

彭小勇,周远群,张紫森,等. 血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠模型建立及其血管功能变化的研究 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(7): 880-886.

Peng XY, Zhou YQ, Zhang ZS, et al. Vascular function in a heterozygous mouse model with conditional knockout of connexin 43 in vascular endothelial cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(7): 880-886.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2022.07.002

血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠模型 建立及其血管功能变化的研究

彭小勇¹,周远群¹,张紫森¹,邓蒙生²,雷艳¹,李涛¹,刘良明¹,王建民²,
康建毅²,杨光明^{2*}

(1. 陆军军医大学大坪医院 野战外科研究部,战伤休克与输血研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042;
2. 陆军军医大学大坪医院 野战外科研究部,武器杀伤生物效应评估研究室,创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室,重庆 400042)

【摘要】 目的 建立血管内皮细胞连接蛋白 43(connexin 43, Cx43)条件性敲除小鼠模型,并对其血管舒张/收缩功能进行检测。方法 将 8 只 Cx43^{fllox/fllox} 小鼠与 C57BL/6 品系野生型(wild type, WT)小鼠交配,子代小鼠继续与 C57BL/6 小鼠回交 9 代进行基因背景转换;再将 Cx43^{fllox/+} 小鼠与血管内皮细胞特异性表达 Tie2-Cre 重组酶小鼠(以下简称 Cre 小鼠)交配,获得 Tie2-Cre/Cx43^{fllox/+} 小鼠。利用鼠尾 PCR 试剂盒进行基因型鉴定,Western Blot 法和免疫荧光法检测小鼠肠系膜上动脉(superior mesenteric artery, SMA)中 Cx43 表达。利用离体张力测定技术检测 SMA 血管舒张/收缩功能,包括去甲肾上腺素诱导的收缩反应性和乙酰胆碱诱导的舒张反应性。结果 PCR 电泳和血管蛋白表达检测结果证实 Tie2-Cre/Cx43^{fllox/+} 小鼠成功构建,肠系膜上动脉中 Cx43 蛋白表达与野生型小鼠相比明显降低($P < 0.01$)。与 WT 小鼠相比,部分敲除血管内皮细胞 Cx43 后使乙酰胆碱诱导的内皮依赖的血管舒张反应性显著降低($P < 0.01$)。结论 采用 Cx43^{fllox/fllox} 小鼠与血管内皮细胞特异性表达 Tie2-Cre 重组酶小鼠成功构建血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠,该小鼠的肠系膜上动脉中 Cx43 表达降低,且舒张反应性明显降低,预期可为研究 Cx43 及其相关结构在血管功能调节中的作用提供动物模型。

【关键词】 血管内皮细胞;连接蛋白 43;基因型鉴定;血管反应性

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)07-0880-07

Vascular function in a heterozygous mouse model with conditional knockout of connexin 43 in vascular endothelial cells

PENG Xiaoyong¹, ZHOU Yuanqun¹, ZHANG Zisen¹, DENG Mengsheng², LEI Yan¹, LI Tao¹, LIU Liangming¹,
WANG Jianmin², KANG Jianyi², YANG Guangming^{2*}

(1. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department of Shock and Transfusion, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042, China. 2. State Key Laboratory of Trauma, Burns and Combined Injury, Department of Weapon Bioeffect Assessment, Research Institute of Surgery, Daping Hospital, Army Medical University, Chongqing 400042)

Corresponding author: YANG Guangming. E-mail: yanggm971@163.com

【基金项目】 国家自然科学基金青年科学基金项目(81801905),国家自然科学基金面上项目(82072164),重庆市基础研究与前沿探索项目(cstc2018jcyjAX0555)。

Funded by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (81801905), the National Natural Science Foundation for General Program of China (82072164), the Natural Science Foundation of Chongqing (cstc2018jcyjAX0555).

【作者简介】 彭小勇(1986—),男,硕士,助理研究员,研究方向:战创伤休克心血管功能变化。Email:pxypy2016@163.com

【通信作者】 杨光明(1979—),男,博士,副研究员,研究方向:战创伤器官功能损害机理及防治研究。Email:yanggm971@163.com

【Abstract】 Objective To establish an endothelial conditional connexin 43 (Cx43)-knockout mouse model and use it to examine vascular relaxation/constriction. **Methods** Eight Cx43^{fllox/fllox} mice were crossed with C57BL/6 wild type (WT) mice and the offspring were backcrossed with C57BL/6 mice. This backcross process was repeated nine times, after which the Cx43^{fllox/+} mice were crossed with vascular endothelial-cell-specific Tie2-Cre recombinase mice to obtain Tie2-Cre/Cx43^{fllox/+} mice. The genotype was confirmed by mouse tail direct polymerase chain reaction (PCR). Expression of Cx43 in the superior mesenteric artery (SMA) was measured by Western Blot and immunofluorescence. SMA rings were used to measure vascular relaxation and the contractile response to acetylcholine (ACh) and norepinephrine. **Results** Tie2-Cre/Cx43^{fllox/+} offspring were obtained and identified by PCR, Western Blot and immunofluorescence. Cx43 expression and ACh-induced endothelium-dependent relaxation reactivity of the SMA were significantly decreased in Tie2-Cre/Cx43^{fllox/+} mice compared with WT mice ($P < 0.01$). **Conclusions** A mouse model with endothelium-specific Cx43-knockout was successfully established by intercrossing Tie2-Cre mice with Cx43^{fllox/fllox} mice. Cx43 expression in vascular tissues and the relaxation reactivity of SMA were decreased by conditional Cx43 knockout. These mice may thus provide an animal model for studying the link between Cx43 and vascular function.

【Keywords】 vascular endothelial cell; connexin 43; genotyping; vascular reactivity

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

连接蛋白 (connexin, Cx) 属于一种跨膜蛋白,能在细胞膜上寡聚形成半通道,该通道是细胞间连接和交流的重要结构,并且具有调节环磷酸腺苷、钙离子以及三磷酸肌醇等小分子进出细胞的功能。根据其相对分子质量大小,连接蛋白命名为 Cx26~Cx56^[1-3]。研究显示,连接蛋白在心血管系统中有大量表达并且发挥重要的作用,包括参与血管张力、血管生成以及心脏发育的调控等。心血管系统表达的连接蛋白主要有 Cx37、Cx40、Cx43 以及 Cx45,其中,Cx43 在心血管系统中的作用受到广泛关注^[4-5]。为了深入研究 Cx43 在哺乳动物中的作用,Reaume 等^[6]首先利用基因编辑技术(先敲除胚胎干细胞中的 Cx43,然后注射至 C57 小鼠胚囊中)构建了 Cx43 的杂合子敲除小鼠,随后 Htet 等^[7]用该小鼠证实了 Cx43 在肺血管舒张反应性调节中发挥重要作用。但是这种方法获得的是全身性广泛敲除 Cx43 的小鼠模型,由于 Cx43 在多个器官组织都有广泛分布且发挥不同的作用,这种广泛敲除模型用于对特定组织器官的研究中具有一定的局限性。而目前有关血管特异性 Cx43 敲除小鼠模型构建及其功能研究的报道尚少。为此,本研究采用 Cx43^{fllox/fllox} 小鼠、血管内皮细胞特异性表达 Tie2-Cre 重组酶小鼠以及 C57BL/6 品系野生型小鼠,构建血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠(本研究未构建血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 纯合子小鼠的原因在于纯合子小鼠发育缓慢,出生后不久即死亡,我们在下文结果与讨论中进行了叙述),并通过 PCR 鉴定基因组 DNA、Western Blot 和免疫荧光染色检测血管 Cx43 表达等方法进行验证,然后检测野

生型和血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠肠系膜上动脉 (superior mesenteric artery, SMA) 的血管反应性(包括收缩和舒张反应性)。希望为深入研究 Cx43 在血管功能中的作用提供更合适的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 只(雌雄各半)SPF 级 Cx43^{fllox/fllox} 小鼠购自美国 Jackson 实验室(动物检疫合格证号:1611A14822),2 只雄性 SPF 级 Tie2-Cre 重组酶小鼠购自江苏集萃药康生物科技股份有限公司(原南京大学-南京生物医药研究院)【SCXK(苏)2020-0004】,C57BL/6 小鼠由陆军特色医学中心实验动物中心提供,均饲养于陆军特色医学中心实验动物中心 SPF 级动物饲养环境【SYXK(军)2017-0026】、【SYXK(军)2017-0058】,饲养期间自由饮水饮食。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定(40%~70%),温度控制在 22~24℃。所有操作均符合陆军军医大学实验动物福利伦理审查委员会要求(AMUWEC2020034)。野生型和 Cx43 敲除杂合子小鼠各 10 只,8~12 周龄,体重 20~25 g,实验时用 0.03% 的戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔麻醉,处死后取血管进行后续实验。

1.1.2 主要试剂与仪器

鼠尾检测试剂盒(包括 DNA 提取试剂和 PCR 试剂)购自美国 Bimake 公司;克-亨氏(Krebs-Henseleit, K-H)液自配,配制所需药品均购自生工生物工程(上海)股份有限公司,去甲肾上腺素购

自远大医药(中国)有限公司,乙酰胆碱购自生工生物工程(上海)股份有限公司;蛋白提取液(RIPA)购自美国 MCE 公司,Cx43 一抗购自美国 Sigma 公司,山羊抗兔和抗小鼠荧光二抗购自美国 Jackson Immuno Research 公司,磷酸盐缓冲液(PBS)粉剂购自中杉金桥生物技术有限公司,免疫荧光二抗购自美国 CST 公司,DAPI 购自英国 abcam 公司。

PCR 仪(Bio-Rad,美国),双色红外成像激光系统(LI-COR,美国),石蜡切片机(Leica,德国),激光共聚焦显微镜(Leica,德国),微血管张力测定仪(AD Instrument,澳大利亚)。

1.2 方法

1.2.1 敲基因小鼠模型构建

Cx43^{flox/flox} 小鼠遗传背景转换:将 2 只雌性 Cx43^{flox/flox} 小鼠与 1 只雄性 C57BL/6 小鼠合笼饲养,得到 F1 子代小鼠,然后对所有子代小鼠基因型进行鉴定,选出基因型为 Cx43^{flox/+} 的 F1 小鼠作为亲本,待其性成熟后按雌:雄 = 2:1 的比例继续与新的 C57BL/6 小鼠合笼进行回交,得到 F2 子代小鼠,选出基因型为 Cx43^{flox/+} 的子代作为亲本进行回交,依次回交 9 次。选择基因型为 Cx43^{flox/+} 的 F10 不同性别小鼠进行互交,再选择基因型为 Cx43^{flox/+} 或者 Cx43^{flox/flox} 与 Cre 小鼠交配可获得 Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} 小鼠^[8]。

1.2.2 基因型鉴定

小鼠出生后 2~3 周进行编号,并取 2 mm 长的鼠尾鉴定。将鼠尾放入 1.5 mL EP 管中按照试剂盒说明书按比例加入 DNA 提取液,放入 55℃ 水浴锅中 30 min,然后 95℃ 干浴 10 min 待用。Flox 引物:上游引物序列 5'-CTTTGACTCTGATTACAGAGC TTAA-3',下游引物序列 5'-GTCTCACTGTTACTT AACAGCTTGA-3';Tie2-Cre 引物:上游引物序列 5'-GCCTGCATTACCGGTCGATGC-3',下游引物序列 5'-CAGGGTGTATAAGCAATCCC-3'。反应体系均为 20 μL:2 × M-PCR Mix 10 μL,上游引物(10 μmol/L)1 μL,下游引物(10 μmol/L)1 μL,无酶水 6 μL,模板 DNA 2 μL。反应条件按照实验室提供的程序设置,Flox:94℃ 2 min;(94℃ 20 s,65℃ 15 s,每个循环降 0.5℃,68℃ 10 s)×10 循环;(94℃ 15 s,60℃ 15 s,72℃ 10 s)×28 循环,72℃ 2 min。Cre:95℃ 5 min;(95℃ 30 s,60℃ 30 s,72℃ 45 s)×30 循环;72℃ 5 min。扩增结束后用 1.5%的

琼脂糖凝胶进行电泳(上样量为 10 μL),根据电泳结果来鉴定小鼠基因型。

1.2.3 Western Blot 法检测 Cx43 蛋白在 SMA 中表达

取小鼠 SMA 放入匀浆器中,加入预冷的含蛋白酶抑制剂 RIPA,研磨后在冰上裂解 30 min 后离心(12 000 r/min,15 min,4℃),取上清后加上样缓冲液,100℃ 干浴 5 min 使蛋白变性;然后制备 10% SDS-PAGE 分离胶,上样量每孔为 30 μg。Cx43(1:5000)和 β-actin(1:7000)使用一抗稀释液进行稀释,二抗为山羊抗兔和抗小鼠(1:10000)。用双色红外成像激光系统扫描,获得 Cx43 的蛋白表达图像。用 Quantity One 分析软件读取各组荧光值,并以 β-actin 作为内参计算相对表达量^[9]。对来源于不同个体的野生型和小鼠的血管组织样本进行检测,实验重复 3 次,对各组相对表达量进行统计学分析。

1.2.4 免疫荧光法检测 Cx43 蛋白在 SMA 中表达

快速取小鼠 SMA 放入冰的 4%多聚甲醛固定 24 h,然后用梯度浓度乙醇脱水,经石蜡包埋后切片,再经脱蜡、水化及抗原修复;用 0.3% TritonX-100 破膜 3 min,加 0.1%牛血清白蛋白室温封闭 2 h,然后孵育 Cx43 一抗(1:500)过夜;次日加二抗(Alexa Fluor 488,1:200)37℃ 孵育 2 h,DAPI 染核后再加抗淬灭封片剂封片,最后用共聚焦显微镜观察^[10]。

1.2.5 小鼠 SMA 血管舒张/收缩功能检测

取小鼠 SMA 制备血管环,并将其挂于盛有 K-H 液的恒温器官灌流槽。每 30 min 更换 1 次 K-H 液,更换 4 次后加入高钾溶液诱导血管预收缩,待收缩达到平台期后再换 K-H 液稳定 30 min,然后向恒温槽中依次加入去甲肾上腺素(NE,终浓度为 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L),待收缩达到平台期后向恒温槽中依次加入乙酰胆碱(ACh,终浓度为 10⁻⁹、10⁻⁸、10⁻⁷、10⁻⁶、10⁻⁵ mol/L)。读取加高钾溶液前的基础张力值为 T₁、高钾液刺激后血管环收缩达到平台期的张力值为 T₂,加 NE 前的基础张力值为 T₁'、加 NE 后血管环收缩达到平台期的张力值为 T₂'、加 ACh 后血管环舒张达到平台期的张力值为 T₃,分别采用最大收缩张力和舒张率来反映收缩和舒张反应性,血管收缩反应性 = (T₂' - T₁') / (T₂ - T₁) × 100%;血管舒张反应性 = (T₂' - T₃) / (T₂' - T₁') × 100%^[11-12]。

1.3 统计学分析

用 SPSS 18.0 统计软件进行统计分析,实验数据以平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验比较两组之间的差异。以 $P < 0.05$ 表示差异具有显著性。

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定

基因组中 Flox 纯合电泳结果为 580 bp 条带,杂合则为 580 bp 和 490 bp 双条带,野生型则为 490 bp 条带;Tie2-Cre 阳性电泳结果为 481 bp,阴性则无条带^[13]。图 1A 中编号 1~6 是同窝小鼠,1、2、3、4 号是 Tie2-Cre 阳性小鼠;2、3、5、6 号是 Cx43^{flox/flox} 小鼠。综合结果表明,2 号和 3 号是 Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} 小鼠。图 1B 中编号 7~12 是同窝小鼠:11 和 12 号是 Tie2-Cre 阳性小鼠;8 和 11 号是 Cx43^{flox/+} 小鼠。综合结果表明,11 号是 Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} 小鼠。后续实验以同样的鉴定筛选方式,由于 Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} 纯合子小鼠发育缓慢、出生后不久即死亡,选取同窝中的野生型和杂合子敲

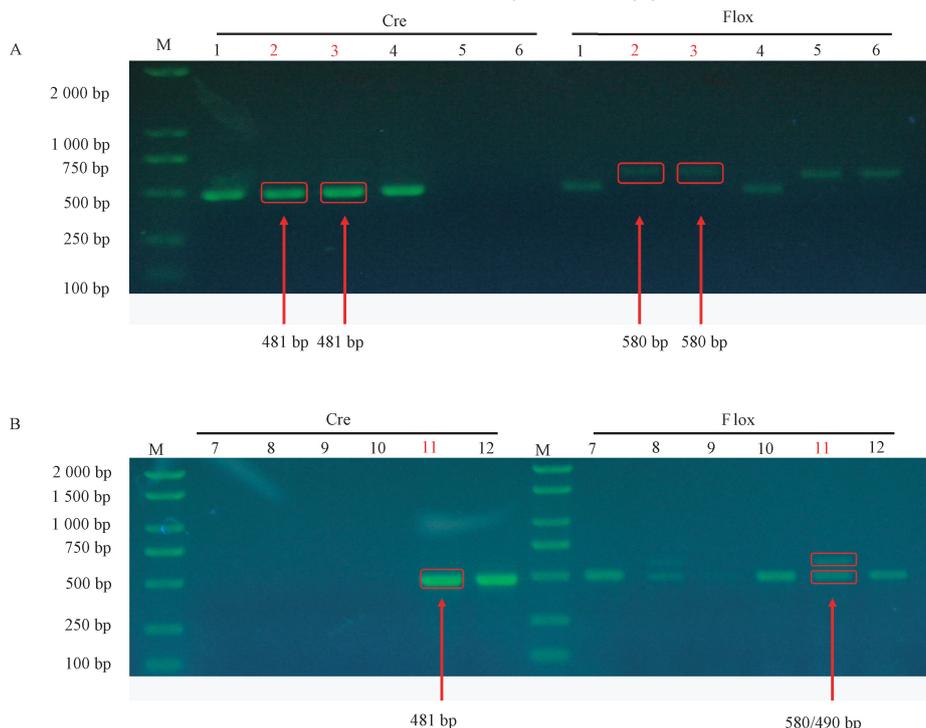
除型小鼠进行后续实验。

2.2 血管内皮 Cx43 敲除小鼠蛋白表达验证

图 2A 中 Western Blot 结果显示,Cx43 敲除杂合子小鼠 SMA 中 Cx43 蛋白表达水平明显降低,与野生型小鼠比较差异有显著性($P < 0.01$)。图 2B,2C 中免疫荧光结果显示,野生型小鼠 SMA 管腔内皮面 Cx43 连续表达,而 Cx43 敲除杂合子小鼠 SMA 管腔内皮面 Cx43 表达降低,连续性变差并出现断裂和缺失,与野生型小鼠比较明显降低。

2.3 敲除 Cx43 后对小鼠 SMA 血管舒张/收缩功能的影响

图 3A 为野生型和 Cx43 敲除杂合子小鼠 SMA 的代表性收缩/舒张曲线,图 3B 的血管收缩功能检测的统计结果显示,血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠 SMA 对 NE 诱导的收缩反应性与野生型小鼠相比无明显差异。而图 3C 的血管舒张功能检测的统计结果显示,Cx43 敲除杂合子小鼠 SMA 对 ACh 诱导的内皮依赖性的舒张反应性显著降低($P < 0.01$),仅为野生型小鼠 10%左右。

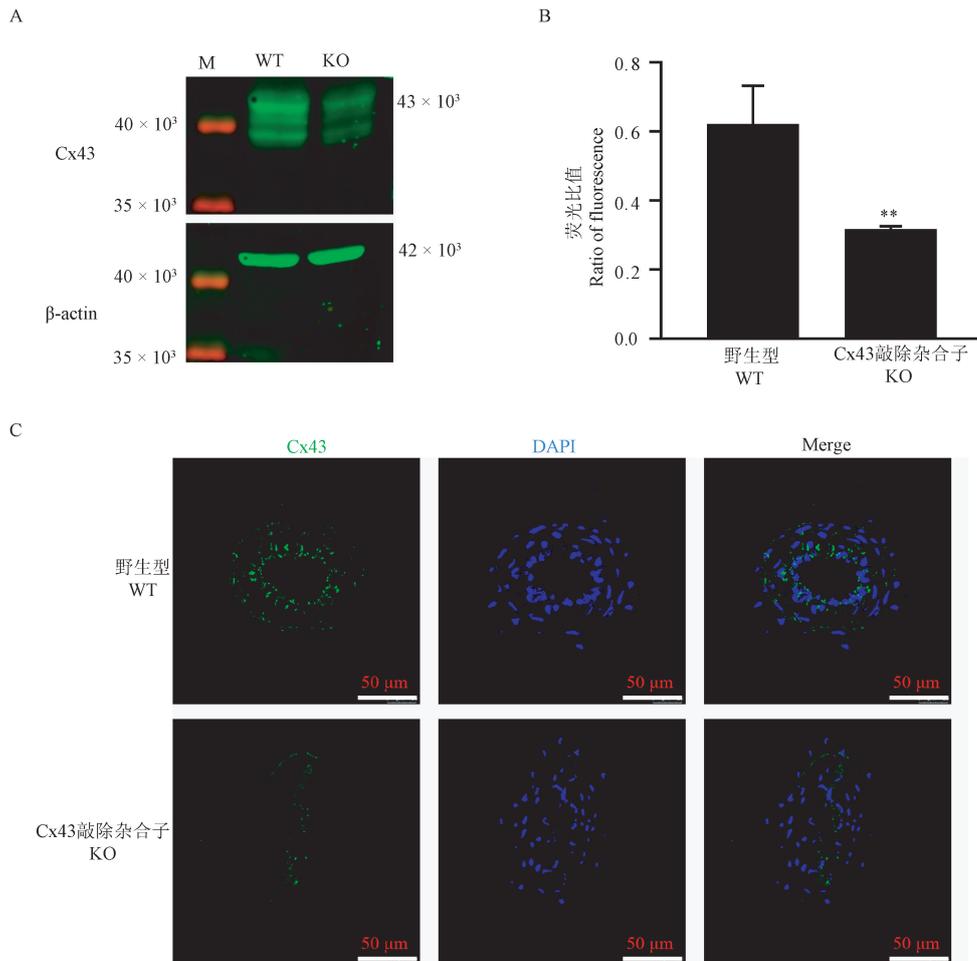


注:M:Marker (biomed, BM2000 或 BM2000⁺); A: Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} 小鼠鉴定图(1~6 为同窝小鼠的编号,其中,2 号和 3 号是 Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} 小鼠); B: Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} 小鼠鉴定图(7~12 为同窝小鼠的编号,其中,11 号是 Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} 小鼠)。

图 1 小鼠基因型的鉴定结果

Note. M. Marker (biomed, BM2000 or BM2000⁺). A. Identification of the genotype of Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} mice (1~6. The number of mice littermates, 2 and 3 are Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} mice). B. Identification of the genotype of Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} mice (7~12. The number of mice littermates, 11 is a Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} mouse).

Figure 1 Identification of the genotype of offspring mice

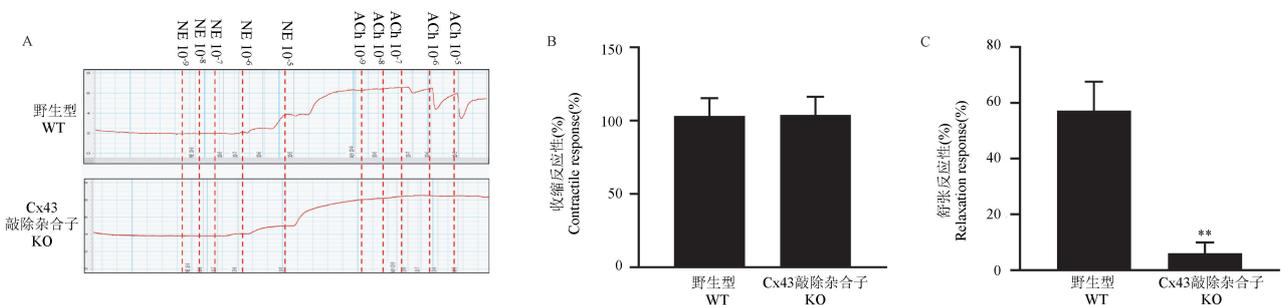


注: M: Marker (Thermo scientific, 26616); WT: 野生型; KO: Cx43 敲除杂合子; A: Western Blot 检测 SMA 中 Cx43 的表达; B: 荧光比值的统计图; 与野生型相比, ** $P < 0.01$; C: IF 检测 SMA 中 Cx43 的表达。

图 2 验证 Cx43 敲除杂合子小鼠 SMA 中 Cx43 的表达情况 ($n = 3$)

Note. M. Marker (Thermo scientific, 26616). WT. Wild type mice. KO. Heterozygous Cx43 knockout mice. A. Expression of Cx43 in SMA detected by Western Blot. B. Statistical plot of fluorescent ratio. Compared with WT group, ** $P < 0.01$. C. Expression of Cx43 in SMA detected by IF.

Figure 2 Verification of Cx43 in SMA in heterozygous Cx43 knockout mice ($n = 3$)



注: WT: 野生型; KO: Cx43 敲除杂合子; A: 代表性血管收缩/舒张曲线; B: 血管收缩反应性的统计图; C: 血管舒张反应性的统计图; 与野生型相比, ** $P < 0.01$ 。

图 3 敲除 Cx43 后对小鼠 SMA 血管舒张/收缩功能的影响 ($n = 8$)

Note. WT. Wild type mice. KO. Heterozygous Cx43 knockout mice. A. Representative curve of vascular relaxation/constriction. B. Statistical plot of contractile response. C. Statistical plot of relaxation reactivity. Compared with WT group, ** $P < 0.01$.

Figure 3 Effect of Cx43 knockout on the vascular relaxation/constriction of SMA ($n = 8$)

3 讨论

近年来国内外研究表明,血管中连接蛋白 43 (Cx43) 的表达变化及其构成的缝隙连接通道与多种血管疾病(如高血压、动脉粥样硬化等)的发生发展密切相关^[14-16],但是其具体作用机制仍不十分清楚。血管平滑肌细胞和内皮细胞是构成血管的主要细胞,它们之间的相互调节是血管病理生理研究的重要内容。因此,构建血管平滑肌细胞或内皮细胞特异性敲除 Cx43 的动物模型对深入研究 Cx43 在血管功能中的作用机制具有重要意义。血管反应性(包括收缩和舒张反应性)是指在生理或病理条件下,器官毛细血管或中小动脉通过收缩或舒张调节器官血流量,以维持器官血流稳定、适应器官功能变化的能力,是反映血管舒缩功能以及血管储备功能的重要指标^[17-18]。血管平滑肌细胞或内皮细胞之间的缝隙连接通道所传导的信号能协调血管的收缩和舒张^[19]。

连接蛋白(connexin, Cx)属于高度保守的膜蛋白,可通过形成缝隙连接通道参与细胞内外及细胞间的物质信息交流(包括直接的电和化学交流等),进而调节细胞的增殖、分化及凋亡等多种病理生理反应^[20]。有研究显示,在哺乳动物中发现的连接蛋白有 21 种,心血管系统中表达的连接蛋白主要有 Cx43、Cx40、Cx37 以及 Cx45,其中,Cx43 因其在心血管系统中的重要作用而受到关注,它在血管平滑肌细胞与血管内皮细胞中都有分布^[19]。既往对广泛性敲除 Cx43 的杂合子小鼠的研究显示,乙酰胆碱诱导的肺血管舒张反应性与野生型小鼠比较明显降低^[7]。

Cre-loxP 重组系统目前是敲除效率相对较高、应用较广的一种位点特异性的条件性基因打靶系统。该系统是通过两类小鼠来获得条件性基因敲除小鼠模型,一类是基因锚定的 flox 小鼠(各种目的基因同源重组引入 loxP 位点),另一类是 Cre 重组酶转基因小鼠(各种组织/细胞特异性或可诱导调控表达 Cre 重组酶)^[21]。本研究将 Cx43^{flox/flox} 小鼠与血管内皮细胞特异性表达 Tie2-Cre 重组酶小鼠进行交配,先通过基因组 DNA 鉴定,筛选出血管内皮细胞 Cx43 敲除的杂合子小鼠,然后进一步验证 Cx43 在血管中的蛋白表达,并初步探讨了特异性敲除 Cx43 对血管舒缩功能的影响。研究结果显示,血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠肠系膜上

动脉中 Cx43 蛋白表达水平与野生型小鼠比较明显降低,其舒张反应性与野生型小鼠比较显著降低。本研究在早期实验中拟建立血管内皮特异性敲除 Cx43 的纯合子小鼠模型,但在实验过程中发现,虽然能够繁殖获得 Tie2-Cre/Cx43^{flox/flox} 纯合子小鼠,但其发育缓慢、体型与体重均明显不如同阶段其他基因型小鼠,并且均在 4~5 周内死亡。我们推测其可能原因在于 Cx43 在多种脏器(尤其是大脑与心血管系统)的发育与功能调节中起重要作用^[22],尽管我们采用了血管特异性的 Cre 小鼠进行杂交,但由于不是诱导型的 Cre 小鼠,仍然可能出现 Cx43 纯合子小鼠发生重要器官的发育畸形和功能异常的情况,这就导致纯合子小鼠在胚胎期或者出生后不久就会死亡。我们下一步拟采用诱导型的 Tie2-Cre 小鼠进行繁殖,以获得血管特异性敲除 Cx43 的纯合子小鼠模型。此外,基因组测序在研究中越来越受到人们的关注,具有高分辨率、结果精确等优点。我们拟在下一步研究中进一步完善对 Tie2-Cre/Cx43^{flox/+} 杂合子小鼠和其他基因型小鼠的测序检测实验,以更精确证明小鼠模型结果的正确性。

综上所述,本研究完成了血管内皮细胞条件性敲除 Cx43 杂合子小鼠的构建并进行鉴定,对 Cx43 敲除的杂合子小鼠血管功能的研究也证实了 Cx43 在血管功能调节中的重要作用,尤其是对血管内皮依赖性的舒张功能的调节作用,可为深入研究 Cx43 在血管功能调节中的作用与机制提供较好的动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] Martin PE, Evans WH. Incorporation of connexins into plasma membranes and gap junctions [J]. *Cardiovasc Res*, 2004, 62(2): 378-387.
- [2] Figueroa XF, Duling BR. Gap junctions in the control of vascular function [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2009, 11(2): 251-266.
- [3] Morel S. Multiple roles of connexins in atherosclerosis-and restenosis-induced vascular remodelling [J]. *J Vasc Res*, 2014, 51(2): 149-161.
- [4] Johnstone S, Isakson B, Locke D. Biological and biophysical properties of vascular connexin channels [J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2009, 278(3): 69-118.
- [5] Simon AM, Goodenough DA. Diverse functions of vertebrate gap junctions [J]. *Trends Cell Biol*, 1998, 8(12): 477-483.
- [6] Reaume AG, de Sousa PA, Kulkarni S, et al. Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43 [J]. *Science* 1995, 267(5205): 1831-1834.
- [7] Htet M, Nally JE, Shaw A, et al. Connexin 43 plays a role in pulmonary vascular reactivity in mice [J]. *Int J Mol Sci*, 2018,

- 19(7): 1891-1911.
- [8] 吴玲玲, 朱晗玉, 洪权, 等. Mxi1 基因敲除小鼠遗传背景的背景转换研究 [J]. 军事医学, 2016, 40(6): 488-490, 511.
Wu LL, Zhu HY, Hong Q, et al. Genetic background transformation in Mxi1 gene knockout mice [J]. Mil Med Sci, 2016, 40(6): 488-490, 511.
- [9] 龚姗, 李弘, 刘叶倩, 等. 复方七苜降压片对 TNF- α 诱导的与平滑肌细胞共培养的血管内皮细胞中炎症因子与 AP-1、MCP-1 蛋白表达的影响 [J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(6): 733-741.
Gong S, Li H, Liu YQ, et al. Effects of compound Qishao Jiangya tablet on inflammatory factor, AP-1 and MCP-1 in vascular endothelial cells stimulated with TNF- α and co-cultured with smooth muscle cells [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(6): 733-741.
- [10] Zheng D, Zhang J, Zhang Z, et al. Endothelial microvesicles induce pulmonary vascular leakage and lung injury during Sepsis [J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 8: 643.
- [11] 彭小勇, 周海军, 李涛, 等. 钙敏感性受体抑制剂 Calhex231 对创伤失血性休克大鼠的保护作用 [J]. 中华创伤杂志, 2018, 34(6): 555-561.
Peng XY, Zhou HJ, Li T, et al. Protective effect of calcium-sensing receptor inhibitor Calhex231 Oil traumatic hemorrhagic shock rats [J]. Chin J Trauma, 2018, 34(6): 555-561.
- [12] 彭小勇, 李涛, 刘良明, 等. CaSR 在大鼠血管收缩/舒张反应性调节中的作用 [J]. 局解手术学杂志, 2016, 25(9): 629-632.
Peng XY, Li T, Liu LM, et al. Effects of CaSR on vascular relaxation /constriction in rats [J]. J Reg Anat Oper Surg, 2016, 25(9): 629-632.
- [13] 黄艺滢, 张文龙, 石柱英, 等. 细胞毒性 T 淋巴细胞相关抗原 4(CTLA4) 敲除和人源化小鼠模型的建立 [J]. 中国实验动物学报, 2021, 29(3): 307-315.
Huang YY, Zhang WL, Shi GY, et al. Establishment of CTLA4-knockout mice and CTLA4-humanized mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2021, 29(3): 307-315.
- [14] 吴立哈, 巫相宏, 闭奇, 等. PPAR- γ 激动剂干预 TLR4/PI3K 通路对脂多糖诱导人冠状动脉血管内皮细胞 Cx43 表达的影响 [J]. 广西医科大学学报, 2021, 38(6): 1124-1128.
Wu LH, Wu XH, Bi Q, et al. Effect of PPAR- γ agonist on Cx43 expression in LPS-induced human coronary artery endothelial cells by regulating TLR4/PI3K pathway [J]. J Guangxi Med Univ, 2021, 38(6): 1124-1128.
- [15] 汪小英, 余艳荣, 王美玲, 等. 吴茱萸次碱抑制 Ang II 诱导的血管平滑肌 Cx43 表达上调 [J]. 中国药理学通报, 2018, 34(8): 1139-1145.
Wang XY, Yu YR, Wang ML, et al. Rutaecarpine prevents up-regulation of Cx43 in vascular smooth muscle cells induced by angiotension II [J]. Chin Pharmacol Bull, 2018, 34(8): 1139-1145.
- [16] 吴亚辉, 乔梁, 林洪启. 基于 Cx43/mito-KATP 信号轴观察右美托咪定预处理对大鼠离体缺血再灌注心脏的保护机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(10): 76-84.
Wu YH, Qiao L, Lin HQ. The protective mechanism of dexmedetomidine preconditioning on ischemia-reperfusion of the isolated rat heart uses the connexin43/mito-KATP signaling axis [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(10): 76-84.
- [17] Wszedybyl-Winklewska M, Wolf J, Szarmach A, et al. Central sympathetic nervous system reinforcement in obstructive sleep apnoea [J]. Sleep Med Rev, 2018, 39(3): 143-154.
- [18] Bhogal AA, Philippens ME, Siero JC, et al. Examining the regional and cerebral depth-dependent BOLD cerebrovascular reactivity response at 7T [J]. Neuroimage, 2015, 114(8): 239-248.
- [19] 于学军, 何作云. 缝隙连接在血管内皮细胞和平滑肌细胞间信号传递的研究进展 [J]. 重庆医学, 2010, 39(11): 1448-1450.
Yu XJ, He ZY. Research of gap junction in signal transmission between vascular endothelial cells and smooth muscle cells [J]. Chongqing Med, 2010, 39(11): 1448-1450.
- [20] 付艳琪, 伍宇思, 罗丹. Cx43 在血管平滑肌及血管重构中的研究进展 [J]. 重庆医科大学学报, 2016, 41(12): 1254-1257.
Fu YQ, Wu YS, Luo D. Research of Cx43 in vascular smooth muscle and vascular remodeling [J]. J Chongqing Med Univ, 2016, 41(12): 1254-1257.
- [21] Ling YH, Ma JX, Qi XL, et al. Novel rat model of multiple mitochondrial dysfunction syndromes (MMDS) complicated with cardiomyopathy [J]. Anim Mod Exp Med, 2021, 4(4): 381-390.
- [22] 李行, 景雅, 李云华, 等. Cx43 敲除小鼠胚胎心脏流出道内第二生心区和心脏神经嵴来源间充质细胞减少 [J]. 中国组织工程研究, 2021, 25(13): 2018-2024.
Li H, Jing Y, Li YH, et al. A downtrend of mesenchymal cells derived from the second heart field and cardiac neural crest in the outflow tract of Cx43 knockout embryonic mouse heart [J]. Chin J Tissue Eng Res, 2021, 25(13): 2018-2024.

[收稿日期] 2022-05-24