

长爪沙鼠脑缺血模型近交系的培育 及其发病机制研究进展

李长龙¹, 杜小燕¹, 王冬平², 陈振文^{1*}

(1. 首都医科大学基础医学院, 北京 100069; 2. 军事医学研究院实验动物中心, 北京 100071)

【摘要】 长爪沙鼠具有脑血管变异缺失的特性, 是脑缺血研究良好的模型动物。普通长爪沙鼠群体中模型成功率低, 影响研究结果稳定性, 不符合实验动物福利要求。我们团队在证实脑血管 Willis 环(circle of Willis, COW)变异缺失具有遗传性的基础上, 首先通过定向选育建立了脑缺血高发群体, 进而通过全同胞近亲繁殖的方式, 建立了脑缺血模型近交系, 其 COW 缺失率达 76.62%, 模型成功率达到 88.89%。此外, 建立了近交系微卫星 DNA 和生化位点遗传检测方法, 分析了长爪沙鼠脑缺血模型近交系动物的生长发育和血液生理生化等指标, 为该模型的推广应用奠定了基础。我们还发现, VEGFA 基因、AKT/PI3K 和 Notch 信号通路在长爪沙鼠脑血管发育中发挥重要作用。通过抑制消减杂交方法筛选获得 4 个与长爪沙鼠脑血管发育相关的基因。长爪沙鼠脑缺血模型近交系的培育成功解决了模型发生率低的问题, 减少了动物使用量, 提高了研究结果可信度和稳定性, 促进了相关机制研究。

【关键词】 长爪沙鼠; 脑缺血; 近交系; 抑制消减杂交

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2018) 04-0512-06

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2018.04.017

Advances in research of the establishment of an inbred Mongolian gerbil model of cerebral ischemia and its mechanism of pathogenesis

LI Changlong¹, DU Xiaoyan¹, WANG Dongping², CHEN Zhenwen^{1*}

(1. School of Basic Medical Sciences, Capital Medical University, Beijing 100069, China. 2. Laboratory Animal Center, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Corresponding author: CHEN Zhenwen. E-mail: czwen@ccmu.edu.cn

【Abstract】 Mongolian gerbil has cerebral vascular variation. It is a good laboratory animal model in cerebral ischemia research. However, the low successful rate affects the stability of research result and does not meet the animal welfare requirements. Our group proved that the cerebral vascular variation is a genetic trait. Next, an ischemia-prone gerbil group was established by the through selecting and breeding. Our group bred a cerebral ischemia inbred gerbil with 76.62% of animals missing circle of Willis and 88.89% of animals with cerebral ischemia by selectively inbred by sister-brother mating. The method of genetic monitor for inbred Mongolian gerbil were established based on biochemical loci and microsatellite DNA. The characteristics of growth and development, blood physiology and biochemistry of the inbred cerebral ischemia Mongolian gerbil were analyzed, which provides a foundation for the application of this model. We found that VEGFA gene, and signal pathway of AKT/PI3K and Notch are correlated with Mongolian gerbil cerebrovascular development. Moreover, four genes related to the development of cerebral blood vessels were screened by suppression subtractive hybridization (SSH). The cerebral ischemia inbred gerbil successfully solves the problem of model low

【基金项目】 国家科技支撑计划(No. 2015BAI09B01); 国家自然科学基金(No. 31572348, No. 31572341, No. 31772545)。

Funded by Key Projects in the National Science & Technology Pillar Program (No. 2015BAI09B01), National Natural Science Foundation of China (No. 31572348, No. 31572341, No. 31772545).

【作者简介】 李长龙(1976—), 男, 博士, 副研究员, 主要从事实验动物遗传发育研究。Email: li-changlong@126.com

【通信作者】 陈振文, 男, 博士, 教授, 主要从事实验动物资源开发及遗传发育研究。Email: czwen@ccmu.edu.cn

incidence, reduces animal use, improves the reliability and stability of result, and promotes the related research of its mechanism.

【Key words】 Mongolian gerbil; cerebral ischemia; inbred; suppression subtractive hybridization

Conflict of interest statement: We declare that we have no conflict of interest statement.

2018 年,第 71 届世界卫生组织(WHO)大会发布的信息显示,心脑血管疾病仍然是人类健康的最大“杀手”,而中国是全世界脑血管病死亡率最高的国家。随着我国老龄化社会的到来,脑血管病的发病率将呈上升趋势。在多种脑血管病发生的高危因素中,脑血管畸形是关键因素之一。脑动静脉畸形(arteriovenous malformations, AVM)会导致脑血管病易患性增强,尤其在儿童和年轻人脑血管病的发生中,AVM 是脑血管病发生最根本的原因之一^[1]。研究发现人的脑底动脉 Willis 环(circle of Willis, COW)存在多种畸形^[2],西方人群中正常结构 COW 的比例为 42% ~ 52%^[3-4]。中国人群中正常结构 COW 的比例仅为 27%,远远低于西方人群,其中后交通支完整率为 31%,前交通支完整率 79%^[5]。COW 变异缺失会导致罹患脑血管病风险性显著增加^[6]。在 COW 不对称的病人中,脑动脉瘤破裂的比例高达 75.7%,说明 COW 的变异缺失还与脑动脉瘤的预后高度相关^[7]。不仅如此,COW 变异缺失与缺血性脑中风病人溶栓处理后的脑出血紧密相关^[8]。因此,COW 变异缺失是脑血管病重要风险因子和预后指标^[9]。动物模型是研究脑缺血发病机制和治疗方法不可或缺的实验材料。现有的脑缺血动物模型主要分为全脑缺血模型和局灶性脑缺血模型,其中全脑缺血模型主要采用双侧结扎颈总动脉和椎动脉获取^[10]。该方法能够复制大脑严重缺血和缺血再灌注模型。局灶性脑缺血模型主要通过开颅法、线栓法、栓塞法和光化学法建立。但上述模型存在手术复杂、对动物损伤大及缺血部位和范围不稳定等缺点。

长爪沙鼠是源自我国的实验动物,后传到日本和欧美等国家,因其具有独特的解剖结构及其对微生物易感性、多种肿瘤易发性等生理和行为学特征,已广泛地应用于寄生虫病、微生物、生殖、内分泌、营养、代谢及药理、肿瘤等诸多领域研究,被称为“多功能”实验动物^[11-12]。目前在主要的发达国家均有商品化的长爪沙鼠出售,如 Charles River 公司。针对长爪沙鼠自发癫痫的特性,美国加利福尼亚大学培育了癫痫易感型(WJL/uc)和抵抗型(STR/uc)两个近交品系。日本培育了长爪沙鼠癫

痫品系(MGS/ldr)^[13]。长爪沙鼠被认为适宜制作脑缺血模型^[14],其优势在于,第一,长爪沙鼠成年体重约为 60 ~ 80 g,适宜手术操作;第二,模型建立方法简单,手术损伤相对小,利于长时间的研究工作;第三,适宜建立全脑和半脑缺血模型或者缺血再灌注模型^[15]。长爪沙鼠脑缺血模型不但用于脑缺血发病和损伤机制研究,也用于相关药物研究开发^[16]。

利用长爪沙鼠建立脑缺血模型也存在不足。由于长爪沙鼠 COW 结构存在差异,造成仅有 30% 左右动物在结扎颈总动脉后出现明确的脑缺血症状^[17-18]。模型成功率低造成了严重的动物浪费和研究结果不稳定,因此开发出脑底动脉 Willis 环变异缺失类型一致,表型性状稳定的模型群体就显得十分必要。

1 长爪沙鼠脑缺血模型高发群体的培育

首都医科大学群体来自于捕获到野生长爪沙鼠。从 1982 年开始实验动物化工作,在质量控制和群体培育方面做了很多工作。杜小燕等^[19-20]通过大量分析,确认长爪沙鼠 COW 具有变异缺失特性,进一步研究证实,通过单侧结扎颈总动脉获得典型半脑缺血症状的前提是 COW 前交通支细小或缺失并后交通支缺失。通过对连续 5 代长爪沙鼠共计 398 只动物的分析证实,长爪沙鼠脑底动脉 COW 变异缺失具有遗传性^[21]。该研究结果表明,通过选育的方式定向培育长爪沙鼠脑缺血模型群体是可行的。

首都医科大学长爪沙鼠研究团队在国家自然科学基金和国家科技支撑计划课题资助下,开展了长爪沙鼠脑缺血高发群的选育工作。由于脑血管 COW 类型分析具有破坏性,因此在亲代动物产子后再进行血管类型分析和模型制作,根据亲代 COW 类型和发病特点对子代个体进行筛选和配种,进而达到选育和富集相关基因的目的。经过 8 年 18 代的定向繁育,长爪沙鼠群体的半脑脑缺血模型成功率由普通种群的 40% 左右上升到 70% 以上,全脑缺血模型成功率可达 80% 以上。经过多个单位的研究证实,该群体成模率稳定,模型一致性好,已经成

为脑缺血模型高发群群体。该群体对于提高实验效率、减少动物使用量和保障动物福利等方面均有重要意义。2014 年 1 月该群体通过了专家鉴定,将为脑缺血研究和药物研发提供新的实验材料。

2 长爪沙鼠脑缺血模型近交系的培育

尽管脑缺血高发群的模型成功率有了很大提升,但是 COW 类型的多样性没有显著改善,为了进一步提高长爪沙鼠脑缺血模型的成模率和模型症状的一致性,固化 COW 类型,团队从 2009 年开始选择血管类型相同和表型特征一致的长爪沙鼠后代开始全同胞兄妹近交繁殖,培育长爪沙鼠脑缺血模型近交系。选育过程中,在每一代都进行血管类型分析和模型成功率测定,通过亲代血管类型和表型特征决定其后代是否留种。

近交系培育过程中会出现严重的近交衰退现象,表现为生育障碍进而导致近交系培育失败。为了保证近交系繁殖成功,采取隔代检测的方法,即子代的仔鼠出生后才检测其祖代的策略。通过对 F1-F15 代所有动物和 F16-F20 代部分动物进行了脑缺血成模率和 COW 缺失类型统计发现,在连续近交 20 代过程中单侧颈总动脉结扎模型发生率总体呈上升趋势,从 F3 的 47.6% 上升到 F18、F19 和 F20 分别达到 73.17%、85.71% 和 88.89%;同时, COW 变异缺失率也呈上升趋势, COW 后交通支的缺失达到 100%;前交通支的缺失率从 F3 代的 50% 上升到 F18、F19 和 F20 分别达到 85.36%、80.95% 和 100%。

为了验证群体 COW 缺失和特性,选择近交 F20 代后 77 只动物进行脑解剖,显微镜下观察 COW 动脉环前后交通支细小或缺失,左缺失、右缺失和双侧缺失及细小等现象均按照缺失统计,否则为完整。结果显示,有 59 只动物出现 COW 缺失,前交通支缺失比例为 76.62%,后交通支缺失比例 100%,长爪沙鼠脑缺血模型近交系群体 COW 缺失比率为 76.62%。目前保有 F18-F23 代种用动物 150 余对。

依据国家标准 GB14923-2010《实验动物哺乳类实验动物的遗传质量控制》中近交系实验动物的命名原则,采用大写的英文字母来命名。长爪沙鼠脑缺血模型近交系的命名应用英文 Cerebral Ischemia Mongolian gerbil 的首字母的大写来命名,即长爪沙鼠脑缺血模型近交系命名为 CIMG。2017

年通过了北京市实验动物专家委员会的专家鉴定。

3 长爪沙鼠脑缺血模型近交系的遗传检测

近交系 (inbred strain) 动物是至少经过连续 20 代的全同胞兄妹之间或亲代与子代之间交配培育而成的实验动物品系。由于长期近亲繁殖,近交系动物个体之间基因高度纯合,具有高度的遗传一致性。因此,建立长爪沙鼠近交系遗传检测方法是评估近交系培育是否成功的重要指标之一。

3.1 CIMG 微卫星 DNA 标记检测

鉴于长爪沙鼠基因组信息未知,因此利用 536 对小鼠微卫星引物在长爪沙鼠基因组中扩增出微卫星位点 130 个,并将其注册到基因数据库中 (GenBank Accession No. GU562694-GU562823, HM 02600)^[21-22]。通过对 PCR 反应和电泳条件的优化,在长爪沙鼠群体中筛选优化获得等位基因数 3 个以上的 39 个微卫星位点。经过 STR (short tandem repeat) 扫描后选择多态性好、分布均匀位点作为长爪沙鼠遗传质量检测的标记位点^[23-24]。在近交培育第 3-20 代,利用上述位点分析长爪沙鼠遗传一致性。结果显示,在 28 个选定位点中,有 AF200947、D2Mit22、D17Mit38、D11Mit35 和 D5Mit31 等 5 个位点出现变化,其中,AF200947 位点从近交第 4 代开始由杂合子变为纯合子;D2Mit22 位点从近交第 11 代开始由杂合子变为纯合子;D17Mit38 位点在近交过程中始终为杂合子状态;D11Mit35 位点最初为纯合子,在近交第 11 代开始出现杂合子并一致延续至近交 20 代;D5Mit31 位点最初为纯合子,在近交第 11 代开始出现杂合子并延续至近交 16 代,从 16 代开始纯合子位点并延续至近交 20 代。在 F16 代时,在 28 个微卫星位点中有 26 个已达到纯合;有 2 个位点仍是杂合状态;而到 F20 代时,有 2 个微卫星位点仍为杂合 (D11Mit35 和 D17Mit38),位点的纯合率达到 92.86%。

3.2 CIMG 生化位点标记检测

生化位点标记检测法是国家标准推荐的近交系动物遗传检测方法。研究采用筛选获得的长爪沙鼠 26 个生化位点对 F9、F14、F19、F20 代动物进行了遗传检测,发现在近交系的培育过程中,有 3 个生化位点从多态变为单态,其中位点 Es-3 在 F14、F17 和 F19 为多态;位点 Pgm-1 在 F14 为多态,Es-4 在 F14 和 F17 为多态。F20 代以上的动物进行遗传检测,其生化位点标记的电泳呈现单一性,未

发现杂合型和多态性,说明这个近交系动物在上述位点均已纯合,已选的 26 个生化标记纯合度达到 100%。上述结果表明,CIMG 已经符合近交系动物遗传质量标准。

4 长爪沙鼠脑缺血模型近交系的生物学特性

4.1 CIMG 生长繁殖特性

选择近交繁育 20 代以上的动物,依据繁殖卡片和对不同阶段动物进行检测,统计其繁殖性能,包括:窝产仔数、初生窝重、初生平均重、离乳均重、成年体重、离乳成活率和胎间隔等。结果显示,在 1 ~ 5 胎,CIMG 平均每胎出生 (3.51 ± 1.47) 只仔鼠,其中第二胎出生动物数最高,为 (4.29 ± 1.89) 只;平均窝重为 (10.80 ± 4.24) g;平均出生重 (3.16 ± 0.42) g,其中第一胎出生重较低,其他胎次平均出生差异不大;CIMG 平均离乳体重为 (31.03 ± 6.30) g,8 周体重平均为 (49.60 ± 5.18) g,总体仔鼠成活率为 74.46%;CIMG 初产日龄和胎间隔变化范围较大。结果表明,CIMG 种鼠生育周期延长、生育能力下降、哺育能力下降和仔鼠畸形高等情况,导致种群的培育过程放缓。

通过对 CIMG 生长曲线分析发现,在 1 ~ 7 日龄,脑缺血动物 $R = 0.9960$,决定度 $R^2 = 0.9921$,在该段时间内影响体重增加的因素中日龄起了 99.21% 的作用;在 1 ~ 8 周龄,脑缺血动物 $R = 0.9910$,决定度 $R^2 = 0.9819$,在该段时间内影响体重增加的因素中周龄起了 98.19% 的作用。

4.2 CIMG 血液生理生化特性

选择 3 月龄 CIMG 动物,分析其主要血液生理生化指标,结果发现,在分析 17 项血液生化指标中 GLU 和 CRE 在雌雄间差异有显著性 ($P < 0.05$),TG 在雌雄个体间差异有极显著性 ($P < 0.01$);在分析的 22 项血液生理指标中,PLT、MPV、BAS 和 LYM 在雌雄间差异有显著性 ($P < 0.05$),PDW 在雌雄个体间差异有极显著性 ($P < 0.01$);其他指标差异无显著性。表明,CIMG 血液生理生化指标相对稳定,雌雄个体间差异小,品系内动物间一致率好。

5 CIMG 脑血管缺失发生机制

5.1 长爪沙鼠脑血管发育时间的确定

大量研究证明,脑血管畸形是由遗传因素所致^[25-26]。血管生成相关基因的对脑血管的发育发

挥至关重要的作用。血管生成因子 (angiogenic factor with G-patch and forkhead-associated (FHA) domain 1, AGGF1) 和血管内皮细胞生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 均被认为对血管生成发挥重要调节作用^[27-28]。研究显示,胚胎发育过程中在血管生成的部位均有 VEGFA 的表达^[29];在 14 日龄小鼠胚胎的大脑组织中,VEGFA 基因也具有高水平的表达^[29]。长爪沙鼠是新的实验动物资源,其妊娠期与常规实验动物存在差异,因此明确脑血管发育时间是探索其脑血管缺失机制中重要的前提。通过分析不同发育时间长爪沙鼠胚胎和个体脑组织 AGGF1 和 VEGFA 基因表达水平来确定其脑血管发育高峰时段。定量 PCR 结果发现,AGGF1 和 VEGFA 基因在 10 d 胚胎时均出现表达的高峰。在个体出生后,不同发育阶段中 VEGFA 和 AGGF1 基因表达变化相对较小并且在心脏组织表达水平高于大脑的水平。提示在胚胎 10 d 是脑血管发育重要时段,也可能是 COW 发育关键时期。

5.2 VEGFA 和 AGGF1 表达与长爪沙鼠脑血管 COW 发育相关性研究

选取了 Willis 环类型一致个体的 10 d 胚胎,分别利用 qPCR 和 Western blot 方法分析上述 2 个基因的表达水平。结果显示,两种方法对 VEGFA 和 AGGF1 表达分析结果具有一致性。AGGF1 基因在不同血管类型个体中的表达水平没有显著变化。VEGFA 基因在不同血管类型个体间存在差异,表明 VEGFA 基因的表达水平与 COW 类型间存在相关性。研究发现,Notch1 的配体 DLL4 在不同 COW 类型的胚胎间存在显著差异。结果表明,在长爪沙鼠 COW 发育过程可能是 VEGFA 基因表达水平变化影响了 Notch 信号通路。

VEGFA 是通过 PI3K/Akt 信号通路在血管生成中内皮细胞的增殖、迁移和分化等多个过程发挥重要作用^[30]。因此本研究分析了不同血管类型中 PI3K/Akt 信号通路。结果显示,相比于 COW 完整胚胎,在 Akt 在 COW 变异缺失胚胎表达中表达显著降低,此外,p-Akt/Akt 和 p-PI3K/PI3K 在 COW 变异缺失的胚胎中也有不同程度的下降。结果表明,PI3K/Akt 信号通路影响长爪沙鼠 COW 的发育。

5.3 长爪沙鼠脑血管畸形基因的筛选及机制研究

脑血管发育受到多种遗传因素的影响,通过抑制消减杂交 (suppression subtractive hybridization,

SHH)方法可以对表达差异基因进行筛选。我们用 9 只长爪沙鼠构建了 12 个不同脑血管类型相关的抑制性消减杂交文库,通过测序和序列比对鉴定了 84 个基因,其中 16 个基因与血管发育相关。通过进一步的定量 PCR 验证,明确半胱氨酸组织蛋白酶抑制素 C (CST3)、鸟苷酸结合蛋白 alpha 刺激亚基 (GNAS)、谷胱甘肽过氧化物酶 4 (GPx4) 和肌动蛋白抑制蛋白 2 (PFN2) 等 4 个基因与长爪沙鼠脑血管畸形相关^[31]。

6 结语

近交系实验动物在生命科学研究和生物医药产业中具有广泛的用途。长爪沙鼠是源自我国的实验动物资源,由于其具有 COW 变异缺失的特性,使其在脑血管发育和脑缺血研究中具有独特价值。CIMG 的培育成功不但丰富了我国实验动物资源,增加了品系,而且是国际上首次培育出脑缺血长爪沙鼠近交系。CIMG 解决了长爪沙鼠脑缺血模型发生率低的问题,减少了动物使用量,提高了研究结果的可信度和稳定性,促进了脑缺血和缺血再灌注的发病机制和治疗方法研究,随着该模型动物的推广应用,必将推动医学生物学及药学研究进程。

参 考 文 献 (References)

- [1] Tu J, Karunanayaka A, Windsor A, et al. Comparison of an animal model of arteriovenous malformation with human arteriovenous malformation [J]. J Clin Neurosci, 2010, 17(1): 96–102.
- [2] Kapoor K, Singh B, Dewan LI. Variations in the configuration of the circle of Willis [J]. Anat Sci Int, 2008, 83(2): 96–106.
- [3] Krabbe-Hartkamp MJ, van der Grond J, de Leeuw FE, et al. Circle of Willis: morphologic variation on three-dimensional time-of-flight MR angiograms [J]. Radiology, 1998, 207(1): 103–111.
- [4] Alpers BJ, Berry RG, Paddison RM. Anatomical studies of the circle of Willis in normal brain [J]. AMA Arch Neurol Psychiatry, 1959, 81(4): 409–418.
- [5] Li Q, Li J, Lv F, et al. A multidetector CT angiography study of variations in the circle of Willis in a Chinese population [J]. J Clin Neurosci, 2011, 18(3): 379–383.
- [6] Hendrikse J, Hartkamp MJ, Hillen B, et al. Collateral ability of the circle of Willis in patients with unilateral internal carotid artery occlusion [J]. Stroke, 2001, 32(12): 2768–2773.
- [7] Stojanović N, Stefanović I, Randjelović S, et al. Presence of anatomical variations of the circle of Willis in patients undergoing surgical treatment for ruptured intracranial aneurysms [J]. Vojnosanit Pregl, 2009, 66(9): 711–717.
- [8] Chuang YM, Chan L, Lai YJ, et al. Configuration of the circle

- of Willis is associated with less symptomatic intracerebral hemorrhage in ischemic stroke patients treated with intravenous thrombolysis [J]. J Crit Care, 2013, 28(2): 166–172.
- [9] Hoksbergen AW, Legemate DA, Csiba L, et al. Absent collateral function of the circle of Willis as risk factor for ischemic stroke [J]. Cerebrovasc Dis, 2003, 16(3): 191–198.
- [10] 李雪丽, 朱丹. 脑缺血动物模型的研究进展 [J]. 中央民族大学学报 (自然科学版). 2010, 19(1): 23–27
Li XL, Zhu D. Advances on animal model of cerebral ischemia [J]. J MUC (Natural Sciences Edition), 2010, 19(1): 23–27.
- [11] Stuermer IW, Plotz K, Leybold A, et al. Intraspecific allometric comparison of laboratory gerbils with mongolian gerbils trapped in the wild indicates domestication in *Meriones unguiculatus* (Milne-Edwards, 1867) (*Rodentia: Gerbillinae*) [J]. Zool Anz, 2003, 242(3): 249–266.
- [12] Lee CH, Yoo KY, Choi JH, et al. Cyclin D1 immunoreactivity changes in CA1 pyramidal neurons and dentate granule cells in the gerbil hippocampus after transient forebrain ischemia [J]. Neurol Res, 2011, 33(1): 93–100.
- [13] 丁贤明, 钱宝珍, Junichiro M, 等. 长爪沙鼠的遗传多样性分析 [J]. 遗传, 2008, 30(7): 877–884.
Ding XM, Qian BZ, Junichiro M, et al. Genetic diversity of Mongolian gerbils (*Meriones unguiculatus*) [J]. Hereditas (Beijing), 2008, 30(7): 877–884.
- [14] Kuchinka J, Nowak E, Szczurkowski A, et al. Arteries supplying the base of the brain in the Mongolian gerbil (*Meriones unguiculatus*) [J]. Pol J Vet Sci, 2008, 11(4): 295–299.
- [15] Bramanti P, Arcadi FA, Di Bella P, et al. Effects of felbamate on brain polyamine changes following transient cerebral ischemia in the Mongolian gerbil [J]. Acta Neural Scand, 2000, 102(5): 309–317.
- [16] Choi S, Kim KW, Choi JS, et al. Angiogenic activity of beta-sitosterol in the ischaemia/reperfusion-damaged brain of Mongolian gerbil [J]. Planta Media, 2002, 68(4): 330–335.
- [17] Kitagawa K, Matsumoto M, Handa N, et al. Prediction of stroke-prone gerbils and their cerebral circulation [J]. Brain Res, 1989, 479(2): 263–269.
- [18] Mayevsky A, Breuer Z. Brain vasculature and mitochondrial responses to ischemia in gerbils 1. Basic anatomical patterns and biochemical correlates [J]. Brain Res, 1992, 598(1–2): 242–250.
- [19] Du XY, Zhu XD, Dong G, et al. Characteristics of circle of Willis variations in the mongolian gerbil and a newly established ischemia-prone gerbil group [J]. ILARJ, 2011, 52(1): E1–7.
- [20] 杜小燕, 杨慧, 王钊. 长爪沙鼠脑底前后交通动脉变异类型分析 [J]. 中国实验动物学报, 2006, 14(2): 112–114.
Du XY, Yang H, Wang J. Variation of anatomical patterns of brain anterior and posterior communication arteries in Mongolian gerbils [J]. Acta Lab Animalis Sci Sin, 2006, 14(2): 112–114.

- [21] 赵太云, 路静, 王钜, 等. 大、小鼠微卫星引物对长爪沙鼠的扩增 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(2): 114–117.
Zhao TY, Lu J, Wang J, et al. Amplification of microsatellite DNA loci of rats and mice in the Mongolian gerbil [J]. Chin J Comp Med, 2006, 16(2): 114–117
- [22] 谭元卿, 李薇, 杜小燕, 等. 种间转移扩增法筛选长爪沙鼠微卫星位点 [J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(2): 1–5
Tan YQ, Li W, Du XY, et al. Screening of novel microsatellite DNA markers in Mongolian gerbils by cross-amplification [J]. Acta Animalis Sci Sin, 2011, 19(2): 1–5.
- [23] Du XY, Chen ZW, Li W, et al. Development of novel microsatellite DNA markers by cross-amplification and analysis of genetic variation in gerbils [J]. J Hered, 2010, 101(6): 710–716.
- [24] 李薇, 江其辉, 杜小燕, 等. 封闭群长爪沙鼠遗传标准的建立 [J]. 实验动物科学, 2011, 28(2): 31–34
Li W, Jiang QH, Du XY, et al. Establishment of genetic standards of closed colony gerbil [J]. Lab Animal Sci, 2011, 28(2): 31–34.
- [25] Boon LM, Brouillard P, Irrthum A, et al. A gene for inherited cutaneous venous anomalies (“glomangiomas”) localizes to chromosome 1p21–22 [J]. Am J Hum Genet, 1999, 65(1): 125–133.
- [26] Laberge-le Couteux S, Jung HH, Labauge P, et al. Truncating mutations in CCM1, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas [J]. Nat Genet, 1999, 23(2): 189–193.
- [27] Tian XL, Kadaba R, You SA, et al. Identification of an angiogenic factor that when mutated causes susceptibility to Klippel-Trenaunay syndrome [J]. Nature, 2004, 427(6975): 640–645.
- [28] Flamme I, Breier G, Risau W. Vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptor 2 (flk-1) are expressed during vasculogenesis and vascular differentiation in the quail embryo [J]. Dev Biol 1995, 169(2): 699–712.
- [29] Breier G, Albrecht U, Sterrer S, et al. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation [J]. Development, 1992, 114(2): 521–532.
- [30] Muñoz-Chápuli R, Quesada AR, Angel Medina M. Angiogenesis and signal transduction in endothelial cells [J]. Cell Mol Life Sci, 2004, 61(17): 2224–2243.
- [31] Li ZK, Huo XY, Zhang SY, et al. Selection of genes associated with variations in the circle of Willis in gerbils using suppression subtractive hybridization [J]. PLoS One, 2015, 10(5): e0127355.

[收稿日期] 2018–06–10