

presenilin-1/presenilin-2 双基因敲除小鼠的寿命观察

唐 红¹, 唐晓琴¹, 邓 飞², 李 昕¹, 陈 波³, 唐明希¹, 阮思蓓¹

(1. 西南医科大学附属医院病理科, 四川 泸州 646000; 2. 南方医科大学深圳医院病理科, 广东 深圳 518102;
3. 西南医科大学神经解剖教研室, 四川 泸州 646000)

【摘要】 目的 观察 Presenilin-1/Presenilin-2 双基因敲除小鼠(dKO mice)的生存曲线,为进一步繁殖及使用该模型对阿尔茨海默病(AD)进行研究提供实验设计等提供参考。**方法** 将 dKO mice 雌性 50 只,雄性 30 只,及野生型同系小鼠雌、雄各 20 只分为 4 组,观察正常喂养情况下 4 组间小鼠 2 年以内各自的生存情况及寿命,绘制生存曲线进行生存分析。**结果** dKO mice 随着时间的延长,雌、雄性生存概率分别低于野生型雌、雄性小鼠,差异均有统计学意义($P < 0.001$, $P < 0.001$; $P < 0.001$, $P < 0.001$);dKO mice 雌、雄性之间的生存概率差异无统计学意义。**结论** 条件性敲除 presenilin-1 与 presenilin-2 双基因可能会缩短小鼠的寿命,其生存概率显著低于野生型小鼠,而 dKO mice 雌、雄性之间的生存概率则无统计学差异。本实验结果可为借助此模型的实验设计应用提供有益参考。

【关键词】 dKO mice;条件性基因敲除;小鼠;寿命

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)11-0006-05

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.11.002

Investigation on life span of presenilin-1/presenilin-2 conditional double knockout mice

TANG Hong¹, TANG Xiao-qin¹, DENG Fei², LI Xin¹,
CHEN Bo³, TANG Ming-xi¹, RUAN Si-bei¹

(1. Department of Pathology, the Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, Chian;
2. Department of Pathology, the Affiliated Shenzhen Hospital of Southern Medical University, Guangdong Shenzhen 518102, Chian;
3. Department of Anatomy, Southwest Medical University, Sichuan Luzhou 646000, China)

【Abstract】 Objective To analyze the survival curves of presenilin-1/presenilin-2 conditional double knockout mice (dKO mice), and provide a reference for further breeding of this strain of mice and studying the pathogenesis of Alzheimer's disease (AD). **Methods** dKO mice (50 females and 30 males) and wild-type controls (20 females and 20 males) were included in this study. The survival of all the mice was observed under the same condition of feeding and nutrition for two years. Life span of each mouse was calculated, survival curves were drawn, and their survival was analyzed. **Results** With the passing of time, the survival probability was decreased in dKO mice. The survival probabilities of female and male dKO mice were significantly worse than that of wild-type controls, respectively ($P < 0.001$, $P < 0.001$; $P < 0.001$, $P < 0.001$). No significant difference was observed between the males and females of dKO mice. **Conclusions** Double knockout presenilin-1 and presenilin-2 genes may shorten the life span of mice, but there is no significant gender difference between the males and females of dKO mice.

【基金项目】 四川省科技厅科技支撑计划(2012SZ0172);四川省教育厅重点项目(16ZA0196);西南医科大学-泸州市科技局联合资助项目(2015LZCYD-S06(6/11));西南医科大学重点项目(2015-YJ002);西南医科大学附属医院科研项目(15056,15087)。

【作者简介】 唐红,女,副教授。E-mail:136810735@qq.com;唐晓琴为共同第一作者。

【通讯作者】 阮思蓓(1988-),女,医师。研究方向:临床及实验病理学。E-mail:294834533@qq.com;唐明希,男,博士,副教授,硕士研究生导师。

【Key words】 dKO mice; Conditional knockout; Mice; Life span

早老素 1 (presenilin-1, PS1) 基因与早老素 2 (presenilin-2, PS2) 基因分别位于 14 号染色体和 1 号染色体上,其基因突变是引发家族型阿尔茨海默病(familial Alzheimer's disease, FAD)的重要原因之一^[1-3]。研究发现,PS1/PS2 双基因敲除小鼠(dKO mice)模型具有年龄依赖性的一系列类似阿尔茨海默病(Alzheimer's disease, AD)的神经退行性病症,如神经元变性、坏死、胶质增生及后期的痴呆行为等^[3-5]。本研究通过观察 dKO mice 的生存曲线,以期对该模型的生存期有更进一步的了解,对实验动物选择、繁殖,以及应用本模型对 AD 研究的实验设计等提供有益参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

亲代小鼠(基因型为 *fPS1/fPS1, PS2 -/-, Cre +/-*)由美国 Ya-Ping Tang 教授(Louisiana State University, USA)惠赠,品系为 B6CBAF1,利用 Cre/loxP 系统,即 Cre 的启动子 α 钙调蛋白激酶 II,来驱动 Cre 在整个前脑兴奋性神经元的特异性表达,但 γ -氨基丁酸(GABA)能神经元并不表达 Cre,因此 PS1 在此神经元里并没被敲除,这种将前脑中的 PS1 基因进行特异性敲除称为条件性敲除,所得杂合子与基因打靶技术将 PS2 基因进行全身性敲除所得杂合子杂交而来^[5]。子代 dKO mice 的繁殖与基因型鉴定如我们报道所述^[6]。动物分组:基因型鉴定合格的实验组 dKO mice 雌性 50 只、雄性 30 只,对照组野生型同系小鼠(购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司【SCXK(沪)2013-0016】)雌、雄各 20 只。

1.2 实验环境

实验动物饲养于西南医科大学实验动物中心 SPF 级屏障设施内【SYXK(川)2013-065】,每盒不超过 4 只,温度控制在(18~22)℃,湿度控制在 40%~60%,12 h/12 h 光照周期,全程喂饲成都达

硕实验动物有限公司生产的 SPF 级大小鼠生长繁殖饲料。鼠盒、垫料、饲料及饮水均经过高温高压灭菌处理,每周更换鼠盒及垫料 2 次,保证充足的饲料和饮水,饲养过程严格按照屏障设施 SOP 操作。

1.3 观察方法

dKO mice 和野生型小鼠按性别分笼饲养,生存时间以小鼠的出生时间为观察起点,观察每只小鼠自然衰老的过程及生存到 2 年时的死亡情况,记录出生日期及自然死亡日期,并绘制生存曲线。在规定实验的时间内仍然存活的数据为删失数据。

1.4 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件处理数据,生存时间以中位生存时间表示,采用非参数估计法 Kaplan-Meier 法(K-M 法)进行生存分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 雌性 dKO mice 和雌性野生型小鼠生存曲线的比较

实验期间,雌性野生型小鼠有 4 只由于打架受伤等原因死亡,实验组有 45 只不明确原因死亡。对雌性 dKO mice 和雌性野生型小鼠的生存情况进行统计分析,两种小鼠的删失情况如(表 1)所示。雌性 dKO mice 生存概率随着时间的延长逐渐降低,显著低于雌性野生型小鼠的生存概率($\chi^2 = 33.737$, $P < 0.001$)。两种小鼠的生存曲线如(图 1)所示。

2.2 雌性 dKO mice 和雄性野生型小鼠生存曲线的比较

实验期间,雄性野生型小鼠有 3 只由于打架受伤等原因死亡。对雌性 dKO mice 和雄性野生型小鼠的生存情况进行统计分析,两种小鼠的删失情况如(表 2)所示。经比较雌性 dKO mice 生存概率低于雄性野生型小鼠的生存概率,两种小鼠的生存时间存在显著差异($\chi^2 = 34.486$, $P < 0.001$)。两种小鼠的生存曲线如(图 2)所示。

表 1 雌性 dKO mice 和雌性野生型小鼠删失情况

Tab. 1 Case processing summary of female dKO mice and female wild-type mice

分组 Groups	总数 Total number	完全数据 Number of events	删失 Censored	
			删失数 Number	百分比 Percent
实验组 ♀	50	45	5	10.0%
对照组 ♀	20	4	16	80.0%
总计 Total	70	49	21	30.0%

表 2 雌性 dKO mice 和雄性野生型小鼠删失情况
Tab.2 Case processing summary of female dKO mice and male wild-type mice

分组 Groups	总数 Total number	完全数据 Number of events	删失 Censored	
			删失数 Number	百分比 Percent
实验组 ♀	50	45	5	10.0%
对照组 ♂	20	3	17	85.0%
总计 Total	70	48	22	31.4%

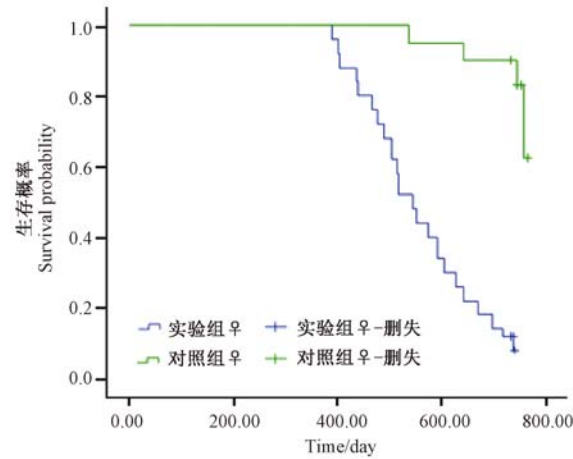


图 1 雌性 dKO mice 和雌性野生型小鼠生存曲线比较
Fig.1 Survival curves of female dKO mice and female wild-type mice

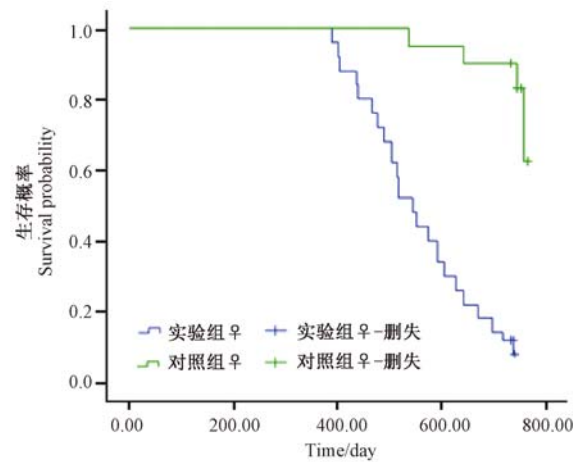


图 2 雌性 dKO mice 和雄性野生型小鼠生存曲线比较
Fig.2 Survival curves of female dKO mice and male wild-type mice

2.3 雄性 dKO mice 和雌性野生型小鼠生存曲线的比较

实验期间,雄性 dKO mice 有 26 只不明确原因死亡。对雄性 dKO mice 和雌性野生型小鼠的生存情况进行统计分析,两种小鼠的删失情况如(表 3)所示。经比较雄性 dKO mice 生存概率显著低于雌性野生型小鼠的生存概率($\chi^2 = 25.971, P < 0.001$),两种小鼠的生存曲线如(图 3)所示。

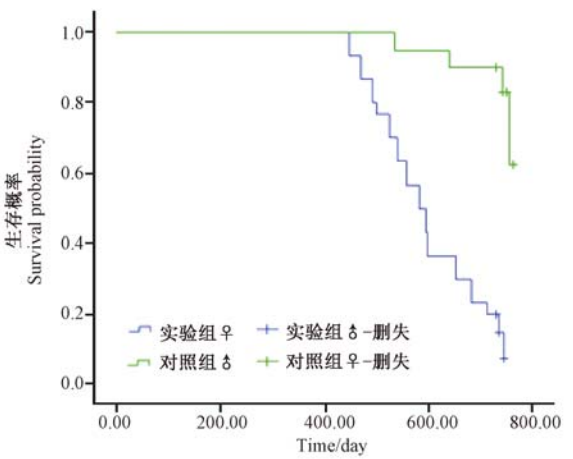


图 3 雄性 dKO mice 和雌性野生型小鼠生存曲线比较
Fig.3 Survival curves of male dKO mice and female wild-type mice

2.4 雄性 dKO mice 和雄性野生型小鼠生存曲线的比较

对雄性 dKO mice 和雄性野生型小鼠的生存情况进行统计分析,两种小鼠的删失情况如(表 4)所示。经比较雄性 dKO mice 生存概率低于雄性野生型小鼠的生存概率,两种小鼠的生存时间差异具有统计学意义($\chi^2 = 28.278, P < 0.001$)。两种小鼠的生存曲线如(图 4)所示。

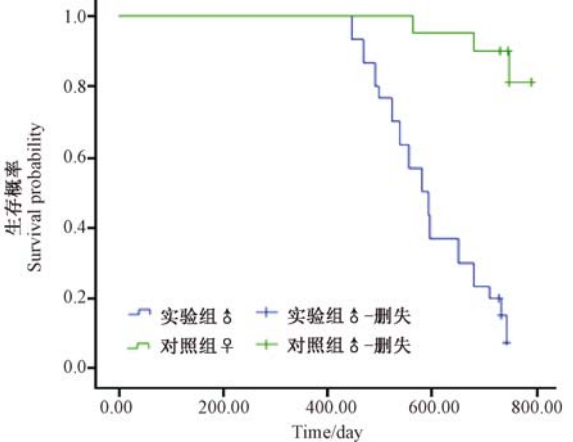


图 4 雄性 dKO mice 和雄性野生型小鼠生存曲线比较
Fig.4 Survival curves of male dKO mice and male wild-type mice

表 3 雄性 dKO mice 和雌性野生型小鼠删失情况

Tab.3 Case processing summary of male dKO mice and female wild-type mice

分组 Groups	总数 Total number	完全数据 Number of events	删失 Censored	
			删失数 Number	百分比 Percent
实验组 ♂	30	26	4	13.3%
对照组 ♀	20	4	16	80.0%
总计 Total	50	30	20	40.0%

表 4 雄性 dKO mice 和雄性野生型小鼠删失情况

Tab.4 Case processing summary of male dKO mice and male wild-type mice

分组 Groups	总数 Total number	完全数据 Number of events	删失 Censored	
			删失数 Number	百分比 Percent
实验组 ♂	30	26	4	13.3%
对照组 ♂	20	3	17	85.0%
总计 Total	50	29	21	42.0%

表 5 不同性别的 dKO mice 删失情况

Tab.5 Gender difference of case processing summary in the dKO mice

性别 Gender	总数 Total number	完全数据 Number of events	删失 Censored	
			删失数 Number	百分比 Percent
雌性 ♀	50	45	5	10.0%
雄性 ♂	30	26	4	13.3%
总计 Total	80	71	9	11.3%

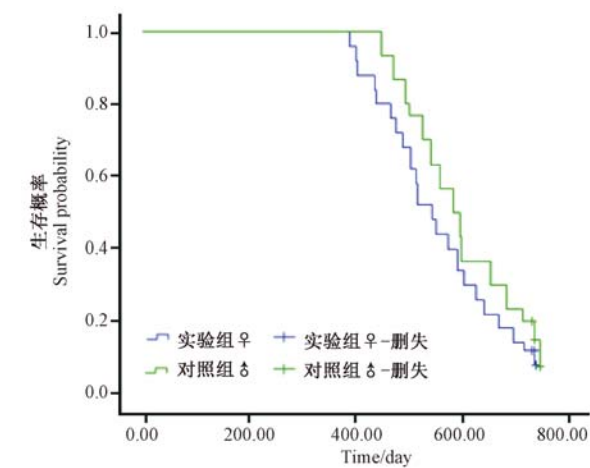


图 5 不同性别 dKO mice 生存曲线比较

Fig.5 Gender difference of survival curves in the dKO mice

2.5 dKO mice 不同性别的生存曲线比较

对不同性别的 dKO mice 生存情况进行比较,删失情况如(表 5)所示。雌性 dKO mice 中位生存时间为 542 d,雄性为 583 d,经比较不同性别之间 dKO mice 的生存曲线无统计学差异($\chi^2 = 1.892, P = 0.169$)。不同性别 dKO mice 的生存曲线如(图 5)所示。

3 讨论

在对 AD 进行研究过程中,由于人脑组织获得

的困难性决定了利用动物模型的重要性,尤其针对像 AD 等与年龄相关的神经退行性病变的研究更为重要。研究表明,敲除 PS1 基因的小鼠将出现严重的发育缺陷以及胚胎致死,而利用 Cre/loxP 系统将前脑中的 PS1 基因进行条件性敲除的小鼠可以存活和繁殖;而敲除 PS2 基因的小鼠仅表现出轻微的肺纤维化^[4-5]。本实验所用的亲代小鼠如 Feng R 等^[5]所述,将前脑中的 PS1 基因进行条件性敲除的小鼠与 PS2 基因敲除的小鼠杂交得到,该动物模型存活情况良好,虽然脑中缺乏 A β 的沉积,但表现出 AD 样神经退行性疾病的其他表型,如学习记忆能力下降、认知功能减退、大脑皮质与海马萎缩、侧脑室和第三脑室的扩大、大量神经元凋亡、以及神经元内 tau 蛋白高度磷酸化等^[3,6]。dKO mice 的成功繁殖与饲养是利用其作为研究 AD 动物模型的基础,对其寿命的了解是顺利进行 AD 研究,尤其对其晚期(≥ 18 月龄)的发病机制研究及药物干预等试验设计具有重要的参考价值。

基因敲除小鼠是把小鼠的一个或几个基因敲除后,培养出用于基础及临床实验的动物模型,从而更全面的模仿、认识以及研究人类疾病。在利用动物模型进行人类疾病研究的同时,对其生存、行为、代谢等研究也不容忽视^[7]。动物的寿命因种别、品系不同而长短不一,敲除不同的基因对小

鼠寿命的影响也可能会不同。Su N 等^[8]发现条件性敲除成纤维细胞生长因子受体 3 (FGFR3) 基因会导致小鼠的寿命缩短;Hellekant G 等^[9]通过对钙稳态调节蛋白 1 (CALHM1) 基因研究发现,敲除 CALHM1 基因的小鼠生存时间比野生型小鼠长近 1 年的时间;Kawai H 等^[10]研究发现敲除 GD3 合酶基因对小鼠的发育和寿命都没有影响。敲除双基因对小鼠的寿命也可能会有影响,如 Koval M 等^[11]发现敲除小鼠内皮细胞的连接蛋白 Cx40 和 Cx43 基因会导致小鼠肺自发性功能障碍和纤维化,使其寿命明显缩短。本实验通过观察 dKO mice 和野生型小鼠的生存状况,发现 dKO mice 中位生存时间雌性为 542 d,雄性为 583 d,随着时间的延长,雌、雄性 dKO mice 生存概率逐渐降低,均分别显著低于雌、雄性野生型小鼠的生存概率($P < 0.001$; $P < 0.001$; $P < 0.001$; $P < 0.001$),而 dKO mice 不同性别之间的生存曲线无统计学差异。

可见,敲除 presenilin-1/-2 双基因可能会缩短小鼠的寿命,但对其不同性别间的影响无明显差别。此信息有助于我们利用此模型对 AD,尤其是对于大于 18 月龄的 dKO mice (晚期 AD) 动物实验的实验设计等具有重要的参考价值。当然,在自然状态下,雌、雄小鼠共同生活,有两性间的亲密接触、情感交流及相互依赖,还会发生交配、繁殖生育、哺乳等不同情况,而本实验中的 dKO mice 和野生型小鼠均按性别分笼饲养,与自然状态下有所不同,这些都有可能对小鼠,尤其对 dKO mice 的病情及寿命可能会有一定的影响。另外,我们的实验设计数量不是很多,这也有可能对实验结果产生一定影响。因此,在今后的工作中对于 dKO mice 的生存情况有待进一步观察与研究。

参考文献:

- [1] 黄少轩,娄季宇,白宏英. 阿尔茨海默病相关基因研究进展 [J]. 中国实用神经疾病杂志, 2016, 04: 82-84.
- [2] Xia D, Watanabe H, Wu B, *et al.* Presenilin-1 knockin mice reveal loss-of-function mechanism for familial Alzheimer's disease [J]. *Neuron*. 2015, 85(5): 967-981.
- [3] 薛小琳,王霆,孟博,等. Presenilin-1/2 双基因条件性敲除小鼠作为阿尔兹海默病动物模型的研究进展 [J]. 中国新药杂志, 2013, 13: 1530-1537.
- [4] Chen Q, Nakajima A, Choi SH, *et al.* Loss of presenilin function causes Alzheimer's disease-like neurodegeneration in the mouse [J]. *J Neurosci Res*. 2008, 86(7): 1615-1625.
- [5] Feng R, Wang H, Wang J, *et al.* Forebrain degeneration and ventricle enlargement caused by double knockout of Alzheimer's presenilin-1 and presenilin-2 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004, 101(21): 8162-8167.
- [6] 张元,郭庆喜,刘勇,等. Presenilin-1/Presenilin-2 双基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 11: 2052-2054.
- [7] 石宏,何伟,王晓宇,等. TRPV1 和 ASIC3 基因敲除小鼠的寿命观察 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 10: 78-81+89.
- [8] Su N, Xu X, Li C, *et al.* Generation of Fgfr3 conditional knockout mice [J]. *Int J Biol Sci*. 2010, 6(4): 327-332.
- [9] Hellekant G, Schmolling J, Marambaud P, *et al.* CALHM1 Deletion in Mice Affects Glossopharyngeal Taste Responses, Food Intake, Body Weight, and Life Span [J]. *Chem Senses*. 2015, 40(6): 373-379.
- [10] Kawai H, Allende ML, Wada R, *et al.* Mice expressing only monosialoganglioside GM3 exhibit lethal audiogenic seizures [J]. *J Biol Chem*. 2001, 276(10): 6885-6888.
- [11] Koval M, Billaud M, Straub AC, *et al.* Spontaneous lung dysfunction and fibrosis in mice lacking connexin 40 and endothelial cell connexin 43 [J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(6): 2536-2546.

[修回日期]2016-07-28