

猪 *VHL* 基因克隆及敲低克隆胚胎的构建

金红红, 王健宇, 王芳, 马婧, 牟彦双, 刘忠华

东北农业大学胚胎工程实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030

金红红, 王健宇, 王芳, 等. 猪 *VHL* 基因克隆及敲低克隆胚胎的构建. 生物工程学报, 2013, 29(6): 716-725.

Jin HH, Wang JY, Wang F, et al. Porcine *VHL* gene cloning and construction of *VHL* knockdown cloned embryos. Chin J Biotech, 2013, 29(6): 716-725.

摘要: 通过在细胞和胚胎水平对猪 Von Hippel-Lindau (*VHL*) 基因进行了基因敲低研究, 以便为建立 *VHL* 疾病模型猪奠定基础。研究首先通过 3'RACE 和 5'RACE 克隆得到猪 *VHL* 基因 cDNA 全长序列 (2 725 bp), Real-time PCR 结果表明 *VHL* 基因广泛表达于猪的各种组织器官, 其中在肾上腺、肝脏、胰腺、心脏和睾丸等组织器官高量表达。进一步在猪 iPS 细胞中对 5 条干扰片段进行筛选, 获得 2 条高效的干扰片段, 干扰效率分别达到 72% ($P=0.0012$) 和 64% ($P<0.01$)。以稳定干扰 *VHL* 基因的猪胎儿成纤维细胞为核供体, 构建克隆胚胎, 结果表明, 克隆胚胎的发育能力与对照组相比没有明显差异, 而且在克隆囊胚中 *VHL* 基因的干扰效率达到 71% ($P<0.01$)。综上所述, 文中获得了猪 *VHL* 基因全长序列并获得该基因稳定敲低的猪细胞和胚胎, 从而为 *VHL* 疾病模型猪的构建奠定了良好的基础。

关键词: *VHL* 基因, RNA 干扰, 猪

Porcine *VHL* gene cloning and construction of *VHL* knockdown cloned embryos

Honghong Jin, Jianyu Wang, Fang Wang, Jing Ma, Yanshuang Mu, and Zhonghua Liu

Laboratory of Embryo Engineering, Department of Life Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China

Abstract: Von Hippel-Lindau(*VHL*) disease is an autosomal dominant disorder and its clinical manifestation including

Received: December 12, 2012; **Accepted:** March 14, 2013

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2012AA020601), Key Technologies Research and Development Program of China (No. 2011BAI15B02), National Major Special Project on New Varieties Cultivation for Transgenic Organisms (Nos. 2011ZX08009-003-006, 2011ZX08006-002).

Corresponding author: Zhonghua Liu. Tel: +86-451-55191747; E-mail: liu086@126.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2012AA020601), 国家科技支撑计划 (No. 2011BAI15B02), 国家转基因生物新品种培育重大专项 (Nos. 2011ZX08009-003-006, 2011ZX08006-002) 资助。

网络出版时间: 2013-05-15

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20130515.1606.002.html>

haemangioblastomas of the central nervous system, renal cell carcinoma, haemochromocytomas, and pancreatic cyst. The deletion, mutation and promoter methylation of *VHL* gene can cause *VHL* disease. Swine is considered as an ideal model for human disease because of its physiological and anatomical similarity to human. We cloned pig *VHL* gene that is 2 725 bp in length. *VHL* highly expressed in adrenal gland, liver, pancreas, heart and testis. We designed 5 shRNAs and screened the most effective interference RNA fragment with a knockdown efficiency of 72%. Porcine embryonic fibroblasts stably transfected with pGenesil-shRNA vector were used as donor cells for nuclear transfer and there was no significant difference of embryo development compared with the control group. Moreover, *VHL* was efficiently knocked-down with efficiency of 71% in porcine cloned blastocyst, these results lay a solid foundation for constructing the *VHL* knock-down model of pig.

Keywords: *VHL* gene, RNA interference, pig

Von Hippel-Lindau (*VHL*) 疾病是临床上常染色体显性遗传病, 主要死因是肾透明细胞癌^[1]和中枢神经系统成血管细胞瘤引起的并发症^[2-4]。目前研究表明 *VHL* 为肿瘤抑制基因并且参与多种生物学功能, *VHL* 基因编码的蛋白 (以下称为 *VHL*) 可特异性结合 ElonginC、B 亚单位形成 p*VHL*-ElonginC-ElonginB 复合物, 从而阻断了 ElonginABC 复合物的形成, 抑制了 RNA 聚合酶 II 的转录延长, 进一步达到抑制 mRNA 合成的目的^[5-6]。此外 *VHL* 还参与细胞外基质的组装^[7-9]、控制细胞外围微管的稳定性以及调控细胞的凋亡和衰老等过程^[10-14]。1993 年, Latif 等通过连锁分析将人 *VHL* 基因定位于染色体 3p25-26, 并首次成功克隆了人 *VHL* 基因^[15]。*VHL* 基因缺失, 会使发育至 E10.5-E12.5 d 的小鼠胚胎因缺少血管导致死亡^[16]。Ma 等构建了接近于人 *VHL* 疾病的小鼠模型, 采用 β -actin 启动子介导的 Cre/lox 定点重组技术的方法, *VHL* 基因敲除后小鼠会引发肝血管瘤, 在胰腺、肾脏、脾和心脏中同样会引发血管扩张和血管再生等^[17]。

猪的心血管系统、消化系统、营养需要以及矿物质代谢等都与人类较接近^[18-21], 因此可能是较好的 *VHL* 疾病模型。但目前, 对猪 *VHL* 基因

的研究较少, 而且并没有得到该基因的全长序列。据此, 本研究首先利用 3'和 5'-RACE 获得猪 *VHL* 基因全长序列, 并应用 RNAi 技术, 在细胞和胚胎中对该基因进行有效干扰为 *VHL* 疾病模型猪的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

新生巴马仔猪源自东北农业大学实验基地猪场, 在实验室解剖取材, 将取得的各器官组织样 (包括肝脏、肾脏、脑、脊髓、肾上腺、结肠、胰腺、心脏、睾丸和肺) 保存于液氮中。

实验所用质粒和菌株包括干扰载体 pGenesil1.0、大肠杆菌 DH5 α 、原代猪胎儿成纤维细胞和猪 iPS (Induced pluripotent stem cells) 细胞均来自本实验室。

1.2 主要试剂

LA Taq 酶、PMD-18T、T4 DNA 连接酶、3'-RACE 试剂盒、5'-RACE 试剂盒、限制性内切酶均购自 TaKaRa 公司; 脂质体 2000 和 Trizol 试剂均购自 Invitrogen 公司; 胶回收试剂盒购自 Axygen 公司; 质粒小量及大量提取试剂盒购自天根生物有限公司; DNA marker 购自全式金公

司、逆转录试剂盒来自 ABI 公司；DNA 测序由上海立菲生物技术有限公司完成。

1.3 猪 *VHL* 基因的克隆

克隆猪 *VHL* 基因保守序列：25 μ L 总体积的 PCR 反应体系包括：模板 1 μ L，引物各 0.5 μ L，10 \times PCR 缓冲液 2.5 μ L，dNTPs 2.5 μ L，*rTaq* 0.3 μ L，dH₂O 17.7 μ L。PCR 反应参数设置为：94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min；94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，60 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，35 个循环；72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳并观察结果，连接 PMD-18T 并测序。共进行了 3 次 3'-RACE 扩增和 5'-RACE 扩增，按照 TaKaRa 公司试剂盒说明书标准操作。引物序列详见表 1。

根据 3'-RACE 和 5'-RACE 扩增获得的序列信息，设计引物利用重叠 PCR 的方法扩增 *VHL* 基因全长 (图 1)。扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳并观察结果，连接 PMD-18T 载体并测序。

1.4 Real-time PCR 检测 *VHL* 基因在猪各组织器官中的表达情况

用 Trizol 试剂提取了小巴马猪肝脏、肾脏、脑、脊髓、肾上腺、结肠、胰腺、心脏、睾丸、

肺和 pm20 (iPS 的一个系) 的 RNA，反转录为 cDNA。Real-time PCR 检测以上 10 种组织中 *VHL* 基因的表达量。反应体系为 20 μ L：上、下游引物各 0.4 μ L，SYBR Mix 10 μ L，ddH₂O 7.8 μ L，cDNA 1 μ L。循环参数：95 $^{\circ}$ C 15 s；95 $^{\circ}$ C 5 s，60 $^{\circ}$ C 34 s，40 个循环，95 $^{\circ}$ C 15 s，60 $^{\circ}$ C 1 min，95 $^{\circ}$ C 15 s。反应在 ABI 7500 Real Time PCR 仪上进行，以 β -actin 作为内参对照，引物序列具体见表 1。

1.5 干扰片段的设计及干扰载体的构建

干扰片段设计：针对猪 *VHL* 基因的 CDS 序列及 3'非编码区，通过 Ambion 网站设计并筛选出 5 条 shRNA 干扰片段 (表 2)，并对这些选定片段提交到 NCBI 网站上进行 Blast 比对，确保了只针对 *VHL* 基因起作用。

重组载体构建：合成的带有 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点的 5 条寡核苷酸单链干扰片段，复性成双链，连接到经 *Bam*H I 和 *Hind* III 线性化的 pGenesil-1 载体。测序正确的 5 种干扰载体。大量提取后测质粒浓度，用于后续转染。

将 pGenesil-1.0-1-pGenesil-1.0-5 五种干扰载体以脂质体的方式分别稳定转染猪 iPS 细胞。24 h 后观察绿色荧光蛋白的表达情况，挑取克隆并纯化克隆，收集全部表达绿色荧光的克隆，提取 RNA 并反转录为 cDNA，冻于 -40 $^{\circ}$ C。Real-time 检测 5 种干扰载体的干扰效率。以 β -actin 作为内参对照，以猪 iPS 细胞中 *VHL* 基因的表达量为 1 (control)，反应在 ABI 7500 Real Time PCR 仪上进行，按照 TaKaRa 试剂盒说明书操作。

1.6 猪克隆胚胎的构建

筛选高效的干扰载体稳定转染猪胎儿成纤

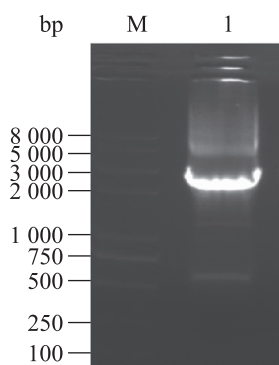


图 1 猪 *VHL* 基因全长的扩增

Fig. 1 The full length of the *VHL* gene cloning by overlapping PCR. M: DNA marker; 1: *VHL* gene.

表 1 引物序列与扩增片段长度

Table 1 Primers and amplified fragment length

Primer name		Primer sequence (5'-3')	Length (bp)
Conserved sequence	Forward	AGGAGATGGAGCCGGGCGG	302
	Reverse	TGTGATATTGGCAAAAATCGG	
3'-RACE-1	GSP1	AACTGAACTATTTGTGCCATCTCT	879
	GSP2	TGTTGATGGACAGCCGATTTTTGC	
3'-RACE-2	GSP1	ATCCATCTACTCTTTGCGACC	618
	GSP2	TGGGGACCTAAAGCGTGTA	
3'-RACE-3	GSP1	GGTTCGGTTTTACATAACTGAGAT	676
	GSP2	ACAGTTTTGTATTCTACTTTCTTATT	
5'-RACE	GSP1	ATTGAGAGATGGCACAAATAGTTC	250
	GSP2	ATGTCCCAGCATCTCGGAAGAGCCAA	
<i>VHL</i> (full length)	Forward	ATGCCCCGGAAGGCTG	2 725
	Reverse	GCTAAATGCACCACCACATCCTA	
Real-time	Forward	GCCGCATCCACAGTTACCGA	161
	Reverse	GGAGGCATCGTTCTTTTCAGGGTAT	
β -actin	Forward	AGATCGTGCGGGACATCAAG	72
	Reverse	GCGGCAGTGCCATCTC	

表 2 猪 *VHL* 基因干扰片段Table 2 shRNA sequences of the pig *VHL* gene

Sorts of shRNA	shRNA sequences (5'-3')	Length of target site (bp)
anti- <i>VHL</i> -shRNA1	<u>GTTATTGCTCACACACCGTGTGTGCTGTCCACGGTGTGTGAGCAATAAC</u>	1 590
anti- <i>VHL</i> -shRNA2	<u>TGGACAAATCAGTCAATGCGTGTGCTGTCCGCAATTGACTGATTTGTCCA</u>	1 106
anti- <i>VHL</i> -shRNA3	<u>ATCAGTCAATGCTTTGGTGGTGTGCTGTCCACCAAAGCATTGACTGAT</u>	1 113
anti- <i>VHL</i> -shRNA4	<u>TGTTGATGGACAGCCGATTGTGTGCTGTCCAATCGGCTGTCCATCAACA</u>	379
anti- <i>VHL</i> -shRNA5	<u>CGGTCCTGATCAGTCTTGAGTGTGCTGTCTCAAGACTGATCAGGACCG</u>	646

Note: the sense sequence and antisense are both 19 bp and the loop is 11 bp.

维细胞系，新霉素筛选 2 周后进行 DNA 水平鉴定，阳性细胞作为核移植的供体细胞。普通成纤维细胞为阴性对照，用固定管吸住一个卵母细胞，在显微操作液（添加 7.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 细胞松弛素 B 的普通操作液）中用注射针吸除第一极体及周围的部分胞质完成去核，并注入一个供体细胞于

透明带下，使之与卵母细胞质膜紧密接触，在融合液中直流电击（1.2 kV/cm、30 μs 、2 次脉冲）诱导体细胞与去核卵母细胞融合形成重构胚并使之被激活，然后进行胚胎培养。

核移植后 48 h 和 156 h 分别统计试验组和对照组胚胎的卵裂率、囊胚率及囊胚细胞

数。Real-time PCR 检测囊胚中 *VHL* 基因的表达水平。

2 结果与分析

2.1 猪 *VHL* 基因的克隆及序列分析

猪 *VHL* 基因序列全长为 2 725 bp, 定位于 13 号染色体上, 通过 NCBI 网站 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 将 *VHL* 克隆序列与预测序列进行 Blast 比对, 核苷酸序列相似性为 100%。通过基因结构分析网站 (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) 分析发现, 5'非编码区域为 65 bp, 3'非编码区域为 2 042 bp, 编码区为 618 bp, 共编码 205 个氨基酸。猪 *VHL* 基因与人和小鼠的 *VHL* 基因的 cDNA 编码区有较高的同源性, 同源性分别为 79.85% 和 71.36%, 其蛋白与人和小鼠的 *VHL* 蛋白序列同源性分别为 78.08% 和 76.10% (图 2)。

为了阐述猪 *VHL* 基因及其他物种的 *VHL* 基因的分子进化关系, 我们基于氨基酸序列利用 MEGA 软件构建系统树。分析发现进化树可以分为灵长类、偶蹄类、啮齿类和节肢动物类。整个系统树的分析结果基本符合常规分类学。从分支上可以看出猪的 *VHL* 基因更接近于人类 (图 3)。

2.2 猪 *VHL* 基因在各组织中的表达分析

在出生 2 d 的巴马猪中检测 *VHL* 基因的表达情况 (图 4)。以 β -actin 作为内参对照, 相对于肝脏中 *VHL* 基因的表达量, 分析其余组织中 *VHL* 基因的表达情况, 发现 *VHL* 基因在肝脏、肾上腺、胰腺、心脏、睾丸中的表达量显著高于肾脏、大脑、脊髓、肠和肺等组织 ($P < 0.01$), 而且在 iPS 细胞 (pm20) 中 *VHL* 基因的表达量也较高, 与肝脏没有显著差异 ($P = 0.4626$)。

Pig	MPRKAG----KAGNAEEA-----RAGAEAEAGA-ESGT	27
Human	MPRRAENWDEAEVGAEEAGVEEYGPPEEDGGEEESGAEESGP	40
Mouse	MPRKAA-----SPEEAAG-EPGP	17
Pig	EESDSKELGAK-EMEAGRSRPVLRVNSREPSQVIFCNRS	66
Human	EESGPEELGAEEMEAGRPRPVLRVNSREPSQVIFCNRS	80
Mouse	EE-----MEAGRPRPVLRVNSREPSQVIFCNRS	46
Pig	PRVVLPVWLNFDGEPQPYPTLPPGTGRRIHRSYRGHLWLFR	106
Human	PRVVLPVWLNFDGEPQPYPTLPPGTGRRIHRSYRGHLWLFR	120
Mouse	PRVVLPLWLNFDGEPQPYPIPPGTGRRIHRSYRGHLWLFR	86
Pig	DAGTSDGLLVNQTELFVPSLNVDGQPIFANITLPVYTLKE	146
Human	DAGTHDGLLVNQTELFVPSLNVDGQPIFANITLPVYTLKE	160
Mouse	DAGTHDGLLVNQTELFVPSLNVDGQPIFANITLPVYTLKE	126
Pig	RCLQVVRSLVRPENYRRLDIARSLYEDLEDHPNVWKDLER	186
Human	RCLQVVRSLVKPENYRRLDIVRSLYEDLEDHPNVQKDLER	200
Mouse	RCLQVVRSLVKPENYRRLDIVRSLYEDLEDYPSVRKDIQR	166
Pig	LKQEHMENQRTAGETEDFN	205
Human	LTQERIAHQRMGD	213
Mouse	LSQEHLESQHLEEEP	181

图 2 *VHL* 序列同源性比对分析

Fig. 2 Multiple sequence alignment result of *VHL* protein.

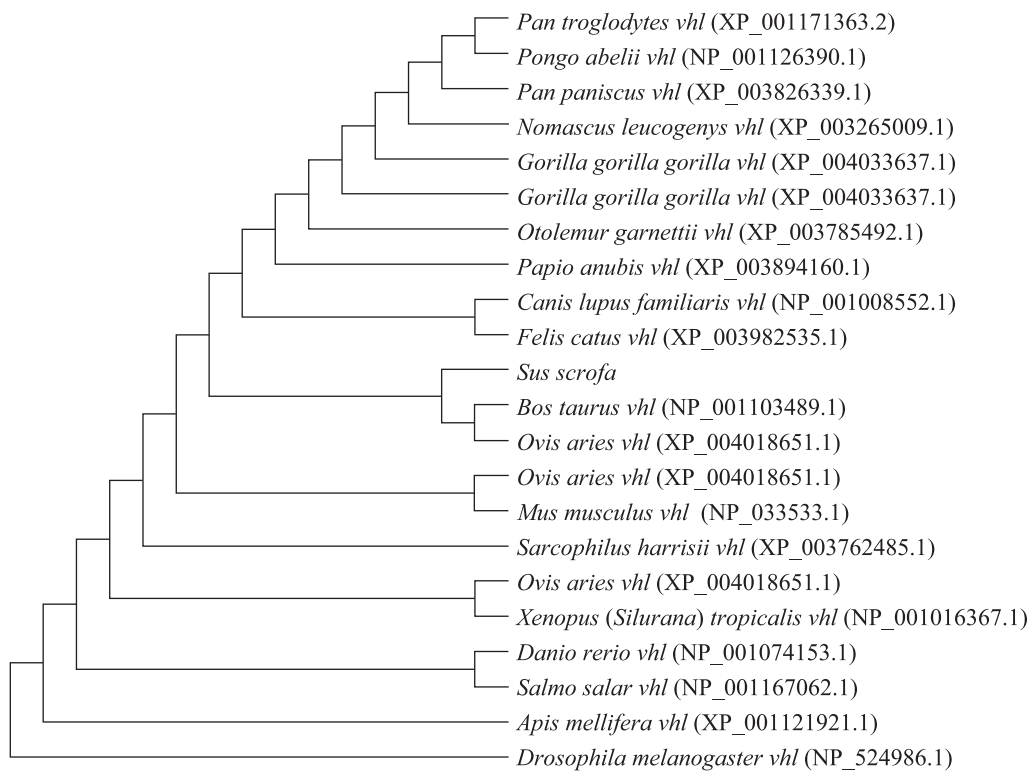


图 3 *VHL* 基因系统树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree analysis of *VHL* gene.

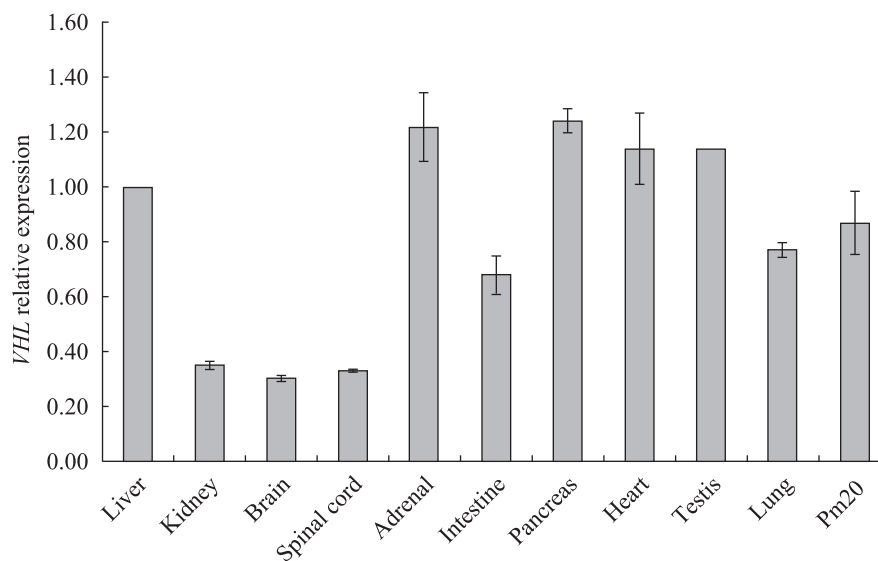


图 4 猪不同组织中 *VHL* 基因表达量的分析

Fig. 4 *VHL* expression in tissues of pig.

2.3 *VHL* 基因的干扰片段在猪 iPS 细胞中的筛选

将 pGenesil-1-pGenesil-5 干扰载体稳定转染猪 iPS 细胞筛选获得纯化的表达绿色荧光的克隆 (图 5A、B)。

Real-time PCR 检测干扰效率, 结果表明, 在 pm20 中, 干扰片段 sh1 和 sh2 显著敲低了 *VHL* 基因的表达, 分别降低了 64% 和 72% (图 5C, $P < 0.01$), 而 sh3、sh4 和 sh5 对 *VHL* 基因的表达没有显著影响 (图 5C, $P > 0.05$)。

2.4 *VHL* 基因的干扰对克隆胚胎发育的影响

将 sh1 和 sh2 两个干扰片段共同连接到 pGenesil-1.0 载体上, 以电转的方式获得稳定转染猪胎儿成纤维细胞, 作为核供体构建克隆胚胎, 结果表明与对照组比较试验组在卵裂率、囊胚率和囊胚细胞数上没有明显差异 (表 3), 进一步 Real-time PCR 结果显示试验组克隆囊胚 *VHL* 基因表达量显著降低了 71% (图 6, $P < 0.01$), 表明所筛选的干扰片段可以有效地在胚胎中敲低猪 *VHL* 基因。

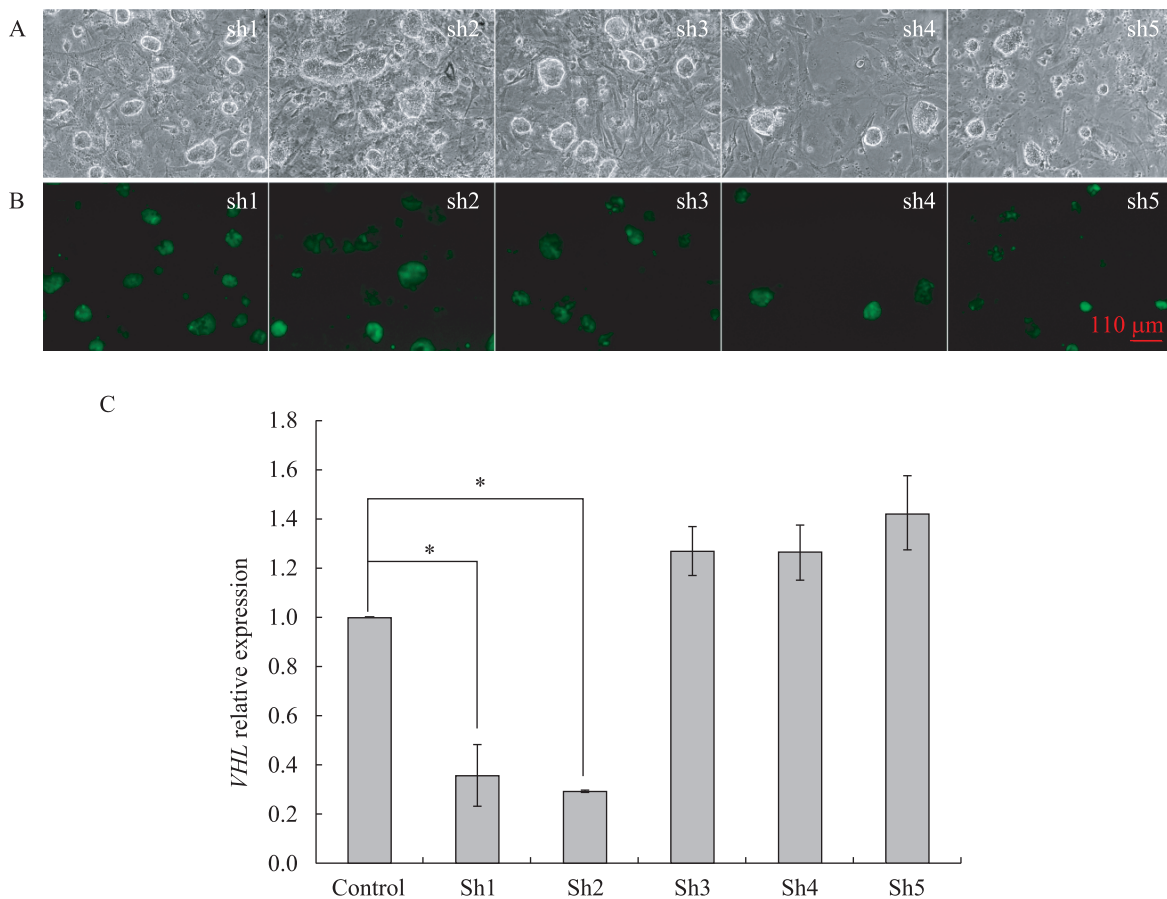


图 5 猪 *VHL* 基因在 iPS 细胞中的干扰克隆及其 Real-time 检测干扰片段的干扰效率

Fig. 5 *VHL* RNAi in iPS of pig. (A) Sh1-Sh5 were observed in the light. (B) Sh1-Sh5 were observed in the fluorescence microscopic. (C) Screen of effective interference fragment by Real-time PCR. The interference efficiency of sh1 and sh2 fragment is about 64% and 72% respectively. *: $P < 0.01$.

表 3 核移植胚胎发育数据

Table 3 Development of nuclear transfer embryos

Groups	Cloned embryos	Replicates	Number (% , $\bar{x} \pm s$)		Cells number ($\bar{x} \pm s$) of blastocysts
			Cleavage embryos	Blastocysts	
<i>VHL</i> knockdown	159	3	105 (78.57±4.67)	18 (13.63±4.51)	34.67±6.11
Control	169	3	71 (77.02±3.98)	15 (17.43±9.40)	36.67±5.51

Note: *: no significant difference between experiment and control group ($P > 0.05$).

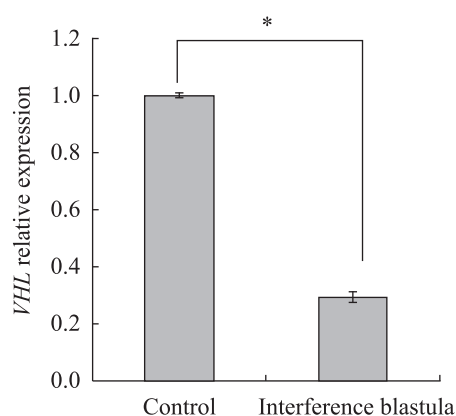


图 6 Real-time PCR 检测 *VHL* 在猪克隆胚胎中的敲低效率

Fig. 6 *VHL* expression level in knockdown blastocyst by Real-time PCR. The interference efficiency is about 71%. *: $P < 0.01$.

3 讨论

我们克隆获得了猪 *VHL* 基因 mRNA 全长, 通过对出生 2 d 的仔猪组织中 *VHL* 基因的表达情况分析, 猪 *VHL* 基因在肝脏、肾上腺、胰腺、心脏、睾丸中的表达量较高。根据克隆获得的序列信息设计了干扰片段, 稳定转染猪 iPS 细胞系筛选获得高效的干扰片段, 并在猪克隆胚胎中成功敲低了 *VHL* 基因, 从而为后续获得 *VHL* 猪疾病模型奠定基础。

猪 *VHL* 基因定位于 13 号染色体上, mRNA

全长 2 725 bp, 共编码 205 个氨基酸。小鼠和人的 *VHL* 基因蛋白序列同源性为 76.10%, 而猪和人的 *VHL* 基因蛋白序列同源性为 78.08%, 而且第 60~200 氨基酸处仅有 4 个氨基酸的差异。说明 *VHL* 基因在人和猪中同源性较高。文献报道人 *VHL* 基因的 103~124 氨基酸编码的蛋白对肾细胞瘤的生长和浸染有抑制作用^[22], 而猪 103~124 氨基酸序列和人相同, 从而预测猪 *VHL* 基因功能与人更相似。

VHL 基因缺失会使胚胎致死, 因此基因敲低的方法是研究 *VHL* 基因的功能及其构建疾病模型思路之一。2006 年, Hong 等利用四环素诱导重组酶 Cre 转基因技术可以在特定时期失活 *VHL* 基因, 发育至 E14.5 d 的小鼠胚胎 *VHL* 基因失活后会引发组织器官大面积的损坏包括胚胎的血管缺陷和肝脏损坏等, 发育至 E15.0 d 的小鼠胚胎 *VHL* 基因失活后卵黄囊的血液循环受阻^[23-24]。在小鼠肾脏中特异性敲除 *VHL* 基因会引发肾囊肿等疾病^[25]。我们通过相对定量的方法检测到 iPS 细胞 (pm20) 中 *VHL* 基因的表达量也较高, 这与文献中报道 *VHL* 基因可与 *klf4*^[26] 多能性因子相互作用吻合。所以我们选择猪 iPS 细胞为筛选有效干扰片段的细胞系, Real-time PCR 检测干扰效率可高达 72%。将稳定转染干扰载体

的猪胎儿成纤维细胞作为核供体,核移植后检测囊胚中 *VHL* 基因的表达量为对照组的 29%。另外, *VHL* 基因敲低后胚胎的卵裂率和囊胚率与对照组相比并没有明显的差异,说明 *VHL* 基因敲低并没有影响猪早期胚胎发育。我们获得了 *VHL* 基因敲低后的囊胚,验证了 *VHL* 干扰片段在胚胎水平的有效性,从而为后续构建四环素诱导的 *VHL* 基因敲低转基因猪及组织特异性 *VHL* 基因敲低猪打下基础。

综上所述我们克隆了猪 *VHL* 基因并且根据序列信息设计干扰片段,筛选出高效的干扰片段,并获得了猪 *VHL* 基因高效干扰的细胞系和克隆胚胎,为后续构建疾病模型猪奠定了基础。

致谢:感谢中山大学项鹏教授对本文的支持和指导!

REFERENCES

- [1] Calzada MJ. Von Hippel-Lindau syndrome: molecular mechanisms of the disease. *Clin Transl Oncol*, 2010, 12: 160–165.
- [2] Lonser RR, Glenn GM, Walther M, et al. Von Hippel-Lindau disease. *Lancet*, 2003, 361: 2059–2067.
- [3] Richard S, David P, Marsot-Dupuch K, et al. Central nervous system hemangioblastomas, endolymphatic sac tumors, and von Hippel-Lindau disease. *Neurosurg Rev*, 2000, 23: 1–24.
- [4] Wanebo JE, Lonser RR, Glenn GM, et al. The natural history of hemangioblastomas of the central nervous system in patients with von Hippel-Lindau disease. *J Neurosurg*, 2003, 98: 82–94.
- [5] Maher ER, Neumann HP, Richard S. Von Hippel-Lindau disease: a clinical and scientific review. *Eur J Hum Genet*, 2011, 19: 617–623.
- [6] Kaelin WG Jr. Molecular basis of the VHL hereditary cancer syndrome. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(9): 673–682.
- [7] Hes FJ, Hoppener JW, Luijt RB, et al. Von Hippel-Lindau disease. *Hered Cancer Clin Practice*, 2005, 3(4): 171–178.
- [8] Ohh M, Yauch RL, Lonergan KM, et al. The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is required for proper assembly of an extracellular fibronectin matrix. *Mol Cell*, 1998, 1: 959–968.
- [9] Kurban G, Hudon V, Duplan E, et al. Characterization of a von Hippel Lindau pathway involved in extracellular matrix remodeling, cell invasion and angiogenesis. *Cancer Res*, 2006, 66: 1313–1319.
- [10] Kuehn EW, Walz G, Benzing T. Von Hippel-Lindau: a tumor suppressor links microtubules to ciliogenesis and cancer development. *Cancer Res*, 2007, 67: 4537–4540.
- [11] Sinha S, Mondal G, Hwang EJ, et al. Von Hippel-Lindau gene product directs cytokinesis: a new tumor suppressor function. *J Cell Sci*, 2011, 124: 2132–2142.
- [12] William G, Kaelin Jr. The von Hippel-Lindau tumour suppressor protein: O₂ sensing and cancer. *Nat Rev Cancer*, 2008, 8: 865–873.
- [13] Barontini M, Dahia PL. VHL disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2010, 24: 401–413.
- [14] Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol*, 2004, 22: 4991–5004.
- [15] Latif F, Tory K, Gnarr J, et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science*, 1993, 260: 1317–1320.
- [16] Gnarr JR, Ward JM, Porter FD, et al. Defective placental vasculogenesis causes embryonic lethality in VHL-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA*,

- 1997, 94: 9102–9107.
- [17] Barry RE. Functional Analysis of the von Hippel-Lindau Tumour Suppressor and Its Role in Tumorigenesis. 1st ed. Zürich: Eidgenössische Technische Hochschule Press, 2004: 91–94.
- [18] Lunney JK. Advances in swine biomedical model genomics. *Int J Biol Sci*, 2007, 3(3): 179–184.
- [19] Aigner B, Renner S, Kessler B, et al. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J Mol Med (Berl)*, 2010, 88: 653–664.
- [20] Schook L, Beattie C, Beever J, et al. Swine in biomedical research: creating the building blocks of animal models. *Anim Biotechnol*, 2005, 16: 183–190.
- [21] Ibrahim Z, Busch J, Awwad M, et al. Selected physiologic compatibilities and incompatibilities between human and porcine organ systems. *Xenotransplantation*, 2006, 13: 488–499.
- [22] Datta K, Sundberg C, Karumanchi SA, et al. The 104-123 amino acid sequence of the beta-domain of von Hippel-Lindau gene product is sufficient to inhibit renal tumor growth and invasion. *Cancer Res*, 2001, 61: 1768–1775.
- [23] Haase VH. The VHL tumor suppressor in development and disease: functional studies in mice by conditional gene targeting. *Semin Cell Dev Biol*, 2005, 16: 564–574.
- [24] Hong SB, Furihata M, Baba M, et al. Vascular defects and liver damage by the acute inactivation of the VHL gene during mouse embryogenesis. *Lab Invest*, 2006, 86: 664–675.
- [25] Rankin EB, Tomaszewski JE, Haase VH. Renal cyst development in mice with conditional inactivation of the von Hippel-Lindau tumor suppressor. *Cancer Res*, 2006, 66: 2576–2583.
- [26] Gamper AM, Qiao X, Kim J, et al. Regulation of *klf4* turnover reveals an unexpected tissue-specific role of pVHL in tumorigenesis. *Molecular Cell*, 2012, 45: 233–243.

(本文责编 郝丽芳)