

论著

文章编号:1000-5404(2014)09-0928-04

一种新的突变 SOD1 转基因小鼠模型的构建及鉴定

吴虹辰¹, 胡俊¹, 周晓杨², 王勇², 杨源瑞¹, 谢首佳¹, 史树贵¹ (400038 重庆, 第三军医大学: 西南医院神经内科¹, 基础医学部实验动物学教研室²)

[摘要] **目的** 构建表达一种新的突变 SOD1 (mSOD1) 转基因小鼠模型, 观察其临床表型, 明确该 mSOD1 类型与肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 的发病关系。**方法** 构建携带 mSOD1 基因的 PCI 质粒载体, 通过受精卵原核注射的方法制备转基因小鼠。利用 PCR 方法鉴定出生的后代, 采用转轮实验和足迹分析观察转基因小鼠的临床表型。**结果** PCR 结果证实获得了表达人 mSOD1 的转基因小鼠; 行为学检测显示, 转基因小鼠在转轮上停留时间为 (59.17 ± 26.27) s, 明显短于野生型小鼠 [(171.83 ± 20.98) s, $P < 0.01$], 转基因小鼠在出生 8 个月左右出现双下肢跛行、拖曳, 足迹欠规整, 后肢足间距为 (34.83 ± 9.72) mm, 明显小于野生型小鼠 [(52.78 ± 7.22) mm, $P < 0.01$]。**结论** 成功构建了 mSOD1 转基因小鼠, 该转基因小鼠出现了类似 ALS 的临床表型。

[关键词] 肌萎缩侧索硬化症; 突变 SOD1; 转基因小鼠

[中图分类号] R-332; R394-33; R746.4

[文献标志码] A

Construction and identification of a transgenic mice expressing a new mutant SOD1 gene

Wu Hongchen¹, Hu Jun¹, Zhou Xiaoyang², Wang Yong², Yang Yuanrui¹, Xie Shoujia¹, Shi Shugui¹ (¹Departement of Neurology, Southwest Hospital, ²Laboratory Animal Center, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[Abstract] **Objective** To establish a transgenic mice expressing a new human mutant SOD1 gene (mSOD1, GenBank ID EF143990), observe the clinical phenotype of this mice model, and determine the relationship of the gene with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). **Methods** A PCI plasmid carrying mSOD1 gene was constructed, and was microinjected into the pronuclei of fertilized mouse egg. Born offspring of these mice were identified by PCR. The clinical phenotypes of the mice were experimented by rota-rod test and footprint analysis. **Results** PCR results confirmed that the transgenic mice expressing mSOD1 gene were established successfully. Behavioral testing showed that the lasting time staying on the wheel was significantly shorter in the transgenic mice than the wild-type ones (59.17 ± 26.27 vs 171.83 ± 20.98 s, $P < 0.01$). The transgenic mice showed double-leg lameness and drag in 8 months after born and impaired walking patterns in footprint. Hind limb extension was significantly shorter in the transgenic mice than the wild-type ones (34.83 ± 9.72 vs 52.78 ± 7.22 mm, $P < 0.01$). **Conclusion** An mSOD1 transgenic mice model is successfully established, and presents similar clinical phenotype of ALS.

[Key words] amyotrophic lateral sclerosis; mutant SOD1; transgenic mice

Supported by the National Natural Science Foundation of China (81200882) and the Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC2011jjA0737, CSTC2012jjA10086). Corresponding author: Shi Shugui, E-mail: shishuguicq@hotmail.com

肌萎缩侧索硬化 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS) 是一种以大脑运动皮层、脑干和脊髓运动神经元进展性破坏为特点神经变性疾病, 成人发病可导致

患者肌肉萎缩、瘫痪和死亡。目前除 riluzole 能延缓病情进展外, 尚缺乏有效的治疗方式。研究表明 20% 的家族性和一些散发性的 ALS 患者有 SOD1 基因突变^[1]。目前, 在人类已检测出 150 多种与 ALS 发生相关的 SOD1 突变。但是, SOD1 基因突变对 ALS 发生和发展的作用, 以及引起神经元退行性改变的机制仍不清楚。我们前期对重庆地区一个 ALS 家系进行了研究, 发现该家系患者携带一种新的 SOD1 突变类型

[基金项目] 国家自然科学基金 (81200882); 重庆市自然科学基金 (CSTC2011jjA0737, CSTC2012jjA10086)

[通信作者] 史树贵, E-mail: shishuguicq@hotmail.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20131223.1610.001.html> (2013-12-23)

(mSOD1, Gene Bank ID: EF143990)^[2], 推测这种新的突变 SOD1 类型可能是导致该家系发病的原因。本研究通过建立表达 mSOD1 的转基因小鼠, 观察转基因小鼠的临床表型, 为进一步研究该 mSOD1 突变类型与 ALS 发病的关系提供动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6~8 周龄雌性 FVB/N 小鼠 48 只, 体质量 20~23 g, 动物批号 SYXK(渝)2012-0002; 6~8 周 FVB/N 假孕雌鼠 37 只, 体质量 20~22 g, 动物批号 SYXK(渝)2012-0002。均购自第三军医大学实验动物中心。小鼠在第三军医大学实验动物中心喂养, 每个 17 cm × 26 cm 的笼子放置 2~3 只小鼠。平均温度为 22 °C, 12:12 昼夜节律(白天时间为 6:00~18:00, 夜晚时间为 18:00~次日 6:00), 食物和水无限制供给。取经 PCR 鉴定的转基因小鼠 5 只(3 只雌鼠, 2 只雄鼠), 体质量 20~22 g, FVB/N 野生型小鼠 5 只(3 只雌鼠, 2 只雄鼠), 体质量 20~25 g, 进行转轮实验和足迹分析。

1.2 主要试剂与仪器

mSOD1 菌液购于上海生物工程有限公司, PCR 引物、限制性内切酶 *Bgl* II、*Bam*H I 购于宝生物工程(大连)有限公司, 质粒小提试剂盒和组织基因组提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, 胶回收试剂盒购自美国 Omega 公司, 用于腹腔注射的人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotropin, HCG)和孕马血清促性腺激素(pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)购于宁波第二激素厂。YLS-4C 疲劳转轮仪购自济南益延科技发展有限公司。

1.3 载体构建

将 mSOD1 亚克隆到以 CMV 为启动子的 PCI 质粒载体的多克隆位点 *Eco*R I + *Sal* I, 构建包涵 mSOD1 基因的转基因载体。转化进大肠杆菌感受态中, 摇菌, 挑选单菌落, 菌落 PCR 扩增。从菌液提取包含 mSOD1 的质粒载体, 限制性内切酶在 *Bgl* II + *Bam*H I 位点双酶切, 胶回收目的片段, 即线性化的质粒载体。经纯化将 DNA 浓度调整为 98 ng/μL, 用于受精卵的原核注射。

1.4 小鼠受精卵制备及受精卵原核注射

6~8 周龄雌性 FVB/N 小鼠, 不限制食物、饮水。腹腔注射 10 IU PMSG, 24 h 后注射 10 IU HCG, 注射 3 h 后与雄鼠合笼, 次日上午挑选有阴道栓者, 收集受精合子。将 1 组(70 枚)受精合子用胚胎转移管转移到操作皿中, 用固定针将合子固定在适当位置, 注射针内移入线性化质粒, 持续推进注射针进入原核, 将注射针内 5 ng/μL 线性化质粒注入原核, 直至原核开始膨胀, 撤出注射针。操作皿中所有合子注射完毕后, 将新一组合子转移到操作皿中继续进行原核注射, 直至注射完所有合子。注射后的合子立即移回培养箱中预平衡好的 M16 培养液中培养。原核显微注射后第 2 天挑选分裂完好的, 发育至 2 细胞期的胚胎进行受体母鼠代孕移植。

1.5 胚胎移植

提前 1 d 将 FVB/N 雌鼠与结扎雄鼠合笼, 次日上午挑选有阴道栓者作为受体雌鼠。将原核注射后胚胎移植到假孕小鼠

的输卵管内, 每只受体雌鼠内移植 33~34 枚胎, 将胚胎数量对半移植到双侧输卵管内。19 d 左右分娩。出生后的小鼠自交产生 F1 代小鼠, F1 代继续自交繁殖 F2 代小鼠。

1.6 转基因小鼠的基因检测

取出生 8~9 周的转基因鼠的鼠尾组织, 利用组织基因组提取试剂盒提取基因组 DNA。以 mSOD1 基因序列为模板, 设计引物: 上游: 5'-CTGACATCCACTTTGCTTTC-3', 下游: 5'-ACCTTCATCTGGTCCATTACTTT-3', 产物大小 214 bp。扩增产物行 1% 琼脂糖凝胶电泳用凝胶成像仪检测及摄像, 经 DNA 测序证实。

1.7 足迹分析

取 mSOD1 转基因小鼠 5 只, 与同品系、同龄野生型小鼠 5 只进行行为学对比, 观察转基因鼠与野生型鼠是否存在行为学差异。将小鼠的后肢涂上红色无毒染料, 置于 1 条狭窄的覆盖白纸的跑道上(55 mm × 55 mm × 500 mm), 首次置于新环境中适应 60 min。实验时避免外界干扰, 每天实验时间、实验环境相同。每天 3 次, 每只小鼠共进行 9 次实验。

1.8 转轮实验

将小鼠置于 YSL-4C 转轮疲劳仪, 从 1 r/min 开始, 180 s 内增加至 35 r/min。记录小鼠掉落时在转轮上的时间, 未掉落的小鼠记为 180 s/(35 r/min)。mSOD1 转基因小鼠、野生型小鼠各 5 只。首次实验时小鼠先适应转轮环境, 然后每天同一时间、同样实验条件, 重复进行 3 次, 每次间隔休息 30 min。实验结果取 3 次的最大值。实验连续进行 6 d。

1.9 统计学分析

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 18.0 统计软件, 对计数数据进行两样本 *t* 检验。

2 结果

2.1 PCI 质粒表达载体的构建

将已测序的 mSOD1 基因序列克隆到以 CMV 为启动子的 PCI 质粒载体多克隆位点 *Eco*R I、*Sal* I, 构建表达 mSOD1 基因的转基因载体。在 *Bgl* II 和 *Bam*H I 位点双酶切 PCI 质粒载体, 产物大小分别为 1 450 bp 和 2 658 bp(图 1)。胶回收大小为 1 450 bp 产物, 纯化后测 mSOD1 浓度为 98 ng/μL。

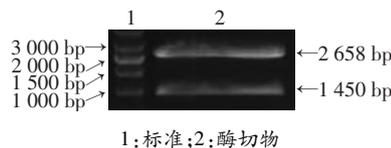
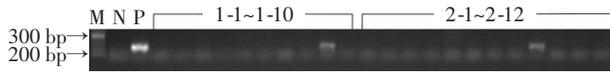


图 1 PCI 质粒载体在 *Bgl* II + *Bam*H I 位点双酶切电泳结果

2.2 转基因鼠的制备

共超数排卵 FVB/N 小鼠 48 只, 收集 880 枚受精合子, 进行显微注射, 分别移植入 37 只假孕雌鼠输卵管中, 9 只小鼠受孕, 妊娠率为 1.02% (9/880), 出生 65 只小鼠, 出生率为 7.39% (65/880), 存活 57 只, 存活率为 6.48% (57/880), 有 5 只阳性小鼠, 外源基因整合率为 0.57% (5/880)。子代小鼠出生 6~8 周后提取鼠尾组织基因组 DNA, 用 PCR 法鉴定 mSOD1 转基因小鼠的基因型, 经鉴定 22 只 F1 代转基因小鼠(编号分别为 1-1~10 和 2-1~12)中, 其中编号为 1-9、2-9 雌性转基因鼠表达人 mSOD1 基因(图 2)。



M: 标准; N: 阴性对照; P: 阳性对照; 1-1~1-10、2-1~2-12: 为22只F1代转基因鼠编号, 其中1-9、2-9为阳性, 2只均为雌性

图2 F1代转基因小鼠鼠尾组织PCR鉴定结果

2.3 转基因小鼠的行为学观察

mSOD1 转基因小鼠足迹欠规整, 步距大小不一(图3)。转基因小鼠后肢足间距为(34.83 ± 9.72) mm, 野生型小鼠后肢足间距为(52.78 ± 7.22) mm, 转基因小鼠后肢足间距明显短于野生型小鼠($P < 0.01$)。转轮实验结果表明, 转基因小鼠在转轮上停留的时间为(59.17 ± 26.27) s, 野生型小鼠为(171.83 ± 20.98) s, 与同龄同品系野生型小鼠相比, 转基因小鼠在转轮上的时间明显缩短($P < 0.01$)。



A: 野生型小鼠后肢足迹较规整, 足间距基本一致; B: 转基因小鼠后肢足迹欠规整, 足间距大小不一致

图3 野生型小鼠与转基因小鼠后肢足迹比较

3 讨论

神经系统变性疾病, 如 ALS、帕金森病、Huntington 舞蹈病和阿尔茨海默病, 具有相同的病理生理学特点和细胞死亡方式(均为凋亡), 且均在病灶中发现不溶性蛋白质的沉积^[3-4]。因此, 通过对 ALS 的深入研究, 有可能揭示这些神经系统变性疾病的发病机制, 为其治疗和预防打下理论基础。由于家族性 ALS (FALS) 具有与散发性 ALS 相同的临床表现、肌电图特征和组织病理学特点, 因此, FALS 可以作为研究 ALS 很好的疾病模型, 通过对 FALS 进行深入研究, 必将有助于明确 ALS 的病因。

我们在重庆地区发现一个具有特殊临床表型的常染色体显性遗传的 ALS 大家系, 家系涉及4代, 受累患者多达14人。该家系患者符合 ALS 诊断标准, 但

与目前文献报道的 ALS 家系患者的临床表型有差异。基因测序发现, 该家系患者 SOD1 基因 2 号外显子发生了插入突变, 导致 SOD1 的翻译提前终止, 使正常由 153 个氨基酸组成的 SOD1 蛋白变为由 35 个氨基酸残基组成的短肽。这是一种新的 SOD1 基因突变类型 (mSOD1, Gene Bank ID: EF143990)。

既往研究证实 SOD1 基因的显性突变是 ALS 的成因之一。SOD1 基因位于人类染色体 21q22.1, 是催化超氧化物阴离子毒性的主要酶, 表达突变 SOD1 的转基因小鼠可以出现类似 ALS 的临床表现。目前认为突变后 SOD1 的细胞毒性可能机制有两种: 一种是 SOD1 的功能丧失 (loss-of-function): SOD1 基因突变可致 SOD1 酶活性丧失, 使超氧化的解毒作用减弱致自由基过量积聚, 从而引起神经元的损伤^[5-6]。但是敲除内源性 SOD1 基因的转基因小鼠可以不发生任何运动神经元疾病。另一种是功能获得 (gain-of-function) 理论: ①突变 SOD1 构象不稳定, 易发生去折叠, 引起突变蛋白聚集物的形成^[7], 突变 SOD1 蛋白的聚集物与过氧亚硝基阴离子 (ONOO⁻) 又可以导致多种蛋白质 (包括神经微丝亚单位) 酪氨酸硝基化, 亚硝基化蛋白可选择性地累及运动神经元^[8-9]; ②SOD1 突变后, Zn²⁺ 与 SOD1 酶之间的结合不稳定, 缺乏 Zn²⁺ 的 SOD1 在 NO 存在的情况下催化生成大量 ONOO⁻, 从而导致氧化应激损伤^[10]; ③变异 SOD1 能产生更多的羟自由基 (OH⁻), OH⁻ 对细胞膜中的多聚不饱和脂肪酸进行氧化, 引起细胞的损伤; ④由于 SOD1 基因突变导致 SOD1 酶结构松解, ONOO⁻ 和 H₂O₂ 达到并与 SOD1 酶中的 Cu²⁺ 反应^[11], 从而直接或间接产生氧化应激损伤。

表达突变 SOD1 的转基因小鼠具有与 ALS 患者类似的临床表现, 可以通过建立表达突变 SOD1 的动物模型来研究 ALS 发病机制。为明确该 mSOD1 是引起重庆这一家系 ALS 发病的原因, 我们建立了通过基因检查证实表达 mSOD1 的转基因小鼠模型。转轮实验是检测小鼠神经肌肉协调能力较为敏感的方法之一, 能准确反映小鼠的神经肌肉协调能力^[12]。足迹分析是目前常用的评估转基因小鼠的肢体运动能力的方法, 能直观反映小鼠肢体运动功能的变化。因此, 我们通过转轮实验和足迹分析, 检测 mSOD1 转基因小鼠是否具有类似 ALS 患者的肌肉萎缩、无力等临床症状的主要特征。结果显示, mSOD1 转基因小鼠转轮实验的成绩明显较野生型鼠差, 说明 mSOD1 转基因小鼠的运动功能较野生型鼠明显下降, 具有四肢肌肉无力的表型。足迹分析发现, mSOD1 转基因小鼠后肢的足迹不规整, 步距长短不一, 有拖曳现象, 步距测量较野生型小鼠短, 具有后肢无力的特征性表现。通过上述临床

表型的检测,证实 mSOD1 转基因小鼠模型建立成功,具有与 ALS 患者类似的临床表型。

由于肌萎缩性侧索硬化症发病机制十分复杂,需深入研究 mSOD1 在 ALS 疾病发生和进程中的分子机制和神经系统不同类型神经元和胶质细胞在 ALS 疾病进程中的作用。本研究仅构建了转基因动物模型,对其临床表型进行了初步研究,下一步应在本研究基础上,对该 mSOD1 基因导致 ALS 的致病机制,潜在的治疗靶点等进行进一步的研究。

参考文献:

- [1] Rosen D R, Siddique T, Patterson D, *et al.* Mutations in Cu/Zn-superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Nature*, 1993, 362(6415): 59-62.
- [2] Hu J, Chen K, Ni B, *et al.* A novel SOD1 mutation in amyotrophic lateral sclerosis with a distinct clinical phenotype[J]. *Amyotroph Lateral Scler*, 2012, 13(1): 149-154.
- [3] Fukada Y, Yasui K, Kitayama M, *et al.* Gene expression analysis of the murine model of amyotrophic lateral sclerosis: studies of the Leu126delTT mutation in SOD1[J]. *Brain Res*, 2007, 1160: 1-10.
- [4] Yamashita S, Mori A, Kimura E, *et al.* DJ-1 forms complexes with mutant SOD1 and ameliorates its toxicity[J]. *J Neurochem*, 2010, 113(4): 860-870.
- [5] Magrane J, Hervias I, Henning M S, *et al.* Mutant SOD1 in neuronal

mitochondria causes toxicity and mitochondrial dynamics abnormalities [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(23): 4552-4564.

- [6] Aguirre N, Beal M F, Matson W R, *et al.* Increased oxidative damage to DNA in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis[J]. *Free Radic Res*, 2005, 39(4): 383-388.
- [7] Kerman A, Liu H N, Croul S, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis is a non-amyloid disease in which extensive misfolding of SOD1 is unique to the familial form[J]. *Acta Neuropathol*, 2010, 119(3): 335-344.
- [8] Turner B J, Ackerley S, Davies K E, *et al.* Dismutase-competent SOD1 mutant accumulation in myelinating Schwann cells is not detrimental to normal or transgenic ALS model mice[J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(5): 815-824.
- [9] Prudencio M, Hart P J, Borchelt D R, *et al.* Variation in aggregation propensities among ALS-associated variants of SOD1: correlation to human disease[J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(17): 3217-3226.
- [10] Kayatekin C, Zitzewitz J A, Matthews C R. Disulfide-reduced ALS variants of Cu, Zn superoxide dismutase exhibit increased populations of unfolded species[J]. *J Mol Biol*, 2010, 398(2): 320-331.
- [11] Boillee S, Cleveland D W. Revisiting oxidative damage in ALS: microglia, Nox, and mutant SOD1[J]. *J Clin Invest*, 2008, 118(2): 474-478.
- [12] 阴均涛,张红丽,闫欣,等.不同行为学测试方法在家族性肌萎缩侧索硬化小鼠模型比较[J].*中国实验动物学报*, 2013, 21(1): 57-60, 90.

(收稿:2013-10-29;修回:2013-12-16)

(编辑 龙亮)

文章编号:1000-5404(2014)09-0931-01

个案与短篇

注射用兰索拉唑与复合磷酸氢钾存在配伍禁忌

李冉,向家梅 (400037 重庆,第三军医大学新桥医院普通外科)

[关键词] 兰索拉唑;复合磷酸氢钾;配伍禁忌

[中图分类号] R969.2 [文献标志码] B

注射用兰索拉唑用于治疗口服疗法不适用的、伴有出血的十二指肠溃疡,为白色粉末,生理盐水稀释后为透明澄清液体。复合磷酸氢钾主要用于完全胃肠外营养中作为磷的补充。我科于2014年2月在临床使用过程中发现兰索拉唑与复合磷酸氢钾存在配伍禁忌,现报告如下。

1 临床资料

患者男性,胃大部切除术后2d,禁食、水。遵医嘱予生理盐水100 mL加入兰索拉唑30 mg静脉滴注,之后予糖盐水500 mL加复合磷酸氢钾2 mL静脉滴入,1 h后巡视病房时发现输液器过滤器内滤网颜色呈浅黑色,立即关闭液体,更换输液器,报告医师,密切观察患者病情变化,未发生不良反应。

为进一步证实2种药物之间存在配伍禁忌,以生理盐水100 mL稀释兰索拉唑30 mg,抽取1 mL稀释后透明澄清液体,

同时抽取复合磷酸氢钾1 mL,2种无色澄清药液混合后迅速变成白色混浊液。将白色浑浊液静置30 min后溶液变成浅褐色,1 h后变成浅黑色。按上述方法重复多次,均出现相同反应。

2 讨论

无论临床应用还是试验都证明2种药物存在配伍禁忌,不能连续输注,应用时应避免2种药液直接接触,在2组液体中间隔1组生理盐水,以防药物发生反应,确保患者用药安全,避免造成不必要的医疗纠纷。目前临床上使用新药较多,提醒护士在查看最新药物配伍禁忌表外,还应在临床使用过程中,特别是在更换输液过程中,应仔细观察2种药物之间有无反应,并且应经常巡视病房,观察药液性状变化及患者情况,发现异常及时报告,及时采取措施^[1]。

参考文献:

- [1] 杨芳.氨甲环酸注射液与盐酸甲氧氯普胺注射液存在配伍禁忌[J].*中国实用护理杂志*, 2012, 28(11A): 56.

(收稿:2014-03-06;修回:2014-03-18)

(编辑 张维)

[通信作者] 向家梅, E-mail: xjm64128@sina.com

[优先出版] <http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140417.1626.004.html> (2014-04-17)