

## Kit无义突变致W<sup>-3Bao</sup>小鼠生殖腺异常及纯合子贫血死亡

吴培林<sup>1</sup>, 尹洪萍<sup>1</sup>, 殷黎静<sup>2</sup>, 朱洁<sup>2</sup>, 曾咏梅<sup>2</sup>, 刘桂杰<sup>1</sup>, 亢晓冬<sup>1</sup>, 俞利平<sup>1</sup>, 顾美儿<sup>1</sup>, 袁红<sup>1</sup>, 吴宝金<sup>1,2,\*</sup>

(1. 杭州师范大学 实验动物科学实验室, 浙江 杭州 310036; 2. 扬州大学 比较医学中心, 江苏 扬州 225001)

**摘要:** W<sup>-3Bao</sup>是本研究组通过诱变获得、Kit无义突变的白斑小鼠。突变基因杂合子小鼠腹部、四肢肢端及尾尖白化, 其部分精曲小管内无精原细胞。突变纯合子小鼠在胚胎后期色泽苍白、个体矮小, 于出生前后死亡; 血液学检查发现纯合子小鼠血色素极低且红细胞变大; 18.5天胚胎的连续切片可见精曲小管轮廓欠清晰, 精原细胞分散分布于睾丸间质, 未迁入精曲小管; 卵巢结构紊乱, 无明显的原始卵泡结构; 骨髓等器官组织未见显著异常。结论: Kit无义突变不仅导致了W<sup>-3Bao</sup>杂合子小鼠白斑形成及纯合子小鼠贫血死亡, 同时影响生殖腺发育。

**关键词:** W-3Bao 小鼠; Kit 基因; 死亡; 大红细胞贫血; 生殖腺异常

中图分类号: Q959.837; Q954.4; Q344 文献标识码: A 文章编号: 0254-5953-(2009)01-0045-08

## Gonadal Abnormality and Homozygous Decease from the Nonsense Mutation of Kit in W<sup>-3Bao</sup> Mouse

WU Pei-lin<sup>1</sup>, YIN Hong-ping<sup>1</sup>, YIN Li-jing<sup>2</sup>, ZHU Jie<sup>2</sup>, ZENG Yong-mei<sup>2</sup>, LIU Gui-jie<sup>1</sup>, KANG Xiao-dong<sup>1</sup>, YU Li-ping<sup>1</sup>, GU Mei-er<sup>1</sup>, YUAN Hong<sup>1</sup>, WU Bao-jin<sup>1,2,\*</sup>

(1. Laboratory of Experimental Animal Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036;  
2. Comparative Medicine Center of Yangzhou University, Yangzhou 225009)

**Abstract:** The W<sup>-3Bao</sup> mouse, which was obtained in previous ENU mutagenesis project, is a new mutant caused by the nonsense mutation of Kit gene. Mating and gross observing combining with PCR and sequencing were used for determining the genotypes of the W<sup>-3Bao</sup> mice. Embryonic development, hematological detection and histopathologic section methods were used for their phenotype analysis. The results showed that the W<sup>-3Bao/+</sup> mouse was white belly, white limb terminals and white tail tip. However, there was no difference of the external appearance among the W<sup>-3Bao/+</sup>, W<sup>-3Bao/3Bao</sup> and wild type mice for the embryo of 12.5 days. The W<sup>-3Bao/3Bao</sup> embryos looked pale since pregnant 14.5 days and dwarf since pregnant 16.5 days. The extremely low level of haematochrome and big red blood cells of W<sup>-3Bao/3Bao</sup> 18.5-day-embryos were found in the inspections of blood routine items and blood smear, which resulted in death of W<sup>-3Bao/3Bao</sup> homozygous mouse around being born, and no live postnatal W<sup>-3Bao/3Bao</sup> mouse was found in this study. No spermatogonium at different developmental stages was found in some contorted seminiferous tubules in adult W<sup>-3Bao/+</sup> mouse. At the age of 18.5-day embryo, the spermatogonium of W<sup>-3Bao/3Bao</sup> mice only lied in interstitial tissue and no one lied in contorted seminiferous tubules, while the spermatogonium of W<sup>-3Bao/+</sup> or W<sup>+/+</sup> mice lied in interstitial tissue and in contorted seminiferous tubules in the same time. At the age of 18.5-day embryo, cells arranged irregularly and primordial follicles were not seen in the W<sup>-3Bao/3Bao</sup> ovaries, while primordial follicles appeared clearly in the ovaries of W<sup>-3Bao/+</sup> or W<sup>+/+</sup> mice. We concluded that because of the nonsense mutation of Kit gene, the W<sup>-3Bao/+</sup> mice show white spot and abnormal development of some contorted seminiferous tubules. The W<sup>-3Bao/3Bao</sup> mice die around birth resulting from severe macrocytic anemia and show abnormal genital glands of both genders.

**Key words:** W<sup>-3Bao</sup> mouse; Kit gene; Decease; Macrocytic anemia; Gonadal abnormality

收稿日期: 2008-10-14; 接受日期: 2008-12-22

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(30670231)资助

\*通讯作者 (Corresponding author), Tel: 0571-28868852, E-mail: baojinwu@163.com

第一作者简介: 吴培林, 52岁, 硕士学位, 副教授, 研究方向为人类疾病动物模型

功能基因研究的策略之一是获得某一基因的众多突变体,通过对该基因突变群体内表现型及基因型的比较分析,推导出特定基因的生物学作用(Balling, 2001; Fu, 2003)。*Kit*是一个著名的与发育相关的基因,其编码的蛋白质是位于细胞膜上的酪氨酸激酶受体,控制着血细胞、黑色素细胞、原始生殖细胞、听毛细胞、肥大细胞以及小肠Cajal细胞等的发育(Geissler et al, 1988; Chabot et al, 1988; Cable et al, 1994; Huizinga et al, 1995; Broudy, 1997; Rajaraman et al, 2003; Magnol et al, 2007)。至2008年10月,小鼠(*Mus musculus*)基因组数据库(Mouse Genomic Informatics, MGI)中已经收录97种不同的*Kit*突变体,这些众多的*Kit*突变系小鼠对*Kit*的功能研究发挥了重要作用。 $W^{-3Bao}$ 是本研究组通过ENU(乙酰基亚硝基脒)诱变获得的呈单基因显性遗传的白斑突变系小鼠;通过连锁分析法,以微卫星为标记把白斑突变基因定位于第5号染色体距着丝粒41.57—42.91 cM之间(Wu et al, 2003),确定*Kit*为白斑候选基因;在此基础上,已经鉴定出 $W^{-3Bao}Kit$ 基因编码区第441碱基T颠换为A,使得第147位密码子由UAU变为终止密码子UAA,这一无义突变导致*Kit*编码蛋白提前终止(Xue et al, 2007)。根据国际通用命名规则,该小鼠被命名为 $W^{-3Bao}$ ,收录在MGI数据库中(<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=alleleDetail&key=27699>)。尽管有关 $W^{-3Bao}$ 小鼠的研究工作已经不少,但是一直未能获得突变基因纯合子小鼠,更不知道纯合子小鼠的表型特征。本文以 $W^{-3Bao}$ 小鼠为研究对象,研究其表型特征以及胚胎发育过程,发现突变杂合子小鼠部分精曲小管发育异常,纯合子小鼠因为大红细胞性贫血在出生前后死亡、生殖腺发育异常。该小鼠不仅仅是*Kit*基因功能研究的好材料,也是研究生殖细胞发育、胚胎造血机制的理想模型。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

1.1.1 实验动物和饲养条件  $W^{-3Bao}$ 突变杂合子小鼠及其背景品系C57BL/6J(B6)小鼠由扬州大学比较医学中心及杭州师范大学实验动物中心提供。实验动物生产许可证:SCXK(浙)2005—0020,使用许可证:SCXK(浙)2005—0071。动物饲养在屏障环境的动物房内,饲喂浙江省实验动物中心小鼠全价饲料,自由采食和饮水,室内温度控制在

(23±2)℃,湿度控制在(55±5)%,室内照明采用12:12h明暗交替。

1.1.2 主要试剂、引物及仪器 LA Taq polymerase、Pyrobest™ DNA Polymerase购自宝生物工程(大连)有限公司;QIA quick Gel Exaction Kit购自QIAGEN公司;测序委托上海生工生物工程公司进行。依据前期对突变基因鉴定的研究结果,本实验针对 $W^{-3Bao}$ 突变位点在基因组上的位置设计覆盖突变位点的PCR引物:上游引物为5'-GAATGCTGGTAT-GTTGGAGG-3';下游引物为5'-ACAGGATGG-AAGAAAGAGGC-3',预计扩增片段长为750 bp(Xue et al, 2007)。PCR仪为BIO-RAD的PTC-200;血常规检测仪为日本SYSMEX公司SYSMEX KX-21。

### 1.2 方法

1.2.1 突变小鼠的繁殖方法与表型特征观察 首先将 $W^{-3Bao}$ 突变杂合子小鼠互交,观察后代小鼠的表型变化,再将带有白斑的后代小鼠与正常B6小鼠交配,根据后代是否有正常小鼠判断亲代小鼠是否为突变基因纯合子。随后,将 $W^{-3Bao}$ 突变杂合子小鼠互交,每日行阴道栓检查,见栓者记为孕0.5天,分别在孕10.5、12.5、14.5、16.5及18.5天剖检母鼠,肉眼观察胎鼠及初生小鼠的表型特征,对可疑的异常小鼠进行编号、基因型鉴定、血液学及组织病理切片检查。

1.2.2 血液学检查 将2月龄 $W^{-3Bao}$ 突变杂合子小鼠与背景B6小鼠父母各20只,眶静脉采血用于血涂片及血常规检测。将胚胎18.5天小鼠断头采血20 μL,经0.5 mL抗凝稀释液稀释后用SYSMEX KX-21血细胞自动分析器检测,待基因型鉴定后分组。纯合子小鼠4只为观察组,杂合子和野生型共4只设为对照组。采血同时,取适量血液做血涂片,瑞氏后染色后镜检。数据统计方法为*t*检验。

1.2.3 组织病理学检查 2月龄正常B6小鼠及 $W^{-3Bao}$ 杂合子小鼠各6只,每种小鼠雌雄各3只,脱颈椎处死,取脑、心、肝、脾、肺、肾、胸腺、肾上腺、小肠组织、小肠淋巴结和生殖腺等主要脏器,用4%甲醛固定。取18.5天胎龄的正常及苍白的整体胎鼠各6只,经Bouin液固定。整体胚胎或组织块适当修剪后,常规脱水、浸蜡、包埋、6 μm厚度切片(整体胚胎行连续切片,每10片取1片)、HE染色和镜检。

1.2.4 突变小鼠的基因型鉴定 样本基因组DNA

的准备: 将有待基因型鉴定的突变系小鼠编号并剪取 0.5 cm 鼠尾, 参考分子克隆手册, 采用蛋白酶K消化、酚氯仿法提取基因组DNA (Sambrook et al 2002)。PCR扩增: PCR反应体系为 50  $\mu$ L, 其中基因组DNA模板 2  $\mu$ L, 上游引物 0.5  $\mu$ L(50 pmol/ $\mu$ L), 下游引物 0.5  $\mu$ L(50 pmol/ $\mu$ L), 10 $\times$ Reaction buffer(含  $Mg^{2+}$ )5  $\mu$ L, dNTP(10 mmol/L) 1  $\mu$ L, LA Taq polymerase (5U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L, 补灭菌超纯水至总体积 50  $\mu$ L。PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 35 s, 54 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 80 s, 35 个循环; 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。测序及基因型鉴定: PCR产物胶回收后送上海生工测序部测序, 测序结果用DNASTar比对寻找突变部位后, 再用Chromas软件观察测序峰图, 依据先前研究结果, *Kit*基因编码区第 441 位碱基处出现明显重叠波 (T与A) 为杂合子, 出现单一T波

为野生型, 出现单一A波为突变纯合子小鼠 (Xue et al, 2007)。

## 2 结果

### 2.1 $W^{3Bao}$ 白斑小鼠的遗传实验

将 $W^{3Bao}$ 白斑杂合子 (图 1) 互交繁殖了 30 只小鼠, 在子代小鼠中均未出现新的表型或见到白斑区域显著扩大。将 30 只杂合子互交后代 (有白斑) 与正常B6 配种, 每一窝后代均见到正常毛色的子代小鼠, 故推测这 30 只杂合子互交后代白斑小鼠均为杂合子, 而纯合子小鼠可能在胚胎期死亡。

### 2.2 $W^{3Bao}$ 小鼠的胚胎发育

将 $W^{3Bao}$ 杂合子小鼠配种检栓, 在孕 10.5、12.5 天剖检母鼠各 5 只, 肉眼未见胎鼠异常; 至孕 14.5



图 1  $W^{3Bao}$  突变小鼠

Fig. 1 The  $W^{3Bao}$  mutant mouse

突变基因杂合子表型为腹部、四肢末端及尾部末端白化, 右侧为 *Kit* 突变位点 (A/T 杂合子)。

The heterozygous shows white belly, limb terminals and tail tip. Right picture shows the mutation, site of *Kit*, which is the heterozygous of A and T.

天, 部分胎鼠身体稍白, 大小形状基本正常; 孕 16.5 天, 可见所有胎鼠存活、活动, 部分胎鼠明显苍白、个体略小; 孕 18.5 天, 胎鼠全部存活、活动正常, 部分胎鼠明显苍白, 个体矮小; 初生小鼠中常见死胎, 存活小鼠外观正常, 未见色泽苍白小鼠。结合基因型鉴定, 发现苍白胎鼠及出生死亡小鼠为突变基因纯合子小鼠, 突变杂合子胎鼠与野生型小鼠外观无区别 (图 2, 3)。本实验一共解剖 10 只孕 18.5 天母鼠, 获得胎鼠 56 只, 其中色泽苍白小鼠 12 只, 色泽苍白小鼠与全部胎鼠的比例与理论上纯合子小鼠数量相近, 说明纯合子小鼠可以存活至孕 18.5 天至出生前后。

### 2.3 血涂片及血常规检测

对 2 月龄左右的 $W^{3Bao}$ 白斑小鼠与B6 背景小鼠血涂片观察及血液常规分析未发现存在差异 (结

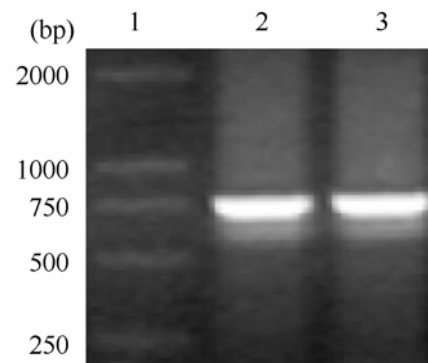


图 2 部分标本 *Kit* 基因突变区基因组局部的 PCR 扩增产物

Fig. 2 PCR Product of local genome

第 1 泳道为 DL2000 DNA marker, 第 2、3 泳道为 *Kit* 基因组扩增产物。Lane 1 was DL2000 DNA marker; Lane 2 and 3 were PCR products of local genome.

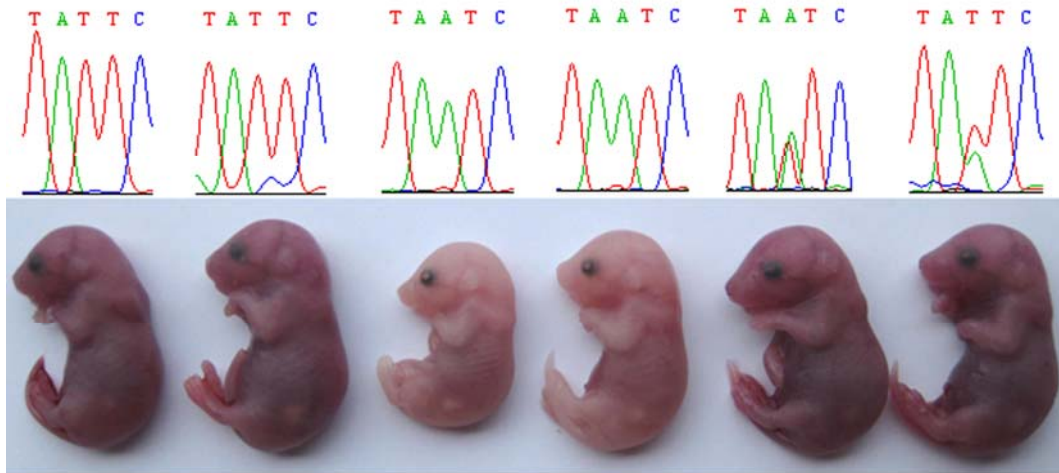


图 3 孕 18.5 天胎鼠外观及基因型鉴定

Fig. 3 External appearance and genotypes of mouse embryos of 18.5-day old

下列为 18.5 天胎鼠，上列为对应基因型；中间两只胎鼠外观苍白，个体矮小，为突变纯合子小鼠；左侧两只为野生型胎鼠，右侧两只为杂合型胎鼠；野生型及杂合型色泽红润、形态大小正常，外观无明显区别。

Lower: 18.5-day-embryos; Upper: the genotypes of corresponding mice. The two mice in the middle are homozygous, they look pale and dwarf. The right two mice are heterozygous and the left two mice are wild type, all of them look ruddy and normal.

果未显示)。胚龄 18.5 天的野生型或突变杂合子小鼠血液色泽深红，镜下血细胞数量多，细胞大小形态正常。与野生型相比，胚龄 18.5 天的突变纯合子小鼠血液颜色明显浅淡，血涂片中细胞数量较少，红细胞形状正常、直径显著增大（图 4）。血常规检测见突变纯合子小鼠的红细胞（RBC）数量、血红蛋白量（HGB），红细胞压积（HCT）显著低于野生型或杂合子；突变纯合子小鼠的平均红细胞体

积（MCV）、平均血红蛋白含量（MCH）、平均血红蛋白浓度（MCHC）显著高于野生型；突变纯合子小鼠的血小板（PLT）数量低于野生型或杂合子；经统计学检验，上述数据均有显著差异性。结合血涂片观察，突变纯合子小鼠被诊断为大红细胞性贫血。具体数值见表 1。

#### 2.4 组织病理学观察

$W^{-3Bao}$  杂合子小鼠脑、心、肝、脾、肺、肾、

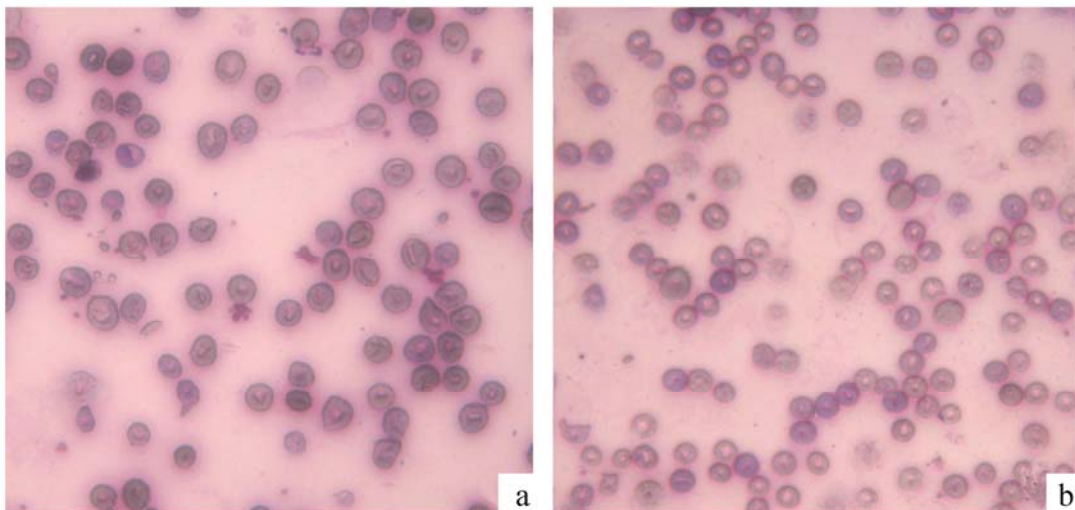


图 4 本研究中小鼠的血涂片

Fig. 4 Pictures of blood film for the mice studied

a: 突变基因纯合子小鼠  $W^{-3Bao/3Bao}$ ; b: 野生型小鼠  $B6^{+/+}$ 。瑞氏染色  $\times 400$ 。

a: From the homozygous mouse  $W^{-3Bao/3Bao}$ , b: From wild type mouse  $B6^{+/+}$ . Wright's staining  $\times 400$ .



表 1 本研究中小鼠的血常规检测结果  
Tab. 1 Detection results of blood routine items for the mice studied

	野生型及突变杂合子小鼠 ( $X \pm S$ ) Wild type and heterozygous mice	$W^{-3Bao}$ 突变纯合子小鼠 ( $X \pm S$ ) $W^{-3Bao/3Bao}$ homozygous mice	$P$ 值 ( $t$ 检验) $P$ value ( $t$ test)
白细胞数量(WBC)( $\times 10^9$ )	5 $\pm$ 1.14	3.95 $\pm$ 0.57	0.10–0.20
红细胞数量(RBC)( $\times 10^{12}$ )	3.12 $\pm$ 0.69	0.21 $\pm$ 0.09	<0.001
血红蛋白量(HGB)(g/L)	107.50 $\pm$ 18.43	20.5 $\pm$ 5.26	<0.001
红细胞压积(HCT)(L/L)	0.341 $\pm$ 0.069	0.034 $\pm$ 0.015	0.01–0.02
平均红细胞体积(MCV)(fL)	109.85 $\pm$ 6.68	154.25 $\pm$ 7.69	<0.001
平均血红蛋白含量(MCH)(pg)	34.75 $\pm$ 2.21	100.25 $\pm$ 16.23	<0.001
平均血红蛋白浓度(MCHC)(g/L)	316.50 $\pm$ 9.47	653.5 $\pm$ 130.47	0.002–0.005
血小板数量(PLT)( $\times 10^9$ )	422 $\pm$ 127.24	112.5 $\pm$ 97.12	0.01–0.005

胸腺、肾上腺、小肠组织、小肠淋巴结和卵巢等主要脏器的石蜡切片均未发现显著异常; 睾丸大小基本正常, 大多数生精小管发育正常, 其内可见处于不同发育阶段的各级生精细胞; 少数生精小管内无生精细胞, 只见支持细胞, 管腔内含分泌物, HE 染色呈粉红色泡沫状 (图 5)。18.5 日龄整体胎鼠的连续石蜡切片中, 生殖腺结构明显异常: 野生型雄鼠睾丸中精曲小管结构清晰, 精原细胞位于精曲小管内及睾丸间质中 (图 6a,b);  $W^{-3Bao/3Bao}$  雄鼠精曲

小管轮廓不清, 部分有形成精曲小管趋势, 精原细胞数量、形态与野生型相当, 但这些细胞全部位于睾丸间质中, 尚未迁入精曲小管 (图 6c, d)。野生型母鼠卵巢, 细胞排列呈团块状或条索状, 卵原细胞深染, 周围呈空泡状, 形成原始卵泡结构 (图 6e,f);  $W^{-3Bao/3Bao}$  卵巢内细胞密集, 弥散片状排列, 未形成原始卵泡基本结构 (图 6g, h)。骨髓、肝、脾等造血器官及其他器官未见显著异常 (骨髓切片见图 7)。

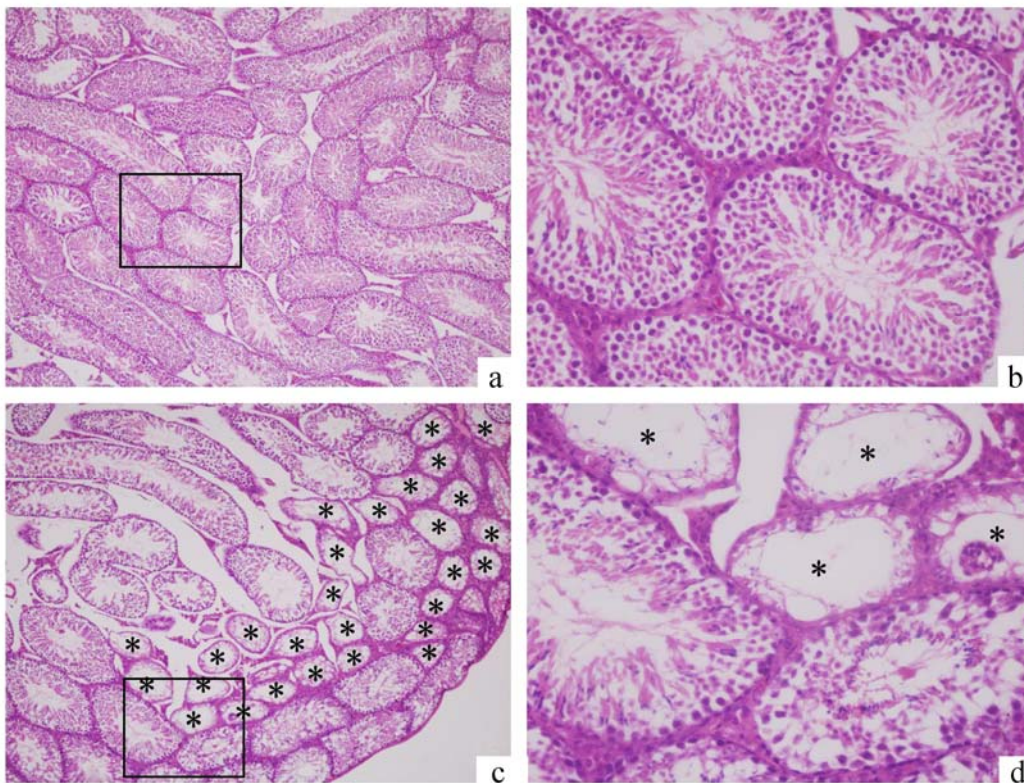


图 5 HE 染色示  $W^{-3Bao}$  杂合子小鼠睾丸结构

Fig. 5 Testis structure of  $W^{-3Bao}$  heterozygous mouse and control by HE staining

a, b 为  $B6^{+/+}$  小鼠; c, d 为  $W^{-3Bao/3Bao}$  小鼠。\* 示发育异常精曲小管; HE 染色。a, c  $\times 100$ , b, d 分别为 a, c 黑框部分放大 ( $\times 400$ )。

a and b were  $B6^{+/+}$  mouse, c and d were  $W^{-3Bao/3Bao}$  mouse. Abnormal contorted seminiferous tubules are marked with \*. HE staining, a and c  $\times 100$ , b and d  $\times 400$  for the box part of a and c respectively.



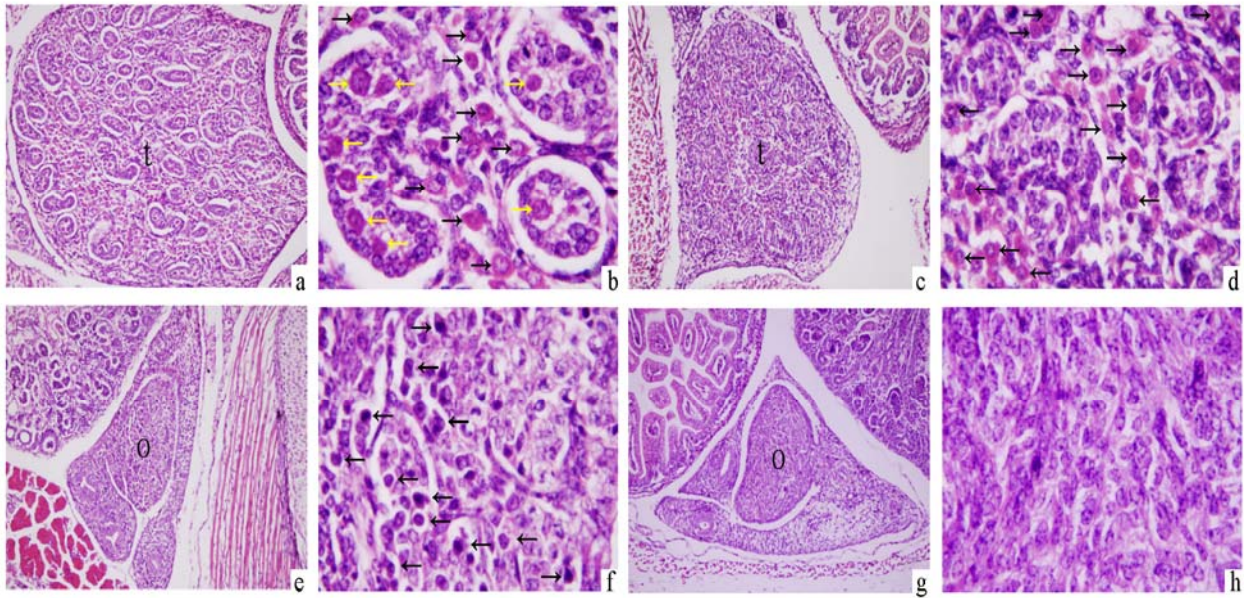


图 6 18.5 天小鼠胚胎生殖腺结构

Fig. 6 Genital gland structure of mouse embryo at the age of 18.5 day

a, b为 $B6^{+/+}$ 小鼠睾丸(以t示之),黄色箭头示精曲小管内精原细胞,黑色箭头示睾丸间质中精原细胞;c, d为 $W^{3Ba0/3Ba0}$ 小鼠睾丸,黑色箭头示睾丸间质中精原细胞,精曲小管内则无精原细胞;e, f为 $B6^{+/+}$ 小鼠卵巢(以O示之),黑色箭头示原始卵泡结构;g, h为 $W^{3Ba0/3Ba0}$ 小鼠卵巢,细胞排列弥散,无原始卵泡结构。HE染色, a, c, e, g  $\times 200$ , b, d, f, h  $\times 1000$ 。

a and b were the testes of  $B6^{+/+}$  mouse marked with t, yellow arrows show the spermatogonium in contorted seminiferous tubules, black arrows show the spermatogonium in interstitial tissue of testis; c and d were the testes of  $W^{3Ba0/3Ba0}$  mouse marked by t, black arrows show the spermatogonium in interstitial tissue of testis and no spermatogonium lies in contorted seminiferous tubules; e and f were the ovary of  $B6^{+/+}$  mouse marked with O, black arrows show primordial follicles; g and h were the ovary of  $W^{3Ba0/3Ba0}$  mouse marked with O, the cells are irregularly arranged and primordial follicles are not seen. HE staining, a, c, e, g  $\times 200$  and b, d, f, h  $\times 1000$ .

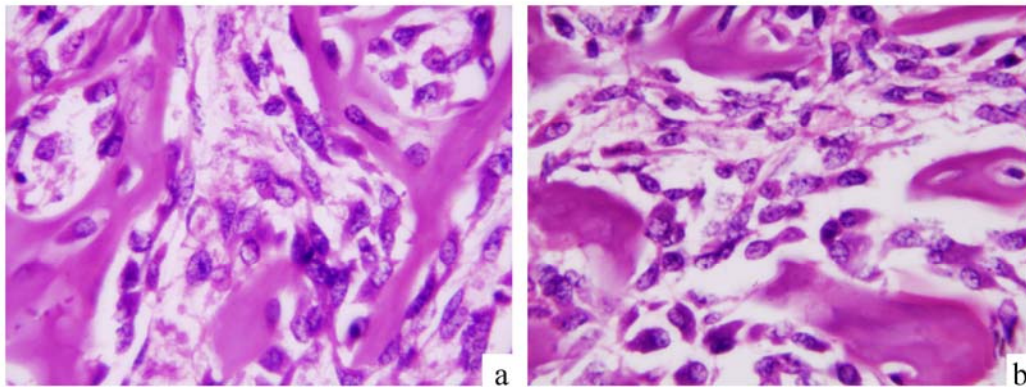


图 7 18.5 天小鼠胚胎骨髓切片

Fig. 7 Paraffin sections of bone marrow for the embryos of the 18.5-day-old mice

a为 $B6^{+/+}$ 小鼠, b为 $W^{3Ba0/3Ba0}$ 小鼠,两者胚胎骨髓切片无显著差异。HE染色,  $\times 1000$ 。

There is no significant difference of bone marrow for the 18.5-day-old embryos between the  $B6^{+/+}$  mouse (a) and the  $W^{3Ba0/3Ba0}$  mouse (b). HE staining  $\times 1000$ .

### 3 讨论

*Kit*蛋白由 975 个氨基酸构成,包含 3 个主要功能区域:一个具有 5 个免疫球蛋白类似重复序列的

细胞外配体结合域,一个短的疏水跨膜域和一个细胞内酪氨酸激酶功能域,后者被一个短的疏水片段分隔成两个部分,其配体是干细胞生长因子(stem cell factor, SCF)。SCF/c-kit共同参与多种细胞信号

的传导, 如: *Jak/STAT* 信号途径、*PL3K* 途径、*Src* 家族、*Ras/Raf/MEK/ERK* 信号途径, 从而在造血及维持肥大细胞、黑色素细胞和精原细胞的存活、增殖和分化过程中起着重要作用(Xiong et al, 2001; Linnekin et al, 1999; Ronnstrand et al, 2004)。 $W^{-3Bao}$  *Kit* 基因编码区第 441 位碱基由 T 颠换为 A, 使得其第 147 位密码子由 UAU 变为终止密码子 UAA, 导致 *Kit* 基因只能编码由 146 个氨基酸组成的部分胞外区部分, 这种蛋白短肽只包括信号肽部分而不包含任何已知的功能结构域 (Xue et al, 2007), 故  $W^{-3Bao}$  尽管是通过 ENU 诱变获得, 但由于产生终止密码导致了无义突变, 本质上相当于 *Kit* 基因敲除小鼠。在小鼠基因组数据库中 (MGI), *Kit* 基因突变系小鼠一共 97 例 (<http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=markerDetail&key=10603>)。有表型描述的 *Kit* 基因突变系小鼠共 38 种, 其中 37 种有色素变化, 22 种血细胞发生异常, 15 种有生殖问题。在所有 *Kit* 突变系小鼠中, 17 种被鉴定出突变碱基, 除 5 种大片段的插入或缺失, 其余均为错义突变且多位于 KIT 蛋白的胞内区, 与  $W^{-3Bao}$  的突变位点不同; 另有 12 种基因剔除小鼠, 其中 11 种都是采用 Knock in 策略研究单个位点的功能, 引入的突变位点也全部集中在胞内的两个激酶区域, 只有 1 种 *Kit* 剔除小鼠  $W^{lacZ}$  与  $W^{-3Bao}$  最为接近。研究者用 lacZ 酶替代 *Kit* 研究其在胚胎期表达。 $W^{lacZ/lacZ}$  小鼠患严重大红细胞贫血并于出生后死亡, 但作者未报道生殖腺发育过程 (Florence et al, 1996)。 $W^{-3Bao}$  与 *Kit* 基因敲除小鼠  $W^{lacZ}$  相比, 表型特征基本一致, 研究结果可比性好。

$W^{-3Bao}$  突变杂合子一条染色体 *Kit* 正常表达, 另一条同源染色体上则表达无功能的短肽, 最终正常的 KIT 之间能形成二聚体, 但是数量减少, 引起 c-kit 依赖的信号传导途径的“单倍体功能不足”而出现白斑表型及部分精曲小管的发育异常, 但本文发现突变杂合子的血细胞发育“似乎”不受影响, 只有当突变基因纯合后, *Kit* 基因的功能完全丧失, 才出现大红细胞贫血并在出生前后死亡。即便是 *Kit* 基因功能完全缺失导致严重的大红细胞贫血,  $W^{-3Bao}$  也能存活至出生前后。这说明胚胎早期造血功能并不完全依赖 *Kit* 信号过程, 而晚期造血则主要来源于 *Kit* 信号。Florence et al (1996) 曾经报道, 哺乳动物发育过程中卵黄囊及胎肝先后发挥 *Kit* 信号依赖的造血功能, 来源于胚内体腔中胚层的背主动脉及尿生

殖嵴附近在胚胎 9.5 天至 12.5 天间有不依赖 *Kit* 信号的造血功能。胚胎期背主动脉及尿生殖嵴附近的造血功能是 *Kit* 功能缺失后,  $W^{-3Bao/-3Bao}$  小鼠能够存活至出生前后的主要原因, 而独立于 *Kit* 信号机制之外的造血功能的意义以及他们与骨髓造血的关系尚待进一步研究。而让作者十分迷惑的是,  $W^{-3Bao/-3Bao}$  小鼠在严重贫血的情况下 (血色素只有正常的 1/15), 骨髓、肝脏及脾等造血相关器官并无显著形态学变化。

成年  $W^{-3Bao}$  杂合子小鼠表现为部分精曲小管内生精过程异常, 而纯合子雄鼠在胚胎 18.5 天时精原细胞的数量并无显著减少, 但位于精曲小管之外, 未能正常迁徙进入精曲小管, 有理由推测: 正是由于精原细胞无法迁徙到精曲小管内, 导致  $W^{-3Bao}$  杂合子后续发育的异常, 而不是这些精曲小管内生精过程的过早退化。先前关于 *Kit* 与生殖腺关系的报道很多, 但是都是描述纯合子小鼠生殖腺的异常, 如  $W^{wds}$  小鼠在杂合子状态下生殖腺正常, 当突变基因纯合时精原细胞在小鼠出生后发育停止 (Ruan et al, 2005)。在 *Kit* 突变杂合子出现部分精曲小管的发育异常的现象为本文首次报道。另外, 几乎所有资料强调 *Kit* 基因突变影响原始生殖细胞在整个发育过程中的迁徙、增值、分化, 但本文的研究结果提示: 可能就是在胚胎后期, 精原细胞未能迁徙到精曲小管内才是导致  $W^{-3Bao}$  小鼠睾丸异常的关键步骤。雌性小鼠卵巢在出生后有生殖周期的差异, 在胚胎发育过程中无位置变化, 卵原细胞较早进入卵巢, 本文未能确定影响卵巢发育的关键步骤。

人类不育影响着大约 10%—15% 的夫妇, 不育的原因男性约占 40%、女性约占 60%。男性原发性不育常伴有无精或寡精症, 遗传因素占病因的 60% 左右。 $W^{-3Bao}$  小鼠作为人类不育不孕的模型值得进一步探讨。尽管  $W^{-3Bao}$  纯合子小鼠生殖腺发育显著异常, 但是不能正常存活, 尚无法直接作为人类不育不孕的模型进行干预;  $W^{-3Bao}$  杂合子睾丸发育异常, 但在本实验中,  $W^{-3Bao}$  杂合子小鼠互交后, 解剖孕鼠 19 只, 共获得胎鼠 123 只, 每窝最少 3 只、最多 10 只、平均 6 只左右, 这与正常背景 B6 小鼠的繁殖能力并无太大差异; 但考虑物种差异, *Kit* 突变杂合子仍然可能影响生殖腺的发育, 临床工作中应注意 *Kit* 突变杂合子与不育不孕的关系。与  $W^{-3Bao}$  小鼠杂合子一致, 由于 *Kit* 基因突变导致的“花斑马”白化病 (斑驳病) 在人类并不罕见, 表现为

头部或躯干腹侧三角形白斑,多通过皮肤移植修复,*Kit*突变系小鼠为这类疾病的其他治疗方法的开发提供了材料(Fleischman et al, 1991)。人类由于叶酸或维生素B12缺乏、DNA合成障碍导致大红细胞性贫血。依据现有资料, $W^{-3Bao}$ 纯合子小鼠的大红细胞贫血不太可能与人类的大红细胞贫血有一致的病因,但由于十分相似的表型特征,两者之间有可能存在部分相同的机制。另一方面,本研究也提醒相关研究者,人类大红细胞贫血也可能存在其他致病原因,尤其人类大红细胞贫血病人经补充叶酸或维生素B12治疗效果不佳的病例也应该考虑*Kit*功能缺失的可能性。

本实验仅仅就突变基因纯合子小鼠的血液学

及组织病理变化进行了初步研究,据报道,*Kit*基因具有显著的“多效性”,在人类及小鼠,*KIT*及其配体*KITL*突变除了黑色素细胞、原始生殖细胞及造血细胞外,还可能引起肥大细胞减少及肝细胞发育异常等(Broudy, 1997; Rajaraman et al, 2003; Kapur et al, 1999; Magnol, 2007)。由于 $W^{-3Bao}$ 纯合子小鼠能够存活至出生前后,而且根据小鼠外观即可识别纯合子,这一小鼠不仅是研究胚胎造血机制以及生殖细胞发育的极好模型,而且对研究*Kit*基因功能缺失导致的其他异常表型的发育提供了材料。

**致谢:**感谢杭州师范大学钟本土教授对小鼠胚胎切片的读片、诊断工作。

### 参考文献:

- Balling R. 2001. ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, **2**: 463-492.
- Broudy VC. 1997. Stem cell factor and hematopoiesis [J]. *Blood*, **90**(4): 1345-1364.
- Cable J, Huszar D, Jaenisch R, Steel KP. 1994. Effects of mutations at the *W* locus (*c-kit*) on inner ear pigmentation and function in the mouse [J]. *Pigment Cell Res*, **7**: 17-32.
- Chabot B, Stephenson DA, Chapman VM, Besmer P, Bernstein A. 1988. The proto-oncogene *c-kit* encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse *W* locus [J]. *Nature*, **335**: 88-89.
- Florence B, Paulo DS, Chantal K, Colette E, Claude D and Jean-Jacques P. 1996. Spatial and temporal patterns of *c-kit*-expressing cells in  $W^{lacZ/+}$  and  $W^{lacZ/W^{lacZ}}$  mouse embryos [J]. *Development*, **122**: 3023-3033.
- Fleischman RA, Saltman DL, Stastny V, Zneimer S. 1991. Deletion of the *c-kit* protooncogene in the human developmental defect piebald trait [J]. *Proc Natl Acad Sci*, **88**: 10885-10889.
- Fu JL. 2003. Pay attention to ENU-induced mouse mutagenesis [J]. *Chinese Science Bulletin*, **48** (22): 2299-2300. [傅继梁. 2003. 值得关注的小鼠 ENU 诱变研究. 科学通报, **48** (22): 2299-2300.]
- Geissler EN, Ryan MA, Housman DE. 1988. The dominant-white spotting (*W*) locus of the mouse encodes the *c-kit* proto-oncogene [J]. *Cell*, **55**: 185-192.
- Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M, Malysz J, Mikkelsen HB, Bernstein A. 1995. *W*/*kit* gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity [J]. *Nature*, **373**: 347-349.
- Kapur R, Cooper R, Xiao X, Weiss MJ, Donovan P, Williams DA. 1999. The presence of novel amino acids in the cytoplasmic domain of stem cell factor results in hematopoietic defects in *Steel<sup>17H</sup>* mice [J]. *Blood*, **94**(6): 1915-1925.
- Linnekin D. 1999. Early signaling pathways activated by *c-Kit* in hematopoietic cells [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, **31** (10):1053-1074.
- Magnol L, Chevallier MC, Nalesso V, Retif S, Fuchs H, Klempt M, Pereira P, Riottot M, Andrzejewski S, Doan BT, Panthier JJ, Puech A, Beloeil JC, de Angelis MH, Hérault Y. 2007. *KIT* is required for hepatic function during mouse post-natal Development [J]. *BMC Developmental Biology*, **7**: 81-95.
- Rajaraman S, Wood LK, Willhite DK, Russell LB, Bedell MA. 2003. Effects of spontaneous *Kit<sup>Steel</sup>* mutations on survival and red blood cells of mice [J]. *Mammalian Genome*, **14**:168-174.
- Ronnstrand L. 2004. Signal transduction via the stem cell factor receptor/*c-Kit* [J]. *Cell Mol Life*, **61**: 2535-2548.
- Ruan HB, Zhang N, Gao X. 2005. Identification of a novel point mutation of mouse proto-oncogene *c-kit* through N-Ethyl-N-nitrosourea mutagenesis [J]. *Genetics*, **169**: 819-831.
- Sambrook J, Russell DW. 2002. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3RD ed (in Chinese) [M]. Beijing: Science Press, 484-488.
- Wu BJ, Mao HH, Shao YX, Xue ZF, Li HD. 2003. Four kinds of ENU-induced white spot mice and chromosome locations of the mutant genes [J]. *Chinese Science Bulletin*, **48**(22): 2301-2307. [吴宝金, 茅慧华, 邵义祥, 薛整风, 李厚达. 2003. ENU 诱变获得4种白斑小鼠及对突变基因的染色体定位. 科学通报, **48**(22): 2301-2307.]
- Xiong AQ, Chen SS, Di X, Liu CZ, Yao J. 2001. Establishment of engineered cells with stably expressing the human stem cell factor receptor *c-Kit* [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **17**(4): 478-482. [熊安琪, 陈松森, 狄旭, 刘长征, 姚杰. 2001. 人干细胞因子受体*c-kit*稳定表达细胞株的构建. 中国生物化学与分子生物学报, **17**(4): 478-482.]
- Xue ZF, Chen B, Yin Y, Mao HH, Yin J, YL, Wu BJ. 2007. A nonsense mutation of *kit* in  $W^{-3Bao}$  mouse results in dominant spotting phenotype [J]. *Acta Zoologica Sinica*, **53**(5): 934-938. [薛整风, 陈兵, 尹媛, 茅慧华, 殷俊, 杨玲, 吴宝金. 2007. *Kit* 基因无义突变导致  $W^{-3Bao}$  小鼠显性白斑形成. 动物学报, **53**(5): 934-938.]