

网络出版时间: 2025-03-17 18:56:17 网络出版地址: <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20250314.1612.001>

◇基础医学研究◇

G 蛋白偶联受体 107 的缺失对 HaCaT 细胞生物学行为的影响

汪璟¹, 赵伟¹, 徐德萃¹, 廖开楠¹, 臧丹丹², 周海胜^{1,2}
(安徽医科大学¹ 生物化学教研室,² 科研实验中心, 合肥 230032)

摘要 目的 构建稳定敲除 G 蛋白偶联受体 107(*GPR107*) 基因的人类角质形成细胞系(HaCaT), 并初步探究 *GPR107* 的缺失对 HaCaT 细胞生物学行为的影响。方法 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 构建敲除 *GPR107* 基因的 HaCaT 细胞, 并通过有限稀释法获得 *GPR107* 缺失的单克隆细胞; 利用 Western blot 和 PCR 扩增基因组 DNA 并测序验证敲除 *GPR107* 的单细胞克隆。运用流式细胞分析术检测细胞周期变化; 利用 CCK-8 检测细胞增殖; 运用流式细胞术检测细胞凋亡水平; 运用 Western blot 检测细胞分化标记分子的变化; 运用细胞划痕实验等方法分析细胞迁移能力。结果 成功将 LentiCas9-Blast 与 plenti-guide-RNA-*GPR107* 质粒转染进 HaCaT 细胞, 并通过有限稀释法得到了 21 株单克隆细胞, Western blot 显示其中 8 株细胞 *GPR107* 表达显著降低; 进一步采用细胞基因组 PCR 测序, 显示获得了 C4 与 2D8 2 株 *GPR107*^{-/-} HaCaT 单克隆细胞株。CCK-8 检测、流式细胞术检测显示 *GPR107* 基因缺失导致 HaCaT 细胞出现 G₀G₁ 期阻滞, 增殖能力显著减弱, 凋亡水平增加; Western blot 显示敲除 *GPR107* 后 HaCaT 细胞分化加快; 细胞划痕实验结果表明敲除 *GPR107* 后 HaCaT 细胞迁移能力增强。结论 成功构建 *GPR107* 基因缺失的 HaCaT 细胞株; *GPR107* 缺失阻滞 HaCaT 细胞 G₀G₁ 期从而抑制了 HaCaT 细胞增殖并促进细胞凋亡, 敲除 *GPR107* 后 HaCaT 细胞分化能力与迁移能力均增强。

关键词 G 蛋白偶联受体 107; 人类角质形成细胞; CRISPR/Cas9; 细胞增殖; 细胞周期

中图分类号 R 34

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2025)03-0385-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2025.03.001

G 蛋白偶联受体 107(G protein-coupled receptor 7, GPCR7, *GPR107*) 是 G 蛋白偶联受体(GPCR)超家族的成员, 因为其天然配体尚未被发现, 因此是一种孤儿受体^[1]。人类 *GPR107* 的 cDNA 最早是从肺组织中克隆出来的。对 *GPR107* 蛋白的结构分析表明, 其 N 端存在一个疏水信号肽和七个跨膜区, 这是 GPCR 超家族成员的典型特征^[2]。有研究^[3]显示 *GPR107* 敲除后, 小鼠胚胎在第 11.5~12.5 天停止发育并最终致死。因此 *GPR107* 在胚胎发育过程中具有重要的作用。但是在人表皮细胞中的功能目前不清楚。CRISPR/Cas 系统最初被描述为细菌和古细菌中的一种适应性免疫系统。现在已被设计为 RNA 引导的内切酶(RNA-guided endonucleases, RGENs), 用于基因组编辑^[4]。CRISPR/Cas9 由一种非特异性 Cas9 核酸酶和一套

可编程的序列特异性 CRISPR RNA(crRNA)组成, 后者可引导 Cas9 在目标位点裂解 DNA 并产生双链断裂。随后的细胞 DNA 修复过程会在目标位点产生所需的插入、缺失或替换。为探讨 *GPR107* 在人表皮细胞生物学行为中的作用, 该实验利用 CRISPR/Cas9 技术, 构建 *GPR107* 基因缺失的人类角质形成细胞系(HaCaT), 研究其对细胞的增殖和迁移等生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、菌株与载体 HaCaT 细胞由周海胜老师实验室保存; TOP10 感受态细胞购自北京擎科生物科技有限公司; LentiCas9-Blast 与 plenti-guide-RNA-*GPR107* 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) 和不含氯化钙的培养基 154(154CF)(货号: M154CF500) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; DMEM 高糖培养基(货号: C11995500BT)

2024-12-10 接收

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

作者简介: 汪璟, 女, 硕士研究生;

周海胜, 男, 教授, 博士生导师, 通信作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

购自美国 Gibco 公司; 青链霉素双抗(货号: P1400) 和 RIPA 裂解液(货号: BL504A) 均购自合肥 Bio-sharp 公司; 苯甲基黄酰氟(货号: P8304) 及胰酶粉末(货号: T8150-25G0) 均购自北京 Solarbio 公司; 转染试剂 Lip 3000 Transfection Kit(货号: L3000008) 购自美国 Invitrogen 公司; 博来霉素(货号: ST1450-1ml), 嘌呤霉素(puromycin dihydrochloride)(货号: ST551-10mg), CCK-8 试剂盒(货号: C0037) 以及细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒(货号: C1052) 均购自上海碧云天生物技术有限公司; 兔来源的 3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, 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) 以及 HRP 标记的羊抗鼠二抗(货号: 7076S) 均购自美国 Cell Signaling Technology 公司; 兔来源的角蛋白 1(cytokeratin 1, K1) 抗体(货号: ab93652) 以及角蛋白 5(cytokeratin 5, K5) 抗体(货号: ab53121) 均购自英国 Abcam 公司; 小鼠来源的胞壳蛋白(invulcrin, IVL) 抗体(货号: sc-21748) 购自美国 Santa cruz 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HaCaT 细胞在含有 10% 胎牛血清和 1% 青/链霉素的 DMEM 培养基中培养, 培养条件为 37 °C、5% CO₂ 和饱和湿度。培养基每 2 d 更换 1 次, 并对细胞进行监测, 当融合率约为 70% ~ 80% 时再进行后续实验。

1.2.2 GPR107 基因结构分析及 plenti-guide-RNA-GPR107 质粒的构建 利用 NCBI 网站下载人源 GPR107 的序列(Gene ID: 57720), 选择第 2 外显子作为敲除位点利用 CRISPRDesign 在线工具(<http://crispr.mit.edu>) 在靶标 DNA 区域中设计 gRNA 序列, 最终选择编辑位点为: 5'-agaccgtacaagaatgatg-3', 设计 gRNA 序列为: 5'-GTTTGTAGAGCTAGAAA-TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACT-TGAAAAAGTGGCACCAGCTCGGTGC-3', 委托北京伊美昂生物科技有限公司合成。

1.2.3 转化及质粒提取 利用热休克法将质粒转化到 Top10 感受态细胞中, 在感受态细胞中加入质粒后, 于 42 °C 水浴中热激 90 s, 进行热休克转化, 并将转化后的细菌涂布于含氨苄青霉素的 LB 平板上, 37 °C 过夜培养, 挑取单个菌落置于含有抗生素的 LB 液体培养基中, 37 °C 震荡扩增培养。按照无内毒素质粒提取试剂盒的说明书, 提取质粒 DNA。

1.2.4 稳定敲除 GPR107 的 HaCaT 细胞系的构建

先利用转染试剂 Lip3000 将表达 Cas9 的载体 Lenti-Cas9-Blast 转染 HaCaT 细胞, 用 300 μg/ml 博来霉素进行筛选 1 个月, 构建稳定表达 Cas9 蛋白的稳转细胞株; 再将 plenti-guide-RNA-GPR107 载体转染入稳定表达 Cas9 蛋白的 HaCaT 细胞中, 并用 0.3 μg/ml 嘌呤霉素筛选一个月, 获得混合细胞克隆。收集蛋白进行 Western blot 鉴定以初步观察基因敲除的效果。为获得单细胞克隆, 将混合克隆的细胞进行细胞计数, 按照 1 个/孔接种细胞到 96 孔板中。生长 3 周后可获得单克隆细胞, 扩大培养。提取单克隆细胞的总蛋白进行 Western blot 鉴定; 同时提取细胞 DNA 进行 PCR 扩增, 以进行测序验证。PCR 验证引物为 Forward primer: 5'-CAGAGGAGAC-CACGTTAGAAGT-3'; Reverse primer: 5'-CTGGGCT-CAGGTGAAGAGATG-3'; 送至北京擎科生物公司进行测序, 从而实现基因敲除。

1.2.5 细胞划痕实验 HaCaT 细胞均匀铺于 6 孔板, 过夜细胞密度达到 90% 左右, 用灭菌过的 10 μl 枪头在铺满细胞的培养皿上划线, 用 PBS 将漂浮的细胞清洗干净, 然后用不含 FBS 的完全培养基培养。在划痕后 0、24、48、72 h 对同一拍摄视野进行拍照。

1.2.6 Western blot 实验 用含 RIPA 和 PMSF 裂解液(100 : 1) 裂解 HaCaT 细胞半小时提取总蛋白。SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 2 h, 一抗 4 °C 孵育过夜, 次日室温孵育二抗 2 h, 1 × TBST 洗膜, 加入 ECL 显影液显影, 条带用 ImageJ 软件进行灰度分析。

1.2.7 细胞增殖检测 采用 CCK-8 检测试剂盒检测细胞增殖能力。具体方法是: 用胰酶消化状态良好的 HaCaT 细胞, 进行细胞计数, 将细胞以 5 000 个/孔均匀铺板于 96 孔板中, 设置 3 个复孔, 并在边缘用 PBS 溶液封边以维持湿度。在测试前加入 10% CCK-8 试剂, 置于培养箱孵育 3 h, 分别在 0、24、48、72、96 h 用酶标仪测定吸光度, 以分析细胞增殖活性。

1.2.8 细胞周期测定实验 用胰酶消化状态良好的 HaCaT 细胞, 加入 1 ml 冰浴预冷 70% 乙醇中, 轻轻吹打混匀, 4 °C 固定 2 h, 1 000 r/min 左右离心 3 ~ 5 min, 沉淀细胞。吸除上清液, 加入 1 ml 冰浴预冷的 PBS, 重悬细胞。再次离心沉淀细胞, 吸除上清液。每管细胞样品中加入 0.5 ml 碘化丙啶染色液, 缓慢并充分重悬细胞沉淀, 37 °C 避光温浴 30 min, 而后上机进行流式检测。

1.2.9 细胞凋亡测定实验 用胰酶消化状态良好的 HaCaT 细胞于流式管,每管用 0.1 ml 的 $1 \times$ Annexin V Binding Buffer 重悬细胞,每 0.1 ml 细胞悬液中加入 $5 \mu\text{l}$ Annexin-V-AbFluor 488 和 $2 \mu\text{l}$ PI 轻柔混匀,室温避光孵育 15 min,孵育结束后加入 0.4 ml 的 $1 \times$ Annexin V Bind Buffer 轻柔混匀后置于冰上,流式上机检测。

1.3 统计学处理 实验数据采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行分析。结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验和单因素方差分析进行统计学分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 成功构建 GPR107 缺失的 HaCaT 细胞株 根据 CRISPR/Cas9 实验方案设计的敲除方案构建的干涉载体 plenti-guide-RNA-GPR107 (图 1A)。将 Lenti-Cas9-Blast 质粒转染进 HaCaT 细胞,用博来霉素药筛得到稳定表达 Cas9 蛋白的细胞株。再将 plenti-guide-RNA-GPR107 质粒转染进 HaCaT 细胞,用嘌呤霉素筛选后获得敲除 GPR107 的 HaCaT 混合克隆细胞。采用有限稀释法,经过克隆化培养,得到 21 株单克隆细胞株。收集细胞总蛋白进行 Western blot 检测,以观察 GPR107 表达量的变化。结果显示,21 株单克隆细胞中,有 8 株细胞的 GPR107 表达显著降低(图 1B)。相对定量的统计分析显示:与正常(WT)组相比,编号为 C10 ($t = 3.925$, $P = 0.0170$), G5 ($t = 3.402$, $P = 0.0272$), G10 ($t = 2.784$, $P = 0.0460$), 2D8 ($t = 5.498$, $P = 0.0003$), 2D9 ($t = 4.365$, $P = 0.0120$), C4 ($t = 5.820$, $P = 0.0043$), D10 ($t = 5.985$, $P = 0.0039$), 以及 2G6 ($t = 7.898$, $P = 0.0014$) 表达降低(图 1C)。收集这 8 株单克隆细胞的基因组 DNA,进行 PCR 扩增后进行 DNA 测序。测序结果显示编号为 C4 与 2D8 克隆出现碱基缺失,导致移码突变(图 1D)。测序结果与 Western blot 结果均证实,成功构建 GPR107 缺失 C4 与 2D8 细胞株。以此两种 GPR107 缺失细胞株开展后续的研究。

2.2 GPR107 缺失阻滞 HaCaT 细胞 G_0G_1 期并抑制 HaCaT 细胞增殖和促进凋亡 为了观察 GPR107 的表达变化对 HaCaT 细胞周期的影响,将细胞培养 24 h 后,运用流式细胞分析仪检测 GPR107 敲除细胞 C4 与 2D8 组和 WT 组细胞周期的变化(图 2A)。结果显示 GPR107 敲除组细胞与

WT 组相比, G_0G_1 期细胞比例显著增加(C4: $t = 6.675$, $P = 0.0005$; 2D8: $t = 0.850$, $P = 0.0003$)、S 期细胞比例显著减少(C4: $t = 5.357$, $P = 0.0006$; 2D8: $t = 5.950$, $P = 0.0004$)、 G_2M 期的细胞比例显著减少(C4: $t = 5.857$, $P = 0.0017$; 2D8: $t = 6.850$, $P = 0.0130$) (图 2B)。因此, GPR107 的缺失,导致 HaCaT 细胞的发生 G_0G_1 期阻滞。

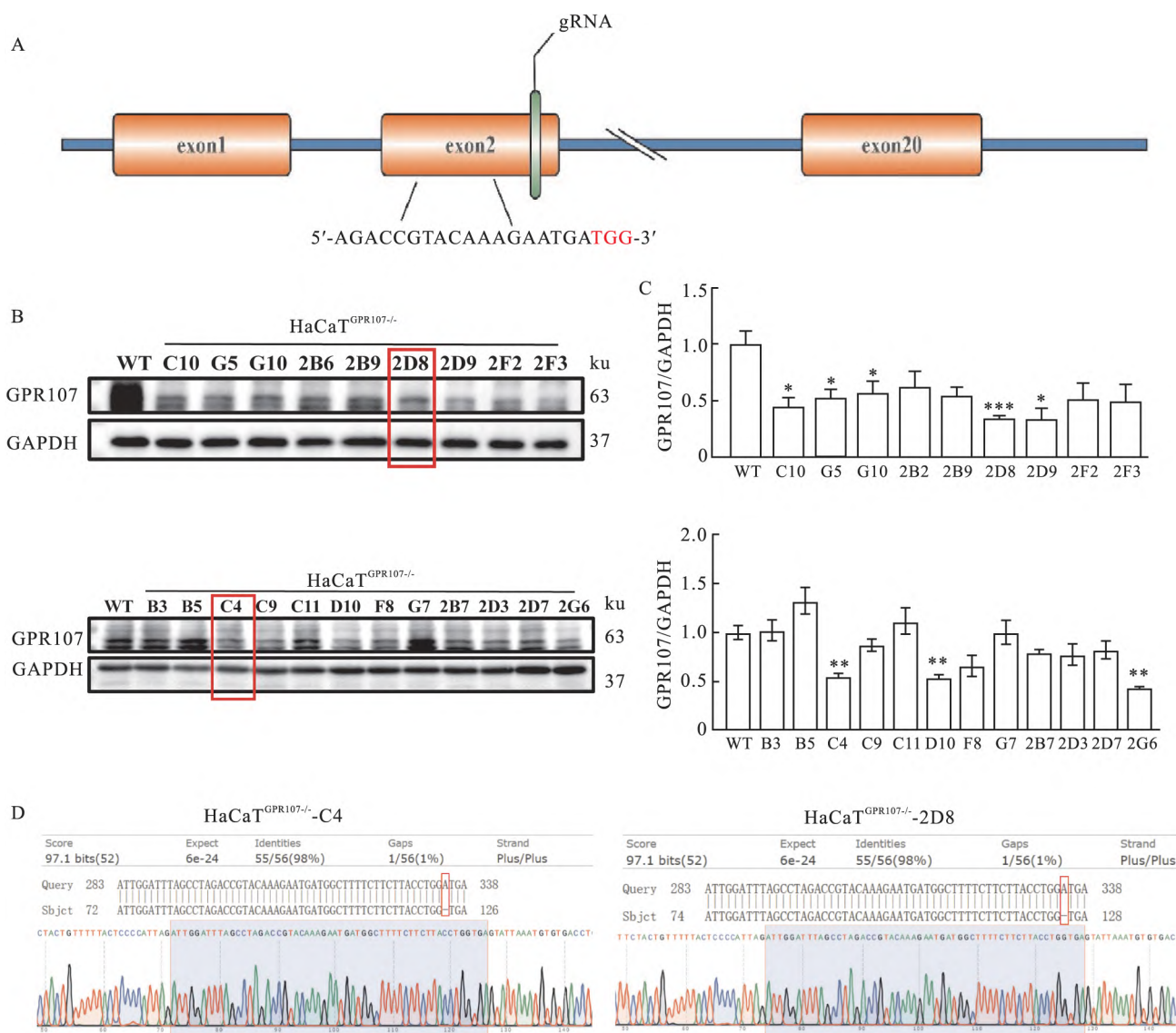
CCK-8 结果显示: GPR107 缺失的 C4 和 2D8 组细胞,在 48 h (C4: $t = 3.558$, $P = 0.0175$)、72 h (C4: $t = 3.366$, $P = 0.0113$) 和 96 h (C4: $t = 5.557$, $P = 0.0007$; 2D8: $t = 5.850$, $P = 0.0013$) 时吸光度均显著低于 WT 对照组细胞吸光度,差异有统计学意义。表明 GPR107 缺失的 HaCaT 细胞的增殖活力显著降低(图 2C)。流式细胞术检测凋亡水平结果显示: GPR107 缺失的 C4 和 2D8 组细胞细胞凋亡水平($F = 235.6$, $P = 0.0003$) 显著低于 WT 对照组凋亡水平,表明 GPR107 缺失的 HaCaT 细胞的凋亡能力增加(图 2D)。

2.3 GPR107 敲除后促进 HaCaT 细胞分化 为了观察 GPR107 的缺失对细胞的分化影响,检测 HaCaT 细胞的分化标记分子表达变化,包括表皮角质化层标记分子 IVL、棘层颗粒层标记分子 K1 和基底层标记分子 K5 等。在 HaCaT 细胞转入 154CF 培养基中培养 5 d 后,收集细胞总蛋白进行 Western blot 检测。结果显示(图 3A):敲除 GPR107 后 HaCaT 细胞表皮角质化层标志蛋白 IVL 表达显著增加,与 WT 组相比差异有统计学意义($F = 7.954$, $P = 0.0205$);但是 K1 和 K5 的表达没有显著差异(图 3B)。证实 GPR107 的缺失有利于 HaCaT 细胞从基底层向角质化层的分化。

2.4 GPR107 敲除后促进 HaCaT 细胞迁移 细胞划痕实验结果显示(图 4A),细胞划痕的愈合率在 24 h 时,各组之间没有显著差异。但是在 48 h (C4: $t = 3.758$, $P = 0.0155$)、72 h (C4: $t = 6.577$, $P = 0.0004$; 2D8: $t = 7.850$, $P = 0.0230$) 时, GPR107 缺失的 C4 和 2D8 组细胞与 WT 对照组细胞相比,48 h 和 72 h 的划痕愈合率均增高,差异有统计学意义(图 4B)。表明 GPR107 敲除后 HaCaT 细胞的迁移能力显著增高。

3 讨论

GPCR 是一大类蛋白质家族,迄今已发现 800 多个成员^[9]。GPCR 的主要结构特征是由大约 25

图1 *GPR107* 缺失的 HaCaT 细胞株的验证Fig. 1 Validation of *GPR107*-deficient HaCaT cell lines

A: Cell knockdown protocol designed according to the Crispr/Cas9 experimental protocol; B: Western blot detection of *GPR107* expression in HaCaT cells; C: Relative quantitative analysis of *GPR107* expression in individual *GPR107*-knocked down HaCaT monoclonal cell lines using GAPDH as internal reference; D: Sequencing results of single-cell clones C4 and 2D8; WT: normal genotyped HaCaT cells; B3, B5, C4, C9, C10, C11, D10, F8, G5, G7, G10, 2B6, 2B7, 2B9, 2D3, 2D7, 2D8, 2D9, 2F2, 2F3, 2G6: different single-cell clones; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs WT group.

~35 个连续氨基酸残基组成的疏水区组成跨膜区。它们在细胞增殖、分化、神经传递、发育和凋亡等众多细胞和生理过程中发挥着关键作用^[4]。GPCR 及其相关的异三聚体 G 蛋白参与调控上皮细胞自我更新和分化^[5]。*GPR107* 是 GPCR 家族新成员,其氨基酸序列具有高度的保守性。人类 *GPR107* 基因位于 9q34.11 区域,全长 86.4 kb,包含 18 个外显子^[6]。

CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术具有靶向

敲除目的基因、易获得单细胞克隆、实现多重基因组编辑等优势^[7]。为了探讨 *GPR107* 在皮肤表皮细胞中作用,本研究采用了 CRISPR/Cas9 介导的基因组编辑技术,对人表皮细胞 HaCaT 进行 *GPR107* 基因敲除。通过筛选获得的 21 株单克隆细胞中,有 8 株细胞的 *GPR107* 表达显著降低;基因组测序和蛋白质表达检测结果都证实,获得了 2 株敲除 *GPR107* 的细胞株。

GPR107 缺失的 HaCaT 细胞,其生物学行为的

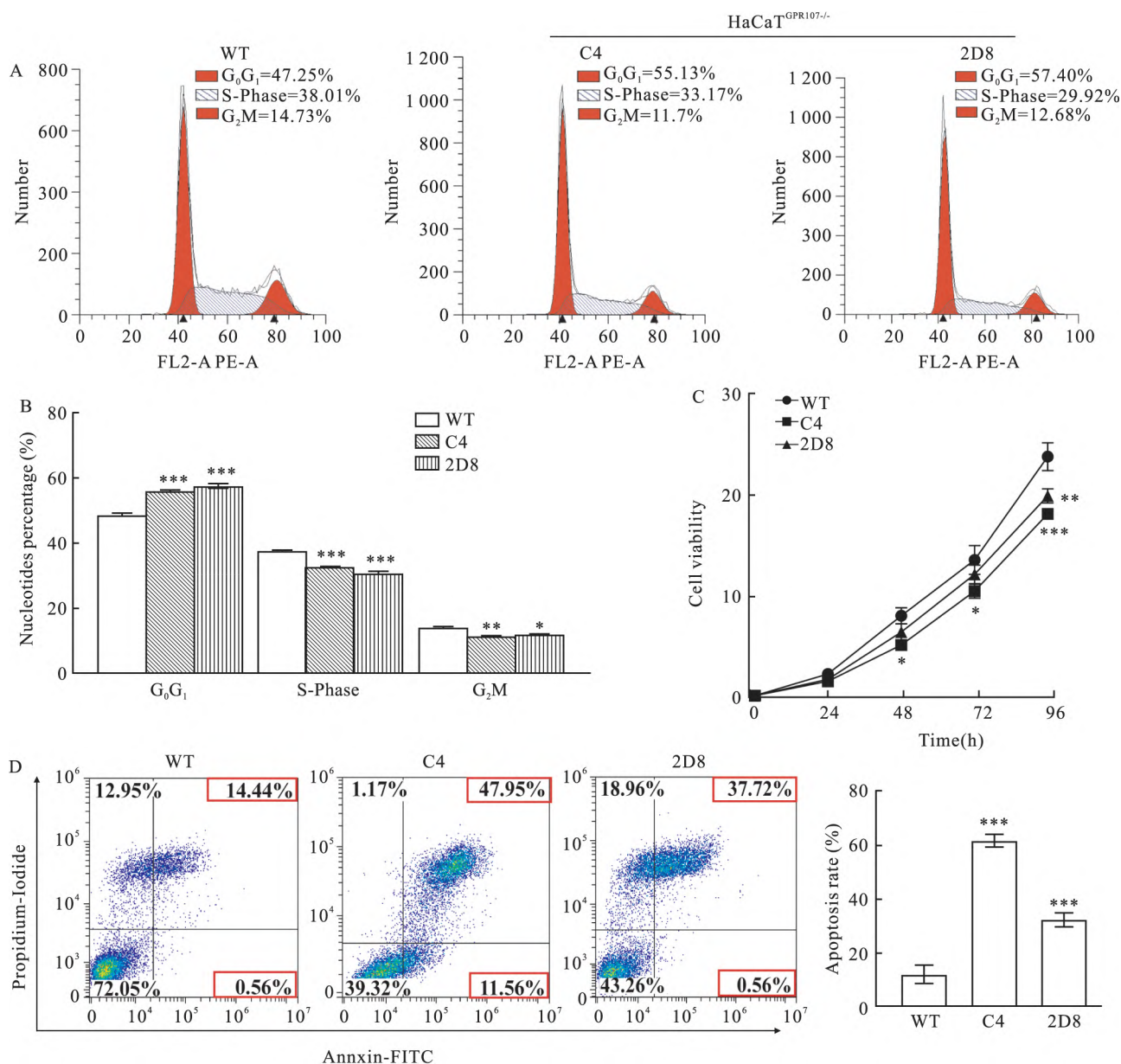


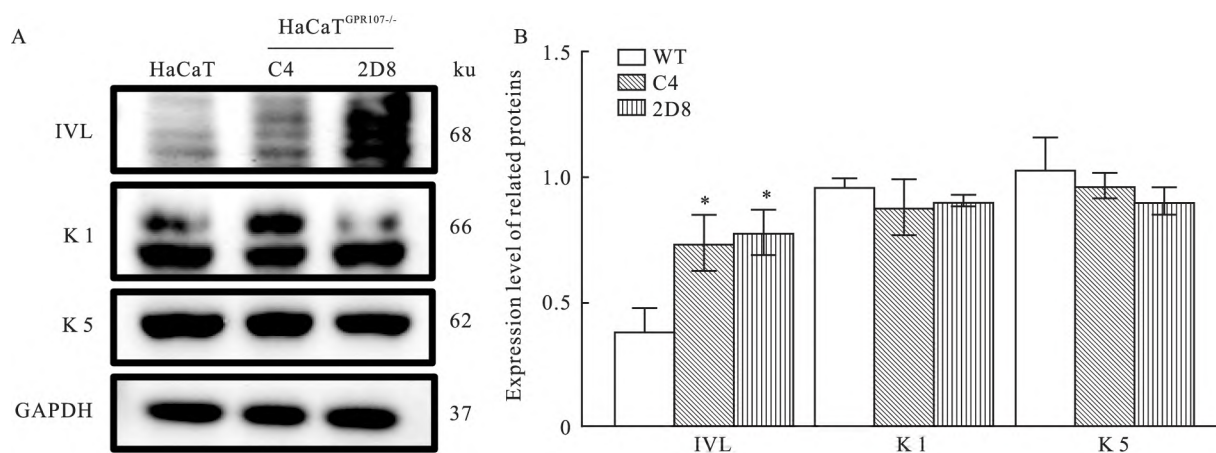
图2 GPR107 敲除后抑制细胞增殖改变细胞周期

Fig. 2 Inhibition of cell proliferation after GPR107 knockdown altered the cell cycle

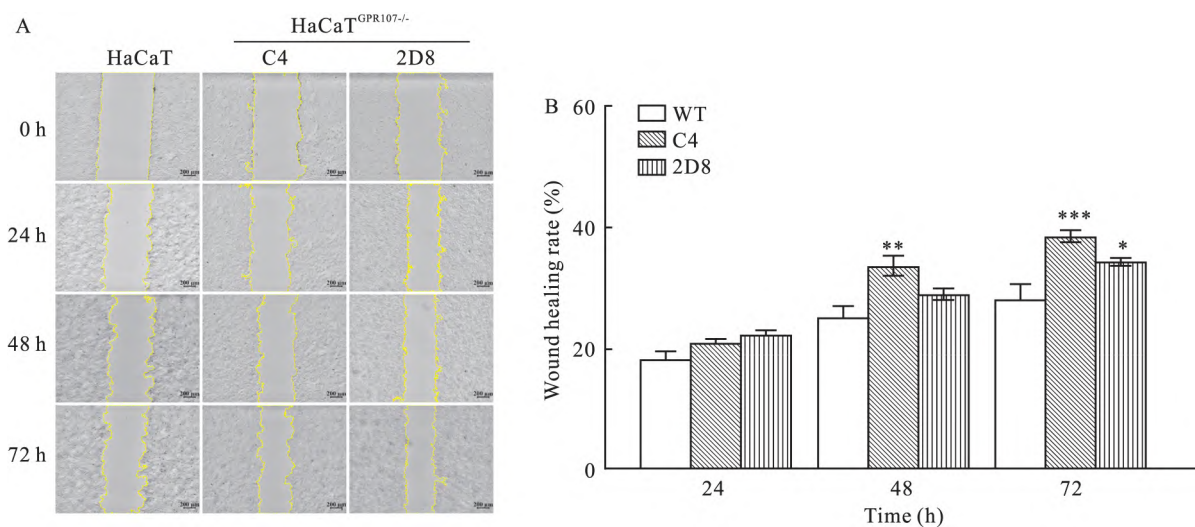
A: Cell cycle flow assay of WT group vs GPR107 knockdown HaCaT monoclonal cell lines C4, 2D8 after 24 h of normal culture; B: Comparison of the distribution of cell cycle phases in each group after statistical analysis; C: CCK-8 assay detection of the proliferative ability of WT group vs GPR107 knockdown HaCaT monoclonal cell lines C4, 2D8; D: After 24 h of normal cultivation, comparison of the cell cycle distribution of the WT group and the GPR107 knockdown HaCaT monoclonal cell line C4, 2D8 in apoptosis flow assay and its statistical analysis; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs WT group.

变化主要表现为: 细胞的增殖能力减弱、细胞凋亡水平增加、细胞分裂时发生 G₀G₁ 期阻滞等。此外, GPR107 的缺失, 表皮细胞向角质层的分化速度加快, 同时伴随细胞的运动能力增加。过去研究^[1]证明, GPCR 作为细胞膜受体, 在角质形成细胞外的信号刺激下, 可以激活 Gαi, 有利于活化丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信

号通路, 从而促进细胞增殖, 减少终末分化标志物的表达。因此, GPR107 缺失的 HaCaT 细胞, 可能由于 MAPK 信号通路的作用减弱, 导致 G₀G₁ 期阻滞、抑制细胞增殖和促进细胞凋亡。HaCaT 细胞作为一种表皮终末分化的永生化细胞, 在高钙环境中保持较高增殖速度, 但是在低钙离子环境中, 能够部分恢复其细胞干性^[1]。在低钙环境培养的 HaCaT 细胞,

图3 *GPR107* 敲除后对 HaCaT 细胞分化的影响Fig.3 Effect of *GPR107* knockdown on HaCaT cell differentiation

A: Western blot detection of changes in the expression of HaCaT cell differentiation marker molecules. C4 and 2D8 are *GPR107*-deficient single-cell clones; B: GAPDH was used as an internal reference, and each of the relative quantitative analysis of target proteins was done; * $P < 0.05$ vs WT group.

图4 *GPR107* 敲除后对 HaCaT 细胞迁移的影响Fig.4 Effect of *GPR107* knockdown on HaCaT cell migration

A: Cell scratch assay of HaCaT cells (magnification $\times 50$); B: Statistical analysis of the scratch healing rate of cells in each group after 24, 48 and 72 h of culture; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs WT group.

当 *GPR107* 缺失时,维持干性的能力降低,有利于细胞终末分化,同时有利于细胞迁移,但其调控的分子机制目前不清楚。

参考文献

- [1] Hoel C M, Zhang L, Brohawn S G. Structure of the GOLD-domain seven-transmembrane helix protein family member TMEM87A [J]. eLife, 2022, 11: e81704. doi: 10.7554/eLife.81704.
- [2] Pilar Pedro M, Lund K, Iglesias-Bartolome R. The landscape of GPCR signaling in the regulation of epidermal stem cell fate and skin homeostasis [J]. Stem Cells, 2020. doi: 10.1002/stem.3273.
- [3] Zhou G L, Na S Y, Niedra R, et al. Deficits in receptor-mediated endocytosis and recycling in cells from mice with *Gpr107* locus disruption [J]. J Cell Sci, 2014, 127(Pt 18): 3916–27. doi: 10.1242/jcs.135269.
- [4] Tabibian M, Moghaddam F S, Motevaseli E, et al. Targeting mRNA-coding genes in prostate cancer using CRISPR/Cas9 technology with a special focus on androgen receptor signaling [J]. Cell Commun Signal, 2024, 22(1): 504. doi: 10.1186/s12964-024-01833-1.
- [5] Gardner J, Eiger D S, Hicks C, et al. GPCR kinases differentially modulate biased signaling downstream of CXCR3 depending on their subcellular localization [J]. Sci Signal, 2024, 17(823): eadd9139. doi: 10.1126/scisignal. add9139.

- [6] Nieto Gutierrez A, McDonald P H. GPCRs: emerging anti-cancer drug targets [J]. Cell Signal, 2018, 41: 65–74. doi: 10.1016/j.cellsig.2017.09.005.
- [7] Pedro M P, Lund K, Kang S W S, et al. GPCR screening reveals that the metabolite receptor HCAR3 regulates epithelial proliferation, migration, and cellular respiration [J]. J Invest Dermatol, 2024, 144(6): 1311–21. e7. doi: 10.1016/j.jid.2023.12.002.
- [8] Luo S, Zhang P, Miao W, et al. Genome-wide identification of G protein-coupled receptors in ciliated eukaryotes [J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(4): 3869. doi: 10.3390/ijms24043869.
- [9] 赵荣荣, 任海风, 宋 乐, 等. 用 CRISPR/Cas9 技术编辑 KLF4 基因对 GES-1 细胞生物学行为的影响 [J]. 安徽医科大学学报, 2017, 52(10): 1441–6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2017.10.006.
- [10] Zhao R R, Ren H F, Song L, et al. Effect of KLF4 gene edited by CRISPR/Cas9 technique on the biological behavior of human gastric epithelial GES-1 cells [J]. Acta Univ Med Anhui, 2017, 52(10): 1441–6. doi: 10.19405/j.cnki.issn1000–1492.2017.10.006.
- [11] Pedro M P, Salinas Parra N, Gutkind J S, et al. Activation of G-protein coupled receptor-Gαi signaling increases keratinocyte proliferation and reduces differentiation, leading to epidermal hyperplasia [J]. J Invest Dermatol, 2020, 140(6): 1195–203. e3. doi: 10.1016/j.jid.2019.10.012.
- [12] Tu Z, Zhang S, Zhou G, et al. LMO4 is a disease-provocative transcription coregulator activated by IL-23 in psoriatic keratinocytes [J]. J Invest Dermatol, 2018, 138(5): 1078–87. doi: 10.1016/j.jid.2017.12.010.

Effect of deletion of G protein-coupled receptor 107 on the biological behaviour of HaCaT cells

Wang Jing¹, Zhao Wei¹, Xu Deping¹, Liao Kainan¹, Zang Dandan², Zhou Haisheng^{1,2}

(¹Dept of Biochemistry, ²Center Scientific Research, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To construct a human keratinocyte-forming cell line (HaCaT) with stable knockout of the G protein-coupled receptor 107 (*GPR107*) gene, and to preliminarily investigate the effect of *GPR107* deletion on the biological behaviour of HaCaT cells. **Methods** Using CRISPR/Cas9 gene editing technology, HaCaT cells with knockout of *GPR107* gene were constructed and monoclonal cells with *GPR107* deletion were obtained by limited dilution method. Genomic DNA was amplified using Western blot and PCR and sequenced to validate the single-cell clones with knockdown of *GPR107*. The cell cycle changes were detected by flow cytometry; cell proliferation was detected by CCK-8; apoptosis was detected by flow cytometry; changes in cell differentiation markers were detected by Western blot; cell migration ability was analyzed by cell scratch assay and other methods. **Results** LentiCas9-Blast and plenti-guide-RNA-*GPR107* plasmids were successfully transfected into HaCaT cells, 21 monoclonal cell lines were obtained by limited dilution, and Western blot showed that the *GPR107* expression was significantly reduced in 8 of them; PCR sequencing of the cellular genome was used, which resulted in the obtainment of C4 and 2D8 *GPR107*^{-/-} HaCaT monoclonal cell lines. CCK-8 assay and flow cytometry assay showed that *GPR107* gene deletion resulted in G₀G₁ phase block, significantly weakened proliferation ability and increased apoptosis level of HaCaT cells. Western blot found that the differentiation of HaCaT cells accelerated after knockdown of *GPR107*. Additionally the results of the cell scratch assay indicated that the migration ability of HaCaT cells was enhanced after knockdown of *GPR107*. The results showed that the migration ability of HaCaT cells was enhanced after knockdown of *GPR107*. **Conclusion** HaCaT cell line with *GPR107* gene deletion is successfully constructed, *GPR107* deletion blocks the G₀G₁ phase of HaCaT cells, which inhibiting the proliferation of HaCaT cells and promoted apoptosis, and it was found that the differentiation and migration of HaCaT cells were enhanced after knocking down *GPR107*.

Key words G protein-coupled receptor 107; HaCaT cells; CRISPR/Cas9; cell proliferation; cell cycle

Fund programs National Natural Science Foundation of China (No. 82071832); Academic Funding Program for Top Talents in Colleges and Universities in Anhui Province (No. gxbjZD2021046)

Corresponding author Zhou Haisheng, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn