doi:10.11659/jjssx.01E017061

·基础研究·

Ad-shRNA-NgR 转染 EAE 大鼠脑组织安全性评估

张 艳[1],秦新月[2],张 敏[1],贺 曦[1],张家玉[3] (1.重庆市急救医疗中心,重庆市第四人民医院神经内科,重庆 400010;2.重庆医科大学附属第一医院神经内科,重庆 400016;3.第三军医大学第二附属医院神经内科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 观察 NgR 特异性 RNA 干扰的重组腺病毒(Ad-shRNA-NgR)转染实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)脑组织后,EAE 大鼠的存活情况,为 EAE 干预实验提供依据。**方法** 80 只大鼠建立 EAE 大鼠模型后,将其随机分成高、中、低、对照组,每组 20 只。实验组分别用滴度为 1×10^{11} pfu/mL、1×10^{10} pfu/mL、1×10^{9} pfu/mL 的 Ad-shRNA-NgR 注入 EAE 大鼠侧脑室。观察注射后第 3 天、第 7 天 EAE 大鼠的存活情况。**结果** Ad-shRNA-NgR 转染 EAE 脑组织后,高滴度组在第 3 天和第 7 天时 EAE 大鼠的存活率显著低于中、低滴度组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。中、低滴度组和对照组 EAE 大鼠的存活率无显著性差异($P>0.05$)。**结论** Ad-shRNA-NgR 转染 EAE 大鼠实验时,滴度从 1×10^{10} pfu/mL 到 1×10^{9} pfu/mL 范围是安全的。

[关键词] 腺病毒;实验性自身免疫性脑脊髓炎;转染;安全性;动物模型

[中图分类号] R329.3 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-02-25

Safety evaluation of Ad-shRNA-NgR in brain tissue of EAE rats

ZHANG Yan[1], QIN Xin-yue[2], ZHANG Min[1], HE Xi[1], ZHANG Jia-yu[3] (1. Department of Neurology, the Fourth People's Hospital in Chongqing, Chongqing Emergency Medical Center, Chongqing 400010, China; 2. Department of Neurology, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 3. Department of Neurology, the Second Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To observe the survival of EAE rats after recombinant adenovirus NgR specific RNA interference (Ad-shRNA-NgR) transfected the brain tissue of the experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), and provide the basis for EAE intervention. **Methods** EAE rats were randomly divided into high, medium, low and control groups (20 rats in each group). The lateral ventricle of EAE rats were injected with a titer of 1×10^{11} pfu/mL, 1×10^{10} pfu/mL and 1×10^{9} pfu/mL Ad-shRNA-NgR. The survival of EAE rats at third and seventh days after injection was observed. **Results** The survival rate of EAE rats of the high titer group was significantly lower than those of the middle titer group and low titer group at third and seventh days after Ad-shRNA-NgR transfected into EAE brain tissue. There was no significant difference in survival rate in middle titer group, low titer group and control group. **Conclusion** The titer of Ad-shRNA-NgR is safe in the experiment of EAE rats from 1×10^{10} pfu/mL to the range of 1×10^{9} pfu/mL.

Keywords: adenovirus; experimental autoimmune encephalomyelitis; transfection; safety; animal model

多发性硬化是中枢神经系统常见的自身免疫性疾病,具有较高的致残率,以慢性炎性脱髓鞘为主要病理改变。其具体的发病机制不明,目前缺乏有效的特异性治疗。实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)是研究多发性硬化常用的动物模型,该模型在临床、病理、生化等方面均能很好地模拟多发性硬化的发病过程。Nogo 受体(nogo receptor,NgR)是轴突再生抑制因子 Nogo-A,髓鞘相关糖蛋白,少突胶质细胞髓鞘糖蛋白的共受体。近年研究提示 NgR 在中枢神经系统免疫性疾病中可能具有免疫调节的作用,其过度表达可能是多发性硬化发病的关键环节。从而提示,通过阻断这一受体的功能或减少其表达,就有可能限制多发性硬化的发生和发展。

[通信作者] 张 艳:E-mail:zhangyanlu2017@163.com

载体系统是基因治疗的基础,腺病毒因其具有能获得高滴度的病毒颗粒、外源基因容量大、表达时间长、转染效率高、没有致癌和致突变的危险等优点,在基因治疗研究中被广泛应用[1]。截止 2013 年 7 月,重组腺病毒载体在“Gene Therapy Clinical Trial Worldwide”网站登记注册的临床基因治疗方案中占 23.5%[2]。腺病毒能够介导特异靶基因降解同时不引起非特异性干扰反应而实现基因沉默,这项技术常常被用于研究某个基因表达异常增高引发疾病的发病机制[3-4]。通过稳定表达 sRNA 的重组载体介导而实现 RNA 干扰[5]。目前,虽然腺病毒在治疗各种肿瘤的临床研究取得一定成就,但其主要还是应用于各种疾病发病机制的探讨或对于发病的动物模型进行治疗性干预的基础研究。在这其中,中枢神经系统性疾病主要包括脑瘤、多发硬化、脑血管意外、帕金森病等[6-9]。

然而,靶向性问题是所有中枢神经系统性疾病机制研究所面对的共同问题。虽然腺病毒对多种组织具有高效的感染能力,但是在实现腺病毒对各种组织特别是脑组织的靶向性感染之前,颅内注射无疑是实现腺病毒对颅内脑组织靶向干预的最重要和直接的手段之一。另一方面,运用重组腺病毒进行体内转染时,重组腺病毒对机体有一定的毒性作用,主要表现为重组腺病毒的剂量及滴度与炎症反应的强弱有直接关系[10]。以上这些,就给颅内直接注射腺病毒实现分子干预的各种临床及临床前实验的安全性问题带来了极大的挑战。

近年来,利用 NgR 特异性 RNA 干扰的重组腺病毒(Ad-shRNA-NgR)转染实验性自身免疫性脑脊髓炎(experimental autoimmune encephalomyelitis,EAE)大鼠脑组织的实验需求逐渐增多,为此,本实验扩增并纯化浓缩腺病毒(Ad-shRNA-NgR),测定并调整病毒滴度,准确评估不同滴度的腺病毒对 EAE 大鼠脑组织进行转染时的安全性,为腺病毒注射转染、干预 EAE 大鼠模型提供了一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 重组腺病毒的扩增、收集、纯化与滴度测定

取 50 ~ 100 uL Ad-shRNA-NgR(重庆医科大学附属第一医院神经内科提供)病毒上清,加入 5% DMEM 至 1 mL,混匀。选取所培养的 293 细胞(重庆医科大学附属第一医院神经内科提供)中长至 50% ~70% 融合的进行转染。腺病毒转染后 48 ~72 h 后,见有 60% ~70% 的细胞出现 CPE 现象即细胞变圆、肿胀、脱落现象,即用橡皮刮将细胞刮下,离心收集细胞。 -20 ℃/37 ℃ 反复冻融,离心,收集上清,同时准备 AdenoPACK 20,病毒洗脱,最后进行缓冲液置换[11]。采用组织培养半数感染量 TCID 50 测定病毒滴度,滴度结果计算公式:TCID 50 = CPE >50% 病毒稀释度 + (>50% 的百分数 -50)/(>50% 的百分数 - <50% 的百分数) ×lg10。

1.2 EAE 动物模型的制备

参照罗家明等[12]经验和方法建立 EAE 模型。简要过程如下:羊毛脂和石蜡油按 1∶3 配成不完全福氏佐剂(incomplete Freund'adjuvant,IFA)。将 BCG 加入 IFA 中,制成含 BCG 分别为 20 mg/mL 的完全福氏佐剂(complete Freund'adjuvant,CFA)。制备豚鼠全脊髓匀浆(spinal cords homogenate of guinea pig,GPSCH)。将 GPSCH 与等量的 CFA 混匀,冰上抽打成油包水型乳剂即得抗原。用足掌向足指/趾方向皮下注射抗原(0.5 mL 只),同时当天于双后足背皮下注射 BPV 0.1 mL含百日咳杆菌 1×10^{11})。采用 Koh 等[13]报告的评分标准对 EAE 进行临床评分。当评分大于等于 1 分记为 EAE 临床发病。

1.3 立体定向手术

在大鼠免疫后第 7 天,将 80 只 EAE 大鼠随机分入高、中、低滴度组和对照组,后用 3.5% 的水合氯醛(1 mL/100 mg)麻醉 EAE 大鼠,显效后固定于立体定位仪。消毒后,剪开大鼠头顶皮肤,在前囟后 0.8 mm,右侧旁开 1.4 mm 处插入微量注射器深约 3.3 mm 入侧脑室,以 2 μL/min 的速度注射总量为 10 μL 的重组腺病毒,注射完毕后针头留置 5 min 后缓慢拔出。高、中、低滴度组分别注射滴度为 1.0×10^{11} pfu/mL、1.0×10^{10} pfu/mL、1.0×10^{9} pfu/mL 的 Ad-shRNA-NgR,对照组以 PBS 代替。注射完毕后,缝合切口,消毒。

1.4 安全性评估

分别统计比较术后第 3 天和第 7 天各组 EAE 模型存活率情况。存活率 = EAE 大鼠模型存活数/本组 EAE 大鼠模型数

1.5 组织切片及 HE 染色

固定后,取侧脑室周围 4 ~ 5 mm 厚的脑组织,将修好的组织块进行石蜡包埋后,脑组织均行连续冠状切片,制成 6 μm 厚的切片,再进行 HE 染色。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 13.0 软件进行分析,组间比较采用 χ^2 检验,$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 转染后第 3 天

重组腺病毒转染 293 细胞后实现扩增,转染后第 3 天显微镜显示见图 1。收集裂解细胞、逐步纯化、校对稀释后得到滴度为 1.0×10^{11} pfu/mL、1.0×10^{10} pfu/mL、1.0×10^{9} pfu/mL 的病毒液。EAE 大鼠经立体定向手术后,第 3 天高、中、低滴度组及对照组的存活率分别为 60%、90%、95%、95%,高滴度组存活率显著低于中、低滴度组(高滴度组和中滴度组,$P = 0.028$;高滴度组和低滴度组,$P = 0.008$),中、低滴度组和对照组 EAE 大鼠的存活率无显著性差异(中滴度组和对照组,$P = 0.548$;低滴度组和对照组,$P = 1$),见表 1。

表 1 各组 EAE 模型转染后第 3 天存活情况比较

组别	n	术后第 3 天		
		存活(例)	死亡(例)	存活(%)
高滴度组	20	12	8	60
中滴度组	20	18	2	90*
低滴度组	20	19	1	95*
对照组	20	19	1	95*

*:与高滴度组比较,$P < 0.05$

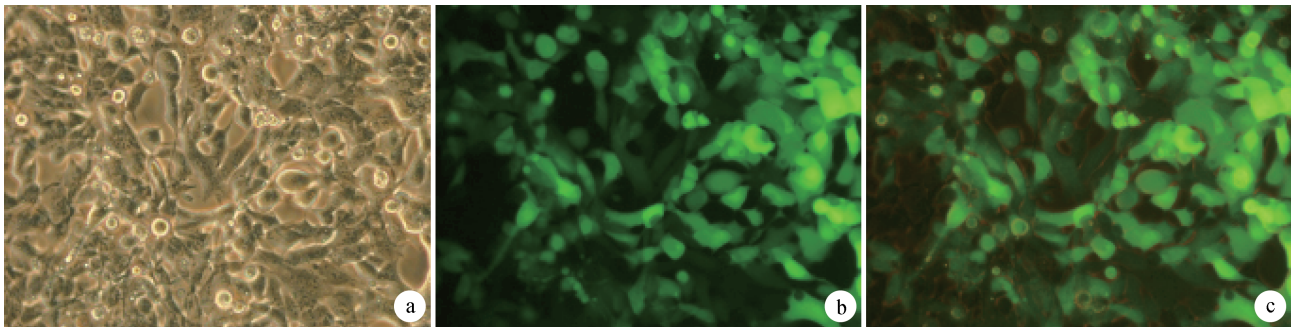
2.2 转染后第 7 天

各组转染后第 7 天 EAE 大鼠脑组织中性粒细胞浸润由低滴度组到高滴度组逐渐增多,炎性反应由弱到强(图 2)。第 7 天时高滴度组存活率进一步下降,达到 50%,仍显著低于中、低滴度组(高滴度组和中滴度组,$P=0.006$;高滴度组和低滴度组,$P=0.001$),而中、低滴度组和对照组 EAE 大鼠的存活率仍无显著性差异(中滴度组和对照组,$P=0.548$;低滴度组和对照组,$P=1$),见表 2。

表 1 各组 EAE 模型转染后第 7 天存活率情况比较

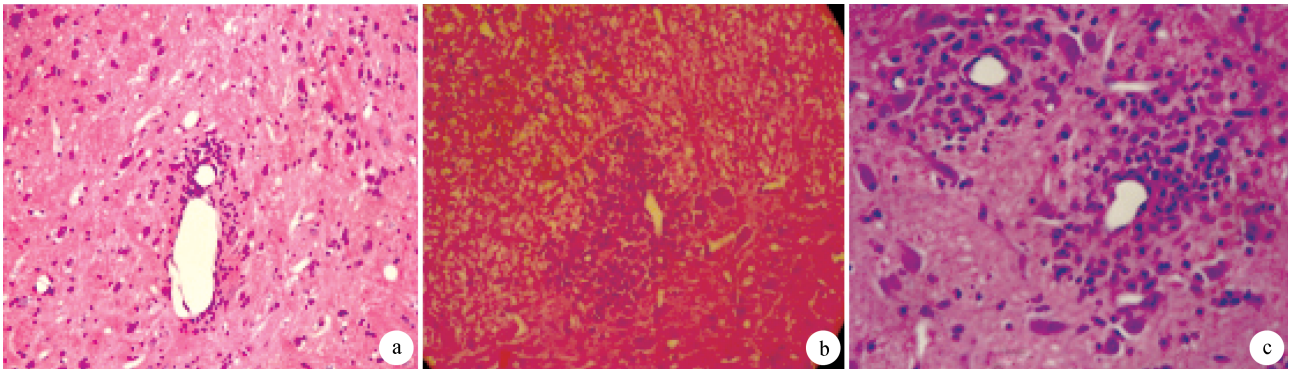
组别	n	术后第 7 天		
		存活(例)	死亡(例)	存活率(%)
高滴度组	20	10	10	50
中滴度组	20	18	2	90 *
低滴度组	20	19	1	95 *
对照组	20	18	2	90 *

*:与高滴度组比较,$P<0.05$



a:普通显微镜;b:荧光显微镜;c:普通 + 荧光显微镜

图 1 转染后第 3 天显微镜显示结果(×200)



a:低滴度组脑组织切片;b:中滴度组脑组织切片;c:高滴度组脑组织切片

图 2 转染后第 7 天中性粒细胞浸润情况(HE ×200)

3 讨论

近年来,越来越多的研究者开始对各种中枢性神经系统疾病的大鼠模型进行颅内注射带有目的基因或可以封闭目的基因的腺病毒,但鲜有文献报道评估注射腺病毒转染 EAE 大鼠后的安全性。Kim 等[14]将一种条件复制型溶瘤腺病毒(CRAd-S-pk7),以 2.5×10^{7}、2.5×10^{8}、2.5×10^{9} 的量注入叙利亚仓鼠颅内后,在第 6、32、64 天时,仓鼠的存活率与对照组无显著性差异,说明腺病毒在 2.5×10^{9} 剂量以下注入仓鼠颅内是安全的。这与本实验检测结果略有不同,即 Ad-shRNA-NgR 腺病毒在 1.0×10^{8} 剂量(即 10 μL × 1.0×10^{10} pfu/mL)以下注入大鼠颅内为安全剂量,在剂量为 1.0×10^{9}(即 10 uL × 1.0×10^{11} pfu/mL)时存活率显著下降,这可能与本实验中 EAE 大鼠模型炎症效应与重组腺病毒注入颅内后炎症反应的协同效应有关,从而增加了 EAE 大鼠的死亡率。同样,Yao 等[15]用 3×10^{8} 剂量的腺病毒(Ad-GFP、Ad-pGFAP-Cre)注入各种实验小鼠颅内,并未因小鼠的大量死亡而影响其实验结果。而在郎洪刚等[16]的研究中,无论是 Ad-GFP 组还是 Ad-BDNF 组 10 μL × 2×10^{10} PFU/mL 的剂量通过侧脑室注入大鼠颅内至少 4 周是安全的,并未引起严重的炎症反应而终止实验。此前,吴小慧等[17]将滴度为 3.16×10^{10}pfu/mL 的 Ad-shRNA-NgR 腺病毒注射到大鼠大脑缺血区时,发现不但腺病毒的转染效率严重下降,同时还观察到大鼠脑组织注射区域内出现明显炎症反应。Ghulam 等[18]以 2×10^{8}、2×10^{9}、2×10^{10} 剂量的腺病毒(HC-Ad-TK and HC-Ad-TetON-Flt3L)注入

Lewis 大鼠颅内,5 d 后在 2×10^{10} 的高剂量组大鼠颅内出现明显的神经毒性病变和免疫炎症病变。

除了机制探讨,颅内注射腺病毒还被用于治疗某些中枢神经性疾病的临床前研究。Vander 等[6]在治疗原发性脑肿瘤的临床前研究中,在 Lewis 大鼠的颅内注射 1.0×10^{8} 的 HC-Ad-TetOn-Flt3L,显著提高了脑肿瘤大鼠 90 d 的存活率。国内越来越多的研究者也在运用侧脑室注射腺病毒的方法用于帕金森病、脑缺血再灌注等疾病模型的治疗,因此该治疗方法的安全性研究也越来越显重要[7-9]。本实验中高滴度组在第 7 天时存活率进一步下降,达到 50%,可能与腺病毒载体在移植转染后第 7 天达到高峰,炎症反应、神经毒性反应进一步增加相关[19]。

本研究选用的载体为带有完整、独立的 GFP 表达系统的腺病毒,可以对转染情况进行直接的镜下观察。来源于人胚肾细胞的 293 细胞,普遍被用作为缺陷型病毒扩增的包装细胞系,扩增效率高[20]。用德国 Starious 公司的 Adno PACK20 纯化收集得到大量重组腺病毒原液,保证了高病毒活性和感染率。为保证腺病毒滴度的可靠性和准确性,本研究采用 TCID50 检测纯化后的腺病毒滴度。本实验选取大鼠侧脑室(EAE 模型病灶多集中在侧脑室附近)局部注射进行转染。本实验选用局部手术后

第 3 天,作为术后急性期的一个观测大鼠存活率时间节点。另外,Abea 等[21]报道腺病毒载体体内外转基因的表达于转染后第 7 天达高峰,故我们选择术后第 7 天为第 2 观测节点。

目前,越来越多的学者采取颅内注射腺病毒的方法进行科学研究。其目的主要有两方面,通过干预阻断或者增强颅内局部脑细胞、组织对于某分子的表达,达到观察这一分子表达变化对于正常脑组织、脑功能乃至整个机体的影响。另一方面,在构建各种疾病模型后,通过颅内注射腺病毒直接干预的方法,试图达到阻断或者延缓疾病进展的目的。但是,以上两种目的都是要在确保安全的前提下才能顺利完成。本实验筛选出了可安全、高效转染 EAE 大鼠脑组织的 Ad-shRNA-NgR 滴度,避免了因腺病毒过激的炎症反应而影响实验结果,甚至导致实验终止,同时避免过少的腺病毒转染而未能达到预期的干预目的,为腺病毒注射转染、干预 EAE 大鼠模型实验提供了一定依据,也为颅内直接注射腺病毒这一方式的各种干预实验提供了安全性参考。

总之,本实验表明在用 Ad-shRNA-NgR 通过侧脑室注射法转染 EAE 大鼠时,滴度从 1×10^{10} pfu/mL 到 1×10^{9} pfu/mL 的 10 μL 腺病毒是安全的。

[参考文献]

[1] Roy I,Holle LW,Holle E,et al. Efficient translocation and apoptosis induction by adenovirus encoded VP22-p53 fusion protein in human tumor cells in vitro[J]. Anticancer Res,2002,22(6A):3185 - 3189.

[2] 薛淑雅,杨月峰. 重组腺病毒载体靶向性策略的研究进展[J]. 中国医药生物技术,2014,9(2):129 - 132. doi:10. 3969/cmba. j. issn. 1673 - 713X. 2014. 02. 008.

[3] Fire A,Xu S,Montomery MK,et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans[J]. Nature,1998,391(6669):806 - 811. doi:10. 1038/35888.

[4] Zamore PD,Tuschl T,Sharp PA,et al. RNAi:double. stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals[J]. Cell,2000,101(1):25 - 33. doi:10. 1016/S0092 - 8674(00)80620 - 0.

[5] Brummelkamp TR,Bernards R,Agami R. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells[J]. Science,2002,296(5567):550 - 553. doi:10. 1126/science. 1068999.

[6] Vander VN,Raja N,Yi E,et al. Preclinical efficacy and safety profile of allometrically scaled doses of doxycycline used to turn "on" therapeutic transgene expression from high-capacity adenoviral vectors in a glioma model[J]. Human gene therapy methods,2016,27(3):98 - 111. doi:10. 1089/hgtb. 2015. 168.

[7] 王 思,李秀华,杜 鹃,等. 侧脑室注射腺病毒介导的 GDNF 基因对帕金森病的保护作用[J]. 山东大学学报(医学版),2016,54(4):32 - 36. doi:10. 6040/j. issn. 1671 - 7554. 0. 2015. 1321.

[8] 唐吉伟,徐军美,钱自亮,等. 腺病毒介导过氧化物酶体增殖物激活受体-γ1 基因脑室内转染对大鼠缺血/再灌注脑的保护作用[J]. 国际麻醉学与复苏杂志,2012,33(1):1 - 5. doi:10. 3760/cma. j. issn. 1673 - 4378. 2012. 01. 001.

[9] 唐春花,郭淮莲,唐文雄,等. 重组腺病毒介导的血管生长素基因转染对大鼠局灶性脑缺血的治疗作用[J]. 中风与神经疾病,2012,29(10):868 - 871.

[10] DeMatteo RP,Chu G,Ahn M. Immunologic barriers to hepatic adenoviral gene therapy for transplantation:cellular and humoral responses limit transgene expression in mouse liver 1[J]. Transplantation,1997,63(2):315 - 319.

[11] He TC,Zhou S,da Costa LT,et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1998,95:2509 - 2514.

[12] 罗家明,秦新月,陈黎燕,等. 甲基强的松龙抑制实验性自身免疫性脑脊髓炎 IL-23/IL-17 轴机制研究[J]. 中国神经精神疾病杂志,2008,6(8):353 - 358. doi:10. 3969/j. issn. 1002 - 0152. 2008. 06. 007.

[13] Koh CS,Paterson PY. Suppression of clinical signs of celltransferred experimental allergic encephalomyelitis and altered cerebrovascular permeability in Lewis rats treated with a p lasminogen activator inhibitor[J]. Cell Immunol,1987,107(1):52 - 63.

[14] Kim JW,Auffinger B,Spencer DA,et al. Single dose GLP toxicity and biodistribution study of a conditionally replicative adenovirus vector,CRAd-S-pk7,administered by intracerebral injection to Syrian hamsters[J]. J Transl Med,2016,14(1):134. doi:10. 1186/s12967 - 016 - 0895 - 8.

[15] Yao Y,Chen ZL,Norris EH,et al. Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity[J]. Nature communications,2014,5. doi:10. 1038/ncomms4413.

doi:10.11659/jjssx.04E017069

·基础研究·

不同浓度丙泊酚后处理对谷氨酸致乳鼠离体脑片损伤的保护作用

王 蔚,王耀丽,周 健 (第三军医大学第三附属医院重症医学科,重庆 400042)

[摘 要] **目的** 探讨不同浓度丙泊酚后处理对谷氨酸(Glu)致乳鼠离体脑片损伤的保护作用。**方法** 切取并培养出生7 d的SD大鼠乳鼠离体脑片,随机分为5组:正常组,Glu损伤组(RI组),1 mg/L丙泊酚后处理组(PL1 + RI组),3 mg/L丙泊酚后处理组(PL3 + RI组),5 mg/L丙泊酚后处理组(PL5 + RI组),每组12例。将RI、PL1 + RI、PL3 + RI、PL5 + RI组培养至第6天,用含1 mmol/L Glu的培养基损伤30 min,建立缺血再灌注模型,损伤后将RI组移入正常的完全培养基,将PL1 + RI、PL3 + RI、PL5 + RI组分别移入含相应处理药物的完全培养基中继续培养24 h。通过对各组脑片进行尼氏小体计数、乳酸脱氧酶(LDH)释放率、组织损伤率的测定来比较各组脑片神经细胞的损伤程度。**结果** 与RI组相比,采用不同浓度丙泊酚后处理的各组,均能使尼氏小体数量增加,使LDH释放率和脑组织损伤率均降低,差异均具有统计学意义($P<0.05$)。PL3 + RI组的尼氏小体数量增加情况较PL1 + RI、PL5 + RI组高,差异具有统计学意义($P<0.05$),LDH释放率、脑组织损伤率低于PL1 + RI、PL5 + RI组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。**结论** 丙泊酚后处理对Glu致乳鼠离体脑片缺血再灌注损伤具有保护作用,但不呈浓度依赖性,在本实验中,3 mg/L丙泊酚显示的保护效果最佳。

[关键词] 丙泊酚;后处理;脑片;保护作用;乳酸脱氢酶

[中图分类号] R971.2;R965.2 [文献标识码] A [收稿日期] 2017-04-20

Protective effect of different concentrations of propofol postconditioning against glutamate neurotoxicity to brain slices of neonatal rats

WANG Wei, WANG Yao-li, ZHOU Jian (Department of Intensive Care Unit, the Third Affiliated Hospital of Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: Objective To explore the effects of different concentrations of propofol postconditioning against glutamate neurotoxicity to brain slices of neonatal rats. **Methods** The brain slices of neonatal rats were prepared and cultured in complete medium. They were randomly divided into five groups: the normal control group, glutamate injury group (RI group), 1 mg/L propofol postconditioning group (PL1 + RI group), 3 mg/L propofol postconditioning group (PL3 + RI group), 5 mg/L propofol postconditioning group (PL5 + RI group), 12 cases in each group. The RI, PL1 + RI, PL3 + RI, PL5 + RI groups were cultured for 6 days, then the brain slices were moved into the culture medium containing glutamate (1 mmol/L) and incubated for 30 minutes. And then, respectively, the brain slices of RI group were put into another complete culture medium, the PL1 + RI group, PL3 + RI group and PL5 + RI group were put into the medium containing corresponding concentrations of propofol medium and long chain fat emulsion injection. All of the above were cultured for 24 hours in order to establish the injury model. The numbers of the Nissl body, the LDH release rates and the brain tissue damage rates of each brain slice were detected to evaluate the effects of propofol postconditioning on the reperfusion injury in the glutamate-damaged brain slices of neonatal rats. **Results** Compared with the RI group, the numbers of the Nissl body of the PL1 + RI group, PL3 + RI group and PL5 + RI were higher, the LDH release rates and

[通信作者] 王耀丽,E-mail:wangylchen2005@aliyun.com

[16] 郎洪刚,曹文斌,杨俊华,等.脑室内注射重组BDNF腺病毒对大鼠海马神经发生的影响[J].解剖学研究,2011,33(4):255-258.

[17] 吴小慧,秦新月,王 敬,等.重组腺病毒Ad-shRNA-NgR在大鼠缺血脑组织的转染效率研究[J].第三军医大学学报,2010,32(8):802-804.

[18] Ghulam M, Weidong X, Mariana P, et al. Safety profile of gutless adenovirus vectors delivered into the normal brain parenchyma implications for a glioma phase 1 clinical trial[J]. Human Gene Therapy Methods, 2012, 23(4): 271-284. doi: 10.1089/hgtb.2012.060.

[19] 唐文雄,郭淮莲,唐春花,等.侧脑室注射重组血管生长素腺病毒对大鼠脑内血管生成的影响[J].中风与神经疾病,2011,28(2):111-114.

[20] Oualikene W, Lamoureux L, Weber JM, et al. Protease-deleted adenovirus vectors and complementing cell lines: potential applications of single-round replication mutants for vaccination and gene therapy[J]. Human Gene Therapy, 2000, 11(9): 1341-1353. doi: 10.1089/10430340050032438.

[21] Abea K, Setoguchib Y, Hayashia T, et al. In vivo adenovirus-mediated gene transfer and the expression in ischemic and reperfused rat brain[J]. Brain Research, 1997, 763(2): 191-201.

(编辑:左艳芳)