

心脏特异性 lncRNA-uc.167 转基因小鼠的构建与表型分析

陈玉梅, 宋桂仙, 李 杏, 范 燚, 吴丽洁, 李 华, 张奇军, 钱玲梅*

(南京医科大学第一附属医院心血管病内科, 江苏 南京 210029)

[摘要] 目的: 构建 lncRNA-uc.167 心肌组织特异性转基因小鼠并对其表型进行分析。方法: 采用 Sfi I、Asc I 双酶切载体质粒 pRP.ExSi-IsI1 和目的片段 uc167-pMD18[®]-T 质粒, 回收连接, 从而把 uc.167 基因克隆入心肌组织特异表达的 IsI 启动子的下游, 构建转基因表达载体, 将所得载体线性化后, 通过显微注射法建立 uc.167 转基因小鼠, 并利用特异引物 PCR 法鉴定转基因小鼠的基因型。通过心脏组织学和超声检查对转基因小鼠的表型进行了初步分析。结果: 成功构建 uc.167 转基因小鼠; 超声心动图显示转基因小鼠心脏结构及相关功能指标均未见明显异常; 心脏重量指数也无明显改变; HE 染色提示心室大小和室壁厚度均无显著性差异, 心肌细胞大小也无明显改变, 且未见炎症浸润、细胞水肿等异常现象; Masson 染色表明转基因阳性和同窝阴性小鼠均未出现明显的心肌纤维化改变。结论: uc.167 转基因小鼠并未出现明显的心脏发育畸形, 心脏结构与功能也未见明显异常。

[关键词] 转基因小鼠; uc.167; 心脏

[中图分类号] R541.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)02-160-06

doi: 10.7655/NYDXBNS20160207

Construction and phenotype analysis of heart-specific lncRNA-uc.167 transgenic mice

Chen Yumei, Song Guixian, Li Xing, Fan Yi, Wu Lijie, Li Hua, Zhang Qijun, Qian Lingmei*

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, NJMU, Nanjing 210009, China)

[Abstract] **Objective:** To construct heart-specific lncRNA-uc.167 transgenic mice and analyze their phenotype. **Methods:** After double enzyme digestion by Sfi1 and Asc1, Vector plasmid pRP. ExSi IsI1 and purpose fragment uc167-pMD18[®] Tplasmid were recycled and connected. And then, the uc.167 gene was cloned into the downstream of the IsI promoter specifically expressed in myocardial tissue to construct the transgene expression vector. Finally, we made the resulting vector linearization, established uc.167 transgenic mice by micro injection and detected the genotype by PCR. The phenotype of transgenic mice was preliminarily analyzed by cardiac histology and echocardiography. **Results:** We successfully constructed uc.167 transgenic mice. Echocardiography displayed that transgenic mice had no obvious abnormality in cardiac structure and function compared with the wild type mice. Heart weight index was not significantly changed both in positive and negative transgenic mice. HE staining suggested ventricular size and ventricular wall thickness had no significant difference and there were also no abnormal phenomenon including the change of cell size, inflammatory infiltration and cell edema in myocardial cell. Masson staining showed that both positive and negative transgenic mice had no significant change in myocardial fibrosis. **Conclusion:** Uc.167 transgenic mice did not appear obvious cardiac malformations, and cardiac structure and function were not significantly abnormal.

[Key words] transgenic mice; uc.167; heart

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(02): 160-165]

心脏发育过程相当复杂, 在基因水平看, 是相关基因在不同时间、不同空间表达调控及相互作用的结果, 稍有异常都有可能影响心脏发育、导致先天性心脏病的发生^[1]。已发现, Nkx2-5、GATA4、

MEF2A、MEF2C、TBX5 等基因以及 Wnt、Notch 等信号通路, 参与调控心脏发育^[1], 为理解先天性心脏病的发生发展提供了分子基础与线索, 但尚不能完全解决先天性心脏病的防治, 因而仍十分有必要继续挖掘胚胎心脏发育的新机制。

近年来, 原被认为“转录噪音”的非编码 RNA, 绝大部分也具备生物学功能, 越来越引人注目^[2]。非

[基金项目] 国家自然科学基金(81370278)

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

编码 RNA 的发现极大拓展了人们对疾病发生发展机制的理解, 目前 miRNA (长度大约 22 nt、在转录后水平负向调控编码基因的非编码 RNA) 的研究最为活跃, 已有大量文献报道了 miRNA 在心脏发育、心血管疾病中的重要作用与机制^[3-4]; 而转录本长度大于 200nt 的长链非编码 RNA (long non-coding RNA, lncRNA)^[5], 由于种类、数量、功能、以及作用机制都远丰富于 miRNA; 具有基因修饰、染色体重组、mRNA 稳定性、表观遗传、基因转录和转录后调节、蛋白质合成代谢及功能调节等重要生物学功能; 与胚胎发育以及诸多疾病的发生密切相关; 可能是 RNA 世界的一个调节枢纽, 已开始引起研究人员的高度关注^[6]。尽管目前有关 lncRNA 在心血管领域中的研究还鲜有报道, 但毋庸置疑, 探索 lncRNA 在心脏发育中的作用与机制将进一步加深对心脏发育机制的理解。

在前期研究中, 通过 lncRNA 芯片技术将空间间隔缺损 (VSD) 与正常的人类胚胎心脏组织转录谱进行比较, 完成了芯片差异表达筛选、生物信息学分析、组织表达分析等工作^[7], 并依据差异显著性、邻近基因与心脏发育的相关性、序列保守性及组织特异性等标准, 筛选出一条与心脏发育密切相关的 lncRNA-uc.167。生物信息学分析及初步的生物学特征研究提示 uc.167 可能具备重要的潜在生物功能。

转基因动物被广泛地应用于发育生物学、遗传学等研究, 在心血管疾病、免疫性疾病、肿瘤、遗传学疾病等医学领域的研究也发挥着不可或缺的作用。本研究拟探讨 uc.167 转基因小鼠的构建与表型分析。

1 材料和方法

1.1 材料

FVB 小鼠 (南京大学模式动物研究所)。氯仿、无水乙醇、多聚甲醛 (上海化学试剂有限公司), 蛋白酶 K (Sigma 公司, 美国), TRIzol (Invitrogen 公司, 美国), 逆转录试剂盒、定量 PCR 试剂盒 (Thermo Scientific 公司, 美国), 基因 lncRNA-uc.167 引物和小鼠内参基因 GAPDH 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 uc.167 心肌组织特异性表达载体的构建

采用 *Sfi* I、*Asc* I 双酶切载体质粒 pRP.ExSi-Isl1 和目的片段 uc167-pMD18[®]-T 质粒, 回收连接, 从而把 uc.167 基因克隆入心肌组织特异表达的 Isl

启动子的下游, 构建 uc.167 转基因载体, 获得重组质粒用质粒限制性内切酶酶切鉴定, 被初步判断为阳性的重组质粒需要经过测序鉴定, 选择在特定酶切位点、按特定方向插入 uc.167 基因全编码区, 经测序确定全编码区无任何突变、缺失或插入的阳性重组质粒方可用于后续实验研究。

1.2.2 建立 uc.167 心肌组织特异性转基因小鼠

采用限制性内切酶 *Pvu* I 进行酶切, 将质粒 pRP.ExSi-Isl1-uc.167 线性化, 再用显微注射法及胚胎移植技术获得 uc.167 心肌组织特异性转基因小鼠, 具体由南京大学模式动物研究所完成。

1.2.3 PCR 鉴定 uc.167 转基因动物的基因表型

剪取小鼠尾尖组织 1~2 cm, 或者小鼠的脚趾, 加入 300 μ L 裂解液和 5 μ L 蛋白酶 K (浓度 20 mg/mL), 55 $^{\circ}$ C 过夜至组织被完全消化, 加入 600 μ L 无水乙醇并混匀, 12 000 r/min 离心 2 min, 移去液体; 加入 600 μ L 70% 乙醇洗涤, 12 000 r/min 离心 2 min, 移去液体; 在空气中晾干; 加入 300 μ L 灭菌蒸馏水溶解 DNA, 保存在 4 $^{\circ}$ C 冰箱。以基因组 DNA 为模板, 将试剂加入 0.2 μ L 去 RNA 酶处理过的 EP 管内, 混和均匀后短暂离心; 置于 PE2400 PCR 仪中进行 PCR 扩增; 吸取 10 μ L PCR 产物进行凝胶电泳, 使用 UVP 凝胶密度扫描仪及相关软件进行分析。PCR 上游引物 5'-GACCAATAGAACTGGGCTTGT-CGAG-3', PCR 下游引物 5'-ATGGAAAGATTGATTC-ACCAAGATGC-3', 目的产物 uc.167 片段 216 bp。转基因鼠可观察到 216 bp 的目的条带, 阴性者则无条带。

1.2.4 uc.167 转基因小鼠心脏组织中 uc.167 表达水平的检测

实时荧光定量 PCR (qRT-PCR) 检测心脏中 uc.167 的表达。分别提取野生型小鼠 (wild-type, WT) 和 uc.167 转基因小鼠 (TG) 的心脏组织 RNA, 反转录成 cDNA lncRNA-uc.167 基因上游引物 5'-GACCAATAGAACTGGGCTTGTTCGAG-3'; 下游引物 5'-ATGGAAAGATTGATTCACCAAGATGC-3', 内参基因 GAPDH 上游引物 5'-ATTCAACGGCAGTCAA-3', 下游引物 5'-CTCGCTCCTGGAAGATGG-3'。对反转录后获得的 cDNA 进行定量检测。扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C 30 s; 95 $^{\circ}$ C 5 s, 60 $^{\circ}$ C 30 s, 40 个循环。

1.2.5 组织学检测 uc.167 转基因小鼠

选用 3 月龄转基因阳性和同窝阴性小鼠, 采用静脉麻醉法牺牲小鼠, 酒精消毒皮肤后打开胸腔取出心脏镜下观察, 并将心脏组织固定在 4% 多聚甲醛中 24 h, 进行取材、脱水、包埋、切片、HE 染色、

Masson 染色。

1.2.6 超声检查 uc.167 转基因小鼠

选取 3 月龄大小、同性别转基因(TG)小鼠($n=9$)和野生型(WT)小鼠($n=9$),腹腔注射阿佛丁对待测小鼠进行麻醉,然后用刮毛刀片或脱毛剂将小鼠胸前的毛除净,腹部向上固定于操作台上,采用 RMV707B 探头,从不同切面(胸骨旁长轴切面、胸骨旁短轴切面、心尖四腔切面、主动脉弓切面、胸骨上切面)对心脏结构和功能进行评估。

1.3 统计学方法

本实验中计量数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用 SPSS15.0 软件进行统计学处理。其中,两样本的比较经方差齐性分析后,进一步选择 t 检验,以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 uc.167 心肌组织特异性表达载体 pRP.ExSi-Isl1-uc.167

采用 *Sfi* I、*Asc* I 双酶切载体质粒 pRP.ExSi-Isl1 和目的片段 uc.167-pMD18[®]-T 质粒,回收连接,从而把 uc.167 基因克隆入心肌组织特异表达的 *Isl* 启动子的下游,构建 uc.167 心肌组织特异性转基因表达载体 pRP.ExSi-Isl1-uc.167,提取并经酶切鉴定质粒正确(图 1A)。测序结果显示插入的 uc.167 cDNA 与报道相同。

2.2 uc.167 心肌组织特异性转基因小鼠模型的建立

用显微注射法将构建好的线性化载体注射到小鼠受精卵原核中,并移植入发情期的假孕母鼠子宫内,小鼠出生后 10 d 剪取少量尾巴组织,提取基因组 DNA,用 PCR 方法对小鼠基因型进行鉴定。为排除 uc.167 基因内源性表达的干扰,把 uc.167 上游引物设计在载体 *Isl1*-promoter 序列上,下游引物设计在 uc.167 基因序列上,从而 PCR 产生的结果只有 uc.167 心肌组织特异性转基因小鼠才可观察到目的条带,而野生型的小鼠则没有条带(图 2A)。为了检测转基因小鼠心脏组织中 uc.167 的表达情况,本研究利用了 qRT-PCR 方法,结果显示,与野生型小鼠组比较,uc.167 在转基因小鼠心脏中表达量明显升高(图 2B)。

2.3 转基因小鼠的心脏结构与功能变化

对 3 月龄大小、同性别 TG 小鼠和 WT 小鼠,采用超声心动图观察其心脏结构并测量相关功能指标。结果发现,uc.167 心脏组织特异性转基因小鼠与 WT 小鼠之间无明显差异改变(图 3,表 1)。

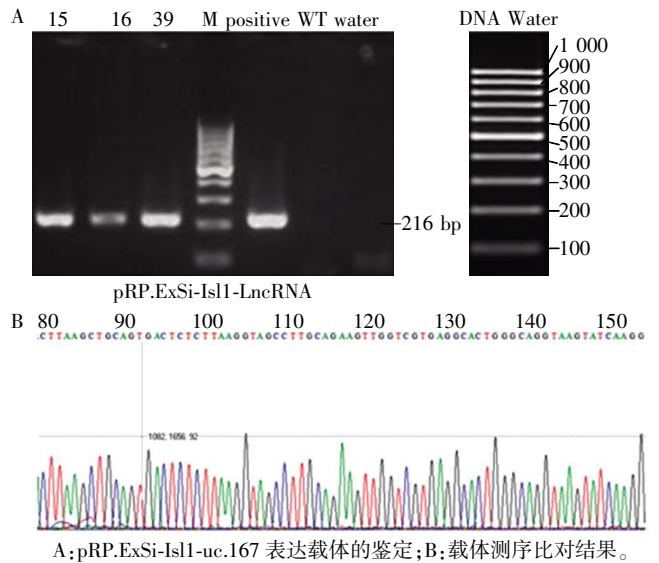


图 1 uc.167 心肌组织特异性表达载体 pRP.ExSi-Isl1-uc.167 构建成功

Figure 1 Construction and identification of heart-specific lncRNA-uc.167 vector

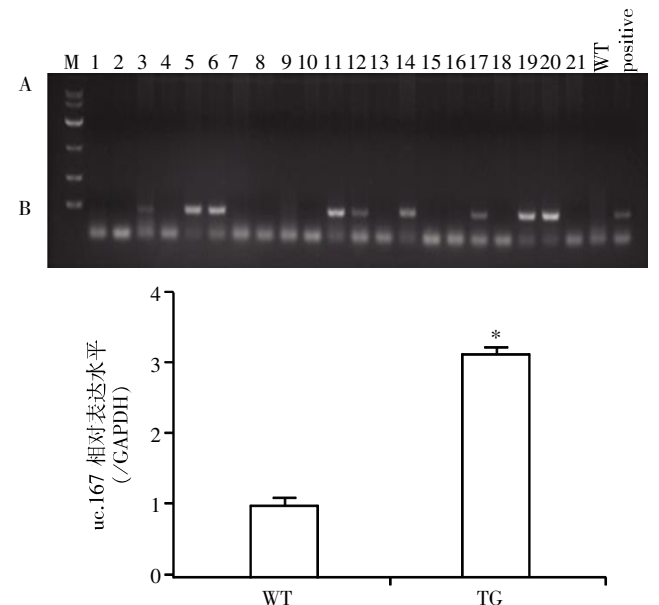
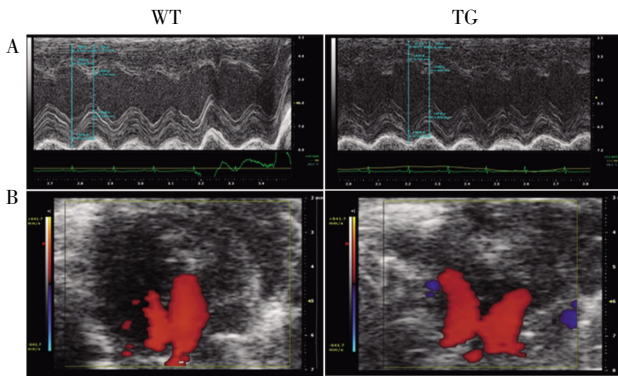


图 2 转基因小鼠的鉴定

Figure 2 Identification of uc.167 transgenic mice

2.4 转基因小鼠的心脏重量指数的变化

光镜下比较 3 月龄大小、同性别 uc.167 心脏组织特异性转基因小鼠与 WT 小鼠的心脏外观差异。结果发现,uc.167 心脏组织特异性转基因小鼠和 WT 小鼠的心脏整体外观形态无明显差异(图 4A)。根据公式:心脏重量指数=心脏重量(g)/体重(g),计算比较 3 月龄大小、同性别 uc.167 心脏组织特异性转基因小鼠与 WT 小鼠的心脏重量指数。结果发



A: M 型心脏超声测左心室结构; B: 彩色多普勒探测心脏穿隔血流。

图 3 uc.167 心脏组织特异性转基因小鼠的超声心动图

Figure 3 The echocardiography of heart-specific uc.167 transgenic mice

表 1 uc.167 转基因小鼠与 WT 小鼠的超声检查指标比较

Table 1 Comparison of the ultrasonography indicators between uc.167 transgenic mice and WT mice

指标	WT 组(n=9)	TG 组(n=9)	P 值
体重(g)	25.70 ± 0.50	25.90 ± 0.70	0.81
心率(bpm)	485 ± 43	496 ± 46	0.72
心间隔厚度(mm)	0.77 ± 0.30	0.78 ± 0.10	0.63
左心室舒张末期内径(mm)	3.61 ± 0.40	3.69 ± 0.30	0.92
左心室收缩末期内径(mm)	2.35 ± 0.40	2.30 ± 0.30	0.73
左室后壁厚度(mm)	0.70 ± 0.07	0.74 ± 0.05	0.56
射血分数(%)	66.90 ± 8.10	68.80 ± 6.30	0.86
左室短轴缩短率(%)	40.40 ± 4.60	42.20 ± 3.80	0.69

现, uc.167 心脏组织特异性转基因小鼠和 WT 小鼠的体重、心脏重量、心脏重量指数均无显著差异(图 4B, 表 2)。

2.5 转基因小鼠心肌的组织学分析

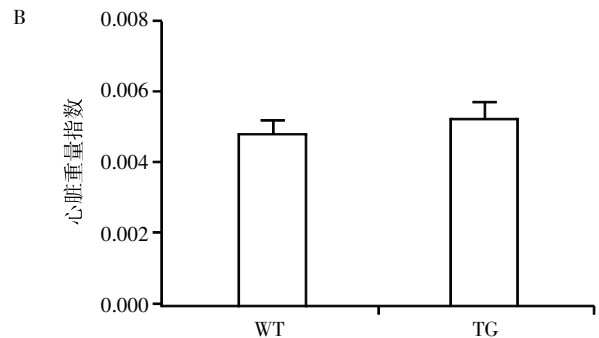
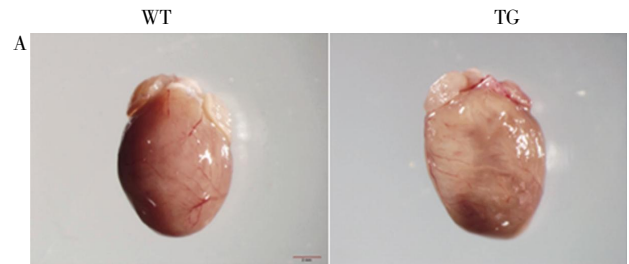
HE 染色显示出生后 3 个月 TG 小鼠和 WT 小鼠的心脏形态学改变。HE 染色结果发现, TG 组小鼠与 WT 组相比, 心室大小、室壁厚度均无显著性差异; 心肌细胞大小也无明显改变, 未见炎症浸润、细胞水肿等异常现象(图 5)

2.6 转基因小鼠心肌的组织学分析

Masson 染色结果显示, 出生后 3 个月, 无论是 TG 小鼠还是 WT 小鼠均未出现明显的心肌纤维化改变(图 6)。

3 讨论

近年来, 为了深入了解某个基因的在体功能, 一些高端、精妙实用的技术方法应运而生, 转基因、基因敲除和基因敲入是这一系列重要技术的代表。转基因动物则是指用实验方法将外源基因整合到染色体基因组内并能稳定遗传表达的一类动物。转



A: uc.167 心脏组织特异性转基因小鼠心脏的整体观; B: uc.167 心脏组织特异性转基因小鼠的心脏重量指数。

图 4 转基因小鼠的心脏重量指数的变化

Figure 4 The changes in heart weight index of transgenic mice

表 2 uc.167 转基因小鼠与 WT 小鼠的体重、心脏重量、心脏重量指数比较

Table 2 Comparison of the body weight, heart weight and heart weight index of mice between uc.167 transgenic mice and WT mice

指标	WT 组(n=9)	TG 组(n=9)	P 值
体重(g)	25.70 ± 0.50	25.90 ± 0.70	0.81
心脏重量(g)	0.128 ± 0.015	0.134 ± 0.011	0.71
心脏重量指数	0.005 ± 0.001	0.005 ± 0.002	0.24

基因动物可以用于模拟人类多种疾病模型, 从而有利于研究疾病的发生发展机制^[8-9]。鉴于初步研究发现 uc.167 在细胞水平上对 P19 细胞诱导向心肌样细胞分化过程产生了显著影响, 进一步构建 uc.167 心肌组织特异性转基因小鼠, 在模式动物水平探讨 uc.167 对心脏发育的影响。

为了获得在心脏组织中特异性表达 uc.167 的转基因小鼠, 本研究选择 Islet1(Isl1) 启动子。Isl1 转录因子目前是心脏祖细胞的唯一特异性标记, Isl1 主要在心脏第二生心区发育中发挥重要作用, 处于整个心脏发育基因调控网络的上游, 与其他下游的转录因子相互作用(如 GATA 锌指结构和叉头转录因子), 级联反应于下游转录因子: Mef2c、Nkx2.5 和 HAND2, 最终影响心脏的发育^[10-13]。

本研究在成功构建 uc.167 转基因小鼠的基础

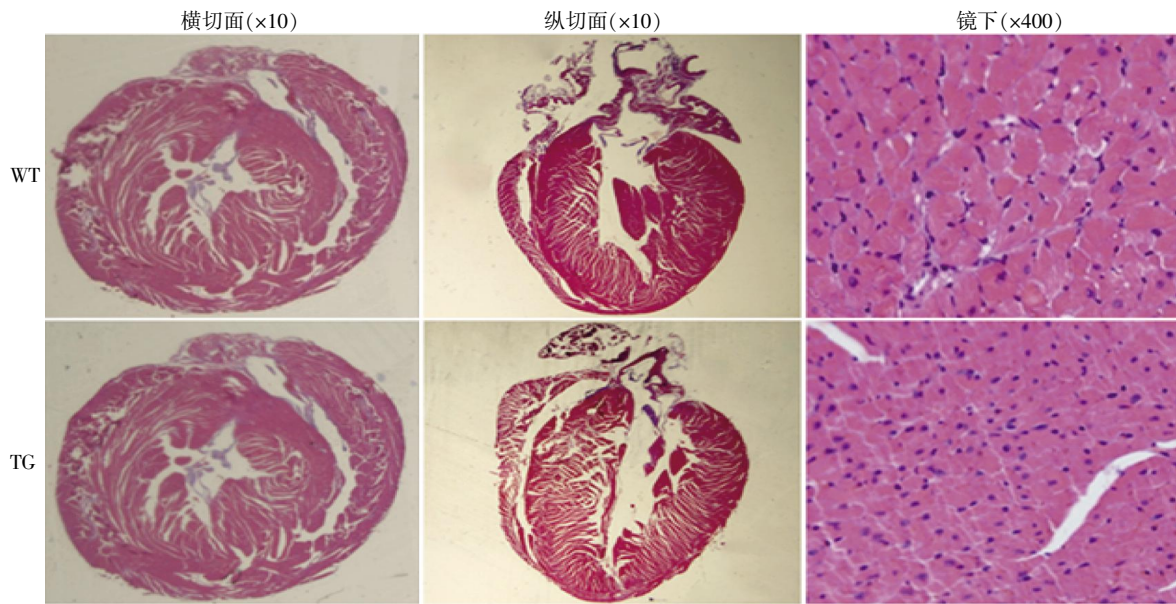
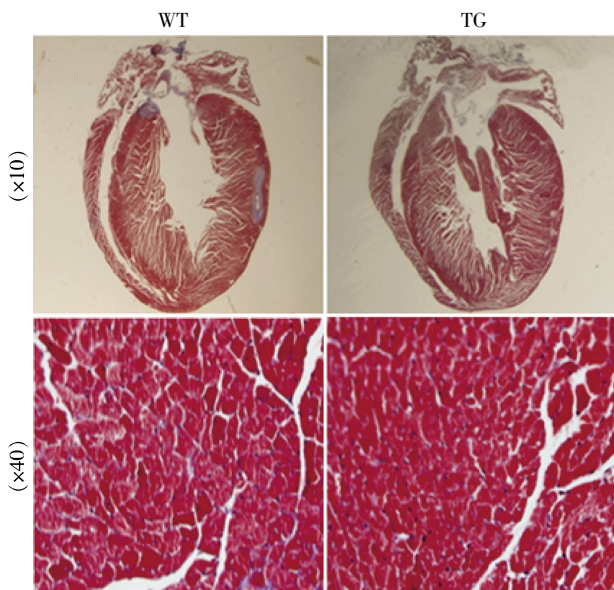


图 5 uc.167 心脏组织特异性转基因小鼠和野生型小鼠的心肌组织 H&E 染色
Figure 5 HE staining of myocardium in uc.167 transgenic mice and WT mice



红色为正常的心肌细胞,蓝色为纤维组织,棕色为细胞核。

图 6 uc.167 心脏组织特异性转基因小鼠和野生型小鼠的心肌组织 Masson 染色

Figure 6 Masson staining of myocardium in uc.167 transgenic mice and WT mice

上,根据基因型鉴定结果,以同年龄、同性别为入组标准,将小鼠分为转基因组和野生型组。通过心超、普通形态学以及 Masson 染色对转基因小鼠的表型进行了初步分析,但结果显示 uc.167 转基因小鼠并未出现明显的心脏发育畸形,心脏重量指数、心脏结构与功能也未见明显异常。这些结果提示正常饲养环境下 uc.167 转基因小鼠在观察期内并未出现明显异常表型。

分析产生这一结果的原因,本研究认为有以下可能:①心脏发育是一个极其复杂的过程,受到多个基因、多个信号通路的调控^[14],某个基因出现异常时,机体可能会通过一些代偿机制来弥补该基因缺陷时产生的不利后果,此外,先心病的发生发展除了上述遗传因素以外,还受到环境、行为等因素的共同作用^[15-16];②lncRNA 数量众多,它们与编码基因共同调控着机体组织器官的发育过程,即使在我们的芯片中也发现 1 508 条差异表达的 lncRNA,这些候选基因可能作为微效基因共同发挥作用,因此 uc.167 不是发挥作用的唯一一条 lncRNA;③前期研究均局限于体外细胞水平,环境比较单一,而生物体的内环境错综复杂,单一基因的作用比较轻微或有其他结构功能相似的基因可代替、补充,因此原有的生物学功能可能无法明显呈现;④转基因效率即基因拷贝数对实验结果也有一定的影响;⑤ uc.167 基因是本实验小组先前人室间隔缺损心肌组中筛选获得的一条 lncRNA,而本部分研究对象是小鼠源性的 uc.167 基因,即使小鼠与人的序列相似度高达 100%,仍有可能存在同源基因生物学功能的差异;⑥本部分研究内容还具有其他不足之处,如用于实验操作的转基因小鼠背景尚不够纯,观察的时间不够长,样本量小等。

[参考文献]

[1] Barnett P, van den Boogaard M, Christoffels V. Localized and temporal gene regulation in heart development [J].

- Curr Top Dev Biol,2012,100:171-201
- [2] Marvulli D,Volpin D,Bressan GM. Spatial and temporal changes of type VI collagen expression during mouse development[J]. Dev Dyn,1996,206(4):447-454
- [3] Krichevsky AM,King KS,Donahue CP,et al. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development[J]. Rna,2003,9(10):1274-1281
- [4] Wutz A,Rasmussen TP,Jaenisch R. Chromosomal silencing and localization are mediated by different domains of Xist RNA[J]. Nat Genet,2002,30(2):167-174
- [5] Adkins RM,Somes G,Morrison JC,et al. Association of birth weight with polymorphisms in the IGF2,H19,and IGF2R genes[J]. Pediatr Res,2010,68(5):429-434
- [6] Kogo R,Shimamura T,Mimori K,et al. Long non coding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers[J]. Cancer Res,2011,71 (20):6320-6326
- [7] Song G,Shen Y,Zhu J,et al. Integrated analysis of dysregulated lncRNA expression in fetal cardiac tissues with ventricular septal defect[J]. PloS One,2013,8 (10): e77492
- [8] Wagner J,Thiele F,Ganten D. Transgenic animals as models for human disease[J]. Clin Exp Hypertens,1995,17(4):593-605
- [9] Sathasivam K,Hobbs C,Mangiarini L,et al. Transgenic models of Huntington's disease[J]. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,1999,354(1386):963-969
- [10] Cai CL,Liang X,Shi Y,et al. Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart[J]. Developmental cell,2003,5(6):877-889
- [11] Laugwitz KL,Moretti A,Caron L,et al. Islet1 cardiovascular progenitors;a single source for heart lineages ? [J]. Development,2008,135(2):193-205
- [12] Dodou E,Verzi MP,Anderson JP,et al. Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development [J]. Development,2004,131(16):3931-3942
- [13] Arceci RJ,King AA,Simon MC,et al. Mouse GATA-4;a retinoic acid-inducible GATA-binding transcription factor expressed in endodermally derived tissues and heart[J]. Molecular and Cellular Biology,1993,13(4):2235-2246
- [14] Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart [J]. Science,2006,313:1922-1927
- [15] Sadowski SL. Congenital cardiac disease in the newborn infant:past,present,and future[J]. Crit Care Nurs Clin North Am,2009,21(1):37-48
- [16] 马丹华,徐厚明,林 宁,等.中国围产儿先天性心脏病危险因素 Meta 分析[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2014,34(9):1273-1278

[收稿日期] 2015-09-07

科技出版物中阿拉伯数字的书写规则

1. 为使多位数字便于阅读,可将数字分成组,从小数点起,向左或向右每 3 位分成 1 组,组间留空隙(约为一个汉字的 1/4),不得用逗号、圆点或其他方式。
2. 纯小数必须写出小数点前用以定位的“0”。
3. 阿拉伯数字不得与除万、亿及法定计量单位词头外的汉字数字连用。如 453 000 000 可写成 45 300 万或 4.53 亿或 4 亿 5 300 万,但不能写成 4 亿 5 千 3 百万;三千元写成 3 000 元或 0.3 万元,但不能写成 3 千元。
4. 一个用阿拉伯数字书写的数值,包括小数与百分数,不能拆开转行。
5. 表示用阿拉伯数字书写的数值范围,使用波浪号“~”。如 10%~20%, $(2\sim 6)\times 10^3$ 或 $2\times 10^3\sim 6\times 10^3$,30~40 km。