

P210^{T315I-BCR/ABL}转基因小鼠模型的建立与鉴定

朱玉峰 王元占 孟凡义

【摘要】 目的 建立P210^{T315I-BCR/ABL}转基因小鼠模型,探讨慢性髓性白血病(CML)的发病机制和筛选抗T315I型CML的有效治疗药物。方法 构建APN/CD13启动子与增强子调控P210^{T315I-BCR/ABL}基因和eGFP基因同时表达的转基因载体,通过显微注射法将构建好的载体注射到C57小鼠的单细胞受精卵中,用PCR方法鉴定转基因鼠首建鼠及其子代基因型,用荧光显微镜和RT-PCR方法检测转基因小鼠外周血中eGFP和BCR-ABL基因表达,经血常规、外周血和骨髓涂片、组织病理学检测转基因小鼠CML表现。结果 共得到3个同时表达eGFP和BCR-ABL基因的转基因小鼠品系,转基因小鼠2月龄时WBC、PLT等较对照组明显升高,以后逐月升高,6月龄时,WBC最高达 $23.9 \times 10^9/L$,中性粒细胞百分比最高达74.6%,PLT最高达 $4\ 136 \times 10^9/L$,外周血和骨髓涂片中可见少量原始粒细胞,动物死亡后病理解剖发现,脾脏肿大,脾脏中可见少量白血病细胞浸润。结论 成功建立了P210^{T315I-BCR/ABL}转基因小鼠模型,为研究CML的发病机制和筛选抗T315I型CML的有效治疗药物奠定基础。

【关键词】 白血病,髓样,慢性; 基因,BCR-ABL; T315I突变; 转基因; 小鼠

Generation and identification of P210^{T315I-BCR/ABL} transgenic mice Zhu Yufeng, Wang Yuanzhan, Meng Fanyi. Laboratory Animal Research Center of Nanfang Hospital, the Southern Medical University, Guangzhou 510515, China

Corresponding author: Wang Yuanzhan, Email:yydws@fimmu.com

【Abstract】 Objective To construct the P210^{T315I-BCR/ABL} transgenic mice model. **Methods** The transgenic vector in which the P210^{T315I-BCR/ABL} gene and eGFP gene was derived by APN/CD13 promoter was constructed and microinjected into the single-cell fertilized eggs of C57 mice. Transgene integration was conformed by PCR genotyping and P210^{T315I-BCR/ABL} expression levels was evaluated by RT-PCR. The CML phenotype was confirmed by blood routine examination, Wright's staining for peripheral blood and bone marrow smears, HE staining for organs of transgenic mice. **Results** Three transgenic mice lines with high expression of P210^{T315I-BCR/ABL} gene and eGFP gene was selected. Compared with the wild type mice, the levels of WBC, platelet and neutrophil granulocyte of transgenic mice began to increase gradually at 2 months, and increase to $23.9 \times 10^9/L$, $4\ 136 \times 10^9/L$, and 74.6% respectively at 6 months. The remarkable hyperplasia of granulocytes was seen in the peripheral blood and bone marrow smears with splenomegaly infiltrated by leukemic cells. **Conclusion** The P210^{T315I-BCR/ABL} transgenic mice was constructed and provided a model to explore the mechanism of T315I CML and screen out the drug for T315 CML patient.

【Key words】 Leukemia, myelogenous, chronic; Gene, BCR-ABL; T315I mutation; Transgenic; Mice

慢性髓性白血病(CML)是造血干细胞的恶性克隆增殖性疾病^[1-2]。t(9;22)(q34;q11)所产生的BCR-ABL融合基因是导致CML的最直接因素。伊

马替尼是目前临床上治疗初发CML患者的主要方法^[3-4],然而部分患者长期使用会对伊马替尼产生耐药性,其中以T315I型突变耐药程度最高,且对达沙替尼、尼罗替尼、伯舒替尼等二代酪氨酸激酶抑制剂均耐药^[5],第三代酪氨酸激酶抑制剂博纳替尼、Rebastinib对T315I CML患者疗效明显,但均不能从干细胞水平根治^[6-7]。目前T315突变的机制不十分清楚^[8],还需借助动物模型进行更深入研究。

动物模型对于研究CML的发病机制和筛选

DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-2727.2015.03.010

基金项目:广东省科技计划项目(2005B60302005)

作者单位:510515 广州,南方医科大学南方医院实验动物研究中心(朱玉峰、王元占),血液科(孟凡义)

通信作者:王元占, Email:yydws@fimmu.com

CML的有效治疗药物均有着重要意义^[9],而目前国内外均未见P210^{T315I-BCR/ABL}转基因小鼠的报道。我们拟克隆在髓系祖细胞特异性表达的APN/CD13启动子,并构建pAPN/EN-P210^{T315I-BCR/ABL}-IRES2-EGFP载体,通过显微注射法建立P210^{T315I-BCR/ABL}转基因小鼠模型,筛选出有效的CML小鼠模型,为进一步研究T315I型突变CML的耐药机制和筛选有效的治疗药物奠定基础。

材料和方法

1. P210^{T315I-BCR/ABL}转基因小鼠的建立:从人基因组中克隆了1 200 bp APN 髓系启动子^[10],从猪基因组中克隆300 bp APN增强子^[11],用APN启动子与增强子替换掉IRES2-eGFP载体的CMVie启动子,同时在该载体的Ecor I酶切位点插入7.2 kb的人源性P210^{T315I-BCR/ABL}基因,从而构建好APN/EN-p210^{T315I-bcr/abl}-IRES2-eGFP转基因载体。用Afl II内切酶将转基因载体线性化,纯化后显微注射到C57BL/6小鼠的受精卵中,然后移植到假孕的C57小鼠输卵管内,制备转基因小鼠。

2. PCR阳性转基因小鼠的鉴定:转基因小鼠在出生7 d用剪趾法标记,收集剪下的组织,用基因组提取试剂盒提取基因组DNA。用PCR法对首建鼠进行筛选,引物扩增位点位于BCR-ABL融合基因的融合位点的两侧,上游引物:CAGGTC-CAACTTCGAGCGGAT,下游引物:GATG-CATCCCACGCTCGAGC,PCR体系为20 μl,反应条件:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,30个循环,最后72℃延伸10 min,扩增片段长度为205 bp。

3. PCR阳性转基因小鼠体内的eGFP和BCR-ABL的表达:乙醚麻醉PCR阳性转基因小鼠后眼眶静脉采血10 μl,用生理盐水稀释20倍,在荧光显微镜下观察eGFP的表达情况。mRNA的逆转录参照Takara RT-PCR试剂盒说明书操作步骤得cDNA,人BCR-ABL融合基因上游引物:5'-CAGGTCCAACCTTCGAGCGGAT-3',下游引物:5'-TGATGTAGTTGCTTGGGAC-3',扩增片段为205 bp;小鼠β-actin基因上游引物:5'-ACACTGTGCCCATCTACGAG-3',下游引物:5'-CACAGGATTCCATACCCAAG-3',扩增片段为436 bp。PCR扩增条件:95℃预变性5 min,95℃变性30 s,60℃退火30 s,72℃延伸30 s,30个循环,最后72℃

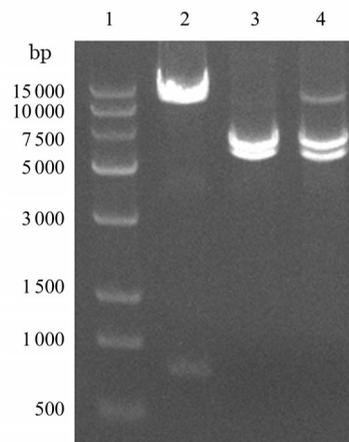
延伸10 min。

4. CML小鼠模型的鉴定:PCR阳性转基因小鼠从第2个月开始每个月用剪尾法采血行外周血常规计数和外周血涂片瑞氏染色分类。待小鼠死亡后取其骨髓细胞,用PBS洗3次后取沉淀涂片瑞氏染色行形态学检查,并取各组织行切片与HE染色后行病理学观察。

结 果

一、载体的构建

用APN启动子与增强子替换掉IRES2-eGFP载体的CMVie启动子,同时在该载体的Ecor I酶切位点插入7.2 kb的人源性P210^{T315I-BCR/ABL}基因,构建好的载体分别经Ecor I、Bamh I和Xho I酶切鉴定,所得片段大小均与预期相符(图1),证明载体构建成功。



1:Marker;2~4分别为Xho I、Ecor I和Bamh I酶切产物

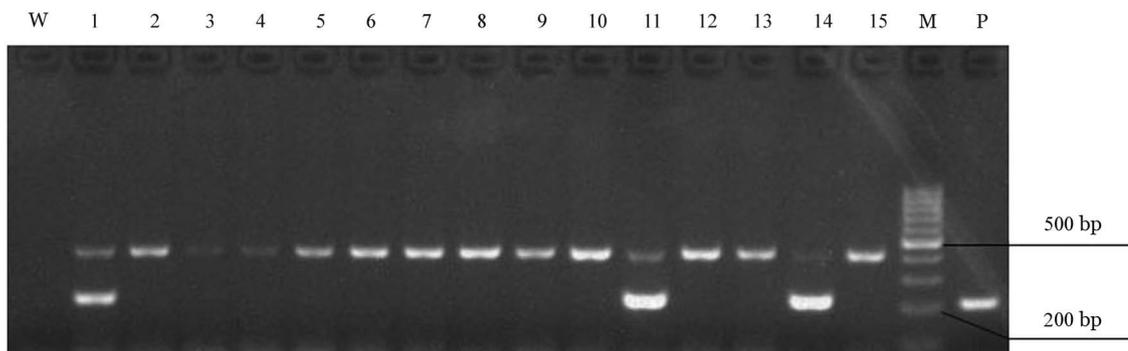
图1 载体经Xho I、Ecor I和Bamh I酶切鉴定结果

二、转基因小鼠的鉴定

将线性化的APN/EN-P210^{T315I-BCR/ABL}-IRES2-eGFP载体显微注射到368个受精卵并移植到10只假孕母鼠的输卵管内,共出生60只小鼠,其中有3只经PCR检测为阳性转基因小鼠(图2),经RT-PCR和荧光显微镜检测,这3只阳性转基因小鼠的外周血中均能很好地表达BCR-ABL和eGFP基因(图3、4)。

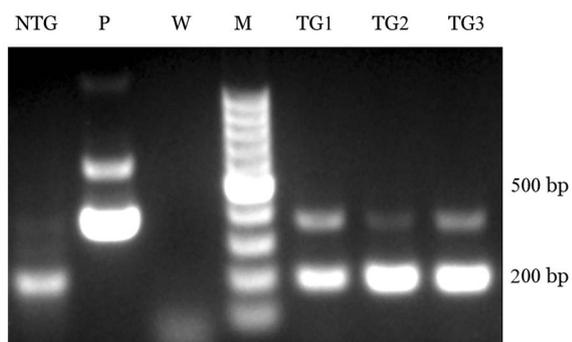
三、转基因小鼠CML相关表现检测

1. 血常规检测:转基因小鼠出生后每月检测1次血常规,结果与对照组相比,转基因小鼠组从第2个月起WBC、中性粒细胞百分比和PLT明显升高,以后逐月上升,到第6个月末,WBC高达23.9×



W:空白对照;M:Marker;P:阳性对照;1~15:转基因小鼠

图2 PCR方法筛选阳性转基因小鼠



NTG:非转基因小鼠;P:阳性对照;W:空白对照;M:Marker;TG1~3:转基因阳性小鼠

图3 RT-PCR方法检测转基因阳性小鼠外周血中的BCR-ABL基因表达

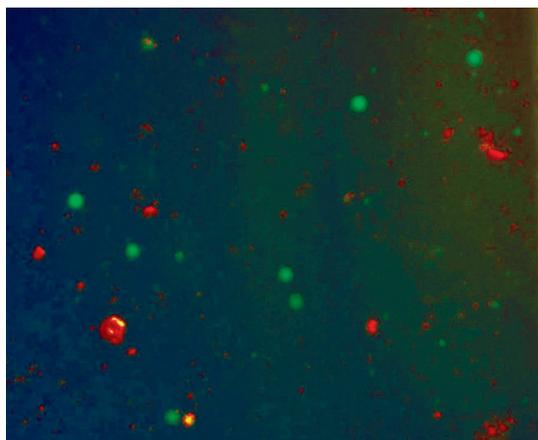
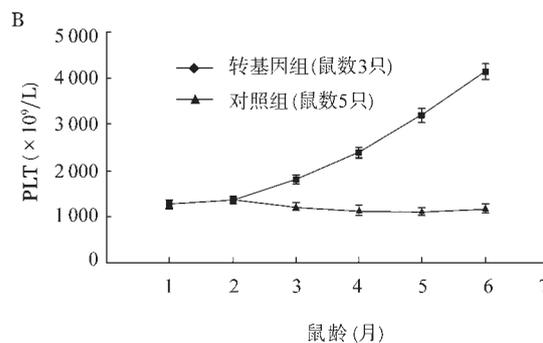
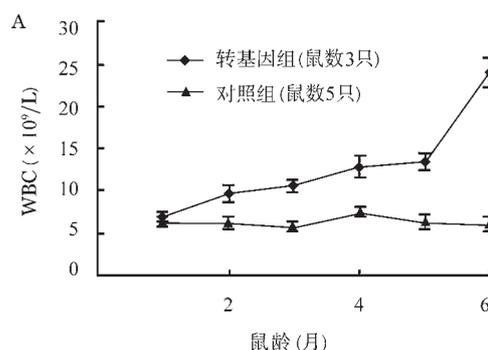


图4 荧光显微镜检测外周血中的eGFP基因表达(×400)



A:WBC; B:PLT

图5 转基因小鼠外周血常规变化

脾脏明显肿大,病理切片经HE染色,发现脾脏组织有白血病细胞浸润。

讨论

目前制备CML动物模型的方法主要有3种,第一种是用CML细胞种植免疫缺陷鼠SCID或NOD/SCID;第二种是携带BCR-ABL基因的逆转录病毒载体感染小鼠骨髓细胞并移植入正常鼠体内^[12];第三种是构建BCR-ABL转基因小鼠模型。转基因小鼠模型相对于其他模型有以下几个优点:①BCR-ABL基因作为转基因小鼠的一部分在体内

10⁹/L,中性粒细胞百分比最高达74.6%,PLT最高达4 136×10⁹/L,有明显的CML表现(图5)。

2. 外周血和骨髓涂片检测:外周血中粒细胞增生明显,幼稚粒细胞比例逐渐增多。骨髓增生极度活跃,各期的粒细胞系统显著增生,细胞形态各异,大小不一,可见少量原始粒细胞。

3. 脾脏的病理学变化:解剖发现转基因小鼠的

表达,更能精确地模拟人CML。②BCR-ABL转基因鼠可以传代。③转基因CML模型有一定的潜伏期,这与人的CML极为相似。④转基因小鼠的CML类似于人CML的单克隆性^[13]。

启动子的选择对于建立BCR-ABL转基因小鼠有着至关重要的作用。最初用BCR的启动子调控BCR-ABL基因的表达,但胚胎在发育过程中全部死亡^[14]。后来改用造血干细胞特异性表达启动子或四环素调控启动子,BCR-ABL转基因小鼠被建立起来,部分转基因小鼠出现类似于人CML症状^[15-17]。2003年Jaiswal等^[18]建立了在髓系祖细胞特异性表达的hMRP8P210^{BCR/ABL}转基因小鼠,该小鼠在出生后第12周开始出现WBC、PLT等升高,出现了与人类CML极为相似的症状,证明除在干细胞特异性表达外,在髓系祖细胞特异性表达210^{BCR/ABL}也可以得到类似于人CML的转基因小鼠。本课题同样利用在髓系祖细胞特异性表达的APN/CD13上游启动子诱导eGFP基因和P210^{T315I-BCR/ABL}基因同时在转基因小鼠体内表达,结果得到的转基因小鼠从第8周开始出现WBC、PLT升高等类似于人CML表现,比hMRP8P210^{BCR/ABL}转基因小鼠还早4周,估计我们克隆的APN的增强子大大地增强了APN启动子的活性,从而增强了BCR-ABL基因的表达量,而BCR-ABL蛋白量又与转基因小鼠的表型有直接关系^[19-20]。另外,因为eGFP基因与P210^{T315I-BCR/ABL}基因在转基因小鼠体内同时表达,通过eGFP能很好地监测P210^{T315I-BCR/ABL}基因的表达情况,这对筛选CML小鼠模型提供了极大的便利。

参考文献

- [1] Witte O. The role of Bcr-Abl in chronic myeloid leukemia and stem cell biology[J]. Semin Hematol, 2001, 38(3 Suppl 8):3-8.
- [2] Jabbour E, Kantarjian H. Chronic myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, monitoring, and management [J]. Am J Hematol, 2012, 87(11):1037-1045.
- [3] Zhang Y, Rowley JD. Chronic myeloid leukemia: current perspectives[J]. Clin Lab Med, 2011, 31(4):687-698.
- [4] Ernst T, Hochhaus A. Chronic myeloid leukemia: clinical impact of BCR-ABL1 mutations and other lesions associated with disease progression[J]. Semin Oncol, 2012, 39(1):58-66.
- [5] 吴莺. BCR-ABL 酪氨酸激酶抑制剂研究进展[J]. 海峡药学, 2013, 25(5):5-8.
- [6] O'Hare T, Shakespeare WC, Zhu X, et al. AP24534, a pan-BCR-ABL inhibitor for chronic myeloid leukemia, potently inhibits the T315I mutant and overcomes mutation-based resistance[J]. Cancer Cell, 2009, 16(5):401-412.
- [7] Eide CA, Adrian LT, Tyner JW, et al. The ABL switch control inhibitor DCC-2036 is active against the chronic myeloid leukemia mutant BCR-ABL T315I and exhibits a narrow resistance profile[J]. Cancer Res, 2011, 71(9):3189-3195.
- [8] 王彦, 冯文莉. 伊马替尼治疗慢性粒细胞白血病的耐药机制与对策[J]. 生命的化学, 2013, 33(4): 407-412.
- [9] Koschmieder S, Schemionek M. Mouse models as tools to understand and study BCR-ABL1 diseases[J]. Am J Blood Res, 2011, 1(1):65-75.
- [10] 梁利波, 马业伟, 赵清正, 等. 氨肽酶基因启动子的克隆及在造血细胞和不同肿瘤细胞中的活性分析[J]. 科学通报, 2001, 46(16):1368-1370.
- [11] Olsen J, Kokholm K, Troelsen JT, et al. An enhancer with cell-type dependent activity is located between the myeloid and epithelial aminopeptidase N (CD 13) promoters[J]. Biochem J, 1997, 322(Pt 3):899-908.
- [12] 张文萍, 冯文莉, 黄世峰, 等. Bcr/abl 逆转录病毒介导的小鼠慢性粒细胞白血病样模型的建立[J]. 第四军医大学学报, 2008, 29(15):1377-1381.
- [13] Koschmieder S, Schemionek M. Mouse models as tools to understand and study BCR-ABL1 diseases[J]. Am J Blood Res, 2011, 1(1):65-75.
- [14] Heisterkamp N, Jenster G, Kiuoussis D, et al. Human bcr-abl gene has a lethal effect on embryogenesis[J]. Transgenic Res, 1991, 1(1):45-53.
- [15] Honda H, Oda H, Suzuki T, et al. Development of acute lymphoblastic leukemia and myeloproliferative disorder in transgenic mice expressing p210bcr/abl: a novel transgenic model for human Ph1-positive leukemias[J]. Blood, 1998, 91(6):2067-2075.
- [16] Steffen K, Berthold G, Pu Z, et al. Inducible chronic phase of myeloid leukemia with expansion of hematopoietic stem cells in a transgenic model of BCR-ABL leukemogenesis [J]. Blood, 2005, 105(1):324-334.
- [17] Pérez-Caro M, Cobaleda C, González-Herrero I, et al. Cancer induction by restriction of oncogene expression to the stem cell compartment[J]. EMBO J, 2009, 28(1):8-20.
- [18] Jaiswal S, Traver D, Miyamoto T, et al. Expression of BCR/ABL and BCL-2 in myeloid progenitors leads to myeloid leukemias [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003, 100(17):10002-10007.
- [19] Gaiger A, Henn T, Hörth E, et al. Increase of bcr-abl chimeric mRNA expression in tumor cells of patients with chronic myeloid leukemia precedes disease progression [J]. Blood, 1995, 86(6):2371-2378.
- [20] Foley SB, Hildenbrand ZL, Soyombo AA, et al. Expression of BCR/ABL p210 from a knockin allele enhances bone marrow engraftment without inducing neoplasia [J]. Cell Rep, 2013, 5(1):51-60.

(收稿日期:2014-07-03)

(本文编辑:董文革)