

## Alk-SMase 基因敲除小鼠的饲养繁殖及鉴定

陈 椽<sup>1</sup>, 吴金东<sup>1</sup>, 钱 俊<sup>2</sup>, 朱顺星<sup>3</sup>, 邵冰峰<sup>1</sup>, 张素青<sup>1</sup>, 何向锋<sup>1</sup>, 杨俐萍<sup>1</sup>, 张一心<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南通大学附属肿瘤医院, 江苏 南通 226001; <sup>2</sup>南通大学研究生部, <sup>3</sup>实验动物中心, 江苏 南通 226001)

**[摘要]** 目的:为了繁育和鉴定碱性鞘磷脂酶(Alkaline sphingomyelinase, alk-SMase)基因敲除小鼠,将引进的基因敲除小鼠进行饲养繁殖,杂合子、纯合子用于继续保种。方法:对其幼鼠剪尾提取基因组 DNA,采用 PCR 方法进行基因型鉴定;取 alk-SMase 表达组织做 HE 染色进行形态学比较。结果:对引进小鼠已成功饲养和繁殖,并得到纯合 alk-SMase 基因缺失型小鼠。结论:正确的饲养、繁殖及基因鉴定方法对于基因敲除小鼠的获得和保种具有重要的意义。

**[关键词]** alk-SMase; 基因敲除小鼠; PCR

**[中图分类号]** R735.35

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)02-183-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20150209

## Breeding and identification of Alk-SMase knockout mice

Chen Yuan<sup>1</sup>, Wu Jindong<sup>1</sup>, Qian Jun<sup>2</sup>, Zhu Shunxing<sup>3</sup>, Shao Bingfeng<sup>1</sup>, Zhang Suqing<sup>1</sup>, He Xiangfeng<sup>1</sup>, Yang Liping<sup>1</sup>, Zhang Yixin<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>The Affiliated Tumor Hospital of Nantong University, Nantong 226001; <sup>2</sup>Department of Postgraduate; <sup>3</sup>Laboratory Animal Center Nantong University, Nantong 226001, China)

**[Abstract]** **Objective:** To breed and identify of alkaline sphingomyelinase (Alkaline sphingomyelinase, alk-SMase) knockout mice. **Methods:** DNA was extracted from the mice tissue. PCR method was used for genotype identification. HE staining was used for morphology identification. **Results:** The gene knockout mice has been successfully feed and bred, and the generated alk-SMase knockout(KO) mice were gotten. **Conclusion:** The correct way to feed, breed and gene identification for gene knockout mice has important significance for obtainment and transgenic mice preservation.

**[Key words]** alk-SMase; knockout mice; PCR

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(02): 183-187]

碱性鞘磷脂酶 (alkaline sphingomyelinase, alk-SMase) 是肠道中负责水解鞘磷脂类的关键酶,其可通过控制神经酰胺(ceramide, Cer)生成过程来间接调节机体的各种生化反应,激发神经鞘磷脂循环细胞凋亡途径,它在辐射诱导的细胞凋亡、调节肿瘤细胞生长、参与 Fas 信号系统的传递等方面发挥着重要作用。近年研究表明,Alk-SMase 和人结肠癌密切相关<sup>[1]</sup>。在结肠癌的发生发展中起着关键的作用,但是目前对于此方面的体外研究大多集中在各种 Alk-SMase 缺失细胞中进行,虽然具有很好的效果,但是在模拟体内环境方面仍有不足,因此,本院于 2012 年从瑞典隆德大学引进 Alk-SMase 基因敲除小鼠杂合子,在南通大学实验动物中心 SPF 级动物实验室饲养繁殖,经基因鉴定成功培育 Alk-SMase 基因敲除小鼠,为深入研究结肠癌疾病提供了动物模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

瑞典隆德大学段瑞冬教授惠赠 5 只 Alk-SMase 基因敲除杂合子小鼠 (+/-)、3 只 Alk-SMase 基因敲除纯合子小鼠 (-/-)。该小鼠遗传背景为 C57BL/6 小鼠,近交系。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 小鼠的饲养和繁殖

按照 SPF 级动物饲养标准进行饲养,饲养于南通大学实验动物中心,屏障环境内温度控制在 20~25℃,湿度控制在 40%~70%,光照周期:12 h/12 h,小鼠饲料、垫料和饮水均经过高温高压灭菌处理,实行自由采食和饮水,垫料 1 周更换 2 次,饲料垫料购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司。因

引进的小鼠数量有限,采用了1只雄鼠和1只雌鼠同居的方式进行繁殖。

1.2.2 小鼠的基因型鉴定

小鼠尾部基因组 DNA 的提取:将小鼠尾部组织小段(长 0.5~1.0 cm)置入 1.5 ml Eppendorf 管中,参照 Fermentas 的 Fast tissue-to-PCR 试剂盒抽提 DNA。

PCR 反应及琼脂糖凝胶电泳基因型鉴定:引物设计:上游引物:5'-CTGCCACTTTACTACTGGT-CAC-3',下游引物:5'-TGGCACTGAGCGAGAAC-3',引物设计参照相关文献[2]。PCR 反应:PCR 反应体系:下列反应物构成 20 L 的反应体系。上游引物 1 μl,下游引物 1 μl,2×Tissue green PCR Master Mix 10 μl,DNA 模板(Diluted Template)4 μl,加 H<sub>2</sub>O 补足 20 μl。采用 PCR 仪进行循环扩增:预变性,95℃ 10 min;变性,95℃ 30 s;退火,55℃ 30 s;延伸,72℃ 1 min,共 35 个循环,最后再延伸 3 min。DNA Ladder (Thermo 公司,美国)。电泳鉴定:分别取 PCR 扩增产物 10 μl 在含 40 μl/1GelRed 的 1.0%琼脂糖凝胶中以 150 V 电泳后于凝胶成像仪 Chemi-DocXRS+中观察拍照。小鼠尾部组织琼脂糖凝胶电泳基因型片段为:野生型:732 bp;纯合子:247 bp;杂合子:732 bp,247 bp,按此基因条带可以鉴别出各个基因型小鼠。

1.2.3 病理学研究

取 25 周龄的纯合子、杂合子、野生型 3 种不同基因表型的小鼠各取 5 只鼠脱颈椎法处死,进行详细尸体解剖检查。主要脏器取材,经 10%福尔马林液固定,常规石蜡包埋、切片,HE 染色,镜检。

1.2.4 繁育与纯合子筛选

采用经典育种与 PCR 相结合的方法对基因敲除小鼠纯合子进行筛选。将用于建系的原代(G0)基因敲除小鼠进行配种繁殖产生的后代,方案见表 1。出生 3 周后仔鼠行 PCR 检测,选出纯合子小鼠。

1.3 统计学方法

采用 Fisher 确切概率法检测 Alk-SMase 基因敲出对子代小鼠性别的影响并统计分析。 $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

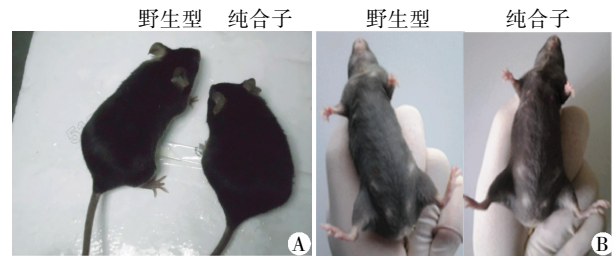
2.1 小鼠的繁殖情况

Alk-SMase 基因敲除杂合子母鼠成功繁殖出子代幼鼠。每只母鼠孕期为 19~21 d,哺乳期为 18~

23 d。每胎平均产 6~10 只幼鼠,成活率>95%。成熟期(雄性):10 周,成熟期(雌性):8 周。

2.2 小鼠的生长情况

幼鼠由母鼠母乳喂养,哺乳期 21 d 左右,产后 3 周离乳。野生型与纯合子小鼠外观形态上未见明显差异(图 1)。



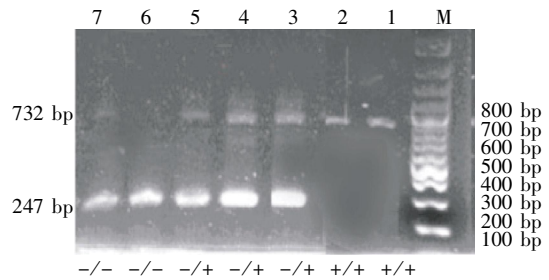
A:小鼠背面照图;B:小鼠正面照。

图 1 小鼠正背面照

Figure 1 Mouse picture

2.3 小鼠基因型鉴定结果

将出生 21 d 的小鼠进行编号,取小鼠组织进行 PCR 扩增结果见图 2。



M: 为 Marker 3 000 bp 分子量标准。1~2: 野生型(+/+),3~5:杂合子(-/+),6~7 号为纯合子。

图 2 子代小鼠 PCR 鉴定结果

Figure 2 PCR showing offspring of transgenic mice

2.4 组织病理学检查

基因敲除小鼠的大肠、小肠及肝组织,HE 染色,镜下可清楚的观察到:杂合子和纯合子的肠绒毛均较野生型明显肥大增生,而杂合子和纯合子无明显区别,小肠平滑肌肥大增生。镜下肝组织未见明显异常(图 3)。

2.5 各世代配种方式及其仔鼠转基因的检测结果

从表 1 中可以看出:纯合子配对其繁殖能力低于其他两组,且纯合子率第 3 组明显高于其他两组,符合孟德尔规律。

从表 2 中可以看出:Alk-SMase 基因敲出与子代小鼠的性别进行比较发现,其差异没有统计意义( $P=0.554$ )。从而 Alk-SMase 基因敲出对子代小鼠的性别没有影响。

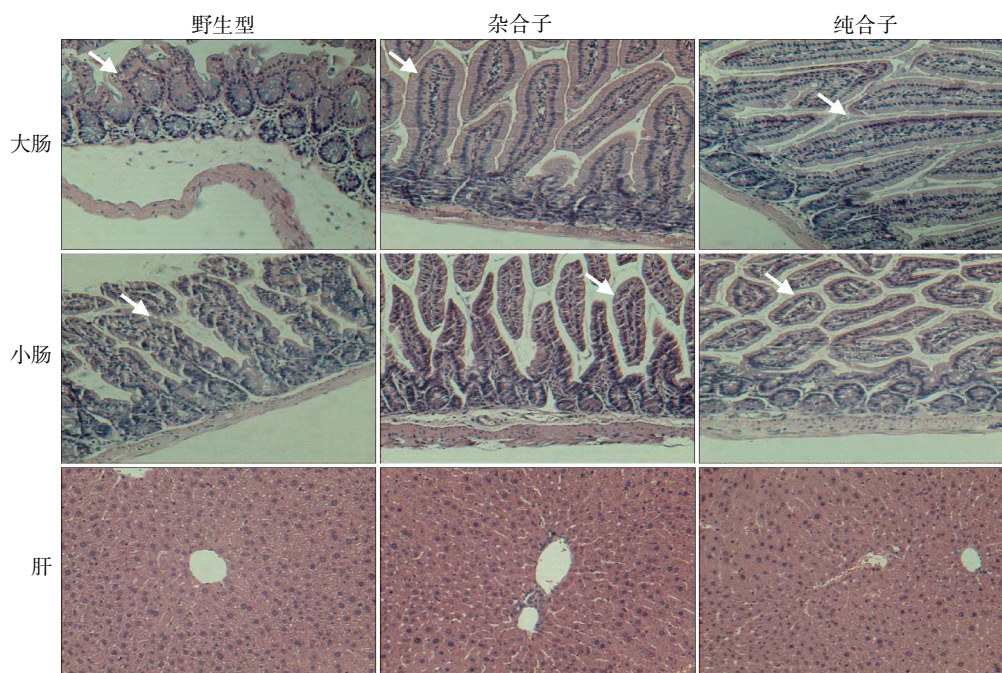


图 3 不同基因型小鼠的比较(HE, ×200)

Figure 3 Comparison of different genotypes of mice(HE, ×200)

表 1 G<sub>0</sub> 繁育及其 F1 代仔鼠基因检测

Table 1 Breeding of G<sub>0</sub> and transgene detection of their offspring

组别	亲代交配方式	基因型	数量	窝数	总仔数 (产仔数/窝数)	存活数 (存活数/窝数)	雌/雄比例	纯合子率
1	♂ (-/-) × ♀ (-/-)	纯合子 homo-/-	0	0	0	0		
		杂合子 hetro+/-	0					
		野生型 WT+/+	0					
2	♂ (+/-) × ♀ (+/-)	纯合子 homo-/-	10	5	22(4.4)	22(4.4)	♀ 14/♂ 8(1.75)	45.45%
		杂合子 hetro+/-	12					
		野生型 WT+/+	0					
3	♂ (+/-) × ♀ (-/-)	纯合子 homo-/-	11	2	17(8.5)	17(8.5)	♀ 14/♂ 8(1.75)	64.70%
		杂合子 hetro+/-	6					
		野生型 WT+/+	0					

表 2 F1 代子鼠基因进行统计分析

Table 2 Statistical analysis of F1 genotype

基因型/性别	纯合子(homo-/-)	杂合子(hetro+/-)	合计	P
雄性 ♂	6	12	18	0.554
雌性 ♀	12	16	28	
合计	18	28	46	

### 3 讨论

Alk-SMase 是尼尔森早在 1969 年首次在肠道中发现的酶<sup>[1]</sup>,然而直到上世纪九十年代才被广泛研究。Alk-SMase 虽然最初是作为 SMase 被发现的,是核苷酸焦磷酸酯酶/磷酸二酯酶(nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase, NPP) 家族成员之一<sup>[3]</sup>。因此,Alk-SMase 又被命名为 NPP7。Alk-SMase

具备很多独有的特性,如组织表达特异性、胆汁盐依赖性、胰酶消化抵抗性、高稳定性等。目前,人们已经在人的胆汁中发现了 Alk-SMase 的活性,并且从人胆汁<sup>[1]</sup>、人和大鼠肠道中<sup>[4-5]</sup>提纯 Alk-SMase。实验显示,Alk-SMase 位于肠道微绒毛膜表面。Alk-SMase 认为具有非特异性清洁作用,将胆汁盐从黏膜表面分离开来。除豚鼠外,Alk-SMase 在许多物种的肠黏膜和人的胆汁中表达,其他器官中均没有表达。Alk-SMase 有独特的特性:其一活性依赖胆汁盐。只有胆汁盐出现的地方才有 Alk-SMase。胆汁盐缺乏的地方 Alk-SMase 活性低,随着胆汁盐聚集,Alk-SMase 活性也增加,这种性能具有生理相关性,因此被认定为是唯一的具有生理活化剂功能的鞘磷脂酶。其二是抵抗胰蛋白酶消化<sup>[1]</sup>。由于 Alk-SMase

仅在肠道中表达,因此结肠肿瘤组织中 Alk-SMase 的改变成为重点。Hertervig 等检测了人结肠息肉、结肠肿瘤、家族结肠息肉等活组织中的 Alk-SMase 活性,结果发现,从腺瘤到腺癌与其邻近组织相比或与正常组织相比 Alk-SMase 的活性呈现一种渐进性的降低<sup>[6-7]</sup>。不仅在活组织中如此,结肠癌患者的粪便中 Alk-SMase 的活性较正常人也明显下降<sup>[8]</sup>。

结肠癌由慢性炎症或长期溃疡发展而来的。人们发现长期溃疡性结肠炎患者的结肠中 Alk-SMase 活性下降了 25%,表明 Alk-SMase 与结肠炎和结肠癌密切相关<sup>[9]</sup>。由于研究的进一步深入,Alk-SMase 作为水解肠道中 SM 的关键酶,Alk-SMase 在结肠癌中水平下降将使结肠上皮细胞对致癌因子和炎症因子更加易感,因此增大了结肠癌的危险。Merrill's 工作组研究发现给老鼠增加天然和人工合成的 SM,短期内可抑制化学致癌物诱发腺瘤的畸变,长期可抑制结肠癌的发展<sup>[10-12]</sup>。而 SM 的这种预防作用通过饲以神经酰胺或其他水解后产生神经酰胺的鞘脂类而重现,SM 需要首先被水解才能发挥抗癌效应<sup>[13]</sup>。在对结肠癌患者的结肠组织的研究中发现:结肠癌患者的结肠黏膜及内容物中 Alk-SMase 活性下降 70%~90%,使 SM 水解和 Cer 生成均减少。已有文献报道结肠癌中 SM 的蓄积和 Cer 的生成下降<sup>[8-9]</sup>。Cer 可通过激活特异磷酸酶和蛋白酶,使一些增殖和抗凋亡分子脱磷酸化,如 Bcl-2、Akt 和 PKCa,并且可以激活 Rb,促进细胞色素 C 从线粒体中释放,从而抑制细胞增殖,促进分化,诱导细胞凋亡<sup>[14]</sup>。另外,Cer 的生成为神经酰胺酶提供了底物,生成鞘氨醇、鞘氨醇也是一种抗增殖促凋亡的分子<sup>[15]</sup>。因此,Alk-SMase 的活性下降导致的 SM 蓄积和 Cer 生成减少可以引发一连串细胞增殖效应,说明了肠道中 Alk-SMase 通过水解 SM 和生成 Cer 发挥其抗癌效应。这就是本课题组引进该模型的目的,为了进一步探讨结肠癌的发生发展及病理变化。

纯合子选育是模型建立的重要的步骤之一。按照孟德尔遗传理论,第 2 组在有 25%的仔鼠成为纯合子,第 3 组有 50%的仔鼠成为纯合子。为了增加获得纯合鼠的机会,建议以第 3 组的配对方案进行配对,已获得更多的纯合子。第 1 组纯合子配对,1 年未见产子,可见敲除 Alk-SMase 基因可能会影响繁殖繁育,也许跟神经生长有关,或导致消化食物欠佳导致营养不良,从而纯合子配对导致不孕不育,或许其缺乏的发病机制可能与巨结肠的形成有

关,这些还需要进一步的研究证实。Alk-SMase 基因敲除小鼠成功构建繁殖有助于对以后的结肠癌及巨结肠的发生发展进行深入的研究,为今后的研究提供基础研究平台和活体模型。有研究报道称 p53 基因敲除小鼠纯合子配对也会导致不孕,且纯合子往往导致更容易罹患肿瘤等恶性疾病<sup>[16]</sup>,Alk-SMase 基因缺乏导致纯合子配对不孕的原因还待进一步研究。

Alk-SMase 基因敲除小鼠引进后,饲养和繁殖一直严格按照 SPF 级动物饲养标准进行。小鼠有 3 种表型:即野生型(+/+),杂合子(+/-),纯合子(-/-),子代经基因鉴定后继续采用杂合子雌雄配对繁殖保种或杂合子与纯合子进行配对,一对纯合子产子量低,多数不易怀孕。在饲养繁殖过程中,有时出现母鼠产子率低的情况,这时应考虑替换掉较老的母鼠或者互换雄性小鼠;还有个别母鼠有食子现象,这个有可能与受过惊吓有关。具体原因尚未明确,有待于进一步研究。

#### [参考文献]

- [1] Duan RD, Nilsson A. Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development[J]. *Prog Lipid Res*, 2009, 48(1): 62-72
- [2] Zhang Y, Cheng Y, Hansen GH, et al. Crucial role of alkaline sphingomyelinase in sphingomyelin digestion: a study on enzyme knockout mice[J]. *J Lipid Res*, 2011, 52(4): 771-781
- [3] Duan RD, Bergman T, Xu N, et al. Identification of human intestinal alkaline sphingomyelinase as a novel ecto-enzyme related to the nucleotide phosphodiesterase family[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(40): 38528-38536
- [4] Cheng Y, Nilsson A, Tmqvist E, et al. Purification characterization and expression of rat intestinal alkaline sphingomyelinase[J]. *J Lipid Res*, 2002, 43(2): 316-324
- [5] Duan RD, Cheng Y, Hansen G, et al. Purification localization and expression of human intestinal alkaline sphingomyelinase[J]. *J Lipid Res*, 2003, 44(6): 1241-1250
- [6] Hertervig E, Nilsson A, Bjrk J, et al. Familial adenomatous polyposis is associated with a marked decrease in alkaline sphingomyelinase activity; a key factor to the unrestrained cell proliferation[J]. *Br J Cancer*, 1999, 81(2): 232-236
- [7] Hertervig E, Nilsson A, Nyberg L, et al. Alkaline sphingomyelinase activity is decreased in human colorectal carcinoma[J]. *Cancer*, 1997, 79(3): 448-453
- [8] Di Marzio L, Di Leo A, Cinque B, et al. Detection of alkaline sphingomyelinase activity in human stool: pro-

- posed role as a new diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer [J]. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 2005, 14(4): 856–862
- [9] Sjöqvist U, Hertervig E, Nilsson A, et al. Chronic colitis is associated with a reduction of mucosal alkaline sphingomyelinase activity[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2002, 8(4): 258–263
- [10] Rosty C, Walsh MD, Walters RJ, et al. Multiplicity and molecular heterogeneity of colorectal carcinomas in individuals with serrated polyposis[J]. *Am J Surg Pathol*, 2013, 37(3): 434–442
- [11] Foersch S, Waldner MJ, Neurath MF. Colitis and colorectal cancer[J]. *Dig Dis*, 2012, 30(5): 469–476
- [12] Erlanson-Albertsson Charlotte/C. High-fat diet not harmless-serious health risks have been surveyed. Atherosclerosis, breast and colonic cancer, depression, reduced-memory, dependence [J]. *Lakartidningen*, 2011, 108(51–52): 2713–2717
- [13] Schmelz EM, Sullards MC, Dillehay DL, et al. Colonic cell proliferation and aberrant crypt foci formation are inhibited by dairy glycosphingolipids in 1, 2-dimethylhydrazine-treated CF1 mice [J]. *J Nutr*, 2000, 130(3): 522–527
- [14] Meyer zu Heringdorf D, Himmel HM, Jakobs KH. Sphingosylphosphorylcholine-biological functions and mechanisms of action[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1582(1-3): 178–89
- [15] Cuvillier O. Sphingosine in apoptosis signaling[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2002, 1585(2-3): 153–162
- [16] 乔录新, 徐 萌, 柴梦音. p53 基因敲除小鼠的饲养繁殖及鉴定[J]. *实验动物科学*, 2012, 29(1): 22–24
- [收稿日期] 2014–03–26

(上接第 172 页)

- versus prostacyclin in ventricular remodeling during heart failure[J]. *Life Sci*, 2011, 89(19-20): 671–676
- [7] Dorris SL, Peebles RS Jr. PGL<sub>2</sub> as a regulator of inflammatory diseases [J]. *Mediators Inflamm*, 2012, 2012: 926968
- [8] Meng GL, Wu F, Yang LY, et al. Synergistic attenuation of myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats by joint treatment with Benazepril and Candesartan [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2009, 54(1): 16–24
- [9] Yu H, Gallagher AM, Garfin PM, et al. Prostacyclin release by rat cardiac fibroblasts; inhibition of collagen expression [J]. *Hypertension*, 1997, 30(5): 1047–1053
- [10] Takenaka M, Yamane Y. Effect of long-term administration of a prostacyclin analogue (beraprost sodium) on myocardial fibrosis in Dahl rats [J]. *J Vet Med Sci*, 2007, 69(12): 1271–1276
- [11] Stratton R, Rajkumar V, Ponticos M, et al. Prostacyclin derivatives prevent the fibrotic response to TGF- $\beta$  by inhibiting the Ras/MEK/ERK pathway [J]. *FASEB J*, 2002, 16(14): 1949–1951
- [12] Narumiya S, Jiang F. Prostacyclin receptor suppresses cardiac fibrosis; role of CREB phosphorylation [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 49(2): 176–185
- [13] Anastasia L, Rota P, Anastasia M, et al. Chemical structure, biosynthesis and synthesis of free and glycosylated pyridinolines formed by cross-link of bone and synovium collagen [J]. *Org Biomol Chem*, 2013, 11(35): 5747–5747
- [14] Svensson RB, Mulder H, Kovanen V, et al. Fracture mechanics of collagen fibrils; influence of natural cross-links [J]. *Biophys J*, 2013, 104(11): 2476–2484
- [15] López B, González A, Hermida N, et al. Role of lysyl oxidase in myocardial fibrosis; from basic science to clinical aspects [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2010, 299(1): H1–9
- [16] González GE, Rhaleb NE, Nakagawa P, et al. N-acetylseryl-aspartyl-lysyl-proline reduces cardiac collagen cross-linking and inflammation in angiotensin II-induced hypertensive rats [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2014, 126(1): 85–94
- [收稿日期] 2014–07–13