

DOI: 10.16781/j.0258-879x.2019.02.0142

· 论 著 ·

## 碳水化合物反应元件结合蛋白条件性基因敲除小鼠模型的建立及鉴定

李昊, 师建辉, 魏纯纯, 麻献华, 陈玉霞, 章卫平\*

海军军医大学(第二军医大学)基础医学院病理生理学教研室, 上海 200433

**[摘要]** **目的** 建立转录因子碳水化合物反应元件结合蛋白(*ChREBP*)的条件性基因敲除小鼠模型,为研究*ChREBP*的体内生物学功能提供技术手段。**方法和结果** 利用*Cre/loxP*基因打靶策略,通过构建基因打靶载体和基于胚胎干细胞(ES细胞)的基因同源重组,在*ChREBP*基因第8外显子的两侧分别引入*loxP*位点;将打靶成功的ES细胞显微注射至小鼠囊胚,然后植入假孕雌鼠子宫获得嵌合鼠,进一步获得可种系传代的*ChREBP<sup>lox/+</sup>*小鼠;将*ChREBP<sup>lox/+</sup>*小鼠与Alb-Cre小鼠交配,获得*ChREBP*的肝脏特异性基因敲除小鼠。**结论** 建立了*ChREBP*条件性基因敲除小鼠模型,为揭示不同组织中*ChREBP*的生理功能和病理学意义提供了重要手段。

**[关键词]** 碳水化合物反应元件结合蛋白;果糖代谢;脂代谢;基因敲除小鼠;基因打靶

**[中图分类号]** R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2019)02-0142-07

### Generation and identification of carbohydrate response element-binding protein conditional gene knockout mouse model

LI Hao, SHI Jian-hui, WEI Chun-chun, MA Xian-hua, CHEN Yu-xia, ZHANG Wei-ping\*

Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

**[Abstract]** **Objective** To establish a conditional knockout mouse model of transcription factor carbohydrate response element-binding protein (*ChREBP*), so as to provide a technical approach for exploring the biological function of *ChREBP* *in vivo*. **Methods and results** Using *Cre/loxP* gene targeting strategy, we constructed the gene targeting vector and franked the 8<sup>th</sup> exon of *ChREBP* gene with *loxP* site in embryonic stem cells (ES cells) via homologous recombination. We microinjected the recombined ES clones into blastocysts and implanted into the uterus of pseudopregnant mice to obtain the chimeric mice and *ChREBP<sup>lox/+</sup>* mice. By crossbreeding *ChREBP<sup>lox/+</sup>* mice with Alb-Cre mice, we generated liver-specific *ChREBP* knockout mice. **Conclusion** The generation of *ChREBP* conditional knockout mouse model provides an important means to reveal the physiological function and pathological significance of *ChREBP* in different tissues.

**[Key words]** carbohydrate response element-binding protein; fructose metabolism; lipid metabolism; knockout mice; gene targeting

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2019, 40(2): 142-148]

果糖摄入过量可导致肥胖、高脂血症、胰岛素抵抗等,是2型糖尿病、非酒精性脂肪肝病、心血管疾病的重要危险因素<sup>[1]</sup>。碳水化合物反应元件结合蛋白(carbohydrate response element-binding protein, *ChREBP*)是调节果糖和脂质代谢的重要转录因子,属于碱性螺旋-环-螺旋-亮氨酸锌指(basic helix-loop-helix-leucine zipper, bHLH-ZIP)转录因子家族成员,能够识别靶基因中的E-box序列。*ChREBP*本身含有几个不同的功能区,包括位

于氨基端的核定位信号、1个多聚脯氨酸区以及位于羧基端与DNA结合的螺旋-环-螺旋/锌指区,其与共作用因子Max样蛋白X(Max-like protein X, MLX)形成异二聚体后才能发挥转录调节作用<sup>[2]</sup>,参与果糖分解、糖酵解、糖异生、脂质从头合成等代谢通路中许多关键酶的表达调控<sup>[3-4]</sup>。*ChREBP*在肝脏组织、脂肪组织、小肠组织、肌肉组织及胰岛β细胞中高表达<sup>[5]</sup>,其分为*ChREBP-α*和*ChREBP-β*两种亚型,能够感受细胞内碳水化合

[收稿日期] 2018-10-11 [接受日期] 2018-12-25

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(31730042)。Supported by Key Program of National Natural Science Foundation of China (31730042)。

[作者简介] 李昊, 硕士生。E-mail: jz\_lihao@163.com

\*通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81871018, E-mail: wzhang@smmu.edu.cn

物的变化, 调节糖酵解和脂质合成等相关代谢酶的基因转录<sup>[6]</sup>。在低糖水平时 ChREBP- $\alpha$  的表达被抑制, 而当细胞内的碳水化合物水平升高时, ChREBP- $\alpha$  则通过转录激活活性更高的 ChREBP- $\beta$  而发挥作用<sup>[6]</sup>。本实验室前期研究结果表明, 锌指蛋白 ZBTB20 是 ChREBP- $\alpha$  的转录激活因子, 参与调节肝脏的脂质从头合成<sup>[7]</sup>。鉴于目前有关 ChREBP 的功能研究大多是基于全身敲除模型或者腺病毒介导的基因干扰, 不同组织中 ChREBP 的生理功能尚不清楚。本研究拟利用 Cre/loxP 系统建立 ChREBP 的条件性基因敲除小鼠模型, 为探寻 ChREBP 的体内功能奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

1.1.1 质粒、菌株与动物 含 ChREBP 基因组的细菌人工染色体 (bacterial artificial chromosome, BAC) 克隆 bMQ-164K10 购自英国 Source BioScience 公司。质粒 (pL-452、pL-451、pBR322-2S、pBR322-MK)、菌株 EL-350 和用于提供胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES 细胞) 及用于假孕的 C57BL/6J\*129S3 雌性小鼠 [实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2017-0010, 使用许可证号: SYXK (沪) 2017-0012] 均由上海南方模式生物研究中心提供。

Flp 转基因小鼠、白蛋白 (albumin, Alb) 启动子调控的 Cre 转基因小鼠 (Alb-Cre 小鼠) 和野生型 C57BL/6J 小鼠均引自美国 Jax 动物公司<sup>[8]</sup>, 在本实验室繁殖饲养 [实验动物使用许可证号为 SYXK (沪) 2014-0028]。饲养条件: SPF 级动物房, 室内温度控制在 25 °C, 湿度控制在 40%~60%, 光照周期为 12 h 光照/12 h 黑暗。

1.1.2 试剂 BAC DNA 抽提试剂盒购自德国 Qiagen 公司。ES 细胞培养所需的 DMEM 培养液 (高糖, ES 细胞级) 和胎牛血清 (ES 细胞级) 购自美国 Gibco BRL 公司, 遗传霉素 (geneticin, G418)、丙氧鸟苷和白血病抑制因子 (leukemia inhibitory factor, LIF) 购自美国 Sigma 公司。兔抗 ChREBP 多克隆抗体 (货号 sc-33764) 购自美国 Santa Cruz 公司, 辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记羊抗兔 IgG 二抗 (货号 111-035-003) 购自美国 Jackson 公司, 鼠抗

$\beta$ -actin 多克隆抗体 (货号 60008-1-Ig) 购自美国 Proteintech 公司, HRP 标记羊抗鼠 IgG 二抗 (货号 115-035-003) 购自美国 Jackson 公司。PrimerStar GXL DNA 聚合酶为日本 TaKaRa 公司产品。

### 1.2 ChREBP 打靶载体的构建

1.2.1 敲除外显子的选择 为设计条件基因打靶载体, 首先分析了小鼠 ChREBP 基因组的结构特点。ChREBP 基因含有 17 个外显子, 其中第 8 外显子长 185 bp, 编码氨基端的 61 个氨基酸; 其上、下游两侧的内含子分别为 4.5 kb 和 3.6 kb。据此推测, 敲除第 8 外显子可造成残留下游编码序列的移码, 从而达到去除 ChREBP 蛋白的目的。因此, 本研究选择 ChREBP 基因第 8 外显子为条件敲除的靶向外显子。

1.2.2 预打靶载体的构建 以 ChREBP 的 BAC 质粒为模板, 利用 PCR 分别扩增 ChREBP 基因组 DNA 的片段 A 和 B, 引物序列见表 1。100  $\mu$ L PCR 体系含模板 DNA (BAC 质粒) 2  $\mu$ L、5 $\times$ 磷酸盐缓冲液 20  $\mu$ L、2 mmol/L dNTP 7  $\mu$ L、2 mol/L 引物 4  $\mu$ L, PrimerStar GXL DNA 聚合酶 1  $\mu$ L; 用水补足 100  $\mu$ L。反应条件: 98 °C 52 min; 98 °C 15 s, 58 °C 45 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。将扩增得到的 A、B 片段分别用 Hind III/Xho I 和 Xho I/BamH I 双酶切后, 同时克隆到 pBR322-2S 载体的 Hind III/BamH I 位点, 获得 ChREBP 基因组 DNA 的取获载体 pRV-ChREBP。将该载体和 BAC 克隆转入菌株 EL-350, 通过细菌内的同源重组<sup>[9]</sup>, 获得含有横跨 A、B 片段 ChREBP 基因组 DNA 的预打靶载体, 记为 pBR322-ChREBP。

1.2.3 loxP-neo-loxP 片段的插入 以含有 loxP-neo-loxP 基因的质粒 pL-452 为模板, 利用 PCR 获得包含 ChREBP 基因组 C 和 D 的 loxP-neo-loxP 基因片段 (各长 80 bp), 引物序列见表 1, 然后经过 EL-350 菌株内的同源重组敲入到上述获得的预打靶载体 pBR322-ChREBP 中, 得到打靶载体 pBR322-MK-ChREBP, 经限制性内切酶及测序鉴定。将含有 pBR322-MK-ChREBP 质粒的 EL-350 菌株经阿拉伯糖诱导 Cre 重组酶表达, 以去除质粒 pL-452 引入的 neo 基因, 这样在 ChREBP 的第 8 外显子上游只保留 1 个 loxP 位点。

1.2.4 Frt-neo-Frt 片段的插入 以含有 Frt-neo-Frt

基因的质粒 pL-451 为模板, 利用 PCR 获得包含 *ChREBP* 基因组 E 和 F 的 *Frt-neo-Frt* 片段 (各长 80 bp), 引物序列见表 1, 与上述去 *neo* 基因的质

粒共同转入 EL-350 菌株, 经过同源重组, 构建打靶载体 pBR322-MK-*ChREBP*-KO, 并经限制性内切酶及测序鉴定。

表 1 *ChREBP* 打靶载体引物序列

Tab 1 Primer sequences of *ChREBP* targeting vector

Primer	Primer sequence (5' -3' )	Size (bp)
RA1	Forward: GCA AGC TTC CAT AGC CCT GGG AGG GTG G Reverse: TAC TCG AGA TTT GGT GCC TTC CAC AGG G	343
RA2	Forward: AGC TCG AGA AAG GCA TGG GAA AG Reverse: GCG GAT CCA TTT CAG AAA CTG TA	361
<i>loxP</i>	Forward: TGC CAA CAG TGC TAG AAG GGG GAG CAG ACA CAG GGA GGG GAA GTG ATC TAG CAT TGG GAC TCC ATG GGT GAG CAG CTT CCA TCA TAT TCA ATA ACC CT Reverse: CAC TCA GGG GAA GCT GAG GTA GAG ATA GAT AGG ATT GCC CTG GGG AAG ATG GTG GGG TCT AGG AGT ATG TGA GAG CCC CAT CTA GAA CTA GTG GAT CC	98 98
<i>Frt</i>	Forward: GAT ACA TGG TCT CAG GGC CCT GAA TGG CCT TGG ATT CAT AGA GAT CAA CCT GTC TTT GCC TCC TGA GTG CAG CCA CTA AAA AGC TTG ATA TCG AAT TC Reverse: CTT CCA ATC TGG CTT GCC CTT TCC CTA GCC TGT CAT TCA CTA AGA CTC AGA ATA CTA GGC AGG TAC AGA TGG TGT ACA CCT CTA GAA CTA GTG GAT CC	98 98

*ChREBP*: Carbohydrate response element-binding protein; RA: Retrieving arm

### 1.3 ES 细胞的基因打靶与筛选

1.3.1 ES 细胞培养 培养皿以 0.1% 明胶包被后接种经丝裂霉素 C 处理的滋养层细胞 (每个 10 cm 盘接种  $2 \times 10^6$  个滋养层细胞), 过夜培养后即可接种 ES 细胞。ES 细胞完全培养液为 DMEM 培养液 (含 1 mol/L  $\beta$ -巯基乙醇、2 mmol/L 谷氨酰胺、0.1 mmol/L 非必需氨基酸、100 U/mL 青霉素、50 mg/L 链霉素、15% ES 级别胎牛血清和 1000 U/mL LIF)。

1.3.2 ES 细胞电穿孔 DNA 转染 处于对数生长期的 ES 细胞加 0.125% 胰蛋白酶-EDTA 消化并计数, 加适量磷酸盐缓冲液使细胞密度达到约  $1.5 \times 10^7$ /mL。取 0.8 mL 上述 ES 细胞悬液, 加入约 35  $\mu$ g 经 *Not I* 线性化的 pBR322-MK-*ChREBP*-KO 质粒 DNA, 混匀后转移至无菌电穿孔杯中, 以 240 V、500  $\mu$ F 的电参数进行电穿孔, 重新悬浮后平均分配到 3 个已铺好滋养层细胞的 10 cm 培养皿中培养。

1.3.3 正负药物筛选 ES 细胞在电穿孔 24 h 后换含有选择药物 G418 (300 mg/L) 和丙氧鸟苷 (2 mol/L) 的培养液进行选择性培养, 每天更换培养液, 经 7~8 d 选择性培养, 抗性 ES 细胞长成肉眼可见的克隆时即可进行挑取。

1.3.4 双抗性细胞克隆的挑取与培养 挑取抗性克隆放入含有 30  $\mu$ L 0.1% 胰蛋白酶-EDTA 的 96 孔板 (凹底) 中消化约 3 min, 轻轻吹打, 使细胞分散, 后转移至 96 孔培养板中培养, 待细

胞生长至 60%~80% 融合后取大部分细胞冻存, 剩余细胞继续培养至 100% 融合后用于提取基因组 DNA。

1.3.5 ES 细胞同源重组克隆的 PCR 鉴定 在长满 ES 细胞的 96 孔板中吸去培养液, 每孔加入 80  $\mu$ L 裂解液 (含 1 mg/L 蛋白酶 K), 56  $^{\circ}$ C 过夜消化后加入无水乙醇, 常规提取基因组 DNA, 溶于 100  $\mu$ L Tris-EDTA 缓冲液中。在 *ChREBP* 同源重组臂外侧和 *neo* 基因中分别设计引物, 鉴定打靶载体的 5'、3' 同源臂与细胞基因组的同源重组情况。引物序列见表 2。所用的 DNA 聚合酶为 PrimeSTAR GXL。反应条件为: 98  $^{\circ}$ C 2 min; 98  $^{\circ}$ C 20 s, 64  $^{\circ}$ C 30 s, 68  $^{\circ}$ C 2 min, 共 35 个循环; 68  $^{\circ}$ C 2 min。PCR 产物大小分别约为 3.4 kb 和 4.9 kb。

1.3.6 ES 细胞的囊胚注射及胚胎移植 注射时采用的是无 LIF 的 DMEM 完全培养液, 每枚囊胚注射 15 个左右的 ES 细胞。注射后的囊胚培养于无 LIF 的 DMEM 完全培养液中, 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养 1 h 左右, 然后将注射后的胚胎移植到 2.5 d 假孕雌鼠 (C57BL/6J\*129S3 小鼠) 子宫中, 每侧移植 8~10 枚。

### 1.4 条件敲除小鼠的繁育与鉴定

1.4.1 首建鼠的繁育及 *neo* 基因去除 挑选毛色嵌合度 >50% 的雄性嵌合鼠与野生 C57BL/6J 雌鼠交配, 获得 ES 细胞来源的首建鼠。同 ES 细胞鉴定方法, 用 PCR 方法鉴定阳性杂合子雌鼠。将杂合

子小鼠与 *flp* 转基因小鼠进行交配, 利用 *flp* 介导的 *Frt* 重组, 去除杂合子小鼠基因组中的 *neo* 基因

表达框; 筛选不含 *neo* 和 *flp* 基因后代小鼠, 记为 ChREBP<sup>lox/+</sup> 小鼠。

表 2 *ChREBP* 基因型引物序列

Tab 2 Primer sequences for *ChREBP* genotypes

Genotyping	Primer sequence (5' -3')	Size (bp)
5' HR	Forward: CCT TTA AAG CTC CCT AAA TGT TGG GGC TC Reverse: CTG AGC CCA GAA AGC GAA GGA	3 407
3' HR	Forward: CCT CCC CCG TGC CTT CCT TGA C Reverse: GGT TGT ATG GAG TTG AGA TCC CCT GA	4 905
<i>loxP</i>	Forward: GGG CCC CAG AGA ACC TA Reverse: TGA CTA CCC CGC AAA GAT	WT: 593; mutant: 681
<i>Flp</i>	Forward: CAC TGA TAT TGT AAG TAG TTT GC Reverse: CTA GTG CGA AGT AGT GAT CAG G	725
<i>Cre</i>	Forward: AGA TGG CGC GGC AAC ACC Reverse: GCG GAT CCG AAA AGA AAA	400
<i>ChREBP-KO</i>	Forward: ACA AAA AGC GGC TCC GTA AGT CC Reverse: GGG GGC GGT AAT TGG TGA AGA AA	363

ChREBP: Carbohydrate response element-binding protein; HR: Homologous recombination; WT: Wide type; KO: Knockout

1.4.2 条件敲除小鼠构建 将 ChREBP<sup>lox/+</sup> 小鼠与肝脏特异性表达的 Alb-Cre 小鼠交配, 最终获得 ChREBP<sup>lox/lox</sup>; Alb-Cre 纯合子小鼠。

1.4.3 小鼠基因型鉴定 取 4 周龄小鼠尾巴, 提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。针对第 8 外显子的下游 *loxP* 位点设计 *ChREBP* 基因型 PCR 鉴定引物 (表 2), 可从野生型、重组的等位基因中分别扩增出 593 bp 和 681 bp 的 PCR 产物。PCR 反应条件: 95 °C 1 min; 95 °C 15 s, 54 °C 15 s, 72 °C 30 s, 共 30 个循环; 72 °C 5 min。Neo 和 Cre 的基因型鉴定方法参见文献 [8]。

1.4.4 小鼠肝脏 *ChREBP* 敲除鉴定 取 4 周龄的小鼠肝脏及小肠组织, 提取基因组 DNA 进行 PCR 鉴定。针对第 8 外显子设计 *ChREBP* 基因型 PCR 鉴定引物 (表 2), 可从野生型等位基因中扩增出 363 bp 的 PCR 产物, 而基因敲除小鼠中由于肝脏中存在一部分非肝脏细胞, 只能扩增出较弱的条带。PCR 反应条件: 95 °C 1 min; 95 °C 20 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 40 个循环; 72 °C 5 min。

## 2 结果

2.1 *ChREBP* 打靶载体的构建及鉴定 利用 *ChREBP* 的 BAC 克隆和细菌内同源重组, 将含 *ChREBP* 基因第 8、9 外显子及两侧部分内含子的基因组 DNA 克隆至含有负性选择标志基因胸苷激酶蛋白 (thymidine kinase, TK) 表达元件

的 pBR322-2S 质粒, 得到预打靶载体 pBR322-ChREBP。进一步通过 PCR 和细菌内同源重组, 在该载体的 *ChREBP* 基因第 8 外显子上游引入 *loxP* 位点, 在其下游插入 *Frt-neo-Frt-loxP* 元件, 从而构建成 *ChREBP* 的条件打靶载体 pBR322-MK-ChREBP-KO (图 1), 并经限制性内切酶的酶切分析及 DNA 测序鉴定正确。

2.2 ES 细胞的基因打靶与同源重组鉴定 打靶载体 DNA 经 *Not I* 酶切线性化后, 通过电穿孔转染 ES 细胞, 经正负筛选获得抗性克隆 88 个。对其基因组 DNA 在打靶载体 5' 和 3' 同源臂与细胞基因组的同源重组情况进行 PCR 扩增鉴定, 结果在 5 个候选克隆中检测到 2 个同源臂均发生同源重组, 分别为 B1、B2、D2、D6 和 E10 (图 2)。对同源重组的 PCR 产物经酶切和 DNA 测序鉴定, 表明上述 ES 细胞克隆为正确的同源重组克隆, 用于后续显微注射和囊胚移植。

2.3 首建鼠的获得与繁育 先后分别注射上述 5 株 ES 细胞克隆至 268 枚囊胚, 并将胚胎移植至 26 只受体假孕雌鼠, 得到 8 只 F0 代小鼠。从毛色判断, 其中 4 只雄性小鼠嵌合度 > 50%。将嵌合雄鼠与野生 C57BL/6J 雌鼠交配, 其中分别来自 ES 细胞克隆 B2、D2 的 2 只嵌合鼠产生 F1 代灰鼠 23 只。经 PCR 鉴定, 其中 5 只为阳性杂合子小鼠 (图 3), 从而获得可以种系传代的基因工程小鼠, 记为 ChREBP<sup>lox-neo/+</sup> 小鼠。为去除 *neo* 基因, 将该 F1 代杂合子小鼠与 *flp* 转基因小鼠交配, 获

得同时携带 *flp* 与 *ChREBP<sup>lox-neo</sup>* 的子代小鼠,通过鼠尾基因组 DNA 的 PCR 检测,证实 *neo* 基因被成功去除,将不含 *neo* 基因的 *ChREBP* 重组等位基因

记为 *ChREBP<sup>lox/+</sup>* (图 4A)。进一步与 C57BL/6/J 小鼠交配,获得不含有 *flp* 的 *ChREBP<sup>lox/+</sup>* 小鼠。

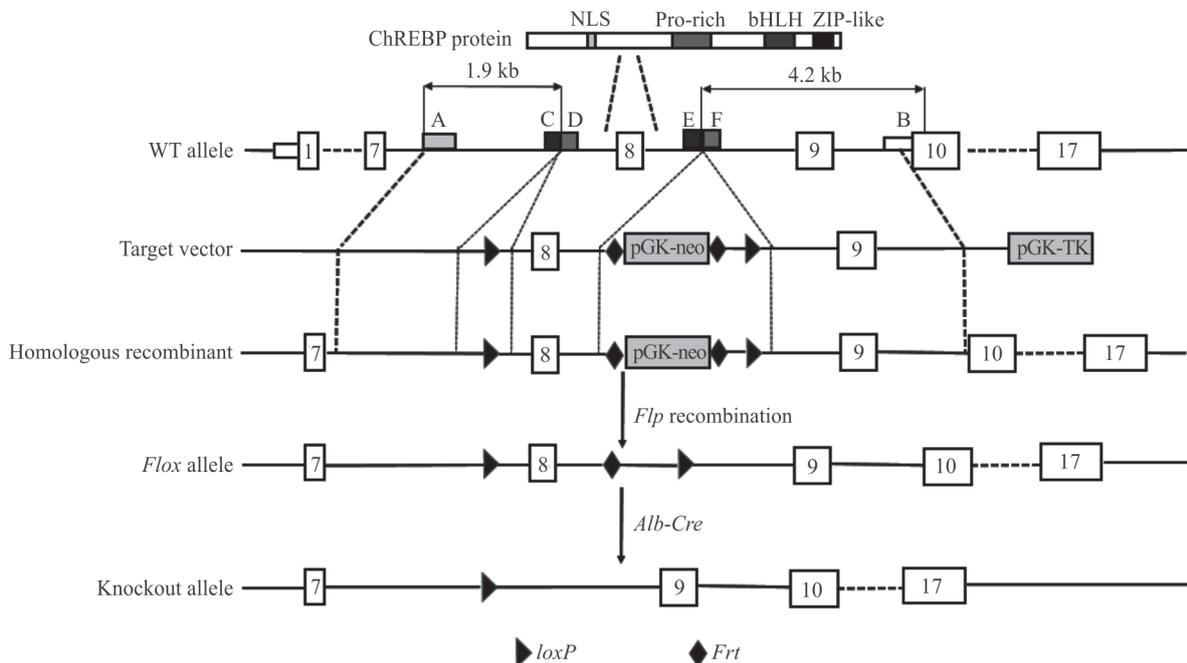


图 1 *ChREBP* 基因打靶路线图

Fig 1 Schematic demonstration for *ChREBP* targeting strategy

A, B: Homologous arms for obtaining the *ChREBP* genomic DNA fragment; C, D: Homologous arms for insertion of the *loxP-neo-loxP* fragment; E, F: Homologous arms for insertion of the *Frt-neo-Frt* fragment. ChREBP: Carbohydrate response element-binding protein; NLS: Nuclear localization signal; Pro-rich: Proline-rich; b-HLH: Basic helix-loop-helix; ZIP: Zipper; Alb: Albumin; WT: Wild type; neo: Neomycin resistance cassette; TK: Thymidine kinase

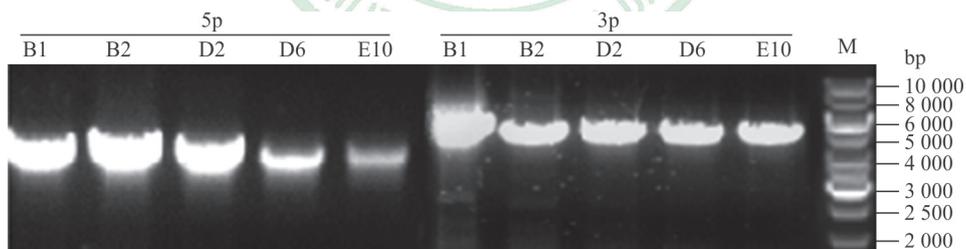


图 2 同源重组阳性 ES 细胞克隆的 PCR 基因型鉴定

Fig 2 Identification of homologous recombinant positive ES clones by PCR genotyping

ES cell: Embryonic stem cell; 5p: 5' Homologous recombination arm; 3p: 3' Homologous recombination arm; M: DNA ladder marker. B1, B2, D2, D6, E10: Clones with correct homologous recombination of both homologous arms

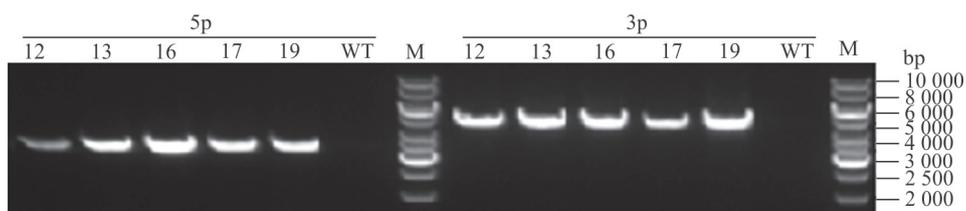


图 3 F1 代小鼠 *ChREBP* 基因重组的 PCR 基因型鉴定

Fig 3 Identification of recombinant *ChREBP* gene in F1 mice by PCR genotyping

ChREBP: Carbohydrate response element-binding protein; 5p: 5' Homologous recombination arm; 3p: 3' Homologous recombination arm; WT: Wild type; M: DNA ladder marker. 12, 13, 16, 17, 19: F1 mice with *ChREBP<sup>lox-neo/+</sup>* genotype

2.4 条件敲除小鼠的建立 将  $ChREBP^{flox/+}$  小鼠与 Alb-Cre 小鼠进行交配, 获得  $ChREBP^{flox/+}; Alb-Cre$  杂合小鼠; 然后, 通过杂合子与杂合子小鼠的交配获得  $ChREBP^{flox/flox}; Alb-Cre$  纯合子小鼠, 即为  $ChREBP$  的肝脏特异性敲除小鼠。为便于快速的批量基因型分析, 本研究针对第 8 外显子下游的  $loxP$  位点设计了基因型鉴定引物, 可分别从野生

型和重组的  $ChREBP$  等位基因中扩增出 593 bp、681 bp 的 DNA 条带 (图 4B), 结合 Cre 的鉴定结果, 可快速判断小鼠的基因型。另外, 提取肝脏及小肠组织基因组 DNA, 针对第 8 外显子设计引物进行 PCR, 结果显示  $ChREBP$  基因在肝脏中被特异性敲除, 而肠道中的  $ChREBP$  基因则不受影响 (图 4C、4D)。

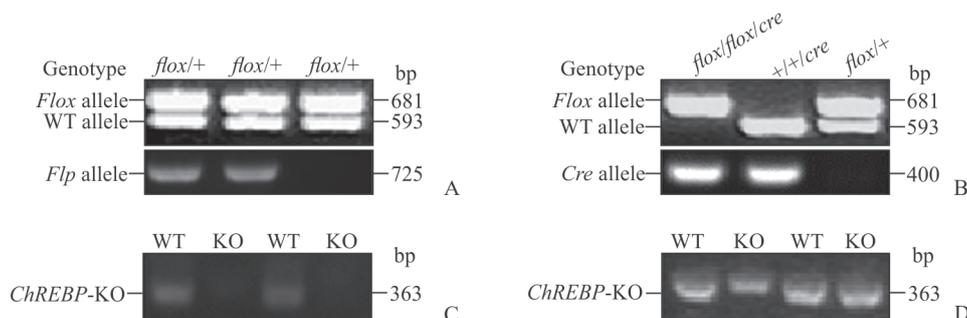


图 4 小鼠基因型和  $ChREBP$  基因敲除 PCR 鉴定结果

Fig 4 PCR genotyping and  $ChREBP$  gene knockout results of mice

A: Identification of *neo* gene deletion in mice by PCR genotyping; B: Identification of  $ChREBP$  gene deletion in mice by PCR genotyping; C: Identification of  $ChREBP$  gene deletion in the liver of mice by PCR; D: Identification of  $ChREBP$  gene deletion in the intestine of mice by PCR.  $ChREBP$ : Carbohydrate response element-binding protein; WT: Wild type; KO: Knockout

### 3 讨论

自 2001 年  $ChREBP$  被发现以来, 对  $ChREBP$  的生理功能的研究一直在持续向前推进。在以往对小鼠  $ChREBP$  全身敲除模型的研究中发现, 全身  $ChREBP$  敲除小鼠对果糖不耐受, 糖酵解及脂肪酸合成能力减弱<sup>[10]</sup>, 肝脏糖原堆积<sup>[5]</sup>。近年研究发现, 肝脏  $ChREBP$  在介导肝脏免受毒性损伤方面发挥重要作用<sup>[11]</sup>; 脂肪中的  $ChREBP$  缺失会导致全身的胰岛素抵抗, 并使葡萄糖转运受损<sup>[12]</sup>; 肠道中  $ChREBP$  的缺失则会导致果糖吸收障碍和不耐受<sup>[13]</sup>, 这些结果表明  $ChREBP$  在体内糖脂代谢中发挥着重要的生理功能。此外,  $ChREBP$  也对肿瘤的发生、发展有着重要的影响。例如, 在人结肠癌细胞系 HTC116 中抑制  $ChREBP$  可导致 p53 激活<sup>[14]</sup>; 在前列腺癌中,  $ChREBP$  的激活与肿瘤细胞的增殖扩散有关<sup>[15]</sup>; 而在白血病中,  $ChREBP$  则可促进白血病细胞的分化从而减少白血病的发生、发展。这些结果提示  $ChREBP$  在不同的细胞中对肿瘤的发生、发展有着不同的作用,  $ChREBP$  的体内功能具有复杂性。

为了更好地研究  $ChREBP$  在体内的生物学功

能, 本研究利用 Cre/ $loxP$  系统建立了  $ChREBP$  的条件敲除小鼠模型。Cre/ $loxP$  系统源于 F1 噬菌体, 通过 Cre 重组酶特异性识别  $loxP$  位点并切割位于 2 个  $loxP$  之间的 DNA 序列, 达到敲除某个基因的目的<sup>[16]</sup>。这种方法不仅可以实现对某种组织特定基因的敲除, 并且具有敲除效率高、应用范围广、胚胎致死率低的优点<sup>[17]</sup>, 因而其在动物基因敲除方面应用广泛。ES 细胞法是目前制备转基因动物的常用方法。ES 细胞是从早期胚胎和原始性腺中分离出来的一类细胞, 具有体外无限增殖、多向分化、自我更新的特点。将外源性基因通过电穿孔等方法导入 ES 细胞后, 分选获得克隆正确、生长较好的 ES 细胞, 将其注射入小鼠胚泡中可发育形成嵌合体小鼠, 再经过杂交即可获得纯合子小鼠。在本研究中, 我们采用 ES 细胞法构建  $ChREBP$  转基因小鼠。首先利用 A、B 2 个同源臂在体外将包含第 8 号外显子的长片段克隆至取获载体, 构建了预打靶载体, 然后分别利用 C、D 和 E、F 这 4 个小同源臂分别将  $loxP$  位点以及  $Frt-neo-Frt$  片段引入, 构建成打靶载体 pBR322-MK- $ChREBP$ -KO, 之后将构建好的打靶载体通过电穿孔法转入到 ES 细胞, 通过正负性筛选获得正确的同源重组克隆并进行鉴定, 挑选正确的克隆进行囊胚注射后移植

入假孕雌鼠子宫中,获得嵌合鼠后继续进行交配繁殖,获得纯合子 Flox 小鼠后,将其与 Alb-Cre 小鼠交配,即实现了在小鼠肝脏组织敲除 *ChREBP*。

本研究利用 *Cre/loxP* 系统成功建立了 *ChREBP* 条件性基因敲除小鼠模型,为揭示不同组织中 ChREBP 的生理功能和病理学意义提供了重要手段。

### [参考文献]

- [1] LIM J S, MIETUS-SNYDER M, VALENTE A, SCHWARZ J M, LUSTIG R H. The role of fructose in the pathogenesis of NAFLD and the metabolic syndrome[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2010, 7: 251-264.
- [2] STOECKMAN A K, MA L, TOWLE H C. Mlx is the functional heteromeric partner of the carbohydrate response element-binding protein in glucose regulation of lipogenic enzyme genes[J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 15662-15669.
- [3] IIZUKA K, HORIKAWA Y. ChREBP: a glucose-activated transcription factor involved in the development of metabolic syndrome[J]. *Endocr J*, 2008, 55: 617-624.
- [4] 周露婷,章卫平. 转录因子碳水化合物反应元件结合蛋白对肝脏糖脂代谢的调节作用[J]. *第二军医大学学报*, 2011,32:318-322.
- ZHOU L T, ZHANG W P. Regulatory role of carbohydrate response element binding protein on hepatic glycolysis and lipogenesis[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2011, 32: 318-323.
- [5] IIZUKA K, BRUICK R K, LIANG G, HORTON J D, UYEDA K. Deficiency of carbohydrate response element-binding protein (ChREBP) reduces lipogenesis as well as glycolysis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 7281-7286.
- [6] HERMAN M A, PERONI O D, VILLORIA J, SCHÖN M R, ABUMRAD N A, BLÜHER M, et al. A novel ChREBP isoform in adipose tissue regulates systemic glucose metabolism[J]. *Nature*, 2012, 484: 333-338.
- [7] LIU G, ZHOU L, ZHANG H, CHEN R, ZHANG Y, LI L, et al. Regulation of hepatic lipogenesis by the zinc finger protein Zbtb20[J/OL]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14824. doi: 10.1038/ncomms14824.
- [8] 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.
- [9] 李玲,国蓉,常绪生,印慨,张晔,刘志民,等. 利用细菌内同源重组技术构建胰岛  $\beta$  细胞特异性表达 Cre 重组酶的基因敲入打靶载体[J]. *第二军医大学学报*, 2014,35:185-190.
- LI L, GUO R, CHANG X S, YIN K, ZHANG Y, LIU Z M, et al. Generation of islet  $\beta$  cell-specific Cre recombinase targeting vector by homologous recombination in bacteria[J]. *Acad J Sec Mil Med Univ*, 2014, 35: 185-190.
- [10] ISHII S, IIZUKA K, MILLER B C, UYEDA K. Carbohydrate response element binding protein directly promotes lipogenic enzyme gene transcription[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 15597-15602.
- [11] ZHANG D, TONG X, VANDOMMELEN K, GUPTA N, STAMPER K, BRADY G F, et al. Lipogenic transcription factor ChREBP mediates fructose-induced metabolic adaptations to prevent hepatotoxicity[J]. *J Clin Invest*, 2017, 127: 2855-2867.
- [12] VIJAYAKUMAR A, ARYAL P, WEN J, SYED I, VAZIRANI R P, MORAES-VIEIRA P M, et al. Absence of carbohydrate response element binding protein in adipocytes causes systemic insulin resistance and impairs glucose transport[J]. *Cell Rep*, 2017, 21: 1021-1035.
- [13] KIM M, ASTAPOVA I I, FLIER S N, HANNOU S A, DORIDOT L, SARGSYAN A, et al. Intestinal, but not hepatic, ChREBP is required for fructose tolerance[J/OL]. *JCI Insight*, 2017, 2. pii: 96703. doi: 10.1172/jci.insight.96703.
- [14] TONG X, ZHAO F, MANCUSO A, GRUBER J J, THOMPSON C B. The glucose-responsive transcription factor ChREBP contributes to glucose-dependent anabolic synthesis and cell proliferation[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 21660-21665.
- [15] ATALA A. Re: inhibition of the hexosamine biosynthetic pathway promotes castration-resistant prostate cancer[J/OL]. *J Urol*, 2017, 197: 403. doi: 10.1016/j.juro.2016.11.022.
- [16] GU H, ZOU Y R, RAJEWSKY K. Independent control of immunoglobulin switch recombination at individual switch regions evidenced through Cre-loxP-mediated gene targeting[J]. *Cell*, 1993, 73: 1155-1164.
- [17] KÜHN R, SCHWENK F. Advances in gene targeting methods[J]. *Curr Opin Immunol*, 1997, 9: 183-188.

[本文编辑] 尹 茶