

miR-15a/16-1 基因敲除小鼠的鉴定及其脾脏免疫细胞频率分析

沈娅婷, 胡春霞, 陈文艳, 李晓敏, 刘浩, 李国利, 龚卫娟, 贾筱琴*

(扬州大学医学院病理学教研室, 江苏 扬州 225009)

[摘要] **目的:**探讨 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠的繁育与子代鼠的鉴定, 及其脾脏免疫细胞频率。**方法:**从子鼠鼠尾中提取基因组 DNA, 采用 PCR 方法进行基因型鉴定。miR-15a/16-1 基因敲除小鼠眼眶取血, 用动物血液分析仪进行全血细胞分析。采用流式细胞仪分析 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠脾脏中免疫细胞频率。**结果:**miR-15a/16-1^{+/+}、miR-15a/16-1^{+/-}、miR-15a/16-1^{-/-} 各表型小鼠互交繁殖结果基本符合孟德尔遗传规律。流式结果显示, miR-15a/16-1 基因敲除小鼠与野生型小鼠相比, CD19⁺、NKG2D⁺ 细胞增多, 其余无明显差异。全血细胞分析结果显示淋巴细胞增多。**结论:**实验所用 PCR 方法可以鉴定 miR-15a/16-1^{-/-} 小鼠; miR-15a/16-1^{-/-} 小鼠的获得为进一步探究 miR-15a/16-1 的作用提供了较理想的动物模型; 敲除 miR-15a/16-1 基因, 小鼠脾脏 CD19⁺、NKG2D⁺ 细胞增多。

[关键词] miR-15a/16-1; 基因敲除小鼠; 免疫功能; 全血细胞分析

[中图分类号] R392.21

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)03-330-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160315

Identification of miR-15a/16-1^{-/-} mice and analysis of their splenic cellular immune function

Shen Yating, Hu Chunxia, Chen Wenyan, Li Xiaomin, Liu Hao, Li Guoli, Gong Weijuan, Jia Xiaoqin*

(Department of Pathology, Medical College of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

[Abstract] **Objective:** To breed and identify the offspring of positive miR-15a/16-1 gene knockout mice and analysis of their splenic cellular immune function. **Methods:** MiR-15a/16-1 knockout mice were paired in different ways. Genomic DNA was isolated from tails and analyzed by PCR. Complete blood analysis was performed in the blood which was collected from the orbit of mice. Analysis of cellular immune function in spleen was performed in miR-15a/16-1 gene knockout mice by FCM. **Results:** The positive rate with miR-15a/16-1 gene of filial generation mice met Mendelian genetic law. Compare with wild-type mice, CD19⁺ and NKG2D⁺ cells of spleen in miR-15a/16-1 gene knockout mice were all up-regulated expression detected by FCM, although there were not significant changes of frequencies of other surface markers. Complete blood analysis showed that lymphocytes increased. **Conclusion:** PCR methods can be used to identify the genotype of the miR-15a/16-1^{-/-} mice, and to establish an animal experimental model to further study the important role of miR-15a/16-1. CD19⁺ and NKG2D⁺ cells of spleen in miR-15a/16-1 gene knockout mice were increased.

[Key words] miR-15a/16-1; knockout mice; immune function; complete blood analysis

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(03):330-334, 360]

MicroRNAs (miRNAs) 是在真核生物中发现的一类具有调控功能的内源性非编码短单链 RNA, 其有 18~25 个核苷酸^[1-2], 可通过碱基互补配对的方式识别靶 mRNA, 并根据互补程度的不同指导沉默复合体降解靶 mRNA 或者阻遏靶 mRNA 的翻译。许多

研究表明, miRNA 参与多种调节途径, 包括细胞增殖、分化和肿瘤的发生发展等^[3]。

miR-15a 与 miR-16-1 位于同一个基因簇上, 为同一个转录本, 定位于染色体 13q14 区段, 在位置上只相差 54 bp。该区段在人类乳腺癌、肺癌、卵巢癌和子宫颈癌患者体内均能发现缺失突变^[4-7]。本课题组的前期研究发现, 应用 miRNA 芯片技术筛选出肝癌组织差异表达 miRNAs, miRNA 表达谱结果显示 miR-15a/16-1 在肝癌组织中表达显著下调^[8]。

[基金项目] 国家自然科学基金(81273214); 江苏省普通高校研究生创新计划(CXLX13-924)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: jxgbl@163.com

已有文献报道,miR-15a/16-1 参与了多种调节炎症和免疫细胞分化的功能^[9-11],那么 miR-15a/16-1 对免疫细胞频率有何影响?如何发挥其免疫调节功能?围绕此问题,本课题组引进了 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠,初步探讨 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠的脾脏免疫细胞频率。

1 材料和方法

1.1 材料

小鼠购自美国 Jackson Laboratory,雄雌各 2 只,品系为 C57BL/6J;基因背景为 miR-15a/16-1 基因敲除纯合子(miR-15a/16-1^{-/-})。

PCR 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成;TaqDNA 聚合酶、DNAMarker I、Loading dye、dNTP(上海博彩生物科技有限公司);红细胞裂解液(杭州碧云天公司);APC 标记的 anti-mouse CD19 抗体、APC 标记的 anti-mouse CD4 抗体、Percep-cy5.5 标记的 anti-mouse CD8 抗体、APC 标记的 anti-mouse CD11c 抗体、Percep-cy5.5 标记的 anti-mouse NK1.1 抗体、FITC 标记的 anti-mouse NKG2D 抗体、APC 标记的 anti-mouse F4/80 抗体、Percep-cy5.5 标记的 anti-mouse Gr-1 抗体(eBioscience 公司,美国);FACS Calibur 流式细胞仪(BD 公司,美国),实时荧光定量 PCR 仪(ABI 7500,ABI 公司,美国),动物血液分析仪(HEMAVET 950FS,Drew 公司,英国)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠的繁育方法

配对情况:因引进的小鼠数量有限,将 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠纯合子与野生型 C57BL/6J 小鼠进行交配,得到 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠杂合子。后将 2 月龄杂合子小鼠采用 1 只雄鼠和 2 只雌鼠同居的方式进行繁殖,共 5 组。饲养条件:在扬州大学医学院实验动物中心恒温恒湿和无菌条件下(SPF 级)喂养。

1.2.2 子代鼠的基因型鉴定

基因组 DNA 的提取:剪小鼠鼠尾于 1.5 mL EP 管中,加入裂解液和蛋白酶 K,混匀,恒温电热振荡箱中 55℃ 过夜;加入酚-氯仿-异戊醇,混匀,冰上静置 20 min;12 000 r/min 离心 5 min,吸上层至另一 EP 管中;加入 2 倍体积无水乙醇,沉淀 DNA;12 000 r/min 离心 8 min,倒掉上层;加入 75%乙醇洗涤,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,重复 1 次;室温下自然放置 20 min,使得多余的乙醇挥发干净;加入

60 μL 60℃ 经灭菌的超纯水溶解基因组,4℃ 溶解过夜,-20℃ 保存备用。

PCR 反应:引物序列由 Jackson Laboratory 提供,上游引物:5'-TCAGTTAACCAATAAAAAGGTCAGC-3',下游引物:5'-GCCTGGGTCTCACCATGTAG-3'。PCR 反应体系:上游引物 1 μL (10 mmol/L),下游引物 1 μL (10 mmol/L),10 × PCR Buffer 2.5 μL, dNTPs(10 mmol/L) 0.5 μL, Taq DNA 聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL, DNA 模板 1 μL,加 H₂O 补足 25 μL。采用 PCR 仪进行循环扩增:95℃ 预变性 5 min;98℃ 30 s, 65℃ 30 s(-1.5℃ 每循环),72℃ 45 s,预扩增,共 10 个循环;98℃ 30 s 变性,50℃ 30 s 退火,72℃ 45 s 延伸,共 20 个循环;最后再延伸 5 min。分别取 PCR 扩增产物 8 μL、10 × Loading Buffer 1 μL 在含 1.5% 琼脂糖凝胶中以 120 V 电泳后于凝胶成像仪中观察拍照。小鼠尾部组织琼脂糖凝胶电泳基因型片断为:野生型(miR-15a/16-1^{+/+},WT)558 bp,纯合子(miR-15a/16-1^{-/-},KO)650 bp,杂合子(miR-15a/16-1^{+/-},WT/KO)558、650 bp。按此基因条带可以鉴别出各个基因型小鼠。

1.2.3 全血细胞分析

对幼龄期 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠进行眼眶取血,用动物血液分析仪分析。

1.2.4 脾脏单细胞悬液的制备

无菌分离获取幼龄期 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠的脾脏,用无菌针芯将脾脏磨碎,经 200 目钢网滤过并收集单细胞悬液,裂解红细胞,PBS 洗涤 2 遍。

1.2.5 流式细胞仪检测膜表面分子的标记

将上述处理的单细胞悬液,先用 PBS 缓冲液充分洗 2 遍,3 500 r/min 离心 5 min;然后加入要标记的抗体,4℃ 孵育 30 min;PBS 缓冲液充分洗 2 遍,3 500 r/min 离心 5 min;200 μL PBS 重悬细胞,上机检测;应用 WinMDI 2.9 软件分析数据。

1.3 统计学方法

利用 GraphPad Prism5 软件包,首先用方差分析比较 3 组数据的差异,然后以野生型小鼠(WT)作为参照系,采用 Dunnett *t* 检验对杂合子(WT/KO)与野生型(WT),纯合子(KO)与野生型(WT)进行两两比较, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠的繁育及鉴定情况

5 组父系母系均为杂合子的小鼠互交,2 个月产鼠 72 只,通过 PCR 鉴定(图 1),有 16 只为 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠纯合子(KO)(占 22.2%),

38 只为 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠杂合子(WT/KO)(占 52.8%),18 只为野生型(WT) (占 25.0%),结果基本符合孟德尔遗传规律。

2.2 幼龄期各表型小鼠的脾脏免疫细胞频率分析

采用流式细胞术对小鼠脾脏免疫细胞表面重要膜型分子进行分析,结果显示幼龄期基因敲除组小鼠脾脏细胞上 CD19、NKG2D 的表达增高,CD4、

CD8、Gr-1、CD11c、F4/80、NK1.1、B220、IgM 的表达无明显变化,提示 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠的脾脏 CD19⁺ 细胞增多($P=0.045\ 0$)、NKG2D⁺ 细胞增多($P=0.010\ 1$),其余免疫细胞无明显改变(图 2)。

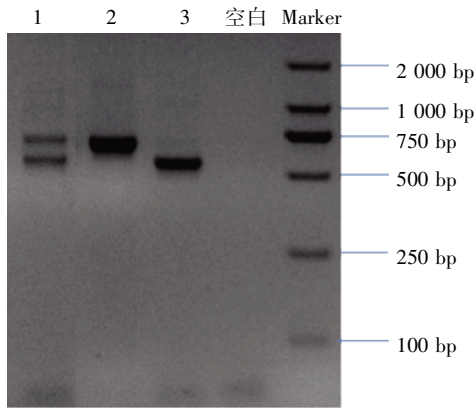
2.3 全血细胞分析

采用动物血液分析仪对 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠眼眶血白细胞、红细胞、单核细胞、中性粒细胞、血红蛋白、血小板数目、淋巴细胞进行分析,结果显示幼龄期基因敲除小鼠淋巴细胞增多,有统计学意义($P=0.041\ 3$),其余无明显变化(图 3)。

3 讨论

基因敲除小鼠技术是借助分子生物学、细胞生物学和动物胚胎学的方法,使小鼠体内某种基因的功能丢失,是揭示基因功能最直接的手段之一^[12]。

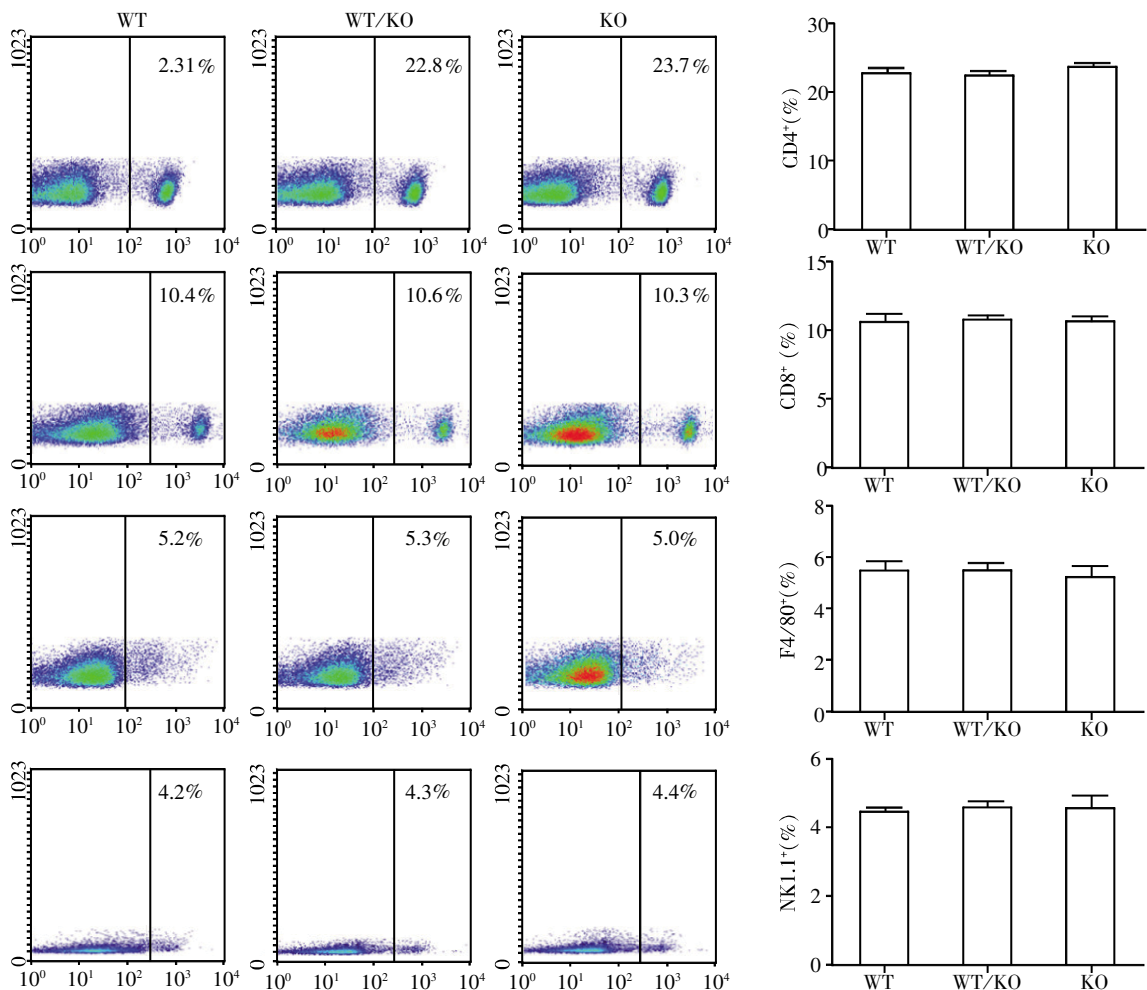
MiR-15a/16-1 是最早发现的具有肿瘤抑制功能的 miRNA 之一,65%的慢性淋巴细胞白血病(chronic lymphocytic leukemia,CLL)患者,16%~40%的骨髓瘤、60%的前列腺癌患者中有 13q14 位点的缺失^[13-14]。Climmino 等^[5]研究发现,miR-15a

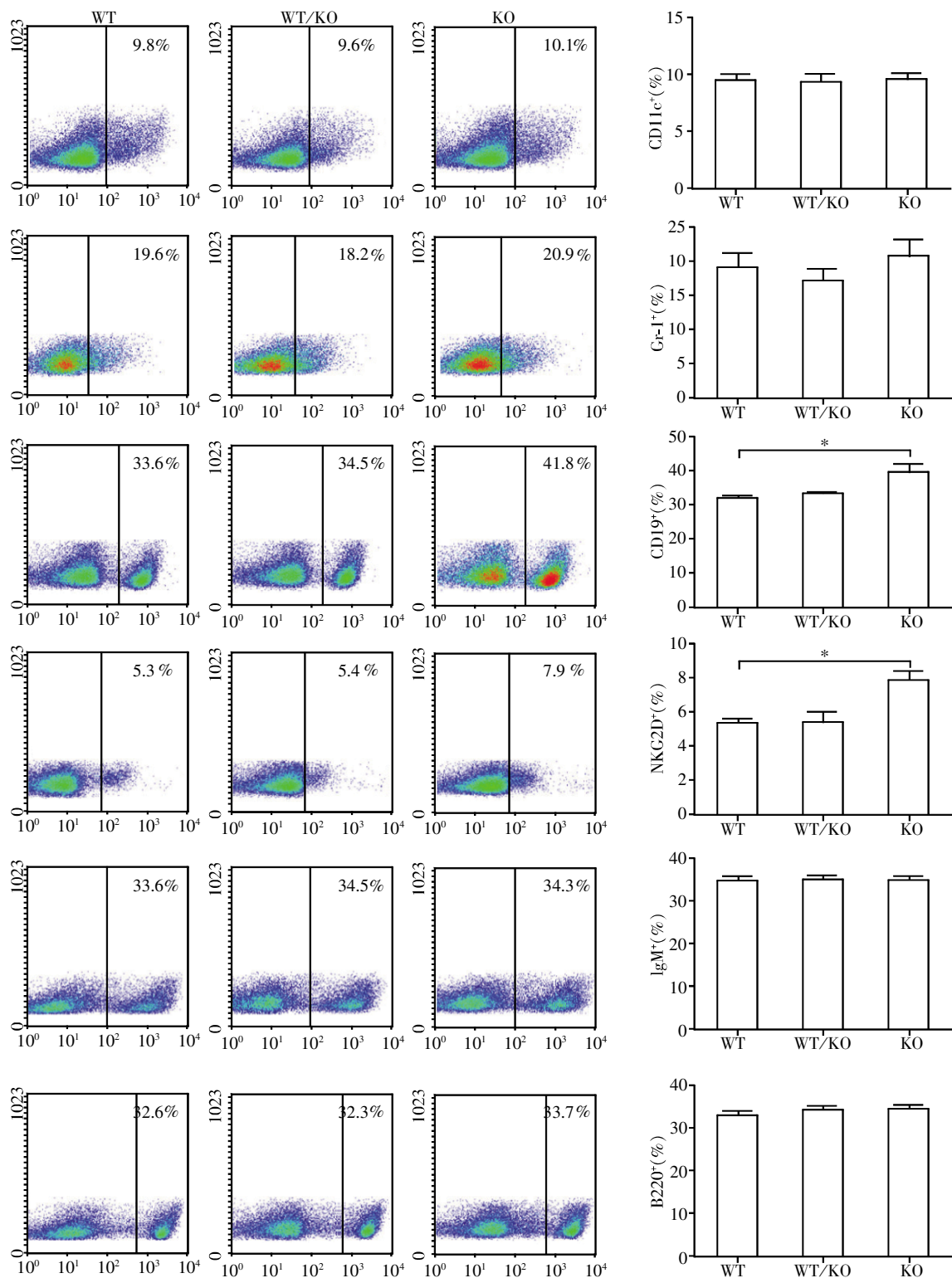


1:miR-15a/16-1^{+/+};2:miR-15a/16-1^{+/-};3:miR-15a/16-1^{-/-}。

图 1 PCR 方法进行基因型鉴定的结果

Figure 1 The results of genotyping by PCR





与 miR-15a/16-1^{-/-}小鼠相比, * $P < 0.05$ ($n=15$)。

图 2 流式细胞术进行小鼠脾脏免疫细胞频率分析

Figure 2 Analysis of cellular immune function in miR-15a/16-1 gene knockout mice by FCM

和 miR-16 负调控 BCL2(一个抗凋亡基因), 因此这 2 个 miRNAs 的缺失或下调, 导致了 BCL2 表达升高, 促进了白血病、淋巴瘤和前列腺癌的发生。

为了进一步研究 miR-15a/16-1 是否参与了免

疫细胞的分化和功能, 我们引进了 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠, 并按照 SPF 级标准进行饲养。由于引进的小鼠均为 miR-15a/16-1 基因敲除纯合子, 首先将其与野生型小鼠杂交, 得到 miR-15a/16-1 基因敲除杂

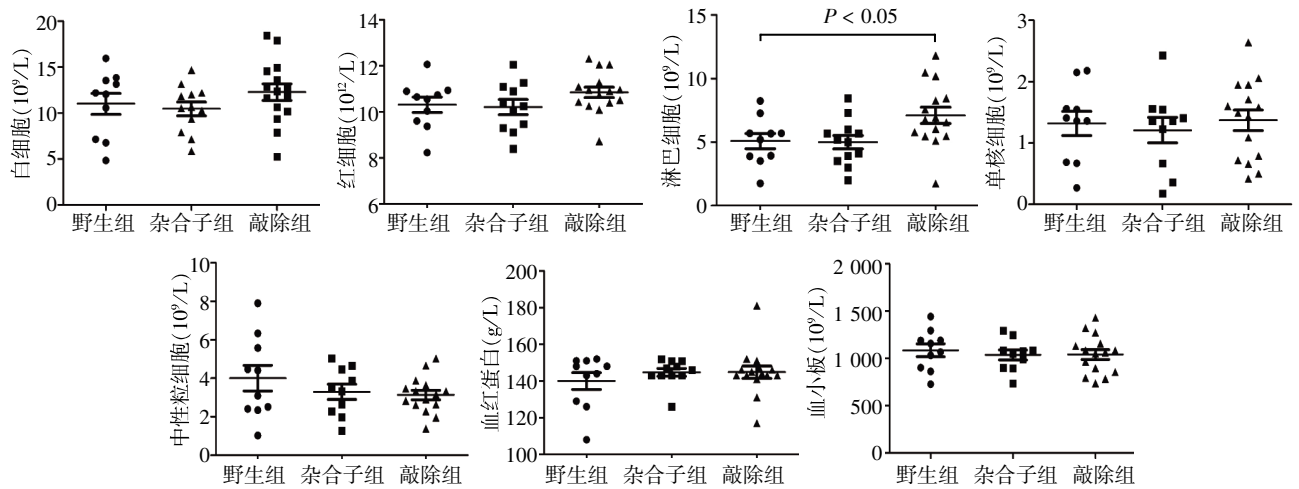


图3 动物血液分析仪进行全血细胞分析的结果

Figure 3 The results of whole blood cells by animal blood analyzer

合子,再将杂合子进行交配,其子代可能出现3种表型,即 miR-15a/16-1^{+/+}、miR-15a/16-1^{+/-}、miR-15a/16-1^{-/-}, miR-15a/16-1 基因敲除杂合子繁殖结果基本符合孟德尔遗传定律,因此以父系杂合子与母系杂合子交配可得到实验用的 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠纯合子。

本研究发幼龄期 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠与野生小鼠相比,流式结果显示脾脏 CD19⁺、NKG2D⁺ 细胞增多,同时检测了 B220⁺、IgM⁺ 并无明显变化,这群增多的脾脏 CD19⁺ 细胞的特征和功能尚不清楚,有待进一步研究。全血细胞分析结果也进一步提示幼龄期 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠淋巴细胞增多。研究报道 NKG2D 不仅表达于所有的 NK 细胞,而且在 CD8⁺ T 细胞和活化的巨噬细胞均有表达,那么在 miR-15a/16-1 基因敲除鼠中,这群增多的 NKG2D⁺ 细胞意义何在,将进行后续研究。

综上所述,本研究初步探讨了幼龄期 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠的脾脏免疫细胞频率,结果发现幼龄期 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠脾脏 CD19⁺ 细胞增多。已有研究报道,部分 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠晚期会发生 B 细胞淋巴瘤^[15]。那么,这群增多的脾脏 CD19⁺ 细胞和 miR-15a/16-1 基因敲除小鼠晚期发生的 B 细胞淋巴瘤之间有着怎样的关联?这群增多的脾脏 CD19⁺ 细胞究竟发挥了怎样的免疫调节功能,是否参与了肿瘤的免疫逃逸,这些作用机制仍需后续实验来进一步探讨。

[参考文献]

[1] Chen CZ, Li L, Lodish HF, et al. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation[J]. Science, 2004, 303 (5654): 83-86

[2] Wang H, Xiao S, Wang M, et al. In silico identification of conserved microRNAs and their targets in bovine fat tissue[J]. Gene, 2015, 559(2): 119-128

[3] Ivey KN, Srivastava D. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions[J]. Cell Stem Cell, 2010, 7(1): 36-41

[4] Aqeilan RI, Calin GA, Croce CM. miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives[J]. Cell Death Differ, 2010, 17(2): 215-220

[5] Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005, 102(39): 13944-13949

[6] Zhang X, Wan G, Mlotshwa S, et al. Oncogenic Wip1 phosphatase is inhibited by miR-16 in the DNA damage signaling pathway[J]. Cancer Res, 2010, 70(18): 7176-7186

[7] Rivas MA, Venturutti L, Huang Y, et al. Downregulation of the tumor-suppressor miR-16 via progesterin-mediated oncogenic signaling contributes to breast cancer development[J]. Breast Cancer Res, 2012, 14(3): R77

[8] 周顺, 贾筱琴, 喻春钊, 等. 上皮间质转化相关蛋白在肝细胞肝癌组织中的表达鉴定及其小分子 RNA 表达谱的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(1): 68-71

[9] Wu H, Neilson JR, Kumar P, et al. miRNA profiling of naive, effector and memory CD8 T cells[J]. PLoS One, 2007, 2(10): e1020

[10] Li T, Morgan MJ, Choksi S, et al. MicroRNAs modulate the noncanonical transcription factor NF-kappaB pathway by regulating expression of the kinase IKKalpha during macrophage differentiation[J]. Nat Immunol, 2010, 11(9): 799-805

[11] Zhou R, Li X, Hu G, et al. miR-16 targets transcriptional corepressor SMRT and modulates NF-kappaB-regulated (下转第 360 页)