

黄艳秋,张月,石柳柳,等. *ABI3BP* 基因敲除小鼠模拟低出生体重模型的初步探讨 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(10): 1307-1312.

HUANG Y Q, ZHANG Y, SHI L L, et al. Preliminary study of *ABI3BP*-knockout mouse simulating low birth weight model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(10): 1307-1312.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.10.008

ABI3BP 基因敲除小鼠模拟低出生体重模型的初步探讨

黄艳秋^{1,2}, 张月^{1,2}, 石柳柳^{1,2}, 赵小英^{1,2}, 唐俊明^{1,2}, 吴艳^{1,2*}

(1. 湖北医药学院基础医学院生理学教研室, 湖北 十堰 442000;

2. 胚胎干细胞研究湖北省重点实验室, 湖北 十堰 442000)

【摘要】 目的 利用 *ABI3BP* 基因敲除小鼠模型观察出生后其体重及糖代谢变化特点, 为低出生体重小鼠模型提供新的选择。方法 利用杂合子交配得到 *ABI3BP* 基因敲除的纯合子 (*ABI3BP*^{-/-})、杂合子 (*ABI3BP*^{+/-}) 和野生型 (WT) 3 组小鼠, 观察出生后不同时间点体重及成年后重要脏器体重比, 检测成年小鼠空腹血糖、糖耐量及胰岛素耐量等糖代谢指标。结果 *ABI3BP*^{-/-} 小鼠 PCR 产物基因测序结果显示敲除区域产生移码突变, RT-qPCR 检测显示, *ABI3BP*^{-/-} 小鼠 *ABI3BP* 在 mRNA 水平上表达显著低于 WT 小鼠。体重测量显示, *ABI3BP*^{-/-} 小鼠出生时体重 (1.25 ± 0.08 g) 显著低于 WT 小鼠 (1.34 ± 0.12 g) ($P < 0.05$), 但成年 (120 d) *ABI3BP*^{-/-} 小鼠体重 (27.70 ± 1.93 g) 反而显著高于 WT 小鼠 (23.64 ± 1.34 g) ($P < 0.01$), 但重要脏器与体重的比值, 各组小鼠之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。空腹血糖及胰岛素耐量实验显示各组小鼠之间无显著性差异, 但糖耐量实验表明 *ABI3BP*^{-/-} 小鼠在腹腔注射葡萄糖后 15 min 时血糖 (15.68 ± 7.04 mmol/L) 低于 WT 小鼠 (23.01 ± 5.75 mmol/L)。结论 *ABI3BP* 基因敲除小鼠呈现低出生体重、生长追赶及成年后糖耐量异常等临床低出生体重新生儿的生长特点, 可作为低出生体重小鼠模型的选择之一。

【关键词】 *ABI3BP*; 基因敲除; 低出生体重; 糖代谢; 小鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 10-1307-06

Preliminary study of *ABI3BP*-knockout mouse simulating low birth weight model

HUANG Yanqiu^{1,2}, ZHANG Yue^{1,2}, SHI Liuliu^{1,2}, ZHAO Xiaoying^{1,2},
TANG Junming^{1,2}, WU Yan^{1,2*}

(1. Department of Physiology, School of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; 2. Hubei Key Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Shiyan 442000, China)

Corresponding author: WU Yan. E-mail: 2668224536@qq.com

【Abstract】 Objective To employ a mouse model of *ABI3BP* gene deletion for the detection of postnatal changes in body weight and glucose metabolism and establish a different method of creating a mouse model of low birth weight.

Methods Heterozygote mice were mated to produce *ABI3BP* gene knockout homozygote (*ABI3BP*^{-/-}) mice, heterozygote (*ABI3BP*^{+/-}) mice, and wild-type (WT) mice. Adult mice from all three groups were evaluated for glucose metabolism

【基金项目】湖北省知识创新专项(2021DFE026), 湖北省自然科学基金(2022CFB934), 湖北省教育厅自然科学基金(Q20212107)。Funded by Knowledge Innovation Program of Science and Technology Department of Hubei Province (2021DFE026), Hubei Provincial Natural Science Foundation (2022CFB934), the Natural Science Foundation of Hubei Provincial Department of Education (Q20212107)。

【作者简介】黄艳秋,女,在读硕士研究生,研究方向:干细胞与代谢相关疾病研究。Email:327274782@qq.com

【通信作者】吴艳,女,副教授,博士,研究方向:干细胞与代谢相关疾病研究。Email:2668224536@qq.com

markers, including the fasting blood glucose level, glucose tolerance, and insulin tolerance. Additionally, body weight was measured at various postnatal time periods, and the weight ratio of critical organs in adulthood was calculated. **Results** The gene sequencing result of the polymerase chain reaction product of *ABI3BP*^{-/-} mice showed that frameshift mutations occurred in the knockout region, with quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction analysis demonstrating significantly reduced *ABI3BP* expression in *ABI3BP*^{-/-} mice compared with that in WT mice. Notably, the birth weight of *ABI3BP*^{-/-} mice (1.25 ± 0.08 g) was markedly lower than that of WT mice (1.34 ± 0.12 g) ($P < 0.05$). Conversely, the weight of adult (120 d) *ABI3BP*^{-/-} mice (27.70 ± 1.93 g) was significantly higher than that of WT mice (23.64 ± 1.34 g) ($P < 0.01$). The ratios of key organ weights to body weight were not significantly different between the groups ($P > 0.05$). Fasting blood glucose and insulin tolerance tests showed no significant variations between the groups. However, glucose tolerance tests indicated that *ABI3BP*^{-/-} mice had lower blood glucose levels (15.68 ± 7.04 mmol/L) than WT mice (23.01 ± 5.75 mmol/L). **Conclusions** Deletion of the *ABI3BP* gene result in mice with low birth weight, poor growth recuperation, and inadequate glucose tolerance in adulthood, similar to the clinical growth traits of low-birth-weight human neonates. Therefore, this mouse model is a promising choice for the study of low birth weight.

【Keywords】 *ABI3BP*; gene knockout; low birth weight; glucose homeostasis; mouse model

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

新生儿低出生体重(low birth weight, LBW)不仅使新生儿在围产期面临更高的发病和死亡风险,而且其成年后胰岛素抵抗、糖尿病、肥胖等代谢性疾病及心血管疾病发生的风险也大大增高^[1-2],因此,构建低出生体重小鼠模型对于研究新生儿低出生体重产生的机制,降低儿童疾病负担和提高我国人口素质有着非常重要的意义。近年来,不同学者应用敲除类胰岛素样生长因子基因、胰岛素样生长因子受体基因及类胰岛素样生长因子结合蛋白基因等基因工程法构建胎儿生长受限动物模型以观察低出生体重胎儿生长过程,为研究新生儿低出生体重生长调控机制提供了新的思路^[3]。

*ABI3BP*最初是通过酵母双杂交系统从人胎盘cDNA文库中发现的Abi3-*Src*同源性3(SH3)结合蛋白,由MATSUDA等^[4]定位到染色体3q12上。*ABI3BP*作为一种细胞外基质蛋白,在多个器官中表达,且在调控细胞增殖、分化、衰老过程中也有着重要作用^[5-6]。有研究显示,重度子痫前期的胎儿宫内生长限制与胎盘内*ABI3BP*基因表达异常有关^[7],但*ABI3BP*与新生儿低出生体重是否有直接关系目前暂无相关报道。本实验旨在通过构建*ABI3BP*基因敲除小鼠,观察小鼠体重、重要脏器重量及糖代谢等特点,为后续将*ABI3BP*基因敲除小鼠作为低出生体重动物模型提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

24只16周龄SPF级WT、*ABI3BP*基因敲除

C57BL/6N小鼠,雌雄各半,体重21~31g,购于华中农业大学实验动物中心模式动物平台【SCXK(鄂)2020-0019】,饲养于湖北医药学院实验动物中心【SYXK(鄂)2019-0031】,室内温度控制在19~24℃,湿度50%~60%,12h明暗交替。小鼠饲料、垫料均经高温消毒处理,饮水经高温高压灭菌处理。饲养过程中,密切观察小鼠生长情况,垫料每周换一次,饲料和饮水每日补充。所有动物操作程序均获湖北医药学院动物伦理委员会批准(湖北医药学院动(福)第2021-实086号)。

1.1.2 主要试剂与仪器

葡萄糖(D9434,美国Sigma公司);胰岛素(I0908,美国Sigma公司);荧光定量逆转录试剂盒(R323-01,南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。

Bio-Rad CFX96 Touch 荧光定量PCR仪器(美国Bio-Rad公司);Bio-Rad Spectrum 600 凝胶成像系统(美国Bio-Rad公司);鱼跃580血糖仪(江苏鱼跃医疗设备股份有限公司);赛多利斯BSA124电子分析天平(上海赛多利斯贸易有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 *ABI3BP*基因敲除小鼠模型设计

*ABI3BP*基因敲除小鼠是通过CRISPR/Cas9(来源于酿脓链球菌)技术敲除*ABI3BP*-201转录本的3号外显子和4号外显子得到。(这一部分工作由华中农业大学实验动物中心模式动物平台完成)。

选择杂合子小鼠交配繁殖扩群,并将不同小鼠命名如下:纯合子小鼠为*ABI3BP*^{-/-};杂合子小鼠为*ABI3BP*^{+/-};野生型小鼠为WT。提取*ABI3BP*^{-/-}小

鼠基因组 RNA, 进行 PCR 扩增后测序鉴定。

通过 RT-qPCR 鉴定组织中 *ABI3BP* mRNA 表达水平。颈椎脱臼法处死小鼠, 取肝及肺组织, 匀浆后提取总 RNA, 反转录后检测 *ABI3BP* 在 *ABI3BP*^{-/-}、*ABI3BP*^{+/-} 和 WT 小鼠肝及肺组织中的表达情况 (引物序列见表 1)。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequences(5'→3')
<i>ABI3BP</i>	F:CGCGTCGTCACCCATACGACAT
	R:CCCCTGGTCTCGCTGTGGCTGTTC
β-actin	F:GTGCTATGTTGCTCTAGACTTCG
	R:ATGCCACAGGATTCCATAACC

1.2.2 小鼠体重测定及生长曲线绘制

使用电子天平直接测定出生至 120 日龄 (成年) 小鼠体重。体重测量频率为: 出生 7 d 内, 每 2 d 1 次; 7 ~ 28 d, 每周 1 次; 28 ~ 120 d, 20 ~ 30 d 各 1 次。按照数据作生长曲线, 并以出生时及 120 d 时体重数据作为差异性统计检验; 对成年小鼠进行拍照比较大。

1.2.3 成年小鼠重要脏器重量测定及脏器体重比计算

使用电子天平测定 120 d 时不同组别小鼠主要脏器 (心脏、肝和肾) 重量; 根据同一小鼠体重, 计算

脏器/体重 (mg/g) 的数值并进行差异性显著检验。

1.2.4 成年小鼠空腹血糖、糖耐量实验和胰岛素耐量检测

取出生后 120 d 不同组别小鼠, 禁食 12 h 后尾静脉取血, 血糖仪和试纸测空腹血糖, 作统计学分析。

取出生后 120 d 不同组别小鼠, 禁食 12 h, 一次性以 2.0 g/kg 腹腔注射葡萄糖, 在注射后不同时间点 (0、15、30、60、90、120 min) 取尾静脉血, 测血糖, 绘制血糖变化曲线。

取出生后 120 d 不同组别小鼠, 禁食 4 h, 一次性以 0.5 U/kg 皮下注射胰岛素, 在注射后不同时间点 (0、15、30、45、60、90 min) 尾静脉取血, 测血糖, 绘制血糖变化曲线。

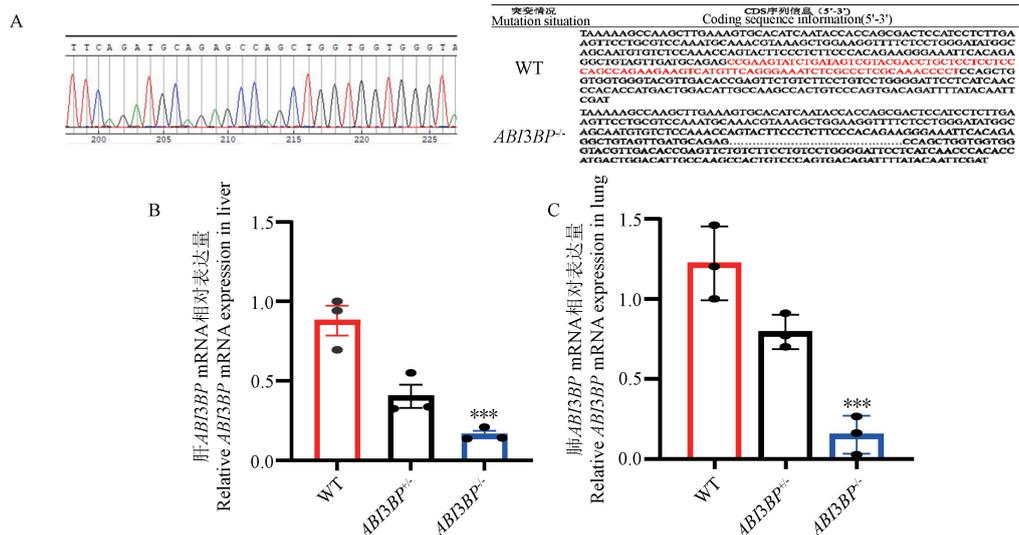
1.3 统计学分析

测量数值均以平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 以 SPSS 16.0 统计软件进行统计, 组间差异采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 *ABI3BP* 基因敲除小鼠鉴定

ABI3BP^{-/-} 小鼠 PCR 产物基因测序结果显示, 敲除区域为第 268 外显子至 353, 产生移码突变 (图 1A)。进一步行肝及肺 mRNA 水平检测显示 (图



注: A: 敲除前后测序结果对比; B: RT-qPCR 检测肝 *ABI3BP* 相对表达量; C: RT-qPCR 检测肺 *ABI3BP* 相对表达量; 与 WT 相比, *** *P* < 0.001。(下同)

图 1 小鼠基因型鉴定 (*n* = 3)

Note. A. Comparison of sequencing results before and after knockout. B. Relative expression of *ABI3BP* in liver was detected. C. Relative expression of *ABI3BP* in lung was detected. Compared with WT, *** *P* < 0.001. (The same in the following figures)

Figure 1 Genotyping of the *ABI3BP* knockout mice (*n* = 3)

1B, 1C); *ABI3BP*^{-/-} 小鼠表达显著低于 WT 小鼠 ($P < 0.001$)。

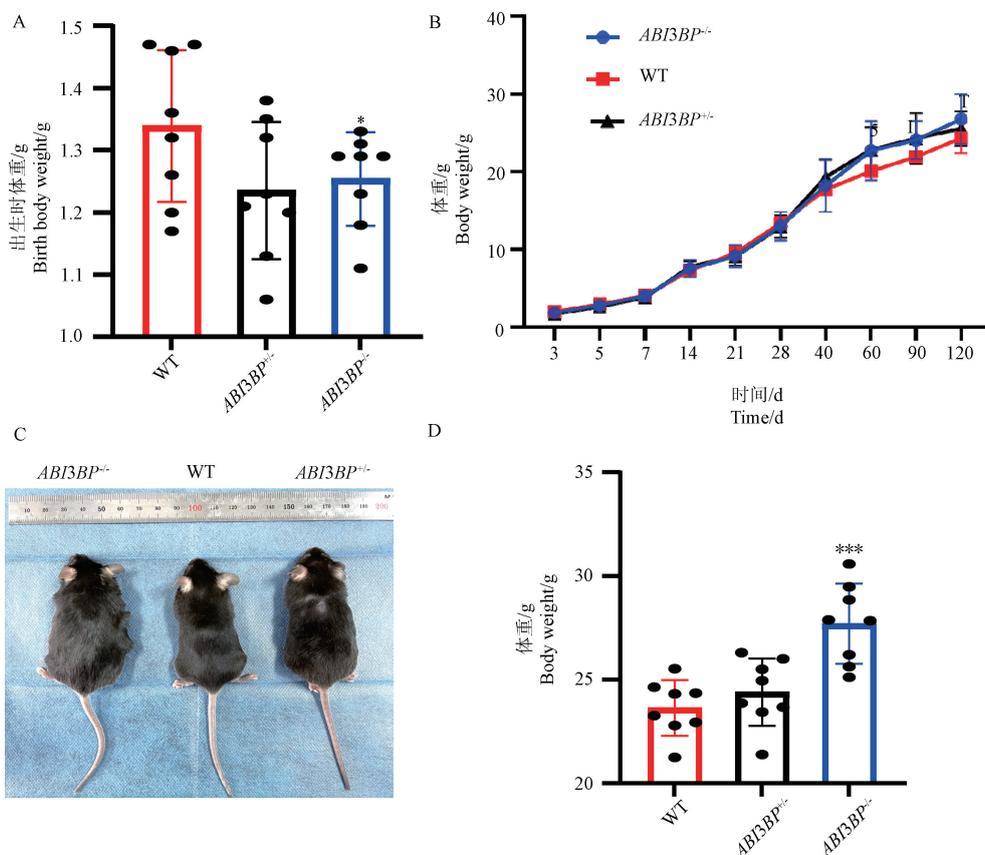
2.2 *ABI3BP* 基因敲除小鼠生长情况

对新生小鼠进行体重检测发现: *ABI3BP*^{-/-} 小鼠出生时体重为 1.25 ± 0.08 g, WT 小鼠为 1.34 ± 0.12 g, 具有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 2A)。进一步绘制生长曲线显示, *ABI3BP*^{-/-} 小鼠从 40 d 开始体重逐渐超过同年龄段 *ABI3BP*^{+/-} 和 WT 小鼠 (图 2B)。成年 *ABI3BP*^{-/-} 小鼠体型明显大于 WT 小鼠 (图 2C), *ABI3BP*^{-/-} 小鼠体重为 27.70 ± 1.93 g, WT

小鼠为 23.64 ± 1.34 g (图 2D, $P < 0.001$)。

2.3 成年 *ABI3BP* 基因敲除小鼠脏器重量及脏器体重比

检测出生后 120 d 时小鼠重要脏器 (心脏、肝、肾) 重量 (表 2), 发现成年 *ABI3BP*^{-/-} 小鼠肝重量显著高于 *ABI3BP*^{+/-} 和 WT 小鼠 ($P < 0.05$)。但进一步脏器体重比结果显示 (表 3), 成年 *ABI3BP*^{-/-} 小鼠与 *ABI3BP*^{+/-} 和 WT 小鼠相比较, 无统计学意义。心脏和肾重量及其与体重的比值, 3 组小鼠之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。



注: A: 出生时体重; B: 体重变化曲线; C: 雌性小鼠 120 d 体型代表照片; D: 120 d 时体重; 与 WT 相比, * $P < 0.05$ 。(下表同)

图 2 不同组别小鼠体重比较 ($n = 8$)

Note. A. Birth weight. B. Body weight curve. C. Representative mouse photo of 120 d female. D. Body weight of 120 d. Compared with WT, * $P < 0.05$. (The same in the following tables)

Figure 2 Body weight of mice in different groups ($n = 8$)

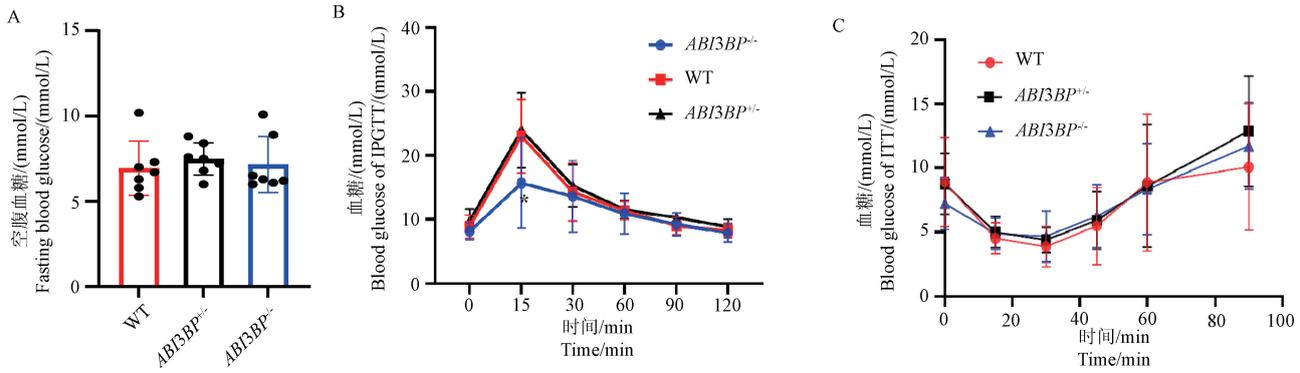
表 2 不同组别小鼠主要脏器重量比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 2 Main organ weight of mice in different groups ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别 Groups	心脏/g Heart/g	肝/g Liver/g	肾/g Kidney/g
WT	0.15 ± 0.01	1.18 ± 0.06	0.32 ± 0.02
<i>ABI3BP</i> ^{+/-}	0.14 ± 0.01	1.27 ± 0.13	0.36 ± 0.06
<i>ABI3BP</i> ^{-/-}	0.15 ± 0.01	$1.53 \pm 0.10^*$	0.36 ± 0.03

2.4 成年 *ABI3BP* 基因敲除小鼠糖代谢情况

检测成年小鼠空腹血糖, 结果显示 (图 3A), *ABI3BP*^{-/-} 小鼠空腹血糖稍高于 WT 小鼠, 无统计学意义 ($P > 0.05$)。经腹葡萄糖耐量实验结果显示 (图 3B): *ABI3BP*^{-/-} 小鼠在腹腔注射葡萄糖 15 min 时血糖值为 15.68 ± 7.04 mmol/L, WT 小鼠为 23.01 ± 5.75 mmol/L, 具有统计学意义 (图 3C)。



注: A:空腹血糖; B:糖耐量; C:胰岛素耐量。

图 3 各组小鼠空腹血糖、糖耐量及胰岛素耐量情况($n = 7$)

Note. A. Fasting blood glucose. B. IPGTT. C. ITT.

Figure 3 Results of fasting blood glucose, intraperitoneal glucose tolerance test and insulin tolerance test in different groups($n = 7$)

表 3 不同组别小鼠主要脏器/体重比较($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 3 Ratio of organ/body weight in different groups($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别 Groups	心脏/体重/ Heart/body/ (mg/g)	肝/体重/ Liver/body/ (mg/g)	肾/体重/ Kidney/body/ (mg/g)
WT	6.17 ± 0.01	51.11 ± 0.06	14.02 ± 0.02
<i>ABI3BP</i> ^{+/-}	5.05 ± 0.01	50.65 ± 0.01	13.22 ± 0.01
<i>ABI3BP</i> ^{-/-}	5.60 ± 0.01	51.29 ± 0.01	13.04 ± 0.01

进一步行胰岛素耐量实验显示, *ABI3BP*^{-/-} 小鼠与 *ABI3BP*^{+/-} 和 WT 小鼠无统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

已有研究证实, *ABI3BP* 基因敲除小鼠生育率和存活率均与野生型小鼠无显著性差异^[8]。但有学者发现, 在重度子痫前期妇女的胎盘中 *ABI3BP* 表达升高^[7], 而胎儿宫内发育直接影响出生时体重。本研究发现, *ABI3BP* 基因敲除小鼠出生时体重明显低于野生型小鼠, 提示 *ABI3BP* 基因敲除与小鼠低出生体重之间存在关联。

临床研究发现, 90% 的早产儿(出生时体重偏低)在婴幼儿时期都出现了不同程度的快速追赶生长^[9]。本研究发现出生 40 d 之后, 基因敲除小鼠体重呈现反方向升高的趋势, 单独统计出生 120 d 时体重, 发现 *ABI3BP* 基因敲除小鼠体重显著高于野生型小鼠, 这一结果与上述的临床观察相符, 证实 *ABI3BP* 基因敲除小鼠虽然出生时体重偏低, 但出生后呈现追赶生长现象。进一步比较小鼠心脏、肝和肾重量与体重比值发现, *ABI3BP* 基因敲除小鼠与野生型小鼠无明显差异, 提示 *ABI3BP* 基因敲除小鼠

未影响小鼠心脏、肝和肾等重要脏器的生长。这一部分结果进一步支持 *ABI3BP* 基因敲除小鼠具有低出生体重早产儿的生长特点。

有研究显示, 低出生体重婴儿早期快速追赶生长易导致成年后发生代谢紊乱^[10-11]。本研究观察到成年小鼠空腹血糖及胰岛素耐量在 *ABI3BP* 基因敲除小鼠与野生型小鼠之间无显著性差异, 但是糖耐量实验显示腹腔注射葡萄糖后 15 min, *ABI3BP* 基因敲除小鼠血糖显著低于野生型小鼠, 提示 *ABI3BP* 基因敲除可能延缓了葡萄糖经过腹腔粘膜早期吸收过程。分布于小肠黏膜上皮的葡萄糖转运体在小肠对葡萄糖的吸收中发挥了重要的作用^[12], 那么, *ABI3BP* 基因敲除是否与 GLUT 有关需要进一步研究。

综上所述, *ABI3BP* 基因敲除小鼠出生时体重偏低, 出生后呈现生长追赶现象, 且未影响重要脏器生长, 但是成年后肠道吸收葡萄糖速度减慢, 有发生成年后代代谢紊乱的风险。以上结果均符合临床低出生体重新生儿生长特点, 由此可见, *ABI3BP* 基因敲除小鼠有望作为低出生体重模型。

参 考 文 献 (References)

- [1] JAŃCZEWSKA I, WIERZBA J, JAŃCZEWSKA A, et al. Prematurity and low birth weight and their impact on childhood growth patterns and the risk of long-term cardiovascular sequelae [J]. Children, 2023, 10(10): 1599.
- [2] TIAN J Y, CHENG Q, SONG X M, et al. Birth weight and risk of type 2 diabetes, abdominal obesity and hypertension among Chinese adults [J]. Eur J Endocrinol, 2006, 155(4): 601-607.
- [3] 张瑞, 荀文丽, 孙云萍. 建立胎儿生长受限动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2009, 17(1): 71-75.

- ZHANG R, GOU W L, SUN Y P. Animal models of fetal growth restriction [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2009, 17(1): 71-75.
- [4] MATSUDA S, IRIYAMA C, YOKOZAKI S, et al. Cloning and sequencing of a novel human gene that encodes a putative target protein of Nesh-SH3 [J]. J Hum Genet, 2001, 46(8): 483-486.
- [5] KARLSEN A, YEUNG C C, SCHJERLING P, et al. Distinct myofibre domains of the human myotendinous junction revealed by single-nucleus RNA sequencing [J]. J Cell Sci, 2023, 136(8): jcs260913.
- [6] DELFÍN D A, DEAGUERO J L, MCKOWN E N. The extracellular matrix protein ABI₃BP in cardiovascular health and disease [J]. Front Cardiovasc Med, 2019, 6: 23.
- [7] NEVALAINEN J, SKARP S, SAVOLAINEN E R, et al. Intrauterine growth restriction and placental gene expression in severe preeclampsia, comparing early-onset and late-onset forms [J]. J Perinat Med, 2017, 45(7): 869-877.
- [8] YANG H, CHEN W, SHI J, et al. Knockout of Abi3bp in mice does not affect their olfactory function, mental state and NNK-induced lung tumorigenesis [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2016, 48(9): 820-826.
- [9] 马丽亚. 早产儿出院后随访研究热点 [J]. 中国当代儿科杂志, 2023, 25(6): 560-565.
- MA L Y. Research hotspots in post-discharge follow-up management of preterm infants [J]. Chin J Contemp Pediatr, 2023, 25(6): 560-565.
- [10] TALARICO V, NICOLETTI A, RAIOLA G. Endocrine and metabolic disorders in adolescent and adult patients born small for gestational age [J]. Acta Biomed, 2023, 94(6): e2023220.
- [11] JEE Y H, JUMANI S, MERICQ V. The association of accelerated early growth, timing of puberty, and metabolic consequences in children [J]. J Clin Endocrinol Metab, 2023, 108(9): e663-e670.
- [12] FIORENTINO T V, DE VITO F, SURACI E, et al. Obesity and overweight are linked to increased sodium-glucose cotransporter 1 and glucose transporter 5 levels in duodenum [J]. Obesity (Silver Spring), 2023, 31(3): 724-731.

[收稿日期] 2024-01-02

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023年版(即第10版)动物学/人类学类的核心期刊!

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评的学术水平和学术影响进行综合评价,受到学术界的广泛认同。

目前,本刊为中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

感谢编委、专家们的帮助与支持,感谢广大作者和读者朋友们的厚爱与信任。本刊编辑部将始终坚守办刊宗旨,不忘初心,严谨办刊,开拓进取,不断创新,向世界一流期刊看齐。

