

条件性胰岛 β 细胞 HLF 基因敲除小鼠构建与鉴定

侯梦龙, 齐心语, 吴建凤, 廖启超, 马 杰, 周 磊, 李一星

(广西畜禽繁育与疾病防控重点实验室, 广西大学动物科学技术学院, 南宁 530004)

摘要 **目的** 为了探究肝白血病因子 (HLF) 在糖尿病中的作用机制, 构建条件性胰岛 β 细胞 HLF 基因敲除小鼠动物模型。**方法** 在细胞水平上, 通过 CCK-8 试验验证 HLF 抑制或过表达对 MIN6 细胞增殖的影响。通过 RT-qPCR 和 Western blot, 分别在 mRNA 水平和蛋白水平检测 HLF 抑制或过表达效果。将 HLF^{fllox/fllox} 转基因小鼠与 Pdx1-Cre^{+/-} 小鼠 (C57BL/6J) 杂交繁育, 获得子代小鼠。利用 PCR 方法鉴定小鼠基因型, 通过 RT-qPCR 技术和 Western blot 检测 HLF 基因在胰岛 β 细胞敲除小鼠 (HLF^{fllox/fllox} Cre^{+/-}) 和对照小鼠 (HLF^{fllox/fllox}) 中的 mRNA 水平和蛋白水平表达差异, 验证敲除效果。同时取 2 组小鼠的胰岛组织制作石蜡切片并进行苏木精-伊红 (HE) 染色分析。**结果** HLF 基因抑制或过表达对 MIN6 细胞增殖无显著影响。在 MIN6 细胞中抑制 HLF 基因, 其 mRNA 表达水平较对照组下降了 74%, 蛋白表达水平较对照组下降了 60%; 过表达 HLF 基因后, 其 mRNA 表达水平为对照组的 2.13 倍, 蛋白表达水平为对照组的 1.8 倍。敲除小鼠的 HLF 基因 mRNA 表达水平较对照组下降了 89%, 蛋白表达水平较对照组下降了 65%。HE 染色结果显示: 敲除小鼠胰岛组织内细胞形态与对照小鼠无明显差异。抑制 HLF 使 MIN6 细胞中糖原含量提高约 20%。**结论** 成功构建 HLF 基因敲除小鼠, 为研究 HLF 在糖尿病发病机制中的作用提供了动物模型。

关键词 肝白血病因子; 条件性胰岛 β 细胞; RT-qPCR; Western blot; 基因敲除; C57BL/6J 小鼠

中图分类号 R 332

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)08-1432-08

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.08.010

糖尿病是一种慢性代谢疾病, 主要特征是患者长期处于高血糖状态, 通常由胰岛素分泌不足或胰岛素作用障碍所引起^[1-3]。胰岛素由胰岛 β 细胞分泌, 胰岛 β 细胞功能缺陷和数量减少是糖尿病发病机制中的关键因素, 然而目前引发该致病因素的具体机制仍不完全清楚。肝白血病因子 (hepatic leukemia factor, HLF) 是碱性亮氨酸拉链结构域 (basic leucine zipper, bZIP) 转录因子家族成员, 是一种多功能转录因子。研究^[4-5]表明 HLF 与细胞增殖、分化、代谢调控和应激反应等多种生理和病理过程有着密切关系, 但其在胰岛 β 细胞中发挥何种作用目前尚不清楚。为了深入探究 HLF 在胰岛 β 细胞中的功能及作用机制, 该研究采用 Cre-loxP 系统构建了胰岛 β 细胞特异性 HLF 基因敲除小鼠模型, 旨在为探索 HLF 在胰岛 β 细胞中的功能及作用机制提供稳定可靠的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 3 只 6~8 周龄雌性 SPF 级 HLF 纯合子 (HLF^{fllox/fllox}) 小鼠和 1 只雄性 SPF 级 HLF 纯合子小鼠, 2 只 7 周龄 SPF 级雄性 Pdx1-Cre^{+/-} 鼠, 体质量 18 g, 均由赛业 (苏州) 生物科技有限公司供应, 两种小鼠遗传背景皆为 C57BL/6J。小鼠饲养于广西大学动物试验基地, 按照 SPF 级标准饲养, 相对湿度为 40%~60%、室温 (23±2)℃, 12 h 光照/黑暗循环, 自由取食、饮水, 动物活体试验经广西大学动物实验伦理审查委员会许可后进行, 伦理审批编号为: GXU-2023-0107。

1.1.2 细胞系 本研究使用的永生细胞系为小鼠胰岛 β 细胞 (MIN6), 培养细胞用含 10% 胎牛血清 (FBS) 和 1% 青-链霉素的 1640 培养基, 在 37℃、5% CO₂、湿度条件 45%~60% 的恒温培养箱中培养。

1.1.3 主要仪器及试剂 主要仪器: 涡旋仪 (海门市其林贝尔仪器制造有限公司, 型号 XW-80A), 梯度 PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司, 型号 T100TM ThermalCycler), 冷冻离心机 (德国 Eppendorf 公司, 型号

2025-03-08 接收

基金项目: 国家重点研发计划项目 (编号: 2023YFE0100800)

作者简介: 侯梦龙, 男, 硕士研究生

李一星, 女, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail:

631673571@qq.com

Centrifuge5804r), 蛋白凝胶成像系统(美国 BIO-RAD 公司, 型号 Universal Hood II), 组织破碎仪(德国 QIAGEN 公司, 型号 TissueLYser II), 生化培养箱(韶关市泰宏医疗器械有限公司, 型号 LRH-150B), 酶标仪(TECAN, 型号 Infinite M200 Pro), 荧光定量 PCR 仪(Analytik Jena, 型号 QTOWER3G), 全能型转印系统(美国 BIO-RAD 公司, 型号 Trans-Blot)。

主要试剂: 细胞培养板及细胞培养瓶(无锡耐思生物科技有限公司), 脂质体转染试剂(上海翌圣生物科技有限公司), TRIzol 试剂[广州康润生物(Genstar)公司], 1640 培养基(美国 Gibco 公司), 胰酶、PBS 缓冲液干粉、DMSO、RIPA 组织/细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司), ECL 超敏发光液、DNA(2000)marker(北京康润诚业生物科技有限公司), 4x 蛋白上样缓冲液(北京索莱宝科技有限公司), 无内毒素质粒大提试剂盒[天根生化科技(北京)有限公司], DH5a(Takara), BCA 蛋白测定试剂盒、CCK-8 试剂(上海碧云天生物技术公司), Alpha Tubulin 蛋白单克隆抗体(武汉三鹰生物技术有限公司), HLF 蛋白单克隆抗体(武汉 Abconal 公司), HRP 偶联的山羊抗兔 IgG (H + L)、HRP 偶联的山羊抗鼠 IgG (H + L)(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.2 小鼠胰岛细胞转染 将 MIN6 细胞置于 24 孔板中培养, 按照碧云天公司说明书中的方法使用脂质体转染试剂对细胞进行过表达/抑制转染处理, 后续更换为细胞完全培养基培养 24 h, 收取细胞样品并进行基因表达定量检测。转染所用序列如表 1 所示。pcDNA3.1-HLF 质粒为实验室前期构建, 其中 HLF 基因序列为小鼠(Mus musculus)基因序列。

1.3 总 RNA 提取 称取 50 mg 的胰腺组织放入 2 mL 离心管中(提取过程中所有使用物品均为无酶), 加入 1 mL TRIzol, 2 枚钢珠, 使用组织破碎仪破碎制成匀浆, 4℃ 离心机 12 000 r/min 离心 10 min; 吸取上清液至新离心管中, 后续操作步骤按照 TRIzol 试剂说明书进行。提取后的 RNA 样品使用 30 μL 灭菌 DEPC 水溶解, 然后用酶标仪测定浓度, 并置于 -80℃ 超低温冰箱保存。

1.4 RT-qPCR 检测 提取小鼠胰腺组织总 RNA, 反转录得到 cDNA。使用 2 × RealStar Power SYBR qPCR 试剂(北京康润诚业生物科技有限公司), 按照该产品说明书步骤进行 RT-qPCR 检测, 采用 2^{-ΔΔC_T}法计算 mRNA 的相对表达量, 使用 β-actin 基因作为内参, 引物序列如表 1 所示。

1.5 Western blot 检测 取 50 mg 胰腺样品于 2 mL 离心管中, 加入 1 mL 预混裂解液(PMSF : RIPA = 1 : 100)和 2 枚钢珠, 用组织破碎仪将样品破碎后, 4℃ 摇床中过夜使其充分裂解。12 000 r/min 离心 10 min 后用 BCA 法测定蛋白浓度, 按照文献^[6]中的方法进行 Western blot 检测, 使用 ImageJ 软件对图像进行处理。

1.6 HLF 对细胞增殖活性的影响 将 MIN6 细胞接种于 96 孔板中培养, 每孔 100 μL, 置于 37℃ 恒温培养箱培养 24 h 后对细胞进行转染, 并在转染后 12、24、48、72 h, 使用 CCK-8 试剂检测细胞增殖能力, 使用酶标仪在 450 nm 波长检测吸光度。按照说明书计算不同处理下的细胞活力。

1.7 HLF 基因胰岛敲除小鼠的基因型鉴定 剪取小鼠尾部 3 mm 装入 1.5 mL 离心管中, 加入 200 μL PCR 裂解液, 置于温度为 55℃ 的恒温摇床裂解过夜后, 加入等体积异丙醇, 颠倒混匀 5 次, 静置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 加入 250 μL ddH₂O, 55℃ 摇床 1 h, 得到 DNA 样品。对 DNA 样品进行 PCR 扩增和凝胶电泳, 通过 PCR 产物确认小鼠基因型(小鼠基因型鉴定引物参见表 1)。

表 1 引物序列
Tab.1 Primer sequences

Primer	Primer sequence
HLF flox Genotyping of mice	F:5'-ATCTGCCACAAAAGCATTAAAGGAC-3'
	R:5'-ATCTGCCACAAAAGCATTAAAGGAC-3'
Pdx1-Cre Genotyping of mice	F:5'-CCTGGACTACATCTTGAGTTGC-3'
	R:5'-AGGCAAAATT TTGCTGTACGG-3'
Internal control β-actin(mice)	F:5'-GCAAGTGCTTCTAGCGGAC-3'
	R:5'-AAGAAAGGCTGTAAACGCGAC-3'
HLF(mice)	F:5'-CCTTCATCTCGAAGACGCATTT-3'
	R:5'-TCTCCGTCATAGGAAGGCT-3'
siNC	Sense: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	Antisense: ACGUGACACGUUCGAGAATT
siHLF	Sense: AAUACAUGGACUUGGAGGAA
	Antisense: UUCUCCAAGUCCAUGUAUU

1.8 组织取样 用乙醚麻醉小鼠, 称取体质量后采用颈椎脱臼处死法处死小鼠, 在脾胃连接处完整取下胰腺组织, 剔除脂肪, 用灭菌后的 PBS 水清洗, 清洗干净后放入 2 mL 离心管中; 将肝脏完整取出后进行 PBS 漂洗 2 次, 使用灭菌棉沾净水分, 分装进 2 mL 离心管。组织样品皆放入液氮快速冷冻, 然后置于 -80℃ 冰箱备用。

1.9 细胞糖原含量检测 取培养于 6 孔板中的细

胞,按照说明书收集到离心管内,加入糖原提取液后使用超声破碎仪破碎细胞,在 95℃ 干浴锅中振荡加热 20 min 后,取出离心管于冰上冷却,室温下 8 000 r/min 离心 10 min ,按说明书将上清液与试剂混匀后,置于 95℃ 干浴锅中加热 10 min ,冷却后转移至 96 孔酶标板中,使用酶标仪于 620 nm 波长检测样品吸光值。最后,使用 BCA 法测定蛋白质浓度并进行归一化处理。

1.10 统计学处理 使用 Graphpad Prism 9.5 软件对所有数据进行统计分析,结果均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。均使用独立样本 *t* 检验方法分析组间差异性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 抑制/过表达 HLF 基因对细胞 HLF mRNA 表达水平影响 在 小鼠胰岛 β 细胞系 MIN6 中,分别转染抑制或过表达 HLF 基因,利用 RT-qPCR 方法检测 HLF mRNA 表达水平,抑制试验和过表达试验分别以转染 siNC 序列和 pcDNA3.1 空载质粒的 MIN6 细胞为对照,RT-qPCR 试验以 β-actin 作为内参基因。结果表明,抑制(图 1A)或过表达(图 1B) HLF 基因对 MIN6 细胞中其 mRNA 的表达水平均产生了影响($P < 0.05$),HLF 抑制组细胞的 mRNA 表达水平为对照组的 26%;HLF 过表达组细胞的 mRNA 表达水平为对照组的 2.13 倍。

2.2 抑制/过表达 HLF 基因对细胞 HLF 蛋白表达水平影响 在 小鼠胰岛 β 细胞 MIN6 中,分别抑制或过表达 HLF 基因,利用 Western blot 方法检测 HLF 蛋白相对表达水平,抑制试验和过表达试验分别以转染 siNC 序列和 pcDNA3.1 空载质粒的 MIN6 细胞为对照,以 α-Tubulin 作为内参。结果表明,抑制(图 2A)或过表达(图 2B) HLF 基因对 MIN6 细胞中蛋白的表达水平均产生了显著影响($P < 0.05$),HLF 抑制组细胞的蛋白表达水平约为对照组的 40%;HLF 过表达组细胞的蛋白表达水平约为对照组的 1.8 倍。

2.3 HLF 基因抑制/过表达对小鼠 MIN6 细胞增殖的影响 在 小鼠 MIN6 胰岛细胞中分别抑制或过表达 HLF,分别在转染后 12、24、48、72 h,使用 CCK-8 方法测定 HLF 表达变化对细胞增殖情况的影响。结果表明,细胞均稳定增殖,抑制/过表达 HLF 均未对 MIN6 细胞增殖产生显著影响($P > 0.05$)。见图 3。

2.4 抑制 HLF 基因对小鼠 MIN6 细胞糖原含量的

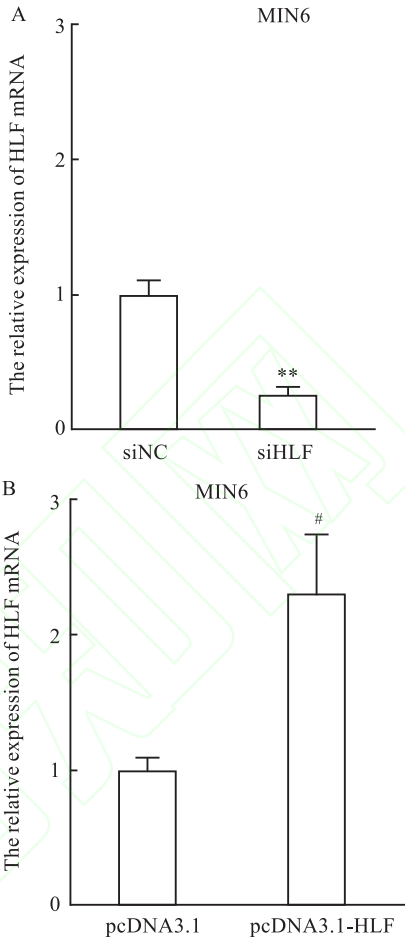


图1 抑制/过表达 HLF 对 MIN6 细胞内 HLF mRNA 表达水平的影响

Fig. 1 The effects of inhibiting/overexpressing HLF on the expression level of HLF mRNA in MIN6 cells

A: The effects of inhibiting HLF on the mRNA expression level of the HLF gene in MIN6 cells; B: The effects of overexpressing HLF on the mRNA expression level of the HLF gene in MIN6 cells; ** $P < 0.01$ vs siNC; # $P < 0.05$ vs pcDNA3.1.

影响 为初步验证抑制 HLF 后胰岛 β 细胞的功能变化,在 小鼠 MIN6 胰岛细胞中利用 siRNA 抑制 HLF,转染 24 h 后检测细胞糖原含量变化。结果显示,相较于对照组,HLF 抑制组糖原含量显著升高约 20% ($P < 0.05$) (图 4)。该结果表明,抑制 HLF 提高胰岛 β 细胞中的糖原含量。

2.5 小鼠的繁育与基因型鉴定 将 4 只 HLF^{flox/flox} 纯合子小鼠自交繁殖 4 个月 后获得 12 只 HLF^{flox/flox} 纯合小鼠,将其与 Pdx1-Cre^{+/-} 小鼠杂交繁育获得 F1 代鼠 14 只。将 F1 代中 HLF^{flox/+} + Cre^{+/-} 鼠与 HLF^{flox/flox} 鼠杂交,获得 F2 代小鼠 36 只,对其进行基因型鉴定,能够扩增出 150 bp 条带的小鼠基因型为 HLF^{+/+},同时扩增出 150、215 bp 条带的小鼠基因

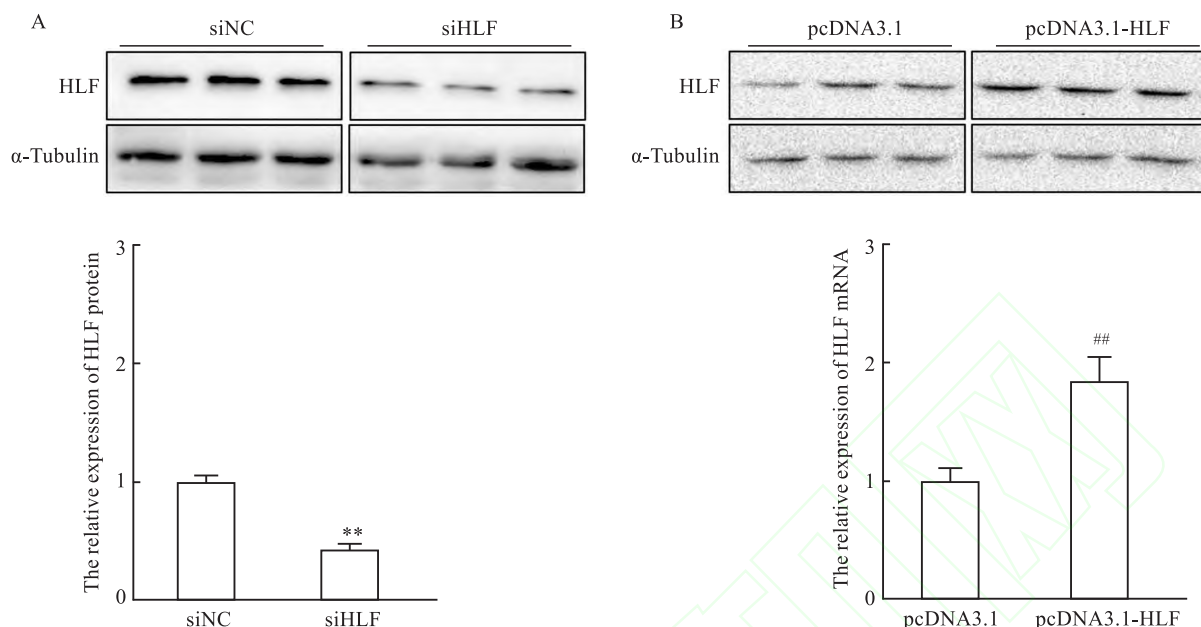


图2 抑制/过表达 HLF 对 MIN6 细胞内 HLF mRNA 表达水平的影响

Fig. 2 The effects of inhibiting/overexpressing HLF on the expression level of HLF mRNA in MIN6 cells

A: The effects of HLF inhibition on the relative expression level of HLF protein in MIN6 cells; B: The effects of HLF overexpression on the relative expression level of HLF protein in MIN6 cells; * $P < 0.01$ vs siNC; # $P < 0.01$ vs pcDNA3.1.

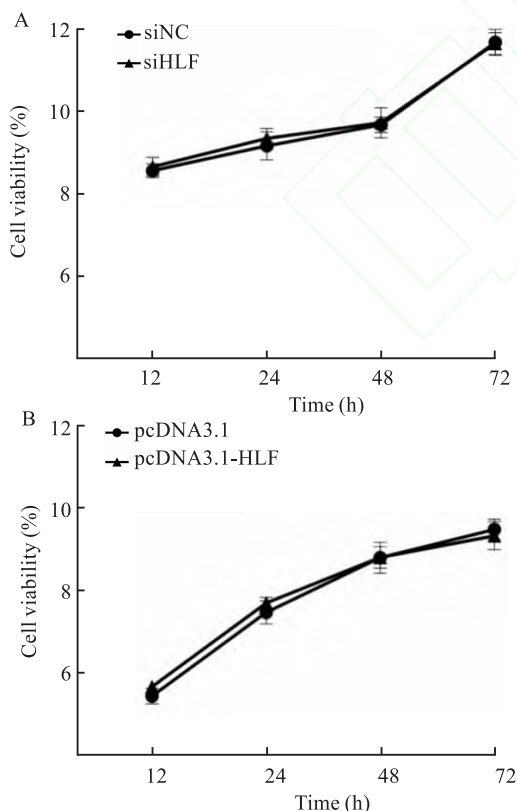


图3 抑制/过表达 HLF 对 MIN6 细胞增殖的影响

Fig. 3 The effects of inhibiting/overexpressing HLF on the proliferation of MIN6 cells

A: The effects of inhibiting HLF on the proliferation of MIN6 cells;

B: The effects of overexpressing HLF on the proliferation of MIN6 cells.

型为 $HLF^{flx/+}$, 仅可扩增出 215 bp 条带的小鼠基因型为 $HLF^{flx/flx}$, 扩增出清晰明亮 650 bp 条带的小鼠基因型为 $Pdx1-Cre^{+/-}$ 。基因型结果显示: $HLF^{flx/+} Cre^{+/-}$ 小鼠 8 只 (编号 6), $HLF^{flx/+}$ 小鼠 9 只, $HLF^{flx/flx} Cre^{+/-}$ 小鼠 10 只 (编号 1-5), $HLF^{flx/flx}$ 小鼠 9 只 (编号 7-11), 结果符合遗传定律。见图 5。

2.6 RT-qPCR 验证 HLF 基因敲除效果 为了验证 HLF 的敲除效果, 分别随机选取 6 只基因型为 $HLF^{flx/flx}$ 和 $HLF^{flx/flx} Cre^{+/-}$ 的小鼠, 采集胰腺和肝脏组织 ($n=6$), 使用 RT-qPCR 方法检测敲除效率, 结果如图 6 所示, 与 $HLF^{flx/flx}$ 小鼠相比, $HLF^{flx/flx} Cre^{+/-}$ 小鼠胰腺组织中 HLF 的 mRNA 表达水平显著降低, 降幅约 91%; 而肝脏组织中两组小鼠 HLF 的 mRNA 表达水平无显著区别, 表明肝脏中 HLF 基因的转录未受影响, 基因敲除是胰腺组织特异的。

2.7 Western blot 验证 HLF 敲除效果 分别随机选取基因型为 $HLF^{flx/flx}$ 和 $HLF^{flx/flx} Cre^{+/-}$ 的小鼠各 3 只, 取胰腺组织和肝脏组织, 利用 Western blot 方法检测 HLF 蛋白表达水平, 将 α -Tubulin 作为内参, 并使用 ImageJ 软件对 Western blot 结果进行量化。结果显示, 与 $HLF^{flx/flx}$ 小鼠相比, $HLF^{flx/flx} Cre^{+/-}$ 小鼠胰腺中, HLF 蛋白表达水平降低 ($P < 0.01$), 为 $HLF^{flx/flx}$ 小鼠蛋白水平的 65% (图 7A); 而肝脏

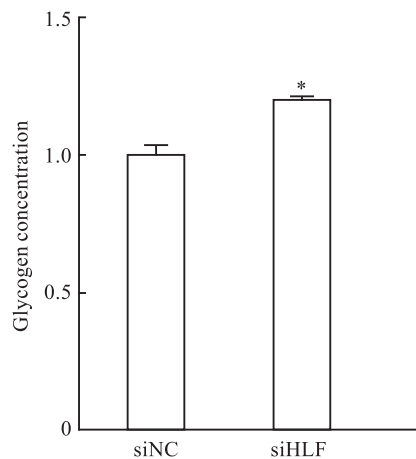


图4 抑制 HLF 基因对 MIN6 细胞糖原含量的影响
Fig.4 The effects of inhibiting the HLF gene on the glycogen content in MIN6 cells.
* $P < 0.05$ vs siNC.

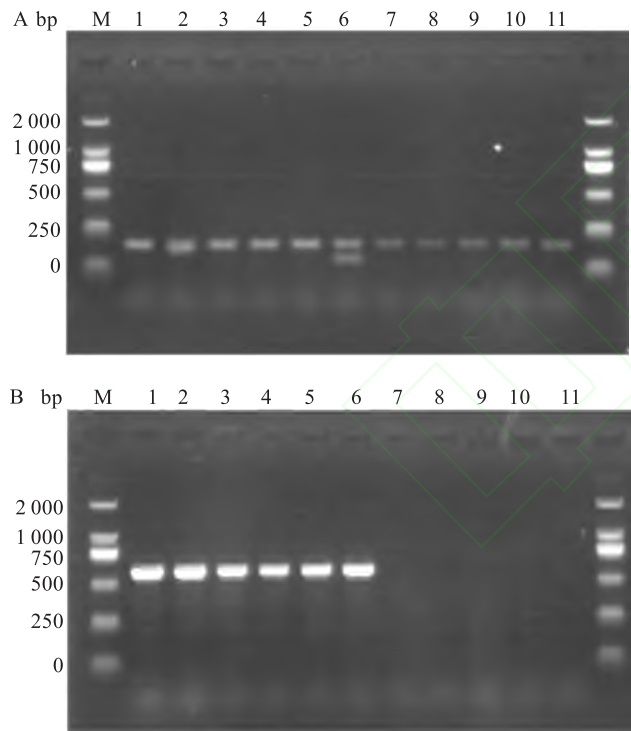


图5 小鼠基因型鉴定结果

Fig.5 Identification results of the genotypes of mice

A: Identification results of the Flox genotype; B: Identification results of the Pdx1-Cre^{+/−} genotype; M: the DNA Marker 2000; 1–11: the mouse numbers. 1–5: HLF^{flox/flox} Cre^{+/−} mice; 6: HLF^{flox/+} Cre^{+/−} mice; 7–11: HLF^{flox/flox} mice.

HLF 蛋白表达水平在 2 组小鼠中无明显差异(图 7B)。上述结果表明胰岛 β 细胞中 HLF 的敲除仅对胰腺 HLF 蛋白表达水平产生影响,而对肝脏 HLF 蛋白表达水平无明显影响。综上,mRNA 水平和蛋白水平的验证结果证实,条件性胰岛 β 细胞 HLF 基

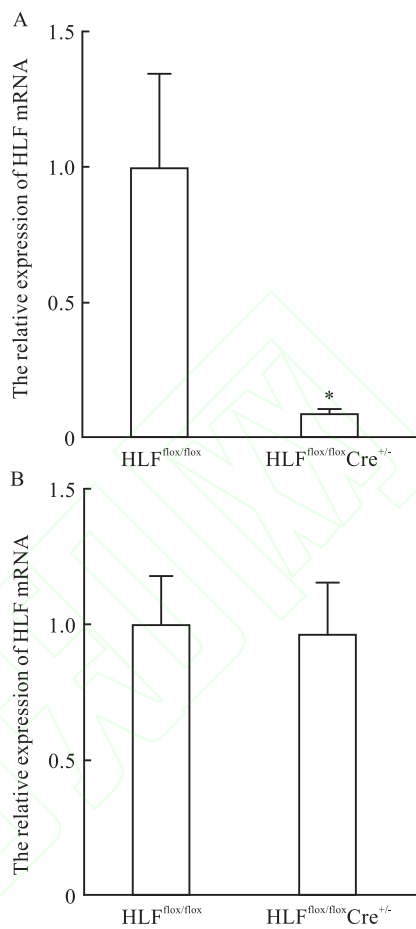


图6 RT-qPCR 验证 HLF 基因敲除效果
Fig.6 Verification of the knockout efficiency of the HLF gene by RT-qPCR

A: The mRNA expression levels of HLF in the pancreatic tissues of mice with different genotypes; B: The mRNA expression levels of HLF in the liver tissues of mice with different genotypes; * $P < 0.05$ vs HLF^{flox/flox}.

因敲除小鼠构建成功。

2.8 HLF 基因敲除对小鼠胰岛形态的影响 将 HLF^{flox/flox} Cre^{+/−} 小鼠(HLF 敲除组)和 HLF^{flox/flox} 小鼠(对照组)在相同条件下喂养 16 周后,取胰腺组织制作石蜡切片,进行 HE 染色,评估胰岛的形态学变化。结果显示,HLF 敲除组小鼠(图 8B)与对照组小鼠(图 8A)在胰岛形态上未出现显著差异,胰岛的整体结构和细胞排列均保持正常。该结果表明,HLF 敲除不会引起胰岛形态结构的变化和胰岛细胞排列的异常。

3 讨论

基因编辑技术的迅猛发展研究基因功能和疾病机制提供了强有力的工具^[7],其中条件性基因敲

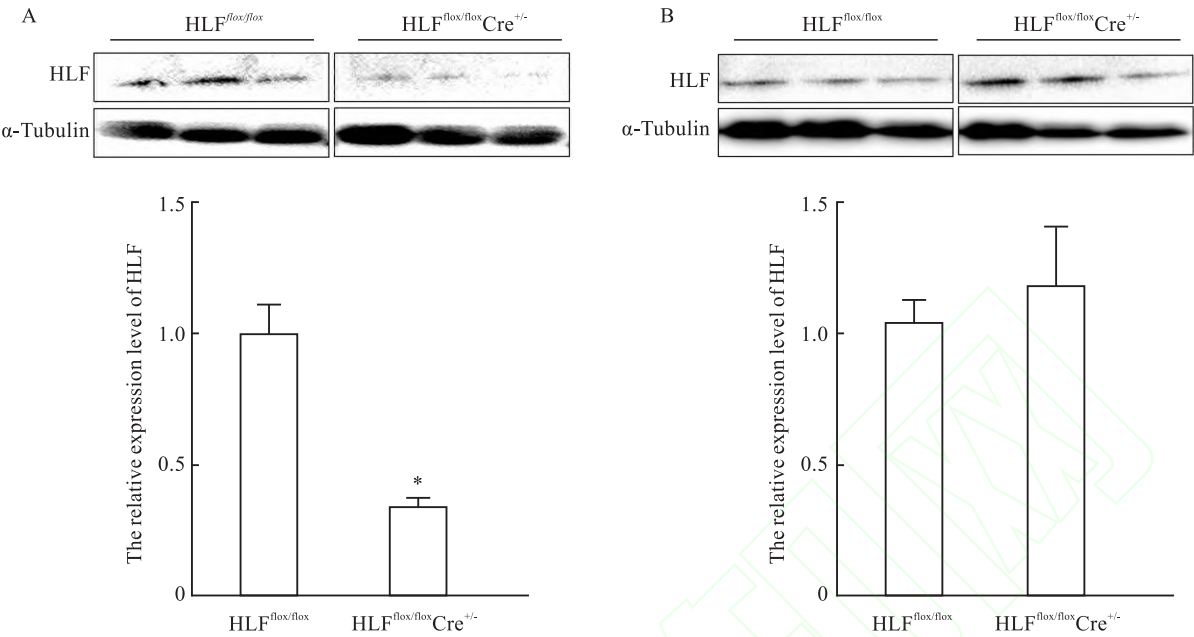


图 7 Western Blot 验证 HLF 敲除效果

Fig. 7 Verification of the knockout effects of HLF by Western Blot

A: The effects of specific knockout of HLF in pancreatic islet β cells on the expression level of HLF protein in pancreatic tissues; B: The effects of specific knockout of HLF in HLF pancreatic islet β cells on the expression level of HLF protein in liver tissues; * $P < 0.05$ vs $HLF^{flx/flx}$.

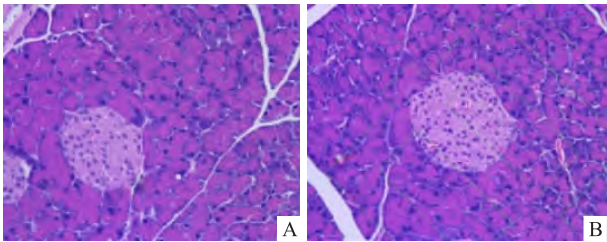


图 8 小鼠胰腺组织 HE 染色结果 $\times 200$

Fig. 8 Results of HE staining of mouse pancreatic tissues $\times 200$

A: Control group; B: HLF knockout group.

除动物模型的构建,使科学家们能够深入探讨基因在生理和病理过程中的具体作用^[8-11]。在这一背景下,本研究利用 Cre-loxP 系统成功构建了条件性 HLF 基因敲除小鼠模型,并初步验证了该模型在胰腺 β 细胞研究中的有效性。结果表明,HLF 的缺失在正常情况下对胰腺 β 细胞的增殖和基本形态没有显著影响,这一发现为进一步研究 HLF 在糖尿病发病机制中的作用提供了前提。细胞糖原含量检测能帮助了解细胞内糖原的储备情况,从而间接反映机体对葡萄糖摄取的调控情况,故根据糖原含量检测实验结果推测 HLF 可能在胰腺 β 细胞对葡萄糖的感知中发挥作用,未来的研究将进一步探讨 HLF 在这些方面的具体作用。

HLF 属于 bZIP 家族,是一种具有 bZIP 结构域

的转录因子,参与多个生物学过程的调控。该基因最初在肝脏中发现,随后研究^[12-14]表明其在神经系统、造血系统以及昼夜节律的调节中也具有重要作用。HLF 通过与 DNA 特定位点结合,调控与昼夜节律、细胞周期、代谢等相关基因的表达。它在肝脏中调控代谢和解毒功能,并在神经元发育和存活过程中起关键作用。HLF 的异常与某些疾病密切相关,尤其是在急性白血病中,其基因融合与癌症的发生联系紧密。由于其在多种疾病中的潜在作用,HLF 已成为研究和治疗白血病、代谢疾病等的关键靶点,探索干预其异常表达的治疗方法可能为相关疾病的治疗带来新的希望。

胰腺作为人体内重要的消化腺体和内分泌器官,主要由外分泌腺和内分泌腺组成。外分泌腺分泌消化酶,帮助分解食物中的蛋白质、脂肪和碳水化合物;内分泌腺由胰岛细胞组成,分泌胰岛素、胰高血糖素等激素,调节血糖水平^[10]。胰腺 β 细胞是胰岛细胞的一种,主要负责分泌胰岛素,维持血糖的稳定。因此,胰腺 β 细胞的功能异常与糖尿病的发生密切相关^[15]。

综上所述,本研究成功构建了条件性胰岛 β 细胞 HLF 基因敲除小鼠动物模型,为深入探讨 HLF 在胰腺 β 细胞中的功能及其在糖尿病发病机制中的作用提供了重要的实验模型^[15]。

参考文献

- [1] Balaji R, Duraisamy R, Santhosh Kumar M P. Complications of diabetes mellitus: a review [J]. *Drug Invent Today*, 2019, 12 (1).
- [2] Mukhtar Y, Galalain A, Yunusa U. A modern overview on diabetes mellitus: a chronic endocrine disorder[J]. *Eur J Biol*, 2020, 5(2): 1 – 14. doi:10.47672/ejb.409.
- [3] Bandy M Z, Sameer A S, Nissar S. Pathophysiology of diabetes: an overview[J]. *Avicenna J Med*, 2020, 10(4): 174 – 88. doi: 10.4103/ajm. ajm_53_20.
- [4] Xue P, Liu Y, Wang H, et al. miRNA-103-3p-Hlf regulates apoptosis and autophagy by targeting hepatic leukaemia factor in heart failure[J]. *ESC Heart Fail*, 2023, 10(5): 3038 – 45. doi:10.1002/ehf2.14493.
- [5] Lehnertz B, Chagraoui J, MacRae T, et al. HLF expression defines the human hematopoietic stem cell state[J]. *Blood*, 2021, 138(25): 2642 – 54. doi:10.1182/blood.2021010745.
- [6] 肖 杨. 紫苏葶对肝脏糖脂代谢紊乱的调控研究[D]. 南宁: 广西大学, 2022
- [6] Xiao Yang. Study on the regulation of perillartine on the disorder of glycolipid metabolism in the liver[D]. Nanning: Guangxi University, 2022.
- [7] Zhang D, Zhang Z, Unver T, et al. CRISPR/Cas: a powerful tool for gene function study and crop improvement[J]. *J Adv Res*, 2020, 29: 207 – 21. doi:10.1016/j. jare.2020.10.003.
- [8] Li H, Yang Y, Hong W, et al. Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2020, 5(1): 1. doi:10.1038/s41392 – 019 – 0089 – y.
- [9] Li Z, Zheng W, Wang H, et al. Application of animal models in cancer research: recent progress and future prospects[J]. *Cancer Manag Res*, 2021, 13: 2455 – 75. doi: 10.2147/CMAR.S302565.
- [10] Mukherjee P, Roy S, Ghosh D, et al. Role of animal models in biomedical research: a review[J]. *Lab Anim Res*, 2022, 38(1): 18. doi:10.1186/s42826 – 022 – 00128 – 1.
- [11] Al-Suhaimi E A, Aljafari M A, Al-Zoghaibi F A, et al. Emerging concepts in endocrine structure and functions [M]. Springer, 2022:247 – 285.
- [12] Hitzler J K, Soares H D, Drolet D W, et al. Expression patterns of the hepatic leukemia factor gene in the nervous system of developing and adult mice[J]. *Brain Res*, 1999, 820(1 – 2): 1 – 11. doi:10.1016/s0006 – 8993(98)00999 – 8.
- [13] Tang W, He J, Huang T, et al. Hlf expression marks early emergence of hematopoietic stem cell precursors with adult repopulating potential and fate[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2021, 9: 728057. doi:10.3389/fcell.2021.728057.
- [14] Chen J, Liu A, Lin Z, et al. Downregulation of the circadian rhythm regulator HLF promotes multiple-organ distant metastases in non-small cell lung cancer through PPAR/NF- κ b signaling[J]. *Cancer Lett*, 2020, 482: 56 – 71. doi:10.1016/j. canlet.2020.04.007.
- [15] Eizirik D L, Pasquali L, Cnop M. Pancreatic β -cells in type 1 and type 2 diabetes mellitus: different pathways to failure[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16(7): 349 – 62. doi:10.1038/s41574 – 020 – 0355 – 7.

Construction and identification of conditional HLF knockout mice with islet β cells

Hou Menglong, Qi Xinyu, Wu Jianfeng, Liao Qichao, Ma Jie, Zhou Lei, Li Yixing

(*Guangxi Key Laboratory of Livestock and Poultry Breeding and Disease Prevention and Control, College of Animal Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004*)

Abstract Objective To explore the mechanism of action of hepatic leukemia factor (HLF) in diabetes mellitus and to construct a conditional animal model of mice with islet β -cell-specific HLF gene knockout. **Methods** At the cellular level, the effects of HLF inhibition or overexpression on the proliferation of MIN6 cells was verified by the CCK-8 assay. The effects of HLF inhibition or overexpression were detected at the mRNA level and protein level by RT-qPCR technology and Western blot technology, respectively. HLF^{flox/flox} transgenic mice were crossed with Pdx1-Cre^{+/-} mice (C57BL/6J) to obtain offspring mice. The genotypes of the mice were identified by the PCR method. The differences in the expression levels of the HLF gene at the mRNA and protein levels in islet β -cell knockout mice (HLF^{flox/flox} Cre^{+/-}) and control mice (HLF^{flox/flox}) were detected by RT-qPCR technology and Western Blot technology to verify the knockout effect. At the same time, the islet tissues of the mice in two groups were taken to make paraffin sections and analyzed by hematoxylin-eosin (HE) staining. **Results** HLF gene inhibition or overexpression had no significant effect on the proliferation of MIN6 cells. When the HLF gene was inhibited in MIN6 cells, the mRNA expression level decreased by 74% compared with the control group, and the protein expression

度拉糖肽对脂多糖诱导的 MLE-12 细胞损伤的保护作用

范星宇,段 皓,闫 洁,王 跃,杜益君,潘天荣,钟 兴

(安徽医科大学第二医院附属医院内分泌科,合肥 230601)

摘要 **目的** 探讨度拉糖肽对脂多糖(LPS)引起的 MLE-12 细胞损伤的保护作用。**方法** 脂多糖($1\text{ }\mu\text{g/mL}$)诱导 MLE-12 细胞构建急性肺损伤体外模型,度拉糖肽处理 24 h。细胞分成 4 组:CON、LPS、LPS + 100 nmol/L 度拉糖肽、LPS + 200 nmol/L 度拉糖肽组,提取各组细胞蛋白和 RNA,qRT-PCR 检测细胞中炎症因子白细胞介素(IL)-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、IL-1 β 、单核细胞趋化因子 1(CCL2)、C-X-C 基序趋化因子配体(CXCL1)、CXCL2 水平,TUNEL 法检测细胞凋亡,Western blot 检测各组细胞磷酸化蛋白激酶 B(P-Akt)与磷酸化细胞外信号调节酶(P-Erk)的表达水平。**结果** 与 CON 组比较,LPS 组细胞炎症介质 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、CCL2、CXCL1、CXCL2 的 mRNA 水平升高,TUNEL 阳性细胞数增加,P-Akt 与 P-Erk 蛋白表达增加。与 LPS 组相比,LPS + 100 nmol/L 度拉糖肽组的 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 、CCL2、CXCL1、CXCL2 的 mRNA 水平下降,TUNEL 阳性细胞数减少,P-Akt 与 P-Erk 蛋白表达下降;而 LPS + 200 nmol/L 度拉糖肽组对炎症因子的改善作用没有 LPS + 100 nmol/L 度拉糖肽组明显。**结论** 度拉糖肽对 LPS 诱导的 MLE-12 细胞损伤具有保护作用,其作用机制可能是通过抑制 Akt 与 Erk 磷酸化来减少炎性介质的表达,使炎性损伤进一步减轻,从而达到保护肺脏的作用。

关键词 度拉糖肽;脂多糖;急性肺损伤;MLE-12 细胞;炎症反应

中图分类号 R 965

文献标志码 A **文章编号** 1000 - 1492(2025)08 - 1439 - 06

doi:10.19405/j.cnki.issn1000 - 1492.2025.08.011

急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是一种临床综合征,表现为肺水肿和气体交换功能障碍^[1],严重时可导致急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)^[2]。细菌感染是 ALI 最

常见的病因,特别是脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)等革兰阴性细菌内毒素引起的感染^[3]。目临床上 ALI 主要采用机械通气等对症治疗,尚缺乏特效治疗方案^[4]。ALI 病理生理学上的表现是肺泡-毛细血管屏障功能障碍,因为它会引起肺泡上皮细胞(alveolar epithelial cells, AECs)损伤,AECs 受损后会释放与损伤相关的分子模式,进一步激活肺泡巨噬细胞,从而加剧炎症反应,导致 ALI 病情恶化^[5]。因此,明确 AECs 损伤的分子机制可为 ALI 提出潜在的治疗策略。胰高血糖素样肽-1(glucagon-like peptide-1, GLP-1)受体激动剂,如度拉糖肽,

2025 - 02 - 15 接收

基金项目:安徽省高等学校自然科学研究项目(编号:2023AH053182);安徽省卫生健康科研项目(编号:AHWJ2023Bac10010)

作者简介:范星宇,女,硕士研究生;

钟 兴,男,主任医师,硕士生导师,通信作者, E-mail: zhongxing@163.com

level decreased by 60% compared with the control group. After overexpressing the HLF gene, the mRNA expression level was 2.13 times compared with that of the control group, and the protein expression level was 1.8 times compared with that of the control group. The mRNA expression level of the HLF gene in the knockout mice decreased by 89% compared with the control group, and the protein expression level decreased by 65% compared with the control group. The results of HE staining showed that there was no significant difference in the cell morphology in the islet tissues between the knockout mice and the control mice. Inhibiting HLF increased the glycogen content in MIN6 cells by approximately 20%. **Conclusion** The HLF gene knockout mice are successfully constructed, providing an animal model for studying the role of HLF in the pathogenesis of diabetes mellitus.

Key words hepatic leukemia factor; conditional islet β cells; RT-qPCR; Western blot; gene knockout; C57BL/6J mice

Fund programs National Key Research and Development Program of China (No. 2023YFE0100800)

Corresponding author Li Yixing, E-mail:631673571@qq.com