

DOI:10.3724/SP.J.1008.2012.00010

## 瞬时性受体电位通道香草酸受体亚型6基因敲除小鼠模型的建立

叶添文<sup>1\*</sup>, 郑晋华<sup>2</sup>, 安 静<sup>3</sup>, 郭清河<sup>1</sup>, 陈方经<sup>1</sup>, 陈爱民<sup>1</sup>

1. 第二军医大学长征医院骨科, 上海 200003

2. 上海南方模式生物研究中心, 上海 201203

3. 上海大学环化学院环境污染与健康研究所, 上海 200444

**[摘要]** **目的** 建立瞬时性受体电位通道香草酸受体亚型6(Trpv6)基因敲除小鼠模型,为在体研究 Trpv6 的生物学功能及其与骨代谢关系奠定基础。**方法** 从Ensembl数据库中获得小鼠 Trpv6 基因组序列。设计基因敲除策略,构建基因敲除载体pBR322-MK-Trpv6。以电穿孔方法将基因敲除载体导入胚胎多能干细胞(ES细胞),用G418和Ganciclovoir进行正负筛选,获得双抗性克隆。PCR鉴定出正确同源重组的ES细胞克隆。将正确同源重组的ES细胞注射到C57BL/6J小鼠的囊胚中,获得嵌合体小鼠。挑选嵌合率在50%的雄鼠与C57BL/6J小鼠交配,获得的灰鼠经PCR鉴定为杂合子小鼠。杂合子小鼠交配后获得纯合子小鼠。**结果** 成功构建了打靶载体pBR322-MK-Trpv6。电穿孔后,共获得24个正确同源重组的克隆,同源重组效率为25%。同源重组的克隆经显微注射后,共获得4只嵌合率大于50%的雄鼠。嵌合鼠与C57BL/6J小鼠交配,获得57只来源于ES细胞的灰鼠,PCR鉴定证实其中17只为杂合子小鼠,阳性率为29.8%。杂合子小鼠交配获得纯合子小鼠。经蛋白质印迹分析证实纯合子小鼠无Trpv6蛋白的表达。**结论** 成功建立了Trpv6基因敲除小鼠模型,其中纯合子小鼠未出现胚胎致死现象。

**[关键词]** Trpv6基因;基因敲除小鼠;骨重建**[中图分类号]** R 349.83**[文献标志码]** A**[文章编号]** 0258-879X(2012)01-0010-06

### Generation of transient receptor potential vanilloid 6 gene knockout mouse model

YE Tian-wen<sup>1\*</sup>, ZHENG Jin-hua<sup>2</sup>, AN Jing<sup>3</sup>, GUO Qing-he<sup>1</sup>, CHEN Fang-jing<sup>1</sup>, CHEN Ai-min<sup>1</sup>

1. Department of Orthopaedics, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China

2. Shanghai Research Center for Biomodel Organisms, Shanghai 201203, China

3. Research Institute of Environmental Pollution and Health, School of Environment and Chemical Engineering, Shanghai University, Shanghai 200444, China

**[Abstract]** **Objective** To create transient receptor potential vanilloid 6 (Trpv6) gene knockout mouse model, so as to pave a way for further research of its biological function and its role in bone metabolism *in vivo*. **Methods** Mouse genomic DNA sequence of Trpv6 gene was obtained from Ensembl database. Trpv6 gene knockout vector (pBR322-MK-Trpv6) was constructed. Trpv6 knockout vector was transferred into the embryonic stem (ES) cells by electroporation and screening of both G418 and Ganciclovoir resistant clones were performed routinely. The homologously recombined ES cell clones were identified by PCR. The correct homologously recombined ES cells were microinjected into C57BL/6J mouse blastocysts to obtain chimera mouse. Male mice with a chimera rate of 50% were mated with C57BL/6J female mice; the offsprings with gray fur were obtained, which were identified as heterozygote mice by PCR. Heterozygote mice were intercrossed to generate homozygote mice. **Results** Targeting vector pBR322-MK-Trpv6 were successfully constructed. A total of 24 correct homologously recombined clones were gained after electroporation. The efficiency of homologous recombination was 25%. Four male mice with a chimera rate of more than 50% were acquired after homologously recombined clones through microinjection. After the chimera mice were mated with C57BL/6J mice, 57 grey-fur mice originated from ES cell were gained, including 17 (29.8%) with heterozygous genotype. Heterozygote mice were intercrossed to generate homozygote mice. Western blotting analysis

**[收稿日期]** 2011-05-04**[接受日期]** 2011-09-13**[基金项目]** 国家自然科学基金(30801172),上海市科委基金(10411963500),上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金。Supported by National Natural Science Foundation of China (30801172), Fund from Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (10411963500), and Special Fund for Cultivation of Outstanding Young Teachers in Shanghai Universities.**[作者简介]** 叶添文,副教授,副主任医师。E-mail: yetianwen@yahoo.com.cn

\* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-81885638, E-mail: yetianwen@yahoo.com.cn

showed no Trpv6 protein expression in homozygote mice. **Conclusion** We have successfully established Trpv6 gene knockout mouse model, and there is no embryonic lethality in homologous mutant mice.

[**Key words**] trpv6 gene; gene knockout mice; bone remodeling

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2012, 33(1):10-15]

TRPV (transient receptor potential vanilloid) 蛋白家族是一类新型钙离子转运通道蛋白, 共有 6 个成员。其中, Trpv6 是 TRP 超家族中的高选择性钙离子通道之一, 表达于具有钙离子跨细胞转运功能的器官, 包括肾脏、十二指肠、骨组织及前列腺等<sup>[1]</sup>。雌激素、维生素 D、钙离子等通过影响 Trpv6 通道的表达, 调节钙离子的代谢<sup>[2]</sup>。因此, 通道蛋白 Trpv6 是机体调节钙离子平衡的重要途径之一。

钙离子的平衡失调在骨质疏松的发病中具有重要作用。钙离子的代谢是由钙离子通道介导的钙离子跨细胞膜转运来完成。Trpv6 通道开放或表达增加意味着钙离子内流加快, 胞内钙离子水平增加。现已知胞内钙离子水平与细胞分化、增殖和功能密切相关。Trpv6 基因敲除后, 小鼠可出现骨质疏松, 且 Trpv6 在成骨细胞上有丰富的表达<sup>[3]</sup>。因此, 我们推测 Trpv6 可能在成骨细胞的骨形成中具有重要作用。如果 Trpv6 的表达与成骨细胞的增殖和功能有关, 那么 Trpv6 的缺陷或异常表达可能会导致骨代谢平衡的失调。本实验通过建立 Trpv6 基因敲除小鼠模型, 为在体研究 Trpv6 基因的生物学功能及其与骨代谢的关系奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 BAC (bacterial artificial chromosome) 含 Trpv6 的 BAC 购自 BACPAC Resources Center, Childene's Hospital Oakland Research Institute。

1.1.2 质粒与菌株 质粒 pL452、菌株 EL350 由 LIU Peng-tao 教授 (英国剑桥大学 Wellcome Trust Sanger Institute) 惠赠。pSC101-BAD- $\gamma\beta\alpha$ -A-tet 由张友明教授 (德国 Gene Bridges GmbH) 惠赠。DH5 $\alpha$  为博大泰克生物技术有限公司产品。pBR322-MK 为上海南方模式生物研究中心实验室改建。

1.1.3 试剂 各种限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、T<sub>4</sub> DNA 聚合酶、Taq 酶及 PCR 相关试剂购自 TaKaRa 公司。L-阿拉伯糖、盐酸、四环素等常规化学试剂主要购自 Sigma 公司和上海化学试剂公司。胶回收试剂盒购自上海华舜生物技术有限公司, BAC 抽提试剂盒购自 Qiagen 公司, 抗 Trpv6 兔源

多克隆抗体和抗  $\beta$ -actin 兔源单克隆抗体分别购自美国 Santa Cruz 公司和 Sigma-Aldrich 公司。辣根过氧化物酶标记羊抗兔二抗购自上海迪奥生物科技有限公司。

1.1.4 细胞培养相关试剂 SCR012 ES 细胞来源于 129S<sub>6</sub>/SvEv 品系小鼠, 购自 Chemicon 公司, 由上海南方模式生物研究中心保存。ES 细胞培养所需的 DMEM 培养液 (高糖, ES 细胞级)、胎牛血清 (ES 细胞级)、G418、Ganciclovoir、白血病抑制因子 (LIF)、青链霉素、胰蛋白酶等分别购自 Gibco BRL、Sigma、Chemicon 公司。

1.1.5 引物设计 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。用来构建打靶载体的引物为 Trpv6 A1: CCC AAG CTT ATT TTA CTG AAT TCT GGA GTT TG; Trpv6 A2: CGG GGT ACC CTA GTA GGC CCA GGA AAG ACC; Trpv6 B1: CGG GGT ACC GTG GTG CCC ATG TCC TTT GCT C; Trpv6 B2: CGC GGA TCC AGC AGT TAC CCA CCT GAC ACC; Trpv6 C: CTG GTG CAG GAA CCT TAC CAT TCA TTG TTG TTG AGG TCA CAC CTC TGA GTG AAG TCT TTA TAA TGG TCG ACG AAT TCC GAA GTT CCT ATT; Trpv6 D: AGC ATT AGA GAG GGG GAA AGA ACA TAT AAT GTC TTT GGG GCA GTC AAT GGA GAA AAA AAC AGA CTC TCT AGA ACT AGT GGA TCC。

用来鉴定 ES 细胞基因型的引物为 P1: GTA ATC TGG GAC ATG CTG CCT G; P2: GGC CTA CCC GCT TCC ATT GCT C; P3: CCG TGC CTT CCT TGA CCC TGG; P4: CCA ACG ATG CTC ACG AGT TCC。

用来鉴定小鼠基因型的引物为 P5: CCA TGT GCC CAG ACA TTT TA; P6: CAG AGC CTG GAC ATC GTT TT; P7: GGG GAA CTT CCT GAC TAG GG。

### 1.2 方法

1.2.1 打靶载体的构建 从 Ensembl 数据库中 (<http://www.ensembl.org/index.html>) 获得 Trpv6 基因组序列, 根据基因组序列设计打靶载体。运

用生物信息学手段,敲除了小鼠 *Trpv6* 基因第 2 外显子并用 *neo* 基因替换,造成移码突变,使其蛋白翻译提前终止在第 3 外显子。运用 ET 克隆的方法构建 *Trpv6* 基因第 2 外显子敲除载体。过程如下:以 BAC 为模板,用引物 *Trpv6* A1 和 *Trpv6* A2 扩增 A 臂(398 bp),*Trpv6* B1 和 *Trpv6* B2 扩增 B 臂(401 bp),将 A 臂和 B 臂克隆至 pBR322-MK 质粒的 *Hind* III 和 *Bam* H I 位点,将 C 臂克隆至 pL452 的 *Kpn* I、*Eco* R I 位点,将 D 臂克隆至 pL452 的 *Bam* H I、*Not* I 位点,然后经过套取和 *neo* 基因敲入,成功构建打靶载体 pBR322-MK-*Trpv6*,并用限制性内切酶及测序进行鉴定。

1.2.2 ES 细胞培养 按常规方法培养,培养皿以 0.1% Gelatin 包被后接种丝裂霉素 C 处理的滋养层细胞(每个 10 cm 培养皿接种  $2 \times 10^6$  个滋养层细胞),过夜培养后即可接种 ES 细胞。ES 细胞完全培养液 DMEM 中含  $10^{-6}$  mol/L  $\beta$ -巯基乙醇、200 mmol/L 谷胺酰胺、非必需氨基酸、100 U/ml 青霉素、50 mg/L 链霉素、15% ES 胎牛血清、1 000 U/ml LIF。

1.2.3 ES 细胞电穿孔 DNA 转染 处于对数生长期的 ES 细胞加 0.125% 胰蛋白酶-EDTA 消化并计数,加适量的 PBS 使细胞密度达到约  $1.5 \times 10^7$  /ml。取 0.8 ml 上述 ES 细胞悬液,加入约 35  $\mu$ g 经 *Not* I 线性化的 pBR322-MK-*Trpv6* 质粒 DNA,混匀后转移至无菌电穿孔杯中以 240 V、500  $\mu$ F 的电参数进行电穿孔,重新悬浮后平均分配到 3 个已铺好滋养层细胞的 10 cm 培养皿中培养。

1.2.4 正负药物筛选 ES 细胞在电穿孔 24 h 后换含有选择药物 G418(终浓度为 300 mg/L)和 Ganciclovir(终浓度为 2  $\mu$ mol/L)的培养液进行选择培养,每天更换培养液,经 7~8 d 选择性培养,抗性 ES 细胞长成肉眼可见的克隆时即可进行挑取。

1.2.5 双抗性细胞克隆的挑取及培养 挑取抗性克隆放入含有 20  $\mu$ l 0.1% 胰蛋白酶-EDTA 的 96 孔板(凹底)中消化约 3 min,轻轻吹打,使细胞分散,转移至 96 孔培养板中培养,待细胞长满至 60%~80% 后取大部分细胞冻存,剩余细胞继续培养至全部长满后用于提取基因组 DNA。

1.2.6 ES 细胞基因组 DNA 的提取 在长满 ES 细胞的 96 孔板中吸去培养液,每孔加入 80  $\mu$ l 裂解液(含 1 g/L 蛋白酶 K),56 $^{\circ}$ C 过夜消化后加入无水乙醇常规提取 DNA,溶于 100  $\mu$ l 的 TE 液中。

1.2.7 同源重组克隆的 PCR 鉴定 在 *Trpv6* 同源重组臂外侧分别设计 P1 和 P4 引物,在 *neo* 序列上设计 P2 和 P3 引物。用 P1 与 P2 引物配对,鉴定 5' 臂同源重组,反应条件:95 $^{\circ}$ C 4 min 变性后,94 $^{\circ}$ C 45 s,61.2 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 180 s,进行 34 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,同源重组克隆应扩增出 3.0 kb 片段;用 P3 和 P4 引物配对鉴定 3' 臂同源重组,反应条件:95 $^{\circ}$ C 4 min 变性后,94 $^{\circ}$ C 45 s,63.6 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 210 s,进行 34 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,同源重组克隆应扩增出 3.5 kb 片段。

1.2.8 ES 细胞的囊胚注射及胚胎移植 注射时采用无 LIF 的 DMEM 完全培养液,每枚囊胚中注射约 15 个 ES 细胞,注射后囊胚培养于无 LIF 的 DMEM 完全培养液中,37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 1 h 左右,将注射后的胚胎移植到 2.5 d 的假孕母鼠子宫中,每侧移植 8~10 枚。假孕母鼠饲养于上海南方模式生物研究中心 SPF 级动物房,自然分娩,产下的后代即为嵌合体小鼠。

1.2.9 嵌合体小鼠育种及 PCR 鉴定基因型 挑选毛色嵌合率大于 50% 的雄性鼠与 C57BL/6J 纯系小鼠(上海南方模式生物研究中心自繁)交配即获得 ES 细胞来源的灰鼠。同 ES 细胞鉴定方法,用 PCR 方法鉴定阳性杂合子小鼠。

1.2.10 杂合子小鼠繁育及基因型鉴定 在小鼠 *Trpv6* 基因组 5' 臂上设计引物 P5,被敲除的区域设计引物 P6,*neo* 基因上设计引物 P7,P5 与 P6 引物配对,可在野生型小鼠基因组中扩增出 599 bp 的片段;P5 和 P7 引物配对,可在突变的小鼠基因组中扩增出 788 bp 的片段,因此 P5、P6、P7 在同一体系内进行 PCR 反应时,野生型小鼠仅能扩增出 599 bp 的条带,纯合子小鼠仅能扩增出 788 bp 的条带,而杂合子小鼠能同时扩增出这 2 个条带。用 TaKaRa 公司的 10 $\times$ LA *Taq* 上样缓冲液配 PCR 反应液体,扩增条件:95 $^{\circ}$ C 5 min 变性后,95 $^{\circ}$ C 30 s,62 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 3 min,进行 30 个循环后,72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.11 蛋白质印迹分析检测 *Trpv6* 蛋白的表达 收集野生型小鼠和基因敲除小鼠骨髓细胞,用细胞蛋白裂解液提取总蛋白,经 1% SDS-PAGE 后,半干转移法转至硝酸纤维素膜,以 5% 脱脂奶粉/TBST 封闭后,加入 *Trpv6*、 $\beta$ -actin 一抗(1:1 000),以及相应的辣根过氧化物酶标记二抗(1:2 000),ECL 显色。

1.3 统计学处理 应用 SPSS 11.5 软件进行统计

学处理, 采用均数方差分析, 小鼠体质量以  $\bar{x} \pm s$  表示。检验水平( $\alpha$ )为 0.05。

## 2 结果

2.1 质粒构建及打靶策略 构建完成的打靶质粒用限制性内切酶及测序鉴定同源臂插入及方向, 打靶质粒图谱见图 1。用 *Not* I 线性化后用于 ES 细胞打靶, 打靶策略见图 2。

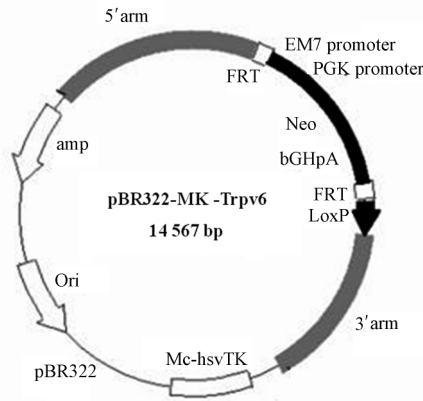


图 1 Trpv6 基因打靶质粒  
Fig 1 Trpv6 gene targeting vector

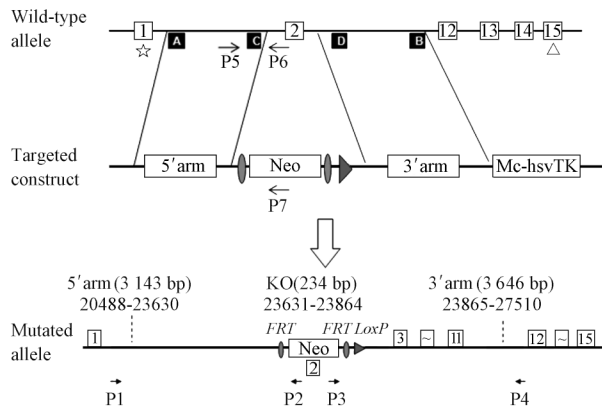


图 2 Trpv6 基因打靶策略  
Fig 2 Trpv6 gene targeting strategy

■ denotes A, B, C and D homologous short arms; the span of A and C arms is 5' homologously recombined arm with a length of 3 143 bp; the span of D and B arms is 3' homologously recombined arm with a length of 3 646 bp; the 2<sup>nd</sup> exon is deleted. □: Exon; ☆: ATG; △: TGA

2.2 同源重组 ES 细胞克隆鉴定 打靶共获得抗性克隆 96 个, 经 PCR 检测共获得 24 个正确同源重组的克隆, 同源重组效率为 25%。挑选状态好的克隆进行复检, 经 PCR 及序列分析证实, 其中 F1、F2 和 H3 为正确同源重组克隆。PCR 鉴定结果见图 3。

2.3 嵌合体及杂合子小鼠育种 通过 ES 细胞的囊胚注射和胚胎移植, F1、F2 克隆分别获得毛色嵌合率大于 50% 成年的雄性小鼠 2 只。4 只雄性嵌合体小鼠与 C57BL/6J 纯系小鼠交配, 来自 F2 克隆的 2 只雄鼠不育, 来自 F1 克隆的 2 只雄鼠共获得 ES 细胞来源的灰鼠 57 只。经 PCR 鉴定, 其中 17 只为阳性杂合的子小鼠, 基本符合孟德尔遗传定律。

杂合子小鼠间交配繁育获得野生型、杂合子、纯合子 3 种基因型小鼠。经繁育共出生 89 只 F2 代小鼠, 其中野生型 19 只、杂合子 52 只、纯合子 18 只, 基本符合孟德尔遗传定律。Trpv6 基因敲除没有导致纯合子小鼠的胚胎致死。小鼠基因型 PCR 鉴定结果见图 4。

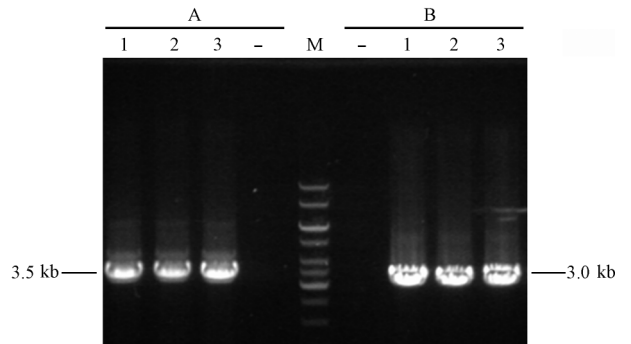


图 3 PCR 鉴定打靶后的 ES 细胞克隆

Fig 3 Identification of targeted ES cell clones by PCR

A: Homologous recombined event at 3' terminal end and a 3.5 kb fragment found by PCR; B: Homologous recombined event at 5' terminal end and a 3.0 kb fragment found by PCR. M: Fermentas 1 kb DNA ladder; -: Negative control; 1: ES cell clone F1; 2: ES cell clone F2; 3: ES cell clone H3

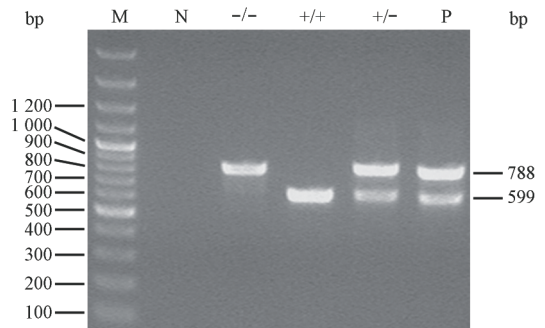


图 4 Trpv6 基因敲除小鼠的基因型鉴定

Fig 4 PCR for genotyping of Trpv6 gene knockout mouse

599 bp fragment could be amplified in wildtype mice, 788 bp fragment in homozygous mice, and 599 bp and 788 bp fragments in heterozygous mice. M: MBI GeneRuler™ 100 bp plus DNA ladder; N: Negative control; P: Positive control(genome DNA in ES cell); +/-: Heterozygous mice; -/-: Homozygous mice; +/+ : Wildtype mice

2.4 小鼠 Trpv6 蛋白的表达 分别从 2 只野生型

小鼠和 2 只 Trpv6 基因敲除小鼠骨髓细胞中抽提总蛋白,用蛋白质印迹法检测 Trpv6 蛋白的表达。结果表明 Trpv6 基因敲除的纯合子小鼠骨髓细胞中无 Trpv6 蛋白的表达(图 5)。

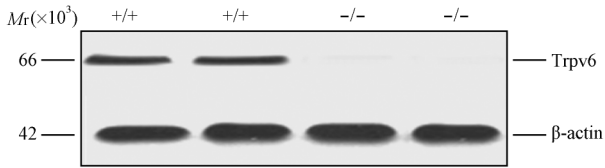


图 5 蛋白质印迹分析 Trpv6 蛋白的表达

Fig 5 Western blotting analysis of Trpv6 protein expression

Western blotting analysis of Trpv6 protein expression is done in bone marrow cells. The 66 000 kb protein straps of Trpv6 could be detected in wildtype mice, but not in homozygous mice. -/-: Homozygous mice; +/+ : Wildtype mice

2.5 Trpv6 基因敲除小鼠的表型观察 Trpv6 基因敲除的嵌合体、杂合子小鼠均能正常交配繁殖,但 Trpv6 基因敲除小鼠存在生育功能缺陷,不能正常交配繁殖。在常规含 1% 钙饲料的喂养下,在出生后各时间段,Trpv6 基因敲除小鼠的体质量明显较野生型小鼠轻,并随着时间延长,体质量差异更明显,结果见图 6。12 周龄的小鼠中,7% 的杂合子小鼠和 30% 的 Trpv6 基因敲除小鼠存在头面部、颈部脱毛和皮炎现象,结果见图 7。

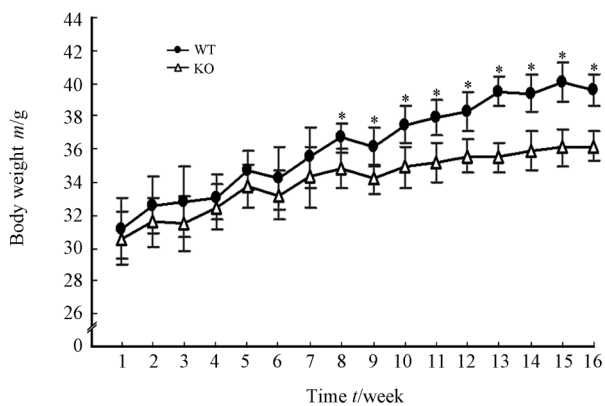


图 6 常规饲料(1%钙)喂养时,成年野生型和 Trpv6 基因敲除小鼠体质量变化

Fig 6 Body weight in adult WT or Trpv6 gene knockout mice fed with regular (1% Ca<sup>2+</sup>) diet

WT: Wildtype; KO: Gene knockout type. \* P<0.05 vs KO group; n=20,  $\bar{x} \pm s$

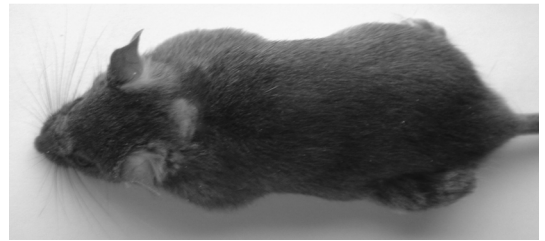


图 7 成年(12 周龄) Trpv6 基因敲除小鼠出现鼻部和颈部脱毛和皮炎

Fig 7 Adult(12 weeks old) Trpv6 gene knockout mouse with persistent alopecia and dermatitis on the nose and neck

### 3 讨论

小鼠的 Trpv6 基因位于第 6 号染色体,其编码的 mRNA 大小为 2 926 nt,编码区大小为 2 181 nt。基因有 2 个转录本,但外显子位置相近。只是 Trpv6-201 转录本的第 11 外显子在 Trpv6-202 转录本中被分成了 3 个外显子(第 12、13 和 14 外显子),导致 Trpv6-202 转录本有 17 个外显子而 Trpv6-201 转录本只有 15 个外显子。通过敲除第 2 个外显子,造成该基因的移码突变,蛋白质翻译在第 3 外显子上提前终止。

在小鼠基因库中,Trpv6 基因与 EphB6 基因尾尾相连。Bianco 等<sup>[4]</sup>用同源重组基因敲除法建立 Trpv6 基因敲除小鼠模型。敲除区域为 Trpv6 的第 9~15 外显子,去除了 Trpv6 基因的穿膜结构域 2 后面的所有序列,并且同时敲除了 EphB6 基因的最后 4 个外显子,即同时使 TRPV6 蛋白和 EphB6 蛋白功能受损。该方法存在的问题:(1)可能导致表型分析时不能确定是哪个基因受损引发的问题;(2) Trpv6 基因的第 1~8 外显子可能编码一段 374 氨基酸残基的截短型蛋白,这个截短型蛋白是否有功能或者对细胞或组织产生其他的影响是未知的。这两个问题都会导致在后续研究表型并分析基因功能时产生不同的见解,不能完全阐明 Trpv6 基因的功能。

本研究采用的方法是敲除了第 2 外显子 98 bp,导致后续 mRNA 阅读框发生移码,不能继续编码蛋白,第 1 外显子的编码区只有 128nt,只能编码 32 个

氨基酸残基,使基因功能完全丧失,而对相邻的 EphB6 基因基本没有影响,所产生的表型可以完全归结于 Trpv6 基因缺失,有利于研究 Trpv6 基因的功能,而不会产生任何歧义。我们在基因转录水平证明纯合子小鼠 Trpv6 基因已被敲除。本研究成功建立了 Trpv6 基因敲除的小鼠模型,为该基因功能的在体研究奠定了基础。

通过 PCR 技术证实,Trpv6 在具有钙离子跨细胞转运功能的器官内均有表达,包括肾脏、十二指肠、空结肠、骨等组织和前列腺、胰腺、汗腺、唾液腺、乳腺等外分泌器官<sup>[5-6]</sup>。Trpv6 在骨组织及成骨细胞表达,提示新型钙离子通道 Trpv6 在骨形成和矿化中发挥着作用<sup>[7]</sup>。Trpv6 基因敲除鼠股骨的骨密度下降,发生骨质疏松,但尿生化脱氧盐酸吡哆醇并没有变化<sup>[4]</sup>。脱氧盐酸吡哆醇是骨分解代谢的重要指标之一。这说明 Trpv6 缺陷所致的骨质疏松的原因不是骨吸收能力增强引起的,可能与骨形成能力减弱有关。给予高钙饲料(含 2% 钙)喂食,Trpv6 基因敲除鼠骨的骨密度的升高不明显<sup>[4]</sup>。这进一步提示了 Trpv6 基因敲除鼠存在骨形成/矿化功能的障碍。高选择性钙离子通道 Trpv6 蛋白是钙离子进入细胞的重要途径。作为胞内钙信号产生的一个重要途径,调节着第二信使钙离子的浓度及各种蛋白酶的活性,可能直接或间接影响细胞内不同的转录因子,调节成骨细胞的生长、分化和功能。因此,Trpv6 通道蛋白在机体骨代谢方面有着重要的作用。

在大多数情况下,对于生命活动关键的基因在被完全敲除后,小鼠会出现胚胎致死。但是,我们在杂合子小鼠交配育种的后代中得到了 Trpv6 基因敲除纯合子小鼠,证明了 Trpv6 基因完全敲除不会导致小鼠发生胚胎致死。Bianco 等<sup>[4]</sup>研究发现 Trpv6 基因敲除小鼠出生早期存在发育异常,但对寿命无影响。在出生后各时间段内,Trpv6 基因敲除小鼠的体质量明显较野生型小鼠轻,且随着鼠龄增长,体质量增加缓慢更明显。几乎所有的 Trpv6 基因敲除小鼠都存在生育功能缺陷,不能正常交配繁殖。在

毛发长出时,约 80% 的 Trpv6 基因敲除小鼠和 30% 杂合子小鼠存在头面部脱毛和皮炎,但随着鼠龄增长,脱毛和皮炎的比例减少。这些表型与本实验观察结果相似。Trpv6 基因敲除小鼠生育异常、体质量增加迟缓,出现脱毛和皮炎等现象,可能与 Trpv6 基因敲除引起上皮钙离子通道蛋白表达缺失,导致组织特异性钙离子信号通路障碍有关。Trpv6 对成骨细胞的增殖、分化、成熟及骨形成作用影响,将是我们下一步研究的重点。

#### 4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] Hoenderop J G, Nilius B, Bindels R J. Epithelial calcium channels: from identification to function and regulation[J]. *Pflugers Arch*, 2003, 446: 304-308.
- [2] van de Graaf S F, Boullart I, Hoenderop J G, Bindels R J. Regulation of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channels TRPV5 and TRPV6 by 1 $\alpha$ , 25-dihydroxy Vitamin D<sub>3</sub> and dietary Ca<sup>2+</sup>[J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2004, 89-90: 303-308.
- [3] Weber K, Erben R G, Rump A, Adamski J. Gene structure and regulation of the murine epithelial calcium channels ECaC1 and 2[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 289: 1287-1294.
- [4] Bianco S D, Peng J B, Takanaga H, Suzuki Y, Crescenzi A, Kos C H, et al. Marked disturbance of calcium homeostasis in mice with targeted disruption of the Trpv6 calcium channel gene[J]. *J Bone Miner Res*, 2007, 22: 274-285.
- [5] Hoenderop J G, Vennekens R, Müller D, Prenen J, Droogmans G, Bindels R J, et al. Function and expression of the epithelial Ca<sup>2+</sup> channel family: comparison of mammalian ECaC1 and 2[J]. *J Physiol*, 2001, 537: 747-761.
- [6] Müller D, Hoenderop J G, Meij I C, van den Heuvel L P, Knoers N V, et al. Molecular cloning, tissue distribution, and chromosomal mapping of the human epithelial Ca<sup>2+</sup> channel (ECAC1)[J]. *Genomics*, 2000, 67: 48-53.
- [7] Lieben L, Benn B S, Ajibade D, Stockmans I, Moermans K, Hediger M A, et al. Trpv6 mediates intestinal calcium absorption during calcium restriction and contributes to bone homeostasis[J]. *Bone*, 2010, 47: 301-308.

[本文编辑] 徐佳