

Rncat先天性白内障小鼠模型培育及初步应用

张 燕, 燕顺生

(新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心, 乌鲁木齐 830002)

[摘要] 先天性白内障是一种严重的致盲性眼病, 是导致儿童失明的主要原因。新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心成功培育了先天性白内障小鼠模型, 并对该模型小鼠(命名为Rncat小鼠)的生物学特性、行为学特性、基因序列及突变体蛋白开展系列研究且取得一定成果, 该白内障模型可能为白内障药物筛选及研发发挥重要作用。本文对该Rncat先天性白内障小鼠模型的生物学特性、行为学、基因学和突变体蛋白研究进展进行综述。

[关键词] 先天性白内障; 小鼠; 生物学特性; 行为学特性

[中图分类号] R-332; Q95-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1674-5817(2021)06-0501-04

Construction and Preliminary Application of a Rncat Congenital Cataract Mouse Model

ZHANG Yan, YAN Shunsheng

(Center for Disease Control and Prevention of Xinjiang Autonomous Uygur Region, Urumqi 830002, China)

Correspondence to: YAN Shunsheng, E-mail: 1300709950@qq.com

[Abstract] Congenital cataract is the main cause of blindness in children. The Center for Disease Control and Prevention of Xinjiang Uygur Autonomous Region successfully constructed mouse models of congenital cataracts. The biological characteristics, behavioral characteristics, gene sequences, and mutant proteins of the model mice were studied, yielding some notable achievements. These novel cataract mouse models may serve as reliable animal models for drug screening and cataract prevention. This paper reviews the research progress on the biological characteristics, behavior, genetics, and mutant proteins of the Rncat congenital cataract mouse model.

[Key words] Congenital cataract; Mice; Biological characteristics; Behavioral characteristics

新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心(原新疆维吾尔自治区实验动物研究中心)的研究人员于1993年在昆明小鼠繁殖群中偶然发现眼部晶状体混浊即具有白内障症状的个体, 经过15代的繁育, 保留其白内障症状的遗传特性, 建立了核心群, 形成先天性白内障(congenital catceraet)小鼠品系, 培育成功先天性白内障小鼠模型。随后发现该白内障小鼠模型为常染色体隐性遗传, 出生15 d时在显微镜下可观察到双眼白内障, 20 d时肉眼可见白内障, 35 d时白内障发育成熟。经中国科学院上海生物工程研究中心鉴定及

检测, 确定该品系小鼠先天性白内障症状是由于Crygs基因突变引起的, 后伴随常染色体隐性遗传, 故命名该品系为Rncat小鼠^[1]。为进一步推动该突变小鼠的深入研究及应用, 现将Rncat小鼠的生物学特性、行为学特性、突变基因鉴定及突变体蛋白的系列研究结果综述如下。

1 Rncat先天性白内障小鼠的生物学特性

1.1 繁殖性能测定

研究人员以Rncat小鼠血缘扩大群为研究目标, 选择近交和封闭群养两种不同的交配方式,

[基金项目] 自治区公益性科研院所基本科研业务经费资助项目(KY2021111)

[作者简介] 张 燕(1983—), 女, 高级实验师, 研究方向: 实验动物模型与比较医学。E-mail: 493396477@qq.com

[通信作者] 燕顺生(1960—), 男, 副主任技师, 研究方向: 实验动物模型与比较医学。E-mail: 1300709950@qq.com

研究分析 Rncat 先天性白内障种鼠的繁殖性能差异;通过统计分析测定仔鼠繁育性能的各项指标、仔鼠生长情况,为今后该小鼠应用于不同类型的临床研究提供繁育、选育等方面的参考数据^[2]。实验结果表明,采取相同方式近交繁殖的 Rncat 先天性白内障小鼠与 BALB/c 小鼠比较,繁殖性能各数值差异不大;但近交繁殖的 Rncat 先天性白内障小鼠与封闭群小鼠相比平均离乳数较少 $[(6.52\pm 2.81)\text{只} \text{ vs } (7.17\pm 2.19)\text{只}]$,差异显著($P<0.05$),与昆明小鼠相比的平均离乳数 $[(10.54\pm 3.42)\text{只}]$ 更少,差异极显著($P<0.01$)^[2]。

1.2 体质量测定

Rncat 先天性白内障小鼠在全同胞兄妹交配的方式中,初生的仔鼠体质量与 BALB/c 小鼠相比明显较轻 $[(1.73\pm 0.11)\text{g} \text{ vs } (1.54\pm 0.23)\text{g}]$,差异有统计学意义($P<0.01$),这可能是由于 Rncat 先天性白内障小鼠来源于昆明小鼠,保留了昆明小鼠的生长特点;但 Rncat 先天性白内障初生小鼠与昆明初生小鼠的体质量 $[(2.02\pm 0.16)\text{g}]$ 相比明显较低,差异也极显著($P<0.01$),这可能是由于近亲交配方式降低其仔鼠的体质量^[2]。

1.3 晶状体混浊度测定

近亲交配的 Rncat 白内障小鼠保留了其先天性白内障特质。在近亲交配繁殖的 5 代中,仔鼠出生时就被检测出晶状体核早期混浊症状,有极个别的小鼠出生时晶状体混浊即达到中等程度;但改变其交配方式,在随机交配 4 代以后,出现晶状体核混浊延迟现象,甚至到了第五代,绝大部分仔鼠晶状体核混浊延迟至 20 日龄左右出现。这说明选择不同的交配方式对 Rncat 先天性白内障小鼠的晶状体核混浊症状有很大的影响。研究人员可以根据需要选择 Rncat 小鼠不同的交配方式,建立相应的动物模型,以满足白内障疾病各种不同临床表现的实验要求^[2]。

1.4 其他生理生化指标测定

研究人员还检测了先天性白内障小鼠的主要脏器质量、血液学及血液生化等生物学指标的数据^[3],结果发现与 28 日龄昆明小鼠相比较,同日龄白内障小鼠的体质量,以及心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏、肾上腺、胸腺、睾丸/卵巢的

质量和脏器系数的差异均不显著;56 日龄白内障小鼠雌鼠的心脏质量 $(168.00\pm 23.35)\text{mg}$ 、肝脏质量 $(1\,438.00\pm 144.51)\text{mg}$ 、肺脏质量 $(186.00\pm 19.50)\text{mg}$ 、肾脏质量 $(412.00\pm 36.75)\text{mg}$ 以及雄鼠的心脏质量 $(197.00\pm 25.23)\text{mg}$ 、肝脏质量 $(1\,426.00\pm 114.46)\text{mg}$ 、脾脏质量 $(73.00\pm 16.18)\text{mg}$ 、肺脏质量 $(200.00\pm 27.22)\text{mg}$ 均低于昆明小鼠各项指标,差异均显著($P<0.05$),而且雌鼠体质量 $(31.30\pm 1.80)\text{g}$ 、脾脏质量 $(81.00\pm 7.00)\text{mg}$ 以及雄鼠体质量 $(34.60\pm 1.90)\text{g}$ 、肾脏质量 $(598.00\pm 31.06)\text{mg}$ 、睾丸质量 $(231.00\pm 12.34)\text{mg}$ 均低于昆明小鼠各项指标,差异极显著($P<0.01$)。

另外,雌鼠淋巴细胞比率 (6.15 ± 0.86) 高于昆明小鼠,差异极显著($P<0.01$)。56 日龄白内障小鼠与昆明小鼠的血液生化学检测数据比较显示,雌鼠碱性磷酸酶含量 $(203.75\pm 31.93)\text{U/L}$ 、葡萄糖含量 $(1.13\pm 0.20)\text{U/L}$ 以及雄鼠血清谷丙转氨酶含量 $(22.50\pm 10.82)\text{U/L}$ 、碱性磷酸酶含量 $(164.63\pm 20.70)\text{U/L}$ 、总蛋白水平 $(53.76\pm 2.03)\text{U/L}$ 等均低于昆明小鼠各项指标,差异极显著($P<0.01$)。56 日龄白内障小鼠与昆明小鼠的血液电解质检测数据显示,所有指标差异均不显著($P>0.05$)。

2 Rncat 先天性白内障小鼠行为学研究进展

通过对先天性白内障 Rncat 小鼠的行为学表现进行检测,对比同月龄的 Rncat 小鼠与正常的近交系 BALB/c 小鼠及昆明小鼠在自主活动度、协调运动、体能和激惹度等方面的行为学数据,检测到 Rncat 小鼠在行为学上与其他近交系或封闭群小鼠存在明显不同,这些数据的差异一方面可能与实验小鼠月龄相同但体质量差异有关,另一方面也可能与白内障小鼠病理改变导致的行为学改变有关^[4]。旷场实验中,在相同的环境条件下, Rncat 小鼠在中央格停留的时间和穿越格子的次数明显多于其他小鼠($P<0.05$),客观反映了 Rncat 小鼠的自主活动量高于其他小鼠,这可能是因为该小鼠先天性白内障病理学改变引起了焦虑相关行为学变化。实验中所有小鼠在四周格的时间明显多于其在中央格的时间($P<0.05$),

这可能与小鼠对空旷环境的恐惧感及沿壁活动的天性有关。另外, Rncat小鼠与昆明小鼠在衣架实验及强迫游泳实验中行为学数据相近, 但与BALB/c小鼠差异显著 ($P < 0.05$), 这可能是因为Rncat小鼠来源于昆明小鼠, 相同月龄小鼠的脑对肢体的控制和体能等表现相似, 而BALB/c小鼠的近交繁殖特性导致其体型较小, 体能较弱, 与Rncat小鼠及昆明小鼠相比差异显著。悬尾实验结果显示, Rncat小鼠与BALB/c小鼠及昆明小鼠相比, 累计不动时间较短, 这为Rncat小鼠可能成为绝望模型实验动物提供了一定的科学数据基础^[4]。

3 Rncat先天性白内障小鼠基因学研究进展

国内外科学家从1950年代即开始研究先天性遗传性白内障的相关基因位点, 迄今为止在小鼠中至少有24个遗传性单纯性白内障基因被定位或被克隆。由于白内障疾病的复杂性, 目前的研究还远远不能阐明这一疾病的发生机制, 根治该疾病还有很远的路要走, 其中主要原因是人类先天性遗传性白内障的家族及样本难以发现。目前, 先天性白内障已经在有限的药物和手术治疗性策略中取得了一些进展, 但有效的治疗性药物及发病机制研究仍处于起步阶段。

通过基因突变研究, 发现Rncat先天性白内障小鼠的Crygs基因存在G489A突变, 使得其翻译产物 γ S晶状体蛋白在163位由色氨酸(Vrp)变为终止密码子, 从而使本来由178个氨基酸组成的 γ S晶状体蛋白变为由162个氨基酸组成的突变体, 导致白内障的发生^[5]。最近研究发现, 敲除Crygs基因的小鼠即无 γ S晶状体蛋白表达, 但并没有引起明显的晶体不透明性; 通过光学显微镜观察发现该基因敲除小鼠的眼晶体正常, 但成熟的纤维细胞中细胞器不完整, 存在肌动蛋白细胞骨架的组织或代谢缺陷。这些研究结构提示, Crygs基因敲除并不直接引起白内障, 先天性白内障小鼠模型突变产生的162个氨基酸组成的突变体(蛋白)可能是先天性白内障发生与发展相关分子机制的一个关键。

4 Rncat先天性白内障小鼠突变体蛋白研究进展

研究人员对先天性白内障小鼠模型的162个氨基酸组成的突变体(蛋白)进行重组及克隆, 获得纯化的162个氨基酸组成的突变体(蛋白质), 并制备了抗体(一抗)、二抗和ELISA检测试剂盒, 随后完成了不同发育阶段的晶状体蛋白质组学定量研究^[6]。用晶状体蛋白定量ELISA检测方法对不同发育阶段的正常小鼠与先天性白内障小鼠模型晶状体内2种蛋白进行比较, 发现念珠(串珠)状纤维结构蛋白(BFSP1/Filensin)含量随小鼠日龄的增长逐渐下降, 且在白内障小鼠晶状体内的含量低于正常小鼠 ($P < 0.05$); β B2晶状体蛋白含量随日龄的增长逐渐上升, 且在白内障小鼠晶状体内含量要高于正常小鼠 ($P < 0.05$)。目前已初步完成了正常小鼠 γ S晶状体蛋白和162个氨基酸组成的突变体的免疫组织化学检测工作。

先天性白内障小鼠模型中白内障的发生与发展常涉及内源致病因素(如基因突变)产生的相关基础蛋白及其相互作用形成的功能复合物, 对这些重要蛋白质的结构与功能进行研究是揭示内源性疾病发生与发展分子机制的关键, 而且是相关诊治策略制定和药物研发的重要基础^[7]。对先天性白内障小鼠模型的前期研究发现, 由于基因突变, γ S晶状体蛋白结构可能发生改变, 其晶状体蛋白的功能也可能发生显著变化。白内障是一种多因素引发的眼科疾病, 晶状体蛋白是白内障疾病发生的关键因素^[8]。利用先天性遗传性白内障小鼠模型研究先天性白内障小鼠Crygs基因突变导致突变体(蛋白)结构和功能的变化, 可进一步了解晶状体蛋白在白内障发展过程中的变化机制及突变体的作用, 进而探讨先天性白内障疾病形成机制, 为白内障疾病发生机制的阐明和相关防治药物的研发提供重要依据。

5 小结

新疆维吾尔自治区疾病预防控制中心成功培育了Rncat先天性白内障小鼠模型, 并进行了繁殖性能、体质量增长、晶状体混浊度等多项生理指标及行为学测定, 还对其作了基因学、突变体

蛋白等研究,为从蛋白质水平上阐明先天性白内障及术后并发症等晶状体相关疾病的发生机制,以及预防和治疗晶状体相关疾病提供了直接的实验数据,值得今后进一步开展应用研究。

参考文献:

- [1] 金怡萍,燕顺生,金玫蕾,等. Rncat 先天性白内障小鼠的晶状体形态学研究[J]. 眼科新进展, 2004, 24(5): 361-363. DOI:10.13389/j.cnki.rao.2004.05.014.
- [2] 张燕,王莹,袁江玲,等. Rncat 小鼠不同交配方式的繁殖性能及晶状体混浊度比较[J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(1): 60-62. DOI: 10.3969/j. issn. 1674-5817.2018.01.012.
- [3] 袁江玲,徐晓辉,张燕,等. 先天性白内障小鼠主要脏器重量和血液生理生化指标的分析[J]. 中国比较医学杂志, 2016, 26(6): 32-36. DOI: 10.3969/j. issn. 1671-7856.2016.06.007.
- [4] 张燕,王莹,马媚,等. 先天性白内障 Rncat 小鼠行为学检测与分析[J]. 中国比较医学杂志, 2018, 28(3):28-31. DOI:10.3969/j.issn.1671-7856.2018.03.005.
- [5] 燕顺生,陈欣如,安冉,等. 先天性白内障小鼠模型突变蛋白重组及克隆的初步研究[J]. 疾病预防控制中心通报, 2018, 33(1): 16-17. DOI: 10.13215/j.cnki.jbyfkzbtb.1801027.
- [6] 陈欣如,燕顺生,安冉,等. 先天性白内障小鼠模型与正常小鼠不同发育阶段几种晶状体蛋白质初步比较研究[J]. 疾病预防控制中心通报, 2015, 30(1):26, 29. DOI: 10.13215/j.cnki.jbyfkzbtb.1412038.
- [7] SI N, SONG Z X, MENG X L, et al. A novel MAF missense mutation leads to congenital nuclear cataract by impacting the transactivation of crystallin and noncrystallin genes[J]. Gene, 2019, 692: 113-118. DOI: 10.1016/j.gene.2019.01.011.
- [8] BARI K J, SHARMA S, CHARY K V R. Structure of G57W mutant of human γ S-crystallin and its involvement in cataract formation[J]. J Struct Biol, 2019, 205(3):72-78. DOI:10.1016/j.jsb.2019.02.003.

(收稿日期: 2021-01-13 修回日期: 2021-07-13)

《实验动物与比较医学》有关作者投稿的说明

《实验动物与比较医学》是我国实验动物科学与比较医学领域创刊最早的专业性学术期刊,执行严格的同行评议和二审三校制度。为提高稿件审理效率,以及规范作者投稿行为,本刊加大初审力度。从2021年4月起,作者从本刊官网投审稿系统(<http://www.slarc.org.cn/Journalx/authorLogOn.action>)投稿时,均需提供以下必备材料和信息:

1. 所有署名作者的信息,包括最高学历、职称、研究方向、E-mail 和电话等,并在文末说明每位作者的贡献情况。
2. 第一作者单位盖章的论文审查表或介绍信扫描件,需承诺本文符合科研诚信要求。
3. 涉及动物实验的研究性文章还需提供实验动物的生产许可证和质量合格证、实验场所的实验动物使用许可证、该研究的实验动物福利伦理审查表的扫描件。文中注明以上三证一表的准确编号。
4. 研究如有基金资助,请提供与本文内容相符的基金立项证明。

以上材料请在投稿时作为附件,一并上传本刊投审稿系统。对于材料不齐或信息造假的稿件,编辑部初审将直接退稿。

《实验动物与比较医学》编辑部