

长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环变异缺失遗传特性分析及 脑缺血模型高发群体的初步培育

周好乐² 杜小燕¹ 路 静¹ 王 迎¹ 陈振文¹

(1. 首都医科大学实验动物部, 北京 10086; 2. 内蒙古医学院遗传学教研室, 呼和浩特 010059)

【摘要】 目的 研究长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环遗传特性, 并定向培育脑缺血高发种群。方法 通过对 5 代定向培育的长爪沙鼠高发群动物共 398 只动物的右侧颈总动脉结扎模型进行观察, 比较长爪沙鼠亲代与子代间脑底动脉 Willis 环的变异缺失类型, 探求其遗传特性, 并根据该遗传特性将 Willis 环后交通支缺失且前交通支缺失或细小的同类型的长爪沙鼠父母所生的子代雌雄个体配对繁殖, 定向培育长爪沙鼠半脑缺血模型高发率种群。结果 当双亲的 Willis 环类型一致时, 其子代大部分与其父母一致; 而当双亲的 Willis 环类型不一致时, Willis 环前交通支与母亲一致率为 60.4%, 前交通支与父亲的一致率为 48.2%, 两者的差异有显著性意义 ($P = 0.015$)。长爪沙鼠半脑缺血模型高发率种群定向培育 5 代后, 行单侧颈总动脉结扎时, 一侧脑缺血造模成功率由 F1 代的 40% 提高到 F5 代的 75%。结论 长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环变异有明显的遗传性, 初步培育出了长爪沙鼠半脑缺血模型高发率种群。

【关键词】 长爪沙鼠; Willis 环; 脑缺血高发模型; 定向培育

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)08-0040-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.08.010

Characterization of the Variations in the Circle of Willis in Gerbils and Selective Breeding of an Ischemia-Prone Gerbil Group

ZHOU Hao-le², DU Xiao-yan¹, LU Jing¹, WANG Ying¹, CHEN Zhen-wen¹

(1. Department of Laboratory Anima Science, Capital Medical University, Beijing 100086, China;

2. Department of Genetics, Inner Mongolia Medical College, Huhhot 010059)

【Abstract】 Objective To investigate the post-UCO (unilateral carotid occlusion) ischemic symptoms and possible correlations of anterior and posterior communicating arteries (ACoA and PCoA) patterns of the circle of Willis between parents and their progeny in gerbils and to selectively breed an ischemia-prone gerbil group. **Methods** We used 398 gerbils from five generations to develop focal cerebral ischemia after UCO, and compared the UCO ischemic symptoms and possible correlations of ACoA and PCoA patterns between parents and their progeny. The progeny which are from the parents with incomplete Willis circle were mated to selectively breed an ischemia-prone group. **Results** It was shown that if the parents had complete ACoAs, their progeny also had a complete ACoAs, and there were significant differences when the parents' ACoAs were incomplete: in 60.4% of offsprings the type of ACoA was consistent with that of their mother and in 48.2% consistent with that of their father. After selectively breeding for five generations, the proportion of UCO ischemia increased from 40% in the F1 animals to 75% in the F5 animals. **Conclusions** Variations in the circle of Willis

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (No. 30570261, 31071988); 国家科技支撑计划课题 (No. 2009BAI83B02)。

[作者简介] 周好乐 (1962-), 女, 教授, 主要研究方向: 遗传学。

[通讯作者] 陈振文 (1959-), 男, 博士, 教授, 主要从事分子遗传学研究, E-mail: czwen@sohu.com。

are of genetic nature and we have successfully established an ischemia-prone gerbil group.

【Key words】 Mongolian gerbil; Genetic character; Ischemia-prone model; Selective breeding

长爪沙鼠是源自我国的“多功能”实验动物^[1]。由于其脑底动脉环前后交通支存在不同程度的缺失,不能构成完整的 Willis 动脉环而成为天然的脑缺血动物模型,已作为研究脑缺血或脑梗塞后大脑各种基因激活与表达变化、各种神经递质的代谢变化、大脑组织的病理学变化以及脑缺血或脑梗塞治疗的理想模型得到广泛应用^[2-4]。但遗憾的是,大量研究结果显示,有这一特点的长爪沙鼠仅有(30~40)% ,换言之,只有 35% 的长爪沙鼠单侧结扎颈总动脉后出现典型脑缺血症状,成为可用的脑缺血动物模型^[5,6]。其余动物中约有一半在短时间内死亡,另一半根本无脑缺血症状产生。科学家们一直在寻找可以预测长爪沙鼠脑缺血发生情况的方法^[7-9],但到目前为止,尚不能解决由于 Willis 环变异种类多而造成单侧结扎颈总动脉脑缺血模型不稳定和不均一的问题。因此,通过动物的定向培育来降低前后交通支的变异,即培育前后交通支缺失的长爪沙鼠群体是解决问题的根本途径。本研究拟通过对长爪沙鼠亲代与子代脑底动脉 Willis 环变异缺失类型的观察,研究其前、后交通支变异情况的遗传特性。并以此为依据,定向培育长爪沙鼠脑缺血模型高发生率群体。

1 材料和方法

1.1 实验动物

长爪沙鼠(首都医科大学实验动物科学部提供) 398 只,合格证号 SCXK(京) 2000-0012,清洁级。动物自由饮水和采食,饲料购于维通利华饲料有限公司。室温为(22±2)℃,相对湿度 50%~70%,人工光照明暗各 12 h。

1.2 长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环变异缺失遗传特性分析

从刚离乳的仔沙鼠中随机选取 10 对,雌雄配对后采取长期同居法单笼饲养,待沙鼠性成熟后自然交配繁殖。当产下的第 1 窝子代成熟后,按照文献方法[5]对所有子代动物行右侧颈总动脉结扎,观察术后症状及脑缺血模型的发生率,然后心脏灌注血管铸型,解剖观察子代的 Willis 环变异缺失类型。让亲代继续繁殖第 2 和第 3 窝(第 2 窝产子数少或雌雄比例不当时生产第 3 窝),待第 2 和第 3 窝仔鼠成熟后,让同父母雌雄个体配对繁殖下一代。同时将亲代雌雄个体动物行右侧颈总动脉结扎,观察术

后症状及脑缺血模型的发生率,然后心脏灌注血管铸型,解剖观察子代的脑底动脉 Willis 环变异缺失类型,并与其子代的术后症状、脑缺血模型的发生率和 Willis 环变异缺失类型进行比较。按此方法繁殖并比较观察 5 代动物。记录所有长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环类型观察结果,然后通过对父母与子代的脑底动脉 Willis 环血管类型分析找出亲代与子代的 Willis 环变异缺失的遗传特点。

1.3 长爪沙鼠脑缺血模型高发生率培育

选取上述实验中长爪沙鼠行单侧颈总动脉结扎后脑缺血模型发生率高(>50%)、模型症状典型、亲代和子代脑底动脉 Willis 环后交通支缺失伴前交通支细小或缺失的兄妹动物进行繁殖。在保证动物连续繁殖不断代的前提下,将亲代和子代动物行右侧颈总动脉结扎,观察术后症状及脑缺血模型的发生率,然后心脏灌注血管铸型,解剖观察脑底动脉 Willis 环变异缺失类型,并将亲代与其子代的术后症状、脑缺血模型的发生率和 Willis 环变异缺失类型进行比较,从而验证所推测的遗传规律,定向培育长爪沙鼠脑缺血高发生率种群。

1.4 数据分析

使用 SPSS11.5 软件用皮尔逊检验(Pearson Chi-Square)对不同 Willis 环变异类型与父母遗传关系之间的差异,判断不同 Willis 环变异类型与父母的遗传关系有无差异。

2 结果

2.1 长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环变异缺失的遗传特性分析

通过对长爪沙鼠 F1 至 F5 代 51 对种鼠及其子代共计 398 只动物的脑底动脉 Willis 环解剖比较观察,发现长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环的变异缺失类型具有明显的遗传性。当双亲的 Willis 环前交通支都完整时,其子代均具有完整的前交通支;而当亲代存在前交通支变异时,其子代可出现多种类型的前交通支变异情况。同样子代后交通支的变异情况也与其亲代有遗传相关性。其中前交通支与母亲一致率为 60.4%,前交与父亲的一致率为 48.2%,两者的差异有显著性意义 $P = 0.015$; 后交与父母的差异没有显著性意义 $P = 0.055$ 。不同 Willis 环变异的遗传情况见表 1。

表 1 父母与子代的 Willis 环前交通支相关性

Tab. 1 The relationship of ACoAs in the parents and children

关系 Relationship	动物总数 Total number	前交通动脉(ACA)			
		一致数 Consistant number	百分率 Percentages	不一致数 Inconsistent number	百分率 Percentages
与母亲 with mother	202	122	60.4%	80	39.6%
与父亲 with father	197	95	48.2%	102	51.8%

表 2 F1 代到 F5 代长爪沙鼠的 CoW 类型和症状的分析

Tab. 2 Analysis of CoW patterns and symptoms from generations F₁ to F₅

代数 Generation	数量 Total	前交通支 ACoA		后交通支 PCoA		症状 Symptoms			
		完整 Complete	不完整 Incomplete	完整 Complete	不完整 Incomplete	无症状 Asymptomatic	闭眼 Ptosis	转圈 Circling	翻转 retroflexion
F1	20	13(65.00%)	7(35.00%)	9(45.00%)	11(55.00%)	12(60.00%)	7(35.00%)	6(30.00%)	3(15.00%)
F2	70	37(52.86%)	33(47.14%)	29(41.43%)	41(58.57%)	32(45.71%)	34(48.57%)	25(35.71%)	18(25.71%)
F3	125	56(44.80%)	69(55.20%)	40(32.00%)	85(68.00%)	46(36.80%)	72(56.00%)	69(55.20%)	63(50.40%)
F4	110	44(40.00%)	66(60.00%)	27(24.55%)	83(75.45%)	32(29.09%)	71(64.54%)	74(67.27%)	48(43.64%)
F5	73	27(36.99%)	46(63.01%)	14(19.18%)	59(80.82%)	18(24.66%)	50(68.49%)	49(67.12%)	28(38.36%)

2.2 长爪沙鼠脑缺血模型高发生率和低发生率群体的培育

随着定向培育长爪沙鼠脑缺血高发生率种群代数的增加,行单侧颈总动脉结扎时,高发种群脑缺血模型成功率随着培育代数的增加而逐渐提高,已由 F1 代的 40% 上升到 F5 代的 75% (图 1)。

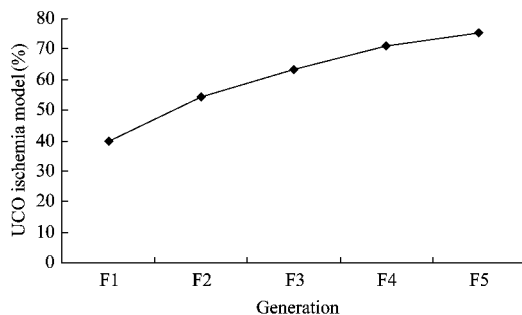


图 1 经单侧颈总动脉结扎后脑缺血模型动物中神经评分大于等于 2 的动物数随培育代数的增加而提高

Fig. 1 The percentages of UCO cerebral ischemic animals with neurological score of 2 and above were increasing with the number of breeding generations

随着定向培育代数的增加前后交通支的变异缺失也逐渐趋同,从 F1 ~ F5 代脑缺血模型高发群体脑底动脉 Willis 环变异缺失类型变化的统计结果显示: Willis 环前交通支细小或缺失率由 F1 的 35% 上升到 F5 的 63.6%; Willis 环后交通支细小或缺失率由 F1 的 45% 上升到 F5 的 77.3%。模型症状的发生率和显著成度也逐步提高(表 2)。

3 讨论

3.1 脑底动脉 Willis 环变异缺失的遗传性

由于目前还不清楚 Willis 环变异缺失的机制,科学家认为该变异与遗传有关。本实验首先进行了 Willis 环遗传特性分析,结果显示:当双亲的 Willis 环前交通支都完整时,其子代大部分具有完整的前交通支;而当亲代存在前交通支变异时,其子代可出现多种类型的前交通支变异情况;子代的个体间表型并没有明显的性别间差异;同样子代后交通支的变异情况也与其亲代有遗传相关性。统计结果显示:前交与母亲一致率为 60.4%,前交与父亲的一致率为 48.2%,两者的差异有显著性意义 $P = 0.015$ 。由此进一步证明了长爪沙鼠脑底动脉 Willis 环的变异缺失具有明显的遗传性,且前交通动脉与母亲的关系更密切。

3.2 脑缺血高发模型种群定向培育

长爪沙鼠脑底动脉解剖结构的变异导致长爪沙鼠半脑缺血模型不稳定和不均一,虽然有多个学者试图通过眼底血流等方法预测脑缺血的发生^[7-9],但并没有彻底解决这个问题。因此,本实验从定向培育高发群体入手,使长爪沙鼠群体的解剖结构趋于一致,从根本上解决长爪沙鼠脑缺血模型发生率低的问题。实验结果证明该方法具有一定的可行性,通过同父母的第一窝动物预测第二窝的缺失率,并进行定向培育半脑缺血高发生率群体,使动物右侧颈总动脉结扎后脑缺血模型的成功率由 F1 代的 40% 上升到 F5 代的 75%。通过对 F1 ~ F5 代脑缺血模型高发群体的血管类型变化及症状

变化的统计显示:前交通支细小或缺失的百分率由 F1 代的 35% 上升到 F5 代的 63.6%;后交通支细小或缺失的百分率由 F1 代的 45% 上升到 F5 代的 77.3%;造模成功率由 F1 代的 40% 上升到 F5 代的 75%。由于在群体培育中部分采用了近交方式,因此繁殖到 F4 代以后遇到了近亲交配引起的繁殖障碍,主要表现为:种鼠生育周期延长、生育能力下降、哺育能力下降和仔鼠畸形等情况,导致种群的培育过程放缓。为了克服近亲阻滞带来的不良影响,在保证脑底动脉 Willis 环的变异缺失类型相同的前提下采取回交的培育方式,本实验中采用回交方法配 7 对,均成功繁育出下一代。由于沙鼠的生活习性等问题,尚未见沙鼠成功回交的文献报道。目前为止,只有 Fujisawa 等^[10]对长爪沙鼠定向培养了癫痫敏感和低频近交系的报道。尽管在首都医科大学脑缺血高发群体中到 F5 代时脑缺血模型成功率达到 75%,但如何保持这一高发生率仍然是个问题,因此,下一步我们将(事实上我们已经开始)培育脑缺血高发的近交系长爪沙鼠,来进一步提高 Willis 环类型的一致性和单侧结扎颈总脑缺血模型的稳定性。

参考文献:

- [1] 王钜,卢静,陈振文,等.长爪沙鼠血液生理生化正常参考值的研究[J].中国实验动物学报,2004,12(2):108-111.
[2] Janac B, Selakovic V, Radenovic L. Temporal patterns of motor

behavioural improvements by MK-801 in Mongolian gerbils submitted to different duration of global cerebral ischemia [J]. Behav Brain Res, 2008, 194: 72-78.

- [3] Taguchi A, Hara A, Saito K, et al. Localization and spatiotemporal expression of IDO following transient forebrain ischemia in gerbils [J]. Brain Res, 2008, 1217: 8-85.
[4] Tu J, Karunanayaka A, Windsor A, et al. Comparison of an animal model of arteriovenous malformation with human arteriovenous malformation [J]. J Clin Neurosci, 2010, 17: 96-102.
[5] 杜小燕,杨慧,王钜,等.长爪沙鼠脑缺血模型的建立制备及脑组织中超氧化物歧化酶和丙二醛含量的测定[J].中国比较医学杂志,2006,16(11):664-667.
[6] Donadio MF, Kozlowski PB, Kaplan H, et al. Brain vasculature and induced ischemia in seizure-prone and non-seizure-prone gerbils [J]. Brain Res, 1982, 234: 263-73.
[7] Kitagawa K, Matsumoto M, Handa N, et al. Prediction of stroke-prone gerbils and their cerebral circulation [J]. Brain Res, 1989, 479: 263-269.
[8] Oostveen JA, Timby K, Williams LR. Prediction of cerebral-ischemia by ophthalmoscopy after carotid occlusion in gerbils [J]. Stroke, 1992, 23: 1588-1593.
[9] Delbarre G, Delbarre B, Barrau Y. A suitable method to select gerbils with incomplete circle of Willis [J]. Stroke, 1988, 19: 126-129.
[10] Fujisawa N, Maeda Y, Yamamoto Y, et al. Newly established low seizure susceptible and seizure-prone inbred strains of Mongolian gerbil [J]. Exp Animals, 2003, 52: 169-172.

(修回日期)2011-03-20

(上接第 34 页)

- [6] Strom J, Haggmark S, Reiz S, et al. Cardiovascular effects of pentobarbital in pigs, and the lack of response to naloxone in pentobarbital induced circulatory failure [J]. Acta Anaesthesiol Scand. 1987, 31: 413-416.
[7] 朱星红,苏炳银,应大君.版纳微型猪近亲系解剖组织学[M].北京:高等教育出版社,2004: 3:80.
[8] 冯如泉,肖福顺,李牧,陈光.中国农大小型猪经隐动脉股动脉穿刺方法[J].实验动物学,2009,26(2):54-56.
[9] 汪洋,王承利,张贺.异氟醚吸入麻醉在巴马小型猪中的应用

[J].中国比较医学杂志,2010,20:38-40.

- [10] 杨国平,唐成春,张建桥,等.芬太尼、司可林与戊巴比妥钠复合麻醉在急性心梗猪模型的应用[J].中国比较医学杂志,2007,17:154-157.
[11] 柳德斌,邵燕斌,栾秀妹,等.小型猪体外循环手术中的麻醉管理[J].山东医药,2009,49:30-32.

(修回日期)2011-03-10