

# 四环素调控 A30P 突变 $\alpha$ -synuclein 转基因小鼠的构建

胡伟东 杨亚萍 程言博 钱进军 李莉  
张萍 石际俊 刘春风\*

(苏州大学附属第二医院神经内科 苏州 215004; 苏州大学衰老与神经疾病实验室 苏州 215123;  
扬州大学比较医学中心 扬州 225009)

**摘要:**为了构建四环素调控的人 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 转基因小鼠模型,将外源基因 pTRE2-*syn* 和 pBC-*nTA* 同时显微注射到 FVB 小鼠 (*Mus musculus*) 受精卵的雄原核中,将注射后存活的受精卵移植到同期发情的假孕受体鼠输卵管中,出生个体经 PCR 检测,获得 *nTA* 和 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 双阳性转基因雌鼠 1 只, A30P 单基因阳性雄鼠 13 只并传代。强力霉素诱导后双阳性后代脑区各部分 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein mRNA 均有表达,而在诱导满 4 周后,脑干  $\alpha$ -synuclein 蛋白表达明显增加,8 周后增加更明显。结果表明,通过强力霉素诱导后,可在小鼠小脑、脑干、海马、皮层检测到 A30P mRNA 表达,脑干  $\alpha$ -synuclein 表达量显著增加。

**关键词:** 四环素; A30P;  $\alpha$ -synuclein; 转基因; 构建

**中图分类号:** Q812 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2009)02-64-07

## Establishment of Tetracycline-controlled A30P Mutation $\alpha$ -synuclein Transgenic Mice

HU Wei-Dong YANG Ya-Ping CHENG Yan-Bo QIAN Jin-Jun LI Li  
ZHANG Ping SHI Ji-Jun LIU Chun-Feng\*

(Department of Neurology, The Second Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou 215004;  
Laboratory of Aging and Nervous Diseases, Suzhou University, Suzhou 215123;  
The Comparative Medicine Center of Yangzhou University, Yangzhou 225009, China)

**Abstract:** To establish tetracycline-controlled A30P mutation  $\alpha$ -synuclein transgenic mice, pTRE2-*syn* and pBC-*nTA* dual transgenic mice were generated by pro-nuclear microinjection and embryo transplantation. Positive founder mice were identified through PCR. An *nTA* and A30P dual positive transgenic founder and thirteen A30P single transgenic founders were obtained. The expression of A30P mRNA was detected by RT-PCR in the brain of the dual transgenic mice after administration of tetracycline. In addition, the expression of  $\alpha$ -synuclein protein in the brainstem was also significantly increased in double-transgenic mice after 4-week continuous treatment with doxycycline.

**Key words:** Tetracycline; A30P;  $\alpha$ -synuclein; Transgenic; Establishment

**基金项目** 2007 年度江苏省脑病生物信息重点实验室开放课题 (Jsb10702) 和苏州大学高校省级重点实验室开放课题 (KJ S0722);

\* 通讯作者, E-mail: liucf20@hotmail.com;

**第一作者介绍** 胡伟东,男,硕士,主治医师;研究方向:帕金森病;E-mail: weidonghu@yahoo.com.cn。

**收稿日期:** 2008-09-09, **修回日期:** 2008-12-30

四环素调控系统是一种高效无毒、具有严密开/关功能的特异性基因诱导表达系统,可根据需要来控制基因表达的开关,是目前比较成熟的真核生物基因诱导表达系统之一,已被成功应用于转基因鼠的基因诱导表达的研究<sup>[1]</sup>,它可分为 Tet-Off 系统和 Tet-On 系统。

Tet-Off 系统是 Gossen 等于 1992 年利用大肠杆菌四环素抗性操纵子 (Tet operator, TetO) 受四环素阻遏蛋白 (Tet repressor protein, TetR) 负性调节的原理,通过把四环素阻遏蛋白 (TetR) 的 N 端 1~207 氨基酸与单纯疱疹病毒 VP16 蛋白的 C 端的 127 氨基酸激活结构域融合,构成四环素转录激活蛋白 (tetracycline controlled transactivator, tTA) 构成调节元件;而 7 个拷贝的四环素抗性操纵子 (TetO) 序列与含有来自巨细胞病毒的最小启动子 (the minimal CMV promoter, PminCMV) 融合构成四环素反应元件 (Tet response element, TRE),目的基因位于下游,其 PminCMV 由于缺少激活蛋白不能启动下游基因的转录。这样无四环素时, tTA 与 TetO 结合后可使 TRE 下游基因转录,而加入四环素时, tTA 蛋白发生构象变化,不能结合 TetO,从而 TRE 下游基因的转录被阻断,构建成了 Tet-Off 基因诱导表达系统。Tet-On 系统是 Gossen 等基于 Tet-Off 系统,通过随机突变改变四环素阻遏蛋白 (TetR) 上 4 个氨基酸,将 tTA 转变为 reverse tTA (rtTA),因此在诱导物存在的情况下,调节蛋白 rtTA 可与四环素反应元件 TRE 特异结合,从而启动下游目的基因的表达;在无诱导物时,四环素反应元件 TRE 的 PminCMV 由于缺少激活蛋白不能启动下游基因的转录,这就是 Tet-On 基因诱导表达系统<sup>[2]</sup>。

帕金森病 (Parkinson disease, PD) 是中老年常见的神经系统变性疾病,其病因及发病机制尚不完全清楚。路易小体是 PD 的特征性病理表现,主要是由一些中空的放射性淀粉样纤维组成,该纤维的主要组分是一种称为  $\alpha$ -synuclein 的蛋白质,而 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 是常染色体显性遗传的家族性 PD 的三种突变形式之一。2008 年, Nuber 等人<sup>[3]</sup> 建立了一个可调控表达

的人野生型  $\alpha$ -synuclein 的小鼠模型,小鼠出现了认知功能损害和进行性运动功能减退,且发现诱导后小鼠的中脑、前脑、黑质、海马大量表达野生型  $\alpha$ -synuclein 蛋白。

基于上述的调控表达系统以及  $\alpha$ -synuclein 与 PD 的重要相关性,我们试图建立一个能人为控制  $\alpha$ -synuclein 表达的小鼠在体模型,为研究  $\alpha$ -synuclein 以及为家族遗传性 PD 提供一个较为可靠的模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物及饲养环境** FVB 小鼠 (*Mus musculus*) 在 SPF (specific pathogen free, 无特定病原体) 级动物房中饲养。温度 (25 ± 1) °C, 相对湿度 70% ± 4%。IVC 鼠盒 (individually ventilated cages, 独立通气笼盒), 饲养密度 5 只/盒。笼具、垫料、饮水瓶均经高压处理,饲料经过<sup>60</sup>Co 辐照。自由采食和饮水,自动光控 (12 h 明/12 h 暗)。

**1.1.2 主要试剂和仪器** PCR 引物由上海生物工程技术服务公司合成, M16、M2 及透明质酸酶购自 Sigma 公司,孕马血清促性腺激素 (PMSG) 购自天津市华孚高生物新技术公司,人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 购自上海第一生化药业公司,RT-PCR 试剂盒与限制性内切酶购自 Fermentas 公司, DNA 聚合酶为大连宝生物工程公司产品,质粒抽提试剂盒和胶回收试剂盒购自 QIAGEN 公司,显微注射仪为 Nikon 公司 TE300。小鼠抗  $\alpha$ -synuclein 单克隆抗体购自 Sigma 公司,HRP 标记羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。DXP-2 小鼠转棒仪、ZIL-2 小鼠自发活动箱购自中国医学科学院药物研究所;自制小鼠爬杆,为一根竖直圆杆,直径 8 mm,高度 70 cm,表面缠敷医用胶布以防滑,并标有刻度。

**1.1.3 质粒和菌种** pTRE2-*syn* 和 pBC-*rtTA* 质粒及宿主菌 *E. coli* DH5 由扬州大学兽医学院实验动物教研室保存。

### 1.2 方法



IgG), 稀释度为 1:2 000, 37 °C 孵育 1 h, 用 TBST 洗膜 3 次, 每次 5 min; (8) ECL 反应: 等量混合 ECL 反应液 A 和 B, 均匀涂满 NC 膜; (9) 压片、显影和定影: 暗室内压片, 显影 60 s 后定影, 流水洗涤终止反应; (10) NC 膜经抗体洗脱液清洗后再进行内标  $\beta$ -actin 检测。

**1.2.8 强力霉素诱导后小鼠的行为学检测**  
分别对未诱导、诱导 4 周、8 周组转基因鼠进行行为学评定。所有行为学检测均在一恒温、固定布局、安静并光照充分的房间进行。固定由两名实验者进行, 一人负责仪器操作, 另一人负责记录。方法如下: (1) 小鼠爬杆检测: 测试前引导小鼠自杆顶爬下至桌面两次, 测试时将小鼠头端向下置于杆顶, 记录小鼠由 50 cm 高度爬至杆底平面的时间, 每只动物测 3 次, 每次间隔 5 min。 (2) 小鼠自发活动检测: 为避免动物活动固有周期的影响, 取每日固定时段 (9:00 ~ 10:00 时) 进行检测。置动物于自发活动箱中, 电脑自动记录设定时间内 (3 min) 的活动量, 次日重复测定一次, 取均值。 (3) 小鼠转棒耐力检测: 调整转棒速度为 12 r/min, 将小鼠置于直径 7 cm 的旋转圆棒上, 记录小鼠被置于棒上至跌落的时间 (潜伏期), 每只动物重复测 3 次, 每次间隔 5 min, 取平均值。测试前每只动物均进行两次适应性训练。

**1.2.9 强力霉素诱导后各组小鼠黑质酪氨酸羟化酶 (TH) 阳性细胞数的变化** 脱颈法迅速

断头取脑, 并切取黑质相应区域组织投入 4% 多聚甲醛中固定 24 h。经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、浸蜡包埋成蜡块后切片, 行切片的 TH 免疫组织化学染色。

**1.2.10 统计学方法** 所有数据以平均值  $\pm$  标准差 (Mean  $\pm$  SD) 表示。多组间比较用方差分析, 两组间比较用 *Lsd-t* 检验。以  $P < 0.05$  认为差异有显著意义。

## 2 结果

**2.1 PCR 检测** 获得的双阳性小鼠的 PCR 电泳分析结果 (图 1)。



图 1 A30P 与 rtTA 双阳性小鼠的 PCR 电泳分析

Fig. 1 Identify of A30P and rtTA transgenic mice by PCR

**2.2 双阳性转基因鼠诱导后各脑区 RT-PCR 结果** 强力霉素诱导 2、4、8 周后, 小鼠小脑、脑干、海马、皮层均有 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 基因的表达 (图 2)。

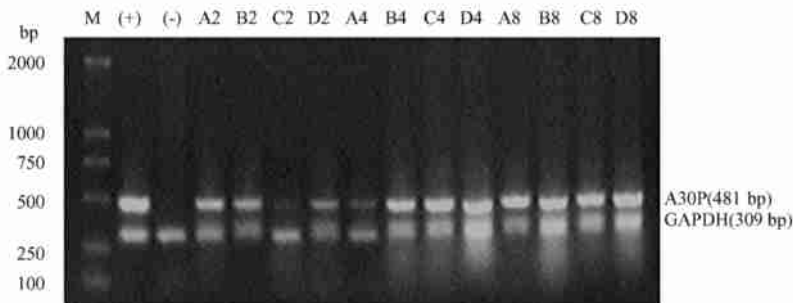


图 2 强力霉素诱导 2 周后小鼠各脑区 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein mRNA 的表达

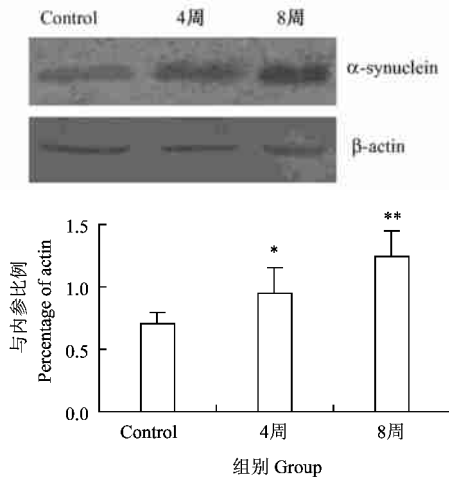
Fig. 2 The expression of A30P mRNA after 2 weeks treatment with doxycycline

M: DNA 分子量标准; (+) 为阳性对照; (-) 为阴性对照; A: 小脑; B: 脑干; C: 海马; D: 皮层; 2, 4, 8 分别代表诱导周数。

M: DNA marker; (+): Positive control; (-): Negative control; A: Cerebellum; B: Brainstem; C: Hippocampus; D: Cortex;

2, 4, 8 represent the weeks of treatment with doxycycline.

**2.3 不同诱导时间段脑干  $\alpha$ -synuclein 蛋白表达** 强力霉素诱导 4 周时,脑干  $\alpha$ -synuclein 蛋白表达明显增加,较对照组有显著性差异 ( $P < 0.05$ ),诱导 8 周时,蛋白表达进一步增加 ( $P < 0.01$ ) (图 3)。



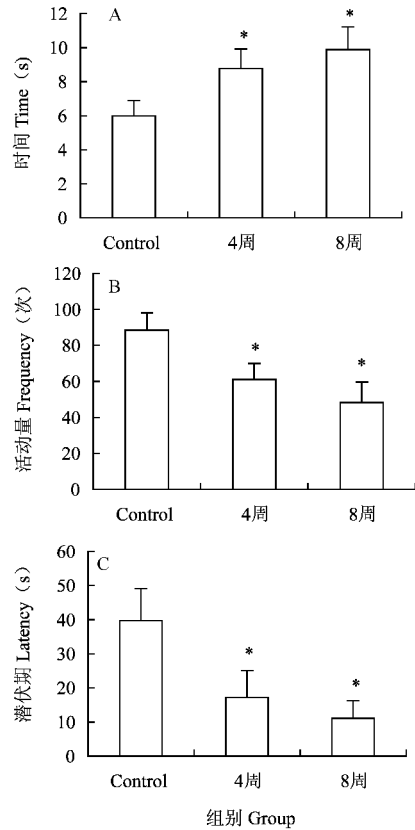
**图 3 强力霉素诱导不同时间后小鼠脑干  $\alpha$ -synuclein 的表达**

**Fig. 3 The expression of  $\alpha$ -synuclein protein in the brainstem after 4-week and 8-week treatment with doxycycline**

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

**2.4 不同诱导时间对小鼠行为的影响** 诱导满 4 周的小鼠表现为爬杆能力较对照组明显减弱,诱导 8 周的小鼠爬杆能力进一步减弱 ( $P < 0.05$ )。自发活动方面,诱导满 4 周后小鼠比对照组的自发活动次数要明显减少 ( $P < 0.05$ );诱导满 8 周的小鼠自发活动更少。而对于转棒

潜伏期,诱导满 4 周的小鼠的转棒潜伏期与对照组相比开始出现明显变短,诱导 8 周的小鼠的潜伏期更短 ( $P < 0.05$ ) (图 4)。



**图 4 强力霉素诱导不同时间后小鼠行为的变化**  
**Fig. 4 Motor function of binary positive mice after 4-week and 8-week treatment with doxycycline**

A: 爬杆; B: 自发活动; C: 转棒耐力。A: Pole-climbing test; B: Spontaneous movement test; C: Rolling bar test. \*  $P < 0.05$



**图 5 强力霉素诱导不同时间后小鼠中脑黑质 TH 阳性细胞数的变化 (20  $\times$ )**

**Fig. 5 The number of tyrosine hydroxylase (TH) positive cells in substantia nigra pars compacta (SNc) after 4-week and 8-week treatment with doxycycline**

**2.5 强力霉素诱导后各组小鼠黑质 TH 阳性细胞数的变化** 随着诱导时间的增加,小鼠黑质 TH 细胞的数量进行性下降。诱导 4 周后较未诱导组明显减少,8 周时减少更明显(图 5)。

### 3 讨 论

转基因动物是指通过各种实验技术将外源性基因导入动物的基因组,使其能在受体动物的基因组内稳定地整合,并遗传给下一代所形成的动物。自 Feany 等人 2000 年建立 PD 的果蝇转基因模型后,关于转基因的研究就此成为热点,在后期的研究中分别建立了野生型、A53T 及 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 的转基因小鼠模型<sup>[5-7]</sup>,其中野生型和 A53T 的较多,而 A30P 的较少,且基本上都是非调控表达的模型,对于可调控表达的模型来说是非常少见的<sup>[3]</sup>。本研究中,我们以德国家族性 PD 中连锁分析发现的 30P 突变  $\alpha$ -synuclein 基因为代表,即该基因第 1 号外显子第 88 位核苷酸位点 G 被 C 取代<sup>[8]</sup>,来研究该突变类型在帕金森病形成过程中的作用,以期能对其尚未完全明了的致病机理有新发现,为此,我们建立了一个诱导表达 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 的小鼠模型,以便更好地研究 A30P 突变型  $\alpha$ -synuclein 在 PD 发病机制中的作用。

我们采用显微注射技术<sup>[9]</sup>将 Tet-On 系统的 pTRE2-*syn* 和 pBC-*nTA* 双基因混合注射受精卵,建立了 Tet-On 诱导表达 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 的转基因小鼠。双基因同时注射使得双基因阳性小鼠获得的时间大为缩短。由于人 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 和小鼠的 *syn* 有较高的同源性,为排除内源性干扰,提高检测的特异性,我们分别在 pTRE2 启动子和 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 中设计并合成 1 对引物。经检测表明,所扩增的基因片段是特异的。本实验中 PCR 检测双基因阳性雌鼠 1 只, A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 单基因阳性雄鼠 13 只。

实验中通过 RT-PCR 检测到 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 在小鼠脑内各个部位均有表达。通过 western blot 技术,发现  $\alpha$ -synuclein 蛋白在脑内

普遍均有表达。对于我们来说,中脑黑质部位是否也有  $\alpha$ -synuclein 蛋白的大量表达是我们所最感兴趣的,结果在对脑干的检测发现,与阴性对照组相比,诱导组中随着诱导时间的增加,该部位的蛋白表达明显增多,异常蛋白质增多聚集可能通过神经细胞毒性等多种途径损害中脑多巴胺能神经元而导致 PD 症状的出现。

爬杆时间测定、自发活动量、旋转棒耐力测验是反映小鼠运动功能良好的行为学指标,能综合评价动物运动功能的质量和耐久力。本研究结果表明,强力霉素诱导后,小鼠的运动功能明显受到影响,且转基因小鼠运动功能与强力霉素诱导时间成反比,随着诱导时间的增加运动能力逐渐衰退,表现在爬杆时间、自发活动和转棒耐力等各个方面。在爬杆实验方面,诱导的双阳性鼠时间明显延长,诱导满 4 周时与未诱导组有显著性差异,诱导满 8 周后爬杆时间进一步延长。在自发活动方面,诱导满 4 周后小鼠的自发活动比对照组明显减少,诱导满 8 周的小鼠自发活动最少。在转棒耐力方面,小鼠的表现同样如此。

黑质多巴胺能神经元对高水平的  $\alpha$ -synuclein 表现出易损性。人类的 SH-SY5Y 细胞系中,野生型和突变型的  $\alpha$ -synuclein 过表达引起活性氧的增加,导致细胞内稳态打破而引发神经元细胞的凋亡<sup>[10]</sup>。另外,过表达的突变蛋白超过了细胞自身的清除能力而异常积聚,可以加速线粒体功能障碍、增强氧化应激的敏感性等促进细胞死亡<sup>[11]</sup>。我们进一步的研究也发现,强力霉素诱导 4 周时转基因鼠中脑黑质切片中 TH 阳性细胞数较未诱导组有明显的减少,8 周时 TH 阳性细胞数量进一步减少。一般认为,黑质 TH 阳性神经元的多少可以反应黑质多巴胺能神经元的水平<sup>[12]</sup>,这一发现与本研究行为学观察的结果一致。

我们得到的转基因小鼠,通过诱导剂(强力霉素)来调控 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 的表达和关闭,从而为进一步在整体水平上研究其基因功能,探讨 A30P 突变  $\alpha$ -synuclein 在 PD 形成中的作用,提供了一条简便而快捷的途径。

## 参 考 文 献

- [ 1 ] Lewandowski M. Conditional control of gene expression in the mice. *Nat Rev Genet*, 2001, **2**(10):743~755.
- [ 2 ] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. *Science*, 1995, **268**(5218):1766~1769.
- [ 3 ] Nuber S, Petrasch-Parwez E, Winner B. Neurodegeneration and motor dysfunction in a conditional model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, 2008, **28**(10):2471~2484.
- [ 4 ] Zarranz J J, Alegre J, Gomez-Esteban J C, et al. The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Ann Neurol*, 2004, **55**(2):164~173.
- [ 5 ] Masliah E, Rockenstein E, Veinbergs I, et al. Dopaminergic loss and inclusion body formation in alpha-synuclein mice: implications for neurodegenerative disorders. *Science*, 2000, **287**(5456):1265~1269.
- [ 6 ] Gasson B I, Duda J E, Quinn S M, et al. Neuronal alpha-synucleinopathy with severe movement disorder in mice expressing A53T human alpha-synuclein. *Neuron*, 2002, **34**(4):521~533.
- [ 7 ] Plaas M, Karis A, Innos J, et al. Alpha-synuclein A30P point-mutation generates age-dependent nigrostriatal deficiency in mice. *J Physiol Pharmacol*, 2008, **59**(2):205~216.
- [ 8 ] Krüger R, Kühn W, Müller T, et al. Ala30Pro mutation in the gene encoding alpha-synuclein in Parkinson's disease. *Nat Genet*, 1998, **18**(2):106~108.
- [ 9 ] Gordon J W, Scangos G A, Plotkin D J, et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci*, 1980, **77**(12):7380~7384.
- [ 10 ] Junn E, Mouradian M M. Human alpha-synuclein over-expression increases intracellular reactive oxygen species levels and susceptibility to dopamine. *Neurosci Lett*, 2002, **320**(3):146~150.
- [ 11 ] Lehmensiek V, Tan E M, Schwarz J, et al. Expression of mutant alpha-synucleins enhances dopamine transporter-mediated MPP+ toxicity in vitro. *Neuroreport*, 2002, **13**(10):1279~1283.
- [ 12 ] 史玉泉编著. 实用神经病学(第三版). 上海:上海科学技术出版社, 2004, 1022~1029.

## 《动物学杂志》第十届编辑委员会

主 编:马 勇

副主编:宋延龄 赵 勇 彭景榘 徐延恭 顾亦农(常务)

编 委:(以姓氏笔画为序)

马 勇 马建章 王祖望 王跃招 王德华 方盛国 计 翔 孙青原 孙悦华  
 刘遵发 许木启 李 宁 李 明 李进华 李枢强 李新正 张正旺 张春光  
 张树义 张瑾峰 吴孝兵 陈佩惠 宋大祥 宋延龄 宋林生 杨 光 杨增明  
 孟安明 宛新荣 郑光美 赵 勇 费 梁 钟文勤 桂建芳 夏国良 顾亦农  
 徐存拴 徐宏发 徐延恭 曹 焯 彭贤锦 彭景榘 蒋志刚 魏辅文

责任编辑:顾亦农 梁 冰