

利用 CRISPR/Cas9 技术构建 FSTL1 基因敲除的 SiHa 细胞稳定株

张 红, 胡晓霞, 洛若愚, 陈 欢, 李梦如, 杨 琅

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:81660434)

作者单位: 430000 湖北, 武汉大学人民医院妇科(张 红, 洛若愚, 陈 欢, 李梦如); 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院妇科(胡晓霞, 杨 琅)

作者简介: 张 红(1992-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 妇科肿瘤相关的临床与基础研究。E-mail: 270076755@qq.com

通讯作者: 胡晓霞(1964-), 女, 医学博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向: 妇科肿瘤相关的临床与基础研究。E-mail: huxia@hotmail.com

[摘要] **目的** 利用 CRISPR/Cas9 技术敲除 SiHa 细胞中的卵泡抑素样蛋白 1(FSTL1) 基因, 构建 FSTL1 基因敲除的 SiHa 细胞稳定株。**方法** 构建 sgRNA-FSTL1 重组质粒并包装成慢病毒。收集病毒液并感染 SiHa 细胞, 使用嘌呤霉素筛选 FSTL1 基因敲除的 SiHa 细胞稳定株; 采用 RT-qPCR 和 Western blot 检测 SiHa 细胞稳定株 FSTL1 mRNA 和蛋白的表达情况。**结果** FSTL1-sgRNA 慢病毒构建成功并筛选出 FSTL1 基因敲除的 SiHa 细胞稳定株; FSTL1 的 mRNA 和蛋白表达水平在 SiHa 细胞稳定株中的表达量均比对照组低, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 利用 CRISPR/Cas9 技术成功构建 FSTL1 基因敲除的 SiHa 细胞稳定株。

[关键词] CRISPR/Cas9; 卵泡抑素样蛋白 1; 基因敲除; SiHa 细胞

[中图分类号] R 331 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2019)08-0842-05

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2019.08.06

Construction of FSTL1 gene knockout SiHa cell stable strain using CRISPR/Cas9 technology ZHANG Hong, HU Xiao-xia, LUO Ruo-yu, et al. Department of Gynaecology, Renmin Hospital of Wuhan University, Hubei 430000, China

[Abstract] **Objective** To knock out follistatin-like protein 1(FSTL1) gene in SiHa cells using CRISPR/Cas9 technology and to construct SiHa cell stable strain with knocking out FSTL1 gene. **Methods** The sgRNA-FSTL1 recombinant plasmid was constructed and was packaged into lentivirus. The virus solution was collected and infected with SiHa cells, and SiHa cell stable strain with knocking out FSTL1 gene was screened by puromycin. The expressions of FSTL1 mRNA and protein in SiHa cell stable strain were detected by real-time quantitative polymerase chain reaction(RT-qPCR) and Western blot. **Results** FSTL1-sgRNA lentivirus was successfully constructed and the SiHa cell stable strain with knocking out FSTL1 gene was successfully screened. The expressions of FSTL1 mRNA and protein in the SiHa cell stable strain group were significantly lower than those in the control group($P < 0.05$). **Conclusion** SiHa cell stable strain with knocking out FSTL1 gene is successfully constructed using CRISPR/Cas9 technology.

[Key words] Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated 9 (CRISPR/Cas9); Follistatin-like protein 1(FSTL1); Gene knockout; SiHa cell

卵泡抑素样蛋白 1(follistatin-like protein 1, FSTL1) 是定位于人的 3q13.33 染色体上, 除外周淋巴细胞以外, 几乎所有的哺乳动物细胞均有表达的一种由 308 个氨基酸构成的分泌性糖蛋白, 属于富含半胱氨酸的分泌性酸性家族蛋白^[1]。有研究^[2-5]报道, FSTL1 参与细胞发育、增殖、分化、迁移、凋亡和癌变等

多种生物学过程的调控。在非肿瘤疾病方面, FSTL1 的异常表达与神经发育^[6]、肺脏正常发育^[7,8]、心脏瓣膜病^[9]等密切相关。在肿瘤相关疾病方面, FSTL1 参与调控多种肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭和转移等生物学活动^[10-12]。然而, FSTL1 在宫颈癌中的生物学作用仍少见报道。本研究主要利用 CRISPR/Cas9

技术获得 FSTL1 基因敲除的 SiHa 细胞稳定株,为深入研究 FSTL1 基因在宫颈癌细胞中的生物学作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 细胞及细胞培养 人胚肾细胞 293T 和宫颈癌细胞 SiHa(HPV16+)购自中科院上海细胞库。用含有 10% 胎牛血清(Gibco)、1% 青霉素和链霉素(索莱宝)的 RPMI1640 培养基(Gibco)培养,培养箱环境设置为 37℃、5% CO₂,细胞呈贴壁生长。

1.2 试剂 Cas9 慢病毒、线性化的 GV371 载体质粒、pHelper1.0 载体质粒、pHelper2.0 载体质粒、TOP10 感受态菌体、质粒转染试剂和 Polybrene 均购自上海吉凯基因公司。基因突变和敲除检测试剂盒(Cruiser™法)购自上海吉盛医学公司。

1.3 方法

1.3.1 sgRNA-FSTL1 慢病毒质粒构建 sgRNA-FSTL1 干扰靶点的选择及引物序列由上海吉凯基因公司设计及合成,见表 1。将合成的引物退火形成带黏性末端的双链 DNA,取 2 μl 双链 DNA 和线性化的 GV371 载体质粒加入酶切连接反应体系中,经 6 个循环(37℃ 5 min,21℃ 5 min)后在 16℃ 条件下孵育 30 min 获得酶切连接产物。将连接产物转化至 TOP10 感受态菌体内,然后将菌体均匀地涂布在含氨苄西林(Amp)的固体培养基上培养,次日挑取单个菌落直接进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳鉴定。选择连入 sgRNA 片段的阳性克隆进行测序分析,将测序正确的克隆菌液扩大培养,使用无内毒素质粒小提中量试剂盒(天根生化)进行质粒抽提,获得高纯度重组质粒。

表 1 sgRNA-FSTL1 靶点引物设计及序列

靶基因	来源物种	靶点编号	sgRNA 序列
FSTL1	Human	KO1	AGTGTCATCGTAATCAACC
	Human	KO2	ACTTACCTCAATGCAGAGAC
	Human	KO3	GTAAGTCCATCTGCCAGCCC

1.3.2 sgRNA-FSTL1 慢病毒包装 取对数期的 293T 细胞培养,待细胞密度达 70% 时更换成无血清培养基,培养 2 h,随后取一支灭菌离心管,加入 20 μg GV371 重组载体质粒、15 μg 的 pHelper1.0 载体质粒、10 μg 的 pHelper 2.0 载体质粒及转染剂 1 ml,室温孵育 15 min 后将离心管中混合液加入到 293T 细胞的培养液中培养 6 h,弃上清培养基并加入完全培养基培养 48 h 后收集 293T 细胞上清液,离心去沉淀后即为慢病毒液。

1.3.3 Cas9-sgRNA-FSTL1 慢病毒感染 SiHa 细胞及

稳定株筛选 感染前 1 d,将 SiHa 细胞接种于 24 孔培养板中培养,4 × 10⁴ cells/孔,次日根据 SiHa 细胞的最佳感染条件加入相应的慢病毒液(2 × 10⁷ TU/ml)及感染试剂(Polybrene),混匀后置于培养箱中培养 16 h 后更换为完全培养基继续培养,3 d 后用嘌呤霉素最佳筛选浓度(1.2 mg/L)筛选感染 Cas9 慢病毒的 SiHa 细胞,再使用 sgRNA-FSTL1 慢病毒感染表达 Cas9 的混合克隆细胞株,感染 3 d 后继续用嘌呤霉素最佳筛选浓度筛选感染 Cas9-sgRNA-FSTL1 慢病毒的 SiHa 细胞 3 d,然后换用最佳筛选浓度减半的嘌呤霉素培养基继续筛选 2 周即获得 FSTL1 基因敲除的 SiHa 细胞稳定株,并用荧光显微镜(奥林巴斯)和基因敲除检测试剂盒(上海吉盛)检测病毒感染效率及基因敲除效果。

1.3.4 FSTL1 mRNA 表达的检测 采用 RT-qPCR 法检测 FSTL1 mRNA 的表达。用 Trizol 试剂(上海普飞)按说明书提取细胞总 RNA,按 Promega M-MLV 反转录试剂盒说明书经 42℃ 1 h,70℃ 10 min 反转录为 cDNA。以 GAPDH 基因作为内参,参照 SYBR Master Mixture 试剂盒(TAKARA)说明书,经 95℃ 预变性 15 s,45 个循环(95℃ 5 s,60℃ 30 s)进行 PCR 扩增。引物由上海吉凯基因公司设计及合成,见表 2。结果采用 2^{-ΔΔCT}法计算 FSTL1 mRNA 相对表达量。

1.3.5 阳性克隆筛选 收集待检测细胞,用基因组 DNA 提取试剂盒(上海吉盛医学)抽提样品基因组。设计合适的引物 PCR 扩增目的基因片段(见表 2)。按照基因突变和敲除检测试剂盒(Cruiser™法)说明书,经 95℃ 预变性 2 min,45 个循环(95℃ 20 s,55℃ 20 s,72℃ 1 kb/min)延伸和 72℃ 退火 5 min 后获得杂交 DNA(KO 组与 NC 组均以各组混合克隆的基因组作为 PCR 底物)。杂交 DNA 在 PCR 仪中经 45℃ 孵育 20 min 后获得酶切产物,随后进行 2% 琼脂糖凝胶电泳检测和酶切分析及测序。

表 2 RT-qPCR 检测引物及酶切信息

序号	检测引物序列	扩增片段 (bp)	酶切 片段 1	酶切 片段 2
KO1	TATCCATAACTGCACAAACATTCTC	352	149	203
	GGCAAACCCAGCAGGCTCATAAG			
KO2	GTATGTTTTAGGAAGAGCTAAGGAG	287	105	182
	CCATGCTTTAAAAATCAGGAATCTG			
KO3	ACATGTAGAGCAGCTGTAATCCTAG	335	118	217
	TCTGACCCAACCAAGCTGCTTCAATT			

1.3.6 FSTL1 蛋白表达的检测 采用 Western blot 法检测 FSTL1 蛋白的表达。用 RIPA 裂解液(碧云天)

按说明书提取细胞总蛋白, SDS-PAGE 上样缓冲液变性蛋白, BCA 蛋白浓度测定试剂盒(碧云天)测定蛋白浓度, 以 25 μg 总蛋白的量上样进行蛋白上样, 120 V 恒压条件下进行 SDS-PAGE 电泳 90 min, 250 mA 恒流低温条件下 PVDF 膜电转 1 h, 5% 脱脂牛奶室温温床封闭 1 h, 4 ℃ 一抗(FSTL1, Proteintech, 1: 500; GAPDH, CST, 1: 1 000)孵育过夜, TBST 清洗, 5 min × 3 次, 37 ℃ 抗兔二抗(CST, 1: 2 000)孵育 2 h, TBST 清洗, 8 min × 4 次, ECL 液化学显色, 暗盒曝光, 显影液显影, 定影液定影, 复印扫描打印一体机(佳能 MG2580)扫描蛋白条带, imageJ 软件分析。

1.4 统计学方法 应用 SPSS20.0 统计软件和 GraphPad Prism5.0 软件进行数据分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 LSD 法检验。P < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 sgRNA-FSTL1 慢病毒的构建及测序结果 GV371 载体质粒(见图 1)经 BbsI 酶切与设计好的 sgRNA-FSTL1 连接, 将连接好的产物转化到 TOP10 感受态, 挑取混合克隆菌落进行鉴定及测序。混合克隆菌落经 RT-qPCR 扩增后的凝胶电泳结果显示, 混合克隆株中有敲除成功的菌体, KO1 和 KO2 见明显敲除, 但 KO3 敲除不明显(见图 2)。DNA 测序结果

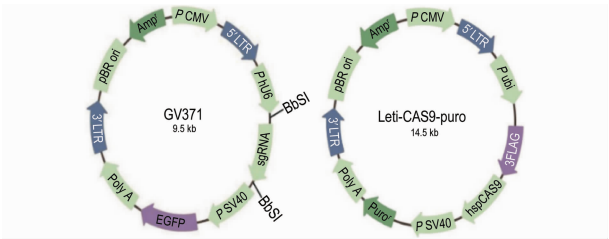
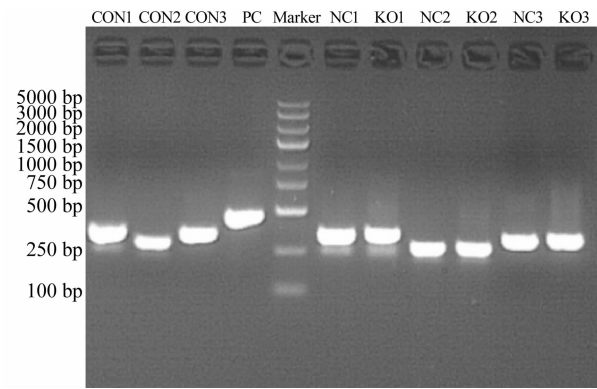


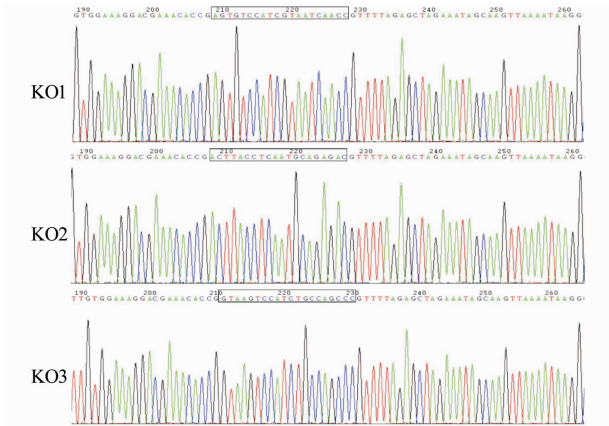
图 1 Cas9 和 sgRNA-FSTL1 慢病毒质粒图谱



注: M: DL2502 Ladder Marker; KO: 实验组对应的靶点; NC: 各实验组对应的阴性对照; CON: 各实验组对应的空细胞对照; PC(阳参): 扩增片段大小为 456 bp

图 2 混合克隆株琼脂糖凝胶验证图

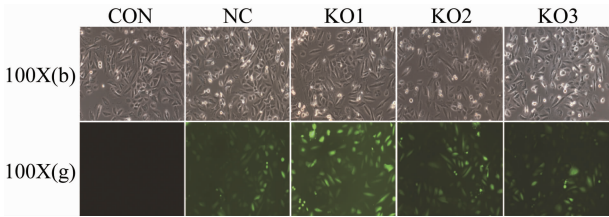
显示, KO1、KO2 和 KO3 靶序列均已成功插入 sgRNA-FSTL1 慢病毒, 获得与原序列相同的表达 sgRNA 的慢病毒质粒(见图 3)。



注: 选中部分为 sgRNA-FSTL1 靶点序列

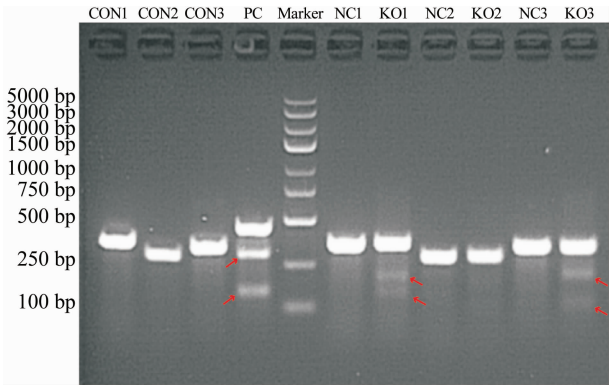
图 3 DNA 序列测序图

2.2 FSTL1 基因敲除的 SiHa 细胞稳定株的检测及筛选结果 本实验先将 SiHa 细胞感染 Cas9 慢病毒, 经最佳浓度的嘌呤霉素(1.2 mg/L)筛选, 得到稳定表达 Cas9 的混合克隆 SiHa 细胞株, 再感染具有活性的 sgRNA-FSTL1 慢病毒得到稳定表达 Cas9-sgRNA-FSTL1 的混合克隆 SiHa 细胞株, 经嘌呤霉素筛选后通过荧光显微镜检测稳定株的感染效率, 并以基因敲除试剂盒检测基因敲除效果。结果显示, 含有绿色荧光蛋白的慢病毒感染 SiHa 细胞致使 NC 组和 KO 组的 SiHa 细胞在荧光显微镜下呈现出绿光, KO1、KO2 和 KO3 的绿色荧光感染效率(荧光显微镜下随机取 5 个视野, 荧光感染效率 = 总绿色荧光细胞数/总细胞数 × 100%)均 > 80%, 且 KO1 的绿色荧光感染效率最高(见图 4)。本实验中, 阳参酶切结果正常, 说明结果客观、可信。与 NC 组相比, 实验组 KO1(酶切片段大小分别为 149 bp、203 bp)和 KO3(酶切片段大小分别为 118 bp、217 bp)出现预期大小的酶切条带, 而 KO2(酶切片段大小分别为 105 bp、182 bp)没有出现预期酶切条带, 表明 KO1 和 KO3 靶位点成功敲除而 KO2 靶位点未被敲除(见图 5)。



注: b: 明视野, g: 绿色荧光视野

图 4 SiHa 细胞稳转株的感染效率图



注:M:DL2502 Ladder Marker;KO:实验组对应的靶点;NC:各实验组对应的阴性对照;CON:各实验组对应的空细胞对照;PC(阳参):扩增片段大小为 456 bp,酶切片段大小分别为 151 bp、303 bp;箭头:酶切片段

图 5 sgRNA 筛选琼脂糖凝胶电泳图

2.3 SiHa 细胞稳定株的 FSTL1 mRNA 和蛋白的表达情况 运用 RT-qPCR 和 Western blot 技术分别检测 SiHa 细胞稳定株(KO3)中 FSTL1 mRNA 和蛋白的表达情况。结果显示,SiHa 细胞稳定株(KO 组)的 FSTL1 mRNA 的表达量(0.18 ± 0.05)低于阴性对照组(1.09 ± 0.13)和空白对照组(1.03 ± 0.06),差异有统计学意义($F = 95.960, P < 0.001$),见图 6。FSTL1 蛋白的表达量(0.49 ± 0.02)也低于阴性对照组(0.85 ± 0.07)和空白对照组(0.76 ± 0.06),差异有统计学意义($F = 34.840, P < 0.001$),见图 7。以上研究表明 FSTL1 基因敲除的 SiHa 细胞稳定株构建成功。

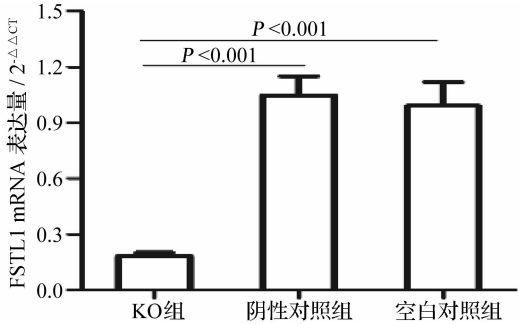


图 6 FSTL1 mRNA 的表达情况图

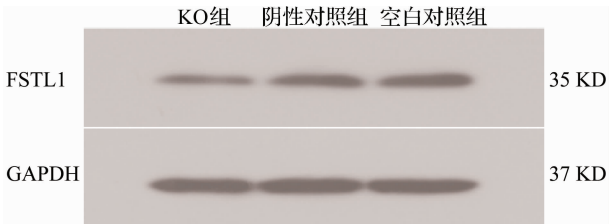


图 7 FSTL1 蛋白的相对表达量图

3 讨论

3.1 FSTL1 是经转化生长因子 $\beta 1$ 刺激鼠类成骨细

胞 MC3T3E1 发现的一种分泌性糖蛋白。现有研究表明 FSTL1 在多种人类肿瘤中出现异常表达,FSTL1 在子宫内膜癌^[13]、非小细胞肺癌^[14]和肾透明细胞癌^[15]等肿瘤中表达下调。Chan 等^[13]运用 RT-PCR 检测技术发现 FSTL1 在子宫内膜癌肿瘤细胞和组织样本中表达下调。FSTL1 mRNA 低表达与非内膜样腺癌,低分化、深肌层浸润、宫颈间质侵犯以及淋巴脉管转移的子宫内膜癌患者呈正相关。然而,也有文献报道 FSTL1 在食管鳞癌^[10]和脑胶质细胞瘤^[12]等肿瘤中表达上调。Jin 等^[12]研究发现 FSTL1 mRNA 在高级别胶质瘤标本中表达上调,其表达水平越高则提示患者预后越不良。我们前期研究^[16]显示,FSTL1 mRNA 和蛋白在宫颈癌组织中表达下调。然而,FSTL1 在宫颈癌细胞中生物学作用仍不清楚,因此本研究利用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术,获得 FSTL1 基因敲除的 SiHa 细胞稳定株,为深入研究 FSTL1 基因在宫颈癌细胞中的生物学作用奠定基础。

3.2 目前,已知的基因敲除技术有锌指核酸酶法、转录激活因子样效应物核酸酶法和 CRISPR/Cas9 法三种。其中 CRISPR/Cas9 基因敲除技术是继锌指核酸酶和转录激活因子样效应物核酸酶法后的一种新型的能够对基因组特定位点进行精确编辑的技术。CRISPR/Cas9 系统中的核酸内切酶 Cas9 蛋白通过导向性 RNA(guide RNA, gRNA)识别特定基因组位点并对双链 DNA 进行切割,通过非同源末端连接和同源重组修复两种方式重新连接好双链 DNA,使原 DNA 链发生突变,从而精确识别切割位点,对目的基因进行特异性剪切、编辑^[17]。该技术相对基因沉默术中的 RNA 干扰技术而言,具有作用时间长,表达更稳定的优点^[18]。与另外两种基因敲除技术比较,具有低成本、低毒性、操作简单及物种无限限制性等优点^[19]。然而,CRISPR/Cas9 技术也有不足之处,存在脱靶效率高及同源重组效率低的风险^[19]。本实验共设计了 3 个切割靶点,降低了 Cas9 的非特异性切割的几率,减少了 CRISPR/Cas9 系统的脱靶效应,以弥补该技术的不足。琼脂糖凝胶电泳和重组质粒 DNA 测序结果表明 KO1、KO2 和 KO3 靶序列均已成功插入 sgRNA-FSTL1 慢病毒。基因敲除试剂盒检测结果表明 KO1 和 KO3 靶位点成功敲除而 KO2 靶位点未被敲除。本研究结果还显示,稳定株的感染效率 >80%,与对照组相比,FSTL1 在 mRNA 和蛋白水平表达下调,表明本实验运用 CRISPR/Cas9 基因敲除技术成功构建了 FSTL1 基因敲除的 SiHa 细胞株。

综上所述,利用 CRISPR/Cas9 技术能成功构建 FSTL1 基因敲除的 SiHa 细胞稳定株,为后续研究 FSTL1 基因在宫颈癌细胞中的分子作用机制提供了一种方法。

参考文献

- Liu S, Shen H, Xu M, et al. FRP inhibits ox-LDL-induced endothelial cell apoptosis through an Akt-NF- κ B-Bcl-2 pathway and inhibits endothelial cell apoptosis in an apoE-knockout mouse model [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010,299(3):E351-E363.
- Bevivino G, Sedda S, Franzé E, et al. Follistatin-like protein 1 sustains colon cancer cell growth and survival[J]. *Oncotarget*, 2018,9(58):31278-31290.
- Yang W, Wu Y, Wang C, et al. FSTL1 contributes to tumor progression via attenuating apoptosis in a AKT/GSK-3 β -dependent manner in hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Biomark*, 2017,20(1):75-85.
- Zhang Y, Xu X, Yang Y, et al. Deficiency of Follistatin-Like Protein 1 Accelerates the Growth of Breast Cancer Cells at Lung Metastatic Sites[J]. *J Breast Cancer*, 2018,21(3):267-276.
- Yang Y, Mu T, Li T, et al. Effects of FSTL1 on the proliferation and motility of breast cancer cells and vascular endothelial cells[J]. *Thorac Cancer*, 2017,8(6):606-612.
- Yamada S, Itoh N, Nagai T, et al. Innate immune activation of astrocytes impairs neurodevelopment via upregulation of follistatin-like 1 and interferon-induced transmembrane protein 3[J]. *J Neuroinflammation*, 2018,15(1):295.
- Liu X, Liu Y, Yang Z, et al. Cell type specific expression of Follistatin-like 1(Fstl1) in mouse embryonic lung development[J]. *J Mol Histol*, 2018,49(4):399-409.
- Liu X, Liu Y, Li X, et al. Follistatin like-1(Fstl1) is required for the normal formation of lung airway and vascular smooth muscle at birth[J]. *PLoS One*, 2017,12(6):e177899.
- Prakash S, Borreguero LJJ, Sylva M, et al. Deletion of Fstl1 (Follistatin-Like 1) From the Endocardial/Endothelial Lineage Causes Mitral Valve Disease[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2017,37(9):e116-e130.
- Lau MC, Ng KY, Wong TL, et al. FSTL1 Promotes Metastasis and Chemoresistance in Esophageal Squamous Cell Carcinoma through NF κ B-BMP Signaling Cross-talk [J]. *Cancer Res*, 2017,77(21):5886-5899.
- Gu C, Wang X, Long T, et al. FSTL1 interacts with VIM and promotes colorectal cancer metastasis via activating the focal adhesion signalling pathway[J]. *Cell Death Dis*, 2018,9(6):654.
- Jin X, Nie E, Zhou X, et al. Fstl1 Promotes Glioma Growth Through the BMP4/Smad1/5/8 Signaling Pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017,44(4):1616-1628.
- Chan QK, Ngan HY, Ip PP, et al. Tumor suppressor effect of follistatin-like 1 in ovarian and endometrial carcinogenesis: a differential expression and functional analysis[J]. *Carcinogenesis*, 2009,30(1):114-121.
- Sun Y, Ji B, Feng Y, et al. TRIM59 facilitates the proliferation of colorectal cancer and promotes metastasis via the PI3K/AKT pathway[J]. *Oncol Rep*, 2017,38(1):43-52.
- Liu Y, Tan X, Liu W, et al. Follistatin-like protein 1 plays a tumor suppressor role in clear-cell renal cell carcinoma[J]. *Chin J Cancer*, 2018,37(1):2.
- 洛若愚, 张红, 胡晓霞, 等. 宫颈癌组织中卵泡抑素样蛋白 1 的表达变化及其意义[J]. *山东医药*, 2018,58(35):1-4.
- Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance[J]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 2016,371(1707):pill 20150496.
- 周晓楠, 宋雪兰, 杨媛, 等. 基因沉默策略及其应用研究进展[J]. *昆明医科大学学报*, 2018,39(1):131-135.
- 任云晓, 肖茹丹, 娄晓敏, 等. 基因编辑技术及其在基因治疗中的应用[J]. *遗传*, 2018,41(1):18-28.

[收稿日期 2019-01-05][本文编辑 余军 吕文娟]