

Duchenne 型肌营养不良小鼠模型鉴定及 干细胞移植后 dystrophin 的变化

庞荣清¹, 李自安¹, 阮光萍¹, 何洁¹, 王强¹, 王金祥¹, 潘兴华¹, 张成³,
张永云^{1,4}, 张小飞^{2,5}

(1. 成都军区昆明总医院云南省干细胞工程实验室, 昆明 650032; 2. 军事医学科学院实验动物中心, 北京 100071;
3. 中山大学附属第一医院神经内科, 广州 510080; 4. 云南农业大学农科专业基础实验教学示范中心, 昆明 650201;
5. 北京市兽药监察所, 北京 102600)

【摘要】 目的 建立 Duchenne 型肌营养不良(DMD)模型 dko 小鼠的鉴定方法, 评估干细胞移植后 dystrophin 的再生水平。方法 采用 SSP-PCR 方法鉴定杂合子鼠交配产生的子代鼠的基因型。生化分析仪测定 dko 小鼠血浆肌酸激酶含量, HE 染色观察肌肉组织学变化。扩增人脐带间充质干细胞并注射到 dko 小鼠后肢肌肉, 2 个月后可检测到人 dystrophin 的表达。结果 杂合子鼠交配可以产生三个基因型的子代鼠, 21.2% 的子代鼠可以鉴定为 dko 小鼠的基因型(285 bp)。dko 小鼠显示了肌营养不良的症状, 血浆肌酸激酶含量高达(16,988.52 ± 617.48) IU/L, 典型的病理变化包括肌纤维大小不一, 多见核中移细胞, 结缔组织增生或炎性细胞浸润。将人脐带间充质干细胞注射到 dko 小鼠后肢肌肉, 2 个月后可检测到人 dystrophin 的表达。结论 采用 SSP-PCR 可用于鉴定 dko 小鼠基因型, dko 小鼠是研究干细胞治疗 DMD 的理想动物模型。

【关键词】 Duchenne 型肌营养不良; 动物模型; 基因型鉴定; 干细胞治疗; Dko 小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 06-0081-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.014

Identification of the method of establishment of a DKO mouse model of Duchenne muscular dystrophy and regeneration of dystrophin expression in vivo after stem cell transplantation

PANG Rong-qing¹, LI Zi-an¹, RUAN Guang-ping¹, HE Jie¹, WANG Qiang¹, WANG Jin-xiang¹,
PAN Xing-hua¹, ZHANG Cheng³, ZHANG Yong-yun^{1,4}, ZHANG Xiao-fei^{2,5}

(1. Stem Cell Engineering Laboratory of Yunnan Province, Kunming General Hospital of Chengdu Military
Command, Kunming 650032, China; 2. Laboratory Animal Center, Military Academy of Medical Sciences,
Beijing 100071; 3. Department of Neurology, the First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510080;
4. Experiment Center of Yunnan Agricultural University, Kunming, 650201;
5. Beijing Institute of Veterinary Drug Control, Beijing, 102600)

【Abstract】 **Objective** To establish a method of identification of DKO mouse model of Duchenne muscular dystrophy, and to assess the dystrophin regeneration after stem cell transplantation. **Methods** Heterozygous mice were mated and the resulting offspring were used to identify their genotype by SSP-PCR. The plasma creatine kinase level was measured

【基金项目】 云南省基金项目(2011HB050, 2013DA004); 成都军区基金项目(B12021, 2012WJ003); “十二五”重大项目(2011ZXJ09201-031)。

【作者简介】 庞荣清(1971-), 男, 副主任医师/副教授, 硕士生导师, 研究方向: 干细胞与再生医学, E-mail: pangrq2000@aliyun.com.

【通讯作者】 张永云, 女, 研究方向: 动物生物化学, E-mail: zyypang@126.com; 张小飞(1979年-), 女, 实验师。研究方向: 实验动物学, E-mail: 15810074189@163.com

by biochemical analyzer and histological changes in the DKO mice were analyzed using HE staining. Human umbilical cord mesenchymal stem cells were prepared and injected into the DKO mice hindlimb muscle, and dystrophin expression was detected by immunofluorescence staining at 2 months after injection. **Results** Mating of heterozygous mice generated three kinds of genotype offsprings, and 21.2% of the offsprings were identified as DKO genotype (285 bp). DKO mice showed dystrophic symptoms, their plasma creatine kinase level was as high as 16988.52 ± 617.48 IU/L, and significant histological changes including diverse myocyte sizes, numerous centrally nucleated cells and connective tissue proliferation or inflammatory cells infiltration. Human dystrophin expression was detected in the DKO mouse hindlimb muscle at two months after injection of human umbilical cord mesenchymal stem cells. **Conclusion** DKO mouse genotype can be identified by SSP-PCR, and DKO mouse is an ideal animal model for studies of stem cell therapy for Duchenne muscular dystrophy.

【Key words】 Duchenne muscular dystrophy; Duchenne muscular dystrophy; Animal model; Genotype identification; Stem cell therapy; DKO mice

Duchenne 型肌营养不良 (Duchenne muscular dystrophy, DMD) 是致死性 X 连锁隐性遗传病。目前尚无有效治疗方法^[1]。建立遗传特征与临床症状与 DMD 患者相似的动物模型是探索 DMD 治疗的关键。Dystrophin 和 utrophin 双敲出 (double-knockout, DKO) 小鼠是 DMD 研究常用的动物模型, 为开展 DMD 治疗, 尤其是干细胞治疗提供了重要条件^[2]。我们课题组从英国牛津大学引进了杂合子种鼠, 本文以此为研究对象, 探讨 DKO 小鼠的饲养管理、鉴定方法以及干细胞移植重建 dystrophin 表达的可行性。

1 材料和方法

1.1 实验动物及试剂器材

DMD 模型种鼠由英国牛津大学 Davies 教授惠赠 (动物入境检疫许可证号为 AD44010011), 饲养于屏障系统环境动物实验室【SYXK (滇) 2013-0011】。阳性对照鼠为 C57BL/6。DMEM/F12 培养液、胎牛血清和 0.25% trypsin-EDTA 均为 Gibco 公司生产; 一抗 mouse-anti-human dystrophin 和二抗 FITC-goat-anti-mouse IgG 均为 Santa Cruz 公司生产; 倒置相差显微镜、生物显微镜和荧光显微镜为 Nikon 公司生产。

1.2 基因型鉴定

种鼠交配后获得的子代鼠用于基因型鉴定。将子代小鼠固定, 酒精擦拭尾巴, 剪断尾尖少许, 取自然滴下的血液 50 ~ 100 μ L 至事先加入 100 μ L 抗凝剂的 Eppendorf 管, 置于低温条件下送实验室按照微量血液 DNA 提取试剂盒说明书的要求提取基因组 DNA。按本课题组建立的实验方法序列特异性引物 (sequence specific primers, SSP)-PCR 法进行基因型鉴定^[3]。上游引物: 5'-GTG AAG GAT GTC

ATG AAA G-3', 下游引物 1: 5'-TGA AGT CCG AAA GAG ATA CC-3', 下游引物 2: 5'-ACG AGA CTA GTG AGA CGT GC-3'。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 共计 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物采用 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测扩增片段, 溴化乙啶染色后紫外灯下观察照相。

1.3 外形观察

由专业饲养员精心饲养观察经基因型鉴定确定的 DKO 小鼠, 注意比较观察 DKO 小鼠与 C57 小鼠精神状态和运动功能。

1.4 肌酸激酶测定

采集 16 周龄 DKO 小鼠外周血血浆, 采用生化分析仪测定外周血 CK 含量。

1.5 组织病理学检测

参照本课题组建立的技术方法^[3], 取 16 周龄 C57 鼠和 DKO 鼠后肢肌肉, 制作病理切片, 行 HE 染色, 生物显微镜下观察病理结构的变化。

1.6 hUCMSC 的准备及移植

按照本课题组建立的方法^[4]分离扩增 hUCMSC, 即采集脐带, 无菌条件下剪碎并转移至含 10% 血清的 DMEM/F12 中培养, 倒置相差显微镜下观察细胞生长增殖情况, 当细胞生长至 90% 融合时胰酶消化传代培养, 第三代 hUCMSC 用于移植实验研究。收集生长良好的第三代细胞调整细胞密度为 1×10^6 /mL, 采用股直肌肌肉注射的方式每只鼠移植 0.5 mL 的 hUCMSC, 对照组注射无细胞的等量基础培养液。

1.7 人 dystrophin 的检测

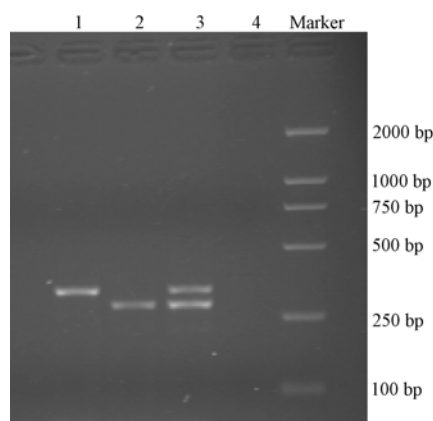
参照我们课题组建立的技术方法^[3], 取移植细胞的 DKO 鼠后肢肌肉, 制作冰冻切片, 室温条件下用 10% 正常羊血清作用 1h, 加入一抗 mouse anti-

human dystrophin 于 4℃ 孵育过夜, PBS 漂洗后加入二抗 FITC-goat anti-mouse IgG 于室温孵育 1h, PBS 漂洗后, 荧光显微镜下观察拍照。

2 结果

2.1 DKO 小鼠的鉴定

采用 SSP-PCR 方法可以将 DMD 模型小鼠鉴定为 mdx、杂合子和 DKO 三种基因型, 即如果只扩增出 340 bp 一个条带的, 提示有正常的 utrophin 基因, 为 mdx 小鼠; 如果只扩增出 285 bp 一个条带的, 提示其 utrophin 基因异常, 为 DKO 小鼠; 如果同时扩增出 340 bp 和 285 bp 两个条带的, 提示其有 1 个正常的 utrophin 基因, 而另外一个等位基因异常, 为 utrophin 基因杂合子 mdx 小鼠 (见图 12)。本实验前后共鉴定子代鼠 85 只, 结果 mdx 小鼠 22 只, 杂合子小鼠 45 只, DKO 小鼠 18 只, 按百分比计算, 分别占 25.9%、52.9%、21.2%, 符合孟德尔遗传规律。



注: 1. mdx 小鼠 (340 bp); 2. DKO 小鼠 (285 bp); 3. 杂合子小鼠 (285 bp + 340 bp); 4. 用纯水代替 DNA 模板的空白对照。

图 1 三种基因型小鼠的 SSP-PCR 电泳图

Note. 1. mdx mice (340 bp); 2. DKO mice (285 bp); 3. Heterozygote mice (285 bp + 340 bp); 4. Water control.

Fig. 1 SSP-PCR products of the three genotype mice

2.2 dko 小鼠的饲养观察

随着 DKO 小鼠的生长, 肌营养不良的症状逐渐突显, 表现为生长迟缓、皮毛稀疏无光泽, 活动力逐渐减弱, 后期出现明显的后肢瘫痪 (见图 2, 彩插 11), 总体而言, DKO 小鼠 9 周龄即可出现运动功能减退, 12 周即可肌萎缩, 生存期约 20 周。DKO 小鼠外周血 CK 值显著高于对照的 C57 鼠, 而 C57 小鼠皮毛密集黝黑有光泽, 好动活力好。饲养管理员需要及时补充高蛋白饲料, 否则临床症状更加明显。

2.3 血浆肌酸激酶变化

16 周龄 DKO 小鼠外周血血浆肌酸激酶含量高达 16988.52 ± 617.48 IU/L, 远远高于 C57 小鼠的含量。

2.4 组织学变化

HE 染色显示: 正常对照 C57 小鼠肌纤维细胞大小均一, 细胞核位于肌细胞边缘, 肌间隙均一正常, 无炎性细胞浸润, 而 DKO 小鼠肌纤维细胞大小不一, 多见核中移细胞, 肌间隙明显增宽, 常见脂肪细胞和结缔组织增生, 可见炎性细胞浸润或肌细胞坏死 (见图 3, 彩插 11)。

2.5 hUCMSC 分离

采用剪碎脐带为糊状直接加入含 10% FBS 的 DMEM/F12 贴壁培养的方法, 可以在光镜下观察到少数长梭形贴壁生长的细胞或从小组织块周围长出少许贴壁生长的细胞, 这些细胞散在分布或围绕组织块呈克隆状生长。传代后大量细胞均匀分布生长至大部分融合状态时, 可见大量成纤维细胞样细胞呈漩涡状生长, 呈现明显的方向性, 显示间充质干细胞的典型形态特征 (图 4, 彩插 11)。

2.6 重建 dystrophin 表达的检测

本研究直接注射 hUCMSC 至 DKO 小鼠后肢股直肌, 两个月后采用免疫荧光染色方法检测到了人 dystrophin 的表达, 而没有注射细胞的对照小鼠只观察到极其微弱的荧光背景, 检测不到 dystrophin 的表达 (见图 5, 彩插 11), 表明植入的 hUCMSC 可以在 DKO 小鼠体内再生为肌纤维, 证明 DKO 小鼠是 DMD 治疗良好的动物模型。

3 讨论

本研究中的杂合子种鼠是将一个 PGKneopA 结构 [磷酸甘油激酶-1 (phosphoglycerate-kinase-1, PGK) 启动子驱动的新霉素 (neomycin) 抗性结构] 插入传统 DMD 动物模型 mdx 小鼠 utrophin 一个等位基因的 7 号外显子内, 造成该基因功能缺失, 从而构建成 utrophin 基因杂合子 mdx 小鼠, 该种鼠互相交配可以产生 mdx、DKO 和杂合子三种基因型的子代鼠^[2]。因此, 保存好杂合子种鼠就可以获得 mdx 和 DKO 两种 DMD 动物模型。本研究结果显示: 采用 SSP-PCR 方法可以将杂合子种鼠的子代鼠鉴定为 mdx、杂合子和 DKO 三种基因型, 其比例符合孟德尔遗传规律, 证明该鉴定方法科学可靠。在随后的饲养过程中, 我们观察到 DKO 小鼠生长明显缓慢,

随着时间推移肌营养不良的症状逐渐突显,这些结果与文献报道一致^[3],临床症状非常接近 DMD 患者。生化检测结果显示:外周血 CK 值大幅升高,病理组织学检查显示核中移明显、肌纤维变形或坏死明显,这些结果证实小鼠存在显著的肌源性损害特征。

研究已经证实:DMD 的发病原因是由于位于 X 染色体上的 dystrophin 基因突变或缺失,导致 dystrophin 蛋白不能表达。Dystrophin 蛋白位于肌细胞膜上,与肌纤维膜糖蛋白结合为抗肌萎缩蛋白复合体(dystrophin-associated protein complex, DAP),这些蛋白与肌细胞的粘附蛋白(laminin)联结,共同构成细胞支架,共同维持着肌纤维的稳定^[5]。DMD 患者由于 dystrophin 蛋白缺失造成细胞骨架不稳定,不能有效抵抗肌纤维的舒缩牵拉,其结果是细胞膜通透性发生改变,肌纤维断裂、变性或坏死。为了补充变性坏死的肌纤维,处于静息状态的肌卫星细胞开始分裂增殖并分化为新的肌纤维,由于患者始终缺乏 dystrophin 基因,新的肌纤维很快又变性坏死,如此恶性循环的结果是耗竭了肌卫星细胞而进入失代偿状态。本研究中观察到的 dko 小鼠临床症状的改变,就是由于 dystrophin 和 utrophin 功能缺失导致肌纤维稳定性破坏的结果。从这个意义上来说,DKO 小鼠饲养过程中补充高蛋白饲料,有助于新的肌细胞的再生,有助于缓解临床症状的快速恶化。

干细胞移植治疗 DMD 的原理就是通过输入健康供体来源的干细胞到 DMD 体内以重建 dystrophin 蛋白的表达。脐带间充质干细胞是一种来源充足、活性好、又相对比较安全、相对容易标准化生产的种子细胞,已成为干细胞研究的热点对象。采用我们先前建立的粘附培养 hUCMSC 的方法,可以在短期内获得足够数量的间充质干细胞^[4]。间充质干细胞不表达 MHC-II 和 CD40 和 CD80 等共刺激分子^[6,7],可以抑制淋巴细胞的增殖反应^[8],这些特殊的生物学特性决定了间充质干细胞可以异体移植或异种移植。本研究中直接注射 hUCMSC 至 DKO 小鼠股直肌两个月后可以清晰地检测到 dystrophin 的表达,与最新研究报道一致^[9]。由于 DKO 小鼠同时缺乏 dystrophin 和 utrophin 的表达,没有两种基因表达的代偿机制,使得 DKO 小鼠的肌纤维稳定性很差,临床症状与 DMD 患者相似,用于干细胞移植治

疗实验,一方面容易检测到 dystrophin 表达的变化,另一方面容易观察到运动功能的改变,实验的灵敏度较高,从这个意义上来说 DKO 小鼠是开展干细胞治疗 DMD 研究的理想动物模型。DKO 小鼠用于干细胞移植研究的不足之处在于体型较小,限制静脉输注细胞数量,采集外周血也相对困难,但杂合子种鼠的饲养不是很难,保种容易,只需采用本研究建立的基因型鉴定方法就可准确确定 DKO 小鼠,作为一种珍贵的实验动物模型仍然值得推广使用。

(本文图 2~5 见彩插 11。)

参 考 文 献

- [1] 刘焯霖,梁秀龄,张成 主编. 神经遗传病 [M]. 第二版,北京:人民卫生出版社,2002,27-216.
- [2] Deconinck AE, Rafael JA, Skinner JA, et al. Utrophin-dystrophin-deficient mouse as a model for Duchenne muscular dystrophy [J]. Cell, 1997, 90(4):717-727.
- [3] Li Z, Liu HY, Lei QF, et al. Improved motor function in dko mice by intravenous transplantation of bone marrow-derived mesenchymal stromal cells [J]. Cytotherapy. 2011, 13(1):69-77.
- [4] 庞荣清,何洁,李福兵,等. 一种简单的人脐带间充质干细胞分离培养方法 [J]. 中华细胞与干细胞杂志. 2011, 1(2):162-167.
- [5] Hoffman EP, Brown RH, Kunkel LM. Dystrophin; the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus [J]. Cell. 1987, 51:919-928.
- [6] Le Blanc K, Tammik L, Zetterberg E, et al. HLA-expression and immunologic properties of undifferentiated and differentiated mesenchymal stem cells [J]. Exp Hematol, 2003, 31:890-896.
- [7] Tse WT, Pendleton JD, Beyer WM, et al. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation [J]. Transplantation. 2003, 75:389-397.
- [8] Rasmuson I, Ringden O, Sundberg B, et al. Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms [J]. Exp Cell Res, 2005, 305:33-41.
- [9] Secco M, Bueno CJ, Vieira NM, et al. Systemic delivery of human mesenchymal stromal cells combined with IGF-1 enhances muscle functional recovery in LAMA2dy/2j dystrophic mice. Stem Cell Rev, 2013, 9(1):93-109.

[收稿日期] 2014-06-19