

· 基础研究 ·

利用 CRISPR/Cas9 技术构建肝脏特异性敲入 *Lcat* 基因小鼠

张芙蓉¹, 苟黎明¹, 李妍², 王泽勇³, 杨斐³, 吴菁¹, 覃健^{3*}, 薛斌^{1*}¹南京医科大学附属逸夫医院中心实验室, ²检验科, ³骨科, 江苏 南京 211166

[摘要] 目的:通过 CRISPR/Cas9 介导的基因编辑技术构建卵磷脂胆固醇脂酰转移酶(lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT)基因敲入 C57BL/6 小鼠并与肝脏特异性表达 *Cre* 的转基因小鼠配繁得到肝脏特异性敲入 *Lcat* 基因 C57BL/6 小鼠模型。为 *Lcat* 基因在肝脏相关代谢疾病发生机制的研究提供动物模型。方法:利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Lcat* 基因敲入小鼠;利用肝脏特异性表达 *Cre* 的转基因小鼠与 *Lcat* 基因敲入小鼠交配得到肝脏特异性敲入 *Lcat* 基因小鼠;通过 PCR 法鉴定小鼠的基因型;利用实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR, qPCR)和 Western blot 技术验证 *Lcat* 基因的 mRNA 水平和蛋白水平。结果:PCR 结果显示肝脏特异性敲入 *Lcat* 基因的小鼠模型构建成功;qPCR 结果显示 *Lcat* 基因在肝脏中特异性高表达;WB 结果显示,与对照组小鼠相比,LCAT 蛋白在肝脏特异性敲入 *Lcat* 的小鼠肝脏中有明显更高的表达。结论:成功构建肝脏特异性敲入 *Lcat* 基因小鼠,为在动物水平探索 *Lcat* 基因在肝脏相关代谢疾病中的功能及相关发病机制提供研究平台。

[关键词] CRISPR/Cas9; *Lcat*; 肝脏特异性; 基因敲入**[中图分类号]** Q785**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2023)10-1366-06**doi:** 10.7655/NYDXBNS20231005

Establishment of liver-specific *Lcat* knock-in mouse models by the CRISPR/Cas9 technique

ZHANG Furong¹, GOU Liming¹, LI Yan², WANG Zeyong³, YANG Fei³, WU Jing¹, QIN Jian^{3*}, XUE Bin^{1*}¹Department of Central Laboratory, ²Department of Clinical Laboratory, ³Department of Orthopedics, Sir Run Run Hospital, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

[Abstract] **Objective:** To construct lecithin-cholesterolacyl transferase (LCAT) knock-in mice by CRISPR/Cas9-mediated gene editing and to obtain liver-specific overexpression of *Lcat* mice by mating with liver-specific *Cre*-expressing transgenic mice. Providing an animal model for the study of the mechanism of the *Lcat* gene in the development of liver-related metabolic diseases. **Methods:** *Lcat* knock-in mice were constructed by CRISPR/Cas9 technology; Liver-specific *Cre*-expressing transgenic mice were mated with *Lcat* knock-in mice to obtain liver-specific overexpressing *Lcat* mice; Genotyping mice by PCR; Quantitative real-time PCR (qPCR) and Western blot (WB) techniques were used to verify the expression of *Lcat* gene in C57BL/6 mice. **Results:** The PCR results showed that the liver-specific overexpression of *Lcat* gene in mice was successfully constructed; the qPCR results showed that the *Lcat* gene was specifically highly expressed in the liver, and the liver of knock-in mice showed higher *Lcat* expression; the WB results showed that LCAT protein was more highly expressed in the liver of liver-specific *Lcat* knock-in mice. **Conclusion:** Liver-specific overexpression of *Lcat* gene mice were successfully constructed, providing a platform for exploring the function of the *Lcat* gene at animal level in liver-related metabolic diseases and the associated pathogenesis.

[Key words] CRISPR/Cas9; *Lcat*; liver-specific; gene knock-in

[J Nanjing Med Univ, 2023, 43(10): 1366-1371]

[基金项目] 国家自然科学基金(32271187, 32071142);江苏省青蓝工程(KY520R202025);省部共建协同创新中心(JZ21449020210617);南京市卫生科技发展专项资金项目(YKK21256)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: qinjian@njmu.edu.cn; xuebin@njmu.edu.cn

成簇规律间隔的短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) 是一组广泛存在于细菌和古细菌中的 DNA 序列, Cas 序列位于其附近, 编码 CRISPR 相关蛋白 9 (CRISPR-associated protein 9, Cas9)^[1-2]。CRISPR/Cas9 技术发现细菌中存在病毒的天然基因组编辑体系, 即细菌识别特定的病毒 DNA 片段并对其进行切割使其失活。利用这一特性, 研究人员通过设计特定的向导 RNA (guide RNA, gRNA) 来识别生物体基因组特定的 DNA 位点并对其进行识别和切割^[3]。CRISPR/Cas9 技术因其更快更高效的特点, 已成为众多基因编辑技术中运用最广泛的技术^[4-6], 特别是基因编辑小鼠。本研究使用 CRISPR/Cas9 技术完成了基因编辑小鼠的构建。

卵磷脂胆固醇脂酰转移酶 (lecithin-cholesterol acyltransferase, LCAT) 是一种广泛存在于血浆中的酶^[7], 主要由肝脏合成并分泌, 对维持机体胆固醇稳态以及参与血浆中胆固醇反向转运 (reverse cholesterol transport, RCT) 起重要作用^[7]。在胆固醇逆向转运过程中, LCAT 将游离的胆固醇进行酯化, 形成的胆固醇酯经转运蛋白转运至肝脏进行代谢, 从而使得外周多余的胆固醇被清除, 以维持体内胆固醇平衡^[8-9]。大量研究表明, 体内 LCAT 水平或活性与众多代谢疾病密切相关^[10]。LCAT 不同程度的突变及缺失会导致家族性 LCAT 缺乏症和鱼眼病^[11-13]; 此外, LCAT 水平或活性异常可导致胆固醇代谢异常, 已被报道与心血管疾病和脂肪肝的发生发展有独立的相关性^[14-15]。与此同时, 本课题组之前的研究也证实 LCAT 参与肝性骨病的调控, 而具体机制需要进一步探索^[16]。因此, 构建肝脏特异性敲入 *Lcat* 小鼠对 LCAT 作为胆固醇代谢异常疾病治疗靶点的进一步研究具有重要意义。

本研究利用 CRISPR/Cas9 的技术, 通过同源重组的原理设计并体外转录 gRNA, 同时构建同源重组载体 (donor vector)。将 Cas9、gRNA、donor vector 同时注射到小鼠的受精卵中并获得 F0 代小鼠。将测序正确的 F0 代小鼠与 C57BL/6JGpt 小鼠交配得到稳定遗传的 F1 代小鼠后将其与肝脏特异性表达 *Cre* 的小鼠交配获得肝脏特异性敲入 *Lcat* 的小鼠。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本研究所用小鼠品系为 C57BL/6, 该品系源自 Abby Lathrop 小鼠株的近交品系实验鼠, 所有小鼠均购自江苏集萃药康生物科技有限公司。动物实验符合南京医科大学伦理委员会的规定并被授权。所有实验小鼠均饲养于无特定病原体 (specific pathogen free, SPF) 环境中, 光照时间为 6:00~18:00 (明/暗循环 12 h), 温度为 (22±3)℃, 所有动物可自由饮食与活动。

1.1.2 主要试剂

2×TaqPlus MasterMix, RNA-easy Isolation Reagent、HiScript III RT SuperMix for qPCR、2×SYBR Green MasterMix (南京诺唯赞生物科技有限公司); 蛋白酶抑制剂、RIPA 蛋白裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司); PVDF 膜 (Millipore 公司, 美国); 鼠抗小鼠 β-actin 抗体 (武汉三鹰生物技术有限公司); 兔抗小鼠 LCAT 抗体 (武汉博士德生物有限公司); ECL 超敏发光液 (上海天能生命科学有限公司); 肝脏特异性 *Lcat* 基因过表达小鼠的 DNA 鉴定引物序列信息及 qPCR 引物序列见表 1, 所有引物合成以及测序结果均来自南京擎科生物技术有限公司。

表 1 小鼠 DNA 鉴定及 qPCR 引物序列

Table 1 The primer sequences for mice genotyping and qPCR

引物名称	上游序列 (5'→3')	下游序列 (5'→3')
H11	ATGCCACCAAAGTCATCAGTGTAG	AGGCGGGCCATTTACCGTAAGTTA
H11-wt	CAGCAAAACCTGGCTGTGGATC	ATGAGCCACCATGTGGGTGTC
Alb1	GGGCAGTCTGGTACTTCCAAGCT	TAGCTACCTATGCGATCCAAACAAC
Actb	GGCTGTATTCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
Lcat	GTAACCACACACGGCCTGTC	TCTTACGGTAGCACATCCAGTT

1.2 方法

1.2.1 *Lcat* 基因敲入小鼠模型的构建

利用 CRISPR/Cas9 技术, 将 CAG-LSL-*Lcat*-His-

polyA 基因片段定点插入到小鼠的 H11 位点。gRNA 的序列为 5'-CTGAGCCAACAGTGGTAGTA-3'。将 CRISPR/Cas9 体系和 donor vector 显微注射到

C57BL/6JGpt 小鼠的受精卵中,获得 F0 代小鼠。经 PCR 和测序验证正确的 F0 代阳性小鼠与 C57BL/6JGpt 小鼠交配获得可稳定遗传的 F1 代阳性小鼠模型。将 F1 代小鼠与肝脏特异性表达 *Cre* 的小鼠交配获得 F2 代小鼠并对其进行基因鉴定。

1.2.2 小鼠基因型的鉴定

取上述 F2 代小鼠的脚趾并使用碱提法提取基因组 DNA,通过 PCR 技术检测目的基因表达。PCR 反应体系为 2×Taq Master Mix 10 μL, cDNA 2 μL, 上下游引物均为 0.4 μL, ddH₂O 7.2 μL。反应条件为: 95 °C 3 min; 95 °C 15 s, 65 °C 15 s, 72 °C 60 s, 35 个循环; 72 °C 5 min。对反应产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。

1.2.3 实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 检测小鼠不同组织 *Lcat* 基因 mRNA 表达

利用 TRIzol 法提取组织总 RNA, 采用逆转录试剂盒制备 cDNA, qPCR 反应体系为 2×SYBR qPCR Master Mix 5 μL, cDNA 1 μL, 上下游引物均为 0.2 μL, ddH₂O 3.6 μL。反应条件为: 95 °C 30 s; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环; 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。单个样品做 3 个重复, 内参基因为 *Actb*, 根据公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算 *Lcat* mRNA 在不同组织中的表达水平。

1.2.4 Western blot 验证小鼠不同组织 LCAT 蛋白水平

颈椎脱臼法处死野生型和肝脏特异性敲入 *Lcat* 的小鼠后, 依次提取各组织并剪取 30 mg 放入含蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液中, 研磨, 12 000 r/min 离心 15 min 取上清, 加入上样缓冲液后 100 °C 金属浴 8 min, 提取总蛋白。在 120 V 电压下经 SDS-PAGE 胶分离蛋白, 湿转法将蛋白转至 PVDF 膜上, 使用 5% 的脱脂奶粉室温封闭 1 h 后孵育一抗 (LCAT 稀释比为 1:1 000, β-actin 稀释比为 1:10 000), 4 °C 摇床孵育过夜后用 PBST 洗 3×10 min, 二抗 1:10 000 稀释后室温孵育 1 h, PBST 洗 3×10 min 后显影成像, 使用 Image J 对 Western blot 条带的灰度值进行统计分析。

2 结果

2.1 小鼠 *Lcat* 基因修饰靶点 gRNA 序列设计及表达载体构建

由于小鼠第 11 号染色体上的 *H11* 位点位于 *Eif4enif1* 与 *Drg1* 这两个基因之间, 且外源基因插入

后对内源基因表达影响较小, 因此针对 *H11* 位点合成 gRNA 序列。采用 CRISPR/Cas9 技术将 CAG-LSL-*Lcat*-His-polyA 片段基因片段定点插入到小鼠的 *H11* 位点上。载体结构见图 1。

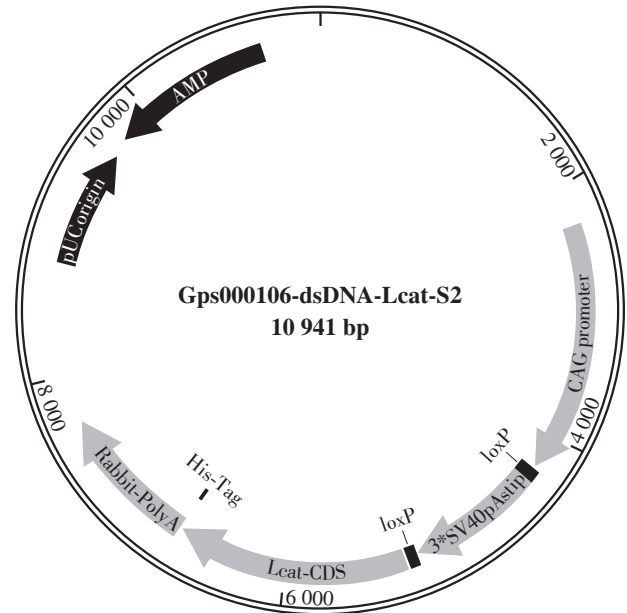
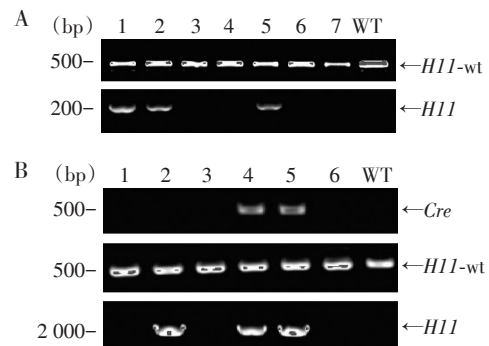


图 1 载体结构示意图

Figure 1 Diagram of carrier structure

2.2 肝脏特异性敲入 *Lcat* 小鼠基因型鉴定

将 F0 代小鼠与 C57BL/6JGpt 小鼠交配获得 F1 代小鼠, 对 1 周内的 F1 代小鼠进行剪趾并提取 DNA 后进行 PCR, 核酸电泳结果中 F1 代杂合子 *H11* 和 *H11*-wt 均有条带显示 (图 2A)。后将 F1 代杂合子与 *Alb-iCre* 小鼠交配得到肝脏特异性敲入 *Lcat* 小鼠。核酸电泳结果中 *H11*、*H11*-wt 和 *Cre* 均有条带显示 (图 2B)。



A: 对 7 只出生后第 7 天 F1 代小鼠进行剪趾提取基因组 DNA, PCR 后完成琼脂糖凝胶电泳; B: 对 6 只出生后第 7 天 F2 代小鼠进行剪趾提取基因组 DNA, PCR 后完成琼脂糖凝胶电泳。

图 2 F1 代和 F2 代小鼠基因型鉴定结果

Figure 2 Identification of genotype in F1 and F2 mice

2.3 肝脏特异性敲入 *Lcat* 小鼠不同组织的 *Lcat* mRNA 水平

为确定小鼠各组织 *Lcat* 转录水平的差异, 根据核酸电泳结果, 筛出基因型带 *Cre* 的敲入 (knock-in, KI) 小鼠, 以未携带 *Cre* 的 KI/WT 或 KI/KI 鼠作为对照, 依次提出心脏、肝脏、肾脏、脑、棕色脂肪的 RNA, 将其进行逆转录, 并将得到的 cDNA 进行 qPCR, 结果以小鼠心脏内 *Lcat* 表达为比较基准, 提示在对照组小鼠中, *Lcat* 主要由肝脏特异性表达, 而在肝脏特异性敲入 *Lcat* 小鼠的肝脏内, *Lcat* 的 RNA 水平显著增加 (图3)。

2.4 肝脏特异性敲入 *Lcat* 小鼠不同组织的 LCAT 蛋白水平

为探究肝脏特异性敲入小鼠与对照组相比各组织 LCAT 蛋白水平的差异, 依次提取各组织蛋白, 并通过 Western blot 检测 LCAT 的表达差异。结果显

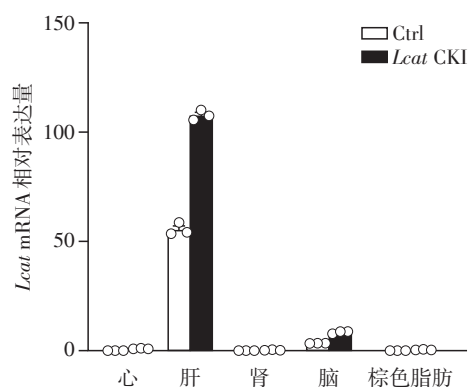
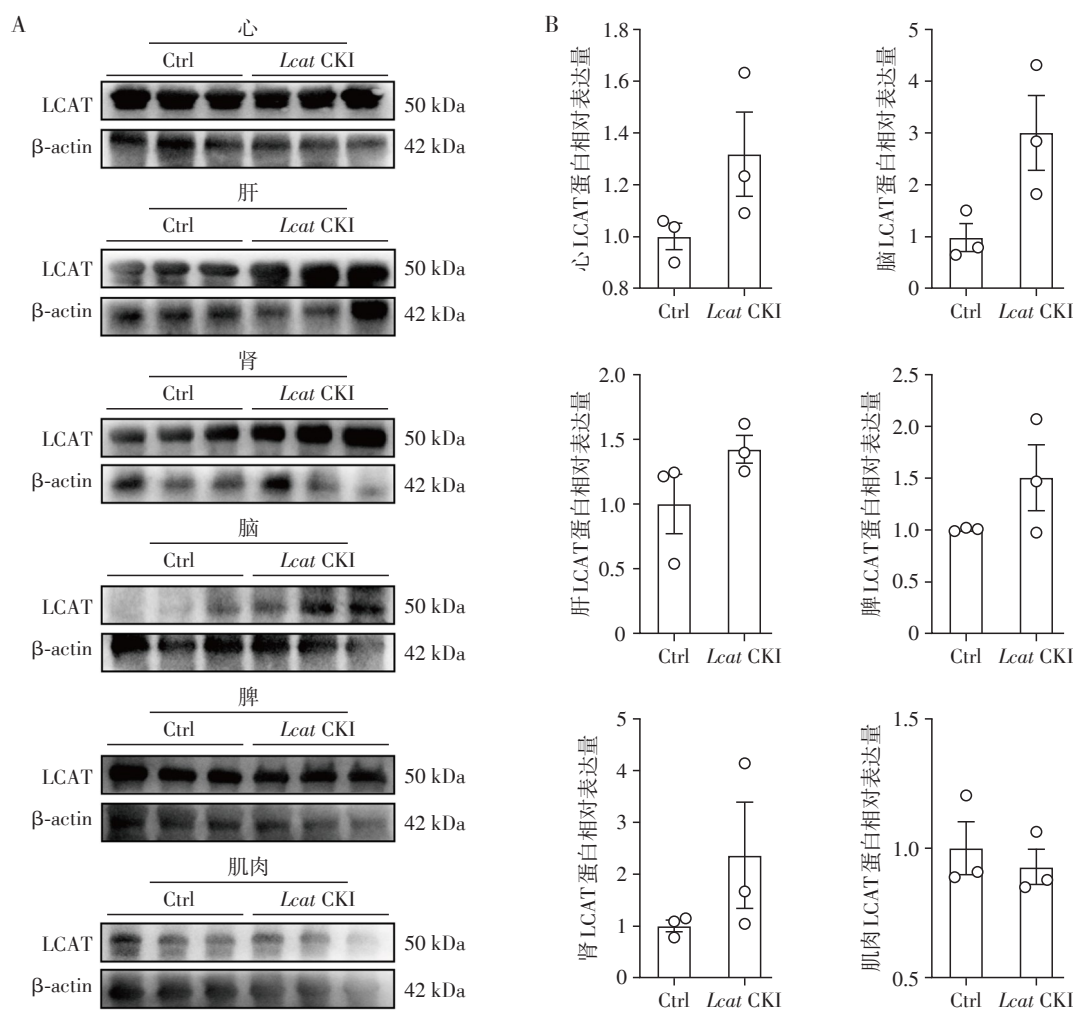


图3 小鼠各组织 *Lcat* mRNA 表达水平

Figure 3 The relative expressions of *Lcat* mRNA in multiple tissues of mice

示, 在肝脏特异性敲入 *Lcat* 小鼠体内, 除肝外, 心、肾、脑和脾中也出现了 LCAT 的高水平表达 (图4)。提示 LCAT 作为一种分泌性蛋白, 可通过血液循环



A: Western blot 检测对照组与肝脏特异性敲入 *Lcat* 小鼠各组织蛋白水平; B: 对 Western blot 结果的统计学分析 (n=3)。

图4 Western blot 检测 *Lcat* CKI 小鼠组织中蛋白表达情况

Figure 4 The relative expressions of proteins in multiple tissues of *Lcat* CKI mice detected by Western blot

运输到其他组织中。

3 讨论

CRISPER/Cas9是近年来发现的一种特定、高效和多功能的基因编辑技术^[17]。利用CRISPER/Cas9对DNA的特定区域进行插入、缺失和替换已广泛应用于基因过程领域并进一步参与疾病的研究与治疗中^[18-20]。CRISPER/Cas9体系主要由Cas9酶和gRNA构成。当gRNA与Cas9结合后,在gRNA的引导下,Cas9完成对指定序列位点的切割。利用CRISPER/Cas9技术完成了基因编辑小鼠的构建,从而对特定基因在相应疾病模型中发挥的作用进行体内研究。

LCAT作为胆固醇代谢中不可缺少的酶,在脂代谢异常中的作用已被广泛研究。如Scarpioni等^[21]发现LCAT缺乏的患者动脉粥样硬化风险显著升高。Gebhard等^[22]通过经冠状动脉造影证实冠心病患者血浆LCAT质量浓度升高,且与斑块体积呈负相关,提示LCAT有动脉粥样硬化保护作用。在动脉粥样硬化负荷的风险预测模型中,LCAT质量浓度优于LCAT活性,表明LCAT质量是动脉粥样硬化保护的关键变量。因此,进一步评估LCAT作为心血管疾病治疗靶点的研究是有必要的。

另一方面,Janac等^[23]对130例患者进行了脂肪肝指数分类,发现较高的LCAT活性与脂肪肝指数升高有关。类似的还有Nass等^[15]对348例受试者的研究中发现,LCAT活性升高与脂肪肝指数升高独立相关,而具体机制尚不清楚。同时,本课题组前期研究显示,*Pp2a*敲除小鼠导致的LCAT升高对肝性骨病有明显缓解与改善作用^[16]。而与之之前报道的小鼠全身性转入人*Lcat*基因相比^[24],本课题首次将鼠源的*Lcat*特异性敲入小鼠肝脏,具有明显的创新性。因此,本课题构建的肝脏特异性敲入*Lcat*小鼠对研究动脉粥样硬化、脂肪肝以及肝性骨病的具体发病机制和靶点的选择具有重要意义。

[参考文献]

[1] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems [J]. *Science*, 2013, 339(6121):819-823

[2] HILLE F, RICHTER H, WONG S P, et al. The biology of CRISPR-cas: backward and forward [J]. *Cell*, 2018, 172(6):1239-1259

[3] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A program-

mable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012, 337(6096):816-821

[4] 曹俊霞,王友亮,王征旭,等.精准调控CRISPR/Cas9基因编辑技术研究进展[J].*遗传*,2020,42(12):1168-1177

[5] GUO N, LIU J B, LI W, et al. The power and the promise of CRISPR/Cas9 genome editing for clinical application with gene therapy [J]. *J Adv Res*, 2022, 40:135-152

[6] 朱浩然,张鑫,祁俊侠,等.利用双引导RNA的CRISPR/Cas9技术构建*Nudt3*基因敲除小鼠[J].*南京医科大学学报(自然科学版)*,2021,41(7):949-955

[7] VITALI C, BAJAJ A, NGUYEN C, et al. A systematic review of the natural history and biomarkers of primary lecithin:cholesterol acyltransferase deficiency [J]. *J Lipid Res*, 2022, 63(3):100169

[8] NORUM K R. The function of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) [J]. *Scand J Clin Lab Inv*, 2017, 77(4):235-236

[9] PAVANELLO C, TURRI M, STRAZZELLA A, et al. The HDL mimetic CER-001 remodels plasma lipoproteins and reduces kidney lipid deposits in inherited lecithin: cholesterol acyltransferase deficiency [J]. *J Intern Med*, 2022, 291(3):364-370

[10] BARAGETTI A, OSSOLI A, STRAZZELLA A, et al. Low plasma lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) concentration predicts chronic kidney disease [J]. *J Clin Med*, 2020, 9(7):2289

[11] FLORES R, JIN X T, CHANG J, et al. LCAT, ApoD, and ApoA1 expression and review of cholesterol deposition in the cornea [J]. *Biomolecules*, 2019, 9(12):785

[12] YAMAMURO D, YAMAZAKI H, OSUGA J I, et al. Esterification of 4 β -hydroxycholesterol and other oxysterols in human plasma occurs independently of LCAT [J]. *J Lipid Res*, 2020, 61(9):1287-1299

[13] KINOSHITA S, SUGITA S, YOSHIDA A. Corneal thickness in the case of familial lecithin-cholesterol acyltransferase deficiency [J]. *Am J Ophthalmol Case Rep*, 2021, 24:101211

[14] OSSOLI A, SIMONELLI S, VITALI C, et al. Role of LCAT in atherosclerosis [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2016, 23(2):119-127

[15] NASS K J, VAN DEN BERG E H, GRUPPEN E G, et al. Plasma lecithin: cholesterol acyltransferase and phospholipid transfer protein activity independently associate with nonalcoholic fatty liver disease [J]. *Eur J Clin Invest*, 2018, 48(9):12988

[16] LU K, SHI T S, SHEN S Y, et al. Defects in a liver-bone

- axis contribute to hepatic osteodystrophy disease progression[J]. *Cell Metab*, 2022, 34(3): 441-457
- [17] MALI P, ESVELT K M, CHURCH G M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957-963
- [18] DEVARAJU N, RAJENDIRAN V, RAVI N S, et al. Genome engineering of hematopoietic stem cells using CRISPR/Cas9 system [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2429: 307-331
- [19] LYU C C, SHEN J, WANG R, et al. Targeted genome engineering in human induced pluripotent stem cells from patients with hemophilia B using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2018, 9(1): 92
- [20] VIKTÓRIA H, BALÁZS G. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system and applications in cancer research [J]. *Magyar Onkologia*, 2018, 62(2): 119-127
- [21] SCARPIONI R, PATIES C, BERGONZI G. Dramatic atherosclerotic vascular burden in a patient with familial lecithin - cholesterol acyltransferase (LCAT) deficiency [J]. *Nephrol Dial Transplant*, 2008, 23(3): 1074
- [22] GEBHARD C, RHAINDS D, HE G, et al. Elevated level of lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) is associated with reduced coronary atheroma burden [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 276: 131-139
- [23] JANAC J, ZELJKOVIC A, JELIC-IVANOVIC Z, et al. The association between lecithin-cholesterol acyltransferase activity and fatty liver index [J]. *Ann Clin Biochem*, 2019, 56(5): 583-592
- [24] FURBEE J W, PARKS J S. Transgenic overexpression of human lecithin: cholesterol acyltransferase (LCAT) in mice does not increase aortic cholesterol deposition [J]. *Atherosclerosis*, 2002, 165(1): 89-100

[收稿日期] 2023-01-28

(责任编辑: 蒋莉)



欢迎关注本刊微博、微信公众号!