

转基因Tomoregulin-1低表达加速扩张型心肌病小鼠的病理进程

郑媛, 侯道荣, 付鹤玲, 尹媛, 鲍丹*

南京医科大学医药实验动物中心, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:探究Tomoregulin-1对扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)小鼠病理进程的影响。方法:Western blot方法检测Tomoregulin-1在cTnT^{R141W} DCM小鼠模型心脏组织中的表达水平;于2、4和6月龄对同窝阴性(non-transgenic littermates, NTG)小鼠、心脏组织特异Tomoregulin-1低表达小鼠、cTnT^{R141W} DCM小鼠和心脏组织特异Tomoregulin-1低表达×cTnT^{R141W}双转基因(double transgenic, DTG)小鼠进行M型超声心动图和病理组织学表型分析。结果:Tomoregulin-1在cTnT^{R141W} DCM小鼠模型心脏组织中表达显著增高;M型超声心动图显示,与NTG小鼠相比,心脏组织特异Tomoregulin-1低表达小鼠在2、4和6月龄时心脏均呈现显著的室壁变薄、心腔增大和心收缩功能减退的表型;与cTnT^{R141W} DCM模型小鼠相比,DTG小鼠在2、4和6月龄时心脏均呈现显著的室壁变薄的表型,亦呈现心腔增大和心收缩功能减退的趋势;病理组织学显示,与NTG小鼠相比,心脏组织特异Tomoregulin-1低表达小鼠心肌细胞排列紊乱并出现间质纤维化的表型;与cTnT^{R141W} DCM模型小鼠相比,DTG小鼠的心肌细胞排列紊乱和间质纤维化程度更加严重。结论:转基因低表达Tomoregulin-1加速了cTnT^{R141W} DCM小鼠的病理进程, Tomoregulin-1可能是DCM调节的重要修饰基因。

[关键词] Tomoregulin-1;扩张型心肌病;转基因小鼠;纤维化

[中图分类号] R541.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2018)09-1187-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20180903

Transgenic low expression of Tomoregulin-1 accelerated dilated cardiomyopathy pathological progress in mice

Zheng Yuan, Hou Daorong, Fu Heling, Yin Yuan, Bao Dan*

Animal Core Facility of NMU, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Tomoregulin-1 on dilated cardiomyopathy (DCM) pathological progress in mice. **Methods:** The expression level of Tomoregulin-1 in the heart of wild-type and cTnT^{R141W} DCM transgenic mice was detected by Western blot. The phenotype analysis of the non-transgenic littermates (NTG), heart-specific Tomoregulin-1 knockdown (Tomoregulin-1-kd), cTnT^{R141W} and heart-specific Tomoregulin-1-kd×cTnT^{R141W} double transgenic (DTG) mice at 2, 4 and 6 months of age were analyzed by M-mode echocardiography and histopathologic examination. **Results:** The expression of Tomoregulin-1 was significantly increased in the heart of cTnT^{R141W} DCM transgenic mice. M-mode echocardiography showed that the heart-specific Tomoregulin-1-kd mice presented thin-walled ventricles, larger left ventricular diameters and decreased cardiac function at 2, 4 and 6 months of age compared with the NTG mice. The DTG mice presented significantly thin-wall ventricles and the tendency of larger left ventricular diameters and decreased cardiac function at 2, 4 and 6 months of age compared with the cTnT^{R141W} DCM mice. Myocardial disarray and fibrosis were clearly observed in the heart tissues from the Tomoregulin-1-kd mice compared with the NTG mice. The DTG mice presented more serious pathological phenotype compared with the cTnT^{R141W} DCM mice. **Conclusion:** Transgenic low expression of Tomoregulin-1 accelerated DCM pathological progress in mice. Tomoregulin-1 may be an important modifier gene of DCM.

[Key words] Tomoregulin-1; dilated cardiomyopathy (DCM); transgenic mice; fibrosis

[Acta Univ Med Nanjing, 2018, 38(09):1187-1191]

[基金项目] 南京医科大学科技发展基金重点项目(2016NJMUZD019)

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

Tomoregulin-1, 也称TMEFF1或TR1, 是1996年Eib等^[1]从成年非洲爪蟾下丘脑—垂体轴中发现的1个新基因编码的蛋白。近年来, 在人和小鼠等哺乳动物体内也克隆出Tomoregulin-1同源基因, 人的Tomoregulin-1基因位于染色体9q31^[2-3]。Tomoregulin-1主要在胚胎发育的中后期和成体的中枢神经系统中表达^[4], 参与胚胎中后期的发育调控和成体中枢神经系统正常功能的维持^[5-7]。

Tomoregulin-1在心脏组织中亦有表达^[8], 且直接与参与心脏发育的Cripto结合。胚胎干细胞中的Cripto缺失会导致肌肉收缩蛋白表达缺失, 使胚胎干细胞向心肌细胞分化缺陷, 但并不影响向其他类型细胞分化的能力^[9]; Cripto基因敲除小鼠因心脏发育缺陷在胚胎期死亡^[10]。可见Cripto对心脏正常发育至关重要, Tomoregulin-1又可直接与Cripto结合, 提示Tomoregulin-1可能参与心脏发育的调控及心脏疾病的发生发展。本研究发现, Tomoregulin-1在cTnT^{R141W}扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)模型小鼠心脏组织中表达显著增高; 而现阶段尚无Tomoregulin-1在DCM中的功能报道, 因此本研究将已建立的心脏组织特异Tomoregulin-1低表达转基因(α -MHC-Tomoregulin-1 knockdown, Tomoregulin-1-kd)小鼠^[11]和cTnT^{R141W}转基因(α -MHC-cTnT^{R141W}, cTnT^{R141W})DCM小鼠^[12-13]杂交, 获得双转基因(double transgenic, DTG)小鼠, 对其心脏形态、结构和功能进行分析, 探究Tomoregulin-1对DCM病理进程的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

选用2月龄的C57BL/6J遗传背景的野生型(wild type, WT)小鼠(北京市维通利华实验动物技术有限公司), 在屏障设施的饲养间饲养, 温度(23 ± 2)℃, 12 h: 12 h明/暗灯照, 动物自由饮水和摄食。实验中涉及动物操作程序已得到南京医科大学动物保护与伦理委员会(IACUC)批准。

羊抗鼠Tomoregulin-1抗体(AF1995)(R&D公司, 美国), 鼠抗GAPDH抗体(上海康城生物公司)。PCR引物由上海英俊生物技术有限公司合成, PCR相关试剂购自大连宝生物工程有限公司。M型超声心动图分析使用加拿大Vevo770小动物超声影像系统。

1.2 方法

1.2.1 Western blot检测Tomoregulin-1在cTnT^{R141W}DCM模型小鼠心脏组织中的表达

RIPA蛋白裂解液分别提取2月龄WT C57BL/6J

小鼠和cTnT^{R141W} DCM小鼠心脏总蛋白, 测定蛋白浓度, 进行SDS-PAGE凝胶电泳, 蛋白转移至NC膜上, 置于5%脱脂奶粉中封闭, 羊抗鼠Tomoregulin-1抗体检测Tomoregulin-1蛋白的表达水平, HRP-偶联的免抗羊抗体结合一抗, HRP-偶联的GAPDH单克隆抗体作为内参。用Image J分析软件测定Western blot条带灰度进行定量分析。

1.2.2 PCR鉴定转基因小鼠的基因型

Tomoregulin-1-kd小鼠^[11]和cTnT^{R141W} DCM小鼠^[12-13]由中国医学科学院医学实验动物研究所制作。将已建立的Tomoregulin-1-kd小鼠和cTnT^{R141W} DCM小鼠杂交获得DTG小鼠。于转基因小鼠出生9~14 d用剪趾法标记, 收集剪下的组织, 用碱裂解法提取基因组DNA, PCR法对转基因小鼠进行基因型检测。Tomoregulin-1-kd上游引物为5'-CGACAACCACTACCTGAGCAC-3', 下游引物为5'-GCCCTCTAGATCAACCACTTTG-3'; 反应条件: 94℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 60℃退火30 s, 72℃延伸40 s, 30个循环; 目的基因Tomoregulin-1-kd片段为525 bp。cTnT^{R141W}上游引物为5'-GAACAGGAGGAAGGCTGAGGATGAG-3', 下游引物为5'-TATTTCCAGCGCCCGGTGACTTTAG-3'; 反应条件: 94℃预变性3 min; 94℃变性30 s, 58℃退火30 s, 72℃延伸40 s, 30个循环; 目的基因cTnT^{R141W}片段为369 bp。

1.2.3 M型超声心动图检测转基因小鼠心脏的形态结构和功能

选用2、4、6月龄同窝阴性(non-transgenic littermates, NTG)、Tomoregulin-1-kd、cTnT^{R141W} DCM和DTG小鼠, 三溴乙醇(0.18 mL/10 g体重)麻醉, 脱去心前区的被毛, 选用30 MHz探头, 进行心脏超声影像分析^[11, 13]。

1.2.4 病理组织学观察转基因小鼠的心肌细胞形态和间质纤维化

选用6月龄NTG、Tomoregulin-1-kd、cTnT^{R141W} DCM和DTG小鼠, 颈椎脱臼法牺牲小鼠, 打开胸腔取出心脏, 将心脏组织固定在中性福尔马林24 h后进行修块、脱水、包埋、切片、苏木素-伊红(haematoxylin-eosin, HE)染色和Masson染色^[11], 镜下观察。

1.3 统计学方法

实验数据以均数±标准误($\bar{x} \pm S_{\bar{x}}$)表示, 数据运用SPSS 16.0统计软件处理, 两组间比较用t检验, 多组间比较采用one-way ANOVA检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Tomoregulin-1在cTnT^{R141W} DCM模型小鼠心脏组织中的表达

与WT小鼠相比, Tomoregulin-1在cTnT^{R141W} DCM模型小鼠心脏组织中的表达显著上调,其表达量是WT小鼠的1.8倍($P < 0.001$,图1)。

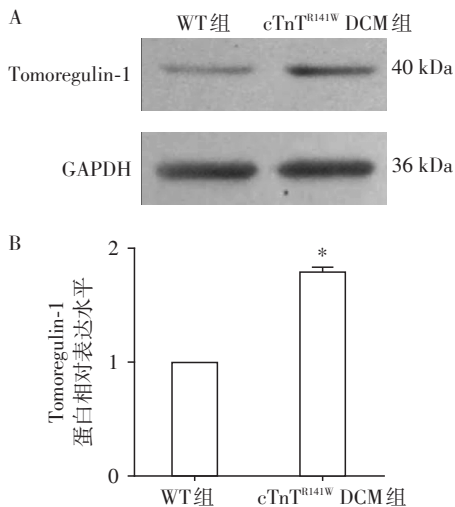


图1 Tomoregulin-1在cTnT^{R141W} DCM小鼠心脏组织中的表达
A: Western blot检测Tomoregulin-1在cTnT^{R141W} DCM模型小鼠心脏组织中的表达。B:运用Image J软件密度定量Tomoregulin-1的相对表达水平,与WT组比较,* $P < 0.001$ ($n=3$)。

Figure 1 Expression of Tomoregulin-1 in the heart of cTnT^{R141W} DCM mice

2.2 转基因小鼠基因型的鉴定

将已建立的Tomoregulin-1-kd小鼠和cTnT^{R141W} DCM小鼠杂交获得DTG小鼠,PCR鉴定阳性转基因小鼠用于本实验(图2)。

2.3 转基因小鼠心脏形态结构和功能的超声心动图表型分析

为了明确Tomoregulin-1基因在DCM病理进程中的功能,分别于2、4、6月龄3个时间点对NTG、Tomoregulin-1-kd、cTnT^{R141W} DCM和DTG小鼠进行心脏超声影像分析。结果显示,与NTG组小鼠相比, Tomoregulin-1-kd组小鼠于2、4、6月龄均表现出室壁显著变薄、心室内径增大、心功能减弱的特点:左心室收缩末期后壁厚度(left ventricular posterior wall at end-systole, LVPWS)分别减小12.69%、13.49%、18.17%;左心室收缩末期前壁厚度(left ventricular anterior wall at end-systole, LVAWS)分别减小12.87%、10.44%、14.72%;左心室收缩末期内径(left

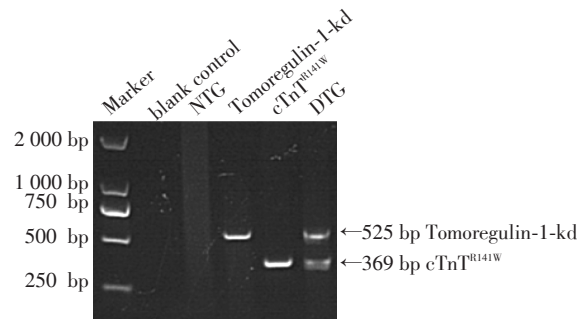


图2 PCR鉴定转基因小鼠的基因型

Figure 2 Genotyping transgenic mice by PCR

ventricular diameter at end-systole, LVESD)分别增加1.21%、7.96%、6.97%;左心室短轴缩短率(left ventricular percent fractional shortening, LVFS)分别减小4.02%、11.88%、12.16%。与cTnT^{R141W} DCM组小鼠相比,DTG组小鼠于2、4、6月龄均表现出室壁显著变薄的特点:LVPWS分别减小16.02%、11.43%、12.15%;LVAWS分别减小9.00%、15.17%、16.47%。并且随着月龄的增加,与cTnT^{R141W} DCM组小鼠相比,DTG组小鼠开始出现心室内径增大和心功能减弱,但差异无显著性(图3)。从不同时间点(2、4、6月龄)不同基因型小鼠心脏形态变化折线的斜率看,亦可反映出Tomoregulin-1心脏特异性低表达可诱导DCM表型,并加速cTnT^{R141W} DCM小鼠的病理进程。

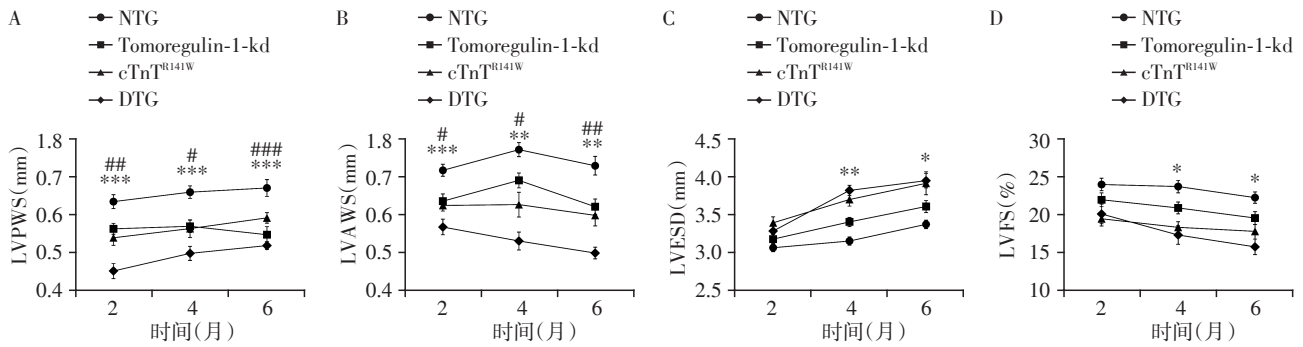
2.4 转基因小鼠心肌细胞形态和间质纤维化的病理组织学表型分析

与NTG小鼠相比, Tomoregulin-1-kd组小鼠心肌细胞排列紊乱并出现间质纤维化;与cTnT^{R141W} DCM组小鼠相比,DTG组小鼠心肌细胞排列紊乱和间质纤维化的程度更加严重(图4)。

3 讨论

DCM是一类以左心室和/或右心室扩张和心功能受损为主要特征的心肌疾病,在人群中的发病率为8:100 000^[14],是除了冠心病和高血压之外诱发心力衰竭的主要危险因素之一。研究发现,心肌肌钙蛋白T(cardiac troponin T, cTnT)的突变如R131W、R141W、R205L和D270N等均可导致DCM的发生。中国医学科学院医学实验动物研究所建立的cTnT^{R141W}转基因小鼠^[15]心脏室壁变薄、心腔变大、间质纤维化、心肌细胞排列紊乱、心功能下降,表现出典型的DCM病理表型,是理想的DCM动物模型。

本研究发现, Tomoregulin-1作为一个新近发现的生长因子,在cTnT^{R141W} DCM小鼠模型中的表达水平显著增高,提示Tomoregulin-1可能是参与DCM病



A: 各组 LVPWS 比较; B: 各组 LVAWS 比较; C: 各组 LVESD 比较; D: 各组 LVFS 比较; 2、4、6 月龄 NTG 组 (n=81、40、26)、Tomoregulin-1-kd 组 (n=69、36、20)、cTnT^{R141W} DCM 组 (n=14、13、12) 和 DTG 组 (n=15、13、13)。Tomoregulin-1-kd 组 vs. NTG 组, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001; cTnT^{R141W} DCM 组 vs. DTG 组, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001。

图3 转基因小鼠心脏形态结构和功能的超声心动图表型分析

Figure 3 Phenotyping analysis of transgenic mice in cardiac morphology and function by echocardiography

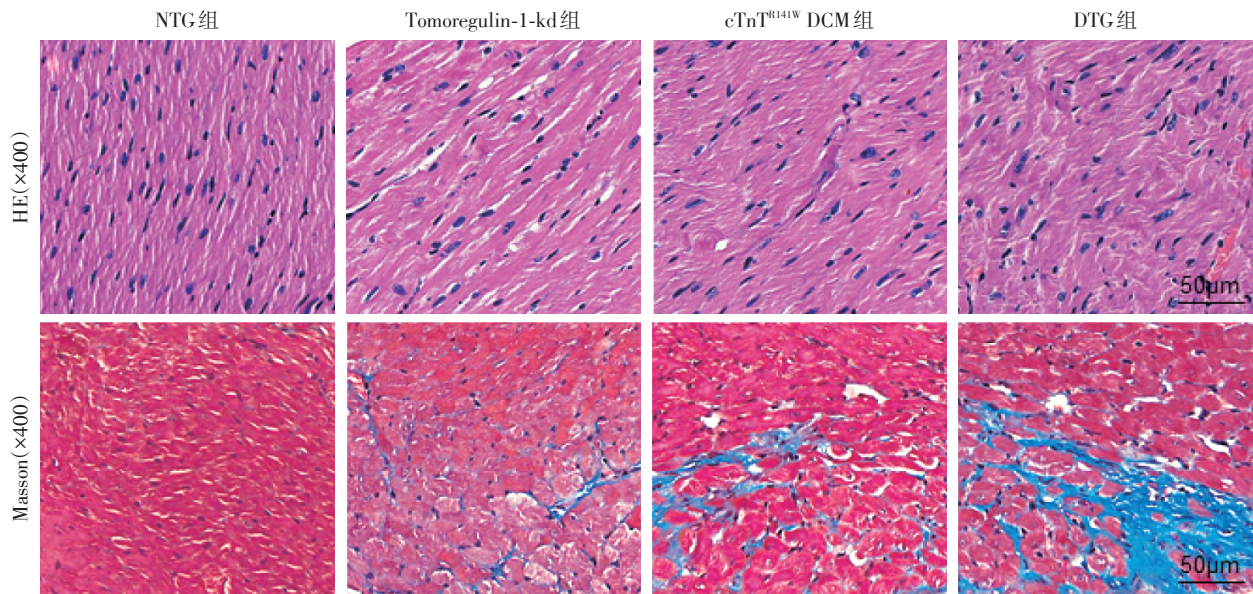


图4 转基因小鼠的病理组织学表型分析

Figure 4 Histopathological phenotyping analysis of transgenic mice

理进程的重要修饰基因。对各组小鼠进行心脏形态、结构和功能分析后发现:与 NTG 小鼠相比, Tomoregulin-1-kd 小鼠表现出显著的室壁变薄、心室内径增大、心功能减弱的特点;与 cTnT^{R141W} DCM 小鼠相比, DTG 小鼠表现出显著的心室壁变薄的特点,且随着月龄的增加,逐渐呈现出心室内径增大和心功能减弱的趋势;病理组织学染色可见, Tomoregulin-1-kd 小鼠较 NTG 小鼠表现出显著的心肌细胞排列紊乱和间质纤维化, DTG 小鼠的心肌细胞排列紊乱和间质纤维化程度均高于 cTnT^{R141W} DCM 小鼠。以上结果表明在正常生理情况下,心脏组织特异的 Tomoregulin-1 低表达会导致心脏组织出现类似 DCM 的表型;在 DCM 时,心脏组织特异的 Tomoregu-

lin-1 低表达会加速 DCM 心脏组织形态、结构和功能的病理性改变。

Tomoregulin-1 是一个 I 型跨膜蛋白,其结构包含 1 个 N 端信号肽、2 个卵泡样 (follistation, FS) 区、1 个保守的表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 样区、1 个跨膜区、1 个细胞内 G 蛋白活化区和 2 个潜在的 N-连接的糖基化和糖胺聚糖结合位点^[1],其中 FS 区能与转化生长因子-β (transforming growth factor-β, TGF-β) 家族的生长因子结合以抑制相应的信号通路,调节细胞生长与分化。近年来 TGF-β 在心室重构发生过程中的作用十分引人关注。心室重构是心肌病发展的重要病理环节,从细胞水平看,心肌细胞和细胞外基质的变化是心室重

构的结构基础^[16-17]。Tomoregulin-1是否通过TGF- β 信号通路参与DCM心肌细胞和细胞外基质的病理改变的调控,仍需进一步研究证实。

综上所述,本研究发现Tomoregulin-1在DCM模型小鼠心脏组织的表达显著上调,转基因Tomoregulin-1低表达加速了DCM小鼠的病理进程, Tomoregulin-1可能是DCM调节的重要修饰基因。

[参考文献]

- [1] Eib DW, Martens GJ. A novel transmembrane protein with epidermal growth factor and follistatin domains expressed in the hypothalamo-hypophysial axis of *Xenopus laevis* [J]. *J Neurochem*, 1996, 67(3): 1047-1055
- [2] Morais Da Silva S, Gates PB, Eib DW, et al. The expression pattern of tomoregulin-1 in urodele limb regeneration and mouse limb development [J]. *Mech Dev*, 2001, 104(1/2): 125-128
- [3] Eib DW, Merkx GF, Martens GJ, et al. Assignment of H7365 (C9orf2) to human chromosome band 9q31 by somatic cell hybrid analysis and fluorescence in situ hybridization [J]. *Cytogenet Cell Genet*, 1998, 81(3/4): 180-181
- [4] Eib DW, Holling TM, Zwijsen A, et al. Expression of the follistatin/EGF-containing transmembrane protein M7365 (tomoregulin-1) during mouse development [J]. *Mech Dev*, 2000, 97(1/2): 167-171
- [5] Gery S, Yin D, Xie D, et al. TMEFF1 and brain tumors [J]. *Oncogene*, 2003, 22(18): 2723-2727
- [6] Noelker C, Schwake M, Balzer-Geldsetzer M, et al. Differentially expressed gene profile in the 6-hydroxy-dopamine-induced cell culture model of Parkinson's disease [J]. *Neurosci Lett*, 2012, 507(1): 10-15
- [7] Lin H, Wada K, Yonezawa M, et al. Tomoregulin ectodomain shedding by proinflammatory cytokines [J]. *Life Sci*, 2003, 73(13): 1617-1627
- [8] Kanemoto N, Horie M, Omori K, et al. Expression of TMEFF1 mRNA in the mouse central nervous system: precise examination and comparative studies of TMEFF1 and TMEFF2 [J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2001, 86(1/2): 48-55
- [9] Xu C, Liguori G, Adamson ED, et al. Specific arrest of cardiogenesis in cultured embryonic stem cells lacking Cripto-1 [J]. *Dev Biol*, 1998, 196(2): 237-247
- [10] Xu C, Liguori G, Persico MG, et al. Abrogation of the cripto gene in mouse leads to failure of postgastrulation morphogenesis and lack of differentiation of cardiomyocytes [J]. *Development*, 1999, 126(3): 483-494
- [11] Bao D, Lu D, Liu N, et al. Tomoregulin-1 prevents cardiac hypertrophy after pressure overload in mice by inhibiting TAK1-JNK pathways [J]. *Dis Model Mech*, 2015, 8(8): 795-804
- [12] Lu D, Zhang L, Bao D, et al. Calponin1 inhibits dilated cardiomyopathy development in mice through the ϵ PKC pathway [J]. *Int J Cardiol*, 2014, 173(2): 146-153
- [13] Lu D, Bao D, Dong W, et al. Dkk3 prevents familial dilated cardiomyopathy development through Wnt pathway [J]. *Lab Invest*, 2016, 96(2): 239-248
- [14] Ramratnam M, Salama G, Sharma RK, et al. Gene-targeted mice with the human troponin T R141W mutation develop dilated cardiomyopathy with calcium desensitization [J]. *PLoS One*, 2016, 11(12): e0167681
- [15] Juan F, Wei D, Xiongzi Q, et al. The changes of the cardiac structure and function in cTnTR141W transgenic mice [J]. *Int J Cardiol*, 2008, 128(1): 83-90
- [16] Manabe I, Shindo T, Nagai R. Gene expression in fibroblasts and fibrosis: involvement in cardiac hypertrophy [J]. *Circ Res*, 2002, 91(12): 1103-1113
- [17] Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling [J]. *Physiol Rev*, 1999, 79(1): 215-262

[收稿日期] 2017-07-03

欢迎投稿 欢迎订閱