

[文章编号] 1007- 3949(2000)- 01- 0005- 08

• 实验研究 •

转基因小鼠中人清道夫受体 AI 基因的稳定遗传和特异表达

万腊香, 杨永宗, Sookja S. Chung¹, Stephen S. M. Chung¹, 曹德良², 吴孟津, 万载阳, 陈 修³

(衡阳医学院分子生物学研究中心, 湖南省衡阳市 421001; 1. 香港大学分子生物学研究所, 香港;

2. Department of Pharmacology, Yale University School of Medicine, New Haven, Connecticut 06520- 8066, USA;

3. 湖南医科大学药理学教研室, 湖南省长沙市 410078)

[关键词] 人清道夫受体 AI; 小鼠, 转基因; 遗传; 基因表达; 内皮, 血管; 动脉粥样硬化

[摘要] 为阐明人清道夫受体 AI (hSR- AI) 的功能及在动脉粥样硬化发生中的作用, 本研究首先构建了含鼠 tie- 1 启动子和人清道夫受体 AI cDNA 的表达载体, 经酶切及测序鉴定后, 用显微注射的方法将制备好的 tie- 1- hSR- A- BGH poly A 片段注入受精卵, 将注射后存活的受精卵移入 ICR 假孕母鼠, 产下的仔鼠经聚合酶链反应和 Southern blot 分析, 筛选出整合有外源基因的阳性转基因鼠; 对小鼠组织 RNA 行逆转录聚合酶链反应及组织切片免疫组织化学染色, 检测人清道夫受体 AI 在小鼠体内的表达水平及表达部位; 光镜及电镜观察转基因鼠血管及其它组织的病理变化。结果发现, 重组 Tie- 1/hSR- AI 质粒中鼠 tie- 1 启动子和人清道夫受体 AI cDNA 序列正确, 显微注射后存活的 561 枚受精卵分别移入 19 只 ICR 假孕母鼠, 有 13 只受孕, 共产下 56 只仔鼠, 存活 54 只, 经过整合检测, 检出 7 只阳性鼠, 整合效率为 13%。在 G1、G2、G3 代及纯合子转基因鼠中 PCR 阳性率分别为 47.8%、71.3%、75.0% 和 100%。5 只雄性转基因鼠的主动脉、肾、肝等组织中均有人清道夫受体 AI 表达, 且主要集中在血管的内皮细胞上; 转基因鼠主动脉内皮细胞明显水肿, 表面呈多囊状和虫蚀样改变, 胞质中有较多水泡, 中膜有糖原沉积样灶性病变, 平滑肌细胞中亦有水肿; 血浆甘油三酯水平明显高于非 C57BL/6 鼠 ($P < 0.05$), 总胆固醇水平虽不比 C57BL/6 高, 但雄性鼠总胆固醇水平明显高于雌性 ($P < 0.01$)。这些结果提示, 已成功建立了鼠 tie- 1 启动子驱动人清道夫受体 AI 在血管内皮细胞特异性表达的转基因鼠。外源基因能在子代鼠中稳定遗传。转基因鼠血管出现内膜水样变性及中膜粘液样变性等动脉粥样硬化的早期病理改变, 表明人清道夫受体 AI 转基因鼠可能易感动脉粥样硬化, 成为新的动脉粥样硬化模型。

Genetics Stability and Expression Specificity of Human Scavenger Receptor - A I on Endothelial Cells in Transgenic Mice

WAN La- Xiang, YANG Yong- Zong, Sookja Kim CHUNG¹, Stephen S. M. CHUNG¹, CAO De- Liang², WU Meng- Jin, WAN Zai- Yang, and CHEN Xiu³

(Researching Center of Molecular Biology, Hengyang Medical College, Hengyang 421001, China; 1. Institute Of Molecular Biology, University of Hong Kong, Hong Kong, China; 2. Department of Pharmacology, School of Medicine, New Haven, Connecticut 06510, USA; 3. Department of Pharmacology, Hunan Medical University, Changsha 410078, China)

MeSH Receptor, Scavenger; Mice, Transgenic; Genetics; Gene Expression; Endothelium, Vascular; Atherosclerosis

ABSTRACT **Aim** To establish a new transgenic mice model for determining the function and roles of human scavenger receptor A in atherosclerosis in vivo. **Methods** Human scavenger receptor A- I minigene- driven tie- 1 promoter was constructed by endonuclease digestion and confirmed by sequence analysis. Transgenic mice were produced via microinjection method. PCR, Southern blot were used to screen the positive transgenic mice. Transgenic mice line established by mating with C57BL/6 mice and offspring were identified by PCR so as to research transgenic mice transmission. Northern blot, RT-PCR, immunohistochemical analysis, light and transmission electron microscopy were used to investigate the expression location of human SR- A and lesions of arteries and vascular endothelial cells in transgenic mice. **Results** The fragment sequence of

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (项目编号 39900061)

[作者简介] 万腊香, 女, 1964 年出生, 湖南省慈利县人, 在读博士生。杨永宗, 男, 1937 年 11 月出生, 福建仙游县人, 病理生理学教授, 博士研究生导师。陈 修, 男, 1928 年出生, 药理学教授, 博士研究生导师。

mouse tie-1 promoter and human SR-AI cDNA are similar to their sequences in Genbank and no ATG before the translation initiation sites of human SR-A by sequence analysis. About 3.4 kb tie-1 promoter-hSR-AI-cDNA-BGH polyA fragment were obtained by Aat⁺ and Xho⁺ I digests. 561 survival embryos injected with purified human SR-A minigene were implanted into the oviducts of 19 ICR pseudopregnant mice. Among the 54 survived pups from 13 foster mothers, 7 founders were identified with PCR and Southern blot analysis. Integration rate of exogenous was 13%. PCR positive rates were 47.8%, 71.3%, 75.0% and 100% in G1, G2, G3 and homozygous transgenic mice, respectively. The results of RT-PCR and immunohistochemical analysis showed human SR-A I specifically expressed on endothelial cells of aorta, liver and renal artery of transgenic mice. Plasma triglyceride level of transgenic mice was significantly higher than the level of non-transgenic mice ($P < 0.05$ vs control). There was no difference in total plasma cholesterol level between transgenic and non-transgenic mice. But in transgenic mice, total plasma cholesterol level was significantly higher of males than of females ($P < 0.01$). SEM of the luminal surface of aorta revealed an irregular, elevated bumpy and swelling surface. There was disruption of the endothelial layer and some blood cell was observed adhering to the surface of them in transgenic mice. TEM of aorta of transgenic mice showed that vesicles, multivesicle bodies and swelling mitochondria filled in plasma of endothelial cells. Vacuolar and mucoid degeneration were observed in the media of aortic arch sections in transgenic mice with HE staining.

Conclusions A transgenic mice model with overexpressed human SR-A on ECs were successfully established in this study. The transgene stable inherited across generation after generation. The high level of plasma lipid, hydropic and mucoid degeneration of arterial wall in transgenic mice may accelerate the development of atherosclerosis. Our studies provide a new transgenic model for investigation of the function and roles of SR-A in atherosclerosis.

清道夫受体 A (scavenger receptor A, SR-A) 是一类三聚体糖蛋白, 其配体非常广泛, 能结合和内化多种多聚阴离子化合物如修饰脂蛋白、马来酰牛血清白蛋白、多聚次黄苷酸、多糖、某些磷脂等生物大分子, 可能参与机体的防御、细胞粘附和信号转导等多种生理及病理过程^[1-3]。由于清道夫受体不受细胞内游离胆固醇的反馈调节, 巨噬细胞能不断摄取修饰脂蛋白, 致使胆固醇酯在细胞内聚集, 形成泡沫细胞。研究发现, 在人类动脉粥样硬化不同阶段的斑块中, 尤其是早期斑块的巨噬细胞上 SR-A 活性增强^[4], 提示 SR-A 在动脉粥样硬化 (atherosclerosis, As) 斑块中泡沫细胞形成过程中可能起着重要作用。

清道夫受体 (SR-A) 有 iv 和 α 型两种异构体, 二者由同一基因编码, 但剪切方式不同。牛、鼠、兔、人的 iv、 α 型 SR 的 cDNA 序列已被克隆, 两型 SR-A 的氨基酸序列及蛋白质结构均已基本查清^[5], 两型之间的主要区别在于 α 型缺乏富含半胱氨酸的 v 区, 而被 6~17 个 C-末端氨基酸残基所取代, 但二者有相似的配体结合活性。目前, 对 SR-A 功能的了解多为体外研究结果, 或源于对小鼠和牛 SR-A 的研究^[6,7], 为了进一步探讨人 SR-A 在体内的功能及在 AS 斑块形成中的作用, 本研究利用 tie-1 基因启动子的血管内皮细胞组织特异性, 成功地建立了能在血管内皮细胞特异表达人 SR-AI 的转基因鼠, 高表达人 SR-AI 的血管内皮细胞吞饮作用增强, 形态结构也发生明显改变。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂 Aat⁺、Xho⁺、Nru⁺、Apa⁺、Afl⁺、Bgl⁺、Sma⁺ 等限制性内切酶及 1 kb 和 100 bp DNA 标准分子质量等购自 New England Biolabs Inc.; SDS 和 Tris 碱购自 Serva 公司; 蛋白酶 K、琼脂糖、dNTP、随机引物标记试剂盒、逆转录试剂盒等购自 Promega 公司; RNA 抽提试剂盒购自 Qiagen 公司; 测序试剂盒购自 PE 公司; α -³²P-CTP 购自北京亚辉生物医学工程公司。引物均由上海生工合成。抗人 SR-A 的单克隆抗体由日本 T. Kodama 教授制备并赠送。

1.1.2 质粒 含有人 SR-A cDNA 全长的 pXhSR1 质粒由日本 T. Kodama 教授制备并赠送。含小鼠 tie-1 启动子 DNA 的 pTie/Sma 质粒由荷兰 K. Alitalo 教授构建、香港大学分子生物学研究所保存。

1.1.3 实验动物 F1 (来源于 C57BL/6 \times DBA)、ICR 假孕母鼠由香港大学实验动物部提供, C57BL/6 小鼠由香港大学实验动物部和协和医科大学实验动物繁育场提供。所有动物均喂饲常规颗粒饲料, 自由饮水。超排卵 F1 与 C57BL/6 小鼠交配提供显微注射用受精卵。

1.2 Tie/hSR-AI 表达载体的构建及鉴定

pTie/Sma 质粒 DNA 分别用 Apa⁺、Afl⁺ 完全酶切, 1.5% 琼脂糖电泳及 GeneClean sample α 试剂盒分离和纯化为 788 bp 的鼠 tie-1 启动子片段。pXhSR1 质粒 DNA 分别用 Nru⁺ 和 Hind⁺ 切去载体上的 CMV 启动子, 再将鼠 tie-1 启动子连接到 pXhSR1 上, 即用鼠 tie-1 启动子代替 pXhSR1 上的 CMV 启动子。

将构建好的新载体转化 DH5 α 宿主菌, 涂抹于含有氨苄青霉素的 LB 培养基平板上培养, 再挑选 6 个转化子扩增培养后提取质粒, 分别用 Sma iv 和 Bgl iv 酶切鉴定。同时对鼠 tie- 1 启动子、人 SR- AI cDNA 及二者间的序列通过自动测序仪测序, 确定从鼠 tie- 1 启动子至人 SR- AI cDNA 序列是否正确。

1.3 显微注射用人清道夫受体 AI 基因的制备

显微注射用的人 SR- AI 基因包括从鼠 tie- 1 启动子、人 SR- A cDNA 及 polyA 信号序列 (tie- 1- hSR- AI- BGHpolyA), 约 3.4 kb 长 (图 1, Figure 1)。新构建的质粒用 Aat iv 和 Xho iv 联合酶切即可获得 tie- 1- hSR- AI- BGHpolyA 片段, 经电泳分离后按改良的琼脂糖凝胶电泳法纯化该片段, 然后溶于 0.1 TE 缓冲液中。通过紫外分光光度计及电泳两种方法测定 DNA 的浓度及质量, 再稀释成 5 mg/L, 每 20 μL 一份, 于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存, 用于显微注射。

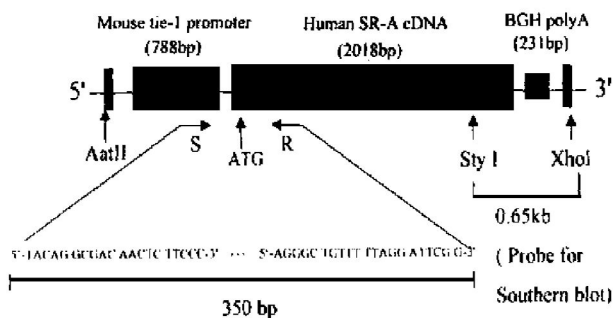


图 1. 人清道夫受体 A iv 的基因结构

Figure 1. The construct of the human SR- A minigene. The sequences and location of polymerase reaction (PCR) primers S (upstream primer) and R (downstream primer) are indicated together with the sizes of the amplified fragments. The region between the 3' end of tie- 1 promoter and 5' end of human SR- A cDNA was identified not to contain ATG with sequencing analysis. Translation of human SR- A was initiated from its ATG.

1.4 转基因小鼠的制备

按文献[8]的方法将已纯化好的线状 tie- 1- hSR- AI- BGHpolyA 显微注射到 F1 小鼠受精卵的雄原核中, 挑选注射后仍然存活的受精卵, 移植到 ICR 假孕母鼠的输卵管壶腹部, 缝合伤口, 待其妊娠, 分娩, 产下的仔鼠即为转基因小鼠 G0 代。经 PCR 和 Southern blot 筛选出的 G0 代阳性转基因鼠作为首建鼠 (Founder) 分别与 C57BL/6 小鼠交配产生的后代即为 G1 小鼠, G1 与 G1 交配产生的后代为 G2,。每代子鼠用 PCR 进行整合检测。

1.5 鼠尾组织基因组 DNA 的抽提

取 4 周龄转基因鼠尾 2.0 cm, 用蛋白酶 K 消化后, 加入 1/4 体积饱和氯化钠, 混匀, 12 000 g 离心 15 min, 转上清液至另一个 1.5 mL 离心管中, 加入 2 倍体积的无水乙醇, 倒转混匀, 即有 DNA 絮状物, 钩取 DNA 絮状物至 1 mL 75% 乙醇中, 洗两次, 离心 1 min, 去掉上清液, 空气干燥沉淀, 再加入 200 μL TE 缓冲液, 待 DNA 完全溶解后, 用紫外分光光度计测 DNA 浓度, -20 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.6 鼠尾组织 DNA 的 PCR 检测

根据小鼠 tie- 1 启动子和人 SR- AI cDNA 序列分别设计 PCR 上、下游引物, 扩增产物为 350 bp DNA。因此, 只有 tie- 1- hSR- A- BGHpolyA 片段完整整合时才能扩增出该 PCR 产物, 仅有 tie- 1 启动子或 SR- AI 均无扩增产物。同时用质粒 DNA 和正常 C57BL/6 鼠尾基因组 DNA 分别作阳性和阴性对照; 用一对肌蛋白基因的特异性引物作内对照。PCR 反应产物用 2% 琼脂糖电泳, 全自动凝胶分析系统照相、分析。

1.7 鼠尾组织 DNA 的 Southern blot 检测

分别取 25 μg 小鼠基因组 DNA 用 PstI 酶切后电泳, 再转膜固定, 按文献[9]方法与 α - ^{32}P - dCTP 标记的探针杂交过夜, 然后洗膜, -70 $^{\circ}\text{C}$ 放射自显影。

1.8 鼠组织 RNA 的逆转录聚合酶链反应检测

用断头法处死动物, 分别取阳性转基因鼠及正常 C57BL/6 小鼠的小肠、肝脏、肾、主动脉、心脏和脑等组织, 按 RNA 试剂盒说明提取组织总 RNA, 紫外分光光度计定量, 并通过电泳确定组织 RNA 无降解后, 用人 SR- AI 的特异性引物, 以肌蛋白基因的特异性引物作内对照, 按逆转录试剂盒说明书进行 RT- PCR。RT- PCR 扩增产物为 447 bp DNA 片段。

1.9 鼠组织切片免疫组织化学染色

取阳性转基因鼠及正常 C57BL/6 小鼠的小肠、肝脏、肾、主动脉、心脏和脑等组织分别作石蜡切片, 利用 ABC 试剂盒提供的试剂按文献[10]做免疫组织化学染色, 一抗为抗人 SR- A 特异性抗体, 二抗为鼠抗人 Ig G。

1.10 鼠组织切片 HE 染色

分别取小鼠小肠、肝脏、肾、主动脉、心脏和脑等组织, 常规石蜡包埋, HE 染色, 光镜下观察这些组织有无病理改变, 重点观察主动脉及各组织中血管。

1.11 鼠组织冰冻切片油红 O 染色

小鼠主动脉弓、肾、肝等组织的冰冻切片附贴于载玻片上, 60% 异丙醇浸 30 s~ 1 min 后, 浸入油红 O 工作液 10~ 15 min; 用 60% 异丙醇洗后, 再以蒸馏水冲洗, 苏木精染色 3~ 5 min, 蒸馏水冲洗二次, 然后

10% 聚乙烯吡咯酮封片。光学显微镜下,脂滴将染成桔黄色,胞核为蓝色。

1.12 扫描电镜和透射电镜标本制备

取主动脉弓部组织分别按常规方法用于制备扫描电镜和透射电镜标本,观察血管内皮细胞超微结构及血管壁形态改变。

1.13 血浆总胆固醇和甘油三酯水平的测定

用消毒刀片割破小鼠尾静脉,让血自然流出,用肝素化试管收集约 150 μ L 全血,用酶法分别测定血浆胆固醇和甘油三酯浓度,具体步骤按试剂盒说明书操作,浓度均用 mg/L 表示。

1.14 统计学处理

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SSPS 统计软件包进行统计分析。

2 结果

2.1 Tie/ 人清道夫受体 A 表达载体的构建

用小鼠 tie-1 启动子代替 pXhSR1 上的 CMV 启动子,构建好的新载体命名为 Tie/ hSR- A 质粒。经酶切及测序鉴定,鼠 tie-1 启动子与人 SR- AI cDNA 序列正确,它们之间的载体序列中无 ATG 密码子,提示转基因不会从人 SR- AI cDNA 之前的任何部位开始翻译,而是利用其 cDNA 上的 ATG 位点开始翻译(图 1, Figure 1)。因此,不会引起人 SR- A 基因密码子的摆动,保证了人 SR- A 蛋白质翻译的准确性。用 Xho IV 和 Aat Ⅲ联合酶切 Tie-1/hSR- AI 质粒,收获 3.4 kb 的电泳带,纯化后再电泳,显示为单一的 3.4 kb 带,且无拖尾降解现象,表明纯化后的片段符合显微注射的要求。

2.2 转人清道夫受体 A 基因鼠(G0)的制备

共显微注射了 872 枚受精卵,注射后存活 561 枚,显微注射后受精卵的存活率为 64%。将存活的受精卵分别移入 19 只假孕 ICR 母鼠的双侧输卵管中,每只约 30 枚,每侧 15 枚。结果共有 13 只母鼠受孕,受孕率为 68.4% (13/19),共产下 56 只仔鼠,胚胎存活率为 10% (56/561),出生后死亡 2 只,仔鼠存活率为 96%。

2.3 阳性鼠的筛选及鉴定

对 G0 小鼠尾组织 DNA 进行 PCR 扩增,在 54 只存活的 G0 小鼠中检出阳性鼠 7 只(图 2, Figure 2),阳性整合率为 13% (7/54)。并通过基因组 Southern blot 分析进一步得到证实。这 7 只阳性鼠即为首建鼠,其中 5 只为雄性,2 只为雌性。

对 PCR 阳性 G1 鼠的各种组织 RNA 进行 RT-

PCR,电泳结果显示(图 3, Figure 3),5 只雄性首建鼠的 G1 鼠的主动脉、肾、肝等组织均有 447 bp 特异性扩增带,而小肠、脑、心脏等组织 RNA 未检出特异性扩增带。提示,人 SR- AI 能在小鼠主动脉组织或血管丰富的组织中表达。小鼠组织切片免疫组织化学结果发现,主动脉内皮表面有棕褐色弧线形或月芽状颗粒,内皮细胞脱落处不着色,其它部位未见阳性颗粒(图 4, Figure 4)。肾内血管也见到同样的改变。提示人 SR- AI 基因表达有血管内皮细胞特异性。

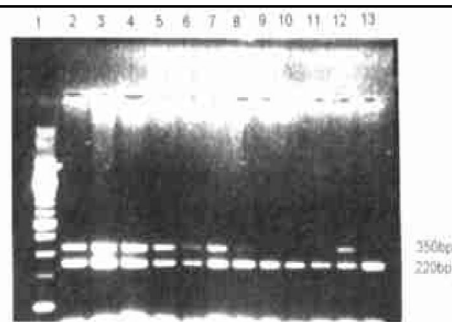


图 2. 用 PCR 方法筛选转基因鼠

Figure 2. Screening transgenic mice by PCR. Lane 1: 100 bp DNA ladder; lane 2- 8: Transgenic mice of F1 generation; lane 9- 11: No Transgenic mice in F1 generation; lane 12: Positive control with plasmid as template; lane 13: negative control (C57BL/6 mice).

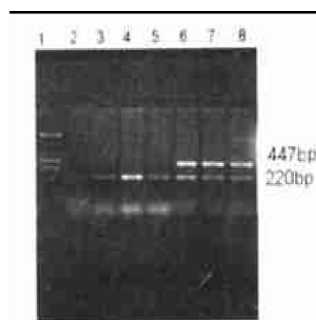


图 3. 用 RT- PCR 方法检测人 SR- AI 基因在转基因小鼠组织中的表达

Figure 3. Expression of human SR- A mRNA extracted from tissues of mice by Reverse Transcriptase - Polymerase Chain Reaction (RT- PCR). Lane 1: PCR marker (1 543 bp, 994 bp, 697 bp, 515 bp, 377 bp, 237 bp); lane 2, 3: Aorta and liver tissue of C57BL/6 mice lane 4- 8: Tissue of brain, heart, liver, kidney and aorta from transgenic mice, respectively.

2.4 转基因鼠的繁殖与建系

5 个雄性转基因鼠的繁殖较快,每窝 3~ 8 个鼠崽,目前已繁殖至第 3 或 4 代,各代小鼠均进行 PCR 筛选,G1、G2、G3 的 PCR 阳性率分别为 47.8%、71.3% 和 75.0%。纯合子鼠生长发育正常,其子代 PCR

阳性率为 100%。提示, 人 SR- AI 基因在子代鼠中能稳定遗传。

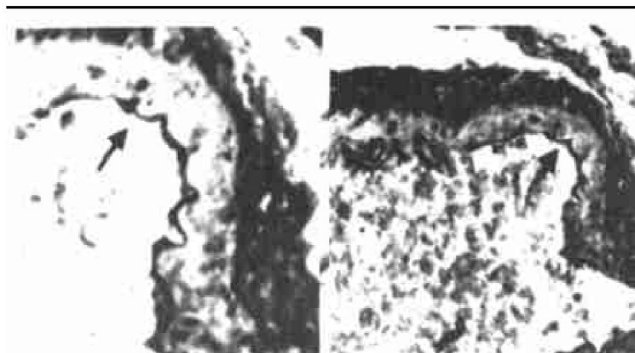


图 4. 转基因鼠主动脉免疫组织化学染色照片

Figure 4. Photomicrograph of immunohistochemical staining of aorta in transgenic mice using monoclonal antibody to human SR- A. $\times 400$

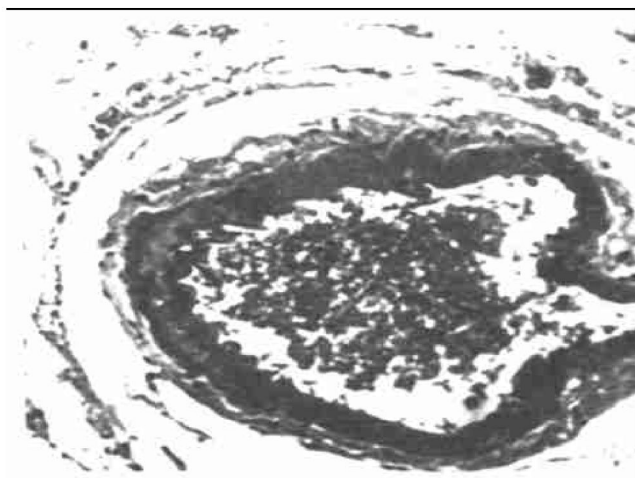


图 5. 转基因鼠主动脉 HE 染色照片

Figure 5. Photomicrograph of aorta section of transgenic mice with HE staining. $\times 400$

2.5 转基因鼠血管组织形态改变

光镜下, 转基因鼠主动脉组织经 HE 染色后发现, 血管壁三层结构完整, 除主动脉瓣尖处内膜有增生外, 其它处内膜无明显增厚, 内皮细胞有脱落, 保留下来的内皮细胞多为细胞核。中膜有空泡样变形, 多呈灶性改变, 病灶内弹力纤维断裂, HE 染色呈淡兰色(图 5, Figure 5), 而油红 O 染色不着色, 说明

为粘液样变性。主动脉中膜平滑肌细胞及肾脏内血管中膜平滑肌细胞均有空泡样变形。而肝、小肠、心脏和脑等组织或其内血管均未发现明显的病理改变。

2.6 转基因鼠血管内皮细胞超微结构的改变

扫描电镜下, 正常 C57BL/6 小鼠血管内皮细胞呈卵石样镶嵌排列, 方向与血流方向一致, 表面光滑(图 6A, Figure 6A)。而转基因鼠内皮细胞排列较乱, 细胞核较扁平, 细胞核间距离明显增宽, 表明内皮细胞有明显肿胀增厚。其表面有许多囊状突起, 也有许多虫蚀样改变, 似为囊状物破裂后留下的破口或袋状改变(图 6B, Figure 6B), 内皮细胞表面有较多血细胞粘附, 包括变形的红细胞及单核细胞、淋巴细胞等。

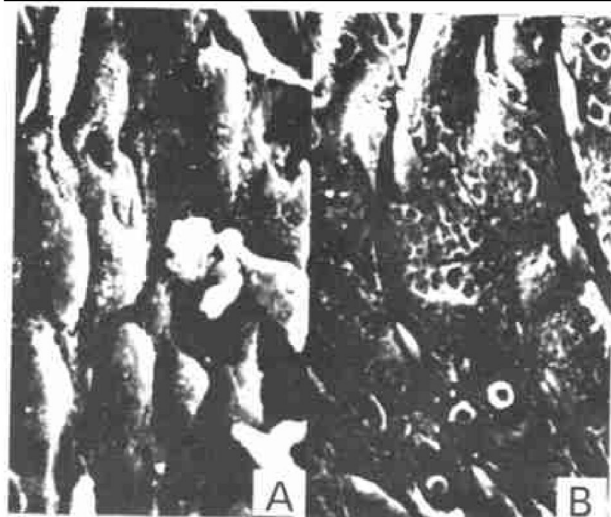


图 6. 扫描电镜下小鼠主动脉内皮. A. C57BL/6 小鼠, B. 转基因小鼠.

Figure 6. Photography of luminal surface of aorta of mice under SEM. A. C57BL/6J mice $\times 1500$, B. transgenic mice $\times 1000$

透射电镜下, C57BL/6 小鼠血管内皮形态正常(图 7A, Figure 7A)。而转基因鼠内皮细胞体积增大, 内有多个透亮的水泡, 水泡破裂处留下不完整的胞膜, 胞质中线粒体肿胀, 细胞核被挤向一侧, 染色质边聚。中膜平滑肌细胞中亦可见小而圆的空泡样改变(图 7B, Figure 7B)。

2.7 转基因鼠血浆总胆固醇及甘油三酯水平的变化

喂正常颗粒饲料下, 与 C57BL/6 小鼠相比, 转基因鼠血浆总胆固醇浓度差异无显著性, 而甘油三酯浓度明显高于 C57BL/6 小鼠 ($P < 0.05$)。转基因鼠系中雄性鼠总胆固醇浓度明显高于雌性 ($P < 0.01$), 而甘油三酯浓度的差异无显著性(表 1, Table

1)。C57BL/6 小鼠甘油三酯及胆固醇水平改变亦无性别差异。

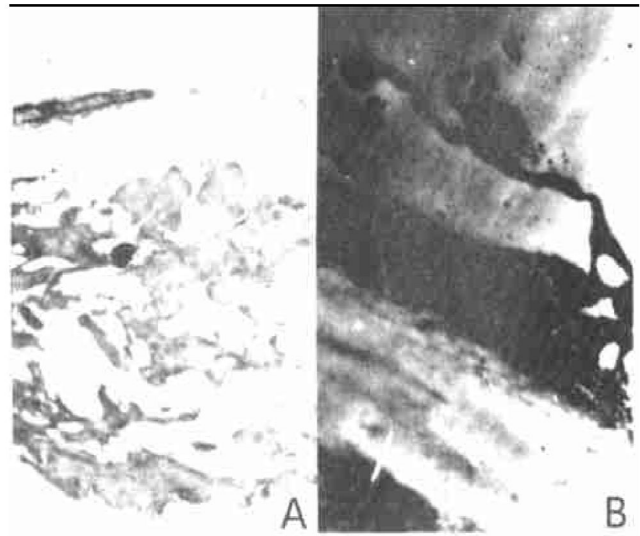


图 7. 小鼠主动脉内皮细胞超微结构 A. C57BL/6 小鼠, B. 转基因小鼠

Figure 7. Ultrastructure of aortic endothelial cell from mice under TEM. A. normal C57BL/6 mice $\times 4000$, B. transgenic mouse $\times 8000$

表 1. 小鼠血浆总胆固醇和甘油三酯浓度 (mg/L)
Table 1. Concentration of plasma total cholesterol and triglyceride

Mouse line	n	TC	TG
C57 M	8	770 \pm 150 ^c	550 \pm 190 ^c
F	5	760 \pm 90	600 \pm 130
Total	13	770 \pm 130	570 \pm 170
Tg line M	17	810 \pm 150 ^{de}	740 \pm 200
F	14	670 \pm 150 ^e	810 \pm 190
Total	31	750 \pm 160 ^a	770 \pm 230 ^b

C57: C57BL/6 mice; Tg line: transgenic mice line Plasma lipid levels in C57BL/6 and heterozygous transgenic human SR - AI mice under regular chow. Data represent mean \pm SD. Plasma lipid levels of transgenic mice were compared to them of C57BL/6 a: $P > 0.05$, b: $P < 0.05$. Males were compared to female of C57BL/6 and transgenic mice, c: $P > 0.05$, d: $P < 0.01$, respectively. Males of transgenic mice were compared males of C57BL/6, female of transgenic mice to females of C57BL/6, e: $P > 0.05$, f: $P < 0.05$.

3 讨论

3.1 转基因小鼠的整合效率及遗传稳定性

显微注射是目前最常用的制备转基因动物的方法,注射的 DNA 片段可以是环状也可以是线状,一般线状 DNA 比环状 DNA 整合效率高^[11,12],本实验中亦用线状 DNA 进行显微注射。实验中共注射 872

枚受精卵,移植到 19 只 ICR 假孕母鼠,有 13 只受孕,共产生 56 只仔鼠,经检测有 7 只已整合有人 SR- AI 转基因,整合效率为 13%,仍偏低。

转基因的整合是随机的,由于生物体在长期进化过程中形成的本身独特的体系,具有一定的排它性,在遗传过程中基因组有可能丢失一部分,所以基因整合效率可能不稳定。在转基因鼠的筛选和鉴定中,我们设计了分别与鼠 tie- 1 启动子和人 SR- AI cDNA 序列相对应的一对特异性引物,只有 tie- 1 启动子和人 SR- AI cDNA 完整整合在一起时才有 PCR 扩增产物,否则,将不被扩增。实验证实,PCR 结果与 Southern blot 分析结果完全吻合。因此,PCR 阳性鼠即表示 tie- 1 启动子与人 SR- AI cDNA 完整整合在其基因组 DNA 中,在转基因鼠的传代中,用 PCR 方法即能确定外源人 SR- A 基因是否完整有效地传给了子代鼠,从而简化了后续的筛选工作。从本研究结果看,G1、G2、G3 小鼠 PCR 阳性率分别为 47.8%、71.3% 和 75%,纯合子小鼠则能 100% 的将外源基因传给子代,提示:(1) 外源基因经显微注射导入受精卵后,可以整合到染色体上,并且可以经有性生殖遗传给后代;(2) 第二代到第三代的阳性率仍为 70% 以上,外源人 SR- A 基因可能“永久”地在转基因小鼠中保留,并能稳定地遗传。

3.2 外源基因在转基因小鼠内皮细胞上表达的特异性

所用外源基因一般由两个区域构成,即启动/调节区和蛋白质编码区,启动子的组织特异性将决定转基因的表达特异性。Tie- 1 基因编码一种内皮细胞酪氨酸激酶受体,该受体在内皮细胞的正常生长发育中起着重要的作用^[13,14]。Korhonen 等^[13]用连接于 tie- 1 基因启动子的 LacZ 报告基因进行的转基因研究表明,在成年小鼠,tie- 1 启动子的活性主要在冠状动脉、瓣膜、主动脉内皮细胞及肺和肾脏的血管内皮细胞上,而在脑和肝组织中活性很低,提示 tie- 1 启动子具有血管内皮细胞表达特异性。本研究首次将人 SR- AI cDNA 与小鼠 tie- 1 启动子组成的融合基因用于制备转基因鼠,RT- PCR 结果显示,人 SR- AI 基因能在小鼠主动脉及肝、肾等组织中表达,而在脑、小肠、心脏等组织中不表达。进一步通过免疫组织化学检测证实,人 SR- AI 的表达主要集中在大血管的内皮细胞上,与 tie- 1 启动子的活性基本一致,表明鼠 tie- 1 启动子驱动人 SR- AI 基因在血管内皮细胞上特异性表达。

3.3 外源基因对转基因鼠血管内皮细胞的影响

清道夫受体 (SR) - A 主要存在于不同组织和

器官的巨噬细胞上,尤其是枯否细胞和脾淋巴结的巨噬细胞,肝窦内皮细胞、成纤维细胞和 AS 斑块内平滑肌细胞亦有表达^[15,16]。研究表明原代培养的兔静脉和牛主动脉内皮细胞无 SR- A 受体 mRNA 表达,用佛波酯诱导亦不能增加 SR- A 的表达和乙酰化低密度脂蛋白(AcLDL)的摄入,表明血管内皮细胞缺乏 SR- A 活性^[17]。内皮细胞是血管壁组织和血液之间的屏障,直接与血液脂蛋白接触,对脂蛋白在血管壁中的转运、修饰及代谢起着关键性作用。因此,改变血管内皮细胞的 SR- A 活性,观察脂代谢和血管壁功能与结构的变化,可能有利于了解人 SR- AI 功能。

正常血管内皮细胞通过内吞、透胞作用或细胞表面特异性受体摄取血液中的脂蛋白等大分子物质。内皮细胞通透性增高时,血液成分特别是血浆蛋白等大分子物质经内皮运输即可增加^[18,19],若超过了生理限度,这些物质就可能在血管壁、组织间隙堆积,促进动脉硬化形成。光镜及电镜观察到,转入 SR- AI 基因鼠主动脉内膜明显肿胀,内皮细胞胞质中出现许多吞饮小泡,提示内皮细胞高表达人 SR- AI 导致内皮细胞吞饮作用增强,吞饮许多阴离子化合物包括血浆脂蛋白和糖蛋白等,并转运到内膜下,导致中膜弹性纤维的破坏及粘液样变性和平滑肌细胞的损害。内皮表面的囊状或虫蚀样改变可能与内皮细胞过多摄取,致吞饮小泡破裂有关。在喂饲正常颗粒饲料的情况下,转入 SR- AI 基因鼠血管壁未见典型的动脉粥样硬化斑块形成,可能因血液中修饰脂蛋白的含量较低有关。但血管壁的这些病理改变与人类 As 的早期病理改变极为相似^[20]。当血脂浓度增高时,内皮细胞高表达人 SR- AI 可能有利于 As 的形成。

在喂正常颗粒饲料情况下,转入 SR- AI 基因鼠的血脂有较大的改变,与正常 C57BL/6 小鼠相比,其甘油三酯水平明显升高,而血清总胆固醇变化不明显;但在转基因鼠系内,血清总胆固醇水平高低与性别有关,雄性鼠胆固醇水平明显高于雌性,也高于 C57BL/6 小鼠,而甘油三酯的变化却无性别差异;同时发现雄性转基因鼠内皮细胞的损害及血管壁病变也较雌性鼠严重。转 hSR- AI 小鼠这些代谢变化机理不清,可能与 SR- AI 对脂蛋白的识别和吞噬与血脂成分不同有关。转入 SR- AI 基因鼠血脂的性别差异也可能为我们研究激素与 As 的关系提供很好的动物模型,因为人 As 发病时间及病变程度与性别差异密切相关,有证据表明,男性的血脂通常高于绝经期前同年龄组的女性^[21]。

SR- A 的配体非常广泛,除了能结合和内化多种多聚阴离子化合物,同时也能识别和介导吞噬体内受损害的蛋白质、细胞以及炎症或组织损伤部位的细胞碎片,清除体内异物。本研究建立的人 SR- AI 转基因鼠将有助于人类 SR- A 在体内的功能和与 As 关系的研究。

致谢 该转基因小鼠是研究者在香港大学分子生物学研究所学习期间完成的,在此,作者特别感谢该所各位老师和同事给予的指导和帮助。

参考文献

- [1] Krieger M, Herz J. Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP) [J]. *Annu Rev Biochem*, 1994, **63**: 601- 637
- [2] Brown MS, Goldstein JL. Scavenging receptors [J]. *Nature*, 1990, **343**: 508- 509
- [3] Greaves DR, Gough PJ, Gordon. Recent progress in defining the role of scavenger receptors in lipid transport, atherosclerosis and host defence [J]. *Curr Opin Lipidol*, 1998, **9** (5): 425- 432
- [4] Geng Y, Kodama T, Hansson GK. Differential expression of scavenger receptor isoforms during monocyte - macrophage differentiation and foam cell formation [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, **14**: 798 - 806
- [5] 万腊香,杨永宗. 清道夫受体 A 基因的表达和调控研究进展 [J]. 国外医学分子生物学分册, 1999, **21** (5): 276- 280
- [6] Suzuki H, Kurihara Y, Takeya M, et al. A role for macrophage scavenger receptors in atherosclerosis and susceptibility to infection [J]. *Nature*, 1997, **386**: 292- 296
- [7] Kodama T, Doi T, Suzuki H. Collagenous macrophage scavenger receptors [J]. *Curr Opin Lipidol*, 1996; **7**(5): 287- 291
- [8] Gordon JW. Production of transgenic mice [M]. San Diego: Academic Press Inc, 1993: 768- 771
- [9] Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, et al. Short protocols in molecular biology [M]. Third edition. 1995 by John Wiley & Sons, Inc.
- [10] Zeng L, Takeya M, Takahashi K. AM- 3K, a novel monoclonal antibody specific for tissue macrophages and its application to pathological investigation [J]. *J Pathol*, 1996, **178**: 207- 214
- [11] Burkhart JG, Burkhart SA, Sampson KS, et al. ENU - induced mutagenesis at a single A: T base pair in transgenic mice containing • X174 [J]. *Mutat Res*, 1993, **292** (1): 69- 81
- [12] 田小利,陈兰英,扈荣良,主编.转基因动物原理,技术与应用 [M]. 长春:吉林科学技术出版社,1994: 3- 119
- [13] Korhonen J, Lahtinen I, Halmekyto M, et al. Endothelial-specific gene expression directed by the tie gene promoter in vivo [J]. *Blood*, 1995, **86** (5): 1 828- 835
- [14] Iljin K, Dube A, Kontusaari S, et al. Role of ets factors in the activity and endothelial cell specificity of the mouse Tie gene promoter [J]. *FASEB J*, 1999, **13** (2): 377- 386
- [15] Pitas RE. Expression of the acetylated low density lipoprotein receptor by rabbit fibroblasts and smooth muscle cells. Up- regulation

- by phorbol esters [J]. *J Biol Chem*, 1990, **265**: 12 722- 727
- [16] Naito M, Suzuki H, Mori T, et al. Coexpression of type I and type II human macrophage scavenger receptors in macrophages of various organs and foam cells in atherosclerotic lesions [J]. *Am J Pathol* 1992, **141**: 591- 599
- [17] Bickel PE, Freeman MW. Rabbit aortic smooth muscle cells express inducible macrophage scavenger receptor messenger RNA that is absent from endothelial cells [J]. *J Clin Invest*, 1992, **1** 450- 457
- [18] Simionescu M. Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium. II. Partial characterization of their anionic sites [J]. *J Cell Biol*, 1981, **90**: 614
- [19] Dart AM and Chin- Dusting JPF. Lipids and the endothelium [J]. *Cardiovas Res*, 1999, **43**: 308- 322
- [20] 武忠弼主编. 超微病理学基础 [M]. 人民卫生出版社, 1990; 113- 127
- [21] Slyper AH. A fresh look at the atherogenic remnant hypothesis [J]. *Lancet*, 1992, **340**: 289- 291
- [22] Oparil S. Arthur C. Corcoran Memorial Lecture. Hormones and vasoprotection [J]. *Hypertension*, 1999, **33** (1 Pt 2): 170- 6
- (此文 1999- 12- 24 收到. 2000- 03- 10 修回)
- (此文编辑 胡必利)

•读者•作者•编者•

关于汉字文稿中名词术语使用英文缩写的规定

当一个多汉字的名词术语在汉字文稿中反复出现时,作者往往喜欢用一个英文缩写词来代替;这样做,既节省篇幅,又避免繁琐重复,为多数期刊所称颂,本刊亦不例外。然而我们在编辑工作中发现,由于受作者层次和参考文献种类等因素的影响,在使用名词术语的英文缩写时存在以下问题: 同一个英文名词如术语,译成的汉文不同,如 derived 这个词,有的译成源性,有的译为衍化,还有的译成衍生;

④名词术语的缩写不规范,英文字母的大小写不一致,如载脂蛋白(apolipoprotein),缩写为 apo 已不规范,而它却有 Apo 和 apo 两种写法;④用法不当,有的用在文题中,有的用作关键词,有的名词术语仅两三个汉字,为图方便,个别作者也用缩写词来代替;而且,第一次出现时,没有汉英对照,只有缩写,这是极不应该的。有鉴于此,为求统一,本刊对汉字文稿中名词术语使用英文缩写词来代替作如下规定,请作者遵照执行。

1 名词术语在 3 个(含 3 个)汉字内,一律使用中文;多于 3 个汉字的,可使用英文缩写;如胆固醇、脂蛋白、内皮素、高血压、糖尿病、再狭窄等,都只能用中文;但冠心病、肺心病等例外。

2 文题、摘要和关键词中的名词术语,不得使用英文缩写词来代替。

3 正文中的各级标题不得用缩写来代替名词术语;段首和句首的名词术语,也不得用缩写词来代替。

4 第一次使用英文缩写词来代替名词术语时,必须按照下列格式来写:中文(英文,缩写)。如极低密度脂蛋白胆固醇(very low density lipoprotein cholesterol,

VLDLC)、动脉粥样硬化(atherosclerosis, As)等,以下行文,可只写缩写词,不必注释中文。5 名词术语的英文缩写原则 5.1 由两个或两个以上的词构成的名词术语,缩写时一律取实词首字母,全大写;如总胆固醇(total cholesterol, TC)。但相沿成习的写法例外,如氧化型低密度脂蛋白(oxidized low density lipoprotein, ox-LDL)。5.2 由主干词加前缀构成的单词名词术语缩写时,不论主干词和前缀之间是否有连字符,一律取前缀和主干词的首字母,全大写,如去甲肾上腺素(norepinephrine, NE)。5.3 组合法构成的单词名词术语,其间若没有连字符,缩写时取首字母和另 1~ 2 个字母,首字母大写,余小写,如动脉粥样硬化(atherosclerosis, As),但相沿成习的写法例外,如动脉硬化(arteriosclerosis, AS)、甘油三酯(triglyceride, TG)、白细胞介素(interleukin, IL)等。

5.4 组合法构成的名词术语,其间有连字符的,按照上述第 5.1 条原则缩写。

5.5 用来代替中文名词术语的英文缩写词,在汉字文稿中不用复数。

5.6 缩写词字母之间不用连字符;若词末有数字,可在数字与左邻字母之间加连字符(用半字线),如 IL-1。

6 书写、打字或排版时,名词术语的英文缩写词不移行。

以上规定,自 1994 年 10 月 1 日起生效;此后,凡文稿中有不符合规定者,本刊将退回作者重写,直到符合本规定为止。

(胡必利起草、修订)