

人心肌肌钙蛋白 C 两种突变转基因小鼠模型 建立与对比分析

高 珊, 陈 伟, 刘 宁, 葛文萍, 高 翔, 吕 丹, 张连峰, 董 伟

(中国医学科学院北京协和医学院比较医学中心, 卫生部人类疾病比较医学重点实验室, 北京 100021)

【摘要】 目的 为建立心肌组织特异性表达人 cTnC^{D145E} 和 cTnC^{G159D} 突变基因转基因小鼠, 为对比分析两种不同心肌病的发生发展建立模型。**方法** 利用定点突变技术分别制备人 cTnC 基因的 cTnC^{D145E} 和 cTnC^{G159D} 两个突变体, 随后插入心肌特异性表达启动子 α -MHC 下游构建人 cTnC^{D145E} 和 cTnC^{G159D} 基因转基因载体。通过显微注射法建立转基因 C57BL/6 小鼠。利用心脏超声和病理观察对比分析不同年龄转基因小鼠心脏的结构与功能。**结果** 建立了心肌组织高表达人 cTnC^{D145E} 和 cTnC^{G159D} 突变基因转基因小鼠, cTnC^{D145E} 和 cTnC^{G159D} 转基因小鼠随年龄增加, 有分别向 HCM 和 DCM 发展的趋势, 12 月龄时, cTnC^{D145E} 转基因小鼠收缩末期和舒张末期左室容积 (left ventricle end-diastolic volume and end-systolic volume, EDV and ESV) 与同窝阴性小鼠相比下降, 射血分数 (ejection fraction, EF) 和收缩末期左室后壁厚度 (left ventricle end-systolic posterior wall thickness, ESPWT) 增加, 而 cTnC^{G159D} 转基因小鼠 EDV 和 ESV 与同窝阴性小鼠相比上升, EF 和 ESPWT 减少。**结论** 心肌组织特异性表达人 cTnC^{D145E} 突变基因转基因小鼠表现肥厚型心肌病病理表型, 而心肌组织特异性表达人 cTnC^{G159D} 突变基因转基因小鼠表现扩张型心肌病病理表型, 二者可作为对比研究由不同发病机制导致的心肌病模型。

【关键词】 心肌肌钙蛋白 C; 肥厚型心肌病; 扩张型心肌病; 转基因小鼠; 心脏超声

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 03-0067-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 003. 014

Establishment of two cardiac-specific human cardiac troponin C mutation transgenic mice and comparative analysis

GAO Shan, CHEN Wei, LIU Ning, GE Wen-ping, GAO Xiang, LU Dan, 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 establish cardiac-specific transgenic mice of the cTnC^{D145E} and cTnC^{G159D} and compare the HCM and the DCM. **Methods** The cTnC^{D145E} and cTnC^{G159D} were generated by site-directed mutagenesis and the transgenic plasmids were constructed by insertion of the mutant genes under the control of α -MHC, which is a myocardium specific promoter. The transgenic mice were generated by microinjection and were all maintained on a C57BL/6J genetic background. The cardiac structure and function of the transgenic mice were compared and analyzed by echocardiographic and pathological observation at different ages. **Results** The cTnC^{D145E} and cTnC^{G159D} transgenic mice were established and

[基金项目] 国家科技支撑计划课题(2012BAB9B02); 国家“重大新药创制”科技重大专项课题(2011ZX09307-302)。

[作者简介] 高珊, 研究方向: 实验动物学。DWS_GAOSHAN@126.com。

[通讯作者] 董伟, 研究方向: 心脏病动物模型与发病机制, E-mail: dwl30032@126.com。

developed to HCM and DCM, respectively, with aging. The left ventricular end-systolic volume (ESV) and left ventricular end-diastolic volume (EDV) decreased and ejection fraction (EF) and left ventricular end-systolic posterior wall thickness (ESPWT) increased in the cTnC^{D145E} transgenic mice, while EDV and ESV increased and EF and ESPWT decreased in the cTnC^{G159D} transgenic mice at 12 months of age. **Conclusions** Cardiac-specific human cTnC^{D145E} transgenic mice showed HCM phenotypes, and cardiac-specific human cTnC^{G159D} transgenic mice showed DCM phenotypes, which can be used as different models for comparative study of the pathogenesis of cardiomyopathy.

【Key words】 Cardiac troponin C; Hypertrophic cardiomyopathy; Dilated cardiomyopathy; Transgenic mice; Echocardiography

心肌病主要分为扩张型、肥厚型和限制型三种,其中以扩张型心肌病最为常见。在肥厚型心肌病(hypertrophic cardiomyopathy, HCM)和扩张型心肌病(dilated cardiomyopathy, DCM)中,基因缺陷分别占发病的 50% 和 35%^[1-2],其病理生理机制主要包括肌小节蛋白基因突变引起的收缩力产生缺陷;细胞骨架蛋白基因突变引起的收缩力传递缺陷;ATP 调节蛋白基因突变引起的心肌能量不足;以及改变的 Ca²⁺ 可利用性和改变的肌纤维 Ca²⁺ 敏感性引起的 Ca²⁺ 内稳态异常^[3]。肌钙蛋白是由 3 个亚单位,即肌钙蛋白 C、肌钙蛋白 I 及肌钙蛋白 T 组成的复合物,主要依靠肌钙蛋白 T 附着于原肌球蛋白,其次是肌钙蛋白 I。肌钙蛋白 c 与肌钙蛋白 T 和 I 相互作用。该复合物和原肌球蛋白一起通过调节钙离子对横纹肌动蛋白 ATP 酶的活性来调节肌动蛋白和肌球蛋白相互作用。心肌肌钙蛋白(cardiac troponin, cTn)是心肌肌肉收缩的调节蛋白。cTn 是由三种不同基因的亚基组成:心肌肌钙蛋白 T(cTnT)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)和心肌肌钙蛋白 C(cTnC)。cTnC 基因有 6 个外显子,编码 161 个氨基酸的心肌肌钙蛋白 C。钙离子与心肌肌钙蛋白 C 结合引起肌钙蛋白-原肌球蛋白复合物的构型改变,从而引发肌肉收缩。cTnT 和 cTnI 基因突变引起的心肌病比较常见^[4-5],而 cTnC 基因突变引起的心肌病比较少见,目前报的引起心肌病的 cTnC 基因突变主要有 11 个引起 HCM 和 DCM 包括 L29Q, A8V, C84Y, E134D, Q122A, E59D/D75Y, G159D, Y5H, M103I, D145E, I148 等^[6]。其中 cTnC^{D145E} 和 cTnC^{G159D} 在蛋白结构中的位置相近,但 cTnC^{D145E} 引起 HCM^[7],而 cTnC^{G159D} 引起 DCM^[6]。这两个突变引起两种相反的表型,建立两个突变的转基因心肌病模型,可用于对比分析两种不同心肌病的机制。本文通过转基因技术分别建立了两种突变的心脏特异转基因小鼠,并对转基因小鼠的心肌病表型进行了长时程对比分析。

1 材料和方法

1.1 人 cTnC^{D145E} 和 cTnC^{G159D} 转基因小鼠建立

人 cTnC 基因购自 Origene 公司,利用定点突变技术分别制备 cTnC^{D145E} 和 cTnC^{G159D} 两个突变体。分别将两个突变体插入心肌特异性表达启动子 α -MHC 下游构建转基因载体。用 PvuI 内切酶将转基因载体线性化,获得 α -MHC 启动的人 cTnC^{D145E} 和 cTnC^{G159D} 基因转基因片段。用显微注射法(TE2000-U 显微注射仪)将线性化的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,制备转基因小鼠。C57BL/6 小鼠购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2011-0001】,用 ICR 小鼠作假孕受体,购自北京维通利华实验动物技术有限公司【SCXK(京)2011-0001】。实验均在卫生部人类疾病比较医学重点实验室完成【SYXK(京)2013-002】。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-2011-001。

1.2 RT-PCR 及 western blot 检测鉴定人 cTnC 基因的表达

提取 cTnC^{D145E} 和 cTnC^{G159D} 转基因小鼠与同窝阴性小鼠心脏 RNA 及总蛋白。RNA 逆转录为 cDNA,PCR 扩增人 cTnC 基因全长,选用只在人 cTnC DNA 中存在的酶切位点的 ClaI 对扩增产物进行酶切(宝生物工程有限公司,中国),人 cTnC 的 PCR 产物被切成两条带,用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。可依次区分 PCR 产物中小鼠 cTnC 和人 cTnC 表达的比例。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,用鼠抗 cTnC 单克隆抗体(LSBio)检测 cTnC 的表达水平。采用辣根过氧化物酶(HRP)-耦联的羊抗鼠抗体结合一抗(北京中杉金桥生物技术有限公司),用 HRP-耦联的鼠抗 GAPDH 单克隆抗体做为内参。

1.3 小鼠的心脏结构与功能超声分析

实验小鼠用三溴乙醇注射麻醉后(0.18 mL/10g 体重),用脱毛剂脱去胸部体毛,置于检测台上,将台温设定为 40℃,小鼠四肢用医用胶布固定于涂有导电胶的电极上,记录生理指标。用 VisualSonics © Vevo770 © 操作系统和专门用于小鼠心脏的 RMV707B 高频超声探头,进行 B 型、M 型超声检测。通过 VisualSonics © Vevo770 © 高分辨率小动物超声系统的软件进行数据分析。

1.4 病理观察

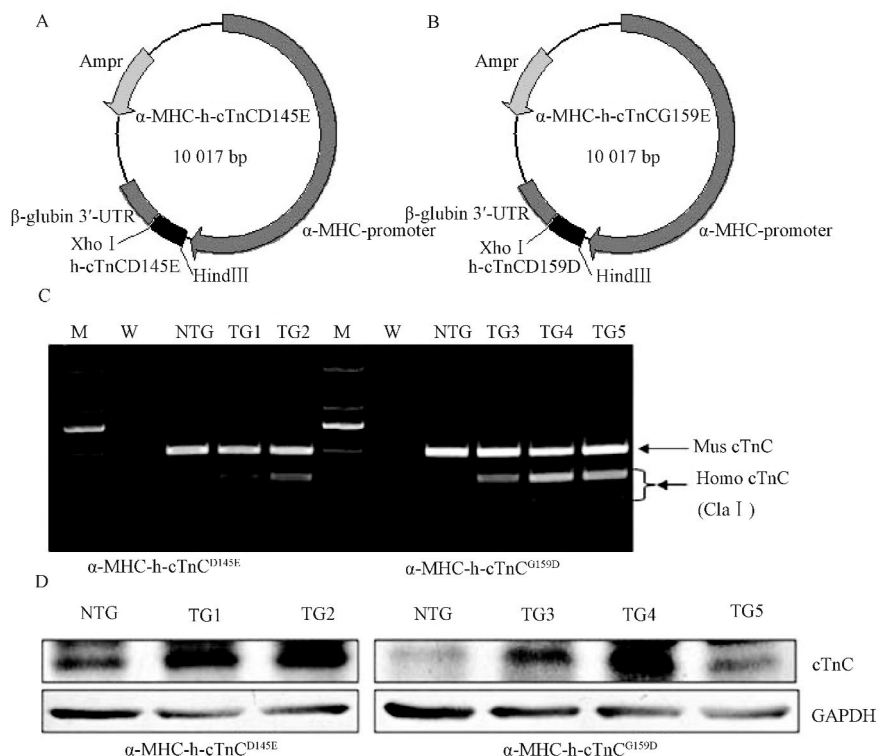
选用 12 月龄的转基因阳性和同窝阴性小鼠,颈椎脱臼法牺牲小鼠,打开胸腔取出心脏,将心脏组织固定在 4% 多聚甲醛中 24 h,进行取材、脱水、包埋、切片、HE 染色和镜下观察(Nikon 显微镜,日本和 Leica MZI6F 体视镜,德国)。

2 结果

2.1 转基因小鼠的建立以及高表达品系筛选

用 PCR 克隆的人 cTnC 基因,测序结果表明同

已报道的序列完全一致(Gene ID: 7134, NM-003280)。将该基因的突变体 cTnC^{D145E}和 cTnC^{G159D}插入心肌特异性表达启动子 α -MHC 下游构建人 cTnC^{D145E}和 cTnC^{G159D}基因转基因载体(图 1A, B)。用 RT-PCR 和 western blot 分析两个突变品系的转基因小鼠心脏中人 cTnC 基因的表达情况。人 cTnC 基因与小鼠 cTnC 基因序列相近,RT-PCR 扩增的目的片段大小一致,无法区分,在人 cTnC 基因序列中存在 ClaI 酶切位点,而小鼠中没有,因此对扩增片段进行酶切,将人 cTnC 基因与小鼠 cTnC 基因分离。结果显示人 cTnC 基因在两个突变品系的转基因小鼠心脏中均有表达,mRNA 拷贝数与内源 cTnC 相当(图 1C),western blot 分析结果显示人 cTnC^{D145E}转基因小鼠中,首建鼠 TG2 的 cTnC 表达是同窝阴性对照的 1 倍以上,选择繁育进一步研究,命名为 α -MHC-h-cTnCD^{145E},在人 cTnC^{G159D}转基因小鼠中首建鼠 TG4 的 cTnC 表达是同窝阴性对照的 1 倍以上,选择繁育进一步研究,命名为 α -MHC-h-cTnCG^{159D}(图 1D)。

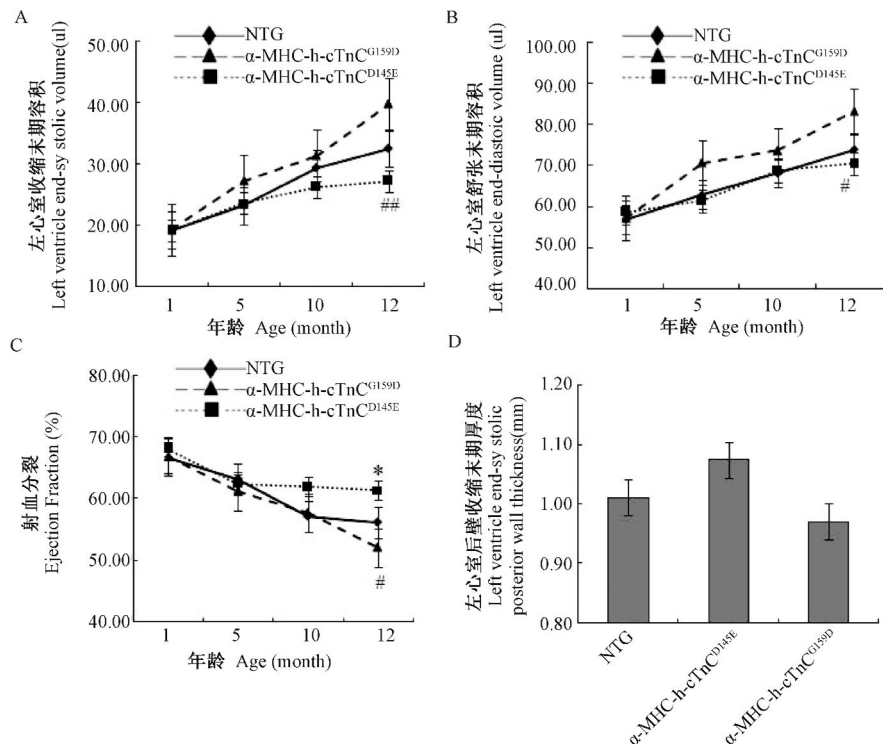


注: NTG:同窝阴性;W:空白对照;M:DNA 相对分子质量标记;TG1-5:阳性转基因小鼠;GAPDH:内参。

图 1 转基因构建及转基因小鼠的表达分析

Note: NTG: Negative littermates; W: Blank control; M: DNA molecular weight marker; TG1-5: The positive transgenic mice; The Western blot was normalized with GAPDH.

Fig. 1 Transgenic construct and the expression analysis of transgenic mice



注: NTG: 同窝阴性; 转基因组与同窝阴性组相比较, * $P < 0.05$, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$ 。

图 2 α -MHC-h-cTnCD^{145E} 和 α -MHC-h-cTnCG^{159D} 转基因小鼠心脏超声对比分析

Note: NTG: Negative littermates; transgenic mice versus NTG, * $P < 0.05$, # $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, ## $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Analysis the heart of α -MHC-h-cTnCD^{145E} and α -MHC-h-cTnCG^{159D} transgenic mice with echocardiography

2.2 两种转基因小鼠的长时程对比超声分析

选取年龄、性别匹配的 α -MHC-h-cTnCD^{145E}, α -MHC-h-cTnCG^{159D} 和同窝阴性小鼠, 在 1 月龄、5 月龄、10 月龄、12 月龄四个时间点, 进行为期 1 年的心脏超声影像分析, 结果显示, α -MHC-h-cTnCD^{145E} 和 α -MHC-h-cTnCG^{159D} 转基因小鼠随年龄增加逐渐向 HCM 和 DCM 发展, 到 12 月龄时表型最明显。在与同窝阴性小鼠的收缩末期左室容积比较, α -MHC-h-cTnCD^{145E} 转基因小鼠下降 16%, 而 α -MHC-h-cTnCG^{159D} 转基因小鼠增加 22% (图 2A)。与同窝阴性小鼠的舒张末期左室容积比较, α -MHC-h-cTnCD^{145E} 转基因小鼠下降 5%, 而 α -MHC-h-cTnCG^{159D} 转基因小鼠增加 13% (图 2B)。与同窝阴性小鼠的射血分数比较, α -MHC-h-cTnCD^{145E} 转基因小鼠增加 9%, 而 α -MHC-h-cTnCG^{159D} 转基因小鼠下降 7% (图 2C)。左心室后壁收缩末期厚度直到 12 月龄才出现明显变化, 与同窝阴性相比, α -MHC-h-cTnCD^{145E} 转基因小鼠增加 6%, 而 α -MHC-h-cTnCG^{159D} 转基因小鼠减少 4% (图 2D)。

2.3 α -MHC-h-cTnCD^{145E} 和 α -MHC-h-cTnCG^{159D}

转基因小鼠病理表型分析 (封 3 图 3)

在 α -MHC-h-cTnCD^{145E}, α -MHC-h-cTnCG^{159D} 和同窝阴性小鼠经过为时 1 年的心脏超声影像分析后, 牺牲小鼠, 取心脏固定, 切片和镜下观察并与 M 超声对比。全心脏切片观察可见 α -MHC-h-cTnCD^{145E} 小鼠左心室室壁比同窝阴性小鼠变厚, 而 α -MHC-h-cTnCG^{159D} 小鼠左心室室壁比同窝阴性小鼠变薄 (图 3A)。两种转基因小鼠都表现心肌细胞排列紊乱 (图 3B)。M 型超声截图也显示 α -MHC-h-cTnCD^{145E} 小鼠左心室室壁变厚, 表现 HCM 表型; α -MHC-h-cTnCG^{159D} 小鼠左心室室壁变薄, 表现 DCM 的表型 (图 3C)。

3 讨论

心肌病是目前发病率较高, 缺乏有效治疗方法的一类疾病, 肌钙蛋白 T, I, C 形成的肌钙蛋白复合物附着于原肌球蛋白, 是钙离子与心肌肌钙蛋白 C 结合引起肌钙蛋白-原肌球蛋白复合物的构型改变, 从而引发肌肉收缩的重要组成部分, 肌钙蛋白三个亚基的基因突变是频率最高心肌病发病原因^[3]。

肌钙蛋白-原肌球蛋白复合物对钙离子敏感,调节肌动蛋白-肌球蛋白相互作用^[4-5]。cTnC^{D145E}和cTnC^{G159D}在蛋白的 C-结构域附近,D145E 突变可以提高 cTnC 对钙离子的敏感性^[7-8]。G159D 突变对 cTnC 的钙离子敏感性没有影响,但可能会增加肌动蛋白-肌球蛋白纤维利用 ATP 的活性^[6]。在人类中 cTnC^{D145E}引起 HCM 而 cTnC^{G159D}引起 DCM。

我们的结果表明,在小鼠心脏中特异表达人 cTnC^{D145E}突变基因建立的 α -MHC-h-cTnC^{D145E}转基因小鼠左室容积在收缩末期和舒张末期均明显下降,射血分数和左心室后壁收缩末期厚度明显增加,以及心肌细胞排列紊乱等 HCM 表型;在小鼠心脏中特异表达 cTnC^{G159D}突变基因建立的 α -MHC-h-cTnC^{G159D}转基因小鼠左室容积在收缩末期和舒张末期均明显增加,射血分数和左心室后壁收缩末期厚度明显下降,以及心肌细胞排列紊乱等 DCM 表型。和人类疾病的表型相似,这两个突变引起两种相反的表型,可分别作为 HCM 和 DCM 转基因心肌病模型,模型特点是发病时间较晚,12 月龄时表型比较明显,且到 12 月龄时没有猝死发生。当心肌病随年龄趋于严重时,可能有猝死发生。cTnC 的这一对突变与 cTnT 的一对突变相比较,cTnT^{R92Q}突变基因转基因小鼠在 10 月龄时就有明显的 HCM 表型^[9],cTnT^{R141W}突变基因转基因小鼠在 4 月龄时就有明显的 DCM 表型,并且有猝死发生^[10]。 α -MHC-h-cTnC^{D145E}转基因小鼠和 α -MHC-h-cTnC^{G159D}转基因小鼠更适合作为老年发病的 HCM 和 DCM 模型。

对遗传性心肌病而言,从基因突变到病理发生之间不仅突变基因在发挥作用,参与心肌生长、分化、肥大、凋亡等多方面的信号通路也在发挥作用。基因突变决定了心肌病的发生,而参与心肌生长、分化、肥大、凋亡等多方面的信号通路决定着心肌病发生的快慢和严重程度。由同一个基因的两种突变制备的表型相反的成对模型,如:cTnT^{R141W}转基因 DCM 模型和 cTnT^{R92Q}转基因 HCM 模型,二者对比分析可以为心肌病的发生提供很好的机制方面的研究工具,利用二者对比分析,发现了 HepC1 和 Cyp3A 等心肌病的影响基因^[11-12]。目前国际上由同一个基因的两种突变制备的表型相反的成对模型并不多, α -MHC-h-cTnC^{D145E}转基因小鼠和 α -MHC-h-cTnC^{G159D}转基因小鼠可用于两种不同心肌

病机制的对比分析,对深入研究心肌病发病机制具有一定的科学意义。

参考文献:

- [1] Roberts R. Molecular genetics. Therapy or terror? [J]. Circulation. 1994, 89(1):499-502.
- [2] Grünig E, Tasman JA, Kücherer H, Franz W, Kübler W, Katus HA. Frequency and phenotypes of familial dilated cardiomyopathy[J]. J Am Coll Cardiol. 1998, 31(1):186-194.
- [3] 冯娟,张连峰. 家族性扩张型心肌病的分子遗传研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(9):550-554.
- [4] 冯娟,张连峰. 心肌肌钙蛋白 T 基因突变在心肌病发病机制中的研究进展[J]. 中国比较医学杂志,2007,17(9):555-558.
- [5] 冯娟,张连峰. 心肌肌钙蛋白 I 基因突变与心肌病的研究进展[J]. 中国实验动物学报,2007,15(5):387-389.
- [6] Sampath K, Gollapudi and Murali Chandra. Cardiomyopathy-Related Mutations in Cardiac Troponin C, L29Q and G159D, Have Divergent Effects on Rat Cardiac Myofiber Contractile Dynamic [J]. Biochemistry Research International. 2012, 1-11.
- [7] Pinto JR, Parvatiyar MS, Jones MA, Liang J, Ackerman MJ, Potter JD. A functional and structural study of troponin C mutations related to hypertrophic cardiomyopathy [J]. J Biol Chem. 2009, 284(28):19090-100.
- [8] Swindle N, Tikunova SB. Hypertrophic cardiomyopathy-linked mutation D145E drastically alters calcium binding by the C-domain of cardiac troponin C [J]. Biochemistry. 2010, 49(23):4813-20.
- [9] 董伟,冯娟,全雄志,等. cTnTR92Q 转基因小鼠肥厚型心肌病模型的建立[J]. 中国比较医学杂志,2008,18(5):5-8.
- [10] Feng Juan, Dong Wei, Quan Xiongzi, Di Ran, Ma Chunmei, Huang Lan, The changes of the cardiac structure and function in cTnTR141W transgenic mice [J]. International Journal of Cardiology. 2008,128:83-90.
- [11] Zhang L, Lu D, Zhang W, Quan X, Dong W, Xu Y, Zhang L. Cardioprotection by Hsp61 in cTnT (R141W) transgenic mice [J]. Transgenic Res. 2012,21(4):867-78.
- [12] Lu D, Ma Y, Zhang W, Bao D, Dong W, Lian H, Huang L, Zhang L. Knockdown of cytochrome P450 2E1 inhibits oxidative stress and apoptosis in the cTnT (R141W) dilated cardiomyopathy transgenic mice [J]. Hypertension. 2012, 60(1):81-9.

[修回日期]2014-01-20