

摘 要

为获得适合精原干细胞移植 (Spermatogonial stem cell transplantation, SSCT) 的移植受体, 本课题组前期制备了 *ETV5* 基因纯合敲除小鼠。该小鼠表现出唯支持细胞综合征, 同时还出现了一系列不良表型, 如: 多趾、肾脏不对称和骨骼肌发育异常等。骨骼肌发育异常导致 *ETV5* 敲除小鼠体重显著小于对照组小鼠, 对于后续精原干细胞移植的试验也造成影响。本文为了探究 *ETV5* 敲除小鼠骨骼肌发育异常的分子机制, 采集 *ETV5* 纯合敲除小鼠和野生型小鼠的后腿骨骼肌组织, 进行转录组测序, 从转录水平上分析了可能导致其骨骼肌发育异常的原因, 筛选了 *Smox* 基因进行进一步验证试验, 通过对 C2C12 细胞过表达或干扰 *Smox* 基因, 以观察 *Smox* 基因对 C2C12 细胞增殖和分化的影响。本文主要研究结果如下:

1) *ETV5* 敲除小鼠骨骼肌转录组测序分析: 筛选出了 574 个差异表达基因, 其中上调基因 292 个, 下调基因 282 个。将分析得到的差异表达基因基于 GO 数据库分别从生物学过程、细胞成分和分子功能三个层面进行 GO 注释, 得到差异表达基因参与的 GO 通路。DEGs 富集的 GO 通路主要是脂肪酸氧化、线粒体内膜、受体复合体、生长因子结合等, 涉及脂肪代谢、生长发育等通路。然后, 本研究基于 KEGG 数据库, 对差异表达基因进行通路注释, 发现主要富集到的通路为: 脂肪酸代谢、PPAR 信号通路、cAMP 信号通路、AMPK 信号通路等通路, qPCR 验证了一部分 DEGs, 分析到其中 *Smox*、*Amd1*、*Plin5*、*Wisp2*、*Hpn*、*Mchr1*、*Mylk4*、*Chrna2*、*Cxcl14* 等基因, 可能影响了 *ETV5* 敲除小鼠的肌肉发育、脂肪累积和体重变化。

2) 过表达或干扰 *Smox* 基因对 C2C12 细胞增殖和分化的影响研究: 我们将分别转染过表达 *Smox* 载体、siRNA 和对照质粒的 C2C12 细胞, 进行 qPCR 试验、EdU 细胞增殖试验以及 CCK8 试验, 结果显示, 过表达 *Smox* 基因促进 C2C12 细胞增殖, 干扰 *Smox* 基因抑制 C2C12 细胞增殖。将上述培养 48h 后的细胞替换分化培养基进行分化培养, 培养 6d 后消化细胞, 进行 qPCR 试验、使用 Myhc 抗体对两组细胞进行免疫荧光染色试验, 以检测两组细胞分化情况, 结果显示过表达 *Smox* 基因提高了 C2C12 细胞的分化能力, 干扰 *Smox* 基因抑制了 C2C12 细胞分化。

关键词: *ETV5*; 骨骼肌发育; 转录组测序; 小鼠成肌细胞; *Smox*

英文缩略词

英文缩写	英文全称	中文全称
APAO	Acetylpolymine oxidase	N1-乙酰多胺氧化酶
cDNA	Complementary DNA	互补 DNA
CMS	Congenital Myasthnic Syndrome	先天性肌无力综合征
ENU	N-nitroso-N-ethylure	乙酰基亚硝基脲
FAD	Flavin adenine dinucleotide	黄素腺嘌呤二核苷酸
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
FPKM	Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments	每千个碱基的转录每百万映射读取的片段
GDNF	Glial cell line-derived neurotrophic factor	胶质细胞源性神经营养因子
GO	Gene Ontology	基因分类数据库
KEGG	Kyoto encyclopedia of genes and genomes	京都基因与基因组百科全书
MPSS	Massively parallel signature sequencing	大规模平行测序技术
MRFs	Myogenic regulatory factor family	生肌调节因子家族
mRNA	Messenger RNA	信使 RNA
MyHC	Myosin Heavy Chain	肌球蛋白重链
MyoD	Myogenic Differentiation 1	肌分化决定因子 1
MyoG	Myogenin	肌生成素
PA	Polyamines	多胺
Pax3	Paired Box 3	配对盒同源转化域基因 3
Pax7	Paired Box 7	配对盒同源转化域基因 7
PCR	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
PGCs	Primordial germ cells	原始生殖细胞
PLZF	Promyelocytic Leukemia Zinc Finger	早幼粒细胞白血病锌指蛋白
qPCR	Quantitative real-time PCR	实时荧光定量 PCR
RNA-Seq	RNA Sequencing	转录组测序
SAGE	Serial Analysis of Gene Expression	基因表达系列分析
siRNA	Small interfering RNA	小干扰 RNA

英文缩写	英文全称	中文全称
SMO	Spermine oxidase	精胺氧化酶
SPD	Spermidine	亚精胺
SPM	Spermine	精胺
SSAT	Spermidine/spermine N1-acetyltransferase	亚精胺/精胺 N1-乙酰基转移酶
SSCs	Spermatogonial stem cell	精原干细胞

目 录

1 前言	1
1.1 <i>ETV5</i> 敲除小鼠的研究	1
1.2 转录组测序分析差异表达基因	2
1.3 骨骼肌发育	4
1.4 <i>Smo</i> 的结构与功能	6
1.5 研究目的与意义	8
1.6 技术路线	9
2 材料与方法	10
2.1 实验材料	10
2.1.1 实验动物	10
2.1.2 实验用细胞和质粒	10
2.1.3 实验试剂与耗材	10
2.1.4 实验仪器与设备	11
2.1.5 实验过程中使用的引物	11
2.2 实验方法	13
2.2.1 <i>ETV5</i> 敲除小鼠的制备及基因型的检测	13
2.2.2 小鼠体质量测量	13
2.2.3 肌肉样本采集和总 RNA 的提取	14
2.2.4 构建文库与测序	14
2.2.5 测序数据的分析	14
2.2.6 差异表达分析	15
2.2.7 实时荧光定量 PCR 验证	15
2.2.8 过表达载体的构建	16
2.2.9 干扰 RNA 的合成	20
2.2.10 细胞培养	20
2.2.11 细胞转染	21
2.2.12 EdU 检测细胞增殖	21
2.2.13 CCK8 检测细胞增殖	22

2.2.14 细胞免疫荧光	23
2.2.15 数据统计分析与图表绘制	23
3 结果与分析	24
3.1 <i>ETV5</i> 敲除小鼠肌肉组织转录组测序结果与分析	24
3.1.1 小鼠基因型鉴定	24
3.1.2 小鼠体重比较	24
3.1.3 测序数据参考基因组比对结果	25
3.1.4 差异表达基因	26
3.1.5 GO 富集分析	27
3.1.6 KEGG 富集分析	29
3.2 <i>Smox</i> 基因对 C2C12 细胞增殖分化的影响	30
3.2.1 qPCR 验证分析	30
3.2.2 过表达载体构建	30
3.2.3 过表达 <i>Smox</i> 对 C2C12 细胞增殖的影响	31
3.2.4 过表达 <i>Smox</i> 对 C2C12 细胞分化的影响	32
3.3 干扰 <i>Smox</i> 基因对小鼠成肌细胞 (C2C12) 的影响	33
3.3.1 干扰 RNA 的筛选	33
3.3.2 干扰 <i>Smox</i> 对 C2C12 细胞增殖的影响	34
3.3.3 干扰 <i>Smox</i> 对 C2C12 细胞分化的影响	35
4 讨论与结论	36
4.1 讨论	36
4.1.1 <i>ETV5</i> 敲除对小鼠肌肉表达谱的影响	36
4.1.2 <i>Smox</i> 对 C2C12 细胞增殖与分化的调控作用	37
4.2 结论	39
4.3 下一步计划	39
参考文献	40
附录 A 硕士期间发表的论文及专利	46
附录 B 差异表达基因	46
致谢	48

1 前言

1.1 *ETV5* 敲除小鼠的研究

将供体的精原干细胞（Spermatogonial stem cell, SSCs）移植到不育的雄性受体的睾丸内，理论上能够使不育的雄性受体重获生精的能力。SSCs 移植的过程是首先制备精原细胞完全消融的雄性受体，将雄性供体的睾丸组织分离出精原细胞，将 SSCs 分离纯化出来，培养或者直接注射到雄性受体的睾丸中，具体详情见图 1.1。制备不育的雄性受体对 SSCs 的移植的研究很重要，随着基因编辑技术的不断开发和应用，近年来有研究者采用基因修饰的方法来获得不育的雄性受体，使用基因编辑技术敲除在 SSCs 或者雄性生殖细胞中表达的关键基因，针对性的消融 SSCs，尽可能的避免对支持细胞和 SSCs 的内环境造成破坏，为后续移植实验打好基础。

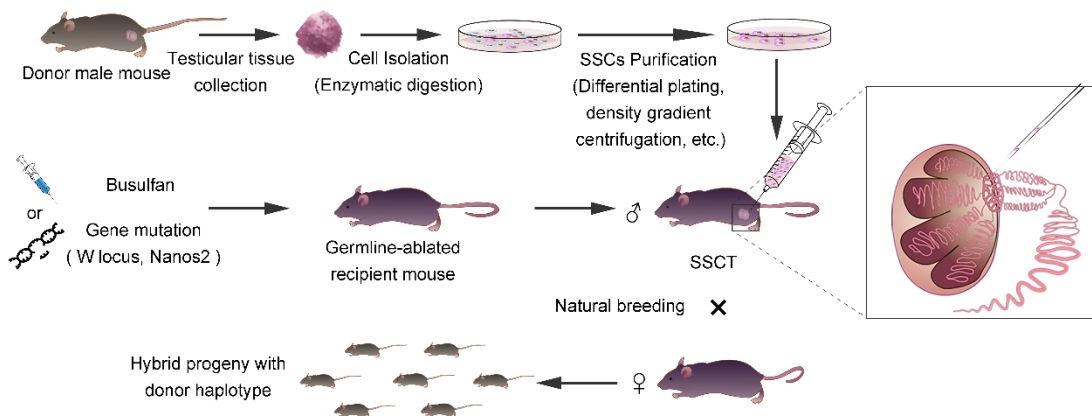


图 1.1 小鼠的 SSCs 移植过程 (Zhao *et al.*, 2021)

ETV5 也称 Ets 相关分子 (Ets related molecule, ERM) 属于 E26 转录因子 (E26 transformation-specific, ETS) 家族的其中一员，ETS 家族转录因子共享一个独特的 ETS DNA 结合域，参与多种发育过程，PEA3 作为其中的一个亚家族由三个成员组成：*ETV1*、*ETV4*、*ETV5* (Oh *et al.*, 2012)，其中 *ETV5* 在哺乳动物的组织中广泛表达，尤其在睾丸 (O'Bryan *et al.*, 2012) 和卵巢 (Eo *et al.*, 2008) 中表达量较高。由于 *ETV5* 的特性，有研究者制备了 *ETV5* 敲除小鼠，相比之下，*ETV5* 敲除导致 SSCs 自我更新缺陷更为严重，并且在机制上与 PLZF 或 GDNF 突变引起的缺陷不同。Oatley 等通过干扰 RNA 将小鼠 *ETV5* 的 mRNA 敲低 60% 会导致 SSCs 在体外的集落形成减

少 (Oatley *et al.*, 2006)。Chen 等利用 Cre 靶向敲除制备了 *ETV5* 基因缺失的小鼠, 研究结果表明, *ETV5* 敲除小鼠的睾丸在第 4 周龄和野生型差不多, 出现减数分裂前和减数分裂后的单倍体生殖细胞。然而, 到了 5 周龄, 生殖细胞的丢失是清晰可见的。到第六周精原细胞开始消融, 到第十周大部分生精小管都没有精原细胞了。生殖细胞在 7 周龄时明显丧失, 在 8 周龄时观察到生精上皮中的生殖细胞完全丧失, 生殖细胞优先于从生精上皮向基部到顶端方向丢失 (Chen *et al.*, 2005)。研究发现, *ETV5* 敲除小鼠除了出现精原细胞消融的表型, 称为唯支持细胞综合征, 在身体的其他方面也出现了缺陷。Schlessner 等靶向干扰小鼠的 *ETV5* 基因, 和野生型相比 *ETV5* 纯合突变小鼠的体质量减少 12%~31%, *ETV5* 纯合敲除小鼠的睾丸显著小于野生型小鼠的睾丸, 睾丸和体重的比例也显著小于野生型 (Schlessner *et al.*, 2008)。Jamsai 等利用 ENU 诱变使小鼠的 *ETV5* 基因产生错义突变, 纯合 *ETV5* 突变的小鼠除了出现唯支持细胞综合征外还产生胚胎期和围产期死亡率升高、多趾、肾脏不对称以及骨骼肌发育不良等症状 (Jamsai *et al.*, 2013)。为了研究精原干细胞移植, 本实验室也利用了 CRISPR/Cas9 技术制备了 *ETV5* 纯合敲除小鼠, 实验结果和 Schlessner 以及 Jamsai 等的研究结果相似, 敲除 *ETV5* 基因的小鼠除了出现内源性精原细胞的消融, 也出现了生长发育的缓慢以及多趾的现象 (Zhang *et al.*, 2021)。

对于 *ETV5* 纯合敲除小鼠骨骼肌发育异常的问题, Hippenmeyer 等对其进行了研究, 研究表明, 它的突变导致许多正常表达丰富的突触下核基因的表达严重下调。*ETV5* 纯合敲除小鼠表现出肌肉中央区域的扩张, 乙酰胆碱受体 (AChR) 簇在其中聚集, AChR 簇逐渐碎裂, 并表现出类似先天性肌无力综合征 (Congenital Myasthenic Syndrome, CMS) 的肌肉无力症状。PEA3 亚家族中的三个成员都在梭内肌纤维和肌梭内表达 (Arber *et al.*, 2000)。*ETV1* 和 *ETV4* 在梭外肌纤维中不以选择性的方式表达, 而 *ETV5* 在骨骼肌的集中区域表达, *ETV1* 和 *ETV4* 都在脊髓中不同的运动神经元池中表达, 但 *ETV5* 在运动神经元中不表达 (Livet *et al.*, 2002)。*ETV5* 纯合敲除小鼠在肌肉构型、肌腱的插入点、单个梭外肌纤维的条纹构型、肌肉内感觉器官的建立以及许多结构和代谢基因的表达水平等方面没有表现出明显的缺陷。

1.2 转录组测序分析差异表达基因

随着测序技术的快速发展, 各大组学逐渐应用于医学、动物、植物等领域的研究, 其中转录组学因其能够快速得到结果和容易上手的特性得到快速发展 (Lockhart

et al., 2000)。转录组是生物体的细胞或者组织的 RNA 的总和, 是研究基因结构、表达和功能的重要材料, 转录组研究是一个探索生物表型相关联基因的过程, 也是研究基因功能的一个重要手段。通过表达谱芯片技术能够研究环境、时间和个体对基因表达的影响, 可以检测出不同个体在相同时间时体内基因的表达量的不同 (Greenbaum *et al.*, 2003)。转录组测序是对生物体能够表达的全部基因进行测序, 通过对得到的数据和公共数据库中已知的序列进行比对, 可能挖掘到新的基因并且预测它的功能。转录组测序方法有基因芯片技术 (Microarray)、基因表达系列分析技术 (Serial Analysis of Gene Expression, SAGE)、大规模平行测序技术 (Massively parallel signature sequencing, MPSS) 以及 RNA 测序技术 (RNA-Seq) (王楚彪等, 2018)。其中, 转录组测序技术中使用最广泛的是 RNA-Seq 技术, 它能够将生物体在某个状态下或者某个时间点的组织或细胞内所有基因转录的 RNA 进行定性和定量分析, 它的优点是高分辨率、高灵敏度以及高通量, 能够准确分辨出单个碱基, 哪怕样品中的只有几个拷贝的转录本也能够检测到, 而且得到的碱基数量十分庞大, 基本能覆盖整个转录组 (Hu *et al.*, 2002)。此外, RNA-Seq 相比于其他转录组测序技术成本较低、操作简易。而且不局限于已知的基因组序列, 同样适用于未知基因组序列的物种, 应用领域非常广, RNA-Seq 作为二代测序技术的一个重要的应用, 已经成为对生物体进行转录组测序和分析的一个重要工具 (Wang *et al.*, 2009)。

研究者将小鼠的三个不同时间的精原细胞亚群、支持细胞和间质细胞进行分选转录组测序分析, 找到了作用于体细胞和生殖细胞的候选信号通路 (Tan *et al.*, 2020)。还有将树鼩的 SSCs 用 FACS 分选出来, 进行了转录组测序分析, 找到了影响树鼩 SSCs 增殖的重要通路: Wnt/ β catenin, 通过添加 Wnt3 (Wnt 通路的激活剂) 到 SSCs 的培养中, 有效提高了树鼩 SSCs 的培养时间 (Li *et al.*, 2017)。用表达增强型绿色荧光蛋白 (EGFP) 的慢病毒载体转染树鼩 SSCs, 并移植到白消安处理后的受体树鼩的睾丸中, 带有 EGFP 标记的 SSCs 能在受体睾丸中定殖恢复精子发生, 并且成功使母树鼩怀孕产生转基因后代。近年来, 单细胞转录组测序 (single-cell RNA-seq, scRNA-seq) 也同样十分火热, Lukassen 等从小鼠睾丸中提取超过 2500 个细胞的 scRNA-seq 数据在标记物检测和验证阶段后得到了改善, 捕获了分化的连续性。scRNA-seq 还可以分析大量测序数据中掩盖的稀有细胞群, 揭示精子发生的过程中性染色体调控的新的见解 (Lukassen *et al.*, 2018)。Shami 等采用 scRNA-seq 技术识别

了人类、猕猴和小鼠的生殖细胞和体细胞类型的转录特征，揭示了它们精子发生的过程中的相似性和差异性，包括 SSCs、分化标记、减数分裂的潜在调节因子以及精子发生过程中生殖细胞与体细胞的交互作用等（Shami *et al.*, 2020）。Green 等从成年小鼠的睾丸的约 35000 个细胞收集了 scRNA-seq 数据鉴定了多种生殖细胞以及体细胞，分析了从精原细胞到精子中的连续发育轨迹，在分化过程中几个过渡点鉴定了新的候选转录因子（Green *et al.*, 2018）。这些工作为 SSCs 以及生殖细胞发育的研究提供了基础和线索。

1.3 骨骼肌发育

骨骼肌由数以千计的肌纤维和结缔组织包被构成，在胚胎发育期间就已经形成。肌纤维由多细胞融合而成，所以一条肌纤维内部会有几十个甚至几百个细胞核。在农业上，饲养经济动物并获得它们的肉体作为食物，而食用经济动物的骨骼肌是人类获取动物蛋白的主要途径，骨骼肌的发育影响了经济动物产肉量，直接关系到畜牧业的经济效益。在医学上，骨骼肌的正常发育是保证人类正常活动和生产的重要条件，骨骼肌发育异常导致的一系列疾病如肌肉萎缩、肌肉肥大、肌肉瘤等等对病人造成了很大的痛苦和困难。因此，研究骨骼肌的生长发育以及背后的分子机制对提高畜牧业经济增产，探索解决肌肉疾病的治疗方案有着重大意义。

骨骼肌大约占人体体重的 40%，在胚胎发育时期，骨骼肌肌纤维的数量就已经确定了，骨骼肌的生长主要是依赖肌卫星细胞的增殖以及肌肉特异性蛋白的积累（Zammit *et al.*, 2006）。骨骼肌发育形成的过程十分复杂，主要包含细胞增殖和分化两个过程（Bentzinger *et al.*, 2012），在脊椎动物胚胎发育中，骨骼肌中胚层的间充质干细胞分化为骨骼肌祖细胞，肌肉祖细胞能够发育形成只有单个细胞核的成肌细胞，多个成肌细胞组成梭形的肌管再分化成肌纤维（Bachmann *et al.*, 1996）。肌卫星细胞是一种位于基膜和肌纤维之间的单核细胞，通常在静息状态下保持静止，在机械负荷或其他刺激下会被激活，卫星细胞在这种情况下的激活有助于肌肉的肥大（Fry *et al.*, 2014）。

骨骼肌生长发育的过程非常复杂，有多种转录因子参与调控，骨骼肌的正常生长发育依赖于转录因子的相互协调，当前的研究与骨骼肌生长发育相关的转录因子主要是：生肌调节因子家族（MRFs）、同源盒转化域 Pax 家族和 Six 家族等。在原始肌节发育过程中，其主要调控作用的是生肌调节因子家族，在 MRFs 包括：MyoD、

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/818056122067007023>