

miR-19b 转基因小鼠的构建及表型分析

胡晓山, 余章斌, 李萌萌, 朱金改, 朱 春, 韩树萍*

(南京医科大学附属南京市妇幼保健院儿科, 江苏 南京 210004)

[摘要] 目的:构建心肌细胞特异性过表达 miR-19b 的转基因小鼠,并对其进行表型分析。方法:先确定载体插入的酶切位点,根据 CloneEZ[®] PCR Cloning Kit 重组原理设计相应引物,以小鼠基因组为模板克隆出带有 miR-19b 前体序列(pre-miR-19b)的目的片段,利用重组酶连接到带有 alpha-MHC 启动子的载体上。将所得载体线性化后,采用显微注射方法注射到小鼠胚胎干细胞内。再将所得的重组胚胎干细胞移植入假孕的 C57BL/6J 雌鼠子宫内,在所得的子代,即 Founder 小鼠中采用特异的引物鉴定出转基因小鼠,并选出相应的品系,进行表型分析。结果:成功构建 miR-19b 转基因小鼠,且 miR-19b 转基因小鼠舒张期室间隔厚度、舒张期左室游离壁厚度以及射血分数均有升高。结论:心肌特异性过表达 miR-19b 可以导致心脏肥大。

[关键词] 转基因小鼠;心脏肥大;miR-19b;心血管疾病

[中图分类号] R785

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)05-579-07

doi:10.7655/NYDXBNS20130504

Construction and phenotype analysis of miR-19b transgenic mouse

Hu Xiaoshan, Yu Zhangbin, Li Mengmeng, Zhu Jingai, Zhu Chun, Han Shuping*

(Department of Pediatrics, Nanjing Maternal and Child Health Care Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210004, China)

[Abstract] **Objective:** To construct heart-special miR-19b overexpression transgenic mouse and analyze their phenotype. **Methods:** Firstly, we found out the suitable restriction enzyme cutting site on the plasmid which carrying alpha-MHC promoter, and design the primers according recombination principle provided by CloneEZ[®] PCR Cloning Kit. We inserted the pre-miR-19b sequence cloned from mice chromosome into the plasmid using recombinase. Secondly, after linearization of recombinant plasmid, they were injected into the embryonic stem (ES) cells. We transplanted the recombinant ES cells into the uterus of the pseudocyesis female C57BL/6J mice. At last, we selected out the lines of transgenic mouse and analyzed the phenotype of TG mouse. **Results:** We successfully constructed miR-19b transgenic mouse. The scores of interventricular septal thickness, left ventricle posterior wall and ejection fraction of miR-19b transgenic mouse were increased. **Conclusion:** The overexpression of heart-special miR-19b may lead to cardiac hypertrophy.

[Key words] transgenic mice; cardiac hypertrophy; miR-19b; cardiovascular disease

[Acta Univ Med Nanjing, 2013, 33(5): 579-585]

microRNAs (miRNA)是真核细胞中一种 21~25 个核苷酸、参与转录后基因调控的非编码单链小分子 RNA,可特异性识别靶基因 mRNA 的 3'-非翻译区(3'-UTR)并与之结合,引起靶基因 mRNA 的降解或翻译抑制,从而对基因进行转录后表达调控,调节许多重要的细胞活动^[1]。目前已经发现了千余种 miRNA^[2]。在近几年对 miRNA 的研究中发现,其对

心脏的发育、生理以及疾病方面都有重要的作用^[3],但 miRNA 发挥作用的具体机制需要进一步研究。miR-19b 是 miR-17~92 家族中的一员,之前的研究发现,敲除 miR-17~92 家族可以导致心脏和肺发育不全^[4],而 miR-19b 对细胞增殖有一定的作用^[5]。一些临床筛查也发现 miR-19b 在某些心血管系统疾病中的表达量升高^[6]。提示 miR-19b 对心脏生理功能有一定的调控作用。

本研究选用 alpha-MHC 基因启动子,构建了 alpha-MHC-pre-miR-19b-hGH 载体,通过显微注射的方法获得了心肌细胞特异性过表达 miR-19b 的转基因

[基金项目] 国家自然科学基金(81070500);江苏省医学重点人才基金项目(RC2011021)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: xuhan70@sina.com

因小鼠, 并发现心肌细胞特异性 miR-19b 高表达可以导致心脏肥大。对进一步研究 miRNA 的功能以及肥厚性心肌病的发病机制有一定的意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株

E. coli DH5 α 感受态细胞购自美国 TransGen Biotech 公司。带有 alpha-MHC 启动子的 pBS II SK(+) 质粒由本实验室保存。

1.1.2 试剂和工具酶

CloneEZ[®] PCR Cloning Kit 购自美国 GenScript 公司。Taq DNA 聚合酶、T4 连接酶、dNTP、限制性内切酶、DNA Marker 和胶回收试剂盒均为日本 TaKaRa 公司产品。基因组 DNA 提取试剂盒、质粒抽提试剂盒购自北京天根公司。TRIzol 购于美国 Invitrogen 公司, TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit 和 TaqMan[®] Small RNA Assays 试剂盒以及特异性探针引物购于美国 ABI 公司。普通引物均由美国 Invitrogen 公司合成。M-MLV First Strand Kit 逆转录试剂盒和带有 ROX 的 Platinum[®] SYBR[®] Green qPCR SuperMix-UDG 实时定量 PCR 试剂盒

购自美国 Invitrogen 公司。

1.1.3 细胞

胚胎干(embryonic stem, ES)细胞来源于冷冻保存的分离的 C57BL/6J 小鼠内细胞团细胞(inner cell mass, ICMs), 由本研究所保存。

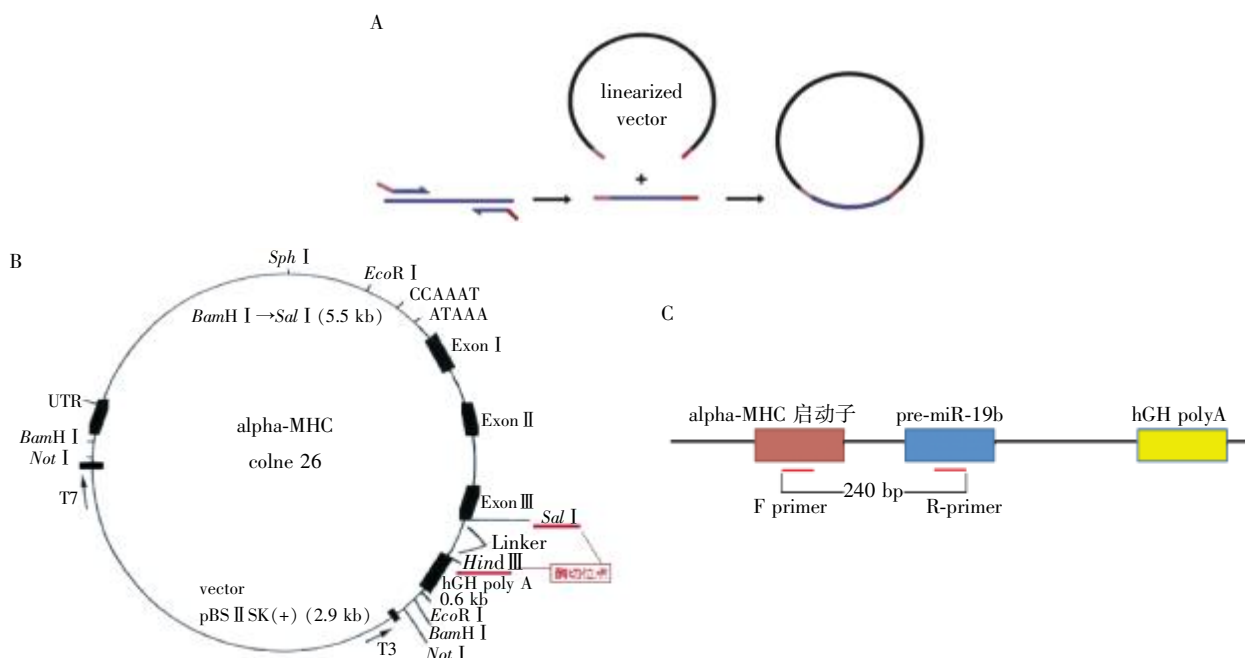
1.2 方法

1.2.1 目的片段的扩增

依据 CloneEZ[®] PCR Cloning Kit 原理(图 1A), 根据小鼠 miR-19b (mmu-miR-19b) 前体序列(pre-miR-19b), 以及插入载体 *Hind* III 上游和 *Sal* I 酶切位点下游的序列, 设计用于扩增目的片段的引物以及用于鉴定阳性质粒的引物, 并用上述引物合成带有 pre-miR-19b 的长度为 131 bp 的目的片段。

1.2.2 构建与鉴定心肌特异性 pre-miR-19b 转基因载体

质粒 pBS II SK(+) 用 *Hind* III 和 *Sal* I 双酶切后, 回收线性化的空载体(图 1B)。将上述带有 pre-miR-19b 的目的片段和线性化的空载体按照 CloneEZ[®] PCR Cloning Kit 步骤进行重组。所得重组质粒用于转化 *E. coli* DH5 α 感受态细菌, 小提质粒后用引物 19b-5 和 19b-3 进行 PCR(表 1), 将阳性质粒对应的菌液送测序。



A: CloneEZ[®] PCR Cloning Kit 原理示意图, 根据该原理设计的重组引物进行 PCR 所得目的片段应与线性化的质粒两端有相同序列, 再在试剂盒提供重组酶的作用下, 将目的片段与线性化的质粒进行重组, 得到重组质粒; B: 带有 alpha-MHC 启动子质粒 pBS II SK(+) 图谱以及酶切位点示意图, 质粒上插入区两侧的 *Sal* I 和 *Hind* III 内切酶位点被选为插入位点, 保证了插入片段的方向正确; C: 转基因小鼠引物设计原理模式图, 引物上游位于 alpha-MHC 启动子序列上, 引物下游位于插入的 pre-miR-19b 序列上, 所得 PCR 产物片段长度为 240 bp。

图 1 pre-miR-19b 过表达质粒的构建模式图

Figure 1 Model chart for construction of pre-miR-19b overexpression vector

表 1 mmu-pre-miR-19b 序列以及用于构建及鉴定 pre-miRNA-19b 过表达质粒的引物序列

Table 1 Sequence of mmu-pre-miR-19b and primers for construction and identification of pre-miR-19b overexpression vector

名称	序列(5'→3')	产物长度
pre-miR-19 序列	CACTGGTCTATGGTTAGTTTTGCAGGTTTGCATCCAGCTGTATA ATATTCTGCTGTGCAAATCCATGCAAAACTGACTGTGGTGGTG	
同源重组引物	Forward Primer:CCCCATAAGAGTTTGAGTCGACCACTGGTCTATGGTTAGT Reverse Primer:AGGGATGCCACCCATCAAGCTTCACCACCACAGTCAGTTT	131 bp
质粒鉴定引物	Forward Primer(19b-5):CACTGGTCTATGGTTAFT Reverse Primer(19b-3):CACCACCACAGTCAGTTT	87 bp
alpha-MHC-pre-miR-19b 鉴定引物	Forward Primer:GCAAACCTCAGGCACCCTTA Reverse Primer:GCAAACCTGCAAAACTAACC	240 bp

1.2.3 转基因小鼠的构建和鉴定

将上述测序正确的带有 alpha-MHC-pre-miR-19b-hGH 片段的质粒进行质粒大提至一定浓度,再用 *Not* I 内切酶酶切后,回收长度为 5.5 kb 带有 alpha-MHC-pre-miR-19b-hGH 的片段,纯化后,注射用 TE 稀释至 2.0 ng/ μ l。通过显微注射,将这个片段注射到小鼠 ES 细胞中。再将注射后的小鼠 ES 细胞植入 10 只假孕母鼠子宫中,共获得子代小鼠 86 只。提取子代小鼠尾巴 DNA,利用 alpha-MHC-pre-miR-19b 鉴定引物进行 PCR 鉴定(表 1)。引物设计原理如图 1C。得到阳性转基因小鼠共 20 只,即为 Founder 小鼠。用其中 2 个月大雄性 Founder 小鼠与同龄 C57BL/6J 雌鼠交配,得到 F1 代小鼠。再进行 PCR 鉴定阳性转基因小鼠(TG 组)。取 2 个月以上阳性 F1 代转基因小鼠心脏,提取 RNA,用 TaqMan[®] MicroRNA Reverse Transcription Kit 将 RNA 逆转录为 cDNA,再用 TaqMan[®] Small RNA Assays 进行 Real-time PCR,检测成熟 miR-19b 的表达量。从中选取 miR-19b 高表达的小鼠,观察其心脏表型。以同窝、同

龄、同性别的野生型小鼠作为对照(WT 组)

1.3 统计学方法

数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,使用统计软件 SPSS17.0 进行分析,组间比较采用成组设计秩和检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

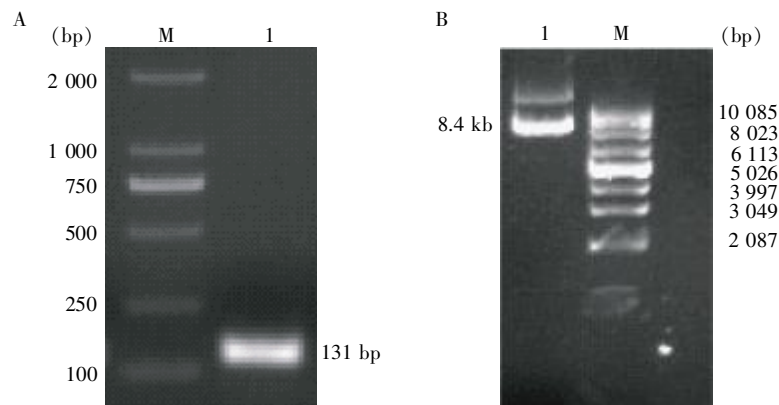
2 结果

2.1 pre-miR-19b 对应的小鼠基因组 DNA 片段的 PCR 扩增以及质粒的线性化

PCR 产物进行 2% 琼脂糖凝胶电泳可见,在 131 bp 处有一特异扩增条带,与理论预测值符合(图 2A)。该片段与 pBS II SK(+)利用 CloneEZ[®] PCR Cloning Kit 重组方法进行连接,得到带有 pre-miR-19b 片段的重组质粒(图 2B)。

2.2 带有 alpha-MHC-pre-miR-19b-hGH 片段的重组质粒的 PCR 和测序鉴定

以重组质粒为模板,用 19b-5 和 19b-3 扩增 pre-miR-19b 片段。阳性质粒有特异扩增条带(87 bp),而空载体没有(图 3A)。将阳性质粒对应的菌液送上



A: pre-miR-19b 对应的小鼠基因组 DNA 片段的 PCR 产物鉴定。1:pre-miR-19b 对应的小鼠基因组 DNA 片段的产物(131 bp); M:DNA 标准 Marker(DL2000)。B:带有 pre-miR-19b 片段的重组质粒电泳鉴定。1:带有 pre-miR-19b 片段的重组质粒(8.4 kb); M:DNA 标准(超螺旋 DNA Marker)。

图 2 pre-miR-19b 片段的克隆及过表达载体的电泳图

Figure 2 Cloning for pre-miR-19b fragment and electrophoretogram for pre-miR-19b overexpression vector

海英俊公司测序,所得结果与 miRBase 上的序列一致(图 3B)。

2.3 Founder 小鼠以及 F1 代转基因小鼠的鉴定

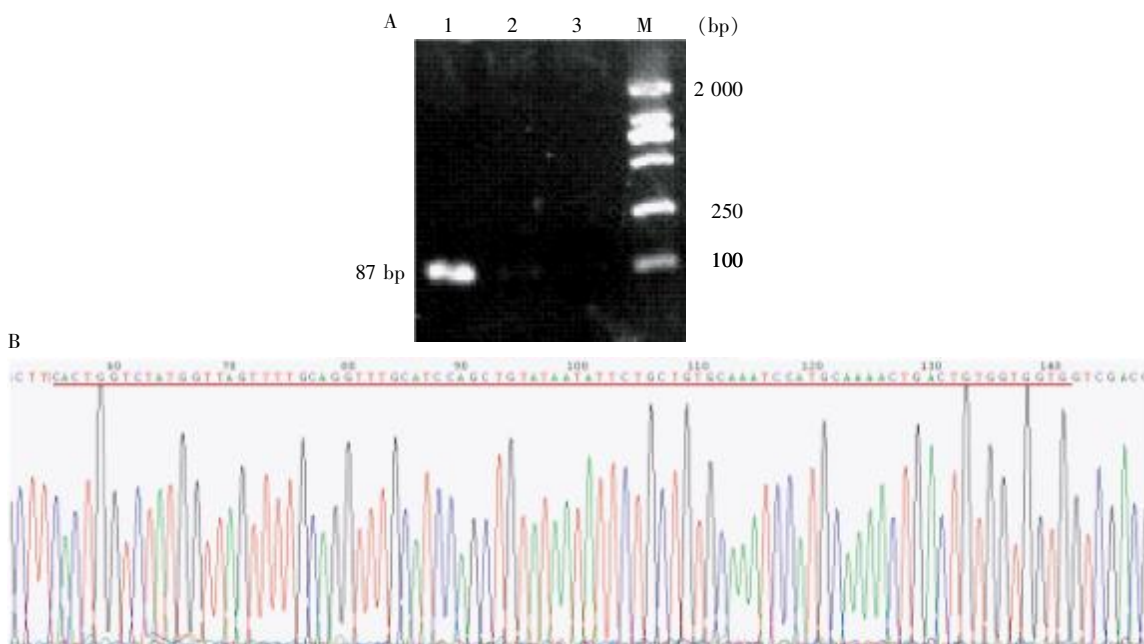
对显微注射受精卵的假孕母鼠所生的 86 只子代小鼠,用 alpha-MHC-pre-miR-19b 鉴定引物进行 PCR 鉴定(表 1)。得到 20 只阳性转基因 Founder 小鼠。再用 2 个月大的阳性雄性 Founder 小鼠与雌性 C57BL/6J 小鼠交配得到 F1 代。用同样的鉴定引物鉴定阳性转基因小鼠(图 4A)。为检测转基因小鼠心肌组织中成熟 miR-19b 的过表达情况,取 F1 代小

鼠心脏组织提取 RNA 后,用 TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit 和 TaqMan® Small RNA Assays 试剂盒进行逆转录及 Real-time PCR,对心脏组织成熟 miR-19b 表达量进行检测(图 4B)。

2.4 转基因小鼠表型分析

2.4.1 miR-19b 转基因小鼠出现心脏肥厚以及心肌细胞肥大

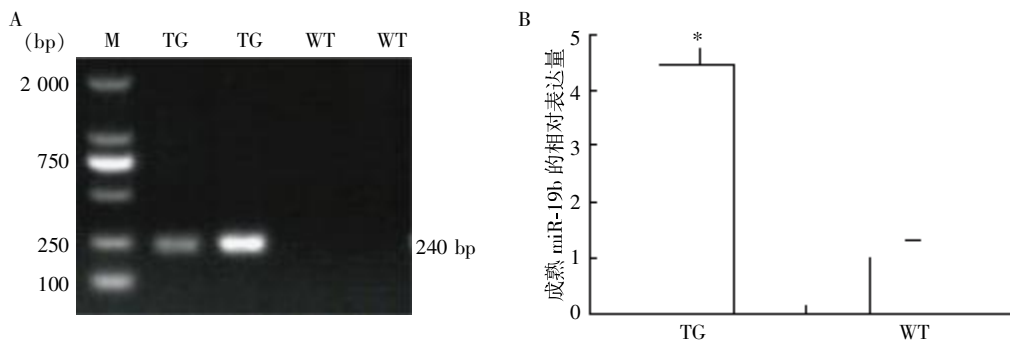
从 1 个月大的小鼠开始分析,发现在 1 月龄时,miR-19b TG 小鼠即出现轻微心脏肥厚现象,表现为心脏体重比轻度升高(图 5A)。在 2 月龄时,心脏肥



A:重组质粒的 PCR 鉴定。1:阳性质粒(87 bp);2:阴性质粒;3:无模板对照;M: DNA 标准(DL2000)。B:重组质粒测序结果,红色下划线显示 pre-miR-19b 序列,经对比检测发现无突变位点。

图 3 重组质粒的鉴定

Figure 3 Identification of recombinant plasmid



A:F1 代小鼠的鉴定,TG 小鼠显示 1 条 240 bp 的扩增带,而同窝的 WT 小鼠则无条带显示。M: DNA 标准(DL2000)。B:F1 代小鼠心脏组织中 miR-19b 成熟体的表达量,用 Real-timePCR 检测 F1 代 TG 小鼠和 WT 小鼠成熟 miR-19b 的表达量,以 U6 作为内参。其中 TG 小鼠和 WT 小鼠各取 3 只,与 WT 组相比,* $P < 0.05$ 。

图 4 转基因小鼠的鉴定

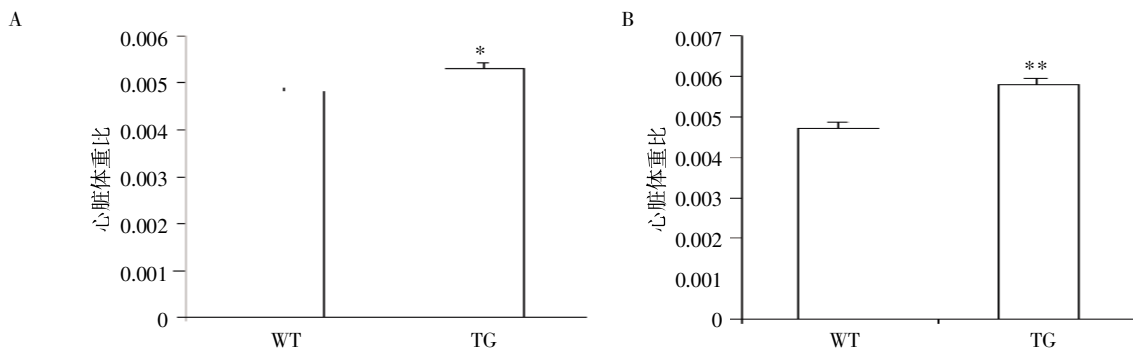
Figure 4 Identification of transgenic mouse

厚现象更为明显(图 5B)。在对 2 月龄小鼠心脏组织大体观察及切片进行 HE 染色可以看出,和 WT 小鼠相比,TG 小鼠心脏体积及室壁厚度明显升高。麦胚凝集素染色显示 TG 小鼠心肌细胞面积较 WT 小鼠明显增大(图 6)。

2.4.2 miR-19b TG 小鼠心功能增强

取 2 月龄 TG 和 WT 小鼠进行心脏超声检测(表 2),心超显示 TG 小鼠舒张期室间隔厚度(inter-

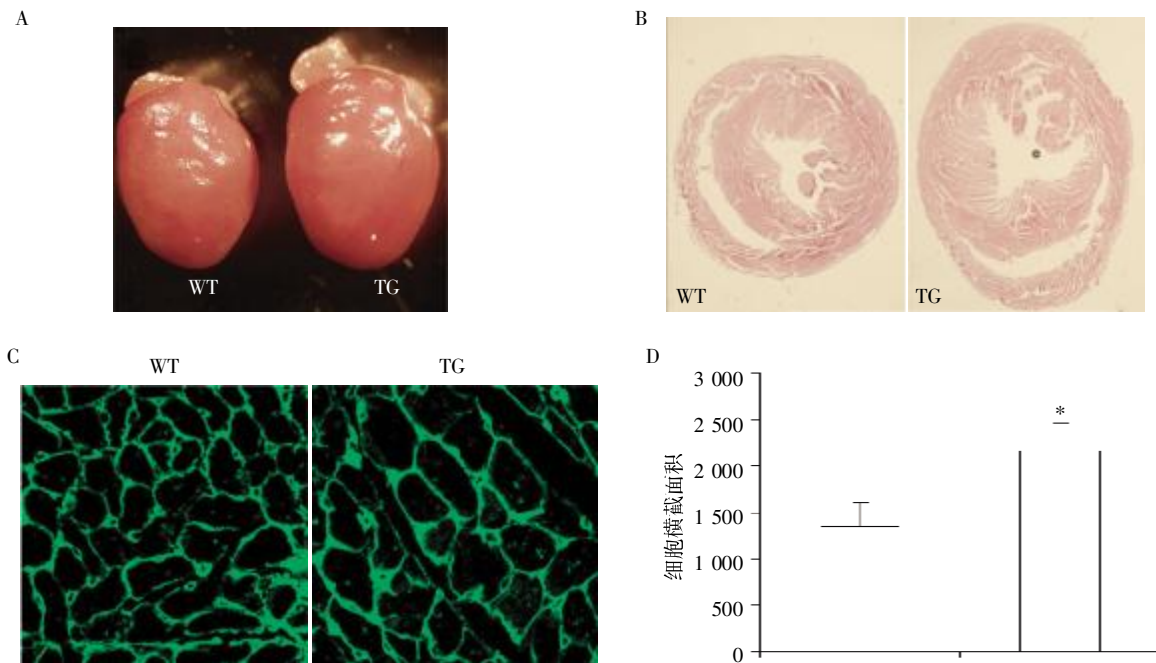
ventricular septum of diastole,IVSd)、舒张期左室游离壁厚度(left ventricular posterior wall of diastole,LVPWd)、舒张末期左室内径(left ventricular internal diastolic dimension of diastole,LVIDd)、射血分数(ejection fraction,EF)、左室短轴缩短率(fractional shortening,FS)较 WT 小鼠相比有明显差异($P < 0.05$),而收缩期室间隔厚度(interventricular septum of systole,IVSs)、收缩期左室游离壁厚度(left ven-



A:1月龄小鼠心脏体重比,取1月龄F1代TG小鼠和同窝WT小鼠测其心脏体重比,其中TG小鼠8只,WT小鼠10只,与WT小鼠比较,* $P < 0.05$;B:2月龄小鼠心脏体重比,取2月龄F1代TG小鼠和同窝WT小鼠测其心脏体重比,其中TG小鼠6只,WT小鼠7只,与WT小鼠比较,** $P < 0.01$ 。

图 5 转基因小鼠心脏体重比的测量

Figure 5 Measurement of ratio of heart weight/body weight in transgenic mouse



A:WT小鼠和TG小鼠心脏大体比较,取2月龄雄性TG和同窝WT小鼠心脏,光镜下相同放大倍数拍摄显示心脏大体形态;B:WT小鼠与TG小鼠心脏组织切片HE染色,取2月龄雄性TG和同窝WT小鼠心脏横向往石蜡切片进行HE染色,光镜下相同放大倍数拍摄;C:麦胚凝集素染色显示TG小鼠和同窝WT小鼠心肌细胞,取心脏横向往石蜡切片,共聚焦显微镜下以相同放大倍数拍摄;D:心肌细胞大小的定量,采用ImageJ软件对C图心肌细胞横截面积进行定量统计,与WT小鼠相比,* $P < 0.001$ 。

图 6 转基因小鼠表型分析

Figure 6 Phenotype analysis for transgenic mouse

tricular posterior wall of systole, LVPWs)和左室收缩末期内径(left ventricular internal dimension of end-systolic, LVIDs)无明显差异。

表2 心超分析结果

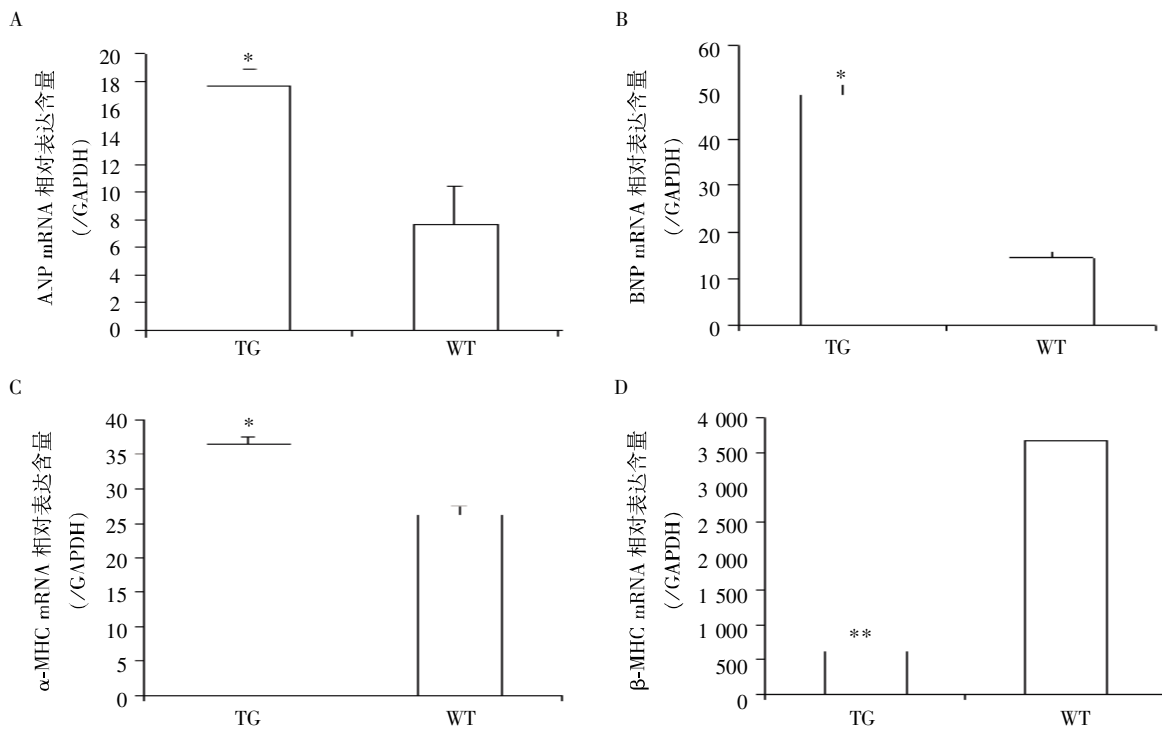
Table 2 Echocardiogram analysis results

观察指标	TG组(n=9)	WT组(n=10)
IVSd(mm)	0.85 ± 0.12	0.70 ± 0.07*
LVIDd(mm)	2.96 ± 0.36	3.71 ± 0.28*
LVPWd(mm)	0.78 ± 0.66	0.61 ± 0.10*
IVSs(mm)	1.30 ± 0.15	0.91 ± 0.20
LVIDs(mm)	1.93 ± 0.25	2.78 ± 0.31
LVPWs(mm)	1.24 ± 0.56	0.98 ± 0.37
EF(%)	74.16 ± 8.90	60.40 ± 9.20*
FS(%)	42.69 ± 3.60	35.12 ± 4.40*

与TG组比较,* $P < 0.05$ 。

2.4.3 心脏肥厚标记物的检测

为进一步验证 miR-19b 转基因小鼠的心脏肥厚表型,取 2 月龄 F1 代雄性小鼠心脏组织,提取 RNA 后进行逆转录,并对 cDNA 进行 Real-time PCR,对心脏肥厚的相关指标心房钠尿肽(atrial natriuretic polypeptide, ANP)、脑钠肽(brain natriuretic peptide, BNP)、 α -心肌肌球蛋白重链(α -myosin heavy chain, α -MHC)、 β -心肌肌球蛋白重链(β -myosin heavy chain, β -MHC)进行 mRNA 水平的检测(图 7)。结果显示,与 WT 对照小鼠相比,miR-19b TG 小鼠心脏肥厚指标包括 ANP、BNP 及 α -MHC 的 mRNA 水平均有升高($P < 0.05$),而 β -MHC mRNA 的水平降低($P < 0.01$)。



其中 TG 和 WT 小鼠各取 3 只,与 WT 组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

图7 Real-time PCR 检测 2 月龄小鼠心脏组织中 ANP、BNP、 α -MHC、 β -MHC 的含量

Figure 7 Measurement of myocardial hypertrophy markers of ANP, BNP, α -MHC and β -MHC by Real-time PCR in mice of 2 months after birth

3 讨论

miR-19b 属于 miR-17~92 家族中的一员。以往对 miR-17~92 家族的研究较多,多数认为其是一种癌细胞生长的促进物^[7-8]。而对其家族中的各个成员研究较少。在 2007 年, Ikeda 等^[6]报道,在扩张性心肌病和主动脉狭窄后期,miR-19b 在心脏中的表达量明显降低,提示如果在这两种疾病的心脏中过表

达 miR-19b,可能有机会改善心脏功能。

本研究利用了一种新的重组方法构建了心肌特异性转基因载体,发现在子代小鼠心脏组织中 miR-19b 表达水平明显升高,表示成功构建了 miR-19b 转基因小鼠。并发现心肌特异性 miR-19b 过表达可以导致心肌细胞肥大,心脏体积增大,心功能增强,但是并没有引起心肌纤维化,提示这种肥大是有利的。本研究显示 miR-19b 过表达引起的心脏肥厚主

要在左室,而右室不明显。可能的原因是,与右室相比,左室需要较大收缩力将血液输送到全身,所承受的压力较高,做功较大。提示 miR-19b 过表达所引起的心室肥厚可能与压力负荷呈正相关。在进一步研究中,可以尝试在这方面寻找突破口。在研究 miRNA 的作用机制时,找到其作用的靶蛋白非常重要。众所周知,miRNA 可以通过抑制 mRNA 的翻译或增加 mRNA 的降解来发挥生物学作用^[9-11]。在以往的文献报道中,有显示 PTEN 是 miR-19b 的靶蛋白之一^[12-15]。PTEN 对 PI3K-AKT 通路有明显的抑制作用^[14],而 PI3K-AKT 信号通路是公认的一种调节细胞增殖的信号通路^[15],以上均提示 miR-19b 引起小鼠心脏肥大可能是通过影响 PTEN-AKT 信号通路来发挥作用的。因此,在未来 miR-19b 导致心脏肥大的机制研究中,可以将主要注意力放在 PTEN 上。而本研究所构建的 miR-19b 转基因小鼠将会是一种有效的工具鼠,为研究 miR-19b 的临床治疗作用提供了必要条件。

[参考文献]

- [1] Shieh JT, Huang Y, Gilmore J, et al. Elevated miR-499 levels blunt the cardiac stress response[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19481
- [2] Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer[J]. Am J Pathol, 2007, 171(3): 728-738
- [3] Wang JX, Jiao JQ, Li Q, et al. miR-499 regulates mitochondrial dynamics by targeting calcineurin and dynamin-related protein-1 [J]. Nat Med, 2011, 17(1): 71-78
- [4] Zhao Y, Ransom JF, Li A, et al. Dysregulation of cardiogenesis, cardiac conduction, and cell cycle in mice lacking miRNA-1-2[J]. Cell, 2007, 129(2): 303-317
- [5] Yin R, Bao W, Xing Y, et al. MiR-19b-1 inhibits angiogenesis by blocking cell cycle progression of endothelial cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 417(2): 771-716
- [6] Ikeda S, Kong SW, Lu J, et al. Altered microRNA expression in human heart disease[J]. Physiol Genomics, 2007, 31(3): 367-373
- [7] Jiang P, Rao EY, Meng N, et al. MicroRNA-17-92 significantly enhances radioresistance in human mantle cell lymphoma cells[J]. Radiat Oncol, 2010, 5(1): 100-108
- [8] Fassina A, Marino F, Siri M, et al. The miR-17-92 microRNA cluster: a novel diagnostic tool in large B-cell malignancies[J]. Lab Invest, 2012, 92(11): 1574-1582
- [9] Quinn EM, Wang JH, O'Collaghan G, et al. MicroRNA-146a is upregulated by and negatively regulates TLR2 signaling[J]. PLoS One, 2013, 8(4): e62232
- [10] Dudda JC, Salaun B, Ji Y, et al. MicroRNA-155 is required for effector CD8 (+) T cell responses to virus infection and cancer[J]. Immunity, 2013, 38(4): 742-753
- [11] Sun K, Deng HJ, Lei ST, et al. miRNA-338-3p suppresses cell growth of human colorectal carcinoma by targeting smoothed [J]. World J Gastroenterol, 2013, 19(14): 2197-2207
- [12] Heidi MN, Leonardo AM, Tale B, et al. Modulation of the osteosarcoma expression phenotype by microRNAs[J]. PLoS One, 2013, 7(10): e48086
- [13] Mavrakis KJ, Van Der Meulen J, Wolfe AL, et al. A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia(T-ALL) [J]. Nat Genet, 2011, 43(7): 673-678
- [14] Wang MH, Lin CL, Zhang JJ, et al. Role of PTEN in cholera toxin-induced SWO-38 glioma cell differentiation [J]. Mol Med Rep, 2013, 7(6): 1912-1918
- [15] Wu SS, Liang QH, Liu Y, et al. Omentin-1 stimulates human osteoblast proliferation through PI3K/Akt signal pathway[J]. Int J Endocrinol, 2013, 2013: 368970

[收稿日期] 2012-12-07