

PP2A Cα 敲除小鼠心肌细胞模型的构建

陈 文,温明达,董大川,高艳红,张 朝

(南京师范大学生命科学学院,江苏省分子医学生物技术重点实验室,江苏 南京 210023)

[摘要] 体外构建 PP2A Cα 敲除的原代小鼠心室肌细胞模型. 选择性地将雄性 PP2A Cα^{fl/fl, Cre/+} 小鼠与雌性 PP2A Cα^{fl/fl, Cre/+} 小鼠交配. 新生小鼠心脏经胰酶消化后差速贴壁获得原代小鼠心室肌细胞,用带有 Cre 的腺病毒感染心肌细胞,经荧光显微镜观察和 Western-blot 检测,分析 PP2A Cα 的敲除效果. 将基因型为 PP2A Cα^{fl/fl, Cre/+} 的雌雄小鼠进行交配,得到其同样基因型的后代,进而可获得足量基因型为 PP2A Cα^{fl/fl, Cre/+} 的原代小鼠心肌细胞. 用带有重组酶 Cre 的腺病毒感染细胞 48 h 后,可见带有绿色荧光的心肌细胞;Western-blot 检测显示,PP2A Cα 在 Cre 腺病毒感染的心肌细胞可下调 60% ~ 80%. 本研究成功建立了 PP2A Cα 敲除的原代小鼠心肌细胞模型.

[关键词] PP2A Cα, 新生小鼠心肌细胞, 带重组酶 Cre 的腺病毒

[中图分类号] Q2-33 [文献标志码] A [文章编号] 1001-4616(2013)02-0074-04

Generation of PP2A Cα Knockout Model in Neonatal Mouse Ventricular Myocytes

Chen Wen, Wen Mingda, Dong Dachuan, Gao Yanhong, Zhang Zhao

(Jiangsu Key Laboratory for Molecular and Medical Biotechnology, School of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: To generate PP2A Cα knockout model in neonatal mouse ventricular myocytes. Male PP2A Cα^{fl/fl, Cre/+} were selectively mated with female PP2A Cα^{fl/fl, Cre/+} mice to obtain abundant offsprings with the same genotype. The neonatal mouse ventricular myocytes were digested by trypsinization and subsequently infected with Cre-adenovirus. The effects of adenovirus infection were observed by fluorescence microscope and identified by western blot analysis. The offsprings in abundance were obtained by setting up a mating between male and female of PP2A Cα^{fl/fl, Cre/+} mice, as a result, an abundance of neonatal mouse ventricular myocytes with the genotype of PP2A Cα^{fl/fl, Cre/+} were available for Ad-Cre infection. Green fluorescence was observed after GFP labeled Cre-adenovirus (Cre-Ad) infection for 48 h. The expression level of PP2A Cα protein in Cre-Ad infected myocytes was 60% ~ 80% lower than control. The PP2A Cα knockout model in neonatal mouse ventricular myocytes was successfully generated.

Key words: PP2A Cα, neonatal mouse ventricular myocytes, Cre-adenovirus

PP2A 是一种多功能的丝/苏氨酸蛋白磷酸酶,参与多种细胞功能活动调节,包括 DNA 复制、转录,细胞周期,发育和细胞信号转导等^[1]. 具有活性的 PP2A 全酶由支架亚基 A,催化亚基 C 和调节亚基 B 组成. 其中催化亚基 C 有 α 和 β 两种亚型^[2]. PP2A 作用底物广泛,全身敲除其编码基因导致动物胚胎致死^[3],说明其生物学作用不可或缺. 临床研究发现,PP2A 活性改变与多种心脏病理过程密切相关^[4]. 我们前期在条件性敲除心脏 PP2A 催化亚基 Cα (PP2A-Cα knockout, KO) 的小鼠观察到,小鼠在出生后第 11 d 发生病理性心肌肥大, L 型钙离子通道 (L-type calcium channel, LTCC) 磷酸化水平上升,电流密度增加^[5],并观察到与细胞内钙信号紊乱相关的心脏舒缩功能异常,最终因心衰而亡. 提示 PP2A 在 LTCC 以及心肌细胞钙循环调节方面具有重要作用. 为了进一步探究 PP2A 缺失与心脏 LTCC 功能变化以及心肌细胞内钙信号紊乱之间是否存在直接的因果关系,排除体内神经和各种体液因素的影响,有必要构建 PP2A Cα KO 的心肌细胞模型. 本文探索了建立细胞模型的可行方法.

收稿日期:2013-01-26.
基金项目:973 课题(2006CB943500)子项目、国家自然科学基金课题(31171302)、江苏高校优势学科建设工程项目(164320H106).
通讯联系人:张朝,教授,博士,研究方向:心肌离子通道功能及其调控. E-mail:zhangzhao@njnu.edu.cn

1 材料与方法

1.1 实验动物

PP2A C α 心脏特异性基因敲除小鼠,由南京大学模式动物中心高翔教授惠赠.小鼠按 1 雄:2 雌合笼饲养在 IVC 系统中,控制室温在(22 \pm 1) $^{\circ}$ C、湿度 40%~60%、12 h(12 h 明暗周期),自由进食进水.所有动物实验操作与《江苏省实验动物管理办法》(2008 年 10 月 1 日颁发)的相关规定一致.

1.2 小鼠基因型鉴定

参照顾鹏宇等^[3]的方法对小鼠进行基因型鉴定.

1.3 新生小鼠心室肌细胞的分离和培养

将新生 1 d~3 d 的小鼠幼仔断头,快速取出心脏,置于 CBFHH 缓冲液中,洗去血液.移除心房和心室底部大血管及其周围结缔组织,将剪碎的心室置于 50 mL 离心管中.加入 5 mL 新鲜配制并含有胰酶(2 mg/L)和 DNA 酶(2 mg/L)的 CBFHH 液,将离心管置于加热磁力搅拌器上消化分离心肌细胞,温度调节在 37 $^{\circ}$ C,转速 50 r/min.每间隔 10 min,轻轻吹打消化液,弃上清,取沉淀部分镜下观察,直至在显微镜下可见大量杆状心肌细胞时,经离心分离,收集细胞,用小牛血清终止消化.重复收集 10~12 次,可获得足量原代小鼠心室肌细胞.将收集的心肌细胞置于 6 cm 培养皿中,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 在 37 $^{\circ}$ C 差速贴壁 50 min,回收未贴壁的心肌细胞至新的培养皿中,根据后续实验需求稀释细胞悬液,并补充 BrdU 抑制成纤维细胞生长,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养.约在 48 h 后心肌细胞可完成贴壁,培养 1 d~3 d 后可见心肌细胞自发搏动.

1.4 腺病毒的扩增、滴度测定与侵染

本实验所采用的 Cre 腺病毒,由苏州大学唐仲英血液研究中心的何玉龙教授惠赠.在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中扩增腺病毒至滴度达 8.0 \times 10⁸ pfu/mL,以 MOI 分别为 10、15 和 20 侵染原代培养的细胞,并在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中继续孵育 48 h.

1.5 免疫印迹法(Westernblot)检测蛋白的相对表达量

小鼠原代心室肌细胞经腺病毒侵染 48 h 后,用预冷的 PBS 漂洗 2 遍,加入 500 μ L 细胞裂解液(50.0 mmol/L Tris,150.0 mmol/L NaCl,0.1% SDS,1.0% NP-40,protease inhibitor cocktail,phosphataseinhibitor cocktail,Sigma),刮取细胞,4 $^{\circ}$ C 旋转裂解 30 min,收集上清;经 Bradford 法测定蛋白浓度后,取 30 μ g 的总蛋白进行 SDS-PAGE 凝胶(10%)电泳分离,按常规方法转印至 PVDF 膜上,孵育 PP2A C α 抗体(MILLIPORE,1:1000 稀释),以 GAPDH 为内参,检测 PP2A C α 相对蛋白的表达量.

2 结果

2.1 交配型小鼠的获得及其基因鉴定

本实验所采用的 KO 小鼠是通过 LoxP/Cre 系统基因打靶策略建立的. PP2A C α 两侧特异性插入 LoxP 位点,以 α -MHC 为启动子(α -MHC 启动子的活性在动物出生后随心肌细胞发育而逐渐增高)驱动 Cre 酶表达,而 Cre 酶可以识别 PP2A C α 两侧的 LoxP 位点并将其切除,进而达到心脏特异性敲除 PP2A C α 的目的.如果将基因型为 PP2A C α ^{fl/fl,Cre/-}与基因型为 PP2A C α ^{fl/-,Cre/+}的小鼠交配,其后代的基因型可能有 3 种,分别为 PP2A C α ^{fl/fl,Cre/+}(即 KO 型)、PP2A C α ^{fl/-,Cre/+}(即用作对照的野生型)和 PP2A C α ^{fl/fl,Cre/-}(即交配型)小鼠.为构建体外 PP2A C α 敲除的细胞模型,需大量获取 PP2A C α ^{fl/fl,Cre/-}基因型小鼠幼仔,故在实验中采取将基因型为 PP2A C α ^{fl/fl,Cre/-}的雌雄小鼠进行交配(1 雄 2 雌)的策略,保证出生的幼鼠均为同基因型.结果如我们的预期,经基因型鉴定显示,交配型小鼠的后代均为 PP2A C α ^{fl/fl,Cre/-}基因型(图 1).

2.2 Cre 腺病毒侵染小鼠心室肌细胞

原代培养新生小鼠心室肌细胞被广泛地用于心脏生理和病理机制的研究.然而,作为终末分化细胞,这些心肌细胞并不发生分裂,因而传统的转基因方法无法有效地将外源性基因导入心肌细胞.而心肌细胞对腺病毒易感,利用其携带作为载体,可以将目的基因导入心肌细胞.本实验所用腺病毒携带重组酶 Cre 和 GFP,经侵染心肌细胞,Cre 酶可识别 PP2A C α 两侧的 Loxp 标记并将其敲除,从而达到体外敲除的目的,而有 GFP 表达者则为病毒侵染成功.如图 2 所示,MOI 分别为 10、15、20 时,空载腺病毒(Ad-v)和 Cre

腺病毒 (Ad-cre) 均可成功侵染原代培养的小鼠心室肌细胞,且 MOI 为 15 时,侵染效果最好.

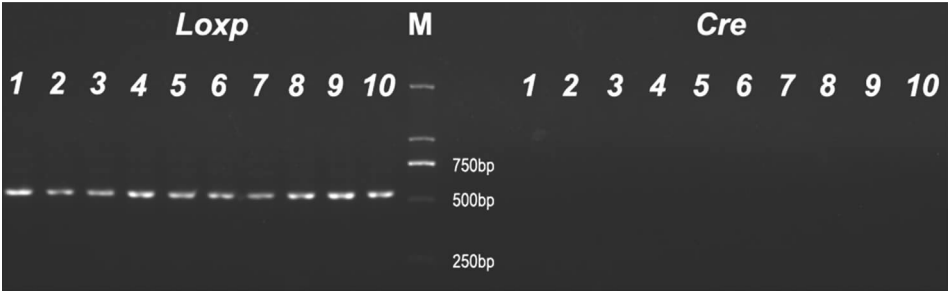


图 1 小鼠尾部基因组 DNA 制备的基因型鉴定
琼脂糖电泳可检测到 593 bp 的 loxp 基因(左侧条带 1 ~ 10),而未检出 460 bp 的 Cre 基因(右侧条带 1 ~ 10).

Fig.1 Genotyping was performed by PCR of genomic DNA from mouse tails
The presence of a 593 bp fragment from the floxed Ppp2Aca allele was amplified by PCR and identified by agarose gel electrophoresis(AGE), whereas, a 460 bp segment that reflects the Cre transgene was absent in AGE identification.

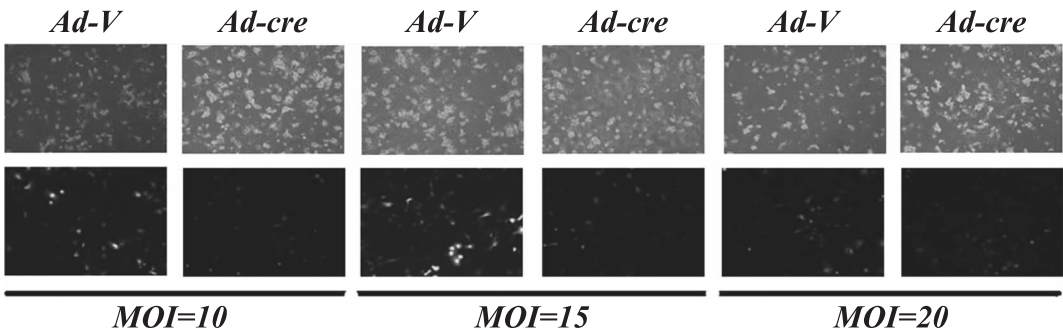


图 2 Cre 腺病毒侵染小鼠心肌细胞
MOI 为 10、15、20 的空载腺病毒和 Cre 腺病毒分别侵染培养的小鼠心肌细胞,侵染成功的细胞显示为绿色荧光.

Fig.2 Infection of the neonatal mouse ventricular myocytes with Cre-adenovirus
The neonatal mouse ventricular myocytes were infected by Ad-v or Ad-Cre with MOI of 10,15 and 20 respectively.
Green fluorecence denotes the successful infection of adenovirus.

2.3 PP2A Cα 敲除效率的分析

Wstern-blot 检测分析的结果如图 3,在 MOI 分别为 10、15 和 20 的 Cre 腺病毒作用下,与转染空载腺病毒相比,PP2A Cα 的蛋白水平分别下降了 60%、80% 和 80%,说明本实验所用体外敲除 PP2A Cα 的方法可以达到和 KO 动物模型相当的水平,说明细胞模型构建成功,并在 MOI = 15 时,PP2A Cα 的体外敲除效果最好.

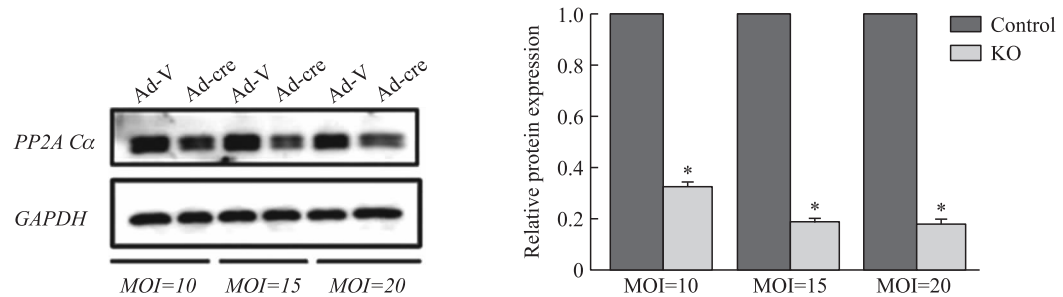


图 3 Cre 腺病毒侵染后 PP2A Cα 敲除效率的检测
Cre 腺病毒侵染交配型原代小鼠心肌细胞后,PP2A Cα 蛋白表达水平的 Western-blot 分析结果(左)以及相对定量(右);* 与对照相比 $P<0.05$.

Fig.3 The efficiency of PP2A Cα knockout in response to Cre-Ad infection
Representative western blot analysis for Ad-v or Cre-Ad infected neonatal mouse ventricular myocytes isolated from those mice with the genotype of PP2A Cα^{fl/fl},Cre^{-/-}(*, $P<0.05$ Cre-Ad vs Ad-v).

3 讨论

获得足够量基因型为 PP2A C α ^{fl/fl, Cre/-}的心肌细胞是建立体外敲除 PP2A C α 细胞模型的必要条件. 如果用 PP2A C α ^{fl/fl, Cre/-}与 PP2A C α ^{fl/-, Cre/+}小鼠交配繁殖,其后代基因型可能有 3 种(已如结果 1 所述),不能保证获得足量的基因型为 PP2A C α ^{fl/fl, Cre/-}的心肌细胞. 而本实验结果表明,通过繁殖交配型小鼠获得同基因型后代,使大量获取这样的心肌细胞成为可能. 相比较直接用 PP2A C α 干扰腺病毒侵染 B6 小鼠心肌细胞而言,利用重组酶 Cre 腺病毒侵染 PP2A C α ^{fl/fl, Cre/-}基因型心肌细胞的策略敲除 PP2A C α ,这些细胞来自于与 KO 小鼠具有同样遗传背景的小鼠,所得体外实验结果与整体动物实验更有可比性和说服力. 在原代小鼠心室肌细胞分离过程中,由于所分离的细胞可能含有成纤维细胞等其他杂质细胞,而 Cre 酶敲除作用仅局限在心肌细胞,虽然 Western-blot 检测时仍可见对照组(转染空载腺病毒)有少量 PP2A C α 蛋白表达(图 3),但并不影响体外建立 PP2A C α 敲除的心肌细胞模型.

4 结论

成功构建了 PP2A C α 敲除的小鼠心肌细胞模型,这为后期在体外水平开展研究提供了基础.

5 致谢

感谢南京大学模式动物中心高翔教授惠赠 PP2A C α KO 小鼠;苏州大学何玉龙教授惠赠 Ad-Cre. 该研究获科技部 973 课题(2006CB943500)子项目和国家自然科学基金课题(31171302)以及江苏高校优势学科建设工程项目(No. 164320H106)的资助,在此一并致谢.

[参考文献]

- [1] Janssens V, Goris J. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth and signalling[J]. Biochem J, 2001, 353 (Pt 3): 417-439.
- [2] Shi Y. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure[J]. Cell, 2009, 139 (3): 468-484.
- [3] Gu P. Generation of Ppp2Ca and Ppp2Cb conditional null alleles in mouse[J]. Genesis, 2012, 50 (5): 429-436.
- [4] Neumann J. Increased expression of cardiac phosphatases in patients with end-stage heart failure[J]. J Mol Cell Cardiol, 1997, 29 (1): 265-272.
- [5] Shi J. Protein phosphatase 2A effectively modulates basal L-type Ca(2+) current by dephosphorylating Ca(v)1.2 at serine 1866 in mouse cardiac myocytes[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2012, 418 (4): 792-798.

[责任编辑:黄 敏]