

# 碱性鞘磷脂酶基因剔除鼠的基因型和表型特征

杨俐萍<sup>1\*</sup>, 朱顺星<sup>2</sup>, 闵娅兰<sup>1</sup>, 刘焕良<sup>1</sup>, 钱红燕<sup>1</sup>, 陈椽<sup>1</sup>, 朱菁烨<sup>1</sup>,  
邵晶晶<sup>1</sup>, 雒润华<sup>1</sup>, 李静<sup>1</sup>, 段瑞冬<sup>3</sup>

(1. 南通大学附属肿瘤医院肿瘤研究所中心实验室, 江苏 南通 226361; 2. 南通大学实验动物中心,  
江苏 南通 226001; 3. 瑞典 LUND 大学胃肠营养实验室, LUND 瑞典, S-22184)

**【摘要】** 目的 为研究 alk-SMase 在结肠癌发生发展中的作用提供动物模型的实验数据。方法 将野生型 (WT, +/+), 杂合子 (+/-), 纯合子 (KO, -/-) alk-SMase 基因剔除小鼠剪尾提取 DNA, PCR 法作基因型鉴定; 取其肝肠组织进行 HE 染色、激光共聚焦分析以及质谱仪检测, 观察和分析不同基因型鼠的表型特征。结果 与 WT 和杂合子比较, KO 鼠显示: 外观和体重无明显区别; 基因型鉴定出现一个条带, 其分子量为 247 bp; 小肠黏膜明显增厚, 但 alk-SMase 表达减弱; 质谱分析显示在肠道和肝脏中的鞘磷脂含量增高, 1-磷酸鞘氨醇含量增加, 而神经酰胺含量降低。结论 alk-SMase KO 鼠有明显特征, 但其外观和体重与其他基因型比较没有明显区别, 为研究 alk-SMase 的生物功能提供了一个理想的动物模型。

**【关键词】** 碱性鞘磷脂酶; 基因剔除小鼠; 基因型; 表型

**【中图分类号】** Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 05-0495-05

Doi: 10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2015. 05. 010

## Genotypic and phenotypic characteristics of alkaline sphingomyelinase knockout mice

YANG Li-ping<sup>1\*</sup>, ZHU Shun-xing<sup>2</sup>, Min Ya-lan<sup>1</sup>, LIU Huan-liang<sup>1</sup>, QIAN Hong-yan<sup>1</sup> Chen Yuan<sup>1</sup>,  
Zhu Jing-ye<sup>1</sup>, Shao Jing-jing<sup>1</sup>, LUO Run-hua<sup>1</sup>, LI Jing<sup>1</sup>, Duan Rui-dong<sup>3</sup>

(1. Key Laboratory, Cancer Research Center, Nantong University, Nantong Jiangsu 226361, China;

2. Animal Research Facility in Nantong University, Nantong Jiangsu 226001;

3. Gastroenterology & Nutrition Laboratory, Lund University, Lund, Sweden S-22184)

**【Abstract】 Objective** To determine the genotypic and phenotypic characteristics of alkaline sphingomyelinase (alk-SMase) knockout (KO) mice and to provide the foundation data of this animal model for further study of the role of alk-SMase in colon cancer. **Methods** DNA was extracted from the tail tissue of wild type, heterozygous, homozygous KO mice, respectively. PCR analysis was used for genotyping. HE staining, confocal microscopy, and mass spectrometry were used for the detection of morphology, alk-SMase expression and sphingolipid metabolites in liver and intestine of the mice. **Results** Compared with the wild type and heterozygous mice, the homozygous KO mice showed that no changes occurred in the appearance and body weight, there was only one band (247bp) appeared on the genotyping, the thickness in small intestinal mucosa was significantly increased with a lower expression level of alk-SMase, and the amount of sphingolipid metabolites in the intestine and liver was changed, i. e. increase of SM and S1P, and reduction of ceramide. **Conclusions** Our findings demonstrate that the homozygous KO mice have specific genotype and phenotype that do not affect their growth. These mice will provide an ideal animal model for further study of alk-SMase functions.

**【Key words】** alk-SMase; Knockout mouse; Genotype; Phenotype

[基金项目] 江苏省创新创业人才基金(项目号: 苏人才 2013-41)。

[通讯作者] 杨俐萍(1958-04), 女, 博士, 教授, 主要从事肿瘤标志物研究, E-mail: liping.yang@ntu.edu.cn

碱性鞘磷脂酶(alkaline sphingomyelinase, alk-SMase)是肠道中鞘磷脂代谢的关键酶,其通过水解鞘磷脂(sphingomyelin, SM)产生一系列生物活性物质,如神经酰胺(ceramide, Cer)和 1-磷酸鞘氨醇(sphingosine-1-P, S1P)来调控细胞的生长、凋亡及炎症反应<sup>[1,2]</sup>。近年来,随着对 alk-SMase 的深入研究,特别是 alk-SMase 基因剔除(knockout, KO)鼠模型的成功建立<sup>[3]</sup>,人们对此酶在生理病理方面的作用有了更进一步的理解,发现它在结肠癌发生发展的研究中起着重要的工具作用<sup>[4]</sup>。然而,对经过转基因技术产生的 alk-SMase KO 鼠本身的特征尚未见有全面的报道。为了阐明 alk-SMase KO 鼠的背景特征,使该模型能更好地应用于 alk-SMase 功能及其在肿瘤中作用的研究,我们从瑞典隆德大学实验动物中心(瑞典隆德大学段瑞冬教授惠赠)引进了 alk-SMase KO 杂合子小鼠,在南通大学 SPF 实验动物中心饲养繁殖,并对其仔鼠进行基因鉴定和表型分析。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

5 只杂合子、3 只纯合子 alk-SMase KO 鼠,其中有 4 只雄性和 4 只雌性,来源于瑞典 LUND 大学实验动物中心(2012 年由段瑞冬教授惠赠),经中国海关安全检查后入驻南通大学 SPF 动物中心,并饲养繁殖。该小鼠遗传背景为 C57BL/6,近交系,由南通大学实验动物中心提供【SCXK(苏)2014-0001】。动物的饲养繁殖以及实验在南通大学实验动物中心进行【SYXK(苏)2012-0031】,并通过南通大学实验动物伦理委员会的审批,批准号为 NTU-KO-2012-009。

### 1.2 饲养和繁殖

按照 SPF 级动物饲养标准进行饲养,实行自由采食和饮水。采用 1 对 1 雌雄鼠“长期同居”方式进行繁殖。母鼠孕期为 19~21 d,哺乳期为 18~23 d。在幼鼠 3 周龄时,断奶分笼,打标记并进行基因鉴定。

### 1.3 基因型鉴定

#### 1.3.1 组织 DNA 的提取

将小鼠尾部组织小段(长约 0.5~1.0 cm)置入 1.5 mL Eppendorf 管中,参照 Fermentas 的 Fast tissue-to-PCR 试剂盒(Thermo, 美国)抽提 DNA。

#### 1.3.2 PCR 反应及琼脂糖凝胶电泳基因型鉴定

引物设计参照相关文献<sup>[3]</sup>,上游引物:5'-CT-GCCACTTTTACACTGGTCAC,下游引物:5'-TG-GCACTGAGGCCGAGAAC。PC 仪循环扩增反应条件:95℃ 10 min 预变,95℃ 30s 变性,55℃ 30s 退火,72℃ 1min 延伸,共 35 个循环。电泳鉴定:分别取 10  $\mu$ L PCR 扩增产物及 DNA ladder(Thermo, 美国)加载在含 40  $\mu$ L GelRed 的 1.0% 琼脂糖凝胶中,经 100V 30 min 电泳后置于凝胶成像仪 ChemiDocXRS+(Bio-Rad, 美国)观察拍照。

### 1.4 表型观察和分析

#### 1.4.1 外观及体重

定期观察野生型(wild type, WT)、杂合子, KO 三种不同基因型小鼠毛色及测量体重的变化。

#### 1.4.2 组织切片 HE 染色

取 25 周龄的三种不同基因型的小鼠各 5 只鼠的小肠、大肠、肝脏,将组织置于 4% 多聚甲醛固定中固定,按常规病理标本制备方法进行石蜡包埋、切片以及苏木精和伊红(HE)染色,显微镜摄像分析。

#### 1.4.3 激光共聚焦分析

制备小肠新鲜冰冻切片标本:组织标本经 4% 多聚甲醛固定过夜后,用 30% 蔗糖脱水 6 h 以上, OCT 包埋。采用冰冻切片机(Leica, 德国)按 6  $\mu$ m 厚度切片。依照免疫荧光染色方法对切片染色:经 10% 牛血清白蛋白封闭后加入抗 alk-SMase 抗体(瑞典 LUND 大学段瑞冬教授赠)4℃ 过夜, PBS 漂洗 3 次后加入荧光二抗(驴抗兔-FITC 绿色荧光)室温 40 min,经 PBS 漂洗 3 次后封片,激光共聚焦摄像分析。

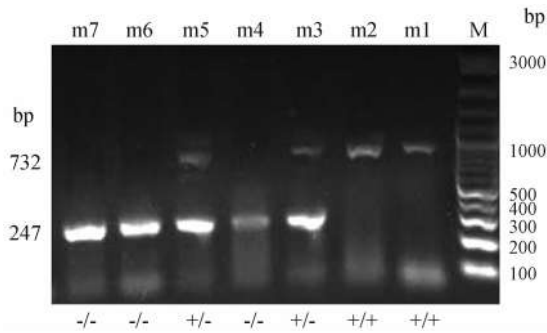
### 1.5 质谱仪检测

取 7~10 只 14~16 周龄 WT 及 KO 鼠,安乐死后快速取其小肠、大肠、肝脏器官组织,用 4℃ PBS 冲洗内容物后,将组织放在液氮中研磨成粉末状, -80℃ 中保存。按照参考文献<sup>[5]</sup>的方法提取磷脂并采用质谱仪(Applied Biosystems, 美国)测定其代谢产物的含量(由中科院化学研究所测定)。

## 2 结果

### 2.1 基因型鉴定

取 3 周龄仔鼠尾部组织 DNA 进行 PCR 扩增显带,3 种基因型的条带显示见图 1:m1、m2 只出现 732 bp 条带,为 WT(+ / +);m3、m5 出现 732 bp 和 247 bp 两个条带,为杂合子型(+ / -);m4、m6、m7 只出现 247 bp 条带,为 KO 型(- / -)。

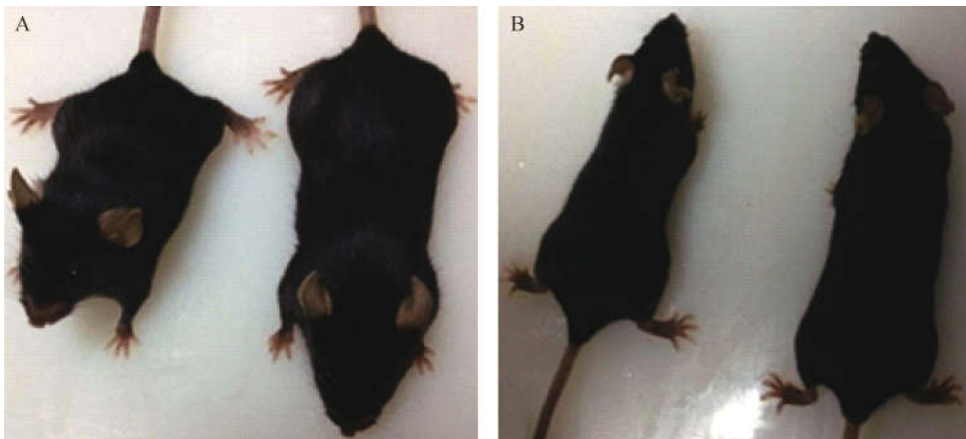


注: m1 ~ m7 为小鼠尾部组织 DNA 样本, M: DL3000 分子量标记, DNA 分子分别显示在 732 bp 和 247 bp 条带上。  
+ / + 为 WT, + / - 为杂合子型, - / - 为 KO。

**图 1** alk-SMase WT、杂合子和 KO 的基因型 PCR 鉴定

Note. m1 - m7 represent the tail DNA samples derived from the offspring mice of alk-SMase KO. M, DL3000 DNA ladder. On the gel there are two bands, 732 bp and 247 bp, + / + wild type, + / - heterozygous, - / - homozygous.

**Fig. 1** alk-SMase genotyping by PCR



注: A. 正面像, 左侧鼠为 WT ( + / + ), 右侧鼠为 KO ( - / - ); B. 背面像, 左侧鼠为 WT ( + / + ), 右侧鼠为 KO ( - / - )。与 WT 比较, KO 小鼠毛色正常, 体重无明显差异。

**图 2** alk-SMase KO 与 WT 鼠外观形态的比较

Note. A, B; Photos taken from front and back of the mice, wild-type ( + / + ) on the left, homozygous ( - / - ) on the right in each photo. Among the same age littermates there are no differences in the appearance and body weight regardless of genotype.

**Fig. 2** Gross appearance of the alk-SMase KO mice

## 2.5 鞘脂代谢产物的质谱分析

SM 在 alk-SMase 的酶解作用下生成 Cer, 继而产生 SIP 的代谢产物。利用微量敏感的质谱仪测定 alk-SMase KO 鼠的肠道黏膜和肝组织中的鞘脂代谢产物含量, 结果显示, ① SM 的含量变化: 虽然与 WT 比较没有统计学的显著差异, 但在 KO 鼠的小肠、结直肠黏膜以及肝组织中的 SM 含量均有所增加, 分别增加 35 pmol/mg (8%), 34 pmol/mg (6%), 29 pmol/mg (6%); ② Cer 的含量变化: 在

## 2.2 小鼠的生长、外观及体重变化

母鼠孕期 19 ~ 21 d, 每胎产仔 6 ~ 10 只, 仔鼠成活率 > 95%, 成熟期; 雄性 10 周, 雌性 8 周。KO 和杂合子型与同窝 WT 小鼠比较, 毛色正常, 外观和体重上未见明显差异 (见图 2)。

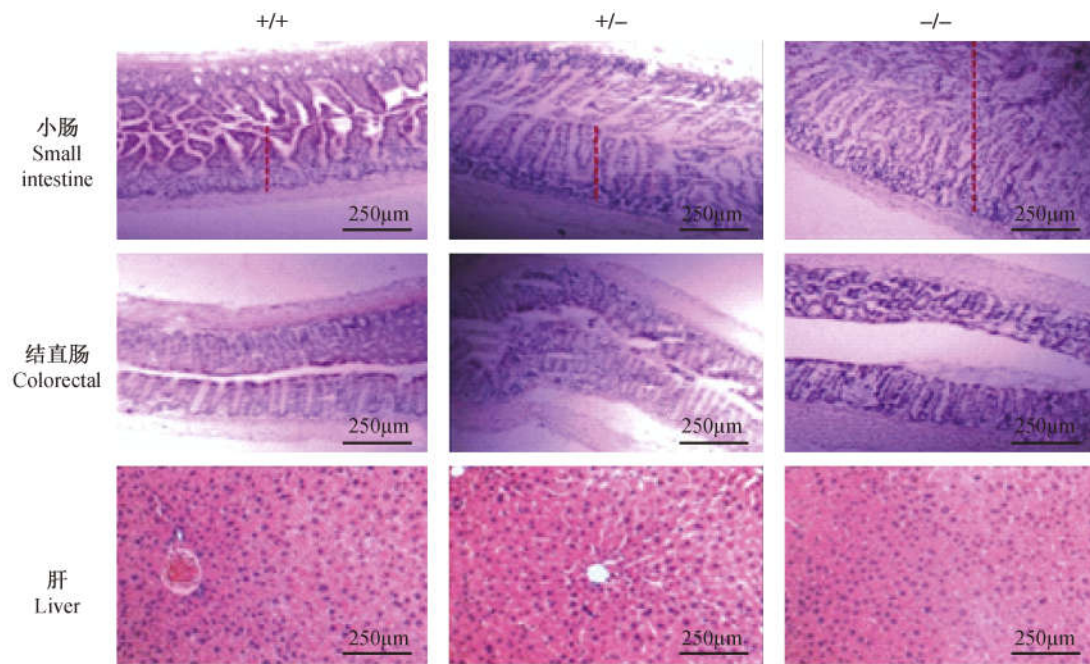
## 2.3 组织形态学特征

显微镜下观察不同基因型鼠的肠壁及肝组织的 HE 染色切片, 发现: WT 和杂合子的肠黏膜、肝组织均无明显区别, 而 KO 小肠黏膜有明显增厚, 几乎为 WT 的 3 倍 (图 3 右上), 但其结直肠黏膜及肝组织的形态则无明显差别 (见图 3)。

## 2.4 alk-SMase 蛋白的荧光表达

将带有绿色荧光标记的抗 alk-SMase 抗体对不同基因型鼠的肠黏膜进行免疫荧光染色, 用激光共聚焦显微镜观察到: WT 肠黏膜上的 alk-SMase 表达是显而易见的, 而杂合子和 KO 肠黏膜上的 alk-SMase 表达量均下降, 在 KO 肠黏膜上的表达几乎消失 (见图 4)。

KO 鼠的小肠、结直肠黏膜以及肝组织中的 Cer 含量均降低, 分别降低 38 pmol/mg (18%), 24 pmol/mg (13%), 4 pmol/mg (3%), 其中小肠黏膜的 Cer 含量减少与 WT 比较有显著的统计学差异,  $P < 0.05$ 。③ SIP 的含量变化: 在 KO 鼠的小肠、结直肠黏膜以及肝组织中的 SIP 含量明显增加, 分别增加 14 fmol/mg (38%), 13 fmol/mg (34%), 5 fmol/mg (18%), 其中肠黏膜的 SIP 含量增加与 WT 比较有显著的统计学差异,  $P < 0.05$  (见图 5)。

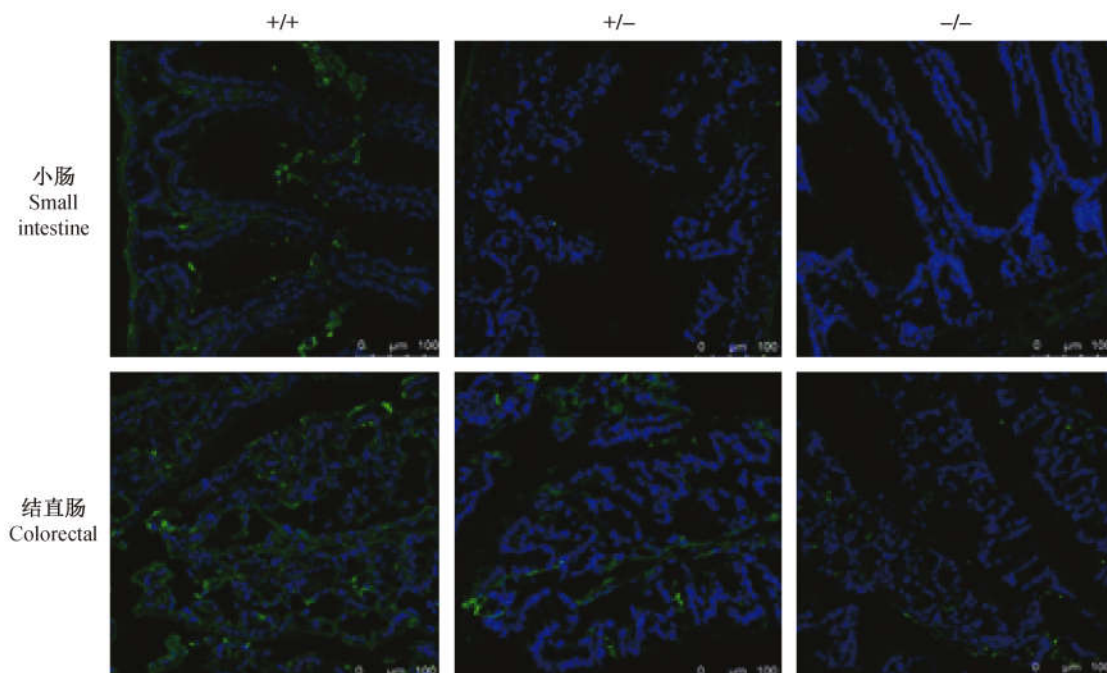


注: HE 染色图片代表来自 10 只不同基因型鼠组织。bar = 250 μm。

**图 3** 不同基因型小鼠肝肠组织形态学比较, ×200

Note. Representative micrographs of HE stained slides were taken from 10 littermates of identified genotypes of mice, respectively. The bars inserted in the images indicate 250 μm

**Fig. 3** Morphological comparison among 3 types of genotype of alk-SMase KO mice

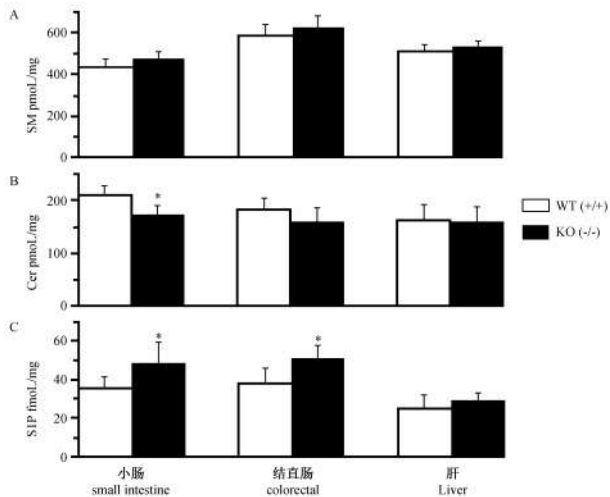


注: 免疫荧光染色图片代表 WT (+/+), 杂合子 (+/-) 及 KO (-/-) 不同基因型鼠的肠壁组织。绿色为 alk-SMase 蛋白, 蓝色为细胞核 (DAPI 阳性)。在 KO (-/-) 肠黏膜上 alk-SMase 的表达明显减弱。标尺 100 μm。

**图 4** alk-SMase 在不同基因型鼠肠黏膜上的表达, ×400

Note. Representative micrographs of alk-SMase immunofluorescence staining from the littermates of identified genotypes with WT (+/+), heterozygous (+/-) and KO (-/-), respectively. Green color indicates positive alk-SMase expression, and blue indicates cell nuclei (DAPI +). The alk-SMase expression was down-regulated in KO (-/-) intestine. The bars inserted in the images indicate 100 μm, ×400

**Fig. 4** alk-SMase expression in the intestinal mucosa of identified genotype of mice.



注: A、B、C 分别为在小肠、结直肠、肝脏中鞘磷脂代谢物 SM、Cer、SIP 含量的质谱仪分析统计图, 其中 SM 和 Cer 的值来自 WT (+/+) 及 KO (-/-) 各 10 只 ( $n=10$ ), SIP 的值来自 WT 及 KO 各 7 只 ( $n=7$ ), 3 次独立的实验。柱形图代表平均值  $\pm$  标准误差, \*  $P < 0.05$ 。

图 5 alk-SMase KO 鼠肝肠组织中鞘磷脂代谢产物含量的质谱仪分析

Note. The histograms in A, B, C represent the levels of sphingolipids metabolites SM, Cer, SIP in the intestine and liver tissues of alk-Mase WT (+/+) and KO (-/-) mice, which were detected by mass spectrometry. Analysis data were from  $n=10$  in both SM group and Cer group, respectively,  $n=7$  in SIP group, respectively. 3 independent experiments, mean  $\pm$  SEM, \*  $P < 0.05$ .

Fig. 5 SM, Cer, SIP levels detected by MS in the intestine and liver of WT and KO mice

### 3 讨论

早在 1969 年瑞典医学家尼尔森就发现肠道中存在 alk-SMase 酶<sup>[6]</sup>, 然而直到 20 世纪 90 年代才被广泛研究, 2011 年才见有 alk-SMase 基因剔除鼠模型的报道<sup>[3]</sup>。研究表明, alk-SMase 的特性具有①组织表达特异性, alk-SMase 仅分布于肠道微绒毛膜上(除人的胆汁外); ②胆汁盐依赖性, 其酶活性需要胆盐的存在; ③胰酶消化抵抗性, 这就保护了酶的高稳定性等<sup>[1]</sup>。alk-SMase 最主要的功能是水解 SM, 肠腔内 SM 在 alk-SMase 酶作用下水解成 Cer, Cer 又在神经酰胺酶的作用下进一步水解成鞘氨醇(sphingosine, Sph), Sph 在鞘氨醇激酶作用下磷酸化成 SIP。Cer、SIP 有第二信使的作用, 两者的平衡调节参与了调控细胞的增生、凋亡、抗炎、新生血管形成等过程<sup>[7,8]</sup>。近年研究表明, alk-SMase 基因剔除鼠化学性诱发结肠癌的发生率高于野生型<sup>[4]</sup>, 提示 alk-SMase 在结肠炎和结肠癌的发生发展中起着重要作用。

虽然 alk-SMase 基因剔除鼠已被用于研究, 但该动物本身的背景特征尚需阐明, 这对于今后研究结肠癌发生的诱因、病理机制和抗癌药的使用是很有必要的。基于这个目的, 我们从瑞典隆德大学引进了 alk-SMase 基因剔除的小鼠, 并在 SPF 级实验动物中心饲养繁殖, 利用形态学方法、PCR 以及质谱仪技术对动物的子代进行基因鉴定, 表型观察以及代谢物含量的测定, 发现从外观、毛色和体重看, KO 与 WT 小鼠没有区别, 但它们的基因型和肠道表型有明显的区分。KO 鼠因在 alk-SMase 基因上剔除了一个外显子, 使序列长度减少, 所以基因鉴定条带上的分子量比 WT 的小<sup>[3]</sup>, 导致 alk-SMase 在肠道的表达下调。由于 alk-SMase 缺失引起 SM 的消化障碍, 出现抗细胞增殖和促凋亡的 Cer 生成减少, 而与 Cer 相抗衡的 SIP 增多, 导致肠道细胞增生, 肠壁增厚(这点在我们的 HE 染色结果中得到证实), 甚至诱发癌症<sup>[4]</sup>。

综上所述, alk-SMase KO 鼠有明显的 alk-SMase 功能缺失背景, 在无诱因之下, 不影响鼠的一般健康状态, 与正常鼠相似, 但是它们可能是结肠癌发生的易感高危鼠群。因此, 本研究通过实验阐明了 alk-SMase KO 鼠的特征, 为进一步利用该动物模型作为研究工具, 对 alk-SMase 的功能尤其是在结肠癌发生发展中的作用及其机制的探讨提供了有价值的实验数据。

### 参 考 文 献

- [1] Duan RD. Alkaline sphingomyelinase: An old enzyme with novel implications [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1761(3): 281 - 291.
- [2] 雒润华, 杨俐萍. 碱性鞘磷脂酶在结肠癌中作用的研究进展 [J]. 交通医学, 2013, 27(4): 319 - 322.
- [3] Zhang Y, Cheng YJ, 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.
- [4] Chen Y, Zhang P, Xu S, et al. Enhanced colonic tumorigenesis in alkaline sphingomyelinase (NPP7) knockout mice [J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(1): 259 - 267.
- [5] Zhao Z, Xu Y. An extremely simple method for extraction of lysophospholipids and phospholipids from blood samples [J]. J Lipid Res, 2010, 51: 652 - 659.
- [6] Nilsson A. The presence of sphingomyelin- and ceramide-cleaving enzymes in the small intestinal tract [J]. Biochim Biophys Acta, 1969, 176: 339 - 347.
- [7] 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.
- [8] 覃蒙斌, 黄杰安. 鞘氨醇激酶-1 在结肠癌中的作用研究进展 [J]. 国际消化病杂志, 2009, 29(1): 26 - 28.

[收稿日期] 2015-04-16