

用 CRISPR/Cas9 技术编辑 KLF4 基因对 GES-1 细胞生物学行为的影响

赵荣荣, 任海风, 宋乐, 张倩, 范楚苓, 刘亚坤, 姜玉, 汪思应, 魏道严

摘要 目的 采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 构建靶向 KLF4 的基因编辑质粒, 建立 CRISPR/Cas9-sgKLF4 人正常胃黏膜 GES-1 细胞株, 观察 KLF4 基因敲除效果及其对细胞生物学行为的影响。方法 设计靶向 KLF4 基因的 sgRNA 序列, 将合成的片段插入到 CRISPR/Cas9 质粒骨架载体 pX459 中, 再将重组后的质粒做转化, 挑取克隆, 扩增后提质粒进行测序验证正确性。将构建好的重组质粒体外转染入人胃黏膜细胞 GES-1 中, 利用嘌呤霉素进行筛选获得 KLF4 敲除的克隆细胞, 应用 Western blot 技术检测未转染细胞和克隆细胞中 KLF4 蛋白的表达情况, 平板克隆实验检测 KLF4 敲低后克隆形成能力, MTT 实验检测其增殖能力, Transwell 实验检测其迁移能力。结果 经测序验证, 成功构建了靶向 KLF4 的重组质粒 pX459-KLF4-sgRNA, 经 Western blot 方法验证, 转染该重组质粒后人胃黏膜上皮细胞株 GES-1 的 KLF4 蛋白表达量明显降低, 行为学实验结果表明, GES-1 细胞敲低 KLF4 基因后克隆形成能力、增殖能力以及迁移能力都明显增强。结论 成功构建了靶向 KLF4 的 CRISPR/Cas9 基因编辑质粒载体及 KLF4 基因敲低的稳定细胞株 GES-1, KLF4 基因敲低后 GES-1 细胞生物学行为的改变证实其抑癌基因活性。

关键词 KLF4; CRISPR/Cas9; 胃癌; GES-1

中图分类号 R 363.14; R 363.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1441-06

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.006

胃癌是严重影响人类健康的常见恶性肿瘤之一, 但是其具体发生机制仍然需要进一步探讨^[1]。胃癌的发生、发展是一个复杂而漫长的病理过程, 除了受环境因素的影响外, 还与自身基因的表达调控有关^[2-3]。Krüppel-like factor 4 (KLF4) 是近年来在胃癌肿瘤分子生物学研究中发现的一个新的抑癌基因, 在终末分化的胃肠黏膜、皮肤等上皮细胞中高表

达^[4], 但是在胃癌组织中呈低表达, 其表达水平与胃癌的发生发展密切相关^[5], 且影响细胞恶性转化, 控制胃癌细胞起源及发生发展, 可望成为胃癌防治的重要靶点^[6-7]。Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) 是一种基因编辑器, CRISPR/Cas9 技术是借助 sgRNA 精确引导 Cas9 内切酶对互补靶序列进行双链切割, 从而对基因进行修饰, 该项技术在被研究^[8-9]后迅速广泛应用于基因编辑领域。对于 KLF4 在胃癌的分子机制研究中, 体内实验的 KLF4 敲除基因模型小鼠已经建立, 但是体外实验用 CRISPR/Cas9 方法建立敲除 KLF4 基因的胃癌细胞或者胃上皮细胞目前尚未见报道^[5-6]。因此, 该研究旨在构建靶向 KLF4 基因的 CRISPR/Cas9 敲低质粒载体, 利用其敲除高表达 KLF4 蛋白的人胃黏膜细胞 GES-1 中 KLF4 基因, 为进一步体外探索和证实 KLF4 与胃癌发生发展及预后之间的关系打下了基础。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 CRISPR/Cas9 质粒骨架载体 pX459 购自美国 Addgene 公司 (ID#62988); 质粒提取试剂盒购自美国 Axygen 公司; 转染试剂 lipofectamine3000 Reagent 购自美国 Invitrogen 公司; 正常胃上皮细胞 GES-1 由本实验室保存; KLF4 抗体购自美国 Santa Cruz 公司; 1640 培养基购自美国 Gibco 公司; 进口胎牛血清购自美国 Hyclone 公司; 嘌呤霉素购自美国 Sigma 公司; 细胞培养孵箱、生物酶标仪购自美国 Thermo 公司; 倒置显微镜购自德国 ZEISS 公司。

1.2 靶向 KLF4 基因的 sgRNA 的设计和合成 首先登陆 NCBI 网站检索 KLF4 基因的 CDS 区基因序列, 再利用张峰实验室在线工具 (<http://crispr.mit.edu>) 根据 CRISPR/Cas9 设计原理设计出符合实验所需的 sgRNA, 然后对其筛选和评估脱靶效应, 最终挑选出特异性最强的 sgRNA, 如图 1 所示。靶向 KLF4 sgRNA oligo 序列为: 5'-[p]CAC-CGCGCCGGCCAGACGCGAACG-3', 5'-[p]AAAC-

2017-04-11 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81472330)

作者单位: 安徽医科大学病理生理学教研室, 合肥 230032

作者简介: 赵荣荣, 女, 硕士研究生;

汪思应, 男, 教授, 博士生导师, 责任作者, E-mail: sywang@ahmu.edu.cn;

魏道严, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: daoyan_wei@yahoo.com

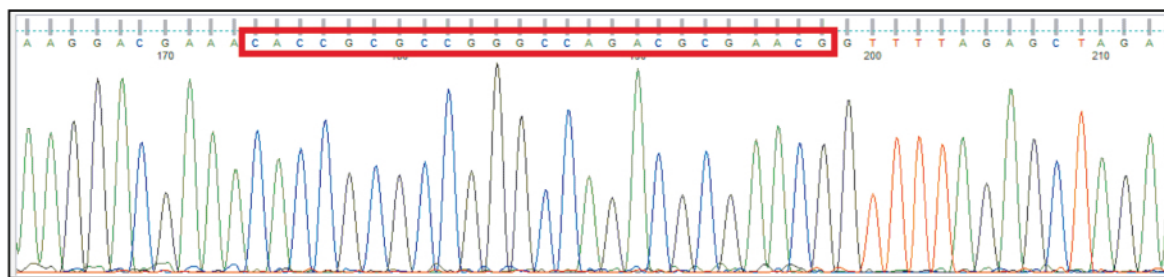


图3 重组质粒 pX459-KLF4-gRNA 测序结果

计时,按时收板,避光加入 MTT 试剂 50 μl 于每孔中,继续放入孵箱培养 4 h 后,避光取出。弃去培养基和 MTT 试剂混合液,加入 DMSO 150 μl 于每孔,置于室温摇床混匀 15 min,用酶标仪 490 nm 检测光密度值。

1.7.3 Transwell 实验检测细胞体外迁移能力 取小室于 24 孔板中,分别将小室的上室和下室加入纯 1640 培养基水化 30 min,弃去,下室加入 500 μl 5% FBS 的 1640 培养基。分别接种三组处于对数生长期的细胞 7×10^4 个,取 300 μl 1640 完全培养基重悬混匀后加入上室中。37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 孵箱中培养 48 h。取出小室,弃去上室培养基,用棉签小心擦净上室未穿过的细胞(上室面)并用 PBS 洗 2 遍,擦拭过程中切勿碰及小室穿透的一面。固定液固定已穿过的细胞(下室面) 15 min,0.1% 结晶紫染色 2 h,清水洗去染液,将小室室温下倒置扣干,显微镜下拍照,计数。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 17.0 统计软件进行分析,所有实验结果采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 pX459-KLF4-sgRNA 的鉴定 测序结果见图 3。

2.2 Western blot 结果 由结果显示,在人胃黏膜细胞 GES-1 中转染重组质粒 pX459-KLF4-gRNA 后,单克隆 pX459-KLF4-gRNA-2 细胞系的 KLF4 基因表达明显敲低。见图 4。

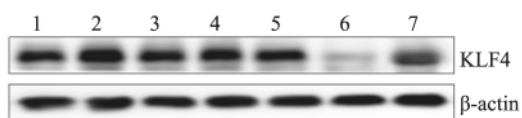


图4 Western blot 法检测 KLF4 的表达情况

1: GES-1 细胞未处理组; 2、3、4: GES-1 细胞转染空载体 pX459 后嘌呤霉素筛选选取的 3 个单克隆细胞; 5、6、7: GES-1 细胞转染重组质粒 pX459-KLF4-gRNA 后嘌呤霉素筛选选取的 3 个单克隆细胞

2.3 形态学结果 与正常胃黏膜 GES-1 细胞相比,转染重组质粒 pX459-KLF4-sgRNA-2 后稳定敲低 KLF4 表达的 GES-1 细胞形态发生明显改变,细胞由椭圆形变成梭型。见图 5。

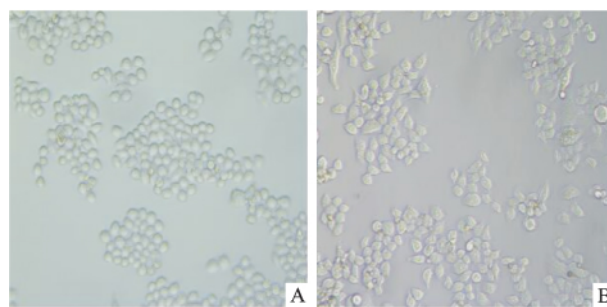


图5 正常 GES-1 细胞和稳定敲低 KLF4 表达 GES-1 细胞的形态学变化 $\times 10$
A: 正常 GES-1 细胞; B: 稳定敲低 KLF4 的 GES-1 细胞

2.4 行为学实验结果

2.4.1 平板克隆实验结果 与正常 GES-1 细胞未处理组和转染 pX459 空载体组相比,GES-1 细胞敲低 KLF4 后,其细胞集落形成能力明显增强,差异有统计学意义 [GES-1: (365.667 \pm 18.770), GES-1-pX459: (373.667 \pm 6.110), pX459-KLF4-sgRNA: (716.333 \pm 33.201), $F = 245.400$, $P < 0.0001$]。见图 6。

2.4.2 MTT 实验结果 与 GES-1 未处理组相比,GES-1 细胞敲低 KLF4 后其细胞增殖能力也明显增强,差异有统计学意义 [GES-1: (0.448 \pm 0.240), GES-1-pX459: (0.434 \pm 0.224), pX459-KLF4-sgRNA: (0.532 \pm 0.302), $F = 5.440$, $P = 0.0449$]。见图 7。

2.4.3 Transwell 实验结果 与 GES-1 未处理组相比,GES-1 细胞敲低 KLF4 后,其细胞在体外迁移能力明显增强,差异有统计学意义 [GES-1: (129.000 \pm 5.568), GES-1-pX459: (130.000 \pm 9.000), pX459-KLF4-sgRNA: (256.333 \pm 8.505), $F = 227.800$, $P < 0.0001$]。见图 8。

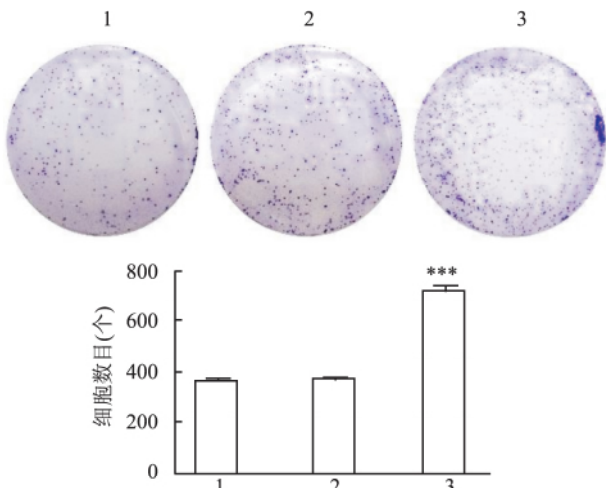


图6 平板克隆实验检测 GES-1 细胞敲低 KLF4 后集落形成能力情况

1: GES-1 未处理组; 2: GES-1-pX459; 3: pX459-KLF4-sgRNA; 与 GES-1 未处理组比较: *** P < 0.000 1

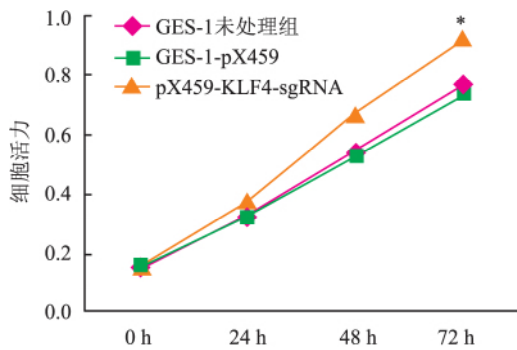


图7 MTT 实验检测 GES-1 细胞敲低 KLF4 后细胞增殖能力情况 与 GES-1 未处理组比较: * P < 0.05

3 讨论

KLF4 是含有锌指结构的转录因子,其主要功能是参与调控细胞的增殖和分化,并且与肿瘤的发生密切相关^[10]。研究^[4,11]证实,KLF4 在不同组织的癌细胞中发挥着不同的功能,其在乳腺癌和口腔癌中发挥着原癌基因的作用,而在胃癌、肠癌以及膀胱癌细胞中发挥着抑癌基因的作用。在胃癌中显示,与正常及肿瘤邻近组织相比,胃癌组织中 KLF4 蛋白的表达水平显著下降,且表达水平与患者的预后呈负相关性;而在淋巴和远处肿瘤转移灶中,KLF4 蛋白的表达水平进一步显著降低,说明 KLF4 蛋白表达的降低和丢失与胃癌的发生发展密切相关。在 KLF4 的功能实验研究^[4]显示转导 KLF4 基因可显著诱导胃癌细胞凋亡,抑制细胞周期进程,降低胃癌细胞动物体内的致瘤性。转基因动物实验^[12]表

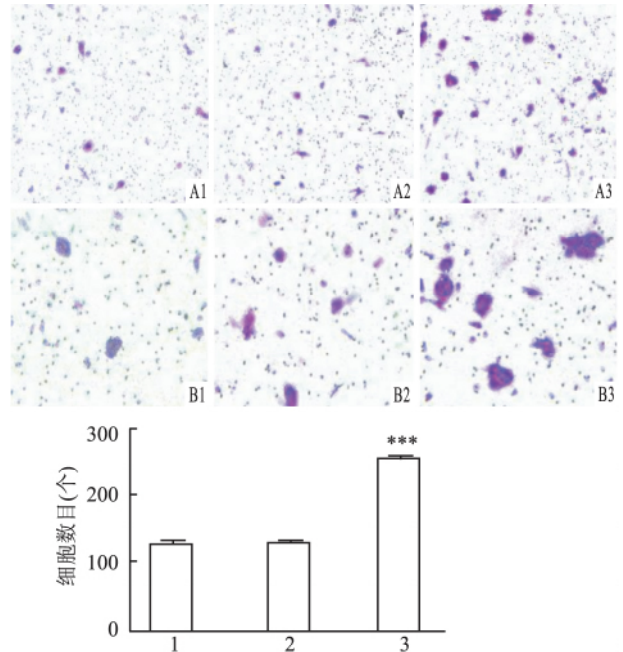


图8 Transwell 实验检测 GES-1 细胞敲低 KLF4 后细胞体外迁移能力情况

A: ×10; B: ×20; 1: GES-1 未处理组; 2: GES-1-pX459; 3: pX459-KLF4-sgRNA; 与 GES-1 未处理组比较: *** P < 0.0001

明,胃组织特异性 KLF4 基因敲除后黏膜腺上皮细胞的增殖显著加速,分化受阻,表现为黏膜腺内颈部的数量增加近 4 倍,而分化的壁细胞和主细胞数量降低近一半,从而导致胃黏膜上皮的过度增生。目前研究^[5-7,10-11]表明,KLF4 在胃癌的演进过程中发挥着重要的作用,但是其在胃癌中表达失活的具体原因仍需探索。为了进一步深入探索和研究 KLF4 在胃癌发生发展中的调控机制,该研究利用 CRISPR/Cas9 技术,在体外敲除高表达 KLF4 蛋白人胃肠上皮细胞 GES-1 中的 KLF4 基因,并体外鉴定敲除效果。

本实验采用 CRISPR/Cas9 系统来完成对 GES-1 细胞中 KLF4 基因的靶向性敲除,包括选择靶区域、构建载体、转染体外鉴定敲除效果等。CRISPR/Cas9 技术是新一代的基因定向编辑技术,相比于锌指核酸内切酶(ZFN)^[13]和类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)^[14]等经典的基因编辑技术,有着更多的优点,例如操作简便、成本较低、制备时间短,并且可以同时沉默任意数量的单个基因等^[15,8]。另一方面,CRISPR/Cas9 技术在降低脱靶效应方面与 TALEN 和 ZFN 技术相比而言也有一定的优越性。在 CRISPR/Cas9 系统中,通过设计并预测出具有最小脱靶率的特异 sgRNA,将其导入细胞,对目的基因

进行靶标并且招募 Cas9 蛋白进行切割,最终导致细胞通过非同源性末端接合和同源重组机制进行 DNA 修复。在基因修复过程中断裂的位点处会发生插入或缺失部分基因片段,产生框移突变,从而达到敲除目的基因的目的^[15]。鉴于 CRISPR/Cas9 技术的高效率以及实用性,其在各种细胞模型中被广泛应用。将目的序列连接到载体并转染至靶细胞是获得长期稳定表达细胞株的首要步骤。目前,转染目的细胞常用的基因导入载体主要包括质粒载体和病毒载体。本实验使用 pX459 质粒作为载体,该质粒不仅可以同时表达 Cas9 和插入的 sgRNA,简化了表达 Cas9 质粒和 sgRNA 质粒共转染的步骤,而且还含有嘌呤霉素抗性筛选标记,转染后通过药物筛选得到阳性克隆。CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术是目前成功广泛应用的热门技术,其在简易克隆和多重基因组编辑方面有着很大优势,为利用基因疗法治疗疾病提供了新方法,在医学领域具有广阔的发展前景。本研究构建了靶向 KLF4 基因的 CRISPR/Cas9 基因敲除质粒,转染该质粒建立的 GES-1 细胞株显示 KLF4 被成功敲低,生物学行为实验结果表明,KLF4 敲低后细胞由上皮型向间质型转化,细胞的增殖、迁移和克隆形成能力增强,进一步证实其抑癌基因功能。本工作作为后续研究 KLF4 在胃癌发生发展中的作用及机制提供了工具,也为制定相应的治疗策略、提高患者预后奠定了基础。

参考文献

- [1] Takeuchi M, Ishii K, Seki H, et al. Excessive visceral fat area as a risk factor for early postoperative complications of total gastrectomy for gastric cancer: a retrospective cohort study[J]. *BMC Surg*, 2016, 16(1): 54.
- [2] Berger H, Marques M S, Zietlow R, et al. Gastric cancer pathogenesis[J]. *Helicobacter*, 2016, 21 Suppl 1: 34-8.
- [3] Polk D B, Peek R M Jr, et al. *Helicobacter pylori*: gastric cancer

- and beyond[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(6): 403-14.
- [4] Wei D, Kanai M, Huang S, et al. Emerging role of KLF4 in human gastrointestinal cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2006, 27(1): 23-31.
- [5] Wei D, Gong W, Kanai M, et al. Drastic down-regulation of Kruppel-like factor 4 expression is critical in human gastric cancer development and progression[J]. *Cancer Res*, 2005, 65(7): 2746-54.
- [6] Li Q, Jia Z, Wang L, et al. Disruption of Klf4 in villin-positive gastric progenitor cells promotes formation and progression of tumors of the antrum in mice[J]. *Gastroenterology*, 2012, 142(3): 531-42.
- [7] Katz J P, Perreault N, Goldstein B G, et al. Loss of Klf4 in mice causes altered proliferation and differentiation and precancerous changes in the adult stomach[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(4): 935-45.
- [8] Charpentier E, Marraffini LA. Harnessing CRISPR-Cas9 immunity for genetic engineering[J]. *Curr Opin Microbiol*, 2014, 19: 114-9.
- [9] Doudna J A, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9[J]. *Science*, 2014, 346(6213): 1258096.
- [10] Asadi M H, Derakhshani A, Mowla S J. Concomitant upregulation of nucleostemin and downregulation of Sox2 and Klf4 in gastric adenocarcinoma[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(7): 7177-85.
- [11] Tetreault M P, Yang Y, Katz J P, et al. Krüppel-like factors in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2013, 13(10): 701-13.
- [12] Müller M, Hermann P C, Liebau S, et al. The role of pluripotency factors to drive stemness in gastrointestinal cancer[J]. *Stem Cell Res* 2016, 16(2): 349-57.
- [13] Sander J D, Dahlborg E J, Goodwin M J, et al. Selection-free zinc-finger-nuclease engineering by context dependent assembly (CoDA) [J]. *Nat Methods* 2011, 8(1): 67-9.
- [14] Sanjana N E, Cong L, Zhou Y, et al. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering[J]. *Nat Protoc*, 2012, 7(1): 171-92.
- [15] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science* 2013, 339(6121): 819-23.

Effect of KLF4 gene edited by CRISPR/Cas9 technique on the biological behavior of human gastric epithelial GES-1 cells

Zhao Rongrong, Ren Haifeng, Song Le, et al

(Dept of Pathophysiology Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct plasmid for knockout of Kruppel-like factor 4 (KLF4) gene by using CRISPR/Cas9 gene editing method and examine its impact on biological behavior of human GES-1 cells. **Methods** Synthesized KLF4 gene targeting sgRNA oligos were inserted into CRISPR/Cas9 plasmid vector of pX459. After transformation, clone isolation and amplification, DNA sequencing confirmed plasmid DNA termed pX459-KLF4-sgRNA,

白藜芦醇抑制低浓度 H₂O₂ 处理佐剂性关节炎大鼠成纤维样滑膜细胞增殖的机制研究

李娜^{1,2} 张俊强¹ 曹威¹ 殷瞳昕³ 胡永涛³ 陈晓宇¹

摘要 目的 探讨抗氧化剂白藜芦醇(Res)对低浓度 H₂O₂ 处理的佐剂性关节炎(AA)大鼠成纤维样滑膜细胞(FLS)增殖的抑制作用。方法 弗氏完全佐剂足趾皮下注射 SD 雄性大鼠,建立 AA 模型,14 d 后股动脉放血处死 AA 大鼠,取血清检测氧化应激指标,组织块培养法培养大鼠滑膜细胞, CCK-8 法观察不同浓度的 H₂O₂ 对 FLS 的增殖影响, Western blot 法检测氧化应激相关蛋白去乙酰化酶 3(SIRT3)、锰超氧化物歧化酶(MnSOD)蛋白的表达。结果 AA 模型大鼠血清氧化应激指标升高,体外实验表明,随着 Res 的浓度增加,低浓度 H₂O₂ 处理的 AA 大鼠 FLS 增殖受抑制, SIRT3、MnSOD 蛋白表达降低。结论 Res 可减轻 AA 大鼠体内的氧化应激状态,机制与降低抗氧化应激蛋白 SIRT3、MnSOD 的表达有关。

关键词 佐剂性关节炎;成纤维样滑膜细胞;白藜芦醇;去乙酰化酶 3;锰超氧化物歧化酶

中图分类号 R 332.72

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2017)10-1446-04

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2017.10.007

类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)属于自身免疫性关节疾病,病理表现为关节滑膜慢性炎症,RA 主要表现为成纤维样滑膜细胞(fibroblast-like synoviocytes, FLS)异常增殖和大量炎细胞(如淋巴细胞和巨噬细胞等)浸润,关节结构破坏^[1]。研究^[2]显示,活性氧(reactive oxygen, ROS)的增加与 FLS 的异常增殖有一定的联系。白藜芦醇(resveratrol, Res)为多元酚类植物,能够显著降低大鼠体内应激状态,其抑制 FLS 增殖作用机制与抗氧化应激蛋白去乙酰化酶 3(sirtuin3, SIRT3)、锰超氧化物歧化酶(manganese superoxide dismutase, MnSOD)的降低密切相关^[3]。该研究旨在体外探讨抗氧化剂 Res 对佐剂性关节炎(adjutant arthritis, AA)大鼠 FLS 增殖影响及是否通过 SIRT3-MnSOD-ROS 而抑制 FLS 增殖。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁级雄性 SD 大鼠,重(170 ± 10)g,饲养于安徽医科大学动物实验中心。饲养于

2017-05-03 接收

基金项目:国家自然科学基金面上项目(编号:81373421);安徽医科大学七年制临床医学专业学生“早期接触科研”训练计划项目(编号:2016-ZQKY-57)

作者单位:安徽医科大学¹组织学与胚胎学教研室、³第二临床医学院,合肥 230032

²安徽省体育科学技术研究所,合肥 230001

作者简介:李娜,女,硕士,检验师;

陈晓宇,男,博士,教授,硕士生导师,责任作者, E-mail:

cxyayd@163.com

was used to transfect human gastric epithelial GES-1 cells *in vitro*. After transfection, GES-1 cells were first selected in cell-cultured medium containing puromycin, and then the selected GES-1 cells were replated into 100 mm dishes for clonal cell culture. Protein samples extracted from individual cell clones were used for Western blot analysis of KLF4 expression. Biological assays of plate clone formation, MTT cell proliferation, and transwell cell migration were used to compare the cellular behavior changes among GES-1 cells of parental, control clone or clone with KLF4 gene knockdown. **Results** DNA sequence analysis confirmed that KLF4 targeting sgRNA sequences were successfully constructed into of pX459 vector. Transfection of the resultant vector of pX459-KLF4-sgRNA into GES-1 cells led to KLF4 gene knockdown indicated by drastic reduction of KLF4 protein expression, significant biological behavior changes including increased cell proliferation, clone formation, and migration abilities. **Conclusion** We successfully constructed human KLF4 gene editing plasmid vector based on CRISPR/Cas9 technique, and the biological behavior changes of the established GES-1 cell line with drastic KLF4 knockdown confirmed the tumor suppressive function of KLF4.

Key words KLF4; CRISPR/Cas9; gastric cancer; GES-1