

CLCN3/MMTV-PyMT 转基因小鼠杂交群体的建立及鉴定

邓璐璐¹, 李琴³, 吴慧¹, 毛建文¹, 徐彬²

(1. 广东药学院基础学院, 广州 510006; 2. 广东药学院生命科学与生物制药学院, 广州 510006;
3. 贵州省六盘水市人民医院, 贵州 六盘水 553001)

【摘要】 目的 建立并鉴定 CLCN3/MMTV-PyMT 双转基因小鼠杂交群体, 构建氯通道 CIC-3 过表达的自发乳腺肿瘤转基因小鼠模型。方法 将 CLCN3 转基因小鼠和 MMTV-PyMT 转基因小鼠分别进行繁殖, 选取阳性子代鼠进行配对, 培育杂交后代, 然后通过 PCR 鉴定基因型、通过组织免疫荧光方法、Western blot 检测转基因小鼠蛋白表达情况。结果 成功繁育 CLCN3 转基因小鼠和 MMTV-PyMT 转基因小鼠, 经 PCR 鉴定成功构建 CLCN3/MMTV-PyMT 双转基因鼠杂交群体, 并成功保种和扩群, 经组织免疫荧光和 Western-blot 分析双转基因小鼠的 CIC-3 蛋白的表达高于 MMTV-PyMT 转基因小鼠。结论 成功构建 CIC-3 过表达的自发乳腺肿瘤转基因小鼠模型, 为进一步研究 CIC-3 在肿瘤生长和转移中的功能提供了良好的动物模型。

【关键词】 CLCN3; MMTV-PyMT; 转基因小鼠; 乳腺癌

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 06-0017-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.003

Establishment and identification of a CIC-3/MMTV-PyMT hybrid mouse strain

DENG Lu-lu¹, LI Qin³, WU Hui¹, MAO Jian-wen¹, XU Bin²

(1. School of Basic Medicine, 2. School of Biosciences and Biopharmaceutics, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China; 3. the People's Hospital of Liupanshui City, Liupanshui 553001)

【Abstract】 **Objective** To establish a CLCN3/MMTV-PyMT double transgenic mouse model of spontaneous breast tumor with simultaneously overexpressing CIC-3. **Method** CLCN3 transgenic mice were crossed with MMTV-PyMT spontaneous mammary tumor model mice. The genotype was determined by PCR. The expression of CIC-3 in tissues was detected by immunofluorescence and Western blot. **Results** CLCN3 and MMTV-PyMT transgenic mice were bred and CLCN3/MMTV-PyMT hybrid mouse model was successfully established. The CIC-3 expression in CLCN3/MMTV-PyMT hybrid mice was higher than that in the MMTV-PyMT mice, assessed by immunofluorescence and Western blot analysis. **Conclusions** Transgenic mouse models of spontaneous breast cancer with simultaneously overexpressing CIC-3 are successfully established. The double transgenic mice provide a good animal model for further research of CIC-3 in tumor growth and metastasis.

【Key words】 CLCN3; MMTV-PyMT; Transgenic mice; Breast cancer

离子通道如 K⁺、Cl⁻ 和 Na⁺ 通道的高表达促进了细胞的生长和运动, 进一步促进恶性肿瘤细胞的生长和转移, 特别是氯离子通道在肿瘤生长和转移

中扮演了重要的角色^[1]。CIC 氯通道(CIC chloride channel)是一类电压门控性氯通道, 目前在哺乳动物细胞中已发现九种家族成员, 其中 CIC-3 是备受

[基金项目] 国家自然科学基金项目(编号:31371144)。

[作者简介] 邓璐璐(1989-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 离子通道转化医学。E-mail: luluwenz@163.com

[通讯作者] 徐彬。E-mail: xubin2003@163.com

关注的一种。在乳腺癌组织中、人胶质瘤中氯离子通道 CIC-3 的表达都明显高于正常组织,并且不同恶性程度之间有明显差异,提示了 CIC-3 可能在肿瘤发生和发展过程中起了重要作用^[2,3]。

近年的研究报道,细胞膜上的 CIC-3 介导了细胞的 premitotic condensation (PMC) 过程,参与细胞周期调控^[4,5]。Zuo^[6]用氯离子通道阻断剂 NPPB 抑制 H₂O₂ 激活的氯电流,减少 PC12 细胞的凋亡,提示与容积调控相关的氯通道 CIC-3 可能参与肿瘤细胞的凋亡过程。我们的研究也发现 CIC-3 在鼻咽癌细胞中作为容积激活性氯离子通道,通过调节容积激活性氯离子电流促进肿瘤细胞的迁移,且发现阻断容积激活性氯离子通道以及下调 CIC-3 的表达都成功抑制鼻咽癌细胞的迁移,进一步表明了 CIC-3 与肿瘤细胞迁移密切相关^[7-9]。这些结果从细胞水平上提示 CIC-3 可能参与肿瘤细胞的细胞周期、细胞凋亡和细胞迁移的调控,但 CIC-3 在体内肿瘤生长和转移中的作用尚未明确。因此,内源性过表达 CIC-3 的转基因小鼠为此方向的研究提供了不可替代的作用。本研究把 CLCN3 转基因小鼠和 MMTV-PyMT 自发性乳腺癌转基因小鼠杂交,构建了内源性 CIC-3 过表达的自发乳腺肿瘤小鼠模型,为进一步研究 CIC-3 在肿瘤生长和转移特别是乳腺癌生长和转移方面的研究提供合适的动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物

CIC-3 过表达转基因小鼠委托 Cyagen Biosciences 公司构建,编号为 TGS120401AH01。质粒名称为 pLV. EX3d. P/neo-EF1A > CLCN3 > IRES/eGFP,携带 GFP 绿色荧光蛋白。2 只 15~20 周龄雄性 MMTV-PyMT 小鼠购自南京大学模式动物研究院【SCXY(苏)2010-0001】,品系为 FVB/N-Tg, 634 Mu/J。同时购进 2 只雌性野生型 FVB 鼠用于保种扩群。SPF 环境饲养【SYXK(粤)2012-0125】,每天紫外 2 h,温度 22~28℃,湿度 40%~60%,昼夜交替。

表 1 转基因小鼠鉴定引物序列

Tab.1 The primer sequences specific for the identification of transgenic mice

基因 Genes	上游引物 Upstream primer (5' - 3')	下游引物 Downstream primer (5' - 3')	产物大小/bp Product size
MTV/PyMT	GGAAGCAAGTACTTCACAAGGG	GGAAAGTCACTAGGAGCAGGG	556
CLCN3	TTGCCTACTATCACCACGAC	GCATCTCCAACCCATTACT	440
内参	CAAATGTTGCTTGCTTGCTGGTG	GTCAGTCGAGTGCACAGTTT	200

1.2 实验材料

真空包装饲料、垫料购于广州中医药大学动物实验中心,鼠尾试剂盒(CW2094)购于康为世纪有限公司,Taq 酶(DRR037S)、DNA marker DL1000(D526A)、琼脂糖购自大连宝生物工程有限公司。小鼠鉴定引物均由上海 Invitrogen 公司合成(表 1)。免疫染色固定液(P0098)、免疫染色洗涤液(P0106)、免疫染色一抗稀释液(P0103)、免疫染色二抗稀释液(P0108)、免疫染色抗荧光淬灭封片液(P0126)、Alexa Fluor488 标记山羊抗兔 IG(H+L)(A0423)、GAPDH 鼠源一抗(AG019-1)均购于碧云天,CIC-3 兔源一抗(ab28736)购于 Abcam,羊抗鼠二抗(H2311)、羊抗兔二抗(CO211)购于 Biotechnology 公司,蛋白裂解液(K0301)购于 Thermo 公司。

1.3 转基因小鼠的整合检测

PCR 方法鉴定转基因小鼠基因型。剪取三周龄小鼠尾尖,采用鼠尾 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA,利用 MMTV-PyMT 和 CIC-3 特异性引物(如表 1)进行 PCR 扩增。PCR 体系分别加入 PCR Mix 酶 25 μL,PCR 引物各 1 μL,模板 DNA 1 μg,ddH₂O 加到 50 μL。反应条件为:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,退火 64℃ 1min,延伸 72℃ 1min,循环 35 次,72℃ 延伸 2 min,4℃ 保存。取 10 μL PCR 产物进行 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统分析结果。

1.4 组织免疫荧光检测

石蜡切片常规脱蜡,蒸馏水浸泡 2 次,每次 5 min,微波抗原修复,单蒸水洗 3 次,每次 5 min。滴加 3% H₂O₂,室温孵育 15 min,PBS 洗涤 3 次,每次 5 min。滴加即用型 5% BSA 封闭液,室温孵育 40 min,弃去封闭液。滴加 CIC-3 抗体(1:100 稀释),湿盒内 4℃ 过夜。复温 40 min,PBS 洗 3 次,每次 5 min,滴加 CY3-抗兔/鼠 IgG 二抗,室温孵育 1 h,PBS 洗 5 次每次 5 min,再加入 DAPI 复染核,PBS 洗 5 次,每次 5 min。滴加抗荧光淬灭剂封片液,封片,自然晾干。

1.5 转基因小鼠杂交群体的构建

选取 2 - 3 月龄 MMTV-PyMT 雄性小鼠和 CLCN3 雌性转基因小鼠进行配对, 喂食高压灭菌过的生瓜子, 记录其分娩时间。其生育的为 F1 代杂交鼠, 待 3 周后剪鼠尾提取 DNA, PCR 鉴定基因型, 其中有 MMTV-PyMT 和 CLCN3 双转阳性小鼠、MMTV-PyMT 单转基因阳性小鼠, 也有 CLCN3 单转阳性小鼠。再选取同窝 MMTV-PyMT 阳性雄性小鼠和 CLCN3 阳性雌性转基因小鼠同胞兄妹交配, 扩大种群。

1.6 蛋白印迹分析

分别通过组织匀浆提取同窝 MMTV-PyMT 单转基因鼠和 MMTV/CLCN3 双转基因鼠、阴性对照小鼠的肺组织蛋白, 然后进行 10% 的十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳, 积层胶 70 V 30 min, 分离胶 120 V 90 min, 然后将蛋白转移至 PVDF 膜上, 350 mA 90 min, 转膜结束用 5% 脱脂奶粉封闭 2h。沿 Marker 70×10^3 处剪开, 大于 70×10^3 加入 CIC-3 抗体 (1:1000 稀释), 小于 70×10^3 的加入 GAPDH 单克隆抗体 (1:1000 稀释), 4℃ 孵育过夜, 回收一抗, TBST 洗 5 次每次 5 min, 分别加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔、羊抗鼠二抗, 室温

孵育 1 h, 回收二抗, TBST 洗膜 5 次每次 5 min, 加入发光液, 胶片显影曝光。

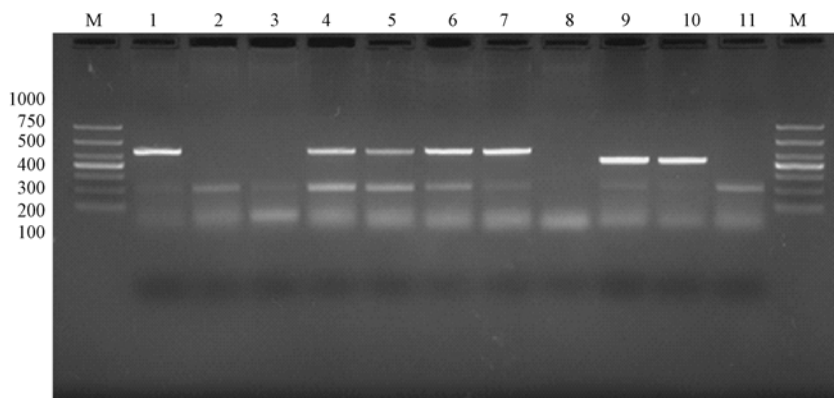
1.7 统计方法

实验数据用均数 \pm 标准误 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两组数据之间的差异用 Student's *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 MMTV 与 CLCN3 转基因鼠的培育与鉴定

首先用引种的 MMTV-PyMT 转基因雄鼠和 FVB 雌鼠进行 1:1 比例配对 (F0 代), 其生育的小鼠为 F1 代幼鼠, 3 周后剪取鼠尾提取 DNA, 经过加入特异性引物 PCR 扩增目的基因片段, 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像, 准确检测到子代阳性转基因鼠, 再选取同窝子代阳性雄鼠和阴性雌鼠进行同胞交配, 扩大种群。至今共育子代 MMTV-PyMT 转基因小鼠共 50 多只。CLCN3 转基因小鼠用同样的方法也进行全同胞交配, 至今共培育子代 80 多只。MMTV-PyMT 阳性小鼠在 556 bp 处有明显条带, CLCN3 阳性小鼠在 440 bp 处出现条带, 200 bp 为内参基因, 部分结果如图 1。



注: 1 ~ 7: MMTV-PyMT 引物 (556 bp); 8 ~ 11: 检测 CLCN3 引物 (440 bp)。

图 1 MMTV-PyMT 和 CLCN3 转基因小鼠的鉴定

Note. 1 - 7: Identification of MMTV-PyMT primer, 556 bp; 8 - 11: Identification of CLCN3 primer, 440 bp.

Fig. 1 Identification of MMTV-PyMT and CLCN3 mice

2.2 CLCN3 转基因小鼠蛋白表达免疫荧光分析

CLCN3 转基因小鼠构建质粒为 pLV. EX3d. P/neo-EF1A > CLCN3 > IRES/eGFP, 为了验证 CLCN3 转基因小鼠是否表达 CIC-3 蛋白, 选取同窝 CLCN3 单转阳性小鼠和双阴性小鼠处死解剖, 取肺, 制作石蜡切片, 进行组织免疫荧光分

析, 由于其质粒中携带 GFP 基因, 所以在构建成功的前提下组织中表达绿色荧光蛋白。结果发现 CLCN3 转基因小鼠在肺组织中 (图 2A) 明显表达 CIC-3 蛋白和绿色荧光蛋白, 而同窝阴性小鼠肺组织 (图 2B) 中仅见支气管上皮细胞少量表达 CIC-3。图 2 见彩插 10。

2.3 MMTV-PyMT 与 CLCN3 转基因鼠杂交群体的建立

选取 2 ~ 3 月龄 MMTV-PyMT 阳性雄鼠和 CLCN3 阳性雌鼠配对(杂交图谱如图 3), 8 周后产仔 8 ~ 12 只, 剪取鼠尾提取基因组 DNA 进行 PCR 扩增鉴定, 若同一只老鼠 MMTV-PyMT 和 CLCN3 分别都出现条带, 则为双转基因鼠阳性鼠(图 1)。共育 MMTV-PyMT 和 CLCN3 双转基因杂交子代小鼠约 100 多只。

2.4 CIC-3 蛋白的组织器官的表达分析

为了验证高度转移的乳腺肿瘤和 CIC-3 蛋白表达之间的关联, 选取同一胎的 CLCN3 单转阳性小鼠、MMTV-PyMT /CLCN3 双转阳性小鼠和双阴性小鼠的肺组织, 采用组织匀浆法提取蛋白, Western-blot 方法检测 CIC-3 蛋白表达水平。结果显示 MMTV-PyMT /CLCN3 双转阳性小鼠的 CIC-3 蛋白含量明显高于同窝的 MMTV-PyMT 单转阳性小鼠(图 4)。

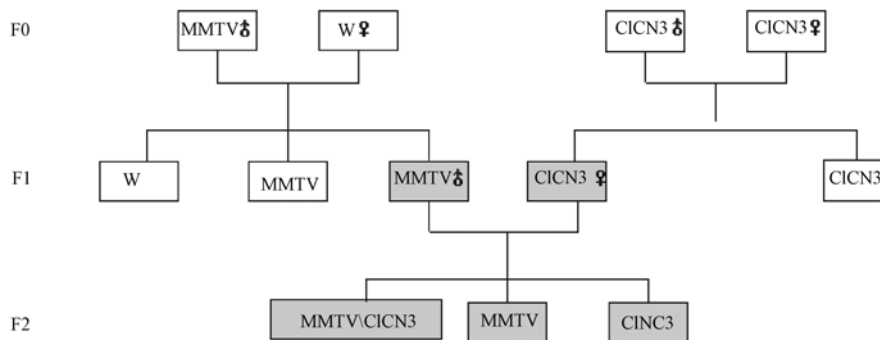
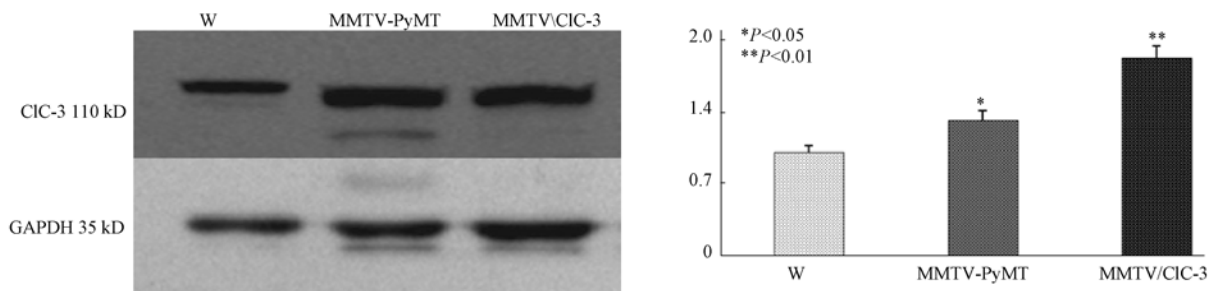


图 3 MMTV-PyMT 与 CLCN3 转基因小鼠杂交群体建立示意图

Fig.3 Establishment of the MMTV-PyMT and CLCN3 hybrid strain



注: MMTV-PyMT 相对于阴性小鼠 * $P < 0.05$, MMTV-PyMT /CLCN3 双转阳性小鼠相对于阴性小鼠 ** $P < 0.01$ 。

图 4 CIC-3 在小鼠肺中的表达

Note. Compare to the negative mice, MMTV-PyMT transgenic mice * $P < 0.05$, MMTV-PyMT /CLCN3 hybrid mice ** $P < 0.01$.

Fig.4 Western blot analysis of CIC-3 expression in the lungs

3 讨论

CIC-3 属于 CIC 家族中的一员, 推荐名为 H^+ / Cl^- exchange transporter 3, 基因符号为 CLCN3。CIC-3 通道蛋白有 13 个跨膜区域, N 和 C 末端均位于细胞内, 其有短型和长型之分, 短型 CIC-3 蛋白由 760 个氨基酸构成, 在短型 CIC-3 蛋白氨基末端(N 端)加上 58 个氨基酸残基即构成长型 CIC-3 通道蛋白。广泛分布于脑、肾、肝、骨骼肌、心脏、肾上腺和胰腺等组织。Jentsch^[10]和 Suzuki^[11]表明 CIC-3 可能作为容积激活性氯离子通道参与调节性细胞容积

回缩(RVD)的调节。RVD 被认为是与细胞的增殖、分化、迁移及细胞的凋亡密切相关的生理功能之一。多项研究发现, 在肿瘤细胞中, CIC-3 可通过调节容积激活性氯离子电流和 RVD 调控细胞的增殖和迁移过程^[12-15]。提示 CIC-3 在肿瘤的生长和转移中有重要的作用。

转基因动物技术的发展有 30 余年的历史。该技术是把目的基因转入早期胚胎细胞, 使之能够整合到染色体上, 并且传递给子代, 这样获得的动物叫转基因动物^[16]。转基因小鼠已经广泛应用于生命科学、医药基础研究等领域。本研究所应用的小鼠

高表达转基因小鼠采用 Gateway 技术把目的基因 CLCN3 克隆到入门载体,不再依赖限制性内切酶而靠载体上存在的特定充足位点和重组酶,高效、快速地把 CLCN3 克隆到目的载体中。该技术是一种通用性的克隆方法,简单便捷,用于基因的蛋白质表达和功能分析^[17]。CIC-3 高表达转基因小鼠质粒名称为 pLV. EX3d. P/neo-EF1A > CLCN3 > IRES/eGFP,稳定克隆到目的载体上,通过胚胎显微注射法得到稳定遗传且高度表达的转基因小鼠,经鼠尾提取基因组 DNA,再 PCR 扩增目的片段,准确快速的检测到 CLCN3 基因高表达,而且在繁殖的后代中也稳定遗传。因为在质粒中携带 GFP 基因,所以组织中表达绿色荧光蛋白,所以采用组织免疫荧光的方法对肺组织进行切片观察,发现内源性所携带的绿色荧光蛋白和 CIC-3 蛋白表达完全一致,表明 CLCN3 过表达转基因小鼠构建成功。

MMTV-PyMT 自发乳腺癌转基因小鼠来源于南京大学模式生物研究所,该小鼠 9 周自发乳腺肿瘤,12 周后出现转移。本研究成功构建了 CIC-3 高表达的自发乳腺肿瘤小鼠模型,通过 PCR 技术和组织免疫荧光、Western blot 方法准确进行鉴定,从基因表达水平和组织蛋白表达水平证实所得杂交小鼠成功整合 CLCN3 和 MMTV-PyVT 基因,并成功表达 CIC-3 蛋白,到目前为止培育杂交子代小鼠共 100 多只。该小鼠模型的成功构建为进一步研究 CIC-3 在肿瘤生长和转移方面的作用提供了良好的实验基础,同时也为研究 CIC-3 高表达对其他组织器官生理病理的影响提供实验材料基础。

(本文图 2 见彩插 10。)

参 考 文 献

- [1] Cuddapah VA, Sontheimer H. Ion channels and transporters in cancer. 2. Ion channels and the control of cancer cell migration [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2011, 301(3): C541-549.
- [2] 赵维,王岩,韩振国,等. 氯离子通道 CIC-3 在乳腺癌中的表达及临床意义 [J]. *中国实验诊断学*. 2009, 13(3): 350-352.
- [3] 徐冰,罗祺,王心蕊,等. CIC-3 在人胶质瘤中的表达及分布 [J]. *中国病理生理杂志*. 2005, 21(11): 2188-2191.
- [4] Habela CW, Olsen ML, Sontheimer H. CIC-3 is a critical regulator of the cell cycle in normal and malignant glial cells [J]. *J Neurosci*. 2008, 28(37): 9205-9517.
- [5] Habela CW, Sontheimer H. Cytoplasmic volume condensation is an integral part of mitosis [J]. *Cell Cycle*. 2007, 6(13): 1613-1620.
- [6] Zuo W, Zhu L, Bai Z, et al. Chloride channels involve in hydrogen peroxide-induced apoptosis of PC12 cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009, 387(4): 666-670.
- [7] Mao J, Chen L, Xu B, et al. Volume-activated chloride channels contribute to cell-cycle-dependent regulation of HeLa cell migration [J]. *Biochem Pharmacol*. 2009, 77(2): 159-168.
- [8] Mao J, Chen L, Xu B, et al. Suppression of CIC-3 channel expression reduces migration of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Biochem Pharmacol*. 2008, 75(9): 1706-1716.
- [9] Mao J, Wang L, Fan A, et al. Blockage of volume-activated chloride channels inhibits migration of nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Cell Physiol Biochem*. 2007, 19(5-6): 249-258.
- [10] Jentsch TJ, Stein V, Weinreich F, et al. Molecular structure and physiological function of chloride channels [J]. *Physiol Rev*. 2002, 82(2): 503-568.
- [11] Suzuki M, Morita T, Iwamoto T. Diversity of Cl⁻ channels [J]. *Cell Mol Life Sci*. 2006, 63(1): 12-24.
- [12] Xu B, Mao J, Wang L, et al. CIC-3 chloride channels are essential for cell proliferation and cell cycle progression in nasopharyngeal carcinoma cells [J]. *Acta Biochim Biophys Sinica*. 2010, 42(6): 370-380.
- [13] 陈丽新,王立伟,朱林燕,等. Cl⁻ 在鼻咽癌细胞调节性容积回缩中的作用 [J]. *中国病理生理杂志*. 2002, 18(5): 480-493.
- [14] 王立伟,陈丽新,朱林燕,等. 抑制氯通道阻抑鼻咽癌细胞周期和细胞增殖 [J]. *中国病理生理杂志*. 2004, 20(5): 715-718.
- [15] Cuddapah VA, Habela CW, Watkins S, et al. Kinase activation of CIC-3 accelerates cytoplasmic condensation during mitotic cell rounding [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2012, 302(3): C527-538.
- [16] Rossant J. Manipulating the mouse genome: implications for neurobiology [J]. *Neuron*. 1990, 4(3): 323-334.
- [17] Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using in vitro site-specific recombination [J]. *Genome Res*. 2000, 10(11): 1788-1795.

[收稿日期] 2014-07-07