

网络出版时间: 2020-6-29 11:26 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200629.1110.010.html>

G 蛋白偶联受体激酶 2 杂合子敲除小鼠构建及表型鉴定

陶娟, 周伟杰, 邵宇, 郭派派, 周正炜, 王珍, 汪庆童, 魏伟

摘要 目的 应用 CRISPR/Cas9 技术构建 G 蛋白偶联受体激酶 2 (GRK2) 杂合敲除 (GRK2^{+/-}) 小鼠, 用于疾病病理机制及药物靶点研究。方法 构建靶向敲除 GRK2 基因的载体, 在体外将先导 RNA 和 Cas9 mRNA 显微注射到 C57BL/6 小鼠的受精卵中, 在小鼠 GRK2 基因的第 3 个外显子上造成基因突变, 通过 PCR 及基因测序测定 F0 代基因型, 成功获得 13bp 和 19bp 敲除两种 GRK2^{+/-} 小鼠。因 GRK2 纯合子敲除胚胎期死亡, 将 19bp 敲除 F0 代小鼠与 C57BL/6 小鼠回交, 获得稳定的 19bp 敲除 F1 代 GRK2^{+/-} 小鼠用于扩繁及实验。结果 GRK2^{+/-} 小鼠基因型稳定, 体重较同龄 C57BL/6 小鼠低, Western blot 检测证实 GRK2^{+/-} 小鼠心脏、脾脏、胸腺、肝脏、巨噬细胞及肾脏组织中 GRK2 蛋白的表达均显著降低。结论 该研究利用 CRISPR/Cas9 技术成功建立了 GRK2^{+/-} 小鼠模型, 为进一步研究 GRK2 在多种脏器、细胞发育中的作用, 疾病发病机制及药物作用靶点提供了重要的动物模型。

关键词 G 蛋白偶联受体激酶 2; CRISPR/Cas9; 基因工程小鼠; 基因型鉴定

中图分类号 R 394.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)07-1035-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.010

G 蛋白偶联受体激酶 2 (G protein-coupled receptors kinase 2, GRK2) 属于 GRKs 家族的一种调控蛋白, 广泛分布于各种组织器官中^[1]。GRK2 磷酸

化被配体激活的 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs), 使其磷酸化, 随后募集 β -arrestin, 引起 GPCRs 的脱敏和内吞, GRK2 还可以特异性调控丝裂原激活的蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) 等细胞信号传导, 在细胞及组织的生长发育中起到重要作用^[2]。课题组近期研究^[3]发现, GRK2 是 GPCRs 信号与胰岛素受体相互作用的关键接头分子, 在 GPCRs 与细胞因子受体的交叉联系中也发挥重要转导作用。大量研究表明, GRK2 参与了多种慢性疾病的发病过程, 如心力衰竭^[4]、类风湿关节炎^[5]等, 目前 GRK2 被认为是诊断心血管系统疾病的生物标志物及治疗靶点, 多个 GRK2 抑制剂处于研究阶段^[6]。为揭示 GRK2 在疾病的进程中发挥了至关重要的作用, 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 GRK2 基因敲除小鼠, 有报道表明 GRK2 基因全敲除可引起胚胎致死, 所以利用该技术构建 GRK2 基因半敲除小鼠 (GRK2^{+/-}) 模型, 并对 GRK2^{+/-} 与同背景的野生型小鼠交配得的后代子鼠进行基因型鉴定和体质量的检测, 并检测 GRK2^{+/-} 小鼠多个组织中 GRK2 蛋白的表达, 验证 GRK2^{+/-} 小鼠的成功构建。

1 材料与方法

1.1 实验动物 GRK2 基因杂合敲除小鼠以 C57BL/6 为背景, 饲养于 SPF 实验室, 由江苏集萃药康生物科技有限公司提供, 生产许可证号: SCXK (苏) 2015-0001。所有实验均得到安徽医科大学临床药理研究所动物实验伦理委员会批准。

1.2 主要试剂 PGK1.1 线性载体由江苏集萃药康生物科技有限公司提供; 核酸染料购自上海天能科技有限公司; 琼脂糖凝胶购自美国 Genetech 公司; Genotyping Mix 购自美国 KapaBiosystems 公司; 抗 GAHDH 抗体购自美国 Proteintech 公司; 抗 GRK2 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 辣根酶标记的山羊抗鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物公司。

1.3 方法

1.3.1 Cas9/先导 RNA (single guide RNA, sgRNA)

2020-04-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81202541、81973332、81973314); 安徽省自然科学基金杰出青年基金 (编号: 1808085J28); 安徽高校自然科学研究重点项目 (编号: KJ2017A176); 安徽省高校优秀青年人才支持计划项目 (编号: gxyqZD2017025); 安徽省留学回国人员创新创业扶持计划 (2017); 安徽医科大学青年拔尖人才支持计划 (2013); 第三批安徽医科大学校级中青年学术技术带头人基金

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 安徽抗炎免疫药物协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 陶娟, 女, 硕士研究生;

汪庆童, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hfwqt727@163.com;

魏伟, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

载体构建 小鼠 GRK2 基因定位于第 19 号染色体上,基因 ID 为 11035,包括 21 个外显子。根据 sgRNA 设计原则,选择外显子 3、4、5 作为设计靶位点(图 1),利用美国麻省理工学院 CRISPR Design 软件(<http://crispr.mit.edu>)设计筛选得到一对 sgRNA,为 GRK2-S1 (GGCAGAAGTCCCGGAAAAGC)、GRK2-S2 (TCTGGAAGAGGCCAAGCCCT),分别识别前间区序列邻近基序为 AGG 和 TGG。将设计的 sgRNA 寡核苷酸单链利用 PCR 仪退火形成双链,反应体系见表 1,反应程序为 37℃ 30 min,95℃ 5 min,缓慢冷却至 25℃ (5℃/min)。然后将双链 sgRNA 与线性化载体 PGK1.1 linear vector 在 T4 DNA 连接酶作用下 16℃ 过夜连接,连接产物转染到 DH5a 感受态细胞,通过 PCR 和基因测序挑选阳性克隆产物,完成 sgRNA 载体构建。

1.3.2 F0 代 GRK2^{+/-} 小鼠获得 将体外转录的 sgRNA 与 Cas9 mRNA 混合后显微注射到 C57BL/6 小鼠受精卵中,将受精卵移植进 C57BL/6 雌性小鼠体内,生产出 10 只 F0 代小鼠。

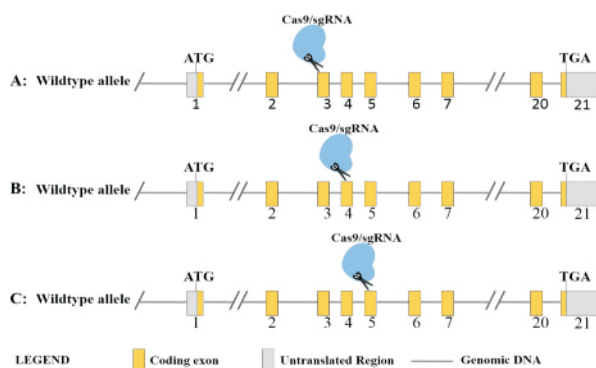


图 1 利用 CRISPR/Cas9 系统构建 GRK2 基因敲除策略

表 1 sgRNA PCR 退火程序的反应体系

反应条件	体积(μl)
S1 oligos	1.0
S2 oligos	1.0
10 × T4 ligation buffer	1.0
T4 PNK	0.5
双蒸水	6.5
总体积	10.0

1.3.3 基因型鉴定

1.3.3.1 鼠尾 DNA 提取 待 F0 代子鼠 2 周大时,剪小鼠尾巴(长不超过 0.2 cm),放入 1.5 ml EP 管中,加入 490 μl 鼠尾裂解液(100 ml 裂解液中含 5 ml 10% SDS、2 ml 5 mol/L NaCl、1 ml 1 mol/L Tris · HCl、10 ml 0.5 mol/L EDTA、82 ml H₂O) 和 10

μl 的蛋白酶 K (10 mg/ml),混匀以后将 EP 管放入 60℃ 水浴锅中消化鼠尾过夜,随后煮沸 10 min 终止裂解。高速离心机 10 000 r/min 离心 10 min 后取上清液进行 PCR 检测。

1.3.3.2 PCR 扩增反应 引物由上海 Invitrogen 公司合成。引物序列、PCR 反应体系及程序见表 2、3、4。

1.3.3.3 1% 琼脂糖凝胶电泳 1 × TAE buffer 30 ml,加入琼脂糖 0.3 g 及 1 μl 的核酸染料,取上述 PCR 扩增产物 10 μl,电压 120 V,电泳 30 min,于 Tanon-1600 全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能公司)中拍照观察。

表 2 GRK2^{+/-} 小鼠基因鉴定引物序列

引物名称	序列
200381-GRK2-in-F1	CACACGCACCCTAACCTGGAATC
200381-GRK2-in-R1	CCTGTGATGGGACAGAGACAGAC
200381-GRK2-in-F2	CTCACTCTCCTCCATACCTC
200381-GRK2-in-R2	CACTCCATAGCACAGGGAGATAC

表 3 GRK2^{+/-} 小鼠基因鉴定 PCR 反应体系

反应体系	体积(μl)	浓度
2 × Taq Master Mix(Dye Plus)	12.5	
双蒸水	9.5	
正向引物	1	10 μmol/L
反向引物	1	10 μmol/L
DNA 样本	1	100 ng/μl
总体积	25	

表 4 GRK2^{+/-} 小鼠基因鉴定 PCR 反应程序

步骤	温度(℃)	时间	循环
1	95	5 min	
2	98	30 s	
3	65	30 s	
4	72	45 s	2 ~ 4, 20 ×
5	98	30 s	
6	55	30 s	
7	72	45 s	5 ~ 7, 20 ×
8	72	5 min	
9	10	∞	

1.3.4 GRK2^{+/-} 小鼠的饲养繁育 GRK2^{+/-} 小鼠于 SPF 级实验室饲养及繁殖。昼夜明暗交替时间为 12/12,小鼠饲料、垫料以及饮用水均经过高温高压消毒灭菌处理,并定时喂少量葵花籽,鼠笼和垫料每周更换两次,各种操作均在超净工作台内按无菌操作进行。繁殖初期将雌性 GRK2^{+/-} 小鼠与 C57BL/6 雄性小鼠按 1:1 进行合笼,孕鼠妊娠期一般 21 d 左右;子鼠 19 ~ 21 d 可与母鼠分笼,将雌雄

小鼠分开饲养;一般雄鼠8周,雌鼠6周左右大小性成熟,可用于配繁。

1.3.5 小鼠体重和主要器官 GRK2 蛋白水平检测

待子鼠8周时,禁食过夜,称重,同时取同窝野生型及 GRK2^{+/-} 小鼠脾脏、胸腺以及心脏组织匀浆提取组织蛋白,加入 5 × loading buffer,煮沸 10 min, 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加入 GRK2 一抗 4 °C 孵育过夜,TPBS 洗膜 10 min × 3 次,加入对应的 HRP 标记的二抗,室温孵育 2 h,TPBS 洗膜,ECL 发光液显影^[7],使用 LAS4000Mini 型化学发光成像分析仪(美国 GE 公司)进行蛋白质信号检测。

1.4 统计学处理 所有数据采用 Graphpad prism 6.0 进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 获得 GRK2 基因杂合敲除 F0 代小鼠 将体外转录扩增的 sgRNA 与 Cas9 mRNA 的混合物显微注射入 C57BL/6 小鼠受精卵中,获得 10 只 F0 代小鼠,编号为 1#-7#、8#-1、8#-2、9#,提取尾部 DNA 经 PCR 扩增后进行测序(图 2A 和 2B),测序结果表明 CRISPR/Cas9 系统作用于 GRK2 基因的 19 号染色体的第三个外显子上,其中 2#小鼠删除了 19 bp 碱基,3#、4#小鼠删除了 20 bp 碱基,8#-1 小鼠缺失

13 bp 碱基,8#-2 虽然缺少了 1 bp 碱基但却插入了 16 bp 碱基导致插入了 15 bp 碱基,9#插入了 21 bp 碱基。由于 8-2# 9#小鼠插入的碱基个数是 3 的倍数,因此未能实现基因的确定突变,因此得到 4 只 F0 代 GRK2^{+/-} 小鼠。

2.2 获得 GRK2 基因杂合敲除 F1 代小鼠 为构建稳定遗传的 GRK2 基因杂合敲除小鼠,4 只 F0 代 GRK2^{+/-} 小鼠与 C57BL/6 小鼠回交,共得到 24 只 F1 代小鼠,编号为 16#-39#。每只子鼠的 DNA 均经过 PCR 扩增及基因测序(图 3A 和图 3B)。发现 20#、21#、23#、36#和 39#小鼠基因突变点,其基因序列如图 3C 所示,将这些基因突变小鼠与野生型小鼠的 DNA 序列进行比对发现,20#、21#和 23#小鼠 GRK2 基因缺失了 13 bp 碱基,36#和 39#小鼠的 GRK2 基因缺失 19 bp 碱基(图 3D),至此成功获得遗传稳定的 13 bp 和 19 bp 缺失 GRK2^{+/-} 小鼠。

2.3 19 bp 缺失的 GRK2^{+/-} 小鼠扩繁 由于 13 bp 的 GRK2 基因序列缺失较短,因此将其进行精子冻存保种,而将 19bp 缺失的 F1 代 GRK2^{+/-} 小鼠与 C57BL/6 小鼠交配扩繁,通过 PCR 及基因测序对其进行基因型鉴定,发现 F2 代小鼠中 46#、47#和 50#均为 19 bp 缺失的 GRK2^{+/-} 小鼠,提示成功建立了 GRK2^{+/-} 小鼠,且具有良好的稳定遗传性(图 4A ~ 4C)。

2.4 GRK2^{+/-} 小鼠生长情况及组织 GRK2 表达 与野生型小鼠相比,GRK2^{+/-} 小鼠外观及生理表现未见明显异常,但生长速度较慢,体型和体重明显小于同窝野生型小鼠(图 5A 和 5B)。为确定 GRK2 基因杂合被敲除的正确性,在基因型鉴定后,应用 Western blot 法检测同窝 GRK2^{+/-} 小鼠及野生型小鼠脾脏、胸腺、心脏、肝脏、巨噬细胞、肾脏组织中 GRK2 蛋白的表达水平,如图 5C-5H 所示,与野生型小鼠相比,GRK2^{+/-} 小鼠脾脏($t = 3.471$, $P = 0.0269$)、胸腺($t = 12.15$, $P = 0.0003$)、心脏($t = 3.908$, $P = 0.0174$)、肝脏($t = 4.297$, $P = 0.0127$)、巨噬细胞($t = 2.999$, $P = 0.0400$)、肾脏($t = 3.898$, $P = 0.0176$)组织中 GRK2 蛋白表达明显低于同窝野生型小鼠各组织。证实了 GRK2^{+/-} 小鼠模型的成功建立。

3 讨论

GRK2 属于丝/苏氨酸激酶家族,磷酸化 GPCRs,GRK2 与 β -arrestin 共同调控 GPCRs 的脱敏

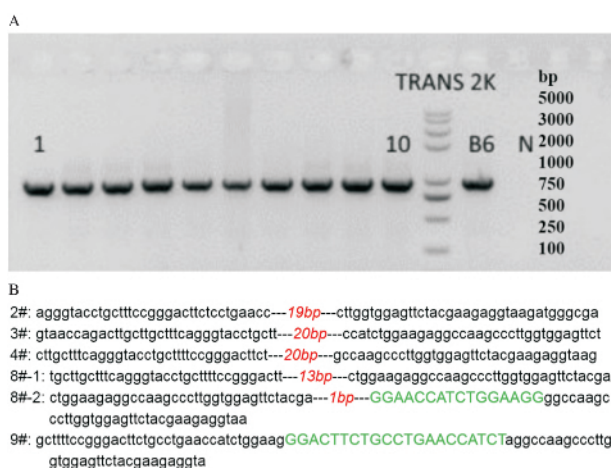


图2 F0代小鼠基因鉴定

A: F0 代 GRK2^{+/-} 小鼠 DNA 凝胶电泳图; 1 ~ 10 为 F0 代 GRK2^{+/-} 小鼠; B6 为野生型 C57BL/6 对照; N 为阴性对照; B: F0 代 GRK2^{+/-} 小鼠 DNA 测序图谱; 2#、3#、4#、8#-1 测序图谱中分别删除了 19 bp、20 bp、20 bp、13 bp 碱基; 8#-2 为删除 1 bp 插入 16 bp 碱基; 9#插入 21 bp 碱基

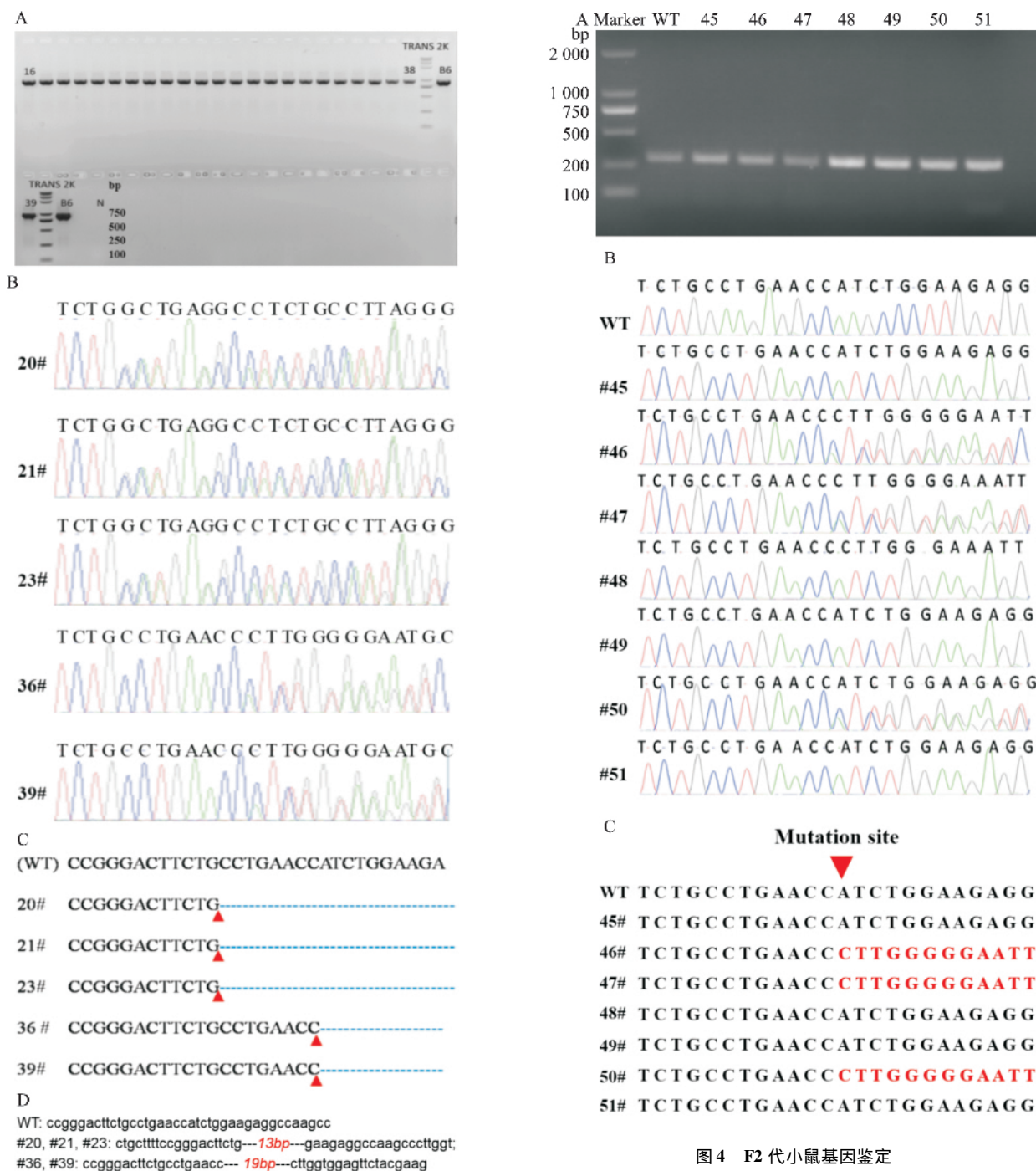


图4 F2代小鼠基因鉴定

A: F2代 GRK2^{+/+} 小鼠 DNA 凝胶电泳图; WT 为野生型小鼠 C57BL/6 对照; 45、46、47、48、49、50、51 为 F2 代小鼠编号; B: 野生型以及 F2 代小鼠的基因测序图谱; C: F2 代小鼠碱基序列及 GRK2^{+/+} 突变位点用红色三角形标出

图3 F1代小鼠基因鉴定

A: F1 代 GRK2^{+/+} 小鼠 DNA 凝胶电泳图; B6 为野生型 C57BL/6 对照; N 为阴性对照; B: 20#、21#、23#、36#、39# 小鼠基因测序图谱; C: GRK2 基因突变小鼠碱基序列及突变位点用红色三角形标出; D: 20#、21#、23# 小鼠 GRK2 基因序列缺失 13 bp 碱基; 36#、39# 小鼠 GRK2 基因序列删除 19 bp 碱基

及内吞,为 GRK2 最经典的作用^[8],最近研究^[2]表明 GRK2 也可直接磷酸化微管蛋白、核糖体蛋白、钠通道及参与 ERK、MAPK 和 NF- κ B 等信号通路的调控,并且通过诱导 Smad 磷酸化来调节转化生长因

子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 介导的细胞生长停滞和凋亡,在细胞的生长发育中起到关键作用。因此,GRK2 在多种慢性疾病包括心血管疾病、神经系统疾病、自身免疫病以及肿瘤的发生和发展中起到了重要作用。

在心血管系统中,GRK2 维持着心脏的正常结

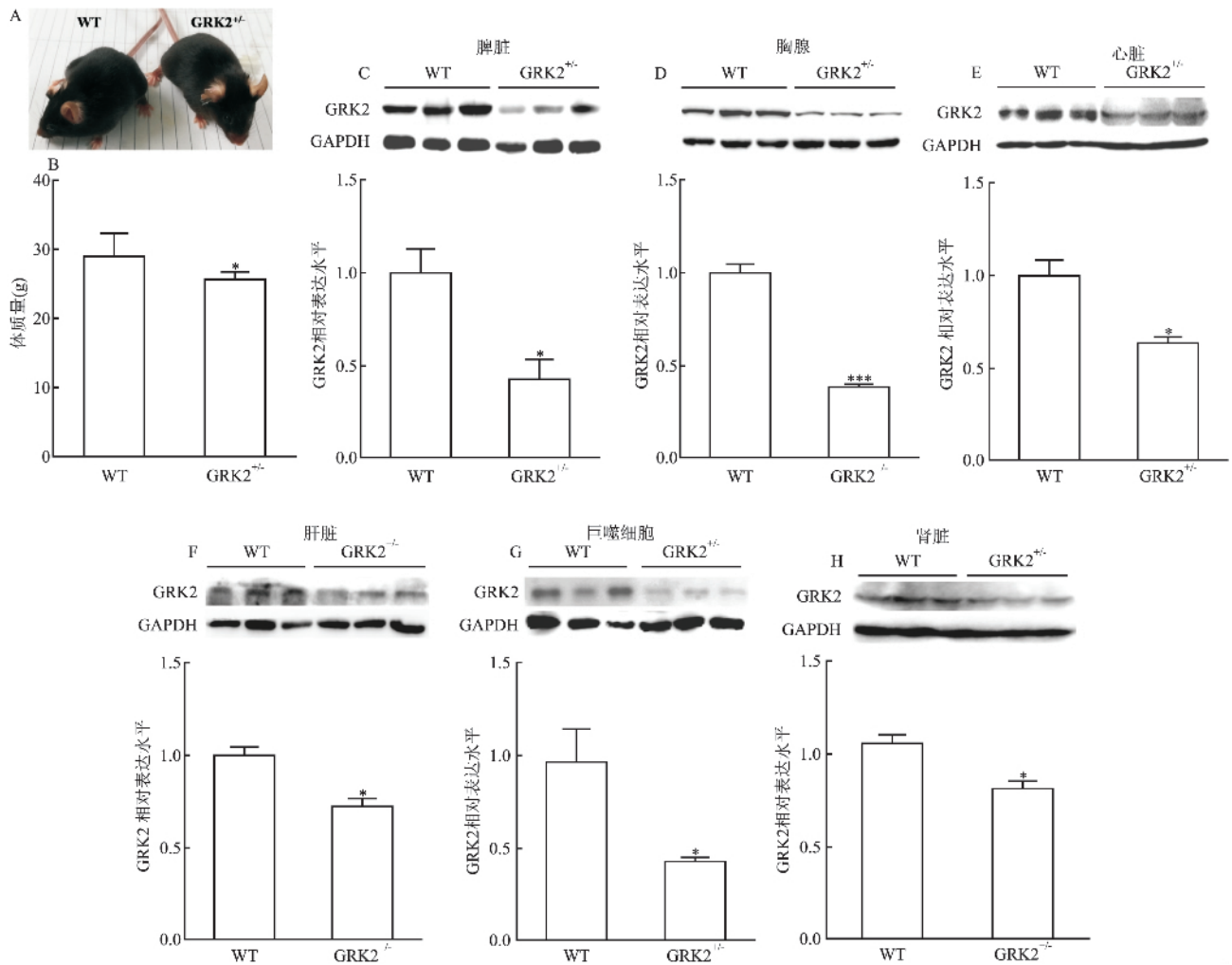


图5 GRK2^{+/-}与野生型小鼠体重及主要组织中GRK2表达情况

A: GRK2^{+/-}小鼠与同窝同龄WT小鼠照片; B: WT与GRK2^{+/-}体重对比; C: 脾脏组织中GRK2蛋白表达; D: 胸腺组织中GRK2蛋白表达; E: 心脏组织中GRK2蛋白表达; F: 肝脏组织中GRK2蛋白表达; G: 巨噬细胞中GRK2蛋白表达; H: 肾脏组织中GRK2蛋白表达; 与WT组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

构和功能, 损伤或应激可使心肌细胞 GRK2 表达水平上调 3~4 倍, 引起肾上腺素受体过度脱敏或表达下降, 导致心脏收缩功能发生障碍。值得注意的是, GRK2 为收缩性心功能障碍发生时第一个产生变化的蛋白^[9]。此外, 在心肌缺血动物模型的心脏组织中也检测到 GRK2 的显著升高, 高血压患者的外周血淋巴细胞中 GRK2 mRNA 水平和活性均显著增加^[10]。这些研究证实了 GRK2 是心血管系统功能不可缺少的调节因子, 逐渐成为临床上心血管疾病诊断的生物标志物和治疗靶点。GRK2 也参与了神经系统疾病及自身免疫病的发病机制, 如阿尔茨海默症、帕金森病、类风湿关节炎以及多发性硬化等疾病中 GRK2 的表达均有不同程度的改变, 与病程显著相关^[11-12]。对于 GRK2 功能的研究将有助于揭示多种慢性疾病的病理机制, 探索药物作用靶点。

因此, 啮齿动物中 GRK2 的缺失为基础发育、生理和发病机制的研究提供了非常有用的动物模型。此外, 该模型在确定药物靶标和开发新的临床治疗方法方面具有重要价值。1996 年, Jaber et al^[13]报道由于心肌发育不全, GRK2 纯合子导致胚胎死亡。他们观察到 GRK2^{-/-}胚胎小鼠的心脏射血分数明显降低, 并伴有严重的心力衰竭。然而 Matkovich et al^[14]发现, 心脏特异性 GRK2 基因敲除小鼠(通过 Cre/loxP 系统获得)具有正常的心脏结构、功能和心脏基因表达, 表明 GRK2 纯合子小鼠心脏的胚胎发育异常可能归因于心脏以外的因素。但心脏特异性 GRK2 基因敲除小鼠对急性和慢性异丙肾上腺素治疗更为敏感, 这表明 GRK2 在维持心脏的儿茶酚胺反应中非常重要。尽管已有研究者通过同源重组技术构建了 GRK2^{+/-}小鼠, 但这种基因编辑技术既费

时又效率低下,限制了 GRK2 的整体研究。本研究采用 CRISPR/Cas9 新型基因编辑技术构建 GRK2^{+/−}小鼠,相比于传统的基因打靶技术具有操作方便、成本较低、周期短和高效率等优点^[13]。

根据 GRK2 基因序列设计出 sgRNA 表达载体,成功删除了 GRK2 基因第三个外显子上的 13 bp 和 19 bp 碱基,发生移码突变,导致 GRK2 遗传信息的改变,基因测序结果表明其遗传信息可稳定遗传。通过检测 GRK2^{+/−}小鼠主要器官以及重要的循环器官(如心脏)中 GRK2 蛋白表达水平,发现其蛋白表达量均明显降低,不同组织中 GRK2 蛋白丰度略有不同可能是在特定器官中的转录和翻译效率存在差异。GRK2^{+/−}小鼠的行为活动均正常,但生长速度慢于同窝出生的野生型小鼠。我们将 GRK2^{+/−}小鼠与 C57BL/6 小鼠进行杂交,防止出现 GRK2 基因敲除纯合子,引起胚胎致死而对母鼠造成损伤。本研究采用 PCR 扩增及基因测序对子鼠进行基因型鉴定,通过一段时间的扩繁,获得了一定数量的 GRK2^{+/−}小鼠,为后续 GRK2 相关机制研究提供了较好的动物模型。本文详细描述 CRISPR/Cas9 技术将为其他研究者构建 GRK2 基因敲除小鼠提供线索。

参考文献

- [1] Makita N, Kabasawa Y, Otani Y, et al. Attenuated desensitization of β -adrenergic receptor by water-soluble N-nitrosamines[J]. *Circ Res*, 2013, 112(2): 327–34.
- [2] Penela P, Murga C, Ribas C, et al. The complex G protein-coupled receptor kinase2 (GRK2) interactome unveils new physiological targets[J]. *Brit J Pharmacol*, 2010, 160(4): 821–32.
- [3] Wang Q T, Liu Y, Fu Q, et al. Inhibiting insulin-mediated β 2-adrenergic receptor activation prevents diabetes-associated cardiac dysfunction[J]. *Circulation*, 2017, 135(1): 73–88.
- [4] Rengo G, Pagano G, Filardi P P, et al. Prognostic value of lymphocyte G protein-coupled receptor kinase-2 protein levels in patients with heart failure[J]. *Circ Res*, 2016, 118(7): 1116–24.
- [5] Wang Q, Wang L S, Wu L, et al. Paroxetine alleviates T lymphocyte activation and infiltration to joints of collagen-induced arthritis[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 45364.
- [6] Murga C, Arcones A C, Cruces-Sande M, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) as a potential therapeutic target in cardiovascular and metabolic diseases[J]. *Front Pharmacol*, 2019, 10: 112.
- [7] 杨思民,汪庆童,刘亢亢,等. 重组 TACI-Ig 融合蛋白抑制抗 CD3 抗体诱导 T 淋巴细胞增殖与活化[J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(7): 919–25.
- [8] Peterson Y K, Luttrell L M. The diverse roles of arrestin scaffolds in G protein-coupled receptor signaling[J]. *Pharmacol Rev*, 2017, 69(3): 256–97.
- [9] Fu Q, Wang Q T, Xiang Y. Insulin and β adrenergic receptor signaling: Cross talk in heart[J]. *Trends Endocrin Met*, 2017, 28(6): 416–27.
- [10] Degos V, Peineau S, Nijboer C, et al. G protein-coupled receptor kinase 2 and group I metabotropic glutamate receptors mediate inflammation-induced sensitization to excitotoxic neurodegeneration[J]. *Ann Neurol*, 2013, 73(5): 667–78.
- [11] Ghanemi A. Targeting G protein coupled receptor-related pathways as emerging molecular therapies[J]. *Saudi Pharm J*, 2015, 23(2): 115–29.
- [12] Gupta R M, Musunuru K. Expanding the genetic editing tool kit: ZFNs, TALENs, and CRISPR-Cas9[J]. *J Clin Invest*, 2014, 124(10): 4154–61.
- [13] Jaber M, Koch W J, Rockman H, et al. Essential role of β -adrenergic receptor kinase 1 in cardiac development and function[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(23): 12974–9.
- [14] Matkovich S J, Diwan A, Klanke J L, et al. Cardiac-specific ablation of G-protein receptor kinase 2 redefines its roles in heart development and beta-adrenergic signaling[J]. *Circ Res*, 2006, 99(9): 996–1003.

Generation of GRK2 heterozygous mouse using CRISPR/Cas9 and genotyping

Tao Juan Zhou Weijie Tai Yu et al

(Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University,

Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine Ministry of Education,

Anhui Collaborative Innovation Center of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Hefei 230032)

Abstract Objective To generate a G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) heterozygous (GRK2^{+/−}) mice by CRISPR/Cas9 for investigating the pathogenic role and therapeutic implication of GRK2. **Methods** GRK2 targeting vector was constructed and the mixture of single guide RNA and Cas9 mRNA was microinjected into zygotes of

网络出版时间: 2020-6-29 11:26 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20200629.1110.011.html>

干扰 AKAP12 调控 G1/S 期促进乳腺癌 MCF-7 细胞增殖

梁瑞鹏¹ 程倩¹ 陆春花² 李可³ 于恒恒² 徐彬² 袁顺杰² 刘维薇⁴ 林清¹

摘要 目的 研究干扰 A 型激酶锚定蛋白 12(AKAP12) 对人乳腺癌 MCF-7 细胞增殖能力的影响,并初步探讨其机制。方法 采用携带干扰 AKAP12 核苷酸序列(shRNA-AKAP12)、空白对照(shRNA-NC)的慢病毒转染乳腺癌 MCF-7 细胞。Western blot 检测转染后细胞 AKAP12 蛋白表达;CCK-8 实验、克隆形成检测增殖能力;Western blot 检测细胞周期相关蛋白激酶抑制蛋白(p21、p27)以及细胞周期进展蛋白 CyclinD1 表达。结果 与 shRNA-NC 细胞相比较,shRNA-AKAP12 细胞 AKAP12 蛋白表达量减少,CCK-8 实验以及克隆形成结果显示,shRNA-AKAP12 细胞增殖能力明显增强($P < 0.0001$, $P < 0.001$)与 shRNA-NC 细胞相比,shRNA-AKAP12 细胞周期相关蛋白激酶抑制蛋白(p21、p27)表达下调,而细胞周期进展蛋白 CyclinD1 表达上调。结论 研究表明干扰 AKAP12 基因可增加 MCF-7 细胞增殖能力,干扰 AKAP12 表达加快 MCF-7 细胞 G1/S 期转换,对于雌激素受体阳性乳腺癌临床治疗和预后评估有一定价值。

关键词 A 型激酶锚定蛋白 12; 乳腺癌; 细胞周期

中图分类号 R 730

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)07-1041-05

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.07.011

2020-04-15 接收

基金项目 国家自然科学基金(编号:81572061)

作者单位 ¹安徽理工大学医学院 淮南 232000

同济大学第十人民医院² 肿瘤放射治疗科、³ 检验科、⁴ 中心实验室 上海 200072

作者简介 梁瑞鹏 男 硕士研究生;

林清 女 副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: lin-qing.linda@163.com

乳腺癌是女性最常诊断的恶性肿瘤之一,近年来无论是发病率还是致死率均高居首位^[1]。众所周知,乳腺癌是一组高度异质性疾病,雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性乳腺癌约占所有乳腺癌 70%,在乳腺癌患者占有较大比例。A 型激酶锚定蛋白 12(A kinase-anchored protein 12; AKAP12)是胞内大分子支架蛋白与维持正常组织结构功能完整^[2]及肿瘤细胞增殖、侵袭转移^[3]等过程密切相关。AKAP12 最早被用来评价重症肌无力预后的抗原,随后研究^[4]发现在 src 基因、ras 基因等原癌基因转化的成纤维细胞中 AKAP12 表达明显下调,文献^[5]报道,与正常组织相比,AKAP12 在多种肿瘤中表达下调,如实体肿瘤肺癌、结直肠癌^[3]、肝癌^[6],血液肿瘤如幼年髓单核细胞白血病^[7],在肿瘤细胞重新表达 AKAP12 抑制肿瘤细胞增殖、迁移侵袭,而干扰 AKAP12 则增加肿瘤细胞增殖、迁移侵袭能力,因此 AKAP12 被认为是潜在的抑癌基因。但 AKAP12 与乳腺癌生物学功能是否有关尚未阐明,AKAP12 是否参与乳腺癌的发生发展有待于研究。该研究通过干扰 ER 阳性乳腺癌 MCF-7 细胞中 AKAP12 表达来观察其对 ER 阳性 MCF-7 细胞增殖、周期机制的影响,初步探讨 AKAP12 在 ER 阳性乳腺癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料 人乳腺癌细胞系 MCF-7、MDA-

female C57BL/6 mouse to generate gene mutation in Exon3. We got both 13bp-deletion and 19bp-deletion GRK2^{+/-} mice according to genotyping performed through PCR and gene sequencing. Since GRK2 homozygous are embryonic lethality, we cross-bred 19 bp-deletion F0 GRK2^{+/-} mice with C57BL/6 to obtain stable 19bp-deletion F1 generation of GRK2^{+/-} mice for propagation and the following experiments. **Results** The genotype of GRK2^{+/-} mouse was steady with significant lower body weight compared with C57BL/6 mouse at the same age. Western blot results showed that almost half of the GRK2 protein expression was reduced in immune organs like spleen and thymus as well as other tissues. **Conclusion** This GRK2 targeted genetically engineered mouse model will provide a promising approach for understanding the role of GRK2 in the development of diverse organs and cells as well as its pathogenic role and therapeutic implications in chronic diseases.

Key words G protein-coupled receptor kinase 2; CRISPR/Cas9; genetically engineered mice; genotyping