

李欣悦, 石桂英, 雷雪裴, 等. 血清剥夺反应因子 (*Sdpr*) 敲除及转基因小鼠的建立与表型分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(5): 7-15.

Li XY, Shi GY, Lei XP, et al. Establishment and phenotypic analysis of *Sdpr*-knockout mice and transgenic mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(5): 7-15.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 05. 002

血清剥夺反应因子 (*Sdpr*) 敲除及转基因小鼠的建立与表型分析

李欣悦, 石桂英, 雷雪裴, 黄艺滢, 李珂雅, 侯丽雅, 王凯瑜, 汤家鸣, 白琳*

(国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室, 中国医学科学院医学实验动物研究所, 北京协和医学院比较医学中心, 北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心, 北京 100021)

【摘要】 目的 建立 *Sdpr* 基因敲除小鼠及 *Sdpr* 转基因小鼠模型, 为 *Sdpr* 基因功能的研究提供小鼠模型。**方法** 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Sdpr* 基因敲除小鼠, 利用过表达质粒构建 *Sdpr* 转基因小鼠模型, 利用 PCR 鉴定小鼠基因型, 利用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 mRNA 和蛋白表达情况, 获取小鼠组织进行组织病理学分析, 利用流式细胞术对小鼠免疫细胞比较分析。**结果** 获得 *Sdpr* 基因敲除及转基因小鼠模型。与野生型小鼠相比, 基因敲除小鼠 *Sdpr* 基因表达降低; 组织多处出现炎性灶, 肺、脂肪有炎性细胞浸润; 肝出现脂肪变性, 中央静脉周围可见髓外造血; 脾组织红髓出现髓外造血; 骨髓中 T 细胞比例降低, 胸腺中 CD4⁺CD8⁻ 细胞增多, CD4⁺CD8⁺ 细胞减少。转基因小鼠 *Sdpr* 基因表达增加; 肝组织轻微脂肪变性; 肺泡间隔增宽; 脾组织淋巴细胞增生, 红髓细胞增多; 外周血中 B 细胞比例增加, M 细胞、T 细胞比例降低, 胸腺 CD4⁺ 细胞增多, CD4⁺CD8⁺ 细胞减少。**结论** 建立和鉴定了 *Sdpr* 敲除和转基因小鼠, 可以为研究 SDPR 蛋白及其相关胞膜蛋白在不同组织器官中的作用机理提供模型。

【关键词】 血清剥夺反应蛋白因子; *Sdpr*; 基因敲除; 转基因; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 05-0007-09

Establishment and phenotypic analysis of *Sdpr*-knockout mice and transgenic mice

LI Xinyue, SHI Guiying, LEI Xuepei, HUANG Yiyong, LI Keya, HOU Liya, WANG Kaiyu, TANG Jiaming, BAI Lin*
(NHC Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine; Institute of Laboratory Animal Science, CAMS&PUMC; Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Critical Diseases, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish *Sdpr*-gene-knockout and *Sdpr* transgenic mouse models to provide suitable models for studying *Sdpr* gene function. **Methods** *Sdpr*-knockout mice were constructed by CRISPR/Cas9 technology, while *Sdpr* transgenic mice were constructed using plasmid overexpression. We identified mouse genotypes by PCR. The mRNA and protein expression levels were determined by qRT-PCR and Western blot. Mouse tissues were obtained for histopathological analysis. We analyzed the immune cells of the knockout mice and transgenic mice by flow cytometry. **Results** *Sdpr*-gene-knockout and transgenic mouse models were obtained. Compared with that in the wild-type mice, the *Sdpr* gene expression level was decreased in the knockout mice. Meanwhile, inflammatory foci appeared in many tissues,

【基金项目】 国家自然科学基金面上项目 (31672374); 北京自然科学基金面上项目 (5202024); 中央高校基本科研业务费专项资金 (3332020051)。

【作者简介】 李欣悦 (1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 细胞生物学。E-mail: lxy415@126.com

【通信作者】 白琳 (1984—), 女, 研究员, 博士, 研究方向: 干细胞转化。E-mail: bailin49@163.com

such as inflammatory cells infiltrated into the lungs and fat. Hepatic steatosis can be observed, and extramedullary hematopoiesis can be seen around the central hepatic vein. Extramedullary hematopoiesis can be observed in the red pulp of the spleen. The proportion of T cells in bone marrow of the knockout mice decreased, the number of $CD4^+CD8^-$ T cells in the thymus increased, while $CD4^+CD8^+$ T cells decreased. In terms of the findings in the transgenic mice, the expression level of the *Sdpr* gene increased. In addition, their liver cells showed slight fatty degeneration and widening of alveolar septa. Moreover, spleen lymphocytes exhibited hyperplasia and red pulp cells increased. The proportion of B cells in the peripheral blood of the transgenic mice increased while the proportions of myeloid and T cells decreased. Finally, thymus $CD4^+$ T cells increased while $CD4^+CD8^+$ T cells decreased. **Conclusions** *Sdpr*-knockout and transgenic mice were successfully established and identified, which can provide models for studying the mechanisms of action of SDPR protein and its related caveolin protein in different tissues and organs.

【**Keywords**】 serum deprivation-response protein; *Sdpr*; gene knockout; transgenic; mice

胞膜窖 (caveolae) 是细胞表面内陷的结构, 陷窝由脂质筏形成并通过小窝蛋白 (caveolin) 聚合, 在细胞内吞、细胞膜组装、细胞内运输、胆固醇稳态调节、信号传导及肿瘤生成等生物学活动中具有重要作用^[1-2]。

Cavin 家族是调节胞膜窖形成和功能的家族^[3-4], 包括了 Cavin-1、Cavin-2、Cavin-3、Cavin-4 4 个成员^[5]。其中 Cavin-2 也称血清剥夺反应因子 (serum deprivation-response protein, SDPR), 为胞膜窖调节蛋白家族成员, 位于人 2 号染色体的 q32-q33 位, 由 418 个氨基酸组成, 在不同物种中具有高度的同源性。SDPR 是最初人血小板中纯化为磷脂酰丝氨酸 (PS) 结合蛋白^[6], 并在体外被证明是蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 异构体的底物^[7], 被发现在血清饥饿的细胞中高表达^[8]。近年来对其功能的研究发现, SDPR 直接参与胞膜窖生物发生和形态, 是形成胞膜窖时膜内陷所必需的, 且其功能可能一部分独立于胞膜窖^[9], 另一方面可以调节胞膜窖的形态, 诱导微管形成的动力学过程^[10]。近几年来对 SDPR 的研究主要集中在肿瘤学的研究, 已发现在多种肿瘤如前列腺癌、乳腺癌和肾癌中 *Sdpr* 基因表达下调, 提示 *Sdpr* 可能为作为抑癌基因影响肿瘤的发生发展^[11-13]。*Sdpr* 可通过阻断转化生长因子- β 信号通路抑制乳腺癌的进展^[14], 也通过促进细胞凋亡作为乳腺癌转移的抑制因子, 降低肿瘤迁移和内侵/外渗能力^[15]。

现有对 *Sdpr* 基因的研究中大多利用细胞系或肿瘤患者组织样本, 为深入研究 *Sdpr* 基因的相关功能及其相关胞膜窖蛋白在不同组织器官中的作用机理, 本研究中我们利用 CRISPR/Cas9 技术和过表达载体建立了 *Sdpr* 基因敲除小鼠和 *Sdpr* 转基因小鼠模型, 为该基因生物学功能的研究及在多种疾病

致病机制及不同疾病进程发展的体内研究中提供有效动物模型。同时, 通过对该模型的初步检测分析中发现 *Sdpr* 基因对小鼠免疫系统具有重要作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验所需动物为 SPF 级 C57BL/6J 小鼠 (雌性, 15 只, 3~4 周龄, 体重 7~12 g; 雄性, 30 只, 6~8 周龄, 体重 18~25 g) 及 ICR 小鼠 (雌性, 4 只, 8~10 周, 体重 27~30 g; 雄性, 2 只, 10 周龄, 体重 35~38 g), 购入于北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK (京) 2019-0008], 长期饲养于中国医学科学院医学实验动物研究所 [SYXK (京) 2019-0014] SPF 级动物屏障环境动物设施。饲养环境: 温度 20℃~26℃, 湿度 40%~70%, 光照周期明暗比 12 h/12 h。饲养期间动物可自由进食饮水, 饲料、水瓶、垫料、鼠盒均经过高温高压灭菌处理。实验中涉及动物的操作程序已通过本所实验动物使用与管理委员会审批 (BL17001), 遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

MEGAscript™ T7 转录试剂盒 (Invitrogen, Am1354); 鼠尾直接 PCR 试剂盒 (Bimake, B45012); DL2000 DNA Marker (TaKaRa); PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa) TB Green® Premix Ex Taq™ (TaKaRa); RIPA 裂解液 (Beyotime, P0013B); BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (Beyotime, P0009); PAGE 凝胶快速制备试剂盒 (10%) (雅酶, PG112); 一抗: SDPR Polyclonal Antibody (proteintech, 12339-1-AP), β -actin (Bioss, bs-0061R); 二抗: 山羊抗兔 (中杉金桥, ZB-5301); 红细胞裂解液 (BD, 555899); 流式抗体 CD3、CD4、CD8、B220、CD11b、NK1.1 (Invitrogen)。

PCR 仪 (Hema); StepOnePlus™ 实时荧光定量 PCR 仪 (applied biosystems, 美国); 多样品研磨珠均质仪 (OMNI, Bead Ruptor 24 Elite); 垂直电泳仪 (Bio-Rad, 美国); 组织脱水机、石蜡包埋机、石蜡切片机 (Leica, 德国); 流式细胞仪 (BD FACS Aria, 美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 *Sdpr* 基因敲除小鼠制备

利用 CRISPR/Cas9 技术进行 *Sdpr* 基因敲除小鼠的建立。小鼠 *Sdpr* 基因 (Gene ID: 20324) 位于第一号染色体的 1 C1.1 区段 (ENSMUSG00000045954)。针对 *Sdpr* 基因选择两个 sgRNA 靶点 (靶点 1: GGCCATCCGAGACAACCTCGCAGG 及靶点 2: GGTA CTTGGAGAGCTTGGTGAGG), 合成两对寡聚核苷酸链 (Mice-*Sdpr*-1-gRNA up: TAGGCCATCCGAGACAACCTCGC 和 Mice-*Sdpr*-1-gRNA down: AAACGCGAGTTGTC TCGGATGG; Mice-*Sdpr*-2-gRNA up: TAGGTACTTGAGAGCTTGGTG 和 Mice-*Sdpr*-2-gRNA down: AAACCACC AAGCTCTCCAAGTA)。将合成的 sgRNA 单链通过退火复性结合成小片段, 插入经 Bsa I 酶切线性化的 pUC57-sgRNA 表达载体, 并将构建完成的 sgRNA 载体通过 MEGAshortscript™ T7 转录试剂盒体外转录成为可注射的 sgRNA。

将 3~4 周龄 C57BL/6 雌鼠注射 PMSG 和 HCG 激素进行超数排卵, 与成年 C57BL/6 小鼠交配后获得受精卵用于注射。Cas9 载体通过体外转录成为可注射的 Cas9-RNA (30 ng/μL), 与转录后的 sgRNA (10 ng/μL) 混合后注射到小鼠受精卵中。采用 8~10 周龄 ICR 雌鼠与结扎的雄鼠交配后选取见栓的雌鼠作为受体鼠, 将注射后的受精卵移植到受体鼠输卵管壶腹部, 等待小鼠出生后鉴定基因型。

1.3.2 *Sdpr* 基因转基因小鼠制备

用 PCR 扩增的小鼠 *Sdpr* (Gene ID: 20324) 基因全长克隆至 pUBC-SBase 表达载体, 将扩增片段插入 pUBC 载体的 UBC 启动子下游, 由 PvuII (TaKaRa) 对载体线性化后获得转基因 DNA 片段, 经过 Sephadex G50 柱纯化并调整浓度为 5 ng/μL, 通过显微注射技术将线性化的转基因载体注射到 SPF 级 C57BL/6J 小鼠受精卵中, 将注射后的受精卵移植至假孕受体 ICR 小鼠体内, 等待小鼠出生后鉴定基因型。

1.3.3 基因型鉴定

小鼠出生后编号并剪取尾尖, 利用鼠尾直接

PCR 试剂盒裂解鼠尾提取基因组 DNA。根据序列信息设计检测引物 (上海英潍捷基)。敲除检测引物为: Mice-*Sdpr* KO-F: 5'-GCTCACTTCAG ACCAACCAGCC-3' 和 Mice-*Sdpr* KO-R: 5'-GGACTGAGCTCAAGTAGGTGGAGG-3' (野生条带为 612 bp, 敲除条带为 451 bp); 转基因检测引物为: *Sdpr*-F1: 5'-ATCCAGAACGACCTCACCAAG-3' 和 *Sdpr*-R1: 5'-TATCGACTTTCTTGAGGCTGGAT-3' (条带为 445 bp) PCR 反应体系为 20 μL。反应程序为 95℃ 5 min; (95℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 45 s) × 30 个循环; 72℃ 10 min。采用浓度 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳并成像。

1.3.4 qRT-PCR 检测 *Sdpr* mRNA 表达情况

Sdpr 敲除小鼠及同窝野生型小鼠各 3 只, *Sdpr* 转基因小鼠及同窝野生型小鼠各 3 只。脱颈处理后, TRIzol 法提取肝、脾、胸腺总 RNA, 利用反转录试剂盒获得 cDNA。根据 *Sdpr* 序列信息设计检测引物 (上海英潍捷基) *Sdpr*-sense: 5'-CATCCAGAACGACCTCACCAA-3' 和 *Sdpr*-anti-sense: 5'-GGGAACTGGCTCCTTCACAA-3'。以 β -actin 为参照基因合成引物 β -actin-sense: TGCTGTCCCTGTATGCCTCT 和 β -actin-anti-sense: TTGATGTCACGCACGATTTTC。采用 SYBR Green 法对不同样本中的 *Sdpr* 基因表达进行分析, 计算 Ct 值, 利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析。

1.3.5 Western blot 检测各组织中 SDPR 蛋白表达

取后续繁育的 6 月龄雄性 *Sdpr* 基因敲除小鼠 (*Sdpr*^{-/-}) 及其同窝野生型小鼠 (*Sdpr*^{+/+}) 各 3 只; 6 月龄雄性 *Sdpr* 基因转基因小鼠 (*Sdpr*-Tg) 及其同窝野生型小鼠 (WT) 各 3 只。安乐死后取小鼠心、肝、脾、肺、胸腺组织置于含研磨珠的研磨管中, 加入 RIPA 裂解液, 使用 OMNI 均质仪研磨后, 冰上裂解 30 min, 12000 r/min 4℃ 离心 20 min 后取上清为组织总蛋白, 经 BCA 试剂盒浓度测定后调整蛋白浓度。制备 10% PAGE 凝胶, 上样量为每孔 30 μg。一抗: SDPR (1: 1000)、 β -actin (1: 2000), 4℃ 孵育过夜。二抗: 山羊抗兔 (1: 5000), 室温孵育 1 h。TBST 洗膜后使用 ECL 发光液显影。

1.3.6 苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色

取 6 月龄的 *Sdpr* 基因敲除小鼠和其同窝野生型小鼠, *Sdpr* 转基因小鼠和其同窝野生型小鼠。取材固定: 脱颈后取心、肝、脾、肺、肾等新鲜组织置于

10%福尔马林中固定 48 h 以上。经乙醇梯度脱水、二甲苯透明、石蜡包埋、切片贴片后,进行常规 HE 染色,封片后于光学显微镜下进行组织病理学变化观察。

1.3.7 免疫细胞流式分析

小鼠眼眶静脉丛采集外周血 100 μ L,加入红细胞裂解液混匀后室温静置 5 min,离心后加入 PBS 缓冲液重悬细胞备用。小鼠脱颈椎法处死,取胸腺、脾置于预冷的 PBS 缓冲液中。用载玻片磨砂端沾取 PBS 后将胸腺、脾研磨成细胞悬液备用;取小鼠双侧后肢骨,使用研钵将骨髓压出,分两次加入 6 mL 预冷 PBS 缓冲液反复吹打直至骨髓组织发白。将细胞悬液经 300 目尼龙膜过滤后,1500 r/min 离心 5 min。加入 PBS 重悬细胞,调整细胞浓度后取 10^6 个细胞荧光抗体标记。

免疫细胞分析采用如下抗体标记: FITC CD4、PE CD45、PerCP-cy5.5 CD3、PE-Cy7 B220、APC CD8、APC-Cy7 CD11b。细胞悬液离心后,加入 PBS 稀释(1:200)的荧光抗体标记,4℃避光染色 30 min, PBS 洗 1 次,2500 r/min 离心 5 min,200 μ L PBS 重悬细胞,经 300 目尼龙膜过滤后上机。FlowJo 计算标记阳性细胞比率。

1.4 统计学方法

数据采用 GraphPad Prism 8.4.0 和 IBM SPSS Statistics 26 进行统计分析,实验中所有数据均以平

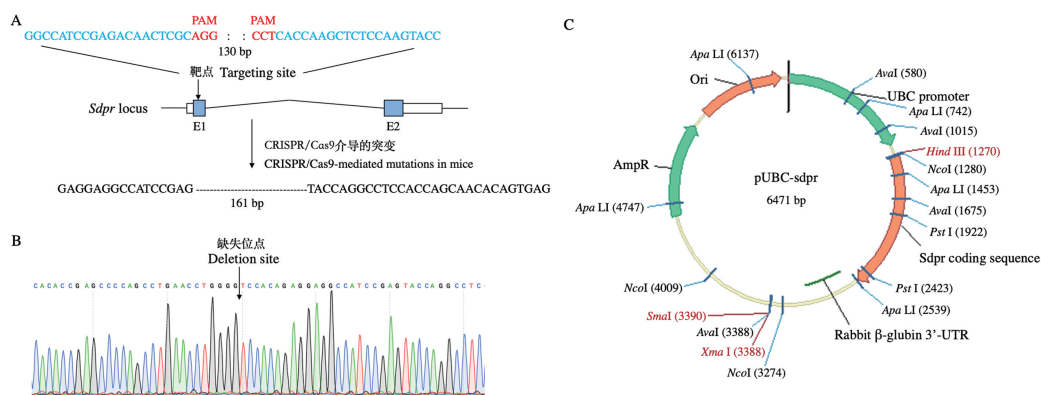
均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。各组间数据分析采用独立样本 t 检验, $P<0.05$ 认为有统计学差异。

2 结果

2.1 *Sdpr* 基因敲除小鼠和转基因小鼠的构建

我们利用 CRISPR/Cas9 的技术构建了 *Sdpr* 基因敲除小鼠,针对 *Sdpr* 基因设计了两个 sgRNA 作用靶点,sgRNA 表达载体经线性化形成粘性末端,退火后与 pUC57-sgRNA 链接(图 1A),测序验证序列结果正确(图 1B)。sgRNA 使 Cas9 可在 sgRNA 作用下识别含有 PAM 的序列,实现 DNA 双链断裂。将成功构建的 sgRNA 表达载体和 Cas9 表达质粒经 T7 RNA 聚合酶体外转录为可注射的 sgRNA 和 Cas9 mRNA,混合后注射到小鼠受精卵中,移植入假孕受体 ICR 小鼠中,待小鼠出生后与野生型小鼠交配繁殖。在后续繁育中剪取小鼠尾尖提取 DNA 进行基因型鉴定,经 PCR 扩增野生条带为 612 bp,敲除条带为 451 bp。同时在 612 bp、451 bp 处有两条带,为杂合子小鼠(图 2A)。

同时将 *Sdpr* 基因插入过表达质粒 UBC 启动子下游,构建得到 *Sdpr* 转基因过表达载体 pUBC-*Sdpr*(图 1C)。利用显微注射将线性化的载体注射到 C57BL/6J 小鼠受精卵,移植入假孕受体 ICR 小鼠中,待小鼠出生后与野生型小鼠交配获得 *Sdpr* 全身过表达的转基因小鼠,后续可稳定传代。转基因阳性小鼠



注:A:利用 CRISPR/Cas9 建立 *Sdpr* 敲除小鼠构建示意图,在第一外显子处设计作用靶点,蓝色为 sgRNA 对应的两靶点,红色为 PAM 基序,Cas9/sgRNA 介导的基因打靶产生移码突变,产生 *Sdpr* 缺失的表达载体;B:*Sdpr* 敲除片段测序结果;C:pUBC-*Sdpr* 表达载体构建。

图 1 *Sdpr* 敲除及转基因小鼠建立方案

Note. A, Schematic diagram of *Sdpr* knockout mice with CRISPR/Cas9 technology. The target was designed on the first exon, the blue was the two targets corresponding to sgRNA, whereas the red was the PAM motif. The Cas9/sgRNA-mediated gene targeting generates frame-shift mutation resulting in *Sdpr*-deficient expression vector was established. B, Chromatographs from *Sdpr* knockout sequences of truncated PCR products. C, Construct of pUBC-*Sdpr* expression vector.

Figure 1 Establishment of *Sdpr* knockout mice and transgenic mice

DNA 扩增片段经电泳后在 445 bp 处可见条带,野生型 C57BL/6J 小鼠在 445 bp 处无条带(图 2B)。

2.2 *Sdpr* 基因敲除和转基因小鼠各组织中的表达

通过 qRT-PCR 和 Western blot 检测 *Sdpr* 在基因敲除小鼠和转基因小鼠各组织中 mRNA 表达水平和蛋白表达水平。结果显示在肝、胸腺和脾组织中 *Sdpr* 基因敲除小鼠 mRNA 表达水平显著低于野生型小鼠(图 3A),在肝、肺、胸腺、脾组织中 SDPR 蛋白表达显著低于野生型小鼠(图 4A、4C);*Sdpr* 转基因小鼠的肝、胸腺、脾组织的 mRNA 相对表达水平高于野生型小鼠(图 3B),在转基因小鼠的心、肝、胸腺、脾组织中 SDPR 蛋白的表达均明显高于野生型小鼠(图 4B、4D)。

2.3 组织病理学变化

在小鼠饲养繁殖过程中发现 *Sdpr* 敲除小鼠和转基因小鼠在寿命、生殖能力等方面与野生型小鼠没有明显差异。

通过在光学显微镜下对 6 月龄的小鼠进行组织的病理学观察,发现与野生型小鼠相比,*Sdpr* 敲除小鼠肝细胞出现脂肪变性,多处可见肉芽肿形成,中央静脉周围可见明显髓外造血;肺局部血管周围炎性细胞浸润,肺泡间隔增宽;脾红髓出现髓外造血;骨髓中细胞形态出现变化,淋巴细胞比例减少,粒细胞比例增加;脂肪存在多处炎性细胞浸润;心脏、肾、胸腺病理未发现异常。

Sdpr 转基因小鼠肝有轻微脂肪变性;小鼠肺中肺泡间隔轻微增宽;脾动脉淋巴鞘周围淋巴细胞增生,红髓细胞增多;骨髓中淋巴细胞比例增多,粒细

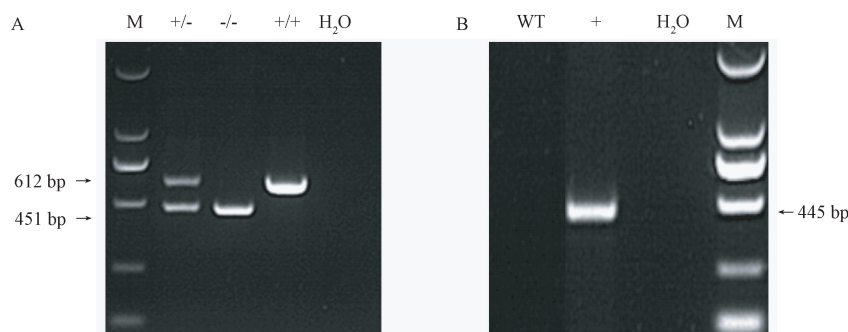
胞比例减少;心脏、肾、胸腺、脂肪未发现病理变化(图 5)。

2.4 *Sdpr* 对免疫细胞的影响

为了解 *Sdpr* 对小鼠免疫细胞的影响,我们选取了 *Sdpr* 基因敲除小鼠、*Sdpr* 转基因小鼠与野生型小鼠每组各 9 只,分别取外周血、骨髓、脾及胸腺中的免疫细胞进行荧光抗体染色标记后利用流式细胞仪进行分析,检测免疫细胞的比例。结果显示与野生型小鼠对照相比,在外周血中 *Sdpr* 转基因小鼠的 B 细胞(B220⁺)比例明显增加,粒细胞(CD11b⁺)和 T 细胞(CD3⁺)比例降低(图 6A);在骨髓中 *Sdpr* 基因敲除小鼠 T 细胞比例降低(图 6B);在脾中 *Sdpr* 敲除小鼠、*Sdpr* 转基因小鼠免疫细胞均没有明显变化(图 6C);T 细胞在胸腺中经历几个阶段发育成熟,结果分析发现在 *Sdpr* 基因敲除小鼠胸腺中 CD4⁻CD8⁻双阴性细胞增多,CD4⁺CD8⁺双阳性细胞减少。*Sdpr* 转基因小鼠胸腺 CD4⁺T 细胞显著增多,CD4⁺CD8⁺双 A 阳性细胞减少(图 6D)。上述结果表明 *Sdpr* 基因对小鼠免疫系统有着重要的影响。

3 讨论

SDPR 在多种组织细胞中广泛表达^[8],在胞膜窖形成中发挥重要作用^[9]。胞膜窖是脂肪细胞表面大量存在结构域,参与胰岛素信号传导、膜运输和脂质稳态^[16-18]。因此,caveolin 蛋白和 Cavin 蛋白家族的转录控制机制对脂肪细胞生物学具有重要意义^[4],该领域的研究可能有助于深入了解胰岛素抵抗和糖尿病。在脂代谢的研究中发现,在脂肪生

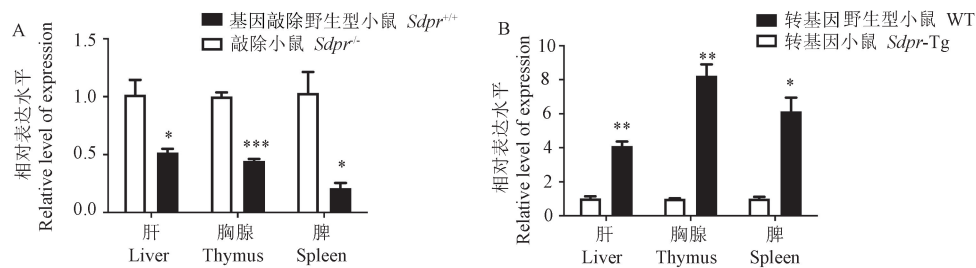


注:A:PCR 鉴定 *Sdpr* 敲除小鼠的基因型;B:PCR 鉴定 *Sdpr* 转基因小鼠的基因型;M:Marker DL2000 (TaKaRa);H₂O:水;+/+:野生型对照;+/-:*Sdpr* 杂合子小鼠对照;-/-:*Sdpr* 敲除纯合小鼠;+:阳性小鼠;WT:野生型小鼠。

图 2 *Sdpr* 敲除及转基因小鼠的鉴定

Note. A, Identify the genotype of *Sdpr* knockout mice by PCR. B, Identify the genotype of *Sdpr* transgenic mice by PCR. M, DNA molecular weight marker DL2000 (TaKaRa). H₂O, Water. +/+, Wild-type mice. +/-, *Sdpr* heterozygous mice. -/-, *Sdpr* knockout homozygous mice. +, Positive mice. WT, Wild type.

Figure 2 Identification of *Sdpr* knockout mice and transgenic mice

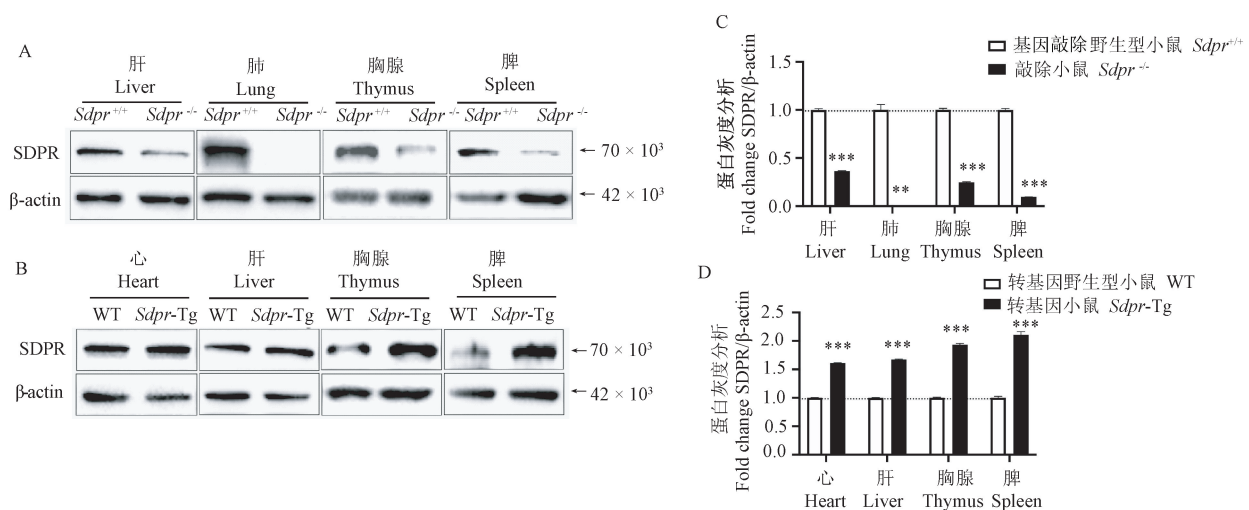


注:A:基因敲除小鼠肝、胸腺、脾组织中 mRNA 相对表达水平; $Sdpr^{+/+}$:基因敲除野生型小鼠; $Sdpr^{-/-}$:敲除小鼠;B:转基因小鼠肝、胸腺、脾组织中 mRNA 相对表达水平;WT:转基因野生型小鼠; $Sdpr$ -Tg:转基因小鼠。与基因敲除野生型小鼠相比, * $P<0.05$, *** $P<0.001$;与转基因野生型小鼠相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

图3 Real-time PCR 检测 *Sdpr* 敲除及转基因小鼠组织中 mRNA 表达水平

Note. A, Relative level of mRNA expression in liver, thymus and spleen of knockout mice. $Sdpr^{+/+}$, Knockout wild-type mice. $Sdpr^{-/-}$, Knockout mice. B, Relative level of mRNA expression in liver, thymus and spleen of transgenic mice. WT, Transgenic wild-type mice. $Sdpr$ -Tg, Transgenic mice. Compared with $Sdpr^{+/+}$, * $P<0.05$, *** $P<0.001$. Compared with WT, * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

Figure 3 *Sdpr* mRNA expression level of knockout mice and transgenic mice in different tissues detected by Real-time PCR



注:A:Western blot 检测 SDPR 蛋白在基因敲除小鼠肝、肺、胸腺、脾中的表达; $Sdpr^{+/+}$:基因敲除野生型小鼠; $Sdpr^{-/-}$:*Sdpr* 基因敲除纯合小鼠,β-actin 为内参;B:Western blot 检测 SDPR 蛋白在转基因小鼠心、肝、胸腺、脾中的表达; $Sdpr$ -Tg:*Sdpr* 转基因小鼠;WT:转基因野生型小鼠,β-actin 为内参;C:敲除小鼠各组织蛋白表达灰度分析;D:在转基因小鼠各组织蛋白表达灰度分析。与基因敲除野生型小鼠相比, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$;与转基因野生型小鼠相比, *** $P<0.001$ 。

图4 SDPR 蛋白在敲除及转基因小鼠各脏器中的蛋白表达

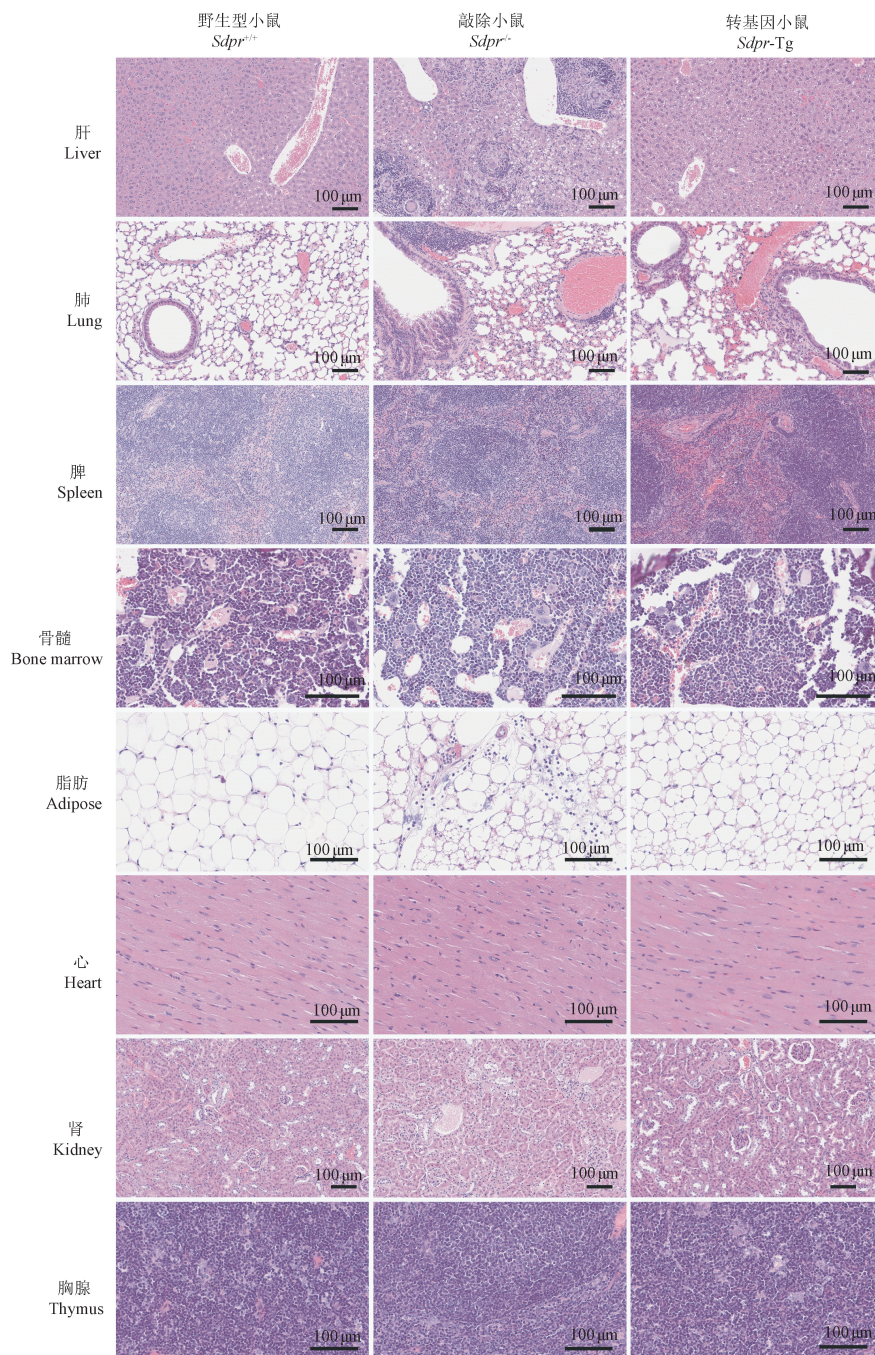
Note. A, Expression level of SDPR protein in liver, lung, thymus and spleen of knockout mice detected by Western blot. $Sdpr^{+/+}$, Knockout wild-type mice. $Sdpr^{-/-}$, *Sdpr* knockout homozygous mice, β-actin as internal reference. B, Expression level of SDPR protein in the heart, liver, thymus and spleen of transgenic mice detected by Western blot. WT, Transgenic wild-type mice. $Sdpr$ -Tg, *Sdpr* transgenic mice, β-actin as internal reference. C, Normalization of protein expression levels in tissues of knockout mice. D, Normalization of protein expression levels in tissues of transgenic mice. Compared with $Sdpr^{+/+}$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. Compared with WT, *** $P<0.001$.

Figure 4 The SDPR protein expression level of knockout mice and transgenic mice in different tissues

成的过程中,CEBPα(CEBPA)和PPARγ(PPARG)是两个关键转录因子,通过相互诱导表达并共同靶向脂肪生成中的关键基因^[19-20],而*Sdpr*可在脂肪细胞分化过程中与CEBPα和PPARγ平行上调,并且CEBPα和PPARγ的激活可诱导原代脂肪细胞及其前体中的SDPR表达,可能表明了脂肪细胞中CEBPα/PPARγ介导的*Sdpr*的重要转录控制机

制^[21]。近期一项研究利用Cavin-2 KO小鼠和Cavin-2敲低的3T3-L1细胞发现,SDPR通过结合胰岛素受体(IRβ)增强其稳定性并调节胰岛素信号传导,该结果强调了*Sdpr*在脂肪生成和脂质代谢中的关键作用,有助于开发治疗病理性肥胖和脂肪生成疾病的新疗法^[22]。

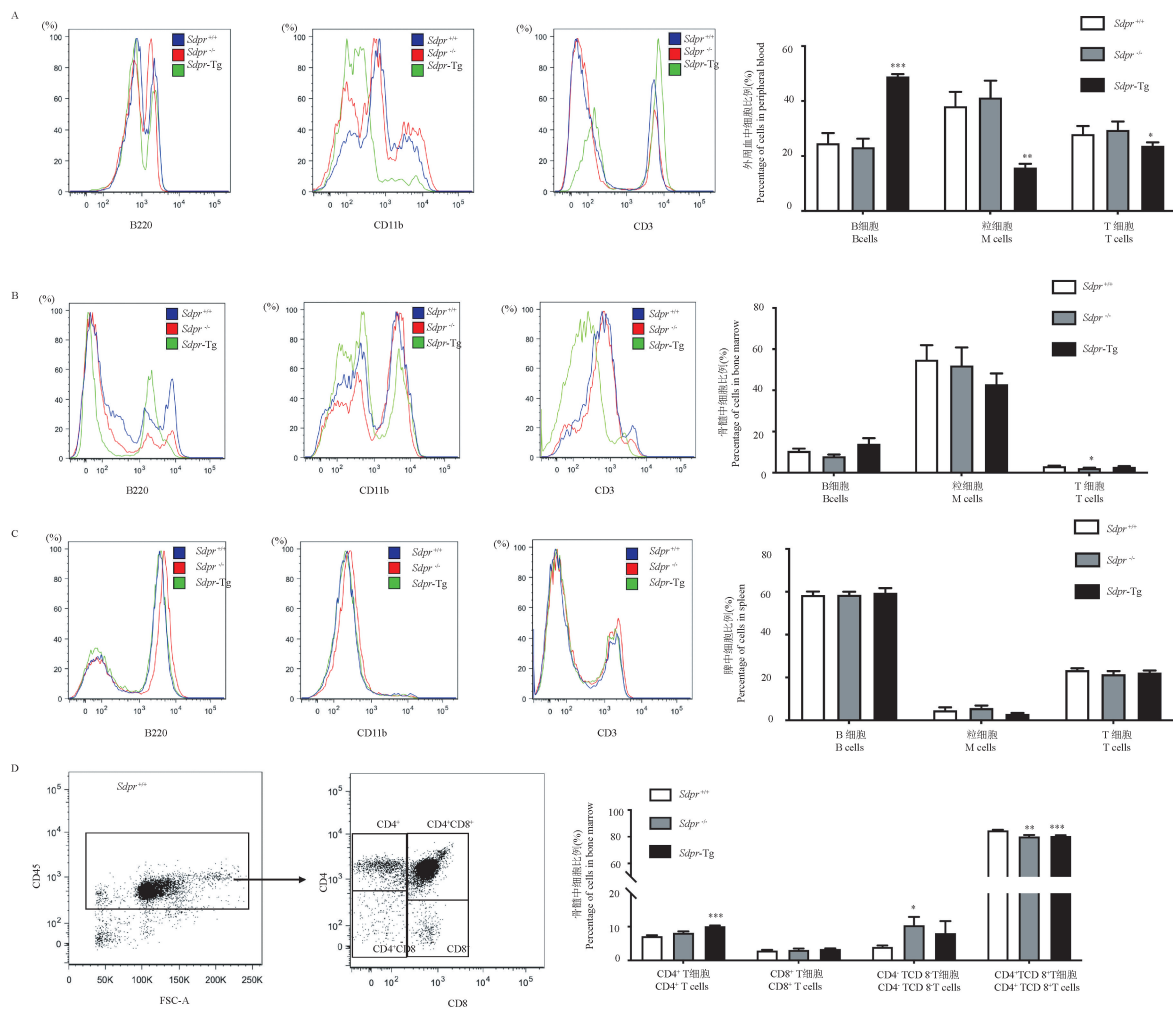
在肿瘤的研究中发现,*Sdpr*在前列腺癌、乳腺

图 5 *Sdpr* 敲除及转基因小鼠主要脏器组织 HE 染色**Figure 5** Histology of the major organs of *Sdpr* knockout and transgenic mice (HE staining)

癌和肾癌中表达均是降低的^[23]。*Sdpr* 已成为肝癌和胃癌等癌症的潜在诊断指标^[24-26]。比较基因组分析显示在 PC3 细胞中加入促进细胞存活的细胞因子 IL-6、IGF-1 和 TGFβ1 后 *Sdpr* 的 mRNA 水平表达降低,说明 *Sdpr* 参与了 IL-6、IGF-1 和 TGFβ-1 诱导激活的下游信号通路^[27]。在肺癌的研究中发现 *Sdpr* 在肺腺癌细胞和组织中的表达下调,且低表达 *Sdpr* 与免疫系统抑制之间存在相关性,对其调控机

制的研究发现 *Sdpr* 与免疫检查点分子 (PD-L1、TNFRSF18、TNFRSF9 和 TDO2) 之间存在负相关,有可能成为肺癌尤其是非小细胞肺癌 (NSCLC) 和 KRAS 突变肺癌治疗及预后的潜在靶点^[28]。

本研究通过 CRISPR/Cas9 技术和 pUBC 过表达质粒及显微注射技术构建了 *Sdpr* 基因敲除小鼠和转基因小鼠全身过表达小鼠模型,该模型与野生型小鼠在寿命、生殖能力等方面无明显差异,且可



注: A:外周血中 B 细胞、粒细胞、T 细胞的比例; B:骨髓中 B 细胞、粒细胞、T 细胞的比例; C:脾中 B 细胞、粒细胞、T 细胞的比例; D:胸腺中 CD4⁺、CD8⁺、CD4⁺CD8⁺ 及 CD4⁺CD8⁺T 细胞的比例。与基因敲除野生型小鼠相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。

图 6 外周血、骨髓、脾及胸腺中免疫细胞的比例

Note. A, Proportion of B(a), myeloid(b) and T cells(c) in peripheral blood. B, Proportion of B(a), myeloid(b) and T cells(c) in bone marrow. C, Proportion of B(a), myeloid(b) and T cells(c) in spleen. D, Proportion of CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ and CD4⁺CD8⁺T cells in thymus. Compared with *Sdpr*^{+/+}, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 6 Percentages of immune cells in the peripheral blood, bone marrow, spleen and thymus

以稳定传代。通过在 DNA、mRNA、蛋白水平上对该模型进行鉴定,并在组织病理学和免疫细胞比例变化上与野生型 C57BL/6J 小鼠进行了比较。

研究结果发现,*Sdpr* 基因的缺失导致小鼠长期处于炎症状态,在敲除小鼠的肺局部血管周围及脂肪组织多处出现炎症细胞浸润,骨髓中细胞形态与比例出现变化,肝、脾可见髓外造血,流式结果显示敲除小鼠骨髓中 T 细胞比例降低;在转基因小鼠肝细胞有轻微脂肪变性,脾有淋巴细胞增生,红髓细胞增多;骨髓中淋巴细胞比例增多,粒细胞比例减少,流式结果显示粒细胞和 T 细胞比例降低,B 细胞比例增加,与 HE 染色结果一致。胸腺是小鼠 T 细

胞发育成熟的场所当来自胎肝或骨髓的 T 细胞进入胸腺后,可经历不同的发育阶段。通过对胸腺组织中免疫细胞进行 CD4/CD8 抗体标记,流式分析发现敲除小鼠胸腺中 CD4⁺CD8⁺ 双阴性细胞增多,CD4⁺CD8⁺ 双阳性细胞减少,证明 *Sdpr* 缺失影响胸腺中 T 细胞成熟,使 T 细胞的发育大量停留在早期;*Sdpr* 转基因小鼠胸腺 CD4⁺T 细胞增多,CD4⁺CD8⁺ 双阳性细胞减少,可推断 *Sdpr* 促使双阳性 T 细胞经正负选择更多分化发育为具有免疫功能的成熟 CD4⁺T 细胞。因此可推断 *Sdpr* 基因对小鼠免疫系统及胸腺发育过程有着重要的影响。

免疫细胞的调控与造血系统中造血干/祖细胞

的发育密不可分,造血干细胞的增殖、分化等过程直接影响到机体免疫系统的调控。且在研究结果中发现,缺失 *Sdpr* 基因的小鼠出现髓外造血的现象,可推测 *Sdpr* 基因对血液细胞发育可能存在影响,因此 *Sdpr* 基因对造血系统发育的调控仍需进一步研究。通过本研究建立了血清剥夺反应因子 *Sdpr* 基因敲除小鼠和转基因小鼠模型,为 *Sdpr* 在生物学过程中的功能、作用机制的研究提供基础,同时为胞膜窖及胞膜窖调节蛋白相互作用的研究提供了模型支持。

参考文献:

- [1] Parton RG, del Pozo MA. Caveolae as plasma membrane sensors, protectors and organizers [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2013, 14(2): 98–112.
- [2] Martinez-Outschoorn UE, Sotgia F, Lisanti MP. Caveolae and signalling in cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2015, 15(4): 225–237.
- [3] McMahon KA, Zojicek H, Li WP, et al. SRBC/cavin-3 is a caveolin adapter protein that regulates caveolae function [J]. EMBO J, 2009, 28(8): 1001–1015.
- [4] Jagan M, Björn M, Elin L, et al. Cavin3 interacts with cavin1 and caveolin1 to increase surface dynamics of caveolae [J]. J Cell Sci, 2015, 128(5): 979–991.
- [5] Hansen CG, Nichols BJ. Exploring the caves: cavins, caveolins and caveolae [J]. Trends Cell Biol, 2010, 20(4): 177–186.
- [6] Burgener R. Purification and characterization of a major phosphatidylserine-binding phosphoprotein from human platelets [J]. Biochem J, 1990, 269(3): 729–734.
- [7] Mineo C, Y-S Y, Chapline C, et al. Anderson. Targeting of protein kinase C α to caveolae [J]. J Cell Biol, 1998, 141(3): 601–610.
- [8] Gustincich S, Vatta P, Goruppi S, et al. The human serum deprivation response gene (SDPR) maps to 2q32-q33 and codes for a phosphatidylserine-binding protein [J]. Genomics, 1999, 57(1): 120–129.
- [9] Hansen CG, Bright NA, Howard G, et al. SDPR induces membrane curvature and functions in the formation of caveolae [J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(7): 807–814.
- [10] Ivan RN. Cavin fever: regulating caveolae [J]. Nat Cell Biol, 2009, 11(7): 789–791.
- [11] Wang QX, Chen ED, Cai YF, et al. Serum deprivation response functions as a tumor suppressor gene in papillary thyroid cancer [J]. Clin Genet, 2019, 96(5): 418–428.
- [12] Luo YH, Wu JH, Wu QY, et al. miR-577 regulates TGF- β induced cancer progression through a SDPR-modulated positive-feedback loop with ERK-NF- κ B in gastric cancer [J]. Mol Ther, 2019, 27(6): 1166–1182.
- [13] Li Y, Wu CH. LINC00261/microRNA-550a-3p/SDPR axis affects the biological characteristics of breast cancer stem cells [J]. IUBMB Life, 2020, 73(1): 188–201.
- [14] Tian Y, Yu Y, Hou LK, et al. Serum deprivation response inhibits breast cancer progression by blocking transforming growth factor- β signaling [J]. Cancer Sci, 2016, 107(3): 274–280.
- [15] Ozturk S, Papageorgis P, Wong CK, et al. SDPR functions as a metastasis suppressor in breast cancer by promoting apoptosis [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2016, 113(3): 638–643.
- [16] Kovtun O, Tillu VA, Ariotti N, et al. Cavin family proteins and the assembly of caveolae [J]. J Cell Sci, 2015, 128(7): 1269–1278.
- [17] Hiram T, Das R, Yang Y, et al. Phosphatidylserine dictates the assembly and dynamics of caveolae in the plasma membrane [J]. J Biol Chem, 2017, 292(34): 14292–14307.
- [18] Strålfors P. Caveolins and caveolae, roles in insulin signalling and diabetes [J]. Adv Exp Med Biol, 2012, 729: 111–126.
- [19] Moseti D, Regassa A, Kim WK. Molecular regulation of adipogenesis and potential anti-adipogenic bioactive molecules [J]. Int J Mol Sci, 2016, 17(1): 124.
- [20] Haakonsson AK, Stahl Madsen M, Nielsen R, et al. Acute genome-wide effects of rosiglitazone on PPAR γ transcriptional networks in adipocytes [J]. Mol Endocrinol, 2013, 27(9): 1536–1549.
- [21] Björn H, Catarina R, Dorota K, et al. Rosiglitazone drives cavin-2/SDPR expression in adipocytes in a CEBP α -dependent manner [J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0173412.
- [22] Higuchi Y, Ogata T, Nakanishi N, et al. Requirement of cavin-2 for the expression and stability of IR β in adequate adipocyte differentiation [J]. Mol Metab, 2022, 55: 101416.
- [23] Li X, Jia ZY, Xhen YQ, et al. Coordinate suppression of Sdpr and Fhl1 expression in tumors of the breast, kidney, and prostate [J]. Cancer Sci, 2008, 99(7): 1326–1333.
- [24] Wang Y, Song Z, Leng P, et al. A systematic analysis reveals gene expression alteration of serum deprivation response (SDPR) gene is significantly associated with the survival of patients with cancer [J]. Oncol Rep, 2019, 42(3): 1161–1172.
- [25] Luo Y, Wu J, Wu Q, et al. miR-577 regulates TGF- β induced cancer progression through a SDPR-modulated positive-feedback loop with ERK-NF- κ B in gastric cancer [J]. Mol Ther, 2019, 27(6): 1166–1182.
- [26] Jing W, Luo P, Zhu M, et al. Prognostic and diagnostic significance of SDPR-cavin-2 in hepatocellular carcinoma [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 39(3): 950–960.
- [27] Tenta R, Katopodis H, Chatziioannou A, et al. Microarray analysis of survival pathways in human PC-3 prostate cancer cells [J]. Cancer Genomics Proteomics, 2007, 4(4): 309–318.
- [28] Luo X, Peng S, Ding S, et al. Prognostic values, ceRNA network, and immune regulation function of SDPR in KRAS-mutant lung cancer [J]. Cancer Cell International, 2021, 21(1): 49.

[收稿日期] 2022-02-14