

从表型到功能

——*p38 α* 基因敲除小鼠的表型分析新进展*

王凤阳 常智杰** 崔玉东¹⁾

(清华大学生物科学与技术系, 北京 100084)

摘要 基因敲除技术的广泛应用, 极大地推动了后基因组时代对于基因功能研究的进程. 近年来, 对于有丝分裂原激活的蛋白激酶家族成员之一——*p38 α* 的基因敲除小鼠的研究, 在过滤“噪音”, 真实、清晰地揭示敲除基因的体内功能等方面极具典型意义. 对于其有关表型分析最新研究进展的回顾说明: 在精心设计及其表型的周密分析前提下, 基因敲除技术的合理运用, 对于全面阐释重要信号分子的体内功能, 推动功能基因的研究进程具有极其重要的意义.

关键词 *p38 α* , 基因敲除, 表型, 功能

学科分类号 Q26

基因敲除 (gene knockout) 也称基因打靶 (gene targeting), 是运用 DNA 分子的同源重组原理, 特异性地在小鼠基因组的某个位点引入特定的突变, 通过对于基因型发生了改变的小鼠表型进行分析, 在动物整体水平研究目的基因功能的一种技术手段. 其广泛应用极大地推动了后基因组时代对于基因功能研究的进程. 在具体研究过程中, 对于所建立的基因敲除小鼠所呈现的无表型、轻度表型、多余的表型等复杂表型的合理分析, 以过滤“噪音”, 真实、清晰地揭示敲除基因的体内功能是研究人员所面临的巨大挑战.

有丝分裂原激活的蛋白激酶家族 (mitogen-activated protein kinases, MAPKs) 成员——*p38 α* 基因敲除小鼠从 E10.5 开始出现的死亡、贫血等复杂表型, 以及应用合理的技术手段对表型进行分析的研究极具典型意义. 本文以之为例, 通过综述其最新研究进展, 以说明基因敲除小鼠表型与基因功能之间关系的复杂与精微.

MAP 激酶家族 *p38* 亚家族由 *p38 α* 、*p38 β* 、*p38 γ* 、*p38 δ* 4 个成员组成. *p38 α* 是一种酪氨酸磷酸化的蛋白激酶, 分子质量 38 ku. 它是哺乳动物细胞在脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 刺激下产生的^[1]. *p38 α* 和来自酵母的 HOG1 与来自瓜蟾的 XMPK2 相类似. 同应激激活的蛋白激酶家族 (stress-activated protein kinase, SAPK) / *c-Jun* 氨基端激酶 (*c-Jun* N terminal kinase, JNK) 一样, 都是主要由高渗、缺氧等应激刺激及前炎性刺激、血管生长因子等作用下激活, 而非有丝分裂原刺激

下活化. MAPK 激酶 3/6 (MAPK kinase 3/6, MKK3/6) 介导其激活, 每一种 MKK 激活不同的 *p38* 亚家族成员, 有多种激酶能够激活 MKK 家族. *p38 α* 与 HOG1 的激活结构域都含有苏氨酸-甘氨酸-酪氨酸 (Thr-Gly-Tyr) 序列, 从而具备被 MKK3 和 MKK6 所靶定激活的酪氨酸与苏氨酸. *p38 α* 的作用底物包括激酶、转录因子和未确定功能的蛋白质等多种. 目前已被鉴定的由 *p38 α* 激活的靶基因有 *MAPKAPK-2* 与 *CHOP1* *GAOD153*、*MEF3* 和 *ATF2* 等^[2~5].

最初对于 *p38 α* 功能的研究, 主要着眼于其通过调控细胞因子和趋化因子生成, 从而在炎症反应过程中所发挥的作用. 之后大量的研究表明, 在细胞对多种细胞因子、生长因子、应激和肽的反应过程以及细胞粘附过程中, *p38 α* 被激活. 所涉及可能的生理功能包括: 促进脂肪细胞、神经细胞、软骨细胞和红细胞等多种类型细胞系的分化; 因细胞类型不同而呈现出对细胞扩增的促进或者抑制. 然而, 运用非绝对特异性抑制剂以及可能影响无关信号传导途径的持续活化剂 (constitute activators) 和显性负向突变体 (dominant negative) 所进行大量细胞水平的研究结果, 与完全真实地反映 *p38 α* 的体内功能还存在着一定的距离^[4~13].

* 国家自然科学基金资助项目 (39970369, 30070703).

** 通讯联系人.

¹⁾ 黑龙江八一农垦大学基因工程中心, 密山 158308

Tel: 010-62773626, E-mail: zhijiec@tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2002-04-25, 接受日期: 2002-05-28

基于以上背景,为了探索在正常发育及生理条件下 p38 α 的功能,多个研究小组先后分别对 p38 α 进行了基因敲除研究. Allen 等^[14]观察到了 p38 α (-/-) 小鼠胚胎死亡的表型. 尽管 Kotlyarov 等^[15]发现, p38 α (-/-) 细胞在茴香霉素或亚硝酸盐刺激下, MAPK 激活的激酶-2 (MAPK-activated protein kinase, MAPKAPK-2) 未被激活,从而提示 p38 α 会做为 MAPKAPK-2 的上游激活剂. 同时,受白介素 1 (interleukin-1) 影响的白介素 6 (interleukin-6, IL-6) 的表达水平大幅度降低,由于在 MAPKAPK-2 缺失的脾细胞内, LPS 会导致 IL-6 mRNA 水平降低,所以 IL-1 导致 IL-6 降低的信号途径可能要求 MAPKAPK-2 的介入. 另外,在 MAPKAPK-2 缺失的细胞内, LPS 导致了 α -肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 和 γ -干扰素 (interferon γ , IFN- γ) 的不足. 因此, p38 α /MAPKAPK-2 途径参与了 IL-6、TNF- α 和 IFN- γ 等细胞因子的产生. 然而,这些细胞因子的缺失,并不能导致胚胎死亡,并且 MAPKAPK-2 (-/-) 小鼠存活. 所以,这些途径都无法解释 p38 α (-/-) 小鼠为何呈现胚胎死亡的表型^[13]. Lu 等^[16]通过 MKK3 基因敲除小鼠的建立,确立了 MKK3 激活 p38 α 的生理功能,由于 LPS 会引起来自 MKK3 (-/-) 小鼠巨噬细胞白介素-12 (interleukin-12, IL-12) p40 亚单位的转录大幅下降,说明在 p38 α (-/-) 或 MAPKAPK-2 (-/-) 小鼠巨噬细胞内, LPS 介导的 IL-12 表达受到影响. 但 MKK3 (-/-) 小鼠及 IL-12 (-/-) 小鼠存活的实验结果,使之仍无法提供解释 p38 α (-/-) 小鼠呈现胚胎死亡表型的线索^[13].

以往对于基因敲除小鼠表型分析的注意力主要集中在胚胎,事实上,不同的基因在胚胎发育的不同阶段发挥作用,诸多基因会通过造成胎盘发育缺陷,从而导致母体与胚胎之间营养与废物交换的不足,成为引起次级胚胎表型的直接原因 (表 1)^[13]. Mudgett 等^[17]在对所建立 p38 α (-/-) 小鼠的表型进行分析时发现, p38 α (-/-) 小鼠胚胎从 E10.5 开始呈现生长迟缓, E12.5 左右出现死亡表型, E13.5 全部死亡. 严重的胎盘发育缺陷,是导致同合子胚胎死亡的直接原因. E10.5 后, p38 α (-/-) 小鼠胎盘迷路层完全丧失,胚胎内脏卵黄囊出现非正常的血管形成,从而说明 p38 α 为二倍体滋养层发育和胎盘血管形成所必需,并且提示 p38 α 在胚胎血管形成过程中发挥着广泛

的作用.

Table 1 Genes associated with placental development

表 1 与胎盘发育相关的基因

Gene	Embryonic lethality	Gene	Embryonic lethality
<i>HGF/c-Met</i>	E11.5	<i>ARNT</i>	E10.5
<i>FGFR2</i>	E10.5	<i>Dlx3</i>	E9.5~10
<i>PDGFB</i>	Not lethal	<i>Esx1</i>	Not lethal
<i>EGFR</i>	Variable	<i>HSF1</i>	E13.5
<i>VCAM-1</i>	E9.5~11.5	<i>GCMa</i>	E9.5~10
<i>SOS1</i>	E10.5	<i>JunB</i>	E10.5
<i>VHL</i>	E10.5~12.5	<i>Ets2</i>	E7.5
<i>UbcM4</i>	E11.5	<i>Mash2</i>	E10
<i>HSP90β</i>	E10.5	<i>Hand1</i>	E7.5
<i>RXRα</i>	E10	<i>I-mfa</i>	E10.5
<i>PPARγ</i>	E9.5	<i>Tfeb</i>	E9.5~10.5
<i>Gata2/3</i>	E9.5~12		

如果说 Mudgett 等工作已通过对于 p38 α (-/-) 小鼠的表型分析,初步揭示了 p38 α 的体内功能的话, Tamura 等^[18]的研究则使人们以更广阔的视角、从更深的层面认识 p38 α 的体内功能. 在对所建立的 p38 α (-/-) 小鼠进行表型分析时, Tamura 等^[18]发现,和其他研究小组的研究结果不同,一些胚胎在 E11.5~E12.5 由于胎盘发育不足出现死亡,而另外一些未死亡的胚胎形态正常,但出现贫血及由于红细胞生成素 (erythropoietin, Epo) 表达的大幅度降低引起的红细胞生成缺陷. 为了揭示 p38 α (-/-) 小鼠胚胎红细胞生成缺陷的机理, Tamura 等^[18]应用流式细胞术,对于分别来自 E11.5 野生型及 E11.5 p38 α (-/-) 小鼠胚胎,存在于不同类型、不同发育阶段红细胞的 CD33、CD44、c-kit 及 Ter-119 等标记物进行了分析,其结果表明, p38 α 的缺失导致红细胞分化严重受阻. 运用反转录聚合酶链反应 (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 分析珠蛋白基因的表达,以及通过对于反映一定的红细胞前体细胞存在的红细胞系集落形成单位 (colony-forming unit-erythroid, CFU-E) 和红细胞系爆式集落形成单位 (burst-forming unit-erythroid, BFU-E) 的分析,进一步说明: p38 α (-/-) 小鼠胚胎性红细胞生成正常,但发育完全的红细胞生成严重缺陷,并且 p38 α (-/-) 小

鼠胚胎的缺陷, 存在于 CFU-E 前体细胞向更成熟的红细胞扩展与分化过程中。

$p38\alpha (-/-)$ 小鼠的血管生成缺陷表型, 与缺失 Epo 受体或其信号途径下游成员的表型相比, 更接近与 $Epo (-/-)$ 的表型^[18, 19], 而且在体外条件下, $p38\alpha (-/-)$ 的红细胞前体细胞在外源性红细胞生成素 (Epoetin, Epo) 的作用下, 终止分化^[17]。因此, Tamura 等^[18]提出了 $p38\alpha$ 可能为 Epo 及其他造血因子的优化表达所必需的假设, 为了证实这种可能, 通过 RT-PCR 及定量实时 (real-time) PCR 技术, 分析了野生型小鼠胚胎胎儿肝 (fetal livers, FLs), $p38\alpha (-/-)$ 型小鼠胎儿肝 Epo 和干细胞因子 (stem cell factor, SCF) 的 mRNA 水平。结果显示: $p38\alpha (-/-)$ 小鼠 FLs 的 Epo mRNA 水平比野生型小鼠胚胎 FLs 低 10 倍, 而 SCF mRNA 水平比野生型小鼠胚胎 FLs 低 2 倍。在有氧条件下, Epo 在一定的调控机制下, 主要在 FLs 及成年肾表达^[20]。为了检测 $p38\alpha$ 在 Epo 表达调控中所充当的角色, Tamura 等^[18]选择具有与 FLs 相似的分化特性的人肝癌细胞系 Hep3B 做为体外研究的细胞模型, 以 CoCl_2 做为低氧诱发剂, 用 $p38\alpha$ 特异性抑制剂 SB203580 孵育 Hep3B 细胞, 发现 Epo mRNA 在 Hep3B 的积聚受到抑制。在 CoCl_2 存在或不存在的不同条件下, 对 Epo 表达的动态分析表明, $p38\alpha$ 活性的抑制导致了 Epo mRNA 的非稳定性, 从而说明 $p38\alpha$ 最可能通过增加 Epo mRNA 的稳定性, 在 Epo 转录后发挥其调节功能。

除了应激刺激, Epo、SCF 和 IL-3 等造血因子具有可以活化 $p38\alpha$ 催化活性的性质^[21~23]。Tamura 等^[18]将来自于 $p38\alpha (-/-)$ 小鼠 E11~13 胚胎的造血干细胞, 经尾静脉注射给以致死剂量的 γ 射线照射过的正常小鼠, 14 周后在外周血中检测到了由其分化成的红细胞、淋巴细胞、单核细胞和粒细胞, 未注射来自于 $p38\alpha (-/-)$ 小鼠 E11~13 胚胎的造血干细胞的对照组小鼠 2 周内全部死亡。上述事实表明: $p38\alpha (-/-)$ 小鼠 FLs 的造血干细胞能够进行红细胞生成, $p38\alpha (-/-)$ 小鼠的造血缺陷为非细胞自主, 并且可以为来自宿主的造血因子所校正。

综合 Allen 等^[14] 几个研究小组对于 $p38\alpha (-/-)$ 小鼠的表型分析, $p38\alpha$ 在胎盘, 以至整个胚胎发育过程中, 通过调控 Epo mRNA 的积累, 控制着 Epo 表达及红细胞生成。

在对于通过建立 $p38\alpha (-/-)$ 小鼠, 以研究其体内功能的有关研究前景进行展望时, 不难看出, 由于 Tamura 等^[18]的研究为在由主要环境应激——缺氧引起的红细胞生成, 与正常发育性红细胞生成之间建立了以前尚不清楚的联系, 必将使人们对于 $p38\alpha$ 的体内功能的认识更为广泛, 也更为全面。尤其值得一提的是已经成功用于 $PPAR\gamma$ 、*Mash2* 基因敲除小鼠研究的四倍体“营救”技术 (tetraploid cells rescue)^[13], 即建立由突变的胚胎干细胞 (embryonic stem cell, ES) 与野生型小鼠四倍体细胞混合发育的嵌合体, 以“营救”由于小鼠某些基因缺失引起的胎盘缺陷, 及其他胚外内胚层或者滋养层发育缺陷, 所导致的胚胎致死表型。如果在 $p38\alpha$ 基因敲除小鼠的研究中得到合理应用, 必将为研究人员带来关于 $p38\alpha$ 体内功能的更多的、极具价值的新信息。

综上所述, 由于小鼠品系的差异可能影响实验结论的可靠性, 以及使用 Hep3B 细胞做为体外研究的细胞模型所得到的实验结果, 可能与来自生成 Epo 的胎儿肝细胞的真实情况并非完全一致, 做到完整、真实地揭示 $p38\alpha$ 的体内功能, 还有大量的工作要做。但毋庸置疑, 在精心设计及其表型的周密分析前提下, 基因敲除技术的合理运用, 为全面阐释 $p38\alpha$ 及其他重要信号分子的体内功能, 推动功能基因的研究进程奠定了极其重要的基础。最后, 引用《Cell》^[13] 的一句原文结束本综述: “The use of carefully designed and analyzed mutant mice is filtering the noise from critical signals in signal transduction”。

参 考 文 献

- 1 Han J, Lee J D, Bibbs L, *et al.* A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells. *Science*, 1994, **265** (5173): 808~811
- 2 Lee J C, Laydon J T, McDonnell P C, *et al.* A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature*, 1994, **372** (6508): 739~746
- 3 Waskiewicz A J, Cooper J A. Mitogen and stress response pathways*MAP kinase cascades and phosphatase regulation in mammals and yeast. *Curr Opin Cell Biol*, 1995, **7** (6): 798~805
- 4 Liao P, Georgakopoulos P D, Kovacs A, *et al.* The *in vivo* role of p38 MAP kinases in cardiac remodeling and restrictive cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98** (21): 12283~12288
- 5 Conrad P W, Rust R T, Han J H, *et al.* Selective activation of p38 α and p38 γ by hypoxia. *J Biol Chem*, 1999, **274** (33): 23570~23576
- 6 Lee J C, Young P R. Role of Csbp/p38/Rk stress response kinase in LPS and cytokine signaling mechanism. *J Leuko Biol*, 1996, **59** (2): 152~157
- 7 Dean J L E, Brool M, Clark A R, *et al.* p38 mitogen-activated

- protein kinase regulates cyclooxygenase-2 mRNA stability and transcription in lipopolysaccharide-treated human monocytes. *J Biol Chem*, 1999, **274** (1): 264~ 269
- 8 Zetser A, Gredinger E, Bengal E. P38 mitogen-activated protein kinase pathway promotes skeletal muscle differentiation: participation of the MEF2C transcription factor. *J Biol Chem*, 1999, **274** (8): 5193~ 5200
 - 9 Puri P L, Wu Z, Zhang P, *et al.* Induction of terminal differentiation by constitutive activation of p38MAP-kinase in human rhabdomyosarcoma cells. *Gens Dev*, 2000, **14** (5): 574~ 584
 - 10 Wu Z, Woodring P J, Bhakta K S, *et al.* p38 and ERK MAP kinases regulate the myogenic program at multiple steps. *Mol Cell Biol*, 2000, **20** (11): 3951~ 3964
 - 11 Cui Y D, Inanami O, Yamamori T, *et al.* fMLP-induced formation of F-actin in HL-60 cells is dependent on PI3-K but not on intracellular Ca^{2+} , PKC, ERK or p38 MAPK. *Inflamm Res*, 2000, **49** (12): 684~ 691
 - 12 崔玉东, 稻波修, 山盛敏, 等. 在 fMLP 刺激的 HL-60 细胞中 PI3-K 介导的肌冻蛋白聚合. *生物化学与生物物理进展*, 2001, **28** (3): 377~ 380
Cui Y D, Inanami O, Yamamori T, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2001, **28** (3): 377~ 380
 - 13 Ihle J N. The challenges of translating knockout phenotypes into gene function. *Cell*, 2000, **102** (2): 131~ 134
 - 14 Allen M, Svenesson L, Roach M, *et al.* Deficiency of the stress kinase p38 results in embryonic lethality: characterization of the kinase dependence of stress responses of enzyme-deficiency embryonic stem cells. *J Exp Med*, 2000, **191** (5): 859~ 870
 - 15 Kotlyarov A, Neininger A, Schubert C, *et al.* MAPKAPK-2 is essential for LPS-induced TNF- α biosynthesis. *Nat Cell Biol*, 1999, **1** (2): 94~ 97
 - 16 Lu H T, Yang D D, Wisk M, *et al.* Defective IL-12 production in mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 3 (MKK3) - deficient mice. *EMBO J*, 1999, **18** (7): 1845~ 1857
 - 17 Mudgett J S, Ding J X, Gul-Siesel L, *et al.* Essential role for p38 α mitogen-activated protein kinase in placental angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97** (19): 10454 ~ 10459
 - 18 Tamura K, Sudo T, Senftleben U, *et al.* Requirement for p38 α in erythropoietin expression: a role for stress kinases in erythropoiesis. *Cell*, 2000, **102** (2): 221~ 231
 - 19 Wu H, Liu X, Jaenisch R, *et al.* Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*, 1995, **83** (1): 59~ 67

From Phenotype to Function: Analysis of Phenotype of p38 α Knockout Mice^{*}

WANG Feng-Yang, CHANG Zhi-Jie^{**}, CUI Yu-Dong¹⁾

(Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract The widespread use of gene knockout technology promotes the course of the research of gene function in post-genomic era greatly. Recently, the research of p38 α knockout mice, which is one member of MAPKs, is very typical in filtering noise from critical signals in signal transduction and translating phenotype into gene function. Looking back on the research of p38 α knockout mice showed: the reasonable use of gene knockout technology, based on carefully designed and analyzed mutant mice, is very important for defining the function *in vivo* of important signal molecular and pushing forward the research of function gene.

Key words p38 α , knockout, phenotype, function

^{*} This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (39970369, 30070703).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-10-62773626, E-mail: zhijie@tsinghua.edu.cn

¹⁾ Center of Gene Engineering, Heilongjiang August First Agricultural University, Mishan 158308, China

Received: April 25, 2002 Accepted: May 28, 2002