

· 论 著 ·

## 促肾上腺皮质激素释放激素基因敲除小鼠的繁殖与基因型鉴定\*

王海燕, 刘 庆, 钟河江, 杨 策, 黄苏娜, 严 军<sup>▲</sup>, 蒋建新<sup>△</sup>

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所第四研究室/全军交通医学研究所/全军交通伤重点实验室/创伤、烧伤与复合伤研究国家重点实验室, 重庆 400042)

**摘要:**目的 探讨促肾上腺皮质激素释放激素(CRH)基因敲除(KO)小鼠饲养、繁殖及基因型鉴定的方法。方法 从美国 Jackson 实验室引进 CRH KO 小鼠,按照遗传学规则,对杂合子型(CRH+/-)小鼠进行配对繁殖,提取幼鼠尾部组织全基因组 DNA,通过聚合酶链反应(PCR)对幼鼠基因型进行鉴定。结果 CRH KO 纯合子型(CRH-/-)小鼠的繁殖和饲养均获得成功,采用 PCR 成功地对所获得的小鼠进行基因分析,在子代小鼠中存在野生纯合子型(CRH+/+)、杂合子型(CRH+/-)及 CRH KO 纯合子型(CRH-/-)小鼠。CRH-/-小鼠较另外 2 种基因型小鼠存活率明显下降,但 3 种基因型小鼠在出生后 10 d 及 30 d 体质量无明显差异。结论 正确的饲养繁殖以及鉴定方法可从杂合子型(CRH+/-)小鼠中获得 CRH KO 纯合子型(CRH-/-)小鼠。

**关键词:**促肾上腺皮质激素释放激素;小鼠,基因敲除;基因型;聚合酶链反应;近亲繁殖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2011.17.002

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2011)17-1668-03

### Reproduction and genotype identification of corticotropin-releasing hormone gene knockout mice\*

Wang Haiyan, Liu Qin, Zhong Hejiang, Yang Ce, Huang Suna, Yan Jun<sup>▲</sup>, Jiang Jianxin<sup>△</sup>

(Department 4, Institute of Surgery Research/Institute of Traffic Medicine &amp; Key Laboratory of Traffic trauma of Chinese People's Liberation Army/State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

**Abstract: Objective** To explore the methods of breeding, reproductin and genotype identification of corticotropin-releasing hormone(CRH)knockout(KO)mice. **Methods** CRH knockout mice were obtained from Jackson laboratory in USA. Heterozygous type (CRH+/-)mice were inbred according to genetic rules to yield CRH knockout mice. The genotypes of offspring were identified by polymerase chain reaction(PCR)using genomic DNA extracted from tissue of mice tails. **Results** Both breeding and reproductin of CRH KO heterozygous type(CRH+/-)mice were successful. PCR was used successfully for genetic analysis in mice obtained. There were wild homozygous genotype(CRH+/+), heterozygous genotype(CRH+/-)and CRH KO homozygous genotype(CRH-/-)in the offspring. Compared with other two genotype mice, survival rate of CRH-/- mice were significantly decreased, however, body mass of the three genotypes mice had no significant difference at 10 and 30 days after birth. **Conclusion** Appropriate reproductin, breeding and identification are effective methods to obtain CRH KO homozygous genotype(CRH-/-)mice from heterozygous genotype(CRH+/-)mice.

**Key words:** corticotropin-releasing hormone; mice, knockout; genotype; polymerase chain reaction; inbreeding

促肾上腺皮质激素释放激素(corticotropin-releasing hormone, CRH)是下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴最重要的调节因子之一,能刺激垂体前叶促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)细胞的阿黑皮素原(proopiomelanocortin, POMC)基因表达,调控机体糖皮质激素分泌水平<sup>[1-3]</sup>。作为研究应激后神经内分泌反应和天然免疫功能关系的重要模式动物,CRH 基因敲除(knock-out, KO)小鼠为进一步研究内源性 CRH 在免疫系统及炎症反应中的作用提供了有力的工具<sup>[4-5]</sup>。然而,国内利用 CRH KO 小鼠进行相关研究的报道还不多。由于 CRH KO 小鼠的饲养和繁殖难度与常规小鼠不同,而获取一定数量的 CRH KO 小鼠是探讨 HPA 轴在神经内分泌反应中作用的前提和基础,因此,本课题在引进 CRH KO 小鼠的同时,对该模式动物的伺

养、保种和基因分型等方面的特点和规律进行了探讨。

#### 1 材料与方 法

**1.1 实验动物** CRH KO 杂合子型(CRH+/-)小鼠(雄鼠 5 只、雌鼠 2 只)购自美国 Jackson 实验室。

**1.2 基因敲除小鼠的建立** 亲代杂合子小鼠为 C57BL/6J 种系背景。通过同源重组的方式将来源于 129S2/SvPas 小鼠的胚胎干细胞-D3 株(embryonic stem cells-D3, ES-D3)中的目的基因(CRH)进行突变,再将突变的胚胎干细胞(embryonic stem cells, ES)注射入 C57BL/6J 小鼠胚胎中以获得嵌合小鼠,通过对嵌合小鼠近交繁殖获得杂合子型(CRH+/-)、野生纯合子型(CRH+/+)及 CRH KO 纯合子型(CRH-/-)小鼠。

**1.3 CRH KO 小鼠的饲养与繁殖** CRH KO 小鼠的饲养和繁殖按照无特定病原(specific pathogen free, SPF)级动物饲养

\* 基金项目:国家自然科学基金重点项目(81030037);国家自然科学基金面上项目(81070624);重庆市自然科学基金资助项目(CSTC, 2007BB5085)。 ▲ 通讯作者, Tel: (023) 68757448, E-mail: yanjun990820@yahoo.com; △ 通讯作者, Tel: (023) 68757401, E-mail: hellojx@126.com。

标准在层流隔离环境饲养,室内温度控制在 20~26 ℃,湿度 50%~60%,照明采取 12 h 昼夜交替的方式。小鼠的饲料由第三军医大学大坪医院野战外科研究所实验动物中心配制。饲养期间密切观察小鼠生长情况。采用 70~80 d 龄 CRH+/+ 雄性小鼠与雌性小鼠按 1:1 间歇同笼兄妹近亲繁殖方法,连续生产 4~5 胎,子鼠 21 d 后离乳,离乳后种鼠亦同笼交配。采用第 2 胎生产动物保种。繁殖出 CRH+/+、CRH+/- 及 CRH-/- 小鼠,并记录小鼠的体质量变化情况。

**1.4 小鼠尾部基因组 DNA 的提取** 取出生后 10 d 左右的幼鼠,剪趾编号。剪取幼鼠尾尖 0.2~0.5 cm,加入组织裂解液 56 ℃ 孵育过夜;6 mol/L 饱和 NaCl 和无水乙醇常规抽提 DNA;室温干燥后,加三羟甲基氨基甲烷-乙二胺四乙酸[tris(hydroxymethyl)aminomethane-ethylene diaminetetraacetic acid,TE]缓冲液溶解,采用分光光度法对提取的小鼠基因组 DNA 进行定量。

**1.5 基因鉴定引物及聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)** 引物序列: oIMR0612: 5'-GAG CTT ACA CAT TTC GTC C-3'; oIMR0613: 5'-GCT CAG CAA GCT CAC AGC AA-3'; oIMR0510: 5'-ATC GCC TTC TTG ACG AGT TC-3'。其中 oIMR0612 和 oIMR0613 引物扩增片段长度为 437 bp,用于检测 CRH+/+,而 oIMR0612 和 oIMR0510 引物扩增片段长度约 600 bp,用于检测 CRH-/-。PCR 扩增参数:94 ℃ 预变性 4 min 后,94 ℃ 变性 30 s,60 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 40 s,共 35 个循环;最后 72 ℃ 延伸 8 min。2% 琼脂糖凝胶电泳 PCR 产物并分析。上述试剂购自北京天根生化科技有限公司。

**1.6 3 种基因型小鼠不同组织中 CRH 的分布检测** 收集成年 CRH+/+、CRH+/- 及 CRH-/- 小鼠的腹腔巨噬细胞,计数后接种至 6 孔细胞培养板,常规孵育 2 h 后,取贴壁细胞提取总 RNA。同时分离提取小鼠下丘脑、肝脏、胸腺和脾脏组织总 RNA,采用逆转录 PCR(reverse transcription-PCR,RT-PCR)检测不同组织中 CRH mRNA 的表达。PCR 引物同 1.5 中的 oIMR612 和 oIMR613 引物,PCR 方法同 1.5。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析,两组间比较采用单向方差分析(one-way analysis of variance,one-way ANOVA)判定差异的显著性,并运用 Origin Pro 7.5 软件作图。采用 Kaplan-Meier 方法分析生存曲线,应用 Log-rank 检验比较各基因型小鼠的生存率。

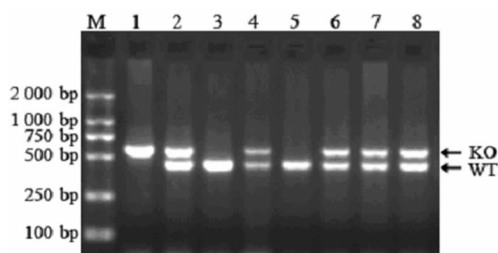
**2 结 果**

**2.1 小鼠基因型的鉴定** 应用 3 个特异性引物可鉴别 3 种不同基因型小鼠,其中泳道 1 仅出现 600 bp 条带,故幼鼠 1 基因型为 CRH-/-;泳道 3、5 仅出现 437 bp 条带,故幼鼠 3 和幼鼠 5 基因型为 CRH+/+;泳道 2、4、6~8 分别出现 437、600 bp 两条带,表明幼鼠 2、4、6~8 的基因型为 CRH+/-,见图 1。

**2.2 3 种基因型小鼠的繁殖情况** 通过杂合子小鼠配对,本实验室成功地繁殖出 1 474 只子代小鼠,通过 PCR 方法鉴定小鼠基因型,结果显示 CRH+/+、CRH+/-、CRH-/- 小鼠所占比例大约为 3:5:1(CRH+/+ 小鼠占 34.87%,CRH+/- 小鼠占 54.48%,CRH-/- 小鼠占 10.65%)。

**2.3 CRH KO 对小鼠生长状况的影响** 相对 CRH+/+ 和 CRH+/- 小鼠而言,早期所得 CRH-/- 小鼠与其同窝小鼠体型相当,在出生 10 d 及 30 d 时,CRH-/- 小鼠体质量与

CRH+/+ 及 CRH+/- 小鼠相比差异无统计学意义,见图 2。提示以 CRH+/- 小鼠为种鼠所繁殖的 CRH-/- 小鼠出生后在无糖皮质激素补充的情况下仍能健康成长,并且,成年后的 CRH-/- 小鼠与 CRH+/+ 及 CRH+/- 小鼠相比,体质量、生长状态及活动等均表现正常,无表型差异。但随着繁殖代数的增加而逐渐呈现出较明显的生长迟缓现象,特别是出生后 1 个月内表现为个头矮小,运动能力弱,生活状态差,CRH-/- 小鼠的体质量显著低于同期的 CRH+/+ 及 CRH+/- 小鼠。后 2 类基因型小鼠均表现如常,无表型差异。



M: DNA Marker; 1: CRH+/+; 3, 5: CRH+/+; 2, 4, 6~8: CRH+/-。

图 1 3 种基因型小鼠基因组 DNA 的 PCR 结果

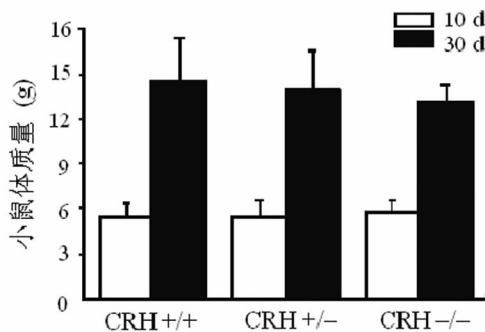
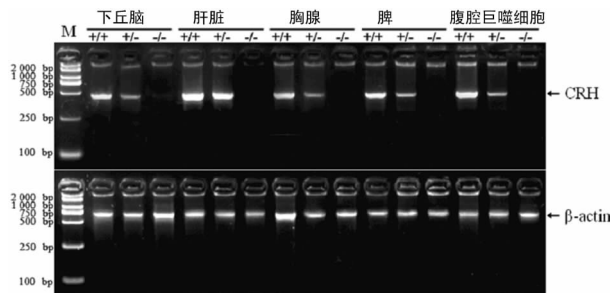


图 2 3 种基因型小鼠出生后 10、30 d 体质量比较(±s)

**2.4 3 种基因型小鼠不同组织中 CRH mRNA 的分布情况** 检测 3 种基因型小鼠下丘脑、肝、胸腺、脾及腹腔巨噬细胞 CRH mRNA 表达,发现 CRH+/+ 及 CRH+/- 小鼠不同组织中均有 CRH mRNA 表达,但 CRH-/- 小鼠无 CRH mRNA 表达,见图 3。进一步证实 CRH-/- 小鼠不同组织中 CRH mRNA 表达的缺失。



M: DNA Marker; +/+ : CRH+/+; +/- : CRH+/-; -/- : CRH-/-。

图 3 3 种基因型小鼠不同组织中 CRH mRNA 的表达

**2.5 3 种基因型小鼠生存率分析** CRH+/- 小鼠与 CRH+/+ 小鼠的存活率基本相似,而在 2~3 周时,CRH-/- 小鼠较另外 2 种基因型小鼠的存活率明显下降,第 4 周后其存活

率才基本稳定,见图 4。

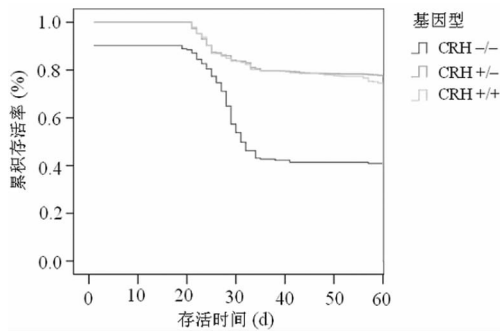


图 4 3 种基因型小鼠生存率分析结果

### 3 讨 论

动物实验是现代细胞与分子生物学实验研究的基本手段,借助遗传学手段研究各种基因突变小鼠已成为医学生物学研究最有力的方法之一,CRH KO 小鼠模型的建立有助于进一步了解糖皮质激素在 HPA 轴系统中的活性机制和在生殖及免疫调节中的作用<sup>[6-8]</sup>。由于 CRH KO 小鼠在所有发育阶段组织中的 CRH 功能完全丢失,因此,它可提供 CRH 缺失的在体评估方法<sup>[6]</sup>。

有研究表明 CRH +/- 小鼠与 CRH +/+ 小鼠在所有参数上表现完全相同并具有繁殖能力,通过 CRH +/- 小鼠交配所获得的首批 4 周龄的 266 只小鼠中,各型小鼠获得率与孟德尔比率相符。CRH +/- 小鼠交配产生的 CRH -/- 小鼠具有正常的生存能力,而且,CRH -/- 小鼠与同窝 CRH +/+ 小鼠或 CRH +/- 小鼠相比,其各项指标如大小、活性及一般行为等均无明显差异<sup>[9]</sup>。CRH +/- 小鼠与 CRH +/+ 小鼠的存活率基本相似,而 CRH -/- 小鼠较另外 2 种基因型小鼠存活率在 2~3 周时明显下降,第 4 周后其存活率才基本稳定,尽管 CRH -/- 小鼠具有很低的基础糖皮质激素水平,但其仍具有生育能力和正常寿命<sup>[6,10]</sup>。

本研究对引进的 CRH KO 小鼠也采用 CRH +/- 小鼠交配的繁殖方式,并获得一定数量的 CRH KO 小鼠。但所获各基因型小鼠的比率与上述报道略有出入,纯合子小鼠获得率较低。推测其原因可能为:(1)CRH 是 HPA 轴在应激时激活的主要中介者,内源性 CRH 的缺乏可能导致 CRH -/- 小鼠死于胚胎期,或于出生后数小时甚至数天后死亡,进而导致难以观察新生鼠的表型,更无从统计该表型的准确获得率,造成获得率低下“假象”。(2)本研究中饲养的小鼠繁殖代数较多,而近交系小鼠随着近亲交配繁殖代数的增加,其基因纯合率不断提高,导致近亲衰退,抵抗力和生育力下降<sup>[11]</sup>。(3)目前基因敲除的结果忽略了背景基因的作用,由于所敲除基因的缺失,动物机体可能产生一种雪崩式的代偿过程,引起基因的第二次改变<sup>[12]</sup>。除遗传背景外,还有其他许多因素使基因敲除结果复杂化,由于基因突变体在体内所有组织发育的过程都会丢失,因此,不能排除其他器官缺陷参与表型改变的可能性<sup>[13]</sup>。CRH 目的基因的缺失与某个或某些背景基因的协同作用可导致 CRH KO 小鼠的出生率低、死亡率高及生长迟缓等现象。

引进的小鼠系美国 Jackson 实验室采用冷冻胚胎复苏的方法所获得。虽然通过兄妹近亲繁殖法获得各型 CRH KO 小鼠可随时保障实验的需要,但不可避免地造成其近亲衰退。为

了消除背景的混淆效应及纠正近亲衰退,一个经典的方法是回交降低背景基因发挥作用的可能性<sup>[11,14]</sup>。经过 6 代回交后,任何遗传背景对基因表达的影响将可通过与正常 C57BL/6J 或 129S2/SvPas 小鼠的比较而得到控制<sup>[6,15]</sup>。故拟下一步引进 129S2/SvPas 小鼠与 CRH +/- 交配,以恢复后者的繁殖及子代存活率。

本研究在美国 Jackson 实验室提供的 PCR 方法基础上优化反应条件进行基因型筛选,结果非常稳定。而对各基因型小鼠下丘脑、肝、胸腺、脾及腹腔巨噬细胞中 CRH mRNA 表达的检测结果,也进一步证实了 PCR 鉴定结果的正确性。另外还发现 CRH +/- 小鼠的 CRH mRNA 表达水平略低于 CRH +/+ 小鼠,并且 CRH mRNA 在组织器官间表达水平不完全相同,提示其在不同组织器官中的作用可能存在差异。

### 参考文献:

- [1] Keller PA, Kirkwood K, Morgan J, et al. The prevention of preterm labour — corticotropin releasing hormone type 1 receptors as a target for drug design and development[J]. *Mini Rev Med Chem*, 2003, 3(4):295-303.
- [2] Matsuwaki T, Kayasuga Y, Yamanouchi K, et al. Maintenance of gonadotropin secretion by glucocorticoids under stress conditions through the inhibition of prostaglandin synthesis in the brain[J]. *Endocrinology*, 2006, 147(3): 1087-1093.
- [3] Lariviere WR, Fiorenzani P, Ceccarelli I, et al. Central CRH administration changes formalin pain responses in male and female rats[J]. *Brain Res*, 2011, 1383:128-134.
- [4] Gay J, Kokkotou E, O'Brien M, et al. Corticotropin-releasing hormone deficiency is associated with reduced local inflammation in a mouse model of experimental colitis[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(7): 3403-3409.
- [5] Chaniotou Z, Giannogonas P, Theoharis S, et al. Corticotropin-releasing factor regulates TLR4 expression in the colon and protects mice from colitis[J]. *Gastroenterology*, 2010, 139(6): 2083-2092.
- [6] Pirnik Z, Petrak J, Bundzikova J, et al. Response of hypothalamic oxytocinergic neurons to immobilization stress is not dependent on the presence of corticotrophin releasing hormone (CRH): a CRH knock-out mouse study[J]. *J Physiol Pharmacol*, 2009, 60(2): 77-82.
- [7] Kolber BJ, Boyle MP, Wiczorek L, et al. Transient early-life forebrain corticotropin-releasing hormone elevation causes long-lasting anxiogenic and despair-like changes in mice[J]. *J Neurosci*, 2010, 30(7): 2571-2581.
- [8] Sithisarn T, Bada HS, Dai H, et al. Effects of perinatal cocaine exposure on open field behavior and the response to corticotropin releasing hormone (CRH) in rat offspring[J]. *Brain Res*, 2011, 1370:136-144.
- [9] Venihaki M, Zhao J, Karalis KP. Corticotropin-releasing hormone deficiency results in impaired splenocyte response to lipopolysaccharide[J]. *J Neuroimmunol*, 2003, 141(1-2): 3-9.

生的内源性应激反应,其机制还有待进一步阐明。

综上所述, ApoJ 作为 MAC 抑制剂,在 ICH 过程中,通过抑制补体系统的激活而减轻脑水肿、保护神经元。根据 ApoJ 在 ICH 后的变化规律以及 ApoJ 作为内源性补体抑制剂,它能否成为临床上监测脑水肿程度的间接指标、在治疗脑损伤过程中发挥重要作用还有待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] Shannan B, Seifert M, Leskov K, et al. Challenge and promise: roles for clusterin in pathogenesis, progression and therapy of cancer[J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13(1): 12-19.
- [2] Lambert J C, Heath S, Even G, et al. Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer's disease[J]. *Nat Genet*, 2009, 41(10): 1094-1099.
- [3] Xue M, Del Bigio MR. Intracerebral injection of autologous whole blood in rat: time course of inflammation and cell death [J]. *Neurosci Lett*, 2000, 283(3): 230-232.
- [4] Bederson JB, Pitts LH, Tsuji M, et al. Rat middle cerebral artery occlusion: evaluation of the model and development of a neurologic examination[J]. *Stroke*, 1986, 17(3): 472-476.
- [5] 崔洁, 王景周, 宋钦, 等. 脑出血大鼠脑水肿与血浆肿瘤坏死因子关系的研究[J]. *重庆医学*, 2007, 36(13): 1244-1245.
- [6] 周志强, 赵立波, 王凤英, 等. rh EPO 抑制大鼠脑出血后炎症反应与增强 LIVIN 的表达[J]. *重庆医学*, 2009, 38(9): 1067-1070.
- [7] 孟凡超, 姜季宇, 杨宵鹏, 等. 实验性脑出血大鼠脑水肿的动态变化[J]. *中国实用神经疾病杂志*, 2006, 9(3): 67-69.
- [8] 张军, 张国华, 林杰. 补体 C3 和 C4 在脑出血后血肿周围组织水肿形成过程中的作用[J]. *中国全科医学*, 2008, 11(5A): 741-743.
- [9] Xi G, Hua Y, Keep RF, et al. Systemic complement depletion diminishes perihematomal brain edema in rats [J]. *Stroke*, 2001, 32(1): 162-167.
- [10] Homeister JW, Lucchesi BR. Complement activation and inhibition in myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1994, 34: 17-40.
- [11] 陈海峰, 浦晓东. 载脂蛋白 J 在心血管疾病中的研究进展 [J]. *国外医学心血管疾病分册*, 2005, 32(6): 332-334.
- [12] Wiggins A, Shen P, Gundlach A. Delayed, but prolonged increases in astrocytic clusterin(ApoJ) mRNA expression following acute cortical spreading depression in the rat: evidence for a role of clusterin in ischemic tolerance[J]. *Brain Res Mol Brain Res*, 2003, 114(1): 20-30.
- [13] Nuutinen T, Suuronen T, Kauppinen A, et al. Clusterin: a forgotten player in Alzheimer's disease [J]. *Brain Res Rev*, 2009, 61(2): 89-104.
- [14] Kim HJ, Yoo EK, Kim JY, et al. Protective role of clusterin /apolipoprotein J against neointimal hyperplasia via antiproliferative effect on vascular smooth muscle cells and cytoprotective effect on endothelial cells[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2009, 29(10): 1558-1564.
- [15] 李艳玲, 何志义. 大鼠脑梗死模型中载脂蛋白 J mRNA 表达的研究[J]. *辽宁医学院学报*, 2008, 29(4): 308-310.
- [16] Hakkoum D, Imhof A, Vallet PG, et al. Clusterin increases post-ischemic damages in organotypic hippocampal slice cultures[J]. *J Neurochem*, 2008, 106(4): 1791-1803.
- [17] Calero M, Rostagno A, Matsubara E, et al. Apolipoprotein J (clusterin) and Alzheimer's disease [J]. *Microsc Res Tech*, 2000, 50(4): 305-315.

(收稿日期: 2010-12-11 修回日期: 2011-02-17)

(上接第 1670 页)

- [10] Bakshi VP, Kalin NH. Corticotropin-releasing hormone and animal models of anxiety: gene-environment interactions [J]. *Biol Psychiatry*, 2000, 48(12): 1175-1198.
- [11] 魏泓. 医学实验动物学[M]. 2 版. 成都: 四川科学技术出版社, 2001: 28-39.
- [12] Gerlai R. Zebra fish: an uncharted behavior genetic model [J]. *Behav Genet*, 2003, 33(5): 461-468.
- [13] Fülöp AK, Foldes A, Buzás E, et al. Hyperleptinemia, visceral adiposity, and decreased glucose tolerance in mice with a targeted disruption of the histidine decarboxylase gene[J]. *Endocrinology*, 2003, 144(10): 4306-4314.
- [14] Harris RB. Leptin responsiveness of mice deficient in corticotrophin-releasing hormone receptor type 2 [J]. *Neuroendocrinology*, 2010, 92(3): 198-206.
- [15] Shinahara M, Nishiyama M, Iwasaki Y, et al. Plasma adiponectin levels are increased despite insulin resistance in corticotropin-releasing hormone transgenic mice, an animal model of Cushing syndrome [J]. *Endocr J*, 2009, 56(7): 879-886.

(收稿日期: 2010-12-31 修回日期: 2011-04-03)