

# Notch修饰相关糖基因 $EOGT1$ 敲除大鼠模型的制备与基因型鉴定

郝晓花<sup>1</sup>, 王建文<sup>1</sup>, 张一帆<sup>2</sup>, 叶小慧<sup>2</sup>, 魏红山<sup>1,2</sup> (1.首都医科大学附属北京地坛医院 传染病研究所, 北京 100015; 2.北京大学地坛医院教学医院 北京大学医学部, 北京 100015)

**摘要:** 目的 建立介导Notch分子O-GlcNAc糖基化修饰的糖基转移酶 $EOGT1$ 基因敲除大鼠模型, 为研究 $EOGT1$ 功能及其在肝功能损伤中的作用奠定基础。方法 通过TALEN基因敲除技术敲除 $EOGT1$ 基因, 获得 $EOGT1^{+/-}$ 大鼠, 将 $EOGT1^{+/-}$ 大鼠杂交后获得 $EOGT1^{-/-}$ 大鼠。通过PCR凝胶电泳技术及DNA测序技术对大鼠的基因型进行鉴定。结果 成功建立3种基因型( $EOGT1^{+/+}$ 、 $EOGT1^{+/-}$ 、 $EOGT1^{-/-}$ )大鼠的鉴定方法, 通过观察发现3种基因型大鼠的外观和行为表现上无显著差异。统计大鼠出生后20天的体重发现,  $EOGT1^{+/+}$ 大鼠和 $EOGT1^{-/-}$ 大鼠的体重有显著差异( $t = 2.257$ ,  $P = 0.0343$ ), 同时还发现 $EOGT1^{-/-}$ 大鼠的生育繁殖能力降低。结论 成功构建了 $EOGT1$ 基因敲除大鼠模型,  $EOGT1$ 基因敲除大鼠与野生型大鼠相比, 体重偏低, 生育繁殖能力降低。该模型的构建为研究Notch分子O-GlcNAc糖基化修饰在肝功能损伤中的作用奠定了基础。

**关键词:**  $EOGT1$ ; 基因敲除; 糖基转移酶; Notch

## Preparation and genotyping identification of glycogene $EOGT1$ knockout mice modified by Notch signal pathway

HAO Xiao-hua<sup>1</sup>, WANG Jian-wen<sup>1</sup>, ZHANG Yi-fan<sup>2</sup>, YE Xiao-hui<sup>1</sup>, WEI Hong-shan<sup>1,2</sup> (1.Institute of Infectious Diseases, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2.Peking University Ditan Teaching Hospital, Peking University Health Science Center, Beijing 100015, China)

**Abstract: Objective** To establish a  $EOGT1$  gene knockout rats model for elucidating the function of  $EOGT1$  in liver injury in future investigation. **Methods**  $EOGT1^{+/-}$  rats were got by the TALEN gene knockout technology.  $EOGT1^{-/-}$  rats were obtained after the hybridization of  $EOGT1^{+/-}$  rats. The genotype was identified by PCR and DNA sequencing technology. **Results** The genotype identification method was established. There was no significant difference on the appearance and behavior of all genotype rats. The average weight of  $EOGT1^{-/-}$  rats were lower than those of  $EOGT1^{+/+}$  rats 20 days after birth ( $t = 2.257$ ,  $P = 0.0343$ ) and the reproductive rate of  $EOGT1^{-/-}$  rats decreased. **Conclusion**  $EOGT1^{-/-}$  rats were prepared. Compared with  $EOGT1^{+/+}$  rats, the average weight and reproductive rate of  $EOGT1^{-/-}$  rats decreased significantly. The construction of gene knockout model laid the foundation for the study of the effects of O-GlcNAc on Notch glycosylation in liver injury.

**Key words:**  $EOGT1$ ; Gene knockout; Glycosyltransferases; Notch

自身免疫性肝炎(autoimmune hepatitis, AIH)是以肝脏的慢性炎症和免疫学异常为主要病变的一种器官特异性的自身免疫性疾病<sup>[1]</sup>。重型AIH可以进展为肝硬化和肝功能衰竭, 导致患者的死亡。目前我国AIH的患病率呈上升趋势, 这种疾病与自身免疫调节机制尤其是与CD4<sup>+</sup>调节性T细胞(regulatory T cells, Treg)亚群分化异常有关<sup>[2-6]</sup>。Notch作为

细胞表面结合配体的受体, 在多细胞生物的分化过程中具有重要的作用, Notch信号对Treg细胞的分化及功能具有促进作用。Delta样配体(Delta-like ligand, DLL)或者Notch的胞内段(Notch intracellular domain, NICD)在细胞中活化后能够诱导Th1的分化。一些研究证实, 在体外使用Notch  $\gamma$ 分泌酶抑制剂(gamma-secretase inhibitor, GSI)能够阻断Th1细胞的分化<sup>[7-11]</sup>。数项体内研究也表明, 使用GSI或抗体阻断DLL4可导致Th17细胞数量显著降低。阻断T细胞的Notch胞内转录调控蛋

白(recombination signal binding protein-Jk, RBP Jk)能够降低IL-22 mRNA的表达, Th17细胞产生减少, 对刀豆球蛋白A(concanavalin A, ConA)诱导的肝功能损伤的保护作用消失<sup>[12-14]</sup>。Notch细胞外结构域(Notch extracellular domain, NECD)的糖基化修饰对Notch的活性具有重要的调节作用。目前在NECD的EGF重复序列上发现了几种不同类型的O-糖基化修饰, 包括了O-岩藻糖(O-fucose, O-Fuc)、O-葡萄糖(O-Glucose, O-Glc)和O-N乙酰葡萄糖胺[O-N-acetyl-D-(+)-glucosamine, O-GlcNAc]以及O-木糖(O-xylose, O-Xyl)<sup>[15]</sup>。O-糖基化修饰对Notch的正确折叠或穿行是必需的, 可调节Notch的激活<sup>[16]</sup>。O-GlcNAc位于果蝇Notch受体EGF重复序列的第20位, Notch受体的配体也是被O-GlcNAc糖基化修饰的蛋白<sup>[15]</sup>。催化EGF重复序列O-GlcNAc糖基化修饰的酶已被确认, 在果蝇中为Eogt, 在哺乳动物中为Eogt1<sup>[17]</sup>。但O-GlcNAc糖基化修饰对Notch活性的影响至今尚未有报道。本研究旨在制备EOGTI基因敲除大鼠, 为研究O-GlcNAc糖基化修饰在Notch信号通路的作用以及在AIH发病中的作用奠定基础。

## 1 材料与方法

**1.1 EOGTI基因敲除大鼠模型的制备** EOGTI基因敲除大鼠委托广州赛业公司制备, 饲养于北京大学医学部实验动物中心SPF级条件下, 动物模型采用TALEN基因敲除技术制备, 作用的靶位点是该基因的第5个外显子, 敲除10个基因, 敲除的基因序列为5'-CCCGGCGAAG-3'。获得杂合子( $EOGTI^{+/-}$ )大鼠3只, 其中雄性1只, 雌性2只。

### 1.2 EOGTI基因敲除大鼠的基因型鉴定

**1.2.1 DNA的提取**  $EOGTI^{+/-}$ 大鼠繁殖的后代满7天后, 取0.3 cm左右鼠尾, 提取DNA, 提取方法按照E.Z.N.A.T@issue DNA Kit(OMEGA)试剂盒实验步骤进行, 提取后的DNA保存于-20℃备用。

**1.2.2 PCR扩增与DNA测序** 通过PCR技术扩增3种基因型大鼠( $EOGTI^{+/+}$ 、 $EOGTI^{+/-}$ 、 $EOGTI^{-/-}$ )的DNA序列, 将PCR扩增产物进行DNA测序。PCR扩增的上游引物序列为5'-GTTTGCCACCAGTCCTGTCTGAAG-3', 下游引物序列为5'-CGCTACCTTATACGGACAGTGGGA-3', 延伸温度为58℃。

**1.3 Western Blot** 处死大鼠后, 取大鼠的心、肝、脾、肺、肾、胸腺、淋巴结, 提取各组织中的蛋白进行Western Blot分析, 其中, 一抗为抗-EOGT1(abcam, 1:700), 内参为 $\beta$ -actin(santa,

1:1000)。

**1.4 统计方法** 采用Graphpad Prism 5.01软件进行数据分析。大鼠体重等计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 进行F检验后发现大鼠体重资料呈正态分布( $F = 3.117$ ,  $P = 0.0722$ ), 采用t检验比较不同基因型大鼠体重的差异, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 大鼠的基因型鉴定** 各基因型大鼠基因PCR产物的琼脂糖凝胶电泳和DNA测序结果如图1和图2所示, 大鼠DNA的扩增条带均为448 bp。 $EOGTI^{+/+}$ 、 $EOGTI^{+/-}$ 及 $EOGTI^{-/-}$ 大鼠通过本方法得以鉴定。

**2.2 EOGTI大鼠的生长发育情况** 将大鼠合笼后, 观察子代大鼠生长发育过程中外观和行为活动的变化, 结果发现3种基因型( $EOGTI^{+/+}$ 、 $EOGTI^{+/-}$ 、 $EOGTI^{-/-}$ )的大鼠在外观和行为表现上无显著差异。称量 $EOGTI^{+/+}$ 大鼠和 $EOGTI^{-/-}$ 大鼠出生后20天的体重, 每组12只,  $EOGTI^{-/-}$ 大鼠的平均体重为( $27.42 \pm 0.99$ ) g,  $EOGTI^{+/+}$ 大鼠的平均体重为( $30.00 \pm 0.5641$ ) g,  $EOGTI^{-/-}$ 大鼠的体重轻于野生型 $EOGTI^{+/+}$ 大鼠, 差异有统计学意义( $t = 2.257$ ,  $P = 0.0343$ ), 见图3。 $EOGTI^{-/-}$ 大鼠在发育过程中相对于 $EOGTI^{+/+}$ 大鼠体重偏低, 提示该基因对大鼠的生长发育及代谢可能有一定的影响。

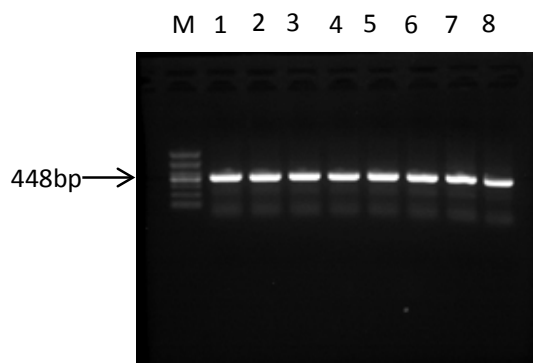


图1 F2代大鼠基因鉴定结果

注: M是分子量为1000的marker, 1、5、6为 $EOGTI^{+/-}$ 大鼠, 2、3、7为 $EOGTI^{+/+}$ 大鼠, 4、8为 $EOGTI^{-/-}$ 大鼠

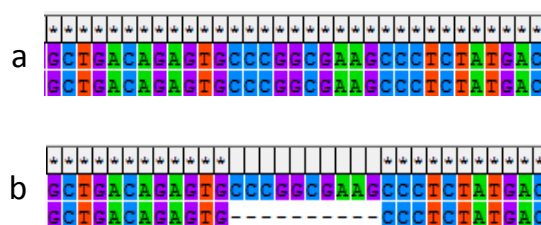


图2 F2代大鼠DNA测序结果

注: a为 $EOGTI^{+/+}$ 大鼠DNA的测序结果; b为 $EOGTI^{-/-}$ 大鼠DNA的测序结果。

**2.3 *EOGT1*大鼠的繁殖情况** 得到*EOGT1*<sup>-/-</sup>纯合子大鼠后,经过5个月的繁殖,共获得*EOGT1*<sup>-/-</sup>大鼠62只,其中死亡3只。平均每胎大鼠数目为6.2只,与野生型相比(每胎子代8~11只)<sup>[18]</sup>,每胎生育数量下降,生殖功能降低。

**2.4 *EOGT1*在不同组织内的表达情况** *EOGT1*<sup>-/-</sup>大鼠中*EOGT1*无表达,在*EOGT1*<sup>+/+</sup>大鼠各组织中,心和肝微量表达*EOGT1*,脾内*EOGT1*的表达水平较高,见图4。

### 3 讨论

通过质谱分析发现,在鼠脑中有5种O-GlcNAc糖基化修饰蛋白,均包含EGF结构域,分别为Hspg2、Nell1、Lama5、Pamr1和Notch2。在中国田鼠卵巢细胞分离出的内源性*EOGT*底物中,鉴定了多种O-GlcNAc糖基化修饰的细胞表面蛋白,包括Notch3<sup>[19]</sup>等。果蝇*Eogt*缺陷会导致严重的翅膀缺陷,说明O-GlcNAc糖基化修饰对果蝇的飞行功能具有重要作用,但是O-GlcNAc糖基化修饰在Notch信号中的作用尚未阐明<sup>[20]</sup>,*EOGT1*基因敲除鼠亦未

见报道。最近的研究发现,人类*EOGT1*基因突变导致了一种罕见的常染色体隐性遗传病(Adams-Oliver综合征)<sup>[21]</sup>,其他的一些研究发现,该病是由Notch通路缺陷造成的,更证明了O-GlcNAc糖基化修饰会影响Notch的功能<sup>[21]</sup>,提示*EOGT1*在人类疾病的发生中具有重要的意义。

本课题组在前期克隆表达了*EOGT1*蛋白,并通过实验证实*EOGT1*蛋白在大鼠心脏、肝脏、脾、胸腺、肺、肾脏和淋巴结均有表达,尤其在脾脏高表达,提示其可能影响T细胞的生长分化等过程<sup>[2-6]</sup>。Notch的糖基化修饰对T细胞的增殖分化具有重要的作用,而O-GlcNAc糖基化修饰对Notch功能的影响尚未明确。Notch1<sup>12f/12f</sup>小鼠(为Notch1配体结合域EGF区12位O-岩藻糖修饰敲除鼠)会导致T细胞发育异常<sup>[22]</sup>。通过上述内容可推测*EOGT1*介导的O-GlcNAc糖基化修饰可能在自身免疫性肝病的CD4<sup>+</sup>T细胞增殖分化中具有重要的作用。

本研究通过一种新型TALEN(transcription activator-like effector nuclease)基因敲除技术<sup>[23,24]</sup>,构建了*EOGT1*基因敲除大鼠。*EOGT1*糖基因敲除有助于更深入地了解O-GlcNAc糖基化修饰的功能以及其在Notch信号途径中的作用,为进一步的研究奠定了基础。*EOGT1*<sup>-/-</sup>大鼠在发育过程中相对于*EOGT1*<sup>+/+</sup>大鼠体重偏低,可能是由于基因敲除影响了大鼠脂肪代谢等的过程,多个其他基因敲除动物中也发现了体重与野生型有差异的现象<sup>[25,26]</sup>,如多巴胺D1、D3受体基因敲除后,断乳期体重与野生型相比体重偏低,推测是由于其影响泌乳素分泌。由于影响体重的因素较多,*EOGT1*<sup>-/-</sup>大鼠繁殖较慢,*EOGT1*基因敲除后对大鼠表型的影响及其在自身免疫性肝病动物模型中的作用还需要进一步研究。

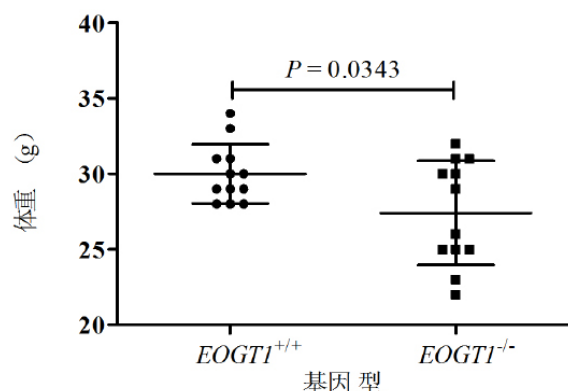


图3 不同*EOGT1*基因型大鼠体重的比较

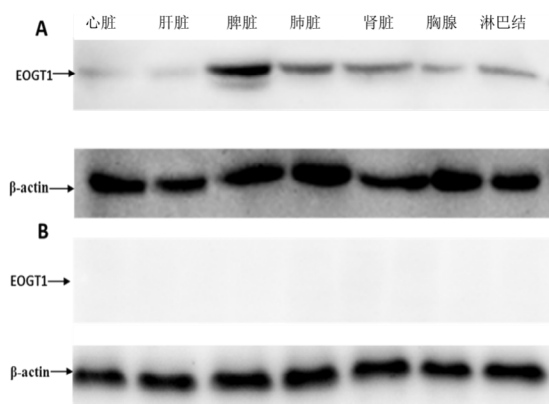


图4 *EOGT1*<sup>+/+</sup>和*EOGT1*<sup>-/-</sup>大鼠各组织中*EOGT1*的表达情况

### 参考文献

- [1] Liberal R, Vergani D, Mieli-Vergani G. Update on autoimmune hepatitis[J]. J Clin Transl Hepatol, 2015, 3: 42-52.
- [2] Silvia F, Longhi MS, Molo CD, et al. A multifaceted imbalance of T cells with regulatory function characterizes type 1 autoimmune hepatitis[J]. Hepatology, 2010, 52: 999-1007.
- [3] Longhi MS, Hussain MJ, Mitry RR, et al. Functional study of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatory T cells in health and autoimmune hepatitis[J]. J Immunol, 2006, 176: 4484-4491.
- [4] Peiseler M, Sebode M, Franke B, et al. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in autoimmune hepatitis are fully functional and not reduced in frequency[J]. J Hepatol, 2012, 57: 125-132.
- [5] Liberal R, Grant CR, Holder BS, et al. The impaired immune

- regulation of autoimmune hepatitis is linked to a defective galectin-9/tim-3 pathway[J]. *Hepatology*,2012,56:677-686.
- [6] Radtke F, Macdonald HR, Tacchini-Cottier F. Regulation of innate and adaptive immunity by Notch.[J]. *Nat Rev Immunol*,2013,13:427-437.
- [7] Amsen D, Helbig C, Backer RA. Notch in T Cell Differentiation: All Things Considered[J]. *Trends Immunol*,2015,36:802-814.
- [8] Zhu J, Yamane H, Paul WE. Differentiation of effector CD4 T cell populations (\*)[J]. *Annu Rev Immunol*,2010,28:445-489.
- [9] Kratky W, Reis e SC, Oxenius A, et al. Direct activation of antigen-presenting cells is required for CD8<sup>+</sup> T-cell priming and tumor vaccination.[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2011,108:17414-17419.
- [10] Amsen D, Antov A, Flavell RA. The different faces of Notch in T-helper-cell differentiation[J]. *Nat Rev Immunol*,2009,9:116-124.
- [11] Bailis W, Yashiro-Ohtani Y, Fang T, et al. Notch simultaneously orchestrates multiple helper T cell programs independently of cytokine signals[J]. *Immunity*,2013,39:148-159.
- [12] Auderset F, Schuster S, Coutaz M, et al. Redundant Notch1 and Notch2 signaling is necessary for IFN  $\gamma$  secretion by T helper 1 cells during infection with *Leishmania major*[J]. *Plos Pathog*,2012,8:e1002560.
- [13] Keerthivasan S, Suleiman R, Lawlor R, et al. Notch signaling regulates mouse and human Th17 differentiation.[J]. *J Immunol*,2011,187:692-701.
- [14] Alam MS, Mak TW. Notch signaling drives IL-22 secretion in CD4<sup>+</sup> T cells by stimulating the aryl hydrocarbon receptor.[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2010,107:5943-5948.
- [15] Tashima Y, Stanley P. Antibodies that detect O-GlcNAc on the extracellular domain of cell surface glycoproteins[J]. *J Biol Chem*,2014,289:11132-11142.
- [16] Shi S, Stanley P. Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways.[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2003,100:5234-5239.
- [17] Fernandez-Valdivia R, Takeuchi H, Samarghandi A, et al. Regulation of mammalian Notch signaling and embryonic development by the protein O-glucosyltransferase Rumi[J]. *Development*,2011,138:1925-1934.
- [18] 郝荣光. 实验动物学[M]. 2版. 上海: 第二军医大学出版社,2004,114.
- [19] Alfaro JF, Gong CX, Monroe ME, et.al, Tandem mass spectrometry identifies many mouse brain O-GlcNAcylated proteins including EGF domain-specific O-GlcNAc transferase targets [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2012,109:7280-7285.
- [20] Tashima Y, Stanley P. Antibodies that detect O-GlcNAc on the extracellular domain of cell surface glycoproteins[J]. *J Biol Chem*,2014,289:11132-11142.
- [21] Ogawa M, Sawaguchi S, Furukawa K, et al. N -acetylglucosamine modification in the lumen of the endoplasmic reticulum[J]. *Biochimica Et Biophysica Acta*,2015,1850:1319-1324.
- [22] Ge C, Stanley P. The O-fucose glycan in the ligand-binding domain of Notch1 regulates embryogenesis and T cell development[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*,2008,105:1539-1544.
- [23] 杨翠翠, 佟慧丽, 马兴红, 等. 利用TALEN技术在牛胎儿成纤维细胞中敲除 Myostatin基因[J]. *遗传*,2014,36:685-690.
- [24] 应春妹, 陈艺升, 郑冰. TALENs技术在基因功能研究中的应用[J]. *检验医学*,2014, 29:459-463.
- [25] 张宝, 刑博, 魏曙光, 等. 多巴胺D1、D3受体敲除及双基因敲除对小鼠体重的影响[J]. *中国比较医学杂志*,2014,24:54-57.
- [26] 魏红山, 李红敏, 任慧. 糖基因GLT25D2敲除小鼠的制备及基因型鉴定[J]. *中华实验和临床病毒学杂志*,2013,27:492-494.

收稿日期: 2016-01-17