

心脏特异表达人源 FAM55A 转基因小鼠的建立

张丽, 全雄志, 董伟, 高翔, 刘宁, 徐艳峰, 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 建立心脏特异表达的人源 FAM55A 转基因小鼠, 为研究该基因在心肌病发病中的作用提供模型。方法 Western blot 检测 FAM55A 在野生型小鼠与 cTnT^{R141W} 转基因小鼠心脏组织中的表达变化及其在野生小鼠的组织表达谱。克隆人源 FAM55A 基因入 α -MHC 启动子下游构建 α -MHC-FAM55A 表达载体, 显微注射法建立 FAM55A 转基因小鼠。PCR 鉴定转基因首建鼠的基因型。Western blot 鉴定人源 FAM55A 在转基因小鼠心脏中的表达。超声检测转基因小鼠心脏的几何构型和功能。HE 染色检测转基因小鼠心脏的病理改变。结果 FAM55A 在野生型小鼠心脏中有少量表达, 在扩张型心肌病小鼠的心脏中表达增加。建立了 1 个心脏组织特异表达人源 FAM55A 转基因小鼠品系。与野生型小鼠相比, FAM55A 转基因小鼠的心脏收缩期和舒张期左室前壁从 1 月龄到 5 月龄持续增厚, 3 月龄转基因小鼠心脏射血分数和短轴缩短率稍有增强, 1 月龄和 5 月龄转基因小鼠心脏功能则与同龄野生型小鼠相比无变化。组织学检测显示, 转基因小鼠心脏左室心肌细胞不均匀肥大, 但不发生紊乱。结论 FAM55A 在扩张型心肌病小鼠的心脏中表达上调, 建立了心脏特异表达的人源 FAM55A 转基因小鼠, 为进一步和心肌病小鼠模型杂交, 研究该基因在心肌病发病中的作用提供了工具。

【关键词】 FAM55A; 转基因; 小鼠; 心肌病

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)09-0001-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.09.001

The Establishment of Cardiac-specific Human FAM55A Transgenic Mice

ZHANG Li, QUAN Xiong-zhi, DONG Wei, GAO Xiang, LIU Ning, XU Yan-feng, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Diseases 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】 Objectives To generate the cardiac-specific human FAM55A transgenic mice, a model for the study of its function and effects on cardiomyopathy. **Methods** The expression of FAM55A gene in the heart tissues from wild type mice and cTnT^{R141W} transgenic mice were analyzed by western blot. The expression of FAM55A in seven different organs was also detected by western blot. The transgenic vector was constructed by inserting the human FAM55A gene into the downstream of α -MHC promoter. The transgenic mice were created by the method of microinjection. The genotype of transgenic line was identified by PCR and the expression level of the gene was determined by Western blot. The pathologic changes of the heart structure and function were analyzed by echocardiography and microscopy. **Results** The expression of FAM55A was up-regulated in the mice with DCM. One line of C57BL/6J transgenic mice with high human FAM55A expression was identified from five transgenic founders. Compared with the wild type mice, FAM55A transgenic mice

[基金项目] 卫生部项目, 实验动物和人类疾病动物模型资源扩展(200802036) 和十一五新药专项支持(2009ZX09501-026)。

[作者简介] 张丽, 女, 博士生, E-mail: zhangliqq2004@126.com。

[通讯作者] 张连峰, E-mail: Zhanglf@cnilas.org。

showed increased left ventricular anterior wall during systolic and left ventricular anterior wall during diastole from one month of age to five months of age. The cardiac function of transgenic mice was increased at three months of age. The cardiomyocytes from transgenic mice exhibited hypertrophy and no disarrange under light microscope. **Conclusions** The expression of FAM55A was up-regulated in the cTnT^{R141W} transgenic mice. The transgenic mice with cardiac-specific expression of the human FAM55A gene were generated and it can be used to crossbreed with the DCM model to investigate the effect of FAM55A gene on the development of cardiomyopathy.

【Key words】 FAM55A; Transgene; Mice; Cardiomyopathy

扩张型心肌病是一种以心腔(左心室和/或右心室)扩张、心肌收缩功能受损为主要特征的原因不明的心肌疾病^[1],是除冠心病和高血压以外导致心力衰竭的主要病因之一,5年内病死率高达15%~50%。

本室建立了心脏特异表达 cTnT^{R141W} 转基因小鼠, cTnT^{R141W} 转基因小鼠全心扩大,室壁变薄,间质纤维化,心肌收缩功能失调^[2],表现出典型的扩张型心肌病病理表型。

FAM55A (family with sequence similarity 55 member A) 是一个假说基因,基因功能仍有待于研究。cTnT^{R141W} 疾病模型动物心脏全基因表达芯片结果显示, FAM55A 在扩张型心肌病动物模型心肌中 mRNA 表达上调,本实验还发现 cTnT^{R141W} 扩张型心肌病小鼠心脏中 FAM55A 蛋白表达显著高于比野生型小鼠,推测 FAM55A 可能是心肌病发生发展中的修饰基因之一。因此,本研究建立心脏特异人源 FAM55A 转基因小鼠,以对该基因的功能及其对心肌病的影响进行初步探索。

1 材料和方法

1.1 FAM55A 表达载体的构建及转基因小鼠的制备

以 pCMV-SPORT6-FAM55A 质粒 (Open Biosystems, 美国, Clone ID5186472) 为模板, PCR 扩增小鼠 FAM55A 全长 cDNA, 上、下游引物分别为 5'-GTCGACCTGAGGGCCAGGATGTCCTCC-3' 5'-GTCGACATCCCTTAGCAAATGTAGTTTAAGAAC-3', 引物 5' 端均带有 SalI 酶切位点(带下划线), 目的基因 FAM55A 为 1235 bp。将扩增片段插入 pMD18T 载体, 经测序并比对正确无突变碱基后, 以 Sal I (宝生物工程(中国)有限公司, 中国) 酶切回收 FAM55A 片段, 并克隆入 α -MHC 启动子 [Genbank Accession no. U_71441 (clone 26)] 下游构建心脏特异人源 FAM55A 表达载体, 用 Not I (宝生物工程(中国)有限公司, 中国) 将其线性化, 用显微注射法将线性化的转

基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠(康蓝公司 [SCXK (京) 2004001]) 的受精卵中, 用 ICR 小鼠(北京维通利华实验动物技术有限公司 [SCXK (京) 2006-0009]) 作假孕受体, 制备转基因小鼠 (TE2000U 显微注射仪)^[3]。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 (GC-08-2031)。

1.2 PCR 鉴定 FAM55A 转基因小鼠的基因型

转基因小鼠在出生 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^[4], 用 PCR 法对转基因小鼠进行基因型检测。 α MHC-FAM55A 转基因小鼠 PCR 引物序列如下, 上游引物为: 5'-CCTCCTGTCCCTGGTGGTT-3', 下游引物为: 5'-CGATGGCCCTGCGAATAA-3' (上海生物工程技术有限公司, 中国)。反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环。琼脂糖电泳分析 PCR 产物, 目的产物 FAM55A 片段 431 bp。

1.3 Western Blot 检测 FAM55A 的表达

提取 3 月龄野生对照小鼠和 cTnT^{R141W} 转基因小鼠的心脏总蛋白; 提取 F1 代阳性转基因小鼠及同窝阴性小鼠的心脏总蛋白, 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白条带转移到 0.45 μ m 硝酸纤维素膜上, 置于 5% 的脱脂奶粉封闭液中, 室温 1 h, 加入 TBST 稀释的鼠抗 FAM55A 多克隆抗体 (1:500) (H00120400-B01, Novus Biologicals, 美国), 4 °C 孵育过夜, 用 TBST 洗膜三次, 每次 10 min。然后加入 1:15000 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG, 室温杂交 1 h。采用 HRP-GAPDH (康成生物, 中国) 作为内参, 弃去二抗, TBST 洗膜三次, 每次 5 min, TBS 洗膜一次, 10 min。将膜置于化学发光剂中, 用 X 光胶片曝光。

1.4 超声检查 FAM55A 转基因小鼠

选用不同月龄的转基因阳性和同窝阴性小鼠, 饱和三溴乙醇麻醉, 选用 30 Hz 的探头, 进行心脏超声影像分析^[5] (Vevo770 小动物超声探测系统, 加拿

大)。

1.5 组织学检测

选用 5 月龄的转基因阳性和同窝阴性小鼠,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中 24 h,进行脱水、包埋、切片,HE 染色。

1.6 统计学分析

数据用 SPSS 统计软件处理。先进行数据的方差齐性检验,组间比较采用独立性 *t* 检验。计量数据用平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。

2 结果

2.1 FAM55A 在野生鼠和 cTnT^{R141W} 转基因小鼠心脏中的表达

提取 3 月龄野生鼠和 cTnT^{R141W} 转基因小鼠心脏组织总蛋白,Western blot 分析 FAM55A 在心脏组织中的表达。结果显示,FAM55A 在扩张型心肌病动物模型心肌中表达显著上调(图 1)。

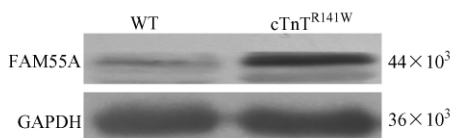


图 1 FAM55A 在野生鼠和 cTnT^{R141W} 转基因小鼠心脏中的表达

Fig. 1 The expression of FAM55A gene in the heart tissues of wild type mice and cTnT^{R141W} transgenic mice

注:分离 3 月龄野生鼠和 cTnT^{R141W} 转基因小鼠的心脏组织总蛋白,GAPDH 作为内对照

Note: The total lysates of heart tissues were isolated from the wild mice and cTnT^{R141W} transgenic mice at 3 months of age, the GAPDH was used as normalization

2.2 FAM55A 的小鼠组织表达谱

提取 3 月龄野生鼠心、肝、脾、肺、肾、脑和睾丸组织总蛋白,Western blot 分析 FAM55A 在各组织中的表达。结果显示,FAM55A 于肺组织中表达最高,心脏、肝、脾、肾等组织中表达较少,脑和睾丸中表达最少(图 2)。

2.3 FAM55A 转基因小鼠的建立

PCR 扩增人 FAM55A 基因,插入 PMD-18T 载体测序,测序结果表明克隆的 cDNA 同已报道 FAM55A 序列完全一致 (GenBank No. BC029049.1),将 FAM55A 基因插入心脏特异表达的 α -MHC 启动子的下游,构建 FAM55A 转基因表

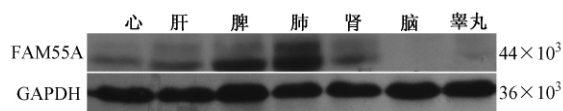


图 2 FAM55A 在野生小鼠不同组织中的表达
Fig. 2 The expression of FAM55A gene in the tissues of wild type mice

注:分离 3 月龄小鼠的心、肝、脾、肺、肾、脑和睾丸组织的总蛋白,用 Western blot 检测 FAM55A 基因在不同组织中的表达水平,GAPDH 作为内对照

Note: The total lysates of heart, liver, spleen, lung, kidney, brain, and testis tissues were isolated from the wild mice at 3 months of age. The expression of FAM55A gene was detected by Western blot and the GAPDH was used as normalization

达载体(图 3A)。用显微注射法将线性化的转基因表达载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,转入受体假孕 ICR 小鼠中,小鼠出生 14 d 提取基因组 DNA,用 PCR 扩增 FAM55A 基因 431 bp 目的片段,鉴定 FAM55A 转基因小鼠的基因型(图 3B),共得到 5 只首建鼠,且均可传代。分别提取 FAM55A 首建鼠的 F1 代阳性转基因小鼠和同龄阴性对照小鼠心脏组织总蛋白,用 FAM55A 多克隆抗体进行 Western Blot 分析,结果显示 44 号首建鼠心脏组织内 FAM55A 蛋白表达量明显高于同龄阴性对照小鼠(图 3C)。

2.4 超声检查 FAM55A 转基因小鼠心脏的结构及功能

1、3、5 月龄 FAM55A 转基因小鼠和同窝阴性小鼠进行心脏超声影像分析(表 1),结果显示,1 月龄 FAM55A 转基因小鼠和同龄野生型小鼠相比,收缩期左室内径(LVID, s)增加了 10% ($P < 0.05$, $n = 12$),舒张期左室前壁厚度(LVAW, d)和收缩期左室前壁厚度(LVAW, s)分别增加了 29.5% 和 23.5% ($P < 0.01$, $n = 12$);3 月龄转基因小鼠心脏射血分数(ejection fraction, EF)增加 6.7% ($P < 0.05$, $n = 12$),短轴缩短率(fraction shortening, FS)增加 9.8% ($P < 0.05$, $n = 12$),舒张期左室前壁厚度(LVAW, d)和收缩期左室前壁厚度(LVAW, s)分别增加了 28.2% 和 24.1% ($P < 0.01$, $n = 12$);5 月龄 FAM55A 转基因小鼠射血分数和短轴缩短率相对于野生型小鼠无变化,舒张期左室前壁厚度(LVAW, d)和收缩期左室前壁厚度(LVAW, s)分别增加了 14.3% 和 31.6% ($P < 0.01$, $n = 12$)。

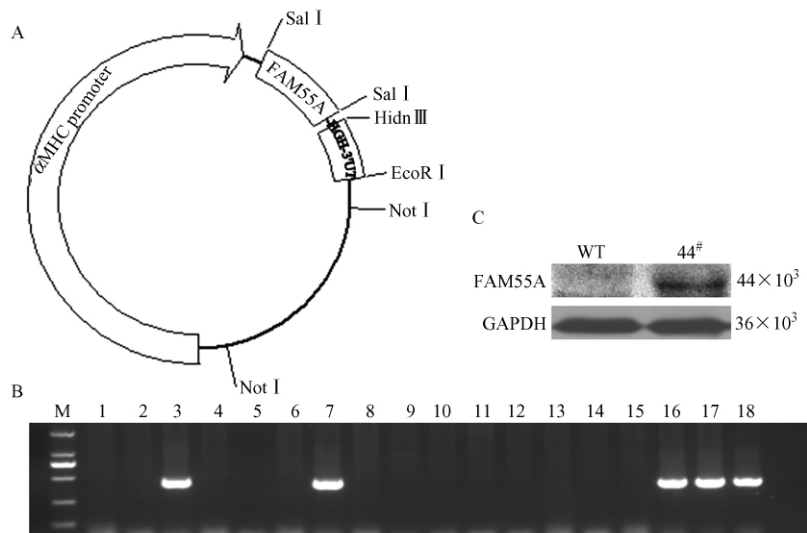


图 3 FAM55A 转基因小鼠的建立

Fig. 3 Generation of FAM55A transgenic mice

注: A, FAM55A 转基因表达载体; B, 基因型鉴定转基因小鼠 PCR 结果;

M, DL2000; 1~18, 鼠尾 DNA 样品, 共鉴定出 3、7、16、17 和 18 5 个阳性转基因小鼠。C, FAM55A 在 44[#] 转基因小鼠心脏中的表达, 以野生型 (WT) 为阴性对照小鼠, GAPDH 加样一致性对照

Note: A FAM55A transgenic expression construct. B Genotyping of FAM55A transgenic mice detected by PCR. M DL2000 DNA marker. 1~18 mice genomic DNA samples. The totally 5 founders were screened as shown in lanes of 3、7、16、17 and 18. C was expression of FAM55A in the 44[#] transgenic mice detected by western blot, and compared with that of the wild type mice control (WT). GAPDH was used as loading control

表 1 1、3、5 月龄野生型小鼠和 FAM55A 转基因小鼠 M 超声参数的独立样本 t 检验

Tab. 1 Independent samples t test of wild type and FAM55A transgenic mice at 1, 3 and 5 months of age

年龄(月)	组别	舒张期左室前壁	收缩期左室前壁	舒张末期左室	收缩末期左室	射血分数	短轴内径缩
Age(month)	Group	LVAW, d (mm)	LVAW, s (mm)	内径 LVEDD (mm)	内径 LVESD (mm)	(%) EF (%)	短率 (%) FS (%)
1 月龄	野生型	0.61 ± 0.13	0.98 ± 0.13	3.36 ± 5.17	2.01 ± 3.43	71.94 ± 5.72	40.43 ± 4.62
	转基因	0.79 ± 0.11 **	1.21 ± 0.16 **	3.39 ± 12.47	2.21 ± 5.09 ⁺	72.97 ± 5.28	41.44 ± 4.32
3 月龄	野生型	0.71 ± 0.08	1.08 ± 0.13	3.69 ± 8.52	2.37 ± 5.11	66.2 ± 5.63	36.07 ± 4.27
	转基因	0.91 ± 0.11 **	1.34 ± 0.15 **	3.59 ± 9.41	2.36 ± 4.12	70.66 ± 5.16 ⁺	39.60 ± 4.49 + 95 ⁺
5 月龄	野生型	0.77 ± 0.09	0.98 ± 0.12	3.68 ± 13.02	2.49 ± 7.78	61.18 ± 7.05	32.44 ± 4.85
	转基因	0.88 ± 0.10 **	1.29 ± 0.10 **	3.76 ± 9.73	2.62 ± 5.92	65.21 ± 5.04	35.32 ± 3.78

注: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 野生型, $n = 16$; FAM55A 转基因, $n = 12$

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Wild type, $n = 16$; FAM55A tg mice, $n = 12$

2.5 FAM55A 转基因小鼠心脏病理学检查

将 5 月龄 FAM55A 转基因小鼠和同窝阴性对照小鼠的心脏进行病理解剖, 进行 HE 染色。HE 染色可见 FAM55A 转基因小鼠心脏心肌细胞不均匀肥大, 但不发生排列紊乱 (封 3 图 4)。

3 讨论

FAM55A 基因作为一个假说基因, 目前还没有关于该基因功能的报道, 更没有和心肌病之间联系的相关报道。本文利用 Western Blot 检测了 FAM55A

在野生型小鼠多个组织中的表达,发现肺组织中表达最高,脑和睾丸中表达极少,心脏组织中有少量表达。并发现 FAM55A 在 cTnT^{R141W} 扩张型心肌病小鼠模型心脏组织中的表达比野生型小鼠高,推测其对心脏发育可能具有重要的作用。

本文中,建立了心脏特异表达的人源 FAM55A 转基因小鼠。Western Blot 结果显示,FAM55A 在 44 号首建鼠心脏组织中与野生型小鼠相比有较高表达。对转基因小鼠 1 月龄到 5 月龄的追踪超声检查,发现 FAM55A 基因的高表达导致心脏收缩期和舒张期左室前壁持续增厚,3 月龄转基因小鼠心脏射血分数和短轴缩短率稍有增强,1 月龄和 5 月龄转基因小鼠心脏功能相对于同龄野生鼠无变化。心脏组织病理观察结果显示,FAM55A 转基因小鼠心脏心肌细胞虽有肥大但不发生紊乱。总之,FAM55A 转基因小鼠心脏左心室发生肥厚,心功能有所增强,推测 FAM55A 基因的过表达可能和代偿性肥厚有关。

目前,FAM55A 基因是一个新基因,本文成功建立了心脏特异表达的人源 FAM55A 转基因小鼠,此转基因小鼠的建立为进一步研究 FAM55A 对心脏正常发育的影响,以及 FAM55A 在心肌病的发生过程中的生物学功能及可能的机制提供了工具动物。FAM55A 转基因小鼠与转基因扩张型心肌病和肥厚

型心肌病小鼠杂交或者对转基因小鼠实施手术的方法,可进一步研究 FAM55A 在心肌病发病中的作用,为心肌病的机制研究和治疗提供线索。

参考文献:

- [1] Richardson P, McKenna W, Bristow M, et al. Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology Task Force on the Definition and Classification of cardiomyopathies [J]. *Circulation*, 1996, 93: 841-842.
- [2] 冯娟,董伟,全雄志,等。cTnT^{R141W} 转基因小鼠扩张型心肌病模型的建立[J]。中国比较医学杂志,2007,17(10): 563-567.
- [3] Gordan JW, Ruddle FH. Integration and stable germline transmission of genes injected into mouse pronuclei [J]. *Science*, 1981, 214 (4526): 1244-1246.
- [4] Truett GE, Heeger P, Mynatt RL, et al. Preparation of PCR-quality mouse genomic DNA with hot sodium hydroxide and tris (HotSHOT) [J]. *Biotechniques*, 2000, 29(1): 52-54.
- [5] Zhou YQ, Foster FS, Nieman BJ, et al. Comprehensive transthoracic cardiac imaging in mice using ultrasound biomicroscopy with an anatomical confirmation by magnetic resonance imaging [J]. *Physiol Genomics*, 2004, 18: 232-244.

(修回日期)2011-05-05

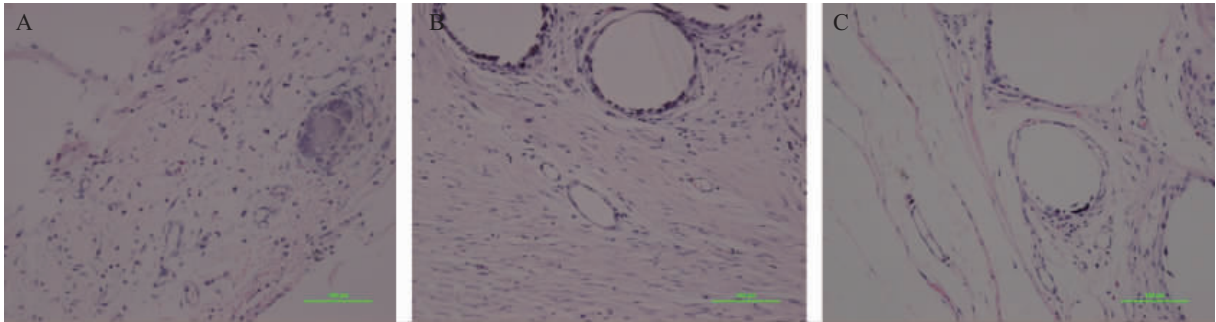


图 5 植入超普补片 1(A)、4(B)、12(C)周后的组织病理学反应(HE)

Fig. 5 Histopathology reaction(HE) of Chaopu group at 1week(A), 4week(B), 12week(C)

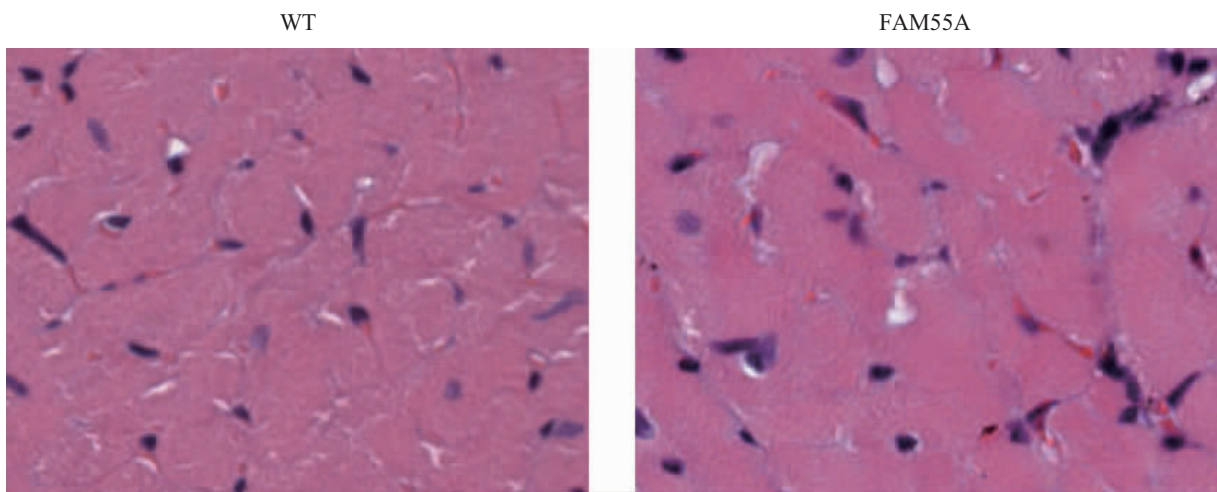


图 4 FAM55A 转基因小鼠的组织学分析(5 月龄的 FAM55A 转基因小鼠和同窝阴性小鼠心脏组织切片,HE 染色。WT,野生型小鼠;FAM55A,FAM55A 转基因小鼠)

Fig. 4 Histology analysis of FAM55A transgenic mice (The sections of heart tissue from the wild type mouse and the transgenic mouse at 5 months of age were stained with HE. WT was wild type mice, and FAM55A was FAM55A transgenic mice)