

· 医药生物技术 ·

# 利用 CRISPR/Cas9 系统敲除小鼠 *Mik3* 基因探讨其对血压的影响

高诗娟\*, 方光明, 张燕红, 杜杰

首都医科大学附属北京安贞医院 北京市心肺血管疾病研究所, 北京 100029

高诗娟, 方光明, 张燕红, 杜杰. 利用 CRISPR/Cas9 系统敲除小鼠 *Mik3* 基因探讨其对血压的影响[J]. 生物工程学报, 2023, 39(4): 1644-1654.

GAO Shijuan, FANG Guangming, ZHANG Yanhong, DU Jie. Generation of *Mik3* KO mice by CRISPR/Cas9 and its effect on blood pressure[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(4): 1644-1654.

**摘要:** 为探讨混合谱系激酶 3 (mixed lineage kinase 3, *Mik3*) 基因敲除(knockout, KO)对小鼠血压的影响, 采用 CRISPR/Cas9 系统构建 *Mik3* 基因敲除(*Mik3* knockout, *Mik3*KO)小鼠模型。T7 核酸内切酶 I (T7 endonuclease I, T7E1) 酶切法验证向导 RNA (small guide RNA, sgRNA) 的活性。体外转录 CRISPR/Cas9 mRNA 及 sgRNA, 显微注射至受精卵并移植入假孕母鼠。聚合酶链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 及 DNA 测序检测基因型。实时荧光定量 PCR (Real-time PCR, RT-PCR) 检测 *Mik3* mRNA 表达, Western blotting 及免疫荧光检测 *Mik3* 蛋白表达。尾套法监测小鼠血压。免疫组化及 Western blotting 检测小鼠主动脉肌球蛋白轻链(myosin light chain, MLC) 磷酸化水平。PCR 基因型鉴定及 DNA 测序显示 *Mik3* 敲除成功, 且 *Mik3* 敲除小鼠未检测到 *Mik3* 蛋白表达, 证实 CRISPR/Cas9 系统成功构建了 *Mik3* 敲除小鼠。*Mik3* 敲除小鼠在基础状态下血压显著高于同笼对照, 且 *Mik3* 敲除小鼠主动脉平滑肌层 MLC 的磷酸化高于对照组, 说明 *Mik3* 具有抗高血压的内源性保护作用。本研究为探讨蛋白激酶 *Mik3* 抗高血压及抗高血压诱导心血管不良重塑的作用机制提供了理想的动物模型。

**关键词:** 基因敲除; 小鼠; CRISPR/Cas9; 混合谱系激酶 3; 血压; 肌球蛋白轻链

资助项目: 国家自然科学基金(91939106, 81770470); 北京市自然科学基金(7192032)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (91939106, 81770470) and the Beijing Natural Science Foundation (7192032).

\*Corresponding author. E-mail: gao\_shijuan@163.com

Received: 2022-12-22; Accepted: 2023-02-16

# Generation of *Mlk3* KO mice by CRISPR/Cas9 and its effect on blood pressure

GAO Shijuan\*, FANG Guangming, ZHANG Yanhong, DU Jie

Beijing Institute of Heart, Lung and Vascular Diseases, Beijing Anzhen Hospital, Capital Medical University, Beijing 100029, China

**Abstract:** To explore the effect of *Mlk3* (mixed lineage kinase 3) deficiency on blood pressure, *Mlk3* gene knockout (*Mlk3*KO) mice were generated. Activities of sgRNAs targeted *Mlk3* gene were evaluated by T7 endonuclease I (T7E1) assay. CRISPR/Cas9 mRNA and sgRNA were obtained by *in vitro* transcription, microinjected into zygote, followed by transferring into a foster mother. Genotyping and DNA sequencing confirmed the deletion of *Mlk3* gene. Real-time PCR (RT-PCR), Western blotting or immunofluorescence analysis showed that *Mlk3*KO mice had an undetectable expression of *Mlk3* mRNA or *Mlk3* protein. *Mlk3*KO mice exhibited an elevated systolic blood pressure compared with wild-type mice as measured by tail-cuff system. Immunohistochemistry and Western blotting analysis showed that the phosphorylation of MLC (myosin light chain) was significantly increased in aorta isolated from *Mlk3*KO mice. Together, *Mlk3*KO mice was successfully generated by CRISPR/Cas9 system. *MLK3* functions in maintaining blood pressure homeostasis by regulating MLC phosphorylation. This study provides an animal model for exploring the mechanism by which *Mlk3* protects against the development of hypertension and hypertensive cardiovascular remodeling.

**Keywords:** gene knockout; mouse; CRISPR/Cas9; mixed lineage kinase 3; blood pressure; myosin light chain

中国高血压患者数高达 2.45 亿, 严重危害国民健康。多种发病机制, 包括交感神经活动亢进、肾素血管紧张素醛固酮系统激活以及血管内皮细胞功能受损等, 导致血容量改变、心输出量增加、外周血管阻力增加而引起血压升高<sup>[1]</sup>。高血压的病因不同, 相应的药物干预措施也不同<sup>[2]</sup>。揭示高血压发病机制对个体化用药具有重要意义。

混合谱系激酶 3 (mixed lineage kinase 3, *Mlk3*)是一种表达于肺、肝及心脏等多种组织的丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)级联反应中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶。*Mlk3* 通过激活 MAPK 通路下游细

胞外信号相关激酶(extracellular signal-related kinases, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)及丝裂原活化蛋白激酶 p38 等, 调控细胞增殖、分化和凋亡<sup>[3-4]</sup>。最近研究发现 *Mlk3* 基因缺失导致心血管系统功能异常, 如 *Mlk3* 基因敲除鼠心功能下降<sup>[5]</sup>; 血管损伤后 *Mlk3* 基因敲除鼠平滑肌细胞异常增殖并形成更厚的新生内膜, 而内膜增厚将增加血管堵塞的风险<sup>[6]</sup>。上述研究提示 *Mlk3* 在心血管系统中发挥内源性保护作用。平滑肌细胞收缩增强是外周血管阻力增加、高血压发生的重要病理基础<sup>[7-8]</sup>, *Mlk3* 基因敲除鼠在血管损伤后平滑肌细胞异常增殖, 促使我们探讨 *Mlk3* 基

因敲除是否影响小鼠血压。为此,本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 *Mlk3* 基因敲除鼠模型<sup>[9-11]</sup>, 探讨 *Mlk3* 是否参与血压调控。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 细胞及动物

小鼠胚胎成纤维细胞系 NIH3T3 购自国家实验细胞资源库北京总部(协和), 培养于 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中。10-12 周龄 SPF 级 C57BL6/J 小鼠购自北京唯尚立德生物科技有限公司, 以 C57BL6/J 为背景构建 *Mlk3* 基因敲除小鼠。实验用鼠繁殖及饲养于北京安贞医院 SPF 级动物房。所有动物实验均遵守首都医科大学附属北京安贞医院实验动物管理委员会的相关规定(动物伦理批准号: GZR-2-009)。

#### 1.1.2 主要试剂

T4 DNA 连接酶、T7E1 外切酶、*Bbs* I 限制性内切酶购自 NEB (北京)有限公司。高保真 DNA 聚合酶购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。Px459 载体来自麻省理工学院 Feng Zhang 实验室捐赠至 Addgene 质粒库。无内毒素质粒提取试剂盒、蛋白酶 K 购自天根生化科技(北京)有限公司。鼠尾裂解液 DirectPCR Lysis Reagent 购自 Viagen Biotech 公司; SYBR real-time PCR 试剂购自 TaKaRa 公司。胎牛血清、DMEM 细胞培养基、Lipofectamine 3000 转染试剂、T7 体外转录试剂盒、SP6 体外转录试剂盒、MEGAclean™ 转录纯化试剂盒、TRIzol、T-PER 组织蛋白提取液、逆转录试剂 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit 购自 Thermo Fisher Scientific 公司。*Mlk3* (#4370S)抗体、p-MLC (phospho- Myosin Light Chain 2 (Ser19), #3671S)抗体购自 Cell Signaling Technology 公司。用于免疫荧光检测的 Alexa Fluor-555 荧光

二抗购自 Jackson ImmunoResearch 公司, 用于 Western blotting 检测的 IRDye®800 偶联二抗购自 Li-COR Biosciences 公司。DAPI 封片液购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 靶向 *Mlk3* 基因 sgRNA 寡核苷酸设计及表达质粒构建

采用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Mlk3* 基因敲除小鼠。小鼠 *Mlk3* 基因(ID: 26403)含有翻译起始密码子的第 3 个外显子两端分别设计上、下游两个向导 RNA (small guide RNA, sgRNA), 通过两个 sgRNA 引导 CRISPR/Cas9 切除第 3 个外显子导致 *Mlk3* 读码框架提前终止而达到敲除 *Mlk3* 基因的目的。应用 <http://crispr.mit.edu/> 网站, 分别选取 *Mlk3* 第 3 个外显子中包含 ATG 序列的上下游 250 bp 以及包含该外显子最后一个碱基上下游 250 bp 的序列为模板, 设计 sgRNA。为确保选取的 sgRNA 有效切割目标片段, 分别针对上下游模板各设计 3 个 sgRNA (表 1)。化学合成带有接头序列的 sgRNA 寡核苷酸双链, 退火后通过 T4 DNA 连接酶接入 *Bbs* I 酶切的带有 CRISPR/Cas9 及 sgRNA 表达框的 px459 载体。DNA 测序确认载体构建成功。

表 1 sgRNA 寡核苷酸序列

Table 1 sgRNA oligonucleotide sequences

sgRNA name	Oligonucleotide sequence (5'→3')
sgRNA1-F	CACCGTACCGGTGGAGTCCGGCCGG
sgRNA1-R	AAACCCGGCCGGACTCCACCGGTAC
sgRNA2-F	CACCGATACCACGGGCACCCGAAGA
sgRNA2-R	AAACTCTTCGGGTGCCCGTGGTATC
sgRNA3-F	CACCGCCATGGCAGGGAGCCGGCGT
sgRNA3-R	AAACACGCCGGCTCCCTGCCATGGC
sgRNA4-F	CACCGTTCAGGTCTCGGTGTATCAC
sgRNA4-R	AAACGTGATACACCGAGACCTGAAC
sgRNA5-F	CACCGCTCGGAGCACGGCCCAGCCG
sgRNA5-R	AAACCGGCTGGGCCGTGCTCCGAGC
sgRNA6-F	CACCGGGGCACACGCCGACCAGCC
sgRNA6-R	AAACGGCTGGTTCGGCGTGTGCCCC

Bold: sgRNA sequence; Non-bold: Adapter sequence.

### 1.2.2 CRISPR/Cas9-sgRNA 共表达质粒细胞转染

NIH3T3 细胞接种至 6 孔板,待细胞密度达到 80%左右,将 2  $\mu\text{g}$  px459-sgRNA 质粒用 Lipofectamine 3000 试剂进行转染。转染后 36 h 提取细胞基因组 DNA。

### 1.2.3 T7E1 内切酶检测 sgRNA 活性

以转染了 px459-sgRNA 质粒的细胞基因组 DNA 为模板,在 sgRNA 介导的编辑位点附近设计引物(表 2)进行 PCR 扩增。PCR 产物热变性、梯度退火后,利用 T7E1 内切酶于 37  $^{\circ}\text{C}$  反应 1 h,反应产物通过琼脂糖凝胶电泳分析。

### 1.2.4 CRISPR/Cas9 mRNA 及 sgRNA 显微注射至受精卵

CRISPR/Cas9 表达质粒在 *Not* I 酶切线性化后用 SP6 体外转录试剂盒转录。带有 T7 启动子的 sgRNA 表达质粒使用 T7 体外转录试剂盒进行转录。转录产物经 MEGAclear™ 转录纯化试剂盒进行纯化。CRISPR/Cas9 mRNA 及 sgRNA 显微注射至受精卵,并移植入假孕小鼠的输卵管。胚胎移植的小鼠在术后 19 d 左右出生。

### 1.2.5 小鼠基因型鉴定

胚胎移植小鼠出生后 7 d 左右采集鼠尾,用含蛋白酶 K 的鼠尾消化液 56  $^{\circ}\text{C}$  消化过夜,85  $^{\circ}\text{C}$  灭活,提取基因组 DNA。PCR 扩增 *Mik3* 目的片段,琼脂糖凝胶电泳及 DNA 测序鉴定基因型。PCR 引物见表 3。

表 2 sgRNA 活性鉴定 PCR 引物

Table 2 PCR primers for evaluation of sgRNA activity

Primer name	Primer sequence (5'→3')	Size (bp)
sgRNA1-3-PCR-F	CAGCCTGACCACACTGCCCT	612
sgRNA1-3-PCR-R	CTTGCCGAAGCCACCGATGC	
sgRNA4-6-PCR-F	CCATGCTGGCCCATCCCAAC	480
sgRNA4-6-PCR-R	GGACTCCCAGGACAGAGGCA	

表 3 *Mik3* 基因型鉴定 PCR 引物

Table 3 PCR primers for *Mik3* genotyping

Primer name	Primer sequence (5'→3')
Primer1	GGAAGTGGAGGGACTCTGCTGC
Primer2	TCCGAAGGCAACAGCAGCTTA
Primer3	CACTGATAGGCCACGGGTATT

### 1.2.6 RNA 提取及 RT-PCR

利用 TRIzol 提取野生及 *Mik3* 基因敲除鼠各 3 只的主动脉组织总 RNA。取 2  $\mu\text{g}$  总 RNA,RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher)逆转录试剂盒逆转录生成 cDNA。cDNA 在 iQ5 系统(Bio-Rad)中使用 SYBR 试剂 (TaKaRa)进行 RT-PCR。以 *GAPDH* 为内参基因,目标基因表达水平以  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  法进行计算。引物序列如表 4 所示。

### 1.2.7 Western blotting 检测

利用 T-PER 组织裂解液(补充 0.5 mol/L EDTA,蛋白酶抑制剂,磷酸酶抑制剂)提取对照及 *Mik3* 基因敲除鼠血管组织总蛋白,BCA 试剂盒测定蛋白浓度。将 60–80  $\mu\text{g}$  的总蛋白经聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后,电转至硝酸纤维素膜。5%脱脂奶粉室温封闭 45 min,加入 MLK3 (1:1 000)及 *GAPDH* (1:1 000)抗体,4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。IRDye®800 偶联二抗室温孵育 2 h 后 Odyssey 红外荧光扫描成像仪采集目的条带。

### 1.2.8 免疫荧光染色

收集对照及 *Mik3* 基因敲除鼠主动脉组织

表 4 RT-PCR 引物

Table 4 RT-PCR primer sequence

Primer name	Primer sequence (5'→3')
Mik3 RT-F	GCCTGTGATACACCGAGACC
Mik3 RT-R	GAGGCCTTGATAACCTCGGG
GAPDH-F	AATGCATCCTGCACCACC
GAPDH-R	ATGCCAGTGAGCTTCCCG

制备冰冻切片,冰丙酮固定 20 min,室温晾干 20 min,磷酸缓冲盐溶液(phosphate buffered saline, PBS)洗后 3% BSA 室温封闭 1 h,加入 MLK3 抗体,4 °C 过夜。PBS 洗后加入 Alexa Fluor-555 荧光二抗,室温孵育 35 min。PBS 洗后 DAPI 封片。使用 Leica ST5 激光扫描共聚焦显微镜观察 *Mlk3* 荧光强度。

### 1.2.9 小鼠血压、心率及血清钙离子浓度测定

BP-2010A 智能无创血压计通过尾套法测量小鼠的心率(heart rate, HR)、收缩压(systolic blood pressure, SBP)及舒张压(diastolic blood pressure, DBP)。测量时,将小鼠置于安静、昏暗的环境,前半身用鼠网网住并用鼠袋固定后,置于设定温度为 37 °C 的保温筒中。待小鼠安静后将加压感应器套入小鼠尾巴,按下开始键自动测量。每只小鼠在安静状态下测量 5 次以上,连续监测 3 d。收集野生及 *Mlk3* 基因敲除鼠外周血,4 °C 静置过夜后 3 000 r/min 离心 15 min,取上清,于全自动生化仪测定血清钙离子浓度。

### 1.2.10 免疫组化

收集野生及 *Mlk3* 基因敲除鼠主动脉组织,制备石蜡切片(4 μm)。二甲苯和梯度乙醇脱蜡至水,抗原热修复后内源性过氧化物酶阻断剂处理 20 min,羊血清工作液常温封闭 30 min,加入磷酸化 MLC (p-MLC)抗体,4 °C 湿盒过夜。湿盒室温平衡 20 min, PBS 洗后加辣根过氧化物酶标记二抗,室温 30 min 后 DAB 显色;苏木素复染 3 min,自来水洗,盐酸乙醇分化数秒,自来水洗;脱水、透明、封片及镜检。使用 Nikon ECLIPSE 90i 显微镜采图,并用 NIS-Elements Br 3.0 软件进行阳性面积的分析。

### 1.2.11 统计分析

用 GraphPad Prism 7.0 软件对数据进行统计分析。结果以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。两组

间比较用 *t* 检验,以  $P<0.05$  认为具有统计学意义。

## 2 结果与分析

### 2.1 靶向 *Mlk3* 基因的 sgRNA 设计及活性验证

在 *Mlk3* 基因的第 3 个外显子两端分别设计上游、下游 2 个 sgRNA,通过 sgRNA 引导 CRISPR/Cas9 核酸酶切割第 3 个外显子,产生插入缺失突变(insertion-deletion, Indel)导致 *Mlk3* 读码框架无法正常表达而达到基因敲除的目的。为确保采用的 sgRNA 发挥作用,分别以第 3 个外显子两端为模板,上下游各设计 3 个不同的 sgRNA (图 1A)。将 sgRNA 构建到携带 CRISPR/Cas9 核酸酶表达框的 px459 载体,并转染至 NIH3T3 细胞。sgRNA 将引导 Cas9 核酸酶切割目标序列。被切割的目标序列自我修复产生 Indel。这种 Indel 在体外可被非配对核酸内切酶 T7E1 识别并剪切,产生小于野生条带的片段。如图 1B 所示,转染了靶向外显子 3 上游的 sgRNA3 及下游的 sgRNA5 的细胞中分别出现了小于野生片段的 Indel 小片段,说明这 2 个 sgRNA 能有效发挥作用,用于构建 *Mlk3* 基因敲除鼠。

### 2.2 *Mlk3* 基因敲除鼠构建

CRISPR/Cas9 mRNA 及 sgRNA 显微注射的受精卵在移植入假孕鼠后 19 d 左右出生子代鼠(图 2A)。提取子代鼠基因组 DNA 进行基因型鉴定。在 Cas9 切割位点上下游设计引物(图 2B,引物 1、引物 3)进行 PCR 扩增,野生鼠扩增出 1 300 bp 的条带,纯合敲除鼠则产生 500 bp 的条带,杂合鼠两条带都有(图 2C)。如果上游引物设计在被敲除的片段中(图 2B,引物 2),则野生鼠及杂合鼠出现 800 bp 的条带,纯合敲除鼠则无目的条带产生(图 2C)。PCR 产物经 DNA

测序,证实 *Mik3* 基因在目标位置缺失了 816 bp (图 2D)。

### 2.3 *Mik3* 基因敲除鼠无 *Mik3* 蛋白表达

为进一步证实 *Mik3* 基因敲除成功,首先利用 RT-PCR 检测了野生及 *Mik3* 敲除鼠升主动脉组织中 *Mik3* mRNA 的表达。RT-PCR 引物设计在敲除的第 3 个外显子上,结果显示 *Mik3* 敲除鼠几乎检测不到 *Mik3*

mRNA 表达(图 3A)。Western blotting 结果显示 *Mik3* 敲除鼠中几乎检测不到 *Mik3* 蛋白表达(图 3B)。进而用免疫荧光检测了野生及 *Mik3* 敲除鼠升主动脉 *Mik3* 的表达,结果显示野生鼠 *Mik3* 在主动脉中层及内膜表达,而敲除鼠观察不到 *Mik3* 的荧光信号(图 3C)。综上所述,本研究成功构建了 *Mik3* 基因敲除鼠。

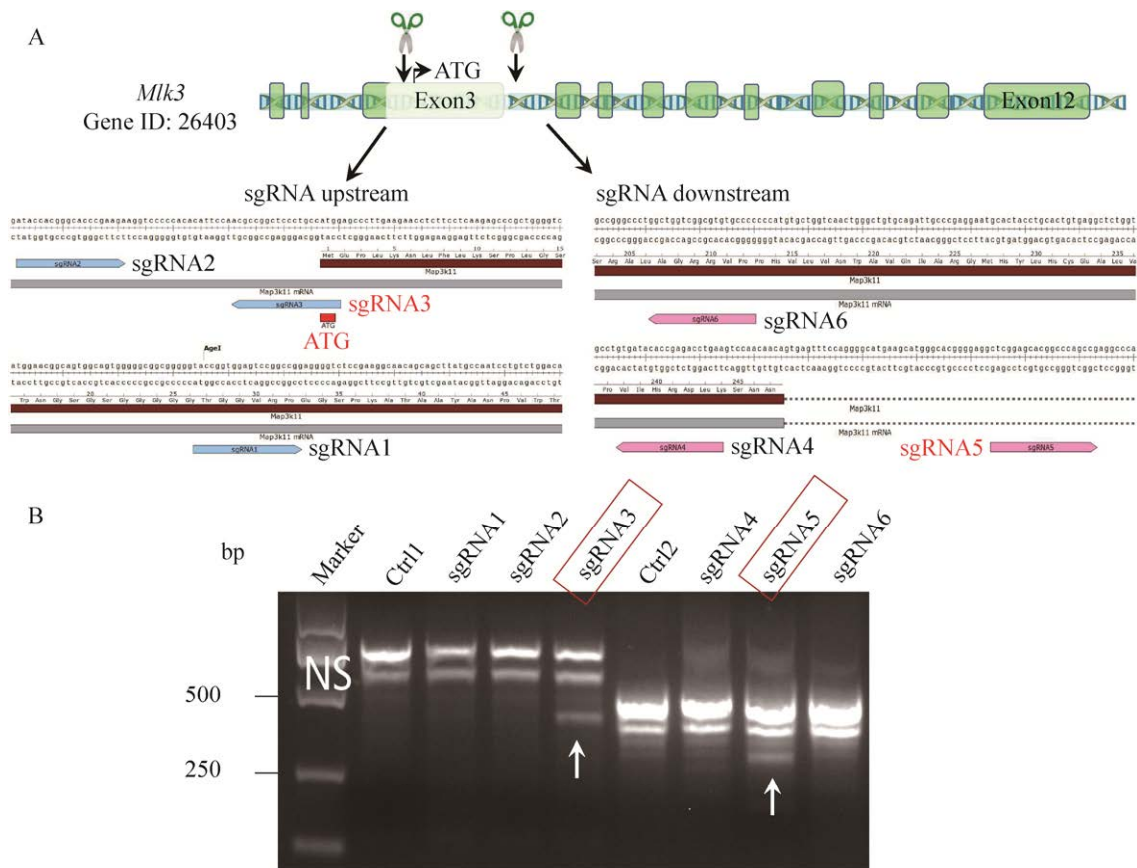


图 1 靶向 *Mik3* sgRNA 设计及验证

Figure 1 sgRNA design and validation. A: A schematic illustration showing the location of sgRNA target sequences in *Mik3* gene. B: Genomic DNA were isolated from NIH3T3 cells transfected with px459-sgRNA plasmids, followed by amplification of *Mik3* fragments carrying sgRNA targeted sites, and digestion with T7E1. The products were detected by agarose gel. Lane 1: Marker; Lane 2 and Lane 6: DNA from cells transfected with px459 without sgRNA plasmid digested with T7E1; Lane 3–5 and Lane 7–9: DNA from cells transfected with px459-sgRNA1, -sgRNA2, -sgRNA3, -sgRNA4, -sgRNA5, or -sgRNA6 and digested with T7E1. White arrow: The small fragment below the wild type band suggesting the sgRNA created indels on *Mik3* gene. Red box: sgRNAs used to construct *Mik3* KO mice.

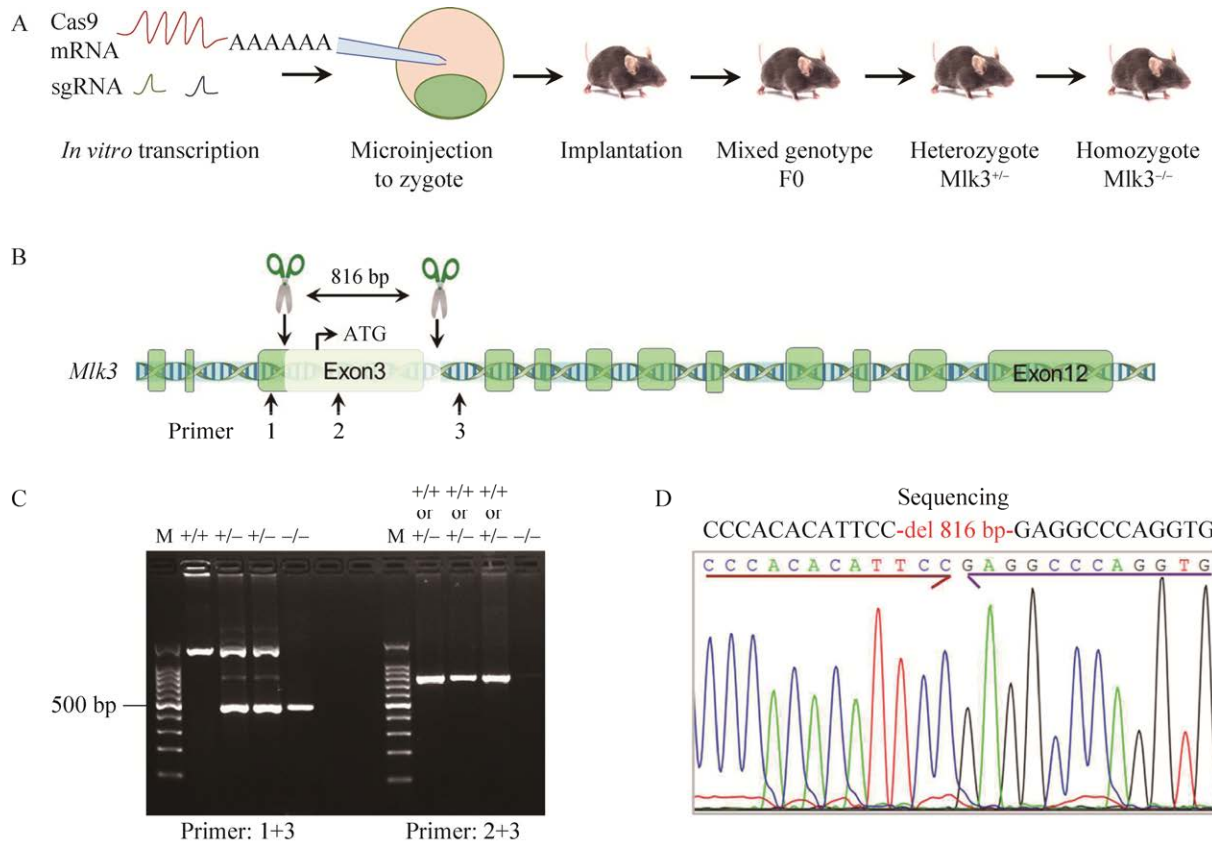


图2 *Mik3* 基因敲除鼠构建

Figure 2 Generation of *Mik3*KO mice by using the CRISPR/Cas9 system. A: General procedure of *Mik3*KO mice. B: A schematic illustration showing the location of sgRNA and genotyping primer in *Mik3* gene. C: Genotyping of *Mik3*KO newborns. M: Marker; +/+ : Wild type; +/- : Heterozygote; -/- : Homozygote. D: DNA sequencing showing the deletion of an 816 bp fragment in *Mik3* gene.

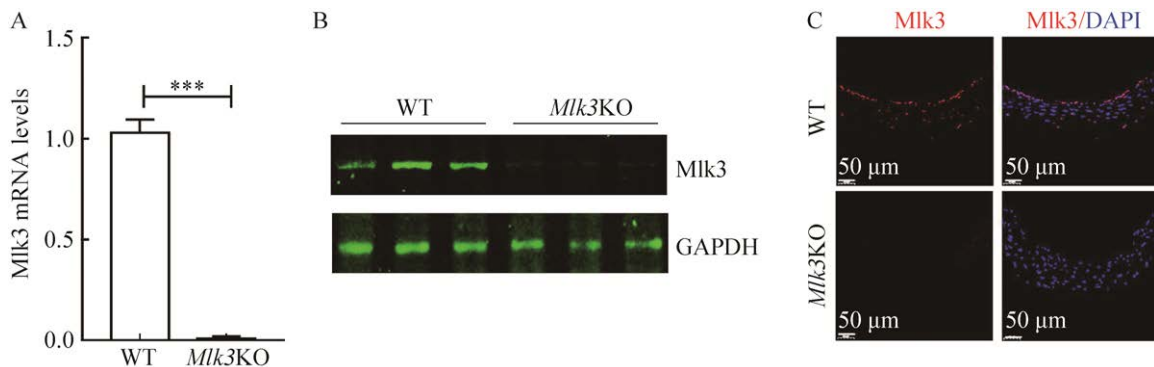


图3 *Mik3* 基因敲除鼠中检测 *Mik3* mRNA 及蛋白表达

Figure 3 Expression of *Mik3* in *Mik3*KO mice. A: RT-PCR. B: Western blotting analysis. C: Immunofluorescence analysis of *Mik3* levels in WT and *Mik3*KO mice. The data represent results from 3 WT mice and 3 *Mik3*KO mice. \*\*\*:  $P < 0.001$ . Scale bar: 50  $\mu$ m.

## 2.4 *Mik3* 基因敲除鼠血压升高

为探讨 *Mik3* 基因缺失对血压的影响, 观察了成年(8-10 周龄) *Mik3* 敲除鼠基础状态下血压及心率等指标变化。*Mik3* 敲除鼠基础状态下收缩压(systolic blood pressure, SBP)及舒张压(diastolic blood pressure, DBP)均显著高于同笼对照鼠(图 4A、4B), 但心率在两组间无差别(图 4C)。上述结果表明 *Mik3* 基因敲除导致小鼠血压升高。为探讨 *Mik3* 对血压的影响是否与血清钙离子浓度有关, 比较了 *Mik3* 基因敲除鼠及同笼对照鼠的血清钙离子浓度, 但两组间无显著差异(图 4D)。*Mik3* 基因敲除是否导致细胞内钙离子浓度异常及钙信号失调有待深入探讨。

## 2.5 *Mik3* 基因敲除鼠血管平滑肌层肌球蛋白轻链磷酸化增强

肌球蛋白轻链(myosin light Chain, MLC)磷酸化水平增强导致血管平滑肌细胞收缩加剧, 外周阻力增加, 在高血压发生发展过程中发挥重要作用<sup>[12-13]</sup>。为初步探讨 *Mik3* 基因缺失导致血压升高的病理基础, 分离野生及 *Mik3* 敲除鼠的主动脉, 免疫组化检测 MLC 磷酸化水平。结果显示 *Mik3* 敲除鼠血管平滑肌层 MLC

磷酸化水平显著高于对照组(图 5A、5B)。Western blotting 检测进一步证实了该结果(图 5C、5D)。*Mik3* 基因敲除导致上调 MLC 磷酸化水平。*Mik3* 通过何种机制调控 MLC 的磷酸化将在后续研究中进行深入探讨。

## 3 讨论

本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建了 *Mik3* 基因敲除鼠, 并发现 *Mik3* 基因敲除鼠血压升高, 血管平滑肌层 MLC 磷酸化水平显著增加, 提示 *Mik3* 可能通过调控 MLC 上游信号通路发挥抵抗血压升高的内源性保护作用。

自 2013 年 CRISPR/Cas9 系统用于基因编辑以来, 不断优化的 CRISPR/Cas9 系统展现出特有的稳定、高效、特异性好、可操作性强的优势, 被广泛用于人、动物、植物、细菌及病毒等模型制备及基因编辑研究, 并使得基因敲除及敲入等动物模型的构建发生了革命性变化<sup>[9-11]</sup>。CRISPR/Cas9 系统编辑的特异性依赖于 sgRNA。当 Cas9 核酸酶及 sgRNA 进入细胞核后, sgRNA 识别目标基因, 引导 Cas9 核酸酶在目标基因编辑位点造成 DNA 双链断裂。细胞经

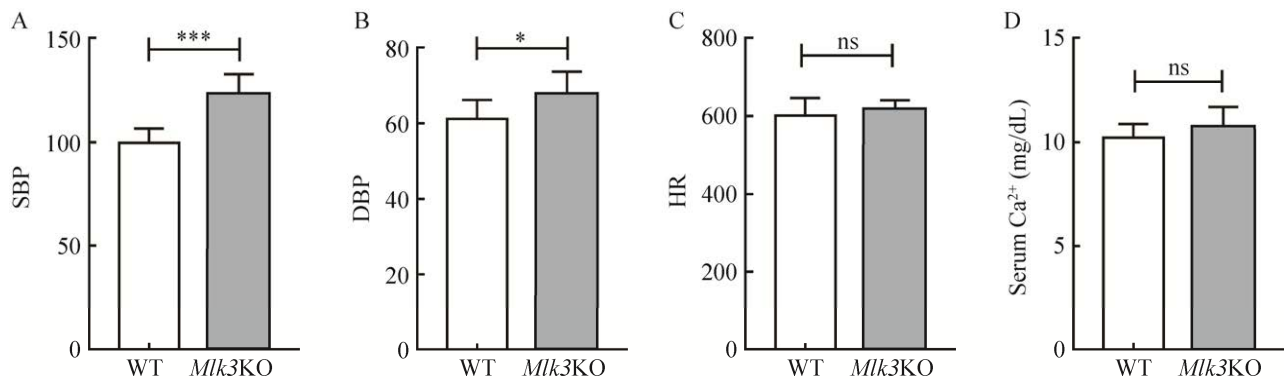


图 4 *Mik3* 基因敲除鼠血压升高

Figure 4 Effects of *Mik3*KO on blood pressure. A: Systolic blood pressure (SBP). B: Diastolic blood pressure (DBP). C: Heart rate (HR) of WT and *Mik3*KO mice. The data represent results from 15 WT mice and 15 *Mik3*KO mice. D: Serum Ca<sup>2+</sup> of WT and *Mik3*KO mice. The data represent results from 8 WT mice and 8 *Mik3*KO mice. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns: No significant differences.



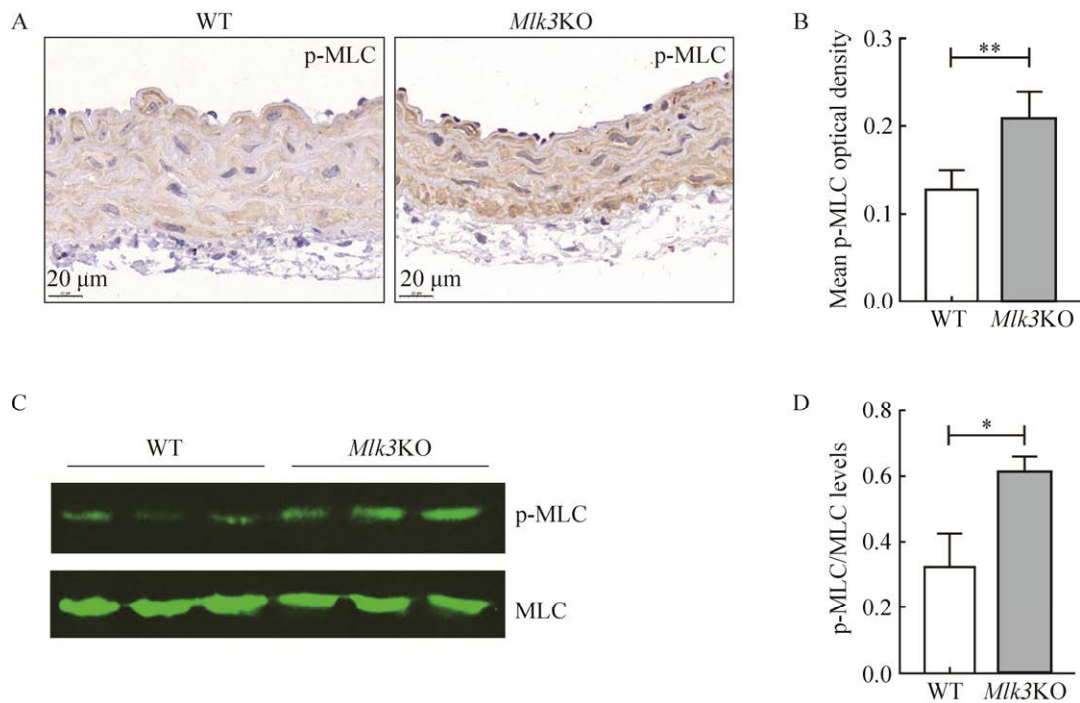


图5 *Mik3* 调控 MLC 磷酸化

Figure 5 Effect of *Mik3*KO on MLC phosphorylation. A: Immunohistochemistry analysis of MLC phosphorylation levels in aortas isolated from WT and *Mik3*KO mice. B: Mean p-MLC per optical density. C: Western blotting analysis of MLC phosphorylation levels in aortas isolated from WT and *Mik3*KO mice. D: Relative intensity of p-MLC to MLC evaluated by Image J. The data represent results from 3 WT mice and 3 *Mik3*KO mice. \*:  $P < 0.05$ ; \*\*:  $P < 0.01$ . Scale bar: 20  $\mu$ m.

过非同源末端连接(non-homologous end joining, NHEJ)修复后形成 Indel<sup>[14-15]</sup>。如果编辑位点选择在目标基因的编码区, Indel 将造成读码框的移位, 导致编码基因提前终止, 达到基因敲除的效果。本研究在 *Mik3* 基因的含有翻译起始位点的第 3 个外显子两端分别设计 sgRNA, 通过上下游 2 个 sgRNA 的共同作用, 造成大片段缺失基础上的 Indel, 从而敲除目的基因。本研究 sgRNA 的设计基于麻省理工学院 Feng Zhang 实验室建立的 sgRNA 在线设计软件, 并将 CRISPR/Cas9-sgRNA 共表达载体转染至 NIH3T3 细胞后, 利用 T7E1 酶切法验证了候选 sgRNA 的活性。图 1B 中 sgRNA3 及 sgRNA5 出现了 T7E1 酶切 Indel 片段产生的小片段, 证实这 2 个

sgRNA 能介导 Cas9 蛋白编辑目标序列。T7E1 酶切实验中 2 个 sgRNA 的活性不高, 可能与 NIH3T3 细胞的转染效率较低有关。后续构建 *Mik3* 基因敲除鼠中, 将体外转录的 Cas9 mRNA 及 sgRNA 通过显微注射至单细胞期的受精卵胞质中, 不涉及转染效率的问题。最终所选用的 sgRNA3 及 sgRNA5 有效介导了 Cas9 核酸酶在 *Mik3* 目标区域造成了 816 bp 的缺失。Western blotting 及免疫荧光等检测证实了 *Mik3* 基因敲除鼠无 *Mik3* 蛋白表达, 说明 *Mik3* 基因敲除鼠构建成功。

*Mik3* 基因敲除鼠血压升高。血管平滑肌细胞过度收缩增加外周血管阻力, 是导致血压升高的重要因素之一。血管平滑肌细胞中肌球蛋白

白轻链 MLC 的磷酸化是平滑肌收缩的关键因素。其磷酸化水平受肌球蛋白轻链激酶(MLC kinase, MLCK)介导的磷酸化修饰以及肌球蛋白轻链磷酸酶(MLC phosphatase, MLCP)介导的去磷酸化修饰的双向调控。Ras 同源基因家族成员 A (Ras homolog family member A, RhoA)/Rho 相关蛋白激酶(Rho associated coiled-coil containing protein kinase, ROCK)信号通路被公认通过抑制 MLCP 的活性和增加 MLC 的磷酸化来介导血管平滑肌收缩<sup>[12-13,16]</sup>。Gadang 等<sup>[6]</sup>研究提示 *Mlk3* 基因缺失增加 RhoA 的活性。由此推测 *Mlk3* 可能通过调控 RhoA/MLCP/p-MLC 途径维持平滑肌收缩稳态, 抑制血压升高。

多个研究证实异常的 *Mlk3* 激活促进多种肿瘤侵袭性生长, 包括结肠癌、乳腺癌及非小细胞肺癌等。而抑制 *Mlk3* 则有效抑制乳腺癌细胞的迁移和侵袭<sup>[4,17]</sup>。因此, 越来越多的研究聚焦于开发 *Mlk3* 小分子抑制剂用于肿瘤治疗<sup>[18-19]</sup>。本研究结果提示抑制 *Mlk3* 的活性具有升高血压的风险。因此, 对于使用 *Mlk3* 抑制剂的患者, 监测血压是必要的。

高血压是多种心脑血管疾病(心力衰竭、心肌梗死、中风、慢性肾病等)最主要的危险因素<sup>[20]</sup>。高血压发病机制复杂, 利用基因敲除鼠等动物模型揭示高血压的发病机制、发现干预新靶点, 具有重要科学意义及临床价值。本研究基于 CRISPR/Cas9 技术成功构建了丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶编码基因 *Mlk3* 敲除小鼠模型。不同于既往报道的大多基因敲除鼠在病理性刺激作用下, 如血管紧张素 II、高盐诱导等发生血压异常<sup>[21-22]</sup>, *Mlk3* 基因敲除小鼠在基础状态下即表现出收缩压及舒张压的显著升高, 提示 *Mlk3* 是抵抗血压升高的重要内源性保护因子。众所周知, 长期高血压将导致心脏及血管不良重塑(remodeling), 即构成心脏及血管壁的细胞

结构、功能发生持久性变化, 进而增加心脑血管疾病的风险<sup>[23]</sup>。因此, 利用本研究构建的 *Mlk3* 基因敲除小鼠模型进行深入机制研究, 不仅有望揭示蛋白激酶 *Mlk3* 抑制血压升高的内源性保护机制, 发现靶向蛋白激酶的干预新靶点, 还能阐明高血压诱导心血管不良重塑的作用机制, 为高血压及其介导的不良事件的有效防治提供了新思路。

## 致谢

感谢上海邦耀生物科技有限公司帮助完成受精卵显微注射及移植入假孕鼠。

## REFERENCES

- [1] OPARIL S, ACELAJADO MC, BAKRIS GL, BERLOWITZ DR, CÍFKOVÁ R, DOMINCZAK AF, GRASSI G, JORDAN J, POULTER NR, RODGERS A, WHELTON PK. Hypertension[J]. Nature Reviews Disease Primers, 2018, 4: 18014.
- [2] FANCHER IS, RUBINSTEIN I, LEVITAN I. Potential strategies to reduce blood pressure in treatment-resistant hypertension using food and drug administration-approved nanodrug delivery platforms[J]. Hypertension, 2019, 73(2): 250-257.
- [3] ING YL, LEUNG IW, HENG HH, TSUI LC, LASSAM NJ. MLK-3: identification of a widely-expressed protein kinase bearing an SH3 domain and a leucine zipper-basic region domain[J]. Oncogene, 1994, 9(6): 1745-50.
- [4] CHADEE DN, KYRIAKIS JM. MLK3 is required for mitogen activation of B-Raf, ERK and cell proliferation[J]. Nature Cell Biology, 2004, 6(8): 770-776.
- [5] CALAMARAS TD, BAUMGARTNER RA, ARONOVITZ MJ, McLAUGHLIN AL, TAM K, RICHARDS DA, COOPER CW, LI N, BAUR WE, QIAO XY, WANG GR, DAVIS RJ, KAPUR NK, KARAS RH, BLANTON RM. Mixed lineage kinase-3 prevents cardiac dysfunction and structural remodeling with pressure overload[J]. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology, 2019, 316(1): H145-H159.
- [6] GADANG V, KONANIAH E, HUI DY, JAESCHKE A.

- Mixed-lineage kinase 3 deficiency promotes neointima formation through increased activation of the RhoA pathway in vascular smooth muscle cells[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2014, 34(7): 1429-1436.
- [7] SUN J, TAO T, ZHAO W, WEI LS, SHE F, WANG P, LI YQ, ZHENG YY, CHEN X, WANG W, QIAO YN, ZHANG XN, ZHU MS. CPI-17-mediated contraction of vascular smooth muscle is essential for the development of hypertension in obese mice[J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2019, 46(3): 109-118.
- [8] BAI LY, KEE HJ, CHOI SY, SEOK YM, KIM GR, KEE SJ, KOOK H, JEONG MH. HDAC5 inhibition reduces angiotensin II-induced vascular contraction, hypertrophy, and oxidative stress in a mouse model[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2021, 134: 111162.
- [9] MALI P, YANG L, ESVELT KM, AACH J, GUELL M, DiCARLO JE, NORVILLE JE, CHURCH GM. RNA-guided human genome engineering *via* Cas9[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 823-826.
- [10] SLAYMAKER IM, GAO LY, ZETSCHKE B, SCOTT DA, YAN WX, ZHANG F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity[J]. *Science*, 2016, 351(6268): 84-88.
- [11] WU YX, ZHOU H, FAN XY, ZHANG Y, ZHANG M, WANG YH, XIE ZF, BAI MZ, YIN Q, LIANG D, TANG W, LIAO JY, ZHOU CK, LIU WJ, ZHU P, GUO HS, PAN H, WU CL, SHI HJ, WU LG, TANG FC, LI JS. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells[J]. *Cell Research*, 2015, 25(1): 67-79.
- [12] PFITZER G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle[J]. *Journal of Applied Physiology*, 2001, 91(1): 497-503.
- [13] RIDDICK N, OHTANI KI, SURKS HK. Targeting by myosin phosphatase-RhoA interacting protein mediates RhoA/ROCK regulation of myosin phosphatase[J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2008, 103(4): 1158-1170.
- [14] RAN FA, HSU PD, WRIGHT J, AGARWALA V, SCOTT DA, ZHANG F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system[J]. *Nature Protocols*, 2013, 8(11): 2281-2308.
- [15] LI Y, GAO SJ, HAN YC, SONG L, KONG Y, JIAO Y, HUANG S, DU J, LI YL. Variants of focal adhesion scaffold genes cause thoracic aortic aneurysm[J]. *Circulation Research*, 2021, 128(1): 8-23.
- [16] WANG YP, ZHENG XR, RIDDICK N, BRYDEN M, BAUR W, ZHANG X, SURKS HK. ROCK isoform regulation of myosin phosphatase and contractility in vascular smooth muscle cells[J]. *Circulation Research*, 2009, 104(4): 531-540.
- [17] CHEN J, GALLO K. MLK3 regulates paxillin phosphorylation in chemokine-mediated breast cancer cell migration and invasion to drive metastasis[J]. *Cancer Research*, 2012, 72 (16): 4130-4140.
- [18] KUMAR S, SINGH SK, VISWAKARMA N, SONDARVA G, NAIR RS, SETHUPATHI P, SINHA SC, EMMADI R, HOSKINS K, DANCIOU O, THATCHER GRJ, RANA B, RANA A. Mixed lineage kinase 3 inhibition induces T cell activation and cytotoxicity[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2020, 117(14): 7961-7970.
- [19] ZHAO HF, WU CP, ZHOU XM, DIAO P, XU YW, LIU J, WANG J, HUANG XJ, LIU WL, CHEN ZW, HUANG GD, LI WP. Synergism between the phosphatidylinositol 3-kinase p110 $\beta$  isoform inhibitor AZD6482 and the mixed lineage kinase 3 inhibitor URM-099 on the blockade of glioblastoma cell motility and focal adhesion formation[J]. *Cancer Cell International*, 2021, 21(24):1-16.
- [20] JONES DANIEL W, HALL JOHN E. Seventh report of the Joint National Committee on prevention, detection, evaluation, and treatment of high blood pressure and evidence from new hypertension trials[J]. *Hypertension (Dallas, Tex: 1979)*, 2004, 43(1): 1-3.
- [21] WANG H, YUAN Z, WANG BB, LI BC, LV HZ, HE JL, HUANG YQ, CUI Z, MA QN, LI T, FU Y, TAN XL, LIU YP, WANG SP, WANG CH, KONG W, ZHU Y. COMP (cartilage oligomeric matrix protein), a novel PIEZO1 regulator that controls blood pressure[J]. *Hypertension*, 2022, 79(3): 549-561.
- [22] MATHIEU NM, NAKAGAWA P, GROBE CC, REHO JJ, BROZOSKI DT, LU KT, WACKMAN KK, RITTER ML, SEGAR JL, GROBE JL, SIGMUND CD. ARRB2 ( $\beta$ -arrestin-2) deficiency alters fluid homeostasis and blood pressure regulation[J]. *Hypertension*, 2022, 79(11): 2480-2492.
- [23] LI YL, LI ZY, ZHANG CC, LI P, WU YN, WANG CX, BOND LAU W, MA XL, DU J. Cardiac fibroblast-specific activating transcription factor 3 protects against heart failure by suppressing MAP2K3-p38 signaling[J]. *Circulation*, 2017, 135(21): 2041-2057.

(本文责编 郝丽芳)