

网络出版时间: 2023-03-07 15:03:38 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20230307.1346.001.html>

◇ 基础医学研究 ◇

载 Cas9-RNP 细胞膜囊泡仿生纳米粒的制备及其对小鼠巨噬细胞 *NLRP3* 基因的敲低作用

武冬青¹, 但章勇¹, 何晓燕², 朱华庆¹

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.03.001

摘要 目的 通过使用小鼠巨噬细胞膜包裹 Cas9 核糖核蛋白复合物 (RNP), 制备 Cas9-RNP 仿生纳米粒 Cas9-RNP@MMs, 旨在利用此仿生纳米粒递送 Cas9-RNP 复合物用于基因编辑, 并进一步在体外研究小鼠巨噬细胞 RAW264.7 对 Cas9-RNP@MMs 的内吞情况及其基因编辑效果, 为开发低毒性的抑制 *NLRP3* 治疗靶点的仿生纳米粒载体提供证据。方法 将提取的小鼠巨噬细胞细胞膜与制备的 Cas9-RNP 混合, 超声后使用脂质体挤压仪挤压得到 Cas9-RNP@MMs。使用纳米颗粒跟踪仪检测 Cas9-RNP@MMs 的颗粒直径, 透射电子显微镜下观察 Cas9-RNP@MMs 的颗粒形态。激光共聚焦荧光显微镜成像分析细胞对 Cas9-RNP@MMs 的内吞情况。采用 MTT 法检测 Cas9-RNP@MMs 生物相容性。通过 qPCR 和 Western blot 检测 *NLRP3* 表达, 来验证 Cas9-RNP@MMs 敲低 *NLRP3* 基因的效果。结果 采用巨噬细胞细胞膜制备的 Cas9-RNP@MMs 平均粒径约为 216 nm; 激光共聚焦荧光显微镜下, Cas9-RNP@MMs 能成功被 RAW264.7 细胞摄取; MTT 检测结果显示 Cas9-RNP@MMs 处理的小鼠巨噬细胞 RAW264.7 具有良好的生物相容性; qPCR 和 Western blot 检测显示, 有两条 *NLRP3* 特异的向导 RNA (sgRNA) 通过 Cas9-RNP@MMs 介导, 有良好的敲低 *NLRP3* 基因表达的效果。结论 利用仿生纳米粒成功制备了内腔载有 Cas9-RNP 复合物的纳米级囊泡 Cas9-RNP@MMs, Cas9-RNP@MMs 具有良好的生物相容性并且可以被 RAW264.7 细胞高效内吞; 含有 *NLRP3* 特异的 sgRNA 的 Cas9-RNP@MMs 能够特异性敲低 *NLRP3* 基因表达。

关键词 细胞膜; 纳米囊泡; Cas9-RNP; 内吞; 基因敲低**中图分类号** R 34**文献标志码** A 文章编号 1000-1492(2023)03-0347-05

2023-02-28 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82170484); 安徽省重点研究与开发项目 (编号: 202004b11020025)**作者单位:** ¹ 安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室, 安徽医科大学分子生物学实验室, 合肥 230032² 安徽医科大学生命科学院, 合肥 230032**作者简介:** 武冬青, 女, 硕士研究生;

朱华庆, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: aydzhq@126.com;

何晓燕, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: hexiaoyan@ahmu.edu.cn

纳米级细胞膜囊泡是人工制备的由生物体自身细胞膜包裹纳米核心制备而成的囊泡。利用不同类型的内源性细胞膜 (例如红细胞膜、免疫细胞膜、血小板膜等) 自身的特性为纳米核心提供生物材料包裹功能, 而其中纳米核心的材料可以根据应用需要进行选择^[1-2]。与其他外源性的人工合成材料相比, 纳米级细胞膜囊泡存在独特的优势, 它具有良好的生物相容性和可降解性、较低的免疫原性以及更长的体内循环时间和靶向性等优势, 作为药物递送载体在生物医学领域具有较高的发展前景和应用价值^[3]。该研究利用小鼠巨噬细胞膜 (macrophage cell membranes, MMs) 包裹 Cas9-RNP 复合物, 制备了一种仿生纳米粒 Cas9-RNP@MMs, 利用细胞内吞的功能, 将 Cas9-RNP@MMs 导入细胞内, 从而递送 Cas9-RNP 复合物进行基因编辑, 为发挥其作为递送载体的生物医学功能, 设计了针对 *NLRP3* 的 gRNA, 以小鼠巨噬细胞 RAW264.7 为体外模型, 检测 Cas9-RNP@MMs 的内吞情况和对 *NLRP3* 敲低效果, 为开发低毒性的抑制 *NLRP3* 治疗靶点的载体提供证据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器 胎牛血清、DMEM 培养基、0.25% 胰酶消化液 (美国 Gibco 公司); 青霉素链霉素双抗 (美国 Hyclone 公司) 磷酸盐缓冲液 (重庆 biosharp 公司); Cas9 蛋白 (南京金斯瑞生物科技); sgRNA 体外转录试剂盒 (重庆英茂盛业生物技术有限公司); anti-NLRP3 (英国 abcam 公司), 山羊抗小鼠 IgG HRP 抗体 (美国 SantaCruz 公司); RIPA 裂解液、蛋白酶抑制剂 (上海碧云天生物技术公司); 高温高压灭菌锅 (HVE-50, 日本 Hirayama 公司); 细胞膜蛋白与细胞质蛋白提取试剂盒 (上海碧云天生物技术公司); 二甲基亚砜 (DMSO)、四甲基偶氮唑蓝 (MTT) (上海阿拉丁生化科技股份有限公司); DIO

细胞膜绿色荧光探针(上海翌圣生物有限公司); 5% 磷钨酸负染色液(北京索莱宝科技有限公司); 酶标仪(美国 Bio-tek 公司); 透射电镜(美国赛默飞公司); 细胞超声破碎仪(TL-450Y 盐城天翎仪器有限公司); 纳米颗粒跟踪分析仪 NanoSight 300; 电泳仪及电泳槽(北京六一仪器厂); 全自动数码凝胶成像系统(上海欧翔公司); 激光共聚焦显微镜(LSM800 德国蔡司公司)。

1.2 细胞培养 RAW264.7 细胞用含 10% 胎牛血清, 1% 青霉素链霉素双抗混合液的 DMEM 完全培养基, 置于无菌培养箱(温度为 37 °C, 含 5% CO₂) 中培养。

1.3 NLRP3 sgRNA 的体外转录合成 使用 sgRNA 体外转录试剂盒, 首先进行 PCR 扩增转录模板, 扩增完成后, 进行转录反应, 按顺序加入试剂盒说明书中标注的试剂, 充分混匀, 37 °C 孵育 4 h, 孵育时尽量采用 PCR 仪等带有热盖的仪器, 切勿使用水浴锅。体外转录时 PCR 正向引物如下: sgRNA-1 (5'-TTAATACGACTCACTATAGGGGACGAGTGTCC-GTTG-CAAGCGTTTTAGAGCTAGAAATA-3'); sgRNA-2 (5'-TTAATACGACTCACTATAGGGAAGGACAGGA-ACGCGCTCTGTTTTAGAGCTAGAAATA-3'); sgRNA-3 (5'-TTAATACGACTCACTATAGGGAAGATTACCCG-CCCGAGAAGTTTTAGAGCTAGAAATA-3')。

1.4 巨噬细胞膜的提取 培养约 2×10^7 个细胞, 用无菌磷酸盐缓冲液(PBS)洗一遍, 用细胞刮子刮下细胞或用含有 EDTA 但不含胰酶的细胞消化液处理细胞使细胞不再紧贴壁, 并用移液器吹打下细胞。离心收集细胞, 吸除上清液, 留下细胞沉淀备用。尽量避免用胰酶消化细胞, 接下来使用细胞膜蛋白与细胞质蛋白提取试剂盒, 提取细胞膜, 把 1 ml 膜蛋白抽提试剂 A(临用前添加了 1% PMSF) 加入收集的细胞中, 轻轻并充分悬浮细胞, 冰浴 10 ~ 15 min (去除细胞核和未破碎的细胞), 然后 4 °C、2 000 r/min 离心 10 min, 小心收集上清液至一新的离心管中。吸取上清液时切勿接触沉淀, 可以有 30 ~ 50 μ l 上清液残留不予吸取。然后 4 °C、12 000 r/min 离心 30 min, 得到细胞膜碎片。

1.5 巨噬细胞膜囊泡化 将收集的巨噬细胞膜用 PBS 重悬或与 Cas9-RNP 混合, 放在超声清洗仪中, 在冰浴条件下超声, 然后在无菌的条件下使用脂质体挤出仪将细胞膜悬液依次通过 2 μ m、800 nm、400 nm 和 200 nm 的聚碳酸酯滤膜, 来回挤出 20 次左右, 制备得到细胞膜囊泡。

1.6 透射电镜表征及粒径分布的测定 取适量细胞膜囊泡悬液, 放在超声清洗仪中在冰浴条件下超声, 取少量细胞膜囊泡悬液滴于铜网支持膜上, 自然干燥后, 加入 50 μ l 磷钨酸负染色液, 染色 5 min 后, 滤纸吸干染色液, 干燥后拍摄透射电镜, 观察细胞膜囊泡的粒径分布。此外, 使用纳米颗粒跟踪分析仪 NanoSight 300 分析细胞膜囊泡的粒径及浓度。

1.7 细胞毒性实验 提前 1 d 将 RAW264.7 细胞均匀地铺在 96 孔细胞培养板中, 每孔加入 100 μ l 完全培养基(每孔约 5 000 个细胞)。次日使用新鲜培养基将 Cas9-RNP@MMs 稀释为 6 种浓度(0、2.5、5、7.5、10、12.5 μ g/ml)。弃掉 96 孔板内原有的培养基, 并加入含上述浓度 Cas9-RNP@MMs 的培养基。培养 24 h 后, 加入 20 μ l 浓度为 5 mg/ml 的 MTT 溶液, 培养 4 h 后, 轻轻吸去 MTT 溶液, 并向每孔中加入 150 μ l 二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)溶液, 在摇床上震荡 30 min, 将细胞培养板放置于酶标仪上, 在 490 nm 波长下, 测定每孔的吸光度, 通过吸光度计算细胞的存活率。

1.8 细胞内吞实验 在共聚焦小皿中培养 RAW264.7 细胞 24 h, 注意控制细胞生长至约 70%, 加入通过 DIO 标记的巨噬细胞膜囊泡 200 μ l 共孵育, 继续培养 6 h 后, 吸去培养基, 用无菌 PBS 缓冲液冲洗 3 遍, 加入 1 ml DMEM 培养基, 随后利用激光共聚焦显微镜拍摄 RAW264.7 细胞对巨噬细胞囊泡 Cas9-RNP@MMs 的摄取情况。

1.9 Western blot 检测 NLRP3 蛋白表达 收集加入 Cas9-RNP@MMs 囊泡 48 h 后的各组 RAW264.7 细胞, 加入 RIPA 裂解提取总蛋白, 以考马斯亮蓝 G250 法进行蛋白定量, 使用 10% SDS-PAGE 胶, 经电泳、转膜后, 5% BSA 封闭 2 h, 加入一抗(1:7 000), 4 °C 孵育过夜。然后加入二抗(1:7 000), 室温孵育 2 h, 显影。

1.10 qPCR 检测 NLRP3 mRNA 表达 收集加入 Cas9-RNP@MMs 囊泡 48 h 后的各组 RAW264.7 细胞, 使用 TRIzol 法提取总 RNA, 测 RNA 浓度和纯度后, 使用逆转录试剂盒合成 cDNA, 用 PCR 仪进行扩增, 按照试剂盒操作方法检测各组细胞 NLRP3 mRNA 表达水平, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 NLRP3 mRNA 相对表达量。

引物序列如下: NLRP3 (F: 5'-ATTACCCGCC-CGAGAAAGG-3', R: 5'-TCGCAGCAAAGATCCACA-CAG-3'); GAPDH (F: 5'-TGACCTCAACTACATG-GTCTACA-3', R: 5'-CTTCCCATTCTCGGCCTTG-3')。

1.11 统计学处理 采用 Graphpad Prism 9.4 统计软件进行统计学分析。数据呈正态分布的以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间样本均数比较采用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 仿生纳米粒 Cas9-RNP@MMs 的粒径分布

提取 RAW264.7 细胞的细胞膜,经 PBS 缓冲液重悬,并与 Cas9-RNP 混合后,使用脂质体挤出器挤压得到仿生纳米粒 Cas9RNP@MMs。通过纳米颗粒跟踪仪测得平均粒径约为 216 nm,见图 1。

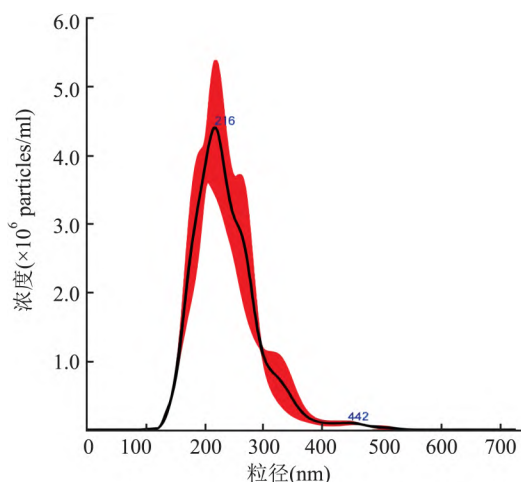


图1 Cas9-RNP@MMs 的纳米颗粒跟踪仪表征

通过负染色技术制片,采用透射电子显微镜拍摄,能够清晰的观察到 Cas9-RNP@MMs 的纳米形貌。形状呈空心椭圆球形或球形,粒径主要在 200 nm 左右。见图 2。外层的 RAW264.7 细胞膜都能完整的形成双层膜的囊泡状结构,表明 RAW264.7 细胞膜囊泡化并成功包裹 Cas9-RNP。

2.2 Cas9-RNP@MMs 的生物相容性 为了验证 Cas9-RNP@MMs 生物相容性良好、无毒性的特点。

使用不同浓度的 Cas9-RNP@MMs 与 RAW264.7 细胞孵育 24 h,通过 MTT 检测,结果显示,随着浓度的增加,Cas9-RNP@MMs 对细胞活力的影响无统计学差异。见表 1。

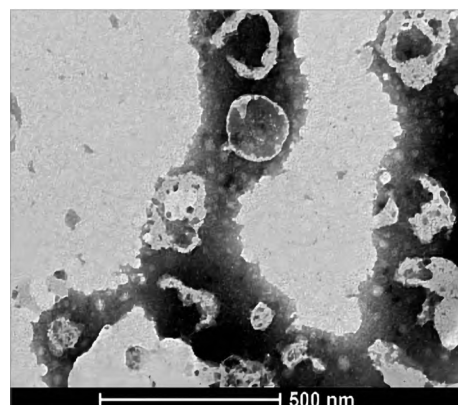


图2 Cas9-RNP@MMs 的 TEM 表征 $\times 12\,000$

表1 不同浓度 Cas9-RNP@MMs 对 RAW264.7 细胞活力的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

浓度($\mu\text{g/ml}$)	A_{490}	细胞活力(%)
0	0.570 ± 0.046	100.000
2.5	0.568 ± 0.060	99.591
5	0.566 ± 0.068	99.240
7.5	0.542 ± 0.044	95.032
10	0.517 ± 0.037	90.590
12.5	0.498 ± 0.039	87.317

2.3 Cas9-RNP@MMs 的细胞内吞情况 使用 DIO 绿色荧光标记仿生纳米粒 Cas9-RNP@MMs,将其加入 RAW264.7 细胞,并在培养箱中孵育 6 h,随后通过激光共聚焦荧光显微镜进行拍摄,可见 DIO 荧光染料标记的 Cas9-RNP@MMs 呈斑点状大量的分布在细胞内,提示 Cas9RNP@MMs 成功被巨噬细胞大量摄取。见图 3。

2.4 Cas9RNP@MMs 系统的基因编辑效果 设

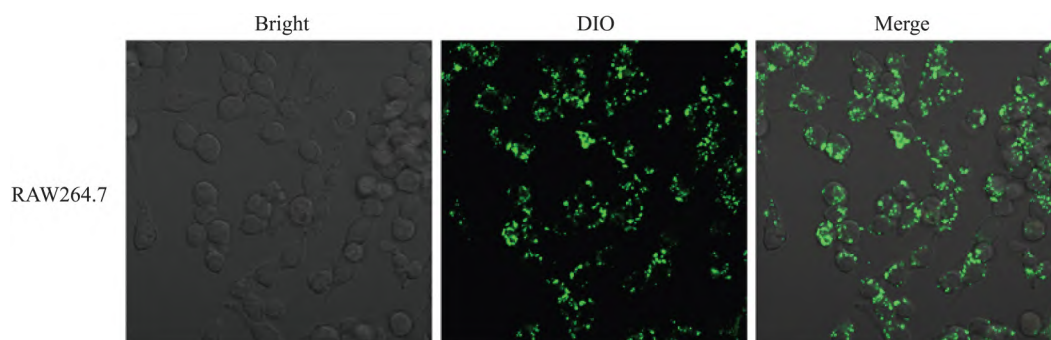


图3 DIO 荧光标记的 Cas9-RNP@MMs 的细胞内吞情况 $\times 500$

计了3条针对NLRP3的向导sgRNA,并将其制备成具有NLRP3特异性的Cas9-RNP@MMs,随后递送到RAW264.7细胞中,评估Cas9RNP@MMs系统的工作效率。通过qPCR检测NLRP3在基因表达水平的变化,结果显示,sgRNA-2和sgRNA-3有明显的敲低NLRP3的效果,差异有统计学意义($F = 156.8, P < 0.0001$),Western blot也显示同样的趋势。见图5。

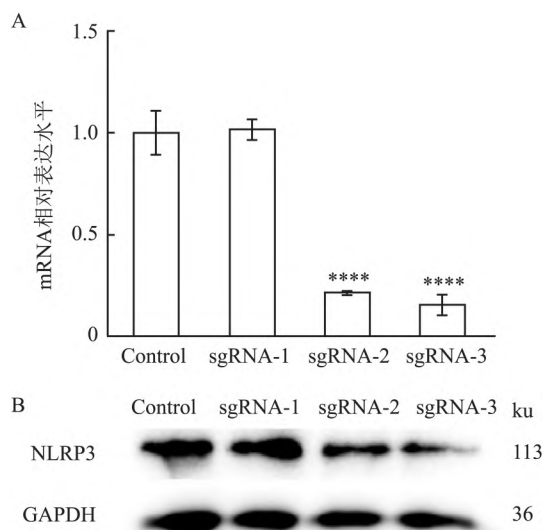


图4 NLRP3表达

A: qPCR检测; B: Western blot检测; 与control组比较: **** $P < 0.0001$

3 讨论

NLRP3是外源性病原体和内源性损伤相关分子模式的胞质传感器。内源性或外源性刺激后,激活的NLRP3与适配器蛋白ASC和半胱氨酸蛋白酶caspase-1组装,形成NLRP3炎症小体,导致caspase-1的裂解和激活,进而促进IL-1 β 和IL-18等促炎因子的成熟和释放^[4]。已有研究^[5-8]证明,抑制NLRP3炎症小体信号能够减轻动脉粥样硬化、败血性休克、T2D、阿尔茨海默病、多发性硬化、痛风等疾病。

因此,抑制NLRP3炎症小体是治疗一些炎症性疾病和自身免疫性疾病的潜在靶点,也是临床药物研究开发的前沿热点方向。而目前针对NLRP3炎症小体的治疗策略主要包括IL-1信号的抗炎生物制剂(例如IL-1受体拮抗剂Kineret)、小分子抑制剂(如格列本脲和MCC950)和NLRP3炎症小体的天然抑制剂(例如omega-3脂肪酸,多巴胺和 β -羟

基丁酸酯)的使用^[7-8]。然而,这些抑制剂或能抑制NLRP3的上下游信号,或能抑制其他炎症小体的活化或其他炎症信号通路,并不能特异性的抑制NLRP3炎症小体,只有靶向NLRP3本身才能特异性的抑制NLRP3炎症小体活化。

CRISPR/Cas9系统具有成本低、操作简单、效率高等优点,是目前最常用的基因编辑方法^[9]。它能够通过单个gRNA导向的特异性Cas9核酸酶,有效地破坏或修复引起疾病的基因^[10]。使用CRISPR-Cas9能直接在基因组水平上破坏关键分子NLRP3,不仅能够有效抑制NLRP3炎症小体的活化,还能够避免一些抑制剂存在的脱靶等弊端。因此,研究CRISPR/Cas9敲除NLRP3是一种有效治疗炎症相关疾病的方法。但是实现CRISPR-Cas9系统的治疗性操作仍然存在一些技术壁垒,其中最主要之一是开发安全有效的递送载体确保将基因编辑工具有效地递送到靶细胞中^[11]。

本研究利用小鼠巨噬细胞膜包裹Cas9-RNP复合物,制备了一种Cas9-RNP@MMs仿生纳米粒囊泡,利用纳米颗粒跟踪仪和电子显微镜技术,成功跟踪了仿生纳米粒囊泡粒径和形态,并在细胞水平验证了仿生纳米粒囊泡的内吞和生物相容性,以及其作为一个载体介导物质进入细胞内的功能。为了验证其临床应用价值,本研究还设计了特异性针对NLRP3的gRNA,制备了NLRP3特异的Cas9-RNP@MMs,以小鼠巨噬细胞RAW264.7为体外模型,检测Cas9-RNP@MMs对NLRP3基因的敲低效果,并鉴定出两个可以有效降低NLRP3表达的特异性gRNA,为开发低毒性的抑制NLRP3表达的治疗靶点的载体提供了很有价值的临床前期证据。该研究目前还处在体外实验阶段,需要动物水平的体内研究进一步证实其效果。该研究或许提供一种新的针对NLRP3相关的疾病治疗策略,为开展后续相关实验奠定基础。

参考文献

- [1] Wu M, Le W, Mei T, et al. Cell membrane camouflaged nanoparticles: a new biomimetic platform for cancer photothermal therapy [J]. Int J Nanomedicine, 2019, 14: 4431-48.
- [2] Narain A, Asawa S, Chhabria V, et al. Cell membrane coated nanoparticles: next-generation therapeutics [J]. Nanomedicine, 2017, 12(21): 2677-92.
- [3] Luk B T, Zhang L. Cell membrane-camouflaged nanoparticles for drug delivery [J]. J Control Release, 2015, 220: 600-7.
- [4] Kelley N, Jeltama D, Duan Y, et al. The NLRP3 inflammasome:

- an overview of mechanisms of activation and regulation [1]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3328.
- [5] Mangan M S J, Olhava E J, Roush W R, et al. Targeting the NLRP3 inflammasome in inflammatory diseases [1]. *Nat Rev Drug Discov*, 2018, 17(8): 588–606.
- [6] 王 萍, 唐宋琪, 农开旭, 等. 柚皮素预处理通过抑制 NLRP3 炎症小体通路减轻小鼠机械通气相关性肺损伤 [1]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(6): 871–5.
- [7] Coll R C, Robertson A A, Chae J J, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases [1]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 248–55.
- [8] Youm Y H, Nguyen K Y, Grant R W, et al. The ketone metabolite beta-hydroxybutyrate blocks NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory disease [1]. *Nat Med*, 2015, 21(3): 263–9.
- [9] Gupta D, Bhattacharjee O, Mandal D, et al. CRISPR-Cas9 system: A new-fangled dawn in gene editing [1]. *Life Sci*, 2019, 232: 116636.
- [10] Barman A, Deb B, Chakraborty S. A glance at genome editing with CRISPR – Cas9 technology [1]. *Curr Genet*, 2020, 66(3): 447–62.
- [11] Liu C, Zhang L, Liu H, et al. Delivery strategies of the CRISPR–Cas9 gene-editing system for therapeutic applications [1]. *J Control Release*, 2017, 266: 17–26.

Preparation of Cas9 – RNP cell membrane vesicle – loaded biomimetic nanoparticles and its efficacy on the *NLRP3* gene knockdown in mouse macrophage

Wu Dongqing¹, Dan Zhangyong¹, He Xiaoyan², Zhu Huaqing¹

(¹Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology of Anhui Medical University, Hefei 230032;

²Dept of College of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective Cas9–RNP biomimetic nanoparticles cas9–RNP@MMs were prepared by encapsulating the Cas9 Ribonucleoprotein complex (RNP) using mouse macrophage membranes, with the aim of utilizing this biomimetic nanoparticle to deliver the Cas9–RNP complex for gene editing, and further study the endocytosis of Cas9–RNP@MMs and its gene editing effect in mouse macrophage RAW264.7 *in vitro*, providing evidence for the development of low-toxicity biomimetic nanoparticle carriers that inhibit *NLRP3* therapeutic targets. **Methods** The purified mouse macrophage membrane was mixed with the prepared cas9–RNP mixture, and after ultrasound, the CAS9–RNP@MMS was obtained by liposome extrusion instrument; The particle size of Cas9–RNP@MMs was measured by nanoparticle tracking analysis, and the particle morphology of Cas9–RNP@MMs was observed under transmission electron microscope. Laser confocal Fluorescence microscope imaging was used to analyze the endocytosis Cas9–RNP@MMs. The Biocompatibility of Cas9–RNP@MMs was measured by MTT assay. The expression of *NLRP3* was detected by qPCR and Western blot to verify the knockdown effect of Cas9–RNP@MMs on *NLRP3* gene. **Results** The average particle diameter of Cas9–RNP@MMs prepared from macrophages was about 216 nm. Under laser confocal fluorescence microscope, the Cas9–RNP@MMs could be successfully endocysed by Raw246.7 cell. MTT assay indicated that the Cas9–RNP@MMs-treated mouse macrophage RAW246.7 had good biocompatibility. qPCR and Western blot showed that two *NLRP3*-specific guide RNA were mediated by Cas9–RNP@MMs, with good effect of knockdown *NLRP3* gene expression. **Conclusion** Nano-scale vesicles Cas9–RNP@MMs loaded with Cas9–RNP complexes were successfully prepared by biomimetic nanoparticles. Cas9–RNP@MMs have good biocompatibility and can be efficiently endocytosed by RAW246.7 cells. Cas9–RNP@MMs containing *NLRP3*-specific sgRNA can specifically knock down *NLRP3* gene expression.

Key words cell membrane; nanovesicles; Cas9–RNP; endocytosis; gene knockdown