

诱导型巨噬细胞特异性敲除 *GRK2* 基因小鼠模型的构建及应用

魏琦, 朱学敏, 刘潇一, 杨雪枝, 魏伟

摘要 目的 建立诱导型巨噬细胞特异性敲除 G 蛋白偶联受体激酶 2 (*GRK2*) 基因 ($GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT^+$) 小鼠模型。方法 基于 Cre/LoxP 系统构建 $GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT^+$ 小鼠。通过 PCR 扩增程序及琼脂糖凝胶电泳鉴定 $GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT^+$ 小鼠的基因型。二氧化碳法处死小鼠后, Western blot 检测骨髓源巨噬细胞 (BMDMs) 和腹腔巨噬细胞 (PMs) 中 *GRK2* 表达。免疫荧光检测小鼠脑、心脏和脾脏巨噬细胞中 *GRK2* 表达。流式细胞术分析前列腺素 E2 (PGE2) 诱导的 PMs 中 M1/M2 比例。结果 基因型鉴定结果表明, *flox* 扩增产物长度在 355 bp 处有一条条带且 Cre 扩增产物长度在 355 bp 处有一条条带的小鼠即为 $GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT^+$ 小鼠。Western blot 结果显示, 与 $GRK2^{flox/flox}$ 小鼠相比, $GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT^+$ 小鼠 BMDMs 和 PMs 中 *GRK2* 表达降低 ($P < 0.01$)。免疫荧光结果显示, 与 $GRK2^{flox/flox}$ 小鼠相比, $GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT^+$ 小鼠脑、心脏和脾脏中 *GRK2* 表达降低 ($P < 0.01$)。流式细胞术结果显示, 与 $GRK2^{flox/flox}$ 小鼠相比, $GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT^+$ 小鼠 PMs 中 CD86/CD206 比例变化差异无统计学意义。在 PGE2 (10 μ mol/L) 刺激下, $GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT^+$ 小鼠 PMs 中 CD86/CD206 比例升高 ($P < 0.01$), 且 $GRK2^{flox/flox}$ 小鼠 PMs 中 CD86/CD206 比例高于 $GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT^+$ 小鼠 ($P < 0.01$)。结论 该研究成功构建出 $GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT^+$ 小鼠模型, 且该小鼠可促进 PGE2 诱导的 PMs 向 M2 型巨噬细胞极化。

关键词 G 蛋白偶联受体激酶 2; Cre/LoxP 系统; 特异性敲除小鼠; 巨噬细胞; 基因型鉴定

中图分类号 R-332

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0534-07
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.003

G 蛋白偶联受体激酶 2 (G protein-coupled re-

2023-03-01 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 81973332、82003763)

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, 安徽省抗炎免疫药物协同创新中心, 合肥 230032

作者简介: 魏琦, 女, 硕士研究生;

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

杨雪枝, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yangxue-zhi@ahmu.edu.cn

ceptor kinase 2, *GRK2*) 属于 G 蛋白偶联受体激酶 (GRKs) 家族, 也是丝/苏氨酸家族的 7 个成员 (GRK1-7) 之一。*GRK2* 由 689 个氨基酸残基组成, 包含 N 端结构域、激酶结构域和 C 端结构域^[1]。*GRK2* 主要分布在胞质中, 通过磷酸化 G 蛋白偶联受体 (G protein-coupled receptors, GPCRs) 介导 GPCRs 的脱敏和复敏^[2]。除了这一经典作用外, 随着更多的 *GRK2* 激酶底物和相互作用蛋白被发现, *GRK2* 还可通过调节 (抑制或活化) 多种其他分子参与机体多种生理过程的调节。大量研究^[3-9] 表明 *GRK2* 在心力衰竭、癌症、抑郁症、神经退行性疾病、类风湿关节炎等疾病的发生发展中发挥重要作用。为了深入研究 *GRK2* 在各种疾病中的变化、作用及机制, 本研究利用 Cre/LoxP 系统构建诱导型巨噬细胞特异性敲除 *GRK2* 基因 ($GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT^+$) 小鼠, 进一步通过他莫昔芬腹腔注射小鼠诱导 Cre 酶入核。此研究对该小鼠进行 *GRK2* 蛋白水平的验证, 并利用流式细胞术初步分析 $GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT^+$ 小鼠对巨噬细胞极化的影响, 将为研究 *GRK2* 调控各类疾病中巨噬细胞的作用及机制提供良好的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 $GRK2^{flox/+}$ 和 $Lyz2-CreERT$ 杂合子 ($Lyz2-CreERT^+$) 小鼠均以 C57BL/6J 品系小鼠为遗传背景, 饲养于 SPF 级动物房, 由江苏集萃药康生物科技有限公司提供, 生产许可证号: SCXK(苏)2018-0008。实验室温度控制在 25 $^{\circ}$ C 左右, 湿度控制在 70% 左右。动物笼盒、垫料、饲料、饮用水均经过高温高压消毒灭菌处理。小鼠自由饮食和饮水。垫料和小鼠笼每周更换 2 次。本实验得到安徽医科大学临床药理研究所动物实验伦理委员会批准 (编号: PZ-2021-012)。

1.1.2 主要试剂 琼脂糖凝胶购于德国 Biofrox 公司; 核酸染料购于美国 ApexBio 公司; 2 \times Rapid Taq Master Mix 购于江苏南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 蛋白酶 K 购于美国 VETEC 公司; Marker

I DNA Ladder 购于北京索莱宝科技有限公司; 抗 GRK2 抗体、抗 GAPDH 抗体、辣根过氧化物酶山羊抗兔/鼠二抗购于美国 Proreintech 公司; Alexa Fluor 594 山羊抗兔荧光二抗、Alexa Fluor 488 山羊抗鼠荧光二抗购于美国 Jackson 公司; ECL 化学发光液购于上海天能科技有限公司; 胎牛血清购自加拿大 Wisent 公司; CD86-APC 和 CD206-Bv421 小鼠流式抗体购自美国 Biologend 公司; 他莫昔芬购于美国 MedChemexpress 公司。

1.1.3 主要仪器 化学发光凝胶成像分析系统(型号: Tanon-1600) 购于上海天能科技有限公司测定小鼠基因型; 通用型电泳仪(型号: DYY-7C) 购于北京六一生物科技有限公司; 玻片扫描仪(型号: Panoramic MIDI) 购于山东济南丹吉尔电子有限公司; 流式细胞仪(型号: Cytomics FC500) 购于美国 Beckman Coulter 公司。

1.2 方法

1.2.1 巨噬细胞特异性敲除 GRK2 小鼠的构建

将引进的 GRK2^{flox/+} 雌性小鼠和 GRK2^{flox/+} 雄性小鼠进行交配繁殖, 子代有 1/4 概率的 GRK2^{flox/flox} 小鼠。此后将雌性小鼠和雄性小鼠基因型均为 GRK2^{flox/flox} 的小鼠进行交配繁殖。将 Lyz2-CreERT⁺ 小鼠与野生型 C57BL/6J 小鼠进行交配繁殖。将 GRK2^{flox/flox} 小鼠与 Lyz2-CreERT⁺ 小鼠杂交, 根据孟德尔遗传定律, 子代得到 GRK2^{flox/+} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠与 GRK2^{flox/+} Lyz2-CreERT⁻ 小鼠的概率各为 1/2。随后将 GRK2^{flox/+} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠与 GRK2^{flox/flox} 小鼠继续繁殖, 子代得到 GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠即为巨噬细胞特异性敲除 GRK2 小鼠(图 1)。GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁻ 小鼠作为对照组 (GRK2^{flox/flox}) 小鼠。

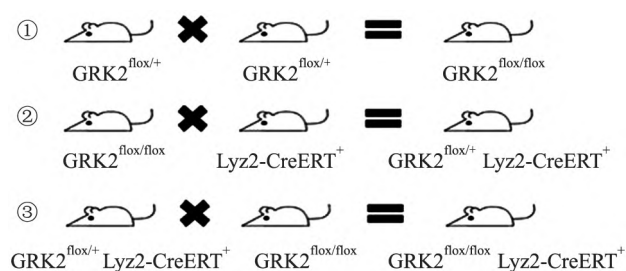


图 1 GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠扩繁策略

1.2.2 小鼠基因型鉴定

1.2.2.1 鼠尾 DNA 提取 待小鼠 3 周龄左右时, 剪 0.3 cm 左右小鼠尾巴于 1.5 ml EP 管中, 加入

300 μ l 鼠尾裂解液和 20 μ l 蛋白酶 K, 55 $^{\circ}$ C 水浴锅消化 12 h, 短暂离心, 取上清液至另一 1.5 ml EP 管中, 加入等体积预冷的异丙醇, 上下轻柔颠倒 10 次, 看到白色絮状 DNA 后, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。加入 400 μ l 预冷的 70% 的乙醇, 上下轻柔颠倒 10 次, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。12 000 r/min 离心 30 s, 吸取残留乙醇, 离心管开盖, 室温静置 2 h 待乙醇挥发。加 30 μ l 的 DEPC 水震荡溶解 DNA, 混匀 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

1.2.2.2 PCR 扩增反应 flox 引物: 正向引物为 5'-CAGGTCTGACTATCTGGCTTTG-3'; flox 引物: 反向引物为 5'-CCTAGTCAGGTTTCTCTGCTAATGC-3'。Cre 引物: 正向引物为 5'-GCTGAAGTCCATAGATCG-GTAGG-3'; Cre 引物: 反向引物为 5'-TTCTGCGG-GAAACCATTTC -3'。PCR 体系的构成: 12.5 μ l 2 \times Taq Mix、9.5 μ l 去离子水、正反向引物 (10 μ mol/L) 各 1 μ l 和 DNA 模板 (100 ng/ μ l) 1 μ l, 总体积 25 μ l。

1.2.2.3 PCR 扩增程序 Loxp PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C、5 min; 98 $^{\circ}$ C、30 s、65 $^{\circ}$ C、30 s、72 $^{\circ}$ C、45 s、20 个循环; 98 $^{\circ}$ C、30 s、55 $^{\circ}$ C、30 s、20 个循环; 72 $^{\circ}$ C、45 s、72 $^{\circ}$ C、45 min。Lyz2-CreERT PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C、5 min; 95 $^{\circ}$ C、30 s、55 $^{\circ}$ C、30 s、72 $^{\circ}$ C、30 s、35 个循环; 72 $^{\circ}$ C、5 min。

1.2.2.4 琼脂糖凝胶电泳 量取 30 ml 的 1 \times TAE buffer, 加入 0.6 g 琼脂糖及 3 μ l 核酸染料, DNA 上样量为 10 μ l, 电压 140 V, 电流 400 mA, 电泳时间 25 min。置于 Tanon-1600 化学发光凝胶成像分析系统中拍照观察。

1.2.3 他莫昔芬诱导 GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠模型建立 饲养 GRK2^{flox/flox} 小鼠和 GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠于 7 周左右给予他莫昔芬 (20 mg/kg), 连续腹腔注射 5 d, 每天 1 次, 且每天固定在同一时间点注射。待小鼠适应 1 周或 2 周后, 二氧化碳过量麻醉处死对照组小鼠和实验组小鼠。提取小鼠腹腔巨噬细胞、骨髓源巨噬细胞及小鼠脑、心脏和脾脏用于 Western blot、免疫荧光检测。

1.2.4 小鼠骨髓源巨噬细胞 (bone marrow-derived macrophages, BMDMs) 提取 二氧化碳过量麻醉处死小鼠后, 将 GRK2^{flox/flox} 小鼠和 GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠后肢的皮毛和足部剥离, 剪下后腿, 剔除肌肉, 先放入盛有 75% 乙醇的容器中浸泡, 再放入盛有无菌冷 PBS 的容器中浸泡。在两根腿骨连接处剪断腿骨, 骨头两端剪开, 用骨髓源冲洗液将骨髓

从股骨和胫骨吹出,反复吹洗至腿骨内看不到明显的红色为止。用纱网将骨髓细胞过筛,1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,加入红细胞裂解液重悬,避光静置 5 min,1 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,细胞沉淀即为小鼠骨髓细胞,用 20 ng/ml 的巨噬细胞集落刺激因子刺激小鼠骨髓细胞,于第 3 天半定量换液,第 5 天全定量换液,第 7 天即为成熟的 BM-DMs。

1.2.5 小鼠腹腔巨噬细胞(peritoneal macrophages, PMs) 提取 二氧化碳过量麻醉处死小鼠后,用镊子沿腹白线拎起小鼠腹部皮肤,将装有 5 ml 不含血清的达尔伯克改良伊格培培养基(DMEM)平刺入小鼠腹腔中,轻柔小鼠腹部 1 min 后静置 1 min,使 PMs 聚集,剪开小鼠腹部皮肤,镊子拎起皮肤,用 1 ml 注射器吸出小鼠腹腔中的液体,2 500 r/min 离心 10 min,弃去上清液,用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液重悬细胞沉淀至 6 孔板中培养,贴壁 6 h 后,弃去上清液,无菌 PBS 洗 3 次,贴壁的即为纯化后的 PMs。

1.2.6 Western blot 检测小鼠 PMs 和 BMDMs 中 GRK2 表达 向提取的小鼠 PMs 和 BMDMs 中加入适量的裂解液,裂解 30 min,12 000 r/min 离心 15 min,取上清液,即为总蛋白,用 BCA 试剂盒测定蛋白的浓度。将收集的蛋白与蛋白上样缓冲液按 4:1 混合,放置沸水中 8~10 min,-20 °C 储存备用。通过 SDS-PAGE 将蛋白分离,220 mA、90 min 电泳将蛋白转至 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭后一抗孵育过夜。TBST 清洗后,二抗 37 °C 孵育 2 h,用增强化学发光试剂盒孵育后于暗室显影。

1.2.7 免疫荧光检测小鼠脑、心脏和脾脏 GRK2 表达 二氧化碳过量麻醉处死小鼠后,取小鼠脑、心脏和脾脏组织固定于 4% 多聚甲醛中,制备冰冻切片,用含 0.5% Triton-X100 的 PBS 通透 30 min,抗原修复后用 5% BSA 室温封闭,PBS 洗后加入 GRK2 一抗 4 °C 孵育过夜,复温 30 min,PBS 洗后室温避光孵育荧光二抗 2 h,DAPI 染色液染色,PBS 洗后用抗荧光衰减封片剂封片,置于玻片扫描仪中检测。

1.2.8 流式细胞术检测小鼠 PMs 中 M1 型和 M2 型巨噬细胞比例 收集贴壁后的 PMs,每管中加入 50 μl 的流式细胞固定液,剧烈振荡后避光孵育 10 min,加入 PBS 2 500 r/min 离心 5 min,弃去上清液,再加入 50 μl 流式细胞破膜液,避光孵育 8 min,其余每管中加入 CD86 和 CD206 抗体,室温避光孵育 1 h,加入 PBS 2 500 r/min 离心 5 min,去上清液,加

入 250 μl PBS 重悬后上机检测其平均荧光强度。

1.3 统计学处理 所有实验数据采用 Graphpad prism 8.3.0 进行统计分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 GRK2^{flx/flx} 小鼠构建及鉴定 基于成簇的规则间隔短回文重复序列/CRISPR 相关蛋白 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein 9,CRISPR/Cas9) 基因编辑技术构建 GRK2^{flx/+} 小鼠,以 GRK2 (ENSMUST00000088737.10) 转录本外显子 2 作为敲除区域(图 2A)。GRK2^{flx/+} 雌性小鼠和 GRK2^{flx/+} 雄性小鼠进行交配繁殖得到 GRK2^{flx/flx} 小鼠。提取鼠尾 DNA,PCR 进行基因型鉴定(图 2B),基因型为 GRK2^{flx/+} 杂合子小鼠扩增得到 254 bp 和 355 bp 位置的条带,基因型为 GRK2^{+/+} 纯合子小鼠扩增得到 254 bp 位置的条带,基因型为 GRK2^{flx/flx} 纯合子小鼠扩增得到 355 bp 位置的条带。结果表明,GRK2^{flx/flx} 小鼠构建成功。

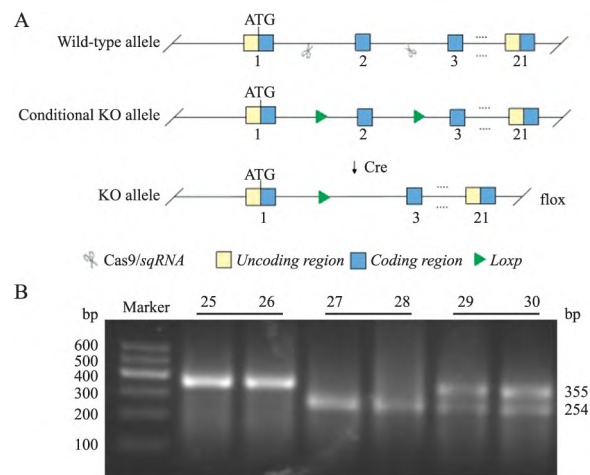


图 2 GRK2^{flx/flx} 小鼠敲除策略及基因型鉴定结果

A: 利用 CRISPR/Cas9 成簇规则间隔短回文重复序列/CRISPR 相关技术构建 GRK2^{flx/flx} 小鼠策略; B: GRK2^{flx/flx} 小鼠基因型鉴定结果; 25、26: 为 GRK2^{flx/flx} 小鼠; 27、28: 为 GRK2^{+/+} 小鼠; 29、30: 为 GRK2^{flx/+} 小鼠

2.2 GRK2^{flx/flx} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠构建及鉴定

PCR 基因型鉴定结果显示,GRK2^{flx/+} Lyz2-CreERT⁻ 小鼠在 flox 扩增产物中 254 bp 和 355 bp 处各有 1 条条带,在 Cre 扩增产物中无条带。GRK2^{flx/flx} Lyz2-CreERT⁻ 小鼠在 flox 扩增产物中 355 bp 处只

有 1 条条带,在 Cre 扩增产物中无条带。GRK2^{fllox/+} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠在 flox 扩增产物中 254 bp 和 355 bp 处各有 1 条条带,在 Cre 扩增产物 355 bp 处只有 1 条条带。GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠在 flox 扩增产物中 355 bp 处只有 1 条条带,在 Cre 扩增产物 355 bp 处只有 1 条条带。基因型 GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 的小鼠则为巨噬细胞特异性敲除 GRK2 小鼠,基因型 GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁻ 的小鼠则为对照组小鼠。见图 3。以上结果表明,GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠构建成功。

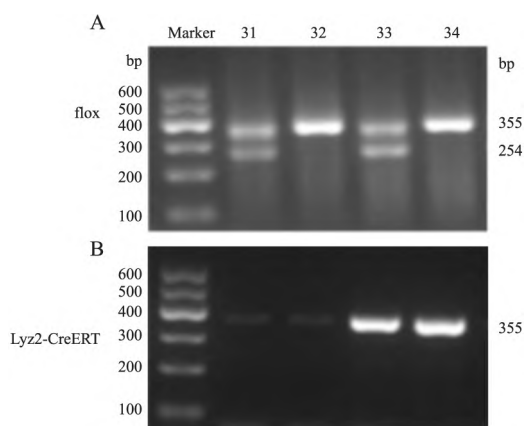


图 3 GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠基因型鉴定结果

A: GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠扩繁策略; B: GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠基因型鉴定结果; 31: GRK2^{fllox/+} Lyz2-CreERT⁻ 小鼠基因型鉴定结果; 32: GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁻ 小鼠基因型鉴定结果; 33: GRK2^{fllox/+} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠基因型鉴定结果; 34: GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠基因型鉴定结果

2.3 GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠的形态鉴定

小鼠基因组信息 (MGI) 数据库表明纯合子 GRK2 全身性敲除小鼠表现为胚胎致死。经观察与分析,与 GRK2^{fllox/fllox} 小鼠相比,GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠生长速度和繁殖能力无明显差异。仅在 GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 雄性小鼠腹腔注射他莫昔芬 (20 mg/kg) 诱导后,外观睾丸增大,且小鼠体质量先短暂下降,停止诱导后恢复正常。见图 4。

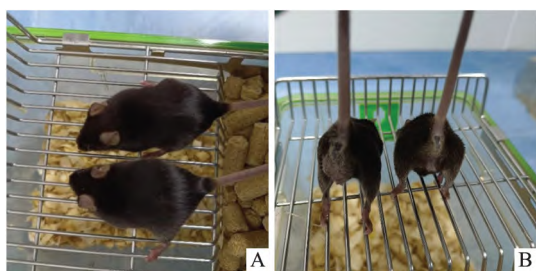


图 4 GRK2^{fllox/fllox} 小鼠和 GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠照片

A: 小鼠外观形态; B: 小鼠睾丸比较

2.4 免疫荧光验证 GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠脑、心脏和脾脏组织中 GRK2 表达情况 免疫荧光观察小鼠的脑、心脏和脾脏组织中巨噬细胞的标记分子 CD11b 及 GRK2 蛋白的表达,结果表明,与 GRK2^{fllox/fllox} 小鼠相比,GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠脑、心脏和脾脏组织中 GRK2 表达降低。见图 5。

2.5 GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠 BMDMs 和 PMs 中 GRK2 表达情况 Western blot 检测 GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠 PMs 和 BMDMs 中 GRK2 蛋白表达,与 GRK2^{fllox/fllox} 小鼠相比,GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠的 BMDMs 中 GRK2 蛋白表达降低 ($t = 7.427, P = 0.0018$) (图 6A、B), PMs 中 GRK2 蛋白表达降低 ($t = 4.645, P = 0.0097$) (图 6C、D)。

2.6 前列腺素 E2 (prostaglandin E2, PGE2) 对 GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠 PMs 极化的作用

用 PGE2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 刺激 GRK2^{fllox/fllox} 小鼠和 GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠 PMs。结果显示 (图 7A、B),与 GRK2^{fllox/fllox} 小鼠相比,GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠 PMs 中 CD86/CD206 比例变化差异无统计学意义。PGE2 (10 $\mu\text{mol/L}$) 刺激下,GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠 PMs 中 CD86/CD206 比例升高 ($P < 0.01$) 且 GRK2^{fllox/fllox} 小鼠 PMs 中 CD86/CD206 比例高于 GRK2^{fllox/fllox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠 ($P < 0.01$)。以上结果提示抑制 GRK2 可以促进巨噬细胞向 M2 型极化。

3 讨论

GRK2 作为调控信号网络的综合节点在机体中发挥重要的作用。生理状态下,GRK2 调控 GPCRs 脱敏复敏,并参与胞质中各类信号转导。关节炎动物模型中,GRK2 的过度“膜募集”会导致调控的 GPCRs 信号及 GRK2 相互作用的分子下游信号失衡^[10]。此外,不同疾病或是同一疾病的不同细胞中,GRK2 变化均不一样。因此,研究 GRK2 在不同疾病、不同细胞中的变化及作用机制对开发靶向 GRK2 的药物十分重要。目前,构建全身性基因敲除小鼠是应用较为广泛的一种机制研究策略。然而,GRK2 基因的纯合突变可能导致心脏衰竭的胚胎死亡。课题组前期构建了 GRK2 基因半敲除 (GRK2^{+/-}) 小鼠^[11],尽管该小鼠全身各组织各细胞的 GRK2 表达有一定程度的降低,但仍存在敲除效率低,个体化差异明显,无法特异性研究 GRK2 在各类细胞中作用等一系列问题。此外,GRK2^{+/-} 小鼠

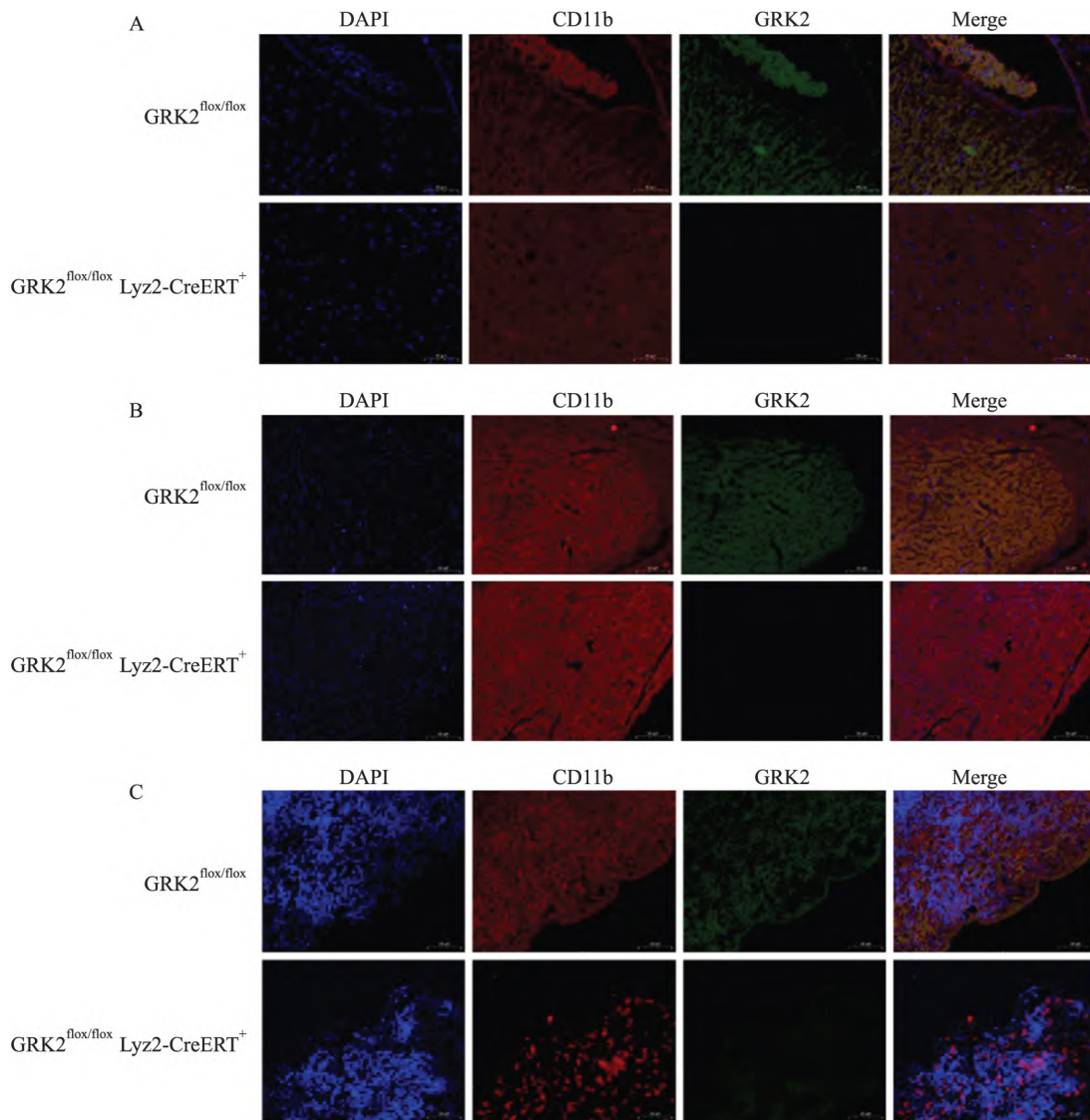


图5 GRK2^{flox/flox}Lyz2-CreERT⁺小鼠脑、心脏和脾脏内 GRK2 蛋白表达($n=3$) ×63

A: 脑组织; B: 心脏组织; C: 脾脏组织; DAPI: DAPI 染色图; Merge: 脑、心脏、脾脏组织 DAPI、CD11b、GRK2 的合并图

虽然可以存活,但体质量和生长速度与野生型小鼠相比均降低^[11]。因此,构建不同组织不同细胞中 GRK2 特异性敲除小鼠对研究 GRK2 调控各类免疫细胞和非免疫细胞的信号机制至关重要。

本实验基于 Cre/LoxP 系统构建了 GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠。本研究首先扩增出 GRK2^{flox/flox} 小鼠和 Lyz2-CreERT⁺ 小鼠,再将两种小鼠进行交配繁殖得到 GRK2^{flox/+} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠,继续将其与 GRK2^{flox/flox} 小鼠交配繁殖得到 GRK2^{flox/+} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠。其次用 Western blot 和免疫荧光两种实验方法验证 GRK2 在目的实验小鼠巨噬细胞中被特异性敲除,结果显示 GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠中 GRK2 表达降低,表明

GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠构建成功。课题组研究过程中发现,GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠相较于 GRK2^{flox/flox} 小鼠生长速度和体质量无明显差异。并进一步发现 PGE2(10 μmol/L) 诱导 GRK2^{flox/flox} 小鼠 PMs 向 M1 型极化,但 PGE2 诱导的 GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠 PMs 中 CD86/CD206 比例降低。本研究为进一步揭示 GRK2 在免疫调节中的潜在机制提供了 GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠模型。

虽然相较于 GRK2^{+/-} 小鼠,GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠生长速度和 GRK2 敲除效率均有改善。但本实验中用到的 Lyz2-CreERT⁺ 小鼠需要经过他莫昔芬再次诱导,成功率和造模时间均有待进一步优化。Lyz2-iCre 小鼠也是在巨噬细胞中特异

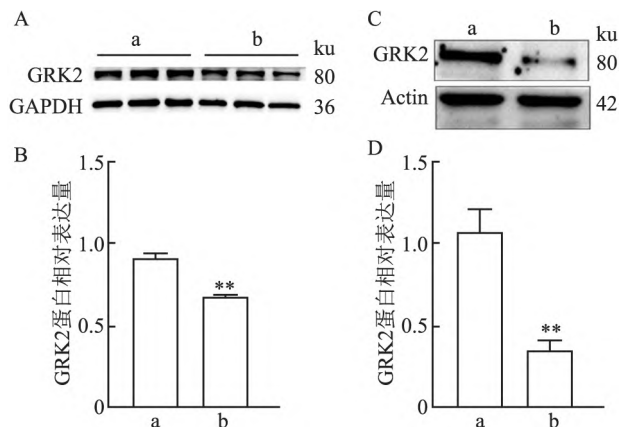


图6 GRK2^{flox/flox}Lyz2-CreERT⁺小鼠的 BMDMs 和 PMs 中 GRK2 表达 (n = 3)

A: 小鼠 BMDMs 中 GRK2 蛋白表达; B: 小鼠 BMDMs 中 GRK2 蛋白表达直方图; C: 小鼠 PMs 中 GRK2 蛋白表达; D: 小鼠 PMs 中 GRK2 蛋白表达直方图; a: GRK2^{flox/flox} 小鼠; b: GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠; 与 GRK2^{flox/flox} 比较: ** P < 0.01

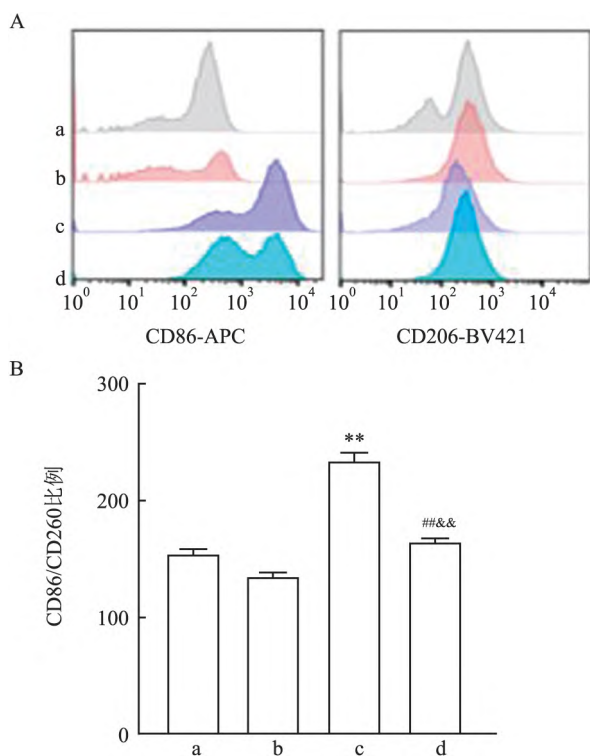


图7 PGE2 对 GRK2^{flox/flox}Lyz2-CreERT⁺小鼠 PMs 中 CD86/CD206 比例的作用 (n = 3)

A: PGE2 (10 μmol/L) 刺激 GRK2^{flox/flox} 小鼠和 GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠 PMs 中 CD86/CD206 平均荧光强度; B: PGE2 (10 μmol/L) 刺激 GRK2^{flox/flox} 小鼠和 GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠 PMs 中 CD86/CD206 平均荧光强度直方图; a: GRK2^{flox/flox}; b: GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺; c: PGE2 + GRK2^{flox/flox}; d: PGE2 + GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺; 与 GRK2^{flox/flox} 组比较: ** P < 0.01; 与 GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 组比较: ## P < 0.01; 与 PGE2 + GRK2^{flox/flox} 组比较: && P < 0.01

性表达 Cre 蛋白,与 Lyz2-CreERT 小鼠相比,有驱动密码子经过优化和不需要他莫昔芬诱导等优点。目前,课题组已经在交配繁育 GRK2^{flox/flox} Lyz2-iCre⁺ 小鼠,也将为后续实验提供基础。此外,Lyz2-CreERT 工具鼠为髓系细胞特异性敲除工具鼠,目前被广泛用于目的基因在巨噬细胞中的特异性敲除^[12-13]。髓系细胞包括单核细胞、成熟巨噬细胞和粒细胞等^[14],GRK2^{flox/flox} Lyz2-CreERT⁺ 小鼠还可被用于研究单核细胞和树突状细胞等在全类疾病中的作用。

参考文献

- [1] Steury M D, McCabe L R, Parameswaran N. G protein-coupled receptor kinases in the Inflammatory response and signaling [J]. Adv Immunol 2017 ,136: 227 - 77.
- [2] Gurevich V V ,Gurevich E V. GPCR signaling regulation: the role of GRKs and arrestins[J]. Front Pharmacol 2019 ,10: 125.
- [3] Sato P Y , Chuprun J K , Grisanti L A , et al. Restricting mitochondrial GRK2 post-ischemia confers cardioprotection by reducing myocyte death and maintaining glucose oxidation [J]. Sci Signal , 2018 ,11(560) : eaau0144.
- [4] Woodall M C , Woodall B P , Gao E , et al. Cardiac fibroblast GRK2 deletion enhances contractility and remodeling following ischemia/reperfusion injury [J]. Circ Res 2016 ,119(10) : 1116 - 27.
- [5] Wang Z Q , He C Y , Hu L , et al. Long noncoding RNA UCA1 promotes tumour metastasis by inducing GRK2 degradation in gastric cancer [J]. Cancer Lett 2017 ,408: 10 - 21.
- [6] Zhang F , Xiang S , Cao Y , et al. EIF3D promotes gallbladder cancer development by stabilizing GRK2 kinase and activating PI3K-AKT signaling pathway [J]. Cell Death Dis ,2017 ,8(6) : e2868.
- [7] Matuzany-Ruban A , Golan M , Miroshnik N , et al. Normalization of GRK2 protein and mRNA measures in patients with depression predict response to antidepressants [J]. Int J Neuropsychopharmacol 2010 ,13(1) : 83 - 91.
- [8] Guimarães T R , Swanson E , Kofler J , et al. G protein-coupled receptor kinases are associated with Alzheimer's disease pathology [J]. Neuropathol Appl Neurobiol 2021 ,47(7) : 942 - 57.
- [9] Yang X Z , Wei W. CP-25 , a compound derived from paeoniflorin: research advance on its pharmacological actions and mechanisms in the treatment of inflammation and immune diseases [J]. Acta Pharmacol Sin 2020 ,41(11) : 1387 - 94.
- [10] Yang X , Li S , Zhao Y , et al. GRK2 mediated abnormal transduction of PGE2-EP4-cAMP-CREB signaling induces the imbalance of macrophages polarization in collagen-induced arthritis mice [J]. Cells 2019 ,8(12) : 1596.
- [11] 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.

- [12] Audu C O , Melvin W J , Joshi A D , et al. Macrophage-specific inhibition of the histone demethylase JMJD3 decreases STING and pathologic inflammation in diabetic wound repair [J]. *Cell Mol Immunol* 2022 ,19(11) : 1251 – 62.
- [13] Davis F M , Kimball A , denDekker A , et al. Histone methylation directs myeloid TLR4 expression and regulates wound healing following cutaneous tissue injury [J]. *J Immunol* ,2019 ,202(6) : 1777 – 85.
- [14] Menon M B , Yakovleva T , Ronkina N , et al. Lyz2-Cre-mediated genetic deletion of septin7 reveals a role of septins in macrophage cytokinesis and Kras-driven tumorigenesis [J]. *Front Cell Dev Biol* 2022 9: 795798.

Construction and application of inducible macrophage-specific knockout *GRK2* gene mice model

Wei Qi ,Zhu Xuemin ,Liu Xiaoyi ,Yang Xuezhi ,Wei Wei

(*Institute of Clinical Pharmacology ,Anhui Medical University ,Key Laboratory of Anti-inflammatory Immune Medicine ,Ministry of Education ,Anhui Collaborative Innovation Center for Anti-inflammatory and Immuno Drugs ,Hefei 230032*)

Abstract Objective To establish an inducible macrophage-specific knockout G protein-coupled receptor kinase 2 (*GRK2*) gene ($GRK2^{lox/lox} Lyz2-CreERT^+$) mice model. **Methods** $GRK2^{lox/lox} Lyz2-CreERT^+$ mice were constructed based on Cre/LoxP system. The genotypes of $GRK2^{lox/lox} Lyz2-CreERT^+$ mice were identified by PCR amplification and agarose gel electrophoresis. After the mice were sacrificed by carbon dioxide method , the expression of *GRK2* in bone marrow-derived macrophages (BMDMs) and peritoneal macrophages (PMs) was detected by Western blot. Immunofluorescence was used to detect *GRK2* expression in mouse brain , heart and spleen macrophages. The M1/M2 ratio in PMs induced by prostaglandin E2 (PGE2) was analyzed by flow cytometry. **Results** The results of genotype identification showed that the mice with a band at 355 bp in the length of the flox amplification product and a band at 355 bp in the length of the Cre amplification product were $GRK2^{lox/lox} Lyz2-CreERT^+$ mice. Western blot results showed that *GRK2* expression in BMDMs and PMs of $GRK2^{lox/lox} Lyz2-CreERT^+$ mice decreased compared with $GRK2^{lox/lox}$ mice ($P < 0.01$) . Immunofluorescence results showed that *GRK2* expression decreased in the brain , heart and spleen of $GRK2^{lox/lox} Lyz2-CreERT^+$ mice compared with $GRK2^{lox/lox}$ mice ($P < 0.01$) . Flow cytometry showed that compared with $GRK2^{lox/lox}$ mice , there was no significant difference in the proportion of CD86/CD206 in the PMs of $GRK2^{lox/lox} Lyz2-CreERT^+$ mice. Under PGE2 (10 μ mol/L) stimulation , the proportion of CD86/CD206 in $GRK2^{lox/lox} Lyz2-CreERT^+$ mice PMs increased ($P < 0.01$) . The proportion of CD86/CD206 in the PMs of $GRK2^{lox/lox}$ mice was higher than that of $GRK2^{lox/lox} Lyz2-CreERT^+$ mice ($P < 0.01$) . **Conclusion** In this study , $GRK2^{lox/lox} Lyz2-CreERT^+$ mice model was successfully constructed , and the mice promoted PGE2-induced polarization of PMs to M2-type macrophages compared with control mice. **Key words** G protein-coupled receptor kinase 2; Cre/LoxP system; specific knockout mice; macrophages; identification of genotype