

· 综 述 ·

基因敲除技术及其在研究线粒体动力学与胰岛素抵抗关系中的应用进展

徐佳¹, 关越琪¹, 于芷懿¹, 张成帅², 关凤英¹, 刘芬¹

1 吉林大学 基础医学院, 吉林 长春 130021

2 吉林大学 临床医学院, 吉林 长春 130021

徐佳, 关越琪, 于芷懿, 等. 基因敲除技术及其在研究线粒体动力学与胰岛素抵抗关系中的应用进展. 生物工程学报, 2019, 35(8): 1382–1390.

Xu J, Guan YQ, Yu ZY, et al. Gene knockout technology and its application in the study of the relationship between mitochondrial dynamics and insulin resistance. Chin J Biotech, 2019, 35(8): 1382–1390.

摘 要: 线粒体动力学即线粒体融合和分裂保持动态平衡的过程, 该过程由融合/分裂相关蛋白精确调控完成, 对于线粒体代谢、质量和功能有着重要的生理意义, 而这些蛋白发生异常可引发线粒体动力学失衡, 进而引起线粒体功能障碍并引发各种疾病状态。文中围绕基因敲除技术, 详细阐述了编码融合/分裂相关蛋白的基因敲除鼠在胰岛素抵抗研究工作中的作用及应用进展, 以期为今后研究线粒体动力学失衡致胰岛素抵抗的信号转导机制奠定基础。

关键词: 基因敲除技术, 线粒体动力学, 胰岛素抵抗

Gene knockout technology and its application in the study of the relationship between mitochondrial dynamics and insulin resistance

Jia Xu¹, Yueqi Guan¹, Zhiyi Yu¹, Chengshuai Zhang², Fengying Guan¹, and Fen Liu¹

1 College of Basic Medical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China

2 College of Clinical Sciences, Jilin University, Changchun 130021, Jilin, China

Abstract: Mitochondrial dynamics, the processes of mitochondrial fusion and fission maintain homeostasis, are precisely regulated by fusion/fission-related proteins, and play an important physiological role in mitochondrial metabolism, quality and function. The aberrant changes of these proteins can trigger mitochondrial dynamics imbalance, which cause mitochondrial dysfunctions and result various disease states. This article focuses on gene knockout technology, and reviews the role and application progress of genes encoding for fusion and fission knockout mice in insulin resistance researches, in order to lay a

Received: April 3, 2019; **Accepted:** June 10, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 81503122).

Corresponding author: Fen Liu. Tel: +86-431-85619754; E-mail: liufen@jlu.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 81503122) 资助。

网络出版时间: 2019-06-27

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190627.1023.001.html>

foundation for future studies on signal transduction mechanism of mitochondrial dynamics imbalance in insulin resistance.

Keywords: gene knockout technology, mitochondrial dynamics, insulin resistance

基因敲除在 20 世纪 80 年代后期出现,是指通过特定的措施使生物体内特定的基因失活或缺失的基因重组技术。一般而言,基因敲除是依据 DNA 同源重组的原理,用设计的同源序列替换靶基因序列进而达到敲除的目的^[1]。

近 20 年来,随着对分子生物学实验技术的需求不断加强,位点特异性重组 (Site-specific recombination) 技术的发展也日渐兴盛,它是目前基因敲除技术中应用最方便和广泛的一项技术。该项技术利用位点特异性重组酶 (Site-specific recombinase, SSR) 对特异性位点 (Secombination target site, RTS) 识别,在基因组上完成外源基因的倒置、置换和删除等操作,具有重组效率高、靶向性好、操作简单、重复性好等优点^[2],目前广泛应用于实验动物领域,主要通过干预目的基因进行相关疾病发病机制及治疗的研究^[3]。本文拟从基因敲除技术的发展、线粒体动力学与胰岛素抵抗关系的研究进展及基因敲除鼠在胰岛素抵抗中的研究进展三方面进行综述。

1 位点特异性重组系统在实验动物研究中的发展

位点特异性重组系统通常由 SSR 及 RTS 两种组分构成。在研究比较成熟的 SSR 系统中,按照 SSR 序列的同源性可分成两个家族:酪氨酸家族和丝氨酸家族。其中来自酪氨酸家族的 Cre/lox P、FLP/FRT 和 Dre/Rox 是目前研究最深入应用最广泛的位点特异性重组系统^[4]。

1.1 Cre/lox P 系统

Cre (Causes recombination) 重组酶于 1981 年从 P1 噬菌体中发现,编码由 343 个氨基酸组成的 38 kDa 单体蛋白^[5]。它具备一定的催化活性,并且类似于限制性核酸内切酶,识别的特异性位点

称为 lox P,能同时使 2 个 lox P 位点间的基因特异性缺失。lox P 的长度为 34 bp,由 2 个 13 bp 的反向回文序列和 1 个 8 bp 核心序列组成。Cre 重组酶具有高达 70% 的重组效率,并且可作用于各种结构的 DNA 底物(如环状、线性甚至超螺旋 DNA)而不需要额外的重组辅助因子^[6],因此它被公认为是基因组工程的最佳 SSR。目前正在研究和开发各种类型的 Cre,例如与荧光分子融合的荧光 Cre、经过优化的高表达 Cre 和在 N-末端和 C-末端具有不同启动子的 Cre。1998 年 Sauer 和 Henderson 创建了表达 Cre 的小鼠细胞系,并提示由 Cre 介导的位点特异性重组发生在小鼠体内,表明原核 Cre/lox P 系统可在哺乳动物细胞中起作用,是一种强大的哺乳动物基因编辑技术^[7]。

这一系统操作非常简单,在待敲除的一段目的基因序列的侧翼各设置 1 个 lox P 序列,经过 Cre 的切除得到 Flox P (Flanked by lox P) 小鼠。当 Flox P 小鼠在与表达 Cre 的小鼠杂交时,目的基因正常表达,从而避免全基因敲除期间可能发生的严重发育缺陷或胚胎致死。为了实现更精准的基因敲除,可将 Cre 基因置于诱导型启动子或增强子控制下,通过诱导 Cre 重组酶的表达来敲除 2 个 lox P 位点间的靶基因,使目的基因在小鼠发育的特定阶段和特定组织中失活,而该基因在其他组织中正常表达,从而实现对目的基因时间和空间的双重调控^[8-9],目前的诱导型 Cre 重组酶系统主要有他莫昔芬 (TAM) 和四环素 (TET)。

Cre/lox P 系统普遍应用于各种生物的遗传重组。Wesam 等^[10]使用 Cre/lox P 系统产生了条件性白细胞介素-1 受体 1 (IL-1R1) 小鼠突变体;Yuki 等^[11]应用 Cre/lox P 系统第一次构建出莱茵衣藻 *Chlamydomonas reinhardtii* 无标记的转基因菌株。Chen 等^[12]通过组合使用 CRISPR/Cas9 和 Cre/lox P

系统在秀丽隐杆线虫中进行了靶向染色体重排。

敲除效率是 Cre/lox P 系统特异性敲除的一个重要问题。效率由几个因素决定,包括 Cre 重组酶的活性、Flox P 的性质以及 Flox P 在细胞增殖或存活中的功能。组织特异性 Cre 的表达水平由调控元件的活性所限制,而调控元件也控制内源性特异性基因。如果 Cre 表达水平不足以介导重组,则可以在构建载体的过程中修饰这些调节元件(例如去除沉默子),然而这些修饰也可能导致 Cre 表达中组织或细胞特异性丧失。人源化 Cre (hCre 或 iCre) 在哺乳动物细胞中表现出比常规 Cre 更高的活性,已被用于提高敲除效率^[13]。另一个需要注意的问题是当 Cre 高水平表达时,Cre 具有细胞毒性^[14]。为了最小化 Cre 毒性,最好以诱导方式控制 Cre 的表达或活性,或者诱导 Cre 自身失活,即 Cre 基因侧翼各放置一个 lox P 位点。

1.2 FLP/FRT 系统

1980 年 Hartley 等对酿酒酵母的 2 μ m 双链环状 DNA 质粒的序列进行了测序,发现其结构上存在 2 个 599 bp 的反向重复序列^[15]。这两个重复序列之间能重组的特性,使酵母中 2 μ m 环状质粒存在两种不同的构型^[16-18]。经过更深入的研究,发现在 2 μ m 环状质粒内发生的 DNA 重组属于位点特异性重组。Broach 等将催化这一重组反应的重组酶命名为“FLP” (Flippase recombination enzyme)^[19]。

FLP 的特异性识别序列 FRT 长度为 48 bp,包含 3 个 13 bp 的重复序列和 1 个 8 bp 的非对称间隔区^[20-21]。其中 2 个 13 bp 的重复序列与 8 bp 间隔区相邻,同时也是重组酶识别和结合的位点,而 FLP 介导的 DNA 链断裂、倒置、重接等重组过程都发生在 8 bp 间隔区^[22]。FLP/FRT 系统广泛应用于微生物和高等真核生物,如大肠杆菌、丝状真菌、玉米、秀丽隐杆线虫、蚕、小鼠等^[23-26]。

Cre 和 FLP 重组酶都属于酪氨酸位点 SSR,但是 FLP 介导的基因敲除效率较低。后来意识到

FLP 的效率之所以低于 Cre,是因为哺乳动物细胞的最适温度不合适。FLP 重组酶的最适反应温度是 30 $^{\circ}$ C,而不是一般细胞培养所需要的 37 $^{\circ}$ C^[27]。因此,开发了增强形式的 FLP——FLPe 和 FLPo,这使 FLPe/FRT 系统替代了 Cre/lox P 系统。Raymond 等^[28]的研究表明,FLPe 和 FLPo 在小鼠 ES 细胞和转基因小鼠中的重组效率达到了 Cre 重组酶的水平。如今,Cre/lox P 和 FLPe/FRT 系统经常组合使用来制备靶向重组体,FLPe/FRT 系统负责去除标记物,而 Cre/lox P 系统负责 DNA 片段的研究。国际基因敲除小鼠协会 (The international knockout mouse consortium, IKMC) 经常利用这种组合策略来生产新的基因敲除小鼠系。

1.3 Dre/Rox 系统

Cre 重组酶的毒性以及 FLP 的较弱特性使寻找新的 SSR 工具迫在眉睫。因此,最近出现了 Cre 样 SSR——Dre,经研究它是一种与 Cre 同样出色的重组酶。Dre 在肠杆菌噬菌体 D6 的研究中被确定为 Cre 样酶,特异的识别位点是 Rox^[29]。

在大肠杆菌和中国仓鼠卵巢细胞中测试了 Dre/Rox 系统,结果良好^[30]。Anastassiadis 等^[31]在小鼠中已经成功应用了 Dre/Rox 系统。Joon 等^[32]提出 Dre/Rox 的重组作为一种新的有效的方法,可用于斑马鱼时间和空间的双重调节。

Dre/Rox 的进一步应用包括基因组工程,如染色体易位、重组^[33]。目前 Dre/Rox 系统研究较少,期待未来有关 Dre/Rox 系统的更多研究,为基因敲除技术的发展增添新的生机。

1.4 小结

位点特异性重组不仅可以避免传统基因敲除技术导致的严重发育不足和胚胎致死,还可以对目的基因的表达从时空两方面进行调控。其中 Cre/lox P 系统和 FLP/FRT 系统由于重组效率高、操作简单,已经广泛应用于各种生物的基因重组特别是高等真核生物的研究中,实现了各种

常规技术难以实施的操作,如基因敲除、点突变、染色体易位、染色体组的大片段删除等^[34]。三种系统的优缺点比较如表 1 所示。

2 线粒体动力学与胰岛素抵抗关系研究进展

胰岛素抵抗 (Insulin resistance, IR) 是指靶组织在正常的血浆胰岛素水平无法发挥正常降糖作用而产生的病理变化及临床表现^[35]。IR 被公认为是糖尿病、高血压、高血脂、肥胖和动脉硬化等代谢性疾病的共同土壤,同时,也是 2 型糖尿病及各种并发症发生发展的重要因素。人类前瞻性研究认为 IR 是未来诊断 2 型糖尿病最好的预测指标^[36]。而最新研究发现 IR 与线粒体动力学失衡密切相关,但两者之间的因果关系尚不明确。

2.1 线粒体动力学

线粒体的形态并不是一成不变的,相反在不同的生理条件下,线粒体经历高度动态变化以适应细胞能量需求。通过线粒体融合和裂变的连续循环发生,细胞内线粒体充分均匀分布,维持其网络的动态平衡,称为线粒体动力学(Mitochondrial dynamics)。线粒体融合/分裂周期可以平衡线粒体的生物能量、减少轻微受损的线粒体、去除严重受损的线粒体^[37]。融合和裂变过程对于维持正常的细胞功能至关重要,例如线粒体呼吸活动、线粒体 DNA (mtDNA) 分布、细胞凋亡、细胞存活和钙信号传导,而该过程由融合/分裂相关蛋白精确调控。

目前发现参与哺乳动物线粒体动力学的 GTPase 家族成员蛋白有:线粒体融合执行分子,包括定位于内膜的 optic atrophy 1 (Opa1) 和定位于外膜的 Mitofusin 1/2 (Mfn1/2),两个线粒体融

合时,首先寻找合适的平面进行外膜的融合,该过程由 Mfn1/2 介导,然后在 Opa1 的介导下进行内膜的融合,同时 Opa1 参与维持线粒体的嵴结构;线粒体分裂执行分子,包括跨膜蛋白 fission protein 1 (Fis1)、胞质中的 dynamin-related protein 1 (Drp1) 和介导 Drp1 募集的外膜蛋白 mitochondrial fission factor (Mff),线粒体分裂时,Drp1 组装成环状结构以 GTP 依赖性方式收缩线粒体膜,而 Fis1 锚定于外膜使线粒体分裂。线粒体分裂因子 49 kDa (MiD49) 和 51 kDa (MiD51) 还可以在沒有 Fis1 和 Mff 的情况下介导裂变^[38]。线粒体融合分裂过程见图 1。线粒体融合被认为是有益的,因为它与线粒体功能和 ATP 的产生增加有关。相反,过度的线粒体分裂是有害的,因为它影响线粒体功能并使 ROS 增加^[39]。总之,线粒体动力学是调节线粒体功能和形态的主要方式,对正常的生命活动具有非常重要的生理意义,而上述融合/分裂关键蛋白发生异常即可引发线粒体动力学失衡,进而诱发各种疾病状态。

2.2 线粒体动力学失衡与胰岛素抵抗的关系

虽然有很多类型的体细胞表达胰岛素受体,但是肝脏、骨骼肌和白色脂肪组织是胰岛素产生生物学效应的主要器官,在能量代谢中直接发挥作用,与葡萄糖稳态密切相关,因此 IR 也主要在这 3 种组织中发生。

肝脏是机体能量代谢的枢纽,在糖脂代谢中发挥着决定性作用。作用于肝脏的胰岛素是其他组织的 2-3 倍,而胰岛素能快速有效地降低肝脏葡萄糖输出 (Hepatic glucose production, HGP),因此肝胰岛素抵抗是 2 型糖尿病发病机制的重要

表 1 三种位点特异性重组系统的比较

Table 1 Comparison of three site-specific recombination systems

Systems	Origin	Advantages	Disadvantages
Cre/lox P	P1 phage	High reorganization efficiency	Cre is cytotoxic
FLP/FRT	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Wide range of applications	Low reorganization efficiency
Dre/Rox	<i>Enterobacteriaceae</i> phage D6	High reorganization efficiency	Narrow range of applications

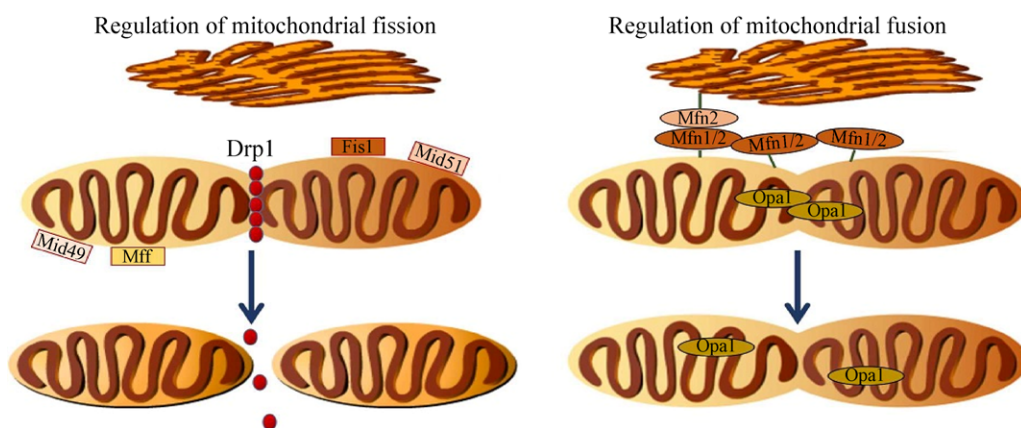


图1 线粒体融合/分裂的调控过程

Fig. 1 Regulation of mitochondrial fusion and fission.

因素。IR 状态下, 胰岛素抑制 HGP 的能力显著下降, 表现为肝糖异生和糖原分解增加, 从而使肝葡萄糖输出增多, 进一步加重高血糖。目前已有证据显示, 在肥胖的 db/db 小鼠存在着肝细胞 ATP 水平下降、线粒体功能紊乱、肝脏线粒体呼吸作用和脂肪酸氧化能力减弱的表型。而蛋白表达方面, 介导线粒体分裂的 Drp1 有不同程度的增多, 而介导线粒体融合的 Mfn2 表达降低了 45%^[40]。

骨骼肌是一种耗能的组织, 它负责高达 80% 的胰岛素作用下的葡萄糖消耗^[41], IR 状态下, 骨骼肌对葡萄糖的摄取和利用降低, 肌糖原生成减少。在胰岛素抵抗患者的肌肉活检中发现, 线粒体呼吸链生物氧化能力下降, 同时电镜观察到线粒体密度和数目明显降低, 提示骨骼肌在 IR 状态下线粒体动力学失衡^[42]。电镜观察 Zucker 大鼠骨骼肌细胞显示线粒体网络结构降低了近 25%, 且融合执行分子 Mfn2 表达水平显著下降^[43]。Jheng 等^[44]发现高脂诱导骨骼肌细胞可以增加线粒体分裂蛋白 Drp1 和 Fis1 的表达, 促进氧化应激, 减少 ATP 生成, 抑制胰岛素刺激下的葡萄糖摄取和利用。

脂肪组织是一个巨大的内分泌器官, 它分泌多种脂肪因子如脂联素、瘦素和 TNF- α , 以调节其他组织如肝脏和肌肉中的葡萄糖代谢, 进而维持葡萄

糖的体内平衡, 而且它对胰岛素非常敏感。在 IR 状态下, 胰岛素抑制脂肪分解作用减弱, 从而使血液中的游离脂肪酸增多^[45]。Chun 等^[46]发现用高浓度的游离脂肪酸处理已分化的 3T3-L1 脂肪细胞, 线粒体分裂蛋白 Drp1 表达升高, 而线粒体融合蛋白 Mfn2 表达下降。Li 等^[47]报道二甲双胍和白藜芦醇通过抑制 Drp1 的活性来保护线粒体完整性, 并通过抑制内质网应激阻止了 NLRP3 炎性体激活, 从而保护脂肪组织免受高葡萄糖损伤。

以上研究发现线粒体动力学失衡即线粒体融合/分裂蛋白异常与 IR 密切相关, 为进一步研究线粒体动力学失衡与 IR 的因果关系, 编码融合/分裂相关蛋白的基因敲除鼠被大量应用于相关研究当中。

3 基因敲除鼠在研究线粒体动力学与胰岛素抵抗关系中的应用

3.1 肝脏特异性敲除 *drp1* (*drp1*LKO) 小鼠

*drp1*LKO (*drp1*-Liver-KO) 小鼠是 *drp1*^{lox P/lox P} 小鼠和 Alb-Cre 小鼠杂交产生的。

高脂饮食喂养时, 与对照小鼠相比, *drp1*LKO 小鼠的肝脏和附睾白色脂肪重量减少, 胰岛素敏感性升高、葡萄糖耐量显著改善, 但血浆胰岛素水平没有显著差异。分析糖酵解关键酶 (丙酮酸激酶[PK1]、葡萄糖激酶[GCK])、糖异生关键酶

(磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶[PEPCK]、葡萄糖-6-羧酸酶[G6pase]) 和过氧化物酶体增殖激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α) 的 mRNA 水平, 发现 GCK、G6pase 和 PGC-1 α 在禁食的 *drp1*LKO 小鼠的肝脏中显著下调^[48]。显示肝脏特异性敲除 *drp1* 可以抑制高脂饮食诱导的肥胖, 故 *drp1* 可能是干预代谢性疾病如肥胖症和糖尿病的潜在靶点。

3.2 肝脏特异性敲除 *mfn1* (*mfn1*LKO) 小鼠

*mfn1*LKO 小鼠是 *mfn1*^{lox P/lox P} 小鼠与白蛋白启动子控制下表达 Cre 重组酶的 C57BL/6 小鼠杂交产生的。经过 Western blotting 验证, *mfn1*LKO 小鼠肝脏中 Mfn1 表达完全消失。肝脏中 MFN1 表达的缺失伴随着 Mfn2 和线粒体动力学其他蛋白的补偿性增加, 例如 Opa1、Drp1 和 MFF, 这提示肝脏线粒体动力学的改变。肝脏中的 Mfn1 缺乏导致优先使用脂质作为能量来源且线粒体生物合成增加。在高脂饮食条件下, 相比于对照小鼠, *mfn1*LKO 小鼠表现出较低的空腹血糖及显著降低的循环胰岛素水平, 且保持更高的胰岛素敏感性。这可能与高脂饮食喂养时 *mfn1*LKO 小鼠中 TCA 活性较高和氧化磷酸化水平偶联作用更强有关, 从而防止可能损害胰岛素作用的酰基肉碱类的积累。此外, *mfn1*LKO 小鼠经二甲双胍处理后肝脏显示出高 AMPK 活化, 与对照小鼠相比降血糖作用更为明显^[49]。故降低 Mfn1 水平可提供一种新的治疗 2 型糖尿病的策略, 以改善二甲双胍耐药人群对药物的敏感性。

3.3 肝脏特异性敲除 *mfn2* (*mfn2*LKO) 小鼠

*mfn2*LKO 小鼠是由 *mfn2*^{lox P/lox P} 小鼠和 Alb-Cre 小鼠杂交产生。在高脂饮食条件下, *mfn2*LKO 小鼠肝脏葡萄糖分泌增多, 葡萄糖耐量受损, 血浆胰岛素水平升高, 出现 IR。*mfn2*LKO 小鼠的葡萄糖耐量损伤是由糖异生所导致的肝葡萄糖升高和糖异生关键酶 (丙酮酸羧化酶[PC]、G6pase、PEPCK) 的编码基因的表达升高造成的^[50]。

3.4 褐色脂肪组织特异性敲除 *mfn2* (BAT-*mfn2*-KO) 小鼠

BAT-*mfn2*-KO 小鼠是 *mfn2*^{lox P/lox P} 小鼠和 Ucp1-Cre 转基因小鼠杂交而产生的。

BAT 中 *mfn2* 的缺失使 BAT 中脂质增加, 但高脂饮食喂养的 BAT-*mfn2*-KO 小鼠与对照小鼠相比空腹血糖水平和肝脂肪变性没有显著性差异, 然而胰岛素敏感性得到改善, 葡萄糖耐量降低, 并且 BAT 的糖酵解能力也升高^[51]。

3.5 非特异性敲除 *mfn2* (*mfn2*-KO) 小鼠

mfn2-KO 小鼠是 *mfn2*^{lox P/lox P} 小鼠与 MEF2C 启动子控制下表达 Cre 重组酶 (MEF2C-73K-Cre) 的小鼠品系杂交, 产生 *mfn2*-KO 小鼠。

在骨骼肌、心脏和大脑中, *mfn2*-KO 的 MFN2 蛋白表达减少了 80%, 在脂肪组织、肾脏和肝脏中表达减少了近 50%。免疫荧光分析表明, *mfn2*-KO 小鼠的肌肉纤维中, Mfn2 明显减少。此外, *mfn2*-KO 小鼠的骨骼肌表现为线粒体分裂增加。

高脂饮食喂养的 *mfn2*-KO 小鼠与对照组相比葡萄糖耐量受损、血浆胰岛素水平升高, 产生 IR, 但胰岛素敏感性并没有显著性差异。*mfn2* 敲除后损害了肝脏、骨骼肌的胰岛素信号通路; 另外肝脏和肌肉中线粒体功能紊乱、过氧化氢浓度增高^[50]。以上融合/分裂基因敲除小鼠与 IR 关系总结如表 2 所示。

表 2 融合/分裂基因敲除小鼠与 IR 关系

Table 2 The relationship of gene knockout mice of fusion/fission and IR

Gene knockout mice	The relationship of gene knockout mice and IR
<i>drp1</i> LKO	Improve insulin sensitivity
<i>mfn1</i> LKO	Improve insulin sensitivity
<i>mfn2</i> LKO	Show impaired glucose tolerance, high insulin levels, and insulin resistance
BAT- <i>mfn2</i> -KO	Improve insulin sensitivity
Non-specific <i>mfn2</i> -KO	Impair insulin signaling in liver and skeletal muscle

4 结语与展望

笔者课题组综述报道融合/分裂的关键蛋白异常引起的线粒体动力学失衡与糖尿病外周胰岛素抵抗密切相关,但线粒体动力学失衡究竟是胰岛素抵抗的起因还是结果尚有待深入探究^[52]。本文综述线粒体融合/分裂相关基因敲除鼠研究结果表明,肝脏特异性敲除 *drp1*、*mfn1* 可使胰岛素的敏感性升高,抑制高脂饮食诱导的肥胖;全身非特异性或肝脏特异性敲除 *mfn2* 可引发 IR,但褐色脂肪组织特异性敲除 *mfn2* 却可以改善 IR;笔者课题组未发表的数据显示,对 *Opa1* 进行沉默干扰,线粒体复合物 I 的表达下降,分裂蛋白 *Drp1* 的表达上升,糖异生关键酶 *PEPCK* 表达上升,诱发肝胰岛素抵抗。这些结果说明融合/分裂基因敲除鼠的基因缺陷特异性与靶组织的选择性均会对机体产生不同的影响,对于研究线粒体动力学与胰岛素抵抗相互关系具有非常重要的价值,也为糖尿病及肥胖症的发病机制与药物治疗的信号转导研究提供了稳定、可靠的模型。笔者课题组长期从事糖尿病研究,先后报道了人参皂苷 Compound K 可通过激活 AMPK 改善高脂联合 STZ 诱导的糖尿病小鼠的肝糖异生^[53]; MiR-27a 通过直接抑制 PPAR γ 刺激巨噬细胞浸润和极化来调节高脂诱导的肥胖小鼠的胰岛素抵抗^[54];通过 2 型糖尿病大鼠模型发现 H6PDH 与 11 β -HSD1 之间的相互作用与 2 型糖尿病的发病机制有关^[55]。后续利用融合/分裂相关基因敲除动物模型对上述信号传导通路的研究将进一步揭示胰岛素抵抗的分子机制,为糖尿病胰岛素抵抗的研究提供了可靠的工具和潜在方向。以上基因敲除小鼠所使用的皆为 Cre/lox P 系统,利用该系统不仅能有效地克服外源基因在染色体中随机整合所带来的不确定性,缩短模型动物建立的时间,还可以实现目标基因在时间和空间上的精确表达调控,为研究类似 IR 等代谢性疾病的发病机制及治疗提供

了一种全新的手段,而其他的基因敲除技术也有待新的发掘与发展。

REFERENCES

- [1] Capecchi MR. Altering the genome by homologous recombination. *Science*, 1989, 244(4910): 1288–1292.
- [2] Gu X, Li Y. The development of site-specific recombination. *Lett Biotechnol*, 2005, 16(4): 417–419 (in Chinese).
谷欣, 黎燕. 位点特异性重组技术研究进展. *生物技术通讯*, 2005, 16(4): 417–419.
- [3] Olorunniji FJ, Rosser SJ, Stark WM. Site-specific recombinases: molecular machines for the genetic revolution. *Biochem J*, 2016, 473(6): 673–684.
- [4] Zhang L, Zhao GP, Ding XM. Site-specific recombination systems: mechanisms and applications. *Sci Sin Vitae*, 2011, 40(12): 1090–1111 (in Chinese).
张霖, 赵国屏, 丁晓明. 位点特异性重组系统的机理和应用. *中国科学: 生命科学*, 2011, 40(12): 1090–1111.
- [5] Nagy A. Cre recombinase: the universal reagent for genome tailoring. *Genesis*, 2000, 26(2): 99–109.
- [6] Abi-Ghanem J, Samsonov SA, Pisabarro MT. Insights into the preferential order of strand exchange in the Cre/loxP recombinase system: impact of the DNA spacer flanking sequence and flexibility. *J Comput Aided Mol Des*, 2015, 29(3): 271–282.
- [7] Sauer B, Henderson N. Site-specific DNA recombination in mammalian cells by the Cre recombinase of bacteriophage P1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 85(14): 5166–5170.
- [8] Bouabe H, Okkenhaug K. Gene targeting in mice: a review. *Methods Mol Biol*, 2013, 1064: 315–336.
- [9] Lan C, Ren LN, Wu M, et al. Deletion of marker gene in transgenic goat by Cre/loxP system. *Chin J Biotech*, 2013, 29(12): 1847–1854 (in Chinese).
兰翀, 任丽娜, 吴敏, 等. 利用 Cre/lox P 系统删除转基因山羊体内的选择标记基因. *生物工程学报*, 2013, 29(12): 1847–1854.
- [10] Abdulaal WH, Walker CR, Costello R, et al. Characterization of a conditional interleukin-1 receptor 1 mouse mutant using the Cre/loxP system. *Eur J Immunol*, 2016, 46(4): 912–918.
- [11] Kasai Y, Harayama S. Construction of marker-free transgenic strains of *chlamydomonas reinhardtii* using a Cre/loxP-mediated recombinase system. *PLoS ONE*,

- 2016, 11(8): e161733.
- [12] Chen XY, Liao SM, Huang XY, et al. Targeted chromosomal rearrangements via combinatorial use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP technologies in *Caenorhabditis elegans*. *Gen Genom Genet*, 2018, 8(8): 2697–2707.
- [13] Kanayama M, Nakao K, Horie S, et al. Generation of transgenic mouse line with prostate-specific expression of codon-improved Cre recombinase. *Prostate Int*, 2018, 6(3): 99–103.
- [14] Loonstra A, Vooijs M, Beverloo HB, et al. Growth inhibition and DNA damage induced by Cre recombinase in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, 98(16): 9209–9214.
- [15] Hartley JL, Donelson JE. Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature*, 1980, 286(5776): 860–864.
- [16] Li ZW, Li YR, Gu ZH, et al. Development and verification of an FLP/FRT system for gene editing in *Bacillus licheniformis*. *Chin J Biotech*, 2019, 35(3): 458–471 (in Chinese).
李宗文, 李由然, 顾正华, 等. 地衣芽胞杆菌 FLP/FRT 基因编辑系统的构建及验证. *生物工程学报*, 2019, 35(3): 458–471.
- [17] Jayaram M, Li YY, Broach JR. The yeast plasmid 2 μ circle encodes components required for its high copy propagation. *Cell*, 1983, 34(1): 95–104.
- [18] Volkert FC, Broach JR. Site-specific recombination promotes plasmid amplification in yeast. *Cell*, 1986, 46(4): 541–550.
- [19] Broach JR, Hicks JB. Replication and recombination functions associated with the yeast plasmid, 2 μ circle. *Cell*, 1980, 21(2): 501–508.
- [20] Senecoff JF, Bruckner RC. The FLP recombinase of the yeast 2-micron plasmid: characterization of its recombination site. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82(21): 7270–7274.
- [21] Sadowski PD. The FLP double cross system a simple efficient procedure for cloning DNA fragments. *BMC Biotechnol*, 2003, 3: 9.
- [22] Kilby NJ, Snaith MR, Murray JAH. Site-specific recombinases: tools for genome engineering. *Trends Genet*, 1993, 9(12): 413–421.
- [23] Kopke K, Hoff B, Kück U. Application of the *Saccharomyces cerevisiae* FLP/FRT recombination system in filamentous fungi for marker recycling and construction of knockout strains devoid of heterologous genes. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(14): 4664–4674.
- [24] Li B, Li N, Duan XG, et al. Generation of marker-free transgenic maize with improved salt tolerance using the FLP/FRT recombination system. *J Biotechnol*, 2010, 145(2): 206–213.
- [25] Long DP, Lu WJ, Hao ZZ, et al. Highly efficient and inducible DNA excision in transgenic silkworms using the FLP/FRT site-specific recombination system. *Transgenic Res*, 2016, 25(6): 795–811.
- [26] Hubbard EJA. FLP/FRT and Cre/lox recombination technology in *C. elegans*. *Methods*, 2014, 68(3): 417–424.
- [27] Buchholz F, Ringrose L, Angrand PO, et al. Different thermostabilities of FLP and Cre recombinases: implications for applied site-specific recombination. *Nucleic Acids Res*, 1996, 24(21): 4256–4262.
- [28] Raymond CS, Soriano P. High-efficiency FLP and Φ C31 site-specific recombination in mammalian cells. *PLoS ONE*, 2007, 2(1): e162.
- [29] Anastassiadis K, Fu J, Patsch C, et al. Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in *E. coli*, mammalian cells and mice. *Dis Model Mech*, 2009, 2(9/10): 508–515.
- [30] Sauer B, McDermott J. DNA recombination with a heterospecific Cre homolog identified from comparison of the *pac-c1* regions of P1-related phages. *Nucleic Acids Res*, 2004, 32(20): 6086–6095.
- [31] Plummer NW, de Marchena J, Jensen P. A knock-in allele of *En1* expressing Dre recombinase. *Genesis*, 2016, 54(8): 447–454.
- [32] Park JT, Leach SD. TAILOR: transgene activation and inactivation using lox and rox in zebrafish. *PLoS ONE*, 2013, 8(12): e85218.
- [33] van der Weyden L, Bradley A. Mouse chromosome engineering for modeling human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*, 2006, 7: 247–276.
- [34] Teng Y, Yang X. Gene targeting: the beginning of a new era in genetics. *Hereditas (Beijing)*, 2007, 29(11): 1291–1298 (in Chinese).
滕艳, 杨晓. 基因打靶技术: 开启遗传学新纪元. *遗传*, 2007, 29(11): 1291–1298.
- [35] Ding MG, Feng N, Tang DS, et al. Melatonin prevents Drp1-mediated mitochondrial fission in diabetic hearts through SIRT1-PGC1 α pathway. *J Pineal Res*, 2018, 65(2): e12491.
- [36] Wang LX, Zhao XZ, Qiao WW, et al. Amelioration effect of duodenal-jejunal bypass surgery on insulin-resistance in Goto-Kakizaki rats. *Acta Lab*

- Animal Sci Sin, 2015, 23(2): 159–164 (in Chinese).
- 王龙霞, 赵先哲, 乔伟伟, 等. 十二指肠-空肠转流手术对 2 型糖尿病大鼠胰岛素抵抗的改善作用. 中国实验动物学报, 2015, 23(2): 159–164.
- [37] Liesa M, Shirihai OS. Mitochondrial dynamics in the regulation of nutrient utilization and energy expenditure. *Cell Metab*, 2013, 17(4): 491–506.
- [38] Rovira-Llopis S, Bañuls C, Diaz-Morales N, et al. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes: pathophysiological implications. *Redox Biol*, 2017, 11: 637–645.
- [39] Jia WP. Role of insulin resistance in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Diagnost Theory Pract*, 2009, 8(3): 233–236 (in Chinese).
- 贾伟平. 胰岛素抵抗在 2 型糖尿病发病机制中的作用. 诊断学理论与实践, 2009, 8(3): 233–236.
- [40] Holmström MH, Iglesias-Gutierrez E, Zierath JR, et al. Tissue-specific control of mitochondrial respiration in obesity-related insulin resistance and diabetes. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 302(6): E731–E739.
- [41] Tomas E, Kelly M, Xiang XQ, et al. Metabolic and hormonal interaction between muscular and adipose tissue. *Proc Nutr Soc*, 2004, 63(2): 381–385.
- [42] Morino K, Petersen KF, Dufour S, et al. Reduced mitochondrial density and increased IRS-1 serine phosphorylation in muscle of insulin-resistant offspring of type 2 diabetic parents. *J Clin Investigat*, 2005, 115(12): 3587–3593.
- [43] Bach D, Pich S, Soriano FX, et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem*, 2003, 278(19): 17190–17197.
- [44] Jheng HF, Tsai PJ, Guo SM, et al. Mitochondrial fission contributes to mitochondrial dysfunction and insulin resistance in skeletal muscle. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(2): 309–319.
- [45] Wang CH, Wang CC, Wei YH. Mitochondrial dysfunction in insulin insensitivity: implication of mitochondrial role in type 2 diabetes. *Ann N Y Acad Sci*, 2010, 1201: 157–165.
- [46] Gao CL, Zhu C, Zhao YP, et al. Mitochondrial dysfunction is induced by high levels of glucose and free fatty acids in 3T3-L1 adipocytes. *Mol Cell Endocrinol*, 2010, 320(1/2): 25–33.
- [47] Li AY, Zhang SH, Li J, et al. Metformin and resveratrol inhibit Drp1-mediated mitochondrial fission and prevent ER stress-associated NLRP3 inflammasome activation in the adipose tissue of diabetic mice. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 434: 36–47.
- [48] Wang LX, Ishihara T, Ibayashi Y, et al. Disruption of mitochondrial fission in the liver protects mice from diet-induced obesity and metabolic deterioration. *Diabetologia*, 2015, 58(10): 2371–2380.
- [49] Kulkarni SS, Joffraud M, Boutant M, et al. Mfn1 Deficiency in the liver protects against diet-Induced insulin resistance and enhances the hypoglycemic effect of metformin. *Diabetes*, 2016, 65(12): 3552–3560.
- [50] Sebastián David S, Hernández-Alvarez María I, Segalés Jessica S, et al. Mitofusin 2 (Mfn2) links mitochondrial and endoplasmic reticulum function with insulin signaling and is essential for normal glucose homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012, 109(14): 5523–5528.
- [51] Mahdavian K, Benador IY, Su S, et al. Mfn2 deletion in brown adipose tissue protects from insulin resistance and impairs thermogenesis. *EMBO Rep*, 2017, 18(7): 1123–1138.
- [52] Chen L, Guan FY, Yu Y. Mitochondrial dynamics in type 2 diabetes mellitus and diabetes complications. *Chin J Pharmacol Toxicol*, 2015, 29(3): 339–347 (in Chinese).
- 陈立, 关凤英, 于洋. 线粒体动力学与 2 型糖尿病和糖尿病并发症关系的研究进展. 中国药理学与毒理学杂志, 2015, 29(3): 339–347.
- [53] Wei SN, Li W, Yu Y, et al. Ginsenoside Compound K suppresses the hepatic gluconeogenesis via activating adenosine-5'-monophosphate kinase: A study *in vitro* and *in vivo*. *Life Sci*, 2015, 139: 8–15.
- [54] Yao F, Yu Y, Feng LJ, et al. Adipogenic miR-27a in adipose tissue upregulates macrophage activation via inhibiting PPAR γ of insulin resistance induced by high-fat diet-associated obesity. *Exp Cell Res*, 2017, 355(2): 105–112.
- [55] Yao F, Chen L, Fan Z, et al. Interplay between H6PDH and 11 β -HSD1 implicated in the pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. *Bioorgan Medic Chem Lett*, 2017, 27(17): 4107–4113.

(本文责编 陈宏宇)