

利用 CRISPR – Cas9 系统建立 Prmt1 敲除的小鼠胚胎干细胞系

蔡 昀 杨光辉 张 业

摘要 目的 利用 CRISPR – Cas9 系统构建 Prmt1 敲除的 E14 小鼠胚胎干细胞系, 并分析验证其敲除效果。**方法** 利用第3代基因编辑技术CRISPR – Cas9系统, 针对Prmt1第4、5、6、7外显子设计4条gRNAs, gRNA两两组合转染E14细胞, 特异性的敲除E14细胞中的Prmt1, 并在蛋白质水平, mRNA水平和基因组水平分别验证敲除效果。**结果** 与对照组相比, 两组敲除实验组都检测不到Prmt1蛋白质和mRNA的表达, 基因组测序结果显示, 两实验组中Prmt1的mRNA均出现无义突变, 使其mRNA的翻译异常终止。同时, 实时定量PCR结果显示, 精氨酸甲基转移酶家族其他成员Prmt2, Carm1和Prmt6 mRNA表达不受影响。**结论** 成功获得特异性敲除Prmt1的E14细胞系, 为研究Prmt1在胚胎干细胞中的作用提供了重要工具。

关键词 CRISPR – Cas9 Prmt1 小鼠胚胎干细胞

中图分类号 R393

文献标识码 A

DOI 10.11969/j. issn. 1673-548X. 2015. 12. 006

Establishment of Prmt1 Knockout Mouse Embryonic Stem Cell Lines Using the CRISPR – Cas9 System. Cai Yun, Yang Guanghui, Zhang Ye. Institute of Basic Medical Sciences, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100005, China

Abstract Objective To establish and confirm Prmt1 knockout mouse embryonic stem cell lines. **Methods** Following instructions of CRISPR – Cas9 system manual, four guide RNAs targeting Prmt1 exon4, exon5, exon6 and exon7 were designed. The gRNA combinations were then transfected into E14 cells. Cell lines were selected and verified from protein, mRNA and genome levels. **Results** Compared with the control group, Prmt1 protein and mRNA were not detected in both knockout groups. Genome sequencing proved that non-sense mutations occurred in Prmt1 mRNA, which further led to the abnormal translation termination. Meanwhile, quantitative PCR results showed that expression of other members of protein arginine methyltransferases, Prmt2, Carm1 and Prmt6, were not affected. **Conclusion**

Prmt1 knockout E14 cell lines were successfully established, which provided important tools for the study of Prmt1 in mouse embryonic stem cells.

Key words CRISPR – Cas9; Prmt1; Mouse embryonic stem cells

基因编辑技术, 是指对DNA的核苷酸进行插入、置换和删除等操作, 从而特异性的去改写DNA图谱的技术。基因编辑技术是基因功能研究的重要手段, 也是遗传学和分子生物学的重要研究方向。Zinc – Finger Nucleases (ZFNs) 和 Transcription Activator – Like Effector Nucleases (TALENs) 是基因编辑技术的重大突破, 它们允许实验者针对特定的DNA序列, 设计识别蛋白, 完成相应序列的编辑操作^[1,2]。Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISPR) – Cas9 技术是近几年发展起来的一种新

的基因编辑技术, 利用一段guide RNA(gRNA), 指导Cas9对靶序列的特异性切割。相比ZFN和TALEN, CRISPR – Cas9系统操作简便、成功率高、细胞毒性小, 因此被越来越多的用于分子生物学研究^[3]。

精氨酸甲基转移酶1(protein arginine methyltransferase 1, PRMT1)是哺乳动物体内含量最高、分布最广泛的精氨酸甲基转移酶, 其活性占全部精氨酸甲基转移酶活性的85%以上^[4]。Prmt1在蛋白质翻译后修饰中起着非常重要的作用, 它可以催化甲基基团从腺苷甲硫氨酸转移到精氨酸的胍基上, 完成精氨酸单甲基化和不对称的双甲基化修饰^[5]。Prmt1是小鼠胚胎发育所必须的。文献报道, Prmt1纯合突变(Prmt1^{-/-})小鼠在妊娠6.5天胚胎死亡^[6]。但是, Prmt1在小鼠胚胎发育过程中发挥着怎样的作用, 其具体的调控机制是怎样的, 至今仍不清楚。利用CRISPR – Cas9系统, 本研究成功构建了Prmt1敲除

基金项目:国家自然科学基金资助项目(90919048);国家教育部博士点基金资助项目(20111106110024)

作者单位:100005 中国医学科学院基础医学研究所/北京协和医学院基础学院生物化学与分子生物学系

通讯作者:张业,电子信箱:yezhang@pumc.edu.cn

的小鼠胚胎干细胞系,为进一步研究 Prmt1 在胚胎发育中的作用提供了重要工具。

材料与方法

1. 试剂:限制性内切酶 BbsI 为 New England Biolabs 公司产品;T4 DNA 连接酶为 TaKaRa 公司产品。M - MLV 反转录酶及 Trizol 试剂为 Invitrogen 公司产品;SYBR Premix Ex Taq 为 Promega 公司产品;DNA 分子质量标准 DL2000,λ HindⅢ为 TaKaRa 公司产品;细胞转染试剂 LipofectamineTM 2000 为 Invitrogen 公司产品,VigoFect 为威格拉斯生物技术公司产品;辣根过氧化物酶标记的抗鼠 IgG 和抗兔 IgG 为 MBL 公司产品;嘌呤霉素为 Sigma 公司产品。

2. 质粒:Cas9 和 guide RNA 表达质粒 pX330 由本所李利民课题组惠赠;PRMT1 guide RNA 表达质粒 pX330 - Prmt1 - exon4、pX330 - Prmt1 - exon5、pX330 - Prmt1 - exon6、pX330 - Prmt1 - exon7 及对照质粒 pX330 - control1、pX330 - control 2 均由本课题组构建。

3. 细胞:HEK293T 为本课题组保存的细胞株;小鼠胚胎干细胞系 E14 由中国科学院生物物理研究所李国红课题组馈赠。

4. Prmt1 single guide RNA (sgRNAs) 的设计:在线设计软件;<http://gt-scan.braembl.org.au/gt-scan/submit>; <http://crispr.mit.edu/> 根据软件输出结果,在 Prmt1 基因上合适的位置设计相应的 sgRNA。

5. 质粒的构建:参照 guide RNA 序列合成多个 25bp 左右的单链 DNA。将相应 DNA 单链退火,形成双链,并用 T4 连接酶,连入经 Bbs I 酶切的 pX330 空载质粒。将连接产物转化感受态细胞,于 37℃ 倒置培养过夜。挑取单克隆,接种于 5ml LB 培养基(含 100mg/ml 氨苄青霉素钠),37℃ 200r/min 振荡培养过夜,参照质粒 DNA 的小量制备试剂盒,提取质粒,送测序进行验证,获取阳性克隆。将阳性克隆大量扩增,大量制备质粒 DNA。

6. 细胞培养:HEK293T 细胞培养于 DMEM 培养基(含 10% 胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100U/ml 链霉素);E14 细胞培养于 KnockoutTM DMEM 培养基(含 15% 胎牛血清,添加 Glutamine、核苷酸、非必需氨基酸、β - 羟基乙醇、青链霉素、LIF);培养条件均为 5% CO₂、37℃。

7. 细胞转染:按照相应的产品说明书进行。

8. 基因组 DNA 的提取:收集 1 × 10⁷ 细胞,加入 500μl 裂解缓冲液 (100mmol/L NaCl,10mmol/L Tris - HCl pH 8.0,0.5% SDS,25mmol/L EDTA,20μg/ml RNase),37℃ 水浴 1h。加入蛋白酶 K 至终浓度 100mg/ml,50℃ 水浴 12~18h,期间不断震荡裂解液以促进蛋白质消化完全。酚抽提 1 次,氯仿/异戊醇抽提 1 次。向抽提后的溶液中加入 0.5 倍体积的 7.5mol/L 乙酸铵和 2 倍体积的乙醇沉淀基因组 DNA。70% 乙醇洗涤沉淀 2 次,将基因组 DNA 溶于 TE 并 4℃ 保存。

9. 细胞总 RNA 的制备,反转录和实时定量 PCR:收集细胞,离心弃上清,加入 1ml Trizol,吹打均匀。加 1/5 体积氯仿 (200ml),振荡混匀,4℃ 12000 × g 离心 15min。取 500μl 上

清,加等体积异丙醇,4℃ 12000 × g 离心 10min。75% 乙醇洗两次,8000 × g 离心 2min,弃上清,20~60μl DEPC 水溶解。取上述 RNA 2μg 进行反转录,获得 cDNA。将获得的 cDNA 稀释 10 倍后,在 Rotor - Gene RG - 3000A (Corbett Research) 上进行实时定量 PCR,以每个样品组的目的基因/管家基因的比值代表相应基因的表达水平。实验中用到的引物有:GAPDH:上游引物:5' - GAAGGTGAAGGTCGGAGTC - 3';下游引物:5' - GAAGATGGTATGGGATT - 3'。Prmt1:上游引物:5' - CCGCAAGGTTATTGGGATT - 3';下游引物:5' - CAGCACGGT-GTTGACCAT - 3'。Prmt3:上游引物:5' - CGCATCTGTTGTT-GAGAAGTT - 3';下游引物:5' - TGCCCATAAGGAGCTGAAGTA - 3'。Carm1:上游引物:5' - GTTTCAAGTGCTCGGT - 3';下游引物:5' - GTTCTGCTGCTGGGATAGGT - 3'。Prmt6:上游引物:5' - CCAGGTGAAGCAGCACTATG - 3';下游引物:5' - TGAAACCAGACGGCCAAAC - 3'。

10. Western blot 法检测:取适量全细胞抽提物,加入 SDS loading buffer,混匀后 100℃ 变性 5min。SDS - PAGE 凝胶电泳分离蛋白,将胶上的蛋白质电转印至硝酸纤维素膜,用 5% 脱脂奶粉室温封闭硝酸纤维素膜 1h,一抗 4℃ 孵育过夜,用 HRP 标记的二抗室温杂交 1h,ECL 法显影检测蛋白表达。实验中用到的一抗及货号如下:FLAG (Sigma, F3165),GAPDH (Santa Cruz Biotech, sc - 166574),PRMT1 (Cell signalling, Tech07 - 404),HSP90α (Aassy designs, SPS - 771)。

11. 统计学方法:采用 SPSS 18.0 软件,数据用 t 检验,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. pX330 - Prmt1 knockout 质粒构建:通过分析小鼠 Prmt1 基因结构图(图 1),笔者针对 Prmt1 第 4 外显子,第 5 外显子,第 6 外显子和第 7 外显子设计了 4 对特异的 guide RNA (gRNA),并合成相应的 DNA 片段,每条约 25bp。同时设计两对不靶向任何哺乳动物基因组序列的 gRNA^[7],作为对照(所有 sgRNA 对应的 DNA 序列如表 1 所示)。将相应的 DNA 片段两两组合,退火得到双链,分别记作 pX330 - Prmt1 - E4、pX330 - Prmt1 - E5、pX330 - Prmt1 - E6、pX330 - Prmt1 - E7,与 Bbs I 酶切得到的线性化 pX330 质粒连接,得到 pX330 - Prmt1 gRNA 表达质粒,亦即 Prmt1 knockout 质粒。重组质粒转染 HEK293T 细胞后,Western blot 法检测分析,证明这些质粒可以正常表达(图 2)。

2. Prmt1 敲除的小鼠胚胎干细胞 E14 细胞系的构建:笔者将构建得到 4 个 pX330 - Prmt1 gRNA 表达质粒两两组合,即 pX330 - Prmt1 - E4 和 pX330 - Prmt1 - E6 一组,记为 Prmt1 - KO1,pX330 - Prmt1 - E5 和 pX330 - Prmt1 - E7 一组,记为 Prmt1 - KO2,两

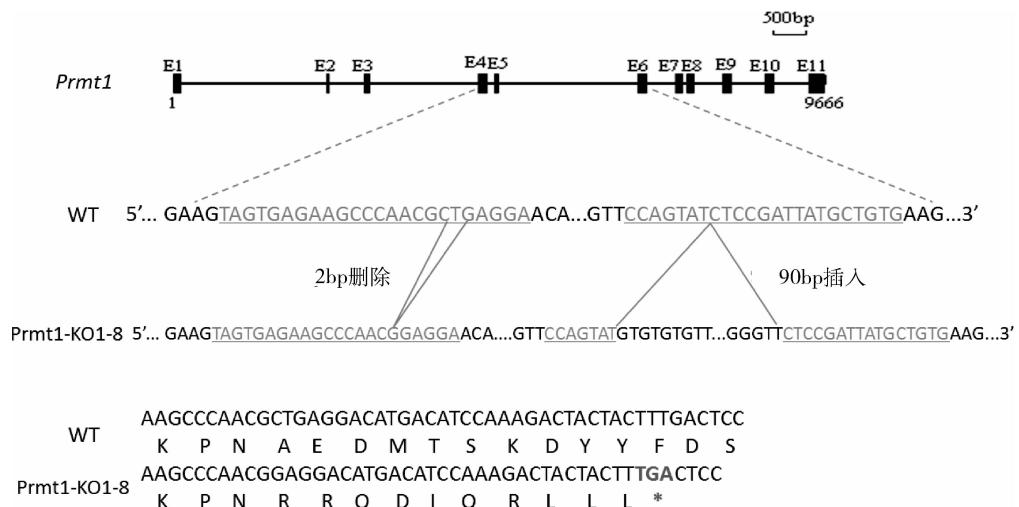


图 1 Prmt - KO1 8 号克隆中 Prmt1 基因序列的变化

Prmt1 第 4 外显子缺失 2bp, 第 6 外显子 6 插入 90bp(上); 由于第 4 外显子缺失 2 个碱基, 蛋白翻译很快终止(下)。Guide RNA 对应序列用下划线标出

表 1 针对 Prmt1 外显子设计的特异性 sgRNAs 和对照 sgRNAs 序列

名称	序列(5' - 3')
Prmt1 - exon4 - S	5' - CACCGTAGTGAGAACGCCAACGCTG - 3'
Prmt1 - exon4 - AS	5' - AAACCAACGGCTGGGCTTCACTAC - 3'
Prmt1 - exon5 - S	5' - CACCGGGGGGGCCCGAACAGTTATT - 3'
Prmt1 - exon5 - AS	5' - AAACATAACCTTGGGGCCCCCGC - 3'
Prmt1 - exon6 - S	5' - CACCGCACAGCATAATCGGAGATAC - 3'
Prmt1 - exon6 - AS	5' - AAACGTATCTCGATTATGCTGTGC - 3'
Prmt1 - exon7 - S	5' - CACCGAACACCGTGCTGCACGCTC - 3'
Prmt1 - exon7 - AS	5' - AAACGAGCGTGCAGCACGGTGTGC - 3'
Control1 - S	5' - CACCG CTTACAATCGTCGGTCAAAT - 3'
Control1 - AS	5' - AAACATTGGACCGACGATTGTAAG - 3'
Control2 - S	5' - CACCGGGCTGGTCCCGGGTTACCC - 3'
Control2 - AS	5' - AAACGGGTAACCCGGACGCACGC - 3'

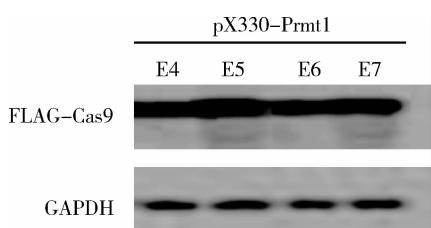


图 2 Western blot 法检测 pX330 - Prmt1 gRNA 表达质粒在 HEK293T 细胞中的表达情况

一个对照质粒一组。3 组质粒分别与含有嘌呤霉素抗性基因的质粒, 共转染 E14 细胞。转染 12h 后, 加入 1.5 μg/μl 嘌呤霉素进行筛选, 48~72h 后, 将细胞按每孔 500 个细胞的浓度接种到 6 孔板, 待细胞长成肉眼可见的克隆后, 挑取单克隆, 扩大培养, 进行验证。

3. Prmt1 敲除的 E14 细胞系的验证: 笔者分别从蛋白质水平, mRNA 水平和基因组水平来验证挑取的单克隆是否成功敲除 Prmt1 基因。首先, 笔者用 Western blot 法分析了 3 组实验中各克隆 Prmt1 蛋白的表达情况。结果显示, 对照组中各克隆均可检测到 Prmt1 的高水平表达; 在 Prmt - KO1 实验组中编号为 8、12、14、16、20、23、24 的克隆检测不到 Prmt1 蛋白表达, 编号 1~7、9、10、11、13、15、17、18、19、21 和 22 的克隆检测到 Prmt1 蛋白表达或出现异常的蛋白条带; 在 Prmt - KO2 实验组中编号为 1、7、9 的克隆中检测不到 Prmt1 表达, 编号为 2、3、4、5、14 的克隆检测到 Prmt1 蛋白表达, 编号为 6、8、10、11、13 的单克隆细胞出现了异常的蛋白条带(图 3)。根据 Western blot 法检测结果, 笔者选取了对照组的 1 号和 2 号, Prmt1 - KO1 实验组的 8、12 和 24 号, Prmt1 - KO2 实验组的 1、7 和 9 号克隆, 进一步进行实时定量 PCR 检测。结果显示, 与实验组相比, Prmt1 - KO1 实验组的 8 号克隆, Prmt1 - KO2 实验组的 1、7 和 9 号克隆几乎检测不到 Prmt1 的转录; 而 Prmt1 - KO1 实验组的 12 和 24 号克隆仍可检测到 Prmt1 的转录(图 4)。

根据以上实验结果, 笔者选取 Prmt1 - KO1 实验组中编号为 8 的克隆(Prmt1 - KO1 - 8)和 Prmt1 - KO2 实验组中编号为 1 的克隆(Prmt1 - KO2 - 1), 进行扩大培养, 并对 Prmt1 的敲除情况进行了进一步的鉴定和分析。基因组序列分析结果显示, 两敲除实验组中 E14 细胞 Prmt1 基因均发生了不同程度的改变。Prmt - KO1 8 号克隆中, Prmt1 基因第 4 外显子缺失

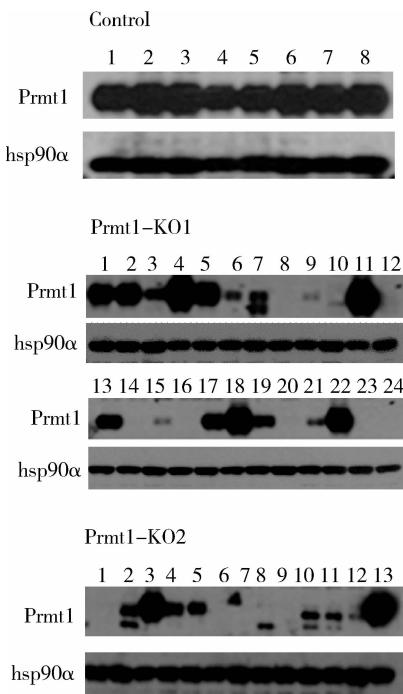


图 3 Western blot 法检测各克隆中 Prmt1 蛋白的表达情况
从上到下分别为对照组、Prmt1 - KO1 实验组和 Prmt1 - KO2 实验组，
各克隆以阿拉伯数字进行编号区分

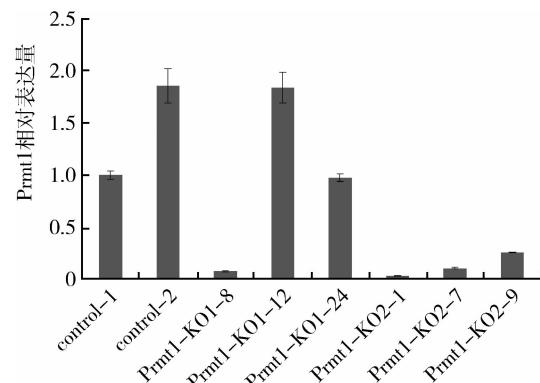


图 4 实时定量 PCR 检测各克隆中
Prmt1 mRNA 的表达水平

从左到右分别为对照组 1 号和 2 号克隆, Prmt1 - KO1 实验组 8、
12 和 24 号克隆, Prmt1 - KO2 实验组 1、7 和 9 号克隆

2bp, 第 6 外显子插入了 90bp; 该基因转录后, 进行蛋白质翻译时, 第 4 外显子缺失的 2 个碱基会导致蛋白质翻译迅速终止(图 1), 从而检测不到 Prmt1 蛋白的表达。而在 Prmt1 - KO2 1 号克隆中, 基因序列显示 Prmt1 第 5 外显子缺失 17bp, 第 7 外显子插入 4bp, 同样导致 Prmt1 蛋白翻译时, 很快就被异常终止(图 5)。

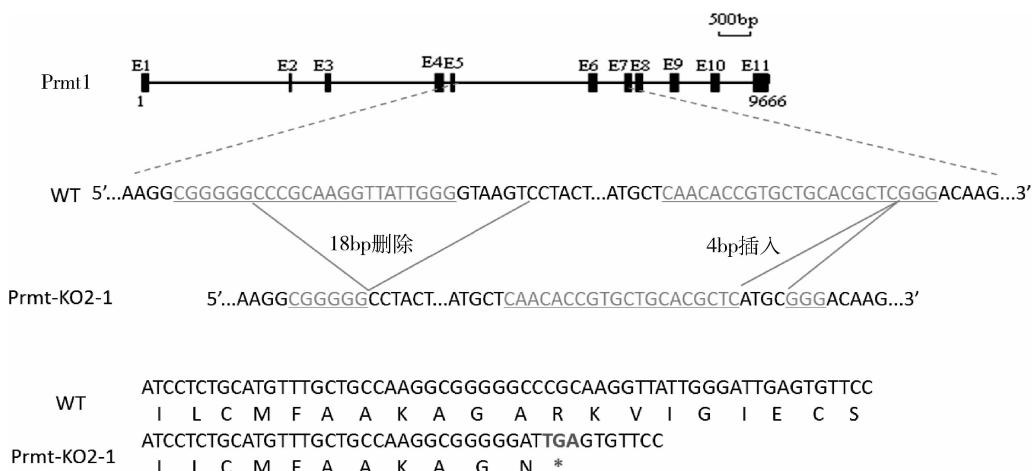


图 5 Prmt1 - KO2 1 号克隆中 Prmt1 基因序列的变化

Prmt1 第 5 外显子缺失 17bp, 第 7 外显子插入 4bp(上); 第 5 外显子碱基缺失导致蛋白翻译异常终止(下)。

Guide RNA 对应序列用下划线标出

此外, 利用实时定量 PCR 技术, 笔者进一步检测了两个克隆中, 精氨酸甲基转移酶家族中其他成员 Prmt3、Carm1 和 Prmt6 的 mRNA 水平。与对照组相比, 两个克隆中 3 个基因的 mRNA 水平均未发生明显变化, 表明 Prmt1 被特异性的敲除(图 6)。

至此, 笔者成功获得了特异性敲除 Prmt1 的两个 E14 细胞系, 为进一步研究 Prmt1 在胚胎干细胞中的

功能提供了有力的工具。

讨 论

CRISPR - Cas9 是最近发展起来的新一代基因编辑技术, 相比之前使用的 ZFN 和 TALEN 技术, CRISPR - Cas9 系统有着一些无可比拟的优点。首先, CRISPR - Cas9 系统操作简便。ZFN 系统和 TALEN 系统, 借助蛋白完成 DNA 序列的识别, 识别

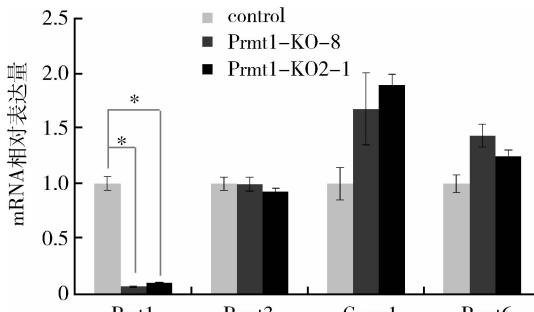


图 6 Prmt1 敲除的 E14 细胞系中 Prmt1、Prmt3、Carm1 和 Prmt6 的 mRNA 表达水平

* P < 0.01

蛋白相对分子质量大,其表达质粒的构建难度很高,往往要求助商业公司进行定制;CRISPR - Cas9 只需表达 20bp 左右的 RNA,即可完成靶序列的识别,操作简便,适于分子实验室独立开展^[8]。其次,CRISPR - Cas9 系统打靶效率高。根据实验方法和靶细胞的不同,ZFN 的基因打靶效率为 1% ~ 30%^[9,10]。经改进后,TALEN 应用于卵细胞基因打靶时,效率可达到 30% 左右^[11]。最近的研究报道指出,利用 CRISPR - Cas9 系统,有科学家在小鼠胚胎干细胞中实现了 78% 的打靶效率^[12]。就笔者的实验而言,尽管没有进行特别的优化,获得 Prmt1 双等位基因敲除细胞克隆的成功率也已超过 30%。最后,由于操作步骤更简单,CRISPR - Cas9 对靶细胞的毒性更小。正是基于以上原因,CRISPR - Cas9 正逐渐替代 ZFN 和 TALEN,成为分子生物学家广泛使用的研究工具。许多科研团队,利用它完成了目标基因的删除、激活、抑制或者修饰等操作,进一步证实了 CRISPR - Cas9 技术的广泛适用性^[3]。

为了研究 Prmt1 在胚胎发育中的作用,本研究利用 CRISPR - Cas9 系统,成功构建了 Prmt1 敲除的小鼠胚胎干细胞系。初步获得 Prmt1 敲除细胞系后,分别从蛋白质水平、mRNA 水平和基因组水平进行验证和分析。结果显示,Prmt1 敲除的细胞中检测不到 Prmt1 mRNA 或蛋白的表达,Prmt1 基因序列发生了特异性的缺失,导致 Prmt1 蛋白表达异常终止。实时定量 PCR 结果则表明,Prmt1 敲除细胞系中,精氨酸甲基转移酶家族其他成员 Prmt2、Carm1 和 Prmt6 mRNA 表达水平与对照组相比基本没有变化,证明 CRISPR - Cas9 介导的 Prmt1 敲除过程具有高度的特异性。

Prmt1 是哺乳动物中最重要的甲基转移酶,可以催化底物的精氨酸残基发生单甲基化或非对称双甲

基化。Prmt1 最早被证明可以催化组蛋白 H4 第 3 位精氨酸残基的甲基化,继而促进 H4 的乙酰化及基因的转录激活^[13]。此外,H4 还可以甲基化 H3R2、H3R17、H3R26,激活靶基因的表达^[5]。Prmt1 也可以催化很多非组蛋白底物的甲基化,例如,Prmt1 可以甲基化 Sam68、MRE11、BTG/TOB 等转录因子,进而参与 RNA 代谢,DNA 损伤修复,细胞信号转导等过程^[14~16]。Prmt1 是胚胎发育所必需的,Prmt1 缺失会导致小鼠胚胎死亡。有证据提示,Prmt1 可以调控 RA 受体的表达,进而影响神经分化过程^[17]。RA 受体也参与多能性基因的调控和胚胎发育过程,所以 Prmt1 影响 RA 表达,可能是其调控胚胎发育的一个证据。此外,笔者观察到,Prmt1 敲除后,细胞生长发生一定程度的阻滞,这可能与 Prmt1 维持基因组完整性的功能有关。

此外,基因组范围内组蛋白 H4R3 甲基化的分布分析,也为 Prmt1 潜在靶基因的确认提供了重要的提示^[18]。尽管已有的文献提供了一些暗示,但 Prmt1 调控胚胎发育的分子机制,至今仍缺乏全面深入的报道。Prmt1 敲除的胚胎干细胞系的获得,为笔者系统分析 Prmt1 的靶基因,研究其在胚胎发育中的作用机制,提供了有力的工具。

参考文献

- Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases [J]. *Genetics*, 2011, 188 (4): 773 - 782
- Boch J, Scholze H, Schornack S, et al. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors [J]. *Science*, 2009, 326: 1509 - 1512
- Hsu P, Lander E, Zhang F. Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157: 1262 - 1278
- Tang J, Frankel A, Cook R, et al. PRMT1 is the predominant type I Protein arginine methyltransferase in mammalian cells [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275: 7723 - 7730
- Bedford MT, Clarke SG. Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why [J]. *Mol Cell*, 2009, 33: 1 - 13
- Pawlak MR, Scherer CA, Chen J, et al. Argining N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable [J]. *Mol Cell Biol*, 2000, 20 (13): 4859 - 4869
- Ophir S, Neville E, Ella H, et al. Genome-Scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells [J]. *Science*, 2014, 3: 84 - 87
- Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering [J]. *Trends Biotechnol*, 2013, 31 (7): 397 - 405
- Pruett-Miller SM, Connelly JP, Maeder ML, et al. Comparison of zinc finger nucleases for use in gene targeting in mammalian cells [J]. *Mol Ther*, 2008, 16 (4): 707 - 717

(下转第 29 页)

气道炎症。吸入性糖皮质激素是目前控制气道炎症的最有效药物,相较于全身激素使用(包括口服或静脉),具有局部药物浓度高、用量少、不良反应小等优点。目前对吸入性糖皮质激素控制气道炎症的作用机制研究已有极大的肯定,并且认为其具有一定防止气道重塑的作用,但其作用机制尚未明确,尤其是后者。Bos 等^[12]研究发现布地奈德可以降低气道的高反应性,防止气道平滑肌层的增厚,阻止黏液腺的肥大,下调收缩蛋白的表达,显著抑制哮喘气道重塑,而对平滑肌刺激的减少可能会使其分泌 TGF-β1 量下降。Kumar 等^[13]研究表明,地塞米松可以通过制嗜酸性粒细胞在上皮内的积累,抑制慢性炎性细胞在气道固有层的积累,下调小鼠上皮下 TGF-β1 的表达,逆转皮下胶原化和上皮肥大。本实验中布地奈德干预后的大鼠肺组织的 OPN 蛋白及 OPN mRNA 的表达均哮喘组较显著降低,其 Wam、Wat 亦较哮喘组显著下降,揭示布地奈德具有拮抗气道重塑的作用,其作用可能与下调哮喘大鼠肺组织 OPN 的表达有关。当然,布地奈德对哮喘气道重塑的抑制作用及机制复杂,还有待于进一步研究。

参考文献

- Zhang WX, Li CC. Airway remodeling: a potential therapeutic target in asthma [J]. World J Pediatr, 2011, 7(2): 124–128
- Morimoto J, Kon S, Matsui Y, et al. Osteopontin: as a target molecule for the treatment of inflammatory diseases [J]. Curr Drug Targets, 2010, 11(4): 494–505
- Konno S, Kurokawa M, Uede T, et al. Role of osteopontin, a multifunctional protein, in allergy and asthma [J]. Clin Exp Allergy, 2011, 41(10): 1360–1366
- Takahashi A, Kurokawa M, Konno S, et al. Osteopontin is involved in mi-

gration of eosinophils in asthma [J]. Clin Exp Allergy, 2009 (39): 1152–1159

- Puxeddu I, Berkman N, Ribatti D, et al. Osteopontin is expressed and functional in human eosinophils [J]. Allergy, 2010, 65(2): 168–174
- Guan XJ, Zhang WX, Li CC, et al. The role of external signal regulated kinase and transforming growth factor β1 in asthma airway remodeling and regulation of glucocorticoids [J]. Med J China, 2007, 87(25): 1767–1772
- Zhang WX, Liang YF, Wang XM, et al. Urotensin upregulates transforming growth factor-β1 expression of asthma airway through ERK-dependent pathway [J]. Mol Cell Biochem, 2012, 364(1–2): 291–298
- Nagasaka A, Matsue H, Matsushima H, et al. Osteopontin is produced by mast cells and affects IgE-mediated degranulation and migration of mast cells [J]. Eur J Immunol, 2008, 38(2): 489–499
- Simoes DC, Xanthou G, Petrochilou K, et al. Osteopontin deficiency protects against airway remodeling and hyperresponsiveness in chronic asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2009, 179(10): 894–902
- Kohan M, Breuer R, Berkman N. Osteopontin induces airway remodeling and lung fibroblast activation in a murine model of asthma [J]. Am J Respir Cell Mol Biol, 2009, 41(3): 290–296
- Anemitsu Y, Ito I, Niimi A, Izuhara K, et al. Osteopontin and periostin are associated with a 20-year decline of pulmonary function in patients with asthma [J]. Am J Respir Crit Care Med, 2014, 190(4): 472–474
- Bos IS, Gosens R, Zuidhof AB, et al. Inhibition of allergen-induced airway remodelling by tiotropium and budesonide: a comparison [J]. Eur Respir J, 2007, 30(4): 653–661
- Kumar RK, Herbert C, Thomas PS, et al. Inhibition of inflammation and remodeling by roflumilast and dexamethasone in murine chronic asthma [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 307(1): 349–355

(收稿日期:2015-05-12)

(修回日期:2015-06-11)

(上接第 22 页)

- Cui X, Ji D, Fisher DA, et al. Targeted integration in rat and mouse embryos with zinc-finger nucleases [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(1): 64–67
- Mashimo T, Kaneko T, Sakuma T, Kobayashi J, et al. Efficient gene targeting by TAL effector nucleases coinjected with exonucleases in zygotes [J]. Sci Rep, 2013, 3: 1253
- Zhou J, Wang J, Shen B, et al. Dual sgRNAs facilitate CRISPR/Cas9 mediated mouse genome targeting [J]. FEBS J, 2014, 281(7): 1717–1725
- Wang H, Huang ZQ, Xia L, et al. Methylation of histone H4 at arginine 3 facilitating transcriptional activation by nuclear hormone receptor [J]. Science, 2001, 293(5531): 853–857
- Jocely C, Francois MB, Marie CB, et al. Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1

[J]. Mol Biol Cell, 2003, 14: 274–287

- Francois MB, Ugo D, Jean YM, et al. Arginine methylation of MRE11 by PRMT1 is required for DNA damage checkpoint control [J]. Genes Dev, 2005, 19: 671–676
- Cyril B, Fabienne G, Valerie R, et al. Interaction of PRMT1 with BIG/TOB proteins in cell signalling: molecular analysis and functional aspects [J]. Genes Cells, 2002, 7: 29–39
- Simandi Z, Czipa E, Horvath A, et al. PRMT1 and PRMT8 regulate retinoic acid-dependent neuronal differentiation with implications to neuropathology [J]. Stem Cells, 2015, 33: 726–741
- Balint BL, Gabor P, Nagy L. Genome-wide localization of histone 4 arginine 3 methylation in a differentiation primed myeloid leukemia cell line [J]. Immunobiology, 2005, 210(2–4): 141–152

(收稿日期:2015-03-26)

(修回日期:2015-04-03)