

CRISPR/Cas9介导的Fam171a1 基因敲除大鼠基因型鉴定 及基因功能的初步研究

李玉凤¹, 杨琪², 王建文¹, 叶小慧², 张曼卡², 郝晓花¹, 黄玉波¹, 魏红山^{1,2} (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** 通过建立Fam171a1基因敲除大鼠模型, 观察基因敲除后大鼠的表型变化, 探索该基因的功能。 **方法** 采用CRISPR/Cas9打靶技术, 获得Fam171a1^{+/-}基因型杂合子。Fam171a1^{+/-}大鼠交配获得Fam171a1^{-/-}基因型纯合子大鼠。采用DNA Analyzer 3730XL测序技术进行基因型鉴定。对功能未知基因Fam171a1进行基本生物信息检索。检测FAM171A1蛋白在野生型大鼠(wild type, WT)和Fam171a1^{-/-}基因型大鼠各组织的表达情况。对于子代鼠20天体重、子代生育情况进行统计。采用全自动生化仪对血清生物化学指标进行检测。 **结果** 获得了稳定遗传的Fam171a1^{-/-}基因型大鼠。通过配笼繁殖共获得F2代125只, 纯合子(Fam171a1^{-/-}) 25只、杂合子(Fam171a1^{+/-}) 71只、野生型(WT) 29只, 比例接近1:2:1。FAM171A1蛋白在WT大鼠肝脏等主要脏器表达, 其中肺组织、脑组织和胰腺组织表达量较高, 心、肝、脾和淋巴结中表达较弱, 肾、胸腺和小肠组织中弱表达或不表达。同时, Fam171a1^{-/-}基因型大鼠各组织中不表达FAM171A1蛋白。Fam171a1^{-/-}子代大鼠出生20天体重显著低于WT大鼠($t = 3.211$, $P = 0.0017$)。成年Fam171a1^{-/-}大鼠血清胆碱酯酶、总蛋白、AST和HDL水平显著高于WT($t = 4.18$, $P < 0.001$; $t = 6.26$, $P < 0.001$; $t = 2.73$, $P = 0.02$; $t = 2.36$, $P = 0.03$)。与Fam171a1^{+/-}大鼠相比, Fam171a1^{-/-}大鼠生育能力无显著差异($t = 0.2132$, $P = 0.8330$)。 **结论** 成功获得稳定遗传的Fam171a1基因敲除大鼠, Fam171a1基因可能参与SD大鼠的生长发育、肝功能的维持及脂代谢的调控。

关键词: Fam171a1; CRISPR/Cas9打靶技术; 膜蛋白; 胆碱酯酶; 脂代谢

Genotype identification of CRISPR/Cas9 mediated Fam171a1 gene knockout rat and a preliminary study on gene function

LI Yu-feng¹, YANG Qi², WANG Jian-wen¹, YE Xiao-hui², ZHANG Man-ka², HAO Xiao-hua¹, HUANG Yu-bo¹, WEI Hong-shan^{1,2} (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 explore the function of Fam171a1 gene by observing the phenotype changes of the gene knockout rats. **Methods** Fam171a1^{+/-} genotype rats were made by CRISPR/Cas9 targeting technology and Fam171a1^{-/-} genotype rat was obtained by mating two Fam171a1^{+/-} genotype rats. Genotypes were identified by DNA Analyzer 3730XL sequencing technology. The biological function of Fam171a1 gene was explored by basic information retrieval. The expression of Fam171a1 protein in liver, brain and other major organs of WT and Fam171a1^{-/-} rats were detected by Western blot technique. The weight of 20 days old filial rats was recorded and the serum biochemical indexes were detected by automatic biochemical analyzer. **Results** Stable genetic Fam171a1^{-/-} genotype rats were obtained. Total of 125 Fam171a1^{+/-} rats were produced, including 25 Fam171a1^{-/-} rats, 71 Fam171a1^{+/-} rats and 29 WT rats. FAM171A1 protein expressed in liver and other major organs especially lung, brain and pancreatic tissue, and did not express or weakly expressed

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2017.01.014

基金项目: 国家自然科学基金(No.81271901); 北京市自然科学基金(No.7152073)

通讯作者: 魏红山 Email: drwei@ccmu.edu.cn

in kidney, thymus and small intestine, but did not express in tissue of Fam171a1^{-/-} rat. The average weight of Fam171a1^{-/-} child rats was significantly lower than that of WT rats ($t = 3.211$, $P = 0.0017$), and serum CHE, TP, AST and HDL level of Fam171a1^{-/-} adult rats were higher ($t = 4.18$, $P < 0.001$; $t = 6.26$, $P < 0.001$; $t = 2.73$, $P = 0.02$; $t = 2.36$, $P = 0.03$). Fertility was comparable between Fam171a1^{-/-} and WT rats ($t = 0.2132$, $P = 0.8330$). **Conclusions** Fam171a1 gene knockout SD rat was successfully obtained, and Fam171a1 gene may be involved in the growth and lipid metabolism of SD rats and maintaining liver function.

Key words: Fam171a1; CRISPR/Cas9; Membrane protein; Cholinesterase; Lipid metabolism

研究乙型肝炎所致肝癌的发病机制及其治疗靶点至关重要。膜蛋白是理想的药物靶点, 约三分之一的基因组编码膜蛋白^[1], 代表了60%现存的和未来的药物靶点^[2]。膜蛋白具有广泛的功能, 是正常发育和生理所必需的蛋白质, 是生物膜功能的主要执行者。在物质转运和细胞信息识别等方面行使重要功能。当膜蛋白发生改变, 会导致一系列疾病。

既往研究对比分析了乙型肝炎病毒表面抗原感染HepG2细胞系前后的表达谱, 筛选出膜蛋白编码基因Fam171a1。利用生物信息学分析技术和数据库检索, 本课题组发现Fam171a1基因编码单次跨膜蛋白, 且产物肽链上多位点具有糖基化和磷酸化修饰等翻译后修饰。在一项国外研究中, FAM171A1蛋白在多灶性肝癌组织中低表达, 而癌周边正常组织表达量则相对较高^[3]。由此可推测膜蛋白FAM171A1可能在HBV介导的肝癌发生过程中发挥重要作用。另外, 在多种疾病的研究中均发现Fam171a1的参与, 如在三阴性乳腺癌组织和老年痴呆患者脑皮质组织中, FAM171A1蛋白表达量升高^[4,5]。由此可见, Fam171a1基因在病毒性肝炎、肝癌以及神经系统疾病的发生发展中发挥重要作用, 是药物治疗的潜在靶点。然而, Fam171a1基因的功能尚未见报道。

基因敲除动物模型的建立, 是研究基因功能的金标准。2013年CRISPR/Cas9系统的出现为基因组编辑提供了很好的解决方案, 该系统已经在多种模式生物、细胞以及家畜中得到大量研究与应用,

具有较强的稳定性。为了研究基因Fam171a1的功能, 本课题组首次利用CRISPR/Cas9系统, 建立Fam171a1基因敲除大鼠模型并进行基因水平和蛋白水平的鉴定, 对Fam171a1基因的功能进行初步探索, 以便为后期的工作奠定基础。

1 材料与方法

1.1 SD大鼠Fam171a1基因敲除模型的制备 采用CRISPR/Cas9打靶技术, 针对Fam171a1基因第二个外显子进行编辑, 获得Fam171a1基因敲除大鼠F1代杂合子10只, 雌性5只, 雄性5只。敲除原理图见图1。

1.2 饲养与繁殖 所有Fam171a1^{+/-}大鼠均饲养于北京大学医学部实验动物中心, 在无特定病原体(SPF)条件下饲养。系统温度20~25℃, 湿度(50±15)%。相应的饲料和饮水均经高温消毒灭菌。采用雌雄配笼的方式进行繁殖, 对子代进行基因型鉴定。

1.3 Fam171a1基因敲除大鼠的基因型鉴定

1.3.1 基因组DNA提取 子代大鼠满10天后, 剪取0.3 cm鼠尾提取基因组DNA。鼠尾基因组提取方法按照E.Z.N.A.T@issue DNA Kit (OMEGA) 试剂盒步骤进行, 提取后的DNA保存于-20℃备用。

1.3.2 PCR扩增和基因型鉴定 通过PCR技术扩增3种基因型大鼠(WT、Fam171a1^{+/-}和Fam171a1^{-/-})的DNA序列。PCR扩增所用引物序列和反应条件见表1, 扩增产物经DNA Analyzer 3730XL测序。

1.4 Fam171a1^{+/-}基因敲除大鼠子代20天体重称量 记

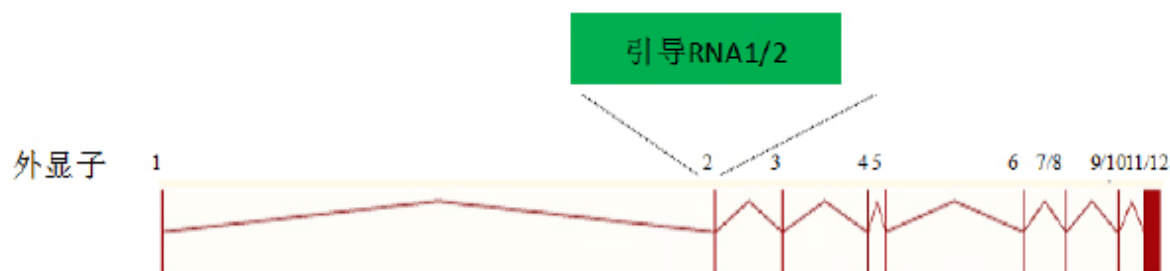


图1 敲除原理图

注: cas9 作用靶点位于 Fam171a1 基因的第2号外显子

录Fam171a1^{+/-}基因敲除大鼠子代出生日期、每胎子代数量及性别,并于20天时测量体重。

1.5 Western blot鉴定FAM171A1蛋白在WT大鼠各组织的表达 将大鼠麻醉后,取Fam171a1^{-/-}和WT大鼠的心、肝、脾、肺、肾、胸腺、淋巴结、脑、小肠、胰腺和膀胱各组织,提取蛋白样品后进行Western blot分析。其中,一抗为兔抗FAM171A1蛋白(novus, 1:3000),内参为兔抗β-actin(CST, 1:3000)。

1.6 大鼠血清生物化学指标检测 大鼠禁食12小时,麻醉后抽取下腔静脉血,留血清。丙氨酸氨基转移酶(alanine transaminase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)、胆碱酯酶(cholinesterase, CHE)、总蛋白(total protein, TP)、白蛋白(albumin, ALB)、胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)和低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)采用全自动生化仪检测, CHE采用硫代丁酰胆碱法检测。

1.7 统计学处理 采用Graphpad Prism5软件进行数据分析,子代大鼠体重等计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。不同

组间子代大鼠体重、生物化学指标比较采用独立样本t检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Fam171a1基因扩增产物测序结果 为明确基因敲除大鼠模型是否构建成功,采用DNA Analyzer 3730XL测序技术进行突变检测。WT大鼠碱基序列为AAACCCATCCGATTACCGGG,而Fam171a1^{-/-}大鼠碱基序列为AAACCCATCCGATTACCGGG。在TT碱基之间插入一个T碱基造成移码突变。检测峰图及序列见图2。

2.2 不同Fam171a1基因型子代大鼠的繁殖情况 将F1代杂合子进行配笼繁育,共获得F2代大鼠130只,其中纯合子(Fam171a1^{-/-})25只,杂合子(Fam171a1^{+/-})71只,野生型(WT)29只。随后对测序鉴定为Fam171a1^{-/-}的大鼠进行配笼。F1代杂合子大鼠生育周期为22~61天,平均34.7天,每胎平均11只,部分F1代的受孕时间较长。F2代纯合子大鼠生育周期为21~71天,平均48.7天,每胎平均11只。纯合子平均生育周期较杂合子大鼠延长,但差异无统计学意义($t = 1.603, P = 0.1330$)。纯合子平均每胎的子代数与杂合子大鼠无显著差异($t = 0.2132, P = 0.8330$)。统计结果见图3。

表 1 Fam171a1 基因扩增引物及反应条件

引物名称	引物序列	产物长度 (bp)		反应条件
		WT	Fam171a1 ^{-/-}	
上游引物	5'-TACTTAGGATGTCCCGTCTTTGGC-3'	467	468	预变性98℃ 5分钟, 变性94℃ 30秒, 退火56℃ 35秒, 延伸72℃ 35秒, 40个循环
下游引物	5'-GGCAGAGAACTGAGCACCTGT-3'			

注: WT: wild type, 野生型大鼠

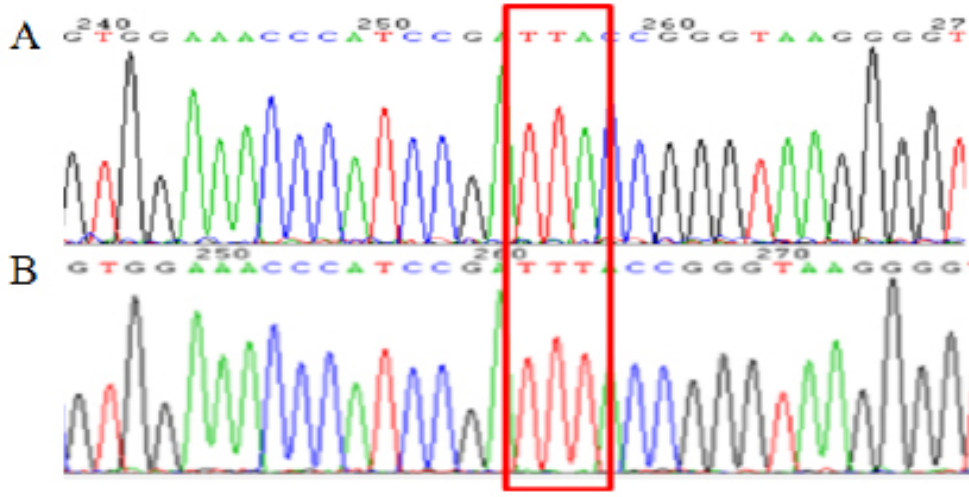


图 2 不同基因型大鼠测序结果

注: A 为 WT 大鼠扩增产物的测序结果; B 为 Fam171a1^{-/-} 大鼠扩增产物的测序结果。在 Fam171a1 基因第二号外显子的两个 T 碱基之间插入一个 T 碱基造成移码突变

2.3 Fam171a1各基因型子代大鼠外观的差异 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,随着饲养时间的延长,3只基因型为Fam171a1^{+/-}的大鼠出现单侧或者双侧白内障,发生比例为30%。出现年龄分别为352天、376天和437天,见图4。

2.4 Fam171a1基因型子代体重的差异 存活子代大鼠在饮食和活动方面无显著差异。大鼠出生20天后,分别称量WT、Fam171a1^{+/-}和Fam171a1^{-/-}大鼠的体重,每组≥50只。Fam171a1^{-/-}大鼠平均体重为(41.94±0.528)g,WT大鼠平均体重为(45.62±1.073)g,Fam171a1^{+/-}大鼠平均体重为(43.51±1.000)g,Fam171a1^{-/-}大鼠的体重显著低于野生型大鼠,差异有统计学意义($t=3.211$,

$P=0.0017$),见图5。

2.5 大鼠血清生物化学指标 Fam171a1基因敲除成功后,检测WT大鼠和Fam171a1^{-/-}大鼠血清生物化学指标。结果显示,与WT大鼠相比,成年Fam171a1^{-/-}基因型大鼠血清ALT、AST、TP、ALB、CHE和HDL水平升高,其中AST、TP、CHE和HDL水平差异具有统计学意义($t=2.73$, $P=0.02$; $t=6.26$, $P<0.001$; $t=4.18$, $P<0.001$; $t=2.36$, $P=0.03$);TG和LDL水平降低,差异无统计学意义($t=0.62$, $P=0.55$; $t=1.85$, $P=0.08$)。其中CHE水平升高最显著,见表2。

2.6 野生型大鼠各组织FAM171A1蛋白的表达 为明确FAM171A1蛋白在各器官的表达情况,本课题组利用Western blot技术检测WT大鼠各组织(心、

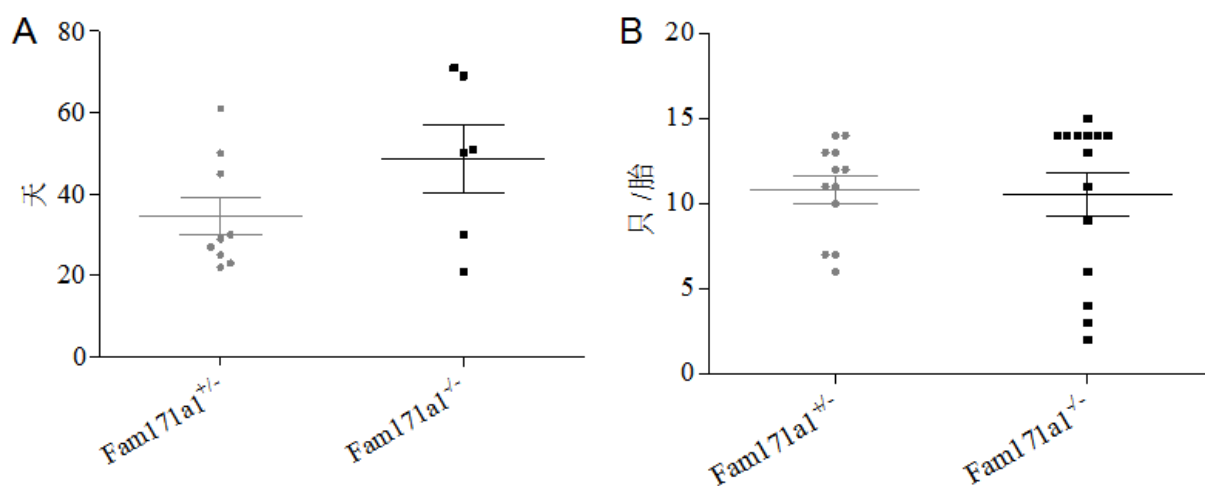


图3 Fam171a1^{+/-}和Fam171a1^{-/-}大鼠生育能力比较

注:图A为F1代杂合子和F2代纯合子生育周期的比较,Fam171a1^{+/-}亲代大鼠生育周期为(34.67±4.622)天,Fam171a1^{-/-}亲代大鼠为(48.67±8.233)天,差异无统计学意义($t=1.603$, $P=0.1330$)。图B为F1代杂合子和F2代纯合子生育能力比较,Fam171a1^{+/-}亲代大鼠每胎生育子代鼠(10.83±0.8056)只,Fam171a1^{-/-}亲代大鼠每胎生育子代鼠为(10.50±1.270)只,差异无统计学意义($t=0.2132$, $P=0.8330$)

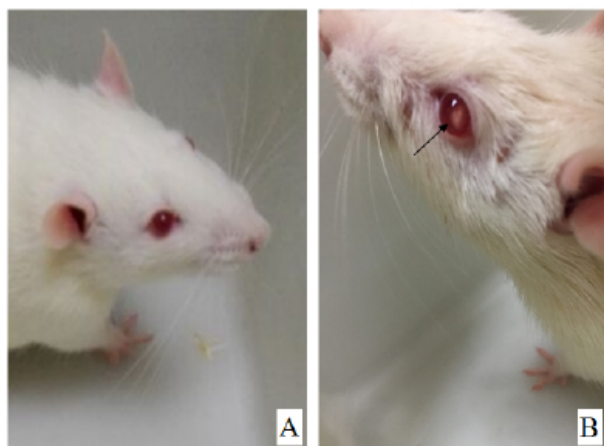


图4 Fam171a1^{+/-}基因型大鼠眼睛出现白内障
注:A为野生型(WT)大鼠;B为Fam171a1^{+/-}大鼠

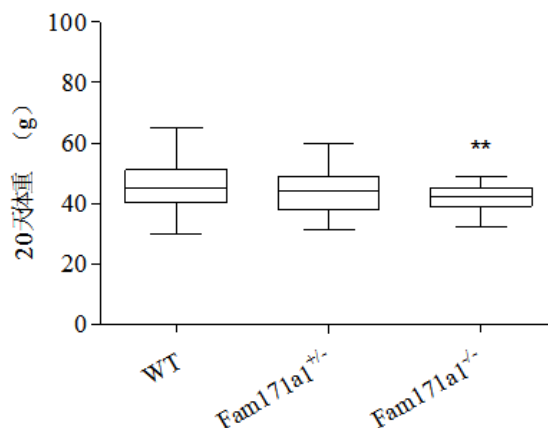


图5 不同Fam171a1基因型大鼠20天体重差异

注:Fam171a1^{-/-}基因型子代大鼠20天体重显著低于WT子代大鼠,差异有统计学意义($t=3.211$, $P=0.0017$);Fam171a1^{+/-}基因型与WT子代鼠相比,20天体重差异无统计学意义($t=1.443$, $P=0.1523$)。WT: wild type, 野生型大鼠

表 2 血清生物化学指标检测结果 ($\bar{x} \pm s$)

基因型	ALT (U/L)	AST (U/L)	TP (g/L)	ALB (g/L)	CHE (U/L)
Fam171a1 ^{-/-} (n = 8)	34.63 ± 1.79	77.60 ± 5.09	61.76 ± 0.81	36.40 ± 0.71	821.30 ± 103.90
WT (n = 8)	31.17 ± 1.49	62.31 ± 1.25	55.51 ± 0.52	34.69 ± 0.30	324.30 ± 44.31
t值	1.45	2.73	6.26	2.09	4.18
P值	0.17	0.02	< 0.001	0.06	< 0.001
基因型	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	HDL (mmol/L)	LDL (mmol/L)	
Fam171a1 ^{-/-} (n = 8)	1.28 ± 0.18	0.66 ± 0.13	0.66 ± 0.14	0.32 ± 0.01	
WT (n = 8)	1.26 ± 0.05	0.75 ± 0.07	0.29 ± 0.01	0.35 ± 0.00	
t值	0.15	0.62	2.36	1.85	
P值	0.89	0.55	0.03	0.08	

注: ALT: 丙氨酸氨基转移酶 (alanine transaminase); AST: 天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase); TP: 总蛋白 (total protein); ALB: 白蛋白 (albumin); CHE: 胆碱酯酶 (cholinesterase); TC: 总胆固醇 (total cholesterol); TG: 甘油三酯 (triglyceride);

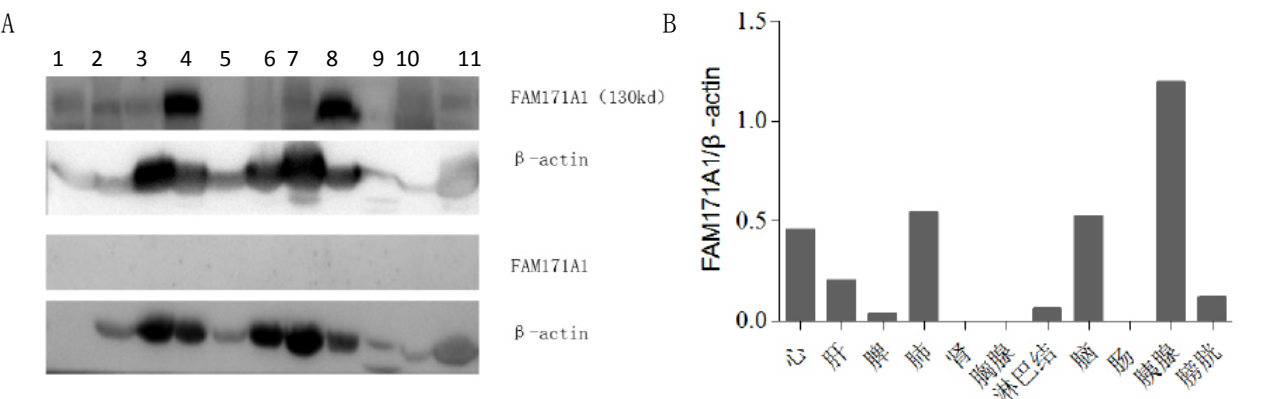


图 6 野生型大鼠各组织 FAM171A1 蛋白表达情况

注: A 为 Western blot 技术检测野生型大鼠各组织 FAM171A1 蛋白的表达情况, 以 β-actin 作为内参照。1 ~ 11 泳道分别为: 心、肝、脾、肺、肾、胸腺、淋巴结、脑、小肠、胰腺和膀胱组织; B 为灰度分析结果, 利用 Image J 软件对 FAM171A1 蛋白表达进行半定量分析

肝、脾、脑等组织) 目的蛋白的表达情况, 并利用 ImageJ 软件对其进行灰度分析获得 FAM171A1 蛋白在各组织的相对表达量。结果显示, FAM171A1 蛋白在大鼠主要器官中均有表达。其中肺组织、脑组织和胰腺组织表达量较高, 心、肝、脾和淋巴结中表达较弱, 肾、胸腺和小肠组织中弱表达或不表达。同时, Fam171a1 基因型大鼠各组织中不表达 FAM171A1 蛋白, 如图 6。

3 讨论

Fam171a1 基因又名 C10orf38, 为蛋白编码基因。本课题组利用生物信息学分析技术和数据库检索发现 Fam171a1 基因编码单次跨膜蛋白, 且产物肽链上多位点具有糖基化和磷酸化修饰。UniProtKB-KW 网站显示其亚细胞定位于细胞膜, UniProtKB 网站显示 FAM171A1 蛋白可能定位于细胞外泌体。其功能未有明确报道。本课题组首先对 CRISPR/Cas9 介导的 Fam171a1 基因敲除大鼠进行了基因水

平和蛋白水平的鉴定, 并利用 Western blot 技术检测 FAM171A1 蛋白在 WT 大鼠各个脏器的表达。然后根据敲除 Fam171a1 基因之后大鼠表型的变化对 Fam171a1 基因的功能进行初步研究。

Western blot 结果显示 Fam171a1^{-/-} 基因型大鼠各组织不表达 FAM171A1 蛋白, 从蛋白水平上验证了 Fam171a1 基因全敲除大鼠模型制备成功。FAM171A1 蛋白在 WT 大鼠大部分组织器官中表达, 脑组织和胰腺组织中表达量较高, 由此可推断其在神经系统的功能以及机体功能的维持方面发挥重要作用。

Fam171a1^{-/-} 大鼠 20 天体重较野生型大鼠降低, 部分其他基因敲除动物模型也有类似现象, 如介导 Notch 分子 O-GlcNAc 糖基化修饰的糖基转移酶 EOGT1 基因敲除大鼠模型在 20 天体重低于野生型大鼠^[6]。Fam171a1^{-/-} 大鼠在生长繁殖过程中, 单眼或双眼逐渐出现白内障, 年龄约在 350 天到 400 天 (相当于人类

30~40岁)。白内障出现与年龄增长密切相关,定义为年龄相关性白内障^[7]。国外也有敲除一个基因导致小鼠发生年龄依赖性白内障的报道^[8]。众所周知,代谢性疾病是白内障发病的一大危险因素。周洋等^[9]指出,中老年白内障患者外周血ALB、TP、BUN、Cr、TC和Ca水平均显著升高,这些血清生物化学指标的变化可能与白内障病变存在着一定的关联性。为了探索Fam171a1基因是否影响大鼠的代谢水平,本研究利用全自动生化仪检测了10周龄成年野生型和纯合子大鼠血清生物化学指标。结果提示肝功能指标和血脂代谢指标异常,且基因敲除大鼠AST、CHE和HDL水平与野生型相比差异有统计学意义。

ALT、AST是最常用于诊断肝细胞受损的指标,其升高说明大鼠肝功能受损。提示FAM171A1蛋白缺失之后,大鼠肝细胞受到一定程度的损伤,Fam171a1基因对于肝功能维持具有重要的作用。

胆碱酯酶按分布主要分为中枢胆碱酯酶和外周胆碱酯酶。中枢胆碱酯酶以乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)为主,主要分布在中枢神经灰质和交感神经节等处,主要催化乙酰胆碱水解,称其为真性胆碱酯酶;外周胆碱酯酶主要以丁酰胆碱酯酶(butyrylcholinesterase, BuChE)为主,主要分布于血浆、脑白质、胰、肝、肠系膜和子宫等处,生理作用不明,称为假性胆碱酯酶(pseudocholinesterase, PChE)。胆碱酯酶主要催化乙酰胆碱的水解,其中AChE主要参与突触间神经冲动的传递,同时对造血细胞和肿瘤细胞的增殖与分化、神经细胞的分化与迁移的形成都有调控作用^[10];BuChE是由肝细胞合成后立即释放入血的水解酶,大多数分布于肝、脑白质和血清中,对乙酰胆碱的特异性较低。血清中的胆碱酯酶主要来源于肝细胞产生的BuChE,AChE含量极少^[11]。研究结果显示,各类肝病(急、慢性肝炎,肝硬化,重症肝炎,肝癌)患者由于肝细胞受损导致BuChE合成减少,血清BuChE活性降低,且随着肝细胞受损程度的加重BuChE活性降低幅度增大;患者病情稳定好转后,BuChE活性逐渐上升^[12-19],提示胆碱酯酶是反映肝细胞功能的重要指标,与血清白蛋白一样均是反映肝脏合成能力的指标^[20],作为肝功能分级的补充指标用于术前判断肝脏储备功能^[21],为重症病毒性肝炎和肝硬化患者预后做出准确判断以及肝硬化分级提供参考依据。另有学者报道^[18,19,22-27],脂肪肝患者血清胆碱酯酶升高,且脂肪肝患者肝功受损越严重时,血清胆碱酯酶活性越低。胆碱酯酶活性升高可作为脂肪肝

患者临床诊断的一项生物化学指标。

高密度脂蛋白(high density lipoprotein, HDL)是一个复杂的颗粒群体,是由脂质和脂蛋白组成的复合体,是脂质代谢的中心。低密度脂蛋白(low density lipoprotein, LDL)是一种携带胆固醇最多的脂蛋白,是由极低密度脂蛋白(very low-density lipoprotein, VLDL)转变而来。本研究结果表明,Fam171a1基因敲除之后,虽然总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)的水平几乎无变化,但HDL和LDL均受到显著影响,提示Fam171a1基因可能参与大鼠脂代谢调控。

近年来,相继有学者报道FAM171A1蛋白相关内容。耿艳等^[5]报道,与正常老年大脑白质相比,老年痴呆患者大脑白质FAM171A1蛋白显著升高。有学者在神经系统突触的分泌滤泡膜上检测到了FAM171A1蛋白的表达^[28]。胆碱酯酶在协助阿尔茨海默症的诊断及鉴别诊断中发挥不可忽视的作用^[29],日本学者Hosoi等^[30]指出BuChE可以作为痴呆患者的一种生物标志物。本研究结果显示,Fam171a1基因敲除后大鼠血清胆碱酯酶水平升高,提示基因Fam171a1在神经系统功能方面的重要性,这也可能是其影响脂质代谢的一个潜在机制。

另外,BuChE活性与恶性肿瘤的发生、病情发展、转移和预后显著相关。Mattes等^[31]指出,BuChE有促进细胞生长的作用。另外有研究^[32]发现,肝癌患者肝切除术前血清BuChE < 5900 U/L,术后并发不良后果的风险显著升高($P < 0.05$),并提出BuChE > 5900 U/L可作为肝切除术前评估患者肝脏储备功能的重要指标之一,术前检测血清BuChE活性在预测肝癌肝切除术后并发症有重要价值(敏感性73%,特异性67%)。多灶性肝癌组织与正常组织相比、三阴性乳腺癌组织与正常组织相比FAM171A1蛋白表达水平有显著差异,均提示FAM171A1蛋白参与肝癌、乳腺癌的发生发展过程。大鼠Fam171a1基因敲除后,血清胆碱酯酶和血清总蛋白显著升高,提示Fam171a1基因敲除后肝细胞合成能力或增殖能力增强,导致反映其合成能力的指标如胆碱酯酶和血清白蛋白升高。Fam171a1基因可能通过影响肿瘤组织的代谢而影响肝细胞合成和增殖能力。

除了上述生物化学指标,本课题组还统计了杂合子大鼠和纯合子大鼠的生育周期和每胎生育的子代数。杂合子各基因型子代比例基本符合孟德尔

遗传定律,且两者的生育周期和每胎子代数目无统计学差异,提示Fam171a1基因可能与大鼠的生育功能无关。

综上所述,Fam171a1基因可能与大鼠的生长发育、肝细胞功能的维持及脂代谢有关。本研究成功建立了稳定遗传的Fam171a1基因敲除大鼠,这为研究Fam171a1基因功能及其在肝增殖、脂肪肝和阿尔兹海默症等相关疾病发生发展中的作用及治疗提供了有效途径。

参考文献

- [1] Stevens TJ, Arkin IT. The effect of nucleotide bias upon the composition and prediction of transmembrane helices[J]. Protein Sci,2000,9(3):505-511.
- [2] Hopkins AL, Groom CR. The druggable genome[J]. Nat Rev Drug Discov,2002,1(9):727-730.
- [3] XING X, HUANG Y, WANG S, et al. Dataset for the quantitative proteomics analysis of the primary hepatocellular carcinoma with single and multiple lesions[J]. Data Brief,2015,5:226-240.
- [4] He J, Yang J, Chen W, et al. Molecular features of triple negative breast cancer: microarray evidence and further integrated analysis[J]. PLoS One,2015,10(6):e0129842.
- [5] 耿艳,张红红,胡亚卓,等.阿茨海默病患者和正常老年人颞叶脑皮质的蛋白质组学分析[J].中国神经免疫学和神经病学杂志,2014,21(2):109-115.
- [6] 郝晓花,王建文,张一帆,等. Notch修饰相关糖基因EOGT1敲除大鼠模型的制备与基因型鉴定[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2016,8(2):103-106.
- [7] 葛坚. 眼科学[M]. 北京:人民卫生出版社,2013:203-226.
- [8] Wu H, Yu Y, David L, et al. Glutaredoxin 2 (Grx2) gene deletion induces early onset of age-dependent cataracts in mice[J]. J Biol Chem,2014,289(52):36125-3639.
- [9] 周洋,任鹏晓,梁勇. 生化指标对中老年人群白内障发病的影响[J]. 国际眼科杂志,2016,16(12):2244-2246.
- [10] Greenblatt HM, Dvir H, Silman I, et al. Acetylcholinesterase: a multifaceted target for structure-based drug design of anticholinesterase agents for the treatment of Alzheimer's disease[J]. J Mol Neurosci,2003,20(3):369-383.
- [11] 刘静,李倩. 胆碱酯酶与临床相关疾病的研究进展[J]. 中国实用医药,2014,9(5):258-260.
- [12] 马洪熹,曹聪. 胆碱酯酶与血清前白蛋白在各类病毒性肝炎检测中的临床意义[J]. 现代诊断与治疗,2016,27(17):3312-3313.
- [13] 陈庄. 慢性丙型肝炎后肝硬化患者血清胆碱酯酶、总胆汁酸及AST/ALT比值联合检测的临床意义[J]. 临床合理用药杂志,2016,9(1):27-28.
- [14] 曾崇亮. 探讨血清CHE、TBA和ADA联合检测在肝病诊断中的临床应用价值[J]. 医学综述,2013,19(9):1695-1697.
- [15] 于佳,王玲玲,冯佳,等. 乙型肝炎肝硬化患者血清胆碱酯酶活性与Child-Pugh分级的相关性研究[J]. 医学综述,2016,22(9):1845-1847.
- [16] 徐贵,张晓艳,杨伟霞. 总胆汁酸、尿酸和胆碱酯酶检测在乙型肝炎肝硬化中的意义[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(12):1724-1726.
- [17] 马艳春. 肝病患者TBA、PA、Cys C、GLDH、CHE检测分析[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2012,4(1):23-25.
- [18] 任徐君. 胆碱酯酶在肝脏疾病检测中的应用分析[J]. 中外医学研究,2014,12(35):86-87.
- [19] 杨丹. 胆碱酯酶在肝脏疾病检测中的应用价值探析[J]. 中国医药指南,2014,12(20):194-195.
- [20] 范昌均. 血清胆碱酯酶、前白蛋白等联合检测在病毒性肝炎中的临床价值[J]. 现代养生,2015,(14):52.
- [21] 李霞. 原发性肝癌患者围手术期血清AFU、PA、CHE联合检测的临床意义[J]. 实用检验医师杂志,2013,5(3):168-170.
- [22] 倪曼曼,张颖秋,陈岳祥,等. 非酒精性脂肪性肝病患者发病和预后的影响因素分析[J]. 临床肝胆病杂志,2016,32(3):453-458.
- [23] 张丹. 肝病患者血脂、胆碱酯酶检测的临床价值[J]. 医学美容(中旬刊),2014,(5):198.
- [24] 刘富新,郝爱军. 轻度脂肪肝血生化指标分析[J]. 医学信息,2015,28(26):63-64.
- [25] 尚宝荣. 生化指标检测结果与脂肪肝发生发展的关系研究[J]. 检验医学与临床,2014,11(18):2614-2615,2617.
- [26] 彭辉. 生化指标异常和脂肪肝发生的关系探讨[J]. 中外健康文摘,2014,(24):113-114.
- [27] 卢作民. 生化指标与脂肪肝发生及发展的关系探析[J]. 医药前沿,2015,5(15):178-179.
- [28] Poelmans GJV. Genes and protein networks for neurodevelopmental disorders[M]. Nijmegen: Donders Institute,2011:257-258.
- [29] 蒋安杰,方芳,晏勇,等. 阿尔茨海默病和血管性痴呆患者血浆同型半胱氨酸和胆碱酯酶水平及其临床意义探讨[J]. 重庆医学,2010,39(12):1530-1532.
- [30] Hosoi M, Hori K, Konishi K, et al. Plasma Cholinesterase Activity in Alzheimer's Disease[J]. Neurodegener Dis,2015,15(3):188-190.
- [31] Mattes CE, Lynch TJ, Singh A, et al. Therapeutic use of butyrylcholinesterase for cocaine intoxication[J]. Toxicol Appl Pharmacol,1997,145(2):372-380.
- [32] Donadon M, Cimino M, Procopio F, et al. Potential role of cholinesterases to predict short-term outcome after hepatic resection for hepatocellular carcinoma[J]. Updates Surg,2013,65(1):11-18.

收稿日期: 2016-09-26

李玉凤,杨琪,王建文,等. CRISPR/Cas9介导的Fam171a1基因敲除大鼠基因型鉴定及基因功能的初步研究[J/CD]. 中国肝脏病杂志(电子版),2017,9(1):68-74.