

成骨细胞特异性过表达 h1 calponin 转基因小鼠的建立

陈锚锚 苏楠 赵子瑜 雷子贤 赵玲 李福兵 陈林

中图分类号: R318.3Q503 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2008)12-0849-05

摘要:目的 为从整体动物水平研究碱性调宁蛋白(h1-calponin)在骨形成过程中的直接作用,我们构建了成骨细胞中特异性过表达 h1-calponin 的转基因小鼠模型,并对其表型进行了初步分析。方法 构建在成骨细胞特异性启动子(collagen I promoter)驱动下表达 h1-calponin 的载体(pColl-calponin),纯化 DNA 片段,再以显微注射的方法将转基因片段导入小鼠受精卵,经移植后得到小鼠。PCR 法检测整合到小鼠基因组中的外源基因,提取 F1 代阳性小鼠原代成骨细胞 RNA,RT-PCR 检测 h1-calponin 在小鼠成骨细胞中的表达情况,并观察转基因小鼠表型及体重变化情况。结果 PCR 检测结果显示 1 只 G0 代转基因鼠中检测到阳性信号,RT-PCR 显示 F1 代转基因小鼠成骨细胞中表达 h1-calponin 较野生对照小鼠明显增加,且转基因小鼠体重与野生小鼠相比有明显降低。结论 成功构建了在成骨细胞特异性过表达 h1-calponin 的转基因小鼠,为深入研究 h1-calponin 在骨骼发育中的作用提供了良好的动物模型。

关键词:碱性调宁蛋白;成骨细胞;转基因小鼠

Generation of transgenic mice with osteoblast specific expression of h1-calponin CHEN Maomao, SU Nan, ZHAO Ziyu, et al. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Trauma Center, Institute of Surgery Research, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

Abstract: **Objective** This study reported the establishment of a transgenic mouse strain with osteoblast specific expression of h1-calponin. **Methods** h1-calponin cDNA driven by collagen I promoter was constructed and introduced into the mouse by nuclear microinjection, and offsprings were produced. DNA was isolated from the tails of the mouse pups, and was used to detect the incorporation of h1-calponin mini gene by PCR using h1-calponin specific primers. The h1-calponin expression in osteoblast of transgenic mice was determined at mRNA level by RT-PCR. **Results** The PCR showed that there were one G0 transgenic mice with positive signal. RT-PCR showed h1-calponin was expressed in the osteoblasts of F1 transgenic mice. **Conclusion** h1-calponin cDNA has been incorporated into the offspring mice. Meanwhile a significant expression of h1-calponin mRNA was detected in the osteoblasts of F1 transgenic mice which offered an useful animal model to study the biological function of h1-calponin in skeleton development and diseases.

Key words: H1-calponin; Osteoblast; Transgenic mice

碱性调宁蛋白(h1-calponin)属调宁蛋白家族, h1-calponin 是平滑肌的标志基因,既往多围绕平滑肌收缩调节的信号转导研究 h1-calponin^[1]。h1-

calponin 在成骨细胞和软骨细胞中亦有表达,有研究表明 h1-calponin 能够影响骨骼发育。骨骼的发育主要可分为膜内成骨和软骨内成骨两种方式。长骨发育主要是通过软骨内成骨这一方式,软骨内成骨可分为软骨形成和骨形成两个过程,而软骨形成也会影响骨形成^[2]。h1-calponin 基因敲除小鼠显示软骨形成和骨形成加快,骨量增加,提示 h1-calponin 是骨形成的负性调节分子,但具体机制不清^[3]。h1-calponin 基因敲除小鼠模型中所有细胞的 h1-

基金项目:国家重点基础研究发展规划资助项目(973 项目)(2005CB522604) 国家自然科学基金杰出青年基金资助项目(30425023); 国家自然科学基金重点资助项目(30530410)

作者单位:400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所创伤实验室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通讯作者:陈林,Email 3inchen70@163.com

calponin 均被敲除,因此难以区分该小鼠骨形成的改变是由 h1-calponin 对成骨细胞的直接作用引起的,还是通过软骨细胞间接影响成骨过程而引起的。因此,为了进一步研究 h1-calponin 对骨形成的直接作用,笔者建立了在成骨细胞特异性过表达 h1-calponin 的转基因小鼠,并对其表型进行了初步分析。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂和仪器:质粒 pSK-SV40PA, pACT2-calponin h1 由本实验室保存,含小鼠成骨细胞特异性 I 型胶原启动子 (Collagen I promoter) 的质粒 pBCKS 由美国冯健全教授惠赠;DH5 α 感受态细菌由本实验室保存;高保真 DNA 聚合酶、凝胶纯化回收试剂盒购自德国 Qiagen 公司,质粒 DNA 抽提试剂盒购于 Omega 公司;T4 连接酶、限制性内切酶购自日本 TaKaRa 公司;细胞培养所用 α -MEM 培养基、FBS、胰蛋白酶、II 型胶原酶等试剂分别购自 Gibco 和 HyClone 公司;Trizol、RT-PCR 相关试剂均购于 Invitrogen 公司;凝胶成像系统及相关软件为美国 Bio-Rad 公司产品;5145R 低温台式离心机为德国 Eppendorf 公司产品;310 型测序仪及试剂为美国 ABI 公司产品;其余为国产分析纯试剂。

1.1.2 实验动物:SPF 级 FVB 小鼠购于上海斯莱克实验动物有限公司,饲养于第三军医大学大坪医院实验动物中心。所有动物实验操作均按第三军医大学实验动物管理委员会要求进行[执行标准 SYXK (军 2002032)]。

1.2 coll-calponin 转基因载体的构建及鉴定

1.2.1 coll-calponin 转基因载体的构建:用 SalI + XhoI 从 pACT2-calponin h1 质粒中切取含 h1-calponin cDNA 的片段,胶回收该片段并对其进行平滑化,插入用 SmaI 酶切并进行去磷酸化处理的 pSK-SV40PA 载体中,经 PCR 及酶切鉴定得到 pCalponinSV40PA 质粒。用 BamHI 酶切 pCalponinSV40PA 质粒并进行钝化,再用 Sac II 酶切后行胶回收;用 EcoRV + Sac II 酶切含有 I 型胶原启动子的 pBCKS,回收含 Collagen I 启动子的 5.0 kb 条带,并将回收片段与经 BamHI + Sac II 酶切后的 pCalponinSV40PA 质粒进行连接,得到 collagen I 启动子驱动 h1-calponin 表达的转基因载体 pColl-calponin。上述操作均按分子克隆实验指南进行^[4]。

1.2.2 coll-calponin 转基因载体的酶切鉴定:用限制

性内切酶 Sac II + Sal I 对此对载体进行酶切消化,以对所构建的载体进行初步鉴定。

1.2.3 coll-calponin 转基因载体的测序鉴定:分别以 SK 载体上的 T7 为测序引物,采用 ABI310 型基因测序仪,对所构建的载体的接头区进行了测序。

1.3 受精卵的显微注射

用限制性内切酶 Sac II、Sal I 分别对此对载体进行酶切消化,回收并纯化注射片段,按常规进行受精卵原核显微注射和输卵管胚胎移植^[5]。

1.4 转基因小鼠鼠尾 DNA 的制备

剪下出生后 10 ~ 14 d 小鼠尾尖约 0.5 cm,加入 200 μ L 组织裂解液 (0.5% SDS, 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L EDTA, 0.01 mol/L Tris-HCl, pH 8.0, 100 μ g/mL 蛋白酶 K), 56 $^{\circ}$ C 保温过夜,饱和 NaCl 150 μ L/Eppendorf 离心管,剧烈振荡 200 次,冰浴 30 min, 14000 r/min 离心 10 min,取上清液 150 μ L 转移至干净 Eppendorf 离心管,加入 250 μ L 无水酒精,反复颠倒混匀,14000 r/min 离心 10 min,可见管底附着的 DNA 斑,倒去上清,Eppendorf 离心管倒置于纸巾上使所有液体流出,Eppendorf 离心管开口、正立,室温干燥 15 min,加入 40 μ L TE, 50 $^{\circ}$ C 2 h,于 4 $^{\circ}$ C 储藏 DNA 备用^[6]。

1.5 coll-calponin 转基因小鼠的 PCR 鉴定

用 Primer premier 5.0 软件设计 PCR 引物,由上海生物工程技术公司合成,扩增 h1-calponin 基因片段,用于成骨细胞过表达 h1-calponin 转基因小鼠的 PCR 检测。coll-calponin 转基因小鼠目的条带为 175 bp,野生型小鼠目的条带为 263 bp。

引物序列:calponin 1-F: 5'-ACACGGCGTCAC-CTCTATG-3'; calponin 1-R: 5'-TGAGTGTGTGCGAGT-GTTCCA-3'。

PCR 扩增条件:预变性 94 $^{\circ}$ C 3 min;然后 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s 重复 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 coll-calponin 转基因小鼠成骨细胞表达效率鉴定

取新生 2 d 的小鼠,PCR 鉴定基因型,75% 酒精消毒 5 min 后,取新生小鼠头盖骨,去除表面软组织,以 PBS 洗净,加入 0.25% 的胰蛋白酶溶液,消化 10 min,弃去上清,沉淀中加入 0.2% II 型胶原酶溶液消化 60 min,将上清吸出,1000 r/min 离心 5 min,弃去离心后的上清,混匀,接种于 α -MEM 培养基 (含青霉素、链霉素和 10% FBS) 中,置于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂、饱和湿度孵箱内培养 3 代,提取成骨细胞总 RNA,

采用 RT-PCR 检测 h1-calponin 在成骨细胞中的表达效率。

1.7 colI-calponin 转基因小鼠初步表型分析

将 colI-calponin 转基因小鼠与 FVB 小鼠交配,得到既有 colI-calponin,又有野生型的同窝小鼠。对出生后不同时期(间隔为 1 周)的 colI-calponin 转基因小鼠进行大体观察(身长、体重、外表特征等),与同窝同性别野生型小鼠对比,进行数据记录并采用统计学分析,并且观察骨发育的相关指标并绘制体重增长曲线。

1.8 统计学处理

采用 SPSS 10.0 统计软件对数据进行方差分析

及 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 colI-calponin 转基因载体的构建及酶切鉴定

构建好的载体及主要酶切位点见图 1A。经 SalI + XhoI 双酶切的全长 h1-calponin cDNA 片段,克隆至含 collagen I 启动子的 pSK-SV40PA 后,重组质粒中应存在 Sac II 和 Sal I 的单一酶切位点,经 Sac II + Sal I 双酶切后得到 3.0 kb、6.8 kb 两个片段,电泳图中观察到两条带。上述结果与预期的酶切结果相符合,见图 1B。

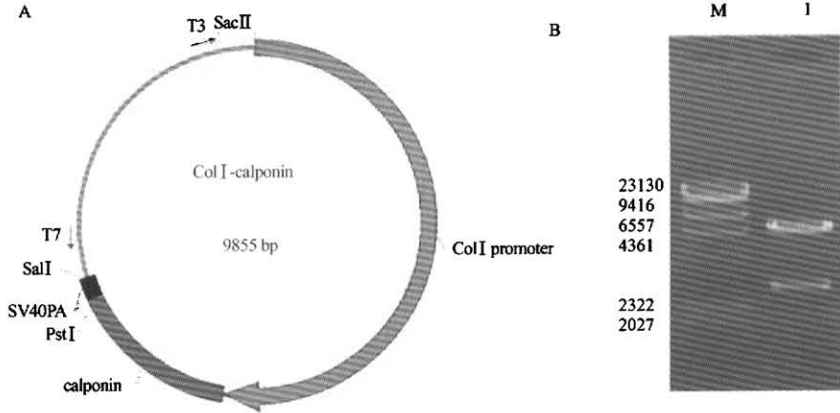


图 1 colI-calponin 转基因载体示意图及酶切鉴定图

A: colI-calponin 转基因载体及主要酶切位点示意图

B: colI-calponin 转基因载体酶切鉴定示意图

M: Hind III 标准 DNA 分子量; 1: Sac II + Sal I 双酶切结果

2.2 colI-calponin 转基因载体的测序鉴定

采用 T7 引物测到重组载体的接头区, colI-calponin 重组质粒 DNA 序列测定证明插入方向和 III 序列无误,其结果如下: T7→5'-ATAGCTATTGCTTTA-TTTGTAACCATATAAGCTGCAATAAACAAGTTCTG-CTTTAATAAGATCCGAATTCCTGCAG CCCTCG AGTT-TTTTTTTTTTTTTTTTGTATGTCACAGCCATTTATTGTG-CTCCAGTGAAATAGAAAAGAATGTGTTTCAGAGTTAC-AAACGCTGCTGTACATCCACAAACACCANGTCACT-GCAAAACCAAAATGCGTGN-3'。

方框内序列为接头区,经比对接头区之前为 SV40 序列,之后为 h1-calponin 序列。

2.3 colI-calponin 转基因小鼠构建及 PCR 鉴定

注射移植小鼠 2 只,其中 1 只母鼠怀孕,产生的 G0 代鼠 7 只成活。提取基因组 DNA 作 PCR 检测,有 1 只小鼠可扩增出目的片段,其余小鼠未见阳性

条带,表明该片段已整合至该小鼠染色体中,见图 2A。G0 代转基因小鼠与 FVB 小鼠交配,得到稳定传代的 F1 代转基因小鼠,见图 2B。

2.4 colI-calponin 转基因小鼠成骨细胞表达效率鉴定

分离培养 F1 代 colI-calponin 转基因小鼠和同窝对照小鼠的原代成骨细胞,提取总 RNA,然后通过半定量 RT-PCR 检测 h1-calponin 在成骨细胞中的表达。结果如图 3 所示。h1-calponin 扩增片段为 175 bp 左右,β-actin 为 760 bp 左右。通过 Bio-Rad 凝胶成像系统软件对光密度分析结果,突变小鼠泳带积分光密度值为(151.12 ± 16.56),β-actin 泳带积分光密度值为(255.81 ± 21.82);野生型小鼠泳带积分光密度值为(86.33 ± 8.21),β-actin 泳带积分光密度值为(255.34 ± 18.52),存在统计学差异($P < 0.05$),转基因小鼠 h1-calponin 表达较野生小鼠高 75%。

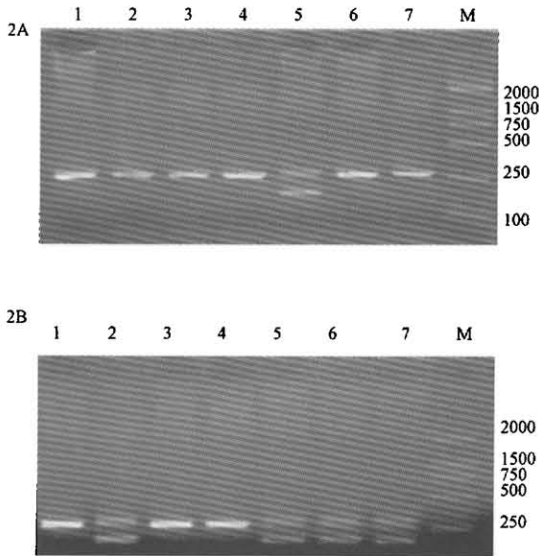


图 2A:G0 代小鼠 PCR 鉴定结果

图 2B:F1 代小鼠 PCR 鉴定结果

M:DL2000 标准 DNA 分子量;1~7:样本

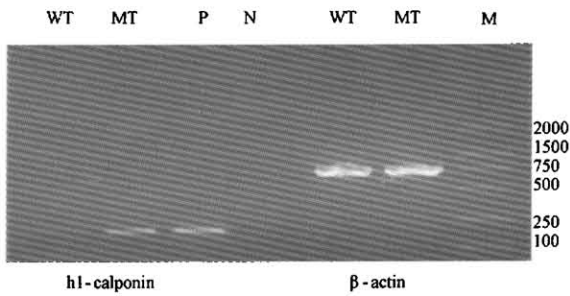


图 3 h1-calponin 在成骨细胞中表达效率鉴定

M:DL2000 标准 DNA 分子量;P:阳性对照;N:阴性对照

WT:野生型小鼠;MT:coll-calponin 转基因小鼠

滑肌组织中分离提取出来的,属调宁蛋白家族。调宁蛋白是一个具有多种功能的蛋白家族,与许多疾病的发生发展都有密切联系。h1-calponin 是平滑肌的标志基因,既往多围绕平滑肌收缩调节的信号转导研究 h1-calponin,其生理作用除抑制平滑肌收缩外^[1],调宁蛋白还是一种抗细胞增殖基因。研究证明,在培养的 SMC,成纤维细胞和肿瘤细胞中过表达 h1-calponin 可抑制这些细胞的增生,Horiuchi 等^[9]发现肝素通过诱导碱性调宁蛋白的表达抑制了子宫肌和平滑肌瘤中 SMC 的增生。Youichi 等^[7]通过对比调宁蛋白基因敲除的小鼠和野生型抗肾小球基膜肾炎模型的小鼠,发现 h1-calponin 表达下调可助长增生性肾小球疾病中系膜细胞的增生。此外,研究发现 h1-calponin 也可调节骨骼发育。其基因缺失可导致骨骼发育异常^[3]。骨骼发育特别是长骨发育主要是通过软骨内成骨这一方式,软骨内成骨可分为软骨形成和骨形成两个过程。软骨形成期胚胎期聚集

2.5 coll-calponin 转基因小鼠初步表型分析

笔者对出生后的 coll-calponin 转基因小鼠和同窝对照小鼠对比观察,突变小鼠与野生小鼠比较,身长、外形无明显变化,见图 4A,但连续测量小鼠体重,发现突变小鼠体重较野生小鼠从出生后 5 周起明显减轻,见图 4B。

3 讨论

碱性调宁蛋白(h1-calponin)最初是作为一种参与平滑肌收缩的肌动蛋白的结合蛋白,从鸡沙囊平

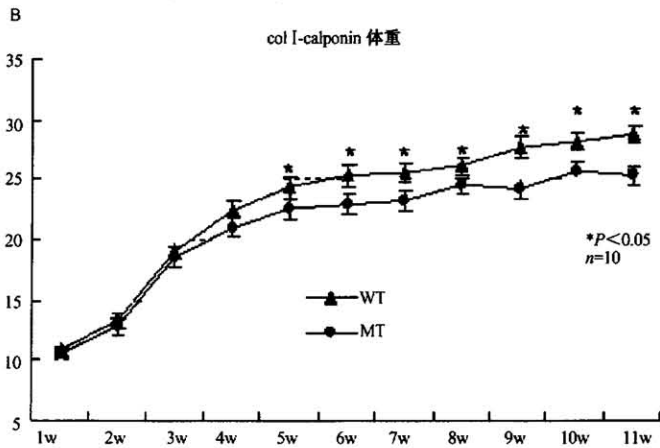
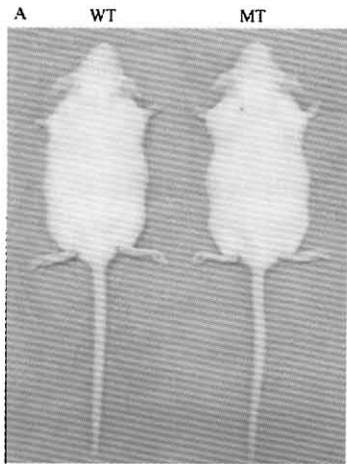


图 4 coll-calponin 转基因小鼠外观及体重增生曲线

A:2 月龄小鼠外观 WT:野生型小鼠 MT:coll-calponin 转基因小鼠

B: 体重增生曲线 WT:野生型小鼠 MT:coll-calponin 转基因小鼠

的间充质干细胞先分化为软骨细胞,而后软骨细胞增生、肥大、凋亡,形成软骨基质,而后成骨细胞在此基础上分泌基质成骨、矿化,这个过程则是骨形成过程。

Yoshikawa 等^[3] 研究发现 h1-calponin 敲除小鼠软骨及骨形成加快,且骨量增加 敲除小鼠长骨长度不变,但更宽些,血清 ALP 显著增加,钙/磷正常,骨骼直径变宽,髓腔增加。在骨折愈合中,研究发现 h1-calponin 敲除的小鼠依靠活化的骨膜成骨细胞的大量增生使得新骨形成增加。h1-calponin 是骨骼发育的一种调节因子,研究其对骨骼发育的作用及机制对了解骨发育及相关疾病的调控非常重要。Yoshikawa 等利用敲除小鼠研究 h1-calponin 在骨发育中的作用,极大地增加了我们对 h1-calponin 在骨发育中作用的认识,但其所用的是常规 h1-calponin 基因敲除小鼠模型,该模型中所有细胞的 h1-calponin 均被敲除,难以区分 h1-calponin 对成骨细胞的间接、直接作用。所以,通过建立在成骨细胞特异性过表达 h1-calponin 的小鼠模型,可以更好地研究 h1-calponin 对成骨细胞及骨形成的直接作用。

I 型胶原(collagen I)是大多数哺乳动物组织的主要成分^[10],由成骨细胞和成齿质细胞以及几种不同类型的成纤维细胞和间充质细胞合成^[11,12],是成骨细胞合成和分泌的类骨质中的主要成分,本研究选用加入了成骨细胞特异性内含子元件的小鼠 collagen I 启动子,为转基因小鼠在成骨细胞中特异性高表达创造了条件。

本研究构建了在成骨细胞中过表达 h1-calponin 动物模型,分离培养小鼠成骨细胞并提取总 RNA,RT-PCR 检测转基因小鼠 h1-calponin 表达效率。结果显示转基因小鼠成骨细胞中表达 h1-calponin 较野生对照小鼠明显增加;并且通过对转基因小鼠初步的表型分析发现转基因小鼠与野生小鼠相比外观无明显差别,但体重有明显下降。分析原因由于文中该小鼠 h1-calponin 在成骨细胞中过表达,会影响小鼠骨骼发育的骨形成过程,且既往研究提示 h1-calponin 具有抑制细胞增生的作用,因此我们认为小鼠体重下降主要可能是由于抑制成骨细胞的增生,从而抑制骨形成,导致成骨能力下降,骨量减少引起的。然而成骨细胞中过表达 h1-calponin 到底对骨形成的具体作用和相关机制尚不清楚,这些问题都需

要利用该小鼠进行深入研究来解答。

成骨细胞过表达 h1-calponin 转基因小鼠动物模型目前在国内未见报道,该模型为研究 h1-calponin 在骨形成中的直接作用提供了良好的动物模型。

【 参 考 文 献 】

- [1] Menice CB, Hulvershom J, Adam LP, et al. Calpenin and mitogen-activated protein kinase signaling in differentiated vascular smooth muscle. *J Biol Chem*, 1997, 272: 25157-25161.
- [2] Gerard Karsenty. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Developmental Cell*, 2002: 389-460.
- [3] Hideki Yoshikawa. Mice lacking smooth muscle calponin display increased bone formation that is associated with enhancement of bone morphogenetic protein responses. *Genes to Cells*, 1998: 685-695.
- [4] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. JIN DY, LI MF, translation. Beijing Science Press, 1992.
- [5] Cheng X, Chen HX, Yang X, et al. Study on improving efficiency of producing transgenic mouse. *Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica*, 2001, 9(3): 160-163.
- [6] Kulkarni RN, Bruning JC, Winnay JN, et al. Tissue specific knockout of the insulin receptor in pancreatic beta cells creates an insulin secretory defect similar to that in type 2 diabetes. *Cell*, 1999, 96: 329-339.
- [7] Sugeno Y, Yoshimura A, Yamamoto H, et al. Smooth muscle calponin in mesangial cells: regulation of expression and a role in suppressing glomerulonephritis. *J Am Soc Nephrol*, 2002, 13: 322-331.
- [8] Takeoka M, Ehara T, Sagara J, et al. H1-calponin induced a flat tened morphology and suppressed the growth of fibrosarcoma HT1080 cells. *Eur J Cancer*, 2002, 38(3): 436-442.
- [9] Horiuchi A, Nikaido T, Taniguchi S, et al. Possible role of calponin h1 as a tumor suppressor in human uterine leiomyosarcoma. *J Natl Cancer Inst*, 1999, 91(9): 790-796.
- [10] Rossert J, De Crombrughe B. Type I collagen: structures, synthesis, and regulation. *Principles of Bone Biology*. Edited by J Bilezikian, L Raisz, G Rodan. San Diego, Academic Press, 1996: 127-142.
- [11] Ducy P, Karsenty G. Two distinct osteoblast-specific cis-acting elements control expression of a mouse osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*, 1995, 15: 1858-1869.
- [12] Rossert J, Eberspaecher H, de Crombrughe B. Separate cis-acting DNA elements of the mouse pro-alpha-1(I) collagen promoter direct expression of reporter genes to different type I collagen-producing cells in transgenic mice. *J Cell Biol*, 1995, 129: 1421-1432.

(收稿日期: 2008-10-09)