



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110964803 A
(43)申请公布日 2020.04.07

(21)申请号 201911171046.9

(22)申请日 2019.11.26

(71)申请人 深圳市人民医院
地址 518000 广东省深圳市罗湖区东门北路1017号大院

(72)发明人 胡继良 胡启东 王浩 项威 王俊

(74)专利代理机构 广州京诺知识产权代理有限公司 44407

代理人 肖金艳

(51)Int.Cl.
C12Q 1/6883(2018.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

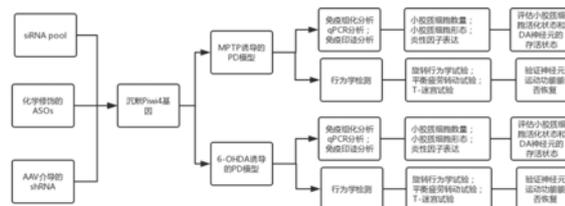
权利要求书2页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法

(57)摘要

一种Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,通过siRNA pool、化学修饰的ASOs、AAV介导的shRNA三种途径对第一实验组、第二实验组和第三实验组的小鼠进行Piwi4基因沉默,然后分别建立MPTP诱导的PD模型和6-OHDA诱导的PD模型,其后分别通过免疫组化技术、qPCR技术和免疫印迹分析技术对对照组、第一实验组、第二实验组、第三实验组的样本进行分析,获得实验数据,利用SPSS等统计分析软件对数据进行分析验证,从而可用于验证Piwi4基因沉默对PD模型神经炎症和神经元存活的影响,从而可为改善PD、治疗PD提供一种全新的思路。



1. 一种Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在于,其包括以下步骤:
随机选取若干只成年小鼠,将其分成对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组;
利用siRNA pool、化学修饰的ASOs、AAV介导的shRNA三种途径分别靶向沉默第一实验组、第二实验组和第三实验组小鼠的Piwi4基因,其中,第一实验组采用siRNA pool途径,第二实验组采用化学修饰的ASOs途径,第三实验组采用AAV介导的shRNA;
使用药物诱导对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组中的小鼠建立PD模型;
处死对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组中的部分PD模型,冰上取PD模型的脑部,并制作出冷冻切片;
分别对对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组的冷冻切片进行染色以评估小胶质细胞活化状态,并用TH免疫法评估黑质DA神经元的存活状态;
将对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组中剩余PD模型的黑质从其脑部分离出来,其后从黑质中分离出神经胶质细胞,提取总RNA和蛋白质;
通过qPCR和免疫印迹法分析Piwi4和炎症因子的表达。
2. 如权利要求1所述的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在于,所述炎症因子包括I1-1 β 、I1-6、Tnf和Nos2。
3. 如权利要求1所述的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在于,使用药物诱导建立PD模型时,所述药物包括MPTP和6-OHDA,所述PD模型包括MPTP诱导的PD模型和6-OHDA诱导的PD模型。
4. 如权利要求3所述的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在于,所述MPTP的注射浓度为16mg/kg,所述6-OHDA的注射量为8ug。
5. 如权利要求1所述的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在于,所述小鼠选用成年雄性C56BL/6小鼠或C57BL/6小鼠。
6. 如权利要求1所述的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在于,利用siRNA pool途径靶向沉默第一实验组小鼠的Piwi4基因时,将靶向Piwi4的Accell siRNA pool或对照siRNA立体定向注射到第一实验组的各小鼠的黑质中。
7. 如权利要求1所述的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在于,利用ASOs途径靶向沉默第二实验组小鼠的Piwi4基因时,其包括以下步骤:
设计若干不同浓度的靶向Piwi4的化学修饰后的Piwi4-ASOs,在BV-2细胞中进行剂量依赖性分析;
通过qPCR和免疫印迹法,从若干个Piwi4-ASOs中选取效果最佳的3~4个Piwi4-ASOs;
将选取出的Piwi4-ASOs分别注射到第二实验组小鼠的黑质中,靶向沉默第二实验组小鼠的Piwi4基因。
8. 如权利要求1所述的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在于,利用AAV介导的shRNA靶向沉默第三实验组小鼠的Piwi4基因时,其包括以下步骤:
构建若干种AAV-MSP-EGFP-Piwi4-shRNA构建体,并分别转染BV-2细胞;
检测Piwi4在LPS处理下的表达;
选取表达效果最好的3种AAV-MSP-EGFP-Piwi4-shRNA构建体,将其包装到AAV6病毒中;

将3种AAV6病毒分别注射到第三实验组小鼠的黑质中以靶向沉默第三实验组小鼠的Piwi4基因。

9. 如权利要求1所述的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在於,对所述对照组、第一实验组、第二实验组的冷冻切片进行染色时,进行Iba-1和Tmem119染色,对第三实验组的冷冻切片进行染色时,进行Iba-1+EGFP双染色和Tmem119+EGFP双染色。

10. 如权利要求1所述的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在於,其还包括对第三实验组的冷冻切片上的EGFP和OX42进行双重染色以检测shRNA是否能在小胶质细胞中特异表达。

11. 如权利要求1所述的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在於,在处死对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组中的部分PD模型之前,用阿扑吗啡对对照组、第一实验组、第二实验组、第三实验组的各PD模型进行腹腔注射,然后对各PD模型进行行为学检测,以验证PD模型的Piwi4基因表达紊乱时,PD模型的运动功能能否恢复。

12. 如权利要求10所述的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在於,所述行为学检测包括用于检测各PD模型的病变程度的旋转行为学试验、用于检测各PD模型的认知功能的T-迷宫实验、用于检测各PD模型的运动协调性的平衡疲劳转动棒试验中的一种或多种。

Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法

【技术领域】

[0001] 本发明涉及基因技术领域,特别涉及一种Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法。

【背景技术】

[0002] 帕金森病(Parkinson's disease,PD)是一种常见的神经系统变性疾病,老年人多见,平均发病年龄为60岁左右,40岁以下起病的青年帕金森病较少见。帕金森病最主要的病理改变是中脑黑质多巴胺(dopamine,DA)能神经元的变性死亡,由此而引起纹状体DA含量显著性减少而致病。导致这一病理改变的确切病因目前仍不清楚,遗传因素、环境因素、年龄老化、氧化应激等均可能参与PD多巴胺能神经元的变性死亡过程。

[0003] 当前治疗PD手段主要是药物治疗和电极植入术(DBS)。药物治疗,一类是直接补充多巴胺前体或抑制DA降解或延长多巴胺在脑内的停留时间,主要有多巴胺替代物多巴丝肼片、左旋多巴的增效剂司来吉兰、恩他卡片。一类为多巴胺受体激动剂,受体激动剂能模拟内源性DA,通过刺激突触后DA受体,减少自由基的形成,保护存活的黑质神经元,代表为溴隐亭、普拉克索。另一类为抗胆碱药物,代表药物苯海索(安坦),通过抑制纹状体内毒覃碱样ACh能神经元的活性和输出,使纹状体DA和ACh两大递质保持相对平衡而发挥治疗作用。这些药物使用都只能是部分有效,而且副作用非常多,如嗜睡、水肿、精神异常、幻觉额冲动控制障碍等。而且随着治疗时间的延长,疗效越来越差,不能改善患者的生活质量。对于中晚期PD以及长期药物治疗已经出现药物疗效减退和严重并发症者,脑深部电刺激(DBS)是可行的一种手术治疗方法。该项技术是采用立体定向的方法在脑内某一特殊位置植入电极,发放弱电脉冲,刺激控制运动的相关神经核团,抑制异常电活动的发放和传导,以减轻PD的临床症状。但昂贵的手术费用和严格的适用征限制了它的应用,术后需要频繁的调整电极参数,并需要配合药物治疗来改善症状,大多数仍然是部分改善症状。由此可见,当前缺乏针对PD行之有效的治疗方法。

[0004] 小胶质细胞是具有先天免疫功能的神经胶质细胞,能够对中枢神经系统中各种损伤做出反应。在静息状态下,它在神经元存活和突触稳态方面有重要作用,并且能够检测局部微环境,一旦检测到脑组织损伤,小胶质细胞将迅速被激活,形态发生剧烈变化,增殖加快,促进促炎和抗炎因子的释放,从而修复损伤部位。另一方面,小胶质细胞的过渡和长期激活将引起神经毒性因子如肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、活性氧(ROS)、一氧化氮(NO)和前列腺素的大量释放而损伤神经组织。黑质中富含小胶质细胞,这些小胶质细胞是如何通过神经炎症来损伤神经元?是否可以通过抑制小胶质细胞的神经炎症来缓解神经元的损伤,从而来缓解PD?

【发明内容】

[0005] 本发明旨在解决上述问题,而提出一种Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其用于验证在PD模型中沉默Piwi4基因能否抑制小胶质细胞介导的神经炎症,以增加

DA神经元的存活率,为改善PD、治疗PD探索新方向。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供了一种Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,其特征在于,其包括以下步骤:

[0007] 随机选取若干只成年小鼠,将其分成对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组;

[0008] 利用siRNA pool、化学修饰的ASOs、AAV介导的shRNA三种途径分别靶向沉默第一实验组、第二实验组和第三实验组小鼠的Piwi4基因,其中,第一实验组采用siRNA pool途径,第二实验组采用化学修饰的ASOs途径,第三实验组采用AAV介导的shRNA;

[0009] 使用药物诱导对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组中的小鼠建立PD模型;

[0010] 处死对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组中的部分PD模型,冰上取PD模型的的脑部,并制作出冷冻切片;

[0011] 分别对对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组的冷冻切片进行染色以评估小胶质细胞活化状态,并用TH免疫法评估黑质DA神经元的存活状态;

[0012] 将对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组中剩余PD模型的黑质从其脑部分离出来,其后从黑质中分离出神经胶质细胞,提取总RNA和蛋白质;

[0013] 通过qPCR和免疫印迹法分析Piwi4和炎症因子的表达。

[0014] 进一步地,所述炎症因子包括I1-1 β 、I1-6、Tnf和Nos2。

[0015] 进一步地,使用药物诱导建立PD模型时,所述药物包括MPTP和6-OHDA,所述PD模型包括MPTP诱导的PD模型和6-OHDA诱导的PD模型。

[0016] 进一步地,所述MPTP的注射浓度为16mg/kg,所述6-OHDA的注射量为8ug。

[0017] 进一步地,所述小鼠选用成年雄性C56BL/6小鼠或C57BL/6小鼠。

[0018] 进一步地,利用siRNA pool途径靶向沉默第一实验组小鼠的Piwi4基因时,将靶向Piwi4的Accell siRNA pool或对照siRNA立体定向注射到第一实验组的各小鼠的黑质中。

[0019] 进一步地,利用ASOs途径靶向沉默第二实验组小鼠的Piwi4基因时,其包括以下步骤:

[0020] 设计若干不同浓度的靶向Piwi4的化学修饰后的Piwi4-ASOs,在BV-2细胞中进行剂量依赖性分析;

[0021] 通过qPCR和免疫印迹法,从若干个Piwi4-ASOs中选取效果最佳的3~4个Piwi4-ASOs;

[0022] 将选取出的Piwi4-ASOs分别注射到第二实验组小鼠的黑质中,靶向沉默第二实验组小鼠的Piwi4基因。

[0023] 进一步地,利用AAV介导的shRNA靶向沉默第三实验组小鼠的Piwi4基因时,其包括以下步骤:

[0024] 构建若干种AAV-MSP-EGFP-Piwi4-shRNA构建体,并分别转染BV-2细胞;

[0025] 检测Piwi4在LPS处理下的表达;

[0026] 选取表达效果最好的3种AAV-MSP-EGFP-Piwi4-shRNA构建体,将其包装到AAV6病毒中;

[0027] 将3种AAV6病毒分别注射到第三实验组小鼠的黑质中以靶向沉默第三实验组小鼠

的Piwi4基因。

[0028] 进一步地,对所述对照组、第一实验组、第二实验组的冷冻切片进行染色时,进行Iba-1和Tmem119染色,对第三实验组的冷冻切片进行染色时,进行Iba-1+EGFP双染色和Tmem119+EGFP双染色。

[0029] 进一步地,其还包括对第三实验组的冷冻切片上的EGFP和OX42进行双重染色以检测shRNA是否能在小胶质细胞中特异表达。

[0030] 进一步地,在处死对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组中的部分PD模型之前,用阿扑吗啡对对照组、第一实验组、第二实验组、第三实验组的各PD模型进行腹腔注射,然后对各PD模型进行行为学检测,以验证PD模型的Piwi4基因表达紊乱时,PD模型的运动功能能否恢复。

[0031] 进一步地,所述行为学检测包括用于检测各PD模型的病变程度的旋转行为学试验、用于检测各PD模型的认知功能的T-迷宫实验、用于检测各PD模型的运动协调性的平衡疲劳转动棒试验中的一种或多种。

[0032] 本发明的有益贡献在于,其有效解决了上述问题。本发明分别通过siRNA pool、化学修饰的ASOs、AAV介导的shRNA三种途径对第一实验组、第二实验组和第三实验组的小鼠进行Piwi4基因沉默,然后分别建立MPTP诱导的PD模型和6-OHDA诱导的PD模型,其后分别通过免疫组化技术、qPCR技术和免疫印迹分析技术对对照组、第一实验组、第二实验组、第三实验组的样本进行分析,获得实验数据,其后便可利用SPSS等统计分析软件对数据进行分析验证,从而可对下述问题进行分析验证:

[0033] 1、siRNA pool、化学修饰的ASOs、AAV介导的shRNA是否能够有效的在PD模型体内抑制由炎症诱导的Piwi4的表达;

[0034] 2、通过抑制Piwi4基因的表达能否减轻黑质中小胶质细胞的激活;

[0035] 3、沉默Piwi4基因能否增强DA神经元的存活;

[0036] 4、当Piwi4基因表达紊乱时,PD模型的运动功能能否恢复。

[0037] 本发明的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,可用于验证Piwi4基因沉默对PD模型神经炎症和神经元存活的影响,从而可为改善PD、治疗PD提供一种全新的思路。

【附图说明】

[0038] 图1是本发明的方法流程图。

[0039] 图2是本发明的对照组、第一实验组、第二实验组、第三实验组与Piwi4基因沉默途径及PD模型的对应关系示意图。

【具体实施方式】

[0040] 下列实施例是对本发明的进一步解释和补充,对本发明不构成任何限制。

[0041] 申请人在研究中首次发现,Piwi4基因可以共同激活小胶质细胞转录因子NF- κ B和AP-1的促炎反应,并发现脂多糖(LPS)处理的小胶质细胞能够特异诱导Piwi4基因表达,随后通过激活转录因子NF- κ B和AP-1促进炎症基因表达,而Piwi4基因高表达于神经炎症小鼠模型的大脑黑质中,参与小鼠体内小胶质细胞的激活,因此,申请人设想,在PD模型中沉默Piwi4是否能够抑制小胶质细胞介导的神经炎症,并增加DA神经元的存活率,以改善

PD,为治疗PD提供一种新思路。为验证申请人的上述观点,因而提出本发明的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,该方法包括以下步骤(如图1~图2所示):

[0042] 一、实验动物分组:

[0043] 选取若干只成年雄性C56BL/6或C57BL/6小鼠,按照随机分组原则将其分为:对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组。其中,所述对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组中的小鼠数量可根据需要而设置,其优选为数量一致,本实施例中,每组各12只小鼠。实验全过程对小鼠的喂养及取材均遵照实验动物管理与保护的有关政策和规定。

[0044] 二、靶向沉默Piwil4基因:

[0045] 对照组的各小鼠不进行基因敲除,其用于进行实验对照;

[0046] 第一实验组的小鼠利用siRNA pool途径靶向沉默Piwil4基因;

[0047] 第二实验组的小鼠利用ASOs(反义寡核苷酸)途径靶向沉默Piwil4基因;

[0048] 第三实验组的小鼠利用AAV(腺相关病毒)介导的shRNA途径靶向沉默Piwil4基因;

[0049] 采用三种途径靶向沉默Piwil4基因,以此来分析验证沉默Piwil4基因能否有效抑制小胶质细胞介导的神经炎症,并增加DA神经元的存活率,改善PD,从而为治疗PD提供一定的实验依据。

[0050] 利用siRNA pool途径靶向沉默Piwil4基因:将靶向Piwil4的Accell™ siRNA pool或对照siRNA立体定向注射到第一实验组的各小鼠的黑质中,以靶向沉默Piwil4基因;其中,靶向Piwil4的Accell™ siRNA pool或对照siRNA试剂购买自赛默飞世尔科技(Dharmacon®)。对照siRNA为阴性对照,其与Piwil4基因没有明显的同源性。本实施例中,第一实验组中的小鼠,一半数量的小鼠注射靶向Piwil4的Accell™ siRNA pool,一半数量的小鼠注射对照siRNA。

[0051] 利用ASOs途径靶向沉默Piwil4基因:

[0052] 1、设计若干不同浓度的靶向Piwi4的化学修饰后的Piwi4-ASOs,在BV-2细胞中进行剂量依赖性分析;本实施例中,优选设置8个不同浓度的Piwi4-ASOs;

[0053] 2、通过qPCR和免疫印迹法,从8个Piwi4-ASOs中选取沉默效果最佳的前3~4个Piwi4-ASOs;本实施例中,选取沉默效果最佳的前3个Piwi4-ASOs,其分别标记为Piwi4-ASOs 1、Piwi4-ASOs 2、Piwi4-ASOs 3。

[0054] 3、将选取出的3个Piwi4 ASOs分别注射到第二实验组小鼠的黑质中,靶向沉默第二实验组小鼠的Piwi4基因;本实施例中,第二实验组小鼠共12只,分别随机选取4只小鼠注射同一个Piwi4-ASOs,即,3个Piwi4-ASOs,每个Piwi4-ASOs对应4只实验小鼠。

[0055] 利用AAV介导的shRNA途径靶向沉默Piwil4基因:

[0056] 1、构建若干种AAV-MSP-EGFP-Piwi4-shRNA构建体,并分别转染BV-2细胞,然后检测Piwi4在LPS处理下的表达;本实施例中,

[0057] 2、选取表达效果最好的前3种AAV-MSP-EGFP-Piwi4-shRNA构建体,将其包装到AAV6病毒中,将其分别标记为AAV6-1、AAV6-2、AAV6-3;

[0058] 4、将AAV6病毒分别注射到第三实验组小鼠的黑质中以靶向沉默第三实验组小鼠的Piwi4基因。本实施例中,第三实验组的小鼠共12只,分别随机选取4只小鼠注射同一种AAV6病毒,即,3种不同构建体包装的AAV6病毒——AAV6 1、AAV6 2、AAV6 3,每种分别有4只实验小鼠。

[0059] 上述步骤1中,AAV-MSP-EGFP-Piwi4-shRNA构建体通过以下方式进行构建:为Piwi4基因设计若干条作用于不同区域的shRNA,多个shRNA质粒中至少有1个确保有明显的抑制作用.MSP启动子启动shRNA,EGFP作为报告基因。

[0060] 三、建立PD模型

[0061] 将对照组、第一实验组、第二实验组、第三实验组中的各小鼠,分别选取同等数量的小鼠建立MPTP诱导的PD模型和6-OHDA诱导的PD模型。本实施例中,每组中各有6只MPTP诱导的PD模型,6只6-OHDA诱导的PD模型。

[0062] 所述MPTP诱导的PD模型是指对小鼠注射MPTP(1-甲基-4-苯基-1,2,3,6-四氢吡啶)以诱导小鼠引起神经元毒性,其具体方法为:每两小时向小鼠腹腔注射16mg/kg MPTP,总共注射4次,以引起急性神经元毒性。

[0063] 所述6-OHDA诱导的PD模型是指对小鼠注射6-OHDA(6-羟基多巴胺氢溴酸盐)以诱导小鼠引起神经元毒性,其具体方法为:将8ug 6-OHDA单侧注射到小鼠纹状体,以引起绝缘侧黑质中的DA神经元逐渐耗竭。

[0064] 为获取足够详尽的实验数据,本实施例中,经前述三种途径靶向沉默Piwi4基因的小鼠及对照组的小鼠,均分别建立同等数量的MPTP诱导的PD模型和6-OHDA诱导的PD模型。

[0065] 具体的,第一实验组中的6只已注射Accell™ siRNA pool的小鼠,3只建立成MPTP诱导的PD模型,3只建立成6-OHDA诱导的PD模型,第一实验组中的6只已注射对照siRNA的小鼠,3只建立成MPTP诱导的PD模型,3只建立成6-OHDA诱导的PD模型。第二实验组中的4只已注射Piwi4-ASOs 1的小鼠,2只建立成MPTP诱导的PD模型,2只建立成6-OHDA诱导的PD模型;第二实验组中的4只已注射Piwi4-ASOs 2的小鼠,2只建立成MPTP诱导的PD模型,2只建立成6-OHDA诱导的PD模型,第二实验组中的4只已注射Piwi4-ASOs 3的小鼠,2只建立成MPTP诱导的PD模型,2只建立成6-OHDA诱导的PD模型。其他实验组,以此类推,其详细情况可参考附图2。

[0066] 三、行为学检测

[0067] 建立PD模型2周后,用阿扑吗啡对对照组、第一实验组、第二实验组、第三实验组的各小鼠进行腹腔注射,然后观察并记录小鼠的行为学变化。本实施例中,阿扑吗啡的注射浓度为0.5mg/kg。

[0068] PD模型的病变程度,通过旋转行为学试验进行检验。

[0069] PD模型的运动协调性,通过平衡疲劳转动棒试验进行检验。

[0070] PD模型的认知功能,通过T-迷宫实验进行评估。

[0071] 所述旋转行为学试验、平衡疲劳转动棒试验、T-迷宫实验的具体实验步骤,可参考公知技术,本实施例不具体介绍。

[0072] 记录下各PD模型的行为学实验数据后,通过统计学软件对数据进行分析,从而可用于验证:当Piwi4基因表达紊乱时,PD模型的运动功能能否恢复。

[0073] 四、免疫组化分析

[0074] 冰冻切片:

[0075] 分别从对照组、第一实验组、第二实验组、第三实验组中随机选取部分6-OHDA诱导的PD模型和MPTP诱导的PD模型进行处死,然后于冰上取PD模型的脑部,冷冻保存备用,其后

用冰冻切片机制取冰冻切片。

[0076] 其中, MPTP诱导的PD模型于注射MPTP后三天后进行处死。6-OHDA诱导的PD模型于注射6-OHDA后七天后处死。

[0077] 为全面进行实验分析, 本实施例中, 分别从对照组、第一实验组、第二实验组、第三实验组中选取一半数量的PD模型进行处死, 剩余一半数量的PD模型用于后续分析。相应的, MPTP诱导的PD模型和6-OHDA诱导的PD模型也各选取一半数量。例如, 对于第一实验组, 12只PD模型, 选取6只PD模型处死, 其中, 3只MPTP诱导的PD模型, 3只6-OHDA诱导的PD模型, 其中, 3只MPTP诱导的PD模型, 部分为注射Accell1TM siRNA pool进行基因沉默的小鼠, 部分为注射对照siRNA进行基因沉默的小鼠。其他实验组, 依次类推, 该步骤中处死的PD模型, 包括了部分未进行Piwi4基因沉默和以各种途径进行Piwi4基因沉默的MPTP诱导的PD模型和6-OHDA诱导的PD模型。

[0078] 处死PD模型的步骤可参考公知技术, 本实施例中, 其通过下列步骤完成: 选取PD模型后, 依次称重, 并以10%水合氯醛腹腔麻醉后, 于心腔内先后灌注生理盐水及4%多聚甲醛内固定, 然后在冰上给予断头取脑, 取出脑组织置于4%多聚甲醛溶液中4℃过夜固定, 再分别由配好的20%蔗糖溶液、30%蔗糖溶液梯度依次脱水, 擦干脑组织表面液体后将脑组织置于-80℃冰箱保存备用。

[0079] 冰冻切片的制备可参考公知技术, 本实施例中, 其通过下列步骤完成: 取出-80℃冰箱保存的PD模型脑组织, 参照小鼠脑立体定位图谱, 用刀片对PD模型脑组织底部进行修整至平整, 调整冰冻切片机至切片厚度20μm, 保持切片机内操作温度为-20℃, 进行小鼠脑冠状连续切片, 用细针粘取冰冻切片按前后次序置于盛有0.01mol/L PBS的6孔板中, 最后剥离皮层部位丢弃。

[0080] 分析:

[0081] 对对照组、第一实验组和第二实验组的PD模型制成的冰冻切片进行Iba-1和Tmem119染色来评估小胶质细胞活化状态, 用TH免疫染色法来评估黑质DA神经元的存活状态。对小胶质细胞活化状态和DA神经元存活状态的评估, 可从小胶质细胞数量、小胶质细胞形态等方面进行评估。

[0082] 对第三实验组的PD模型制成的冰冻切片的EGFP和OX42进行双重染色, 检测shRNA是否能在小胶质细胞中特异性表达。其后, 进行EGFP+Iba-1双染色和Tmem119+EGFP双染色来评估小胶质细胞PiwiL4 (EGFP+Piwi14) 的特异性敲除效果及小胶质细胞的激活程度, 用EGFP+TH免疫染色法来评估黑质DA神经元的存活状态。

[0083] 其中, TMEM119是一种细胞表面蛋白, 同时也是鼠源和来源小胶质细胞的特异性标记物, 其特点是其不在巨噬细胞或其他免疫/神经细胞上表达, 其不同于其他小胶质细胞标记物。通过Tmem119染色可用于评估小胶质细胞活化状态。

[0084] Iba-1, 离子钙结合衔接分子1, 是小胶质细胞和巨噬细胞特异性的钙结合蛋白, 参与激活的小胶质细胞的细胞膜皱褶形成和吞噬作用。通过Iba-1染色可用于评估小胶质细胞的活化状态。

[0085] 其中, Iba-1和Tmem119染色步骤, 可参考公知技术, 本实施例不具体介绍。

[0086] 用TH免疫染色法评估黑质DA神经元的存活状态, 可参考公知技术, 例如: 将已剥离皮层的冰冻切片用PBST冲洗3次, 加入TH一抗(1:2000), 置于4℃摇床孵育过夜后, 用PBST冲

洗3次(5min/次),加山羊抗兔荧光二抗(1:500),室温锡纸包裹避光并摇床孵育2h后,用PBST冲洗3次(5min/次)。冲洗后避光贴片至载玻片,使冰冻切片周围自然干燥,用70%甘油磷酸盐缓冲液进行封片盖上盖玻片,置于4℃冰箱保存备用。其后取出已制好的模片,置于荧光显微镜下,在镜下观察PD模型脑组织切片黑质中AAV病毒转染表达情况,并观察TH阳性细胞的染色情况,参照小鼠脑解剖图谱,于100倍镜下确定黑质边界,在400倍镜下对TH阳性细胞按固定顺序进行计数,最后计算出每套冰冻切片TH阳性细胞数。

[0087] 五、qPCR和免疫印迹分析

[0088] 将对照组、第一实验组、第二实验组和第三实验组中剩余PD模型的黑质从其脑部分离出来,其后从黑质中分离出神经胶质细胞,提取总RNA和蛋白质,通过qPCR和免疫印迹法分析Piwi4和炎症因子的表达,通过对小胶质细胞激活标记物和DA神经元标志物的qPCR和免疫印迹法分析,对RAN和蛋白质进行分析。

[0089] 剩余PD模型中,包括了部分未进行Piwi4基因沉默和以各种途径进行Piwi4基因沉默的MPTP诱导的PD模型和6-OHDA诱导的PD模型。

[0090] 所述炎症因子包括I1-1 β 、I1-6、Tnf和Nos2。

[0091] 将剩余PD模型的黑质从其脑部分离出来以提取总RNA和蛋白质的步骤,可参考公知技术。本实施例中,其可通过以下步骤提取总RNA:将剩余PD模型以10%水合氯醛腹腔麻醉后断头取脑,快速于冰上取左侧黑质组织,称重后分别置于脱酶EP管中,EP管需提前经湿热灭菌,每个EP管中分别加入Trizol液(1ml/100mg),置于冰上预冷,研磨棒研磨组织至肉眼可见组织块,静置5min,然后每管加入200 μ L的氯仿剧烈震荡30s后室温静置5min,置于4℃离心机以12000r/min转速离心15min;用标枪吸取上清液转移至新的EP管中,根据上清液量加入等体积的异丙醇混匀,室温静置10min后,再次置于4℃离心机以12000r/min转速离心15min,弃去上清液,缓慢加入与异丙醇等量的75%预冷乙醇溶解RNA,轻柔晃动,置于4℃离心机以12000r/min转速离心5min,弃上清后,空气中自然晾干RNA沉淀15min,待RNA沉淀颜色变透明时,加入20 μ l DEPC水溶解,取溶解后的RNA 1 μ l用DEPC水稀释100倍后,置紫外分光光度仪测RNA质量及OD260/OD280值,OD比值在1.8~2.0之间为纯RNA。将提取的纯RNA置于-80℃冰箱保存。

[0092] qPCR和免疫印迹分析的具体步骤,可参考公知技术,本实施例不具体介绍。

[0093] 通过上述分组实验,分别通过siRNA pool、化学修饰的ASOs、AAV介导的shRNA三种途径对第一实验组、第二实验组和第三实验组的小鼠进行Piwi4基因沉默,然后分别建立MPTP诱导的PD模型和6-OHDA诱导的PD模型,其后分别通过免疫组化技术、qPCR技术和免疫印迹分析技术对对照组、第一实验组、第二实验组、第三实验组的样本进行分析,获得实验数据,其后便可利用SPSS等统计分析软件对数据进行分析验证,从而可对下述问题进行分析验证:

[0094] 1、siRNA pool、化学修饰的ASOs、AAV介导的shRNA是否能够有效的在PD模型体内抑制由炎症诱导的Piwi4的表达;

[0095] 2、通过抑制Piwi4基因的表达能否减轻黑质中小胶质细胞的激活;

[0096] 3、沉默Piwi4基因能否增强DA神经元的存活;

[0097] 4、当Piwi4基因表达紊乱时,PD模型的运动功能能否恢复。

[0098] 本发明的Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法,可用于验证Piwi4基因沉

默对PD模型神经炎症和神经元存活的影响,从而可为改善PD、治疗PD提供一种全新的思路。

[0099] 尽管通过以上实施例对本发明进行了揭示,但是本发明的范围并不局限于此,在不偏离本发明构思的条件下,以上各构件可用所属技术领域人员了解的相似或等同元件来替换。

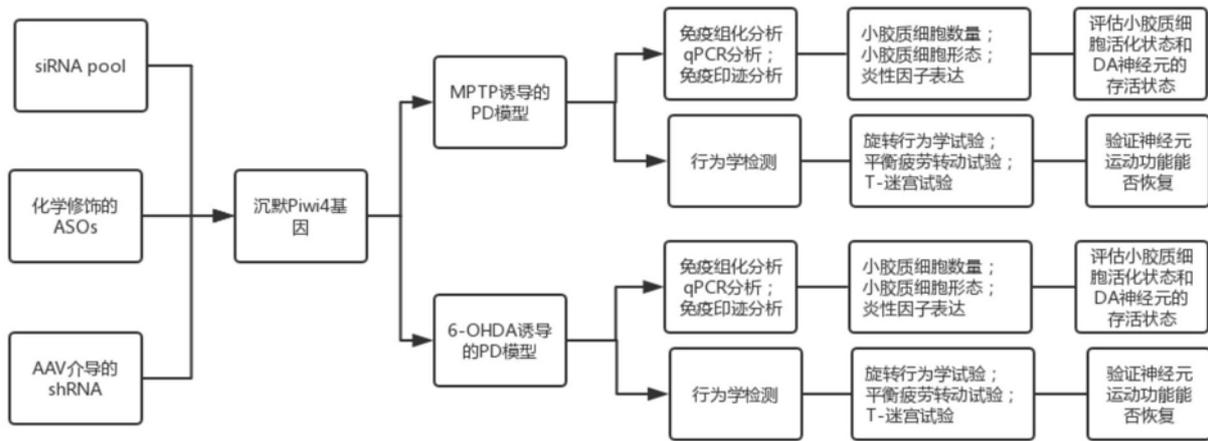


图1

| 实验组 | 沉默途径 | 沉默参数 | 建立PD模型 |
|-------|---------------|---------------------|---------------|
| 对照组 | 不沉默 | | MPTP诱导的PD模型 |
| | | | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| 第一实验组 | siRNA pool途径 | AccellTM siRNA pool | MPTP诱导的PD模型 |
| | | AccellTM siRNA pool | MPTP诱导的PD模型 |
| | | AccellTM siRNA pool | MPTP诱导的PD模型 |
| | | AccellTM siRNA pool | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | AccellTM siRNA pool | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | AccellTM siRNA pool | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | 对照siRNA | MPTP诱导的PD模型 |
| | | 对照siRNA | MPTP诱导的PD模型 |
| | | 对照siRNA | MPTP诱导的PD模型 |
| | | 对照siRNA | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | 对照siRNA | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | 对照siRNA | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| 第二实验组 | ASOs途径 | Piwi4 ASOs 1 | MPTP诱导的PD模型 |
| | | Piwi4 ASOs 1 | MPTP诱导的PD模型 |
| | | Piwi4 ASOs 1 | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | Piwi4 ASOs 1 | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | Piwi4 ASOs 2 | MPTP诱导的PD模型 |
| | | Piwi4 ASOs 2 | MPTP诱导的PD模型 |
| | | Piwi4 ASOs 2 | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | Piwi4 ASOs 2 | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | Piwi4 ASOs 3 | MPTP诱导的PD模型 |
| | | Piwi4 ASOs 3 | MPTP诱导的PD模型 |
| | | Piwi4 ASOs 3 | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | Piwi4 ASOs 3 | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| 第三实验组 | AAV介导的shRNA途径 | AAV6 1 | MPTP诱导的PD模型 |
| | | AAV6 1 | MPTP诱导的PD模型 |
| | | AAV6 1 | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | AAV6 1 | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | AAV6 2 | MPTP诱导的PD模型 |
| | | AAV6 2 | MPTP诱导的PD模型 |
| | | AAV6 2 | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | AAV6 2 | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | AAV6 3 | MPTP诱导的PD模型 |
| | | AAV6 3 | MPTP诱导的PD模型 |
| | | AAV6 3 | 6-OHDA诱导的PD模型 |
| | | AAV6 3 | 6-OHDA诱导的PD模型 |

图2

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN110964803A | 公开(公告)日 | 2020-04-07 |
| 申请号 | CN201911171046.9 | 申请日 | 2019-11-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 深圳市人民医院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 深圳市人民医院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 深圳市人民医院 | | |
| [标]发明人 | 胡继良 胡启东 王浩 项威 王俊 | | |
| 发明人 | 胡继良 胡启东 王浩 项威 王俊 | | |
| IPC分类号 | C12Q1/6883 G01N33/53 G01N33/68 | | |
| CPC分类号 | C12Q1/6883 C12Q2600/158 G01N33/53 G01N33/6893 G01N2800/2835 | | |
| 代理人(译) | 肖金艳 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

一种Piwi4基因沉默对PD模型神经影响的实验方法，通过siRNA pool、化学修饰的ASOs、AAV介导的shRNA三种途径对第一实验组、第二实验组和第三实验组的小鼠进行Piwi4基因沉默，然后分别建立MPTP诱导的PD模型和6-OHDA诱导的PD模型，其后分别通过免疫组化技术、qPCR技术和免疫印迹分析技术对对照组、第一实验组、第二实验组、第三实验组的样本进行分析，获得实验数据，利用SPSS等统计分析软件对数据进行分析验证，从而可用于验证Piwi4基因沉默对PD模型神经炎症和神经元存活的影响，从而可为改善PD、治疗PD提供一种全新的思路。

