

心脏组织特异性表达 Neuregulin - 2 转基因小鼠的建立及心脏功能分析

路迎冬, 鲍 丹, 刘 宁, 张 旭, 马元武, 吕 丹, 张连峰

(中国医学科学院医学实验动物研究所, 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 神经调节蛋白 2(neuregulin - 2, NRG2)可促进神经系统发育,基因缺失表现早期生长延迟, NRG2 在心脏中也有表达,但其在心脏发育尤其是病理刺激时对心脏结构及功能的影响尚未见报道。本文目的是建立心脏组织特异性表达 NRG2 转基因小鼠,分析其在正常及压力负荷刺激时对心脏结构及功能的影响。**方法** 将人 NRG2 基因插入到心脏特异性启动子 α - MHC 下游,构建转基因表达载体,显微注射法建立 NRG2 转基因小鼠,PCR 鉴定转基因小鼠基因型,western blot 鉴定 NRG2 蛋白在心脏中的表达并筛选高表达的转基因品系,主动脉缩窄术(transverse aortic constriction, TAC)制备压力负荷诱导的心肌肥厚小鼠模型。利用超声影像分析和病理学观察小鼠心脏结构和功能改变。**结果** 建立了心脏组织特异性高表达 NRG2 转基因小鼠品系。与同窝阴性转基因小鼠相比,转基因小鼠左室舒张末期后壁厚度(LVPWD)明显增加,3 月龄时可达 15.6% ($P < 0.05$),经压力负荷刺激后,NRG2 转基因手术小鼠心室壁增厚程度显著下降,心室腔增大,同时心肌排列紊乱程度和纤维化程度明显比 NTG 手术小鼠严重。**结论** 在压力负荷下,转基因表达 NRG2 缩短了肥厚过程,同时加速了心衰进程。

【关键词】 NRG2; 转基因; 压力负荷; 心室重构

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 03-0078-05

doi: 10. 3969. j. issn. 1671. 7856. 2014. 003. 016

The establishment of cardiac-specific human Neuregulin-2 transgenic mice and cardiac function analysis

LU Ying-dong, BAO Dan, LIU Ning, ZHANG Xu, MA Yuan-wu, LV Dan, ZHANG Lian-feng

(Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences(CAMS) & Comparative Medicine Centre, Peking Union Medical College(PUMC), Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To study the effects of NRG2 on cardiac structure and function, we established the cardiac-specific human NRG2 transgenic mice and investigate the effect of NRG2 on cardiac structure and function under pressure overload situation. **Methods** The transgenic vector was constructed by insertion of the human NRG2 gene under the α - MHC promoter. The transgenic mice were generated by microinjection and were all maintained on a C57BL/6J genetic background. The genotype of transgenic mice was identified by PCR and the expression level of target gene was

【基金项目】 国家科技支撑计划课题(2012BA139B02)。

【作者简介】 路迎冬(1988 年 -),女,硕士生,研究方向:比较医学。E-mail: luyd@cnilas.org。

【通讯作者】 张连峰。E-mail: zhanglf@cnilas.org。

determined by western blot. Transverse aortic constriction (TAC) was applied to prepare the pressure overload induced cardiomyopathy mice model. The cardiac structure and function of the transgenic mice were compared and analyzed by echocardiographic and pathological observation. **Results** Transgenic mice with high level of NRG2 in heart tissues were established. The left ventricular wall thickness (LVPWD) was increased, and to 15.6% at 3 months old compared with that of the non transgenic (NTG) mice. The hypertrophy of left ventricular wall caused by pressure overload was removed due to the expression of NRG2. Meanwhile, cardiac disarray and fibrosis were increased obviously compared with that of the NTG mice. **Conclusion** The transgenic expression of NRG2 in heart tissues could shorten the pathological process of hypertrophy, but accelerated the process of heart failure (HF).

【Key words】 NRG2; Transgene; Pressure overload; Ventricular remodeling

神经调节蛋白(neuregulins, NRGs)是神经系统及心脏等器官介导细胞与细胞间相互作用的信号蛋白,属于表皮生长因子家族成员,参与细胞增殖,分化及细胞形态的形成^[1],NRGs 通常包括 6 个识别结构域,分别是 N 末端结构域,免疫球蛋白样结构域,糖基化富集间隔区,表皮生长因子(epidermal growth factor, EGF)样结构域,疏水跨膜结构域和羧基末端尾巴^[2]。NRGs 通过与酪氨酸激酶受体家族的 EGF 受体结合介导相应的生物学功能,包括 ErbB1, ErbB2, ErbB3, ErbB4 受体间通过形成同源或异源二聚体,使胞内酪氨酸激酶磷酸化,募集胞内各种磷酸酶发挥生物学作用^[3,4]。目前,已知 NRGs 包括 4 个成员,分别是 NRG1, NRG2, NRG3 及 NRG4。其中 NRG1 是 4 个成员中结构和功能研究的较为彻底的一个, NRG1 主要表达于心内膜及心肌微血管内皮细胞,与心肌细胞上的 ErbB 受体相互作用,在心肌细胞的发育、存活及维持成熟心肌细胞的功能方面发挥重要的作用^[5]。NRG4 的体外试验中证实胰腺中能够促进分泌生长激素抑制素细胞的分化,而 NRG3 的功能目前还不清楚^[5,6]。

NRG2 又称 NTAK (neural - and thymus - derived activator for the ErbB kinase), Don - 1 (divergent of neuregulin 1) 或 HRG2 (heregulin2), 与 NRG1 的同源性最高,能够直接激活 ErbB3 和 ErbB4,间接激活 ErbB2^[7],而 ErbB2 和 ErbB4 对于维持心脏的功能具有重要作用^[10],提示 NRG2 可能参与心脏组织发育。然而目前尚无关于 NRG2 在心脏发育及相关心脏疾病调控的研究报道,在本室前期研究中发现 NRG2 在心脏中表达,并且心肌病发生时,其表达会发生改变,提示其可能参与的心肌病发生发展。所以本研究特建立心脏组织特异性表达 NRG2 转基因小鼠,分析其在正常及压力负荷刺激下对心脏结构形态及功能的影响,以期分析

提供模型动物及理论依据。

1 材料和方法

1.1 NRG2 转基因载体构建及转基因小鼠模型的建立

以 pCMV6-XL5-h-NRG2 质粒 (OriGene, 美国, Clone ID NM_013983) 为模板,用 PCR 法扩增人 NRG2 全长 cDNA,上游引物为: 5'-CCCAAGCTTATGGCCTGGCCAGATGCG,下游引物为: 5'-CCGCTCGAGTCCTTAAAGATAGTGGGGCCG GC(上海英俊生物技术有限公司合成,中国)。反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 64℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 3 min, 30 个循环。扩增片段大小为 2559 bp。将扩增片段插入 PMD18T 载体,经测序比对正确后,以 *Hind*III 和 *Xho*I (宝生物工程有限公司,中国) 酶切回收 NRG2 片段,并插入到 α -MHC 启动子的下游构建心脏特异性表达的 NRG2 表达载体,再用 *Pvu*I (宝生物工程有限公司,中国) 将其线性化, Sephadex G50 柱纯化 DNA 片段,获得表达 NRG2 基因的转基因片段,注射前将转基因片段浓度调至 5 ng/ μ L,用显微注射法将线性化的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中(小鼠购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-001】),使用 ICR 小鼠作为假孕受体小鼠(购自北京维通利华实验动物有限公司【SCXK(京)2012-001】),制备转基因小鼠(TE2000U 显微注射仪)。实验在本研究所卫生部人类疾病比较医学重点实验室完成【SCXK(京)2013-002】。实验中涉及动物操作程序已经得到中国医学科学院医学实验动物研究所动物使用与管理委员会批准,批准号为 ILAS-GC-2012-001。

1.2 PCR 鉴定 NRG2 转基因小鼠基因型

转基因小鼠在出生 7 - 14 d 时,用剪脚趾标记法标记,收集剪下的组织,碱裂解法提取基因组

DNA^[11], PCR 法对首建鼠进行筛选。PCR 上游引物为: NRG2-S30 5'-ATGCTGCTCTTCGGTGTGT, 下游引物为: NRG2-A739 5'-CCGTCTGGCTCTTCATCTTC。PCR 反应体系 20 μ L。反应条件: 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min。扩增片段大小为 433 bp。

1.3 western blot 鉴定 NRG2 蛋白的表达

颈椎脱臼法牺牲小鼠, 提取 F₁ 代转基因阳性和转基因阴性 (non-transgenic, NTG) 小鼠心脏组织总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 取 20 μ g 蛋白经高温变性后, 进行 8% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳, 将蛋白转移至 NC 膜上 (Millipore, 美国), 用含有 5% 脱脂奶粉的 TBST (20 mmol/L Tris, 0.05% Tween, pH 7.6) 封闭 NC 膜, 用 NRG2 单克隆抗体 (1:1000 稀释, WH0009542M, sigma, 美国) 检测 NRG2 蛋白表达水平, 采用 HRP-偶联的羊抗鼠抗体 (1:10000 稀释, ZB-2305, 康成生物, 中国) 结合一抗。选用 HRP-偶联的 β -actin 单克隆抗体 (1:10000 稀释, KC-5A08, 中杉金桥, 中国) 作为内参。用 Image J 分析软件分析 western blot 条带灰度。

1.4 超声影像分析

小鼠经腹腔注射三溴乙醇 (18 mL/kg 体重) 麻醉, 脱胸前区被毛, 仰卧固定于加热板上, 以保持体温, 四肢固定, 选用 30Hz 的探头, 按住 Zhou YQ^[12] 报道的方法进行心脏超声影像分析 (Vevo770 小动物超声影像系统, 加拿大)。

1.5 压力负荷诱导的心肌肥厚小鼠模型建立

采用主动脉缩窄手术 (thoracic aorta constriction, TAC) 建立压力负荷诱导的心肌肥厚小鼠模型。小鼠经腹腔注射三溴乙醇麻醉、脱毛、仰卧位固定。气管插管连至呼吸机 (频率为 125 ~ 150 次/min) 进行部分开胸手术。利用 27G 平头针头于无名动脉 [innominate artery (IA)], 即头臂动脉干 (brachiocephalic trunk) 和左颈总动脉 (left common carotid artery, LCCA) 间动脉弓进行结扎, 获得理论直径为 0.4 mm 重建血管。假手术 (Sham) 小鼠动脉重建步骤外, 其余步骤与 TAC 手术小鼠相同^[13]。

1.6 病理观察

颈椎脱臼牺牲小鼠, 打开胸腔取出心脏, 将心脏组织固定在中性福尔马林中 24h。脱水, 石蜡包埋及切片, HE 和 Masson^[13] 染色后显微镜下观察

(Nikon 显微镜, 日本) 组织学变化。

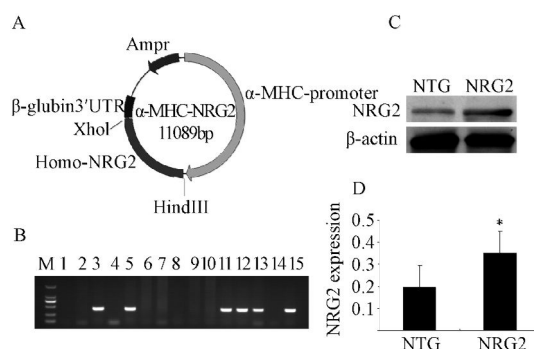
1.7 统计分析

实验数据以 Mean $\pm$ SD 表示, 用 Student's t-tests 或 one-way ANOVA 分析处理数据, $P < 0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

2.1 NRG2 转基因小鼠的建立

用 PCR 法克隆的 NRG2 基因, 测序结果表明克隆片段同已报道的 NRG2 序列完全一致 (Gene ID: 9542)。将人的 NRG2 基因插入到心脏特异表达的 α -MHC 启动子下游, 构建得到人 NRG2 转基因表达载体 (图 1A)。用显微注射法将线性化的转基因载体注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中, 转入到 ICR 假孕受体小鼠中, 出生的首建鼠与野生型小鼠交配获得子代转基因小鼠。提取小鼠基因组 DNA, 用 PCR 法扩增 NRG2 目的基因片段, 大小为 433 bp, 鉴定小鼠基因型 (如图 1B)。提取心脏组织总蛋白, 用 NRG2 单克隆抗体进行 western blot 分析, Image J 软件分析条带灰度, 对 western blot 结果进行定量, 结果显示转基因小鼠心脏组织 NRG2 的表达显著高于同龄阴性对照小鼠 (NTG) ($P < 0.05$) (图 1C 和 1D), 同时 NRG2 转基因小鼠可稳定传代。



注: M: DNA 分子量 Marker DL2000; A, α -MHC - NRG2 表达载体构建; B, PCR 鉴定 NRG2 转基因小鼠基因型; C, Western Blot 分析 NRG2 蛋白在转基因小鼠心脏组织中的表达, β -actin 为内参; D, 转基因小鼠心脏组织内 NRG2 蛋白表达量的定量分析。

图 1 α -MHC-NRG2 转基因小鼠模型的建立

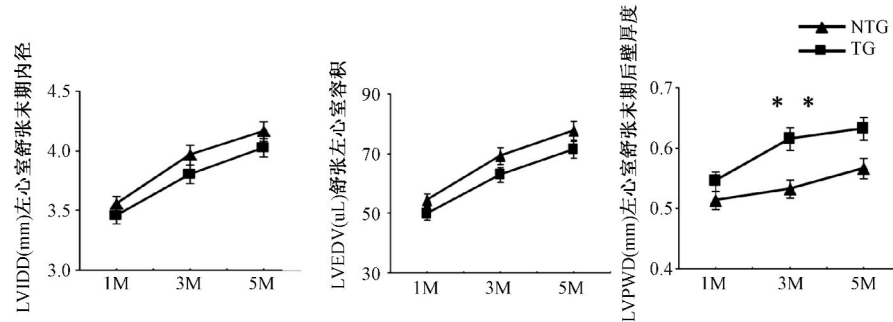
Note: M: DNA molecular weight marker DL2000; A, The construct of α -MHC-NRG2 expression vector. B, PCR to identify the genotype of NRG2 transgenic mouse. C, Western Blot to analysis the NRG2 expression level in heart tissue of transgenic mice, β -actin as internal reference. D, The quantitative analysis of the NRG2 protein level in heart tissue.

Fig.1 The establishment of α -MHC-NRG2 transgenic mice

2.2 NRG2 转基因小鼠心脏结构和功能分析

NRG2 转基因小鼠于 1、3 和 5 月龄进行心脏超声影像分析(图 2),与 NTG 小鼠相比,左心室舒张末期内径(left ventricular internal dimension at endiastole, LVIDD)在三个时间点变化均不明显;左

心室舒张末期后壁厚度(left ventricular posterior wall at endiastole, LVPWD)明显增加,3 月龄时可达 15.6% ($P < 0.05$),舒张期左心室容积变化也不明显(LV end-diastolic volume, LVEDV)有微弱的增加趋势。



注:“▲”代表同窝阴性小鼠(NTG);“■”代表 NRG2 转基因小鼠(TG)。

图 2 α-MHC-NRG2 转基因小鼠 1、3 和 5 月龄心脏超声表型分析

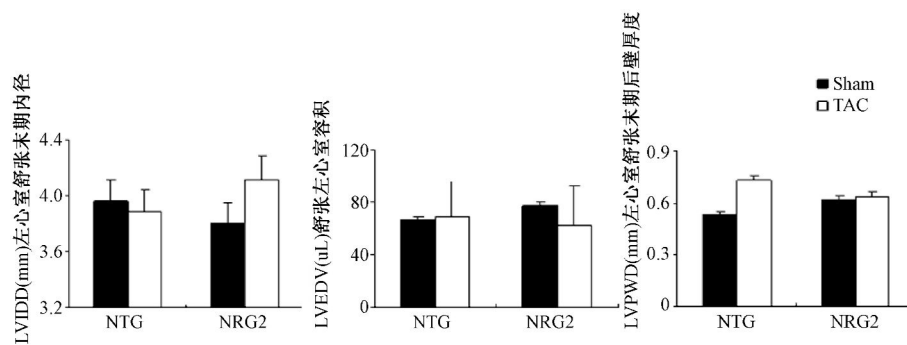
Note: M: month; “▲”: NTG; “■”: NRG2.

Fig. 2 The echocardiography analysis of α-MHC-NRG2 transgenic mice at 1, 3 and 5 months of age

2.3 压力负荷情况下 NRG2 转基因小鼠心脏结构和功能分析

对 2 月龄 NRG2 转基因和同窝阴性小鼠进行 TAC 手术处理,于术后 4 周对小鼠进行心脏超声影像分析(图 3)。与假手术组(Sham)小鼠相比,NTG 小鼠经过 TAC 手术处理后的 LVIDD 变化不明显。NTG 小鼠经过 TAC 手术处理后的 LVEDV 有微弱的

下降,而转基因小鼠经过 TAC 手术处理后的 LVEDV 增加 22.8%。NTG 小鼠经过 TAC 手术处理后的 LVPWD 增加明显,高达 37.0%,而 NRG2 转基因小鼠 LVPWD 仅增加 4.1%。说明转基因表达 NRG2 后,心脏在压力负荷下的肥厚过程被抑制,而是表现为左心室扩大的病理表型。



注:“■”代表假手术组(Sham);“□”代表 TAC 组。

图 3 α-MHC-NRG2 转基因小鼠 TAC 术后超声分析心脏表型和功能变化

Note:“■”: Sham;“□”: TAC.

Fig. 3 Morphology and function changes after TAC treatment by echocardiography analysis

2.4 压力负荷情况下 NRG2 转基因小鼠心肌组织学分析

为了确定压力负荷下转基因表达 NRG2 对心脏的肥厚抑制作用,是抵抗了肥厚过程,还是缩短了肥厚过程而加速了心衰进程,对 2 月龄 NRG2 转基因和同窝阴性小鼠进行 TAC 手术处理,于术后 4 周

时,对小鼠的心脏进行病理组织学观察,分析心肌结构形态与纤维化改变。结果显示,NRG2 转基因小鼠手术小鼠心室壁增厚程度显著下降,心室腔增大,同时心肌排列紊乱程度和纤维化程度明显比 NTG 小鼠严重,说明在压力负荷下,转基因表达 NRG2 缩短了肥厚过程,同时加速了心衰进程(封

底图 4)。

3 讨论

NRG2 与 NRG1 基因结构最为相似,其表皮生长因子样结构域即具有和 ErbB 受体相互作用的功能,它以不同程度的亲和力直接和 ErbB2、ErbB4 结合,而 ErbB2 和 ErbB4 促进神经系统发育及神经肌肉间的连接,对维持心脏的功能具有重要作用^[10]。NRG2 在成年大鼠中的表达主要分布于肝和肺以及脑组织中的小脑和嗅球;NRG2 在小鼠的整个神经系统的发育阶段都有表达,能够促进神经系统发育及神经肌肉间的连接,且在 9.5 d 小鼠胚胎中主要表达于心脏的心房结构^[3, 8-9]。NRG2 异构体种类多样,其中人的 NRG2 γ 和 β 具有抵抗血管生成的作用^[3],而 NRG2 敲除小鼠表现出早期生长发育迟缓,增加刚出生幼崽的死亡率的的情况。这些皆提示 NRG2 可能参与心脏病生理进程,然而目前尚无关于 NRG2 在心脏发育及相关心脏疾病调控的研究报道,所以本文建立了心脏组织特异性过表达 NRG2 转基因小鼠,研究其于心脏发育已心脏疾病调节中的生理作用^[7]。

与 NTG 小鼠相比,NRG2 转基因小鼠 LVPWD 增加,表明 NRG2 作为一种生长因子,具有促进心脏发育的作用。NTG 小鼠经过 TAC 手术处理后的 LVEDV 有微弱的下降,而转基因小鼠经过 TAC 手术处理后的 LVEDV 增加。NTG 小鼠经过 TAC 手术处理后的 LVPWD 增加明显,高达 37.0%,而 NRG2 转基因小鼠 LVIDD 仅增加 8.4%。说明转基因表达 NRG2,心脏在压力负荷下的肥厚过程被抑制,而是表现为左心室扩大的病理表型。本文利用的 TAC 重建小鼠模型是诱导心肌肥厚和心衰的常用方法^[13],其可模拟人类心血管疾病并可用于分析涉及心肌肥厚及心衰过程的相关研究工作,其原理是主动脉经结扎重建后,心脏左室负荷增加,心肌发生代偿性肥厚反应,小鼠最初形成心肌肥厚,但心脏很快失代偿,心室发生扩张并以时间依赖的方式逐渐发展为心衰,同时病理组织学改变与临床表现类似。

结合本文超声及病理组织学分析的结果,在压力负荷,NRG2 过表达可使小鼠心脏由代偿期更快进入失代偿期,转基因表达 NRG2 缩短了肥厚过程,同时加速了心衰进程。

参考文献:

[1] Yamada K, Ichino N, Nishii K, et al. Characterization of the

human NTAK gene structure and distribution of the isoforms for rat NTAK Mrna[J]. Gene, 2000. 255(1): 15-24.

- [2] Wen D, Peles E, Cupples R, et al. Neu differentiation factor: a transmembrane glycoprotein containing an EGF domain and an immunoglobulin homology unit[J]. Cell, 1992. 69(3): 559-572.
- [3] Nakano N, Higashiyama S, Ohmoto H, et al. The N-terminal region of NTAK/neuregulin-2 isoforms has an inhibitory activity on angiogenesis[J]. J Biol Chem, 2004. 279(12): 11465-11470.
- [4] Carraway KL, Cantley LC. A new acquaintance for erbB3 and erbB4: a role for receptor heterodimerization in growth signaling[J]. Cell, 1994. 78(1): 5-8.
- [5] Falls DL. Neuregulins: functions, forms, and signaling strategies[J]. Exp Cell Res, 2003. 284(1): 14-30.
- [6] Huotari MA, Miettinen PJ, Palgi J, et al. ErbB signaling regulates lineage determination of developing pancreatic islet cells in embryonic organ culture[J]. Endocrinology, 2002. 143(11): 4437-4446.
- [7] Britto JM, Lukehurst S, Weller R, et al. Generation and characterization of neuregulin-2-deficient mice[J]. Mol Cell Biol, 2004. 24(18): 8221-8226.
- [8] Longart M, Liu Y, Karavanova I, et al. Neuregulin-2 is developmentally regulated and targeted to dendrites of central neurons[J]. Journal of Comparative Neurology, 2004. 472(2): 156-172.
- [9] Rimer M, Cohen I, Lomo T, et al. Neuregulins and erbB receptors at neuromuscular junctions and at agrin-induced postsynaptic-like apparatus in skeletal muscle[J]. Molecular and Cellular Neuroscience, 1998. 12(1): 1-15.
- [10] Galindo CL, Ryzhov S, Sawyer DB. Neuregulin as a Heart Failure Therapy and Mediator of Reverse Remodeling[J]. Current heart failure reports, 2013; 1-10.
- [11] Birnboim HC. A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA[J]. Methods Enzymol, 1983. 100: 243-255.
- [12] Whitesall SE, Hoff J, Vollmer AP, et al. Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods[J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2004. 286(6): H2408-H2415.
- [13] 吕丹,鲍丹,董伟,等. 主动脉缩窄术模型小鼠成模早期评价技术. 中国实验动物学报[J]. 2013. 21(4): 21-25
- [14] Zhang W, Lv D, Dong W, et al. Expression of CYP2E1 increases oxidative stress and induces apoptosis of cardiomyocytes in transgenic mice[J]. FEBS Journal, 2011. 278(9): 1484-1492.

[修回日期]2014-02-20