

造血干细胞全标记红色和绿色荧光 转基因小鼠的筛选

张晓娟 李小颖 施海霞 葛文平 梁虹 张连峰

(中国医学科学院,北京协和医学院,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,
国家中医药管理局人类疾病动物模型三级实验室,北京 100021)

【摘要】 目的 对五种荧光转基因小鼠造血干细胞中的荧光标记细胞进行分析,筛选造血干细胞全标记红色和绿色荧光转基因小鼠,为造血干细胞分化机制体内示踪研究提供理想的动物模型。方法 采用活体荧光影像系统对两种红色荧光转基因小鼠品系 C57BL/6J-TgN(CAG-DsRed-1 和 CAG-DsRed-2) ZLFILAS 和三种绿色荧光转基因小鼠品系 C57BL/6J-TgN(CAG-EGFP-1、CAG-EGFP-2 和 CAG-EGFP-3) ZLFILAS 的荧光标记进行比较;采用流式细胞术检测各转基因小鼠的骨髓 $lin^{(-)}c-kit^{(+)}$ Sca-1⁺(LSK)造血干细胞荧光标记细胞比率,根据标记比率筛选造血干细胞全标记红色和绿色荧光转基因小鼠。结果 活体荧光影像分析表明转基因小鼠均系统性表达红色或绿色荧光。流式细胞术检测表明 LSK 造血干细胞中高度表达红色和绿色荧光,其中 C57BL/6J-TgN(CAG-DsRed-1) ZLFILAS 和 C57BL/6J-TgN(CAG-EGFP-1) ZLFILAS 的造血干细胞全部为荧光标记细胞。结论 筛选获得在造血干细胞中全标记的红色和绿色荧光转基因小鼠,可为造血干细胞体内研究提供有效示踪工具。

【关键词】 红色荧光蛋白;绿色荧光蛋白;转基因;造血干细胞;小鼠

【中图分类号】 R349.83; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)05-0014-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.05.004

Selection of Transgenic Mouse Models with Totally Labeled Fluorescence in Hematopoietic Stem Cell

ZHANG Xiao-juan, LI Xiao-ying, SHI Hai-xia, GE Wen-ping, LIANG Hong, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Medical Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences; Key Laboratory of Human Diseases Animal Models, State Administration of Traditional Chinese Medicine; Beijing Union Medicine College, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To compared the ratios of fluorescence labeling cells to the $lin^{(-)}c-kit^{(+)}$ Sca-1⁺(LSK) stem cells from the five transgenic mouse lines, selected the mouse lines of totally fluorescence labeled, for tracking the hematopoietic stem cells and in vivo fluorescence imaging analysis. **Methods** The expressions of the fluorescent protein in vivo were observed under in vivo fluorescence imaging system, the expression of those genes in the stem cells were investigated with flow cytometry. **Results** The fluorescent protein was expressed in most tissues in the five transgenic mice. The fluorescent protein expressions were observed in almost all LSK stem cells of C57BL/6J-TgN(CAG-DsRed-1) ZLFILAS and C57BL/6J-TgN(CAG-EGFP-1) ZLFILAS. **Conclusions** Two transgenic mouse lines were indicated in which LSK stem cells were marked completely by red or green fluorescence protein separately, suggesting the two mouse lines may be useful tools for in vivo tracking the hematopoietic stem cells.

[基金项目] 国家科技重大专项“艾滋病和病毒性肝炎等重大传染病防治”(2009ZX10004-307); 十一五新药专项支持(2009ZX09501-026)。

[通讯作者] 张连峰, E-mail: lianfeng_zhang3@yahoo.com.cn。梁虹, E-mail: lianghong5@gmail.com。

【Key words】 Red fluorescent protein; Green fluorescent protein; Transgene models; Hematopoietic stem cell; Mouse

建立一种长期、稳定、直观且不影响组织细胞形成能力的标记方法是进行干细胞分化与定位研究的有效工具。常用的干细胞标记方法有 LacZ 基因、荧光染料 Hoechst 和 5-溴-2 脱氧尿嘧啶核苷 (BrdU) 等,这些免疫组化染色的缺陷是只能在组织切片上观察干细胞的存活、迁移和分化情况,需要牺牲大量的实验动物来观察不同时间点干细胞在体内的转归,无法实时、纵向监测干细胞在体内的动态迁移过程^[1]。荧光发光是通过激发光激发荧光基团达到高能量状态,而后产生发射光。常用的有红色荧光蛋白 (RFP) 和绿色荧光蛋白 (GFP)^[2]。荧光成像被广泛用于细胞凋亡、蛋白质相互作用、免疫细胞迁移、癌症及药物研究等多个领域。最近几年,这项技术开始被用于干细胞研究,可在活体内观察干细胞的行为和生物学特性及其转归,准确获得活体动物体内靶位置的干细胞在各时间点的生长和分化情况,加速了干细胞在肿瘤、组织工程等领域的研究进展。

为满足科学研究的需要,国内外研究者建立了多种荧光转基因小鼠。但由于转基因载体构建所采用的启动子不同、靶基因染色体插入位置的位置效应以及转基因拷贝数的差异,不同荧光转基因小鼠的造血干细胞标记率和标记细胞亚群不同,从而影响了小鼠干细胞荧光标记在干细胞研究中的进一步应用。本文比较了五种红色或绿色荧光转基因小鼠的造血干细胞中荧光标记细胞的比率,以期筛选造血干细胞全标记荧光转基因小鼠,为干细胞示踪提供一种有效手段。

1 材料和方法

1.1 转基因小鼠的获得

两种红色荧光转基因小鼠品系分别被命名为 C57BL/6J-TgN (CAG-DsRed-1) ZLFILAS 和 C57BL/6J-TgN (CAG-DsRed-2) ZLFILAS。三种绿色荧光转基因小鼠分别被命名为 C57BL/6J-TgN (CAG-EGFP-1) ZLFILAS、C57BL/6J-TgN (CAG-EGFP-2) ZLFILAS 和 C57BL/6J-TgN (CAG-EGFP-3) ZLFILAS。转基因小鼠的制备过程是将 DsRed 基因和 EGFP 基因插入 CAG 启动子下游构建转基因载体。经原核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 (TE2000-U 显微注射仪),受精卵移

植到 ICR 假孕受体小鼠输卵管中,制备转基因小鼠^[2]。

1.2 活体荧光影像系统分析红色和绿色荧光转基因小鼠

将各品系荧光转基因阳性小鼠用三溴乙醇 (0.18 mL/10 g) 麻醉后放入活体荧光影像系统的暗箱中拍照,SlideBook 4.0 软件进行分析 (日本 Roger 公司)。

1.3 小鼠 LSK 造血干细胞的荧光标记分析

颈椎脱臼牺牲小鼠,取双腿胫骨、股骨用预冷的 PBS 冲出骨髓腔的骨髓细胞,吹打成单细胞悬液,过滤,计数,调整浓度至 1×10^8 cell/mL。取 50 μ L 全骨髓细胞悬液至于 96 孔板一孔中,加入 Biotin 偶联的 7 种 lineage 抗体 (CD11b-Biotin、Gr1-Biotin、Ter119-Biotin、IL-7R-Biotin、B220-Biotin、CD4-Biotin、CD8-Biotin) (Biolegend),冰上孵育 30 min,加入 200 μ L staining medium (PBS + 1% BSA),400g 5 min 离心弃上清后,加入 Scal (Iy6A/E)-PE-cy7、ckit (CD117)-APC、Anti-Biotin-APC-cy7 抗体 (Biolegend),冰上避光孵育 30 min,离心,弃上清,用 500 μ L staining medium 重新悬浮细胞,移至流式管中准备流式分析,每只小鼠收集 0.5×10^6 细胞,计算 Lineage⁻Scal⁺、c-kit⁺ 的骨髓干细胞中 GFP-FITC⁺ 或 RFP-PE⁺ 细胞所占的比例。调整其余骨髓细胞浓度为 4×10^6 cell/mL,荧光显微镜下观察细胞的荧光标记情况。

2 结果

2.1 活体荧光影像系统分析红色和绿色荧光蛋白转基因小鼠

对各品系的荧光蛋白转基因小鼠进行活体荧光影像系统分析,结果显示,C57BL/6J-TgN (CAG-DsRed-1 和 CAG-DsRed-2) ZLFILAS 转基因小鼠呈现红色荧光,荧光蛋白在全身多个组织器官中表达 (见彩插 2 图 1A、1B)。C57BL/6J-TgN (CAG-EGFP-1、CAG-EGFP-2 和 CAG-EGFP-3) ZLFILAS 转基因小鼠呈现绿色荧光,荧光蛋白在全身多个组织器官中表达。其中 C57BL/6J-TgN (CAG-EGFP-1) ZLFILAS 转基因小鼠的荧光蛋白表达强度最高,其次是 C57BL/6J-TgN (CAG-EGFP-2) ZLFILAS 转基因小鼠,C57BL/6J-TgN (CAG-EGFP-3) ZLFILAS 转基因

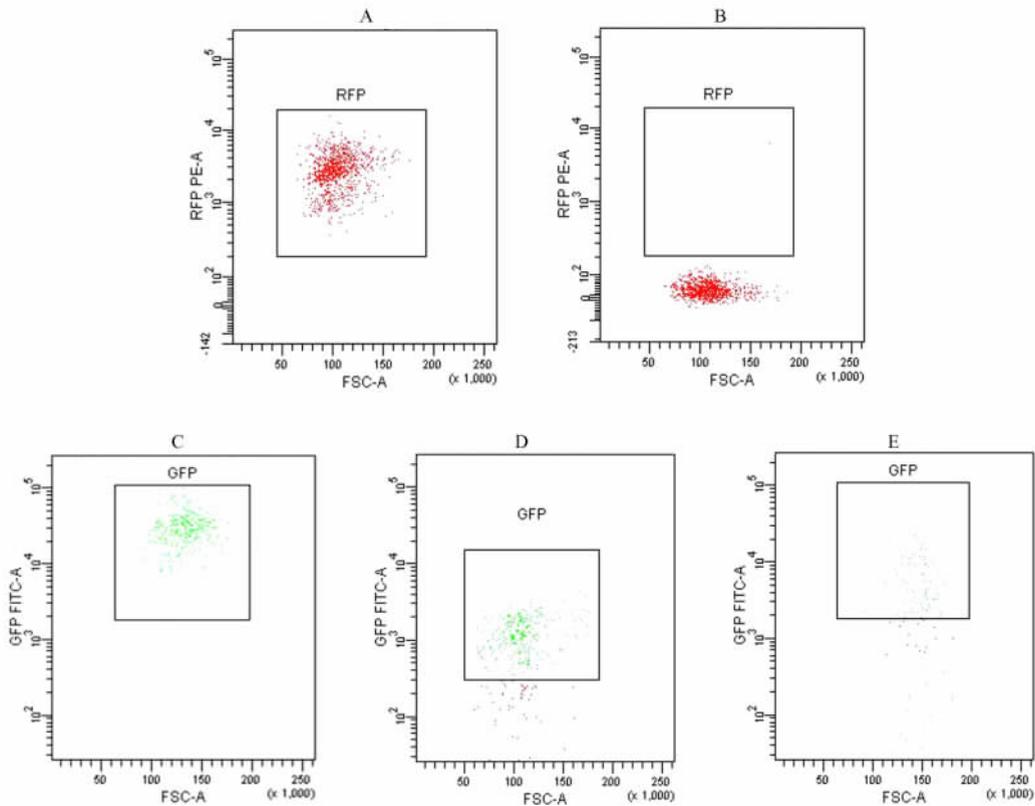


图 2 不同品系荧光转基因小鼠造血干细胞中的荧光细胞比率。A-E 分别为如下品系: C57BL/6J-TgN (CAG-DsRed-1、CAG-DsRed-2、CAG-EGFP-1、CAG-EGFP-2 和 CAG-EGFP-3) ZLFILAS。

Fig. 2 The ratios of fluorescent cells in LSK cells of in different transgenic mice (A-E represent C57BL/6J-TgN (CAG-DsRed-1、CAG-DsRed-2、CAG-EGFP-1、CAG-EGFP-2 和 CAG-EGFP-3) ZLFILAS respectively)

小鼠的荧光蛋白表达相对最弱(见彩插 2 图 1C、1D 和 1E)。

2.2 LSK 造血干细胞中荧光标记细胞的比率

流式细胞检测表明,各荧光转基因小鼠品系的 LSK 造血干细胞均有荧光标记细胞(图 2)。其中, C57BL/6J-TgN (CAG-DsRed-1 和 CAG-EGFP-1) ZLFILAS 这两个荧光转基因品系的几乎全部 LSK 造血干细胞为荧光标记细胞,荧光细胞比率分别为 99.9% 和 99.4%; C57BL/6J-TgN (CAG-EGFP-2 和 CAG-EGFP-2) ZLFILAS 的 LSK 造血干细胞中的荧光标记细胞比率较低,分别为 85.3% 和 65.7%; 而 C57BL/6J-TgN (CAG-DsRed-2) ZLFILAS 的 LSK 造血干细胞中的荧光标记细胞比率则只有 0.1%。该结果表明, LSK 造血干细胞中的荧光标记细胞比率与活体荧光成像结果并非完全一一对应。

2.3 骨髓细胞中的荧光标记细胞

荧光显微镜观察发现,不同品系骨髓细胞中的荧光标记细胞比率不同,其中, C57BL/6J-TgN (CAG-DsRed-1 和 CAG-EGFP-1) ZLFILAS 这两个荧

光转基因品系的荧光标记细胞比率最高(见彩插 2 图 3)。

3 讨论

活体动物体内光学成像主要的功能是追踪并检测标记细胞在体内的活动及标记基因在体内的表达。荧光成像相对于其他活体动物体内成像技术,如超声(ultrasound)、计算机断层摄影(computed tomography, CT)、核磁共振(magnetic resonance imaging, MRI)和正电子衍射成像(positron-emission tomography, PET)等技术,具有操作简便、结果直观、测量快速、灵敏度高及费用低廉等优点。利用这种成像技术可直接、实时观察标记的基因及细胞在活体动物体内的活动及反应。利用光学标记的转基因动物模型可以研究疾病的发生发展过程,进行药物研究及筛选传统的动物实验方法需要在不同的时间点牺牲实验动物以获得数据,得到多个时间点的实验结果。活体荧光成像通过对同一组实验对象在不同时间点进行记录,跟踪同一观察目标

的迁移及变化,所得的数据更加真实可信。因其操作简单、所得结果直观、灵敏度高,有点,得到迅速发展,已广泛应用于生命科学、医学研究及药物开发等方面^[3]。现行的骨髓移植技术通常检测供体造血干细胞在受体骨髓中的数目,是一种终点检测方法。应用转基因鼠,将荧光报告标记的造血干细胞移植入脾及骨髓,可以通过荧光发光实时检测这些干细胞的后代在动物体内的生长和活动。

荧光蛋白在体内,尤其是干细胞中的表达必须在强启动子,如鸡 β 肌动蛋白(chicken β -actin)或 CAG 启动子的驱动下才能高效的进行^[4-5],且转基因载体插入位点和拷贝数对基因表达效率也具有显著的影响。本研究将 DsRed 和 EGFP 插入 CAG 强启动子下游,构建了系统性表达红色和绿色荧光转基因小鼠。其中 DsRed-Express 转基因小鼠红色荧光蛋白 EGFP 转基因小鼠绿色荧光蛋白在全身多个组织器官和骨髓细胞中表达。其中, C57BL/6J-TgN (CAG-DsRed-1) ZLFILAS 和 C57BL/6J-TgN (CAG-EGFP-1) ZLFILAS 的造血干细胞全部为荧光

标记细胞,这两种红色和绿色荧光转基因小鼠模型将为干细胞的分化与定位研究提供了有力的工具动物和分子影像学技术手段。

参考文献:

- [1] Cao YA, Wagers AJ, Beilhack A et al. Shifting foci of hematopoiesis during reconstitution from single stem cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004; 101(1): 221 - 226.
- [2] 冯娟,高苒,全雄志等. 红色荧光和绿色荧光转基因小鼠模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2007, 15(4): 267 - 270.
- [3] Robert M. Advantages of multi-color fluorescent proteins for whole-body and in vivo cellular imaging [J]. J Biomedical Optics, 2005, 10:041021 - 0410210.
- [4] Sangmi C, Therese A, Kai-C S, et al. Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines [J]. Stem Cell, 2002, 20:139 - 145.
- [5] Li LG, Mignone J, Yang M, et al. Nestin expression in hair follicle sheath progenitor cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100:9958 - 9961.

(修回日期)2010-12-31

(上接第 21 页)

- [12] Nishimura M, Sasaki T, Ohishi A, et al. Angiotensin-converting enzyme inhibitors and probucol suppress the time-dependent increase in urinary Type IV collagen excretion of Type II diabetes mellitus patients with early diabetic nephropathy [J]. Clin Nephrol, 2001, 56:96 - 103.
- [13] Kondo S, Shimizu M, Urushihara M, et al. Addition of the antioxidant probucol to angiotensin II type I receptor antagonist arrests progressive mesangioproliferative glomerulonephritis in the rat [J]. J Am Soc Nephrol, 2006, 17:783 - 794.
- [14] Yoshida M, Kimura H, Kyuki K, et al. Combined effect of

probucol and insulin on renal damage in diabetic rats fed a high cholesterol diet [J]. Eur J Pharmacol, 2006, 548:174 - 180.

- [15] Gorogawa S, Kajimoto Y, Umayahara Y, et al. Probuco preserve pancreatic beta-cell function through reduction of oxidative stress in type 2 diabetes [J]. Diabetes Res Clin Prac, 2002, 57:1 - 10.
- [16] El-Demerdash E, Awad AS, Taha RM, et al. Probuco attenuates oxidative stress and energy decline in isoproterenol-induced heart failure in rat [J]. Pharmacol Res, 2005, 51:311 - 318.

(修回日期)2011-02-18

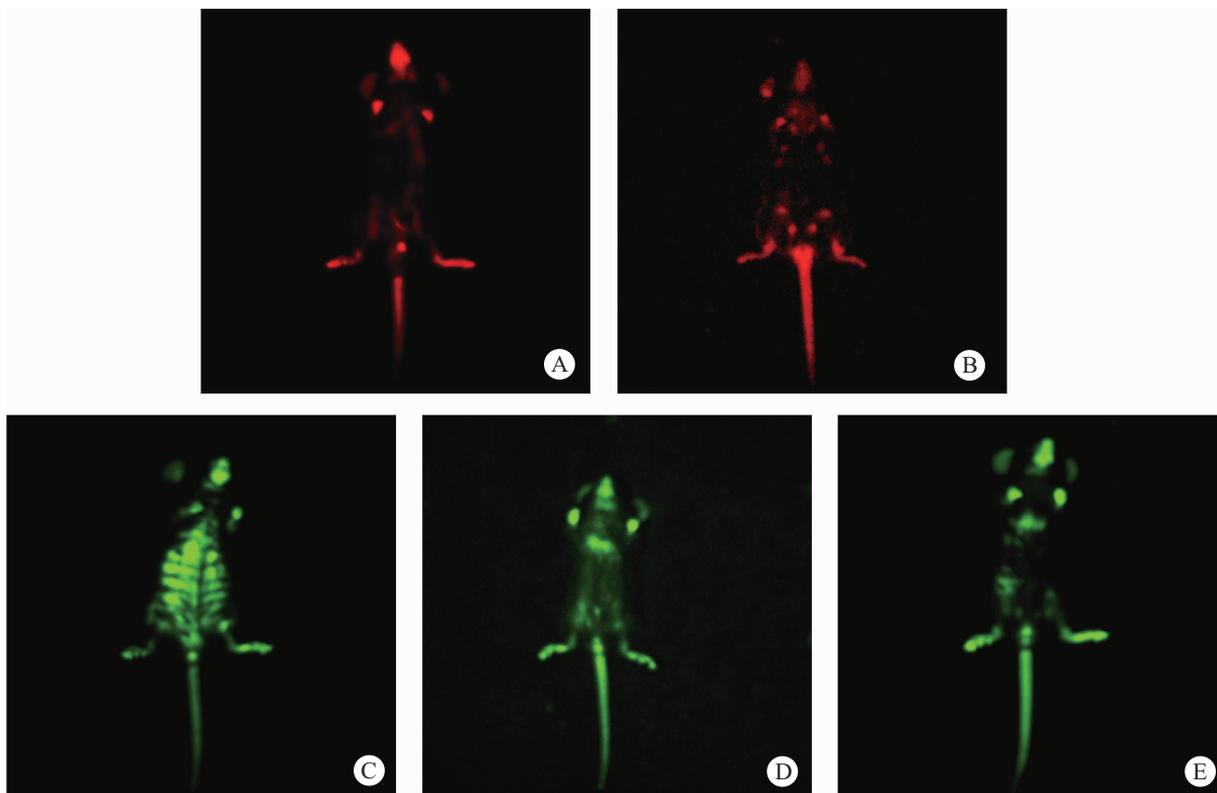


图 1 不同荧光转基因小鼠的活体荧光成像比较研究。A-E 分别为如下品系: C57BL/6J-TgN(CAG-DsRed-1、CAG-DsRed-2、CAG-EGFP-1、CAG-EGFP-2 和 CAG-EGFP-3)ZLFILAS

Fig. 1 The comparative studies of fluorescent protein expressions in different transgenic mice in vivo fluorescence imaging system (A-E represent C57BL/6J-TgN(CAG-DsRed-1、CAG-DsRed-2、CAG-EGFP-1、CAG-EGFP-2 和 CAG-EGFP-3) ZLFILAS respectively)

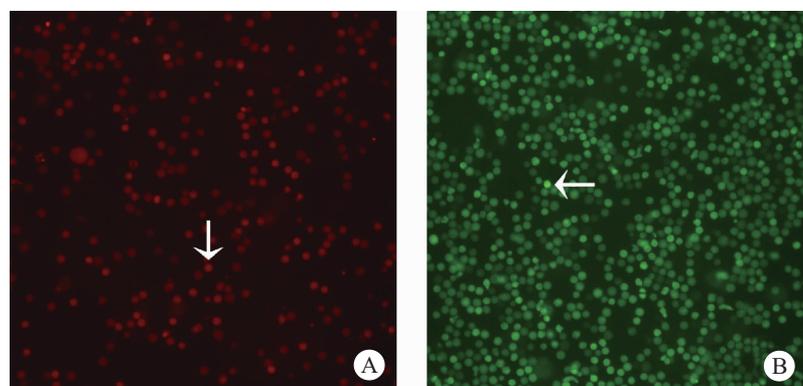


图 3 两种荧光转基因小鼠骨髓细胞中的荧光细胞。A、B 分别为 C57BL/6J-TgN(CAG-DsRed-1 和 AG-EGFP-1) ZLFILAS,箭头指示为干细胞样细胞

Fig. 3 The ratios of fluorescent cells in bone marrow cells of in different transgenic mice (A and B represent C57BL/6J-TgN(CAG-DsRed-1 and CAG-EGFP-1). Arrow indicated cells with the morphology of stem cell