

· 基础研究 ·

## 条件性胰岛β细胞 CASK 基因敲除小鼠的构建及鉴定

袁清照<sup>1</sup>, 谢金阳<sup>1</sup>, 刘星婧<sup>1</sup>, 袁 标<sup>2</sup>, 王 尧<sup>1\*</sup><sup>1</sup>东南大学附属中大医院内分泌科, 江苏 南京 210009; <sup>2</sup>南京医科大学生物化学与分子生物学系, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的: 构建条件性胰岛β细胞钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶(calmodulin-dependent serine protein kinase, CASK)基因敲除小鼠, 为研究 CASK 基因在糖尿病发生中的机制提供动物模型。方法: 将 CASK<sup>loxP/-</sup> 雌鼠与 CASK<sup>loxP/Y</sup> 雄鼠杂交, 获得基因型为 CASK<sup>loxP/loxP</sup> 雌鼠、CASK<sup>loxP/Y</sup> 雄鼠; 再让条件性胰岛β细胞特异性表达 Cre 重组酶雄鼠与 CASK<sup>loxP/loxP</sup> 雌鼠杂交获得 CASK<sup>loxP/Y</sup> MIP-Cre 雄鼠和 CASK<sup>loxP/-</sup> MIP-Cre 雌鼠。CASK<sup>loxP/Y</sup> MIP-Cre 基因型小鼠即为本实验所需要构建的模型小鼠。小鼠出生后 1~2 周剪尾, 通过 PCR 鉴定小鼠基因型, 4~5 周龄时腹腔注射他莫昔芬诱导 Cre 重组酶表达后, 利用实时荧光定量 PCR、蛋白质印迹技术验证 CASK 基因敲除效果。结果: 从引进这两种小鼠开始, 繁殖 10 个月, 共获得基因型为 CASK<sup>loxP/Y</sup> MIP-Cre 的雄鼠 28 只, PCR 结果证实小鼠基因型符合 CASK<sup>loxP/Y</sup> MIP-Cre。实时荧光定量 PCR、蛋白质印迹结果显示 CASK<sup>loxP/Y</sup> MIP-Cre 小鼠胰岛 CASK 表达量明显下降。结论: 利用 Cre/loxP 系统, 成功构建了条件性胰岛β细胞 CASK 基因敲除小鼠, 为在动物水平研究 CASK 基因在糖尿病发病机制中的作用提供了研究平台。

**[关键词]** CASK; Cre-loxP 系统; 胰岛β细胞

**[中图分类号]** Q789

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2019)09-1274-06

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20190903

## Construction and identification of mice by conditional CASK knockout in islet β cells

Yuan Qingzhao<sup>1</sup>, Xie Jinyang<sup>1</sup>, Liu Xingjing<sup>1</sup>, Yuan Li<sup>2</sup>, Wang Yao<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Endocrinology, Zhongda Hospital Affiliated to Southeast University, Nanjing 210009; <sup>2</sup>Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** This study aims to explore the function of CASK gene on the regulation of diabetes mellitus in successfully constructed and identified mice model by conditionally CASK knockout in islet β-cells. **Methods:** CASK<sup>loxP/-</sup> female mice and CASK<sup>loxP/Y</sup> male mice were crossed to obtain CASK<sup>loxP/loxP</sup> female mice and CASK<sup>loxP/Y</sup> male mice, and then the male mice with conditioned islet beta cells expressing Cre recombinase and CASK<sup>loxP/loxP</sup> female mice were crossed to obtain CASK<sup>loxP/Y</sup> MIP-Cre male mice and CASK<sup>loxP/-</sup> MIP-Cre female mice. Mice with CASK<sup>loxP/Y</sup> MIP-Cre genotype are the model mice needed for this experiment. Mice were tailed 1-2 weeks after birth, and their genotypes were identified by PCR. The expression of Cre recombinase was induced by intraperitoneal injection of tamoxifen at 4-5 weeks. Real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot were used to verify the knockout effect of CASK gene. **Results:** Twenty-eight male mice with CASK<sup>loxP/Y</sup> MIP-Cre genotype were obtained after 10-month cross-breeding. Genotype validated by PCR analysis were CASK<sup>loxP/Y</sup> MIP-Cre. The expression of CASK in islets decreased significantly in CASK<sup>loxP/Y</sup> MIP-Cre mice detected by real-time fluorescence quantitative PCR and Western blot. **Conclusion:** By using Cre-loxP recombination system, the mice model with conditionally CASK deleted in islets was successfully constructed, which provided a research platform for studying the role of CASK gene in the pathogenesis of diabetes mellitus.

**[Key words]** CASK; Cre-loxP recombination system; pancreatic β cell

[J Nanjing Med Univ, 2019, 39(09): 1274-1279, 1297]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81570734)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: wang\_yao100@163.com

com

糖尿病是以慢性高血糖为主要特征的一种全身性代谢紊乱综合征, 胰岛β细胞功能障碍是各种类型糖尿病发病机制的最终环节和共同特征<sup>[1-3]</sup>, 可

表现为胰岛素合成、分泌、作用等任何环节的异常。目前认为胰岛β细胞功能障碍的机制有糖毒性、脂毒性、胰岛炎症、内质网应激等,并涉及多个分子,如胰十二指肠同源盒基因-1(PDX-1)、转录因子 Forkhead box O1(FoxO1)、鼠胰岛素启动子元件3B结合蛋白(MafA)、促炎性细胞因子、葡萄糖转运蛋白2(GLUT-2)等<sup>[4-13]</sup>。其中高脂状态介导的内质网应激是2型糖尿病发生发展的重要因素,转录因子 FoxO1是介导胰岛β细胞内质网应激损伤的关键分子<sup>[14-17]</sup>。我们运用ChIP-DSL芯片技术筛选出189个FoxO1可能的下游靶基因,其中钙/钙调蛋白依赖性丝氨酸蛋白激酶(calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase, CASK)被证实是FoxO1的下游靶基因。

CASK是膜相关鸟苷酸激酶家族(membrane-associated guanylate kinase, MAGUK)中的一员<sup>[18]</sup>。在神经系统中研究较多,它具有参与细胞内外信号传递、细胞核内基因转录调控、神经递质转运和释放等功能<sup>[19-21]</sup>。胰岛素分泌过程与神经递质分泌过程有诸多相似之处<sup>[22]</sup>,而且在神经递质释放过程中发挥重要功能的蛋白在胰岛β细胞中也呈现高表达,如Mint-1、Munc18<sup>[23]</sup>和RhoGTP<sup>[24]</sup>等。我们的前期结果及国外研究表明,CASK在原代胰岛和胰岛β细胞系上高表达<sup>[25]</sup>,棕榈酸刺激INS-1细胞后CASK表达下降,过表达CASK可改善棕榈酸诱导的INS-1细胞胰岛素释放功能的损伤,干扰CASK表达可显著降低高浓度K<sup>+</sup>作用下的胰岛素分泌,同时减少胰岛素囊泡在细胞膜上的锚定数<sup>[26]</sup>,这些结果提示CASK很可能参与了胰岛素分泌过程。然而目前对CASK在代谢中作用的研究多集中在细胞和分子水平,为进一步了解CASK的作用,我们根据Cre/loxP系统原理,利用CASK纯合子(CASK<sup>loxP/loxP</sup>)小鼠和胰岛β细胞特异性表达Cre重组酶小鼠(简称MIP-Cre小鼠),构建可诱导性胰岛β细胞CASK基因敲除小鼠模型,为在整体动物水平研究CASK基因在胰岛β细胞中的作用及糖尿病的发病机制提供了研究平台。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

蛋白酶K(PTK, P2308, Sigma公司,美国), DNA Marker、Premix Taq(RR901)(TaKaRa公司,日本), 琼脂糖(BIOWEST, 南京森贝伽生物科技有限公司), EB替代物(Dured 220T85, 南京天为生物科技

有限公司); CASK抗体(Santa Cruz公司, 美国), GAPDH抗体(Cell Signaling Technology公司, 美国); V型胶原蛋白酶(C9263)、Histopaque(10771)(Sigma公司, 美国), Hank's平衡盐溶液(HBSS, 北京雷根根生物技术有限公司), 他莫昔芬(T5648)、玉米油(C8267)(Sigma公司, 美国)。PCR、qPCR引物均为上海捷瑞生物工程有限公司合成。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 条件性胰岛β细胞特异表达Cre重组酶小鼠

取B6.Cg-Tg(Ins1-Cre/ERT)1Lphi/J小鼠(简称MIP-Cre小鼠)的精子复苏(建模地点:美国Jackson公司, 来源为南京大学模式动物研究所), MIP-Cre转基因小鼠有随机整合和定点整合两种方式, 采用随机整合, 鉴定引物针对外源插入的Cre的基因序列, 因此不能区分杂合子和纯合子。第1批复苏后获得1只雌性阳性鼠, 由于过于弱小死亡, 随后进行第2批复苏, 获得6只小鼠, 4雄2雌, 其中3只为阳性鼠(2只雄性, 1只雌性)。

#### 1.2.2 CASK<sup>loxP/-</sup>小鼠

与广州赛业有限公司合作完成CASK杂合子(CASK<sup>loxP/-</sup>)小鼠的构建, 最初获得9只雌性杂合突变体小鼠(即loxP小鼠), 基因型为CASK<sup>loxP/-</sup>, 其中1只小鼠由于吃仔原因死亡, loxP小鼠在毛色、大小、体重等方面没有发现明显异常。

#### 1.2.3 小鼠的饲养和繁殖

将小鼠置于洁净的层流动物房内, 室内温度控制在20~25℃, 湿度控制在40%~70%, 12h光照、昼夜交替。将构建获得的8只雌性杂合突变体CASK<sup>loxP/-</sup>小鼠与野生型(C57BL/6, 南京医科大学实验动物中心)小鼠交配即净化, 得到20只净化后的小鼠(F0代), 由于CASK位于X染色体上, 雄性阳性小鼠即CASK半合子小鼠。其中5只小鼠为半合子, 基因型为CASK<sup>loxP/Y</sup>, 7只小鼠为杂合子, 基因型为CASK<sup>loxP/-</sup>, 其余均为野生型小鼠。然后再将CASK<sup>loxP/Y</sup>雄鼠与CASK<sup>loxP/-</sup>雌鼠交配, 繁殖出CASK<sup>loxP/loxP</sup>雌鼠、CASK<sup>loxP/Y</sup>雄鼠。另外将MIP-Cre小鼠和野生型(C57BL/6)小鼠进行交配繁殖, 扩大MIP-Cre小鼠的数量。按照上述配繁方案将loxP小鼠和MIP-Cre小鼠积极扩繁, 为后期实验稳定建系。动物实验经过南京医科大学伦理委员会审核。

#### 1.2.4 条件性胰岛β细胞CASK基因敲除小鼠的构建流程

基于Cre/loxP系统原理, 构建流程如下: 将MIP-Cre小鼠与CASK<sup>loxP/loxP</sup>小鼠进行杂交繁殖, 根据遗传

定律,子代可能的基因型有:CASK<sup>loxP/Y</sup>、CASK<sup>loxP/-</sup>、CASK<sup>loxP/Y</sup>MIP-Cre(CASK半合子表达Cre重组酶阳性小鼠)、CASK<sup>loxP/-</sup>MIP-Cre(CASK杂合子表达Cre重组酶阳性小鼠),CASK<sup>loxP/Y</sup>MIP-Cre基因型小鼠即为本实验所需要构建的模型小鼠。在小鼠胰岛β细胞中,在胰岛素与外源性他莫昔芬同时作用下可诱导Cre重组酶表达,Cre重组酶能有效切除两个LoxP位点间的序列。因此通过控制外源性注射他莫昔芬时间可获得不同周龄胰岛β细胞CASK基因敲除小鼠。

### 1.2.5 小鼠组织DNA的提取

剪约2 mm鼠尾放入100 μL PBS中,加入1 μL的蛋白酶K(PTK)(10 mg/mL),使其终浓度为0.1 mg/mL,65 °C过夜;95 °C 20 min水浴,然后离心1 min,转速为12 000 r/min,吸取上清移入新的EP管中,此即为DNA模板,保存于-20 °C备用。

### 1.2.6 PCR反应及琼脂糖电泳和成像分析

利用CASK基因和Cre基因的鼠特异性引物(表1)

进行PCR反应。CASK基因PCR反应体系(20 μL):PCRmixTaq 10 μL,上、下游引物各1 μL(引物浓度为10 μmol/L),模板DNA 2 μL,加灭菌蒸馏水补足体积。反应条件为:94 °C预变性3 min;94 °C变性30 s,60 °C退火35 s,72 °C延伸35 s,38个循环;最后72 °C延伸5 min,4 °C保存备用。Cre基因PCR反应体系(20 μL):PCRmixTaq 10 μL,Cre上、下游引物各1 μL(引物浓度为10 μmol/L)和模板DNA 2 μL,加灭菌蒸馏水补足体积。反应条件为:95 °C预变性5 min;95 °C变性30 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸40 s,35个循环;最后72 °C延伸5 min,4 °C保存备用。两种基因PCR反应终产物(10 μL/孔)进行1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统分析结果。

### 1.2.7 小鼠胰岛的分离提取

小鼠禁食过夜,麻醉后打开腹腔和胸腔,结扎胆总管,右心耳放血,将头皮针插入胆总管中注入胶原酶V,将充盈的胰腺组织分离;迅速放入预冷的50 mL灭菌离心管中,加入胶原酶V,37 °C水浴慢

表1 基因型鉴定引物信息  
Table 1 Primers for genotyping

基因名称	引物序列(5'→3')	扩增片段大小(bp)
INS1-CRE	上游:ATTTGGCCAGCTAAACATGCTT 下游:CCTGTTTTGCACGTTCCACCG	129
CASK	上游:GCTAAAGTCATCAGCCTATGTG 下游:GCAGTACAGAATGGAGAAGTCAA	272
CASK <sup>loxP/Y</sup> 或CASK <sup>loxP/loxP</sup>	上游:GCTAAAGTCATCAGCCTATGTG 下游:GCAGTACAGAATGGAGAAGTCAA	385

速振荡消化后,冰上终止胶原酶活性;涡旋直至组织呈泥沙状,加入2倍体积含10% FBS的HBSS,颠倒混匀终止消化后过筛;4 °C离心,沉淀中加入冰HBSS重悬;4 °C再次离心,沉淀中加入Histopaque-1077重悬;沿离心管管壁缓慢加入HBSS,4 °C离心后,迅速吸取HBSS与Histopaque-1077之间的夹层;放入预先加入消化终止液的6孔板中,在体式显微镜下反复挑拣完整胰岛。

### 1.2.8 胰岛β细胞CASK基因敲除小鼠敲除效果验证

在目的基因小鼠(CASK<sup>loxP/Y</sup>MIP-Cre, KO)和同窝对照WT小鼠(C57BL/6)出生1~2周后鼠尾提取DNA鉴定小鼠基因型,每组小鼠6~8只,4~5周龄时连续腹腔注射他莫昔芬(玉米油配制,浓度30 mg/mL,剂量为5 μL/kg)5 d,停药观察3~4周后处死小鼠,按照上述方法分离提取6~8只小鼠胰岛,提取RNA和总蛋白。按照常规qPCR、Western blot验证

CASK基因敲除效果。特异性引物序列见表2。

表2 QPCR引物信息  
Table 2 Primers for QPCR

基因名称	引物序列(5'→3')
actin	上游:GAACACGGCATTGTCCACCAACT 下游:GCCTGGATGGCTACGTACATG
CASK	上游:AAGGAGAAAATAAAGGTTGC 下游:GGAGGTAGGTTCTTCGGAG

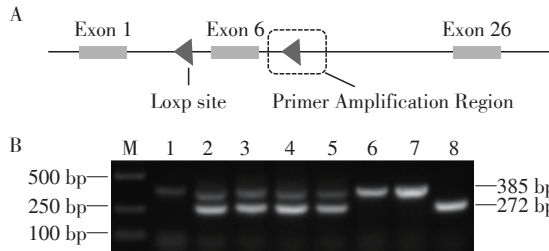
### 1.3 统计学方法

实时荧光定量PCR实验所得Ct值根据2<sup>-ΔΔCt</sup>计算,蛋白质印迹结果通过Image J软件半定量分析,所得数据均以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,利用GraphPad Prism7.0统计软件进行t test-unpaired分析,实验至少重复3次。P≤0.05为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CASK<sup>loxp/-</sup>、CASK<sup>loxp/loxp</sup>、CASK<sup>loxp/Y</sup>、MIP-Cre、CASK<sup>loxp/-</sup>MIP-Cre和CASK<sup>loxp/Y</sup>MIP-Cre小鼠繁殖及鉴定

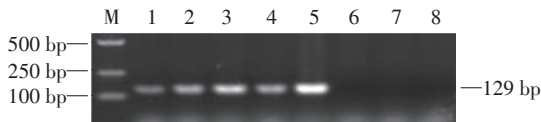
在获得CASK<sup>loxp/-</sup>杂合子小鼠后(图1A),与C57BL/6小鼠杂交,不断扩大CASK<sup>loxp/-</sup>小鼠、CASK<sup>loxp/Y</sup>小鼠数量,再将CASK<sup>loxp/-</sup>小鼠与CASK<sup>loxp/Y</sup>小鼠杂交,可获得的基因型有CASK<sup>loxp/-</sup>、CASK<sup>loxp/loxp</sup>、CASK<sup>loxp/Y</sup>和野生型(C57BL/6),子代小鼠皮肤及毛发均为黑色,部分子代小鼠基因型鉴定结果如图1B; MIP-Cre小鼠(黑色)和C57BL/6小鼠(黑色)杂交,可获得Cre重组酶阳性小鼠(MIP-Cre小鼠)和Cre重组酶阴性小鼠,部分子代小鼠基因型鉴定结果如图2;然后将CASK<sup>loxp/loxp</sup>雌鼠与MIP-Cre雄鼠杂交,可获得的基因型有CASK<sup>loxp/-</sup>、CASK<sup>loxp/Y</sup>、CASK<sup>loxp/-</sup>MIP-Cre和CASK<sup>loxp/Y</sup>MIP-Cre,部分子代小鼠基因型鉴定结果如图3。



A: CASK<sup>loxp/-</sup>小鼠的基因型示意图; B: 基因型鉴定结果; 1、6、7可见385 bp单一条带, 1为CASK<sup>loxp/Y</sup>半合子雄鼠, 6、7为CASK<sup>loxp/loxp</sup>纯合子雌鼠; 2、3、4、5可见272 bp和385 bp两个条带, 为CASK<sup>loxp/-</sup>杂合子雌鼠; 8可见272 bp单一条带, 为野生型小鼠; M为Marker。

图1 CASK<sup>loxp/loxp</sup>雌鼠、CASK<sup>loxp/-</sup>雌鼠、CASK<sup>loxp/Y</sup>雄鼠基因型鉴定

Figure 1 Genotyping results of CASK<sup>loxp/loxp</sup> female mice, CASK<sup>loxp/-</sup> female mice and CASK<sup>loxp/Y</sup> male mice



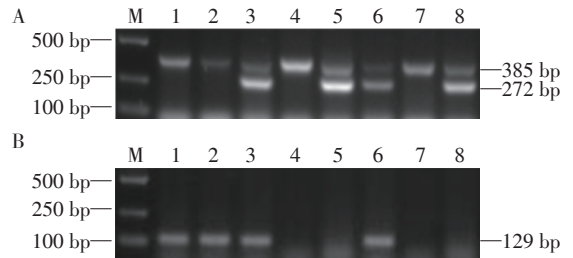
1、2、3、4、5: 可见129 bp单一条带, 为Cre重组酶阳性小鼠; 6、7、8: 无条带, 为Cre重组酶阴性小鼠; M: Marker。

图2 表达Cre重组酶小鼠基因型鉴定

Figure 2 Genotyping results of Cre recombinase mice

### 2.2 CASK基因敲除效果验证

KO小鼠胰岛中CASK mRNA表达水平明显低于WT小鼠(图4A), 差异有统计学意义( $P < 0.05$ ); KO小鼠胰岛中CASK蛋白表达水平较WT小鼠明显降低, 半定量分析结果显示敲除效率约64%(图4B)。同时提取KO小鼠和WT小鼠的肝、肾、大脑、

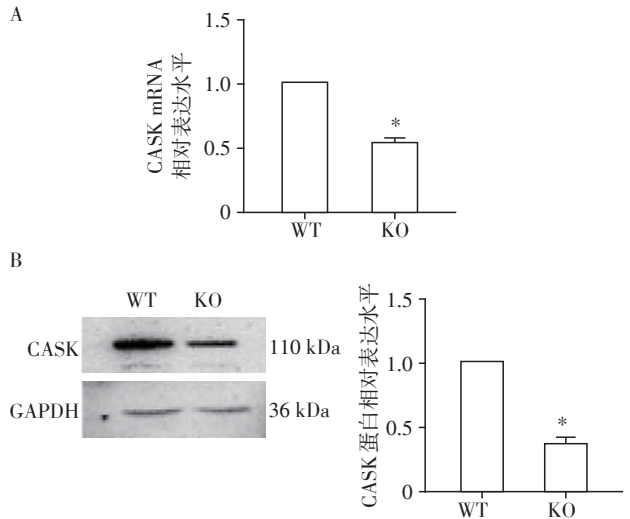


A: CASK<sup>loxp/Y</sup>基因型鉴定; B: Cre重组酶表达鉴定。1、2: CASK<sup>loxp/Y</sup>MIP-Cre雄鼠; 3、6: CASK<sup>loxp/-</sup>MIP-Cre雌鼠; 4、7: CASK<sup>loxp/Y</sup>雄鼠; 5、8: CASK<sup>loxp/-</sup>雌鼠; M: Marker。

图3 CASK<sup>loxp/-</sup>MIP-Cre雌鼠、CASK<sup>loxp/Y</sup>MIP-Cre雄鼠基因型鉴定

Figure 3 Genotyping results of the CASK<sup>loxp/-</sup>MIP-Cre female mice and CASK<sup>loxp/Y</sup>MIP-Cre male mice

下丘脑等组织蛋白进行Western blot检测, 发现KO小鼠和WT小鼠在肝、肾等其他组织中的CASK蛋白表达水平无明显差异(图5)。



A: KO小鼠胰岛的CASK mRNA表达检测; B: KO小鼠胰岛的CASK蛋白表达检测及半定量结果( $n=6\sim 8$ )。与WT小鼠比较, \* $P < 0.05$ 。

图4 CASK基因敲除效果验证

Figure 4 Validation of CASK gene knockout effect

### 2.3 KO小鼠的体重检测

对正常饮食的KO小鼠和WT小鼠的体重进行监测(4~8周), 结果显示KO小鼠与WT小鼠相比, 生长速度无明显差异(图6)。

## 3 讨论

CASK广泛表达于脑、肝、肌肉、脂肪和胰腺等组织中<sup>[27]</sup>, 多定位于邻近基底膜的细胞质中<sup>[28]</sup>。CASK基因在不同种属中大小不一, 人CASK基因长约

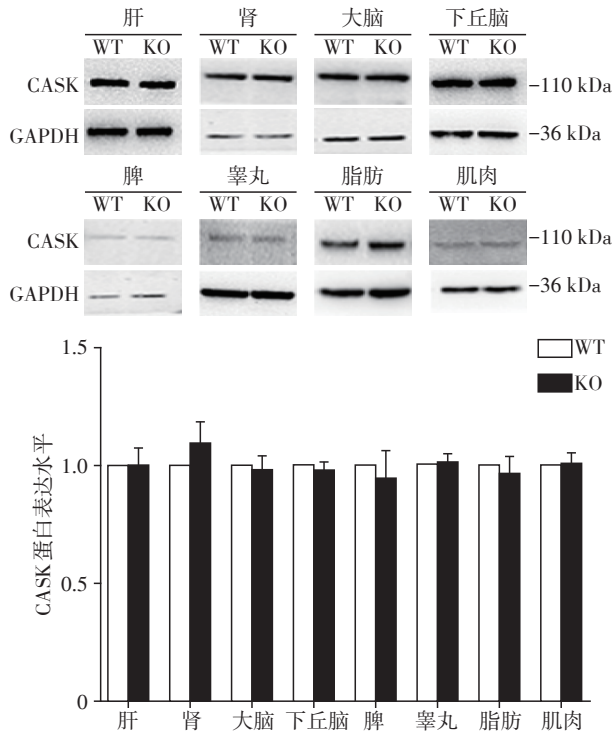


图5 小鼠各组织中的CASK蛋白表达

Figure 5 Expression of CASK protein in tissues of mouse

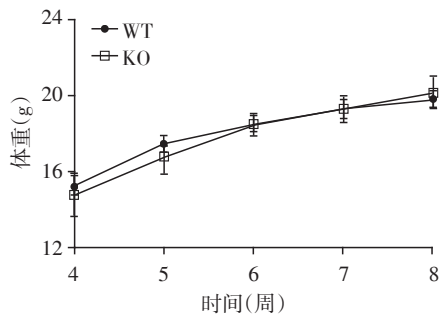


图6 WT和KO小鼠的体重检测

Figure 6 Detection of body weight in WT and KO mice

408 kb<sup>[29]</sup>,丝盘虫仅有8 kb<sup>[30]</sup>,普通狨猴可达458 kb<sup>[31]</sup>。CASK是一种多结构域蛋白,从N-端到C-端分别由钙调蛋白依赖激酶样结构域、两个L27结构域(LIN-2和LIN-7相互作用)、PDZ结构域(PSD-95-Dlg-ZO1)、SH3结构域、蛋白质4.1结合域及鸟苷酸激酶样结构域组成<sup>[21]</sup>。在神经系统中,CASK可通过其不同结构域与多种蛋白以及下游效应分子相互作用发挥不同功能<sup>[20-21]</sup>,如与胞外基质蛋白受体Sydecan-2和Sydecan-3结合发挥胞内外信号传递功能;与肌动蛋白结合,在神经元中起到稳定形态和参与神经递质囊泡运输和传递作用;还可以与Ca<sup>2+</sup>通道蛋白结合形成分子复合体,调控Ca<sup>2+</sup>内流和突触小泡中神经递质的释放<sup>[32]</sup>。神经细胞与胰腺内分泌细胞发

育通路高度相似<sup>[33]</sup>,胰岛β细胞分泌系统的作用模式与神经元也十分相近,都有囊泡成熟、转运、锚定、融合和释放过程<sup>[34-35]</sup>。目前研究表明,CASK是胰岛β细胞内质网应激损伤中关键分子FoxO1的下游靶基因,且CASK在胰岛β细胞中高表达并参与胰岛素分泌过程<sup>[25,36]</sup>,但目前对CASK在糖代谢及糖尿病中的研究多集中在体外培养的胰岛β细胞系及原代胰岛,缺乏整体动物水平上的研究,因此构建条件性胰岛β细胞CASK基因敲除小鼠模型对进一步深入研究CASK的功能极为重要。

本研究利用Cre/Loxp重组系统介导基因打靶的方法,旨在构建胰岛β细胞特异性CASK基因敲除小鼠模型,为深入研究CASK在胰岛β细胞和糖尿病发生发展中的作用奠定基础。小鼠胰岛qPCR、Western blot结果显示,KO小鼠与WT小鼠相比CASK表达明显减少,说明基因敲除成功。小鼠肝、肾等不同组织CASK表达的检测结果显示CASK在不同组织中均有表达,但表达水平不同,这与以往文献报道一致,KO小鼠与WT小鼠相比各组织CASK表达水平无明显差异,进一步说明基因敲除的特异性。此外,本研究利用的Cre小鼠是小鼠胰岛素I启动子调节的Cre重组酶小鼠(MIP-Cre小鼠),胰岛素I启动子在脑中并没有表达,避免了对脑组织中目的基因的敲除,且目前尚未有研究报道MIP-Cre小鼠本身存在糖代谢及胰岛表型异常,因此MIP-Cre小鼠具有广阔的应用前景。另外监测基因敲除鼠体重增长结果显示,该小鼠和正常野生型小鼠在生长速度方面无明显差异。

综上所述,本研究利用Cre/Loxp重组系统成功构建了条件性胰岛β细胞CASK基因敲除小鼠模型,该小鼠和正常野生型小鼠在生长速度方面无明显差异。这是国际上首次利用Cre/Loxp技术构建条件性胰岛β细胞CASK基因敲除小鼠模型,为深入研究CASK基因在糖尿病发生机制中扮演的角色提供了重要的动物模型。

[参考文献]

[1] Donath MY, Storling J, Maedler K, et al. Inflammatory mediators and islet beta-cell failure: a link between type 1 and type 2 diabetes[J]. J Mol Med (Berl), 2003, 81(8): 455-470

[2] Weir GC, Laybutt DR, Kaneto H, et al. Beta-cell adaptation and decompensation during the progression of diabetes[J]. Diabetes, 2001, 50(1): S154-S159

[3] Brownlee M. The pathobiology of diabetic complications -

- A unifying mechanism [J]. *Diabetes*, 2005, 54(6): 1615-1625
- [4] Thorens B, Wu YJ, Leahy JL, et al. The loss of GLUT2 expression by glucose-unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment [J]. *J Clin Invest*, 1992, 90(1): 77-85
- [5] Nesher R, Warwar N, Khan A, et al. Defective stimulus-secretion coupling in islets of psammomys obesus, an animal model for type 2 diabetes [J]. *Diabetes*, 2001, 50(2): 308-314
- [6] Harmon JS, Gleason CE, Tanaka Y, et al. *In vivo* prevention of hyperglycemia also prevents glucotoxic effects on PDX-1 and insulin gene expression [J]. *Diabetes*, 1999, 48(10): 1995-2000
- [7] Poitout V, Olson LK, Robertson RP. Chronic exposure of beta TC-6 cells to supraphysiologic concentrations of glucose decreases binding of the RIPE3b1 insulin gene transcription activator [J]. *J Clin Invest*, 1996, 97(4): 1041-1046
- [8] Lupi R, Dotta F, Marselli L, et al. Prolonged exposure to free fatty acids has cytostatic and pro-apoptotic effects on human pancreatic islets - evidence that beta-cell death is caspase mediated, partially dependent on ceramide pathway, and Bcl-2 regulated [J]. *Diabetes*, 2002, 51(5): 1437-1442
- [9] Lameloise N, Muzzin P, Prentki M, et al. Uncoupling protein 2: a possible link between fatty acid excess and impaired glucose-induced insulin secretion? [J]. *Diabetes*, 2001, 50(4): 803-809
- [10] Maedler K, Oberholzer J, Bucher P, et al. Monounsaturated fatty acids prevent the deleterious effects of palmitate and high glucose on human pancreatic beta-cell turnover and function [J]. *Diabetes*, 2003, 52(3): 726-733
- [11] Kawamori D, Kaneto H, Nakatani Y, et al. The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(2): 1091-1098
- [12] 陈玮, 殷荔, 缪爱梅, 等. 促炎性细胞因子对大鼠胰岛β细胞 miR-29 家族及抗凋亡蛋白表达水平的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(6): 787-792
- [13] 孙春涛, 薛丽华, 朱子阳, 等. IL-1β、TNF-α 和 IFN-γ 对小鼠胰岛β细胞中 lncRNA 表达谱的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2016, 36(7): 788-793
- [14] Tang ED, Nunez G, Barr FG, et al. Negative regulation of the forkhead transcription factor FKHR by Akt [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(24): 16741-16746
- [15] Martinez SC, Tanabe K, Cras-Méneur C, et al. Inhibition of Foxo1 protects pancreatic islet beta-cells against fatty acid and endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis [J]. *Diabetes*, 2008, 57(4): 846-859
- [16] Alikhani M, Maclellan CM, Raptis M, et al. Advanced glycation end products induce apoptosis in fibroblasts through activation of ROS, MAP kinases, and the FOXO1 transcription factor [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2007, 292(2): C850-C856
- [17] Kim DH, Kim JY, Yu BP, et al. The activation of NF-κB through Akt-induced FOXO1 phosphorylation during aging and its modulation by calorie restriction [J]. *Biogerontology*, 2008, 9(1): 33-47
- [18] Hsueh YP. The role of the MAGUK protein CASK in neural development and synaptic function [J]. *Curr Med Chem*, 2006, 13(16): 1915-1927
- [19] Martin JR, Ollo R. A new Drosophila Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase (Caki) is localized in the central nervous system and implicated in walking speed [J]. *EMBO J*, 1996, 15(8): 1865-1876
- [20] Hsueh YP, Yang FC, Kharazia V, et al. Direct interaction of CASK/LIN-2 and syndecan heparan sulfate proteoglycan and their overlapping distribution in neuronal synapses [J]. *J Cell Biol*, 1998, 142(1): 139-151
- [21] Hsueh YP, Sheng M. Regulated expression and subcellular localization of syndecan heparan sulfate proteoglycans and the syndecan-binding protein CASK/LIN-2 during rat brain development [J]. *J Neurosci*, 1999, 19(17): 7415-7425
- [22] Seino S, Shibasaki T. PKA-dependent and PKA-independent pathways for cAMP-regulated exocytosis [J]. *Physiol Rev*, 2005, 85(4): 1303-1342
- [23] Tomas A, Meda P, Regazzi R, et al. Munc 18-1 and granuphilin collaborate during insulin granule exocytosis [J]. *Traffic*, 2008, 9(5): 813-832
- [24] McMullan R, Hiley E, Morrison P, et al. Rho is a presynaptic activator of neurotransmitter release at pre-existing synapses in *C. elegans* [J]. *Genes Dev*, 2006, 20(1): 65-76
- [25] Suckow AT, Comoletti D, Waldrop MA, et al. Expression of neuroligin, neuroligin, and their cytoplasmic binding partners in the pancreatic beta-cells and the involvement of neuroligin in insulin secretion [J]. *Endocrinology*, 2008, 149(12): 6006-6017
- [26] Wang Y, Lin HY, Hao NA, et al. Forkhead box O1 mediates defects in palmitate-induced insulin granule exocytosis by downregulation of calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase expression in INS-1 cells [J]. *Diabetologia*, 2015, 58(6): 1272-1281
- [27] Cohen AR, Woods DF, Marfatia SM, et al. Human CASK/

- mized mice [J]. *Neurobiol Aging*, 2015, 36(2): 993-1006
- [6] Kim YN, Choe SR, Cho KH, et al. Resveratrol suppresses breast cancer cell invasion by inactivating a RhoA/YAP signaling axis [J]. *Exp Mol Med*, 2017, 49(2): e296
- [7] 李慧. 白藜芦醇下调 Cyclin 家族表达调节皮肤癌 HS-4 细胞的增殖 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(8): 1802-1804
- [8] 李运红, 陈敏, 邹晓平, 等. 白藜芦醇对胃腺癌细胞株增殖和凋亡的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2011, 31(8): 1192-1195, 1211
- [9] 劳玲娟, 宋新江, 徐佳. PTEN 在白藜芦醇对体外直肠癌细胞生长和凋亡的影响 [J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(9): 1730-1735
- [10] 刘晓明, 朱智伟, 王刚, 等. 白藜芦醇通过抑制膀胱癌细胞的糖代谢增强顺铂的抗肿瘤活性 [J]. *中国现代应用药理学*, 2016, 33(10): 1262-1267
- [11] 董成龙, 游娜, 许向红, 等. 白藜芦醇对人甲状腺乳头状癌 IHH4 细胞增殖和凋亡的影响 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2015, 35(8): 1096-1103
- [12] 何蕾, 倪敏, 樊志敏. 虎杖提取物白藜芦醇抗肿瘤机制的研究进展 [J]. *中医药导报*, 2017, 23(08): 40-43
- [13] 杨梦祺, 刘盼盼, 黄蓬. 肿瘤氧化还原代谢与干预 [J]. *中国生化药物杂志*, 2016, 36(9): 16-23
- [14] Emilia JM, Wenzel U, Daniel H, et al. Resveratrol induces apoptosis through ROS-dependent mitochondria pathway in HT-29 human colorectal carcinoma cells [J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56(12): 4813-4818
- [15] 周珏, 陈丹丹, 王炳昕, 等. 水飞蓟宾通过诱导活性氮生成增多介导人表皮癌 A431 细胞死亡 [J]. *沈阳药科大学学报*, 2016, 33(10): 807-813
- [收稿日期] 2019-01-05

(上接第 1279 页)

- LIN-2 binds syndecan-2 and protein 4.1 and localizes to the basolateral membrane of epithelial cells [J]. *J Cell Biol*, 1998, 142(1): 129-138
- [28] Blair HJ, Reed V, Gormally E, et al. Positioning of five genes (CASK, ARX, SAT, IMAGE cDNAs 248928 and 253949) from the human X chromosome short arm with respect to evolutionary breakpoints on the mouse X chromosome [J]. *Mamm Genome*, 2000, 11(8): 710-712
- [29] Venter JC, Smith HO, Adams MD. The sequence of the human genome [J]. *Clin Chem*, 2015, 61(9): 1207-1208
- [30] Stevenson D, Laverty HG, Wenwieser S, et al. Mapping and expression analysis of the human CASK gene [J]. *Mamm Genome*, 2000, 11(10): 934-937
- [31] Laconte L, Mukherjee K. Structural constraints and functional divergences in CASK evolution [J]. *Biochem Soc Trans*, 2013, 41(4): 1017-1022
- [32] Najm J, Horn D, Wimplinger I, et al. Mutations of CASK cause an X-linked brain malformation phenotype with microcephaly and hypoplasia of the brainstem and cerebellum [J]. *Nat Genet*, 2008, 40(9): 1065-1067
- [33] Hori Y, Gu X, Xie X, et al. Differentiation of insulin-producing cells from human neural progenitor cells [J]. *PLoS Med*, 2005, 2(4): e103
- [34] Fujimoto K, Shibasaki T, Yokoi N, et al. Piccolo, a Ca<sup>2+</sup> sensor in pancreatic beta-cells. Involvement of cAMP-GEFII.Rim2. Piccolo complex in cAMP-dependent exocytosis [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(52): 50497-50502
- [35] Ohara - Imaizumi M, Ohtsuka T, Matsushima S, et al. ELKS, a protein structurally related to the active zone-associated protein CAST, is expressed in pancreatic beta cells and functions in insulin exocytosis: interaction of ELKS with exocytotic machinery analyzed by total internal reflection fluorescence microscopy [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16(7): 3289-3300
- [36] Zhu ZQ, Wang D, Xiang D, et al. Calcium/calmodulin-dependent serine protein kinase is involved in exendin-4-induced insulin secretion in INS-1 cells [J]. *Metabolism*, 2014, 63(1): 120-126
- [收稿日期] 2018-12-26