

基于 CRISPR/Cas9 系统建立 *GPR108* 缺失的 THP-1 细胞株及其功能初步研究

王雯雯¹ 涂珍珍¹ 臧丹丹² 汪璟¹ 张银涛¹ 周海胜^{1,2,3}

摘要 目的 建立稳定敲除 G 蛋白偶联受体 108 (*GPR108*) 基因的人单核细胞白血病细胞系 (THP-1), 并初步研究其功能。方法 根据人 *GPR108* 基因序列设计, 合成可应用于成簇有规律的间隔短回文重复序列及其相关蛋白 9 (CRISPR/Cas9) 的单链引导 RNA (sgRNA1 和 sgRNA2) 对应的 DNA, 利用分子克隆技术在 pL-CRISPR-EFS-GFP 慢病毒载体中插入 sgRNA1 和 sgRNA2 序列, 构建重组载体 (pL-CRISPR-EFS-GFP-sgRNA1 和 pL-CRISPR-EFS-GFP-sgRNA2)。将测序正确的重组体与包装质粒 (pMD2.G 和 psPAX2) 共转染 293T 细胞进行病毒包装, 收集病毒液并感染 THP-1 细胞。利用流式细胞分选技术分离 GFP⁺ 细胞于 96 孔培养板中, 培养获得单细胞克隆。利用聚合酶链式反应 (PCR) 和蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测 THP-1 细胞中 *GPR108* 是否敲除成功。应用脂多糖 (LPS) 刺激 *GPR108*^{-/-} 和 *GPR108*^{+/+} 的 THP-1 细胞, Western blot 法检测细胞内白细胞介素-8 (IL-8) 的表达, 流式微球技术 (CBA) 检测细胞培养上清液中的 IL-8 浓度。结果 成功构建重组慢病毒载体 pL-CRISPR-EFS-GFP-sgRNA 转染 THP-1 细胞后通过流式细胞仪分选获得单细胞克隆 F9。PCR 和 Western blot 法均证实 F9 是 *GPR108*^{-/-} THP-1 单细胞克隆。LPS 刺激 *GPR108*^{-/-} 和 *GPR108*^{+/+} THP-1 细胞, Western blot 和 CBA 的结果均显示敲除 *GPR108* 的 THP-1 细胞中 IL-8 的合成和分泌明显减少。结论 成功建立 *GPR108* 缺失的 THP-1 细胞株; 缺失 *GPR108* 的 THP-1 细胞在受到 LPS 刺激时产生的趋化因子 IL-8 显著降低。为后续研究 *GPR108* 在免疫炎症中的作用奠定了基础。

关键词 *GPR108*; THP-1 细胞; CRISPR/Cas9; IL-8

中图分类号 R 392.11

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0528-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.002

2023-02-23 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 82071832); 高校学科(专业)拔尖人才学术资助项目(编号: gxbjZD2021046)

作者单位: 安徽医科大学¹ 生物化学教研室、² 科研实验中心、³ 皮肤病研究所, 合肥 230032

作者简介: 王雯雯, 女, 硕士研究生;

周海胜, 男, 教授, 博士研究生导师, 责任作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

G 蛋白偶联受体 108 (G protein-coupled receptor 108, *GPR108*) 是一种包含有 7 次跨膜的受体。早在 2007 年被发现并获得 cDNA 克隆, 序列分析它属于 G 蛋白偶联受体超家族^[1]。*GPR108* 分布广泛, 包括脊索动物、非脊椎动物、植物和真菌^[1]。人的 *GPR108* 基因定位在 19 号染色体上 (chr19p13.3), 编码的蛋白质含有 543 个氨基酸, 主要分布在高尔基体、囊泡和内质网等亚细胞器膜上, 在生理条件下表达较低。有关 *GPR108* 功能的研究较少, 最近的研究^[2]提示 *GPR108* 是高度保守的腺相关病毒感染细胞所需要的重要介导分子。从 cDNA 文库筛选显示 *GPR108* 可能是潜在的 NF- κ B 激活剂, 提示 *GPR108* 可能参与炎症反应^[3]。前期研究^[3]表明 *GPR108* 在 Toll 样受体 (Toll-like receptor, TLR) 介导的信号通路中具有负调控作用。为进一步探讨 *GPR108* 在免疫细胞中对炎症反应的影响, 拟以人单核细胞白血病细胞系 (THP-1) 为细胞模型, 运用成簇有规律的间隔短回文重复序列及其相关蛋白 9 [clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/CRISPR-associated protein 9 (Cas9)] 技术, 建立稳定敲除 *GPR108* 的 THP-1 细胞系, 并探讨在 TLR4 激动剂脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 作用下, NF- κ B 下游趋化因子白细胞介素-8 (interleukin 8, IL-8) 的表达变化。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、菌株与载体 THP-1 与 293T 细胞由实验室保存; Top10 感受态细胞购自北京擎科生物科技有限公司; pL-CRISPR-EFS-GFP 慢病毒载体、pMD2.G 质粒和 psPAX2 质粒由实验室保存。

1.1.2 抗体及主要试剂 2 × Taq Master Mix (货号: P112-02) 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 质粒提取试剂盒 (货号: DP103-03) 购自北京天根生物科技有限公司; 胎牛血清 (FBS) (货号: 16000-044) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司;

RPMI-1640 培养基(货号: SH30809.01B)及 DMEM 高糖培养基(货号: SH30022.01B)购自美国 Hyclone 公司; LPS(货号: L4391-1MG)购自美国 Sigma 公司; 兔抗 IL-8 抗体(货号: 27095-1-AP)购自武汉 Proteintech 公司; 兔抗 GAPDH 抗体(货号: AB010301)购自安徽朵能生物科技有限公司; HRP 标记的羊抗兔二抗(货号: 7074S)购自美国 Cell Signaling Technology 公司; Polybrene(货号: BL628A)及 RIPA 裂解液(货号: BL504A)购自合肥 Biosharp 公司; I'maFect 转染试剂(货号: IMA201101S)购自北京 IMAGEN 公司; 苯甲基黄酰氟(货号: P8340)购自北京 Solarbio 公司; 细胞因子流式微球技术(cytometric bead array, CBA)试剂盒(货号: P010041)购自杭州赛基生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 CRISPR/Cas9 重组载体的构建

在 Ensembl 网站查询 *GPR108* 基因的外显子序列,并在线设计两个靶向 *GPR108* 外显子 1 号和外显子 13 号的单链引导 RNA(single guide RNA, sgRNA)(表 1)。在该序列 5' 端添加 CACC 碱基;在其互补序列 5' 端加入 AAAC 碱基,同时在 3' 端加入 C 碱基,以保证该粘性末端可以连接至载体。将设计好的序列送公司合成。BsmBI 酶切 pL-CRISPR. EFS. GFP 慢病毒载体,将 sgRNA1 和 sgRNA2 通过 T4DNA 连接酶分别连接在慢病毒载体上。得到连接产物后,将其转化到 Top10 感受态细胞中,均匀涂布在氨苄青霉素 LB 平板上,37 °C 培养后挑取单克隆菌落扩增,用质粒提取试剂盒提取质粒,测序验证。

表 1 sgRNA 及检测引物序列

名称	序列(5'-3')
sgRNA1	F: CACCGCTCACCAGACTACGGGGAAC R: AAACGTTCCCGTAGTCTGGTGAGC
sgRNA2	F: CACCGGACAGCACCGGTTCCGAA R: AAACCTCGGAACCGGTGCTGTCCC
detection primer	F: AGCCTGGGTCATAGGTCAT R: AGGCAGAGAGGCCAGATAA

1.2.2 病毒包装和制备

转染前 1 h 将细胞培养基更换为新鲜 DMEM 培养基。取成功构建的重组慢病毒质粒(pL-CRISPR. EFS. GFP-sgRNA1 和 pL-CRISPR. EFS. GFP-sgRNA2)分别与包装质粒(pMD2. G 和 psPAX2)共转染 293T 细胞,6 h 后更换新鲜 DMEM 完全培养基,24 h 后在倒置荧光显微镜观察转染效率,转染后 48、72 和 96 h 收集含有病毒的培养上清液,1 000 r/min 离心 5 min,0.45 μm 滤

器过滤,分装存放于 -80 °C 备用。

1.2.3 THP-1 细胞的感染和单细胞克隆的建立

将状态良好的 THP-1 细胞接种于 6 cm 培养皿中,培养至密度约 3×10^5 /ml 时,取两种病毒液同时加入培养基中,并添加 polybrene 至终浓度为 5 μg/ml,轻轻混匀培养基,24 h 后更换新鲜培养基,并在倒置荧光显微镜下观察感染效率。72 h 后收集细胞。通过流式分选仪(Moflo-XDP)分选 GFP⁺ 细胞并接种在 96 孔板中培养以获得单细胞克隆。

1.2.4 聚合酶链反应(PCR)

利用 PCR 方法在基因组水平鉴定 THP-1 细胞中敲除的 *GPR108* 基因。裂解细胞,利用酚氯仿混合液去除蛋白质,提取细胞基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板,扩增程序:95 °C 预变性 5 min,95 °C 变性 30 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 1 min,共 30 个循环,扩增 *GPR108* 基因片段,引物序列见表 1。将 PCR 产物进行测序。

1.2.5 细胞培养

293T 细胞培养条件为添加有 10% FBS 的 DMEM 完全培养基。THP-1 细胞利用 10% FBS 的 RPMI-1640 完全培养基在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。为了观察 THP-1 细胞表达 IL-8 的水平,培养细胞中分别加入 2.0、5.0 μg/ml 的 LPS 作用 5 h,再加入 1 μg/ml 的布雷菲德菌素 A(Brefeldin A, BFA)继续培养 3 h,以阻断 IL-8 的分泌。对数生长期的 THP-1 细胞中加入终浓度为 1 μg/ml 的 LPS 作用 24 h,收集细胞培养的上清液。

1.2.6 Western blot 实验

根据参考文献^[4]的方法,提取细胞总蛋白。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白,湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜后,用含 5% 脱脂奶粉的封闭液,室温封闭 2 h,将膜放入相应的一抗稀释液中 4 °C 过夜。次日将膜放入辣根过氧化物酶标记的二抗,室温孵育 1 h,显影。

1.2.7 CBA 细胞因子检测

收集细胞培养上清液,按照试剂盒说明书操作检测细胞上清液中 IL-8。即离心去除残留细胞。将含有对应抗体的捕获微球缓冲液加入待测样品避光室温孵育 1 h,再加入荧光检测试剂避光室温孵育 2 h 后,PBS 洗涤并重悬微球,流式细胞分析仪检测样品。

1.3 统计学处理

实验数据用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析,结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 *t* 检验分析。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 pL-CRISPR. EFS. GFP-sgRNA 重组质粒

根据 *GPR108* 基因的 DNA 序列,设计的

sgRNA1 和 sgRNA2 靶向外显子 1 和 13 号。将合成 sgRNA1 和 sgRNA2 对应的 DNA 进行复性和 *BsmB* I 酶切, 并与经 *BsmB* I 酶切后的 pL-CRISPR. EFS. GFP 载体进行连接, 形成重组载体(图 1A)。转化 Top10 感受态细胞, 挑选单克隆菌后进行扩增, 提取质粒 DNA 进行测序。测序结果显示, sgRNA 均成功插入载体(图 1B)。

2.2 pL-CRISPR. EFS. GFP-sgRNA 敲除效果验证 在荧光显微镜下初步观察感染慢病毒的 THP-1 中有较多的绿色荧光细胞(图 2A)。利用流式细胞分选仪分选 GFP⁺ 的 THP-1 细胞, 其比例达到 32.5% (图 2B)。将单个阳性细胞接种到 96 孔板中培养, 共获得 7 株单克隆细胞株。

将获得的 7 株单克隆细胞株扩大培养并提取细胞基因组 DNA, 利用表 1 中的引物进行 PCR 扩增。根据设计引物位置, 以野生型基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增后, 可以获得的 PCR 产物大小为

6 453 bp, 而成功敲除后的基因组 DNA 进行扩增获得的产物为 700 bp 左右。如图 3A 所示, 以 F9 细胞克隆的基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增后, 获得 700 bp 的特异性 DNA 带, 提示成功敲除 *GPR108*; 但是以野生型细胞基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增时, 没有获得特异性 6 453 bp 的 DNA 带, 其原因可能与运行 PCR 的延伸时间较短有关。

将获得的 PCR 扩增产物进行测序, 测序结果与野生型 *GPR108* 基因序列比对, 结果证实将 *GPR108* 的 1~13 号外显子成功敲除(图 3B、D)。将 F9 克隆株提取细胞蛋白, Western blot 结果显示蛋白浓度较低, 难以检测 *GPR108* 的表达(图 3C)。由此证实 F9 的单细胞克隆是 *GPR108* 基因敲除的 THP-1 细胞株。

2.3 *GPR108* 缺失抑制 IL-8 的合成和分泌 Western blot 检测 THP-1 细胞内 IL-8 的表达水平, 结果显示, 利用 2.0、5.0 μg/ml 的 LPS 刺激 THP-1 细胞

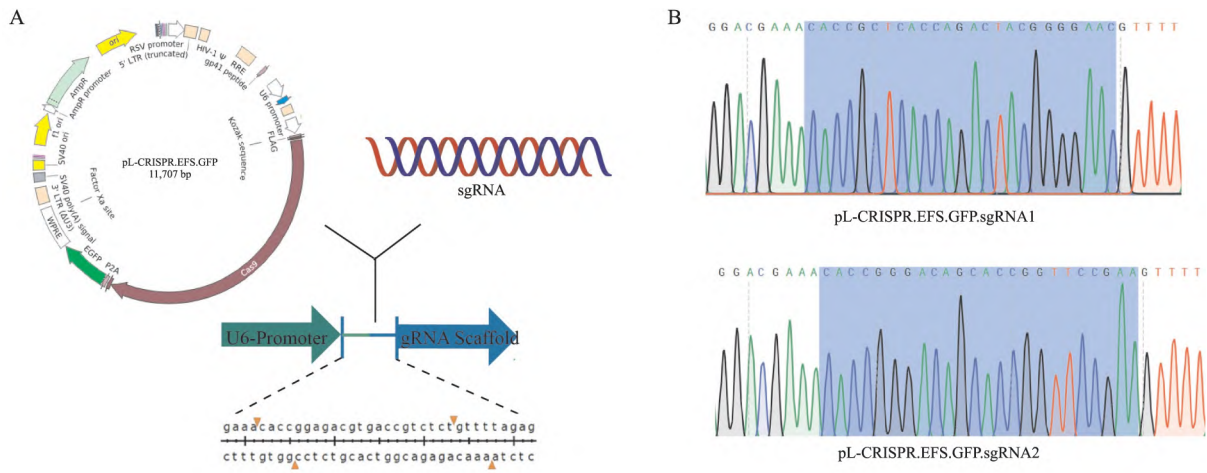


图 1 重组质粒示意图及质粒测序结果

A: pL-CRISPR. EFS. GFP-sgRNA 重组质粒模式图; B: 重组质粒测序结果

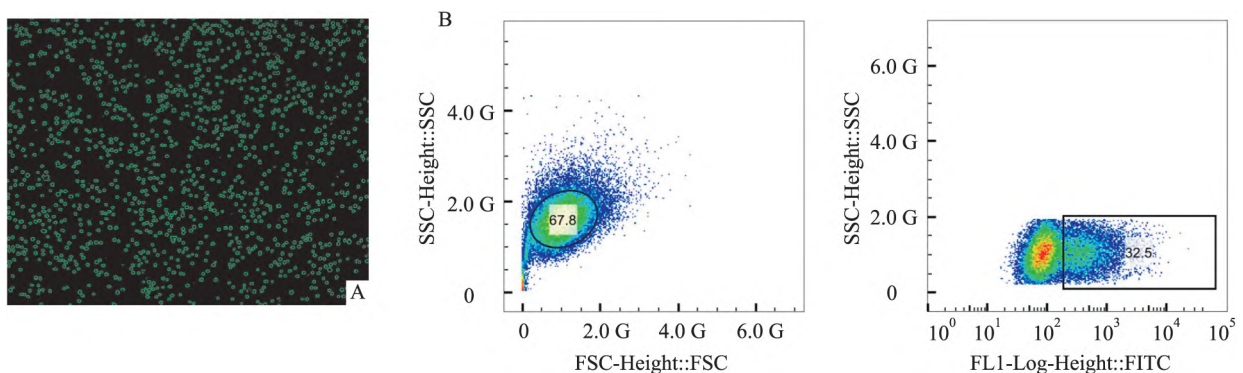
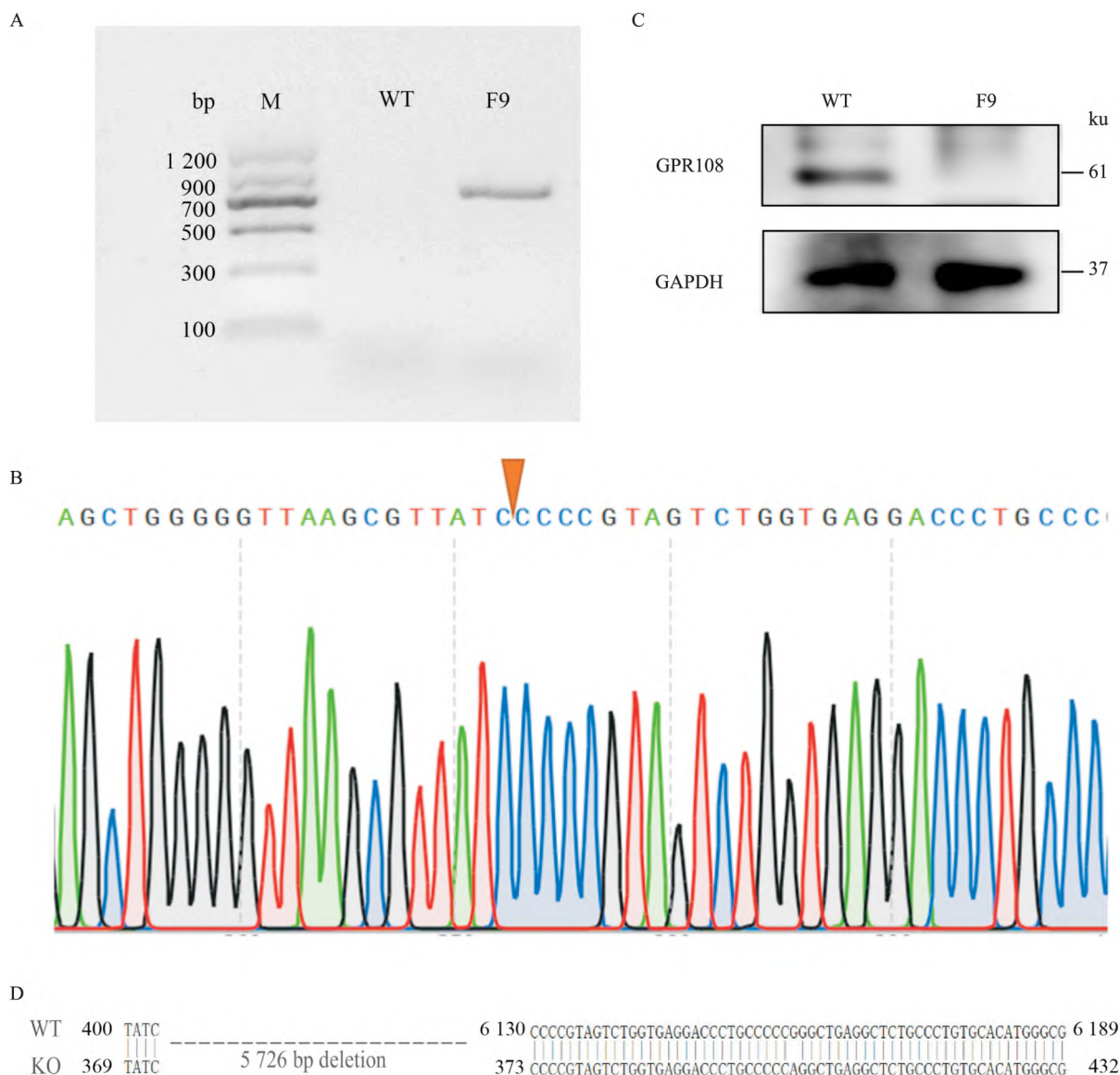


图 2 阳性单克隆株的获得

A: 病毒感染 THP-1 细胞 24 h 荧光观察感染效率 ×40; B: 流式分选系统接种阳性细胞

图3 敲除 *GPR108* 的单细胞克隆 F9 的鉴定

A: 单个细胞克隆 F9 的基因组 PCR 鉴定; B: F9 细胞克隆基因组 PCR 扩增产物的测序结果; C: Western blot 检测野生型 THP-1 细胞和 F9 单细胞克隆 *GPR108* 蛋白表达水平; D: F9 细胞克隆基因组 PCR 扩增产物的测序结果与野生型 *GPR108* 基因序列比对

5 h 后, *GPR108*^{+/+} THP-1 细胞中 IL-8 的表达增高 ($t = 15.31$, $P = 0.0001$), *GPR108*^{-/-} THP-1 细胞中 IL-8 的表达也有增高 ($t = 3.996$, $P = 0.0162$), 且具有浓度依赖性; 但是在 *GPR108*^{-/-} THP-1 细胞中 IL-8 的表达水平较对照组细胞降低 ($t = 5.441$, $P = 0.0055$; $t = 4.677$, $P = 0.0095$; $t = 16.75$, $P < 0.0001$) (图 4A、B)。CBA 方法检测 THP-1 细胞上清液中分泌的 IL-8 水平, 结果显示: 在无 LPS 刺激时, *GPR108*^{-/-} THP-1 细胞分泌 IL-8 较 *GPR108*^{+/+} THP-1 细胞组降低 ($t = 30.13$, $P < 0.0001$); 在加入或不加入 LPS 刺激的情况下, *GPR108*^{+/+} THP-1 细胞分泌的 IL-8 差异无统计学意义 ($t = 0.0045$, $P >$

0.9966); 与不受 LPS 刺激相比, *GPR108*^{-/-} THP-1 细胞在受到 LPS 刺激时分泌 IL-8 增加 ($t = 14.09$, $P = 0.0001$), 但较 LPS 刺激 *GPR108*^{+/+} THP-1 细胞分泌的 IL-8 减少 ($t = 9.625$, $P = 0.0007$) (图 4C)。

3 讨论

G 蛋白偶联受体 (GPCRs) 又称为 7 跨膜受体 (7 TMRs), 是人类基因组中最庞大的细胞膜表面受体家族, 含有 800 多种蛋白质。其典型结构特征是有 7 个跨膜的 α -螺旋, 另外含有 3 个胞内环, 3 个胞外环以及一个胞外氨基末端结构域和一个胞内羧基尾等部分组成^[5]。GPCRs 的主要功能是将细胞外的

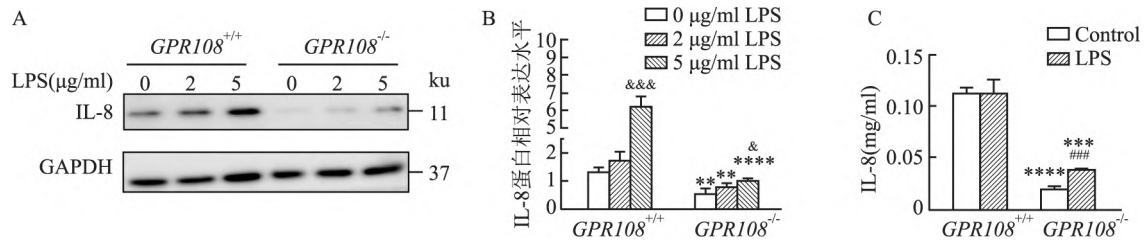


图4 IL-8分泌水平检测

A: Western blot 检测 *GPR108*^{+/+} 和 *GPR108*^{-/-} THP-1 细胞在不同浓度 LPS 刺激 5 h 后细胞内 IL-8 表达水平; B: 以 GAPDH 为内参, IL-8 蛋白相对定量分析; C: LPS 刺激 *GPR108*^{+/+} 和 *GPR108*^{-/-} THP-1 细胞 24 h 后, CBA 法检测细胞培养上清液中 IL-8 表达水平; 与同组 0 μg/ml LPS 组比较: &P < 0.05, &&P < 0.001; 与 Control 组比较: ###P < 0.001; 与 *GPR108*^{+/+} 组比较: **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001

各种刺激转化为细胞内信号,调节多种生理活动,如新陈代谢、细胞分化、细胞生长、感官与感知等^[6-7]。GPR108 是 GPCRs 家族成员,具有与 GPCRs 相似的结构特征,因尚未发现其配体,属于 GPCRs 中的孤儿受体。在 cDNA 文库筛选中发现 GPR108 可能作为 NF-κB 的激活剂,主要在 NF-κB 激酶亚基 β 抑制剂和 NF-κB 激酶调节亚基 γ 抑制剂上游起正向调控作用^[8]。前期研究^[3]表明 *GPR108* 缺失小鼠的原代胚胎成纤维细胞 (MEF) 中包括 TLR4 在内的多种 TLRs 表达增加; *GPR108* 通过调节 MyD88 泛素化水平,抑制 LPS 刺激时 TLR4 启动的炎症反应,从而调节下游的 NF-κB 信号通路和细胞因子的分泌。因此, *GPR108* 缺失会增强细胞内 LPS 诱导的免疫反应,但在不同类型的细胞中细胞因子的分泌也表现出一定的差异。因此, *GPR108* 在不同类型的细胞中的调控复杂性。

THP-1 细胞系是一种永生化的急性髓系白血病细胞系,具有巨噬细胞的部分特性,经常用于做人单核细胞来源的巨噬细胞的细胞系模型^[9]。研究^[10]证实 LPS 刺激 THP-1 可以增加肿瘤坏死因子的表达,这是依赖于激活 TLR4/NF-κB 信号通路。为了探讨 *GPR108* 在巨噬细胞中的功能,该研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 *GPR108* 缺失的 THP-1 细胞株。通过 PCR 检测单细胞克隆的基因组 DNA,并利用 Western blot 方法检测细胞总蛋白的 GPR108,结果均证实获得的 F9 细胞克隆是 *GPR108* 缺失的 THP-1 细胞,成功敲除了 *GPR108*。

为了探讨 *GPR108* 缺失的 THP-1 细胞对于 LPS 刺激的反应性,利用 LPS 刺激 *GPR108*^{-/-} 的 THP-1 细胞,通过提取细胞的总蛋白,对比 *GPR108*^{+/+} 的 THP-1 细胞,Western blot 分析显示 *GPR108* 缺失导致 IL-8 表达显著降低,且 CBA 检测细胞上清液分泌

的 IL-8 也明显减低。特别是在没有 LPS 刺激的情况下, *GPR108*^{-/-} THP-1 细胞分泌的 IL-8 也明显低于 *GPR108*^{+/+} THP-1 细胞;而 LPS 刺激 *GPR108*^{+/+} THP-1 细胞,分泌型 IL-8 没有明显的变化。其原因是 LPS 刺激 THP-1 细胞能促进 IL-8 的表达,但对于 IL-8 的成熟和分泌可能没有明显的作用。在 *GPR108* 缺失的情况下,IL-8 的合成和分泌均较对照组细胞显著降低,这可能与 NF-κB 信号通路处于静息状态有关,其机制有待后续进一步研究。 *GPR108* 缺失的 THP-1 细胞在 LPS 刺激后,IL-8 的合成和分泌有所增加,但仍然低于正常对照组,说明 *GPR108* 的缺失,导致 THP-1 细胞对 LPS 的反应性降低。而 *GPR108*^{-/-} THP-1 细胞中 IL-8 的表达与 LPS 具有浓度依赖性; *GPR108* 缺失的 THP-1 细胞, LPS 刺激伴随 IL-8 分泌显著增加,这可能与 LPS 刺激后刺激 IL-8 的表达有关。

综上所述,利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在 THP-1 细胞中成功实现了 *GPR108* 基因的敲除,建立了稳定敲除的细胞株。该细胞株在对 LPS 刺激反应中,显示 *GPR108* 的缺失抑制了 THP-1 合成和分泌趋化因子 IL-8,其机制可能与 TLR4/NF-κB 信号通路活化状态有关。这些研究结果,为后续深入探讨 *GPR108* 在巨噬细胞参与的炎症反应中的作用及其机制奠定了基础。

参考文献

[1] Edgar A J. Human GPR107 and murine Gpr108 are members of the LUSTER family of proteins found in both plants and animals, having similar topology to G-protein coupled receptors [J]. DNA Seq, 2007, 18(3): 235-41.

[2] Dudek A M, Zabaleta N, Zimm E, et al. *GPR108* is a highly conserved AAV entry factor [J]. Mol Ther 2020 28(2): 367-81.

[3] Dong D, Zhou H, Na S Y, et al. *GPR108*, an NF-κB activator suppressed by TIRAP, negatively regulates TLR-triggered immune

- responses [J]. *PLoS One* 2018 ,13(10) : e0205303.
- [4] 邓庆梅,周利利,郭思佳,等. 转录因子 GRHL3 促进皮肤鳞癌细胞迁移和侵袭 [J]. *安徽医科大学学报*, 2019 ,54(2) : 236 - 41.
- [5] Packiriswamy N ,Parameswaran N. G-protein-coupled receptor kinases in inflammation and disease [J]. *Genes Immun* , 2015 ,16 (6) : 367 - 77.
- [6] Heldin C H ,Lu B ,Evans R , et al. Signals and receptors [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2016 8(4) : a005900.
- [7] Nieto Gutierrez A ,Mcdonald P H. GPCRs: emerging anti-cancer drug targets [J]. *Cell Signal* 2018 41: 65 - 74.
- [8] Meisen W H ,Nejad Z B ,Hardy M , et al. Pooled screens identify GPR108 and TM9SF2 as host cell factors critical for AAV transduction [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev* 2020 17: 601 - 11.
- [9] Baxter E W ,Graham A E ,Re N A , et al. Standardized protocols for differentiation of THP-1 cells to macrophages with distinct M (IFN γ + LPS) , M(IL-4) and M(IL-10) phenotypes [J]. *J Immunol Methods* 2020 478: 112721.
- [10] Liu Z ,Gu Y ,Chakarov S , et al. Fate mapping *via* Ms4a3-expression history traces monocyte-derived cells [J]. *Cell* ,2019 ,178 (6) : 1509 - 25. e19.

Construction of THP-1 cell line with *GPR108* gene deletion by CRISPR/Cas9 system and exploration of its function

Wang Wenwen¹ , Tu Zhenzhen¹ , Zang Dandan² , Wang Jing¹ , Zhang Yintao¹ , Zhou Haisheng^{1 2 3}

(¹*Dept of Biochemistry and Molecular Biology* , ²*Center for Scientific Research* ,

³*Institute of Dermatology , Anhui Medical University , Hefei 230032*)

Abstract Objective To establish a Tohoku hospital pediatrics-1 (THP-1) cell line with G protein-coupled receptor108 (*GPR108*) deletion and explore its functions. **Methods** According to the requirements of the clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) /CRISPR-associated protein 9 (Cas9) system , two single guide RNAs (sgRNA1 and sgRNA2) paring to the flanking fragments of human *GPR108* gene were designed and synthesized. The two oligonucleotides were inserted in the pL-CRISPR. EFS. GFP vector to generate the new recombinant vectors (pL-CRISPR. EFS. GFP-sgRNA1 and pL-CRISPR. EFS. GFP-sgRNA2) . The recombinant vectors and packaging plasmids (pMD2. G and psPAX2) , were co-transfected into 293T cells to generate virus for infecting THP-1 cells. The *GFP*⁺ cells were screened and isolated in 96-well culture plates by flow cytometry to obtain single-cell clones. PCR and Western blot were used to detect whether *GPR108* was successfully knocked out in THP-1 cells. Both *GPR108*^{+/+} and *GPR108*^{-/-} THP-1 cells were treated with lipopolysaccharide (LPS) . Interleukin 8 (IL-8) derived from the THP-1 cells , which were treated by LPS , was detected with Western blot and cytometric bead array (CBA) analysis. **Results** The recombinant lentiviral vector pL-CRISPR. EFS. GFP-sgRNA was successfully constructed and single-cell clone F9 was obtained by flow cytometric sorting after transfection of THP-1 cells. PCR and Western blot both confirmed that F9 was a *GPR108*^{-/-} THP-1 single-cell clone. LPS stimulated *GPR108*^{-/-} and *GPR108*^{+/+} THP-1 cells , both Western blot and CBA results showed a significant decrease in IL-8 synthesis and secretion in *GPR108*^{-/-} THP-1 cells. **Conclusion** The *GPR108*^{-/-} THP-1 cell clone is successfully obtained based on the CRISPR/Cas9 system. *GPR108* deletion in THP-1 cells treated by LPS leads to a decrease of IL-8 expression and secretion. It lays the foundation for further research on the molecular mechanisms of *GPR108* in the immune inflammatory response.

Key words *GPR108*; THP-1; CRISPR/Cas9; IL-8