

三转基因银屑病小鼠模型建立与表型分析

高祥, 刘宁, 葛文萍, 潘烁, 张海涛, 张连峰, 董伟

(北京协和医学院, 中国医学科学院医学实验动物研究所, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 尿激酶型纤溶酶激活剂(PLAU)、尿激酶型纤溶酶激活剂受体(PLAUR)和信号传导与转录激活因子3(STAT3)是参与银屑病病理发生的重要基因。本文目的是制备皮肤特异性表达 *PLAU*、*PLAUR* 和 *STAT3* 三种基因的转基因小鼠,建立可进行性再现银屑病病理进程的小鼠模型。**方法** 将 *PLAU*、*PLAUR* 和 *STAT3* 基因分别插入牛角蛋白5启动子(BK5)下游,构建转基因表达载体,通过显微注射法建立在皮肤组织同时高表达 *PLAU*、*PLAUR* 和 *STAT3* 三种基因的转基因 C57BL/6J 小鼠。利用 PCR 法鉴定转基因小鼠的基因型,Western blot 检测基因表达水平,HE 染色观察皮肤病理表型。**结果** *PLAU*、*PLAUR* 和 *STAT3* 三种基因在选定的转基因小鼠皮肤组织均有明显表达;转基因小鼠与同龄野生型小鼠相比表皮状态差,炎症明显;4月龄的转基因小鼠真皮变薄,表皮过度角化、棘层增厚,毛囊减少、发育异常、部分毛囊内未见毛干,角化不全区域内可见 Munro 氏小脓肿,真皮炎细胞浸润。**结论** 建立了稳定传代的皮肤特异性表达 *PLAU*、*PLAUR* 和 *STAT3* 基因的转基因小鼠品系,转基因小鼠具有进行性的银屑病表型,可以作为多病因综合银屑病小鼠模型。

【关键词】 银屑病;信号传导与转录激活因子3;尿激酶型纤溶酶激活剂;转基因小鼠

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2015) 07-0011-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2015.007.003

Establishment of the psoriasis transgenic mouse model and analysis of the phenotype

GAO Xiang, LIU Ning, GE Wen-ping, PAN Shuo, ZHANG Hai-tao, ZHANG Lian-feng, DONG Wei

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences and Comparative Medical Center, Peking Union Medical College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To develop a model that could copy the pathological development of psoriasis, the triple-transgenic mice that harboring Plasminogen activator, urokinase (PLAU), PLAUR receptor (PLAUR) and signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) were generated. They are the important genes involved in the pathological development of psoriasis. **Methods** The transgenic plasmid was constructed by insertion of the *PLAU*, *PLAUR* and *STAT3* into the downstream bovine keratin 5 promoter respectively. The transgenic mouse was produced by microinjection and the genotyping was detected by PCR. The expression level of the transgenic gene was determined by Western blotting. The pathological changes were observed by HE staining. **Results** One mouse line was selected with over expression of the *PLAU*, *PLAUR* and *STAT3* in the tissue of skin. The transgenic mice showed decreased dermal layer, a hyperkeratinized cuticular layer and increased stratum spinosum. The number of hair follicle was reduced and developed abnormally in the transgenic mice. The Munro abscess in the dermal layer and the increased inflammatory cell infiltrates in dermal layer were

also observed in the transgenic mice. **Conclusions** A transgenic mouse line was produced and passage stably, which expressed the *PLAU*, *PLAUR* and *STAT3* in the tissue of skin and developed the psoriasis progressively. All of our results suggested that the transgenic mice were a useful animal model for psoriasis.

【Key words】 Psoriasis; Signal transducer and activator of transcription 3; Plasminogen activator urokinase; Transgenic mice

银屑病(牛皮癣, psoriasis)是一种以表皮过度增生和真皮慢性炎症反应为特征的常见皮肤病。白色人种发病率较高约为 2%~5%, 黄种人发病率较低约为 0.5%, 难根治, 易复发。目前发病原因不明, 与呼吸道感染, 胃炎, 饮食习惯, 精神紧张、忧虑, 不当使用激素药物等有关。有两方面的病理特征, 一方面是真皮慢性炎症反应, 包括 T 细胞、中性粒细胞浸润, 炎症因子: 比如 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6、IL-23 分泌增加等^[1-2]。另一方面, 是表皮过度增生, 包括一些与表皮增生相关的血纤维蛋白溶酶原激活因子(tPA), 双调蛋白(AREG)等高表达^[3-4]。银屑病是人类特有的一类疾病, 在动物中少见, 银屑病动物模型的制作主要采用化学制剂诱导, 基因修饰或组织移植等方式制备, 可以在一定程度上模拟银屑病的病理表型、慢性炎症等^[4-7], 但是各有优缺点, 银屑病药物评价需要一种既有表皮过度增生因素又有慢性炎症因素参与的多病因动物模型的研发。

信号传导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)是 STAT 转录因子家族的一员, JAK/STAT 信号通路是大部分细胞因子, 包括 IL2、IL7、IL12、IL10、IL21 等发挥生物学作用的核心通路, STAT3 调控 CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、Th17、Treg 细胞和 B 细胞等多种淋巴细胞的分化与成熟, 与炎症关系密切^[8]。STAT3 参与皮肤伤口的愈合、角质细胞迁移、毛囊生长、抵抗皮肤的放射损伤等, 皮肤转基因表达活化的 STAT3 可引发类似银屑病的病变, 而抑制 STAT3 表达可以改善银屑病症状^[9], 推测, STAT3 参与表皮过度增生和真皮慢性炎症过程, 也是重要的治疗靶点之一。

血纤维蛋白溶酶原, 血纤维蛋白溶酶, 抑制因子, 激活因子细胞受体是一个多基因成员参与的体系, 调节细胞外基质的水解与细胞外基质信号, 参与血管生成、肿瘤发生、皮肤发育等多种过程^[10]。尿激酶型纤溶酶激活剂(plasminogen activator, urokinase, PLAU)是多种血纤维蛋白溶酶原的激活因子, PLAU 和 PLAU 受体(plasminogen activator, urokinase receptor, PLAUR,) 也叫做 UPAR 或 CD87,

都在皮肤组织表达^[11-12]。PLAU/PLAUR 表达升高可能是银屑病发生的重要原因^[12]。

本文利用转基因技术, 将 *STAT3*、*PLAU* 和 *PLAUR* 同时转入小鼠基因组, 建立皮肤特异表达三种基因的转基因小鼠, 小鼠表现毛囊发育异常、表皮过度增生和慢性炎症, 可以作为多病因综合小鼠银屑病。

1 材料和方法

1.1 人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 三种表达载体的构建及转基因

人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 三个基因的 cDNA 购买自 Origene 公司, 用 PCR 的方法克隆三种基因的开放阅读框, 并在两端引入酶切位点 Kpn I (宝生物工程有限公司 中国) 和 EcoRV (宝生物工程有限公司 中国), 插入 pMD-18T Simple Vector (宝生物工程有限公司 中国), 测序证实序列正确。以 Kpn I 和 EcoRV 进行酶切回收三种基因片段, 均插入牛角质蛋白 5 (bovine keratin 5) 启动子下游构建人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 三种表达载体。构建成功后, 再用 Sal I (宝生物工程有限公司 中国) 将其线性化。调整转基因片段浓度至 4 ng/ μ L, 用显微注射法 (TE2000-U 显微注射仪) 将线性化的三种混合后的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中, 制备三转基因小鼠^[13]。C57BL/6J 小鼠购自北京维通利华生物技术有限公司【SCXK (京) 2014-0001】。实验室使用许可【SYXK (京) 2013-0004】。实验中涉及动物的操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会的批准, 批准号为 ILAS-GC-2015-002。

1.2 PCR 鉴定三转基因小鼠的基因型

转基因小鼠在 9~14 日龄时用剪趾法标记, 收集剪下的组织, 用碱裂解法提取基因组 DNA, 利用特异引物通过 PCR 法进行检测。PCR 反应条件: 鼠尾 DNA 模板 10~100 ng, *PLAU* 基因上游引物 5' GGGCAGCACTGTGAAATAGATAAG 下游引物为 5' CCCAGGTAGACGATGTAGTCCTC; *PLAUR* 基因上游引物为 5' GATTGCCGTGTGGAAGAGTG 下游引物为

5' TCAGGAAGTGAAGGTGTCG; *STAT3* 基因上游引物为 5' GAGAGTCAAGACTGGGCATATGC 下游引物为 5' CCAGCTCACTCACAATGCTTCTC。PCR 反应体系 20 μL (试剂购自宝生物工程(中国)有限公司)。反应条件:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s, 30 个循环。目的基因片段分别为 *PLAU* 基因 545 bp, *PLAUR* 基因 475 bp, *STAT3* 基因 550 bp。

1.3 Western blot 检测鉴定三种基因的表达

提取三转基因小鼠与同龄野生型小鼠皮肤总蛋白,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,蛋白转移至 NC 膜上 (Millipore 美国),置于 5% 脱脂奶粉封闭液,分别用兔抗人 *PLAU* 抗体 (Abcam)、兔抗人 *PLAUR* 抗体 (Abcam)、鼠抗鼠 *STAT3* 抗体 (Cell Signaling) 检测基因的表达水平。采用辣根过氧化物酶 (Hrp)-耦联的羊抗兔抗体和羊抗鼠抗体结合一抗 (Pierce, USA),用 Hrp-耦联的鼠抗 β-actin 单克隆抗体做为内参 (康成生物,中国)。

1.4 转基因小鼠与同龄野生型小鼠的大体观察

选用同龄同性别的转基因阳性小鼠和野生型小鼠,SPF 级动物房,同等条件正常饲养,定期观察两组小鼠表皮毛发生长情况,并拍照记录。

1.5 HE 染色观察 4 月龄转基因小鼠与同龄野生型小鼠的皮肤组织

选用 4 月龄的转基因阳性和同龄野生小鼠,取小鼠背部及腹部皮肤,固定在 10% 中性甲醛中 48 h,进行修块、脱水、包埋、切片、HE 染色和镜下观察 (Nikon 显微镜,日本和 Leica MZ16F 体视镜,德国) [14]。

2 结果

2.1 人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 三种基因表达载体的构建

用 PCR 克隆的人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 基因,测序结果表明同已报道的序列完全一致 (*PLAU* Gene ID: 5328, NM-002658; *PLAUR* Gene ID: 5329, NM-002659; *STAT3* Gene ID: 20848, NM-011486;)。将三种基因分别插入皮肤特异的表达启动子 BK5 下游,构建人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 基因三种转基因载体 (图 1)。

2.2 三转基因小鼠基因型的鉴定

用显微注射法将线性化的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,转入到假孕受体 ICR 小

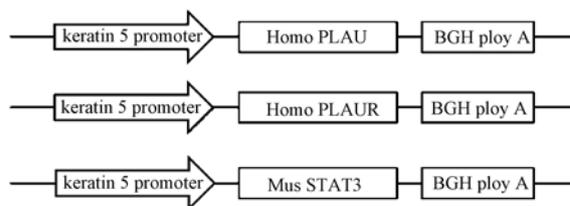
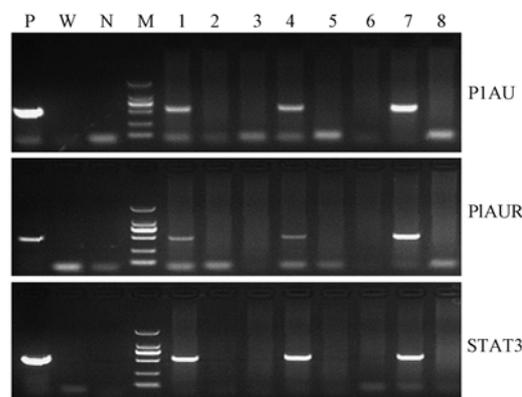


图 1 人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 基因转基因表达载体
Fig.1 *PLAU*, *PLAUR*, *STAT3* transgenic construct

鼠中,小鼠出生后 9~14 d 提取基因组 DNA,用 PCR 扩增目的基因片段来检测转基因小鼠,三种目的基因片段分别为 *PLAU* 基因 545 bp, *PLAUR* 基因 475 bp, *STAT3* 基因 550 bp (图 2),共得到 3 只首建鼠均可传代。



注:P:阳性对照;N:阴性对照;W:空白对照;
M:DNA 相对分子质量标记;1,4,7 是 F0 代阳性转基因小鼠;
2,3,5,6,8 是 F0 代阴性小鼠。

图 2 PCR 鉴定转基因小鼠基因型

Note:P, positive control; N, negative control; W, blank control;
M, DNA molecular weight marker; Lane 1, 4, 7 the positive transgenic mice; Lane 2, 3, 5, 6, 8 negative.

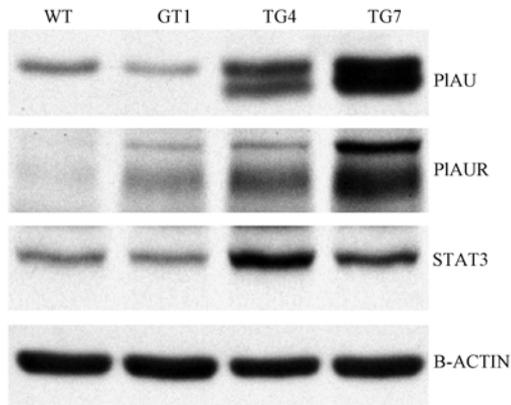
Fig.2 Genotyping the transgenic mice by PCR

2.3 人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 三种基因的表达

首先用 Western blot 分析 3 个系 1 月龄的转基因小鼠皮肤中人 *PLAU*, *PLAUR* 及鼠 *STAT3* 的表达情况,结果显示三种蛋白在皮肤中均有表达,表达量各有差别 (图 3),选取三种基因均有较高表达水平的 TG7 保种繁殖,并进行下一步实验。

2.4 转基因小鼠与同龄野生型小鼠表皮差异

先用 Western blot 结果显示 TG4 皮肤中主要高表达 *PLAU* 和 *STAT3*,而 TG7 皮肤中 *PLAU*, *PLAUR* 和 *STAT3* 均高表达。和 TG4 小鼠比较 TG7 小鼠表型更明显,说明三种基因同时表达对病理发生是关键。TG7 小鼠在 1 月龄就表现腹部毛发稀疏,无光



注:WT:野生型小鼠;TG1、TG4、TG7:转基因小鼠;内参: β -actin。

图 3 三种基因在转基因小鼠皮肤中的表达

Note: WT was Wild type mice; TG1, TG4 and TG7 were the transgenic lines; The Western blot was normalized with β -actin.

Fig. 3 The expression of the transgenic genes in the skin of mice

泽,表皮粗糙,至 4 月龄表现典型腹部皮肤红肿和炎症(图 4)。皮肤炎症主要表现在腹部,背部表型不明显。除皮炎表型外,小鼠生育和发育无异常。

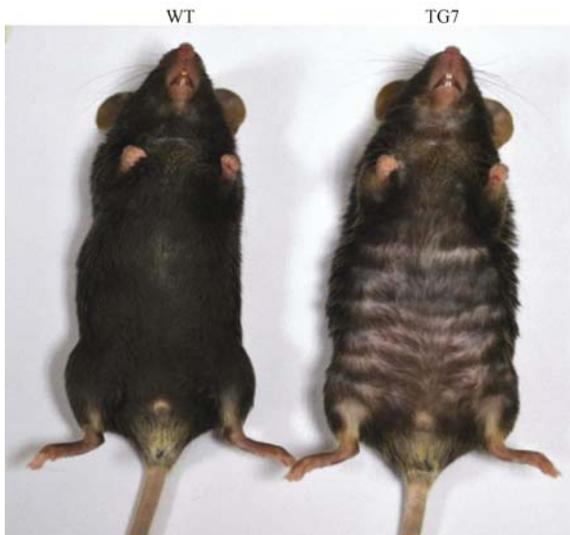


图 4 转基因小鼠表皮表型

Fig. 4 The phenotype of the transgenic mouse

2.5 皮肤病理表型(图见彩插 1)

选用 4 月龄的转基因阳性和同龄野生小鼠,采取颈椎脱臼法牺牲,取背部及腹部皮肤,HE 染色,镜下观察显示,转基因小鼠真皮变薄(图 5A),表皮过度角化和棘层增厚(图 5B),毛囊减少和发育异常,部分毛囊内未见毛干(图 5C),角化不全区域内可见中性白细胞构成的小脓肿(Munro 氏小脓肿)和真皮炎细胞浸润((图 5D))。

3 讨论

真皮慢性炎症反应和表皮过度增生是银屑病的 2 个典型的病理特征,参与银屑病的病理发生因素很多,如 T 细胞、中性粒细胞浸润,炎症因子分泌增加^[1-2],一些与表皮增生相关的因子表达增多,如 iPA, AREG, STAT3, PLAU, PLAUR^[3-4, 11-12]。利用一些具有刺激和损伤作用的化学物质对动物皮肤进行处理,比如,可以用 10% 十二烷基硫酸钠(SDS)涂抹小鼠背部皮肤造成银屑病样体征,但是这种模型一方面病理发生机制与银屑病病理发生机制差别较大,主要局限于病理表型的模仿;另一方面,在移出化学物质后,动物会自行痊愈,没有渐进性的特点,留给药物治疗的观察时间也比较短。通过转基因的方式在皮肤局部表达参与银屑病发生的一些基因,可以在病因和病理发生过程方面更好的模仿银屑病。针对参与银屑病发生的一些基因单独转基因有时候并不能引发皮肤银屑病样体征,比如, *Wnt5a* 基因在银屑病发病过程高表达,但是在皮肤转基因表达 *Wnt5a* 只观察到毛囊发育异常,而没有银屑病样体征^[15]。所以,将多种相关基因一起转基因可以整合多种病因的作用,更真实的模仿银屑病。

PLAU, *PLAUR* 和 *STAT3* 都是参与银屑病病理发生的重要基因^[9, 11-12]。牛角蛋白 5 启动子(BK5)是常用的皮肤组织特异表达的启动子^[16]。本文利用 BK5 启动子驱动 *PLAU*, *PLAUR* 和 *STAT3* 的表达,建立了在皮肤中同时表达这三种基因的转基因小鼠(图 1-3)。和野生型小鼠相比,转基因小鼠在 1 月龄就表现腹部毛发稀疏,无光泽,表皮粗糙,至 4 月龄表现典型腹部皮肤红肿和炎症(图 4)。转基因小鼠真皮变薄,表皮过度角化和棘层增厚,毛囊减少和发育异常,角化不全区域内可见中性白细胞构成的小脓肿和真皮炎细胞浸润(图 5)。转基因小鼠在病因、炎症和皮肤损伤三方面都能表现银屑病特征,并且具有累进性的特点,可以作为多病因综合银屑病小鼠模型。

参考文献:

- [1] Tokura YI, Mori T, Hino R. Psoriasis and other Th17-mediated skin diseases[J]. JUOEH. 2010 Dec 1;32(4):317-28.
- [2] Yamamoto M, Nakajima K, Takaishi M, et al. Psoriatic inflammation facilitates the onset of arthritis in a mouse model[J]. J Invest Dermatol. 2015, 135(2):445-53.

- [3] Airola K1, Reunala T, Salo S, *et al.* Urokinase plasminogen activator is expressed by basal keratinocytes before interstitial collagenase, stromelysin-1, and laminin-5 in experimentally induced dermatitis herpetiformis lesions[J]. *J Invest Dermatol.* 1997,108(1):7-11.
- [4] CookPW, Piepkom M, Clegg CH, *et al.* Transgenic expression of the human amphiregulin gene induces a psoriasis-like phenotype [J]. *J Clin Invest.* 1997,100:2286-2294.
- [5] Zhu X, Wu Y, Huang S C, *et al.* Overexpression of Wnt5a in mouse epidermis causes no psoriasis phenotype but an impairment of hair follicle anagen development[J]. *Exp Dermatol.* 2014,23(12):926-8.
- [6] Schön M, Behmenburg C, Denzer D, *et al.* Pathogenic function of IL-1 beta in psoriasiform skin lesions of flaky skin (fsn/fsn) mice[J]. *Clin Exp Immunol.* 2001,123(3):505-10.
- [7] Nickoloff BJ, Kunkel SL, Burdick M, *et al.* Severe combined immunodeficiency mouse and human psoriatic skin chimeras. Validation of a new animal model[J]. *Am J Pathol.* 1995,146(3):580-8.
- [8] Kane A, Deenick EK, Ma CS, *et al.* STAT3 is a central regulator of lymphocyte differentiation and function [J]. *Curr Opin Immunol.* 2014,28(6):49-57.
- [9] Sano S1, Chan KS, DiGiovanni J. Impact of Stat3 activation upon skin biology: a dichotomy of its role between homeostasis and diseases[J]. *J Dermatol Sci.* 2008 Apr;50(1):1-14. Epub 2007 Jul 2.
- [10] Montuori N, Ragno P. Role of uPA/uPAR in the modulation of angiogenesis[J]. *Chem Immunol Allergy.* 2014;99:105-22.
- [11] Gao Q1, Fu G, Huang G, *et al.* Relationship between urokinase plasminogen activator receptor (uPAR) and the invasion of human prenatal hair follicle[J]. *Arch Dermatol Res.* 2010,302(6):409-18.
- [12] Jensen PJ, Baird J, Belin D, *et al.* Tissue plasminogen activator in psoriasis[J]. *J Invest Dermatol.* 1990,95(5):13S-14S.
- [13] 路迎冬,张旭,马婧,等. Sleeping Beauty 转座酶转基因小鼠模型的建立[J]. *中国比较医学杂志.* 2013,23(10):7-12.
- [14] 张丽,关菲菲,张旭,等. 瘦素基因敲除肥胖大鼠的血糖及病理长期观察[J]. *中国比较医学杂志.* 2014,24(3):45-49.
- [15] Omoto D, Yamaguchi T, Haruyama S. *et al.* Is Wnt5a overexpression sufficient for generating a psoriasis-like phenotype in transgenic mice? [J]. *Exp Dermatol.* 2015,24(3):183-4.
- [16] Diamond I, Owolabi T, Marco M, *et al.* Conditional gene expression in the epidermis of transgenic mice using the tetracycline-regulated transactivators tTA and rTA linked to the keratin 5 promoter[J]. *J Invest Dermatol.* 2000,115(5):788-94.

[修回日期]2015-06-05