

磷酸二酯酶 4D 纯合子敲除小鼠的构建

朱振铎, 苏甜甜, 程慧娟, 江春如, 方茹红, 管秋韵, 何凤, 葛明丽, 魏伟, 汪庆童

摘要 目的 应用 CRISPR/Cas9 技术构建磷酸二酯酶 4D (PDE4D) 纯合子敲除小鼠, 为深入探究 PDE4D 基因的功能及作用机制提供基础。方法 针对 PDE4D 基因外显子 4、5 号构建载体显微注射到 C57BL/6J 小鼠受精卵中, 经过母本繁育和子代交配获得 PDE4D^{-/-}小鼠, 通过 PCR 产物测序及基因型鉴定技术测定小鼠基因型。使用超声成像系统和 HE 染色检测小鼠主要器官形态和功能的变化, 通过 Western blot 实验验证 PDE4D 蛋白在小鼠体内的表达情况。结果 PDE4D^{-/-}小鼠基因型稳定遗传, 小鼠体型较小, 体内主要器官无明显形态及组织学改变。PDE4D 杂合或纯合敲除小鼠

主要组织中 PDE4D 表达减少或基本不表达, 敲除效果较好。**结论** 本课题利用 CRISPR/Cas9 技术成功建立了 PDE4D^{-/-}小鼠, 未发现明显生理异常, 可用于以 PDE4D 为靶点的疾病发病机制及药物研究。

关键词 磷酸二酯酶 4D; CRISPR/Cas9; 基因敲除; 基因型鉴定

中图分类号 R 394.33

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)02-0208-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.02.006

2022-12-15 接收

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81973314、81973332); 安徽省杰出青年科学基金(编号: 1808085J28); 安徽高校协同创新项目(编号: GXXT-2020-066); 2021 年安徽省高校学科(专业)拔尖人才学术资助项目(编号: gxbjZD2021047)

作者单位: 安徽医科大学临床药理研究所, 抗炎免疫药物教育部重点实验室, 安徽医科大学类风湿关节炎研究中心, 合肥 230032

作者简介: 朱振铎, 男, 硕士研究生;

汪庆童, 女, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: hfwq727@163.com;

魏伟, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: wwei@ahmu.edu.cn

磷酸二酯酶(phosphodiesterase, PDE)是 21 个基因编码的 11 种不同亚型酶(PDE1-PDE11)的超级大家族^[1], PDE4D 亚型在心脏、肝脏、肾脏等组织中表达较高。PDE4D 的主要功能是通过与环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)结合并将其降解为 5'-腺嘌呤核苷酸(adenosine 5'-monophosphate, 5'AMP)^[2]。PDE4D 表达升高会增加房颤的易感性和心源性中风的风险, 也在非酒精性脂肪肝、阿尔茨海默病等疾病的发生发展中发挥重要作用^[3], PDE4D 可能为这些疾病的潜在治疗靶点。构建 PDE4D 基因敲除小鼠对充分阐明 PDE4D 的病理作用机制及药物靶点的明确具有重要意义。该研究与江苏集萃药康生物科技有限公司合作, 利用

were divided into control group (Control), hypoxia/reoxygenation group (H/R) and hypoxia/reoxygenation + GSK-3 β inhibitor group (H/R + TDZD-8) for experiment. The brain tissues of zebrafish in each group were selected to determine the mRNA expressions of hypoxia inducible factor 1 α and 1 β (HIF-1 α and HIF-1 β) at different reoxygenation time points by qRT-PCR, and the protein expression levels of HIF-1 α , GSK-3 β , p-GSK-3 β (Ser 9) and MAP2 were detected by Western blot, TTC staining and TUNEL staining were used to detect cerebral infarction area and cell apoptosis, and immunofluorescence was used to detect the distribution and expression of MAP2 in brain. **Results** Compared with Control group, the mRNA levels of Hif-1 α and Hif-1 β ($P < 0.01$) and protein expression of Hif-1 α ($P < 0.01$) increased in H/R group, the area of cerebral infarction ($P < 0.01$) and apoptotic cells ($P < 0.01$) increased, p-GSK-3 β (Ser 9)/GSK-3 β ratio, MAP2 protein expression ($P < 0.05$) and immunofluorescence expression of MAP2 ($P < 0.01$) reduced; Furthermore, TDZD-8 pretreatment could relieve the brain injury of H/R zebrafish by decreasing the infarct size and cell apoptosis, improving the ratio of p-GSK-3 β (Ser 9)/GSK-3 β , and increasing the expression of MAP2. **Conclusion** Hypoxia/reoxygenation can cause brain neuron damage in zebrafish, and its mechanism may be related to inhibition of GSK-3 β phosphorylation and MAP2 expression. GSK-3 β specific inhibitor TDZD-8 can reverse the damage of brain neurons caused by hypoxia/reoxygenation by promoting the expression of P-GSK-3 β (Ser 9) and reducing MAP2 degradation.

Key words zebrafish; cerebral hypoxia/reoxygenation injury; GSK-3 β ; MAP2; TDZD-8

CRISPR/Cas9 技术构建 PDE4D 基因纯合敲除 (PDE4D^{-/-}) 小鼠, 对后代子鼠进行基因型鉴定, 检测 PDE4D^{-/-} 小鼠主要器官组织中 PDE4D 蛋白的表达水平, 超声影像学 and HE 染色观察小鼠主要器官形态、功能与组织学特征, 从而验证 PDE4D^{-/-} 小鼠构建的结果, 为以 PDE4D 为靶点的疾病和药物研究提供基因工程动物模型。

1 材料与方法

1.1 实验动物 小鼠在 SPF 级实验室饲养及繁殖。实验室光照和黑暗时间各 12 h 交替, 小鼠饲料、垫料以及饮用水均经过高温高压消毒灭菌处理。本研究经安徽医科大学临床药理研究所动物实验伦理审查委员会批准, 伦理审查批准号为 LLSC 20190307。

1.2 主要试剂及仪器 PGK1.1 线性载体由江苏集萃药康生物科技有限公司提供; 核酸染料购自中国 Meilunbio 公司; 琼脂糖凝胶购自中国 Biosharp 公司; Genotyping Mix 购自中国 Vazyme 公司; 抗 GAPDH 抗体购自美国 Proteintech 公司; 抗 PDE4D 抗体购自美国 Proteintech 公司; 辣根酶标记的山羊抗鼠 IgG 购自美国 Jackson 公司。Tanon-1600 全自动数码凝胶图像分析系统购自上海天能公司, Visual Sonics Vevo 2100 系统购自加拿大 FUJI FILM 公司, Panoramic MIDI 高分辨玻片扫描系统购自匈牙利 3D HISTECH 公司, Tanon-5200 成像系统购自上海天能公司。

1.3 方法

1.3.1 先导 RNA 载体构建 PDE4D 基因共有 20 个转录本, 由至少 18 个外显子组成, 分布在 150 kb 的基因组 DNA 上。根据 PDE4D 基因的结构特点, 选择 PDE4D 的外显子 4、外显子 5 (ENSMUST00000122041.7) 为敲除区域, 该区域包含 229bp 的编码序列, 敲除该区域将导致 PDE4D 蛋白质缺失(图 1)。利用 CRISPR Design 软件设计筛选得到先导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 分别为 5S1-(GTGAGCCGACTGTAAAGTGC)、5S2-(AAGGTACAACCTTGACCATC)、3S1-(AATGGGACCTGATACCTT)、3S2-(AGATCTACCCAAGGTATTCA), 各自识别前间区序列邻近基序 CGG、CGG、GGG、AGG。构建 sgRNA 表达载体, 将载体线性化和纯化后作为模板用于体外转录。

1.3.2 PDE4D^{-/-} 小鼠获得 将 Cas9 mRNA 和转录后的 sgRNA 显微注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵

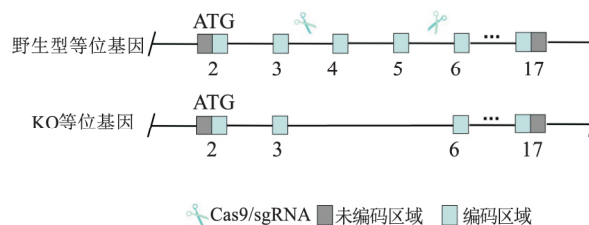


图 1 利用 CRISPR/Cas9 系统构建 PDE4D 基因敲除策略

原核中, 然后移植入 C57BL/6J 假孕雌性小鼠子宫中, 繁育后获得阳性 F0 (PDE4D^{+/-}) 小鼠, 阳性 F0 代小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配产生具有杂合基因型 (PDE4D^{+/-}) 的稳定 F1 后代模型。PDE4D^{+/-} 小鼠之间进一步杂交产生 F2 代纯合子小鼠 (PDE4D^{-/-}), 通过 PCR 和基因测序确认小鼠基因序列。

1.3.3 基因型鉴定

1.3.3.1 鼠尾 DNA 的提取 子代小鼠在 14 日龄时剪尾, 剪取组织长度约 0.2 cm。在 EP 管中加入鼠尾裂解液 (50 ml 裂解液中含 25 ml Tris HCl, 0.2923 g NaCl, 10 ml EDTA pH = 8, 0.5 g SDS, 37.5 ml ddH₂O) 和蛋白酶 K (10 mg/ml), 涡旋后置入 60 °C 水浴锅过夜。次日煮沸 10 min 终止裂解。高速离心 10 min 去除组织或毛发残留, 吸取上清液, 加入等体积预冷的异丙醇, 上下轻柔颠倒。室温静置 10 min, 离心去上清液, 加入预冷的 70% 乙醇溶液, 离心去上清液。室温 30 min, 待乙醇挥发, 加入 20 μl DEPC 水, 溶解作为 DNA 样本保存在 4 °C。

1.3.3.2 PCR 扩增反应 引物设计策略为 F1、R1 针对 KO 小鼠设计, F2、R2 针对野生型小鼠设计(图 2)。引物由上海生工公司合成。引物序列为 F1 (GCATGAAGGATACTTCCCAAGACTG)、R1 (GACTGGGGTGCCTCTGAGCTTTTA)、F2 (GAACAGACATAGAGCACCTTCCACA)、R2 (CCTTGAGCCTGTTAGT-GCTGGGAT)。PCR 反应体系总体积共 25 μl, 包含 2 × Taq Master Mix 12.5 μl, ddH₂O 9.5 μl, 正向引物 1 μl, 反向引物 1 μl, DNA 样本 1 μl。PCR 反应程序依次为 95 °C 5 min, (98 °C 30 s, 65 °C 30 s, 72 °C

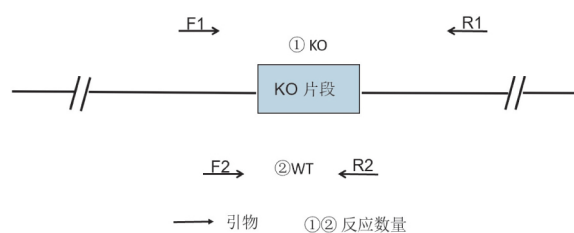


图 2 引物设计策略

45 s) 共 20 个循环 (98 °C 30 s ,55 °C 30 s ,72 °C 45 s) 经过 20 个循环 ,72 °C 5 min ,4 °C 保存。

1.3.3.3 凝胶电泳 配制 1% 琼脂糖凝胶电泳 ,琼脂糖 0.3 g 加入 1 × TAE buffer 30 ml 中。加入 3 μl 的核酸染料 取上述 PCR 扩增产物 10 μl 电泳 ,电压 120 V ,电泳 30 min ,在全自动数码凝胶图像分析系统中观察分析条带。

1.3.4 超声影像学检查 为评价 PDE4D 小鼠心脏结构和功能 ,用 Visual Sonics Vevo 2100 系统和 MS 550 探头监测经胸超声心动图。褪去小鼠胸腹部毛发 异氟烷诱导麻醉。当小鼠被麻醉后 ,置于加热垫上 ,心率保持在每分钟 400 ~ 500 次。在 B-mode 下扫描短轴切面获得乳头肌切面 ,用 M-mode 分析心脏收缩功能 ,得到 3 个心脏周期的左心室射血分数 (ejection fraction ,EF) 和左心室缩短分数 (fractional shortening ,FS) 。使用脉冲波多普勒评估心脏舒张功能。从脉冲波多普勒频谱波形中 ,测量二尖瓣 E/A 比值 (mitral valve E to A ratio ,MV E/A) 、左心室等容舒张时间 (left ventricular isovolumic relaxation time ,IVRT) 。转换探头角度获取肝脏和肾脏的超声图像 ,观察其所在位置、大小、形态及内部回声情况。

1.3.5 小鼠体质量和重要器官的 HE 染色 将野生型小鼠、PDE4D^{+/-} 和 PDE4D^{-/-} 称重后 ,麻醉小鼠处死取其心脏、肝、肾组织 ,用 4% 多聚甲醛固定 ,包埋在石蜡中切成 4 μm 的切片进行苏木精 - 伊红 (HE) 染色。使用高分辨玻片扫描系统收集 HE 染色的图像。

1.3.6 主要器官 PDE4D 蛋白水平检测 麻醉小鼠后处死取其心脏、肝、肾提取组织蛋白。使用含有 10 mmol/LPMSF 和 10 mmol/L 磷酸酶抑制剂的裂解缓冲液中提取蛋白质。制备 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 ,电泳 ,将目的蛋白转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂牛奶 37 °C 封闭 2 h ,在 PDE4D 一抗中 4 °C 过夜。用相应的二抗在 37 °C 下孵育 2 h。最后在成像系统上应用 ECL 底物对膜进行成像 ,ImageJ 软件对条带进行半定量分析。

1.4 统计学处理 所有数据采用 graphpad prism 8.0.2 进行统计分析 ,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采取单因素方差分析。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 获得 PDE4D 杂合敲除 F1 代小鼠 将 sgRNA

显微注射到 C57BL/6J 小鼠的受精卵中 ,获得阳性 F0 代小鼠 ,通过基因测序对其进行基因型鉴定 ,测序结果比对野生型小鼠基因序列 (图 3A) ,可以确定在小鼠的基因组序列中 ,PDE4D 基因缺失。为了构建稳定遗传的 PDE4D^{-/-} 小鼠 ,F0 代 PDE4D^{+/-} 小鼠与 C57BL/6J 小鼠交配得到 F1 代小鼠 ,编号为 39、41、43、45。F1 代子鼠 DNA 经过 PCR 扩增后 ,凝胶电泳结果显示在 383 bp 处和 385 bp 处均有阳性条带 (图 3B) ,表明成功繁育出 PDE4D^{+/-} 小鼠。

```
A aagtgttttc aattaactgt cagtctcgac cataaggaac aaacaggcca 109875968
gtgtcattgg gagcatgaag gatacttccc aagactgaga tttcttgcac 109876018
AACTTCTAGA TAGAAGCTAA GTTCTGAAGA ATGAATGTCG GTTTTCTTAG 109876068
CAAAGGAGAG ATAGATAATC AAGAGAACAA CTCAGGAAGC AAGTAGCCAG 109876118
AGAGGATTGG TAGTICAATG TGAGCCGACT gtaaagtgcc ggatgttcca 109876168
agtgtacct tgggacaaga aggtgttttc ttgcaattga gaaatgatca 109876218
agacctacag tctagctaag acgtttttat ttatttctga agcaaagatg 109876268
aagggtttct actgatggat gtgtagtcag tattatttgc attctaagat 109876318
ctttagatat ttgtgctcga taaagactgg aaaatggatt caaгааacta 109876368
ctgtaaagge cattatgtgt tcacagcaaa agatggagaa agaagtgatg 109876418
caatacgaat actctcaaaa ccaaaaagag cccattttca actagatcat 109876468
```

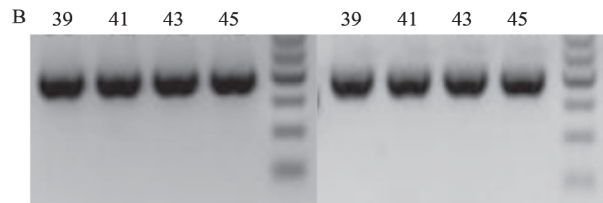


图 3 F0 代和 F1 代小鼠基因鉴定

A: F0 代 PDE4D^{+/-} 小鼠碱基序列; B: F1 代 PDE4D^{+/-} 小鼠 DNA 凝胶电泳图; 39、41、43、45: F1 代小鼠编号

2.2 获得 PDE4D 基因纯合敲除小鼠 为获得 PDE4D^{-/-} 小鼠 ,F1 代 PDE4D 杂合子小鼠交配繁育得到 F2 代小鼠 ,通过 PCR 扩增对其进行基因型鉴定 (图 4) 。编号 13、21、33 为纯合子小鼠。凝胶电泳结果显示编号 13、21、33 号在 383 bp 处有阳性条带 ,而 385 bp 处没有阳性条带 ,提示成功建立

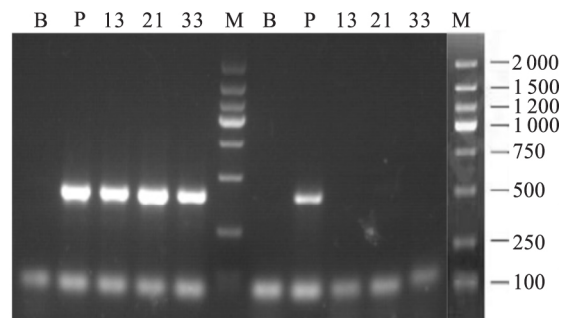


图 4 F2 代小鼠基因鉴定

B: 空白对照; P: 阳性对照; 13、21、33: PDE4D 纯合子小鼠; M: DNA Marker

PDE4D^{-/-}小鼠,且具有稳定遗传性。

2.3 验证 PDE4D 敲除对小鼠体内主要脏器的影响 与 PDE4D^{+/+}小鼠相比, PDE4D^{-/-}小鼠外观及生理表现未见明显异常。称重后发现同窝小鼠 PDE4D 敲除小鼠体质量相比于 PDE4D^{+/+}小鼠减轻 ($P < 0.01$) (图 5A)。获取小鼠心脏、肝、肾等体内重要脏器的超声图像和超声指标。超声心动图结果显示 PDE4D 敲除小鼠心脏形态无明显改变。红圈和蓝圈区分肾脏和肝脏超声图像。肝脏大小正常,包膜光滑,肝脏下缘角锐利。肾形态大小均一,肾实质回声均匀(图 5B)。心脏收缩功能参数 EF 和 FS

与 PDE4D^{+/+}小鼠相比没有明显改变,心脏舒张功能参数 E/A、IVRT 指标也无明显变化(图 5C)。小鼠麻醉后,取出其心脏、肝肾组织包埋后染色,HE 结果显示 PDE4D^{-/-}小鼠的心脏乳头肌部位心肌细胞排列整齐,心肌细胞大小无明显差异。肝细胞形态完整,胞核无明显改变,肝小叶形态完整。肾脏组织结构正常,肾小球无萎缩,肾小管排列紧密(图 5D)。以上结果可提示 PDE4D 敲除对小鼠生长有抑制作用,但对体内重要器官心、肝、肾等无明显影响。

2.4 PDE4D 敲除小鼠体内 PDE4D 表达情况 为

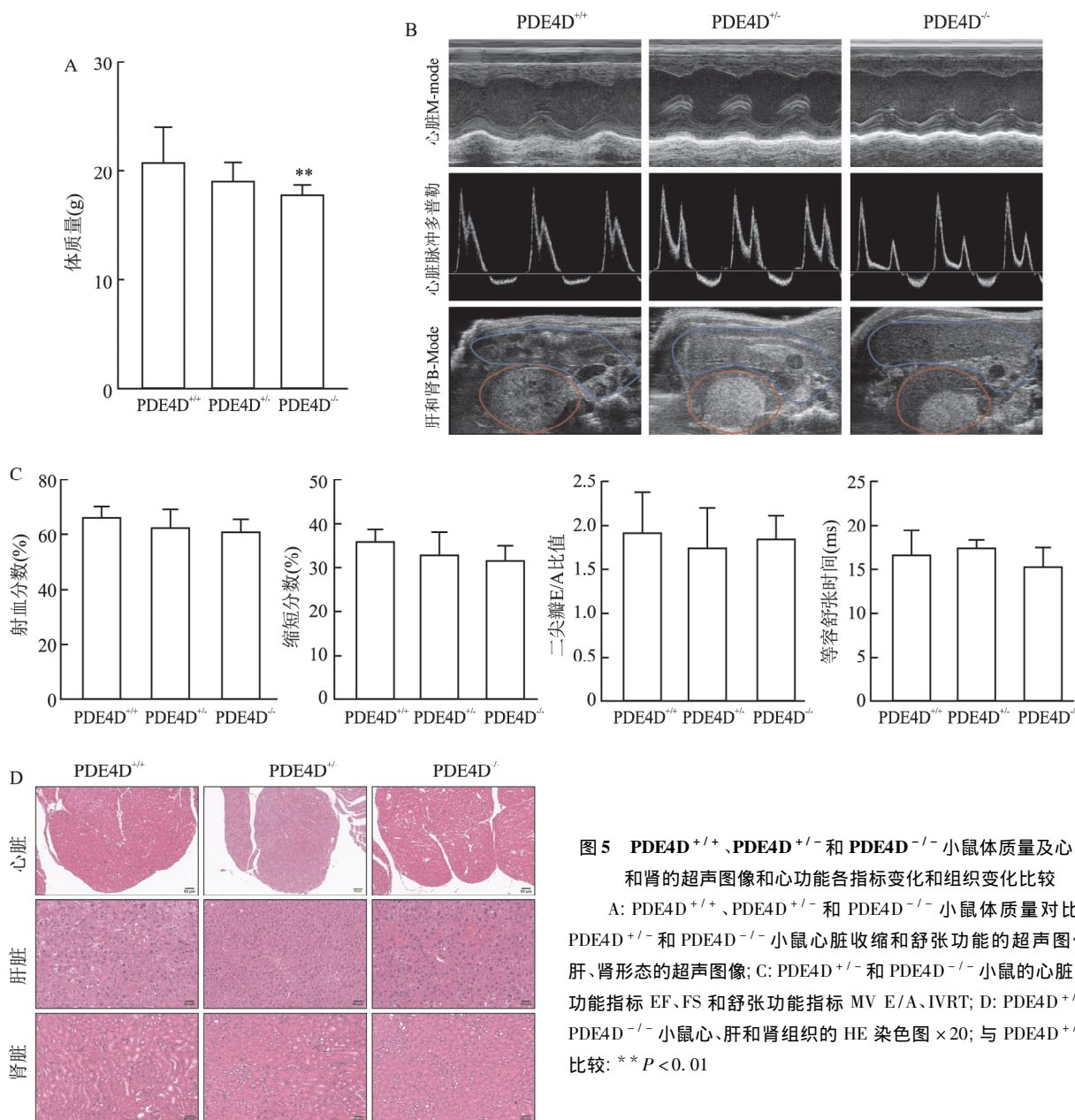


图 5 PDE4D^{+/+}、PDE4D^{+/-}和 PDE4D^{-/-}小鼠体质量及心、肝和肾的超声图像和心功能各指标变化和组织的组织变化比较

A: PDE4D^{+/+}、PDE4D^{+/-}和 PDE4D^{-/-}小鼠体质量对比; B: PDE4D^{+/-}和 PDE4D^{-/-}小鼠心脏收缩和舒张功能的超声图像及肝、肾形态的超声图像; C: PDE4D^{+/-}和 PDE4D^{-/-}小鼠的心脏收缩功能指标 EF、FS 和舒张功能指标 MV E/A、IVRT; D: PDE4D^{+/-}和 PDE4D^{-/-}小鼠心、肝和肾组织的 HE 染色图 ×20; 与 PDE4D^{+/+}组比较: ** $P < 0.01$

验证 PDE4D 小鼠的敲除情况,用 PDE4D 小鼠心脏、肝、肾提取组织蛋白。结果显示,在心脏、肝脏、肾脏组织中,PDE4D^{+/-}小鼠 PDE4D 蛋白表达与 PDE4D^{+/+}小鼠相比明显降低($P < 0.05$),PDE4D^{-/-}小鼠 PDE4D 蛋白几乎无表达($P < 0.001$) (图 6),以上结果验证了 PDE4D 基因在小鼠体内成功敲除,且敲除效果较好。

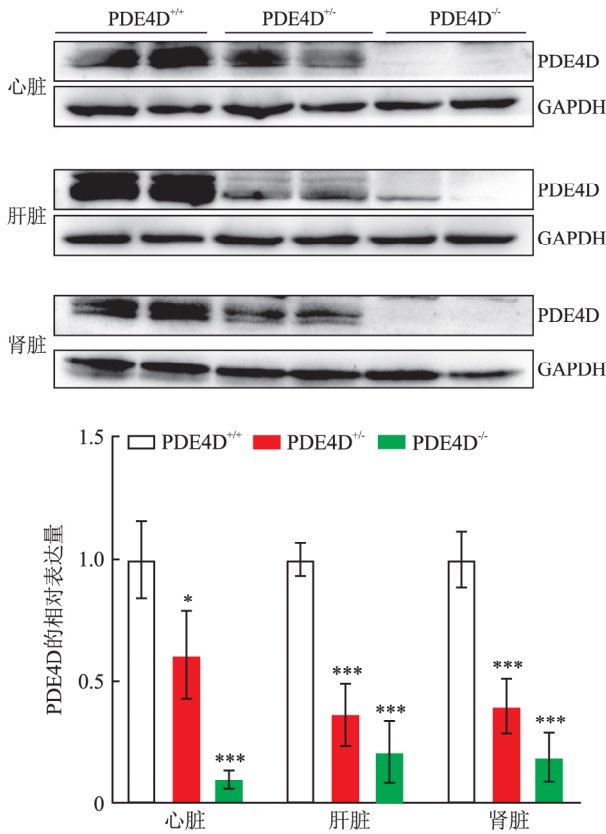


图 6 PDE4D^{+/+}、PDE4D^{+/-}和 PDE4D^{-/-}小鼠主要组织中 PDE4D 的表达情况
与 PDE4D^{+/+}组比较: * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$

3 讨论

通过 PCR 扩增后凝胶电泳和基因测序技术以及 Western blot 实验验证 PDE4D^{-/-}小鼠 PDE4D 蛋白的表达情况,可以确定已经繁育出稳定遗传的 PDE4D 纯合子敲除小鼠。PDE4D^{-/-}小鼠体质量比同年龄野生型小鼠低,有研究报道称 PDE4D 敲除小鼠生长延迟、排卵障碍、出生后生存能力降低^[4]。PDE4D 纯合雌性小鼠表现出生育能力下降,研究者认为是排卵障碍和颗粒细胞对促性腺激素的敏感性降低所致。本研究显示雌性 PDE4D^{-/-}小鼠生育率低于野生型小鼠,雌性 PDE4D^{-/-}小鼠每笼生育 4 ~

6 只,野生型小鼠每笼生育 6 ~ 8 只。为确定敲除 PDE4D 后是否对体内脏器有影响,本研究采用超声影像学技术检测重要脏器心脏的功能、肝和肾的形态以及 HE 染色观察心、肝、肾的病理变化,结果显示 PDE4D 敲除小鼠体内主要器官无明显的病变,可以确保下一步动物实验的顺利开展。

PDE4D 属于磷酸二酯酶家族,在心血管疾病、自身免疫性疾病、神经系统疾病、肿瘤等的发生发展中起到重要作用。PDE4D 的表达是由胰岛素受体、胰岛素受体底物和 G 蛋白偶联受体激酶 2 (G protein-coupled receptor kinase 2, GRK2) 和 β -arrestin2 依赖的 β_2 肾上腺素受体 (β_2 adrenergic receptor, β_2AR) - 细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK) 信号级联反式激活介导。高脂饮食饲养使小鼠心脏中 PDE4D 的表达增加,导致心脏收缩和舒张功能障碍^[5]。糖尿病大鼠心脏中同样观察到 cAMP 水平增加,PDE4D 表达特异性上调^[6]。PDE4D 通过激活肝脏中的 CD36-转化生长因子- β_1 (transforming growth factor, TGF- β_1) 信号传导,在非酒精性脂肪肝和相关高血压的发病机制中起重要作用^[7]。这些研究共同证实 PDE4D 是人体系统功能不可缺少的调节因子,正在逐渐成为临床上疾病诊断治疗靶点。因此,哺乳动物 PDE4D 敲除小鼠为特定疾病的病理生理机制的研究提供了非常有价值的动物模型。

虽然可以使用 PDE4D 抑制剂整体降低 PDE4D 的表达或活性用以探索其功能,但均存在局限性。常见的 PDE4D 抑制剂有多肽片段、重组腺相关病毒包裹的 PDE4D 短发夹 RNA (short hairpin RNA, shRNA) 和小分子化合物等。抑制性多肽的半衰期通常较短,给药途径受限;重组腺相关病毒的组织特异性较差,干扰效率差异较大。已知小分子化合物 BPN14770 和 CP-671305 可选择性抑制 PDE4D 的活性,BPN14770 对 PDE4D3 的半抑制浓度 (half maximal inhibitory concentration, IC₅₀) 为 7.4 nmol/L,对 PDE4D7 的抑制 IC₅₀ 为 7.8 nmol/L,而对其他 PDE4D 亚型的抑制率有待确定,CP-671305 抑制 PDE4D 的 IC₅₀ 为 3 nmol/L,但在较大浓度时,其也可以抑制 PDE4 的其他同工酶^[8]。采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 PDE4D 基因敲除小鼠,具有成本较低、周期短和效率高等优点,可明确减少 PDE4D 的表达,为研究提供可靠的动物模型^[9]。

综上所述,本研究成功建立了可稳定遗传的 PDE4D 纯合敲除小鼠,敲除 PDE4D 未发现对体内

主要脏器产生明显的影响,可用于 PDE4D 为靶点的疾病模型探索和新药研发。

参考文献

- [1] Conti M, Beavo J. Biochemistry and physiology of cyclic nucleotide phosphodiesterases: essential components in cyclic nucleotide signaling [J]. *Annu Rev Biochem*, 2007, 76: 481–511.
- [2] Ricciarelli R, Fedele E. Phosphodiesterase 4D: an enzyme to remember [J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(20): 4785–9.
- [3] Jorgensen C, Yasmeen S, Iversen H K, et al. Phosphodiesterase 4D (PDE4D)—A risk factor for atrial fibrillation and stroke? [J]. *J Neurol Sci*, 2015, 359(1–2): 266–74.
- [4] Jin S L, Richard F J, Kuo W P, et al. Impaired growth and fertility of cAMP-specific phosphodiesterase PDE4D-deficient mice [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(21): 11998–2003.
- [5] Wang Q, Liu Y, Fu Q, et al. Inhibiting insulin-mediated beta2-adrenergic receptor activation prevents diabetes-associated cardiac dysfunction [J]. *Circulation*, 2017, 135(1): 73–88.
- [6] Hanna R, Nour-Eldine W, Saliba Y, et al. Cardiac phosphodiesterases are differentially increased in diabetic cardiomyopathy [J]. *Life Sci*, 2021, 283: 119857.
- [7] Tao X, He H, Peng J, et al. Overexpression of PDE4D in mouse liver is sufficient to trigger NAFLD and hypertension in a CD36-TGF-beta1 pathway: therapeutic role of roflumilast [J]. *Pharmacol Res*, 2022, 175: 106004.
- [8] Berry-Kravis E M, Harnett M D, Reines S A, et al. Inhibition of phosphodiesterase-4D in adults with fragile X syndrome: a randomized, placebo-controlled, phase 2 clinical trial [J]. *Nat Med*, 2021, 27(5): 862–70.
- [9] 陶娟,周伟杰,郇宇,等. G 蛋白偶联受体激酶 2 杂合子敲除小鼠构建及表型鉴定 [J]. *安徽医科大学学报* 2020, 55(7): 1035–41.

Construction of phosphodiesterase 4D homozygous knockout mice

Zhu Zhenduo, Su Tiantian, Cheng Huijuan, Jiang Chunru, Fang Ruhong,

Guan Qiuyun, He Feng, Ge Mingli, Wei Wei, Wang Qingtong

(*Institute of Clinical Pharmacology, Anhui Medical University, Key Laboratory of Anti-inflammatory and Immune Medicine, Ministry of Education, Rheumatoid Arthritis Research Center, Anhui Medical University, Hefei 230032*)

Abstract Objective The CRISPR/Cas9 technology was applied to construct PDE4D homozygous knockout mice to provide a basis for in-depth investigation of PDE4D gene function and mechanism of action. **Methods** A vector was constructed for PDE4D gene exon 4, 5 microinjected into fertilized eggs of C57BL/6J mice, and PDE4D^{-/-} mice were obtained after maternal breeding and offspring mating, and the mice genotypes were determined by PCR product sequencing and genotype identification techniques. Changes in morphology and function of the major organs of the mice were detected using an ultrasound imaging system and H&E staining, and the expression of PDE4D protein in the mice was verified by Western blot assay. **Results** The PDE4D^{-/-} mouse genotype was stably inherited, the mice were small, and there were no obvious morphological and histological changes in the major organs *in vivo*. The PDE4D expression was reduced or largely absent in the major tissues of PDE4D heterozygous or pure knockout mice, and the knockout effect was better. **Conclusion** PDE4D^{-/-} mice were successfully established using CRISPR/Cas9 technology, and no significant physiological abnormalities were found, which could be used for disease pathogenesis and drug research using PDE4D as the target.

Key words phosphodiesterase 4D; CRISPR/Cas9; gene knockout; genotyping