

Adiponectin 基因剔除 LacZ 基因 敲入小鼠模型的建立*

任维华^{1,2)**} 李西华^{1,2)**} 王芳¹⁾ 乔建瓯^{2,3)} 党素英^{1,2)} 孔辉²⁾
王龙^{2,4)} 陆顺元⁴⁾ 孙霞²⁾ 徐国江²⁾ 傅继梁²⁾ 费俭²⁾ 王铸钢^{1,2,4)***}

⁽¹⁾上海交通大学医学院医学遗传学教研室, 上海 200025;

⁽²⁾上海南方模式生物研究中心, 上海 201203;

⁽³⁾上海交通大学医学院附属瑞金医院内分泌科, 上海 200025;

⁽⁴⁾上海交通大学医学院附属瑞金医院医学基因组学国家重点实验室, 上海 200025)

摘要 adiponectin 是脂肪细胞特异分泌的一种活性蛋白质, 具有增加胰岛素敏感性、抗炎及抗动脉硬化等活性. 建立 adiponectin 基因剔除 β -半乳糖苷酶基因 (LacZ) 敲入小鼠模型, 可为整体动物水平研究 adiponectin 基因功能及其表达调控机制等提供理想工具. 根据生物信息学方法获得 adiponectin 基因组序列, 设计基因剔除及敲入策略, 在 adiponectin 基因第 2 和第 3 号外显子剔除的同时, 在其 ATG 和信号肽序列后顺接 LacZ 基因完整编码序列, 构建完成了 Adipo-LacZ-XpPNT 基因剔除质粒. 通过电穿孔将打靶质粒转入 ES 细胞, 以 G418 和 ganciclovir 进行药物筛选, 获得药物抗性的 ES 细胞克隆, PCR 和 DNA 印迹鉴定出正确同源重组克隆. 将同源重组的 ES 细胞克隆注入小鼠囊胚得到嵌合体小鼠, 嵌合体小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配产生杂合子小鼠, 杂合子间交配获得 adiponectin 基因剔除 LacZ 基因敲入纯合子小鼠. 经 RT-PCR、RNA 印迹和 ELISA 检测证实纯合子小鼠脂肪和血清中 adiponectin 基因表达呈阴性. RT-PCR、RNA 印迹及蛋白质印迹检测发现, LacZ 基因在突变小鼠脂肪组织中有特异性表达, 其表达谱与内源性 adiponectin 基因的表达谱一致. 但在脂肪组织及外周血中未能检测到 LacZ 活性, 且血清中 LacZ 蛋白亦呈阴性. 由此成功建立了 adiponectin 基因完全灭活及 LacZ 基因以内源性 adiponectin 基因表达谱表达的小鼠模型, 为进一步研究该基因功能及其表达调控创造了有利条件.

关键词 adiponectin, 基因剔除, β -半乳糖苷酶基因(LacZ), 基因敲入

学科分类号 Q78

adiponectin是由脂肪细胞分泌的特异性蛋白. 人和鼠 adiponectin 分别由 244 和 247 个氨基酸组成, 分子质量约为 30 ku. 其结构包括信号序列 (17aa)、非同源结构域 (28aa)、一个由 22 个 Gly-X-Y 重复的 N 端胶原样结构域和一个与 TNF α 之 β 片层结构相似的 C 端球状结构域 (g-adiponectin)组成^[1,2]. 生理状态下, adiponectin 存在于机体细胞外液中以胶原三聚体或更高的聚合体形式发挥其生理作用^[3~5]. 研究表明, 肥胖、代谢综合征、2 型糖尿病以及冠状动脉疾病患者血浆中 adiponectin 水平明显低于健康人群^[6], 且在 2 型糖尿病动物模型中 adiponectin 血浆水平降低程度与胰岛素抵抗的发展相平行^[6]. 提示 adiponectin 的相对低水平表达与胰岛素抵抗的发生密切相关. 进一

步推测 adiponectin 在脂类代谢和胰岛素敏感性调节中发挥主要作用. 日本学者证明, adiponectin 可以特异性结合骨骼肌或肝脏细胞膜上的 G 蛋白偶联受体 1 和受体 2, 进而调节脂肪酸氧化和糖代谢^[7,8]. 到目前为止, 对 adiponectin 的表达调控机制尚未完全阐明. 如对肥胖者 adiponectin 浓度反而下降这一矛盾现象难以解释, 推测可能存在某种反馈机

*国家杰出青年科学基金(39925023), 国家高技术研究发展计划(863) (2001AA216081, 2004AA216080), 上海市科学技术发展基金 (99JC14029, 99XD14005), 上海市教委 E-研究院计划 (E03003) 资助项目.

并列第一作者. * 通讯联系人.

Tel/Fax: 021-64457997, E-mail: zhugangw@shsmu.edu.cn

收稿日期: 2006-02-13, 接受日期: 2006-06-09

制:即脂肪组织增多时 TNF 可能通过旁分泌作用抑制了 adiponectin 的产生和释放.体外实验证明,PPAR α 、PPAR γ 、C/EBP α 、C/EBP β 、胆固醇调节元件相关蛋白 (ADD1/SREBP1c) 等转录因子、胰岛素和糖皮质激素能够上调 adiponectin 的表达^[9,10],IL-6、TNF α 及地塞米松等则抑制 adiponectin 的表达^[11~14].最近, Fasshauer 等发现,肥胖相关的胰岛素抵抗、高胰岛素血症可引起 adiponectin 受体表达下调和 adiponectin 抵抗.但在体内 adiponectin 基因表达调控是否与体外实验相似? adiponectin 受体调节机制如何? adiponectin 是通过何种细胞信号通路影响胰岛素抵抗的发生?对上述问题的回答还需在整体动物水平进行深入的研究.

基因剔除 (gene knockout) 是在整体动物水平研究基因功能的一种最直接有效的方法,同时也是跟踪特定基因的时空表达规律,研究基因表达调控机制的有效手段.传统的在体研究基因表达调控的方法,是通过建立特定基因 5'上游或 3'下游调控序列驱动报告基因表达的转基因动物模型而实现的.用这种方法获得的研究结果常受到整合位置效应及转基因过表达的影响.应用改良的基因剔除策略,即将筛选基因与报告基因定点插入 (基因敲入, knock-in) 到特定基因位点,破坏该基因的结构,同时使报告基因受被破坏基因调控序列 (插入位置上游和下游) 的调控而表达.这样的基因剔除小鼠品系不仅可用于研究基因功能,而且是研究剔除基因时空表达调控的良好模型.本研究基于此策略,构建了 adiponectin 基因剔除 β -半乳糖苷酶报告基因 (LacZ) 敲入打靶载体,在剔除 adiponectin 基因大部分编码区序列的同时,在 adiponectin 基因信号肽 (SP) 序列后顺接 LacZ 报告基因,通过 adiponectin 基因启动子和 SP 序列驱动报告基因 LacZ 的表达和分泌.通过 ES 细胞打靶、同源重组 ES 细胞克隆筛选、囊胚注射和移植等过程,获得了 adiponectin 基因剔除 LacZ 基因敲入小鼠模型.该小鼠模型的建立对进一步在整体动物水平研究 adiponectin 基因表达调控机制、揭示 adiponectin 在胰岛素抵抗中的作用和机制等有重要意义.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 来源于 129S1/Sv 品系小鼠 ES 细胞株 CJ7、打靶载体质粒 XpPNT 由本室保存,SPF 级 129Sv 小鼠, C57BL/6J 小鼠,由上海南方模式生物研究

中心保种繁育.

1.1.2 各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、各种 DNA 聚合酶等购自 Takara 公司、Promega 公司、NEB 公司; PGEM-Teasy、pSV- β -galactosidase vector 质粒购自 Promega 公司; 尼龙膜 Nytran Supercharge 及 WESTRAN PVDF 膜购自 Schleicher&Schuell 公司; α -³²P-dATP 购自 NEN Life Science 公司; 小鼠 Adiponectin ELISA 试剂盒购自 BR 公司; LacZ 化学发光试剂盒来自于罗氏公司.

1.1.3 细胞培养相关试剂,包括 DMEM 培养基 (high glucose, ES-cell-qualified) 及胎牛血清 (ES-cell-qualified)、G418、Gancyclovir、LIF、青链霉素、胰蛋白酶、胶原等试剂均为 Gibco BRL 公司、Sigma 公司、CHEMICON 公司产品.其他试剂购自 Sangon、Sigma 等公司.

1.1.4 电穿孔仪及电转杯为 Biorad 公司产品; 细胞培养箱为 Heraeus 公司产品; 显微注射平台为 Olympus 公司产品等.

1.1.5 引物由上海英俊生物技术有限公司和上海生工生物工程技术公司合成. AdipoZ5' armU: ATTGGTACCAGGCCAACGCACGAGGAGTA; AdipoZ5' armD: ATATGCTAGCCCTTCTGAACA-ATGGAAAGG; AdipoZ3' armU: AATTCTCGAG-CTCAGCCCCGAAGATATGGGAAGA; AdipoZ3' armD: ATATGCGGCCGCTGGGCCAGAATGATGCTTGGTTA; LacZU: CTAGCCCTTCTGAACAATGGAAAGG; LacZD: ATATTCTAGATTGCATGCCTGC-AGGTCGAC; AdipoZ5' JDU: AGCAATGGCGGG-CAAGATGACTCA; AdipoZ5' JDD: CGGTGCGG-GCCTCTTCGCTATTAC; AdipoZ3' JDU: CGCTA-CCGGTGGATGTGGAATGTG; AdipoZ3' JDD: GCCGCTATCTGGCCTTACTTTGGG; AdipoZ5' PU: GCTTAGTACTTCAGTCCCAT; Adipo-Z5' PD: C-CATTGCTCTGAAGCTTTTA; cLacZU: CTTCCC-GCCCGGTGCAG; cLacZD: CTTCCCGCCCGG-TGCAGTATGA; WAdipoZ3' JDU: ACATTTGGT-GGATGTGGAAT; RAdipoZ3' JDU: GCTACCGG-TGGATGTGGAAT; WRAdipoZ3' JDD: CTGCTC-TTGCCCCAAACTGA; Adpcu: ACCAGGCCGTG-ATGGCAGAGAT; Adpcd: TGTGAAGCCCCCA-TACCAAATGTG.

1.2 方法

1.2.1 打靶载体的构建. 从 UCSC Genome Bioinformatics 数据库中获得小鼠 adiponectin 基因

序列并据此设计打靶策略, 以小鼠 ES 细胞株 CJ7 基因组 DNA 为模板, 用 AdipoZ5'armU、AdipoZ5'armD; AdipoZ3'armU、AdipoZ3'armD 引物对分别 PCR 扩增出 3 037 bp 的 5'同源臂和 3 506 bp 的 3'同源臂片段, 以 pSV- β -galactosidase vector 质粒为模板, 用引物 LacZ-U、LacZ-D 扩增 3.60 kb LacZ 编码序列 (去掉起始密码), 引物末端均带有限制性酶切位点. 5'同源臂的 3'端为 adiponectin ATG 及信号肽 (SP) 序列, 在其后接入 LacZ 完整编码框序列. 以 X-pPNT 质粒为母体质粒, 先将 5'同源臂克隆至 *Kpn* I、*Nhe* I 位点, 接着将 LacZ 克隆至 5'同源臂下游 *Nhe* I、*Xba* I 位点, 最后把 3'同源臂克隆至 *Xho* I、*Not* I 位点, 构建成 AdipoZ-XpPNT 打靶载体, 限制性内切酶分析和测序鉴定载体结构正确.

1.2.2 滋养层细胞的制备和 ES 细胞培养. 按常规方法制备含有 *neo* 转基因的 129S1 小鼠胚胎 (13.5 天) 成纤维细胞, 培养至第 3 或第 4 代细胞接近融合时, 加丝裂霉素 C (终浓度 10 mg/L) 处理 2 h 后收集冻存, 作为滋养层细胞. ES 细胞培养按常规方法, ES 细胞完全培养基为 DMEM 中含 10^{-6} mol/L β -巯基乙醇, 100 U/ml 青霉素, 50 mg/L 链霉素, 15%胎牛血清 (ES-cell-qualified), 1 000 U/ml LIF.

1.2.3 ES 细胞电穿孔 DNA 转移及药物筛选. 处于对数生长期的 ES 细胞, 经 0.1%胰蛋白酶-EDTA 消化, 计数后用 PBS 调节细胞浓度至 1.2×10^7 /ml. 取 0.8 ml ES 细胞悬液, 加入 40 μ g 经 *Not* I 线性化的 XpPNT-AdipoZ 质粒 DNA, 吹吸混匀后转移至电穿孔杯中, 在 240 V, 500 μ F 条件下进行电穿孔. 以新鲜 ES 细胞培养液悬浮混匀后, 平均分配到 2 个已铺好滋养层细胞的 10 cm 培养皿中培养. 24 h 后换含药物 G418 (400 mg/L) 和 Gancyclovir (2 μ mol/L) 的培养液, 每天更换. 经过 7~8 天选择性培养后, 挑取肉眼可见的抗药性 ES 细胞克隆. 继续培养至 60%~80%细胞融合时, 消化细胞并分为两份, 一份转入铺有滋养层细胞的 48 孔板生长然后冻存, 另一份转入仅有 gelatin 包被的 48 孔板, 待细胞长满后提取基因组 DNA.

1.2.4 同源重组 ES 细胞克隆的 PCR 鉴定. 以 ES 细胞基因组 DNA 为模板, 在 adiponectin 同源重组臂外侧分别设计 AdipoZ5'JDU 和 AdipoZ3'JDD 引物, 在 LacZ 序列上设计引物 AdipoZ5'JDD, 与 AdipoZ5'JDU 配对, PCR 鉴定 5'臂同源重组, 同源重组克隆应扩增出 4 398 bp 的片段; 在 *neo* 基因

序列上设计引物 AdipoZ3'JDU, 与 AdipoZ3'JDD 引物配对鉴定 3'臂同源重组, 同源重组克隆应扩增出 3 733 bp 的片段. 凝胶回收 PCR 产物, 进行测序鉴定.

1.2.5 ES 细胞克隆 DNA 印迹杂交. 取约 10 μ g ES 细胞基因组 DNA, *Eco*R I 酶切过夜, 0.8%琼脂糖凝胶 50 V 电泳过夜后, 按常规方法将 DNA 转移至尼龙膜. 以 AdipoZ5'PU、AdipoZ5'PD 引物对扩增 5'臂外侧 397 bp 基因组序列作为探针, 按 NEB Random Primer Labeling Kit 的说明标记 32 P, 按 Clontech 公司 Expresshyb 杂交液说明书进行杂交后, X 光片置-80℃冰箱中放射自显影.

1.2.6 ES 细胞的囊胚显微注射和胚胎移植. 4~5 周龄的 C57BL/6J 怀孕后 3.5 天, 处死采集囊胚. 每个囊胚注射 8~15 个 ES 细胞, 注射后囊胚移植到假孕母鼠子宫 (每侧子宫移植囊胚 4~8 个), 产下的仔鼠即为嵌合体小鼠.

1.2.7 小鼠的育种和基因型鉴定. 将雄性嵌合体小鼠与 C57BL/6J 雌鼠交配, 可产生杂合子. 杂合子间相互交配繁殖后代. 小鼠基因型鉴定采用 PCR 的方法. 对 2~3 周龄的小鼠剪尾提取基因组 DNA 作为模板, 依据以 adiponectin 3'同源臂下游基因组序列设计引物 WRAdipoZ3'JDD, 依 *neo* 序列设计引物 RAdipoZ3'JDU, 可在发生重组的基因组中扩增 3.7 kb 重组片段, 依被剔除区域 adiponectin 基因组序列设计引物 WAdipoZ3'JDU 与 WRAdipoZ3'JDD 配对, 可扩增 4.35 kb 野生型基因组片段. 3 引物在同一体系中反应时, 野生型小鼠仅能扩增出 4.35 kb 片段, 纯合子小鼠仅能扩增出 3.7 kb 片段, 而杂合子小鼠能扩增出上述两种片段.

1.2.8 RNA 印迹和 RT-PCR 检测小鼠组织中 adiponectin 和 LacZ 的表达.

取 8 周龄雄性杂合子 (Adi+/LacZ+) 小鼠白色脂肪、褐色脂肪、脑、肝、肌肉、睾丸等 11 种组织, 提取总 RNA, 以 RNA 印迹检测 adiponectin 和 LacZ 表达. RNA 印迹检测 adiponectin 的探针以 129 小鼠基因组为模板, 以引物 Adpcu 和 Adpcd 扩增 adiponectin 编码区 839 bp 的片段获得; RNA 印迹检测 LacZ 的探针以 pSV- β -galactosidase vector 质粒为模板, 用引物 cLacZU 和 cLacZD 扩增 LacZ 编码区 400 bp 的片段获得.

进一步以 RT-PCR 对 8 周龄雄性野生型 (Adi+/Adi+)、杂合子 (Adi+/LacZ+) 和纯合子 (LacZ+/LacZ+) 小鼠脂肪中 adiponectin 和 LacZ 的表达进行

检测. 以引物 Adpcu 和 Adpcd, 扩增 aponectin 编码区 839 bp 的片段, 反应条件: 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 27 个循环; 以引物 cLacZU 和 cLacZD, 扩增 LacZ 编码区 400 bp 的片段, 反应条件: 95℃ 30 s, 58℃ 30 s, 72℃ 40 s, 27 个循环.

1.2.9 蛋白质印迹检测小鼠脂肪组织和血清中 LacZ 的表达. 取 8 周龄 3 种基因型雄性小鼠血清和白色脂肪组织, 用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液制成匀浆, 离心取上清用 Lowry 法定量蛋白质浓度. 取 15 μg 的总蛋白上样, 7% SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE), 半干法转膜, 用 5% 的 ECL blocking agent-TBST 封闭 1 h, 加入 TBST 稀释的抗 LacZ 一抗 (1 : 500, 1 mg/L, Sigma) 工作液 4℃ 孵育过夜, 洗膜后加 TBST 稀释的羊抗 IgG 二抗 (1 : 10 000) 室温 1 h, 洗膜后按 ECL plus 试剂盒的说明进行化学发光检测.

1.2.10 小鼠血清中 adiponectin 和 LacZ 的活性表达检测. 取 8 周龄 3 种基因型小鼠血清, 按照 BR 公司 Adiponectin ELASA 试剂盒和罗氏公司 LacZ 化学发光试剂盒说明书步骤, 测定小鼠血清 adiponectin 浓度和 LacZ 活性.

2 结 果

2.1 打靶载体的构建及打靶策略

完成构建的打靶质粒用酶切及测序证实同源臂序列和方向正确, adiponectin 起始密码及信号肽序列后顺接 LacZ 序列, 编码框正确. 载体质粒以 Not I 线性化后用于 ES 细胞打靶. 打靶质粒见图 1, 打靶策略见图 2.

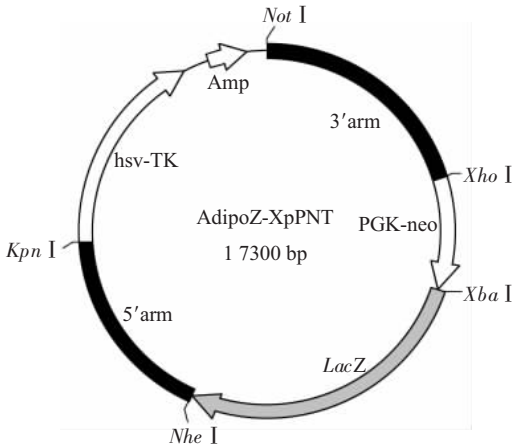


Fig. 1 Adiponectin gene “knock-out” and LacZ gene “knock-in” vector

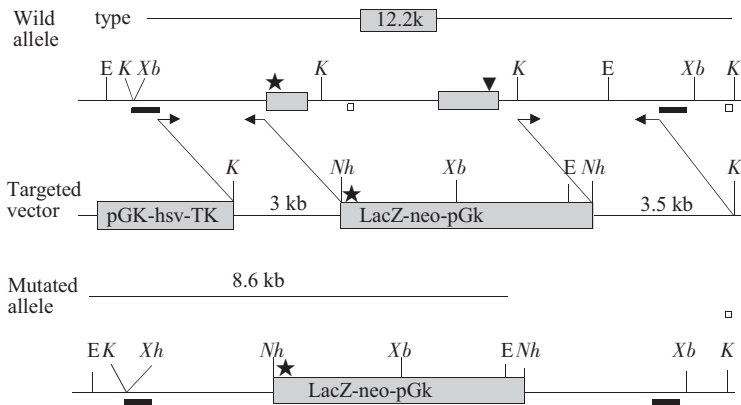


Fig. 2 Adiponectin gene “knock-out” & LacZ gene “knock-in” strategy

The black horizontal arrows denote the primer pairs used for amplification of homologous arms. The homologous arms are 3 kb and 3.5 kb respectively. Exon 2 except for its ATG and signal peptide sequence, intron 2 and exon 3 were deleted. Whole LacZ gene sequence was inserted into the same region. K: *Kpn* I ; Xb: *Xba* I ; Nh: *Nhe* I ; N: *Not* I ; ★: ATG; ▼: TGA.

2.2 同源重组 ES 细胞克隆鉴定

打靶共获得抗性克隆 366 个, PCR 检测到有 6 个正确同源重组克隆, 分别为第 14、33、94、181、189、271 号克隆 (图 3). 测序证实 5'端和 3'

端 PCR 产物序列符合预期正确重组片段序列. DNA 印迹鉴定结果进一步证明 6 个克隆均为正确同源重组克隆 (图 3a、3b、3c)

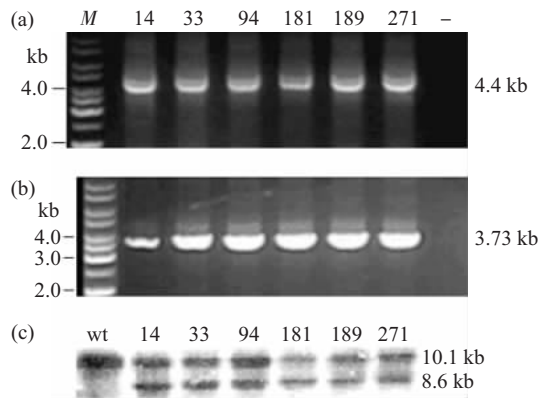


Fig. 3 Identification of targeted ES cell clones by PCR and Southern blot

(a) Recombined event at 5' terminal should be expected with 4.4 kb fragment in PCR reaction. (b) Recombined event at 3' terminal should be expected with 3.733 kb fragment in PCR reaction. (c) Southern blot analysis using 5' probe (ES cell genomic DNA digested by *EcoR* I) shows that fragment derived from targeted allele is 8.6 kb and that from wild type allele is 10.1 kb. M: NEB 1 kb DNA ladder; wt: wild type ES cell.

2.3 嵌合体及杂合子育种

通过显微注射和囊胚移植后, 产生了 7 只毛色嵌合度在 80% 以上 129/C57 嵌合体雄性小鼠. 与 C57BL/6J 雌鼠交配, 共获得 ES 细胞来源的灰色小鼠 44 只. 经鉴定, 共有 21 只为 F1 阳性杂合小鼠, 符合孟德尔遗传规律. 杂合子间交配繁殖获得野生型、杂合子和纯合子 3 种基因型小鼠, 且 3 种小鼠出生数量基本符合孟德尔遗传定律, 说明 *adiponectin* 基因剔除没有导致纯合子小鼠胚胎致死. PCR 鉴定小鼠基因型结果见图 4.

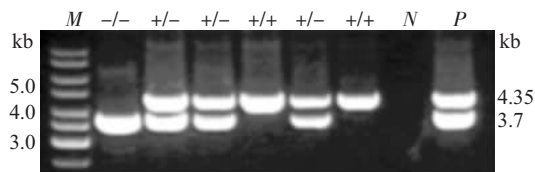


Fig. 4 PCR for genotyping of *adiponectin* gene knockout and *LacZ* gene knock-in mice

Only 4.35 kb fragment in wild type mice and 3.7 kb fragment in homozygous mice could be amplified. Both 4.35 kb and 3.7 kb fragments could be amplified in heterozygous mice. M: NEB 1 kb DNA ladder; N: Negative control; P: Positive control; -/-: Homozygous; +/-: Heterozygous; +/+: Wild type.

2.4 *Adiponectin* 和 *LacZ* 基因在小鼠组织中的表达

RNA 印迹结果显示(图 5a), 在杂合子 (*Adi*+

/*LacZ*+)小鼠的脂肪组织中可检测到 *adiponectin* 和 *LacZ* 基因的表达, 特别是在白色脂肪组织中 *adiponectin* 表达水平较高, 而在脑、胸腺、心、肺、肝、脾、肾、肌肉、睾丸等 9 种组织中均未检测到 *adiponectin* 和 *LacZ* 的表达. 另外, 我们进一步对 3 种基因型小鼠白色脂肪组织 RNA 进行 RT-PCR 的检测, 结果显示, 在野生型和杂合子小鼠中可检出 *adiponectin* 基因表达, 纯合子小鼠中无 *adiponectin* 基因表达(图 5b), 而 *LacZ* 基因在杂合子和纯合子小鼠中表达, 在野生型小鼠中无 *LacZ* 基因表达. 以上结果在 RNA 水平上证明通过基因打靶实现了 *adiponectin* 基因灭活, 同时 *LacZ* 基因按照 *adiponectin* 基因表达谱表达.

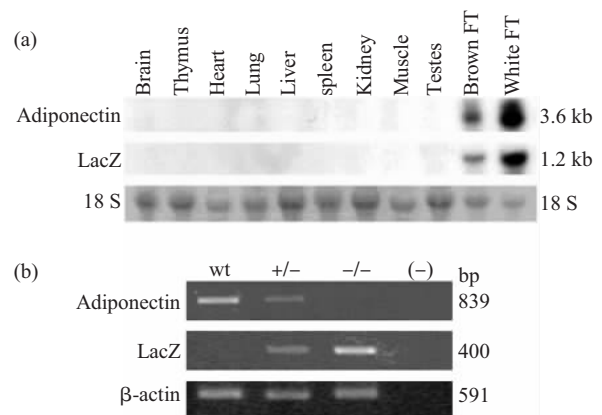


Fig. 5 *Adiponectin* and *LacZ* gene expression by Northern blot and RT-PCR

(a) Expression profiles of *adiponectin* and *LacZ* in heterozygous mice. 3.6 kb band of *adiponectin* and 1.2 kb band of *LacZ* could only be detected in brown and white adipose. (b) RT-PCR analysis of *adiponectin* and *LacZ* expression in the adipose of mice with three different genotypes. The 839 bp transcripts of *adiponectin* could be detected in heterozygous and wild type mice, but not in homozygous mice; while 839 bp transcripts of *LacZ* could be detected in heterozygous and homozygous mice, not in wild type mice.

2.5 *LacZ* 蛋白在小鼠脂肪组织和血清中的表达

蛋白质印迹结果显示(图 6), 3 种基因型血清中均未检测到 110 ku *LacZ* 蛋白带, 而在脂肪组织中, 除野生型小鼠的脂肪组织外, 杂合子和纯合子小鼠均能检测到 110 ku *LacZ* 蛋白带.

2.6 小鼠血清中 *adiponectin* 浓度和 *LacZ* 的活性

通过酶联免疫法和化学发光法分别对野生型和纯合子小鼠血清 *adiponectin* 浓度和 *LacZ* 活性进行测定. 结果表明, 在纯合子小鼠血清中未检测到 *adiponectin* 蛋白(图 7a), 进一步在蛋白质水平证

明, adiponectin 基因的灭活, 没有 adiponectin 蛋白分泌入血, 而纯合子小鼠血清中 LacZ 活性与野生型小鼠相比, 没有显著性差异 (图 7b).

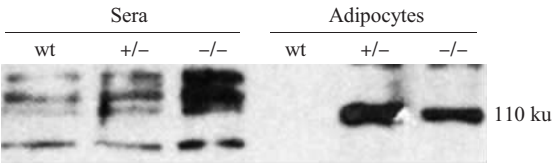


Fig. 6 Western blot analysis of LacZ protein in fat tissues and sera of mice

110 ku band of LacZ protein could only be detected in adipose of heterozygous and homozygous mice, not in wild type. LacZ protein band could not be detected in sera of mice with all three genotypes.

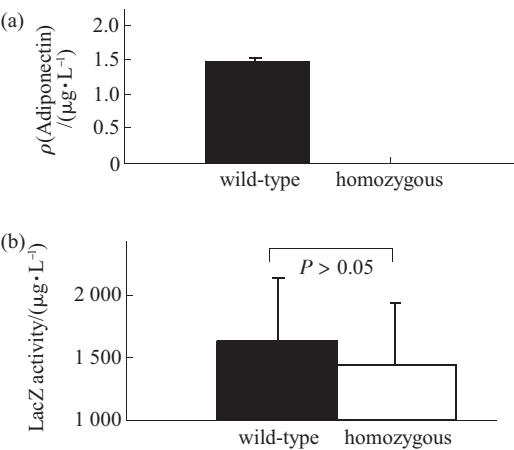


Fig. 7 Adiponectin content and LacZ activity in mouse serum

(a) Serum adiponectin is undetectable in homozygous mice compared to wild type mice ((1.48±0.13) μg/L). (b) LacZ activity in homozygous ((1438.7± 302.7) μg/L) is comparable to wild type mice ((1629.8± 484.3) μg/L).

3 讨 论

小鼠 adiponectin 基因包括三个外显子, 其中第二和第三外显子为编码区, 编码产生具有信号肽、非同源结构域、胶原样结构域和球状结构域的 adiponectin 蛋白. 研究发现, 球状结构域对维持胰岛素增敏起关键作用^[12]. 本研究设计的基因剔除方案是剔除编码信号肽序列以外的第二和第三外显子序列, 以保证该基因的完全灭活, 同时将报告基因 LacZ 置于编码 adiponectin 蛋白信号肽的序列下游, 使 LacZ 基因受完整的 adiponectin 基因表达调控序列驱动表达, 并由 adiponectin 蛋白信号肽引导分泌入血. 本研究通过 ES 细胞基因打靶获得 6 个同源重组克隆, PCR 和 DNA 印迹均证实, 同源重组

克隆一条染色体上的 adiponectin 基因编码信号肽序列以外的第二和第三外显子序列被 LacZ-PGKneo 序列置换. 同源重组 ES 细胞克隆经显微注射、嵌合体育种获得了 adiponectin 基因剔除 LacZ 基因敲入的纯合子小鼠. RNA 印迹、RT-PCR、蛋白质印迹检测小鼠组织和血清中 adiponectin 和 LacZ 基因的表达证实, 在纯合子小鼠中脂肪组织和血清的 adiponectin 基因表达呈阴性, 而 LacZ 基因特异地在小鼠脂肪组织中表达, 但在血清中没有检测到 LacZ 活性. 本研究实现了在建立 adiponectin 基因灭活的同时, 也达到 LacZ 报告基因按照内源 adiponectin 基因表达谱表达的小鼠模型的目标, 为整体动物水平研究 adiponectin 基因功能和表达调控机制奠定了基础.

β-半乳糖苷酶基因 (LacZ), 是一种常用的报告基因, 其优点是利用邻硝基苯-β-D 半乳吡喃糖苷 (ONPG) 作为底物反应后比色分析, 操作简便、快速且灵敏. 本研究中 LacZ 基因表达呈现出 adiponectin 基因表达的组织特异性, 即在脂肪组织特异表达. 但在小鼠血清没有检测到 LacZ 蛋白, 表明信号肽不是 LacZ 蛋白出胞的充分条件. 有研究表明, 在大肠杆菌体内将信号肽序列加在 LacZ 基因上游同样不能使 LacZ 蛋白分泌出胞^[15], 我们的结果与之类似.

adiponectin 作为一种分泌蛋白, 可能参与体内多种生理生化过程. 研究表明, 给予哺乳动物注射 adiponectin 可发挥增加胰岛素敏感性、抗炎及抗动脉硬化功效^[16~19]. 最新的研究表明, 血浆 adiponectin 浓度与人体骨矿密度呈负相关^[18], 先兆子痫妇女血 adiponectin 浓度较血压正常孕妇显著升高, 却与胰岛素抵抗无关^[20]. 为了获得关于 adiponectin 基因功能的直接证据, Kuboda^[21], Maeda^[22]和 Ma^[8]相继建立了 adiponectin 基因剔除小鼠模型, 前两者的研究表明, 在长期高脂肪饮食诱导下, 与野生型小鼠比较, 杂合子和纯合子小鼠都有不同程度的胰岛素抵抗, 而后的研究中, adiponectin 基因剔除小鼠并不表现胰岛素抵抗和葡萄糖耐量低下. 本研究初步观察结果表明, 成年鼠在基础条件下, 体重、血糖、糖耐量、胰岛素敏感性等指标在 3 种基因型之间无显著性差异, 与文献报道一致. 因此对 adiponectin 基因功能还需要进一步地深入研究. 本研究建立了 adiponectin 基因剔除 LacZ 基因敲入小鼠模型, 一方面可通过全面观察 adiponectin 基因缺失时小鼠的表型, 确定

adiponectin功能与小鼠表型之间的关系, 另一方面通过简便方法检测各种调控因素及药物对 LacZ 表达的影响, 研究 adiponectin 基因表达调控机制与其功能之间的关系, 筛选治疗与 adiponectin 相关疾病的药物. 由于 adiponectin 在血清中浓度相对较高(5~30 mg/L)^[5], 我们期望利用 LacZ 报告基因模拟生理状态下 adiponectin 的表达和分泌水平, 以便于检测和评价. 本研究中 LacZ 报告基因受 adiponectin 调控序列驱动, 在小鼠脂肪组织特异表达但不能分泌入血, 这一点并不影响上述研究目标的实现. 我们将利用本研究中建立的小鼠模型, 重点研究 IL-6、TNF α 等细胞因子及与代谢相关的各种蛋白激酶信号通路分子(如 Akt、Erk、IP3k、PMAPK、AMPK)、胰岛素 / 胰岛素样生长因子等对 adiponectin 基因表达调控的影响, 以确定 adiponectin 是通过何种细胞信号通路影响胰岛素抵抗等病理过程的发生, 进一步研究各种调控因素影响小鼠表型的分子途径.

参 考 文 献

- Scherer P E, William S, Fogliano M, *et al.* A novel protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes. *J Biol Chem*, 1995, **270** (50): 26746~26749
- Maeda K, Okubo K, Shimomura I, *et al.* cDNA cloning and expression of a novel specific collagen-like factor, apM1 (Adipose Most abundant Transcript 1). *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, **221** (2): 286~289
- Nakano Y, Tobe T, Choi-Miura N H, *et al.* Isolation and characterization of GBP28, a novel Gelatin-binding protein purified from human plasma. *J Biochem(Tokyo)*, 1996, **120** (4): 803~812
- Pajvani U B, Hawkins M, Combs T P, *et al.* Complex distribution, not absolute amount of adiponectin, correlates with thiazolidinedione-mediated improvement in insulin sensitivity. *J Biol Chem*, 2004, **279** (13): 12152~12162
- Arita Y, Kihara S, Ouchi N, *et al.* Paradoxical decrease of an adipose-specific protein, adiponectin, in obesity. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, **257** (1): 79~83
- Hotta K, Funahashi T, Bodkin N L, *et al.* Circulating concentrations of the adipocyte protein adiponectin are decreased in parallel with reduced insulin sensitivity during the progression to type 2 diabetes in rhesus monkeys. *Diabetes*, 2001, **50** (5): 1126~1133
- Yamauchi T, Kamon J, Minokoshi Y, *et al.* Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase. *Nat Med*, 2002, **8** (11): 1288~1295
- Ma K, Cabrero A, Saha P K, *et al.* Increased beta -oxidation but no insulin resistance or glucose intolerance in mice lacking adiponectin. *J Biol Chem*, 2002, **277** (38): 34658~34661
- Fasshauer M, Klein J, Neumann S, *et al.* Hormonal regulation of adiponectin gene expression in 3T3-L1 adipocytes. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **290** (3): 1084~1089
- Halleux C M, Takahashi M, Delporte M L, *et al.* Secretion of adiponectin and regulation of apM1 gene expression in human visceral adipose tissue. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **288** (5): 1102~1107
- Iwaki M, Matsuda M, Maeda N, *et al.* Induction of adiponectin, a fat-derived antidiabetic and antiatherogenic factor, by nuclear receptors. *Diabetes*, 2003, **52** (7): 1655~1663
- Tonelli J, Li W, Kishore P, *et al.* Mechanisms of early insulin-sensitizing effects of thiazolidinediones in type 2 diabetes. *Diabetes*, 2004, **53** (6): 1621~1629
- Zang Y, Matheny M, Zolotukhin S, *et al.* Regulation of adiponectin and leptin gene expression in white and brown adipose tissues: influence of beta3-adrenergic agonists, retinoic acid, leptin and fasting. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1584** (2~3): 115~122
- Maeda N, Takahashi M, Funahashi T, *et al.* PPARgamma ligands increase expression and plasma concentrations of adiponectin, an adipose-derived protein. *Diabetes*, 2001, **50** (9): 2094~2099
- Moreno F, Fowler A V, Hall M. A signal sequence is not sufficient to lead beta-galactosidase out of the cytoplasm. *Nature*, 1980, **286** (5771): 356~359
- Berg A H, Combs T P, Du X, *et al.* The adipocyte-secreted protein Acrp30 enhances hepatic insulin action. *Nat Med*, 2001, **7** (8): 947~953
- Yamauchi T, Kamon J, Waki H, *et al.* The fat-derived hormone adiponectin reverses insulin resistance associated with both lipoatrophy and obesity. *Nat Med*, 2001, **7** (8): 941~946
- Matsuda M, Shimomura I, Sata M, *et al.* Role of adiponectin in preventing vascular stenosis. The missing link of adipo-vascular axis. *J Biol Chem*, 2002, **277** (40): 37487~37491
- Jurimae J, Rembel K, Jurimae T, *et al.* Adiponectin is associated with bone mineral density in perimenopausal women. *Horm Metab Res*, 2005, **37** (5): 297~302
- Kajantie E, Kaaja R, Ylikorkala O, *et al.* Adiponectin concentrations in maternal serum: elevated in preeclampsia but unrelated to insulin sensitivity. *J Soc Gynecol Investig*, 2005, **12** (6): 433~439
- Kubota N, Terauchi Y, Yamauchi T, *et al.* Disruption of adiponectin causes insulin resistance and neointimal formation. *J Biol Chem*, 2002, **277** (29): 25863~25866
- Maeda N, Shimomura I, Kishida K, *et al.* Diet-induced insulin resistance in mice lacking adiponectin/ACRP30. *Nature Med*, 2002, **8** (7): 731~737

Generation of Adiponectin Gene Knock-out and LacZ Gene Knock-in Mouse Model*

REN Wei- Hua^{1,2)**}, LI Xi-Hua^{1,2)**}, WANG Fang¹⁾, QIAO Jian-Ou^{2,3)},
DANG Su-Ying^{1,2)}, KONG Hui²⁾, WANG Long^{2,4)}, LU Shun-Yuan⁴⁾,
SUN Xia²⁾, XU Guo-Jiang²⁾, FU Ji-Liang²⁾, FEI Jian²⁾, WANG Zhu-Gang^{1,2,4)***}

⁽¹⁾Department of Medical Genetics, Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200025, China;

⁽²⁾Shanghai Research Center for Model Organisms, Shanghai 201203, China;

⁽³⁾Department of Endocrinology, Rui-Jin Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200025, China;

⁽⁴⁾State Key Laboratory of Medical Genomics, Rui-Jin Hospital Affiliated to Shanghai Jiaotong University Medical School, Shanghai 200025, China)

Abstract Adiponectin is an adipocyte-derived secretory protein. It was found to be associated with insulin resistance, inflammation and arteriosclerosis. To further study the biological function and expression of adiponectin *in vivo*, adiponectin gene knock-out and LacZ gene knock-in mouse model was constructed. Gene targeting strategy was designed to replace part of exon 2 and exon 3 of adiponectin gene with full length LacZ gene in frame with remaining upstream ATG and signal peptide sequence of exon 2. The targeting vector (Adipo-LacZ-XpPNT) was constructed and verified by restriction enzyme digestion and sequencing. CJ7 ES cells were transfected with targeting vector linearized by *Not I* digestion, selected in the medium containing both G418 and ganciclovir. Resistant clones were screened by PCR and further confirmed by Southern blot for correct homologous recombinants. Chimera mice were obtained by routing microinjection of homologous recombined ES cells into blastocysts. After mating, mice heterozygous and further homozygous for adiponectin knockout and LacZ gene knock-in were established. Expression of both endogenous adiponectin and exogenous LacZ gene in mouse tissues and sera were detected by RT-PCR, Northern-blot, Western blot and ELISA. The results show that adiponectin was disrupted at both mRNA and protein levels. LacZ gene is expressed exclusively in adipose tissue of mutant mice. Its expression profile is identical to endogenous adiponectin. Unexpectedly, LacZ activity could not be detected in both adipose tissue and serum although LacZ protein can be detected in adipose tissue but not in serum of mutant mice. In conclusion, mice homozygous for adiponectin knockout and LacZ gene knock-in have been successfully constructed. Mutant mice display LacZ expression profile identical to endogenous adiponectin albeit neither LacZ activity nor protein can be detected in serum of mutant mice.

Key words adiponectin, gene knockout, LacZ, gene knock-in

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China for Outstanding Young Scientists (39925023), Hi-Tech Research and Development Program of China (2001AA216081, 2004AA216080), Science and Technology Commission of Shanghai Municipality (99JC14029, 99XD14005) and E-Institutes of Shanghai Municipal Education Commission (E03003).

**Authors equally contributed to this work.

***Corresponding author. Tel/Fax: 86-21-64457997, E-mail: zhugangw@shsmu.edu.cn

Received: February 13, 2006 Accepted: June 9, 2006