



TRPV1 和 ASIC3 基因敲除小鼠的寿命观察

石宏¹, 何伟¹, 王晓宇¹, 胡玲¹, 宿杨帅¹, 辛娟娟¹, 杨兆坤¹,
韩旭², 高洁², 张毅³, 景向红¹

(1. 中国中医科学院针灸研究所, 北京 100700; 2. 山东中医药大学, 济南 250355;
3. 中国中医科学院中药研究所, 北京 100700)

【摘要】 目的 观察酸敏感离子通道亚基3(ASIC3, 又名 ACCN3)基因敲除 ASIC3^{-/-}小鼠、香草酸瞬时受体亚型 I(TRPV1)基因敲除 TRPV1^{-/-}小鼠的生存曲线, 为进一步繁殖使用该品系小鼠提供参考。方法 选用 105 只基因敲除小鼠, 其中 ASIC3^{-/-}鼠 44 只, TRPV1^{-/-}鼠 61 只。观察正常喂养两种小鼠 500 d 以内的生存情况, 并绘制生存曲线, 进行生存分析。结果 ASIC3^{-/-}小鼠与 TRPV1^{-/-}小鼠随着时间的延长, 生存概率降低, 经比较 TRPV1^{-/-}小鼠的生存概率优于 ASIC3^{-/-}小鼠的生存概率, 两种小鼠的生存时间存在统计学差异, ($P = 0.004$, $P < 0.01$), 两种小鼠中不同性别之间的生存曲线无显著学差异。结论 TRPV1^{-/-}小鼠的生存概率优于 ASIC3^{-/-}小鼠的生存概率。而两种鼠不同性别之间的生存概率则基本相当。

【关键词】 ASIC3^{-/-}; TRPV1^{-/-}; 生存分析; 小鼠; 基因敲除

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 10-0078-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.010.015

Survival analysis of ASIC3^{-/-} and TRPV1^{-/-} mice

SHI Hong¹, HE Wei¹, WANG Xiao-yu¹, HU Ling¹, SU Yang-shuai¹, XIN Juan-juan¹, YANG Zhao-kun¹,
HAN Xu², GAO Jie², ZHANG Yi³, JING Xiang-hong¹

(1. Institute of Acupuncture and Moxibustion, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;
2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355;
3. Insititue of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700)

【Abstract】 Objective To analyze the survival curves of ASIC3^{-/-} and TRPV1^{-/-} mice, and provide a reference for further breeding of these strains of mice. **Methods** Forty-four ASIC3^{-/-} mice and sixty-one TRPV1^{-/-} mice were included in this study. The survival of the mice was observed in normal feeding for 500 days, survival curves were drawn, and their survival was analyzed. **Results** With the passing of time, the survival probability was decreased in ASIC3^{-/-} mice and TRPV1^{-/-} mice. The survival probability of TRPV1^{-/-} mice was significantly better than that of ASIC3^{-/-} mice ($P = 0.004$, $P < 0.01$). No significant difference was observed between the males and females of the same strain. **Conclusions** The survival probability of TRPV1^{-/-} mice is better than that of ASIC3^{-/-} mice. There is no significant gender difference in the two strains of mice.

【Key words】 ASIC3^{-/-}, mice; TRPV1^{-/-}, knockout; Survival analysis; Mice

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81173205); 国家重点基础研究发展计划(973 计划)(2011CB505201)。

[作者简介] 石宏(1970-), 女, 副主任技师, 实验动物学及电生理学实验技术。

[通讯作者] 景向红(1966-), 女, 博士, 研究员, 博士生导师。研究方向: 针灸作用机制研究。Email: jxhtjb@263.net。

通常在开放饲养条件下,小鼠的寿命为 1.5~2 年,而无菌小鼠,寿命可达 3 年。而近交系小鼠生活能力弱,寿命较短。ASIC3^{-/-}和 TRPV1^{-/-}纯合子小鼠是以正常近交系 C57BL/6 为背景,利用基因敲除技术将相关基因定点灭活制备而成的动物模型。

在工作中 TRPV1^{-/-}小鼠常用于热痛敏实验、神经病理痛、内脏痛实验等,ASIC3^{-/-}小鼠一般用于机械痛敏实验研究。本研究组前期的工作对 TRPV1^{-/-}小鼠和 ASIC3^{-/-}小鼠繁殖性能与痛阈进行了比较,结果显示 ASIC3^{-/-}小鼠的繁殖能力较 TRPV1^{-/-}小鼠弱^[1]。而相关 TRPV1^{-/-}小鼠和 ASIC3^{-/-}小鼠的死亡生存率还未见报道。我们在实验过程中对他们的出生、存活、死亡进行记录,并对这两种鼠的生存曲线进行了比较,以期对两种基因敲除小鼠的生存期有更进一步的了解,对实验室引进繁殖使用该种小鼠提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验动物

动物品种:ASIC3^{-/-}小鼠、TRPV1^{-/-}小鼠。动物来源:TRPV1 基因敲除小鼠(stock number: 003770)从美国 JAX 实验室引进,品系为 B6.129S4-*Trpv1*^{tm1Jul}/J, ASIC3 基因敲除小鼠(stock number: 013127)从美国 JAX 实验室引进,品系为 B6.129-*Asic3*^{tm1Wsh}/J。动物分组:TRPV1^{-/-}和 ASIC3^{-/-}纯合子小鼠通过检验检疫,饲养,繁殖,测序鉴定,检测合格后进行观察。其中 TRPV1^{-/-}组 61 只, ASIC3^{-/-}组 44 只。

1.2 实验环境

动物饲养在中国中医科学院中医基础理论研究所动物房 SPF 级屏障设施内(实验动物使用许可证号:SYXK(京)2010-0032)室内温度控制在(20~25)℃,湿度控制在 40%~70%,全程喂饲北京科澳协力饲料有限公司生产的大小鼠生长繁殖饲料。饲料、垫料、饮水均经过高温高压灭菌处理,动物饮水为酸化纯净水(pH2.5-3.0),每周更换垫料饮水 1~2 次,光暗照明 12 h 交替,饲养流程严格按照屏障设施 SOP 操作。

1.3 观察方法

ASIC3^{-/-}、TRPV1^{-/-}纯合子小鼠按性别分笼饲养,生存时间以小鼠离乳后时间作为观察起点,观察小鼠生存到 500 d 时动物的死亡情况。在规定时间内存活的数据做为删失数据。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 16.0 软件,生存时间以中位生存时间表示,生存率的非参数估计法采用 Kaplan-Meier 法,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。非参数法 Kaplan-Meier 的生存概率的公式为: $S(t_i) = N \text{ surviving past } t(i) / N \text{ total}$ 。

2 结果与分析

2.1 ASIC3^{-/-}小鼠和 TRPV1^{-/-}小鼠生存曲线的比较

我们对 ASIC3^{-/-}小鼠和 TRPV1^{-/-}小鼠生存曲线进行分析,统计 500 d 以内的两种鼠的生存情况。

表 1 观测量 ASIC3^{-/-}小鼠和 TRPV1^{-/-}小鼠删失情况

Tab.1 Case processing summary of ASIC3^{-/-} mice and TRPV1^{-/-} mice

品系 Groups	总数 Total number	未删失 的例数 Number of events	删失 Censored	
			删失数 Number	删失的百分比 Percent
ASIC3 ^{-/-}	44	13	31	70.5%
TRPV1 ^{-/-}	61	5	56	91.8%
总计 Total	105	18	87	82.9%

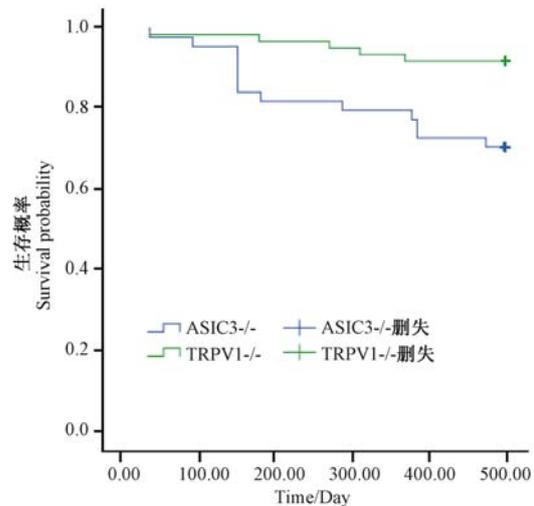


图 1 ASIC3^{-/-}小鼠和 TRPV1^{-/-}小鼠的生存曲线比较

Fig.1 Survival curves of ASIC3^{-/-} mice and TRPV1^{-/-} mice

从图 1 中可以看出两组小鼠在 30 d 左右开始出现死亡,大约从第 150 天后,两组小鼠的生存时间出现差异,随着时间的延长,生存概率降低;总体上 TRPV1^{-/-}小鼠的生存概率优于 ASIC3^{-/-}小鼠的生存概率。两组小鼠的生存时间存在统计学差异($P = 0.004, P < 0.01$)。

2.2 ASIC3^{-/-}不同性别小鼠生存曲线的比较

我们对 ASIC3^{-/-}不同性别的基因敲除小鼠进行生存曲线分析,统计 500 d 以内的生存情况。

表 2 观测量 ASIC3^{-/-}不同性别小鼠删失情况

Tab.2 Gender difference of case processing summary in the ASIC3^{-/-} mice

性别 Gender	总数 Total Number	未删失的例数 Number of Events	删失 Censored	
			删失数 Number	删失的百分比 Percent
雌♀	25	10	15	60.0%
雄♂	19	3	16	84.2%
总计 Total	44	13	31	70.5%

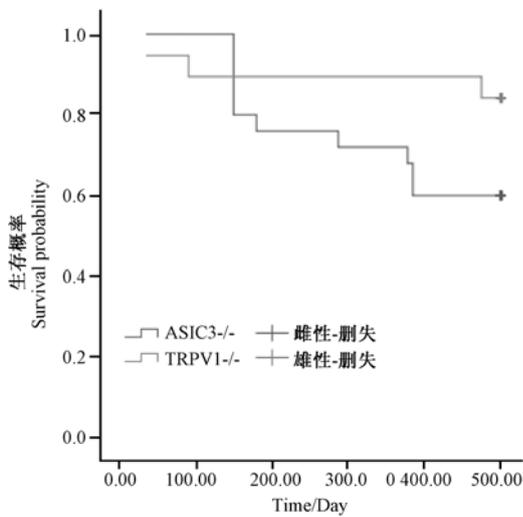


图 2 ASIC3^{-/-}不同性别小鼠的生存曲线比较

Fig.2 Gender difference of survival curves in the ASIC3^{-/-} mice

总体上,ASIC3^{-/-}小鼠随着时间的延长,生存概率在降低;在第 150 天前,雌性小鼠的生存概率高于雄性小鼠,第 150 天后,雌性小鼠的生存概率低于雄性小鼠,但两组小鼠的生存时间尚无统计学差异。

2.3 TRPV1^{-/-}不同性别小鼠的生存曲线比较

从图 3 中可以看出 TRPV1^{-/-}小鼠中雄性小鼠与雌性小鼠的生存概率几乎相当。两组小鼠的生存时间无统计学差异。

表 3 观测量 TRPV1^{-/-}不同性别小鼠删失情况

Tab.3 Gender difference of case processing summary in the TRPV1^{-/-} mice

性别 Gender	总数 Total Number	未删失的例数 Number of Events	删失 Censored	
			删失数 Number	删失百分比 Percent
雌♀	22	2	20	90.9%
雄♂	39	3	36	92.3%
总计 Total	61	5	56	91.8%

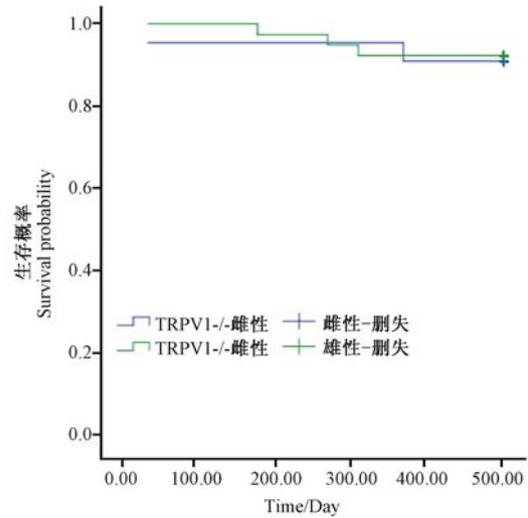


图 3 TRPV1^{-/-}不同性别小鼠的生存曲线比较

Fig.3 Gender difference of survival curves in the TRPV1^{-/-} mice

3 讨论

基因敲除小鼠是通过把小鼠的一个或几个基因敲除后,培养出适合药物临床实验的动物模型,以期更好的模仿人类疾病进行研究。在利用基因敲除小鼠进行模型研究的同时,对于其生存、代谢等的研究也是不容忽视的问题。

曾有研究表明动物的寿命一般都取决于种别。动物品系不一样,寿命也不同。即使在同一种内遗传背景的差异也会造成寿命长短不一。通常的观点认为雄性寿命比雌性短,但美国杰克逊实验室用老化小鼠开展的延长寿命的研究表明,情况未必都如此^[2]。而我们实验室对 ASIC3 和 TRPV1 两种基因敲除小鼠的性别进行分别比较,发现雌性小鼠和雄性小鼠的寿命相当。这也验证了上一说法。

TRPV1^{-/-}是纯合子靶突变小鼠,它与野生型小鼠不同,它在后肢皮下注射辣椒素化合物后肿胀减少,痛反应降低,他们对于酸化环境或耐热(43℃)反应明显减弱。在皮下注射辣椒素后对温度感觉严重减少。纯合子显示出对热诱发疼痛相关的行为严重不敏感和不反感摄入辣椒素的饮用水^[3]。TRPV1 被发现存在于中枢神经系统及末梢神经系统上,并且涉及痛觉的传递和调制,以及整合各种同疼痛信息^[4,5]。TRPV1 对辣椒素敏感,伤害性热刺激(> 43℃)和酸(pH < 5.9)也可使其激活。内源性物质,如大麻素类的花生四烯酸乙醇胺(anandamide)和脂氧酶代谢产物等也可激活

TRPV1^[6]。

现在人们意识到 TRPV1 通道是体温调节中的一个环节。这是因为人们发现一些针对 TRPV1 的选择性受体拮抗剂会导致体温升高(高温症),这说明在体内 TRPV1 通道通过告知大脑应当降温,来不间断的调节着体温^[7]。如果因某种原因导致 TRPV1 通道没有及时发出这种降温信号,则体温会不断上升。于此类似的,这也是为什么食用含有辣椒素的食物会导致流汗——大脑希望通过该方式来降低体温。最近的一项研究表明,在内脏中 TRPV1 通道也会持续的工作,通过发出降低体温的信号来不断调节体温^[8]。因此,该通道的主要功能被认为是调节体温^[9]。

最近《Cell》杂志上的一项新研究发现,没有特殊痛觉感受器的鼠存活时间更长,美国加州大学伯克利分校科学家饲养了没有痛觉感受器 TRPV1 的鼠。结果显示缺失 TRPV1 的鼠比普通鼠平均寿命长 14%,研究人员利用一种名为 antimigraine 的药物在阻断 TRPV1 下游蛋白 CGRP 后发现衰老小鼠的代谢状况明显改善。它们的新陈代谢也显示出快速和年轻迹象^[10]。还有研究小组通过基因操作,培育出容易患上胃肠道癌的实验鼠,然后给其中一些实验鼠喂食 TRPV1 受体的激动剂辣椒素,结果发现,与没有喂食辣椒素的实验鼠相比,喂食了辣椒素的实验鼠癌细胞的数目较少,肿瘤大小也较小,寿命也得到延长^[11]。另有研究观察到 TRPV1^{-/-}鼠结肠神经源性炎症减轻,癌症发作减少。因此推论其寿命延长的原因可能与抑制了炎症反应有关^[12]。

ASIC3 纯合子基因敲除小鼠显示出正常变化和疼痛相关的皮肤机械力的敏感性和炎症性疼痛的感觉,它与夜盲相关的视力丧失和与年龄引起的听力损失相关。这进一步阐明该基因在机械感知方面的作用^[13]。

ASIC3 作为一种广泛存在于痛觉传导通路上的酸敏感阳离子通道,对炎症环境中痛觉过敏的形成起着不可忽视的作用,在外周神经系统向中枢传递的必经之路——背根神经节(dorsal root ganglion, DRG)以及外周伤害性化学感受器上均发现有 ASIC3 mRNA 的持续表达,而在炎症疼痛动物模型中,伴随着痛阈的降低、痛敏的出现,ASIC3 的表达和功能明显上调^[14,15]。用敲除 ASIC3 基因的小鼠建立炎症疼痛模型,它们不再出现痛敏行为反应,

DRG 细胞的电流幅度也大大下降,这提示 ASIC3 对炎性痛敏的产生起着重要作用^[15,16]。

本实验观察到,TRPV1^{-/-}小鼠的生存概率要优于 ASIC3^{-/-}小鼠。而 TRPV1^{-/-}和 ASIC3^{-/-}都是痛觉缺失的小鼠,它们生存概率为何有差异?这提示我们与痛觉相关的这两种离子通道可能对小鼠生存的影响是不同的。目前的文献对 TRPV1 报道的较多,而对 ASIC3 受体的研究较少,在今后的工作中还需要对其机制进行进一步的研究。

参考文献:

- [1] 石宏, 吉长福, 尚红艳, 等. 与感觉相关的 ASIC3、TRPV1 基因敲除小鼠繁殖性能的观察与痛阈的比较 [J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(5): 1-4.
- [2] 徐万祥. 实验用大鼠和小鼠的最大寿命 [J]. 实验动物与比较医学, 1988(3): 163.
- [3] <http://jaxmice.jax.org/strain/003770.html> [J/OL]. 2014-06-12.
- [4] Cui M, Honore P, Zhong C, Gauvin D, et al. TRPV1 receptors in the CNS play a key role in broad-spectrum analgesia of TRPV1 antagonists [J]. J Neurosci. 2006, 26 (37): 9385-9393.
- [5] Huang SM, Bisogno T, Trevisani M, et al. An endogenous capsaicin-like substance with high potency at recombinant and native vanilloid VR1 receptors [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002, 99(12): 8400-8405.
- [6] Clapham DE. SnapShot: mammalian TRP channels [J]. Cell, 2007, 129: 220.
- [7] Gavva NR, Bannon AW, Surapaneni S, et al. The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation [J]. J. Neurosci., 2007, March, 27 (13): 3366-3374.
- [8] Steiner AA, Turek VF, Almeida MC, et al. Nonthermal activation of transient receptor potential vanilloid-1 channels in abdominal viscera tonically inhibits autonomic cold-defense effectors [J]. J Neurosci, 2007. July, 27 (28): 7459-7468.
- [9] Gavva NR. Body-temperature maintenance as the predominant function of the vanilloid receptor TRPV1 [J]. Trends Pharmacol Sci, 2008, 29 (11): 550-557.
- [10] Riera CE, Hulsing MO, Follet P, et al. TRPV1 pain receptors regulate longevity and metabolism by neuropeptide signaling [J]. Cell, 2014. 157(5):1023-1036.
- [11] de Jong PR, Takahashi N, Harris AR, et al. Ion channel TRPV1-dependent activation of PTP1B suppresses EGFR-associated intestinal tumorigenesis [J]. J Clin Invest, 2014, 124(9):3793-3806.
- [12] Vinuesa AG, Sancho R, García-Limones C, et al. Vanilloid receptor-1 regulates neurogenic inflammation in colon and protects mice from colon cancer [J]. Cancer Res, 2012, 72 (7): 1705-1716.

(下转第 89 页)

- 估模型构建 [J]. 复旦学报(医学版), 2007, 34(5):656-661.
- [10] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB 19489-2008 实验室生物安全通用要求 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2009.
- [11] Siu CF, Yuen SK, Cheung A. Burnout among public doctors in Hong Kong: cross-sectional survey [J]. Hong Kong Med J, 2012, 18(3):186-278.
- [12] Gholamzadeh S, Sharif F, Rad FD. Sources of occupational stress and coping strategies among nurses who work in Admission and Emergency Departments of Hospitals related to Shiraz University of Medical Sciences [J]. Iran J Nurs Midwifery Res, 2011, 16(1):41-47.
- [13] Cousins R, Donnell C. Nurse prescribing in general practice: a qualitative study of job satisfaction and work-related stress [J]. Fam Pract, 2012, 29(2):223-230.
- [14] Dorevitch S, Forst L. The occupational hazards of emergency physicians [J]. Am J Emerg Med, 2000, 18(3):300-311.
- [15] Xu W, Yu H, Gao W, et al. When job stress threatens Chinese workers: combination of job stress models can improve the risk estimation for coronary heart disease—the BADCAR study [J]. J Occup Environ Med, 2011, 53(7):771-776.
- [16] Kawaharada M, Saijo Y, Yoshioka E, et al. Relations of occupational stress to occupational class in Japanese civil servants—analysis by two occupational stress models [J]. Ind Health, 2007, 45(2):247-302.
- [17] 吴建华, 戴俊明, 余慧珠, 等. 上海市卢湾区 3 种不同职业人群职业紧张程度的调查 [J]. 环境与职业医学, 2007, 24(3):333-335.
- [18] 李娟, 邹建芳, 闫永建, 等. 山东省职业病专科医务人员职业紧张与职业倦怠的调查研究 [J]. 中国保健营养(中旬刊), 2012, (7):272-273.

〔修回日期〕2014-08-13

(上接第 81 页)

- [13] <http://jaxmice.jax.org/strain/013127.html>[J/OL]. 2014-06-12
- [14] Ohtori S, Inoue G, Koshi T, et al. Upregulation of acid-sensing ion channel 3 in dorsal root ganglion neurons following application of nucleus pulposus on nerve root in rats [J]. Spine, 2006, 31(18):2048-2052.
- [15] Omori M, Yokoyama M, Matsuoka Y, et al. Effects of selective spinal nerve ligation on acetic acid-induced nociceptive responses and ASIC3 immunoreactivity in the rat dorsal root ganglion [J]. Brain Res, 2008, 1219(2):26-31.
- [16] Staniland AA, McMahon SB. Mice lacking acid-sensing ion channels (ASIC) 1 or 2, but not ASIC3, show increased pain behaviour in the formalin test [J]. Eur J Pain, 2009, 13(6):554-563.

〔修回日期〕2014-09-15