# 构建携带人GFAP启动子和p27基因的重组腺病毒 载体及其转染对星形胶质细胞增殖的影响

## 刘娜,聂璐薇,姚达宝,陈施玲,潘超,徐莉

#### 作者单位

华中科技大学同济 医学院附属同济医 院神经内科 武汉 430030 基金项目 湖北省自然科学基 金青年基金项目 (No. 2019CFB113) 收稿日期 2023-08-12 通讯作者 徐莉 lilizhouxu@163. com **摘要 目的**:构建携带人GFAP启动子和p27基因的重组腺病毒载体并进行鉴定,研究其转染星形胶质细胞 后对细胞生长增殖的影响。方法:对实验室原有的pGFAP-IRES2-EGFP-p27质粒进行转化、扩增、抽提、酶 切后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定和测序;通过设计引物,进行PCR扩增后分别获取GFAP启动子和p27基因片 段,依次交换入线性化表达载体GV269和pDC315-GFAP-EGFP载体,最终构建pDC315-GFAP-p27-EGFP; 将其转染HEK293细胞包装成重组病毒颗粒,经在HEK293细胞反复扩增数代后,进行纯化及滴度检测;转 染星形胶质细胞后观察细胞生长和荧光表达情况;检测转染后星形胶质细胞细胞周期和凋亡比例、p27的表 达情况。结果:经酶切鉴定和测序,成功鉴定真核表达载体pGFAP-IRES2-EGFP-p27;经PCR鉴定和测序, 成功构建重组腺病毒过表达载体pDC315-GFAP-p27-EGFP;经包装后,Ad-GFAP-p27-EGFP可见EGFP表达 和细胞致病效应,而且能够特异性地在星形胶质细胞中表达绿色荧光蛋白;经流式细胞仪分析,转染星形胶 质细胞 72 h后,与对照组相比,转染组处于S期的细胞比例下降,G1和G2期的细胞比例增高,凋亡比例增 高(P<0.05);转染后第5天,星形胶质细胞中p27蛋白表达水平较对照组有明显升高(P<0.05)。结论:利用 腺病毒包装系统AdMax成功构建了携带人GFAP启动子和p27基因的重组腺病毒过表达载体,其可以特异 性转染星形胶质细胞过表达p27,对星形胶质细胞的生长增殖有明显抑制作用。

关键词 p27;GFAP启动子;细胞周期;腺病毒载体;星形胶质细胞

**中图分类号** R741;R741.02;R743 **文献标识码** A **DOI** 10.16780/j.cnki.sjssgncj.20230629 **本文引用格式:**刘娜, 聂璐薇, 姚达宝, 陈施玲, 潘超, 徐莉. 构建携带人 GFAP 启动子和 p27 基因的重组腺病 毒载体及其转染对星形胶质细胞增殖的影响[J]. 神经损伤与功能重建, 2023, 18(10): 564-568, 573.

Construction of Recombinant Adenovirus Vector Carrying Human GFAP Promoter and p27 Gene and Its Transfection Effect on Astrocyte Proliferation LIU Na, NIE Luwei, YAO Dabao, CHEN Shiling, PAN Chao, XU Li. Department of Neurology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Abstract Objective: To construct a recombinant adenovirus vector carrying the human GFAP promoter and p27 gene and identify its effects on cell growth and proliferation after transfecting into astrocytes. Methods: The original pGFAP-IRES2-EGFP-p27 plasmid in the laboratory was transformed, amplified, extracted, digested, identified and sequenced by agarose gel electrophoresis. By designing primers and conducting PCR amplification, GFAP promoter and p27 gene fragments were obtained, and then exchanged into linearized expression vectors GV269 and pDC315-GFAP-EGFP, respectively. Finally, pDC315-GFAP-p27-EGFP was constructed. Transfect it into HEK293 cells and package it into recombinant virus particles. After repeated amplification of several generations in HEK293 cells, purify it and detect its titer. Observe cell growth and fluorescence expression after transfecting astrocytes. Detect the cell cycle and apoptosis ratio of astrocytes after transfection, as well as the expression of p27. Result: After enzyme digestion identification and sequencing, the eukaryotic expression vector pGFAP-IRES2-EGFP-p27 was successfully identified. After PCR identification and sequencing, the recombinant adenovirus overexpression vector pDC315-GFAP-p27-EGFP was successfully constructed. After packaging, Ad-GFAP-p27-EGFP showed EGFP expression and cytopathic effects, and was able to specifically express green fluorescent protein in astrocytes. According to flow cytometry analysis, 72 hours after transfecting astrocytes, compared with the control group, the proportion of cells in the S phase decreased in the transfection group, while the proportion of cells in the G1 and G2 phases increased and the proportion of apoptosis increased (P<0.05). On the 5<sup>th</sup> day after transfection, the expression level of p27 protein in astrocytes significantly increased compared to the control group (P<0.05). Conclusion: A recombinant adenovirus overexpression vector carrying the human GFAP promoter and p27 gene was successfully constructed using the adenovirus packaging system AdMax. It can specifically transfect astrocytes to overexpress p27, and has a significant inhibitory effect on the growth and proliferation of astrocytes.

Keywords p27; GFAP promoter; cell cycle; adenovirus vector; astrocytes

脑卒中发生后,除了神经元出现不可逆性损伤甚 至死亡外,星形胶质细胞可出现活化增殖,其过度增殖 时形成胶质瘢痕,机械性阻断神经轴突再生,进一步导 致局部神经环路破坏<sup>[1,2]</sup>。调控星形胶质细胞增殖是神 经功能修复中的潜在干预靶点。

p27是细胞周期蛋白依赖性激酶(cyclin-dependent kinase,CDK)的调节因子<sup>[3]</sup>。它通过抑制CDK2细胞周 期蛋白E和CDK4细胞周期蛋白D复合物阻止G1/S转 变,将细胞周期阻滞于G1期;还通过CDK依赖性或非 依赖性机制调节G2/M的进程和胞质分裂的完成:它还 参与调节细胞运动和迁移、控制细胞分化程序和激活 细胞凋亡或自噬的过程。甚至在神经发生的增殖晚 期和有丝分裂的早期具有一定的作用<sup>[5]</sup>。胶质纤维酸 性蛋白(glia fibrillary acidic protein, GFAP)启动子作为 星形胶质细胞常用的特异性启动子<sup>66</sup>,在基因治疗中起 到重要的作用四。若将两者构建在同一个腺病毒载体 上就可以对星形胶质细胞的细胞周期起到特异性的负 调控<sup>18]</sup>。因此,本研究拟采用AdMax 腺病毒包装系统, 构建靶向性针对星形胶质细胞增殖的重组腺病毒过表 达载体Ad-GFAP-p27-EGFP。其中EGFP为增强型绿 色荧光蛋白,是一种报告基因。当EGFP与GFAP启动 子结合,促使靶细胞在转录和翻译的过程中产生 EGFP,观察到绿色荧光则提示在靶细胞中成功地过表 达p27。构建的病毒载体可能会有效地特异性调控星 形胶质细胞过度增殖活化,预防瘢痕形成,为神经修复 带来希望。

#### 1 材料与方法

## 1.1 主要试剂与材料

1.1.1 实验动物 出生0~2d的SD大鼠5只,由华中 科技大学同济医学院实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 pGFAP-IRES2-EGFP-p27 质粒为本 实验室自制保存<sup>[9,10]</sup>; pDC315-EGFP(kl830) Vector、 GV269和AdMax腺病毒包装系统购自上海吉凯基因化 学技术有限公司; HEK293(CRL-1573) 购自美国ATCC 公司;感受态细菌DH5(CD201)购自北京全式金生物技 术有限公司; 1 kb DNA ladder Marker(\*SM0311)、EcoR I(ER0271)、BamH I(ER0051)、Not I(ER0591)购自日本 Fermentas公司; XbaI(R0145S)购自美国 NEB公司; In-Fusion <sup>™</sup> PCR Cloning Kit (639626) 和 Adeno-X <sup>™</sup> Virus Purification Kit 购自美国 Clontech 公司; Hoechst 33342、DAPI、MTT及抗体购自美国 Sigma公司。 1.2 方法 1.2.1 质粒 pGFAP-IRES2-EGFP-p27 的酶切鉴定与 测序 将有卡拉霉素抗性的 5 μL 质粒 pGFAP-IRES2-EGFP-p27转化感受态细菌 DH5。挑取阳性单克隆菌落 进行扩增,将部分菌液样本送往上海生工生物公司测 序。其余菌液用试剂盒小量提取质粒 pGFAP-IRES2-EGFP-p27后,分别用 EcoR I、Not I、BamH I 三酶切 处理质粒和 EcoR I 单酶切处理质粒,得到的酶切样本 进行凝胶电泳鉴定。

1.2.2 构建 pDC315-GFAP-EGFP 使用 Xba I 和 EcoR I 对 GV269 真核表达载体进行双酶切消化,最终 将 GV269 真核表达载体线性化。同时设计上游引物 为5'-TTATTATAGTCAGCTCTAGAGAGCTCCCACC TCCCTCTCTG-3',下游引物为5'-CCCTTGCTCACC ATGAATTCCGAGCAGCGGAGGTGATGCGTC-3',进 行 PCR 扩增。PCR 反应体系为 ddH<sub>2</sub>O 12.4  $\mu$ L、5×Taq buffer 4  $\mu$ L、DNTPs (2.5 mM) 1.6  $\mu$ L、上游引物(10  $\mu$ M) 0.4  $\mu$ L、下游引物(10  $\mu$ M) 0.4  $\mu$ L、Template 1  $\mu$ L、Taq polymerase 0.2  $\mu$ L。循环条件:94 ℃预变性 5 min, 94 ℃变性30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延长 40 s,72 ℃再 次稳定延伸 10 min,经过 30 个循环后获取 GFAP 启动 子基因片段。将 PCR 产物交换入线性化表达载体获取 得到 pDC315-GFAP-EGFP。

1.2.3 重组腺病毒载体 pDC315-GFAP-p27-EGFP 构建 与鉴定 pGFAP-IRES2-EGFP-p27 载体用 EcoR I 进行 酶切消化,通过设计上游引物5'-ACCTCCGCTGCTCG GAATTCCGCCACCATGTCAAACGTGCGAGTG-3', 下游引物5'-CCCTTGCTCACCATGAATTCCGTTTG ACGTCTTCTGAG-3',经过 PCR 扩增后得到 p27 基因 片段,PCR反应体系及循环条件同1.2.2。将 PCR 产物 交换入线性化表达载体 pDC315-GFAP-EGFP 中得到 pDC315-GFAP-p27-EGFP,并对其进行 PCR 鉴定。转 化后接种阳性转化子,37 ℃培养16 h 后保存为甘油 菌。

1.2.4 重组腺病毒载体的包装、扩增与纯化 包装采用AdMax 腺病毒包装系统,按说明书提取病毒包装系统,按说明书提取病毒包装系统中的质粒 DNA,溶于除菌的 TE中。取出冻存 HEK293 细胞迅速解冻进行传代培养。转染前24h,用 胰酶消化 HEK293 细胞,重新用含 10% FBS 的 DMEM 培养基进行培养。转染前2h更换为无血清 DMEM 培养基进行转染。转染后大约10~15 d时,约有 50%的 HEK293 细胞脱壁,低速离心收集细胞重悬于2 mL DMEM 中进行传代培养。当细胞生长达到 60% 汇合时,弃去原培养液,加入复制缺陷型腺病毒重组成功后

收获的粗提液 2 mL 培养 90 min 后,补加完全培养液 3 mL继续培养。待大部分细胞出现典型的细胞病变, 且有 50%的细胞脱壁时,离心收集细胞并重悬于 2 mL DMEM 中, -70 ℃/37 ℃反复冻融、振荡 3 次,于4 ℃, 7000 g离心 5 min,收集病毒上清于 -70 ℃保存。将此 过程进行几轮重复就可以得到大量重组腺病毒。最后 按 Adeno-X <sup>™</sup> Virus Purification Kit 说明书步骤对重组 腺病毒进行纯化。

1.2.5 重组目的腺病毒滴度检测 将HEK293 细胞接种于96孔板中,每孔约含1×10<sup>3</sup>个细胞。准备12个无菌的Ep管将病毒进行倍比稀释,直至稀释到10<sup>-13</sup>。弃去原培养液,依次将10<sup>-13</sup>至10<sup>-6</sup>稀释的病毒液加入96孔板中,同时设立不含病毒的完全培养基作为对照。将96孔板置于37℃,5% CO<sub>2</sub>细胞培养箱中继续培养,10 d后观察细胞病变现象,并对细胞病变孔进行计数,计算每一行的阳性率。计算公式如下:病毒滴度/(PFU/mL)=10×(x+0.8)。其中,x=10<sup>-1</sup>~10<sup>-13</sup>依次稀释度下细胞病变阳性率总和。

1.2.6 大鼠星形胶质细胞的分离、培养及病毒转染 取新生大鼠大脑组织,剔除软脑膜及血管后取大脑皮 质,剪碎、胰酶消化、网筛过滤后,以密度为2×10<sup>5</sup>个/mL 接种于涂有多聚赖氨酸的培养皿中培养。取3代细胞 摇床振摇2h后弃上清液。用胰酶消化后接种于有盖 玻片的6孔板中。当细胞的融合率约为50%~60%时, 吸取培养基,用10<sup>-5</sup>稀释度的Ad-GFAP-p27-EGFP感 染4个孔,同时设立空白对照,每天在显微镜下观察 细胞的荧光表达。在第5天时用无菌Hoechst 33342 (10 μg/mL)进行染色,通过荧光显微镜观察星形胶质 细胞中EGFP与Hoechst荧光共表达情况计算转染效 率。

1.2.7 转染后星形胶质细胞的细胞周期及凋亡的检测 Ad-GFAP-p27-EGFP转染星形胶质细胞第3天, 胰酶消化、重悬细胞、重复离心后,在细胞沉淀中加入-20℃预冷的90%乙醇,重悬细胞,冰浴过夜。次日重复离心去上清后收集细胞。250 µL PBS 重悬细胞后加入2 µL浓度为1 mg/mL 的 RNaseA(去离子水配制),37℃水浴40 min。加入50 µL浓度为100 µg/mL 的 PI染色液(PBS 配制),避光染色20 min。上机检测, 流式细胞仪激发波长为488 nm,用 Cell Quest 及 Modfit 软件分析细胞周期和凋亡,确定细胞周期和凋亡的分布。

1.2.8 转染后星形胶质细胞中p27蛋白表达水平的检测 用TBS冲洗贴壁细胞2~3次,加入细胞总蛋白提

取试剂提取蛋白。上样、垂直电泳分离、全湿式电转至 PVDF膜上,室温下用含5%脱脂奶粉的TBS-T封闭1h, 加入一抗Rabbit polyclonal Anti-p27慢摇4℃过夜,第 2天室温下洗膜后加入二抗慢摇2h,洗膜后加入ECL 试剂浸泡2~4 min后曝光,洗片机洗片。用SynGene 成像系统拍照并进行条带分析,以测定p27的蛋白表 达水平。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件处理数据。符合正态分布以 及方差齐性的计量资料以(x±s)表示,组间相应各时间 点同一指标比较采用独立样本均数 t检验; P<0.05 为 差异有统计学意义。

## 2 结果

#### 2.1 重组质粒pGFAP-IRES2-EGFP-p27的酶切鉴定

提取重组质粒 pGFAP-IRES2-EGFP-p27,分别用 EcoR I、BamH I和Not I 三酶切和EcoR I 单酶切。三 酶切后产物电泳为0.6 kb、1.3 kb、2.2 kb、3.5 kb 4条带,分 别代表 p27、IRES-EGFP、GFAP 启动子和 pEGFP-1 骨 架;EcoR I 单酶切电泳结果为2.2 kb(代表GFAP 启动子) 和 5.4 kb 2条带。酶切鉴定 pGFAP-IRES2-EGFP-p27 质粒中DNA 片段与之前构建时的结果相一致,见图 1。



注:(A)pGFAP-IRES2-EGFP-p27载体结构示意图;(B)样本1为pGFAP-IRES2-EGFP-p27/EcoR I 单酶切鉴定结果,样本2为pGFAP-IRES2-EGFP-p27/BamH I +Not I +EcoR I 三酶切鉴定结果。

图 1 重组质粒 pGFAP-IRES2-EGFP-p27 载体的结构图 及酶切鉴定结果

#### 2.2 pGFAP-IRES2-EGFP-p27 质粒的测序结果

对 pGFAP-IRES2-EGFP-p27 质粒测序的结果与 GenBank进行比对完全吻合,见图2。

2.3 重组腺病毒载体 pDC315-GFAP-p27-EGFP 的鉴定

将含有 p27 基因片段的 PCR 产物交换入线性化 表达载体 pDC315-GFAP-EGFP 中得到 pDC315-GFAPp27-EGFP,并对其阳性转化子进行 PCR 鉴定。8个转 化子样品中有7个阳性转化子可得到大小为694 bp的 p27条带,见图3。

2.4 pDC315-GFAP-p27-EGFP的测序结果及结果分析

pDC315-GFAP-p27-EGFP测序后,与GenBank进行 比对完全吻合。启动子GFAP测序结果比对:>lcl|64463 Length=2208; Score=4078 bits(2208), Expect=0.0; Identities=2208/2208(100%),Gaps=0/2208(0%)。p27测 序结果比对:>lcl|34851 Length=597; Score=1098 bits(594),Expect=0.0;Identities=594/594(100%),Gaps= 0/594(0%)。以上结果说明,测序结果与目标序列完全 一致。

2.5 腺病毒滴度检测

由于Ad-GFAP-p27-EGFP在稀释度为10<sup>-6</sup>的孔中 CPE为阳性,所以认为稀释度为10<sup>-1</sup>~10<sup>-5</sup>的孔中 CPE也都为阳性,则根据X=10<sup>-1</sup>~10<sup>-13</sup>依次稀释度下 CPE 阳性率总和,即X=1×9+0.5=9.5;样品的滴度/ (PFU/mL)=10×(9.5+0.8)=1010.3=2×10<sup>10</sup>/(PFU/mL)。

2.6 转染HEK293细胞荧光表达的观察

通过荧光观察发现,第1天,HEK293细胞中未见 到绿色荧光;第5天,HEK293细胞中有少量的绿色荧 光表达,这可能与启动子的特异性有关,见图4。

2.7 转染后星形胶质细胞荧光表达的观察及其转染效 率测定

在 Ad-GFAP-p27-EGFP 转染组中, 第1天, 星形胶 质细胞中未见到绿色荧光。第2天, 星形胶质细胞中

 530
 540
 550
 560
 570
 580
 590
 600
 610
 620
 640
 650
 660

 ALLAL COULT TO GOULD ALLAL COULD ALLAL COULD COULD ALLAL COU

2 pGFAP-IRES2-EGFP-p27部分测序图

注:1: 阴性对照(ddH<sub>2</sub>O);2: 阴性对照;3: 阳性对照 (GAPDH);4: Marker;5~11: p271~8号转化子,其中有7个阳 性转化子可得到694 bp的条带。

图 3 PCR鉴定 pDC315-GFAP-p27-EGFP 电泳图

有少量的绿色荧光表达。第3天,星形胶质细胞中1/3 的细胞有绿色荧光表达。第5~7天,星形胶质细胞中 大部分细胞都表达了绿色荧光,荧光强度很高。第 10~11天开始,荧光表达减弱,可持续到20d左右。对 照组中未见绿色荧光的表达。同时还可以观察到 Ad-GFAP-p27-EGFP转染组与对照组相比,转染1周后 细胞增殖缓慢,细胞数量下降。转染效率可以用EGFP 阳性细胞数/ Hoechst 33342 阳性细胞数来计算。通过 统计分析转染效率为(73.94±3.50)%。

2.8 转染后对星形胶质细胞细胞周期及凋亡的检测

经流式细胞仪分析,与对照组相比,Ad-GFAP-p27-EGFP转染星形胶质细胞后 72 h,处于S期的星形胶质 细胞比例下降,细胞周期阻滞在G1和G2期的比例增 高,阻滞在G0/G1期的细胞百分比较对照组显著增高 (P<0.05),即对细胞增殖有抑制作用。与对照组相 比,Ad-GFAP-p27-EGFP组中星形胶质细胞的细胞凋 亡率增高,具有统计学意义(P<0.05)。

2.9 转染后星形胶质细胞中p27蛋白表达情况

Ad-GFAP-p27-EGFP转染后第5天,星形胶质细胞中 p27 蛋白表达水平较对照组均有明显升高(P<0.05)。实验结果提示 Ad-GFAP-p27-EGFP转染星形 胶质细胞能够过表达p27。



注:(A)GFAP-p27-EGFP,24 h,光学显微镜,100×;(B) GFAP-p27-EGFP,24 h,荧光显微镜,100×;(C)GFAP-p27-EGFP, 5 d,光学显微镜,100×;(D)GFAP-p27-EGFP,5 d,荧光显微镜, 100×。

图 4 Ad-GFAP-p27-EGFP转染HEK293细胞后绿色荧光的表达

注:(A-C)空白对照组第5天,星形胶质细胞未见绿色荧光 表达;(D-F)Ad-GFAP-p27-EGFP转染组第5天,可见大部分星 形胶质细胞表达绿色荧光,表示病毒转染成功;D中的绿色荧光 为GFAP,B、E中的蓝色荧光为Hoechst 33342染色的细胞核,C、 F为EGFP和Hoechst 33342双标结果(200×)

图 5 Ad-GFAP-p27-EGFP转染后星形胶质细胞绿色荧光蛋白 表达情况



注:(A、B)通过流式分析星形胶质细胞的细胞周期比例; (C)转染组与对照组相比,细胞周期阻滞在G0/G1期比例增高, \*P<0.05;(D、E)通过流式检测星形胶质细胞的细胞凋亡比例; (F)转染组与对照组相比,细胞凋亡率增高,\*P<0.05。

图 6 Ad-GFAP-p27-EGFP转染72h后检测星形胶质细胞 细胞周期及调亡比例



17 Western blot 检测转染后弗 5 天星形胶质细胞中 p27 蛋白表达水平

### 3 讨论

基因治疗作为医学前沿的治疗策略之一,一直是 研究的热点<sup>[11-14]</sup>。靶向性基因治疗优势在于可以最大 程度减少治疗过程中伴随的全身副作用。腺病毒载体 在基因工程中有着广泛的应用<sup>[15]</sup>。与其它载体相比, 有如下优点:宿主范围广泛;转染效率和目的基因表达 水平高,副作用小,安全性好;携带的基因不整合到宿 主基因组,无插入突变的危险;携带基因表达的时间约 4~8周,这与胶质细胞活化时间大致相同。因此,本研 究中选择腺病毒作为重组目的基因的载体。

脑卒中具有高发病率、高致残率、高死亡率的特点<sup>166</sup>。星形胶质细胞是大脑中分布最广泛的一类胶质 细胞,脑卒中发生后它能够及时响应损伤信号并迅速 增殖<sup>[17]</sup>。它们分泌大量的炎性因子进一步加重损伤区 的炎症反应,促进神经元和其他细胞的凋亡;还上调血 管表皮生长因子和碱性成纤维细胞生长因子的表达, 这2种因子具有强烈的促进胶质细胞增殖的作用,可 以促进胶质瘢痕形成<sup>[18]</sup>。这些均对神经损伤造成恶性 循环,导致神经功能障碍。

GFAP启动子作为星形胶质细胞常用的特异性启 动子[19],可以驱动相连的外源性基因在星形胶质细胞 中特异性的表达。而p27参与许多生物学过程,如细 胞增殖、分化、迁移和凋亡<sup>[20]</sup>。本研究通过PCP扩增、 鉴定和载体的测序,证明将两者构建在同一个腺病毒 载体 Ad-GFAP-p27-EGFP 上,将其转染 HEK 293 细胞 时,只有微弱的绿色荧光表达,但是转染星形胶质细 胞,可见大部分细胞都表达了高强度的绿色荧光,这说 明了GFAP启动子具有特异性;将其转染星形胶质细 胞后,与对照组相比,转染组处于S期的细胞比例下 降,G1和G2期的细胞比例增高,调亡比例增高,说明 对其细胞周期起到了特异性的负调控作用;转染后第5 天,星形胶质细胞中p27蛋白表达水平有明显升高;转 染1周后细胞增殖缓慢,细胞数量下降,说明通过过表 达p27,可抑制星形胶质细胞的生长增殖。因此,重组 腺病毒过表达载体Ad-GFAP-p27-EGFP可以用于进一 步的体内实验,考量其作为靶向性基因治疗工具的可 行性。

#### 参考文献

[1] Yao ZM, Sun XR, Huang J, et al. Astrocyte-Neuronal Communication and Its Role in Stroke[J]. Neurochem Res, 2023, 48: 2996-3006.

[2] Constantakis JW, Reed-McBain CA, Famakin B. Astrocyte innate immune activation and injury amplification following experimental focal cerebral ischemia[J]. Neurochem Int, 2023, 162: 105456.

[3] García-Osta A, Dong J, Moreno-Aliaga MJ, et al. p27, The Cell Cycle and Alzheimer's Disease[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23: 1211.

[4] Bencivenga D, Stampone E, Roberti D, et al. p27Kip1, an Intrinsically Unstructured Protein with Scaffold Properties[J]. Cells, 2021, 10: 2254.

[5] Hörster H, Garthe A, Walker TL, et al. p27kip1 Is Required for Functionally Relevant Adult Hippocampal Neurogenesis in Mice[J]. Stem Cells, 2017, 35: 787-799.

[6] Kim SC, Park JY, Hwang EM. Caspase-dependent apoptosis induces reactivation and gliogenesis of astrocytes in adult mice[J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 1054956.

[7] Verma R, Chen X, Xin D, et al. Olig1/2-Expressing Intermediate Lineage Progenitors Are Predisposed to PTEN/p53-Loss-Induced Gliomagenesis and Harbor Specific Therapeutic Vulnerabilities[J]. Cancer Res, 2023, 83: 890-905.

[8] 刘娜. 构建携带人 GFAP 启动子和 p27 基因的腺病毒载体及其对胶质增生的影响[D]. 华中科技大学, 2012.

[9] 朱舟, 徐逸, 田学愎, 等. GFAP 启动子调控的双顺反子真核表达载体 pGFAP-IRES2-EGFP-p27 的构建及表达分析[J]. 中国组织化学与细胞化 学杂志, 2007, 16: 34-39.

[10] 朱舟, 潘邓记, 徐逸, 等. 转染真核表达载体 pGFAP-IRES2-EGFP-p27 对星形胶质细胞增殖的抑制作用 [J]. 神经损伤与功能重建, 2007, 2: 10-13.

TTC染色,证实模型是成功的。与传统线栓法相比较, 改良线栓法一定程度上降低了手术操作难度,提高了 模型的稳定性和成功率,因线栓阻塞方式一致,2种建 模方法在梗塞时间相同的情况下,梗死灶体积应无差 异,后续我们将进一步深入研究,以获得确切结论。

## 参考文献

[1] 中华医学会神经病学分会,中华医学会神经病学分会脑血管病学组.中国缺血性卒中和短暂性脑缺血发作二级预防指南2022[J].中华神经科杂志,2022,55(10):1071-1110.

[2] Wu M, Gu X, Ma Z. Mitochondrial Quality Control in Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury[J]. Mol Neurobiol, 2021, 58(10): 5253-5271.

[3] Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, et al. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats[J]. Stroke, 1989, 20(1): 84-91.
[4] Lopez MS, Vemuganti R. Modeling Transient Focal Ischemic Stroke in Rodents by Intraluminal Filament Method of Middle Cerebral Artery Occlusion[J]. Methods Mol Biol, 2018, 1717: 101-113.

[5] 何芳雁,韩春妮,李艳,等.制作线栓法大鼠脑缺血再灌注模型的要 点及体会[J].实验动物科学,2013,30(4):46-48.

[6] 范瑞娟, 罗亚非, 孙玉凤. 新式线栓法建立大鼠局灶性脑缺血再灌注 模型的建立[J]. 中国民族民间医药, 2014, 23(2): 26-27.

[7] 孙念霞,高维娟,易忠良.改良线栓法制作SD大鼠局灶性脑缺血再

灌注模型[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(2): 225-230.

[8] 吴琳, 刘娅楠, 张娜, 等. 大鼠脑缺血再灌注模型制作流程详述及经验总结[J]. 实验动物科学, 2021, 38(3): 62-65.

[9] 王东亮, 王冬, 何天鵬, 等. 两种线栓法制作小鼠大脑中动脉栓塞模型的比较[J]. 中华神经创伤外科电子杂志, 2019, 5(6): 358-364.

[10] 李勇,徐卓,王建,等.颈总与颈外插线构建大脑中动脉栓塞大鼠模型脑微循环灌注的比较[J].中国组织工程研究,2023,27(11):1683-1691. [11] 杨国源,金坤林,张志君.实验卒中模型方法学[M].上海:上海交通 大学出版社,2019.

[12] L L, X W, Z Y. Ischemia-reperfusion Injury in the Brain: Mechanisms and Potential Therapeutic Strategies[J]. Biochem Pharmacol (Los Angel), 2016, 5(4): 213.

[13] McCabe C, Arroja MM, Reid E, et al. Animal models of ischaemic stroke and characterisation of the ischaemic penumbra[J]. Neuropharmacology, 2018, 134(Pt B): 169-177.

[14] Howells DW, Porritt MJ, Rewell SS, et al. Different strokes for different folks: the rich diversity of animal models of focal cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(8): 1412-1431.

[15] Sutherland BA, Neuhaus AA, Couch Y, et al. The transient intraluminal filament middle cerebral artery occlusion model as a model of endovascular thrombectomy in stroke[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2016, 36(2): 363-369.

[16] Morris GP, Wright AL, Tan RP, et al. A Comparative Study of Variables Influencing Ischemic Injury in the Longa and Koizumi Methods of Intraluminal Filament Middle Cerebral Artery Occlusion in Mice[J]. PLoS One, 2016, 11(2): e0148503.

(本文编辑:唐颖馨)

৯৮৯০ চেএচ এই ১৯৮৯ চন চন্দ্র হিরাজে চেরাজে চেরাজি চেরাজি চেরাজি চেরাজি মাজ

### (上接第568页)

[11] Street JS, Qiu Y, Lignani G. Are Genetic Therapies for Epilepsy Ready for the Clinic[J]? Epilepsy Curr, 2023, 23: 245-250.

[12] Persico I, Fiscarelli I, Pelle A, et al. Phenotype reversion as "natural gene therapy" in Fanconi anemia by a gene conversion event[J]. Front Genet, 2023, 14: 1240758.

[13] Olson TS, Walters MC. Allogeneic haematopoietic stem-cell transplantation versus gene therapy for haemoglobinopathies[J]. Lancet Haematol, 2023, 10: e798-e800.

[14] Malvasi M, Casillo L, Avogaro F, et al. Gene Therapy in Hereditary Retinal Dystrophies: The Usefulness of Diagnostic Tools in Candidate Patient Selections[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24: 13756.

[15] Wang Y, Shao W. Innate Immune Response to Viral Vectors in Gene Therapy[J]. Viruses, 2023, 15: 1801.

[16] Liu J, Guo Y, Zhang Y, et al. Astrocytes in ischemic stroke: Crosstalk

in central nervous system and therapeutic potential[J]. Neuropathology, 2023. Online ahead of print.

[17] Xie X, Liu J. New role of astrocytes in neuroprotective mechanisms after ischemic stroke[J]. Arq Neuropsiquiatr, 2023, 81: 748-755.

[18] Li L, Zhou J, Han L, et al. The Specific Role of Reactive Astrocytes in Stroke[J]. Front Cell Neurosci, 2022, 16: 850866.

[19] Sompol P, Gollihue JL, Weiss BE, et al. Targeting Astrocyte Signaling Alleviates Cerebrovascular and Synaptic Function Deficits in a Diet-Based Mouse Model of Small Cerebral Vessel Disease[J]. J Neurosci, 2023, 43: 1797-1813.

[20] McKay LK, White JP. The AMPK/p27Kip1 Pathway as a Novel Target to Promote Autophagy and Resilience in Aged Cells[J]. Cells, 2021, 10: 1430.

(本文编辑:唐颖馨)