

朱华,郭亚茜,杜晓鹏,等. 无菌 *APP^{swe}/PS1 Δ E9* 双转基因小鼠模型建立及脑内斑块变化初步观察[J].中国实验动物学报, 2019,27(4):521 - 526.

Zhu H,Guo YP,Du XP, et al. Establishment of germ free *APP^{swe}/PS1 Δ E9* transgenic mice and changes of amyloid plaques in the brain [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(4):521 - 526.

Doi:10. 3969/j.issn.1005-4847. 2019. 04. 015

无菌 *APP^{swe}/PS1 Δ E9* 双转基因小鼠模型建立及 脑内斑块变化初步观察

朱华,郭亚茜,杜晓鹏,李卓,秦川*

(卫健委人类疾病比较医学重点实验室,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】 目的 使用剖宫产净化方法建立无菌 *APP^{swe}/PS1 Δ E9*(PAP)双转基因小鼠模型并对动物脑内斑块沉积情况进行初步观察,为研究肠道菌群与阿尔茨海默症关系提供新的动物模型。**方法** 选择阳性 PAP 雄性杂合子鼠与经产的 C57 野生型雌鼠 1:2 进行交配。怀孕母鼠在超净工作台内行剖宫产手术,用无菌 ICR 小鼠代乳。术后每个月进行无菌状态检测;PCR 方法检测剖宫产所得 PAP 仔鼠的基因型;免疫组化方法定量检测 9 月龄 PAP 小鼠脑内斑块变化情况。**结果** 实施剖宫产手术 12 例,获仔鼠 66 只,剖宫产存活率及离乳存活率分别为 95.45% (63/66) 和 95.24% (60/63),净化后按国标检测无菌状态均为合格。免疫组化结果显示 9 月龄无菌 PAP 小鼠海马内斑块较同月龄 SPF 级动物减少。**结论** 通过剖宫产净化技术去除了 PAP 小鼠携带的菌群,9 月龄无菌 PAP 小鼠脑内斑块减少。

【关键词】 转基因小鼠;无菌动物;剖宫产;淀粉样斑块

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 04-0521-06

Establishment of germ free *APP^{swe}/PS1 Δ E9* transgenic mice and changes of amyloid plaques in the brain

ZHU Hua, GUO Yaxi, DU Xiaopeng, LI Zhuo, QIN Chuan*

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

Corresponding author: QIN Chuan. E-mail: qinc@cnilas.org

【Abstract】 Objective To establish a germ-free mouse strain to provide a new animal model for studies on the relationship between gut flora and Alzheimer’s disease and the changes of amyloid plaques in the brain, by establishing a *APP^{swe}/PS1 Δ E9* (PAP) transgenic mouse model using a cesarean section decontamination technique. **Methods** Cesarean section was performed on pregnant PAP mice to obtain pups under a SPF barrier environment, and the pups were then transferred to female germ-free ICR mice that served as foster mothers. Survival rates of the pups were calculated at 7 days of age and after weaning. Pathogens were tested each month according to the national standards. The newborn PAP mice were genotyped by polymerase chain reaction (PCR). The deposition of A β plaques in brain tissue were observed using

[基金项目] 医科院重大协同创新项目(2017-12M-2-005, 2016-12M-2-006)。
Funded by CAMS Innovation Foundation for Medical Sciences (CIFMS) Grant (2017-12M-2-005, 2016-12M-2-006)。
[作者简介] 朱华,主任技师,研究方向:疾病与肠道微生态。Email: zhuh@cnilas.org
[通信作者] 秦川,教授,博士生导师。研究方向:病理与病理生理学。Email: qinc@cnilas.org

immunohistochemical staining. **Result** 12 cesarean sections were performed on pregnant PAP mice, and a total of 63 pups were collected and transferred to a foster mother. The survival rate of pups after cesarean section and weaning was 95.45% (63/66) and 95.24% (60/63), respectively. Pathogens were tested after decontamination, and all the pups were pathogen-negative, thus met the requirement of germ-free mice. The deposition of A β plaques was lower in the germ-free PAP mice than in SPF mice of the same age. **Conclusions** A germ-free PAP mouse model is established by cesarean section and foster mother technique. This new animal model can be used for studies on the relationship between gut flora and Alzheimer's disease and the changes of amyloid plaques in the brain tissue.

【**Keywords**】 transgenic mice; germ-free mice; cesarean section; amyloid plaques; Alzheimer's disease

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 是一种以记忆丧失和认知减退为主要临床症状的大脑神经退行性疾病。特征性的病理学表现有: β 淀粉样肽 (β amyloid peptides, A β) 沉积形成的老年斑和 tau 蛋白过度磷酸化形成的神经原纤维缠结^[1-2]。目前有关 AD 的病因仍然不明确且临床上无有效的防治措施。随着对脑-肠-微生物菌群 (brain-gut-microbiota axis, BGM) 概念的提出, 肠道菌群对 AD 的调控作用越来越受到关注^[3], 但目前缺乏菌群与特定基因关系研究的动物模型。APP^{sw}/PS1 Δ E9 (PAP) 双转基因阿尔茨海默病小鼠模型由中国医学科学院医学实验动物研究所比较医学重点实验室构建培育。该模型以 C57BL/6J 小鼠为背景, 含有人 APP^{swedish} 突变位点和人 PS1 Δ E9 突变位点。其在 3 月龄出现学习和记忆缺陷, 4.5 月龄开始出现老年斑, 12 月龄出现大量老年斑, 具有和 AD 患者相似的病理表型。是目前常用的 AD 动物模型^[4]。本研究采用剖宫产技术对 PAP 小鼠进行无菌化, 并对其病理表型进行初步观察, 为研究肠道菌群与 AD 间关系提供一种新的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

用于繁殖的 PAP 阳性雄鼠和野生型 C57BL/6J 雌鼠购自北京华阜康生物科技股份有限公司【SCXK(京)2014-0004】。体重 (20 $\pm$ 2) g, 无菌带乳 ICR 母鼠由本实验室繁育。动物实验在中国医学科学院医学实验动物研究所隔离设施内进行【SYXK-(京)2018-0004】。本实验中动物的使用已获得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 (IACUC) 批准, 批准号: ZH17003。

1.1.2 试剂与仪器

RIPA 裂解液购自江苏碧云天公司; 十二烷基硫酸钠 (SDS)、过硫酸胺 (APS)、Tris-HCl、甘氨酸、TEMED、Tween-20 购自美国 Sigma 公司; N,N'-亚甲基双丙烯酰胺和丙烯酰胺购自美国 Bio-Rad 公司; 磷酸酶抑制剂购自美国 Thermo 公司; GAPDH、超敏二步法免疫组化检测试剂盒及含有 DAPI 的水溶性封片剂均购自北京中杉金桥公司。使用的主要仪器有: ZHJH-C1118C 型超净台、凝胶成像系统 (上海天能公司)、组织脱水机、石蜡包埋机、石蜡切片机 (德国 Leica)、IQ5PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 孕鼠的准备

选择 10~16 周龄经检测为阳性的健康 PAP 雄性杂合子鼠 10 只, 与经产的 10~16 周龄 C57BL/6J 雌鼠野生型小鼠 1:2 进行交配, 记录交配日期。隔离器内无菌代乳鼠提前 48 h 交配。每日上下午检查一次母鼠阴道口是否有阴栓。见有阴栓作为 0 天, 开始计算孕期。已确诊受孕的母鼠与雄鼠分开单独饲养。

1.2.2 剖宫产净化

小鼠受孕 17 d 开始密切观察动物, 当受孕小鼠食欲突然下降, 烦躁不安, 有作窝行为, 经触诊其耻骨已打开 5 mm 左右, 外阴潮红并处于开口状态, 此时受孕小鼠已临产, 可进行子宫摘除术。剖宫产手术在 36~38℃ 环境中进行: 牺牲母鼠, 快速分离子宫, 连同止血钳一起迅速转入装有 2% 过氧乙酸的渡槽, 停留 30 s, 传入隔离器内。传入隔离器内的子宫用 5% NaHCO₃ 溶液中和子宫表面残留的过氧乙酸后摊在纱布上, 用带齿镊子将子宫及羊膜撕破, 取出胎仔。迅速擦去胎仔鼻和口部的羊膜及羊水。健康的仔鼠开始张口呼吸, 没有呼吸的要轻轻触压胸部促其呼吸, 必要时用镊子轻夹尾根, 使其发出

叫声,引发呼吸。开始呼吸的仔鼠将由紫红色渐渐变为鲜红色。

将呼吸正常的剖宫产仔鼠,放入代乳母鼠的原盒内。用代乳母鼠亲仔的粪便连同垫料涂抹代乳仔鼠,使失去原气味。此时留一部分亲仔共同哺乳,待母鼠接受代乳后,可除去亲仔。代乳仔鼠 20~25 d 离乳。

1.2.3 无菌状态维持及检测

离乳的小鼠转移至其他隔离器饲养。每个月取隔离器内饲料、垫料、饮水、小鼠粪便送卫健委实验动物质量检测中心进行无菌状态检测并出具正式报告。

1.2.4 转基因阳性动物的鉴定

子代小鼠出生 9~14 d 内剪趾法标记,收集剪下的组织按照文献^[4]的方法进行基因型鉴定。

1.2.5 脑内斑块染色

小鼠脱颈椎处死后取左半脑固定于福尔马林溶液中 24 h、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡、石蜡包埋,制作厚度为 5 μm 横断面石蜡切片,隔 3 取 1。切片贴到经多聚赖氨酸处理过的玻片上,按照文

献^[4]的方法对 9 月龄无菌 PAP 转基因阳性小鼠及同月龄 SPF 级小鼠海马和皮层内斑块进行免疫组化染色,观察斑块数量变化。切片光镜下观察后用 Aperio 切片扫描系统对切片进行扫描,随机截取 5 个高倍视野(400×),采用 Image-Pro PLUS 图像分析系统对阳性细胞数和光密度值(IOD)进行分析。每只动物计数 3 张切片,取平均值。

1.3 统计学方法

实验结果用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,SPSS22.0 软件进行差异显著性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 剖宫产手术及代乳情况

用来交配的 20 只母鼠中,13 只观察到有阴栓,其中一例母鼠在 18.5 d 自然分娩,其余 12 例实施剖宫产手术,剖得仔鼠 66 只(表 1)。其中有 3 只为死胎 ICR 无菌母鼠不予代乳,其余 63 只用母鼠成功代乳至离乳。到离乳时存活 60 只,剖宫产存活率和例如存活率分别为 95.45%和 95.24%。

表 1 PAP 小鼠剖腹宫手术及代乳情况

Table 1 Caesarean section and fostering results of the PAP mice

孕鼠编号 ID No.	剖得仔鼠数(只) Number of pups been collected	予以代乳数(只) Number of pups been fostered	剖宫产成活率(%) Survival rate of caesarean section (%)	离乳只数(只) Survival number of weaning pups	离乳成活率(%) Survival rate of weaning pups (%)
PAP1	5	5	100	5	100
PAP2	6	5	83.33	5	100
PAP3	5	5	100	5	100
PAP4	4	3	75	1	33.33
PAP5	6	5	83.33	5	100
PAP6	6	6	100	6	100
PAP7	5	5	100	5	100
PAP8	7	6	85.71	6	100
PAP9	6	6	100	6	100
PAP10	5	5	100	4	80
PAP11	5	5	100	5	100
PAP12	6	6	100	6	100

2.2 转基因阳性动物的鉴定

部分无菌 PAP 小鼠基因鉴定结果见图 1,携带 APP^{swe}/PS1 基因的阳性鼠可见清晰 PCR 扩增条带,与目的片段大小相符,阴性鼠无条带(图 1)。剖出的阳性鼠在 9 月龄、12 月龄安乐时可见盲肠巨大,符合无菌动物的生物学特性(图 2)。

2.3 无菌状态维持及检测

按照 GB/T14926.41、43-2001,GB14922.2-2011 进行无菌状态检测。检测结果合格(图 3)。

2.4 脑内斑块检测

9 月龄无菌化 PAP 小鼠(图 4A)及 SPF 级(图 4B)脑内斑块含量免疫组化结果。无菌 PAP 小鼠海马内斑块减少,皮层内斑块数量未见显著性差异(表 2)。

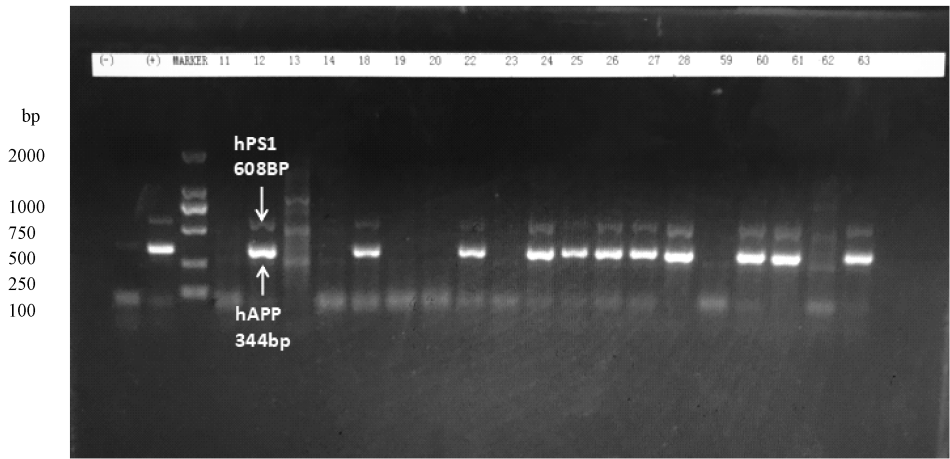


图 1 部分 PAP 小鼠 PCR 鉴定凝胶电泳图

Figure 1 PCR identification of a part of PAP mice by gel electrophoresis

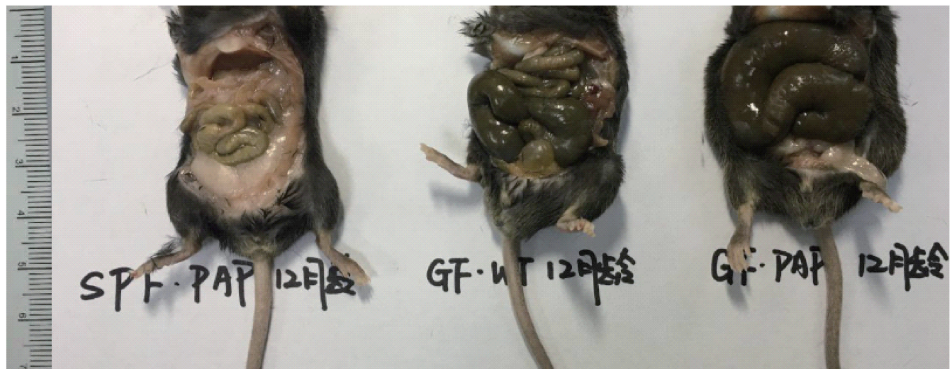


图 2 无菌 PAP 小鼠的盲肠

Figure 2 Cecum of the germ-free PAP mice

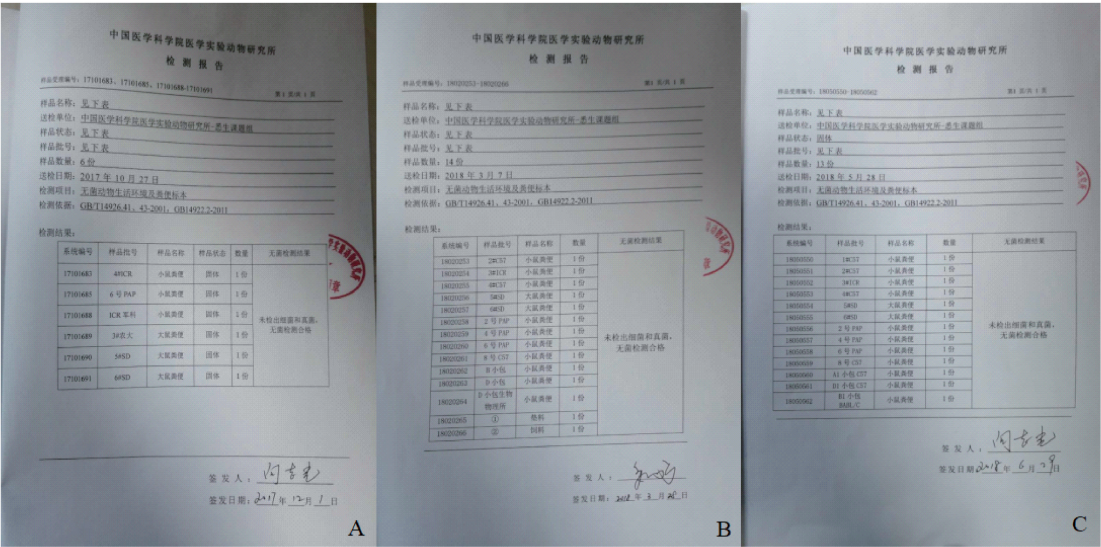


图 3 PAP 小鼠剖宫产净化后无菌检测结果

Figure 3 Pathogen test results after caesarian section in the PAP mice

表 2 PAP 小鼠脑内斑块沉积情况及细胞光密度值($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Table 2 Senile plaques deposition and IOD in brain tissues of the PAP mice ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

组别 Groups	海马 Hippocampus		皮层 Cortex	
	阳性细胞数	光密度值	阳性细胞数	光密度值
	Number of positive cells	IOD	Number of positive cells	IOD
无菌 PAP 小鼠 Germ-free PAP mice	11. 32 $\pm$ 3. 73 *	1987. 64 $\pm$ 79. 62 *	8. 57 $\pm$ 2. 88	1431. 62 $\pm$ 132. 113
SPF 级 PAP 小鼠 SPF PAP mice	17. 46 $\pm$ 3. 78	2864. 37 $\pm$ 198. 45	9. 24 $\pm$ 2. 62	1716. 71 $\pm$ 159. 71

注:与 SPF 级 PAP 小鼠相比, * $P < 0. 05$ 。
Note. Compared with the SPF PAP mice, * $P < 0. 05$.

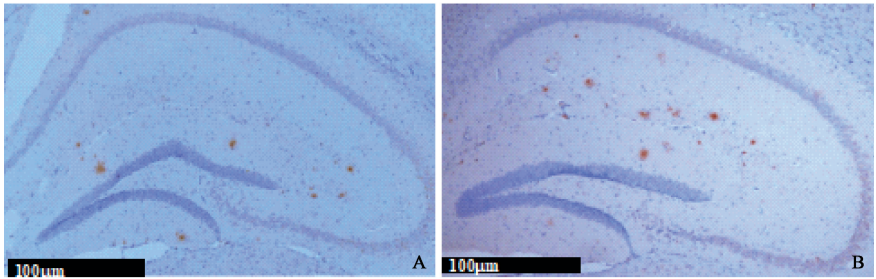


图 4 PAP 小鼠脑内斑块检测结果

Figure 4 IHC staining of senile plaques in brain tissues of the PAP mice

3 讨论

无菌动物是指通过无菌剖宫产手术或无菌胚胎移植进行无菌化获得的动物,利用无菌饲养方法维持于无菌隔离器,利用现有方法检测不到活的微生物和寄生虫的动物^[5]。作为微生物背景最清晰的动物,可对菌群、基因及饮食等环境因素进行有效控制,是研究肠道菌群(gut microbiota, GM)对人类疾病及健康影响的最有效动物模型之一^[6-7]。遗传工程动物是研究是研究特定基因功能的重要工具,将无菌动物技术与遗传工程动物结合建立无菌化小鼠人类疾病动物模型,可揭示某种特定基因引起的表型变化与肠道菌群之间的关系,为研究肠道菌群与疾病关系提供了更多的模型选择。

无菌动物有自己的生物学特点:发育和体重增长缓慢,每窝产仔数减少^[8]。PAP 双转小鼠作为基因工程动物,由于基因组经过人工改造,繁殖力和免疫力都受到影响。因此与其他常规品系小鼠剖腹净化及动物相比,剖宫产及动物繁育过程中有更多需要注意的操作细节:①微生物质量控制:剖宫产净化的一个缺点是不能去除可通过胎盘垂直传播的病原体,因此在选择用来交配的转基因和野生型小鼠时就要进行严格的微生物质量控制:选用符合 SPF 级动物标准的 PAP 雄鼠和野生型雌鼠;孕鼠的交配在 SPF 级设施内进行;尽量避免由动物本身

带来的污染。②严格无菌操作:剖宫产手术在超净台内完成,手术中严格执行无菌操作:超净台除紫外灯照射消毒外,还要用酒精擦拭台面。高压灭菌的手术器械在超净台内才能打开,保证每只孕鼠一套手术器械,连续手术时两个手术之间也要对台面进行消毒。因超净台内有气流,剖宫产手术在电热毯上进行以保证适宜温度。③剖宫产时机的选择:经产鼠的孕期较初产鼠的准确,但仍不宜以见栓后天数为主要剖宫产指征,必需结合动物的表现进行判断。实施剖宫产手术 12 只动物的孕期从 17.5 d 到 21 d 不等,差异很大。我们的经验是在 17 d 左右开始仔细观察动物,当受孕小鼠食欲突然下降,烦躁不安,有作窝行为,外阴潮红并处于开口状态,结合触诊判断趾骨已打开 5 mm 左右时为最佳剖宫产时机。

本研究中由于技术人员剖宫产技术操作熟练、注重操作细节及无菌动物每窝产仔数少但成活率高生物学特性等原因,剖宫产存活率(95.45%)与离乳存活率(95.24%)均较高,但孕鼠每胎产仔数低于封闭群及单转基因小鼠剖宫产净化相关文献^[9-11],可能与双转基因动物繁殖能力降低有关。无菌动物的体重增长较缓慢,为模型小鼠后期的正常发育,我们延长了小鼠离乳的时间。经剖宫产净化的 PAP 小鼠脑内斑块含量发生改变,提示肠道菌群可能与斑块形成有关,相关研究正在进行中。

本研究将无菌技术应用于研究阿尔茨海默症常用的 APP^{swe}/PS1 双转基因小鼠,建立了无菌化 PAP 小鼠模型,为研究肠道菌群与阿尔茨海默症之间的关系提供一种新的动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Hong SY, Jeong WS, Jun M. Protective effects of the key compounds isolated from Corni fructus against β -amyloid-induced neurotoxicity in PC12 cells [J]. Molecules, 2012, 17 (9): 10831-10845.
- [2] Shih PH, Chan, YC, Liao JW, et al. Antioxidant and cognitive promotion effects of anthocyanin-rich mulberry (Morus atropurpurea L.) on senescence-accelerated mice and prevention of Alzheimer's disease [J]. J Nutr Biochem, 2010, 21 (7): 598-605.
- [3] Dinan TG, Stilling RM, Stanton C, et al. Collective unconscious: how gut microbes shape human behavior [J]. J Psychiatr Res, 2015, 63: 1-9.
- [4] Song N, Zhang L, Qin C. et al. Cyanidin 3-O- β -glucopyranoside activates peroxisome proliferator-activated receptor - γ and alleviates cognitive impairment in the APP^{swe}/PS1 Δ E9 mouse model [J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 9(9):1786-1800.
- [5] Wostmann BS, Pleasants JR. The germ-free animal fed chemically defined diet: a unique tool [J]. Proc Soc Exp Biol Med, 1991, 198(1): 539-546.
- [6] Faith JJ, Rey FE, O'Donnell D, et al. Creating and characterizing communities of human gut microbes in gnotobiotic mice [J]. ISME J, 2010, 4(9): 1094-1908.
- [7] Falk PG, Hooper LV, Midtvedt T, et al. Creating and maintaining the gastrointestinal ecosystem: what we know and need to know from gnotobiology [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 1998, 62(4):1157-1170.
- [8] 王荫槐,王钊. 悉生动物学 [M]. 沈阳: 辽宁大学出版社, 2003.
- Wang YH, Wang J. Gnotobiotic animals [M]. Shenyang: Liaoning University Press, 2003.
- [9] 张辰子,杨林,夏冠玲,等. APP^{swe}/PS1 Δ E9 转基因小鼠的剖宫产净化技术研究[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(7): 50-54.
- Zhang CZ, Yang L, Xia GL, et al. Study of decontamination technique among APP^{swe}/PS1 Δ E9 transgenic mice using caesarian section [J]. Chin J Comp Med, 2013, 23(7):50-54.
- [10] 乔欣,李胜利,焦昆,等. ICR 母鼠代乳在长爪沙鼠剖宫产净化中的应用[J]. 实验动物科学, 2011, 28(2):37-43.
- Qiao X, Li SL, Jiao K, et al. Foster nursing by ICR mice in the cleaning of gerbils through cesarotomy [J]. Lab Ani Sci, 2011, 28(2):37-43.
- [11] 卢笑丛,徐国景,戴涌,等. 使用超净工作台实施子宫摘除术净化 KM 小鼠的研究[J]. 中国实验动物学报, 2003, 11(4): 208-210.
- Lu XC, Xu GJ, Dai Y, et al. Study on the purification of Kunming mouse strain by hysterectomy in the situation of bacteria free [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2003, 11(4): 208-210.

[收稿日期] 2019-02-26