hypertrophy[J]. Cardiovasc Res, 2012, 93(4): 563 – 572.
[3] Papageorgiou N, Tousoulis D, Androulakis E, et al. The role of microRNAs in cardiovascular disease[J]. Curr Med Chem, 2012, 19(16): 2605 – 2610.
[4] Fiedler J, Thum T. MicroRNAs in myocardial infarction[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013, 33(2): 201 – 205.
[5] Pan ZW, Lu YJ, Yang BF. MicroRNAs: a novel class of potential therapeutic targets for cardiovascular diseases[J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(1): 1 – 9.
[6] 周世权,张艳炜,董秋实,等. miRNA 与心脑血管病研究进展[J]. 中国公共卫生, 2014, 30(3): 378 – 380.
[7] Matteucci E, Giampietro O. Proposal open for discussion: defining agreed diagnostic procedures in experimental diabetes research[J]. J Ethnopharmacol, 2008, 115(2): 163 – 172.
[8] Sayed D, Hong C, Chen IY, et al. MicroRNAs play an essential role in the development of cardiac hypertrophy[J]. Circ Res, 2007, 100(3): 416 – 424.
[9] 刘洁婷,李洪志,吴丹,等. 糖尿病心肌病与 miR – 1/miR – 206 和胰岛素样生长因子表达的关系[J]. 中国生化药物杂志, 2012, (33)4: 389 – 391.
[10] Xu XD, Song XW, Li Q, et al. Attenuation of microRNA – 22 derepressed PTEN to effectively protect rat cardiomyocytes from hypertrophy[J]. J Cell Physiol, 2012, 227(4): 1391 – 1398.
[11] Duisters RF, Tijsen AJ, Schroen B, et al. miR-133 and miR-30 regulate connective tissue growth factor: implications for a role of microRNAs in myocardial matrix remodeling[J]. Circ Res, 2009, 104(2): 170 – 178.
[12] Guo R, Hu N, Kandadi MR, et al. Facilitated ethanol metabolism promotes cardiomyocyte contractile dysfunction through autophagy in murine hearts[J]. Autophagy, 2012, 8(4): 593 – 608.
[13] Pan W, Zhong Y, Cheng C, et al. MiR-30-regulated autophagy mediates angiotensin II-induced myocardial hypertrophy[J]. PLoS One, 2013, 8(1): e53950.
[14] Pan Z, Sun X, Shan H, et al. MicroRNA-101 inhibited postinfarct cardiac fibrosis and improved left ventricular compliance via the FBJ osteosarcoma oncogene/transforming growth factor-beta 1 pathway[J]. Circulation, 2012, 126(7): 840 – 850.
[15] Busk PK, Cirera S. MicroRNA profiling in early hypertrophic growth of the left ventricle in rats[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 396(4): 989 – 993.

收稿日期: 2013 – 08 – 13 (解学魁编辑 郑新校对)

中国公共卫生 CPH

· 实验研究 ·

叶酸代谢基因缺失对 ALS 线虫运动能力影响*

苟芸,黄国伟,樊丽宇,罗素慧,刘欢,张绪梅

摘 要:目的 了解 5 – 甲酰四氢叶酸环连接酶(Y106G6E. 4)、蛋氨酸合成酶(R03D7. 1)和四氢叶酸脱氢酶(Dao-3)基因突变对肌萎缩侧索硬化症(ALS)秀丽隐杆线虫运动能力的影响。**方法** 通过与 N2 株系杂交获得单拷贝 G85R: YFP 雄虫,分别与 VC2322(Y106G6E. 4)、RB755(R03D7. 1)和 VC1197(Dao-3)突变株系回交,单线虫 PCR 法鉴定后代三突变基因纯合性,荧光鉴定超氧化物歧化酶 Sod1(G85R)基因纯合的双突变体,光镜下观察双突变体在 NGM 平板上的爬行距离及在 M9 培养液中的摆动次数。**结果** 成功构建了 G85R/VC2322、G85R/RB755 和 G85R/VC1197 三个双突变体,经 PCR 和荧光鉴定表明其相应的基因型均为纯合型;与 ALS 模型线虫比较,双突变体线虫 G85R/VC2322、G85R/RB755 和 G85R/VC1197 每分钟摆动次数[(14. 6 ± 2. 39)、(17. 4 ± 2. 23)、(10. 2 ± 1. 64)]和相对爬行距离[(22. 25 ± 3. 59)、(23. 25 ± 3. 30)、(21. 5 ± 2. 07)]均减小,且差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 体内叶酸代谢相关基因改变将进一步损伤 ALS 线虫的运动能力,为深入探讨叶酸代谢途径在 ALS 发生发展中的作用奠定基础。

关键词: 秀丽隐杆线虫;肌萎缩侧索硬化症;超氧化物歧化酶 1;叶酸
中图分类号: R 383. 1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-0580(2014)08-1046-04 DOI: 10. 11847/zgggws2014-30-08-19

Effects of folate metabolism-related gene deletion on motor ability in ALS *C. elegans*

GOU Yun, HUANG Guo-wei, FAN Li-yu, et al (*Department of Nutrition and Food Hygiene, School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin* 300070, China)

Abstract: Objective To construct a double mutants of 5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase (Y106G6E. 4), methionine synthase (R03D7. 1), and 5, 10-methenyl-tetrahydrofolate synthetase (Dao-3) and G85R::YFP and to detect motor ability of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) after folate metabolism-related gene deletion. **Methods** *C. elegans* was cultured in nematode growth medium (NGM) agar plates. Hermaphrodites of G85R::YFP strain were hybridized with N2 males to obtain the G85R mutant males; then G85R mutant males were backcrossed to VC2322 (Y106G6E. 4), RB755 (R03D7. 1), and VC1197 (Dao-3), respectively. Y106G6E. 4, R03D7. 1 and Dao-3 homozygous genotypes of the progenies were identified with single worm PCR. Then the hermaphrodites with

* **基金项目:** 国家自然科学基金(81373003; 30901192)
作者单位: 天津医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学系,天津 300070
作者简介: 苟芸(1990 –),女,甘肃陇南人,硕士在读,研究方向:营养与神经退行性疾病。
通讯作者: 张绪梅,E-mail: zhangxumei@ tijmu. edu. cn
数字出版日期: 2014 – 6 – 24 09: 10
数字出版网址: http://www. cnki. net/kcms/detail/21. 1234. R. 20140627. 0939. 010. html

the homozygous genotypes were self-fertilized. Superoxide dismutase 1 (Sod1) gene was identified with fluorescence intensity. Crawling distance on the plates and thrashing times in liquid media of the *C. elegans* with all double mutants were observed. **Results**　Double mutants were successfully constructed. PCR and fluorescene test showed that the mutant worms had the corresponding homozygous genotypes. Compared with ALS *C. elegans*, both thrash times in liquid media (14.6 ± 2.39, 17.4 ± 2.23, and 10.2 ± 1.64) and crawling distance on the plates (22.25 ± 3.59, 23.25 ± 3.30, and 21.5 ± 5.07) were decreased in G85R/VC2322, G85R/RB755 and G85R/VC1197 double mutants. The differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion**　Double mutants could be obtained by hydridization in *C. elegans*. Folate-related metabolic changes might cause damage to motor ability of ALS worms, suggesting that folate metabolism may play an important role during the initiation and progression of ALS.

Key words: *Caenorhabditis elegans*; amyotrophic lateral sclerosis; superoxide dismutase 1; folate

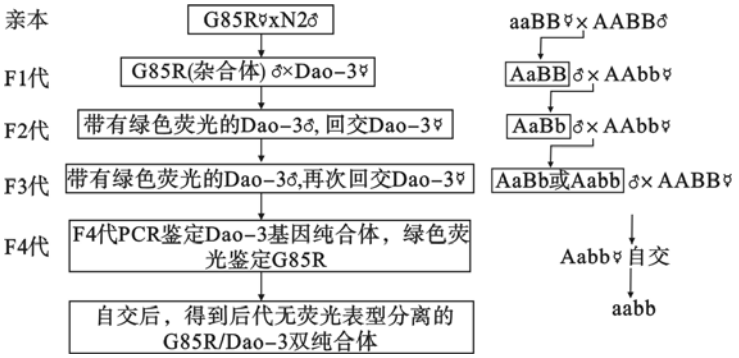
肌萎缩侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis, ALS)是一种进行性、致死性的运动神经元疾病,至今尚无有效治愈手段[1]。研究发现,约有20%的家族性 ALS 病例以及2%散发病例是由超氧化物歧化酶基因(superoxide dismutase 1, Sod1)显性突变导致[2]。G85R 是 Sod1 基因点突变的一种,线虫转 G85R-Sod1 基因后可导致神经突触泡生物生成和转运紊乱而出现运动能力减弱[3]。此外,有证据表明叶酸在 ALS 的预防和治疗方面表现出积极的作用,如叶酸单独用药及叶酸和维生素 B_{12} 联合用药能够显著降低 G93A-Sod1 ALS 模型小鼠血浆同型半胱氨酸(homocysteine, Hcy)的水平,延缓疾病的发生和延长模型小鼠的生存时间[4]。本研究将分别构建 G85R-Sod1:YFP 与叶酸代谢相关5-甲酰四氢叶酸环连接酶(5-formyltetrahydrofolate cyclo-ligase, Y106G6E.4)、蛋氨酸合成酶(methionine synthase, R03D7.1)和四氢叶酸脱氢酶(5,10-methenyl-tetrahydrofolate synthetase, Dao-3)基因缺失的双突变体并检测各突变体的运动能力,以明确叶酸代谢在 ALS 线虫病理发展中的作用。

1　材料与方法

1.1　实验对象　野生型秀丽隐杆线虫(*C. elegans*, the Bristol strain, N2)株系,尿嘧啶渗漏突变型大肠杆菌 OP50, G85R-Sod1:YFP 为人突变型 Sod1 转基因线虫模型由 Johns Hopkins University, Dr. Wang 惠赠,本实验室保存。VC2322(Y106G6E.4), RB755(R03D7.1)和 VC1197(Dao-3)突变株系购自美国 Caenorhabditis Genetics Center。

1.2　秀丽隐杆线虫培养　线虫的培养使用线虫标准培养基(nematode growth medium, NGM)。使用 E. coli OP50 作为线虫食物。线虫于生化培养箱培养,培养温度为 20 ℃。

1.3　G85R/VC2322、G85R/RB755、G85R/VC1197 双突变体株系构建　每次分别挑取 8 只 N2 雄虫与 5 只 G85R::YFP 雌雄同体线虫放入同一个培养皿中进行交配培养。3 d 后取带有绿色荧光 F1 雄虫,分别与 VC2322、RB755 和 VC1197 雌雄同体线虫交配,此次交配计为回交 1 次(×1),将 F2 代(含有 YFP)雄性线虫再次分别回交 VC2322、RB755、VC1197(×2),得到 F3 雄虫(含有 YFP),再次分别回交 VC2322、RB755、VC1197(×3),将 F4(含有 YFP)线虫进行 PCR 鉴定分别得到 Y106G6E.4、R03D7.1 和 Dao-3 基因纯合的突变体。以上基因的纯合体雌雄同体自交,最后通过荧光强度鉴定,得到同时为双拷贝 Sod1 基因纯合的双突变体。线虫交配具体流程图和遗传图如图 1 所示(以 G85R/VC1197 双突变体构建为例)。



注:A:Sod1 基因;B:Dao-3 基因;a:Sod1 突变基因;b:Dao-3 突变基因。

图 1　双突变体构建流程和遗传图

1.4　单线虫基因组 PCR 鉴定

1.4.1　单线虫基因组 DNA 提取　挑取 1 只线虫放入 20 μL 含蛋白酶 K(终浓度为 250 μg/mL)的裂解缓冲液(配方:50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-

HCl(pH 8.3),2.5 mmol/L $MgCl_2$,0.45% Nonidet P-40,0.45% Tween 20)中,于 50 ℃水浴 15 min、90 ℃水浴 10 min、4 ℃保存。裂解的线虫溶液可作为 PCR 扩增的模板。

1.4.2　引物设计　在 wormbase(http://www.wormbase.org/)上分别找到 Y106G6E.4、R03D7.1 和 Dao-3 基因序列,用 primer 3 软件设计相应基因的 PCR 扩增引物。Dao-3 引物:P1:gctcacgctcaaaacatgaa,P2:tcttctcatcactcccccac;R03D7.1 引物:P1:cgaggatgaaggagttccag,P2:ctgatgcagctggaagcata;Y106G6E.4 引物:P1:cacctcggaaggctagaatgc,P2:ccgatccctgacgatatcaa。

1.4.3　PCR 反应　线虫 PCR 反应同常规 PCR。95 ℃预变性 5 min,后 94 ℃ 30 s,58 ℃ 45 s,72 ℃ 120 s 进行 30 个循环,72 ℃ 10 min。凝胶成像分析系统将电泳后的琼脂糖凝胶拍照并分析。

1.4.4　线虫运动能力检测　将线虫转移到已接种有 OP50 新的 NGM 平板上,转移后线虫将在短时间内具有最大的移动距离。用录像方法记录每个线虫转移后 30 s 的活动距离,计算移动距离/身长比值作为其移动指数。将处于 L4 幼虫期的线虫转移到 20 ℃条件下 M9 缓冲液(每升缓冲液含有 3 g KH_2PO_4,6 g Na_2HPO_4,5 g NaCl,1 mL 1 mmol/L MgSO4),让其适应 1 min 后,计数在 1 min 内线虫身体在缓冲液中的摆动次数。

1.5　统计分析　采用 SPSS 16.0 软件进行单因素方差分析,若组间差异有统计学意义,各组间两两比较采用 SNK-q 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$。

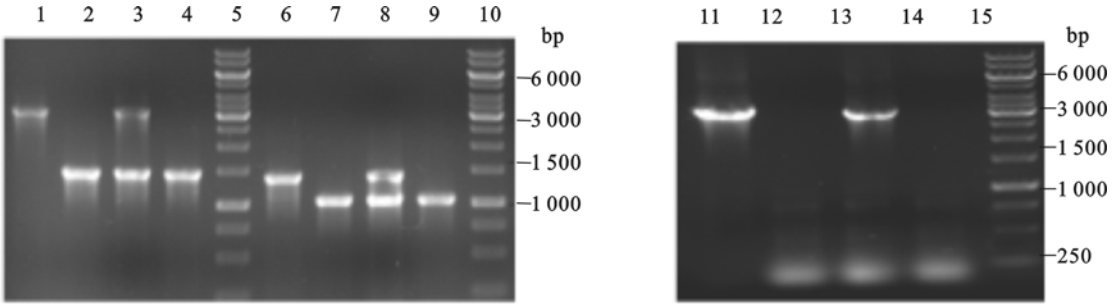
2　结　果

2.1　G85R/VC1197、G85R/VC2322、G85R/RB755 双突变体 Sod1 基因鉴定(图 2)　通过观察杂交 F4 代个体的绿色荧光强弱判断双突变体中 Sod1 基因的拷贝情况,Leica MZ16F 体式显微镜下荧光鉴定结果如图 2,强荧光为双拷贝 Sod1 基因纯合体,弱荧光为单拷贝的基因杂合体。

注:左图为 Sod1 双拷贝基因纯合体,右图为 Sod1 单拷贝的杂合体。

图 2　Leica MZ16F 体式显微镜下杂交 F4 代个体 Sod1 基因的荧光鉴定(63 ×,50 ms)

2.2　Y106G6E.4、R03D7.1 和 Dao-3 基因的单线虫基因组 PCR 鉴定(图 3)　将 F4 代带有绿色荧光的雌雄同体个体进行单线虫 PCR 鉴定。预期 Dao-3 基因缺失突变体的扩增片段 1 515 bp,野生型片段大小 3 014 bp;Y106G6E.4 基因缺失突变体的扩增片段 1 077 bp,野生型片段大小 1 445 bp;R03D7.1 突变体的扩增片段 230 bp,野生型片段大小 3 182 bp。如图 3 所示,以上 3 个基因野生型、突变型和杂合型扩增片段均与预期扩增片段大小一致。



注:野生型、突变体亲本、F4 代杂合个体、F4 代纯合个体 Dao-3 基因扩增片段泳道为 1、2、3、4,Y106G6E.4 基因扩增片段泳道为 6、7、8、9,R03D7.1 基因扩增片段泳道为 11、12、13、14,DNA marker 泳道为 5、10、15。

图 3　Y106G6E.4、R03D7.1 和 Dao-3 基因单线虫基因组 PCR 鉴定

2.3　叶酸代谢基因突变对 ALS 线虫身体摆动能力影响(表 1)　为考察叶酸代谢相关基因突变对秀丽隐杆线虫运动能力的影响,分析各双突变体线虫在 M9 培养液中每分钟摆动次数,进行单因素方差分析。结果表明,与 N2 对照组(176.4 ± 11.59)次/min 比较,转基因 ALS 线虫 G85R-Sod1(32 ± 4.34)身体摆动能力受到严重影响($P < 0.05$);与 G85R-Sod1 线虫比,3 种双突变体 G85R/VC2322(14.6 ± 2.39)、G85R/RB755(17.4 ± 2.23)和 G85R/VC1197(10.2 ± 1.64)的身体摆动能力均明显降低($P < 0.05$)。

2.4　叶酸代谢基因突变对 ALS 线虫身体移动能力影响(表 1)　对双突变体线虫在 NGM 平板上的移动能力进行方差分析。结果表明,与 N2 对照组(90 ± 5.10)相比,转基因 ALS 线虫 G85R-Sod1(29.25 ± 2.87)在 NGM 平板上的相对移动距离(移动距离/身长长度)明显缩短($P < 0.05$);与 G85R-Sod1 线虫比,3 种双突变体 G85R/VC2322(22.25 ± 3.59)、G85R/RB755(23.25 ± 3.30)和 G85R/VC1197(21.5 ± 2.07)的身体摆动能力均受到进一步损害($P < 0.05$)。

表 1　Y106G6E.4、R03D7.1 和 Dao-3 基因突变对 ALS 线虫身体摆动、移动能力的影响($\bar{x} \pm S, n = 4$)

组别	线虫摆动次数(次/min)	线虫相对移动距离(运动距离/身长长度)
N2	176.40 ± 11.59	90.00 ± 5.10
G85R-Sod1	32.00 ± 4.34[a]	29.25 ± 2.87[a]
VC2322	164.80 ± 28.71	85.75 ± 3.95
RB755	166.60 ± 11.52	77.50 ± 2.38[a]
VC1197	162.20 ± 10.43[a]	74.00 ± 6.06[a]
G85R/VC2322	14.60 ± 2.39[ab]	22.25 ± 3.59[ab]
G85R/RB755	17.40 ± 2.23[ab]	23.25 ± 3.30[ab]
G85R/VC1197	10.20 ± 1.64[ab]	21.50 ± 2.07[ab]

注:与 N2 比较,a $P < 0.05$;与 G85R-Sod1 比较,b $P < 0.05$。

3　讨　论

秀丽隐杆线虫是神经毒理学及神经退行性疾病研究的适宜模型生物[5]。其虫体小,通体透明,易在显微镜下对活体组织和细胞进行跟踪观察,尤其是可以借助绿色或红色荧光标记,通过其荧光强度判断基因的表达水平。在本实验中使用 YFP 标记 G85R 转基因线虫,较易筛选后代 Sod1 基因阳性表达,大大缩短了双突变体线虫的筛选时间。

对 ALS 病理机制的深入探讨和有效治疗药物的研发是目前乃至今后世界医学的难点热点。研究表明,ALS 的发病机制极其复杂,可能涉及到基因突变、氧化应激、线粒体功能障碍、神经营养因子缺乏等各个方面[6]。大量证据表明,叶酸及其代谢在神经管畸形[7-8]和神经退行性疾病[9]发生发展过程中起重要作用并影响神经干细胞增殖分化[10],但目前叶酸在运动神经元疾病 ALS 病理进程中的作用研究较少,仅有动物实验证明叶酸对 ALS 疾病模型小鼠具有保护作用[4]。另外鉴于血浆 Hcy 和叶酸浓度呈负相关,而在 ALS 病患脑中发现 Hcy 的增高[11],这可能是叶酸具有 ALS 保护作用的另一重要间接证据。本研究发现与叶酸相关体内代谢改变可加重 ALS 病情,为叶酸对 ALS 疾病可能的神经保护作用提供实验依据。

蛋氨酸合成酶,四氢叶酸脱氢酶和 5-甲酰四氢叶酸环连接酶等均是叶酸相关一碳单位代谢通路中重要的酶,而一碳代谢途径与嘌呤、胸苷核苷酸和氨基酸(特别是含硫氨基酸)代谢密切相关。基于 RNA 加工异常和含硫氨基酸如牛磺酸增多可能为 ALS 发病的起始事件,故推测叶酸依赖型一碳单位的代谢可能涉及 ALS 疾病进程。本实验结果表明,三个叶酸代谢相关酶基因突变均可加重 ALS Sod1 模型线虫的运动损伤,说明叶酸代谢改变可能是该病发生发展的重要病理机制之一。另外由于 ALS 的发病机制十分复杂,要完全明确运动神经元损害的机制与叶酸代谢之间的关系尚需要进行大量的工作。

参考文献

[1] 包建玲,黄红云. 肌萎缩性侧索硬化症动物模型的应用进展[J]. 生物技术通讯,2008,19(2):310-312.

[2] Rosen DR, Siddique T, Patterson D, et al. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis[J]. Nature, 1993, 362:59-62.

[3] Wang J, Farr GW, Hall DH, et al. An ALS-linked mutant SOD1 produces a locomotor defect associated with aggregation and synaptic dysfunction when expressed in neurons of *Caenorhabditis elegans*[J]. PLoS Genet, 2009, 5(1):e1000350.

[4] Zhang X, Chen S, Li L, et al. Folic acid protects motor neurons against the increased homocysteine, inflammation and apoptosis in SOD1 G93A transgenic mice[J]. Neuropharmacology, 2008, 54(7):1112-1119.

[5] 李煜,敬海明,李国君. 秀丽隐杆线虫神经毒理学研究进展[J]. 中国公共卫生,2013,29(4):622-624.

[6] Bruijn LI, Miller TM, Cleveland DW. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS[J]. Annu Rev Neurosci, 2004, 27:723-749.

[7] Jagerstad M. Folic acid fortification prevents neural tube defects and may also reduce cancer risks[J]. Acta Paediatr, 2012, 101(10):1007-1012.

[8] 陈云霞,武延隽,申丽丽. 育龄女性叶酸代谢相关酶基因多态性分析[J]. 中国公共卫生,2010,26(8):958-959.

[9] Reynolds EH. The neurology of folic acid deficiency[J]. Handb Clin Neurol, 2014, 120:927-943.

[10] 王广雷,黄国伟,张绪梅,等. 叶酸对胎鼠大脑神经干细胞增殖蛋白表达影响[J]. 中国公共卫生,2008,24(4):462-464.

[11] 王宏利,樊东升. 血浆同型半胱氨酸水平和肌萎缩侧索硬化症的关系[J]. 中华内科杂志,2012,51(4):308-310.

收稿日期: 2014-02-11　　(张翠编辑　郑新校对)