

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2019.07.002

肝细胞 Lamp-2a 时间特异性基因敲除大鼠的构建及评估*

张苗¹ 周霞¹ 王敏² 孙可帅¹ 马硕怡¹ 郑小红¹ 王敬博¹ 韩英^{1△}

(1 空军军医大学西京消化病医院肿瘤生物学国家重点实验室 陕西 西安 710032; 2 上海市儿童医院 上海 200062)

摘要 目的:构建肝细胞 Lamp-2a 时间特异性基因敲除大鼠模型(L2AKO)并对其评估,为后续胆汁酸代谢研究提供研究基础。**方法:**将引进的 Lamp-2a^{loxP} 大鼠和 Alb-Cre^{ERT2} 工具鼠杂交繁殖,得到基因型 Lamp-2a^{loxP} Alb-Cre^{ERT2} 大鼠;后者再与 Lamp-2a^{loxP/loxP} 杂交得到双臂 loxp 阳性和 Alb-Cre^{ERT2} 阳性的大鼠,于 4-6 周时经他莫昔芬的诱导实现对肝细胞 Lamp-2a 基因的时间特异性敲除。分别通过 qPCR 方法、Western-Blot 技术、免疫组织化学方法对 Lamp-2a 的敲除结果进行验证。**结果:**免疫组织化学结果显示:该模型可选择性敲除肝细胞 Lamp-2a,而肾脏 Lamp-2a 正常表达;Western 和 qPCR 结果显示肝脏 Lamp-2a 的水平明显降低。L2AKO 与 WT 大鼠相比体重变化无明显差别。肝生化检测发现 L2AKO 大鼠 AST 明显高于 WT 组大鼠。**结论:**采用 Cre/loxp 系统及其他莫昔芬诱导的方法成功构建肝细胞 Lamp-2a 时间特异性基因敲除大鼠,并且 L2AKO 大鼠生长未受影响,为胆汁酸代谢研究建立了较好的动物模型。

关键词:他莫昔芬;Lamp-2a;Cre/loxp 系统;时间特异性敲除

中图分类号:R-33;Q78;R575 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2019)07-1206-06

Establishment and Evaluation of Time-conditionally Hepatocyte-specific Lamp-2a Gene Knockout Rats*

ZHANG Miao¹, ZHOU Xia¹, WANG Min², SUN Ke-shuai¹, MA Shuo-yi¹, ZHENG Xiao-hong¹, WANG Jing-bo¹, HAN Ying^{1△}

(1 State Key Laboratory of Cancer Biology, Xijing Hospital of Digestive Diseases, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Children's Hospital of Shanghai, Shanghai, 200062, China)

ABSTRACT Objective: To establish and evaluate a time-conditionally hepatocyte-specific Lamp-2a gene knockout rat model (L2AKO) and to provide an opportunity for further studies of bile acid metabolism. **Methods:** First, Lamp-2a^{loxP}-rats and Alb-Cre^{ERT2} rats were interbred to obtain Lamp-2a^{loxP} Alb-Cre^{ERT2}-rats, which were then interbred with Lamp-2a^{loxP/loxP} rats. After that, we obtained the double-arm loxp positive and Alb-Cre^{ERT2} positive rats. Finally, time-conditionally hepatocyte-specific Lamp-2a gene knockout rats can be acquired by tamoxifen induction during 4-6 weeks. The model was verified by qPCR, Western-Blot and immunohistochemistry. We also evaluate the weight and liver serum function of this model. **Results:** Immunohistochemical results showed that there was almost no expression of Lamp-2a gene in hepatocytes, while the expression of Lamp 2a gene in kidney was normal as wild type rats (WT). Western and qPCR results showed that the protein and mRNA level of Lamp-2a in liver decreased significantly. As for the body weight, there was no obvious difference between L2AKO and WT rats. However, the biochemical test of liver function suggested that the AST level of L2AKO rats was higher than WT rats. **Conclusions:** The Cre/loxp system and tamoxifen induction method have been used to successfully establish a time-conditionally hepatocyte-specific Lamp-2a gene knockout rat model. And the growth of L2AKO rats was not affected in this process. Therefore, it could be a better animal model for further studies of bile acid metabolism.

Key words: Tamoxifen; Lamp-2a; Cre/loxp; Time Conditionally Knockout

Chinese Library Classification(CLC): R-33; Q78; R575 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2019)07-1206-06

前言

胆汁淤积性肝病,主要包括原发性胆汁性胆管炎(primary biliary cholangitis,PBC)和原发性硬化性胆管炎(primary sclerosing cholangitis,PSC),是胆汁形成和/或胆汁流动受损从而导致胆汁盐等有损胆汁成分在细胞内滞留并对细胞造成损伤

的疾病^[1]。临床患者多表现瘙痒、乏力、黄疸、尿色深等。有研究报告肝细胞中的亲水胆汁酸与疏水胆汁酸比例异常,即有毒性的疏水胆汁酸浓度过高导致肝细胞凋亡,胆管细胞活化,引起肝脏慢性炎症,胆管细胞增殖和肝纤维化^[2,3]。胆汁淤积性肝病由于胆汁酸代谢或排泄障碍对肝细胞造成损坏,因此,研究胆汁酸代谢对于探究胆汁淤积性肝病的发病机理以及寻找潜在的

* 基金项目:国家自然科学基金面上项目(81770569;81870398);国际合作与交流项目(81820108005)

作者简介:张苗(1992-),硕士研究生,主要从事胆汁淤积性肝病的研究,电话:(029)84771521,E-mail:zhmfmnu@163.com

△通讯作者:韩英,教授,博士生导师,主要从事原发性胆汁性胆管炎的机制研究,E-mail:hanying@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2018-10-13 接受日期:2018-11-09)

治疗靶点至关重要。

课题组前期发现 PBC 患者肝脏组织 LAMP-2 表达及分布与疾病进展成正相关^[4],PBC 患者外周血 LAMP-2 水平升高,且治疗后血清 LAMP-2 下降程度有助于评判患者对 UDCA 治疗的应答情况^[5]。另外,前期我们利用 TALENs 技术成功构建了 Lamp-2 基因敲除大鼠模型发现 Lamp-2 基因敲除大鼠:1) 呈现有肝内胆汁淤积的表型,表现为血清中反应早期胆汁淤积的指标碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)升高,胆汁排泄功能降低,电镜检测发现毛细胆管发育障碍和肝内胆汁淤积现象。2)对胆汁淤积的耐受性降低,更易发生胆汁排泄障碍。在胆总管结扎术后,Lamp-2 基因缺陷鼠中的胆红素升高更明显^[6]。Lamp2 全基因敲除大鼠因为心脏明显增大、心肌异常肥厚、心腔严重缩小,多合并节段性小肠出血坏死,胰腺损伤等因素出现死亡率明显增加,并且全身敲除影响其它脏器的功能可能会干扰实验结果。而时间特异性敲除鼠的优点在于基因敲除的时间可以根据实验目的控制,自身可以形成前后对照,同时实现组织的特异性敲除^[7-9]。因此,我们利用基因敲除技术,构建肝细胞 Lamp-2a 基因时间特异性敲除大鼠模型 L2AKO,旨在实现组织特异性和时间特异性敲除 Lamp-2a 基因,为更深入研究胆汁酸代谢提供工具。

1 材料与方法

1.1 实验动物及试剂

SD 大鼠购自北京百奥赛图基因生物技术有限公司,由第四军医大学实验动物中心(SPF 级)饲养。血液/细胞/组织基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;D2000 DNA marker 购自天根生化科技(北京)有限公司;Pre-mix TaqTM (TaKaRa TaqTM Version 2.0 plus dye)购自宝生物工程(大连)有限公司;琼脂糖购自美国 Sigma 公司;抗 Lamp-2a 兔多抗购自 abcam 公司;TRIZOL 购自美国 sigma 公司;RNA 反转录试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。他莫昔芬、玉米油购自美国 sigma 公司。

1.2 肝细胞 Lamp-2a 特异性敲除大鼠构建策略和方法

1.2.1 F1 代转基因大鼠的获得 在 Lamp-2a 的 Exon9A 的上游和下游的内含子中分别设计合适的 sgRNA,构建打靶载体使其分别在 Lamp-2a 的 Exon9A 的上游和下游的内含子中分别插入了 loxp 位点,之后经过体外转录得到 sgRNA 和 Cas9 mRNA。混合 Cas9 mRNA,sgRNA 以及打靶载体,作为注射样品,显微注射到 SD 大鼠受精卵。注射后存活受精卵移植到代孕的 SD 母鼠,出生得到 Funder(F0)大鼠。阳性 F0 大鼠和野生型大鼠交配得到 F1。以上的 F1 代大鼠来源于北京百奥赛图基因生物技术有限公司。

1.2.2 F2 代转基因大鼠的获得 F1 代雌性嵌合体大鼠与 F1 代雄性嵌合体大鼠杂交获得双臂阳性的 F2 代大鼠。有 2 条条带代表只有一条染色体被 loxp 锚定,如图 1 用红色标记的 4 和 13 号;只有一条条带并且分子量大(条带与 2 条条带的上层条带平齐)说明有 2 条染色体被 loxp 锚定,如图 1 的 3、5、6、7、8、9 号;只有一条条带并且条带分子量小(条带与 2 条条带的下层条带平齐)说明没有染色体被 loxp 锚定,如图 1 的 1、2 号。F1 代雄性嵌合体大鼠与雌性 Alb-Cre^{ERT2} 工具鼠交配获得单臂

loxp 阳性和 Alb-Cre^{ERT2} 阳性杂合的 F2 代雌性大鼠,只要有 1 条条带就说明 Alb-Cre^{ERT2} 重组成功,没有条带代表没有 Alb-Cre^{ERT2} 基因。

1.2.3 F3 代转基因大鼠的获得 将 F2 代获得的单臂 loxp 阳性和 Alb-Cre^{ERT2} 阳性杂合雌鼠与 F2 代获得的 Lamp-2a^{loxP} 雄鼠杂交,获得双臂 loxp 阳性和 Alb-Cre^{ERT2} 阳性的 F3 代大鼠。

1.2.4 时间特异性敲除肝细胞 Lamp-2a 大鼠的获得 F3 代大鼠 4-6 周时给予他莫昔芬,剂量按照 80 mg/kg 连续 5 天腹腔注射,在他莫昔芬的诱导下,定位于胞浆的雌激素受体可转位到细胞核,把双侧 loxp 锚定的基因进行特异性敲除。一般给药后 1-2 周可实现靶细胞基因的特异性敲除^[10-12]。

1.3 大鼠基因型鉴定

通过 PCR 对同源重组的基因克隆进行筛选,反应条件为 94.0℃ 30 seconds,55℃ 30 seconds,70℃ 50 seconds,30 个循环,以 flox 引物对,阳性克隆出 362 bp 片段,阴性克隆出 285 bp 片段。对于 Alb-CreERT2 重组酶的 PCR 鉴定:GO Taq G2 Green Master Mix,反应条件:94.0 °C 30 seconds,55°C 30 seconds,70°C 50 seconds,以 Alb-CreERT2 引物对,阳性克隆出 384 片段。

1.4 时间特异性敲除肝细胞 Lamp-2a 表型分析

提取肝细胞 Lamp-2a 基因条件性敲除大鼠和同窝野生型大鼠的肝脏和肾脏组织,经甲醛溶液固定后,石蜡包埋、切片、HE 染色后进行形态学观察,免疫组织化学检测 Lamp-2a 的表达情况。提取肝脏的组织蛋白,采用 Western Blot 检测 Lamp-2a 的表达。TRIZOL 法提取组织的 RNA,采用 Real-time PCR 检测相关基因的表达情况,引物序列见表 1。

表 1 引物序列
Table 1 Primer Sequence

Primer	Sequence
FLOX-F	GAAGCCAGCAGTTAATGCCAACAGG
FLOX-R	CCAGTAATTTTCATGCAGTTCCCCTTC
Alb-Cre ^{ERT2} -F	TCATCACCGATGGCTATGGAAGTGC
Alb-Cre ^{ERT2} -R	GGGTCGCTACAGACGTTGTTTGTC
Lamp-2a-F	GTGCAACAAAGAGCAGGTGGTTTCC
Lamp-2a-R	AATAAGTACTCTCCAGGGCTGCT
Lamp-2b-F	GTGCAACAAAGAGCAGGTGGTTTCC
Lamp-2b-R	ATCAAGCCTGAAAGACCAGCACCA
Lamp2-F	TGTTTCAGCACTATTGGGGCATTAC
Lamp2-R	GTAGCCAGCAGACAGGTAGCATTGC
Lamp1-F	TTTCCCAATGCCAGCTCCAAAGGGC
Lamp1-R	CTTGCTGAAGTTGCTACTCGGCAGG
Lamp-2c-F	GTGCAACAAAGAGCAGGTGGTTTCC
Lamp-2c-R	AGCAATTATAAGGAAGCCCAAGGCC

1.5 大鼠肝功生化检测

大鼠腹腔注射 1%戊巴比妥钠 30 mg/kg 麻醉后,内眦采血离心获得的血清西京医院检验科测定。

1.6 统计分析

免疫组化染色分析采用 image protein plus 软件。Western-Blot 条带灰度分析利用 Image J 软件。定量数据统计分析及作图均利用 Graphpad Prism 7 软件,两组之间的比较利用 t 检验, $P < 0.05$ 时评定为具有统计学差异。数据采用均数 \pm 标准差来表示。

2 结果

2.1 F2 代转基因大鼠的获得

一方面,雌性嵌合体大鼠与雄性嵌合体大鼠杂交获得 4 只双臂 loxp 阳性的大鼠 6 只,其中雄性 4 只,雌性 2 只,其为 F2 代。如图 1 A 所示为 Lamp-2a^{loxp/loxp} 鉴定结果:红色标注的 3、5、6、7、8、9 是我们所需要的 F2 代大鼠。

另一方面,雄性嵌合体大鼠与雌性 Alb-CreERT2 工具鼠交配获得单臂 loxp 阳性和 Alb-CreERT2 阳性杂合的雌性大鼠也为 F2 代。结果如图 1 B 所示:B 图左边表示 Lamp-2a^{loxp/-} 的结果,图中用红色标注的 7、8 号为单臂 loxp 阳性;B 图右边表示 Alb-Cre^{ERT2} 基因的表达情况,图中用红色标注的 1、3、5、7、8 号表示 Alb-Cre^{ERT2} 阳性。因此,综合 B 图的结果得出 7、8 号就是获得的单臂 loxp 阳性和 Alb-CreERT2 阳性杂合的雌性大鼠。

2.2 F3 代转基因大鼠的获得

将 F2 代获得的单臂 loxp 阳性和 Alb-Cre^{ERT2} 阳性杂合雌鼠与 F2 代获得的 Lamp-2a^{loxp} 雄鼠杂交,获得双臂 loxp 阳性和 Alb-Cre^{ERT2} 阳性的大鼠共 10 只,其中雌鼠 2 只,雄鼠 8 只,此为 F3 代。结果如图 1 C 所示:红色标注的 1、4、6、7、10、11、12、13、14、15 为双臂 loxp 阳性和 Alb-Cre^{ERT2} 阳性的大鼠,也就是我们的实验鼠;而其它的同窝野生型可作为对照组。

2.3 肝细胞 Lamp-2a 时间特异性基因敲除大鼠的鉴定

首先通过免疫组化染色,结果如图 2 所示:发现 L2AKO

组(表示肝细胞 Lamp-2a 基因时间特异性敲除大鼠)大鼠肝脏 Lamp-2a 明显下降,而肾脏 Lamp-2a 分子正常表达;WT 组(同窝野生型)的肝脏和肾脏 Lamp-2a 分子均正常表达。

其次,我们通过 Western-Blot 技术从组织蛋白水平进一步验证敲除的效果,结果如图 3 所示:发现 L2AKO 组大鼠 Lamp-2a 的水平明显降低,同时半定量灰度分析结果也显示 L2AKO 组与 WT 组相比 Lamp-2a 的水平明显降低,差异具有统计学意义。

我们还从 mRNA 水平检测了 L2AKO 组及 WT 组 Lamp-2a 基因的表达,结果如图 4 所示:发现 L2AKO 组大鼠 Lamp-2a 水平明显降低。为了进一步明确敲除 Lamp-2a 对其它分子的影响,我们还检测了 Lamp2、Lamp1、Lamp-2b、Lamp-2c 的表达水平,结果发现 L2AKO 组 Lamp2 明显降低,Lamp1 的表达不受影响,而 Lamp-2b 和 Lamp-2c 水平则呈现一定的上升趋势。Lamp-2a 敲除后导致 Lamp2 的其它亚型(Lamp-2b、Lamp-2c)代偿性升高。

上述结果表明我们成功构建了肝细胞 Lamp-2a 时间特异性基因敲除大鼠模型,为之后的研究奠定基础。

2.4 L2AKO 大鼠与 WT 大鼠一般生长情况比较

为了评估特异性敲除肝细胞 Lamp-2a 基因对大鼠一般情况的影响,我们监测 L2AKO 组和 WT 组大鼠的体重,结果如表 2 所示:L2AKO 组大鼠与 WT 相比,体重增长没有明显差异,这提示肝细胞 Lamp-2a 时间特异性基因敲除可能对大鼠生长没有明显影响。

2.5 L2AKO 大鼠与 WT 大鼠肝脏功能比较

我们还进一步评估了特异性敲除肝细胞 Lamp-2a 对肝脏生化功能的影响,结果如图 5 所示:发现 L2AKO 的大鼠 AST 的水平高于 WT 组大鼠,而 ALT 则没有明显变化。

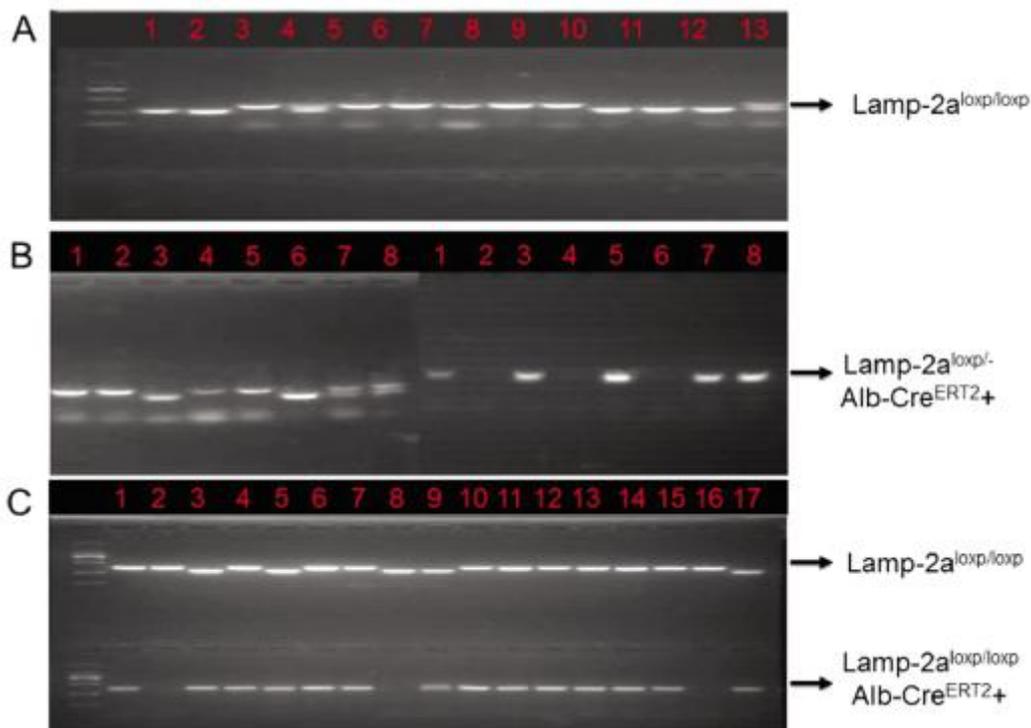


图 1 肝细胞 Lamp-2a 基因时间特异性敲除大鼠的基因型 PCR 鉴定结果

Fig.1 The genotype identification of time-conditionally hepatocyte-specific Lamp-2a gene knockout rats by PCR analysis

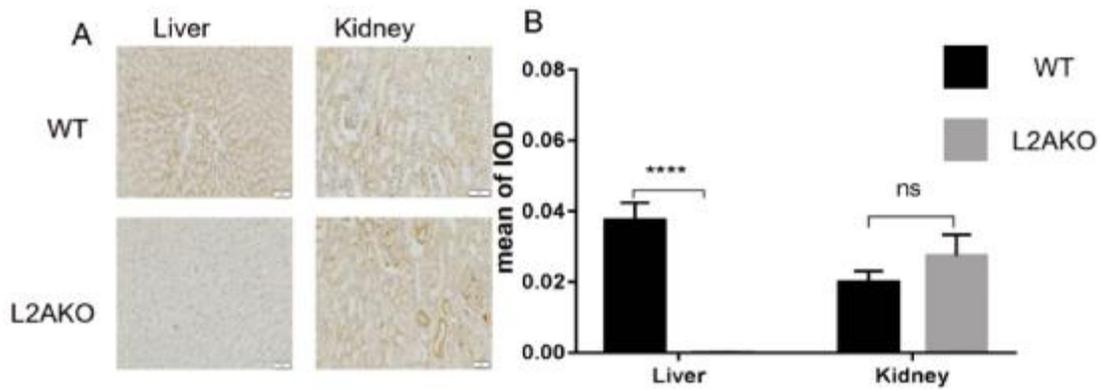


图2 肝细胞 Lamp-2a 基因时间特异性敲除大鼠的免疫组化鉴定(200×)

Fig.2 Immunohistochemical results of time-conditionally hepatocyte-specific Lamp-2a gene knockout rats(200×)

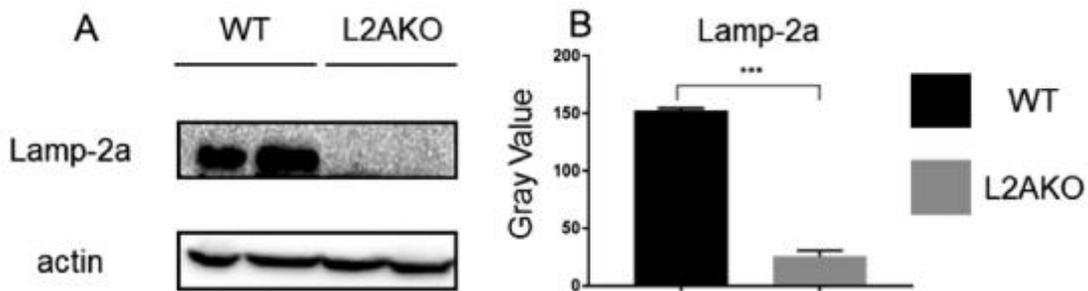


图3 肝细胞 Lamp-2a 时间特异性基因敲除大鼠的 Western-Blot 鉴定

Fig.3 Western-Blot results of time-conditionally hepatocyte-specific Lamp-2a gene knockout rats

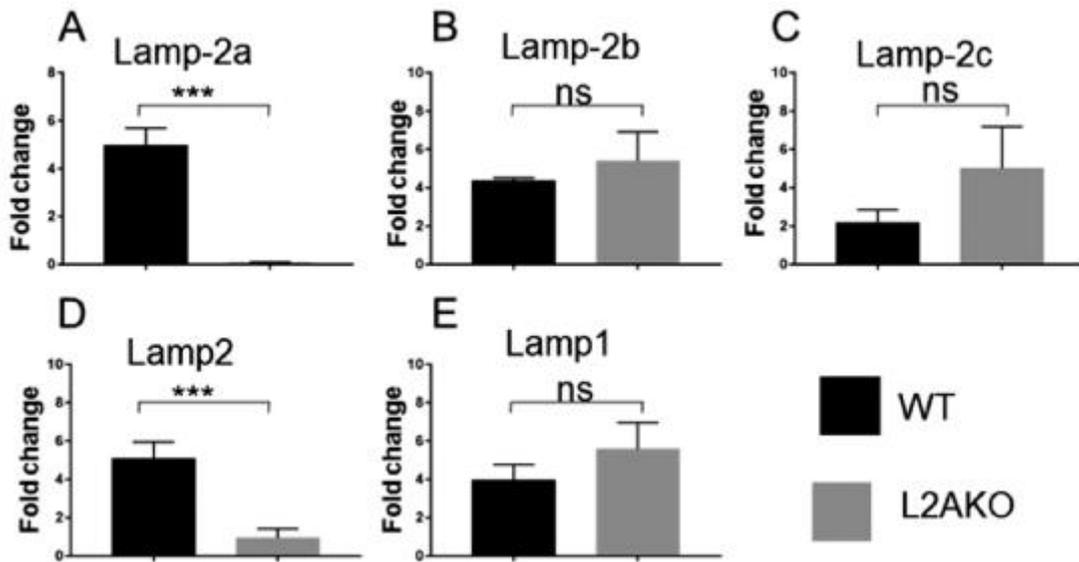


图4 肝细胞 Lamp-2a 基因时间特异性敲除大鼠的 qPCR 鉴定

Fig.4 qPCR results of time-conditionally hepatocyte-specific Lamp-2a gene knockout rats

表2 L2AKO 与 WT 的体重变化

Table 2 The body weight change of L2AKO and WT rats

Time	WT	L2AKO	P Value
	$\bar{x} \pm s \% / g$	$\bar{x} \pm s \% / g$	
2w	12.7± 9.2	12.2± 5.2	0.916
3w	14.3± 7.6	16.5± 5.6	0.627
4w	15.8± 9.2	15.4± 9.4	0.948
5w	16.7± 8.2	23.1± 5.6	0.209
6w	20.3± 8.3	26.9± 6.3	0.203
7w	25.4± 7.1	31.3± 5.4	0.199

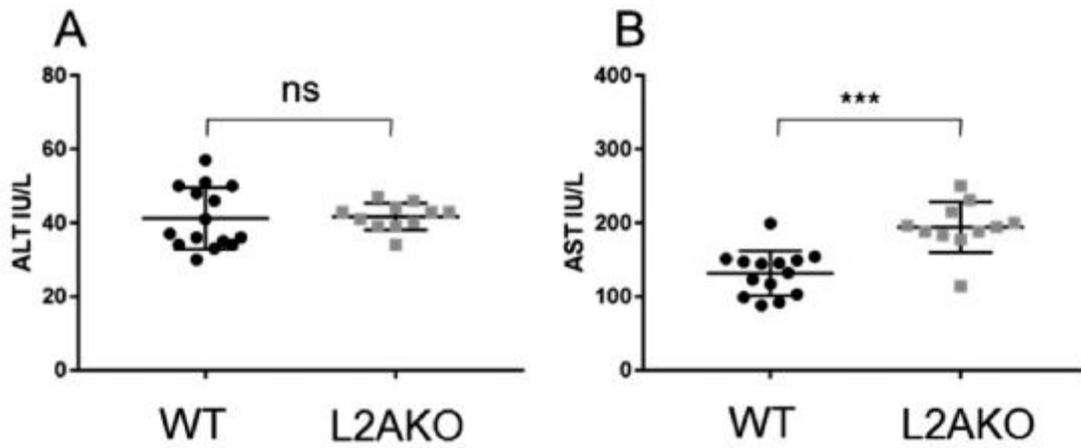


图 5 L2AKO 大鼠与 WT 大鼠的肝功能

Fig.5 Biochemical test of liver function of L2AKO and WT rats

3 讨论

胆汁淤积性肝病是由于肝细胞和 / 或胆管细胞水平的胆汁形成或流动受损进而对机体造成损伤的疾病,按组织学病因可以分为肝细胞性胆汁淤积和胆管细胞性胆汁淤积两大类,前者主要包括各种病毒性肝炎、药物性胆汁淤积以及进行性家族性肝内胆汁淤积病等;而后者主要包括原发性胆汁性胆管炎(PBC)、原发性硬化性胆管炎(PSC)以及 PBC、PSC 与 AIH 重叠综合征等^[13-15]。如果不及时治疗,严重胆汁淤积可诱发急性暴发性肝功能衰竭;慢性胆汁淤积会激活炎症反应,可进展为肝纤维化和肝硬化,最终导致肝功能衰竭^[16,17]。胆汁酸在胆汁淤积性肝病中发挥重要作用,并且肝细胞是胆汁代谢的中心环节,因此研究肝细胞中胆汁酸形成和转运的相关分子可能为探究胆汁淤积性肝病的发病机制提供新的切入点。

课题组前期发现胆汁淤积性肝病中的原发性胆汁性胆管炎患者的外周血中 Lamp2 水平升高,并且肝脏中 Lamp2 的表达分布与疾病进展相关^[45]。同时课题组构建的 Lamp2 基因敲除大鼠也呈现肝内胆汁淤积表征以及对胆汁淤积耐受性下降,更易发生胆汁排泄障碍^[6]。Lamp-2a 是 Lamp2 基因的 3 种亚型之一,位于 X 染色体,Lamp-2a 主要在胎盘、肺、肝脏高表达,肾脏、胰腺次之,脑、骨骼肌最低。Lamp-2b 则在骨骼肌高表达,脑、胎盘、肺、肾脏、胰腺次之,肝脏则最低。Lamp-2c 的具体表达部位,目前尚不清楚。因此 Lamp-2a 在肝脏中表达最高^[18-21]。Lamp-2a 是参与分子伴侣介导的自噬(chaperone-mediated autophagy, CMA)的唯一亚型,并且是 CMA 途径的限速分子^[22-24]。溶酶体膜上的 Lamp2a 不仅作为 CMA 底物蛋白的受体,而且已经有研究证实溶酶体膜的 Lamp2a 与病理和生理条件下的 CMA 活性直接相关^[25-27]。在分子层面,条件性敲除某一基因的遗传修饰动物是研究该基因的生物学功能的重要手段。随着生物技术的发展,目前的遗传修饰动物已经从全身各组织和细胞的某基因全身敲除转变为某种组织或者某种细胞的条件特异性敲除某基因。时间特异性敲除动物与其它条件性敲除鼠设计原理相同即首先把两个 loxp 位点锚定到目的基因的一个或几个重要外显子的两侧构建成嵌合鼠,再与特定组织中表达 cre 酶的工具鼠进行杂交,可实现在特定组织或细胞中敲除基

因,同时该基因在其他组织或细胞中的表达不受影响,而时间特异性敲除鼠的独特性就在于基因敲除的时间可以根据实验目的控制,自身可以形成前后对照^[28,29]。目前此技术在肿瘤中比较盛行,而胆汁酸代谢研究领域属于亟待开垦的荒地。因此基于课题组的前期发现以及 Lamp-2a 在 CMA 途径的核心作用和时间可控性的遗传修饰特点,我们课题组构建了肝细胞 Lamp-2a 基因时间特异性敲除转基因大鼠,实现基因的组织特异性和时间特异性敲除。

本实验采用 Cre-loxp 系统条件性的干扰肝细胞 Lamp-2a 的正常表达,构建了肝细胞 Lamp-2a 基因时间特异性敲除大鼠模型。免疫组化显示选择性敲除肝细胞 Lamp-2a 分子不影响肾脏组织 Lamp-2a 的表达;Western 和 qPCR 结果均显示 L2AKO 组与 WT 相比肝脏 Lamp-2a 表达明显降低。肝细胞 Lamp-2a 特异性敲除以后,Lamp2 的水平明显下降,而 Lamp-2b、Lamp-2c 轻度代偿性增高,这也从侧面反映 Lamp-2a 在 Lamp2 的构成中占比明显,同时 Lamp1 的表达不受影响。结合免疫组化、Western、qPCR 结果证实我们成功构建了肝细胞 Lamp-2a 时间特异性基因敲除的转基因大鼠。

由于课题组前期的 Lamp2 基因全身 KO 鼠与同窝野生型相比体型体重明显矮小,由于其它器官的受累可出现智能低下、心脏明显增大、心肌异常肥厚、心腔严重缩小,多合并节段性小肠出血坏死,胰腺损伤等因素出现死亡率明显增加,因此经常表现为生长周期不超过 8 周,使实验周期受限^[30]。我们监测了肝细胞 Lamp-2a 基因时间特异性敲除大鼠与同窝野生型大鼠的一般情况,发现敲除肝细胞 Lamp-2a 分子不影响大鼠的正常生长周期和体重增长变化。说明肝细胞 Lamp-2a 基因特异性敲除后对大鼠的一般情况没有明显的影响,因此我们的肝细胞 Lamp-2a 时间特异性基因敲除大鼠能更好为后续实验提供条件。另外,我们构建的肝细胞 Lamp-2a 基因特异性敲除大鼠与一般的条件性敲除鼠的优点在于其可以控制敲除的时机,根据实验需要人为控制基因的敲除时间,从而形成前后对照,并且相比较于 Lamp2 全基因敲除鼠的纯合子出现胚胎致死的现象,我们的转基因大鼠可获得纯合子,为进一步分析雌雄大鼠肝细胞 Lamp-2a 基因特异性敲除的表型奠定基础。另外,有文献报道 L2AKO 小鼠在 4 个月的时候可出现 ALT 升高^[31],但是

我们的转基因大鼠却并未出现这一现象,而是表现为L2AKO的AST高于WT的AST,大鼠和小鼠之间可能存在一定的种属差异。

我们利用 Cre/loxP 技术成功构建肝细胞 Lamp-2a 基因时间特异性敲除大鼠,为下一步的胆汁酸代谢研究提供良好的条件,也为阐明 Lamp-2a 基因与胆汁淤积性疾病的关系提供实验工。但是时间性条件性遗传修饰动物并不是十全十美,其与一般的条件性遗传修饰动物的优点在于其基因控制水平的时间可操控性。实验员需根据实验目的以及实验动物的种属查阅文献摸索给药浓度、给药途径、给药时间等,这样子就增加了实验时间、实验试剂的耗费以及实验人员的工作量。因此我觉得本文所做的工作除了给我们的下一步研究奠定基础,还有为我们之后的科研工作者进行构建时间性条件性遗传修饰动物(尤其是大鼠)提供一个相对可靠的大鼠的给药方案,资源共享,既可以加快实验的进展、减少实验试剂的浪费,又可以减轻实验人员的工作量。

参 考 文 献(References)

- [1] Trauner M, Fuchs C D, Halilbasic E, et al. New therapeutic concepts in bile acid transport and signaling for management of cholestasis [J]. *Hepatology*, 2017, 65(4): 1393-1404
- [2] Li M, Cai S Y, Boyer J L. Mechanisms of bile acid mediated inflammation in the liver[J]. *Mol Aspects Med*, 2017, 56: 45-53
- [3] Pinto C, Giordano D M, Maroni L, et al. Role of inflammation and proinflammatory cytokines in cholangiocyte pathophysiology [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2018, 1864(4 Pt B): 1270-1278
- [4] Wang L, Wang J, Shi Y, et al. Identification of a primary biliary cirrhosis associated protein as lysosome-associated membrane protein-2 [J]. *J Proteomics*, 2013, 91: 569-579
- [5] Wang L, Guo G Y, Wang J B, et al. A decline of LAMP- 2 predicts ursodeoxycholic acid response in primary biliary cirrhosis[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 9772
- [6] Wang L, Wang J, Cai W, et al. A Critical Evaluation of Liver Pathology in Humans with Danon Disease and Experimental Correlates in a Rat Model of LAMP-2 Deficiency [J]. *Clin Rev Allergy Immunol*, 2017, 53(1): 105-116
- [7] Feil S, Valtcheva N, Feil R. Inducible Cre mice[J]. *Methods Mol Biol*, 2009, 530: 343-363
- [8] Schonig K, Weber T, Frommig A, et al. Conditional gene expression systems in the transgenic rat brain[J]. *BMC Biol*, 2012, 10: 77
- [9] Sandhu U, Cebula M, Behme S, et al. Strict control of transgene expression in a mouse model for sensitive biological applications based on RMCE compatible ES cells[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011, 39(1): e1
- [10] Weisend C M, Kundert J A, Suvorova E S, et al. Cre activity in fetal albCre mouse hepatocytes: Utility for developmental studies[J]. *Genesis*, 2009, 47(12): 789-792
- [11] Cebula M, Ochel A, Hillebrand U, et al. An inducible transgenic mouse model for immune mediated hepatitis showing clearance of antigen expressing hepatocytes by CD8+T cells [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68720
- [12] Park E J, Sun X, Nichol P, et al. System for tamoxifen-inducible expression of cre-recombinase from the Foxa2 locus in mice [J]. *Dev Dyn*, 2008, 237(2): 447-453
- [13] Santiago P, Scheinberg A R, Levy C. Cholestatic liver diseases: new targets, new therapies [J]. *Therap Adv Gastroenterol*, 2018, 11: 322991032
- [14] Bull L N, Thompson R J. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis[J].*Clin Liver Dis*, 2018, 22(4): 657-669
- [15] Tan D, Goodman Z D. Liver Biopsy in Primary Biliary Cholangitis: Indications and Interpretation [J]. *Clin Liver Dis*, 2018, 22 (3): 579-588
- [16] Ghonem N S, Assis D N, Boyer J L. Fibrates and cholestasis[J]. *Hepatology*, 2015, 62(2): 635-643
- [17] Assis D N. Chronic Complications of Cholestasis: Evaluation and Management[J]. *Clin Liver Dis*, 2018, 22(3): 533-544
- [18] Cuervo A M, Dice J F. A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes [J]. *Science*, 1996, 273 (5274): 501-503
- [19] Chiang H L, Terlecky S R, Plant C P, et al. A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins [J]. *Science*, 1989, 246(4928): 382-385
- [20] Cuervo A M, Dice J F. Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane[J]. *Traffic*, 2000, 1(7): 570-583
- [21] Lee J, Xu Y, Zhang T, et al. Secretion of misfolded cytosolic proteins from mammalian cells is independent of chaperone-mediated autophagy[J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(37): 14359-14370
- [22] Kaushik S, Cuervo A M. The coming of age of chaperone-mediated autophagy[J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(6): 365-381
- [23] Eskelinen E L, Cuervo A M, Taylor M R, et al. Unifying nomenclature for the isoforms of the lysosomal membrane protein LAMP-2[J]. *Traffic*, 2005, 6(11): 1058-1061
- [24] Aydin Y, Stephens C M, Chava S, et al. Chaperone-Mediated Autophagy Promotes Beclin1 Degradation in Persistently Infected Hepatitis C Virus Cell Culture[J]. *Am J Pathol*, 2018, 188(10): 2339-2355
- [25] Park Y, Liu C, Luo T, et al. Chaperone-Mediated Autophagy after Traumatic Brain Injury[J]. *J Neurotrauma*, 2015, 32(19): 1449-1457
- [26] Issa A R, Sun J, Petitgas C, et al. The lysosomal membrane protein LAMP2A promotes autophagic flux and prevents SNCA-induced Parkinson disease-like symptoms in the Drosophila brain[J]. *Autophagy*, 2018, 14(11): 1898-1910
- [27] Pajares M, Rojo A I, Arias E, et al. Transcription factor NFE2L2/NRF2 modulates chaperone-mediated autophagy through the regulation of LAMP2A[J]. *Autophagy*, 2018, 14(8): 1310-1322
- [28] Onodera T, Sakudo A, Tsubone H, et al. Review of studies that have used knockout mice to assess normal function of prion protein under immunological or pathophysiological stress [J]. *Microbiol Immunol*, 2014, 58(7): 361-374
- [29] Yang J, Yu F, Lou F, et al. Reporter Mice Used for Dentinogenesis Study[J]. *Curr Stem Cell Res Ther*, 2018, 13(2): 91-100
- [30] Ma S, Zhang M, Zhang S, et al. Characterisation of Lamp2-deficient rats for potential new animal model of Danon disease [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 6932
- [31] Schneider J L, Suh Y, Cuervo A M. Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation [J]. *Cell Metab*, 2014, 20(3): 417-432