

# 利用 CRISPR/Cas9 系统构建 *FGF21* 基因敲除小鼠模型

刘旭, 张平, 张晓枫, 李兴, 白宇, 贾克荣, 郭晓东, 张豪, 马晓燕, 仓明, 刘东军, 郭旭东

内蒙古大学生命科学学院, 实验动物研究中心, 呼和浩特 010070

**摘要:** 成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)是细胞间的多功能信号分子, 调节生物体的多种生理功能。*FGF21* 作为一种重要的调控因子, 对毛囊发育及生长周期具有重要作用。为研究 *FGF21* 基因对毛囊发育及生长周期的影响及作用机制, 本研究通过构建靶向敲除 *FGF21* 基因的载体, 体外将 Cas9 mRNA 和 gRNA 显微注射到 FVB 小鼠受精卵中, 在小鼠 *FGF21* 基因的第 1 外显子上造成移码突变, 从而获得 *FGF21* 基因敲除(knock out, KO)小鼠。通过测序鉴定  $F_0$  代小鼠基因型, 共获得 3 只 *FGF21* 等位基因敲除小鼠(*Fgf21*<sup>-/-</sup>); qRT-PCR 和 Western blotting 结果表明, 在 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠中未检测到 *FGF21* mRNA 表达和 FGF21 蛋白表达; 经脱毛再生及皮肤组织 H&E 染色发现, 与野生型(wild type, WT)小鼠相比, *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠体重降低、器官组织未出现异常变化、毛发生长速度减慢、毛囊的直径和毛发的密度均减小。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠模型, 为后续研究 *FGF21* 基因在毛囊发育及生长周期中的功能提供了更好的动物模型。

**关键词:** *FGF21*; CRISPR/Cas9; *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠; 毛囊

## Construction of *FGF21* knockout mouse models by the CRISPR/Cas9 system

Xu Liu, Ping Zhang, Xiaofeng Zhang, Xing Li, Yu Bai, Kerong Jia, Xiaodong Guo, Hao Zhang, Xiaoyan Ma, Ming Cang, Dongjun Liu, Xudong Guo

The Research Center for Laboratory Animal Science, College of Life Science, Inner Mongolia University, Hohhot 010070, China

**Abstract:** Fibroblast growth factors (FGFs) are multifunctional signal molecules between cells, regulating the various physiological functions of the organism. FGF21 is a regulatory factor of the FGF family and has been postulated to play important roles in hair follicle development and hair follicle growth cycle. To evaluate the roles of *FGF21*, we had established a *FGF21* knockout mouse model, using the CRISPR/Cas9 technology. We had constructed a *FGF21* targeting vector and microinjected it with Cas9 mRNA and gRNA into fertilized ova of FVB mice. The gRNA was designed to target the exon 1 of the endogenous mouse *FGF21* gene. Three lines of *Fgf21*<sup>-/-</sup> mice were obtained from these experiments,

收稿日期: 2017-05-16; 修回日期: 2017-12-22

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(编号: 2013AA102506)和国家自然科学基金项目(编号: 31160228)资助[Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No.2013AA102506) and the National Natural Science Foundation of China (No.31160228)]

作者简介: 刘旭, 硕士, 专业方向: 生殖生物学与生物技术。E-mail: xuliu2016@163.com

通讯作者: 郭旭东, 副研究员, 研究方向: 分子生物学和生殖生物学。E-mail: xudguo@163.com

DOI: 10.16288/j.ycz.17-011

网络出版时间: 2017/12/27 9:53:06

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20171227.0952.004.html>

and confirmed to harbor *Fgf21*<sup>-/-</sup> genotypes and null expression phenotype, using DNA sequencing, qRT-PCR and Western blotting. *FGF21* mRNA and FGF21 protein were not detected in tissues of these *Fgf21*<sup>-/-</sup> mice. Depilation and histochemistry analyses showed that the *Fgf21*<sup>-/-</sup> mice had lower body weight, slower hair regrowth and poorer hair quantities and smaller hair follicles diameters, as compared to WT mice. The *Fgf21*<sup>-/-</sup> mice reported here could provide a useful genetic model for future studies of *FGF21* functions in hair follicle development and hair follicle growth cycle.

**Keywords:** *FGF21*; CRISPR/Cas9; *Fgf21*<sup>-/-</sup> mice; hair follicle

成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)是一类小型肽类分子,在生长、发育、性别决定与分化等生物学过程中发挥重要作用<sup>[1,2]</sup>。研究发现,脊椎动物 FGF 家族包括 7 个亚家族,分别是 FGF1/2、FGF4/5/6、FGF3/7/10/22、FGF8/17/18、FGF9/16/20、FGF11/12/13/14 和 FGF19/21/23。FGF 家族成员多数需要与细胞表面的酪氨酸激酶 FGF 受体(fibroblast growth factor receptors, FGFRs)和肝素共结合后发挥其生物学功能<sup>[3]</sup>。但 FGF19/FGF21/FGF23 亚家族缺少肝素结合区域,且需要与 KLB (beta Klotho)结合形成共同复合体从而激活 FGFR 信号<sup>[4]</sup>。研究证明,FGF21 的 C 末端、N 末端与其生物活性密切相关:首先 FGF21 的 C 末端与 KLB 的跨膜蛋白结合,随后 N 末端与 FGFR 结合,形成稳定的 FGF21/KLB/FGFR 复合体,从而激活下游信号分子发挥其生物学效应<sup>[5,6]</sup>。小鼠(*Mus musculus*) *Fgf21* 蛋白由 210 个氨基酸组成,氨基末端含有一段由 30 个氨基酸组成的典型信号肽序列<sup>[7]</sup>。Li 等<sup>[8]</sup>研究发现,人 FGF21 编码基因与小鼠序列相似性约为 75%。FGF21 作为一种重要的调控因子,在脂肪、肝脏、脑和胰脏等组织的代谢调节、临床药理和生物免疫等方面发挥重要作用,但其作用机制还未被完全阐明。

目前,有关 FGFs 在毛囊生长发育及调控机理方面的研究越来越广泛。研究证明,凝集性生长的乳头细胞促进毛母质细胞增殖角化可能与 *FGF7* 有关<sup>[9]</sup>; *FGF5* 对毛囊生长发育、绒毛密度、绒毛长度有一定的调控作用<sup>[5]</sup>; *FGF10*、*FGF8* 和 *FGFR3* 的 mRNA 和蛋白水平在毛囊生长发育的不同部位与不同时期存在差异表达<sup>[10]</sup>,表明它们可能与毛囊的生长发育具有一定的关系,并在不同水平发挥调控作用。此外,临床研究发现,*FGF7* 与 *FGF2* 有可能参与了雄激素性脱发(androgenetic alopecia, AGA)<sup>[11]</sup>,

为进一步深入研究 *FGF7* 和 *FGF2* 对毛囊生长发育的调控作用提供了线索。这些研究结果为解析 FGFs 基因调控毛囊生长发育的分子机制奠定了基础,也为临床上毛囊再生研究与动物绒、毛候选基因的筛选提供了思路。*FGF21* 作为 FGF 家族的一员,Dong 等<sup>[12]</sup>通过生物信息学手段预测其对毛囊的生长发育及相关因子的调控也有重要的影响,但并未得到具体的实验证实。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建了小鼠 *FGF21* 基因敲除载体,并快速建立了 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠模型,为后续研究 *FGF21* 在毛囊发育及生长周期中的功能提供了更好的动物模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

本研究所用小鼠品系为 FVB,该品系源自远交系 Swiss 鼠,是在美国 NIH (National Institutes of Health, NIH)选育得到的 Fv1b(易发 B 型白血病)同型合子近交系。动物实验符合内蒙古大学动物伦理委员会的规定并被授权。小鼠胎儿成纤维细胞和 *E. coli* 感受态细胞由本实验室保存。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 gRNA 设计和 CRISPR/Cas9 系统载体制备

靶位点的选择是基因敲除的关键,通过序列的突变而造成基因功能的缺失。*FGF21* 基因位于 7 号染色体上,包含 3 个外显子。根据 gRNA 靶基因的设计原则,本研究在小鼠 *FGF21* 基因(Gene ID: 56636)第 1 外显子(185~422)设计靶位点,利用美国麻省理工学院 CRISPR Design 软件(<http://crispr.mit.edu/>)设计筛选得到 4 个 gRNA,分别为:

*FGF21-1*(217~236): 5'-GCAGTCGGACCCAC-

AGTCCCC-3' ;

*FGF21*-2(306~325) : 5'-TTGGGGGTCAAGTC-CGGCA-3' ;

*FGF21*-3(304~323) : 5'-GCCGGACTTGACCC-CCAAAC-3' ;

*FGF21*-4(253~272) : 5'-GATGCTTGGTAGAC-CCCCAG-3'.

将 4 个 gRNA 与对应的互补序列分别加上与 *Bbs* I 酶切 CRISPR/Cas 骨架质粒互补的粘性末端, 合成对应的 Oligo<sup>[13]</sup>. 合成条件为: 95℃ 3 min, 缓慢冷却至 25℃(-1℃/20 s), 16℃ 20 min. 将合成的 gRNA 单链复性形成的双链与线性化的 CRISPR/Cas 骨架进行连接, 连接产物加入 *E. coli* 感受态细胞, 经转化、涂板, 并于 37℃ 恒温倒置过夜. 次日, 挑取单菌落, 进行菌液 PCR, 经琼脂糖凝胶电泳检测, 确定为阳性细菌后进行测序. 测序正确的样品继续摇菌, 37℃、220 r/min 恒温摇床培养过夜, 提取质粒后分别命名为 *FGF21*-gRNAN(N=1~4) 和 hCas9.

#### 1.2.2 在细胞水平上利用 Surveyor 突变检测试剂盒检测 *FGF21* 敲除效率

将 *FGF21*-gRNAN 和 hCas9 质粒转染至汇合度达到 60%~80% ( $8 \times 10^6$ ) 的小鼠胎儿成纤维细胞, 2 d 后提取细胞基因组 DNA. 按照 Surveyor 突变检测试剂盒(日本 TRANSGEMIC 公司)说明书, 分别加入 1  $\mu$ L Surveyor Nuclease S、1  $\mu$ L Surveyor Enhancer S、0.15 mol/L  $MgCl_2$  3  $\mu$ L 和 20  $\mu$ L DNA, 混匀后 42℃ 放置 1 h, 加入 1/10 体积的终止液混匀后用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测.

#### 1.2.3 Cas9/gRNA 体外转录

通过 *Xba* I 内切酶线性化 hCas9 质粒获得 Cas9 mRNA 体外转录模板, 用 mMESSAGE mMACHINE®T7 Ultra Kit(美国 Life Technologies 公司)体外转录 Cas9 mRNA, MEGAclear™ Kit 纯化回收 Cas9 mRNA 并进行电泳检测. 以 *FGF21*-F1 和 *FGF21*-R1 为引物(引物序列见表 1)扩增 *FGF21*-gRNA 质粒, 得到 *FGF21*-gRNA 体外转录模板. 扩增程序: 94 预变性 5 min; 94 变性 30 s, 56 复性 30 s, 72 延伸 50 s, 共 35 个循环; 最后再 72 延伸 10 min,

表 1 引物信息

Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')
FGF21-F1	GTCCTGCCAAGTGTGTCAAATA
FGF21-R1	GGACCACAGAAAGAGACTCACCG
FGF21-F2	TACTCCCATCTGGAGGACCC
FGF21-R2	CACAAAGGTATGAGGGCGGA
gRNA-5'R	TGTACAAAAAAGCAGGCTTTAAAG
gRNA-3'F	CGGTGTTTCGTCCTTTCCACAAGA
gRNA-F	GTTTATAGAGCTAGAAATAGCAAG
gRNA-R	TAATGCCAACTTTGTACAAGAAAG
GAPDH-F	CACGATGGAGGGGCCGACTCATC
GAPDH-R	TAAAGACCTCTATGCCAACACAGT

16 保温. 使用 MEGAshortscript™ Kit 体外转录 *FGF21*-gRNA, 使用 MEGAclear™ Kit 纯化回收得到 *FGF21*-gRNA 并进行电泳检测.

#### 1.2.4 小鼠受精卵显微注射

根据文献<sup>[14,15]</sup>将体外转录好的 *FGF21*-gRNA 和 Cas9 mRNA 混合: 取 25 ng/ $\mu$ L *FGF21*-gRNA 20  $\mu$ L 和 100 ng/ $\mu$ L Cas9 mRNA 10  $\mu$ L 混匀, 加入 3 mol/L 乙酸钠 3  $\mu$ L, pH 值调至 5.2, 用无水乙醇沉淀后再用无酶水重悬. 通过显微注射法将混合物注射到小鼠受精卵胞质中, 将存活的受精卵移植到假孕受体母鼠内, 至母鼠生产获得首建鼠 F<sub>0</sub> 代.

#### 1.2.5 基因型鉴定

受精卵移植的假孕母鼠单笼饲养 20 d 后, 观察乳鼠出生情况. 剪取长至 1 周后 F<sub>0</sub> 代小鼠尾尖组织 1 cm, 提取基因组 DNA. 在 *FGF21* 基因靶向区域使用 *FGF21*-F1 和 *FGF21*-R1 引物(引物序列见表 1)进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物进行测序鉴定 F<sub>0</sub> 代小鼠基因型.

#### 1.2.6 qRT-PCR 和 Western blotting 验证

取野生型(WT)和 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠的皮肤组织提取总 RNA, 经逆转录得到 cDNA. 利用引物 *FGF21*-F2 和 *FGF21*-R2(引物序列见表 1)进行 qRT-PCR, 以 *GAPDH* 为内参基因, 检测 *FGF21* mRNA 的表达情况. PCR 扩增条件为: 95 5 min; 95 30 s, 54 30 s, 72 30 s, 45 个循环; 72 10 min, 4 保

存。PCR 产物用 2% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

取 WT 和 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠的背部皮肤组织, 在含有蛋白酶抑制剂的匀浆中提取总蛋白, 经十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)分离。用含 5% 奶粉的磷酸缓冲液(phosphate buffer solution, PBS)的封闭液室温放置 1 h, 经 FGF21 抗体(ab644857, 上海艾博抗贸易有限公司)4 ℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次, 羊抗兔二抗(ab6721, 上海艾博抗贸易有限公司)室温孵育 1 h, TBST 洗 3 次, 经 ECL 显影液在化学发光仪中显影成像, 检测 FGF21 蛋白表达情况。

### 1.2.7 *FGF21* 组织表达谱和 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠表型分析

取 WT 小鼠脑、心脏、肝脏、脾脏、肺、肾脏、胰脏、胸腺、胆囊、睾丸、卵巢、脂肪和肌肉组织各 120 mg, 分别剪碎后放于 1.2 mL TRIzol (TaKaRa 公司)中, 用酚/氯仿抽提各种组织的 RNA 并溶于焦碳酸二乙酯(Diethylpyrocarbonate, DEPC)水中。以 RNA 为模板, 根据 PrimeScript™ RT-PCR Kit 说明书, 用逆转录酶(大连 TaKaRa 公司)逆转录成 cDNA, 利用引物 FGF21-F2 和 FGF21-R2(引物序列见表 1)进行 qRT-PCR, 分析 *FGF21* 在 WT 小鼠各种组织中的表达情况。利用 *GAPDH*(引物序列见表 1)作为内参基因, 使用  $\Delta\Delta C_t$  方法计算 *FGF21* 的相对表达量, 实验均重复 3 次。

定期观察 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠的生长状况, 取性别相同、8 周龄的 WT 和 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠称量体重并统计, 分别取对照组(同窝 WT 小鼠)和 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠各 3 只解剖观察比较器官组织生理情况。

### 1.2.8 人工脱毛诱导毛发进入生长期

小鼠的毛发生长周期约为 17~19 d, 包括生长期、退行期和静止期<sup>[2]</sup>。6~10 周龄的小鼠毛发均已进入静止期, 通过人工脱毛处理可诱导小鼠毛发从静止期进入生长期<sup>[3]</sup>。待 WT 和 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠长至 6~10 周龄后, 将蜡和松香按 1:1 混合加热至融化后, 用玻璃棒涂抹于小鼠背部皮肤, 待混合物凝固后, 用镊子逆着小鼠毛发生长的方向脱毛处理, 实时监测毛发再生速度。

### 1.2.9 石蜡切片及染色

取小鼠脱毛后长毛程度相同的 WT 和 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠皮肤组织, 经 4% 多聚甲醛固定 24 h, 流水冲洗 24 h, 无水乙醇脱水 3 h, 二甲苯透明 1 h 处理后用石蜡包埋, 并用石蜡切片机(德国 Leica 公司)切成 6  $\mu$ m 厚的组织切片, 进行 H&E(hematoxylin-eosin staining)染色, 用中性树胶封片, 显微镜观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 gRNA 表达载体的构建

#### 2.1.1 gRNA 片段扩增结果

利用引物 gRNA-F 和 gRNA-R、gRNA-5'R 和 gRNA-3'F(表 1)扩增 gRNA、gRNA 5'端和 gRNA 3'端, 用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 得到 gRNA 目的条带与设计的 gRNA 一致, 表明 gRNA 载体构建成功(图 1A)。

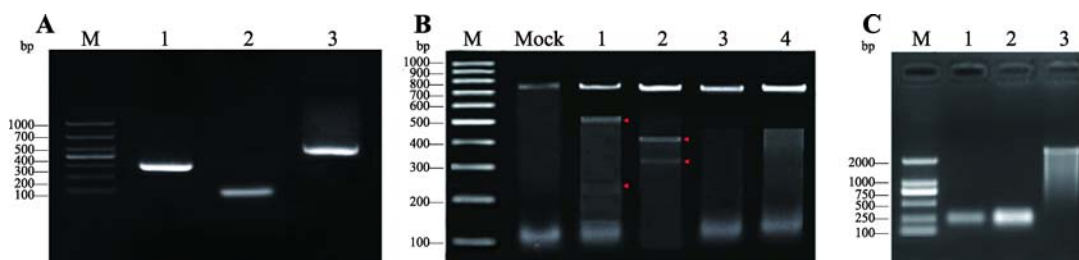


图 1 gRNA 的鉴定及 Cas9 mRNA 和 *FGF21*-gRNA 的体外转录

Fig. 1 Identification of gRNA and *in vitro* transcription of Cas9 mRNA and *FGF21*-gRNA

A: gRNA PCR 扩增产物电泳图。M: DL1000 marker; 1: gRNA 5'端(319 bp); 2: gRNA 3'端(177 bp); 3: gRNA(455 bp)。B: Surveyor 酶检测 *FGF21* 敲除效率。M: 100 bp marker; Mock: 未处理的细胞; 1、2、3、4 分别为转染 *FGF21*-gRNA(N=1~4)后的结果; 红色箭头代表切割的预期大小, 表示基因发生突变。C: Cas9 mRNA 和 *FGF21*-gRNA 体外转录结果。M: DL2000 marker; 1~3: 分别为 *FGF21*-gRNA1、*FGF21*-gRNA2 和 Cas9 mRNA。



### 2.1.2 细胞水平检测 *FGF21* 敲除效率

按照 Surveyor 突变检测试剂盒说明书, 将细胞提取 DNA 与 Surveyor 试剂形成的反应液混匀后, 在 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示 gRNA1 和 gRNA2 敲除效率较高且无拖尾现象(图 1B), 因此选用 gRNA1 和 gRNA2 作为实验靶位点 gRNA。

### 2.1.3 *FGF21*-gRNA 和 Cas9 mRNA 体外转录

利用构建好的 gRNA1 和 gRNA2 质粒制备相应的体外转录产物, 经体外转录得到的 gRNA 浓度均在 500 ng/ $\mu$ L 以上, 电泳结果表明其条带完整(图 1C)。得到的 Cas9 mRNA 的浓度为 100 ng/ $\mu$ L, 电泳条带存在拖带情况(图 1C), 这可能是因为 Cas9 mRNA 基因序列长度超出试剂盒最佳转录范围, 导致体外转录时 Cas9 mRNA 存在部分序列转录不完全。但从图中可以发现, Cas9 mRNA 主带清晰, 说明转录产物完整。

## 2.2 *Fgf21*<sup>-/-</sup>小鼠基因型鉴定

将转录的 *FGF21*-gRNA 和 Cas9 mRNA 混合物注射到 340 颗受精卵, 挑选状态良好的 322 颗受精卵移植到 16 只假孕 FVB 母鼠体内, 约 3 周后共获得 63 只 F<sub>0</sub> 代小鼠, 出生率为 19.6% (表 2)。提取 F<sub>0</sub> 代小鼠基因组 DNA, 利用引物 FGF21-F2 和 FGF21-R2 (引物序列见表 1) 进行 PCR 扩增, PCR 产物送测序。经测序分析与 WT 小鼠基因组序列进行比对后, 对 F<sub>0</sub> 代小鼠进行 *FGF21* 进行敲除情况统计(表 2)。在获得的 18 只 *FGF21* 基因敲除小鼠中, 共有 3 只 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠。*Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠原始测序序列比对与峰图见图 2。

表 2 显微注射获得 *FGF21* 基因敲除小鼠

Table 2 The generation of *FGF21* knockout mice by pronucleus injection

注射 卵数	移植 卵数	F <sub>0</sub> 出生小鼠 (出生率)	首建鼠 (突变率)	双敲小鼠 (突变率)	单敲小鼠 (突变率)
340	322	63(19.6%)	18(28.6%)	3(4.8%)	15(23.8%)

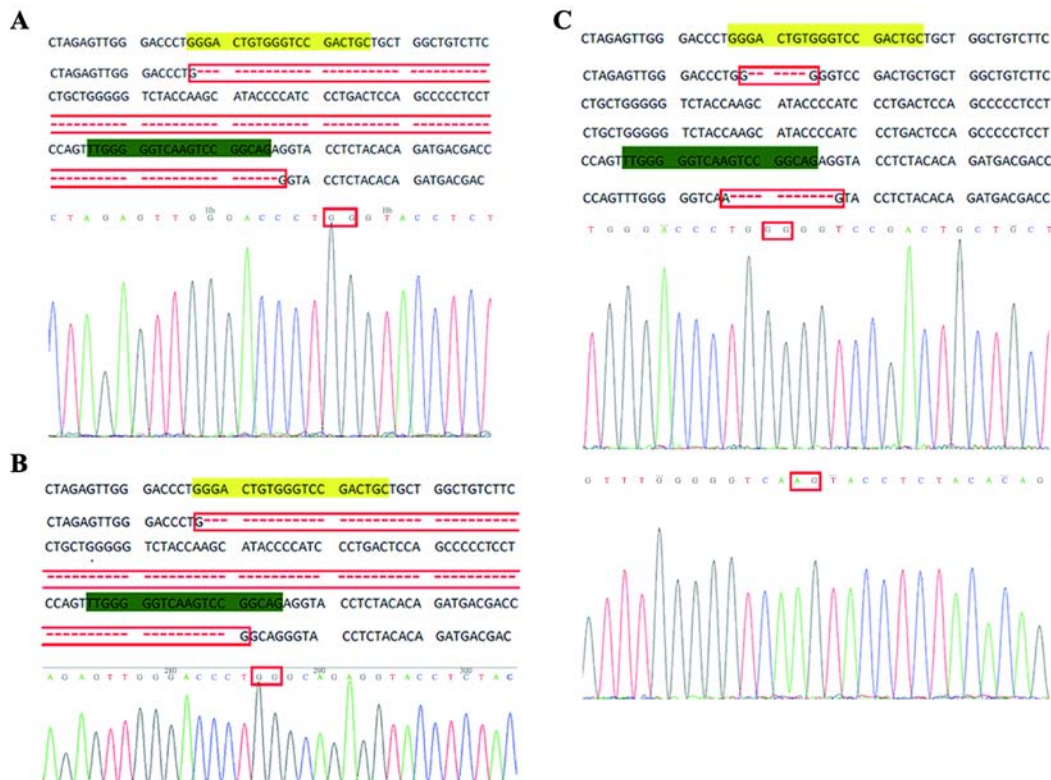


图 2 *Fgf21*<sup>-/-</sup>小鼠基因型鉴定

Fig. 2 Genotype identification of *Fgf21*<sup>-/-</sup> mice

A: *Fgf21*<sup>-/-</sup> (-103 bp) 小鼠; B: *Fgf21*<sup>-/-</sup> (-109 bp) 小鼠; C: *Fgf21*<sup>-/-</sup> (-17 bp) 小鼠。黄色区表示第 1 个靶位点, 绿色区表示第 2 个靶位点, 红色虚线表示缺失基因。

### 2.3 qRT-PCR 和 Western blotting 鉴定 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠 *FGF21* mRNA 和 FGF21 蛋白表达

利用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 WT 和 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠背部皮肤中 *FGF21* 基因及蛋白表达情况。qRT-PCR 结果表明, 与 WT 相比, *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠背部皮肤中未检测到 *FGF21* mRNA 表达(图 3A)。以  $\alpha$ -tubulin 为内参, 通过 Western blotting 检测 FGF21 蛋白表达情况(图 3B)。结果表明, 在 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠的背部皮肤中未检测到大小为 22 kDa 的 FGF21 蛋白表达, 表明 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠构建成功, 可以用于后续分析。

### 2.4 *FGF21* 组织表达谱和 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠表型分析

#### 2.4.1 *FGF21* 基因在 WT 小鼠各组织中的表达

为研究 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠的表型及敲除 *FGF21* 基因后的影响, 本文首先利用 qRT-PCR 检测 *FGF21* 基因在 WT 小鼠各组织中的 mRNA 表达水平。结果表

明, *FGF21* 基因在胰腺中高表达, 在脂肪、肝脏、睾丸、肌肉、胸腺、皮肤、脑、肺、卵巢、心脏、肾脏、胃、脾脏、胆囊等组织中表达水平较低(图 4), 结果与 Fon 等<sup>[16]</sup>的研究结果相一致。

#### 2.4.2 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠表型分析

通过对出生的 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 和 WT 小鼠的观察比较, 未发现异常变化, 生长状况良好。对 8 周龄的 WT 和 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠称重统计发现, WT 雄性小鼠平均体重为 24.52 g, 雌性为 23.28 g; *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠雄性平均体重为 24.35 g, 雌性为 23.22 g。结果证明, 处于同周龄同性别的 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠体重明显轻于 WT 小鼠, 这可能与 *FGF21* 基因对肌肉脂肪组织的调控有关<sup>[4]</sup>。通过解剖学初步发现, 与 WT 小鼠相比, *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠各组织形态颜色没有明显差别, 并且无组织病变状况出现, 尤其是 *FGF21* 基因高表达的胰腺(图 5), 而 *FGF21* 敲除后对小鼠的组织生理影响还需进一步的研究。

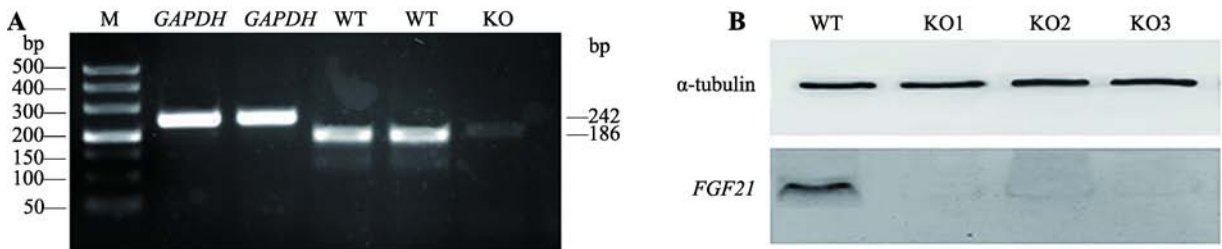


图 3 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠 *FGF21* mRNA 和 FGF21 蛋白表达情况

Fig. 3 *FGF21* mRNA and FGF21 protein expression of *Fgf21*<sup>-/-</sup> by qRT-PCR and Western blotting

A: qRT-PCR 检测 *FGF21* mRNA 表达。M: DL500 bp; WT: 野生型; KO: *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠。B: Western blotting 检测 FGF21 蛋白表达。WT: 野生型小鼠; KO1、KO2、KO3: *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠。

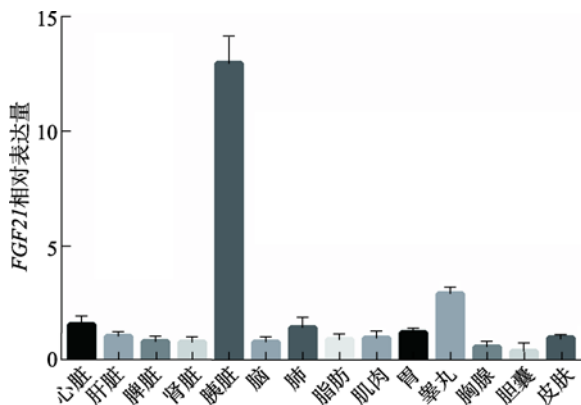


图 4 *FGF21* 基因组织表达谱

Fig. 4 *FGF21* mRNA expression in tissues

### 2.5 *FGF21* 基因对小鼠毛发影响

通过观察 WT 小鼠和 3 只 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠皮肤毛发生长变化, 发现脱毛后第 12 d, WT 小鼠和 3 只 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠毛发生长差异显著。野生小鼠已长出较长、较厚的被毛(图 6A); 3 只 *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠皮肤颜色只是变白, 体表基本没有长出毛发(图 6: B~D)。结果证明, 与 WT 小鼠相比, *Fgf21*<sup>-/-</sup> 小鼠毛发生长速度相对较慢。

选取脱毛后毛发长势相同的皮肤组织, 进行组织切片实验(WT: 12 d; *Fgf21*<sup>-/-</sup>: 17 d), 观察处于毛发生长程度一致的小鼠毛囊变化。结果发现, 与

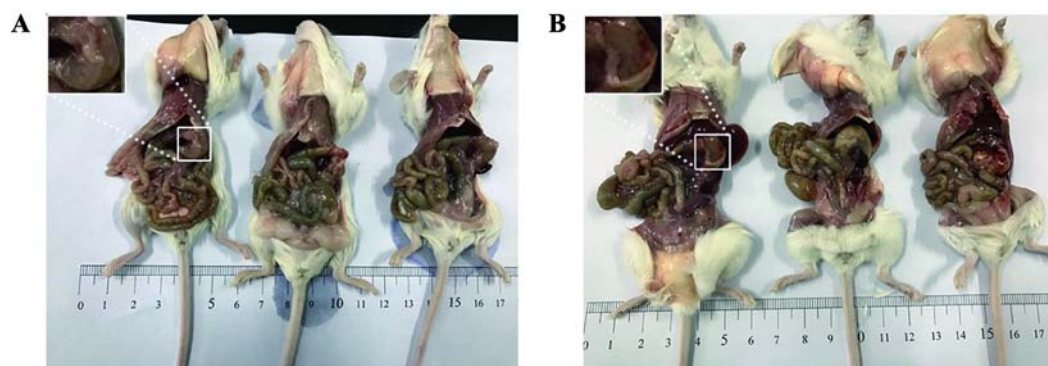


图 5 WT 和  $Fgf21^{-/-}$  小鼠解剖分析

Fig. 5 The anatomical analyses of WT and  $Fgf21^{-/-}$  mice

A : WT 小鼠解剖图(左上放大图为胰腺) ; B :  $Fgf21^{-/-}$  小鼠解剖图(左上放大图为胰腺)。

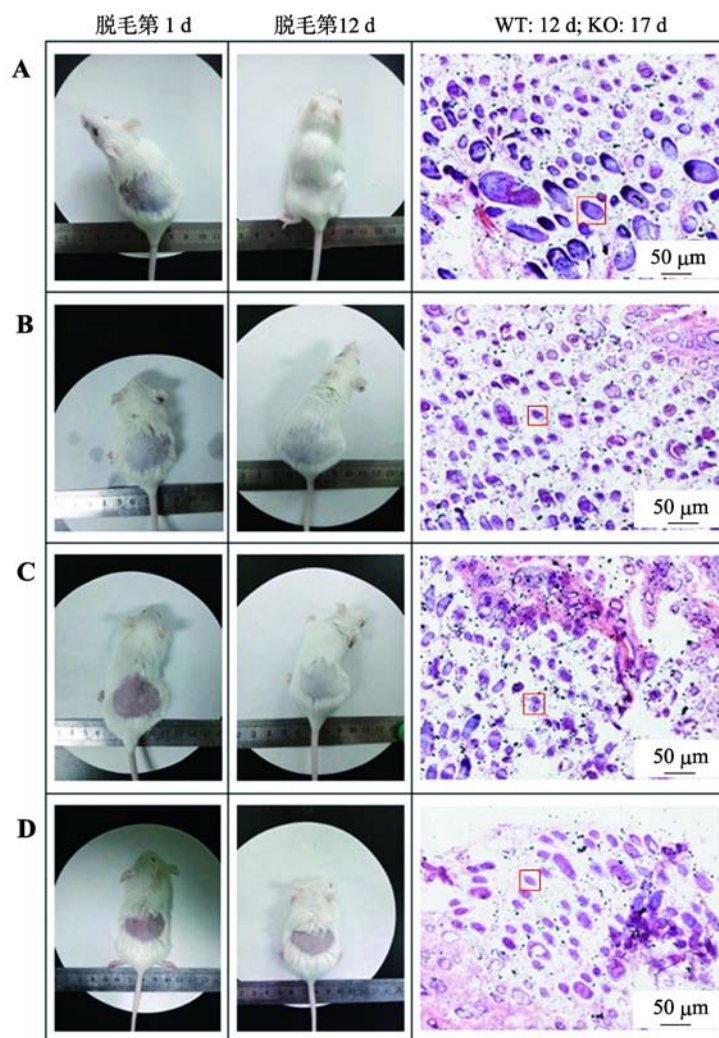


图 6 WT 和  $Fgf21^{-/-}$  小鼠毛发再生速度的比较和组织切片观察

Fig. 6 The comparison of the hair re-growth speed and paraffin section in WT and  $Fgf21^{-/-}$  mice

A : WT 小鼠毛发再生情况及组织切片观察 ; B~D :  $Fgf21^{-/-}$  小鼠毛发再生情况及组织切片观察。

红色框区为一个毛囊 ; WT : 野生型小鼠 ; KO :  $Fgf21^{-/-}$  小鼠。



WT 小鼠相比(图 6A), *Fgf21*<sup>-/-</sup>小鼠的毛囊数量减少, 并且毛囊直径变小(图 6: B~D)。

### 3 讨 论

2010 年后, 制备遗传基因修饰动物模型的方法主要依赖于锌指核酸酶(zinc finger nucleases, ZFN)技术、转录激活因子样效应核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALENs)技术及 CRISPR/Cas9 技术<sup>[17]</sup>。相比 ZFN 和 TALENs 技术, CRISPR/Cas9 系统具有设计简单、操作方便、费用低廉等显著优势<sup>[18,19]</sup>, 给生命科学研究的各个领域带来了革命性的改变。该技术只需要依据目的基因的 DNA 的序列设计一段与之互补的 gRNA 序列, 在其介导下可快速实现对基因组 DNA 的打靶, 并且其打靶效率高, 方法操作简单, 实验周期短, 可以在细胞内同时进行多个基因编辑操作<sup>[20]</sup>, 对生物学领域的发展起到深远影响。

本研究利用 CRISPR/Cas9 系统, 通过显微操作构建 *FGF21* 基因敲除小鼠模型, 但结果只得到 3 只 *Fgf21*<sup>-/-</sup>小鼠, 敲除效率为 28.6%, 造成这种情况的原因主要是显微注射技术操作难度大。此外, DNA 纯化回收、体外转录过程、注射片段 *FGF21*-gRNA 和 Cas9 mRNA 浓度的调整都是非常重要的因素。本研究初步建立 CRISPR/Cas9 介导的基因敲除小鼠模型的技术体系, 但是多个环节都有待改进。

FGF21 以自分泌、旁分泌和内分泌的形式作用于多种靶器官内并调节体内内环境的能量平衡。由于 FGF21 的生理复杂性和不同的代谢功能, 对肝脏、脂肪、胰腺等组织的脂肪酸和葡萄糖代谢等有重要的调控作用<sup>[21]</sup>, 而且能降低血糖、甘油三酯、果糖胺以及高血糖素浓度, 改善胰岛  $\beta$  细胞功能, 有望成为治疗肥胖症、糖尿病和脂肪肝等疾病的新一代“药物”。同时, *FGF21* 也是最新发现的一个影响毛囊周期和结构的基因, 通过生物信息学研究发现其功能可能是在毛囊发育中促进转变成退行期<sup>[12]</sup>, 推测 *FGF21* 在毛囊发育和周期中发挥着重要的作用, 但并没有具体实验验证。因为 *FGF21* 在毛囊发育调控的机制研究还处于相对粗浅的水平, 本实验通过构建 CRISPR/Cas9 表达载体及制备 *FGF21* 基因敲除

小鼠, 发现 *Fgf21*<sup>-/-</sup>小鼠毛发生长速度明显减慢, 毛囊直径变小, 从而间接推断 *FGF21* 在毛囊发育过程中发挥重要作用, 对阐明 *FGF21* 在毛囊周期中的调控作用提供实验依据。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了 *FGF21* 基因敲除小鼠模型, 为今后进一步探究 *FGF21* 的结构、功能、靶基因以及对毛囊发育的作用及生长周期的调控机制提供参考。

### 参考文献(References):

- [1] Oulion S, Bertrand S, Escriva H. Evolution of the *FGF* gene family. *Int J Evol Biol*, 2012, 2012: 289147. [DOI]
- [2] Kharitononkov A, Adams AC. Inventing new medicines: the *FGF21* story. *Mol Metab*, 2014, 3(3): 221–229. [DOI]
- [3] Johnson CL, Mehmood R, Laing SW, Stepniak CV, Kharitononkov A, Pin CL. Silencing of the *Fibroblast growth factor 21* gene is an underlying cause of acinar cell injury in mice lacking MIST1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 306(8): E916–E928. [DOI]
- [4] Chu AY, Workalemahu T, Paynter NP, Rose LM, Giuliani F, Tanaka T, Ngwa JS, CHARGE Nutrition Working Group, Qi QB, Curhan GC, Rimm EB, Hunter DJ, Pasquale LR, Ridker PM, Hu FB, Chasman DI, Qi L, DietGen Consortium. Novel locus including *FGF21* is associated with dietary macronutrient intake. *Hum Mol Genet*, 2013, 22(9): 1895–1902. [DOI]
- [5] Nishimura T, Nakatake Y, Konishi M, Itoh N. Identification of a novel FGF, FGF-21, preferentially expressed in the liver. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1492(1): 203–206. [DOI]
- [6] Lee P, Brychta RJ, Linderman J, Smith S, Chen KY, Celi FS. Mild cold exposure modulates fibroblast growth factor 21 (FGF21) diurnal rhythm in humans: relationship between FGF21 levels, lipolysis, and cold-induced thermogenesis. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98(1): E98–E102. [DOI]
- [7] Adams AC, Coskun T, Cheng CC, O'Farrell LS, Dubois SL, Kharitononkov A. Fibroblast growth factor 21 is not required for the antidiabetic actions of the thiazolidinediones. *Mol Metab*, 2013, 2(3): 205–214. [DOI]
- [8] Li ZJ, Choi HI, Choi DK, Sohn KC, Im M, Seo YJ, Lee YH, Lee JH, Lee Y. Autologous platelet-rich plasma: a potential therapeutic tool for promoting hair growth. *Dermatol Surg*, 2012, 38(7 Pt 1): 1040–1046. [DOI]
- [9] Yousaf R, Meng QH, Hufnagel RB, Xia Y, Puligilla C, Ahmed ZM, Riazuddin S. MAP3K1 function is essential



- for cytoarchitecture of the mouse organ of Corti and survival of auditory hair cells. *Dis Model Mech*, 2015, 8(12): 1543–1553. [DOI]
- [10] Park S, Erdogan S, Hwang D, Hwang S, Han EH, Lim YH. Bee venom promotes hair growth in association with inhibiting 5 $\alpha$ -reductase expression. *Biol Pharm Bull*, 2016, 39(6): 1060–1068. [DOI]
- [11] Wang XL, Cai B, Zhou JK, Zhu HJ, Niu YY, Ma BH, Yu HH, Lei AM, Yan HL, Shen QY, Shi L, Zhao XE, Hua JL, Huang XX, Qu L, Chen YL. Disruption of *FGF5* in cashmere goats using CRISPR/Cas9 results in more secondary hair follicles and longer fibers. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164640. [DOI]
- [12] Dong Y, Xie M, Jiang Y, Xiao NQ, Du XY, Zhang WG, Tosser-Klopp G, Wang JH, Yang S, Liang J, Chen WB, Chen J, Zeng P, Hou Y, Bian C, Pan SK, Li YX, Liu X, Wang WL, Servin B, Sayre B, Zhu B, Sweeney D, Moore R, Nie WH, Shen YY, Zhao RP, Zhang GJ, Li JQ, Faraut T, Womack J, Zhang YP, Kijas J, Cockett N, Xu X, Zhao SH, Wang J, Wang W. Sequencing and automated whole-genome optical mapping of the genome of a domestic goat (*Capra hircus*). *Nat Biotechnol*, 2013, 31(2): 135–141. [DOI]
- [13] Li GL, Zhong CL, N Si, Liu DW, Cai GY, Li ZC, Yang HQ, Wu ZF. Establishment of porcine *Xist* knockout model using CRISPR/Cas9 system. *Hereditas (Beijing)*, 2016, 38(12): 1081–1089.  
李国玲, 钟翠丽, 倪生, 刘德武, 蔡更元, 李紫聪, 杨化强, 吴珍芳. 利用 CRISPR/Cas9 系统建立 *Xist* 基因敲除猪模型. *遗传*, 2016, 38(12): 1081–1089. [DOI]
- [14] Gratz SJ, Cummings AM, Nguyen JN, Hamm DC, Donohue LK, Harrison MM, Wildonger J, O'Connor-Giles KM. Genome engineering of *Drosophila* with the CRISPR RNA-guided Cas9 nuclease. *Genetics*, 2013, 194(4): 1029–1035. [DOI]
- [15] Kondo S, Ueda R. Highly improved gene targeting by germline-specific Cas9 expression in *Drosophila*. *Genetics*, 2013, 195(3): 715–721. [DOI]
- [16] Fon Tacer K, Bookout AL, Ding XS, Kurosu H, John GB, Wang L, Goetz R, Mohammadi M, Kuro-o M, Mangelsdorf DJ, Kliewer SA. Research resource: comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse. *Mol Endocrinol*, 2010, 24(10): 2050–2064. [DOI]
- [17] Yan QM, Zhang QJ, Yang HQ, Zou QJ, Tang CC, Fan NN, Lai LX. Generation of multi-gene knockout rabbits using the Cas9/gRNA system. *Cell Regen*, 2014, 3(1): 12. [DOI]
- [18] Wan HF, Feng CJ, Teng F, Yang SH, Hu BY, Niu YY, Xiang AP, Fang WZ, Ji WZ, Li W, Zhao XY, Zhou Q. One-step generation of *p53* gene biallelic mutant Cynomolgus monkey via the CRISPR/Cas system. *Cell Res*, 2015, 25(2): 258–261. [DOI]
- [19] Yang H, Wang HY, Shivalila CS, Cheng AW, Shi LY, Jaenisch R. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154(6): 1370–1379. [DOI]
- [20] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957–963. [DOI]
- [21] Fisher FM, Maratos-Flier E. Understanding the physiology of FGF21. *Annu Rev Physiol*, 2016, 78: 223–241. [DOI]

(责任编辑: 谷峰)