



评述

条件基因打靶技术在组织稳态研究中的应用

滕艳, 杨晓*

军事医学科学院生物工程研究所发育和疾病遗传学研究室, 北京 100071

* 联系人, E-mail: yangx@nic.bmi.ac.cn

收稿日期: 2011-07-15; 接受日期: 2011-08-28

国家自然科学基金(批准号: 30671538)资助项目

doi: 10.1360/052011-589

摘要 基因打靶技术作为最有效的定向修饰小鼠基因组的技术手段在揭示基因的生理功能、研究人类疾病的遗传机制以及寻找新的药物靶标的过程中发挥重要的作用。基于 Cre-LoxP 定位重组系统的条件基因打靶技术的发展使得基因失活可以限制在特定发育阶段的特定组织或细胞内, 这一优势使得条件基因打靶技术成为解析哺乳动物基因功能的主要研究手段。本文将主要介绍军事医学科学院在建立小鼠条件基因打靶技术平台, 以及应用这一技术研究 TGF- β /Smad 等重要信号通路在维持组织稳态和抑制疾病的生理功能和机制方面的主要进展。

关键词条件基因打靶
TGF- β /Smad 信号通路
组织稳态
疾病模型

2007 年 10 月 8 日, 美国科学家 Mario R. Capecchi 和 Oliver Smithies, 英国科学家 Martin J. Evans 因为在利用胚胎干细胞对小鼠基因进行定向修饰原理方面的系列发现分享了 2007 年诺贝尔生理学或医学奖。这些先驱者的工作直接催生了基因打靶技术, 对生命科学和医学的研究模式和总体面貌产生了深刻的影响。

基因打靶技术是在胚胎干细胞技术和同源重组技术基础之上发展起来的一种定向改变生物活体遗传信息的实验手段。基因打靶技术的发明使得研究者第一次能对关于特定基因生理功能的假设进行实验验证, 并通过基因打靶研究真正建立基因变异和疾病间的因果关系。在基因打靶技术 20 多年的发展和应用过程中, 呈现出几个明显的发展趋势: 一是通过条件基因敲除(conditional gene knockout)技术在时间和空间上对基因敲除进行调控; 二是发展满足大规模基因功能研究需要的随机基因敲除技术; 三是

通过基因敲入(knockin)技术在基因组上引入精细突变以研制精确模仿人类疾病的动物模型。基于 Cre-LoxP 定位重组系统的组织特异性条件基因敲除技术可以克服重要功能基因敲除所导致的早期致死表型, 模拟人类疾病相关的体细胞突变, 并对突变进行时空上的调控, 因此逐渐取代传统的完全基因敲除技术, 成为在生物整体水平上进行基因和基因组功能研究的主流。

我们从 20 世纪末开始建立小鼠组织特异性条件基因敲除技术平台的探索。在国内率先研制成功了 10 多种组织特异性表达 Cre 重组酶的转基因小鼠; 利用组织特异性条件基因敲除技术, 深入研究了 TGF- β /Smad 等重要信号通路在哺乳动物组织器官发育和稳态维持中的生理功能和机制; 研制了软骨瘤、骨质疏松、毛发脱落和皮肤癌、食管癌、心肌肥厚以及新生儿颅内出血的小鼠模型, 为理解多种人类疾病发生的病理过程和分子机制提供了新的理论基础。

和独特的实验模型.

1 组织特异性 Cre 重组酶转基因小鼠: 条件基因打靶技术的关键工具小鼠

Cre 重组酶属于位点特异性重组酶, 能介导 2 个 34 bp 的 LoxP 位点之间的特异性重组, 使 LoxP 位点间的序列被删除^[1]. Cre 重组酶介导的条件基因打靶通常需要两种小鼠: 一种是在特定发育阶段的特定组织或细胞中表达 Cre 重组酶的转基因小鼠; 一种是在基因组中引入 LoxP 序列的小鼠, 即靶基因或重要功能域片段被两个 LoxP 序列锚定的条件打靶小鼠. 两种小鼠杂交之后, Cre 重组酶介导的重组发生在特定的组织或细胞中, 导致这些组织或细胞中靶基因被删除, 并表现出相应的表型^[2~4].

要利用条件基因打靶技术研究基因的生理功能, 组织特异性表达 Cre 重组酶转基因小鼠的研制是至关重要的环节. 近年来, 我们自主研制了 13 种组织特异性表达 Cre 重组酶的转基因小鼠^[5~10](表 1), 包括在国内首先研制的血管内皮细胞、平滑肌细胞^[5]、心肌细胞^[6]、肺上皮细胞、胃上皮壁细胞、角质细胞^[7]、胰腺细胞、肝细胞^[8]、成骨细胞^[9]、早期成骨细胞、软骨细胞^[10]表达 Cre 重组酶的转基因小鼠.

我们在国际上首先研制了在脑血管内皮细胞中特异性表达 Cre 重组酶的转基因小鼠(SP-A-Cre). 利用表面活性蛋白 A(SP-A)启动子调控 Cre 重组酶在转

基因小鼠中的表达. 在 SP-A-Cre 转基因小鼠的脑血管内皮细胞、肺 II 型上皮细胞和腺胃上皮细胞中可以检测到 Cre 重组酶的活性. 其中脑血管内皮细胞中 Cre 重组酶的活性在胚胎期 11.5 d 就能检测到. SP-A-Cre 转基因小鼠的成功研制为研究脑血管内皮细胞的遗传控制及其在血脑屏障形成中的功能和机制奠定了基础.

我们首先报道了在终末分化的肥大型软骨细胞中特异性表达 Cre 重组酶的转基因小鼠(Col10a-Cre). 证明 X 型胶原(Col10a)启动子可调控 Cre 重组酶在含有肥大软骨细胞的组织中表达, 包括椎骨、尾骨、胫骨、桡骨和肋骨等. Col10a-Cre 转基因小鼠的成功研制为深入研究调控肥大型软骨细胞生理功能的信号通路及其分子机制提供了良好的工具小鼠.

最近, 我们报道了在胃顶细胞中特异性表达 Cre 重组酶的转基因小鼠(Capn8-Cre). 利用钙激活蛋白酶 8(Capn8)启动子成功研制了在胃黏膜层顶细胞中特异性表达 Cre 重组酶的转基因小鼠. Capn8-Cre 转基因小鼠在出生后 3 d 即可在胃黏膜层检测到 Cre 重组酶的活性. 成年 Capn8-Cre 转基因小鼠除在胃黏膜层顶细胞表达 Cre 重组酶外, 在肝细胞以及少量皮肤角质细胞也能检测到 Cre 重组酶的活性.

这些组织特异性 Cre 重组酶转基因小鼠的成功研制为系统地开展小鼠条件基因敲除研究提供了关键的工具小鼠, 同时也是进行特定细胞谱系分析的宝贵工具.

表 1 组织或细胞特异性 Cre 重组酶转基因小鼠

名称	启动子	Cre 表达的细胞特异性
SP-A-Cre	Surfactant protein A	脑血管内皮, 肺上皮
Tie2-Cre	Tie2	血管内皮
SMA-Cre	α -Smooth muscle actin	胚胎期心肌细胞, 平滑肌
MHC-Cre	α -Myosin heavy chain	心肌细胞
Capn8-Cre	Calcium activated protease 8	胃顶细胞
Atp4b-Cre	H ⁺ /K ⁺ ATPase β	胃壁细胞
K5-Cre	Keratin 5	角质细胞
Insulin-Cre	Insulin	胰腺细胞 B 细胞
Albumin-Cre	Albumin	肝细胞
OC-Cre	Osteocalcin	成骨细胞
Col1a1-Cre	Collagen I α 1	早期成骨细胞
Col2a-Cre	Collagen 2a	软骨细胞
Col10a-Cre	Collagen 10a	肥大型软骨细胞

2 TGF- β /Smad 等重要信号通路维持组织稳态和抑制疾病的生理功能和机制

稳态是一个开放复杂的系统所具备的最典型和最重要的特质。哺乳动物组织器官发育成形后并不是一成不变的,而是通过稳态维持使机体面对复杂的来自自身或者环境信号的刺激保持动态平衡。组织稳态失衡是许多疾病发生的重要原因,但对于组织稳态遗传调控机制的认识还非常有限。转化生长因子- β (TGF- β)超家族包括 TGF- β s、骨形态发生蛋白(BMPs)、生长分化因子(GDFs)、Nodal、活化素(activin)和抑制素(inhibin)等 30 多个成员,大体上可分为 TGF- β /Activin/Nodal 和 BMP/GDF/MIS(Muellerian Inhibiting Substance)2 个亚家族,具有调节细胞增殖、谱系分化、迁移、黏附和凋亡等广泛的生物学功能。这些信号分子作用于细胞膜上的 I 型和 II 型跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体复合物,导致经典的 Smad 通路被激活。首先磷酸化激活受体依赖型 Smad(R-Smad, 包括 Smad1, 2, 3, 5, 8)。其中, Smad2, 3 主要传递 TGF- β 和活化素信号, Smad1, 5, 8 主要传递 BMP 信号。R-Smad 招募通用型 Smad(Co-Smad, 即 Smad4)并与之结合形成三聚体,进入核内调节靶基因的转录。而抑制型 Smad(I-Smad, 包括 Smad6, 7)则能阻止 R-Smad 的磷酸化,或促成受体的降解,从而负向调控 Smad 通路^[11]。Smad4 分子被认为是 TGF- β 超家族信号通路的枢纽,通过阻断 Smad4 的功能即可阻断 Smad 介导的经典 TGF- β /BMP 信号通路。TGF- β /Smad 信号通路成员的突变被发现与多种人类疾病相关,包括遗传性出血性毛细血管扩张症、血管瘤等心血管系统疾病,胰腺癌、结肠癌、鳞状细胞癌等各种肿瘤,骨关节炎等骨骼系统疾病。然而,对于 TGF- β /Smad 信号通路维持组织稳态、抑制各种疾病发生的生理功能和机制的了解还十分有限。

我们利用小鼠组织特异性条件基因敲除技术,在动物整体水平上开展了系统研究,证明了 TGF- β /Smad 等重要信号通路失调导致组织稳态失衡及其与疾病发生之间的因果联系。通过系列组织特异性 Smad4 基因敲除小鼠的研制和分析,揭示了 TGF- β /Smad 信号通路维持心血管系统上皮系统和骨骼系统稳态、抑制相关疾病的生理功能。

2.1 心血管系统发育和稳态维持的遗传机理研究

心血管系统是哺乳动物机体中最早发育并行使功能的器官。心血管系统主要包括心脏、血液和血管,它通过运送营养、气体、激素以及形成细胞帮助机体维持稳态和抵御疾病。在脊椎动物胚胎发育中,心脏的发育经历新月型心、线形心管、环状心、心腔的形成,最终发育成具有两房两室的成熟心脏。心脏发育的时空顺序是通过精确地控制细胞与细胞间信号以及调节特定的基因表达来实现的。这些复杂信号通路的失调常导致先天性心脏病以及成年之后的各种心脏疾患。中国每年死于心血管疾病的人数约 250 万人,高居慢性病死亡榜首位。理解心血管系统发育的遗传机制对于提高心血管疾病诊断和风险预报的准确性、发展个性化治疗策略具有重要意义。

TGF- β 信号参与心脏形成的整个过程。TGF- β 促进心脏前体细胞的特化、并通过调节心脏特异性转录因子如 Nkx2.5, GATA-4 等的表达促进心肌细胞分化^[12,13]。TGF- β 家族分子在心脏左右不对称性发育、心脏环化以及腔室形成过程中也发挥了重要作用^[14,15]。利用 Smad5 双等位基因敲除的胚胎干细胞深入研究了 Smad5 基因在胚胎干细胞体外定向心肌细胞分化中的功能,发现 Smad5 基因缺失导致心肌细胞凋亡。为了研究 Smad4 介导的 TGF- β 信号在胚胎心脏发育过程中的作用,我们建立了胚胎心肌细胞特异性 Smad4 基因敲除小鼠,发现 Smad4 是小鼠心脏发育过程中心肌细胞增殖和分化所必需的,同时也为理解先天性心脏病发生的原因提供了新的线索。我们的研究显示,平滑肌肌动蛋白(SMA)启动子调控 Cre 重组酶在胚胎期 9.5 d 的心肌细胞中特异性表达。SMA-Cre 转基因小鼠背主动脉血管平滑肌细胞中特异性表达始于胚胎期 11.5 d,胚胎期 12.5 d 后在多种组织的平滑肌中特异性表达。SMA-Cre 介导的早期胚胎心肌细胞 Smad4 基因敲除(Smad4^{fl/fl}; SMA-Cre)导致小鼠由于严重的心脏发育缺陷死于胚胎期 12.5~15.5 d。Smad4 突变胚胎心脏的心肌细胞增殖能力明显下降,同时表现心室闭锁不全。研究结果还显示 Smad4 基因缺失导致 TGF- β /BMP 配体表达异常以及 Nkx2.5, GATA4 和 MEF2c 等心脏发育相关转录因子表达显著下降。这些结果提示在胚胎中期心肌细胞增殖的调控中存在一个 BMP 信号反馈环路。

TGF- β 信号通路在维持心脏组织稳态、调控心肌肥厚等疾病发生过程中也起着十分复杂有时甚至是

相互矛盾的作用. 我们利用出生后心肌细胞特异性表达 Cre 重组酶的转基因小鼠(α -MHC-Cre), 揭示了 Smad4 维持心脏稳态和抑制心肌肥厚的生理功能, 首先提出心肌细胞丧失对 TGF- β 的反应性是导致心肌肥厚乃至心衰的重要原因之一, 为理解心肌肥厚的病理过程提供了新的理论基础. 我们的研究显示, 大约 70% 的心肌细胞特异性 Smad4 基因敲除小鼠(Smad4^{fl/fl}; α -MHC-Cre)在出生后 5 到 12 月死亡. Smad4 基因敲除小鼠在 1 月龄开始出现心肌肥厚, 其心脏与体重、心脏与胫骨长度的比值较对照小鼠明显升高, 心肌肥厚的标志性分子的表达显著上调. 组织学分析以及分离成年小鼠心肌细胞测量结果显示 Smad4 基因敲除小鼠的心肌细胞尺寸明显增加. 利用 M 型超声和颈动脉插管检测了小鼠的心脏功能和血流动力学变化, 发现 Smad4 基因突变导致小鼠心脏收缩功能受损. 我们还检测了突变小鼠心脏中 MAPK 和 PI3K 等心肌肥厚相关信号通路中重要分子的表达, 发现 MEK1-ERK1/2 通路被激活可能是导致 Smad4 突变小鼠心肌肥厚的原因之一. 此后国际上其他研究小组也证实了一些 TGF- β 配体如生长分化因子 15 和 BMP10 均可能通过 Smad 信号通路抑制心肌细胞的肥大性生长, 进一步证明了 TGF- β /Smad 信号通路抑制心肌肥厚的生理功能^[16,17].

我们的研究还揭示了 TGF- β /Smad 信号通路在血管发育和稳态维持中的生理功能和分子机制. 血管的形成包括两个阶段: 一是血管发生(vasculogenesis), 即中胚层的非血管细胞发育为成血管母细胞、在原位分化为内皮细胞并形成初级血管网络的过程; 二是血管形成(angiogenesis), 是原始血管网络通过生长、迁移、发芽和修剪等复杂的血管重塑过程发育成具有精细复杂等级结构的血管网络的过程. 血管发育的时空顺序以及稳态维持是通过精确地控制细胞与细胞间信号以及调节特定的基因表达来实现的. 大量研究结果显示 TGF- β 超家族在血管形成的决定期和成熟阶段具有重要的多效应的功能^[18]. *Tgfb1*, *Tgfb2*, *AIK1*, *AIK2* 和 *Smad5* 基因敲除小鼠表现出血管形成障碍、周细胞和平滑肌招募和增殖缺陷, 提示 TGF- β 信号通路的成员相互协调通过类似的机制调控体内血管形成的过程^[18]. 值得注意的是, 虽然许多研究结果表明 TGF- β 超家族分子对血管形成的生理功能有重要影响, 但对它们进行的研究大多是利用体外实验和完全基因敲除小鼠完成的. 由于血管内皮细胞

发育和分化受到体内许多因子和信号通路的影响, 体外实验完全在非生理条件下进行研究, 很难完全模拟体内生理过程. 此外, 数量众多的配体和受体之间具有广泛的功能冗余和代偿. 所有这些原因导致我们对 TGF- β 超家族信号通路在血管内皮细胞发育和相关疾病中的作用和机制的认识依然不够确切.

我们在以前的研究中揭示了 Smad5 可能介导 TGF- β 信号在血管形成过程中抑制血管内皮细胞增殖、促进平滑肌细胞的分化和招募^[19]. 此后, 我们建立了国内首例血管内皮细胞特异性基因敲除小鼠(Smad4^{fl/fl}; Tie2-Cre), 揭示了 Smad4 维持胚胎血管重塑和稳态的生理功能, 为研究遗传性出血性毛细血管扩张症的病理机制提供了新型的实验模型. 内皮细胞特异性 Smad4 基因敲除导致小鼠 E 10.5 d 死于心血管发育缺陷. 突变胚胎的卵黄囊不能形成卵黄血管, 初级血管不能分支入胎盘迷路和胚胎神经管, 背主动脉缩窄破损, 心脏增大伴有小心梁的减少, 心内膜垫形成缺陷. 进一步分析证实 Smad4 突变小鼠胚胎血管内皮细胞成熟障碍, 内皮细胞之间的连接受损, 内皮细胞与其周围的间质细胞分离, 血管平滑肌细胞/周细胞形成缺陷. 荧光素酶实验证实 Smad4 缺失的内皮细胞对 TGF- β 1 和 BMP2 的反应性明显降低. 体外 Matrigel 成管实验表明 Smad4 缺失的内皮细胞体外成管能力显著下降. 分子水平上, 发现促血管生成素 2 表达上调和间隙连接分子 connexin43 表达下调与突变胚胎血管完整性下降密切相关, 提示 Smad4 通过调节促血管生成素和间隙连接分子的表达维持胚胎血管重塑和稳态.

我们的研究还揭示了 TGF- β /Smad 信号通路通过促进血管内皮细胞与周细胞相互作用维持血脑屏障功能和脑血管稳态的全新生理功能. 尽管内皮细胞在血管形成过程中起着主导的作用, 但内皮细胞也需要壁细胞的支持以完成血管重塑和成熟的过程. 内皮细胞和壁细胞间的相互作用对于血管的正常发育和稳态维持至关重要, 相互作用的异常与严重的血管疾病密切相关. 以脑血管为例, 脑血管内皮细胞间具有复杂的紧密连接, 是血脑屏障的有效组成部分. 与其他组织相比, 脑血管内皮具有更高的周细胞覆盖率. 这些特征都使得脑血管内皮较外周组织血管内皮具有不同的特质, 使其足以胜任中枢神经系统的功能需要. 直到最近, 利用 *Pdgfrb* 基因敲除导致周细胞缺如的小鼠才证实了周细胞对于血脑屏障功

能的调节具有无可取代的重要生理作用^[20]。我们最近报道了国际上首例脑血管内皮细胞特异性基因敲除小鼠。通过对脑血管内皮细胞特异性 *Smad4* 基因敲除小鼠(*Smad4^{fl/fl}*; SP-A-Cre)的表型分析,发现脑血管内皮细胞 *Smad4* 突变小鼠重现了人类新生儿颅内出血的主要病理改变,包括血管扩张、血管瘤形成、以及以脑室出血为特征的血管完整性缺陷。组织学分析显示脑血管的周细胞与内皮细胞不能紧密接触,造成血管扩张和血管瘤的形成。我们分别采用了2个体外的共培养实验进一步评价 *Smad4* 基因敲除内皮细胞与周细胞间的相互作用。体外血脑屏障模型显示在与周细胞共培养时, *Smad4* 突变内皮细胞的通透性较对照显著升高;三维成管实验也显示 *Smad4* 突变内皮细胞和周细胞不能相互作用形成管状结构。应用体外生化等方法阐明了一种脑血管完整性维持的全新分子机制:内皮细胞 *Smad4* 信号通过与 Notch 信号协同上调黏附分子 N-cadherin 表达来稳定脑血管内皮细胞与周细胞的相互作用,从而维持小鼠脑血管的完整性。这一发现首先阐明了脑血管内皮细胞与周细胞相互作用维持血脑屏障和脑血管稳态的重要生理功能及其调控机制,为理解新生儿颅内出血和成人脑中风的发生机制提供了全新的理论基础和独特的小鼠模型。

2.2 上皮系统稳态维持的遗传机理研究

鳞状细胞癌是最常见的恶性上皮性肿瘤,常发生在皮肤、口腔、食管等处。中国是食管癌高发区,平均每年的死亡人数约为15万人。95%以上的食管癌病理分型为鳞状细胞癌,少部分为腺癌。鳞状细胞癌的恶性程度与临床治疗和预后密切相关。深入研究鳞状细胞癌发生的病理过程及其分子机制对于鳞状细胞癌的早期诊断和治疗具有重要的意义。

上皮组织稳态的维持有赖于组织干细胞的自我更新和动员、临时增殖细胞的有限增殖和有序分化。我们通过不同类型组织特异性基因敲除小鼠的研制和分析,揭示了 TGF- β /Smad 和 PTEN/Akt 信号通路抑制组织干细胞过度动员、抑制细胞增殖、促进终末分化,从而抑制鳞状细胞癌发生的重要生理功能。我们首先报道了角质细胞特异性 *Smad4* 基因敲除小鼠(*Smad4^{fl/fl}*; K5-Cre)的研制和鉴定,这也是国内首例角质细胞特异性基因敲除小鼠。角质细胞特异性 *Smad4* 基因敲除小鼠发生进行性毛发脱落和皮肤癌,

显示 *Smad4* 介导的 TGF- β 信号在维持毛囊周期循环和抑制皮肤癌发生过程中具有重要的生理功能。进一步研究发现 *Smad4* 介导的 TGF- β 信号通过诱导角质细胞凋亡促使毛囊周期进入退化期,并通过下调 cyclinD1 和上调细胞周期抑制蛋白抑制角质细胞的增殖和皮肤鳞状细胞癌的发生。此外,我们最近的研究还证明成牙本质细胞中的 *Smad4* 可通过非细胞自主性机制抑制角质细胞增殖和牙源性角化囊性瘤发生,揭示了牙源性角化囊性瘤发生的新的分子机制,为该病的治疗提供了新的思路。

我们的研究还发现 *Smad4* 通过调节毛囊干细胞动员和自我更新而维持上皮稳态和抑制鳞状细胞癌发生的生理功能。毛囊干细胞位于毛囊隆突部位,在毛囊周期中能够产生毛囊及其附属结构,在创伤愈合过程中能够产生毛囊间表皮。毛囊干细胞的活化和自我更新受到严格调控从而维持毛囊和表皮的组织稳态。我们的研究表明,角质细胞 *Smad4* 基因敲除将导致毛囊干细胞过度动员,引起毛囊、皮脂腺的异常增生。毛囊干细胞的过度动员最终导致干细胞耗竭,表现为 BrdU 标记滞留细胞的丢失、干细胞标记分子角蛋白 15 和 CD34 表达的降低以及 *Smad4* 突变角质细胞的克隆形成能力显著降低。进一步研究显示核内 β -catenin 的增加以及 c-Myc 表达的升高可能与毛囊干细胞的过度动员相关。这一研究首先揭示了 *Smad4* 通过调节毛囊干细胞动员和自我更新而维持上皮稳态和抑制鳞状细胞癌发生的生理功能。

利用条件基因敲除技术研制双基因或者多基因敲除小鼠是研究不同信号通路间的相互作用及其生物学效应的有效手段。许多生长因子和激素可通过激活 PI3K 信号通路调节细胞的增殖、凋亡和迁移,肿瘤抑制基因 *PTEN* 作为磷酸酯酶可使 PI(3,4,5)P3 的 3 位去磷酸化变成 PI(4,5)P2 从而抑制 PI3K 信号通路。以前的研究显示 *PTEN* 可以抑制角质细胞的增殖和分化。为了探索 *Smad4* 介导的 TGF- β 信号和 *PTEN* 信号通路是否存在相互作用,我们在国际上首先报道了角质细胞特异性 *Smad4* 和 *PTEN* 双基因敲除小鼠的研制和鉴定。100%的双基因敲除突变小鼠在出生后2个月内前胃发生侵袭性鳞状细胞癌,显示 *Smad4* 介导的 TGF- β 信号和 *PTEN* 信号通路可以协同抑制角质细胞的增殖和鳞状细胞癌发生。在分子水平上,我们发现双基因敲除突变小鼠肿瘤发生加速与细胞周期抑制分子 p27, p21 和 p16 表达显著下降,以及细胞

周期蛋白 cyclin D1 过表达有关. 我们的研究提供了关键的实验证据首次证实 *Smad4* 和 *PTEN* 通过协同调节细胞周期相关分子的表达抑制皮肤角质细胞的增殖以及皮肤癌和食管癌发生的功能. *Smad4* 和 *PTEN* 双基因敲除小鼠被作为两种能模拟人类食管癌发生病理过程的遗传修饰小鼠之一被同行关注和评述^[21], 随后的大量研究显示 *Smad4* 和 *PTEN* 协同抑制细胞增殖和肿瘤发生具有普适性^[22-24].

2.3 骨骼系统稳态维持的遗传机理研究

骨骼的形成包括软骨内成骨和膜内成骨两种方式. 骨骼的正常发育和稳态维持涉及发育过程中的图式形成、细胞分化和骨重塑等生物学过程, 其发育异常可导致许多骨骼系统疾病如骨质疏松和骨关节炎等, 深入研究骨骼发育的分子机制对于这些疾病的早期诊断、预防及治疗具有重要的意义.

我们通过软骨细胞特异性基因敲除小鼠的研制和分析, 揭示了 *TGF- β /Smad* 和 *PTEN/Akt* 信号通路调节软骨细胞增殖和分化、抑制软骨瘤发生的生理功能. 骨骼系统是体内 *TGF- β s*, *BMPs* 储量最高的器官. 软骨细胞表达各种类型的 *TGF- β s*, *BMPs* 分子以及它们的受体和 *Smads* 分子. 此前的研究显示, *Smad3* 基因敲除导致小鼠罹患骨关节炎, 证实 *Smad3* 介导的 *TGF- β* 信号抑制生长板和关节软骨细胞的肥大分化. 此后, 我们在国际上首先报道 *Smad3* 基因突变可能与人类骨关节炎相关, 最近的研究证实 *Smad3* 突变与人类早发性骨关节炎相关^[25]. 为了进一步深入理解 *TGF- β /Smad* 信号调节软骨细胞增殖和分化的生理功能, 我们研制了软骨细胞特异性 *Smad4* 基因敲除小鼠, 这也是国内首例软骨细胞特异性基因敲除小鼠. 系统的组织学分析显示软骨细胞 *Smad4* 基因敲除导致小鼠体型矮小和软骨组织骨化延迟, 并影响了软骨细胞的增殖、分化和凋亡, 引起生长板软骨组织结构紊乱, 显示 *Smad4* 分子介导的信号可能作为形态发生素(morphogen)指导软骨细胞沿着骨骼长轴顺序分化. 在分子水平上证实 *Smad4* 基因敲除引起生长板软骨细胞肥大分化提前, 且诱导毗邻的软骨膜细胞分化为成骨细胞. 原位杂交和免疫组化结果显示 *Ihh* 分子及其受体 *Ptc1* 和 *PTHrP* 分子及其受体 *PPR* 在基因敲除小鼠中的表达明显降低. 小鼠距骨体外培养实验结果表明, *Smad4* 基因敲除后软骨细胞失去了对 *BMP* 和 *TGF- β* 分子调节软骨细胞肥大分化

的反应性, 而 *Shh* 可以抑制对照和 *Smad4* 基因敲除距骨的肥大分化, 表明 *Ihh* 分子调节 *PTHrP* 分子的表达可能是通过 *Smad4* 分子非依赖的信号通路.

我们还发现 *PTEN* 通过缺氧诱导因子 *1 α* (*HIF1 α*) 途径调节软骨细胞对缺氧应激的适应性, 并首次证明了内质网应激失调和软骨肿瘤发生间的必然联系. 研究结果显示, 软骨细胞 *PTEN* 基因敲除导致 *AKT* 活化, 并使突变小鼠表现出类似人类内生性软骨瘤的软骨发育障碍. 起源于 *PTEN* 基因敲除静息软骨细胞的软骨肿瘤“瘤核”增殖和分化能力受损, 并伴随内质网应激增强. 进一步研究显示, *PTEN* 基因敲除软骨细胞中内质网应激仅在缺氧应激条件下发生, 表现为内质网肿胀、非折叠蛋白反应相关基因表达上调. 在 *PTEN* 基因敲除生长板和培养软骨细胞中观察到内质网应激可以导致 *HIF1 α* 及其下游靶分子表达上调, 提示 *PI3K/AKT* 信号通路通过 *HIF1 α* 途径调节软骨细胞对缺氧应激的适应性. 这些结果证明软骨细胞 *PTEN* 是调节软骨细胞适应应激和抑制软骨肿瘤发生所必需的.

通过对成骨细胞特异性 *Smad4* 基因敲除小鼠 (*Smad4^{fl/fl};OC-Cre*) 的表型分析, 我们首次提供了遗传学上的证据证明 *Smad4* 在出生后小鼠骨重建和骨组织稳态的维持过程中具有重要的功能. 研究结果证实 *Smad4* 基因缺失会导致成骨细胞骨形成速率和功能下降、以及骨钙素、I 型胶原、碱性磷酸酶和 *Runx2* 等重要成骨细胞分子标记物和调节分子表达下调, 最终导致骨质疏松. 我们的结果还揭示了 *Smad4* 基因缺失导致的成骨细胞功能失调可能通过下调 *TGF- β 1* 和改变 *RANKL/OPG* 调控轴分子表达的比例, 从而使 7 月龄后的突变小鼠小梁骨密度回升. 这些结果揭示了成骨细胞 *Smad4* 在调节出生后骨形成以及破骨细胞分化和骨吸收过程中的重要作用及其可能机制. 此外, 通过成骨细胞特异性 *Gab1* 条件基因敲除小鼠的研制和分析, 揭示了成骨细胞中的锚定蛋白 *Gab1* 介导胰岛素、*IGF-1* 等生长因子信号调节骨代谢稳态和抑制骨质疏松的生理功能.

3 结语

综上所述, 我们利用小鼠组织特异性条件基因敲除技术, 系统地研究了 *TGF- β /Smad* 等重要信号通路通过调节组织干细胞动员和自我更新、抑制临时增

殖细胞的增殖、促进细胞分化、维持终末分化细胞稳态, 从而抑制相关系统疾病的重要而广泛的生理功能, 在 TGF- β /Smad4 和 PTEN/Akt 信号通路维持组织稳态的机制方面有系列的新发现. 将基因芯片和蛋白质组学等高通量研究技术和模式动物遗传修饰技术结合起来, 可以提供一个非常有效的生物整体系统解析基因和蛋白质在正常生理过程和相关病理过程中的作用和机制. 结合体外生化和生理学研究手段, 有助于阐明相关疾病的发生机理以及寻找新的

药物靶标, 为今后的疾病个性化治疗提供理论基础. 我们近期的研究揭示了受 TGF- β 信号通路调节的 miRNA 促进成肌分化和心肌肥厚的生理功能和机制, 为深入理解 TGF- β 信号维持组织稳态的生理功能提供了一种新的表观遗传机制. 未来的研究还将通过转基因和基因敲除技术, 在动物整体水平上深入研究受 TGF- β 等重要信号通路调节的 miRNA 的生理功能, 为在表观遗传层面上理解 TGF- β 等重要信号通路维持组织稳态和抑制疾病的机制提供新的线索.

参考文献

- 1 Nagy A. Cre recombinase: The universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 2000, 26: 99–109
- 2 Gu H, Marth J D, Orban Pr C, et al. Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science*, 1994, 265: 103–106
- 3 Lakso M, Sauer B, Mosinger B, et al. Targeted oncogene activation by site-specific recombination in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 6232–6236
- 4 Rajewsky K, Gu H, Kuhn R, et al. Conditional gene targeting. *J Clin Invest*, 1996, 98: 600–603
- 5 杨蕾蕾, 吴壮, 程萱, 等. 平滑肌细胞特异表达 Cre 重组酶转基因小鼠的建立. *军事医学科学院院刊*, 2005, 29: 219–222
- 6 王剑, 张莉, 毛春明, 等. 心脏组织特异性表达 Cre 重组酶转基因小鼠的建立. *军事医学科学院院刊*, 2005, 29: 38–40
- 7 毛春明, 杨晓, 程萱, 等. 角质细胞特异性表达 Cre 重组酶转基因小鼠的建立. *遗传学报*, 2003, 30: 407–413
- 8 王友亮, 程萱, 崔芳, 等. 肝细胞组织特异性表达 Cre 重组酶转基因小鼠的建立. *中华肝脏病杂志*, 2004, 12: 163–166
- 9 程萱, 翁土军, 谭晓红, 等. 成骨细胞特异性表达 Cre 重组酶转基因小鼠的建立. *遗传*, 2007, 29: 1237–1242
- 10 郝振明, 杨晓, 程萱, 等. 软骨组织特异性表达 Cre 重组酶转基因小鼠的研制和鉴定. *遗传学报*, 2002, 29: 424–429
- 11 Derynck R, Zhang Y E. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature*, 2003, 425: 577–584
- 12 Gausson V, Van de Putte T, Mishina Y, et al. Endocardial cushion and myocardial defects after cardiac myocyte-specific conditional deletion of the bone morphogenetic protein receptor ALK3. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99: 2878–2883
- 13 Monzen K, Shiojima I, Hiroi Y, et al. Bone morphogenetic proteins induce cardiomyocyte differentiation through the mitogen-activated protein kinase kinase kinase TAK1 and cardiac transcription factors Csx/Nkx-2.5 and GATA-4. *Mol Cell Biol*, 1999, 19: 7096–7105
- 14 Hamada H, Meno C, Watanabe D, et al. Establishment of vertebrate left-right asymmetry. *Nat Rev Genet*, 2002, 3: 103–113
- 15 Mikhailov A T, Torrado M. Shaping the Heart in Development and Disease. *Kerala: Transworld Research Network*, 2010. 117–144
- 16 Xu J, Kimball T R, Lorenz J N, et al. GDF15/MIC-1 functions as a protective and antihypertrophic factor released from the myocardium in association with SMAD protein activation. *Circ Res*, 2006, 98: 342–350
- 17 Chen H, Yong W, Ren S, et al. Overexpression of bone morphogenetic protein 10 in myocardium disrupts cardiac postnatal hypertrophic growth. *J Biol Chem*, 2006, 281: 27481–27491
- 18 Pardali E, Goumans M J, ten Dijke P. Signaling by members of the TGF-beta family in vascular morphogenesis and disease. *Trends Cell Biol*, 2010, 20: 556–567
- 19 Yang X, Castilla L H, Xu X, et al. Angiogenesis defects and mesenchymal apoptosis in mice lacking SMAD5. *Development*, 1999, 126: 1571–1580
- 20 Daneman R, Zhou L, Kebede A A, et al. Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis. *Nature*, 2010, 468: 562–566
- 21 Frese K K, Tuveson D A. Maximizing mouse cancer models. *Nat Rev Cancer*, 2007, 7: 645–658
- 22 Ding Z, Wu C J, Chu G C, et al. SMAD4-dependent barrier constrains prostate cancer growth and metastatic progression. *Nature*, 2011, 470: 269–273
- 23 Xu X, Ehdai B, Ohara N, et al. Synergistic action of Smad4 and Pten in suppressing pancreatic ductal adenocarcinoma formation in mice. *Oncogene*, 2010, 29: 674–686
- 24 Xu X, Kobayashi S, Qiao W, et al. Induction of intrahepatic cholangiocellular carcinoma by liver-specific disruption of Smad4 and Pten in mice. *J Clin Invest*, 2006, 116: 1843–1852
- 25 van de Laar I M, Oldenburg R A, Pals G, et al. Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet*, 2011, 43: 121–126