

杨桥,郭红刚,楼琦,等. *Fancm* 基因敲除小鼠构建及其表型分析[J].中国实验动物学报, 2019, 27(3):323 - 330.

Yang Q, Guo HG, Lou Q, et al. Generation and phenotypic analysis of *Fancm* gene knockout mice [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(3):323 - 330.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.03.009

Fancm 基因敲除小鼠构建及其表型分析

杨桥^{1,2}, 郭红刚¹, 楼琦¹, 柯贤福¹, 周文伟¹, 应华忠¹, 俞冰², 张婷婷^{1*}

(1. 浙江省医学科学院, 杭州 310000; 2. 浙江中医药大学, 杭州 310000)

【摘要】 目的 构建范可尼贫血通路 *Fancm* 基因敲除小鼠,研究 *Fancm* 基因缺失对小鼠生理功能,特别是雄性生殖器官的影响。**方法** 采用 CRISPR/Cas9 技术,获得 *Fancm* 基因敲除小鼠。分析 FANCM 蛋白在野生型和 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸组织中的表达。统计 *Fancm*^{-/-} 小鼠的出生率、体重、性别比例及子代生育情况,分析血液常规指标。组织形态学研究雄性 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸生理病理表型。**结果** 敲除 *Fancm* 基因 ATG 区域,获得稳定遗传的 C57BL/6 背景 *Fancm*^{-/-} 小鼠。*Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸中 FANCM 蛋白表达完全丢失。*Fancm*^{-/-} 小鼠无明显的胚胎致死现象,但雌性 *Fancm*^{-/-} 小鼠数目显著少于雄性 *Fancm*^{-/-} 小鼠。同窝 *Fancm*^{-/-} 小鼠比较野生型体重无明显区别,部分血常规指标有显著性差异。*Fancm*^{-/-} 小鼠有明显的生殖能力缺陷。雄性 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸有显著的发育缺陷,其生精细胞凋亡增加、细胞周期阻滞,影响睾丸发育与精子的生成。**结论** 成功获得稳定遗传 C57BL/6 背景 *Fancm*^{-/-} 小鼠,*Fancm* 基因参与小鼠的生长发育,特别是雄性生殖器官功能的维持及调控。

【关键词】 范可尼贫血综合征;FANCM 蛋白;Crispr/Cas9 技术;*Fancm* 基因敲除;睾丸发育缺陷;小鼠

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 03-0323-08

Generation and phenotypic analysis of *Fancm* gene knockout mice

YANG Qiao^{1,2}, GUO Honggang¹, LOU Qi¹, KE Xianfu¹, ZHOU Wenwei¹,
YING Huazhong¹, YU Bing², ZHANG Tingting^{1*}

(1. Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310000, China.

2. Zhejiang School of Chinese Medicine, Hangzhou 310000)

Corresponding author: ZHANG Tingting. E-mail: tingting.zhang@zjams.com.cn

【Abstract】 Objective To generate a *Fancm* gene knockout mouse model and to elucidate the biological function of *Fancm* in mouse development. **Methods** *Fancm*^{-/-} mice were generated by the CRISPR/Cas9 method. We analyzed their body weight, birth rate, gender ratio, and fertility. Blood samples were analyzed by a complete blood count (CBC). Testes from the *Fancm*^{-/-} and wildtype littermates were subjected to pathophysiological assessment. **Results** C57BL/6 background *Fancm* knockout mice were generated by ATG region deletion using the CRISPR/Cas9 method. Western blotting indicated the complete depletion of FANCM protein in the testis lysate from *Fancm*^{-/-} mice. The *Fancm*^{-/-} mice showed no sign of embryonic lethality. However, there were significantly less female *Fancm*^{-/-} mice compared with male *Fancm*^{-/-} mice. There was no significant difference in body weight between the *Fancm*^{-/-} mice and wild type littermates. The CBC indicated a slight, but significant, increase in the Hb level. The *Fancm*^{-/-} mice were infertile. The male *Fancm*^{-/-} mice had a reduced testicular size and abnormal testicular architecture. The IHC and TUNEL assays indicated increases in cell cycle arrest and apoptosis in spermatogenic cells. **Conclusions** *Fancm* gene knockout causes defects of male reproductive organ

【基金项目】 浙江省科技厅、卫生厅项目(2017F10007,2017C37142,2017C37157,2017KY037,2017KY038,2018C37125,2018KY342)。

Funded by Science and Technology Project of Zhejiang Province (2017F10007, 2017C37142, 2017C37157, 2017KY037, 2017KY038, 2018C37125, 2018KY342).

【作者简介】 杨桥,研究方向:中药药理,实验血液学。Email: yangqiao_zhejiang@163.com

【通信作者】 张婷婷,副研究员,研究方向:范可尼综合症、实验血液学。Email: tingting.zhang@zjams.com.cn

development in mice.

【**Keywords**】 Fanconi anemia; FANCM; CRISPR/Cas9; *Fancm* gene knockout; testis development defect; mice

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

范可尼贫血(Fanconi Anemia, FA)又称范可尼贫血综合征,是一种较为少见的隐性遗传疾病^[1-2]。FA 患者多伴有先天发育异常、进行性骨髓衰竭与高度癌症易感性^[3-4]。近年来,范可尼贫血综合征中的不孕不育表型也引起了广泛关注^[5-6]。范可尼贫血综合征是由于范可尼贫血通路基因缺失造成的。至今为止,文献中陆续报道了 22 个范可尼贫血通路基因(*FANCA* to *FANCV*),其中的任何一个发生突变,都会导致范可尼贫血症的发生。范可尼贫血通路蛋白参与 DNA 交联损伤修复(DNA interstrand crosslinks, ICLs),维护基因组稳定性与完整性^[1,7]。范可尼贫血症是研究 DNA 损伤修复通路在生长发育与肿瘤发生中功能的重要模型。

FANCM 是范可尼贫血通路的核心蛋白之一, FANCM 识别并且结合到 DNA 交联损伤的位点,募集并激活下游 FANCD2-FANCI 复合物,启动 DNA 损伤修复级联反应^[8-9]。德国大学的研究发现 *FANCM* 基因突变与家族早发性乳腺癌有显著的相关性,是乳腺癌早期诊断与风险评估的指标^[10]。多个国际医学中心都报道了 *FANCM* 基因突变与三阴性乳腺癌以及卵巢癌的发病、药物敏感性以及治疗预后的相关性^[11-15]。最近多个临床研究证明了 *FANCM* 基因突变与遗传性不孕不育的直接相关,多组男性家族性不育症与非阻塞性无精症患者的全基因组测序结果都发现了遗传性 *FANCM* 基因变异^[16-17]。法国学者还在一个有遗传性卵巢早衰的芬兰家族中发现 *FANCM* 基因突变是其致病因素^[18]。

本课题组一直致力于范可尼贫血综合征相关基因的研究,为了更好的理解 *FANCM* 突变造成的生理学变化,特别是范可尼贫血综合征相关的表型。我们使用 CRISPR/Cas9 技术构建了 *Fancm* 基因敲除小鼠模型,希望借助此小鼠研究 *Fancm* 基因缺失对机体所产生的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2~4 月龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠 80 只,体重 20~30 g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供【SCXK(沪)2017-0005】;2 月龄,体重 25~30 g,SPF 级 ICR 小鼠 5 只,由浙江省实验动物中心提供

【SCXK(浙)2014-0001】;所有小鼠均饲养于浙江省医学科学院实验动物中心 SPF 环境【SYXK(浙)2014-0008】。近交系繁育,温度维持在 22~25℃,湿度维持在 50%~70%,昼夜明暗交替时间为 12 h/12 h。所有操作均符合浙江省医学科学院实验动物中心伦理委员会审批(伦理审批号:2018-099)。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 体外转录与显微注射

使用文献^[19-20]中方法 Phusion 高保真 DNA 聚合酶(NEB,美国)PCR 快速合成 sgRNA 转录模板。使用 MEGAscript 转录试剂盒(Ambion,美国)体外合成 sgRNA, Megaclear 纯化试剂盒(Ambion,美国)纯化 sgRNA。选取 3~4 周龄雌性 C57BL/6 小鼠进行超数排卵,每只注射 10 IU 血清促性腺激素(PMSG),46~48 h 后再注射 10 IU 绒毛膜促性腺激素(HCG),24 h 后解剖获取卵母细胞,同时解剖获取 8 周龄以上 C57BL/6 雄性小鼠精子,进行体外受精,形成受精卵。利用显微操作仪(Eppendorf,德国)将 sgRNA/Cas9 mRNA 混合样本注射到受精卵胞质中。注射后将受精卵置于 37℃ 5% CO₂ 培养箱培养数小时,取状态良好的受精卵移植到假孕 ICR 受体小鼠输卵管内,每只受体移植 20~30 枚受精卵。

1.2.2 基因型鉴定

剪取约 3 mm 小鼠尾尖组织,用 DNA 提取试剂盒(生工,中国)提取基因组 DNA,进行 PCR 扩增,引物 FAM-F: TGGCGGGAGACTAATGGGCGT; FAM-R: CTATGTCCACAAGAGCCAGCCT。电泳分析并进行测序鉴定。对 *Fancm*^{-/-}小鼠的体形大小、毛色、生长发育周期等进行观察分析^[21]。

1.2.3 蛋白免疫印迹鉴定 FANCM 蛋白表达

取 *Fancm*^{-/-}小鼠与同窝野生型小鼠,脱颈椎猝死解剖获取其睾丸组织,在含有蛋白酶抑制剂裂解液中匀浆提取总蛋白,经 6% SDS-PAGE 凝胶电泳分离,70 V 恒压湿转 2.5 h。经 Anti-FANCM (Abcam,英国)抗体 4℃ 孵育过夜, TBST 洗 3 次,羊抗兔二抗室温孵育 2 h, TBST 洗 2 次,经 ECL 显影液在化学发光仪中显影成像。

1.2.4 血常规检测

Fancm^{-/-}小鼠与同窝野生型小鼠,戊巴比妥钠麻醉进行眼眶取血约 100 μL,使用全自动血液分析仪(Celltace,日本)分析。

1.2.5 H&E 染色、IHC 免疫组化、TUNEL 实验方法
取 *Fancm*^{-/-}小鼠与同窝野生型小鼠,脱颈椎猝死解剖获取其睾丸组织,用 4% 多聚甲醛溶液过夜固定,组织包埋切片,进行苏木素伊红(H&E)染色、PCNA 免疫组化染色、TUNEL 染色,显微镜镜检,图像采集分析。

1.3 统计学分析

GraphPad Prism 5.0 进行统计学分析,实验数据表达为 mean ± SEM,Microsoft Excel 软件进行卡方独立性检验(χ².TEST),显著性差异表示为 **P* < 0.05, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001。

2 结果

2.1 基因敲除小鼠品系的建立及基因型鉴定

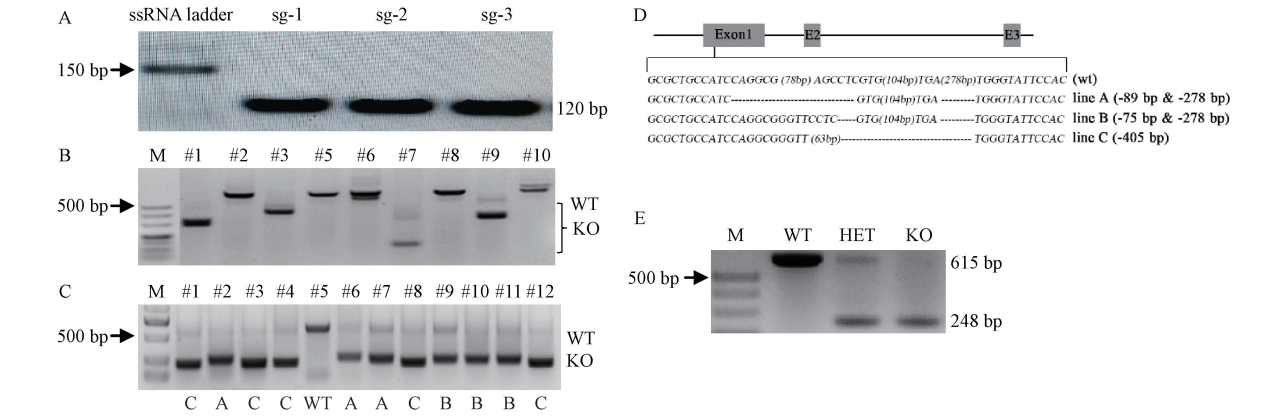
针对小鼠 *Fancm* 基因序列蛋白编码区第 1 个外显子中的 ATG 区域,使用 <http://crispr.mit.edu/> 网站工具设计 3 个 sgRNA(sg-1:AGAACGCTCTTCCAGACGTG;sg-2:TGGCGGCGTACGAGGCTGAG;sg-3:ACTGTGGAATACCCATCACG)。根据设计的 sgRNA 序列,PCR 合成转录模板,MEGAshortscript 转录试剂盒体外合成 sgRNA,MEGAclear 试剂盒纯化,以低分子量 ssRNA ladder(NEB,美国)为参照,进行 2% 的琼脂糖凝胶电泳,结果显示 120 bp 处一条单一的 sgRNA 条带(图 1A),Nanodrop 检测 A260/280 约

2.0, A260/230 约 2.1,浓度在 2000 ng/μL 左右, -80℃ 保存。使用前,混合 Cas9 mRNA(吉莟生物,中国)100 ng/μL 和每种 sgRNA 各 40 ng/μL。

约 55 个显微注射后状态较好的受精卵,移植到 2 只假孕 ICR 小鼠中,共出生 9 只 F0 代小鼠。进行 PCR 鉴定与 TA 克隆测序分析(图 1B),F0 代小鼠中,#5 为野生型序列,#8 为纯合 21 bp 缺失,#1、#2、#3、#6、#9、#10 为测序双峰,敲除效率可达 80% 以上。选择有大片段缺失的#1、#3、#9 作为 F0 代首建鼠与野生型 C57BL/6 进行交配,对 F1 代小鼠进行 PCR 鉴定及测序(图 1C),确定三种基因型突变(图 1D),分别为 line A (-89 bp & 278 bp)、line B (-75 bp & 278 bp)、line C (-405 bp),其中 Line A 与 B 中 89 bp 与 75 bp 的敲除均包含 *Fancm* 基因 ATG 起始密码子区域,Line C 中的 405 bp 敲除,在 *Fancm* 基因 CDS1 中,无法造成移码突变。最终保留 line A (-89 bp & 278 bp)进行繁育互交。对 F2 代小鼠进行 PCR(图 1E)鉴定,野生型为 615 bp 条带,纯合 *Fancm*^{-/-}小鼠为 248 bp 条带,杂合 *Fancm*^{+/-}小鼠为 615/248 bp 两条条带。

2.2 Western blot 检测野生型与 *Fancm*^{-/-}小鼠睾丸组织中 FANCM 蛋白表达情况

范可尼贫血家族基因在小鼠生殖器官,特别是睾丸中有高水平表达^[22-23]。提取 8 ~ 10 周龄



注:A:sgRNA 体外合成与电泳鉴定。B:PCR 鉴定 F0 代嵌合子小鼠,M 为 Marker DL500。C:选择的 F0 代小鼠与野生型 C57BL/6 交配,PCR 鉴定 F1 代杂合子 *Fancm*^{+/-}小鼠,M 为 Marker DL2000。D:图 C 中 PCR 产物测序后,分析 F1 代小鼠 sgRNA 靶点敲除序列。“(#bp)”为省略基因编码数,“-”为缺失编码,Exon1、E2、E3 分别为外显子 1、2、3。E:PCR 基因鉴定同窝野生型、杂合 *Fancm*^{+/-}小鼠、纯合 *Fancm*^{-/-}小鼠。WT:野生型 Wild type;HET:杂合 Heterozygote;KO:敲除 Knockout;M 为 Marker DL500。

图 1 *Fancm* 基因敲除小鼠的构建与基因鉴定

Note. A, *In vitro* synthesis and electrophoresis identification of sgRNA. B, Identification of F0 chimera mice by PCR. M, Marker DL500. C, Selected F0 chimera mice are mated with wild type C57BL/6 mice. The F1 heterozygous mice is identified by PCR. M, Marker DL2000. D, After sequencing the PCR products in Figure C, the sgRNA target knockout sequences of F1 mice are analyzed. “(#bp)” marks the region omitted. “-” marks the deleted sequence. E2, E3 are exon2 and exon3. E, Genotyping of Wild type, heterozygote *Fancm*^{+/-} mice and homozygote *Fancm*^{-/-} mice from the same littermates are identified by PCR. M, Marker DL500.

Figure 1 Establishment and identification of the *Fancm* knockout mice

Fancm^{-/-}及同窝野生型小鼠睾丸组织总蛋白,使用 anti-FANCM 抗体 (ab95014, Abcam) 进行 Western blot 分析。FANCM 蛋白大小为 227×10³左右,野生型小鼠睾丸组织中有显著性表达,在 *Fancm*^{-/-}小鼠睾丸组织中无表达,证明 *Fancm* 基因已经被完全敲除(图 2)。GAPDH 为内参蛋白。

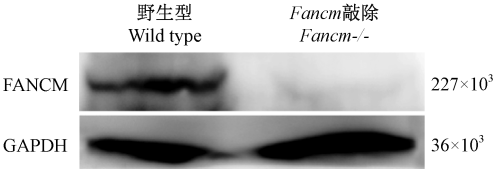


图 2 Western Blot 检测野生型与 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸组织中 FANCM 蛋白表达

Figure 2 Detection of FANCM protein expression in the wild type and *Fancm*^{-/-} mouse testis by Western blot

2.3 *Fancm*^{-/-}小鼠繁育与观察

小鼠饲养于 SPF 屏障环境中,将 8~10 周的雄性与雌性 *Fancm*^{+/-} 小鼠进行交配。观察发现 *Fancm*^{+/-} 小鼠的繁育周期、产仔胎数、每胎产仔数与野生型并无明显区别(数据未列出)。6 周左右的 *Fancm*^{-/-} 小鼠与同窝的野生型小鼠比较,体重、外形并无明显区别(图 3A),解剖后观察主要脏器脾、肝、肺、肾、脑等组织正常(数据未列出)。雌雄 *Fancm*^{+/-} 小鼠交配后子代小鼠中 *Fancm*^{-/-} 小鼠的比例为 19.6%,低于预期的 25%,但卡方检验(χ^2 . TEST)分析无显著性,说明 *Fancm* 基因缺失没有导

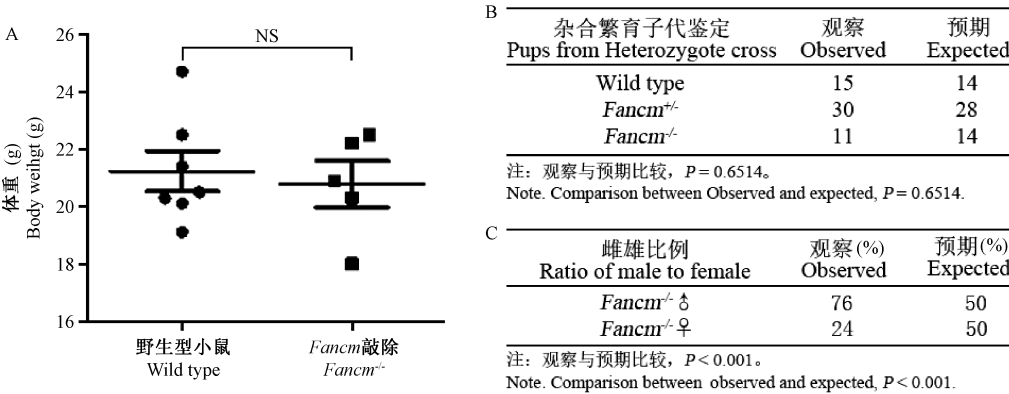
致明显的胚胎致死性(图 3B)。但是雌性 *Fancm*^{-/-} 小鼠的数目显著低于雄性 *Fancm*^{-/-} 小鼠,具体原因不明(图 3C)。雄性与雌性 *Fancm*^{-/-} 相互交配,分别与野生型小鼠交配都有不育表型(数据未列出)。

2.4 *Fancm*^{-/-}小鼠的血常规分析

血常规分析发现 8 周左右 *Fancm*^{-/-} 小鼠与同窝的野生型小鼠比较, *Fancm*^{-/-} 小鼠血红蛋白浓度(HGB)有显著性升高,白细胞数(WBC)有明显升高但是未达到显著性($P = 0.0553$)。红细胞数(RBC)、血小板计数(PLT)与野生型小鼠无明显区别(图 4)。

2.5 *Fancm*^{-/-}小鼠睾丸发育的组织病理学分析

多个范可尼贫血通路基因敲除的小鼠都有生殖器官发育缺陷与生殖能力降低的表型^[23-24]。雄性与雌性 *Fancm*^{-/-} 小鼠相互交配,分别与野生型小鼠交配都有不育表型(数据未列出)。解剖 8 周左右的同窝野生型与 *Fancm*^{-/-} 雄性小鼠发现 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸体积明显较小(图 5A),睾丸与体重比与野生型雄性小鼠比较显著性降低(图 5B)。将睾丸组织固定后切片进行 H&E 染色发现野生型小鼠的生精小管具有正常的组织结构和完全的生殖细胞分布(图 5C),而 *Fancm*^{-/-} 小鼠的生精小管发育退化,具有严重异质性(图 5D)。根据文献^[16-17]描述方法把小鼠睾丸 H&E 染色切片中显示的异质性生精小管的典型图像分为 4 类(图 5E):①组织形态相对正常的生精小管 (relatively normal tubules, RN),

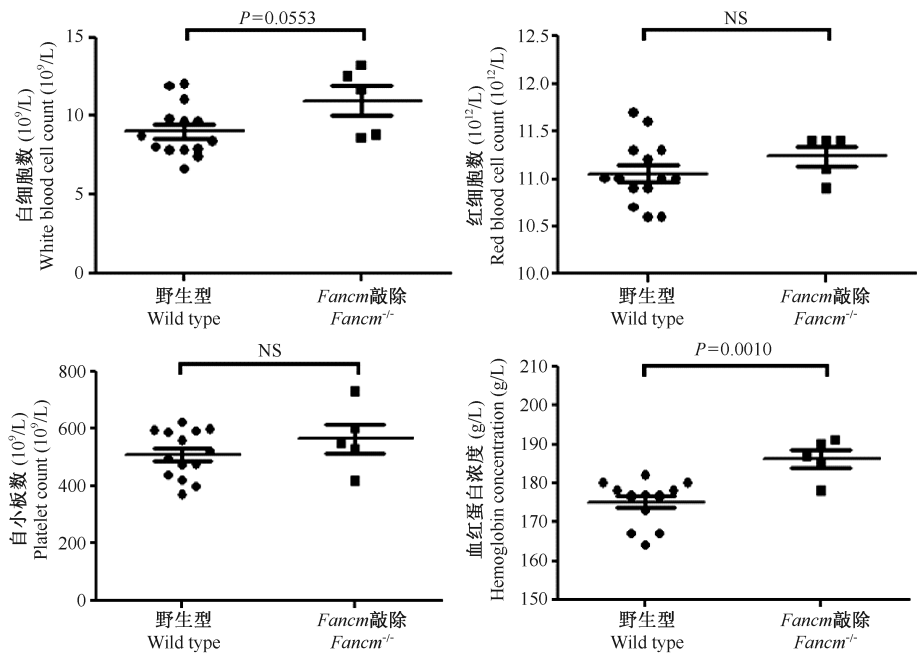


注:A:同窝 8 周龄 Wild type 与 *Fancm*^{-/-} 小鼠体重比较, $n \geq 5$ 。B: *Fancm*^{+/-} 互交繁育,子代 *Fancm*^{-/-} 小鼠数目观察值与预期值比较,卡方检验(χ^2 .TEST)分析显著性。C:雌雄 *Fancm*^{-/-} 小鼠比例观察值与预期值比较,卡方检验(χ^2 .TEST)分析显著性。

图 3 *Fancm*^{-/-} 小鼠表型分析

Note. A, Comparison of body weight between 8-week-old wild type and *Fancm*^{-/-} mice in the same litter. $n \geq 5$. B, *Fancm*^{+/-} mice were mated with each other, and the observed number and expected number of offspring *Fancm*^{-/-} mice are compared. χ^2 .TEST for statistical analysis. C; The observed versus the expected numbers of male and female *Fancm*^{-/-} mice. χ^2 .TEST is used to analyze the statistical significance.

Figure 3 Phenotypic analysis of the *Fancm*^{-/-} mice



注:同窝 8 周龄 Wild type 与 *Fancm*^{-/-} 小鼠血常规分析, $n \geq 5$ 。“NS”, 无显著性差异。

图 4 *Fancm*^{-/-} 小鼠血常规分析

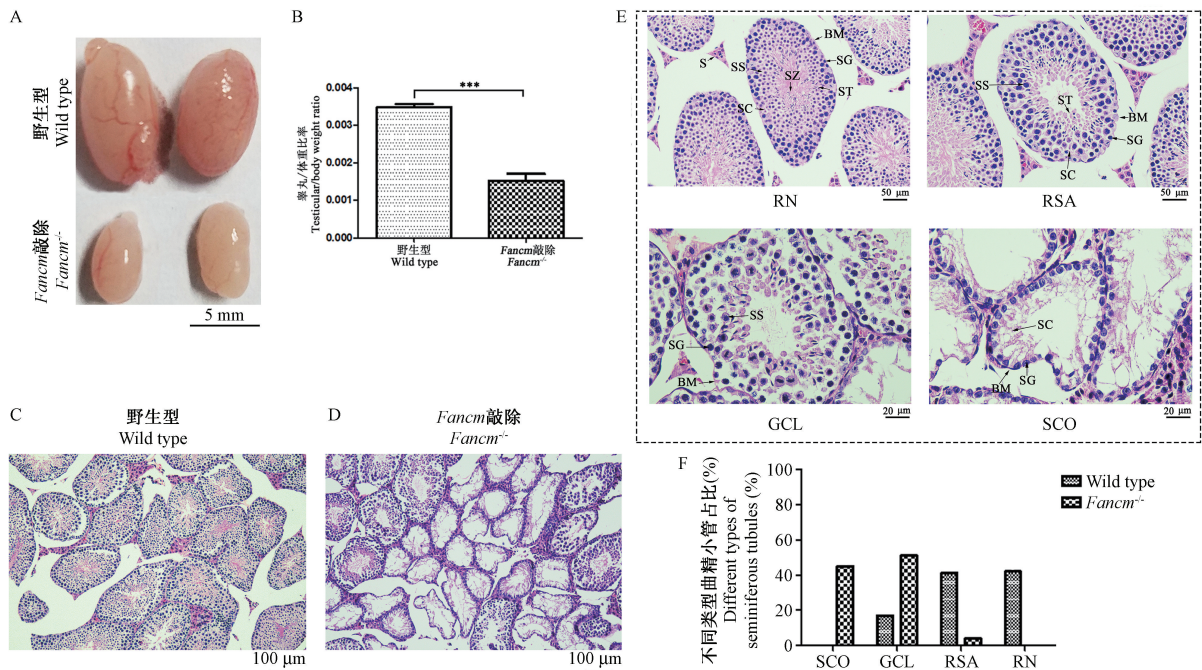
Note. The blood routine of 8-week-old wild type and *Fancm*^{-/-} mice in the same littermates is analyzed. $n \geq 5$. “NS”, Not significant.

Figure 4 Blood routine analysis of *Fancm*^{-/-} mice

②只有精母细胞和精子细胞,但是没有成熟的精子生成的生精小管(round spermatid arrest, RSA),③只有睾丸支持细胞与少量的生殖细胞的生精小管(degenerated tubules with massive germ, cell loss, GCL),④生精小管只有空泡状的睾丸支持细胞完全没有生殖细胞(Sertoli cell-only tubules,SCO)。在显微镜下分别观察 181 个野生型小鼠生精小管和 148 个 *Fancm*^{-/-} 小鼠生精小管,根据每个生精小管横切面的不同形态,将其归列为以上 4 类生精小管中的一类。统计分析野生型小鼠与 *Fancm*^{-/-} 小鼠中,每一类生精小管占有所有生精小管的百分比。结果显示(图 5F)在野生型小鼠中 RN 型生精小管占 42%,而 41%为 RSA 型,17%为 GCL 型,没有 SCO 型生精小管。在 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸中 RN 和 RSA 型共计只有 3%,54%为 GCL 型,43%的生精小管为 SCO 型。这些结果证明 FANCM 蛋白缺失严重影响小鼠睾丸的正常发育。

由于 FA 通路蛋白的 DNA 损伤修复功能在调控细胞周期、细胞有丝分裂减数分裂进程中有重要作用^[25]。我们进一步对 Wild type 与 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸组织切片进行细胞周期标记物 PCNA 免疫染色与细胞凋亡标记物 TUNEL 检测。PCNA 免疫染色结果显示 Wild type 小鼠睾丸组织中,几乎 100%的生精小管中都有大量的 PCNA 染色阳性细胞,并且

均匀分布在生精小管内部边缘(图 6A)。而 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸中只有少数结构较为完整的生精小管中有 PCNA 阳性细胞,但细胞数目很少,且呈现不规则分布(图 6B)。对 Wild type 小鼠(图 6A)与 *Fancm*^{-/-} 小鼠(图 6B)睾丸组织 PCNA 染色切片,在显微镜下分别观察多个视野,统计每个视野中有 PCNA 阳性细胞的生精小管数目,计算 PCNA 阳性、阴性生精小管百分比并进行统计比较。Wild type 小鼠中 100%的生精小管都有正常的 PCNA 阳性细胞,而 *Fancm*^{-/-} 小鼠中,只有 24.5%的生精小管有 PCNA 阳性细胞,而 76.5%的生精小管均无 PCNA 阳性细胞(图 6C)。TUNEL 染色结果显示部分 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸生精小管中(图 6E)有大量 TUNEL 阳性细胞。在显微镜下分别观察图 6D、6E 中多个视野,统计每个视野中每个生精小管中 TUNEL 阳性细胞的数目,并进行统计比较。Wild type 小鼠中有 5 个以上的 TUNEL 阳性细胞的生精小管数目占比只有 1.2%,而 *Fancm*^{-/-} 中有 10.8%。Wild type 小鼠中有 1~4 个 TUNEL 阳性细胞的生精小管数目占比 11.2%,*Fancm*^{-/-} 中只有 6.5%。综上所述,*Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸精子发育过程中,生精细胞周期阻滞与细胞凋亡,导致 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸发育缺陷。



注:A:同窝 8 周龄野生型 Wild type、纯合子 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸形态比较,比例尺=5 mm。B:同窝 8 周龄野生型 Wild type、纯合子 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸与体重比例统计分析,(*n*=3, *** *P*<0.001)。C、D:同窝 8 周龄野生型 Wild type (C)、纯合子 *Fancm*^{-/-} 小鼠 (D) 睾丸切片 H&E 染色。×100;比例尺=100 μm。E:不同类型生精小管 H&E 染色图:① 组织形态相对正常的生精小管 (RN),② 有的只有精母细胞和精子细胞,但是没有成熟的精子生成 (RSA),③ 有的只有睾丸支持细胞与少量的生殖细胞 (GCL),④ 有的生精小管只有空泡状的睾丸支持细胞完全没有生殖细胞 (SCO);S:间质,BM:基底膜,SC:支持细胞,SG:精原细胞,SS 次级精母细胞,ST:精子细胞,SZ:精子;×200,比例尺=50 μm;×400,比例尺=20 μm。F:按照图 E 中的类型分类,统计图 C Wild type、图 D *Fancm*^{-/-} 中不同类型的生精小管占比。

图 5 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸的组织病理学分析

Note. A. Comparison of testicular morphology between 8-week-old wild type and homozygous *Fancm*^{-/-} mice in the same litter. Scale bar=5 mm. B. Statistical analysis of testis/body weight ratio of 8-week-old wild type and *Fancm*^{-/-} mice in the same litter. *n*=3, *** *P*<0.001. C, D. Histology (HE staining) of testicular tissues of 8-week-old wild type (C) and *Fancm*^{-/-} mice (D) in the same litter. E: Representative images of H&E stained testicular sections showing various seminiferous tubules in adult *Fancm*^{-/-} mice. ① SCO: Sertoli cell-only tubules, ② GCL: degenerated tubules with massive germ cell loss, ③ RSA: tubules with round spermatids as their most advanced spermatogenic cells (round spermatid arrest, RSA), ④ RN: relatively normal tubules. S: stroma, BM: basement membrane, SC: supporting cells, SG: spermatogonia, SS: secondary spermatocytes, ST: sperm cells, SZ: sperm. F: Quantification of different types of seminiferous tubules in Wild type (C) and *Fancm*^{-/-} (D) mice based on the seminiferous tubule description in (E).

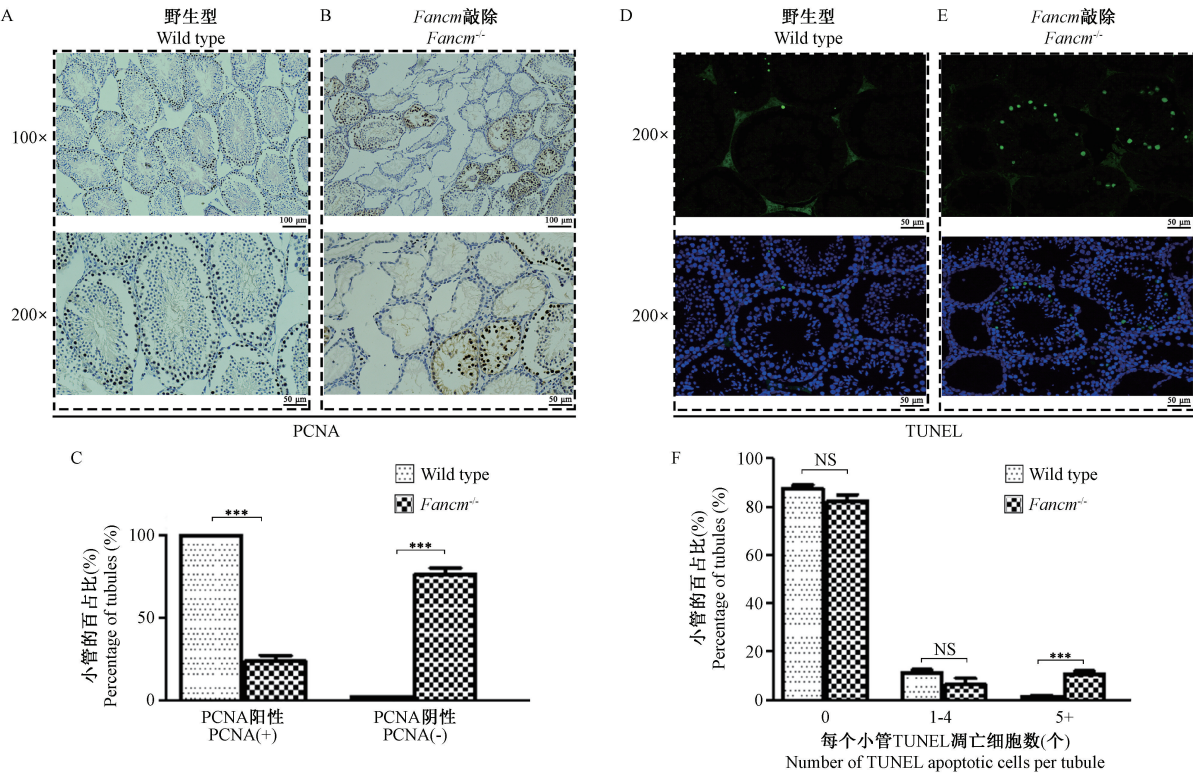
Figure 5 Histopathological analysis of the *Fancm*^{-/-} mouse testes

3 讨论

本研究使用 CRISPR/Cas9 技术^[26] 直接在 *Fancm* 基因 ATG 区域设计 sgRNA,靶向敲除 ATG 序列,完全终止 *Fancm* 基因的转录翻译起始^[27]。*Fancm*^{-/-} 小鼠中 FANCM 蛋白表达完全消失。*Fancm*^{-/-} 小鼠的出生率、体重、形态与同窝野生型小鼠比较无明显差异。雌雄 *Fancm*^{-/-} 小鼠都有不育症表型,组织形态学研究表明 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸中大部分的生精小管发育严重退化。免疫组化与 TUNEL 实验发现,*Fancm*^{-/-} 小鼠生精小管中细胞周期标志 PCNA 染色阳性细胞显著减少而凋亡信号标

记 TUNEL 阳性细胞显著增加,说明 *Fancm* 在小鼠睾丸发育、精子生成中具有重要作用。*Fancm* 全基因敲除小鼠将是全面精确研究 *Fancm* 基因在机体发育中生理功能的重要工具。

本研究的 *Fancm*^{-/-} 小鼠与文献报道中 *Fancm* 点突变小鼠相比睾丸退化程度更加严重,生精小管病变也更加显著^[17],我们推测由于 *Fancm* 点突变小鼠中的 FANCM 蛋白编码在突变位点后面附近终止,并没有完全缺失,剩余截断的 FANCM 蛋白还具有部分功能,能够在一定程度上缓解生殖器官发育缺陷的表型。人源 FANCM 蛋白共有 2048 个氨基酸,蛋白的 N 端为 ATP 结合区,中间部分为 MHF 蛋



注:A、B:野生型与 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸切片 PCNA 染色。细胞核为蓝色,PCNA 阳性细胞为棕黄色;上图:×100,比例尺=100 μm;下图:×200,比例尺=50 μm。C:野生型 Wild type、纯合子 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸生精小管中有 PCNA 阳性细胞的生精小管比例统计($n=4$) (** $P<0.001$)。D、E:野生型与 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸切片 TUNEL 染色。细胞核为 DAPI 蓝色,TUNEL 阳性细胞为 FITC 绿色;×200,比例尺=50 μm。F:野生型 Wild type、纯合子 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸生精小管中 TUNEL 阳性细胞数目的分布统计($n=6$) (** $P<0.001$)。

图 6 野生型与 *Fancm*^{-/-} 小鼠睾丸切片 PCNA 染色与细胞凋亡 TUNEL 分析

Note. A, B: Testicular tissues of 8-week-old wild type (A) and *Fancm*^{-/-} (B) mice. PCNA immunohistochemistry staining. The nuclei were blue-stained, and the PCNA-positive cells were brownish yellow. C: Percentage of seminiferous tubules with PCNA-positive cells in wild type (A) and *Fancm*^{-/-} (B) mice. ($n=4$, ** $P<0.001$). D, E: Testicular tissues of 8-week-old wild type (D) and *Fancm*^{-/-} (E) mice. TUNEL staining. The nuclei are blue, and the TUNEL-positive cells are FITC-green. Upper: TUNEL staining, Lower: TUNEL staining merged with DAPI staining. F: Percentage of seminiferous tubules with TUNEL-positive cells in wild type (D) and *Fancm*^{-/-} (E) mice. ($n=6$, ** $P<0.001$).

Figure 6 Comparison of the apoptosis in the testicular tissues of wild type and *Fancm*^{-/-} mice (Immunohistochemical PCNC staining)

白结合区,C 端为 FAAP24 蛋白结合区。全基因测序分析显示,每个 *FANCM* 基因突变患者的突变位点都不同,剩余截断的 *FANCM* 蛋白保留了大小不同的 MHF 结合区与 FAAP24 结合区^[16,28-29]。剩余截断 *FANCM* 蛋白片段根据大小的不同,具有不同的 *FANCM* 蛋白的部分功能,这可能是 *FANCM* 突变患者生殖器官病变程度临床症状差异明显的直接原因^[16]。

FANCM 蛋白不仅与其他 FA 通路蛋白协同参与 DNA 交联损伤修复,还具有 FA 通路以外的独立功能与作用^[9]。*FANCM* 蛋白复合物在识别并结合到 DNA 损伤位点后,不仅可以激活 FA 通路,还参与 ATR 通路信号传导、端粒序列复制、DNA 稳定性维护等功能^[30-31]。据报道 *FANCM* 突变的患者症状与其他 FA 通路基因突变患者症状有明显差异。

FANCM 突变患者贫血与骨髓衰竭的表型不明显,但是生殖缺陷与肿瘤高发的表现出非常突出^[29]。*Fancm*^{-/-} 小鼠存在生殖器官发育缺陷的表型与多个经典的 FA 基因如 *Fanca*、*Fancd2* 基因敲除小鼠的表型非常相似^[24],证明 *Fancm* 基因与其他 FA 通路基因功能相似。但是 *Fancm* 小鼠与其他 FA 小鼠在生殖缺陷的严重程度,骨髓衰竭、急性髓系白血病的发生、肿瘤发病率等方面的差异还有待后续的细致研究。使用 *Fancm* 小鼠模型研究 *Fancm* 基因缺失造成的生理病理表型,并与其他范可尼贫血小鼠表型比较,其研究结果将对 *FANCM* 突变患者的早期临床诊断、基因型表型鉴定以及后续的治疗等提供巨大的帮助。

参 考 文 献 (References)

[1] Ceccaldi R, Sarangi P, D' Andrea AD. The Fanconi anaemia

- pathway: new players and new functions [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2016, 17(6): 337–349.
- [2] Nalepa G, Clapp DW. Fanconi anaemia and cancer: an intricate relationship [J]. *Nat Rev Cancer*, 2018, 18(3): 168–185.
 - [3] Rosenberg PS, Alter BP, Ebell W. Cancer risks in Fanconi anemia: findings from the German Fanconi Anemia Registry [J]. *Haematologica*, 2008, 93(4): 511–517.
 - [4] Bagby G. Recent advances in understanding hematopoiesis in Fanconi anemia [J]. *F1000Research*, 2018, 7: 105.
 - [5] Kutler DI, Singh B, Satagopan J, et al. A 20-year perspective on the International Fanconi Anemia Registry (IFAR) [J]. *Blood*, 2003, 101(4): 1249–1256.
 - [6] Kutler DI, Patel KR, Auerbach AD, et al. Natural history and management of Fanconi anemia patients with head and neck cancer: A 10-year follow-up [J]. *Laryngoscope*, 2016, 126(4): 870–879.
 - [7] Moldovan GL, D'Andrea AD. To the rescue: The Fanconi anemia genome stability pathway salvages replication forks [J]. *Cancer Cell*, 2012, 22(1): 5–6.
 - [8] Wang Y, Leung J, Jiang Y, et al. FANCM and FAAP24 maintain genome stability via cooperative as well as unique functions [J]. *Mol Cell*, 2013, 49(5): 997–1009.
 - [9] Xue X, Sung P, Zhao X. Functions and regulation of the multitasking FANCM family of DNA motor proteins [J]. *Genes Dev*, 2015, 29(17): 1777–1788.
 - [10] Neidhardt G, Hauke J, Ramser J, et al. Association between loss-of-function mutations within the FANCM gene and early-onset familial breast cancer [J]. *JAMA Oncol*, 2017, 3(9): 1245–1248.
 - [11] Kiiski JI, Pelttari LM, Khan S, et al. Exome sequencing identifies FANCM as a susceptibility gene for triple-negative breast cancer [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(42): 15172–15177.
 - [12] Kiiski JI, Tervasmaki A, Pelttari LM, et al. FANCM mutation c. 5791C>T is a risk factor for triple-negative breast cancer in the Finnish population [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2017, 166(1): 217–226.
 - [13] Dicks E, Song H, Ramus SJ, et al. Germline whole exome sequencing and large-scale replication identifies FANCM as a likely high grade serous ovarian cancer susceptibility gene [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(31): 50930–50940.
 - [14] Nguyen-Dumont T, Myska A, Karpinski P, et al. FANCM and RECQL genetic variants and breast cancer susceptibility: relevance to South Poland and West Ukraine [J]. *BMC Med Genet*, 2018, 19(1): 12.
 - [15] Silvestri V, Rizzolo P, Zelli V, et al. A possible role of FANCM mutations in male breast cancer susceptibility: Results from a multicenter study in Italy [J]. *Breast*, 2018, 38: 92–97.
 - [16] Kasak L, Punab M, Nagirnaja L, et al. Recessive loss-of-function variants in FANCM cause non-obstructive azoospermia [J]. *Am J Hum Genet*, 2018, 103(2): 200–212.
 - [17] Yin H, Ma H, Hussain S, et al. A homozygous FANCM frameshift pathogenic variant causes male infertility [J]. *Genet Med*, 2018, 21: 62–70.
 - [18] Baptiste F, Patrycja P, Sandrine C, et al. A homozygous FANCM mutation underlies a familial case of non-syndromic primary ovarian insufficiency [J]. *eLIFE*, 2017, 6.
 - [19] Chen S, Lee B, Lee YF, et al. Highly efficient mouse genome editing by CRISPR ribonucleoprotein electroporation of zygotes [J]. *J Biol Chem*, 2016, 291(28): 14457–14467.
 - [20] 杜建勇, 邓然, 高虹, 等. 一种 gRNA 快速合成及检测方法的建立 [J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(03): 267–271+290.
 - [20] Du JY, Deng R, Gao H, et al. Establishment of a rapid method for synthesis and detection of gRNA [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2015, 23(03): 267–271+290.
 - [21] 付明阳, 王春芳, 李宵, 等. MiR-31 转基因小鼠的构建及其在组织器官的表达 [J]. *中国实验动物学报*, 2018, 26(01): 1–7.
 - [21] Fu MY, Wang CF, Li X, et al. Establishment of a miR-31 transgenic mouse and its expression in tissue and organs [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2018, 26(01): 1–7.
 - [22] Kim JM, Parmar K, Huang M, et al. Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype [J]. *Dev Cell*, 2009, 16(2): 314–320.
 - [23] Houghtaling S. Epithelial cancer in Fanconi anemia complementation group D2 (Fancd2) knockout mice [J]. *Genes Dev*, 2003, 17(16): 2021–2035.
 - [24] Parmar K, D'Andrea A, Niedernhofer LJ. Mouse models of Fanconi anemia [J]. *Mutat Res*, 2009, 668(1–2): 133–140.
 - [25] Chloé G, Chelysheva L, Choinard S, et al. AAA-ATPase FIDGETIN-LIKE 1 and helicase FANCM antagonize meiotic crossovers by distinct mechanisms [J]. *PLoS Genet*, 2015, 11(7).
 - [26] Wang H, Yang H, Shivalila CS, et al. One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering [J]. *Cell*, 2013, 153(4): 910–918.
 - [27] Bakker ST, van de Vrugt HJ, Rooimans MA, et al. FancM-deficient mice reveal unique features of Fanconi anemia complementation group M [J]. *Hum Mol Genet*, 2009, 18(18): 3484–3495.
 - [28] Bogliolo M, Bluteau D, Lespinasse J, et al. Biallelic truncating FANCM mutations cause early-onset cancer but not Fanconi anemia [J]. *Genet Med*, 2018, 20(4): 458–463.
 - [29] Catucci I, Osorio A, Arver B, et al. Individuals with FANCM biallelic mutations do not develop Fanconi anemia, but show risk for breast cancer, chemotherapy toxicity and may display chromosome fragility [J]. *Genet Med*, 2018, 20(4): 452–457.
 - [30] Pan X, Drosopoulos WC, Sethi L, et al. FANCM, BRCA1, and BLM cooperatively resolve the replication stress at the ALT telomeres [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(29): 5940–5949.
 - [31] Hailong W, Shibo L, Joshua O, et al. The concerted roles of FANCM and Rad52 in the protection of common fragile sites [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 2791–2804.