

黄姣,霍锦倩,刘姣,等. 糖原贮积症 0 型斑马鱼疾病模型的构建及表型分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(12): 43-52.
Huang J, Huo JQ, Liu J, et al. Establishment and phenotypic analysis of a zebrafish disease model of glycogen storage disease type 0 [J]. Chin J Comp Med, 2021, 31(12): 43-52.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2021.12.007

糖原贮积症 0 型斑马鱼疾病模型的构建及表型分析

黄 姣^{1,2,3#}, 霍锦倩^{1,2,3#}, 刘 姣^{1,2,3}, 陈 洁^{1,2,3}, 祖 尧^{1,2,3},
张庆华^{1,2,3}, 任建峰^{1,2,3*}

(1.上海海洋大学 科技部海洋生物科学国际联合研究中心,上海 201306;2.上海海洋大学 水产种质资源发掘与利用教育部重点实验室,上海 201306;3.上海海洋大学 水产科学国家级实验教学示范中心,上海 201306)

【摘要】 目的 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建糖原贮积症 0(GSD0)型斑马鱼疾病模型,研究该病的发病进程和机制。**方法** 针对 *gys1* 和 *gys2* 基因各设计一个靶点,进行基因编辑和突变体筛选;利用 qPCR 技术检测早期发育阶段和成鱼不同组织基因表达情况,通过 PAS 染色技术检测糖原累积情况。**结果** 获得了 *gys1* 和 *gys2* 基因各两种有效突变类型的 F_2 纯合突变体,成功构建了 GSD0 型斑马鱼疾病模型。*gys1*^{-/-} 纯合子 F_3 早期胚胎发育迟缓,48 hpf 内全部死亡,而 *gys2*^{-/-} 纯合子发育正常。基因表达分析显示,野生型斑马鱼早期发育阶段(0~125 hpf),*gys1* 和 *gys2* 的表达先下降后上升,受精卵时期表达最高;成鱼阶段,*gys1* 在心脏和肌肉组织中高表达,*gys2* 在肝中高表达。PAS 糖原染色显示,与野生型相比,*gys1*^{-/-} 心脏和肌肉没有明显的糖原积累,*gys2*^{-/-} 肝没有明显的糖原积累。**结论** *gys1* 和 *gys2* 基因敲除斑马鱼模型的表型与小鼠模型相似,但也存在差异;Gys1 敲除小鼠模型中 F_2 大部分纯合子死亡,斑马鱼 *gys1*^{-/-} 纯合子 F_2 正常生长发育,而自交产生的 F_3 不能存活。斑马鱼 *gys1* 和 *gys2* 敲除突变体的制备,为进一步研究人类糖原储存障碍 GSD0 的发病进程和机制提供了材料。

【关键词】 糖原贮积症 GSD0;疾病模型;斑马鱼;基因敲除;*gys1*;*gys2*

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2021) 12-0043-10

Establishment and phenotypic analysis of a zebrafish disease model of glycogen storage disease type 0

HUANG Jiao^{1,2,3#}, HUO Jinqian^{1,2,3#}, LIU Jiao^{1,2,3}, CHEN Jie^{1,2,3}, ZU Yao^{1,2,3}, ZHANG Qinghua^{1,2,3}, REN Jianfeng^{1,2,3*}

(1. International Research Center for Marine Biosciences, Ministry of Science and Technology, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China. 2. Key Laboratory of Exploration and Utilization of Aquatic Genetic Resources, Ministry of Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306. 3. National Demonstration Center for Experimental Fisheries Science Education, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306)

【Abstract】 Objective To study the detailed process and mechanism of glycogen storage disease (GSD) type 0 using a zebrafish disease model established by CRISPR/Cas9 gene editing technology. **Methods** Target sites were determined for *gys1* and *gys2*. After gene editing, homozygous mutants were screened. The expression levels of *gys1* and *gys2* were quantified with qPCR at early developmental and adult stages. Glycogen accumulation was assessed by periodic acid-Schiff staining. **Results** Homozygous F_2 *gys1* and *gys2* genes with two effective mutation types were successfully obtained. Homozygous *gys1*^{-/-} F_3 had a delay in early embryonic development and died within 48 hpf, whereas homozygous

[基金项目] 上海市科委国际科技合作项目(15410723300)。

[作者简介] 黄姣(1993—),女,硕士研究生,研究方向:发育生物学。E-mail:1554011563@qq.com

霍锦倩(1994—),女,硕士研究生,研究方向:发育生物学。E-mail:2374022731@qq.com *共同第一作者

[通信作者] 任建峰(1980—),男,副研究员,硕士生导师,研究方向:斑马鱼器官发育调控。E-mail:jfren@shou.edu.cn

gys2^{-/-} developed normally. Gene expression analyses of *gys1* and *gys2* in wildtype zebrafish showed that their expression levels decreased first and then increased during early developmental stages (0~125 hpf) with the highest expression at the fertilized egg stage. At the adult stage, *gys1* was highly expressed in heart and muscle tissues, while *gys2* was highly expressed in the liver. Glycogen staining showed no significant glycogen accumulation in the heart or muscle of *gys1*^{-/-} or in the liver of *gys2*^{-/-} compared with the corresponding wildtype tissues. **Conclusions** The phenotypes of *gys1* and *gys2* knockout zebrafish models were similar to those of mouse models, but there were some differences. In the *Gys1* knockout mouse model, most F₂ homozygotes die. Among *gys1* knockout zebrafish, *gys1*^{-/-} homozygous F₂ developed normally, whereas F₃ generated by self-crossing did not survive. The model of *gys1* and *gys2* knockout in zebrafish provides materials for further study on the pathogenesis of human GSD type 0.

【Keywords】 glycogen storage syndrome type 0; disease model; zebrafish; knockout; *gys1*; *gys2*

糖原是由葡萄糖结合而成的一种支链动物淀粉多糖,被作为能量代谢葡萄糖单位的储存库^[1-2],主要储存在心脏、肌肉和肝。糖原贮积症(glycogen storage disease, GSD)是一组常染色体遗传疾病,患者糖原合成或分解正常代谢受到影响,而引起的疾病^[3],主要表现为肌肉、心脏、脑和肝中糖原代谢异常^[4]。根据缺陷的酶和影响的组织至少可分为 16 种类型^[5]。GSD 的临床表现缺乏特异性,累及骨骼肌主要表现为肌无力、运动不耐受、肌痛、肌溶解和萎缩,累及心肌表现为心肌病,累及肝主要表现为低血糖和肝肿大^[4]。

哺乳动物糖原合酶(glycogen synthase, GYS)有两种亚型,即肌型糖原合酶和肝型糖原合酶,分别由 *GYS1* 和 *GYS2* 基因编码^[1],*GYS* 基因表达具有组织特异性,*GYS1* 主要在骨骼肌和心肌表达,此外还在脑、肾和脂肪组织中表达^[6],而 *GYS2* 则在肝中特异性表达^[7]。肌糖原主要作用是肌肉收缩运动提供能量。肝糖原主要作用是维持血糖平衡,当没有足够的葡萄糖时,肝糖原转化为葡萄糖,释放到血液中,防止低血糖^[8]。人类 *GYS2* 基因突变会导致肝糖原合成失败,而 *GYS1* 基因突变则会导致肌糖原合成失败,两者突变导致的糖原贮积症疾病分别称为 GSD0a 型和 GSD0b 型^[9]。

GSD0 型疾病自 1963 年 Lewis 发现以来,临床病例报道不足 40 例,主要是 GSD0a 型,GSD0b 型病例非常少。一例 GSD0b 型病例报道,三兄妹 *GYS1* 基因发生无义突变(R462X),10.5 岁的哥哥在户外运动时死于心脏骤停,尸检报告显示为肥厚性心肌病;2 年后,死者的弟弟出现同哥哥相似的肥厚性心肌病症状、并伴有运动时心率和血压异常等症状^[10]。另一 GSD0b 型病例报道,一女儿患者 5 岁开始反复发作晕厥,并伴有肌肉无力和疼痛症状,12 岁时死于心脏骤停^[2]。

GSD 病由基因突变所致,所以缺乏有效的治愈方法和手段,目前主要通过饮食管理和康复训练等措施干预,缓解疾病症状,避免低血糖、高乳酸血症、高尿酸血症和高脂血症等的发生^[9]。GSD0 疾病模型基础研究上,Pederson 等^[1]构建了 *Gys1* 基因敲除小鼠模型,该小鼠肌肉和心脏等组织缺乏糖原储备,90%的小鼠出生后死于心功能受损,其心脏整体变小。Xirouchaki 等^[11]构建了肌肉特异性 *Gys1* 基因敲除小鼠,该小鼠肌肉中 *Gys1* 基因 mRNA 和蛋白浓度降低 85%以上,糖原含量下降 70%,餐后高血糖和葡萄糖耐量下降;在胰岛素刺激下,该小鼠的葡萄糖代谢和肌肉葡萄糖摄取下降,运动和耐力也明显下降。Irimia 等^[12]构建了肝特异性 *Gys2* 基因敲除小鼠,该小鼠能够存活,肝糖原合酶发生缺陷,肝糖原含量下降了 95%,并出现了轻微的低血糖症状,该模型很好地模拟了 GSD0a 病理生理学。

斑马鱼(*Danio rerio*)具有世代周期短、子代多、胚胎透明、易进行实验操作等优点,已成为继小鼠之后研究器官发育及疾病模型构建等的一种新型模式动物^[13]。本研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建了斑马鱼 *gys1* 和 *gys2* 突变体,期望通过斑马鱼糖原贮积症模型的建立,为进一步研究糖原贮积症的发病机制和详细进程提供材料。

1 材料和方法

1.1 实验动物

斑马鱼野生型 AB 品系购自中国科学院分子细胞科学卓越创新中心斑马鱼平台,养殖在循环水系统中,水温 26℃~28℃,光照周期为 14 h 明/10 h 暗。受精后 5 d 的幼鱼开始投喂草履虫,受精后 15 d 的幼鱼开始投喂丰年虫。所有实验均按照上海海洋大学动物伦理委员会的规定(SHOU-DW-2016-001)进行操作。

1.2 主要试剂与仪器

gRNA 骨架体外转录模板 pUC19-scaffold 质粒由北京大学熊敬维教授惠赠; MAXIscript® T7 体外转录试剂盒 (Ambion, AM1314) 购自赛默飞世尔科技公司; NLS-Cas9-NLS 蛋白 (GenScript, Z03389-100) 购自南京金斯瑞生物科技有限公司; T7E1 内切酶 (NEB, M0302L) 和 Phusion® 高保真 PCR 反应预混液 (NEB, M0531L) 购自 NEB (北京) 有限公司; PrimeScript™ 反转录试剂盒 (TaKaRa, RR047A) 购自大连宝生物公司; LightCycler® 480 SYBR Green I 荧光定量 PCR 反应液 (Roche, 04887352001) 购自罗氏生命科学公司; 糖原 PAS 染色液试剂盒 (G1281) 购自北京索莱宝科技有限公司。

体式显微镜 (SteREO Discovery. V8) 和正置荧光显微镜 (Axio Imager2) 均为 Zeiss 公司产品; 微量注射泵 (PLI-100A Plus) 为美国 Warner Instruments 公司产品; 实时荧光定量 PCR 系统 (LightCycler® 480II) 为罗氏生命科学公司产品。

1.3 实验方法

1.3.1 基因敲除靶点设计和 gRNA 合成

从 Ensembl 斑马鱼数据库 (http://asia.ensembl.org/Danio_rerio/Info/Index) 下载 *gys1* 和 *gys2* 基因组序列。利用 zifit 网站 (<http://zifit.partners.org/ZiFiT/>), 在尽量靠近起始密码子 ATG 的外显子序列上搜索靶点位置, 所有靶点序列与斑马鱼基因组序列进行 BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 比对, 选择序列特异性好的靶点。

利用 T7 启动子体外转录合成靶点 gRNA。分别利用 *gys1* 上游引物: 5'-TAATACGACTCACTATAGGGCTTCACGGCCTGCTCTCGTTTATAGAGCTAGAAATAGC-3', *gys2* 上游引物: 5'-TAATACGACTCACTATAGGAACCTGGACCGCTGGAAGGTTTATAGAGCTAGAAATAGC-3'; 和下游通用引物: 5'-AAAAAAGCACCGACTCGGTGCCAC-3', 扩增 pUC19-scaffold 质粒。然后以 PCR 产物作为模板, 体外转录合成靶点 gRNA。

1.3.2 基因敲除 F₀ 嵌合体的制备

进行繁殖的亲本纯合子筛选。其实验步骤如下, 选取性成熟的野生型斑马鱼雌雄各 10 尾, 利用碱裂解法提取尾鳍组织基因组 DNA, 利用靶点上下游引物 (表 1) 扩增 PCR, 扩增产物进行测序分析。所有检测个体序列一致的亲本为纯合子。

在受精卵 1 细胞期进行显微注射并进行基因

敲除效率的检测。将 1 nL Cas9 蛋白和 gRNA 的混合物 (800 ng/μL; 100 ng/μL) 注射入受精卵。注射组和对照组胚胎置于培养箱中孵化, 温度保持在 28.5℃。取 2 dpf (days post fertilization) 的胚胎 (混合 5 枚胚胎为 1 组, 取 3 组平行样品), 采用碱裂解法提取基因组 DNA, 利用表 1 引物进行 PCR 扩增, 然后进行敲除效率检测。25 μL PCR 反应体系如下, DNA 模板 2.0 μL, 上下游引物各 1.0 μL, 2×Easy Taq® PCR 反应预混液 12.5 μL, ddH₂O 补齐至 25 μL。PCR 反应程序如下: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 40 s, 共 33 个循环, 72℃ 再延伸 5 min。

分别采用 T7E1 酶切法和 Sanger 测序法检测基因敲除效率。首先, 将 PCR 产物进行 T7E1 酶切, 然后进行电泳分析。根据电泳条带灰度值, 参照公式 $100 \times (1 - \sqrt{1 - (b+c)/(a+b+c)})$ 估算基因敲除效率, a 为未切开条带灰度值, b 和 c 分别为切开条带的灰度值^[14]。通过 Sanger 测序法进一步确认基因敲除是否成功, 将酶切成功的 PCR 产物测序, 若靶点处及以后出现套峰, 则证明基因敲除成功。

1.3.3 纯合突变体的筛选及表型分析

F₁ 基因突变类型筛选。将性成熟的 F₀ 成鱼与野生型成鱼进行外交获得 F₁, 待 F₁ 达到 2 月龄时, 采用同基因敲除效率检测的流程, 进行 F₁ 基因突变类型筛选。提取 F₁ 尾鳍基因组 DNA, 进行 PCR 扩增和产物 T7E1 酶切, 酶切成功的 PCR 产物进行 TA 克隆测序, 确定每尾 F₁ 基因突变类型, 并筛选发生移码突变的个体。

F₂ 纯合突变体筛选。将具有相同突变类型的 F₁ 杂合子成鱼进行内交, 获得不同突变类型的 F₂。采用同基因敲除效率检测的流程, 进行 F₂ 个体基因型鉴定。提取 F₂ 成鱼尾鳍基因组 DNA, 进行 PCR 扩增, 并将产物进行 T7E1 酶切分析。产物切开对应的个体为杂合子, 产物未切开对应的个体为野生型或纯合突变体, 将产物未切开对应的个体通过测序进一步确定其基因型。F₂ 纯合突变体内交获得 F₃, 仔细观察 F₂ 和 F₃ 表型。

1.3.4 突变体糖原累积情况检测

通过 PAS 染色法检测糖原在组织中的累积情况。收集野生型和纯合突变体成鱼的心脏、肌肉和肝组织, 用 10% 福尔马林固定 24 h 后进行石蜡切片。按照试剂盒使用说明进行糖原染色操作。石蜡切片染色后进行逐级乙醇脱水, 二甲苯透明, 中

性树胶封片,光学显微镜下观察并拍照。

1.3.5 不同发育时期和不同组织基因表达分析

对胚胎或幼鱼不同发育时期和成鱼不同组织的 *gys1* 和 *gys2* 基因表达水平进行检测。选取斑马鱼胚胎或幼鱼早期发育的 15 个时期和野生型成鱼的 12 个组织,包括脑、眼睛、鳃、心脏、肌肉、皮肤、肝、脾、肠、肾、卵巢和精巢,进行基因表达水平分析,每种样品取 3 个生物学重复。利用 TRIzol 法提取所有样本总 RNA 备用。

将总 RNA 反转录获得 cDNA,利用 NCBI 网站在线程序设计 *gys1* 和 *gys2* 基因 qRT-PCR 引物,引物序列见表 2,使用罗氏 LightCycler® 480II 荧光定量 PCR 进行基因表达量分析。内参基因选择斑马鱼 β -actin,基因相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算,基因表达图利用 Graphpad prism5 软件绘制。

2 结果

2.1 基因敲除靶点设计及序列分析

分别在 *gys1* 和 *gys2* 基因外显子上设计一个靶点,*gys1* 的正向靶点位于基因第 4 个外显子上(图 1a),*gys2* 的正向靶点位于基因的第 3 个外显子上(图 1b)。将斑马鱼 *gys1* 和 *gys2* 基因编码蛋白序列与小鼠及人类同源基因编码的蛋白序列进行相似性分析。结果显示,GYS 蛋白序列在人、小鼠和斑马鱼 3 物种中高度保守(图 1c~1d),斑马鱼 Gys1 与小鼠和人蛋白的氨基酸序列一致性达到 92%,斑马鱼 Gys2 与小鼠和人蛋白氨基酸序列一致性达

到 89%。

2.2 F_0 嵌合体基因敲除效率检测

混合 F_0 胚胎基因敲除效率 T7E1 酶切法检测结果显示,*gys1* 基因编辑 3 组平行实验的敲除效率分别是 66%、55% 和 53%(图 2a),*gys2* 基因编辑 3 组平行实验的敲除效率分别是 0%、56% 和 63%(图 2c)。酶切成功的 PCR 产物进一步通过 Sanger 测序法检测,结果显示靶点处及以后出现套峰现象(图 2b、2d),表明基因敲除成功。

2.3 纯合突变体 F_2 的筛选

将基因编辑引起突变的 F_0 与野生型外交获得 F_1 ,在约 2 月龄时,通过 T7E1 酶切检测的方法筛选 F_1 杂合子。在 54 尾 *gys1* F_1 中筛选到 28 尾杂合子(图 3a),在 54 尾 *gys2* F_1 中筛选到 19 尾杂合子(图 3b)。 F_1 杂合子通过 TA 克隆测序的方法筛选有效基因突变类型,*gys1* 杂合子筛选出 4 种有效突变类型(图 3c),*gys2* 杂合子筛选出 3 种有效突变类型(图 3d)。

分别将 *gys1* 两种突变类型(-7 bp 和 +13, -2 bp)和 *gys2* 两种突变类型(-4 bp 和 +4, +19, +17 bp) F_1 内交获得 F_2 。对 F_2 个体基因型和数目进行统计分析,结果显示,野生型、杂合型和纯合型 3 种基因型存活个体数量比例接近 1:2:1,卡方检验分析无显著性差异(表 3),符合孟德尔分离定律,表明 *gys1* 和 *gys2* F_2 纯合子不存在胚胎致死表型。

表 1 靶点及检测引物序列信息

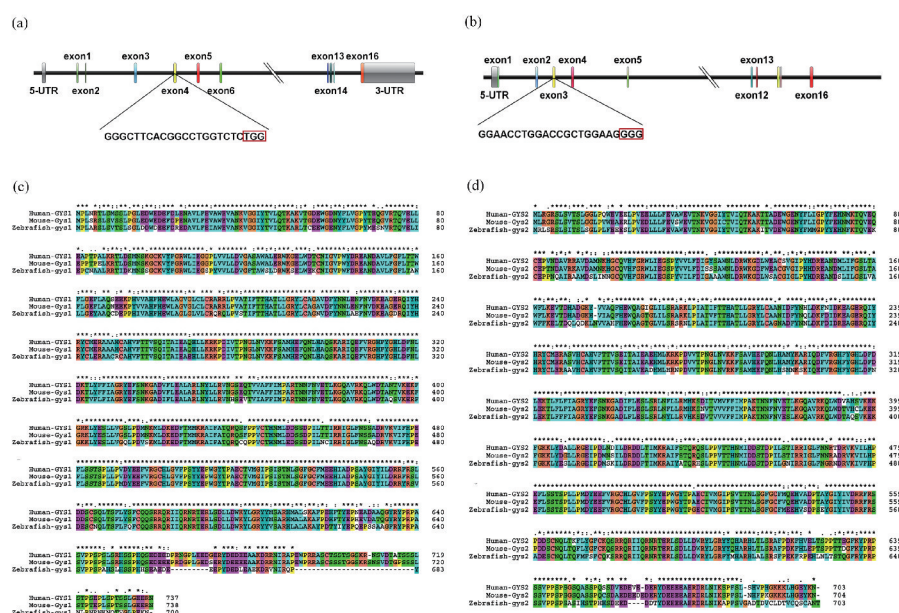
Table 1 Information of target sites and detecting primer sequences

基因 Gene	靶点序列(5'-3') Target sequence	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	PCR 产物(bp) PCR product	T7E1 酶切产物(bp) Product digest
<i>gys1</i>	GGGCTTCACGGCCTGCTCTC	<i>gys1</i> -F	TCCTTATGACAAGAACTCTGTTTCC	489	184+301
		<i>gys1</i> -R	CTGATTGCACGGCTCTCCC		
<i>gys2</i>	GGAACCTGGACCGCTGGAAG	<i>gys2</i> -F	TGCCTGAGTGACAGTATATTGGTT	480	149+331
		<i>gy2</i> -R	GGAGATTATCACTGCAGGAGAA		

表 2 qRT-PCR 引物序列

Table 2 Primer sequences for qRT-PCR

基因 Gene	引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence	PCR 产物(bp) PCR product
<i>gys1</i>	<i>gys1</i> -F	GATTGCATGGGAGGTCGCTA	181
	<i>gys1</i> -R	AATGGTTCTCTGAGTGCCG	
<i>gys2</i>	<i>gys2</i> -F	ATATCATGACCGAGAGGCCA	113
	<i>gy2</i> -R	GGAAGTGAGCAACTACATTG	
β -actin	β -actin-F	ATGGATGAGGAAATCGCTG	140
	β -actin-R	ATGCCAACCATCACTCCCTG	



注:(a-b):斑马鱼 *gys1* 和 *gys2* 基因结构及靶点的序列和位置。红框表示 Cas9 蛋白识别出 PAM (原间隔邻近基序) 区域;(c-d):人类、小鼠和斑马鱼 GYS1 和 GYS2 蛋白氨基酸序列比对。

图 1 斑马鱼 *gys1* 和 *gys2* 基因敲除靶点示意图及编码蛋白序列相似性分析

Note. (a-b), The gene structures of *gys1* and *gys2* and the sequences and locations of the target sites. The red box indicates the Cas9 protein recognized PAM (protospacer adjacent motif) region. (c-d), The alignment of amino acid sequences of GYS1 and GYS2 between human, mouse, and zebrafish.

Figure 1 Schematic diagram of target sites of *gys1* and *gys2* and the sequence alignment of GYS1 and GYS2 between human, mouse and zebrafish

gys1 和 *gys2* 基因分别编码 700 和 703 个氨基酸。*gys1* 两种突变类型纯合子基因编码的蛋白分别截短至 267 和 124 个氨基酸。*gys2* 两种突变类型纯合子基因编码的蛋白分别截短至 164 和 194 个氨基酸(图 3e~3f)。

2.4 纯合子 F₂ 及其后代 F₃ 表型分析

与野生型相比,*gys1* 和 *gys2* 两种突变类型的 F₂ 纯合子在生长发育过程中未发现异常表型。*gys1*^{-/-} F₂ 自交后代 F₃ 早期胚胎发育缺陷,48 hpf 内全部死亡,而 *gys2*^{-/-} F₂ 自交后代 F₃ 发育正常。对野生型和 *gys1*^{-/-} F₃ 早期胚胎发育 7 个时间点(0、6、12、24、30、36 和 48 hpf)胚胎存活和死亡数量进行统计。结果显示,野生型胚胎发育至 24 hpf 后不再死亡,而 *gys1*^{-/-} F₃ 胚胎至 48 hpf 内全部死亡,且死亡数量主要集中在 0~24 hpf 时间段内(图 4a~4b)。对 *gys1*^{-/-} F₃ 与野生型胚胎 24 hpf 内重要发育时期比较发现,与野生型相比,*gys1*^{-/-} F₃ 胚胎从 0.5 hpf 开始发育延迟;8 hpf 时候,相对野生型延迟发育约 2 h;24 hpf 时候,相对野生型延迟发育约 3 h(图 4c)。

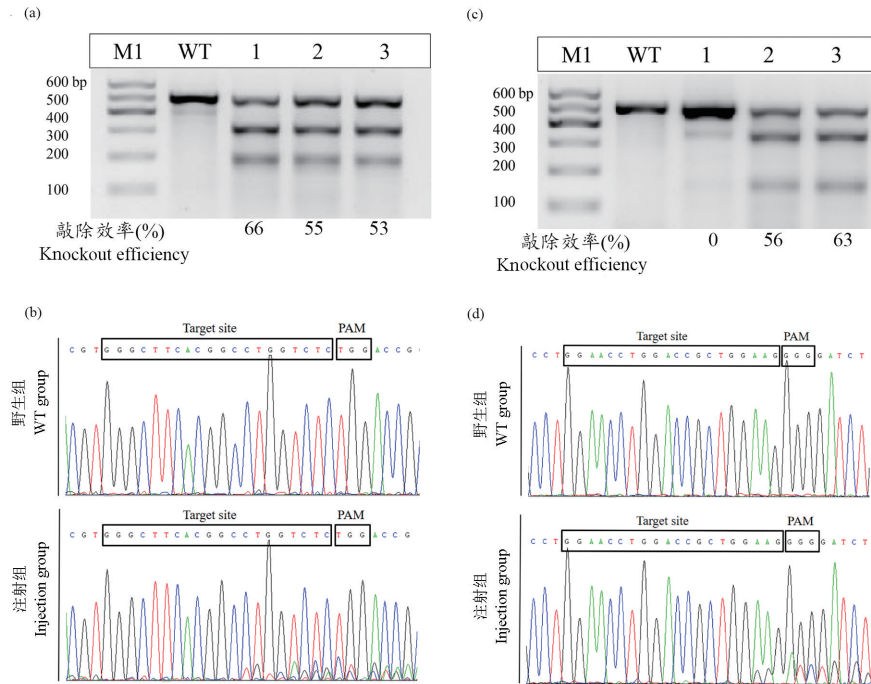
2.5 *gys1* 和 *gys2* 早期发育阶段表达模式分析

gys1^{-/-} 内交产生的后代胚胎发育异常,推测 *gys1* 基因在斑马鱼胚胎发育中发挥重要的作用。因此,利用 qRT-PCR 技术检测了 *gys1* 和 *gys2* 基因早期发育阶段表达情况,结果显示,*gys1* 基因在早期发育过程中呈现先下降再升高的趋势,且在 1 细胞期表达量最高,尾芽期(bud stage)和 12 hpf 降到最低,然后升高,125 hpf 时达到 1 细胞期 30%(图 5a);*gys2* 与 *gys1* 表达模式相似,但是 *gys2* 的表达量低于 *gys1* 表达量,约为 *gys1* 表达量的一半(图 5b)。

2.6 *gys1* 和 *gys2* 组织表达谱和糖原染色分析

对成鱼不同组织 *gys1* 和 *gys2* 基因表达情况进行了定量分析,结果显示 *gys1* 在所有组织中均有表达,其中在肌肉组织中的表达量最高(图 6a);而 *gys2* 肝中表达最高,是其它组织表达量的 50~100 倍(图 6b)。

对 *gys1* 和 *gys2* 突变体与野生型的糖原染色分析显示,与野生型相比,*gys1*^{-/-} 心脏和肌肉中没有明显糖原累积,而肝却没有明显差别;*gys2*^{-/-} 肝中糖原累积量显著降低,而心脏和肌肉没有明显变化(图 6c)。

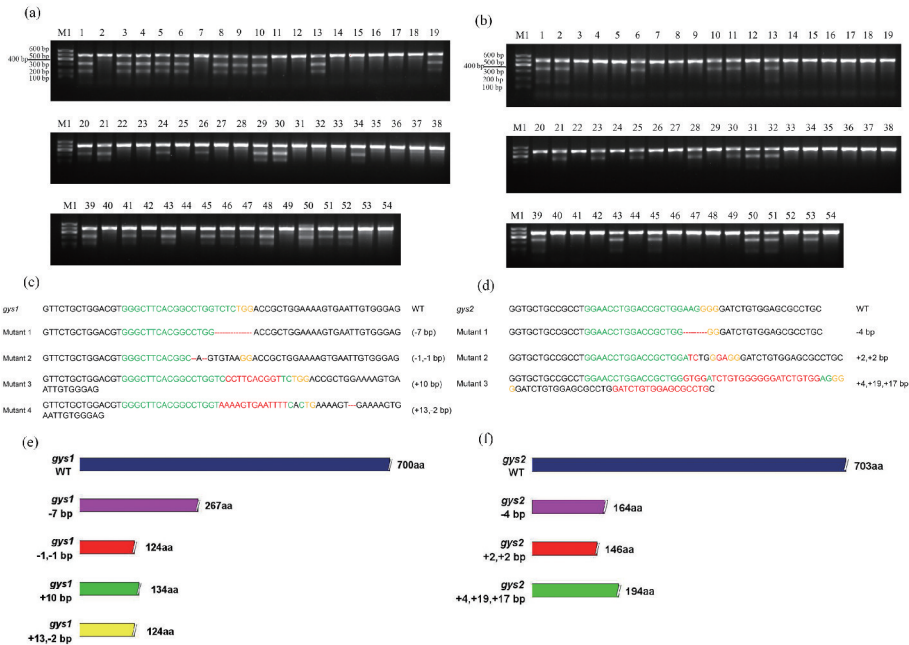


注:(a):通过 T7E1 酶切法检测 *gys1* 基因敲除效率;(b):通过 Sanger 测序法分析 *gys1* 基因敲除;(c):通过 T7E1 酶切法检测 *gys2* 基因敲除效率;(d):通过 Sanger 测序法分析 *gys2* 基因敲除。黑框分别表示靶点位置和 PAM 位点。

图 2 斑马鱼 *gys1* 和 *gys2* 基因敲除 T7E1 酶切检测和 Sanger 法测序检测

Note.(a), The assay of knockout efficiency for *gys1* by T7E1 enzyme digestion. (b), The assay of knockout for *gys1* by Sanger sequencing. (c), The assay of knockout efficiency for *gys2* by T7E1 enzyme digestion. (d), The assay of knockout for *gys2* by Sanger sequencing. The boxes indicate the target sites and PAM sites, respectively.

Figure 2 Gene knockout of *gys1* and *gys2* assayed with T7E1 digestion and Sanger sequencing in zebrafish



注:(a):T7E1 酶切法筛选 *gys1* F_1 杂合子;(b):T7E1 酶切法筛选 *gys2* F_1 杂合子;(c-d):Sanger 测序法检测 *gys1* 和 *gys2* 突变类型;(e-f):*gys1* 和 *gys2* 两种突变类型形成的截断蛋白示意图。

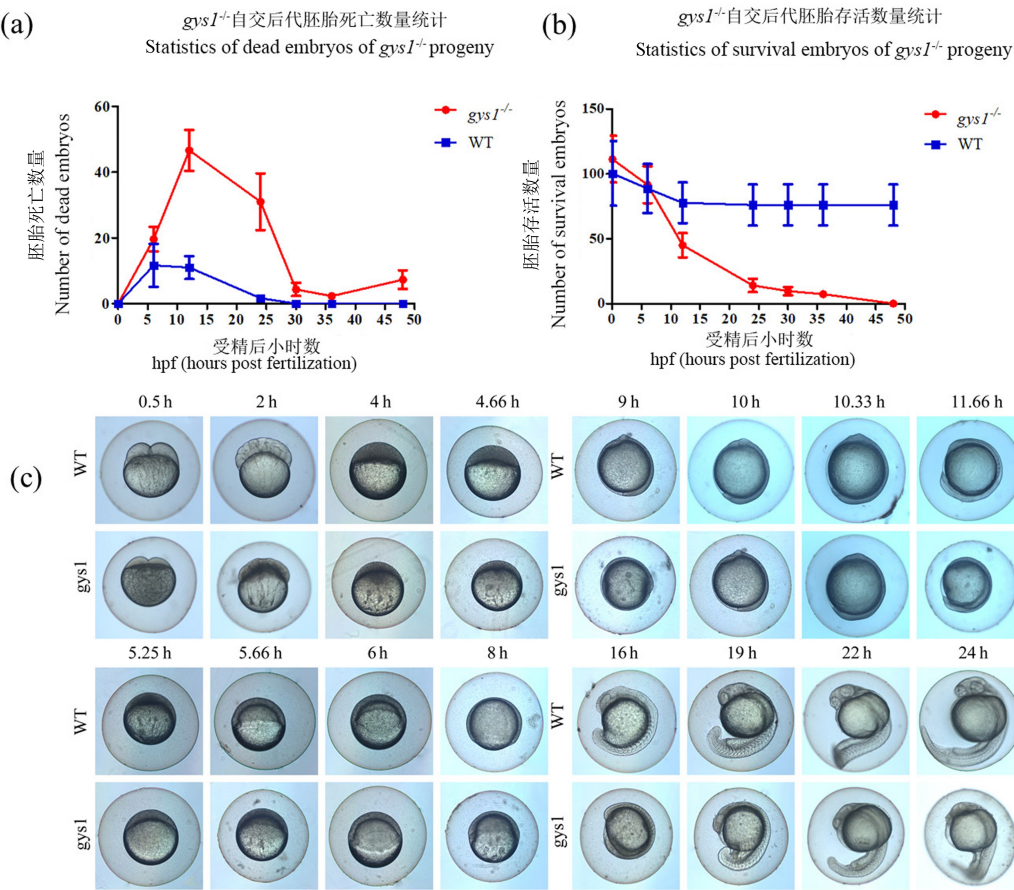
图 3 斑马鱼 *gys1* 和 *gys2* 突变体 F_1 和 F_2 筛选及突变类型

Note.(a), T7E1 screening of *gys1* F_1 heterozygotes. (b), T7E1 screening of *gys2* F_1 heterozygotes. (c-d), The mutation type of *gys1* and *gys2* detected by Sanger sequencing. (e-f), The schematic diagrams showing the truncated proteins of two mutation type of *gys1* and *gys2* genes.

Figure 3 Screening of heterozygous F_1 and homozygous F_2 of *gys1* and *gys2* and the representation of mutation type and truncated protein sequences

表 3 *gys1* 和 *gys2* 不同基因型 F₂ 个体数目卡方检验分析
Table 3 Chi-square test of different genotypes of *gys1* and *gys2* F₂

基因 Gene	基因型 Genotype	野生型 Wild type	杂合子 Heterozygote	纯合子 Homozygote	分离比 Separation ratio	卡方值 Chi-square value	P 值 P value
<i>gys1</i>	-7 bp	24	57	27	1:2.4:1.1	0.50	0.7788
	+13, -2 bp	17	36	15	1:2.1:0.9	0.35	0.8394
<i>gys2</i>	-4 bp	18	47	19	1:2.6:1.1	1.21	0.5461
	+4, +19, +17 bp	32	55	25	1:1.7:0.8	0.91	0.6344



注:(a):0~48 hpf 期间 *gys1*^{-/-} F₃ 和 WT 胚胎死亡数量统计;(b):0 ~ 48 hpf 期间 *gys1*^{-/-} F₃ 和 WT 胚胎存活数量统计;(c):0~24 hpf 期间 F₃ 和 WT 胚胎发育观察。

图 4 *gys1*^{-/-} 纯合子 F₂ 及其后代 F₃ 表型分析

Note.(a), The statistics of dead embryos of *gys1*^{-/-} F₃ and WT during the period from 0 to 48 hpf. (b), The number of survival embryos of *gys1*^{-/-} F₃ and WT during the period from 0 to 48 hpf. (c), Observation of embryonic development of F₃ and WT during 0~24 hpf.

Figure 4 Phenotypic analysis of *gys1*^{-/-} F₂ and their offspring F₃

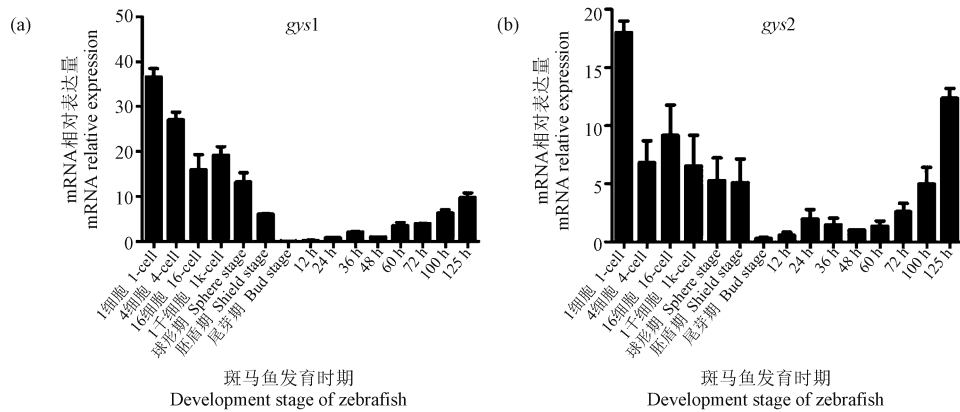
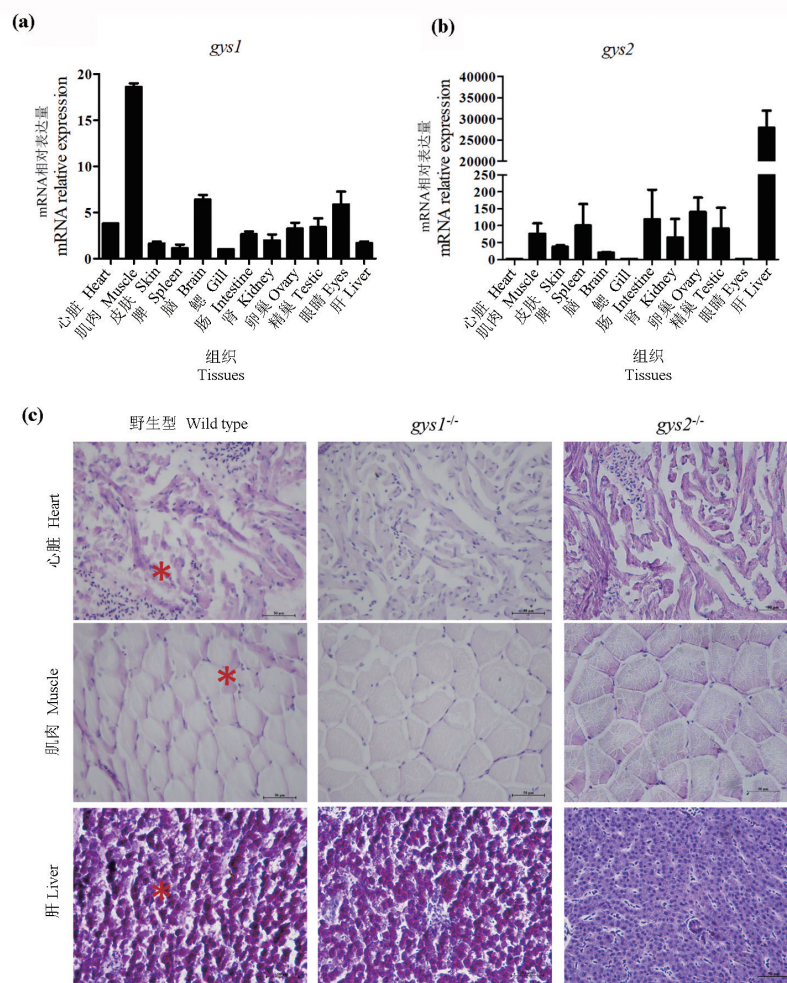


图 5 *gys1* 和 *gys2* 基因在野生型斑马鱼早期发育阶段表达模式

Figure 5 The expression pattern of *gys1* (a) and *gys2* (b) during early developmental stages



注: (a-b): 成年野生型斑马鱼不同组织中 *gys1* 和 *gys2* 基因表达模式; (c): 通过 PAS 染色比较野生型与 *gys1*^{-/-} 和 *gys2*^{-/-} 突变体心脏、肌肉和肝组织中糖原的储存情况。红色星号表示糖原储存位置。

图 6 *gys1* 和 *gys2* 基因在野生型成鱼组织表达谱及突变体组织糖原染色

Note. (a-b), The expression pattern of *gys1* and *gys2* in different adult tissues of WT zebrafish. (c), The comparison of glycogen storage in heart, muscle and liver tissues between WT and mutants of *gys1*^{-/-} and *gys2*^{-/-} through PAS staining. The red asterisk indicates glycogen storage.

Figure 6 Expression pattern of *gys1* and *gys2* in different adult tissues of WT zebrafish and PAS staining of different mutant tissues

3 讨论

动物疾病模型的构建对于研究人类疾病的发病机理和药物筛选具有重要作用。基因编辑技术是一种精准、快速的人工基因突变技术手段。基因编辑技术主要经历了 3 个技术发展阶段,分别是锌指核酸酶(ZFNs, zinc-finger nucleases)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALENs, transcription activator-like effector nucleases)和 CRISPR (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats) 技术^[15]。其中,CRISPR/Cas9 基因编辑技术因其操作简单、成本低、效率高等特点,现已发展成为应用最广泛的基因编辑技术^[16]。斑马鱼具有繁殖周期短、产卵量大、胚胎透明、基因组与人类基因组相似性高等特点^[17],已成为继果蝇、线虫和小鼠之后的又一种重要的模式动物。通过 CRISPR/Cas9 技术构建斑马鱼疾病模型为研究人类疾病发病机理和筛选有效药物提供了有效途径。糖原贮积症是一组遗传性先天糖代谢酶缺陷导致的代谢障碍疾病,该疾病至少可分为 16 种类型^[5]。GSD0a 型和 GSD0b 型分别由 *GYS2* 和 *GYS1* 突变导致;*GYS1* 突变表现为运动疲劳、运动不耐受、累及心脏可引起肥厚性心肌症,突发心脏骤停;*GYS2* 突变表现为餐后高血糖和高脂血症,伴有肝肿大症状^[4,18-20]。肌肉和肝是葡萄糖摄取和转化的主要部位^[21],因此,多种类型的糖原贮积症都累及肌肉、心脏和肝^[22-24]。糖原贮积症疾病的类型很多,其中以 GSD V 型最为常见,其疾病动物模型类型也较多,包括了天然突变的牛、羊动物模型和人工构建的小鼠和斑马鱼模型^[25-26]。目前,GSD0 型疾病的临床病例报道很少,其疾病模型也只有小鼠模型。Pederson 等^[1]构建的 *Gys1* 敲除小鼠模型显示,90% 的小鼠出生后死于心功能受损。Xirouchaki 等^[11]构建的肌肉特异性 *Gys1* 敲除小鼠显示,小鼠糖代谢和运动能力受损。Irimia 等^[12]构建的肝特异性 *Gys2* 基因敲除小鼠模型很好地模拟了 GSD0a 病理生理学。

与小鼠和人类基因结构一样,斑马鱼 *gys1* 和 *gys2* 基因也包含 16 个外显子,且编码蛋白的氨基酸序列一致性分别是 92% 和 89%,因此,斑马鱼 *gys1* 和 *gys2* 突变体可能很好得模拟人类 *GYS1* 和 *GYS2* 基因突变导致的疾病,为进一步研究 GSD0 型疾病的发病进程及详细机制提供材料。斑马鱼 *gys1*^{-/-}

和 *gys2*^{-/-} 突变体的表型与人类患者和小鼠模型表型相似,但也存在差异。基因组表达分析显示,*gys1* 和 *gys2* 基因广泛表达于所检测的组织中,但 *gys1* 在肌肉组织中表达最高,*gys2* 在肝中表达最高;这与人类糖原合酶组织表达模式一致。糖原染色分析结果进一步显示,斑马鱼 *gys1*^{-/-} 突变体心脏和肌肉组织糖原累积明显减少,而 *gys2*^{-/-} 突变体出现肝组织糖原累积量显著降低,斑马鱼表型与 GSD0 型疾病患者肌肉活检结果相一致。因此,我们构建的斑马鱼疾病模型能够很好模拟人类糖原贮积症 GSD0 型。

与 *Gys1* 敲除小鼠模型 F₂ 大部分死亡不同^[9],斑马鱼 *gys1*^{-/-} 突变体 F₂ 正常生长发育,但其自交后代即 F₃ 胚胎发育缺陷,48 hpf 内全部死亡。对 *gys1*^{-/-} F₃ 24 hpf 内胚胎发育过程观察发现,相对野生型斑马鱼,*gys1*^{-/-} F₃ 胚胎发育迟缓(图 4c)。对 *gys2*^{-/-} 突变体的观察显示,未发现异常死亡现象。*gys2* 是肝糖原合成酶,组织 qPCR 结果也显示,*gys2* 在肝中显著高表达;因此,*gys2* 缺失会导致肝糖原累积降低,但是心脏和肌肉中糖原无明显变化。解剖 *gys2*^{-/-} 突变体时,发现突变体肝要比野生型肝体积小(未做统计分析)。*gys2*^{-/-} 突变体后代能够正常生长发育和繁殖。基因表达模式分析结果显示,*gys1* 和 *gys2* 在胚胎发育过程中(1 细胞期至盾形期)高表达,两基因都在 1 细胞期的表达量最高,且 *gys1* 表达量高于 *gys2* 表达量。因此,我们推测 *gys*(糖原)对胚胎早期发育极为重要,可能为胚胎发育提供能量。斑马鱼卵子受精后,胚胎在早期发育过程中所需要的能量都来源于卵子形成过程中积累的能量。组织 qPCR 结果显示,*gys1* 在整个机体各个组织都有表达,尤其在肌肉中高表达,同时在卵巢中也有明显表达,可能对卵子糖原的积累非常重要。当在斑马鱼中敲除 *gys1*,*gys1*^{-/-} 的斑马鱼卵巢可能不能有效的合成糖原,卵子不能有效的积累糖原;因此 *gys1*^{-/-} 雌鱼产的卵,受精后,早期胚胎没有足够的糖原为其发育提供能量,所以胚胎在发育过程中死亡,且大多集中在 13~14 hpf(图 4a)。对小鼠的研究表明,小鼠 1 细胞期可以检测到高的糖原合酶活性,2 细胞期开始大量积累糖原,胚胎早期发育阶段多种器官的糖原水平先升高后降低;胚胎发育过程中糖原水平的变化表明,糖原对胚胎发育可能具有特殊的作用,但很少有研究提供确切证据^[1]。因此,我们推测 *gys1* 完全缺失,导致 *gys1*^{-/-}

F₂ 卵子形成过程中只有少量糖原积累(*gys2* 可能发挥作用), 不能为受精卵早期发育持续提供能量, 导致胚胎死亡。

gys1^{-/-} 纯合子中 *gys2* 是否存在显著代偿作用? 从组织和早期发育阶段 qPCR 结果来看, *gys1* 和 *gys2* 的表达位置具有重合现象, 提示基因表达可能有冗余现象。但是从突变体的组织切片(图 6c)来看, *gys1* 不能补偿 *gys2*^{-/-} 纯合子肝表型; 同样, *gys2* 也不能补偿 *gys1*^{-/-} 纯合子心脏和肌肉表型, 因此, 我们推测 *gys1*^{-/-} 纯合子中 *gys2* 可能不存在显著代偿作用。

斑马鱼 *gys1*^{-/-} F₂ 和 *gys2*^{-/-} 纯合子能够正常生长发育, 后续, 我们将通过运动耐受、糖耐受和胰岛素耐受等实验, 在细胞和分子水平上阐明 GSD0 发病进程和机制, 为深入认识人类糖原贮积症 GSD0 奠定基础。

参考文献:

- [1] Pederson BA, Chen H, Schroeder JM, et al. Abnormal cardiac development in the absence of heart glycogen [J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(16): 7179-7187.
- [2] Sukigara S, Liang WC, Komaki H, et al. Muscle glycogen storage disease 0 presenting recurrent syncope with weakness and myalgia [J]. Neuromuscul Disord, 2012, 22(2): 162-165.
- [3] 王利群, 李焰生, 黄坚. 糖原贮积症一例报告 [J]. 第二军医大学学报, 2003, 24(1): 43-47.
- [4] 曾召琼, 易帆, 谢小兵. 糖原累积病研究进展 [J]. 检验医学与临床, 2018, 15(22): 3458-3461.
- [5] Kanungo S, Wells K, Tribett T, et al. Glycogen metabolism and glycogen storage disorders [J]. Ann Transl Med, 2018, 6(24): 474.
- [6] Kaslow HR, Lesikar DD. Isozymes of glycogen synthase [J]. FEBS Lett, 1984, 172(2): 294-298.
- [7] Kaslow HR, Lesikar DD, Antwi D, et al. L-type glycogen synthase. Tissue distribution and electrophoretic mobility [J]. J Biol Chem, 1985, 260(18): 9953-9956.
- [8] Wilson WA, Roach PJ, Montero M, et al. Regulation of glycogen metabolism in yeast and bacteria [J]. FEMS Microbiol Rev, 2010, 34(6): 952-985.
- [9] Forbes G. Glycogen storage disease. Report of a case with abnormal glycogen structure in liver and skeletal muscle [J]. J Pediatr, 1953, 42(6): 645-653.
- [10] Kollberg G, Tulinius M, Gilljam T, et al. Cardiomyopathy and exercise intolerance in muscle glycogen storage disease 0 [J]. N Engl J Med, 2007, 357(15): 1507-1514.
- [11] Xirouchaki CE, Mangiafico SP, Bate K, et al. Impaired glucose metabolism and exercise capacity with muscle-specific glycogen synthase 1 (*gys1*) deletion in adult mice [J]. Mol Metab, 2016, 5(3): 221-232.
- [12] Irimia JM, Meyer CM, Peper CL, et al. Impaired glucose tolerance and predisposition to the fasted state in liver glycogen synthase knock-out mice [J]. J Biol Chem, 2010, 285(17): 12851-12861.
- [13] Bootorabi F, Manouchehri H, Changizi R, et al. Zebrafish as a model organism for the development of drugs for skin cancer [J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(7): 1550.
- [14] Zetsche B, Gootenberg JS, Abudayyeh OO, et al. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system [J]. Cell, 2015, 163(3): 759-771.
- [15] 刘瑞琪, 王玮玮, 吴勇延, 等. CRISPR-Cas9 研究进展及在基因治疗上的应用 [J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(10): 72-78.
- [16] Mussolino C, Cathomen T. RNA guides genome engineering [J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 208-209.
- [17] Stewart AM, Braubach O, Spitsbergen J, et al. Zebrafish models for translational neuroscience research: from tank to bedside [J]. Trends Neurosci, 2014, 37(5): 264-278.
- [18] Oezen H. Glycogen storage diseases: new perspectives [J]. World J Gastroenterol, 2007, 13(18): 2541-2553.
- [19] Oldfors A, Dimauro S. New insights in the field of muscle glycogenoses [J]. Curr Opin Neurol, 2013, 26(5): 544-553.
- [20] DiMauro S, Spiegel R. Progress and problems in muscle glycogenoses [J]. Acta Myol, 2011, 30(2): 96-102.
- [21] Jue T, Rothman DL, Shulman GI, et al. Direct observation of glycogen synthesis in human muscle with ¹³C NMR [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989, 86(12): 4489-4491.
- [22] Laforêt P, Inoue M, Goillot E, et al. Deep morphological analysis of muscle biopsies from type III glycogenesis (GSDIII), debranching enzyme deficiency, revealed stereotyped vacuolar myopathy and autophagy impairment [J]. Acta Neuropathol Commun, 2019, 7(1): 167.
- [23] 张睿. 糖原累积病 2 例临床与基因分析 [D]. 济南: 山东大学, 2016.
- [24] Nogales - Gadea G, Santalla A, Brull A, et al. The pathogenomics of McArdle disease -- genes, enzymes, models, and therapeutic implications [J]. J Inherit Metab Dis, 2015, 38(2): 221-230.
- [25] 黄皎. 糖原贮积症 GSD0 和 GSDV 斑马鱼疾病模型的构建及其表型分析 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019.
- [26] 黄皎, 霍锦倩, 刘皎, 等. 糖原贮积症 V 型斑马鱼疾病模型的构建及其表型分析 [J]. 上海海洋大学学报, 2021, 30(1): 11-20.

[收稿日期] 2020-08-20