

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580024871.6

[51] Int. Cl.

C12N 5/00 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 7 月 18 日

[11] 公开号 CN 101001948A

[22] 申请日 2005.7.25

[21] 申请号 200580024871.6

[30] 优先权

[32] 2004.7.26 [33] US [31] 60/591,935

[86] 国际申请 PCT/CN2005/001114 2005.7.25

[87] 国际公布 WO2006/010323 英 2006.2.2

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.23

[71] 申请人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 谢赏恩 张林晴娇

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 刘冬 黄可峻

权利要求书 3 页 说明书 26 页 附图 11 页

[54] 发明名称

前胶原 IIA 缺乏小鼠

[57] 摘要

本发明涉及采用通过转基因(基因敲除)技术进行遗传学修饰的小鼠,产生先天性心脏缺损和肥厚型心肌病的双重模型。本发明产生表现为多发性心血管畸形的经敲除的小鼠,其将用作心血管疾病的模型,用于治疗心室重建、恶性心律失常、原发性肺动脉高压和退行性瓣膜疾病以及先天性心脏病的潜在的药物的筛选。

1. 一种用于产生突变的前胶原 IIA (Col2A-1)转基因小鼠的方法，所述方法包括以下步骤：

a) 通过在小鼠胚胎干细胞中的同源重组，将含有拟置换相应的内源性同源基因的突变的 Col2A-1 转基因的基因-靶向载体，导入小鼠胚胎干细胞中；

b) 选择步骤(a)的含突变的 Col2A-1 转基因的小鼠胚胎干细胞；

c) 将在步骤(b)中选择的小鼠胚胎干细胞导入小鼠胚泡中或使步骤(b)中选择的小鼠胚胎干细胞与小鼠桑葚胚聚集在一起；

d) 将在步骤(c)中的小鼠胚泡或经聚集的桑葚胚植入假孕的小鼠中，从而形成胚胎；

e) 使步骤(d)的胚胎发育至足孕，从而产生嵌合建立者转基因小鼠；和

f) 使步骤(e)的嵌合建立者转基因小鼠与野生型小鼠杂交，从而产生突变的 Col2A-1 转基因小鼠。

2. 依据权利要求 1 的方法，其中突变的 Col2A 转基因缺乏编码针对 BMP-2 或 TGF- β 1 的富含半胱氨酸的结合域的外显子 2。

3. 一种产生无效突变小鼠(IIA-/-)的方法，所述方法包括使权利要求 1 的转基因小鼠与小鼠的远系繁殖品系回交。

4. 一种依据权利要求 2 的方法，其中所述无效突变小鼠显示多发性心血管畸形，人先天性心脏缺损或在心脏形成模式和形态发生中类似于那些与缺失 BMP、TGF β 与结节信号传导途径功能相关的缺损的特征。

5. 依据权利要求 4 的方法，其中的心脏缺损包括心室隔膜缺损(VSD)、动脉导管未闭(PDA)、动脉干永存(PTA)、右心室肥大、伴有或不伴有锁骨下动脉的异常起源的右主动脉弓，和与 VSD 有关的、其中主动脉和肺动脉全部出现的或与右心室分得很开的双出口右心室

(DORV), 大动脉移位(TOGA)、畸形的冠状动脉以及伴原发性心房隔膜缺损的心内膜垫缺损。

6. 依据权利要求 1 中所述方法产生的转基因小鼠。

7. 依据权利要求 3 中所述方法产生的转基因小鼠。

8. 依据权利要求 7 的转基因小鼠, 其中所述转基因小鼠是称为 191-IIA 的品系。

9. 一种筛选用于治疗所选择的心脏疾病的药物的方法, 所述方法包括以下步骤:

a) 提供显示与所选择的心脏疾病相关的症状的 191-IIA 小鼠;

b) 得到一种或多种症状的第一个测量结果;

c) 将药物给予 191-IIA 小鼠;

d) 得到在步骤(b)中所检测症状的第二个测量结果; 和

e) 将步骤(b)中的第一个测量结果与步骤(d)中的第二个测量结果进行比较, 以确定该药物能否治疗所选择的心脏疾病。

10. 依据权利要求 9 方法, 其中所述治疗可包括靶向 BMP/TGF 相关分子和诱导对细胞肥大的 Smad 信号传导途径的药物和基因疗法。

11. 依据权利要求 9 的方法, 其中所述药物可为天然存在的化合物或其纯的衍生物, 合成的化合物, 配体捕获物, BMP 或 TGF 激动剂, 受体拮抗剂, Smad 家族蛋白质, 或病毒或非病毒载体。

12. 依据权利要求 9 的方法, 其中所述选择的心脏疾病包括心脏病猝死、心脏肥大、心肌细胞肥大、细胞杂乱排列、伴右心室肥大的肺动脉高压, 以及瓣膜纤维化。

13. 一种来源于 191IIA 小鼠心脏组织的细胞系。

14. 依据权利要求 5 的方法, 其中前胶原 IIA 蛋白产生的缺乏导致胚胎心肌细胞中 NKx2-5 和 GATA-4 的表达减少, 这两种重要的转录因子控制心脏形态发生, 且其突变在人的先天性心脏病中已被确认。

15. 依据权利要求 14 的方法，其中前胶原 IIA 蛋白被用于调节转录因子诸如 Nkx2-5 和 GATA-4 以及由 BMP/TGF β 信号传导调节的其它基因的表达水平，从而改变心血管结构的模式。

16. 依据权利要求 5 的方法，其中前胶原 IIA 蛋白产生的缺乏导致 Smad1 磷酸化减少和核易位，这两个特征对于 BMP2-诱导细胞内信号传导是重要的。

前胶原 IIA 缺乏小鼠

本申请要求 2004 年 7 月 26 日提交的美国临时申请号 60/591,935 的优先权，其内容在此通过引用结合于本申请中。

在本申请的全文中引用了不同的出版物。对于这些出版物的全部引用可于权利要求书的前面看到。这些出版物的公开内容在此通过引用结合于本申请中，以便更加全面地描述在本文描述和要求的本发明之日前的本领域现状。

发明背景

心脏病猝死(SCD)是主要的公共卫生问题，在美国 35 岁以上人群中因心脏病所致死亡高达 63%。¹而急性缺血性心脏疾病是此人群中 SCD 的主要病因，但是青少年和 40 岁以下的青壮年猝死的最常见病因之一是肥厚型心肌病(HCM)。其它较少发生的病因包括畸形的冠状动脉、Marfan's 综合征、致心律失常的右心室发育异常、心肌炎、主动脉瓣膜狭窄和冠状动脉粥样硬化性疾病。HCM 是遗传性心肌疾病，在没有继发病因时，存在具有非扩张的、高动力性腔室(hyperdynamic chamber)的不对称的或对称的左心室肥大。它同样地侵袭男性和女性，以高度可变化的临床过程、不同的病理学和复杂的遗传表达为特点。依靠潜在的(underlying)突变，在疾病谱的一个极端方面，HCM 可与正常长寿共存，但在另外一个极端方面，它是青年运动员中 SCD 的最常见的病因。SCD 的病因被假定为源于电不稳定性心肌基质的复合的心室心动过速或纤维性颤动，但也提示有心动过缓和严重梗塞。对 HCM 中的 SCD 的预防仍然是临床医师的主要挑战。在第三期中心(tertiary centers)，已有报告使用可植入的心复律除颤器(cardioverter defibrillator) (ICD)是有用的，但患者可仍然罹患伴有血栓栓塞性卒中风险的晚期心力衰竭和心房纤维性颤动。^{3,4} HCM 的病

理模型对于了解 HCM 的发展和 SCD 的病因将是必需的，对于预防和治疗将是重要的。当前，已知的疾病基因占有家族性肥厚型心肌病病例的约 50-70%。⁵ 人的大多数原发性心肌病，无论是肥厚型或扩张的，都是由于收缩性蛋白质、细胞骨架蛋白质或间隙连接蛋白质的突变，在大多数病例中是结构性缺损的直接结果。

心脏细胞外基质起着多项重要的功能作用，如同基质之于细胞粘附和支撑，如同信号之于细胞生存，如同贮主(reservoir)之于生长因子，并且作为组织机械学(mechanics)的主要决定因素。胶原是哺乳动物心脏中细胞外基质的主要成分并表现为动态(dynamic)表达模式和在发育过程中和在病理条件下同种型(isoform)多样性。⁵ 在成年心肌中，I型胶原占总胶原的 80%，与 III 型胶原一起形成支持个体心肌细胞和平滑肌细胞的纤维状胶原网络，和组织肌肉束、传导系统和冠状脉管系统进入粘性的收缩性单位。相反地，III 型胶原是新生大鼠心脏中的主要成分，约占总胶原含量的三分之一，并且因此其粘弹性不同于成年心肌。在右心室肥大的啮齿动物模型中，I 型和 III 型胶原的比率有显著改变。^{9,10} II 型和 VIII 胶原在心脏发育过程中短暂表达并已涉及心脏形态发生中。尽管 II 型胶原通常是软骨特有的，已经显示在小鼠胚胎发生过程中有非常广泛的组织分布。小鼠 $\alpha 1$ (II) 胶原基因(*Col2a-1*)在许多非软骨组织中短暂表达，诸如脊索、神经视网膜、尾腱、心脏、外胚层表面、颅盖的间充质、胎脑、内耳的感觉上皮细胞和形成肢芽的顶外胚层脊(apical ectodermal ridge)(AER)。对外显子 2 的可选的剪接产生或者包括(IIA mRNA)或排除(IIB mRNA)此外显子的 II 型前胶原 mRNAs。IIA 型 mRNA 在 9.5 天胚胎的心房和心室的外心膜细胞中均含量丰富，但是在 10.5 天即迅速减少。12.5 天后，IIB mRNA 水平迅速升高并最后超过 IIA mRNAs。到了 16.5 天，IIB mRNAs 是主要的 *Col2a-1* 转录物，主要在成熟软骨细胞中表达。¹³ 自一家医院的尸检分析显示，在 2 例 II 型胶原疾病的软骨发育不良(hypochondrogenesis)的婴儿心脏隔膜(septation)中发

现缺损。至今尚未明确, IIA 型胶原是如何对心脏形态发生起作用的, 但近期的研究提示, 它可调节生长因子。众所周知, 包含在 IIA mRNA 中的 II 型胶原基因(*Col2a-1*)的外显子 2, 编码在前- $\alpha 1$ (II)胶原链的氨基-前肽中的富含半胱氨酸的球形域。在体外试验中显示, 所述富含半胱氨酸的域结合骨形态发生蛋白(如 BMP2)和转化生长因子(TGF)- $\beta 1$ 。

TGF- $\beta 1$ 和 BMP-2 属于调节生长和分化的转化生长因子- β 超家族。如同 TGF- β 超家族的其它成员(TGF- β /活化素/结节和 BMP/GDF/MIS 亚家族), 它们不同的生物学作用是通过形成 I 型和 II 型丝氨酸/苏氨酸激酶受体的异聚复合物, II 型受体将 I 型受体磷酸化和随后活化 Smad 蛋白而介导的。受体激活的 Smads (R-Smads, Smads 1-3、5、8)由 I 型受体激酶磷酸化, 与共同的介体 Smads (co-Smads, Smad4)形成异聚复合物, 并易位核中, 在那里它们与特定的转录因子和辅调节因子(co-regulators)相互作用以调节基因表达。R-Smads2 和 3 应答于 TGF- β 亚家族, 而 R-Smads 1、5 和 8 主要应答于 BMP 亚家族。两种抑制性 Smads (I-Smad), Smad6 和 Smad7, 通过与 Smad4 竞争结合活化的 R-Smads 负性调节 TGF- β /BMP 信号传导, 抑制 R-Smads 的磷酸化, 或靶向所述受体使其降解。^{16, 17} TGF- $\beta 1$ 和 BMP-2 在心脏发育的多个不同方面, 特别是在心肌细胞分化、瓣膜发生和流出道和隔膜的发育方面, 均起重要的作用。¹⁸⁻²¹ TGF- $\beta 1$ 在出生后的心脏中发挥不同的生物学活性。它控制主要组织相容性复合物的表达, 减少由心脏成纤维细胞产生的细胞外基质蛋白质, 调节血管平滑肌细胞表型, 导致心脏肥大和增强 β -肾上腺素能的信号传导。关于在出生后哺乳动物心脏中的 BMP-2 作用的信息有限。在新生大鼠心肌细胞培养中, BMP-2 通过激活 Smad1 途径发挥抗细胞凋亡作用和通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶途径增强收缩性。^{22, 23} 临床上, 原发性肺动脉高压, 一种肺动脉中内皮和平滑肌细胞的增生加强的疾病, 与作用 BMP (BMPR-II)的 II 型受体的突变相关联。^{24, 25}

近期在 Marfan 综合征鼠科动物模型的研究也显示, 细胞外基质, 在本例中, 微纤维蛋白, 在调节 TGF- β 信号传导的活性作用。^{26, 27}

在人扩张的心肌病中, 增强的肌束膜的纤维化与 I 型, III 型和 VI 型胶原含量的增加有关, V 型胶原在心肌的细胞内基质中增加。II 型胶原在正常心脏或扩张的心肌病中不表达。²⁸ II 型胶原在肥厚型心肌病人中是否异常表达还有待研究。多种心肌病和改变收缩性的小鼠模型集中在导致前述的蛋白质、细胞周期调节蛋白、涉及钙代谢的调节蛋白的突变上, 和集中在肾上腺素能受体亚单位的信号传导级联上。虽然基质缺损通常不被认为是心肌病可能的病因, 细胞外基质调节组织模型和心肌细胞分化的概念并不新颖。甚至在伴有 III 型胶原的定向去除的小鼠中, 没有心脏异常, 且猝死是由于主动脉破裂。²⁹ 因此, 在本申请所述的成年 191-IIA 突变小鼠是用于研究可突然发生的心肌病诱导的死亡的非常重要的模型。

Taussig-Bing 畸形(TBA)是罕见的但复杂的先天性心脏病, 其包括伴肺动脉下室间隔缺损(VSD)的右心室双出口(DORV)。主动脉和肺动脉干移位。TBA 是仅次于法乐氏四联症(Tetralogy of Fallot)的 DORV 的最常见的变型。患 TBA 的婴儿常常表现充血性心力衰竭和肺动脉高压。其诊断是合并相关联的血管缺损诸如冠状动脉畸形、主动脉下狭窄、主动脉弓缩窄或中断。目前推荐的治疗是在单次手术中完全纠正, 特别是包括动脉调转手术, VSD 修补, 主动脉梗阻的矫正性修补和畸形的冠状动脉的移位。因此, 对于这些血管缺损的详细绘图对矫正性手术的成功至关重要。TOGA 是最常诊断的新生儿紫绀性心脏缺损复合症(ref)和包含心室大动脉不协调(ventriculoarterial discordance)。人 TBA 或 TOGA 的遗传学集中在有关左-右不对称或内脏异位综合征的候选基因上。三个人类基因的突变与 TOGA 相关: 锌指转录因子 *ZIC3* { Digilio, M. C. 等. Complete transposition of the great arteries: patterns of congenital heart disease in familial precurrence. *Circulation* **104**, 2809-14 (2001). } { Belmont, J.W.,

Mohapatra, B., Towbin, J.A. & Ware, S. M. Molecular genetics of heterotaxy syndromes. *Curr Opin Cardiol* **19**, 216-20 (2004).}、*CFC1* (human CRYPTIC gene){ Goldmuntz, E.等. CFC1 mutations in patients with transposition of the great arteries and double- outlet right ventricle. *Am J Hum Genet* **70**, 776-80 (2002).}和 *PROSIT240* { Muncke, N.等. Missense mutations and gene interruption in PROSIT240, a novel TRAP240-like gene, in patients with congenital heart defect (transposition of the great arteries). *Circulation* **108**, 2843-50 (2003).}。这些临床发现已经在用基因技术去除(genetic ablation) *Zic3* 的小鼠模型{ Purandare, S. M.等. A complex syndrome of left-right axis, central nervous system and axial skeleton defects in *Zic3* mutant mice. *Development* **129**, 2293-302 (2002).}、潜在的(EGF- CFC){ Gaio, U.等. A role of the cryptic gene in the correct establishment of the left-right axis. *Curr Biol* **9**, 1339-42 (1999).}和 TRAP220{ Ito, M., Yuan, C.X., Okano, H.J., Darnell, R.B. & Roeder, R.G. Involvement of the TRAP220 component of the TRAP/SMCC coactivator complex in embryonic development and thyroid hormone action. *Mol Cell* **5**, 683-93 (2000).}中得到验证。

在此，发明人描述在 C57/BL6 遗传背景上带有 IIA 突变的小鼠，是 TBA 和 TOGA 的新的小鼠模型。在人 COL2A1 基因中的突变是显性的，导致具有从出生前致死到轻微畸形的严重的疾病谱的软骨发育异常。在外显子 2 中的显性的突变已在施蒂克勒综合征(Stickler Syndrome)和还伴有眼睛缺损的瓦格纳氏综合征(Wagner's Syndromes) 中被发现{ Richards, A.J.等. COL2A1 exon 2 mutations: relevance to the Stickler and Wagner syndromes. *Br J Ophthalmol* **84**, 364-71 (2000).}{ Van Der Hout, A.H.等. Occurrence of deletion of a COL2A1 allele as the mutation in Stickler Syndrome shows that a collagen type II dosage effect underlies this syndrome. *Hum Mutat* **20**, 236 (2002).}{ Donoso, L.A.等. Identification of a stop codon mutation in exon 2 of the collagen 2A1 gene in a large stickler syndrome family. *Am J*

Ophthalmol **134**, 720-7 (2002).} { Donoso, L.A. 等. Clinical variability of Stickler syndrome: role of exon 2 of the collagen COL2A1 gene. *Surv Ophthalmol* **48**, 191-203 (2003).} { Gupta, S. K., Leonard, B.C., Damji, K.F. & Bulman, D. E. A frame shift mutation in a tissue-specific alternatively spliced exon of collagen 2A1 in Wagner's vitreoretinal degeneration. *Am J Ophthalmol* **133**, 203-10 (2002).}。然而，没有紫绀性先天性心脏缺损的报告或与 *Col2a1* 基因突变系统性相关。仅有一例来自一家医院的尸检研究报告，2个患II型胶原疾病的软骨发育不良的婴儿的心脏隔膜缺损{ Potocki, L., Abuelo, D.N. & Oyer, CE. Cardiac malformation in two infants with hypochondrogenesis. *Am J Med Genet* **59**, 295-9 (1995).}。鉴于未治疗的紫绀性先天性心脏病的发病率和死亡率临床意义重大，IIA前胶原可作为新的标记用于先天性心脏病复合症的出生前筛查。作为在心脏形态发生中BMP依赖的 *Nkx2.5* 表达的关键调节因子，IIA前胶原可作为用于心肌再生疗法的生长因子的新的传递系统。了解这些心血管缺损在IIA无效突变体中的细胞机制，对阐明治疗或预防紫绀性心脏疾病复合症的新策略将是极为重要的。

发明概述

本发明提供两个系的经遗传工程改造的小鼠，其中前胶原IIA基因的外显子2与loxP序列侧翼邻接(flanked)，并且该外显子2通过与表达Cre-重组酶的杂交小鼠而缺失。外显子2的缺失导致IIA转录物的缺失。这进而导致心血管缺损的双重表现，其中一个主要是C57/BL6遗传背景的谱系死于严重的先天性心脏病(IIA^{-/-})，而在远系繁殖的遗传背景(C57BL6/ICR/129)下的另一个谱系发展为以心肌细胞肥大、杂乱排列(disarray)和瓣膜纤维化(191-IIA)为特征的肥厚型心肌病。本发明提供筛选用于减少肥大、杂乱排列和纤维化的药物的方法，以及通过将所述药物给予或者191-IIA成年小鼠或者IIA^{-/-}突变的胚胎减少心血管形成模式结构的缺损。这样的药物可以是合成

的或天然发现的激素、生长因子、肽类或由适合用于基因转移的载体携带的基因。本发明还提供从心脏或主动脉的原代细胞培养物和衍生于敲除小鼠的永久的细胞系。来自 191-IIA 小鼠的永久的或原代细胞培养物的细胞，被用于筛选改善或消除肥大、增殖或纤维化过程的药物。

图的简述

图 1 191-IIA 小鼠的系谱 pedigree

上栏的框图概述了 191-IIA 小鼠中的猝死的自然史。下栏的框图显示在这些不同龄的小鼠中发现的四例心脏肥大的实例。

图 2 191.1 心脏的 H&E 染色

A C E - 来自野生型小鼠。**B D F** - 来自 191.1 雄性鼠，于 2 个月龄死亡的 Col11A 的纯合子无效突变体。**A B** - 来自野生型(A)和突变体(B)的心脏的两室的短轴面图像。突变体的左心室壁较不致密，因此比野生型的左心室壁厚。**C D** - 右心室(RV)，100 x 总放大率。在突变体的 RV 壁厚度增加。**E F** - 侧 LV 壁，400 x 总放大率。在野生型中心肌细胞为大小均匀，而在心肌中显示平行方向排列(E)，突变体心肌以心肌细胞肥大和杂乱排列为特征(F)。

图 3 191.3 心脏的 H&E 染色

A C - 分别为野生型小鼠的主动脉瓣(AV)和二尖瓣(MV)。**B D** - 于 3 个月龄死亡的 191.3 雄性鼠的 AV 和 MV。在突变体中，两种瓣膜均出现纤维变性。所有的框图用 400 x 总放大率。比例，一格 - 20 μm 。

图 4 大龄 191-IIA 小鼠的 H&E 染色

A B - 来自于 8 个月龄死亡的 254.66 雄性小鼠的 LV 侧壁。注意到多细胞结构(hypercellularity)。**C** - 254.66 的 RV。注意到多细胞结构和心肌细胞肥大。**D** - 来自于 15 个月龄死亡的 191.29 雄性小鼠的 LV 侧壁。比较图 2F、4A 和 4B，此小鼠的心肌细胞并不紊乱无序。所有框图用 400 x 总放大率。比例，一格 - 20 μm 。

图 5 *Ila* mRNA 的正常表达模式和 *Ila*^{-/-}小鼠的繁殖

A - 正常发育的心脏中 *Ila* mRNA 的不对称分布。用 *Ila*-特异性探针制作原位杂交的野生型胚胎的整体标本(Whole mount)(WISH)。在 2-体节配对阶段(E8.0), *Ila* mRNA 在心半月瓣(cardiac crescent)中有很强的表达。在 10-体节配对阶段(E8.5), *Ila* mRNA 在初始心脏管道回路(looping primitive heart tube)中仍有很强的表达。在 27-体节配对阶段(E9.5), *Ila* mRNA 在心球(bulbous cordis)和流出道中, 接着是在左心室中表达最高, 在流入道(心房)中发现最低水平。**B** - *Col2a1* 定位和目标载体的示意图, 其中外显子 2 被插入由 loxP 位点侧翼连接的 Neo 基因中断(disrupted)。所述 Neo 基因随后被 Cre-介导的重组切除。**C, D, E** - 靶向性缺失分别由 DNA 印迹法、RT-PCR 和 WISH 证实。

图 6 新生鼠 *Ila*^{-/-}突变体中的心血管缺损

从左至右, 显示从胸的头端至尾端的横断面。框图(A-C)来自 WT 新生小鼠。框图(D-L)来自 *Ila*^{-/-}突变体。**A, B** - 在 WT, 肺动脉(p)起自右心室(rv)和位于主动脉(a)的前面和头端。主动脉弯向气管(t)的左侧和产生右锁骨下动脉(rs)和右颈动脉(rc)、左颈动脉(c)和左锁骨下动脉(ls)。**C** - 心房间隔膜将右和左心房(箭头处)分隔开, 而心室间隔膜(ivs)将左心室(lv)与右心室(rv)分隔开。注意右心室壁比左心室壁厚。**D-F** - 伴 DORV 的不完全 TOGA 的实例, 和肺动脉下的 VSD。**D** - 在 *Ila*^{-/-}突变体中, 产生头部血管的主动脉(a), 在肺动脉(p)的前面。畸形的冠状动脉(星号*)起自升主动脉。**E** - 冠状动脉离开(箭头)之处的主动脉(a), 完全起自 RV。大动脉导管未闭(pda)连接左降主动脉(da)。**F** - 肺动脉(p)在主动脉的尾端并且均起自 LV 和 RV。肺瓣膜(pv)正覆盖瓣膜下心室隔膜缺损(箭头处)。**G** - 完全 TOGA 的实例, 此处主动脉(a)起自 RV。肺动脉(p)向尾端和后面易位(transposed)并且完全起自 LV。**H** - 大 ECD (双箭头处)。**I** - 动脉干永存(PTA), 一种伴有以起自共同动脉干的后壁和共享共同异常的动脉干瓣膜(truncal

valves) (tv)的、产生的主肺动脉(p)的初始流出道的间隔完全失败的情况。**J** - 具有右主动脉弓的 $IIA^{-/-}$ 突变体的右侧视图, 并且降主动脉(rda)弯向气管(t)的右侧, 产生分开的右颈动脉(rc)、右锁骨下动脉(rs)和左颈动脉(lc)。大 PDA 连接肺动脉和降主动脉(rda)。**K** - 在 $IIA^{-/-}$ 突变体中, 阻断主动脉弓。注意在左颈动脉(ic)和左锁骨下动脉(ls)之间的主动脉弓缺失(用虚线划出)。**L** - 食管后(retro-esophageal)左锁骨下动脉(res)起自右降主动脉(rda)和行经于食管(e)和气管后面。

图 7 $IIA^{-/-}$ 胚胎中缺损的 BMP 信号传导

A - 在 E9.5 $IIA^{-/-}$ 胚胎(右框图)中的用 BMP2 核糖核酸探针(ribo probe)的 WISH 显示, 在心脏, 包括房室内膜垫和前心外膜器官(PEO)中 BMP2 表达减少。**B** - 用 BMP4 核糖核酸探针的 WISH 还显示, 在 $IIA^{-/-}$ 胚胎的心室、心房和 PEO 中 BMP4 表达减少(右框图)。**C** - 用 TGF β -2 核糖核酸探针的 WISH 显示, 在 AV 内膜垫和 PEO 中减少表达(右框图)。**D** - 在 E13.5 心脏中, 抗 BMP2 蛋白(上框图)和 BMP4 (下框图)的免疫组织化学显示, 在 $IIA^{-/-}$ 突变体中, 蛋白质表达没有显著变化(右上框图和下框图)。**E** 在来自 E13.5 胚胎的系列片段中, 抗磷酸化的 Smad1 (p-Smad1)免疫组织化学。在 $IIA^{-/-}$ 突变体(第三框图和第四框图)中, 用 p-Smad1 染色的核的数量在整个心脏, 特别是在右心室(RV)和心室间隔膜(IVS)中显著减少。**F** - 在野生型心脏中, IIA 、BMP2 和 BMP4 蛋白的共同定位。在 E8.5 中(第一排), IIA 蛋白和 BMP 蛋白共同定位于心内膜和心肌的 ECM。在 E9.5 回路心脏的 OFT 中(第二排), BMPs 和 IIA 蛋白仍共同定位于心肌的 ECM, 但是在心内膜衬中的 BMP 表达丧失。在同一的心脏的初始左心室中(第三排), BMPs 和 IIA 共同定位于心肌的 ECM。

图 8 $IIA^{-/-}$ 胚胎中缺损的 $Nkx2.5$ 表达

A - 用 $Nkx2.5$ 核糖核酸探针的 WISH。在 E9.5, $IIA^{-/-}$ 心脏中的 $Nkx2.5$ 表达显著减少(第二列)。E9.5 心脏的横断面显示, 突变体心脏大小缩减和单个细胞中 $Nkx2.5$ 表达的减少(第四列)。**B** - 用 *Col2a1*

核糖核酸探针的 E8.5 胚胎的 WISH, 检测基因的转录和确认 IIA 和 IIB mRNAs。在 IIA^{-/-}突变体中(右框图), 在心脏中检测到减少的信号, 尽管对 *Col2a1* 的外显子 2 的靶向性缺失不应影响基因的转录。C. 使用 VISTA 程序, *Col2a1* 基因座的比较基因组学识别基因的上游序列的三个保守的未编码区。D. 一个区(C 区)含保守的 Nkx2-5、GATA4 和 SRF 位点。E. *Col2a1* 基因座的顶部图表显示, 基因的转录启动子的三个(A、B、C 区)保守的未编码的上游序列的位置, bSY1 是 bac 克隆(61 F08)的修饰(modification), 后者含具有以 LacZ 基因插入基因的外显子 1 中的完整的 *Col2a1* 基因。中间一排, 典型的 bSY1 转基因胚胎的 X-gal 染色显示, 在心脏中的强的表达, 下面一排, 为 bSY2^{nkx-neo} 8.5dpc 胚胎。在 bSY1 胚胎中, 心脏中的深蓝色染色概括内源性的 *Col2a1* 表达模式。底排, 为在 bSY2^{nkx-neo} 胚胎中, 通过将 neo 基因插入到 Nkx2.5 位点, 在 *Col2a1* 的 5' 调节区上的 Nkx2.5 结合位点的缺失, 导致心脏的 lacZ 表达的取消。

图 9. 在心血管形态发生过程中 IIA 前胶原在 Nkx2.5 调节回路中的作用的作用的简述

一旦建立收缩的、直线的心脏管, OFT 的回路形成和延长还涉及增加从心半月瓣和心脏前区(anterior heart field)的心脏原始(progenitor)细胞和通过心脏神经嵴细胞的最终参与。在此阶段, 启动调节回路, 在那里通过调节 *Col2a1* 基因, 增强 Nkx2.5 或保持 IIA 前胶原的产生。IIA 前胶原依次用作促进剂, 螯合 BMP2 配体, 呈现对 BMP 受体的形态发生素, 并因此增加这些原始细胞的发育所必需的 BMP 信号传导。应注意还不知道 IIA 前胶原和 BMP 复合物如何通过蛋白酶(诸如弗林样(furin-like), tolloid)加工以释放 BMP 与受体相互作用。核易位和使 BMP 应答的磷酸化 smads - Co-smad 4 复合物与在 Nkx2.5 的 5' 调节区上的 smad 应答元件结合, 促进 Nkx2.5 的转录和翻译。Nkx2.5 依次激活 *Col2a1* 并且因此完成调节回路。此调节回路可能还包括 GATA 和 SRF 转录因子的组合相互作用。已知 GATA4 和 Smad4 协

同反式激活(cooperatively transactivate) Nkx2-5, 而 GATA6 已经显示调节 Nkx2-5 (在 Patient RK, McGhee, JD, Curr Op Gen Dev 12:416-422 (2002); Peterkin T 等 Sem Cell Dev Biol 16: 83-94 (2005)中综述)。

Nkx2-5 还显示在加强调节网络中调节 GATA6 {Molkentin, J. D.等. Direct activation of a GATA6 cardiac enhancer by Nkx2.5: evidence for a reinforcing regulatory network of Nkx2.5 和 GATA transcription factors in the developing heart. *Dev Biol* 217, 301-9 (2000).}。SRF 可与 GATA4 或 Nkx2-5 相互作用以激活心肌细胞中的基因。注意出现保守的 *Col2a1* 增强子元件中的 SRF、GATA 和 Nkx2-5 结合位点(图 8.C-D)。

发明详述

在小鼠胚胎发生的过程中, 小鼠 $\alpha 1$ (II)胶原基因(*Col2a-1*)在许多非软骨组织诸如脊索、神经视网膜、尾腱、心脏、外胚层表面、颅盖的间充质、胎脑、内耳的感觉上皮细胞和形成肢芽的顶外胚层脊中短暂表达。对外显子 2 的可变剪接产生或者包括(IIA mRNA)或排除(IIB mRNA)该外显子的 II 型前胶原 mRNAs。IIA 型 mRNA 在 9.5 天龄胚胎的心房和心室的心肌外膜细胞中均含量丰富, 但是在 10.5 天即迅速减少。12.5 天后, IIB mRNA 水平迅速升高并最后超过 IIA mRNAs。到了 16.5 天, IIB mRNAs 主要为 *Col2a-1* 转录物, 主要在成熟中的软骨细胞中表达。

为了了解 IIA 的功能, 基因靶向技术被用于胚胎干细胞, 以产生只能产生没有外显子 2 的 *Col2a-1* mRNA 的突变小鼠。非常有说服力的证据显示, IIA 在心脏形态发生中, 通过调节 BMP 和 TGF β 信号传导, 起着重要的的作用。缺乏 IIA 的小鼠显示具有某些人先天性心脏病的许多特征的多发性心血管畸形。因为严重表型的可变的外显率, IIA 突变体与 C57B16 背景(6 代)回交。这些 *IIA*^{-/-} 突变体的遗传背景主要是 C57/BL6 背景(约为 90-95%), 而 129Sv 和 ICR 背景的影响较少。对 *IIA* 无效突变(*IIA*^{-/-})的小鼠纯合子显示, 在心脏形成模式和形

态发生中的缺损，与那些 BMP、TGF- β 和结节信号传导途径功能的缺失有关的那些相似，并且死于围产期的心血管机能不全。心脏缺损的疾病谱包括心室隔膜缺损 (VSD)、动脉导管未闭(patent ductus arteriosus)(PDA)、动脉干永存(persistent truncus arteriosus)(PTA)、右心室肥大、伴有或不伴有锁骨下动脉的异常起源(anomalous origins)的右主动脉弓，与 VSD 有关的、其中主动脉和肺动脉全部出现的或与右心室分得很开的双出口右心室(DORV)，大动脉移位(TOGA)，以及伴原发的(primum)心房隔膜缺损的心内膜垫缺损。BMP/TGF β 信号传导活性和 *Nkx2.5* 的表达在 IIA-/-突变体心脏中都减少。发明人显示 *Nkx2.5* 调节 *Col2a1* 基因，其相反地，在 *Nkx2.5*-无效突变体中向下调节。发明人的发现表明，细胞外基质蛋白诸如前胶原 IIA 有新的作用，其通过经由调节回路的 BMP 介导的信号传导，用调节心脏转录因子活性来调节心血管形态发生。前胶原 IIA 缺乏可加重某些常见的先天性心脏病。多数突变体胚胎有 DORV 三联症，不完全 TOGA 和肺动脉下的 VSD，结果与人的 Taussig-Bing 畸形(Taussig-Bing 畸形)相一致。Taussig-Bing 畸形是罕见但严重的紫绀性先天性心脏病复合症，由 Pernkopf 于 1920 年首先描述并随后由 Helen Taussig 和 Richard J. Bing 在 1949 年描述。³⁰ 其遗传性传送和分子缺损的模式尚未被系统研究过。此 IIA 突变体系因此可用作 Taussig-Bing 畸形的新的动物模型。

在产生这些 IIA 无效突变体中，也产生包括 C57/BL6、129Sv、ICR 的具有混合的遗传背景的能生长发育的 IIA7-小鼠系(此后指的是 191-IIA)。这在纯合子杂交的第 5 代。在第 2 代，19 只动物中的 12 只在出生后很快死亡。在第 3 代产出的 28 只动物中，6 只在 2-8 个月间过早地死亡。有趣的是，在那些所显示的过早死亡的动物中，雄性占多数(图 1)。以下观察由有限的尸检结果作出：

- 伴心房扩大和增加右和/或左心室壁厚度的心脏肥大(图 1, 2C, 2D)

- 具有非典型核的多细胞结构，主要是在小间隙(图 2F, 4A-C)
- 心肌细胞杂乱排列和大小不一，具显著的细胞肥大(图 2F, 4A-D)
- 瓣膜纤维化(图 3B, D)
- 没有广泛的心肌坏死或纤维化
- 没有流出道或主动脉弓畸形
- 心肌细胞肥大和杂乱排列的严重程度似乎与缩短的生存期相关(比较图 2F 与图 4A, B 和 D)。

因为在胎儿和/或出生后发育期间的心肌细胞增殖和生长失调，这些成年 191 Co/IIA^{-/-}小鼠发展为心肌病。一种可能的机制是，在关键的心脏形态发生期的 IIA 前胶原的缺乏，扰乱(perturbs)在不同的胶原同种型中的精细的平衡和改变了胎儿/新生的/成年心脏中的细胞外基质成分。众所周知，包含在 IIA mRNA 中的 II 型胶原基因(*Col2a-1*)的外显子 2，编码富含半胱氨酸的球形域，后者在体外试验中显示，结合骨形态发生蛋白(如 BMP2)和转化生长因子(TGF)- β 1。此在心脏基质中的改变依次可扰乱 BMP2 和 TGF- β 的固有的局部梯度，并通过影响肌原纤维节装配(sarcomeric assembly)和/或信号传导可改变心肌细胞的收缩性。

临床研究已经证实心脏肥大是主要心血管活动(cardiac events)诸如心肌梗塞、心力衰竭、心脏性猝死和卒中的主要风险因素。^{31, 33} 该突变小鼠系可用于筛选用于治疗作为猝死和心力衰竭的主要风险的巨大心脏肥大的潜在药物。例如，可给予成年 191-IIA 小鼠药物 X 或安慰剂。经 4 周的治疗后，两组 191-IIA 小鼠被处死且用组织学技术检测心脏肥大中变化的程度。在该突变小鼠系中诱导的心肌梗塞作为筛选用于对抗心室重建和恶性心律失常的潜在药物的平台将是有益的。在该案例中，结扎 191-IIA 小鼠的冠状动脉以诱导心肌梗塞。一组接受药物 X，而另一组接受安慰剂。两组均具有可植入的遥感测定装置以评价恶性心律失常的发生。两组均具有连续的超声心动图

以评价心脏功能方面的任何变化。药物治疗结束时，两组动物均被处死且用石蜡包埋它们的心脏、系列切片、苏木素和曙红染色和三色(trichrome)的Mason's染色处理。检测这些心脏切片，以便了解与心室重建以及细胞杂乱排列和肥大相关的几何学变化。

TGF- β 和 BMP 信号传导在心肌病的发展中的作用：

众所周知，包含在 IIA mRNA 中的 II 型胶原基因(*Col2a-1*)的外显子 2，编码在前- $\alpha 1$ (II)胶原链的氨基-前肽中的富含半胱氨酸的球形域。在体外试验中显示，所述富含半胱氨酸的域结合骨形态发生蛋白(如 BMP2、BMP4、BMP7)和转化生长因子(TGF)- $\beta 1$ 。已经显示，TGF β 超家族的成员和下游效应物在心脏发育(表 1 中的实例)，特别是在心肌细胞分化、瓣膜发生和流出道和隔膜发育多方面中起着重要的作用。TGF- $\beta 1$ 在出生后的心脏中具有不同的生物学活性。它控制主要组织相容性复合物的表达，减少由心脏成纤维细胞产生的细胞外基质蛋白，调节血管平滑肌细胞表型，导致心脏肥大和增强 β -肾上腺素能的信号传导。关于在出生后哺乳动物心脏中的 BMPs 作用的信息有限。在新生大鼠心肌细胞培养中，BMP-2 通过激活 Smad1 途径发挥抗细胞凋亡作用和通过激活磷脂酰肌醇 3 激酶途径增强收缩性。因此，成年 191-IIA 突变小鼠为用于继发于 BMP/TGF 信号传导的失调的心肌病的非常重要的模型。191-IIA 突变体是筛选潜在的药物的有用的模型，无论它是药物或基因疗法，均靶向 BMP/TGF 诱导的对细胞肥大的 Smad 信号传导途径和增殖。这样的候选药物可为配体捕获物(traps)、BMP 或 TGF- β 激动剂、受体拮抗剂或 Smads 蛋白。这样的药物试验的终点将为(1) 改善或消除心脏肥大和(2)延迟存活期。

TGF- β 和 BMP 信号传导在原发性肺动脉高压中的作用：

原发性肺动脉高压(PPH)是一种进行性和致命性疾病，其静息时平均肺动脉压大于 25 mmHg 或 30 mmHg，在不存在左侧的心脏疾病、慢性血栓栓塞性疾病、潜在的肺疾病或其它继发性病因中发挥作用。

它是一种罕见的病症，常常侵袭青年人，特别是三十岁左右的女性，导致进行性右心力衰竭甚至死亡，其存活中值 2.8 年。PPH 以关联血管丛损伤、中间肥大、内膜纤维化、纤维样退行性变性和血栓形成损害的前毛细管的小肺动脉阻塞为特征。与原发性肺动脉高压有关的症状常为非特异性的，包括呼吸困难、心悸、疲劳、胸痛、近乎晕厥(near-syncope)、昏厥、外周性水肿，因而正确的诊断常延误作出。标准的疗法包括抗凝、钙通道阻滞剂、前列腺环素输注，以及在难以控制的病例中，进行肺移植术和心房的房隔造口术。其它正在试验的药物包括吸入的或口服的前列腺环素类似物、磷酸二酯酶抑制剂、内皮素(endothelin)-1 受体拮抗剂和 L-精氨酸。主要的发病机理认为是涉及到平滑肌和内皮细胞增殖失调，而非不正常的血管收缩。³⁴ 遗传分析显示有害的 BMP (BMPR2) 的 II 型受体中的杂合性突变存在于多数家族和最高达 26% 的原发性肺动脉高压零星病例中。^{24, 25, 35} 另外，在 9% 的服用食欲抑制剂芬氟拉明和右芬氟拉明后的已发展为肺动脉高压的患者中，发现在 BMPR2 中有突变。³⁶ 最近，发现在 TGF- β 受体的成分 ALK-1 中的突变最常见于遗传性出血性毛细血管扩张和肺动脉高压的患者中。³⁷

许多实验数据证实，缺损的 TGF- β 和 BMP 信号传导在肺动脉高压的发病机理中起关键作用。例如，在平滑肌中表达显性的-阴性的 BMPR2 的转基因小鼠发展为肺动脉高压。³⁸ 当 BMP-2 增强正常人肺血管平滑肌细胞的凋亡，来自 PPH 患者的原代动脉平滑肌细胞，显示出应答于 BMP 和 TGF-p 的不正常的生长。^{39, 40} 在一个实施方案中，191-IIA 小鼠将用作 PPH 的静态模型(stand model)以筛选靶向肺血管平滑肌细胞和内皮细胞中 BMP/TGF 诱导的 Smad 信号传导途径的潜在的药物，无论它将是药物或基因疗法。这样的候选药物可为配体捕获物、BMP 或 TGF-P 激动剂、受体拮抗剂或 Smads 蛋白。这样的药物试验的终点将为(1) 改善或消除在 PPH (如，丛源性

(plexogenic)或血栓形成性腺病)中发现的病理, 和(2) 改善或消除右心室肥大, 及(3) 延长存活期。

TGF- β 和 BMP 信号传导在瓣膜纤维化中的作用:

IIA 胶原在胚胎发育的关键时期的短暂的缺乏导致半月瓣和房室瓣膜纤维化。近些年的研究已经明显地确定 TGF- β 和 BMPs 在发育过程中的瓣膜发生中的关键作用。目前, 外科手术修补、瓣膜置换和球囊瓣膜切开术, 对于主动脉狭窄和二尖瓣狭窄(两者均存在纤维变性、伴小叶机动性降低的经常钙化的瓣膜), 仍然是唯一的治疗选择。191-IIA 小鼠将作为静态模型以开发新的非外科手术疗法, 用于退行性瓣膜疾病的治疗。将靶向 TGF- β 和 BMP 信号传导途径的药物给予 191-IIA 小鼠并且筛选它们的抗纤维变性的效用。

血液动力学的变化特点和确定在成年 191Co/IIA-/-小鼠猝死中的机制:

1) 突然死亡的成年 191Co/IIA-/-小鼠的尸检分析

a) 光学显微镜法

顺着心脏的特定的轴, 将心、肺和主动脉的石蜡包块切片, 进行 H&E 染色和 Mason's 三色染色处理并分析其炎性浸润、病理性肥大和组织间隙的纤维化。

b) 电子显微镜法

通过透射电子显微镜检测心脏切片, 以描绘肌原纤维和细胞外基质中的任何超微结构缺损。

2) 心血管功能性评价

在 191 Co/IIA-/-小鼠中发现的心脏肥大可由肌细胞肥大、增生、伴腔室扩张的心肌纤维化或浸润性疾病引起。为了定义心脏肥大的临床过程和阐明猝死的机理, 发明人计划平行研究 191 Co/IIA-/-小鼠和野生型同窝出生的小鼠。杂合性 191 CoI-IIA+/-小鼠由 191 Co/IIA-/-小鼠与 ICR 小鼠回交一轮产生。野生型同窝出生的小鼠源于杂合性

杂交。由于猝死的模式在不同年龄组可不同，所以以下的研究将在2个月龄和8个月龄的小鼠中实施。

a) 用超声心动图(ECHO)测定腔室大小和功能

将进行连续的经胸廓的 ECHO，以测定左和右心室腔室的大小、壁厚度、心脏收缩的功能和明显的瓣膜疾病的表现。

b) 评价系统性高血压

肥大、纤维化或腔室扩张可为高血压性心脏疾病或瓣膜疾病的临床表现。用尾套法(cuff-tail)获得连续的血压测量。这种非侵入体内的方法使得人们可按时间纵向研究这些小鼠的高血压的发展。

c) 心脏性心律失常的评价

由于机理至今未明，肥大、纤维化和左心室功能不全常常导致为心脏性猝死主要病因的恶性心律失常。为了消除作为猝死的潜在病因的恶性心律失常，用来自 Data Sciences International 的微型遥感装置监控 IIA^{-/-}小鼠和野生型同窝出生的小鼠的心脏节律。

d) 左心室收缩性和顺应性的测定

细胞外基质成分和心肌细胞构造的任何变化将总是侵袭心脏的球状收缩性能。为了测定心脏收缩的收缩性和舒张性顺应性中的任何变化，将在非恢复性手术中使用来自 Millar 的专门的电导导管以产生左心室压-体积回路。

e) 肺动脉高压的评价

在这些过早死亡的 IIA^{-/-}小鼠中的一个一致的结果是右心室壁厚度增加。合并细胞过多和肥大可解释这个结果。右心室肥大可为原发性心肌疾病或继发于肺动脉高压的表现。为了消除肺动脉高压，通过插入单腔式导管(0.25mm O.D.)，以弯曲的顶部从右颈静脉直通右心房、三尖瓣和右心室进入主肺动脉，直接测量肺动脉压。检测肺切片以了解与肺动脉高压，诸如气道脉管系统的中间肥大和肺纤维化有关的显微变化。

成年 Co/IIA^{-/-}小鼠心脏细胞和分子缺损的测定。

鼠科动物的心肌细胞在出生后头三周时间内连续以低速率增殖。

⁴² 更近期的形态测量学分析已证实，小鼠心肌细胞在出生后头4天连续分化和在第5天和第14天间体积增加。14天后，单个的心肌细胞体积连续增加，虽然是以比较慢的速率，但最终于3个月龄时达到成年的大小。⁴³ 可能在191 Co/IIA-/-小鼠中这种从增殖到发育性生长的转变点已移位。因此，这部分研究集中在2、5和8个月龄的成年小鼠上。如果心肌细胞肥大是突出的特征，则从比较早的时间点检测心脏，以测定出生后何时开始病理性肥大。所有用于切片(1)、(2)和(4)的试剂为商业上可获得的。用于细胞外基质蛋白的特征鉴定的抗体或者是商业上可获得的或者可通过发明人的海外同事获得。

1) 心肌细胞肥大

a) 形态测量学分析

i) 增加的壁厚度可由于心肌细胞大小增加(肥大)、肌细胞和/或非肌细胞密度增加(增生)，和/或由浸润过程的组织间隙的空间增加所致。为了确定是否存在肌细胞肥大，将HA-/-小鼠和其性别匹配的野生型同窝出生的小鼠于2个月龄处死，称取体重和心脏重量，测量胫骨长度。将确定LV或RV/体重比率和LV/RV比率。为了进行组织学分析，将1 mL的氯化钙0.1 M注入下腔静脉(inferior cava)以达到心脏停搏于舒张期，用磷酸盐缓冲液以100 mmHg、随后用3.7%的甲醛溶液逆行灌注动物。将停搏的心脏在4%的多聚甲醛中固定2个小时至24个小时，石蜡包埋切片。

ii) 为了测定心肌细胞的密度和大小，将用概述心脏肌纤维膜的FITC-层粘连蛋白(laminin)抗体和碘化丙锭(propidium iodide)(PI)免疫荧光双标处理心脏切片。为了测定左和右心室的单个心肌细胞的尺寸和体积，将使用由Leu和其合作者开发的方法分离单个心肌细胞。⁴³ 简言之，将来自或左或右心室的一条心肌固定于板上，并且在钙通道阻滞剂维拉帕米的存在下，将进行胶原酶消化。经轻轻磨碎，单个心肌细胞以棒状细胞形式被释放出来。将这些细胞平铺于明胶覆

盖的薄片上和用肌节 α -肌动蛋白抗体处理以用于免疫荧光标记。将测定每个细胞肌节的排列(arrangement)以及密度。该方法还允许心肌细胞从右心室的选择性分离并将在这些细胞中评定细胞肥大的存在是非常有用的。

iii) 使用激光共聚焦显微镜和 3-D 成像重建程序测量细胞体积。

b) 收缩性蛋白的改变

用心脏溶解产物的免疫印迹法分析肌球蛋白重链、肌球蛋白轻链、原肌球蛋白、肌钙蛋白 T 和肌动蛋白的水平。

c) “胎鼠”基因的再激活

压力超负荷所致的心脏肥大与“胎鼠”基因的再激活有关。因此，用 RT-PCR 对 ANP、BNP、 α -骨骼肌动蛋白、 β -MHC 和 SERCA 的表达进行定量。

d) 肥厚型信号传导途径

促细胞分裂剂(mitogen)激活的蛋白质(MAP)激酶是心脏肥大的主要介体之一。涉及 p38 MAPK, ERK1/2 和 INK 磷酸化的 MAPK 途径的激活，用蛋白质印迹分析法测定。

e) 细胞凋亡

对于尸检结果的一种可能的解释是，心肌细胞凋亡和细胞周期调节改变了。肥大可以作为对细胞凋亡的补偿性反应形式发生。为了确定细胞凋亡在成年 IIA^{-/-}小鼠中是否增强，将对 2 个月龄小鼠的心脏切片进行原位 TUNEL 染色。

2) 增生

a) 肌细胞对非肌细胞

如果 PI 染色表明密度增加，发明人将通过分别用波形蛋白、平滑肌 α -肌动蛋白或肌节 α -肌动蛋白抗体双重标记鉴别正在增殖的成纤维细胞、肌纤维细胞和心肌细胞。

b) 心肌细胞增生

i) 一旦心肌细胞增生，则问题是在成年 191 Co/IIA-/-小鼠中，心肌细胞 DNA 合成和有丝分裂是否增强。安乐处死 2 个月龄小鼠前 4 个小时，经腹膜内注射 BrdU，处理心脏用于以抗 BrdU 和抗肌节 MHC (MF20) 抗体间接免疫荧光标记。另外，通过使用磷酸-组蛋白 H3 单克隆抗体，鉴别有丝分裂的细胞。

ii) 如果存在心肌细胞增生，则分离永久细胞系并通过对成年 IIA-/-心脏的心肌细胞的酶促分裂建立。这样的细胞系对于研究心肌细胞中的细胞周期调节是有用的工具。

3) 心脏细胞外基质中的改变

如果存在左和/或右心室肥大，紧要的是确定心脏中的胶原总含量、同种型和分布是否有任何变化。因为心脏细胞外基质成分的改变可在出生时存在或可应答于机械性压力，新生鼠和成年心肌均要检测。用于细胞外基质蛋白的特征鉴定的抗体或者是商业上可获得的或者可通过发明人的海外同事获得。

a) 胶原含量和同种型

i) 通过测量羟脯氨酸浓度，分别测定左心室、隔膜和右心室中的总胶原含量。

ii) 通过免疫组织化学法测定 I-V 型和 VI 型的空间分布和蛋白质表达水平。

iii) 通过天狼星红-偏振光(Sirius red-polarization)方法了解 I 型和 III 型胶原的分布模式。当心脏切片被用天狼星红染色时，I 型胶原显示为稠厚的、强烈折射的、黄色或红色的纤维，而 III 型胶原则显示为薄的、弱折射的绿色纤维。

iv) 透射电子显微镜证实了得自天狼星红方法的结果并且认可细胞外基质的不同成分和周围细胞之间关系的最高分辨率的检查。

v) 为了确定 I 型和 III 型胶原含量改变是否是由于 IIA 型缺失所致，在不同的时间点进行定量的实时 TaqMan RT-PCR。因为 mRNA

可能不反映蛋白质水平甚或表达，对心脏溶解产物进行蛋白质印迹分析以使转录物和蛋白质之间的表达水平相关联。

vi) 为了确定出生后心脏中的 IIB 型前胶原是否有不正常的异位表达，使用 II 型胶原抗体进行蛋白质印迹分析。在 IIA-/-小鼠中，免疫反应带显示 IIB 前胶原单独地存在。

b) 非胶原成分的分布

通过免疫组织化学、原位杂交、蛋白质印迹和定量 RT-PCR，检测层粘连蛋白、肌原纤蛋白、蛋白聚糖(双糖链蛋白聚糖、饰胶蛋白聚糖(decorin)和纤调蛋白聚糖(fibromodulin))和纤连蛋白的分布和表达水平。

4) TGF- β /BMP 信号传导途径在成年心肌中的完整性

a) TGF- β 同种型表达

近期的人和动物研究显示，在心脏肥大和心肌的纤维化的背景下心肌的 TGF- β 1-3 增加。因此，如果存在肥大或纤维化，进行定量 PCR 以确定 TGF- β 升高的时间进程和量值以及用免疫组织化学定位 TGF- β 同种型在小间隙中的表达。

b) 由于 Co/IIA 基因的靶向缺失，BMP2 和 TGF- β 1 结合富含半胱氨酸的域失去，因而在机理上重要的是，确定成年心脏病理是否为扰乱 TGF- β /BMP 信号传导途径的结果。

i) 通过用抗 Smads 1/5/8 或 2/3 的总的或磷酸化的形式的抗体，对心脏细胞质和核进行蛋白质印迹分析，测定 Smads 1/5/8 或 2/3 的蛋白质表达水平、磷酸化状态和核易位。

ii) 用同样的一批磷酸-Smads 抗体，在得自 IIA-/-和+/+同窝出生的成年小鼠心脏切片上进行免疫组织化学测定，以证实磷酸-Smads 1/5/8 或磷酸-Smads2/3 和 Co-Smad4 复合体的核易位。分析将集中在与心肌肥大/增生的存在相关的核共同定位的流行率上。如果没有检测到核共同定位，用定量 PCR 和免疫印迹法测定受侵袭的和非受侵袭的成年 191 Co/IIA-I-小鼠的心脏中的 I 型和 II 型受体(TpR-II)，

BMPR-II, ALK 1-2,3,5 和 6)、Co-Smad 4 和抑制性 Smads 6 和 7 的表达水平。

除了在细胞内水平的潜在的缺损, 通向它们的特异性受体的 TGF- β 1 和 BMP-2 配体的途径, 可被称为配体捕获物的蛋白质的大家族侵袭。

5) 确定心肌病的机理的微阵列分析

为了了解导致这些心脏缺损的分子事件, 使用微阵列技术以分析在 191 Co/IIA-/-心脏中的基因表达的模式。除了 TGF/BMP 信号传导途径的改变, 在 191 Co/IIA-I-心脏中有许多种类的基因受到影响, 所述基因包括编码细胞外基质蛋白、细胞周期调节剂、收缩性和细胞骨架蛋白、离子通道和肌肉-特异性转录因子的基因。微阵列技术被选择用于候选基因途径, 因为前者使全基因组(genome-wide)以高效的和定量的手段同时筛选许多 mRNAs 中的改变。在此实例中的微阵列分析可测定细胞外基质与心肌细胞之间复杂的相互作用。基因表达谱(profiles)的时间依赖性变化对腔室-特异性的变化具有重要性。在三个不同的时间点检测基因表达谱: 胚胎第 15.5 天、新生儿 1 周和青年成年期(2 个月)。选择这三个时间点, 是因为在 E15.5, 心脏形态发生已完成并且有从右心室清晰的解剖学分开的左心室。在出生时存在主要血液动力学的改变并且同种型转换发生在应答于此血液动力学移动的主要的收缩性蛋白中。然而, 因为鼠科动物心肌细胞在出生后头三周中以低速率连续增殖, 检测基因表达谱超出(beyond)从增殖到发育生长的此转换点。因为腔室规格(specification)(即左对右心室)由不同组的基因转录调节和因为在 191 Co/IIA-/-小鼠中存在明显的右心室肥大, 将这三个时间点的基因表达谱在左和右心室之间比较。(实施例: 表 2)

表 2

组	胚胎第 15.5 天	出生后第 3 天	成年 2 个月 龄

野生型	左心室	左心室	左心室
191 Co/IIA-/-	左心室	左心室	左心室
野生型	右心室	右心室	右心室
191 Co/IIA-/-	右心室	右心室	右心室

因此, 本发明提供用于产生突变的前胶原 IIA (Col2A-1) 转基因小鼠的方法, 所述方法包括以下步骤: a) 通过在小鼠胚胎干细胞中的同源重组, 将含有拟置换相应的内源性同源基因的突变的 Col2A-1 转基因的、基因靶向的载体, 导入小鼠胚胎干细胞中; b) 选择含突变的 Col2A-1 转基因的步骤(a)的小鼠胚胎干细胞; c) 将在步骤(b)中选择的小鼠胚胎干细胞导入小鼠胚胎中或使步骤(b)中选择的小鼠胚胎干细胞与小鼠桑葚胚聚集在一起(aggregating); d) 将在步骤(c)中的小鼠胚胎或经聚集的桑葚胚植入假孕的小鼠中, 从而形成胚胎; e) 使步骤(d)的胚胎发育至足孕, 从而产生嵌合建立者(chimeric founder)转基因小鼠; 和 f) 使步骤(e)的嵌合建立者转基因小鼠与野生型小鼠杂交, 从而产生突变的 Col2A-1 转基因小鼠。突变的 Col2A 转基因缺乏编码针对 BMP-2 或 TGF- β 1 的富含半胱氨酸的结合域的外显子 2。本发明也提供上述转基因小鼠。

本发明还提供产生无效突变小鼠(IIA-/-)的方法, 所述方法包括使突变的 Col2A-1 转基因小鼠与小鼠的远系繁殖的品系(C57BL6)回交(backcrossing)。无效突变小鼠显示多发性心血管畸形, 人先天性心脏缺损或在心脏形成模式和形态发生中类似于那些与缺失 BMP、TGF β 与结节信号传导途径功能相关的缺损的特征。心脏缺损复合症包括心室隔膜缺损(VSD)、动脉导管未闭(PDA)、动脉干永存(PTA)、右心室肥大、伴有或不伴有锁骨下动脉的异常起源的右主动脉弓, 和伴有关联的 VSD 的、其中主动脉和肺动脉全部出现的或与右心室分得很开的双出口右心室(DORV), 大动脉移位(TOGA)、畸形的冠状动脉以及伴原发性心房隔膜缺损的心内膜垫缺损。该突变小鼠系代表人

的罕见但严重的紫绀性先天性心脏病复合症，一种 Taussig-Bing 畸形的新的遗传模型。本发明也提供上述转基因小鼠。上述转基因小鼠可以是称为 191-IIA 的小鼠品系或具有类似表型的转基因小鼠。这样的表型包括左或右心室的肥大、心肌细胞肥大和杂乱排列，具有非典型核的多细胞结构、瓣膜纤维化和缺乏广泛的心肌坏死流出道畸形和鳃状弓(branchial arch)畸形。

本发明还提供使用 191-IIA 小鼠确定用于治疗心脏疾病的药物的方法，所述方法包括以下步骤：a) 将药物给予第一组成年 191-IIA 小鼠；b) 将安慰剂给予第二组成年 191-IIA 小鼠；c) 检测步骤(a)的组和步骤(b)的组的一种或多种下列症状：心脏肥大、心脏增生、瓣膜纤维化、心脏功能、连续血压和心脏、恶性心律失常以及右和左心室中的基因表达谱的时间依赖性变化；和 d) 比较步骤(c)中的测量结果(measurements)以确定该药物是否能治疗心脏病。治疗可为药物治疗和基因治疗，这些治疗是针对 BMP/TGF 相关分子和诱导的对细胞肥大的 Smad 信号传导途径的。所述药物可为天然存在的化合物或其纯的衍生物、合成的化合物、配体捕获物、BMP 或 TGF 激动剂、受体拮抗剂、Smad 家族蛋白，或病毒或非病毒载体。

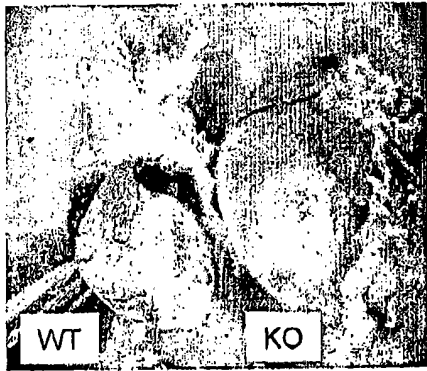
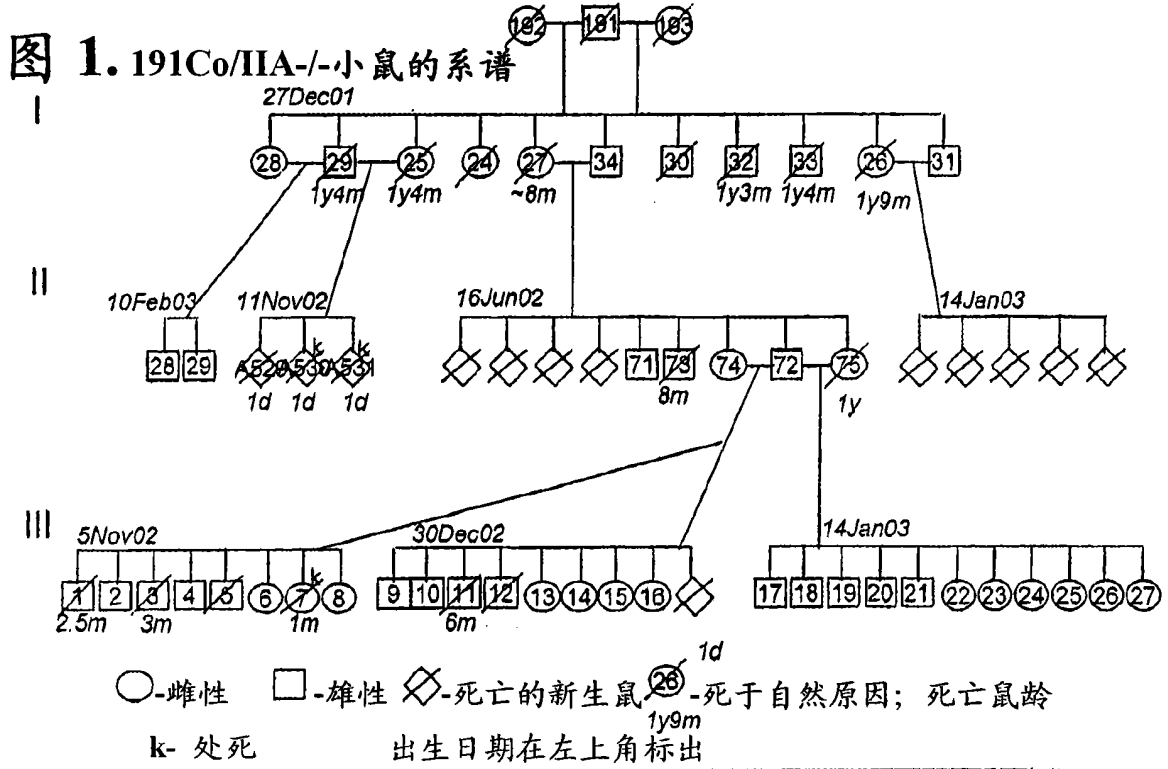
本发明还提供来源于 191IIA 小鼠心脏组织或那些 IIA-/-小鼠胚胎的心脏组织的细胞系。

本发明还提供使用前胶原 IIA 或其衍生物以用滴定法测定胚胎心肌细胞中关键心脏转录因子诸如 Nkx2.5 和 GATA4 表达水平的方法。

参考文献

1. Zheng ZJ, Croft IB, Giles WH, Mensah GA. Circulation 2001; 104:2158-63.
2. Virmani R, Burke AP, Farb A. Cardiovascular Pathology 2001; 10:211-218.
3. Maron BJ, McKenna WJ, Danielson GK, et al. Journal of the American College of Cardiology 2003; 42:1687-1713.
4. Maron BJ. N. Engl. J. Med. 2003; 349:1064-1075.
5. Fatkin D, Graham RM. Physiol. Rev. 2002; 82:945-80.
6. Weber KT, Sun Y, Tyagi SC, Cleutjens JP. J. Mol. Cell. Cardiol. 1994; 26:279-92.
7. de Souza RR. Biogerontology 2002; 3:325-35.
8. Medugorac I. Res. Exp. Med. (Berl) 1980; 177:201-11.
9. Honda M, Yamada S, Goto Y, et al. Jpn. Circ. J. 1992; 56:392-403.
10. Gardi C, Martorana PA, Calzoni P, et al. Experimental and Molecular Pathology 1994; 60:100-107.
11. Cheah KS, Au PK, Lau ET, Little PF, Stubbs L. Mamm Genome 1991; 1:171-83.
12. Wood A, Ashhurst DE, Corbett A, Thorogood P. Development 1991; 111:955-68.
13. Rahkonen O, Savontaus M, Abdelwahid E, Vuorio E, Jokinen E. Histochem. Cell. Biol. 2003; 120:103-10.
14. Potocki L, Abuelo DN, Oyer CE. Am. J. Med. Genet. 1995; 59:295-9.
15. Zhu Y, Oganessian A, Keene DR, Sandell LJ. J. Cell. Biol. 1999; 144:1069-80.
16. Shi Y, Massague J. Cell 2003; 113:685-700.
17. Zwijsen A, Verschueren K, Huylebroeck D. FEBS Lett 2003; 546:133-9.
18. Delot EC, Bahamonde ME, Zhao M, Lyons KM. Development 2003; 130:209-20.
19. Keyes WM, Logan C, Parker E, Sanders EJ. Anat. Embryol. (Berl) 2003.
20. Monzen K, Nagai R, Komuro I. Trends Cardiovasc. Med. 2002; 12:263-9.
21. Schlange T, Andree B, Arnold HH, Brand T. Mech. Dev. 2000; 91:259-70.
22. Izumi M, Fujio Y, Kunisada K, et al. J. Biol. Chem. 2001; 276:31133-41.
23. Ghosh-Choudhury N, Abboud SL, Chandrasekar B, Ghosh Choudhury G. FEBS Lett 2003;544:181-4.
24. Atkinson C, Stewart S, Upton PD, et al. Circulation 2002; 105:1672-8.

25. Machado RD, Pauciulo MW, Thomson JR, et al. Am. J. Hum. Genet. 2001; 68:92-102.
26. Kaartinen V, Warburton D. Nat. Genet. 2003; 33:331-2.
27. Neptune ER, Frischmeyer PA, Arking DE, et al. Nat. Genet. 2003; 33:407-11.
28. Yoshikane H, Honda M, Goto Y, Morioka S, Ooshima A, Moriyama K. Jpn. Circ. J. 1992; 56:899-910.
29. Liu X, Wu H, Byrne M, Krane S, Jaenisch R. PNAS 1997; 94:1852-1856.
30. Taussig HB B, RJ. American Heart Journal 1949; 37:551-559.
31. Haider AW, Larson MG, Benjamin EJ, Levy D. J. Am. Coll. Cardiol. 1998; 32:1454-9.
32. Harjai KJ. Ann. Intern. Med. 1999; 131:376-86.
33. Verdecchia P, Carlini G, Circo A, et al. J. Am. Coll. Cardiol. 2001; 38:1829-35.
34. Runo JR, Loyd JE. The Lancet 2003; 361:1533-1544.
35. Deng Z, Morse JH, Slager SL, et al. Am. J. Hum. Genet. 2000; 67:737-44.
36. Humbert M, Deng Z, Simonneau G, et al. Eur. Respir. J. 2002; 20:518-23.
37. Harrison RE, Flanagan JA, Sankelo M, et al. J. Med. Genet. 2003; 40:865-71.
38. West J, Fagan K, Steudel W, et al. Circ. Res. 2004.
39. Zhang S, Fantozzi I, Tigno DD, et al. Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol. 2003; 285:L740-54.
40. Morrell NW, Yang X, Upton PD, et al. Circulation 2001; 104:790-5.
41. Champion HC, Bivalacqua TJ, Greenberg SS, Giles TD, Hyman AL, Kadowitz PJ. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 2002; 99:13248-53.
42. Cluzeaut F, Maurer-Schultze B. Cell Tissue Kinet. 1986; 19:267-74.
43. Leu M, Ehler E, Perriard JC. Anat. Embryol. (Berl) 2001; 204:217-24.



191.3 雄性(3个月)



191.11 雄性(6个月)



191.73 雄性(9个月)

191.75 雄性
(12个月)



5 mm

图 2. 191.1 心脏的 H & E 染色

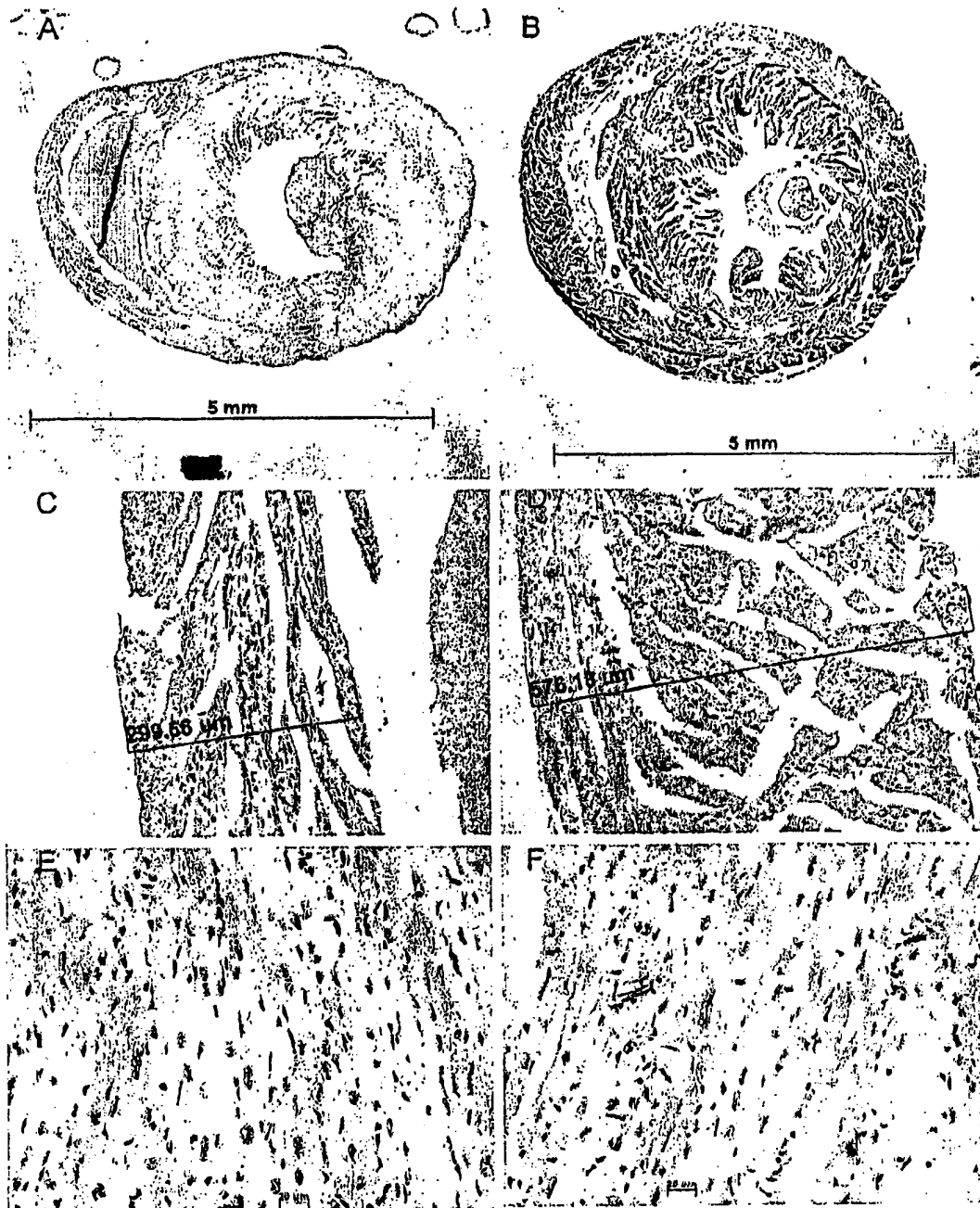


图 3. 191.3 心脏的 H & E 染色



图 4. 老年 $191\text{Co}/\text{IIA}^{-/-}$ 小鼠的 H & E 染色

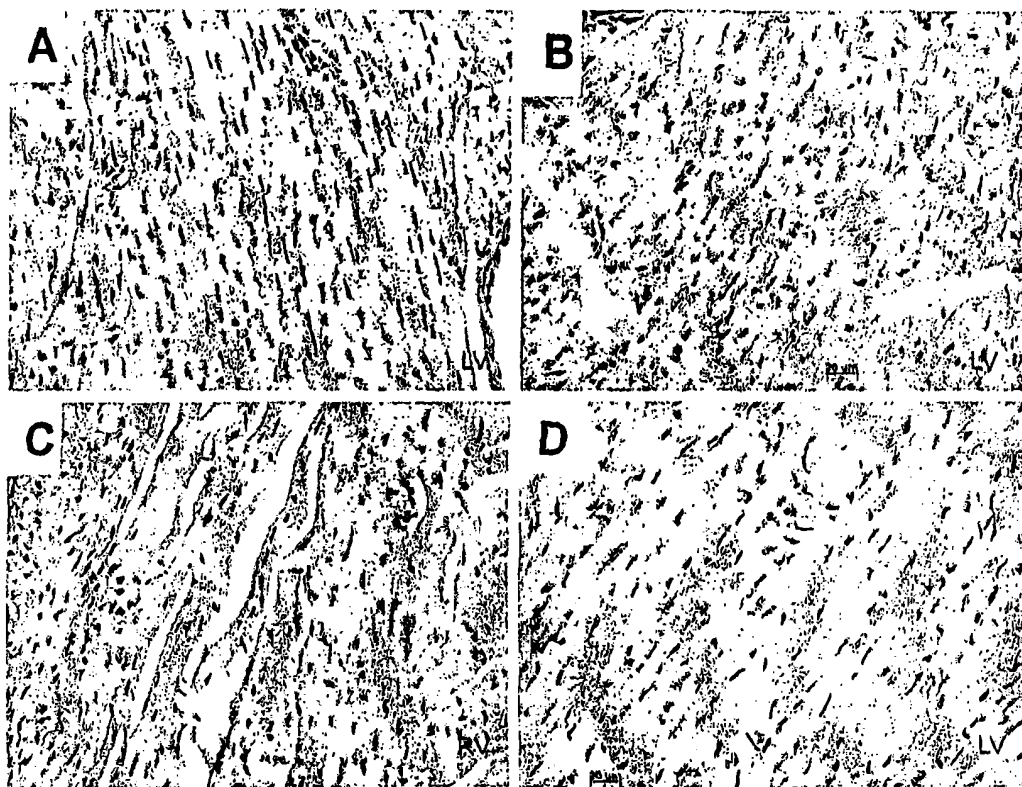


图 5. IIA mRNA 的正常表达模式和 IIA^{-/-}小鼠的繁殖

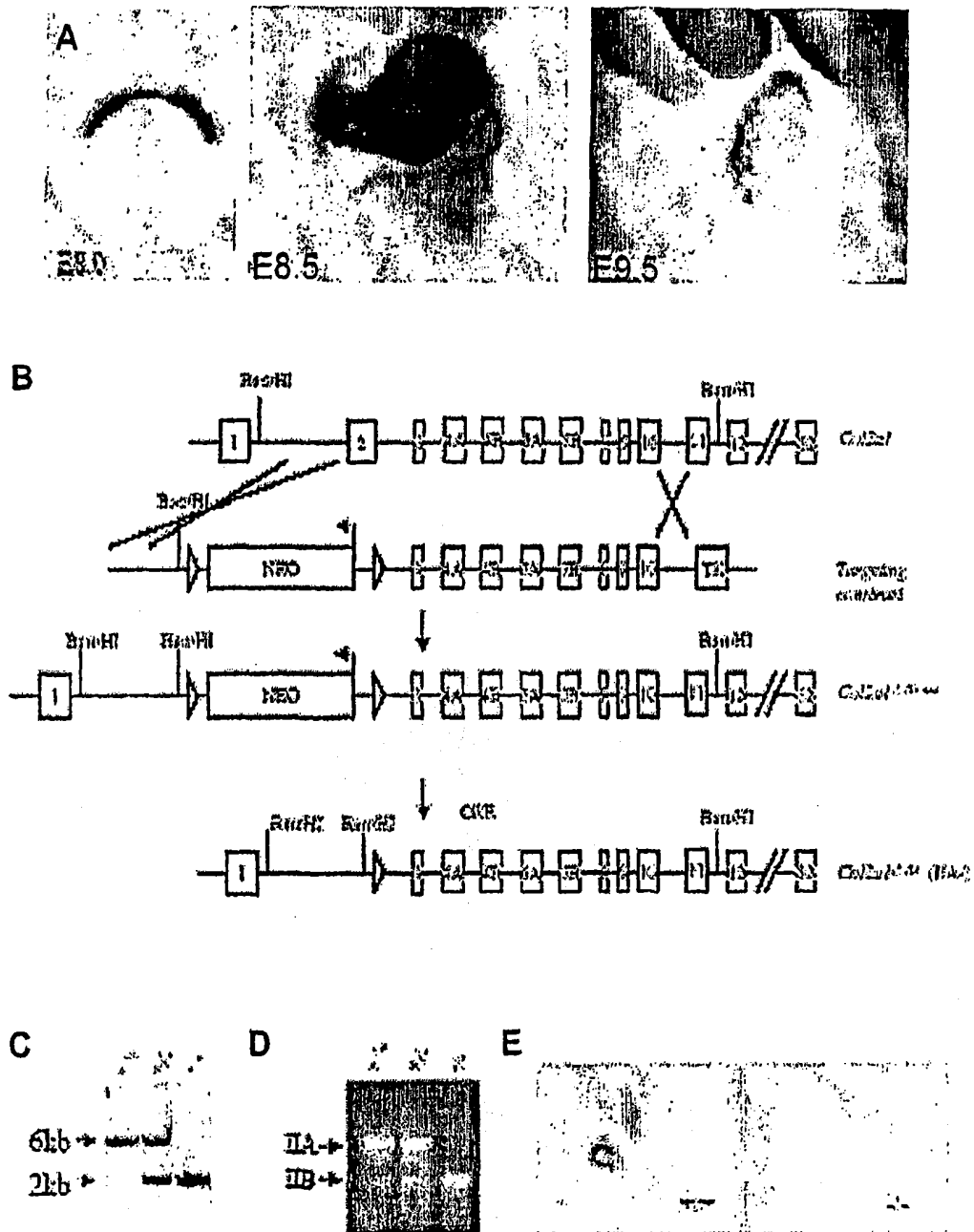


图 6. 新生鼠 $Co/IIA^{-/-}$ 突变体中的心血管缺损

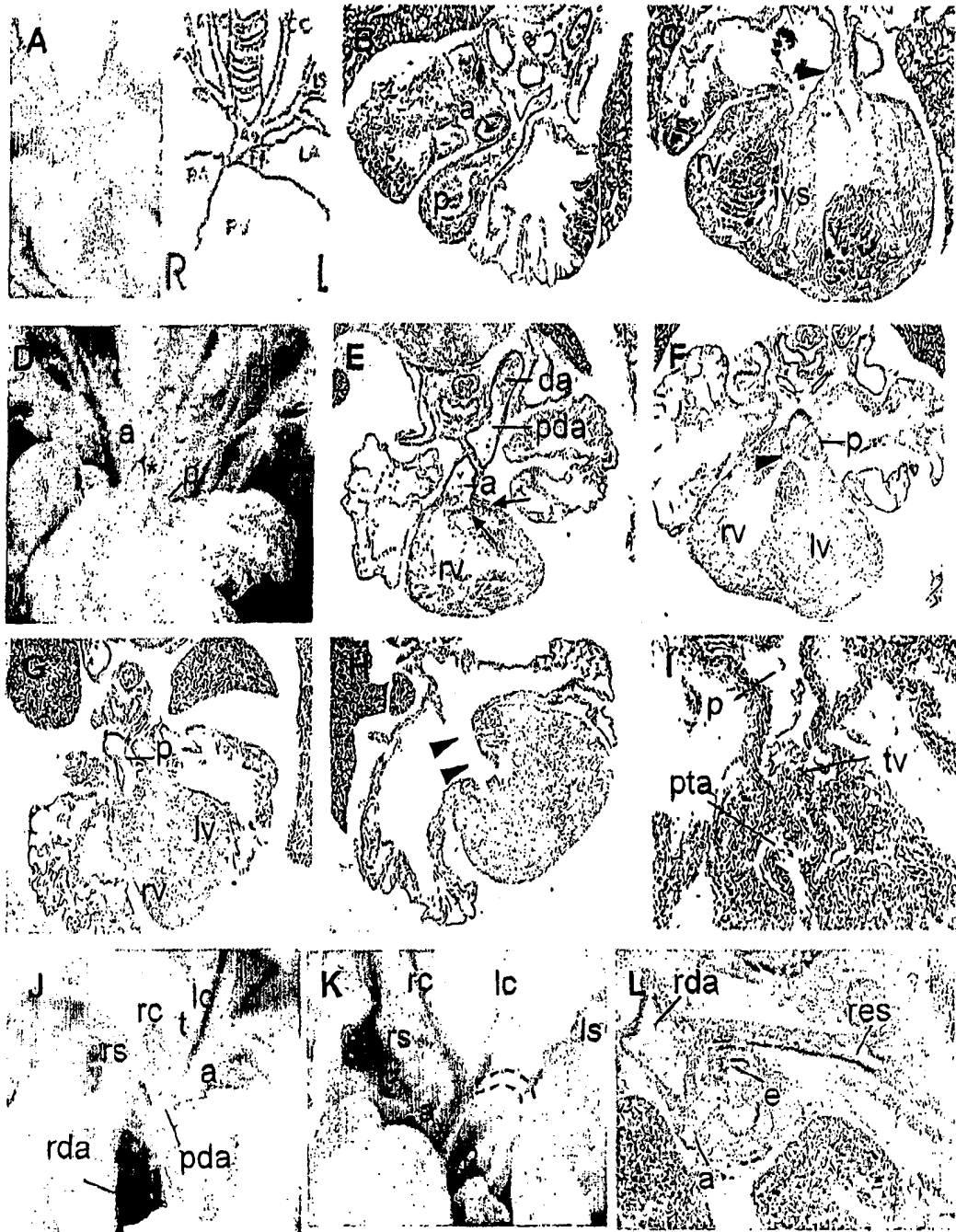


图 7. IIA^{-/-}胚胎中缺损的 BMP 信号传导

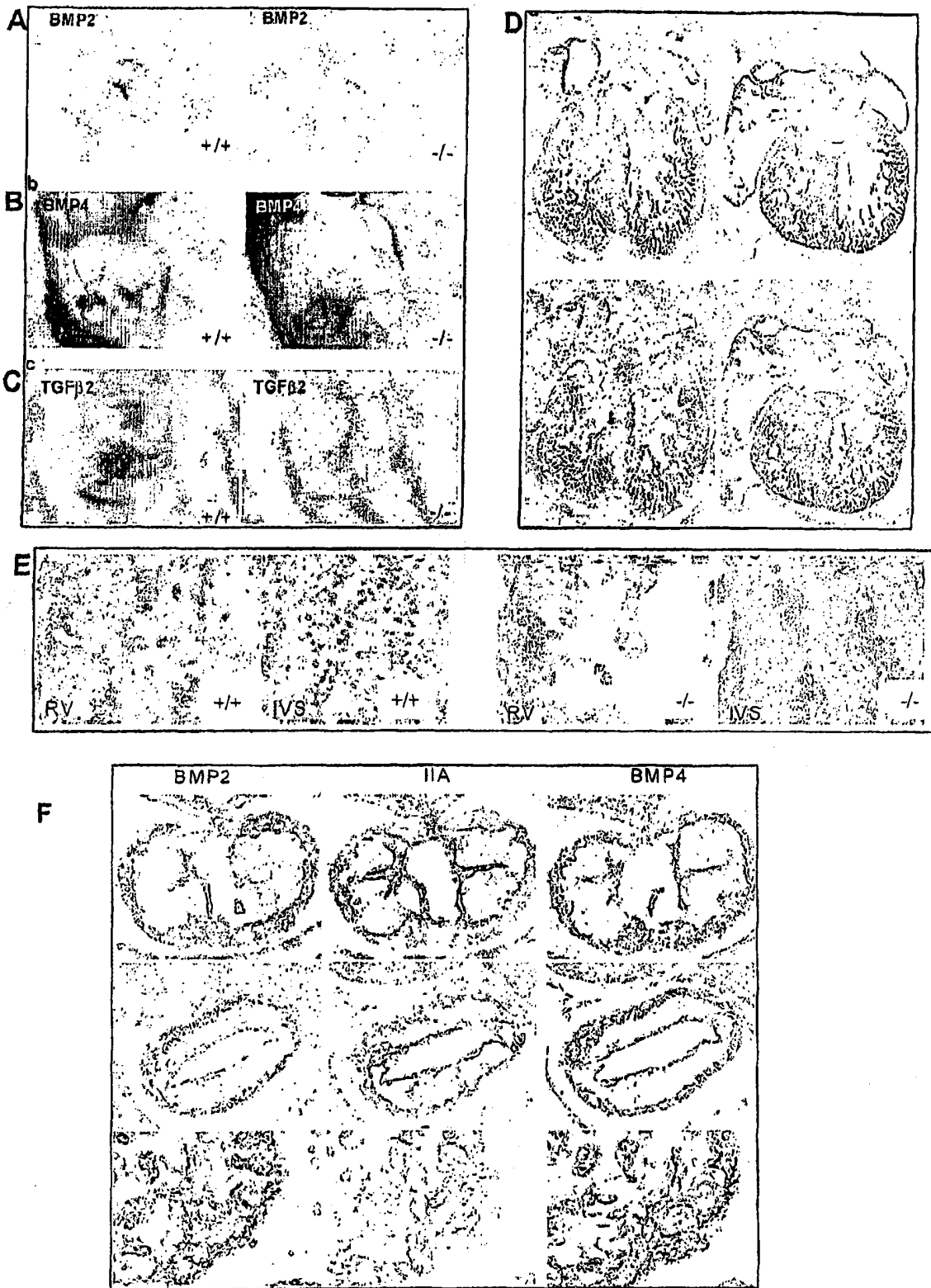


图 8. IIA 型- Nkx2.5 交叉依赖的(cross-dependant)调节回路

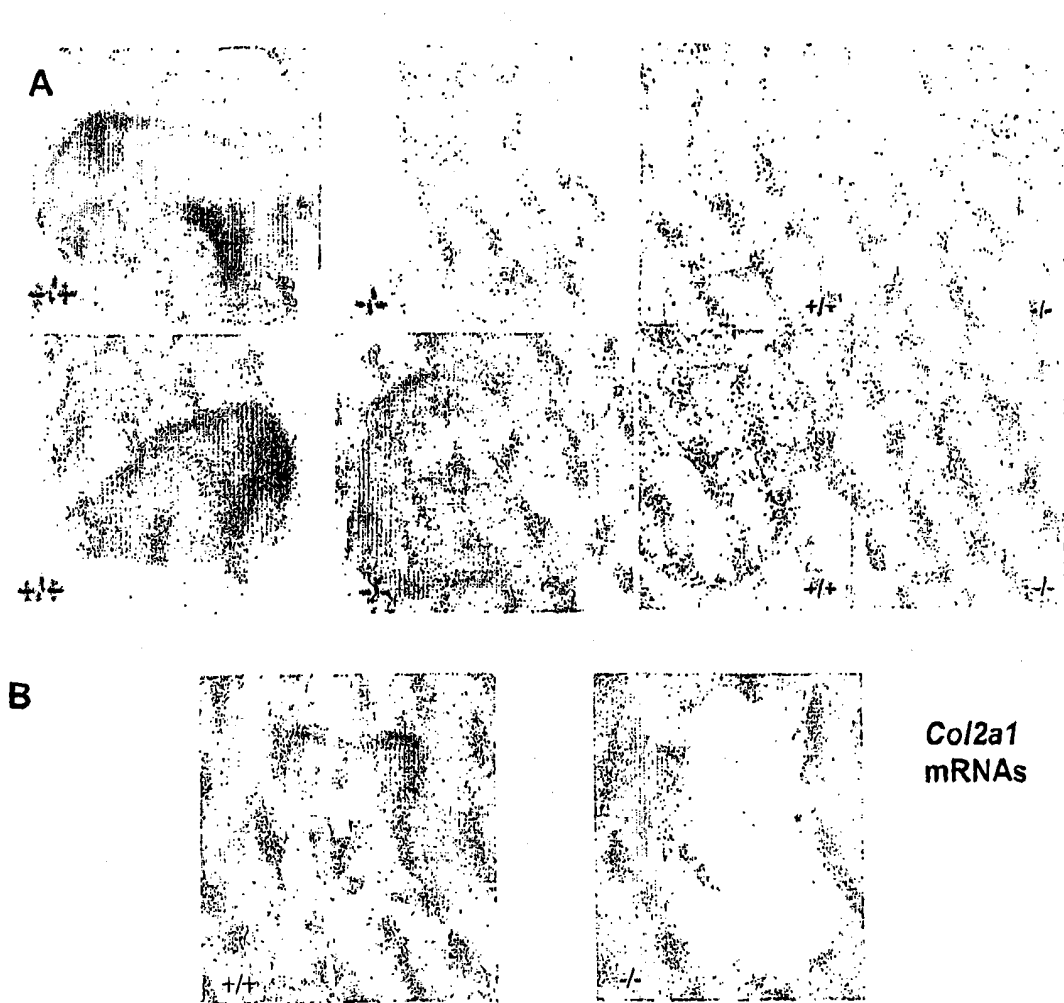


图 8. IIA 型- Nkx2.5 交叉依赖的调节回路(续)

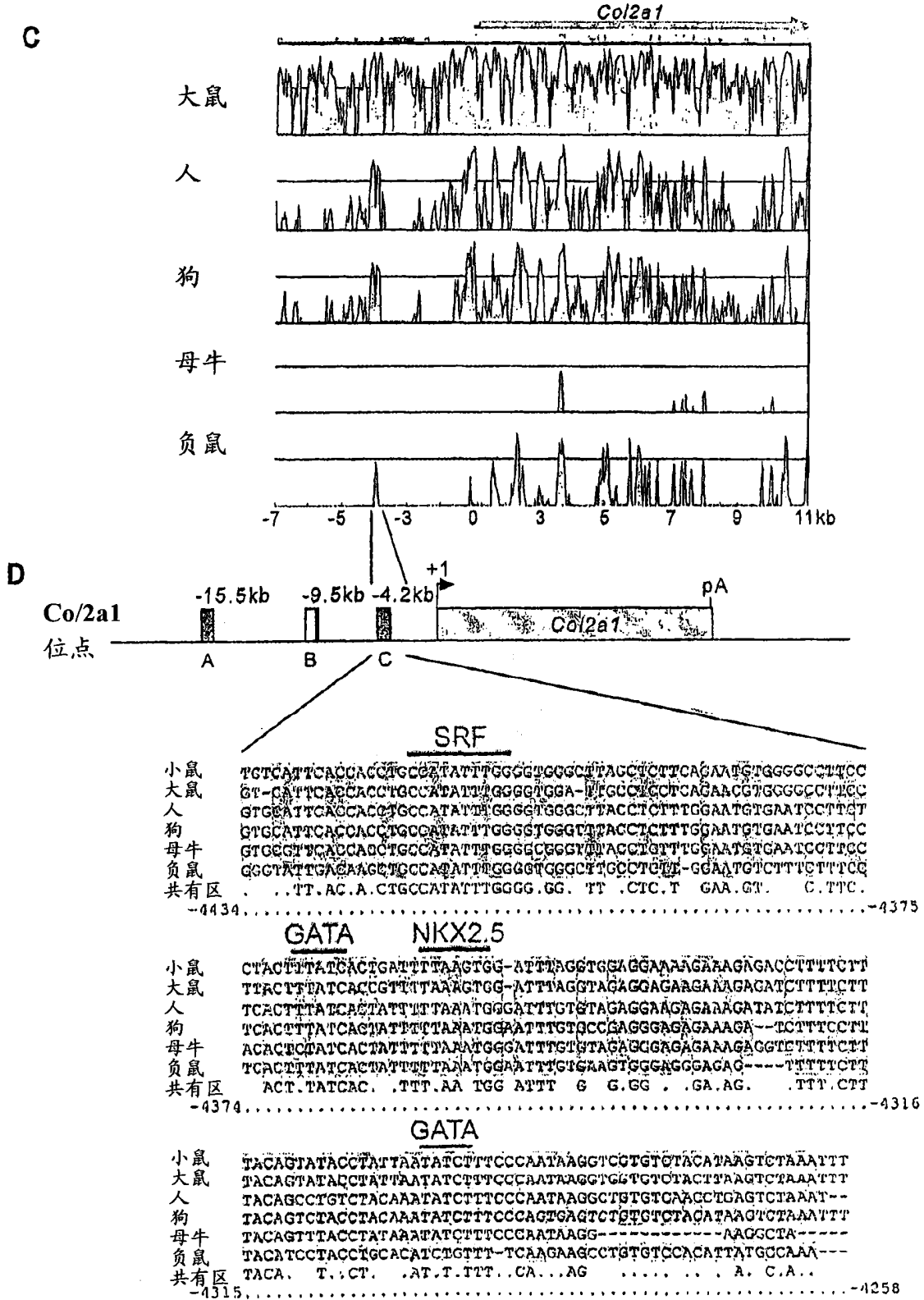


图 8. IIA 型-Nkx2.5 交叉依赖的调节回路(续)

E

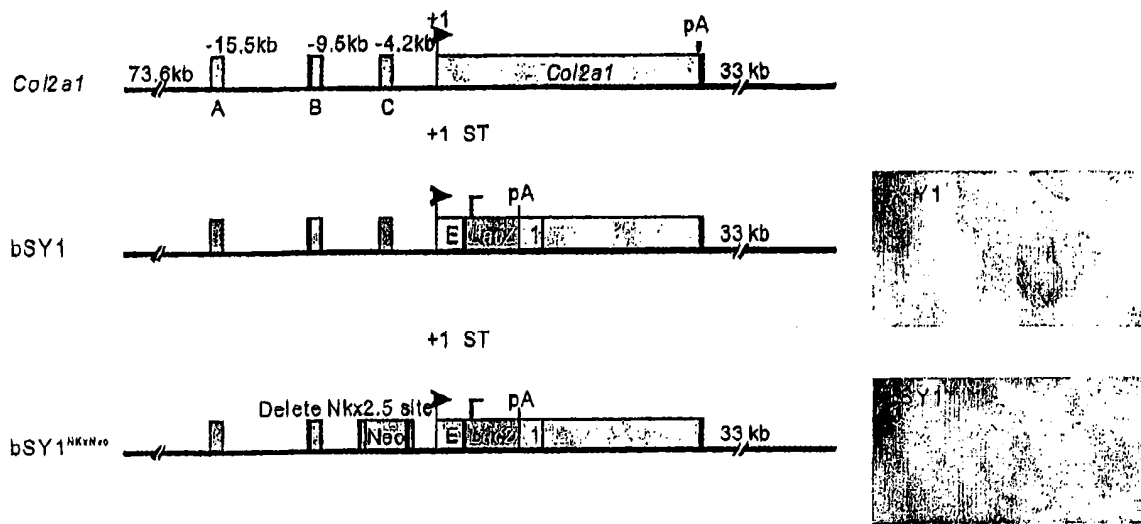
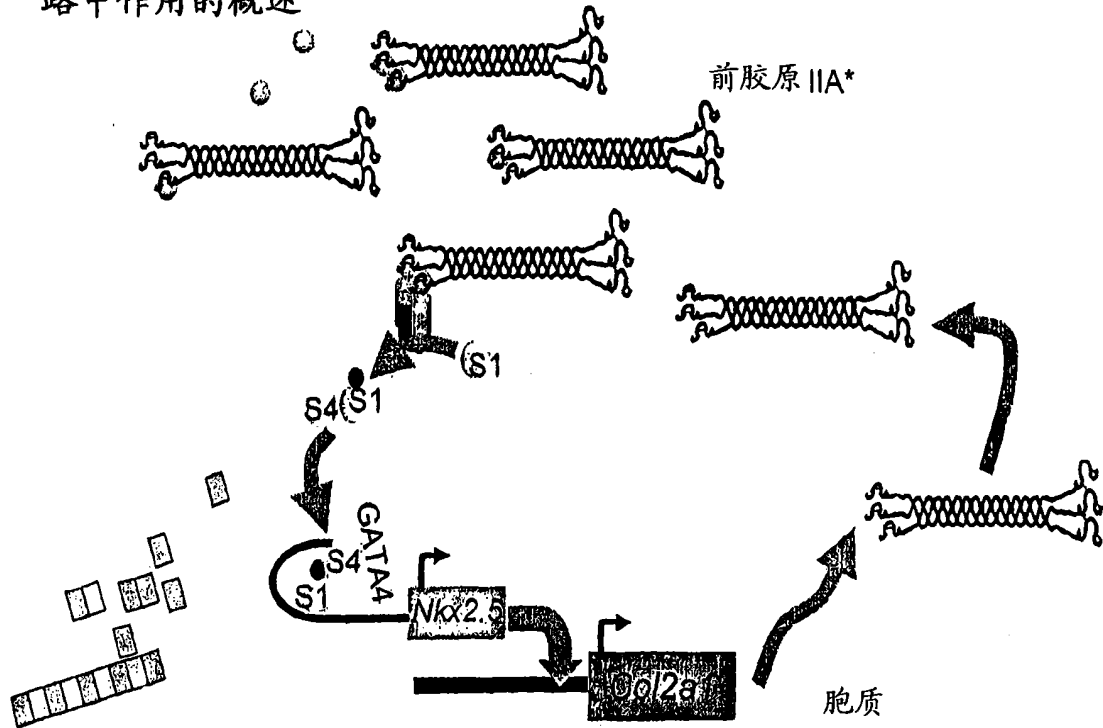

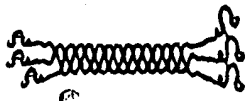









图 9. 在心血管形态发生过程中 IIA 前胶原在 Nkx2.5 调节回路中作用的概述



在心脏回路中的心肌细胞, E9.0 在前面

-  BMP 受体
-  IIA 前胶原
-  BMP 应答性 smad
-  BMP2/BMP4
-  磷酸化
-  Co-smad 4
-  Nkx2.5 基因
-  肌原纤维
-  Col2a1 基因

* 细胞外基质中的 IIA 前胶原复合物——如 BMP-IIA 前胶原或 BMP-IIA N-前肽的构型尚不清楚。复合物中的另外的可能的相互作用是与蛋白酶, 如 tolloid, 弗林样蛋白酶(furin-like), spc4 的相反作用, 它们可以裂解以促进 BMP 与其受体的相互作用。