

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20210861

· 论 著 ·

Mafb 基因敲除小鼠的构建及其尿道下裂表型初步分析

刘振恣^{1,2}, 孔晓燕^{1,2}, 沈炼桔^{1,2,3}, 龙春兰^{1,2,3}, 刘 星^{3,4,5,6*}, 魏光辉^{3,4,5,6}

1. 重庆医科大学附属儿童医院儿童泌尿生殖发育与组织工程重庆市重点实验室, 重庆 400014
2. 重庆医科大学附属儿童医院儿科学重庆市重点实验室, 重庆 400014
3. 重庆医科大学附属儿童医院儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 重庆 400014
4. 重庆医科大学附属儿童医院泌尿外科, 重庆 400014
5. 重庆医科大学附属儿童医院儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 重庆 400014
6. 重庆医科大学附属儿童医院国家儿童健康与疾病临床医学研究中心, 重庆 400014

[摘要] **目的** 利用成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) 及其相关蛋白 9 (Cas9) 构建 v-maf 肌筋膜纤维肉瘤癌基因同源物 B (*Mafb*) 基因敲除小鼠, 初步研究该基因缺失对尿道发育的影响。**方法** 根据 CRISPR/Cas9 技术原理构建 *Mafb* 基因敲除 F0 代 C57BL/6J 小鼠; 经 PCR 及基因测序鉴定阳性的 F0 代小鼠与野生型 C57BL/6J 小鼠交配繁殖, 获得 F1 代 *Mafb* 基因敲除杂合子 (*Mafb*^{+/-}) 小鼠; *Mafb*^{+/-} 小鼠间进行交配繁殖, 获得 *Mafb* 基因敲除纯合子 (*Mafb*^{-/-}) 胎鼠。收集雄性 *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎组织, 通过免疫荧光技术检测阴茎组织中 *Mafb* 蛋白表达情况及尿道缝处上皮钙黏蛋白 (E-cadherin) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -SMA) 表达情况, 扫描电子显微镜及石蜡切片 H-E 染色观察阴茎组织形态。**结果** 成功构建、繁育 *Mafb*^{+/-} 小鼠并得到雄性 *Mafb*^{-/-} 胎鼠。免疫荧光检测结果显示雄性 *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎组织中几乎不存在 *Mafb* 蛋白表达, 且相较于野生型小鼠其尿道缝处 E-cadherin 蛋白表达明显降低、 α -SMA 蛋白表达明显增高; 扫描电子显微镜及 H-E 染色显示雄性 *Mafb*^{-/-} 胎鼠为尿道下裂表型。**结论** 成功构建 *Mafb* 基因敲除小鼠模型, 该基因敲除可导致小鼠出现尿道下裂表型及尿道缝处细胞中 E-cadherin 和 α -SMA 的表达差异, 为进一步研究该基因在尿道下裂发生机制中的作用奠定了基础。

[关键词] v-maf 肌筋膜纤维肉瘤癌基因同源物 B; 基因敲除; 基因型鉴定; 尿道下裂; 动物模型

[中图分类号] R 695 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2097-1338(2022)02-0152-08

Construction of *Mafb* knockout mice and preliminary analysis of hypospadias phenotype

LIU Zhen-min^{1,2}, KONG Xiao-yan^{1,2}, SHEN Lian-ju^{1,2,3}, LONG Chun-lan^{1,2,3}, LIU Xing^{3,4,5,6*}, WEI Guang-hui^{3,4,5,6}

1. Chongqing Key Laboratory of Child Urogenital Development and Tissue Engineering, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
2. Chongqing Key Laboratory of Pediatrics, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
3. Key Laboratory of Child Development and Disorders of Ministry of Education, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
4. Department of Urology, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
5. China International Science and Technology Cooperation Base of Child Development and Critical Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China
6. National Clinical Research Center for Child Health and Disorders, Children's Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China

[Abstract] **Objective** To construct v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B (*Mafb*) knockout mice by clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) and CRISPR-associated protein 9 (Cas9), and explore the impact brought by this gene deletion on the urethral development. **Methods** The F0 *Mafb* knockout C57BL/6J mice were constructed according to the principle of CRISPR/Cas9 technology. F0 mice identified by polymerase chain reaction and gene sequencing were mated with wild-type C57BL/6J mice to obtain F1 *Mafb* knockout heterozygous (*Mafb*^{+/-}) mice. *Mafb* knockout homozygous (*Mafb*^{-/-}) fetal mice were obtained by mating between *Mafb*^{+/-} mice. The penile tissues of male

[收稿日期] 2021-09-01 **[接受日期]** 2021-12-07

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目 (81970571). Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81970571).

[作者简介] 刘振恣, 硕士生. E-mail: liu-z-min@qq.com

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 023-63633264, E-mail: liux@hospital.cqmu.edu.cn

Mafb^{-/-} fetal mice were collected. The expression of *Mafb* protein in the penile tissues and the expression of epithelial cadherin (E-cadherin) and α -smooth muscle actin (α -SMA) in the urethral seam were detected by immunofluorescence. The histological morphology of the penile tissues was observed by scanning electron microscopy and paraffin section hematoxylin-eosin (H-E) staining. **Results** The *Mafb*^{+/-} mice were successfully constructed and bred, and male *Mafb*^{-/-} fetal mice were obtained. Immunofluorescence showed scarce expression of *Mafb* protein in the penises of the male *Mafb*^{-/-} fetal mice; compared with wide type mice, the expression of E-cadherin was downregulated and α -SMA was upregulated in the urethral seam. Scanning electron microscopy and H-E staining showed that the phenotype of male *Mafb*^{-/-} fetal mice was hypospadias. **Conclusion** The *Mafb* knockout mouse model is successfully constructed. The knockout of *Mafb* can lead to the hypospadias phenotype and change the expression levels of E-cadherin and α -SMA on the urethral seam. This model lays a foundation for further study on the role of *Mafb* in the pathogenesis of hypospadias.

[**Key words**] v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B; gene knockout; genotype identification; hypospadias; animal models

[Acad J Naval Med Univ, 2022, 43(2): 152-159]

尿道下裂是指阴茎腹侧发育缺陷导致的尿道口异位开口, 发病率为 1/1 000~1/100^[1], 是小儿泌尿系统最常见的发育缺陷之一^[2]。尿道下裂病因仍不明确, 可能由基因、环境和内分泌等多因素共同作用所致^[1,3], 探究其发病机制十分必要。雄激素驱动外生殖器雄性化是阴茎正常发育的关键^[4]。然而, 在胚胎外生殖结节性别分化的过程中, 雄激素受体 (androgen receptor, AR) 有哪些协同转录因子尚不清楚。v-maf 肌筋膜纤维肉瘤癌基因同源物 B (v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B, *Mafb*) 是一种碱性亮氨酸拉链 (basic-leucine zipper protein, bZIP) 转录因子, 属于活化蛋白 1 (activator protein 1, AP-1) 超家族成员, 表达广泛并参与多种生物学事件, 如细胞分化、凋亡、增殖和迁移等^[5-7]。除在颌面部、胰腺和肾脏等组织表达并发挥重要作用^[8-10]外, *Mafb* 在正常雄性个体尿道板上皮细胞中亦有显著表达, 这是雄激素干预雄性尿道分化的重要靶区^[11-12]。有研究通过器官培养实验发现, 雄激素 5 α -双氢睾酮 (5 α -dihydrotestosterone, DHT) 干预后的雄性和雌性小鼠生殖结节中 *Mafb* 表达明显增加^[13]。本课题组前期研究发现, 尿道下裂患儿较正常儿童包皮组织中 *Mafb* 表达显著下降^[14]。这一系列的研究结果表明 *Mafb* 受雄激素信号通路调控, 可能在雄性外生殖结节发育和尿道下裂的发病机制中起到至关重要的作用。此外, 本课题组前期通过免疫荧光技术及透射电子显微镜证实, 上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 在大鼠尿道发育中发挥重要作用^[15]。本研究拟构建 *Mafb* 基因敲除小鼠, 观察其是否有尿

道下裂表型, 并关注 EMT 标志物上皮钙黏蛋白 (epithelial cadherin, E-cadherin) 和 α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA) 在此模型尿道处的表达, 为后续探讨 *Mafb* 基因对尿道发育的影响及相关机制奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料

1.1.1 实验动物 采用成簇的规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 及其相关蛋白 9 (CRISPR-associated protein 9, Cas9) 介导的基因编辑技术构建以 C57BL/6J 为遗传背景的 *Mafb* 基因敲除小鼠, 由本课题组与上海南方模式生物科技股份有限公司 [实验动物生产许可证号: SCXK (沪) 2017-0010] 合作完成。野生型 C57BL/6J 小鼠购自重庆医科大学实验动物中心 [实验动物生产许可证号: SCXK (渝) 2017-0001]。实验动物均在重庆医科大学附属儿童医院动物实验中心 SPF 级动物房饲养 [实验动物使用许可证号: SYXK (渝) 2017-0012]。实验操作符合实验动物伦理学要求并通过伦理审查 (CHCMU-IACUC20200424018)。

1.1.2 试剂 EmeraldAmp PCR Master Mix、DNA marker [宝日医生物技术 (北京) 有限公司], 引物 [生工生物工程 (上海) 股份有限公司], 蛋白酶 K (大连美仑生物技术有限公司), 兔抗 *Mafb* 多克隆抗体、小鼠抗 E-cadherin 单克隆抗体 (英国 Abcam 公司), 兔抗 α -SMA 单克隆抗体 (成都正能生物技术有限责任公司), Hoechst 33342、抗荧光淬灭封片液 (上海碧云天生物技术有限公司),

Cy3-山羊抗兔二抗、Cy3-山羊抗小鼠二抗(北京康为世纪生物科技有限公司), Triton X-100(美国Sigma公司), Tris、EDTA、十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS)(美国Genview公司)。组织裂解液配制: 3 mol/L NaCl 66.7 μL、1 mol/L Tris-HCl (pH=8.0) 100 μL、0.5 mol/L EDTA 10 μL、10% SDS 20 μL、蛋白酶K 10 μL, 双蒸水定容至1 mL。

1.1.3 仪器 T100 PCR仪(美国Bio-Rad公司), 光学显微成像系统和荧光显微成像系统(日本Nikon公司), Inspect S50扫描电子显微镜(美国FEI公司), 组织切片机(德国Leica公司)。

1.2 *Mafb* 基因敲除小鼠的构建和基因型鉴定

1.2.1 *Mafb* 基因敲除小鼠的构建 根据Ensembl数据库(<http://ensemblgenomes.org/>)中的小鼠基因组序列信息, 小鼠*Mafb*基因仅存在转录本Mafb-201(ENSMUST00000099126.5), 且仅有一个外显子(exon 1)。通过Crispor在线软件(<http://crispor.tefor.net/>), 针对exon 1的5'-非翻译区(untranslated region, UTR)和3'-UTR分别设计2条特异性高且更靠近编码区域的指导RNA(guide RNA, gRNA), 其中gRNA1的序列为5'-GGGAAACTTTGCGGCCGCG-3'(前间隔序列邻近基序为CGG), gRNA2的序列为5'-TCTGGGCCAGGGCAAGGGCG-3'(前间隔序列邻近基序为GGG)。通过体外转录的方式获得*Cas9* mRNA和gRNA, 将其显微注射到C57BL/6J小鼠的受精卵中, 通过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)途径进行基因沉默, 获得F0代小鼠(图1)。经PCR扩增及上海南方模式生物科技股份有限公司测序鉴定阳性的F0代小鼠与野生型C57BL/6J小鼠交配获得6只F1代小鼠。将鉴定为*Mafb*基因敲除杂合子(*Mafb*^{+/-})的F1代小鼠按照雌雄比2:1于傍晚合笼, 次日清晨在雌鼠阴道口寻找阴栓, 发现阴栓当天视为妊娠

日(gestation day, GD) 0.5 d, GD 18.5 d剖宫产取出胎鼠, 采用PCR鉴定*Mafb*和性别基因型。

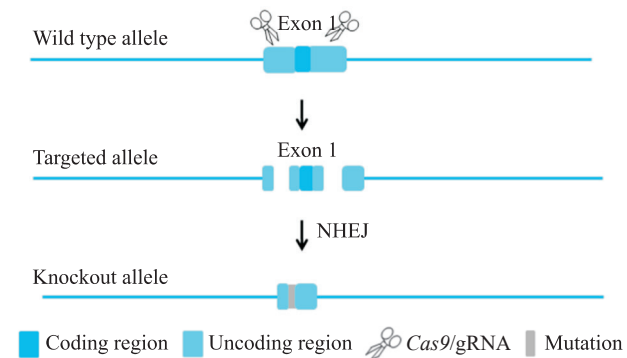


图1 *Mafb* 基因敲除小鼠构建策略

Fig 1 Construction strategy of *Mafb* knockout mice

The *Cas9* protein bound to the target site under the guidance of gRNA resulting in the deletion of the sequence of exon 1, and finally obtained *Mafb* knockout mice. *Mafb*: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B; *Cas9*: Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated protein 9; gRNA: Guide RNA; NHEJ: Non-homologous end joining.

1.2.2 PCR 鉴定基因型 取胎鼠尾组织, 加入组织裂解液 500 μL, 56 °C 水浴过夜; 次日以 13 000×g 离心 15 min, 取上清液至 1.5 mL EP 管中, 加等体积异丙醇, 混匀后 13 000×g 离心 10 min; 弃上清, 经 75% 乙醇洗涤后用 DEPC 水溶解 DNA, 放入 -20 °C 冰箱备用。基因型鉴定引物序列由上海南方模式生物科技股份有限公司设计(表1), 由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。*Mafb* 敲除和野生型基因型鉴定 PCR 扩增条件: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 15 s, 72 °C 2 min, 循环 35 次; 72 °C 5 min, 12 °C 保持。性别基因型鉴定 PCR 扩增条件: 95 °C 2 min; 95 °C 30 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环 35 次; 72 °C 2 min, 12 °C 保持。取 PCR 产物 10 μL 进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳。

表 1 基因型鉴定引物序列

Tab 1 Primer sequences for genotype identification

Genotype	Primer name	Primer sequence (5'-3')		Product length/bp
		Forward	Reverse	
<i>Mafb</i> -knockout	P1	TCCGTCCCACTCGGCTCCAG	GGGAGTCCAGGGCTAGGGGC	604
<i>Mafb</i> -wild type	P2	TGGCGAGCAACTACCAGCAG	TCACGCACCGACATGGACAC	406
<i>SRY</i> -male	P3	CTTTTCCAGGAGGCACAGA	GACAGGCTGCCAATAAAAGC	250

Mafb: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B; *SRY*: Sex determining region Y.

1.3 *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎组织表型观察 收集雄性 *Mafb*^{-/-} 和野生型胎鼠阴茎组织标本, 一部分放入 4% 多聚甲醛溶液中固定以备石蜡包埋, 一部分放入 2.5% 戊二醛溶液中固定进行扫描电子显微镜观察。

1.3.1 免疫荧光技术检测 *Mafb*、E-cadherin 和 α -SMA 蛋白表达 固定完成的 *Mafb*^{-/-} 和野生型胎鼠阴茎组织由重庆医科大学儿科研究所免疫组织化学室统一脱水处理。充分浸蜡后, 将阴茎远端垂直向下进行包埋, 凝固后连续切片, 厚度为 4 μ m, 由远及近顺序编号。切片放入 60 $^{\circ}$ C 烤箱烘烤 24 h, 室温保存。取出保存的切片, 放入 60 $^{\circ}$ C 烤箱预热 30 min, 脱蜡后置于枸橼酸溶液中用微波炉高火加热修复抗原, 冷却后经 0.2% Triton X-100 溶液打孔、0.5% 牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA) 溶液封闭后, 加入 *Mafb* 抗体、E-cadherin 抗体和 α -SMA 抗体 (稀释比例为 1 : 200, 0.5% BSA 配制) 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育。室温复温 30 min, PBS 清洗后加入荧光二抗 (稀释比例为 1 : 200, 0.5% BSA 配制)、Hoechst 33342 (稀释比例为 1 : 200,

PBS 配制) 孵育。使用抗荧光淬灭封片液封片, 通过荧光显微成像系统采集图像。

1.3.2 扫描电子显微镜和 H-E 染色观察阴茎组织形态 将固定完成的胎鼠阴茎组织用 PBS 清洗后, 用 4% 蔗糖溶液洗涤 5 min, 梯度乙醇脱水; 样本粘于导电胶上, 临界点干燥, 真空喷镀, 在扫描电子显微镜下观察。选取阴茎组织石蜡切片, 脱蜡后经 H-E 染色, 中性树脂封片, 在光学显微镜下观察。

2 结果

2.1 小鼠繁殖情况 获得的 *Mafb*^{+/-} 小鼠饮食、发育等正常, 皮肤、毛色与野生型小鼠相比无明显差异, 无外观畸形 (图 2A、2B); *Mafb*^{+/-} 雌鼠妊娠期为 19.5 d, 哺乳期为 21 d, 合笼后每胎孕 5~8 只, 可正常生长繁殖。*Mafb*^{-/-} 鼠出生正常, 但很快出现发绀, 并在出生 2 h 内死亡 (图 2C、2D)。GD 18.5 d 的 *Mafb*^{-/-} 胎鼠外观与野生型胎鼠未见明显差异, 未出现唇腭裂、四肢缺损、脊柱裂等外观畸形 (图 2E~2H)。

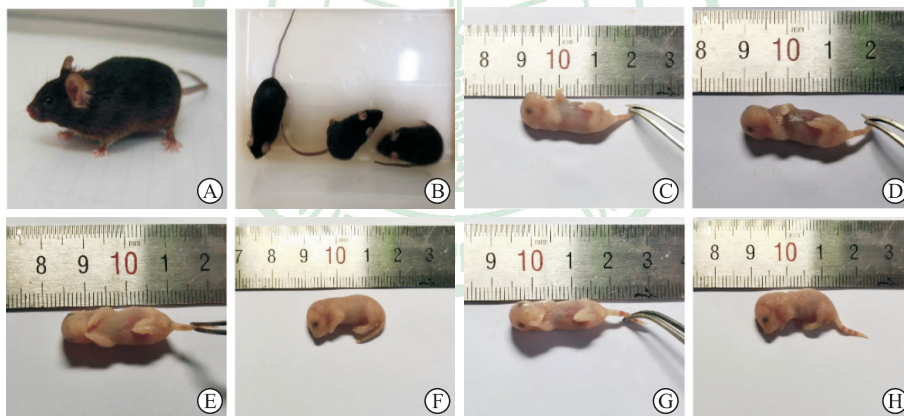


图 2 *Mafb* 基因敲除小鼠大体形态学观察

Fig 2 General morphological observation of *Mafb* knockout mice

A: Adult *Mafb*^{+/-} mouse; B: Adult *Mafb*^{+/-} mouse (the left one) and wild type mice (the right two); C: Newborn wild type mouse; D: Newborn *Mafb*^{-/-} mouse; E, F: Fetal wild type mouse at GD 18.5 d; G, H: Fetal *Mafb*^{-/-} mouse at GD 18.5 d. *Mafb*: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B; GD: Gestation day.

2.2 小鼠基因型鉴定结果 P1 引物为 *Mafb* 基因缺失型引物, P2 引物为 *Mafb* 基因野生型引物, P3 引物为雄性基因型引物。根据 PCR 结果判定基因型, 野生型小鼠仅有 P2 引物扩增产物约 406 bp 的条带, *Mafb*^{+/-} 小鼠会同时出现 P1 和 P2 引物扩增产物约 604 bp 和约 406 bp 的条带, *Mafb*^{-/-} 小鼠仅出现 P1 引物扩增产物约 604 bp 的条带 (图 3A); 雄性小

鼠出现 P3 引物扩增产物约 250 bp 的条带, 雌性小鼠则未出现条带 (图 3B)。

2.3 *Mafb* 基因敲除小鼠阴茎组织中 *Mafb* 蛋白表达情况 免疫荧光检测结果显示, *Mafb* 蛋白在野生型胎鼠阴茎组织中主要表达在尿道上皮细胞, 而在 *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎组织中几乎没有表达 (图 4), 证明 *Mafb* 基因敲除小鼠模型成功建立。

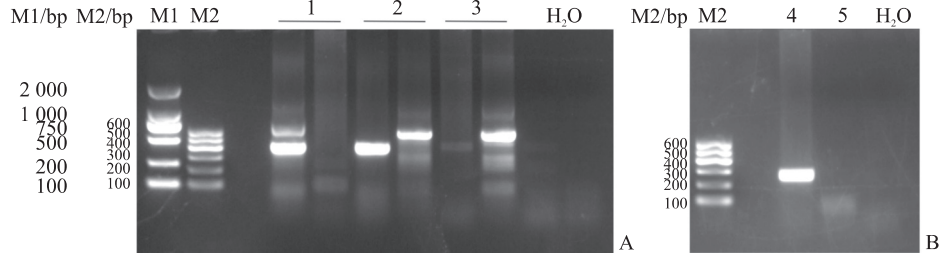


图3 *Mafb* 基因敲除小鼠基因型鉴定结果

Fig 3 Results of genotype identification of *Mafb* knockout mice

A: Genotype identification of *Mafb*; B: Genotype identification of *SRY*. M1: DL 2000 marker; M2: DNA marker I; 1: Genotype identification of wild type mice, only 406 bp band; 2: Genotype identification of *Mafb*^{+/-} mice, both 406 bp and 604 bp bands; 3: Genotype identification of *Mafb*^{-/-} mice, only 604 bp band; 4: Genotype identification of male mice; 5: Genotype identification of female mice; H₂O: Negative control. *Mafb*: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B; *SRY*: Sex determining region Y.

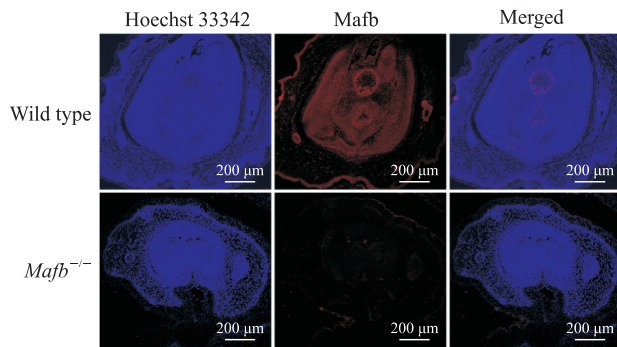


图4 免疫荧光检测 *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎组织中 *Mafb* 蛋白的表达

Fig 4 *Mafb* protein expression in penile tissues of fetal *Mafb*^{-/-} mice detected by immunofluorescence

Mafb: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B.

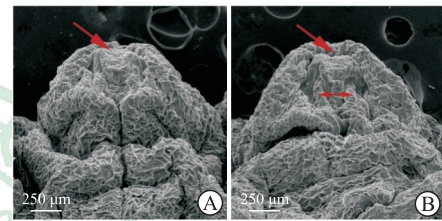


图5 扫描电子显微镜下观察 *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎组织形态
Fig 5 Morphology of penile tissues of fetal *Mafb*^{-/-} mice observed under scanning electron microscopy

A: Fetal wide type mouse; B: Fetal *Mafb*^{-/-} mouse. The single-head arrows indicate urethral meatus, and the double-headed arrow indicates failure of urethral fold fusion in fetal *Mafb*^{-/-} mouse. *Mafb*: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B.

2.4 *Mafb* 基因敲除小鼠阴茎组织形态 扫描电子显微镜下观察可见, 雄性 C57BL/6J 小鼠的阴茎在 GD 18.5 d 已基本发育成型, 野生型胎鼠阴茎组织形态完整, 尿道皱褶在腹侧融合, 冠状沟清晰, 尿道并入龟头 (图 5A); *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎组织形态异常, 尿道皱褶融合障碍、腹侧包皮部分缺如, 呈现“V”字形, 尿道开口在阴茎腹侧位置 (图 5B)。H-E 染色结果显示, 野生型胎鼠阴茎组织尿道板已充分融合, 中心尿道腔清晰; *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎腹侧包皮发育缺损, 尿道板未完全融合 (图 6)。

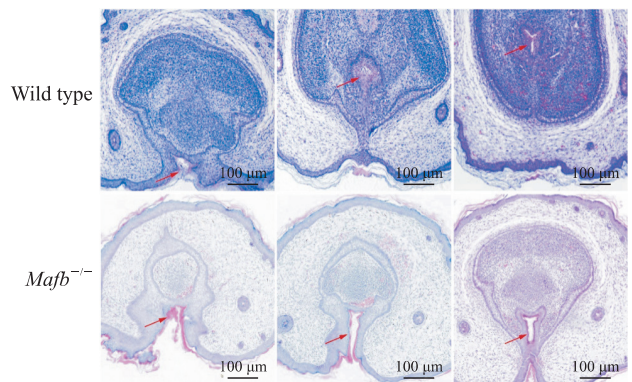


图6 *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎组织连续切片病理学观察

Fig 6 Pathology of serial sections of penile tissues in fetal *Mafb*^{-/-} mice

Hematoxylin-eosin staining. The sections from left to right are the distal to proximal end of the penis. The arrows indicate urethral meatus. *Mafb*: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B.

2.5 *Mafb* 基因敲除小鼠阴茎组织 E-cadherin 和 α -SMA 表达情况 免疫荧光检测结果显示, 与野生型胎鼠相比, *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎组织尿道缝处细胞 E-cadherin 表达明显下降 (图 7), α -SMA 表达明显增加 (图 8)。

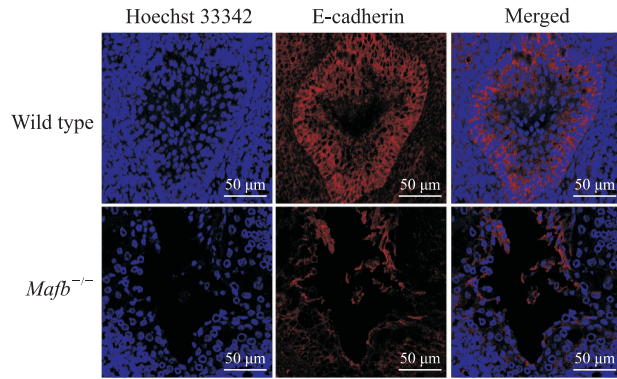


图7 免疫荧光检测 *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎组织中 E-cadherin 的表达

Fig 7 E-cadherin expression in penile tissues of fetal *Mafb*^{-/-} mice detected by immunofluorescence

Mafb: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B; E-cadherin: Epithelial cadherin.

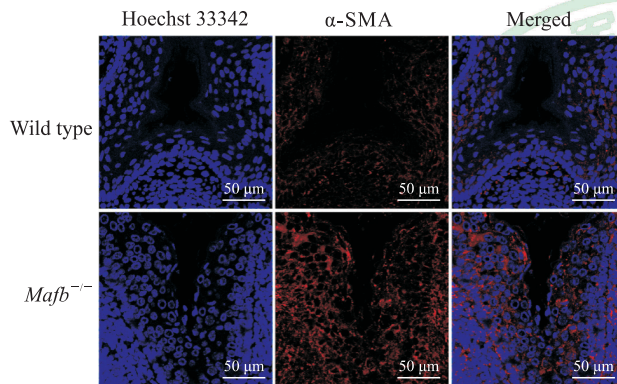


图8 免疫荧光检测 *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎组织中 α-SMA 的表达

Fig 8 α-SMA expression in penile tissues of fetal *Mafb*^{-/-} mice detected by immunofluorescence

Mafb: V-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog B; α-SMA: α-smooth muscle actin.

3 讨论

尿道下裂是男性最常见的先天性畸形之一，主要表现为腹侧包皮发育不全和尿道口异位等症状^[16-17]。目前尿道下裂的主要治疗手段仍是外科手术，通常需要多次手术以达到功能和外观上可接受的结果，但术后并发症如尿道痿、尿道狭窄等常不能避免，特别是重型尿道下裂患者，甚至可出现终身排尿困难和性功能障碍，并有增加心理问题发生的风险^[18-19]。因此，尿道下裂作为一个重要的健康问题，探究其发病机制尤为重要。目前大多数尿道下裂患者病因仍不明确，而现阶段主要的研究方向是遗传易感性和环境内分泌干扰物^[20-21]，其中，

对外生殖器发育具有重要调控功能的雄激素信号通路逐渐成为关注重点。

外生殖器的发育涉及多种信号通路调控，雄激素信号通路在男性生殖发育过程中发挥着重要作用^[4]。动物胚胎研究发现，在小鼠中，直到 GD 14.5 d，不同性别外生殖器的解剖学差异才显著，而生殖器结节的性别分化始于 GD 16.5 d，此时尿道板管状化形成尿道，男性尿道并入龟头，这一系列过程依赖于雄激素信号通路^[22]。在胚胎组织或成体组织中局部产生的雄激素包括睾酮和 DHT，这 2 种激素在生殖结节器官发生中通过 AR 介导其重要作用^[23-24]，而雄激素可诱导 *Mafb* 的表达。有研究表明 *Mafb* 在 *AR* 基因条件性敲除小鼠的雄性生殖结节中表达显著下调^[25]，结合本课题组前期使用 DHT 干预正常儿童包皮成纤维细胞发现 *Mafb* 表达显著上调、而 AR 拮抗剂氟他胺干预会显著下调 *Mafb* 的表达^[26]，提示转录因子 *Mafb* 为雄激素反应靶基因，可能参与调节男性外生殖器形成。

Mafb 是 AP-1 家族的重要成员，作为启动基因转录的开关，其在肾脏、胰腺、肺和脑等多个组织中广泛表达^[5]，该基因缺失可能会导致生长发育过程中部分功能减弱或障碍，例如，*Mafb* 基因突变与跖骨溶解综合征相关，*Mafb* 和 *Maf* 双敲除可导致睾丸血管增生、睾丸间质细胞缺陷和生殖细胞数量减少等^[27-29]。在与尿道发育过程类似的颌面部发育研究中，已证实小鼠胚胎颌面腭融合过程中 *Mafb* 在腭架周围上皮和内侧缘上皮中表达强烈，表达模式与唇腭发育中作用一致，表明 *Mafb* 在唇腭形态发生中发挥作用^[30]。本研究构建了 *Mafb* 基因敲除小鼠，发现 *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎尿道板融合不完全，腹侧包皮融合障碍，出现明显的尿道下裂表型，说明 *Mafb* 是男性外生殖器形成过程中的重要一环。但 *Mafb* 的下游基因有哪些及如何通过靶基因影响尿道发育的具体机制目前仍不明确，需进一步研究。EMT 在胚胎发育中，尤其在神经嵴发育、腭部形成等过程中的关键作用已有相关文献报道^[31-32]，本课题组前期证实 EMT 与大鼠胚胎阴茎发育关系密切^[15]，故本研究挑选 EMT 关键蛋白 E-cadherin 和 α-SMA 检测，发现 *Mafb*^{-/-} 胎鼠尿道缝处细胞表达与野生型小鼠相比出现明显差异，提示间质细胞可能存在异常增殖，推测尿道融合障碍可能与 *Mafb* 表达下降导致尿道缝处 EMT 异常有

关,其机制有待进一步研究。

CRISPR/Cas9 系统通过 gRNA 和 Cas9 蛋白的参与,将待编辑的细胞基因组 DNA 看作病毒或外源 DNA,精确剪切预设的 DNA 位点造成 DNA 双链断裂,诱导其发生缺失突变^[33],具有合成简便、特异性高、可对靶基因多个位点或多个基因同时敲除、更容易预测可能的突变位点等优点^[34]。相较于此前研究使用的 Cre-loxp 系统构建模型^[25,35-36],本研究利用 CRISPR-Cas9 技术通过 NHEJ 高效沉默基因,成功构建了 *Mafb* 基因敲除小鼠, *Mafb*^{+/-} 小鼠生长良好、能够正常繁育,而 *Mafb*^{-/-} 小鼠在出生时正常、但很快出现发绀并死亡,这与 2003 年的一项研究结果相印证,此研究分析 *Mafb*^{-/-} 小鼠会由于呼吸节律缺陷和致命性的中枢性呼吸暂停导致出生后立即死亡^[35]。本研究取材的 GD 18.5 d 小鼠阴茎组织几乎已发育完整^[37],因此 *Mafb*^{-/-} 小鼠出生后的致命性缺陷对本研究结果几乎没有影响。本研究采用免疫荧光技术检测 *Mafb*^{-/-} 胎鼠阴茎组织形态,结果表明几乎没有 *Mafb* 蛋白表达,说明敲除成功,且与 PCR 基因型鉴定结果一致。

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 *Mafb* 基因敲除小鼠,通过对 *Mafb* 基因敲除小鼠的繁育和基因型的鉴定及 *Mafb*^{-/-} 胎鼠尿道下裂表型的初步研究,证实该基因敲除可导致小鼠出现尿道下裂表型及尿道缝处细胞中 E-cadherin 和 α -SMA 的表达差异,这为进一步研究 *Mafb* 在尿道下裂发生机制中的作用奠定了基础。

[参考文献]

- [1] MANSON J M, CARR M C. Molecular epidemiology of hypospadias: review of genetic and environmental risk factors[J]. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, 2003, 67: 825-836.
- [2] WOOD D, BAIRD A, CARMIGNANI L, DE WIN G, HOEBEKE P, HOLMDAHL G, et al. Lifelong congenital urology: the challenges for patients and surgeons[J]. Eur Urol, 2019, 75: 1001-1007.
- [3] SKAKKEBAEK N E, RAJPERT-DE MEYTS E, BUCK LOUIS G M, TOPPARI J, ANDERSSON A M, EISENBERG M L, et al. Male reproductive disorders and fertility trends: influences of environment and genetic susceptibility[J]. Physiol Rev, 2016, 96: 55-97.
- [4] MATSUSHITA S, SUZUKI K, MURASHIMA A, KAJIOKA D, ACEBEDO A R, MIYAGAWA S, et al. Regulation of masculinization: androgen signalling for external genitalia development[J]. Nat Rev Urol, 2018, 15: 358-368.
- [5] TSUCHIYA M, MISAKA R, NITTA K, TSUCHIYA K. Transcriptional factors, Mafs and their biological roles[J]. World J Diabetes, 2015, 6: 175-183.
- [6] PAI EL, CHEN J, FAZEL DARBANDI S, CHO F S, CHEN J, LINDTNER S, et al. Maf and Mafb control mouse pallial interneuron fate and maturation through neuropsychiatric disease gene regulation[J/OL]. Elife, 2020, 9: e54903. DOI: 10.7554/eLife.54903.
- [7] LABOTT A T, LOPEZ-PAJARES V. Epidermal differentiation gene regulatory networks controlled by MAF and MAFB[J]. Cell Cycle, 2016, 15: 1405-1409.
- [8] YUAN Q, BLANTON S H, HECHT J T. Association of ABCA4 and MAFB with non-syndromic cleft lip with or without cleft palate[J]. Am J Med Genet A, 2011, 155A: 1469-1471.
- [9] XIAFUKAITI G, MAIMAITI S, OGATA K, KUNO A, KUDO T, SHAWKI H H, et al. MafB is important for pancreatic β -cell maintenance under a MafA-deficient condition[J/OL]. Mol Cell Biol, 2019, 39: e00080-19. DOI: 10.1128/MCB.00080-19
- [10] USUI T, MORITO N, SHAWKI H H, SATO Y, TSUKAGUCHI H, HAMADA M, et al. Transcription factor MafB in podocytes protects against the development of focal segmental glomerulosclerosis[J]. Kidney Int, 2020, 98: 391-403.
- [11] NISHIDA H, MIYAGAWA S, MATSUMARU D, WADA Y, SATOH Y, OGINO Y, et al. Gene expression analyses on embryonic external genitalia: identification of regulatory genes possibly involved in masculinization processes[J]. Congenit Anom (Kyoto), 2008, 48: 63-67.
- [12] 向涵,王绍,周玥,刘星,沈炼桔,龙春兰,等. 邻苯二甲酸二乙酯诱导的大鼠尿道下裂与 *Mafb* 的表达相关: 基于转录组测序结果[J]. 南方医科大学学报, 2019, 39: 456-463.
- [13] MATSUSHITA S, SUZUKI K, OGINO Y, HINO S, SATO T, SUYAMA M, et al. Androgen regulates *Mafb* expression through its 3'UTR during mouse urethral masculinization[J]. Endocrinology, 2016, 157: 844-857.
- [14] KONG X, LUO J, XIANG H, WANG S, SHEN L, LONG C, et al. Expression of *Mafb* is down-regulated in the foreskin of children with hypospadias[J/OL]. J Pediatr Urol, 2021, 17: 70.e1-70.e6. DOI: 10.1016/j.jpuro.2020.10.006.
- [15] ZHOU Y, LIU X, HUANG F, LIU Y, CAO X, SHEN L, et al. Epithelial-mesenchymal transformation and apoptosis in rat urethra development[J]. Pediatr Res, 2017, 82: 1073-1079.
- [16] RÜBBEN I, STEIN R. Hypospadias: insights and challenges[J]. Urologe A, 2017, 56: 1256-1265.

- [17] BASKIN L S, EBBERS M B. Hypospadias: anatomy, etiology, and technique[J]. *J Pediatr Surg*, 2006, 41: 463-472.
- [18] WIENER J S, HUCK N, BLAIS A S, RICKARD M, LORENZO A, DI CARLO H N M, et al. Challenges in pediatric urologic practice: a lifelong view[J]. *World J Urol*, 2021, 39: 981-991.
- [19] DEMARCO R T. Hypospadias surgery: search for elusive perfection-should we re-define surgical success to improve outcomes and provide reasonable postoperative expectations?[J]. *J Urol*, 2021, 206: 505-506.
- [20] FOSTER W G, EVANS J A, LITTLE J, ARBOUR L, MOORE A, SAUVE R, et al. Human exposure to environmental contaminants and congenital anomalies: a critical review[J]. *Crit Rev Toxicol*, 2017, 47: 59-84.
- [21] JOODI M, AMERIZADEH F, HASSANIAN S M, ERFANI M, GHAYOUR-MOBARHAN M, FERNS G A, et al. The genetic factors contributing to hypospadias and their clinical utility in its diagnosis[J/OL]. *J Cell Physiol*, 2019, 234: 5519-5523. DOI: 10.1002/jcp.27350.
- [22] SUZUKI H, SUZUKI K, YAMADA G. Systematic analyses of murine masculinization processes based on genital sex differentiation parameters[J]. *Dev Growth Differ*, 2015, 57: 639-647.
- [23] SUZUKI H, MATSUSHITA S, SUZUKI K, YAMADA G. 5 α -Dihydrotestosterone negatively regulates cell proliferation of the periurethral ventral mesenchyme during urethral tube formation in the murine male genital tubercle[J]. *Andrology*, 2017, 5: 146-152.
- [24] COOKE P S, WALKER W H. Male fertility in mice requires classical and nonclassical androgen signaling[J/OL]. *Cell Rep*, 2021, 36: 109557. DOI: 10.1016/j.celrep.2021.109557.
- [25] SUZUKI K, NUMATA T, SUZUKI H, RAGA D D, IPULAN L A, YOKOYAMA C, et al. Sexually dimorphic expression of *Mafb* regulates masculinization of the embryonic urethral formation[J]. *PNAS*, 2014, 111: 16407-16412.
- [26] 王绍,周玥,向涵,刘星,沈炼桔,龙春兰,等. 雄激素受体干预对包皮成纤维细胞*Mafb*基因表达的影响[J]. *重庆医科大学学报*, 2019, 44: 1003-1009.
- [27] LI S Y, GU X, HEINRICH A, HURLEY E G, CAPEL B, DEFALCO T. Loss of *Mafb* and *Maf* distorts myeloid cell ratios and disrupts fetal mouse testis vascularization and organogenesis[J]. *Biol Reprod*, 2021, 105: 958-975.
- [28] RUSSELL R, CARNESE P P, HENNINGS T G, WALKER E M, RUSS H A, LIU J S, et al. Loss of the transcription factor MAFB limits β -cell derivation from human PSCs[J/OL]. *Nat Commun*, 2020, 11: 2742. DOI: 10.1038/s41467-020-16550-9.
- [29] ZANKL A, DUNCAN E L, LEO P J, CLARK G R, GLAZOV E A, ADDOR M C, et al. Multicentric carpotarsal osteolysis is caused by mutations clustering in the amino-terminal transcriptional activation domain of MAFB[J]. *Am J Hum Genet*, 2012, 90: 494-501.
- [30] BEATY T H, MURRAY J C, MARAZITA M L, MUNGER R G, RUCZINSKI I, HETMANSKI J B, et al. A genome-wide association study of cleft lip with and without cleft palate identifies risk variants near MAFB and ABCA4[J]. *Nat Genet*, 2010, 42: 525-529.
- [31] NAKAJIMA A, F SHULER C, GULKA A O D, HANAI J I. TGF- β signaling and the epithelial-mesenchymal transition during palatal fusion[J/OL]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19: 3638. DOI: 10.3390/ijms19113638.
- [32] KAWACHI T, TADOKORO R, TAKAHASHI Y. Cell lineage, self-renewal, and epithelial-to-mesenchymal transition during secondary neurulation[J]. *J Korean Neurosurg Soc*, 2021, 64: 367-373.
- [33] CROTEAU F R, ROUSSEAU G M, MOINEAU S. The CRISPR-Cas system: beyond genome editing[J]. *Med Sci*, 2018, 34: 813-819.
- [34] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering[J]. *Cell*, 2014, 157: 1262-1278.
- [35] BLANCHI B, KELLY L M, VIEMARI J C, LAFON I, BURNET H, BÉVENGUT M, et al. *Mafb* deficiency causes defective respiratory rhythmogenesis and fatal central apnea at birth[J]. *Nat Neurosci*, 2003, 6: 1091-1100.
- [36] PARK J G, TISCHFIELD M A, NUGENT A A, CHENG L, DI GIOIA S A, CHAN W M, et al. Loss of MAFB function in humans and mice causes Duane syndrome, aberrant extraocular muscle innervation, and inner-ear defects[J]. *Am J Hum Genet*, 2016, 98: 1220-1227.
- [37] GEORGAS K M, ARMSTRONG J, KEAST J R, LARKINS C E, MCHUGH K M, SOUTHARD-SMITH E M, et al. An illustrated anatomical ontology of the developing mouse lower urogenital tract[J]. *Development*, 2015, 142: 1893-1908.

[本文编辑] 魏莎莎, 孙岩