

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01045

ZBTB20 基因敲除小鼠出生后肝脏甲胎蛋白基因持续高表达的病理学意义

张 海¹, 谢志芳¹, Claude Szpirer², 章卫平^{1*}

1. 第二军医大学基础部病理生理学教研室, 上海 200433

2. 比利时布鲁塞尔大学生物与分子医学研究所, 12 Rue Profs Jeneer & Brachet, B-6041 Gosselies, Belgium

[摘要] **目的** 探讨出生后肝脏甲胎蛋白(AFP)基因异常高表达在 ZBTB20 基因敲除小鼠生长发育障碍、严重低血糖和未成年死亡等表型中可能的病理作用。**方法** 将 ZBTB20 单基因敲除小鼠与 AFP 单基因敲除小鼠杂交, 建立 ZBTB20 与 AFP 的联合基因敲除小鼠模型, 观察并监测其与 ZBTB20 单基因敲除小鼠在生长发育、存活率及血糖水平上的差异。**结果** ZBTB20/AFP 双基因敲除小鼠繁殖成功后, 通过观察和监测发现其在生长发育、存活率及血糖代谢等方面与 ZBTB20 单基因敲除小鼠相比无明显差异。**结论** ZBTB20 单基因敲除小鼠生长发育障碍、严重低血糖和未成年死亡等表型与其 AFP 基因出生后异常开放无显著关系。

[关键词] 甲胎蛋白类; ZBTB20; 锌指蛋白; 基因敲除小鼠

[中图分类号] R 349.64 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2010)10-1045-04

Pathological implication of postnatally up-regulated AFP expression in ZBTB20 knockout neonatal mice

ZHANG Hai¹, XIE Zhi-fang¹, Claude Szpirer², ZHANG Wei-ping^{1*}

1. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Universit Libre de Bruxelles, Institut de Biologie et de M decine Mol eculaires, 12 Rue Profs Jeneer & Brachet, B-6041 Gosselies, Belgium

[Abstract] **Objective** To investigate the pathological roles of postnatally up-regulated alpha-fetoprotein(AFP) expression in ZBTB20 knockout mice in postnatal growth retardation, metabolic dysfunction, and pre-mature mortality. **Methods** ZBTB20 and AFP knockout mice were generated by crossbreeding ZBTB20 knockout mice with AFP knockout mice. The postnatal growth, survival rate, and blood glucose of ZBTB20/AFP double knockout mice were observed and compared with those of ZBTB20 knockout mice. **Results** There were no significant differences in postnatal growth, survival, and glucose homeostasis between ZBTB20/AFP double knockout mice and ZBTB20 knockout mice. **Conclusion** The postnatally up-regulated liver AFP in ZBTB20 knockout mice is not associated with the growth retardation, hypoglycemia, or pre-mature mortality.

[Key words] alpha-fetoproteins; ZBTB20; zinc finger protein; knockout mice

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31(10):1045-1048]

甲胎蛋白(alpha-fetoprotein, AFP)是哺乳动物胚胎时期的血清蛋白, 主要由卵黄囊和胎肝细胞产生, 出生后 AFP 基因快速失活。但在成年肝细胞恢复增殖的情况下, 如肝再生和肝细胞癌等, 肝脏 AFP 基因的表达又会被重新激活^[1]。AFP 具有雌激素结合功能, AFP 基因敲除小鼠表现为雌性不育, 推测其胚胎时期主要生理功能是参与大脑的性别发育和保护雌性动物的生育能力^[2-3]。此外, AFP 作为载体蛋白, 还能结合类固醇、脂肪酸、胆色素等

物质^[4], 推测其可能具有广泛的病理生理功能。

锌指蛋白 ZBTB20 是介导肝脏 AFP 基因出生后转录失活的主要转录抑制因子^[5]。ZBTB20 基因敲除小鼠出生后肝脏 AFP 基因处于持续开放状态^[5-6], 是研究 AFP 病理学作用的理想模型。ZBTB20 基因缺陷可导致小鼠生长发育障碍、海马发育异常、严重低血糖和未成年死亡等严重表型^[6-7]。因此, 本研究通过建立 ZBTB20 与 AFP 基因的联合敲除小鼠模型, 分析出生后肝脏 AFP 基因

[收稿日期] 2010-08-16 **[接受日期]** 2010-09-06

[基金项目] 国家自然科学基金(90608026, 30772478). Supported by National Natural Science Foundation of China(90608026, 30772478).

[作者简介] 张 海, 硕士, 助教. E-mail: zhanghai@smmu.edu.cn

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81871020, E-mail: wzhang@smmu.edu.cn

持续高表达与 ZBTB20 基因敲除小鼠表型的可能关系。

1 材料和方法

1.1 主要试剂及仪器 Taq plus 酶、Buffer 及 dNTP 均购自北京天根生物科技有限公司。SDS、NaCl、EDTA 及 Tris·Cl 购自国药集团。蛋白酶 K 购自上海生工生物工程技术有限公司。血糖试纸购自美国强生公司。

1.2 动物饲养及繁殖 SPF 级 ZBTB20 全身性基因敲除小鼠系本室与美国哈佛大学公共卫生学院合作建立^[6]。AFP 基因敲除小鼠为比利时布鲁塞尔大学 Claude Szpirer 教授提供,详见文献^[2]。实验小鼠均饲养于本室 SPF 级动物房。选取 ZBTB20 单基因敲除杂合子雄性小鼠(ZBTB20^{+/-})和杂合子雌性小鼠(ZBTB20^{+/-})交配,获得 ZBTB20 单基因敲除纯合子小鼠(ZBTB20^{-/-}),选取同窝野生型小鼠(ZBTB20^{+/+})作为对照。将 AFP 单基因敲除纯合子雄性小鼠(AFP^{-/-})与 ZBTB20 单基因杂合子雌性小鼠(ZBTB20^{+/-})交配繁殖可以获得 AFP 杂合子/ZBTB20 杂合子小鼠(AFP^{+/-}/ZBTB20^{+/-});将 AFP 杂合子/ZBTB20 杂合子雄性小鼠(AFP^{+/-}/ZBTB20^{+/-})与 AFP 杂合子/ZBTB20 杂合子雌性小鼠(AFP^{+/-}/ZBTB20^{+/-})交配,获得 AFP 纯合子/ZBTB20 纯合子(AFP^{-/-}/ZBTB20^{-/-})的双基因敲除小鼠。因 AFP 杂合子小鼠(AFP^{+/-})和 ZBTB20 杂合子小鼠(ZBTB20^{+/-})均无明显表型。选取同窝 AFP 杂合子/ZBTB20 杂合子小鼠(AFP^{+/-}/ZBTB20^{+/-})为正常对照小鼠。选取 ZBTB20 单基因敲除小鼠(AFP^{+/+}/ZBTB20^{-/-})和 AFP 单基因敲除小鼠(AFP^{-/-}/ZBTB20^{+/+})作为对照小鼠。

1.3 小鼠基因型鉴定 剪取适量小鼠尾巴,置于 0.5 ml 裂解缓冲液[0.5% SDS, 0.1 mol/L NaCl, 0.05 mol/L EDTA, 0.01 mol/L Tris-HCl(pH = 8.0), 100 μg/ml 蛋白酶 K]中 55℃ 过夜。次日上午 11 000×g 离心 10 min。取上清加入 500 μl 异丙醇,混匀,可见絮状沉淀。将絮状沉淀溶于 200 μl TE 溶液中 55℃ 过夜使基因组 DNA 充分溶解。以获得的基因组 DNA 为模板,利用 AFP 基因及 ZBTB20 基因特异性引物^[2,6]进行 PCR 扩增,PCR 产物用含 EB 的 2% 琼脂糖凝胶电泳 120 V,20 min,凝胶摄影仪观察、摄像。

1.4 观察指标 从出生后 2 周开始对配对小鼠称量体质量及监测血糖,同时密切观察小鼠存活状态和死亡时间。

1.5 统计学处理 采用 GraphPad Prism 5.00 软件进行统计学分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。存活率比较采用 χ^2 检验,组间比较采用方差分析,检验水平(α)为 0.05。

2 结果

2.1 ZBTB20 单基因敲除小鼠及 AFP/ZBTB20 双基因敲除小鼠基因型鉴定 ZBTB20 基因 PCR 鉴定结果如图 1A 所示,ZBTB20 敲除条带大小约为 300 bp,野生型小鼠条带约为 100 bp。AFP 基因 PCR 鉴定结果如图 1B 所示,AFP 基因敲除条带大小约为 500 bp,野生型小鼠条带为 300 bp 左右。当小鼠鼠尾基因组 PCR 结果出现 ZBTB20 敲除与 AFP 敲除条带时,则表明该小鼠为双基因敲除小鼠。

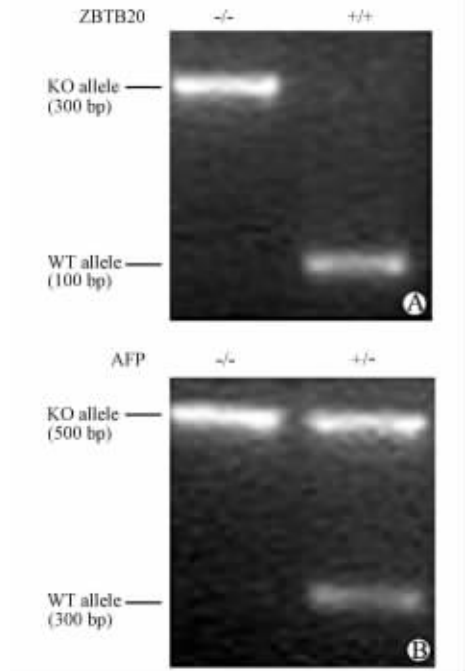


图 1 小鼠基因组 DNA PCR 分析
Fig 1 PCR analysis of tail genomic DNA
A: ZBTB20; B: AFP

2.2 AFP/ZBTB20 双基因敲除小鼠生长发育状态监测 ZBTB20 基因敲除小鼠出生后存在生长发育障碍,未成年死亡等表型^[6]。对 AFP/ZBTB20 小鼠双基因敲除小鼠(AFP^{-/-}/ZBTB20^{-/-})及对照小鼠出生后 2 周、3 周和 4 周进行体质量监测,结果发现 AFP/ZBTB20 小鼠双基因敲除小鼠(AFP^{-/-}/ZBTB20^{-/-})与 AFP 野生型/ZBTB20 敲除小鼠

(AFP^{+/+}/ZBTB20^{-/-}) 在体质量上并无明显差异, 都明显低于对照小鼠(图 2)。

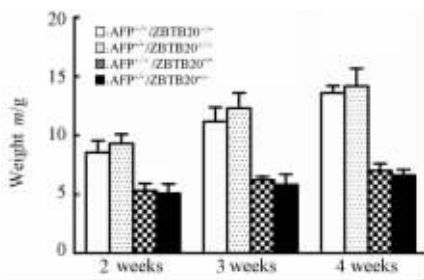


图 2 AFP/ZBTB20 双基因敲除小鼠体质量

Fig 2 Body-weights of AFP/ZBTB20 double knockout mice
 $n=5, \bar{x} \pm s$

AFP 单基因敲除小鼠在生长发育、存活率上与对照小鼠相比无明显异常^[2]。选取 AFP/ZBTB20 双基因敲除小鼠(AFP^{-/-}/ZBTB20^{-/-})及对照小鼠进行存活率监测,发现 AFP/ZBTB20 双基因敲除小鼠(AFP^{-/-}/ZBTB20^{-/-})出生后 2 周开始出现死亡,80%的小鼠在出生后 3~6 周内死亡,在出生后 8 周内则全部死亡。这与 ZBTB20 单基因敲除小鼠(AFP^{+/+}/ZBTB20^{-/-})相比在存活率上无明显差异,均存在未成年死亡的表型(图 3)。

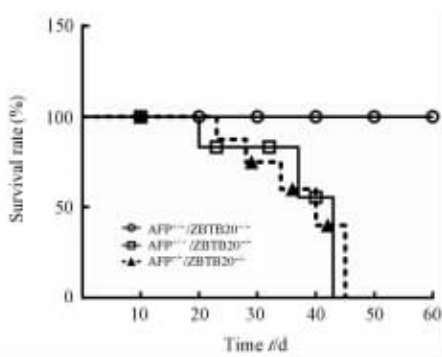


图 3 AFP/ZBTB20 双基因敲除小鼠存活率观察

Fig 3 Survival curves of AFP/ZBTB20 double knockout mice and control mice

2.3 AFP/ZBTB20 双基因敲除小鼠血糖水平的检测 ZBTB20 单基因敲除小鼠表型之一为严重低血糖。肝脏是机体重要的物质代谢器官,本研究对 AFP/ZBTB20 双基因敲除小鼠(AFP^{-/-}/ZBTB20^{-/-})及对照小鼠出生后 2 周和 3 周开始进行随机血糖检测,发现 AFP/ZBTB20 双基因敲除小鼠与 ZBTB20 单基因敲除小鼠在血糖水平上无明显差异,提示 AFP 基因异常高表达对肝脏糖代谢及血糖水平并无明显影响(图 4)。

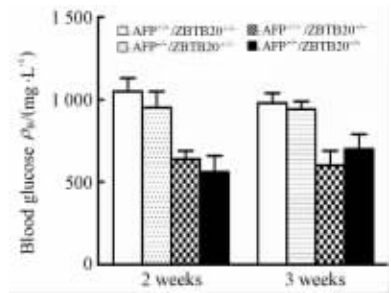


图 4 AFP/ZBTB20 双基因敲除小鼠血糖水平(进食状态)

Fig 4 Blood glucose of AFP/ZBTB20 double knockout mice (at fed state)
 $n=5, \bar{x} \pm s$

3 讨论

AFP 是哺乳动物胎儿时期的血清蛋白,主要在胎儿肝细胞和内胚层的卵黄囊中合成^[1],随着胎儿出生 AFP 基因表达水平迅速降低,在转录水平有接近 10 000 倍的降低^[8]。目前对 AFP 生理功能并不十分清楚,推测 AFP 可能发挥载体蛋白和免疫调节的作用。研究发现胚胎时期 AFP 可与雌激素结合,保护脑性别分化过程中雌激素对其的影响^[9]。同时,AFP 可与脂肪酸、胆红素等结合发挥载体蛋白的运输作用^[4]。研究表明,AFP 在胚胎时期可能保护胚胎抵御母体免疫系统的影响^[10]。胚胎产生的 AFP 可以进入母体血液循环,母体 AFP 水平的异常提示胎儿可能存在脊柱裂和唐氏综合征^[11-12]。对于 AFP 基因敲除小鼠,其胚胎发育正常,雌性小鼠出生后无生育能力,雄性小鼠生育能力则正常^[2]。

为了研究新型锌指蛋白 ZBTB20 在体内的生物学功能,本研究建立了 ZBTB20 基因敲除小鼠模型。模型建立后,观察到 ZBTB20 基因敲除纯合子小鼠存在严重的生长发育障碍、严重低血糖和未成年死亡等表型。进一步分析发现 ZBTB20 基因敲除小鼠出生后肝脏 AFP 表达水平异常升高,接近胎肝水平,但白蛋白表达水平却维持正常^[9]。为了进一步确定 AFP 高水平表达与 ZBTB20 基因敲除小鼠表型之间关系,本研究建立了 AFP/ZBTB20 双基因敲除小鼠模型(AFP^{-/-}/ZBTB20^{-/-}),分析生长发育、存活率及血糖水平等指标。实验结果表明 AFP 基因/ZBTB20 基因双基因敲除小鼠模型(AFP^{-/-}/ZBTB20^{-/-})与 ZBTB20 单基因敲除小鼠相比,在体质量、存活率、血糖水平等方面并没明显差异。可见,AFP 基因高表达和生长发育障碍、严重低血糖之间没有因果联系。ZBTB20 基因敲除小鼠的生长发育障碍、严重低血糖和未成年死亡与肝脏 AFP 基因高表达没有关系。

ZBTB20 基因敲除小鼠是目前唯一肝脏 AFP

基因高表达的小鼠模型,对 AFP 基因高表达情况下病理学意义的研究提供了重要手段。本研究表明,肝脏 AFP 基因的持续高表达与该模型小鼠的生长发育障碍、血糖代谢紊乱等表型没有直接关系。鉴于 AFP 在肝癌中的异常高表达,AFP 高表达对机体免疫系统等的影 响一直受到关注,我们后续建立的肝细胞特异性 ZBTB20 基因敲除小鼠为研究 AFP 的免疫调节等可能病理作用提供了技术手段^[5]。

[参考文献]

[1] Tilghman S M. The structure and regulation of the alpha-fetoprotein and albumin genes[J]. *Oxf Surv Eukaryot Genes*,1985, 2:160-206.

[2] Gabant P,Forrester L,Nichols J, Van Reeth T,De Mees C,Pa-jack B,et al. Alpha-fetoprotein, the major fetal serum protein, is not essential for embryonic development but is required for female fertility[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002,99:12865-12870.

[3] Bakker J,De Mees C,Douhard Q,Balthazart J,Gabant P,Szpirer J, et al. Alpha-fetoprotein protects the developing female mouse brain from masculinization and defeminization by estrogens[J]. *Nat Neurosci*,2006,9: 220-226.

[4] Gillespie J R,Uversky V N. Structure and function of alpha-fetoprotein: a biophysical overview[J]. *Biochim Biophys Acta*,

2000,1480(1-2):41-56.

[5] Xie Z,Zhang H,Tsai W,Zhang Y,Du Y,Zhong J, et al. Zinc finger protein ZBTB20 is a key repressor of alpha-fetoprotein gene transcription in liver[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*,2008, 105:10859-10864.

[6] Sutherland A P,Zhang H,Zhang Y,Michaud M,Xie Z,Patti M E, et al. Zinc finger protein Zbtb20 is essential for postnatal survival and glucose homeostasis[J]. *Mol Cell Biol*,2009, 29: 2804-2815.

[7] Xie Z, Ma X, Ji W, Zhou G, Lu Y, Xiang Z, et al. Zbtb20 is essential for the specification of CA1 field identity in the developing hippocampus[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 6510-6515.

[8] Belayew A, Tilghman S M. Genetic analysis of alpha-fetoprotein synthesis in mice[J]. *Mol Cell Biol*,1982,2:1427-1435.

[9] MacLusky N J,Naftolin F. Sexual differentiation of the central nervous system[J]. *Science*,1981,211:1294-1302.

[10] Tomasi T B Jr. Structure and function of alpha-fetoprotein[J]. *Annu Rev Med*,1977,28:453-465.

[11] Leighton P C,Kitau M J,Chard T,Gordon Y B,Leek A E. Levels of alpha-fetoprotein in maternal blood as a screening test for fetal neural-tube defect[J]. *Lancet*,1975,2:1012-1015.

[12] Cuckle H S,Wald N J,Lindenbaum R H. Maternal serum alpha-fetoprotein measurement: a screening test for Down syndrome[J]. *Lancet*,1984,1:926-929.

[本文编辑] 贾泽军

• 书 讯 •

《组织学与胚胎学·医学遗传学·病理学实验指导》已出版

该书由全宏勋主编,第二军医大学出版社出版,ISBN 978-7-5481-0102-4,16开,定价:18.00元。

该书是组织学与胚胎学、医学遗传学和病理学3门基础医学课程的实验指导。其目的是希望通过3门基础医学课程的实验教学,帮助学生巩固所学基本知识,加强理论与实验的联系,掌握3门课程实验的基本操作技术,引导其开阔思路,培养其观察、比较、分析的能力和严谨求实的科学态度。该书可作为高等医学专科(职业)学校相关课程的实验教学参考用书。

该书由第二军医大学出版社出版发行科发行,全国各大书店均有销售。

通讯地址:上海市翔殷路800号,邮编:200433

邮购电话:021-65344595,65493093

<http://www.smmup.com>