

# *Hr* 基因敲除小鼠模型的构建和表型分析

朱奎成<sup>1,2</sup>, 徐存拴<sup>1</sup>, 陈莹莹<sup>2</sup>, 王纯耀<sup>2</sup>, 章金涛<sup>2</sup>

(1. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007; 2. 郑州大学实验动物中心, 郑州 450052)

**【摘要】** 目的 建立基因敲除小鼠以深入研究无毛基因(hairless, *Hr*)的功能。方法 利用类转录激活因子效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术,制备*Hr*基因敲除小鼠,观察基因敲除小鼠毛发生长发育规律,并取部分皮肤组织石蜡切片,显微镜下分析结果。结果 获得一个在*Hr*基因编码区86~87位有2个碱基缺失的首建鼠,产生了TGA终止密码子。通过与野生型鼠杂交获得阳性子代,进行同窝交配,传至第2代小鼠14 d开始脱发,30 d左右毛发脱净,并终身保持无毛。皮肤组织学观察发现真皮内形成大小不等的包裹。研究结果表明成功建立的*Hr*基因敲除小鼠表现出毛发生长异常。结论 证明了无毛基因与毛发生长发育的密切关系,为研究*Hr*基因的精确功能提供了良好的动物模型。

**【关键词】** 无毛基因;基因敲除;小鼠;表型

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016) 08-0075-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.08.012

## Construction of a *Hr* mutant knockout mouse model and phenotypic analysis

ZHU Kui-cheng<sup>1,2</sup>, XU Cun-shuan<sup>1</sup>, WANG Chun-yao<sup>2</sup>,  
CHEN Ying-ying<sup>2</sup>, ZHANG Jing-tao<sup>2</sup>

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Laboratory Animal Center of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052)

**【Abstract】 Objective** To establish a *Hr* mutant knockout mouse model to study the function of *Hr* gene. **Methods** Transcription activator-like effector nucleases (TALENs) technique was used to disrupt the mouse *Hr* locus, creating heritable mutations that eliminate *Hr* function to explore the effects of *Hr* on hair development and provide a good model to study the function of *Hr* gene. The phenotype of *Hr*<sup>-/-</sup> mice was observed after birth and skin histology of the transgenic mice was studied by light microscopy. **Results** It was shown that a F0 mouse with the 2-bp deletion in *Hr* gene ranging from 86 to 87 base pairs was obtained. The male mice with clear deletion of the *Hr* fragment and with obvious frame shifting were mated with wild-type female mice, and F<sub>1</sub> mice were achieved. The heterozygous males mated with females to generate the F<sub>2</sub> homozygous mice. The first hair coat of *Hr*<sup>-/-</sup> mice developed normally. Beginning from 14 days after birth, however, there was a rapid hair loss. The mice were completely hairless except for a few vibrissae at 30 days. Histologically, two characteristic structures appeared, the utriculus and dermal cyst. **Conclusions** The results suggest that *Hr*<sup>-/-</sup> mice are successfully created using TALENs, and *Hr* is important for regulating hair development, which could explain at least in part the hair loss and be applied to study the mechanism of hair growth and development disorder.

**【Key words】** *Hr*; Knockout; mouse; Phenotype

[基金项目] 国家自然科学基金(编号: 31372270)。

[作者简介] 朱奎成(1975-),男,在读博士,副教授。研究方向: 动物学。Email: kuicheng123@126.com。

[通讯作者] 1. 徐存拴(1958-),男,博士,教授,研究方向: 细胞分化调控; 2. 章金涛(1968-),男,博士,教授,研究方向: 遗传学。

脱发或称秃发是一种常见的人类疾病。毛发生长和脱落的调节是一个高度复杂的过程,受到许多基因的调控<sup>[1]</sup>。寻找影响毛发生长和脱落的重量级因子,将为阐明毛发生长周期的调控机制,研发有效治疗脱发性疾病的药物提供新的思路和治疗手段。无毛小鼠(hairless mice)是一种皮肤和被毛结构发生异常变化的小鼠,该种小鼠出生后第一次毛发生长正常,大约在 14 d 开始从头部向尾部脱毛,正常情况下 1 周内被毛全部脱净,并终生保持无毛状态,其表型类似于人的丘疹性无毛症(papular atrichia)<sup>[2]</sup>,是皮肤病及毛发生长研究的良好实验动物模型,由于无毛小鼠的无毛表型是因为一个被定位于 14 号染色体上的功能基因突变所致<sup>[3]</sup>,因此,该基因被命名为“无毛基因”(hairless gene, *Hr*)。近十年来,有关小鼠 *Hr* 基因等位自发突变动物的报道达 16 个之多,这些研究结果揭示了 *Hr* 基因突变与多样化表型之间的复杂关系<sup>[4-5]</sup>,成为研究毛发生长脱落机制的重要实验材料,但进展缓慢。作者认为,建立遗传突变动物,进一步分析无毛基因的精确功能和毛囊周期的调控途径有助于探明 *Hr* 基因致脱发的发病机制,并为人的脱发、斑秃等毛发疾病研究提供重要的新线索。本研究利用 TALENs 技术建立了 *Hr* 基因敲除的小鼠模型提供基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

C57BL/6J 小鼠购于北京维通利华实验动物技术有限公司(SCXK(粤)2013-0032)。饲养于郑州大学实验动物中心 SPF 级动物房,许可证号:SYXK(豫)2016-0002。饲料购自郑州大学实验动物中心,经<sup>60</sup>Co 辐照灭菌。

### 1.2 TALENs 载体的构建和体外转录

根据 NCBI 上 *Hr* 基因序列,利用 TALEN 在线设计工具(<http://zifit.partners.org/ZiFiT/ChoiceMenu.aspx>)设计基因敲除位点。左右靶点的识别模块经 golden gate 方法组装完成后,克隆到载体上构建成 pRP [TALEN]-Hygro-CMV > 22nt \_ TGTGAACGGCATTGTGGGACAG 真核表达载体。线性化后,在 T7 启动子的作用下体外转录为 mRNA 注射到 C57BL/6J 的受精卵中,挑选注射后状态良好的受精卵,移植到假孕母鼠的输卵管内,待其自然生下 F<sub>0</sub> 代小鼠。

剪取经原核注射产生的 1 周龄首建鼠的鼠尾组织,提取基因组 DNA,利用引物扩增目的片段,PCR 上游引物为:5'-CTCATGCTTTGTCCTTACCCTCC

AG-3',下游引物为:5'-CACCAGTGAGAGTGTGTCCTTGGG-3',对扩增出的 PCR 产物进行测序,与 C57BL/6J 小鼠基因目的序列比对,分析靶点序列缺失情况。

### 1.3 基因敲除小鼠繁殖及表型分析

显微注射获得 F<sub>0</sub> 代小鼠分别与野生型的 C57BL/6J 交配,对交配获得的 F<sub>1</sub> 代小鼠进行基因型鉴定,分别建系。将来自同一只 F<sub>0</sub> 的阳性 F<sub>1</sub> 代小鼠同胞交配,可获得 F<sub>2</sub> 代小鼠,对 F<sub>2</sub> 代小鼠进行基因型鉴定。理论上 F<sub>2</sub> 代小鼠中 25% 的几率为 *Hr*<sup>-/-</sup> 纯合子小鼠。

出生后每天观察小鼠被毛及皮肤形态的变化,详细记录。皮肤组织学观察:动物颈椎脱臼法处死,取背部中央皮肤,体积分数 10% 甲醛溶液固定,脱水,石蜡包埋,切片,HE 染色,显微镜下观察,拍照。

## 2 结果

### 2.1 *Hr* 敲除小鼠的构建及 PCR 鉴定

根据小鼠 *Hr* 核酸序列信息,针对外显子设计两处相邻的靶序列进行 TAL 识别模块构建,将这两个相邻靶点识别模块融合克隆到 FokI 的 N-末端,形成真核表达载体,原核注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中,移植到假孕鼠子宫内,共出生 13 只幼仔,剪取 7 日龄的鼠尾组织,提取基因组 DNA,PCR 扩增,测序与 C57BL/6J 小鼠基因序列比较,其中 10# 小鼠在 *Hr* 编码区 86~87 位共 2 个碱基的缺失,产生了 TGA 终止密码子(图 1)。

### 2.2 基因敲除小鼠繁殖及表型初步分析

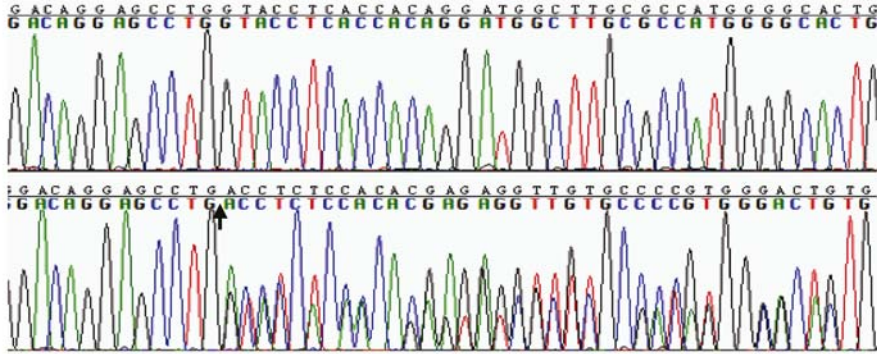
2.2.1 形态观察:基因敲除小鼠出生后被毛生长正常,与有毛小鼠无法区分。大约 2 周左右,基因敲除纯合子小鼠开始从背部开始脱毛(图 2 A),然后延伸至头颈部及尾部。1 月龄时毛发基本脱落殆尽,仅保留极少分散毛发,皮肤为肉色偏红,皮肤薄,头、颈部有较细的皮肤皱纹(图 2 B),并随年龄增长,皮肤变厚,颜色加深,更加松弛并终身保持无毛状态。

2.2.2 组织学:14 日龄敲除小鼠皮肤可见毛囊上部的毛管部宽大形成椭圆囊,毛囊解体,毛球部和毛乳头滞留于真皮内(图 3 A)。1 月龄敲除小鼠皮肤小囊内含一些角质碎屑样物质,真皮层中见几排大小不等的包囊(图 3 B)。14 日龄(图 3 C)和 1 月龄(图 3 D)对照小鼠真皮中见多量发育正常的毛囊。

WT agccctgtgaacggcattgtgggacaggagcctggtacctcaccacaggatggcttgcgcatggggca  
 10# agccctgtgaacggcattgtgggacaggagcctg--acctcaccacaggatggcttgcgcatggggca (-2)

A

Mouse-10: missing 2 bases (GT)



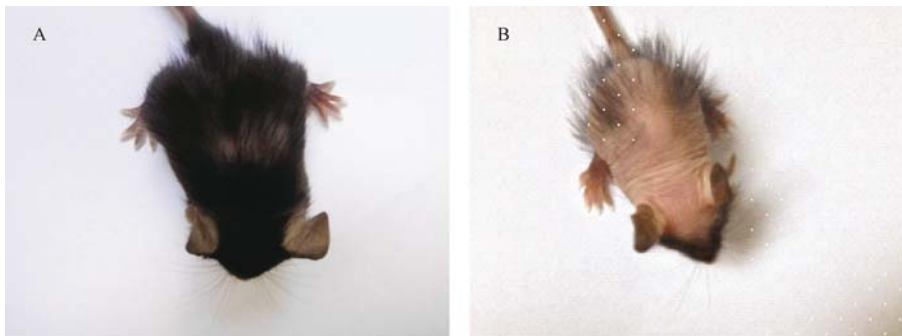
B

A: - 示碱基缺失部分; B: 上图为正常 C57BL/6J 小鼠, 下图为基因敲除小鼠; 箭头示碱基缺失位点。

图 1 测序结果序列比对图(A)和测序图(B)

A: The short dotted lines represent the knockout bases. B: Sequence comparison and sequence map of different mice. The wild-type sequence is shown at the top. The arrow shows deletion sites.

Fig. 1 Sequence comparison and sequence map



A: 14 日龄敲除小鼠全身毛发稀疏; B: 1 月龄敲除小鼠毛发基本脱净。

图 2 转基因小鼠脱毛规律及皮肤表型的变化

A: Note the sparse hair at 14 days of age. B: Hair is almost completely missing at one month of age.

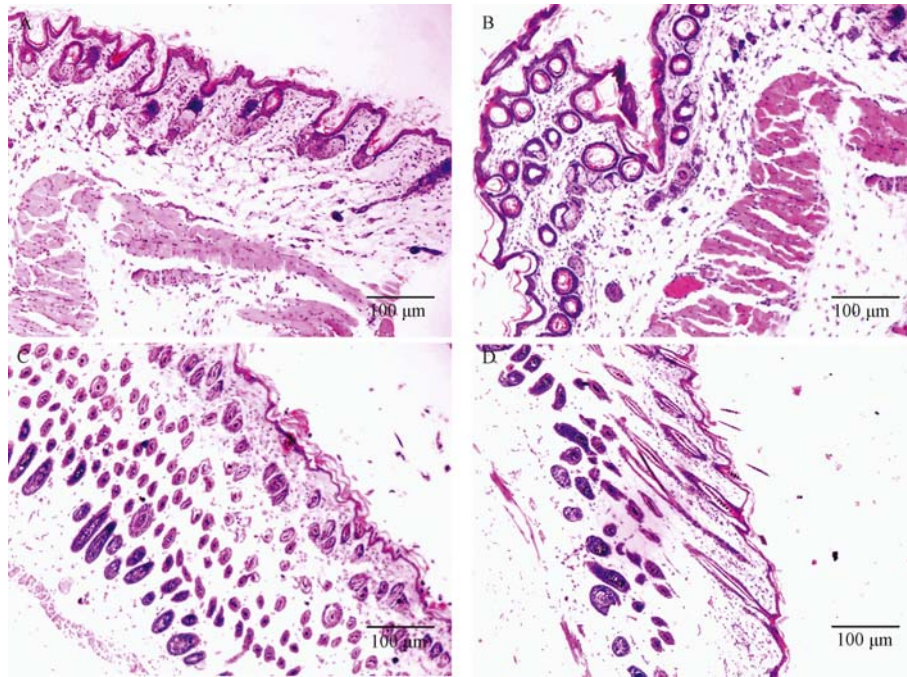
Fig. 2 Hair loss in the hr knockout mice and changes of the skin phenotype

### 3 讨论

无毛基因是一个多效基因,位点的突变,不仅造成完全和持久的无毛,而且还导致免疫与繁殖的异常(Ignatieva et al, 1988)、淋巴瘤易感性的增高(Meier et al, 1969)、二噁英毒性敏感性的增加等<sup>[6]</sup>。到目前为止,无毛基因已发现了 16 个等位基因,如 hairless (*hr<sup>hr</sup>*) 突变、rhino (*hr<sup>rh</sup>*) 突变、*Hrrh-J* 突变、*Hrrh-R* 突变等。不同等位基因间即具有共同特征,如程序化的脱毛方式,皮肤皱褶,育仔困难,免疫受损,真皮包囊出现等<sup>[7]</sup>。目前,通过建立转基因

动物模型来研究基因的生物学功能,已越来越普遍地被研究者所接受<sup>[8]</sup>。基因敲除是证明基因功能不可缺少的逻辑环节,是研究基因功能最直接有效的方法之一。TALEN 作为一种高效的基因编辑工具,当其在基因组上产生双链断裂后,可以通过 NHEJ 修复方式产生基因敲除<sup>[9]</sup>。

课题组采用 TALENs 技术构建了 *Hr* 基因敲除小鼠,测序发现 *hr* 编码区 86 ~ 87 位共 2 个碱基的缺失,产生了 TGA 终止密码子。基因敲除小鼠生长发育观察发现,小鼠出生后 14 d 开始从头颈部、背部、尾部开始脱毛,表现为稀毛特征,最后全身脱



A: 14 日龄敲除小鼠毛囊上部的毛管部宽大形成椭圆囊。B: 1 月龄敲除小鼠真皮深层及皮下组织有几排大小不等的包裹。C: 14 日龄 C57BL/6J 小鼠毛囊。D: 1 月龄 C57BL/6J 小鼠毛囊。

图 3 基因敲除和 C57BL/6J 小鼠皮肤组织学观察 (HE, 标尺 = 100 μm)

A: The widened hair canals of upper follicle form multiple utricles in a 14-day-old *Hr* knockout mice.

B: Note the several rows of dermal cysts in a 1-month-old *Hr* knockout mouse. C: Normal hair follicles in a

14-day old control mouse. D: Hair follicles in a wild-type mouse developed normally at day 30.

Fig. 3 Histologic appearance of skin in the *Hr* knockout mice (HE, Bar = 100 μm)

净,并终生保持无毛状态。皮肤组织学观察发现毛发生长缺陷,皮肤内毛囊瓦解,并形成许多椭圆囊及真皮包裹,与无毛基因自发突变研究结果一致<sup>[10]</sup>。本研究敲除小鼠的获得说明 *Hr* 基因影响了毛囊的正常生长发育,机理可能在于基因缺失致其基因产物-无毛蛋白的丧失,无毛蛋白是一个 H3K9 去甲基化酶,可通过直接控制其靶基因,调节表皮的内稳态<sup>[11]</sup>。利用本试验建立的基因敲除小鼠模型,对深入了解 *Hr* 基因在毛发生长发育中表达调控的分子机制,鉴别控制毛发生长的关键基因并研究它的作用机制,可能为最终揭开人类脱发的奥秘,发展有效治疗药物,解决毛发再生难题提供了有价值的材料。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling [J]. *Physiol Rev*, 2001, 81: 449-494.
- [ 2 ] Porter RM. Mouse models for human hair loss disorders [J]. *J Anat*, 2003, 202: 125-131.
- [ 3 ] Jones JM, Elder JT, Simin K, et al. Insertional mutation of the hairless locus on mouse chromosome 14 [J]. *Mamm Genome*,

1990, 4(11): 639-643.

- [ 4 ] Yip L, Horev L, Sinclair R, et al. Atrichia with papular lesions: a report of three novel human hairless gene mutations and a revision of diagnostic criteria [J]. *Acta Derm Venereol*, 2008, 88: 346-349.
- [ 5 ] Benavides F, Oberyzyn TM, VanBuskirk AM, et al. The hairless mouse in skin research [J]. *J Dermatol Sci*, 2009, 53: 10-18.
- [ 6 ] Kim JE, Song D, Kim J, et al. Oral supplementation with cocoa extract reduces UVB-induced wrinkles in hairless mouse skin [J]. *J Invest Dermatol*, 2015, 11: 455-457.
- [ 7 ] 王冬平, 栾蓉晖, 李善如, 等. BALB/c 突变无毛小鼠特异性免疫功能的研究 [J]. *中国实验动物学报*, 2003, 11(1): 23-25.
- [ 8 ] 孙振红, 苗向阳, 朱瑞良, 等. 动物转基因新技术研究进展 [J]. *遗传*, 2010, 32(6): 539-547.
- [ 9 ] Miller JC, Tan S, Qiao G, et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing [J]. *Nat Biotechnol*, 2011, 29(2): 143-148.
- [ 10 ] 章金涛, 付淑莉, 王纯耀, 等. 无毛小鼠不同年龄皮肤结构的比较研究 [J]. *中国实验动物学报*, 1998, 6(1): 37-41.
- [ 11 ] Liu L, Kim H, Casta A. Hairless is a histone H3K9 demethylase [J]. *FASEB J*, 2014, 8: 1534-1542.

[ 修回日期 ] 2016-04-04