

Scientific Reports | Sema3a-CreERT2小鼠用于特异靶向心脏Purkinje纤维

2018年2月，中国科学院生物化学与细胞生物学研究所周斌研究组又有新科研成果发表在 Scientific Reports 上，题为“Genetic targeting of Purkinje fibres by Sema3a-CreERT2”，提供了一种新的遗传学工具——Sema3a-CreERT2工具鼠——用于研究调节浦肯野纤维功能的分子机制。本研究中Sema3a-CreERT2 工具鼠由上海南方模式生物构建。

2018年2月，中国科学院生物化学与细胞生物学研究所周斌研究组的新科研成果发表在 Scientific Reports 上，题为“Genetic targeting of Purkinje fibres by Sema3a-CreERT2”，提供了一种新的遗传学工具——Sema3a-CreERT2工具鼠——用于研究调节浦肯野纤维功能的分子机制。

研究背景

心脏传导系统（cardiac conduction system）是由位于心壁内，由特有的功能高度分化的心肌细胞构成，其功能是产生电冲动并传导到心脏各部，使心房肌和心室肌按一定节律性收缩。心脏收缩从右心房窦房结（SA结）开始。然后，电活动在房室结（AV结）处延迟，随后通过房室束（His束及束支）快速传导并迅速地传播到整个心室壁。心脏传导系统功能异常就可能导致心律失常。

浦肯野纤维（Purkinje fiber），是构成房室束及其分支的主要细胞，又称束细胞。浦肯野纤维细胞间连接及其离子通道机制是保证心脏电冲动正常传导的基础，当细胞间连接及跨膜离子流发生变化时，浦肯野纤维系统电生理发生改变，从而导致心律失常。因此，了解调节浦肯野纤维发育、形成、以及维持正常功能的分子机制就将为心律失常的病理生理过程提供解释与证据。

先前的研究中，有一些Cre或CreERT2工具鼠被用来标记心脏传导系统。比如：

- 用Hcn4-CreERT2来标记传导系统，包括窦房结、部分房室结、His束、束支和浦肯野纤维。不过，除传导系统以外，Hcn4-CreERT2还会把发育中的心脏的部分内皮细胞也标记上。
- Cntn2-Cre也是心脏传导系统的另一种遗传工具，它特异性靶向SA结、AV结，左束支和右束支以及浦肯野纤维。
- Cx40-CreERT2靶向心房和VCS心肌细胞，以及冠状动脉内皮细胞。

可惜的是，缺乏特异性靶向浦肯野纤维（而不靶向其它细胞）的专一性工具，对于专门研究浦肯野纤维的功能还是不够的。

研究所用小鼠模型

• Sema3a-CreERT2 小鼠

由于已知Sema3a基因敲除纯合子小鼠具有感觉和交感神经元异常、胚胎骨和软骨结构异常、心脏缺陷和出生后死亡的严重不良表型，故利用经典 ES 细胞打靶技术，将诱导型 CreERT2 插入到小鼠 Sema3a 基因的起始密码子位置，构建Sema3a-CreERT2小鼠模型。

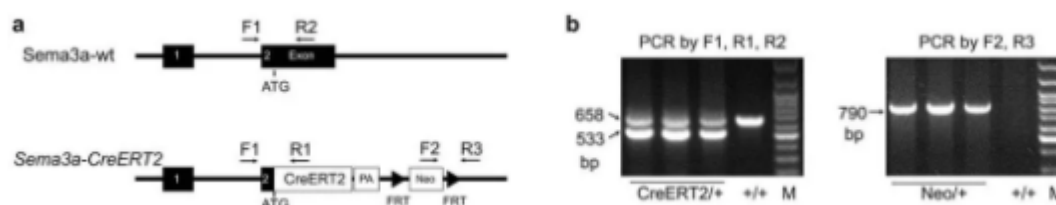


图1. Sema3a-CreERT2构建策略于基因型鉴定结果。

• R26-tdTomato 小鼠：在小鼠Rosa26位点定点插入条件性表达的tdTomato报告基因。

研究结果

• 构建Sema3a-CreERT2小鼠模型。

Sema3a是从无脊椎动物到脊椎动物都保守的信号素家族的成员。研究表明Sema3a在神经系统发育中具有重要作用。Sema3a可能是一种化学抑制剂，可以抑制轴突的生长，尤其是外周神经轴突，从而维持正常的神经元形态模式。Sema3a的过度表达会导致神经疾病，如精神分裂症；而Sema3a缺陷又导致异常的神经系统。此外，Sema3a还在免疫调节和癌症发展中起到生理作用。最近的一项研究表明Sema3a可以通过调节交感神经支配的模式来保持正常的心律。虽然有研究发现Sema3a在Purkinje纤维和小梁心肌细胞亚组中表达，但Sema3a在心脏传导系统中的谱系追踪却至今没有报道。

利用经典 ES 细胞打靶技术，将诱导型 CreERT2 插入到小鼠 Sema3a 基因的起始密码子位置，构建Sema3a-CreERT2小鼠模型。用雌激素受体（ESR）抗体染色作为Sema3a的替代物，检测Sema3a

在Sema3a-CreERT2小鼠组织中的表达。在E12.5, E14.5和E19.5胚胎心脏切片中对ESR（代替Sema3a）和TNNI3（心肌细胞Marker）共染色。免疫染色结果显示ESR/Sema3a主要在小梁心肌表达，但在E12.5和E14.5天的胚胎心脏致密层中也检测到少量的表达。在E19.5天，ESR/Sema3a在位于心室腔侧的心内膜下小梁心肌细胞中表达。在致密心肌的心肌细胞或冠状动脉中未检测到ESR/Sema3a。总之，这些数据与早前对Sema3a表达的研究一致，证明了Sema3a-CreERT2小鼠构建成功。

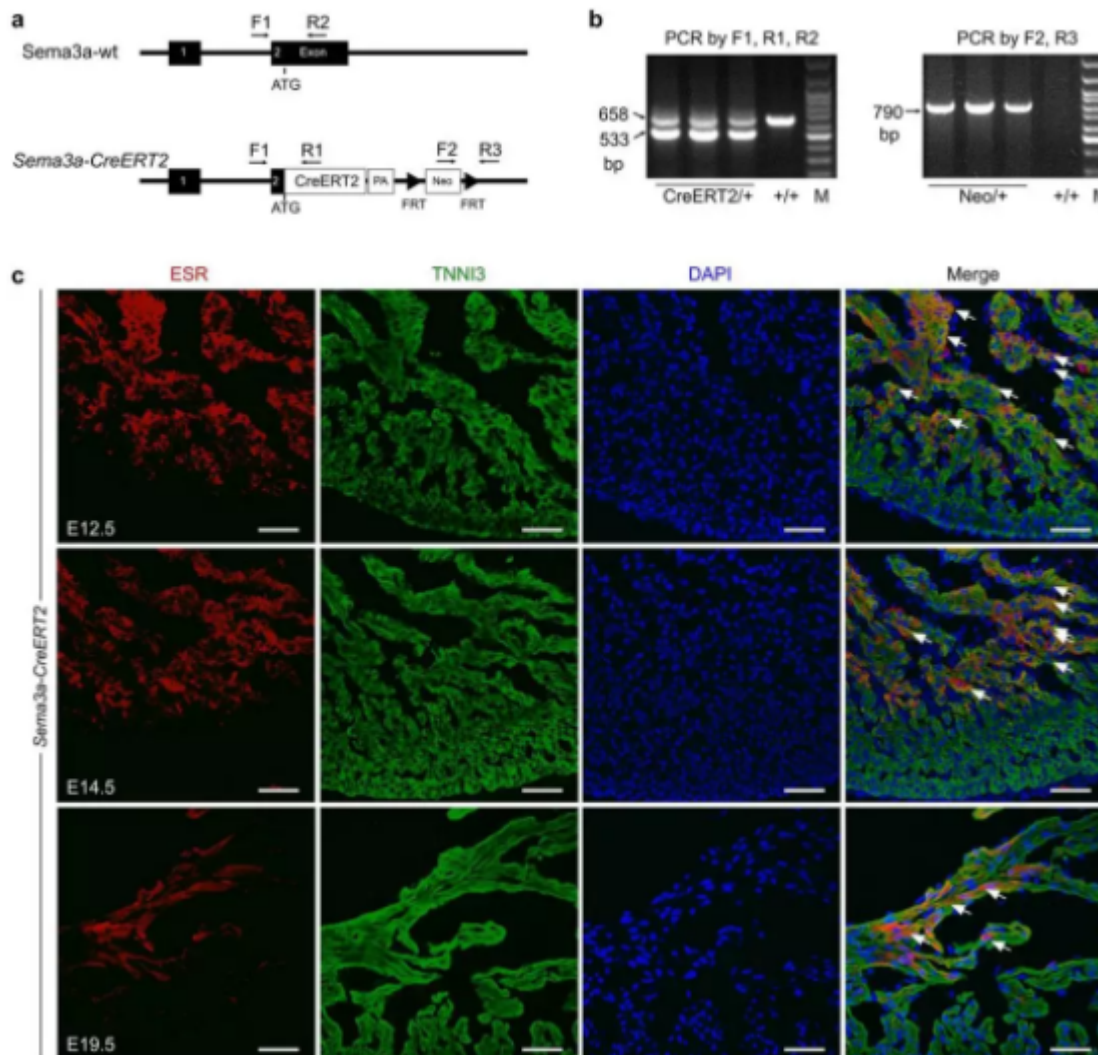


图2. (a-b) Sema3a-CreERT2构建策略于基因型鉴定结果。(c) 在E12.5, E14.5和E19.5天 Sema3a-CreERT2小鼠心脏雌激素受体（ESR）免疫荧光染色，指示Sema3a的表达。箭头指示Sema3a+心肌细胞。

• Sema3a-CreERT2在成年小鼠心脏中标记浦肯野纤维。

根据Sema3a-CreERT2小鼠的ESR染色分析，Sema3a主要在小梁心肌细胞中表达，而不是在致密层中。由于浦肯野纤维主要集中在心室壁的最内层，接下来就需要确定Sema3a-CreERT2是否可以特异性靶向成年小鼠心脏中的浦肯野纤维。通过Sema3a-CreERT2与R26-tdTomato小鼠交配获得Sema3a-CreERT2; R26-tdTomato双阳性小鼠。只有在他莫昔芬存在时，CreERT2才会从细胞质易位到细胞核中进行Cre-

loxP重组，这就可以使Sema3a +细胞及其后代中永久标记上tdTomato红色荧光（RFP）（图3b）。

对8-12周龄的小鼠给予他莫昔芬诱导，并在他莫昔芬处理48小时后收集心脏组织样本，发现在心房心肌细胞有稀疏的RFP+细胞（图3c-d）。为了确定Sema3a是否在SA结和AV结中表达，对HCN4和RFP进行共染色，发现Sema3a在SA结中不表达并且在AV节点中有少量表达（图3e-f）。Cx40在研究中被用来作为心室传导系统（VCS）marker，因此我们生成了Sema3a CreERT2; R26-tdTomato; Cx40 GFP三阳性小鼠来检测浦肯野纤维中Sema3a的表达。发现RFP与GFP+细胞共同定位于心室壁的心内膜下层，而致密心肌中的GFP+冠状动脉则未检测到RFP信号（图3g）。心脏整体荧光结果显示Cx40在心房中表现出总体表达，而几乎未检测到Sema3a。Cx40也在His（HB）束中，在左束支和右束支以及浦肯野纤维中表达，这与之前的报道一致。与Cx40（GFP信号）相比，Sema3a（RFP信号）很大程度上只存在浦肯野纤维中，并且在His束或束支中也没有检测到（图3h-i）。Z-stack共聚焦证实Sema3a（RFP信号）在心室心肌心内膜下的Cx40阳性浦肯野纤维中表达（图3j）。这些数据表明，Sema3a-CreERT2能够特异性靶向成年小鼠心脏中的心室浦肯野纤维。

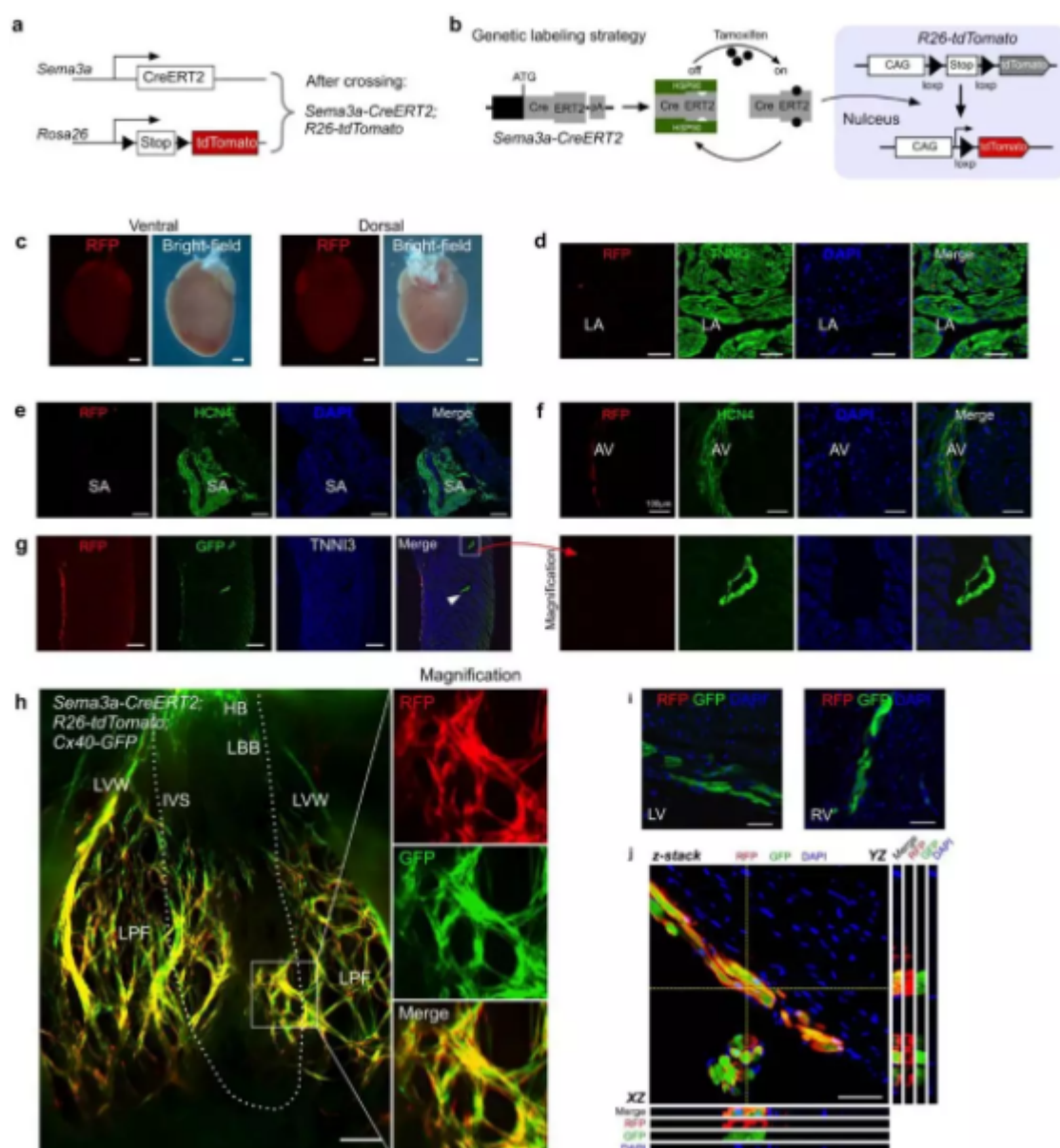


图3. 成年小鼠心脏中Sema3a表达谱。（a）Sema3a-CreERT2; R26-tdTomato小鼠交配示意图。（b）

通过他莫昔芬诱导标记Sema3a+细胞示意图。(c) Sema3a-CreERT2; R26-tdTomato小鼠心脏整体红色荧光RFP表达示意图。(d) Sema3a-CreERT2; R26-tdTomato小鼠RFP和TNNI3免疫荧光染色显示心房中RFP+细胞稀少。(e) 在SA结中未检测到Sema3a+细胞。(f) Sema3a在AV结中的表达。

(g) Sema3a-CreERT2; R26-tdTomato小鼠中RFP, GFP和TNNI3的免疫染色显示CX40+冠状动脉(箭头所示)呈RFP阴性。(h) Sema3a-CreERT2; R26-tdTomato; Cx40-GFP小鼠心脏的整体荧光视图。虚线表示IVS和LVW之间的界限。(i) 对Sema3a-CreERT2; R26-tdTomato; Cx40-GFP小鼠心脏LBB或RBB中未检测到Sema3a, 而Cx40-GFP为阳性。(j) Z-stack共聚焦显示Sema3a在浦肯野纤维中表达。

• 利用Sema3a-CreERT2对浦肯野纤维进行谱系追踪。

由于Sema3a在胚胎时期比在成年后具有更广泛地表达, 那么问题来了, Sema3a+心肌细胞是什么时候开始向浦肯野纤维的命运发展的呢? 将他莫昔芬注射到E12.5, E14.5或E18.5天的Sema3a-CreERT2; R26-tdTomato; Cx40-GFP三阳性小鼠中, 并在P7或P21天对小鼠心脏进行分析。谱系示踪数据显示E12.5开始诱导标记的Sema3a+细胞在P7和P21时产生了Cx40阳性的浦肯野纤维(少数)和Cx40阴性的工作心肌细胞(大部分)(图4a-b)。E14.5的Sema3a+细胞更局限于心室心肌的心内膜层, 并在P7和P21时产生Cx40阳性的浦肯野纤维和Cx40阴性的工作心肌细胞(图4c-d)。E18.5开始诱导标记的Sema3a+细胞在P7和P21天的心室心内膜下表面产生了几乎所有的Cx40阳性的浦肯野纤维, 而Cx40阴性的工作心肌细胞则很少(图4e-f)。这些数据表明, Sema3a+心肌细胞在围产期阶段(例如E18.5天)开始了其心室传导系统特化的命运(图4g)。

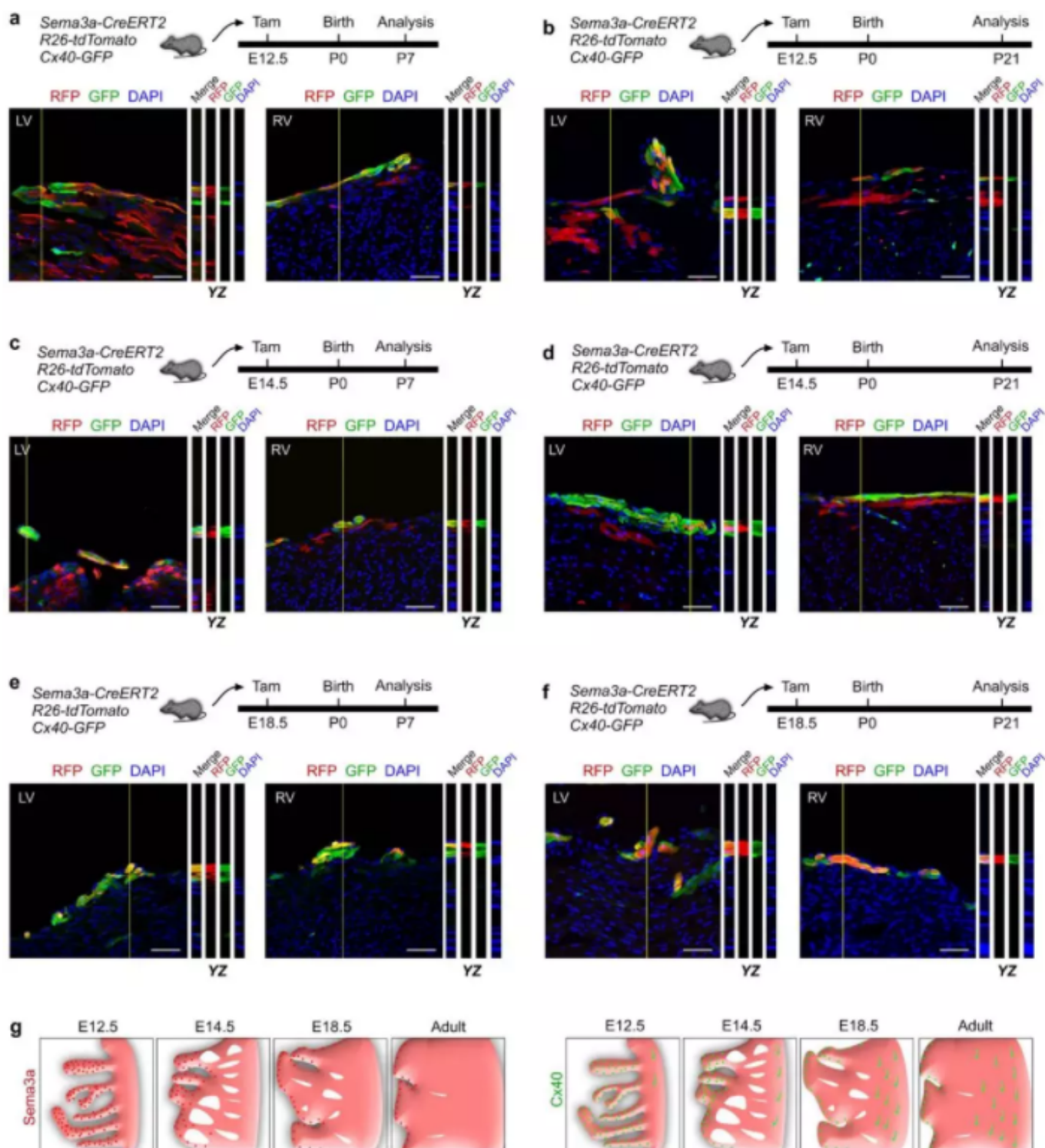


图4. Sema3a+心肌细胞在心脏发育过程中的传导系统特化。(a-f) 在E12.5 (a, b), E14.5 (c, d) 和E18.5 (e, f) 对Sema3a-CreERT2;R26-tdTomato; Cx40-GFP三阳性小鼠给予他莫昔芬诱导。每组在P7和P21收集心脏。Z-stack共聚焦显示Sema3a与Cx40荧光表达情况。(g) 示意图分别表示发育中和成年心脏中的Sema3a +细胞 (红色) 和Cx40 +细胞 (绿色)。

• Sema3a+心肌细胞的定量。

Sema3a+心肌细胞在心脏中到底占多大比例呢？通过将他莫昔芬注射到成年小鼠中体内诱导Sema3a+标记，在他莫昔芬处理48小时后对心脏进行分析。RFP和TNNI3免疫荧光染色显示在心室心肌的心内膜下表面的RFP+心肌细胞（图5a）。对心脏切片中RFP+心肌细胞比例进行定量分析，结果 $1.02 \pm 0.13\%$ 心肌细胞被Sema3a-CreERT2标记上红色荧光，而在他莫昔芬未处理的情况下几乎没有心肌细胞被标记上（图5c）。将心肌细胞分离出来进行定量（图5b, d）也得到了一致的结果。

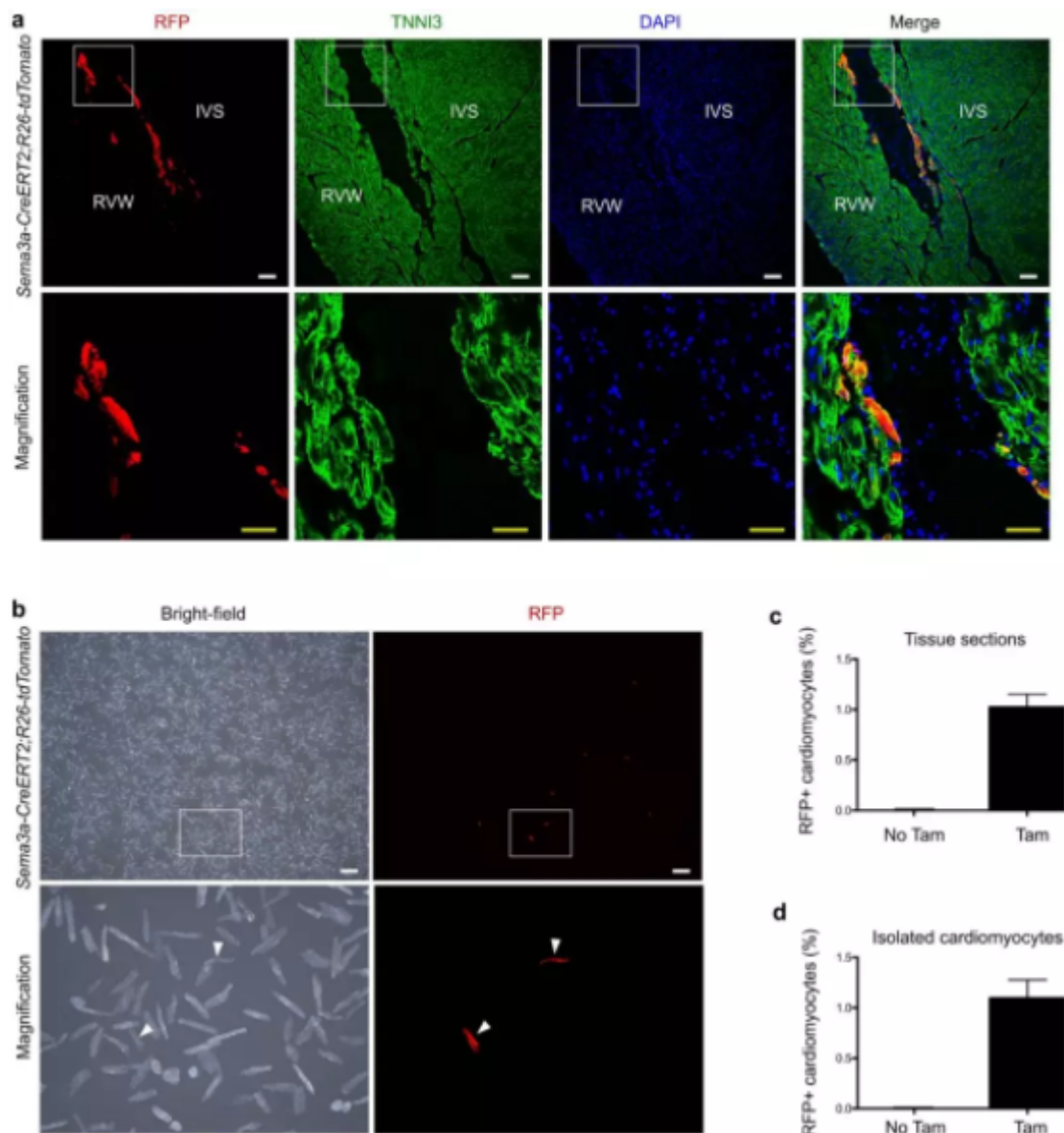


图5. 成年心脏中Sema3a+心肌细胞数量的定量分析。（a）成年心脏中RFP和TNNI3的免疫荧光染色。IVS，室间隔；RVW，右心室壁。（b）来自成年Sema3a CreERT2; R26-tdtomato小鼠的分离后心肌细胞。（c）定量心脏RFP+心肌细胞的百分比。（d）定量分离后的RFP+心肌细胞百分比。

Sema3a-CreERT2 作为一种全新的遗传工具小鼠，它特异性靶向成年小鼠心脏中的浦肯野纤维。它较Hcn4-CreERT2（靶向窦房结、房室结、His束、束支和浦肯野纤维）和Cntn2-Cre（靶向SA结，AV结和His-Purkinje系统）对浦肯野纤维更具有针对性。与Cx40-CreERT2工具相比，Sema3a-CreERT2也不会标记冠状动脉内皮细胞或心房心肌细胞。

对浦肯野纤维的谱系示踪结果表明，Sema3a+细胞在早期胚胎阶段主要向小梁心肌细胞发育，而在围产期间，Sema3a+心肌细胞呈现特化为浦肯野纤维的命运。

[全文下载](#)