



安徽医科大学学报

Acta Universitatis Medicinalis Anhui

ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: Tmem121 肝细胞特异性敲除小鼠模型的建立与鉴定
作者: 王月, 何国良, 李兰玉, 吴倩, 周军媚
网络首发日期: 2025-06-05
引用格式: 王月, 何国良, 李兰玉, 吴倩, 周军媚. Tmem121 肝细胞特异性敲除小鼠模型的建立与鉴定[J/OL]. 安徽医科大学学报.
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250605.0924.002>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

Tmem121 肝细胞特异性敲除小鼠模型的建立与鉴定

王 月¹, 何国良¹, 李兰玉², 吴 倩³, 周军媚^{1,4,5,6}

(桂林医学院附属医院¹广西肝脏损伤与修复分子医学重点实验室、⁵广西神经鞘脂代谢相关疾病基础研究重点实验室、⁶肝胆胰外科实验室, 桂林 541001; 桂林医学院²实验动物中心、³临床医学院、⁴中美健康与疾病脂质研究中心, 桂林 541001)

摘要 目的 建立并鉴定跨膜蛋白 121 (*Tmem121*) 肝细胞特异性基因敲除小鼠。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 与 Cre-loxp 系统构建 *Tmem121*^{fllox/+}/Cre⁺ 与 *Tmem121*^{fllox/fllox} 小鼠, 再将两种小鼠进行杂交繁育获得后代小鼠。提取后代小鼠的鼠尾 DNA, 通过 PCR 鉴定小鼠基因型, 获得肝细胞特异性 *Tmem121* 基因敲除小鼠 (*Tmem121*^{fllox/fllox}/Cre⁺, *Tmem121*^{ΔHep})。观察并分析敲除小鼠与对照小鼠的生长繁殖及器官发育情况。利用 PCR 及 Western blot 法验证 *Tmem121* 在小鼠原代肝细胞中敲除效率。利用 CellMask™ 深红质膜染色法比较对照组小鼠与敲除组小鼠原代肝细胞的形态差异并进行统计学分析。**结果** 通过小鼠基因型鉴定, 成功获得 *Tmem121*^{fllox/fllox}/Cre⁺ 小鼠。敲除小鼠与对照小鼠在体质量、繁殖能力及肝脏的生长发育方面均无明显差异。肝细胞特异性敲除 *Tmem121* 基因对肝组织形态结构及病理特征无明显影响。与对照组相比, 敲除组小鼠原代肝细胞 *Tmem121* 在 mRNA 及蛋白水平均明显降低 ($P<0.01$)。CellMask™ 深红质膜染色结果显示 *Tmem121* 敲除组小鼠的原代肝细胞的双核比例增多 ($P<0.05$), 细胞表面积减小 ($P<0.001$)。**结论** 成功建立肝细胞特异性 *Tmem121* 基因敲除小鼠模型, 为进一步研究 *Tmem121* 基因在肝脏疾病中的作用及机制提供了动物模型。

关键词 跨膜蛋白 121; 特异性敲除; Cre/LoxP 系统; 肝细胞; 基因型鉴定; 原代肝细胞分离

中图分类号 R332

文献标志码 A

Establishment and identification of hepatocyte-specific *Tmem121* knockout mouse model

Wang Yue¹, He Guoliang¹, Li Lanyu², Wu Qian³, Zhou Junmei^{1,4,5,6}

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82060124、82260529), 广西科技厅中央引导地方科技发展资金项目 (编号: 桂科 ZY21195024), 大学生创新创业训练计划项目 (编号: 202210601005)。

作者简介: 王 月, 女, 硕士研究生;

周军媚, 女, 副研究员, 硕士生导师, 通信作者, E-mail: 6376994@qq.com

(¹ Guangxi Key Laboratory of Molecular Medicine in Liver Injury and Repair, ⁵Guangxi Health Commission Key Laboratory of Basic Research in Sphingolipid Metabolism Related Diseases, ⁶Laboratory of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, the Affiliated Hospital of Guilin Medical University Guilin, 541001; ²Laboratory Animal Center, ³Clinical Medical College, ⁴China-USA Lipids in Health and Disease Research Center, Guilin Medical University, Guilin, 541001)

Abstract Objective To establish and identify hepatocyte-specific transmembrane protein 121 (*Tmem121*) knockout mice. **Methods** The hepatocyte-specific *Tmem121* knockout mice (*Tmem121*^{flox/flox}/Cre, *Tmem121*^{ΔHep}) were obtained by crossbreeding of *Tmem121*^{flox/+}/Cre and *Tmem121*^{flox/flox} mice, which were generated using the CRISPR/Cas9 and Cre/Loxp systems. The genotype was verified by PCR using genomic DNA extracted from mouse tails as template. The growth, reproduction and organ development of both control and knockout mice were observed and analyzed. PCR and Western blot methods were performed to assess the knockout efficiency of *Tmem121* in mouse primary hepatocytes. CellMask™ Deep Red plasma membrane staining was employed to compare the morphological differences in primary hepatocytes between control and knockout mice. **Results** *Tmem121*^{flox/flox}/Cre mice were successfully obtained according to genotype identification analysis, and there were no significant differences between control and knockout mice in body mass, reproductive ability, growth and development of liver. The specific knockout of *Tmem121* gene in primary hepatocytes did not significantly affect the morphological structure or pathological characteristics of liver tissue. However, compared to the control group, the levels of *Tmem121* mRNA and protein in the primary hepatocytes of the knockout group were significantly reduced ($P<0.01$). CellMask™ Deep Red plasma membrane staining indicated that the proportion of binucleated hepatocytes in *Tmem121*-deficient mice significantly increased ($P<0.05$), while the cell area was significantly reduced ($P<0.001$). **Conclusion** Hepatocyte-specific *Tmem121* knockout mice are successfully constructed, which provides an animal model for further exploration of the function and mechanism of *Tmem121* gene in liver diseases.

Key words transmembrane protein121; specific knockout; Cre/LoxP system; hepatocytes; genotype identification; primary hepatocyte isolation

Fund programs National Natural Science Foundation of China (Nos.82060124, 82260529), Central Government Guiding Local Scientific and Technological Development Fund from Guangxi

Science and Technology Department (No.GuikeZY21195024), College Student Innovation and Entrepreneurship Training Program (No.202210601005)

Corresponding author Zhou Junmei, E-mail: 6376994@qq.com

跨膜蛋白 121 (transmembrane protein121, *Tmem121*) 最早是从鸡胚心脏中分离的一个跨膜蛋白, 含有 319 个氨基酸的跨膜蛋白, 该蛋白序列从线虫到人类等不同物种进化中都具有高度保守性, 人与鼠的同源性更是高达 96%^[1]。研究^[2]发现 *Tmem121* 基因在成人的心脏、肝脏、骨骼肌、胰腺组织中均有较高的表达。而基因的组织表达谱暗示其功能。*Tmem121* 在心脏中的功能已有文献报道, 在心脏特异性转基因小鼠模型中, *Tmem121* 过表达能通过细胞外调节蛋白激酶信号通路抑制异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚^[3]。有文献^[4]报道 *Tmem121* 在宫颈癌组织中表达显著下调, *Tmem121* 过表达能抑制宫颈癌细胞株 HeLa 细胞的迁移和侵袭, 可能是一种新的宫颈癌抑制剂。*Tmem121* 在肝脏组织中的表达暗示其在肝脏中具有一定的作用, 但 *Tmem121* 在肝脏中的功能尚未见报道。因此为了探究 *Tmem121* 在肝脏中的作用, 该研究利用 Cre/LoxP 体系, 选择肝脏特异性表达的白蛋白 (albumin, Alb) 启动子驱动 Cre 酶的表达, 构建肝细胞特异性 *Tmem121* 基因敲除小鼠, 为后期进一步研究 *Tmem121* 在各种肝脏疾病中的作用提供动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 C57BL/6J *Tmem121*^{flox/+}/Cre 雄鼠与 *Tmem121*^{flox/flox} 雌鼠各三只, 体质量 (21±2) g, 由赛业生物科技有限公司定制【SCXK (苏) 2022-0016】。实验用小鼠均饲养于桂林医学院实验动物中心 SPF 级动物房【SYXK 桂 2020-0005】, 提供 12 h 的昼夜光变化周期, 给予采食和饮水自由, 环境温度 22~26 °C, 湿度 45%~65%。本研究的动物实验获得桂林医学院动物伦理委员会的批准 (伦理审批号: GLMC-IACUC-20241056)。

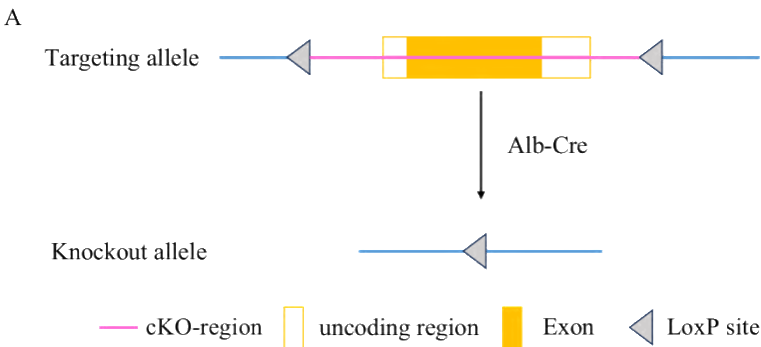
1.1.2 主要试剂 鼠尾基因型快速鉴定试剂盒、DNA ladder、Easy-Load™ PCR Master Mix (Green, 2×) (上海碧云天生物技术有限公司, 货号: D7283S、D0110、D7255), Hanks、PBS×10、L-Glutamine (上海遥鹏生物技术有限公司, 货号: C3571-0500、C3592-0500、C3543-0100), EDTA (上海懋康生物技术有限公司, 货号: MS3585), Percoll 细胞分离液、50×TAE (北京索莱宝科技有限公司, 货号: P8370、T1060), 低糖 DMEM、Williams E media、HEPES、pierce® Goat Anti-Mouse IgG、pierce® Goat Anti-Rabbit IgG、CellMask Deep Red Plasma Membrane Stain (美国 Thermo Fisher Scientific 公司, 货号: 11054002、12551032、15630080、UL295755、UH283636、C10046), 胎牛血清 FBS、Liberase、(美国 Sigma-Aldrich 公司,

货号：C0239、5401020001），FastPure® Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2（南京诺唯赞生物科技股份有限公司，货号：RC101-01），Anti-TMEM121（英国 Abcam 公司，货号：ab151077），Anti-β-actin（美国 EnoGene Biotech 公司，货号：E12-041），山羊抗兔 IgG（H+L），山羊抗鼠 IgG（H+L）（美国 Proteintech 生物公司，货号：SA00001-2、SA00001-1）。

1.1.3 主要仪器 PCR 仪（北京天根生化科技有限公司，型号：TGreat Expert），凝胶成像仪（美国 SYNGENEN 公司，型号：G: BOX），二氧化碳细胞培养箱（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，型号：371），超净工作台（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，型号：1300 SERIES A2），倒置荧光显微镜（美国 Thermo Fisher Scientific 公司，型号：EVOS™ M5000），高速离心机（德国 Eppendorf，型号：Centrifuge 5810R），石蜡切片机（上海徠卡显微系统贸易有限公司，型号：RM2245），全自动生化分析仪（深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司，型号：BS-460）。

1.2 方法

1.2.1 肝细胞特异性 *Tmem121* 基因敲除小鼠的构建与繁殖 小鼠 *Tmem121* 基因位于小鼠的 12 号染色体上，具有 2 个外显子，其编码序列位于第二个外显子。Loxp 位点选择在第二个外显子的两端插入，当含有 Loxp 位点的小鼠与肝细胞特异性表达的 Alb-Cre 小鼠交配时，Cre 酶删除 Loxp 区域的序列，使得 *Tmem121* 基因的整个编码区被删除，实现肝细胞特异性 *Tmem121* 基因的敲除，见图 1A。将 *Tmem121*^{fllox/+}/Cre 小鼠与 *Tmem121*^{fllox/fllox} 小鼠进行交配，根据孟德尔定律，子代小鼠包含四种基因型：*Tmem121*^{fllox/fllox}/Cre、*Tmem121*^{fllox/fllox}、*Tmem121*^{fllox/+}/Cre 和 *Tmem121*^{fllox/+}。其中 *Tmem121*^{fllox/fllox}/Cre 为肝细胞特异性 *Tmem121* 基因敲除小鼠（Hepatocyte-specific *Tmem121* knockout mice, *Tmem121*^{ΔHep}）；*Tmem121*^{fllox/fllox} 小鼠作为对照组小鼠，见图 1B。



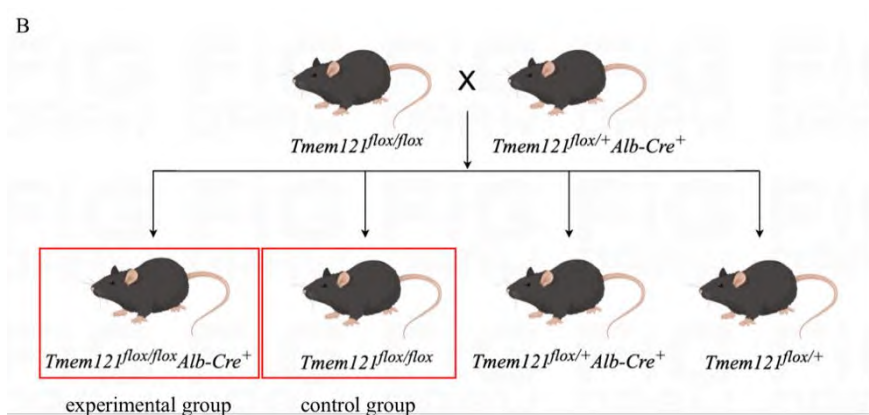


图 1 肝细胞特异性 *Tmem121* 基因敲除小鼠的构建 (A) 与繁殖策略图 (B)

Fig.1 Establishment (A) and reproductive strategies (B) of Hepatocyte-specific *Tmem121* knockout mice

1.2.2 小鼠基因型鉴定 待 F1 代小鼠 3 周龄时，剪取小鼠尾尖约 0.5 cm，置于 EP 管内并加入消化液 50 μ l。消化过程：55 $^{\circ}$ C 15 min，95 $^{\circ}$ C 5 min，最后加入 50 μ l 终止液终止消化。将上述反应获得的 DNA 通过 PCR 反应体系：2 $\times$ PCR Master Mix 10 μ l，去离子水 8 μ l，正反向引物各 0.5 μ l (10 μ mol/L)，DNA 1 μ l，引物序列见表 1。反应程序为：94 $^{\circ}$ C 3 min，然后进行 35 个循环（94 $^{\circ}$ C 30 s、60 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 30 s），接着 72 $^{\circ}$ C 5 min，最后稳定在 4 $^{\circ}$ C。PCR 完成后，对产物进行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳，电压 110 V，时间 20 min。电泳结束，用凝胶成像系统拍照观察并分析。

表 1 引物序列

Tab.1 Primer sequences

Gene	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')	Length/bp
<i>Flox</i>	TCTAGGATCAGAAACTTGCTCAGT	CCACTCGCATTCTAAATGCCCT	290/226
<i>Alb-Cre</i>	GAAGCAGAAGCTTAGGAAGATGG	TTGGCCCCTTACCATAACTG	390
<i>Tmem121</i>	CTTCGTGCTGGAGATCAAGC	ATCCAAAGCCACCCAGAAGA	219
<i>GAPDH</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTG	TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA	123

1.2.3 评价小鼠基本情况、繁育能力及肝脏组织器官生长发育情况 观察 *Tmem121^{flox/flox}* 和 *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠的体质量、生长发育状态、繁殖能力等。取 8 周龄的 *Tmem121^{flox/flox}* 和 *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠各 7 只称重。解剖取出小鼠肝组织，称重并计算肝系数（肝脏质量与体质量之比）。

1.2.4 肝脏组织 HE 染色 将小鼠肝脏组织石蜡包埋、切片，烤片后将石蜡切片于二甲苯中脱蜡 10 min，依次用梯度乙醇水化，苏木精染色 2 min，用流水冲洗，0.1% 的盐酸酒精进

行分化，流水冲洗，伊红染色 1 min 后，再次用流水冲洗，最后依次经梯度乙醇脱水，二甲苯透明，中性树脂封片后使用正置光学显微镜观察并拍照。

1.2.5 小鼠肝功能生化指标检测 各取 7 只 *Tmem121^{flox/flox}* 及 *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠，经眼球取血，静置 1 h 后，3 000 r/min 离心 10 min，取上层血清备用。运用全自动生化分析仪，按照操作说明，对两组小鼠的丙氨酸氨基转移酶（alanine aminotransferase, ALT）、门冬氨酸氨基转移酶（aspartate aminotransferase, AST）、白蛋白（albumin, ALB）以及乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase, LDH）的含量进行检测。

1.2.6 小鼠原代肝细胞的分离与培养 取 8~10 周龄 *Tmem121^{flox/flox}* 和 *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠（体质量约 22~25 g），麻醉后固定。腹部消毒后，做“U”形切口暴露腹腔门静脉和下腔静脉。从下腔静脉平行进针，蠕动泵按 3 ml/min 的流速灌注肝脏，灌注液进入肝脏并出现白点时立即剪开门静脉，待肝脏呈灰白色时，灌注液更换含 Liberase 酶的消化缓冲液，5 min 左右肝脏边缘透明后停止灌注。此时肝脏脆弱易碎，小心取出肝脏，放入含预冷的消化缓冲液管中转移至培养皿，撕开肝脏包膜释放细胞，混悬液用 70 μm 细胞筛过滤，收集滤液。利用 Percoll 连续密度梯度离心法分离纯化肝细胞；细胞铺板后，3 h 更换为维持培养基（Williams E media + 1% L-Glutamine + 1% 双抗）。

1.2.7 PCR 检测 *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠原代肝细胞中 *Tmem121* 的表达 收集 *Tmem121^{flox/flox}* 和 *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠原代肝细胞，按照试剂盒所附说明进行 RNA 提取并逆转录成 cDNA。通过 PCR 反应扩增 *Tmem121* 和内参 *GAPDH* 基因，引物序列见表 1。随后将 PCR 产物进行电泳（110 V，20 min），凝胶成像仪拍照并分析结果。

1.2.8 Western blot 检测 *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠原代肝细胞中 *Tmem121* 蛋白表达 收集 *Tmem121^{flox/flox}* 和 *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠原代肝细胞，加入适量的蛋白裂解液 RIPA，用于提取细胞的总蛋白。依照一定比例添加蛋白上样缓冲液，在 100 °C 的条件下煮沸 5 min。制备 SDS 聚丙烯酰胺凝胶以便进行上样电泳操作，接着进行转膜（湿转方式为：100 V 电压持续 60 min），再用 5% 的脱脂牛奶在室温下封闭 1 h。用 TBST 清洗 3 次后，将其置于抗体 *Tmem121*（1:2 000）、β-actin（1:3 000）稀释液中，在 4 °C 条件下孵育过夜。次日，加入相应的二抗 [山羊抗兔 IgG（H+L）、山羊抗鼠 IgG（H+L），1:5 000]，于常温下孵育 1 h。再次用 TBST 清洗 3 次后，向其中加入 ECL 显影剂，在凝胶成像系统对目的蛋白条带进行检测，并分析实验结果。

1.2.9 细胞膜染色法观察原代肝细胞形态 使用 CellMask™ Deep Red Plasma Membrane Stains 试剂盒对原代肝细胞进行细胞膜染色。步骤如下：先对培养的原代细胞 PBS 冲洗 3

次，接着滴加染色液，于 37℃ 环境中孵育 20 min；随后舍弃染色液，用 PBS 冲洗 3 次，再加入 4%多聚甲醛在 37℃ 下固定 10 min；去掉固定液后进行 PBS 冲洗；然后滴加 DAPI，在室温避光条件下孵育 5 min；最后用 PBS 冲洗 3 次，在荧光显微镜下进行观察并拍照。

1.3 统计学处理 每次实验重复至少 3 次及以上，实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。运用 *t* 检验来检验实验组和对照组之间的统计学差异， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。采用 GraphPad Prism 7.0 软件进行绘图。

2 结果

2.1 肝细胞特异性 *Tmem121* 敲除小鼠基因型鉴定结果 对 *Tmem121*^{flx/+}/Cre 小鼠与 *Tmem121*^{flx/flx} 小鼠杂交子代进行基因型鉴定，部分结果见图 2。利用 Flox 引物仅扩增出 290 bp 条带的小鼠基因型为 *Tmem121*^{flx/flx} 纯合子，仅扩增出 226 bp 条带的为野生型小鼠，同时扩增出 290 bp 和 226 bp 条带为 *Tmem121*^{flx/+} 小鼠。利用 Cre 引物扩增出 390 bp 条带则表明小鼠含有 Cre 基因。结果显示 1, 2, 3, 4, 6, 7 为含 Cre 基因的小鼠，1, 6 号为 Alb-Cre 小鼠, 2 号为 *Tmem121*^{ΔHep} 小鼠；3, 4, 7 号为 *Tmem121*^{flx/+}/Cre 小鼠, 5 号为 *Tmem121*^{flx/flx} 小鼠。

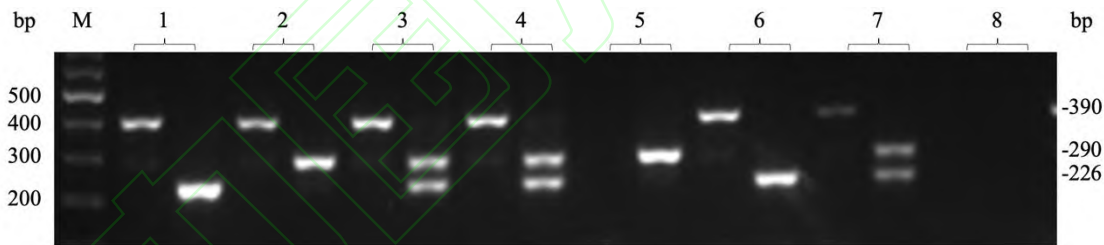


图 2 小鼠基因型 PCR 鉴定结果

Fig.2 Genotype identification of mouse by PCR

M:DNA marker; 1-7:mouse ID, The front lane is Alb-Cre primer, and the back lane is Flox primer;8:negative control.

2.2 肝细胞特异性 *Tmem121* 敲除小鼠的一般情况 *Tmem121*^{flx/flx} 小鼠与 *Tmem121*^{ΔHep} 小鼠在外观、生长发育、性情方面均未见明显差异见图 3A-3B。*Tmem121*^{ΔHep} 雌鼠妊娠期为 19~21 d，每胎产 4~12 只小鼠，成活率>95%。成年后 *Tmem121*^{flx/flx} 小鼠与 *Tmem121*^{ΔHep} 小鼠体重没有明显差异 ($t = 0.016$, $P > 0.05$) 见图 3C。

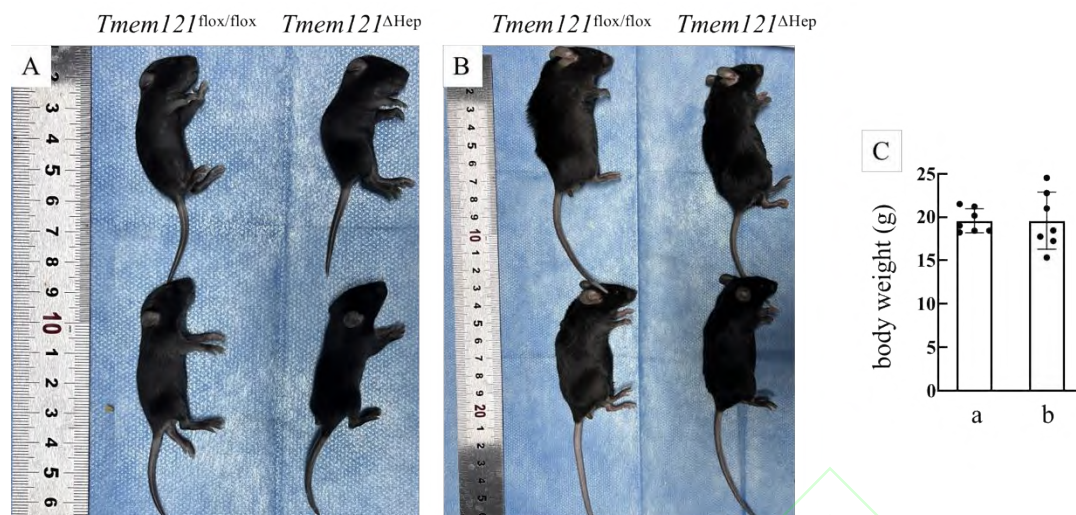


图3 *Tmem121^{flox/flox}* 和 *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠外观及体质量比较

Fig.3 Comparison of appearance and weight between *Tmem121^{flox/flox}* and *Tmem121^{ΔHep}* mice

A, B: Comparison of the appearances of 10-day-old mice; B: Comparison of the appearances of 10-week-old mice; C: Comparison of the body weights of adult mice ($n = 7$); a: *Tmem121^{flox/flox}* mice; b: *Tmem121^{ΔHep}* mice.

2.3 肝细胞特异性 *Tmem121* 敲除小鼠肝脏生长发育情况 为分析肝细胞特异性 *Tmem121* 敲除对小鼠肝脏发育的影响, 解剖 8 周龄 *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠及同窝对照小鼠, 取肝组织进行形态学观察和称量。结果显示, *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠与同窝对照小鼠相比, 肝系数及肝脏形态均无明显差异 ($t = 0.687$, $P > 0.05$), 见图 4A-4B。



图4 *Tmem121^{flox/flox}* 和 *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠肝系数及形态学观察

Fig.4 Observation of the liver coefficient and morphology in *Tmem121^{flox/flox}* and

Tmem121^{ΔHep} mice

A, B: Comparison of the appearances of 10-day-old mice; B: Comparison of the appearances of 10-week-old mice; C: Comparison of the body weights of adult mice ($n = 7$); a: *Tmem121^{flox/flox}* mice; b: *Tmem121^{ΔHep}* mice.

2.4 *Tmem121^{flox/flox}* 及 *Tmem121^{ΔHep}* 小鼠肝脏组织 HE 染色 为了分析肝脏特异性敲除

Tmem121 对小鼠肝脏组织的影响, 苏木精-伊红染色观察 *Tmem121*^{ΔHep} 小鼠与 *Tmem121*^{flox/flox} 小鼠的肝脏组织, 结果发现 (图 5), 两组小鼠肝脏组织被膜完整, 肝索排列较为整齐; 中央静脉内皮完整, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列, 肝小叶结构正常, 未见明显淤血扩张及炎性细胞浸润; 结果提示肝细胞特异性敲除 *Tmem121* 基因对肝组织的形态结构及病理特征无明显影响。

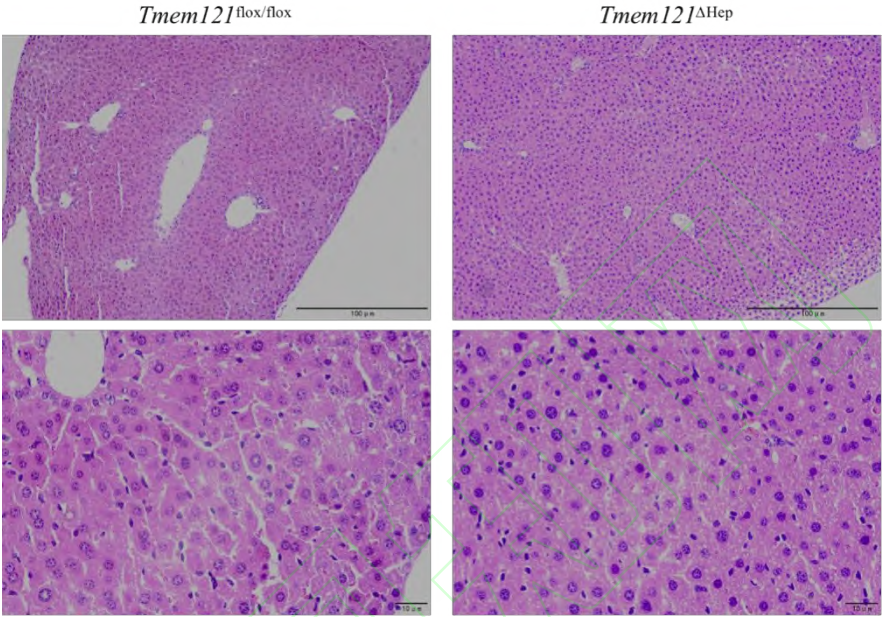


图 5 小鼠肝脏组织 HE 染色图

Fig.5 HE staining of mice liver tissue

2.5 *Tmem121*^{flox/flox} 及 *Tmem121*^{ΔHep} 小鼠血清生化指标的比较 收集 *Tmem121*^{flox/flox} 及 *Tmem121*^{ΔHep} 小鼠血清进行生化指标测定, 分析肝脏特异性敲除 *Tmem121* 对小鼠肝脏功能的影响。ALT 和 AST 是临床上应用最广泛的反映肝细胞损伤的生化指标。血清生化分析结果发现 ALT ($t=0.730$, $P>0.05$) 和 AST ($t=0.914$, $P>0.05$) 在两组小鼠中均差异无统计学意义。ALB 蛋白是反映肝脏合成功能的标志物, LDH 常用来评估肝功能是否正常。结果显示 ALB ($t=2.137$, $P>0.05$) 和 LDH ($t=0.762$, $P>0.05$) 在两组小鼠中的差异也没有统计学意义, 见图 6。这些结果提示肝细胞特异性敲除 *Tmem121* 基因在正常状态下对肝功能无明显影响。

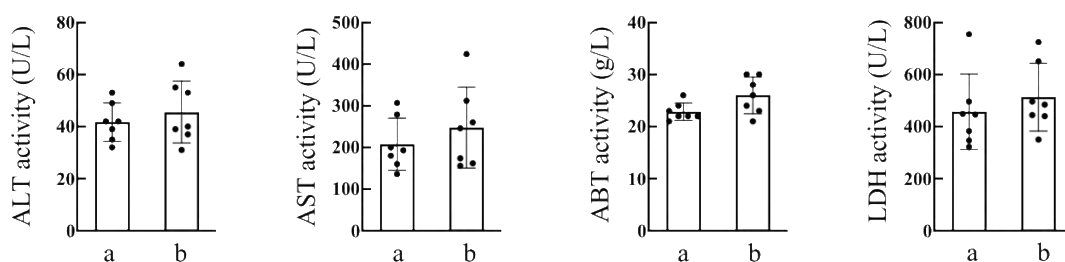


图 6 小鼠血生化指标比较 ($n = 7$)

Fig.6 Comparison of the blood biochemical indicators of mice ($n = 7$)

a: *Tmem121*^{flox/flox} mice; b: *Tmem121*^{ΔHep} mice.

2.6 验证肝细胞中 *Tmem121* 的敲除效果 利用 PCR 及 Western blot 检测肝细胞中 *Tmem121* 在转录水平和翻译水平上的表达变化。PCR 结果显示 *Tmem121*^{flox/flox} 小鼠肝细胞可扩增出 219 bp, 而 *Tmem121*^{ΔHep} 小鼠肝细胞无条带 (图 7A), 表明 *Tmem121*^{flox/flox} 细胞基因含有 *Tmem121* 片段。Western blot 结果显示 *Tmem121*^{ΔHep} 小鼠肝细胞中基本检测不到 *Tmem121* 蛋白 (图 7B)。提示肝脏特异性 *Tmem121* 基因敲除小鼠构建成功。

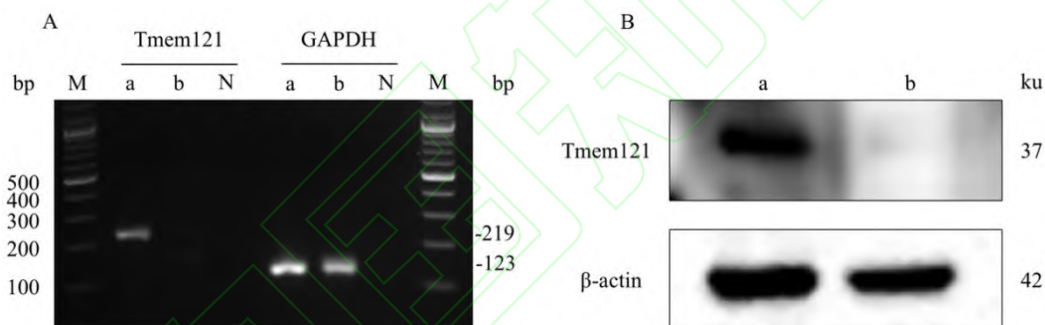


图 7 *Tmem121*^{flox/flox} 和 *Tmem121*^{ΔHep} 小鼠肝细胞 *Tmem121* 表达水平

Fig.7 The expression level of *TMEM121* in the hepatocytes of *Tmem121*^{flox/flox} and *Tmem121*^{ΔHep} mice

A: The expression levels of *Tmem121* and *GAPDH* genes in mouse primary hepatocytes detected by PCR; B: The protein expression levels of *Tmem121* in mouse primary hepatocytes detected by Western blot; M: DNA marker; N: Negative control; a: *Tmem121*^{flox/flox} mice; b: *Tmem121*^{ΔHep} mice.

2.7 *Tmem121* 缺失对原代肝细胞形态的影响 Invitrogen CellMask™ 细胞膜染料能够快速均匀地标记细胞膜, 便于观察肝细胞的形态结构。*Tmem121*^{ΔHep} 和 *Tmem121*^{flox/flox} 小鼠原代肝细胞膜染色发现, 与 *Tmem121*^{flox/flox} 相比, *Tmem121*^{ΔHep} 小鼠肝细胞表面积平均值为 688.49 μm^2 , 是对照鼠的 46.89% ($t = 10.750$, $P < 0.001$)。同时发现 *Tmem121*^{ΔHep} 小鼠中的双核细胞较多, 是对照小鼠的 1.23 倍 ($t = 3.062$, $P < 0.05$) 见图 8A-8C。

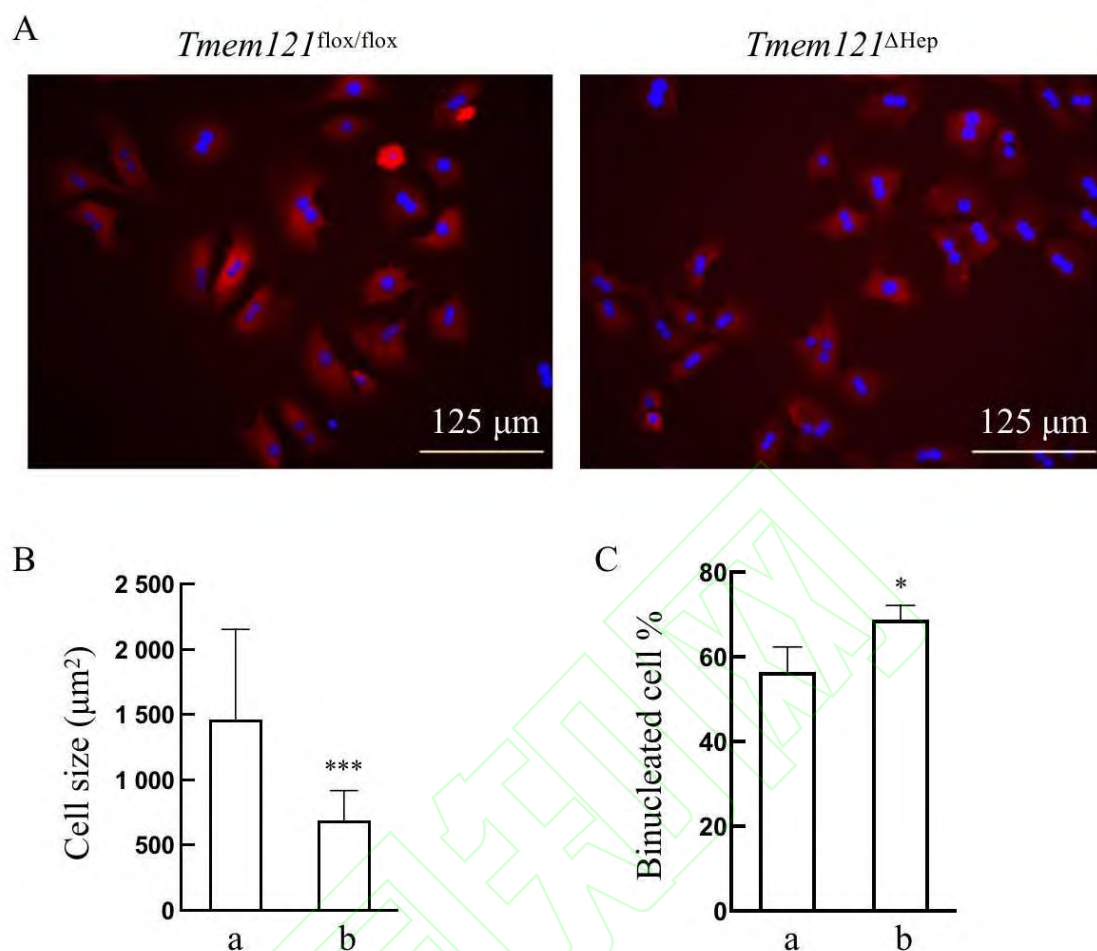


图8 *Tmem121^{ΔHep}* 和 *Tmem121^{flox/flox}* 小鼠原代肝细胞膜染色和细胞表面积及双核细胞比例

Fig.8 Cell membrane staining, cell surface area and the proportion of binuclear cells of primary hepatocytes in *Tmem121^{flox/flox}* and *Tmem121^{ΔHep}* mice

A: Cell membrane staining of primary hepatocytes in *Tmem121^{flox/flox}* and *Tmem121^{ΔHep}* mice; B-C: Cell surface area and the proportion of binuclear cells of primary hepatocytes in *Tmem121^{flox/flox}* and *Tmem121^{ΔHep}* mice; * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$; a: *Tmem121^{flox/flox}* mice; b: *Tmem121^{ΔHep}* mice.

3 讨论

跨膜蛋白是跨越细胞质膜的蛋白，常穿膜1次或多次，约占总蛋白的三分之一，具有非常重要的功能，是药物作用的重要靶点^[5]。据估计，超过50%的上市药物靶向跨膜蛋白，包括G蛋白偶联受体、离子通道和溶质载体转运体^[6]。但是还有一类跨膜蛋白因其结构和功能的研究非常有限，故以跨膜蛋白（transmembrane, TMEM）命名^[7]。*Tmem121*蛋白便是其中一员，*Tmem121*在成人肝脏组织中较强的表达，提示其在肝脏中可能具有一定的功能，但目前尚未见研究报道。

CRISPR/Cas9 基因敲除技术联合 Cre-loxp 系统构建组织特异性基因敲除的动物模型是研究基因功能的重要手段^[8-10]。*Tmem121* 基因具有 2 个外显子，其蛋白的编码区位于第二个外显子上。本研究在 *Tmem121* 第二个外显子的两端插入两个方向相同的 loxP 位点，利用肝细胞特异性表达的 Alb-Cre 识别 loxP 位点，并切除在两个 loxP 位点间的 DNA 序列，从而实现肝细胞特异性敲除 *Tmem121* 基因。利用 Alb-Cre 工具鼠和 *Tmem121*^{fllox/fllox} 杂交，得到 *Tmem121*^{fllox/+}/Cre 小鼠，再将 *Tmem121*^{fllox/+}/Cre 和 *Tmem121*^{fllox/fllox} 进行杂交，对子代小鼠进行基因型鉴定，最终得到 *Tmem121*^{fllox/fllox}/Cre (*Tmem121*^{ΔHep}) 小鼠。PCR 和 Western blot 实验结果显示 *Tmem121*^{ΔHep} 小鼠肝细胞中 *Tmem121* 的表达水平显著降低，这表明在肝脏中特异性敲除 *Tmem121* 小鼠构建成功。本研究发现，与对照鼠相比，*Tmem121*^{ΔHep} 鼠的生育能力和生长发育都正常，肝脏大小和肝功能均没有明显变化。HE 染色显示 *Tmem121*^{ΔHep} 鼠的肝脏组织中肝小叶结构正常，肝细胞排列整齐，未见明显淤血扩张及炎性细胞浸润等病理表型。但是在 *Tmem121* 缺失的肝细胞中双核细胞所占比例显著增加，肝细胞表面积显著变小。

成人肝脏是独特的多倍体器官，尤其在病理情况下，多倍体肝细胞增加，多倍体肝细胞在肝脏中与代谢改变、损伤修复、肿瘤发生密切相关^[11]。有研究发现^[12]，肝脏特异性缺失 E2F 转录因子 7 (E2F transcription factor 7, *E2f7*) 和 E2F 转录因子 8 (E2F transcription factor 8, *E2f8*) 的小鼠肝脏中双核肝细胞显著减少，而肝脏功能保持正常；但当小鼠受到促瘤刺激时，肝脏容易发生肿瘤，可见肝脏多倍体状态不利于肝脏肿瘤的形成。在正常稳态条件下，肝细胞倍性的增加不影响肝脏功能，但病理情况下肝细胞多倍性会使肝脏对损伤刺激更敏感^[13]。*Tmem121*^{ΔHep} 鼠表型正常，但肝脏中的双核细胞明显增加，*Tmem121*^{ΔHep} 鼠是否对病理刺激会更敏感，从而发生更明显的病理性改变，这还需要进一步的实验来证明。

Matsumoto 团队^[14]利用多色报告基因标记和追踪多倍体肝细胞，发现在多种肝损伤模型中，肝脏中多倍体肝细胞具有更强的增殖能力。这些研究结果提示肝细胞的倍性与细胞的增殖能力密切相关。本研究肝细胞中 *Tmem121* 缺失使肝脏中双核细胞增加，提示 *Tmem121* 可能影响肝细胞增殖，这为以后的研究提供了方向。

总之，本研究成功构建了 *Tmem121* 肝细胞特异性敲除小鼠模型，结果显示肝细胞中 *Tmem121* 基因缺失的小鼠的发育正常，肝功能正常，但多倍体肝细胞增加 ($P < 0.05$)，细胞表面积大小减小 ($P < 0.001$)，这提示 *Tmem121* 可能在肝脏损伤修复过程中与肝细胞的增殖以及病理刺激下肝癌的发生有关。本研究为进一步深入探究 *Tmem121* 在肝脏疾病中的作用及其机制提供了可靠的实验动物模型。

参考文献

- [1] Nesset A L, Bader D M. Hole is a novel gene product expressed in the developing heart and brain[J]. *Mech Dev*, 2002, 117(1-2): 347-50. doi: 10.1016/s0925-4773(02)00213-7.
- [2] Zhou J, Li Y, Liang P, et al. A novel six-transmembrane protein hHole functions as a suppressor in MAPK signaling pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005, 333(2): 344-52. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.05.115.
- [3] Xu W, Wang Y, Zhou J, et al. Cardiac specific overexpression of hHole attenuates isoproterenol-induced hypertrophic remodeling through inhibition of extracellular signal-regulated kinases (ERKs) signalling[J]. *Curr Mol Med*, 2016, 16(5): 515-23. doi: 10.2174/1566524016666160523143704.
- [4] Yang B, Cai Y, Zhu P, et al. Transmembrane protein 121 as a novel inhibitor of cervical cancer metastasis[J]. *Exp Ther Med*, 2022, 24(3): 572. doi: 10.3892/etm.2022.11509.
- [5] Fagerberg L, Jonasson K, von Heijne G, et al. Prediction of the human membrane proteome[J]. *Proteomics*, 2010, 10(6): 1141-9. doi: 10.1002/pmic.200900258.
- [6] Fliegel L. Structure and function of membrane proteins[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 8350. doi: 10.3390/ijms24098350.
- [7] Marx S, Dal Maso T, Chen J W, et al. Transmembrane (TMEM) protein family members: Poorly characterized even if essential for the metastatic process[J]. *Semin Cancer Biol*, 2020, 60: 96-106. doi: 10.1016/j.semcancer.2019.08.018.
- [8] 董伟波, 陈悦兰, 王 焱, 等. 巨噬细胞特异性 TDO2 基因敲除小鼠的构建[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(6): 994-1000. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.013.
- [8] Dong W B, Chen Y L, Wang Y, et al. Construction of macrophage-specific TDO2 knockout mice[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(6): 994-1000. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.013.
- [9] 许雅萍, 王语涵, 陈婷婷, 等. 肝细胞特异性 Sirt3 基因敲除小鼠模型的构建[J]. *安徽医科大学学报*, 2024, 59(3): 384-90. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.003.
- [9] Xu Y P, Wang Y H, Chen T T, et al. Construction of hepatocyte-specific Sirt3 gene knockout mouse model[J]. *Acta Univ Med Anhui*, 2024, 59(3): 384-90. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.03.003.
- [10] Foster M P, Benedek M J, Billings T D, et al. Dynamics in cre-loxP site-specific recombination[J]. *Curr Opin Struct Biol*, 2024, 88: 102878. doi: 10.1016/j.sbi.2024.102878.
- [11] 张亦凡, 鲁逸权, 郝风节, 等. 多倍体肝细胞的生理功能及其病理性改变的相关疾病[J]. 外

科理论与实践, 2023, 28(6): 574-9. doi: 10.16139/j.1007-9610.2023.06.015.

[11] Zhang Y F, Lu Y Q, Hao F J, et al. Physiological function of polyploid hepatocytes and pathological changes in its associated diseases[J]. J Surg Concepts Pract, 2023, 28(6): 574-9. doi: 10.16139/j.1007-9610.2023.06.015.

[12] Wilson S R, Duncan A W. The ploidy state as a determinant of hepatocyte proliferation[J]. Semin Liver Dis, 2023, 43(4): 460-71. doi: 10.1055/a-2211-2144.

[13] Sladky V C, Akbari H, Tapias-Gomez D, et al. Centriole signaling restricts hepatocyte ploidy to maintain liver integrity[J]. Genes Dev, 2022, 36(13-14): 843-56. doi: 10.1101/gad.349727.122.

[14] Matsumoto T, Wakefield L, Tarlow B D, et al. *In vivo* lineage tracing of polyploid hepatocytes reveals extensive proliferation during liver regeneration[J]. Cell Stem Cell, 2020, 26(1): 34-47.e3. doi: 10.1016/j.stem.2019.11.014.