

C1型尼曼-匹克病小鼠生长繁殖及血液生理生化指标的测定分析

乔梁^{1,2}, 杨恩慧^{1,2}, 杨记超^{1,2}, 顾巧美¹, 董宏天¹, 林俊堂^{1,2*}, 闫欣^{1,2*}

(1. 新乡医学院生命科学技术学院, 河南 新乡 453003; 2. 河南省医用组织再生重点实验室, 河南 新乡 453003)

【摘要】 目的 测定SPF级C1型尼曼-匹克病小鼠(*Npc1*^{-/-}小鼠)的生长繁殖及血液生理生化指标,为开展NPC1病人的研究提供理论性的基础资料。方法 ①选取0~77日龄*Npc1*^{-/-}、*Npc1*^{+/-}和*Npc1*^{+/+}小鼠雌雄各40只,定期称重并绘制生长曲线;②*Npc1*^{-/-}小鼠由*Npc1*^{+/-}小鼠交配繁殖产生,统计*Npc1*^{+/-}小鼠连续4代的繁殖数据;③检测60日龄*Npc1*^{-/-}和*Npc1*^{+/+}小鼠的血液生理生化指标。结果 ①*Npc1*^{-/-}小鼠的体重在7周前随着日龄的增加而增加,7周后随着日龄的增加而减少,直至11周左右死亡。*Npc1*^{+/+}和*Npc1*^{+/-}小鼠的体重均随着日龄的增长而逐渐增加,两者之间并没有显著差别。4周后雄性比雌性体重增加明显比雌性小鼠快;②*Npc1*^{+/-}小鼠不同代内交配分娩间隔、窝产仔数、离乳仔数、离乳仔数中雌雄数量及阳性数量差异无显著性($P>0.05$),而第2代的离乳率明显大于第1代($P<0.05$);③*Npc1*^{-/-}和*Npc1*^{+/+}小鼠血液生理指标中平均红细胞血红蛋白含量(MCH)和平均过氧化物酶指数(MPXI)差异有显著性($P<0.05$),其余差异无显著性($P>0.05$)。生化指标中尿素(UREA)差异有极显著性($P<0.01$),而天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、葡萄糖(GLU)、乳酸脱氢酶(LDH)、钾(K)和铜(Cu)等差异有显著性($P<0.05$),其余差异无显著性($P>0.05$)。结论 ①*Npc1*^{-/-}、*Npc1*^{+/-}和*Npc1*^{+/+}小鼠的生长曲线因基因型和性别不同而存在差异;②*Npc1*^{+/-}小鼠不同代的繁殖能力差异无显著性;③*Npc1*^{-/-}和*Npc1*^{+/+}小鼠的部分血液生理生化指标差异有显著性。

【关键词】 C1型尼曼-匹克病,小鼠;生长曲线;繁殖;血液参数

【中图分类号】 Q95-33

【文献标识码】 A

【文章编号】 1005-4847(2017)03-0250-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2017.03.004

Analysis of growth, reproductive and blood physiological and biochemical parameters in Niemann-Pick disease type C1 mice

QIAO Liang^{1,2}, YANG En-hui^{1,2}, YANG Ji-chao^{1,2},

GU Qiao-mei¹, DONG Hong-tian¹, LIN Jun-tang^{1,2*}, YAN Xin^{1,2*}

(1. College of Life Science And Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China;

2. Henan Key Laboratory of Medical Tissue Regeneration, Xinxiang 453003)

【Abstract】 **Objective** To investigate the growth curve, breeding rate, and blood physiological and biochemical parameters in *Npc1* gene mutant mice (*Npc1*^{-/-}) for providing theoretical evidence in research on Niemann-Pick disease type C1 (NPC1) patient. **Methods** 1) The body mass of *Npc1*^{-/-}, *Npc1*^{+/-}, and *Npc1*^{+/+} mice (n = 120; 60 ♀, 60 ♂) was measured from 0 to 77 days; (2) As *Npc1*^{-/-} mice were born only by the mating *Npc1*^{+/-} mice, the breeding rate of *Npc1*^{+/-} mice was counted here from the 1st to 4th generation; (3) The blood physiological and biochemical parameters were measured on both *Npc1*^{-/-} and *Npc1*^{+/+} mice at 60 days. **Results** 1) Compared with the wild type controls, the

【基金项目】 国家自然科学基金项目(编号:81400936,81600987,U1304808);河南省高等学校重点科研项目(编号:16A180014);河南省高校科技创新人才支持计划(14HASTIT032);河南省科技发展计划项目(142300410192);新乡医学院神经医学学科群支持计划。

【作者简介】 乔梁(1985-),男,博士,专业:发育神经生物学。Email: qiaoliang927@163.com

【通讯作者】 林俊堂(1976-),男,教授,研究方向:神经发育与干细胞诱导分化。Email: linjtlin@126.com;闫欣(1980-),男,教授,研究方向:神经退行性疾病与细胞发育。Email: pangyufu@aliyun.com。*共同通讯

body weight of *Npc1*^{-/-} mice was progressively increased up to 7 weeks and then decreased, and died around 11 weeks. The body weight of the *Npc1*^{+/-} and *Npc1*^{+/+} mice was increased as time went on. After 4 weeks, the male mice showed a higher weight gain than the females; (2) The generations of *Npc1*^{+/-} mice had no significant difference in mating-parturition interval, litter size, weaning litter and the number of male and female ($P > 0.05$), but the weaning rate of the 2nd generation was significantly higher than that of the 1st generation ($P < 0.05$); (3) The hematological parameters showed a significant difference only in mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean peroxidase index (MPXI) between the *Npc1*^{-/-} and *Npc1*^{+/+} mice ($P < 0.05$). No significant difference was found in other hematological parameters ($P > 0.05$). Among the biochemical parameters, aspartate aminotransferase (AST), glucose (GLU), lactate dehydrogenase (LDH), potassium (K) and copper (Cu) had a significant difference between the *Npc1*^{-/-} and *Npc1*^{+/+} mice ($P < 0.05$). **Conclusions** 1) The growth curves of *Npc1*^{-/-}, *Npc1*^{+/-}, and *Npc1*^{+/+} mice are different due to different genotype and sex; (2) The reproduction rates of *Npc1*^{+/-} mice have no significant difference among different generations; (3) The blood physiological parameters (MCH, MPXI) and biochemical parameters (UREA, AST, GLU, LDH, K, Cu) are significantly different between *Npc1*^{-/-} and *Npc1*^{+/+} mice.

[Key words] Niemann-Pick disease type C1, Mice; Growth rate; Reproduction; Hematological parameters

Corresponding author: LIN Jun-tang. E-mail: linjtlin@126.com. YAN Xin. E-mail: Email: pangyufu@aliyun.com

com

C1 型尼曼 - 匹克病 (Niemann-Pick disease type C1, NPC1) 是由 *Npc1* 基因 (18q11, OMIM #257220) 突变引起细胞内脂类代谢异常的一种常染色体隐性遗传的神经退行性疾病。NPC1 在各个年龄段均可发病,多在发病后的 5 ~ 20 年内死亡^[1,2]。临床上初期表现为肝脾肿大,后期逐渐出现进行性神经系统受损,如共济失调、垂直性核上性眼肌麻痹、肌张力障碍、构音障碍、吞咽困难、痴呆和癫痫等,因其临床表型多种多样,易被误诊和漏诊。目前,针对 NPC1 尚无有效的治疗手段。

C1 型尼曼 - 匹克病小鼠 (BALB/cNctr-*Npc1*^{miN}/J, *Npc1*^{-/-} 小鼠) 是 *Npc1* 基因自然突变的小鼠,其病理改变和临床表现与人 NPC1 非常相似。因此,*Npc1*^{-/-} 小鼠是研究 NPC1 的理想动物模型^[3]。目前,NPC1 患者临床样本获得极为困难,利用 *Npc1*^{-/-} 小鼠开展 NPC1 研究显得尤为重要。Morris 等^[4]曾对 *Npc1*^{-/-} 小鼠的部分生长繁殖及血液生化指标进行分析,其结果并不能全面反映 *Npc1*^{-/-} 小鼠的生理状况。而国内关于 SPF 级 *Npc1*^{-/-} 小鼠生长繁殖及血液生理生化指标的研究几乎没有报道,其背景资料还不是很充实。因此,本实验利用从浙江大学医学院引进的 SPF 级 *Npc1*^{+/-} 小鼠,繁育扩大后对其后代进行详细的生长、繁殖性状及血液生理生化指标等测定,进而为利用 *Npc1*^{-/-} 小鼠开展人 NPC1 的研究提供重要的基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 *Npc1*^{+/-} 小鼠由浙江大学医学院段树民院士研究组提供。原种群自美国 Jackson 实验室 (002760) 引进,屏障环境动物房内进行饲养和繁殖。6 ~ 8 周 *Npc1*^{+/-} 小鼠按雌雄 2:1 配对合笼,交配后获得突变型 (*Npc1*^{-/-})、杂合型 (*Npc1*^{+/-}) 和野生型 (*Npc1*^{+/+}) 小鼠。

1.1.2 饲养管理及环境

实验小鼠在 IVC 独立送风隔离笼具中饲养繁殖,温度 20 ~ 26℃,相对湿度 30% ~ 65%,压差 10 ~ 20 Pa,换气次数 20 次/时,进风速度 30 ~ 35 m/s,目标压差 13 Pa,空气洁净度 < 100 级,噪声 < 55 dB,自动控制;12 h 光照/12 h 黑暗,自由摄食与饮水,定期更换垫料。

小鼠用垫料由广州赛博诺生物科技有限公司提供【SCXK(京)2014-0008】。小鼠繁育饲料由北京科澳协力饲料有限公司提供【SCXK(京)2014-0010】。饲料的营养成分为:水分 85.5 g/kg、粗蛋白 224 g/kg、粗脂肪 46.6 g/kg、粗纤维 37 g/kg、粗灰分 66 g/kg,钙 11.4 g/kg,总磷 8.2 g/kg。饮用水为纯水/超纯水一体化系统(默克密理博)制备的纯水。鼠笼、水瓶、水、饲料和垫料等物品均经 MAST 脉动真空灭菌器(新华医疗)灭菌,灭菌温度 121℃,灭菌时间 20 min,置换时间 4 min,干燥时间 10 min,脉动次数 3。

1.1.3 实验仪器

电子天平(精确到 0.1 g,深圳信诺普电子衡器厂);XS-500i 血液分析系统(希森美康);ADVIA 2400 全自动临床生化分析仪(西门子);5415R 冷冻

离心机(Eppendorf);常规手术器械。

1.2 实验方法

1.2.1 基因型鉴定

剪 3~5 mm 鼠尾放入 PCR 管中,加入 50 μ L 碱性溶液(25 mmol/L NaOH, 0.2 mmol/L EDTA), 95 $^{\circ}$ C 裂解 30 min,室温冷却后加入 50 μ L 中和液(40

mmol/L Tris-HCl, pH 5)混匀,取 2 μ L 进行 PCR 反应。

采用两对引物对小鼠基因型进行鉴定(表 1)。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 3 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,63 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 45 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 2 min。最后,使用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测基因型。

表 1 基因型鉴定引物

Tab. 1 Primers used for genotype identification

引物 Primer	长度/Length, bp	序列/Sequence, 5'→3'
野生型引物 Wild type primer	173	F:CTG TAG CTC ATC TGC CAT CG R:TCT CAC AGC CAC AAG CTT CC
突变型引物 Mutant type primer	475	F:TGA GCC CAA GCA TAA CTT CC R:GGT GCT GGA CAG CCA AGT A

1.2.2 生长曲线测定

用电子天平分别称取 120 只 0~77 日龄小鼠($Npc1^{-/-}$ 、 $Npc1^{+/-}$ 和 $Npc1^{+/+}$ 小鼠各 40 只,♂♀各半)的体重,每周称重一次,绘制生长曲线。

1.2.3 繁殖数据统计

收集和统计 $Npc1^{+/-}$ 小鼠的 F1、F2、F3、F4 代的交配分娩间隔、窝产仔数、离乳仔数、离乳率、离乳仔数中雌雄数量及阳性数量。

1.2.4 血液生理指标测定

将 60 日龄的 $Npc1^{-/-}$ 和 $Npc1^{+/+}$ 小鼠摘眼球取血,送新乡雅仕杰医学检验所用 XS-500i 血液分析系统检测 29 项血常规指标(表 3)。

1.2.5 血液生化指标测定

将剩余的全血 4 $^{\circ}$ C 静止 1 h 后,3000 r/min 离心 15 min,分离出血清,送新乡雅仕杰医学检验所用 ADVIA 2400 全自动临床生化分析仪检测 27 项血生化指标(表 4)。

1.3 数据分析

采用 Excel 统计软件,实验数据进行 Student *t* 检验,以平均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 基因型鉴定

取同窝出生的 21 日龄小鼠进行基因型鉴定,结果如图 1 所示, $Npc1^{-/-}$ 小鼠:1 条带,475 bp; $Npc1^{+/+}$ 小鼠:1 条带,173 bp; $Npc1^{+/-}$ 小鼠:2 条带,分别为 173 bp 和 475 bp。

2.2 $Npc1^{-/-}$ 小鼠的生长曲线

雌、雄 $Npc1^{-/-}$ 小鼠的体重在 7 周前随着日龄的增加而增加,7 周后随着日龄的增加而减少。4~5 周体重快速增长,6~7 周体重增加缓慢,7 周之后

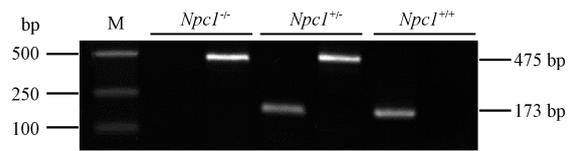


图 1 基因型鉴定结果(M:marker)

Fig. 1 Results of genotype identification

体重逐步减少,直至 11 周左右死亡。5 周前雌雄小鼠体重基本无差异,6~7 周雄性小鼠体重增加明显比雌性小鼠快,7 周后雌性小鼠体重减少明显比雄性小鼠快。

雌、雄 $Npc1^{+/+}$ 和 $Npc1^{+/-}$ 小鼠的体重均随着日龄的增加而增加,4 周时出现一个快速生长期,之后体重增加缓慢,最后趋于稳定。4 周前雌雄小鼠体重基本无差异,随后雄性小鼠体重增加明显比雌性小鼠快。雄性 $Npc1^{+/+}$ 和 $Npc1^{+/-}$ 小鼠的体重 4 周后基本无差异,而雌性 $Npc1^{+/-}$ 小鼠体重比 $Npc1^{+/+}$ 略低。

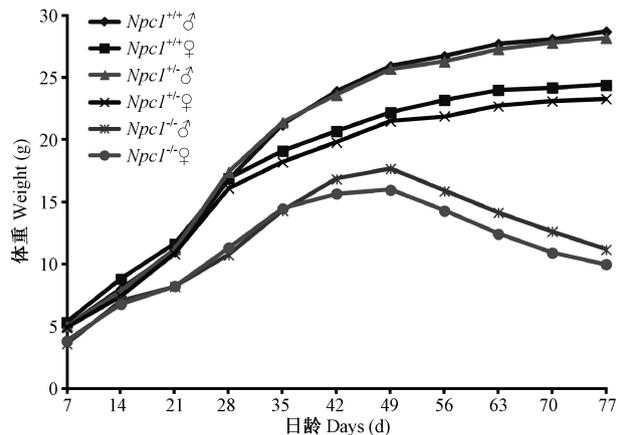


图 2 $Npc1^{-/-}$ 、 $Npc1^{+/-}$ 和 $Npc1^{+/+}$ 小鼠的生长曲线

Fig. 2 Growth curves of the $Npc1^{-/-}$, $Npc1^{+/-}$, and $Npc1^{+/+}$ mice

2.3 *Npc1*^{+/-} 小鼠繁殖性能

由于 *Npc1*^{-/-} 小鼠不育, 需要通过 *Npc1*^{+/-} 小鼠交配进行繁殖。因此, 对 17 窝 SPF 级 *Npc1*^{+/-} 小鼠产仔进行连续 4 代统计(表 2), 离乳小鼠分别为 131、112、136 和 109 只, 共计 448 只。随后分别统计 4 代内交配分娩间隔、窝产仔数、离乳仔数、离乳

率、离乳仔数中雌雄数量及阳性数量(表 2)。分析表明不同代内交配分娩间隔、窝产仔数、离乳仔数、离乳仔数中雌雄数量及阳性数量差异无显著性($P > 0.05$), 而第 2 代的离乳率明显大于第 1 代($P < 0.05$)。

表 2 *Npc1*^{+/-} 小鼠繁殖性状($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Reproductive performance of the *Npc1*^{+/-} mice

繁殖性状 Reproductive performance	第一代 1st generation	第二代 2nd generation	第三代 3rd generation	第四代 4th generation	平均值 Average
交配分娩间隔/d Mating-parturition interval	—	33.65 ± 14.70	43.59 ± 22.03	32.47 ± 13.45	36.57 ± 4.99
窝产仔数/只 Litter size	7.71 ± 2.71	6.59 ± 1.94	8.00 ± 2.87	6.41 ± 3.66	7.18 ± 0.69
离乳仔数/只 Weaning litter	7.18 ± 2.94	6.59 ± 1.94	7.82 ± 3.03	6.29 ± 3.62	6.97 ± 0.59
离乳率/% Weaning rate	92.25 ± 12.95	100.00 ± 0.00*	96.99 ± 9.91	98.53 ± 4.15	96.94 ± 2.91
雄性数量/只 Male	3.24 ± 1.86	3.35 ± 1.97	3.53 ± 1.97	3.00 ± 2.00	3.28 ± 0.19
雄性阳性数量/只 Positive males	0.53 ± 0.80	0.35 ± 0.86	0.53 ± 0.87	0.76 ± 0.90	0.54 ± 0.15
雌性数量/只 Female	4.00 ± 1.73	3.24 ± 2.28	4.29 ± 1.99	3.29 ± 2.23	3.71 ± 0.45
雌性阳性数量/只 Positive females	0.82 ± 0.81	0.47 ± 0.62	0.76 ± 0.83	0.59 ± 0.80	0.66 ± 0.14

注: 与第 1 代相比, * $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$, compared with the F1 mice.

表 3 *Npc1*^{-/-} 小鼠血液生理指标($\bar{x} \pm s$)

Tab. 3 Blood physiological parameters in the *Npc1*^{-/-} mice

血液生理指标 Blood physiological parameters	<i>Npc1</i> ^{+/+}	<i>Npc1</i> ^{-/-}
白细胞总数 WBC, 10 ³ cells/ μ L	3.84 ± 0.59	6.60 ± 4.69
红细胞计数 RBC, 10 ⁶ cells/ μ L	9.87 ± 0.41	10.25 ± 0.49
血红蛋白浓度 HGB, g/dL	18.83 ± 0.50	18.20 ± 1.82
红细胞压积 HCT, %	43.23 ± 1.10	43.53 ± 0.81
红细胞平均体积 MCV, fL	43.83 ± 1.43	42.53 ± 1.27
平均血红蛋白含量 MCH, pg	19.13 ± 0.32	17.73 ± 0.99
平均血红蛋白浓度 MCHC, g/dL	43.63 ± 0.87	41.77 ± 3.53
实测平均血红蛋白浓度 CHCM, g/dL	29.47 ± 0.21	28.30 ± 0.96
平均红细胞血红蛋白含量 MCH, pg	12.90 ± 0.53	12.00 ± 0.10*
红细胞体积分布宽度 RDW, %	15.77 ± 0.96	17.10 ± 1.30
血红蛋白含量分布宽度 HDW, g/dL	3.29 ± 0.03	3.29 ± 0.17
血小板计数 PLT, 10 ³ cells/ μ L	1178.33 ± 151.89	1142.00 ± 296.56
血小板平均体积 MPV, fL	6.70 ± 0.30	7.43 ± 0.51
血小板平均浓度 MPC, g/dL	22.53 ± 0.78	21.27 ± 1.07
血小板平均质量 MPM, pg	1.34 ± 0.02	1.38 ± 0.02
中性粒细胞计数 Neut, 10 ³ cells/ μ L	0.93 ± 0.20	3.88 ± 3.99
中性粒细胞百分比 Neut%, %	24.13 ± 1.45	49.20 ± 20.20
淋巴细胞计数 Lymph, 10 ³ cells/ μ L	2.68 ± 0.36	2.31 ± 0.69
淋巴细胞百分比, Lymph%	70.07 ± 1.77	43.23 ± 17.57
单核细胞计数 Mono, 10 ³ cells/ μ L	0.06 ± 0.01	0.14 ± 0.06
单核细胞百分比 Mono%, %	1.57 ± 0.21	2.30 ± 0.62
嗜酸性细胞数 Eos, 10 ³ cells/ μ L	0.13 ± 0.05	0.15 ± 0.06
嗜酸性细胞百分比 Eos%, %	3.50 ± 1.22	3.37 ± 2.42
嗜碱性细胞数 Baso, 10 ³ cells/ μ L	0.01 ± 0.00	0.02 ± 0.00
嗜碱性细胞百分比 Baso%, %	0.07 ± 0.06	0.37 ± 0.25
大型不染色细胞数 LUC, 10 ³ cells/ μ L	0.02 ± 0.01	0.12 ± 0.13
大型不染色细胞百分比 LUC%, %	0.60 ± 0.10	1.50 ± 0.72
中性粒细胞左移指数 PMN _x /MN _x LI	2.20 ± 0.07	2.14 ± 0.30
平均过氧化物酶指数 MPXI	-1.83 ± 1.10	-6.57 ± 1.76*

注: 与 *Npc1*^{+/+} 相比, * $P < 0.05$ 。

Note. * $P < 0.05$, compared with the *Npc1*^{+/+} mice.

2.4 *Npc1*^{-/-} 小鼠血液生理指标测定

与 *Npc1*^{+/+} 小鼠相比, *Npc1*^{-/-} 小鼠的红细胞血红蛋白含量 (MCH) 明显降低, 而过氧化物酶指数 (MPXI) 则显著性上升, 差异达到显著水平 ($P < 0.05$), 其余生理指标差异无显著性 ($P > 0.05$)。

2.5 *Npc1*^{-/-} 小鼠血液生化指标测定

Npc1^{-/-} 和 *Npc1*^{+/+} 小鼠血液生化指标测定结

表 4 SPF 级 *Npc1*^{-/-} 小鼠血液生化指标 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 4 Blood biochemical parameters in the SPF *Npc1*^{-/-} mice

血液生化指标 Blood biochemical parameters	<i>Npc1</i> ^{+/+}	<i>Npc1</i> ^{-/-}
总胆固醇 TC, mmol/L	2.69 ± 0.38	2.10 ± 0.56
低密度脂蛋白胆固醇 LDL-C, mmol/L	0.12 ± 0.03	0.13 ± 0.04
高密度脂蛋白胆固醇 HDL-C, mmol/L	1.52 ± 0.37	0.95 ± 0.33
甘油三酯 TG, mmol/L	0.98 ± 0.23	0.81 ± 0.32
总蛋白 TP, g/L	53.67 ± 1.53	46.00 ± 14.00
清蛋白 ALB, g/L	34.00 ± 1.00	28.67 ± 8.74
球蛋白 GLB, g/L	19.67 ± 0.58	17.33 ± 5.51
清球比 A/G	1.73 ± 0.03	1.67 ± 0.17
丙氨酸氨基转移酶 ALT, U/L	37.33 ± 0.58	560.67 ± 412.54
天门冬氨酸氨基转移酶 AST, U/L	128.67 ± 27.54	983.67 ± 360.85*
ALT 与 AST 比值 ALT/AST	3.44 ± 0.69	5.07 ± 4.46
碱性磷酸酶 ALP, U/L	164.00 ± 21.52	198.33 ± 68.19
总胆红素 TBIL, μmol/L	1.07 ± 0.31	0.93 ± 0.60
尿素 UREA, mmol/L	7.00 ± 0.30	11.53 ± 1.31**
尿酸 UA, μmol/L	102.00 ± 20.81	302.33 ± 147.07
肌酐 CR, μmol/L	11.33 ± 0.58	16.67 ± 4.04
葡萄糖 GLU, mmol/L	6.97 ± 0.81	4.13 ± 1.05*
血清肌酸激酶测定 CK, U/L	1789.33 ± 176.98	1495.67 ± 614.01
乳酸脱氢酶 LDH, U/L	789.67 ± 276.51	2014.33 ± 560.42*
钾 K, mmol/L	5.65 ± 0.12	7.41 ± 0.93*
钠 Na, mmol/L	158.67 ± 1.15	327.67 ± 163.54
氯 Cl, mmol/L	118.00 ± 1.73	278.33 ± 152.53
钙 Ca, mmol/L	2.47 ± 0.01	2.90 ± 0.52
无机磷 P, mmol/L	3.10 ± 0.49	3.85 ± 0.77
铜 Cu, μmol/L	11.73 ± 0.71	31.77 ± 10.57*
锌 Zn, μmol/L	12.93 ± 0.77	10.76 ± 2.97
镁 Mg, mmol/L	1.19 ± 0.05	1.54 ± 0.39

注: 与 *Npc1*^{+/+} 相比, * $P < 0.05$ 。与 *Npc1*^{+/+} 相比, ** $P < 0.01$ 。

Note. * $P < 0.05$, compared with the *Npc1*^{+/+} mice; ** $P < 0.01$, compared with the *Npc1*^{+/+} mice.

3 讨论

Npc1^{-/-} 小鼠的 *Npc1* 基因发生自然突变, 导致所表达的 NPC1 突变蛋白丧失脂质转运功能, 从而使胆固醇、葡萄糖酰鞘氨醇、鞘糖脂 GM2 和 GM3 等脂类分子在细胞中沉积^[5]。而胞体内大量脂质沉积, 会阻碍不同神经细胞的生长发育和它们之间的脂质循环, 影响神经元胞膜、髓鞘和胶质细胞的正常结构和功能, 最终导致神经细胞变性坏死^[1]。*Npc1*^{-/-} 小鼠的神经病理学改变主要为神经元变性、

果如表 4 所示, 其中 *Npc1*^{-/-} 小鼠的尿素 (UREA) 与 *Npc1*^{+/+} 小鼠差异达到极显著水平 ($P < 0.01$)。天门冬氨酸氨基转移酶 (AST)、葡萄糖 (GLU)、乳酸脱氢酶 (LDH)、钾 (K) 和铜 (Cu) 与 *Npc1*^{+/+} 小鼠差异达到显著水平 ($P < 0.05$), 其余生化指标差异无显著性 ($P > 0.05$)。

轴突球状体形成和髓鞘形成障碍等, 类似于人 NPC1 的神经病变组织, 故作为 NPC1 动物模型已广泛用于 NPC1 的研究中。

Npc1^{-/-} 小鼠体重在整个生长发育过程中比 *Npc1*^{+/+} 和 *Npc1*^{+/-} 小鼠明显要低, 尤其是在 7 周以后体重明显减少。*Npc1*^{-/-} 小鼠在 4~6 周时出现运动障碍和认知功能受损, 9 周时出现进行性共济失调, 10~12 周左右死亡^[4,6,7]。因此, *Npc1*^{-/-} 小鼠在 6~7 周时表现发育迟缓。而 7 周后神经退行性症状不断加剧, 导致 *Npc1*^{-/-} 小鼠后肢慢慢瘫痪, 进食

逐步减少,体重明显减轻,直至 11 周左右死亡(平均死亡率为 67.5%)。

$Npc1^{-/-}$ 小鼠通过 $Npc1^{+/-}$ 小鼠交配繁殖而来,不同代次之间的繁殖性能无明显差异。 $Npc1$ 基因突变影响胆固醇的运输,从而干扰性激素的产生,阻碍精巢和卵巢的发育过程,导致 $Npc1^{-/-}$ 小鼠不育^[8,9]。 $Npc1^{+/-}$ 小鼠第 2 代离乳率与第 1 代之间存在显著的差异($P < 0.05$),可能的原因是雌鼠生产第 1 代时,哺乳仔鼠的经验不足,随着年龄的增长其哺乳能力逐渐增强,后 3 代的离乳仔数和离乳率相对第 1 代都要高。另外, $Npc1^{-/-}$ 小鼠阳性数量不受代次和性别的影响,说明 $Npc1^{+/-}$ 小鼠 4 代内的繁殖性能较好。

$Npc1^{-/-}$ 和 $Npc1^{+/+}$ 小鼠的血液生理指标(MCH 和 MPXI)和生化指标(UREA、AST、GLU、LDH、K 和 Cu)存在显著差异。 $Npc1^{-/-}$ 小鼠的肝脏病变严重,常见肝脾肿大。肾脏的肾间质出现纤维化,肾脏衰老导致肾功能衰退^[4]。因此,与肝和肾功能相关的生化指标(UREA、AST、LDH 和 K)出现明显的升高。但是,与 NPC1 脂类代谢异常的指标(TC、LDL-C、HDL-C 和 TG)并没有差异,而 NPC1 临床分析表明 TC 和 HDL-C 存在差异^[10],揭示常规的血液检查在诊断 NPC1 方面存在不准确性。

本实验通过对 SPF 级 $Npc1^{-/-}$ 小鼠的生长发育、繁殖性能和血液生理生化指标的测定及分析,可为使用 $Npc1^{-/-}$ 小鼠研究 NPC1 提供基础数据。同时,建立 $Npc1^{-/-}$ 小鼠生长繁殖及血液生理生化等指标的数据库,为进一步研究 NPC1 的发病机制和药物开发提供了参考依据。不过,其生物学特性还

需进一步完善。

参 考 文 献

- [1] Vanier MT. Niemann-Pick disease type C [J]. Orphanet J Rare Dis, 2010, 5(1): 16.
- [2] Patterson MC, Hendriksz CJ, Walterfang M, et al. Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update [J]. Mol Genet Metab, 2012, 106(3): 330 - 344.
- [3] Loftus SK, Morris JA, Carstea ED, et al. Murine model of Niemann-Pick C disease: mutation in a cholesterol homeostasis gene [J]. Science, 1997, 277(5323): 232 - 235.
- [4] Morris MD, Bhuvaneshwar C, Shio H, et al. Lysosome lipid storage disorder in NCTR-BALB/c mice. I. Description of the disease and genetics [J]. Am J Pathol, 1982, 108(2): 140.
- [5] Vance JE. Transfer of cholesterol by the NPC team [J]. Cell Metab, 2010, 12(2): 105 - 106.
- [6] Vöikar V, Rauvala H, Ikonen E. Cognitive deficit and development of motor impairment in a mouse model of Niemann-Pick type C disease [J]. Behav Brain Res, 2002, 132(1): 1 - 10.
- [7] Baudry M, Yao Y, Simmons D, et al. Postnatal development of inflammation in a murine model of Niemann-Pick type C disease: immunohistochemical observations of microglia and astroglia [J]. Exp Neurol, 2003, 184(2): 887 - 903.
- [8] Roff CF, Strauss 3rd JF, Goldin E, et al. The murine Niemann-Pick type C lesion affects testosterone production [J]. Endocrinology, 1993, 133(6): 2913 - 2923.
- [9] Gérvy NY, Lopes FL, Ledoux S, et al. Aberrant intracellular cholesterol transport disrupts pituitary and ovarian function [J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(7): 1778 - 1786.
- [10] 邓小鹿,尹飞,毛华雄,等. C 型尼曼 - 匹克病 4 例临床分析 [J]. 中国实用儿科杂志, 2011, 26(3): 207 - 209.

[收稿日期] 2016 - 11 - 11