

柯璐,曹愿,谷文达,等. 通过 CRISPR/Cas9 技术构建 *Apoe* 基因敲除小鼠模型及其表型研究 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(11): 1390-1398.

KE L, CAO Y, GU W D, et al. Use of CRISPR/Cas9 system for establishment and characterization of *Apoe* gene knockout mice model [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(11): 1390-1398.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.11.003

通过 CRISPR/Cas9 技术构建 *Apoe* 基因敲除小鼠模型及其表型研究

柯璐,曹愿,谷文达,刘甦苏,孙晓炜,赵皓阳,翟世杰,郭怀勇,娄玥,范昌发*

(中国食品药品检定研究院实验动物资源研究所,北京 102629)

【摘要】 **目的** 本研究通过 CRISPR/Cas9 技术构建 *Apoe* 基因敲除小鼠模型,以进一步探讨 *Apoe* 在血脂代谢和形成动脉粥样硬化病症中的功能。**方法** 针对 C57BL/6J 小鼠 *Apoe* 基因设计 2 个 sgRNA 靶位点,并将 sgRNA 和 Cas9 mRNA 共同注入受精卵,移植至 ICR 受体鼠,获得 F₀ 代小鼠,通过提取鼠尾 DNA 以及 PCR 筛选,获得阳性小鼠。通过荧光定量逆转录 PCR 法检测小鼠各组织中 *Apoe* mRNA 表达水平。检测小鼠血清中的血脂指标,并通过油红 O 染色主动脉血管,以检测动脉内膜脂质的积聚。**结果** PCR 及测序结果确认成功构建了 *Apoe* 基因敲除小鼠 (C57BL/6-*Apoe*^{em1}/Nifdc, 简称 *Apoe* KO 小鼠);实时荧光定量逆转录 PCR 实验结果显示,*Apoe* KO 纯合小鼠 (*Apoe*^{-/-}) 的肝、大脑、脾、肾和肺组织中的 *Apoe* mRNA 显著降低;血清总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平显著升高,且雄性小鼠的血清高密度脂蛋白胆固醇水平显著降低;主动脉血管油红 O 染色显示,在相同且食用正常饲料条件下,野生型 (wild-type, WT) 小鼠无脂质堆积,*Apoe*^{-/-} 小鼠则呈现大量红色脂质斑块。**结论** 本研究成功构建 *Apoe* 基因敲除小鼠,该纯合子小鼠在非高脂饲料下呈典型的异常血脂代谢及主动脉内膜脂质积聚特征,为 *Apoe* KO 小鼠资源提供了背景数据,为血脂代谢异常表型研究提供新模型。

【关键词】 *Apoe*; C57BL/6-*Apoe*^{em1}/Nifdc; CRISPR/Cas9; 血脂代谢; 主动脉

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 11-1390-09

Use of CRISPR/Cas9 system for establishment and characterization of *Apoe* gene knockout mice model

KE Lu, CAO Yuan, GU Wenda, LIU Susu, SUN Xiaowei, ZHAO Haoyang, ZHAI Shijie,
GUO Huaiyong, LOU Yue, FAN Changfa*

(Institute for Laboratory Animal Resources, National Institutes for Food and Drug Control (NIFDC), Beijing 102629, China)

Corresponding author: FAN Changfa. E-mail: fanf@nifdc.org.cn

【Abstract】 **Objective** The CRISPR/Cas9 system was utilized to generate an *Apoe* knockout mice model to support further investigations of the role of *Apoe* in lipid metabolism and atherosclerosis. **Methods** Two single guide RNAs designed for *Apoe* in C57BL/6J mice were co-injected with Cas9 mRNA into fertilized eggs, followed by transplantation into ICR recipient mice to obtain F₀ generation mice. KO mice were identified by polymerase chain reaction (PCR) screening of tail DNA. *Apoe* mRNA expression in various tissues was assessed by quantitative real-time PCR and lipid indexes were measured in serum samples. Lipid accumulation in the inner lining of aortic vessels was detected by oil red O staining. **Results** PCR and sequencing confirmed the successful construction of *Apoe* KO mice (C57BL/6-*Apoe*^{em1}/Nifdc). *Apoe* mRNA levels were significantly reduced in the liver, brain, spleen, kidney, and lung tissues of *Apoe* KO homozygous mice

【基金项目】 国家重点研发计划 (2023YFC3402000)。

Funded by National Key Research and Development Program (2023YFC3402000).

【作者简介】 柯璐,女,硕士,研究实习员,研究方向:疾病动物模型。Email: kksl100@163.com

【通信作者】 范昌发,男,博士,研究员,博士生导师,研究方向:疾病动物模型。Email: fanf@nifdc.org.cn

(*Apoe*^{-/-}), as shown by reverse transcription quantitative real-time PCR. Serum total cholesterol and low-density lipoprotein cholesterol levels were increased in *Apoe*^{-/-} mice, and high-density lipoprotein cholesterol levels were decreased in male *Apoe*^{-/-} mice. Extensive lipid plaques were observed in the inner lining of the arteries in *Apoe*^{-/-} mice compared with WT mice, under normal chow consumption conditions. **Conclusions** This study successfully established an *Apoe* KO mice model exhibiting a typical abnormal lipid metabolism phenotype with arterial lipid accumulation, even without a high-fat diet intervention. This work provides background data for the *Apoe* KO mice resource and a new model for the study of abnormal lipid metabolism.

【Keywords】 *Apoe*; C57BL/6-*Apoe*^{em1}/Nifdc; CRISPR/Cas9; lipid metabolism; aorta

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

维持正常的胆固醇水平对于哺乳动物细胞功能和活力至关重要^[1]。胆固醇水平的升高是造成多种疾病的重要危险因素。脂类不溶于水,需要与载脂蛋白结合,实现在血浆中正常运输。载脂蛋白 E (apolipoprotein E, *Apoe*) 是一种多态性蛋白参与脂蛋白的转化与代谢过程,是极低密度脂蛋白 (very low density lipoprotein, VLDL) 和高密度脂蛋白 (high density lipoprotein, HDL) 的组成部分,在脂蛋白和胆固醇的代谢和再分布中起着重要作用^[2]。*Apoe* 主要在肝和大脑中合成^[3],当 *Apoe* 功能失调或缺失时,人类^[4]和动物模型^[5]会出现严重的高脂血症。在 *Apoe* 敲除小鼠中^[6],动脉粥样硬化会自行发展,是动脉粥样硬化的理想模型。自从 1992 年 PIEDRAHITA 等^[6]首次通过胚胎干细胞打靶技术失活 *Apoe* 基因之后,大量研究揭示了 *Apoe* 的基因功能^[7-12],其在心血管系统、神经系统、呼吸系统、免疫系统、骨细胞发育和代谢发育等多种生理功能中都起着重要作用。虽然 *Apoe* 基因敲除小鼠在国内使用较为广泛,但多从国外引进,在商业化应用或药物研发领域可能存在知识产权限制。因此,本文通过 CRISPR/Cas9 技术构建了 *Apoe* 基因敲除小鼠模型 (*Apoe* KO 小鼠),检测分析了 *Apoe* 对血脂代谢以及诱导动脉粥样硬化的功能作用,为 *Apoe* 体内功能及靶向机制研究提供模型资源。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

20 只 15 ~ 20 g 的 4 ~ 6 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6J 小鼠,20 只 30 ~ 35 g 的 10 ~ 12 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠和 10 只 25 ~ 30 g 的 6 ~ 8 周龄 SPF 级雌性 ICR 小鼠由中检院实验动物资源所繁育并提供【SCXK(京)2022-0002】,饲养于本单位实验动物资源研究所屏障环境中【SYXK(京)

2022-0014】。饲养期间给予小鼠标准饲料(武汉市万千佳兴生物科技有限公司)及灭菌自来水。饲养环境:室温 20 ~ 26 °C,相对湿度 40% ~ 70%,照明 12 h 明/12 h 暗。所有操作均符合本单位实验动物伦理学要求(中检动(福)第 2024(B)011 号)。

1.1.2 主要试剂与仪器

mMESSAGE mMACHINE T7 转录试剂盒 (AM1344)、多聚腺苷酸加尾试剂盒 (AM1350)、MEGAscript T7 Transcription Kit (AM1354) 和 MEGAclear Transcription Clean-Up Kit (AM1908) 均购于 Thermo Fisher; RNeasy Mini kit (74104) 购于 QIAGEN; RNA 提取试剂 (AN30307A)、RT-PCR 试剂盒 (AM81680A) 和荧光定量 PCR 试剂盒 (AM81776A) 购于 TaKaRa; 油红 O 试剂盒 (0803A22) 购于 LEAGENE。

微量定量注射仪 (FemtoJet 4i, Eppendorf); 显微镜注射系统 (IX71, OLYMPUS); 荧光定量 PCR 仪 (LC480 II, Roche); 超微量分光光度计 (Nanodrop2000, Thermo); 体视显微镜 (SM2745, Nikon); 冷冻离心机 (3-18KS, Sigma); PCR 扩增仪 (K960, Heal Force); 全自动生化分析仪 (7180, HITACHI)。

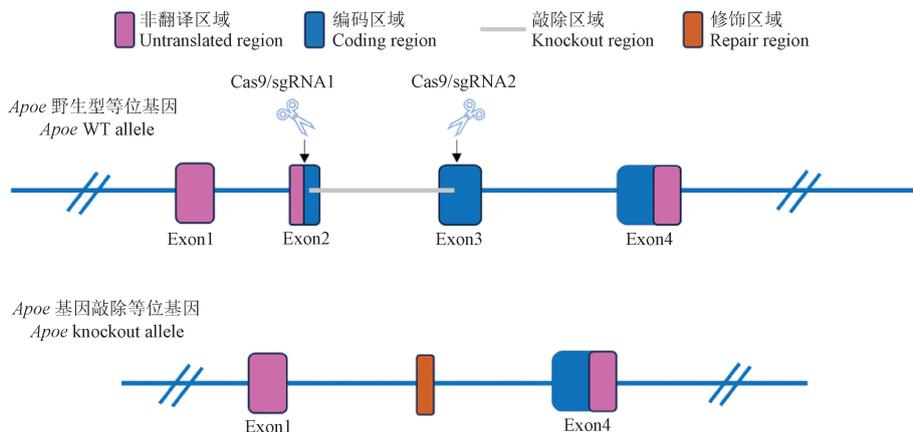
1.2 方法

1.2.1 小鼠 *Apoe* 基因敲除策略

小鼠 *Apoe* 基因定位于小鼠 7 号染色体,含有 4 个外显子。如图 1 所示,根据小鼠 *Apoe* 基因结构,在 2 号和 3 号外显子分别设计 2 个 sgRNA 靶位点,通过 CRISPR/Cas9 编辑技术敲除 2 号和 3 号外显子部分序列后,使得 *Apoe* 蛋白无法正常翻译,构建基因缺失模型。

1.2.2 sgRNA 的体外合成及转录

小鼠 *Apoe* 基因 Gene ID (NCBI): 11 816 定位于小鼠 7 号染色体 (Chromosome7: 19, 430, 034-19, 433, 113, Ensembl: ENSMUSG00000002985), 全长

图 1 *Apoe* 基因敲除小鼠构建策略Figure 1 Construction strategy of *Apoe* knockout mice

4518 bp, 包含 11 个转录本, *Apoe*-206 转录本长度为 1408 bp, 有 4 个外显子。根据敲除模型设计原则, 选择共有转录本的 2 号外显子和 3 号外显子作为敲除区域。在 2 号和 3 号外显子的上下游分别设计 2 个 sgRNA 靶位点, 通过在线网站 <https://cctop.cos.uni-heidelberg.de/> 设计获得 sgRNA 序列 (如表 1 所示)。并在 sgRNA 设计后通过网站 <http://www.rgenome.net/> 检测其是否存在潜在脱靶位点, 确保该 sgRNA 仅有一个目标靶点。

表 1 sgRNA 序列信息

Table 1 sgRNA sequence information

sgRNA 靶序列 sgRNA target sequence	序列信息 (5' - 3') Sequence information (5' - 3')
sgRNA1	F: TAGGTATGGAGCAAGGACTTGCTG R: AAACCAAGCAAGTCCTTGCTCCATA
sgRNA2	F: TAGGGCAGGCCTGAACCGCTTCT R: AAACAGAAGCGTTTCAGGGCCTGC

引物合成后经退火连接后使用 Bbs I 酶切 pT7 质粒, 然后克隆转化, 次日挑取 4 个菌落进行质粒提取, 并进行测序验证。以测序正确的 sgRNA 质粒为模板进行 PCR 扩增。PCR 条件: 95 °C 5 min; 95 °C 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C 15 s, 共 30 个循环, 反应程序结束后于 4 °C 保存。PCR 扩增产物加入 2 倍体积无水乙醇, 12 000 r/min 离心 10 min, 弃去上清, 加入 500 μL 70% 乙醇清洗 2 次, 然后将沉淀溶解于 30 μL RNase free 水中。使用 MEGAshonscript T7 Transcription Kit 进行体外转录, 于 37 °C 孵育 4 h, 然后加入 DNase 消化 20 min, 使用 MEGAclear Transcription Clean-Up Kit 纯化产物, 经进一步浓缩并分装存于 -80 °C 备用。

1.2.3 Cas9 mRNA 的体外转录

采用 px330 质粒为模板, 采用 Hind III 酶进行酶

切, 电泳跑胶回收后, 最终加入 30 μL RNase free 水溶解。以回收产物为模板, 利用 mMESSAGE mMACHINE T7 Transcription kit 进行体外转录, 于 37 °C 孵育 2 h, 然后加入 DNase 消化 20 min, 再使用 Poly(A) Tailing kit 加尾 50 min, 最后使用 RNeasy Mini kit 对产物进行纯化, 再经浓度测定后分装存于 -80 °C 备用。

1.2.4 显微注射及胚胎移植

4 ~ 6 周龄 C57BL/6 雌性小鼠超数排卵后与雄鼠合笼, 挑选见栓雌鼠, 剖开腹腔, 在输卵管壶腹部收集受精卵细胞。将构建好的 sgRNA 和 Cas9 mRNA 于冰上解冻, 混合浓度为 sgRNA 50 ng/μL, Cas9 mRNA 100 ng/μL, 12 000 r/min 离心 40 min, 吸取上清, 见图 2。用吸管吸取液体从注射针后端注入尖端, 进行显微注射。操作成功的囊胚放入胚胎培养液中, 37 °C, 5% CO₂ 培养 30 ~ 60 min, 随后快速移植到假孕母鼠的子宫内, 缝合后将移植鼠饲养于 IVC 环境中。移植鼠产出 F₀ 代小鼠后通过剪尾进行基因型鉴定与筛选。

1.2.5 实时荧光定量逆转录 PCR (reverse transcription quantitative real-time PCR, RT-qPCR)

分别取 *Apoe* KO 纯合小鼠与同窝野生型小鼠组织用于 RT-qPCR 检测。使用 RNAiso Plus 提取组织 RNA, 并检测 RNA 浓度及纯度, 测定 OD_{260 nm}/OD_{280 nm} 及 OD_{260 nm}/OD_{230 nm} 的值在 1.8 ~ 2.2 的范围内, 反转录合成 cDNA 后, 以 *Gapdh* 为内参采用 RT-qPCR 技术对其进行表达量的测定。反应的条件设置: 95 °C 5 min; 95 °C 10 s, 60 °C 30 s (40 个循环); 95 °C 15 s, 60 °C 60 s, 95 °C 15 s。反应结果使用 LC480 Software 1.5 软件收集、分析。所有的样品都在同一块板中做 3 次重复, RT-qPCR 引物如表 2 所示。

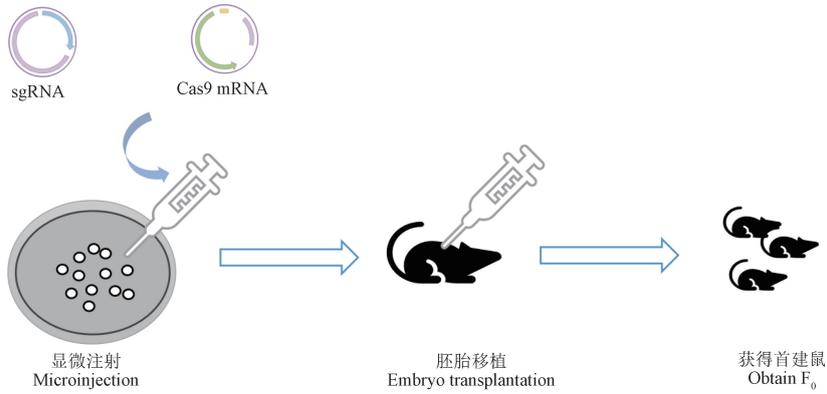


图 2 Apoe KO 小鼠构建流程

Figure 2 Construction process of Apoe KO mice

表 2 RT-qPCR 引物序列

Table 2 RT-qPCR primer sequences

引物 Primer	序列信息(5'-3') Sequence information(5'-3')	解链温度/℃ Tm/℃	GC 含量/% GC/%	产物长度/bp Product length/bp
<i>Apoe</i>	F: CCGTGTCTGTGGTCACATT	58.67	52.63	91
	R: CAGGGTTGGTTGCTTTGC	57.24	55.56	
<i>Gapdh</i>	F: GGTGGTGTGAACGGATTTG	59.48	55.00	97
	R: GAAGGGTCTGTGATGGCAA	60.61	55.00	

1.2.6 血脂水平测定

注射 0.5 mg/mL 的舒泰,小鼠麻醉后采集血液,全血静置 1 ~ 2 h,待血液充分凝固后离心分离得到血清,使用全自动分析仪以及胆固醇(cholesterol, Chol)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)和高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)试剂盒对血清进行血脂指标检测。

1.2.7 动脉粥样硬化特征检测

将小鼠仰卧位固定于解剖台,麻醉后剪开胸腔,充分暴露心脏。将连有生理盐水的输液器针头自心尖部插入左心室,在右心耳剪开一小口进行全身灌注。灌注完成后分离主动脉并置于 4% 的甲醛中固定,固定后将血管外部的多余脂肪分离干净。将 Vannas 弹簧剪自升主动脉断口处伸入血管管腔内,沿主动脉弓大弯侧剖开整个主动脉。将剖开的主动脉内膜面朝上展开并进行固定。60% 异丙醇浸洗 20 ~ 30 s 后加入改良油红 O 染色液,密闭染色

10 ~ 15 min。再置入 60% 异丙醇稍洗去除染液,蒸馏水复洗。最后固定血管后拍照,分析阳性斑块的数量。

1.3 统计学分析

用 SPSS 23.0 和 Graphpad 8.0 软件进行统计学分析,数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 *t* 检验分析。以 *P* < 0.05 为具有统计学意义。

2 结果

2.1 Apoe KO 小鼠的造模

如表 3 所示,将显微注射后的 80 枚受精卵移植到假孕母鼠的子宫内,产仔后获得 30 只 F₀ 代小鼠,通过 PCR 结果显示共有 5 只小鼠的靶位点发生非同源重组修复,导致碱基发生随机缺失(图 3A)。对 PCR 产物进行 Sanger 测序,5 只敲除小鼠分别为 2 号(雌性,敲除 934 bp),13 号(雄性,敲除 773 bp),18 号(雄性,敲除 603 bp),21 号(雄性,敲除 437 bp),27 号(雌性,敲除 721 bp)(图 3B ~ 3G)。根据 CRISPR/Cas9 的工作原理一般会在 PAM 序列

表 3 Apoe KO 小鼠的筛选流程

Table 3 Procedures for acquisition of Apoe KO mice

品系 Strain	胚胎移植数/个 Number of embryos transferred/numbers	新生小鼠数/只 Number of born mice/numbers	敲除阳性小鼠数/只 Number of knock-out positive mice/numbers	筛选阳性小鼠数/只 Number of positive mice was screened/numbers
C57BL/6J	80	30	5	2



注:A:PCR 鉴定 F₀ 代小鼠基因型,野生型条带大小:1147 bp,敲除片段大小分别为 934 bp,773 bp,603 bp,437 bp,721 bp;B:F₀ 代小鼠测序比对;C~G:5 只 F₀ 代 Apoe KO 小鼠的 Sanger 测序峰图。

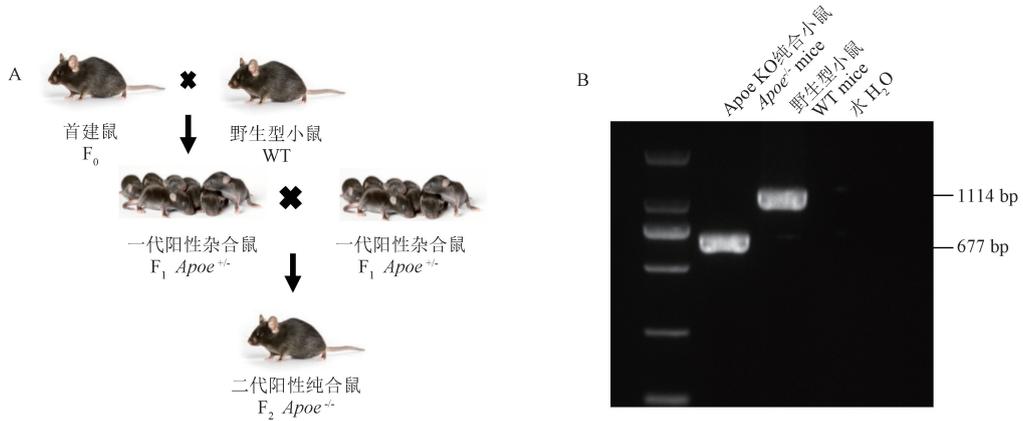
图 3 Apoe KO 小鼠筛选

Note. A. F₀ generation mice genotypes were identified by PCR. Size of wild-type band was 1147 bp, and the size of knockout band was 934 bp, 773 bp, 603 bp, 677 bp, 721 bp. B. Sequencing comparison of F₀ generation mice. C ~ G. Sanger sequencing peak result of F₀ positive Apoe KO mice.

Figure 3 Screening of Apoe KO mice

上游的第 3 个碱基进行断裂,因此根据两条 sgRNA 可以预测目标敲除条带是 605 bp,以上敲除小鼠大都在目标片段附近。之前的研究表明,在阳性小鼠的筛选中,通常优先选取雄性且非 3 的整倍数碱基敲除的小鼠^[13]。因此,选择了其中的 13 号和 21 号阳性小鼠进行扩繁,本研究中使用 21 号阳性小鼠进

行实验。将 21 号 F₀ 代小鼠与野生型小鼠交配,获得 F₁ 代小鼠,通过 PCR 筛选出 Apoe KO 杂合小鼠 (Apoe^{+/-}) (图 4A)。最后通过 F₁ 代杂合小鼠自交获得 F₂ 代 Apoe KO 纯合小鼠 (Apoe^{-/-}), PCR 结果如图 4B 所示。野生型条带大小为 1147 bp,敲除鼠条带大小为 677 bp。



注:A: Apoe KO 小鼠繁殖策略;B: F₂ 代小鼠 PCR 鉴定小鼠基因型。

图 4 Apoe KO 纯合小鼠的繁殖与鉴定

Note. A. Reproductive strategy of Apoe KO mice. B. Genotyping were identified by PCR of F₂ generation mice.

Figure 4 Reproduction and identification of Apoe^{-/-} mice

2.2 Apoe mRNA 相对表达量的变化

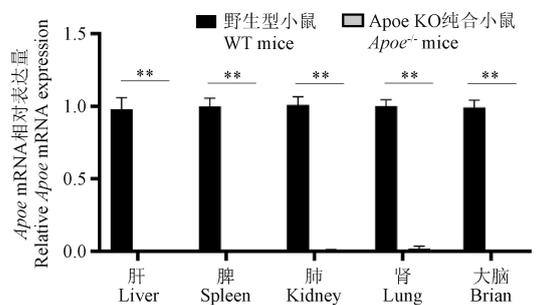
为了验证敲除效率,在 Apoe 基因的第 2 号外显子和第 3 号外显子设计上下游引物,利用 RT-qPCR 检测 3 ~ 4 月龄小鼠组织中的 Apoe mRNA 表达水平,如图 5 所示,与野生型小鼠相比,Apoe KO 纯合小鼠的肝、脾、肺、肾和大脑组织中的 Apoe mRNA 表达水平显著降低,几乎检测不到 Apoe mRNA 的表达,这表明 Apoe 基因被成功敲除,并获得了 Apoe KO 纯合小鼠。

2.3 小鼠血脂代谢的变化

通过检测 3 ~ 4 月龄小鼠血清中各项血脂代谢的指标,结果如图 6 所示,虽然 Apoe KO 纯合小鼠的甘油三酯水平与野生型小鼠无明显差异,但总胆固醇水平显著升高。同时测量了 LDL-C 与 HDL-C,发现 Apoe KO 纯合小鼠血清中的 LDL-C 显著升高,但 HDL-C 没有显著的变化,进一步分析发现,Apoe KO 纯合雄性小鼠的血清 HDL-C 显著降低,而雌性小鼠无显著性差异。这表明 Apoe 基因会影响血脂代谢,并且对雄性小鼠的影响更大。

2.4 小鼠主动脉血管的脂质积聚

解剖 3 ~ 4 月龄的小鼠,油红 O 染色其主动脉血管,如图 7A 所示,野生型小鼠的主动脉血管干净平滑,无任何油红 O 阳性脂质斑块,而同龄的 Apoe



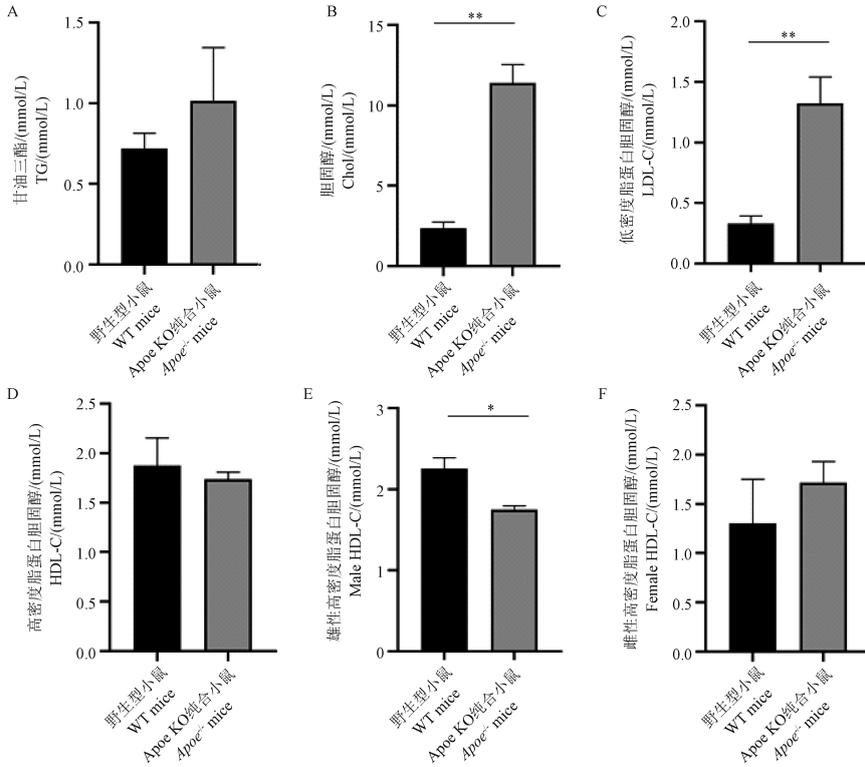
注:与野生型小鼠相比,** $P < 0.01$ 。(下同)

图 5 Apoe KO 纯合小鼠中 Apoe mRNA 的表达水平($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Note. Compared with WT mice, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures)

Figure 5 Apoe mRNA expression levels in Apoe^{-/-} mice ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

KO 纯合小鼠的主动脉内壁附着有油红 O 染色阳性红色的脂质斑块,如图 7A 箭头所指,Apoe KO 纯合小鼠的主动脉弓、降主动脉和血管交界处都分布着红色脂质斑块。同时对野生型小鼠、Apoe 敲除组小鼠的油红 O 染色阳性斑块数量统计发现,二者存在显著性差异(图 7B)。这些结果表明即使在没有高脂饲料饲喂的情况下,Apoe KO 纯合小鼠在 3 ~ 4 月龄的时候就能够形成早期动脉粥样硬化的特征。



注:A: TG 水平比较; B: Chol 水平比较; C: LDL-C 水平比较; D: HDL-C 水平比较; E: 雄性 HDL-C 水平比较; F: 雌性 HDL-C 水平比较; 与野生型小鼠相比, * $P < 0.05$ 。

图 6 3 ~ 4 月龄 Apoe KO 纯合小鼠与同龄野生型小鼠血脂比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Comparison of TG levels. B. Comparison of Chol level. C. Comparison of LDL-C levels. D. Comparison of HDL-C levels. E. Comparison of HDL-C levels in male mice. F. Comparison of HDL-C levels in female mice. Compared with WT mice, * $P < 0.05$.

Figure 6 Comparison of serum lipid levels between *Apoe*^{-/-} mice and WT mice at 3 ~ 4 months age ($\bar{x} \pm s, n = 5$)



注:A: 主动脉根部油红 O 染色; 箭头: 油红 O 阳性染色斑块; B: 主动脉血管油红 O 阳性染色斑块数量统计。

图 7 Apoe KO 纯合小鼠与野生型小鼠血脂主动脉根部油红 O 染色 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Note. A. Oil red O staining of aorta root. Arrow. Oil red O positive staining plaque. B. Statistical analysis of aorta oil red O positive staining plaque.

Figure 7 Oil red O staining of aorta root of *Apoe*^{-/-} mice and WT mice ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论

人类疾病与基因功能密切相关,研究基因的功能是当今生命科学领域的重要内容。通过基因编辑技术构建特定基因的敲除模型,不仅仅为某种疾病提供模型工具,也是研究基因功能的首选方法。其中基因编辑的小鼠模型已被广泛应用于多种研究领域,由于小鼠与人有 90% 同源基因,因此这些基因功能可以类推至人类身上^[14]。Apoe 是一种多功能蛋白,作为血浆脂蛋白的组分在脂质运输中起着重要作用^[4]。有研究表明,通过胚胎干细胞同源重组构建的靶向缺失 Apoe 小鼠在动脉树的许多部位会自发动脉粥样硬化性病变^[5]。

CRISPR/Cas9 基因编辑技术是通过 sgRNA 引导能够对目标基因内特定位点进行精确修饰,是一种简单、高效且经济实惠的基因组编辑技术^[15]。在本研究中通过设计两条 sgRNA 能够预测敲除位置以及片段大小,造成靶位点中间区域片段的缺失,相比于单一 sgRNA 能够实现更高的敲除效率以及可控性。在胚胎移植后通过 PCR 和测序筛选 F₀ 代的阳性敲除小鼠,一般选择符合所设计的 sgRNA 预期敲除片段大小的小鼠,排除敲除片段大小为 3 的倍数的小鼠,同时保留多个 F₀ 代小鼠传代繁殖,以保证能够扩繁稳定的敲除小鼠群体,由于雄性小鼠在扩繁中的相对优势,可以优先考虑雄性小鼠作为 F₀ 代小鼠。在本研究中,选择了 437 bp 片段敲除的 21 号 F₀ 代小鼠进行传代,在 F₂ 代获得纯合的 Apoe KO 小鼠。有研究表明,Apoe 在多个组织中都有所表达,其中肝细胞是 Apoe 蛋白的主要合成位点^[16]。通过 RT-qPCR 检测到 Apoe mRNA 在野生型小鼠的肝、脾、肺、肾和大脑表达,尤其在肝中的表达最高,与之前的研究结果一致,而敲除 Apoe 基因的纯合子小鼠的组织几乎检测不到 Apoe mRNA 的表达,这证明敲除小鼠模型的构建是成功的。

Apoe 作为血浆脂质水平的关键调节因子,能够参与血浆脂质含量的稳态控制。对小鼠血清胆固醇水平检测结果显示 Apoe KO 纯合小鼠胆固醇、LDL-C 水平显著升高,雄性 Apoe KO 纯合小鼠 HDL-C 水平显著降低,以及 Apoe KO 纯合小鼠主动脉内壁形成的脂质累积,这都是动脉粥样硬化的早期表征^[17]。小鼠的动脉粥样硬化以时间依赖性方式发展动脉病变,因此在血脂和血管的检测中小鼠年龄选择也尤为重要,本研究选取的 3 ~ 4 月龄小鼠处

于动脉粥样硬化的早期进程,有文献表明在 8 ~ 9 月龄小鼠中动脉能观察到更广泛病变分布^[18],在 1 岁时出现晚期动脉粥样硬化病变,能够获得更好的病理学表征^[19]。在动脉粥样硬化疾病的小鼠模型构建中,Apoe 基因缺失小鼠会自发形成动脉粥样硬化,但通常在研究中会通过高脂肪饮食加速 Apoe KO 小鼠动脉粥样硬化进程,更好地模拟人类饮食依赖性动脉粥样硬化的表征^[20]。而本研究中,在正常的、非高脂饲料情况下,即可观察到典型的脂质斑块表型,意味着本模型可以用于动脉粥样硬化研究。

综上,本研究通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功构建 Apoe KO 小鼠模型,并对其在血脂代谢以及血管病变中的功能进行了初步研究,发现 Apoe 在血液中维持胆固醇稳态和清除乳糜微粒的功能,可以模拟动脉粥样硬化的发展病程。另外,Apoe 在神经、血管等许多疾病中都有着重要的作用,本研究提供了新的 Apoe KO 小鼠模型,并且在传代 4 代之后依然能够正常繁殖以及保持稳定的表型,为更好地研究 Apoe 在疾病中的功能提供了基础。

参 考 文 献 (References)

- [1] CHEN L, ZHAO Z W, ZENG P H, et al. Molecular mechanisms for ABCA1-mediated cholesterol efflux [J]. Cell Cycle, 2022, 21(11): 1121-1139.
- [2] REUE K L, QUON D H, O' DONNELL K A, et al. Cloning and regulation of messenger RNA for mouse apolipoprotein E [J]. J Biol Chem, 1984, 259(4): 2100-2107.
- [3] RABER J, AKANA S F, BHATNAGAR S, et al. Hypothalamic-pituitary-adrenal dysfunction in Apoe^{-/-} mice: possible role in behavioral and metabolic alterations [J]. J Neurosci, 2000, 20(5): 2064-2071.
- [4] MAHLEY R W. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology [J]. Science, 1988, 240(4852): 622-630.
- [5] PLUMP A S, SMITH J D, HAYEK T, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells [J]. Cell, 1992, 71(2): 343-353.
- [6] PIEDRAHITA J A, ZHANG S H, HAGAMAN J R, et al. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992, 89(10): 4471-4475.
- [7] FULLERTON S M, SHIRMAN G A, STRITTMATTER W J, et al. Impairment of the blood-nerve and blood-brain barriers in apolipoprotein E knockout mice [J]. Exp Neurol, 2001, 169(1): 13-22.
- [8] HARTLEY C J, REDDY A K, MADALA S, et al.

- Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 279 (5): H2326-H2334.
- [9] MASSARO D, MASSARO G D. Apoem1Unc mice have impaired alveologenesis, low lung function, and rapid loss of lung function [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008, 294 (5): L991-L997.
- [10] ZHOU X, PAULSSON G, STEMME S, et al. Hypercholesterolemia is associated with a T helper (Th) 1/Th2 switch of the autoimmune response in atherosclerotic Apo E-knockout mice [J]. *J Clin Invest*, 1998, 101(8): 1717-1725.
- [11] SCHILLING A F, SCHINKE T, MÜNCH C, et al. Increased bone formation in mice lacking apolipoprotein E [J]. *J Bone Miner Res*, 2005, 20(2): 274-282.
- [12] MOGHADASIAN M H, MCMANUS B M, NGUYEN L B, et al. Pathophysiology of apolipoprotein E deficiency in mice: relevance to apo E-related disorders in humans [J]. *FASEB J*, 2001, 15 (14): 2623-2630.
- [13] 吴曦, 霍桂桃, 刘甦苏, 等. 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术建立 Fc γ R 基因大片段敲除小鼠模型 [J]. *中国实验动物学报*, 2019, 27(5): 583-591.
- WU X, HUO G T, LIU S S, et al. Establishment of a large fragment Fc γ R gene knockout mouse model using CRISPR/Cas9 genome editing technique [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2019, 27(5): 583-591.
- [14] VANDAMME T F. Use of rodents as models of human diseases [J]. *J Pharm Bioallied Sci*, 2014, 6(1): 2-9.
- [15] MA Y, ZHANG L, HUANG X. Genome modification by CRISPR/Cas9 [J]. *FEBS J*, 2014, 281(23): 5186-5193.
- [16] HUANG Y, MAHLEY R W. Apolipoprotein E: structure and function in lipid metabolism, neurobiology, and Alzheimer's diseases [J]. *Neurobiol Dis*, 2014, 72: 3-12.
- [17] JAWIEN J, NASTAŁEK P, KORBUT R. Mouse models of experimental atherosclerosis [J]. *J Physiol Pharmacol*, 2004, 55 (3): 503-517.
- [18] REDDICK R L, ZHANG S H, MAEDA N. Atherosclerosis in mice lacking Apo E. Evaluation of lesion development and progression [J]. *Arterioscler Thromb*, 1994, 14(1): 141-147.
- [19] WANG Y X, HALKS-MILLER M, VERGONA R, et al. Increased aortic stiffness assessed by pulse wave velocity in apolipoprotein E-deficient mice [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000, 278(2): H428-H434.
- [20] LI Y, ZHANG C G, WANG X H, et al. Progression of atherosclerosis in ApoE-knockout mice fed on a high-fat diet [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(18): 3863-3867.

[收稿日期] 2024-04-17

《中国实验动物学报》稿约

国内刊号 CN 11-2986/Q 国际刊号 ISSN 1005-4847 邮局代号 2-748

一、杂志介绍

本刊是由中国实验动物学会与中国医学科学院医学实验动物研究所主办的全国性高级学术刊物(月刊),以理论与实践、普及与提高相结合为宗旨,征稿的范围是与实验动物与动物实验相关的生命科学各分支学科,栏目设置包括研究报告、研究快报和进展与综述。要求来稿材料翔实、数据可靠、文字简练、观点明确、论证合理,有创新、有突破、有新意。

本刊是中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》(北大核心)等数据库收录。

二、投稿要求及注意事项

文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。文章字数在 6000 字之内。

投稿网址: <http://zgdydw.cnjournals.com/>

期待您的来稿!