技术与方法

利用CRISPR/Cas9技术构建CreERT2定点敲入Isl1 基因小鼠模型及分析

周云鹤^{1,2} 顾晓雯¹ 杨 桦¹ 黄丹丹¹ 费 俭^{1,3*} (¹同济大学生命科学与技术学院,上海 200092; ²同济大学体育教学部,上海 200092; ³上海南方模式生物研究中心,上海 200092)

摘要 心肌祖细胞增殖和分化是心脏损伤后修复再生的基础,而Isl1被认为是心肌祖细胞的特 异性标志。为了研究以及示踪Isl1⁺心肌祖细胞及其分化后代,该文尝试利用成簇规律间隔短回文重复 序列CRISPR/Cas9系统,将CreERT2定点插入到小鼠Isl1内源基因启动子之后,建立了CreERT2基因敲入 小鼠模型。通过与Rosa26-loxP-neo-loxP-lacZ小鼠(Rosa26-lacZ⁺)交配,获得Isl1-CreERT(KI)/Rosa26-lacZ⁺ 双杂合小鼠。经过基因型鉴定、组织表达谱测定和X-gal染色、冰冻切片和石蜡切片等方法,确认基 因敲入小鼠的CreERT2表达在成年小鼠心脏窦房结、心脏神经节、主动脉弓和肺动脉根部,与文献报 道的Isl1表达部位相同。该研究建立的模型可为研究心肌祖细胞的增殖和谱系示踪提供重要的模型。 关键词 CRISPR/Cas9;心肌祖细胞; Isl1基因; 小鼠模型

Construction and Analysis of *CreERT2* Knock-in Mouse for Genetic Labling of Isl1⁺ Cardiac Progenitor Cells by CRISPR/Cas9 Technology

Zhou Yunhe^{1,2}, Gu Xiaowen¹, Yang Hua¹, Huang Dandan¹, Fei Jian^{1,3*}

(¹School of Life Sciences and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China; ²Department of Physical Education, Tongji University, Shanghai 200092, China; ³Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 200092, China)

Abstract Cardiomyocytes in adult mammals retain a limited ability to proliferate in response to specific stimuli, but little is known about the origin of proliferating cells. LIM-homeodomain transcription factor islet-1(Isl1)-expressing cells are used to study the optimal endogenous progenitor cells in cardiac regeneration. Using the CRISPR/Cas9 genomic editing technology, we constructed Isl1-CreERT2 knock-in mouse model which harboringan *CreERT2* cassette down steam of the *Isl1* promoter. We crossed Isl1-CreERT2 males with Rosa26-loxP-neo-loxP-LacZ transgenic reporter mice (Rosa26-lacZ⁺) and analyzed Isl1⁺ positive cells by X-Gal staining. The results showed that Tamoxifen-Inducible Cre/loxP recombination, as depicted by blue cells, existed in heart sinoatrial node, cardiac ganglia, the aortic arch and pulmonary roots in adult mice. Isl1 expression profile was corresponding with previous research. By this work, we established Isl1-CreERT2 knock-in mouse model successfully, and the model provides a useful tool for tracing cardiac progenitor cells in cardiac regeneration. This study will be helpful

收稿日期: 2015-05-29 接受日期: 2015-09-14

*Corresponding author. Tel: +86-21-65985591, E-mail: jfei@tongji.edu.cn

国家自然科学基金(批准号: 31401019)、中央高校基本科研业务费专项资金(批准号: 1430219032)和上海市科委项目基金(批准号: 13DZ2293700)资助的课题 *通讯作者。Tel: 021-65985591, E-mail: jfei@tongji.edu.cn

Received: May 29, 2015 Accepted: September 14, 2015

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.31401019), the Fundamental Research Funds for the Central Universities (Grant No.1430219032) and the Fund of Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (Grant No.13DZ2293700)

网络出版时间: 2015-10-21 16:26:12 URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20151021.1626.010.html

for understanding and treating cardiovascular diseases, clinical medicine and sports rehabilitation medicine.

Keywords CRISPR/Cas9; cardiac progenitor cells; *Isl1* gene; mouse models

心血管疾病是威胁人类健康最严重的疾病之 一^[1]。心肌细胞损失及再生不足可导致心功能不全、 心律失常和心脏衰竭等^[2]严重心脏疾病,而心肌细 胞的修复和补充对于心肌损伤后心脏功能的恢复 具有重要意义。成体心肌祖细胞(cardiac progenitor cells, CPCs)被认为是心肌细胞更新的来源之一,因 此,心肌祖细胞的更新、分化和有效动员已成为近 年来研究的热点。

CPCs标记物是心肌祖细胞分类的标志,目前 已发现有多种CPCs标志物,主要分为3类:Nkx2.5^{+/} c-kit⁺ CPCs、Isl1⁺ CPCs以及Wt-1⁺/T-box⁺心外膜 祖细胞(epicardial progenitor cells, EPCs)。其中, Nkx2.5^{+/}c-kit⁺ CPCs的细胞成分复杂⁽³⁾,很难获得 纯化细胞。Wt-1⁺/T-box⁺目前只能分化为心肌细胞 和血管平滑肌细胞^[4],Isl1⁺细胞是目前研究最多的 CPCs,具有定向分化为心肌细胞系、内皮细胞系和 平滑肌细胞系的潜能^[5]。

LIM同源结构域转录因子1(insulin transcription factor1, Isl1)基因最早由Karlsson等^[6]在大鼠中发现 并克隆, 隶属于转录因子LIM同源盒基因家族Islet 亚家族。Isll基因有6个外显子,编码349个氨基酸。 Isl1蛋白具有高度保守的3部分结构域,包括2个串联 的LIM结构域和1个LIM同源域。我们前期的研究表 明, Isl1协同多个基因共同调节心脏发育^[7], 如Isl1直 接调控目的基因Mef2c,影响心肌细胞的肥大^[8];而 Isll与GATA4及Nkx2.5的协同作用则对心肌细胞的 增殖具有积极作用^[9]。Isl1缺失会导致心脏诸多缺 陷,产生异常心脏结构,导致胚胎早期致死(E10.5)。 Isl1⁺细胞在胚胎发育期、出生后直到成年都存在^[10], 其在心脏中的表达呈现不对称且随着心脏发育成熟 表达逐渐下调^[11]。在E14.5时, Isll在流出道、部分 心房、心脏神经节、窦房结及房室结等处有持续表 达^[12]。Cai等^[13]检测到E8.5至E10.25小鼠心室大部分 细胞都有表达,这提示, Isl1+祖细胞可能是两类生心 区的共同祖细胞,但这还需进一步研究。

成簇规律间隔短回文重复序列系统(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, associated RNA guided endonuclease Cas, CRISPR/Cas)是细菌或古细菌在长期演化过程中形成的抵御

外来遗传物质的一种获得性免疫防御机制^[14]。其中, II型CRISPR/Cas系统结构最为简单,可由向导RNA 引导单一的Cas9蛋白特异性地切割目的DNA^[15]。利 用CRISPR/Cas9基因编辑系统的优势,结合现有转 基因动物技术,可以大幅度提高各种基因修饰动物 的获得效率,缩短获得的时间,从而快捷有效地研究 基因功能^[16];同时,可建立包括灵长类疾病模型在内 的多种动物疾病模型,促进生物和医学的发展。

为了研究以及示踪Isl1⁺心肌祖细胞及其分化 后代,本文尝试利用CRISPR/Cas9系统,将受他莫昔 芬调控的CreERT2基因定点插入到小鼠Isl1基因启 动子下游,使得CreERT2的表达受控于Isl1基因启动 子。该基因敲入小鼠可用于研究和示踪Isl1基因表 达的心肌祖细胞的增殖和分化,也可以用于在心肌 祖细胞中采用条件性基因敲除策略研究小鼠的基因 功能。

1 材料与方法 1.1 材料

1.1.1 试剂和实验仪器 各种限制性内切酶、T4 DNA连接酶、Taq酶及PCR相关试剂购自TaKaRa公 司, 胶回收试剂盒、质粒抽提试剂盒购于Qiagen公 司, TRizol Reagent、体外转录试剂盒购自Invitrogen 公司, 2×Taq PCR MasterMix、Quantscript RT Kit购 自Tiangen公司, Trans2K Plus DNA Marker购自北 京全氏金生物技术有限公司, X-gal购自Ameresco 公司, 他莫昔芬购自Sigma公司,常规化学试剂主 要购自Sigma公司和上海化学试剂公司。常规PCR 仪和 Real-time PCR 仪 (CFX96 Real-Time System C1000TM Thermal Cycler)仪购自Eppendorf公司,光 学显微镜购自Olympus公司,冰冻切片机购自Leica 公司。

1.1.2 引物合成与DNA序列测定 合成与测序由 英潍捷基(上海)贸易有限公司完成。载体构建用引 物和基因型鉴定用引物(引物位置见策略图1)详见 表1。

1.1.3 实验动物 SPF级4~8周龄C57BL/B6小鼠由 上海斯莱克实验动物有限责任公司提供。基因敲除 小鼠由上海南方模式生物科技发展有限公司完成。

Table 1 The oligonucleotide sequences of vector construct primers and gene identification primers	
引物名称	寡核苷酸序列
Primer name	Oligonucleotide sequence
Isl1-5arm	F: 5'-TCG ACG GTA TCG ATA AGC TAA CCC ATT TCT TTT GGG TCT-3'
Isl1-5arm	R: 5'-GGA GCC CAT GGT GGC ATC TGT AAG AGG GAG TAA TG-3'
Isl1-3arm	F: 5'-ATG GGA GAC ATG GGC GAT C-3'
Isl1-3arm	R: 5'-TAG AAC TAG TGG ATC CTC TGA AAT GAA AAT AAA TGC A-3'
CreERT2	F: 5'-GCC ACC ATG GGC TCC AAT TT-3'
CreERT2	R: 5'-GCC CAT GTC TCC CAT TCC CCA GCA TGC CTG CTA TT-3'
Isl1-id-f2(2.66)	5'-GTC GGG AGG AAA GGA ACC AA-3'
Isl1-id-r2	5'-GGA GCC CCC AAA ATA ATG TAA GT-3'

表1 载体构建引物和基因鉴定引物寡核苷酸序列



GAG TAA GAG ATA AGG AAG AGA GGT GCC CCG AGC CGT GCG AGT CCG CCG CTG CTG CTG CGC CTC CGC TCT GCC AAC TCC GCC GGC TTA AAT CGG ACT CCC AGA TCT GCG AGG GCG CGG CGC AGC CGG GCA GCT GTT TCC CCC AGT TTT GGC AAC **CCC GGG GGC CAC TAT TTG CCA CCT** AGC CAC AGC ACC AGC ATC CTC TCT GTG GGC TAT TCA CCA ATT GTC CAA CCA CCA TTT CAC TGT GGA CAT TAC TCC CTC TTA CAG AT<u>A TG</u>G GAG ACA TGG GCG ATC CAC CAA AAA

> 图2 Isl1-001-exon1序列信息 Fig.2 Isl1-001-exon1 sequence information

Rosa26-lacZ⁺小鼠由上海南方模式生物科技发展有限公司繁育提供。所有小鼠饲养在恒温(21~22 °C)、 具备空气过滤的SPF级动物房内,每隔12 h光暗循 环,每日小鼠自由进食标准鼠粮及饮水。本文的动 物实验方案获得上海南方模式生物研究中心实验动 物使用与看护委员会(IACUC)的批准, IACUC号为 20140003。

1.2 方法

1.2.1 CRISPR/Cas9位点设计 将kozak-CreERT2-BGHpolyA定点插入到Isl1的转录本Isl1-001的 exon1的翻译起始位点ATG之前(emsenbl的序列号: ENSMUSG00000042258)。针对Isl1-001的exon1设计 GuideRNA位点,该exon序列信息如图2(斜体为非翻译区,粗体为GuideRNA位点,下划线为起始密码子)。 1.2.2 基因敲入载体构建 以小鼠基因组为模板,使用引物Isl1-5arm-F、Isl1-5arm-R,PCR扩增出5'端; 使用引物Isl1-3arm-F、Isl1-3arm-R,PCR扩增出3'端; 同时扩增出片段kozak-CreERT2-BGHpolyA(引物为CreERT2-F和CreERT2-R)。pL451-cc质粒使用*Hind* III和*Bam*H I双酶切,回收3 000 bp条带与5'端、kozak-CreERT2-BGHpolyA、3'端四片段进行In-Fusion反应 (使用TaKaRa公司的In-fusion HD Cloning kit)。获得载体后使用*Sal* I和*Not* I双酶切,回收4 000 bp的Isl1-5'arm-kozak-CreERT2-BGHpolyA-3'arm片段,用于 基因敲入的同源重组片段,设计策略原理如图1。

1.2.3 *Cas9* mRNA和Guide RNA的体外转录 *Cas9* mRNA使用mMESSAGE mMACHINE[®] T7Ultra Kit, 根据Cas9的DNA模板进行体外转录; Guide RNA使用MEGAshortscript[™] Kit, 根据相应的DNA模板进行体外转录, 产物均使用MEGAclearTM Kit纯化。相关操作步骤详见相关产品说明书。

1.2.4 受精卵注射 上述转录的RNA和同源重组片 段混合配制成注射溶液,样品注射到C57BL/6J小鼠品 系的受精卵中,注射后的受精卵移植到ICR品系的假 孕小鼠中,怀孕小鼠出生的仔鼠被称为F0代小鼠。

1.2.5 F0代和F1代小鼠基因组制备和基因型鉴定 F0代小鼠出生后2周,剪取鼠尾0.3 cm,加400 μL裂解 液(包含10% SDS、1 mol/L Tris、0.5 mol/L EDTA和 5 mol/L NaCl)及40 μL蛋白酶K(10 mg/mL), 56 °C消 化过夜。离心取上清, 2倍体积无水乙醇沉淀, 75% 乙醇洗涤, 稍晾干后溶解于100 μL纯水中, 50 °C烘 箱助溶1 h。

以小鼠基因组DNA为模板使用NEB LongAmp[®] Taq DNA Polymerase扩增鉴定片段,引物为Isl1-idf2(2.66)和Isl1-id-r2。根据理论值可扩增出2 600 bp条 带(野生型)或4 600 bp条带(基因敲入阳性),反应条件 为:94 °C预变性30 s; 94 °C变性20 s, 65 °C退火5 min, 进行34个循环; 65 °C延伸10 min, PCR体系参见NEB 说明书。1%琼脂糖凝胶电泳后割胶回收4 600 bp条 带,测序鉴定。

鉴定为阳性的F0代小鼠和野生型C57BL/6J小鼠 交配,获得F1代小鼠。小鼠出生后2周剪取鼠尾0.3 cm, 同上鉴定基因型。

1.2.6 实时定量PCR检测*Isl1和CreERT2*的表达 基因敲入阳性小鼠命名为Isl1-CreERT(KI)。将成 年Isl1-CreERT(KI)小鼠与成年Rosa26-lacZ⁺小鼠 交配,获得的子代小鼠(出生后2周),提取尾组织 基因组样品,PCR进行基因型鉴定;筛选获得Isl1-CreERT(KI)/Rosa26-lacZ⁺双杂合小鼠模型。提取 Isl1-CreERT(KI)/Rosa26-lacZ⁺双杂合小鼠的心脏、 下丘脑、垂体、肾上腺、胃、前列腺和骨骼肌(大 腿后侧肌群)的组织RNA,反转录成cDNA,进行实 时定量PCR检测。引物序列为,Cre-F: 5'-AGC GAT GGA TTT CCG TCT CTG-3', Cre-R: 5'-AGC TTG CAT GAT CTC CGG TAT TGA A-3'; Isl1-F: 5'-GCC CGC TCT AAG GTG TAC CAC ATC-3', Isl1-R: 5'- TCA TGA TGC TGC GTT TCT TGT CCT T-3'; 内参 β-actin-F: 5'-GGC TGT ATT CCC CTC CAT CG-3', β-actin-R: 5'-CCA GTT GGT AAC AAT GCC ATG T-5'。 扩增条件为: 94 °C预变性3 min; 94 °C变性30 s, 60°C退火30 s, 72°C延伸20 s, 35个循环。PCR产物 用2%琼脂糖凝胶电泳检测(120 V, 20 min)。

1.2.7 lacZ染色、冰冻切片和石蜡切片 他莫昔芬 给药剂量参考文献[6,9],用新鲜玉米油配制他莫昔 芬终浓度为20 mg/kg,8周龄Isl1-CreERT(KI)/Rosa26lacZ⁺双杂合小鼠腹腔注射他莫昔芬(170 mg/kg),注 射1周后取小鼠心脏。

冰冻切片标本处理:脱颈处死小鼠,先用PBS快 速灌注左心室,然后用4℃预冷的4%多聚甲醛充分灌 注,4℃冰箱预冷4%多聚甲醛固定4h。然后15%蔗糖 过夜,30%蔗糖脱水沉底。OCT包裹后速冻,冰冻切 片机做心脏冠状切片和水平切片,厚度为10μm。

冰冻切片X-gal染色参照文献[5-6],组织PBS冲洗后放入4% PFA固定液,4°C固定2h,PBS洗3次,随后使用X-gal染液(包含0.1 mol/L PBS、0.01%脱氧胆酸、0.02% NP40、1 mg/mL X-gal、10 mmol/L铁氧化钾、10 mmol/L黄血盐以及2 mmol/L MgCl₂)于37°C进行染色。PBS洗数次停止染色。核固红复染,然后DBA显色,梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封片,光学显微镜下观察。

石蜡切片标本处理:脱颈处死小鼠,先用PBS快速灌注左心室,然后用50~100 mmol/L KCl溶液浸泡扩张心腔,冠状面和水平面剖开小鼠心脏。4°C预冷的4%多聚甲醛在4°C冰箱中固定2h。1% NP40液体穿透5h, X-gal染色^[6-7], 37°C恒温箱过夜。样本经过PBS冲洗3次,每次3~5 min。样本随后经过梯度酒精脱水,二甲苯透明,石蜡包埋后进行心脏冠状切片和水平切片,厚度为5 μm。

石蜡切片经脱蜡后进行核固红复染, 然后DBA 显色、梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树胶封片, 于光学显微镜下观察。

2 结果

2.1 F0代小鼠的获得与繁育

通过受精卵显微注射和移植,受体数23,怀孕 数13,怀孕率56.52%;移植卵数460,出生小鼠数75, 出生率16.30%。其中阳性2只,阳性率为2.67%。图 3为基因型鉴定结果。



2#: 阴性小鼠; 6#、10#: 阳性小鼠; WT: 野生型小鼠; M: 1 Kb ladder。 2#: negative; 6#,10#: positive; WT: wild type; M: fermentas 1 Kb ladder.

图3 F0代小鼠基因型鉴定图

Fig.3 Genotyping of F0-generation mice

TTT GAG TAA GAG ATA AGG AAG AGA GGT GCC CCG AGC CGT GCG AGT CCG CCG CTG CTG CTG CGC CTC CGC TCT GCC AAC TCC GCC GGC TTA AAT CGG ACT CCC AGA TCT GCG AGG GCG CGG CGC AGC CGG GCA GCT GTT TCC CCC AGT TTT GGC AAC CCC GGG GGC CAC TAT TTG CCA CCT AGC CAC AGC ACC AGC ATC CTC TCT GTG GGC TAT TCA CCA ATT GTC CAA CCA CCA TTT CAC TGT GGA CAT TAC TCC CTC TTA CAG ATG CCA CCA TGG GCT CCA ATT TAC TGA CCG... (B)

TTT GAG TAA GAG ATA AGG AAG AGA GGT GCC CCG AGC CGT GCG AGT CCG CCG CT G CTG CTG CGC CTC CGC TCT GCC AAC TCC GCC GGC TTA AAT CGG ACT CCC AGA TC T GCG AGG GCG CGG CGC AGC CGG GCA GCT GTT TCC CCC AGT TTT GGC AAC CCC G GG GGC CAC TAT TTG CCA CCT AGC CAC AGC ACC AGC ATC CTC TCT GTG GGC TAT T CA $\mathit{CCA} \mathit{ATT} \mathit{GTC} \mathit{CAA} \mathit{CCA} \mathit{CCA} \mathit{TTT} \mathit{CAC} \mathit{TGT} \mathit{GGA} \mathit{CAT} \mathit{TAC} \mathit{TCC} \mathit{CTC} \mathit{TTA} \mathit{CAG} \mathit{ATG} \mathit{CCA} \mathit{CC\underline{A}}$ TGG GCT CCA ATT TAC TGA CCG.....

A: 6#小鼠测序结果; B: 10#小鼠测序结果

A: the sequence of 6#; B: the sequence of 10#.

图4 模型小鼠在目的sgRNA位点的插入/缺失突变 Fig.4 The inserted and deleted mutation of the model mice at the sgRNA sites

分别回收6#和10#的4 600 bp条带测序。测序发 现, Kozak-CreERT2-BGHpolyA片段定点插入到了Isll 基因起始密码子ATG之前的位置,但插入该片段的同 时Cas9对靶位点的切割造成外显子1部分序列的缺 失,6#小鼠缺失了45个碱基,10#小鼠缺失了8个碱基。 测序结果如图4(斜体为Isll基因的5'UTR,加粗为缺失 序列,斜体加粗为Kozak序列,下划线为起始密码子)。 2.2 Isl1-CreERT(KI)/Rosa26-lacZ⁺双杂合小鼠

CreERT2和Isl1组织表达水平的检测

为了检测Isl1-CreERT(KI)/Rosa26-lacZ⁺双杂 合小鼠组织中CreERT2和Isl1的表达情况,本研究 利用RT-PCR和实时定量PCR方法,对小鼠组织中 上述两个基因的表达进行了测定。结果显示, Isl1-CreERT(KI)/Rosa26-lacZ⁺双杂合小鼠CreERT2和Isl1 在心脏、下丘脑、垂体、肾上腺、胃、前列腺和 骨骼肌均有不同程度表达,两者表达谱基本一致(图 5)。

2.3 Isl1-CreERT2(KI)/Rosa26-lacZ双阳性小鼠 心脏组织LacZ染色的组织学鉴定

2.3.1 心脏整染及冰冻切片结果 他莫昔芬诱导 后小鼠心脏X-gal整染, 经体视镜观察, 可见少量蓝 色X-gal染色阳性细胞的胞体分布于心脏神经节、 窦房结和肺动脉根部,如图6所示,与已报道文献描 述相同[15,17]。

双杂合小鼠整染后的心脏进行冰冻切片及核 固红复染后,可见少量X-gal染色阳性细胞的胞体分 布于心脏神经节、主动脉弓和肺动脉根部等,结果 如图7所示,与已报道文献描述相同[15,17]。

2.3.2 小鼠心脏经过石蜡切片以及核固红复染后结果 石蜡切片经核固红复染后,可见少量X-gal染色阳性 细胞的胞体分布于窦房结、心脏神经节、主动脉弓 和肺动脉根部等(图8)。

3 讨论

CRISPR/Cas9系统近年来被成功用于多个物种 的基因组编辑,极大地改变了包括小鼠在内的基因 工程动植物的产生方式,为实现外源基因的精确整 合提供了重要的基础。我们曾利用传统的DNA雄 原核显微注射方法来建立受控于Isll基因启动子的 CreERT2转基因小鼠,但一直无法筛选到CreERT2的 表达和内源Isl1基因表达行为一致的小鼠品系。造 成这一现象的原因和传统转基因小鼠技术只能随机 进行DNA插入的转基因方法有密切的关系。而本研 究通过CRISPR/Cas9的方法,非常高效地将CreERT2 定点插入到小鼠Isll基因启动子下游。经实时定量 PCR证明,在该小鼠中CreERT2的表达和内源性Isll



A: 双杂合小鼠心肌*CreERT2*表达鉴定结果。M: DNA marker; 1~2: 阴性对照; 3~5: 心肌内参β-Actin表达; 6~8: 心肌*CreERT2*表达。B: 双杂合小鼠心肌*Isl1*表达鉴定结果。M: DNA marker; 1~3: 阴性对照; 4~6: 下丘脑*Isl1*表达; 7~9: 心肌*Isl1*表达; 10: 心肌内参β-actin表达。C: 双杂合小鼠 *Isl1*在各组织中的实时定量PCR表达谱。D: 双杂合小鼠*CreERT2*在各组织中的实时定量PCR表达谱。

A: identification of *CreERT2* expression in double heterozygous mice myocardial tissue. M: DNA marker; 1~2: negative control; 3~5: internal control β -Actin of cardiac cDNA; 6~8: *CreERT2* of cardiac cDNA. B: identification of *Isl1* expression in double heterozygous mice myocardial tissue. M: DNA Marker; 1~3: negative control; 4~6: *Isl1* of hypothalamus cDNA; 7~9: Isl1 of cardiac cDNA; 10: internal control β -actin of cardiac cDNA. C: *Isl1* expression profile of double heterozygous mice.

图5 Isl1-CreERT(KI)/Rosa26-lacZ⁺双杂合小鼠组织中CreERT2和Isl1的表达水平 Fig.5 Expression of Isl1 and CreERT2 in Isl1-CreERT(KI)/Rosa26-lacZ⁺ double heterozygous mice



A: 阳性细胞分布于心脏神经节; B: A图的局部放大, 阳性细胞分布于心脏神经节; C: 阳性细胞分布于窦房结; D: 阳性细胞分布于肺动脉根部。 CG: 心脏神经节; PU: 肺动脉; SAN: 心脏窦房结。

A: labeled X-gal⁺ cells in the cardiac ganglion; B: enlarged part of A. labeled X-gal⁺ cells in the cardiac ganglion; C: labeled X-gal⁺ cells in the sinoatrial node; D: labeled X-gal⁺ cells in the pulmonary artery. CG: cardiac ganglion; PU: pulmonary artery; SAN: sinoatrial node.

图6 Isl1-CreERT(KI)/Rosa26-lacZ⁺双杂合成年小鼠心脏X-gal整染结果

Fig.6 Stereoscope Results of Double heterozygous adult mice heart X-gal staining



A: 阳性细胞分布于主动脉根部, 未复染; B: 阳性细胞分布于心脏神经节, 未复染; C: 阳性细胞分布于神经节, 复染; D: 阳性细胞分布于肺动脉根部, 复染。AO: 主动脉; CG: 心脏神经节; PU: 肺动脉。

A: labeled X-gal⁺ cells in the indicates aorta without counterstaining; B: labeled X-gal⁺ cells in the cardiac ganglion without counterstaining; C: labeled X-gal⁺ cells in the cardiac ganglion with counterstaining; D: labeled X-gal⁺ cells in the pulmonary artery with counterstaining. AO: aorta; CG: cardiac ganglion; PA: pulmonary artery.

图7 Isl1-CreERT(KI)/Rosa26-lacZ⁺双杂合成年小鼠心脏X-gal染色冰冻切片及复染结果

Fig.7 Frozen sections of Isl1-CreERT(KI)/Rosa26-lacZ⁺ double heterozygous adult mice heart X-gal staining



双杂合小鼠心脏X-gal染色后石蜡切片结果。A: 阳性细胞分布于心脏神经节; B: 阳性细胞分布于主动脉根部; C: 阳性细胞分布于窦房结; D: 阳 性细胞分布于肺动脉根部。CG: 心脏神经节; AO: 主动脉; SAN: 心脏窦房结; PU: 肺动脉。

Paraffin results of double heterozygous adult mice heart. A: labeled X-gal⁺ cells in the cardiac ganglion; B: labeled X-gal⁺ cell in the indicates aorta; C: labeled X-gal⁺ cells in the sinoatrial node; D: labeled X-gal⁺ cells in the pulmonary artery. CG: cardiac ganglion; AO: aorta; SAN: sinoatrial node; PU: pulmonary artery.

图8 Isl1-CreERT(KI)/Rosa26-lacZ⁺双杂合成年小鼠心脏X-gal染色石蜡切片 Fig.8 Paraffin results of double heterozygous adult mice heart X-gal staining

的表达一致。通过和Rosa26-LacZ⁺报告小鼠交配, 并对杂交小鼠的心脏组织冰冻切片和石蜡切片进行 X-gal染色,确认CreERT2细胞在成年小鼠心脏窦房 结、心脏神经节、主动脉弓和肺动脉根部表达,从 基因水平和蛋白水平验证CreERT2的表达,与已有 文献报道的表达*Isl1*相一致^[15,17]。后续研究还可以应 用整体原位杂交技术检测Isl1-CreERT2小鼠心脏中 Isl1基因的内源性表达分布,以直接验证与CreERT2 表达谱(X-gal染色阳性细胞)的一致性。

成年哺乳动物内源性心肌祖细胞(CPCs)在新心 肌细胞形成的生理性心脏重塑中的作用仍然未知。 心肌细胞增殖的来源一直是一个未解之谜,是心脏 原有心肌细胞的分裂,还是祖细胞的自我更新与分 化,抑或是骨髓间充质干细胞、内皮祖细胞和造血 干细胞的动员?本研究建立的基因敲入模型可以用 于建立心肌祖细胞的Isl1+CPCs谱系示踪及相关基 因功能研究,为胚胎期心脏的发育过程及成年哺乳 动物心脏心肌祖细胞的动员、增殖和分化机制的研 究提供了重要的工具。

参考文献 (References)

- 1 http://www.who.int/cardiovascular_diseases/en/.
- 2 Jennings GL, McMullen JR. Left ventricular hypertrophy: Beyond the image and defining the human cardiac phenotype in hypertension. J Hypertens 2007; 25(5): 941-7.
- 3 Chien KR, Domian IJ, Parker KK. Cardiogenesis and the complex biology of regenerative cardiovascular medicine. Science 2008; 322(5907): 1494-7.
- 4 杜建霖,张进,蒲 荻,高二志,杨景涛,高凌志,等.基因谱 系示踪技术揭示小鼠Tbx18+心脏祖细胞向心系细胞分化 的潜能. 生物化学与生物物理进展(Du Jianlin, Zhang Jin, Pu Di, Gao Ezhi, Yang Jingtao, Gao Lingzhi, *et al.* Genetic fate mapping reveals the differentiation potential of Tbx18+ cardiac progenitors into cardiomyocyte lineages in the mouse heart. Progress in Biochemistry and Biophysics) 2011; 38(2): 127-33.
- 5 Bu L1, Jiang X, Martin-Puig S, Caron L, Zhu S, Shao Y, *et al.* Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. Nature 2009; 460(7251): 113-7.
- 6 Karlsson O, Thor S, Norberg T, Ohlsson H, Edlund T. Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. Nature 1990; 344(6269): 879-82.

- 7 周云鹤. 有氧运动诱导心肌肥大和心肌细胞增殖的研究进展. 中国细胞生物学学报(Zhou Yunhe. Advances in the research of serobic exercise-induced hypertrophy and cardiomyocyte proliferation. Chinese Journal of Cell Biology) 2013; 35(10): 1551-8.
- 8 Fonoudi H, Yeganeh M, Fattahi F, Ghazizadeh Z, Rassouli H, Alikhani M, et al. ISL1 protein transduction promotes cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells. PLoS One 2013; 8(1): e55577.
- 9 Ma Q, Zhou B, Pu WT. Reassessment of Isl1 and Nkx2-5 cardiac fate maps using a Gata4-based reporter of Cre activity. Dev Biol 2008; 323(1): 98-104.
- 10 Genead R, Danielsson C, Andersson AB, Corbascio M, Franco-Cereceda A, Sylven C, *et al.* Islet-1 cells are cardiac progenitors present during the entire lifespan: From the embryonic stage to adu lthood. Stem Cells Dev 2010; 19(10): 1601-15.
- 11 Moretti A, Caron L, Nakano A, Lam JT, Bernshausen A, Chen Y, et al. Multipotent embryonic isl1+ progenitor cells lead to cardiac, smooth muscle, and endothelial cell diversification. Cell 2006; 127(6): 1151-65.
- 12 Laugwitz KL, Moretti A, Lam J, Gruber P, Chen Y, Woodard S, *et al.* Postnatal isl1⁺ cardioblasts enter fully differentiated cardiomyocyte lineages. Nature 2005; 433(7026): 647-53.
- 13 Cai CL, Liang X, Shi Y, Chu PH, Pfaff SL, Chen J, *et al.* Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. Dev Cell 2003; 5(6): 877-89.
- 14 Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol 2002; 43(6): 1565-75.
- 15 Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. Science 2012; 337(6096): 816-21.
- 16 梁 丹, 吴宇轩, 李劲松. CRISPR/Cas9技术在干细胞中的应用. 生命科学(Liang Dan, Wu Yuxuan, Li Jinsong. Progress of CRISPR/Cas9 in stem cell research. Chinese Bulletin of Life Sciences) 2015; 27(1): 93-8.
- 17 Weinberger F, Mehrkens D, Starbatty J, Nicol P, Eschenhagen T. Assessment of DNA synthesis in Islet-1+ cells in the adult murine heart. Biochem Biophys Res Commun 2015; 456(1): 294-7.