



猪 CCAR1 基因细胞定位、表达特性 及对细胞增殖的影响

张宁芳¹, 吴怡琦¹, 成志敏², 杨晓伟³, 李萌¹, 杨阳¹,

刘宏⁴, 高鹏飞¹, 蔡春波¹, 郭晓红¹, 李步高¹, 曹果清^{1*}

(1. 山西农业大学动物科学学院, 太谷 030801; 2. 山西省高等创新研究院, 太原 030032;

3. 大同海关技术中心, 大同 037000; 4. 大同市种猪场, 大同 037000)

摘要: 旨在获得猪 CCAR1 基因的完整 CDS 序列, 研究其亚细胞定位和表达特性, 探究其对细胞增殖的影响和作用机制。本研究以 1 日龄马身猪肾组织 cDNA 为模板, 采用 RT-PCR 技术分段扩增猪 CCAR1 基因的 CDS 区, 通过测序和序列拼接获得完整 CDS 区; 采用细胞免疫荧光技术检测 CCAR1 在 PK15 细胞中的定位; 采用 qRT-PCR 技术检测猪 CCAR1 基因的时空表达规律; 采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除 PK15 细胞的 CCAR1 基因, 通过 qRT-PCR、Western blot 以及 CCK8 (cell counting kit 8) 技术检测 CCAR1 基因敲除对细胞增殖能力及细胞增殖和凋亡相关基因表达的影响。结果表明, 猪 CCAR1 基因的完整 CDS 区长 3 459 bp (MH301308.1), 在 PK15 细胞的细胞质和细胞核中均有表达。大白猪和马身猪不同组织 CCAR1 的表达谱基本相似, 在所检测的组织中均有表达, 均表现为在肾和小肠中表达量最高, 在脾、肝、小脑和肌肉中呈中度表达, 在心和皮下脂肪中低表达; CCAR1 基因在大白猪和马身猪初生、3 月龄和 6 月龄 3 个年龄阶段的两种骨骼肌中也均有表达。CRISPR/Cas9 基因编辑系统能有效降低 CCAR1 的表达, 在转染 48 h 后, 相比于对照组, 试验组都对细胞增殖产生极显著抑制 ($P < 0.01$); CCAR1 基因敲除后, 细胞增殖标记基因 *Mki67* 表达水平显著下降 ($P < 0.05$), Wnt 通路下游靶基因 *C-myc* 表达量显著下降 ($P < 0.05$), Wnt 通路核心蛋白 β -catenin 和凋亡标记基因 *Caspase3* 的表达量无显著差异。CCAR1 基因在猪不同组织和不同发育阶段均有表达, 可能通过调控细胞增殖基因 *Mki67* 和 Wnt 通路下游靶基因 *C-myc* 的表达而影响细胞增殖, 在猪的生长发育过程中起重要作用。

关键词: 猪; CCAR1 基因; 细胞定位; 表达特征; 基因敲除; 细胞增殖

中图分类号: S828.2

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2020)11-2651-14

Cellular Localization, Expression Patterns of CCAR1 Gene, and Its Effect on Cell Proliferation in Pig

ZHANG Ningfang¹, WU Yiqi¹, CHENG Zhimin², YANG Xiaowei³, LI Meng¹, YANG Yang¹,

LIU Hong⁴, GAO Pengfei¹, CAI Chunbo¹, GUO Xiaohong¹, LI Bugao¹, CAO Guoqing^{1*}

(1. College of Animal Science, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China;

2. Shanxi Academy of Advanced Research and Innovation, Taiyuan 030032, China;

3. Datong Customs Technology Center, Datong 037000, China;

4. Datong Pig Breeding Farm, Datong 037000, China)

收稿日期: 2020-05-29

基金项目: 三晋学者支持计划专项经费资助(2016;2017); 国家自然科学基金(31872336); 山西省农业重点研发项目(201803D221022-1); “山西省 1331 工程”资助(2017)

作者简介: 张宁芳(1993-), 女, 山西晋城人, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 1097482023@qq.com; 吴怡琦(1996-), 女, 山西运城人, 硕士生, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究, E-mail: 946095068@qq.com。张宁芳与吴怡琦为同等贡献作者

* 通信作者: 曹果清, 主要从事猪新品种(系)培育与推广和地方猪种特色基因研究与利用, E-mail: anniecao710502@aliyun.com

Abstract: The aim of this study was to obtain the complete coding sequence (CDS) of *CCAR1* gene, and to explore its subcellular localization, expression profile and its effects on cell proliferation and action mechanism in pig. In this study, the cDNA from kidney tissue of 1-day-old Mashen pigs were used as the template to obtain the full-length CDS of *CCAR1* gene by RT-PCR and sequencing. The cellular immunofluorescence staining was used to explore the subcellular localization of *CCAR1* in PK15 cells. The temporal and spatial expression profile of *CCAR1* was investigated by qRT-PCR in this study. The *CCAR1* gene in PK15 cells was knocked out by using CRISPR/Cas9 gene editing technology, and the effects of *CCAR1* gene on cell proliferation and expression of cell proliferation and apoptosis related genes were investigated by qRT-PCR, Western blot and CCK8 (cell counting kit 8) technologies in this experiment. The results showed that the complete CDS region of pig *CCAR1* gene was 3 459 bp in length (MH301308.1). *CCAR1* protein was localized in both cytoplasm and nucleus of PK15 cells. The expression profiles of *CCAR1* mRNA between Large White and Mashen pigs was similar, which was expressed in all detected tissues, with the highest expression in kidney and small intestine, middle expression in spleen, liver, cerebellum and muscle, and the lowest expression in heart and subcutaneous fat. Temporal expression results showed that *CCAR1* was expressed in both psoas muscle and *longissimus dorsi* muscle at 3 developmental stages both in Mashen and Large White pigs. The CRISPR/Cas9 gene editing system effectively reduced the expression of *CCAR1*. CCK8 results showed that after 48 hours of transfection, compared with the control group, the proliferation of cells in the experimental groups were extremely significantly inhibited ($P < 0.01$). After *CCAR1* gene knocked out, the expression level of *Mki67*, a marker of cell proliferation, was significantly decreased ($P < 0.05$). There was no significant difference in the expression level of *Caspase3* and the core protein β catenin in Wnt pathway between control group and experimental groups, and the expression level of downstream target gene *C-myc* of Wnt pathway was decreased significantly ($P < 0.05$). *CCAR1* gene was expressed almost in all tissues at different developmental stages, and affected cell proliferation by regulating the expression levels of *Mki67* and *C-myc*, and played an important role in growth and development of pig.

Key words: pig; *CCAR1* gene; cellular localization; expression patterns; gene knockout; cell proliferation

* **Corresponding author:** CAO Guoqing, E-mail: anniecao710502@aliyun.com

细胞增殖是细胞的一项重要生理过程,是生物体生长、发育和遗传的基础。细胞增殖是一个精细复杂的过程,涉及到许多分子、通路等的相互作用。细胞周期和凋亡调节因子 1 (cell-cycle and apoptosis regulator 1, *CCAR1*) 是通过反义依赖性功能基因敲除策略鉴定的一种新的细胞增殖、凋亡信号调节因子^[1-2],在人、小鼠、大鼠、犬、黑猩猩、家禽、蜜蜂和秀丽隐杆线虫等多个物种中表达^[3],具有 DNA 结合结构域、蛋白结合结构域以及 RNA 结合结构域 (S1-like)^[4-5]。探究 *CCAR1* 基因的结构和功能,揭示其对细胞增殖的影响和作用机制,阐明其对个体生长发育的影响,将为 *CCAR1* 基因作为分子标

记应用于畜禽分子育种提供重要依据。研究发现, *CCAR1* 在 Wnt 信号通路中作为一种转录共激活分子,能够协助开关分子 β -catenin 在信号通路中发挥作用^[6-9],参与一些信号的扩散和转移^[10]。如在 HT29 结肠癌细胞中, *CCAR1* 与 β -catenin 共激活其下游的靶基因,促进结肠癌细胞的生长^[11]。此外, *CCAR1* 还可以作为一个关键的细胞内转导的增殖或凋亡信号分子响应于不同的信号途径。 *CCAR1* 能够参与到 Caspase 泛素化蛋白酶途径,与 APC/C 结合,阻滞 G2/M 细胞周期^[12]; *CCAR1* 通过结合肿瘤抑制基因 *p53*,对细胞周期产生正调控作用^[13]; *CCAR1* 还能够与辅活化因子 p160 结合,

形成复合物,然后与活化激素核受体结合,激活目标基因的转录,对雌激素诱导的基因表达和人乳腺癌细胞的雌激素依赖性生长有重要作用^[14]。CCAR1 可以调节阿霉素依赖性 DNA 损伤诱导的细胞凋亡,其发挥作用依赖于肿瘤抑制基因 *p53* 的共激活^[15],若撤去血清生长因子或表皮生长因子受体则会导致 CCAR1 基因的表达升高。CCAR1 能够以类维生素 A 依赖的方式触发细胞凋亡信号的传导^[16],也可通过激活半胱天冬酶-9(caspase 9)抑制人乳腺癌细胞生长并导致细胞凋亡^[17]。总之,CCAR1 能够通过多种信号途径影响细胞的增殖或凋亡过程。

目前,有关 CCAR1 基因的研究主要集中在其对癌症引发的机制及治疗作用上^[18]。在胃腺癌组织中,CCAR1 表达的异常升高与胃腺癌的发生密切相关^[19]。CCAR1 功能模拟物 CFMs 能够通过促进细胞凋亡而抑制癌细胞的生长^[20]。而有关猪 CCAR1 基因的研究未见报道。本研究采用 RT-PCR 技术扩增猪 CCAR1 基因完整 CDS 序列,采用细胞免疫荧光技术对 CCAR1 进行亚细胞定位,采用 qRT-PCR 技术检测猪 CCAR1 基因的表达谱和发育性表达规律,采用 CRISPR/Cas9 系统、Western blot 及 CCK8 等技术探究 CCAR1 基因对细胞增殖的影响。本研究将为揭示猪 CCAR1 基因的结构和功能及在猪生产中的应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验动物和样品采集 马身猪(Mashen pig, 中国地方猪种)和大白猪(Large White pig, 引进商业猪种)来源于山西省大同市种猪场。1 日龄马身猪和大白猪各 6 头,屠宰后,立即采集心、肝、背部皮下脂肪、脾、肾、小肠、小脑以及背最长肌等组织,用于 CCAR1 基因的 CDS 区扩增及表达谱分析;初生、3 月龄、6 月龄的马身猪和大白猪,每个品种每阶段各 6 头,屠宰后,采集背最长肌和腰大肌,用于 CCAR1 基因发育性表达规律分析。所采集的样品保存在液氮中带回实验室,置于一 80 °C 冰箱中保存备用。

1.1.2 细胞系和质粒 PK15 细胞和 CRISPR/Cas9 质粒均为山西农业大学动物遗传育种与繁殖博士点实验室保存。

1.1.3 主要试剂 固相 RNAase 清除剂购自 Andybio 公司;TRIZOL[®] Reagent 购自 Life Technologies 公司;PrimeScript[®] RT Master Mix、SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II65、感受态细胞购自 TaKaRa 公司;2×ES Taq MasterMix 购自康为世纪公司;胎牛血清(FBS)购自 Gibco 公司;低糖 DMEM 培养基、CCK8 试剂盒、2%BSA 山羊血清购自博士德生物工程有限公司;DNase /RNase-Free Water、TritonX-100、DAPI 溶液、胰酶、青链霉素混合液购自索莱宝公司;RIPA 裂解液购自碧云天公司;兔源 CCAR1 一抗购自 Bioworld 公司;兔源 β -actin 一抗、荧光二抗 Goat Anti-Rabbit IgG/Alexa Fluor 594 购自博奥森公司;多聚甲醛购自 Biotopped 公司;限制性内切酶 *BsmB* I、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司;胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自 Omega 公司;lipo2000 转染试剂购自 Invitrogen 公司;引物合成与测序由上海生工生物工程有限公司完成;无水乙醇、氯仿、异丙醇等购自天津市风船化学试剂科技有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 合成 采用 TRIZOL[®] Reagent 试剂盒提取各组织和细胞的总 RNA,提取方法参照试剂盒说明书。将提取的总 RNA 用核酸蛋白测定仪(ND-1000, Gene Company Limited)测定其纯度及浓度, $OD_{260\text{ nm}}/OD_{280\text{ nm}}$ 为 1.8~2.0 的总 RNA 用于后续研究。采用 PrimeScript[®] RT Master Mix 试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA。合成的 cDNA 于一 20 °C 冰箱中保存备用。

1.2.2 猪 CCAR1 基因 CDS 区的扩增及生物信息学分析 猪 CCAR1 基因 CDS 区较长,且 GenBank 数据库中只有预测序列,经多次试验,均未能通过一次反应扩增出全长 CDS 序列,因此分段设计引物(表 1),进行扩增并测序,再通过序列拼接获得完整 CDS 区序列。扩增体系 10 μL :cDNA 1 μL , 上、下游引物(10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)各 1 μL , 2×ES Taq MasterMix 5 μL , ddH₂O 2 μL ;反应程序:95 °C 3 min;94 °C 30 s,60 °C 30 s,72 °C 1 min,35 个循环;72 °C 5 min,4 °C 保存。反应完成后,用 1% 的琼脂糖凝胶检测扩增产物,并将扩增产物送交上海生工生物工程有限公司测序,结果用 Sequencher 软件进行拼接,获得猪 CCAR1 基因的全长 CDS 序列。

表 1 RT-PCR 引物序列、扩增位置、产物长度

Table 1 RT-PCR primer sequences, amplification locations and product lengths

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	扩增位置/bp Amplification location	产物长度/bp Product length
CCAR1-1	F:TCCACTCCTACCCATTGGTCTA R:TTGCAGCCCAGTTTGGATGT	2 051~2 387	337
CCAR1-2	F:CATGGGTGGATGCTTTCCT R:CTGGGTCTGGTCCATCCAAC	1 374~1 715	342
CCAR1-3	F:ACAACCAGCACGGAGGTTAG R:GGGAAAGCATCCACCCATGT	1 042~1 392	351
CCAR1-4	F:GCAACCTCAGAAGCAACGTG R:CTAACCTCCGTGCTGGTTGT	601~1 061	461
CCAR1-5	F:CGCTCTAATTCTACGGCGT R:AGGCTTGTAGGCAGTCCAAC	47~525	479
CCAR1-6	F:TGTTACGCGAAGCCAAGGTA R:AGGTTGCGTTTGTGCTGAC	13~607	595
CCAR1-7	F:GTTCGACGTGTTGTTCCACG R:GAGGGTTTCCACTCTGAGC	1 238~1 942	705
CCAR1-8	F:AACTGGGTGCAAAAAGTGG R:GCAAGACTCACGGAGCACTA	2 375~3 097	723
CCAR1-9	F:GCAACCTCAGAAGCAACGTG R:TCTGGTGGATCAAGAACGGC	601~1 494	894

采用 NCBI 在线软件 CD-search (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 预测 CCAR1 蛋白保守结构域, 利用在线软件 TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) 对蛋白质跨膜结构进行预测, 利用 NetPhos 3.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>) 预测磷酸化位点, 利用 PSORT II Prediction 软件 (<https://psort.hgc.jp/form2.html>) 预测 CCAR1 的亚细胞定位。

1.2.3 猪 CCAR1 基因亚细胞定位 用 24 孔细胞培养板培养 PK15 细胞, 当细胞生长铺满培养板 60% 左右时, 用 PBS 清洗细胞 3 次×5 min, 再加入 1 mL 4% 的多聚甲醛固定 30 min, 弃多聚甲醛, PBS 清洗 3 次×5 min; 加 0.1% TritonX-100 500 μ L, 作用 30 min, 弃液体, PBS 清洗 3 次×5 min; 加 2% BSA 山羊血清 500 μ L, 封闭 1 h; 弃去封闭液, 勿洗, 加 CCAR1 一抗(1:1 000 稀释)300 μ L, 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育; 弃一抗, PBS 清洗 3 次×5 min, 加 500 μ L 荧光二抗(1:20 000 稀释), 在暗处作用 1 h, PBS 避光清洗 3 次×5 min; 加 100 μ L DAPI 水溶液复染细胞核 5 min, PBS 清洗 2 次×5 min。荧光显微镜

(EVOS FL Auto, 美国)下观察并拍照。

1.2.4 猪 CCAR1 基因表达特性检测 采用 qRT-PCR 技术检测 1 日龄马身猪和大白猪不同组织中 CCAR1 基因的表达谱以及在初生、3 月龄、6 月龄等阶段腰大肌和背最长肌中的时序性表达特征。在 NCBI 数据库中检索猪 CCAR1 基因序列(XM_021072498.1), 利用在线网站 Primer-BLAST 设计引物(表 2), 由生物工程技术有限公司合成。反应体系为 10 μ L; 2×Ultra SYBR Mixture 5 μ L, 上、下游引物(10 μ mol·L⁻¹)各 0.15 μ L, ROX 0.2 μ L, Template cDNA 2 μ L, RNase-free ddH₂O 2.5 μ L。反应条件:95 $^{\circ}$ C 预变性 20 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 20 s, 60 $^{\circ}$ C 退火及延伸 20 s, 36 个循环。18S 为内参基因, 每个样本做 3 个技术重复。

1.2.5 CCAR1 基因对细胞增殖的影响

1.2.5.1 sgRNA 的设计与合成: 根据 NCBI 数据库中猪 CCAR1 基因序列(登录号: XM_021072498.1), 利用在线网站 <http://crispr.dbcls.jp/> 进行 sgRNA 的设计。选择得分较高、特异性较强的 3 条 sgRNA 序列, 分别命名为 sg1、sg2 和 sg3 (表 3), 在正链的 5' 端添加 accg, 负链的 5' 端添加 aaac, 使其能够与线性化的 Cas9 敲除载体连接。

表 2 qRT-PCR 引物序列

Table 2 The sequences of qRT-PCR primers

基因名称 Gene name	GenBank 登录号 Accession number	引物序列(5'→3') Primer sequence	产物长度/bp Product size
CCAR1	XM_021072498.1	F: AGAGATTTCGCTACCATCGCC R: AAGGCAATGCCAAACATCCG	103
18S	NW_018085108.1	F: CCCACGGAATCGAGAAAGAG R: TTGACGGAAGGGCACCA	122
β -catenin	XM_021068566.1	F: GCTCTTGTGCGTACTGTCTT R: GCTGGTCAGATGACGGAGAG	84
Mki67	XM_021074506.1	F: ATTCCAGAAAGCACCAGGCT R: TCCACTGTCTTCTCAGGGGT	82
Caspase3	NM_214131.1	F: TTCAGAGGGGACTGCTGTAGA R: CCCACTGTCCGTCTCAATCC	105
Parp2	XM_005656314.3	F: TTGAATGGGAGTACGGTGCC R: TCGCATACGGACCTGATTGG	120
C-myc	NM_001005154.1	F: ACAACCGAAAATGTGCCAGC R: GTTTCTCTCTGGCGTTCCA	92

表 3 sgRNAs 序列

Table 3 The sequences of sgRNAs

向导 RNA sgRNAs	正链 sgRNA 序列(5'→3') Sequence of plus strand of sgRNA	负链 sgRNA 序列(5'→3') Sequence of minus strand of sgRNA
sg1	accgAAATGGCTTCGGTCTTATCC	aaacGGATAAGACCGAAGCCATTT
sg2	accgGCTTCGGTCTTATCCGGGAC	aaacGTCCCGGATAAGACCGAAGC
sg3	accgGAAGCTCTGGTCTCGCGAC	aaacGTCGCGACGACCAGAGCTTC

小写字母为与 *BsmB* I 酶切位点互补的粘性末端序列

Lowercase letters are the sticky end sequences complementary to *BsmB* I digestion site

1.2.5.2 Cas9-CCAR1 敲除载体的构建与鉴定:

1)sgRNA退火连接。将合成的 sgRNA 序列溶解并稀释至 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行退火连接,反应体系: $10 \times$ Buffer $2 \mu\text{L}$,sgRNA 上、下游引物各 $2 \mu\text{L}$,ddH₂O 补足至 $20 \mu\text{L}$ 。PCR 反应程序: $93 \text{ }^\circ\text{C}$ 5 min ,然后每分钟降 $1 \text{ }^\circ\text{C}$,降至 $25 \text{ }^\circ\text{C}$,共 68 个循环, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。
2)Cas9 质粒线性化。使用 *BsmB* I 酶切 Cas9 载体骨架, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,之后切胶回收线性化载体。酶切反应体系: $10 \times$ Buffer $1 \mu\text{L}$,质粒 DNA 500 ng ,*BsmB* I 酶($10\ 000 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$,ddH₂O 补足至 $10 \mu\text{L}$ 。酶切反应条件: $55 \text{ }^\circ\text{C}$, 2 h ; $80 \text{ }^\circ\text{C}$, 10 min 。
3)sgRNA 退火产物与线性 Cas9 载体连接。连接反应体系: 500 ng 线性 Cas9 质粒, $1 \mu\text{L}$ sgRNA 退火产物,T4 DNA 连接酶 solution I $5 \mu\text{L}$,ddH₂O 补足至 $10 \mu\text{L}$ 。连接反应条件: $4 \text{ }^\circ\text{C}$,

过夜。4)连接产物转化至感受态细胞。转化反应体系: $5 \mu\text{L}$ 连接产物, $50 \mu\text{L}$ 感受态细胞。转化反应条件:将连接产物与感受态细胞混匀,冰上静置 30 min ; $42 \text{ }^\circ\text{C}$ 90 s ;冰上放置 5 min 。
5)转化产物进行涂板, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 过夜培养,隔天挑取单菌落摇菌,提取质粒进行测序鉴定。

1.2.5.3 质粒提取和细胞转染:

经测序鉴定构建成功的重组质粒命名为 Cas9-sg1CCAR1(SG1)、Cas9-sg2CCAR1(SG2)和 Cas9-sg3CCAR1(SG3),使用去内毒素质粒提取试剂盒提取 3 种质粒。

PK15 细胞接种至 10 cm 培养皿中,使用含 10% FBS 和 1% 双抗的低糖 DMEM 培养基在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$, $5\% \text{ CO}_2$ 条件下进行培养。将细胞进行消化计数,接种至 6 孔板或 12 孔板中,到细胞生长汇合至 $40\% \sim 50\%$ 即可进行转染。准备溶液 A: $2\ 500 \text{ ng}$

质粒 DNA ($\geq 1\ 000\ \text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 溶于 $150\ \mu\text{L}$ 基础培养基中, 混匀; 溶液 B: 脂质体 (Lipofectamine 2000, $1\ \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) $6\ \mu\text{L}$ 溶于 $150\ \mu\text{L}$ 无血清培养基中, 混匀, 静置 $5\ \text{min}$ 。将上述 A、B 溶液轻柔混合, 室温下静置 $15\ \text{min}$ 。将细胞用基础培养基清洗 $1\sim 2$ 遍, 然后将混好的溶液加入至细胞板中, $6\ \text{h}$ 后更换为完全培养基, 过夜培养后在显微镜下观察转染效率。设定转染空质粒为阴性对照组 (negative control, NC), 转染 SG1、SG2 和 SG3 重组质粒为敲除试验组 SG1、SG2 及 SG3。

1.2.5.4 qRT-PCR: 在转染后 $48\ \text{h}$ 收集细胞进行总 RNA 的提取并反转录为 cDNA。以 $18\ \text{S}$ 为内参基因, 检测 NC 组与敲除组 SG1、SG2 和 SG3 细胞中 *CCAR1* 基因及 SG3 组 *β catenin*、*Mki67*、*Caspase3*、*Parp2*、*Cmyc* 等基因的相对表达量。反应体系 $10\ \mu\text{L}$: SYBR $5\ \mu\text{L}$, Rox $0.2\ \mu\text{L}$, 上、下游引物各 $0.15\ \mu\text{L}$, cDNA $2\ \mu\text{L}$, ddH₂O $2.5\ \mu\text{L}$ 。反应条件: $95\ ^\circ\text{C}$ 预变性 $20\ \text{s}$; $95\ ^\circ\text{C}$ 变性 $20\ \text{s}$, $60\ ^\circ\text{C}$ 退火及延伸 $20\ \text{s}$, 36 个循环。结果根据 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算, 引物序列见表 2。

1.2.5.5 Western blot: 提取阴性对照组和敲除组细胞总蛋白, 利用核酸蛋白浓度测定仪 (ND-1000, Gene Company Limited) 测定蛋白浓度。取 $200\ \text{ng}$ 蛋白上样, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳结束后, 采用湿转法进行转膜, 5% 封闭蛋白粉室温封闭 $1\ \text{h}$,

一抗采用 $1:1\ 000$ 稀释, $4\ ^\circ\text{C}$ 孵育过夜。隔天回收一抗, PBST 洗膜 3 次, 加入荧光二抗, 避光室温孵育 $1\ \text{h}$, 洗膜后使用 LICOR 仪器 (ODYSSEY CLx, Gene Company Limited) 曝光, 使用仪器自带软件 Image Studio 计算分析条带光密度值。

1.2.5.6 CCK8 检测细胞增殖: 将细胞消化计数后接种至 96 孔细胞板中, 每组设置 6 个重复, 待细胞汇合至合适浓度时按照之前方法进行转染。在转染后的 24 、 48 、 72 和 $96\ \text{h}$ 分别进行检测, 每孔加入 $10\ \mu\text{L}$ CCK8 试剂, 在 $37\ ^\circ\text{C}$, 5% CO_2 培养箱中培养 $1\ \text{h}$, 使用酶标仪 (SynerGyH1, BioTek) 检测各孔在 $450\ \text{nm}$ 波长处的吸光度。

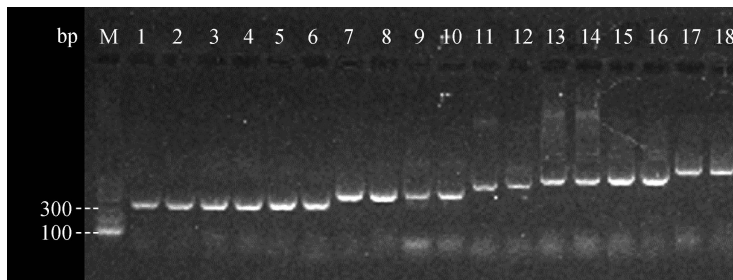
1.3 统计与分析

所得数据均采用 GraphPad Prism5 软件中的 One-way ANOVA 进行方差分析和显著性检验, 当 $P < 0.05$ 时认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 猪 *CCAR1* 基因 CDS 区扩增及生物信息学分析

本研究采用 RT-PCR 方法分段扩增猪 *CCAR1* 基因 CDS 区, 结果见图 1, 扩增产物大小与预期结果一致。PCR 产物直接测序后进行序列拼接, 获得猪 *CCAR1* 基因完整 CDS 区, 长度为 $3\ 459\ \text{bp}$, 已提交 GenBank, 登录号为 MH301308.1。



M. DNA 相对分子质量标准; 1, 2. *CCAR1*-1 PCR 产物; 3, 4. *CCAR1*-2 PCR 产物; 5, 6. *CCAR1*-3 PCR 产物; 7, 8. *CCAR1*-4 PCR 产物; 9, 10. *CCAR1*-5 PCR 产物; 11, 12. *CCAR1*-6 PCR 产物; 13, 14. *CCAR1*-7 PCR 产物; 15, 16. *CCAR1*-8 PCR 产物; 17, 18. *CCAR1*-9 PCR 产物

M. DNA 1000 ladder; 1, 2. *CCAR1*-1 PCR product; 3, 4. *CCAR1*-2 PCR product; 5, 6. *CCAR1*-3 PCR product; 7, 8. *CCAR1*-4 PCR product; 9, 10. *CCAR1*-5 PCR product; 11, 12. *CCAR1*-6 PCR product; 13, 14. *CCAR1*-7 PCR product; 15, 16. *CCAR1*-8 PCR product; 17, 18. *CCAR1*-9 PCR product

图 1 RT-PCR 扩增结果

Fig. 1 RT-PCR results

经预测, *CCAR1* 蛋白包括 5 个保守结构域, 分别为 S1-Like 结构域、SPOR super 结构域、DBC1 结构域、SAP 结构域以及 SMC_N super 结构域 (图 2); 跨膜结构预测发现该蛋白不属于跨膜蛋白 (图 3); 磷酸化位点预测结果表明, *CCAR1* 蛋白存在丝

氨酸、苏氨酸和酪氨酸共 3 个磷酸化位点, 发生在 3 个位置上磷酸化修饰的氨基酸残基数分别为 36 、 30 和 6 (图 4); 亚细胞定位结果表明, 73.9% 定位于细胞核, 13.0% 定位于细胞骨架, 8.7% 定位于线粒体, 4.3% 定位于细胞质膜 (图 5)。

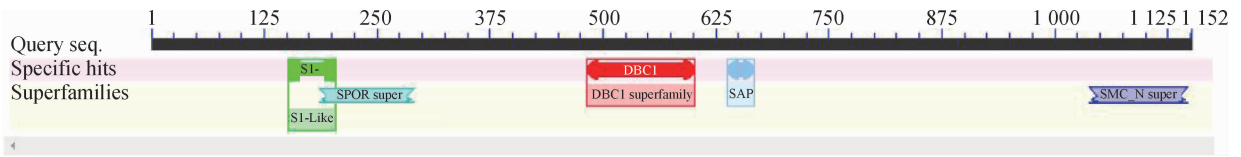


图 2 CCAR1 保守功能域预测结果

Fig. 2 The prediction results of conservative function domains of CCAR1

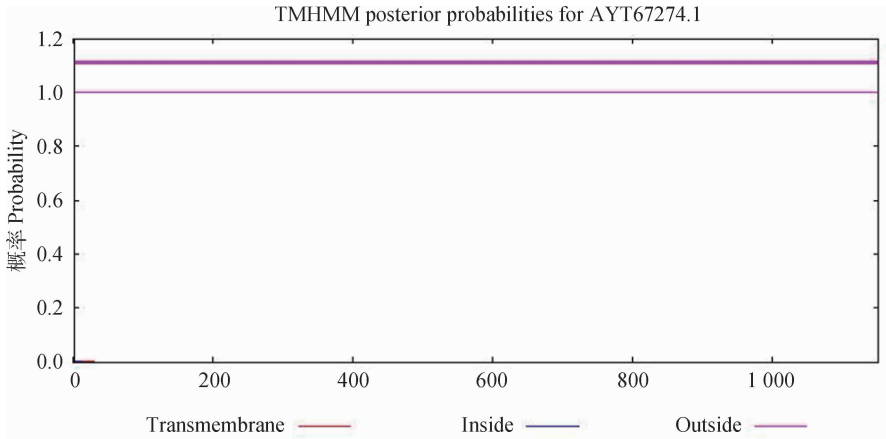


图 3 CCAR1 跨膜预测结果

Fig. 3 The prediction results of transmembrane of CCAR1

2.2 CCAR1 亚细胞定位

为确定 CCAR1 在细胞中的表达定位,本研究采用免疫荧光技术在 PK15 细胞系中检测其亚细胞

定位,结果表明,CCAR1 蛋白在细胞质和细胞核中均有表达(图 6)。

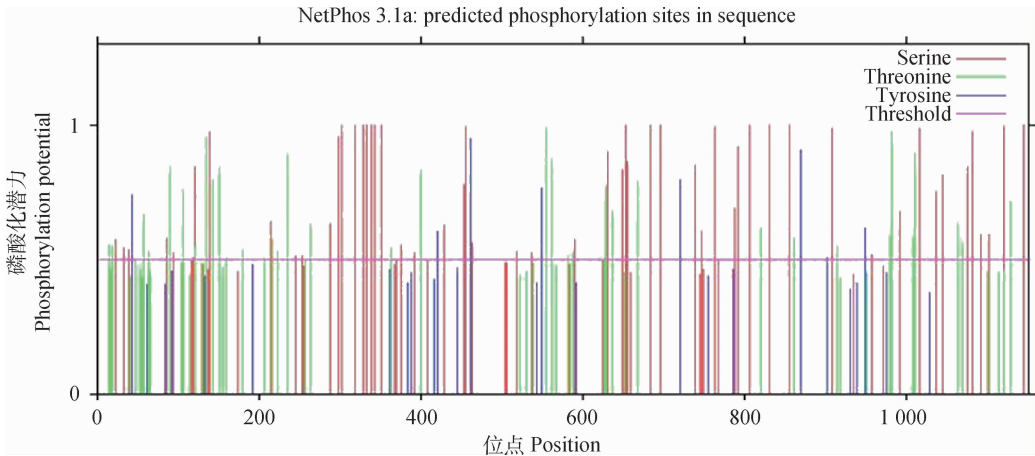


图 4 CCAR1 磷酸化位点预测结果

Fig. 4 The prediction results of phosphorylation sites of CCAR1

2.3 猪 CCAR1 基因表达特征

2.3.1 不同组织 CCAR1 基因 mRNA 表达谱分析

本研究采用 qRT-PCR 方法检测了 CCAR1 基因在不同组织中的表达规律,结果表明(图 7),在马身猪中,CCAR1 基因 mRNA 在心、肝、皮下脂肪、脾、肾、

小肠、小脑以及肌肉等组织中均有表达,其中,在肾中的表达量最高,极显著高于其他组织($P < 0.01$),其次是小肠和小脑组织,在脾、肝、肌肉中呈中度表达,在心和皮下脂肪中表达量最低。大白猪不同组织 CCAR1 基因表达谱与马身猪基本相似,在肾和小肠

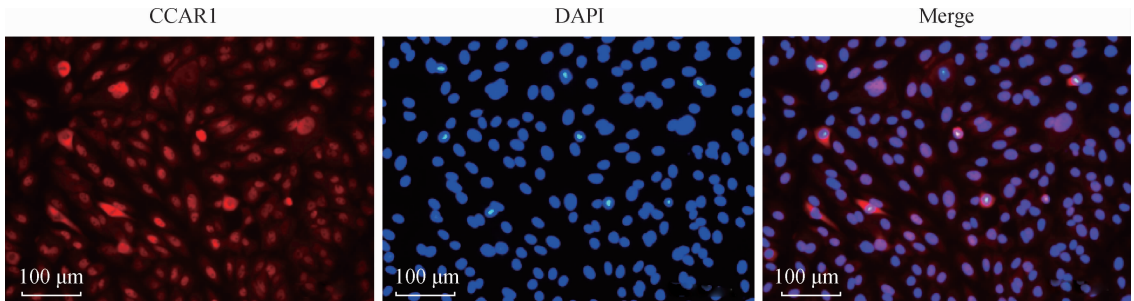
Results of the *k*-NN Prediction

$k = 9/23$

73.9%: nuclear
13.0%: cytoskeletal
8.7%: mitochondrial
4.3%: plasma membrane

图 5 CCAR1 亚细胞定位预测结果

Fig. 5 The prediction results of subcellular localization of CCAR1



CCAR1 蛋白为红色荧光;细胞核用 DAPI 染色,为蓝色荧光;Merge 为叠加图

CCAR1 protein appeared in red; Cell nuclei were stained with DAPI and appeared in blue; Merge was superposition graph

图 6 CCAR1 在 PK15 细胞中的亚细胞定位

Fig. 6 Subcellular localization of CCAR1 in PK15 cells

中表达量最高,在肝、脾、小脑、肌肉组织中呈中度表达,在心和皮下脂肪中低表达。

2.3.2 不同发育阶段肌肉组织中 CCAR1 基因的表达规律 对大白猪和马身猪在初生、3 月龄、6 月龄等阶段腰大肌 (psoas muscle) 和背最长肌 (*longissimus dorsal*) 中 CCAR1 基因 mRNA 表达量进行了检测,结果发现 (图 8),大白猪腰大肌中,CCAR1 基因的表达量在 6 月龄时最高,极显著高于初生和 3 月龄 ($P < 0.01$),而初生和 3 月龄的表达量差异不显著 ($P > 0.05$);大白猪背最长肌中,CCAR1 基因的表达量在 3 月龄最高,极显著高于初生和 6 月龄 ($P < 0.01$),初生时的表达量显著高于 6 月龄 ($P < 0.05$)。马身猪腰大肌中,CCAR1 基因的表达规律与大白猪不同,3 月龄时表达量最高,极显著高于 6 月龄和初生阶段 ($P < 0.01$),6 月龄的表达量显著高于初生阶段 ($P < 0.05$);马身猪背最长肌中,CCAR1 基因的表达量也是 3 月龄时最高,显著高于初生时 ($P < 0.05$),但与 6 月龄时的表达量差异不显著,6 月龄的表达量显著高于初生阶段 ($P < 0.05$)。

2.4 CCAR1 基因对细胞增殖的影响

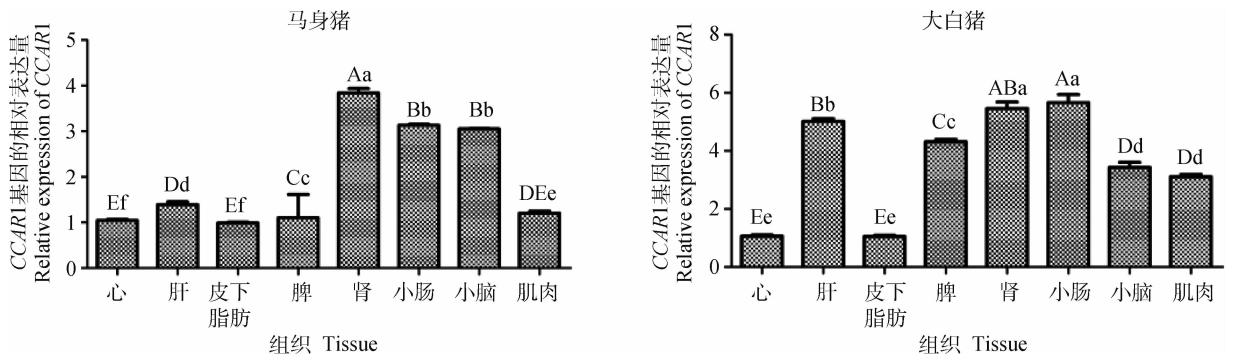
2.4.1 Cas9-CCAR1 敲除载体的构建与细胞转染 将合成的 sgRNA 序列退火后与经 *BsmB* I 线

性化的 Cas9 质粒连接,连接产物转化至感受态细胞,经涂板、培养、单菌落摇菌后,提取质粒进行测序鉴定,结果表明 3 条重组质粒均构建成功 (图 9)。

空质粒以及重组质粒转染 PK15 细胞 12 h 后即可进行观察。在荧光显微镜下试验组和阴性对照组均可以观察到绿色荧光 (图 10),转染效率为 20%~30%,表明质粒转染成功,可进行下一步试验。

2.4.2 不同重组质粒的敲除效果比较 在 PK15 细胞中转染重组质粒后,继续培养 48 h,收集细胞,分别提取细胞 RNA 和蛋白质,进行 qRT-PCR 和 Western blot 检测。与 NC 组相比,SG1 和 SG3 组 CCAR1 基因在 mRNA 和蛋白水平上的表达量均呈现极显著下降 ($P < 0.01$),SG2 组 CCAR1 基因的表达量呈显著下降 ($P < 0.05$,图 11)。

2.4.3 CCAR1 基因敲除后对细胞增殖的影响 使用 CCK8 试剂盒检测细胞增殖,结果见图 12。由图 12 可以看出,在 PK15 细胞中,与 NC 组相比,SG3 试验组对细胞增殖的抑制作用最为明显,SG1 试验组次之,最后是 SG2 试验组。但在各试验组中,在 48 h 及以后,均对细胞增殖产生了极显著抑制 ($P < 0.01$),表明 CCAR1 基因敲除后对细胞增殖产生抑制作用。



柱状图的数值为“平均数±标准误”。相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),不同大写字母表示差异极显著($P<0.01$).下同

Values of histogram are the “mean±standard error”. The same letter represents no significant difference($P>0.05$), different lowercase letters represent significant difference ($P<0.05$), different capital letters represent extremely significant difference ($P<0.01$). The below is the same

图 7 1 日龄马身猪和大白猪 8 个组织中 *CCAR1* 基因 mRNA 的相对表达量

Fig. 7 The mRNA relative expression of *CCAR1* gene in 8 tissues of Mashen and Large White pigs of 1-day-old

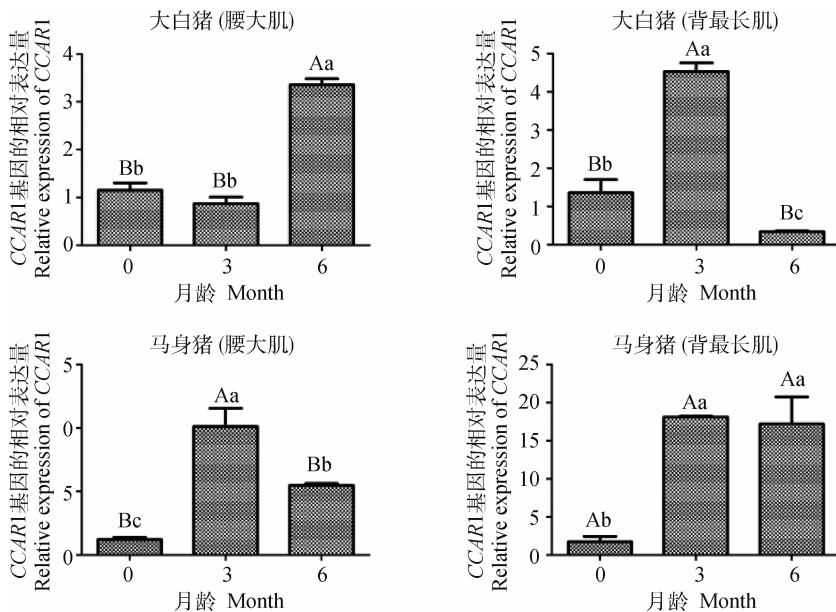


图 8 马身猪和大白猪不同发育阶段腰大肌和背最长肌中 *CCAR1* 基因 mRNA 相对表达量

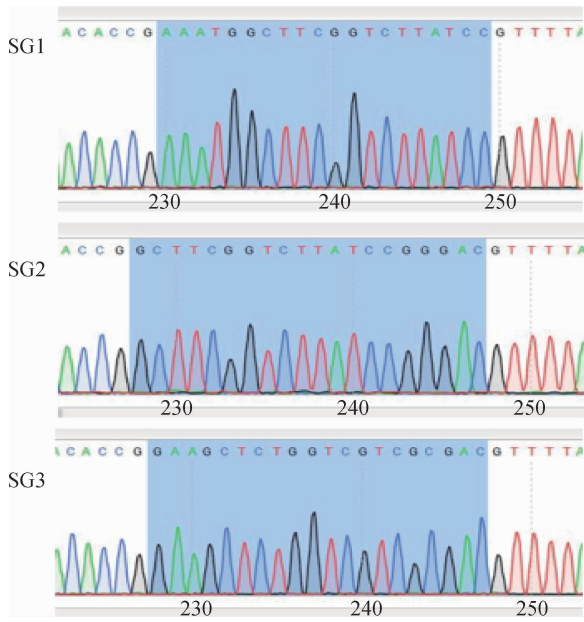
Fig. 8 The relative expression of *CCAR1* mRNA in psoas muscle and *longissimus dorsal* muscle at different developmental stages in Mashen and Large White pigs

2.4.4 转染 SG3 敲除载体对细胞增殖及凋亡相关基因表达的影响 在 PK15 细胞中,转染 SG3 后,细胞增殖标记基因 *Mki67* 表达水平显著下降($P<0.05$),凋亡标记基因 *Parp2* 的表达量极显著上升($P<0.01$),而凋亡标记基因 *Caspase3* 和 Wnt 通路核心蛋白 β catenin 的表达量未见显著变化, Wnt 通路下游靶基因 *C-myc* 表达量显著下降($P<0.05$,图 13)。

3 讨论

CCAR1 基因是细胞中比较保守的基因,在个体发育过程中,其表达量一直处于稳定增长的趋势,说明该基因在个体发育过程中具有重要作用。

贾宝林^[2]对中国卤虫 *CCAR1* 的细胞定位进行了研究,PSORT 软件预测发现,*CCAR1* 中有 30.4% 位于细胞质中,17.4% 位于细胞核中,21.7%



阴影部分为 sgRNA 序列
The shadow parts are sgRNAs sequence

图 9 重组质粒部分测序结果
Fig. 9 Partial sequencing results of recombinant plasmids

位于线粒体中,13%位于内质网中,其余位于高尔基体及囊泡分泌系统等,随后的细胞免疫荧光试验也表明,CCAR1 遍布细胞质内^[21],各细胞器均有分布。本研究中,在 PK15 细胞中,CCAR1 在细胞质和细胞核中均有表达,表明 CCAR1 既可以作为转录共激活分子,在细胞核中调控靶基因的表达,又可以作为信号分子在细胞质中扩散和响应细胞信号,参与各种细胞过程。

本研究中,CCAR1 基因在马身猪和大白猪的心、肝、皮下脂肪、脾、肾、小肠、小脑以及肌肉等组织中均有表达,且在初生、3 月龄、6 月龄等阶段的腰大肌和背最长肌中也均有表达,表明该基因参与绝大多数细胞的生命活动,在个体发育过程中有重要作用。本研究结果与贾宝林^[2]对中国卤虫的研究结果一致,该结果表明,CCAR1 在卤虫的头、胸、腹以及附肢、卵囊等器官和组织内均有表达,且在卤虫的整个发育时期内都保持着较高的表达量,其表达量变化趋势与卤虫的生长发育有一定的关联性^[2]。本研究中,不同猪种不同肌肉组织中 CCAR1 基因的发

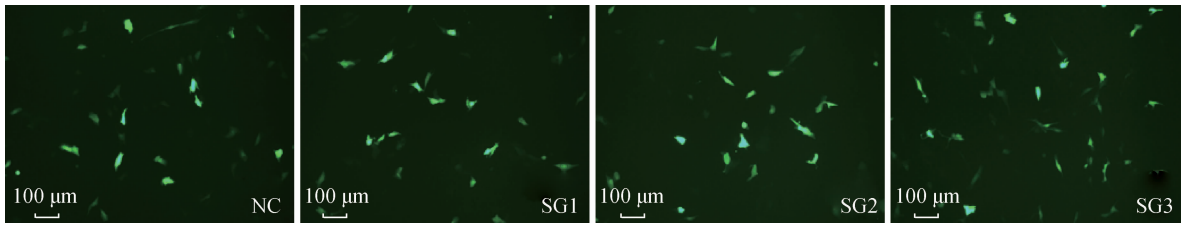
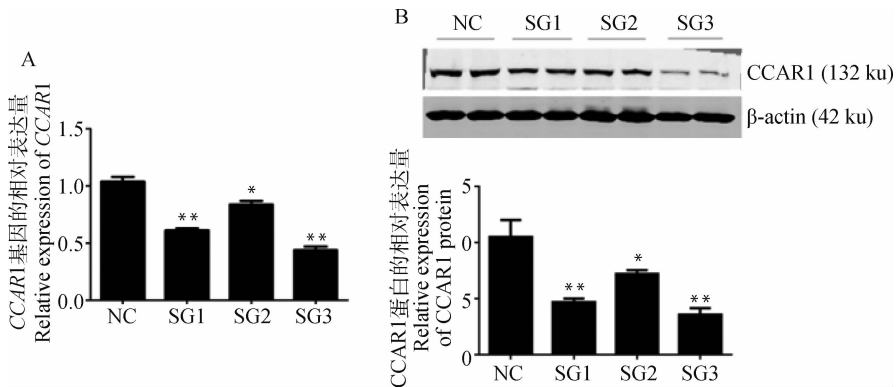


图 10 质粒转染 PK15 细胞荧光下视野
Fig. 10 Plasmid transfected PK15 cells in microscopy under fluorescent field



A. qRT-PCR 检测 CCAR1 基因的干扰效率;B. Western blot 检测 CCAR1 蛋白的干扰效果。* . $P < 0.05$, * * . $P < 0.01$, 下同

A. The interference efficiency of CCAR1 gene by qRT-PCR; B. The interference efficiency of CCAR1 protein by Western blot. * . $P < 0.05$, * * . $P < 0.01$, the same as below

图 11 转染 SG1、SG2 和 SG3 质粒后 PK15 细胞中 CCAR1 基因 mRNA 和蛋白的表达情况
Fig. 11 mRNA and protein expression of CCAR1 gene in PK15 cell transfected with SG1, SG2, and SG3 plasmids

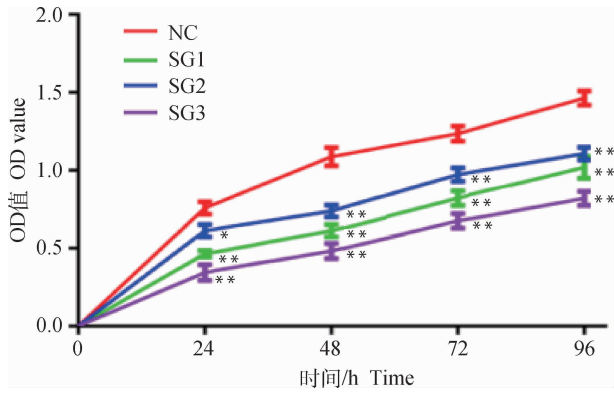


图 12 转染 SG1、SG2 和 SG3 质粒后 PK15 细胞的增殖能力
Fig. 12 Cell proliferation ability of PK15 cell transfected with SG1, SG2, and SG3 plasmids

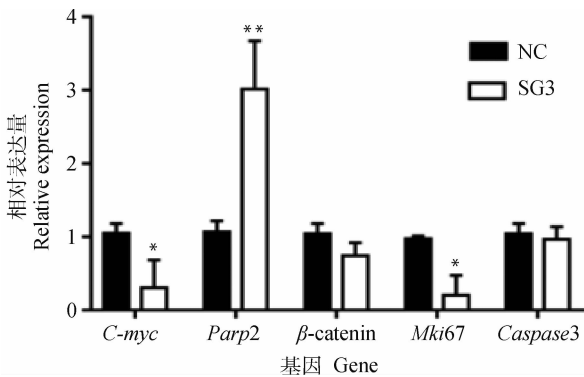


图 13 PK15 细胞中转染 SG3 对 *C-myc*、*Parp2*、*beta-catenin*、*Mki67*、*Caspase3* 基因表达的影响
Fig. 13 The mRNA expressions of *C-myc*, *Parp2*, *beta-catenin*, *Mki67* and *Caspase3* genes in PK15 cell transfected with SG3

育性表达规律不同,大白猪背最长肌、马身猪腰大肌和背最长肌中 *CCAR1* 基因的表达量均表现为 3 月龄时最高,随后维持稳定或下降;而大白猪腰大肌中 *CCAR1* 基因的表达量在 6 月龄达到最高。这种差异可能与品种与肌肉类型的互作有关,需要进一步深入研究。

CRISPR/Cas9 系统是目前应用最广泛的基因组编辑系统^[22-24],该系统通过向导 RNA 和靶标 DNA 的碱基互补配对实现对基因组 DNA 的特异性切割^[25-27],已应用于多种动物基因组靶向修饰的研究中^[28-33]。Bi 等^[34]利用 CRISPR/Cas9 技术得到了 *MSTN* 基因单敲除猪,检测发现,*MSTN* 的表达量下降了大约 50%。Zhou 等^[35]用 CRISPR/Cas9 系统成功获得 *PINK1* 和 *PARK2* 两个基因同时敲除猪及酪氨酸酶 (tyrosinase, TYR) 双染色体突变个体,为研究白化病提供了动物模型。本研究利用

在线网站 <http://crispr.dbcls.jp/> 针对 *CCAR1* 基因的 CDS 区进行 sgRNA 的设计,选择了 3 条得分较高的序列作为打靶序列进行敲除载体的构建,结果表明,在 PK15 细胞中,SG1 和 SG3 试验组 *CCAR1* 基因 mRNA 和蛋白质表达水平极显著下降 ($P < 0.01$),SG2 组 *CCAR1* 基因 mRNA 和蛋白质表达水平显著下降 ($P < 0.05$),表明构建的 3 个敲除载体均具有降低 *CCAR1* 基因表达水平的作用,综合来看,SG3 敲除效果最好且最稳定。

细胞增殖是细胞生长发育的基础^[36-37],研究表明,*CCAR1* 基因对细胞增殖存在一定的调控作用。*CCAR1* 是细胞核周的磷酸化蛋白,是 Wnt/ β -catenin 信号通路的一个新的组成元件,可作为类固醇/甲状腺细胞核受体、 β -catenin、(APC/C)E3 连接酶和抑癌基因 *p53* 等的共激活因子,调节细胞生长和凋亡等生物学过程^[2]。目前有关 *CCAR1* 的研究主要集中在癌症与癌细胞上。在 167 个肝细胞癌案例中,共观察到 149 个案例存在高的 *CCAR1* 蛋白表达以及微血管侵犯、肝内转移等^[38]。在人类乳腺癌细胞中,*CCAR1* 最初被鉴定为一种由维甲酸 (CD437) 和化疗药物诱导凋亡信号中所必需的蛋白质^[16]。结肠癌细胞系中,在依赖于 β -catenin 存在的情况下,*CCAR1* 与 Wnt 信号通路靶基因的启动子结合激活 Wnt 靶基因,敲除 *CCAR1* 会抑制 Wnt 靶基因的表达并且抑制结肠癌细胞系的生长^[17]。本研究中,转染 *CCAR1* 敲除载体 48 h 后,PK15 细胞的增殖能力明显下降 ($P < 0.01$),且转染 SG3 后,细胞增殖标记基因 *Mki67* 表达水平显著下降 ($P < 0.05$),Wnt 通路下游靶基因 *C-myc* 表达量显著下降 ($P < 0.05$),这与前人研究中敲除 *CCAR1* 抑制 Wnt 靶基因表达的结论一致。在对胃癌细胞株 AGS 和 MKN28 的研究中,使用慢病毒表达载体 shRNA 沉默 *CCAR1* 的表达后,内源 *CCAR1* 的水平降低,显著影响 Wnt 信号转导的靶基因如 *AXIN2*、*Lgr5*、*CD44*、*survivin* 和 *C-myc* 的表达^[10]。可见,*CCAR1* 基因不仅在癌细胞中调控细胞增殖,在 PK15 细胞中,也可以通过调控细胞增殖基因 *Mki67* 和 Wnt 通路下游靶基因 *C-myc* 的作用而影响细胞的增殖。

CCAR1 似乎是调节细胞生长和细胞凋亡的双相调节因子。Ou^[11] 研究表明,在 HT29 结肠癌细胞中,*CCAR1* 能够与 β -catenin 相互作用,增强 β -catenin 下游靶基因的转录活性,介导结肠癌细胞的生长;减少 *CCAR1* 或 β -catenin 的表达,不影响结

肠癌细胞生长, 只能降低结肠癌细胞的克隆形成能力。本研究中, 在 PK15 细胞中, 通过 CRISPR/Cas9 技术减少 CCAR1 表达的同时, 也显著降低了 Wnt 靶基因 *C-myc* 及细胞增殖标记基因 *Mki67* 的表达, 并对细胞增殖产生了显著的抑制作用。此外, 转染 SG3 前后, 虽然凋亡标记基因 *Caspase3* 的表达在 PK15 细胞中未发生显著变化, 但 *Parp2* 的表达量却极显著上升 ($P < 0.01$)。 *Parp2* 是细胞凋亡核心成员 Caspase 的切割底物^[39], 在 DNA 损伤修复与细胞凋亡中发挥着重要作用^[40], 可作为细胞凋亡的标志。本研究结果表明, 在 PK15 细胞中, 敲除 CCAR1 基因不仅抑制细胞的增殖, 还有可能会促进细胞凋亡, 这与 Chang 等^[10] 研究中通过慢病毒表达载体 shRNA 沉默 CCAR1 的表达后, 不仅显著抑制 Wnt 信号通路靶基因的表达而抑制细胞增殖, 而且导致 AGS 和 MKN28 细胞产生凋亡的结果相一致。

4 结 论

本研究成功获得了猪 CCAR1 基因的完整 CDS 区序列 (MH301308.1), 长 3 459 bp, 定位于细胞质和细胞核中; CCAR1 基因在马身猪和大白猪所检测的组织及不同月龄的肌肉组织中均有表达; 采用 CRISPR/Cas9 技术敲低 CCAR1 基因的表达后, PK15 细胞的增殖能力受到显著抑制, CCAR1 基因通过调控细胞增殖基因 *Mki67* 和 Wnt 通路下游靶基因 *C-myc* 的作用而影响细胞增殖, 在个体生长发育过程中有重要作用。

参考文献 (References):

- [1] ZHU Y J, ZHENG B, LUO G J, et al. Circular RNAs negatively regulate cancer stem cells by physically binding FMRP against CCAR1 complex in hepatocellular carcinoma [J]. *Theranostics*, 2019, 9 (12): 3526-3540.
- [2] 贾宝林. CCAR-1 在中国卤虫胚胎滞育解除过程中的作用[D]. 大连: 辽宁师范大学, 2016.
JIA B L. The potential role of CCAR-1 during the diapause embryonic restarting process of *Artemia sinica* [D]. Dalian: Liaoning Normal University, 2016. (in Chinese)
- [3] MUTHU M, CHERIYAN V T, RISHI A K. CARP-1/CCAR1: A biphasic regulator of cancer cell growth and apoptosis[J]. *Oncotarget*, 2015, 6(9): 6499-6510.
- [4] ZHANG L Y, LEVI E, MAJUMDER P, et al. Trans-activator of transcription-tagged cell cycle and apoptosis regulatory protein-1 peptides suppress the growth of human breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [J]. *Mol Cancer Ther*, 2007, 6(5): 1661-1672.
- [5] 傅 容. CCAR-1 通过调节 unc-52/perlecan 的 RNA 选择性剪接影响半桥粒结构[D]. 苏州: 苏州大学, 2017.
FU R. CCAR-1 affects hemidesmosome biogenesis by regulating unc-52/perlecan alternative splicing [D]. Suzhou: Soochow University, 2017. (in Chinese)
- [6] MATTES B, DANG Y L, GREICIUS G, et al. Wnt/PCP controls spreading of Wnt/ β -catenin signals by cytonemes in vertebrates [J]. *eLife*, 2018, 7: e36953.
- [7] LUKE J J, BAO R Y, SWEIS R F, et al. Wnt/ β -catenin pathway activation correlates with immune exclusion across human cancers [J]. *Clin Cancer Res*, 2019, 25(10): 3074-3083.
- [8] COHEN M, AMIR S, GOLAN M, et al. β -TrCP up-regulates HIF-1 in prostate cancer cells [J]. *Prostate*, 2019, 79(4): 403-413.
- [9] 张宁芳, 高鹏飞, 成志敏, 等. Wnt 信号通路对细胞增殖的调控 [J]. *生命科学*, 2018, 30(5): 551-558.
ZHANG N F, GAO P F, CHENG Z M, et al. Regulation of the Wnt signaling pathway on cell proliferation [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2018, 30(5): 551-558. (in Chinese)
- [10] CHANG T S, WEI K L, LU C K, et al. Inhibition of CCAR1, a coactivator of β -catenin, suppresses the proliferation and migration of gastric cancer cells [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(2): 460.
- [11] OU C Y. Differential role of two coactivators, CCAR1 and CARM1, for dysregulated β -catenin activity in colorectal cancer cell growth and gene expression [D]. Los Angeles: University of Southern California, 2010.
- [12] FRANÇOIS S, D'ORLANDO C, FATONE T, et al. Necdin enhances myoblasts survival by facilitating the degradation of the mediator of apoptosis CCAR1/CARP1 [J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43335.
- [13] PULIYAPPADAMBA V T, WU W J, BEVIS D, et al. Antagonists of anaphase-promoting complex (APC)-2-cell cycle and apoptosis regulatory protein (CARP)-1 interaction are novel regulators of cell growth and apoptosis [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(44): 38000-38017.
- [14] KIM J H, YANG C K, HEO K, et al. CCAR1, a key regulator of mediator complex recruitment to nuclear receptor transcription complexes [J]. *Mol Cell*, 2008,

- 31(4):510-519.
- [15] SEKHAR S C, VENKATESH J, CHERIYAN V T, et al. A H2AX - CARP-1 interaction regulates apoptosis signaling following DNA damage[J]. *Cancers*, 2019, 11(2): 221.
- [16] RISHI A K, ZHANG L Y, BOYANAPALLI M, et al. Identification and characterization of a cell cycle and apoptosis regulatory protein-1 as a novel mediator of apoptosis signaling by retinoid CD437[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(35): 33422-33435.
- [17] OU C Y, KIM J H, YANG C K, et al. Requirement of cell cycle and apoptosis regulator 1 for target gene activation by Wnt and β -catenin and for anchorage-independent growth of human colon carcinoma cells [J]. *J Biol Chem*, 2009, 284(31): 20629-20637.
- [18] CHERIYAN V T, MUTHU M, PATEL K, et al. CARP-1 functional mimetics are novel inhibitors of drug-resistant triple negative breast cancers[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(45): 73370-73388.
- [19] 吕蓉蓉, 齐洁敏, 陈 龙. 凋亡相关因子 CCAR1、Par-4 在胃癌中的表达及临床意义[J]. 承德医学院学报, 2018, 35(6): 451-454.
- LV R R, QI J M, CHEN L. Expression and significance of apoptosis related factors CCAR1 and Par-4 in gastric adenocarcinoma [J]. *Journal of Chengde Medical College*, 2018, 35(6): 451-454. (in Chinese)
- [20] ASHOUR A E, JAMAL S, CHERYAN V, et al. Abstract 5566: CARP-1 functional mimetics (CFMs): a novel class of small molecule inhibitors (SMIs) of medulloblastoma cell growth[J]. *Cancer Res*, 2013, 73 (8 Supplement): Abstract nr 5566.
- [21] 贾宝林. CARP-1 (Cell Division Cycle and Apoptosis Regulator Protein 1) 的生物功能和表达模式探究[J]. 生物化工, 2016, 2(2): 39-40.
- JIA B L. The expression pattern and biological function of CARP-1 (Cell Division Cycle and Apoptosis Regulator Protein 1)[J]. *Biological Chemical Engineering*, 2016, 2(2): 39-40. (in Chinese)
- [22] ADELMANN C H, WANG T, SABATINI D M, et al. Genome-Wide CRISPR/Cas9 screening for identification of cancer genes in cell lines [C]//Cancer Driver Genes. Methods in Molecular Biology. New York: Humana Press, 2019, 1907: 125-136.
- [23] SCHUSTER S, SARAVANAKUMAR S, SCHÖLS L, et al. Generation of a homozygous CRISPR/Cas9-mediated knockout human iPSC line for the *STUB1* locus[J]. *Stem Cell Res*, 2019, 34: 101378.
- [24] OAKES B L, FELLMANN C, RISHI H, et al. CRISPR-Cas9 circular permutants as programmable scaffolds for genome modification[J]. *Cell*, 2019, 176 (1-2): 254-267. E16.
- [25] 郭姗姗, 张冰莹, 何文欣, 等. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 CREB 基因敲除细胞系并探讨 CREB 对 APP 基因表达的调控作用[J]. 中国细胞生物学学报, 2017, 39(9): 1147-1155.
- GUO S S, ZHANG B Y, HE W X, et al. The establishment of stable CREB gene knock out cell lines with CRISPR/Cas9 technique and the regulatory effects of CREB on APP gene expression[J]. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2017, 39(9): 1147-1155. (in Chinese)
- [26] WANG K K, OUYANG H S, XIE Z C, et al. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16623.
- [27] YIN L L, MADDISON L A, LI M Y, et al. Multiplex conditional mutagenesis using transgenic expression of Cas9 and sgRNAs [J]. *Genetics*, 2015, 200 (2): 431-441.
- [28] BASSETT A R, TIBBIT C, PONTING C P, et al. Highly efficient targeted mutagenesis of *Drosophila* with the CRISPR/Cas9 system[J]. *Cell Rep*, 2013, 4 (1): 220-228.
- [29] CHANG N N, SUN C H, GAO L, et al. Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos[J]. *Cell Res*, 2013, 23(4): 465-472.
- [30] LO T W, PICKLE C S, LIN S, et al. Precise and heritable genome editing in evolutionarily diverse nematodes using TALENs and CRISPR/Cas9 to engineer insertions and deletions[J]. *Genetics*, 2013, 195(2): 331-348.
- [31] LI D L, QIU Z W, SHAO Y J, et al. Heritable gene targeting in the mouse and rat using a CRISPR-Cas system[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(8): 681-683.
- [32] SU Y H, LIN T Y, HUANG C L, et al. Construction of a CRISPR-Cas9 system for pig genome targeting [J]. *Anim Biotechnol*, 2015, 26(4): 279-288.
- [33] HORVATH P, BARRANGOU R. CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea[J]. *Science*, 2010, 327(5962): 167-170.
- [34] BI Y Z, HUA Z D, LIU X M, et al. Isozygous and selectable marker-free *MSTN* knockout cloned pigs generated by the combined use of CRISPR/Cas9 and Cre/LoxP[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 31729.
- [35] ZHOU X Q, XIN J G, FAN N N, et al. Generation of

- CRISPR/Cas9-mediated gene-targeted pigs via somatic cell nuclear transfer[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015,72(6):1175-1184.
- [36] EVAN G I, VOUSDEN K H. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer[J]. *Nature*, 2001,411(6835): 342-348.
- [37] PIKE M C, SPICER D V, DAHMOUSH L, et al. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk[J]. *Epidemiol Rev*, 1993, 15(1):17-30.
- [38] HA S Y, KIM J H, YANG J W, et al. The overexpression of CCAR1 in hepatocellular carcinoma associates with poor prognosis [J]. *Cancer Res Treat*, 2016,48(3):1065-1073.
- [39] FARRÉS J, LLACUNA L, MARTIN-CABALLERO J, et al. PARP-2 sustains erythropoiesis in mice by limiting replicative stress in erythroid progenitors [J]. *Cell Death Differ*, 2015,22(7):1144-1157.
- [40] BECK C, ROBERT I, REINA-SAN-MARTIN B, et al. Poly(ADP-ribose) polymerases in double-strand break repair: focus on PARP1, PARP2 and PARP3 [J]. *Exp Cell Res*, 2014,329(1):18-25.

(编辑 郭云雁)