

建立阿尔茨海默症的转基因动物模型

常洋 秦川* 尹红星 朱华 蔡有余

(中国医学科学院中国协和医科大学实验动物研究所, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立阿尔茨海默症转基因动物模型, 为病因研究和药物筛选提供了一个合适的动物模型。
方法 通过显微注射方法将外源 DNA 注射到小鼠受精卵的雄性原核, 移植到假孕母鼠的输卵管。仔鼠出生后, 经 PCR 及 PCR-Southern 杂交检测阳性小鼠。
结果 共注射 887 枚受精卵, 存活 482 枚, 移卵后产仔 35 只, 阳性 3 只。阳性鼠分别传代, 在 F₂ 代获得纯合子后建系。免疫组织化学显示在大脑皮层、小脑及海马的神经细胞有 A β 沉淀形成。
结论 通过显微注射的方法已建立与人类发病机理相似的阿尔茨海默症转基因动物模型。

【关键词】 阿尔茨海默症; APP; 转基因; 模型

【中图分类号】 Q75 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 0529-1356(2000)02-144

ESTABLISHMENT OF THE TRANSGENIC MODEL OF ALZHEIMER DISEASE

CHANG Yang, QIN Chuan*, YIN Hong-xing, ZHU Hua, CAI you-yu

(Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish a transgenic model of Alzheimer disease. **Methods** We constructed the transgene containing the human APP cDNA 695 V717I driven by PDGF promoter which expresses specifically in nervous system. The transgene was microinjected into the male pronucleus of the zygotes. The tail DNA of pups was tested by PCR and Southern blot. **Results** 887 embryos were microinjected, 482 were implanted to 20 recipient pseudopregnant mice, 3 of 35 pups carrying the transgene. Each Heterozygous founders generated a transgenic line that was homozygous for the transgene. Immunocytochemistry revealed plaques in pallium, cerebellum, and hippocampus. **Conclusions** Resembling animal model of the human pathogenic mechanism for the screening of proper remedies established in our laboratory and could be used for further studied.

【Key words】 Alzheimer disease; APP; Transgene; Model

阿尔茨海默症(Alzheimer disease, AD)是进行性神经降解性疾病, 通常表现为记忆丧失。其基本病理表现是由于 APP 在脑部的异常代谢产生的 38~42 个氨基酸的有神经毒性的多肽(A β A₄)沉积在大脑皮层和海马结构, 形成 β 淀粉样斑块^[1]。动物模型的缺少已经成为 AD 发病机理研究及药物筛选的主要障碍。虽然化学方法, 免疫方法甚至将多肽直接注入啮齿类动物脑内的努力都已尝试, 但都不是很理想^[2]。1980 年 Cordon 等^[3,4]以玻璃针刺进受精卵的雄原核, 注入 DNA 溶液, 成功地获得转基因动

物。利用转基因技术复制人类疾病动物模型, 已成为一个主要发展方向。

我们以 PDGF 启动子调控 APP cDNA 构建转基因, 通过显微注射进入小鼠受精卵的雄性原核。通过 PCR 及 Southern 杂交检测获得阳性小鼠, 现在正在传代建系。

材料和方法

1. 转基因片段的制备

含有全长突变的人 APP cDNA 695 V717I 受控

【收稿日期】1999-06-08 **【修回日期】**1999-10-18

【基金项目】 国家科技部特别资助项目

【作者简介】 常洋(1969-), 男(汉族), 黑龙江省哈尔滨市人, 博士

* 通讯作者(To whom correspondence should be addressed)

于 PDGF 启动子调控的质粒 pPDAP⁶⁹⁵ 由本课题组构建^[5]。质粒 pPDAP⁶⁹⁵ 的 T_{th}11I+XbaI 的酶切片段为 4.1kb, 透析袋法进行回收。氯化铯超离纯化, 于 20℃、40 000r/min 离心 48h。分步收集, 将含有 DNA 的溶液合并, 在注射缓冲液中透析。注射缓冲液含 7.5mmol/L Tris(pH7.4) 与 0.175 mmol/L EDTA。

2. 转基因操作

2.1 限制性内切酶及主要生化试剂: 限制性内切酶及 Tap DNA 聚合酶购于 Promega 公司及华美生物工程公司。一般化学试剂均为国产分析纯。乳酸钠、透明质酸酶、矿物油、BSA 等均购于 Sigma 公司 (embryo tested)。孕马血清(PMS) 购于天津市华孚高新生物技术公司, 人绒毛膜促性腺激素(HCG) 为上海生物化学制药厂生产。

2.2 动物品系: 种小鼠为 BDF1, 10 周龄以上。供卵鼠为 KM, 4~5 周龄, 体重 12~16g。结扎公鼠为 KM/ICR, 10 周龄以上。受体鼠(假孕鼠) 为 KM/ICR, 8 周龄以上, 体重 30g 以上。

2.3 主要仪器: 倒置显微镜(Nikon)、显微操作系统(NARISHIGE)、解剖镜(Nikon) 钟表镊(Swiss)、CO₂ 孵箱、DNA 合成仪(PE480)。

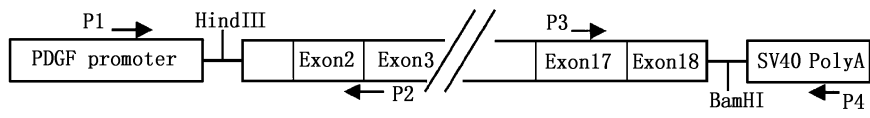


图 1 APP 695 转基因构建及 PCR 引物设计图

Fig. 1 Construction of APP⁶⁹⁵ transgene and design of PCR primers

P1 为 5'-GTCACCCCTAGTTCTTTTT-3', P2 5'-GGTAGACTTCTTGGCAATAC-3', PCR 循环: 94℃ 5min 预变性; 94℃ 1min, 57℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 延长 10min。

P3 为 5'-GGTGGGCGGTGTTGTCAT-3', P4 为 5'-ACCTCCCCCTGAACCTGAAA-3', PCR 循环: 94℃ 5min 预变性; 94℃ 30s, 57℃ 30s, 72℃ 30s, 30 个循环; 72℃ 延长 10min。

3.3 PCR-Southern P₃、P₄ 引物对扩增产物选用 DIG 高效随机引物标记与检测试剂盒 I(B·M·) 进一步检测。

3.4 转基因鼠建系 首建鼠与 C57BL 交配, 产生 F₁ 代。F₁ 代阳性鼠同窝互交, 在 F₂ 代检测纯合子。

4. 病理学检查

标本经 4% 中性甲醛固定, 常规石蜡切片, 免疫

2.4 超排卵和取卵: 供卵鼠于明暗循环的明循环中点腹腔注射 PMS 10 IU, 46h 后注射 HCG 10IU, 并与公鼠合笼, 次日晨将有阴栓的母鼠处死。取输卵管在膨大部划出卵团, 加透明质酸酶消化, 挑出受精卵于 M₁₆ 继续培养 4h。

2.5 显微注射 GD-1 管在水平拉针仪(MODEL PN-30, NARISHIGE JAPAN) 拉成注射针。拉针条件: HEATER LEVEL: 70.4, MAGNET SUB: 22.1, MAGNET MAIN: 59.6。注射针末端虹吸 DNA 溶液后, 于 400 倍镜下注入受精卵雄性原核。注射浓度 2mg/L。

2.6 移卵: 受精卵注射后在 M₁₆ 继续培养 2~4h, 挑选生长状态较好的卵, 进行移卵。每只假孕鼠输卵管单侧移卵约 30 枚。

3. 转基因鼠的鉴定及传代建系

3.1 提取鼠尾 DNA: 仔鼠乙醚麻醉后, 剪 1.0~1.5cm 鼠尾, 在裂解液中剪碎后, 加蛋白酶 K 消化过夜。酚、氯仿抽提, 乙醇沉淀、漂洗, 晾干后加 150μL TE 溶解。

3.2 鼠尾 DNA 的 PCR 检测: 取 1~2μL 鼠尾 DNA 进行 PCR 反应。本实验共设计两对引物, 分别位于转基因片段的 5' 端和 3' 端(图 1)。

组织化学采用 ABC 法。ABC 试剂盒为 VECTOR 公司产品, 一抗为小鼠抗人 Aβ 单克隆抗体, 1:200 稀释。

结 果

1. 回收的转基因片段凝胶电泳(图 2)



图 2 APP 695 转基因片段电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of APP⁶⁹⁵ transgene 1% Agrose

1, λDNA/HindIII Marker

2, APP⁶⁹⁵ transgene

2. 共注射 887 枚卵, 2~4h 后存活 482 枚, 植入 20 只假孕鼠, 8 只妊娠, 共产仔 35 只, 阳性 3 只, 阳性率 8.6%(3/35)。

3. 为提高 PCR 的特异性, 我们将引物分别设计在来自不同基因的片段中。同时参考 APP 基因组约 180kb, 含有 18 个外显子^[6], 将 P1 设计在 PDGF

启动子的 3'端^[7], P2 设计在 APP cDNA 的 5'端第 2 外显子与第 3 外显子连接处。PCR 扩增产物 574bp, 中间含有单一 HindIII 酶切位点可对扩增产物进一步鉴定。P3、P4 亦分别设计在 APP cDNA 的 3'端第 17 外显子和 SV40 的 5'端, 含单酶切位点 BamHI。PCR 鉴定结果如图 3。



图 3 PCR 筛选电泳结果

Fig. 3 Identification of tail DNA by PCR, 1.2% agarose

3a Primer P1、P2

1, Positive control

2, Negative control

3, Tg40#, 4, Tg46#, 5, Ct47#,

6, PCR Marker 1543, 994, 694,

515, 377, 237bp

3b Primer P3、P4

1, Positive control

2, Negative control

3, Tg40#, 4, Tg46#, 5, Tg47#,

6, PCR Marker 1543, 994, 694,

515, 377, 237bp



图 4 PCR-Southern 杂交结果

Fig. 4 PCR-Southern result

1, Tg40#; 2, Tg46#;

3, Tg47#

4. PCR 初步筛选出的 40#、46#、47# 阳性鼠, 经进一步 PCR-Southern 杂交检测确定为首建鼠(图 4)。3 只首建鼠分别和 C57BL 雌性正常鼠交配, 进行传代建系。Tg40#、Tg46#、Tg47# F1 代的阳性率分别为 24.0%(6/25), 42.9%(12/28), 7.1%(2/28)。

5. 免疫组织化学检查结果, 在转基因阳性鼠的大脑皮层、小脑及海马区神经细胞有 A β 产生, 免疫组织化学显示神经细胞胞浆及间质呈黄棕色染色(图 5)。对照鼠免疫组织化学染色呈阴性。

讨 论

1980 年 Cordon 等^[7]以玻璃针刺进受精卵的雄原核, 注入 DNA 溶液, 成功地获得转基因动物。利用转基因技术复制人类疾病动物模型, 已成为一个主要发展方向。

研究表明, 直接表达 APP 基因的 A β 片段或 C99-104 片段以产生 AD 表型, 可能不是一个适当的策略^[8]。而 APP 基因组长达 170kb, 转基因操作

难度较大。已在病人脑部发现 APP 各剪接单体表达比例的异常, 推测 APP 基因的异常表达与 AD 发病有关。在 M17 成纤维细胞瘤细胞中发现 V717I 突变可增加 A β (1~42) 与 A β (1~40) 的比例, 而前者正是选择沉淀在斑块核心的主要成分, 证明这些突变是致病性的。PDGF 启动子具有神经组织特异性, 调控目的基因在转基因鼠的大脑皮层、海马、下丘脑、小脑广泛表达, 与 AD 的病变部位一致。因此, 我们选择 PDGF 启动子调控全长突变 APP cDNA。

显微注射技术操作复杂, 所需仪器昂贵。受精卵最终发育成个体的比例远低于未经显微注射的受精卵, 这是由于体外操作、注射造成的物理损伤及 DNA 溶液的化学损伤。同时, 移卵手术对动物也是一种损伤。我们在操作过程中所有条件的优化都是将这些损害减低到最小程度, 我们在实验中总结一些经验。

采集受精卵的数量及质量很重要, 受很多因素的影响。3 周龄雌鼠对激素非常敏感, 超排卵数量多, 但卵膜脆性大, 易碎。5 周龄以上鼠, 超排卵数量

减少,但卵较成熟,卵膜有韧性。我们一般选择 4~5 周鼠作供体。PMS 的用量为 7~10IU/只,HCG 的用量为 5~7IU/只。PMS 的质量及纯度很关键。过多的杂蛋白会影响吸收。我们观察,PMS 的用量在 10IU 以内时,超排卵的数量与剂量成正比,超过 10IU 卵的数量增加并不明显,但质量下降,很可能是过量的激素,对卵巢及动物体产生损害,或影响正常生理代谢。HCG 的用量在 5IU 时,一般就能保证超排成功。关键是控制采卵时间与注射 HCG 间隔 20h,此时受精卵正好停留在输卵管的膨大部。任何人工的培养,都难以模拟母鼠体内的最佳条件。所以,应尽量减少受精卵在体外的培养时间,特别是显微操作的时间。注射完成后,尽早移回母鼠体内。注射针拉制后,不经磨针仪处理直接使用,保证尖端的锐利、平滑。注射针始终保持一定压力,进针后不再调整压力。观察到原核膨大后,迅速退针。

外源 DNA 注射到受精卵的雄性原核。小鼠的雄性原核较雌性原核大,易于显微操作。注射后的受精卵,培养 2h 后,即开始移卵。选择 KM 或 ICR 作假孕鼠的优点是,发情周期稳定,母性强。同时,在颜色上易与仔鼠区分。8 周龄时,雌鼠各脏器发育完全成熟,适于作假孕鼠。体重在 27~32g 时最好,过大则卵巢上的脂肪垫肥厚,不利于移卵操作。考虑到双侧移卵手术操作时间长,对动物损害大。我们采用单侧移卵约 30 枚。通过观察,我们发现单侧移卵鼠,最终妊娠仍是双侧。说明,受精卵可以被移动到双角子宫的另一侧着床,虽然具体的机制还不清楚。

经 PCR 筛选出的 40#、46# 和 47# 阳性鼠再经 Southern 杂交鉴定,未发现假阳性。早期的转基因研究中,一直将 Southern 杂交作为阳性鼠的最终结论。实践证明,通过严谨、合理的设计,PCR 鉴定完全可以作为最终结论。

3 只阳性鼠已分别建系,现已传到 F₂ 代。理论上,F₁ 代的阳性率应为 50%,但由于转基因随机整合到小鼠的基因组,外源基因的插入可能会影响一些的基因的表达与调控,扰乱了进化过程中形成的稳定、平衡、优化的内环境。所以转基因动物普遍表现为繁殖能力低,抗病能力差。这一点对需要保种、育种的转基因动物尤其重要。Tg46#F₁ 代的阳性率接近 50%,但 Tg47# 仅为 7.1%,很可能阳性动物在胚胎发育的早期就受到了影响。F₂ 代纯合子的

鉴定工作,正在进行中。

转基因技术在医学研究中的应用,主要是建立与人类发病机理相似的疾病模型。阿尔茨海默症转基因动物模型的建立为研究 APP 的代谢、AD 的发生和发展及药物干预对发病进程的影响提供了极好的动物模型。

感谢中国医学科学院基础所李铁昌、郭志晨,中国农业科学院畜牧所陈英在转基因技术上提供的帮助。

本文图 5,6 见插图第 10 页

图 版 说 明

图 5 APP⁶⁹⁵ 转基因鼠脑神经细胞胞浆及间质呈黄棕色,ABC 法 ×400

图 6 对照鼠脑神经细胞胞浆及间质呈阴性,ABC 法 ×400

Explanation of figures

Fig. 5 Immunocytochemistry analysis of the APP⁶⁹⁵ Transgenic mice, ABC ×400. The brain of 3-month-old Transgenic mice were immunostained with A β antibodies.

Fig. 6 Immunocytochemistry analysis of the non-transgenic mice, ABC ×400. The brain of 3-month-old non-transgenic mice were not immunostained with A β antibodies.

参 考 文 献

- [1] Jie K, Hans-Georg L, Unterbeek A, et al. The Precursor of Alzheimer disease amyloid A β Protein resembles a cell-surface receptor[J]. Nature, 1987,325(19):733-735.
- [2] Games D, Khan K M, Soriano F G. Lack of alzheimer pathology after β amyloid protein injections in rat brain[J]. Neurobiology of Aging, 1992,13:569-574.
- [3] Alan R S. Transgenic animals[J]. Mole Med, 1996,334(10):653-655.
- [4] Adriano A, Sebastian B, Ulrich S, et al. Transgenic and knockout mice: models of neurological disease [J]. Brain Pathology, 1994,4():3-20.
- [5] 常洋,秦川,琦祖和,等. APP 真核表达载体的构建与鉴定[J]. 中国老年学杂志,1999;19(4):239~241.
- [6] Yoshikai S, Sasaki H, Dohura K, et al. Genomic organization of the human amyloid betaprotein precursor gene[J]. Gene, 1990,87():257-264.
- [7] Masakiyo S, Jochen W, Elaine W, et al. PDGF B-chain in neurons of the central nervous system, posterior pituitary, and in a transgenic Model[J]. Cell, 1991,64:217-227.
- [8] Gordon J W, Ruddle F H. Integration and stable germ Line transmission of genes injected into mouse pronuclei[J]. Science, 1981,214:1224-1246.
- [9] 常洋,秦川,蔡有余.阿尔茨海默症的转基因动物模型.中国实验动物学杂志,1999,9(2) 110~114.

