

利用 CRISPR/Cas9 技术构建 ALK7^{LoxP/LoxP} 小鼠品系

赵强¹, 刘灯泉¹, 李毅辉², 戴红艳¹, 唐梦熊³, 管军¹

(1. 青岛大学附属青岛市市立医院心内科, 山东省青岛市 266000; 2. 山东大学齐鲁医院重症医学科, 山东省济南市 250012; 3. 山东大学齐鲁医院急诊科, 山东省济南市 250012)

[关键词] CRISPR/Cas9; 活化素受体样激酶 7 基因; LoxP 序列; 组织特异性敲除

[摘要] 目的 利用 CRISPR/Cas9 技术将 LoxP 序列靶向导入小鼠活化素受体样激酶 7 (ALK7) 基因, 构建 ALK7^{LoxP/LoxP} 小鼠, 与组织特异性 Cre 小鼠杂交, 获得时空特异性 ALK7 基因敲除小鼠, 为研究 ALK7 在特定时间特定组织中的功能奠定基础。方法 利用 CRISPR/Cas9 技术编辑小鼠 ALK7 基因; 设计合成识别 ALK7 基因外显子 4-6 上下游非编码序列的 sgRNA。设计并合成 LoxP-ALK7-LoxP 打靶载体, 测序正确后, 显微注射法将体外合成的 sgRNA、Cas9 mRNA 和打靶载体注射到小鼠受精卵, 移植受精卵至假孕小鼠输卵管代孕。获得仔鼠后通过 PCR、Southern blot 鉴定子代小鼠基因型, 实时荧光定量 PCR、Western blot 检测 ALK7 转录表达水平。结果 获得了含有目的基因的打靶阳性小鼠, 并且插入的 LoxP 序列不影响 ALK7 的转录表达水平。结论 利用 CRISPR/Cas9 技术成功将 LoxP 序列靶向引入小鼠 ALK7 基因, 成功构建 ALK7^{LoxP/LoxP} 小鼠品系, 为进一步构建组织特异性 ALK7 基因敲除小鼠模型奠定了基础。

[中图分类号] Q81;R5

[文献标识码] A

Establishment of ALK7^{LoxP/LoxP} mouse by CRISPR/Cas9

ZHAO Qiang¹, LIU Dengquan¹, LI Yihui², DAI Hongyan¹, TANG Mengxiong³, GUAN Jun¹

(1. Department of Cardiology, Affiliated Qingdao Municipal Hospital of Qingdao University, Qingdao, Shandong 266000; 2. ICU, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250012; 3. Department of Emergency, Qilu Hospital of Shandong University, Jinan, Shandong 250012, China)

[KEY WORDS] CRISPR/Cas9; ALK7 gene; LoxP sequence; tissue-specific knockout

[ABSTRACT] **Aim** To generate mutant mouse with ALK7 gene inserted by LoxP sequences by CRISPR/Cas9, to further develop temperospatial specific ALK7 deleted mouse models via cross bred with the tissue-specific Cre mouse, providing a basis for functional study of ALK7 in special time and tissue. **Methods** The CRISPR/Cas9 technology was used to edit ALK7. Two sgRNAs were designed to direct Cas9 endonuclease cleavage in intron 3-4 and intron 6-7. The targeting vector with LoxP-ALK7-LoxP sequence was designed. sgRNA, Cas9 mRNA and targeting vector were co-injected into zygotes, which were transferred to pseudopregnant mice. The pups were genotyped by PCR and Southern blot. Real-time PCR and Western blot were performed for analysis of the expression of ALK7. **Results** The ALK7^{LoxP/LoxP} mouse was generated by CRISPR/Cas9, and did not show influence on the expression of ALK7. **Conclusion** The CRISPR/Cas9 technology can successfully generate the ALK7^{LoxP/LoxP} mouse by inserting LoxP sequence into ALK7 gene, which is a basis for the creation of tissue-specific ALK7 deleted mouse models.

糖尿病心血管病变是糖尿病患者致死致残的主要原因^[1-2]。近年发现, 糖尿病心血管病变与糖尿病脂肪组织分泌功能模式改变密切相关。糖尿病状态下, 脂肪组织中脂联素等抗炎因子分泌减

少, 白细胞介素 6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein-1, MCP-1) 等炎性因子分泌增加, 使糖尿病患者血管呈现一种

[收稿日期] 2018-08-08

[修回日期] 2018-09-26

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81670411)

[作者简介] 赵强, 硕士研究生, 研究方向为心血管疾病与动脉粥样硬化, E-mail 为 ZhaoQiangDoc@163.com。通信作者管军, 博士, 主任医师, 博士研究生导师, 研究方向为冠心病的诊断及介入治疗, E-mail 为 guanjun@medmail.com.cn。

慢性、低度的炎症状态,影响血管功能和结构,导致血管重构^[3-4]。然而,调节糖尿病脂肪组织分泌模式改变,影响糖尿病血管重构的因素尚未阐明。

活化素受体样激酶7(activin receptor-like kinase 7, ALK7)是新近发现的糖尿病血管与脂肪功能调控因子,ALK7是从人胎盘克隆出的 Activin 受体家族新成员,也是转化生长因子 β (transforming growth factor- β , TGF- β)超家族 I 型受体之一^[5]。目前已知 ALK7 可通过 Nodal、Activin A、GDF 等配体激活 Smads、GDF3 等信号通路,参与细胞增殖、分化、凋亡、黏附等调控^[6-9]。最近研究报道 ALK7 基因 SNP rs13010956 基因多态性与代谢综合征患者颈动脉内膜中膜厚度相关^[10]。除此之外,动物研究发现,ALK7 被抑制后糖尿病大鼠主动脉纤维化减轻^[11]。ALK7 在脂肪组织高表达,具有相对脂肪组织特异性,参与脂肪细胞增殖、分化和活性的调控^[12-14]。因此,我们推测 ALK7 可能是调控糖尿病脂肪与血管重构的重要桥梁分子。但对于 ALK7 在糖尿病脂肪与血管组织中相互的作用及作用机制尚不清楚,因此通过构建时空与组织特异性敲除 ALK7 的小鼠,有助于研究 ALK7 在糖尿病脂肪与血管病变中的分子机制,从而为糖尿病血管病变病理机制与治疗方法提供理论依据。

利用成簇、规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)相关技术编辑是近年来兴起的一项核酸编辑技术,CRISPR 基因编辑工具来源于细菌对外源性核酸的免疫反应,主要由 CRISPR RNA(crRNA)、反式激活 crRNA(trans-activating crRNA, tracrRNA)和 CRISPR 相关(CRISPR associated, Cas)基因表达的 Cas9 蛋白组成,又称为 CRISPR/Cas9 系统^[15]。Jinek 等^[16]将 crRNA 和 tracrRNA 的功能合二为一,融合成为单导向 RNA(single guide RNA,

sgRNA),进一步简化了 CRISPR/Cas9 系统,提高了编辑效率。

本研究中,我们利用 CRISPR/Cas9 技术将 LoxP-ALK7-LoxP 打靶载体与小鼠受精卵基因组靶向重组,构建 ALK7^{LoxP/LoxP} 小鼠品系。在此基础上,通过与组织特异性 Cre 小鼠杂交获得组织特异性 ALK7 基因敲除小鼠模型,为构建组织特异性 ALK7 基因敲除小鼠模型奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料

4 周龄 SPF 级 C57BL/6J 小鼠购自山东大学实验动物中心。所有实验用小鼠均在 SPF 级动物房饲养与繁殖。温度控制在 22 ℃,湿度 70%,自动光控(12 h 明/12 h 暗),自由采食和饮水。质粒小提试剂盒、DNA 提取试剂盒、PCR 试剂盒购自 TIAN-GEN。sgRNA、Cas9 mRNA 及供体载体由南京大学南京生物医药研究院合成。

1.2 实验流程

将打靶载体、sgRNA、Cas9 mRNA 显微注射到小鼠受精卵,利用 CRISPR/Cas9 系统对小鼠受精卵 ALK7 基因的两个位点进行切割,造成双链断裂。当细胞启动同源重组的修复方式时,借助打靶载体在切割位点引入 2 个 LoxP 序列,得到 ALK7^{LoxP/LoxP} 受精卵,移植受精卵获得 F0 代鼠,通过 PCR 测序以及 Southern blot 验证阳性小鼠;将阳性 F0 代小鼠和背景鼠回交得到 F1 代。通过 PCR 及测序验证 F1 代中阳性小鼠。获得 ALK7 FLoxP^{+/-} 小鼠,随后通过杂交培育出 ALK7 FLoxP^{+/+} 小鼠。培育成功的小鼠与脂肪组织特异性 Cre 打靶小鼠交配,子代中 Cre 酶的表达可以特异性敲除 2 个 LoxP 序列之间的基因片段,即条件性敲除 ALK7 等位基因(图 1)。

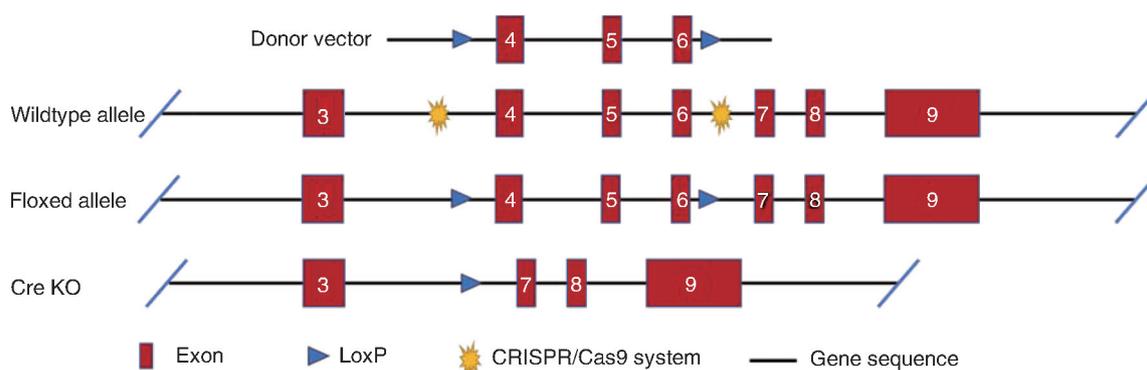


图 1. 通过 CRISPR-Cas9 构建 ALK7^{LoxP/LoxP} 示意图

Figure 1. Diagram of ALK7^{LoxP/LoxP} gene generated via CRISPR-Cas9

1.3 sgRNA 的设计和合成

参考美国国立信息技术中心的数据库(NIH)中小鼠 ALK7 基因序列。应用麻省理工学院的 CRISPR Design 工具 <http://crispr.mit.edu/> 设计 2 个 sgRNA: 5'-CTTTAGCCCTGTCTCC-AGG-3', 5'-GT-GTTAGAGTTCCGAGG-TGG-3' 非外显子, 长度为 20 nt, 两个 sgRNA 反向识别, 选择识别位点位于 ALK7 外显子 3-4(Exon3-4), 以及外显子 6-7(Exon6-7) 非编码区的两个 sgRNA。

1.4 设计和获取供体载体

根据 sgRNA 序列设计一个携带靶位点同源臂及 LoxP 位点的打靶载体。其长度包括插入切割位点的 2 个同向 LoxP 序列, 其间包含 ALK7 外显子 4-6 的同源序列, 以及它们两侧的同源臂(图 1)。足够长的同源序列有利于同源重组。

1.5 受精卵注射

6~8 周龄 C57BL/6J 雄性小鼠和雌性小鼠交配后, 获取受精卵。将两种 sgRNA、Cas9 mRNA 和打靶载体显微注射到受精卵中。另取 5 只同期输卵管结扎假孕母鼠作为受体, 将注射后的受精卵移植入假孕的母鼠输卵管中。

1.6 小鼠基因型鉴定

1.6.1 DNA 提取 出生 4 周龄小鼠, 消毒剪鼠尾 0.1 cm 置入标记好的 1.5 mL EP 管中, 提取方法按试剂盒步骤进行, 提取的基因组 DNA, 保存于 -20 °C 备用。

1.6.2 引物设计 根据 ALK7 是否引入了 2 个同向 LoxP 的基因序列, 用 Primer Premier 6.0 软件辅助设计引物, 用于鉴别 ALK7 等位基因为野生型或重组型(图 2)。

1.6.3 PCR 反应体系与程序 2×PCR mix 10 μL, ddH₂O 6 μL, 小鼠 DNA 提取液 2 μL, 上游引物 1 μL, 下游引物 1 μL。Touchdown PCR 程序进行扩增(表 1)。扩增产物常规方法进行琼脂糖凝胶电泳。

表 1. Touchdown PCR 扩增条件

Table 1. Amplification condition of touchdown PCR

步骤	温度	时间	
1	94 °C	3 min	
2	98 °C	30 s	
3	65 °C	30 s	-0.5 °C/cycle
4	72 °C	45 s	重复步骤 2-4, 20 次
5	95 °C	30 s	
6	55 °C	30 s	
7	72 °C	45 s	重复步骤 5-7, 20 次
8	72 °C	5 min	
9	10 °C	∞	

1.6.4 判断指标 引物 P1 扩增后, 野生型小鼠出现 239 bp 单一片段, 重组型纯合子出现 332 bp 单一片段, 重组型杂合子出现 239 bp 和 332 bp 片段; 引物 P2 扩增后, 野生型小鼠出现 303 bp 单一片段, 重组型纯合子出现 398 bp 单一片段, 重组型杂合子新出现 303 bp 和 398 bp 片段; 经引物 P3、P4、P5 和 P6 扩增后, 野生型无扩增, 重组型获得 616 bp、661 bp、657 bp 和 653 bp 片段。

1.6.5 Southern blot 探针引物 ALK7-PinF1: TA-AACAGTGAAGTGCAGCAG; ALK7-PinR1: CTGGGA-CACTAAAACAACCTC。探针序列: Pin-1: taaacagtgaatgtcggcagcaaatgattggtgtagagtcagtagcaaggctgatattgacacatctaggaaaatctactagtctagtattatcatgtcttagtagtctagttgtcctgtcttagtcactctgggtcacggaaagatctggagcatttggaaatgtggaggaggcatttaggtgtgctggccagtgggatgttattggaacttgaatggctgtgttatctgctgggttattcggctacatcacaggctattcctcgggtgtccagatcttagcactgtaccctagacagtgtagaatgagtaggagatttagtgggtgttgcattcattgttagtttaacctgcctcagaattgaagttaacctgtcagataataattagtagtttagtgcctccag。限制性内切酶 Sac I, Wildtype 片段长度 13.2 kB, Targeted 片段长度 6.0 kB。

1.7 RT-PCR 检测 ALK7 mRNA 表达

TRIzol 提取小鼠内脏脂肪组织总 RNA, 分光光度计测定总 RNA 的纯度和浓度。反转录获得 cDNA, 反转录反应体系 (20 μL): 依据反转录试剂盒说明书配置。反转录程序: 37 °C 15 min; 85 °C 5 s; 4 °C 结束。RT-PCR 反应体系 (20 μL): cDNA 2 μL, SYBR Green PCR Mix 10 μL, 正向引物 0.5 μL, 反向引物 0.5 μL, DEPC 水 7 μL。PCR 扩增条件: 95 °C 预变性 30 s, 95 °C 变性 5 s, 57 °C 退火 5 s, 72 °C 延伸 10 s, 40 个循环。使用引物 5'-TGGCTGTGAAG-CACGATTCT-3'、5'-CGGGAGCCATGTACCTCTTG-3' 定量 ALK7 mRNA 含量, 以 β-actin 作为内参标准化, 通过 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算 ALK7 mRNA 水平。

1.8 小鼠表型分析

取 8 周龄野生型和 ALK7^{LoxP/LoxP} 小鼠, 雌雄各 6 只同龄, 称量体质量。观察各组小鼠的生长状态、繁殖能力是否存在差异。

1.9 Western blot 检测脂肪组织 ALK7 的表达

强力细胞裂解液裂解细胞, 提取小鼠脂肪组织总蛋白, BCA 试剂盒测定样品浓度, 10% SDS-PAGE 凝胶电泳, PVDF 膜印迹, 5% 脱脂牛奶封闭, 依次孵育兔抗小鼠 ALK7 一抗, HRP 标记山羊抗兔二抗, 发光显影, 使用 Photoshop 进行分析。

1.10 统计学方法

应用 SPSS19.0 软件进行统计学分析, 计量资料

采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 $ALK7^{LoxP/LoxP}$ 小鼠的体质量及生长繁育

8 周末, 同龄雄性 $ALK7^{LoxP/LoxP}$ 小鼠体质量 $[(24.02 \pm 0.36) \text{ g}]$ 与野生型小鼠体质量 $[(24.12 \pm 0.24) \text{ g}]$ 相比, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。雌性 $ALK7^{LoxP/LoxP}$ 小鼠体质量 $[(19.08 \pm 0.37) \text{ g}]$ 与野生型小鼠 $[(18.62 \pm 0.37) \text{ g}]$ 相比差异无显著性 ($P > 0.05$)。 $ALK7^{LoxP/LoxP}$ 小鼠的毛发光泽, 活动状态、生长发育和繁殖能力与野生型小鼠相比均无明显

差异。

2.2 $ALK7^{LoxP/LoxP}$ 小鼠鉴定结果

本实验培育的 F1 代 20 只小鼠中, 通过 6 对引物鉴定其基因型(图 2), 其中 4 只(编号 4、5、7、8)小鼠经引物 P1 PCR 扩增产物出现 332 bp 和 239 bp 两条条带, 引物 P2 PCR 扩增产物出现了 303 bp 和 398 bp 两条条带, 且小鼠合笼后未出现 $LoxP$ 分离现象, 说明成功插入的 2 个 $LoxP$ 序列位于一条染色体上; 引物 P3-P6 均出现条带, 说明 2 个 $LoxP$ 方向一致。野生型小鼠经引物 P1、P2 扩增后仅出现单一条带, 引物 P3-P6 无扩增条带。表明这些小鼠一条 $ALK7$ 等位基因外显子 4-6 两端成功插入了两个同向 $LoxP$ 序列(图 3)。

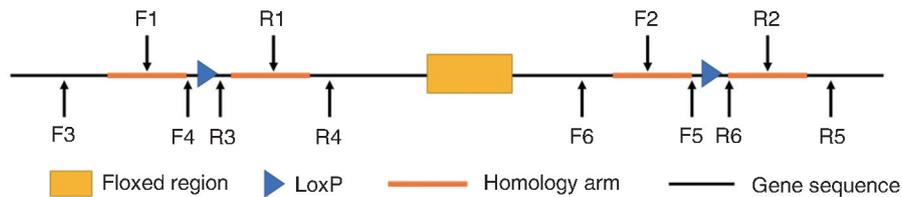


图 2. $ALK7^{LoxP/LoxP}$ 小鼠鉴定引物 F 为 Forward primer, R 为 Reverse primer。

Figure 2. The primers for genotyping of $ALK7^{LoxP/LoxP}$ mice

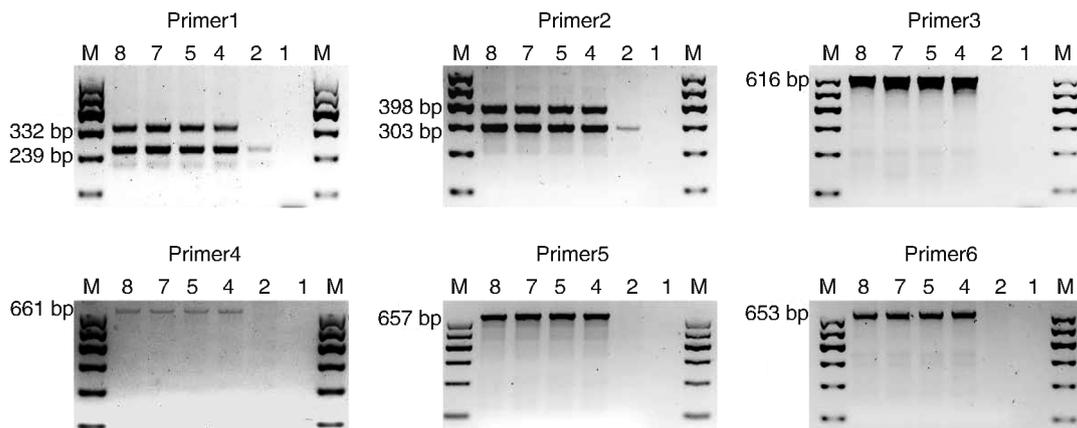


图 3. PCR 分析 $ALK7^{LoxP/LoxP}$ 小鼠基因 Primer1-6 扩增片段琼脂糖凝胶电泳结果, 1 为空白对照, 2 为野生型对照, 4、5、7、8 均为 $ALK7^{LoxP/LoxP}$ 小鼠。

Figure 3. PCR analysis for $ALK7^{LoxP/LoxP}$ mice gene

2.3 Southern blot 鉴定结果

为进一步验证 $ALK7^{LoxP/LoxP}$ 小鼠基因型, 来自阳性小鼠和野生型小鼠的 DNA 经 $Sac I$ 酶切后用 Pin 探针进行杂交, 野生型小鼠在 13.2 kB 位置出现单一片段, $ALK7^{LoxP/LoxP}$ 小鼠出现 13.2 kB 和 6 kB 两个片段, 这些结果表明, $ALK7$ 等位基因成功与打靶载体发生同源重组, 即 $ALK7^{LoxP/LoxP}$ 小鼠(图 4)。

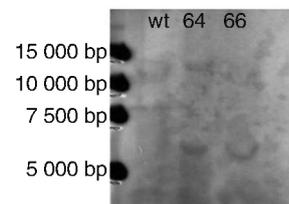


图 4. Southern blot 鉴定 $ALK7^{LoxP/LoxP}$ 小鼠基因

Figure 4. Southern blot analysis for $ALK7^{LoxP/LoxP}$ mouse gene

2.4 ALK7 mRNA 实时荧光定量 PCR 结果

为确保插入的序列不影响 ALK7 基因的正常表达,提取阳性小鼠和野生型小鼠内脏脂肪组织 mRNA 进行实时荧光定量 PCR 实验,结果 ALK7^{LoxP/LoxP} 小鼠 ALK7 mRNA 转录水平与野生型小鼠相比差异无统计学意义 ($P > 0.05$; 图 5),说明 ALK7 外显子 4-6 两端插入的 LoxP 序列不影响 ALK7 mRNA 的表达。

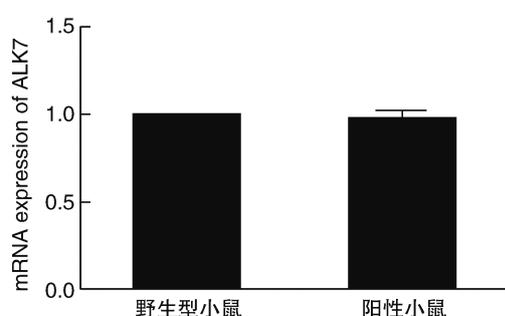


图 5. 实时荧光定量 PCR 分析 ALK7 mRNA 的表达

Figure 5. Real-time PCR analysis for mRNA expression of ALK7

2.5 脂肪组织 ALK7 的表达

Western blot 结果显示,ALK7^{LoxP/LoxP} 小鼠脂肪组织 ALK7 蛋白表达水平与野生型小鼠相比差异无显著性,说明在 LoxP 的插入不影响 ALK7^{LoxP/LoxP} 小鼠 ALK7 蛋白水平的表达(图 6)。

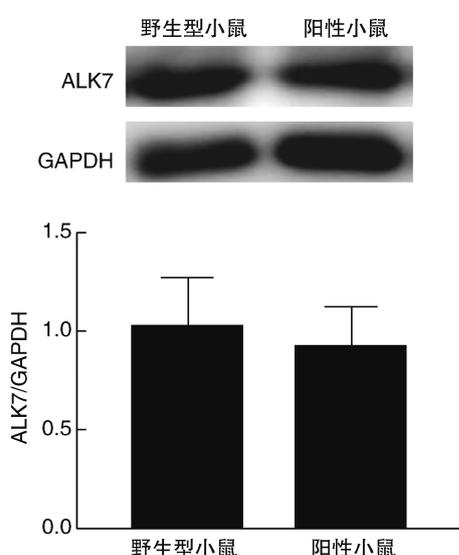


图 6. ALK7^{LoxP/LoxP} 小鼠及野生型小鼠脂肪组织中 ALK7 蛋白的表达

Figure 6. ALK7 protein expression in adipose tissue of ALK7^{LoxP/LoxP} mouse and wild-type mouse

3 讨论

构建组织特异性基因敲除小鼠模型是研究基因功能最直接有效的手段之一。近几年研究发现 ALK7 基因与糖尿病血管硬化的发生发展关系密切。本研究组 2012 年在国际上首先报道 ALK7 基因 SNP rs13010956 基因多态性与代谢综合征患者颈动脉内膜中膜厚度相关^[10]。为验证 ALK7 与糖尿病血管硬化的关系,我们建立 2 型糖尿病大鼠模型,采用 ALK7 RNAi 腺病毒抑制 ALK7 表达,结果发现,ALK7 被抑制后糖尿病大鼠主动脉纤维化减轻^[11]。并且,ALK7 与糖尿病的发生发展密切相关,它促进胰岛 β 细胞凋亡^[17],加重胰岛素抵抗,高血糖还可以促进 ALK7 表达,进一步促进胰岛素释放减少和胰岛素抵抗,引起血糖持续升高。在脂肪细胞中,ALK7 下游信号分子 Samd4 入核后与 C/EBP α 结合,过氧化体增殖物激活型受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 表达减少,脂肪酶如脂肪甘油三酯脂肪酶 (adipose triglyceride lipase, ATGL) 和激素敏感性脂肪酶 (hormone sensitive lipase, HSL) 活性降低,导致脂肪细胞增生、体积增大^[13]。ALK7 下游调控信号分子如 Smads、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 还广泛参与了脂肪细胞因子如炎症因子、血管活性物质的释放等作用^[18]。综上,我们推测 ALK7 对糖尿病动脉纤维化除与血管本身有关外,ALK7 对血管周围脂肪组织 (perivascular adipose tissue, PVAT) 的作用可能更为重要。但目前对于 ALK7 与糖尿病动脉硬化及在 PVAT 重构中的作用及其具体机制尚不完全清楚。因此,构建组织特异性 ALK7 基因敲除模型对于研究 ALK7 在糖尿病动脉硬化的作用及其具体机制极为重要。

CRISPR/Cas9 是源于化脓性链球菌对抗外源 DNA 的防御系统。由 CRISPR 转录加工成的 crRNA 与 tracrRNA 互补形成 crRNA : tracrRNA 二聚体。二聚体通过间隔序列配对识别外源 DNA 原始间隔序列的互补链,指导 Cas9 内切酶切割外源 DNA。Cas9 蛋白在 crRNA 引导序列靶标的特定位置剪切双链 DNA,打断目标基因,再通过非同源重组 (non-homologous end-joining, NHEJ) 修复机制,与目标基因序列发生重组,而达到插入突变这一目的^[19]。为简化操作,Jinek 等^[16]将 crRNA 和 tracrRNA 融合成 sgRNA 短链,发现 sgRNA 具有与 crRNA : tracrRNA 二聚体相同甚至更强的活性。且 sgRNA 具有设计和合成简便,靶向精确,不同 sgRNA 可以同时引导

Cas9 切割多个位点等优点。目前,CRISPR/Cas9 已成为一种便捷、有效、稳定基因编辑工具。

近年来随着 Cre 特异性表达小鼠的市场化,培育靶基因受 LoxP 修饰的小鼠成为建模的关键。本研究通过 CRISPR/Cas9 技术成功将 2 个同向 LoxP 序列插入 ALK7 基因外显子 4-6 的上下游,构建出 ALK7^{LoxP/LoxP} 小鼠,后代基因型稳定,并且不影响 ALK7 mRNA 的表达,无致死及明显疾病,随后将通过杂交技术繁育出 ALK7 FLoxP^{+/+} 小鼠。进而再与血管内皮、平滑肌、脂肪组织特异性 Cre 打靶小鼠交配,子代中 Cre 酶的表达可以特异性敲除 2 个 LoxP 序列之间的基因片段,引起外显子 4-6 编码片段缺失及移码突变,便能实现不同组织 ALK7 基因特异性敲除这一目标。

CRISPR/Cas9 技术已成为一种高效的基因编辑工具,在生物研究方面发挥重要作用。本研究利用此项技术成功将 LoxP 序列同向定点引入小鼠 ALK7 基因两端,成功构建 ALK7^{LoxP/LoxP} 小鼠品系。为进一步通过 Cre 重组酶特异性敲除组织 ALK7 基因奠定基础,并将为研究 ALK7 在糖尿病管周脂肪重构中的作用及糖尿病动脉硬化提供研究平台。

[参考文献]

- [1] Shah AD, Langenberg C, Rapsomaniki E, et al. Type 2 diabetes and incidence of cardiovascular diseases: a cohort study in 1.9 million people [J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2015, 3(2): 105-113.
- [2] Chiasson JL, Le Lorier J. Glycaemic control, cardiovascular disease, and mortality in type 2 diabetes [J]. *Lancet*, 2014, 384(9958): 1906-1907.
- [3] Henninger AM, Eliasson B, Jenndahl LE, et al. Adipocyte hypertrophy, inflammation and fibrosis characterize subcutaneous adipose tissue of healthy, non-obese subjects predisposed to type 2 diabetes [J]. *PLoS One*, 2014, 9(8): e105262.
- [4] 王芝嫣, 王毅. 脂肪组织异常与动脉粥样硬化[J]. *国际心血管病杂志*, 2017, 44(05): 271-273, 281.
- [5] Ryden M, Imamura T, Jornvall H, et al. A novel type I receptor serine-threonine kinase predominantly expressed in the adult central nervous system [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(48): 30603-30609.
- [6] Liu L, Ding WY, Zhao J, et al. Activin receptor-like kinase 7 mediates high glucose-induced H9c2 cardiomyoblast apoptosis through activation of Smad2/3 [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(9): 2027-2035.
- [7] Hu T, Su F, Jiang W, et al. Overexpression of activin receptor-like kinase 7 in breast cancer cells is associated with decreased cell growth and adhesion [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(7): 3441-3451.
- [8] Khalil AM, Dotimas H, Kahn J, et al. Differential binding activity of tgf-beta family proteins to select tgf-beta receptors [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2016, 358(3): 423-430.
- [9] 汪雄, 张玲, 陶凌. GDF11 通过上调 ABCA1 表达促进小鼠体内胆固醇逆转运[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(4): 329-334.
- [10] Zhang W, Wang H, Zhang W, et al. ALK7 gene polymorphism is associated with metabolic syndrome risk and cardiovascular remodeling [J]. *Arq Bras Cardiol*, 2013, 101(2): 134-140.
- [11] Li WB, Zhao J, Liu L, et al. Silencing of activin receptor-like kinase 7 alleviates aortic stiffness in type 2 diabetic rats [J]. *Acta Diabetol*, 2015, 52(4): 717-726.
- [12] Murakami M, Shirai M, Ooishi R, et al. Expression of activin receptor-like kinase 7 in adipose tissues [J]. *Biochem Genet*, 2013, 51(3-4): 202-210.
- [13] Yogosawa S, Mizutani S, Ogawa Y, et al. Activin receptor-like kinase 7 suppresses lipolysis to accumulate fat in obesity through downregulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma and C/EBP alpha [J]. *Diabetes*, 2013, 62(1): 115-123.
- [14] Balkow A, Jagow J, Haas B, et al. A novel crosstalk between ALK7 and cGMP signaling differentially regulates brown adipocyte function [J]. *Mol Metab*, 2015, 4(8): 576-583.
- [15] Mali P, Esvelt KM, Church GM. Cas9 as a versatile tool for engineering biology [J]. *Nat Methods*, 2013, 10(10): 957-963.
- [16] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2013, 337(6096): 816-821.
- [17] Zhao F, Huang F, Tang M, et al. Nodal induces apoptosis through activation of the ALK7 signaling pathway in pancreatic INS-1 beta-cells [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2012, 303(1): E132-143.
- [18] Yadav H, Quijano C, Kamaraju AK, et al. Protection from obesity and diabetes by blockade of TGF-beta/Smad3 signaling [J]. *Cell Metab*, 2011, 14(1): 67-79.
- [19] Burgess DJ. Technology: a CRISPR genome-editing tool [J]. *Nat Rev Genet*, 2013, 14(2): 80.

(此文编辑 许雪梅)