

II型肺泡上皮细胞*Brg1*基因条件 敲低小鼠的基因型鉴定

司道祝¹ 彭单伊¹ 张 荣³ 夏耘秋² 牛 超² 苟 好¹ 刘 姜¹
王莉佳¹ 田代印² 刘恩梅² 邹 琳¹ 符 州^{1*}

(¹重庆医科大学附属儿童医院儿科研究所, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室,
儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆市干细胞治疗工程技术研究中心, 重庆 400014;
²重庆医科大学附属儿童医院呼吸中心, 重庆 400014; ³第四军医大学附属第一医院西京医院, 西安 710000)

摘要 该文旨在鉴定特异敲低II型肺泡上皮细胞中*Brg1*(Brahma-related gene 1)基因小鼠的基因型, 为进一步研究*Brg1*在肺相关疾病中的作用奠定基础。将两对转基因小鼠*Brg1*^{fl/fl}和*SP-C-rtTA/(tetO)₇-Cre*进行繁殖交配, 将得到纯合子、杂合子及野生型3种基因型。出生后1周龄剪尾提取基因组DNA, PCR法判定基因型。用多西环素诱导法诱导(tetO)₇-Cre重组酶活性, 靶向剪切II型肺泡上皮细胞上*Brg1*基因, 磁珠分选法提取小鼠原代II型肺泡上皮细胞, 通过观察细胞生长特征、检测proSP-C表达鉴定原代II型肺泡上皮细胞, RT-PCR法、Western blot检测*Brg1*表达水平。结果显示, 成功繁殖了*Brg1*纯合子小鼠, 通过磁珠分选法成功分离了原代II型肺泡上皮细胞, 用多西环素诱导法成功敲低了II型肺泡上皮细胞*Brg1*基因。该结果为相关研究提供动物模型奠定了基础。

关键词 *Brg1*; II型肺泡上皮细胞; 基因敲低; 基因型

Genotype Identification of Mice with Conditional *Brg1* Knocking down in Type II Alveolar Epithelial Cells

Si Daozhu¹, Peng Danyi¹, Zhang Rong³, Xia Yunqiu², Niu Chao², Gou Hao¹, Liu Jiang¹,
Wang Lijia¹, Tian Daiyin², Liu Enmei², Zou Lin¹, Fu Zhou^{1*}

(¹Department of Pediatric Research Institute, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders, China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Chongqing Engineering Research Center of Stem Cell Therapy, Chongqing 400014, China;

²Respiratory Center of Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China;

³Xijing Hospital, The First Affiliated Hospital of the Fourth Military Medical University, Xi'an 710000, China)

Abstract The purpose of this study was to identify the genotype of knocking down of *Brg1* (Brahma-related gene1) gene in type II alveolar epithelial cells (AEC2s) in mice, and to lay a foundation for further study on the role of *Brg1* in lung related diseases. Two pairs of transgenic mice, *Brg1*^{fl/fl} and *SP-C-rtTA/(tetO)₇-Cre*, were introduced to breed and mated, and homozygous (*SP-C-rtTA/(tetO)₇-Cre/Brg1*^{fl/fl}), heterozygous (*SP-C-rtTA/(tetO)₇-Cre/Brg1*^{fl/-}) and wild-type genotypes were obtained. Genomic DNA was extracted from the tail of one-week-old mice. PCR/Q-PCR were used to identify the genotype. Gentle MACS Dissociator was applied for

收稿日期: 2016-09-19 接受日期: 2017-01-09

重庆市科技委员会重大专项(批准号: Cstc2014yykfc10003)资助的课题

*通讯作者。Tel: 023-63622934, Fax: 023-63622934, E-mail: fu_zhou79@aliyun.com

Received: September 19, 2016 Accepted: January 9, 2017

This work was supported by the Key Grant from Chongqing Science and Technology Commission (Grant No.Cstc2014yykfc10003)

*Corresponding author. Tel: +86-23-63622934; Fax: +86-23-63622934, E-mail: fu_zhou79@aliyun.com

网络出版时间: 2017-02-23 17:09:28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170223.1709.004.html>

isolation and purification of primary AEC2s after 7 days Doxycycline-inducible. The phenotype of isolated and cultured AEC2s was confirmed by observation of the morphology of AEC2s and detection of the expression of prosurfactant protein-C (proSP-C). The success of *Brg1*-knockdown was measured by RT-PCR and Western blot. The results showed that the feeding and breeding of *Brg1* homozygous mice were successful. Primary AEC2s were successfully extracted, and the specific knocking down of *Brg1* in AEC2s was successful. This study provided the animal experimental model for the relevant research.

Keywords *Brg1*; type II alveolar epithelial cells; gene knock-down; genotype

肺泡是肺进行气体交换的基本单位, 其表面覆盖的单层肺泡上皮主要由I型和II型肺泡上皮细胞(Type II alveolar epithelial cells, AEC2s)构成。尽管AEC2s只覆盖肺泡表面的5%~10%, 但其具有增殖和分化能力^[1], 可通过增殖修复受损的肺泡^[2]。AEC2s可分泌细胞表面活性物质, 维持肺泡的稳态; 还参与固有免疫, 调解细胞与细胞、细胞与基质间的连接^[3], 在各种肺疾病中起重要作用。因此, 从复杂的肺成份中得到高纯度高产量的AEC2s并建立体外细胞模型可为研究AEC2s的功能奠定实验基础。

染色质重构复合物核心催化亚基*Brg1*(Brahma-related gene 1)是SWI/SNF(switching/sucrose non-fermenting)家族的重要组成成分, 其主要通过ATP水解产生的动力来影响细胞分裂过程中染色质的重排, 使一些特异性的基因表达被抑制, 从而影响细胞增殖和分化。研究表明, *Brg1*在胚胎发育及胚胎干细胞多能性维持中有重要作用^[4], 多种细胞的活动进程均需*Brg1*的参与^[5]。在小鼠上皮细胞系MLE-15中发现, 由AEC2s分泌的肺泡表面活性物质SP-B(surfactant protein-B)的表达需要*Brg1*参与, *Brg1*敲低会导致SP-B的表达下降^[6], 提示*Brg1*对AEC2s的生物学功能具有调控作用, 但仅限于细胞层面。因此, 本研究特异性、条件性敲低小鼠AEC2s中*Brg1*基因, 为进一步研究*Brg1*对AEC2s生物学功能的调控、*Brg1*在肺发育、各种肺疾病中的作用提供模式动物。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

小鼠DNA提取试剂配制如下。(1)缓冲液A: 0.5 mol/L EDTA(pH8.0) 100 μ L+10 mol/L NaOH 625 μ L, 加双蒸水定容至250 mL, 室温储存; (2)缓冲液B: 40 mmol/L Tris(pH8.0) 100 mL(pH3.0)。滤柱缓冲液: 含0.5% biotin-free BSA、含2 mmol/L EDTA的PBS,

0.22 μ m滤器过滤。PCR引物由深圳华大基因合成。DNA Marker、SYBR Premix Ex TaqTM购自TaKaRa公司。PCR Master Mix(2 $\times$)购自Fermentas公司。2%多西环素(Sigma公司)水配方: 0.4 g多西环素和10 g蔗糖溶于200 mL ddH₂O中, 并用0.22 μ m滤器过滤。原代II型肺泡上皮细胞提取主要试剂购自Miltenyi Biotec公司。RIPA蛋白裂解液和BCA蛋白质定量检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。兔抗人*Brg1*多克隆抗体购自Santa Cruz Biotechnology公司。兔抗人proSP-C多克隆抗体购自Abcam公司。兔抗人 β -actin多克隆抗体、Dylight549山羊抗兔二抗和辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。ECL发光试剂盒购自南京凯基生物科技发展有限公司。DMEM培养基购自Gibco公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.2 小鼠的饲养和繁殖

由于*Brg1*纯合敲除有胚胎致死性^[7], 因此我们引进、繁殖出AEC2s上特异性条件敲低*Brg1*小鼠。这种条件敲低系统包括两种转基因小鼠, 均为C57BL/6J背景。一种转基因小鼠的肺泡表面活性物质(surfactant protein-C, SP-C)启动子区连接四环素反式激活因子(reversetetracycline transactivator, *rtTA*)基因, 该*rtTA*基因可被多西环素激活(图1), 同时多个*rtTA*连接位点邻近一个极小的巨细胞病毒启动子区(TetO)-CMV, 该启动子连接*Cre*基因, 以在AEC2s特异性激活*Cre*重组酶。为特异性敲低*Brg1*基因, *Cre*重组酶基因中带有可识别的loxP位点, 该loxP位点可插入*Brg1*基因中, 当*Cre*重组酶被激活, 即可通过loxP识别并特异性剪切*Brg1*基因。另一种为*Brg1*转基因小鼠, 两个loxP片段分别插入*Brg1*基因片段的第16号、17号外显子和第18号、19号外显子之间^[8]。给予多西环素后, *Cre*重组酶被激活, 即可靶向剪切*Brg1*基因片段中两个loxP位点之间17号及18号外显子, 同时保留一个loxP位点。将引进的两种转基因小鼠隔

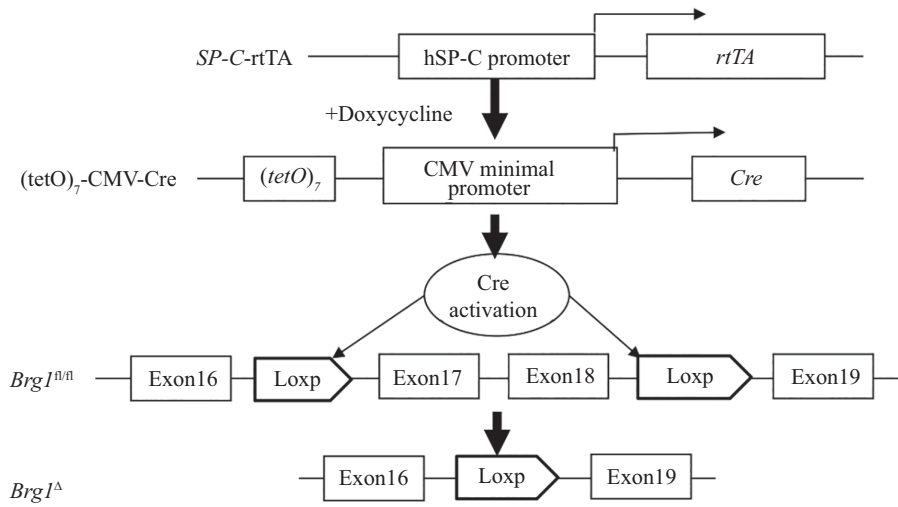


图1 II型肺泡上皮细胞特异性敲低*Brg1*基因示意图

Fig.1 Diagram describing of the conditional knockdown of *Brg1* in the mouse lung type II alveolar epithelial cells

离饲养观察未见异常后进入饲养区, 严格按照SPF动物管理相关规定进行实验操作。饲养屏障环境内温度控制在20~25℃, 湿度控制在50%~60%, 饲料、垫料和饮水均经过高温高压灭菌处理后使用; 实行自由采食和饮水, 垫料每周更换2次。将*Brg1^{fl/fl}*(*Brg1*编码序列两侧插入两段同向loxp位点切割序列的转基因小鼠)雌性和*SP-C-rtTA/(tetO)₇-Cre*(小鼠II型肺泡上皮细胞中*SP-C*连接有*Cre*重组酶的小鼠)雄性小鼠按2:1配对, 出生小鼠子一代喂养母乳至3周后断离母乳。繁殖出的小鼠将出现*SP-C-rtTA/(tetO)₇-Cre/Brg1^{fl/fl}*纯合子(II型肺泡上皮细胞中*Brg1*基因纯合小鼠)、*SP-C-rtTA/(tetO)₇-Cre/Brg1^{fl/-}*杂合子(II型肺泡上皮细胞中*Brg1*基因杂合小鼠)及野生型(wild-type, WT)3种基因型。继续繁殖, 观察小鼠出生及生长情况。

1.3 小鼠的基因型鉴定

1.3.1 小鼠尾部组织基因组DNA的提取 在子鼠

1周龄时, 剪取小鼠尾部组织0.5~1.0 mm, 置于1.5 mL Eppendorf管中, 先加入75 μL缓冲液A, 100℃金属浴40 min, 每20 min混匀、瞬离1次, 后加入225 μL缓冲液B, 涡旋混匀, 12 000 r/min离心3 min, 取适量上清液用于扩增目的基因片段。

1.3.2 小鼠基因型的聚合酶链反应(PCR/q-PCR)及琼脂糖凝胶电泳 设计引物序列, 见表1。PCR体系均为25 μL。*Brg1*、*Cre* PCR扩增条件为: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 61℃退火30 s, 72℃延伸30 s, 35个循环; 72℃延伸5 min; 10℃延伸10 min; 4℃保存。2%琼脂糖凝胶电泳: 琼脂糖0.3 g溶于1×电泳缓冲液15 mL中; DNA每孔加10 μL; 电泳电压120 V, 时间30 min。*SP-C-rtTA*基因q-PCR的条件为: 反应体系共12 μL; 扩增条件为: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 59℃退火1 min, 72℃延伸45 s, 拍照1次, 35个循环; 65~95℃, 每升高0.5℃照相1次。

表1 PCR/q-PCR引物
Table 1 Primers for PCR/q-PCR

基因名 Name	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')
<i>Brg1</i> loxp	CTC ATG CAC AGA GGT CCT G	TAG CCC CTT GAA AGT GAT CC
(<i>TetO</i>) ₇ - <i>Cre</i> 1084/1085	GCG GTC TGG CAG TAA AAA CTA TC	GTG AAA CAG CAT TGC TGT CAC TT
(<i>TetO</i>) ₇ - <i>Cre</i> 7338/7339	CTA GGC CAC AGA ATT GAA AGA TCT	GTA GGT GGA AAT TCT AGC ATC ATC C
<i>SP-C-rtTA</i>	CAA ATG TTG CTT GTC TGG TG CGC TGT GGG GCA TTT TAC TTT AG	GTC AGT CGA GTG CAC AGT TT CAT GTC CAG ATC GAA ATC GTC
<i>SP-C</i>	ATG GAG AGC CCA CCG GAT TA	ACC ACG ATG AGA AGG CGT TT
<i>Brg1</i>	GAG GAG GTC CGG CAG AAG AAA TC	TTC TTC TGC TTC TTG CTC TC
<i>GAPDH</i>	CAG CGA CAC CCA CTC CTC CAC CTT	CAT GAG GTC CAC CAC CCT GTT GCT

1.4 多西环素诱导II型肺泡上皮细胞中*Brg1*基因敲低

1.4.1 多西环素诱导*Brg1*基因敲低 小鼠给予2%多西环素水替代日常饮水, 喝多西环素水7 d, 每3 d换水1次, 以激活Cre重组酶活性, 靶向剪切两个loxP位点之间的*Brg1*基因, 实现AEC2s中特异敲低*Brg1*, 饲料按SPF动物管理相关规定的标准给予。敲低后的小鼠分别记为*Brg1*^{ΔAEC/ΔAEC}、*Brg1*^{ΔAEC/+}及*Brg1*^{+/+}。

1.4.2 肺组织HE染色观察肺部病理变化 将小鼠麻醉后, 取出左肺组织, 用4%中性甲醛固定24 h, 行冲水、脱水、组织透明、浸蜡、包埋。组织切片, 切片厚度为4 μm, 进行HE染色, 光镜下观察组织形态学变化。

1.4.3 提取小鼠原代II型肺泡上皮细胞 用磁珠分选法提取原代AEC2s^[9]。实验具体分为以下3个步骤。(1)肺的解剖和原代AEC2s的分离: 麻醉小鼠, 70%酒精消毒, 气管插管, 心脏灌流去血; 气管插管处给予预热的中性蛋白酶2 mL裂解肺, 并迅速注射0.5 mL融化的低熔点琼脂糖, 冷冻肺部6 min; 分离肺, 将肺放入含有2 mL中性蛋白酶的15 mL离心管中, 37 °C孵育6 min; 将肺转入含5 mL DMEM培养皿中, 扯碎肺组织, 室温慢摇10 min; 肺匀浆先后通过100 μm和40 μm细胞滤器, 细胞悬液于200 ×g离心10 min, 去上清。(2)磁珠分选CD45阴性细胞, 纯化AEC2s: 用预冷的滤柱缓冲液重悬细胞, 计数总细胞量, 200 ×g离心10 min; 用90 μL(1×10⁷细胞)滤柱缓冲液重悬细胞, 加入10 μL CD45微珠, 4 °C慢摇15 min, 加入10 mL滤柱缓冲液, 200 ×g离心10 min; 准备MACSLS柱子; 500 μL滤柱缓冲液重悬细胞, 再加2 mL滤柱缓冲液, 将细胞悬液滤过柱子, 收集CD45阴性细胞, 计数, 200 ×g离心10 min。(3)磁珠分选生物素标记的抗小鼠上皮细胞黏附分子阳性细胞, 纯化AEC2s: 90 μL滤柱缓冲液重悬细胞, 加入10 μL FcR封闭液, 4 °C慢摇10 min; 以1:50比例加入生物素化Ep-CAM抗体, 4 °C慢摇30 min, 后加入10 mL滤柱缓冲液, 200 ×g离心10 min; 90 μL滤柱缓冲液重悬细胞, 加入10 μL链霉亲和素, 4 °C慢摇15 min, 后加入10 mL滤柱缓冲液, 200 ×g离心10 min; 准备MACSLS柱; 500 μL滤柱缓冲液重悬细胞, 再加2 mL滤柱缓冲液, 收集到的细胞即为纯化的AEC2s。将提取的AEC2s用含10% FBS的DMEM, 37 °C、CO₂培养箱内培养, 培养24 h后换液, 此后每2 d换液1次, 每天用倒置显微镜观察细胞形态特征及生长的基本

情况。

1.4.4 细胞免疫荧光染色鉴定II型肺泡上皮细胞 盖玻片置于24孔板中, 将提取的原代AEC2s接种于盖玻片, 48 h后取出盖玻片, 4%甲醛固定, 0.5% Triton X-100破膜, 山羊血清封闭, 加入proSP-C一抗(1:200), 4 °C孵育过夜; 37 °C复温, Dylight549山羊抗兔二抗(1:100)孵育, DAPI染细胞核, 封片, 倒置显微镜观察proSP-C表达, 并分析纯度。

1.4.5 RT-PCR检测*Brg1*和*SP-C* mRNA水平 RNAiso试剂(TaKaRa公司)裂解3种小鼠提取的AEC2s, 氯仿抽提总RNA溶于无酶(水无DNA酶、无RNA酶)中, 利用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA, 再进行PCR。引物由华大基因生物公司合成(表1)。扩增条件为: 95 °C预变性2 min; 95 °C变性5 s, 58 °C退火10 s, 照相1次, 35个循环; 最后溶解曲线从65~95 °C每升高1 °C照相1次。实验数据用2^{-ΔΔCt}法分析定量PCR结果。

1.4.6 Western blot检测*Brg1*和proSP-C蛋白质水平 RIPA裂解液提取细胞总蛋白, BCA法定量蛋白质, 80 μg蛋白质上样, 经10% SDS-PAGE, 转膜, 室温封闭1 h, 一抗(proSP-C 1:1 000; *Brg1* 1:100; β-actin 1:500), 4 °C孵育过夜, 洗膜, 二抗(1:5 000)室温孵育1 h, ECL发光液(Bio-Rad公司)进行蛋白质信号检测。

1.5 数据统计

实验数据以mean±S.D.形式表示, 用SPSS 11.5软件进行显著性差异分析。*P*<0.05认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠生长情况

Brg1^{fl/fl}雌性和*SP-C-rtTA/(tetO)*₇-*Cre*雄性小鼠配对繁殖出的子代小鼠生长良好, 反应正常。同窝中3种基因型同日龄小鼠的大体形态见图2。

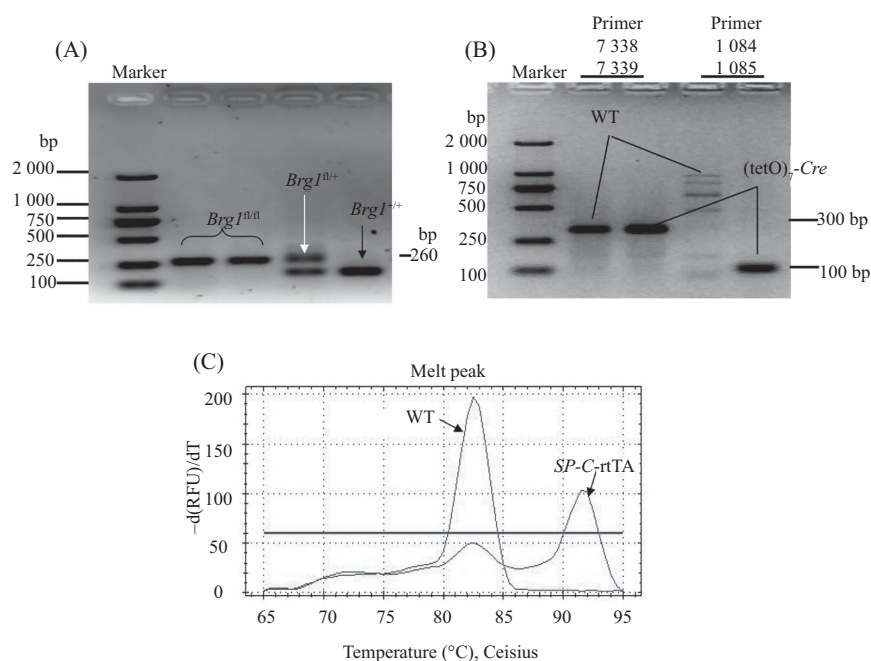
2.2 小鼠基因型的鉴定

为鉴定*Brg1*^{fl/fl}与*SP-C-rtTA/(tetO)*₇-*Cre*杂交后产生的子代小鼠的基因型, 我们应用PCR扩增、琼脂糖凝胶电泳同时鉴定了*Brg1*、(tetO)₇-*Cre*和*SP-C-rtTA*基因。*Brg1*与*Cre*基因型判定方式为: *Brg1*^{fl/fl}纯合扩增条带在260 bp, *Brg1*^{fl/-}杂合扩增条带同时有260 bp和160 bp两条带(图3A); 引物(tetO)₇-*Cre*1084/1085用于鉴定*Cre*是否为阳性, 阳性扩增带在100 bp, 无杂带, 阴性有杂带; 引物(tetO)₇-*Cre*7338/7339用于鉴定所提



图2 3种基因型小鼠大体形态

Fig.2 The gross morphology of three kinds of gene type mouse



A: PCR示*Brg1*基因鉴定结果; B: PCR示*(tetO)7-Cre*鉴定结果; C: q-PCR示*SP-C-rtTA*鉴定结果。

A: the result of genotype of *Brg1* was determined by PCR; B: the result of genotype of *(tetO)7-Cre* was determined by PCR; C: the result of genotype of *SP-C-rtTA* was determined by q-PCR.

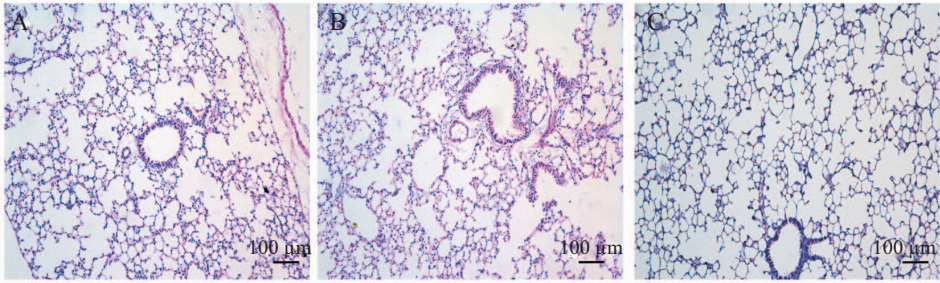
图3 *Brg1*转基因小鼠子代基因型鉴定结果Fig.3 The results of PCR genotyping of filial generation of *Brg1* transgenic mice

DNA是否可用, 条带300 bp为可用(图3B)。*SP-C-rtTA*判断方式为: 阳性小鼠熔解峰在 92 ± 1 °C, 阴性熔解峰在 82 ± 1 °C(图3C)。*Brg1*为纯合、*(tetO)7-Cre*和*SP-C-rtTA*同时阳性, 该小鼠为纯合子, 记为*SP-C-rtTA/(tetO)7-Cre/Brg1^{fl/fl}*。*Brg1*为杂合, *(tetO)7-Cre*和*SP-C-rtTA*为阳性, 该小鼠为杂合子, 记为*SP-C-rtTA/(tetO)7-Cre/Brg1^{fl/+}*。*(tetO)7-Cre*或*SP-C-rtTA*为阴性, 无论*Brg1*为纯合或杂合, 该小鼠为同窝野生型, 记为WT。

2.3 II型肺泡上皮细胞特异性敲低*Brg1*结果

2.3.1 肺组织病理改变 成功鉴定小鼠基因型后, 我们用多西环素诱导*Brg1*敲低, 取3种基因型小鼠肺组织行HE染色, 发现*Brg1*^{ΔAEII/ΔAEII}、*Brg1*^{ΔAEII/+}及*Brg1*^{+/+}等3种基因型肺部病理改变无明显差异(图4), 提示由多西环素诱导的II型肺泡上皮细胞特异性敲低*Brg1*不会引起肺部自发性的病理改变。

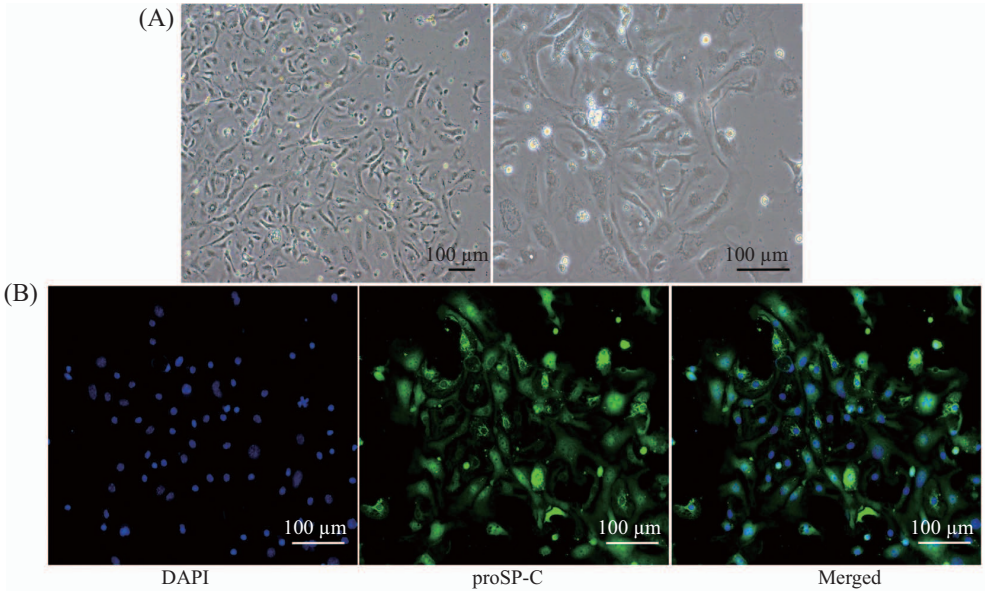
2.3.2 倒置显微镜和免疫荧光法鉴定小鼠原代II型肺



A: *Brg1*^{ΔAEII/ΔAEII} 纯合敲低组; B: *Brg1*^{ΔAEII/+} 杂合敲低组; C: *Brg1*^{+/+} 同窝对照组。
A: *Brg1*^{ΔAEII/ΔAEII} group; B: *Brg1*^{ΔAEII/+} group; C: *Brg1*^{+/+} group.

图4 多西环素诱导后3种基因型小鼠肺组织病理改变(HE染色)

Fig.4 Pathological changes of lung tissue of three genotypes mouse after Doxycycline-inducible (HE staining)



A: 倒置显微镜观察AEC2s形态; B: 免疫荧光法检测proSP-C和DAPI的表达。
A: morphology of AEC2s under inverted microscope; B: expression of proSP-C and DAPI detected by immunofluorescence.

图5 倒置显微镜和免疫荧光法鉴定原代小鼠II型肺泡上皮细胞

Fig.5 Identification of primary type II alveolar epithelial cells by microscope and immunofluorescence staining

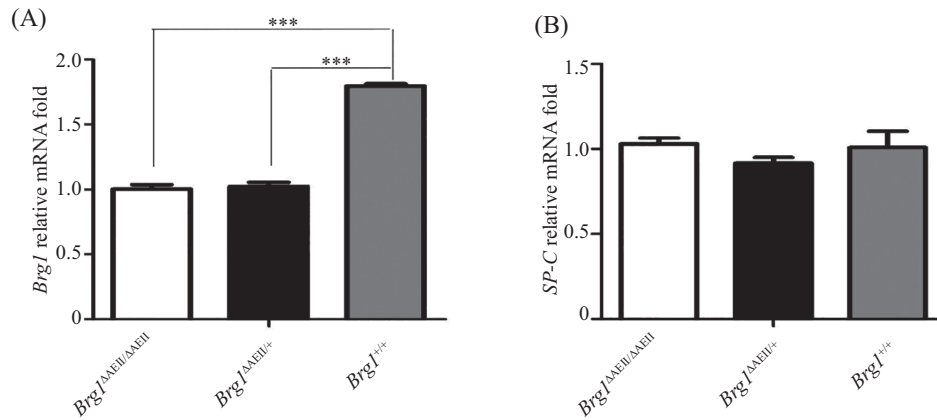
泡上皮细胞 为鉴定*Brg1*的敲低效率,我们用磁珠分选法提取了小鼠原代II型肺泡上皮细胞,提取的细胞培养12~18 h开始伸展贴壁,形态呈圆形或立方形,细胞质内有大量反差明显的细小颗粒,胞核明显,细胞呈岛状生长。培养24 h后,部分细胞贴壁生长,逐渐融合,36 h细胞平展呈多边形,相互连接成细胞单层(图5A)。培养72 h后,细胞内颗粒逐渐减少,第6~7 d明显减少,无法辨认AEC2s形态。除观察细胞形态之外,我们用免疫荧光法观察到大于90%的细胞proSP-C为阳性(图5B),提示II型肺泡上皮细胞提取成功。

2.3.3 RT-PCR检测*Brg1*和*SP-C* mRNA水平 我们将II型肺泡上皮细胞裂解,用RT-PCR的方法检测*Brg1*和*SP-C* mRNA水平。结果发现,与对照组相比,

Brg1^{ΔAEII/ΔAEII}纯合敲低组*Brg1* mRNA水平极显著降低($P<0.001$), *Brg1*^{ΔAEII/+}杂合敲低组*Brg1* mRNA水平也极显著降低($P<0.001$)。而*SP-C*在3组统计学上无差异(图6),提示*Brg1*的敲低对*SP-C*的表达无影响。
2.3.4 Western blot检测*Brg1*和proSP-C蛋白表达 我们进一步用Western blot验证*Brg1*敲低水平,结果显示,与对照组比较, *Brg1*^{ΔAEII/ΔAEII}纯合敲低组*Brg1*蛋白水平明显降低($P<0.01$),敲低效率50%~60%, *Brg1*^{ΔAEII/+}组*Brg1*也有降低($P<0.05$),提示*Brg1*敲低成功。3组proSP-C表达量统计学上无差异($P>0.05$)(图7),与RT-PCR结果相符。

3 讨论

AEC2s是组成肺泡上皮细胞的2种主要细胞之

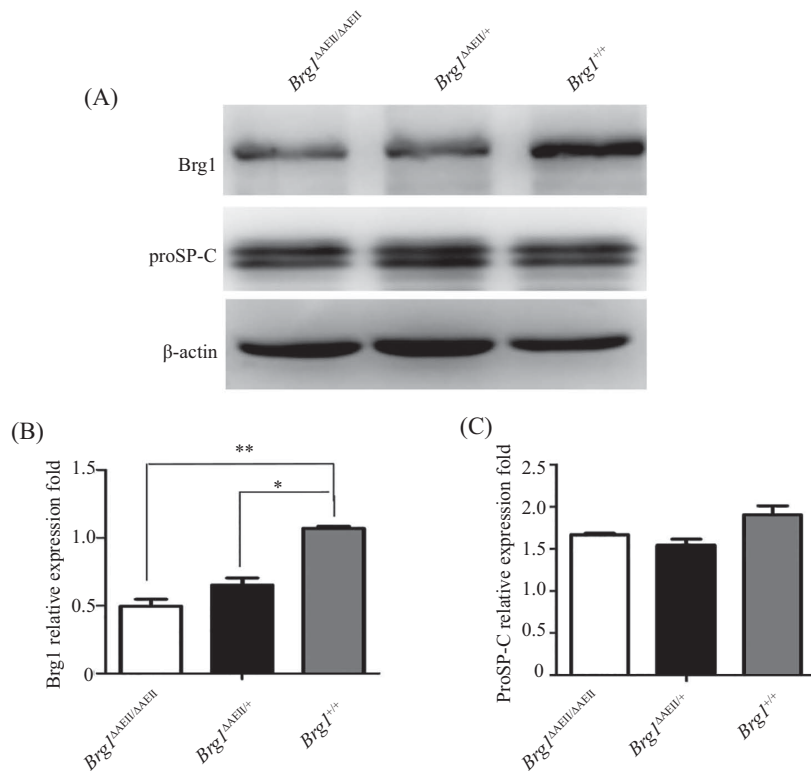


A: *Brg1* mRNA水平; B: *SP-C* mRNA水平。*** $P < 0.001$, 与 $Brg1^{+/+}$ 组比较。

A: mRNA level of *Brg1*; B: mRNA level of *SP-C*. *** $P < 0.001$ vs $Brg1^{+/+}$ group.

图6 RT-PCR检测多西环素诱导后原代II型肺泡上皮细胞中*Brg1*和*SP-C* mRNA水平

Fig.6 The mRNA levels of *Brg1* and *SP-C* in primary type II alveolar epithelial cells after Doxycycline-inducible



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

图7 Western blot检测多西环素诱导后原代II型肺泡上皮细胞中*Brg1*和*proSP-C*蛋白质表达水平

Fig.7 The protein levels of *Brg1* and *proSP-C* in primary type II alveolar epithelial cells after Doxycycline-inducible

一, 其可以分化为I型细胞, 也可通过有丝分裂补充自身的数量, 因此被认为是肺泡上皮的干细胞^[10-11], 在肺发育、肺损伤等过程中有重要作用。SP-C是仅在AEC2s表达的惟一活性蛋白^[12], 故主要靠检测SP-C表达来鉴定AEC2s。本研究通过磁珠分选法分选、纯化小鼠原代AEC2s, 免疫荧光法及Western blot均证实小鼠原代AEC2s提取成功, 所提取的细胞含量高(90%以上), 纯度高, 细胞生长状态好, 为进一步体

外研究AEC2s的生物学功能奠定了基础。

*Brg1*是染色质重构蛋白复合物SWI/SNF的核心催化亚基。*Brg1*基因位于人类染色体19p13.2上, 小鼠体内位于9A3, 可与多种蛋白质结合并相互作用, 在细胞周期调控、细胞分化、DNA修复及个体发育中发挥重要作用^[5,13]。近几年研究发现, *Brg1*与肺疾病关系密切。Orvis等^[14]和Xi等^[15]发现, 在人非小细胞肺癌细胞中, *Brg1*缺失会改变细胞形态、增

加成瘤潜能。而在由脂多糖诱导的急性肺损伤小鼠模型中, *Brg1*表达升高, 对研究急性肺损伤的分子机制具有重要的指导意义^[16]。在小鼠肺泡上皮细胞系MLE-15中发现, *Brg1*对肺泡表面活性物质SP-B的表达起重要作用^[6], 提示*Brg1*可能调控AEC2s的生物学功能, 如其干性的维持、自身增殖分化等, 但该研究仅限于细胞层面, 在小鼠肺泡上皮中敲低*Brg1*的研究尚无报道, 因此我们需要构建特异性AEC2s上敲低*Brg1*的小鼠模型。*Cre*重组酶是一种应用最广泛的条件性特异性位点敲除哺乳动物基因的工具^[17], 同时由于*Brg1*纯合敲除有胚胎致死性^[7], 全身敲除后无法繁殖, 因此我们构建了AEC2s特异性、条件性*Brg1*基因敲低小鼠, 引进*Brg1^{fl/fl}*小鼠, 与AEC2s带有(*tetO*)₇-*Cre*重组酶的小鼠杂交, 并按照SPF级动物饲养标准进行饲养和繁殖, 采用PCR和琼脂糖凝胶电泳对其子代出现的*SP-C-rtTA/(tetO)7-Cre/Brg1^{fl/fl}*纯合子、*SP-C-rtTA/(tetO)7-Cre/Brg1^{fl/-}*杂合子及野生型3种基因型进行鉴定。3种基因型小鼠经多西环素诱导后, 通过RT-PCR及Western blot验证*Brg1*纯合敲低效率50%~60%, 杂合敲低效率55%~70%。与野生型小鼠相比, *Brg1*敲低小鼠生长状态良好, 且无胚胎期致死性, 肺上亦无病理改变, 为进一步体内研究*Brg1*与AEC2s的功能、*Brg1*对疾病产生影响的机制等提供模式动物。另有研究表明, *Brg1*有促进心和肾纤维化的作用^[18-19], 但其在肺纤维化中的表达及作用尚无报道。我们发现, 在此敲低效率下敲低*Brg1*后可影响小鼠对博来霉素所致肺纤维化的易感性, 提示该模型适用于疾病的研究, 由于肺纤维化发生发展中成纤维细胞亦为关键细胞, 因此, 本研究结果为进一步研究*Brg1*对成纤维细胞的影响、肺成纤维细胞甚至肺部其他细胞特异性*Brg1*基因敲低鼠的构建提供了可能性。

参考文献 (References)

- Bishop AE. Pulmonary epithelial stem cells. *Cell Prolif* 2004; 37(1): 89-96.
- Rock JR, Barkauskas CE, Currence MJ, Xue Y, Harris JR, Liang J, *et al.* Multiple stromal populations contribute to pulmonary fibrosis without evidence for epithelial to mesenchymal transition. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011; 108(52): 1475-83.
- Gereke M, Grobe L, Pretin S, Kasper M, Deppenmeier S, Gruber AD, *et al.* Phenotypic alterations in type II alveolar epithelial cells in CD4⁺ T cell mediated lung inflammation. *Respir Res* 2007; 8: 47.
- Ho L, Ronan JL, Wu J, Staahl BT, Chen L, Kuo A, *et al.* An embryonic stem cell chromatin remodeling complex, esBAF, is essential for embryonic stem cell self-renewal and pluripotency. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106(13): 5181-6.
- Ho L, Crabtree GR. Chromatin remodelling during development. *Nature* 2010; 463(7280): 474-84.
- Cao Y, Vo T, Millien G, Tagne JB, Kotton D, Mason RJ, *et al.* Epigenetic mechanisms modulate thyroid transcription factor 1-mediated transcription of the surfactant protein B gene. *J Biol Chem* 2010; 285(3): 2152-64.
- Bultman S, Gebuhr T, Yee D, La Mantia C, Nicholson J, Gilliam A, *et al.* A *Brg1* null mutation in the mouse reveals functional differences among mammalian SWI/SNF complexes. *Mol Cell* 2000; 6(6): 1287-95.
- Sumi-Ichinose C, Ichinose H, Metzger D, Chambon P. SNF2b-BRG1 is essential for the viability of F9 murine embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol* 1997; 17(10): 5976-86.
- Messier EM, Mason RJ, Kosmider B. Efficient and rapid isolation and purification of mouse alveolar type II epithelial cells. *Exp Lung Res* 2012; 38(7): 363-73.
- Kinnard W, Tudor R, Papst P, Fisher JH. Regulation of alveolar type II cell differentiation and proliferation in adult rat lung explants. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1994; 11(4): 416-25.
- Holm BA, Matalon S, Finkelstein JN, Notter RH. Type II pneumocyte changes during hyperoxic lung injury and recovery. *J Appl Physiol* 1988; 65(6): 2672-8.
- Hamvas A, Cole FS, Noguee LM. Genetic disorders of surfactant proteins. *Neonatology* 2007; 91(4): 311-7.
- Hargreaves DC, Crabtree GR. ATP-dependent chromatin remodeling: Genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res* 2011; 21(3): 396-420.
- Orvis T, Hepperla A, Walter V, Song S, Simon J, Parker J, *et al.* BRG1/SMARCA4 inactivation promotes non-small cell lung cancer aggressiveness by altering chromatin organization. *Cancer Res* 2014; 74(22): 6486-98.
- Xi Q, He W, Zhang XH, Le HV, Massagué J. Genome-wide impact of the BRG1 SWI/SNF chromatin remodeler on the transforming growth factor β -transcriptional program. *J Biol Chem* 2008; 283(2): 1146-55.
- 张荣, 彭单伊, 夏耘秋, 高黎, 徐洁, 任洛, 等. 脂多糖诱导急性肺损伤小鼠中E-cadherin和*Brg1*的表达及意义. 免疫学杂志 (Zhang Rong, Peng Danyi, Xia Yunqiu, Gao Li, Xu Jie, Ren Luo, *et al.* The expression and significance of E-cadherin and *Brg1* in mice challenged by lipopolysaccharide. *Immunological Journal*) 2015; 31(5): 391-5.
- Feng YQ, Seibler J, Alami R, Eisen A, Westerman KA, Le Boulch P, *et al.* Site-specific chromosomal integration in mammalian cells: Highly efficient CRE recombinase-mediated cassette exchange. *J Mol Biol* 1999; 292: 779-85.
- Weng X, Yu L, Liang P, Li L, Dai X, Zhou B, *et al.* A crosstalk between chromatin remodeling and histone H3K4 methyltransferase complexes in endothelial cells regulates angiotensin II-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 2015; 82: 48-58.
- Zager RA, Johnson AC. Renal ischemia-reperfusion injury up regulates histone-modifying enzyme systems and alters histone expression at proinflammatory/profibrotic genes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2009; 296(5): 1032-41.