

## 植入前遗传学诊断(PGD)出生小鼠对高温环境的应激能力评估

顾雷雷,曾艳,羊洋,董国英,祝辉\*

(南京医科大学基础医学院组织胚胎学系,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:评估胚胎植入前遗传学诊断(PGD)出生小鼠对高温环境的应激能力。方法:构建小鼠模型,分别为实验组 PGD 小鼠和对照组 Normal 小鼠。在 5 周龄时,将两组小鼠置于 45℃ 高温环境,分析比较它们对热应激的反应调节能力。结果:45℃ 高温应激下,PGD 小鼠平均耐受至死亡时间为 59.31 min,显著低于 Normal 组平均死亡时间 79.63 min( $P < 0.001$ )。在 45℃ 30 min 应激下,两组小鼠应激激素水平相似;中枢应激器官——蓝斑和下丘脑室旁核的组织结构及神经元活性在两组小鼠间无明显差异;外周应激器官——肾上腺皮质和髓质的组织结构,以及皮质合成分泌皮质酮的功能、髓质合成分泌肾上腺素的能力在两组小鼠间均无差异。结论:PGD 小鼠对 45℃ 高温环境的反应调节能力与 Normal 小鼠存在差异,这一异常可能不是由蓝斑、下丘脑以及肾上腺的功能差异直接造成的,而与它们所分泌激素的进一步作用有关。需要对应激激素的靶器官进行全面的结构、功能评估。

**[关键词]** 胚胎植入前遗传学诊断;高温应激;下丘脑室旁核;蓝斑;肾上腺

**[中图分类号]** R329

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2013)11-1485-08

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20131101

## Evaluation of stress ability to heat of offspring by preimplantation genetic diagnosis in mice

Gu Leilei, Zeng Yan, Yang Yang, Dong Guoying, Zhu Hui\*

(Department of Histoembryology, School of Basic Medical Sciences, NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To evaluate the impact of preimplantation genetic diagnosis procedures on the heat stress response in the offspring using mouse model. **Methods:** We use the mouse models, which divided into PGD group and Normal group. At 5 weeks of age, evaluate the stress system of PGD offspring under 45℃ heat stress. **Results:** Under heat stress, the mean death time is 59.31 min and 79.63 min in PGD and Normal group, respectively ( $P < 0.001$ ). There is no significant difference between the two groups of mice under the stress, such as serum hormones, structure and neuronal activity of locus coeruleus and hypothalamus. Similarly, there is no significant difference of adrenal structure between two groups, and the level of adrenaline, noradrenaline and corticosterone is the same trend. **Conclusion:** The different response ability between two groups under heat stress is not related to the function of locus coeruleus, hypothalamus and adrenal. It may be related to the further function of their secreted hormones.

**[Key words]** preimplantation genetic diagnosis; heat stress; hypothalamic paraventricular nucleus; locus coeruleus; adrenal

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(11): 1485-1492]

植入前遗传学诊断 (preimplantation genetic diagnosis, PGD) 是一项建立在体外受精-胚胎移植 (IVF-ET) 及现代分子生物学、细胞生物学和遗传学基础上的诊断方法, 指在胚胎移植前, 取其遗传物质进行分析, 筛选出无遗传缺陷的胚胎进行移植, 保证健康子代的出生<sup>[1]</sup>。

然而, PGD 过程涉及体外受精、胚胎体外培养、胚胎移植、卵裂球活检等一系列非自然或侵入性的干预操作, 这些操作作用于胚胎早期发育的敏感时期, 其对子代的生长发育可能产生不良影响, 这在 PGD 广泛应用于临床前并没有经过全面评估。近年来已有研究显示胚胎培养及移植操作可使其子代生理指标发生改变或功能异常<sup>[2-4]</sup>, 本课题组前期研究证实卵裂球活检出生的小鼠脑发育异常, 罹患神经退行性疾病的风险增加<sup>[5]</sup>。因此, 对 PGD 子代的生长发育状况进行全面评估非常重要。

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助(31271604)

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

个体的正常生长发育依赖体内内外环境的协调,使机体各系统、器官达到正常、稳定状态。当受到体内及外界环境变化的刺激时,机体会做出相应的适应性反应来维持和重建内环境稳态,即应激反应<sup>[6]</sup>。应激反应主要以神经内分泌改变为主,包括蓝斑(LC)-交感-肾上腺髓质系统和下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统(HPA轴)的兴奋所引起的一系列神经内分泌反应以及由此引起的全身非特异性反应<sup>[7-8]</sup>。若机体做出适应性调节,则能顺应正常的生长发育,表现出正常的生理功能;若适应、调节能力异常,则生长发育及功能异常。因此,应激能力与个体的生理及病理改变相关。PGD出生的个体,因为在受精和胚胎发育早期阶段受到一系列非生理性操作,其出生后对于环境变化等刺激因素的反应性是否会受到影响?其应激能力是否会发生改变,导致其适应环境的调节能力发生异常,进而引起生长发育和生理功能的异常?这些问题都有待解决,对于全面评估PGD子代健康非常重要。

本研究拟构建PGD出生的小鼠模型,以正常受孕出生的小鼠(Normal)为对照,对出生后5周龄小鼠的应激能力进行评估。本研究以45℃高温作为环境变化因素,检测热应激下两组小鼠蓝斑(LC)-交感-肾上腺髓质系统及HPA轴的结构和功能状态。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

清洁级ICR小鼠[南京医科大学实验动物中心,动物合格证号:SCXK(苏)2002-0031]。放免试剂盒(北京华英生物技术研究所),c-Fos抗体(Abcam公司,美国),二抗(北京中杉金桥),RNeasy Plus Micro Kit(Qiagen公司,德国),PrimeScript RT-PCR Kit,SYBR Premix Ex Taq II Kits(TaKaRa公司,日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠模型构建

实验分为实验组(PGD)和对照组(Normal)。PGD组取小鼠自然交配后的受精卵,在体外发育至四细胞期,随机移除1个卵裂球后移植入假孕鼠而出生小鼠<sup>[5]</sup>,Normal组为自然交配分娩的小鼠。

#### 1.2.2 高温应激实验

选择5周龄小鼠,每组各36只。每只小鼠单独放在28 cm × 17 cm × 12 cm笼子里,置于45℃温箱中,保证氧气供给,观察每只小鼠的致死亡时间。

为进一步评估热状态下小鼠应激系统的调节能力,取另一批小鼠进行高温应激实验,在45℃下30 min的时间点,摘眼球取血,离心后取小鼠血清以及应激器官下丘脑、蓝斑和肾上腺组织,留待检测。

#### 1.2.3 血清激素检测

血清的肾上腺素、去甲肾上腺素、促肾上腺皮质激素(ACTH)和皮质酮运用放免试剂盒测定。

#### 1.2.4 肾上腺、脑组织HE染色

①脱水:10%福尔马林固定后肾上腺、脑组织进行各级浓度乙醇梯度脱水,70%乙醇I—70%乙醇II—80%乙醇I—80%乙醇II—90%乙醇I—90%乙醇II—100%乙醇I—100%乙醇II。每一步骤脱水为30 min;②透明:组织脱水后,进行二甲苯I和二甲苯II透明处理,分别为15 min;③浸蜡:透明后组织浸入56℃熔点石蜡中,分别浸石蜡I和石蜡II各45 min;④包埋:包埋机打开预热,融化石蜡,用包埋筐包埋组织,然后置于4℃恒温冰台上冷却、凝固石蜡;⑤切片:石蜡切片机将包埋好的组织石蜡块切成薄片,每张厚度为5 μm;⑥贴片:水槽盛适量水,加热至42℃,将切片置于水槽中展片,然后用处理过的玻片将蜡片贴于玻片上,铅笔做好标记;⑦烘片:将制作好的石蜡切片置于65℃恒温箱中过夜,使切片干燥;⑧脱蜡水化:切片首先通过二甲苯I 15 min和二甲苯II 15 min进行脱蜡,然后经过100%乙醇I—100%乙醇II—90%乙醇—80%乙醇—70%乙醇水化,每个步骤5 min;⑨苏木素染色:三蒸水洗片2次,每次5 min,苏木素染色5 min,流水冲10 min;⑩盐酸分色:1%盐酸中放置1~2 s,流水冲10 min;⑪伊红染色:水溶性伊红染色2~3 min;⑫脱水透明:依次经过70%乙醇—80%乙醇—90%乙醇—100%乙醇I—100%乙醇II,每个步骤5 min,再经过二甲苯I 10 min和二甲苯II 10 min;⑬封片:在组织上滴中性树胶进行封片,标记标本,烘干后常温保存;⑭光镜下观察:Axion Vision 2 plus(ZEISS)显微镜观察,Axion Vision 3.0拍照。

#### 1.2.5 下丘脑室旁核(PVN)免疫组化

取脑组织,石蜡包埋、5 μm切片,根据脑图谱定位PVN。经过脱蜡水化、去内源性过氧化物酶、抗原修复、封闭,兔抗c-Fos抗体(1:100)4℃孵育过夜,二抗37℃孵育1 h,然后DAB显色、封片,最后在Axion Vision 3.0下观察拍照,Image J1.43u软件计数分析。

#### 1.2.6 蓝斑c-Fos/TH免疫荧光双染

全脑组织取下后,4%PFA固定过夜,20%蔗糖缓冲液中24 h,30%蔗糖缓冲液中24 h,然后取蓝斑

所在脑组织, OCT 包埋、切片 5  $\mu\text{m}$ 。PBS 洗片后封闭 1 h, c-Fos 抗体 (1:100) 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。PBS 洗片后加二抗羊抗兔 IgG/FITC (1:500), 37 $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 1 h。再洗片, 室温封闭 1 h, 一抗 TH (1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。然后洗片, 加二抗 Alexa Fluor 647 goat anti-chicken IgG (1:1 000), 37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 1 h。孵育后, Hoechst 染核, DABCO 封片, ZEN 2009 软件拍照, Image J1.43u 软件计数分析。

### 1.2.7 肾上腺油红 O 染色

冰冻切片 5  $\mu\text{m}$ , 4% PFA 固定 40 min, PBS 洗片, 油红 O 染色 10 min, PBS 冲去多余染液, 苏木素染核 30 s, 流水冲 10 min, 1% 盐酸 1~2 s, 流水冲 10 min, 甘油封片。AxioVision 3.0 拍照, Image J1.43u 软件计数分析。

### 1.2.8 Real-time PCR

RNeasy Plus Micro Kit 提取肾上腺 RNA, 反转录试剂盒反转录为 cDNA, SYBR Premix Ex Taq II Kits 应用于 Realtime PCR。所用的基因引物如下表 1。

表 1 糖皮质激素合成途径中调节蛋白的 DNA 引物

Table 1 DNA primers of regulatory proteins in glucocorticoid synthesis pathway

基因	Forward(5'→3')	Reverse(5'→3')	产物(bp)
StAR	ACTTCGTGAGCGTGGCTGTA	CCGTGTCAGCTCTGATGACACC	115
P450 <sub>sec</sub>	GTGGACCCCAAGGATGCGTCCG	CAGGCGCCATCACCTCTTGTT	118
3- $\beta$ HSD	AGCTGCCCTGATCTTTTCAGCC	TCCTTTATTCCTGTGCAGCAGCCG	117
P450 <sub>c21</sub>	GGCCTCACTCAGAAACTCGGGC	TGGGGTCGGCCAGCAAAGTC	131
P450 <sub>c11</sub>	TCACCATGTGCTGAAATCCTTCCAC	TGGGACACCAAAGAAAAAGGCTGT	150
PNMT	TCACCATGTGCTGAAATCCTTCCAC	TGGGACACCAAAGAAAAAGGCTGT	118
$\beta$ -actin	CCGTAAAGACCTCTATGCC	CTCAGTAACAGTCCGCCTA	278

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件, 分析数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 两组间比较进行 *t* 检验。  $P \leq 0.05$  认为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 高温应激反应

在 45 $^{\circ}\text{C}$  应激条件下, PGD 小鼠平均耐受至死亡时间为 59.31 min, 显著低于 Normal 小鼠的平均死亡时间 79.63 min ( $P < 0.001$ , 图 1)。

### 2.2 应激激素水平测定

在应激原的刺激下, 一方面蓝斑神经元被激活, 引起交感-肾上腺髓质反应, 使肾上腺髓质的嗜铬

细胞分泌肾上腺素和去甲肾上腺素增加。另一方面, 应激原还激活 HPA 轴, 下丘脑室旁核神经元活性增加, 刺激垂体前叶分泌促肾上腺皮质激素 (ACTH), 促进肾上腺皮质分泌糖皮质激素 (在鼠中主要为皮质酮)。因此应激相关激素的水平反映小鼠的应激能力。本研究检测了两组小鼠肾上腺素、去甲肾上腺素、ACTH 和皮质酮水平, 结果显示, 在 45 $^{\circ}\text{C}$  30 min 的热应激下, PGD 和 Normal 两组小鼠的血清肾上腺素、去甲肾上腺素、皮质酮和 ACTH 水平均无显著差异 ( $P > 0.05$ , 图 2)。

### 2.3 45 $^{\circ}\text{C}$ 30 min 高温应激下, 应激中枢蓝斑、PVN 的结构和功能状态评估

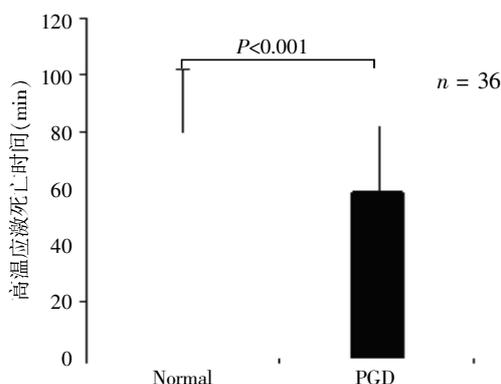


图 1 PGD 小鼠和 Normal 小鼠 45 $^{\circ}\text{C}$  应激致死时间  
Figure 1 The death time of mice under heat stress

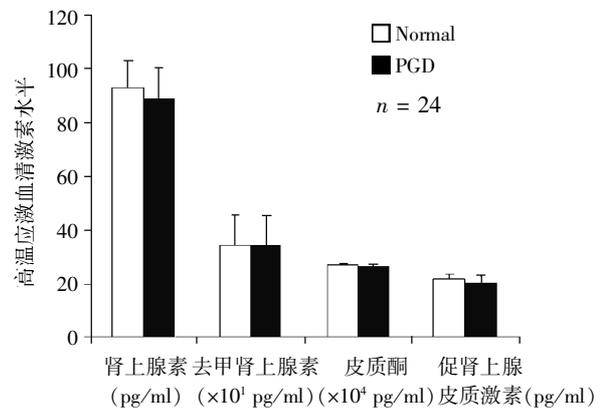


图 2 45 $^{\circ}\text{C}$  应激 30 min 血清激素水平测定  
Figure 2 Levels of hormones at 30 minutes stress point

### 2.3.1 蓝斑和 PVN 的组织结构

根据小鼠脑图谱,定位脑组织蓝斑和 PVN,制作石蜡切片并作 HE 染色,观察其组织结构。结果

显示,PGD 和 Normal 两组小鼠在蓝斑和 PVN 未见明显的形态结构异常,两组之间无明显差异(图3)。

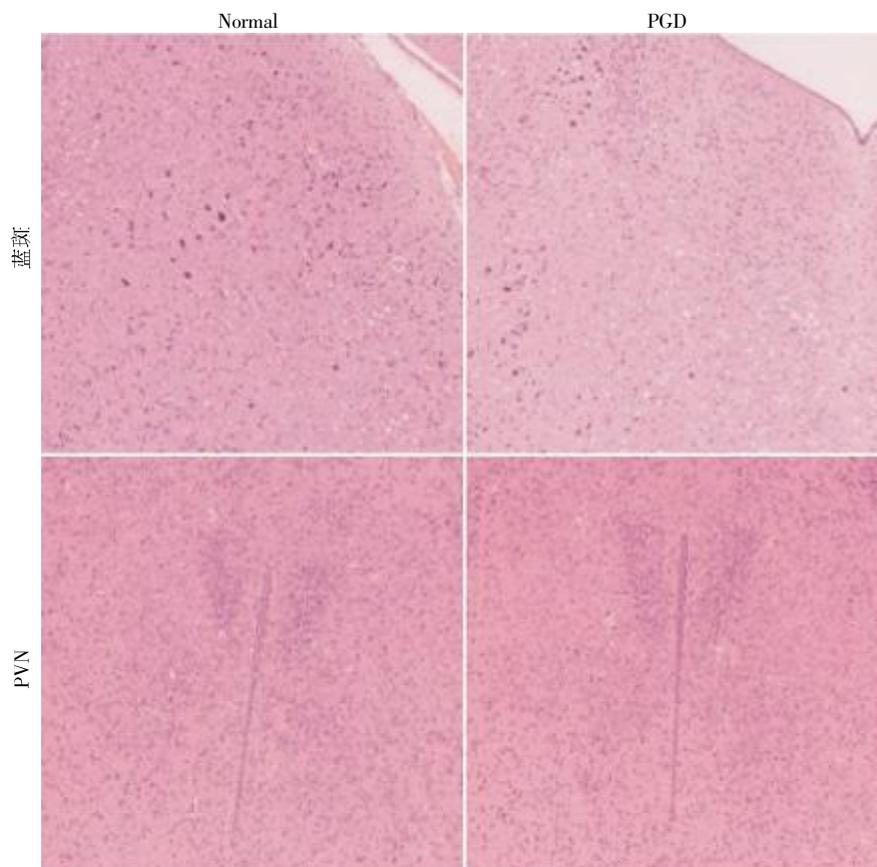


图3 蓝斑和 PVN HE 染色( $\times 10$ )

Figure 3 Hematoxylin-eosin stain of LC and PVN( $\times 10$ )

### 2.3.2 蓝斑和 PVN 的功能评估

c-Fos 是一种原癌基因,可在数分钟内对外界刺激做出反应,并进行表达,被称为早期改变基因。神经元兴奋或状态变化时,c-Fos 表达迅速增加,因此,免疫组化法检测出高水平的 c-Fos 蛋白被用作神经元活动变化的标志。酪氨酸羟化酶(TH)存在于儿茶酚胺能神经元的胞浆中,是儿茶酚胺生物合成过程中的限速酶,可作为蓝斑-去甲肾上腺素能神经细胞的标记物<sup>[9-10]</sup>。

经 PGD 和 Normal 两组小鼠蓝斑 c-Fos/TH 免疫荧光双染,计数蓝斑 TH 阳性细胞数量,再计数 TH 阳性细胞中 c-Fos 阳性的细胞数量,计算 c-Fos/TH 阳性的细胞数比例,可反映蓝斑-去甲肾上腺素能神经元的活性状态。结果显示,在 45℃ 30 min 热应激下,PGD 和 Normal 两组小鼠蓝斑区域去甲肾上腺素能神经元的活性无明显差异( $P > 0.05$ ,图4)。

对 PGD 和 Normal 两组小鼠下丘脑旁核进行

c-Fos 免疫组化染色,计数阳性细胞,PGD 和 Normal 两组小鼠比较无显著差异( $P > 0.05$ ,图5)。

### 2.4 45℃ 30 min 高温应激下,外周应激器官肾上腺的结构和功能状态评估

肾上腺是体内调节多种生理过程的内分泌器官,在应激反应、代谢及心血管系统方面发挥着重要作用<sup>[11]</sup>。肾上腺分泌激素受到机体应激反应的调节,肾上腺由皮质和髓质组成,皮质主要分泌糖皮质激素,髓质主要分泌儿茶酚胺(肾上腺素和去甲肾上腺素)<sup>[12]</sup>。

#### 2.4.1 肾上腺皮质、髓质组织结构

肾上腺组织石蜡切片经 HE 染色观察 PGD 和 Normal 两组小鼠的肾上腺皮质和髓质,未见明显的形态结构异常,两组间无显著差异(图6)。

#### 2.4.2 肾上腺皮质、髓质合成分泌激素的功能评估

##### 2.4.2.1 肾上腺皮质合成分泌糖皮质激素能力

糖皮质激素的合成以胆固醇为原料,首先通过

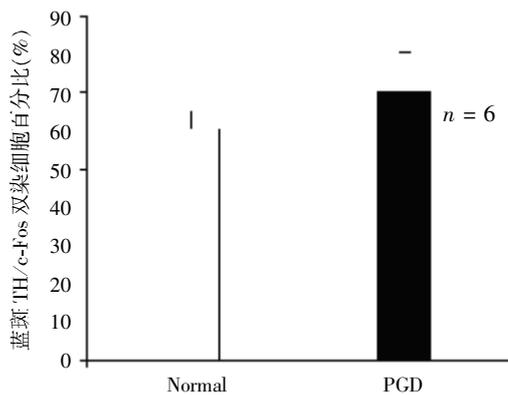
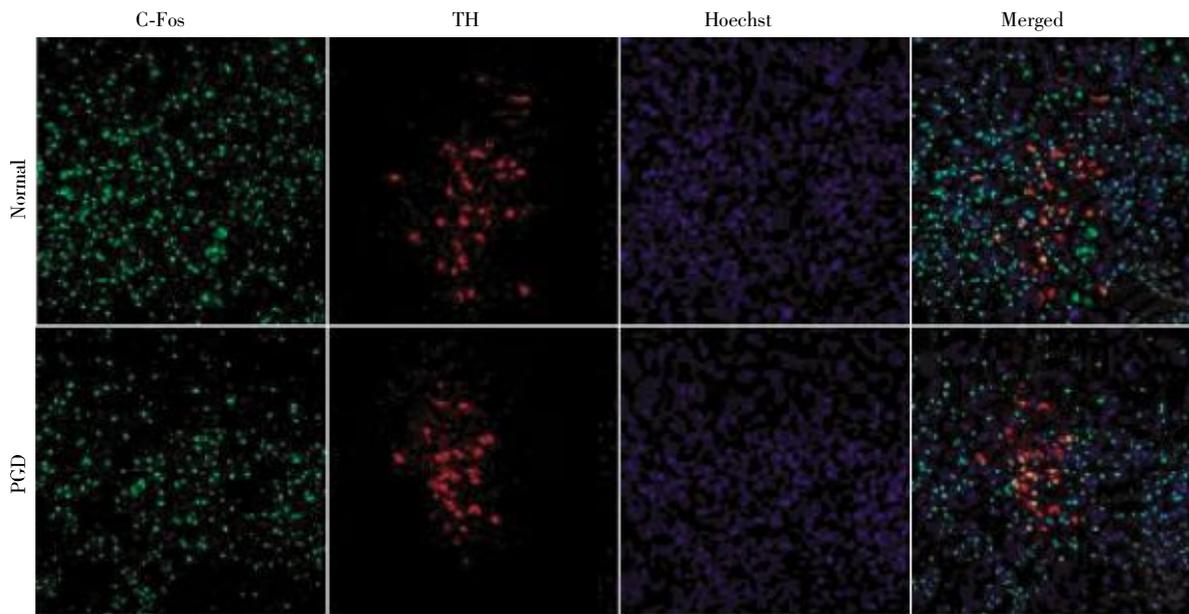


图 4 蓝斑 c-Fos/TH 免疫荧光双染及阳性信号计数( $\times 20$ )

Figure 4 Immunofluorescence stain of c-Fos/TH in LC and the positive signal counting of immunofluorescence stain of c-Fos/TH in LC ( $\times 20$ )

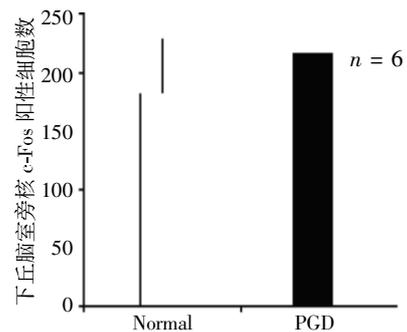
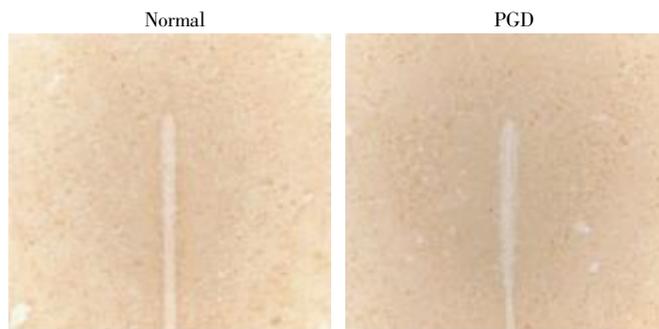


图 5 PVN c-Fos 免疫组化及阳性信号计数统计( $\times 20$ )

Figure 5 Immunohistochemistry of c-Fos in PVN and the positive signal counting of c-Fos in PVN ( $\times 20$ )

类固醇激素合成急性调节蛋白(StAR)的作用,将胆固醇转运入线粒体内,再由一系列经典类固醇生成酶类:细胞色素 P450 侧链裂解酶(P450SCC)、 $3\beta$ -羟基类固醇脱氢酶( $3\beta$ -HSD)、细胞色素 P450 21-羟化酶(P450c21)、细胞色素 P450 11 $\beta$ -羟化酶(P450c11),催化合成糖皮质激素。

将一侧肾上腺组织进行冰冻切片并油红 O 染色,反映肾上腺皮质中胆固醇的含量。计数油红 O

染色的阳性信号,并在两组小鼠之间进行比较,结果显示:在  $45^{\circ}\text{C}$  30 min 热应激下,PGD 和 Normal 两组小鼠的肾上腺皮质油红阳性信号无差异 ( $P > 0.05$ ,图 7)。

糖皮质激素合成途径中任何一种酶的异常都能导致激素合成障碍和其前体物积聚,造成代谢紊乱。用 Real-time PCR 检测肾上腺中重要调节蛋白及相关酶的 mRNA 水平,验证 PGD 和 Normal 两组小鼠

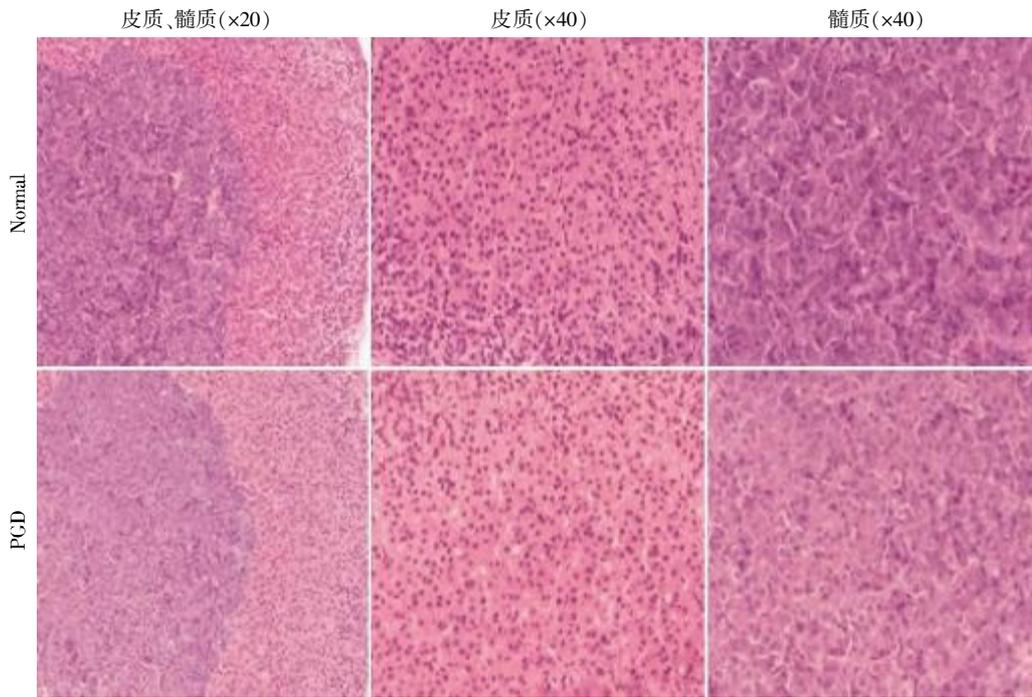


图6 肾上腺皮质、髓质形态结构

Figure 6 Morphological structure of adrenal cortex and medulla

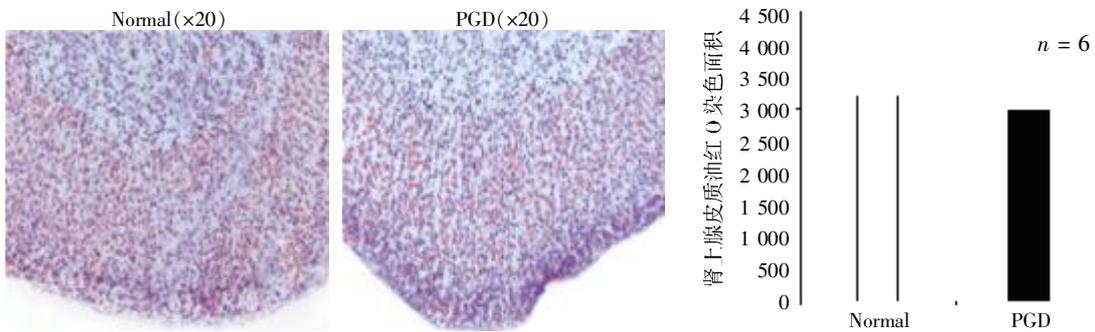
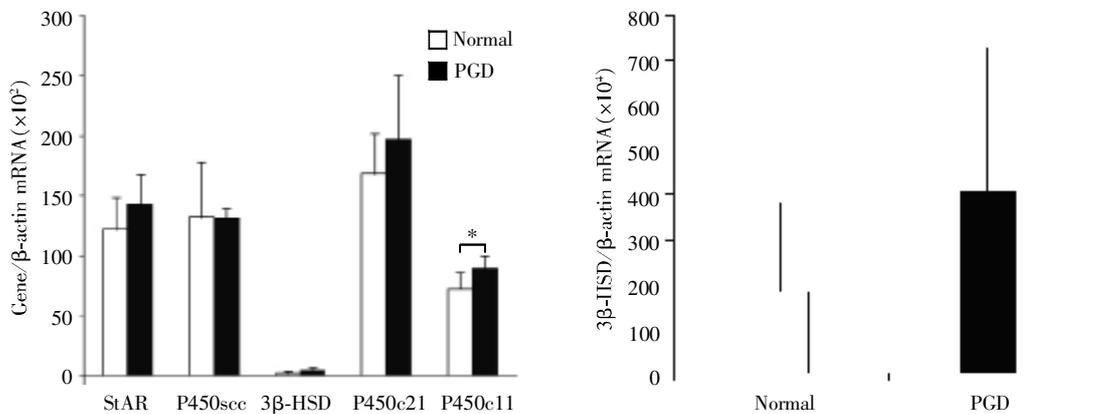


图7 肾上腺皮质油红O染色阳性信号统计分析

Figure 7 Oil red O stain of adrenal cortex and the positive signal counting of oil red O stain



两组比较, \* $P < 0.05$ ,  $n = 6$ 。

图8 皮质酮合成调节蛋白和酶的基因表达

Figure 8 mRNA level of corticosterone synthesis regulatory protein and enzyme

参与激素合成的关键分子表达是否有差异。结果显示:在 45°C 30 min 应激下,PGD 小鼠的 P450c11 表达较 Normal 组偏高( $P < 0.05$ ,图 8);StAR 和其他类固醇生成酶的表达水平在两组小鼠间无统计学差异。

#### 2.4.2.2 肾上腺髓质合成分泌肾上腺素能力

肾上腺素为儿茶酚胺合成通路中最终产物,由去甲肾上腺素在苯乙醇胺甲基转移酶(PNMT)的催化下转化生成<sup>[13]</sup>。若 PNMT 异常可导致肾上腺素合成异常。用 Real-time PCR 检验肾上腺 PNMT 表达水平。结果显示:在 45°C 30 min 应激下,PGD 和 Normal 两组小鼠的 PNMT 表达量无显著差异 ( $P > 0.05$ ,图 9)。

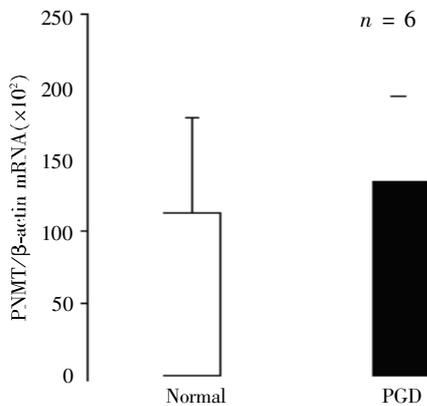


图 9 去甲肾上腺素转化生成肾上腺素关键酶 PNMT 表达  
Figure 9 mRNA level of PNMT

### 3 讨论

PGD 是对有遗传风险的胚胎进行植入前遗传物质分析的诊断方法,是辅助生殖的重要组成,在其应用过程中涉及诸多非生理性操作<sup>[14]</sup>。由于 PGD 应用时间短,其子代的健康状况缺乏大样本、长时期、多中心的流调资料。目前,对 PGD 操作及其出生子代进行系统、长期的安全评估仍是非常重要的课题。本研究运用小鼠模型,选取对个体生长发育具有重要意义的应激能力作为评估着眼点,在 45°C 热应激下评估 PGD 小鼠对于环境变化的反应调节能力,以期为全面评估 PGD 子代健康提供有价值的信息。

通过观察 PGD 小鼠和对照小鼠在 45°C 高温环境下的耐受时间,发现 PGD 小鼠在热应激下的存活时间明显低于 Normal 小鼠,提示其对高温环境的反应和调节能力异常。因此,进一步对参与应激反应的两个主要调控轴:蓝斑-交感-肾上腺髓质系统及

下丘脑-垂体-肾上腺皮质系统(HPA 轴)进行了分析评估。

比较 45°C 30 min 热应激作用下 PGD 和 Normal 小鼠的蓝斑-交感-肾上腺髓质系统,未发现蓝斑区域以及肾上腺髓质的组织结构异常。同时,两组小鼠蓝斑的神经元活性,以及肾上腺髓质合成分泌的肾上腺素和去甲肾上腺素水平均无显著差异。这些结果提示,PGD 小鼠的蓝斑-交感-肾上腺髓质系统在 45°C 高温应激下能产生与 Normal 小鼠相似的反应,以适应环境的变化。

另一方面,本文比较了 PGD 和对照小鼠 HPA 轴相关器官的结构和功能,证实两组小鼠下丘脑室旁核区及肾上腺皮质的组织结构正常。进一步对下丘脑室旁核(PVN)的神经元活性进行检测,显示两组小鼠 PVN 区 c-Fos 阳性的神经元数目无显著差异,提示 PGD 小鼠 HPA 轴的中枢器官对 45°C 热环境具有与 Normal 小鼠相似的反应能力。同时,评估了 HPA 轴的外周器官肾上腺皮质合成激素的功能,证实两组小鼠肾上腺中合成激素的原料以及参与激素合成的关键酶表达无显著差异,虽然 PGD 小鼠 P450c11 的 mRNA 水平相对于 Normal 小鼠偏高,但未影响肾上腺皮质最终合成分泌的皮质酮水平。上述结果提示,PGD 小鼠 HPA 轴对 45°C 高温应激能产生与 Normal 小鼠相似的反应。而在本课题组最近的研究中,发现 PGD 小鼠在 -20°C 30 min 的冷应激作用下,肾上腺皮质分泌皮质酮的水平低于 Normal 小鼠,提示其对 -20°C 冷应激的调节能力不同于 Normal 小鼠(资料未发表)。本研究只选取 45°C 这一单一的温度作为热应激条件,虽然显示 PGD 小鼠在该条件下肾上腺调节能力与 Normal 小鼠无明显差异,但仍不能排除当 PGD 小鼠面临更剧烈的高温环境时,能表现出与 Normal 小鼠相同的调节能力。

在应激状态下,机体通过兴奋蓝斑-交感-肾上腺髓质系统和下丘脑-垂体-肾上腺皮质轴,引起相应激素的分泌增加,进而影响诸多器官的生理生化活动,以适应环境的变化。因此,本研究观察到的 PGD 小鼠对 45°C 热环境的反应调节能力异常,可能不是由于蓝斑、下丘脑以及肾上腺的结构和功能差异直接造成的,而与这两个系统最终分泌的应激激素(包括肾上腺素、去甲肾上腺素、糖皮质激素)的进一步作用有关,激素靶器官的应答水平差异可能造成两组小鼠的不同反应。

接受交感神经节后纤维支配的器官中存在着与肾上腺素、去甲肾上腺素反应的受体,称为肾上腺素

能受体。肾上腺髓质激素作用于心脏、肝、肾、动静脉血管、肌肉、脂肪组织等,通过靶器官的肾上腺素能受体,产生复杂的作用,如心肌收缩力和兴奋度增强,心输出量增加,收缩压升高;还促进糖原和脂肪分解,升高血糖,提供更多的能量等<sup>[15]</sup>。虽然在45℃ 30 min的高温作用下,PGD小鼠和Normal小鼠的肾上腺髓质激素分泌水平没有差异,但若诸多靶器官的激素受体数量或激素受体敏感性存在差异,可造成在相同激素水平下产生不同的机体耐受效应。

肾上腺糖皮质激素及其受体对调节和维持机体正常生理状态起重要作用<sup>[16]</sup>。糖皮质激素经典受体为糖皮质激素受体 $\alpha$ ,几乎在所有组织、细胞中表达。应激时,机体一方面激活,释放大量炎症介质及炎症因子,从而抵御刺激因子;另一方面,糖皮质激素抑制炎症反应过度,以免组织器官损伤,保护机体正常生理功能。糖皮质激素受体的正常表达对维持机体的正常生理状态起重要作用,其表达或功能发生抑制时,机体就会出现糖皮质激素抵抗现象,继发引起炎症因子分泌大量增加,导致严重炎症反应。当应激强烈时,糖皮质激素受体的表达和功能下调,会造成机体在糖皮质激素受体水平上的应激反应紊乱,继发全身性多器官损害。由此推测,若PGD小鼠和Normal小鼠的全身各组织、细胞中糖皮质激素受体的表达或功能存在差异,则这些组织、细胞对于糖皮质激素的应答有差异,从而可造成机体不同程度的应激紊乱和应激损伤,有可能是造成两组小鼠存活时间差异的原因。

综上所述,本研究发现PGD小鼠对45℃高温环境的调节能力与Normal小鼠存在差异,这一异常可能不是由蓝斑-交感-肾上腺髓质系统和HPA轴的主要器官——蓝斑、下丘脑以及肾上腺的结构和功能差异直接造成的,而是与它们所分泌激素的进一步作用有关。因蓝斑-交感-肾上腺髓质系统和HPA轴分泌的应激激素对全身多种组织器官产生广泛复杂的作用,因此对这些靶器官需要进行全面的结构、功能评估,尤其是器官在应激状态下的反应能力和应答水平。本研究结果为PGD子代的全面健康评估提供了有价值的信息。然而,在本实验中,与对照组相比,PGD组小鼠涉及了体外培养、卵裂球活检和胚胎移植等多项操作,每项操作的特异性作用还有待于进一步的研究揭示。

#### [参考文献]

[1] Simpson JL. Preimplantation genetic diagnosis at 20 years [J]. *Prenat Diagn*, 2010, 30(7): 682-695

- [2] de Mouzon J, Goossens V, Bhattacharya S, et al. Assisted reproductive technology in Europe, 2007: results generated from European registers by ESHRE [J]. *Hum Reprod*, 2012, 27(4): 954-966
- [3] Sunderam S, Chang J, Flowers L, et al. Assisted reproductive technology surveillance--United States, 2006 [J]. *MMWR Surveill Summ*, 2009, 58(5): 1-25
- [4] Watkins AJ, Platt D, Papenbrock T, et al. Mouse embryo culture induces changes in postnatal phenotype including raised systolic blood pressure [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(13): 5449-5454
- [5] Yu Y, Wu J, Fan Y, et al. Evaluation of blastomere biopsy using a mouse model indicates the potential high risk of neurodegenerative disorders in the offspring [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2009, 8(7): 1490-1500
- [6] Lecic-Tosevski D, Vukovic O, Stepanovic J. Stress and personality [J]. *Psychiatrike*, 2011, 22(4): 290-297
- [7] Chrousos GP. Stress and disorders of the stress system [J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2009, 5(7): 374-381
- [8] Kyrou I, Tsigos C. Stress hormones: physiological stress and regulation of metabolism [J]. *Cur Opin Pharmacol*, 2009, 9(6): 787-793
- [9] Kovács KJ. c-Fos as a transcription factor: a stressful (re) view from a functional map [J]. *Neurochem Int*, 1998, 33(4): 287-297
- [10] Bernuci MP, Szawka RE, Helena CV, et al. Locus coeruleus mediates cold stress-induced polycystic ovary in rats [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(6): 2907-2916
- [11] Bielohuby M, Herbach N, Wanke R, et al. Growth analysis of the mouse adrenal gland from weaning to adulthood: time- and gender-dependent alterations of cell size and number in the cortical compartment [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007, 293(1): E139-146
- [12] Bland ML, Desclozeaux M, Ingraham HA. Tissue growth and remodeling of the embryonic and adult adrenal gland [J]. *Ann N Y Acad Sci*, 2003, 995(1): 59-72
- [13] Kvetnansky R, Sabban EL, Palkovits M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89(2): 535-606
- [14] Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification [J]. *Nature*, 1990, 344(6268): 768-770
- [15] Low DA, Keller DM, Wingo JE, et al. Sympathetic nerve activity and whole body heat stress in humans [J]. *J Appl Physiol*, 2011, 111(5): 1329-1334
- [16] Klein SC, Peterson ME. Canine hypoadrenocorticism: part I [J]. *Can Vet J*, 2010, 51(1): 63-69

[收稿日期] 2013-06-13