

高丽娟,李博,于磊,等. *Marcks11* 基因敲除对小鼠成年造血的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2023, 33(6): 35-45, 61.
Gao LJ, Li B, Yu L, et al. Effect of *Marcks11* gene knockout on adult hematopoiesis in mice [J]. Chin J Comp Med, 2023, 33(6): 35-45, 61.
doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2023.06.005

Marcks11 基因敲除对小鼠成年造血的影响

高丽娟¹, 李 博¹, 于 磊¹, 齐晓龙¹, 张 旭¹, 高 珊², 刘 宁², 马元武^{1,2*}

(1.北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,北京市人类重大疾病实验动物模型工程技术研究中心,国家卫生健康委员会人类疾病比较医学重点实验室,北京 100021;2.北京协和医学院比较医学中心,中国医学科学院医学实验动物研究所,国家人类疾病动物模型资源库,北京 100021)

【摘要】 目的 建立造血系统特异性 *Marcks11* 敲除小鼠,探究该基因敲除对小鼠成年造血的影响。**方法** 对 E15.5 *Marcks11* 敲除小鼠进行胎肝竞争性移植实验,分析胎肝移植后不同月龄小鼠外周血中成熟功能谱系血细胞的占比。流式分选胎肝 KSL 细胞,利用 RNA-Seq 分析该基因敲除后差异基因表达。利用 CRISPR/Cas9 技术,构建 *Marcks11* 条件敲除小鼠,并与 *Vav1-Cre* 小鼠杂交,获得造血系统特异性 *Marcks11* 敲除小鼠。利用 PCR 和 Sanger 测序鉴定基因型。利用 Real-time PCR 检测小鼠骨髓和造血干细胞中 *Marcks11* mRNA 的表达。利用流式细胞技术分析小鼠骨髓、外周血、脾和胸腺中不同类型造血细胞的占比。通过竞争性骨髓移植实验分析 *Marcks11* 敲除对造血重建的影响。**结果** *Marcks11* 敲除造成胎肝移植后 B 细胞占比下降、髓系细胞占比升高,骨髓中 CLP 和 CMP 占比下降、GMP 占比升高。RNA-seq 结果显示该基因敲除后导致胎肝 KSL 细胞中 252 个基因上调,400 个基因下调。GO 结果显示差异基因主要富集在免疫应答、质膜以及低压门钙离子通道活性等相关基因。KEGG 结果显示差异基因主要富集在造血谱系分化和细胞因子受体互作相关信号通路。我们利用 CRISPR/Cas9 技术成功建立造血特异性 *Marcks11* 敲除小鼠。流式结果表明 *Marcks11* 缺失不影响小鼠成年造血,但影响骨髓移植后的造血重建能力。**结论** 成功建立造血系统特异性 *Marcks11* 敲除小鼠。造血系统敲除 *Marcks11* 基因,不影响成年稳态造血,但影响成年造血重建能力。我们建立的 *Marcks11* 条件敲除小鼠,为该基因的成年造血功能研究以及该基因的其他组织特异性功能研究提供了动物模型。

【关键词】 豆蔻酰化的富含丙氨酸 C 激酶底物蛋白 1;*Marcks11*;条件敲除小鼠;造血干细胞;骨髓移植
【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2023) 06-0035-11

Effect of *Marcks11* gene knockout on adult hematopoiesis in mice

GAO Lijuan¹, LI Bo¹, YU Lei¹, QI Xiaolong¹, ZHANG Xu¹, GAO Shan², LIU Ning², MA Yuanwu^{1,2*}

(1. Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing Engineering Research Center for Experimental Animal Models of Human Diseases, Key Laboratory of Human Diseases Comparative Medicine, National Health Commission of China, Beijing 100021, China. 2. Comparative Medicine Center, Peking Union Medical College, Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences, National Human Diseases Animal Model Resource Center, Beijing 100021)

【Abstract】 Objective To establish hematopoietic system-specific *Marcks11* knockout mice and explore the effect of *Marcks11* gene deletion on hematopoiesis. **Methods** Using fetal liver competitive transplantation of E15.5 *Marcks11*

[基金项目] 中国医学科学院医学与健康科技创新工程项目(2021-I2M-1-024)。
[作者简介] 高丽娟(1997—),女,在读硕士研究生,研究方向:疾病动物模型建立与造血干细胞功能研究。E-mail:1260407943@qq.com
[通信作者] 马元武(1983—),男,博士,研究员,硕士生导师,研究方向:基因编辑与疾病动物模型创制。E-mail:mayuanwu@cnilas.org

gene knockout mice, we analyzed the proportions of various hematopoietic cell types in peripheral blood at 1, 2, 3, and 4 months after fetal liver transplantation. KSL cells were sorted by flow cytometry and analyzed by RNA-seq. We used CRISPR/Cas9 technology to generate *Marcks11* conditional knockout mice and obtained hematopoietic system-specific *Marcks11* knockout mice by crossing with *Vav1-Cre* mice. The genotype of the produced mice was confirmed by PCR and Sanger sequencing. Real-time PCR was used to assess *Marcks11* mRNA expression in bone marrow and hematopoietic stem cells. Flow cytometry was used to analyze the proportions of various hematopoietic cell types in bone marrow, peripheral blood, spleen, and thymus. The effect of *Marcks11* gene knockout on hematopoietic reconstitution was analyzed by competitive bone marrow transplantation. **Results** *Marcks11* gene knockout decreased the proportion of B cells, increased the proportion of myeloid cells, decreased CLP and CMP, and increased GMP after fetal liver transplantation. RNA-seq showed that 252 genes were upregulated and 400 genes were downregulated. GO analysis showed that the differentially expressed genes were significantly enriched in the immune response, plasma membrane, and low-pressure gate calcium channel activity. KEGG analysis showed that the differentially expressed genes were significantly enriched in hematopoietic lineage differentiation and cytokine-cytokine receptor interaction-related signaling pathways. We generated hematopoietic system-specific *Marcks11* knockout mice successfully. Flow cytometry showed that *Marcks11* deletion did not affect the steady-state hematopoietic functions of adult mice, but it did affect the hematopoietic reconstitution ability after competitive bone marrow transplantation. **Conclusions** We successfully established hematopoietic system-specific *Marcks11* knockout mice and found that *Marcks11* gene knockout does not affect stable hematopoiesis, but affects hematopoietic reconstitution. The underlying mechanism requires further investigation. This study provides an animal model to examine the gene function of *Marcks11* in adult hematopoiesis and other aspects.

[Keywords] myristoylated alanine-rich C-kinase substrate like 1; *Marcks11*; conditional knockout mice; hematopoietic stem cell; bone marrow transplantation

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

造血干细胞通过自我更新维持自我,并通过分化发育为成熟功能血细胞,维持机体整个生命周期的造血稳态^[1-2]。造血干细胞(hematopoietic stem cells, HSCs)在特定微环境和细胞内外调控因子的协同作用下,增殖分化产生各类造血祖细胞,造血祖细胞进而定向分化为具有不同形态的原红细胞、原粒细胞、原单核细胞、原巨核细胞和原淋巴细胞,随后进一步分化发育成成熟血细胞,维持机体的造血稳态^[1-4]。当机体受到损伤、辐射等外界刺激时, HSCs 的自我更新和发育分化能力遭到破坏,造血稳态失衡,发生贫血、白血病等系列血液系统疾病^[5-7]。虽然 HSCs 的增殖、发育、分化是目前研究最为系统的一类多潜能干细胞,但对这一精细而复杂的调控过程仍存在很多不清楚的地方。因此,进一步深入了解 HSCs 的分化发育过程,不仅有助于了解血液系统疾病的发生、发展过程,同时也有助于发展基于 HSCs 的治疗策略。

豆蔻酰化富含丙氨酸 C 激酶底物蛋白(myristoylated alanine-rich C-kinase substrate, MARCKS)家族包含 MARCKS 和 MARCKS 相关蛋白 1(MARCKSL1)两个成员。该家族成员功能结构域具有以下特点:(1)N 末端的肉豆蔻酰化位点结构

域,可以进行可逆的豆蔻酰化修饰,通过疏水性肉豆蔻酰基共价结合,可逆地插入质膜内侧,成为蛋白质的脂质锚定位点;(2)MH2 结构域(MARCKS Homology 2, MH2),目前功能尚不明确;(3)效应结构域(effector domain, ED),位于蛋白质的中心,由 24/25 个氨基酸残基组成的高碱性片段^[8-9]。ED 被蛋白激酶磷酸化后,降低与质膜的亲和力,转移到细胞质中,这种由质膜到胞质的易位也称为“静电开关”^[10]。MARCKSL1 是一种肌动蛋白结合蛋白,分子量大小为 20 kDa^[11],在脊椎动物中广泛表达,参与大脑发育^[12-13]、血管生成^[14-15]和炎症反应^[16]等一系列生理、病理过程,但目前关于 MARCKSL1 在造血系统中是否发挥功能以及发挥什么样的功能仍不清楚。

前期工作中,我们建立了 *Marcks11* 系统敲除小鼠,通过初步分析发现 *Marcks11* 敲除会影响胎肝中造血干细胞的数量^[17]。但是由于该基因缺失会导致小鼠胚胎死亡,这严重限制了该基因在成年造血中的功能研究。在本研究中,我们首先通过胎肝移植实验,分析了 *Marcks11* 基因缺失对胎肝造血重建的影响,并通过 RNA-seq 分析了差异基因表达情况和可能的信号通路。在确定 *Marcks11* 在造血中发挥

重要功能后,为进一步研究该基因在成年造血中的功能,我们利用 CRISPR/Cas9 技术,建立 *Marcks1* 条件敲除小鼠,再与造血系统特异的 *Vav1-Cre* 小鼠杂交,获得造血系统特异性 *Marcks1* 敲除小鼠,分析了该基因缺失对成年造血和造血重建的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

本实验使用 2 月龄 SPF 级 C57BL/6 小鼠雌雄各 25 只,体重为 22~32 g;6~8 周龄 SPF 级 *Vav1-Cre* 小鼠雌雄各 5 只,体重为 15~20 g;2 月龄 SPF 级 CD45.1 小鼠雌雄各 3 只,体重为 22~26 g;2 月龄 SPF 级 CD45.1/CD45.2 小鼠雌雄各 20 只,体重为 22~35 g。野生型 C57BL/6 小鼠购于北京华阜康生物科技有限公司[SCXK(京)2020-0004],*Vav1-Cre* 小鼠由中国医学科学院血液学研究所的袁卫平教授惠赠,CD45.1 小鼠和 CD45.1/CD45.2 小鼠由清华大学董忠军教授惠赠,实验所需的动物饲养于本单位 SPF 级屏障动物设施内[SYXK(京)2019-0011],饲养环境符合相应的国家标准。饲养期间小鼠自由饮水和摄食。本研究所涉及的所有动物实验,通过本单位实验动物伦理委员会(IACUC)的审批(MYW20005),并在动物实验过程中严格遵循实验动物的 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

MEGA shortscript T7 转录试剂盒(Ambion 公司,Am1354);全基因组 DNA 提取试剂盒(TransGen 公司,EE101-22);Sca1 流式抗体(Invitrogen 公司,25598182);c-kit 流式抗体(Invitrogen 公司,17117282);CD34 流式抗体(Invitrogen 公司,11034182);Flt3(Invitrogen 公司,12135182);CD45.1 流式抗体(Invitrogen 公司,12045381);CD45.2 流式抗体(Invitrogen 公司,45045482);CD4 流式抗体(Invitrogen 公司,11004286);CD8a 流式抗

体(Invitrogen 公司,17008182);B220 流式抗体(Invitrogen 公司,13045285);CD11b 流式抗体(Invitrogen 公司,47011282);Ly6G 流式抗体(Invitrogen 公司,13593182);10×EDTA 抗凝剂(麦瑞博生物公司,M10128);10×红细胞裂解液(BD 公司,555899)。PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国);实时荧光定量 PCR 仪(Thermo 公司,美国);流式细胞仪(BD 公司,美国);数码凝胶成像处理系统(Tanon 公司,中国)。

1.3 实验方法

1.3.1 基于 CRISPR/Cas9 技术建立 *Marcks1* 条件敲除小鼠

我们利用 CRISPR/Cas9 技术建立 *Marcks1* 基因条件敲除小鼠。首先,针对 *Marcks1* 基因,设计两个 sgRNA 靶点,靶点信息见表 1,由公司合成互补的寡聚核苷酸链,退火后连接到 *Dra* I 线性化后的 pUC57-sgRNA 载体中。构建好的载体,经线性化和酚氯仿抽提后,作为模板利用 MEGAshortscriptT7 转录试剂盒体外转录获得目标 sgRNA。通过基因工程手段,扩增 *Marcks1* 基因片段并在第二外显子上下游插入 *loxP* 序列,并构建到 pUC19-DNA 载体中作为同源重组模板。

对 C57BL/6 雌鼠注射激素 PMSG 和 HCG 进行超排卵,随后将雌鼠与 C57BL/6 雄鼠合笼,次日,从雌鼠输卵管中获得可用于注射的受精卵。

将 sgRNA、Cas9 蛋白和纯化后供体模板混合,通过显微注射方式将其注入受精卵核质中,随后将注射后的受精卵移植到假孕雌鼠输卵管,等待小鼠出生,并进行基因型鉴定。获得的条件敲除小鼠与 *Vav1-Cre* 小鼠杂交获得造血系统特异性敲除小鼠。

1.3.2 小鼠基因型鉴定

剪取新生小鼠(7~10 d)的脚趾,按照全式金全基因组 DNA 提取试剂盒的步骤提取基因组 DNA,溶于 0.1×TE 中,进行 PCR 扩增。敲除小鼠检测引

表 1 sgRNA 靶点和寡聚核苷酸链合成信息
Table 1 sgRNA target sequence and oligos

靶点 Target	序列 Sequence
sgRNA1(PAM)	GGTGATGTTGGATGGGAGTG(AGG)
M-Marcks1I-E2A-sgRNA-up	5'-TAGGTGATGTTGGATGGGACTG-3'
M-Marcks1I-E2A-sgRNA-down	5'-AAACCACTCCCATCCAACATC-3'
sgRNA2(PAM)	GGGAAGAACTTAAACCAACC(AGG)
M-Marcks1I-E2B-sgRNA-up	5'-TAGGGAAGAACTTAAACCAACC-3'
M-Marcks1I-E2B-sgRNA-down	5'-AAACGGTTGGTTTAAAGTTCTTC-3'

物 为: M-Marcksl1-F/M-Marcksl1-WT-R 和 M-Marcksl1-F/M-Marcksl1-KO-R,PCR 条件为:94℃持续 5 min;94℃持续 30 s,62℃持续 30 s,72℃持续 30 s,此步骤 30 个循环;72℃持续 10 min;保温于 4℃。野生条带和敲除条带分别是 1923 bp 和 316 bp。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳后成像。引物序列见表 2。条件敲除小鼠的鉴定:引物 M-Marcksl1-loxP-F/M-Marcksl1-loxP-R, PCR 条件: 95℃持续 5 min;95℃持续 20 s,60℃持续 30 s,72℃持续 2 min,此步骤 30 个循环;72℃持续 10 min;保温于 4℃。引物 Cre-F/Cre-R, PCR 条件为:95℃持续 5 min;95℃持续 20 s,60℃持续 30 s,72℃持续 30 s,此步骤 30 个循环;72℃持续 10 min;保温于 4℃。条件敲入条带和敲除条带分别是 1842 bp 和 235 bp。PCR 产物用 1.5%的琼脂糖凝胶电泳后成像观察。引物序列见表 2。

表 2 小鼠基因型鉴定引物序列
Table 2 Primer sequences for genotype identification

引物 Primer	序列 Sequence	PCR 产物 Amplicon
M-Marcksl1-F	5'-TCCAGGCCCGGTGAG-3'	1923 bp
M-Marcksl1-WT-R	5'-GCCTCATCTGTTCCGTTTCAC-3'	
M-Marcksl1-F	5'-TCCAGGCCCGGTGAG-3'	316 bp
M-Marcksl1-KO-R	5'-TCTGTAGGTGGAGGTTGATAGC-3'	
M-Marcksl1-loxP-F	5'-CTGTGAGGGGTGAGGCTGATGTT-3'	1842 bp
M-Marcksl1-loxP-R	5'-AACTTATATTGCCTGCTCTTCCC-3'	
Cre-F	5'-TACTGACGGTGGGAGAATG-3'	437 bp
Cre-R	5'-CTGTTTCACTATCCAGGTTACG-3'	

1.3.4 流式分析

外周血单细胞悬液准备:小鼠眼眶静脉丛采血 100 μL,提前在管中加入 10 μL 10×EDTA 抗凝剂,混匀,随后加入 1 mL 1×红细胞裂解液,混匀后于 37℃恒温箱中静置 10 min,离心,弃去上清,加入 PBS 重悬细胞备用。

脾细胞和胸腺细胞单细胞悬液准备:脱颈椎法牺牲小鼠后,取绿豆大小(3~4 mm³)的胸腺、脾组织置于病理载玻片毛面一侧,用另一载玻片毛面一侧沾取 PBS 后研磨组织,制成单细胞悬液备用。

骨髓单细胞悬液准备:取小鼠双侧胫骨和股骨,用 1 mL 注射器吸取 PBS 从骨头两端反复冲洗骨髓腔直至骨头发白,获取的骨髓细胞备用。

流式抗体染色和流氏上机分析:抗体染色组合见表 3。按照对应抗体组合进行染色后,4℃避光静置 30 min,加入 PBS 清洗,离心弃去上清,加入 PBS 重悬细胞后用 70 μm 的滤膜滤入流式管中,上机和流式分析。

1.3.3 竞争性移植实验

胎肝竞争性移植实验:取 E15.5 小鼠胎肝,制成单细胞悬液,将 0.01 ee 胎肝细胞和 1×10⁵ 个竞争性骨髓细胞(CD45.1 小鼠)混合,尾静脉注射进入经致死辐照的受体小鼠(9 Gy,X 射线)(CD45.1/CD45.2 小鼠)体内。移植后每个月采集受体小鼠的外周血进行流式分析血细胞占比,4 个月后再对受体小鼠的骨髓细胞进行流式分析。Ctrl 为对照小鼠,KO 为敲除小鼠。

成年鼠的竞争性骨髓移植实验:将 1×10⁷ 个骨髓细胞(Marcksl1^{f/f}/Vav1 小鼠为敲除组,Marcksl1^{f/f}小鼠为对照组)与 1×10⁷ 个竞争性骨髓细胞(CD45.1 小鼠)混合,尾静脉注射进入经过致死照射的受体小鼠(CD45.1/CD45.2 小鼠)中。移植后每个月采集受体小鼠外周血进行流式分析细胞占比。Ctrl 为对照小鼠,cKO 为条件敲除小鼠。

表 3 流式抗体组合
Table 3 Flow cytometry antibody combination

细胞 Cell	抗体 Antibody
造血干细胞 KSL	c-kit ⁺ Scal ⁺ Lin ⁻
长期造血干细胞 LT-HSC	c-kit ⁺ Scal ⁺ Lin ⁻ CD34 ⁻ Flt3 ⁻
短期造血干细胞 ST-HSC	c-kit ⁺ Scal ⁺ Lin ⁻ CD34 ⁺ Flt3 ⁻
多潜能祖细胞 MPP	c-kit ⁺ Scal ⁺ Lin ⁻ CD34 ⁺ Flt3 ⁺
造血祖细胞 HPC	Lin ⁻ Scal ⁻ c-kit ⁺
髓系祖细胞 CMP	Lin ⁻ Scal ⁻ c-kit ⁺ CD34 ⁺ CD16 ⁻
粒系祖细胞 GMP	Lin ⁻ Scal ⁻ c-kit ⁺ CD34 ⁺ CD16 ⁺
巨核系祖细胞 MEP	Lin ⁻ Scal ⁻ c-kit ⁺ CD34 ⁺ CD16 ⁻
淋巴系祖细胞 CLP	Lin ⁻ Scal ^{Mid} c-kit ^{Mid} CD127 ⁺ Flt3 ⁺
T 淋巴细胞 T lymphocytes	CD3 ⁺ CD4 ⁺ /CD3 ⁺ CD8 ⁺
B 淋巴细胞 B lymphocytes	B220 ⁺
髓系细胞 Myeloid cells	CD11b ⁺
粒细胞 Granulocytes	Ly6G ⁺

1.4 统计学方法

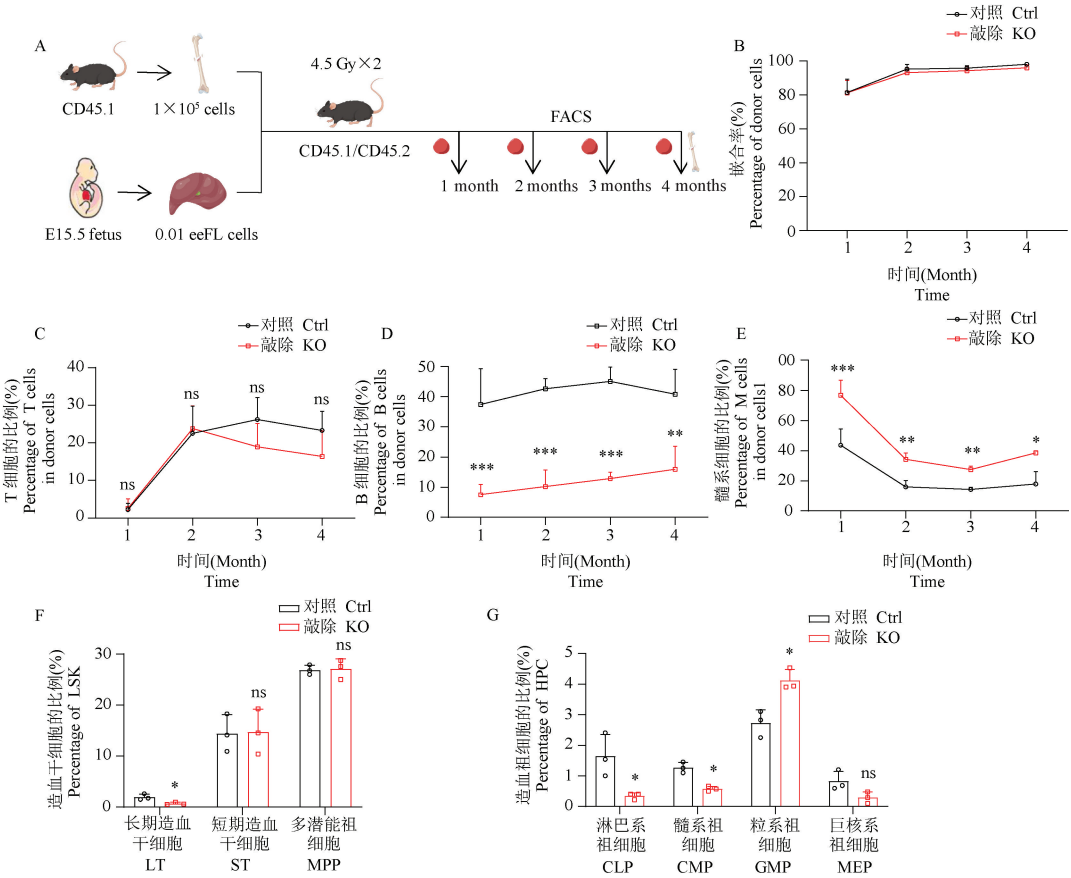
流式细胞仪结果使用 FlowJo 10 软件进行数据分析,数据结果绘图和统计使用 GraphPad Prism 8.0 软件。用平均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示实验中所有数据。采用独立样本 *t* 检验进行组间比较,认为 $P<0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 *Marcks11* 基因敲除影响小鼠的胎肝造血重建能力

在前期工作中,我们发现 *Marcks11* 基因敲除影响胎肝中 KSL 细胞的比例^[17]。为进一步研究该基因缺失对造血功能的影响,我们对敲除小鼠和对照

小鼠 E15.5 胎肝进行竞争性移植实验,具体操作流程如图 1A 所示,分析胎肝造血的重建能力。结果显示,受体小鼠中供体小鼠细胞的嵌合率在移植 2 个月后达 90% 以上,表明移植成功(图 1B)。对移植后不同时间点外周血中淋系和髓系细胞占比进行流式细胞分析,结果显示敲除组 T 淋巴细胞的占比与对照组相比无明显差异(图 1C),B 淋巴细胞的占比显著降低(图 1D),髓系细胞占比显著升高(图 1E)。对移植 4 个月后受体小鼠的骨髓造血干/祖细胞进行流式分析,结果显示长期造血干细胞(LT)的比例下降,短期造血干细胞(ST)和多潜能祖细胞(MPP)的占比无显著差异(图 1F)。与对照组相比,敲除组淋系祖细胞(CLP)和髓系祖细胞(CMP)



注:A:E15.5 胎肝竞争性移植示意图;B:受体小鼠的嵌合率分析;C:受体小鼠外周血中供体来源 T 细胞的比例;D:受体小鼠外周血中供体来源 B 细胞的比例;E:受体小鼠外周血中供体来源髓系细胞的比例;F:受体小鼠骨髓中长期造血干细胞、短期造血干细胞、多潜能祖细胞的比例;G:受体小鼠骨髓中淋巴系祖细胞、髓系祖细胞、粒系祖细胞、巨核系祖细胞的比例。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图 1 *Marcks11* 基因敲除对胎肝造血重建能力的影响 ($n\geq 3$)

Note. A, E15.5 fetal liver competitive transplantation diagram. B, Percentage of donor cells in peripheral blood of recipient mice. C, Percentage of donor-derived T cells in peripheral blood of recipient mice. D, Percentage of donor-derived B cells in peripheral blood of recipient mice. E, Percentage of donor-derived M cells in peripheral blood of recipient mice. F, Percentage of LT, ST, MPP in bone marrow of recipient mice. G, Percentage of CLP, CMP, GMP, MEP in bone marrow of recipient mice. Compared with Ctrl group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 1 The effect of *Marcks11* gene knockout on hematopoietic reconstructive ability

的占比显著下降,粒系祖细胞(GMP)的比例显著升高(图 1G)。以上结果表明,*Marcksl1* 基因敲除影响胎肝造血重建能力。

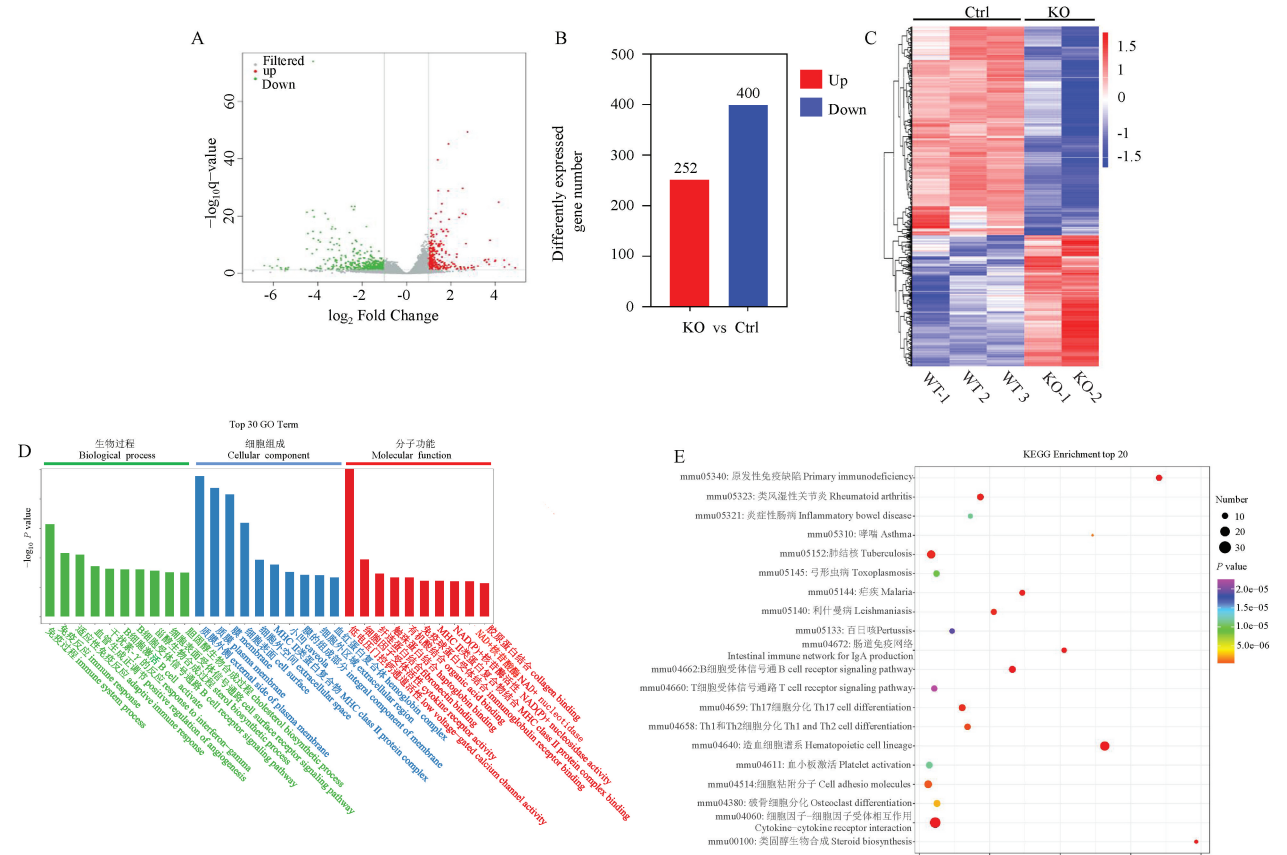
2.2 *Marcksl1* 基因敲除 KSL 细胞的表达差异分析

为进一步确定 *Marcksl1* 缺失导致的基因表达图谱的改变以及可能涉及的信号通路,我们对 *Marcksl1* 基因敲除和对照小鼠的 KSL 细胞收集并进行转录组测序分析,结果分析显示存在 652 个差异表达基因($P<0.05$, Fold change ≥ 2) (图 2A),其中 252 个上调基因,400 个下调基因(图 2B、2C)。随后,我们进行了差异基因的 GO(Gene Ontology)富集分析(list hits ≥ 2),结果显示差异表达基因主要集中在免疫应答、质膜、低压门钙离子通道活性等相关基因(图 2D)。KEGG 富集分析结果显示,基因表达差异主要富集在造血谱系分化和细胞因子受体

互作等相关信号通路(图 2E)。

2.3 建立造血系统特异性 *Marcksl1* 敲除小鼠

由于 *Marcksl1* 敲除会导致胚胎死亡,难以研究该基因的成年生物学功能。如图 3,为研究成年 *Marcksl1* 基因功能或特定组织器官中的功能,我们利用 CRISPR/Cas9 技术建立 *Marcksl1* 条件敲除小鼠,构建策略如图 3A 所示。对新生小鼠进行基因型鉴定(图 3B)和 Sanger 测序(图 3C),结果表明我们成功建立了 *Marcksl1* 条件敲除小鼠。将构建的 *Marcksl1* 条件敲除小鼠与 *Vav1-Cre* 工具小鼠杂交(图 3D),建立造血系统特异性 *Marcksl1* 敲除小鼠(*Marcksl1^{fl/fl}/Vav1*, *Marcksl1* cKO 小鼠),基因型鉴定结果(图 3E)和 Cre 介导的 *loxP* 序列之间的重组测序图(图 3F),表明在目标组织中可以实现 *Marcksl1* 基因的敲除。利用 Real-time PCR 分析小鼠骨髓细

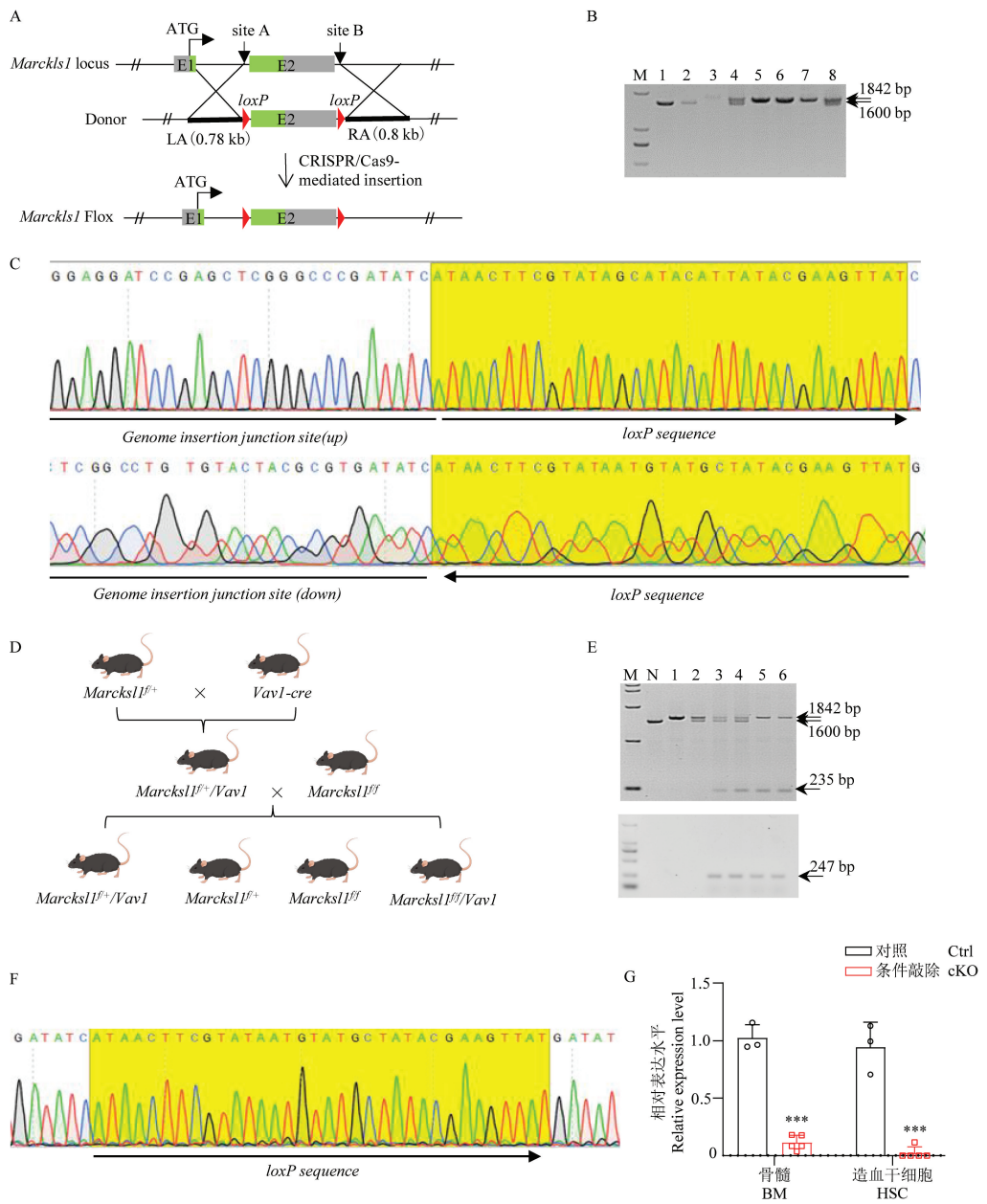


注: A: 差异表达基因火山图; B: 差异表达基因的数量; C: 热图显示差异表达基因; D: GO 富集分析差异表达基因; E: 针对差异表达基因进行 KEGG 信号通路富集分析。

图 2 *Marcksl1* 敲除小鼠 KSL 细胞的差异表达基因富集分析

Note. A, Volcano map of differentially expressed genes. B, Number of differentially expressed genes. C, Heat map of differentially expressed genes. D, GO (Gene Ontology) enrichment analysis of differentially expressed genes. E, Enrichment analysis of differentially expressed genes using KEGG signaling pathway.

Figure 2 Enrichment analysis of differentially expressed genes in KSL cells of *Marcksl1* knockout mice



注:A:利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Marcks11* 条件敲除小鼠策略图;B:*Marcks11* 条件敲除小鼠基因型鉴定的 PCR 产物电泳图;M 为 Marker DL2000,1,2 为 WT,3、5、6、7 为 *Marcks11*^{f/f},4、8 为 *Marcks11*^{f/+};C:*Marcks11* 插入 loxP 片段的测序结果图;D:造血系统特异性 *Marcks11* 敲除小鼠的获得过程;E:造血系统特异性 *Marcks11* 敲除小鼠的基因型鉴定 PCR 产物电泳图;M 为 Marker DL15000;N 为阴性对照,1 为 *Marcks11*^{f/f};2 为 *Marcks11*^{f/+};3、4 为 *Marcks11*^{f/+}/*Vav1*;5、6 为 *Marcks11*^{f/f}/*Vav1*;F:*Marcks11* 敲除片段的测序结果图;G:*Marcks11*^{f/f}/*Vav1* 小鼠骨髓细胞和造血干细胞中 *Marcks11* mRNA 的相对表达水平($n \geq 3$)。与对照组相比,*** $P < 0.001$ 。

图 3 建立造血系统特异性 *Marcks11* 敲除小鼠

Note. A, Strategy map of *Marcks11* conditional knockout mice was constructed using CRISPR/Cas9 technique. B, Electrophoresis of PCR products identified by *Marcks11* conditional knockout mice genotype. M, Marker DL2000. 1, 2, WT. 3, 5, 6, 7, *Marcks11*^{f/f}. 4, 8, *Marcks11*^{f/+}. C, Sequencing result diagram of *Marcks11* inserted loxP fragment. D, Acquisition process of hematopoietic system-specific *Marcks11* knockout mice. E, Electrophoresis of PCR products identified by hematopoietic system-specific *Marcks11* knockout mice genotype. M, Marker DL15000. N, Negative control. 1, *Marcks11*^{f/f}. 2, *Marcks11*^{f/+}. 3, 4, *Marcks11*^{f/+}/*Vav1*. 5, 6, *Marcks11*^{f/f}/*Vav1*. F, Sequencing result of *Marcks11* knockout fragment. G, Relative expression level of *Marcks11* mRNA in mice bone marrow cells and hematopoietic stem cells. Compared with Ctrl group, *** $P < 0.001$.

Figure 3 Establish hematopoietic system specific *Marcks11* knockout mice

胞和造血干细胞中的表达情况,结果进一步显示我们成功敲除了 *Marcksl1* 基因(图 3G)。综上,我们成功建立造血系统特异性 *Marcksl1* 敲除小鼠。

2.4 *Marcksl1* 造血系统特异性敲除不影响生殖

对 *Marcksl1* 条件敲除小鼠的出生情况进行统计分析,76 只子代小鼠的基因型统计结果显示子代小鼠的出生率符合孟德尔遗传规律(表 4),表明 *Marcksl1* 造血系统特异性敲除不会影响生殖。

2.5 *Marcksl1* 敲除不影响成年造血

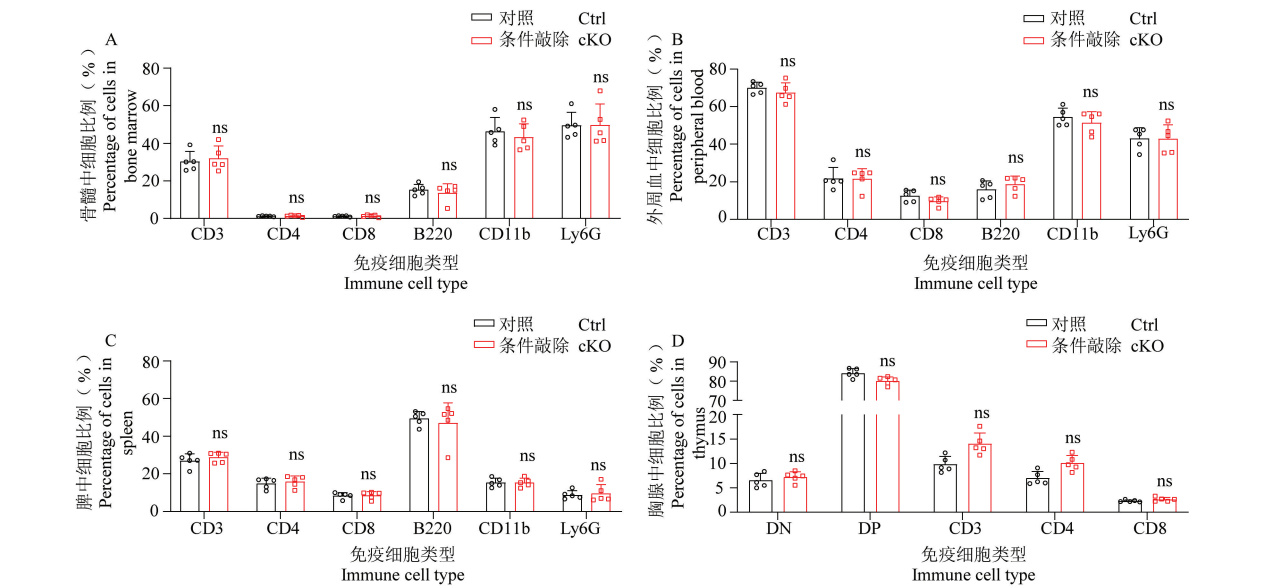
为了解 *Marcksl1* 缺失对成年小鼠造血的影响,我们通过流氏分析了 2 月龄对照组 *Marcksl1^{f/f}* 小鼠和敲除组 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠外周血细胞、骨髓细胞、脾细胞和胸腺细胞的占比。结果显示,与对照组相比,敲除小鼠在造血干细胞、造血干/祖细胞以及成熟功能细胞方面均无明显变化(图 4、图 5)。上述结果表明 *Marcksl1* 造血特异性敲除不影响成年造血。

2.6 *Marcksl1* 敲除影响成年小鼠的造血重建能力

随后,我们分析了 *Marcksl1* 敲除对成年造血重建能力的影响,通过对 2 月龄小鼠进行竞争性骨髓移植实验,流程如图 6A 所示。结果显示移植后 1 个月受体小鼠的嵌合率达到 90% 以上,表明移植成功(图 6B)。对移植后外周血中的 T 细胞、B 细胞和髓系细胞进行占比分析,结果显示 cKO 组相较于对照组,T 细胞(图 6C)、B 细胞(图 6D)和髓系细胞(图 6E)的比例显著提高。上述结果表明, *Marcksl1* 敲除影响成年造血重建能力。

表 4 *Marcksl1* 基因条件性敲除小鼠的出生率
Table 4 Birth rate of *Marcksl1* gene conditional knockout mice

基因型	出生率
Genotype	Birth rate
<i>Marcksl1^{f/+}/Vav1</i>	21/76(28%)
<i>Marcksl1^{f/+}</i>	17/76(22%)
<i>Marcksl1^{f/f}</i>	18/76(24%)
<i>Marcksl1^{f/f}/Vav1</i>	20/76(26%)

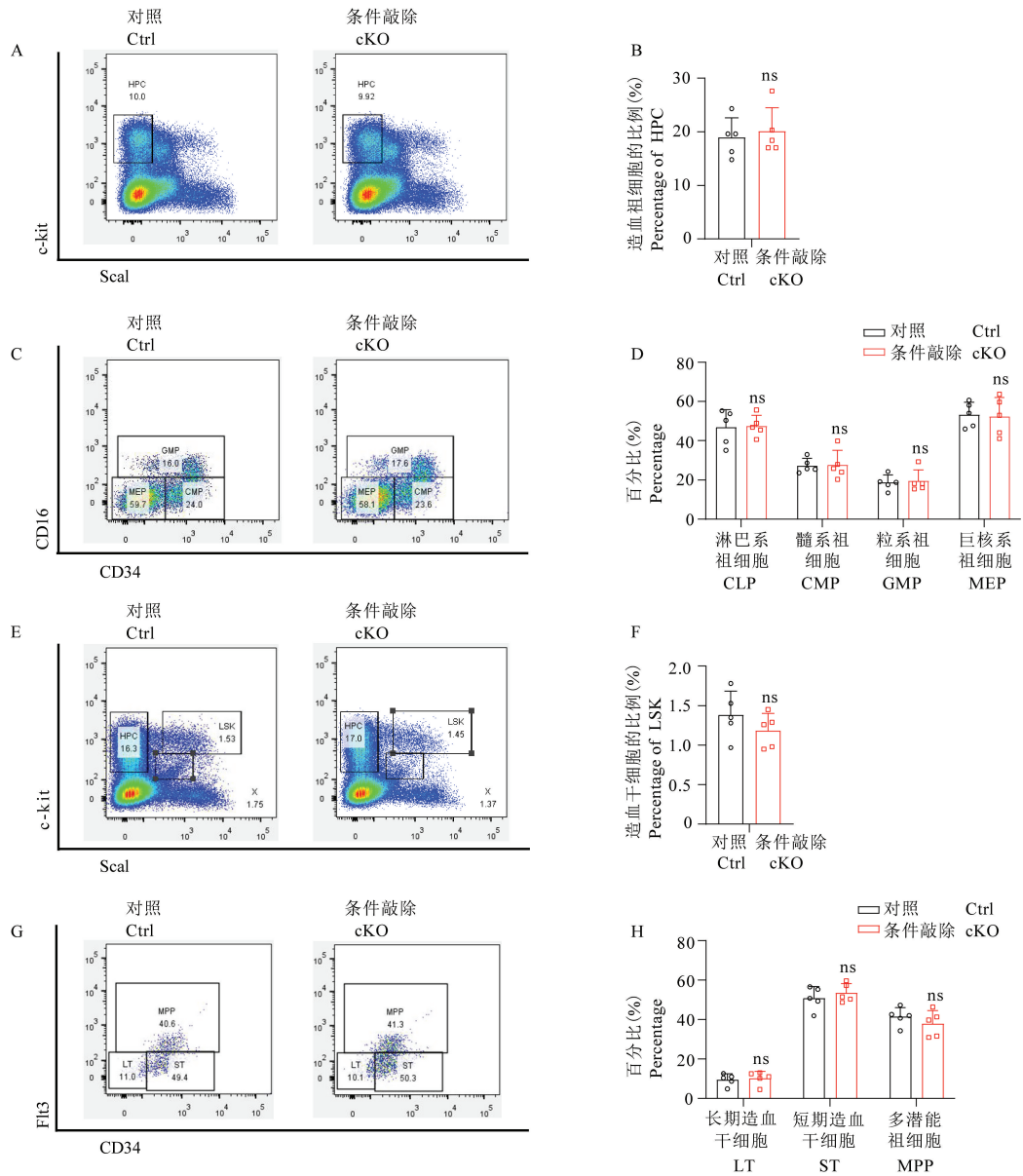


注:A:2月龄 *Marcksl1^{f/f}* 和 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠骨髓中 T 细胞、B 细胞、髓系细胞、粒细胞的比例;B:2月龄 *Marcksl1^{f/f}* 和 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠外周血中 T 细胞、B 细胞、髓系细胞、粒细胞的比例;C:2月龄 *Marcksl1^{f/f}* 和 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠脾中 T 细胞、B 细胞、髓系细胞、粒细胞的比例;D:2月龄 *Marcksl1^{f/f}* 和 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠胸腺中 T 细胞的比例。CD3:CD3⁺ T 细胞;CD4:CD3⁺CD4⁺ T 细胞;CD8:CD3⁺CD8⁺ T 细胞;B220:B 细胞;CD11b 为髓系细胞;Ly6G:粒细胞;DN:CD4⁻CD8⁻ 双阴性细胞;DP:CD4⁺CD8⁺ 双阳性细胞。

图 4 *Marcksl1* 缺失不影响稳态条件下免疫细胞的比例($n=5$)

Note. A, Percentage of T cells, B cells, myeloid cells and granulocytes in bone marrow of 2-month-old *Marcksl1^{f/f}* and *Marcksl1^{f/f}/Vav1* mice. B, Percentage of T cells, B cells, myeloid cells and granulocytes in peripheral blood of 2-month-old *Marcksl1^{f/f}* and *Marcksl1^{f/f}/Vav1* mice. C, Percentage of T cells, B cells, myeloid cells and granulocytes in spleen of 2-month-old *Marcksl1^{f/f}* and *Marcksl1^{f/f}/Vav1* mice. D, Percentage of T cells in thymus of 2-month-old *Marcksl1^{f/f}* and *Marcksl1^{f/f}/Vav1* mice. CD3, CD3⁺ T cells. CD4, CD3⁺CD4⁺ T cells. CD8, CD3⁺CD8⁺ T cells. B220, B cells. CD11b, myeloid cells. Ly6G, granulocytes. DN, CD4⁻CD8⁻ double negative cells. DP, CD4⁺CD8⁺ double positive cells.

Figure 4 *Marcksl1* deletion has no effect on the percentage of immune cells under steady-state conditions

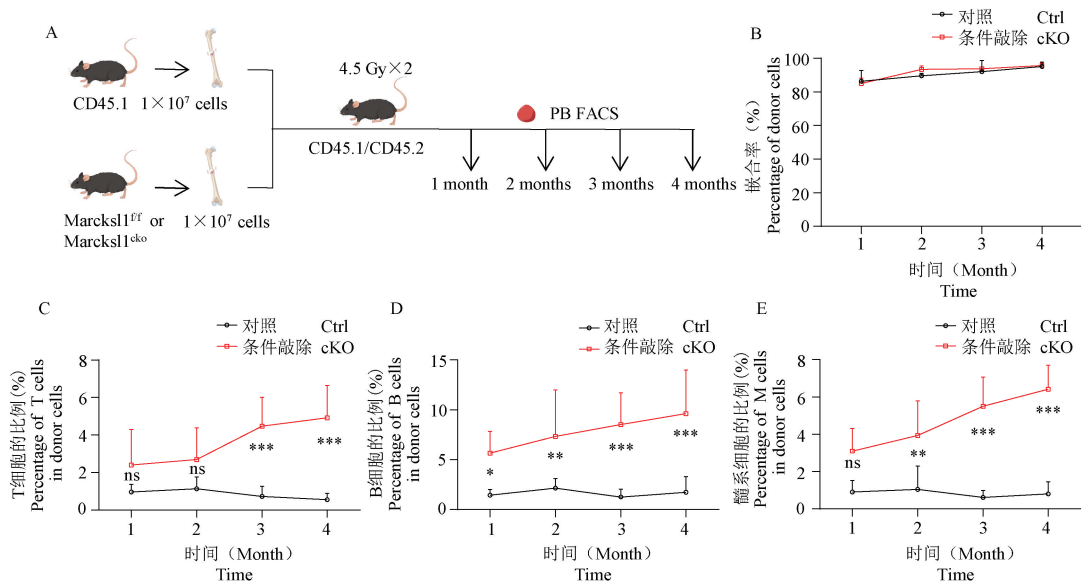


注:A:2月龄 *Marcksl1^{f/f}* 和 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠骨髓造血祖细胞的代表性流式散点图;B:2月龄 *Marcksl1^{f/f}* 和 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠骨髓造血祖细胞的比例;C:2月龄 *Marcksl1^{f/f}* 和 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠骨髓中髓系祖细胞、粒系祖细胞、巨核系祖细胞的代表性流式散点图;D:2月龄 *Marcksl1^{f/f}* 和 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠骨髓中淋巴系祖细胞、髓系祖细胞、粒系祖细胞、巨核系祖细胞的比例;E:2月龄 *Marcksl1^{f/f}* 和 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠骨髓造血干细胞的代表性流式散点图;F:2月龄 *Marcksl1^{f/f}* 和 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠骨髓造血干细胞的比例;G:2月龄 *Marcksl1^{f/f}* 和 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠骨髓中长期造血干细胞、短期造血干细胞、多潜能祖细胞的代表性流式散点图;H:2月龄 *Marcksl1^{f/f}* 和 *Marcksl1^{f/f}/Vav1* 小鼠骨髓中长期造血干细胞、短期造血干细胞、多潜能祖细胞的比例。

图 5 *Marcksl1* 缺失不影响稳态条件下造血干/祖细胞的比例 ($n = 5$)

Note. A, Representative flow scatter diagram of hematopoietic progenitor cells in bone marrow of 2-month-old *Marcksl1^{f/f}* and *Marcksl1^{f/f}/Vav1* mice. B, Percentage of hematopoietic progenitor cells in bone marrow of 2-month-old *Marcksl1^{f/f}* and *Marcksl1^{f/f}/Vav1* mice. C, Representative flow scatter diagram of CMP, GMP, MEP in bone marrow of 2-month-old *Marcksl1^{f/f}* and *Marcksl1^{f/f}/Vav1* mice. D, Percentage of CLP, CMP, GMP, MEP in bone marrow of 2-month-old *Marcksl1^{f/f}* and *Marcksl1^{f/f}/Vav1* mice. E, Representative flow scatter diagram of hematopoietic stem cells in bone marrow of 2-month-old *Marcksl1^{f/f}* and *Marcksl1^{f/f}/Vav1* mice. F, Percentage of hematopoietic stem cells in bone marrow of 2-month-old *Marcksl1^{f/f}* and *Marcksl1^{f/f}/Vav1* mice. G, Representative flow scatter diagram of LT, ST, MPP in bone marrow of 2-month-old *Marcksl1^{f/f}* and *Marcksl1^{f/f}/Vav1* mice. H, Percentage of LT, ST, MPP in bone marrow of 2-month-old *Marcksl1^{f/f}* and *Marcksl1^{f/f}/Vav1* mice.

Figure 5 *Marcksl1* deletion has no effect on the percentage of hematopoietic stem/progenitor cells under steady-state conditions



注:A:小鼠竞争性骨髓移植流程图;B:受体小鼠移植细胞嵌合率分析;C:来自于供体小鼠的T淋巴细胞在受体小鼠中的占比分析;D:受体小鼠外周血中供体来源B淋巴细胞的占比分析;E:受体小鼠外周血中供体来源髓系细胞的比例。与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$ 。

图6 *Marcks11* 敲除对成年造血干细胞造血重建能力的影响($n\geq 3$)

Note. A, Competitive bone marrow transplantation diagram. B, Percentage of donor cells in peripheral blood of recipient mice. C, Percentage of donor-derived T cells in peripheral blood of recipient mice. D, Percentage of donor-derived B cells in peripheral blood of recipient mice. E, Percentage of donor-derived M cells in peripheral blood of recipient mice. Compared with Ctrl group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$.

Figure 6 Effect of *Marcks11* knockout on hematopoietic reconstructive ability of hematopoietic stem cells

3 讨论

MARCKSL1 在多种组织器官中高表达,并参与神经系统发育^[12-13,18-19]、血管形成^[14-15]以及肿瘤生长迁移^[20-21]等多种生理、病理过程。MARCKSL1 参与神经发育过程,MARCKSL1 缺失会导致小鼠神经管闭合不全影响大脑发育,最终导致胚胎发育终止^[13]。此外,MARCKSL1 还在内皮细胞中富集表达,当 MARCKSL1 的 ED 结构域被 Jun 氨基末端激酶(JNK)磷酸化时,MARCKSL1 通过与 F-肌动蛋白结合,来调节内皮细胞的大小和形状影响血管直径进而影响血管生成^[14]。也有报道 MARCKSL1 在多种实体肿瘤中异常表达,调节肿瘤细胞的增殖、迁移和侵袭过程^[22],如 MARCKSL1 在食管鳞癌中高表达,通过与 F-肌动蛋白相互作用促进侵袭性伪足形成和细胞外基质降解,调节肿瘤细胞的迁移和侵袭^[23]。MARCKSL1 在肺腺癌中表达上调,通过激活 PI3K/AKT 信号通路促进上皮间充质转化调节癌细胞的增殖、迁移和侵袭^[24-25]。尽管已有的研究发现了一些 MARCKSL1 重要生理和病理功能,但是 MARCKSL1 在不同组织、器官中的功能研究仍处于初步阶段,非常重要的一个原因是由于该基因敲除

会导致胚胎发育后期死亡,难以研究该基因在成年以及不同组织器官中的功能。

MARCKSL1 在介导炎症反应、调节免疫应答中发挥重要作用,与造血系统调控密切相关。在前期工作中,我们通过分析 MARCKSL1 的表达图谱,发现该基因在造血干细胞中高表达,且表达与年龄呈正相关。初步的结果显示 *Marcks11* 基因缺失影响胎肝中造血干细胞的比例^[17],这提示 MARCKSL1 可能与造血过程密切相关。本研究中,我们基于前期建立的 *Marcks11* 敲除小鼠,进一步分析该基因缺失对胎肝造血重建的影响,结果表明,*Marcks11* 缺失影响造血重建过程,导致 B 细胞占比下降、髓系细胞占比升高,发生分化偏移。为深入探究其内在机制,我们对获得的 KSL 细胞进行表达差异分析,发现 *Marcks11* 基因缺失主要影响造血谱系分化和细胞因子互作相关的信号通路,这也可能是导致造血重建过程中发生分化偏移的重要原因。由于该基因敲除会导致小鼠胚胎发育后期死亡^[17],限制了该基因的成年以及组织细胞特异性功能研究。为此,我们通过 CRISPR/Cas9 技术构建了 *Marcks11* 条件敲除小鼠,通过与 *Vav1-Cre* 小鼠杂交,获得造血特异性 *Marcks11* 敲除小鼠,通过出生小鼠的基因型分析,

发现 *Marcksl1* 造血特异性敲除不影响生殖。随后我们分析了成年阶段造血干细胞分化发育不同阶段细胞的占比,发现 *Marcksl1* 缺失不影响成年造血。但成年竞争性骨髓移植实验,发现 *Marcksl1* 缺失影响造血重建过程,并导致 T 细胞、B 细胞和髓系细胞的比例升高,是否也是通过影响造血谱系分化和细胞因子互作相关的信号通路,来影响造血重建过程,仍需要进一步研究证实。我们以 *Marcksl1* 系统敲除和造血系统特异性敲除小鼠为基础,探讨了 *Marcksl1* 在稳态造血和造血重建中发挥的作用,有助于我们深入了解造血发育过程和造血调控网络,也有助于造血系统疾病的诊断、治疗和病因分析等。

综上,通过本研究,我们建立了 *Marcksl1* 造血系统特异性敲除小鼠,结合全身敲除小鼠模型,初步确定了该基因缺失,不影响成年稳态造血,但会影响造血重建过程, MARCKSL1 可能通过影响造血谱系分化和细胞因子受体互作等信号通路,影响造血重建过程,但具体机制仍需进一步研究证实,以上结果表明了 *Marcksl1* 在造血过程中发挥一定作用,提示我们 MARCKSL1 可能成为潜在的造血调控分子或造血系统疾病的治疗靶点。我们的工作为 *Marcksl1* 基因的成体造血功能研究,以及该基因的组织器官特异性功能研究提供了重要的动物模型。在之后的研究中我们可以以 *Marcksl1* 造血系统特异性敲除小鼠为基础,构建血液系统疾病模型,比如 MLL-AF9 急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)模型,以此来探究 MARCKSL1 影响 AML 发展的分子机制,为通过 MARCKSL1 治疗 AML 提供理论依据和可行性。

参考文献:

- [1] Orkin SH. Hematopoiesis: how does it happen? [J]. Curr Opin Cell Biol, 1995, 7(6): 870-877.
- [2] Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology [J]. Cell, 2008, 132(4): 631-644.
- [3] Akashi K, Traver D, Miyamoto T, et al. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages [J]. Nature, 2000, 404(6774): 193-197.
- [4] Wang Z, Ema H. Mechanisms of self-renewal in hematopoietic stem cells [J]. Int J Hematol, 2016, 103(5): 498-509.
- [5] Goyama S, Kitamura T. Epigenetics in normal and malignant hematopoiesis: an overview and update 2017 [J]. Cancer Sci, 2017, 108(4): 553-562.
- [6] Asada S, Kitamura T. Clonal hematopoiesis and associated diseases: a review of recent findings [J]. Cancer Sci, 2021,

- 112(10): 3962-3971.
- [7] Jiang P, Wang H, Zheng J, et al. Epigenetic regulation of hematopoietic stem cell homeostasis [J]. Blood Sci, 2019, 1(1): 19-28.
- [8] El Amri M, Fitzgerald U, Schlosser G. MARCKS and MARCKS-like proteins in development and regeneration [J]. J Biomed Sci, 2018, 25(1): 43.
- [9] Chen Z, Zhang W, Selmi C, et al. The myristoylated alanine-rich C-kinase substrates (MARCKS): a membrane-anchored mediator of the cell function [J]. Autoimmun Rev, 2021, 20(11): 102942.
- [10] McLaughlin S, Aderem A. The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions [J]. Trends Biochem Sci, 1995, 20(7): 272-276.
- [11] Li J, Aderem A. MacMARCKS, a novel member of the MARCKS family of protein kinase C substrates [J]. Cell, 1992, 70(5): 791-801.
- [12] Wu M, Chen DF, Sasaoka T, et al. Neural tube defects and abnormal brain development in F52-deficient mice [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(5): 2110-2115.
- [13] Chen J, Chang S, Duncan SA, et al. Disruption of the MacMARCKS gene prevents cranial neural tube closure and results in anencephaly [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996, 93(13): 6275-6279.
- [14] Kondrychyn I, Kelly DJ, Carretero NT, et al. Marcksl1 modulates endothelial cell mechanoreponse to haemodynamic forces to control blood vessel shape and size [J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 5476.
- [15] Kim BR, Lee SH, Park MS, et al. MARCKSL1 exhibits anti-angiogenic effects through suppression of VEGFR-2-dependent Akt/PDK-1/mTOR phosphorylation [J]. Oncol Rep, 2016, 35(2): 1041-1048.
- [16] Green TD, Crews AL, Park J, et al. Regulation of mucin secretion and inflammation in asthma: a role for MARCKS protein? [J]. Biochim Biophys Acta, 2011, 1810(11): 1110-1113.
- [17] 李博, 高丽娟, 于磊, 等. *Marcksl1* 基因敲除小鼠的建立及造血表型初步分析 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(5): 108-114.
- [18] Tanaka T, Shimizu S, Ueno M, et al. MARCKSL1 regulates spine formation in the amygdala and controls the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and anxiety-like behaviors [J]. EBioMedicine, 2018, 30: 62-73.
- [19] Prieto D, Zolessi FR. Functional diversification of the four MARCKS family members in zebrafish neural development [J]. J Exp Zool B Mol Dev Evol, 2017, 328(1/2): 119-138.
- [20] Björklblom B, Padzik A, Mohammad H, et al. C-Jun N-terminal kinase phosphorylation of MARCKSL1 determines actin stability and migration in neurons and in cancer cells [J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(17): 3513-3526.