DOI:10.16016/j.1000-5404.201902114

CRISPR/Cas9 技术敲除斑马鱼 lkb1 基因及表型分析

梁 森[1],李帅庭[2],袁 志[2],黄慧哲[2] 400016 重庆,重庆医科大学基础医学院:生物化学与分子生物学教研室[1],发育生物学研究室[2]

[摘要] **目的** 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除斑马鱼 lkb1 基因,观察和验证纯合子表型,初步探讨 Lkb1 对肾小管发育的影响。**方法** 针对斑马鱼 lkb1 基因设计并体外合成 gRNA,通过显微注射技术将 gRNA 和 Cas9 mRNA 注入野生型胚胎一细胞期卵黄中,利用 T7E1 酶切和测序筛选出高效 gRNA,通过测序筛选出 F0 代突变体及可遗传突变体,野生鱼和可遗传突变体鱼杂交产生 F1 代杂合子突变体,测序鉴定 F1 代杂合子突变类型,通过 F1 代杂合子自交产生 F2 代纯合子幼鱼,通过观察鉴定出纯合子表型;通过 RT-PCR 和免疫印迹验证纯合子表型。**结果** 制备了斑马鱼 lkb1 gRNA 和 Cas9 mRNA,筛选出 3 种产生移码突变的杂合子,发现斑马鱼 lkb1 基因敲除纯合子幼鱼受精后第 5 天游动时头尾剧烈摆动,异常兴奋,鱼鳔缺失,体轴弯曲,卵黄消耗过快,肝脏暗淡,肠道水肿;第 9 天大多数死亡;纯合子 g6pase、pdk2b、pcpck1 mRNA 显著升高,Lkb1 完全不表达;肾小管标志蛋白 mRNA 显著升高。**结论** 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除斑马鱼 lkb1 基因产生了多种表现,包括肝脏衰竭、肠道水肿、体轴弯曲、鱼鳔缺失、早期致死的表型,同时表明 Lkb1 对斑马鱼肾小管发育有影响。

[关键词] CRISPR/Cas9;lkb1 ;斑马鱼
[中图法分类号] Q959.466; R394-33; R394.1 [文献标志码] A

Knockout and phenotype analysis of lkb1 gene in zebrafish by CRISPR/Cas9 technology

LIANG Sen[1], LI Shuaiting[2], YUAN Zhi[2], HUANG Huizhe[2] [1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, [2]Department of Developmental Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016, China

[**Abstract**] **Objective** To knock out lkb1 gene in zebrafish by CRISPR/Cas9 technique, observe and verify homozygote phenotype, and preliminarily explore the effect of lkb1 on the development of renal tubule. **Methods** The gRNA targeting lkb1gene was designed and synthesized. The gRNA and Cas9 mRNA were injected into the wild-type cell-phase embryo yolk by microinjection technique. The high-efficiency gRNA was screened by T7E1 digestion and sequencing. The F0 mutants and heritable mutants were screened by sequencing. Wild-type fish and heritable mutant fish were used to hybridize to produce F1 hybrid heterozygous mutants, and F1 hybrid heterozygous mutants were identified by sequencing. Then F2 generation homozygous juveniles were produced by self-crossing of F1 heterozygotes. Homozygous phenotypes were identified, and homozygous phenotypes were verified by qPCR and Western blot analysis. **Results** The zebrafish lkb1 gRNA and Cas9 mRNA were prepared, and 3 heterozygotes with frameshift mutations were obtained. It was found that the zebrafish Lkb1 knockout homozygous juveniles violently swayed at the head and tail on the 5th day after fertilization, and with missed swim bladder, bended body axis, fast yolk consumption, dim liver, and edematous intestinal tract, and most of them died on the 9th day. The mRNA levels of homozygous g6pase, pdk2b and pcpck1 were significantly increased, while lkb1 was not expressed at all. The mRNA levels of homozygous renal markers, trmp7, slc12a1 and slc12a3 were also obviously elevated. **Conclusion** Knockout of zebrafish lkb1 gene by CRISPR/Cas9 technology results in liver failure, edematous intestinal tract, bended body axis, missed swim bladder, and early lethal phenotype. The knockout also shows effect on the development of renal tubule.

[**Key words**] CRISPR/Cas9;lkb1;zebrafish

Corresponding author: HUANG Huizhe, E-mail:huangh@xmu.edu.cn

[通信作者] 黄慧哲,E-mail:huangh@xmu.edu.cn
[网络首发] http://kns.cnki.net/KCMS/detail/50.1126.r.20190411.1103.001.html

肾间质纤维化是慢性肾脏疾病发展为终末期肾脏衰竭的共同病变过程,而肾小管上皮细胞间充质转分化(epithelial-mesenchymal transition,EMT)是肾间质纤维化的主要病变原因[1]。越来越多的研究表明,引起Peutz-Jeghers综合征(PJS)的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Lkb1[2]调节肿瘤细胞的EMT、转移和侵袭过程,如肝癌细胞[3]、肺癌细胞[4]、卵巢癌细胞[5]、胃癌细胞[6]等。受lkb1调节的EMT相关分子如ZEB1、E-cadherin、vimentin、β-catenin,已经明确引起EMT的信号通路如TGF-β[7]、Ras[8-9]都与lkb1相关,但目前关于lkb1引起EMT的机制还不明确。另一方面初级纤毛是大多数类型的细胞表面非运动性丝状结构(包括肾小管),纤毛含有复杂的大分子运输系统接受信号刺激,并影响细胞大小、极性、细胞周期及迁移。肾脏纤毛病与囊肿、炎症和纤维化密切相关,而lkb1作为纤毛中的代谢传感器[10],在肾脏发育和疾病发生中的作用机制不清楚。因此,研究肾脏发育过程中lkb1的作用对深入认识lkb1在EMT进展中的机制至关重要。近几年CRISPR/Cas9基因编辑技术因高效、成本低等优势已经在体外[11-12]和体内[13-14]实验中得到广泛应用,本课题组利用CRISPR/Cas9基因编辑技术成功构建了其他基因的敲除模型[15]。通过比较发现人与斑马鱼lkb1蛋白有82%的同源性,目前已经利用斑马鱼研究了lkb1基因对血糖稳态的影响[16],更重要的是斑马鱼整个发育过程都在体外完成,个体小,产卵量大,胚胎透明,容易干预,肾脏结构简单,已经成为研究肾脏的良好模式生物。因此,本研究选择斑马鱼作为研究对象,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建斑马鱼lkb1突变体,为进一步阐释Lkb1在肾脏EMT中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 AB品系斑马鱼,海圣水循环系统中喂养。胚胎使用holtfreter溶液置于28.5 ℃恒温培养箱培养。

1.1.2 试剂 质粒SP6-Cas9由重庆大学王业启教授馈赠;Not Ⅰ核酸内切酶购自TaKaRa公司;phusion® hot start flex 2×master Mix和HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit(E2050S)购自NEB公司;天根普通DNA产物纯化试剂盒(DP204-02)和miRcute miRNA lsolation Kit(DP501)购自天根生化科技有限公司;mMessAGE mMACHINE® SP6 Transcription Kit(AM1340)购自Invitrogen公司;RNA lnhibitor购自sigma公司;qiagen RNeasy® Mini Kit(74104)购自Qiagen公司;兔抗人GAPDH(10494-1-AP)和LKB1(10746-1-AP)多克隆抗体购自Proteintech公司。

1.1.3 仪器 显微注射器,p-97微电极拉制仪和毛细玻璃管购自Sutter公司;PCR仪购自Bio-Rad公司;体式显微镜购自Zeiss公司;全自动凝胶成像系统购自北京赛智创业科技有限公司。

1.2 斑马鱼lkb1基因敲除

1.2.1 gRNA靶位点及鉴定引物设计 ①斑马鱼lkb1 gRNA靶位点设计:根据http://chopchop.cbu.uib.no/选择两个位于斑马鱼lkb1基因外显子上没有脱靶、高效的gRNA靶位点(表1)。②鉴定引物设计:设计前、后引物应距靶位点两端200~300 bp(表2)。

表1 lkb1 gRNA靶位点核苷酸序列

靶位点	序列5′→3′	位置
gRNA1	AGCTTGGCACGCTTGCGGCGCGG	2号外显子上
gRNA2	GATCGGGAAATACCTGATGGGGG	2号外显子上

表2 lkb1 gRNA鉴定引物序列

靶位点	引物序列5′→3′	片段大小
gRNA1	上游:AGATGTCCGGATCTCCAGTAGT 下游:TCACCATATACTGAATGTCGCA	574 bp
gRNA2	上游:ACAGGCGTTTATCGGCTATTAT 下游:TCACCATATACTGAATGTCGCA	452 bp

1.2.2 体外合成gRNA和Cas9 mRNA ①gRNA体外合成。委托生工公司合成上游引物:5′-AATTAATACGACTCACTATA+Lkb1-gRNA+GTTTTAGAGCTAGAAATAGC-3′;下游引物:5′-GATCCGCACCGACCCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTATTTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC-3′。phusion® hot start flex 2×master Mix PCR扩增,Tian Gen KIT胶回收、纯化PCR产物制备gRNA体外转录模板;HiScribe T7 Quick High Yield RNA Synthesis Kit体外转录gRNA,转录结束后加TURBO DNase消化DNA模板,模板消化后用1%琼脂糖凝胶电泳检测gRNA转录效率,miRcute miRNA lsolation Kit纯化gRNA,Nanodrop测定浓度并用RNase-free water稀释到600 ng/μL,分装后-80 ℃保存。②Cas9 mRNA体外合成。限制性内切酶*Not* Ⅰ线性化pSP6-Cas9质粒,TIANGEN纯化试剂盒纯化酶切产物,Invitrogen mMESSAGE mMACHINETM SP6试剂盒体外转录Cas9 mRNA,转录结束后用TURBO DNase消化DNA模板。模板消化后用1%琼脂糖凝胶电泳检测Cas9 mRNA转录效率。转录产物用qiagen RNeasy Mini Kit纯化。Nanodrop测定Cas9

mRNA 浓度并用 RNase-free water 稀释到 800 ng/μL,分装后-80 ℃保存。

1.2.3　检测 gRNA 有效性并筛选出突变体　①检测 gRNA 有效性。将 gRNA 和 Cas9 mRNA 混合物显微注射到斑马鱼胚胎一细胞期卵黄中,48 h 后用 50 mmol/L NaOH 和 1 mol/L Tris-HCL 提取单个幼鱼基因组,用鉴定引物 PCR 扩增,PCR 产物用 T7E1 核酸内切酶酶切鉴定突变效率,并对可疑产物测序确认。②选择产生高效突变的 gRNA 显微注射,将幼鱼养到 1.5 月剪尾鳍测序筛选出突变体,突变体喂养到成鱼后与野生型(wild type,WT)鱼杂交,胚胎测序筛选出可遗传突变体。

1.2.4　杂合子的筛选及纯合子表型鉴定　①杂合子的筛选。可遗传突变体与野生鱼杂交,幼鱼喂养到 1.5 月剪尾鳍测序筛选出杂合子,杂合子继续喂养到成鱼。②纯合子表型鉴定。相同突变类型杂合子雌鱼和雄鱼自交,观察胚胎发育过程的异常表型(统计死亡数量)拍照并测序鉴定。

1.3　验证纯合子表型

1.3.1　Western blot 检测 lkb1 纯合子蛋白表达情况　①蛋白提取:分别配野生型和杂合子斑马鱼,收取 6 d 的野生型(WT)和 lkb1 纯合子($lkb1^{-/-}$)幼鱼各 100 枚,用 RIPA 裂解液提取蛋白。②免疫印迹。

1.3.2　RT-PCR 检测 lkb1 纯合子糖代谢关键酶和肾小管标志蛋白的 mRNA 水平　①设计 RT-PCR 引物见表 3。②总 RNA 提取。分别配野生型和杂合子斑马鱼,收取 7 d 野生型和纯合子幼鱼各 30 枚,使用 TRIzol 提取总 RNA,并测定 RNA 浓度。③使用 TaKaRa 逆转录试剂盒逆转录成 cDNA。④RT-PCR 检测糖代谢关键酶和肾小管标志蛋白的 mRNA 水平。

表 3　RT-PCR 引物序列

基因	引物序列 5′→3′	片段大小
g6pase	上游:TATGGGAGACCCGAAAGC 下游:TGTCCAATCCACCAGTAAGG	165 bp
pdk2b	上游: TTAGGAACAGGCACAATGAC 下游: ATGCGAATGGAAACACG	135 bp
pepck1	上游: GCTGCCCTCTGCCACTCAA 下游: CCGCTGCGAAATACTTCTTTG	258 bp
trmp7	上游:AGATGAAATAGTGCCGACCAA 下游:GAGGACGCAGTTCTTTAGTG	255 bp
slc12a1	上游:CAGGGCAAGGGCAACA 下游:GCAGACGAAACGGCTCAAT	286 bp
slc12a3	上游:GATGAGGCAACAAAGGAAT 下游:CAAGCCATGTAAAGAGGACTA	188 bp

1.4　统计学处理

各实验至少重复 3 次,使用 SPSS 21.0 统计软件进行单因素方差分析。检验水准:$\alpha=0.05$。

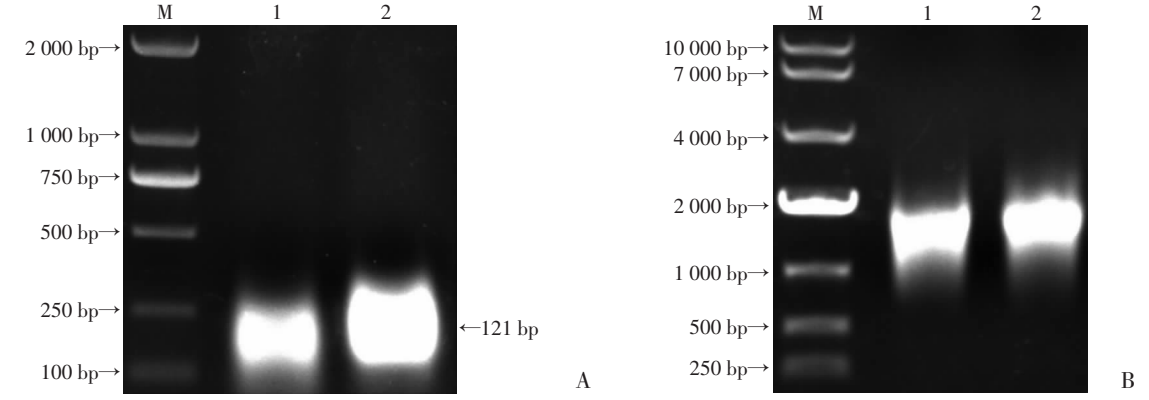
2　结果

2.1　制备了 sgRNA 和 Cas9 mRNA

琼脂糖凝胶电泳结果表明成功转录出了 lkb1-gRNA1、gRNA2(图 1A)和 Cas9 mRNA(图 1B)。Nanodrop 测定 lkb1-gRNA1、gRNA2 和 Cas9 mRNA 浓度分别为 2400、4900、1200 ng/μL。

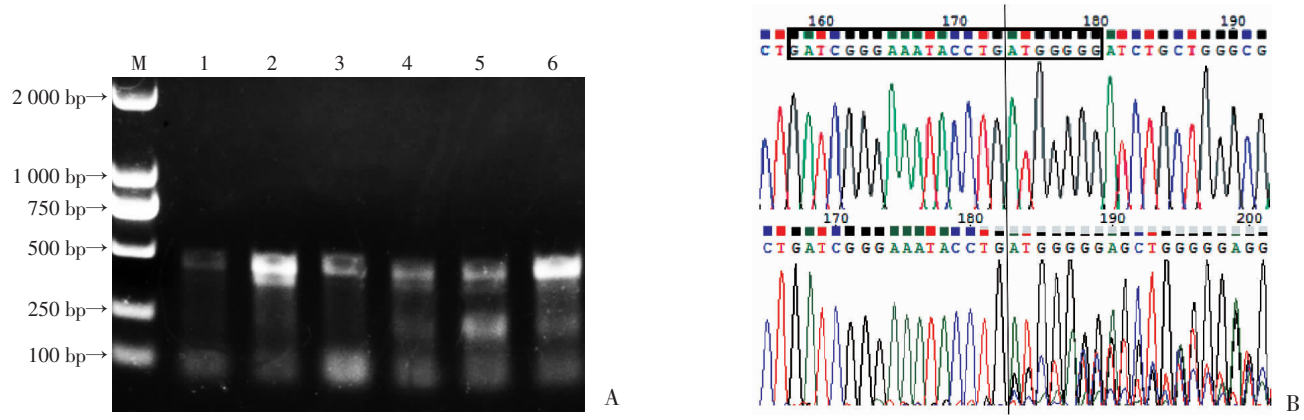
2.2　鉴定出 lkb1-sgRNA2 有效

lkb1-gRNA2 与 Cas9 mRNA 显微共注射后提 48 h 胚胎基因组,鉴定引物 PCR 产物使用 T7E1 酶切后琼脂糖凝胶电泳(图 2A)表明 lkb1-gRNA2 注射后(胚胎 5)产生明显突变。PCR 产物测序,测序重叠峰(图 2B)出现在 lkb1-gRNA2 靶位点(黑色线框所标注的序列)酶切位点附近,确定 lkb1-gRNA2 诱导突变有效。



A:体外转录 lkb1-gRNA　M:DNA 标准(DL2000);1: lkb1-gRNA1;2:lkb1-gRNA2;B: 体外转录 Cas9 mRNA　M:DNA 标准(DL10000);1:第 1 份线性化 sp6-Cas9 质粒转录的 mRNA;2:第 2 份线性化 sp6-Cas9 质粒转录的 mRNA

图 1　体外转录合成 gRNA 和 Cas9 mRNA



A:T7E1 酶切 PCR 产物(注射 lkb1-gRNA2 和 Cas9mRNA 后 48 h 提基因组,用鉴定引物 PCR)鉴定突变效率 M:DNA 标准(DL2000);1~6:6 枚胚胎各自的 PCR 产物酶切结果;5 号鱼酶切条带最明显; B:5 号测序结果与野生型比较　WT:表示野生鱼的测序结果;黑线框表示 lkb1-gRNA2 靶位点序列;MU(MIX):表示 5 号鱼测序结果,与野生鱼比较,在靶位点处产生明显重叠峰

图 2　T7E1 酶切及测序鉴定 gRNA 有效性

2.3　筛选出 3 种杂合子突变体

lkb1-gRNA2 注射产生的胚胎喂养到 1.5 月剪尾鳍测序筛选出突变体,将突变体喂养到成鱼,与野生型杂交检测胚胎基因型筛选出可遗传突变体,将野生鱼和可遗传突变体杂交产生 F1 代,喂养到 1.5 月剪尾鳍测序筛选出 3 种预测产生移码突变并且提前终止翻译的杂合子 K48、K44、K68(图 3A),其中 K68 突变体缺失 7 个碱基,预测只翻译 59 个氨基酸(图 3B);K44 突变体缺失 4 个碱基,预测只翻译 60 个氨基酸;K48 突变体缺失 3 个碱基,预测产生较长的移码突变氨基酸序列。

2.4　斑马鱼 lkb1 纯合子表型

同种突变类型的杂合子成鱼雌雄自交产生 F2 代胚胎,通过观察发育期发现在受精后第 5 天有 25%幼鱼未形成鱼鳔,体轴靠近头部轻微出现腹侧、侧向弯曲,卵黄比野生型更小,肠道开始出现坏死水肿,头尾同时高频率摆动做无定向运动。6 d 出现死亡,体轴弯曲更加明显,躯干更加纤细,肠道病变坏死水肿加重,肝脏变暗。7 d 死亡更多(主要是躯干严重弯曲型),肝脏变黑,肠道水肿坏死更加明显(图 4A、B)。9 d 大多数死亡(图 4C)。同时对这种异常表型测序进行验证,结果都是纯合子(图 4D)。氨基酸序列比对及移码突变在 Lkb1 蛋白的位置(图 4E),确定纯合子 lkb1-K68$^{-/-}$突变体只翻译了 59 个氨基酸,且与野生型一样的氨基酸只有 49 个,在 Lkb1 功能域之前终止,表明 lkb1-K68$^{-/-}$突变体完全敲除了 Lkb1。

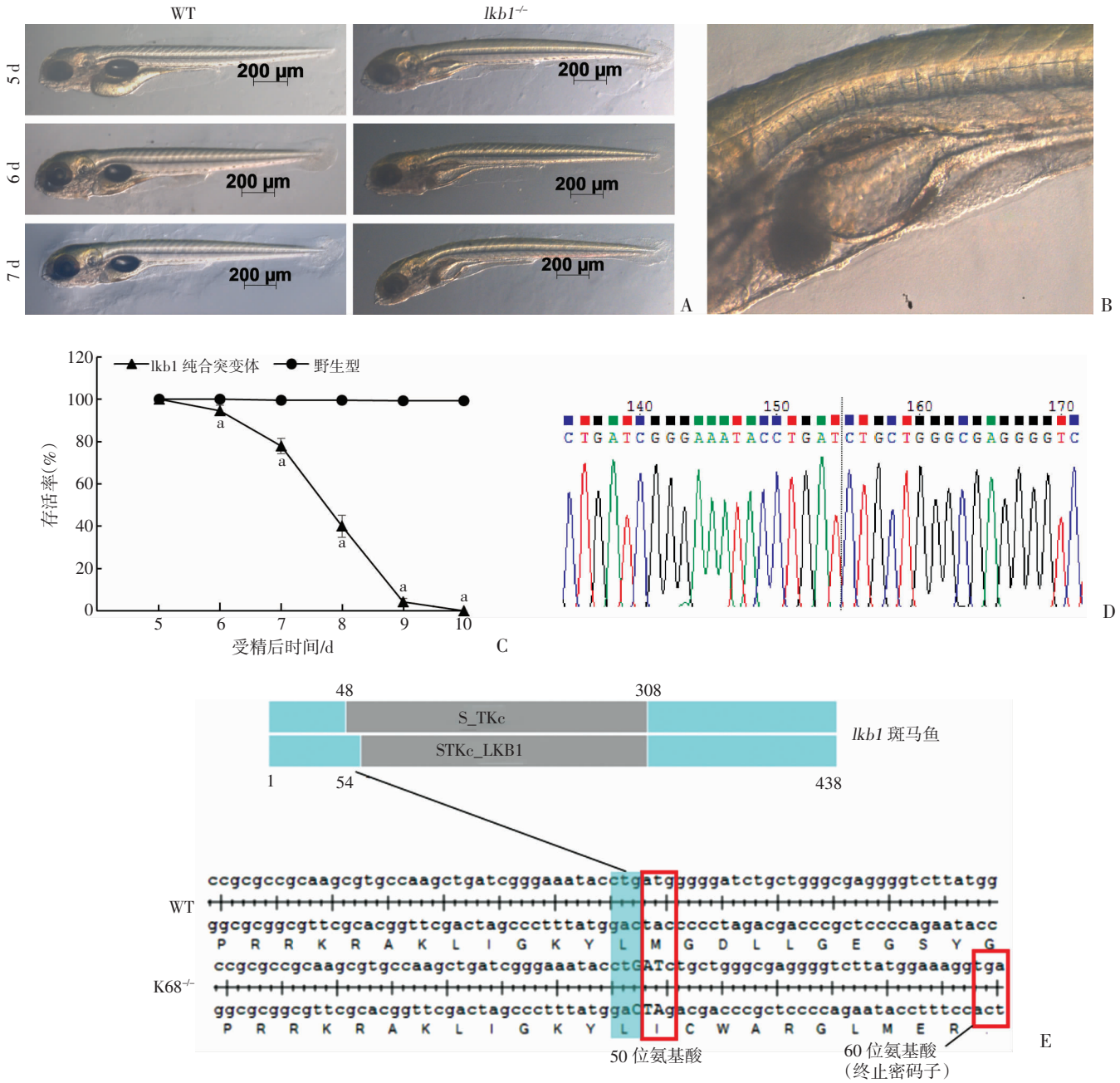
2.5　Western Blot 检测不到纯合子 Lkb1 表达

提取 6 d 的 k68-lkb1$^{-/-}$和野生幼鱼蛋白,免疫印迹检测 Lkb1 表达情况,结果表明鉴定出的 lkb1$^{-/-}$表型与野生型比较完全不表达 Lkb1(P<0.05,图 5A),证明鉴定出的纯合子表型是敲除 Lkb1 特异的,同时也确定敲除了 Lkb1。



A:lkb1 的 3 种突变类型　WT:野生型,下划线:表示野生型靶位点序列;红色字母:示 PAM 区;K48:缺失 3 个碱基的突变体;K44:缺失 4 个碱基的突变体;K68:缺失 7 个碱基的突变体; B:K68 杂合子测序结果　在靶位点处产生双峰

图 3　杂合子突变体类型和 k68 杂合子测序结果

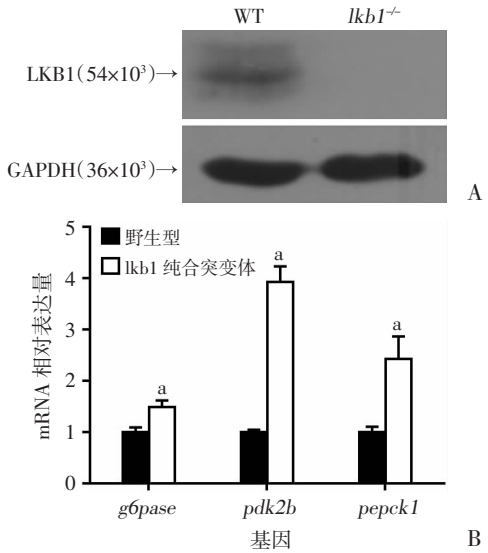


A:lkb1 纯合子表型　WT:野生型受精后的表型;lkb1$^{-/-}$: K68 纯合子突变体受精后的表型,鱼鳔缺失,肝脏逐渐变黑,体轴逐渐弯曲,肠道水潴留;B:的 K68 纯合子 7 d 局部表型;C :lkb1 纯合子生存曲线;D:K68 纯合子测序结果　与较野生型缺失了 7 个碱基;E:纯合子 lkb1-K68$^{-/-}$突变体氨基酸序列及蛋白质位置　WT:野生型斑马鱼序列;K68$^{-/-}$:K68 纯合子序列;绿色背景示 K68$^{-/-}$从这个氨基酸开始产生移码突变,红色线框(50 位氨基酸)表示第 1 个产生移码突变的氨基酸是第 50 位;60 位氨基酸(终止密码子)表示 K68$^{-/-}$突变体翻译到这个位点终止,黑色实线表示移码突变发生在 Lkb1 功能域起点位置

图 4　斑马鱼 lkb1-k68 纯合子对表型、基因及蛋白表达的影响

2.6　lkb1 纯合子能量代谢功能相关的酶 RNA 水平上调

Lkb1 敲除表现出饥饿状态,葡萄糖产生增多,葡萄糖-6-磷酸酶(g6Pase)、磷酸烯醇丙酮酸羧激酶 1(pepck1)和丙酮酸脱氢酶激酶(pdks)上调。为了验证鉴定的纯合子表型的特异性,从 mRNA 水平检测了斑马鱼 g6pase,pdk2b,pcpck1 的表达情况。发现纯合子第 7 天 g6pase 增加了 49%,pdk2b 增加了约 3 倍,pcpck1 增加了约 1.5 倍,与野生型比较差异均有统计学意义($P<0.05$,图 5B)。进一步证实观察到的是 lkb1 敲除纯合子的特异表型,同时也验证了 Lkb1 敲除出现饥饿状态。

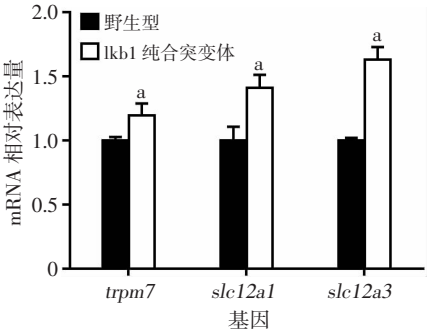


A:Western blot 检测 lkb1 纯合子蛋白表达 WT:6 d 的野生型鱼;lkb1$^{-/-}$:6 d 的 lkb1 纯合子鱼;B:RT-PCR 检测 lkb1 纯合子 g6pase、pdk2b、pcpck1 的水平 野生型:7 d 的野生型鱼;lkb1 纯合突变体:7 d 的 lkb1 纯合子鱼;a:$P<0.05$,与野生型比较

图 5 Western blot 和 RT-PCR 验证 lkb1 突变体

2.7 Lkb1 对斑马鱼肾小管发育的影响

选择肾小管标志蛋白 trmp7(近直小管)、slc12a1(远端小管前段)和 slc12a3(远端小管后段)分析 lkb1 纯合子对肾小管的影响。Real-time PCR 结果显示斑马鱼 lkb1 纯合子肾小管各个区段标志物,与野生型(设为 1)比较,纯合子表达都显著增加($P<0.05$,图 6),肾小管远端增加更加明显,表明 lkb1 基因对斑马鱼肾小管产生明显影响。



野生型:7 d 的野生型鱼;lkb1 纯合突变体:7 d 的 lkb1 纯合子鱼;trmp7:近直小管标志蛋白;slc12a1:远端小管前段标志蛋白;slc12a3:远端小管后段标志蛋白;a:$P<0.05$,与野生型比较

图 6 Real-time PCR 检测 lkb1 纯合子肾脏标志物 trmp7、slc12a1 及 slc12a3 的 mRNA 表达水平

3 讨论

目前得到广泛应用的基因编辑技术包括锌指核酸酶技术(zincfinger nucleases,ZFNs)、转录激活样效应核酸酶技术(transcription activator-like effectors nucleases,TALENs)和 CRISPR/Cas9(Clustered regularly interspaced short palindromic repeats-CRISPR-associated proteins)基因编辑。与 ZFNs 和 TALENs 相比,CRISPR/Cas9 有明显优势。ZFNs 和 TALENs 都是基于蛋白质工程,需要复杂且耗时的蛋白质工程选择和验证。相比之下,CRISPR/Cas9 仅需要用于 DNA 靶向的 sgRNA,其相对便宜且易于设计和生产。在内源 CRISPR/Cas9 系统中,成熟 crRNA 与反式激活 crRNA(tracrRNA)组合以形成 tracrRNA:crRNA 复合物,其将 Cas9 引导至靶位点。在靶位点,CRISPR/Cas9 介导的序列特异性切割需要与 crRNA 匹配的 DNA 序列原型间隔区(gRNA)和短的原型间隔区相邻基序(PAM)。与靶位点结合后,与 crRNA 匹配的 DNA 链和相反链分别被 Cas9 的 HNH 核酸酶结构域和 RuvC 样核酸酶结构域切割,在靶位点产生双链断裂(DSB)。CRISPR/Cas9 产生的 DSB 将触发细胞 DNA 修复过程,包括非同源末端连接(NHEJ)介导的易错 DNA 修复和同源定向修复(HDR)介导的无错误 DNA 修复。NHEJ 介导的 DNA 修复可快速连接 DSB,但在靶位点产生小的插入和缺失突变。这些突变有助于破坏或废除靶基因或基因组元件的功能[17]。

Lkb1 是 AMPK 的主要上游激酶,Lkb1 与假激酶 STRAD 和支架蛋白 MO25 形成复合物,磷酸化 AMPK 及其他密切相关的激酶,如盐诱导型激酶(SIK)和微管亲和力调节激酶(MARK),发挥多功能生物学功能,如细胞生长和增殖[18]、细胞极性[19]、自噬[20]。

本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除斑马鱼 lkb1 基因,设计了 2 条 sgRNA,经过验证发现有 1 条非常高效。经过测序筛选和传代,筛选出 3 种杂合子突变体。通过观察杂合子自交产生的胚胎,发现 3 种突变体纯合子都产生相同异常表型,但是表型的严重程度有所不同,而 3 种突变体都产生了移码突变且提前终止翻译,认为移码突变产生的氨基酸在蛋白功能中可能也发挥了部分作用。

Lkb1 主要调节能量代谢,小鼠肝脏敲除 Lkb1 导致高血糖症,主要是通过葡萄糖生成增加产生的。糖异生途径增强,而这种饥饿状态在斑马鱼中有所不同,有研究表明斑马鱼敲除 Lkb1 也表现出饥饿状态[15],

但卵黄消耗完之前就出现低血糖症状,表明 Lkb1 敲除后加快能量消耗。而这与观察到的 lkb1 纯合子卵黄消耗过快,体轴纤细表型一致。通过 RT-PCR 检测到糖异生途径增强也证实了这一结论,同时肝脏发黑有可能是肝脏负荷太大导致肝脏衰竭坏死,而肠道水肿坏死有可能是继发于肝脏坏死,导致腹腔水潴留。lkb1 纯合子斑马鱼体轴弯曲,特异性发生在头部近端,这种表型未见报道过,而 Lkb1 在蠕虫的同源物 PAR-4 和 Lkb1 在果蝇都是前后轴形成必需的[21],但这种表型在脊椎动物中没有得到证实,由于得到的 3 种突变体都产生这种体轴弯曲表型,所以我们猜测 Lkb1 对于斑马鱼前后轴的形成也是必需的。lkb1 纯合子还表现出明显的兴奋和头尾同时剧烈摆动,可能与调节神经元极性的 Lkb1-Sad / Mark 途径受限导致轴突发育异常有关[22]。更重要的是电生理研究表明 Lkb1 通过控制 MCU(线粒体钙单向转运体)摄取 Ca^{2+} 的能力来调节神经递质释放,在 Lkb1 缺失的轴突中,线粒体依赖性突触前 Ca^{2+} 稳态的改变导致神经递质释放性质的急剧变化,增强了异步和同步形式的神经递质释放以及短期突触前可塑性的改变[23]。我们猜测 lkb1 纯合子斑马鱼异常兴奋有可能是 MCU(线粒体钙单向转运体)下调,神经递质异常释放增强导致的。文献[10]报道小鼠肾小管远端条件性敲除 Lkb1 导致尿浓度发生变化,尿量增加,肾脏随着时间逐渐变小,组织学显示肾小管扩张,增厚肾小管基底膜,间质性炎症和纤维化,与本研究中检测到纯合子突变体肾小管标志蛋白 mRNA 水平增加是一致的。因此,Lkb1 可能对斑马鱼肾小管发育有影响。下一步将研究 lkb1 纯合子突变体对肾小管的影响机制。

综上所述,Lkb1 对斑马鱼体轴形成,神经发育、维持正常神经反射,维持肝脏和肠道正常功能和存活都是至关重要的。本研究构建的 lkb1 突变体为进一步探究 Lkb1 的作用机制提供了依据,也为研究 Lkb1 对斑马鱼肾脏发育的影响构建了良好的模型。

参考文献:

[1] LOVISA S, LEBLEU V S, TAMPE B, *et al*. Epithelial-to-mesenchymal transition induces cell cycle arrest and parenchymal damage in renal fibrosis[J]. Nat Med, 2015, 21(9):998-1009. DOI:10.1038/nm.3902.

[2] YADAV H, DEVALARAJA S, CHUNG S T, *et al*. TGF-β1/smad3 pathway targets PP2A-AMPK-FoxO1 signaling to regulate hepatic gluconeogenesis[J]. J Biol Chem, 2017, 292(8):3420-3432. DOI:10.1074/jbc.M116.764910.

[3] QIU B J, WEI W, ZHU J W, *et al*. EMT induced by loss of LKB1 promotes migration and invasion of liver cancer cells through ZEB1-induced YAP signaling[J]. Oncol Lett, 2018, 16(5): 6465-6471. DOI:10.3892/ol.2018.9445.

[4] YAO Y H, CUI Y, QIU X N, *et al*. Attenuated LKB1-SIK1 signaling promotes epithelial-mesenchymal transition and radioresistance of non-small cell lung cancer cells[J]. Chin J Cancer, 2016, 35: 50. DOI:10.1186/s40880-016-0113-3.

[5] HONG B, ZHANG J, YANG W, *et al*. Activation of the LKB1-SIK1 signaling pathway inhibits the TGF-β-mediated epithelial-mesenchymal transition and apoptosis resistance of ovarian carcinoma cells[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(2): 2837-2844. DOI:10.3892/mmr.2017.8229.

[6] HU M, ZHAO T K, LIU J, *et al*. Decreased expression of LKB1 is associated with epithelial-mesenchymal transition and led to an unfavorable prognosis in gastric cancer[J]. Hum Pathol, 2019, 83: 133-139. DOI: 10.1016/j.humpath.2018.08.017.

[7] LIN H, LI N, HE H, *et al*. AMPK inhibits the stimulatory effects of TGF-β on Smad2/3 activity, cell migration, and epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Mol Pharmacol, 2015, 88(6):1062-1071. DOI: 10.1124/mol.115.099549.

[8] SHORNING B Y, JARDÉ T, MCCARTHY A, *et al*. Intestinal renin-angiotensin system is stimulated after deletion of Lkb1[J]. Gut, 2012, 61(2):202-213. DOI: 10.1136/gutjnl-2011-300046.

[9] MCGHEE A, SIVARAJAH M, GONG Q, *et al*. Angiotensin II type 2 receptor blockade inhibits fatty acid synthase production through activation of AMP-activated protein kinase in pancreatic cancer cells[J]. Surgery, 2011, 150(2):284-298. DOI: 10.1016/j.surg.2011.06.002.

[10] VIAU A, BIENAIMÉ F, LUKAS K, *et al*. Cilia-localized LKB1 regulates chemokine signaling, macrophage recruitment, and tissue homeostasis in the kidney[J]. EMBO J, 2018, 37(15): e98615. DOI: 10.15252/embj.201798615.

[11] CLAUDE-TAUPIN A, FONDERFLICK L, GAUTHIER T, *et al*. ATG9A is overexpressed in triple negative breast cancer and its in vitro extinction leads to the inhibition of pro-cancer phenotypes[J]. Cell, 2018, 7(12): E248. DOI:10.3390/cells7120248.

[12] FORRESTER A, DE LEONIBUS C, GRUMATI P, *et al*. A selective ER-phagy exerts procollagen quality control *via* a Calnexin-FAM134B complex[J]. EMBO J, 2019, 38(2): e99847. DOI:10.15252/embj.201899847.

[13] DING F, HU Q, WANG M, *et al*. Knockout of SlSBPASE suppresses carbon assimilation and alters nitrogen metabolism in tomato plants[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(12):

E4046. DOI:10.3390/ijms19124046.

[14] RAMANAGOUDR-BHOJAPPA R, CARRINGTON B, RAMASWAMI M, *et al*. Multiplexed CRISPR/Cas9-mediated knockout of 19 Fanconi anemia pathway genes in zebrafish revealed their roles in growth, sexual development and fertility[J]. PLoS Genet, 2018, 14(12): e1007821. DOI: 10.1371/journal.pgen. 1007821.

[15] 刘菁, 梁森, 袁志. CRISPR/Cas9 技术敲除 faf1 基因对斑马鱼软骨及肌节发育的影响[J]. 第三军医大学学报, 2017,39(17):1709-1714. DOI:10.16.16/j.10000-5404.201612182.
LIU J, LIANG S, YUAN Z. Effects of faf1 gene knockout by CRISPR/Cas9 on zebrafish cartilage and sarcomere development[J]. J Third Mil Med Univ, 2017, 39(17):1709-1714. DOI:10.16.16/j.10000-5404.201612182.

[16] KUANG X, LIU C, FANG J, *et al*. The tumor suppressor gene lkb1 is essential for glucose homeostasis during zebrafish early development[J]. FEBS Lett, 2016, 590(14):2076-2085. DOI: 10.1002/1873-3468.12237.

[17] ZHANG F, WEN Y, GUO X. CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges[J]. Hum Mol Genet, 2014, 23(R1): R40-R46. DOI:10.1093/hmg/ddu125.

[18] NGUYEN H B, BABCOCK J T, WELLS C D, *et al*. LKB1 tumor suppressor regulates AMP kinase/mTOR-independent cell growth and proliferation via the phosphorylation of Yap[J]. Oncogene, 2013, 32(35): 4100-4109. DOI:10.1038/onc.2012.431.

[19] LI J, LIU J, LI P P, *et al*. Loss of LKB1 disrupts breast epithelial cell polarity and promotes breast cancer metastasis and invasion[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2014, 33: 70. DOI:10.1186/s13046-014-0070-0.

[20] SUN A, LI C, CHEN R, *et al*. GSK-3β controls autophagy by modulating LKB1-AMPK pathway in prostate cancer cells[J]. Prostate, 2016, 76(2): 172-183. DOI: 10.1002/pros.23106.

[21] MARTIN S G, ST JOHNSTON D. A role for drosophila LKB1 in anterior-posterior axis formation and epithelial polarity[J]. Nature, 2003, 421(6921): 379-384. DOI: 10.1038/nature01296.

[22] SHELLY M, POO M M. Role of LKB1-SAD/MARK pathway in neuronal polarization[J]. Dev Neurobiol, 2011, 71(6):508-527. DOI:10.1002/dneu.20884.

[23] KWON S K, SANDO R, LEWIS T L, *et al*. LKB1 regulates mitochondria-dependent presynaptic calcium clearance and neurotransmitter release properties at excitatory synapses along cortical axons[J]. PLoS Biol, 2016, 14(7): e1002516. DOI:10.1371/journal.pbio.1002516.

(收稿:2019-02-24;修回:2019-04-04)

(编辑 汪勤俭)