

张静远,姜晓龙,崔淑芳. 基于 CRISPR/Cas9 系统构建裸鼹鼠 HIF-1 α 基因敲除质粒及其功能验证 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32(2): 202-209.

ZHANG J Y, JIANG X L, CUI S F. Construction of HIF-1 α gene knockout plasmid and functional verification in naked mole rats based on CRISPR/Cas9 system [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(2): 202-209.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2024.02.007

基于 CRISPR/Cas9 系统构建裸鼹鼠 HIF-1 α 基因敲除质粒及其功能验证

张静远,姜晓龙,崔淑芳*

(海军军医大学基础医学院实验动物学教研室,上海 200433)

【摘要】 目的 利用簇状规则间隔回文重复序列 (CRISPR)/Cas9 基因编辑系统构建质粒并敲除裸鼹鼠皮肤成纤维 (NSF skin fibroblasts, NSF) 细胞 HIF-1 α 基因,为研究裸鼹鼠的耐低氧机制及缺氧相关疾病的发生发展机制提供体外细胞模型。**方法** 针对裸鼹鼠 HIF-1 α 基因的 1 ~ 4 号外显子区域设计 4 对 sgRNA 序列,并成功构建表达质粒。筛选得到最优 sgRNA 后,转染 HEK-293T 细胞收集上清液测定病毒滴度。前期用 pLenti-Cas9 (blast) 病毒感染 NSF 细胞,后用制备的 HIF-1 α -sgRNA 病毒感染表达 Cas9 蛋白的 NSF 细胞。经药筛后观察荧光表达,同时提取细胞 gDNA 和蛋白。通过 T7E1 酶和 Western Blot 检测 NSF 细胞中 HIF-1 α 基因变化及蛋白表达情况。**结果** Sanger 测序显示,所设计的 sgRNA 成功插入到 pX459 和 pKLV2-U6-sgRNA2 载体上,序列验证正确,重组质粒构建成功;T7E1 酶切实验成功切除 3 条带,sgRNA 的打靶效率为 54%,Western Blot 结果表明,经药筛后的裸鼹鼠 NSF 细胞 HIF-1 α 基因敲除成功,蛋白水平显著降低 ($P = 0.0019$);且未发现 HIF-1 α 敲除细胞形态的明显变化,基因敲除对细胞增殖能力无明显影响。**结论** 成功构建靶向裸鼹鼠 HIF-1 α 基因的 CRISPR/Cas9 质粒,且质粒靶向敲除 HIF-1 α 基因功能验证成功,将有利于裸鼹鼠耐低氧机制研究,并为人类缺氧相关疾病防治提供理论依据。

【关键词】 裸鼹鼠;HIF-1 α ;基因敲除;CRISPR/Cas9 系统

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1005-4847 (2024) 02-0202-08

Construction of HIF-1 α gene knockout plasmid and functional verification in naked mole rats based on CRISPR/Cas9 system

ZHANG Jingyuan, JIANG Xiaolong, CUI Shufang*

(Department of Laboratory Animal Science, School of Basic Medical Sciences, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

Corresponding author: CUI Shufang. E-mail: youngstar_sf@163.com

【Abstract】 Objective To construct plasmids and knock out HIF-1 α gene expression in an naked mole rat skin fibroblasts (NSF) cell line using CRISPR/Cas9 genomic editing technology, to provide an *in vitro* cell model for studying the mechanism of hypoxia tolerance and the occurrence and development of hypoxia-related diseases in naked mole rats. **Methods** We designed four pairs of single guide RNA (sgRNA) sequences targeting exons 1 ~ 4 of the NSF HIF-1 α gene and successfully constructed an expression plasmid. The plasmid with the optimal sgRNA was identified and transfected into 293T cells, and the supernatant was used for detecting the virus titer. Lentivirus particles carrying sgRNAs

【基金项目】 全军实验动物专项 (SYDW[2018]18, SYDW[2018]17), 上海市军民融合发展专项 (2020-jmrh1-kj9)。

Funded by Military Experimental Animal Project (SYDW[2018]18, SYDW[2018]17), Shanghai Military-Civilian Integration Development Project (2020-jmrh1-kj9)。

【作者简介】 张静远,女,助教,硕士,研究方向:实验动物学。Email:457541734@qq.com

【通信作者】 崔淑芳,女,教授,研究方向:实验动物资源开发与疾病动物模型研究。Email:youngstar_sf@163.com

of HIF-1 α were transfected into NSF cells which express Cas9 protein, based on a previous protocol. After transfection, fluorescence signals were observed under a fluorescence microscope, and HIF-1 α expression in NSF cells was detected by Western Blot and T7 endonuclease 1 (T7E1) analysis. **Results** Sanger sequencing showed that the designed sgRNA was successfully inserted into pX459 and pKLV2-U6-sgRNA2 vectors, demonstrating successful construction of a recombinant plasmid for transfection. T7E1 digestion successfully removed three bands and the target efficiency of sgRNA was 54%. Western Blot showed that the HIF-1 α gene was successfully knocked out and its protein level was significantly reduced in NSF cells from naked mole rats ($P = 0.0019$). There were no obvious morphological changes in HIF-1 α -knockout cells under the microscope, and gene knockout had no obvious effect on cell proliferation. **Conclusions** We successfully constructed an HIF-1 α -knockout cell line using CRISPR/Cas9 technology, to provide an experimental basis for further studies of the biological function of HIF-1 α , as well as the mechanism of hypoxia tolerance in naked mole rats. The result also provide a theoretical foundation for the prevention and treatment of hypoxia-related diseases.

[Keywords] naked mole rat; HIF-1 α ; gene knockout; CRISPR/Cas9 technology
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

裸鼹鼠 (naked mole rat) 是已知寿命最长的啮齿类动物,最长寿命超过 30 年,其生活方式类似于蚂蚁为洞穴群居生物,每个社会群体可多达 300 多个社会成员^[1]。裸鼹鼠的这种生活方式使其可以在低氧、高二氧化碳的环境中生存。这种环境对于人和大多数哺乳动物而言都是致命的,会导致缺氧和高碳酸血症的发生^[2-3]。而裸鼹鼠表现出独特的生理特征,可抵抗生活在这种环境中的不利影响。其在缺氧环境中的优秀表现,吸引了很多学者的目光,也逐渐成为缺氧性病症研究的模式生物^[4]。

在生命体中约 1.0% ~ 1.5% 的基因组受缺氧的转录调控,缺氧诱导因子 (HIF)-1 α 是调节这些基因的转录因子,也是目前发现的唯一在特异性低氧状态下发挥活性的转录因子^[5]。基因编辑技术是一项可对生物基因组进行定向改造的新技术,是研究基因功能的有利手段^[6]。随着对基因编辑技术的不断探索,CRISPR/Cas9 系统逐渐取代早期的 TALEN 和 ZFN 技术,其以特异性强、基因编辑设计流程简化被广泛应用于多种物种的精确修饰^[7-9]。因此,本文以裸鼹鼠皮肤成纤维细胞 (NSF) 为研究对象,通过 CRISPR/Cas9 系统对 HIF-1 α 进行敲除,为裸鼹鼠耐低氧机制研究以及 HIF-1 α 在缺氧相关疾病的深入研究提供体外细胞模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞和载体

裸鼹鼠皮肤成纤维细胞由本实验室保存;主要载体 pX459-CRISPR-puro、pLenti-cas9-blast、pLenti-sgRNA、psPAX2、pMD2. G 均为实验室前期留存的载体。

1.1.2 主要试剂与仪器

细胞培养所需胎牛血清 (FBS)、青霉素/链霉素、DMEM (低糖)、0.25% 胰蛋白酶均购自美国 Gibco 公司;大肠杆菌 DH5 α 感受态购自天根生化科技 (北京) 有限公司,DNA 提取试剂盒、质粒提取试剂盒购自美国 Omega Bio-Tek 公司,转染试剂 Lipofectamine™ 3000 购自赛默飞世尔科技 (中国) 有限公司;抗体购自美国 Proteintech 公司,嘌呤霉素、杀稻瘟菌素购自美国 Sigma 公司,引物合成及测序委托上海生工生物工程有限公司进行。三气培养箱 (Esco,新加坡)、倒置荧光显微镜 (Leica,德国)、低温高速离心机 (Eppendorf,德国)、电泳仪及转膜系统 (Bio-Rad,美国)、凝胶成像系统 (天能,中国)。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 的设计和合成

针对裸鼹鼠 HIF-1 α 基因序列及蛋白功能结构域,使用 CRISPR 在线设计工具,靶向 Exon1、Exon2、Exon3、Exon4 设计了 4 对 sgRNA 引物,分别为 sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3、sgRNA4 (见表 1),分别在其两端加上 BsmI 酶切位点。将序列送上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 sgRNA 筛选

将 pX459-CRISPR-puro 载体进行 BsmI 核酸内切酶酶切,胶回收后得到线性载体,分别与退火完成的 oligos 进行连接,然后将连接产物转化至 DH5 α 感受态细胞,经涂板过夜培养后挑取 3 个单克隆菌落摇菌扩增,部分菌液测序鉴定,其他菌液进行质粒抽提,将重组质粒命名为 pX459-CRISPR-puro-sgRNA1、pX459-CRISPR-puro-sgRNA2、pX459-CRISPR-puro-sgRNA3、pX459-CRISPR-puro-sgRNA4,利用电化学转染的方法,按照 Neon 电转说明书进行

表 1 CRISPR/Cas9 敲除 HIF-1α 基因 sgRNA 引物序列

Table 1 CRISPR/Cas9 knocks out the sgRNA primer sequence of HIF-1α gene	
名称 Items	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
sgRNA1-F	CACCGCTCTTTGCTTCGCCGAGATCTGG
sgRNA1-R	AAACCCAGATCTCGGCGAAGCAAAGAGC
sgRNA2-F	CACCGGCCCTGGATGGCTTTGTTATGG
sgRNA2-R	AAACCCATAACAAAGCCATCCAGGGCC
sgRNA3-F	CACCGAGAAAAGTCTTGCTATCTAGAGG
sgRNA3-R	AAACCTCTAGATAGCAAGACTTTTCTC
sgRNA4-F	CACCGCCAAAAGAGGTGGATATGTCTGG
sgRNA4-R	AAACCCAGACATATCCACCTCTTTTGGC

电转,工作模式为 program 1,转染质粒用量为 1 μg,后利用嘌呤霉素筛选阳性细胞。

在 sgRNA 敲除靶点两端设计特异性检测引物(见表 2),对目的片段进行扩增,按照胶回收试剂盒对目的片段进行回收,退火之后进行 T7E1 酶切实验,分别加入 NEB buffer2 2.5 μL、T7E1 酶 1 μL、蒸馏水 2 μL,按照 37 ℃ 1 h、75 ℃ 5 min 进行反应,利用 2.5% 琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切效果。通过 Image J 软件分析电泳条带灰度值,并按照公式 $f_{cut} = (b + c)/(a + b + c)$ 和 $indel(\%) = [1 - (1 - f_{cut})^{1/2}] \times 100$ 计算打靶效率,其中 a 是未被酶切条带灰度值,b 和 c 是酶切条带灰度值。

表 2 引物信息
Table 2 Primer information

名称 Items	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
HIF-1α-F-sg1	CATGTTTGTGCTCCCTTTTCG
HIF-1α-R-sg1	ATGCAGCCAGGCAAACTATT
HIF-1α-F-sg2	ACACAGGAAAAATAGATGCTGTAG
HIF-1α-R-sg2	CATTTCCTCATGGTCACACGG
HIF-1α-F-sg3	GCTCATGTACTTAGCTGGGCA
HIF-1α-R-sg3	GGCTTCAGGATATATCATTCTGTTC
HIF-1α-F-sg4	GTGGGAGGTTTATTTTCAGCTATGC
HIF-1α-R-sg4	CTGACGTGGAAACCTAAGCCA

1. 2. 3 pLenti-sgRNA 重组表达载体的构建与鉴定

将 pLenti-sgRNA 载体进行 *BsmI* 核酸内切酶酶切,胶回收后得到线性载体,与优选的退火 sgRNA 双链 oligos 进行连接,然后将连接产物转化至 DH5α 感受态细胞,经涂板过夜培养后挑取 3 个菌落进行单克隆摇菌扩增,部分菌液测序鉴定,其他菌液进行质粒抽提,将重组质粒命名为 pLenti-sgRNA。

1. 2. 4 慢病毒包装

取对数生长期、汇合度为 70% ~ 80% 的 HEK-293T 细胞,分别将载体 pLenti-Cas9 (blast)、重组质

粒 pLenti-sgRNA 各 1 μg 和慢病毒包装质粒 psPAX2 (0.75 μg)、pMD2.G (0.25 μg) 加入到 Opti-MEM 培养基 (125 μL) 和 P3000 (5 μL) 的混合液中,充分混匀制成质粒混合液备用。将 Lipofectamine 3000 (10 μL) 加入到 Opti-MEM 培养基 (240 μL) 中,充分混匀制成 Lipofectamine 3000-Opti-MEM 混合液备用。将两种混合液按照体积 1 : 1 充分混匀,于室温静置 10 min。然后将静置后的混合液缓按照每孔 250 μL 的体积缓慢滴加到处于对数生长期、汇合度为 70% ~ 80% 的 293T 细胞培养孔中。轻柔混匀之后,于二氧化碳细胞培养箱静置培养。48 h 后收集上清液,超速离心后用 0.22 μmol/L 滤器过滤,测定病毒滴度,立即使用或 -80 ℃ 保存。

1. 2. 5 裸鼯鼠 NFS 细胞杀稻瘟菌素、嘌呤霉素筛选浓度测定及慢病毒感染

从二氧化碳培养箱中取出处于对数生长期、汇合度为 70% 的裸鼯鼠 NFS 细胞,PBS 洗 1 次,加入适量 0.25% 胰酶消化,室温条件下进行离心,然后加入细胞培养基进行重悬,充分混匀后进行细胞计数。将细胞按照 10^4 个/孔的浓度均匀铺板,于培养箱中静置培养 24 h。第 2 天按照 0.5、1.0、1.2、2.0、3.0、4.0、8.0 μg/mL 的浓度梯度配置含稻瘟菌素和嘌呤霉素新鲜完全培养基并进行换液,每个浓度设置 3 个复孔,继续培养 48 h,选择能够完全杀死 NFS 细胞的浓度作为杀稻瘟菌素的最适浓度。

培养 NSF 细胞,取对数生长期的 NSF 细胞接种于六孔板,待细胞融合度约 30% 时,加入适量 pLenti-Cas9 (blast) 慢病毒颗粒进行感染 24 h,之后进行杀稻瘟菌素筛选。将筛选获得的阳性细胞传代后,分别加入适量 pLenti-sgRNA 慢病毒颗粒再次感染,24 h 后换嘌呤霉素筛选培养基继续培养观察,72 h 后根据蓝色荧光蛋白表达情况,收集细胞提取细胞总蛋白。

1. 2. 6 细胞总蛋白的提取及 Western Blot 检测

弃去细胞培养液,用 4 ℃ PBS 缓冲液冲洗细胞 2 次,使用 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂) 冰上静置 30 min。使用细胞刮刀收取细胞,于 4 ℃,12 000 r/min 条件下离心 15 min,留取上清。使用 BCA 蛋白定量试剂盒对提取的蛋白浓度进行定量分析,加入 5 × Loading buffer 100 ℃ 煮沸 5 min,之后进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,恒流 200 mA 转至孔径为 0.22 μmol/L 的 PVDF 膜上,5% 的脱脂奶粉室温封闭 1.5 h。分别加入特异性抗 HIF-1α 抗体

(1 : 1000) 与抗 GAPDH 抗体 (1 : 5000), 于 4 ℃ 条件下静置 12 h, 然后使用 TBST 洗涤 3 次, 每次洗涤 10 min, 然后于室温条件下静置 1.5 h, 再次进行 TBST 洗涤 3 次, 每次洗涤 10 min, 最后通过化学发光显影系统观察蛋白的表达情况。

1.2.7 NSF 细胞 HIF-1α 基因敲除及脱靶的鉴定

利用 sgRNA 敲除靶点两端设计特异性检测引物, 使用基因组试剂盒提取 NSF 细胞基因组 DNA, 以其为模板进行 PCR 扩增, 产物进行 Sanger 测序, 并与参考序列进行对比。

1.2.8 CCK8 检测细胞增殖活性

根据 CCK8 试剂盒说明书所示, 使用 DMEM 将细胞 (野生型/基因敲除) 分别稀释至每毫升 2×10^4 个, 充分混匀后按照每孔 100 μL 的体积接种到 96 孔培养板中, 空白孔只加 DMEM, 每组设置 3 个复孔, 于二氧化碳培养箱静置培养过夜后, 按照每孔 10 μL 的体积加入 CCK-8 试剂, 孵育 2 h 后通过酶标仪检测在 450 nm 波长处的吸光度 (OD₄₅₀)。

1.3 统计学分析

采用 Image J 1.52p 软件进行灰度分析, 向软件

中导入 Western Blot 条带图片, 并将其转化为灰度图片, 消除图片背景影响后选定区域进行灰度值测定, 然后将目的蛋白的灰度值除以内参蛋白的灰度值。数据用 Graphpad Prism 9 进行绘图及单因素方差分析 (ANOVA), $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 pX459-CRISPR-puro-HIF1α-sgRNA 质粒鉴定和 sgRNA 筛选

针对 HIF-1α 基因序列, 设计 4 对 sgRNA 序列 (sgRNA1、sgRNA2、sgRNA3、sgRNA4), 测序结果与所设计的 sgRNA 序列一致, 说明 pX459-CRISPR-puro-sgRNA1、pX459-CRISPR-puro-sgRNA2、pX459-CRISPR-puro-sgRNA3、pX459-CRISPR-puro-sgRNA4 和 pLenti-HIF1α-sgRNA 重组质粒构建成功 (见图 1)。T7E1 酶切实验琼脂糖凝胶电泳结果显示, HIF-1α-sg1、HIF-1α-sg2、HIF-1α-sg3、HIF-1α-sg4 引物扩增后的 PCR 产物长度分别为 468、411、401、459 bp, 其中, HIF-1α-sg2 的靶向片段经 T7E1 酶切后, 得到两条小片段, 大小分别为 220 bp 和 170 bp, 符合设

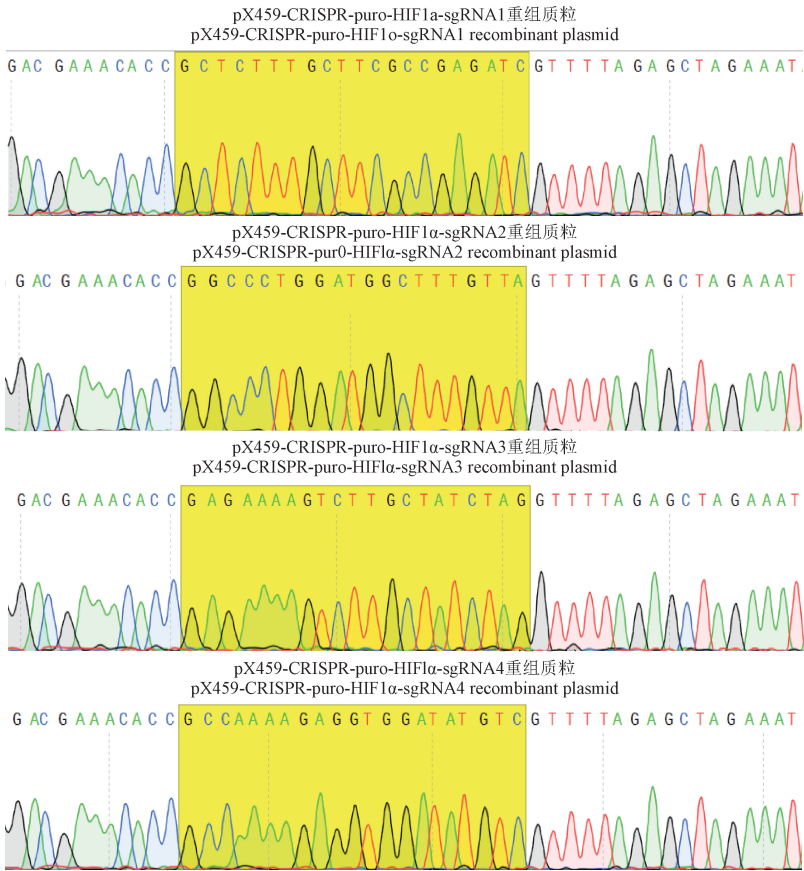


图 1 pX459-CRISPR-puro-HIF1α-sgRNA 重组质粒
Figure 1 pX459-CRISPR-puro-HIF1α-sgRNA recombinant plasmid

计预期。利用灰度分析和相关计算公式得出 sgRNA2 的打靶效率分别为 54%, 为 4 个 sgRNA 中最佳引物(见图 2)。

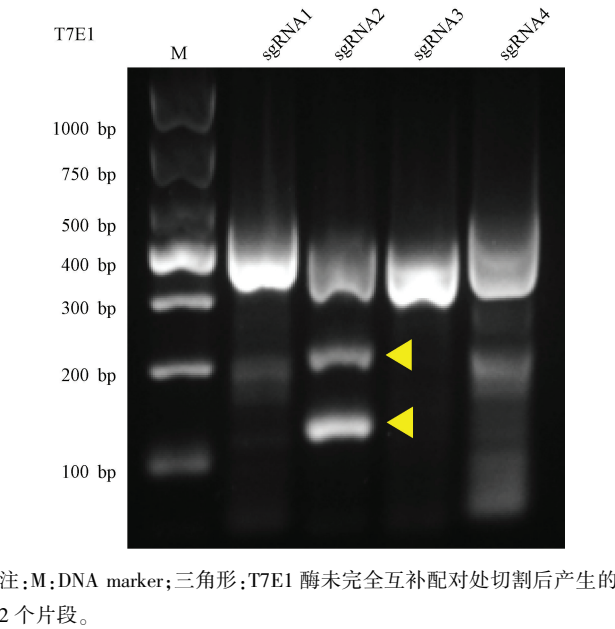


图 2 T7E1 酶切实验结果

Note. M. DNA marker. Triangular. Two fragments produced after cleavage where the T7E1 enzyme is not fully complemented by the pair.

Figure 2 T7E1 enzyme digestion experiment results

2.2 杀稻瘟菌素和嘌呤霉素筛选浓度测定

使用不同浓度的杀稻瘟菌素和嘌呤霉素完全培养基对裸鼯鼠 NFS 细胞药筛 48 h, 对照组细胞保持良好的生长状态, 但当嘌呤霉素浓度大于 2.0 $\mu\text{g/mL}$ 以及杀稻瘟菌素浓度大于 3.0 $\mu\text{g/mL}$ 时, 细胞达到完全死亡的状态。因此, 分别选取 2.0、3.0 $\mu\text{g/mL}$ 作为嘌呤霉素和杀稻瘟菌素作为裸鼯鼠 NFS 细胞最佳筛选浓度。

将筛选得到的 sgRNA2, 退火连接到经 *BsmI* 限制性核酸内切酶切割形成的线性化 pLenti 表达载体上, 挑选转染重组 pLenti 质粒成功的耐药阳性克隆菌株, 通过菌液 PCR 鉴定为阳性克隆后, 提取阳性克隆质粒并进行 Sanger 测序, 如图 3 所示, sgRNA2 序列准确插入表达质粒, 表明 pLenti-sgRNA2 表达载体构建成功。将质粒 pLenti-sgRNA2 与慢病毒包装质粒 psPAX2、pMD2. G 共转染 HEK-293T 细胞, 分别于 24、48 h 进行 BFP 荧光观察, 并收集细胞上清, 超速离心收集病毒(见图 4)。

2.3 NSF 细胞 pLenti-sgRNA 慢病毒感染效果

利用 Lenti-Cas9-puro 慢病毒颗粒感染 NSF 细胞后, 进行 BSD 筛选。筛选成功后将细胞按 1 : 2 传代, 感染 pLenti-sgRNA2 慢病毒, 24 h 后进行 puro 筛

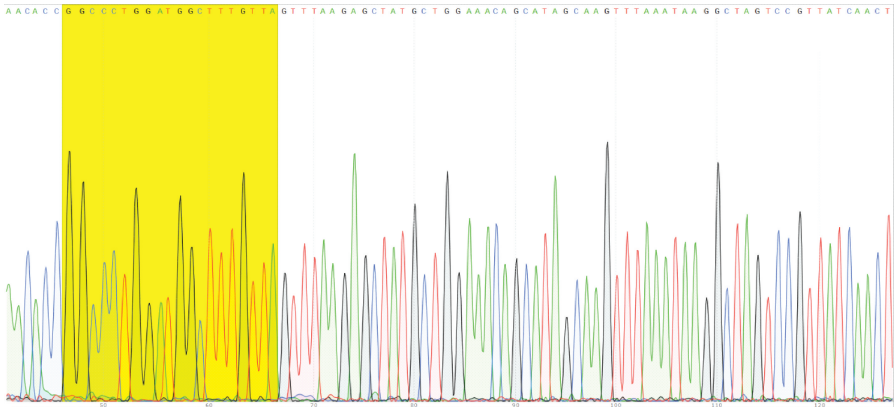


图 3 pLenti-sgRNA2 重组质粒

Figure 3 pLenti-sgRNA2 recombinant plasmid

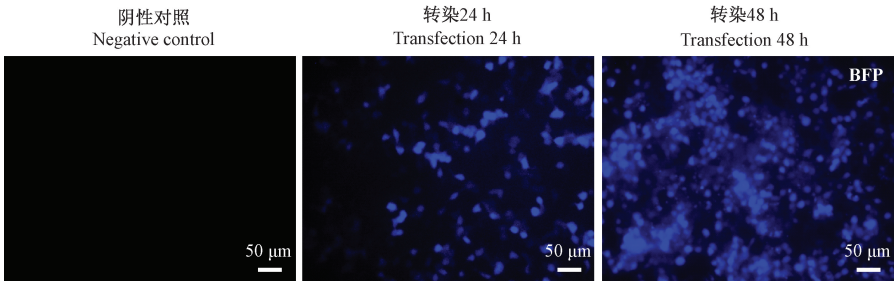


图 4 plenti-sgRNA 质粒阳性 293T 细胞

Figure 4 Plenti-sgRNA plasmid positive 293T cells

选,72 h 后,在荧光显微镜下观察到 80% 以上的 NSF 细胞能表达蓝色荧光蛋白,表明慢病毒能高效感染 NSF 细胞(见图 5)。

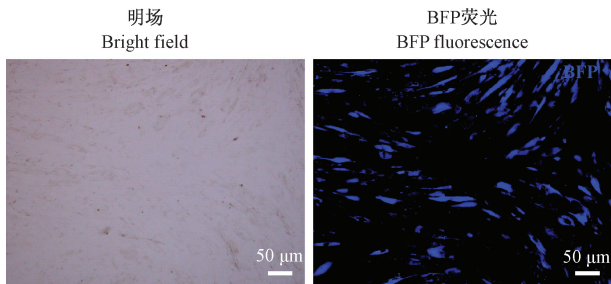


图 5 plenti-sgRNA2 阳性感染细胞图片
Figure 5 plenti-sgRNA2 positive infected cells

2.4 Western Blot 检测 NSF 细胞中 HIF-1α 表达

将经 pLenti-sgRNA2 慢病毒感染后的 NSF 细胞,加入 2.0 μg/mL 嘌呤霉素连续筛选 48 h,将出现抗嘌呤霉素的阳性细胞 1 : 2 传代,获得 NSF-HIF-1α KO1、NSF-HIF-1α KO2,分别提取 NSF-WT

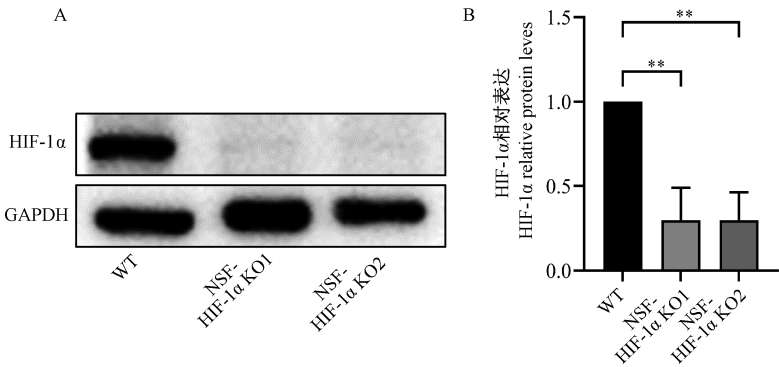
及 NSF-HIF-1α KO1、NSF-HIF-1α KO2 细胞蛋白,通过 Western Blot 检测 HIF-1α 蛋白表达水平,结果显示,与对照组相比,实验组 pLenti-sgRNA2 混合细胞中 HIF-1α 的表达明显减少,说明成功得到了 HIF-1α 敲除的 NSF 细胞(见图 6)。

2.5 NSF 细胞基因组 DNA HIF-1α 基因检测

为进一步验证基因组 DNA 突变,利用在敲除靶点两端设计敲除检测引物 HIF-1α-sg2(见表 3),提取 NSF-HIF-1α KO1、NSF-HIF-1α KO2 细胞 DNA,通过 PCR 鉴定后纯化产物并测序,可见在 sgRNA 靶点处出现明显重叠峰,说明有效突变产生(见图 7)。

2.6 敲除 HIF-1α 对 NSF 细胞增殖活性的影响

利用 CCK8 试剂盒检测野生型 NSF 细胞和 NSF-HIF-1α-KO1、NSF-HIF-1α-KO2 细胞的增殖情况。结果显示,NSF 细胞对照组和 HIF-1α 敲除组细胞的 OD₄₅₀ 无显著性差异(见图 8),表明 HIF-1α 基因敲除后对 NSF 细胞增殖活性无显著影响。



注:A;WT 细胞、NSF-HIF-1α KO1 细胞、NSF-HIF-1α KO2 细胞 HIF-1α 蛋白 Western Blot 结果;B:Image J 灰度分析,相对定量统计;与 WT 组相比,** $P < 0.01$ 。

图 6 NSF 细胞中 HIF-1α 蛋白表达水平($n = 3$)

Note. A. WT cells, NSF-HIF-1α KO1 cells, NSF-HIF-1α KO2 cell HIF-1α protein expression. B. Image J grayscale analysis, relative quantitative statistical chart. Compared with WT group, ** $P < 0.01$.

Figure 6 HIF-1α in NSF cells protein expression level($n = 3$)

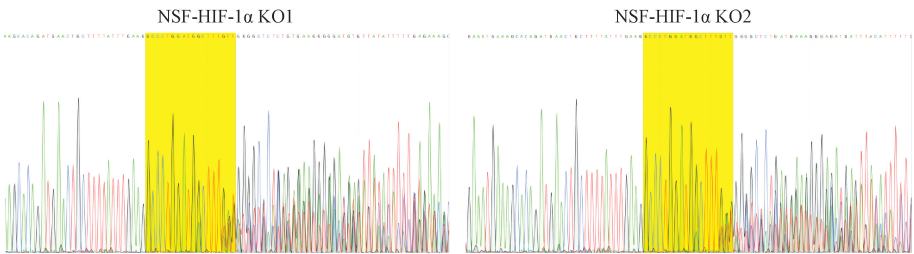


图 7 HIF-1α 基因敲除 NSF 细胞测序峰图

Figure 7 Sequencing peak map of HIF-1α gene knockout NSF cells

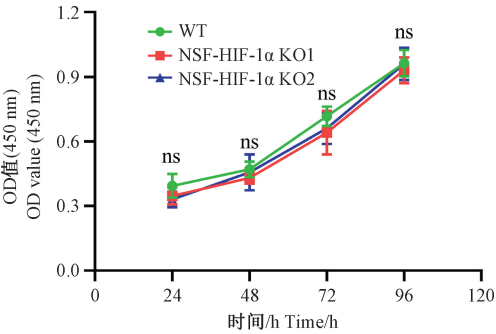


图 8 HIF-1 α 基因敲除对 NSF 细胞增殖活性的影响

Figure 8 Effect of HIF-1 α gene knockout on the proliferation activity of NSF cells

3 讨论

缺氧或低氧水平是影响人类许多疾病病理的重要微环境,包括肿瘤、糖尿病、衰老和心脑血管疾病等^[10-13]。缺氧诱导因子(HIF)在维持氧稳态方面起着重要作用,其通过诱导细胞向缺氧代谢表的特定遗传转换,促进细胞在缺氧条件下的适应和存活^[14]。HIF 由 HIF-1 α 和 HIF-1 β 两个亚基共同组成异二聚体,其活性主要由 HIF-1 α 亚基的稳定性决定^[15]。在常氧条件下,HIF-1 α 组成性降解,而在低氧条件下,它的结构稳定并转移到细胞核中,协调基因表达。因此,在缺氧条件下,HIF-1 α 可准确地感知氧浓度的降低,进而调节细胞内稳态^[16]。裸鼹鼠由于独特的生存环境,使其具备超强的低氧耐受能力,前期研究也发现裸鼹鼠组织中保持着高水平的 HIF-1 α 蛋白的表达和积累,同时,缺氧相关病理现象的消失也使其成为耐低氧机制研究的理想模型^[17]。皮肤是裸鼹鼠抵御外界损伤的第一道防线,是最大的器官,而皮肤成纤维细胞是组成皮肤的重要细胞和结构成分。为了进一步探究 HIF-1 α 在裸鼹鼠耐低氧特性中的调控机制,本研究利用 CRISPR/Cas9 技术,体外敲除裸鼹鼠皮肤成纤维细胞中 HIF-1 α 基因,为 HIF-1 α 相关机制以及缺氧相关疾病的研究提供全新的细胞模型。

CRISPR/Cas9 系统是基于 gRNA 识别序列位点,利用 Cas9 蛋白靶向进行切割来实现基因编辑。自 1987 年 Crispr/Cas9 系统的问世,基因编辑进入了一个新时代^[18]。低成本、高效、简便和广适用性,使其在动植物、细菌以及病毒等不同领域得到了快速发展,也为生命科学研究提供了极大的便利^[9]。在 CRISPR/Cas9 基因编辑研究领域中,皮肤成纤维细胞成为应用较为广泛的细胞种类之一。

SHANDILYA 等^[19]使用 CRISPR/Cas9 技术对 HSF-1 和 Na/K-ATP 酶 α 1 亚基的编辑,从而降低了体外牛皮肤成纤维细胞对热休克的抵抗能力。罗洪等^[20]基于 CRISPR/Cas9 系统建立 DNA 结合抑制因子 3 基因敲除人皮肤成纤维细胞系。冯新宇等^[21]利用 CRISPR/Cas9 系统敲除绵羊皮肤成纤维细胞 Wnt2 基因以进一步研究。本研究基于 CRISPR/Cas9 系统,利用慢病毒转染技术首次实现对裸鼹鼠皮肤成纤维细胞的基因编辑。慢病毒转染是转染技术不断进步和发展的良好产物,与电穿孔和脂质体转染不同,通过慢病毒载体将外源基因带入并整合到宿主基因组中,在大大提高转染效率的同时降低细胞损伤^[22]。本实验成功构建了靶向 HIF-1 α 慢病毒表达载体,通过 HEK-293T 细胞分别制备 Cas9 和 gRNA 病毒,经感染,构建了稳定表达 Cas9 的 NSF 细胞。随后将 gRNA 转入表达 Cas9 蛋白的 NSF 细胞中,构建了 HIF-1 α 敲除的 NSF 细胞模型。经嘌呤霉素筛选获得 HIF-1 α 敲除的混合细胞库,进一步利用 Western Blot 检测显示混合细胞株的 HIF-1 α 蛋白表达与未转染组的 NSF 细胞相比显著降低,提示 HIF-1 α 基因成功敲除。

本研究成功构建了靶向 NSF 细胞 HIF-1 α 基因的 CRISPR/Cas9 质粒,并顺利敲除了 NSF 细胞中的 HIF-1 α 基因,为后续利用 CRISPR/Cas9 系统构建基因编辑裸鼹鼠动物模型奠定了实验基础。同时,也为 HIF-1 α 下游靶基因筛选和机制研究提供了细胞模型。

参 考 文 献(References)

[1] GRAHAM R J, MEGAN S, ROCHELLE B. Naked Mole-Rat mortality rates defy gompertzian laws by not increasing with age [J]. eLife, 2018, 7: e31157.

[2] ZIONS M, MEEHAN E F, KRESS M E, et al. Nest carbon dioxide masks GABA-dependent seizure susceptibility in the naked mole-rat [J]. Curr Biol, 2020, 30(11): 2068-2077.

[3] 肖邦, 赵善民, 林丽芳, 等. 裸鼹鼠不同组织中低氧相关基因的表达 [J]. 实验动物与比较医学, 2014, 34(5): 400-404, 410.

XIAO B, ZHAO S M, LIN L F, et al. Comparative effects of hypoxia on autophagy and apoptosis of naked mole rat fibroblasts [J]. Lab Anim Comp Med, 2014, 34(5): 400-404, 410.

[4] PARK T J, REZNICK J. Extreme physiology extreme tolerance to hypoxia, hypercapnia, and pain in the naked mole-rat [J]. J Muscle Res Cell Motil, 2023, 44(2): 61-72.

[5] WANG G L, JIANG B H, RUE E A, et al. Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92

(12): 5510–5514.

[6] DONOHOUE P D, BARRANGOU R, MAY A P. Advances in industrial biotechnology using CRISPR-cas systems [J]. Trends Biotechnol, 2018, 36(2): 134–146.

[7] GUPTA S K, SHUKLA P. Gene editing for cell engineering: trends and applications [J]. Crit Rev Biotechnol, 2017, 37(5): 672–684.

[8] LAHR W S, SIPE C J, SKEATE J G, et al. CRISPR-Cas9 base editors and their current role in human therapeutics [J]. Cytotherapy, 2023, 25(3): 270–276.

[9] ZHU Y. Advances in CRISPR/Cas9 [J]. Biomed Res Int, 2022, 2022: 9978571.

[10] SHARMA A, SINHA S, SHRIVASTAVA N. Therapeutic targeting hypoxia-inducible factor (HIF-1) in cancer: cutting gordian knot of cancer cell metabolism [J]. Front Genet, 2022, 13: 849040.

[11] WIGERUP C, PÅHLMAN S, BEXELL D. Therapeutic targeting of hypoxia and hypoxia-inducible factors in cancer [J]. Pharmacol Ther, 2016, 164: 152–169.

[12] WU Q, YOU L, NEPOVIMOVA E, et al. Hypoxia-inducible factors: master regulators of hypoxic tumor immune escape [J]. J Hematol Oncol, 2022, 15(1): 77.

[13] YU B, WANG X, SONG Y, et al. The role of hypoxia-inducible factors in cardiovascular diseases [J]. Pharmacol Ther, 2022, 238: 108186.

[14] XIA Y, CHOI H K, LEE K. Recent advances in hypoxia-inducible factor (HIF)-1 inhibitors [J]. Eur J Med Chem, 2012, 49: 24–40.

[15] GRADIN K, MCGUIRE J, WENGER R H, et al. Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor [J]. Mol Cell Biol, 1996, 16(10): 5221–5231.

[16] KE Q, COSTA M. Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) [J]. Mol Pharmacol, 2006, 70(5): 1469–1480.

[17] 杨文静, 崔淑芳. 普通级封闭群裸鼹鼠种群的建立及其生物学特性的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(4): 518–522.

YANG W J, CUI S F. Establishment of a closed colony of conventional naked mole-rats and progress in research of their biological characteristics [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(4): 518–522.

[18] ISHINO Y, SHINAGAWA H, MAKINO K, et al. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product [J]. J Bacteriol, 1987, 169(12): 5429–5433.

[19] SHANDILYA U K, SHARMA A, SODHI M, et al. Editing of *HSF-1* and *Na/K-ATPase* $\alpha 1$ subunit by CRISPR/Cas9 reduces thermal tolerance of bovine skin fibroblasts to heat shock *in vitro* [J]. Anim Biotechnol, 2023, 34(8): 3626–3636.

[20] 罗洪, 陈美桦, 王林旭, 等. 基于 CRISPR/Cas9 系统建立 DNA 结合抑制因子 3 基因敲除人皮肤成纤维细胞系 [J]. 军事医学, 2023, 47(7): 493–499.

LUO H, CHEN M H, WANG L X, et al. Construction of inhibitor of DNA binding 3 gene knockout human skin fibroblast cell line based on CRISPR/Cas9 system [J]. Mil Med Sci, 2023, 47(7): 493–499.

[21] 冯新宇, 袁超, 郭婷婷, 等. 利用 CRISPR/Cas9 系统敲除绵羊皮肤成纤维细胞 Wnt2 基因的研究 [J]. 畜牧与兽医, 2018, 50(2): 52–55.

FENG X Y, YUAN C, GUO T T, et al. Knockout of Wnt2 in the primary cell of sheep skin fibroblast via the CRISPR/Cas9 system [J]. Anim Husb Vet Med, 2018, 50(2): 52–55.

[22] PERRY C, RAYAT A C M E. Lentiviral vector bioprocessing [J]. Viruses, 2021, 13(2): 268.

[收稿日期] 2023-05-09