

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.20.008

前脑特异性 CCKR-2 双转基因小鼠的繁育及基因鉴定*

凌 凤¹ 阮思蓓¹ 唐晓琴¹ 李 昕³ 高子清¹ 李 丽¹唐亚平^{2,3} 罗 静¹ 唐明希^{1Δ}

(1 西南医科大学附属医院病理科 四川 泸州 646000; 2 西南医科大学神经生物研究室 四川 泸州 646000;

3 广州医科大学附属广州市妇女儿童医疗中心 广东 广州 510000)

摘要 目的: 繁育及鉴定可调控前脑特异性胆囊收缩素受体 2 (Cholecystokinin receptor-2, CCKR-2) 双转基因小鼠(tTA/tetO-CCKR-2 double transgenic, 简称 dtg), 为进一步研究 CCKR-2 在焦虑相关疾病, 如焦虑症、恐惧行为、创伤后应激障碍等发病过程中的作用及分子机制提供实验模型。**方法:** (1) 利用 α -CaMKII/tTA 单转基因小鼠与 tetO/CCKR-2 单转基因小鼠杂交, 所得子代尽可能远亲繁殖获得 dtg 小鼠, 提取子代鼠尾基因组 DNA, 采用 PCR 法及琼脂糖凝胶电泳法鉴定 PCR 产物以确定其基因型; (2) 采用原位杂交方法验证 CCKR-2 双转基因前脑特异性表达, 筛选 CCKR-2 双转基因型及前脑特异性表达者作为继代种鼠和实验用鼠。**结果:** (1) PCR 凝胶电泳图显示清晰的 tTA (350 bp) 和 CCKR-2 (550 bp) 条带, 野生型无条带显示, 表明琼脂糖凝胶电泳结果与 dtg 模型预期基因片段大小相符; (2) 原位杂交结果显示 dtg 小鼠前脑区域有强烈的 CCKR-2 表达而野生型小鼠不明显。此结果表明 dtg 双转基因小鼠在本实验室的成功建立与繁殖及继代, 同时繁殖出更多的 dtg 小鼠。**结论:** 通过正确的饲养繁育和基因鉴定方法能成功获得 dtg 双转基因小鼠, 为本实验室进行后续相关研究奠定了基础。

关键词: CCKR-2; 转基因小鼠; 聚合酶链反应; 琼脂糖凝胶电泳; 原位杂交

中图分类号: Q95-3; R749.72 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273(2021)20-3841-04

Breeding and Identification of CCKR-2 Double Transgenic Mice*

LING Feng¹, RUAN Si-bei¹, TANG Xiao-qin¹, LI Xin³, GAO Zi-qing¹, LI Li¹, TANG Ya-ping^{2,3}, LUO Jing¹, TANG Ming-xi^{1Δ}

(1 Department of Pathology, The affiliated Hospital of Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China;

2 Department of Neurobiology, The Southwest Medical University, Luzhou, Sichuan, 646000, China; 3 Institute of Pediatrics, The affiliated Guangzhou Women and Children's Medical Center of Guangdong Medical University, Guangzhou, Guangdong, 510000, China)

ABSTRACT Objective: To breed and identify inducible forebrain-specific cholecystokinin receptor-2 (CCKR-2) transgenic (tTA/tetO-CCKR-2 tg, abbreviated as dtg) mice, in order to serve the dtg mice as models for further studying the molecular mechanism and pathogenesis of CCKR-2 in fear behavior, anxiety disorder, posttraumatic stress disorder morbidity and other related diseases. **Methods:** (1) The dtg mice were obtained by crossing α -CaMKII/tTA single transgenic mice with tetO/CCKR-2 single transgenic mice, and the offspring was obtained as distant relatives as possible. The genomic DNA was extracted from the tails tissue of the offspring mice. PCR and agarose gel electrophoresis were used to identify the PCR products. (2) In situ hybridization verified the specific expression of CCKR-2 double transgenic mice in the forebrain, and that dtg mice were selected as subculture and experimental mice. **Results:** (1) The clear bands of tTA (350 bp) and CCKR-2 (550 bp) were shown in the PCR gel electrophoresis pattern, while no band was shown in the wild type, which indicated that the agarose gel electrophoresis results were consistent with the expected target size of gene fragments in the dtg mice model. (2) In situ hybridization results showed that CCKR-2 was strongly expressed in the forebrain of dtg mice, but not in the wild type mice. The results showed that dtg double transgenic mice were successfully bred and identified in the laboratory, and more dtg mice were bred. **Conclusion:** The dtg double transgenic mice can be obtained successfully through correct breeding and gene identification, which provides references for the application of the model and lays a foundation for the follow-up studies in the laboratory.

Key words: CCKR-2; Transgenic mice; Polymerase chain reaction; Agarose gel electrophoresis; In situ hybridization

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R749.72 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)20-3841-04

* 基金项目: 四川省科技厅科技支撑计划项目(14ZC0054); 西南医科大学 - 泸州市联合项目(2017LZXNYD-J14);

西南医科大学青年基金项目(2017-ZRQN-074, 2018-ZRQN-092); 西南医科大学附属医院项目(17153)

作者简介: 凌凤(1991-), 女, 硕士, 研究方向: 神经精神相关疾病, 电话: 18011019106, E-mail: 1565926130@qq.com

Δ 通讯作者: 唐明希, 男, 博士, 硕士生导师, 教授, 研究方向: 神经精神相关疾病, E-mail: mxtang69@163.com

(收稿日期: 2020-11-27 接受日期: 2020-12-23)

前言

各种潜在应激和精神压力,常可诱发焦虑相关疾病,如创伤后应激障碍(Posttraumatic stress disorder, PTSD),特定的恐惧症和恐慌症等,都被认为是各种焦虑、抑郁、自闭等症的主要根源^[1,2],其主要分子机制尚不清楚,临床治疗效果仍不理想,因此需要借助于动物模型来进行相关机制及临床前药物疗效、代谢及毒理等研究,表明试验动物模型的制作、正确的鉴定方法、饲养和继代等都很重要。近年来,越来越多的实验证明胆囊收缩素(Cholecystokinin, CCK)能系统在各型焦虑症的发病机理中有着重要作用^[3,4]。有研究表明 CCK 在中央杏仁核(CeA)中通过 CCKR-2 的信号传导,既可调节炎症反应性疼痛,也与焦虑相关表型有关^[5]。也有报道,作为 CCKR-2 激动剂的 CCK-4,可能会促进恐慌焦虑的发生,并与剂量呈正相关^[6]。同时,在焦虑障碍的临床诊治中,能拮抗 CCK-2 受体的药物被认为是具有很大治疗潜力和研究价值的药物^[7]。我们前期已成功构建 tTA/tetO-CCKR-2 tg 动物模型,简称 dtg 小鼠^[8,9],表现出焦虑相关疾病的行为特性,其大脑皮层、海马、纹状体、杏仁核等在内的前脑区域的 CCK-2 受体结合能力明显增强,可能参与了焦虑相关的神经分子机制。本研究通过对前脑特异性 CCKR-2 双转基因 dtg 小鼠模型进行正确饲养、繁育及基因型鉴定与定位,拟确认该模型在本实验室的成功建立,为进一步研究 CCKR-2 在各型焦虑、惊恐、创伤后应激障碍等发病过程中的作用及神经分子机制等提供有效的动物模型和良好的科研基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

使用的实验动物是 SPF 级的前脑特异性 CCKR-2 dtg 小鼠,遗传背景为 B6CBAF1^[8,9],体重 220~240 g。实验动物饲养在西南医科大学实验动物中心[SYXK(川)2013-065]内^[10],12 h 进行一次光照,室温保持在 22 ± 1 °C,湿度为 75 %。鼠盒严格清洗消毒,所有小鼠需要接触的物品均进行高温高压灭菌消毒。期间供应足够的饲料和饮水,每个星期换两次垫料。为避免近亲繁殖对子代的影响,尽量采用远亲繁殖和继代,每隔 5-6 代采取一次野生型与 dtg 杂交进行繁殖。

1.2 主要仪器和试剂

电泳仪型号为 TY-200-C;PCR 仪型号为 Bio-RadPTC-200;Taq 酶和蛋白酶 K 购自天根生化科技有限公司。引物设计如我们已报道所述^[9]:CCKR-2 F:5'-ACGGtgGGAG-GCCTATATAA-3',R:5'-GAGtggtgAAGGGCAtgCAA-3';tTA F:5'-AGGCTtgAGATCtgGCCATAC-3',R:5'-AGGAAAAgtgAG-TAtgGtg-3'。

1.3 子代小鼠基因型鉴定

1.3.1 小鼠 DNA 提取 此小鼠 DNA 提取实验在西南医科大学 SPF 动物房内进行。提取小鼠 DNA 前一天高压消毒灭菌所需用到的手术器械,包括手术刀片、直镊、弯盘、弯镊、弯剪等。(1)剪取其尾部末端 0.5 cm 左右后将其置于 1.5 mL EP 管内后再存放于 -70 °C 的冰柜内。(2)消化:每只 EP 管内加入 500 μL 消化液后放在 55 °C 的恒温孵育箱中,摇床上消化过夜。(3)DNA 的提取:取出已消化好的装有鼠尾的 EP 管,上下翻转 3-5

次,后使用离心机离心 20 min,离心速度为 13000 rpm。离心后使用移液枪吸取上清液至对应的 1.5 mL EP 管内;单只 EP 管内再加入异丙醇 500 μL 使之上下翻转 5 次左右,置于室温 5 min 后,再使用离心机如前所述重复离心 20 min,弃去上清后,再加入 70 %酒精洗涤;后再使用离心机如前所述重复离心 20 min,弃去上清液后,于室温干燥后,再往每只 EP 管内添加 50 μL TE 缓冲液,放置 60 °C 恒温孵育箱内过夜;每只 EP 管内加入 100 μL TE 缓冲液后存放于 4 °C 冰箱内。

1.3.2 PCR 反应体系 CCKR-2 及 tTA 反应体系总量为 25 μL,组成如下:dd H₂O,16.1 μL;25 mM MgCl₂,1.5 μL;10 × PCR Buffer (without MgCl₂),2.5 μL;dNTP (10 mM;2.5 mM each),2.0 μL;Primer 1 (50 mM),0.3 μL;Primer 2 (50 mM),0.3 μL;TAQ DNA polymerase (5 U/ml),0.3 μL;DNA (in 200-250 ml H₂O),2.0 μL。

1.3.3 PCR 反应条件 CCKR-2 及 tTA 反应条件如下:(1)95 °C 预变性 1 min;(2)94 °C 变性 15 sec,55 °C 退火 20 sec,72 °C 延伸 3 min,重复 30 个循环;(3)4 °C 维持;(4)取 CCKR-2 及 tTA 的 PCR 反应产物及 DNA Marker 分别进行 0.8 %琼脂糖凝胶电泳(140 V,20 min)。

1.4 子代小鼠组织学鉴定

具体的原位杂交鉴定方法如之前已发表所述^[9],简单来说,使用低温恒温器(Leica,CM-1900)切取厚度为 20 μm 野生型小鼠及 dtg 子代小鼠的大脑矢状切面,再采用寡核苷酸(35S 标记的 β-球蛋白 poly-A)探针进行原位杂交。

2 结果

2.1 小鼠繁殖情况

前脑特异性 CCKR-2 dtg 目的小鼠的繁殖策略如图 1 所示^[9],将 tTA 单转基因小鼠与 tetO-CCKR-2 单转基因小鼠交配所得。每只母鼠每胎平均产约 7-8 只幼鼠,偶尔会有母鼠吃食幼崽的情况,成活率接近 100 %。21 天后再将幼鼠与母鼠分开喂养,幼鼠于 6 周龄时取鼠尾提取 DNA 鉴定转基因成功与否,8 周龄后可交配继代。

2.2 子代小鼠基因型鉴定结果

提取前脑特异性 CCKR-2 dtg 小鼠尾巴 DNA,用 CCKR-2 及 tTA 特异性引物扩增提取的 DNA 片段,得到的琼脂糖凝胶电泳结果如图 2 所示,其中 WT 小鼠无条带显示,α-CaMKI-I/tTA 单转基因显示 350 bp 条带,tetO/CCKR-2 单转基因显示 550 bp 条带,dtg 小鼠显示出明显的 550 bp 和 350 bp 大小的双条带。

2.3 子代小鼠 CCKR-2 原位杂交定位结果

如图 3 所示,WT 小鼠前脑区域未见明显杂交信号(3A),dtg 小鼠前脑的皮层,海马,纹状体、杏仁核等显示出较强的杂交信号,而在中脑(丘脑/下丘脑)和后脑(脑干/脑桥/小脑)几乎未显示(3B)。

3 讨论

由于焦虑症人体实验的局限性,一个较好的遗传动物模型应用对研究焦虑相关疾病的机制和相关药物疗效、代谢、毒理等试验具有不可替代的优越性,因此,正确选择实验动物模型

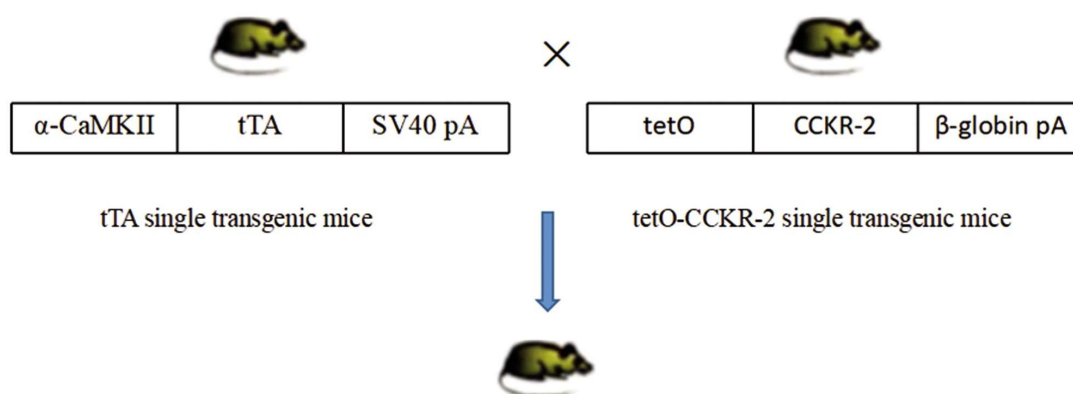


图1 tTA/tetO-CCKR-2 双转基因小鼠繁殖策略

Fig.1 Breeding tTA/tetO-CCKR-2 dtg mice

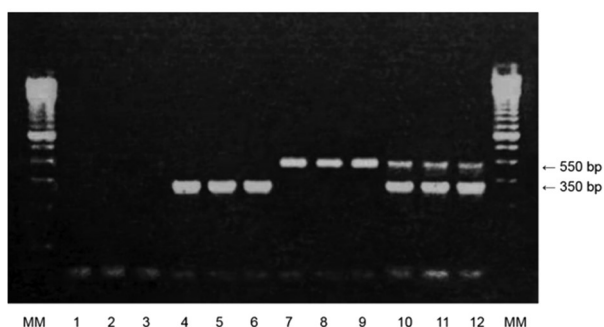
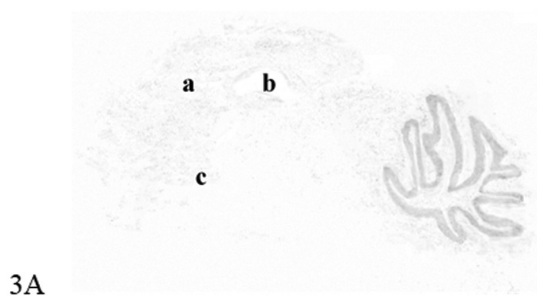


图2 子代小鼠基因型鉴定

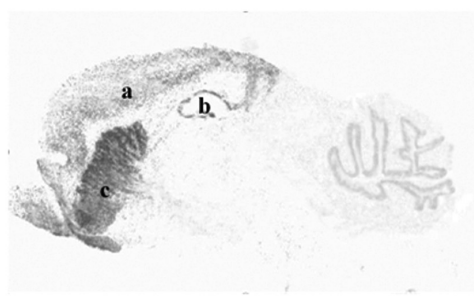
Fig.2 The offspring genotyping with PCR

Note: No band was found in No.1-3 (WT mice). The α -CaMKII/tTA single tg mice are in No.4-6. The tetO/CCKR-2 single tg mice are represented in No.7-9. The dtg mice are represented in No. 10-12. MM, 1 kb.

是进行研究实验的前提,成功与正确地鉴定、繁殖、继代和饲养等又是利用该模型进行相关研究的基础。CCK 是大脑内含量丰富的神经递质之一,具有兴奋中枢神经元和抑制突触后反应的双重作用,主要表达于前脑皮层及海马组织中^[11]。CCK 作为抑制神经元亚群之一,通过反复作用大脑皮层海马体诱导其神经元活性^[12-15]。最新研究发现,CCK 神经元可能通过抑制 PV+ 神经元而对皮层活动产生较大影响^[16,17]。学者发现低剂量的抗焦虑作用药物(如苯二氮卓类等)可阻断 CCK 诱导的海马神经元活性,表明 CCK 能系统可能是焦虑症药物治疗的潜在靶点^[18]。胆囊收缩素受体 2 (Cholecystokinin receptor-2, CCKR-2) 作为 CCK 能系统中主要的受体类型,主要表达于大脑的边缘系统,参与调节情绪反应和行为^[19],能介导 CCK 诱导的焦虑相关症状^[20,21]。有证据表明 CCKR-2 的基因多态性与创伤后应激



3A



3B

图3 子代小鼠脑组织原位杂交结果

Fig.3 In situ hybridization detects CCKR-2 transgene expression of the offspring

Note: a, Cortex; b, Hippocampus; c, Striatum.

障碍及惊恐障碍等相关^[22]。我们的前期研究构建起了前脑特异性 CCKR-2 双转基因 dtg 小鼠模型,相较于对照组小鼠,CCKR-2 的过度表达与小鼠焦虑相关^[8],表现出恐惧行为和焦虑样行为的增强^[9],提示 CCKR-2 在神经心理学的发病机制中起到重要作用。因此,了解 CCKR-2 在焦虑症及创伤后应激障碍等的具体机制有利于为焦虑相关疾病制订相应的预防和治疗策略。

转基因技术是指宿主细胞的基因组接受并稳定整合外源基因,且在下一代予以表达,引起生物体可遗传性状改变的基因操作技术,而动物转基因技术更是早已成为生物医学研究领

域的研究趋向^[23]。转基因动物模型被广泛应用于各种临床及基础研究实验中,以期更好地模仿、研究人类疾病奠定基础。dtg 模型采用四环素诱导调控(tetracycline transactivator (tTA)/tet operator (tetO), tTA/tetO)系统调控目的基因 CCKR-2 在特定的前脑区域表达^[8,9]。Tet-Off(tTA 依赖)最早由 Gossen 等提出^[24]的 BD Clontech 的四环素诱导调控系统和最常用的药物诱导型转基因表达系统之一,现已被广泛应用于动物模型的可逆诱导基因表达^[25-27]。在此系统中,tTA 与启动子 P_{tec} 的结合通过有无四环素参与,调节下游基因的表达。本实验室繁殖和鉴定的小鼠,采用 Tet-Off(tTA 依赖)系统诱导 CCKR-2 基因表达的双转基

因 dtg 小鼠,亲代小鼠由 tTA 单转基因小鼠和 CCKR-2 单转基因小鼠杂交所得,易成活,对该动物模型基因鉴定则采用 PCR 及琼脂糖凝胶电泳技术确认基因的成功转入 (550 bp 及 350 bp); 采用原位杂交技术定位 CCKR-2 前脑特异性表达, 确认 CCKR-2 dtg 小鼠模型在本实验室的成功引进及建立, 并获得稳定遗传的子代小鼠,为本实验室进一步繁育及使用该模型对焦虑症、恐惧行为、应激障碍等进行研究提供了载体。

基因组 DNA 鉴定方法有多样,如 Southern 法和酚氯仿提取法等,各有优缺点^[28]。本实验采用的鉴定方式具有简便、易操作、准确和低成本等优点,电泳条带清晰,大小与预期目的片段相符,表明 dtg 小鼠的基因型鉴定可通过鼠尾提取 DNA、PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳鉴定。原位杂交技术能很好地定位目的基因的表达,使用的 35S 标记的寡核苷酸探针 (β - 球蛋白 poly-A),能特异性识别外源性转基因 CCKR-2,而对内源性 CCKR-2 不识别。本实验结果显示 dtg 小鼠前脑区域有明显的杂交信号,中脑和后脑几乎无信号,确认了 dtg 小鼠前脑特异性的 CCKR-2 转基因高表达,说明以上鉴定方法可以应用于此模型子代的鉴定及在本实验室的成功建立。

总之,前脑特异性 CCKR-2 dtg 小鼠模型在本实验室的成功鉴定、繁殖、继代与饲养为进一步研究 CCKR-2 在各型焦虑症、创伤后应激障碍、恐惧症、恐慌症等发病过程中的神经生物学机制等提供实验动物载体,同时也为相关疾病的药物筛选等提供实验动物模型。

参考文献(References)

- [1] Ma H, Miller C. Trapped in a Double Bind: Chinese Overseas Student Anxiety during the COVID-19 Pandemic[J]. Health Communication, 2020, 6(4): 1-8
- [2] Eskander N, Vadukapuram R, Zahid S, et al. Post-traumatic Stress Disorder and Suicidal Behaviors in American Adolescents: Analysis of 159,500 Psychiatric Hospitalizations[J]. Cureus, 2020, 12(5): e8017
- [3] Comeras LB, Herzog H, Tasan RO. Neuropeptides at the crossroad of fear and hunger: a special focus on neuropeptide Y [J]. Annals of the New York Academy of sciences, 2019, 1455(1): 1-22
- [4] Peter Z, Katharina D, Jacques B. Neuronal network of panic disorder: the role of the neuropeptide cholecystokinin[J]. Depression and anxiety, 2012, 29(9): 762-774
- [5] Roca LO, Fossat P, Ma S, et al. Acquisition of analgesic properties by the cholecystokinin (CCK)/CCK2 receptor system within the amygdala in a persistent inflammatory pain condition [J]. Pain, 2019, 160(2): 345-357
- [6] 姜云璐,王正文,陈京,等.胆囊收缩素 II 型受体研究进展 [J]. 济宁医学院学报, 2018, 41(3): 199-203
- [7] Rataud J, Darche F, Piot O, et al. Anxiolytic effect of CCK-antagonists on plus-maze behavior in mice[J]. Brain Res, 1991, 48(1-2): 315-317
- [8] Chen Q, Nakajima A, Meacham C, et al. Elevated cholecystokininergic tone constitutes an important molecular/neuronal mechanism for the expression of anxiety in the mouse[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(10): 3881-3886
- [9] Chen Q, Tang M, Mamiya T, et al. Bi-Directional effect of cholecystokinin receptor-2 overexpression on Stress-Triggered fear memory and anxiety in the mouse[J]. Plos One, 2010, 5(12): e15999
- [10] 张元,郭庆喜,刘勇,等. Presenilin-1/Presenilin-2 双基因敲除小鼠的繁育及基因型鉴定 [J]. 现代生物医学进展, 2014, 14(11): 2052-2054
- [11] Michel B, Eric D. Cholecystokinin and panic disorder [J]. Acta Neuropsychiatrica, 2004, 16(2): 85-93
- [12] Kotzadimitriou D, Nissen W, Paizs M, et al. Neuregulin 1 Type I Overexpression Is Associated with Reduced NMDA Receptor-Mediated Synaptic Signaling in Hippocampal Interneurons Expressing PV or CCK[J]. eNeuro, 2018, 5(2): 0418-17
- [13] Caroline F, Jill R, Katarzyna P, et al. Regulation of the Hippocampal Network by VGLUT3-Positive CCK- GABAergic Basket Cells [J]. Frontiers in Cellular Neuroscience, 2017, 11(5): 140
- [14] Pelkey KA, Chittajallu R, Craig MT, et al. Hippocampal GABAergic Inhibitory Interneurons [J]. Physiological Reviews, 2017, 97 (4): 1619-1747
- [15] Hioki H, Sohn J, Nakamura H, et al. Preferential Inputs from Cholecystokinin-Positive Neurons to the Somatic Compartment of Parvalbumin-Expressing Neurons in the Mouse Primary Somatosensory Cortex[J]. Brain Research, 2018, 1695(9): 18-30
- [16] Whissell PD, Cajanding JD, Nicole F, et al. Comparative density of CCK- and PV-GABA cells within the cortex and hippocampus [J]. Frontiers in Neuroanatomy, 2015, 9(9): 124
- [17] Leicht G, Mulert C, Eser D, et al. Benzodiazepines counteract rostral anterior cingulate cortex activation induced by Cholecystokinin-Tetrapeptide in humans[J]. Biol Psychiat, 2012, 73(4): 337-344
- [18] Berna MJ, Tapia JA, Sancho V, et al. Progress in developing cholecystokinin (CCK)/gastrin receptor ligands that have therapeutic potential[J]. Current opinion in pharmacology, 2007, 7(6): 583-592
- [19] Li H, Ohta H, Izumi H, et al. Behavioral and cortical EEG evaluations confirm the roles of both CCKA and CCKB receptors in mouse CCK-induced anxiety [J]. Behavioural brain research, 2013, 237(1): 325-332
- [20] Zwanzger P, Domschke K, Bradwejn J, et al. Neuronal network of panic disorder: the role of the neuropeptide cholecystokinin [J]. Depression and anxiety, 2012, 29(9): 762-774
- [21] Kopin AS, McBride EW, Schaffer K, et al. CCK receptor polymorphisms: An illustration of emerging themes in pharmacogenomics[J]. Trends in Pharmacological sciences, 2000, 21(9): 346-353
- [22] Jiang H, Liu X, Li Q. Application of transgenic animal models in colorectal cancer research [J]. World Chin J Digest, 2015, 23 (10): 1603-1608
- [23] Gossen M, Freundlieb S, Bender G, et al. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells [J]. Science, 1995, 268(5218): 1766-1769
- [24] Zhang JF, Chen L, Zhang J, et al. Drug Inducible CRISPR/Cas Systems [J]. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2019, 17(7): 1171-1177
- [25] Mayumi, Yamada, Yusuke, et al. Light Control of the Tet Gene Expression System in Mammalian Cells [J]. Cell Reports, 2018, 25(2): 487-500
- [26] Takagi, Erina, Miyao, et al. A Tet-On Inducible System for Controlling CD19-Chimeric Antigen Receptor Expression upon Drug Administration[J]. Cancer immunology research, 2016, 4(8): 658-668
- [27] Safari R, Meuwissen R. Practical use of advanced mouse models for lung cancer[J]. Methods in Molecular Biology, 2015, 1267(4): 93
- [28] 张文将,易健,贾平,等.载脂蛋白 E 基因敲除(APOE-/-)小鼠基因的鉴定方法及模型应用 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(7): 1103-1108