

CD-1 遗传背景小鼠 EAE 模型:遗传背景对临床表现的影响

王松¹, 顾冰洁¹, 张璐¹, 李冠宇¹, 杨晓帆¹, 王慧娟¹, 胡刚², 季晓辉^{1*}

(¹南京医科大学微生物与免疫学系, ²药理学系, 江苏 南京 210029)

[摘要] **目的:**制作不同基因背景小鼠自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis, EAE)模型,比较不同遗传背景小鼠发病、神经功能评分和病理变化的差异。**方法:**用髓鞘少突胶质细胞糖蛋白抗原(MOG35-55)免疫 C57BL/6 和 CD-1 基因背景小鼠,用完全弗氏佐剂作为抗原载体,并在不同时间点用精制百日咳毒素增强免疫效果,建立自身免疫性脑脊髓炎模型;记录小鼠发病时间与表现,每天进行神经功能评分,并取其脑和脊髓组织进行病理学检查和以 CD4、IL-17 为靶标的免疫组化染色。**结果:**C57BL/6 组小鼠发病高峰期出现于初次免疫后 17~25 d,表现典型的拖尾、单侧或双侧后肢瘫痪等改变,神经功能评分在 3 分左右;CD-1 组小鼠发病高峰期较 C57BL/6 组推迟,出现于免疫后 35~40 d,可见相似的拖尾及偏瘫表现,神经功能评分在 2.8 分左右。病理检查可见 C57BL/6 模型小鼠脑、脊髓出现炎症性细胞浸润,而 CD-1 小鼠的炎性改变相对较轻、且主要出现于脊髓;罗克沙尔固蓝染色法鉴定显示,模型小鼠脑脊髓组织出现脱髓鞘病变,以 C57BL/6 小鼠更为严重。免疫组织化学法显示 2 种模型小鼠发病高峰期均存在不同程度的 CD4⁺及 IL-17⁺ 炎性细胞的浸润。**结论:**不同的遗传背景对 EAE 模型发病、临床表现和病理改变有明显影响;CD-1 小鼠亦可运用于制作慢性迁延性 EAE 模型,更符合人类多发性硬化的特点。

[关键词] 实验性自身免疫性脑脊髓炎;CD-1 小鼠;C57BL/6 小鼠;胶质细胞髓鞘少突糖蛋白(MOG35-55)

[中图分类号] Q933

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)06-771-08

doi:10.7655/NYDXBNS20130611

Experimental autoimmune encephalomyelitis model in CD-1 gene background mice:effect of genetic background on clinical manifestations

Wang Song¹, Gu Bingjie¹, Zhang Lu¹, Li Guanyu¹, Yang Xiaofan¹, Wang Huijuan¹, Hu Gang², Ji Xiaohui^{1*}

(¹Department of Microbiology and Immunology, ²Department of Pharmacology, NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** In order to establish different mouse models of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), compare the features of development, clinical scores and pathological analysis in different gene background. **Methods:** Mice were induced by myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG35-55) peptide in complete Freund's adjuvant (CFA), also received pertussis toxin twice for immune enhancement, established EAE mice models with record the onset time, clinical manifestation, nerves function scores for daily. Finally the spinal cord and brain tissues were taken for pathological analysis with CD4 and IL-7 immunocytochemistry staining.

Results: C57BL/6 mice reached the peak of clinical scores at 17 to 25 days after first induction, and showed typical performance like limp tail and partial or complete limb paralysis. The mean clinical score was 3.0. CD-1 mice put off the peak till 35 to 40 days after first induction compared with C57BL/6 mice. CD-1 mice also showed limp tail or limb paralysis with similar performance. The mean clinical score was 2.8. The results of H.E. and Luxor fast blue analysis showed CD-1 mice changing were lighter than C57BL/6 mice, most manifestations occurred in spinal cord. While immunochemistry analysis results showed CD4⁺ and IL-17⁺ lymphocytes infiltration in varying degrees. **Conclusion:** Different gene background have apparently influence on susceptibility, clinical performance and pathological changing in EAE model. CD-1 mice can also be used to produce chronic EAE model, with the characteristics coincide with multiple sclerosis.

[Key words] experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE); CD-1 mouse; C57BL/6 mouse; myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55(MOG35-55)

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(6): 771-778]

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金重点项目(2010NJMUZ32)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jixiaohui@njmu.edu.cn

多发性硬化(multiple sclerosis, MS)是人类中枢神经系统(central nervous system, CNS)的自身免疫性疾病。最近研究认为 MS 和其动物模型——实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalo-myelitis, EAE)是一种以病变中枢内聚集大量 CD4⁺ TH1 型细胞为主要特征的自身免疫性炎症^[1-2]。由于神经系统疾病的特殊性,相关的研究更多的是基于动物模型的 EAE。该模型因其发病表现和病理改变与 MS 相仿,现已成为研究 MS 病理生理机制和临床药物前期研究的重要手段与工具^[1,3]。随着 EAE 的广泛应用,已有多种不同基因背景的小鼠被涉及^[4-6]。近年研究发现 IL-17⁺的 TH-17 细胞在其中也有重要作用。目前, C57BL/6、SJL 和 PL/J 小鼠种群制作的 EAE 模型得到广泛采用。但后两种小鼠在国内仍然不易获得。C57BL/6 小鼠引种较早,国内各科研院所已大规模繁殖选用,但不同地域长期封闭繁殖造成了一些亚群的产生,这对实验模型的建立、实验结果的分析均产生了不同程度的影响。近年来, CD-1 小鼠在国内得到大规模的引种繁殖,其种系稳定,抗病力和适应力强,繁殖率和成活率高,且价格低廉易于获得,因而已广泛应用于毒理学、免疫学和肿瘤学的研究^[7-9]。但运用 CD-1 小鼠建立 EAE 模型尚未见报道,此种小鼠对诱导 EAE 的敏感性如何、临床病理表现如何尚不清楚。如能运用 CD-1 小鼠建立 EAE 模型,又能对 MS 研究的开展提供一种模型动物。因此探索 CD-1 小鼠新的动物模型的建立具有现实意义。

1 材料和方法

1.1 材料

雌性 C57BL/6 和 CD-1 小鼠各 14 只, 8~10 周龄, 体重 18~20 g。C57BL/6 小鼠由中国科学院上海实验动物中心提供, CD-1 小鼠由南京医科大学药理与神经功能学实验室胡刚教授提供。每种基因背景小鼠随机分成正常对照组和模型组, 每组 7 只。实验动物在南京医科大学实验动物中心 SPF 环境饲养, 室温 23~25℃, 相对湿度 40%~60%。

抗原采用髓鞘少突胶质细胞糖蛋白 MOG35-55 多肽(西安联美生物科技有限公司), 纯度≥95%。佐剂采用完全弗氏佐剂(CFA), 其中含灭活结核菌素(H37RA, Difco 公司, 美国)。免疫制剂: 将 MOG35-55 无菌水溶液与完全弗氏佐剂按 1:1 比例混合, 充分乳化制成均一的油包水抗原乳剂, MOG 终浓度: 1 mg/ml, H37RA 终浓度: 4 mg/ml。免疫增强剂

百日咳毒素(Sigma 公司, 美国)无菌水溶液, 终浓度: 1 μg/ml。其他试剂包括罗克沙尔固蓝染料(luxol fast blue, LFB, Sigma 公司, 美国), Anti-CD4 及 Anti-IL17 抗体(Biolegend 公司, 美国), SABC 法免疫组织化学试剂盒(武汉博士德生物工程公司)。

1.2 方法

1.2.1 模型的诱导及神经功能评估

采用 2 轮免疫法。先以 MOG35-55 免疫制剂分别免疫 C57BL/6 和 CD-1 小鼠, 背部肩胛两侧及腹部皮下分 4 点注射 200 μl, 再于免疫后 1 h 腹腔注射百日咳毒素 200 μl 以增强免疫反应。免疫当天记为 day 0。免疫后 2 d(day 2), 再次腹腔注射相同剂量百日咳毒素。初次免疫后第 7 天(day 7), 以上述相同方法进行再次免疫。

神经功能的评估于初次免疫后开展, 每日进行双盲评估并作记录, 标准如下: 0 分, 没有临床表现; 1 分, 小鼠尾部张力降低或麻痹; 2 分, 部分后肢瘫痪; 3 分, 完全后肢或部分前后肢麻痹, 共济失调; 4 分, 后肢完全麻痹和部分前肢麻痹; 5 分, 濒死或死亡^[10-11]。

1.2.2 组织病理学分析

对实验动物在发病高峰期(初次免疫后 C57BL/6 小鼠在第 25 天, CD-1 小鼠在第 50 天)取脑和脊髓组织进行病理学检查。程序如下: 用浓度为 4% 的水合氯醛腹腔注射麻醉小鼠, 打开胸部, 将灌注用针经心尖部进入左心室, 然后剪开右心耳, 迅速推入生理盐水, 观察心耳处流出无色澄清液体后, 换 4% 多聚甲醛溶液继续灌注。灌注 30 min 后, 完整取出脑和脊髓, 固定于 4% 甲醛磷酸缓冲液中 4℃ 放置 24 h, 脱水浸蜡固定包埋切片, 37℃ 烤干切片备用。经苏木素-伊红(HE)和罗克沙尔快蓝法(Luxol fast blue)染色, 光镜下观察炎性细胞浸润和神经元轴索脱髓鞘改变。

1.2.3 免疫组织化学分析

切片常规脱蜡; H₂O₂ 双氧水灭活内源性酶, 去离子水洗 3 次; 热抗原修复法置于枸橼酸盐缓冲液(pH6.0)中反复加热沸腾 3 次, 待自然冷却; 5% BSA 封闭 20 min; 滴加适量一抗(Anti-CD4, 1:100; Anti-IL17, 1:250), 4℃ 过夜, PBS 洗 3 次; 加二抗, 室温 20 min, PBS 洗 3 次; 加 SABC, 室温 20 min, PBS 洗 4 次; DAB 显色, 镜下控制显色时间, 苏木素轻度复染, 封片。

1.3 统计学方法

采用 SPSSv16 软件对 EAE 各组体重及神经功

能评分,进行统计分析,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,对组间计量资料进行 *t* 检验或校正检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 临床表现与神经功能评分

C57BL/6 小鼠 EAE 发病较早,在第 2 次免疫后 3 d 即开始出现明显的临床症状,小鼠活动能力下降,进食进水减少,尾部张力下降;且病情进展较快,初次免疫到发病高峰期为 17~25 d,发病小鼠表现为进行性体重减轻,后肢及前肢部分或全部麻痹,大小便失禁,运动方面可观察到步态偏瘫,共济失调等行为学改变(图 1A)。小鼠的体重下降程度和临床症状严重程度呈正相关。高峰期后随病情的缓解体重逐渐增加。C57BL/6 小鼠 EAE 发病率达到 100%,发病高峰期神经功能评分平均 3 分左右。对照组小鼠均无发病表现。

CD-1 小鼠 EAE 发病缓慢,临床症状相对较轻,

在第 2 次免疫 7 d 后小鼠活动逐渐出现减少,9 d 以后可观察到症状较轻的拖尾等症状(图 1B),但体重减轻现象不明显,神经功能评分多在 2 以下;病情进展缓慢,发病高峰期多在初次免疫 38 d 后出现,40 d 前后达到峰值,此时神经功能评分平均在 2.8 分左右,并出现体重减轻;此后病情严重程度略下降后趋于稳定,表现为慢性迁延型的单相病程。发病率 85%。在部分小鼠延长观察期时还观察到反复缓解复发的特点。C57BL/6 与 CD-1 小鼠 EAE 平均神经功能评分经统计学处理,差异具有统计学意义($P < 0.05$,图 2A);体重差异也具有统计学意义($P < 0.05$,图 2B)。

2.2 组织病理学检查

2.2.1 脑脊髓组织 HE 染色

HE 染色组织病理检查结果显示,发病高峰期 C57BL/6 EAE 小鼠脑和脊髓实质内有大量的炎性细胞浸润,炎性细胞围绕中枢实质内小血管形成“袖套样”现象,炎性病变血管常伴有扩张,亦常伴有周

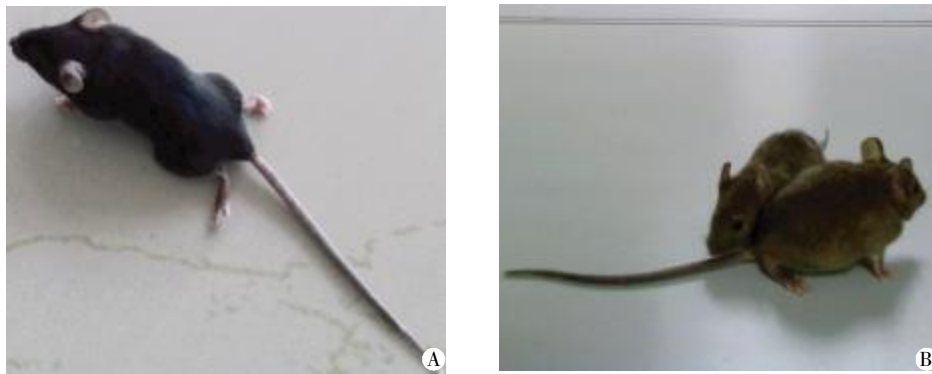


图 1 MOG 多肽免疫后 C57BL/6 小鼠(A)与 CD-1 小鼠(B) EAE 的拖尾和后肢瘫痪表现

Figure 1 Limp tail and limb paralysis of EAE C57BL/6(A) and CD-1(B) mice after MOG immunization

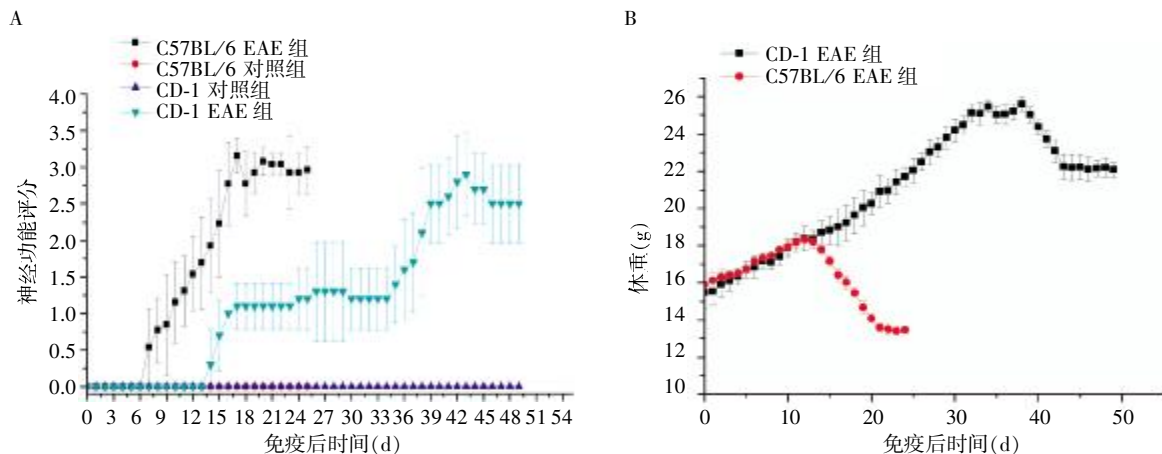


图 2 抗原诱导后 CD-1 和 C57BL/6 小鼠神经功能评分(A)和体重(B)的变化

Figure 2 Changes of nervous function scores(A) and body weight (B) of CD-1 and C57BL/6 mice after immunization

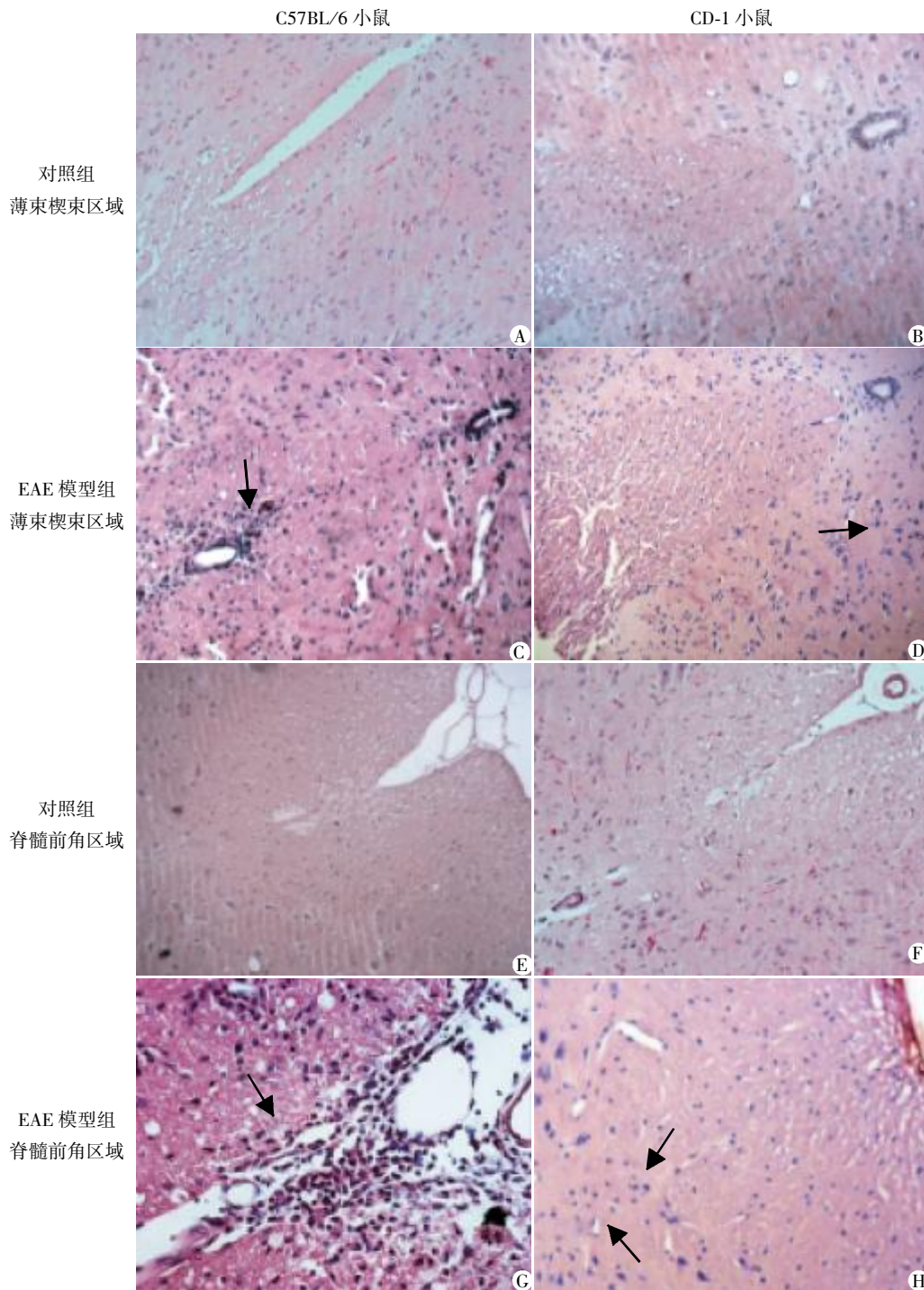
围组织弥散性炎性细胞浸润。脑、脊髓组织内均可见以上病变,且脊髓内炎性细胞浸润多集中于前、后角附近结构,如皮质脊髓前束、薄束附近,并可涉及前索、外侧索皮质附近区域。炎症反应程度与实验鼠的临床评分呈正相关。

CD-1 EAE 小鼠在发病高峰期也有类似病变,

但炎性浸润相对较轻,且主要发生于脊髓;脑病变较轻或无明显改变,脑中较少见到“袖套样”现象(图3)。

2.2.2 罗克沙尔快蓝法髓鞘染色

经罗克沙尔固蓝法(LFB)染色观察中枢脱髓鞘情况,C57BL/6 EAE 小鼠炎性细胞浸润附近区域脊



A、B、D、E、F、H,×100;C、G,×200。箭头所指为淋巴细胞。

图3 C57BL/6 和 CD-1 EAE 模型小鼠中枢神经组织的炎症性病理变化(HE 染色)

Figure 3 Inflammatory characteristic of central nervous tissue in C57BL/6 and CD-1 EAE mice (HE staining)

髓白质稀疏,正常髓鞘组织崩解,严重者可见到不规则的片状缺失,高倍镜下可见红染的炎性细胞周围髓鞘成分脱失较重。而 CD-1 EAE 小鼠脱髓鞘情况相对较轻。对照组未见明显异常变化(图 4)。

2.3 免疫组织化学法染色

免疫组化法检测发病高峰期小鼠的脊髓和脑组织,观察中枢神经组织 CD4⁺ T 细胞和 IL-17⁺ T 细胞的浸润。结果显示,中枢内浸润有 CD4⁺ T 细胞,可见 C57BL/6 EAE 相对于 CD-1 小鼠在脊髓前角、后角血管周围有较多的 CD4⁺和 IL-17⁺细胞浸润,在脑实质内尚有部分固有细胞同样表现出 IL-17 染色弱阳性(图 5)。

3 讨论

MS 是一种慢性、炎症性、中枢神经系统脱髓鞘疾病,多认为以中枢内 CD4⁺ T 细胞浸润为主要病理特点,发病原因至今不明^[12]。在 20 世纪前半叶就有

学者从不同方法和角度报道了 EAE 现象与人类 MS 的相似性。因 EAE 模型的发病特点、病理学和免疫学特征与人类 MS 极类似,至今 EAE 模型已成为研究人类 MS 可靠的方法^[13-15]。

由于基因背景的差异,不同种属不同品系的动物对 EAE 的敏感性不同。建立多种动物模型,可为不同的研究方向提供了研究基础。以往的研究中,使用大鼠制作急性进展型 EAE 模型常用于药物干预研究和疾病的诱导及恢复提供平台,但在病理特点上大鼠急性 EAE 模型又有别于人类 MS,表现为中枢神经组织内少见有髓鞘的缺失;在免疫学方面,同样又不如小鼠自身免疫性脱髓鞘性病变更明显^[4,16-17]。小鼠的基因与人类基因的相似性决定了小鼠 EAE 模型的优势,在小鼠 EAE 模型上模拟人类 MS 的病程特点、病理变化及免疫学特性具有更相似的表现^[18-19]。目前 EAE 动物模型的建立还局限于少数几种基因背景的实验小鼠,虽然同种模型的研究结果

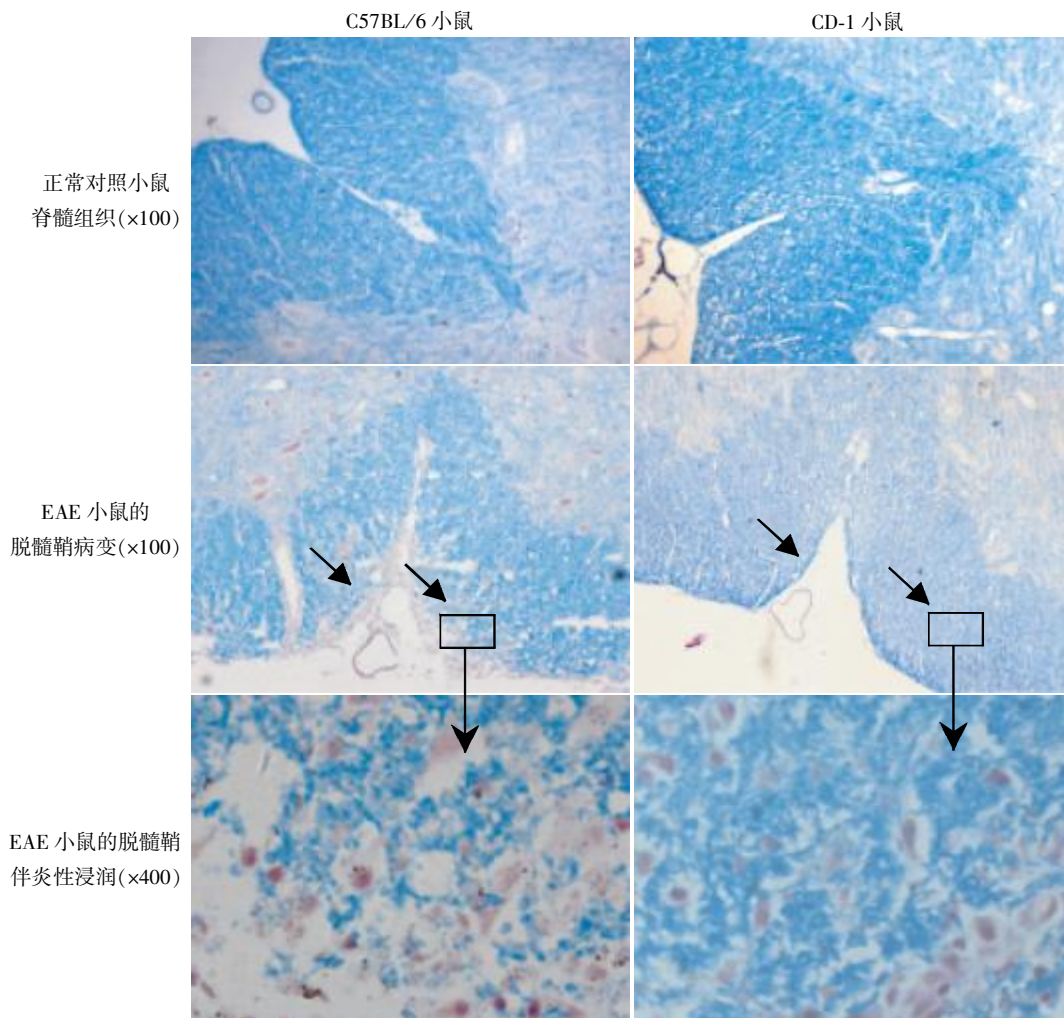
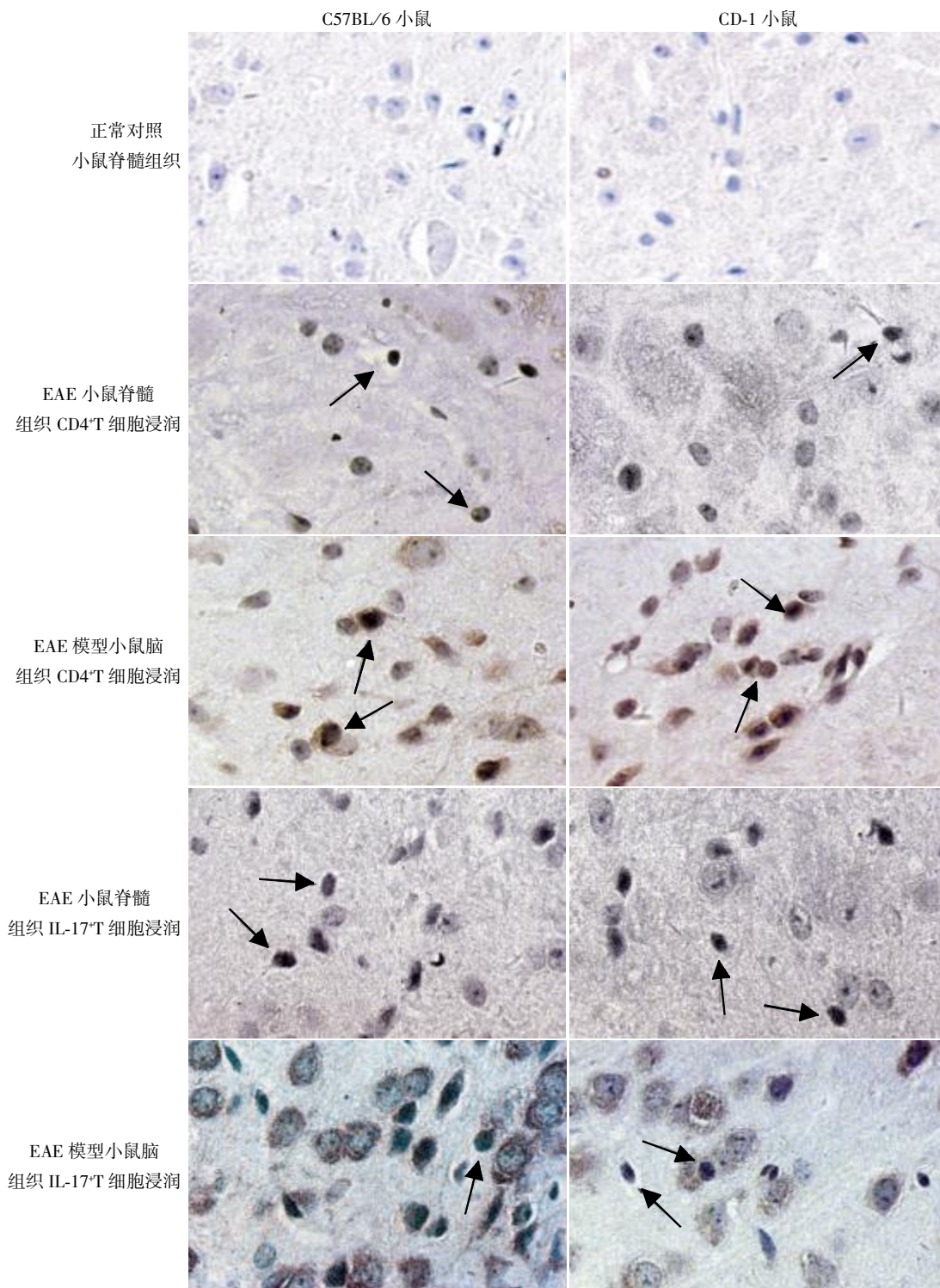


图 4 LFB 染色观察 EAE 小鼠的脊髓脱髓鞘病变

Figure 4 Analysis of spinal cord demyelinating in Luxol fast blue staining sections



箭头所指为淋巴细胞。

图5 EAE模型小鼠中枢神经组织中的CD4⁺和IL-17⁺T淋巴细胞浸润(免疫组化染色,×400)

Figure 5 CD4 and IL-17 immunohistochemistry show lymphocytes infiltration in CNS (IHC,×400)

在一致性方面能稳定地提供考量,但这并不能完全模拟MS的全部病理生理。人类MS的临床表现也常常表现出多样性,这其中不得不考虑不同人群的易感性因素,不同人种临床表现差异也紧密联系于基因背景的影响^[20-21]。因而在制作其动物模型时,尝

试制作不同基因背景小鼠,比较病理改变和免疫学特征具有参考和实用价值。

本研究选用的实验小鼠为纯系C57BL/6和CD-1,国内来源较为广泛,其遗传背景明确。由于小鼠的相关检测试剂种类繁多,更适合在免疫学

领域研究 EAE 的病理机制。特别是今后建立在这些基因背景小鼠上所制作的基因敲除小鼠,为深入探寻这些基因在疾病发展过程中的作用提供基础。C57BL/6 小鼠已被广泛地应用于制作 EAE 模型,常用 MOG35-55 抗原免疫来诱导。因其稳定性好,临床病理与人类 MS 相似,已经成为公认的经典模型。

CD-1 小鼠源于 ICR 小鼠,后者因其适应性强,繁殖力强,生长速度快,实验重复性较好成为国际上最常用的封闭群小鼠,但由于各国引种自行繁殖不可避免的带来亚系问题,致使研究结果出现了一些差异。为了减少因地域封闭饲养造成的种群上的差异,Charles River 实验室按照国际遗传学标准制成品系稳定的 CD-1 小鼠,其比较于 ICR 小鼠在遗传背景及品系稳定性上有明显的优势,最近在免疫学领域的运用越来越广泛,在糖尿病相关研究中已被用于制作 B 型胰岛细胞损伤为主的 I 型糖尿病小鼠模型,常用于治疗糖尿病外周神经病研究的替代模型^[22-24],在此类研究中 CD-1 小鼠制作的糖尿病模型更类似于胰岛自身免疫损伤为主的 I 型糖尿病,部分同样发现糖尿病相关神经病变中以胶质细胞增生为主要表现的中枢神经脊髓组织炎症^[25],此外还见报道 CD-1 小鼠制作的 I 型糖尿病模型用于致炎性 TH1 型细胞因子、黏附因子等免疫调节方面的研究^[26]。然而,CD-1 小鼠能否用来制作 EAE 模型、其对 MOG35-55 抗原诱导 EAE 的敏感性如何尚无文献提供参考答案。本研究结果表明,CD-1 小鼠对于 MOG35-55 抗原较纯系 C57BL/6 小鼠敏感性略低,使用 MOG35-55 免疫 CD-1 小鼠制作的 EAE 模型主要表现在病程持续时间长,致死率低;与 C57BL/6 小鼠 EAE 模型相比,虽然病程迁延时间过长,神经功能平均评分略低,但发病率相近。在病理检查结果上,HE 染色表现为广泛的间质弥散性淋巴细胞浸润,其中主要有 CD4⁺和 IL-17⁺淋巴细胞。由于其病程表现更类似于人类 MS 慢性迁延的特点,考虑到 CD-1 小鼠为封闭群,通过进一步探索免疫方法、改善模型稳定性,对于进行慢性迁延型与复发缓解相关的 MS 研究可作为潜在的替代模型,具有较好的应用前景。

[参考文献]

[1] Kuerten S, Lehmann PV. The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis; lessons learned for multiple sclerosis? [J]. J Interferon Cytokine Res, 2011, 31(12): 907-916

[2] Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, et al. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis [J]. Clin Exp Immunol, 2010, 162(1): 1-11

[3] 林泓怡, 李跃华, 郭琳, 等. 实验性自身免疫性脑脊髓炎动物模型的改良 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2003, 23(3): 235-237, 242

[4] 周璟, 张家胜, 马宝骊, 等. 实验性自身免疫性脑脊髓炎大鼠模型的建立 [J]. 上海第二医科大学学报, 2002, 22(1): 16-18, 25

[5] 徐全刚, 王晓辉, 黄德晖, 等. MOG35-55 诱发实验性自身免疫性脑脊髓炎小鼠模型 [J]. 中华神经医学杂志, 2006, 5(2): 141-144

[6] Lukinovic-Skudar V, Taradi SK, Andreis I, et al. Experimental allergic encephalomyelitis as an animal model for multiple sclerosis [J]. Lijec Vjesn, 2001, 123(3-4): 81-88

[7] Rydgren T, Vaarala O, Sandler S. Simvastatin protects against multiple low-dose streptozotocin-induced type 1 diabetes in CD-1 mice and recurrence of disease in nonobese diabetic mice [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2007, 323(1): 180-185

[8] Lallemand B, Ouedraogo M, Wauthoz N, et al. Synthesis and plasma pharmacokinetics in CD-1 mice of a 18beta-glycyrrhetic acid derivative displaying anti-cancer activity [J]. J Pharm Pharmacol, 2013, 65(3): 402-410

[9] Li Y, Hamasaki T, Teruya K, et al. Erratum to: Suppressive effects of natural reduced waters on alloxan-induced apoptosis and type 1 diabetes mellitus [J]. Cytotechnology, 2012, 64(3): 299

[10] Costa O, Divoux D, Ischenko A, et al. Optimization of an animal model of experimental autoimmune encephalomyelitis achieved with a multiple MOG(35-55) peptide in C57BL/6/J strain of mice [J]. J Autoimmun, 2003, 20(1): 51-61

[11] Kuerten S, Kostova-Bales DA, Frenzel LP, et al. MP4- and MOG:35-55-induced EAE in C57BL/6 mice differentially targets brain, spinal cord and cerebellum [J]. J Neuroimmunol, 2007, 189(1-2): 31-40

[12] Lassmann H, van Horssen J. The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis [J]. FEBS Lett, 2011, 585(23): 3715-3723

[13] Paterson PY. Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells [J]. J Exp Med, 1960, 111: 119-136

[14] Lipton M M, Freund J. Allergic encephalomyelitis in the rat induced by the intracutaneous injection of central nervous system tissue and adjuvants [J]. J Immunol, 1953, 71(2): 98-109

[15] Pedotti R, De Voss JJ, Steinman L, et al. Involvement of

both 'allergic' and 'autoimmune' mechanisms in EAE, MS and other autoimmune diseases[J]. Trends Immunol, 2003,24(9):479-484

[16] 吴志英,赵振华,林毅,等. 实验性自身免疫性脑脊髓炎模型的建立和长期观察研究[J]. 中风与神经疾病杂志, 2009(3):300-302

[17] Bingjie Gu, Yin Zen, Chen Yin, et al. Sinomenine reduces iNOS expression via inhibiting the T-bet IFN- γ pathway in experimental autoimmune encephalomyelitis in rats[J]. The Journal of Biological Research, 2012, 6(26):448-455

[18] Mendel I, Kerlero DRN, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells [J]. Eur J Immunol, 1995, 25(7):1951-1959

[19] Dal Canto MC, Melvold RW, Kim BS, et al. Two models of multiple sclerosis: experimental allergic encephalo-myelitis(EAE) and Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection. A pathological and immunological comparison[J]. Microsc Res Tech, 1995, 32(3):215-229

[20] Lin R, Charlesworth J, van der Mei I, et al. The genetics of multiple sclerosis[J]. Pract Neurol, 2012, 12(5):279-288

[21] Kruger D. Multiple sclerosis[J]. JAAPA, 2012, 25(7):54-55

[22] Francis G, Martinez J, Liu W, et al. Intranasal insulin ameliorates experimental diabetic neuropathy[J]. Diabetes, 2009, 58(4):934-945

[23] Francis G J, Martinez J A, Liu W Q, et al. Motor end plate innervation loss in diabetes and the role of insulin [J]. J Neuropathol Exp Neurol, 2011, 70(5):323-339

[24] Ventura-Sobrevilla J, Boone-Villa VD, Aguilar CN, et al. Effect of varying dose and administration of streptozotocin on blood sugar in male CD1 mice[J]. Proc West Pharmacol Soc, 2011, 54:5-9

[25] Toth CC, Jedrzejewski NM, Ellis CL, et al. Cannabinoid-mediated modulation of neuropathic pain and microglial accumulation in a model of murine type I diabetic peripheral neuropathic pain[J]. Mol Pain, 2010, 6:16

[26] Nemeth ZH, Bleich D, Csoka B, et al. Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes [J]. FASEB J, 2007, 21(10):2379-2388

[收稿日期] 2013-04-27

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每3位分成1组,组间留空隙(约为一个汉字的1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如453 000 000可写成45 300万或4.53亿或4亿5 300万,但不能写成4亿5千3百万;三千元写成3 000元或0.3万元,但不能写成3千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如10%~20%, (2~6) $\times 10^3$ 或 $2 \times 10^3 \sim 6 \times 10^3$, 30~40 km。

(本刊编辑:接雅俐)