

· 论 著 ·

基于 Cre/loxP 系统的糖皮质激素受体基因条件性打靶嵌合鼠的获得

何志颖,姚玉成,李建秀,王新民,胡以平*

(第二军医大学基础医学部细胞生物学教研室,上海 200433)

[摘要] **目的:**应用 Cre/loxP 系统建立诱导型糖皮质激素受体(GR)基因剔除小鼠模型,为在体内直接进行 GR 基因的研究提供条件。**方法:**针对 GR 基因第 2 外显子构建诱导型目标载体,将打靶载体电穿孔转染胚胎干细胞(embryonic stem cell, ES),经 Southern 杂交筛选发生正确同源重组的 ES 细胞,囊胚注射法制备嵌合体并进行生殖系检测及纯化建系。**结果:**成功构建了针对 GR 基因第 2 外显子的诱导型目标载体,转染 ES 细胞获得了工程化的 ES 细胞,经囊胚注射获得了由工程化的 ES 细胞和体细胞共同发育而来的嵌合体小鼠。**结论:**基于 Cre/loxP 系统的 GR 基因条件性打靶嵌合鼠的获得,为得到理想的诱导型 GR 基因剔除小鼠模型奠定了基础。

[关键词] 受体,糖皮质激素;嵌合体;Cre/loxP 系统;胚胎干细胞

[中图分类号] R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2005)03-0290-04

Generation of chimeras of glucocorticoid receptor conditional gene targeting mice based on Cre/loxP system

HE Zhi-ying, YAO Yu-cheng, LI Jian-xiu, WANG Xin-min, HU Yi-ping* (Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish an inducible model of glucocorticoid receptor (GR) gene knock-out mice using Cre/loxP system. **Methods:** An inducible targeting vector aiming at the exon 2 of GR gene was constructed. The targeting vector was electroporated into ES cells and targeted ES clones were obtained by Southern blot screening. Chimeras were acquired by blastocysts injection and the germ-line chimeras were obtained with the detection of gonad. **Results:** An inducible targeting vector aiming at the exon 2 of GR gene was successfully constructed. GR targeted ES cells were obtained by Southern blot screening and chimeras were produced by blastocysts injection. **Conclusion:** Generation of chimeras of GR conditional gene targeting mice based on Cre/loxP system has laid a solid foundation for establishing an ideal inducible model of GR gene knock-out mice.

[KEY WORDS] receptors, glucocorticoid; chimera; Cre/loxP system; embryonic stem cell

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2005, 26(3): 290-293]

糖皮质激素受体 (glucocorticoid receptor, GR) 介导糖皮质激素在生理和发育上的作用十分复杂,涉及多个器官和系统^[1]。目前对于 GR 的研究多在细胞和药物诱导的动物模型上进行,制备 GR 基因缺陷的基因工程小鼠以作为相关研究的实验动物模型,对于该领域研究的深入和发展具有重要意义。1995 年 Cole 等^[2]制作了 GR 基因组型缺陷的小鼠品系,但发现这种小鼠的纯合体小鼠在出生数小时后因肺发育不良而呼吸衰竭死亡,同时肝脏代谢能力以及下丘脑-垂体-肾上腺轴的反馈调节也严重障碍。因此,单纯从 ES 细胞途径获得 GR 基因缺陷的基因型再发育成个体的途径出发,很难得到理想的小鼠模型。小鼠 GR 基因全长 110 kb,由 9 个外显子组成,基因的表达至少受到 3 个启动子的控制,其中 1 个是 T 淋巴细胞专一性的,另外 2 个在各种细胞和组织中都不同程度的调控基因表达^[3]。GR 基因第 3、4 外显子为 DNA 结合区,第 5、6、7、8 外显子为激素结合区,第 2 外显子可能是发

挥生理作用的关键部位^[4]。本室前期的工作也证实,GR 基因第 2 外显子组成型缺陷的小鼠因肺发育问题无法获得成体动物。为了避免 GR 基因组型缺陷对小鼠生长发育的影响,我们构建了针对第 2 外显子的诱导型目标载体^[5,6],转染胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES) 获得了工程化的 ES 细胞,经囊胚注射获得了由工程化的 ES 细胞和体细胞共同发育而来的嵌合体小鼠。目前对嵌合体小鼠的测交实验正在进行中,以判定种系嵌合鼠的获得,从而得到理想的诱导型 GR 基因剔除小鼠模型。

1 材料和方法

1.1 材料 DMEM、HBSS、LIF、胰酶购自 Gibco 公司;胎牛血清购自 Hyclone 公司;M₂ 培养液、石蜡

[基金项目] 国家高新技术发展规划(“863”计划)课题(102-10-04-03)。

[作者简介] 何志颖(1976-),男(汉族),博士生,主治医师。

* Corresponding author. E-mail: yphu@smmu.edu.cn

油购自 Sigma 公司;来自 129/SvJ 小鼠品系的 ES 细胞系购自 Genomesystems 公司;制备含 G418 抗性饲养层细胞的 *neo* 基因转基因小鼠以及 pFlox 质粒由美国 Roswell Park Cancer Institute 的 Paul Solowey 教授赠送;PCR 引物由上海生工生物工程服务有限公司合成;Taq 酶以及 dNTP 均购自上海生工生物工程服务有限公司;C57BL/6J、ICR 小鼠由本室 SPF 级动物房提供,GR 基因片段由本室克隆,pBluescript 质粒本室保存;显微操作仪、拉针仪及磨针仪等设备为 Nikon 公司产品;CO₂ 孵箱为 Heraeus 公司产品。

1.2 GR 条件基因打靶载体的构建 按图 1 所示的流程进行同源臂的亚克隆(原理见图 2 所示),以 pFlox 为打靶载体构建 GR 条件基因打靶载体。

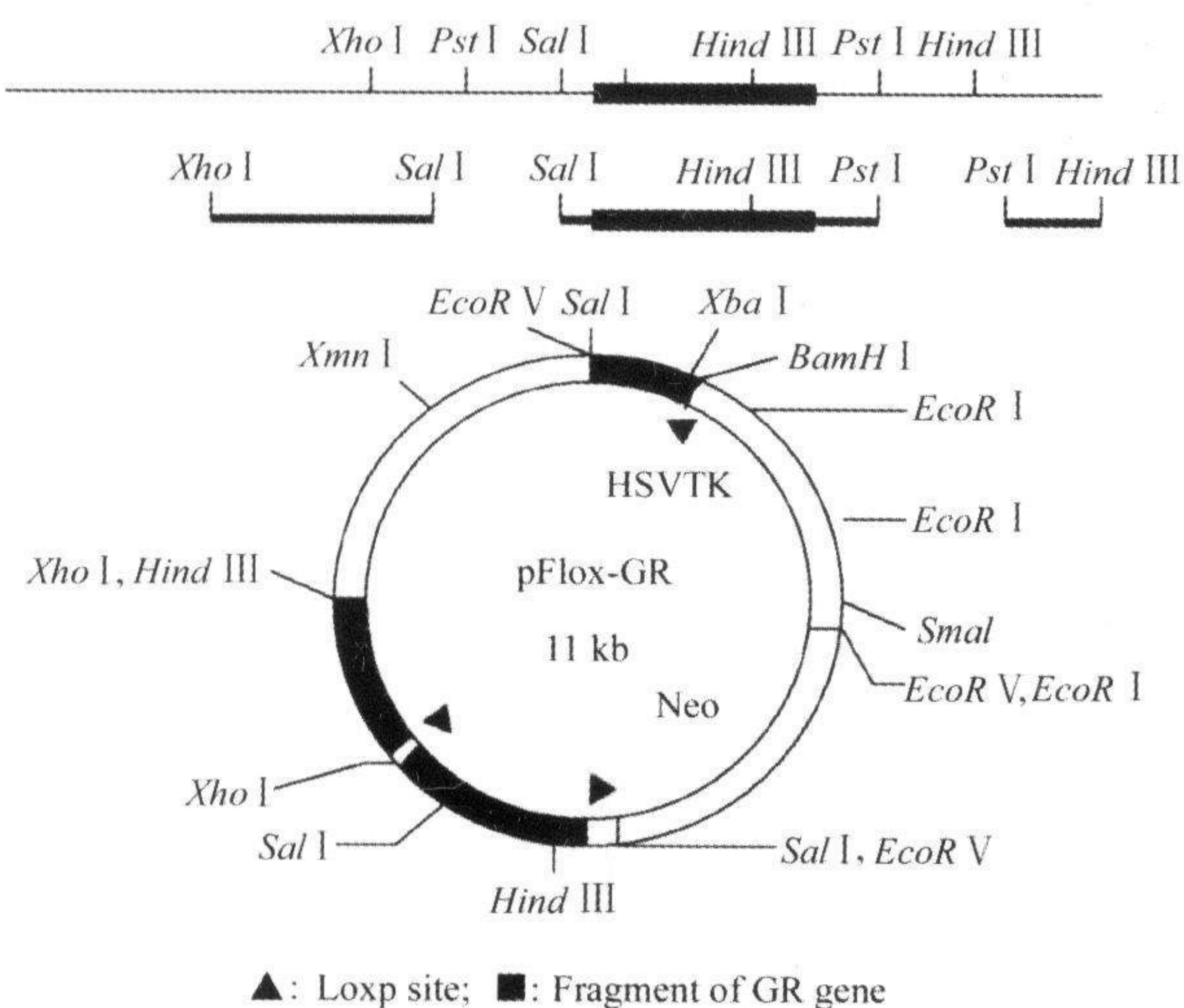


图 1 GR 条件基因打靶载体 pFlox-GR 的构建

Fig 1 Construction of inducible targeting vector pFlox-GR

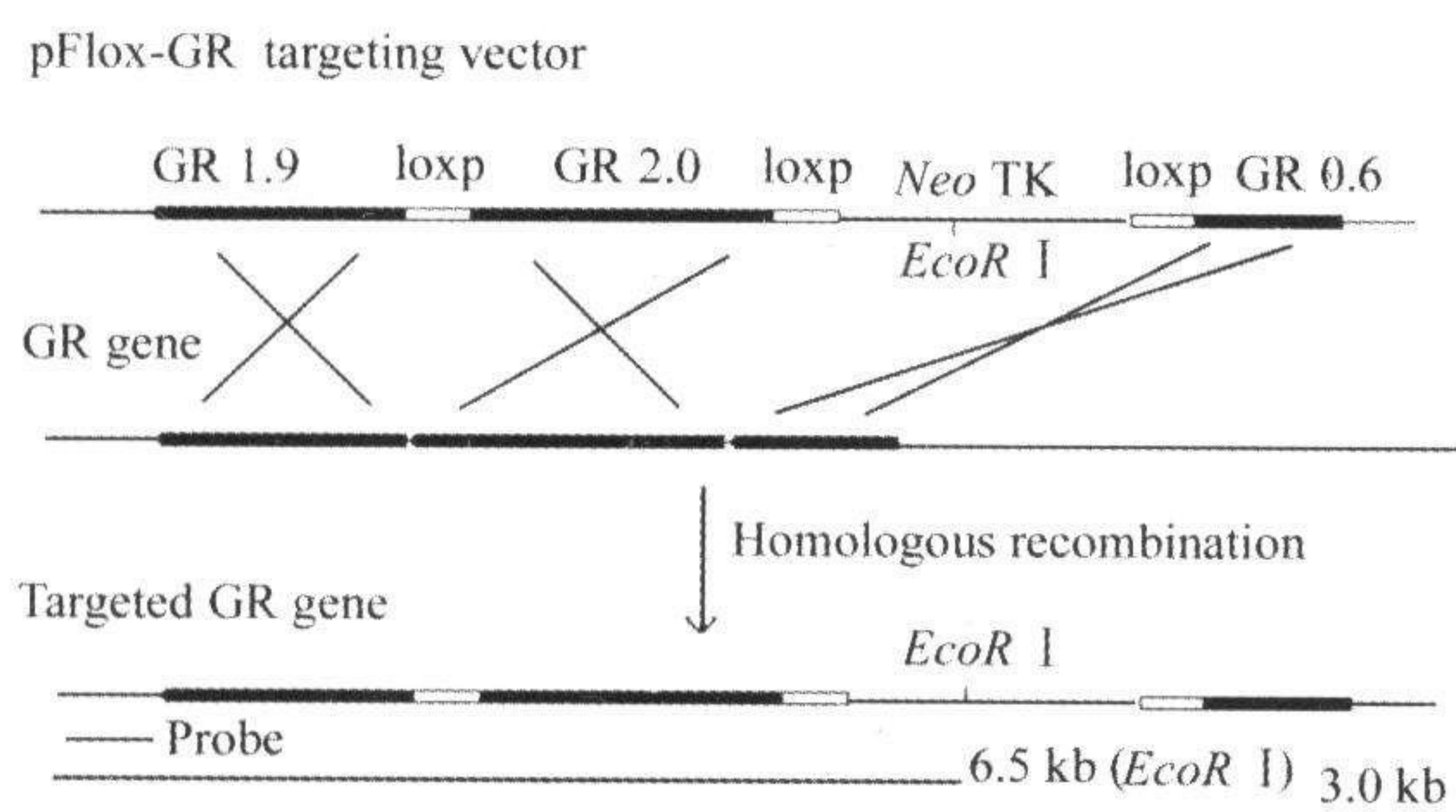


图 2 基因打靶过程及检测原理示意图

Fig 2 Process and detection of gene targeting

The overstriking lines indicate homologous arms of GR gene, and "probe" indicates the position of probe used for Southern blot

1.3 滋养层细胞的制备 用于 G418 筛选的滋养层细胞取自 *neo* 基因转基因小鼠,用于普通 ES 细胞

培养的滋养层细胞取自 C57BL/6J 小鼠。方法是取 12~13 d 的孕鼠,乙醇消毒后处死,取出胎鼠,剪去头和内脏后剪碎,胰酶消化成单细胞悬液,将细胞悬液平铺在培养瓶中,补足培养液,37 °C、5% CO₂ 的条件下培养。培养 2 代后 γ 射线(28 Gy)处理。

1.4 ES 细胞的培养、转染及筛选 培养瓶以 0.2% 明胶预处理 30 min 后,将滋养层细胞铺于明胶上,ES 以适当数量接种在饲养层上,加入含 1 000 U/ml LIF 的培养液,37 °C、5% CO₂ 的条件下培养。消化细胞,计数约 10⁷/ml,装入电极杯,230 V/13.5 ms 电转染。将细胞铺于饲养层上培养 72 h,加入 G418(400 μ g/ml)筛选,连续加药 7~10 d。经筛选后的细胞克隆以毛细管挑取,继续扩大培养。

1.5 中靶 ES 细胞的鉴定 为了排除挑取克隆中非同源重组的存在,对得到的抗性克隆以打靶载体 5' 端外测的特异性探针进行了基因组 DNA 的 Southern 印迹鉴定,探针采用放射性核素随机引物法标记。

1.6 中靶 ES 细胞的囊胚腔注射 取 3~4 周龄 C57BL/6J 雌鼠,经超排处理(PMSG/HCG)后与雄鼠交配,第 2 天检查有阴栓者记为 0.5 d,3 d 后孕鼠断颈处死,M₂ 溶液冲洗子宫得囊胚,将消化好的中靶 ES 细胞通过显微注射注入到囊胚腔中,CO₂ 孵箱孵化 3~4 h 使囊腔恢复后重新植入到 ICR 假孕小鼠子宫中进行培育。

1.7 中靶 ES 细胞和嵌合体小鼠的基因组 PCR 检测^[7] 以 *neo* 基因为模板设计引物,上游 5'-TTG TCA AGA CCG ACC TGT CCG GTG C-3';下游 5'-ATA GAA GGC GAT GCG CTG CGA ATC G-3'。反应条件为 94 °C 1 min,63 °C 30 s,72 °C 1 min,30 个循环。PCR 产物大小为 635 bp,以 1.2% 的琼脂糖电泳观察。

2 结果

2.1 GR 条件基因打靶载体 pFlox-GR 的构建 通过对 GR 基因的酶谱分析,以 pBluescript 为载体,分别亚克隆了 GR 基因第 2 外显子上游约 2.4 kb 片段,包含第 2 外显子 2.0 kb 片段,以及下游 0.6 kb 片段。分别以 2.4 kb 片段中的 1.9 kb 片段、2.0 kb 片段和 0.6 kb 片段为同源片段构建 GR 条件基因打靶载体 pFlox-GR(图 1)。酶切分析结果显示酶切条带与预计一致,表明 pFlox-GR 可进一步用于小鼠胚胎干细胞的转染。

2.2 中靶 ES 细胞的筛选和鉴定 以 G418 对转染细胞进行筛选,得到表达 *neo* 基因抗性的小鼠胚胎

干细胞克隆。扩增挑选的 ES 克隆,提取基因组 DNA 进行 Southern 印迹鉴定,基因组 DNA 进行 *EcoR* I 限制性内切酶消化后,用特定的探针对细胞基因组进行筛选,其中野生型 ES 细胞(GR^+/GR^+)只出现 9.5 kb 的杂交条带,发生同源重组的中靶 ES 细胞(GR^+/GR^-)由于外源切点的引入应出现 9.5 kb 和 6.5 kb 两条杂交条带,图 3 中 1~3 野生型 ES 细胞只出现 9.5 kb 的杂交条带,而 4~6 中靶 ES 细胞出现 9.5 kb 和 6.5 kb 两条杂交条带,与预期结果一致,这证实我们得到了按预期设计发生了正确同源重组的中靶 ES 细胞。

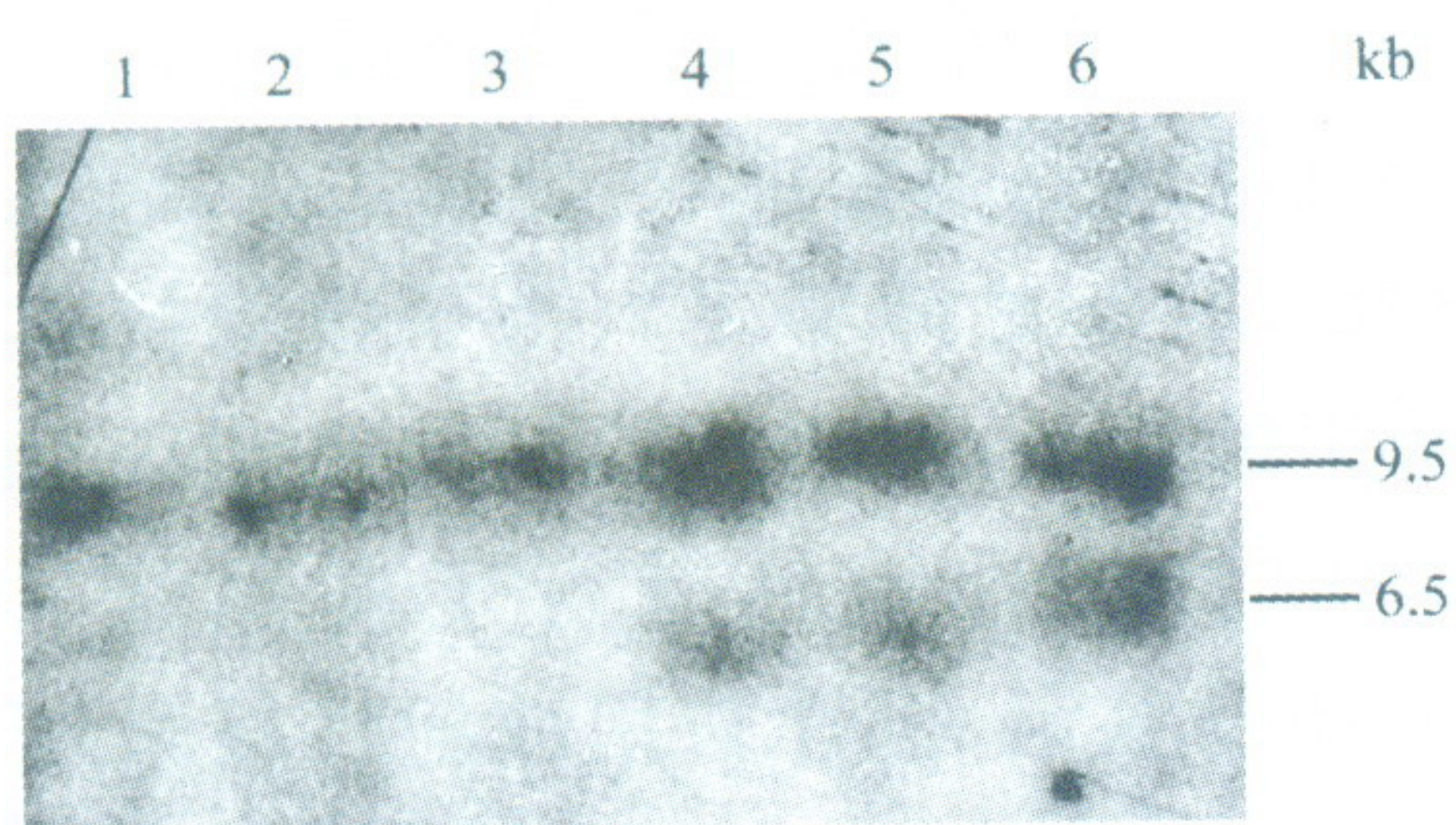


图 3 ES 细胞的 Southern 印迹杂交鉴定

Fig 3 Analysis of targeting ES cells by Southern blot
1-3: Wild type ES cells; 4-6: Targeted ES cells

2.3 中靶 ES 小鼠胚胎干细胞的囊胚腔注射 将获得的中靶 ES 细胞进行囊胚腔注射,共注射了 70 个 C57/BL 小鼠囊胚,分别回输到 6 只假孕小鼠中。产仔小鼠中出现褐色和黑色的两种毛色嵌合现象(图 4, A 中黑鼠为正常 C57/BL 小鼠),说明该小鼠由注射的胚胎干细胞和原 C57/BL 小鼠的胚胎细胞共同发育而来。共出生小鼠 21 只,其中嵌合体 11 只,平均嵌合率为 52.3%,其中 4 只小鼠的毛色嵌合率达 50%~70%,4 只 30%~50%嵌合体小鼠,另 3 只在 30%以下。

2.4 ES 细胞和嵌合鼠基因组的 *neo* 基因检测 pFlox-GR 基因打靶载体中含有 *neo* 基因,因此可分别以正常 129/svJ 小鼠的 ES 细胞、中靶 ES 细胞、嵌合体小鼠的黑色皮肤细胞和灰色皮肤细胞的基因组 DNA 为模板,扩增 *neo* 基因。在中靶 ES 细胞和嵌合体小鼠褐色皮肤基因组中扩增出了 635 bp 片段,而正常小鼠 ES 细胞和嵌合体小鼠黑色皮肤细胞中未见特异性片段(图 5),这进一步证实嵌合体小鼠是由注射的胚胎干细胞和原 C57/BL 小鼠的胚胎细胞共同发育而来。另外,将该片段通过 DNA 序列测定证实为 *neo* 基因序列。

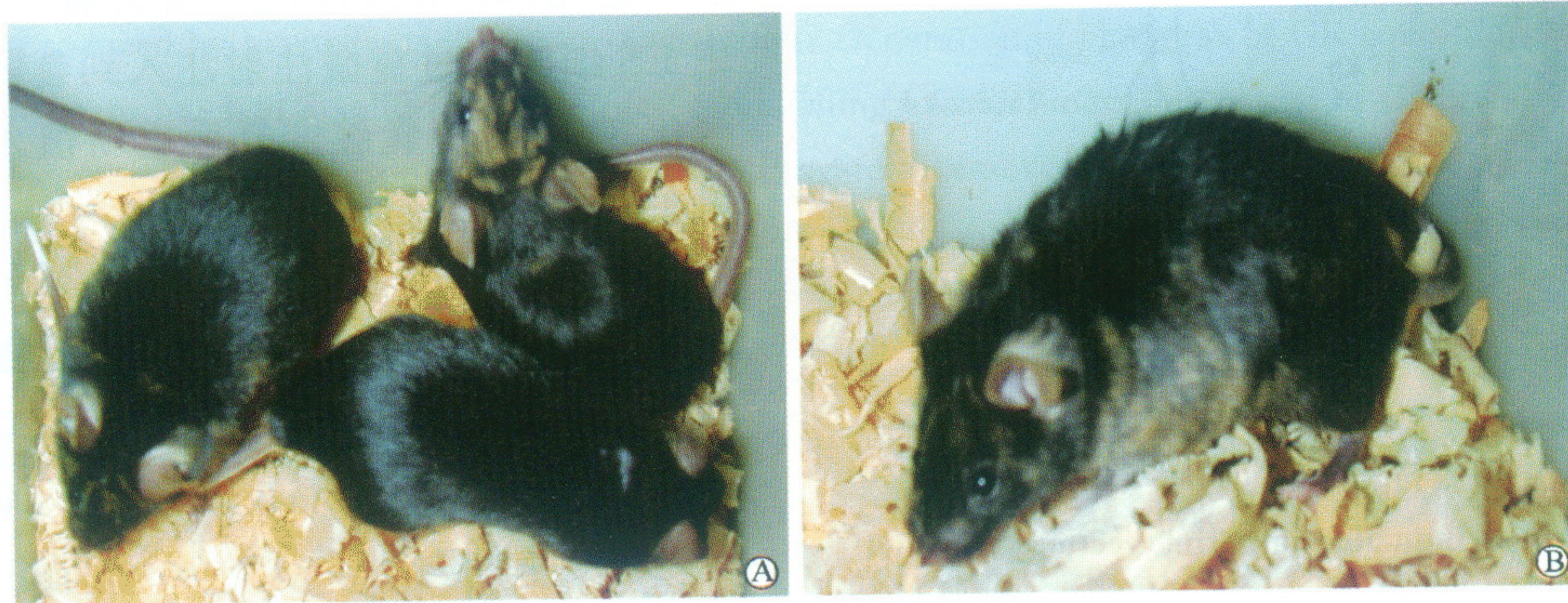


图 4 中靶 ES 细胞囊胚腔注射获得的嵌合鼠

Fig 4 Chimeric mice from blastocyst injection of gene targeting ES cells

A: Above elevation of chimeras(C57/BL mouse used as control); B: Side elevation of chimeras

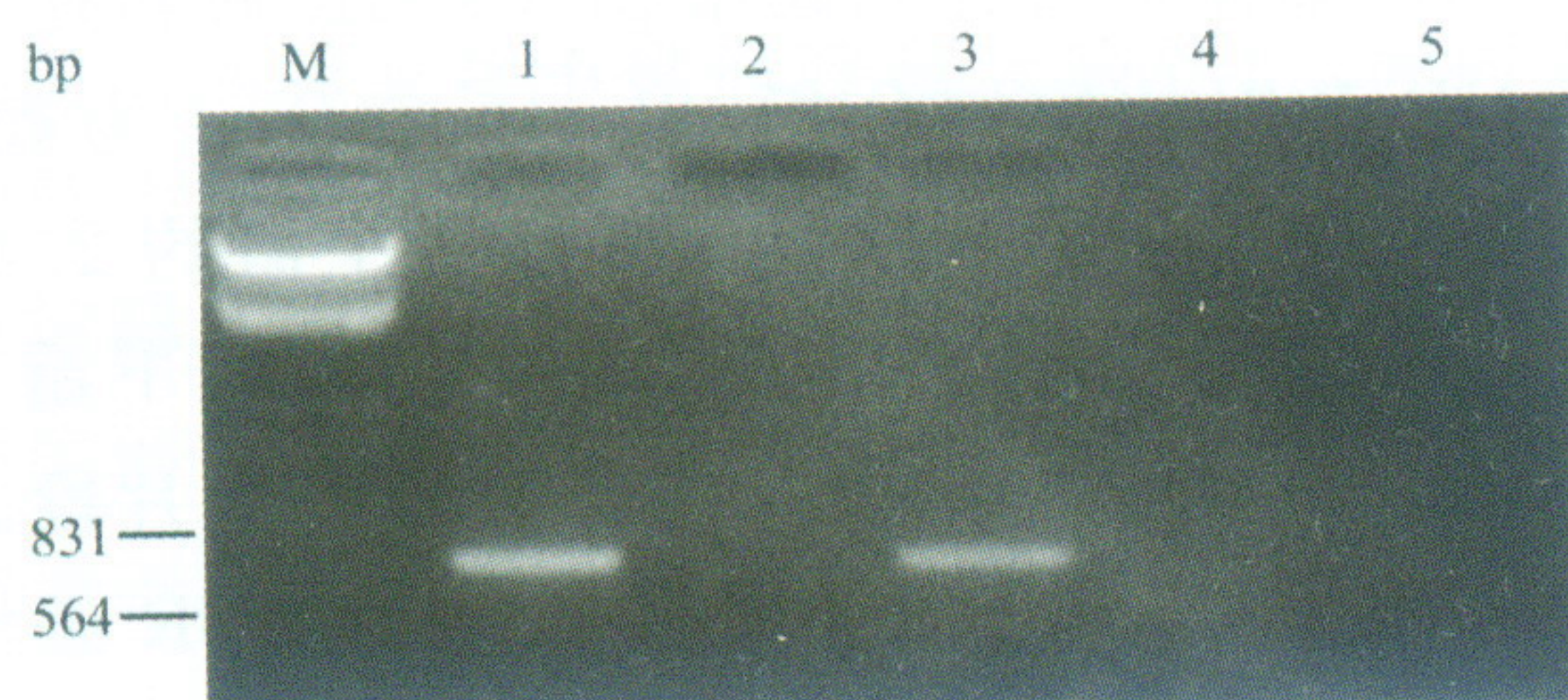


图 5 ES 细胞和嵌合鼠基因组的 *neo* 基因检测

Fig 5 PCR analysis of *neo* gene in ES cells and chimeric mice

M: Marker; 1: Targeting ES cells; 2: Wild type ES cells; 3: Agouti coat cells of chimeras; 4: Black coat cells of chimeras

3 讨论

糖皮质激素由肾上腺合成分泌,其作用涉及调节糖、蛋白质和脂类代谢、免疫反应以及各种神经系统的生理反应(如应激反应和行为等)^[1]。糖皮质激素的生理作用是通过细胞内糖皮质激素受体来介导的,其功能如同一个转录激活因子。由于没有满意的 GR 基因缺陷的动物模型,目前对于 GR 的研究多数停留在细胞和药物引导的动物模型上进行。因此,制作 GR 基因剔除小鼠模型,将为在体内直接

进行 GR 及糖皮质激素的研究,为阐明 GR 基因与休克及 MSOF 关系和验证徐仁宝课题组提出的“休克和 MSOF 发生的 GR 减少假说”提供最直接的平台^[8]。已有的证据也表明,GR 基因剔除小鼠对于严重创伤、休克等所致的全身炎症综合征(SIRS)的基础和临床研究十分必要。近几年,研究者们分别用不同的方法将小鼠 GR 基因的第 2、3 和 4 外显子破坏,但前者由于致死效应未能获得小鼠模型,而后者虽然获得了模型但却没有满意的表型^[2,9~11]。本室前期的工作也证实,GR 基因第 2 外显子组成型缺陷的小鼠因肺发育问题无法获得成体动物(未发表资料)。因此已出现的组成型 GR 基因剔除小鼠缺乏实用性,如何获得满意的 GR 基因缺陷型小鼠模型以供研究使用仍是目前迫切需要解决的问题。为了克服 GR 基因组成型缺陷致死的缺点,本课题旨在采用 Cre/loxP 系统,建立诱导型 GR 基因缺陷小鼠模型,其步骤大致是:利用同源重组原理在小鼠 ES 细胞中将 Cre 重组酶的识别序列(即 loxP 位点)插入 GR 基因第 2 外显子的两侧,经囊胚注射获得种系嵌合体,然后与表达 Cre 重组酶的转基因小鼠杂交,由于 Cre 重组酶的表达受可被诱导性的启动子调控(本室建立的 Cre 转基因小鼠由于干扰素诱导表达^[12,13]),其表达后 loxP 位点即发生重组,剔除 2 个 loxP 位点之间的序列,从而避免了因该胚胎发育相关基因的剔除导致小鼠死于肺发育不良引发呼吸衰竭而无法获得成体动物的缺点。

本次实验经囊胚注射获得 11 只嵌合体,目前对嵌合体小鼠的测交实验正在进行中,以判定种系嵌合鼠的获得。种系嵌合鼠的获得是实现 ES 细胞途径的决定步骤,因为在 ES 细胞中进行的基因改造必须通过嵌合体的生殖细胞才能传递给后代。基因打靶小鼠的建立是一项艰巨的系统工程,其中涉及打靶载体的构建、ES 细胞的培养及筛选、嵌合体的制备以及胚胎移植等一系列需前后衔接的工作,尤其是如何维持 ES 细胞的未分化状态及种系嵌合能力更是该工程的重中之重。1999 年尚克刚等在国内首次报道了小鼠 ES 细胞种系嵌合体的研究^[14],但有较好表型的带遗传修饰 ES 细胞种系嵌合体或者说基因剔除小鼠研究国内一直未获突破。通过近十年的努力,本室在 ES 细胞培养及种系嵌合体的获得方面建立了很好的基础^[15]。本研究希望在这方面有所超越,通过 GR 条件基因打靶小鼠种系嵌合鼠的最终获得,并筛选出具有良好表型的品系,从

而得到理想的诱导型 GR 基因剔除小鼠模型。

[参考文献]

- [1] Karin M. New twists in gene regulation by glucocorticoid receptor: is DNA binding dispensable[J]? *Cell*, 1998, 93 (4): 487-490.
- [2] Cole TJ, Blendy JA, Monaghan AP, et al. Targeted disruption of the glucocorticoid receptor gene blocks adrenergic chromaffin cell development and severely retards lung maturation [J]. *Genes Dev*, 1995, 9 (13): 1608-1621.
- [3] Strahle U, Schmidt A, Kelsey G, et al. At least three promoters direct expression of the mouse glucocorticoid receptor gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89 (15): 6731-6735.
- [4] Danielsen M, Northrop JP, Ringold GM. The mouse glucocorticoid receptor: mapping of functional domains by cloning, sequencing and expression of wild type and mutant receptor proteins[J]. *EMBO J*, 1986, 5 (10): 2513-2522.
- [5] 姚玉成,胡以平. 糖皮质激素受体基因片段的克隆和目标载体的构建[J]. 第二军医大学学报, 1999, 20(10): 726-728.
- [6] 姚玉成,胡以平. GR 基因片段的克隆和可诱导的目标载体的构建[J]. 癌变·畸变·突变, 1999, 11(3): 113-116.
- [7] 姚玉成,熊俊,王新民,等. 通过胚胎干细胞途径获得的嵌合体小鼠中 neo 基因在各组织中的分布[J]. 遗传学报, 2001, 28 (12): 1116-1119.
- [8] 徐仁宝. 糖皮质激素受体减少在休克发生中的作用——一个新假说[J]. 生命科学, 1999, 9(2): 78-80.
- [9] Reichardt HM, Kaestner KH, Tuckermann J, et al. DNA binding of the glucocorticoid receptor is not essential for survival [J]. *Cell*, 1998, 93 (4): 531-541.
- [10] Finotto S, Krieglstein K, Schober A, et al. Analysis of mice carrying targeted mutations of the glucocorticoid receptor gene argues against an essential role of glucocorticoid signalling for generating adrenal chromaffin cells[J]. *Development*, 1999, 126(13): 2935-2944.
- [11] Tronche F, Kellendonk C, Reichardt HM, et al. Genetic dissection of glucocorticoid receptor function in mice[J]. *Curr Opin Genet*, 1998, 8(5): 532-538.
- [12] 姚玉成,瞿晓渊,李建秀,等. Mx-Cre 转基因小鼠的建立及其培育[J]. 遗传学报, 2001, 28(4): 313-316.
- [13] 瞿晓渊,姚玉良,熊俊,等. 干扰素诱导 Mx-Cre 转基因小鼠表达的重组酶活性的体外检测[J]. 遗传学报, 2001, 28(9): 822-826.
- [14] 陈伟胜,韩嵘,尚克刚. 小鼠 ES 细胞种系嵌合体的获得[J]. 遗传学报, 1999, 26(2): 126-134.
- [15] 何志颖,王新民,李建秀,等. 条件培养液改进小鼠 ES 细胞嵌合体制备效率的观察[J]. 第二军医大学学报, 2005, 26(3): 294-297.

[收稿日期] 2004-10-20

[修回日期] 2005-01-27

[本文编辑] 曹静