

# 胆固醇酯转移蛋白转基因家兔制作及生物学特性分析

高守翠<sup>1</sup>, 成大欣<sup>1</sup>, 赵四海<sup>1,2</sup>, 陈玉龙<sup>1</sup>, 王晓靖<sup>1</sup>, 白亮<sup>1</sup>, 范江霖<sup>1,3</sup>, 刘恩岐<sup>1,2</sup>

(1. 西安交通大学心血管研究中心脂代谢与动脉粥样硬化研究室, 西安 710061; 2. 西安交通大学医学院实验动物中心, 西安 710061; 3. 山梨大学医学部分子病理学系, 日本 山梨 409-3898)

**【摘要】** 目的 制作肝脏特异性高表达人胆固醇酯转移蛋白(CETP)转基因家兔并对其生物学特性分析进行分析。方法 利用显微注射方法制作 CETP 转基因家兔, 利用 Western blot、real-time PCR 和 CETP 活性鉴定试剂盒鉴定模型家兔中人 CETP 转基因的表达和活性。结果 PCR 检验结果显示成功获得 CETP 转基因家兔, 转基因主要在肝脏特异性表达, 其血浆 CETP 活性相对于非转基因家兔明显升高。结论 成功建立了高表达人 CETP 的转基因家兔, 为研究 CETP 功能和其参与心血管疾病的机制提供了良好模型。

**【关键词】** 胆固醇酯转移蛋白; 转基因; 家兔; 血浆; 肝

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)04-0331-05

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.04.001

## Establishment of cholesteryl ester transfer protein transgenic rabbits by DNA microinjection and analysis of their biological properties

GAO Shou-cui<sup>1</sup>, CHENG Da-xin<sup>1</sup>, ZHAO Si-hai<sup>1,2</sup>, CHEN Yu-long<sup>1</sup>, WANG Xiao-jing<sup>1</sup>,  
BAI Liang<sup>1</sup>, FAN Jiang-lin<sup>3</sup>, LIU En-qi<sup>1</sup>

(1. Laboratory for Lipid Metabolism and Atherosclerosis, Xi'an Jiaotong University Cardiovascular Research Center;  
2. Laboratory Animal Center, Xi'an Jiaotong University medical School, Xi'an 710061, China;  
3. Department of Molecular Pathology, Faculty of Medicine, Yamanashi University, Yamanashi 409-3898, Japan)

**【Abstract】 Objective** The aim of this study was to generate human cholesteryl ester transfer protein (CETP) transgenic rabbits and analyze their biological properties. **Methods** We generated human CETP transgenic rabbits by DNA microinjection, and detected the expression of human CETP by real-time PCR and Western blot assay. The activity of CETP was measured using an activity assay kit. **Results** Human CETP transgenic rabbits were successfully generated by DNA microinjection. Compared with wide type rabbits, the expression of human CETP was dramatically increased in the liver of the human CETP transgenic rabbits. The plasma CETP activity was also much higher in the liver of human CETP transgenic rabbits than that of control rabbits. **Conclusions** The model of human CETP transgenic rabbits is successfully established by DNA microinjection. It will provide a useful tool for the studies of CETP biological function and its involvement in the mechanisms of cardiovascular diseases.

**【Key words】** Cholesteryl ester transfer protein; Transgene; Rabbits; Plasma; Liver

基因修饰动物模型是当今生物医学研究的主要工具,主要包括基因敲除和转基因动物模型。在研究候选基因在疾病发生中的作用及其分子机制时,往往需要改变其在体内的表达水平,比如高表达和敲低或敲除,从正反两方面揭示其参与疾病的机制。

基因修饰技术已逐渐推广到大多数常用实验动物。家兔是常用实验动物之一,与大鼠和小鼠相比,其体型相对较大,便于取材和手术操作。由于家兔的生物学特征,其在心血管疾病、生物反应器、免疫学和病毒学等研究领域被广泛应用<sup>[1-4]</sup>。转基因家兔在

**【基金项目】** 国家自然科学基金(No. 81370379, 81070250)。

**【作者简介】** 高守翠(1989-),女,硕士。研究方向:动脉粥样硬化的发病机制。E-mail: gaoshoucu@stu.xjtu.edu.cn

**【通讯作者】** 刘恩岐,博士,教授。E-mail: liuenqi@mail.xjtu.edu.cn

这些领域也被广泛用来研究相关疾病的发病机制,尤其是在心血管疾病研究领域。人胆固醇酯转移蛋白(cholesterol ester transfer protein, CETP)是一个极度疏水的糖蛋白,包含 476 个氨基酸,其中非极性氨基酸占 45%,在胆固醇逆向转运中,CETP 能够促进胆固醇酯从高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)转运到含载脂蛋白 B(apolipoprotein B, apoB)的脂蛋白颗粒中,同时反向转运甘油三酯(triglyceride, TG),抑制 CETP 可能能够增加循环中 HDL 水平的升高。近年来 CETP 因参与血浆脂蛋白胆固醇水平的调控和脂蛋白颗粒的重塑,在脂蛋白代谢中的作用倍受重视<sup>[5]</sup>。但是,CETP 究竟是抗心血管疾病发生因子还是促进心血管疾病因子一直存在争议<sup>[6]</sup>。为了研究 CETP 参与血脂代谢和炎症进而参与动脉粥样硬化的分子,我们设计了人 CETP 肝脏细胞特异性表达载体,用显微注射方法制作 CETP 转基因家兔,为研究 CETP 与心血管疾病,主要是动脉粥样硬化的关系提供动物模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

雌性、雄性 SPF 级日本大耳白兔各 50 只,3 月龄,体重 2.5 kg 左右,来源于西安交通大学医学部实验动物中心【SCXK(陕)2012-003】。动物饲养室的温度、光照、噪声和换气次数等均符合国标要求(GB14925-2010),自由饮水和采食。该研究通过了西安交通大学实验动物管理委员会批准。

### 1.2 主要试剂和仪器

卵泡刺激素和绒毛膜促性腺激素(宁波市三生药业有限公司,中国),透明质酸酶(Sigma,美国)、2 × PCR Mix、反转录和 rael-time PCR 试剂(Takara,日本),质粒、血液或组织全基因组 DNA、总 RNA 和总蛋白质提取试剂盒(Omega,美国),CETP 抗体(Abcam,英国)和活性鉴定试剂盒(BioVision,中国),Sal I 内切酶(Fermentas,立陶宛),M2 和 M16 培养液(自制)。仪器:P-97 拉针仪(Sutter,美国),MF-900 烧针仪(Narishige,日本),体视显微镜(Olympus,日本),二氧化碳培养箱(Thermo,美国),显微注射系统(Eppendorf,德国),PCR 仪(Eppendorf,德国),蛋白电泳系统(Bio-Rad,美国)。

### 1.3 转基因动物制作<sup>[7]</sup>

人 CETP 转基因家兔制作采用经典的显微注射方法。动物实验操作在西安交通大学医学部实验动物中心进行【SYXK(陕)2012-005】。

#### 1.3.1 基因载体构建

将人 CETP (cDNA, NM\_000078) 基因克隆连接到 pJC13 质粒,置于 apoE 启动子控制之下,以控制其在肝脏特异性表达,扩增、纯化后用于显微注射。

#### 1.3.2 激素注射程序

给供体雌性家兔皮下注射卵泡刺激素诱导同期发情,每隔 0.5 IU/12 h,共注射 3 d 6 次。供体雌兔在实验第 4 天进行自然交配或人工授精,随后肌肉注射绒毛膜促性腺激素 150 IU,刺激卵巢排卵。

#### 1.3.3 准备代孕雌兔

实验第 4 天,代孕雌兔与供体兔同时注射 150 IU hCG,使代孕雌兔子宫、输卵管与显微注射后的受精卵处于生理同期。

#### 1.3.4 收集受精卵和显微注射

实验第 5 天,过量麻醉处死供体兔,打开腹腔取其输卵管、部分子宫和卵巢。用 M<sub>2</sub> 培养液冲洗输卵管,收集得受精卵并冲洗。受精卵转移至 M<sub>16</sub> 培养液,至于二氧化碳培养箱备显微注射。将受精卵转移至显微注射平台,调整持卵针和显微注射针。在低倍镜定位受精卵,200 倍视野下观察,可明显观察到两个原核的卵为受精卵。移动持卵针向备注射的受精卵,利用负压固定受精卵,注射针刺入雄性原核并进行目的基因溶液的注射,观察到雄原核稍膨胀,拔掉注射针。

#### 1.3.5 胚胎移植

麻醉代孕雌兔,取俯卧位,脊柱旁侧开 0.5 ~ 1 cm 切口,用平镊夹住卵巢上方的脂肪垫,将输卵管拉出腹腔。将显微注射完的受精卵用自制移卵管移植到受体兔输卵管,稍停顿以避免受精卵流失。移植完毕将输卵管送回腹腔。

#### 1.3.6 模型鉴定

将离乳后仔兔剪去少许组织或采 150 μL 血,提取基因组 DNA,进行 PCR 检测。Sense, 5'-TCAGC-CACTTGTCATCGC-3'; Anti-sense, 5'-GGCATCG-GTCCGCACTCTA-3',产物大小:230 bp。程序:95℃ 10 s,55℃ 30 s,72℃ 1 min,共进行 35 个循环,PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳(20 g/L)。

## 1.4 目的基因表达分析

将 F0 代 CETP 转基因家兔禁食 16 h,抽血,3000 r/min 离心分离血浆,检测血浆中 CETP 的表达和活性和总胆固醇(total cholesterol, TC)。繁殖 CETP 转基因家兔,处死 F1 代转基因家兔 1 只和同窝非转基因家兔 1 只,按试剂盒说明书提取各主要脏器总蛋白和总 RNA 备用。Rael-time PCR CETP

用引物序列同上,家兔 GAPDH 引物序列:Sense, 5'-ATCACTGCCACCCAGAAGAC-3'; Anti-sense, 5'-GTGAGTTTCCCGTTCAGCTC-3', PCR 反应体系为 SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> II (10 μL), 上下游引物各 1 μL (10 mol/L), cDNA 模板 1 μL, 加双蒸水 7.0 μL。反应条件: 95℃ 30 s 开始程序, 95℃ 5 s, 55℃ 40 s 共 40 个循环。CETP Western blot 和活性测定, 按试剂盒说明书进行。

## 2 结果

### 2.1 基因构建

pJC13-apoE-hCETP 质粒构建成功 (图 1A),

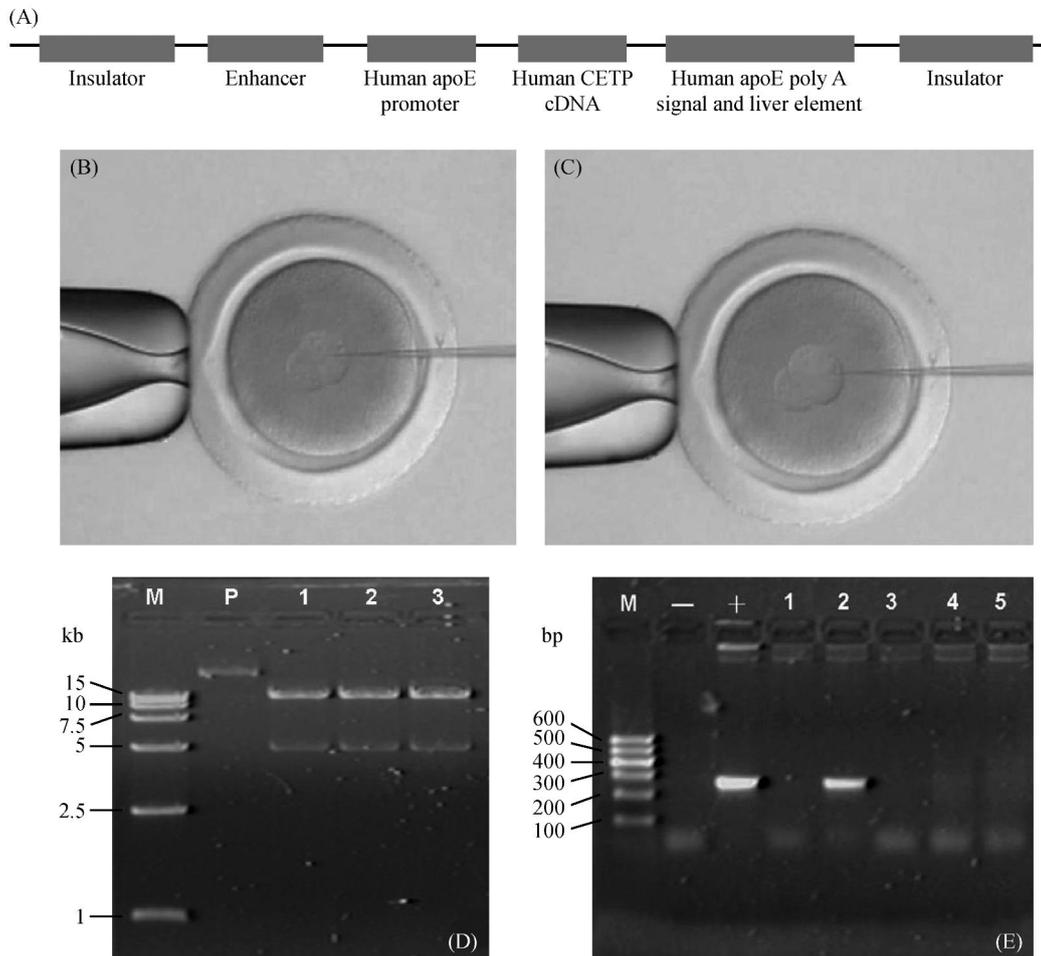
ApoE 启动子用于控制人 CETP 基因的组织特异性表达。含有目的基因的质粒载体扩增、提取后酶切, 线性化目的基因用于显微注射 (图 1D)。

### 2.2 目的基因注射与模型鉴定

收集受精卵后, 将目的基因溶液注射到雄原核, 雄原核稍膨大 (图 1B, C), 注射后的受精卵进行胚胎移植。代孕家兔产下仔兔, 离乳后抽取 150 μL 血样, 提取全基因组 DNA 进行常规 PCR 检测, PCR 产物琼脂糖电泳结果显示我们获得了人 CETP 转基因阳性家兔 (图 1E)。

### 2.3 转基因效率

本次人 CETP 转基因家兔制作实验中, 共收集



注: A. 转基因载体设计; B, C. 显微注射; D. 转基因载体的准备; E. 仔兔转基因携带情况检测。M. DNA marker; P. 质粒; D 1~3. Sal I 酶切后的质粒; E. - 阴性对照; + 阳性对照; E1~5: 仔兔基因 PCR 扩增产物样本。

图 1 转基因载体的准备

Note. A. Design of the transgenic vector preparation; B, C. Microinjection; D. Preparation of transgenic vector; E. Detection of offsprings carrying the transgenes; M. DNA marker; P. Plasmids; Fig. 1D 1~3. Plasmid after Sal I enzyme digestion; Fig. 1E. - Negative control, + Positive control; Fig. 1E1~5. Samples of PCR product amplification of the offspring genes.

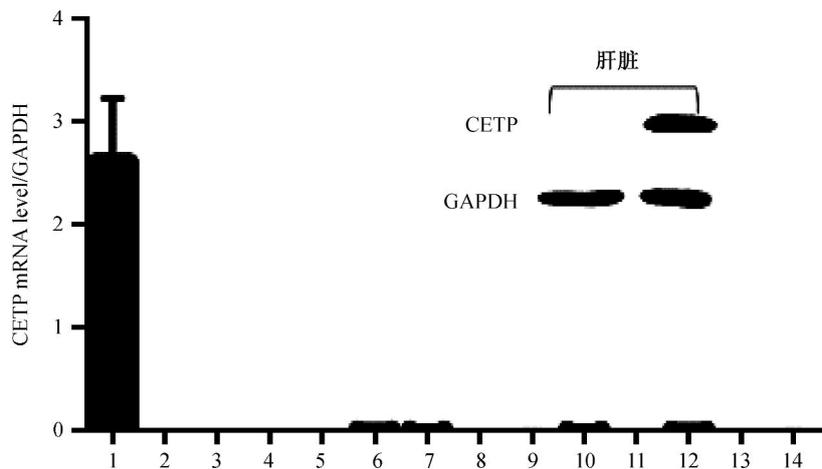
Fig. 1 Preparation of transgene, microinjection and the PCR test results of the offsprings

到 1522 枚受精卵,有 868 枚受精卵适合显微注射。显微注射后移植入 32 只受体兔,其中 11 只受孕(34.3%),产仔 45 只,转基因阳性幼兔 1 只,转基因效率约为 2.2%。

#### 2.4 转基因表达与活性

Western Blot 方法被用来检测了人 CETP 转基因家兔中 CETP 转基因的表达,由于人 CETP 转基因和家兔内源性 CETP 具有交叉反应,故未能确定其表达量。Real-time PCR 检测结果发现,在转基因

家兔各主要组织器官中,人 CETP 转基因主要在肝脏表达,与设计的相一致(图 2)。血浆中 CETP 的活性检测结果显示,转基因家兔 CETP 活性为每小时 25.2 pmol/ $\mu$ L,同窝非转基因家兔 CETP 活性为每小时 17.2 pmol/ $\mu$ L,转基因家兔活性高于非转基因家兔。转基因家兔血浆 TC 为 19 mg/dL,同窝非转基因家兔血浆 TC 为 18 mg/dL,但转基因家兔血浆 HDL-C 为 4 mg/dL,显著低于非转基因家兔的 12 mg/dL。



注:1. 肝;2. 心脏;3. 脾;4. 肺;5. 肾;6. 肾上腺;7. 脂肪;8. 肌肉;9. 睾丸;10. 主动脉弓;11. 肺巨噬细胞;12. 脑;13. 脊髓;14. 小肠。

图 2 人 CETP 转基因在模型家兔主要器官/组织的 mRNA 表达水平

Note. 1. Liver, 2. Heart, 3. Spleen, 4. Lungs, 5. Kidneys, 6. Adrenal glands, 7. Fat, 8. Muscle, 9. Testes, 10. Aortic arch, 11. Pulmonary macrophages, 12. Brain, 13. Spinal cord, 14. Small intestine.

Fig. 2 The mRNA expression levels of human CETP transgene in the main organs/tissues of transgenic rabbits

### 3 讨论

转基因家兔作为重要的生命医学研究用动物模型,在心血管疾病、感染性疾病以及代谢性疾病等的研究中具有重要的科研价值,随着生物技术的发展,它在生命医学研究的其他领域也越来越受到重视<sup>[4,7-9-11]</sup>。目前为止,显微注射法仍是制作转基因动物的最常用方法之一。在本研究中,我们利用显微注射方法制作成功人 CETP 转基因家兔,为相关研究提供了良好的候选动物模型。CETP 作为可能的心血管疾病的治疗靶点,最近几年很受研究人员重视,并投入了很多精力进行相关研究。虽然 CETP 转基因小鼠已经研发成功,但利用该模型取得的研究成果仍存在很多争议<sup>[4,7-9]</sup>。这与小鼠本身的生物学特性有很大关系,小鼠脂质代谢与人类的差异是其可能原因之一。小鼠体内富含 HDL, ApoE 敲除后 HDL 和 LDL 均升高,其动脉粥样硬化病变与人类存在差异,小鼠缺乏 CETP,导致其胆固

醇代谢与人类存在差异<sup>[10]</sup>。因此基于小鼠等啮齿类动物模型的有关 CETP 的研究可能存在一定先天性缺陷。

目前针对 CETP 抑制剂的研究陷于相对被动的局面<sup>[11]</sup>。这其中的一个重要原因可能是先期动物模型的选择存在问题,大多基于啮齿类模型的研究结果尚需进一步确证。在本研究中我们建立了人 CETP 转基因家兔,该模型在肝脏特异性高表达人 CETP,并释放入血。血浆检测 CETP 活性在转基因家兔明显升高,并最终影响了血浆 HDL-c 的浓度。这些特征表明该模型在 CETP 与心血管疾病的研究中具有重要的应用价值。家兔属于兔形目动物,在系统发育上比啮齿类实验动物更接近人类;家兔脂蛋白特征与人类相似,富含 LDL,脂蛋白代谢更适合人类心血管疾病研究,另外,与啮齿类动物相比,家兔体型大,更容易进行主要脏器功能检测、血液生化分析和实验操作<sup>[10]</sup>。在他汀类药物的发现、药效评价和最终被应用的历史中,他汀类药物在啮齿类

动物中的研究结果趋于阴性结论,但在家兔模型的研究中展现出良好的降血脂作用,这为他汀类药物最终得以发掘和应用于临床起到了重要推动作用<sup>[12]</sup>。本模型的研发成功和应用,必将进一步加深研究者对 CETP 和动脉粥样硬化相关疾病关系的认识。

#### 参 考 文 献

- [ 1 ] Manning PJ, Ringler DH, Newcomer CE. The biology of the laboratory rabbits [M]. San Diego USA: Academic Press Inc, 1994: 367 - 380.
- [ 2 ] Fan J, Watanabe T. Transgenic rabbits as therapeutic protein bioreactors and human disease models [J]. Pharmacol Ther, 2003, 99 (3): 261 - 282
- [ 3 ] 刘恩岐, 范江霖. 转基因兔在动脉粥样硬化中的应用及发展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2003, 11(4): 371 - 375.
- [ 4 ] Zhao S, Wei K, Yu Q, et al. General topic: applications of transgenic rabbits in biomedical research-based on literature search [J]. World Rabbit Sci, 2010, 18(3): 159 - 167.
- [ 5 ] Polk D, Shah PK. Cholesterol ester transfer protein (CETP) and atherosclerosis [J]. Drug Discov Today Ther Strateg, 2007, 4 (2): 137 - 145.
- [ 6 ] Kappelle PJ, Perton F, Hillege HL, et al. High plasma cholesteryl ester transfer but not CETP mass predicts incident cardiovascular disease: a nested case-control study [J]. Atherosclerosis, 2011, 217(1): 249 - 252.
- [ 7 ] 刘恩岐, 郑华东, 赵四海, 等. 转基因家兔的制作 [J]. 动物学杂志, 2006, 41(3): 64 - 71.
- [ 8 ] 赵四海, 郑华东, 刘恩岐. 生物医学研究中实验动物的应用状况与分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2006, 16(4): 245 - 248.
- [ 9 ] Zhao S, Liu E, Chu Y, et al. Numbers of publications related to laboratory animals [J]. Scand J Lab Anim Sci, 2007, 34(2): 81 - 86.
- [ 10 ] Rader DJ, Degoma EM. Future of cholesteryl ester transfer protein inhibitors [J]. Annu Rev Med, 2014, 65: 385 - 403.
- [ 11 ] Shiomi M, Ito T. The Watanabe heritable hyperlipidemic (WHHL) rabbit, its characteristics and history of development: a tribute to the late Dr. Yoshio Watanabe [J]. Atherosclerosis, 2009, 207(1): 1 - 7.

[ 收稿日期 ] 2015-01-22

·快讯·

## 《中国实验动物学报》继续获得“中国科协精品科技期刊工程项目”资助

《中国实验动物学报》获得 2015 - 2017 年“中国科协精品科技期刊工程 - 学术质量提升项目”资助,这是本刊继 2013 - 2014 年“中国科协精品科技期刊工程”之后第 2 次获得该项目资助。

“精品科技期刊工程项目”由中国科协组织,目的是提升中国科协科技期刊的学术影响力和核心竞争力,发挥示范引领作用,更好地服务科技创新和广大科技工作者,发挥科技期刊在创新驱动发展战略中的重要支撑作用。2015 - 2017 年为中国科协精品科技期刊工程项目第 4 期。

本刊获得的“精品科技期刊工程项目”资助,将进一步促进期刊的传播与发展,并推动本刊对生物医药的支持作用,对于提高公众对实验动物的认知、增强实验动物福利、促进我国实验动物技术的发展,向世界展示我国实验动物科学的创新研究,都具有重要意义!

本刊编辑部