 2014, 266: 94–103.
- [19] Falsafi SK, Ghafari M, Miklosi AG, *et al.* Mouse hippocampal GABAB1 but not GABAB2 subunit-containing receptor complex levels are paralleling retrieval in the multiple-T-maze [J]. *Front Behav Neurosci*, 2015, 9: 276.
- [20] Barnes CA. Memory deficits associated with senescence: a neurophysiological and behavioral study in the rat [J]. *J Comp Physiol Psychol*, 1979, 93(1): 74–104.
- [21] Li L, Csaszar E, Szodorai E, *et al.* The differential hippocampal phosphoproteome of *Apodemus sylvaticus* paralleling spatial memory retrieval in the Barnes maze [J]. *Behav Brain Res*, 2014, 264: 126–134.
- [22] Harrison FE, Reiserer RS, Tomarken AJ, *et al.* Spatial and nonspatial escape strategies in the Barnes maze [J]. *Learn Mem*, 2006, 13(6): 809–819.
- [23] Rondi-Reig L, Petit GH, Tobin C, *et al.* Impaired sequential egocentric and allocentric memories in forebrain-specific-NMDA receptor knock-out mice during a new task dissociating strategies of navigation [J]. *J Neurosci*, 2006, 26(15): 4071–4081.
- [24] Fouquet C, Babayan BM, Watilliaux A, *et al.* Complementary Roles of the Hippocampus and the Dorsomedial Striatum during Spatial and Sequence-Based Navigation Behavior [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e67232.
- [25] Fouquet C, Tobin C, Rondi-Reig L. A new approach for modeling episodic memory from rodents to humans: the temporal order memory [J]. *Behav Brain Res*, 2010, 215(2): 172–179.
- [26] Vorhees CV, Williams MT. Value of water mazes for assessing spatial and egocentric learning and memory in rodent basic research and regulatory studies [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2014, 45: 75–90.
- [27] Ennaceur A, Delacour J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data [J]. *Behav Brain Res*, 1988, 31(1): 47–59.
- [28] Kim S, Kim T, Lee HR, *et al.* Impaired learning and memory in CD38 null mutant mice [J]. *Mol Brain*, 2016, 9(1): 16.
- [29] Rogel-Salazar G, Luna-Munguia H, Stevens KE, *et al.* Transcranial focal electrical stimulation via tripolar concentric ring electrodes does not modify the short- and long-term memory formation in rats evaluated in the novel object recognition test [J]. *Epilepsy Behav*, 2013, 27(1): 154–158.
- [30] Matsumoto J, Uehara T, Urakawa S, *et al.* 3D video analysis of the novel object recognition test in rats [J]. *Behav Brain Res*, 2014, 272: 16–24.
- [31] Antunes M, Biala G. The novel object recognition memory: neurobiology, test procedure, and its modifications [J]. *Cogn Process*, 2012, 13(2): 93–110.
- [32] Rajagopal L, Massey BW, Huang M, *et al.* The novel object recognition test in rodents in relation to cognitive impairment in schizophrenia [J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(31): 5104–5114.
- [33] Hyltin MJ, Orsi SA, Moore AN, *et al.* Disruption of the perineuronal net in the hippocampus or medial prefrontal cortex impairs fear conditioning [J]. *Learn Mem*, 2013, 20(5): 267–273.
- [34] Bures J, Fenton AA, Kaminsky Y, *et al.* Dissociation of exteroceptive and idiothetic orientation cues: effect on hippocampal place cells and place navigation [J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 1997, 352(1360): 1515–1524.
- [35] Bahnik S, Stuchlik A. Temporal and spatial strategies in an active place avoidance task on Carousel: a study of effects of stability of arena rotation speed in rats [J]. *PeerJ*, 2015, 3: e1257.
- [36] Atucha E, Roozendaal B. The inhibitory avoidance discrimination task to investigate accuracy of memory [J]. *Front Behav Neurosci*, 2015, 9: 60.



实验动物学教学改革：课程学习与从业证书培训相结合

周智君*, 俞远京, 苏志杰

(中南大学实验动物学部, 长沙 410008)

【摘要】 将研究生的课程教学与从业人员岗位证书规范化培训紧密结合是改革研究生医学实验动物学教学的一个行之有效的举措。一方面,通过转变实验动物学教学模式,使学生能够将实验动物学普遍知识与其各自专业相结合,提高他们在动物实验中的动手能力以及研究课题独立的寻找、设计和实施能力,在实践中培养其创新性思维。另一方面,在教学中同时学习国家的关于实验动物的法律法规和相关的伦理知识,使学生通过课程的学习获得实验动物从业人员岗位资格证书,打开动物实验的第一道门槛,最终达到实验结果精确可靠,方法规范、标准,又符合伦理学原则。

【关键词】 实验动物学;教学模式;教学改革

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)07-0090-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.07.016

Reform of the laboratory animal science teaching: combination of course teaching and certificate training

ZHOU Zhi-jun*, YU Yuan-jing, SU Zhi-jie

(Department of Laboratory Animals, Central South University, Changsha 410078, China)

【Abstract】 The combination of medical laboratory animal science teaching with standardized certificate training is an effective reform for the laboratory animal science teaching of postgraduates. On the one hand, by the changing of laboratory animal science teaching mode, which can combine the general knowledge of laboratory animal science with their respective specialty, it is able to improve their practical ability to carry out animal experiments, the ability to design and implement independent research and to innovate. On the other hand, by the learning of the national law, regulations and relevant ethical knowledge, the students can acquire the certificate, which is the threshold for processing the laboratory animals, and ultimately achieve precise and reliable experimental results, normalized and standardized method, proceeding in line with the ethical principles.

【Key words】 Laboratory animal science; Teaching mode; Teaching reform

实验动物学是在现代科学技术带动下崛起的一门以生命科学为主体,医学和生物学为核心的综合性新兴边缘学科,对生命科学的发展起着重要的支撑和促进作用,已形成独特的理论体系和学科特色^[1,2],发展趋势表现出以下基本特点:(1)研究手段多样性,由过于的单纯以整体研究为主,发展到

更多地注意采用现代分子生物学技术;(2)各种模式动物的比较基因组学的发展丰富了实验动物学的内涵;(3)大量特殊实验动物模型已制备或培育成功;(4)实验动物替代材料的应用和替代方法的研究发展加快,发达国家普遍开展了以替代(replacement)、减少(reduction)和优化(refinement)

【基金项目】 中南大学研究生教育教学改革研究(2014JGB49)。

【通讯作者】 周智君(1971-),高级实验师,研究方向:野生动物的实验动物化。Email: zhouzhijun@csu.edu.cn。

为核心的“3R”运动。因此,提高实验动物学的教学水平,培养学生的各项能力,对促进学科与支撑性领域的发展显得尤为重要^[4]。

现代生物医学研究日新月异对动物实验提出了更高的要求,国家发布了《实验动物许可证管理办法》。对从事实验动物和动物实验的科技人员、专业管理人员和技术工作者,都必须接受有关法律、法规及专业培训,必须取得实验动物从业人员岗位证书^[5-6]做出规定。

怎样通过研究生的实验动物学课程教学,做到既能提高研究生对实验动物学的学术水平,又能达到国家对实验动物从业人员的基本要求?作者对此进行了一些探讨。

1 现状和差距

1.1 实践动手能力不强

实验动物学是一门实践与理论均很强的学科,过去的教学往往着重介绍各类生物学科对实验动物学的渗透,而对本学科的实验操作强调不够,尽管国内有很多生物医学院校在研究生中开设了实验课,但课时数也相对较少,动手操作的机会很少,致使有些学生在开展科研实验时就连一些基本的动物实验操作都不会,操作不规范,对动物造成严重损伤,使科研结果不准确,甚至有部分学生没有真正接触过实验动物,对实验动物存在惧怕、怜悯、憎恶心理,对科研实验显得无所适从。

1.2 缺乏案例分析,启发创新意识不强

案例教学是培养学生分析问题与解决问题的有效手段,这种教学可以使枯燥的理论原理在实际工作中得到应用,可以使学生在生动的教学模式中获得知识,例如:人类疾病动物模型的案例分析,首先提出人类的疾病问题,分析解决这种疾病机理的研究思路,分析建立这类疾病动物模型的可行性,总结这类模型的研究现况,按照实验动物的生物学与模型的评价标准,选择最优实验动物,然后提出制模方案,对制模结果进行分析,总结这类模型的优点与不足,正确与理性的对待动物模型。然而现有的教学模式缺乏具体的案例分析,使学生只能依样画葫芦,缺乏实验技术、实验设计、实验方法和独立从事实验工作能力的培养和训练。同时随着招生规模的扩大,实验室的硬件投入和人员配备相对滞后,好多实验人多设备少,不是学生在做试验而是在听试验,因而很难形成创新意识和主动意识。

1.3 国际规范和从业要求强调不够

随着实验动物学的迅猛发展,生命科学在实验动物和动物实验方面也提出了更高的要求,使实验动物的管理越来越国际化、标准化、规范化。国际实验动物科学理事会(International Council for Laboratory Animal Science, ICLAS)对实验动物福利伦理和善待实验动物做出了严格规定。我国对实验动物、动物实验场地、从业人员等也一一制定了相关的法律法规,要求凡是从事实验动物和动物实验的科技人员、专业管理人员和技术工作者,都必须取得实验动物从业人员岗位证书。这就要求从业人员不但要懂得实验动物知识,还要熟知有关实验动物福利伦理和善待实验动物的基本内容,掌握我国实验动物发展现状及法制化要求。

2 教学改革探讨

2.1 多种媒体的优化组合与实验课相结合

实验动物学课程是一门理论知识覆盖面广,实际操作及动手要求很强的学科,但教学内容比较抽象,很多内容难以准确形象地描述清楚,学生在课堂上只能被动地接受知识,无法上升到与实际相结合。动物实验课作为实验动物学不可或缺的重要组成部分,除了验证、巩固、扩充课堂理论教学内容外,还注重培养学生实验动物基本操作技能、严肃严谨科学态度和独立创新科研思维等。但是,实验课要传授的内容太多,有些实验课实验周期长,实验内容多,影响学习的连贯性,加之实验经费及研究生课程学习时间的限制,传统的教学方法很难达到理想的教学效果。为此,我们制作了一系列的实验动物教学录像,将基本的实验操作录制下来,与多媒体课件优化组合,结合动物实验课的训练,能加快学生的实验技能向个人科研能力转化,促进理论知识转变为科研实践能力,这样有利于学生综合素质的提高和全面发展。

2.2 精选案例,改变传统的教学模式,创立四维医学实验动物学教学模式

案例分析法是由哈佛大学于 1880 年开发完成,后被哈佛商学院用于培养高级经理和管理精英的教育实践,开始时只是作为一种教育技法用于高级经理人及商业政策的相关教育实践中,后来被许多公司借鉴过来成为用于培养公司企业得力员工的一种重要方法,是创造力的培养有效方法。

创造力是指充分运用已有知识和经验,形成新

思想、发现新方法、发明新技术、创造新事物的能力,是知识、能力和人格等基本要素的综合反映,具有新颖性、探索性、批判性、实用性等特征。历史上实验动物的实践有大量的有趣案例可供教学分析,例如裸鼠的发现与相关的肿瘤模型,通过裸鼠的发现案例的分析,可以将实验动物疾病模型基因的保存与表达,动物的饲养与保种等问题给予充分的讨论。因此,在实验动物学教学过程中,鼓励引导学生根据自己所学理论知识,设计一个和自己专业相关或感兴趣的动物实验或者自己的毕业课题,为其提供实践的平台设施,使学生能自主创新研发,使科研思维和创新能力的提升,有效增强了学生的社会综合竞争力。通过案例分析可以将自主能力和创新性思维的培养始终贯穿实验动物学教学的全过程。

结合国内外实验动物学的发展,在研究生的实验动物课程教学中,除传统的理论教学外,设置师生互动课堂,使学生将理论知识能更好有效地应用于自己的专业研究中,引导学生开展自主研发实践,从而建立实验动物学 - 动物实验技术 - 引导应用 - 自主研发实践四维医学实验动物学课程教学模式,建立医学特色突出,符合医学实验动物学课程教学大纲,以满足对医学研究生的培养需求和培养目标。利用实验动物公共服务平台,引导鼓励学生自主研发,积极开展课外实践,提升科研思维与创新能力的培养。通过优化实践环节,才能真正的加强自主能力和创新性思维的培养。通过自主设计实验逐渐培养学生自主能力和创新性思维能力。

2.3 课程学习和取得从业人员岗位资格证书紧密结合

随着我国实验动物事业的飞速发展,实验动物的管理也逐步标准化、规范化、法制化,我国制定了一系列具有强制性的实验动物国家标准和管理办法,要求凡是从事实验动物和动物实验的各类人员

(动物实验专业人员和管理人员),都必须进行有关法律、法规及专业培训,并取得实验动物从业人员岗位证书。

医学专业的研究生科学研究离不开实验动物和动物实验,因此,在研究生实验动物学课程教学的过程中同时遵从实验动物从业人员岗位资格培训的要求,对学生进行规范化的培训,使他们在课程学习的同时取得实验动物从业人员岗位资格证书,一举两得。

实验动物学教学改革需要不断探索和实践,在全面推进改革创新的新形势下,积极探索适合高等医学院校教育的实验动物学教学体系,充分发挥实验动物学在医学研究中的重要地位,是摆在实验动物学教学改革面前的重要任务。实验动物学教学改革不仅需要平时教学中进行一些大胆尝试和积极创新,而且在医学实验动物学教学活动中还要力求通过实验动物学教学工作使学生深入领会该学科在医学科学实验研究中的地位与作用,并能自觉地将该学科科技正确应用于各自的专业领域,为以后在医学研究中依法从事动物实验研究工作奠定坚实的基础。

参考文献:

- [1] 方喜业,邢瑞昌,刘一农,等. 关于实验动物学学科分类归属意见 [J]. 中国实验动物学杂志, 1998, 8(2): 104 - 108.
- [2] 杨晓萍. 高等教育学 [M]. 重庆: 重庆出版社, 2006.
- [3] 魏泓. 医学实验动物学 [M]. 四川: 四川科技出版社, 2001.
- [4] 师长宏, 张海. 浅谈高等医学院校硕士研究生《实验动物学》教学的几点感想 [J]. 教育科研. 2009, 83:18 - 21.
- [5] 陈振文, 王锯, 王承利, 等. 我国实验动物专业人才培养的回顾与展望 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(6): 378 - 379.
- [6] 胡娟峰, 战大伟, 江其辉, 等. 实验动物人员培训的思考与展望 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(12): 785 - 787.

[修回日期]2016-01-07