

文章编号 1006-8147(2021)05-0492-04

论 著

# 利用基因打靶技术构建血管内皮特异性 *Stk24/25* 双基因敲除小鼠

高睿, 郑祥建

(天津医科大学基础医学院药理学系, 天津 300070)

**摘要** 目的: 构建 *Stk24/25* 双基因敲除小鼠模型, 并对其基因型及敲除效率进行测定。方法: 使用基因打靶技术构建基因敲除小鼠, 利用 PCR 及凝胶电泳技术对亲代及子代小鼠进行基因型鉴定; 并利用 RT-qPCR 测定目的基因在小脑血管内皮细胞中 mRNA 转录水平的表达情况。结果: 通过 PCR 技术成功检测出小鼠子代基因型 *Cdh5cre<sup>+</sup>/Stk24<sup>fl/fl</sup>/Stk25<sup>fl/fl</sup>* 纯合子小鼠, 经鉴定血管内皮基因敲除 *Stk24*、*Stk25* 后表达量分别下降了 27% ( $t=2.874, P=0.0207$ ) 和 30% ( $t=17.21, P<0.001$ )。结论: 采用基因打靶技术成功构建了 *Stk24/25* 双基因敲除小鼠。

**关键词** 基因打靶; 脑血管内皮细胞; *Stk24*; *Stk25*

中图分类号 Q7

文献标志码 A

## Establishment of a mouse model with endothelial-specific *Stk24/25* knockout with gene targeting technique

GAO Rui, ZHENG Xiang-jian

(Department of Pharmacology, School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract Objective:** To generate endothelial specific *Stk24* and *Stk25* gene-knockout mice using gene targeting technology, and identify the genotype and the knockout efficiency of *Stk24/25* mouse strains. **Methods:** Gene knockout mice were established with gene targeting technology. The genotypes of mouse were identified by PCR and gel electrophoresis. The expression of target mRNA in cerebellum endothelial cells was detected by RT-qPCR. **Results:** The genotypes of the mice were successfully identified by PCR, including *Cdh5cre<sup>+</sup>-Stk24<sup>fl/fl</sup>-Stk25<sup>fl/fl</sup>* mice. The expression level of *Stk24*, *Stk25* mRNA in the cerebellum endothelial cells of *Stk24/25* gene knockout mice significantly reduced by 27% ( $t=2.874, P=0.0207$ ) and 30% ( $t=17.21, P<0.001$ ), respectively. **Conclusion:** The mouse models with endothelial specific *Stk24/25* gene knockout are successfully established by using gene targeting technique.

**Key words** gene targeting; cerebrovascular endothelial cells; *Stk24*; *Stk25*

生发中心激酶 III (GCK III) 是 Sterile 20 家族蛋白亚群, 包括 *STK24*、*STK25*、*MST4*。它们在控制细胞周期、细胞凋亡、细胞迁移及黏附等过程中发挥重要作用。近几年, GCK III 复合物被报道与很多临床疾病相关, 包括海绵状脑血管畸形 (CCM) [1]。CCM 是较为常见的脑血管疾病, 可引起卒中、头痛、癫痫、脑出血, 其致病基因为 *CCM1*、*CCM2*、*CCM3*。在结构上, *CCM3* 通过其 N-末端二聚化结构域结合 GCK III, 并且招募其他 CCM 相关基因 (*CCM2*、*CCM1*) 形成完整的复合体, 在 CCM 病理生理中起到不可或缺的作用 [2-3]。*STK24*、*STK25*、*MST4* 是 CCM 致病基因的下流, 在斑马鱼模型中敲除 *Stk24* 和 *Stk25* 基因后会与 CCM3 相似的心血管表型 [4-5]。本研究致力于构建血管内皮特异性 *Stk24* 和 *Stk25* 双基因敲除小鼠, 为 *Stk24*、*Stk25* 基因敲除小鼠作为 CCM 疾病模型, 进一步探讨 CCM 致病通路提供坚实基础。

作者简介 高睿 (1994-), 女, 硕士在读, 研究方向: 药理学; 通信作者: 郑祥建, E-mail: zxj88@hotmail.com。

## 1 材料及方法

1.1 实验动物 *Cdh5creErt2* 工具鼠来自 Ralf Adams 实验室, *Stk24<sup>fl/fl</sup>* 小鼠由上海模式生物科技公司定制, *Stk25<sup>fl/fl</sup>* 小鼠由本实验室构建制备。实验过程中对小鼠的处置按照中华人民共和国科学技术委员会颁布的《实验动物管理条例》相关规定进行, 符合动物伦理学管理要求。伦理批号: 2017022501。

小鼠的饲养繁殖均在天津医科大学实验动物中心 SPF 级动物房中。屏障内环境均符合国家对实验动物环境设施的要求, 温度: 20℃~26℃; 相对湿度: 40%~70%; 12 h/12 h 循环光照; 垫料、笼器具均进行高压真空灭菌, 达到纯净无菌要求, 动物采用自由饮水进食的方式; 鼠笼的垫料隔天更换 1 次, 保证小鼠居住环境的洁净度。

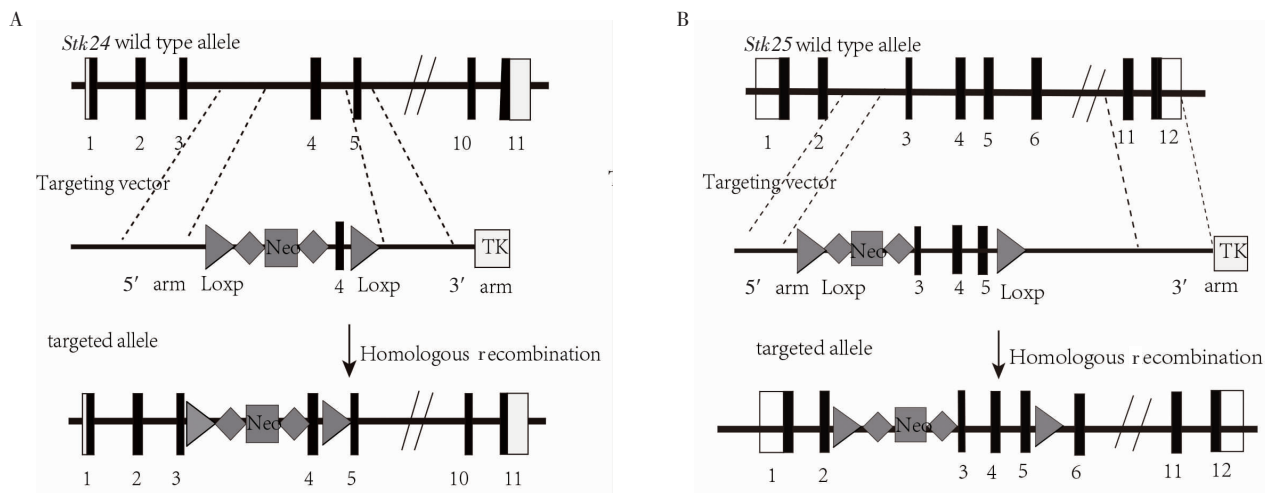
1.2 主要试剂 TRIzol™ 试剂 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司), 2X GoTaq master Mix (Promega), 琼脂糖 (北京索莱宝科技有限公司), DNA 分子量标准指示剂 (思科捷), 实时定量 qPCR mix (Genstar),

cDNA 逆转录试剂盒 (genstar) 血管内皮特异磁珠 (Miltenyi), 胶原酶 IV (sigma 公司)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 基因打靶构建基因工程小鼠** 利用基因打靶技术分别构建 *Stk24*、*Stk25* 转基因小鼠。首先在 Ensembl 基因库分析目标基因 *Stk24* 和 *Stk25*。最终选定 4 号外显子作为 *Stk24* 的目标靶点, 3、4、5 号外

显子作为 *Stk25* 的目标靶点, 并且在 3' 和 5' 端适当位置插入 loxp 位点, 如图 1 所示, 由此构建目标基因载体。随后在 ES 细胞达到指数增长时期时, 使用电击法将目标基因载体转到 ES 细胞中, 完成阳性筛选后将阳性克隆注射入小鼠受精卵中, 得到 F0 代基因工程小鼠, 如图 2。进一步将 *Stk24*、*Stk25* 基因敲除小鼠进行杂交, 得到两种基因同步敲除的小鼠。



注: A: 选取 *Stk24* 野生型等位基因 4 号外显子为目的片段, 构建目的基因载体; B: 选取 *Stk25* 野生型等位基因 3、4、5 号外显子为目的片段, 构建目的基因载体; Wild type allele: 野生型等位基因; Targeting vector: 打靶载体; Targeted allele: 靶向等位基因; Neo removed: Neo 基因去除; Homologous recombination: 同源重组

图 1 *Stk24* 以及 *Stk25* 打靶基因载体构建示意图

Fig 1 Construction of vector of *Stk24* and *Stk25* target gene

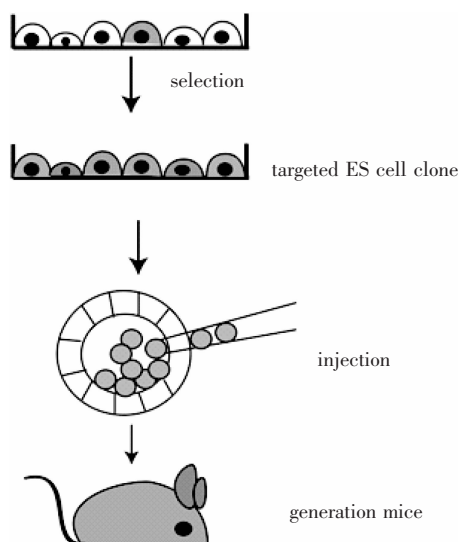


图 2 显微注射原理图

Fig 2 Schematic diagram of microinjection

**1.3.2 小鼠基因型鉴定** 以剪掉小鼠脚趾的方式进行编号, 随后对小鼠基因型进一步鉴定。将小鼠组织块放入对应编号的 1.5 mL EP 管内, 加入 75  $\mu$ L 鼠尾裂解液, 离心, 确保小鼠组织块已沉入管底, 95 $^{\circ}$ C 水浴 30 min 后加入 75  $\mu$ L 中和液。随后取 2  $\mu$ L 作为 DNA 模板进行 PCR 扩增, 反应体系以及 PCR 程序

设定如下。反应体系为 2  $\mu$ L DNA 模板, 正向反向引物各 0.5  $\mu$ L, 水 3  $\mu$ L, GOtaq mix 5  $\mu$ L。PCR 仪反应程序如下: 预变性: 94 $^{\circ}$ C, 5 min; 变性: 94 $^{\circ}$ C, 30 s; 退火: 60 $^{\circ}$ C, 30 s; 延伸: 72 $^{\circ}$ C, 40 s。变性, 退火, 延伸为 32 个循环; 延伸: 72 $^{\circ}$ C, 10 min。扩增产物用 2.5% 的琼脂糖凝胶进行凝胶电泳, 根据条带长度来鉴定小鼠基因型。鉴定引物详见表 1。

**1.3.3 出生后小鼠诱导基因敲除** 在幼鼠出生后第 2 天使用 4-羟基他莫昔芬诱导, 确保喂养良好, 小鼠幼崽采用侧卧位, 左手抓取, 暴露出白色奶水充盈的胃部。此时使用 1 mL 胰岛素注射器经小鼠胃部注射, 快速进针, 深度约为 0.5 cm, 剂量为 0.025 mg/g。停留 30 s 左右, 慢慢将针移出, 用酒精擦去少量溢出的液体, 将注射完毕后的鼠放入母鼠身边, 并向笼内加入瓜子安抚母鼠。于出生后第 6 天检测目的基因诱导敲除情况。

**1.3.4 分离小鼠脑血管内皮细胞** 将小鼠麻醉后, 充分暴露下腔静脉以及心腔, 剪断下腔静脉的同时从左心室缓缓注入 PBS 溶液充分灌流, 尽量冲走组织内循环的血液。剖开小鼠颅骨, 将小脑剪碎研磨, 并加入配置好的胶原酶 IV 在 37 $^{\circ}$ C 水浴使组织充分

表 1 小鼠基因型鉴定引物序列

Tab 1 DNA identification primer sequences of mice

基因	引物	引物类型	引物序列(5'→3')	产物(bp)
<i>Cdh5cre</i>	Primer I	突变型上游引物	GAACCTGATGGACATGTTTCAGGGA	目的条带:500
	Primer II	突变型下游引物	ATTCTCCCACCGTCAGTACG	
<i>Stk24</i>	Primer I	上游引物	CCGTGGACACAGGGACAAGTA	野生型条带:250
	Primer II	下游引物	GAGGGAGCAGAAACAGCCAGA	目的条带:200
<i>Stk25</i>	Primer I	上游引物	GTGGAGCCTAGTAGATTGTGCT	野生型条带:300
	Primer II	下游引物	CCACACACTGCTCCTGCTTTGT	目的条带:350

消化,离心重悬过 70 μmol/L 筛,重悬后与血管内皮特异性磁珠在 4℃进行孵育,利用磁珠的特异性结合作用筛选出小鼠小脑血管内皮细胞。选择将两对对照组小鼠和两对基因敲除小鼠的小脑内皮细胞合并。以上实验共重复 5 次,产生 5 组实验数据。

1.3.5 RNA 提取 加入 Tizol 迅速裂解组织后,静置使细胞充分裂解,加入氯仿,震荡离心后将试管 45°倾斜取上清,加入异丙醇混匀孵育后离心,弃掉上清,使用 75%乙醇清洗沉淀,离心后,晾干加入适量水溶解。

1.3.6 mRNA 水平检测 得到小脑血管内皮细胞 RNA 后,测定 RNA 浓度,利用逆转录试剂盒经 PCR 仪逆转录后得到 cDNA,随后进行 RT-qPCR,对 mRNA 表达水平进行分析。引物信息见表 2。

表 2 RT-qPCR 引物

Tab 2 RT-qPCR primer sequences

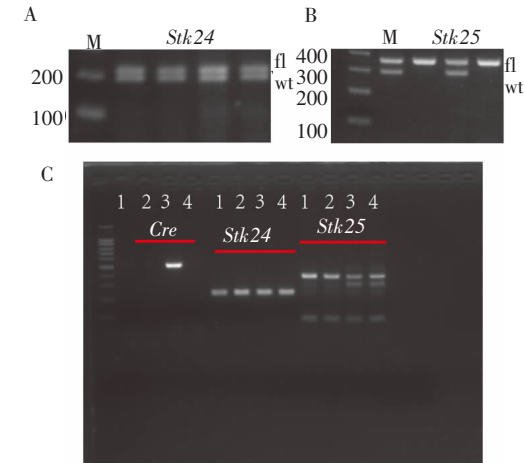
基因	引物	引物类型	引物序列(5'→3')
<i>Gapdh</i>	P1	上游引物	GTCCCGTAGACAAAATGGTGA
	P2	下游引物	TTTGATGTTAGTGGGTCTCG
<i>Stk24</i>	P1	上游引物	CAGCTGACGGATACCCAGATC
	P2	下游引物	GTAGTTCCCTTCCAGTGTGGG
<i>Stk25</i>	P1	上游引物	CTGCACTGGACTTGCTGAAAC
	P2	下游引物	GGACCAGATGTCAGCCTTGAA
<i>Mst4</i>	P1	上游引物	CATTGGATCTTCTGCGTGCTG
	P2	下游引物	CCAAAACGGAGTCCCTACGAA

1.5 统计学处理 RT-qPCR 结果采用 Graph Prism 软件进行分析。数据呈现正态分布,并采用非配对 *t* 检验来确定统计学意义。*P*<0.05 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠基因型鉴定结果 通过 PCR 检测 loxp 位点,*stk24* 野生型条带位置在 200 bp,目的条带在 250 bp。*Stk25* 野生型条带位置在 300 bp,目的条带在 400 bp。*Cdh5cre* 位点为 500 bp 的阳性条带。因此使用 *Cdh5cre*<sup>+</sup>/*Stk24*<sup>fl/+</sup>/*Stk25*<sup>fl/+</sup> 雄鼠与 *Stk24*<sup>fl/fl</sup>/*Stk25*<sup>fl/fl</sup> 雌鼠杂交,可以初步得到 *Cdh5cre*<sup>+</sup>/*Stk24*<sup>fl/+</sup>/*Stk25*<sup>fl/fl</sup> 目的小鼠。下一步利用 *Cdh5cre*<sup>+</sup>/*Stk24*<sup>fl/+</sup>/*Stk25*<sup>fl/fl</sup> 与 *Stk24*<sup>fl/fl</sup>/*Stk25*<sup>fl/fl</sup> 进一步杂交,可得到 *Cdh5cre*<sup>+</sup>

/*Stk24*<sup>fl/fl</sup>/*Stk25*<sup>fl/fl</sup>,见图 3。

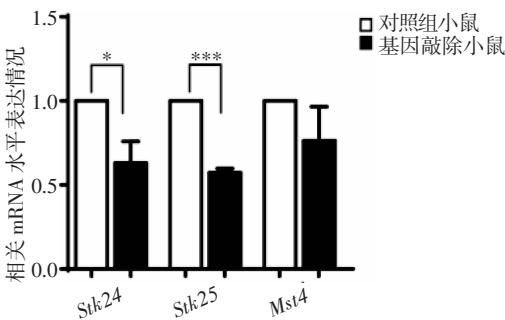


注:M 表示 marker,A、B 为 *Stk24*、*Stk25* 以及 *Cdh5cre* 基因的 目的基因条带和野生型条带位置;C 为 *Cdh5cre*<sup>+</sup>/*Stk24*<sup>fl/+</sup>/*Stk25*<sup>fl/+</sup> 雄鼠与 *Stk24*<sup>fl/fl</sup>/*Stk25*<sup>fl/fl</sup> 雌鼠杂交后代的鉴定电泳图;序号为子代小鼠编号,3 号小鼠基因型为 *Cdh5cre*<sup>+</sup>/*Stk24*<sup>fl/+</sup>/*Stk25*<sup>fl/fl</sup>

图 3 *Stk24*、*Stk25* 条件性敲除小鼠基因型鉴定电泳图

Fig 3 Electrophoretogram for genotyping of *Stk24* and *Stk25* conditional knockout mice

2.2 转录水平验证 *Stk24*、*Stk25* 基因敲除 通过对 5 组实验结果的统计学分析发现,分别与对照组相比,诱导后血管内皮特异性敲除小鼠 *Stk24* 和 *Stk25* 的敲除效率分别为 27% (*t*=2.84, *P*=0.0207) 和 30% (*t*=17.21, *P*<0.001),而同为 GCKⅢ 蛋白家族的 *Mst4* 基因表达量差异没有统计学意义。见图 4。



注:*Stk24*:*t*=2.874;*Stk25*:*t*=17.21;\**P*<0.05;\*\*\**P*<0.001

图 4 小鼠小脑血管内皮细胞中相关基因 mRNA 表达情况

Fig 4 Relative mRNA expression in endothelial cells of cerebellum in mice

### 3 讨论

CCM 是一种显性遗传疾病,患者首发症状通常为癫痫、头痛、反复发作的脑出血,严重影响患者生活质量<sup>[6]</sup>。近年来,随着对海绵状畸形疾病研究逐渐明朗,研究者发现其致病基因主要由 *CCM1*、*CCM2*、*CCM3* 基因构成,一般情况下 3 种基因形成一个完整的复合体,进而对下游丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(MEKK)3 通路起到抑制作用<sup>[7-8]</sup>。一旦其中基因发生突变,对 MEKK3 的抑制作用消失,转而激活 MEKK3 及其下游基因,使正常血管形态发生改变,出现静脉瘤样病理表现<sup>[9]</sup>。

有研究报道,*CCM3* 可与 Sterile-20 样激酶的 GCK III 亚家族成员结合,在果蝇模型中,GCK III 和 *CCM3* 基因的缺失对果蝇气管发育具有相同的影响<sup>[10]</sup>。先前研究发现,在斑马鱼模型中敲除 *Stk24* 和 *Stk25* 也同样导致斑马鱼心脏变大,心包积液等严重心脏表型,与 *CCM* 基因敲除后的表型基本一致<sup>[11]</sup>。为进一步验证 GCK III 蛋白家族 *Stk24* 和 *Stk25* 在哺乳动物体内的作用,笔者利用基因打靶技术构建了 *Stk24/Stk25* 双基因敲除小鼠模型。基因敲除小鼠作为疾病研究的重要模型动物,可模拟疾病的发生、发展,在疾病的机制研究中起重要作用。因此构建血管内皮特异性 *Stk24* 和 *Stk25* 双基因敲除小鼠,对 *CCM* 致病通路以及血管发育的研究起到至关重要的作用。本研究成功繁育出目的基因敲除小鼠,并对其进行基因型鉴定以及 mRNA 水平敲除效率验证,确认成功构建出血管内皮细胞特异性 *Stk24/Stk25* 敲除小鼠。通过对基因敲除小鼠的生长繁殖情况进行观察,笔者发现其与野生型小鼠具有相同的繁殖能力,并且子代状态良好。综上,本研究通过基因打靶技术成功构建了 *Stk24/Stk25* 双基因敲除小鼠,为进一步研究海绵状脑血管畸形致病机制以

及相关药物筛选提供了较好的动物模型。

#### 参考文献:

- [1] DRAHEIMK M, LI X, ZHANG R, et al. CCM2-CCM3 interaction stabilizes their protein expression and permits endothelial network formation[J]. J Cell Biol, 2015, 208(7): 987
- [2] WANG K, ZHOU H J, WANG M. CCM3 and cerebral cavernous malformation disease[J]. Stroke Vasc Neurol, 2019, 4(2): 67
- [3] DRAHEIM K M, FISHER O S, BOGGON T J, et al. Cerebral cavernous malformation proteins at a glance[J]. J Cell Sci, 2014, 127(4): 701
- [4] ZHOU Z, TANG A T, WONG W Y, et al. Cerebral cavernous malformations arise from endothelial gain of MEKK3-KLF2/4 signalling[J]. Nature, 2016, 532(7597): 122
- [5] ZHENG X, XU C, DI LORENZO A, et al. CCM3 signaling through sterile 20-like kinases plays an essential role during zebrafish cardiovascular development and cerebral cavernous malformations[J]. JCI, 2010, 120(8): 2795
- [6] BARANOSKI J F, KALANI M Y, PRZYBYLOWSKI C J, et al. Cerebral cavernous malformations: review of the genetic and protein-protein interactions resulting in disease pathogenesis[J]. Front Surg, 2016, 3(60): 11
- [7] LANT B, YU B, GOUDREAULT M, et al. CCM-3/STRIPAK promotes seamless tube extension through endocytic recycling[J]. Nat Commun, 2015, 6(6449): 248
- [8] HWANG J, PALLAS D C. STRIPAK complexes: structure, biological function, and involvement in human diseases[J]. Int J Biochem Cell B, 2014, 47(118): 48
- [9] ZHOU Z, RAWNSLEY D R, Goddard L M, et al. The cerebral cavernous malformation pathway controls cardiac development via regulation of endocardial MEKK3 signaling and KLF expression[J]. Dev Cell, 2015, 32(2): 168
- [10] MADSEN C D, HOOPER S, TOZLUOGLU M, et al. STRIPAK components determine mode of cancer cell migration and metastasis[J]. Nat Cell Biol, 2015, 17(1): 68
- [11] ROSEN J N, SOGAH V M, YE L Y, et al. CCM2-like is required for cardiovascular development as a novel component of the Heg-CCM pathway[J]. Dev Biol, 2013, 376(1): 74

(2021-01-20 收稿)