



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》



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

2016 8

邮发代号: 82-917

第26卷(第8期) Vol.26 No.8

ISSN 1671-7856



中国比较医学杂志

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

月刊 1991 年 3 月创刊

第 26 卷 第 8 期 2016 年 8 月 30 日出版

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: bjbm@cnilas.org

http://zgsgydw.alljournal.ac.cn/

zghjyxzz/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、中文生物医学期刊文献数据库、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: 中国邮阅读网: www.183read.com

本期执行主编 徐 平

本期责任编辑 吴漪丽

目 次

(本刊已入编“中文核心期刊要目总览”)

专题研究

The Collaborative Cross mouse genetic reference population designed for dissecting complex traits * Hanifa Abu

Toamih Atamni, Mahmoud Egbaria, Yaser Salaymeh, et al. (1)

复杂性状遗传 CC 小鼠在传染病领域的应用及研究进展 * 许黎黎, 秦川 (20)

复杂性状遗传 CC 小鼠 - 肿瘤研究新平台 * 李克娟, 高蓓 (25)

复杂性状遗传 CC 小鼠与精准医学研究 * 杜朋, 陈孟毅, 李程程, 等 (30)

研究报告

巴贝西虫感染黑线仓鼠生物学特性的变化 叶莉, 马帅, 王昱佳, 等 (36)

小鼠尾静脉注射与心肌注射腺病毒载体

转染效率的比较 杨琳珊, 占贞贞, 汪波, 等 (42)

遥测方法对比传统安全药理学方法的

优势及应用 孙晶晶, 周泉, 齐珍珍, 等 (47)

金属硫蛋白表达在 C57BL/6J 小鼠肝细胞癌

发生中的变化及意义 易旭, 龙黎, 程明亮 (53)

尿通卡克乃其片大鼠长期毒性实验的血液指标变化 热比姑丽·伊斯拉木, 阿布都吉力力·阿布都艾尼, 冷英莉, 等 (59)

A53T α -synuclein 抑制 SH-SY5Y 细胞 2 型

囊泡单胺转运体的表达 满建梅, 郭军堂, 张代娟, 等 (66)

急性肺损伤大鼠呼吸膜 AQP1 和 AQP5 的表达 岳胜, 朱平, 岳磊, 等 (70)

Hr 基因敲除小鼠模型的构建和表型分析 朱奎成, 徐存拴, 陈莹莹, 等 (75)

蛋白磷酸酶 5 (PP5) 对小鼠脂肪代谢的影响 王君, 邱彬, 刘明, 等 (79)

利用吗啉代寡核苷酸技术下调早期斑马鱼胚胎

Imna 基因的初步研究 刘丰, 黄慧敏, 王志华, 等 (85)

不同来源高度免疫缺陷小鼠微卫星

DNA 遗传检测的分析 范涛, 王洪, 魏杰, 等 (91)

应用 16S rRNA 高通量测序法比较人与

常用实验动物口腔菌群的异同 顾东曙, 陈傍柱, 江霞, 等 (96)

广 告 (封二, 封三, 封底)

* 复杂性状遗传 CC 小鼠专题

期刊基本参数: CN11-4822/R * 1991 * m * 大 16 * 92 * zh * p * ¥20.00 * 2000 * 16 * 2016-8

CHINESE JOURNAL OF COMPARATIVE MEDICINE

Monthly Established in March 1991 Volume 26 Number 8 August 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://zgswdw.alljournal.ac.cn/zgbjyxxz/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

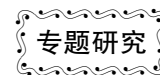
CSSN

ISSN 1671-7856
CN 11-4822/R

Copyright 2016 by the Chinese Association for Laboratory Animal Sciences

CONTENTS IN BRIEF

- The Collaborative Cross mouse genetic reference population designed for dissecting complex traits *Hanifa Abu Toamih Atamni, Mahmoud Egbaria, Yaser Salaymeh, et al.* (1)
- Application and Research Progress of Collaborative Cross mice in Infectious Disease Area *XU Lili, QIN Chuan* (20)
- Collaborative Cross mice as a novel platform in cancer research *LI Ke-juan, GAO Ran* (25)
- Collaborative Cross mice and precision medicine *DU Peng, CHEN Meng-yi, LI Cheng-cheng, et al.* (30)
- Biological characteristics of Chinese hamster infected with *Babesia* *YE Li, MA Shuai, WANG Yi-jia, et al.* (36)
- Comparison of the efficiency of tail vein injection and intramyocardial injection of adenovirus vector in mice *YANG Lin-shan, ZHAN Zhen-zhen, WANG Bo, et al.* (42)
- Advantages and application of telemetry compared with the traditional methods in safety pharmacology *SUN Jing-jing, ZHOU Quan, QI Zhen-zhen, et al.* (47)
- Changes and significance of metallothionein expression during hepatocarcinogenesis in C57BL/6J mice *YI Xu, LONG Li, CHENG Ming-liang* (53)
- A long-term study of the toxicity of an Uyghur medicine, Kursi Kaknaq, on hematological parameters in rats *Rabigul·Islam, Abdujilil·abdugheny, LENG Yingli, et al.* (59)
- A53T α -synuclein decreases the expression of type 2 vesicular monoamine transporter in neuroblastoma SH-SY5Y cells *MAN Jian-mei, GUO Jun-tang, ZHANG Dai-juan, et al.* (66)
- Expression of AQP1 and AQP5 is decreased in the alveolar-capillary membrane in rats with acute lung injury *YUE Sheng, ZHU Ping, YUE Lei, et al.* (70)
- Construction of a *Hr* mutant knockout mouse model and phenotypic analysis *ZHU Kui-cheng, XU Cun-shuan, WANG Chun-yao, et al.* (75)
- Influence of protein phosphatase 5 on the lipid metabolism in mice *WANG Jun, QIU Bin, LIU Ming, et al.* (79)
- Study on the *lmna* gene knockdown in zebrafish embryo with morpholino oligonucleotides *LIU Feng, HUANG Hui-min, WANG Zhi-hua, et al.* (85)
- Genetic monitoring and analysis of highly immunodeficient mice from different sources by microsatellite DNA markers *FAN Tao, WANG Hong, WEI Jie, et al.* (91)
- Comparison of human and animal oral microbiota by Illumina sequencing of 16S rRNA tags *GU Dong-shu, CHEN Bang-zhu, JIANG Xia, et al.* (96)



The Collaborative Cross mouse genetic reference population designed for dissecting complex traits

Hanifa Abu Toamih Atamni¹, Mahmoud Egbaria¹, Yaser Salaymeh¹, Aysar Nashif² and Fuad A. Iraqi¹

(1. Department of Clinical Microbiology and Immunology, Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Ramat Aviv, Tel Aviv, Israel; 2. Department of Prosthodontics, Dental School at Hadassah, Hebrew University, Jerusalem, Israel)

【Abstract】 Complex traits are multifactorial traits controlled by polygenic host factors. These trait-related phenotypic characteristics and performance including body weight, blood chemistry, immune cell profiles, as well host susceptibility to infectious and chronic diseases. In recent years, tremendous efforts were invested aiming to map the host genetic factors attribute to these traits and subsequently clone the gene/s underlying these loci. In parallel to human studies, a number of mouse models and approaches were developed aimed to enhance the mapping process and the gene cloning. These include of using resources such as F₂, backcross, advanced intercross lines, outbred populations, consomic, congenic and recombinant inbred lines (RIL). The constraints of these approaches were the limited resolution mapping of genomic regions of the quantitative trait loci (QTL) associated with the trait of interests, and the limited genetic diversity observed in the parental founders. To overcome these limitations, a new genetically highly diverse recombinant inbred lines of mouse population was established, namely the Collaborative Cross (CC), created from full reciprocal mating of 8 divergent strains of mice: A/J, C57BL/6J, 129S1/SvImJ, NOD/LtJ, NZO/HiLtJ, CAST/Ei, PWK/PhJ, and WSB/EiJ. By intercrossing these eight founders to generate the different CC lines, the genetic makeup of the newly developed resource is completely different from the eight parental lines, and will show heterosis, which subsequently will response differently comparing with their original founders. Finally, our results suggest that it is not essential to defining the phenotypic response of the eight parental lines, prior of assessing the CC lines, because it is believed that genetic interaction of the new genetic makeup of the new lines will reveal new phenotypic response, which completely different from the parental lines. In this report, we present to the community the power of the CC for dissecting variety of complex traits including host susceptibility to infectious and chronic diseases as well body performance traits. Based on our results from a variety of studies, we recommend to the community, that the best strategy of using this population is to aim of phenotyping about 50 and more of CC lines, with limited number of biological replicates (3–4 mice per line), and subsequently using the publicly available high dense genotype information of the CC lines as well the sequence database of the eight founders, it will be possible performing QTL mapping to a unprecedented precision genomic regions less than 1 MB, subsequently lead to identify potential strong candidate genes. These achievements are believed cannot be obtained with any other currently available mouse resource populations.

【中图分类号】R-33 【文献标识码】A 【文章编号】1671-7856(2016) 08-0001-19

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.001

Background

Controlled and standardized investigations of the genetics of susceptibility towards complex disease with complex etiologies, including infectious and chronic diseases are almost impossible to be performed in humans due to multiple limitations. Major limitations are due to difficulty of controlling environmental

challenges, and since susceptibility itself is a “complex trait”, meaning that, it is controlled by the cumulative effect and interactions of numerous genetic loci and environmental factors. In crosses between genetically defined strains of mice, chromosomal regions responsible for the genetic variance of complex traits can be mapped as quantitative trait loci (QTL) in experimental populations available for precise study

under defined conditions (Iraqi et al. 2000a and 2000b). Importantly, comparative mapping shows that the majority of murine genes have known homologues in the human genome emphasizing the relevance of QTL analysis and gene identification in the mouse model for understanding complex disease in humans. Once QTL or the corresponding genes have been identified in the mouse, genetic analysis can then be extended successfully to humans. It is well known that the usage of mouse models is tightly established in research of human medicine (Klopocki et al. 2010; Rankinen et al. 2006; Wicker et al. 2005). In recent years, evidence of genetic loci controlling a wide variety of complex traits has accumulated through QTL mapping studies in mice and other species; yet for the most part, albeit with some important exceptions, the genes underlying these mapped loci remain unknown. This resulted in the realization that a new model-population dedicated to genetic analysis of complex traits was needed to understand complex human diseases. After

much discussion in the genetics community the Collaborative Cross (CC) was designed to provide a new mouse resource for high resolution analysis of complex traits, with particular emphasis on traits relevant to human health in its broadest aspects (Threadgill et al. 2002; Churchill et al. 2004). This unique reference genetic resource will eventually comprise a set of approximately 350 recombinant inbred lines (RIL) created from full reciprocal matings of 8 divergent strains of mice: A/J, C57BL/6J, 129S1/SvImJ, NOD/LtJ, NZO/HiLtJ, CAST/EiJ, PWK/PhJ, and WSB/EiJ. Controlled randomization was performed during the breeding process to break up large linkage disequilibrium blocks and to recombine the natural genetic variation present in these inbred strains with the aim to create a unique and inexhaustible resource of RI strains exhibiting a large phenotypic and genetic diversity (Roberts et al. 2007). Figure 1 shows the development of an individual CC line and the ultimate mosaic genotype structure after a series of inbreeding

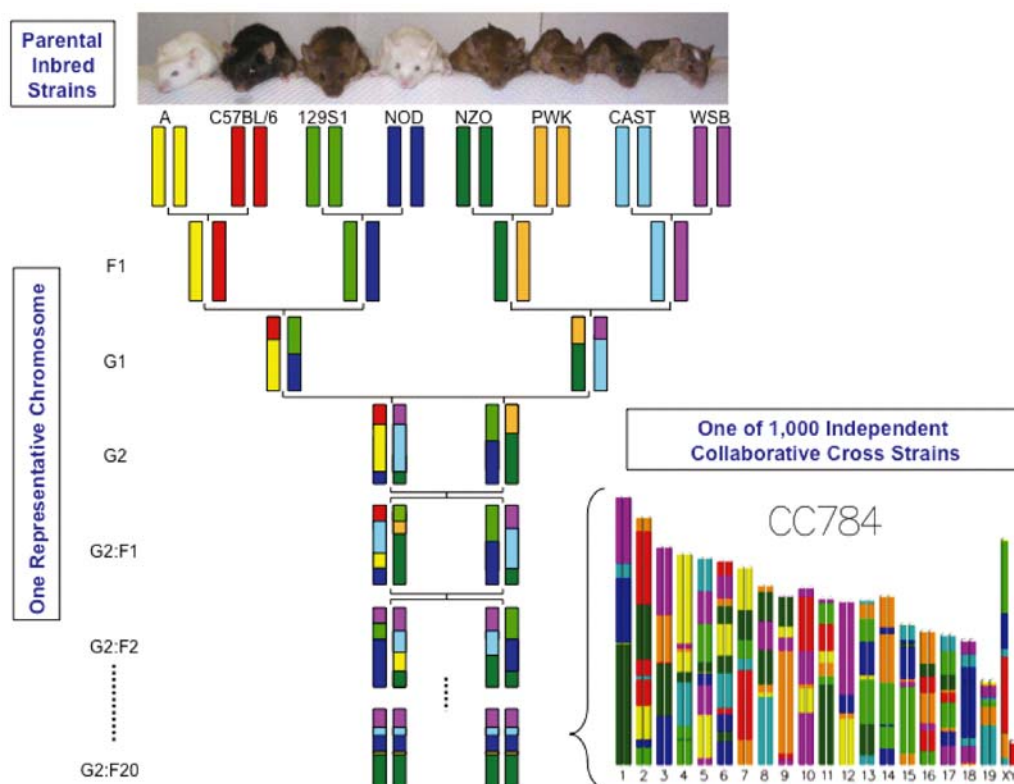


Fig. 1 Single CC line (CC784) funnel breeding scheme by eight founder strains. Each CC line originates from an independently breeding funnel of the eight CC founders so that every recombination site in the CC population is, uniquely generated. In this example, a CC line is produced from the breeding line with laboratory code. [Threadgill and Churchill 2012]

generations.

Based on simulation studies, the 100 RIL being developed at our lab should allow mapping a QTL explaining a total of 5% of the RIL phenotypic variation (equivalent to 2.5% of F2 variation) to an average mean location error of 3.5 cM (Valdar et al. 2006). Initially, all CC mice were genotyped with mouse diversity array (MDA) that consist 620,000 SNP markers (Yang et al. 2009). We filtered out all SNPs with heterozygous or missing genotypes in the 8 CC founders, or that were not in common between the arrays, leaving 170,935 SNPs. The SNPs were mapped onto build 37 of the mouse genome. The HAPPY HMM (Mott et al. 2000) computed a descent probability distribution for each of the 170,935 SNPs intervals, which we reduced to 8533 intervals by averaging the matrices in groups of $n = 20$ consecutive SNPs. This reduction reduced further the effects of genotyping error and made analysis faster. Mean heterozygosity was computed across each window of 20 SNPs. Figure 2 shows the genomic reconstruction of a CC line after genotyping with the MDA and using HAPPY software (Mott et al. 2005). Recently, all mice were re-genotyped at an advanced generations with new 7500 custom design SNP array, mouse universal genotype array (MUGA), which provided the genome architecture of the CC lines (Iraqi et al., 2011). Finally, after 5 advanced generations, all CC lines

were genotyped with MegaMUGA, and the genotypes of the three SNP arrays were merged to prepare a single genotype file, which was used in QTL mapping (Levy et al. 2015).

Three founders of the CC (CAST/EiJ, PWK/PhJ, and WSB/EiJ) are wild-derived, representing the subspecies *M. m. castaneus*, *M. m. musculus* and *M. m. domesticus* respectively, and which contribute a large number of sequence variants not segregating among classical strains descended from *M. m. domesticus* (most classical strains differ from the reference C57BL/6J at about 4 million SNPs, whereas PWK and CAST each differ at about 17 million SNPs, and WSB at 6 million (Keane et al. 2011).

Consequently quantitative trait locus (QTL) mapping using the CC succeeded to uncover novel QTLs involving contrasts between the wild-derived strains, as shown in a pilot experiment in which we fine-mapped QTLs associated with survival after infection by *Aspergillus fumigatus*, we mapped eight QTLs, five of which involved contrasts with wild-derived strains and which would not have been present in a cross between classical laboratory inbred strains (LIS) (Fig. 3). These studies confirm that by phenotyping a relatively modest number of CC lines (around 70 lines), with sufficient replication, it is possible to map QTLs to a resolution of about 1Mb (Valdar et al. 2006).

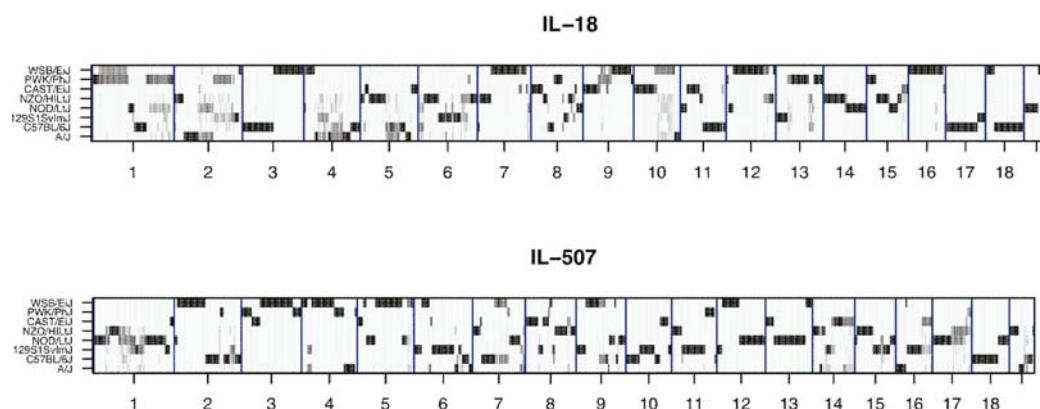


Fig. 2 Reconstructions of the genomes of representative CC lines IL-18 and IL-507 from the hidden Markov model (HMM) implemented by HAPPY program. The X-axis shows the 19 autosomes, the Y-axis shows 8 parental founder strains of the CC lines. The black horizontal bands represent genetically fixed loci, contributed only by one founder, while gray bands represent loci with residual heterozygosity [Durrant et al. 2011].

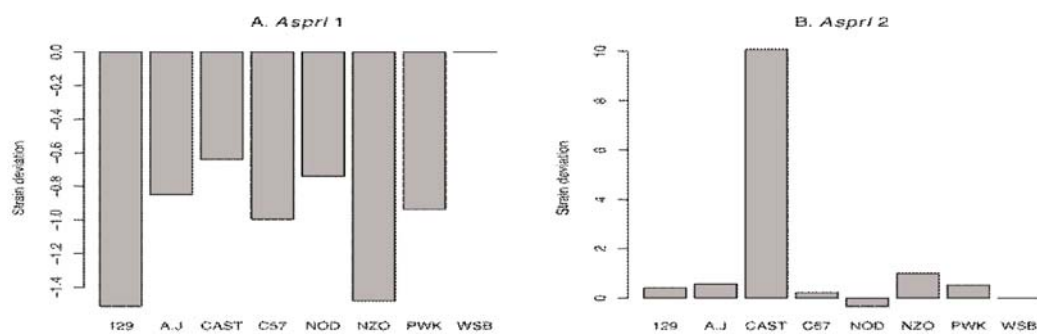


Fig. 3 Estimated effects on survival time after *Aspergillus fumigatus* infection, for the eight CC founder strains for each of seven QTLs identified in a screen of 66 CC lines. Effects are shown as deviations relative to WSB/EiJ, which is arbitrarily assigned the trait effect of 0. The X-axis of each plot shows the founder strains. The Y-axis shows the estimated effect on survival for the haplotype of the corresponding CC founder. QTLs A, B, C, G and to some extent D all involve a contrast between a wild-derived strain (CAST, PWK or WSB) and the other founders. [Durrant et al. 2011].

In a recent study, we have shown that the genetic background of the CC mice is the main determinant of gut microbiome diversity (Kovacs et al. 2011). These results are another strong proof that the genetic makeup of the CC is unique and can lead to understand their effect on host response and performance.

Further, by incorporating variation data from the genome sequences of the CC founders – available from the Sanger Mouse Genomes Project (Keane et al. 2011) – and restricting attention to variants whose differences across the founders are consistent with the pattern of action of the QTL (Yalcin et al. 2005), the list of candidate genes under QTLs can be significantly refined. These studies confirm that by phenotyping a relatively modest number of CC lines (around 70 lines), with sufficient replication, it is possible to map QTLs to a resolution of about 1 Mb (Durrant et al. 2011; Vered et al. 2014; Levy et al. 2015; Aylor et al. 2011; Philip et al. 2011; Kelada et al. 2011; Xiong et al. 2014; Ram et al. 2014; Gralinski et al. 2015; Rogala et al. 2014; Phillippi et al. 2014; Ferris et al. 2013; Thaisz et al. 2012; Bottomly et al. 2012; Mathes et al. 2011; Gelinas et al. 2011; Zombeck et al. 2011).

Mouse Genetic Resource populations (GRPs) are popular for the study of complex traits and biological systems in both medical and life sciences applications because genotyping is only required once (what has

been described as the “genotype once, phenotype many times” paradigm), replicate individuals can be produced with the same genotype at will allowing for optimal case/control and gene-by-environment designs (Broman 2005).

Herein we demonstrate our various studies using the CC mouse population for dissecting the genetic architecture underlying the phenotypic variation observed among certain, populations, defined as complex trait in either basic biological/physiological differences or host response towards infectious or chronic diseases. Infectious disease studies in our lab scanned independently the CC population response towards various known pathogens, such as *Aspergillus fumigatus* (Durrant et al. 2011), *Klebsiella pneumoniae* (Vered et al. 2014), co-infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* (Shusterman et al. 2013), *Pseudomonas aeruginosa* (Lorè et al. 2015), and host response towards microbial toxins (LPS/LPA) for study of *sepsis*. As well, complex chronic diseases, cancer and behavioral diseases with complex etiologies were studied at our lab using the power of the CC population. Including study of high-fat diet induced type 2 diabetes (T2D) and metabolic syndrome (Atamni et al. 2016), development of colon cancer (Dorman et al. 2016), and autism. Additionally, we are scanning the CC population for genetic factors underlying basic

phenotypic variation in normal state without disease in the background, this includes influencing immune response cell lineages in peripheral blood, body composition traits using dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA). Understanding the host susceptibility to all of these complex traits is important since all affecting all systems under the same genetic background.

Published Results Using Collaborative Cross population

1 Infectious diseases

1.1 Map host susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infection

Invasive disseminated aspergillosis is a serious disease in humans, inflicting severe damage to the kidneys, liver, spleen, brain, heart and other organs (Latgé 1999, Soubani and Chandrasekar 2002). The risk of acquiring invasive pulmonary aspergillosis is also higher in individuals with defective immune systems, such as those suffering from neutropenia. Users of corticosteroids or other immunosuppressive therapies, such as those used to prevent rejection following organ transplantation, and late-stage human immunodeficiency virus infection are also at higher risk. Towards mapping of host susceptibility to *Aspergillus fumigatus* (AF), in previous study we phenotyped 371 mice from 66 CC lines for susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infection. The survival time after infection ranged from 4 to 28 days and varied significantly between CC lines ($P < 0.05$).

Figure 4 shows the mean survival profile of the CC lines after infection with AF. Broad sense heritability was 0.18. QTL mapping based on survival analysis and ancestral haplotype reconstruction of the CC genomes identified genome-wide significant QTLs on chromosomes 2, 3, 8, 10 (two QTL), 15 and 18. QTL mapping resolution varied between 2 and 11.6 Mb. Use of variation data from the genomes of the CC founder strains refine these QTLs further and suggest several candidate genes (Durrant et al. 2011). To our knowledge this was the first report mapping susceptibility loci for invasive aspergillosis in immune-competent mice.

1.2 Map host susceptibility to *Klebsiella pneumoniae* infection.

Klebsiella pneumoniae (Kp), is one of the major pulmonary pathogens causing severe pneumonia and sepsis mainly in immunocompromised patients. Using the Collaborative Cross population as a high genetically diverse reference and intraperitoneal injection of Kp as infectious challenge, enabled us dissecting the genetic architecture contributing to Kp host susceptibility at different time points during the challenge. For this purpose, 328 mice generated from 73 CC lines were challenged with K-2, strain of Kp, at concentration of 10^4 CFU/ml (Colony forming units per ml) injected intraperitoneally (IP). Mice response towards the infection was monitored daily following the challenge for 15 days, at terms of body weight and survival. In Vered et al. 2014 we have published our findings, while body weight variation between the CC lines were

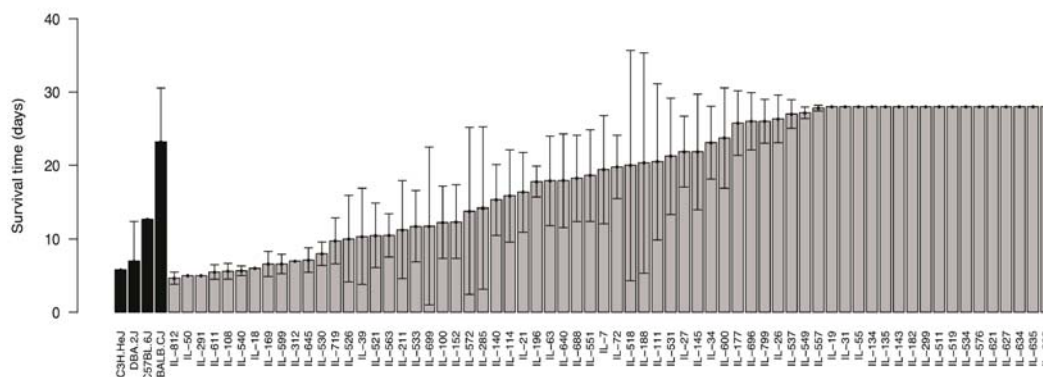


Fig. 4 Mean survival time (days) of different CC lines in response to *Aspergillus fumigatus* infection. The X-axis represents the different CC lines while Y-axis represents the mean survival days ($\pm$ SEM). Full details of the analysis are presented in Durrant et al. 2011.

not significant during the infection period, significant variation ($P < 0.05$) was observed in mean survival time between the different CC lines (Fig. 5A). Survival time following the *Kp* infection varied among the C lines to result in survival between 2 to 15 days post infection, importantly we noticed that mice that survived more than 7 days could survive the complete challenge period, which might be critical time point for the disease. The wide variation observed in response to

infection proves that host response to infection is highly heritable, controlled by genes. Indeed broad sense heritability (H^2) confirm this, where H^2 was 0.45. Next step aimed to map the genetic regions underlying the significant variances of the mean survival time at different time points between days 1 to 2. Using only 48 CC lines of the unique mouse model of CC population enables successful mapping of at least three QTLs associated with host susceptibility to *Klebsiella*

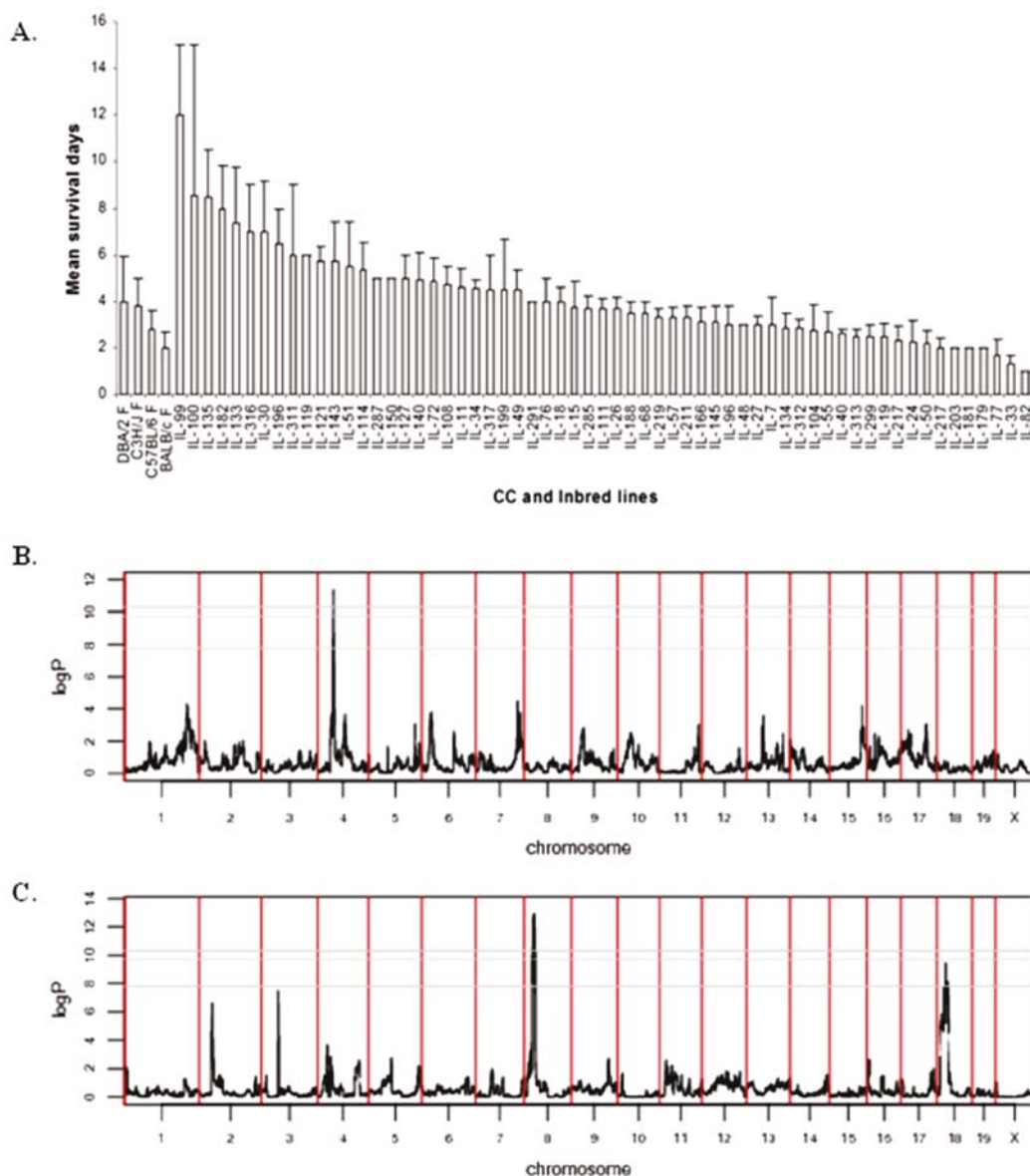


Fig. 5 Genetic dissection of host response to *Klebsiella pneumonia* infection. Fig. 5 A. shows phenotypic profile of mean survival time (days) of the different CC lines and four inbred strains after infection with *Klebsiella pneumonia*. X-axis represents the CC lines, Y-axis represents the mean survival time in days ($\pm$ SEM). Fig. 5 B and C present the QTL mapping results using the phenotypic and genotypic data of the CC lines. In total results revealed three significant QTLs associated with survival time after infection with *Kp*, on days QTL on chromosome 4 named *Kprl1* (Fig. 5 B) and on day 8 two QTLs named *Kprl2* and *Kprl3* on chromosomes 8 and 18, respectively (C). The X-axis shows the 19 chromosomes, Y-axis logP of the linkage analysis. [Vered et al. 2014]

pneumonia (Fig. 5B). Linkage analysis has confirmed the mapping of three significant QTLs, named *Klebsiella pneumoniae* resistant locus 1, 2, and 3 (*Kprl1*, *Kprl2* and *Kprl3*), located on chromosomes 4, 8, and 18, respectively. The mapped QTLs were specific to certain time points during the infection, suggesting different “players” (genes) changing during response progress (Chr. 4 – day 2 and Chr. 8 and 18 for day 8).

The mentioned QTLs demonstrate the power of the CC population to enable fine mapping with high resolution suggesting narrow genomic intervals (less than 0.6 Mb), whereas the wild derived strains were the main contributors for the genetic variance for the hosts susceptibility. Gene browse results of the significant QTLs for candidate genes, confirmed their relevance towards the complex trait of susceptibility towards *Klebsiella pneumoniae*. Candidate genes located within the QTLs intervals included known protein coding genes that are involved in cell adhesion and cytoskeleton structure, which plays major role phagocytosis and for eliminating bacterial infection (*Kprl1* QTL; candidate genes *Ikbkap* - Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase complex-associated protein, *Actl7a* and *Actl7b* - actin-like 7a and 7b, while for *Kprl1* QTL; *Ctnnal1* - catenin alpha-like 1 gene).

This was the first report of mapping multiple host susceptibility loci for Kp in immune-competent mice, which demonstrate significantly the complexity of host response to Kp infection despite the fixed environmental conditions. QTL analysis suggests multiple Kp-specific regions on the genome, that differ from the QTL in response to *Aspergillus fumigatus*, involving genes with different roles during infection and host response. All these results and success of fine mapping with unique resolution have confirmed the valuable use of the three wild derived strains, as founders of the CC population.

1.3 Map host susceptibility to oral mixed infection (*P. gingivalis* and *F. nucleatum*)

Periodontal infection (periodontitis) is the most common chronic inflammatory disease in humans,

which results in destruction of tooth-supporting tissues and eventually leading to tooth loss. This process is characterized by destruction of the periodontal ligament, formation of periodontal pockets, and alveolar bone resorption (Williams. 1990). The disease is initiated by periodontal pathogenic bacteria, which accumulate as subgingival biofilm and stimulate an inflammatory response in the host gingiva (Wilson. 1995). An excessive or sustained response leads to chronic inflammation, which is a potent amplification system for recruiting humoral and cellular components of the immune system. Recently, several lines of evidence suggest that there is a significant genetic component associated with the susceptibility to chronic periodontitis (Baker et al. 2000 and 2002). We use the oral mixed infection system (of the two anaerobic gram negative bacteria *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum*) as was previously described by Polak (Polak et al. 2009). The phenotype is measured as the residual alveolar bone volume, in mm³, after infection using the micro-CT scan, which provides an accurate measurement of the attachment loss around the animal teeth (Wilensky et al. 2005). As a step towards identifying and subsequently cloning these genetic factors, we have assessed a total of 272 mice (103 females and 169 males) generated from randomly selected 23 CC lines used as genetic reference (genotype) and infection with *Porphyromonas gingivalis* and *Fusobacterium nucleatum* as environmental challenge for bone loss evaluation (phenotype). The study cohort consisted of two experimental groups; 1) Control – treated with phosphate buffered-saline (PBS) without bacteria (CBV = control bone volume) and 2) Challenge - infected with oral mixed infection (*P. gingivalis* and *F. nucleatum*), each CC line representative in both groups. The bone loss phenotype in response to infection was calculated by differences between the bone volumes among these two groups for each CC line. The study findings as published in Shusterman et al. 2013, reveals highly significant variation ($p < 0.05$) in bone loss phenotype among the CC lines in response to infectious challenge (Fig. 6). The CC

lines were clustered by sub-groups based on their response to the infection in terms of bone volume, susceptible, resistant and intermediate. 25% of the scanned CC lines were considered “Infectious Susceptible” since they showed bone loss in response to the challenge (IL26 / IL57 / IL72 / IL182 / IL196 and IL711), the rest 75% of the scanned CC lines were either resistant or moderately susceptible with no significant difference in bone volume. Estimated broad sense heritability (H^2) was 0.4 for both CBV and RBV, while 0.2 for LBV.

These finding strongly affirms existence of strong genetic background underlying development of periodontitis and confirms the usefulness of the CC lines for QTL mapping for susceptibility to periodontal infection. Therefore, the study was extended to the assessment of ~100 CC lines for periodontitis using this protocol, and recently we mapped QTL associated with host susceptibility to periodontitis (unpublished data).

1.4 Map host susceptibility to *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa (*P. aeruginosa*) is listed among the WHO (World Health Organization)

leading resistant pathogens with greatest public health concern, to be one of major bacterial infections (10 – 15% of cases) in hospitals and healthcare systems worldwide. Severe infection with *P. aeruginosa* is typical among intensive care unit patients (ICU) with high risk for development of ventilator-associated pneumonia (VAP) and Sepsis (Gellatly and Hancock 2013). Wide variations are observed in host response, mainly individuals at risk and Cystic Fibrosis patients towards *P. aeruginosa* infection. So far many efforts were invested in dissecting *P. aeruginosa* genotypic features that might be underlying the variations in host response leading to differential disease phenomenon's and pathogenesis (Bianconi et al. 2011; Cigana et al. 2009; Bragonzi et al. 2009; Nguyen and Singh 2006). Yet, recent study approaches are focused instead on dissecting the host genetic background that might be playing crucial role controlling the variations in response severity (Weiler and Drumm 2013). To address this approach, various studies in murine models assessed multiple mice strains infected by *P. aeruginosa* and repeatedly the results confirmed significant variation in infection response between the inbred strains (Bragonzi 2010, De Simone et al.

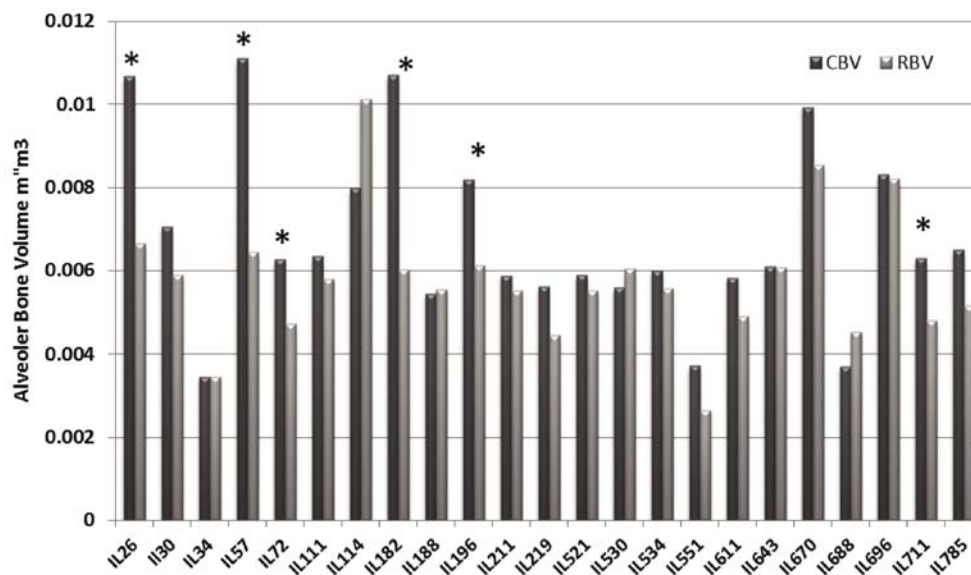


Fig. 6 Collaborative Cross (CC) lines alveolar bone volume changes in response to oral mixed infection. A dark Gray column presents control bone volume (CBV) and a light Gray column presents residual bone volume (RBV). Labeled with asterisk (*) are 6 CC lines of total 23 CC lines (IL26, IL57, IL72, IL182, IL196, and IL711) showing a significant bone loss ($P < 0.05$) and considered to be susceptible to the infection. X-axis represents the CC lines, Y-axis represents the alveolar bone volume mm^3 (Shusterman et al. 2013).

2014). As step forwards fine mapping of these regions in the genome using the CC mouse population, Lore' *et al.* 2015 assessed total of 92 mice (50 males, 42 females) generated from 17 CC lines and challenged by *P. aeruginosa* infection (intratracheal injection), following the infection with *P. aeruginosa*, host response was determined for 7 days in terms of survival time (days) and body weight (gram) changes. As reported by Lore' *et al.* 2015, the CC lines varied significantly in their survival time (Fig. 7A) ranging between lethal response (survival 1.5 days) to complete resistance (100% survival). As well, the CC lines varied in their body weight changes following the challenge, where few CC lines showed significant decrease in body weight and others showed recovery of BW after day 5. Summarizing the mean survival time (MST) and percentage change in body weight of day 1 (CBW1) (Fig. 7B). Hereby, using few lines of the CC population we demonstrate the role of strong genetic components controlling the host response despite fixed and strictly controlled environmental conditions. Certainly estimated broad sense heritability calculations shown to be high for both traits of the response post infection, survival time with $H^2 = 0.54$ and body weight loss with $H^2 = 0.28$. Due to these promising findings, number of CC lines were extended, and recently we mapped QTL associated with host susceptibility to *P. aeruginosa* infection (unpublished data).

1.5 Map host susceptibility to sepsis (unpublished).

Sepsis is a severe health complication, usually triggered by immune response of the body against infectious disease (Levy *et al.* 2003). Usually, sepsis is treated with antibiotic therapies together with aggressive operative intervention and supportive treatments for the body systems in intensive care unit (ICU). Despite continues advances in antibiotic therapies and medical support, high morbidity and mortality of sepsis are reported (Friedman *et al.* 1998). Sepsis pathogenesis is studied from multiple directions, one is based on dissecting the microbial factors contributing to the disease and another is host factors contributing to the sepsis development and progress. Focusing on host response, so far studies show that septic response of the host is triggered mainly by microbial toxins, primarily Lipopolysaccharide components (LPS) in gram negative bacteria and lipoteichoic acid (LTA) in gram positive bacteria (van der Poll and Opal 2008; Mattsson *et al.* 1993). Due to variations in sepsis incidence and severity among populations, it is evident that strong genetic factors might be controlling the development of sepsis in response to interaction with microbial toxins during infectious disease. Dissecting the genetic architecture underlying the sepsis development and severity is necessary for prevention and development of personalized implementations to combat sepsis

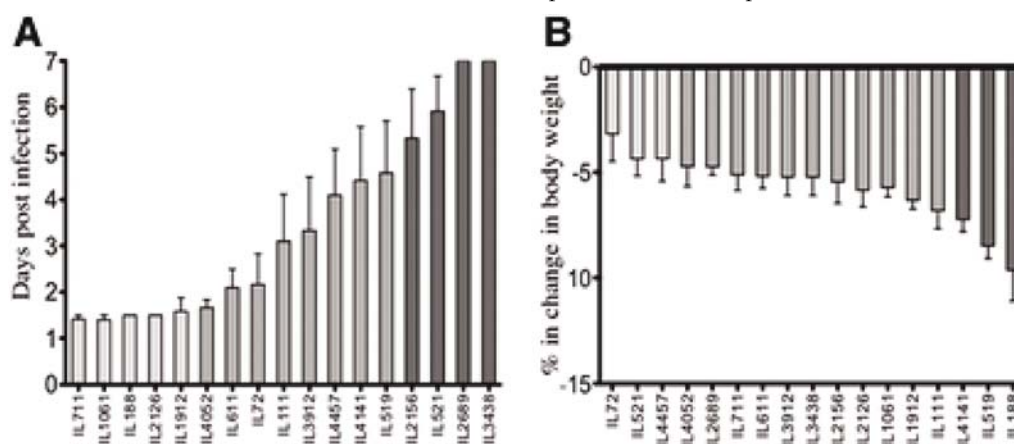


Fig. 7 CC lines response to *P. aeruginosa* airway infection. Fig. 7A shows the mean survival time (MST) in days ($\pm$ SEM). Fig. 7B show the percentage changes in body weight (CBW1) following the infection. X-axis represents the CC lines, Y-axis represents the mean survival time in days ($\pm$ SEM) in Fig. "A" and % change in body weight in Fig. "B".

deterioration. Hence, ongoing study in our lab using the CC lines population as different host genetic references and LPS/LTA separately injections as environmental challenge for host exposure to microbial toxins. Hitherto, 296 mice generated from 16 CC lines were given an i. p. injection of LPS (dissolved in PBS), thereafter host response was monitored for 72 hours in terms of survival time (hours), body temperature ($^{\circ}\text{C}$) and weight (gram) changes. Preliminary data analysis showed (Fig. 8A) a significant variation in survival time, where some CC lines exhibited increased LPS susceptibility and died after an average of 30 hours in contrast with the LPS-resistant CC lines that survived the 72 hours challenge. More importantly, two way ANOVA of sex effect cross CC lines revealed a significant sex effect ($P < 0.05$), in which for most of the scanned CC lines, males were more prone to septic shock than females of the same CC line (Fig. 8B). At the level of thermal response,

main response during the first 30 hours following the LPS injection was characterized by hypothermia for most of the CC lines, afterwards the CC lines varied in their response towards either hyperthermia or hypothermia (Fig. 8C). Similar variations were observed in body weight changes after the challenge (Fig. 8D).

Our preliminary data analysis confirms the significance of variation in host response to the toxic microbial component LPS in terms of survival time and also parameters of body temperature and weight changes, suggesting the involvement of multiple body systems to be controlled by strong genetic components. Meanwhile, further CC line are being assessed with LPS challenge to enrich the phenotypic data reference and enable fine mapping of the genomic regions responding to LPS. As well, similar experiment is ongoing with LTA stimulation.

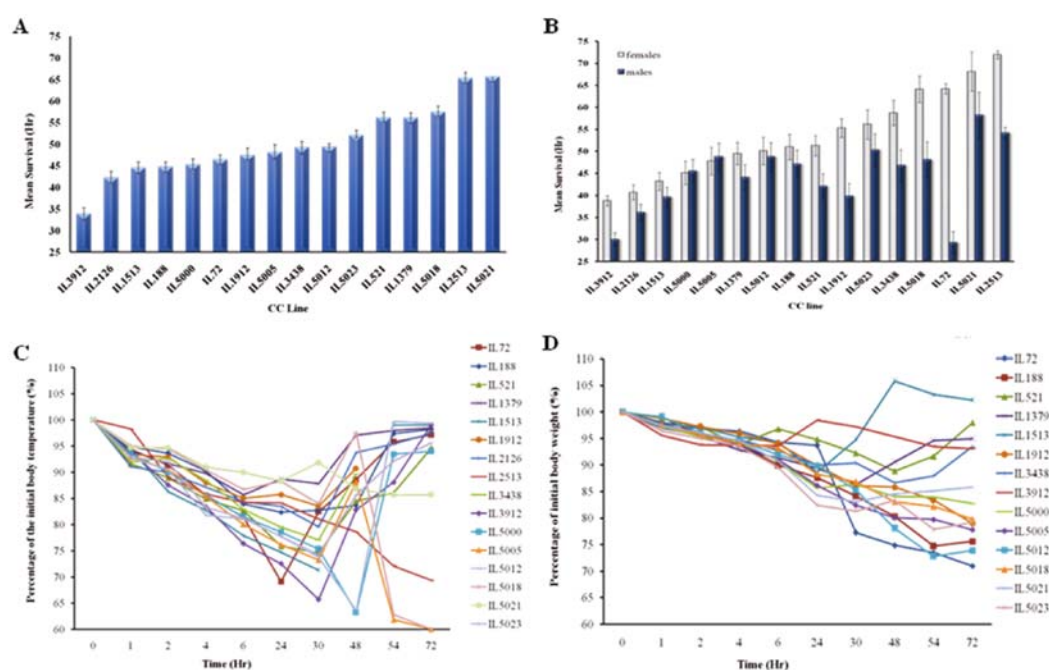


Fig. 8 CC lines septic response towards the microbial toxic component lipopolysaccharide (LPS). Fig. 8A shows CC lines mean ($\pm$ SEM) survival time (Hr) profile during the 72 hours after the infection. Fig. 8B shows the data split by sex in each CC line due to significant sex effect, X-axis represents the CC lines, Y-axis represents the mean survival time in hours ($\pm$ SEM), in in Fig. B- white column for females, blue column for males. Fig. 8C and D presents multiple patterns of temperature (C) and body weight (D) changes during the 72 hours post infection. Changes in temperature and body weight were calculated as percentage of initial value. X-axis represents time after LPS injection (Hr), Y-axis represents percentage of the initial body temperature (Fig. C) / weight (Fig. D).

2 CC lines for study of Colorectal cancer

One form of the inherited colorectal cancer is *familial adenomatous polyposis* (FAP) syndrome, a rare dominant genetic disease, which is characterized by multiple intestinal polyps (Moser et al. 1993, Rubinfeld et al. 1993; Sheng et al. 2010; Silverman et al. 2003; Suraweera et al. 2006). It is caused by a functional mutation in the *adenomatous polyposis coli* (*Apc*) gene. In order to investigate the syndrome in vivo, *Apc*^{Min/+} mouse was developed, imitating the polyp phenomenon in humans (Joslyn et al. 1991; Kinzler et al. 1991; Dietrich et al. 1993; Harada et al. 1999; Hirohashi and Kanai 2003). In previous studies, *Min*^{+/-} mouse was used for identifying the genes (modifiers) affecting the function of *Apc* gene. Currently, a number of chromosomal regions associated with modifiers of *Apc* gene were mapped (MOM 1 – 10), but failed to identify the actual genes in these loci that affect the function of *Apc* gene, due to the low resolution mapping of these regions (Lawrence et al. 2007; Cormier et al. 2000; Morin et al. 1997; Moser et al. 1992; Oikarinen et al. 2009; Silverman et al. 2002). The CC mice are a powerful tool for high resolution mapping of loci associated with complex traits, and can lead to suggest strong candidate genes underlying these loci. As proof of concept about the use of CC mouse population for mapping modifiers of *Apc*, we have generated a (*CC-C57BL/6 lines carrying the Apc*^{Min/+} mutation) F1 mouse population, by crossing male mice of C57BL/6J carrying *Apc*^{Min/+} with females of advanced inbreeding generations of CC lines. The study cohort consisted of 27 F1 CC-C57BL/6 lines carrying the *Apc*^{Min/+} mutation. The litters from these mating were tested by polymerase chain reaction (PCR) in order to distinguish the litter carrying *Apc* mutant genes from the wild type. F1 heterozygous mouse carriers for the mutated *Apc* gene were housed and kept for a five-month period on a 12 – hour light/dark cycle. During this period, body weight (gram) was monitored bi-weekly. At the terminal time point,

mice were sacrificed, packed cell volume was measured (anemia indicator) and spleen and intestine were removed. The spleen weight was measured (inflammation indicator) and Intestines were divided into small intestine and colon for further characterization of length, weight and polyp count. The number and sizes of polyps in the small intestine and colon were recorded after fixation in 10% neutral buffered formalin (NBF) overnight, and stained with methylene blue. Findings of the study were recently published at Dorman et al. 2016, revealing a significantly wide variation of all the phenotypic parameters including total number of polyps (Fig. 9) among the *CC-C57BL/6 lines carrying the Apc*^{Min/+} mutation, despite the constant environmental conditions for the overall population. Hence, these significant variations are suggested to be attributed by the variation of the CC lines genetic backgrounds. And indeed, a heritability calculation certifies this statement with high H² value of 0.64 for the total number of polyps. Additionally, Durman et al. 2016 assessed secondary effects of the disease, such as body weight changes, anemia and splenomegaly (enlarged spleen). Estimated Pearson correlations (Table 1) reports significant negative correlation between the number of polyps and packed cell volume ($r = -0.84$, $P < 0.01$), i. e. the more polyps (colon cancer) the lower packed cell volume (anemia), and positive significant correlation between number of polyps and Spleen % weight ($r = 0.74$, $P < 0.01$), i. e. the more polyps (colon cancer) the larger spleen (Splenomegaly). As for body weight changes, it is apparent that although when compared to control CC lines most of the *CC-C57BL/6 lines carrying the Apc*^{Min/+} mutation gain less weight during the five months period, and yet there is a significant variation in patterns of body weight gain between the CC lines. At the time of writing this report, linkage analysis was performed and modifier for *Apc* genes and their ability to induce colorectal cancer were mapped (unpublished data).

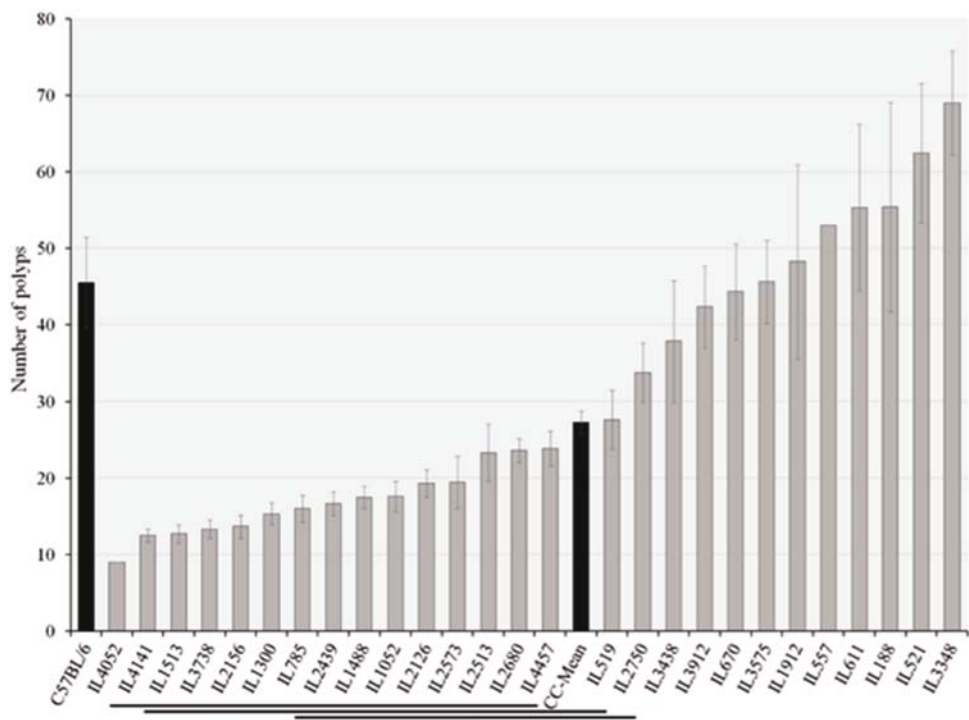


Fig.9 Average number of polyps (±SEM) in the 27 F1 CC-C57BL/6 – Min lines (n = 1 – 16 mice/line).

X-axis represents CC lines and the C57BL/6 strain which is *Apc*^{Min/+} mutation carrier (first black column from the left) , Y-axis represents number of polyps. [Dorman et al. 2016]

Tab.1 Pearson correlation values between traits: total polyps, intestine length, intestine % weight, % PCV, spleen % weight and polyps per cm. * Correlation is significant at *P* < 0. 05 ** Correlation is significant at *P* < 0. 01. [Dorman et al. 2016]

Table 1 / Trait	Total Polyps	Intestine Length	Intestine %Weight	%PCV	Spleen %Weight	Polyps per cm
Total Polyps	1	0.589**	0.695**	-0.841**	0.743**	0.998**
Intestine Length	0.589**	1	0.266	-0.457*	0.317	0.539**
Intestine %Weight	0.695**	0.266	1	-0.769**	0.815**	0.714**
%PCV	-0.841**	-0.457*	-0.769**	1	-0.846**	-0.852**
Spleen %Weight	0.743**	0.317	0.815**	-0.846**	1	0.764**
Polyps per cm	0.998**	0.539**	0.714**	-0.852**	0.764**	1

3 CC lines for Type 2 Diabetes study

The prevalence of type 2 diabetes (T2D) , in the past decades, has increased into epidemic proportions, and in year 2000 was 150 million and it is expected to double by the year 2025. Several lines of evidence provide support for the role of genetic variation in the

pathogenesis of T2D and insulin resistance. In this context, diabetes can be considered as a complex disease, where the challenge is the Western diet and CC lines as genetic reference. Recent publication of our study by *Atamni et al.* 2016, introduces the powerful utility of CC lines population for understanding the genetic bases of high fat (42% fat) diet-induced T2D

(HFD induced T2D). Study cohort consisted of 683 mice generated from 21 CC lines; mice were divided into two experimental groups: 1) Control – maintained on Chow standard rodents' diet and 2) Challenge group – maintained on HFD, each CC line was representative in both groups. The dietary challenge started at age of 8 weeks old lasting for 12 weeks, in which body weight (gram) and size (length, waist circumference) were assessed bi-weekly. At the terminal time point, an intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) was performed to evaluate the diabetogenic status of the mice in response to the dietary challenge, compared between CC lines within each group (genetic effect) and also between groups (diet effect). Published findings at *Atamni et al.* 2016 presents an extensive variations of all the measured phenotypes between the CC lines, importantly body

diabetogenic and weight response to HFD challenge significantly influenced by the host genetic background with strong sex effect in each CC line, indicating that males and females from the same CC line experience the disease differently. CC lines showed multiple patterns for glucose clearance (Fig. 10), in which different outcomes are observed including resistibility, susceptibility and moderate intermediate response. Some CC lines were highly susceptible towards consumption of HFD showing impaired glucose tolerance when compared to mice from control group of the same CC line. Similar finding at the level of body weight changes, showing multiple patters, some towards continues gain, some towards moderate gain and some even showed high body weight resistance keeping their body weight balanced despite HFD consumption (Fig. 10).

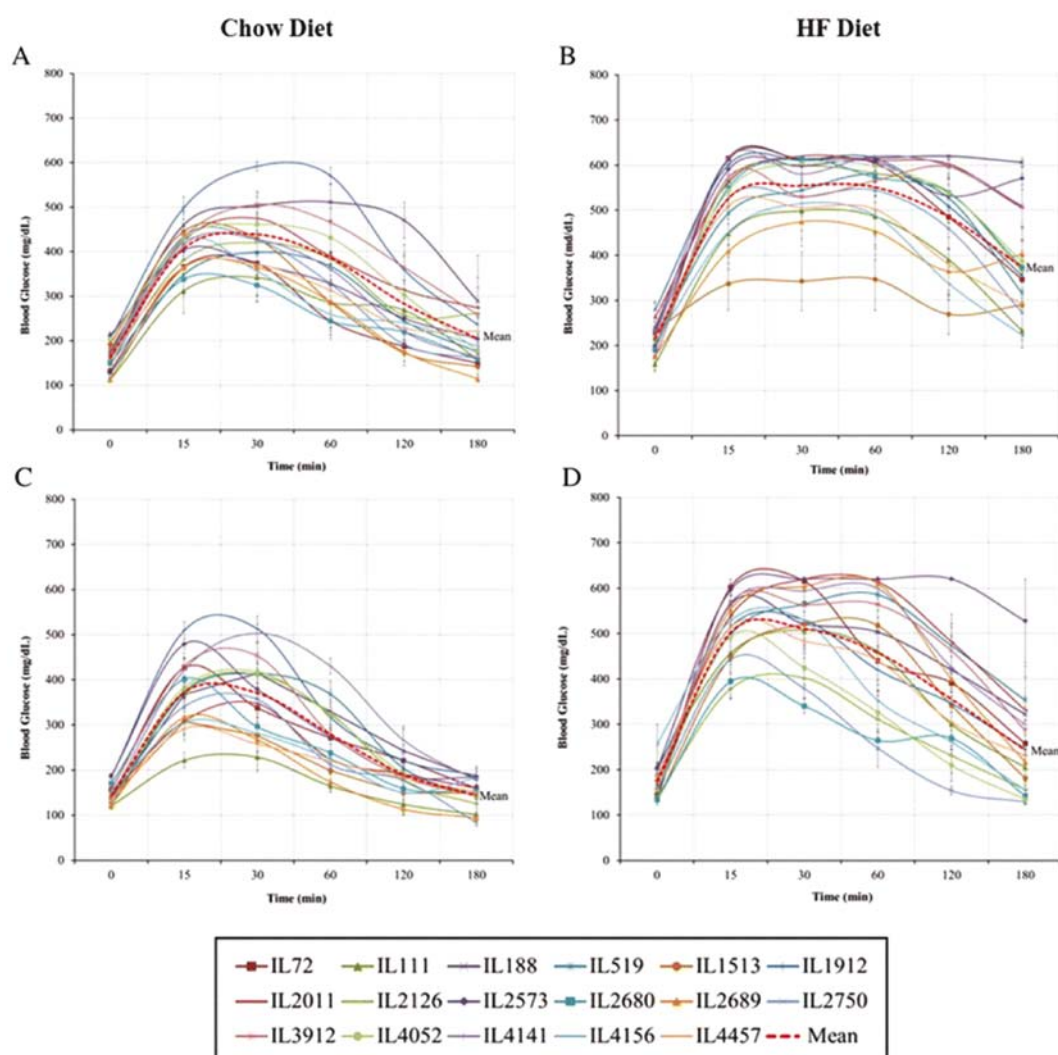


Fig.10 Kinetics of glucose clearance for 17 CC lines (split by sex) as assessed during the 180 minutes intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) after 12 weeks on Chow diet (CH, 18 % fat) and on high fat diet (HFD, 42 % fat). The dark central line shows average glucose levels (mg/dL) across lines. Chart A, Males-Chow; B, Males-HFD; C, Females-Chow; D, females-HFD. [Atamni et al. 2016]

The bottom line of this comprehensive study is that “one size does not fit all” in context of diets, genetic background of host plays critical role in body response towards HFD or standard diet. Therefore, discovering the candidate genes involved in susceptibility or resistibility will bring us closer towards personalized diets for prevention and treatment of obesity and T2D development.

Quantitative trait loci (QTL) that determine susceptibility to HFD challenge, as expressed in body weight and total area under curve of overall intraperitoneal glucose tolerance test (IPGTT) phenotypes were identified recently to be published soon. Furthermore, precise QTL mapping for individual time points during the IPGTT and body weight accumulation was performed and QTL mapped (unpublished data).

4 CC lines for fundamental Body traits

4.1 Dissecting genetic background of body composition (unpublished)

In this study, we aim to determine the genetic factors underlying the body composition using the CC population and the power of the DEXA scan technique. The following phenotypes were recorded by the DEXA scan; 1) bone tissue features; bone area (cm^2), bone mineral content (BMC), bone mineral density (BMD), 2) Soft tissues; fat (gram), lean (gram), percentage fat (% fat). Using the phenotypic data and genotypic data of the CC lines will enable genome-wide scan analysis for identifying quantitative trait loci associated with these traits. Additionally, body length (BL = distance in cm between nose and anus), waist

circumference, body weight (BW), the body mass index ($\text{BMI} = \text{BW}/\text{BL}^2$) were measured for each mouse, which will also be used as a phenotype for determining the variation between the different CC lines. On average 4 – 10 individuals of 18 to 20 – week old mice of both sexes from each randomly used 15 CC lines, which were maintained on standard rodent diet, were analysed. Figure 12. A to D show the profiles of the different tested traits of different CC lines using DEXA scan. The statistical analysis of the phenotypic results have shown significant ($P < 0.05$) variations between the different CC lines. Sex effect was also observed with the different tested traits.

4.2 Genetic background of Immune response (unpublished)

Mapping quantitative trait loci (QTLs) effecting the immune response cells lineages in the peripheral blood and subsequently identifying the genes underlying these QTL can lead to better understanding of the host response to these different infectious diseases. For this purpose, we initiated a study aimed of mapping the genes, which control the production of various subsets of cells that are participating in the host defense. Here, we present the immune profiles data on 15 CC mouse lines by quantification of the amount of peripheral blood T, B, and macrophages cells of mature mice (3 – 5 mice per line of 10 weeks old). The immunophenotyping was performed using flow cytometry analysis using fluorescence activated cell staining (FACS) technology. Blood samples were collected from the orbital venous plexus of mice. Blood samples from individual mice were incubated with specific antibodies including anti CD3e (T cells), anti

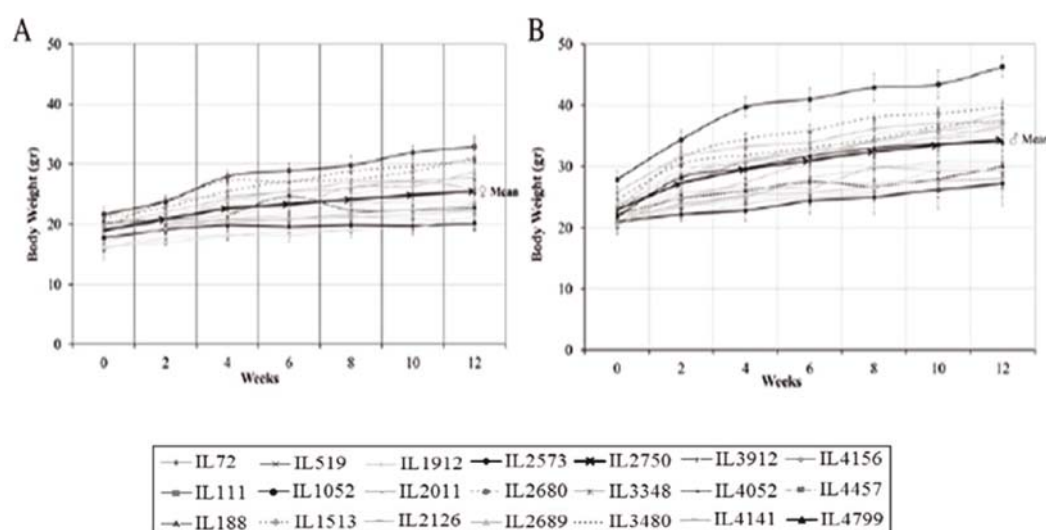


Fig. 11 Kinetics of body weight (g) means ($\pm$ SEM) of females (A) and males (B) of 21 CC lines during 12 weeks on high fat dietary challenge (HFD, 42 % fat). [Atamni et al. 2016]

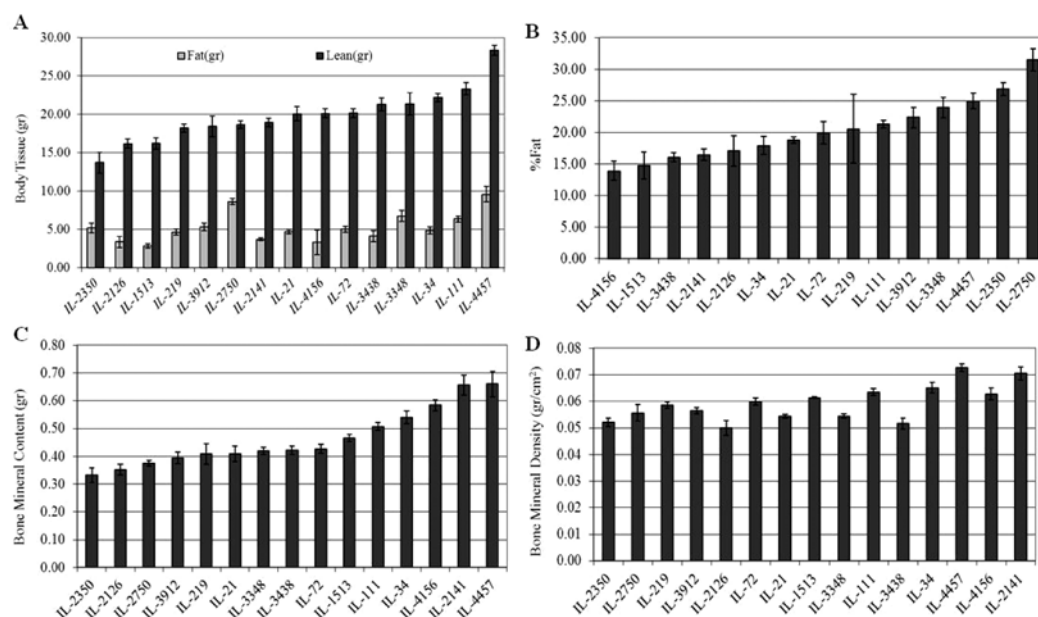


Fig. 12 Phenotypic profiles of the body composition complex traits assessed by DEXA scan of different CC lines. X-axis represent the CC lines, Y-axis represent phenotypic trait value; “A” represents body tissue weight in gram, “B” represents percentage Fat (%), “C” represents bone mineral content in gram, “D” represents bone mineral density in gram/cm².

CD19 (B cells), and anti CD11b (macrophages). (Fig. 13). Our study revealed marked differences in the relative proportions of different cells in the different CC mouse lines. The relative proportions varied between 13.5 – 43% for B lymphocytes and between 6.5 – 36% for T lymphocytes. As for macrophages their proportion value range was 10.6 – 39% in the different CC lines. Our results are compatible with the results, which already published for different commercially available inbred mouse strains. Thus, these results form the basis for extending the study of more CC lines, and recently using phenotypic data

from 63 lines, we were able to map QTL associated with the immune profile cells (unpublished data).

4.3 Map QTL for trabecular bone microarchitecture

Microarchitecture of trabecular bone structure is considered as complex trait controlled by multiple genetic factors. Therefore, microstructure of trabecular bone is known to differ among populations resulting in phenotypic variations towards development of osteoporosis and bone fractures (mechanic strength). Trabecular bone microstructure variations can lead to fracture risk variations between individual despite their similar bone mineral density (BMD), indicating that

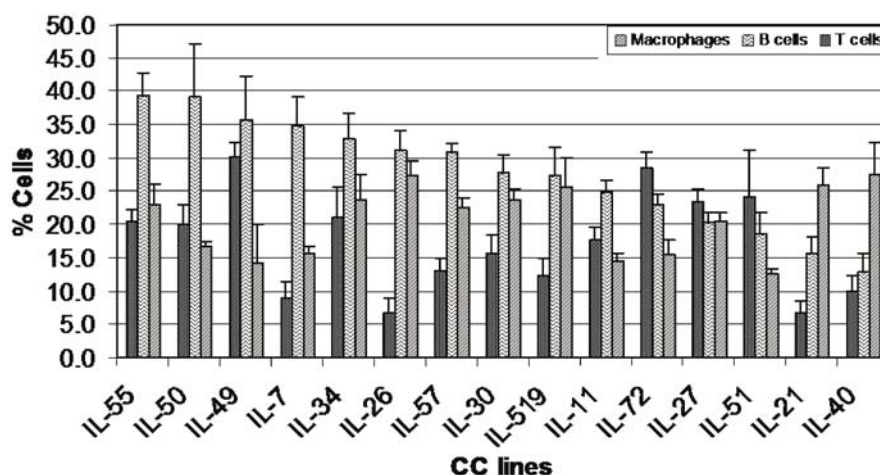


Fig. 13 Percentage of T, B and macrophage immune cells in 15 naïve CC mouse lines. The X-axis represents the CC lines, Y-axis represents the percentage, including standard errors of the three tested immune cells in CC lines at age of 8 – 9 week old mice. The percentage of T, B and macrophage immune cells in peripheral blood was assessed by FACS analysis.

additional bone features, such as trabecular bone microstructure determines the bone strength (Chappard et al. 2011). In attempts to characterize the genetic background underlying these features, Levy et al. 2015, scanned the femoral distal metaphysis of 160 mice generated from 31 CC lines for trabecular traits measured by microtomographic (CT) analysis. The measured trabecular traits comprised of trabecular bone volume fraction (BV/TV), number (Tb. N), thickness (Tb. Th), and connectivity density (Conn. D). And indeed, using relatively small number of CC lines, Levy et al. 2015 succeeded in mapping six quantitative trait loci, where 4 loci on chromosomes 2 and 7 for BV/TV and Tb. Th (2 loci for each trait), two additional loci on chromosomes 8 and 14 for Tb. N and Conn. D, respectively (Fig. 14) (1% false discovery rate). Genome browse of the mapped QTLs suggest newly genes with relevance to skeletal biology to be further validated. Heritability values of these traits confirmed their high genetic component ranging from 0.6 to 0.7. In this study, Levy et al. 2015 demonstrates for the first time significant genetic linkage between multiple genetic loci and trabecular microstructural features, suggesting new candidate genes to be further validated for their contribution in microstructure trabecular bone traits.

Conclusions

The Collaborative Cross (CC) is a next-generation mouse genetic reference population designed

by the mouse genetics community for high resolution mapping of genetic factors of relevance to human health, such as susceptibility to infectious and chronic diseases, and response to medical interventions. However, it is a very flexible resource with very wide potential application to complex traits of interest for human medicine and livestock agriculture.

The CC will eventually consist of a set of about 350 recombinant inbred lines are currently available for study. These lines were generated by reciprocal crosses between 8 founder lines, including among them 5 relatively unrelated classical laboratory strains, and 3 lines derived from recent wild accessions (two *Mus subspecies*, and one *Mus domesticus*). The CC resource contains extremely wide genetic diversity relative to existing mouse genetic resources, and has already demonstrated unprecedented power for high resolution QTL mapping. Genotypes and all generated phenotypes will be stored centrally and made publicly available making the CC a “Genotype once, phenotype once” resource. Phenotypic distribution of CC lines is also consistent with the presence of very large variation among them in quantitative traits as well.

The estimated heritability (H^2) effects of the different assessed phenotypic traits recorded on CC mice (Tab. 2), have confirmed that the genetic factors are the major player underlying this phenotypic variations. The published and unpublished results highlighted the usefulness of this mouse GRPs to identify complex genetic traits, which may lead to

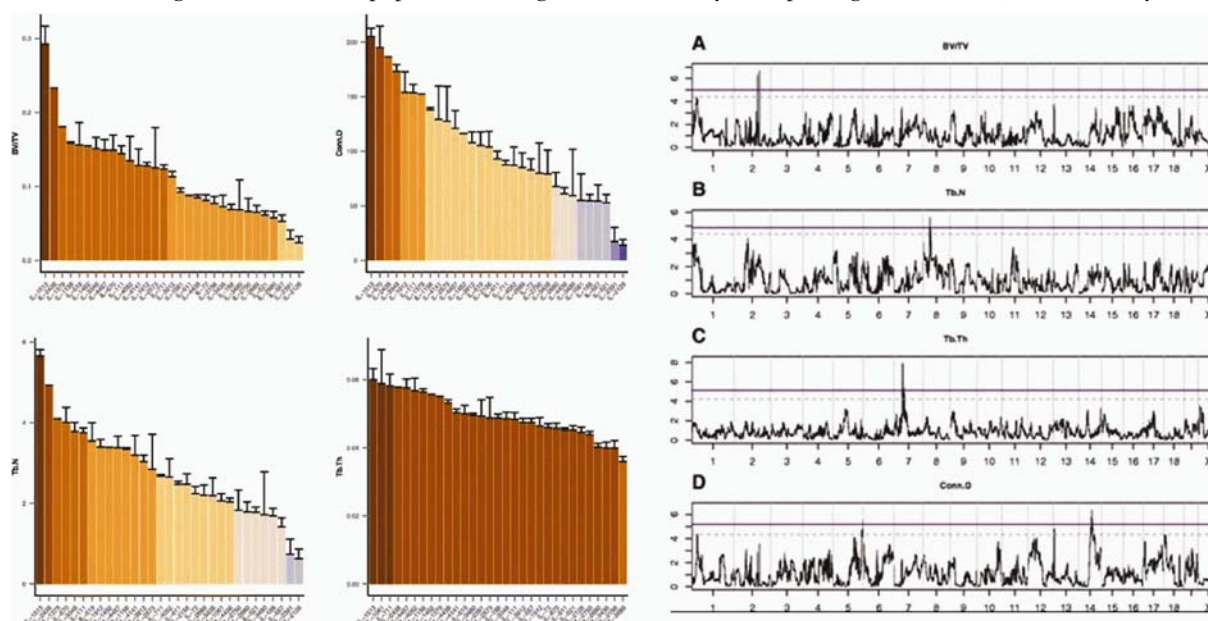


Fig. 14 QTL haplotype mapping of trabecular bone traits using the CC lines. On the left side; phenotypic profile of the trabecular bone features BV/TV, Tb. N, Tb. Th and Conn. D. X-axis represents CC lines and Y-axis represents the phenotypic trait value. On the right side; QTL mapping results revealing 6 significant QTLs using the phenotypic and genotypic data of the CC lines at HAPPY software. [Levy et al. 2015]

Tab. 2 Estimated heritability of variety of phenotypic traits assessed in the CC mice

Topic	Challenge	Trait	H ²
Infectious diseases	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Survival time (days)	0.78
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Survival time (days)	0.45
	<i>P. gingivalis</i> and <i>F. nucleatum</i>	CBV	0.4
		RBV	0.4
		LBV	0.2
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Survival time (days)	0.54
		Body weight loss (gr)	0.28
	Lipopolysaccharide (LPS)	Survival time (Hr)	0.19
		Total polyps number	0.64
Tumorigenesis	CC - C57BL/6 lines carrying Apc Min/ + mutation	% Packed Cell volume	0.51
		% Spleen weight	0.53
Type 2 Diabetes diabetes	High fat diet (42%)	♀ IPGTT Total AUC	0.43
		♂ IPGTT Total AUC	0.37
Obesity	High fat diet (42%)	♀ Body Weight gain	0.53
		♂ Body Weight gain	0.38
Body composition	DEXA scan	Body % Fat	0.44
		Bone mineral density (BMD gr/cm ²)	0.00
Immune system	FACS analysis	T cells	0.34
		B cells	0.30
		Macrophages	0.16
Trabecular bone microarchitecture	Micro tomography scan	BV/TV	0.63
		Tb. N	0.71
		Tb. Th	0.56
		Conn. D	0.67

IPGTT = intraperitoneal glucose tolerance test; AUC = area under curve.

Trabecular bone volume fraction (BV/TV), number (Tb. N), thickness (Tb. Th), and connectivity density (Conn. D)

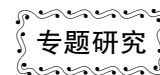
translation to human diseases. A number of previous studies have shown the knowledge gained in the mouse experimental systems can be applied to humans. This research will continue to make major discoveries in biomedical research and, thus, contribute to a better understanding and treatment of human and livestock diseases.

参考文献:

- [1] Atamni HJ, Mott R, Soller M, *et al.* High-fat-diet induced development of increased fasting glucose levels and impaired response to intraperitoneal glucose challenge in the collaborative cross mouse genetic reference population [J]. BMC Genet, 2016, 17:10.
- [2] 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.
- [3] Baker PJ, Roopenian DC. Genetic susceptibility to chronic periodontal disease [J]. Microbes Infect, 2002, 4: 1157 – 1167.
- [4] Baker PJ, Dixon M, Roopenian DC. Genetic control of susceptibility to *Porphyromonas gingivalis*-induced alveolar bone loss in mice [J]. Infection Immunity, 2000, 68: 5864 – 5868.
- [5] Bianconi I, Milani A, Cigana C, *et al.* Positive signature-tagged mutagenesis in *Pseudomonas Aeruginosa*: Tracking patho-adaptive mutations promoting airways chronic infection [J]. PLoS Pathogens, 2011, 7 (2): e1001270.
- [6] Bottomly D, Ferris MT, Aicher LD, *et al.* Expression quantitative trait Loci for extreme host response to influenza A in pre-collaborative cross mice [J]. G3 (Bethesda), 2012, 2 (2): 213 – 221.
- [7] Bragonzi A, Paroni M, Nonis A, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* microevolution during cystic fibrosis lung infection establishes clones with adapted virulence [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 180(2): 138 – 145.
- [8] Bragonzi A. Murine models of acute and chronic lung infection with cystic fibrosis pathogens [J]. Int J Med Microbiol, 2010, 300(8): 584 – 593.
- [9] Broman KW. The genomes of recombinant inbred lines [J]. Genetics 2005, 169(2): 1133 – 1146.
- [10] Chappard D, Baslé MF, Legrand E, *et al.* New laboratory tools in the assessment of bone quality [J]. Osteoporos Int, 2011, 22 (8): 2225 – 2240.
- [11] Churchill G, Airey D, Allayee H, *et al.* The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits [J]. Nature Genetics, 2004, 36: 1133 – 1137.
- [12] Cigana C, Curcurù L, Leone MR, *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* exploits lipid A and muopeptides modification as a strategy to lower innate immunity during cystic fibrosis lung infection [J]. PLoS One, 2009, 4(12): e8439.

- [13] Cormier RT, Bilger AJ, Lillich RB, *et al.* The Mom1AKR intestinal tumor resistance region consists of Pla2g2a and a locus distal to D4Mit64 [J]. *Oncogene*, 2000, 19: 3182–3192.
- [14] De Simone M, Spagnuolo L, Lorè NI, *et al.* Host Genetic background influences the response to the opportunistic *Pseudomonas aeruginosa* infection altering cell-mediated immunity and bacterial replication [J]. *PLoS One*, 2014, 9 (9): e106873.
- [15] Dietrich WF, Lander ES, Smith JS, *et al.* Genetic identification of Mom-1, a major modifier locus affecting Min-induced intestinal neoplasia in the mouse [J]. *Cell* 1993, 75: 631–639.
- [16] Dorman A, Baer D, Tomlinson I, *et al.* Genetic analysis of intestinal polyp development in Collaborative Cross mice carrying the Apc (Min/+) mutation [J]. *BMC Genet.* 2016, 19; 17:46.
- [17] Durrant C, Tayem H, Yalcin B, *et al.* Collaborative Cross mice and their power to map host susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infection [J]. *Genome Res*, 2011, 21:1239–1248.
- [18] Ferris MT, Aylor DL, Bottomly D, *et al.* Modeling host genetic regulation of influenza pathogenesis in the collaborative cross [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(2): e1003196.
- [19] Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time [J]. *Crit Care Med*, 1998, 26 (12): 2078–86.
- [20] Gelinas R, Chesler EJ, Vasconcelos D, *et al.* A genetic approach to the prediction of drug side effects: bleomycin induces concordant phenotypes in mice of the collaborative cross [J]. *Pharmgenomics Pers Med*, 2011, 4: 35–45.
- [21] Gellatly SL, Hancock RE. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defences [J]. *Pathog Dis*, 2013, 67(3): 159–173.
- [22] Gralinski LE, Ferris MT, Aylor DL, *et al.* Genome wide identification of SARS-CoV susceptibility loci using the Collaborative Cross [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11 (10): e1005504.
- [23] Harada N, Tamai Y, Ishikawa T, *et al.* Intestinal polyposis in mice with a dominant stable mutation of the beta-catenin gene [J]. *EMBO J*, 1999, 18: 5931–5942.
- [24] Hirohashi S, Kanai Y. Cell adhesion system and human cancer morphogenesis [J]. *Cancer Sci*, 2003, 94: 575–581.
- [25] Iraqi F. Fine mapping of quantitative trait loci using advanced intercross lines of mice and positional cloning of the corresponding genes [J]. *J Exp Lung Res*, 2000a, 26: 641–649.
- [26] Iraqi F, Clapcot S, Kuman P, *et al.* Fine mapping of trypanosomiasis resistance QTLs in mice using advanced intercross lines [J]. *Mammalian Genome*, 2000b, 11: 645–648.
- [27] Iraqi FA, Mahajne M, Salaymah A, *et al.* The genome architecture of the Collaborative Cross mouse genetic reference population [J]. *Genetics* 2011, 190 (2): 389–402.
- [28] Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, *et al.* Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis [J]. *Cell* 1991, 66: 601–613.
- [29] Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, *et al.* Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation [J]. *Nature* 2011, 14 (477): 289–294.
- [30] Kelada SN, Aylor DL, Peck BC, *et al.* Genetic analysis of hematological parameters in incipient lines of the collaborative cross [J]. *G3 (Bethesda)*, 2012, 2(2): 157–165.
- [31] Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK, *et al.* Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21 [J]. *Science*, 1991, 253: 661–665.
- [32] Klopocki E, Hennig BP, Dathe K, *et al.* Deletion and point mutations of PTHLH cause brachydactyly type E [J]. *Am J Hum Genet.* 2010, 86(3): 434–439.
- [33] Kovacs A, Ben-Jacob N, Tayem H, *et al.* Genotype is a stronger determinant than sex of the mouse gut microbiota [J]. *Microb Ecol*, 2011, 61(2): 423–428.
- [34] Latgé JP. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis [J]. *Clin Microbiol Rev*, 1999, 12(2): 310–350.
- [35] Lawrence KN, Shedlovsky A, Biehl BS, *et al.* Identification of Mom7, a novel modifier of APCmin/+ on mouse chromosome 18 [J]. *Genetics* 2007, 176: 1237–1244.
- [36] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, *et al.* 2001 CCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS International Sepsis Definitions Conference [J]. *Crit Care Med*, 2003, 31 (4): 1250–1256.
- [37] Levy R, Mott RF, Iraqi FA, *et al.* Collaborative cross mice in a genetic association study reveal new candidate genes for bone microarchitecture [J]. *BMC Genomics* 2015, 16(1): 1013.
- [38] Lorè NI, Iraqi FA, Bragonzi A. Host genetic diversity influences the severity of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in the Collaborative Cross mice [J]. *BMC Genet*, 2015, 16: 106.
- [39] Mattsson E, Verhage L, Roloff J, *et al.* Peptidoglycan and teichoic acid from *Staphylococcus Epidermidis* stimulate human monocytes to release tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta and interleukin-6 [J]. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 1993, 7(3): 281–287.
- [40] Mathes WF, Aylor DL, Miller DR, *et al.* Architecture of energy balance traits in emerging lines of the Collaborative Cross [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2011, 300(6): E1124–1134.
- [41] Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, *et al.* Activation of β -catenin-Tcf signaling in colon cancer by mutations in β -catenin or APC [J]. *Science*, 1997, 275: 1787–1790.
- [42] Moser AR, Dove WF, Roth KA, *et al.* The Min (multiple intestinal neoplasia) mutation: its effect on gut epithelial cell differentiation and interaction with a modifier system [J]. *J Cell Biol*, 1992, 716: 1517–1526.
- [43] Moser AR, Mattes EM, Dove WF, *et al.* ApcMin, a mutation in the murine Apc gene, predisposes to mammary carcinomas and focal alveolar hyperplasias [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1993, 90: 8977–8981.
- [44] 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 U S A, 2000, 23(7): 12649–12654.
- [45] Nguyen D, Singh PK. Evolving stealth: Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during cystic fibrosis infections [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(22): 8305–8306.
- [46] Oikarinen SI, Cleveland AG, Cork KM, et al. Genetic mapping of Mom5, a novel modifier of ApcMin-induced intestinal tumorigenesis [J]. Carcinogenesis, 2009, 30: 1591–1596.
- [47] Philip VM, Sokoloff G, Ackert-Bicknell CL, et al. Genetic analysis in the Collaborative Cross breeding population [J]. Genome Res, 2011, 21: 1223–38.
- [48] Phillippi J, Xie Y, Miller DR, Bell TA, Zhang Z. et al. Using the emerging Collaborative Cross to probe the immune system. Genes Immun, 2014, 15(1): 38–46.
- [49] Polak D, Wilensky A, Shapira L, et al. Mouse model of experimental periodontitis induced by *Porphyromonas gingivalis*/*Fusobacterium nucleatum* infection: bone loss and host response [J]. J Clin Periodontol, 2009, 36(5): 406–410.
- [50] Ram R, Mehta M, Balmer L, et al. Rapid identification of major-effect genes using the collaborative cross [J]. Genetics, 2014, 198(1): 75–86.
- [51] Rankinen T, Zuberi A, Chagnon YC, et al. The human obesity gene map: the 2005 update [J]. Obesity (Silver Spring), 2006, 14(4): 529–644.
- [52] Roberts A, Villena FP, Wang W, et al. The polymorphism architecture of mouse genetic resources elucidated using genome-wide resequencing data [J]. Mammalian Genome, 2007, 18(6): 473–481.
- [53] Rogala AR, Morgan AP, Christensen AM, et al. The Collaborative Cross as a resource for modeling human disease: CC011/Unc, a new mouse model for spontaneous colitis [J]. Mamm Genome. 2014, 25(3–4): 95–108.
- [54] Rubinfeld B, Souza B, Albert I. Association of the APC gene product with betacatenin [J]. Science, 1993, 262: 1731–1734.
- [55] Sheng JQ, Cui WJ, Fu L, et al. APC gene mutation in Chinese familial adenomatous polyposis patients [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16: 1522–1526.
- [56] Shusterman A, Salymah Y, Nashef A, et al. Genotype is an important determinant factor of host susceptibility to periodontitis in the Collaborative Cross and inbred mouse populations [J]. BMC Genetics, 2013, 14: 68–79.
- [57] Silverman KA, Koratkar RA, Siracusa LD. et al. Identification of the modifier of Min 2 (Mom2) locus, a new mutation that influences Apc-induced intestinal neoplasia [J]. Genome Res, 2002, 12: 88–97.
- [58] Silverman KA, Koratkar RA, Siracusa LD, et al. Exclusion of Madh2, Madh4, and Madh7 as candidates for the modifier of Min 2 (Mom2) locus [J]. Mamm. Genome Res, 2003, 14: 119–129.
- [59] Soubani AO, Chandrasekar PH. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. Chest, 2002, 121(6): 1988–1999.
- [60] Suraweera N, Haines J, McCart A, et al. Genetic determinants modulate susceptibility to pregnancy-associated tumorigenesis in a recombinant line of Min mice [J]. Human Mol Genetics, 2006, 15: 3429–3435.
- [61] Thaisz J, Tsaih SW, Feng M, et al. Genetic analysis of albuminuria in collaborative cross and multiple mouse intercross populations [J]. Am J Physiol Renal Physiol, 2012, 303(7): F972–981.
- [62] Threadgill DW, Hunt KW, Williams RW. Genetic dissection of complex and quantitative traits: from fantasy to reality via a community effort [J]. Mamm Genome 2002, 16: 344–355.
- [63] Valdar W, Flint J, Mott R. Simulating the collaborative cross: power of quantitative trait loci detection and mapping resolution in large sets of recombinant inbred strains of mice [J]. Genetics, 2006, 172(3): 1783–1797.
- [64] Van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis [J]. Lancet Infect Dis, 2008, 8(1): 32–43.
- [65] Vered K, Durrant C, Mott R, et al. Susceptibility to *Klebsiella pneumoniae* infection in collaborative cross mice is a complex trait controlled by at least three loci acting at different time points [J]. BMC Genomics, 2014, 15: 865.
- [66] Weiler CA, Drumm ML. Genetic influences on cystic fibrosis lung disease severity [J]. Front Pharmacol, 2013, 4: 40.
- [67] Wicker LS, Clark J, Fraser HI, et al. Type 1 diabetes genes and pathways shared by humans and NOD mice [J]. J Autoimmun, 2005, 25(Suppl): 29–33.
- [68] Wilensky A, Gabet Y, Yumoto H, et al. Three-dimensional quantification of alveolar bone loss in *Porphyromonas gingivalis*-infected mice using micro-computed tomography [J]. J Periodontol, 2005, 76(8): 1282–1286.
- [69] Williams RC. Periodontal disease [J]. N Engl J Med, 1990, 322(6): 373–382.
- [70] Wilson M. Biological activities of lipopolysaccharides from oral bacteria and their relevance to the pathogenesis of chronic periodontitis [J]. Sci Prog, 1995, 78 (Pt 1): 19–34.
- [71] Xiong H, Morrison J, Ferris MT, et al. Genomic profiling of collaborative cross founder mice infected with respiratory viruses reveals novel transcripts and infection-related strain-specific gene and isoform expression [J]. G3 (Bethesda), 2014, 4(8): 1429–1444.
- [72] Yalcin B, Flint J, Mott R. Using progenitor strain information to identify quantitative trait nucleotides in outbred mice [J]. Genetics, 2005, 171: 673–681.
- [73] Yang H, Ding Y, Hutchins LN, et al. A customized and versatile high-density genotyping array for the mouse [J]. Nature Methods, 2009, 6(9): 663–666.
- [74] Zombeck JA, Deyoung EK, Brzezinska WJ, et al. Selective breeding for increased home cage physical activity in collaborative cross and Hsd:ICR mice [J]. Behav Genet, 2011, 41(4): 571–582.



复杂性状遗传 CC 小鼠在传染病领域的应用及研究进展

许黎黎, 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, 北京 100021)

【摘要】 动物模型是传染病防控研究体系中的重要支撑环节, 起到连接实验室基础科研和临床诊疗的桥梁作用。小鼠是目前最被广泛使用的传染病动物模型, 然而, 免疫系统完整的成熟小鼠很多情况下对某些传染病病原并不易感。近年来, 开发临床病例表征与人类更接近的协同杂交 (Collaborative Cross, CC) 小鼠, 又称复杂性状遗传小鼠资源是目前的研究热点和建立疾病动物模型的另一切入口。本文将对目前使用 CC 小鼠感染传染病病原 (包括病毒、细菌、真菌等) 后呈现出表型多样性的研究报道做一综述, 以期为进一步研究 CC 小鼠对不同传染病的易感性, 丰富我国传染病动物模型资源库, 为应对各种重大及新发突发传染病及临床的精细化诊疗提供有价值的参考数据。并在此基础上, 提出一系列有关 CC 小鼠资源目前亟待解决的关键科学技术问题, 同时对未来在传染病领域的应用作一展望, 以作抛砖引玉之用。

【关键词】 复杂性状遗传小鼠; 传染病; 易感性; 动物模型

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)08-0020-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.002

Application and Research Progress of Collaborative Cross mice in Infectious Disease Area

XU Li-li, QIN Chuan

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) & Comparative Medicine Centre, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Animal model plays an important role in prevention and control of infectious disease, which could link basic research in laboratory with clinical diagnosis and treatment for human patients. Mouse is the most widely used animal model of infectious disease, however, adult immunocompetent mice are resistant to some pathogens. The highly genetically diverse Collaborative Cross (CC) mice could recapitulate many of the genetic characteristics of an outbred population, such as humans. Based on this, this review will focus on the application and research progress of CC mice in infectious disease (including viruses, bacteria, fungi etc.), which could provide useful reference data for expansion of animal model resource bank, and implement of precision medicine of major and new emerging infectious diseases. We hope this review could serve as a modest spur to induce other researchers to come forward with their valuable contributions.

【Key words】 Collaborative Cross mice; Infectious disease; Susceptibility; Animal model

人类社会的发展历史也是不断同各种疾病, 尤其是传染病 (Infectious disease) 进行斗争的历史。

【基金项目】 十二科技重大专项 (2012ZX10004501-004); 国家自然科学基金 (31370203); 北京市自然科学基金 (7142106), 协和科技新星培养项目。

【作者简介】 许黎黎, 副教授, 硕士生导师。E-mail: xull@cnilas.org。

【通讯作者】 秦川, 教授, 博士生导师。E-mail: qinchuan@cnilas.org。

目前,传染病在各类疾病发病率的排行榜中高居榜首,而全球每年死于各类传染病的人数占总死亡人数的三分之一。随着新发传染病的不断出现和原来流行病病原体的不断变异并产生耐药性等问题,再加上全球的城市化进程加快、交通日益发达、及人口老龄化等因素又为传染病的流行创造了条件,其结果导致传染病的流行正在全球复活^[1]。据统计,1973 年以来,仅新发现的传染病就达几十种,且仍在不断增加。这些新发传染病的出现在严重威胁人类的健康的同时,还影响到社会稳定、经济发展和国家安全。

当传染病疫情爆发时,应急防控的主要任务一般包括:确定病原、流行病学调查、易感动物筛查、探索临床救治方案、研制疫苗、研发标准化检测试剂等,这其中病原的诊断和检测、监测预警和防治策略评价研究等都依赖于动物模型的建立^[2]。合适的动物模型可为传染病的病原体溯源、国家卫生防控政策制定、传染病的民众个人防护提供实验依据和生物安全保障;为各种临床救治策略的科学性验证和推广提供动物模型支撑;为国家的药物和疫苗储备提供科学性的动物实验基础;为拓展现有药物的新功能,增加新适应症,缩短药物研发和应用周期,及时有效的为对抗疫情提供药物做出保障。

理想的传染病动物模型,应能全部或基本上模拟人类疾病的临床表现、疾病过程、病理生理学变化、免疫学反应等疾病特征。小鼠由于体积小,饲养管理方便,易于控制,生产繁殖快,有明确的质量控制标准,是目前最被广泛使用的实验动物,已拥有大量的近交系、突变系和封闭群,包括人们熟知的 BALB/c 小鼠、C57BL/6 小鼠、DBA 小鼠、ICR 小鼠等,也包括多种自发突变疾病模型品系。近交系动物由于高度的基因纯合和遗传的均质性,在相同的环境因素作用下,表现型是均一的,对各种刺激的反应是一致的,具有良好的重复性。

然而,免疫系统完整的成熟小鼠很多情况下对某些传染病病原并不易感,推测可能是由于其强大的先天免疫系统,尤其是 IFN- γ 型反应所导致^[3]。通过将病原在小鼠体内连续传代获得小鼠适应株,是建立该疾病小鼠感染模型的途径之一。但感染病原适应株后的小鼠很多情况下与人类患者在临床表征、组织病理等方面仍表现出显著性差异,一些非常重要的临床感染现象均无法体现。近年来,由于小鼠遗传工程技术的迅猛发展,开发临床病例

表征与人类更接近的协同杂交(Collaborative Cross, CC)小鼠,又称复杂性状遗传小鼠资源是目前的研究热点和建立疾病动物模型的另一切入口。CC 小鼠包括数百种基因型不同的小鼠系,能体现不同小鼠亚种的遗传学变异,其单核苷酸多态性是传统实验室小鼠的四倍,因此其感染某一病原后,可以更好地模拟人类患者的不同病理过程,为研究个体间基因差异和疾病易感性、靶向药物疗效提供动物模型资源,并为“精准医疗计划”的实施奠定研究基础^[4]。

有基于此,目前越来越多的研究团队开始利用 CC 小鼠资源来填补现有某些病原体自然感染小鼠模型的空白,或者针对已经建立了小鼠模型的一些病原,扩展丰富现有小鼠模型资源,更好的模拟人类患者临床病理表征的多样性。本文将对目前使用 CC 小鼠感染传染病病原(包括病毒、细菌、真菌等)后呈现出表型多样性的研究报道做一综述,以期为进一步研究 CC 小鼠对不同传染病的易感性,丰富我国传染病动物模型资源库,为应对将来可能出现的新发突发传染病提供有价值的前期参考。

1 CC 小鼠品系的构建及基因型的多态性

CC 小鼠包括数百种基因型不同的小鼠系,它们来自于八个原始种系:五个实验室品种(C57BL/6J, A/J, 129S1/SvImJ, NOD/ShiLtJ, NZO/H1LtJ)和三个源自野生小鼠的近交系(CAST/EiJ, PWK/PhJ, WSB/EiJ)^[5, 6]。Robert 等证实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^[7],品系间总共存在 36M 的单核苷酸多态性(SNPs)^[8],这也是选择这几种品系作为“founder”的原因所在。

八种原始品系小鼠作为 G0 代,首先互相交配形成 56 种可能的 G1 代杂交组合,G1 的后代再分别进行交配从而获得 4 种 G2 代小鼠,G2 $\times$ G2 可获得首批 8 种子代杂交小鼠,通过对 G2:F1 代进行数代的近交,大概在 G2:F22 代时获得充分近交的子代,最终繁育形成的独立 CC 小鼠品系分别具有八种原始品系小鼠独一无二的基因组重组模式^[9]。这种育种方式称为“漏斗型育种”(breeding funnel),在系统化的育种设计中,每个位点上的每一个原始种系的等位基因频率理论上为 0.125(1/8),但其通常出现在常染色体位点上,未必会在线粒体基因组和性染色体上实现,因此在设计育种漏

斗组合时,要尽量选择使杂交重组平衡分布于 X, Y, 及常染色体上的育种方式^[5]。

2 CC 小鼠感染病原体后的表型多样性

2.1 CC 小鼠感染病毒后的表型多样性 2

2.1.1 埃博拉(Ebola)病毒:免疫系统完整的成熟小鼠(包括常见近交系和封闭群)不能感染埃博拉病毒。Rasmussen 等的一项在 47 个 CC 小鼠种系中测试埃博拉引发的宿主应答的研究证实病毒感染对不同小鼠种系造成的影响并不相同^[10]。这项刊登在 2014 年 11 月 21 日《科学》杂志上的最新研究为揭示埃博拉易感性背后的遗传学差异奠定了基础。当 47 个 CC 小鼠系被感染埃博拉病毒的小鼠适应株时,所有小鼠在感染初期都出现了体重减轻的现象,19% 的小鼠系能抵抗病毒并在两周内恢复体重,11% 的小鼠系对病毒有部分抗性,70% 的小鼠系感染后的病死率超过 50%。不同品系表现出的症状也有较大差异,有的小鼠只出现肝脏炎症,有的小鼠还表现出凝血障碍等埃博拉病毒感染的标志性症状,这些小鼠很好的模拟了人类患者的不同病理过程。研究人员进一步分析了对埃博拉病毒最易感和最不易感的两种 CC 小鼠品系,易感性高的小鼠感染后会出现凝血缺陷、内出血、脾脏增大和肝脏严重损伤,感染后 5 或 6 d 死亡。对埃博拉病毒不易感的小鼠感染后 5 d 体重下降 15%,但并无其它症状,14 d 后体重完全恢复至感染前。研究显示,在最易感和最不易感的两种 CC 小鼠的肝和脾中,病毒的 RNA 拷贝数并无显著性差异。但易感小鼠组织中病毒滴度水平是不易感小鼠的十倍。研究人员还比较了两种 CC 小鼠的基因表达模式,内皮细胞酪氨酸激酶基因 Tie1 和 Tek 的转录水平有显著差异,而这两种酶与凝血功能有关。Tie1 等位基因在 8 个 CC 原始品系中变化较大,极有可能就是造成不同 CC 小鼠品系症状差异的主要原因。

2.1.2 流感病毒(Influenza virus):Ferris 等使用 H1N1 亚型流感病毒的鼠肺适应株 PR8 感染 8 种原始 CC 小鼠品系(A/J(AJ), C57BL/6J(C57BL6J), 129S1/SvImJ(129S1), NOD/ShiLtJ(NOD), NZO/HILtJ(NZO), CAST/EiJ(CAST), PWK/PhJ(PWK), 以及 WSB/EiJ(WSB)),证实感染后第 4 天,8 种小鼠在体重下降率、肺组织病毒滴度、感染引起的炎症反应、及病理改变等方面均呈现出较大的差异性(p 值范围:0.15 ~ 1.37×10^{-9})。小鼠的

体重下降率介于 0.78% (NZO/HILtJ) ~ 16.09% (C57BL/6J),肺组织病毒滴度介于 101.06 (NZO/HILtJ) ~ 105.75 (129S1/SvImJ),呼吸道炎症评分介于 0.33 (NZO/HILtJ) ~ 2.67 (129S1/SvImJ),血管炎症评分介于 0.33 (NZO/HILtJ) ~ 1.67 (129S1/SvImJ),肺泡炎症评分介于 0 (NZO/HILtJ) ~ 1.67 (129S1/SvImJ 和 CAST/EiJ)[11]。Xiong 等的重复实验也得到了类似的结论^[12]。

通过进行数量性状基因座定位(quantitative trait loci (QTL) mapping)分析,研究者鉴定了宿主动物的遗传基因多态性(genetic polymorphisms),来阐明引起疾病不同表型的最终原因。通过利用全基因组测序数据,一个位于抗流感明星基因 Mx1 内的关键宿主反应 QTL(*Hr13* 和 *Hr14*)被证实是导致不同品系小鼠感染后呈现差异化表型的最主要等位基因^[11, 13, 14]。

Leist 等则使用 H3N2 亚型流感病毒来感染 8 种原始 CC 小鼠品系,通过观察小鼠感染后的死亡率、体重下降率、检测肺组织病毒滴度等,证实 8 种小鼠对 H3N2 病毒的易感性具有显著性差异,其中 A/J, CAST/EiJ, WSB/EiJ 三种品系表现为高度易感, C57BL/6J, 129S1/SvImJ, NOD/ShiLtJ 中度易感, NZO/HILtJ 和 PWK/PhJ 则最不易感。研究者还发现 CAST/EiJ 品系的小鼠感染后呈现的表型与其它品系具有较大差异,尽管肺组织能检测到高滴度的病毒,但并未出现粒细胞浸润和巨噬细胞增多的现象。肺组织的病理检测和转录组分析结果证实 CAST/EiJ 品系的小鼠感染后出现了异常的白细胞招募(leukocyte recruitment)反应,较好的模拟了人类患者的白细胞黏附缺陷现象,进一步扩展了现有流感动动物模型的资源库^[15]。

2.1.3 SARS 冠状病毒(SARS-CoV):Xiong 等使用了与 Ferris 等类似的做法,将感染病原体由流感病毒替换成 SARS 病毒,用 SARS-CoV 的鼠肺适应株感染 8 种原始 CC 小鼠品系,证实感染后第 4 天, 129S1/SvImJ 和 CAST/EiJ 两种 CC 品系的肺组织携带的病毒 RNA 拷贝数较 NZO/HILtJ 和 NOD/ShiLtJ 品系小鼠具有显著性差异($P < 0.05$),8 种品系小鼠感染后的体重下降率也呈现出多样性,感染后第 4 天时,NOD 及 AJ 小鼠已恢复至感染前体重,NZO 品系体重仅下降 5%,而 CAST 和 PWK 小鼠体重下降接近 20%,剩余 3 种品系小鼠体重下降 10% 左右^[12]。

Gralinski 等进一步通过遗传图谱揭示导致 SARS-CoV 感染不同品系 CC 小鼠后呈现多样化表型的多个基因座,通过将表型和基因型数据进行集成汇总,同时结合基因敲除小鼠动物感染实验,一种 E3 泛素连接酶基因 *Trim55*,被证实在维持肌纤维、血管套及相关炎症反应的形成等方面具有至关重要的作用^[16]。

2.1.4 西尼罗(West Nile)病毒:通过 C57BL/6J 小鼠感染模型,西尼罗病毒感染后的先天和获得性免疫特征已得到较充分的研究,但该小鼠模型在临床症状、免疫反应多样性等方面与临床患者仍存在较大差异。Graham 等通过使用 5 种 F1 代的杂交 CC 小鼠品系,证实它们感染西尼罗病毒后,在生存率、临床症状表现、组织携带的病毒滴度、以及外周组织和中枢神经系统所激发的先天和获得性免疫等方面均呈现出较大的差异^[17]。通过鉴定不同品系 CC 小鼠的 *Osa1b* 等位基因,证实了前人关于 *Osa1b* 是决定西尼罗病毒宿主易感性的关键基因的结论。同时,他们还发现即使不同品系的 CC 小鼠的 *Osa1b* 基因状态完全一致,其感染西尼罗病毒后所呈现出的表型也具有较大的差异性,这在很大程度上弥补了传统 C57BL/6J 小鼠感染模型的单一性和局限性,为深入研究西尼罗病毒的感染和免疫机制提供了具有遗传多样性的小鼠模型。

2.2 CC 小鼠感染细菌后的表型多样性

2.2.1 肺炎杆菌(*Klebsiella pneumoniae*):Vered 等通过对四种近交系小鼠(BALB/CJ, DBA/2J, C3H/HeJ 和 C57BL/6J)和 73 种品系的 CC 小鼠腹腔内接种克雷伯氏肺炎杆菌,结果证实对于近交系而言,尽管所有小鼠感染后全部死亡,但不同品系的平均存活天数存在较大差异($P < 0.05$)。BALB/CJ 小鼠最易感,平均存活天数仅 2 d,与其它三种近交系小鼠存在显著性差异。DBA/2J 和 C3H/HeJ 品系最不易感,分别存活 4 和 3.8 d。对于 73 种 CC 小鼠而言,感染后的存活率和平均存活天数存在更加显著的差异($P < 0.0001$),存活率最高者可达 40%,但大部分品系仍 100% 死亡;平均存活天数最短者仅 1 d,最长者达 12 d^[18]。

2.2.2 绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*):Lore 等使用 17 个 CC 品系和 A/J 小鼠进行绿脓杆菌的感染性实验^[19],A/J 小鼠感染 7 d 后死亡率为 30%,但 CC 小鼠的死亡率表现出极大的差异,其中有完全不易感的品系,感染 7 d 后 100% 存活,也有品系在感染 1.5

d 时即 100% 死亡。体重方面,不同的 CC 品系感染后在体重下降方面也呈现出较大的差异性,有的品系感染 3 天内体重减轻 23%,有的品系感染 5 d 后体重即完全恢复,而 A/J 小鼠感染 3 d 时体重减轻 16%,且在感染 7 d 时并未完全恢复至感染前水平。本研究证实了宿主遗传背景的差异是导致对绿脓杆菌的易感性呈现多样化的主要原因,而非宿主个体的体重、性别、年龄等因素。

2.3 CC 小鼠感染真菌后的表型多样性

Durrant 等鉴定了 4 种近交系小鼠(BALB/cJ, DBA/2J, C3H/HeJ, C57BL/6J)和 66 种 CC 小鼠品系对烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*) Af293 的易感性差异^[20],结果证实 BALB/cJ 小鼠对其高度不易感,感染后平均存活天数为 23.2 d;DBA/2J 和 C3H/HeJ 小鼠的易感性较高,平均存活天数分别为 5.8 d 和 7.0 d;C57BL/6J 小鼠感染后的平均存活天数为 12.7 d。四种近交系小鼠感染后的体重下降和体温升高程度与存活天数呈反比。对于 CC 小鼠而言,本研究中所有 66 种品系的 CC 小鼠感染后的平均存活时间均优于四种近交系,其中 17 种品系对烟曲霉菌 Af293 完全不易感,至 28 d 观察期结束 100% 存活;14 种 CC 品系存活 4~10 d,21 种 CC 品系存活 10~20 d,14 种 CC 品系存活 20~27 d。

3 目前待解决的关键问题及未来研究展望

自 Collaborative Cross 项目启动至今已过去十年,第一代的 8 种原始近交品系已应用于包括传染病在内的多项研究中。这些具有复杂性状和遗传多样性的小鼠资源为研究者们提供了一个前所未有的机会,通过利用系统遗传学的研究手段,对大规模不同遗传背景的小鼠品系在群体层面对各种生理和病理表型进行的全面分析,揭示各种表型与潜在的遗传变异、基因之间、以及基因与环境之间的相互作用关系,为人类疾病的研究提供技术和理论支持。

综观 CC 小鼠在传染病方面的报道,绝大多数的研究仅使用 8 种原始近交小鼠品系,得到的多样化表型仍有限,为了更好的模拟人类患者感染后呈现的病理表征多样化,目前亟需繁殖培育出更多的 CC 小鼠品系,经过 20 多代不同品系之间的杂交,最终获得包含 8 个亲本不同染色体组合的近 200 个独立品系,并进行稳定的传代保种。

另一点目前待解决的关键问题,是 QTL 分辨率

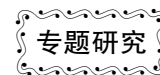
尚未达到基因水平。鉴于关联作图可以得到高质量的野生小鼠基因数据,因此可通过将 CC 小鼠进行远系杂交,得到高分辨率的遗传图谱,以弥补大量的可重复基因型带来的缺陷^[21],为更加精确的定位传染病易感基因、深入研究传染病致病机制奠定基础。

最后,对于传染病研究领域而言,目前仅有极少数病原体被用来进行 CC 小鼠多样化易感性的测试,研究者应充分利用已有病原体、动物和技术资源,观察更多的病原体,包括现在正在世界范围内流行的寨卡(Zika)病毒、中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV)等,感染多品系 CC 小鼠后呈现出的表型多样性,为目前迫在眉睫的疫情防控、精细化的临床救治方案的确定提供及时而必要的临床前指导数据。在进行层出不穷的新发突发传染病疫情防控的同时,研究者还应针对一些传统的传染病,如流感、结核病、病毒性肝炎等,利用 CC 小鼠资源,进一步扩展现有小鼠模型的范围,分别建立可模拟人类患者不同临床病理表征的多品系小鼠模型资源库,同时完成与人临床症状的比较医学比对,总结每种 CC 品系感染后的关键临床特征,建立相应标准,使相关药物和疫苗的评价实验更有针对性,更接近不同的临床表现,在疫情再次爆发时搭建新药研发的绿色、高效通道。

参考文献:

- [1] Zwizwai R. Infectious disease surveillance update [J]. *Lancet Infect Dis*, 2016, 16(4) : 415.
- [2] Sutton TC, Subbarao K. Development of animal models against emerging coronaviruses: From SARS to MERS coronavirus [J]. *Virology*, 2015, 479 – 480 : 247 – 258.
- [3] Bray M. The role of the Type I interferon response in the resistance of mice to filovirus infection [J]. *J Gen Virol*, 2001, 82(6) : 1365 – 1373.
- [4] 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(11) : 1133 – 1137.
- [5] Chesler EJ, Miller DR, Branstetter LR, *et al.* The Collaborative Cross at Oak Ridge National Laboratory: developing a powerful resource for systems genetics [J]. *Mamm Genome*, 2008, 19(6) : 382 – 389.
- [6] Threadgill DW, Churchill GA. Ten years of the Collaborative Cross [J]. *Genetics*, 2012, 190(2) : 291 – 294.
- [7] Roberts A, Pardo-Manuel de Villena F, Wang W, *et al.* The polymorphism architecture of mouse genetic resources elucidated using genome-wide resequencing data: implications for QTL discovery and systems genetics [J]. *Mamm Genome*, 2007, 18(6 – 7) : 473 – 481.
- [8] Keane TM, Goodstadt L, Danecek P, *et al.* Mouse genomic variation and its effect on phenotypes and gene regulation [J]. *Nature*, 2011, 477(7364) : 289 – 294.
- [9] Broman KW. The genomes of recombinant inbred lines [J]. *Genetics*, 2005, 169(2) : 1133 – 1146.
- [10] Rasmussen AL, Okumura A, Ferris MT, *et al.* Host genetic diversity enables Ebola hemorrhagic fever pathogenesis and resistance [J]. *Science*, 2014, 346(6212) : 987 – 991.
- [11] Ferris MT, Aylor DL, Bottomly D, *et al.* Modeling host genetic regulation of influenza pathogenesis in the collaborative cross [J]. *PLoS Pathog*, 2013, 9(2) : e1003196.
- [12] Xiong H, Morrison J, Ferris MT, *et al.* Genomic profiling of collaborative cross founder mice infected with respiratory viruses reveals novel transcripts and infection-related strain-specific gene and isoform expression [J]. *G3 (Bethesda)*, 2014, 4(8) : 1429 – 1444.
- [13] Kollmus H, Wilk E, Schughart K. Systems biology and systems genetics—novel innovative approaches to study host-pathogen interactions during influenza infection [J]. *Curr Opin Virol*, 2014, 6 : 47 – 54.
- [14] Bottomly D, Ferris MT, Aicher LD, *et al.* Expression quantitative trait Loci for extreme host response to influenza in pre-collaborative cross mice [J]. *G3 (Bethesda)*, 2012, 2(2) : 213 – 221.
- [15] Leist SR, Pilzner C, van den Brand JM, *et al.* Influenza H3N2 infection of the collaborative cross founder strains reveals highly divergent host responses and identifies a unique phenotype in CAST/EiJ mice [J]. *BMC Genomics*, 2016, 17(1) : 143.
- [16] Gralinski LE, Ferris MT, Aylor DL, *et al.* Genome Wide Identification of SARS-CoV Susceptibility Loci Using the Collaborative Cross [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(10) : e1005504.
- [17] Graham JB, Thomas S, Swarts J, *et al.* Genetic diversity in the collaborative cross model recapitulates human West Nile virus disease outcomes [J]. *MBio*, 2015, 6(3) : e00493 – 15.
- [18] Vered K, Durrant C, Mott R, *et al.* Susceptibility to *Klebsiella pneumoniae* infection in collaborative cross mice is a complex trait controlled by at least three loci acting at different time points [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15 : 865.
- [19] Lorè NI, Iraqi FA, Bragonzi A. Host genetic diversity influences the severity of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in the Collaborative Cross mice [J]. *BMC Genet*, 2015, 16 : 106.
- [20] Durrant C, Tayem H, Yalcin B, *et al.* Collaborative Cross mice and their power to map host susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infection [J]. *Genome Res*, 2011, 21(8) : 1239 – 1248.
- [21] Flint J, Mott R. Applying mouse complex-trait resources to behavioural genetics [J]. *Nature*, 2008, 456(7223) : 724 – 727.

[修回日期] 2016 – 07 – 05



复杂性状遗传 CC 小鼠——肿瘤研究新平台

李克娟, 高 蓐

(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, 北京 100021)

【摘要】 癌症是由于机体细胞失去正常调控过度增殖而引发的一系列复杂性状疾病的统称, 其本质上是一种基因疾病。用于传统肿瘤小鼠模型的重组近交(RI)品系由于只起源于两个近交祖系, 因此规模小且等位基因多样性较少, 在统计功效上存在局限性。复杂性状遗传(Collaborative Cross mice, CC)小鼠是由来自八个原始种系近交产生的数百种基因型不同的小鼠品系, 能够体现不同小鼠亚种的遗传学变异, 具有高遗传多样性, 大种群规模等重要特征。它可以模拟人类复杂性状疾病中不同人群对病因或治疗方法个体易感性的差异, 为促进复杂性状疾病易感基因筛查、基因功能发现等方面的研究提供了一个更好的研究工具与信息平台。本文就 CC 小鼠在医学应用中的研究现状、挑战性与局限性、以及其在肿瘤研究中的应用前景进行综述。

【关键词】 复杂性状遗传小鼠(CC小鼠); 遗传多样性; 个体易感性; 肿瘤

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0025-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.000

Collaborative Cross mice as a novel platform in cancer research

LI Ke-juan, GAO Ran

(Institute of laboratory animal sciences, CAMS & PUMC, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Cancer is a general term of a series of complex traits of the disease triggered by the body cells losing their normal regulation of excessive proliferation, which essentially is a genetic disease. Recombinant inbred strain (RI) mouse generated from one pair of founders has been widely used in traditional tumor model. However, RI has many limitations on the statistic efficiency because of the small scale and lacking of allele diversity. The Collaborative Cross (CC) was designed to generate hundreds of recombinant inbred lines by 8 divergent strains of mice. CC mice embody a tremendous amount of natural genetic variation in different sub-strains of mouse and the single nucleotide polymorphism is four times of the traditional experimental mice. The high-genetic diversity and large scale population enables CC mice simulates the differences of individual susceptibility to the pathogeny or the therapies, thus provides a better research tool and information platform for expediting discovery of genes and genes function in human complex traits diseases. This review summarizes our current knowledge of this field, including methodologic aspects, applications, challenges and limitations, and utilization for cancer research.

【Key words】 Collaborative Cross; Genetic diversity; Individual sensitivity; Cancer

癌症是由于多种致癌因素激活原癌基因或(和)灭活肿瘤抑制因子, 使细胞发生转化并无限增殖的一类基因组疾病的统称^[1]。癌症已成为世界

范围内高发病率和高死亡率的主要原因之一。根据世界卫生组织(WHO)2014年发布的数据显示, 2012年全世界共新增1400万癌症病例并有820万

【基金项目】 中国医学科学院基本科研业务费专项资助项目(DWS201402)。

【作者简介】 李克娟(1987-), 女, 博士, 研究方向: 肿瘤模型构建。E-mail: likejuan@cnilas.org。

【通讯作者】 高蓐(1980-), 女, 副研究员, 研究方向: 肿瘤模型构建。E-mail: gaoran26@hotmail.com。

人死亡^[2]。其中,中国新增 307 万癌症患者并造成约 220 万人死亡,分别占全球总量的 21.9% 和 26.8%。据 Siegel^[3] 最新研究报道,种族对肿瘤的发病率具有非常显著的影响。在所有癌症种类中,黑色人均比白色人种拥有更高的癌症发病率和死亡率(肾癌的死亡率除外),几乎是亚太裔人种的 2 倍。此外,性别对癌症的发病率也有显著影响,与女性相比男性的泌尿系统癌症发病率和死亡率均是女性的 2 倍左右。大量流行病学研究与临床观察表明大部分癌症(约 90% ~ 95%)都是由环境因素导致的^[4],其余的 5% ~ 10% 则是由遗传因素导致的^[5]。但是对于相同的致癌风险为什么有些人更加易感仍然是一个谜。另一方面,为什么有些肿瘤患者对同一药物表现出更好的敏感性或者对治疗方案表现出更好的治疗效果,对此临床上也没有给出科学的解释。例如,我们知道白血病是一种常见的恶性程度极高的肿瘤,曾经一度是被认为是一种“无药可救”的疾病。随着 2012 年第一例白血病患者的治愈,免疫疗法 CAR-T 给白血病患者带来了希望,但是同样是白血病患者,CAR-T 疗法却也不能达到 100% 的治愈效果,而白血病临床分型非常复杂,如何在这些分型中找到针对 CAR-T 疗法有效的分型对于白血病的治疗是否成功尤为重要。为此在第 15 届爱丁堡全球小鼠基因峰会上,美国橡树岭国家实验室(Oak Ridge National Laboratory)提出了复杂性状遗传(Collaborative Cross, CC)小鼠育种计划,并建立了复杂性状联盟(Complex Trait Consortium, CTC)组织^[6],用于选择培育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形状的相关研究^[7]。

1 CC 小鼠

CC 小鼠的理念背后是为了充分开发 RI 小鼠的潜能,并将这种潜能发挥到极致。众所周知,RI 小鼠是由两个无关高质近交系进行杂交,用其 F2 代进行全同胞兄妹交配 20 代以上而育成的新近交系,其近交系数达 98.6% 以上。RI 具有双亲近交系特性和重组后新近交品系特性,大大推动了遗传学,肿瘤学,免疫学和行为学等学科的发展。RI 小鼠因为其具备来源清楚,个体间均一性高,组织相容性高,重复性好等优点,到目前为止已成为肿瘤病因学,肿瘤药理学等研究的理想和经典模型并且被广泛应用。但是 RI 小鼠由于受到遗传多样性(genetic

variability)与映射能力(mapping power)的局限也存在很多不足。遗传多样性的不足是因为 RI 小鼠仅由两个亲本品系杂交而来,并且这些亲本品系往往起源于共同的祖系,更加限制了遗传多样化。而映射能力取决于测试过程中可以获取的品系。常用的基因片段的分辨率通常在 2 ~ 4 cM (~ 4 至 8 Mb),但是传统的 RI 小鼠在后基因组时代不足以提供有效的候选基因进行分析。第一个问题可以通过使用 8 个原始品系,其中包含来自不同大陆的野生型品系,来代替原来的 2 个亲本品系来解决。第二个问题则可以通过产生大量的 RI 品系来解决。CC 小鼠的概念的提出正好弥补了这些不足,所选的 8 个原始品系使得 CC 小鼠的遗传多样性最大化,其中包括三种刚刚完成基因组测序的实验用近交系: A/J, C57BL/6J 和 129S1/SvImJ,以及来自日本和新西兰被用作自身免疫与肥胖模型的两个品系 NOD/LtJ 和 NZO/HiLtJ,除此之外,使用来自小鼠 3 个 *Mus* 亚种的野生近交系作为补充,他们分别是来自捷克布拉格的 PWK/PhJ (*Mus. musculus. musculus*),来自美国巴尔的摩的 WSB/EiJ (*Mus. musculus. domesticus*),以及来自泰国的 CAST/Ei (*Mus. musculus. castaneus*)^[8,9]。他们的遗传物质的多样性可以基本覆盖小鼠全基因组的 90%^[10],且亲缘关系相对较远,可以保证 CC 品系遗传位点的分散性^[11]。

CC 小鼠的育种过程如图 1 所示,八种原始品系作为 G0 代,首先互相交配形成 56 种可能的 G1 代杂交组合,然后,56 个 G1 品系再分别进行交配得到 1680 种可能的 G2 代杂交组合,G2 代品系再次进行交配可以获得 8! (40 320) 种组合可能的 G3 代杂交小鼠。通过 G3:F1 代进行数代的同胞近交,大概在 G3:F20 时获得充分近交的子代,最终繁育形成独立的 CC 小鼠品系。每个 CC 小鼠品系都将随机获得八个原始品系小鼠所有的遗传变异,这种独一无二的基因重组模式称为“漏斗型育种”(breeding funnel)。CC 小鼠在繁殖过程中的控制和最小随机化选择将目前存在于这些自交系中的自然遗传变异进行充分重组,使得该实验种群的每个重组位点都是独一无二的,可提供足够的资源来研究单基因附近的数量性状位点(QTL)^[6,13]。其结果将是一个具有高遗传多样性的大种群规模的独特品系,为近交系小鼠的表型表达带来巨大的遗传变异潜能^[14,15]。

CC 小鼠项目最初在杰克逊实验室(The Jackson Laboratory)运作,而后将 G3:F1 代运至 3 个育种机构,包括美国田纳西州的橡树岭国家实验室(Oak Ridge National Laboratory),后来被迁移到北卡罗来纳大学教堂山分校(CC-UNC)^[7];肯尼亚内罗毕的国际家畜研究中心(The International Livestock Research Institute),后来被迁移至以色列的特拉维夫大学(Tel Aviv University)(CC-TAU)^[16];以及澳大利亚佩斯的西澳医学研究中心/西澳大学(Western Australia Institute for Medical Research/University of Western Australia/Geniad Ltd.)(CC-GND)^[12]。目前,在上述 3 个机构共育有约 200 个 CC 品系^[17]。

2 CC 小鼠的研究及其医学应用

CC 种群平衡的等位基因频率,均匀分布的重组位点和表型分布都优于其他实验资源^[18-20]。经过十几年的发展,CC 小鼠已被用于遗传学,传染病学和免疫学等研究领域并取得了突破性研究进展。例如基因定位,Ram 等^[21]利用 120 个 CC 小鼠品系的毛色设计了一个原理循证研究,不论使用 SNP-Based 法或者一种基于 QTL 定位法,调节六种毛色表型的四种基因均被成功定位。CC 小鼠作为一种新型的动物模型在医学研究中的优势也日益凸显,目前已经有两个利用 CC 小鼠成功构建疾病模型的案例,一个是溃疡性结肠炎^[22],另外一个糖尿病视网膜病变^[23]。同时,对于大规模不同遗传背景的小鼠品系在群体层面对各种生理和病理表型进行全面分析,可揭示各种表型与潜在的遗传变异、基因之间,以及基因与环境之间的相互作用,为人类复杂性疾病的研究和理解提供更多的证据。Rasmussen 等^[24]利用 47 个 CC 小鼠品系感染埃博拉病毒,发现 19% 的小鼠品系能够抗病毒并且能够在两周内恢复体重,11% 的小鼠品系对病毒有部分抗性,70% 的小鼠品系感染病毒后病死率超过半数以上。不同品系的小鼠表现出的症状也有差异,有的小鼠只出现肝脏炎症,有的小鼠则表现出凝血障碍等埃博拉病毒感染的标志性症状。这些小鼠很好地模拟了人群患病不同病理过程。研究人员还比较了最易感和最不易感的两种 CC 小鼠的基因表达模式,发现内皮细胞酪氨酸激酶基因 Tiel 和 Tek 的转录水平有显著差异,而这两种酶与凝血功能有关。研究表明埃博拉感染的严重程度与宿主

的遗传背景有很大关系,而不能单从病毒方面进行解释。此外,Ferris^[25],Leist^[26],以及 Xiong 等^[27]人分别将 H1N1 亚型流感病毒,H3N2 亚型流感病毒以及 SARS 流感病毒感染 CC 小鼠的 8 个原始品系,均通过品系间的表型差异揭示了宿主易感背后的遗传学机理。此外,Durrant 等^[28]在真菌感染实验中使用 4 种近交系小鼠(BALB/CJ, DBA/2J, C3H/HeJ, C57BL/6J)和 66 个 CC 小鼠品系定位了烟曲霉菌易感的候选基因。与此类似,Vered 等^[29]使用上述 4 种近交系小鼠和 73 个 CC 小鼠品系通过评价腹腔内接种克雷伯氏肺炎杆菌后的存活时间差异证实了不同 CC 小鼠品系感染细菌后存在表型多样性。

具有高度遗传多样性的 CC 小鼠无疑也为肿瘤这一复杂性状疾病的研究提供了一个绝佳的机会。Ferguson 等^[30]首次将 CC 小鼠应用在肿瘤研究上,他们评价了 50 个 CC 小鼠黑色素瘤的特征,其中包括色素痣,色素瘤的发病时间及其多样性,解剖位置偏好,色素痣转化为黑色素瘤以及其转移的时间。研究表明不同 CC 小鼠品系间表现出了广泛的差异(图 2)。此外,研究还发现,紫外线辐射暴露加剧了大多数小鼠品系的新生仔色素痣和黑色素瘤的形成,但是仍有少部分 CC 小鼠品系并未表现出该现象。这表明 CC 小鼠体内的遗传变异将有助于解释对阳光暴晒(皮肤癌的主要环境致癌因素)的个体敏感性。由于在一个小鼠模型里面 CC 小鼠的遗传变异带来了引人注目的表型多样性,黑色素瘤相关的内表型对比给我们提供了有关致癌的机制,例如黑色素瘤发病率是否依赖于预先存在的色素痣细胞的密度。已有的小鼠模型已被用于研究基因突变在肿瘤发生过程中的功能作用。CC 小鼠模型将在下一阶段进一步研究生物变异或者遗传变异如何最大程度地影响肿瘤的形成与发病机制。

3 CC 小鼠的局限性

CC 小鼠相关的报道主要集中在病毒细菌和真菌等感染性疾病的研究中,为了更好地利用 CC 小鼠来研究人类复杂性状疾病,需要解决当前存在的某些局限性,因为近交动物经常会出现健康问题,生殖能力也会下降,据报道,CC 小鼠在近交传代 5 代后,有 90% 的小鼠将不再繁殖^[31],因此寻求更好地方法做好 CC 小鼠的繁殖与保种工作显得尤为重要。同时,利用 CC 小鼠作为动物模型进行研究时,

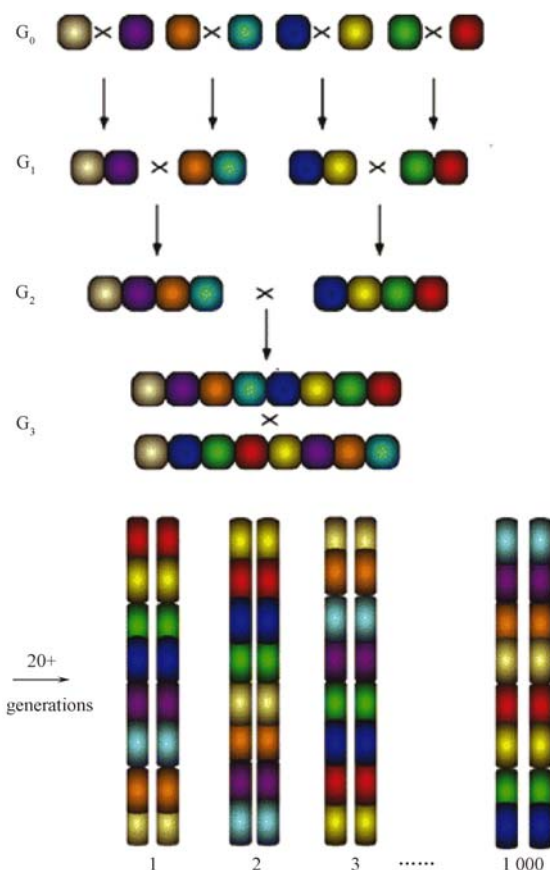


图1 CC小鼠育种设计方案。8个原始品系被定义为G0并且它们的基因组构成分别使用8种颜色来代替^[12]

Fig.1 Breeding strategy to generate a single breeding "funnel."

The eight founder strains are designated as G0 and their genomes are represented by different colors.

需要使用70个品系以上才能基本消除不同品系带

来的假阳性结果,而目前的研究报道很少能够达到这一品系数目的要求,使得QTL分辨率达不到基因水平^[32]。如何创造更好的实验条件来实现大规模群体实验来弥补这一缺陷,为更加精准的定位易感基因,研究复杂性状疾病也是开展CC小鼠研究亟待解决的问题之一。

4 CC小鼠在肿瘤研究中的应用前景

CC小鼠在肿瘤领域的研究刚刚起步,目前仅在黑色素瘤的易感性表型差异上面有相关研究报道。与此同时,CC小鼠作为一种新型研究工具与信息平台,将越来越受到肿瘤研究者们的关注及应用。研究者可以利用CC小鼠资源进行肿瘤的病因学研究,用以模拟不同人群对致癌因子的敏感差异,加上系统遗传学方法对肿瘤易感基因进行筛查;还可以利用CC小鼠模拟评价不同人群对现有抗肿瘤药物的药敏药效以及药理作用,寻找药物靶向基因;此外,CC小鼠因其具有丰富的性状差异与遗传多样性,可以帮助我们理解类似前面所述的为什么不同白血病患者对CAR-T疗法的不同反应的问题,并且可以帮助我们找到CAR-T疗法的易感表型和易感基因,类似的,其他有效疗法也可以更加准确的定位相关表型或者相关基因,实现精准治疗。这一切都表明CC小鼠将在肿瘤领域掀起一股划时代的具有革命意义的研究风潮,将为实现精准的分子诊断及精准医疗提供更多的临床前指导数据。

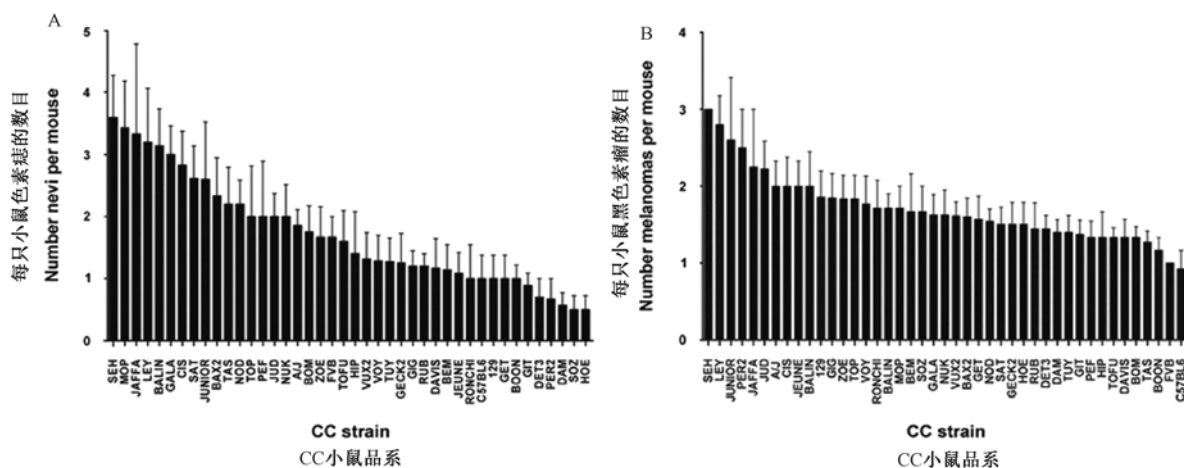


图2 紫外线照射条件下不同CC小鼠品系色素痣及黑色素瘤的数目差异^[30]

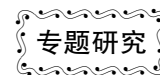
注:(A)色素痣;(B)黑色素瘤。

Fig.2 Average number of nevoid plaques and melanomas per mouse for each CC strain background.

Note. (A) nevoid plaques; (B) melanomas.

参考文献:

- [1] Garraway LA, Verweij J, Ballman KV. Precision oncology: an overview [J]. J Clin Oncol, 2013, 31(15):1803–1805.
- [2] World Health Organization (WHO). World Cancer Report 2014. Chapter 1.1 [M]. ISBN 9283204298.
- [3] Siegel R, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65, 5–29.
- [4] Manton KG, Akushevich I, Kravchenko J. Cancer mortality and morbidity patterns in the US population: An interdisciplinary approach [M]. Springer Science & Business Media. 2008. 89–140.
- [5] Anand P, Kunnumakara AB, Sundaram C, *et al.* Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes [J]. Pharm Res, 2008, 25 (9):2097–2116.
- [6] Threadgill D, Churchill G. Ten Years of the Collaborative Cross [J]. Genetics, 2012, 2 (2):153–156.
- [7] Chesler EJ, Miller DR, Branstetter LR, *et al.* The Collaborative Cross at Oak Ridge National Laboratory: developing a powerful resource for systems genetics [J]. Mamm Genome, 2008, 19 (6):382–389.
- [8] Churchill G, Airey D, Allayee H, *et al.* The Collaborative Cross, a community resource for the genetic analysis of complex traits [J]. Nat Genet, 2004, 36 (11):1133–1137.
- [9] Broman KW. The genomes of recombinant inbred lines [J]. Genetics, 2005, 169 (2):1133–1146.
- [10] Roberts A, Pardo-Manul de-Villena F, Wang W, *et al.* The polymorphism architecture of mouse genetic resources elucidated using genome-wide resequencing data: implications for QTL discovery and systems genetics [J]. Mamm Genome, 2007, 18 (6–7):473–481.
- [11] Yang H, Wang JR, Didion JP, *et al.* Subspecific origin and haplotype diversity in the laboratory mouse [J]. Nat Genet, 2011, 43 (7):648–655.
- [12] Morahan G, Balmer L, Monley D. Establishment of ‘The Gene Mine’: a resource for rapid identification of complex trait genes [J]. Mamm Genome, 2008, 19 (6):390–393.
- [13] Threadgill DW, Hunter KW, Williams RW. Genetic dissection of complex and quantitative traits: from fantasy to reality via a community effort [J]. Mamm Genome, 2002, 13 (4):175–178.
- [14] Lander ES, Schork NJ. Genetic dissection of complex traits [J]. Science 1994, 265:2037–2048.
- [15] Paterson AH. Molecular dissection of quantitative traits: progress and prospects [J]. Genome Res, 1995, 5 (4):321–333.
- [16] Iraqi FA, Churchill G, Mott R. The Collaborative Cross, developing a resource for mammalian systems genetics: a status report of the Wellcome Trust cohort [J]. Mamm Genome, 2008, 19:379–381.
- [17] Morgan AP, Welsh CE. Informatics resources for the Collaborative Cross and related mouse population [J]. Mamm Genome, 2015, 26 (9–10):521–539.
- [18] Soller M, Iraqi FA. The Collaborative Cross – A next generation mouse genetic resource population for high resolution genomic analysis of complex traits [J]. Livestock Science, 2014, 166 (4):19–25.
- [19] Aylor DL, Valdaie W, Foulds-Mathes W, *et al.* Genetic analysis of complex traits in the emerging collaborative Cross [J]. Genome Res, 2011, 21 (8):1213–1222.
- [20] Philip VM, Sokoloff G, Ackert-Bicknell CL, *et al.* Genetic analysis in the Collaborative Cross breeding population [J]. Genome Res, 2011, 21 (8):1223–1238.
- [21] Ram R, Mehta M, Balmer L, *et al.* Rapid identification of major-effect genes using the collaborative cross [J]. Genetics, 2014, 198 (1):75–86.
- [22] Rogala AR, Morgan AP, Christensen AM, *et al.* The collaborative Cross as a resource for modeling human disease: CC011/Unc, a new mouse model for spontaneous colitis [J]. Mamm Genome, 2014, 25 (3–4):95–108.
- [23] Weerasekera LY, Balmer LA, Ram R, *et al.* Characterization of retinal vascular and neural damage in a novel model of diabetic retinopathy [J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2015, 56 (6):3721–3730.
- [24] Rasmussen AL, Okumura A, Ferris MT, *et al.* Host genetic diversity enables Ebola hemorrhagic fever pathogenesis and resistance [J]. Science, 2014, 346 (6212):987–991.
- [25] Ferris MT, Aylor DL, Bottomly D, *et al.* Modeling host genetic regulation of influenza pathogenesis in the collaborative cross [J]. PLoS Pathog, 2013, 9 (2):e1003196.
- [26] Leist SR, Pilzner C, van den Brand JM, *et al.* Influenza H3N2 infection of the collaborative cross founder strains reveals highly divergent host responses and identifies unique phenotype in CAST/EiJ mice [J]. BMC Genomics, 2016, 17 (1):143.
- [27] Xiong H, Morrison J, Ferris MT, *et al.* Genomic profiling of collaborative cross founder mice infected with respiratory viruses reveals novel transcripts and infection-specific gene and isoform expression [J]. G3 (Bethesda). 2014, 4 (8):1429–1444.
- [28] Durrant C, Tayem H, Yalcin B, *et al.* Collaborative Cross mice and their power to map host susceptibility to *Aspergillus fumigatus* infection [J]. Genome Res, 2011, 21 (8):1239–1248.
- [29] Vered K, Durrant C, Mott R, *et al.* Susceptibility to *Klebsiella Pneumoniae* infection in collaborative cross mice is a complex trait controlled by at least three loci acting at different time points [J]. BMC Genomics, 2014, 15:865.
- [30] Ferguson B, Ram R, Handoko HY, *et al.* Melanoma susceptibility as a complex trait: genetic variation controls all stages of tumor progression [J]. Oncogene, 2015, 34 (22):2879–2886.
- [31] Schmidt CW. Diversity outbred: a new generation of mouse model [J]. Environ Health Perspect, 2015, 123 (3):A64–67.
- [32] Flint J, Mott R. Applying mouse complex-trait resources to behavioural genetics [J]. Nature, 2008, 456 (7223):724–727.



复杂性状遗传 CC 小鼠与精准医学研究

杜 朋, 陈孟毅, 李程程, 樊飞跃, 孟爱民

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 生物组学技术在生物学、医学上的转化应用, 为精准的个体化预防、诊断、治疗提供了关键性的技术体系, 精准医学模式应运而生。实验动物学研究是疾病发病机制研究转化到临床不可或缺的手段。为应对目前严重危害人类疾病的复杂性、多样性特点, 2002 年国际复杂性状联盟 (Complex Trait Consortium, CTC) 倡议研发建立新的小鼠遗传资源库; 通过不同纯系小鼠品系间的杂交创建小鼠复杂性状遗传资源库 (Collaborative Cross mice, CC 小鼠)。随着原始亲本小鼠 (founder) 选定、杂交品系的繁殖, CC 小鼠在检测小鼠表型、疾病易感性、疾病发生发展及预后与遗传因素的关系方面进行了系列的尝试。文中将就 CC 小鼠在疾病发生发展及药物评价个体化研究中的应用做一简要介绍。

【关键词】 精准医学; CC 小鼠; 数量性状定位

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0030-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.004

Collaborative Cross mice and precision medicine

DU Peng, CHEN Meng-yi, LI Cheng-cheng, FAN Fei-yue, MENG Ai-min

(Institute of Laboratory Animal Sciences, Chinese Academy of Medical Science & Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 The individual variability should be considered in precision medicine-prevention and treatment strategies. Medical research using genomics, proteomics, metabolomics, systems analyses, and other modern tools has made big progress. In 2002, the members of the Complex-Trait Consortium proposed to develop a new mouse genetics resource called the Collaborative Cross (CC). The CC is a genetic reference panel of recombinant inbred lines of mice, designed for the dissection of complex traits and gene networks. It will provide a powerful measure for functional studies of biological networks, which will be essential to understand the intricacies of disease processes.

【Key words】 Precision medicine; The Collaborative Cross; Quantitative trait locus (QTL)

1953 年沃森和克里克发现 DNA 双螺旋结构开启了分子生物学时代。50 年后的 2003 年“人类基因组计划”宣布完成。从基因序列分析到各种组学技术的发展, 分子生物学技术在医学研究中的应用对探讨疾病病因、发病机制及诊断技术更新、治疗方案制定产生了深远的影响。在此基础上近年来

精准医学不断地被提出, 尤其是美国总统奥巴马在 2015 年国情咨文演讲中提出了精准医学计划, 推动个体基因组学的研究, 引起世界关注。2016 年我们国家将精准医学纳入国家重点研发计划。精准医学的目的是精确找到疾病的原因和治疗靶点, 为患者提供更具针对性和有效性的治疗措施, 提高疾病

【基金项目】 国家自然科学基金(81573094, 81372928); 中央科研院所基本业务费(2016ZX310042)。

【作者简介】 杜朋, 男, 硕士研究生, 研究方向: 放射医学。Email: dp7355@163.com。

【通讯作者】 樊飞跃, 男, 研究员, 研究方向: 辐射致癌机制及其干预。E-mail: faithyfan@yahoo.com; 孟爱民(1963-), 女, 研究员, 研究方向: 成体干细胞损伤机制及干预。E-mail: ai_min_meng@126.com。

诊治与预防效益。因此,精准医学研究应关注技术成果转化应用,最终能实现对于疾病进行个性化精准治疗。

动物实验在人类疾病发病机制研究和药物研发的有效性、安全性评价中起着不可替代的作用。肿瘤、传染性疾病、糖尿病、心脑血管疾病等慢性复杂性疾病是严重危害人类健康的常见疾病,是目前预防诊疗研究的重点。为了更好地研究个体遗传因素对复杂性疾病发生发展、诊断及治疗反应性的影响,2002 年,国际复杂性状联盟 (Complex Trait Consortium, CTC) 针对复杂疾病的遗传多样性,倡议研发建立新的小鼠遗传资源库,通过不同纯系小鼠品系间的杂交创建小鼠复杂性状遗传资源库^[1] (Collaborative Cross mice, CC 小鼠)。随着原始亲本小鼠 (founder) 选定、杂交品系的繁殖,不同世代次数的 CC 小鼠在检测小鼠表型、疾病易感性、疾病发生发展及预后与遗传因素的关系方面进行了系列的系统遗传学方法的尝试。下面将就 CC 小鼠在疾病发生发展及药物评价个体化研究中的应用做一简要介绍。

1 精准医学为个体化医疗目标实现提供新的途径

精准医学是应用现代遗传技术、分子影像技术、生物信息技术,结合患者生活环境和临床数据,实现精准的疾病分类及诊断,制定具有个性化的疾病预防和治疗方案。精准医学得以实施的核心科学问题,是要根据每一个个体的分子特征 (基因突变) 的差异,准确了解病因,从而进行更为精准的医疗预防、诊断和个性化治疗,是一种个体定制的、因人因病而异的医疗模式,是卫生与健康保障的新概念。

我们国家有关精准医学的任务包括新一代生命组学技术研发,大规模人群队列研究,精准医学大数据的资源整合、存储、利用与共享平台建设,疾病预防诊断治疗方案的精准化研究,精准医疗集成应用示范体系建设。精准医学涵盖了疾病三级预防里的各项内容,包括风险预测、早期诊断、分类诊断、机制描述、疗效评估、预后预测、方案制定等。其中疾病防治方案的精准化研究包括基于组学特征谱的疾病分子分型研究,基于分子影像技术的疾病精准治疗方案的研究,药物个性化应用评价与临床应用研究,罕见病精准诊疗技术研究,疾病诊疗规范及应用方案的精准化研究,精准医疗临床决

策支持系统研发和个体化治疗靶标发现与新技术研发^[2]。

精准医学概念为基础研究及转化、临床诊疗模式带来了革命性的变化。围绕着个性化诊疗这个核心,对影响疾病发生发展的各种环境因素和个体因素的判断及评价具有重要的意义。人类疾病一般是多基因改变和环境因素共同作用引起,病因、临床表现及治疗反应性都非常复杂。癌症、糖尿病、心脏和肺脏疾病都属于这类疾病。复杂性状疾病,即多基因病,是指由多个基因位点共同参与,且和环境因素相互作用决定表型的遗传病。复杂疾病遗传因素分析的主要目标之一是找出其易感基因^[3]。为了达到这一目标,迄今为止,大致经历了 3 个阶段。第 1 阶段:候选基因研究 (candidate gene research); 第 2 阶段:基因组连锁扫描 (whole-genome linkage scanning); 第 3 阶段:基因组关联研究 (genome-wide association studies, GWAS)。因为复杂疾病在遗传学上具有某些独特的复杂特点,致使各种遗传分析的效力不够高。目前所有遗传分析就其结果来看,主要存在 3 个问题:分析效力低;可重复性不强;验证工作不够;对目的易感基因的性质、功能和作用机制知之甚少。我国于 2009 年开始在 863 计划重点项目中特别就肺癌、食管癌、高血压、糖尿病和精神分裂症等 5 种复杂疾病的 GWAS 进行招标,这对于推动我国在复杂疾病的遗传学研究向前发展具有重要意义。在此基础上 2016 年“精准医学研究”列为国家优先启动的重点专项之一,并正式进入实施阶段。其中构建百万人以上的人群国家大型健康队列、重大疾病专病队列和罕见病临床队列是其重要的研究内容。重大疾病专病队列包括心血管疾病,脑血管疾病,呼吸系统疾病,代谢性疾病,乳腺癌,食管癌等。

实验动物科学在此基础上也作了相应的准备。如建立各种动物资源库,为探讨疾病发生机制研究及诊断、治疗手段的研发提供工具。CC 小鼠资源就是其中之一。

2 复杂性状遗传 CC 小鼠的建立和应用特点

相对人群研究,实验动物具有寿命短、可操作性强等优势。为了更好地利用动物模型研究复杂性状疾病,2002 年,国际复杂性状联盟 (Complex Trait Consortium, CTC) 针对复杂疾病的遗传多样性,

启动了复杂性状遗传 CC 小鼠 (Collaborative Cross mice, CC) 项目。CC 项目的目标是为数量性状定位 (quantitative trait locus, QTL) 及系统遗传学研究提供小鼠种群资源, 希望最终建立 1000 个重组纯系小鼠 (Recombinant Inbred, RI)^[4]。

2002 年经过广泛的讨论 CTC 确定了 8 种小鼠作为 CC 小鼠的原始亲本小鼠 (founder): A/J, C57BL/6J、129S1Sv/ImJ、NOD/ShiLtJ、NZO/H1LtJ、CAST/EiJ、PWK/PhJ 和 WSB/EiJ。其中前 5 个品系是实验室常用的纯系小鼠, 后 3 个来自野生型小鼠。遗传学分析结果显示这 8 种小鼠覆盖了 90% 的小鼠遗传变异。目前 CC 小鼠种群可用的有 200 余个小鼠品系。与以往进行遗传易感性研究需要繁殖 F1 代、回交等手段, 实验非常繁琐、耗时长。CC 小鼠进行遗传易感性分析具有以下优势: (1) CC 小鼠具有遗传多样性; 由于杂交设计, 每个品系的 CC 小鼠都携带有 8 个原始亲本的遗传信息, 比往常用实验室小鼠品系更具备遗传多样性。(2) CC 小鼠遗传背景清晰; 有完整的各种遗传序列、转录因子序列数据库提供应用。(3) 实验设计简单, 实验步骤简便; 与经典的遗传学分析比较, 利用 CC 小鼠进行遗传易感性分析具有明显的优势。如在进行各种性状的遗传分析研究中, 只需根据性状影响因素多少选择一定数量的 CC 小鼠品系, 观察不同品系之间的性状表型差异。将表型检测数据输入数据库, 进行 QTL 及 SNP 位点的分析, 省略了取材、提取 DNA、RNA 进行分子生物学实验的步骤。(4) 可以利用 CC 小鼠进行生物和疾病表型的多基因位点分析, 可以通过增加检测品系减少假阳性结果; 例如单基因疾病需要筛选 20~30 个 CC 小鼠品系, 3 个影响基因则可以选择 50~80 个 CC 小鼠品系, 甚至更多。利用 CC 小鼠筛选研究成果, 可以发现疾病易感小鼠和/或抵抗小鼠, 建立非基因修饰的易感 (抵抗) 小鼠模型, 有助于疾病机制研究及药物评价转化; 有助于发现疾病易感基因及其调节机制; 可以利用系统遗传学方法进行多因素分析, 有助于阐明复杂性疾病的发病机制及疾病转归。

目前利用 CC 小鼠进行传染性疾病、肿瘤、糖尿病的复杂性疾病的患病易感性、治疗敏感性及预后预测开展了广泛的研究。这些研究将为临床研究在病因、诊断、治疗效果判定等生物学标志的研究提供重要的提示和补充。

3 复杂性状遗传 CC 小鼠在疾病易感性和诊治方面的应用

利用小鼠可以快速鉴定多基因控制性状的主效应基因, 寻找疾病易感基因以及治疗反应差异性的遗传位点, 了解药物产生毒副作用的遗传学基础, 为精准医学中个体治疗的生物学指标提供参考, 为疾病的早期诊断和监测提供依据。

3.1 快速鉴定多基因控制性状的主效应基因

为探讨利用 CC 小鼠寻找多基因控制性状位点, Morahan G 实验室应用 110 个 CC 小鼠品系, 通过 metaMUGA 数据库将 CC 小鼠与 Founder 小鼠 SNP 位点对比, 进行单体型重建 (Haplotype reconstruction), 候选基因定位, 回归分析各种被毛颜色的候选基因位点, 并且探讨了检测 3 个基因座位的联合效应, 并在文中详细介绍了 CC 小鼠使用、数据分析步骤^[5]。外周血细胞计数在临床上疾病诊疗检测中应用非常广泛, 各种计数值受到严格的遗传学调控, 关键基因的突变会有严重的临床表型, 如对疟疾的易感性差异。外周血参数的变异呈现线性改变, 推测应该是受多个基因影响, 产生微弱的表型效应。Collins F^[6] 实验室应用 8 个 founder 及 131 个 pre-CC 小鼠品系, 进行 SNP 扫描及数量性状位点作图 (QTL), 发现了影响平均红细胞压积 (MCV)、白细胞 (WBC)、单核细胞 (MO)、中性粒细胞 (NE) 遗传基因的基因位点。7 号染色体上的 Mcevq4 对 MCV 产生极大的影响; WBC 与 18 号染色体上的 Wbcq7 有关; NE 与 11 号染色体上 pctq1 相关; MO 受 1 号染色体上的 Moq1 的影响。而 RBC、Hb、RDW、PLT 以及平均血小板体积的基因则不能用 QTL 定位区分。

骨小梁微观结构是一个复合性状, 由多基因复杂相互作用进行调控。确定这些遗传因素有助于预测骨质疏松及其相关风险。CC 小鼠 QTL 可以在相对较小的群体中有高的检出率。Levy R^[7] 等通过 10 μm 分辨率微 CT 设备扫描股骨远端干骺端获得骨小梁性状指标。评估性状指标包括骨小梁体积分数 ((BV/TV)、数目 (Tb. N)、厚度 (Tb. Th) 和联接密度 (Tb. N)。对 31 个 CC 品系小鼠进行包含 77808 个 SNP 的全基因组单倍型作图。根据 CC 小鼠序列变异分离数据库进行单倍型扫描的优化, 发现潜在的候选基因。分析结果显示这些性状的遗传遗传力从 0.6 到 0.7。除 Tb. Th 外各种骨骼微结构性状有显著的性别效应。单倍型扫描结果显示

有 6 个 QTL, BV/TV 和 Tb. Th 指标 2 号和 7 号染色体分别有两个非常接近的位点。Tb. N 和 Conn. D 分别在 8 号和 14 号染色体各有一个位点。研究者利用之前报道的骨形成功能相关基因确定了候选基因。在文献基础上,在这些基因当中排名特别高的那些被验证是正确的,包括 *Atp*, *Oxt*, *B2m*, *Pcsk6*, *Rgma*, *Rb1* 和 *Cpb2*。其他候选基因有 *Sgcz*, *Fgf20* 和 *Chd2*。研究者首次展示了在几个遗传位点和骨小梁结构参数间的全基因组关联性,也筛选出了几个与骨骼性状有关新的候选基因。

3.2 复杂性疾病遗传病因研究

慢性非传染性疾病(简称“慢病”或“慢性病”)是目前威胁我国民众健康最主要的一大类疾病。根据国务院发布的《中国居民营养与慢性病状况报告(2015 年)》,2012 年我国居民慢性病死亡率达 533/10 万,慢病导致的死亡占总死亡人数的 86.6%。其中,心脑血管疾病、恶性肿瘤、慢性阻塞性肺疾病(慢阻肺)、糖尿病和神经精神疾病等重大慢病为主要死因,且增长迅猛。这几大类疾病占总死亡的比例从 1990 年的 65.5% 增至 2010 年 79.4%。更为严峻的是,由于生活方式改变及人口老龄化的影响,预计未来 10~15 年,我国慢病仍呈快速增长态势。2016 年我们国家启动的“重大慢性非传染性疾病防控研究”重点专项正式进入实施阶段。其中发病机制及慢病并发症危险因素预警技术的研究也是其重要内容,这对慢病的群体防治和个体化治疗均具有重要作用。

目前常见的慢性疾病多数受多基因遗传控制。II 型糖尿病占糖尿病患者 90% 以上。多种证据显示糖尿病发病过程及胰岛素抵抗受到多基因控制。Iraqi F 实验室^[8]用了 21 个品系 CC 小鼠共 683 只,其中 265 只给予高脂饮食(42% 脂肪),384 只小鼠给予标准饲料(18% 脂肪)。8 周小鼠喂饲不同饲料持续 20 周,定期测定体重(BW)、体长(BL)、腰围(WC)、及体质指数(BMI)。因为小鼠性别与饲料因素相互影响,因此将性别分开进行分析。结果发现,高脂饮食两种性别均出现肥胖及糖耐量升高的 CC 小鼠有 6 种品系;易感性相似但有性别差异的雌性有 2 种,雄性有 4 种,只有 2 种雌性对高脂饮食有抵抗。糖耐量下降不肥胖的两种性别均出现的小鼠有 4 株,仅雄性小鼠出现的有 3 种,仅雌性小鼠出现的有 3 株。高脂饮食体重增加分两个阶段,开始 6 周 CC 小鼠各株两种性别体重均有升高。接下来

6 周大部分雄性小鼠体重仍在增加,雌性小鼠表现出现了分化,有些体重下降,有些保持体重,有些升高。今后在代谢性疾病研究中需引起注意。

一般饲料喂养,两种性别小鼠均没有表现出糖耐量异常。高脂饮食可导致明显的个体差异。进行计算得出广义遗传力系数在 0.5 左右(Broad sense heritability coefficients, *Bhc*),提示遗传因素和环境因素具有相互作用。CC 小鼠各种系之间的遗传系数(Heritability coefficients, *Hc*)很高,提示种系之间的差异主要是遗传因素发挥主要作用。研究结果验证了 II 型糖尿病是复杂性状遗传,受到多基因调节和性别控制。

糖尿病视网膜病(Diabetic retinitis, DR)是致盲的主要因素。应用合适的非基因修饰的小鼠模型能够反映人类疾病特征有助于阐明潜在的发病机制。Morahan G 实验室^[9]选择了 64 种 CC 品系小鼠,每种小鼠至少 10 只,通过静脉注射四氧嘧啶或链脲佐菌素诱发糖尿病,筛选 DR 特征性病变,同时进行全视网膜铺片和组织切片观察视网膜损伤情况。最终筛选到和人发病特征最接近的小鼠,命名为 FOT_FB。进而对 FOT_FB 开展更深入的研究,在发生糖尿病后在多个时间点检查视网膜血管组织学和神经结构来研究 DR 的发展进程;通过芯片技术比较对照组和糖尿病组的视网膜变化。结果显示一些小鼠 7 d 就出现 DR 特征性变化,如周细胞退化、无细胞毛细血管形成、小血管增生、穆勒细胞增生、神经节细胞丢失。随着时间延长这些损伤更为显著。引发糖尿病 21 d 后,严重的血管增生、微血管瘤、视网膜前损伤、穆勒细胞增生和视网膜外层损伤都很明显。基因芯片结果显示发现许多与 DR 相关已知的基因表达呈显著差异,并发现晶状体蛋白基因(*Cryba1*)表达上调,这个基因在 DR 发病中的作用还需进一步验证。发现 FOT_FB 品系为研究 DR 发病和开发危害视力疾病治疗手段提供了有用的模型,CC 小鼠为 DR 易感性基因筛选及靶向治疗提供了数据。

过敏性哮喘是以气道粒细胞浸润为特征的复杂性疾病。除了嗜酸性粒细胞之外,在严重哮喘,中性粒细胞(PMN)在局部也明显增加。Rutledge H 等^[10]利用居室尘螨诱导的哮喘小鼠模型寻找中性粒细胞炎症的遗传决定因子。小鼠采用了 8 个 founder 品系、151 个前 CC 品系(preCC)。肺灌洗液中 PMN 计数和中性粒细胞标志趋化因子 CXCL1 浓

度测定发现在 preCC 中这两者高度相关。QTL 作图确定了三个影响 PMN 的变异区。其中一个和 CXCL1 在 7 号染色体的 QTL 共定位。研究者利用肺 eQTL 数据发现 *Zfp30* 基因有一个变异区与 CXCL1/PMN 应答有关。这些遗传变异通过改变 *Zfp30* 表达调节 CXCL1 和 PMN。研究者建立 QTL 和这三个内表型间关系的结构分析模型。*Zfp30* 表达于正常小鼠肺气管上皮细胞,在体外 *Zfp30* 表达改变影响了 CXCL1 针对免疫刺激的应答。该研究发现 *Zfp30* 是一个新的中性粒细胞气管炎症调节因子;过敏性哮喘中性粒细胞浸润受 3 个基因位点调控,PMN 表型由 CXCL1 和 *Zfp30* 介导。

内质网应激(ER stress)发生于错误折叠蛋白在内质网中累积。细胞对 ER stress 的应答对细胞的生存很重要,涉及复杂的转录和翻译水平的变化。ER stress 是许多人类疾病的首要诱发和调节因子。了解 ER stress 应答怎样影响人类疾病的第一步就是判定 ER stress 应答如何在转录水平上存在个体差异。Chow CY 等^[11]用一种通常用于诱导 ER stress 的药物衣霉素,在 founder 小鼠的胚胎成纤维细胞中诱导产生 ER stress,分析其转录反应发现数百个 ER stress 应答不同基因。值得注意的是,炎症反应基因在这些品系中区别最大;而主要的经典 ER stress 应答基因未表现出变化。为了揭示在这些品系在 ER stress 应答的基因结构,研究者评估了来源于 CC founder 小鼠间 F1 代 MEF 的转录应答。超过 80% 的基因调节差异来源于顺式调节差异。研究表明 ER stress 转录应答在品系之间是高度多样性的,这源自在个体下游应答基因而不是主要信号转录因子的遗传多样性。这些结论对于理解遗传多样性如何影响 ER stress 应答有重要意义。

上述研究结果提示利用 CC 小鼠可以对复杂性疾病、复杂性疾病的严重表型以及发病分子机制进行遗传影响因素的研究,为研究结果的临床转化提供生物学标志。

利用 CC 小鼠进行疾病易感基因以及治疗反应差异性的遗传位点分析在其他方面也有应用。比较多的是有关传染病和肿瘤的遗传易感性分析,如肿瘤发生发展(黑色素瘤^[12])、细菌(绿脓杆菌^[13]、肺炎杆菌^[14])、病毒(SARS 病毒性^[15])、霉菌(烟曲霉菌^[16])感染的易感性多基因定位研究等。

3.3 药物产生毒副作用的遗传学基础研究

由于个体差异,患者应用药物后不仅疗效会有

较大差异,药物的毒副作用也表现不同。探讨这种差异产生的遗传学机制,筛选监测的生物学指标,对这种个体差异进行预测和评价,是个体化精准治疗的重要内容。CC 小鼠的建立,为这部分工作提供研究手段。

博来霉素对人和小鼠均有引起肺纤维化的副作用,但是存在有易感性差异,Gelinas R 等^[17]利用不同品系的 CC 小鼠研究表型与遗传的关系。随机选 40 个品系,6~8 周的雄性 CC 小鼠,分别在 1、4、8、11、15、18、22、25 d 8 次腹腔注射博来霉素,剂量 0.035 U/g,在第 33 天,小鼠安乐死,收集血液中血浆测 miRNA;右肺检测可溶性胶原含量,左肺固定做病理检测,进行肺纤维化半定量;小鼠尾部 DNA 高密度基因分型。通过对数据进行分析发现,由博来霉素引起的肺纤维化表型,一个动物受影响其兄弟姐妹也会有相应的反应;可溶性胶原检测显示相同的结果;但 miRNA 的结果与之不一致。肺纤维化易感或不易感,是与遗传相关的,和人一样,CC 小鼠会产生基因突变来应对药物反应;具有遗传多样性的 CC 小鼠也许能够揭示药物反应规律。

氟哌啶醇是治疗精神疾病的有效药物,但由于部分患者会产生运动障碍导致患者依从性下降,限制了药物应用。Valdar 实验室^[18]应用 8 个 founder 小鼠及其 54 个双杂交一代(F1,有 2 株不能生育)小鼠进行药物和安慰剂双杂交研究,检测遗传、性别、双亲来源以及杂交对氟哌啶醇反应性的影响。每个杂交系列至少 4 只小鼠,药物组雌雄各 1 只;安慰剂组雌雄各 1 只,共 270 只小鼠,包括 137 只雌性(68 只药物组,69 只安慰剂组)、雄性 133 只(66 只药物组,67 只安慰剂组)。对两种性别药物安慰剂配对小鼠观察神经行为学指标(旷场实验、倾斜屏实验、口部空嚼运动、惊吓试验),血浆和脑内药物水平,以及体重变化。为阐明氟哌啶醇治疗反应性的遗传特点,在 Neyman-Rubin potential outcomes framework 的“difference of models”及 Bayesian hierarchical model 基础上建立新的预测模型“difference of models”、“multiple-impute matched pairs”进行药物治疗反应与遗传变异关系分析。结果发现药物长期作用诱发的肌肉强直主要与加性遗传效应(占 28%)和双亲 NZO/HILdJ 和 129S1/SvImJ 小鼠来源效应(占 14.8%)有关;自主活动增加则主要受小鼠特异性株系交配繁殖的影响(12.8%)。用药后行为学的表现为双重性,有加性

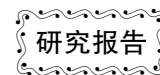
遗传效应(10.2% ~ 53.2%),同时上位遗传效应也很明显(10.64% ~ 25.2%)。惊反射的前脉冲抑制试验显示加性效应和上位效应占相同的比例。治疗前活动与肌肉强直呈现单向上位效应。结果揭示了小鼠氟哌啶醇治疗反应性的遗传特征,提示小鼠对药物反应性的差异主要与遗传加性效应、双亲来源、交配方式有关。

实验动物学研究在疾病发病机制研究中起到重要作用,也是临床转化不可或缺的手段。复杂性状遗传 CC 小鼠对疾病发生机制研究,诊断及治疗反应性各种表型进行系统生物学研究,研究成果会提供各种生物学标志物,并在资源多样性小鼠、基因敲除小鼠、人源化小鼠等动物模型进行验证,将会为人群队列研究数据的收集和分析提供线索和佐证。CC 小鼠作为一种新的资源,在实验设计、数据分析、应用领域等方面的探索需要各学科交叉,才能充分发挥在个体化诊治中的作用。

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. *Nature Genetics*[J]. 2004,36(11):1133-1137.
- [2] Cyranoski D. China embraces precision medicine on a massive scale[J]. *Nature News*, 2016. 529(7584):9-10.
- [3] 方福德,复杂疾病遗传分析的现状、问题和展望[J]. *中国医学科学院学报*, 2009,31(6):661-663.
- [4] Threadgill DW, Churchill GA. Ten years of the Collaborative Cross[J]. *Genetics*, 2012,190(2):291-294.
- [5] Ram R, Mehta M, Balmer L, *et al.* Rapid identification of major-effect genes using the collaborative cross[J]. *Genetics*, 2014,198(1):75-86.
- [6] Kelada SN, Aylor DL, Peck BC, *et al.* Genetic analysis of hematological parameters in incipient lines of the collaborative cross[J]. *G3 (Bethesda)*, 2012,2(2):157-165.
- [7] Levy R, Mott RF, Iraqi FA, *et al.* Collaborative cross mice in a genetic association study reveal new candidate genes for bone microarchitecture[J]. *BMC Genomics*, 2015,16(1):1013.
- [8] Atamni HJ, Mott R, Soller M, *et al.* High-fat-diet induced development of increased fasting glucose levels and impaired response to intraperitoneal glucose challenge in the collaborative cross mouse genetic reference population [J]. *BMC Genet*, 2016,17:10.
- [9] Weerasekera LY, Balmer LA, Ram R, *et al.* Characterization of Retinal Vascular and Neural Damage in a Novel Model of Diabetic Retinopathy[J]. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 2015,56(6):3721-3730.
- [10] Rutledge H, Aylor DL, Carpenter DE, *et al.* Genetic regulation of Zfp30, CXCL1, and neutrophilic inflammation in murine lung [J]. *Genetics*, 2014,198(2):735-745.
- [11] Chow CY, Wang X, Riccardi D, *et al.* The genetic architecture of the genome-wide transcriptional response to ER stress in the mouse[J]. *Plos Genetics*, 2015,11(2):e1004924.
- [12] Ferguson B, Ram R, Handoko HY, *et al.* Melanoma susceptibility as a complex trait: genetic variation controls all stages of tumor progression[J]. *Oncogene*, 2015,34(22):2879-2886.
- [13] Lore NI, Iraqi FA, Bragonzi A. Host genetic diversity influences the severity of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia in the Collaborative Cross mice[J]. *BMC Genet*, 2015,16:106.
- [14] Vered K, Durrant C, Mott R, *et al.* Susceptibility to klebsiellapneumoniae infection in collaborative cross mice is a complex trait controlled by at least three loci acting at different time points[J]. *Bmc Genomics*, 2014,15(1):25-46.
- [15] Gralinski LE, Ferris MT, Aylor DL, *et al.* Genome Wide Identification of SARS-CoV Susceptibility Loci Using the Collaborative Cross [J]. *Plos Genetics*, 2015, 11(10):e1005504.
- [16] Durrant C, Tayem H, Yalcin B, *et al.* Collaborative Cross mice and their power to map host susceptibility to infection. 2011[J]. *Genetics*, 2012,190(2):389-401.
- [17] Gelinas R., Chesler EJ, Vasconcelos D, *et al.* A genetic approach to the prediction of drug side effects: bleomycin induces concordant phenotypes in mice of the collaborative cross [J]. *Pharmacogenomics & Personalized Medicine*, 2011,4:35-45.
- [18] Crowley JJ, KimY, Lenarcic AB, *et al.* Genetics of adverse reactions to haloperidol in a mouse diallel: a drug-placebo experiment and Bayesian causal analysis[J]. *Genetics*, 2013, 196(1):321-347.

[修回日期]2016-07-05



巴贝西虫感染黑线仓鼠生物学特性的变化

叶 莉¹, 马 帅², 王昱佳^{1,3}, 郑珺文^{1,3}, 王冬平¹, 李桂军¹,
范君文¹, 时彦胜¹, 张小飞⁴, 白杰英¹

(1. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071; 2. 北京农业质量标准与检测技术研究中心, 北京 100097;
3. 首都师范大学生物系, 北京 100048; 4. 北京市兽药监察所, 北京 102600)

【摘要】 目的 建立巴贝西虫感染的黑线仓鼠模型, 明确感染后黑线仓鼠生物学特性的变化规律, 为巴贝西虫病的检测与防治提供基础数据资料。**方法** 腹腔注射含巴贝西虫的血液感染黑线仓鼠, 感染的第 0、2、4、6、8、10、12、14、16、23、30、37 天每次取 5 只动物采集抗凝血和全血, 制备血涂片, 通过吉姆萨染色检测虫体繁殖情况; 分离血液总 DNA, 用 REAL-TIME PCR 检测巴贝西虫的在宿主体内的繁殖规律; 用全自动生化检测仪测定血液生理生化指标; 处死动物后分别采集心、肝、脾、肺、肾等器官, 称重测定脏器系数; 用 ELISA 法检测感染动物血清中 IL-2 浓度。**结果** 感染后第 4 天黑线仓鼠体内的巴贝西虫数量最多, 之后整体呈下降趋势, 在第 12 天有一个短暂升高。感染动物的脏器系数变化最大的属于肝脏和脾脏, 心、肺和肾脏系数在整个感染期内稍有波动, 均在正常值范围内。感染动物的血细胞均有波动, 在第 10、23 天两次达峰值, 其中白细胞变化最为剧烈; 检测到变化的血液生化指标在第 12 天达峰值。感染动物血清中的 IL-2 在第 10 天达峰值, 之后连续下降。**结论** 感染巴贝西虫的黑线仓鼠具有典型的蛭传寄生虫病特点, 病原侵入一周内达繁殖顶峰, 且病原可在宿主体内长期潜伏。宿主免疫响应应在第 2 周达到峰值, 与免疫相关的脏器及血细胞有明显的应激反应。据此, 可有针对性的开展巴贝西虫病的诊断与防治。

【关键词】 巴贝西虫; 黑线仓鼠; 脏器系数; 细胞因子

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0036-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 08. 005

Biological characteristics of Chinese hamster infected with *Babesia*

YE Li¹, MA Shuai², WANG Yi-jia^{1,3}, ZHENG Jun-wen^{1,3}, WANG Dong-ping¹,
LI Gui-jun¹, FAN Jun-wen¹, SHI Yan-sheng¹, ZHANG Xiao-fei⁴, BAI Jie-ying¹

(1. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;
2. Beijing Research Center for Agricultural Standards and Testing, Beijing 100097; 3. Capital Normal University,
Beijing 100048; 4. Beijing Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 102600)

【Abstract】 Objective To establish a Chinese hamster model of *babesia* infection, to find the changing pattern of organs and biochemical parameters in Chinese hamster infected with *Babesia*, and to promote the detection and treatment of

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (31272385); “十二五”重大专项 (2011ZXJ09201 - 031); 北京市自然科学基金面上项目 (5152023); 病原微生物生物安全国家重点实验室开放课题 (SKLPBS1435); 军事医学科学院创新基金 (2012CXJJ022); 后勤“十二五”面上项目 (CWS11J092)。

【作者简介】 叶 (1988 -), 女, 研究实习生, 研究方向: 人兽共患疾病模型, E-mail: 18066045532@163. com; 马帅 (1990 -), 女, 助理研究员, E-mail: mashuai19890926@126. com。叶莉和马帅为本文共同第一作者。

【通讯作者】 张小飞 (1978 -), 女, 副研究员, 研究方向: 兽药安全与检测, E-mail: wangyizxf@163. com; 白杰英 (1977 -), 男, 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 人兽共患感染性疾病致病机理, E-mail: baijieying@126. com。

babesiosis. Methods Healthy 5-week old Chinese hamsters were infected by intraperitoneal injection of blood containing *Babesia*. Blood samples were collected at 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 23, 30, and 37 days after infection from 5 hamsters at each time point. Blood smears were prepared to detect the parasites using Giemsa staining. ELISA assay was employed to test the IL-2 concentration. The blood biochemical indexes were detected using an automatic biochemical analyzer. DNA was extracted from the whole blood and REAL-TIME RCR was performed to determine the reproduction of *Babesia*. After the animals were sacrificed, the heart, lung, spleen, liver, and kidney were taken to analyze the changes of organ coefficients. **Results** The highest level of *Babesia* in the hamsters occurred on day 4 after the *Babesia* injection, and then showing a decreasing tendency. However, there was a transient increase on the 12th day after infection. The liver and spleen displayed most extensive response to the infection showing hepatomegaly and splenomegaly, but the variation of heart and kidneys coefficients was within the norm. There were prominent changes of blood cells, especially leucocytes, with two peaks at day 10 and 23 after the *Babesia* infection. The peak changes of blood biochemical indexes occurred at day 12 after infection. The concentration of serum IL-2 reached a peak on the 10th day after infection. **Conclusions** The Chinese hamsters display typical characteristics of tick-borne diseases such as hepatomegaly and splenomegaly. The immunological system is activated along with the infection and reaches a highest stage in the second week. Afterwards the *Babesia* can live in the hamster body for a long period of time. The results of this study provide useful information supporting further studies on the detection, treatment and prevention of *Babesiosis*.

【Key words】 *Babesia*; Babesiosis; Chinese hamster; Organ coefficients; Blood biochemistry; IL-2

近年来,随着 SARS、禽流感、MERS 及 ZIKA 等各种新发或再发的人兽共患感染性疾病不断危害公众健康,对于病原微生物的研究再次成为科学研究热点,这其中也包括对于巴贝西虫等原虫类寄生虫的研究。巴贝西虫是一类寄生于宿主红细胞内的原虫,一般经蜱虫叮咬传播,属于蜱传寄生虫^[1]。巴贝西虫病具有典型的寄生虫病症状,常见虫种包括双芽巴贝西虫 (*B. bigemina*)、牛巴贝西虫 (*B. bovis*)、马巴贝西虫 (*B. equi*)、鼠巴贝西虫 (*B. microti*) 和犬巴贝西虫 (*B. canis*) 等^[2,3],该类寄生虫可引起马、牛、羊、猪和犬等多种动物的巴贝西虫病。个别虫种可引起人的感染,人感染巴贝西虫后的症状主要表现为发热、寒战、溶血性贫血、头痛、咽痛、肌肉痛、关节痛和脾肿大等。免疫力低下的人和动物更易感染巴贝西虫,而且会表现出较严重的症状,且长时间不能自愈,甚至危及生命^[4]。

巴贝西虫感染动物模型的创制已有相关报道,卢艳等(2012 年)建立了田鼠巴贝西虫感染的小鼠模型,比较和分析了感染田鼠巴贝西虫的雌性 BALB/c 小鼠、免疫抑制 BALB/c 小鼠、雄性 SCID 小鼠和 NOD-SCID 小鼠的感染率和虫体分布等数据^[5]。但用免疫抑制或者缺陷动物作为模型,对于病原与机体相互作用的研究有诸多不足,因此,筛选正常动物创制寄生虫感染模型是一件非常重要的工作。本研究拟以黑线仓鼠为目标动物开展巴贝西虫感染研究。作者单位具有自主培育的黑线仓鼠及其白化突变系,课题组前期对黑线仓鼠的生

理生化指示及其特性进行了详细的比较分析^[6];开展旋毛虫感染黑线仓鼠的实验研究,确定黑线仓鼠是良好的寄生虫感染模型,在动物模型的制备和免疫响应方面都优于同类动物^[7]。本研究拟建立巴贝西虫感染的黑线仓鼠模型,重点分析黑线仓鼠感染巴贝西虫后生物学特性的变化,免疫应答启动的过程及反应程度,从而深入了解巴贝西虫感染后宿主免疫应答响应机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级黑线仓鼠 200 只,5 周龄,雌雄各半,由军事医学科学院实验动物中心提供[SCXK-(军)2012-0004],动物饲养与实验在军事医学科学院实验动物中心动物实验室完成[SYXK-(军)2012-0021]。实验过程中对动物的处置符合科技部颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》要求,按 3R 原则给予人道关怀。

1.2 仪器和材料

IL-2 ELISA kit(上海西唐);SYBR Premix Ex Taq™ II (Qiagen);DNA marker(康为世纪);血液 DNA 提取试剂盒(天根生物);血液生理生化与血细胞检测试剂(Backman)。一次性注射器、离心管、枪头、镊子、手术钳等耗材均从军事医学科学院科技部条件处器材供应站领取。仪器主要有二氧化碳培养箱(Healforce)、显微镜(Nikon)、酶标仪(Rayto)、微量核酸蛋白测定仪(ND2000)、电子天秤

(Sartorius) 和 real-time PCR 扩增仪(Bio-Rad)、全自动血液生理生化分析仪(Backman)。巴贝西虫获赠于军事医学院微生物流行病学研究所刘玮研究员,虫体保存在经血液感染的 SCID 鼠中,每两周经皮下注射感染血液传代 1 次。

1.3 实验方法

1.3.1 巴贝西虫感染黑线仓鼠:检测感染巴贝西虫的 SCID 种鼠,其红细胞巴贝西虫感染率大于 50% 时(约 65%),用乙醚麻醉后立刻打开胸腔,用 1mL 注射器直接抽取心脏血,注入含乙二胺四乙酸钠(EDTA-Na)的离心管中。按 1:1 比例与 0.9% 生理盐水混合后,立刻腹腔注射黑线仓鼠,每只动物注射 200 μ L 抗凝血/生理盐水混合物。动物接种当天记为第 0 天(第 0 天),接种次日开始观察记为第 1 天(D1),依次记为 D2、D3、D4、D5……。

1.3.2 巴贝西虫感染率的测定:眼球采血制备血涂片,用吉姆萨染色法进行镜检,确定受试动物体内寄生虫的存在。同时,用 real-time PCR 法检测巴贝西虫的感染率。取抗凝血 0.1 mL,提取基因组 DNA 作为模板。根据 Genbank 上巴贝西虫 18S rRNA 的序列设计引物,内参为 β -actin。巴贝西虫的上下游引物序列分别为:5-CTTAGTATAAGCTTTTATACAGC-3 和 5-ATAGGTCAGAACTTGAATGATACA-3; β -actin 上下游引物序列分别为 5-AGTGTC CCA ACA TCC CAG C-3 和 5-GTG ACA CCGTCC CCA GAA T-3,扩增产物长度 238 bp。反应条件:预变性 95 $^{\circ}$ C 1 min,变性 94 $^{\circ}$ C 40 s,退火 57 $^{\circ}$ C 40 s,循环 40 次;溶解曲线:95 $^{\circ}$ C 1 min,57 $^{\circ}$ C 1 min,循环 119 次(每隔 0.3 $^{\circ}$ C 采集 1 次荧光信号),至 94.6 $^{\circ}$ C(表 1)。使用仪器自身携带的软件收集分析所有样品,都在同一块板中做 3 次重复,数值以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

表 1 荧光定量 PCR 反应体系

Tab.1 Reaction system of the real-time fluorescence PCR	
PCR 组分	体积 Volume
2 $\times$ SYBR Premix	7.5 μ L
上游引物	1 μ L
下游引物	1 μ L
gDNA 模板	1 μ L
RNase free H ₂ O	4.5 μ L
合计 Total	15 μ L

1.3.3 感染动物脏器系数的计算:处死动物后,采取其心、肝、脾、肺、肾等相应脏器,用 0.1% PBS 缓冲液冲洗掉血渍,在吸水纸上轻轻吸干残余水渍,放到电子天秤上称量。脏器系数 = 脏器重量/动物

体重。

1.3.4 血液生理生化值的测定:取全血约 0.2 mL,室温 1 500 r/min 离心 10 min,取上清液即血清,用于测定血液生理生化值;另取全血 0.2 mL 用全自动血细胞分析仪测定实验动物的血细胞的变化,对照参数为地鼠专用数据。

1.3.5 细胞因子变化分析:将抗小鼠 IL-2 单抗包被于酶标板上,标准品和样品中的 IL-2 与单抗相结合,加入生物素化的抗小鼠 IL-2,形成免疫复合连接在板上,辣根过氧化物酶标记的 Streptavidin 与生物素相结合,加入底物工作液后显蓝色,最后加终止液,测定 450 nm A 值,绘制标准曲线计算标本中 IL-2 的浓度。

2 结果分析

2.1 巴贝西虫感染情况检测

2.1.1 镜检:感染第 2 天起,用显微镜观察到血涂片上细胞中的巴贝西虫(图 1),虫体呈半月形或者弯钩形,个别呈梨形环。

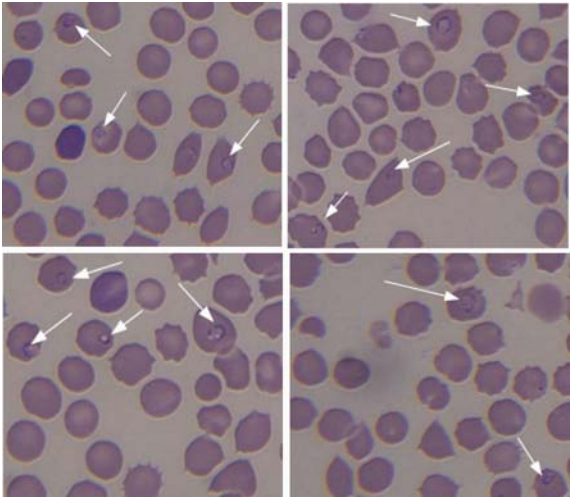
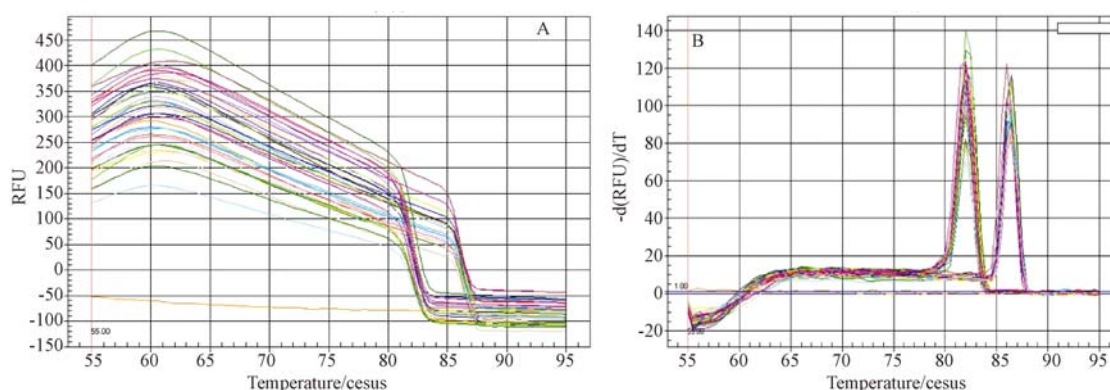


图 1 镜检发现黑线仓鼠红细胞中的巴贝西虫 100 $\times$
Fig.1 Babesia in the erythrocytes of Chinese hamster observed under the microscope. Arrows indicate the parasites in erythrocytes. 100 $\times$

2.1.2 Real-time PCR 检测:提取的 DNA 用 ND2000 微量核酸蛋白测定仪测定 A260/A280 值,各组样品 A260/A280 的值在 1.8 ~ 2.0 之间,纯度较好。巴贝西虫与 β -actin 的扩增曲线均较为平滑,没有出现非正常的数值偏移,二者融解曲线分别 82 $^{\circ}$ C 和 86 $^{\circ}$ C 时有单一峰出现,判断为目的峰(图 2)。通过公式计算可以看出,巴贝西虫在感染后的第 2 天即可达到较高感染率,在第 4 天达到整个感

染期的峰值(图 3)。在感染的前两周内都保持较高

的感染率,自第 3 周开始急剧下降。

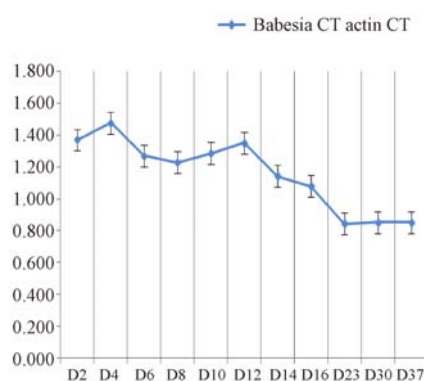


A: 样品 D2-D37 的扩增曲线。B: 样品 D2-D37 的融解曲线

图 2 巴贝西虫与 β -actin 的 real-time PCR 扩增与融解曲线

A: Amplification of the sample D2-D37. B: Dissociation curves of the sample D2-D37.

Fig. 2 Amplification and dissociation curves of *Babesia* and β -actin in real-time PCR



感染率 = 巴贝西虫 CT 平均值/ β -actin CT 平均值。

图 3 感染期间巴贝西虫感染率的变化趋势 (real-time PCR 结果)

The infection rate = average CT values of *Babesia*/average CT values of β -actin.

Fig. 3 Tendency of the changes of infection rate of *Babesia* detected by real-time PCR

2.2 黑线仓鼠脏器系数的变化

黑线仓鼠受巴贝西虫感染后,其心、肝、脾、肺、肾等脏器系数均有不同程度的变化。但是变化最为明显的是肝脏和脾脏。肝脏在感染的前 3 周有 3 次波动,每周都有 1 个峰值,自第三周后便开始持续下降(图 4A)。而脾脏系数在第 1 周相对稳定,在 D4 天稍有升高,从第 2 周开始(第 10 天)至第 3 周(第 16 天)有两次峰值,且一次比一次变化大,在第 3 周的第 16 天达高大值,之后便持续下降(图 4B)。

2.3 黑线仓鼠血液生理生化值的变化

2.3.1 血液生化指标的变化:对血液中的总蛋白、碱性磷酸酶、胆固醇、尿酸、血糖、淀粉酶、谷草转氨

酶和甘油三酯等生化指标进行了测定。其中,总蛋白、碱性磷酸酶和胆固醇没有明显变化,而后面五个生化指标都呈现了相同的变化趋势。淀粉酶在第前两周分别有两次升高,在第 3 周(第 12 天)达峰值(图 5);谷草转氨酶在感染后的第 2 天即迅速升高,但随即下降,在感染后的第 3 周(第 12 天)达峰值(图 5);甘油三酯、血糖和尿酸在感染后无明显变化,直到第 3 周(第 12 天)升高至最大值,之后回复到原来状态(图 5)。从图 5 可以看出,所有呈现变化的血液生化指标均在感染后的第三周(第 12 天)上升至最大值,之后回复原状。

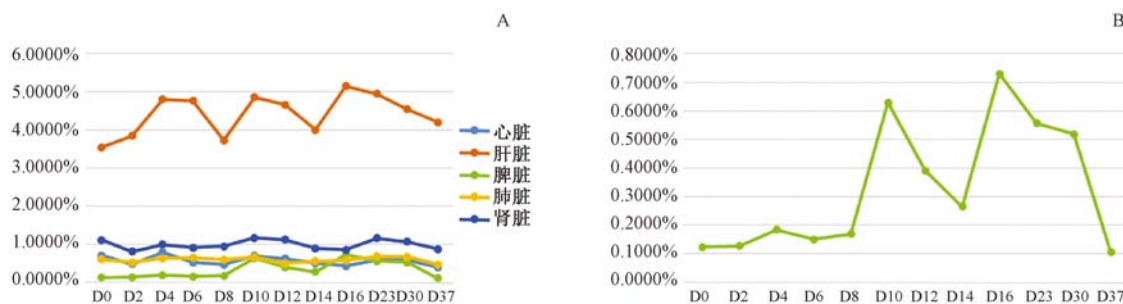
2.3.2 血液生理指标的变化:全自动生理生化测定仪共检测了 22 项生理指标,其中有明显变化的共有 6 个,包括白细胞、红细胞、淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、血红蛋白和中性粒细胞。统计分析发现,白细胞与红细胞的变化趋势相同,感染后每周的细胞计数都有波动,第 2 周(第 10 天)达到峰值(图 6);而淋巴细胞、嗜酸性粒细胞、血红蛋白和中性粒细胞则有多次波动,在第 2 周(第 8 天)达峰值(图 6)。

2.4 感染动物细胞因子的变化

巴贝西虫感染黑线仓鼠血清 IL-2 含量的变化如图 7 所示。感染后第 2 天 IL-2 便升高,之后持续升高,第 2 周(第 10 天)达峰值,自第 3 周后便恢复到正常状态。

3 讨论

巴贝西虫是一类微小的寄生虫,直径约 1~5 μm ,主要侵袭宿主的红细胞^[8]。已知此类寄生虫在生命周期中有两个宿主:蜱和各种脊椎动物。其中



A: 心、肝、脾、肺和肾脏系数变化趋势; B: 肾脏系数变化趋势。

图 4 巴贝西虫感染黑线仓鼠脏器系数变化图

A: Tendency of the changes of heart, liver, spleen, lung and kidney coefficients. B: Tendency of the changes of kidney coefficient.

Fig. 4 Changes of organ coefficients in the Chinese hamster infected with *Babesia*

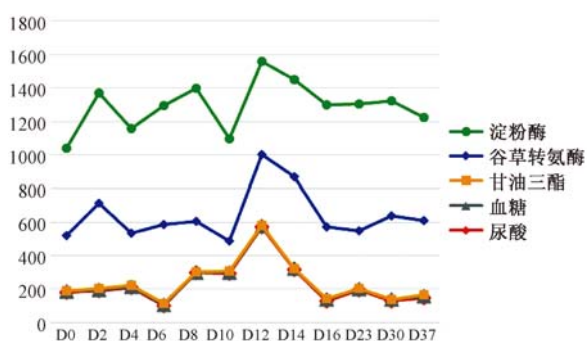


图 5 巴贝西虫感染黑线仓鼠生化指标变化趋势图

Fig. 5 Tendency of the changes of biochemical components in the Chinese hamster infected with *Babesia*

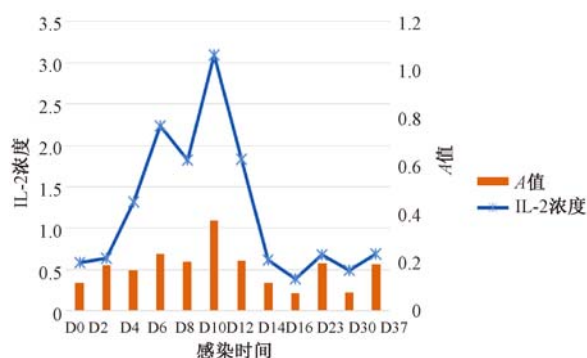


图 7 巴贝西虫感染黑线仓鼠血清中 IL-2 浓度的变化

Fig. 7 Changes of the serum concentration of IL-2 in the Chinese hamster infected with *Babesia*

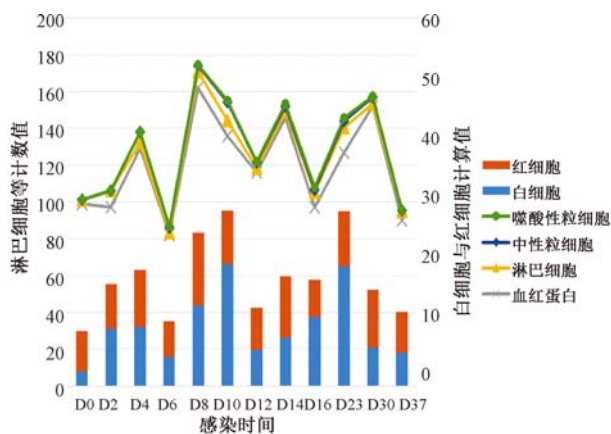


图 6 巴贝西虫感染黑线仓鼠生理指标变化趋势图

Fig. 6 Tendency of the changes of physiological indexes in the Chinese hamster infected with *Babesia*

蜱是其终身宿主,而其它脊椎动物,包括人,是其中间宿主。巴贝西虫病虽然没有像禽流感、SARS、MERS 等病毒病那样暴发成灾,但近年来在世界各地均有报道,亚洲的中国^[9]/日本^[10]、南美的巴西^[11]/乌干达^[12]、欧洲的法国^[13]/挪威^[14]等均有相关报道,且有人畜致死病例。

巴贝西虫感染动物后,在 24 h 内可完成侵入,而进入宿主的红细胞^[8]。在实验室条件下,巴贝西虫可在 4℃ 存活 21 d^[15]。而当巴贝西虫感染黑线仓鼠后,24h 完全侵入黑线仓鼠红细胞,第 2 天开始不断增殖,在第 4 天便可达到峰值(图 3),之后持续下降,仅在第 2 周末(第 12 天)又出现一次增殖高峰(图 3)。实验第 37 天,仍可通过 real-time PCR 检测到巴贝西虫。根据文献报道,巴贝西虫感染后的第 1 至 4 周表现出临床症状^[4],而且其感染可持续 9 周甚至 6 个月之久^[16]。因此,可确定巴贝西虫感染后会在动物体内长期存在,在没有药物作用的情况下,在感染的前两周会有两次增殖,之后在受试动物自身免疫系统的抵制下达到一个动态平衡。伴随着巴贝西虫的增殖,受感染黑线仓鼠的防御响应机制启动,其脏器系数发生一定的变化。脏器变化最为明显的是肝脏和脾脏,肝脏系数在感染后的 3 周内分别有 3 次升高(图 4A),而脾脏系数在感染的第 2 和第 3 周分别有两次达峰值(图 4B)。肝脏和脾脏是两个重要的免疫抑制细胞分泌器官,因

此,在病原微生物入侵后,受影响最大的当属肝和脾。与其它的感染性病原微生物相似,巴贝西虫会使受感染动物产生与疟疾相似的症状,同时伴随着肝肿大和脾肿大等症状^[1,4]。

血常规和血液的生理生化检查主要包括血细胞和血小板计数、血红蛋白含量测定、血液中的离子及各种酶的测定等,可为疾病的诊断、疗效的观察及预后的判断提供重要参考^[17]。巴贝西虫感染后,黑线仓鼠血液的生化指标发生明显变化,其中淀粉酶、谷草转氨酶、甘油三酯、血糖和尿酸均在第 2 周(第 12 天)达到峰值(图 5)。而血细胞的变化趋势为每周有一次峰值(图 6),其中典型的当属白细胞,黑线仓鼠感染巴贝西虫后第 2 天,白细胞数迅速增加,第 2 周(第 10 天)达峰值,而第 3 周(第 23 天)则再次达峰值(图 6)。巴贝西虫是血液寄生虫,动物感染后血细胞和血液生化值受影响最大,其参数都不同程度的波动^[18]。而其中,白细胞因含诸多免疫抵制因子而发生最为显著的变化,以抵制病原微生物的侵染和攻击。

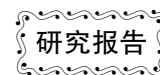
IL-2 大部分是由血液白细胞产生的,可提高机体对病毒、细菌、真菌、原虫等感染的免疫应答,是一种免疫增强剂,具有抗病毒、抗肿瘤和提高机体免疫功能等作用^[19]。巴贝西虫感染黑线仓鼠后,随着血细胞的变化,血清中的 IL-2 也发生了明显的变化,IL-2 的变化直接反映了宿主的免疫响应。从感染第 2 天起,IL-2 持续增加,在第 2 周(第 10 天)达峰值(图 7),这一变化趋势与白细胞相似,反映出在没有药物作用的情况下,黑线仓鼠机体对病原体的抵制和适应有一个过程,在这一过程中,存在着宿主免疫系统与病原相互制衡,从而达到动态平衡的战斗。

了解巴贝西虫侵入宿主的时间点,分析其在宿主体内的增殖特性,可以深入分析病原与宿主相互作用,对于寄生虫病的诊断与治疗也有重要的参考意义。另外,黑线仓鼠对于寄生虫感染具有均一、稳定的应激反应状态,在旋毛虫、巴贝西虫、利什曼原虫等感染中均可获得较好的数据^[7,20]。因此,黑线仓鼠可以作为寄生虫感染研究良好的候选模型动物。

参考文献:

- [1] Hunfeld KP, Hildebrandt A, Gray JS. Babesiosis: recent insights into an ancient disease [J]. Int J Parasitol, 2008, 38 (11): 1219 - 1237.
- [2] Kjemtrup AM, Conrad PA. Human babesiosis: an emerging tick-borne disease [J]. Int J Parasitol, 2000, 30 (12 - 13): 1323 - 1337.
- [3] Irwin PJ. Canine babesiosis: from molecular taxonomy to control [J]. Parasit Vectors, 2009, 2 (Suppl 1): S4.
- [4] Vannier E, Krause PJ. Human babesiosis [J]. N Engl J Med, 2012, 366 (25): 2397 - 2407.
- [5] 卢艳,蔡玉春,陈韶红,等.田鼠巴贝虫实验动物模型的建立 [J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 2012, 30 (6): 423 - 427.
- [6] 赵爽,王冬平,刘晓,等.黑线仓鼠及其白化突变系血液生理生化值的测定与分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2011, 21 (7): 17 - 21.
- [7] 张小飞,刘冉,崔晓霞,等.旋毛虫感染黑线仓鼠及其白化突变系后细胞因子变化比较分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24 (8): 11 - 15.
- [8] Rozej-Bielicka W, Stypułkowska-Misiurewicz H, Gołab E. Human babesiosis [J]. Przegl Epidemiol, 2015; 69: 489 - 494.
- [9] Wang HX, Huang F. Babesia Infection in the Southwest of China, a case report [J]. Jundishapur J Microbiol, 2014, 7 (11): e13504. DOI: 10.5812/jjm.13504
- [10] Iguchi A, Soma T, Suzuki H, et al. The epidemiological survey for atovaquone resistant related gene of *Babesia gibsoni* in Japan [J]. J Veter Med Sci, 2015, published in advance. DOI: 10.1292/jvms.15-0480
- [11] Moraes PHG, Rufino CP, Baraúna ARF, et al. Molecular characterization of *Babesia vogeli* in dogs from Belém, northern Brazil [J]. Genet Mol Res, 2015, 14 (4): 16364 - 16371.
- [12] Probst T, Kalema-Zikusoka G, Altet L, et al. Infection and exposure to vector-borne pathogens in rural dogs and their ticks, Uganda [J]. Parasites & Vectors, 2015, 8: 306.
- [13] Magalie RM, Claire VM, Jeanne C, et al. Update on epidemiology of canine babesiosis in Southern France [J]. BMC Vet Res, 2015, 11: 223.
- [14] Mørch K, Holmaas G, Frolander PS, et al. Severe human *Babesia* divergent infection in Norway [J]. Int J Infect Dis, 2015, 33: e37 - e38.
- [15] Eberhard ML, Walker EM, Steurer FJ. Survival and infectivity of *Babesia* in blood maintained at 25°C and 2 - 4°C [J]. J Parasitol, 1995, 81: 790 - 792.
- [16] Herwaldt BL, Linden JV, Bosserman E, et al. Transfusion-associated babesiosis in the United States: a description of cases [J]. Ann Intern Med, 2011, 155: 509 - 519.
- [17] 张华,侯绍华.血常规检查在猫犬疾病诊断中的应用 [J]. 中国动物检疫, 2009, 26 (3): 55 - 56.
- [18] Mylonakis E. When to suspect and how to monitor babesiosis [J]. Am Fam Physician, 2001, 63 (10): 1969 - 1974.
- [19] 金伯泉,熊思东.医学免疫学(第 5 版) [M]. 北京:人民卫生出版社, 2008: 61 - 62.
- [20] 遇秀玲,郑振峰.白化黑线仓鼠解剖学与组织学特性的比较研究 [J]. 中国实验动物学杂志, 1991, 1 (3,4): 191 - 193.

[修回日期] 2016 - 04 - 08



小鼠尾静脉注射与心肌注射腺病毒载体转染效率的比较

杨琳珊¹, 占贞贞¹, 汪波¹, 杨珺琦¹, 范慧敏^{1,2}, 刘中民^{1,2}

(1. 同济大学附属东方医院心力衰竭研究所, 上海 200120;
2. 同济大学附属东方医院心胸外科, 上海 200120)

【摘要】 目的 比较小鼠尾静脉注射或心肌注射腺病毒载体后心脏组织和肝脏组织中靶基因的转染效率。**方法** 构建表达绿色荧光蛋白 GFP 的腺病毒载体 (GFP-Ad)。C57BL/6 小鼠 20 只随机分为尾静脉注射腺病毒载体组与心肌注射腺病毒载体组各 10 只, 用实时定量 PCR 检测不同时间点小鼠心肌组织和肝脏组织中 GFP 的 mRNA 表达水平, 并且通过荧光显微镜观察 GFP 荧光表达情况。**结果** 心肌注射腺病毒载体组心脏组织中 GFP 的 mRNA 表达水平明显高于尾静脉注射腺病毒载体组, 心肌注射腺病毒载体组心脏组织中荧光强度明显增强。同时, 我们发现两组的肝脏组织中 GFP 的 mRNA 表达水平和荧光强度均明显高于心脏组织中; 且在尾静脉注射腺病毒载体组, 肝脏组织中 GFP 的 mRNA 表达水平和荧光强度在 7 d 达高峰, 而心肌注射腺病毒载体组则在 3 d 达高峰。**结论** 提高心脏组织中靶基因的转染效率宜采用心肌注射腺病毒载体的方法; 对于肝脏组织转染效率, 两种注射方法均可, 鉴于尾静脉注射腺病毒载体的方法创伤小, 宜采用。

【关键词】 心肌注射; 尾静脉注射; 腺病毒载体; 转染效率

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0042-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.006

Comparison of the efficiency of tail vein injection and intramyocardial injection of adenovirus vector in mice

YANG Lin-shan¹, ZHAN Zhen-zhen¹, WANG Bo¹, YANG Jun-qi¹, FAN Hui-min^{1,2}, LIU Zhong-min^{1,2}

(1. Institute of Heart Failure, East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120, China;
2. Cardio-Thoracic Surgery, East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200120)

【Abstract】 Objective To investigate the efficiency of target gene transfection of the heart and liver after tail vein or intramyocardial injection of adenovirus vector (GFP-Ad). **Methods** GFP-AD was constructed at first. A total of 20 male 8-week old C57BL/6 mice were randomly and equally divided into tail vein injection of GFP-AD group and intramyocardial injection of GFP-AD group. The mRNA levels of GFP in the heart and liver tissues were detected by Q-PCR at different time points. Fluorescence microscopy was performed to visualize the expression of GFP fluorescence. **Results** Compared with the tail vein injection group, the GFP mRNA level in mouse heart tissue was apparently higher in the intramyocardial injection group. In both groups, the GFP mRNA levels in liver tissue were significantly increased compared with that in the heart tissue. In the tail vein injection group, the GFP mRNA level in liver tissue reached a peak on day 7; but in the intramyocardial injection group, the mRNA level of GFP in liver tissue reached a peak on day 3. We also observed the same trend of GFP fluorescence expression in the tail vein injection group compared with that in the

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81370433, 81373146, 81571541); 上海市“创新行动计划”基础研究领域项目(14JC1405200)。

[作者简介] 杨琳珊, 女, 硕士在读, 研究方向: 心血管免疫; Email: yls2011114@163.com。

[通讯作者] 占贞贞, 副教授、副研究员, Email: zhanzz@tongji.edu.cn; 刘中民, 教授、主任医师, Email: liu.zhongmin@tongji.edu.cn。

intramyocardial injection group. **Conclusions** Intramyocardial injection of adenovirus vector is suitable to achieve a higher transfection efficiency in mouse heart tissue compared with the tail vein injection method. Although both injection methods are suitable for transfection of mouse liver, the tail vein injection method is preferential for it is simple and less invasive.

【Key words】 Intramyocardial injection; Tail vein injection; Adenovirus vector; Transfection efficiency; Mice.

小鼠尾静脉注射是动物实验中药物干预的常用途径。但小鼠尾静脉较细,造成穿刺难度大,因此很大程度上制约了实验的成功与否,且其药效如何也有待论证。心肌注射是除尾静脉给药的另外一种方法,但由于其是一种有创的给药途径,因此其应用也受限制。现将这两种方法的心脏组织及肝脏组织中靶基因的转染效率作比较。

1 材料和方法

1.1 实验动物

C₅₇BL/6 雄性小鼠 20 只,8 周龄,体重(24 ~ 26)g,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司(生产许可证【SCXK(沪)2012-0002】),随机分为小鼠尾静脉注射组和心肌注射组各 10 只,饲养于同济大学实验动物中心屏障环境【SYXK(沪)2014-0026】。

1.2 主要试剂和仪器

SYBR Green QPCR Mix(日本 Toyobo 公司);组织转染带绿色荧光的腺病毒载体由上海和元生物有限公司合成。0.1% 戊巴比妥钠,倒置显微镜,小动物呼吸机,显微外科手术器械。

1.3 方法

1.3.1 小鼠尾静脉注射:将小鼠置于固定器内,露出尾巴,按陈育尧^[1]的方法尾静脉注射 GFP-Ad。一次注射量为 0.05 ~ 0.1 mL/10 g 体重^[2]。空白对照组注射同剂量 PBS。

1.3.2 小鼠心肌注射:0.1% 戊巴比妥钠(0.1 mL/10 g)腹腔麻醉,小鼠肌肉松弛充分后气管插管,连接呼吸机。小鼠右侧卧位固定于手术台上,在距胸骨左缘 0.3 cm 处沿 4、5 肋间做横行切口进胸,暴露心脏,使用一次性胰岛素注射器于靠近心尖处直接心肌注射腺病毒液体,1 只小鼠 50 μ L^[4]。注射完毕后使用 3-0 线逐层关闭胸腔。断开呼吸机,术后将小鼠放置于温毯上密切观察。空白对照组按同样操作注射同剂量 PBS。

1.4 检测组织中 GFP 的表达水平

两组小鼠于实验后第 3、5、7 天分别处死 3 对,分别取心脏组织和肝脏组织做冰冻切片和提取 RNA 做实时荧光定量 QPCR。抽提组织 RNA 后,利

用 SYBR MicroRNA Assay Kit 中的探针进行实时荧光定量 PCR,检测 GFP 表达水平。以 U6 snRNA 为内参,反应体系为 10 μ L,2- $\Delta\Delta$ Ct 方法计算 GFP 的相对表达水平。定量反应条件为 95 $^{\circ}$ C 10 min,扩增 1 个循环,95 $^{\circ}$ C 15 s,扩增 40 个循环,60 $^{\circ}$ C 1 min 扩增 40 个循环,在每个循环的 60 $^{\circ}$ C 时测定荧光。

1.5 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,对计量资料进行正态性检验,两组间均数比较采用 *t* 检验,多组间均数比较采用方差分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏组织和肝脏组织中 GFP 的表达水平比较

qPCR 检测结果显示,心肌注射组的心脏组织中 GFP 的 mRNA 表达水平明显高于尾静脉注射组。两个实验组的肝脏组织中 GFP 的 mRNA 表达水平均明显高于心脏组织中,尾静脉注射组升高更为明显。GFP 的 mRNA 表达水平尾静脉注射组在 7 d 左右达高峰,而心肌注射组则在 3 d 左右达高峰;同时 QPCR 检测发现从小鼠尾静脉注射组取得的肝脏组织和心脏组织中的 GFP 的 mRNA 表达水平在 3 d 和 5 d 左右是下调于从心肌注射组中取得的肝脏组织,而在 7 d 左右结果却与之相反,这种变化在肝脏组织中更明显。见图 1。

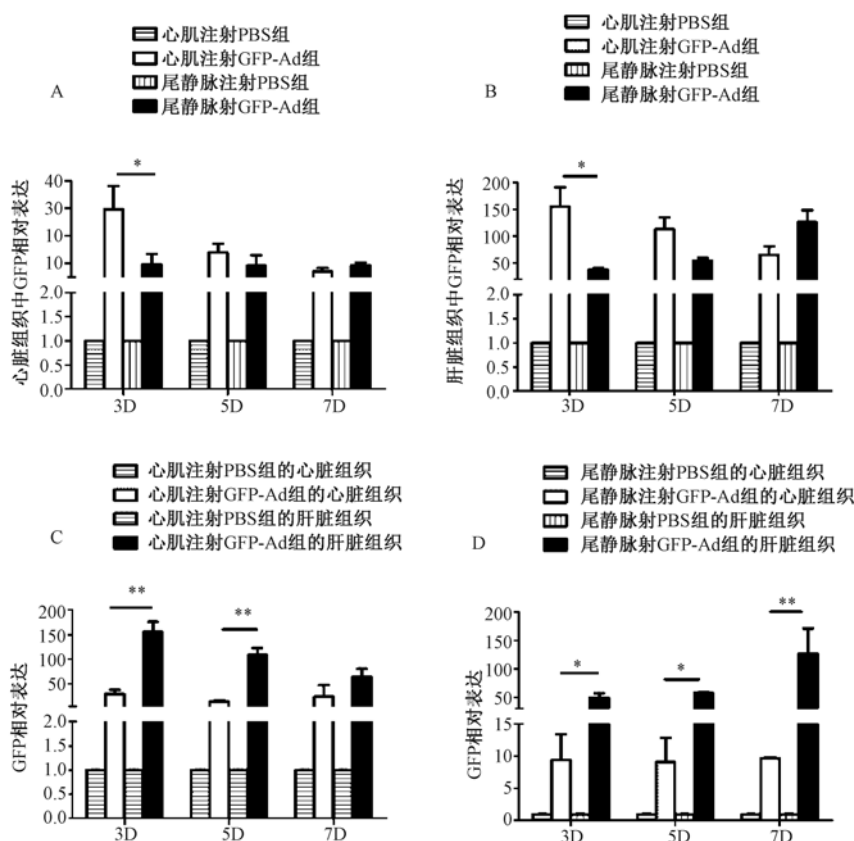
2.2 心脏组织和肝脏组织冰冻切片观察 GFP 荧光情况

结果发现,心脏组织中的 GFP 荧光强度心肌注射组明显强于尾静脉注射组。在尾静脉注射组,肝脏组织中 GFP 荧光明显强于心脏组织,且在 7 d 左右达高峰,而在心肌注射组,则心脏组织中 GFP 荧光强度明显高于肝脏组织,且在 3 d 左右达高峰。见图 2。

3 讨论

3.1 小鼠尾静脉注射的几个问题探讨

3.1.1 尾静脉扩张:应该保持实验室温度在 26 $^{\circ}$ C 左右,尤其是冬季,适宜的室内温度对小鼠尾静脉有一定的扩张作用并且能够使血流通畅降低注射阻力。目前使用较多的是用酒精涂擦使尾静脉扩张,也有使用红外线灯加热小鼠尾部,另外有报道



A: 心肌注射腺病毒载体组与尾静脉注射腺病毒载体组, 心脏组织中 GFP 的 mRNA 表达水平比较。B: 心肌注射腺病毒载体组与尾静脉注射腺病毒载体组, 肝脏组织中 GFP 的 mRNA 表达水平比较。C: 心肌注射腺病毒载体组, 心脏组织与肝脏组织中 GFP 的 mRNA 表达水平比较。D: 尾静脉注射腺病毒载体组, 心脏组织与肝脏组织中 GFP 的 mRNA 表达水平比较。* 为 $P < 0.05$, ** 为 $P < 0.01$ 。

图 1 两实验组小鼠组织中 GFP 表达水平

Note. A: Comparison of GFP mRNA expression levels in the mouse heart tissues of the intramyocardial injection and tail vein injection groups. B: Comparison of GFP mRNA expression levels in the mouse liver tissue of the intramyocardial injection and tail vein injection groups. C: Comparison of GFP mRNA expression levels in the mouse heart and liver tissues in the intramyocardial injection group. D: Comparison of GFP mRNA expression levels in the mouse heart and liver tissues in the tail vein injection group. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Fig. 1 GFP mRNA levels in mouse tissues of the two groups

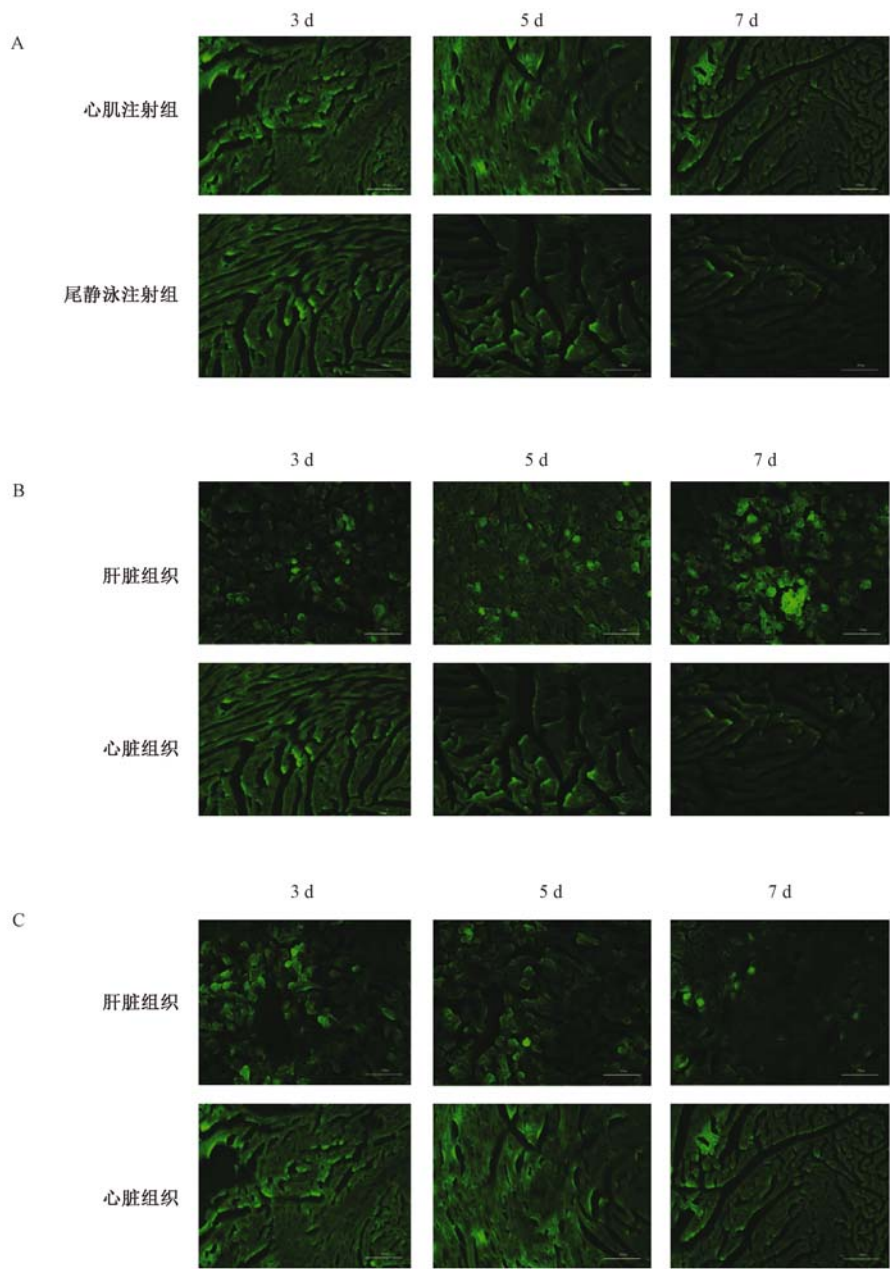
使用硝酸甘油扩张尾静脉从而降低穿刺难度, 且其效果优于 75% 乙醇^[5]。我们所使用的热水浸泡联合酒精涂擦法能使尾静脉扩张更充分, 其效果优于单用热水浸泡法和单用酒精涂擦法。但是水浴的温度以 50℃ ~ 60℃ 较为适宜, 温度太低则尾静脉扩张效果不理想, 若温度超过 70℃ 则容易烫伤皮层, 甚至在拉尾固定的过程中小鼠挣扎导致皮层脱落并出血, 容易诱发感染。

3.1.2 注射剂量: 单次小鼠尾静脉注射剂量不宜超过 400 μL 每只, 大剂量迅速推注容易造成小鼠循环超负荷导致猝死, 特别是悬浮颗粒型液体更容易造成栓塞导致小鼠死亡, 因此推注药物的过程应该缓慢并观察小鼠的反应。我们在实验过程中采用

的注射剂量为 200 μL 每只, 即约为全血体积的 14%, 小于 100 μL 注射剂量时在一次注射不成功时药物损失量的影响会比较大, 因此 200 μL 是一个比较适宜的注射量。

3.2 小鼠心肌注射的几个问题探讨

3.2.1 小鼠模型的建立: 成功的麻醉与气管插管是建立模型的前提, 麻醉过量易导致小鼠死亡, 故麻醉用量应谨慎, 药量宜少不宜多, 以使小鼠不能自主翻身为宜, 本实验以 0.1% 戊巴比妥钠 (0.1 mL/10 g) 腹腔麻醉, 效果良好。气管插管次数不宜太多, 因插管次数太多易致喉水肿而窒息死亡, 插管时用小镊子拉出鼠舌, 顺舌根插成功率较高, 插管后接呼吸机, 若小鼠胸廓起伏与呼吸机频率一致



A: 心肌注射腺病毒载体组与尾静脉注射腺病毒载体组的小鼠心脏组织中不同时间的 GFP 荧光强度比较。B: 尾静脉注射腺病毒载体组, 心脏组织与肝脏组织不同时间的 GFP 荧光强度比较。C: 心肌注射腺病毒载体组, 心脏组织与肝脏组织不同时间的 GFP 荧光强度比较。

图 2 两组小鼠组织中 GFP 荧光强度比较。(标尺 = 100 μm)

Note. A: Comparison of fluorescence intensity of GFP in the mouse heart tissues at different time points of the intramyocardial and tail vein injection groups. B: Comparison of the fluorescence intensity of GFP in the mouse heart and liver tissues at different time points of the tail vein injection group. C: Comparison of the fluorescence intensity of GFP in the mouse heart and liver tissues at different time points of the intramyocardial injection group.

Fig.2 GFP fluorescence expression in mouse tissues of the two groups(Bar = 100 μm)

提示插管成功。

3.2.2 心肌注射: 成功开胸暴露心脏后,即于靠近心尖处直接心肌注射腺病毒液体,每只小鼠 50 μL。注意排空注射器内空气,以免造成空气栓塞导致小鼠死亡。由于小鼠心肌比较薄,故注射液体时注射

器针头不能刺入太深以防注入心腔。

3.3 腺病毒转染效率的探讨

我们实验比较了心肌注射或尾静脉注射腺病毒载体后心脏组织和肝脏组织中靶基因的转染效率,结果发现心肌注射腺病毒载体方法心脏组织中

靶基因的转染效率明显高于尾静脉注射方法,且两种方法注射腺病毒载体后肝脏组织中靶基因的转染效率均明显高于心脏组织中,尾静脉注射组升高更为明显,且在尾静脉注射腺病毒载体组,肝脏组织中靶基因的转染效率 7 d 达高峰,而心肌注射腺病毒载体组则在 3 d 达高峰。小鼠血液循环和人体血液循环是相似的,血液都是从左心室射入主动脉,沿动脉到全身各部包括肝脏的毛细血管,然后汇入小静脉,大静脉,最后经上下腔静脉回到右心房。其中,肝脏的血液循环十分丰富,肝脏对来自体内和体外的许多非营养物质如各种药物、毒物以及体内某些代谢产物,具有生物转化作用,通过新陈代谢将它们彻底分解或以原形排出体外。无论是心肌注射腺病毒载体还是尾静脉注射腺病毒载体方法,腺病毒载体相当于一种外来非营养物质,其首先进入肝脏进行生物转化,因此,两种方法注射腺病毒载体后肝脏组织中靶基因的转染效率均明显高于心脏组织中。腺病毒载体从尾静脉注入体内后,其首先经过静脉回流进入心脏,然后才经左心室射入主动脉,沿动脉到达肝脏组织中;而心肌注射腺病毒载体则直接从左心室射入主动脉,然后到达肝脏,因此两种方法注射腺病毒载体后,其在肝脏组织中的转染效率各显示不同的高峰,尾静脉注射腺病毒载体组肝脏组织中靶基因的转染效率 7 d 达高峰,而心肌注射腺病毒载体组则在 3 d 达高峰。肝脏还有药物首过效应,首过效应使某些药物经胃肠道等途径给药后,经门脉系统进入肝脏,在肝脏被代谢,而使进入血液循环的原形药量减少的现象,尾静脉注射腺病毒进入体内后首先经过肝脏的首过消除效应,到达心脏组织后病毒量减少,因此尾静脉注射腺病毒载体方法心脏组织中靶基因的转染效率明显低于心肌注射方法。具体机制

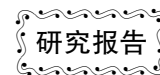
还有待深入研究。

总之,小鼠尾静脉注射法是常用的药物干预途径,传统的方法是采用 1 mL 注射器(0.5 号针头)在回抽见血后予以注射,但是由于注射过程中小鼠挣扎尾部摆动易使针头移位,导致注射失败,且难以估算注射液有效入量,影响最终的实验结果。采用我们自制的这种方法进行尾静脉注射可以准确的估算注射液有效入量,但是由于其操作繁琐,耗时较长,且药物经过肝脏的首过消除到达心脏后其疗效有所下降,因此如果是研究肝脏方面的疾病,采用尾静脉注射效果优于心肌注射。采用心肌注射法,药物没有肝脏的首过消除效应,心脏组织中腺病毒转染效率明显增加,因此用于研究心脏方面疾病此法效果更好;且小鼠开胸可用于做心梗模型,利于后续方面的研究。

参考文献:

- [1] 陈育尧,黄雪玲. 小鼠尾静脉注射法[J]. 毒理学杂志, 2008, 22(4): 311-312.
- [2] 蔡陈之,陈凯. 小鼠尾静脉注射的几点体会[J]. 科技向导, (2010), (6): 4.
- [3] Oleg Tarnavski JRM., Schinke M, Nie Q, et al. Mouse cardiac surgery comprehensive techniques for the generation of human diseases and their application for genomic studies [J]. *Physiol Genomics*, 2004, 16(3): 349-60.
- [4] Svensson EC, M., Marshall DJ, Woodard K, et al. Efficient and stable transduction of cardiomyocytes after intramyocardial injection or intracoronary perfusion with recombinant adeno-associated virus vectors [J]. *Circulation*, 1999, 99: 201-205.
- [5] 蒋兰兰,冯俊涛,罗百灵,等. 硝酸甘油干预法对小鼠尾静脉穿刺效果的影响[J]. 中国医学工程, 2004, 12(4): 92-93.

[修回日期]2016-04-26



遥测方法对比传统安全药理学方法的优势及应用

孙晶晶, 周 泉, 齐珍珍, 郭秋平

(广州医药研究总院有限公司药物非临床评价研究中心, 广州 510240)

【摘要】 目的 对比传统安全药理研究方法, 论证遥测方法的优势。**方法** 分别使用传统安全药理方法和遥测技术对 Beagle 犬进行连续的心率、呼吸频率、血压和心电等生理指征监测, 分析对比麻醉状态、清醒状态和采食前后 Beagle 犬的生理指标的变化。**结果** 维持麻醉会造成动物的心率、呼吸频率、血压和心电 QT 间期等出现显著变化; 清醒动物 24 h 的生理指标变化不明显, 并呈现出一定的生物节律; 相对清醒动物, 麻醉动物的心率显著升高、血压显著升高、心电 QRS (QRS 段) 和 QTcf (QTcf 间期) 显著延长、呼吸频率降低; 采食后动物心率显著升高, QTcf 极显著延长。**结论** 传统安全药理研究方法会影响动物心率、血压、呼吸频率和 QT 间期等生理指标, 影响药物评价的客观性, 通过遥测技术使用清醒动物进行安全药理研究能够减少误差, 但在具体应用时需尽量排除外界干扰。

【关键词】 Beagle 犬; 遥测; 安全药理

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0047-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 08. 007

Advantages and application of telemetry compared with the traditional methods in safety pharmacology

SUN Jing-jing, ZHOU Quan, QI Zhen-zhen, GUO Qiu-ping

(Center for Drug Non-Clinical Evaluation and Research, Guangzhou Pharmaceutical Research Institute Co. Ltd, Guangzhou 510240, China)

【Abstract】 Objective To prove the advantages of telemetry by comparing with the traditional methods in safety pharmacology. **Methods** To monitor continuously the heart rate, respiratory rate, blood pressure and ECG of Beagle dogs by traditional and telemetry methods respectively, analyze and compare the changes between anesthetized and conscious dogs before and after feeding. **Results** Maintenance of anesthesia changed significantly the heart rate, respiratory rate, blood pressure and QT interval in the ECG of animals. The changes of physiological indicators in 24 h is not obvious in conscious animals, and showed a certain biorhythm. Compared with the conscious animals, the anesthetized dogs' heart rate was significantly higher, blood pressure increased significantly, QRS and QTcf interval prolonged significantly, respiratory frequency decreased, heart rate increased significantly after feeding, and QTcf interval extended very significantly. **Conclusions** Traditional methods in safety pharmacology affect animal physiological indicators such as heart rate, blood pressure, respiratory rate and QT interval, which affect the objectivity of drug evaluation. Using conscious animals by telemetry can reduce these errors, however, the interference from outside should be eliminated.

【Key words】 Beagle dog; Telemetry; Safety pharmacology

【基金项目】 广州市科信局市科研条件建设 (编号: 穗科条[2009]5-11, 穗科条[2013]277-1); 广州市科信局生物产业重大专项 (编号: 201300000053)。

【作者简介】 孙晶晶 (1978-), 女, 研究方向: 新药研发。E-mail: sjjing3@sina.com。

【通讯作者】 郭秋平 (1978-), 女, 研究方向: 新药研发。E-mail: 13427595023@163.com。

安全药理学(safety pharmacology)主要是研究药物在治疗范围内或以上的剂量时,潜在的不期望出现的对生理功能的不良影响,即观察药物对中枢神经系统、心血管系统和呼吸系统的影响^[1]。其中心血管系统实验主要在犬或猴等大动物上进行,建议采用清醒动物。相对传统的使用麻醉动物进行的安全药理学实验方法,借助遥测技术使用清醒动物可排除麻醉、创伤应激及动物活动受限等因素的干扰,同时增加受试物对动物 QT 间期、血压、呼吸、心率等安全药理学研究参数影响的检测灵敏度^[2,3],因而实验结果更客观、准确,更为接近临床。测得的生理信号更能反映动物在正常且自然的状态下的生理状况。

在安全药理实验中,使用遥测技术的优势显而易见:实验设计更为科学;可长时间连续监测;所得数据更接近真实值;符合“3R”国际原则等^[4]。目前国内已有遥测技术应用在 Beagle 犬、食蟹猴、巴马小型猪等动物的成功案例^[5-7],也据此进行过安全药理研究^[8]。刘雁^[9]在同时使用麻醉动物和清醒动物进行化合物 A 的安全药理评价时发现,因麻醉剂对动物反射功能的抑制,可导致清醒动物的心率降低的化合物 A 会同时降低麻醉动物的心率和血压,证明使用麻醉动物会影响某些药物的评价效果,但遥测技术相对于传统安全药理研究方法的优点并未得到全面的论证,本实验以 Beagle 犬为例,探讨遥测方法相对于传统安全药理学实验方法的优势以及实际应用中需要注意的问题。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

普通级 Beagle 犬,8~12 月龄,8~12 kg,购自广州医药研究总院有限公司实验动物研究开发中心(SCXK(粤)2013-0007)。动物单笼饲养于普通级动物房(SYXK(粤)2013-0003),动物房环境符合国标要求。

1.2 药品、试剂和溶剂

50200 麻醉机(Stoelting 公司),用于动物维持麻醉;遥测生理信号采集系统(Data Sciences International 公司),用于麻醉动物生理信号采集;MP150 十六道生理记录仪(美国 Biopac),用于清醒动物生理信号采集。

注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司,批号:F3112130),布洛芬缓释片(惠州大亚制药股份

有限公司,批号:140405),丙泊酚注射液(西安力邦制药有限公司,批号:1410231),异氟烷(宝龄富锦生物股份有限公司,批号:4900-1201),肝素钠注射液(江苏万邦生化医药股份有限公司,批号:1401106),0.9%氯化钠注射液(广东科伦药业有限公司,批号:D13110806-2)。

1.3 动物实验

1.3.1 麻醉动物的生理数据采集:动物采用静脉注射丙泊酚注射液诱导麻醉后行气管插管,使用 0.5%~1%异氟烷进行维持麻醉。将动物仰卧保定于恒温手术台上,对其颈部进行除毛和常规消毒,在无菌条件下切开颈部皮肤进行单侧颈总动脉插管(动脉插管内充满 125 U/mL 肝素钠溶液)。使用十六道生理记录仪记录动物的呼吸、血压和心电。

1.3.2 清醒动物的生理数据采集:动物使用丙泊酚注射液诱导麻醉后使用 1.5%~3%异氟烷进行维持麻醉,在无菌条件下行 D70-PCTR 植入子植入手术。术前和术后 3 d,每天经口饲喂布洛芬缓释片镇痛,术后 5 d,每天肌肉注射青霉素钠消炎,并据恢复状况进行创口常规消毒,待动物痊愈后使用 DSI 遥测系统进行生理数据采集。

1.4 数据获取及分析

选取 6 只 Beagle 犬,在麻醉稳定状态下使用 MP150 十六道生理记录仪采集连续 6 h 的呼吸、血压和心电,另取 3 只雄性 Beagle 犬采用 DSI Dataquest A. R. T 软件连续获取 24 h 的呼吸、血压和心电,并用 Acqknowledge 3.8.1 软件进行数据处理。所有数据使用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 20.0 软件进行统计学处理,差异显著性采用配对 *t* 检验和单因子方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 麻醉动物

以麻醉稳定时为 0 min,分别取 0、5、15、30、60、120、180、240、300、360 min 的数据(取相应时间点附近稳定的 60 s 数据的均值)进行分析统计,统计结果见表 1、表 2,其中 QTcf 间期为 QT 间期的校正值, $QTcf = QT / (RR^{1/3})$ 。

随麻醉维持时间的延长,动物的心率、呼吸频率、血压均有下降趋势,且相比 0 min,心率在 5、15、60 min 及之后有显著(或极显著)降低,呼吸频率在 180、240 min 有显著降低,QT 间期在 5、15、60 min 及之后有显著延长,QTcf 间期在 5、60 min 及之后有

显著延长。

2.2 清醒动物

清醒动物取指定段中间附近生理信号稳定的 60 s 的均值,且避开动物采食后 60 min(每天 8:00、16:00 饲喂),采集 3 只清醒动物全天的数据见表 3、

表 4。

全天动物心率、呼吸频率、血压和 QTcf 间期在 10:00 ~ 11:00 较高,且心率和 QTcf 间期比 5:00 ~ 6:00 显著升高,其它指标的变化均无统计学意义。

表 1 麻醉 Beagle 犬心率呼吸血压($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab.1 Heart rate, respiratory rate and mean blood pressure of the anesthetized Beagle dogs

时间点 (min)	心率	呼吸频率	平均压
Time points (min)	Heart rate (bpm)	Respiratory rate (bpm)	Mean blood pressure (mmHg)
0	166.2 ± 18.0	10.9 ± 7.0	124.5 ± 6.3
5	158.0 ± 15.0 *	11.0 ± 7.6	123.4 ± 5.8
15	157.7 ± 14.7 *	10.3 ± 7.4	125.1 ± 4.4
30	160.5 ± 13.4	12.0 ± 10.3	125.4 ± 4.5
60	154.5 ± 19.3 *	10.4 ± 9.5	124.8 ± 5.9
120	152.3 ± 20.1 *	9.1 ± 7.2	123.4 ± 7.2
180	144.9 ± 13.0 **	7.5 ± 6.0 *	118.0 ± 6.3
240	141.0 ± 13.6 **	6.6 ± 5.4 *	116.5 ± 7.8
300	139.4 ± 10.0 **	7.0 ± 4.4	113.8 ± 8.9
360	140.5 ± 10.5 *	6.9 ± 3.6	110.2 ± 13.5

注: * 表示与 0 min 比较, $P < 0.05$, ** 表示与 0 min 比较, $P < 0.01$ 。
Note. Compared with 0 min, * means $P < 0.05$ and ** means $P < 0.01$.

表 2 麻醉 Beagle 犬心电图指标($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab.2 Cardiographic parameters of the anesthetized Beagle dogs

时间点 (min)	PR 间期	QT 间期	QRS 段	QTcf 间期
Time points (min)	PR (s)	QT (s)	QRS (s)	QTcf (s)
0	0.074 ± 0.011	0.219 ± 0.018	0.074 ± 0.008	0.305 ± 0.017
5	0.074 ± 0.011	0.231 ± 0.017 **	0.075 ± 0.009	0.317 ± 0.016 *
15	0.075 ± 0.011	0.229 ± 0.013 *	0.074 ± 0.008	0.311 ± 0.014
30	0.073 ± 0.008	0.227 ± 0.011	0.073 ± 0.009	0.314 ± 0.014
60	0.074 ± 0.011	0.231 ± 0.016 **	0.074 ± 0.007	0.316 ± 0.014 *
120	0.075 ± 0.010	0.236 ± 0.016 **	0.074 ± 0.009	0.322 ± 0.017 *
180	0.075 ± 0.008	0.242 ± 0.014 **	0.076 ± 0.008	0.328 ± 0.017 *
240	0.075 ± 0.010	0.246 ± 0.016 **	0.075 ± 0.009	0.333 ± 0.019 *
300	0.076 ± 0.010	0.246 ± 0.014 **	0.076 ± 0.010	0.331 ± 0.016 *
360	0.077 ± 0.009	0.244 ± 0.015 *	0.075 ± 0.009	0.332 ± 0.018 *

注: * 表示与 0 min 比较, $P < 0.05$, ** 表示与 0 min 比较, $P < 0.01$ 。
Note. Compared with 0 min, * means $P < 0.05$ and ** means $P < 0.01$.

表 3 清醒 Beagle 犬心率呼吸血压($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab.3 Heart rate, respiratory rate and mean blood pressure of 3 conscious Beagle dogs

时间点	心率	呼吸频率	平均压
Time points	Heart rate (bpm)	Respiratory rate (bpm)	Mean blood pressure (mmHg)
9:00 ~ 10:00	87.3 ± 6.0 ^{ab}	24.0 ± 2.9	109.9 ± 11.9
10:00 ~ 11:00	90.2 ± 7.7 ^a	23.5 ± 2.1	115.6 ± 12.6
11:00 ~ 12:00	87.6 ± 9.6 ^{ab}	23.5 ± 3.3	112.6 ± 16.0
13:00 ~ 14:00	73.7 ± 8.8 ^{ab}	23.4 ± 4.0	109.5 ± 10.2
14:00 ~ 15:00	72.8 ± 17.7 ^{ab}	19.8 ± 2.9	114.6 ± 6.7
17:00 ~ 18:00	71.5 ± 5.6 ^{ab}	19.0 ± 3.1	112.8 ± 6.3
22:00 ~ 23:00	78.3 ± 8.3 ^{ab}	17.8 ± 4.9	96.9 ± 4.8
1:00 ~ 2:00	78.8 ± 17.5 ^{ab}	19.4 ± 4.2	102.2 ± 4.1
5:00 ~ 6:00	68.6 ± 3.7 ^b	18.2 ± 4.1	111.6 ± 12.1

注: 具有同样字母角标表示差异无显著性 ($P \geq 0.05$), 不同角标表示差异有显著性 ($P < 0.05$)。
Note. The same letter superscripts mean no significant difference ($P \geq 0.05$), different letter superscripts mean significant difference ($P < 0.05$).

表 4 清醒 Beagle 犬心电图指标($\bar{x} \pm s, n=3$)
Tab.4 Cardiographic parameters of 3 conscious Beagle dogs

时间点 Time points	QRS 段 QRS (s)	QT 间期 QT (s)	QTcf 间期 QTcf 间期 (s)	ST 段 ST (s)
9:00 ~ 10:00	0.057 ± 0.014	0.230 ± 0.018	0.261 ± 0.026 ^{ab}	0.191 ± 0.011
10:00 ~ 11:00	0.057 ± 0.005	0.233 ± 0.006	0.266 ± 0.009 ^a	0.192 ± 0.007
11:00 ~ 12:00	0.055 ± 0.002	0.231 ± 0.010	0.262 ± 0.006 ^{ab}	0.193 ± 0.019
13:00 ~ 14:00	0.055 ± 0.001	0.239 ± 0.006	0.255 ± 0.017 ^{ab}	0.199 ± 0.009
14:00 ~ 15:00	0.057 ± 0.006	0.232 ± 0.010	0.246 ± 0.009 ^{ab}	0.190 ± 0.011
17:00 ~ 18:00	0.049 ± 0.003	0.243 ± 0.014	0.257 ± 0.008 ^{ab}	0.200 ± 0.011
22:00 ~ 23:00	0.054 ± 0.010	0.239 ± 0.002	0.261 ± 0.007 ^{ab}	0.196 ± 0.005
1:00 ~ 2:00	0.055 ± 0.004	0.241 ± 0.009	0.263 ± 0.012 ^{ab}	0.198 ± 0.008
5:00 ~ 6:00	0.051 ± 0.004	0.227 ± 0.018	0.237 ± 0.020 ^b	0.191 ± 0.017

注: 具有同样字母角标表示差异无显著性($P \geq 0.05$), 不同角标表示差异有显著性($P < 0.05$)。
Note. The same letter superscript means no significant difference ($P \geq 0.05$), different letter superscript means significant difference ($P < 0.05$).

表 5 麻醉动物和清醒动物的生理指标对比($\bar{x} \pm s, n=9$)
Tab.5 Comparison of physiological parameters in anesthetized and conscious Beagle dogs

时间点 Time points	心率 Heart rate (bpm)	呼吸频率 Respiratory rate (bpm)	平均压 Mean blood pressure (mmHg)	QRS 段 QRS (s)	QT 间期 QT (s)	QTcf 间期 QTcf (s)
麻醉 Anesthetized	159.5 ± 17.2 ^a	14.9 ± 9.8 ^b	122.3 ± 4.5 ^a	0.073 ± 0.004 ^a	0.226 ± 0.009 ^b	0.310 ± 0.009 ^a
上午 Morning	88.4 ± 0.9 ^b	23.7 ± 3.3 ^a	112.7 ± 11.9 ^b	0.056 ± 0.043 ^b	0.231 ± 0.003 ^{ab}	0.263 ± 0.014 ^b
下午 Afternoon	72.7 ± 10.3 ^c	20.7 ± 3.5 ^{ab}	112.3 ± 7.2 ^b	0.054 ± 0.005 ^b	0.238 ± 0.010 ^a	0.253 ± 0.012 ^b
夜间 Night	75.2 ± 11.0 ^c	18.5 ± 3.9 ^{ab}	103.6 ± 9.4 ^c	0.054 ± 0.006 ^b	0.236 ± 0.012 ^{ab}	0.254 ± 0.017 ^b

注: 具有同样字母角标表示差异无显著性($P \geq 0.05$), 不同角标表示差异有显著性($P < 0.05$)。
Note. The same letter superscript means no significant difference ($P \geq 0.05$), different letter superscripts means significant difference ($P < 0.05$).

表 6 采食前后动物的生理指标对比($\bar{x} \pm s, n=6$)
Tab.6 Comparison of physiological parameters in the dogs before and after feeding

时间点 Time points	心率 Heart rate (bpm)	呼吸频率 Respiratory rate (bpm)	平均压 Mean blood pressure (mmHg)	QRS 段 QRS (s)	QT 间期 QT (s)	QTcf 间期 QTcf (s)
采食前 Before	70.7 ± 11.7	19.0 ± 3.3	113.1 ± 8.9	0.054 ± 0.006	0.229 ± 0.013	0.248 ± 0.019
采食后 After	108.9 ± 18.6 [*]	20.7 ± 2.9	109.8 ± 5.6	0.055 ± 0.007	0.219 ± 0.017	0.294 ± 0.022 ^{**}

注: * 表示与采食前比较, $P < 0.05$, ** 表示与采食前比较, $P < 0.01$ 。
Note. Compared with that before feeding, * means $P < 0.05$ and ** means $P < 0.01$.

2.3 麻醉动物和不同时间段的清醒动物对比

考虑到随麻醉维持时间延长动物的生理指标会出现的变化,取 3 只雄性麻醉动物 0、5、15 min 的数据作为麻醉动物数据。

因正常动物全天的生理指标存在生物节律,故将清醒动物数据按照上午(7:00 ~ 12:00)、下午(13:00 ~ 18:00)、夜间(22:00 ~ 6:00)统计,与麻醉动物比较,结果见表 5。

对比清醒状态,麻醉状态的动物心率显著升高,血压显著升高, QRS 段和 QTcf 间期显著延长,呼吸频率有所降低。

对于清醒动物,上午的心率、呼吸频率和血压最高,心率较下午、夜间显著升高,夜间的血压显著低于白天。

2.4 动物采食前后比较

采用清醒动物进行安全药理实验时,可避免绝大多数人为干扰,但动物仍需定时饲喂,本实验考察了动物在采食前后的生理指征变化。

动物分别在 8:00 和 16:00 进行喂食,将其 8:30 ~ 9:00 以及 16:30 ~ 17:00 的生理数据视为采食后,5:00 ~ 6:00 以及 14:00 ~ 15:00 视为采食,结果见表 6。

采食后动物心率显著升高,QTcf 间期极显著延长。

3 讨论

3.1 传统的安全药理实验方法

传统安全药理研究方法中药物对 Beagle 犬的呼吸、心血管系统的影响常采用气体麻醉的动物进行,其呼吸、心血管系统的指标与麻醉密切相关,且动物保定、手术引起的创伤应激和其它实验条件也可致动物生理指征变化。本实验模拟麻醉动物的安全药理实验方法,记录分析麻醉稳定 6 h 的 Beagle 犬的生理信号。

与麻醉稳定 0 min 相比,随麻醉维持时间的延长,动物的呼吸、心率和血压有降低趋势,且在部分时间点有显著降低,与王青秀等^[10]的研究相符。随麻醉时间延长,QT 间期和 QTcf 间期有延长趋势,且在大多数时间点发生显著延长。异氟烷麻醉会造成动物不同程度的呼吸抑制,有减弱心脏收缩力的副作用,通过抑制心肌或(和)扩张血管,引起不同程度的动脉血压下降,并可通过直接作用于心肌细胞及通过神经体液因素间接影响心肌^[11]。另外,动物在麻醉维持过程中,因能量消耗未能及时补充也会导致机体变化。证明传统安全药理实验方法会对动物的呼吸、心血管系统指标等产生不同程度的影响,影响实验研究结果。

3.2 清醒动物

现行指导原则建议采用清醒动物进行安全药理实验,在本实验室条件下,通过外科手术,在 Beagle 犬体内埋植 D70-PCTR 遥测植入子,待动物恢复,以 DSI 遥测生理信号采集系统连续记录并分析 Beagle 犬 24 h 的生理信号。

动物房采用 12 h(7:00~19:00)的照明,清醒动物心率为 68.6~90.2 bpm,呼吸频率为 17.8~24.0 bpm,平均动脉压为 96.9~115.6 mmHg,其全天的心率、呼吸频率、血压存在一定波动,呈现出“白天高、夜间低”的趋势,但除心率、QTcf 间期在 10:00~11:00 较 5:00~6:00 有明显升高外,其它指标的变化均无统计学意义。上午的心率、呼吸频率和血压最高,心率较下午、夜间显著升高,白天的血压较夜间显著升高。全天的基础数据和呈现出的生物节律与李娜等^[12]的研究相符。

动物在笼中进行数据采集,数据采集期间禁止除饲养员外所有人员进出动物房,且采集点避开了

饲喂后 60 min 内的时间,消除了人为影响和动物采食的影响。证明全天的动物状况相对稳定,干扰因素较少且容易控制,同时也能体现出类似人体昼夜节律的生物节律^[13],证明所得数据的客观有效。通过遥测技术采用清醒动物进行安全药理实验可以排除干扰,减小误差,利于客观反映实验结果。

在使用遥测方法进行的安全药理研究中,可采用拉丁方设计方法,能减少使用动物数量,且试验精确性比传统的随机单位组高,试验结果分析简便^[14]。

3.3 麻醉动物和清醒动物对比

为规避麻醉时间延长对动物造成的影响,本实验取动物麻醉稳定 0~15 min 的生理指标与清醒动物上午、下午和夜间进行对比,可以看出对比清醒状态,麻醉状态的动物心率、血压显著升高,QRS 段、QTcf 间期明显延长,呼吸较上午时显著降低。

动物在丙泊酚诱导麻醉后采用异氟烷(0.5%~1.5%)进行维持麻醉,麻醉水平处在浅麻醉和适度麻醉之间,符合呼吸 12~20 次,心率大于 90 次/min 的特征^[15],其呼吸频率低于清醒动物,血压和心率显著高于清醒动物,其血压升高、呼吸频率降低的结果与王青秀等^[10]的研究相符。QTcf 间期较清醒动物显著延长,证明对比清醒状态,麻醉动物的多项生理指征均出现不同程度的变化,在安全药理研究中,这些因麻醉引起的变化都可能掩盖所评价药物的效果或毒性。

3.4 动物采食影响

对比采食前,动物采食后代谢增加,因此心率显著升高,QTcf 间期极显著延长。实际应用中,动物采食后一定时间段(本实验为 60 min)的数据需要摒弃,减少其对实验结果的干扰。有研究表明,定时饲喂的 Beagle 犬在饲喂前 5 min 心率以及血流动力学指标迅速上升^[16],且动物在饲喂过程中同样呈现较高的兴奋状态。结合本实验结果,在使用遥测方法进行安全药理实验时,数据采集应尽量避免饲喂前后的时间。

4 结论

传统安全药理实验方法中,动物生理指征会因麻醉出现较大变化,且随麻醉维持时间延长有一定波动,会产生系统误差,其实验结果不能完全反映所评价药物的情况。采用遥测技术开展安全药理实验,使用清醒动物,减少了因实验条件产生的系

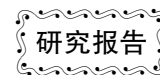
统误差,并采用拉丁方设计实验方案,不同组别同时给药,降低了实验操作过程中的随机误差,可更客观真实的反映所评价药物的情况。

使用遥测方法进行安全药理研究时,除需消除人为干扰外,数据采集时还应避开饲喂前后的时间。进行数据分析时,还需考虑因生物节律导致的全天生理指标变化。

参考文献:

- [1] 《中药、天然药物和化学药物研究技术指导原则》课题组. 中药、天然药物和化学药物研究技术指导原则 [S]. 国家食品药品监督管理局, 2014:1.
- [2] ICH Guidance for Industry ICH S7A; Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals [S]:3. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7A/Step4/S7A_Guideline.pdf. 2000. 2015. 09. 01.
- [3] ICH. ICH Guidance for Industry ICH S7B; Safety Pharmacology Studies for Assessing the Potential for Delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals [S]:5. http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S7B/Step4/S7B_Guideline.pdf. 2005. 2015. 09. 01.
- [4] 阳海鹰, 王青秀, 刘雁, 等. 双压力导管植入体比格犬体内植入手术的实施及在安全药理学研究中的应用 [J]. 军事医学, 2011, 35(6): 465-468.
- [5] 李娜, 丁双双, 王文誉, 等. 比格犬生理遥测系统的建立 [J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2011, 29(1): 16-21.
- [6] 孙伟, 安田仁, 杨小平. 食蟹猴无线遥测系统的方法的建立和技术要点 [A]. 首届中国药物毒理学会(2011 年)暨国际药物非临床安全性评价研究论坛论文集 [C]. 2011: 190-191.
- [7] 陈亮, 潘永明, 朱科燕, 等. 基于遥测技术对巴马小型猪部分生理指标的观测 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(7): 30-36.
- [8] 张颖丽, 孙立, 王三龙, 等. 清醒 Beagle 犬口服 BTA 心血管遥测安全药理研究 [J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(3): 607.
- [9] 刘雁. FOB 和植入式遥测系统的建立与应用 [D]. 北京: 中国人民解放军军事医学科学院, 2011: 110-114.
- [10] 王青秀, 刘雁, 王国强, 等. Beagle 犬在清醒遥测、麻醉和束缚状态下的生物学特性比较浅析 [A]. 中国毒理学会第三届中青年学者科技论坛暨 2011 年全国前列腺病理毒理学研讨会论文摘要 [C], 2011: 131.
- [11] 王洪斌. 现代兽医麻醉学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 73-78.
- [12] 李娜, 王文誉, 奚剑飞. 生物遥测法检测清醒状态下 Beagle 犬的心电生理特性 [A]. 第九届中国实验动物科学年会论文集 [C]. 2010: 396-402.
- [13] 赵瑛. 人体昼夜节律和健康 [J]. 生物学通报, 1999, 34(8): 18-20.
- [14] 车爱萍. HR0905、普拉格雷与盐酸普拉格雷安全药理学研究及遥测系统验证 [D]. 上海: 第二军医大学, 2011: 85.
- [15] 李林, 赵玉军(译). 小动物外科手术护理技术与概念 [M]. 沈阳: 辽宁科学技术出版社, 2010: 106.
- [16] Nakagawa K, Miyagawa Y, Takemura N, et al. Effect of diet on the cardiovascular system in healthy beagle dogs [J]. J Vet Med Sci, 2010, 72(5): 615-619.

[修回日期]2016-03-30



金属硫蛋白表达在 C57BL/6J 小鼠 肝细胞癌发生中的变化及意义

易 旭¹, 龙 黎², 程明亮²

(1. 贵阳中医学院第二附属医院中心实验室, 贵州 贵阳 550002; 2. 贵州医科大学附属医院感染科, 贵州 贵阳 550004)

【摘要】 目的 了解金属硫蛋白(MTs)基因表达水平在小鼠肝细胞癌(HCC)发生过程中的动态变化及其规律,探讨 MTs 在 HCC 发生中的重要意义。**方法** 将 125 只 5~8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠随机分为正常对照组和 HCC 模型组。模型组小鼠于第 1、2 周分别腹腔注射一次二乙基亚硝胺(100 mg/kg, 50 mg/kg),第 3 周起灌胃给予乙醇(53%, 5 mL/kg, 5 d/周),直至 35 周;正常组始终给予等量灭菌自来水灌胃。分别于实验 1、3、9、13、24 及 35 周末处死小鼠,收集肝组织样本并计算肝脏指数。采用组织病理学 HE、Masson 及网状纤维染色检测肝组织损伤及 HCC 发生情况,采用酶联免疫吸附法检测肝组织匀浆丙二醛(MDA)的活性;采用实时荧光定量 PCR 分析 MTs 转录水平。**结果** 模型组小鼠可见进行性的肝脏病变,35 周末时,肝脏质地显著变硬,表面可见大小不等结节形成,约 50% 小鼠可见肝细胞异常核分裂像和异常的肝板结构等 HCC 发生病理改变,具有显著增加的肝脏指数;不同时段均表现出增加的 MDA 活性;实验 13 周前各时段具有显著增加的 MTs mRNA 水平,24 周后可见 III 级纤维化形成,且 MTs mRNA 水平显著下降,甚至低于正常水平。**结论** 小鼠肝组织 MTs mRNA 水平从损伤初期的显著增加直至显著纤维化后的低表达变化,表明 MTs 表达下调与 HCC 发生有关。

【关键词】 肝细胞癌;金属硫蛋白;基因表达;小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0053-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 08. 008

Changes and significance of metallothionein expression during hepatocarcinogenesis in C57BL/6J mice

YI Xu¹, LONG Li², CHENG Ming-liang²

(1. Central Laboratory, Second Hospital Affiliated to Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China;
2. Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China)

【Abstract】 Objective To investigate the dynamic changes of metallothionein(MTs) gene expression and explore the important significance of MTs during hepatocarcinogenesis. **Methods** One hundred and twenty-five SPF 5-8-week old male C57BL/6J mice were randomly divided into control group and model group. Diethylnitrosamine (DEN) was given to the mice at a dose of 100 mg/kg, ip, and 50 mg/kg, ip, in the first and next week, respectively. The mice were given ethanol (53%, 5 mL/kg/day, 5 days/week) from the third week of experiment till 35 weeks. At 1, 3, 9, 13, 24 and 35 weeks of the experiment, liver samples were taken for histopathological examination of liver damages and incidence of HCC. The liver index and malondialdehyde (MDA) of liver homogenate were determined. All liver tissue samples were examined by histopathology using hematoxylin and eosin (HE), Masson and reticular fiber staining. Real-time RT-PCR was used to analyze the mRNA expression level of liver metallothionein-1/2 (MT-1/2) in different periods. **Results** Progressive liver

[基金项目] 国家重点基础研究发展计划(973 计划前期专项)(2011CB512114)。

[作者简介] 易旭(1976-),女,研究方向:肝病的基础研究。E-mail: yixu2013@yeah.net。

[通讯作者] 程明亮(1956-),男,研究方向:肝病的防治基础与临床研究,E-mail: mlcheng@yeah.net。

damages in model group mice were identified in different periods. Hepatocytes abnormal tission and abnormal liver plate structure, architecture often characteristic of HCC could be seen in approximately 50% of mice at 35 weeks. In addition to these, a higher liver index also were seen at 35 weeks. Increased MDA levels in the mouse liver tissues were observed in each stage. Real-time RT-PCR analysis showed that significantly increased transcription of MT-1 and MT-2 at 1, 3 and 9 weeks, then gradually declined and even below the normal level. **Conclusions** MTs gene expression levels in mouse liver tissues are changed from significantly increased in the early stage of injury to decreased expression combined with distinct fibrosis. Our findings further demonstrate that the down-regulation of MTs level is closely correlated with hepatocarcinogenesis.

【Key words】 Hepatocellular carcinoma; Carcinogenesis; Metallothionein; Gene expression; Mice

金属硫蛋白 (metallothioneins, MTs) 是一小分子、富含半胱氨酸的重金属结合蛋白,其抗氧化能力在动脉粥样硬化、心肌保护、脑缺血再灌注损伤及肝毒性等多种生理及病理过程中具有重要意义^[1-3]。研究认为,MTs 在包括上皮及叶间来源的多种肿瘤中呈现上调表达,且与肿瘤的侵袭能力及较差的预后密切相关,但在胃肠道肿瘤和肝细胞癌 (HCC) 中的研究数据却得出相反的结论,即具有下调的,甚至低于正常水平的 MTs 水平^[4-6]。由于大量研究表明了氧化应激和 HCC 恶性转化的相关性^[7],因此,为了进一步明确肝脏 MTs 这一重要抗氧化剂的表达水平与 HCC 发生的关系,本文参考文献[8],以遗传毒物二乙基亚硝胺为引发剂,乙醇为促进剂制备 C57BL/6J 雄性小鼠 HCC 发生模型,在不同处理时段动态检测肝组织 MTs 基因表达水平,探讨其变化规律,以期 HCC 的防治提供有意义的实验室依据。现报告如下:

1 材料和方法

1.1 实验动物

选择 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 125 只,5~8 周,体重(21 ± 2)g,由北京华阜康生物科技股份有限公司提供(动物质量许可证号:SCXK(京)2009-0004)。饲养于贵州医科大学实验动物中心带有 IVC 系统的饲养房内,使用许可证号为 SYXK(黔)2012-0001,SPF 级小鼠用饲料喂养,自由饮用灭菌自来水,恒温($20 \sim 23$)℃。

1.2 试剂

二乙基亚硝胺 (diethylnitrosamine, 美国 Sigma, N0756);无水乙醇(20110714,国药集团化学试剂有限公司,分析纯 AR);丙二醛 ELISA 试剂盒 (JK10167,美国 BD);离心柱型总 RNA 提取试剂盒 (L1126,北京天根);离心柱型 RNA 纯化试剂盒 (K0011,北京天根);逆转录试剂盒 (00135397,美国

Thermo Scientific); $2 \times$ SYBR Green Mix (1210,美国 Biomiga); β -actin、MT-1 及 MT-2 引物由上海基康生物技术有限公司合成;

1.3 实验动物分组及处理

健康雄性 C57BL/6J 小鼠 125 只,适应性喂养 7 d 后,将小鼠随机分成正常对照组 (60 只) 和模型组 (65 只)。模型组小鼠于实验第 1、2 周分别腹腔注射一次二乙基亚硝胺 (100 mg/kg, 50 mg/kg),第 3 周起灌胃给予乙醇 (53%, 5 mL/kg, 5 d/周),直至 35 周。正常对照组小鼠始终灌胃给予灭菌自来水。

1.4 检测指标和检测方法

1.4.1 标本采集与组织病理学检测:小鼠经戊巴比妥钠麻醉后,分别于实验 1、3、9、13、24 及 35 周末观察、收集肝组织样本并计算肝脏指数(肝脏指数 = 肝脏湿重/体重 $\times 100\%$);病理学检测用肝组织置于 4% 中性甲醛内固定 24~48 h 后,常规石蜡包埋,制成 4 μ m 切片,行 HE、Masson 及网状纤维染色,镜下观察肝组织病理学变化(HCC 发生组织学判断以国际癌症研究机构出版的啮齿类动物肿瘤标准进行^[9],由贵州医科大学病理学教研室协助完成)。

1.4.2 肝组织匀浆丙二醛的含量 (nmol/mg) 测定:分别制备各阶段两组小鼠肝组织混合样本 0.5~0.8 g,置于预冷的 1 mL 生理盐水中,玻璃匀浆器手工匀浆,4 000 r/min,离心 10~15 min,取上清液,稀释 100 倍后参考试剂盒说明书以双抗体夹心法检测匀浆中丙二醛的活性。

1.4.3 肝组织 MT-1、MT-2 基因 mRNA 水平:提取、纯化各时段小鼠肝组织总 RNA,运用变性琼脂糖凝胶电泳和紫外吸收测定法对 RNA 质量进行检测;以 1 μ g 总 RNA 于 10 μ L 逆转录体系中进行逆转录;cDNA 产物 4 倍稀释后进行实时荧光定量 PCR 检测,设置实时定量 PCR 程序:50℃ 2 min (1 个循环),95℃ 10 min (1 个循环),95℃ 15 s,60℃ 1 min (40 个循环)。目的基因 Ct 值经同一样本的

内参基因校正后计算各组间每个基因的^{ΔΔ}Ct,通过 2^{-^{ΔΔ}Ct}计算组间对应基因的表达差异。β-actin、MT-1 及 MT-2 基因引物序列如下: MT-1 F5'-AATGTGCCAGGGCTGTGT-3', R5'- GCTGGGTTGGTCCGATACTATT-3'; MT-2 F5'-TGTGCCTCCGATGGATCCT-3', R5'-GCAGCCCTGGGAGCACTT-3'; β-actin F 5'-GGCCAACCGTGAAAAGATGA-3', R5'- CAGCCTGGATGGCTACGTACA-3'。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行数据处理,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间不同时段数据的比较采用重复测量的方差分析,以 $P < 0.05$ 显示差异具有显著性。

2 结果

2.1 小鼠肝脏解剖与镜下病理学观察

35 周后,正常组小鼠无肉眼可见的病理改变。模型组小鼠肝脏外观呈黄褐色,肿胀、质地变硬且

表面形成大小不等结节(最大直径可达到 0.5 ~ 1.0 cm)(图 1)。运用 H&E、Masson 和网状纤维染色镜检发现,实验 1 周后,肝细胞明显水肿,3 周后可见较多点灶状坏死,炎性细胞浸润(图 2 A,B);9 周后可见肝细胞气球样变、脂肪变性,部分肝组织可见轻度(I 级)的纤维化形成(图 2 C);13 周后可见明显的碎片状坏死,II 级纤维化形成(图 2 D);24 周时见显著的桥接坏死、亚大块坏死与密集的非典型增生,III 级纤维化形成(图 2 E);35 周末可见异常核分裂像、异常的肝板结构(肝板数量增加 ≥ 3 层)等肝细胞癌病理改变,伴有大量炎性细胞浸润、纤维间隔及假小叶形成(图 2 F)。

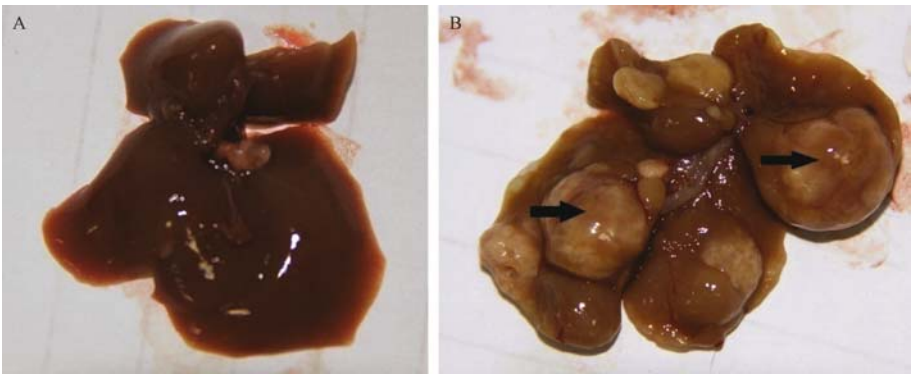
2.2 肝脏指数及肝组织匀浆 MDA 水平

处理 35 周后,与正常组比较,模型组小鼠肝脏显示显著增加的肝脏指数($P < 0.01$);在观察的 6 个时段,模型组均呈现比正常组显著增加的肝组织 MDA 水平($P < 0.01$)(表 1)。

表 1 不同时段肝组织匀浆 MDA 含量及肝脏指数($\bar{x} \pm s$)
Tab.1 MDA in the liver homogenate and the liver index at different periods

时间(周)Weeks	小鼠数量(只) Total number of mice		正常组 Control group		模型组 Model group	
	正常组 Control group	模型组 Model group	丙二醛 MDA nmol/mg	肝脏指数 Liver index	丙二醛 MDA nmol/mg	肝脏指数 Liver index
1	10	10	8.12 ± 0.33	4.72 ± 0.40	12.69 ± 0.10 ^a	4.33 ± 0.17
3	10	10	7.61 ± 0.22	4.41 ± 0.53	13.32 ± 0.10 ^a	4.0 ± 0.40
9	10	10	7.63 ± 0.14	5.67 ± 0.78	14.76 ± 0.28 ^a	4.67 ± 0.48
13	10	10	7.84 ± 0.41	4.23 ± 0.36	15.42 ± 0.50 ^a	5.06 ± 0.20
24	10	10	8.13 ± 0.21	4.46 ± 0.42	15.16 ± 0.30 ^a	6.53 ± 0.85
35	10	15	7.93 ± 0.13	4.77 ± 0.71	15.82 ± 0.54 ^a	9.14 ± 1.80 ^a

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$ 。
Note. ^a $P < 0.01$, compared with the control group.

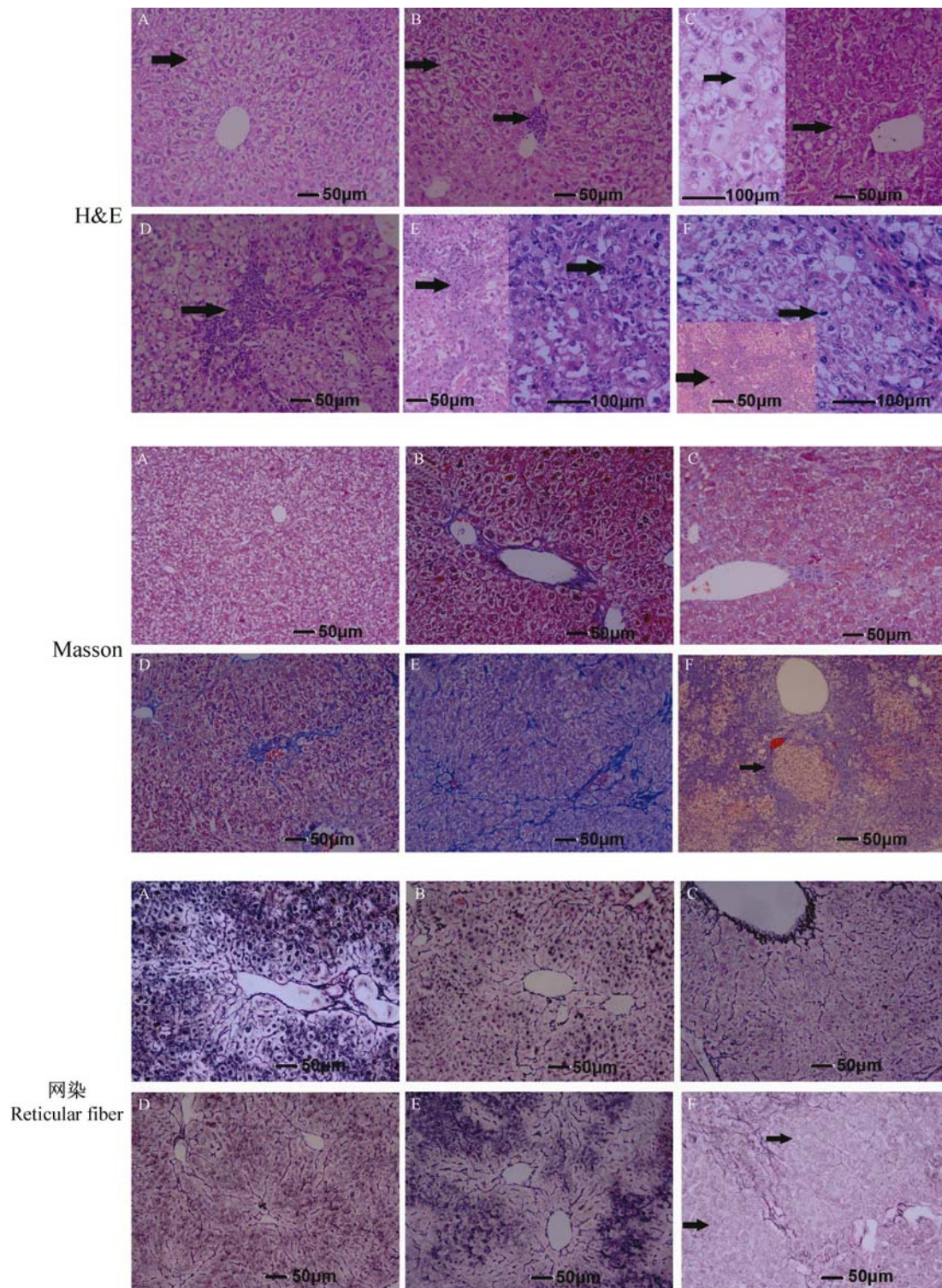


注: A: 正常组; B: 模型组

图 1 35 周末正常组与模型组小鼠肝脏大体观(箭头示肿瘤结节)

Note. A: Control group; B: Model group

Fig.1 Representative images of the mouse livers at 35-week (arrows indicate the tumor nodules)



注: A、B、C、D、E、F、分别为处理 1、3、9、13、24 及 35 周末时肝组织镜下观(箭头示肝组织病理改变)。

图 2 不同时段小鼠肝组织 H&E、Masson 及网状纤维染色镜下观(标尺 = 100 µm/50 µm)

Note. A-F: Light microscopy of mice liver at 1, 3, 9, 13, 24 and 35 weeks, respectively (arrows indicate the pathological changes of liver).

Fig. 2 Pathological changes of the liver in mice. H&E, Masson and reticular fiber staining. (Bar = 100 µm/50 µm)

2.3 肝组织 MT-1、MT-2 mRNA 水平

正常组小鼠在不同时段间具有相似的肝组织 MT-1 或 MT-2 mRNA 表达水平;实验 1、3、9 及 13 周

末,模型组小鼠均显示比正常组显著增加的 MT-1 mRNA 表达水平($P < 0.01$),且随病程进展逐渐降低;实验 24 及 35 周末,模型组小鼠肝组织 MT-1 的

表 2 不同时段小鼠肝组织 MT-1、MT-2 mRNA 表达水平分析
Tab. 2 Analysis of MT-1/MT-2 mRNA levels in the mouse liver at different periods

时间(周) Weeks	小鼠数量(只) Total number of he mice		正常组 Control group		模型组 Model group	
	正常组 Control group	模型组 Model group	MT-1	MT-2	MT-1	MT-2
1	10	10	0.15 ± 0.05	0.12 ± 0	5.70 ± 0.07 ^a	1.76 ± 0.07 ^a
3	10	10	0.11 ± 0	0.09 ± 0	1.50 ± 0.04 ^a	1.28 ± 0.02 ^a
9	10	10	0.12 ± 0	0.11 ± 0	0.98 ± 0.02 ^a	0.68 ± 0.04 ^a
13	10	10	0.11 ± 0	0.13 ± 0	0.57 ± 0.02 ^a	0.17 ± 0.01
24	10	10	0.11 ± 0	0.11 ± 0	0.02 ± 0 ^a	0.01 ± 0 ^a
35	10	15	0.12 ± 0	0.1 ± 0	0.01 ± 0 ^a	0.01 ± 0 ^a

注:与正常组比较,^a $P < 0.01$

Note. ^a $P < 0.01$, compared with the control group.

mRNA 水平均显著低于正常组小鼠($P < 0.01$);MT-2 mRNA 表达水平于实验 13 周末时与正常组相似,24 周后也显著低于正常组小鼠(表 2)。

3 讨论

肝细胞癌(HCC)是世界范围内第 5 位最常见和第 3 位引起癌症相关死亡的恶性肿瘤,治疗选择非常局限^[10]。许多研究证实了人类多种肿瘤中同时具有增加的 MTs 表达,如乳腺癌、肾癌、肺癌、鼻咽癌、卵巢癌、前列腺癌、唾液腺癌、睾丸癌和膀胱癌等^[6],但也发现 MTs 的表达并不常见于所有人类肿瘤,如 HCC^[3,4]。运用 DEN 诱导的 C57BL/6J 小鼠 HCC 模型,Jharna D 等^[5]发现 MT 的表达在 HCC 组织中显著减少甚至缺乏,一致地,运用 HCC 临床样本,发现癌组织中 MT 表达亦显著低于相应的邻近正常肝组织。Park Y 等^[11]也发现,MT-1、MT-2 人 HCC 癌组织细胞核和细胞质 MT-1、MT-2 表达的丢失比邻近癌旁组织显著,多元变量分析揭示 MT-1、MT-2 表达的减弱是无复发生存和总生存率的独立预后不良因素。研究表明^[12],MTs 敲除鼠(MTKO 鼠)显示了更高的超氧化物阴离子水平,MTs 的缺失通过活化 NF- κ B 靶基因促进 DEN 诱导的肝癌形成。上述研究结果均提示 MTs 下调可能与肝癌的发生密切相关,因此,有必要了解 HCC 发生过程中 MTs 表达水平的变化,进一步证实其与 HCC 发生的相关性。基于上述研究设想,本文通过制备 HCC 发生动态小鼠动物模型,了解了不同时段肝组织 MTs 基因的转录水平。

基于酒精相关性肝癌形成的机制及 HCC 化学诱导模型制备的原理,本文参考文献方法^[8],采用化学诱导二步法制备小鼠 HCC 发生模型,以遗传毒物二乙基亚硝胺(DEN)为引发剂,乙醇为促进剂。该诱导方法的优势在于对肝脏的损伤-纤维化-恶性

转变周期同人类 HCC 的发生高度相似^[13]。研究表明,HCC 的发生除与诱导剂及浓度有关外,还与性别、年龄和鼠种类有关^[5]。Brandon-Warner 等研究了乙醇对 HCC 发生的影响,发现慢性乙醇喂养能协同 DEN 明显增加雄性小鼠肿瘤的发生^[14]。基于上述研究背景,本文选择雄性 C57BL/6J 小鼠作为实验用动物。结果发现,乙醇 + DEN 处理 35 周,显著诱导了小鼠肉眼可见的肝脏病变及镜下进行性的肝脏损伤、癌前病变甚至典型的 HCC 发生等病理改变;同时,通过对不同时段肝组织脂质过氧化物的检测也揭示了模型组小鼠始终增加的肝脏丙二醛含量。

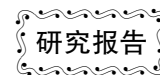
基于氧化应激在 DEN 及酒精相关性肝细胞癌形成中的重要作用,以及过多自由基形成和 MTs 缺失或减弱促进肝癌形成的理论基础^[7,15,16],从抗氧化应激角度探讨 MTs 水平动态变化与 HCC 发生的相关性具有重要的毒理学与临床意义。在哺乳动物中,MTs 包括 4 种亚型(MT1-MT4),其中 MT-1 和 MT-2 几乎存在于所有类型软组织,能够被多种刺激,包括金属离子、细胞因子、生长因子和氧化应激等活化,呈数倍增加,从而保护细胞抗细胞毒性、辐射和 DNA 损伤^[17,18]。Klaassen 等^[19]认为,肝脏 MTs 的诱导是一影响对肝脏毒性结果发生发展的重要适应性机制。运用 MTs 过表达的转染鼠或 MTs 裸鼠的研究也强有力地显示了不同氧化应激条件下 MTs 的抗氧化损伤保护,如阿霉素心脏毒性、缺血-再灌注、糖尿病和酒精消费等^[1]。本文对不同时段小鼠肝组织 MT-1、MT-2 基因转录水平的分析发现,在诱导早期,即出现肝细胞坏死、急性炎症病理表现时,小鼠产生非常显著的 MTs 转录水平,尤其 MT-1。随着诱导的进行,肝脏出现中重度纤维化,此时肝组织 MTs 表达水平亦显著下降,甚至低于正常水平。结果显示小鼠肝组织 MTs 基因表达水平

呈现一定的变化与规律性,总的趋势表现为与肝脏损伤程度呈负相关,即从损伤初期的显著增加直至纤维化形成后的低表达。表明随着肝脏损伤因素的持续,肝组织应激性增加 MTs 转录的能力逐渐减弱甚至丧失,从而失去了其对肝脏损伤的保护。因此,本文结果进一步提示 MTs 在不同病理时段的表达差异性表明了其在肝细胞恶性转化中的潜在作用。由于大量的研究认为增加抗氧化剂的运用可降低癌症的发生率^[20],故设想若早期刺激肝组织中 MTs 合成或外源补充 MTs 也许是阻止 HCC 发生发展的一个重要策略。综合目前国内外的研究,尚未有关不同病因所致 HCC 过程中 MT 表达情况的报道,因此,本文也是首先初步探讨了 MT 表达动态变化与酒精相关性肝癌发生的相关性,对于其他病因所致的 HCC,尤其是乙型肝炎病毒/丙型肝炎病毒相关性 HCC,其发生过程中 MT 表达的变化将是我们下一步努力探讨的方向。

参考文献:

- [1] Ruttkay-Nedecky B, Nejdil L, Gumulec J, et al. The role of metallothionein in oxidative stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14 (3): 6044 – 6066.
- [2] 朱中生, 王海燕, 王登峰, 等. 金属硫蛋白对 ApoE 基因缺陷小鼠血脂、动脉粥样硬化及主动脉 SR-A I 表达的影响[J]. *山东医药*, 2013, 53(14): 30 – 33.
- [3] 郭家彬, 冯敏, 张丽, 等. 金属硫蛋白在缺血性脑损伤过程中的调控作用 [J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2014, 28 (6): 898 – 903.
- [4] Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogenesis [J]. *Mutat Res*, 2003, 533(1 – 2): 201 – 209.
- [5] Datta J, Majumder S, Kutay H, et al. Metallothionein expression is suppressed in primary human hepatocellular carcinoma and is mediated through inactivation of CCAAT/enhancer binding protein alpha by phosphatidylinositol 3-kinase signaling cascade [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6): 2736 – 2746.
- [6] 鹿晓麟, 姜长杰, 张艳桥. 金属硫蛋白在癌症中的研究进展 [J]. *中国肿瘤*, 2014, 23(3): 218 – 223.
- [7] Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer [J]. *Chem Biol Interact*, 2006, 160(1): 1 – 40.
- [8] Heindryckx F, Colle I, Van Vlierberghe H. Experimental mouse models for hepatocellular carcinoma research [J]. *Int J Exp Pathol*, 2009, 90(4): 367 – 86.
- [9] Mohr U. International Classification of Rodent Tumors Part I — The Rat. 10. Digestive System [M]. In: Mohr U, (ed). IRAC Scientific Publications No. 122. International Agency for Research on Cancer, WHO; Lyon. 1997.
- [10] Kew MC. Hepatocellular carcinoma in developing countries: Prevention, diagnosis and treatment [J]. *World J Hepatol*, 2012, 4(3): 99 – 104.
- [11] Park Y, Yu E. Expression of metallothionein-1 and metallothionein-2 as a prognostic marker in hepatocellular carcinoma [J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(9): 1565 – 1572.
- [12] Chaabane W, User SD, El-Gazzah M, et al. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: Interdependence between those pathways and effects on cancer [J]. *Arch Immunol Ther Exp*, 2013, 61(1): 43 – 58.
- [13] 赵彤, 李柏. 二乙基亚硝胺在小鼠诱发性肝癌模型中的应用 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(1): 76 – 80.
- [14] Brandon-Warner E, Walling TL, Schrum LW, et al. Chronic ethanol feeding accelerates hepatocellular carcinoma progression in a sex-dependent manner in a mouse model of hepatocarcinogenesis [J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2012, 36 (4): 641 – 653.
- [15] Qi Y, Chen X, Chan CY, et al. Two-dimensional differential gel electrophoresis/analysis of diethylnitrosamine induced rat hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Cancer*, 2008, 122(12): 2682 – 2688.
- [16] Majumder S, Roy S, Kaffenberger T, et al. Loss of metallothionein predisposes mice to diethylnitrosamine-induced hepatocarcinogenesis by activating NF-KB target genes [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(24): 10265 – 10276.
- [17] 肖定福, 张彬, 李忠义, 等. 不同应激因子对小鼠肝脏金属硫蛋白诱导合成的影响 [J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17 (2): 90 – 96.
- [18] Thirumoorthy N, Manisenthil Kumar KT, Shyam Sundar A, et al. Metallothionein: An overview [J]. *World J Gastroenterol*, 2007, 13(7): 993 – 996.
- [19] Klaassen CD, Liu J. Induction of metallothionein as an adaptive mechanism affecting the magnitude and progression of toxicological injury [J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106 (1): 297 – 300.
- [20] Seifried HE, McDonald SS, Anderson DE, et al. The antioxidant conundrum in cancer [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(15): 4295 – 4298.

[修回日期]2016 – 03 – 28



尿通卡克乃其片大鼠长期毒性实验的血液指标变化

热比姑丽·伊斯拉木¹, 阿布都吉力力·阿布都艾尼¹, 冷英莉², 王 静²

(1. 新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所, 乌鲁木齐, 新疆 830049; 2. 新疆银朵兰维药股份有限公司, 乌鲁木齐, 新疆 830013)

【摘要】 目的 探讨尿通卡克乃其片大鼠长期毒性试验血液学指标变化。**方法** SD 大鼠 120 只, 雌雄各半, 随机分为对照组, 尿通卡克乃其片低、中、高剂量组。对照组为灌胃给予 0.5% 羧甲基纤维素钠混悬液, 低、中、高剂量组分别灌胃给予尿通卡克乃其片 0.32 g、1.6 g、3.2 g(生药)/kg·d, 每周 6 d, 连续 180 d, 分别观察大鼠在给药 90 d、180 d 及停药后 30 d 一般状况、血液细胞变化、血生化变化、电解质及血凝指标变化。**结果** 在实验期间大鼠未见死亡或无明显毒性反应。与对照组比较, 在实验期间大鼠红细胞计数(RBC)、血红蛋白(HGB)、平均红细胞血红蛋白含量(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、血小板计数(PLT)、白细胞计数(WBC)、淋巴细胞百分含量(LYMP%); 丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、葡萄糖(GLU)、尿素氮(BUN)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)、肌酐(Crea)、总胆固醇(TCHO)、甘油三酯(TG)、肌酸磷酸激酶(CK); 钾离子浓度(K⁺)、钠离子浓度(Na⁺)、氯离子浓度(Cl⁻)、凝血酶原时间(PT), 具有统计学差异($P < 0.05 \sim P < 0.01$), 但未见时间、剂量规律性, 无病理意义。**结论** 0.32 g、1.6 g、3.2 g(生药)/kg·d 剂量下灌胃尿通卡克乃其片原料粉 180 d 对大鼠血液指标无明显异常, 该药在临床剂量下长期使用是安全的。

【关键词】 尿通卡克乃其片; 大鼠; 长期毒性; 血液指标

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0059-07

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.009

A long-term study of the toxicity of an Uyghur medicine, Kursi Kaknaq, on hematological parameters in rats

Rabigul·Islam¹, Abdujilil·abdugheny¹, LENG Ying-li², WANG Jing²

(1. Institute of Xinjiang Traditional Uyghur Medicine, Urumqi 830049, China;

2. Xinjiang Yinduolan Uyghur Medicine Co. Ltd., Urumqi 830013)

【Abstract】Objective To investigate the long-term toxicity of an Uyghur medicine, Kursi Kaknaq, on hematological parameters in the rats. **Methods** A total of 120 healthy Sprague-Dawley rats were randomly divided into the control, low dose (0.32 g/kg·d), moderate dose (1.6 g/kg·d) and high dose (3.2 g/kg·d) Kursi Kaknaq groups. The drug was given orally, 6 days per week for 180 days. The control group was given 0.5% sodium carboxymethyl cellulose suspension. **Results** No death was recorded in the rats and no obvious toxic events were observed during the experiment. Hematological parameters including RBC, HGB, MCH, MCHC, LYMP%, WBC, and PLT; biochemical parameters including ALT, AST, ALP, GLU, BUN, ALB, TBIL, Crea, TCHO, TG, and CK; electrolyte time parameters such as K⁺, Na⁺, Cl⁻ and prothrombin time(PT) showed statistically significant differences ($P < 0.05$ and $P < 0.01$), but did not show time and dose effect regularity, and no pathological significance. **Conclusions** No obvious toxic effects on

[基金项目] 新疆维吾尔自治区专利实施计划项目基金(编号 2009002); 新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市科学技术计划项目基金(编号 C111110002)。

[作者简介] 热比姑丽·伊斯拉木(1970-), 女, 研究方向: 维药药理毒理学研究。E-mail: rabiya272@126.com。

[通讯作者] 冷英莉(1976-), 女, 研究方向: 新药开发。E-mail: 719803232@qq.com。

hematological parameters are observed in the SD rats treated with Kursi Kaknaq at doses of 0.32 g, 1.6 g, or 3.2 g (crude drug)/kg·d orally administered for 180 days, indicating that this drug is safe for long-term clinical use.

【Key words】 Kursi Kaknaq, Uyghur medicine; Rats; Chronic Toxicity, Blood parameters

尿通卡克乃其片是在古代维医秘方的基础上采用现代科学技术研制而成的片剂,由酸浆、黄瓜子、血竭、西黄耆胶、阿拉伯胶、巴旦仁等 10 味维吾尔药材组成,具有镇痛、利尿的功效。临床上用于治疗尿痛、尿不尽、尿血、尿道流脓等^[1]。本文初步探讨尿通卡克乃其片(100% 处方原药粉)的大鼠灌胃长期毒性试验血液学指标变化,对其临床应用安全性进行再评价。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

SD 大鼠 140 只,SPF 级,雌雄各半,体重 60~90 g,由新疆医科大学医学实验动物中心提供,生产许可证号:SCXK(新)2003-0001。实验动物使用许可证号:SYXK(新)2003-0002。动物实验经新疆维吾尔自治区维吾尔医药研究所药物安全性评价中心(GLP)审核,符合动物伦理委员会的管理准则。实验开始前检疫,经一般行为观察,选用符合要求的 120 只大鼠(♀、♂ 各半)进行长期毒性试验。

1.2 仪器与试剂

PM4000/3 全自动生化分析仪,意大利·罗马;BC300 全血细胞分析仪,深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司;HK2003 电解质分析仪,郑州市汇科电子有限公司;SZZ 血凝分析仪,深圳市鹏瑞佳电子有限公司;高速冷冻离心机,TGL-16G,金坛市华峰仪器有限公司。

尿通卡克乃其片(100% 处方原药粉)由新疆华康药业有限责任公司(现新疆银朵兰维药股份有限公司)提供,批号:080601。红细胞计数(RBC)、血红蛋白(HGB)、红细胞容积(HCT)、平均红细胞体积(MCV)、平均红细胞血红蛋白含量(MCH)、平均红细胞血红蛋白浓度(MCHC)、血小板计数(PLT)、白细胞计数(WBC)、淋巴细胞百分含量(LYM%)、中间细胞百分含量(MID%)、粒细胞百分含量(GRA%)、网织红细胞数(Ret);丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、碱性磷酸酶(ALP)、葡萄糖(GLU)、尿素氮(BUN)、总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、总胆红素(TBIL)、肌酐(Crea)、总胆固醇(TCHO)、甘油三酯(TG)、肌酸磷酸激酶(CK);钾离子浓度(K^+)、钠离子浓度

(Na^+)、氯离子浓度(Cl^-)、凝血酶原时间(PT),上述试剂盒均购自中生北控生物科技股份有限公司。

1.3 动物实验^[2-4]

1.3.1 动物分组及给药方法:取 120 只大鼠,雌雄分别按体质量随机分为 4 组,分别为对照组、尿通卡克乃其片(原药粉)低、中、高 3 个剂量组。每组 30 只,雌雄各半。对照组 0.5% CMC-Na 混悬液;尿通卡克乃其片低剂量组为 0.32 g(生药)/kg,中剂量组为 1.6 g(生药)/kg,高剂量组为 3.2 g(生药)/kg(即分别相当于临床成人每日每公斤用的 5、25、50 倍)。本实验采用与临床一致的给药途径,灌胃给药(1 mL/100 g·bw)。每天给药 1 次,每周给药 6 d,连续给药 180 d。分别在给药 90 d 结束时、给药 180 d 结束时和停药 30 d 结束时,每组各处死 10 只(雌雄各半)。

1.3.2 观察指标:

1.3.2.1 一般状况观察:每日观察大鼠一般形态外观、行为活动、饮食情况、分泌物、排泄物等,同时观察动物中毒反应的征象,起始时间,严重程度,持续时间,是否可逆,填写笼旁观察记录表肉眼观察动物。

1.3.2.2 血细胞指标检测:分别在给药 90 d 结束时(处死 40 只,雌雄各半)、给药 180 d 结束时(处死 40 只,雌雄各半)和停药 30 d 结束时(处死 40 只,雌雄各半),检查各组大鼠血细胞指标(RBC、HGB、HCT、MCV、MCH、MCHC、PLT、WBC、LYM%、MID%、GRA%、Ret)1 次,总共 3 次。

1.3.2.3 血生化指标检测:分别在给药 90 d 结束时(处死 40 只,雌雄各半)、给药 180 d 结束时(处死 40 只,雌雄各半)和停药 30 d 结束时(处死 40 只,雌雄各半),检查各组大鼠血生化指标(ALT、AST、ALP、GLU、BUN、TP、ALB、TBIL、Crea、TCHO、TG、CK)1 次,总共 3 次。

1.3.2.4 电解质及血凝检测:分别在给药 90 d 结束时(处死 40 只,雌雄各半)、给药 180 d 结束时(处死 40 只,雌雄各半)和停药 30 d 结束时(处死 40 只,雌雄各半),检查各组大鼠电解质指标(K^+ 、 Na^+ 、 Cl^-)及血凝指标(PT)1 次,总共 3 次。

1.3.3 统计学方法:各项数据均以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 17.0 统计软件进行统计分

析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般观察

与对照组比较,尿通卡克乃其片组(低、中、高剂量)分别在给药 90 d 结束时、给药 180 d 结束时和停药 30 d 结束时,大鼠未见动物死亡或无明显毒性反应。

2.2 血细胞指标检测

与对照组比较,给药 180 d RBC(♀: M)、HGB(♀: M、H)降低($P < 0.05$),分别在给药 90 d 和停药后 30 d 均差异无统计学意义($P > 0.05$);给药 90 d MCH(♂: L、H)升高($P < 0.05$),分别在给药 180 d 和停药后 30 d 均差异无统计学意义($P > 0.05$);MCHC 在给药 90 d(♂♀: L、M、H),给药 180 d(♂: L、M, ♀: H),停药 30 d(♀: L、M)差异有统计学意义($P < 0.05$);给药 90 d WBC(♀: M、H)、LYMP%(♀: L)、PLT(♂: M)升高($P < 0.05$),给药 180 d 均差异无统计学意义($P > 0.05$),但停药 30 d PLT(♂: M)升高($P < 0.05$)。结果见表 1。

2.3 血生化指标检测

与对照组比较,AST(♂)在给药 90 d(L)、给药 180 d(H)、停药 30 d(H)降低($P < 0.05$);给药 180 d ALT(♂: M、H)降低、BUN(♀: H)升高($P < 0.01$),停药 30 d ALT(♂: M)、BUN(♂: M)均升高($P < 0.05$);分别在给药 180 d 和停药 30 d ALP(♂, H)降低, GLU(♀, H)升高($P < 0.05 \sim P < 0.01$);给药 90 d CK(♂: L)、ALB(♀: H)、TCHO(♀: L)降低($P < 0.05$),分别在给药 180 d 和停药 30 d 除 TCHO, ♂ M 外均差异无统计学意义($P > 0.05$);停药 30 d TBIL(♂: H)降低($P < 0.01$),分别在给药 90 d、180 d 均差异无统计学意义($P > 0.05$);给药 180 d Crea(♂: M)、TG(♂: L、M、H)降低,分别在给药 90 d、停药 30 d 均差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果见表 2。

2.4 电解质及血凝检查

与对照组比较,给药 90 d, K^+ (♂♀: L、M、H)、 Na^+ (♂: L, ♀: L、M、H)差异有统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$),分别在给药 180 d、停药 30 d 差异没有统计学意义($P > 0.05$)。给药 90 d Cl^- (♂: L, ♀: L、M、H),停药 30 d(♂: L、H)差异有统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$)。给药 180 d PT(♂: L)升高,给药 90 d、停药 30 d 差异没有统计学意义(P

> 0.05)。结果见表 3。

3 讨论

尿通卡克乃其片是维吾尔医经典方剂。药性干寒,具有生干生寒,清热消炎,除腐排脓,利尿通阻等功效^[5]。同时可作为异常粘液质清除剂,具有清除异常黏液质,恢复黏液质的正常状态,平衡体液,调整气质,用于治疗疾病^[6-8]。本文初步探讨尿通卡克乃其片(100% 处方原药粉)的大鼠灌胃长期毒性试验血液学指标变化,对其临床应用安全性进行再评价。

血细胞结果表明,给药 180 d RBC(♀: M)、HGB(♀: M、H)降低($P < 0.05$),分别在给药 90 d 和停药后 30 d 均差异无统计学意义($P > 0.05$);说明 RBC、HGB 变动在正常范围内(一般雌性大鼠正常范围比雄性低)。给药 90 d MCH(♂: L、H)升高($P < 0.05$),分别在给药 180 d 和停药后 30 d 均差异无统计学意义($P > 0.05$);说明 MCH 变化无时间和剂量规律性。MCHC 在给药 90 d(♂♀: L、M、H),给药 180 d(♂: L、M, ♀: H),停药 30 d(♀: L、M)差异有统计学意义($P < 0.05$);此变化无规律性。给药 90 d WBC(♀: M、H)、LYMP%(♀: L)、PLT(♂: M)升高($P < 0.05$),给药 180 d 均差异无统计学意义($P > 0.05$),但停药 30 d PLT(♂: M)升高($P < 0.05$);说明此变化无时间、剂量规律性,且变动量在正常范围内。

血生化结果表明,AST(♂)在给药 90 d(L)、给药 180 d(H)、停药 30 d(H)降低($P < 0.05$);给药 90 d CK(♂: L)、TCHO(♀: L)降低;给药 180 d Crea(♂: M)、TG(♂: L、M、H)降低;停药 30 d TBIL(♂: H)降低($P < 0.01$);给药 180 d 和停药 30 d ALP(♂: H)降低;均无病理意义。给药 180 d ALT(♂: M、H)降低,BUN(♀: H)、GLU(♀: H)升高($P < 0.05 \sim P < 0.01$);停药 30 d ALT(♂: M)、BUN(♂: M)、GLU(♀, H)均升高($P < 0.05 \sim P < 0.01$);说明升高作用无明显剂量规律性,且变动量在正常范围内。给药 90 d ALB(♀: H)降低($P < 0.05$),给药 180 d 和停药 30 d 均差异无统计学意义($P > 0.05$),说明降低作用无时间规律性,且变动在正常范围内。

电解质与血凝结果表明,给药 90 d, K^+ (♂♀: L、M、H)、 Na^+ (♂: L, ♀: L、M、H),给药 90 d Cl^- (♂: L, ♀: L、M、H)、停药 30 d Cl^- (♂: L、H),给

表 1 尿通卡克乃其片大鼠长毒试验血液细胞数据分析 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别 Groups		红细胞计数(RBC) ($10^{12}/L$)			血红蛋白(HGB) (g/L)			平均红细胞血红蛋白含量(MCH) (pg)		
		给药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 180 d Drug treatment for 180 days	停药 30 d Drug withdrawal for 30 days	给药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 180 d Drug treatment for 180 days	停药 30 d Drug withdrawal for 30 days	给药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 180 d Drug treatment for 180 days	停药 30 d Drug withdrawal for 30 days
雄性 (♂)										
对照 (Control)										
		7.65 ± 0.19	8.00 ± 0.56	8.00 ± 0.19	143.40 ± 3.58	150.40 ± 5.55	149.80 ± 5.36	18.68 ± 0.39	18.78 ± 0.81	18.68 ± 0.65
低剂量 (Low)		7.41 ± 0.30	7.55 ± 0.48	7.69 ± 0.52	142.00 ± 2.24	144.00 ± 3.81	146.00 ± 10.10	19.40 ± 0.62 *	19.04 ± 0.79	18.96 ± 0.62
中剂量 (Medium)		7.61 ± 0.28	8.00 ± 0.37	8.100 ± 0.10	148.80 ± 5.40	149.00 ± 4.24	155.20 ± 2.59	19.52 ± 0.69	18.60 ± 0.35	19.14 ± 0.34
高剂量 (High)		7.50 ± 0.31	8.00 ± 0.21	7.91 ± 0.34	148.00 ± 6.56	148.60 ± 1.67	150.80 ± 3.70	19.72 ± 0.36 *	18.54 ± 0.67	19.06 ± 0.38
雌性 (♀)										
对照 (Control)										
		7.30 ± 0.21	7.56 ± 0.58	7.60 ± 0.36	142.00 ± 3.46	147.60 ± 3.21	148.40 ± 5.18	19.44 ± 0.56	19.52 ± 1.23	19.48 ± 0.36
低剂量 (Low)		6.97 ± 0.35	7.20 ± 0.34	7.26 ± 0.45	141.00 ± 7.31	144.20 ± 3.96	147.20 ± 4.09	20.22 ± 0.33	20.02 ± 0.98	20.22 ± 0.88
中剂量 (Medium)		6.81 ± 0.45	6.79 ± 0.24 *	7.32 ± 0.28	139.00 ± 11.10	139.60 ± 2.61 *	149.60 ± 6.58	20.34 ± 0.36	20.54 ± 0.55	20.42 ± 0.65
高剂量 (High)		7.22 ± 0.22	7.21 ± 0.30	7.22 ± 0.16	142.20 ± 6.60	139.60 ± 3.78 *	141.60 ± 5.27	19.78 ± 0.79	19.34 ± 0.36	19.54 ± 0.34
组别 Groups		白细胞计数(WBC) ($10^9/L$)			淋巴细胞百分含量(LYMP) (g/L)			血小板计数(PLT) ($10^9/L$)		
		给药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 180 d Drug treatment for 180 days	停药 30 d Drug withdrawal for 30 days	给药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 180 d Drug treatment for 180 days	停药 30 d Drug withdrawal for 30 days	给药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 180 d Drug treatment for 180 days	停药 30 d Drug withdrawal for 30 days
雄性 (♂)										
对照 (Control)										
		4.65 ± 2.54	5.10 ± 1.73	5.82 ± 0.87	12.33 ± 3.02	19.72 ± 5.99	28.54 ± 11.06	1005.50 ± 158.65	1166.80 ± 196.26	1023.00 ± 91.83
低剂量 (Low)		7.56 ± 1.98	4.34 ± 1.23	6.28 ± 2.58	26.10 ± 3.91	27.22 ± 8.04	25.62 ± 3.95	1348.80 ± 272.30	1203.60 ± 125.04	1307.20 ± 371.37
中剂量 (Medium)		7.70 ± 0.79	3.54 ± 1.39	6.00 ± 0.69	24.04 ± 12.92	29.10 ± 11.00	36.18 ± 4.41	1405.80 ± 279.87 *	1242.40 ± 116.16	1331.60 ± 91.06 **
高剂量 (High)		10.36 ± 6.52	6.70 ± 1.41	5.06 ± 0.77	19.40 ± 10.74	30.50 ± 5.20	25.68 ± 5.94	1326.60 ± 142.06	1102.00 ± 96.32	1136.60 ± 136.88
雌性 (♀)										
对照 (Control)										
		3.50 ± 1.41	5.76 ± 3.15	4.52 ± 1.26	13.52 ± 8.43	27.28 ± 10.10	25.52 ± 6.60	1067.60 ± 117.92	1066.80 ± 50.87	1026.80 ± 147.39
低剂量 (Low)		3.76 ± 0.85	3.64 ± 2.06	4.34 ± 2.48	29.54 ± 4.81 *	25.72 ± 6.32	33.56 ± 9.87	1293.00 ± 145.92	1140.00 ± 287.30	1213.80 ± 115.47
中剂量 (Medium)		5.58 ± 0.81 *	4.60 ± 2.57	4.28 ± 1.64	18.04 ± 4.81	28.76 ± 8.43	24.12 ± 3.71	1179.12 ± 189.76	1048.80 ± 135.02	1212.20 ± 247.81
高剂量 (High)		5.80 ± 1.62 *	3.44 ± 1.09	3.60 ± 0.39	15.94 ± 4.68	25.28 ± 6.78	23.54 ± 1.64	1133.60 ± 278.92	1163.00 ± 69.80	1216.20 ± 147.53

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. the control group.

表 2 尿通卡克乃其片大鼠长毒试验血液生化指标数据分析($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Tab.2 Biochemical analysis of chronic toxicity of Kursi Kaknaq in the rats($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	天门冬氨酸转氨酶(AST)(U/L)				丙氨酸转氨酶(ALT)(U/L)				碱性磷酸酶(ALP)(U/L)				葡萄糖(GLU)(mmol/L)				肌酸酐酶(CK)(U/L)			
	给药 90 d	给药 180 d	停药 30 d	停药 90 d	给药 90 d	给药 180 d	停药 30 d	停药 90 d	给药 90 d	给药 180 d	停药 30 d	停药 90 d	给药 90 d	给药 180 d	停药 30 d	停药 90 d	给药 90 d	给药 180 d	停药 30 d	停药 90 d
雄性(♂)	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days
	低剂量(Low)	159.20 ± 16.84	202.00 ± 19.56	149.80 ± 22.32	36.60 ± 7.80	45.00 ± 6.32	29.80 ± 8.04	86.00 ± 10.75	118.40 ± 15.31	149.80 ± 14.20	8.62 ± 1.44	8.30 ± 1.27	13.04 ± 1.61	712.40 ± 54.25	969.00 ± 28.24	374.20 ± 98.03	377.00 ± 79.84 *	927.00 ± 232.78	507.80 ± 175.69	507.80 ± 175.69
	中剂量(Medium)	115.60 ± 14.03 *	199.60 ± 34.13	151.40 ± 20.65	33.60 ± 1.67	40.60 ± 3.51	32.20 ± 4.09	95.20 ± 34.52	107.00 ± 11.66	140.00 ± 22.86	10.66 ± 0.72	7.72 ± 0.85	9.31 ± 2.18 *	672.00 ± 208.79	968.60 ± 348.62	515.00 ± 198.85	672.00 ± 208.79	968.60 ± 348.62	515.00 ± 198.85	515.00 ± 198.85
	高剂量(High)	154.40 ± 25.13	169.60 ± 26.77	160.40 ± 23.42	33.20 ± 5.26	31.80 ± 3.56 **	43.40 ± 8.38 *	74.32 ± 23.38	79.80 ± 14.65 *	152.60 ± 25.18	8.74 ± 1.60	6.92 ± 0.64	10.38 ± 1.41 *	661.00 ± 78.66	587.80 ± 166.92	335.40 ± 126.06	661.00 ± 78.66	587.80 ± 166.92	335.40 ± 126.06	335.40 ± 126.06
雌性(♀)	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days
	低剂量(Low)	124.60 ± 28.71	136.60 ± 19.37	145.20 ± 17.46	43.80 ± 12.99	45.00 ± 12.75	39.00 ± 15.62	57.80 ± 28.73	42.60 ± 15.03	77.60 ± 19.40	9.00 ± 1.64	7.50 ± 0.80	8.20 ± 2.30	328.60 ± 51.91	383.40 ± 158.15	226.00 ± 141.03	328.60 ± 51.91	383.40 ± 158.15	226.00 ± 141.03	226.00 ± 141.03
	中剂量(Medium)	107.20 ± 30.16	146.20 ± 39.33	141.40 ± 7.67	37.40 ± 10.04	41.40 ± 6.11	34.60 ± 6.06	46.80 ± 2.28	53.80 ± 7.46	78.00 ± 41.76	8.90 ± 1.51	6.82 ± 0.19	8.06 ± 1.55	295.00 ± 154.49	411.80 ± 163.36	388.20 ± 211.90	295.00 ± 154.49	411.80 ± 163.36	388.20 ± 211.90	388.20 ± 211.90
	高剂量(High)	124.00 ± 18.56	110.20 ± 29.03	137.00 ± 29.03	45.00 ± 20.25	32.80 ± 9.36	50.20 ± 10.31	40.60 ± 11.59	81.80 ± 19.21 *	46.00 ± 12.59	7.84 ± 0.83	6.68 ± 0.68	8.06 ± 1.47	339.20 ± 159.77	396.20 ± 127.95	332.40 ± 118.97	339.20 ± 159.77	396.20 ± 127.95	332.40 ± 118.97	332.40 ± 118.97
雄性(♂)	总胆红素(TBIL)(mg/L)	133.00 ± 15.95	129.80 ± 26.38	137.20 ± 50.15	47.40 ± 22.60	38.40 ± 7.83	53.20 ± 21.70	62.40 ± 38.40	58.20 ± 23.90	45.40 ± 27.56	7.86 ± 2.13	9.40 ± 0.60 **	11.22 ± 1.31 *	365.20 ± 176.99	388.20 ± 126.63	487.40 ± 166.91	365.20 ± 176.99	388.20 ± 126.63	487.40 ± 166.91	487.40 ± 166.91
	肌酐(Crea)(μmol/L)	给药 90 d	给药 180 d	停药 30 d	停药 90 d	给药 90 d	给药 180 d	停药 30 d	停药 90 d	给药 90 d	给药 180 d	停药 30 d	停药 90 d	给药 90 d	给药 180 d	停药 30 d	停药 90 d	给药 90 d	给药 180 d	停药 30 d
	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 90 days	Drug treatment for 180 days	Drug withdrawal for 30 days	Drug treatment for 90 days
	低剂量(Low)	42.38 ± 10.49	27.34 ± 16.86	9.74 ± 2.76	42.96 ± 4.43	62.62 ± 4.43	71.68 ± 7.74	7.47 ± 1.41	8.94 ± 0.60	10.26 ± 1.19	0.54 ± 0.06	1.51 ± 0.25	0.90 ± 0.28	32.40 ± 0.89	32.60 ± 2.79	40.00 ± 1.41	1.10 ± 0.07	1.70 ± 0.18	1.61 ± 0.29	1.61 ± 0.29
雌性(♀)	甘油三酯(TG)(U/L)	34.62 ± 15.14	20.84 ± 7.83	8.92 ± 2.02	42.79 ± 4.40	54.47 ± 4.40	64.28 ± 5.31	6.60 ± 0.61	7.47 ± 1.06	10.34 ± 0.87	0.54 ± 0.10	1.15 ± 0.38 *	0.72 ± 0.27	30.40 ± 0.55	30.20 ± 3.11	39.40 ± 1.14	1.14 ± 0.21	1.47 ± 0.18	1.90 ± 0.27	1.90 ± 0.27
	中剂量(Mid)	49.26 ± 12.38	29.08 ± 13.57	7.26 ± 2.60	36.10 ± 5.2252	79.46 ± 6.67	6.56 ± 0.85	8.49 ± 0.39	12.17 ± 0.57 *	0.78 ± 0.12 **	0.74 ± 0.15	33.20 ± 2.77	32.60 ± 2.07	42.00 ± 4.36	1.40 ± 0.31	1.48 ± 0.18	1.40 ± 0.31	1.48 ± 0.18	2.37 ± 0.42 *	2.37 ± 0.42 *
	高剂量(High)	42.80 ± 13.42	28.74 ± 8.46	4.62 ± 0.75 **	39.77 ± 1.42	60.37 ± 0.87	66.68 ± 3.92	5.65 ± 1.08	7.67 ± 1.31	10.83 ± 1.16	0.54 ± 0.10	0.70 ± 0.12 **	0.64 ± 0.08	30.00 ± 0.71	33.00 ± 4.85	40.60 ± 2.30	1.24 ± 0.21	1.55 ± 0.24	1.68 ± 0.33	1.68 ± 0.33
	总胆固醇(TC)(mmol/L)	35.34 ± 15.42	36.58 ± 6.70	7.88 ± 2.68	46.86 ± 3.08	69.60 ± 2.58	76.66 ± 3.86	6.14 ± 1.43	8.05 ± 0.84	11.17 ± 0.68	0.47 ± 0.06	0.92 ± 0.56	0.49 ± 0.03	39.00 ± 2.00	37.40 ± 2.88	47.60 ± 2.07	1.67 ± 0.31	2.01 ± 0.42	2.20 ± 0.58	2.20 ± 0.58
雄性(♂)	总胆红素(TBIL)(mg/L)	33.16 ± 16.35	24.44 ± 12.54	7.42 ± 2.51	48.59 ± 5.51	62.12 ± 10.40	67.06 ± 6.38	7.20 ± 1.74	7.39 ± 0.88	11.69 ± 1.17	0.44 ± 0.02	0.52 ± 0.10	0.44 ± 0.12	38.60 ± 1.52	35.80 ± 0.45	45.00 ± 3.54	1.14 ± 0.21 *	2.16 ± 0.55	2.51 ± 0.50	2.51 ± 0.50
	中剂量(Mid)	40.58 ± 18.70	23.26 ± 10.96	6.12 ± 0.59	42.24 ± 9.13	54.57 ± 8.60	71.35 ± 5.88	7.46 ± 0.72	8.41 ± 0.37	10.77 ± 1.07	0.43 ± 0.08	0.55 ± 0.17	0.74 ± 0.31	39.80 ± 2.17	34.20 ± 3.76	45.40 ± 2.88	1.40 ± 0.30	1.63 ± 0.30	3.42 ± 1.32	3.42 ± 1.32
	高剂量(High)	30.42 ± 12.04	45.40 ± 11.95	6.52 ± 2.87	42.10 ± 6.14	69.38 ± 9.52	73.87 ± 5.16	7.54 ± 1.549	62 ± 0.26 **	11.10 ± 1.20	0.46 ± 0.12	0.44 ± 0.04	0.63 ± 0.10	34.60 ± 2.07 **	38.40 ± 2.61	50.20 ± 2.61	1.24 ± 0.21	2.10 ± 0.38	3.07 ± 0.57	3.07 ± 0.57
	总胆固醇(TC)(mmol/L)	30.42 ± 12.04	45.40 ± 11.95	6.52 ± 2.87	42.10 ± 6.14	69.38 ± 9.52	73.87 ± 5.16	7.54 ± 1.549	62 ± 0.26 **	11.10 ± 1.20	0.46 ± 0.12	0.44 ± 0.04	0.63 ± 0.10	34.60 ± 2.07 **	38.40 ± 2.61	50.20 ± 2.61	1.24 ± 0.21	2.10 ± 0.38	3.07 ± 0.57	3.07 ± 0.57

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. the control group.

表 3 尿通卡克乃其片大鼠长毒试验血液电解质及凝血酶原时间(PT)数据分析($\bar{x} \pm s, n=5$)
Tab.3 Blood electrolyte and PT analysis of Kursi Kaknaq in the rats($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别 Groups	钾离子浓度(K ⁺) (mmol/L)				钠离子浓度(Na ⁺) (mmol/L)				氯离子浓度(Cl ⁻) (mmol/L)				凝血酶原时间(PT) (sec)			
	给药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 180 d Drug treatment for 180 days	停药 30 d Drug withdrawal for 30 days	停药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 180 d Drug treatment for 180 days	停药 30 d Drug withdrawal for 30 days	停药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 180 d Drug treatment for 180 days	停药 30 d Drug withdrawal for 30 days	停药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 90 d Drug treatment for 90 days	给药 180 d Drug treatment for 180days	停药 30 d Drug withdrawal for 30 days	停药 90 d Drug treatment for 30 days
雄性(♂)																
对照(Control)	3.96±0.16	4.33±0.15	4.61±0.14	141.06±1.39	105.44±0.88	139.34±1.06	137.42±1.27	105.44±0.88	105.18±0.66	105.18±0.66	98.48±1.06	12.52±1.03	12.40±0.38	12.40±0.38	13.14±1.13	13.14±1.13
低剂量(Low)	3.45±0.31**	4.83±0.21	4.90±0.49	130.40±0.26**	103.74±0.54	137.50±1.54	137.78±1.29	103.74±0.54	104.96±0.88	104.96±0.88	100.78±1.00*	12.88±1.63	13.96±0.93*	13.96±0.93*	13.32±0.75	13.32±0.75
中剂量(Medium)	4.44±0.29**	4.77±0.18	5.12±0.79	137.88±0.69	102.48±1.65**	138.96±1.09	138.70±4.57	102.48±1.65**	104.20±1.55	104.20±1.55	101.00±2.07	12.42±1.42	12.58±0.90	12.58±0.90	13.32±0.91	13.32±0.91
高剂量(High)	4.49±0.17**	4.55±0.46	4.06±0.13	137.42±0.62	104.62±1.05	138.66±0.95	138.84±4.41	104.62±1.05	106.14±1.79	106.14±1.79	101.56±1.87*	12.02±0.77	13.64±0.92	13.64±0.92	13.40±1.04	13.40±1.04
雌性(♀)																
对照(Control)	3.81±0.08	3.92±0.33	4.11±0.51	141.10±0.60	109.06±1.02	140.80±0.85	137.44±1.42	109.06±1.02	107.14±1.54	107.14±1.54	103.16±0.95	13.42±1.23	13.42±1.23	13.42±1.23	13.26±0.48	13.26±0.48
低剂量(Low)	3.36±0.26**	4.25±0.25	4.61±0.62	130.96±0.58**	105.98±0.99**	140.02±0.90	137.94±0.86	105.98±0.99**	106.10±0.88	106.10±0.88	104.28±0.96	13.00±0.26	13.00±0.26	13.00±0.26	13.78±0.89	13.78±0.89
中剂量(Medium)	4.21±0.19**	4.32±0.29	4.31±0.13	139.50±1.23**	105.70±0.92**	139.60±0.67	136.86±0.68	105.70±0.92**	106.24±0.71	106.24±0.71	103.70±1.50	12.94±1.01	12.94±1.01	12.94±1.01	13.08±0.62	13.08±0.62
高剂量(High)	4.23±0.22*	4.09±0.37	3.93±0.12	138.12±0.64**	105.66±0.90**	144.94±11.92	137.32±2.08	105.66±0.90**	104.82±5.06	104.82±5.06	104.98±1.73	13.18±1.40	13.18±1.40	13.18±1.40	13.68±0.77	13.68±0.77

注: 与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. the control group.

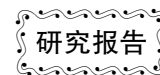
药 180 d PT(♂:L)均有差异统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$),说明变动在正常范围之内,无病理意义。

总而言之,0.32 g、1.6 g、3.2 g(生药)/kg·d(相当于拟推荐成人临床剂量的 5、25、50 倍)剂量下的尿通卡克乃其片原料粉灌胃大鼠 180 d,虽大鼠个别剂量组、血液个别指标差异有统计学意义($P < 0.05 \sim P < 0.01$),但无剂量、时间规律性,均无病理意义。因此,尿通卡克乃其片原料粉灌胃大鼠 180 d 对大鼠血液指标无明显异常,在临床用剂量下长期使用是安全的。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国卫生部药品标准—维吾尔药分册(维文)[M]. 乌鲁木齐:新疆科技卫生出版社,1999:169.
- [2] 袁伯俊,廖明阳. 药物毒理学实验方法与技术[M]. 北京:化学工业出版社,2007:141-146,200-231.
- [3] 魏伟,吴希美,李元建. 药理实验方法学(第4版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2010:393-406.
- [4] 热比姑丽·伊斯拉木,尤力都孜·买买提,阿布都吉力力·阿布都艾尼,等. 疆曼陀罗子及其代表制剂镇痛艾比西帕丸的大鼠长期毒性试验[J]. 中国药理学通报,2011,27(10):1479-1480.
- [5] 艾力阿吉·库尔班尼亚孜艾米琪. 维吾尔医成药宝库(维文)[M]. 乌鲁木齐:新疆人民卫生出版社. 2007:169-170.
- [6] 热比姑丽·伊斯拉木,阿娜古丽·买合木提,冷英莉,等. 异常黏液质清除剂尿通卡克乃其片的药效学实验研究[J]. 中国医药导报,2010,7(15):52-54.
- [7] 阿不都热依木·卡德尔·阿塔哥. 中国新疆维吾尔医药学[M]. 乌鲁木齐:新疆人民卫生出版社. 2013:100-104.
- [8] 哈木拉提·吾甫尔,阿不都热依木·玉素甫. 维吾尔医气质、体液论及其现代研究[M]. 乌鲁木齐:新疆科学技术出版社,2003:46-49.

[修回日期]2016-03-30



A53T α -synuclein 抑制 SH-SY5Y 细胞 2 型 囊泡单胺转运体的表达

满建梅, 郭军堂, 张代娟, 陈安琪

(潍坊医学院临床医学院, 潍坊 261053)

【摘要】 目的 研究稳定表达 A53T α -synuclein 对神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞中 2 型囊泡单胺转运体 (VMAT2) 蛋白表达的影响。**方法** 构建 A53T α -synuclein 真核表达载体, 用脂质体 lipofectamineTM2000 转染 SH-SY5Y 细胞, 经 G418 筛选获得稳定转染单克隆细胞株; 分别采用 Western blotting 及 DCFH-DA 染色检测细胞系 A53T α -synuclein 过表达对 VMAT2 蛋白的表达及细胞内活性氧类物质 (ROS) 水平的影响。**结果** Western blotting 结果显示 VMAT2 的表达在稳定表达 A53T α -synuclein 的细胞系中明显降低。DCFH-DA 染色结果显示稳定表达 A53T α -synuclein 细胞系内 DCF signal (507.3 ± 7.1) 较对照组 (410.7 ± 10.5) 明显增多 ($P < 0.05$)。**结论** A53T α -synuclein 能够通过抑制 VMAT2 的表达, 增加细胞内的 ROS 水平, 在帕金森病的发病过程中发挥重要作用。

【关键词】 帕金森氏病; A53T α -synuclein; VMAT2

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0066-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.010

A53T α -synuclein decreases the expression of type 2 vesicular monoamine transporter in neuroblastoma SH-SY5Y cells

MAN Jian-mei, GUO Jun-tang, ZHANG Dai-juan, CHEN An-qi

(School of Clinical Medicine, Weifang Medical University, Weifang 261053, China)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of A53T α -synuclein on the expression of type 2 vesicular monoamine transporter (VMAT2) in neuroblastoma SH-SY5Y cells stably expressing A53T α -synuclein. **Methods** A53T α -synuclein eukaryotic plasmid was constructed by transfection of the SH-SY5Y cells using LipofectamineTM2000, and a stable transfected monoclonal cell line was selected by G418. Western blotting and DCFH-DA staining were used to detect the effect of A53T α -synuclein overexpression on the expression of VMAT2 protein and level of reactive oxygen species (ROS). **Results** Western blotting showed that compared with the control group, the expression of VMAT2 protein was significantly decreased, and DCFH-DA staining showed that DCF signal was significantly increased (507.3 ± 7.1) than that in the cell line stably expressing A53T α -synuclein (410.7 ± 10.5) ($P < 0.05$). **Conclusions** A53T α -synuclein can increase the intracellular ROS level by inhibiting the expression of VMAT2, thereby playing an important role in the pathogenesis of Parkinson's disease.

【Key words】 Parkinson's disease; A53T α -synuclein; VMAT2

[基金项目] 山东省自然科学基金(ZR2011HM014); 山东省自然科学基金(ZR2015HL126)。

[作者简介] 满建梅(1989-), 女, 硕士研究生, 专业: 病理学与病理生理学。Email: 1192746984@qq.com。

[通讯作者] 陈安琪(1981-), 女。Email: chen安琪_1981@163.com。

帕金森氏病(Parkinson's disease, PD)的主要病理特征是黑质多巴胺能神经元的选择性变性及 Lewy body (LB) 的形成, α -synuclein 是 LB 的重要成分^[1]。A53T α -synuclein 是人们在常染色体显性家族 PD 患者中发现的突变体^[2], 与 PD 的发病密切相关, 但具体机制还不清楚。研究发现 A53T α -synuclein 可与 VMAT2 在体外发生特异性分子间相互作用^[3], 提示 A53T α -synuclein 参与了多巴胺(DA)的代谢调节过程, 在 PD 的多巴胺神经元选择性变性过程中发挥作用。本研究目的是建立稳定表达 A53T α -synuclein 的细胞系, 并研究其对 VMAT2 蛋白表达的影响, 为研究 PD 的发病机制提供新思路。

1 材料和方法

1.1 材料

神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞购自中国医学科学院基础所细胞中心; 携带 A53T α -synuclein 的 T 载体及 β -半乳糖苷酶的 pcDNA3.0-LacZ 真核细胞表达载体为本室保存; Lipofectamine™ 2000 购自 Gibco BRL; 山羊抗人 VMAT2 多克隆抗体、小鼠抗人 α -synuclein 多克隆抗体、小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自 Santa Cruz; 辣根酶(HRP)标记 IgG 购自中杉金桥; XhoI、HindIII、T₄ DNA 连接酶、高保真 Pyrobest DNA 聚合酶购自大连宝生物; 2'-7'-二氯荧光素双醋酸盐(DCFH-DA)、X-gal 购自 Sigma; G418 购自 Amersco; PCR 引物由上海博亚公司合成。

1.2 方法

1.2.1 真核表达载体构建: 合成正义引物 cttcataagcttcgacagtgtgtg(含 HindIII 内切酶位点)和反义引物 taagatctcgaggaaactgggagcaag(含 XhoI 内切酶位点), 以携带 A53T α -synuclein 的 T 载体为模板进行 PCR 反应。条件: 94℃ 变性 1 min, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 25 个循环。回收的 PCR 产物与 pcDNA3.0 分别用 HindIII 和 XhoI 酶切。酶切产物纯化后加入 T₄ 连接酶 4℃ 连接过夜后转化 DH 5 α 感受态大肠杆菌, 挑取单菌落小量扩增, 提取质粒, 用 HindIII 和 XhoI 酶切鉴定并进行测序, 测序正确的克隆命名为 pcDNA3.0-A53T。

1.2.2 细胞培养及转染: 将 SH-SY5Y 接种于高糖 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清, 100 IU/mL 青霉素, 100 μ g/mL 链霉素)中, 37℃, 5% CO₂ 培养; 取对数生长期细胞接种到 24 孔板内, 当细胞密度达到

50% ~ 80% 时, 按照脂质体 Lipofectamine™ 2000 (Gibco BRL) 说明书进行转染。24 h 后加入抗生素含 G418 的完全培养基进行持续筛选, 两周后挑选单克隆进行扩大培养并继续保持筛选压力到 2 个月以上。稳定表达 A53T α -synuclein 的细胞系为实验组, 稳定表达 β -半乳糖苷酶的细胞系为对照组。

1.2.3 β -半乳糖苷酶活性检测: 培养细胞 72 h 后, 用冰冷的 PBS 洗涤细胞两次, 10% 甲醛固定液室温固定 5 min。PBS 洗涤两次后加入 X-gal 染色液(1g/L), 37℃ 孵育 12 h。显微镜下观察, 蓝染细胞为表达 β -半乳糖苷酶阳性细胞。

1.2.4 Western blotting 检测蛋白表达: 胰酶消化细胞后, 1 000 g 离心 10 min, PBS 洗 3 次后, 弃上清液, 加入 1/5 体积的 6 $\times$ SDS 蛋白质上样缓冲液, 混匀后 100℃ 煮沸 10 min 进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 蛋白转移到 PVDF 膜后, 用 TBST 稀释的 5% 脱脂奶粉室温摇动封闭 1 h, 一抗(VMAT2 抗体 1:500, α -synuclein 抗体 1:500, β -actin 抗体 1:500)室温孵育 4 h, 1:5 000 二抗室温孵育 1 h, ECL 化学发光与曝光。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞内 ROS 水平: 培养细胞 24 h 后, 用胰酶进行消化; 将细胞重新悬浮于预冷的无血清培养基中, 加入 DCFH-DA(10 μ mol/L), 孵育 20 min 后, 离心收集细胞, PBS 重新洗涤细胞 3 次, 最后重新悬浮于 500 μ L PBS, 流式细胞仪(E6155, BD FACS Calibur)中检测荧光强度, 每次 10 000 个, 重复 3 次, 记录平均 DCF signal。

1.2.6 统计学方法: 数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。统计学方法采用 *t* 检验。

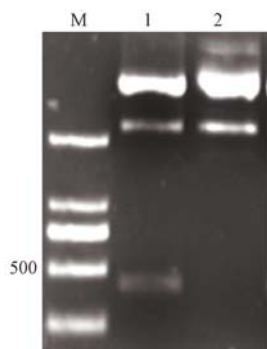
2 结果

2.1 pcDNA3.0-A53T 真核表达载体的鉴定

Hind III 和 XhoI 双酶切 pcDNA3.0 和 pcDNA3.0-A53T, 酶切产物电泳可见 1 泳道有 500 bp 左右大小的条带, 与预期结果一致(见图 1)。DNA 测序结果与 Genbank 报道的序列一致。

2.2 稳定表达 β -半乳糖苷酶细胞系的鉴定

真核表达载体 pCMVSYN-A53T 没有 β -半乳糖苷酶基因, 在细胞中无法产生 β -半乳糖苷酶, 无法作用于 X-gal 中的吡啶环而显蓝色。相反, 稳定转染 β -半乳糖苷酶基因的细胞系能够产生 β -半乳糖苷酶, 细胞则有明显的蓝染, 提示 β -半乳糖苷酶在细胞系中稳定表达。如图 2 所示。

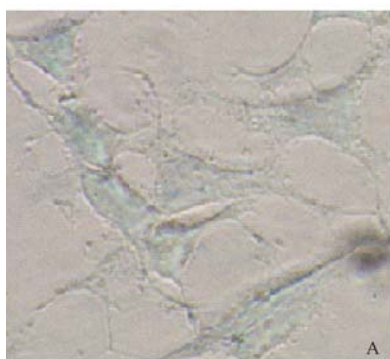


M: DNA marker; 1: pcDNA3.0-A53T; 2: pcDNA3.0

图1 pcDNA3.0-A53T 真核表达载体的酶切鉴定

M: DNA marker; Lane 1: pcDNA3.0-A53T; Lane 2: pcDNA3.0.

Fig. 1 Identification of eukaryotic expression vector pcDNA3.0-A53T

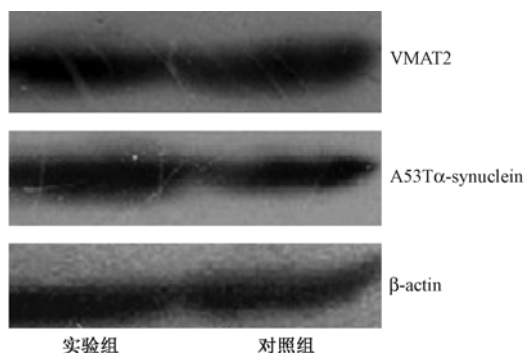


注: A: 稳定表达 β-半乳糖苷酶细胞系; B: 稳定表达 A53Tα-synuclein 细胞系

图2 X-gal 染色检测 β-半乳糖苷酶的表达

Note. A: Cells stably expressing β-galactosidase; B: Cells stably expressing A53T α-synuclein.

Fig. 2 The detection of β-galactosidase by X-gal staining



注: 实验组: 稳定表达 A53Tα-synuclein 细胞系;
对照组: 稳定表达 β-半乳糖苷酶细胞系

图3 Western blotting 检测 A53T α-synuclein 及 VMAT2 的表达

Note. Experimental group: Cells stably expressing A53T α-synuclein. Control group: Cells stably expressing β-galactosidase.

Fig. 3 Expression of A53T α-synuclein and VMAT2 detected by Western blotting

2.3 Western blotting 结果

Western blotting 结果显示,在 SH-SY5Y 细胞中有野生型 α-synuclein 蛋白的表达,但 α-synuclein 蛋白的表达量在稳定转染 A53T α-synuclein 的细胞系中(实验组)较稳定表达 β-半乳糖苷酶细胞系(对照组)明显增多,提示细胞系中有 A53T α-synuclein 的过表达,而 VMAT2 在实验组中的表达量较实验组明显降低。如图 3 所示。

2.4 细胞内 ROS 水平的变化

如图 4 所示,稳定表达 A53T α-synuclein 细胞系的 DCF signal (507.3 ± 7.1) 较稳定表达 β-半乳糖苷酶细胞系 (410.7 ± 10.5) 明显增高 ($P < 0.05$),提示 A53Tα-synuclein 过表达能够明显增加细胞 ROS 的产生。

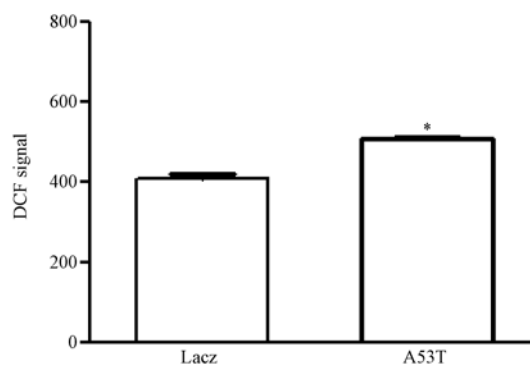


图4 细胞系内 ROS 水平的变化

Fig. 4 Changes of intracellular ROS level

3 讨论

α-Synuclein 是一种具有非 β-淀粉样结构(NAC)的可溶性蛋白质,主要分布于中枢神经系统突触前末梢和核周,在突触囊泡转运、神经递质的

释放及多巴胺的代谢过程中具有重要的调节作用^[4,5]。 α -Synuclein 蛋白正常、错误折叠及其寡聚化之间存在动态平衡,失衡后如出现大量错误折叠,会导致寡聚体及纤维体的形成。Peelaerts W 等^[6]认为纤维态是主要的毒性物质,它可引起进行性运动功能损害和细胞死亡,具体的机制尚不清楚。目前研究认为导致 PD 发病的重要因素可能与 DA 异常代谢产生的 ROS 有关,它能够引起神经元的氧化损害^[7]。细胞内的 DA,尤其是 DA 的代谢产物能够与 α -synuclein 相互作用,促进 α -synuclein 的异常聚集及纤维化,形成 LB 小体^[8]。生理条件下,多巴胺一旦在神经元中合成,立即可以通过 VMAT2 转运到突触囊泡中进行储存,否则中枢神经系统内的 DA 能够通过自身氧化和酶降解产生 ROS^[9]。

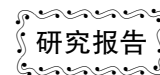
本研究通过 Western blotting 检测显示 A53T α -synuclein 在 SH-SY5Y 细胞系中稳定高效表达,为进一步研究 PD 发病机制提供了良好的细胞模型。在稳定表达 A53T α -synuclein 细胞系中的 VMAT2 表达水平明显低于对照组,提示其有抑制 VMAT2 蛋白表达的作用。为了进一步探讨 A53T α -synuclein 抑制 VMAT2 表达可能对细胞系产生的影响,我们通过 DCFH-DA 染色检测细胞内 ROS 水平的变化,结果显示 A53T α -synuclein 过表达能够明显的增加细胞内的 ROS 水平,这可能与抑制 VMAT2 的表达有密切的关系。据此,我们认为过表达的 A53T α -synuclein 作用于 VMAT2,下调其蛋白表达水平,打破了细胞内 DA 的平衡,致使细胞内 ROS 累积,

造成对细胞的损害。A53T α -synuclein 如何影响 VMAT2 基因的表达及具体功能有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Spillantini MG, Schmidt ML, Lee VM, et al. Alpha-synuclein in Lewy bodies [J]. *Nature*, 1997, 388(6645): 839–840.
- [2] Polymeropoulos MH, Lavedan C, Leroy E, et al. Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease [J]. *Science*, 1997, 276(5321): 2045–2047.
- [3] 陈安琪,王建英,牟青杰,等. A53T α -synuclein 与 II 型单胺囊泡转移体相互作用的鉴定[J]. *中国临床实用医学*, 2008 (7): 43–45.
- [4] Lashuel HA1, Overk CR, Oueslati A, et al. The many faces of α -synuclein: from structure and toxicity to therapeutic target [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2013, 14(1): 38–48.
- [5] Venda LLI, Cragg SJ, Buchman VL, et al. α -Synuclein and dopamine at the crossroads of Parkinson's disease [J]. *Trends Neurosci*, 2010, 33(12): 559–568.
- [6] Peelaerts W, Bousset L, Van der Perren A, et al. α -Synuclein strains cause distinct synucleinopathies after local and systemic administration [J]. *Nature*, 2015, 522(7556): 340–344.
- [7] Jenner P, Olanow CW. Understanding cell death in Parkinson's disease [J]. *Ann Neurol*, 1998, 44(3 Suppl 1): S72–84.
- [8] Follmer C, Romão L, Einsiedler CM, et al. Dopamine affects the stability, hydration, and packing of protofibrils and fibrils of the wild type and variants of α -synuclein [J]. *Biochemistry*, 2007, 46(4): 472–482.
- [9] Parsons SM. Transport mechanisms in acetylcholine and monoamine storage [J]. *FASEB J*, 2000, 14(15): 2423–2434.

[修回日期]2016–03–09



急性肺损伤大鼠呼吸膜 AQP1 和 AQP5 的表达

岳 胜, 朱 平, 岳 磊, 乔国华

(郑州大学附属洛阳中心医院急诊科, 河南 洛阳 471000)

【摘要】 目的 确定水通道蛋白 AQP1 及 AQP5 是否在大鼠肺泡毛细血管膜(呼吸膜)表达,进而研究急性肺损伤(ALI)大鼠 AQP1 和 AQP5 的表达调节及激素干预的作用。**方法** 采用亲和的抗人 AQP1 和 AQP5 抗体,应用免疫组化及免疫电镜的方法研究 AQP1 及 AQP5 在呼吸膜的分布。选用肺泡内灌注脂多糖(LPS)制作大鼠 ALI 动物模型,研究 ALI 时呼吸膜 AQP1 及 AQP5 的变化。**结果** 免疫染色显示 AQP1 主要表达于正常肺组织的微血管内皮,而 AQP5 主要表达于肺泡 I 型上皮细胞。免疫组化分析进一步表明 LPS 灌注后 4h~48h AQP1 及 AQP5 在呼吸膜的表达均下降;AQP1 蛋白于 LPS 灌注后 24h 及激素干预后有部分恢复($P < 0.05$),而 AQP5 无这种恢复现象。**结论** ALI 时 AQP1 及 AQP5 在呼吸膜的表达减少,提示 ALI 时 AQP1 和 AQP5 的下降表达可能与其液体转运的异常有关。

【关键词】 水通道蛋白 1,水通道蛋白 5,急性肺损伤,激素

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0070-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.011

Expression of AQP1 and AQP5 is decreased in the alveolar-capillary membrane in rats with acute lung injury

YUE Sheng, ZHU Ping, YUE Lei, QIAO Guo-hua

(Department of Emergency, Luoyang Central Hospital, the Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Luoyang, Henan 471000, China)

【Abstract】 Objective To determine if aquaporin1 (AQP1) and aquaporin5 (AQP5) are expressed in the alveolar-capillary membrane in rats, and to investigate the changes of AQP1 and AQP5 expression in the rat with acute lung injury. **Methods** The distribution of AQP1 and AQP5 in alveolar capillary membrane was investigated by immunohistochemistry and immunoelectron microscopy with affinity-purified antibodies to human AQP1 and AQP5. The possibility that alveolar capillary membrane AQP1 and AQP5 undergo altered regulation was studied by a rat model established using intra-tracheal instillation of lipopolysaccharide (LPS). **Results** Immunolabelling showed that AQP1 was stained primarily in the microvascular endothelium of normal lungs, while AQP5 was expressed in type I pneumocytes. Immunohistochemical analysis showed a significant decrease in the expression of AQP1 and AQP5 in injured lungs at 4-48 h after LPS instillation. AQP1 protein was resumed partly at 24 h after LPS instillation and steroid administration, whereas AQP5 was unchanged. **Conclusions** The decreased expressions of AQP1 and AQP5 in injured lungs suggest that both of them may play a role in abnormal fluid transportation.

【Key words】 Aquaporin 1, AQP1; Aquaporin 5, AQP5; Acute lung injury; Fluid transportation; Steroid; Rat

临床中,肺水肿的形成涉及肺间质和毛细血管 的液体转运,近年来关于肺组织中液体转运的分子

机制的研究显示,水通道蛋白(aquaporins, AQP)s 是一组在哺乳动物体内表达的水选择通道的分子家族,它们可以增强浆膜面水通透力的功能,因而可以提供快速液体转运的通路^[1,2]。在一些病理条件下,其可影响和破坏肺组织流体的运输,造成充血性心力衰竭、呼吸窘迫综合征、肺水肿损伤等。目前,涉及到水通道蛋白调节急性肺损伤(acute lung injury, ALI)的研究还很少。本研究探讨了水通道蛋白家族成员 AQP1 和 AQP5 在大鼠肺泡毛细血管膜的表达,并研究内毒素(LPS)诱导的急性肺损伤(ALI)大鼠模型中 AQP1 和 AQP5 的表达调节及激素干预的作用。

1 材料和方法

1.1 动物

雄性 SD 大鼠共 45 只,均购自上海交通大学动物实验中心(SCXK(沪)2013-0013),体质量(230 ± 15)g,所有大鼠均在郑州大学附属洛阳中心医院动物实验室(SYXK(豫)2011-0076)的清洁环境下饲养观察,普通饲料适应性喂养 1 周后使用。

1.2 试剂和仪器

山羊抗人 AQP1 多克隆抗体,大鼠抗人 AQP5 单克隆抗体,小鼠抗人 β -actin 单克隆抗体购自美国 Sigma 公司,免疫组化 S-P 试剂盒, DAB 显色试剂盒均购自北京中杉生物技术公司。RPMI Medium 1640 培养基, Western-blot 转印仪,蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司。另备 24 孔板、OMEM 培养液、DMSO、酶标仪、漩涡振荡器、移液枪等。

1.3 急性肺损伤动物模型的制备

将 SD 大鼠随机分为 3 组,即 NS 组(对照组)($n = 10$),脂多糖(LPS)组($n = 20$)和激素组($n = 15$)。将 3 组大鼠均用七氟烷麻醉,暴露气管,将 NS 对照组($n = 10$)按 0.5 mL/kg NS 灌注大鼠气管,12 h 后观察其生命体征和肺组织变化。将 LPS(E. coli serotype 055: B5 LPS, Sigma, USA)按 200 μ g/kg 溶于无菌 NS,使用 25 号针头予大鼠 0.5 mL/kg 气管注射,观察气管注射 LPS 后 4 h、12 h、24 h 和 48 h 等不同阶段($n = 5$)的大鼠肺组织变化,激素组大鼠给予 0.5 mL/kg LPS(200 μ g/kg)气管内注射,并同时给予甲基强的松龙(30 mg/kg)尾静脉注射。观察注射后 4 h、12 h、24 h 等不同阶段($n = 5$)的大鼠肺组织变化。

1.4 样本检测

将大鼠腹腔注射戊巴比妥钠(50 mg/kg),颈动脉插管监测血压。将大鼠放血处死,暴露肺组织和气管。采用 2.5 mL 的 37℃ 无菌无热原的磷酸盐缓冲溶液(PBS)进行经右主气管进行灌洗肺组织,共计 9 次。丢弃第 1 次的灌洗液,将其他 8 个 2.5 mL 灌洗液馏分回收和汇总。使用标准法计算其总细胞数。

将细胞固定并行 HE 染色。将 BAL 在 1 000 r/min 离心 10 min,并收集。BAL 中的白蛋白浓缩 5 倍并用溴甲酚绿法测定。右下肺部分用 4% 多聚甲醛固定,石蜡包埋,每个肺切片常规用苏木精染色处理,光镜下观察。对大鼠左上肺行免疫组化研究,通过电子显微镜和免疫电子显微镜检查,左肺的其余部分进行称量,获得肺湿重,然后将其放置于 60℃ 温箱内干燥脱水 5 d。待其重量不再变化时称其干重。

1.5 免疫组织化学和免疫电镜观察

AQP1 和 AQP5 在肺组织中的表达:(1)免疫组化染色:按试剂盒说明书操作。抗 AQP1 抗体浓度 1:1000,抗 AQP5 抗体浓度 1:1000。图像分析测 AQP1 和 AQP5 阳性染色的平均吸光度(A)。(2)免疫电镜染色:抗 AQP5 抗体浓度 1:1000。(3)肺组织胞膜蛋白 AQP1 及 AQP5 分析:免疫印迹法一抗(抗 AQP1 抗体 1:1000;抗 AQP5 抗体,1:500),4℃ 过夜孵育,二抗(碱性磷酸酶标记,1:2000)孵育后显色。阳性显色为棕黄色,经 UVP 扫描仪扫描成像,计算曲线下面积的 A 值。

1.6 免疫组化染色结果判定

AQP1 和 AQP5 在肺组织中的表达强度依阳性细胞数分为四级:(1)阴性(-):阳性细胞数 < 5%;(2)弱阳性(+):阳性细胞数 5% ~ 20%;(3)阳性(++):阳性细胞数 20% ~ 60%;(4)强阳性(+++):阳性细胞数 > 60%。

1.7 Western-blot 检测各组肺组织中 AQP1 和 AQP5 蛋白含量

各组肺组织块称重,加入蛋白裂解液以及 PMSF(50 μ L PMSF + 3 mL 蛋白裂解液),用匀浆器研磨组织;4℃ 裂解 30 min,置入 4℃ 恒温离心机,以离心半径 10 cm、12 000 r/min 离心 15 min。收集上清液,BCA 试剂盒检测蛋白浓度。将样品蛋白 8 μ g 在 5% ~ 17% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转 PVDF 膜, PBS 液加 0.05% Tween-20 (PBS-T)洗涤,2% 脱脂奶粉室温封闭 2 h;再用

PBS-T 洗膜,加 AQP1 和 AQP5 一抗,4℃ 孵育过夜, PBS-T 洗涤,二抗(羊抗兔/鼠 IgG)室温孵育 2 h, PBS-T 洗膜,用 ECL 方法在暗室显影,X 线片曝光。采用 Image Pro Plus 图像分析软件分析结果。

1.8 统计学方法

应用 SPSS 18.0 软件:计数资料采用 t 检验,计量资料采用方差分析, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺损伤的严重程度

3 组中所有大鼠均存活。LPS 组大鼠呼吸正常,和 NS 对照组大鼠的平均动脉压 95 ± 2.6 mmHg 比较,LPS 组大鼠的平均动脉压明显降低,4 h 和 12 h 的平均动脉压分别为 68 ± 6.6 mmHg 和 71 ± 6.8 mmHg,其差异具有统计学意义($P < 0.05$)。24 h 和 48 h 大鼠的平均动脉压分别为 83 ± 10.4 mmHg 和 87 ± 7.9 mmHg,虽有部分恢复,但和 NS 对照组大鼠相比,差异仍具有统计学意义($P < 0.05$)。

LPS 灌注后,大鼠的肺湿干重比在显著增加 4 h 和 12 h 时显著增加,分别为 6.73 ± 0.68 和 6.50 ± 0.59 ,和 NS 对照组大鼠(4.48 ± 0.37)比较,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。和 NS 对照组大鼠(4.48 ± 0.37)比较,LPS 组大鼠 24 h 和 48 h 时肺湿干重比的差异无统计学意义($P > 0.05$)。

2.2 LPS 组的组织学检查

组织学检查显示,LPS 注入大鼠气管后,4 h 和 12 h 后,大鼠肺间质水肿,肺组织明显中性粒细胞浸润。电镜显示大鼠肺组织 I 型肺泡上皮肿胀,细胞膜突出像是肺泡腔空间的泡沫,同时,II 型细胞绒毛干枯脱落。在 24 h 和 48 h 后,在肺组织中检测

到类似的组织学变化,在脂多糖灌注后,肺间质水肿缓解。电镜观察肺泡毛细血管膜尚连续,但厚度不均匀。

2.3 AQP1 和 AQP5 在正常肺组织细胞中的分布

在 NS 对照组,免疫标记法显示 AQP1 主要分布在肺组织微血管的内皮细胞膜,以及少部分分布在肺上皮细胞膜(图 1)。检测显示 AQP5 主要表达在 I 型肺泡膜上表达(图 2),但不在 II 型肺泡上皮细胞、血管内皮细胞和间质细胞内分布。免疫电镜显示 AQP1 在微血管内皮细胞的顶端和基底膜上,而 AQP5 主要存在于 I 型肺泡上皮细胞的顶膜(图 3)。

2.4 不同组间 AQP1 和 AQP5 的表达

气管内灌注 LPS 4 h ~ 48 h 后,免疫组化分析大鼠肺组织中 AQP1 和 AQP5 的表达。与 NS 对照组比较,LPS 组 AQP1 和 AQP5 在细胞中表达的位置和特异性染色的细胞类型不变。但是,和 NS 对照组比较,LPS 组各个阶段的 AQP1 表达均降低(图 1 和 4)。与 4 h ~ 12 h 阶段的 LPS 组大鼠相比,24 h ~ 48 h 后,LPS 组大鼠的 AQP1 表达部分恢复(表 1)。另一方面,LPS 组大鼠肺组织 AQP5 表达 4 h ~ 48 h 各个阶段均有所降低,24 h ~ 48 h 后也没有任何的恢复(图 5)。

此外,结果显示,和 LPS 组相比,激素组大鼠在气管内灌注 LPS 联合甲基强的松龙的注射 4 h ~ 12 h 后,大鼠肺组织微血管内皮细胞 AQP1 的表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$),但 I 型肺泡细胞中 AQP5 的表达则不受甲基强的松龙的影响(表 1)。此外,激素组大鼠在注射甲基强的松龙 4 h ~ 12 h 后,BAL 液中白蛋白浓度和 PMN% 显著下降,证明激素组肺泡毛细血管膜通透性部分恢复。

表 1 LPS 组各阶段 BALF 中 PMN% 和肺组织中 AQP1 和 AQP5 含量($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Content of AQP5 and AQP1 in the lung tissue and PMN% of BALF of the LPS group at each stage($\bar{x} \pm s$)

组别	支气管肺泡灌洗液中的清蛋白含量	支气管肺泡灌洗液中中性粒细胞比例	水通道蛋白 AQP1 灰度值	水通道蛋白 AQP5 灰度值
Groups	Albumin in BALF	PMN% in BALF	AQP1 grayscale (A)	AQP5 grayscale (A)
NS 对照组 (NS control group)	0.15 ± 0.03	7.3 ± 2.3	33.5 ± 5.3	$24.6 \pm 3.6^*$
LPS 4 h	$0.54 \pm 0.16^*$	$89.6 \pm 7.3^*$	$20.8 \pm 3.4^*$	20.9 ± 2.5
12 h	$0.59 \pm 0.15^*$	$87.9 \pm 6.9^*$	$21.4 \pm 3.6^*$	20.4 ± 3.8
24 h	$0.37 \pm 0.12^{\#}$	$88.3 \pm 10.7^*$	$26.7 \pm 4.3^{\#}$	18.3 ± 1.9
48 h	$0.31 \pm 0.11^{\#}$	$64.2 \pm 8.2^{\#}$	$27.6 \pm 5.1^{\#}$	18.4 ± 2.7
激素组 4 h (Hormone group)	$0.32 \pm 0.10^{\#}$	$60.5 \pm 7.7^{\#}$	$26.9 \pm 4.7^{\#}$	21.1 ± 2.6
12 h	$0.27 \pm 0.06^{\#}$	$62.4 \pm 6.8^{\#}$	$26.8 \pm 4.8^{\#}$	20.7 ± 4.3
24 h	$0.28 \pm 0.07^{\#}$	$59.3 \pm 7.2^{\#}$	$27.5 \pm 4.9^{\#}$	18.2 ± 2.9

注: * $P < 0.05$, vs. NS 对照组; $^{\#} P < 0.05$, vs. LPS 4 h ~ 12 h 组。

Note: * $P < 0.05$, vs. the NS control group; $^{\#} P < 0.05$, vs. the LPS 4 - 12 h groups.

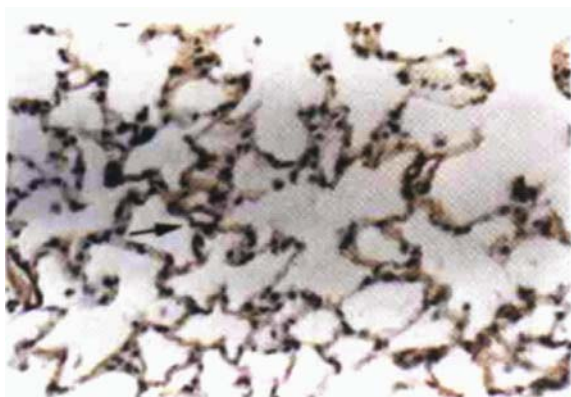


图 1 NS 组 AQP1 主要在肺组织微血管内皮细胞中表达(箭头示, SABC, ×40)

Fig.1 The expression of AQP1 in NS group was mainly expressed in microvascular endothelial cells in the lung tissue. Arrowhead indicates SABC. ×40



图 3 免疫电镜显示, I 型肺泡上皮细胞顶膜型中表达 AQP5。(箭头示, SABC, 标尺 = 20 μm)

Fig.3 AQP5 is expressed in the apical membrane of type I alveolar epithelial cells, shown by immunoelectron microscopy. Arrowhead indicates SABC. Bar = 20 μm

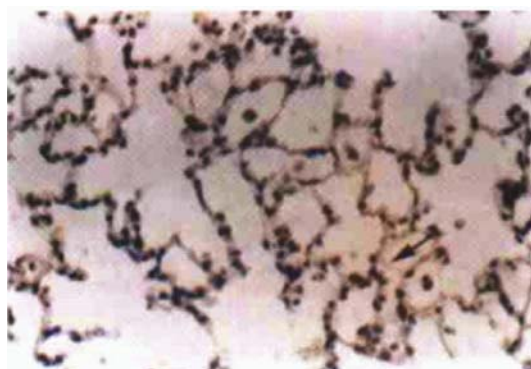


图 5 免疫组化显示: 气管内灌注 LPS 12 h 后, I 型肺泡细胞 AQP5 表达降低。(箭头示, SABC, ×40)

Fig.5 Immunohistochemistry shows that the expression of AQP5 in type I alveolar cells is decreased at 12 h after LPS perfusion LPS. Arrowhead indicates SABC. ×40)

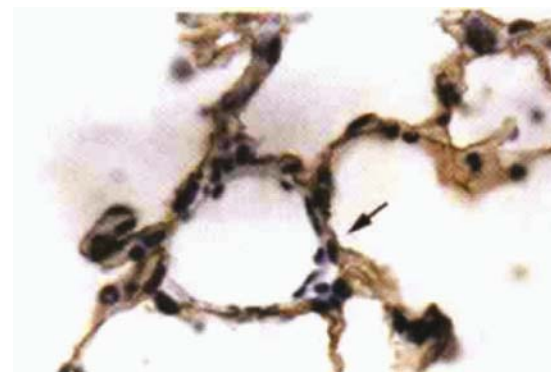


图 2 免疫组织化学染色显示 AQP5 在 I 型肺泡细胞内表达(箭头示 SABC, ×100)

Fig.2 Immunohistochemical staining shows that AQP5 is expressed in type I alveolar cells. Arrowhead indicates SABC. ×100

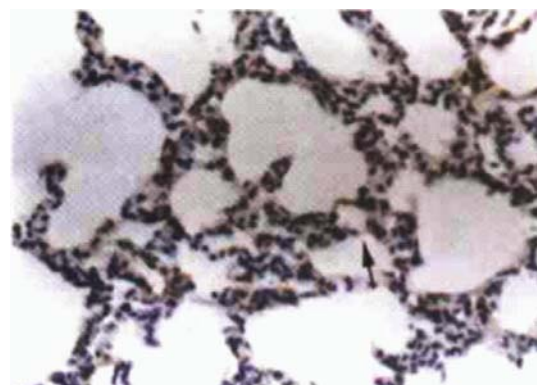


图 4 免疫组织化学显示: 气管内灌注 LPS 4 h 后, 肺组织微血管内皮细胞的 AQP1 表达显著降低。(箭头示, SABC, ×40)

Fig.4 Immunohistochemistry shows that the expression of AQP1 in microvascular endothelial cells of lung tissue was significantly decreased at 4 hours after LPS perfusion. Arrowhead indicates SABC. ×40

2.5 Western-blot 检测各组大鼠肺组织 AQP1 和 AQP5 蛋白表达

LPS 组大鼠经 LPS 灌注后 4 h, AQP1 蛋白量减少至 NS 对照组的 $(45.2 \pm 4.4)\%$ ($P < 0.05$)。AQP5 降至 NS 对照组的 $(68.6 \pm 8.9)\%$ ($P < 0.05$, $n = 5$); 24 h 后 AQP1 蛋白量降至 NS 对照组的 $(63.4 \pm 5.9)\%$, AQP5 降至 NS 对照组的 $(61.4 \pm 4.6)\%$, 差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

水通道蛋白 (aquaporins, AQP) [3] 是一种存在生物膜上的分子量为 28000 的具有通透水分功能的内在蛋白。水通道蛋白通过减小水越膜运动的阻力而使细胞间水分迁移的速率加快。水通道蛋白

的嵌入使生物膜对水的通透能力大大提高,因此可以通过改变水孔蛋白的活性和调节水孔蛋白在膜上的丰度两种途径来调节膜对水的通透能力^[4]。目前在人类细胞中已发现的 AQP 至少有 12 种,均具有选择性的让水分子通过的特性。在动物中如肾脏、眼、脑中都存在 AQP。而在肺组织中有 6 种 AQP 表达,其中 AQP1 主要分布在肺毛细血管内皮细胞,AQP5 主要分布在肺泡 I 型细胞的顶膜面,这种分布表明 AQP1、AQP5 与肺水的形成和吸收过程密切相关^[5]。

Towne 等^[6]采用免疫组织化学和免疫荧光染色法测银屑患者的皮肤组织中 AQP5 的表达,发现不同于正常表皮,AQP5 在银屑病皮损和皮损周围的表皮中表达下降。使用 Tewameter RTM210 和 Corneometer RCM 820 检测银屑病患者皮损及周围的结果显示:TEWL 增加、水合作用下降。研究者们认为,AQP5 的表达是引起银屑病患者皮损部位的干燥的一个关键因素。Nakakoshi M 等^[7]发现,皮肤鳞状细胞癌强表达 AQP5 蛋白,以及创伤愈合过程中 AQP5 对角质形成细胞起作用等现象,推进了深入研究 AQP5 参与了皮肤肿瘤的过程。研究发现,暴露于肿瘤诱导剂,AQP5 基因敲除鼠未出现皮肤肿瘤,而野生型小鼠则出现多种肿瘤;皮肤乳头瘤状细胞强表达 AQP5,并与增殖标记物 K14 共定位,这一点与皮肤鳞癌类似。在皮肤肿瘤的发生过程中,AQP5 基因敲除小鼠对肿瘤诱导剂导致的皮肤肿瘤有明显的抵抗性^[8]。

研究显示,AQP1 主要表达于肺泡周围的毛细血管内皮细胞^[9]。本实验结果显示,在 NS 对照组,免疫标记法显示 AQP1 主要分布在肺组织微血管的内皮细胞膜,以及少部分分布在肺上皮细胞膜。检测显示 AQP5 主要表达在 I 型肺泡膜上表达,但不在 II 型肺泡上皮细胞、血管内皮细胞和间质细胞内分布。免疫电镜显示 AQP1 在微血管内皮细胞的顶端和基底膜上,而 AQP5 主要存在于 I 型肺泡上皮细胞的顶膜。AQP1、AQP5 在呼吸膜不同的表达位置,推测其可能具有不同的生理功能^[10]。

在本研究中,组织学检查显示,LPS 注入大鼠气管后,4 h 和 12 h 后,大鼠肺间质水肿,肺组织明显中性粒细胞浸润。电镜显示大鼠肺组织 I 型肺泡上皮肿胀,细胞膜突出像是肺泡腔空间的泡沫,同时,II 型细胞绒毛干枯脱落。在 24 h 和 48 h 后,在肺组织中检测到类似的组织学变化,在脂多糖灌注后,

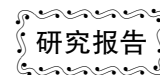
肺间质水肿缓解。电镜观察肺泡毛细血管膜尚连续,但厚度不均匀。气管内灌注 LPS 4 h ~ 48 h 后,免疫组化分析大鼠肺组织中 AQP1 和 AQP5 的表达。与 NS 对照组比较,LPS 组 AQP1 和 AQP5 在细胞中表达的位置和特异性染色的细胞类型不变。但是,和 NS 对照组比较,LPS 组各个阶段的 AQP1 表达均降低。与 4 h ~ 12 h 阶段的 LPS 组大鼠相比,24 h ~ 48 h 后,LPS 组大鼠的 AQP1 表达部分恢复。另一方面,LPS 组大鼠肺组织 AQP5 表达 4 h ~ 48 h 各个阶段均有所降低,24 h ~ 48 h 后也没有任何的恢复。

此外,结果显示,和 LPS 组相比,激素组大鼠在气管内灌注 LPS 联合甲基强的松龙的注射 4 h ~ 12 h 后,大鼠肺组织微血管内皮细胞 AQP1 的表达增强,差异有统计学意义($P < 0.05$),但 I 型肺泡细胞中 AQP5 的表达则不受甲基强的松龙的影响(表 1)。此外,激素组大鼠在注射甲基强的松龙 4 h ~ 12 h 后,BAL 液中白蛋白浓度和 PMN% 显著下降,证明激素组肺泡毛细血管膜通透性部分恢复。

综上所述,AQP1 和 AQP5 虽然均是 AQP 的家族成员,但两者在结构及功能上均有较明显的差异,根据本研究的结果,我们推测它们在完成液体转运的过程中可能通过不同的刺激方式发挥不同的作用。

参考文献:

- [1] Arge P, Preston GM, Smith BL, et al. Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel [J]. *Am J Physiol*, 1993, 256: F463 - F467.
- [2] Borgnia M, Nielsen S, Engel A, et al. Cellular and molecular biology of the Aquaporin water channel. [J] *Annu Rev Biochem*, 1999, 68: 425 - 458.
- [3] 杨国栋,姚新民. 莨菪类药物治疗急性肺损伤的探索和药理学基础 [J]. *中国急救医学*, 2004, 4(4): 48 - 58.
- [4] 张惟才,韩聪译. 蛋白质的 SDS2 聚丙烯酰胺凝胶电泳 [M]. 黄培堂,主译. 分子克隆实验指南(第 3 版). 北京: 科学出版社, 2003: 1713 - 1726.
- [5] King LS, Nielsen S, Agre P. Aquaporins in complex tissues. I. Developmental patterns in respiratory and glandular tissues of rat [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(5 pt1): C1541 - C1548.
- [6] Towne JE, Harrod KS, Krane CM, et al. Decreased expression of AQP 1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2000, 22: 34 - 44.
- [7] Ma T, Fukuda N, Song Y, et al. Role of AQP5 in lung fluid transport [J]. *J Clin Invest* 2000; 105: 93 - 100.
- [8] Rutschman DH, Olivera W, Sznajder JJ. Active transport and passive liquid movement in isolated perfused rat lungs [J]. *J Appl Physiol*, 1993, 75: 1574 - 1580. (下转第 90 页)



Hr 基因敲除小鼠模型的构建和表型分析

朱奎成^{1,2}, 徐存拴¹, 陈莹莹², 王纯耀², 章金涛²

(1. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007; 2. 郑州大学实验动物中心, 郑州 450052)

【摘要】 目的 建立基因敲除小鼠以深入研究无毛基因(hairless, *Hr*)的功能。**方法** 利用类转录激活因子效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术, 制备*Hr*基因敲除小鼠, 观察基因敲除小鼠毛发生长发育规律, 并取部分皮肤组织石蜡切片, 显微镜下分析结果。**结果** 获得一个在*Hr*基因编码区86~87位有2个碱基缺失的首建鼠, 产生了TGA终止密码子。通过与野生型鼠杂交获得阳性子代, 进行同窝交配, 传至第2代小鼠14 d开始脱发, 30 d左右毛发脱净, 并终身保持无毛。皮肤组织学观察发现真皮内形成大小不等的包裹。研究结果表明成功建立的*Hr*基因敲除小鼠表现出毛发生长异常。**结论** 证明了无毛基因与毛发生长发育的密切关系, 为研究*Hr*基因的精确功能提供了良好的动物模型。

【关键词】 无毛基因; 基因敲除; 小鼠; 表型

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0075-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.012

Construction of a *Hr* mutant knockout mouse model and phenotypic analysis

ZHU Kui-cheng^{1,2}, XU Cun-shuan¹, WANG Chun-yao²,
CHEN Ying-ying², ZHANG Jing-tao²

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Laboratory Animal Center of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

【Abstract】 Objective To establish a *Hr* mutant knockout mouse model to study the function of *Hr* gene. **Methods** Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) technique was used to disrupt the mouse *Hr* locus, creating heritable mutations that eliminate *Hr* function to explore the effects of *Hr* on hair development and provide a good model to study the function of *Hr* gene. The phenotype of *Hr*^{-/-} mice was observed after birth and skin histology of the transgenic mice was studied by light microscopy. **Results** It was shown that a F0 mouse with the 2-bp deletion in *Hr* gene ranging from 86 to 87 base pairs was obtained. The male mice with clear deletion of the *Hr* fragment and with obvious frame shifting were mated with wild-type female mice, and F₁ mice were achieved. The heterozygous males mated with females to generate the F₂ homozygous mice. The first hair coat of *Hr*^{-/-} mice developed normally. Beginning from 14 days after birth, however, there was a rapid hair loss. The mice were completely hairless except for a few vibrissae at 30 days. Histologically, two characteristic structures appeared, the utriculus and dermal cyst. **Conclusions** The results suggest that *Hr*^{-/-} mice are successfully created using TALENs, and *Hr* is important for regulating hair development, which could explain at least in part the hair loss and be applied to study the mechanism of hair growth and development disorder.

【Key words】 *Hr*; Knockout; mouse; Phenotype

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 31372270)。

[作者简介] 朱奎成(1975-), 男, 在读博士, 副教授。研究方向: 动物学。Email: kuicheng123@126.com。

[通讯作者] 1. 徐存拴(1958-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 细胞分化调控; 2. 章金涛(1968-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 遗传学。

脱发或称秃发是一种常见的人类疾病。毛发生长和脱落的调节是一个高度复杂的过程,受到许多基因的调控^[1]。寻找影响毛发生长和脱落的重量级因子,将为阐明毛发生长周期的调控机制,研发有效治疗脱发性疾病的药物提供新的思路和治疗手段。无毛小鼠(hairless mice)是一种皮肤和被毛结构发生异常变化的小鼠,该种小鼠出生后第一次毛发生长正常,大约在 14 d 开始从头部向尾部脱毛,正常情况下 1 周内被毛全部脱净,并终生保持无毛状态,其表型类似于人的丘疹性无毛症(papular atrichia)^[2],是皮肤病及毛发生长研究的良好实验动物模型,由于无毛小鼠的无毛表型是因为一个被定位于 14 号染色体上的功能基因突变所致^[3],因此,该基因被命名为“无毛基因”(hairless gene, *Hr*)。近十年来,有关小鼠 *Hr* 基因等位自发突变动物的报道达 16 个之多,这些研究结果揭示了 *Hr* 基因突变与多样化表型之间的复杂关系^[4-5],成为研究毛发生长脱落机制的重要实验材料,但进展缓慢。作者认为,建立遗传突变动物,进一步分析无毛基因的精确功能和毛囊周期的调控途径有助于探明 *Hr* 基因致脱发的发病机制,并为人的脱发、斑秃等毛发疾病研究提供重要的新线索。本研究利用 TALENs 技术建立了 *Hr* 基因敲除的小鼠模型提供基础资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

C57BL/6J 小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司(SCXK(粤)2013-0032)。饲养于郑州大学实验动物中心 SPF 级动物房,许可证号:SYXK(豫)2016-0002。饲料购自郑州大学实验动物中心,经⁶⁰Co 辐照灭菌。

1.2 TALENs 载体的构建和体外转录

根据 NCBI 上 *Hr* 基因序列,利用 TALEN 在线设计工具(<http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx>)设计基因敲除位点。左右靶点的识别模块经 golden gate 方法组装完成后,克隆到载体上构建成 pRP[TALEN]-Hygro-CMV > 22nt _ TGTGAACGGCATTTGTTGGGACAG 真核表达载体。线性化后,在 T7 启动子的作用下体外转录为 mRNA 注射到 C57BL/6J 的受精卵中,挑选注射后状态良好的受精卵,移植到假孕母鼠的输卵管内,待其自然生下 F₀ 代小鼠。

剪取经原核注射产生的 1 周龄首建鼠的鼠尾组织,提取基因组 DNA,利用引物扩增目的片段,PCR 上游引物为:5'-CTCATGCTTTGTCCTTACCCTCC

AG-3',下游引物为:5'-CACCAGTGAGAGTGTGTCC TTGGG-3',对扩增出的 PCR 产物进行测序,与 C57BL/6J 小鼠基因目的序列比对,分析靶点序列缺失情况。

1.3 基因敲除小鼠繁殖及表型分析

显微注射获得 F₀ 代小鼠分别与野生型的 C57BL/6J 交配,对交配获得的 F₁ 代小鼠进行基因型鉴定,分别建系。将来自同一只 F₀ 的阳性 F₁ 代小鼠同胞交配,可获得 F₂ 代小鼠,对 F₂ 代小鼠进行基因型鉴定。理论上 F₂ 代小鼠中 25% 的几率为 *Hr*^{-/-} 纯合子小鼠。

出生后每天观察小鼠被毛及皮肤形态的变化,详细记录。皮肤组织学观察:动物颈椎脱臼法处死,取背部中央皮肤,体积分数 10% 甲醛溶液固定,脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色,显微镜下观察,拍照。

2 结果

2.1 *Hr* 敲除小鼠的构建及 PCR 鉴定

根据小鼠 *Hr* 核酸序列信息,针对外显子设计两处相邻的靶序列进行 TAL 识别模块构建,将这两个相邻靶点识别模块融合克隆到 FokI 的 N-末端,形成真核表达载体,原核注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,移植到假孕鼠子宫内,共出生 13 只幼仔,剪取 7 日龄的鼠尾组织,提取基因组 DNA,PCR 扩增,测序与 C57BL/6J 小鼠基因序列比较,其中 10#小鼠在 *Hr* 编码区 86~87 位共 2 个碱基的缺失,产生了 TGA 终止密码子(图 1)。

2.2 基因敲除小鼠繁殖及表型初步分析

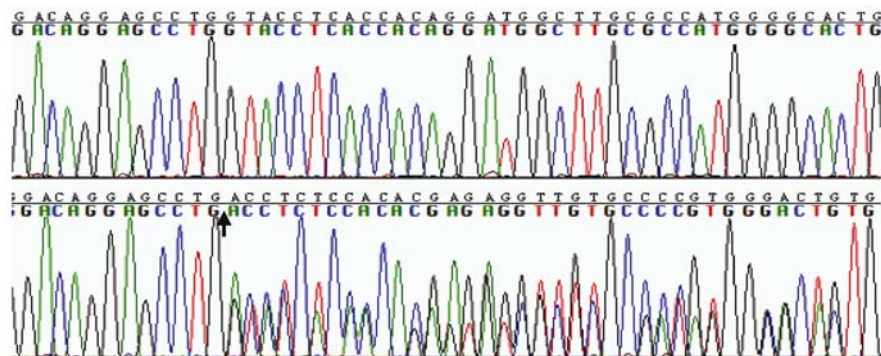
2.2.1 形态观察:基因敲除小鼠出生后被毛生长正常,与有毛小鼠无法区分。大约 2 周左右,基因敲除纯合子小鼠开始从背部开始脱毛(图 2 A),然后延伸至头颈部及尾部。1 月龄时毛发基本脱落殆尽,仅保留极少分散毛发,皮肤为肉色偏红,皮肤薄,头、颈部有较细的皮肤皱纹(图 2 B),并随年龄增长,皮肤变厚,颜色加深,更加松弛并终身保持无毛状态。

2.2.2 组织学:14 日龄敲除小鼠皮肤可见毛囊上部的毛管部宽大形成椭圆囊,毛囊解体,毛球部和毛乳头滞留于真皮内(图 3 A)。1 月龄敲除小鼠皮肤小囊内含一些角质碎屑样物质,真皮层中见几排大小不等的包囊(图 3 B)。14 日龄(图 3 C)和 1 月龄(图 3 D)对照小鼠真皮中见多量发育正常的毛囊。

WT agccctgtgaacggcattgtgggacaggagcctgttacctaccacaggatggcttgcgcatggggca
 10# agccctgtgaacggcattgtgggacaggagcctg--acctcaccacaggatggcttgcgcatggggca (-2)

A

Mouse-10: missing 2 bases (GT)



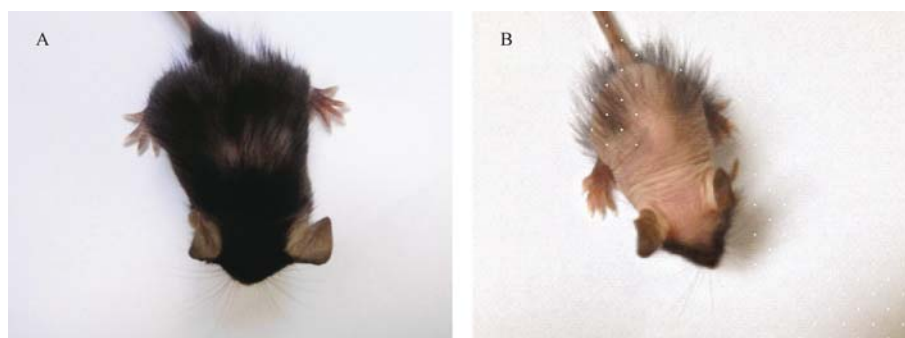
B

A: - 示碱基缺失部分; B: 上图为正常 C57BL/6J 小鼠, 下图为基因敲除小鼠; 箭头示碱基缺失位点。

图 1 测序结果序列比对图(A)和测序图(B)

A: The short dotted lines represent the knockout bases. B: Sequence comparison and sequence map of different mice. The wild-type sequence is shown at the top. The arrow shows deletion sites.

Fig.1 Sequence comparison and sequence map



A: 14 日龄敲除小鼠全身毛发稀疏; B: 1 月龄敲除小鼠毛发基本脱净。

图 2 转基因小鼠脱毛规律及皮肤表型的变化

A: Note the sparse hair at 14 days of age. B: Hair is almost completely missing at one month of age.

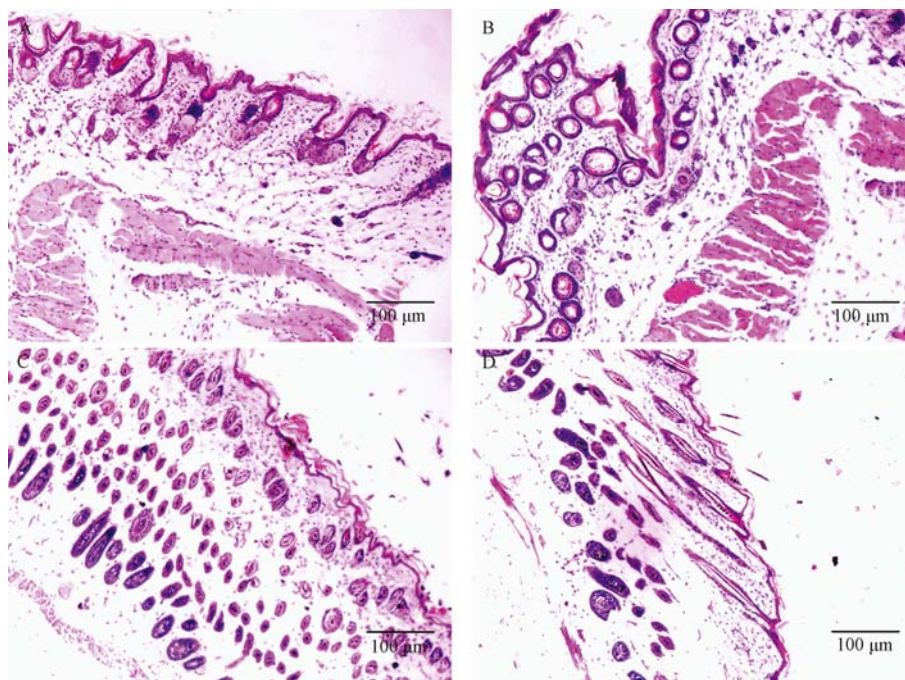
Fig.2 Hair loss in the hr knockout mice and changes of the skin phenotype

3 讨论

无毛基因是一个多效基因,位点的突变,不仅造成完全和持久的无毛,而且还导致免疫与繁殖的异常(Ignatieva et al, 1988)、淋巴瘤易感性的增高(Meier et al, 1969)、二噁英毒性敏感性的增加等^[6]。到目前为止,无毛基因已发现了 16 个等位基因,如 hairless(*hr^{hr}*)突变、rhino(*hr^{rh}*)突变、*Hrrh-J* 突变、*Hrrh-R* 突变等。不同等位基因间即具有共同特征,如程序化的脱毛方式,皮肤皱褶,育仔困难,免疫受损,真皮包囊出现等^[7]。目前,通过建立转基因

因动物模型来研究基因的生物学功能,已越来越普遍地被研究者所接受^[8]。基因敲除是证明基因功能不可缺少的逻辑环节,是研究基因功能最直接有效的方法之一。TALEN 作为一种高效的基因编辑工具,当其在基因组上产生双链断裂后,可以通过 NHEJ 修复方式产生基因敲除^[9]。

课题组采用 TALENs 技术构建了 *Hr* 基因敲除小鼠,测序发现 *hr* 编码区 86 ~ 87 位共 2 个碱基的缺失,产生了 TGA 终止密码子。基因敲除小鼠生长发育观察发现,小鼠出生后 14 d 开始从头颈部、背部、尾部开始脱毛,表现为稀毛特征,最后全身脱



A: 14 日龄敲除小鼠毛囊上部的毛管部宽大形成椭圆囊。B: 1 月龄敲除小鼠真皮深层及皮下组织有几排大小不等的包裹。C: 14 日龄 C57BL/6J 小鼠毛囊。D: 1 月龄 C57BL/6J 小鼠毛囊。

图 3 基因敲除和 C57BL/6J 小鼠皮肤组织学观察 (HE, 标尺 = 100 μm)

A: The widened hair canals of upper follicle form multiple utricles in a 14-day-old *Hr* knockout mice.

B: Note the several rows of dermal cysts in a 1-month-old *Hr* knockout mouse. C: Normal hair follicles in a 14-day old control mouse. D: Hair follicles in a wild-type mouse developed normally at day 30.

Fig. 3 Histologic appearance of skin in the *Hr* knockout mice (HE, Bar = 100 μm)

净,并终生保持无毛状态。皮肤组织学观察发现毛发生长缺陷,皮肤内毛囊瓦解,并形成许多椭圆囊及真皮包裹,与无毛基因自发突变研究结果一致^[10]。本研究敲除小鼠的获得说明 *Hr* 基因影响了毛囊的正常生长发育,机理可能在于基因缺失致其基因产物-无毛蛋白的丧失,无毛蛋白是一个 H3K9 去甲基化酶,可通过直接控制其靶基因,调节表皮的内稳态^[11]。利用本试验建立的基因敲除小鼠模型,对深入了解 *Hr* 基因在毛发生长发育中表达调控的分子机制,鉴别控制毛发生长的关键基因并研究它的作用机制,可能为最终揭开人类脱发的奥秘,发展有效治疗药物,解决毛发再生难题提供了有价值的材料。

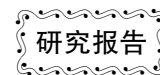
参考文献:

- [1] Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81: 449–494.
- [2] Porter RM. Mouse models for human hair loss disorders [J]. *J Anat*, 2003, 202: 125–131.
- [3] Jones JM, Elder JT, Simin K, et al. Insertional mutation of the hairless locus on mouse chromosome 14 [J]. *Mamm Genome*,

1990, 4(11): 639–643.

- [4] Yip L, Horev L, Sinclair R, et al. Atrichia with papular lesions: a report of three novel human hairless gene mutations and a revision of diagnostic criteria [J]. *Acta Derm Venereol*, 2008, 88: 346–349.
- [5] Benavides F, Oberyszyn TM, VanBuskirk AM, et al. The hairless mouse in skin research [J]. *J Dermatol Sci*, 2009, 53: 10–18.
- [6] Kim JE, Song D, Kim J, et al. Oral supplementation with cocoa extract reduces UVB-induced wrinkles in hairless mouse skin [J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 11: 455–457.
- [7] 王冬平, 栾蓉晖, 李善如, 等. BALB/c 突变无毛小鼠特异性免疫功能的研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2003, 11(1): 23–25.
- [8] 孙振红, 苗向阳, 朱瑞良, 等. 动物转基因新技术研究进展 [J]. *遗传*, 2010, 32(6): 539–547.
- [9] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143–148.
- [10] 章金涛, 付淑莉, 王纯耀, 等. 无毛小鼠不同年龄皮肤结构的比较研究 [J]. *中国实验动物学报*, 1998, 6(1): 37–41.
- [11] Liu L, Kim H, Casta A. Hairless is a histone H3K9 demethylase [J]. *FASEB J*, 2014, 8: 1534–1542.

[修回日期]2016–04–04



蛋白磷酸酶 5 (PP5) 对小鼠脂肪代谢的影响

王 君¹, 邱 彬², 刘 明², 王 超², 雍伟东², 谢忠稳¹

(1. 安徽农业大学, 茶与食品科技学院, 茶树生物学与资源利用国家重点实验室, 安徽, 合肥 230036;
2. 中国医学科学院医学实验动物研究所, 基因与发育室, 北京 100021)

【摘要】 目的 利用蛋白磷酸酶 5 (PP5) 基因敲除小鼠, 探究 PP5 在小鼠脂肪代谢中的作用。**方法** 随机选取 6 周龄雄性 PP5 基因敲除 (PP5 KO) 和野生型 (WT) 小鼠, 高脂饲养 6 周后, 应用 HE 染色和油红 O 染色技术对小鼠肝脏结构和脂滴积累进行检测, 应用 Western blotting 和 real-time PCR 技术检测肝脏组织中脂代谢相关基因的表达情况。同时应用 PP5 KO 和 WT 小鼠成纤维细胞, 在体外观察 PP5 对脂肪分化的影响。**结果** 与 WT 小鼠相比, 高脂饲养后 PP5 KO 小鼠体重与 WT 小鼠相比显著减轻, 肝脏中脂滴数量显著较少且脂滴较小。体外实验发现与 WT 小鼠胚胎成纤维细胞 (mouse embryonic fibroblast, MEF) 相比 PP5 KO MEF 细胞脂肪分化显著较弱, 脂滴较小。此外, 在 PP5 KO 肝脏组织中脂肪分化标记基因 *CD36*、*AP2*、*PPAR γ* ₂ 和 *Glut4* 的相对表达量显著降低, 而能量代谢相关蛋白糖皮质激素受体 (GR) 的磷酸化水平显著增加, 解偶联蛋白 1 (UCP1) 表达量也显著升高。**结论** PP5 通过调节 GR 的去磷酸化影响机体脂肪分化和能量代谢调控小鼠脂肪代谢。

【关键词】 蛋白磷酸酶 5; 糖皮质激素受体; 解偶联蛋白 1; 脂肪分化; 能量代谢

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0079-06

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.013

Influence of protein phosphatase 5 on the lipid metabolism in mice

WANG Jun¹, QIU Bin², LIU Ming², WANG Chao²,
YONG Wei-dong², XIE Zhong-wen¹

(1. College of Tea and Food Sciences, State Key Laboratory of Tea Plant Biology and Utilization, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China; 2. Laboratory of Gene and Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021)

【Abstract】 Objective To investigate the effect of protein phosphatase 5 (PP5) on lipid metabolism in the PP5 knockout (KO) mice. **Methods** Male PP5 KO and wild type (WT) mice at the age of 6 weeks were used in this study. In order to study the effect of high fat diet (HFD) feeding, the body weight was measured. The liver histology was examined by HE and oil red O staining. To further verify PP5 functions in the adipogenesis, *in vitro* experiment was carried out using mouse embryonic fibroblasts (MEF). Western blotting and real-time PCR were performed to quantified the expression of lipid metabolism-related genes in the liver tissues. **Results** Compared with the WT mice, the body weight gain was slower in the KO mice. The size of the lipid droplets was smaller and the quantity was less in the KO mouse liver tissue. *In vitro* study revealed that the KO mouse MEF cells showed less differentiated adipocytes with smaller lipid droplets than the WT MEF cells. This observation was further confirmed by detecting the expression of adipogenesis-related genes in the HFD liver. The markers of adipocyte differentiation, such as *CD36*, *AP2*, *PPAR γ* ₂, and *Glut4*, were significantly decreased, while energy expenditure-related markers, such as phosphorylation of GR and expression of UCP1, were

【基金项目】 国家自然科学基金(81272273)、国家科技重大专项(2014ZX10004002-003-001)资助。

【作者简介】 王君(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 营养与发育生物学。E-mail: junwang138@sina.com。

【通讯作者】 谢忠稳, 男, 教授, 研究方向: 营养与代谢生物学, Email: zhongwenxie@ahau.edu.cn; 雍伟东, 男, 研究员, 研究方向: 生殖与发育生物学, Email: wyong@cnilas.org。

significantly increased. **Conclusions** Protein phosphatase 5 may play a regulatory role in the mouse lipid metabolism through regulating the de-phosphorylation of p-GR and enhancing the expression of UCP1.

【Key words】 Protein phosphatase 5; GR; UCP1; Adipocyte differentiation; Energy metabolism; Mice

甾体激素受体是一类参与细胞调控的核受体超家族,对生物体具有极其重要的作用,主要包括糖皮质激素受体(GR)、雌激素受体(ER)、雄激素受体(AR)、孕激素受体(PR)以及盐皮质激素受体(MR)。其中糖皮质激素受体在个体中具有广泛表达,介导糖皮质激素(GCs)对机体糖、脂肪和蛋白质的生物合成和代谢等功能的调节作用。由于糖皮质激素(GCs)是全身能量平衡的重要调节因子^[1],因而GR的活性变化将严重影响机体的物质能量代谢功能。蛋白磷酸酶5(PP5),是一种在机体内广泛表达的共伴侣蛋白,具有丝氨酸/苏氨酸磷酸酶活性,在细胞生长、增殖、分化、迁移以及胁迫条件下的细胞生存等方面都发挥重要作用^[2,3]。研究表明PP5能够直接与HSP90/GR复合体结合,通过催化GR的去磷酸化过程^[4],调节GR活性。另有研究利用体外小鼠成纤维细胞脂肪诱导分化模型发现,敲除PP5可明显抑制脂肪分化^[5]。这些结果提示PP5可能通过调节GR去磷酸化影响脂肪分化,但目前仍缺乏有力的体内实验证据。本研究利用PP5基因敲除小鼠和PP5敲除小鼠成纤维细胞,从体内和体外两方面探讨敲除PP5基因对脂肪代谢的影响及其分子机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物及实验环境

清洁级雄性PP5敲除(PP5 KO)小鼠为本实验室保存,PP5敲除小鼠及其野生型(WT)对照小鼠饲养繁殖于中国医学科学院医学实验动物研究所,动物使用合格号为【SYXK(京)2011-0022】。动物实验方案经中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会批准,批准号为ILAS-PG-2014-012。

1.2 实验仪器

电子天平(精度0.01 g,上海民桥电子天平厂)。MRI(7.0T micro MRIV,美国Varian公司)。石蜡切片机(IVS-401,日本Sakura Finetek公司)。冰冻切片机(CM1900,德国Lecia)。光学显微镜(BX50,日本Olympus公司)。PCR循环仪(Applied Biosystem 7500,美国ABI公司)。化学发光成像系统(Tanon 5500,中国天能公司)。

1.3 材料

高脂饲料(60 kcal% fat, D12492)购自美国Research Diets公司。异氟宁(上海雅培制药有限公司)。高糖DMEM、胎牛血清(FBS)、青霉素-链霉素购自美国Invitrogen公司,用于培养小鼠胚胎成纤维细胞,使用前按每100 mL培养液中89%高糖DMEM、10% FBS和1%青/链霉素混合均匀后使用。磷酸酶抑制剂和蛋白酶抑制剂购自美国Sigma公司,RIPA裂解液购自中国碧云天生物科技有限公司,使用RIPA裂解液1 mL/0.1 g组织、蛋白酶抑制剂10 μ L/0.1 g组织(1片溶于100 mL三蒸水)、磷酸酶抑制剂1 μ L/0.1 g组织的混合液裂解小鼠肝脏组织。地塞米松(DEX)、IBMX和胰岛素购自美国Sigma公司,使用终浓度为地塞米松1 μ mol/L、IBMX 500 μ mol/L、胰岛素10 μ mol/mL与DMEM的混合液诱导小鼠胚胎成纤维细胞脂肪分化。Trizol购自美国Invitrogen公司,按1 mL/0.1 g组织提取mRNA。mRNA反转使用cDNA反转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒(SYBR green法)购自中国TaKaRa公司,组织蛋白定量使用BCA蛋白定量试剂盒购自中国碧云天生物科技有限公司,Western blotting检测使用p-GR抗体购自美国Cell Signaling Technology公司,UCP1抗体购自美国Abcam公司,使用比例均为抗体:稀释液=1:1 000。

1.4 实验方法

1.4.1 小鼠高脂饲养和体重测量:随机选取6周龄雄性PP5 KO和WT小鼠各6只,高脂喂养6周,每周称量并记录小鼠体重1次。

1.4.2 MRI扫描小鼠体内脂肪:取上述高脂喂养6周后的PP5 KO和WT雄鼠各3只,2%异氟宁/ O_2 (L/min)对其进行麻醉后使用MRI进行扫描,应用IRW软件(Inveon Research Workplace, Siemens, 美国)计算小鼠脂肪体积。

1.4.3 肝脏组织HE染色和油红O染色:随机选取上述高脂诱导后PP5 KO和WT雄鼠各3只,脱颈处死,肝脏以10%中性福尔马林固定,石蜡包埋后以4 μ m厚度切片,随后进行HE染色。另取1 cm $\times$ 1 cm $\times$ 0.5 cm大小肝脏经冰冻切片后,进行油红O染色。组织切片染色封片后光学显微镜下观察并采集图片。

1.4.4 MEF 细胞诱导脂肪分化:参考文献方法^[6],永生 PP5 KO 和 WT 型 MEF 细胞按 2×10^5 个/孔接种于 60 mm 细胞培养皿中,使用 DMEM 培养基(含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素)在 37℃、5% CO₂ 条件的细胞培养箱中培养。待细胞密度达 80% 密度时(记为 d-2),继续培养 2 天(记为 d0)。在 d0 时,将培养基更换为含有脂肪分化诱导剂的 DMEM 培养基(含 10% FBS、1% 青霉素-链霉素、500 μmol/L IBMX、1 μmol/L DEX、10 μmol/mL insulin)。2 天后(d2)将培养基更换为只含有 10% FBS 和 10 μmol/mL insulin 的 DMEM 培养基,以后每 2 d 更换 1 次 DMEM 培养基(10% FBS、1% 青霉素-链霉素至 d8。当细胞诱导分化至第 8 天时将细胞取出经油红 O 染色后,在光学显微镜(BX50, Olympus, 日本)下观察并照像。

1.4.5 肝脏 mRNA 提取及 Real-time-PCR 检测:取高脂诱导后 PP5 KO 和 WT 雄鼠各 3 只,脱颈处死,取其肝脏。以 TRIzol 法提取小鼠肝脏 mRNA 后,各样本以 500 ng mRNA 反转录合成 cDNA,以 Gapdh 作为内参,使用 SYBR green 相对定量法进行 PCR 扩增反应。实验中用到的引物序列如下表 1:

1.4.6 Western blotting 检测肝脏蛋白表达:取高脂诱导后 PP5 KO 和 WT 雄鼠各 3 只,脱颈处死,取其肝脏在冰上以 RIPA 蛋白裂解液(含 10% 蛋白酶抑制剂、1% 磷酸酶抑制剂)提取组织蛋白。蛋白经 BCA 法定量后以 60 μg 上样量进行 SDS-PAGE 电泳,转膜封闭后孵育一抗(UCP1, 1:1000; p-GR, 1:1000)过夜。次日孵育二抗(1:5000)后以 ECL 法使用化学发光成像系统采集荧光信号。

1.4.7 统计学方法:数据使用平均值 $\pm$ 标准误($\bar{x} \pm s$)表示,应用 GraphPad Prism 5.0 软件以 T-test 双尾法进行检验分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

±s)表示,应用 GraphPad Prism 5.0 软件以 T-test 双尾法进行检验分析,以 $P < 0.05$ 表示差异有显著性。

2 结果

2.1 PP5 基因敲除小鼠对高脂诱导的体重增加明显抑制

PP5 KO 小鼠在高脂喂养 3 周后,体重明显轻于野生型小鼠;高脂诱导 5 周后,野生型小鼠体重达到 (28.61 ± 1.00) g,而 PP5 基因敲除小鼠体重仅为 (23.70 ± 0.72) g,二者相比具有显著性差异($P = 0.0074$,图 1)。摄食量测定结果显示,PP5 KO 小鼠和 WT 小鼠的摄食量没有差别,说明敲除 PP5 并不影响小鼠的摄食量。以上结果表明 PP5 基因敲除小鼠能够抵制高脂诱导的体重增加。

2.2 敲除 PP5 基因抑制高脂诱导的小鼠体内脂肪积累

通过核磁共振成像仪对高脂喂养 6 周后的 WT 和 KO 小鼠体内脂肪含量进行测定。图 2A 显示的白色区域表示脂肪组织,从图中可以看出 WT 小鼠的脂肪含量多于 KO 小鼠。运用 Inveon Research Workplace 软件计算白色区域的绝对脂肪面积,除以体重即是单位体重的绝对脂肪体积,结果如图 2B 所示,WT 小鼠的单位体重的绝对脂肪体积显著高于 KO 小鼠($P = 0.0476$)。这一结果表明,PP5 KO 小鼠体脂含量显著少于对照组,未出现肥胖表型,提示敲除 PP5 基因能够抑制小鼠体内脂肪积累。

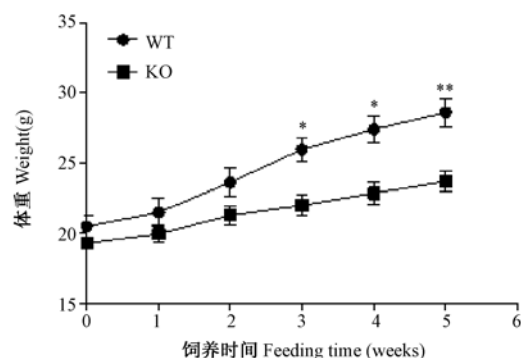
2.3 敲除 PP5 基因小鼠肝脏脂肪沉积明显较少

高脂饲养 6 周后,WT 小鼠肝脏切片 HE 染色显示有显著的脂肪堆积(空泡为脂肪组织),而 PP5 KO 小鼠肝脏切片中脂肪堆积明显少于 WT,并且其

表 1 Realtime-PCR 检测引物

Tab. 1 The primers of real-time PCR test

引物名称	引物序列
CD36	F:5'-CCAGACAACCATGTTTCTGCACTG-3' R:5'-GGACTTGCATGTAGGAAATGTGGA-3'
AP2	F:5'-GCTGGGCACTGTAGGTCAATCTCC-3' R:5'-GGTCGTTGACGTGGGAGTAAGGAT-3'
PPAR γ 2	F:5'-GGGTGAACTCTGGGAGATT-3' R:5'-ATGCTTTATCCCCACAGAC-3'
Glut4	F:5'-GGCCTGCCGAAAGAGTCTAAAG-3' R:5'-GCAAGGACATTGGACGCTCTCTCT-3'
GR	F:5'-GGACCACCTCCCAAACCTCTG-3' R:AGGTAATTGTGCTGTCCTTCCA-3'
UCP1	F:5'-CGGGCATTACAGAGGCAA-3' R:5'-ACTGAGTCGTAGAGGCCAATCC-3'
Gapdh	F:5'-ATCAACGGGAAGCCCATCAC-3' R:5'-TTGGTCCACCCCTCAAGTG-3'



注:高脂饲养后小鼠周体重记录, $n = 6$ 。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。

图 1 敲除 PP5 基因对小鼠体重的影响

Note. The body weight of mice fed with high fat diet

was recorded every week. $n = 6$. *, $P < 0.05$, **, $P < 0.01$.

Fig. 1 The effect of knocking out PP5 on body weight of the mice.

脂肪颗粒较小(图 3 A-D)。脂肪特异性油红 O 染色法对高脂诱导后的 WT 和 PP5 KO 小鼠肝脏进行分析,结果与 HE 染色一致(图 3 E-H),高脂诱导后 WT 小鼠肝脏切片出现大量的红色脂滴,脂肪沉积严重,而 PP5 KO 小鼠肝脏切片与 WT 相比红色脂滴明显减少,并且脂滴较小。这些结果揭示 PP5 可能通过调节小鼠脂肪细胞的形成或者脂肪分解影响脂代谢。

2.4 敲除 PP5 基因对小鼠胚胎成纤维细胞脂肪分化的影响

小鼠 MEF 细胞体外诱导脂肪分化实验结果显示,对体外诱导脂肪分化至第 8 天的小鼠 MEF 细胞进行油红 O 染色,结果如图 4 所示,与 WT MEF 细胞相比,PP5 KO MEF 细胞在体外诱导脂肪分化后产生的脂滴数量明显较少,且脂滴大小也小于 WT MEF 细胞。这一结果进一步证实敲除 PP5 基因脂肪细胞的分化受到抑制。

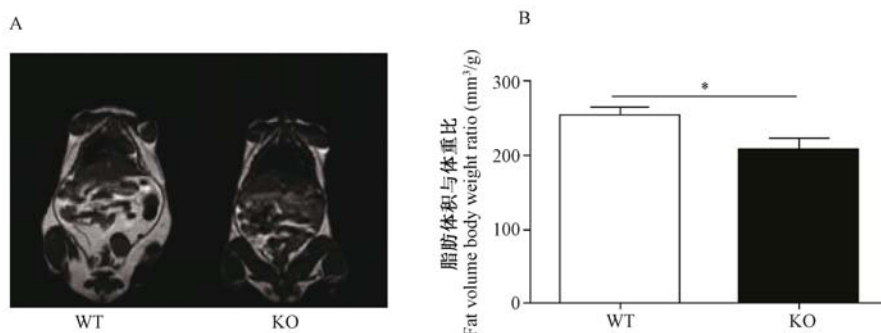
2.5 敲除 PP5 对小鼠肝脏中脂代谢相关基因的影响

利用 real-time PCR 技术检测了高脂诱导后脂肪形成标记基因包括 *CD36*、*AP2*、*PPAR γ_2* 、*Glut4* 及能量代谢相关基因 *GR* 和 *UCP1* 的表达。结果(图 5 A-D)显示,与 WT 小鼠相比 KO 小鼠肝脏中 *CD36*、*AP2*、*PPAR γ_2* 和 *Glut4* 表达显著减少,*GR* 表达没有差异性变化(图 5E),但解偶联蛋白 1(*UCP1*)表达量却显著性升高(图 5 F)。用 western blotting 技术检测了 p-GR 和 UCP1 在蛋白水平上的变化。结果显示(图 6),高脂诱导后 PP5 KO 小鼠肝脏中 p-GR 和 UCP1 蛋白表达量显著升高。这些结果表明 PP5 敲除后小鼠能量代谢增强,脂肪分化减弱。

3 讨论

我们前期研究发现在细胞水平敲除 PP5 可使脂肪分化作用减弱^[5]。本研究利用 PP5 基因敲除小鼠和 PP5 敲除小鼠 MEF 细胞,从体内和体外两方面探讨敲除 PP5 基因对脂代谢的影响以及参与这一过程的分子机制。实验结果发现,高脂诱导后 PP5 KO 小鼠体重较 WT 小鼠显著减轻,单位体重脂肪体积显著低于 WT 小鼠。进一步通过对高脂饲养小鼠肝脏 HE 和油红 O 染色证实,引起上述表型的原因可能是 PP5 KO 小鼠脂肪分化减少或者脂肪代谢增强导致。体外诱导 MEF 细胞脂分化实验证实,敲除 PP5 基因具有明显降低脂分化的能力。通过 real-time PCR 和 western blotting 技术分析脂肪代谢相关基因表达,发现 PP5 KO 脂肪形成标记基因 *CD36*、*AP2*、*PPAR γ_2* 、*Glut4* 相对表达量显著降低,能量代谢相关基因 *GR* 相对表达量无显著性变化,但磷酸化 GR (p-GR) 和 UCP1 的蛋白表达量显著升高。这些结果表明 PP5 基因敲除后小鼠能量代谢增强,脂肪分化减弱。

高脂饮食和运动缺乏的情况下机体会将未能消耗的营养成分转化为脂肪储存在脂肪组织、肝脏、肌肉中。一旦体内能量供应不足时,GCs 就会促进脂肪和蛋白质分解,为机体提供能量。而 GR 通过介导 GCs 实现对机体糖、脂肪和蛋白质的生物合成和分解代谢等功能的调节作用,GCs 是全身能量平衡的重要调节因子^[1],因而 GR 作为转录因子通过调控脂肪分解基因、脂肪形成基因,如 *CD36* 和 *Glut4* 的表达对机体的物质能量代谢起到重要调控作用。GR 与热休克蛋白 90 相互结合,而 PP5 通过

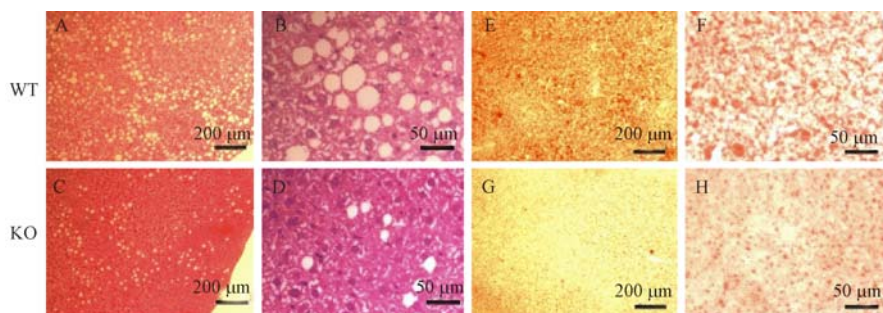


注: A. 小鼠磁共振图; B. 脂肪体积与小鼠体重比统计图, $n = 3$ 。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。

图 2 敲除 PP5 对小鼠脂肪含量的影响

Note. A: MRI photograph of mice. B: Statistic result of fat volume/body weight/ratios. $n = 3$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Fig. 2 The effect of knocking out PP5 on the mouse whole body fat

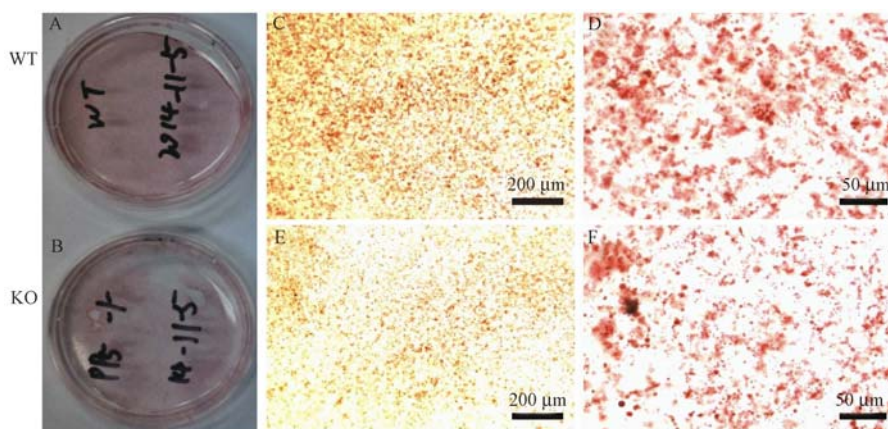


注: A-D. 肝脏石蜡切片 HE 染色; E-H. 肝脏冰冻切片油红 O 染色。

图 3 *PP5* 对小鼠肝脏脂肪的影响 (10 倍, 标尺 = 200 μm ; 40 倍, 标尺 = 50 μm)

Note. A-D: HE staining; E-H: Oil red O staining.

Fig. 3 Effect of *PP5* on the mouse liver fat. 10 times, bar = 200 μm ; 40 times, bar = 50 μm .

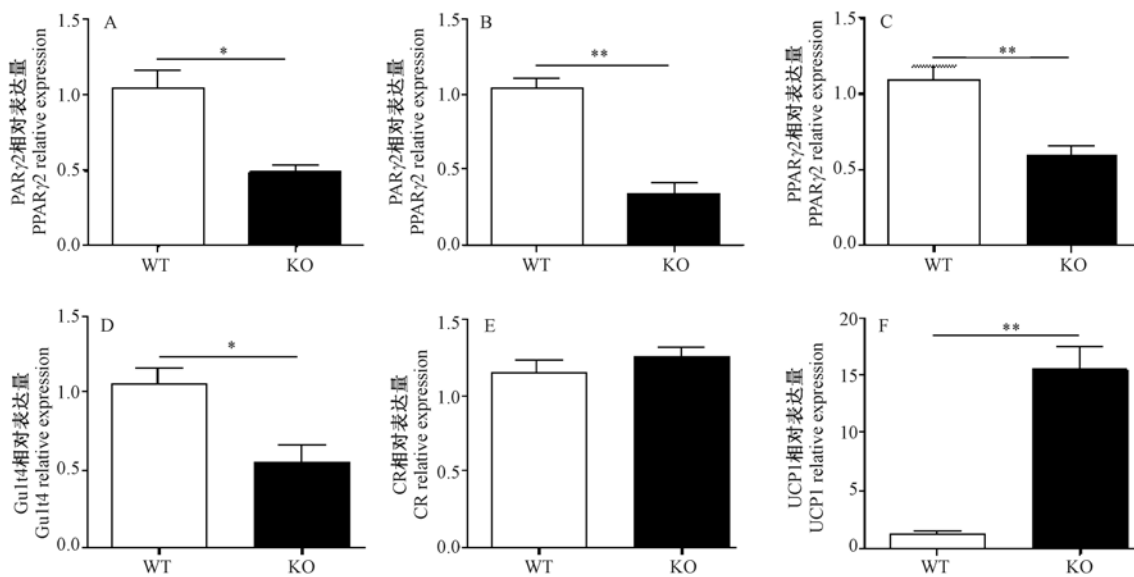


注: A-F. 诱导分化后 WT 和 KO MEF 细胞油红 O 染色。

图 4 敲除 *PP5* 基因抑制 MEF 细胞脂肪分化 (10 倍, 标尺 = 200 μm ; 40 倍, 标尺 = 50 μm)

Note: A-F. Adipocyte differentiation of WT and KO mouse embryonic fibroblasts. Oil red O staining.

Fig. 4 Knocking out *PP5* prevents the adipogenesis of MEF cells (10 times, bar = 200 μm ; 40 times, bar = 50 μm)



注: $n = 3$ 。*, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$ 。

图 5 肝脏中脂代谢相关基因表达

Note: $n = 3$. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

Fig. 5 Expression of lipid metabolism-related genes in the mouse livers.

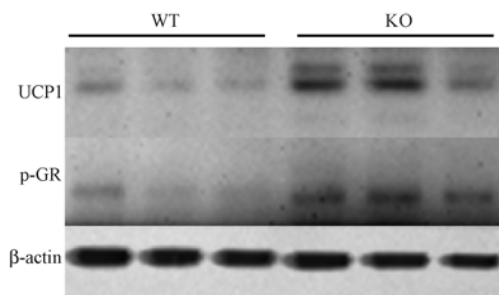


图 6 肝脏中 UCP1 和 p-GR 的表达

Fig. 6 The expression of UCP1 and p-GR in the livers

它的 TPR 结构域与热休克蛋白 90 结合,从而与 GR 构成复合物行使转录因子功能^[7]。PP5 作为蛋白磷酸酶能够使 GR 去磷酸,这将增强 GR 的活性^[1, 4, 8]。我们的实验结果表明当 PP5 敲除后 GR 磷酸化水平升高,抑制脂肪形成相关基因 *CD36*、*AP2*、*PPAR γ* 、*Glut4* 的表达,在 PP5 KO 小鼠体内揭示了 PP5 对脂肪形成的抑制作用这与已报道的体外实验结果一致,并且当 PP5 KO MEF 细胞重新获取 PP5 之后这种抑制作用减弱^[5]。

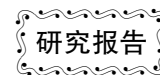
哺乳动物体内的脂肪组织分为白色脂肪和棕色脂肪,白色脂肪主要以甘油三酯的形式储存能量,而棕色脂肪则通过氧化分解脂肪为机体提供热量^[9],这种作用主要通过线粒体膜上的解偶联蛋白 1 (UCP1) 完成^[10]。已有研究证实与野生型小鼠相比 UCP1 缺乏的小鼠对高脂诱导型肥胖更加敏感^[11],与此相反,过表达 UCP1 的小鼠抵抗高脂诱导型肥胖^[12]。我们实验中发现,当 PP5 敲除后小鼠 UCP1 表达量升高且小鼠表现出对高脂诱导型肥胖的抵抗,这一现象此前未见报道,但 PP5 通过 UCP1 调控小鼠能量代谢的具体机制尚不清楚,有待进一步的研究。由于 PP5 是一种蛋白磷酸酶,目前尚未有关于 PP5 是否能够影响 UCP1 磷酸化的报道,而糖皮质激素 (GCs) 能够抑制 UCP1 的表达^[13],因此我们推断 PP5 KO 中 UCP1 的增加是一个间接调控过程,可能的机理也许是 PP5 敲除后 GR 活性增强,大量的 GCs 与 GR 结合从而对 UCP1 的抑制减弱,UCP1 的表达量升高进而增强由 UCP1 介导的脂分解能量代谢。PP5, GR 和 UCP1 三者之间的关系还有待进一步的深入研究。

参考文献:

[1] Vegiopoulos A, Herzig S. Glucocorticoids, metabolism and metabolic diseases[J]. Mol Cell Endocrinol, 2007, 275(1-2): 43-61.

- [2] Dean DA, Urban G, Aragon IV, et al. Serine/threonine protein phosphatase 5 (PP5) participates in the regulation of glucocorticoid receptor nucleocytoplasmic shuttling [J]. BMC Cell Biol, 2001, 2: 6.
- [3] Golden T, Swingle M, Honkanen R E. The role of serine/threonine protein phosphatase type 5 (PP5) in the regulation of stress-induced signaling networks and cancer [J]. Cancer Metastasis Rev, 2008, 27(2): 169-178.
- [4] Jacob W, Rosenzweig D, Vazquez-Martin C, et al. Decreased adipogenesis and adipose tissue in mice with inactivated protein phosphatase 5 [J]. Biochem J, 2015, 466(1): 163-176.
- [5] Hinds TJ, Stechschulte LA, Cash HA, et al. Protein phosphatase 5 mediates lipid metabolism through reciprocal control of glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPARGamma) [J]. J Biol Chem, 2011, 286(50): 42911-42922.
- [6] 张曼, 邱彬, 曹勇, 等. 共伴侣蛋白 FKBP51 在高脂诱导肥胖中的作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2015(07): 53-58.
- [7] Silverstein AM, Galigniana MD, Chen MS, et al. Protein phosphatase 5 is a major component of glucocorticoid receptor. hsp90 complexes with properties of an FK506-binding immunophilin [J]. J Biol Chem, 1997, 272(26): 16224-16230.
- [8] Smas CM, Chen L, Zhao L, et al. Transcriptional repression of pref-1 by glucocorticoids promotes 3T3-L1 adipocyte differentiation [J]. J Biol Chem, 1999, 274(18): 12632-12641.
- [9] Tseng YH, Cypess AM, Kahn CR. Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy [J]. Nat Rev Drug Discov, 2010, 9(6): 465-482.
- [10] Schneider K, Valdez J, Nguyen J, et al. Increased energy expenditure, UCP1 expression and resistance to diet-induced obesity in mice lacking nuclear factor-erythroid-2 related transcription factor-2 (Nrf2) [J]. J Biol Chem, 2016. doi: 10.1074/jbc.M115.673756
- [11] Feldmann HM, Golozubova V, Cannon B, et al. UCP1 ablation induces obesity and abolishes diet-induced thermogenesis in mice exempt from thermal stress by living at thermoneutrality [J]. Cell Metab, 2009, 9(2): 203-209.
- [12] Kopecky J, Clarke G, Enerback S, et al. Expression of the mitochondrial uncoupling protein gene from the aP2 gene promoter prevents genetic obesity [J]. J Clin Invest, 1995, 96(6): 2914-2923.
- [13] Soumano K, Desbiens S, Rabelo R, et al. Glucocorticoids inhibit the transcriptional response of the uncoupling protein-1 gene to adrenergic stimulation in a brown adipose cell line [J]. Mol Cell Endocrinol, 2000, 165(1-2): 7-15.

[修回日期] 2016-04-19



利用吗啉代寡核苷酸技术下调早期斑马鱼胚胎 *lmna* 基因的初步研究

刘 丰^{1,2}, 黄慧敏^{1,2,3}, 王志华^{1,2}, 吴西军², 何志旭^{1,2,3}, 舒莉萍^{1,2,4}

(1. 贵州医科大学免疫学教研室, 贵阳, 贵州 550004; 2. 贵州医科大学组织工程与干细胞实验中心, 贵阳, 贵州 550004;
3. 贵州医科大学附属医院儿科学教研室, 贵阳, 贵州 550004; 4. 贵州医科大学实验动物中心, 贵阳, 贵州 550004)

【摘要】 目的 利用吗啉代寡核苷酸技术建立下调斑马鱼 *lmna* 基因的技术方法。**方法** 在斑马鱼 *lmna* 基因序列中选择靶点, 设计针对斑马鱼 *lmna* 基因的嗎啉代寡核苷酸序列(*lmna*-MO), 构建能特异指示 *lmna* 基因表达的 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒, 并通过显微注射方式将二者共注射入斑马鱼胚胎中, 通过观察胚胎中绿色荧光表达量反应 *lmna* 基因表达量, 并通过蛋白质印迹法检测胚胎中 lamin 蛋白表达量。**结果** 蛋白质印迹法检测斑马鱼体内 lamin 蛋白的表达, 分别有大小为 69 KD 和 62 KD 两种蛋白表达。设计并构建了 *lmna*-MO 和重组质粒 *lmna*-EGFP-pCS²⁺, 单独注射 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒后观察到从 6 hpf 到 96 hpf 胚胎均有绿色荧光蛋白表达; 二者共注射后观察到, 与对照组相比, 实验组从 6 hpf 至 30 hpf 胚胎中绿色荧光蛋白表达量均不同程度下降或消失; 蛋白质印迹实验结果显示实验组胚胎内 lamin 蛋白表达量明显下降。表明已成功下调了斑马鱼胚胎 *lmna* 基因表达。**结论** 可通过 *lmna*-MO 和重组质粒 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 共注射方法下调斑马鱼 *lmna* 基因表达, 并通过绿色荧光蛋白表达量反映下调效果。该方法可为深入研究人核纤层病提供良好的动物模型。

【关键词】 斑马鱼; *lmna*; 基因下调; 吗啉代寡核苷酸技术

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0085-06

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 08. 014

Study on the *lmna* gene knockdown in zebrafish embryo with morpholino oligonucleotides

LIU Feng^{1,2}, HUANG Hui-min^{1,3}, WANG Zhi-hua^{1,2},
WU Xi-jun², HE Zhi-xu^{1,3}, SHU Li-ping^{1,2,4}

(1. Guizhou Provincial Key Laboratory for Regenerative Medicine, Stem Cell and Tissue Engineering Research Center and
Sino-US Joint Laboratory for Medical Sciences, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, China;
2. Department of Immunology, 3. Department of Pediatrics, 4. Laboratory Animal Center,
Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

【Abstract】 Objective Lamins are the major components of nuclear lamina underneath the inner nuclear membrane (INM). Lamins express in most cells and are involved in the whole process of growth, also play a major role in cell stability and embryonic development. Mutant in human LMNA gene may lead to a series of disorders, which are similar to

【基金项目】 国家自然科学基金项目资助 (NO. 31260284)。

【作者简介】 刘丰 (1989 -), 男, 硕士研究生, 研究方向: 儿童血液系统和免疫系统疾病。

【通讯作者】 何志旭, 男, 博士, 教授, 研究方向: 儿童血液系统和免疫系统疾病; 舒莉萍, 女, 博士, 副教授, 研究方向: 儿童血液系统和免疫系统疾病, E-mail: gyslp_456@163.com。

progeria or other aging-associate syndrome. In this study, we report a new *lmna* knockdown animal model generated in our laboratory in order to provide a useful tool for studying laminopathies. **Methods** Two plasmids tagged to zebrafish *lmna* gene were designed based on morpholino oligonucleotides technology. Co-microinjected the plasmids into zebrafish embryos to knockdown *lmna* gene. Imaging and western blot detection were used to identify the mutants. **Results** Two different proteins, Lamin A/C, were expressed in the zebrafish embryos. Two plasmids *lmna*-MO and *lmna*-EGFP-pCS²⁺ were generated and co-microinjected into embryos. The results of imaging and western blot showed that the expression of *lmna* gene was downregulated in the zebrafish embryos. **Conclusions** Lamin A/C are expressed in zebrafish. *lmna* gene can be knocked down by the injection of *lmna*-MO and *lmna*-EGFP-pCS²⁺. This new animal model may be a powerful tool for study on laminopathies.

[Key words] Zebrafish; *lmna*; Gene knockdown; Morpholino oligonucleotides; Laminopathy

核纤层蛋白(lamins)属于 V 型中间纤维蛋白家族(intermediate filament, IF)成员,它是细胞骨架的重要组成部分,可维持核膜正常形态,同时影响 DNA 复制、DNA 损伤修复和转录^[1,2]。Lamins 及其相关蛋白的突变可导致人核纤层蛋白病,由于 lamin A/C 几乎表达于所有的细胞和组织,高度组织特异性和在相同基因不同突变位点导致的疾病的广泛性相对复杂。尽管国内外已进行大量研究,核纤层蛋白病潜在的分子机制仍亟待解释^[3-6]。

斑马鱼是近年新兴的重要模式生物体,其具有体外受精,胚胎透明,与人类基因高度同源,繁殖发育迅速,成熟快,体积小,可用于高通量大规模筛选突变型,便于建立疾病模型等优点^[7,8]。目前较前沿的基因下调方法有吗啉代寡核苷酸技术,该技术稳定且应用广泛,成本较低,不会被核酸酶所降解,水溶性好,对细胞无毒副作用,并且不会和人工合成的 RNA 一样,激活细胞干扰素的分泌,激发免疫应答,特异性好,是如今广泛应用于斑马鱼的高效基因下调方法之一^[9-10]。

本实验构建有增强绿色荧光蛋白(EGFP)标记的斑马鱼 *lmna* 基因的质粒,并设计靶向斑马鱼 *lmna* 基因的吗啉反义寡核苷酸,利用吗啉代寡核苷

酸技术下调斑马鱼 *lmna* 基因的表达。以绿色荧光蛋白表达量作为 *lmna* 表达下调的标志,从而建立下调 *lmna* 基因表达的斑马鱼动物模型,为核纤层病的深入研究提供动物模型。

1 材料和方法

1.1 吗啉代寡核苷酸序列设计

利用吗啉代寡核苷酸技术抑制内源性 *lmna* 基因的表达。吗啉代寡核苷酸针对基因编码起始位点 ATG 设计,作用于 mRNA 的翻译起始位点 AUG 附近或者 AUG 上游的 5' 非编码区(untranslation region, UTR)区域,它与 mRNA 的结合阻碍了核糖体的翻译起始复合体向翻译起始位点的移动,从而导致多肽的合成过程无法起始。由于 ATG 对于 *lmna* 基因的起始翻译有着至关重要的作用,所以设计吗啉代寡核苷酸时避开 ATG 起始区,于其 5' UTR 区设计反义的寡核苷酸,使得外源性 mRNA 翻译表达不受影响,如图 1。*lmna*-MO 的靶序列位于 *lmna* 基因的 5' UTR 端,control-MO 的序列由无意的 25 个碱基序列组成,结构稳定却不与任何基因的 mRNA 结合,作为实验对照组。

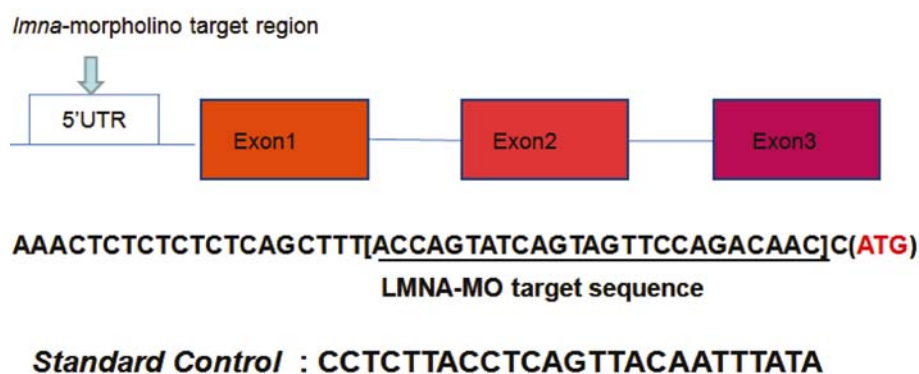


图 1 吗啉代寡核苷酸设计示意图

Fig. 1 Illustration of the design of morpholino oligonucleotides

1.2 构建 *lmna*-pCS²⁺ 质粒

本实验以不含 5' UTR 端序列的 *lmna*-pCS²⁺ 质粒为模板,设计上游引物包括吗啉代寡核苷酸序列前后各加一个碱基(共 27 个),后加 ATG 起始密码子后的 20 个碱基;根据 pCS²⁺ 载体及目的基因选取限制性内切酶,上游引物的 5' 端选择加 BamHI 酶切位点,下游引物的 5' 端选择加 EcoRI 酶切位点,通过 PCR 法克隆两端含有合适酶切位点的 *lmna* 片段,长度为 501 bp。将 *lmna* 片段连入 pCS²⁺ 载体中,构建 *lmna*-pCS²⁺ 质粒。

1.3 构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒

该质粒用于吗啉代寡核苷酸的效能测定,双酶切 EGFP-pCS²⁺ 质粒,获取 EGFP 片段,将 EGFP 片段连接入 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒中,构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒。

2 结果

2.1 蛋白质印迹实验验证斑马鱼中 *lmna* 基因编码蛋白质的表达

收集野生型斑马鱼胚胎,检测 *lmna* 基因表达蛋白,斑马鱼 *lmna* 基因表达的蛋白有两种,大小分别为 69 kDa 和 62 kDa,β-actin 为内参基因,大小为 43 kDa,如图 2 所示。

2.2 *lmna*-MO 及 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒构建

本实验针对 *lmna* 5' UTR 端的序列设计了一条针对 *lmna* 5' UTR 的反义寡核苷酸序列,同时用 control-MO 作为对照。构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒,用于 *lmna*-MO 测效,检测是否能有效抑制 *lmna* 基因的表达。构建重组质粒的 *lmna* 片段主要是含有吗啉代寡核苷酸靶向的 5' UTR 序列,将克隆的 *lmna* 片段与 pCS²⁺ 载体通过 T4 连接酶进行粘性末端连接,构建 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒。将 EGFP 片段插入 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒中,构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒。利用 PCR 法克隆 *lmna* 片段,约 501 bp,如图 3 所示。

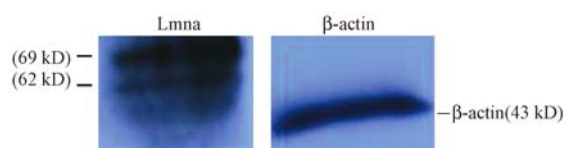


图 2 斑马鱼中 *lmna*、β-actin 基因编码蛋白质的表达

Fig. 2 Expression of the protein of *lmna* and β-actin gene in zebrafish

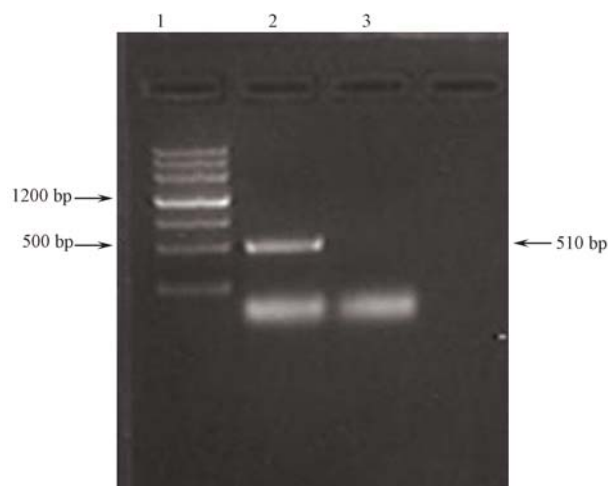
将克隆的 *lmna* 片段与 pCS²⁺ 载体通过 T4 连接酶进行粘性末端连接,构建 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒,将重组质粒行测序检测,测序结果显示重组质粒中含有吗啉代寡核苷酸靶向的 5' UTR 序列,如图 4 所示。

构建 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒成功之后,还需插入 EGFP 片段。利用 EcoRI 和 XbaI 两个限制性内切酶双酶切 EGFP-pCS²⁺ 重组质粒,得到 EGFP 片段大小约 717 bp,如图 5 所示。与 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒相连,构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒。EGFP 片段不含 ATG,连于 *lmna* 后,使得 EGFP 特异性表达于 *lmna* 片段之后,可通过荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白的表达,即 *lmna* 基因的表达。

将酶切获得的 EGFP 片段插入 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒中,T4 连接酶进行粘性末端连接,构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒,将重组质粒测序,结果如图 6 所示。

2.3 野生型斑马鱼胚胎 *lmna*-MO 及 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 显微注射

显微注射 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒入野生型斑马鱼单胚胎期胚胎,荧光显微镜下观察胚胎表达绿色荧光蛋白,可见 6 hpf (hours post-fertilization,受精后小时数)开始胚胎中有 *lmna* 基因广泛表达,直至 72 hpf 表达量开始下降,如图 7A-G 所示。证实该质粒中 EGFP 能有效示踪 *lmna* 基因的表达,可用于 *lmna*-MO 的效能鉴定。单独注射 *lmna*-EGFP-pCS²⁺



(1: DNA marker III, 2: *lmna* PCR 产物, 3: 空白对照)

图 3 斑马鱼 *lmna* 基因的 PCR 产物电泳图

(1: DNA marker III; 2: *lmna* PCR product; 3: Blank)

Fig. 3 Electrophoresis results of zebrafish *lmna* gene PCR products

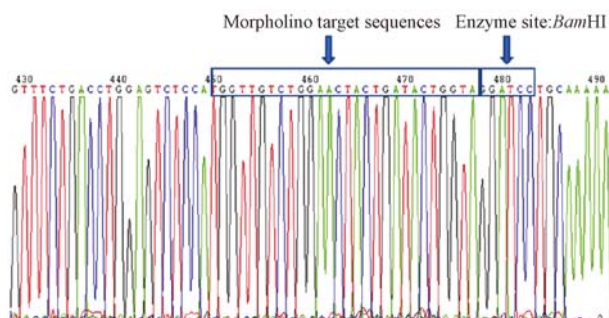
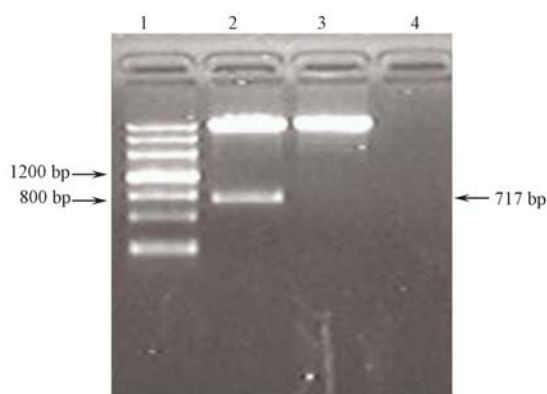


图 4 *lmna*-pCS²⁺ 重组质粒测序结果

Fig. 4 The sequencing result of *lmna*-pCS²⁺ plasmid



(1: DNA marker III; 2: EGFP-pCS²⁺ 酶切产物; 3: pCS²⁺ 酶切产物)

图 5 双酶切电泳图 (EcoRI 和 XbaI)

(1: DNA marker III; 2: EGFP-pCS²⁺; 3: pCS²⁺)

Fig. 5 The electrophoresis shows the results of double digestion with EcoRI and XbaI

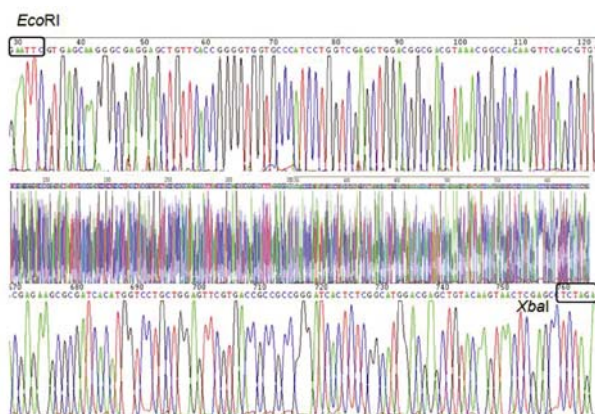
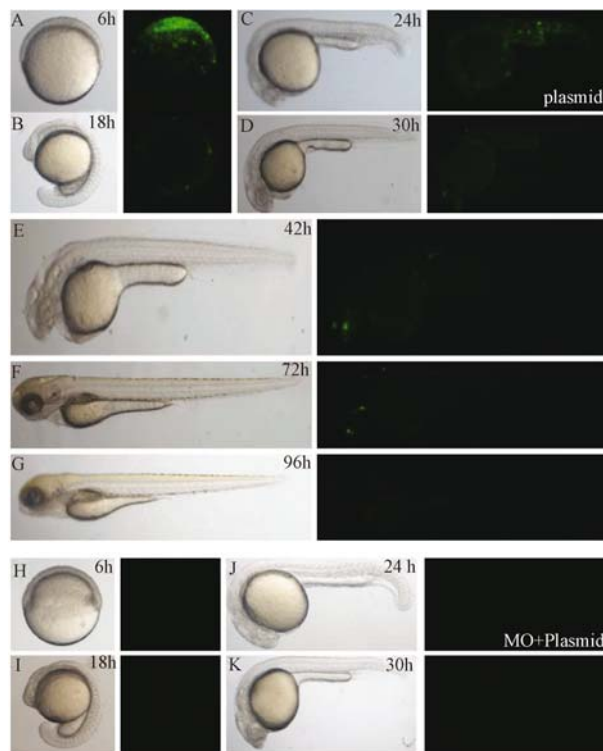


图 6 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 重组质粒测序结果

Fig. 6 The sequencing results of *lmna*-EGFP-pCS²⁺ plasmid

质粒在荧光显微镜下可观察到绿色荧光在不同时期胚胎中泛在表达,而将 *lmna*-MO 与 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒共注射入野生型斑马鱼单胚胎期胚胎后,各时期胚胎中绿色荧光均消失,即位于绿色荧



(A-G 图分别为不同时相胚胎的白场和荧光图;

H-K: *lmna*-MO, *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒混合注射组)

图 7 *lmna*-MO, *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 显微注射后的荧光表达情况

(A-G show the white field and fluorescence photos of different phase embryos; H-K: *lmna*-MO, *lmna*-EGFP-pCS²⁺ plasmid co-microinjected group)

Fig. 7 The fluorescent expression of the *lmna*-EGFP-pCS²⁺

光蛋白之前的 *lmna* 基因表达被下调,如图 7H-K 所示。

2.4 蛋白质印迹实验检测显示实验组 lamin 蛋白表达量下降

采用蛋白质印迹实验检测发现对照组野生型斑马鱼胚胎表达两种 lamin 蛋白(即 lamins A/C)。实验组斑马鱼 *lmna* 基因 mRNA 翻译受阻,蛋白合成出现障碍,与对照组相较, lamin 蛋白表达水平明显降低,如图 8 所示。

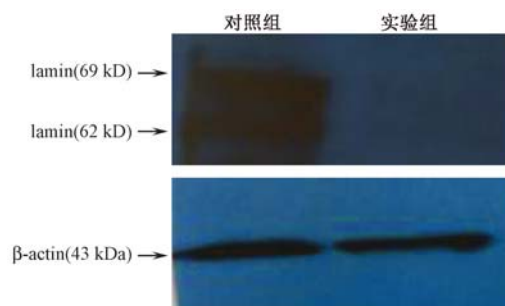


图 8 核纤层蛋白在斑马鱼体内的表达

Fig. 8 Expression of lamin protein in the zebrafish

3 讨论

核纤层普遍存在于高等动物的真核细胞的细胞核中,主要成分是核纤层蛋白,其向外与内层核膜上的蛋白结合,向内与染色质的特定区段结合^[11,12]。核纤层蛋白除了参与细胞核形状和大小的维持,还参与 DNA 的复制、有丝分裂中染色体的重组、细胞信号传导和细胞凋亡等过程^[13]。核纤层蛋白病是由于 LMNA 基因突变所导致的疾病,目前有 180 多个 LMNA 突变型被报道,但具体的发病机制仍不清楚,还需进一步研究与探讨^[14-16]。模式生物作为基因功能研究常用对象,其生长发育过程在长期的进化过程中具有高度的保守性,是研究人类发育、系统功能、疾病发生发展等的重要工具。目前常用的模式生物有大小鼠、斑马鱼、果蝇等,本实验选用斑马鱼为研究对象,斑马鱼具有胚胎透明、体外发育、体积小、繁殖率高及鱼种发育遗传背景清晰等优点使其成为研究脊椎动物,特别是研究人类发育和疾病的模式物种之一^[17-19]。

本实验用蛋白质印迹法检测斑马鱼中 lamin 蛋白的表达,检测出两个蛋白条带,即 lamin A/C。成功构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒用于吗啉代寡核苷酸测效。*lmna*-MO 序列位于 *lmna* 基因 5' UTR 端,即位于非编码区,通过 RT-PCR 法不可直接克隆针对 5' UTR 的 *lmna* 片段,故将 *lmna*-pCS²⁺ 质粒为模板,设计特异性引物,通过 PCR 法将 5' UTR 的非编码区片段克隆,并与 EGFP 片段相连,构建 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒,该 EGFP 片段不含 ATG,其与 *lmna* 基因片段相连,通过 *lmna* 基因片段的 ATG 端编码翻译绿色荧光蛋白,并利用绿色荧光蛋白监测 *lmna* 基因的表达,用于吗啉代寡核苷酸测效,由于 *lmna* 基因和 EGFP 均由 ATG 起始密码子驱动表达,故在注射后其可在胚胎中泛在表达。*lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒显微注射入斑马鱼单细胞期胚胎中,于荧光显微镜下直接观察绿色荧光表达情况,荧光表达从 6hpf 在全胚胎广泛表达,至 30 hpf 时逐渐减少以致 72 hpf 后完全消失,而共注射组从 6 hpf 至 30 hpf 均无绿色荧光蛋白表达,与对照组相比表明 *lmna*-MO 特异下调了斑马鱼胚胎中 *lmna* 基因的表达量;而 72 hpf 之后荧光蛋白表达的减少则可能由于 MO 的活性与重组质粒表达效应随胚胎发育的下降导致,故 *lmna*-MO 可特异下调早期斑马鱼胚胎 *lmna* 基因的表达量。

显微注射法是一种应用于基因功能研究的技术,通过显微注射相关基因的 DNA 和 mRNA 实现特定基因的过表达。利用吗啉代寡核苷酸技术建立特定基因下调模型,吗啉反义寡核苷酸 (phosphorodiamidate morpholino oligomers, PMO) 属于第三代反义寡核苷酸,是逆向遗传学技术的一种。吗啉代寡核苷酸技术的原理基于 RNA 的五元核糖骨架被含有氮和氧的六元环替代,并相连于 A、T、C、G 等碱基。RNA-MO 进入细胞后,可以和目的基因 mRNA 结合,形成 RNA-RNA 双链,抑制细胞内正常 mRNA 的剪接过程,从而达到抑制基因表达的目的。吗啡啉有抑制起始翻译,减少传统反义寡核苷酸非特异性的效应,是一种新型反义寡核苷酸,具有良好的稳定性、溶解度和细胞渗透性,因此这种双链结构能稳定存在于生物体内,抵抗多种核酸酶和蛋白酶,不易降解,易溶于水,能在细胞中存留较长的时间。吗啉代寡核苷酸可以靶向于目的 mRNA,编码的蛋白质是多样化的,包括配体、跨膜受体、细胞内的蛋白质和转录因子。本实验设计的吗啉代寡核苷酸序列与目的基因 mRNA 5' 翻译起始序列附近大小为 25 个碱基序列互补,在目的基因 mRNA 5' 端形成稳定的 RNA-RNA 双链,通过阻碍 mRNA 和核糖体的结合而阻断 *lmna* 基因的起始翻译过程。将 *lmna*-EGFP-pCS²⁺ 质粒与特异性的吗啉代寡核苷酸共注射入斑马鱼单细胞期胚胎中,各时相胚胎中绿色荧光均消失,即位于绿色荧光蛋白之前的 *lmna* 基因表达被下调,说明 *lmna*-MO 可以有效下调 *lmna* 基因的表达。蛋白质印迹实验结果同样证实了实验组斑马鱼 *lmna* 基因 mRNA 翻译受阻,蛋白合成出现障碍,与对照组相较,*lmna* 蛋白表达水平明显降低。说明实验组斑马鱼体内 *lmna* 蛋白已被下调。

本实验成功构建了吗啉代寡核苷酸技术下调斑马鱼 *lmna* 基因表达所需的重组质粒 *lmna*-MO 及可用于特异性指示 *lmna* 基因下调的重组质粒 *lmna*-EGFP-pCS²⁺。通过显微注射的方法将两者共注射入野生型斑马鱼单细胞期胚胎中,通过绿色荧光蛋白表达量反应 *lmna* 基因表达量。成功建立了下调 *lmna* 基因的斑马鱼模型,该模型为深入研究人核纤层病提供了良好的动物模型。

参考文献:

- [1] Gordon LB, Rothman FG, López-Otín C, et al. Progeria: a paradigm for translational medicine [J]. Cell, 2014, 156(3):

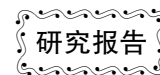
- 400–407.
- [2] Prokocimer M, Barkan R, Gruenbaum Y. Hutchinson-Gilford progeria syndrome through the lens of transcription [J]. *Aging Cell*, 2013, 12(4): 533–543.
- [3] Scaffidi P, Gordon L, Misteli T. The cell nucleus and aging: tantalizing clues and hopeful promises [J]. *PLoS Biol*, 2005, 3(11): e395.
- [4] Al-Saaidi R, Bross P. Do lamin A and lamin C have unique roles? [J]. *Chromosoma*, 2015;124(1): 1–12.
- [5] Davidson PM, Lammerding J. Broken nuclei — lamins, nuclear mechanics, and disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2014, 24(4): 247–256.
- [6] Kind J, van Steensel B. Stochastic genome-nuclear lamina interactions: modulating roles of Lamin A and BAF [J]. *Nucleus*, 2014, 5(2): 124–130.
- [7] Shu LP, Zhou ZW, Zhou T, et al. Ectopic expression of Hoxb4a in hemangioblasts promotes hematopoietic development in early embryogenesis of zebrafish [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2015, 42(12): 1275–1286.
- [8] 刘静, 何嘉玲, 暴国, 等. 应用 TALEN 技术敲除 *gata4* 基因建立斑马鱼先天性心脏病模型 [J]. *中国比较医学杂志*, 2015, 25(4): 1–7, 13
- [9] Ibrahim MX, Sayin VI, Akula MK, et al. Targeting isoprenylcysteine methylation ameliorates disease in a mouse model of progeria [J]. *Science*, 2013, 340(6138): 1330–1333.
- [10] Liu B, Zhou Z. Lamin A/C, laminopathies and premature ageing [J]. *Histol Histopathol*. 2008, 23(6):747–763.
- [11] Camozzi D, Capanni C, Cenni V, et al. Diverse lamin-dependent mechanisms interact to control chromatin dynamics. Focus on laminopathies [J]. *Nucleus*, 2014, 5(5): 427–440.
- [12] Hirtle-Lewis M, Desbiens K, Ruel I, et al. The genetics of dilated cardiomyopathy: a prioritized candidate gene study of LMNA, TNNT2, TCAP, and PLN [J]. *Clin Cardiol*, 2013, 36(10): 628–633.
- [13] Barthélémy F, Navarro C, Fayek R, et al. Truncated prelamin A expression in HGPS-like patients: a transcriptional study [J]. *Eur J Hum Genet*, 2015, 23(8):1051–1061.
- [14] Hadj-Rabia S, Mashiah J, Roll P, et al. A new lamin A mutation associated with acrogeria syndrome [J]. *J Invest Dermatol*, 2014, 134(8): 2274–2277.
- [15] Malashicheva A, Bogdanova M, Zbirnyk A, et al. Various lamin A/C mutations alter expression profile of mesenchymal stem cells in mutation specific manner [J]. *Mol Genet Metab*, 2015, 115(2–3): 118–127.
- [16] Yang SH, Procaccia S, Jung HJ, et al. Mice that express farnesylated versions of prelamin A in neurons develop achalasia [J]. *Hum Mol Genet*, 2015, 24(10): 2826–2840.
- [17] Berman JN, Kanki JP, Look TA. Zebrafish as a model for myelopoiesis during embryogenesis [J]. *Exp Hematol*, 2005, 33: 997–1006.
- [18] Davidson AJ, Zon LI. The ‘definitive’ (and ‘primitive’) guide to zebrafish hematopoiesis [J]. *Oncogene*, 2004, 23(43): 7233–7246.
- [19] 舒莉萍, 何志旭, 姚冬静, 等. 野生型斑马鱼胚胎中 *hoxd3* 基因 mRNA 的表达谱 [J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2012, 41(1): 69–74.

[修回日期] 2016–04–18

(上接第 74 页)

- [9] Bai C, Fukuda N, Song Y, et al. Lung fluid transport in aquaporin-1 and aquaporin-4 knockout mice [J]. *J Clin Invest*, 1999, 103: 555–561.
- [10] Delclaux C, Rezaigui RS, Delacourt C, et al. Alveolar neutrophils in endotoxin-induced and bacteria-induced acute lung injury in rats [J]. *Am J Physiol*, 1997; 273: L104–L112.

[修回日期] 2016–05–30



不同来源高度免疫缺陷小鼠微卫星 DNA 遗传检测的分析

范 涛, 王 洪, 魏 杰, 周舒雅, 岳秉飞, 李保文

(中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

【摘要】 目的 对不同来源的高度免疫缺陷小鼠进行遗传背景的检测分析,旨在发现经遗传修饰的小鼠遗传背景是否符合近交系遗传特征。**方法** 对收集到的 4 种不同来源以 NOD 为背景的高度免疫缺陷小鼠,选取 30 个微卫星 DNA 位点进行 PCR 检测,通过凝胶电泳结果和 STR 扫描确定基因型,进行遗传分析。**结果** 4 组 20 个样本中共有 17 个位点呈现多态性,A、B 两组小鼠 30 个微卫星位点表现为纯和,其他两组小鼠中不同位点均出现杂合个体;A、B 两组遗传距离最小,保持着较高的遗传相似度。**结论** 研究表明,不同来源高度免疫缺陷小鼠遗传背景有差异。

【关键词】 免疫缺陷小鼠;微卫星;遗传质量

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0091-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.015

Genetic monitoring and analysis of highly immunodeficient mice from different sources by microsatellite DNA markers

FAN Tao, WANG Hong, WEI Jie, ZHOU Shu-ya, YUE Bing-fei, LI Bao-wen.

National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

【Abstract】 Objective To test and analyze the genetic background of highly immunodeficient mice from different sources. **Methods** Four highly immunodeficient mouse strains from different sources of NOD background were collected. 30 microsatellite DNA sites were detected, and the genotype can be displayed by gel electrophoresis and STR scanning. **Results** 17 microsatellite sites exhibit polymorphism in 20 mice of the four groups. There were 30 homozygous loci in the mice of groups A and B, and heterozygous in the other two groups. The genetic distance is minimum between groups A and B, showing a higher genetic similarity. **Conclusions** The genetic backgrounds are different in highly immunodeficient mice from different sources.

【Key words】 Immunodeficient mice; Microsatellite; Genetic quality; Mice

高度免疫缺陷小鼠“NSG”是在 NOD (non-obese diabetic) 小鼠的背景下,发生重症联合免疫缺陷 Prkdc^{scid} (protein kinase, DNA activated, catalytic polypeptide, Prkdc; severe combined immune deficiency, SCID) 和白细胞介素 2 受体 γ 链

(interleukin 2 receptor gamma chain, Il2rg) 缺失突变产生的。该小鼠模型表现为成熟 T、B 淋巴细胞、功能性 NK 细胞缺失,细胞因子信号缺少。由于其免疫缺陷程度相对于其他品系更高,能更好地适用于人类造血干细胞、外周血单核细胞和肿瘤的异种移

[作者简介] 范涛(1983-),男,技师,专业:实验动物保种。E-mail: crvchinaft@126.com。

[通讯作者] 李保文(1967-),男,副主任技师。E-mail: libaowen2003@aliyun.com。

植,而成为一种理想的人源化免疫缺陷小鼠模型。不同来源的高度免疫缺陷小鼠有不同的建立方法:一种方法是同源导入,通过回交获得以受体小鼠品系为背景的双基因突变型小鼠;另一种是利用基因编辑技术直接在背景品系小鼠上进行改造,更快、更直接地获得目标动物。微卫星又称短串联重复序列(short tandem repeat, STR),作为分子标记在实验动物的遗传质量检测中具有良好的适用性,被广泛应用^[1-4]。具有高度多态性的简单重复序列可以用于区分不同近交系小鼠,而在同品系内不同个体间,微卫星 DNA 则呈单态性^[5,6],可以用于近交系遗传质量评价。本实验通过选择 30 个微卫星位点对收集到的 4 种不同来源,不同制作方法的“NSG”小鼠进行遗传检测,旨在发现这些遗传工程小鼠从制作之初背景品系的选取,到后期建系保种的过程,在遗传质量方面是否符合近交系特点。

1 材料和方法

1.1 材料

4 种不同来源的“NSG”小鼠由本单位收集保存并提供,生产许可证号【SCXK(京)2014-0013】。4 种小鼠中有两种是在背景品系上做的基因敲除,两种为同源导入。每品系 5 只,4~6 周龄,雌雄在选择时不做限制,SPF 级环境饲养,选择 1 只 B6 小鼠作为参照。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 DNA 提取:将 4 种不同来源高度免疫缺陷小鼠顺序编为 A、B、C、D 四个组。剪取小鼠尾尖 3~5 mm 放入 EP 管中,加蛋白酶 K 缓冲液裂解过夜,酚/氯仿法提取 DNA,浓度稀释至 50~100 ng/ μ L,4℃ 保存。

1.2.2 微卫星位点的选择:根据文献报道^[7],选择 30 个多态性较高的微卫星位点,覆盖小鼠 1~20 号染色体,引物序列详见表 1,引物由英潍捷基(上海)贸易有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增:反应体系:总反应体系 20 μ L,其中:10 $\times$ PCR buffer 2 μ L,上、下游引物各 1 μ L, dNTP 1.2 μ L,镁离子 1.5 μ L, Taq 酶 0.2 μ L,基因组 DNA 1 μ L,纯水 12.1 μ L。PCR 反应条件:95℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s;退火温度(54~64℃) 30 s;72℃ 延伸 30 s;35 个循环;72℃ 延伸 8 min;扩增产物 4℃ 保存。

1.2.4 电泳:2.5% 琼脂糖凝胶,电泳。溴化乙锭染色,用紫外可见分析仪查看结果并记录。

1.2.5 STR 扫描:将 21 个样本扩增产物放入 STR 扫描仪,用 GeneMarker V2.2.0 读取各样本在各位点扩增片段的大小。每个位点按照片段大小顺序记为 a、b、c、d,根据等位基因分型不同,各微卫星位点的基因型以 aa、ab、ac 等方式记录,基因型全部纯和,判断为符合近交系特征;反之出现杂合基因型则不符合近交系遗传特点。

1.2.6 数据结果:用 Lynch 法计算组间相似系数,同时将数据放入 PopGen1.32 进行统计分析。

2 结果

2.1 PCR 检测分析结果

30 个微卫星位点均能扩增出条带。根据电泳结果进行初步筛查,可观察到多态性位点,以 D5Mit48 位点为例(图 1),C 组 1、2、4、5 号小鼠在该位点上与其他组别个体间有差别,呈现多态性。通过与 B6 PCR 结果的比较, D7Mit12、D14Mit3、D18Mit19、D19Mit3、D19Mit16 位点两种品系的扩增片段长度一致,表现为单态性。

2.2 STR 扫描及结果

琼脂糖凝胶电泳肉眼难以观察区别小于 10 bp 的片段,STR 扫描可以精确检测片段的具体长度,区分相差 1 bp 的 DNA 片段。根据 STR 扫描结果,可以更准确地判断各位点的多态性,同时判断位点为纯合还是杂合,判读方法如图 2 所示。C 组在 D12Mit7 位点出现了两种片段长度,经扫描,1、4、



图 1 4 组小鼠在 D5Mit48 位点 PCR 凝胶电泳结果

Fig. 1 PCR gel electrophoresis at loci D5Mit48 of mice in the four groups

5 号样本出现 106 bp 和 122 bp 两个波形,说明该小鼠在这个位点为杂合状态,基因型记录为 ab;2 号样本和 3 号样本各在 122 bp 和 106 bp 出现了一个波形,说明这两只小鼠在该位点为纯和型并表现出多态性,记录为 bb、aa,以此类推。4 组 20 个实验样本判读结果(表 1)。

根据 STR 扫描结果,参照样本 B6 所有微卫星位点都为纯合状态;A、B 组的 10 只小鼠 30 个微卫星位点均为纯合状态;C 组的 5 个样本中在 D2Mit15、D8Mit33、D9Mit21、D9Mit23、D11Mit4、D12Mit7、D17Nds3、D17Mit11、D18Mit9、D19Mit16 等 10 个位点上,出现多个杂合型个体;D 组的样本仅有一只小鼠在 D19Mit6 位点上表现为杂合型。4 组 20 个样本中共有 17 个位点呈现出多态性,包括: D1Mit365、D2Mit15、D3Mit29、D5Mit48、D6Mit8、D6Mit102、D8Mit33、D9Mit21、D9Mit23、D11Mit4、D12Mit7、D16Mit9、D17Nds3、D17Mit11、D18Mit9、D19Mit16、DXMit16。

2.3 4 种小鼠相似系数

按 Lynch 法计算相似系数其结果(表 2)。A 组与 B 组小鼠相似度最高,其次是 B 组与 D 组;C、D 两组相似性最低。C 组与其他三组都有较低的相

似性。

2.4 4 种小鼠遗传距离比较

通过 PopGen1.32 软件分析 Nei' (1978) 遗传距离、遗传相似度指标结果(表 3)。通过计算可以看出 A 组与 B 组遗传距离最小,保持着较高的遗传相似度。

3 讨论

Jackson 实验室发布的高度免疫缺陷小鼠是通过将 NOD. CB17-*Prkdc*^{scid}/J 与 B6.129S4-*Il2rg*^{tm1Wjl}/J 两品系杂交,产生同时具备 *Prkdc*^{scid} 和 *Il2rg* 基因型的 F1 代后,与 NOD. CB17-*Prkdc*^{scid}/J 回交 8 代,产生的杂合子相互交配得到 *Prkdc*^{scid} 和 *Il2rg* 双纯合型(*Il2rg* 是 X-link 基因,雄性为半合子)的 NSG 小鼠^[8]。国内不少实验室和基因工程公司则使用基因编辑技术,在 NOD 或 NOD/SCID (NOD. CB17-*Prkdc*^{scid}) 小鼠上进行基因改造而获得同样的动物模型。不论哪种方式,最终获得的目标动物都应符合近交系特点。根据实验结果,A、B 两组中所包含的 10 只小鼠样本 30 个位点均处于纯和状态,符合近交系特点;C 组的 5 只小鼠样本中,在 10 个位点上出现多个个体的基因型为杂合,可以判定其不符合近交系遗传特征。D 组有一只小鼠在 1 个位点上出现杂合基因型,可将其本身及其后代淘汰,不进入繁育体系。

根据报道^[9],不同近交系在 D7Mit12、D19Mit3 两个微卫星位点呈单态性,实验证明 NOD 小鼠也符合该特点。不同组别的小鼠在同一位点上也具有多态性。例如 A 组全部样本在 D1Mit365 位点、C 组在 D6Mit8 位点上都出现了与其他三组不一致的 DNA 片段长度,但都为纯合的基因型,这可能是在小鼠模型构建之初选择了不同的亚系而导致的。又如 A 组在 D3Mit29、D17Nds3 两个位点各出现了 1 只与组内其他 4 只不同的基因型,如果该样本处在基础群或核心群中,可以在日后的繁育管理中将其淘汰,避免在该位点出现杂合等位基因。

近交系小鼠的遗传质量直接影响着实验结果的可靠性^[10,11],大多数基因工程小鼠都是以近交系为背景进行基因改造而来。遗传质量的改变可能发生在建立时选用的小鼠自身发生遗传变异,遗传背景不符合近交系特点;也可能发生在后续的建系保种过程中,如回交倒入品系不合格,回交未超过 5 代(N5),未严格按照全同胞兄妹繁殖等。

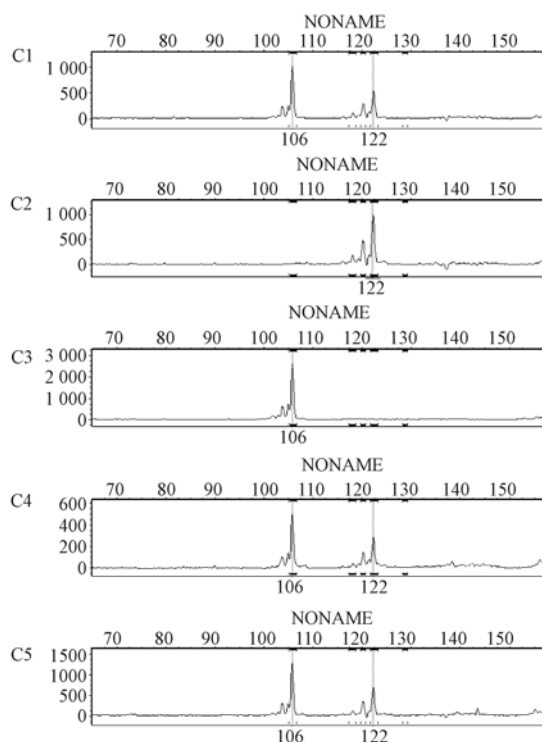


图 2 C 组样本在 D12Mit7 位点的微卫星扫描波形

Fig. 2 The waveforms of loci D12Mit7 in STR scanning of samples of the group C

表 1 30 个微卫星座位的引物序列、扩增条件及各组基因型结果

Tab.1 The primer sequence and optimal conditions amplification of 30 microsatellites loci and genotype results

位点	引物序列 (5' - 3')	染色体	退火温度	A 组	B 组	C 组	D 组
Locus	Primer sequence (5' - 3')	Chr.	Temp (℃)	Group A	Group B	Group C	Group D
D1Mit365	ATCACCTGCAATAGTACCCCC TTAATCAGTCATCATAGGCTTTTCC	1	54	bb 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D2Mit15	ATGCCTTAGAAGAATTTGTTCCTC CTTGAAAAACACATCAAAATCTGCG	2	54	aa 5/5	aa 5/5	aa 1/5 ab 4/5	aa 5/5
D3Mit29	GATGAGAGATTCTGATGTGGAGG CCAGCCTCAGTATCTCAAAACC	3	64	aa 1/5 bb 4/5	aa 1/5 bb 4/5	bb 5/5	aa 5/5
D4Mit235	AGGCCAAAGGTTGGATTCT GAGACTTGAAATGAAGCATTTAGG	4	55	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D5Mit48	GACTATCATCCAAGCCAAGACC AAAAAGACACTTTCCTGACATAGC	5	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 1/5 bb 4/5	aa 5/5
D6Mit102	CCATGTGGATATCTTCCCTTG GTATACCCAGTTGTAAATCTTGTGTG	6	54	bb 5/5	aa 1/5 bb 4/5	bb 5/5	bb 5/5
D6Mit8	TGCACAGCAGCTCATTCTCT GGAAGGAAGGAGTGGGGTAG	6	60	aa 5/5	aa 5/5	bb 5/5	aa 5/5
D6Mit15	CACTGACCCTAGCACAGCAG TCCTGGCTTCCACAGGTACT	6	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D7Mit281	TTCTCTACCTCCTGAGCCA GCCACAAGGAAGACACCATT	7	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D7Mit12	GCTGGGTTTATTTCATTGCAA TCCAGCTCATGGGTAGAAGA	7	58	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D8Mit33	TTTGAGCAAAGGACTTGCCT TTATTCTGCCTCAACACCACC	8	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 2/5 ab 3/5	aa 5/5
D8Mit14	TTTTACACTCACGTGTGCG GTCTCTCCTTCTGGCGCTG	8	63	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D9Mit23	AAGAAGTTTCCATGACATCATGAA AGAAGAAAAATCTTGACAGCTCTG	9	65	aa 5/5	aa 5/5	aa 1/5 ab 4/5	aa 5/5
D9Mit21	CAGTCCCCTGGTTAATAACAACAAC TATAGTCCATTGTGGCAGAGGAGT	9	59	aa 5/5	aa 5/5	aa 1/5 ab 4/5	aa 5/5
D10Mit12	ATGTCCAAAACACCAGCCAG GGAAGTGATGGAGCTCTGTT	10	54	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D11Mit4	CAGTGGGTATCAGTACAGCA AAGCCAGCCCAGTCTTCATA	11	54	cc 5/5	cc 5/5	ac 4/5 cc 1/5 aa 1/5	bb 5/5
D12Mit7	CCGGGGATCTAAAACATACAT TCTAATCTCAGCCCAATGGT	12	60	bb 5/5	bb 5/5	bb 1/5 ab 3/5	bb 5/5
D12Nds11	CATTTGAGGACAGTCAGGATC GGAACTTTCATGCCAGTACTAG	12	54	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D13Mit3	TCAGGCTCATCCCAGATACC TTTTGCAGAGAACACACACC	13	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D14Mit3	GCAATTACACCTCCTCGGAG CACAAGGCATATGGTACCC	14	54	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D15Mit5	CTTCCTAATTCCTGTCAAGCAAAT GTTTCATTGGTCAATGGAACTTA	15	54	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D15Mit15	AGCATACACTCTCTGTTCCTGCT AATAAATACCAGAGAAGCACCGTG	15	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
D16Mit9	TCTTGCTCTGGTATCAACTACAG CCTCCTTGCCAGCTAAAC	16	55	bb 5/5	bb 4/5 cc 1/5	aa 5/5	aa 4/5 cc 1/5
D17Mit11	TGAATTTATGAGGGGGGTCA TGTCCCATATCTCTCTTTATACACA	17	54	bb 5/5	bb 5/5	ab 4/5 bb 1/5	bb 5/5
D17Nds3	TTCTGTGCGGCCCTTATCAG AGACAATGGGTAACAGAGGCA	17	58	bb 1/5 cc 4/5	cc 5/5	ac 4/5 cc 1/5 aa 1/5	cc 5/5
D18Mit9	AGAGGCATTGCACACAAG GCCCCTTGGAGAGTTGGT	18	60	aa 5/5	aa 5/5	ab 1/5 bb 3/5	aa 5/5
D18Mit19	ATTGGCTGTTCAAGTGCCAG ATGCACAATAGCTCATAGCTTCT	18	55	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5 bb 3/5
D19Mit16	TCTTAGGTAATCTCCCTTAGGGG TGGTAAATGTAAAACTGAAGCATG	19	54	bb 5/5	bb 5/5	ab 2/5 bb 3/5	bc 1/5 dd 1/5
D19Mit3	CTCCCTACTGCAGTGCTC TTGCATAGTTGGCCAAAGTG	19	60	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5	aa 5/5
DXMit16	CTGCAATGCCTGCTGTTTTA CCGGAGTACAAAGGGAGTCA	X	58	aa 5/5	bb 5/5	aa 1/5 bb 1/5 cc 3/5	cc 5/5

表 2 任意两组间相同等位基因数量与相似系数
Tab.2 The number of the same alleles and similarity index between any two groups

	A 组	B 组	C 组	D 组
A 组	—	28	20	24
B 组	0.933	—	18	26
C 组	0.667	0.600	—	17
D 组	0.800	0.867	0.567	—

注：对角线以上部表示两组间相同位点数量，对角线以下为两组间相似系数。

Note. The number of the same alleles (above the diagonal) and similarity index (below the diagonal)

表 3 任意两组间遗传相似度和遗传距离
Tab.3 Genetic identity and genetic distance between any two groups

	A 组	B 组	C 组	D 组
A 组	—	0.9288	0.7921	0.8444
B 组	0.0739	—	0.8311	0.885
C 组	0.2331	0.185	—	0.8195
D 组	0.1692	0.1221	0.1991	—

注：对角线以上部表示两组间遗传相似度，对角线以下为两组间遗传距离。

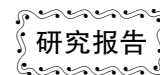
Genetic identity (above the diagonal) and genetic distance (below the diagonal)

微卫星 DNA 具有位点充足，遗传稳定，多态性高，片段短容易扩增等优势，非常适合用于近交系的遗传监测。近交系遗传修饰小鼠在保种、扩繁的过程中除目的基因的检测外，定期对基础群和核心群的繁殖个体进行遗传背景的筛查很有必要，及时发现不合格的个体并不作选留，可维护整个种群的纯合性。本文通过微卫星 DNA 分子标记对不同来源高度免疫缺陷小鼠的遗传质量进行检测，为近交系小鼠微卫星位点的筛选提供数据支撑，同时，对建立动物模型质量评价提供参考。对于今后的保种和繁殖以及使用的意义和社会价值的重要性进行阐述。

参考文献：

- [1] Basta PV, Whitmore SP, Basham KB, et al. Microsatellite analysis in FVB/N mice [J]. Comp Med, 2004, 54(5): 524 – 527.
- [2] Katoh H, Yoshino S, Inui Y, Honda S, et al. Microsatellite genotyping for genetic quality testing using sperm cells in the mouse [J]. Exp Anim, 2005, 54(4): 373 – 376.
- [3] 陈振文, 欧阳兆和, 董罡, 等. 用微卫星标记技术对国内 BALB/c 小鼠遗传质量的分析 [J]. 遗传, 2004, 26(6): 845 – 848.
- [4] 李芳芳, 魏杰, 王洪, 等. 应用微卫星标记对两个豚鼠封闭群的遗传学研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 33 – 38.
- [5] 欧阳兆和, 陈振文, 李瑞生, 等. 微卫星 DNA 多态性在十种近交系小鼠遗传监测中的应用研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2004, 14(2): 71 – 74.
- [6] 王纯耀, 杨卫红, 宋国英, 等. 微卫星 DNA 在近交系小鼠遗传监测中的应用 [J]. 中国兽医学报, 2008, 28(3): 333 – 335.
- [7] 王洪, 杜小燕, 徐平, 等. 上海 KM 小鼠种子群体遗传状况分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(12): 27 – 32.
- [8] JAX Mice, JAX Mice & Services, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME. World Wide Web (<http://www.jax.org/strain/005557>)
- [9] 刘先菊, 王艳蓉, 高子琪, 等. 近交系小鼠微卫星 DNA 引物的筛选和 Tm 值优化研究 [J]. 实验动物科学, 2012, 29(1): 9 – 13.
- [10] 张树辉, 魏泓, 史景泉. 近交系小鼠微卫星 DNA 多态性的研究 [J]. 遗传, 2000, 22(6): 375 – 378.
- [11] 刘先菊, 王艳蓉, 张丽芳, 等. 常用近交系小鼠微卫星 DNA 多态性的分析研究 [J]. 实验动物科学, 2010, 27(5): 1 – 4.

[修回日期]2016 – 04 – 28



应用 16S rRNA 高通量测序法比较人与常用实验动物口腔菌群的异同

顾东曙¹, 陈傍柱¹, 江霞¹, 刘海月², 那顺巴雅尔³, 周宏伟⁴, 顾为望

(1. 南方医科大学实验动物中心, 广州 510515; 2. 南方医科大学公共卫生与热带医学学院, 广州 510515;
3. 广东医科大学, 东莞 523808; 4. 南方医科大学珠江医院检验医学部, 广州 510282)

【摘要】 目的 应用 16S rRNA 高通量测序法测定几种常用实验动物(西藏小型猪、比格犬、猕猴、新西兰兔、Wistar 大鼠)的口腔菌群, 并和人的口腔菌群进行对比分析, 为口腔微生态的动物模型研究提供基础性资料。**方法** 用一次性棉拭子采集西藏小型猪、比格犬、猕猴、新西兰兔、Wistar 大鼠和人的口腔菌群标本, 提取样品总 DNA, 使用带标签的通用引物扩增 16S rRNA V4 区片段, Illumina 测序, 经 BIPES 以及 QIIME 分析比较菌群多样性及结构。**结果** 人与 5 种常用实验动物口腔菌群的丰富度均差异显著($P < 0.05$), 不同种类动物有其各自独特的口腔菌群, 但猴的口腔菌群与人最为相似。**结论** 根据与人口腔某类菌群的相似程度, 5 种动物中, 猴口腔的梭菌属(*Fusobacterium*)、卟啉菌属(*Porphyromonas*)水平与人最相似, 提示猴可能是研究人口腔菌群较适宜的模型动物。从特定菌门角度, 西藏小型猪可能是研究与变形菌门(*Proteobacteria*)相关疾病的较适宜模型动物; 比格犬可能是研究与螺旋体门(*Spirochaetes*)相关疾病的较适宜模型动物。

【关键词】 实验动物; 口腔菌群; 16S rRNA; 西藏小型猪; 比格犬; 猕猴; 新西兰兔; Wistar 大鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0096-07

doi: 10. 3969. j. issn. 1671 - 7856. 2016. 08. 016

Comparison of human and animal oral microbiota by Illumina sequencing of 16S rRNA tags

GU Dong-shu¹, CHEN Bang-zhu¹, JIANG Xia¹, LIU Hai-yue²,
Nashun Bayaer³, ZHOU Hong-wei⁴, GU Wei-wang¹

(1. Laboratory Animal Center of Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;
2. Department of Environmental Health, School of Public Health and Tropical Medicine, Southern Medical University,
Guangzhou 510515; 3. Guangdong Medical University, Dongguan 523808;
4. Department of Laboratory Medicine of Zhujiang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510282)

【Abstract】 Objective To provide original reference data for oral ecosystem research, Tibet minipigs, beagle dogs, rhesus monkey, New Zealand white rabbits and Wistar rats were selected to study their respective characteristics of oral microbial communities and compared with normal data of humans. **Methods** Total DNA was extracted from the specimens of oral microbial communities of Tibet minipigs, beagle dogs, rhesus monkey, New Zealand white rabbits and Wistar rats, and used to amplify 16S rRNA V4 fragments with labeled universal primers. The diversity and structure of microbial

【基金项目】 广东省科技计划项目(编号: 2013B030300040, 2015A030302076); 东莞松山湖高新区生物医药外包服务基地建设(编号: 2012B011000004)。

【作者简介】 顾东曙(1979-), 女, 硕士, 专业: 动物学。Email: 20595411@qq.com。

【通讯作者】 顾为望(1956-), 男, 教授, 研究方向: 实验动物培育、人类疾病动物模型制备与比较医学。Email: guww100@163.com。

communities from those animals were compared with that of humans using BIPES and QIIME analysis after Illumina sequencing of 16S rRNA V4 fragments. **Results** The richness of the oral microbial communities of humans and the five species of laboratory animals was significantly different ($P < 0.05$). Different species of animals have their own unique oral flora, among which the oral flora of the monkey is the most similar to that of humans. **Conclusions** Among the five species of laboratory animals, the oral microbial communities of rhesus monkeys and humans have highest similarity. Specifically, the *Fusobacterium* and *Porphyromonas* levels of rhesus monkeys is most similar to those of humans. Our findings indicate that rhesus monkeys may be suitable animal model for studies of human oral microbial communities. Tibet minipigs may be suitable animal model for Proteobacteria studies, while beagle dogs may be appropriate for modeling of diseases related to Spirochaetes.

【Key words】 Laboratory animal; Tibet minipig; Beagle dog; Rhesus monkey; New Zealand white rabbit; Wistar rat; Oral microbiota; 16S rRNA

口腔菌群是由大量口腔微生物组成的复杂生态体系,口腔内适宜的温度、湿度、丰富的营养来源以及复杂的结构,为口腔内各种微生物的生长、繁殖和定居提供了便利条件,形成了口腔微生物的多样性^[1]。口腔内微生物的多样性有利于维持口腔健康,抵御外界不良因素对机体的侵袭。一旦微生物群落失调,则可导致龋病、牙周病以及口腔溃疡等口腔疾病^[2]。微生物的多样性及结构研究是进行复杂微生态系分析的基础,通过分析口腔中微生物丰度与结构的变化,能够揭示口腔疾病发生与微生物群落之间的关系,从而为预防和治疗口腔疾病提供合理的理论依据^[3,4]。细菌 16S rRNA 基因在所有细菌的基因组中存在,是编码 rRNA 相对应的 DNA 序列,在长时间的进化过程中,rRNA 分子有些部位的序列变化非常缓慢,具有高度的保守性,基于这些序列的高度保守性可以检测细菌种系上的深远关系;同时,16S rRNA 又具有 9 个高度可变区,V1 至 V9 可变区(本研究中选择了 V4 可变区),可变区序列因细菌不同而异,保守区和可变区交错排列。通常基于保守区序列设计引物,PCR 扩增,得到 16S rRNA 扩增片段,再利用可变区序列的差异实现对细菌种属的分类、鉴定。运用高通量测序技术测序,将高通量测序序列与基因数据库(或特定序列)进行比对,将一定相似度的菌属归为某种特定菌属,可实现对菌属快速、准确地分类鉴定,目前这种方法是研究口腔微生物多样性最为广泛,最为有效的手段之一。本研究通过课题组前期基于 16S rRNA 建立的 Illumina 双末端测序法(BIPES)^[4,5],并采用 QIIME 比较分析几种常用实验动物与人的口腔菌群结构,为口腔疾病模型动物的选择提供数据基础。

1 材料和方法

1.1 耗材

一次性棉拭子(苏州康健医疗器械有限公司)、各种型号 EP 管等耗材(上海 Sangon 公司)、口腔拭子基因组 DNA 快速提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)、Ex-taq 酶(宝生物工程大连有限公司)。

1.2 实验动物

成年普通级西藏小型猪(简称“猪”):东莞松山湖明珠实验动物科技有限公司提供(许可证号:SCXK(粤)2012-030);成年普通级猕猴(简称“猴”):南方医科大学实验动物中心提供(许可证号:SCXK(粤)2014-0025);成年普通级比格犬(简称“犬”):西安市迪乐普生物资源开发有限公司提供(许可证号:SCXK(陕)2014-001);成年 SPF 级新西兰大白兔(简称“兔”):南方医科大学实验动物中心提供(SCXK(粤)2011-0015);成年 SPF 级 Wistar 大鼠(简称大鼠):南方医科大学实验动物中心提供(SCXK(粤)2011-0015)。

1.3 方法

1.3.1 样品采集:一次性棉拭子采集成年猪、犬、猴、兔、大鼠口腔菌群样品,每个品种 4 只,雄性 1 只,雌性 3 只;40~60 岁健康人群口腔样本 10 个,男性 5 个,女性 5 个。所有样品 -20℃ 保存。

1.3.2 样品总 DNA 提取:按照北京百泰克生物技术有限公司口腔拭子基因组 DNA 快速提取试剂盒说明书提取样品总 DNA,置于 -20℃ 保存。

1.3.3 细菌 16S rRNA 基因扩增:选择带标签的通用引物扩增 16S rRNA V4 区域,引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,引物上游:V4F-5'-GAGTGCCAGCMGCCGCGGTAA-3',引物下游:

V4R252 – 5'-TTAGGAGACCCGACTACHVGGGTWTCTAAT-3'。每个样品对应相应的带标签上下游引物信息,PCR 扩增体系为 25 μL(表 1)。PCR 扩增条件: 94℃, 2 min;94℃, 30 s;52℃, 45 s;72℃, 30 s; 30 个循环;72℃, 5 min;4℃保存。

表 1 PCR 反应体系

Tab.1 Reaction mixture of PCR

试剂名称	浓度	加入体积
10 × Taq buffer	(Mg ²⁺ Free)	2.50 μL
dNTP Mix	(2.5mM)	2.00 μL
Mg ²⁺	(25 mM)	1.50 μL
Ex-taq	(5U/5 μL)	0.25 μL
Forward primer	(10 μM)	0.50 μL
Reverse primer	(10 μM)	0.50 μL
Template		2.00 μL
ddH ₂ O		15.75 μL

1.3.4 Illumina Solexa 测序: 为尽量避免因 PCR 扩增造成各样品浓度差异对后续基因测序深度的影响,样品上机测序之前进行凝胶电泳检测,利用凝胶分析软件 BandScan 以 DNA Marker (2 000 bp) 200 bp 条带为基准对 DNA 样品进行相对定量,确保尽量以相等的终浓度混合样品,然后将标准品(细菌质粒)加入样品 PCR 产物,以同等比例的终浓度混合均匀。Illumina HiSeq 2000 测序平台进行高通量测序^[5]。

1.3.5 数据分析: 高通量测序数据用 BIPES (Barcoded Illumina Paired-end Sequencing) 流程进行初步原始序列处理^[6]。BIPES 流程将碱基拼接和序列分析分为了两部分,一部分是使用 mothur 进行序列的挑拣,去除复杂的嵌合体序列,得到干净的序列,进而进入下一步的 QIIME 分析,包括 alpha 多样性,beta 多样性和 RDP 聚类分析等。

使用 TSC 聚类将微生物进行界门纲目科属种

的分类。并采用分阶段聚类算法 RDP (Ribosomal Database Project, RDP)^[7]将序列聚类成最小操作分类单元(Operational Taxonomic Units,OTUs),当细菌 16S rRNA 基因序列之间的距离在 0.03 以内,把它们视为同一个种属。对于获得的 OTUs,使用对其进行分类注释。用 mothur 软件^[8]进行测序数据的质量分析,去除错误序列和嵌合体。采用 QIIME 对样本 PD_whole_tree、Shannon 等多样性指数分析,从而分析样品的 α 多样性,即单个样品包含种属结构的多样性;基于 UniFrac 距离^[8],进行主成分分析^[9],分析 β 多样性;采用线性判别式分析效应值(linear discriminant analysis effect size,LEfSe)^[10],Galaxy89 在线工具寻找不同组别之间有统计学差异的菌群标志物。应用 SPSS 20.0 进行统计分析,采用 One-Way ANOVA 进行 Bonferroni 法两两比较分析或 Kruskal-Wallis One-way ANOVA 进行两两比较,校正检验水准。采用 GraphPad prism5 软件工具对 PD_whole_tree、Shannon 等作图。

2 结果

2.1 测序与质量控制

35 个样品质控后共获取了 939272 条 16S rRNA 基因序列,所有样品全部纳入后续分析。

2.2 常用实验动物与人口腔菌群比较分析

2.2.1 α 多样性分析: α 多样性通常是指群落内的物种丰度和均匀度。PD_whole_tree 指观察到的种属数,反映菌落内的丰度;Shannon 指数则受到菌落丰度和均度两者的影响。

图 1 A 显示: 人与猪、犬、猴、兔、大鼠口腔菌群的 α 多样性,即菌群丰度差异显著($P < 0.05$);猪与犬、猴、兔口腔菌群的丰度差异显著($P < 0.05$),其

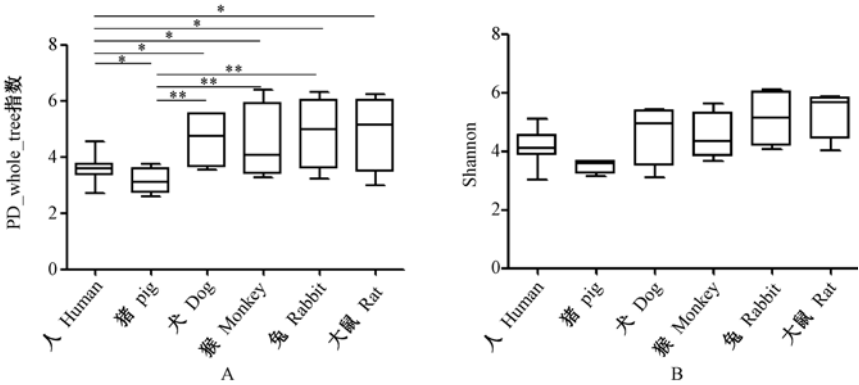


图 1 常用实验动物与人口腔菌群 PD _whole_tree(A) 和 Shannon 指数(B)

Fig.1 PD _whole_tree (A) and Shannon index (B) of oral flora in commonly used laboratory animals and humans

他动物间均无显著差异 ($P > 0.05$) ;该结果提示,猪的口腔菌群多样性最低,人次之,其他 4 种动物口腔菌群物种丰富程度相对较高。图 1 B 显示:人、猪、犬、猴、兔、大鼠口腔菌群 Shannon 指数均无显著差异 ($P > 0.05$)。

2.2.2 β 多样性分析: β 多样性研究群落之间菌落的相似性关系,图 2 (A1、B1) 中一个点表示一个样品,样品之间的距离代表样品之间的相似度,距离越近,相似度越高。加权 UniFrac 距离在未加权的基础上增加了菌群的丰度。图 2 显示:除人之

外,几个常用实验动物的样品间距离较近,相似度较高;无论加权和未加权 UniFrac 距离中,猴与人的距离相对较近(见图 2 中 A2、B2),表明猴的口腔菌群相对于其他种类动物与人更相似,猴可能是研究人口腔菌群较适宜的模型动物。

2.2.3 口腔菌群结构组成:

2.2.3.1 菌群结构门水平:图 3 显示:人、猪、犬、猴、兔、大鼠口腔菌群均以放线菌门 (*Actinobacillus*)、拟杆菌门 (*Bacteroides*)、变形菌门 (*Proteobacteria*) 和厚壁菌门 (*Firmicutes*) 为主,均占

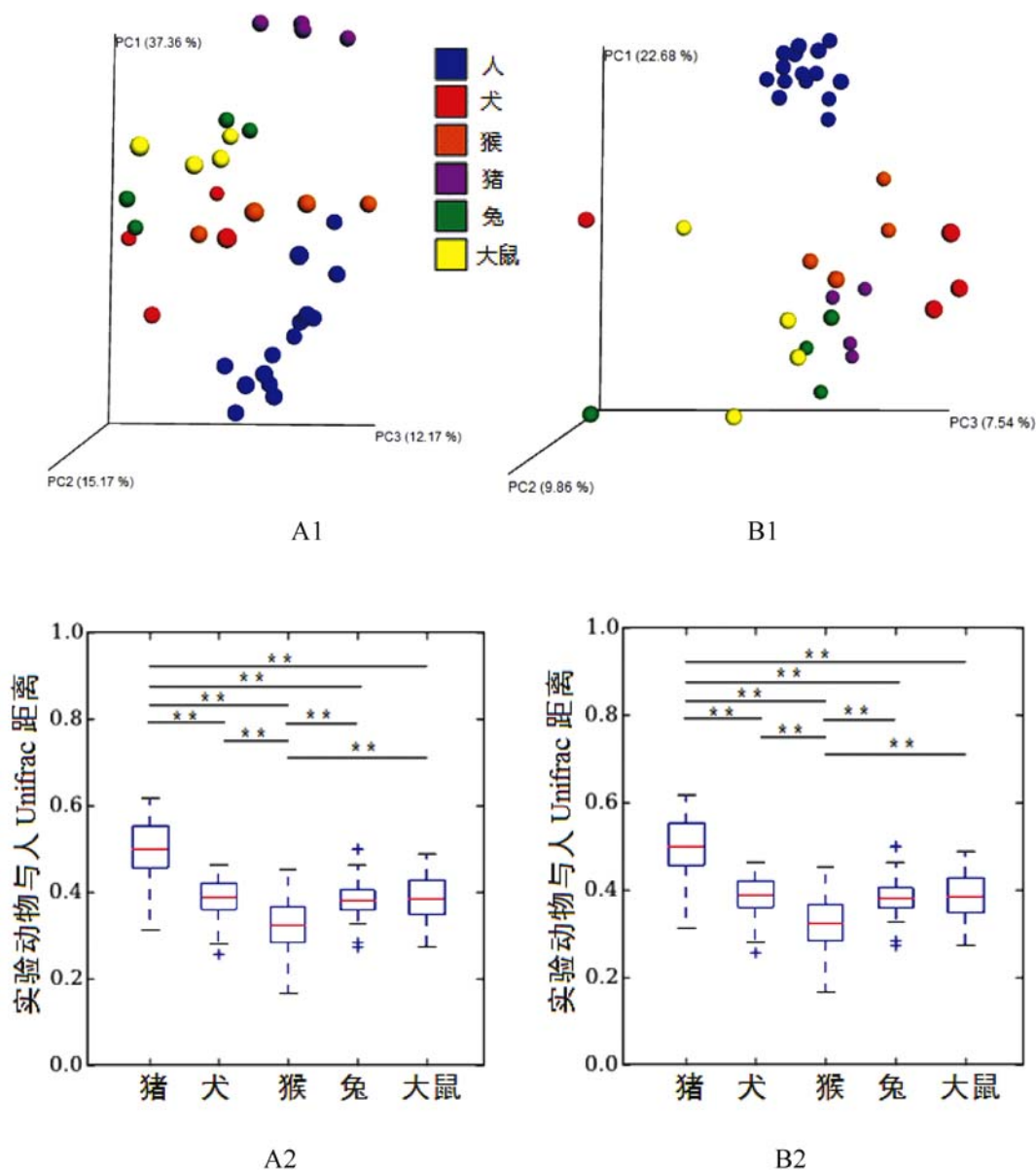


图 2 常用实验动物与人口腔菌群加权 UniFrac 距离 (A1, A2) 和未加权 UniFrac 距离 (B1, B2)

Fig. 2 Weighted UniFrac distance (A1, A2) and unweighted UniFrac distance (B1, B2) of oral flora in commonly used laboratory animals and humans

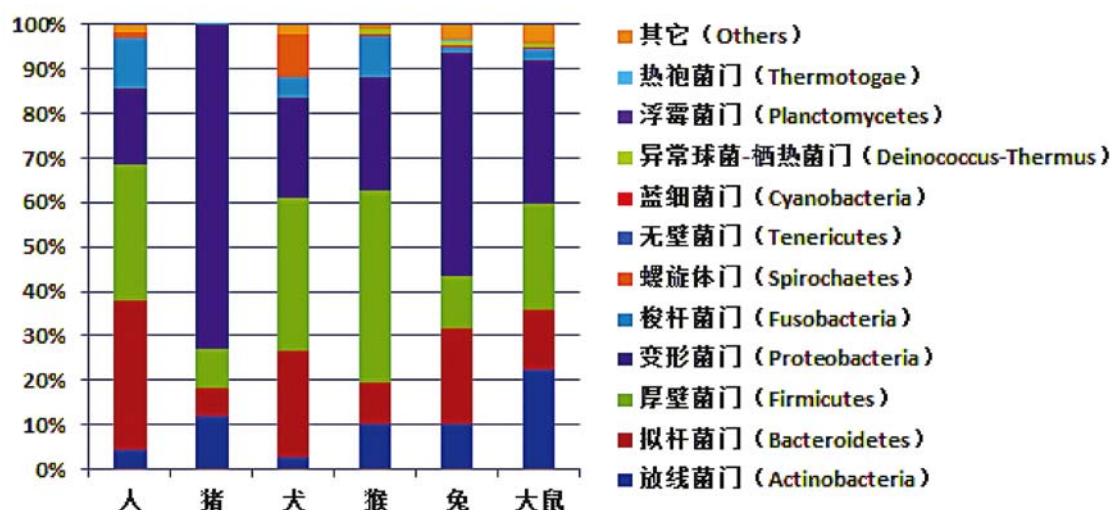


图3 常用实验动物与人口腔菌群结构门水平分布

Fig. 3 Distribution of oral flora at phylum level in commonly used laboratory animals and humans

80% 以上; 人的口腔菌群中, 放线菌门 (*Actinobacillus*)、拟杆菌门 (*Bacteroides*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、厚壁菌门 (*Firmicutes*) 和梭杆菌门 (*Fusobacterium*) 五个门的细菌占主要地位, 高达 97.1%, 在五种实验动物中, 猴以上五个菌门的水平与人最相似; 猴的梭杆菌门 (*Fusobacteria*) 比其它几种动物与人更相似; 猪的变形菌门 (*Proteobacteria*) 显著高于人与其它几种动物; 犬的螺旋体门 (*Spirochaetes*) 显著高于人和其它几种动物。

2.2.3.2 菌群结构属水平:

从图 4 可以看出, 人与不同种类实验动物的口腔菌群在属水平上均差异较大。人口腔中数量最多的是普氏菌属 (*Prevotella*), 这种菌属在猪、犬、猴、兔、鼠的口腔中均分布较少; 猪、猴、兔、鼠的口腔菌群中均含有链球菌, 猴口腔的链球菌含量最高; 五种动物中, 猴口腔菌群中梭菌属 (*Fusobacterium*)、卟啉菌属 (*Porphyromonas*) 与人最相似。

2.2.4 不同物种口腔菌群的统计学分析及生物标志物:

为进一步确定菌群种属的丰富度差异, 采用在线统计工具 LEfSe 来确定人与 5 种动物的差异菌属, LDA 值设置为 4。结果表明: 人的普氏菌属 (*Prevotella*) (从门到属)、梭菌属 (*Fusobacterium*) (从门到属)、奈瑟氏菌属 (*Neisseria*) 丰富度较高; 猴的链球菌属 (*Streptococcus*) (从门到属)、棒杆菌属 (*Corynebacterium*) (从科到属)、巴斯德氏菌科 (*Pasteurellaceae*) (从目到科)、毛螺旋菌科 (*Lachnospiraceae*)、放线杆菌属 (*Actinobacillus*) 丰富度较高; 猪的莫拉氏菌属 (*Moraxella*) (从门到属)、

金氏菌属 (*Kingella*) 丰富度较高; 犬的梭菌目 (*Clostridiales*) (从纲到目)、卟啉菌属 (*Porphyromonas*) 丰富度较高; 兔的丛毛单胞菌科 (*Comamonadaceae*) (从目到科)、鞘脂杆菌目 (*Sphingobacteriales*) (从纲到目)、黄杆菌科 (*Flavobacteriaceae*) (从纲到科) 丰富度较高; 鼠的罗氏菌属 (*Rothia*) (从门到属) 丰富度较高。

3 讨论

人与 5 种常用实验动物口腔菌群丰度差异显著 ($P < 0.05$), 除了物种本身影响外, 可能与彼此之间的饮食、环境等多种因素有关。菌群 β 多样性分析显示: 猴与人的距离相对较近, 表明猴的口腔菌群相对于其他种类动物与人更相似, 提示猴可能是研究人口腔菌群较适宜的模型动物。人的口腔菌群中, 放线菌门、拟杆菌门、变形菌门、厚壁菌门和梭杆菌门 5 个门的细菌占主要地位, 高达 97.1%, 在五种实验动物中, 猴以上 5 个菌门的水平与人最相似, 这可能因为猴与人的亲缘关系最近, 以及人工驯养繁殖的猴与人的饮食较相似有关; 梭杆菌门是导致人口腔疾病的重要菌门, 在 5 种动物中, 猴与人的梭杆菌门水平最相似, 提示猴可能是研究人与梭杆菌门细菌相关口腔疾病的较适宜模型; 变形菌门包括很多病原菌, 如变形杆菌、沙门氏菌、弧菌、螺杆菌等, 与口腔感染性疾病密切相关, 猪的变形菌门较其它几种动物丰富, 提示猪可能是研究与变形菌门相关疾病的较适宜模型动物; 螺旋体是人口腔正常菌群的一个组成部分, 与牙周疾病的发生关系密切, 在坏死性龈炎病变部位, 可以发现大量的螺

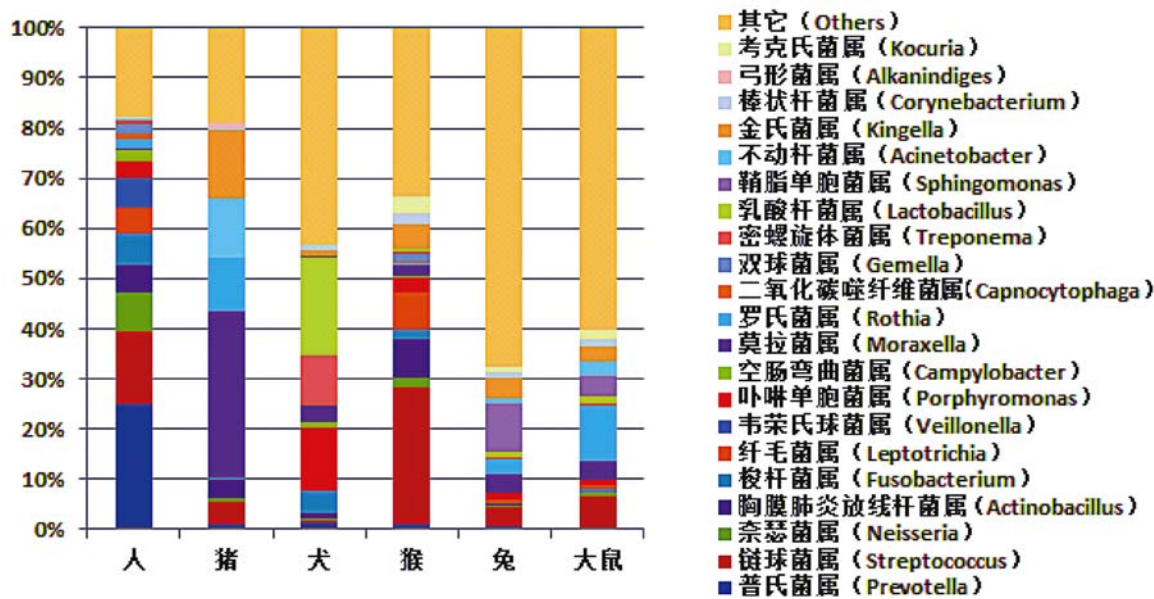


图 4 常用实验动物与人口腔菌群结构属水平分布

Fig. 4 Distribution of oral flora at genera level in commonly used laboratory animals and humans

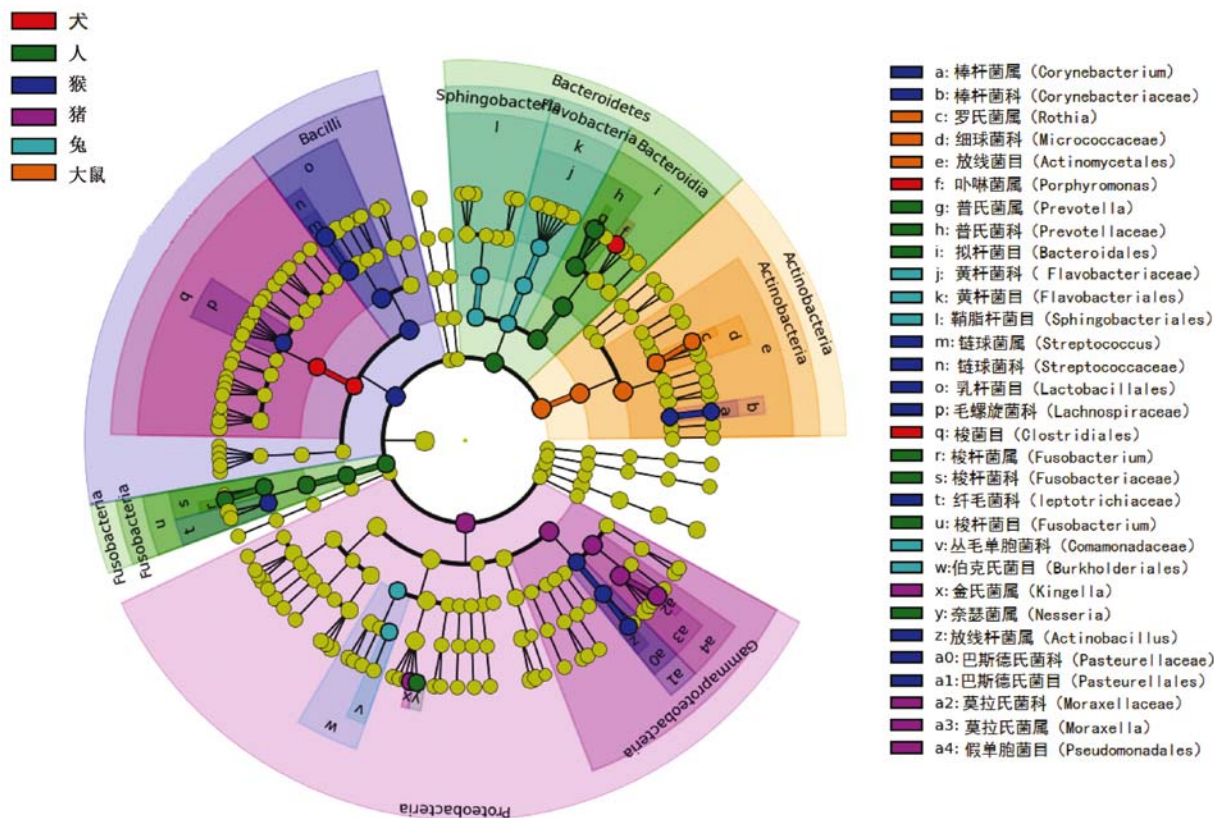


图 5 常用实验动物与人口腔菌群 LefSe 结果进化分支图 (LDA = 4.0, $P < 0.05$)

Fig. 5 LEfSe results of oral flora in commonly used laboratory animals and humans (LDA = 4, $P < 0.05$)

旋体,在慢性牙周炎的病损区也可发现菌斑中的螺旋体^[12],在 5 种动物中,只有犬口腔的螺旋体门较为丰富,提示犬可能是研究与螺旋体门相关疾病的

适宜模型动物。
人口腔中数量最多的是普氏菌属,是牙周病和牙周脓肿的致病菌^[13],这种菌属在五中动物中均分

布较少。梭菌属可与螺旋体混合感染,会引起急性溃疡性龈炎、急性坏死龈炎等,当人的炎症性牙周病变得严重时,此二类菌数大为增加,疾病减轻时又会减少,是牙周疾病治疗效果观察指标之一;卟啉菌属是口腔菌群中和牙周病相关的一个菌属^[14],它可侵入人牙龈成纤维细胞,并且在相当浓度的抗生素作用下存活^[15]。研究表明,它和类风湿关节炎也有一定的关联,类风湿关节炎的患者普遍患有牙周疾病,并且使用抗生素的水平偏高^[16];本研究中猴口腔的梭菌属、卟啉菌属比其他种类动物与人更相似,提示猴可能是研究与此菌属相关疾病的适宜模型动物。

目前,人体口腔菌群的研究较多,实验动物与人体之间正常口腔菌群的对比研究进行的很少;某一物种下的不同条件或刺激之间的对比研究较多,不同物种之间相同条件下的比较研究较少。与以往类似的研究相比,本研究的不同之处主要在于以下两点:以往的研究多采用 2~3 种实验动物,而本研究涵盖了医学研究中较常用的 5 种常用实验动物(猪、犬、猴、兔、大鼠),研究的动物种类最多;以往的研究多采用变性梯度凝胶电泳(DGGE)技术,本研究采用 16S rRNA 高通量测序法,能够较为全面和准确的反映微生物群落结构,而 DGGE 仅能够反映有限的优势微生物类群,在技术水平上具有局限性。

参考文献:

- [1] 张存宝,张雄. 口腔微生态研究进展[J]. 中国乡村医药, 2012, 19(14):81-82.
- [2] 王鹏. 宏基因组法检测侵袭性牙周炎治疗前后菌斑微生物多样性[D]. 山东大学, 2015.
- [3] 杨永华,姚健. 分子生物学方法在微生物多样性研究中的应用[J]. 生物多样性, 2000, 8(3): 337-342.
- [4] 周伟,张东升. 口腔微生物多样性研究进展[J]. 中国微生态学杂志, 2015, 27(6): 738-741.
- [5] 邓冠华,查龙应,张国霞,等. 高通量 16S rRNA 标签测序法比较人与不同动物肠道微生物组多样性[J]. 生态科学, 2014, 33(05): 851-857.
- [6] Zhou HW, Li DF, Tam NF, et al. BIPES, a cost-effective high-throughput method for assessing microbial diversity[J]. ISME J, 2011, 5(4): 741-749.
- [7] Huse SM, Dethlefsen L, Huber JA, et al. Exploring microbial diversity and taxonomy using SSU rRNA hypervariable tag sequencing[J]. PLoS Genet, 2008, 4(11): e1000255.
- [8] Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, et al. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities[J]. Appl Environ Microbiol, 2009, 75(23): 7537-7541.
- [9] Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nat Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [10] Segata N, Izard J, Waldron L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. Genome Biol, 2011, 12(6): R60.
- [11] 李岩涛,李金陆,杨圣辉,等. 小型猪、大鼠及人口腔常见菌群的比较研究[J]. 北京口腔医学, 2006, 14(03): 153-156.
- [12] 吴娅菲,杨美蕾,肖晓蓉,等. 口腔菌群中螺旋体的分布[J]. 中国微生态学杂志, 1990, (1): 69.
- [13] Tanaka S, Yoshida M, Murakami Y, et al. The relationship of *Prevotella intermedia*, *Prevotella nigrescens* and *Prevotella melaninogenica* in the supragingival plaque of children, caries and oral malodor[J]. J Clin Pediatr Dent, 2008, 32(3): 195-200.
- [14] Naito M, Hirakawa H, Yamashita A, et al. Determination of the genome sequence of *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 and genomic comparison with strain W83 revealed extensive genome rearrangements in *P. gingivalis*[J]. DNA Res, 2008, 15(4): 215-225.
- [15] Irshad M, van der Reijden WA, Crielaard W, et al. In vitro invasion and survival of *Porphyromonas gingivalis* in gingival fibroblasts; role of the capsule[J]. Arch Immunol Ther Exp (Warsz), 2012, 60(6): 469-476.
- [16] Wegner N, Wait R, Sroka A, et al. Peptidylarginine deiminase from *Porphyromonas gingivalis* citrullinates human fibrinogen and alpha-enolase: implications for autoimmunity in rheumatoid arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2010, 62(9): 2662-2672.

[修回日期]2016-05-02