

## 研究论文

## 肾上腺皮质束状带特异性表达Cre重组酶转基因小鼠的构建

张宁宁<sup>1, #</sup>, 王长楠<sup>1, #</sup>, 倪鑫<sup>1, 2, \*</sup><sup>1</sup>海军军医大学生理学教研室, 上海 200433; <sup>2</sup>中南大学湘雅医院分子代谢组学研究中心, 长沙 410008

**摘要:** 肾上腺是人体重要的内分泌器官。由于缺乏肾上腺皮质束状带特异性表达Cre酶的工具鼠, 目前对肾上腺皮质束状带细胞中特异表达基因的功能缺乏深入的解析。*CYP11B1*基因编码类固醇11 $\beta$ -羟化酶, 该酶是糖皮质激素合成的关键酶, 在肾上腺皮质束状带中特异性表达。本研究旨在利用*CYP11B1*基因在束状带特异性表达的特点, 构建在肾上腺皮质束状带中特异性表达Cre重组酶的转基因动物。采用CRISPR/Cas9技术在*CYP11B1*基因终止密码子位点定点敲入2A-GfpCre表达框, 获得*CYP11B1*-2A-GfpCre同源重组载体, 进而构建*CYP11B1*Cre小鼠, 并通过mTmG和LacZ染色确定Cre酶主要表达在小鼠肾上腺皮质束状带。在此基础上, 本研究还用该工具鼠与胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶(cystathionine  $\gamma$ -lyase, *CTH*)条件性敲除鼠交配, 获得了肾上腺皮质束状带*CTH*特异性敲除的小鼠, 并证实了该动物肾上腺皮质束状带中*CTH*表达缺失。以上结果充分说明肾上腺皮质束状带特异性表达Cre重组酶小鼠构建成功。该工具鼠的成功构建, 为深入研究肾上腺皮质束状带相关功能提供了有力工具。

**关键词:** 肾上腺皮质细胞; 束状带; Cre重组酶; 转基因小鼠

**中图分类号:** Q81

## Construction of transgenic mice with specific Cre recombinase expression in the zona fasciculata in adrenal cortex

ZHANG Ning-Ning<sup>1, #</sup>, WANG Chang-Nan<sup>1, #</sup>, NI Xin<sup>1, 2, \*</sup><sup>1</sup>Department of Physiology, Navy Medical University, Shanghai 200433, China; <sup>2</sup>Research Centre for Molecular Metabolomics, Xiangya Hospital, Central Southern University, Changsha 410008, China

**Abstract:** The adrenal gland is an important endocrine organ of human body. *CYP11B1* gene was specifically expressed in the zona fasciculata in adrenal cortex. In order to better study the function of genes specifically expressed in the zona fasciculata in adrenal cortex, the mice with Cre recombinase specifically expressed in the zona fasciculata in adrenal cortex were constructed. It was then confirmed that *CYP11B1* was specifically expressed in adrenal glands. Then, using CRISPR/Cas9 technique, *CYP11B1*-2A-GfpCre recombinant vector was constructed and subsequently injected into the fertilized eggs of mice. It was confirmed that the Cre gene was mainly expressed in the zona fasciculata in adrenal cortex of *CYP11B1*Cre mice by using mTmG and LacZ staining. The *CYP11B1*Cre mice were then mated with cystathionine  $\gamma$ -lyase (*CTH*)<sup>fl/fl</sup> mice, thereby generating *CTH*<sup>fl/fl</sup>/*CYP11B1*Cre mice. It was also confirmed that *CTH* gene in the zona fasciculata in adrenal cortex was specifically knocked out in these mice. These results suggest that transgenic mice with specific Cre recombinase expression in the zona fasciculata in adrenal cortex were constructed successfully. This animal model can be a powerful tool for the study of the function of genes expressed in the zona fasciculata in adrenal cortex.

**Key words:** adrenocortical cells; zona fasciculata; Cre recombinase; transgenic mice

Received 2020-01-20 Accepted 2020-03-20

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 31971077) and the Innovation Team Project of Hunan Provincial Science and Technology Department, China (No. 2018rs3030).

<sup>#</sup>These authors contributed equally to this work.

<sup>\*</sup>Corresponding author. Tel: +86-21-81870978; E-mail: nixin@smmu.edu.cn

肾上腺由肾上腺皮质及肾上腺髓质构成, 是人体重要的内分泌器官。肾上腺皮质可分为球状带、束状带及网状带, 是机体固醇类激素重要的生成组织, 其中球状带主要分泌醛固酮, 束状带主要分泌糖皮质激素, 而网状带主要分泌性激素<sup>[1]</sup>。众所周知, 糖皮质激素既是维持机体稳态的核心激素, 更是机体应激反应的关键激素<sup>[2, 3]</sup>, 因此, 该激素分泌的水平决定了机体能否适度应答内外环境的各种刺激以维持机体的稳态。机体长期糖皮质激素分泌过多, 会导致疾病的发生, 例如库兴氏综合征。而糖皮质激素分泌不足, 则使机体应对伤害性刺激的潜能降低, 进而增加机体的死亡率。

在肾上腺皮质组织, 糖皮质激素主要从胆固醇开始从头合成, 在一系列酶的作用下, 生成糖皮质激素, 其合成受到了下丘脑-垂体-肾上腺轴的调控<sup>[4]</sup>。以往对糖皮质激素分泌调控机制的研究多关注该轴对糖皮质激素分泌的调控, 而本研究组最近研究显示, 肾上腺皮质局部产生的气体分子 H<sub>2</sub>S 和 NO 都参与了糖皮质激素的生成<sup>[5, 6]</sup>, 提示肾上腺皮质局部因子在调控糖皮质激素生成中的重要性。而有关这方面的机制目前所知甚少。

愈来愈多的研究表明, 一些疾病如心血管疾病、代谢性疾病和精神疾病的发生与机体在生命早期不良的生长发育环境有关, 即所谓的糖皮质激素胎源性疾病学说<sup>[7-11]</sup>。胎源性疾病发生的一个重要机制则是生命早期不良的环境刺激通过对机体一些重要组织器官的印迹作用, 而使机体在成年后对各种刺激的反应发生变化, 进而导致疾病的发生。研究表明, 下丘脑-垂体-肾上腺轴的过度激活, 特别是肾上腺皮质功能改变引起的糖皮质激素生成异常在其中起着重要作用<sup>[12-14]</sup>。然而, 生命早期不良环境因素导致肾上腺皮质功能异常尤其是产生糖皮质激素的束状带功能异常的分子机制尚有待于阐明。

上述研究领域未取得突破的重要原因是缺乏能特异性解析肾上腺皮质不同部分功能的研究手段和工具。Cre-Loxp 系统是近年来发展起来的特异性组织敲除技术, 通过将编码 Cre 重组酶的序列插入到某个组织特异性表达的基因, 获得在该组织特异性表达 Cre 重组酶的动物, 如小鼠 (即 Cre 工具鼠)。将组织特异性 Cre 小鼠与在某一基因中已插入 Loxp 序列的条件性敲除小鼠 (即 flox 小鼠) 交配, 即可得到在该组织中特异性敲除或敲低该基因的动物模型, 进而研究特定基因或蛋白在特定组织中的

功能或作用<sup>[15-17]</sup>。目前已经有多个实验室报道已经构建了肾上腺皮质特异性 Cre 工具鼠<sup>[18-20]</sup>。例如, Lambert-Langlais 等<sup>[18]</sup>构建了基于醛酮还原酶 1B7 (Aldo-Keto reductase 1B7, *Akr1b7*) 基因的启动子与 Cre 酶重组载体, 并获得了 *Akr1b7*Cre 转基因小鼠, 证实了 Cre 酶在肾上腺皮质的表达。然而该工具鼠的 Cre 酶在肾上腺皮质的全层都有表达, 无法特异性定位于肾上腺皮质某一层, 使该工具鼠应用具有一定的局限性。*CYP11B1* 基因编码类固醇 11 $\beta$ -羟化酶 (11 $\beta$ -hydroxylase, P450c11), 该酶将 11-脱氧皮质酮转化为皮质醇或皮质酮, 是一种糖皮质激素合成的关键酶, 且特异性表达在肾上腺皮质束状带, 具有高度的组织特异性<sup>[21-23]</sup>。因此, 本研究选择 *CYP11B1* 基因, 以构建在肾上腺皮质束状带组织特异性表达 Cre 酶的工具鼠。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 实验所用 C57BL/6J、Rosa26mTmG 和 Rosa26LacZ 小鼠由上海南方模式生物科技公司提供。实验方案获得海军军医大学生物医学伦理委员会批准。

**1.2 *CYP11B1*Cre 小鼠的构建** CRISPR/Cas9 是一种有效的基因编辑工具, 近年来广泛应用于各种基因编辑研究中<sup>[24-26]</sup>。本研究采用该技术构建了 *CYP11B1*Cre 工具鼠 (由上海南方模式生物科技公司提供技术服务)。简述如下: 首先构建 *CYP11B1*-2A-GfpCre 同源重组载体。通过同源重组的方式, 在 *CYP11B1* 基因终止密码子位点定点敲入 2A-Gfp-Cre 表达框。通过体外转录的方式, 获得针对 *CYP11B1* 基因第 9 个外显子的 Cas9 mRNA 和 gRNA。*CYP11B1* 的第 9 个外显子序列如下: 5'-TT CGTTTTGATGCCAGCTCCAGTCCTCTCCTCAC TTTCAGGCCTGTCAACTAGTCACACAGCCTTTT TCTTTTGGTGTCCCAAGATGTCAATAGCTTCTTCTTCTGATGACACATTGCC-3'。对应的引导序列为: Guide 1#: 5'-AGGCTGTGTGACTAGTTGACAGG-3'; Guide 2#: 5'-AGTTGACAGGCCTGAAAGTGAGG-3'。根据以上两个引导序列, 扩增出 gRNA 片段。然后通过 In-Fusion cloning 的方法构建同源重组载体, 该载体包含 4 kb 5' 同源臂、2A-GfpCre 和 4 kb 3' 同源臂 (图 1)。将扩增出的 Cas9 mRNA、gRNA 片段和同源重组载体, 用显微注射方法注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中, 获得 F0 代小鼠。剪取

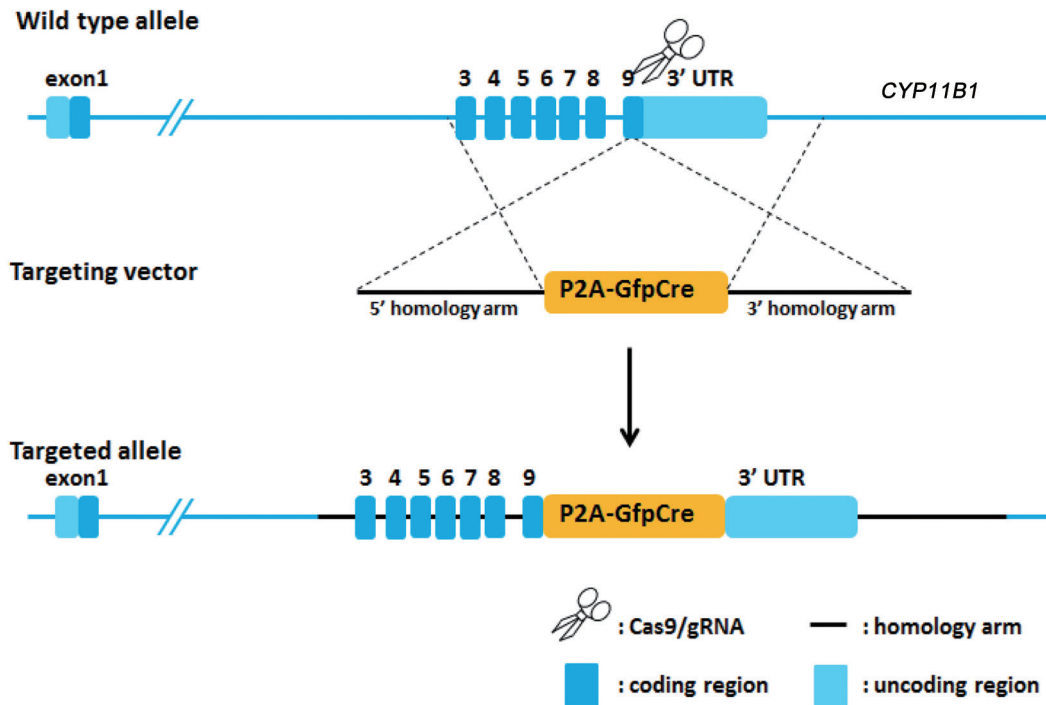


图 1. *CYP11B1*-2A-GfpCre同源重组载体的构建

Fig. 1. Construction of *CYP11B1*-2A-GfpCre recombinant vector.

鼠尾，经长片段 PCR 鉴定。共获得 5 只正确同源重组的 F0 代小鼠。将 F0 代小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配获得 3 只阳性 F1 代小鼠。该工具鼠的鉴定引物序列为：P1: 5'-TTGCATGTGATCTCTAGAGGAGG-3'; P2: 5'-ATGATGGGAACCAGACAGAAAGTC-3'; P3: 5'-CTTCAGCTCGATGCGGTTCCACCAG-3'。PCR 扩增条件为：94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s，58 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 1 min，共 35 个循环；最后 72 °C 延伸 5 min。只有 511 bp 大小的条带代表野生型，只有 700 bp 大小的条带代表纯合子，同时出现 511 bp 和 700 bp 大小的两个条带代表杂合子。

**1.3 胱硫醚- $\gamma$ -裂解酶 (cystathionine  $\gamma$ -lyase, *CTH*)<sup>fl/fl</sup>/*CYP11B1*Cre 鼠的构建** *CTH* 是内源性 H<sub>2</sub>S 的生成酶之一，本课题组以往的研究表明，该酶在小鼠肾上腺皮质和髓质都有表达<sup>[5]</sup>。*CTH* 条件性敲除小鼠 (*CTH*<sup>fl/fl</sup>) 由上海南方模式生物科技公司构建，其背景为 C57BL/6J。将该鼠与 *CYP11B1*Cre 鼠交配获得 *CTH*<sup>fl/fl</sup>/*CYP11B1*Cre 小鼠。小鼠的基因型鉴定采用鼠尾 DNA 提取，PCR 鉴定。

**1.4 免疫荧光染色** 成年小鼠 (10 周龄) 用水合氯醛麻醉后，取肾上腺组织，并用 4% 多聚甲醛固定，

然后进行石蜡包埋。切成 5  $\mu$ m 厚的切片。石蜡切片在染色前按照二甲苯、无水乙醇、95% 乙醇、80% 乙醇、70% 乙醇、ddH<sub>2</sub>O、0.01 mol/L PBS 顺序脱蜡至水。然后用柠檬酸钠抗原修复液 (Solarbio 公司) 进行抗原修复。用 5% BSA 封闭 30 min 后，加入抗 *CYP11B1* 蛋白 (Santa Cruz Biotechnology 公司, 1:100) 或者 *CTH* 抗体 (Abcam 公司, 1:100) 于 4 °C 摇床上孵育过夜。PBS 洗 3 次后，用相应的二抗 (Cell Signaling Technology 公司) 室温避光孵育 1 h。随后用 DAPI 染液 (Solarbio 公司) 标记细胞核。用荧光显微镜 (Nikon, 日本) 观察荧光表达。

**1.5 mTmG 检测** 将 *CYP11B1*Cre 鼠与 Rosa26mTmG 工具鼠交配，对子代小鼠进行基因鉴定，筛选出 Cre 及 mTmG 双阳性小鼠。这种小鼠成年后 (10 周龄)，在麻醉状态下取心、肝、脾、肺、肾、肾上腺和脑组织，并用 OCT 包埋剂 (Tissue-Tek) 包埋，注意避光，切成厚度 8  $\mu$ m 的冰冻切片，用荧光显微镜观察上述组织中红色和绿色荧光分布。

**1.6 LacZ 染色** *CYP11B1*Cre 鼠与 Rosa26LacZ 工具鼠交配获得子代小鼠，通过基因鉴定，筛选出 Cre 及 LacZ 双阳性小鼠。该小鼠成年后 (10 周龄)，

在麻醉状态下取心、肝、脾、肺、肾、肾上腺和脑组织，并用 OCT 包埋剂包埋，进行冰冻切片 (8  $\mu\text{m}$ )。用  $\beta\text{-gal}$  染色试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 对肾上腺组织进行染色。用光学显微镜 (Nikon, 日本) 观察组织中阳性着色分布。

**1.7 Western blot** 成年  $\text{CTH}^{\text{fl}}/\text{CYP11B1Cre}$  小鼠麻醉后，取心、肝、脾、肺、肾和肾上腺组织，取 50 mg 组织，加入预冷 RIPA 裂解缓冲液 (Roche 公司) 进行匀浆，离心后，获取上清液，用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司) 进行蛋白定量。将获取的组织蛋白提取液加入上样缓冲液，100  $^{\circ}\text{C}$  变性后，用 10% SDS-PAGE 进行蛋白分离，将凝胶上的蛋白转到硝酸纤维素膜，该膜用 5% 脱脂牛奶室温封闭后，加入抗 CTH (1:500) 或者  $\beta\text{-actin}$  抗体 (1:1 000, Abcam 公司)，在 4  $^{\circ}\text{C}$  摇床孵育过夜。随后用 TBST 洗膜，用相应的二抗 (1:5 000, Cell Signaling Technology 公司) 室温孵育后，用化学发光系统 (上海天能科技有限公司) 进行蛋白条带发光显色。

## 2 结果

### 2.1 CYP11B1蛋白在肾上腺组织中的分布

本研究利用免疫荧光方法观察了 CYP11B1 蛋白在肾上腺组织中的表达分布。如图 2 所示，CYP11B1 蛋白主要在肾上腺皮质中间区域 (即束状带) 中表达，而肾上腺皮质其他区域以及肾上腺髓质未见 CYP11B1 蛋白表达。

### 2.2 mTmG检测Cre重组酶表达

mTmG 小鼠是一种双荧光报告小鼠，其在 Cre 剪切位点前后分别有红色荧光 (mT) 及绿色荧光

(mG) 编码序列，这两种荧光序列广泛分布于小鼠全部组织中。当没有用 Cre 重组酶剪切时，剪切位点前的红色荧光表达，各组织中可见红色荧光；当组织中有 Cre 表达时，Cre 重组酶将红色荧光编码序列剪切掉，于是绿色荧光编码序列工作，呈现绿色荧光。这一技术被广泛应用于 Cre 小鼠的 Cre 酶活性分布的验证<sup>[27]</sup>。本研究将  $\text{CYP11B1Cre}$  小鼠与 mTmG 工具鼠交配，筛选获得 Cre 及 mTmG 双阳性小鼠。如图 3 所示，在 Cre 及 mTmG 双阳性小鼠各主要脏器中，只有肾上腺皮质束状带显绿色荧光，其他心、肝、脾、肺、肾、脑等各组织中均表达红色荧光，表明  $\text{CYP11B1Cre}$  小鼠 Cre 重组酶只在肾上腺皮质束状带中特异性表达。

### 2.3 LacZ检测Cre重组酶表达

LacZ 是  $\beta$ -半乳糖苷酶的编码基因，其编码的  $\beta$ -半乳糖苷酶可将无色化合物 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚- $\beta$ -D-半乳糖苷) 降解生成半乳糖及 5-溴-4-靛蓝，后者呈蓝色，因此， $\beta\text{-gal}$  染色可用于验证是否有 LacZ 表达，常用于蓝白斑筛选<sup>[28]</sup>。LacZ 也被开发形成一个工具鼠品系。这种工具鼠插入了一段 Loxp-stop-Loxp (LSL) 序列和 LacZ 编码序列。当没有 Cre 重组酶表达时，LSL 序列阻碍 LacZ 序列表达，无法生成  $\beta$ -半乳糖苷酶， $\beta\text{-gal}$  染色结果无蓝色；当组织中存在 Cre 重组酶时，Cre 重组酶可以剪切掉 LSL 序列，使得 LacZ 序列表达，生成  $\beta$ -半乳糖苷酶，染色结果呈蓝色，由此用于 Cre 重组酶的鉴定<sup>[29]</sup>。本研究将  $\text{CYP11B1Cre}$  小鼠与 LacZ 工具鼠交配，通过基因鉴定，筛选出 Cre 及 LacZ 双阳性小鼠。如图 4 所示，在 Cre 及 LacZ 双阳性小鼠的各主要脏器中，蓝色着色主要出现在肾上腺皮质束

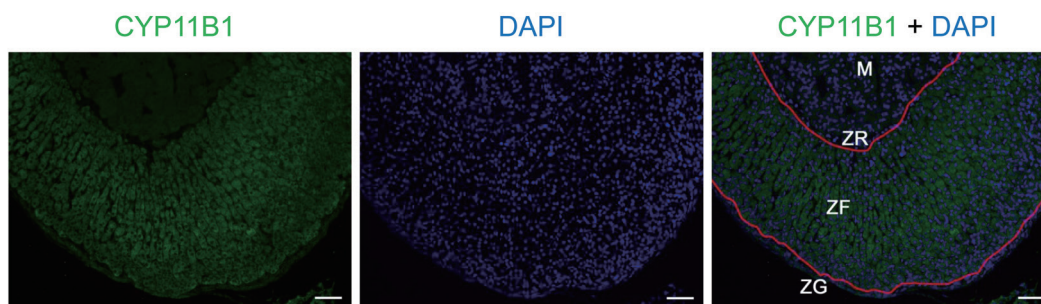


图 2. CYP11B1蛋白在小鼠肾上腺组织的分布

Fig. 2. Distribution of CYP11B1 protein in mouse adrenal gland. Adrenal glands were obtained from adult C57BL/6J mice. Immunofluorescent staining was performed as described in Materials and Methods. Representative images of CYP11B1 expression in adrenal gland. Scale bar, 100  $\mu\text{m}$ . ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculata; ZR: zona reticulata; M: medulla.

状带。皮质的其他区域以及髓质都未见明显的蓝色着色。而心、肝、脾、肺、肾、脑等各组织中均无蓝色，表明 Cre 重组酶只在肾上腺皮质，尤其是肾上腺皮质的束状带中特异性表达。

#### 2.4 用 *CYP11B1*Cre 工具鼠构建肾上腺皮质 *CTH* 基因敲除小鼠

Cre 工具小鼠主要用于和不同基因的 flox 小鼠交配，以获得某种基因在特定组织中敲除或敲低的

动物<sup>[30–33]</sup>。本课题组以往的研究表明，小鼠肾上腺皮质表达 *CTH* 基因及其蛋白<sup>[5]</sup>。本研究将 *CTH<sup>fl</sup>* 小鼠与 *CYP11B1*Cre 鼠交配，通过基因鉴定获得 *CTH<sup>fl</sup>/CYP11B1*Cre 和 *CTH<sup>fl</sup>/CYP11B1*Cre 小鼠，并用 Western blot 方法检测了这两种小鼠心、肝、脾、肺、肾和肾上腺组织中 *CTH* 表达，结果如图 5 所示，在 *CTH<sup>fl</sup>/CYP11B1*Cre 小鼠肾上腺组织中未检测到 *CTH* 蛋白，而心、肝、脾、肺、肾组织中仍然有

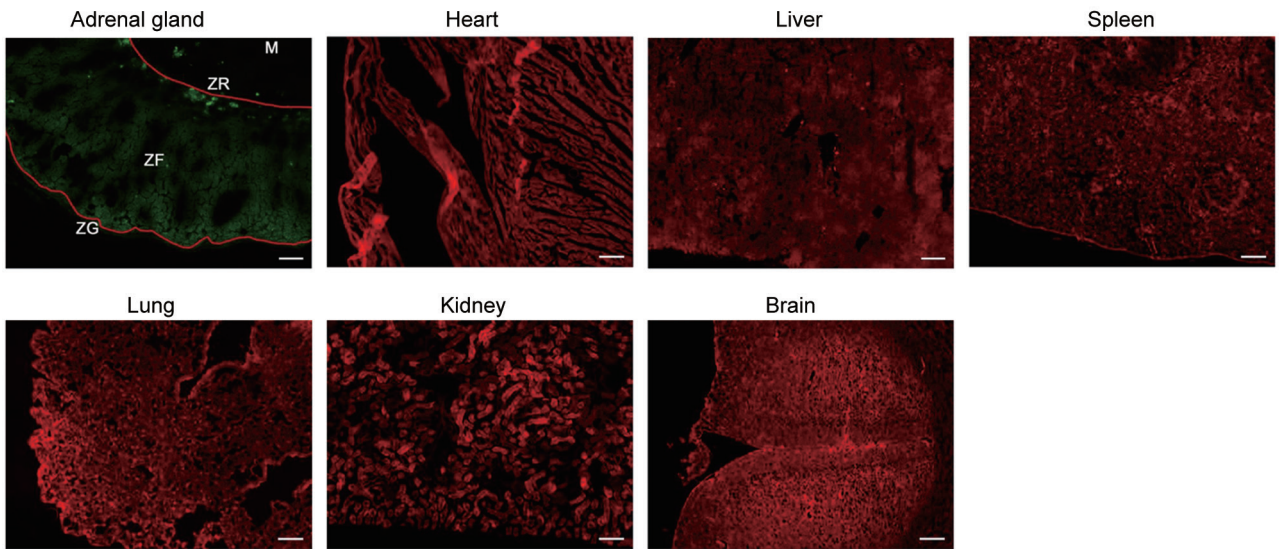


图 3. *CYP11B1*Cre 小鼠与 mTmG 工具鼠交配获得的 Cre 及 mTmG 双阳性小鼠各组织中 mTmG 的表达

Fig. 3. The expression of mTmG in various tissues of both Cre and mTmG positive mice generated by *CYP11B1*Cre mice mated with mTmG mice. Representative images showed green fluorescence in the zona fasciculata of adrenal cortex and red fluorescence in other organs. Scale bar, 100 μm. ZG: zona glomerulosa; ZF: zona fasciculata; ZR: zona reticulatis; M: medulla.

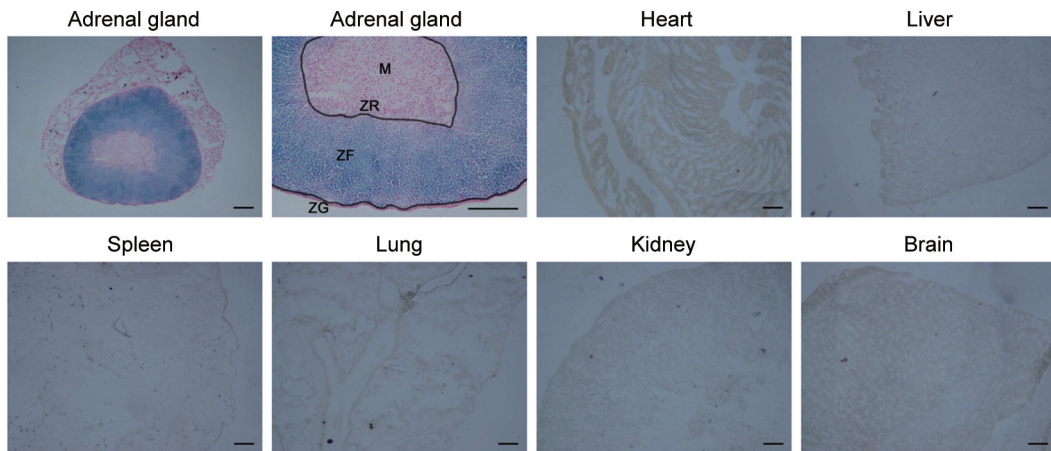


图 4. *CYP11B1*Cre 小鼠与 LacZ 工具鼠交配获得的 Cre 及 LacZ 双阳性小鼠各组织 β-gal 着色

Fig. 4. β-gal staining in various tissues of both Cre and LacZ positive mice generated by *CYP11B1*Cre mice mated with LacZ mice. Representative images showed that β-gal positive staining was found in adrenal cortex, in particular, zona fasciculata of adrenal cortex. No β-gal positive staining was found in other organs. Scale bar, 500 μm. ZG: zona glomerulosa; ZF; zona fasciculata; ZR: zona reticulatis; M: medulla.

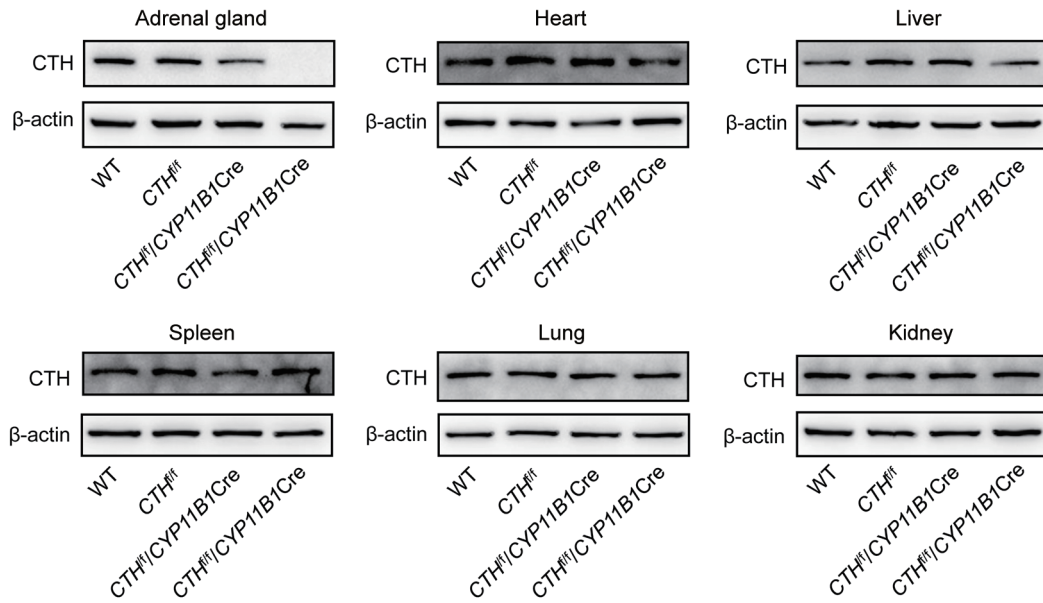


图 5. 胱硫醚-γ-裂解酶(CTH)在不同基因型小鼠多种组织中的蛋白表达水平  
 Fig. 5. The protein expression level of cystathionine γ-lyase (CTH) in various tissues of the mice with *CTH* gene modification. A number of tissues including adrenal gland, heart, liver, spleen, lung and kidney were obtained from wild type (WT), *CTH<sup>fl/fl</sup>*, *CTH<sup>fl/fl</sup>/CYP11B1Cre* and *CTH<sup>fl/fl</sup>/CYP11B1Cre* mice. CTH protein levels were determined by Western blot analysis.

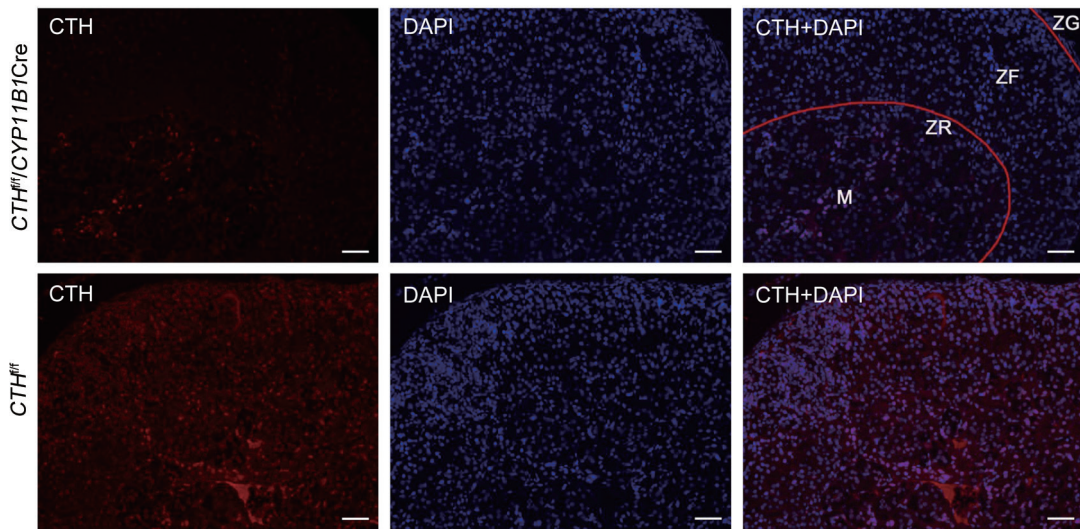


图 6. 胱硫醚-γ-裂解酶(CTH)基因修饰小鼠肾上腺皮质组织中CTH的表达分布  
 Fig. 6. Protein expression of cystathionine γ-lyase (CTH) in adrenal gland of the mice with *CTH* gene modification. Adrenal gland was obtained from *CTH<sup>fl/fl</sup>* and *CTH<sup>fl/fl</sup>/CYP11B1Cre* mice. Immunofluorescent staining was performed to reveal CTH expression in adrenal cortex. Representative images showed CTH staining in adrenal cortex of *CTH<sup>fl/fl</sup>* and *CTH<sup>fl/fl</sup>/CYP11B1Cre* mice. Scale bar, 100 μm. ZG: zona glomerulosa; ZF; zona fasciculata; ZR: zona reticulatis; M: medulla.

CTH 表达。

进一步的免疫荧光检测结果显示，CTH 阳性细胞在 *CTH<sup>fl/fl</sup>* 小鼠的肾上腺皮质中有较多的表达，而在 *CTH<sup>fl/fl</sup>/CYP11B1Cre* 小鼠肾上腺皮质中 CTH 阳性

着色减少，尤其是肾上腺皮质束状带未见明显的荧光着色（图 6）。

以上结果表明 *CYP11B1Cre* 工具鼠与 *CTH<sup>fl/fl</sup>* 小鼠交配可以获得肾上腺皮质特异性 *CTH* 敲除小鼠。

### 3 讨论

本研究采用 CRISPR/Cas9 技术, 通过同源重组的方式, 以 *CYP11B1* 为靶点, 插入了 Cre 重组酶编码序列, 成功构建了在肾上腺皮质束状带中特异性表达 Cre 重组酶的小鼠。本研究还初步证实用该工具鼠与 *CTH* 条件性敲除小鼠交配获得的 *CTH<sup>fl/fl</sup>/CYP11B1Cre* 小鼠的肾上腺皮质 *CTH* 被敲除, 而心、肝、脾、肺和肾组织中的 *CTH* 表达没有显著变化。

肾上腺皮质是机体非常重要的内分泌器官, 其分泌的类固醇激素 (如糖皮质激素和盐皮质激素) 是维持机体稳态的核心激素, 它们分泌的异常可引起心血管、代谢、神经、精神等疾病的发生。因此, 构建肾上腺皮质特异性 Cre 工具鼠, 对于深入研究肾上腺皮质的功能显得尤为重要。以往有学者利用类固醇激素合成过程中一些酶或者控制类固醇合成的关键转录因子的基因, 建立 Cre 工具鼠<sup>[19, 20]</sup>。*CYP11A1* 基因编码细胞色素 P450 侧链裂解酶, 是类固醇激素合成中重要的限速酶, 该酶是将 C27 的胆固醇裂解为 C21 的孕烯醇酮。*CYP11A1* 基因在具有类固醇激素生成能力的组织都有表达, 特别是在肾上腺皮质全层和性腺组织中高表达, 基于该基因所建立的 *CYP11A1Cre* 工具鼠, 其 Cre 酶在肾上腺皮质组织中有表达<sup>[19]</sup>, 且有学者用该工具鼠阐释了肾上腺皮质局部分子在肾上腺皮质功能中的作用<sup>[34, 35]</sup>。然而正如前所述, *CYP11A1* 基因在能够合成类固醇激素的组织中都有表达, 使用 *CYP11A1Cre* 工具鼠所获得某一基因敲除不仅发生在肾上腺皮质, 也会发生在性腺等组织, 显然该工具鼠的特异性不强。还有学者构建了基于类固醇生成因子-1 (steroidogenic factor-1, *SF-1*) 基因的 Cre 工具鼠<sup>[36]</sup>, 和 *Cyp11A1* 一样, *SF-1* 在可合成类固醇激素的组织中都有表达, 因此, *SF-1Cre* 小鼠的 Cre 酶在肾上腺皮质和性腺都有表达。*Akr1b7* 是小鼠醛酮还原酶的成员, 其主要作用是在类固醇激素生成过程中由 P450 酶产生的有害醛类产物进行降解。该酶主要表达在输精管和肾上腺皮质。Lambert-Langlais 等<sup>[18]</sup> 在 *Akr1b7* 基因启动子中插入 Cre 酶的片段, 进而构建了 *Akr1b7Cre* 鼠, 其 Cre 酶表达在肾上腺皮质全层, 在性腺组织中不表达, 可以作为肾上腺皮质特异性 Cre 工具鼠。

醛固酮合酶 (aldosterone 又称 *CYP11B2*) 和 *CYP11B1* 分别催化醛固酮及皮质醇生物合成过程的最后一步。这两种酶属于同工酶, *CYP11B2* 特异性表达

于肾上腺皮质球状带, 而 *CYP11B1* 特异性表达于肾上腺皮质束状带<sup>[37, 38]</sup>。已有学者构建了 *CYP11B-2Cre* 工具鼠, 并证明 Cre 酶表达在肾上腺皮质球状带<sup>[35]</sup>。*CYP11B1* 基因位于 4 号染色体长臂 2 区 2 号带, 其所编码的 P450c11 可将 11-脱氧皮质激素转化为皮质醇, 是皮质醇合成的关键酶。该酶特异性表达在肾上腺皮质的束状带, 具有高度的组织特异性, *CYP11B1* 可作为肾上腺皮质束状带的标记物<sup>[21, 22]</sup>。因此, 在构建相应的肾上腺皮质束状带特异性表达 Cre 重组酶动物模型时, 本研究选择该基因作为插入 Cre 重组酶的基因。结果显示, 基于 *CYP11B1* 基因构建的 *CYP11B1Cre* 鼠, 其 Cre 酶主要表达在肾上腺皮质束状带, 在球状带未见表达, 在其他组织中也未见表达。用该工具鼠也能把束状带中的 *CTH* 基因敲除。以上结果表明了基于 *CYP11B1* 基因构建的 Cre 工具鼠是一种肾上腺皮质束状带特异性 Cre 工具鼠。

糖皮质激素是机体应激反应的关键激素, 该激素主要由肾上腺皮质的束状带细胞分泌, 束状带细胞功能异常必然导致糖皮质激素分泌的异常。如前所述, 生命早期的一些不良生长环境会对肾上腺皮质细胞产生印迹效应, 而使糖皮质激素分泌异常<sup>[39, 40]</sup>。还有研究显示, 患有严重精神疾病的患者肾上腺组织的体积及重量均未发生明显变化, 然而其肾上腺皮质束状带的横截面积显著增加了 25% 左右<sup>[41]</sup>, 提示肾上腺皮质束状带可能在严重精神疾病的发生、发展过程中起重要的作用。本研究组以往研究表明, 脓毒症时肾上腺皮质局部的  $H_2S$  生成酶 *CTH* 和胱硫醚  $\beta$  合酶 (cystathionine  $\beta$  synthase, CBS) 表达减少将导致糖皮质激素分泌的相对不足, 提示肾上腺皮质局部因子在维持糖皮质激素生成中的重要作用<sup>[5]</sup>。本研究所构建的肾上腺皮质束状带特异性表达 Cre 重组酶工具鼠, 可为上述有关糖皮质激素分泌调控分子机制和肾上腺皮质束状带发育和功能研究提供一个有力的研究工具。

总之, 本研究构建了 *CYP11B1Cre* 工具鼠, 并证明了该工具鼠的 Cre 酶在肾上腺皮质束状带特异性表达, 并具有将束状带中的某一基因敲除的能力。

### 参考文献

- 1 Laredo J, Hamilton BP, Hamlyn JM. Secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells: role of the zona glomerulosa and zona fasciculata. *Biochem Biophys Res Commun* 1995; 212(2): 487–493.

- 2 Galbally M, Watson SJ, van IJzendoorn M, Saffery R, Ryan J, de Kloet ER, Oberlander TF, Lappas M, Lewis AJ. The role of glucocorticoid and mineralocorticoid receptor DNA methylation in antenatal depression and infant stress regulation. *Psychoneuroendocrinology* 2020; 115: 104611.
- 3 Zhao J, Zhang P, He Z, Chen S, Golden T, Li L, Li M, Wu N. The stress response HPA-axis hormone, glucocorticoid, reduces cellular SKA complex gene expression. *Psychiatry Res* 2018; 260: 428–431.
- 4 Silverman MN, Sternberg EM. Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction. *Ann N Y Acad Sci* 2012; 1261: 55–63.
- 5 Wang CN, Liu YJ, Duan GL, Zhao W, Li XH, Zhu XY, Ni X. CBS and CSE are critical for maintenance of mitochondrial function and glucocorticoid production in adrenal cortex. *Antioxid Redox Signal* 2014; 21(16): 2192–2207.
- 6 Wang CN, Duan GL, Liu YJ, Yu Q, Tang XL, Zhao W, Li XH, Zhu XY, Ni X. Overproduction of nitric oxide by endothelial cells and macrophages contributes to mitochondrial oxidative stress in adrenocortical cells and adrenal insufficiency during endotoxemia. *Free Radic Biol Med* 2015; 83: 31–40.
- 7 Barker DJ. Fetal origins of cardiovascular disease. *Ann Med* 1999; 31(Sup1 1): 3–6.
- 8 Barker DJ. The developmental origins of chronic adult disease. *Acta Paediatr Suppl* 2004; 93(446): 26–33.
- 9 Barker DJ. The fetal and infant origins of disease. *Eur J Clin Invest* 1995; 25(7): 457–463.
- 10 Phillips DI, Hirst S, Clark PM, Hales CN, Osmond C. Fetal growth and insulin secretion in adult life. *Diabetologia* 1994; 37(6): 592–596.
- 11 Langley-Evans SC. Fetal origins of adult disease. *Br J Nutr* 1999; 81(1): 5–6.
- 12 Braun T, Challis JR, Newnham JP, Sloboda DM. Early-life glucocorticoid exposure: the hypothalamic-pituitary-adrenal axis, placental function, and long-term disease risk. *Endocr Rev* 2013; 34(6): 885–916.
- 13 Anwar MA, Saleh AI, Al Olabi R, Al Shehabi TS, Eid AH. Glucocorticoid-induced fetal origins of adult hypertension: Association with epigenetic events. *Vascul Pharmacol* 2016; 82: 41–50.
- 14 Clark PM, Hindmarsh PC, Shiell AW, Law CM, Honour JW, Barker DJ. Size at birth and adrenocortical function in childhood. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1996; 45(6): 721–726.
- 15 Pluck A. Conditional mutagenesis in mice: the Cre/loxP recombination system. *Int J Exp Pathol* 1996; 77(6): 269–278.
- 16 Stricklett PK, Nelson RD, Kohan DE. The Cre/loxP system and gene targeting in the kidney. *Am J Physiol* 1999; 276(5): F651–F657.
- 17 Kuhn R, Torres RM. Cre/loxP recombination system and gene targeting. *Methods Mol Biol* 2002; 180: 175–204.
- 18 Lambert-Langlais S, Val P, Guyot S, Ragazzon B, Sahut-Barnola I, De Haze A, Lefrancois-Martinez AM, Martinez A. A transgenic mouse line with specific Cre recombinase expression in the adrenal cortex. *Mol Cell Endocrinol* 2009; 300(1–2): 197–204.
- 19 O'Hara L, York JP, Zhang P, Smith LB. Targeting of GFP-Cre to the mouse *Cyp11a1* locus both drives cre recombinase expression in steroidogenic cells and permits generation of *Cyp11a1* knock out mice. *PLoS One* 2014; 9(1): e84541.
- 20 Wu HS, Lin HT, Wang CK, Chiang YF, Chu HP, Hu MC. Human *CYP11A1* promoter drives Cre recombinase expression in the brain in addition to adrenals and gonads. *Genesis* 2007; 45(2): 59–65.
- 21 Ogishima T, Suzuki H, Hata J, Mitani F, Ishimura Y. Zone-specific expression of aldosterone synthase cytochrome P-450 and cytochrome P-45011 beta in rat adrenal cortex: histochemical basis for the functional zonation. *Endocrinology* 1992; 130(5): 2971–2977.
- 22 White PC, Dupont J, New MI, Leiberman E, Hochberg Z, Rosler A. A mutation in CYP11B1 (Arg-448---His) associated with steroid 11 beta-hydroxylase deficiency in Jews of Moroccan origin. *J Clin Invest* 1991; 87(5): 1664–1667.
- 23 Mukai K, Mitani F, Shimada H, Ishimura Y. Involvement of an AP-1 complex in zone-specific expression of the CYP11B1 gene in the rat adrenal cortex. *Mol Cell Biol* 1995; 15(11): 6003–6012.
- 24 Ma Y, Ma J, Zhang X, Chen W, Yu L, Lu Y, Bai L, Shen B, Huang X, Zhang L. Generation of eGFP and Cre knockin rats by CRISPR/Cas9. *FEBS J* 2014; 281(17): 3779–3790.
- 25 Cong L, Zhang F. Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Methods Mol Biol* 2015; 1239: 197–217.
- 26 Wang T, Wei JJ, Sabatini DM, Lander ES. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science* 2014; 343(6166): 80–84.
- 27 Muzumdar MD, Tasic B, Miyamichi K, Li L, Luo L. A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 2007; 45(9): 593–605.
- 28 Xu SY, Fomenkov A. Construction of pSC101 derivatives with Camr and Tetr for selection or LacZ' for blue/white screening. *Biotechniques* 1994; 17(1): 57.
- 29 Soriano P. Generalized lacZ expression with the ROSA26 Cre reporter strain. *Nat Genet* 1999; 21(1): 70–71.
- 30 Kobayashi N, Noguchi H, Fujiwara T, Tanaka N. Establishment of a reversibly immortalized human hepatocyte cell line by using Cre/loxP site-specific recombination. *Trans-*



- plant Proc 2000; 32(5): 1121–1122.
- 31 Smith AJ, De Sousa MA, Kwabi-Addo B, Heppell-Parton A, Impey H, Rabbitts P. A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination. *Nat Genet* 1995; 9(4): 376–385.
- 32 Saito E, Suzuki D, Kurotaki D, Mochizuki A, Manome Y, Suzawa T, Toyoshima Y, Ichikawa T, Funatsu T, Inoue T, Takami M, Tamura T, Inagaki K, Kamijo R. Down-regulation of Irf8 by Lyz2-cre/loxP accelerates osteoclast differentiation *in vitro*. *Cytotechnology* 2017; 69(3): 443–450.
- 33 Guan ZB, Wang KQ, Shui Y, Liao XR. Establishment of a markerless multiple-gene deletion method based on Cre/loxP mutant system for *Bacillus pumilus*. *J Basic Microbiol* 2017; 57(12): 1065–1068.
- 34 Fumel B, Froment P, Holzenberger M, Livera G, Monget P, Fouchecourt S. Expression of dominant-negative thyroid hormone receptor  $\alpha 1$  in Leydig and Sertoli cells demonstrates no additional defect compared with expression in Sertoli cells only. *PLoS One* 2015; 10(3): e119392.
- 35 Engeland WC, Massman L, Miller L, Leng S, Pignatti E, Pantano L, Carlone DL, Kofuji P, Breault DT. Sex differences in adrenal bmal1 deletion-induced augmentation of glucocorticoid responses to stress and ACTH in mice. *Endocrinology* 2019; 160(10): 2215–2229.
- 36 Bingham NC, Verma-Kurvari S, Parada LF, Parker KL. Development of a steroidogenic factor 1/Cre transgenic mouse line. *Genesis* 2006; 44(9): 419–424.
- 37 Bassett MH, Zhang Y, White PC, Rainey WE. Regulation of human CYP11B2 and CYP11B1: comparing the role of the common CRE/Ad1 element. *Endocr Res* 2000; 26(4): 941–951.
- 38 Bureik M, Lisurek M, Bernhardt R. The human steroid hydroxylases CYP1B1 and CYP11B2. *Biol Chem* 2002; 383(10): 1537–1551.
- 39 Williams-Wyss O, Zhang S, MacLaughlin SM, Kleemann D, Walker SK, Suter CM, Cropley JE, Morrison JL, Roberts CT, McMillen IC. Embryo number and periconceptual undernutrition in the sheep have differential effects on adrenal epigenotype, growth, and development. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2014; 307(2): E141–E150.
- 40 Challis JR, Sloboda D, Matthews SG, Holloway A, Alfaidy N, Patel FA, Whittle W, Fraser M, Moss TJ, Newnham J. The fetal placental hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, parturition and post natal health. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 185(1–2): 135–144.
- 41 Busch JR, Lundemose SB, Lynnerup N, Jacobsen C, Jorgensen MB, Banner J. Enlargement of the human adrenal zona fasciculata and chronic psychiatric illness - an autopsy-based study. *Stress* 2020; 23(1): 69–76.