CRISPR/Cas9 敲低环氧合酶 2 表达对黄曲霉毒素 B1 诱导 肝细胞核 DNA 损伤与脂质蓄积的影响

韩佩宇,车琳,陈圆圆,江珊,段军燕,孙宝芳,何承勇,林育纯,林忠

宁*

(厦门大学 公共卫生学院,分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室,福建 厦门 361102)

摘要:为探讨黄曲霉毒素 B1 (AFB1)诱导的肝细胞核 DNA 损伤与脂质蓄积的关系,以慢病毒质粒为 载体,采用 CRISPR/Cas9 技术构建含靶向环氧合酶 2(COX-2)编码基因(PTGS2)小向导 RNA (sgRNA) 的重组质粒,经测序验证成功后,制备假病毒感染 HepG2 细胞构建稳定敲低 COX-2 表达的细胞。 通过实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)和蛋白免疫印迹(WB)检测 mRNA 和蛋白水平,结果显示与 HepG2-Cas9-NC 对照细胞相比, HepG2-Cas9-PTGS2 敲低细胞中 PTGS2 mRNA 与 COX-2 蛋白表达 水平分别减少至(49.1±1.8)%和(48.1±0.7)%。给予细胞 AFB1 处理,通过 WB 和免疫荧光(IF) 法检测 DNA 损伤标志物 γH2AX 的表达水平,结果显示 AFB1 处理组敲低细胞中,γH2AX 蛋白水平 和荧光焦点形成数显著低于对照细胞(p<0.05);进一步检测脂质合成相关指标,发现敲低细胞中 PPARγ蛋白、总胆固醇(TC)、总甘油三脂(TG)水平以及油红O染色阳性脂滴在细胞分布密度,均显 著低于对照细胞(p<0.05)。进一步在敲低细胞中回补 COX-2 后给予 AFB1 处理,γH2AX 水平、脂质 分布密度均升高(p<0.05)。综上,本研究成功构建了 HepG2-Cas9-PTGS2 敲低细胞,并发现敲低 COX-2 表达对 AFB1 诱导的肝细胞核 DNA 损伤和脂质蓄积有显著抑制作用,为进一步研究靶向干预 COX-2 在外源化学物诱导肝细胞毒性中的作用机制提供了细胞模型和依据。 关键词: CRISPR/Cas9; 环氧合酶 2; 黄曲霉毒素 B1; 核 DNA 损伤; 脂质蓄积 中图分类号: R 155.3+2 文献标志码: A

黄曲霉毒素 B1 (aflatoxin B1, AFB1)是毒性极强的环境污染物,我国东南部等地区是已知的高污染区^[1]。AFB1 主要经由被污染的花生等食品进入人体,靶向肝脏发挥毒性效应,由其造成的人群健康危害已成为一个重要的公共卫生问题。已有报道指出 AFB1 诱导肝细胞毒性的机制主要有氧化应激^[2]、核 DNA 损伤^[3]、细胞周期阻滞、增殖抑制以及脂质蓄积等^[4]。已知环氧合酶(cyclooxygenases,

收稿日期: 2018-03-07 录用日期: 2018-05-16

基金项目: 国家自然科学基金(81573181, 81472997, 81773465); 福建省自然科学基金(2015J01344) ***通信作者:** linzhn@xmu.edu.cn

COXs)是花生四烯酸代谢合成前列腺素家族的限速酶^[5],分 COX-1 和 COX-2 两个亚型^[6],分别由 *PTGS1* 和 *PTGS2* 基因编码;其中 COX-2 为诱导型酶,与炎症反应、细胞增殖、细胞凋亡等多种病 理过程有关,并参与肝细胞脂质蓄积的调节^[5]。有研究表明,氧化应激可诱导 DNA 双链断裂,与脂 质蓄积等并发症有关^[7]。本课题组前期研究发现 AFB1 可由细胞应激诱导 COX-2 表达升高^[8];然而 目前 COX-2 是否作为调控 AFB1 诱导肝细胞 DNA 损伤与脂质蓄积的靶点仍未阐明。

簇状规律性间隔性短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/Cas9 系统是古生菌在长期演化过程中形成的用于对抗入侵的病毒及外源 DNA 的一种适应性防御体系^[9]。*Cas9* 基因在 CRISPR 位点附近,其编码的蛋白具有解旋酶和核酸酶作用;通常 Cas9 蛋白以无活性形式存在,当与 crRNA (CRISPR-derived RNA)结合后,三维结构发生改变,在其指引下与相应 DNA 结合并对特定 DNA 序列进行剪切^[10]。近年来,借助于 CRISPR/Cas9 系统,通过设计一段小向导 RNA (small guide RNA, sgRNA)与下游 Cas9 形成核糖核蛋白复合物,引导 Cas9 到相应 DNA 位置以利用其对哺乳动物细胞目的基因进行编辑,成为一种高效和简易的基因编辑技术。因此,本研究拟采用 CRISPR/Cas9 系统构建稳定敲低 *PTGS2* 基因表达的 HepG2 细胞株,应用于探讨 COX-2 在 AFB1 引起肝细胞核 DNA 损伤和脂质蓄积中的作用和潜在的调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 质粒、菌株及细胞株

CRISPR/Cas9 质粒 lentiCRISPR v2 购自 Addgene 公司; pCMV-dR8.9、VSV-G、pCMV 质粒、 pCMV-*PTGS2* 质粒, HepG2 和 HEK293T 细胞由本实验室保存。感受态大肠杆菌 *Stbl3* 购自上海唯地 生物技术有限公司。

1.1.2 实验试剂

Quick Ligase 购售美国 New England Biolabs 公司; 氨苄青霉素、高效质粒抽提试剂盒购自美国 Life Technologies 公司; TRIzol RNA 提取试剂盒、X-tremeGENE HP DNA 转染试剂、嘌呤霉素、 OPTI-MEM[®]I Reduced Serum 培养液、*Esp31**内切酶、二甲基亚砜(DMSO)购自美国 Thermo Scientific 公司; RPMI-1640 培养基、胎牛血清、青霉素链霉素双联抗生素、0.25%(质量分数)胰蛋白酶购自 美国 Gibco 公司; cDNA 合成试剂盒、SYBR PrimeScriptTM RT-PCR 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司; 羊抗鼠/兔-HRP-IgG 二抗、驴抗鼠-Alexa Fluor-IgG 荧光二抗、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体、 COX-2 抗体、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptors γ, PPARγ) 抗体购自美国 Cell Signal Technology 公司; 磷酸化组蛋白 H2AX(phosphor-histone H2A.X (Ser139), γH2AX)抗体购自美国 Millipore 公司; AFB1 购自美国 EnzoLife 公司; 4,6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI) 购自上海碧云天生物有限公司;总胆固醇(TC)、总甘油三酯(TG)检测和油红 O 染色试剂盒购自南京 建成生物技术有限公司;其他常规试剂购自厦门绿茵公司。

1.2 实验方法

1.2.1 sgRNA 序列设计与合成

利用 http://crispr.mit.edu 网站,按照 sgRNA 设计原则设计靶向基因 *PTGS2* 的两对 sgRNA 寡核 苷酸片段,序列见表 1。

1.2.2 重组质粒的构建与鉴定

lentiCRISPR v2 质粒用限制性内切酶 *Esp31**酶切,产物进行琼脂糖凝胶电泳鉴定,切胶回收质 粒大片段产物;将合成的 sgRNA 片段稀释为 10 µmol/L,分别取正、反链各 0.25 µL,加入 5 µL 10× 退火缓冲液和超纯水至 50 µL,混匀后 95 ℃孵育 5 min,自然冷却至室温,形成双链寡核苷酸片段; 然后将 50 ng 酶切回收的线性化 lentiCRISPR v2 载体、1 µL 退火后的双链 sgRNA 片段、1 µL 连接酶、 5 µL 2×连接缓冲液,加超纯水至 11 µL,室温连接 10 min;再将连接产物转化 *Stb13* 感受态细胞,涂 布于氨苄青霉素抗性的 LB 平板,37 ℃培养过夜;次日挑取分别含有 sgRNA1 或 sgRNA2 的单克隆 菌落各 3 个于 LB 培养基中,37 ℃振荡培养 12 h,提取质粒进行测序鉴定。

1.2.3 HepG2-Cas9-PTGS2敲低细胞的构建

采用HEK293T细胞包装含有目的质粒或对照质粒的假病毒,收集病毒上清,使用X-tremeGENE HP DNA转染试剂,感染预先接种于直径6 cm的细胞培养皿的HepG2细胞,8 h后更换含有10%胎牛血 清的RPMI-1640培养基;36 h后,使用0.6 µg/mL嘌呤霉素进行细胞筛选,直至空白对照HepG2细胞全 部死亡时终止,重复筛选2次。获取靶向PTGS2基因稳定敲低COX-2表达的细胞,经鉴定分别命名为HepG2-Cas9-PTGS2-sgRNA1(简称Cas9-PTGS2-sgRNA1)和-sgRNA2(简称Cas9-PTGS2-sgRNA2)敲低 细胞;转入空质粒的细胞命名为HepG2-Cas9-NC(简称Cas9-NC)对照细胞。

1.2.4 PTGS2基因敲低COX-2表达效率鉴定

将筛选得到的细胞以 3.5×10⁵/孔接种于 6 孔板,采用蛋白免疫印迹(WB)检测 PTGS2 敲低效率,选择敲低效率较高的细胞株用于后续实验。同时,采用本课题组前期优化的条件进行实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)^[11]检测 PTGS2 和 PTGS1 的 mRNA 水平,引物序列见表 1。

1.2.5 细胞分组处理和目的基因 mRNA 水平检测

细胞以 3.5×10⁵/孔接种于 6 孔板,分为处理组 (2 μmol/L AFB1)和对照组(等体积的溶剂 DMSO) 处理 48 h,提取总 RNA,逆转录成 cDNA,采用 qRT-PCR 检测包括参与代谢活化的细胞色素 P450 家族相关基因 *CYP2B6*和 *CYP3A4*、人肝型脂肪酸结合蛋白 1(fatty acid binding protein 1, FABP1)基 因 *FABP1*和肝脏脂质合成相关基因 *PPARG*的 mRNA 水平。以 *ACTB* 作为内参基因,结果将循环数 Ct 值转换成 2^{-ΔΔCt}来进行比较,相关基因的引物序列详见表 1。

名称	序列(5'→3')
PTGS2-sgRNA-1-FP	CACCGAACTCATAATTGCATTTCGA
PTGS2-sgRNA-1-RP	CTTGAGTATTAACGTAAAGCTCAAA
PTGS2-sgRNA-2-FP	CACCGCGTTCCAAAATCCCTTGAAG
PTGS2-sgRNA-2-RP	CGCAAGGTTTTAGGGAACTTCCAAA
PTGS2-qRT-FP	CAGCCATACAGCAAATCCTTG
PTGS2-qRT-RP	CAAATGTGATCTGGATGTCAAC
PTGS1-qRT-FP	CAGTGGCTCGTATCCCAAAT
PTGS1-qRT-RP	AGGCACAGATTCAGGGAATG
ACTB-qRT-FP	CACCAGGGCGTGATGGT
ACTB-qRT-RP	CTCAAACATGATCTGGGTCAT
CYP2B6-qRT-FP	GAGTGTGGAGGAGCGGATT
CYP2B6-qRT-RP	AGACGATGGAGCAGATGATGT
CYP3A4-qRT-FP	TCCCACAAAGCTCTGTCCG
CYP3A4-qRT-RP	CATAGGTGGGTGGTGCCTT
FABP1-qRT-FP	TTCACCATCACCGCTGGGT
FABP1-qRT-RP	TTATGTCGCCGTTGAGTTCG
PPARG-qRT-FP	ATGGAGCCCAAGTTTGAGTTT
PPARG-qRT-RP	TGTAGCAGGTTGTCTTGAATGTC

表1 本研究涉及寡核苷酸与引物序列

Tab.1 Oligonucleotides and primer sequences involved in this study

1.2.6 蛋白表达的 WB 检测

各处理组细胞采用十二烷基磺酸钠(SDS)裂解法提取总蛋白,检测细胞中 COX-2、PPARγ、γH2AX 的蛋白表达水平,以 GAPDH 为内参。各目的蛋白条带采用 Image J 软件分析测定灰度值后进行表达 水平的半定量分析。

1.2.7 细胞核 DNA 损伤的免疫荧光检测

细胞以 1.5×10* 孔接种于 24 孔板, 分组处理至终点, 4% (质量分数)多聚甲醛室温固定 20 min, TritonX-100 打孔 5 min, 5% (体积分数) 胎牛血清封闭 30 min, 检测细胞核 DNA 双链损伤标志物 γH2AX。4 ℃避光孵育 γH2AX 抗体 8 h, 室温避光孵育荧光二抗 1 h, DAPI 染色 1 min, 各步骤间 均用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗 3 次。使用共聚焦显微镜观察, 图像拍照并分析荧光焦点形成数。

1.2.8 细胞内 TC 与 TG 含量检测

细胞分组处理至终点,收集细胞,依据试剂盒说明书进行操作,PBS 清洗 2 次后超声匀浆,匀 浆液加入显色试剂并使用分光光度计检测 546 和 570 nm 处光密度(*OD*),标准曲线法计算 TC 和 TG 含量。

1.2.9 细胞内脂质的油红 O 染色

细胞以 8×10⁴/孔接种于 12 孔板,分为处理组(2 和 5 μmol/L AFB1)和对照组(DMSO)处理 48 h,按试剂盒方法进行油红 O 染色,使用正置显微镜观察细胞内脂质分布,图像拍照;采用 Image J 软件分析测定视野内脂滴所占面积,统计视野内细胞个数后进行半定量分析。

1.2.10 细胞内野生型 COX-2 的回补试验

细胞采用构建的 pCMV-PTGS2 质粒(1 μg/mL)作为回补组,以 pCMV 质粒(1 μg/mL)为对照组, 分别瞬时转染 HepG2-Cas9-NC 对照细胞和 HepG2-Cas9-PTGS2 敲低细胞 12 h,分为 AFB1 (2 μmol/L) 处理组(2 μmol/L AFB1)或对照组(DMSO)处理 48 h。提取细胞总 RNA,逆转录成 cDNA,采用 qRT-PCR 检测 PTGS2 的 mRNA 水平;收获细胞,采用 SDS 裂解法提取总蛋白,检测细胞中 COX-2 与 γH2AX 的蛋白表达水平;采用检测试剂盒进行油红 O 染色,进行细胞内脂质分布观察、图像拍照和半定量 分析。

1.2.11 统计学分析

每项实验至少重复3次,使用 SPSS 18.0软件进行统计学分析。定量分析数据以(x ± s)形式表示, 两组间比较采用 t-检验、多组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA), p<0.05表示差异具有 统计学意义。

2 结果与分析

2.1 lentiCRISPR-PTGS2 重组质粒的构建

lentiCRISPR v2 载体酶切后得到特异性大片段(图 1(a));测序结果显示,设计的 sgRNA 序列位于质粒酶切位点序列之间,与设计序列一致,说明 2 个重组质粒构建成功,分别命名为 lentiCRISPR-*PTGS2*-sgRNA1(图 1(b))和 lentiCRISPR-*PTGS2*-sgRNA2(图 1(c))。



 ⁽a) lentiCRISPR v2 载体限制性酶切图; (b) lentiCRISPR-PTGS2-sgRNA1 测序图谱;
 (c) lentiCRISPR-PTGS2-sgRNA2 测序图谱。



2.2 HepG2-Cas9-PTGS2 稳定敲低 COX-2 表达细胞株的鉴定

细胞形态学观察结果显示:与 Cas9-NC 对照细胞相比,HepG2-Cas9-PTGS2 敲低细胞的形态无明显改变(图 2(a));Cas9-PTGS2-sgRNA1 和-sgRNA2 敲低细胞中 PTGS2 mRNA 水平分别减少到(49.1±1.8)%和(73.5±2.2)%,且与 Cas9-NC 对照细胞相比均有显著性差异(p<0.05);而 PTGS1 mRNA 水平未见显著性差异(图 2(b))。Cas9-PTGS2-sgRNA1和-sgRNA2 敲低细胞中 COX-2 蛋白表达水平降低(图 2(c)),分别为 Cas9-NC 对照细胞的(48.1±0.7)%和(63.2±1.1)%,差异均显著(p<0.05,图 2(d))。结果可见 HepG2-Cas9-PTGS2-sgRNA1 敲低细胞具有更高的 COX-2 敲低表达效率,故选择其(后简称 Cas9-PTGS2 敲低细胞)用于后续实验。



2.3 COX-2 敲低表达对 AFB1 诱导 DNA 损伤的抑制作用

如图 3(a)所示, AFB1 处理组 Cas9-PTGS2 敲低细胞与 Cas9-NC 对照细胞中, CYP2B6 和 CYP3A4 mRNA 水平均显著增高(p<0.05), 而两种细胞间无显著性差异, 说明 AFB1 诱导肝细胞反应性的染毒 细胞模型建立成功, 但 COX-2 敲低表达对肝细胞代谢无显著影响。

由图 3(b)可见:与 Cas9-NC 对照细胞相比,Cas9-PTGS2 敲低细胞中 COX-2 表达降低;AFB1 处理组 Cas9-NC 对照细胞中 COX-2 表达显著性增高,Cas9-PTGS2 敲低细胞中 COX-2 蛋白同样受 AFB1 诱导,但表达水平显著低于 Cas9-NC 对照细胞。AFB1 处理组 Cas9-NC 对照细胞中 γH2AX 表

达较对照组明显增高,而 Cas9-PTGS2 敲低细胞中 γH2AX 表达未明显增高。相应地,AFB1 处理组 Cas9-NC 对照细胞核中 γH2AX 荧光焦点形成较对照组增加(图 3(c)),数目显著增多(p<0.05,图 3(d)); 而在 AFB1 处理组 Cas9-PTGS2 敲低细胞中,细胞核中 γH2AX 荧光焦点形成较少(图 3(c)),数目显 著低于 AFB1 处理组 Cas9-NC 对照细胞(p<0.05,图 3(d))。上述结果说明靶向抑制 COX-2 表达可减 弱 AFB1 诱导的干细胞核 DNA 损伤。



(a) *CYPs* mRNA 水平变化;
 (b) COX-2 和γH2AX 的蛋白水平变化;
 (c) 细胞核内γH2AX 荧光焦点形成图像;标
 尺=10 μm;
 (d) 每个细胞中γH2AX 荧光焦点数。*与 Cas9-NC 对照细胞的对照组相比, p<0.05; #与 Cas9-NC 对
 照细胞的 AFB1 处理组相比, p<0.05。

图 3 AFB1 处理 Cas9-PTGS2 细胞中代谢酶、COX-2 和yH2AX 的检测 Fig.3 Levels of CYPs mRNA, COX-2 and yH2AX in AFB1-treated Cas9-PTGS2 cells

2.4 COX-2 敲低表达对 AFB1 诱导肝细胞脂质蓄积的影响

2.4.1 脂质合成相关基因 mRNA 和蛋白表达水平受抑制

AFB1 处理组 Cas9-NC 对照细胞和 Cas9-PTGS2 敲低细胞中,脂质合成相关基因 FABP1 与 PPARG mRNA 水平较对照组均显著增高(p<0.05),且 AFB1 处理组 Cas9-PTGS2 敲低细胞中 PPARG mRNA 水平显著低于 Cas9-NC 对照细胞中(p<0.05,图 4(a))。AFB1 处理组 Cas9-NC 对照细胞和 Cas9-PTGS2 敲低细胞中的 PPARγ 蛋白表达均增高;但在 Cas9-PTGS2 敲低细胞中,PPARγ 蛋白水平明显低于 Cas9-NC 对照细胞中(图 4(b))。上述结果说明 COX-2 敲低表达可抑制 AFB1 诱导肝细胞中 PPARG 转录和 PPARγ 表达。

2.4.2 肝细胞中 TC 和 TG 含量降低

如图 4(c)和(d)所示: Cas9-PTGS2 敲低细胞中 TC 和 TG 水平显著低于 Cas9-NC 对照细胞中 (p<0.05); 两种细胞中 AFB1 处理组的 TC 和 TG 含量较对照组均显著增高(p<0.05), 但在 Cas9-PTGS2 敲低细胞中显著低于 Cas9-NC 对照细胞中(p<0.05)。

2.4.3 肝细胞中脂质分布和蓄积减少

由图 4(e)和(f)可见: AFB1 处理组 Cas9-NC 对照细胞和 Cas9-PTGS2 敲低细胞中,油红 O 染色 阳性脂滴在细胞内的分布密度显著增加(p<0.05)、并随 AFB1 的剂量增加而增加;且在 Cas9-PTGS2 敲低细胞中的密度显著低于同剂量 AFB1 处理组的 Cas9-NC 对照细胞中(p<0.05)。上述结果说明 COX-2 敲低表达可抑制 AFB1 诱导肝细胞中 TC 和 TG 增高引起的脂质蓄积。



(a)脂质合成相关基因 mRNA 水平变化; (b) PPARγ 蛋白表达水平变化; (c) TC 含量; (d) TG 含量; (e)油红 O 染 色照片,标尺=50 μm; (f)脂滴密度半定量分析。*与 Cas9-NC 对照细胞的对照组相比, p<0.05; #与 Cas9-NC 细

胞中相同剂量 AFB1 处理组相比, p<0.05。

图 4 AFB1 处理诱导 Cas9-PTGS2 细胞中脂质合成的变化 Fig.4 Changes of lipid synthesis in AFB1-treated Cas9-PTGS2 cells

2.5 COX-2 回补对 AFB1 诱导肝细胞 DNA 损伤和脂质蓄积的影响

2.5.1 野生型 COX-2 的回补作用

Cas9-NC 对照细胞中,与 pCMV 对照组相比, pCMV-PTGS2 回补组细胞中 PTGS2 mRNA 水平 显著升高(p<0.05,图 5(a)), COX-2 表达也明显增高(图 5(b));且 pCMV-PTGS2 回补组 Cas9-PTGS2

敲低细胞中 PTGS2 mRNA 水平显著升高(p<0.05,图 5(a))和 COX-2 表达也明显增加(图 5(b)),但均低于回补组 Cas9-NC 对照细胞中(p<0.05,图 5(a)和(b))。上述结果说明在敲低细胞中回补野生型 COX-2 表达模型建立成功。

2.5.2 COX-2 回补对 γH2AX 诱导表达和脂质蓄积的增强作用

Cas9-NC 对照细胞中,与 pCMV 对照组相比,pCMV-PTGS2 回补细胞中 γH2AX 蛋白水平(图 5(b)) 明显增高,脂滴密度(图 5(c)和(d))显著增加(p<0.05);与 AFB1 处理组相比,pCMV-PTGS2 回补细胞的 AFB1 处理组中 γH2AX 蛋白水平(图 5(b))和脂滴密度(图 5(c)和(d))进一步增加。上述结果说明 COX-2 表达增高与 AFB1 诱导 γH2AX 蛋白表达和脂质蓄积有潜在关联性。

Cas9-PTGS2 敲低细胞中,与 pCMV 对照组相比, pCMV-PTGS2 回补细胞中 γH2AX 蛋白水平(图 5(b))明显增高,脂滴密度(图 5(c)和(d))显著增加(p<0.05);与 AFB1 处理组相比,pCMV-PTGS2 回补 细胞的 AFB1 处理组中,γH2AX 蛋白水平(图 5(b))和脂滴密度(图 5(c)和(d))进一步增加,但均显著低 于 Cas9-NC 对照细胞中(图 5(b)、(c)和(d))。综上结果表明野生型 COX-2 回补对 AFB1 诱导 γH2AX 蛋白表达和脂质蓄积有恢复作用。



(a) PTGS2 mRNA 水平; (b) COX-2 和γH2AX 蛋白水平及其半定量结果; (c)和(d) 油红 O 染色密度半定量分析。*与两种细胞各自 pCMV 对照组相比,p<0.05;*与 Cas9-NC 细胞相同处理组相比,p<0.05; *pCMV-PTGS2 回补组与 pCMV 对照组相比,p<0.05。</p>

图 5 AFB1 处理 Cas9-PTGS2 细胞的 COX-2 回补试验中 COX-2、γH2AX 和脂质蓄积的水平 Fig.5 Levels of COX-2, γH2AX, and lipid in COX-2 rescue assay on AFB1-treated Cas9-PTGS2 cells

3 讨论与结论

在 CRISPR/Cas9 技术出现前, 锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)与转录激活因子样效应物 核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)技术已应用于基因编辑, 但存在投入大、

且失败率较高的不足。CRISPR/Cas9 系统是利用 sgRNA 引导 Cas9 核酸酶在 N20 介导的靶位点处进 行 DNA 特异性剪切,从而达到敲除基因的目的。本研究利用 CRISPR/Cas9 系统中 Cas9 的核酸酶活 性,设计针对 PTGS2 特定序列(位于第 3 外显子区域)的识别,在 HepG2 细胞基因组水平上对 PTGS2 进行选择性切割,导致修复过程中出现缺失、移码等形式突变提前形成终止密码子,从而使 PTGS2 基因不能表达正确的 COX-2 全长蛋白,由此靶向干预 COX-2 蛋白表达,充分利用了 CRISPR/Cas9 系统操作简便、成本低、成功率高的优点^[9]。在通常情况下,用 CRISPR/Cas9 剪切目的基因时,该 基因 mRNA 转录水平理论上不受影响,但本研究构建的 Cas9-PTGS2 细胞中 COX-2 蛋白靶向敲低表 达的同时, PTGS2 mRNA 水平也降低。根据已有文献^[12, 13]提示,可能原因为采用 CRISPR/Cas9 系统 对基因进行选择性切割和导致修复过程中出现缺失、移码等形式突变,由此导致 RNA 二级结构的改 变,从而损害 mRNA 稳定性并导致其降解速度加快。

本研究采用的 lentiCRISPR v2.0 是 CRISPR/Cas9 系列中改进的单质粒系统^[14],质粒上同时含有 *Cas9* 基因序列以及 sgRNA 的酶切位点,可经过一轮转染得到目的细胞以加快进程,而且该质粒同 样适用于原代细胞转染^[15]。本研究从序列评分中设计的 5 对 sgRNA,经过质粒酶切、连接、鉴定、 感染、筛选等步骤构建获得了含有两条不同 sgRNA 的 lentiCRISPR-Cas9-*PTGS2* 细胞,对 COX-2 蛋 自敲低效率分别为 51.0%和 26.5%;另有文献报道,可以通过向目的细胞分次转染多个插有不同 sgRNA 序列的质粒来提高目的基因剪切敲除效率^[16]。此外,为了排除 CRISPR/Cas9 技术潜在"靶外 效应"的影响,本研究中还在构建的 Cas9-*PTGS2* 敲低表达细胞中瞬时转染野生型 COX-2 表达进行回 补实验,验证了靶向 COX-2 干预对肝细胞中 yH2AX 蛋白的表达、以及油红 O 染色阳性脂质分布和 含量增加的恢复作用,进一步证实了 COX-2 诱导表达和干预在介导肝细胞 DNA 损伤和脂质蓄积中 的潜在关联性。

目前国内外研究中, COX-2 表达的干预多集中在选择性抑制剂,如塞来昔布、白藜芦醇、非甾体类抗炎药上。有研究发现,塞来昔布与非甾体类抗炎药在抑制 COX-2 的同时会引起肝功能指标改变的副作用^[8];白藜芦醇除了抑制 COX-2 外,还存在抵抗氧化损伤、抑制肿瘤增殖等特异性不高的问题^[11]。本研究构建的特异性靶向 *PTGS2* 基因的 Cas9-*PTGS2* 敲低细胞中,敲低 COX-2 时未见对 COX-1 表达产生明显影响,且在敲低细胞中可通过靶向回补的方式使野生型 COX-2 表达部分回升和 进行功能效应调节。因此,在降低 *PTGS2* 的靶外效应、提高特异性方面显现出优势,为其应用于 COX-2 调控机制和实验研究提供了新策略。

AFB1 是国际癌症研究组织(IARC)划定为 I 类致癌物,通过 CYP3A4 等代谢形成 AFB1-8,9-环氧 化物,继而与 DNA 共价结合形成 AFB1-DNA 加合物,造成各种形式的 DNA 损伤。组蛋白 H2AX 磷酸化产生的 γH2AX 可作为反映 DNA 双链断裂和修复的一种生物标志物,其水平增高提示细胞核 DNA 损伤的发生^[17]。本研究中,AFB1 急性暴露可显著改变 *CYPs* mRNA 与 γH2AX 水平,验证了 AFB1 被代谢活化而诱导细胞核 DNA 双链损伤的毒性作用。进一步分析发现,COX-2 敲低表达可以

部分抑制 γH2AX 形成,并在 Cas9-PTGS2 敲低细胞中回补野生型 COX-2 后 γH2AX 水平升高,说明 COX-2 的诱导表达参与了 AFB1 暴露引发 DNA 损伤的调节作用^[18]。

有研究表明,塞来昔布通过抑制 COX-2 可以增加线粒体中脂肪酸的 β 氧化,减少由高脂饮食引 起的非酒精性脂肪肝的脂肪变性和炎症^[5];在鸡肝细胞中,AFB1 暴露诱导 COX-2 表达,引起肝脏 炎症与脂质蓄积;FABP1 主要介导肝脏中脂肪酸的摄取;PPARγ 是一类由配体激活的核转录因子, 参与糖类和脂类合成过程,多种降脂类及抗糖尿病药物以其作为治疗靶点^[19]。Fujimori 等^[20]发现, 在烟酸处理的小鼠 3T3-L1 细胞中,COX-2 表达和 PGF2α 表达量上升,从而抑制 CCAAT 增强子结 合蛋白 C/EBPβ 介导的激活作用,增高 PPARγ 表达而促进脂肪形成;同时会产生活性氧导致 DNA 的损伤^[21]。Zheng 等^[22]研究表明,PPARγ 抑制剂延缓了宫颈癌细胞中 γH2AX 的形成。三磷酸腺苷 结合盒转运体 A1 (ABCA1)是一种重要的膜蛋白转运体,能介导细胞内胆固醇流出;而 DNA 损伤会 影响 ABCA1 的转录与表达,抑制胆固醇流出,最终促进细胞内脂质的蓄积^[23]。本研究通过油红 O 染色发现 COX-2 敲低表达可使 AFB1 引起的脂质分布减少和密度降低,在 Cas9-*PTGS2* 敲低细胞中 回补野生型 COX-2 后脂质密度回升。同时,AFB1 可引起肝细胞 FABP1 和 PPARG mRNA 水平上升, 说明 AFB1 可通过 FABP1 和 PPARγ 促进肝细胞脂质蓄积,而在 Cas9-*PTGS2* 敲低细胞中, *PPARG* mRNA 水平下降,但 *FABP1* mRNA 水平无显著变化,暗示 COX-2 可能通过 PPARγ 而非 FABP1 调 控AFB1引起的肝细胞脂质蓄积。蛋白水平检测也证明COX-2 介导了 AFB1 引起的肝细胞脂质蓄积。

综上可得出结论: AFB1 作用于肝细胞经过 CYP450 代谢酶代谢活化产生毒性效应,通过诱导 COX-2 表达上调 PPARγ 水平,启动脂质代谢失稳态并导致细胞核双链 DNA 损伤,而 DNA 修复障 碍会进一步加剧脂质蓄积。本研究通过 CRISPR/Cas9 技术靶向基因干预使 COX-2 敲低表达,可以 有效抑制 AFB1 引发的肝细胞 DNA 损伤和脂质代谢失调,为靶基因编辑细胞模型的构建及其应用于 外源化学物诱导肝毒性的机制探讨和安全性评价提供了更理想的研究工具。

参考文献:

[1] KENSLER T W, ROEBUCK B D, WOGAN G N, et al. Aflatoxin: a 50-year odyssey of mechanistic and translational toxicology[J]. Toxicol Sci, 2011, 120(Suppl 1): S28-48.

[2] LIU Y, WANG W. Aflatoxin B1 impairs mitochondrial functions, activates ROS generation, induces apoptosis and involves Nrf2 signal pathway in primary broiler hepatocytes[J]. Anim Sci J, 2016, 87(12): 1490-1500.

[3] SMIT E, SOUZA T, JENNEN D G, et al. Identification of essential transcription factors for adequate DNA damage response after benzo(a)pyrene and aflatoxin B1 exposure by combining transcriptomics with functional genomics[J].

Toxicology, 2017, 390: 74-82.

[4] ROTIMI O A, ROTIMI S O, DURU C U, et al. Acute aflatoxin B1-Induced hepatotoxicity alters gene expression and disrupts lipid and lipoprotein metabolism in rats[J]. Toxicol Rep, 2017, 4: 408-414.

[5] COPPOLA M, GLINNI D, MORENO M, et al. Thyroid hormone analogues and derivatives: actions in fatty liver[J].World J Hepatol, 2014, 6(3): 114-129.

[6] MARTIN-SANZ P, CASADO M, BOSCA L. Cyclooxygenase 2 in liver dysfunction and carcinogenesis: facts and perspectives[J]. World J Gastroenterol, 2017, 23(20): 3572-3580.

[7] LEE J S, YOO J, KIM H, et al. Tumor stroma with senescence-associated secretory phenotype in steatohepatitic hepatocellular carcinoma[J]. PLoS One, 2017, 12(3): e0171922.

[8] ALI A H, WAHEED A, FAKHREDDIN J, Drug-disease interaction: effect of inflammation and nonsteroidal anti-inflammatory drugs on cytochrome P450 metabolites of arachidonic acid[J]. J Pharm Sci, 2018, 107(2): 756-763.

[9] SHALEM O, SANJANA N E, HARTENIAN E, et al. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells[J].

Science, 2014, 343(6166): 84-87.

[10] JINEK M, JIANG F, TAYLOR D W, et al. Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation[J]. Science, 2014, 343(6176): 1247997.

[11] ZHOU T J, ZHANG S L, HE C Y, et al. Downregulation of mitochondrial cyclooxygenase-2 inhibits the stemness of nasopharyngeal carcinoma by decreasing the activity of dynamin-related protein 1[J]. Theranostics, 2017, 7(5): 1389-1406.
[12] FLYNN R A, ZHANG Q C, SPITALE R C, et al. Transcriptome-wide interrogation of RNA secondary structure in living cells with icSHAPE[J]. Nat Protoc, 2016, 11(2): 273-290.

[13] WAN Y, QU K, ZHANG Q C, et al. Landscape and variation of RNA secondary structure across the human transcriptome[J]. Nature, 2014, 505(7485): 706-709.

[14] SANDER J D, JOUNG J K. CRISPR-Cas9 systems for editing, regulating and targeting genomes[J]. Nat Biotechnol, 2014, 32(4): 347-355.

[15] SANJANA N E, SHALEM O, ZHANG F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening[J]. Nat Methods, 2014, 11(8): 783-784.

[16] HAEUSSLER M, SCHONIG K, ECKERT H, et al. Evaluation of off-target and on-target scoring algorithms and integration into the guide RNA selection tool CRISPR[J]. Genome Biol, 2016, 17(1): 148.

[17] ISHII Y, KURODA K, MATSUSHITA K, et al. Phosphorylation of protein phosphatase 2A facilitated an early stage of chemical carcinogenesis[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 336: 75-83.

[18] AROOR, LOWERY J R, RICARDO J R, et al. A proteomic analysis of liver after ethanol binge in chronically ethanol treated rats[J]. Proteome Sci, 2012, 10(1): 29.

[19] SOLCAN C, GOGU M, FLORISTEAN V, et al. The hepatoprotective effect of sea buckthorn (Hippophae rhamnoides) berries on induced aflatoxin B1 poisoning in chickens 1[J]. Poult Sci, 2013, 92(4): 966-974.

[20] FUJIMORI K, AMANO F. Niacin promotes adipogenesis by reducing production of anti-adipogenic PGF2α through suppression of C/EBPβ-activated COX-2 expression[J]. Prostaglandins Other Lipid Mediat, 2011, 94(3/4): 96-103.

[21] GRYGIEL G B. Peroxisome proliferator-activated receptors and their ligands: nutritional and clinical implications-a review[J]. Nutr J, 2014, 13:17.

[22] AN Z, YU J R, PARK W Y. T0070907 inhibits repair of radiation-induced DNA damage by targeting RAD51[J].Toxicol *In Vitro*, 2016, 37:1-8.

[23] 唐艳艳. EZH2 介导 ABCA1 启动子区域 DNA 和组蛋白甲基化促进动脉粥样硬化进展[D].南华大学, 2014: 15-16.

Effects of COX-2 Knockdown using CRISPR/Cas9 on Nuclear DNA Damage and Lipid Accumulation in AFB1-induced Hepatocytes

HAN Peiyu, CHE Lin, CHEN Yuanyuan, JIANG Shan, DUAN Junyan, SUN Baofang, HE Chengyong, LIN Yuchun, LIN Zhongning^{*}

(State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostics, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: To investigate the relationship between aflatoxin B1 (AFB1)-induced nuclear DNA damage and lipid accumulation in hepatocytes, the lentiviral plasmids were used as the vector to construct recombinant plasmids containing the targeting cyclooxygenase 2 (COX-2) gene (*PTGS2*) small guide RNA (sgRNA) using CRISPR/Cas9 technique. The recombinant plasmids were packaged with pseudovirus to infect HepG2 cells. Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) and Western blot (WB) detection of *PTGS2* mRNA and COX-2 protein levels showed that *PTGS2* mRNA and protein levels

in HepG2-Cas9-*PTGS2* cells reduced to (49.1±1.8)% and (48.1±0.7)%, respectively, compared with HepG2-Cas9-NC control cells. After these cells were treated with AFB1, the level of γ H2AX, a DNA damage marker, was detected using WB and immunofluorescence (IF). The results showed that the level of γ H2AX and fluorescence foci were significantly lower in HepG2-Cas9-*PTGS2* cells than in HepG2-Cas9-NC cells (p<0.05). Lipid synthesis related experiments revealed that PPAR γ protein expression, total cholesterol (TC), total triglyceride (TG) levels, and Oil Red O staining positive cells were significantly lower in HepG2-Cas9-NC cells (p<0.05). Furthermore, the level of COX-2, γ H2AX, and lipid in AFB1-treated HepG2-Cas9-*PTGS2* cells increased after being rescued by wide type COX-2 expression (p<0.05). In summary, COX-2 knockdown HepG2-Cas9-*PTGS2* cells were successfully constructed using CRISPR/Cas9 technique. COX-2 knockdown significantly inhibited AFB1-induced hepatocytes DNA damage and lipid accumulation. The successful construction of HepG2-Cas9-*PTGS2* cells provides an ideal research tool for studying the mechanism of COX-2 in hepatotoxicity induced by xenobiotics such as AFB1.

Key words: CRISPR/Cas9; cyclooxygenase 2; aflatoxin B1; nuclear DNA damage; lipid accumulation