

SV40 TAg 转基因小鼠模型的建立及其表达

匡颖 梁斌 麻孙恺 王珏 费俭 王铸钢 毛积芳*

(上海南方模式生物研究中心, 上海 201203)

摘要 为了建立中枢神经系统肿瘤小鼠模型, 构建了大鼠神经元特异性烯醇化酶(rat neuron-specific enolase, NSE)基因启动子调控下的猿猴病毒 40 大 T 抗原基因(simian virus 40 large T antigen gene, SV40 TAg)转基因载体, 通过受精卵雄原核显微注射的方法制备转基因小鼠。PCR 鉴定转基因小鼠的基因型; RT-PCR 和 Northern 印迹检测转基因阳性鼠中 SV40 TAg RNA 水平的表达及其组织特异性; 免疫组化检测其蛋白质水平的表达。经显微注射共获得 9 只首代转基因阳性鼠(首建者, Founder 小鼠), 其中 2 例出生时即发生神经干细胞来源的肿瘤, 其他 Founder 小鼠经繁育后共建立了 5 个 SV40 TAg 转基因小鼠系, 其中有 4 个系检测到 SV40 TAg RNA 水平的表达且特异性地表达于脑组织, 但未检测到蛋白质水平的表达。研究表明 NSE 启动子活性具有较强的组织特异性, 并起始于小鼠胚胎发育期; SV40 TAg 具有明显的致癌作用, 且 SV40 TAg 诱发的神经系统肿瘤易造成转基因小鼠早期死亡。

关键词 猿猴病毒 40 大 T 抗原基因; 大鼠神经元特异性烯醇化酶基因启动子; 转基因小鼠; 神经系统肿瘤

20 世纪早期开始的小鼠近交系研究主要用于肿瘤小鼠模型的产生。近交系实验清楚地表明小鼠恶性肿瘤易感性受遗传背景的影响, 表现为孟德尔遗传规律的特点。根据“癌变”的二次突变理论^[1], 可以认为许多遗传性肿瘤易感综合征是抑癌基因或癌基因突变的结果, 不同的基因诱变因素(包括: 黄曲霉素、环戊烷苯并芘、放射性辐射等理化诱变剂)产生不同类型的肿瘤小鼠, 且肿瘤的产生很大程度上取决于小鼠本身肿瘤抑制基因诱变的结果。随着基因工程技术的日臻完善, 转基因和基因剔除技术的日渐成熟, 通过基因修饰技术获得人类肿瘤或肿瘤易感小鼠模型已被各国学者普遍接受。与理化诱变剂相比, 此类技术制备的人类肿瘤小鼠模型的显著特点是, 模型小鼠的遗传背景单一, 突变效应不参杂其他体细胞突变的影响; 该肿瘤小鼠的表型可通过生殖系传递; 采用条件性(时空性或组织特异性诱导)基因表达调控组件的转基因或基因剔除技术建立的人类肿瘤小鼠模型可以对不同生长期、不同组织器官内肿瘤的发生过程进行观察, 有助于肿瘤发生机制的研究, 同时可用于常用理化诱变剂难以诱导的肿瘤小鼠模型(如神经系统)的建立。

根据建立神经系统恶性肿瘤小鼠模型的实际需要, 本文采用转基因技术制备肿瘤小鼠模型, 转基

因载体中致癌基因采用猿猴病毒 40 大 T 抗原基因(simian virus 40 large T antigen gene, SV40 TAg), 其上游构建了具有神经组织特异调控活性的大鼠神经元特异烯醇化酶(rat neuron-specific enolase, NSE)基因启动子。对首代转基因阳性的小鼠(首建者, Founder 小鼠)及其后代的基因型、表型, 以及 SV40 TAg 的组织表达特异性进行了鉴定, 并对该技术制备肿瘤小鼠模型的展望进行了描述和讨论。

1 材料与方法

1.1 材料

质粒 pMX1-SV40 TAg-Neo(含 SV40 TAg 基因)由第四军医大学口腔医院朱庆林博士提供; 质粒 pTet-on-NSE(含大鼠神经元烯醇化酶基因启动子)由中科院上海生物化学与细胞生物学研究所蔡友庆博士提供; pGL3-Basic、pBluescript-SK 以及 DH5 α 细菌株由本中心保存。杂交一代小鼠(CBA \times C57BL/6J)、C57BL/6J 小鼠以及转基因小鼠由本中心动物房繁育。QIAquick Gel Extraction Kit 为 Qiagen 公司

收稿日期: 2006-04-05 接受日期: 2006-08-16

国家自然科学基金资助项目(No.30471948)

* 通讯作者。Tel: 021-58961006, Fax: 021-58951005, E-mail:

jifang@hotmail.com

产品。*Bam*HI、*Nhe*I、*Sma*I、*Kpn*I、*Xba*I 等限制性内切酶、T4 DNA 连接酶和 RT-PCR Kit 均为 TaKaRa 公司产品。其他化学试剂为 Sigma 产品或国产分析纯产品。SABC 免疫组化试剂盒及 DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司,小鼠抗 SV40 TAg 单克隆抗体(PAb100)购自美国 BD 公司。

1.2 SV40 TAg 真核表达载体的构建

*Bam*HI 酶切 pMX1-SV40 TAg-Neo 质粒 DNA, 并回收 2.1 kb 的 SV40 TAg 基因全长 cDNA 片段, 将其克隆于 pBluescript SK 质粒的 *Bam*HI 位点, 形成 pBluescript SK- SV40 TAg, 经 DNA 序列测定证实插入片段方向、序列正确(Accession AJ276576)。*Sma*I 和 *Xba*I 双酶切 pBluescript SK- SV40 TAg, 回收 2.1 kb SV40 TAg cDNA 片段, 并用以取代 pGL3-Basic 的 *Sma*I 和 *Xba*I 位点间的荧光素酶 cDNA 片段, 形成 pGL3-SV40 TAg 质粒载体, *Kpn*I 和 *Nhe*I 双酶切 pTet-on-NSE, 回收 1.7 kb NSE 启动子片段, 并将其克隆于 pGL3-SV40 TAg 的 *Kpn*I 和 *Nhe*I 位点形成 pGL3-NSE-SV40 TAg 真核表达载体。*Apa*LI 和 *Kpn*I 线性化 pGL3-NSE-SV40 TAg, QIAquick Gel Extraction Kit 回收并纯化 5 kb 的片段用于显微注射。

1.3 转基因操作

转基因小鼠是通过受精卵雄原核显微注射的方法制备的, 受精卵取自超排的雌性杂交一代(CBA× C57BL/6J)小鼠, DNA 浓度 5 ng/μl, 注射后的受精卵植入 0.5 天假孕母鼠的输卵管中, 每只假孕鼠单侧输卵管移植 25 枚受精卵。移植后母鼠饲养于本中心 SPF 级动物房。

1.4 小鼠基因组 DNA 的提取

仔鼠在 3 周龄时(或根据文章中所特定的时间点)剪取鼠尾 0.5 cm, 加 500 μl 裂解液及 50 μl 蛋白酶 K (10 mg/ml), 56 °C 消化过夜。离心取上清液, 无水乙醇沉淀, 70% 乙醇洗涤, 稍晾干后溶解于 200 μl 纯水中。

1.5 PCR 鉴定转基因阳性鼠

经 DNA Star 软件分析, 选取下列引物对用于转基因阳性鼠鉴定。引物 a: 5'-AAAAAAGCGGG-TTGATAGCCTACAA-3', 引物 b: 5'-ACTCCCCT-CCAGTGCCCTTTACAT-3', 反应条件: 94 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 30 s, 35 个循环, 应扩增出 265 bp 的

条带。

1.6 RT-PCR 和 Northern 印迹检测转基因阳性小鼠 SV40 TAg 的表达

取稳定传代的 F1 代杂合子成年雄性小鼠脑、肝脏、心脏、脾脏、肾脏组织和野生型小鼠脑组织, 按 Trizol 试剂(Invitrogen)说明书提取组织总 RNA, RQ1 DNase (Promega)处理后, 取 1 μg 按 RNA PCR Kit (TaKaRa)说明书进行反转录随机引物引导的 cDNA 第一链合成, 随后用上述引物对(a、b)进行 PCR 检测。

各取 35 μg 上述各组织样品 RNA, 0.8% 戊二醛琼脂糖变性胶电泳分离, 转移至尼龙膜(S&R 产品), 紫外交联后, 与 ³²P 标记的 SV40 TAg cDNA 探针进行杂交, X 胶片于 -80 °C 放射自显影。

1.7 转基因载瘤小鼠的病理检测

取载瘤小鼠的肿瘤组织, 10% 中性甲醛固定过夜, 常规方法进行石蜡包埋、组织切片(5 μm), HE 染色后显微镜下观察。

1.8 转基因小鼠的免疫组化分析

取转基因小鼠的肿瘤组织或脑组织, 常规方法进行组织固定、包埋、切片。5 μm 的石蜡切片经脱蜡至水, 3% 过氧化氢灭活内源性酶, 热修复抗原, 一抗(1:200 稀释)、二抗、SABC 温育后, DAB 显色, 苏木精轻度复染, 常规脱水、透明、封片, 显微镜下观察。

2 结果

2.1 转基因载体的构建

转基因载体的结构如图 1, 经限制性内切酶酶切鉴定和 DNA 序列测定(资料未显)证明构件结构正确, 其中 SV40 TAg 结构置于 NSE 启动子结构的下游。

2.2 转基因 Founder 小鼠的产生和载瘤小鼠的鉴定

如表 1, 在 pGL3-NSE-SV40 TAg 转基因小鼠制备过程中, 显微注射后共获得 449 枚成活的受精卵, 分别移植到 19 只假孕母鼠体内, 其中 14 只怀孕, 怀孕率为 74%; 出生仔鼠 50 只, 产仔率为 11%, 在我中心 2004 年所制备的 12 种转基因小鼠中, 产仔率平均为 20.31% (内部资料), 由此分析

表 1 pGL3-NSE-SV40 TAg 转基因小鼠的制备

注射后成活受精卵	受体母鼠	受孕鼠	怀孕率	出生鼠	阳性鼠	发病鼠
449 个	19 个	14 个	74%	50 个	9 个	2 个

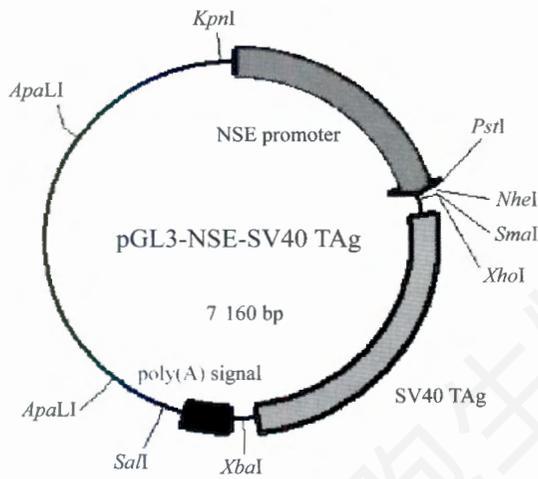


图1 pGL3-NSE-SV40 TAg 质粒的构建

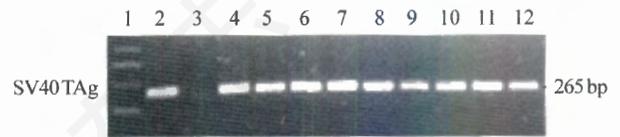


图2 pGL3-NSE-SV40 TAg 转基因阳性鼠的PCR 鉴定
1: marker; 2: 质粒 DNA; 3: 阴性对照; 4: NT1; 5: NT2; 6: NT9; 7: NT12; 8: NT14; 9: NT15; 10: NT24; 11: NT29; 12: NT45。

并不排除存在胚胎期肿瘤导致流产的可能性。以 PCR 方法鉴定仔鼠的鼠尾 DNA, 共获得 9 只 pGL3-NSE-SV40 TAg Founder 小鼠(图 2), 记为 NT1、NT2、NT9、NT12、NT14、NT15、NT24、NT29、NT45。

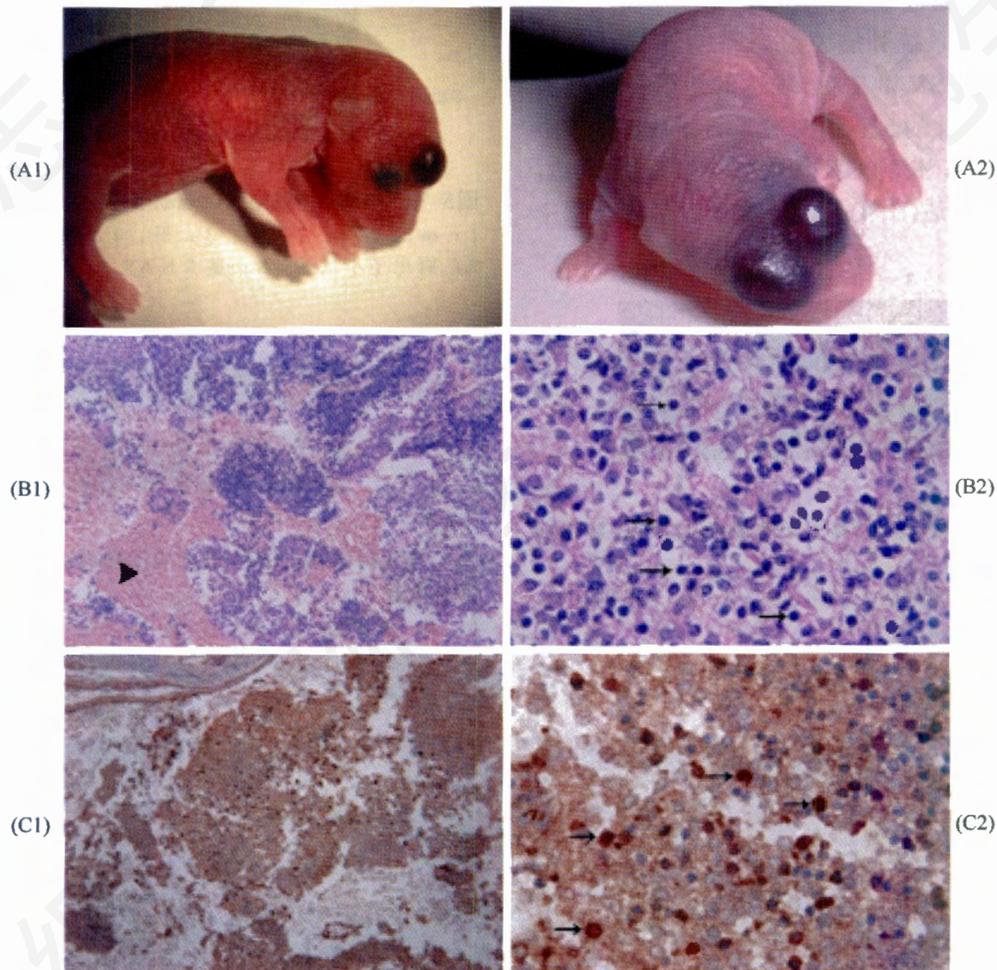


图3 pGL3-NSE-SV40 TAg 转基因恶性肿瘤小鼠及其病理检查

A1: NT1 Founder 小鼠表型; A2: NT2 Founder 小鼠表型; B1: NT2 Founder 小鼠的肿瘤组织切片(400 \times); B2: NT2 Founder 小鼠的肿瘤组织切片(1 000 \times); C1: NT2 Founder 小鼠的免疫组化染色(400 \times); C2: NT2 Founder 小鼠的免疫组化染色(1 000 \times)。B1 箭头所指为大量的红细胞浸润; B2 箭头所指为核着色深、核质比例大的肿瘤细胞; C2 箭头所指为免疫组化阳性的肿瘤细胞。

其中 NT1、NT2 二只 Founder 小鼠具有明显的眼部和头颅肿瘤表型, 分别于出生 2、3 天后夭折, NT1 Founder 小鼠的肿瘤长在头部两眼中间(图 3A1), 肿瘤与颅内脑组织相连。NT2 Founder 小鼠的两个肿瘤均长在眼部(图 3A2), 肿瘤组织也与颅内脑组织相连。尸检结合组织切片检查发现, 患鼠的肝、肺、肾等脏器无肿瘤病灶。肿瘤组织切片显示局部出现大量体积小、细胞核形状不规则、核着色深、核/质比例大的肿瘤细胞(图 3B2 箭头所指), 并伴有大量红细胞浸润和组织坏死(图 3B1 箭头所指), 为“原始神经干细胞来源恶性肿瘤”表型, 免疫组化分析显示, 部分肿瘤细胞的细胞核中有 SV40 TAg 的表达(棕色颗粒)(图 3C1、图 3C2 箭头所指)。

其余的 Founder 小鼠与野生型的 C57BL/6J 交配、繁育、建系, NT9、NT12、NT24、NT29、NT45 五只 Founder 小鼠成功建系, 这些小鼠及其后代无明显的神经系统肿瘤表型。

2.3 转基因小鼠 SV40 TAg 表达的组织特异性

提取稳定传代的 5 个系 F1 代杂合子成年雄性小鼠脑的组织 RNA, RT-PCR 检测 SV40 TAg 的表达, 只有 NT9 系不表达(图 4)。为了检测转基因小鼠中

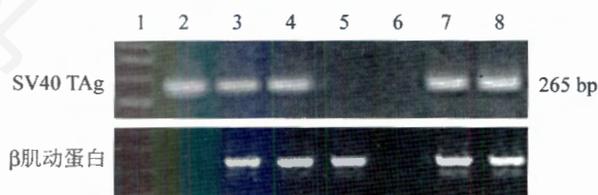


图4 pGL3-NSE-SV40 TAg转基因阳性鼠脑组织中SV40 TAg表达的RT-PCR检测

1: marker; 2: 质粒 DNA; 3: NT24; 4: NT29; 5: NT9; 6: 阴性对照; 7: NT12; 8: NT45。

SV40 TAg 表达的组织特异性, 取 NT45 系的成年雄性小鼠脑、心、肝、脾、肾组织 RNA 进行 RT-PCR 和 Northern 印迹检测, 结果表明 SV40 TAg 主要在脑组织转录(图 5、图 6), NSE 启动子活性具有神经系统表达的组织特异性。

2.4 转基因小鼠脑中 SV40 TAg 表达的免疫组化检测

取 NT12、NT24、NT29、NT45 四个系的雄性杂合子小鼠及野生型 F1 代雄性小鼠的脑组织, 免疫组化分析显示, 四个转基因小鼠系的脑组织中均未见 SV40 TAg 的表达。如图 7 所示, NT45 系小鼠与野生型小鼠脑组织中均未检测到 SV40 TAg 的表

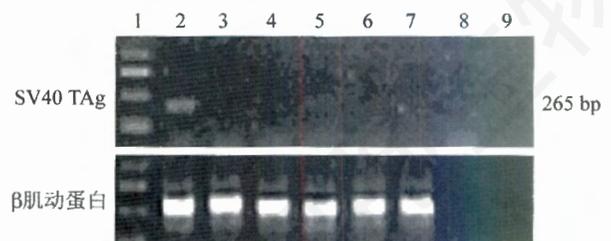


图5 NT45系阳性鼠中NSE启动子组织特异性的RT-PCR检测

1: marker; 2: 脑; 3: 肝; 4: 肾; 5: 心; 6: 脾; 7: 野生型小鼠脑; 8: 脑 RNA; 9: 阴性对照。

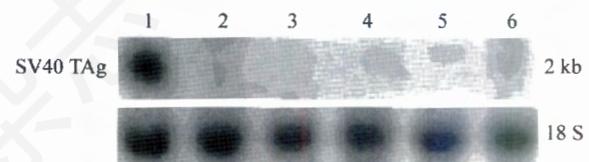


图6 NT45系阳性鼠中NSE启动子组织特异性的Northern印迹检测

1: 脑; 2: 心; 3: 肝; 4: 脾; 5: 肾; 6: 野生型小鼠脑。

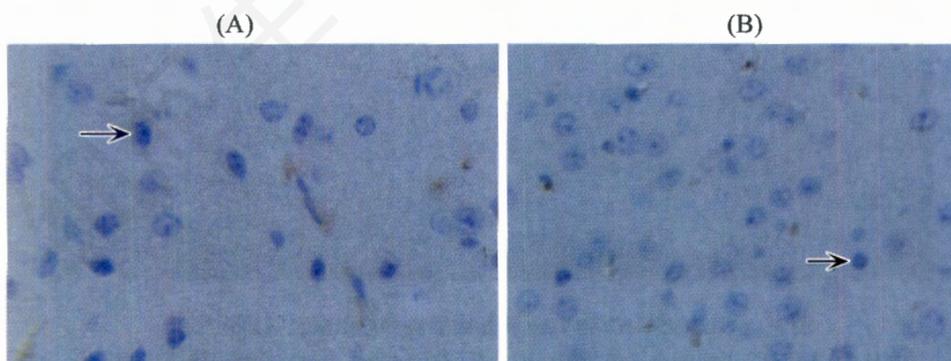


图7 转基因阳性鼠脑组织中 SV40 TAg 表达的免疫组化检测

A: 野生型 F1 代雄性小鼠脑组织; B: NT45 系雌性小鼠脑组织。箭头所指为脑细胞的细胞核, 但免疫组化为阴性。

达, 其他三个转基因系中也未检测到(资料未列出)。

3 讨论

目前, 研究中所需的脑肿瘤小鼠模型主要是通过甲基胆蒽等化学致癌剂埋于皮层, 或用肿瘤移植的方法获得的。SV40 是一种多瘤病毒, 体外研究发现, 它可使人及动物多种组织类型的正常细胞发生恶性转化, SV40 TAg 已成为公认的癌基因, 国际上利用SV40 TAg基因与具有不同组织表达特异性的启动子相结合, 已成功制备了前列腺^[2]、卵巢^[3]、乳腺、膀胱、肺^[4]、肾、肝、脑、胃等组织的各种肿瘤小鼠模型。SV40 TAg 转基因小鼠能自发地产生脑神经瘤^[5], 原发性外胚层肿瘤如视网膜母细胞瘤和肾上腺嗜铬细胞瘤^[6], 垂体瘤和甲状腺瘤^[7]。国内章翔等报道, 人脑胶质细胞瘤中 SV40 TAg 的免疫组化、Western 印迹均呈现阳性^[8,9], 而且SV40 TAg的致癌作用与它的表达产物和抑癌蛋白 p53、pRb 形成特异性复合物使后者抑癌活性丧失, 以及反式激活细胞癌基因异常表达和破坏细胞基因组结构与稳定性等有关^[9]。1987 年至 1997 年间 Sakimura 等^[10]和 Oliva 等^[11]报道了 NSE 基因的结构, 其后的研究证实 NSE 启动子具有神经元组织特异活性^[12,13]。为建立一种神经组织肿瘤小鼠模型, 本研究构建了 NSE 启动子调控的 SV40 TAg 转基因载体。在已有的 SV40 TAg 神经系统肿瘤转基因小鼠模型中所采用的主要有金属硫蛋白(metallothionein, MT)^[5]、大鼠酪氨酸羟化酶(rat tyrosine hydroxylase, rTH)^[14]、人的黄体生成素 β 亚基(human luteinizing hormone β subunit, hLH β)^[15]、人的苯基乙醇胺-N-甲基转移酶(human phenylethanolamine N-methyltransferase, hPNMT)^[16]等基因的启动子。我们的研究结果得到以下启示: ① SV40 TAg 在其转基因小鼠中具有明显的致癌作用; ②与文献报道相似^[11,12], NSE 启动子具有神经组织特异性促进下游基因表达的活性; ③ NSE 启动子活性起始于小鼠胚胎发育期^[13], 由此诱发的致癌基因 SV40 TAg 的神经系

瘤易造成转基因小鼠早期死亡, 因此制备具有条件性即可诱导的神经组织特异性调控构件调控的致癌基因的转基因小鼠, 将有助于获得本研究预期的传代肿瘤小鼠模型, 这将是我们的下一步的主要研究方向。

经培育和繁殖, 本研究已建立 SV40 TAg 转基因小鼠系, 尽管 RT-PCR 和 Northern 印迹可证实四个系小鼠的脑组织具有 SV40 TAg RNA 水平的表达, 但是并未检测到蛋白质水平的表达, 也未见自发性神经组织肿瘤的发生, 其原因并不十分清楚。推测与以下因素有关: ① SV40 TAg 表达量不足或不表达。一般来说, 转基因小鼠外源基因的表达受多种因素的影响, 其中包括外源基因整合位点、整合拷贝数等, 不同系转基因小鼠中这些参数不同, 常易造成外源基因体内表达量的不同。②体内某些防御机制的建立以抵抗 SV40 TAg 的成瘤作用。尽管如此, 我们认为该类转基因小鼠仍具有潜在的遗传性致癌倾向, 为此下一步我们打算运用致癌剂体内诱导以观察该类转基因小鼠是否为肿瘤易感性小鼠。

感谢本中心徐国江、王龙老师等对本研究的帮助。感谢第二军医大学东方肝胆医院病理科王一老师对小鼠病理检查的帮助。

参考文献 (References)

- [1] Knudson AG Jr. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1971, **68**: 820
- [2] Greenberg NM et al. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, **92**: 3439
- [3] Garson K et al. *J Soc Gynecol Investig*, 2003, **10**: 244
- [4] Chailley-Heu B et al. *J Pathol*, 2001, **195**: 482
- [5] Brinster RL et al. *Cell*, 1984, **37**: 367
- [6] Fung KM et al. *Lab Invest*, 1994, **70**: 114
- [7] Bosse P et al. *Oncogene*, 1997, **14**: 2661
- [8] 步星耀等. *中华神经外科疾病研究杂志*, 2002, **1**: 54
- [9] 甄海宁等. *中华实验和临床病毒学杂志*, 2001, **15**: 73
- [10] Sakimura K et al. *Gene*, 1987, **60**: 103
- [11] Oliva D et al. *Genomics*, 1991, **10**: 157
- [12] Chen J et al. *Mol Pharmacol*, 1998, **54**: 495
- [13] Cinato E et al. *Genesis*, 2001, **31**: 118
- [14] Suri C et al. *J Neurosci*, 1993, **13**: 1280
- [15] Windle JJ et al. *Nature*, 1990, **343**: 665
- [16] Hammang JP et al. *Neuron*, 1990, **4**: 775

Generation of Simian Virus 40 Large T Antigen Gene Transgenic Mice and Its Expression

Ying Kuang, Bin Liang, Sun-Kai Ma, Jue Wang, Jian Fei, Zhu-Gang Wang, Ji-Fang Mao*

(Shanghai Research Center of Biomodel Organism, Shanghai 201203, China)

Abstract To create a genetic mouse model with neuronal tumor, the transgenic vector containing simian virus 40 large t antigen gene (SV40 TAg) regulated by rat neuron-specific enolase (NSE) promoter was constructed and micro-injected into the male pronuclei of fertilized eggs from F1 hybrid mice (C57BL/6J×CBA). Transgenic mice were identified by PCR analysis on genomic DNA from mouse tail, SV40 TAg transcripts were detected by RT-PCR and Northern Blot. After microinjection, 9 founder mice carrying SV40 TAg gene were obtained. Two of them were died caused by nervous system tumor at day 2 and day 3 postnatally, which were further identified by histological brain section. The survivable founder mice were backcrossed to C57BL/6J mice and 5 transgenic mouse lines were successfully established. The SV40 TAg transcripts were detected in 4 of 5 transgenic mouse lines and were only detected in the brain tissue by RT-PCR and Northern blot analysis. The results in this paper indicated that the SV40 TAg gene as an oncogene has the potency for tumorigenesis; The NSE promoter directly enhanced the expression of SV40 TAg gene specially in nervous systematic tissue; The activity of NSE promoter is initiated at mouse embryonic stage, therefore, the SV40 TAg transgenic mouse lethality suffered from nervous system tumor is often occurred at mouse embryonic or early development phase. Our research is benefit to further exploit a new mouse model with nervous system tumor.

Key words simian virus 40 large T antigen gene; rat neuron specific enolase promoter; transgenic mouse; nervous system tumor

Received: April 5, 2006 Accepted: August 16, 2006

This work supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30471948)

*Corresponding author. Tel: 86-21-58951006, Fax: 86-21-58951005, E-mail: jifang@hotmail.com