

网络出版时间: 2018-2-11 11:56 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20180210.0835.017.html>

WDR1 与小鼠精神分裂样阴性症状呈正相关性

王梅¹, 王静¹, 杨中州², 高隽¹

摘要 目的 探讨海马 CA1 区条件性敲除 WDR1 与小鼠精神分裂样阴性症状的关系, 并进一步分析其潜在神经机制。方法 利用分子生物学手段, 构建海马 CA1 区的 WDR1 条件性敲除小鼠 [CA1-Cre; WDR1^{flox/flox} (CKO)] 结合做窝行为学手段、免疫荧光等实验方法观察分析 CA1 区 WDR1 在精神分裂样阴性症状中的作用。结果 ① 脑片免疫荧光的结果显示 WDR1 在 CKO 小鼠中敲除成功; ② 做窝实验结果显示: WDR1 CKO 小鼠做窝质量明显高于 WDR1^{flox/flox} 小鼠 (WT 组); ③ 培养海马神经元, 免疫荧光染色法显示, CKO 小鼠的树突棘密度明显增加。结论 实验结果表明敲除 WDR1 能够增加海马 CA1 区神经元的树突棘, 并提高小鼠做窝能力, 提示 WDR1 与小鼠精神分裂样阴性症状呈正相关。

关键词 WDR1; 海马; 精神分裂样阴性症状; 做窝

中图分类号 Q 189

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)02-0196-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.007

精神分裂症是一类以情感障碍、精神活动与周围环境不协调、脱离现实为主要特征的常见精神疾病。其终生患病率在世界范围内约为 1%^[1]。临床阴性症状较为多见, 表现为情感低落或情绪冷漠、精神性失语症、意志缺乏。阴性症状的危害不容忽视, 且相对更难治疗。WDR1 (WD repeat protein 1) 是一种 64 ku 的位于细胞质中的细胞骨架蛋白, 促进 F-actin 解聚, 参与调节树突棘的形成^[2-3]。就目前国内外的研究结果来看, 有研究者对精神分裂症患者的背外侧前额叶皮层进行蛋白质组学分析, 发现 WDR1 在该脑区的表达出现异常^[4]。虽然目前发现 WDR1 的表达在精神分裂症中有变化, 但是并没有直接证据证明海马脑区的 WDR1 与精神分裂症的关系及其调控机制。通过海马 CA1 区条件性敲除 WDR1 来观察 WDR1 与精神分裂样阴性症状的关系。

2017-11-12 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81222013、30871264)

作者单位: ¹ 南京医科大学基础医学院神经生物学系, 南京 211166

² 南京大学模式动物研究所, 南京 210093

作者简介: 王梅, 女, 硕士研究生;

高隽, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: gaojun@njmu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 材料 实验选用了两种基因工程小鼠, 均为 C57BL/6 背景: ① WDR1^{flox/flox} 小鼠是将 *loxP* 片段选择性地插入 WDR1 基因内含子中, 该小鼠由南京大学模式动物所杨中州实验室赠送; ② CA1-Cre 小鼠, 该小鼠的特点为 Cre 重组酶特异性表达于海马 CA1 区, 该品系小鼠由美国麻省理工学院 Picower 学习记忆研究所 Susumu Tonegawa 教授赠送。利用 Cre/*loxP* 技术, 将 WDR1^{flox/flox} 小鼠与 CA1-Cre 小鼠杂交, 即可得到海马 CA1 区特异性敲除 WDR1 基因的小鼠, 即 CA1-Cre; WDR1^{flox/flox} (CKO) 小鼠。行为学采用 8~10 周龄雄鼠, 20~25 g, 每天 12/12 h 昼夜交替饲养。抗体: Anti-WDR1 抗体 (美国 Protein-tech 公司); 腺相关病毒 (上海泰廷生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠基因型鉴定 小鼠出生 1 周后即可进行基因型鉴定。剪下小鼠的脚趾并编号, 将脚趾放入 1.5 ml 的离心管, 加入 500 μ l 消化液, 55 $^{\circ}$ C 烘箱中过夜消化。第 2 天消化好后振荡离心, 常温 12 000 r/min 离心 5 min, 吸取上清液 400 μ l 的消化液加入离心管, 接着加入 400 μ l 预冷的异丙醇, 充分混匀后 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min, 弃上清液, 加入 500 μ l 75% 乙醇混合振荡, 4 $^{\circ}$ C 或常温 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液, 再加入 500 μ l 100% 无水乙醇混匀, 4 $^{\circ}$ C 或常温 12 000 r/min 离心 1 min。然后弃去上清液, 倒置晾干, 最后加入 80~120 μ l 灭菌水溶解, 放入 -4 $^{\circ}$ C 保存, DNA 提取完毕。每个 PCR 过程采取 20 μ l 体系 (2 μ l 模板 DNA, 1 μ l 引物, 7 μ l 水及 10 μ l 的混合 taq 酶), 放入 PCR 仪中进行扩增。结束后放入琼脂糖凝胶中电泳, 在孔中加入 DNA marker, 跑胶完成后用凝胶成像系统观察条带有无及位置。引物序列: WDR1-F: 5'-GGACCTTCTAAGCAGTTACAACC-3'; WDR1-R: 5'-TTGCACAGAGGTGAATGACAGAG-3'。Camk2-Cre-F: 5'-TGCCACGACCAAGTGACAGCAATG-3'; Camk3-Cre-R: 5'-ACCAGAGACGGAAATCCATCGCTC-3'。

1.2.2 做窝实验 做窝实验是用于评价啮齿类动物筑窝能力的方法,其可以反映出动物的冷漠样情绪。实验具体步骤如下:首先,晚上 20:00(熄灯)之前 1 h 将实验小鼠笼搬至安静清洁的房间,再将小鼠单笼单只放置,笼内添有充足的水、食物以及 6 片正方形紧密压制的脱脂棉片。然后,用标签详细记录小鼠的组别、编号,将其贴至笼子的边缘。最后,每隔 2、4、6、12 h 观察小鼠筑窝情况,并用相机拍照进行记录。根据小鼠做窝的不同情况,对其做窝行为进行评分,并对得分进行比较,具体的评分标准如下:5 分:95% 的脱脂棉被撕碎,窝形完美,立体感强,高度高于小鼠身高 50%;4 分:95% 的脱脂棉被撕碎,窝形扁平,高度不足小鼠身高 50%;3 分:大部分棉片被撕碎,但形状不规则,无法辨认出一个窝;2 分:小部分棉片被撕碎;1 分:95% 以上的棉片保持完好。见图 1。

1.2.3 海马神经元体外培养 手术器械高压灭菌。准备预冷的 HBSS 缓冲液及 37 °C 预热的 0.25% 胰酶、Neurobasal 培养基。用 P0 新生鼠,冰上取脑后,放入 4 °C 预冷的 HBSS 缓冲液中解剖分离出海马组织。将组织剪碎后加入 0.25% 胰酶 37 °C 消化 5 min,在此期间可轻柔振荡几次。消化结束后,用含有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液终止消化反应,将其轻轻吹打混匀至细胞完全分散,室温下 1 000 r/min 离心 10 min。吸去上清液,根据沉淀的细胞量加入 300 μ l 左右的 DMEM 培养液重新悬浮细胞,取上述细胞悬液适当稀释后用细胞计数板进行计数。将所需密度的神经元接种于多聚-D-赖氨酸氢溴酸盐包被过的 24 孔板中,轻晃培养板使其混匀,置于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中培养。24 h 后换 Neurobasal 培养液,第 3 天加入 10 μ mol/L 阿糖胞苷来抑制胶质细胞的生长,以后每 2~3 d 半定量换液。

1.2.4 神经元细胞转染病毒及免疫荧光实验 神经元培养到 7~9 d 时,转染 GFP 腺相关病毒 2 μ l (AAV-CMV-bG-eGFP,滴度: 2.24×10^{10})。体外继续培养到 18~21 d 时进行实验。室温下,将细胞用 4% 多聚甲醛固定 20 min,用封闭液(3% BSA +

0.3% Triton X-100) 封闭 1 h,封闭完成后加入配制好的一抗孵育液 4 °C 过夜。次日 4 °C 取出后室温孵育 30 min,然后用 PBS/T 漂洗,洗去一抗后加入相应的荧光二抗,室温下避光孵育 2 h,再用 PBS 漂洗。在载玻片上滴加防荧光淬灭剂,将带有细胞的一面贴到载玻片上,用滤纸吸干多余液体,指甲油封边后置于暗盒中保存。染好后的细胞贴片用奥林巴斯激光共聚焦显微镜采集图像。

1.3 统计学处理 实验中的数据记录后用 Excel 进行整理分析,再用 Origin 8.5 进行作图与统计,以 $\bar{x} \pm s$ 的形式表示。做窝质量评分比较使用 One-sided t-test,其他实验使用 Student t-test 统计方法, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 WDR1 条件性敲除小鼠的基因型鉴定 为了研究 WDR1 与精神分裂症的关系,实验利用 Cre/loxP 技术构建了 WDR1 基因条件性敲除小鼠,将 CA1-Cre 小鼠与 WDR1^{flox/flox} 小鼠(简称 WT 小鼠)杂交,子代中 loxP 位点就有概率在 Cre 重组酶的作用下将 4 号外显子切除,得到 CA1-Cre; WDR1^{flox/flox} 小鼠(简称 CKO 小鼠),见图 2A。首先,对 WT 小鼠和 CKO 小鼠进行了初步的外观观察,发现出生 2 个月后的 CKO 小鼠和 WT 小鼠在外形上没有明显的区别,见图 2B。接着通过海马脑片免疫荧光实验验证敲除效率,结果表明 CKO 小鼠的海马组织中 WDR1 的荧光强度明显降低($t = 6.509$, $P < 0.001$, $n = 4$),见图 2C、D。表明 WDR1 在海马 CA1 区敲除成功。

2.2 WDR1 敲除后小鼠精神分裂样阴性症状减弱

冷漠情绪是精神分裂症阴性症状的一种常见症状,做窝实验能够评价小鼠是否有冷漠样情绪。WT 组($n = 8$)与 CKO 组($n = 8$)小鼠做窝质量在 2 h 时差异无统计学意义,但是在以后的 4、6、12 h 时,CKO 组小鼠做窝评分明显高于 WT 组($t = -1.922$ 、 -2.335 、 -2.274 , $P = 0.029$ 、 0.038 、 0.042)。说明海马 CA1 区敲除 WDR1 使小鼠更不容易产生冷漠样情绪。见图 3。



图 1 小鼠做窝实验的评分标准

A: 1 分; B: 2 分; C: 3 分; D: 4 分; E: 5 分

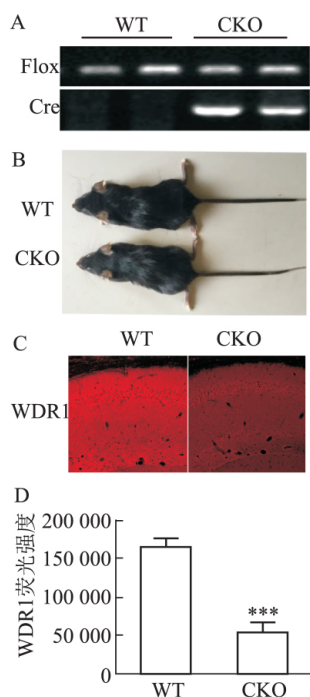


图2 WDR1 条件性敲除小鼠的鉴定

A: WT 与 CKO 组小鼠基因型鉴定结果; B: WT 组与 CKO 组小鼠外观比较; C: 两组小鼠海马脑片免疫荧光实验结果 $\times 20$; D: 免疫荧光结果统计; 与 WT 组比较: *** $P < 0.001$

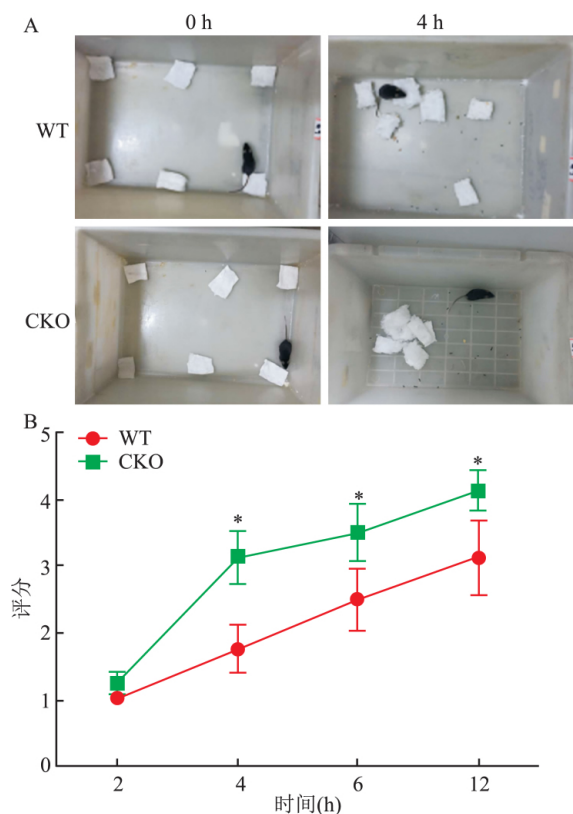
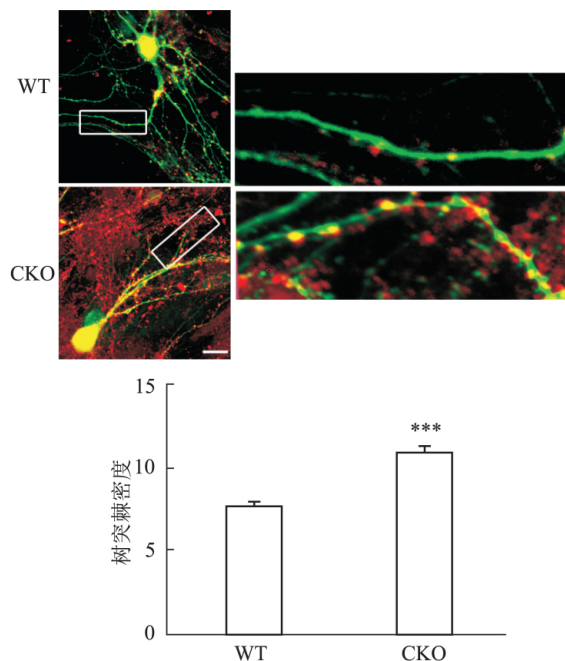


图3 不同时间点小鼠做窝质量评分

A: 两组小鼠分别在 0、4 h 做窝照片; B: A 中做窝评分统计; 与 WT 组比较: * $P < 0.05$

2.3 WDR1 敲除后树突棘明显增多 WDR1 能够促进 actin 的解聚, 进而减少树突棘密度, 而树突棘减少是精神分裂症的主要神经病理改变, 提示在海马中敲除 WDR1 可能对精神分裂症产生影响。通过海马神经元原代培养、病毒转染及免疫荧光染色的方法, 观察 CKO 小鼠树突棘的形态变化。结果显示 WDR1 敲除后, CKO 组小鼠相比于 WT 组, 神经元的树突棘明显增多 ($n = 23$, $t = 6.906$, $P < 0.001$)。表明海马 CA1 区敲除 WDR1 可以增加树突棘密度, 提示 WDR1 与精神分裂样阴性症状呈正相关性。见图 4。

图4 海马 CA1 区敲除 WDR1 后神经元树突棘增加 免疫荧光 $\times 180$

A: 两组小鼠海马神经元共聚焦照片; B: 两组小鼠神经元树突棘密度统计; 与 WT 组比较: *** $P < 0.001$

3 讨论

精神分裂症的阴性症状在行为方面表现为失语症、意志力下降、快感缺乏和无法正常表达情感, 在认知方面则表现为记忆力减退、执行能力下降、注意力不能集中、语言能力和阅读能力降低以及社会认知能力受损, 严重影响了个人的身心健康和生活质量甚至可能危及个人的生命安全。近年来, 越来越多的证据表明 WDR1 与精神分裂症有着密切的关系, 有学者对 1 162 例欧美样本的全基因组进行关联分析, 发现 WDR1 基因与精神分裂症的发病年龄相关性很大^[5]。也有研究^[6]显示在精神分裂症患者的前额叶皮层中 WDR1 蛋白表达增加。

WDR1 影响 actin ,促进 F-actin 解聚 ,进而影响树突棘的形成 ,使树突棘减少。在海马 CA1 区条件性敲除 WDR1 后 ,小鼠海马中锥体神经元的树突棘增加。海马被公认为在记忆形成中起到核心作用 ,但有研究^[7]表明在精神分裂症患者中海马的结构和功能也是异常的。通过对精神分裂症患者死后的脑组织进行检测 ,结果显示神经元树突棘的减少是最常见的神经病理改变 ,并且这种改变出现在海马齿状层、额叶皮层、初级视觉皮层和颞叶皮层等多个脑区^[8]。海马 CA1 区条件性敲除 WDR1 小鼠的树突棘明显增加。做窝实验是用来评价啮齿类动物的筑窝能力的行为学模型 ,可以反映出动物的冷漠情绪 ,目前做窝实验是一种可以广泛用来评价啮齿类动物精神分裂样阴性症状的动物模型^[9]。在做窝模型中 ,CKO 小鼠在做窝质量评价中也获得更高的得分 ,表现出更好的做窝能力。上述结果提示 ,WDR1 与精神分裂样阴性症状有着密切的联系。

目前对于精神分裂症的研究 ,越来越重视海马脑区在其中的作用。海马被公认为在学习记忆中有重要的作用。目前很多研究^[10]显示在精神分裂症患者中海马结构及功能异常。在精神分裂症发病初期 ,海马体积缩小。除宏观的变化 ,有研究^[11]显示精神分裂症患者的一些脑局部微观结构改变 ,海马的锥体细胞体积变小、密度增加 ,提示轴突发育过程中的突触删除以及树突棘密度减少^[12]。类似的微观结构改变在前额叶、丘脑等其他脑区也有出现。除了树突棘密度的改变之外 ,突触的传递也会影响精神分裂症。突触蛋白是一种与突触结构和功能密切相关的蛋白 ,在突触的形成与传递中也起着重要作用^[13] ,那么很可能 WDR1 同样也可以通过调节海马脑区树突棘密度及突触传递来对精神分裂症产生影响。

综上所述 ,实验结果表明 WDR1 很可能是通过影响 actin 进而改变树突棘的密度 ,最终调控精神分裂症的阴性症状 ,能够为 WDR1 与精神分裂样阴性症状呈正相关提供直接证据 ,即减弱冷漠样情绪的

表型。实验结果为以后研究精神分裂症提出了一个新的思路 ,WDR1 缺失可能能够改善精神分裂症的阴性症状 ,也为精神分裂症的临床治疗提供了一个新的潜在治疗靶点。

参考文献

- [1] van Os J , Kapur S. Schizophrenia [J]. *Lancet* , 2009 , 374 (9690) : 635 - 45.
- [2] Lei W , Omotade O F , Myers K R , et al. Actin cytoskeleton in dendritic spine development and plasticity [J]. *Curr Opin Neurobiol* , 2016 , 39 : 86 - 92.
- [3] Adler H J , Sanovich E , Brittan-Powell E F , et al. WDR1 presence in the songbird basilar papilla [J]. *Hear Res* , 2008 , 240 (1 - 2) : 102 - 11.
- [4] Glessner J T , Reilly M P , Kim C E , et al. Strong synaptic transmission impact by copy number variations in schizophrenia [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* , 2010 , 107 (23) : 10584 - 9.
- [5] Wang K S , Liu X , Zhang Q , et al. Genome-wide association analysis of age at onset in schizophrenia in a European-American sample [J]. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* , 2011 , 156B (6) : 671 - 80.
- [6] Martins-de-Souza D , Gattaz W F , Schmitt A , et al. Prefrontal cortex shotgun proteome analysis reveals altered calcium homeostasis and immune system imbalance in schizophrenia [J]. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* , 2009 , 259 (3) : 151 - 63.
- [7] Hall J , Whalley H C , Marwick K , et al. Hippocampal function in schizophrenia and bipolar disorder [J]. *Psychol Med* , 2010 , 40 (5) : 761 - 70.
- [8] Moyer C E , Shelton M A , Sweet R A. Dendritic spine alterations in schizophrenia [J]. *Neurosci Lett* , 2015 , 601 : 46 - 53.
- [9] Pedersen C S , Sorensen D B , Parachikova A I , et al. PCP-induced deficits in murine nest building activity: employment of an ethological rodent behavior to mimic negative-like symptoms of schizophrenia [J]. *Behav Brain Res* , 2014 , 273 : 63 - 72.
- [10] Heckers S. Neuroimaging studies of the hippocampus in schizophrenia [J]. *Hippocampus* , 2001 , 11 (5) : 520 - 8.
- [11] Lewis D A , Sweet R A. Schizophrenia from a neural circuitry perspective: advancing toward rational pharmacological therapies [J]. *J Clin Invest* , 2009 , 119 (4) : 706 - 16.
- [12] Meyer-Lindenberg A. From maps to mechanisms through neuroimaging of schizophrenia [J]. *Nature* , 2010 , 468 (7321) : 194 - 202.
- [13] Gitler D , Takagishi Y , Feng J , et al. Different presynaptic roles of Synapsins at excitatory and inhibitory synapses [J]. *J Neurosci* , 2004 , 24 (50) : 11368 - 80.

WDR1 positively correlated with schizophrenia-like negative symptoms

Wang Mei¹ , Wang Jing¹ , Yang Zhongzhou² , et al

(¹Dept of Neurobiology , Nanjing Medical University , Nanjing 211166; ²Model Animal Research Center and MOE Key Laboratory of Model Animals for Disease Study , Nanjing University , Nanjing 210093)

Abstract Objective To investigate the relationship between the conditional knockout WDR1 in the hippocampal CA1 region and schizophrenia-like negative symptoms in mice , and to analyze the underlying neural mechanisms.

姜黄素联合干扰素- β /维甲酸对乳腺癌细胞的协同效应

葛素侠¹, 任敏¹, 查晓军², 吴晓东¹

摘要 目的 研究姜黄素和干扰素- β /维甲酸(IFN- β /RA)联合用药对人乳腺癌细胞 MCF-7 的生长抑制效应,探讨姜黄素和 IFN- β /RA 联合用药的合理性及科学性。方法 实验分组如下:对照组(加培养基)、姜黄素组(40 $\mu\text{mol/L}$)、IFN- β /RA 组(IFN- β 750 U/ml, RA 1.5 $\mu\text{mol/L}$)、姜黄素联合 IFN- β /RA 组(姜黄素 40 $\mu\text{mol/L}$, IFN- β 375 U/ml, RA 0.75 $\mu\text{mol/L}$)。分别处理乳腺癌细胞 MCF-7,采用 MTT 法检测细胞活性,采用 Annexin-V/PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡情况。结果 姜黄素和 IFN- β /RA 联合用药可显著抑制乳腺癌 MCF-7 细胞增殖,同时诱导细胞凋亡,这种作用强于单药($P < 0.05$),表现为协同作用。结论 姜黄素联合 IFN- β /RA 对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖具有更强的抑制作用,并能促进细胞凋亡,具有协同作用。

关键词 姜黄素; 干扰素- β ; 维甲酸; 乳腺癌; MCF-7

中图分类号 R 737.9

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2018)02-0200-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2018.02.008

干扰素- β (interferon- β , IFN- β)联合维甲酸(retinoic acid, RA)是目前已知的能够抑制乳腺癌细胞生长的药物,但目前乳腺癌细胞对于 IFN- β /RA 药

物的敏感性逐渐下降,抵抗性逐渐增强^[1]。为解决这一问题笔者选择 IFN- β /RA 与其他药物联合治疗。姜黄素是从植物姜黄根茎中提取出来的一种多酚类化合物,许多研究^[2]已证实姜黄素具有抗肿瘤活性,并被用于许多恶性肿瘤包括乳腺癌的治疗。但目前关于姜黄素和 IFN- β /RA 联合用药在乳腺癌细胞中的研究鲜有文献报道,因此该研究旨在探讨两者联合用药对乳腺癌细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料 人类乳腺癌细胞系(Michigan cancer foundation 7, MCF-7)购自中科院上海细胞生物研究所细胞库; IFN- β 购自美国 Millipore 公司; RA、姜黄素、MTT 购自美国 Sigma 公司; 膜联素 V/碘化丙啶(Annexin V /propidium iodide, Annexin V/PI)细胞凋亡试剂盒购自美国 BioVision 公司; 胎牛血清购自上海 Excell 公司; DMEM 培养基(高糖)购自美国 Hyclone 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将人类乳腺癌 MCF-7 细胞用含有 10% 胎牛血清、1% 双抗(100 U/ml 青霉素、100 $\mu\text{g/ml}$ 链霉素)的 DMEM 培养基,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内培养,实验取对数生长期细胞。

1.2.2 MTT 法检测细胞活性 将细胞以 10^4 个/孔分别接种到 96 孔板中,每孔体积 200 μl ,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱内培养。细胞贴壁后分别加入相应药物,分组如下:对照组(加培养基)、姜黄素组

2017-10-27 接收

基因项目: 安徽省自然科学基金(编号: 1608085MH238)

作者单位: ¹ 安徽医科大学第一附属医院乳腺外科, 合肥 230022

² 安徽医科大学基础医学院生物化学与分子生物学实验室, 合肥 230032

作者简介: 葛素侠,女,硕士研究生;

任敏,男,副教授,副主任医师,硕士生导师,责任作者,

E-mail: 455639300@qq.com

Methods By means of molecular biology, conditional knockout(CKO) mice with CA1-specific deletion of WDR1 by Cre-loxp system(CA1-Cre; WDR1^{fllox/fllox}), combined with nest building behavioral analysis, cell biology assay and immunohistochemistry to analyze the role of WDR1 in negative-like symptoms of schizophrenia. **Results** ① Slices immunofluorescence showed WDR1 decreased in WDR1 CKO mice; ② Nest building behavioral test results showed that the nest quality was significantly higher in CKO mice than WDR1^{fllox/fllox} mice(WT group); ③ Cell immunofluorescence showed that dendritic spine density was significantly increased in CKO mice. **Conclusion** WDR1 deficiency could increase the number of dendritic spines of neurons in hippocampal CA1 region and improve the ability of nest building, suggesting that WDR1 is negatively correlated with the schizophrenia-like negative symptoms.

Key words WDR1; hippocampus; schizophrenia-like negative symptoms; nest building