

· 基础研究 ·

基于 CRISPR / Cas9 系统 I 型干扰素受体亚单位 1 基因敲除的 Caco-2 细胞系的构建

刘欣奕^{1,2}, 安妮³, 章青², 王宏², 孔翔羽², 王铭月^{1,2}, 庞立丽², 段招军²

1. 甘肃中医药大学公共卫生学院, 甘肃 兰州 730000; 2. 中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所
国家卫生健康委员会医学病毒和病毒病重点实验室, 北京 102206;
3. 中国医学科学院医药生物技术研究所, 北京 100050

摘要: 目的 利用成簇规律间隔短回文重复序列 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) / CRISPR 相关蛋白 9 (CRISPR-associated protein 9, Cas9) 系统在人结肠腺癌细胞 Caco-2 中敲除 I 型干扰素受体亚单位 1 (interferon alpha / beta receptor subunit 1, *IFNAR1*) 基因, 构建 *IFNAR1* 基因敲除 Caco-2 细胞系。方法 利用 CRISPR / Cas9 技术设计特异性识别 *IFNAR1* 基因外显子区的 sgRNA (single guide RNA) 序列, 构建 LentiCRISPRv2-*IFNAR1*-sgRNA 重组质粒, 慢病毒包装后感染 Caco-2 细胞, 嘌呤霉素抗性筛选, 有限稀释法培养单克隆细胞系。通过靶基因测序和 Western blot 法验证 *IFNAR1* 基因敲除情况; 通过加入外源性 IFN β 检测 *IFNAR1* 基因敲除细胞 CXC 趋化因子配体 10 (CXC chemokine ligand 10, *CXCL10*) 和干扰素刺激基因 20 (interferon-stimulated gene 20, *ISG20*) mRNA 水平。结果 质粒 LentiCRISPRv2-*IFNAR1*-sgRNA 测序结果显示插入位置均位于 BsmB I 酶切黏性末端。共获得 2 株 *IFNAR1* 基因敲除单克隆细胞株, 测序结果显示 Caco-2-*IFNAR1*-KO1 的 *IFNAR1* 第 6 个外显子发生 5 bp 缺失, Caco-2-*IFNAR1*-KO2 的第 7 个外显子发生 18 bp 缺失, 同时有 1 bp 增加。与野生型 Caco-2 细胞相比, Caco-2-*IFNAR1*-KO1 和 Caco-2-*IFNAR1*-KO2 细胞 *IFNAR1* 蛋白未见表达。相比于 0 ng / mL IFN β , 在 50 ng / mL 外源 IFN β 刺激下, Caco-2-*IFNAR1*-KO1 和 Caco-2-*IFNAR1*-KO2 细胞 *CXCL10* 基因 mRNA 水平 (t 分别为 0.566 和 1.268, $P > 0.05$) 和 *ISG20* 基因 mRNA 水平 (t 分别为 1.522 和 1.733, $P > 0.05$) 均无明显升高; 与野生型 Caco-2 细胞相比, 在 50 ng / mL 外源 IFN β 刺激下, Caco-2-*IFNAR1*-KO1 和 Caco-2-*IFNAR1*-KO2 细胞 *CXCL10* 基因 mRNA 水平 (t 分别为 6.763 和 6.777, $P < 0.05$) 和 *ISG20* 基因 mRNA 水平 (t 分别为 5.664 和 5.653, $P < 0.05$) 均显著降低。结论 利用 CRISPR / Cas9 技术成功获得了 *IFNAR1* 基因敲除的 Caco-2 细胞株, 该细胞系依赖 I 型 IFN 受体 (interferon alpha / beta receptor, IFNAR) 激活的下游分子被明显抑制, 为进一步探讨病毒感染 Caco-2 细胞后的天然免疫反应及复制包装机制提供了有力的工具。

关键词: 人结肠腺癌细胞; CRISPR / Cas9 系统; I 型干扰素受体亚单位 1 基因; 基因编辑; 干扰素 β ; CXC 趋化因子配体 10; 干扰素刺激基因 20

中图分类号: Q784 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2023)02-0145-07

Construction of interferon alpha / beta receptor subunit 1 gene knockout Caco-2 cell line based on CRISPR / Cas9 system

LIU Xin-yi^{*}, AN ni, ZHANG Qing, WANG Hong, KONG Xiang-yu,
WANG Ming-yue, PANG Li-li, DUAN Zhao-jun

^{*}School of Public Health, Gansu University of Traditional Chinese Medicine,
Lanzhou 730000, Gansu Province, China

Corresponding author: PANG Li-li, E-mail: cactusea@163.com;

DUAN Zhao-jun, E-mail: zhaojund@126.com

Abstract: Objective To knockout interferon alpha / beta receptor subunit 1 (*IFNAR1*) gene in human colorectal adenocarcinoma cells Caco-2 using clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR) / CRISPR-associated

基金项目: 国家重点研发计划(2021YFC2301000).

通信作者: 庞立丽, E-mail: cactusea@163.com; 段招军, E-mail: zhaojund@126.com

protein 9 (Cas9) system to construct *IFNAR1* knockout Caco-2 cell line. **Methods** The single guide RNA (sgRNA) sequence was designed to specifically recognize the exon region of *IFNAR1* gene using CRISPR / Cas9 technology, and the LentiCRISPRv2-*IFNAR1*-sgRNA recombinant plasmid was constructed. Caco-2 cells were infected with the plasmid packaged by lentivirus and screened by puromycin resistance. The obtained monoclonal cell lines were cultured by limited dilution method, which were verified for the effect of *IFNAR1* gene knockout by target gene sequencing and Western blot, and detected for the mRNA levels of CXC chemokine ligand 10 (*CXCL10*) and interferon-stimulated gene 20 (*ISG20*) in *IFNAR1* knockout cells by adding exogenous IFN β . **Results** Sequencing results of plasmid LentiCRISPRv2-*IFNAR1*-sgRNA showed that the insertion sites were all located at the sticky end of BsmB I enzyme digestion. Two *IFNAR1* knockout monoclonal cell lines were obtained. The sequencing results showed that Caco-2-*IFNAR1*-KO1 had 5 bp deletion in the sixth exon of *IFNAR1*, and Caco-2-*IFNAR1*-KO2 had 18 bp deletion and 1 bp insertion in the seventh exon. Compared with wild-type Caco-2 cells, Caco-2-*IFNAR1*-KO1 and Caco-2-*IFNAR1*-KO2 cells showed no expression of *IFNAR1* protein. Compared with no IFN β stimulation, the mRNA levels of *CXCL10* gene ($t = 0.566$ and 1.268 respectively, $P > 0.05$) and *ISG20* gene ($t = 1.522$ and 1.733 respectively, $P > 0.05$) in Caco-2-*IFNAR1*-KO1 and Caco-2-*IFNAR1*-KO2 cells stimulated by 50 ng / mL IFN β showed no significant increase. While compared with those of wild-type Caco-2 cells, the mRNA levels of *CXCL10* gene ($t = 6.763$ and 6.777 respectively, $P < 0.05$) and *ISG20* gene ($t = 5.664$ and 5.65 respectively, $P < 0.05$) in Caco-2-*IFNAR1*-KO1 and Caco-2-*IFNAR1*-KO2 cells decreased significantly under the stimulation of 50 ng / mL exogenous IFN β . **Conclusion** Caco-2 cell line with *IFNAR1* knockout was successfully constructed by using CRISPR / Cas9 technology, and the downstream molecules activated by *IFNAR* (interferon alpha / beta receptor) in this cell line were obviously inhibited, which provided a powerful tool for further exploration of the innate immune response and replication packaging mechanism of Caco-2 cells after virus infection.

Keywords: Human colorectal adenocarcinoma cell; CRISPR / Cas9 system; Interferon alpha / beta receptor subunit 1 (*IFNAR1*); Gene editing; IFN β ; CXC chemokine ligand 10 (*CXCL10*); Interferon-stimulated gene 20 (*ISG20*)

自 1957 年从灭活流感病毒感染鸡胚中发现干扰素(interferon, IFN)至今,研究人员相继揭示了 IFN 的转录诱导机制、作用模式、抗病毒作用等。根据与受体结合方式不同,将 IFN 分为 I、II 和 III 型。I 型 IFN 包含 IFN α 、IFN β 、IFN κ 、IFN ϵ 、IFN ω 、IFN τ 、IFN δ 、IFN ζ ; II 型 IFN 包含 IFN γ ; III 型 IFN 包含 IFN $\lambda 1$ 、IFN $\lambda 2$ 、IFN $\lambda 3$ 、IFN $\lambda 4$ 。在发挥抗病毒作用中,细胞通过胞质途径和跨膜途径,利用模式识别受体识别病原体相关分子模式^[1-2],诱导和激活 IFN 产生,之后 IFN 与 IFN 受体结合,通过信号传导通路引起下游信号的激活^[3-4],一部分产生转录因子,通过间接作用,正反馈继续促进 IFN 的大量产生;另一部分则活化 IFN 刺激基因(interferon-stimulated genes, *ISGs*)的表达,产生细胞因子直接发挥抗病毒作用^[5-6]。1976 年,人 IFN 成功治疗了 2 例慢性乙型肝炎患者,被美国批准进入相关病毒感染性疾病的临床试验和治疗。目前,IFN 已成为临床针对乙型和丙型肝炎病毒感染的主要治疗制剂^[7]。

I 型 IFN 受体(interferon alpha / beta receptor, *IFNAR*)由低亲和力 *IFNAR* 亚单位 1(interferon alpha / beta receptor subunit 1, *IFNAR1*)和高亲和力 *IFNAR* 亚单位 2(interferon alpha / beta receptor subunit 2, *IFNAR2*)基因两个亚基组成^[8-9],与 IFN 结合后,活化的二者分

别继续招募磷酸化非受体蛋白酪氨酸激酶 2 (non-receptor protein tyrosine kinase 2, TYK2)和酪氨酸激酶 1 (janus tyrosine kinase 1, JAK1),从而磷酸化信号传导与转录激活子(signal transducers and activators of transcription, STAT),解离成二聚体,与干扰素调节因子 9(interferon regulatory factor 9, IRF9)形成干扰素刺激转录因子 3(interferon-stimulated transcription factor 3, ISGF3)复合物, ISGF3 释放入核信号与核内 IFN 刺激反应元件(interferon-sensitive response elements, ISREs)结合, *ISG* 进行转录翻译,最终抑制病原体入侵细胞^[10]。其中, *IFNAR2* 作为高亲和力亚基主要作用是下游 JAK1 结合,与 IFN 配体形成复合物诱导下游信号传导^[11],一旦 *IFNAR1* 水平过低, *IFNAR2* 形成的复合物则不会继续进行下游信号的传导。因此,敲除 *IFNAR1* 对于细胞 IFN 在天然免疫阶段发挥抗病毒作用机制的研究具有重要意义。

人结肠腺癌细胞 Caco-2 通过普通培养就可自发分化为单层肠上皮细胞,因此可以很好地模拟人体内小肠上皮细胞环境。由于其能构建与人体极为相似的肠道环境,目前常用于胃肠道感染病毒及相关口服药物早期作用机制研究。本研究利用成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR) / CRISPR 相关蛋白 9

(CRISPR-associated protein 9, Cas9) 基因编辑技术, 构建 *IFNAR1* 基因敲除的 Caco-2 细胞系, 并进行外源性 IFN β 刺激试验验证, 为探索细胞 IFN 受体在抵抗病毒入侵的先天免疫过程中发挥的作用机制提供基因敲除细胞模型。

1 材料与方法

1.1 细胞、菌株及质粒 人结肠腺癌细胞 Caco-2、人胚胎肾细胞 HEK293T、LentiCRISPRv2 质粒由中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所病毒性腹泻室保存; 感受态大肠埃希菌 DH5 α 购自擎科生物科技有限公司; 质粒 psPAX2、VSV-G 由中国医学科学院医药生物研究所岑山研究员惠赠。

1.2 主要试剂及仪器 限制性内切酶 BsmB I、T4 DNA 连接酶购自美国 NEB 公司; 无内毒素质粒提取试剂盒、基因组 DNA 提取试剂盒购自美国 OMEGA 公司; 胶回收试剂盒购自德国 QIAGEN 公司; 细胞转染试剂 Thermo LipofectamineTM 3000、ABI QuantStudio 5 荧光定量 PCR 仪购自美国 Thermo 公司; IMDM 培养基、DMEM 培养基、胎牛血清 (FBS)、胰酶、嘌呤霉素 (Puromycin) 购自美国 GIBCO 公司; 聚凝胺 (Polybrene) 购自北京 Solarbio 公司; IFN β 、兔抗 IFNAR1 单克隆抗体、辣根过氧化物酶偶联的鼠抗 β -actin 单克隆抗体购自美国 abcam 公司; 辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG 购自碧云天科技有限公司; 2 \times Taq PCR StarMix (Dye) 购自北京康润诚业生物科技有限公司。

1.3 特异性 sgRNA 设计 根据 CRISPR / Cas9 技术, 通过 (<https://zlab.bio/guide-design-resources>) 网站在 *IFNAR1* 基因第 6 个和 7 个外显子区分别设计 sgRNA

(single guide RNA), 命名为 IFNAR1-sgRNA-1 和 IFNAR1-sgRNA-2, 根据 LentiCRISPRv2 载体 BsmB I 酶切位点, 将 sgRNA 正义链 5' 端添加 CACC, 反义链 5' 端添加 AAAC, 使其形成互补的黏性末端。根据 sgRNA 插入载体位置设计 sgRNA 插入鉴定引物, 根据 sgRNA 靶向序列位置设计 PCR 鉴定引物, 引物序列见表 1。引物由北京擎科生物科技有限公司合成。

1.4 LentiCRISPRv2-*IFNAR1*-sgRNA 质粒的构建 将 LentiCRISPRv2 利用 BsmB I 酶切, 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定同时回收酶切后线性化质粒。将设计的 sgRNA oligo 利用 ABI QuantStudio 5 荧光定量 PCR 仪将温度从 95 $^{\circ}$ C 降至 4 $^{\circ}$ C, 按照 1 $^{\circ}$ C / min 的速度进行退火处理; 将线性化的 LentiCRISPRv2 质粒与退火形成的双链 sgRNA 利用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜; 连接产物转化大肠埃希菌 DH5 α 感受态细胞, 涂布氨苄抗性 (100 mg / mL) 琼脂平板, 37 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 挑取单克隆, 送北京擎科生物科技有限公司测序, 比对无误后进行去内毒素质粒提取, 提取的质粒命名为 Lenti-CRISPRv2-*IFNAR1*-sgRNA-1 (简称 S1) 和 Lenti-CRISPRv2-*IFNAR1*-sgRNA-2 (简称 S2)。

1.5 慢病毒包装及感染 将 HEK293T 细胞按照 6×10^5 个 / 孔接种 6 孔板, 长满 80% 左右时, 将 S1、S2 分别进行慢病毒包装, 将 S1 / S2 : psPAX2 : VSV-G 按照 4 : 3 : 1 的比例, 利用 LipofectamineTM 3000 转染至 HEK293T 细胞中, 6 h 后更换为含 20% FBS 的 IMDM 培养基, 48 h 后收集上清, 经 0.22 μ m 滤膜过滤备用。将 Caco-2 细胞按 3×10^5 个 / 孔接种 6 孔板, 长满 30% ~ 50% 时, 将慢病毒液与含 20% FBS 的 IMDM 培养基按照 1 : 1 比例加至 6 孔板中, 同时加入 8 μ g / mL polybrene, 感染 48 h。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

名称	序列(5'→3')	片段大小(bp)
<i>IFNAR1</i> sgRNA 引物		
<i>IFNAR1</i> -sgRNA-1F	CACCGCATGACCTTTCAAGTTCAG	24
<i>IFNAR1</i> -sgRNA-1R	CGTACTGGAAAAGTTCAAGTCCAAA	24
<i>IFNAR1</i> -sgRNA-2F	CACCGAGATGCTTGTACGCGGAGA	24
<i>IFNAR1</i> -sgRNA-2R	CTCTACGAACATGCGCCTCTCAAA	24
sgRNA 插入鉴定引物		
V2CX1876F	CATAATAGCAACAGACATACAAAC	24
V2CX3763R	CAAATCTAAAACGCTTAAATAGC	23
PCR 鉴定引物		
Identification primer-S1-F	TGAACTACCTCCACCAGAA	19
Identification primer-S1-R	CTCACATACAGCGTCACTAA	20
Identification primer-S2-F	AACAGGAGCGATGAGTCT	18
Identification primer-S2-R	TTCTGCTGGAGGTAGTTCA	19

1.6 单克隆细胞株筛选及培养 将感染后细胞的培养基更换为含 20% FBS 的 IMDM, 加入终浓度为 2 ~ 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素, 进行传代及筛选, 周期为 7 ~ 10 d, 筛选 2 ~ 3 次; 待对照组 [野生型 Caco-2 细胞 (Caco-2-WT)] 全部死亡后, 将筛选出细胞的培养基更换为含 20% FBS 的 IMDM 继续挑取单克隆, 利用有限稀释法, 将细胞消化为单个细胞, 按每孔最多 1 个细胞的密度接种至 96 孔板中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温箱培养约 1 周; 消化细胞, 按 2×10^5 个 / cm^2 的接种密度移至 6 孔板中继续传代培养, 获得稳定传代的单克隆细胞。

1.7 单克隆细胞株 *IFNAR1* 基因鉴定 采用 PCR 法。提取单克隆细胞株基因组 DNA, PCR 扩增目的基因片段。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定后, 送北京擎科生物科技有限公司测序。

1.8 *IFNAR1* 蛋白表达的检测 采用 Western blot 法。冰上裂解 Caco-2-*IFNAR1*-KO1、Caco-2-*IFNAR1*-KO2 和 Caco-2-WT, 提取蛋白, 经 12% SDS-PAGE 分离后, 转膜仪转至 PVDF 膜上, 10% 脱脂奶粉室温封闭 1 h; 加入兔抗 *IFNAR1* 单克隆抗体 (1: 2 000 稀释) 和辣根过氧化物酶偶联的鼠抗 β -actin 单克隆抗体 (1: 4 000 稀释), 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜; 1 \times PBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔 IgG (1: 1 000 稀释), 室温孵育 1 h; 1 \times PBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 化学发光法显影。

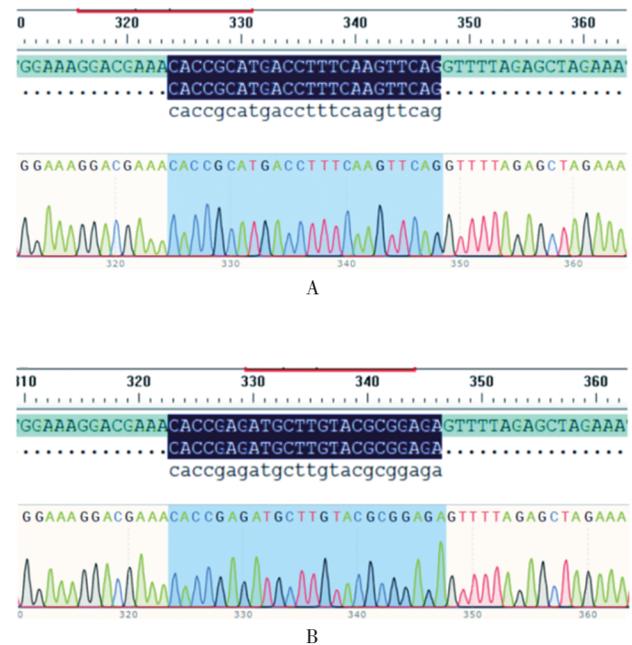
1.9 *IFN* 受体功能检测 采用 *IFN* β 刺激试验。将 Caco-2-*IFNAR1*-KO1、Caco-2-*IFNAR1*-KO2 和 Caco-2-WT 细胞株接种至 24 孔板中, 按照 0、50 ng / mL 的浓度加入 *IFN* β , 试验重复 3 次, 37 $^{\circ}\text{C}$ 作用 6 h。提取细胞总 RNA (去除细胞内 DNA), 反转录获得 cDNA, 以其为模板进行 Real-time PCR, 检测 CXC 趋化因子配体 10 (CXC chemokine ligand 10, *CXCL10*) 和 *IFN* 刺激基因 20 (interferon-stimulated gene 20, *ISG20*) mRNA 水平。反应条件: 50 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 共 40 个循环; 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 95 $^{\circ}\text{C}$ 15 s。以 *GAPDH* 作为内参, 以野生型 Caco-2 细胞 0 ng / mL *IFN* 刺激组其中 1 孔作为对照, 采取相对定量法 ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) 进行定量。

1.10 统计学分析 采用 GraphPad Prism 软件进行统计学处理, *t* 检验进行数据差异分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组质粒 LentiCRISPRv2-*IFNAR1*-sgRNA 的

鉴定 测序结果显示插入位置均位于 BsmB I 酶切黏性末端, 见图 1。



A: S1; B: S2。

注: 蓝色阴影序列为 sgRNA 序列。

图 1 LentiCRISPRv2-*IFNAR1*-sgRNA 质粒测序结果

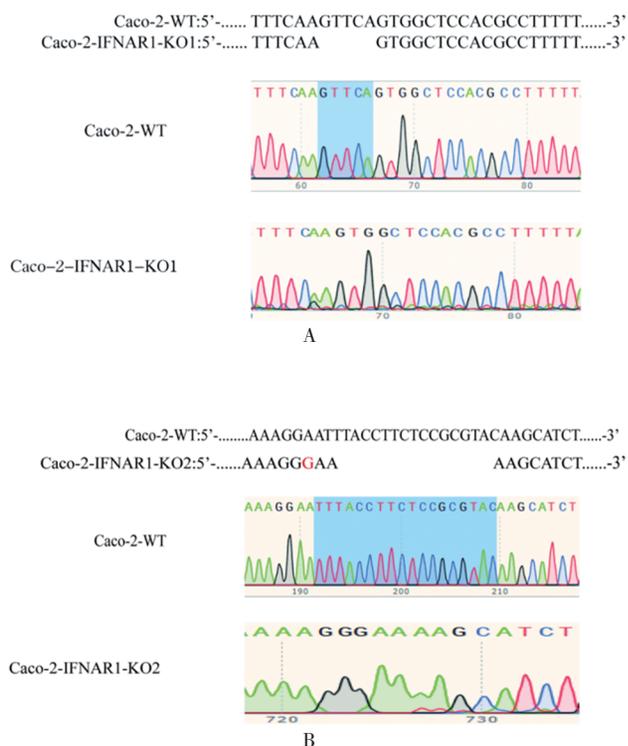
Fig. 1 Sequencing result of LentiCRISPRv2-*IFNAR1*-sgRNA plasmids

2.2 *IFNAR1* 敲除 Caco-2 细胞株的筛选 最终获得 2 株单克隆细胞株: Caco-2-*IFNAR1*-KO1 和 Caco-2-*IFNAR1*-KO2。测序结果显示, Caco-2-*IFNAR1*-KO1 *IFNAR1* 第 6 个外显子发生 5 bp 缺失, Caco-2-*IFNAR1*-KO2 第 7 个外显子发生 18 bp 缺失同时有 1 bp 增加, 见图 2。

2.3 *IFNAR1* 敲除 Caco-2 细胞株 *IFNAR1* 蛋白的表达水平 Western blot 分析显示, Caco-2-WT 细胞中 *IFNAR1* 蛋白正常表达, Caco-2-*IFNAR1*-KO1 和 Caco-2-*IFNAR1*-KO2 细胞中 *IFNAR1* 蛋白未见表达, 见图 3。表明 *IFNAR1* 基因的缺失和插入突变导致 *IFNAR1* 阅读框移码, 使 Caco-2-*IFNAR1*-KO1 和 Caco-2-*IFNAR1*-KO2 细胞不能正常表达 *IFNAR1* 蛋白。成功构建 2 株 *IFNAR1* 蛋白表达缺失的 *IFNAR1* 敲除 Caco-2 细胞株。

2.4 *IFNAR1* 敲除对 *IFN* 受体功能的影响 结果显示, 相比于 0 ng / mL *IFN* β , 在 50 ng / mL 外源 *IFN* β 刺激下, Caco-2-*IFNAR1*-KO1 和 Caco-2-*IFNAR1*-KO2 细胞 *CXCL10* 基因 mRNA 水平 (*t* 分别为 0.566 和 1.268, $P > 0.05$) 和 *ISG20* 基因 mRNA 水平 (*t* 分别为

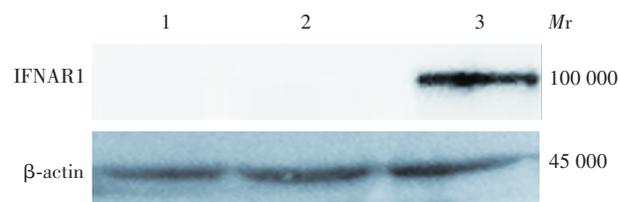
1.522和1.733, $P > 0.05$)均无明显升高;与Caco-2-WT细胞相比,在50 ng/mL外源IFN β 刺激下,Caco-2-IFNAR1-KO1和Caco-2-IFNAR1-KO2细胞*CXCL10*基因mRNA水平(t 分别为6.763和6.777, $P < 0.05$)和*ISG20*基因mRNA水平(t 分别为5.664和5.653, $P < 0.05$)均显著降低。见图4。表明*IFNAR1*基因敲除明显抑制了IFNAR下游信号通路的激活。



A: Caco-2-IFNAR1-KO1与Caco-2-WT测序比对; B: Caco-2-IFNAR1-KO2与Caco-2-WT测序比对。

图2 *IFNAR1*敲除Caco-2细胞株的测序结果

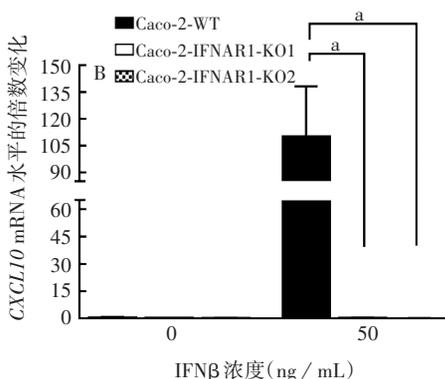
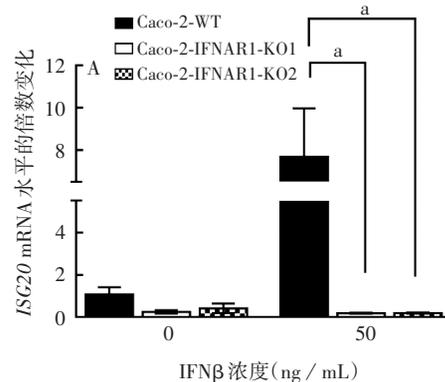
Fig. 2 Sequencing result of *IFNAR1* knockout Caco-2 cell lines



1: Caco-2-IFNAR1-KO1细胞; 2: Caco-2-IFNAR1-KO2细胞; 3: Caco-2-WT细胞。

图3 *IFNAR1*敲除Caco-2细胞株的Western blot鉴定

Fig. 3 Identification of *IFNAR1* knockout Caco-2 cell lines by Western blot



注: a 表示 $P < 0.05$ 。

图4 野生型Caco-2细胞株和*IFNAR1*敲除Caco-2细胞株中*ISG20*(A)和*CXCL10*基因(B)mRNA水平

Fig. 4 Levels of mRNA of *ISG20* gene (A) and *CXCL10* gene (B) in wild-type Caco-2 cell line and *IFNAR1* knockout Caco-2 cell lines

3 讨论

高效的基因编辑从本质上讲是有针对性的将目标染色体上的DNA双链进行断裂,诱导DNA损伤修复。目前在基因编辑技术领域,CRISPR-Cas作为第三代基因编辑系统^[12],无论在便捷性、效率还是成本方面均体现出独有的优势。CRISPR/Cas9系统是目前最常用的基因编辑工具,将crRNA和tracrRNA融合在1条sgRNA上,利用sgRNA识别靶标DNA^[13],极大地提高了操作的针对性和便捷性。本研究利用CRISPR/Cas9技术敲除Caco-2细胞*IFNAR1*基因,在基因序列和蛋白表达层面验证*IFNAR1*基因表达被成功敲除,体现了该项技术的可靠性和稳定性。

有研究证实,*IFNAR1*作为IFNAR重要亚基,与IFNAR结合进一步激活下游JAK-STAT信号通路,对下游信号传导和ISGs转录激活阶段具有重要作用^[14]。*IFNAR1*主要通过独立与IFN结合,同时招募另一个亚基形成三元复合物才能被激活。在*IFNAR1*

和 IFNAR2 功能试验中发现, IFNAR 中 IFNAR1 数量过低, 则不能完全激活下游信号通路^[15]。因此, 敲除 *IFNAR1* 对抑制细胞发挥 I 型 IFN 抗病毒作用, 具有重要意义。

CXCL10 和 ISG20 作为 IFN 激活因子, 对 IFN 发挥抗病毒过程起到直接和间接的重要作用。CXCL10 又称 IFN 诱导蛋白 10, 是 CXCL 趋化因子家族的一种细胞因子^[16]。作为调节机体炎症和免疫反应的重要趋化因子配体, 作用机制为通过与 CXCR3 受体结合, 诱导细胞趋化、细胞凋亡、细胞生长和血管稳定^[17]。有文献表明, 在感染病毒的个体体液中观察到 CXCL10 的异常水平, 表明 CXCL10 在细胞应对病毒感染等情况时, 自身分泌一种及时应对感染创伤的重要机制^[18-20]。IFN 作为广谱、非特异性的、高效的抗病毒蛋白, 其真正发挥抗病毒作用是通过激发 ISGs 实现的^[21], 细胞产生的 IFN 通过旁分泌或自分泌形式, 作用到自身或临近细胞, 通过与相应受体结合, 达到大范围高效率激发下游 JAK-STAT 信号通路, 诱导多种 ISGs 表达^[22], 从而真正发挥直接抗病毒作用。I、II、III 型 IFN 均可诱导产生 ISG20, 最初报道在感染乙型肝炎病毒的黑猩猩肝脏内进行病毒清除过程中检测到 ISG20^[23], 表明 ISG20 可能对细胞应答病毒感染过程产生重要影响。关于 ISG20 对病毒抑制作用研究中, 通过过表达该因子, 大部分单股正链和负链 RNA 病毒均明显被抑制^[24]。同时也有研究表明, ISG20 能抑制 HIV-1 和乙型肝炎病毒的复制^[25]。本研究也显示, *IFNAR1* 敲除 Caco-2 细胞的 *CXCL10* 和 *ISG20* 的转录激活受到了抑制, 提示 Caco-2 细胞敲除 *IFNAR1* 基因后降低了抗病毒能力, 为后期提高病毒分离效率及病毒感染滴度提供了途径。

病毒性传染病严重威胁人类健康, 是引起人类死亡的主要原因之一。许多肠道感染病毒不易在传代细胞上分离培养, 无法大量扩增或病毒滴度难以提高, 限制了对病毒株的致病机制的研究, 阻碍了病毒疫苗的研制和药物筛选。利用 CRISPR / Cas9 技术以及针对 IFN 发挥作用的关键通路相关基因的敲除构建稳定表达细胞株, 对研究 IFN 的抗病毒机制及针对难培养病毒的分离和扩增具有重要意义。虽然该技术对于目前存在的脱靶效应仍然无特别有效的方法, 但仍为细胞基因层面的编辑和探索提供了更加便捷、广阔的平台和空间。IFN 受体作为 IFN 发挥直接抗病毒作用的重要靶点, 一些机制尚不明确, 本文通过 CRISPR / Cas9 基因编辑技术构建了 *IFNAR1* 基因敲除 Caco-2 细胞系, 为研究 IFN 通路抗病毒的效果和机制提供了工具, 为后续针对其他通路和因

子的研究也具有借鉴意义。

参考文献

- [1] PANG L L, DUAN Z J, LUO D X, *et al.* Research advances in mechanisms of interferon [J]. *China Med Abstracts Dermatol*, 2021, 38 (6): 485-491 + 2. (in Chinese)
庞立丽, 段招军, 罗迪贤, 等. 干扰素作用机制的研究进展 [J]. *皮肤科学通报*, 2021, 38 (6): 485-491 + 2.
- [2] MOHEI H, KELLAMPALLI U, VLASOVA-ST LOUIS I. Immune reconstitution disorders: spotlight on interferons [J]. *Int J Biomedical Investigation*, 2019, 2 (1): 1000119. DOI: 10.31531/2581-4745.1000119.
- [3] XUE W, DING C, QIAN K, *et al.* The interplay between coronavirus and type I IFN response [J]. *Frontiers Microbiol*, 2021, 12: 805472.
- [4] AU-YEUNG N, HORVATH C M. Transcriptional and chromatin regulation in interferon and innate antiviral gene expression [J]. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 2018, 44: 11-17.
- [5] LEE S M, KIM P, YOU J, *et al.* Role of damage-associated molecular pattern / cell death pathways in vaccine-induced immunity [J]. *Viruses*, 2021, 13 (12): V13122340. DOI: 10.3390/v13122340.
- [6] YANG E, LI M M H. All about the RNA: interferon-stimulated genes that interfere with viral RNA processes [J]. *Frontiers Immunol*, 2020, 11: 605024. DOI: 10.3389/fimmu.2020.605024.
- [7] XIE X, LU L G. Advances in antiviral treatments of HBV-induced liver cirrhosis [J]. *J Practical Hepatol*, 2018, 21 (1): 140-144. (in Chinese)
谢晓, 陆伦根. 乙型肝炎肝硬化抗病毒治疗的进展 [J]. *实用肝病杂志*, 2018, 21 (1): 140-144.
- [8] MCNAB F, MAYER-BARBER K, SHER A, *et al.* Type I interferons in infectious disease [J]. *Nat Reviews Immunol*, 2015, 15 (2): 87-103.
- [9] QIAN G, ZHU L, LI G, *et al.* An integrated view of deubiquitinating enzymes involved in type I interferon signaling, host defense and antiviral activities [J]. *Frontiers Immunol*, 2021, 12: 742542. DOI: 10.3389/fimmu.2021.742542.
- [10] ARDANUY J, SCANLON K, SKERRY C, *et al.* Age-dependent effects of type I and type III IFNs in the pathogenesis of bordetella pertussis infection and disease [J]. *J Immunol*, 2020, 204 (8): 2192-2202.
- [11] ZHONG S, ZHANG T, TANG L, *et al.* Cytokines and chemokines in HBV infection [J]. *Frontiers Mol Biosciences*, 2021, 8: 805625. DOI: 10.3389/fmolb.2021.805625.
- [12] BREZGIN S, KOSTYUSHEVA A, BAYUROVA E, *et al.* Immunity and viral infections: modulating antiviral response via CRISPR-Cas systems [J]. *Viruses*, 2021, 13 (7): V13071373. DOI: 10.3390/v13071373.
- [13] KOUJAH L, SHUKLA D, NAQVI A R. CRISPR-Cas based targeting of host and viral genes as an antiviral strategy [J]. *Seminars Cell & Developmental Biol*, 2019, 96: 53-64.

- 高光平, 朱利霞, 王洪彬, 等. 毛皮动物源大肠杆菌毒力和耐药基因检测及药物敏感性分析[J]. 中国兽医学报, 2019, 39 (4): 671-677.
- [21] LIU L J, MA G Q, ZHANG S Z, *et al.* Classification and drug resistance analysis of pathogenic *Escherichia coli* in diarrhea piglets [J]. Chin Animal Husbandry & Veter Med, 2018, 45 (10): 2876-2884. (in Chinese)
- 刘丽娟, 马光强, 张胜沾, 等. 仔猪腹泻致病性大肠杆菌分型鉴定及耐药性分析[J]. 中国畜牧兽医, 2018, 45 (10): 2876-2884.
- [22] ZHANG J B, MA C F, YU T, *et al.* Detection of virulence genes and antimicrobial resistance analysis of *Escherichia coli* isolated from dairy cows mastitis in Ningxia [J]. Chin J Animal Veter Sci, 2016, 47 (1): 177-182. (in Chinese)
- 张金宝, 马春芳, 余婷, 等. 宁夏地区奶牛乳房炎大肠杆菌毒力基因检测和耐药性分析[J]. 畜牧兽医学报, 2016, 47 (1): 177-182.
- [23] ZHANG Z X, LI P, LI Y Y, *et al.* Analyzing phylogenetic groups, drug resistance phenotypes, and drug resistance genotypes of *Escherichia coli* isolates causing salpingoperitonitis in layer chicken [J]. Chin J Prevent Veter Med, 2019, 41 (9): 885-890. (in Chinese)
- 张召兴, 李佩国, 李蕴玉, 等. 致蛋鸡卵黄性腹膜炎大肠杆菌分子分群、耐药表型及耐药基因型检测与分析[J]. 中国预防兽医学报, 2019, 41 (9): 885-890.
- [24] ZHANG X X, QIAO J, MENG Q L, *et al.* Phylogenetic analysis and resistance characteristics of *Escherichia coli* from calves in Xinjiang [J]. J Domestic Animal Ecol, 2016, 37 (6): 60-64. (in Chinese)
- 张星星, 乔军, 孟庆玲, 等. 新疆犊牛源大肠杆菌系统进化及其耐药特性[J]. 家畜生态学报, 2016, 37 (6): 60-64.
- [25] LIU B X, ZHAO A Q, LIU C C, *et al.* Pathogenicity and drug resistance of diarrhea *Escherichia coli* in calves in Hebei province [J]. Chin J Prevent Veter Med, 2020, 42 (2): 133-138. (in Chinese)
- 刘勃兴, 赵安奇, 柳翠翠, 等. 河北省犊牛腹泻大肠杆菌致病性及耐药性分析[J]. 中国预防兽医学报, 2020, 42 (2): 133-138.
- [26] JIANG Z M, AI C M, WANG Y R, *et al.* Risk assessment of antibiotic-resistant bacteria in foods: A review [J]. Food Sci, 2019, 40 (5): 282-288. (in Chinese)
- 姜竹茂, 艾春梅, 王晔茹, 等. 食品中耐药细菌风险评估的研究进展[J]. 食品科学, 2019, 40 (5): 282-288.
- [27] AMER M M, MEKKY H M, AMER A M, *et al.* Antimicrobial resistance genes in pathogenic isolated from diseased broiler chickens in Egypt and their relationship with the phenotypic resistance characteristics [J]. Veter World, 2018, 11 (8): 1082-1088.
- [28] YU Z N, WANG J, HO H, *et al.* Prevalence, antimicrobial-resistance phenotypes and genotypes of *Escherichia coli* isolated from raw milk samples from mastitis cases in four regions of China [J]. J Global Antimicrob Resist, 2020, 22: 94-101.

收稿日期: 2022-05-28 编辑: 王佳凤

(上接第 150 页)

- [14] DUNCAN C J A, THOMPSON B J, CHEN R, *et al.* Severe type I interferonopathy and unrestrained interferon signaling due to a homozygous germline mutation in STAT2 [J]. Sci Immunol, 2019, 4 (42): aav7501. DOI: 10.1126/sciimmunol.aav7501.
- [15] BRISSE M, HUANG Q, RAHMAN M, *et al.* RIG-I and MDA5 protect mice from pichinde virus infection by controlling viral replication and regulating immune responses to the infection [J]. Frontiers Immunol, 2021, 12: 801811. DOI: 10.3389/fimmu.2021.801811.
- [16] LIU M, GUO S, HIBBERT J M, *et al.* CXCL10 / IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications [J]. Cytokine & Growth Factor Reviews, 2011, 22 (3): 121-130.
- [17] COLASANTI T, STEFANANTONI K, FANTINI C, *et al.* The prostacyclin analogue iloprost modulates CXCL10 in systemic sclerosis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23 (17): ijms231710150. DOI: 10.3390/ijms231710150.
- [18] SPENCER CLINTON J L, TRAN L L, VOGT M B, *et al.* IP-10 and CXCR3 signaling inhibit Zika virus replication in human prostate cells [J]. PloS One, 2020, 15 (12): e0244587. DOI: 10.1371/journal.pone.0244587.
- [19] MURSALIN M H, COBURN P S, MILLER F C, *et al.* C-X-C chemokines influence intraocular inflammation during bacillus endophthalmitis [J]. Investigative Ophthalmol & Visual Sci, 2021, 62 (14): 14.
- [20] FERREIRA H, MENDES M A, DE MATTOS BARBOSA M G, *et al.* Potential role of CXCL10 in monitoring response to treatment in Leprosy patients [J]. Frontiers Immunol, 2021, 12: 662307. DOI: 10.3389/fimmu.2021.662307.
- [21] DEYMIER S, LOUVAT C, FIORINI F, *et al.* ISG20: an enigmatic antiviral RNase targeting multiple viruses [J]. FEBS Open Bio, 2022, 12 (6): 1096-1111.
- [22] MERSINOGLU B, CRISTINELLI S, CIUFFI A. The impact of epitranscriptomics on antiviral innate immunity [J]. Viruses, 2022, 14 (8): v14081666. DOI: 10.3390/v14081666.
- [23] KANG D, GAO S, TIAN Z, *et al.* ISG20 inhibits bluetongue virus replication [J]. Virologica Sinica, 2022, 37 (4): 521-530.
- [24] WEISS C M, TROBAUGH D W, SUN C, *et al.* The interferon-induced exonuclease ISG20 exerts antiviral activity through upregulation of type I interferon response proteins [J]. MSphere, 2018, 3 (5): 00209-18. DOI: 10.1128/mSphere.00209-18.
- [25] CHEN X, SUN D, DONG S, *et al.* Host interferon-stimulated gene 20 inhibits pseudorabies virus proliferation [J]. Virologica Sinica, 2021, 36 (5): 1027-1035.

收稿日期: 2022-06-11 编辑: 王佳凤