

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.05.001

• 基础研究 •

Etk 敲除及过表达细胞株构建并探讨 Etk 对细胞增殖的影响*

苏 宏 李 钊 刘婷婷 陈超飞 王 敏[△]

(中山大学附属第一医院转化医学中心 广东 广州 510000)

摘要 目的:利用 CRISPR-Cas9 技术在人脐静脉内皮细胞(Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)中构建 Etk(Epithelial and endothelial tyrosine kinase)敲除稳定细胞株以及利用慢病毒构建 Etk 过表达稳定细胞株,并初步探讨 Etk 基因对 HUVECs 细胞增殖的影响。**方法:**利用 CRISPR-Cas9 技术,使用在线工具设计针对 Etk 的 sgRNA (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>)。将 sgRNA 利用连接酶整合到病毒载体中,包被病毒并感染 HUVECs 敲除 HUVECs 中的内源性 Etk。利用嘌呤霉素筛选得到 Etk 敲除的稳定细胞株。PCR 扩增 Etk 基因序列,将其整合到 pLEX-MCS 慢病毒过表达载体中构建 Etk 过表达重组质粒。包被病毒并感染 HUVECs,在 HUVECs 中过表达 Etk,利用嘌呤霉素筛选得到 Etk 过表达的稳定细胞株。利用 qRT-PCR 和 Western-Blotting 检测 Etk 的敲除和过表达情况。利用 CCK-8 盒子检测两种稳定细胞株细胞增殖情况。**结果:**利用 CRISPR-Cas9 技术有效的敲除 HUVECs 中内源性 Etk,同对照相比,Etk 的 mRNA 和蛋白水平显著地降低($P<0.01$)。同时利用慢病毒在 HUVECs 中过表达 Etk,同对照相比,在过表达 Etk 稳定细胞株中 Etk 的 mRNA 和蛋白表达显著上调($P<0.01$)。CCK-8 检测发现,Etk 敲除降低细胞增殖能力;而 Etk 过表达增加细胞增殖能力。**结论:**通过 CRISPR-Cas9 技术成功在 HUVECs 中敲除 Etk,利用慢病毒过表达系统成功的在 HUVECs 中过表达 Etk,并且初步验证了 Etk 促进 HUVECs 细胞增殖。

关键词:Etk;CRISPR-Cas9 敲除;慢病毒过表达;细胞增殖

中图分类号:R-33;Q785 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)05-801-07

Construction of Etk Knockout and Overexpression Cell Strains and Investigation for the Effect of Etk on HUVECs Proliferation*

SU Hong, LI Zhao, LIU Ting-ting, CHEN Chao-fei, WANG Min[△]

(Department of translational medicine, The First Affiliated Hospital Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong, 510000, China)

ABSTRACT Objective: In order to study the function of Etk in HUVECs proliferation, we created Etk knockdown cell strain by CRISPR-Cas9 and build Etk overexpression cell strain by lentivirus transfection. **Methods:** According to CRISPR-Cas9 method, sgRNAs of Etk were designed by the online tool (<https://chopchop.rc.fas.harvard.edu/>). After cloned into a lentivirus vector and packaged into lentivirus, sgRNA were delivered into HUVECs by lentivirus transfection. Etk knockdown cell strain was selected by puromycin. The CDS sequence of Etk was amplified by PCR and cloned into LentiORF pLEX-MCS vector. After packaged into lentivirus and transfection into HUVECs, Etk overexpression cell strain was selected by puromycin. qRT-PCR and Western Blotting were used to analyze the mRNA and protein level of Etk in Etk knockdown and overexpression cell strains. Meanwhile, CCK-8 kit was used to examined cell proliferation in these two cell strains. **Results:** CRISPR-Cas9 knockdown significantly decreased Etk expression in HUVECs. The mRNA and protein levels of Etk were markedly decreased ($P<0.01$) in Etk knockdown cell strain compared to its control cell strain. The mRNA and protein levels of Etk were significantly increased in Etk overexpression cell strain compared to its control cell strain ($P<0.01$). Regarding CCK-8 analysis, Etk knockdown decreased cell proliferation while Etk overexpression increased cell proliferation. **Conclusions:** We used CRISPR-Cas9 to create Etk knockdown cell strain and lentivirus system to creat Etk overexpression cell strain in HUVECs. In addition, we proved that Etk promotes HUVECs proliferation.

Key words: Etk; CRISPR-Cas9 Knockdown; Lentivirus overexpression; Cell proliferation

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q785 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)05-801-07

前言

近年来,随着生活水平不断提高和人口老龄化趋势加剧,心血管疾病的发病率和死亡率呈现出上升和年轻化的趋势^[1]。

* 基金项目:国家自然科学基金重大研究计划培育项目(91539110)

作者简介:苏宏(1994-),男,硕士研究生,主要研究方向:心血管疾病,电话:15521478820,E-mail: suh2408@outlook.com

[△] 通讯作者:王敏,教授,主要研究方向:心血管疾病,E-mail: 1256830791@qq.com

(收稿日期:2019-12-19 接受日期:2020-01-12)

血管内皮细胞与血管功能密切相关^[2]。近些年的研究发现 Etk 在调节心脏功能、心肌重塑以及血管生成方面发挥着重要作用^[3,4]。

Etk 高表达于主动脉内皮细胞中^[5]。是 Tec 非受体酪氨酸家族中的成员之一。Etk 是由 PH、TH、SH3、SH2 和 kinase domain 结构域组成,不同的结构域调控其不同功能^[6,7]。通过不同的结构域与不同的分子结合,Etk 调控不同的信号通路从而参与细胞增殖、凋亡等病理生理活动^[8-10]。

CRISPR-Cas9 是近年来发展迅速的基因编辑技术。基因修饰率高,可以实现对基因敲除和插入的多种修饰。Cas9 通过结合 sgRNA,识别切割目的基因的靶点序列,造成 DNA 双链断裂,最终达到敲除目的基因的效果^[11]。本研究通过 CRISPR-Cas9 基因敲除技术和慢病毒过表达技术,分别在 HUVECs 中构建 Etk 敲除和过表达的细胞模型,探究 Etk 在调节内皮细胞增殖方面的作用,为探究 Etk 调节内皮细胞功能的众多分子机制研究提供实验依据和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株、质粒 本实验中用到的 HUVECs、293T 细胞以及感受态细胞均来自中山大学附属第一医院转化医学中心。实验所用到的质粒 LentiCRISPR V2 敲除质粒以及 LentiORF pLEX-MCS 过表达质粒均由本实验室构建。

1.1.2 试剂、抗体、仪器 DMEM 培养基、ECM 培养基、胎牛血清(FBS)、DPBS、0.25%胰酶、双抗和嘌呤霉素均购买自美国 Gibco 公司;琼脂糖胶试剂、PVDF 膜、Lipofectamine 3000 Transfection Reagent、免疫荧光二抗、含 DAPI 封片剂以及化学发光液购买自美国 Invitrogen 公司;RIPA 裂解液购买自碧云天生物公司;BCA 蛋白定量试剂盒购买自 Takara 日本公司;1.5 M Tris-HCL (pH 8.8)、0.5 M Tris-HCL (pH 6.8)和标准分子量蛋白预染 Marker 购买自美国 Bio-Rad 公司;30%聚丙烯酰胺和 Tween 20 购买自美国 Sigma 公司;Anti-Etk、Anti-β-Actin 单克隆抗体和 HRP 二抗购买自美国 CST 公司;RNA 转录试剂盒购买自金全生物技术公司;Fast SYBR Green Master Mix 购买自美国 Applied Biosystems 公司;Cell Counting kit-8 (CCK-8)试剂盒购买自日本同仁公司。二氧化碳培养箱、Nanodrop 分光光度计购买自美国 ThermoFisher 公司;Western Blotting 电泳及转膜设备购买自 Bio-Rad 公司;共聚焦显微镜 ZEISS LM880 购买自德国卡尔蔡司公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养和传代 HUVECs 在 55 cm² 的培养皿中进行培养,采用 ECM 培养基,培养基中含有 10%胎牛血清,1%青链霉素,培养基中加入内皮细胞生长因子 ECGS。细胞在 37℃,含 5% CO₂ 的条件下进行培养。细胞每隔 48 小时更换一次培养基,待细胞生长至 90%融合度进行传代。细胞传代首先吸去培养基,加入 2 mL DPBS 清洗一次,加入 1 mL 0.25%胰酶消化 20-30 s,加入 2 mL 胎牛血清终止消化,轻轻吹打收集细胞到离心管中。1000 rpm 室温离心 3 分钟后吸去上清,加入新鲜培养基,用移液枪轻轻吹打重悬细胞,按照 1:3 的比例将细胞均匀的接种到新的培养皿中。293T 细胞采用 DMEM 基础培养基,培养基含有 10%胎牛血清以及 1%青链霉素。每隔 48-72 小时

更换新鲜培养基。细胞生长至 90%融合度时进行细胞传代和病毒包装。

1.2.2 重组载体构建和质粒转染 实验室利用 CRISPR-Cas9 技术进行基因敲除实验,成功建立了完整的实验流程^[12,13]。在 sgRNA 设计网站 chopchop (<https://chopchop.cbu.uib.no/>) 输入 Etk 的基因信息,选择基因敲除功能。选取 3 条网站评分最高的针对 Etk 的 sgRNA 序列,序列见表 1。在 sgRNA 序列两端分别加入 *BsmB* I 的酶切位点产生粘性末端,将设计序列送至公司合成。将合成的双链 sgRNA 退火。55℃水浴情况下利用 *BsmB* I 核酸限制酶酶切 LentiCRISPR V2 载体 3 小时产生与 sgRNA 相同的粘性末端;将退火产物与酶切后的载体混合,37℃利用 T4 DNA 连接酶反应 1 小时。将连接产物转化到感受态细胞 Stbl3 后培养在氨苄抗性的 LB 培养板中,培养 12 小时后挑取单克隆菌落进行基因测序。选取测序正确序列,菌液大摇提取质粒。

293T 细胞生长至 90%融合度,Opti-MEM 培养基稀释包装质粒 VSVG、psPAX2、TAT3、HEPACAM2 以及携带有 sgRNA 序列的载体质粒,Lipo3000 作为助转染试剂。同时将 LentiCRISPR V2 作为空载对照组被慢病毒。转染 48 h 后收集上清,4℃,3000×g 离心 15 分钟去除细胞碎片,0.45 μm 过滤器过滤病毒液,收集病毒液感染 HUVECs。在 21 cm² 培养皿中分别加入 2 mL 病毒液和 2 mL ECM 培养基,加入 ploybrene (8 μg/μL)增强转染效果。48 小时后细胞传代并更换为新鲜的 ECM 培养基,培养基中加入浓度为 1 μg/μL 的嘌呤霉素筛选慢病毒表达成功的细胞,筛选持续三天。qRT-PCR 和 Western Blotting 验证 sgRNA 的敲除效果。

利用 LentiORF pLEX-MCS 系统构建 Etk 野生型基因过表达载体。依据 NCBI 数据库设计扩增 Etk CDS 的正向和反向引物。在引物的 5'端分别加入 *NotI* 与 *MluI* 的保护碱基和酶切位点,序列信息见表 2。以现有质粒 Etk (E42K)为模板,利用 PCR 反应扩增 Etk 的 CDS 区域。琼脂糖凝胶检测 PCR 反应结果,切胶回收与目的基因大小相近的凝胶。同时利用 *NotI* 与 *MluI* 对过表达载体 pLEX 和切胶回收的 PCR 产物进行双酶切。酶切后将酶切过的 PCR 产物与酶切过的 pLEX 载体混合,利用 T4 DNA 连接酶进行连接。将连接产物转化到感受态细胞 Stbl3 中,在氨苄培养板培养 12 小时后挑取单克隆菌落扩增。利用测序鉴定连接的载体,扩增测序正确的单克隆菌液并提取质粒。利用 Etk 过表达载体质粒以及过表达系统辅助质粒 VSVG, pCMV delta R8.2 包装慢病毒病感染 HUVECs,筛选 Etk 过表达细胞株,方法如 Etk 敲除慢病毒包装、细胞感染和筛选所示。

1.2.3 qRT-PCR 和 Western Blotting 检测 Etk 敲除和过表达的 mRNA 和蛋白表达 将经过嘌呤霉素筛选后的 HUVECs 接种到 6 孔板内进行培养,细胞培养 48 小时后利用 Trizol 提取总 RNA。测 RNA 浓度,利用 Takara 逆转录试剂盒将 RNA (1 μg) 逆转录成 cDNA。设计 Etk 以及内参基因 β-Actin 引物,见表 3。利用 qRT-PCR 检测 Etk 表达情况。体系为 SYBR-Green 10 μL、稀释后的 cDNA 8 μL、正反向引物 (10 μM) 各 1 μL。每个样品设置 3 个复孔,实验重复 3 次以上。qRT-PCR 程序设置为 95℃ 20 s,95℃ 3 s,60℃ 30 s,后两步设置 40 个循环。设置溶解曲线程序为 95℃ 15 s,60℃ 60 s,95℃ 15 s。应用 2^{-ΔΔCt} 法分

析基因 mRNA 相对表达量。qPCR 实验均重复至少 3 次。将数据导入统计软件 GraphPad Prism 进行统计学差异分析。

取经过嘌呤霉素筛选后的 HUVECs 接种到 6 孔板内进行培养,培养 48 小时后加入适量的细胞裂解液 RIPA、蛋白酶抑制剂 PMSF 裂解细胞。4 ℃,12000× g 离心收集细胞裂解液上清。BCA 法测蛋白浓度,计算上样量保持上样总蛋白一致。加入 2× Loading buffer 将蛋白 100 ℃煮沸 10 分钟。用 8%的 SDS-PAGE 凝胶进行蛋白电泳,加入标准蛋白样品 Marker 指示大小。电泳程序设置为 80 V 25 分钟,然后转为 130 V 60 分钟电泳。电泳结束后进行转膜,转膜程序设置为 4 ℃ 100 V 120 分钟。转膜结束后用 5%的 BSA 浸泡封闭 PVDF 膜 1 小时。封闭结束后一抗孵育,将抗体按照 1:1000 的比例进行稀释。将膜在室温下孵育 1 个小时后转入 4 ℃孵育过夜。一抗孵育过夜后用含 Tween 的 TBST 洗膜 3 次,每次洗 5 分钟。1:2000 稀释二抗,二抗室温孵育 1 小时。1 小时后 TBST 洗膜三次,每次洗 5 分钟。在膜上相应的位置滴加曝光液后进行曝光。Western-Blot 实验均重复至少 3 次。利用软件 Image J 对曝光条带进行灰度分析。将灰度分析数据导入统计软件 GraphPad Prism 进行统计学差异分析。

1.2.4 免疫荧光检测 Etk 敲除和过表达 将爬片从 75%酒精中取出置于 24 孔板中,PBS 清洗 3 次。孔中加入 400 μL 0.1% 明胶以及 4 μL Fibronectin,将培养板放在培养箱中孵育 2 小时。2 小时后吸去明胶,每个孔中接种 1×10^5 细胞,,细胞培养 48 小时。培养结束后,吸去培养基,加入 DPBS 清洗 3 次。加入

500 μL 4%多聚甲醛固定 30 分钟。固定结束后 PBS 清洗 3 次,每次 5 分钟。然后在孔中加入 500 μL 0.1% Triton-100X 透化处理 5 分钟。吸去透化液并用 PBS 清洗爬片 3 次,每次 5 分钟。接下来每孔加入 500 μL 1% BSA 封闭 30 分钟。封闭结束后每孔加入 50 μL Anti-Etk 抗体,4 ℃孵育过夜。一抗过夜后用 PBS 清洗爬片 3 次,每次 5 分钟。之后避光室温孵育二抗 1 小时,后面的过程一直保持避光。同样孵育结束后用 PBS 清洗爬片 3 次,每次 5 分钟。接下来,用含有 DAPI 的封片剂封片。最后共聚焦显微镜进行拍照。

1.2.5 CCK-8 检测 HUVECs 增殖 首先将 Etk 敲除和 Etk 过表达细胞以及对照组细胞离心重悬制成细胞悬液。利用细胞计数仪进行计数。分别在 96 孔板中接种 1×10^4 个细胞 (100 uL 培养基),每组细胞设置 3 个复孔。分别在细胞接种后的 0 小时、12 小时、24 小时、48 小时、72 小时的时间点用 CCK-8 法在 450 nm 波长测量各孔的 OD 值。实验均重复至少 3 次。

1.3 统计学分析

利用统计软件 GraphPad Prism 8.0.1 对所有实验数据进行统计分析。实验数据均重复 3 次以上,数据表示为均数±标准差($\bar{x} \pm s$)的形式。组间比较采用的检验方法为 t 检验,检验水准 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 CRISPR-Cas9 敲除 Etk 和慢病毒构建 Etk 过表达载体质粒测序鉴定

表 1 Etk sgRNA 序列
Table 1 The sgRNA Sequence of Etk

sgRNA	Sequence (5'-3')	
sgRNA1	Forward	GGTACTTGACCAGCAGGTGG
	Reverse	CCACCTGCTGGTCAAGTACC
sgRNA2	Forward	AGATGGTGTCCGATGCCAGG
	Reverse	CCTGGCATCGGACACCATCT
sgRNA3	Forward	TTGAGAACAGGAACTGCCCG
	Reverse	CGGGCAGTTCCTGTTCTCAA

表 2 Etk PCR 引物序列
Table 2 The PCR primer sequence of Etk

Gene	Sequence (5'-3')	
Etk	Forward	TTGCGGCCGCGCCACCATGGATACAAAATCTATTCTAGAA
	Reverse	GACGCGTTCAATGCTTGTCTTTTCCCGAAGT

表 3 Etk qRT-PCR 引物序列
Table 3 The qRT-PCR primer sequence of Etk

Gene	Sequence (5'-3')	
Etk	Forward	GCA TGGCCTTCTTGGAGAGT
	Reverse	CCTCTGGAGCTGACCACTTG
β-Actin	Forward	CTGTCCACCTTCCAGCAGATGT
	Reverse	TGTCACTTCACCGTTCCAGTT

表 4 pLEX-MCS 载体测序引物

Table 4 The sequencing primers of Plex-MCS Vector

Gene	Sequence (5'-3')
pLEX-MCS	
Forward	CACCAAAATCAACGGGACTT
Reverse	ATATAGACAAACGCACACCGGCCT

将退火后的双链 sgRNA 与酶切过的 LentiCRISPR V2 载体用 T4 DNA 连接酶连接,以 U6 启动子作为测序引物进行测序(通用引物,测序公司提供)。将 sgRNA 序列与测序结果对比,如图 1 A 所示,sgRNA 均正确插入到 LentiCRISPR V2 载体中。

设计引物合成 Etk 的 CDS,引物 5' 端加入 *NoI* 与 *MluI* 的保护碱基和酶切位点。利用 KOD-Plus-Neo 高保真 PCR 酶进行 PCR 反应,反应结束后将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。Etk 的 CDS 区包含 2028bp,电泳条带见图 1 B,PCR 产物大小

和 Etk 的 CDS 大小相符。回收纯化琼脂糖凝胶中的 DNA 条带。用核酸内切酶 *NoI* 与 *MluI* 双酶切回收产物和慢病毒过表达质粒 LentiORF pLEX-MCS。利用 T4 DNA 连接酶连接酶切后的 Etk PCR 产物与酶切后的 pLEX 载体。将连接产物转化到 *Stb13* 感受态细胞中培养。挑取阳性单克隆测序,测序正反向引物见表 4。测序结果与 NCBI 数据库中 Etk 的 CDS 序列 Blast,序列达到 99% 的匹配(2027/2028),见图 1 C。其中,第 42 位的谷氨酸(E)突变为赖氨酸(K)可以增强 Etk 的膜结合能力^[14,15]。

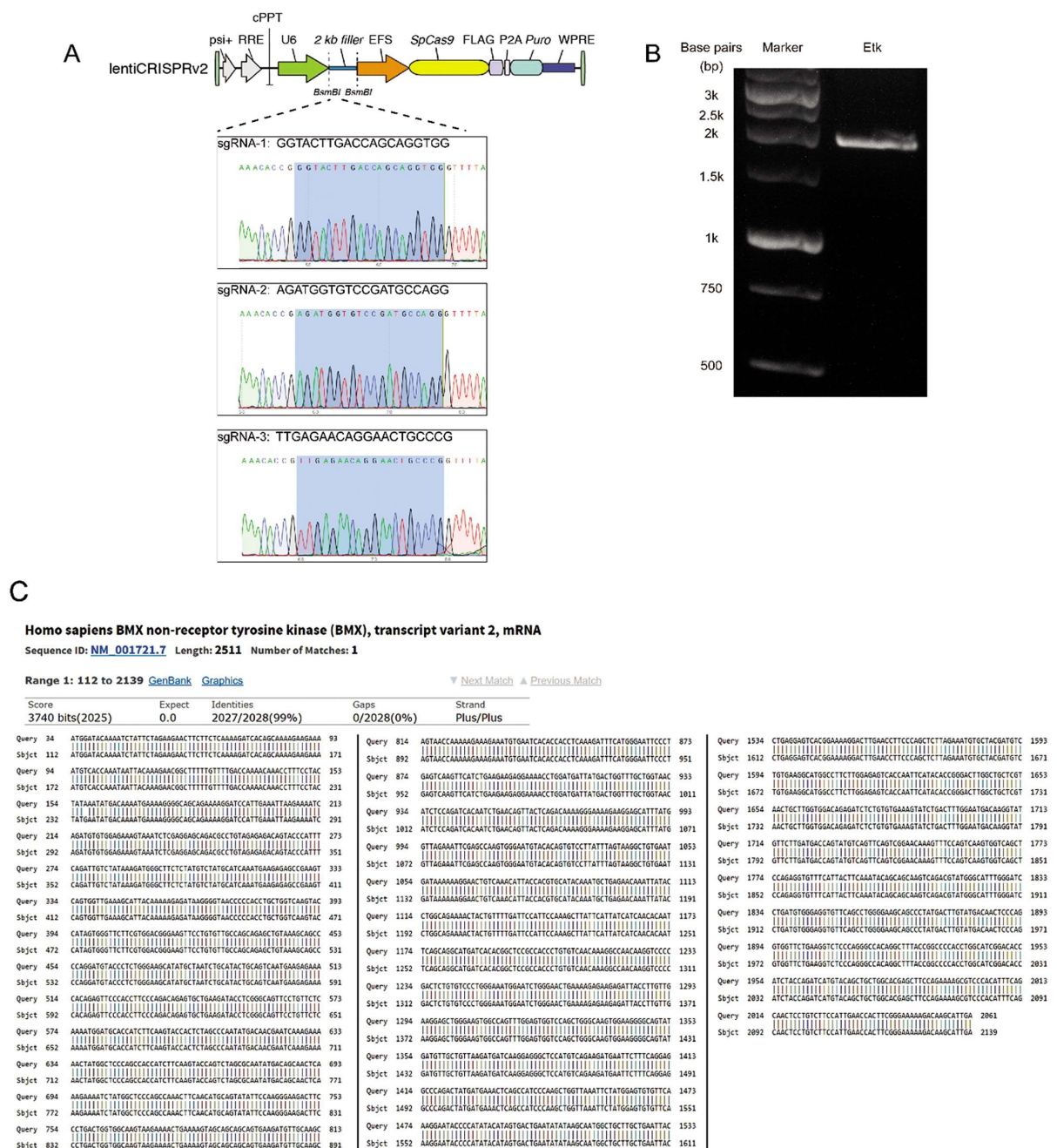


图 1 A. Etk sgRNA 靶点位置和测序信息; B. Etk PCR 产物凝胶电泳图; C. Etk 基因 Blast 结果

Fig. 1 A: Identification of the sgRNA target of Etk and sequence result; B: Agarose gel electrophoresis of the Etk PCR product; C: The gene of Etk blast result

2.2 检测 Etk 在敲除和过表达 HUVECs 中的表达

利用 qRT-PCR 和 Western Blotting 检测 Etk 在 HUVECs 中的敲除和过表达效果。如图 2 A 所示, 同对照组相比, 在 CRISPR-Cas9 敲除组细胞中 Etk 的 mRNA 表达水平显著下降 ($P<0.01$)。Western Blotting 结果显示, 在 Etk 敲除组细胞中 Etk 的蛋白表达水平显著降低 ($P<0.01$), 见图 2 B。图 2A-B 证明 CRISPR-Cas9 有效的敲除 HUVECs 中内源性的 Etk。同样利用 qRT-PCR 和 Western Blotting 检测 Etk 在 Etk 过表达 HUVECs 中的水平。如图 3 A qRT-PCR 结果显示, 相比转染空载体的对照组, 转染 Etk 野生型的实验组细胞中 Etk 的 mRNA 表

达水平显著上升 ($P<0.01$)。Western Blotting 结果显示在 Etk 过表达的 HUVECs 中 Etk 的蛋白表达水平显著上升 ($P<0.01$), 见图 3 B。图 3 A-B 说明我们利用慢病毒系统在 HUVECs 中有效的过表达了 Etk 基因。为了进一步验证 Etk 在敲除和过表达 HUVECs 中的表达变化, 我们利用免疫荧光检测 Etk 在对照细胞、Etk 敲除和 Etk 过表达 HUVECs 中的表达情况。如图 4 A 所示, 同对照细胞相比, Etk 在敲除细胞中的表达显著降低。而在慢病毒过表达 Etk 的 HUVECs 中 Etk 表达量显著上升, 见图 4 B。综上, 我们利用多种实验方法证明 Etk 敲除和过表达 HUVECs 构建成功。

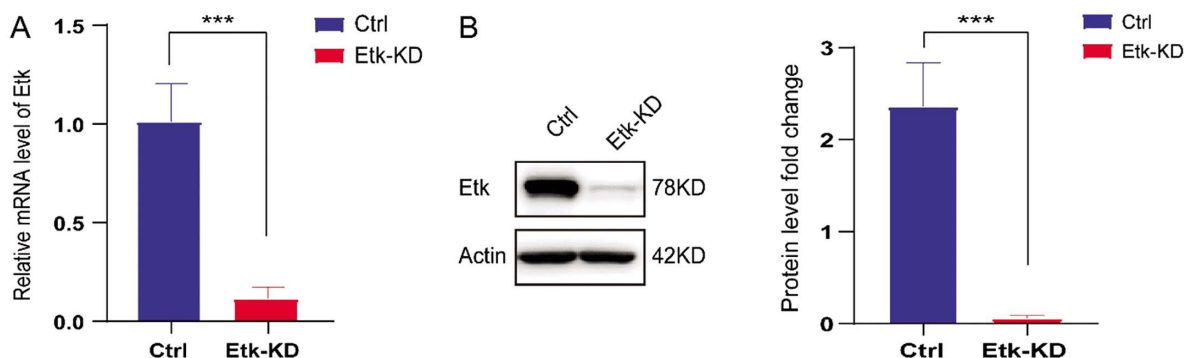


图 2 A. qRT-PCR 检测 HUVECs 中 Etk 敲除后 Etk mRNA 的水平变化 (***) $P<0.01$);

B. Western Blotting 检测 HUVECs 中 Etk 的敲除效果 (***) $P<0.01$)

Fig.2 A: The mRNA level of Etk was quantified by qRT-PCR in HUVECs in Etk knockdown HUVECs (***) $P<0.01$);

B: The protein level of Etk by Western Blotting in Etk knockdown HUVECs (***) $P<0.01$)

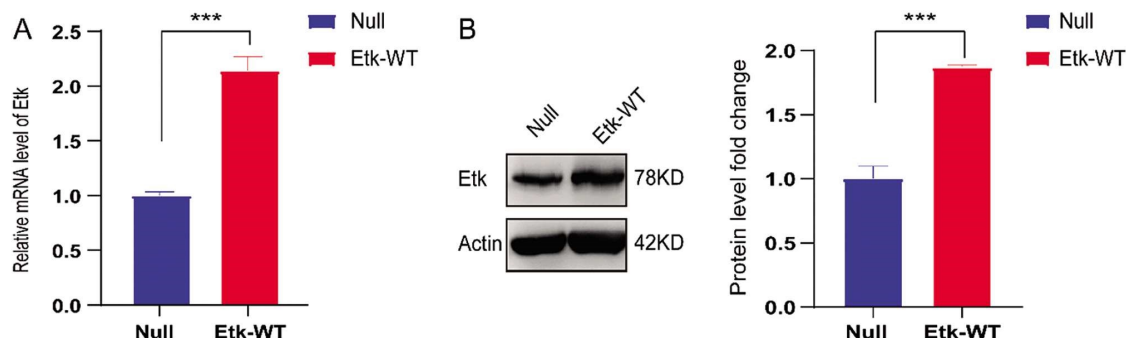


图 3 A. qRT-PCR 检测 Etk 的 mRNA 表达情况 (***) $P<0.01$); B. Western Blotting 检测 Etk 的蛋白表达情况 (***) $P<0.01$)

Fig.3 A: The mRNA expression of Etk by qRT-PCR (***) $P<0.01$); B: The protein level of Etk by Western Blotting (***) $P<0.01$)

2.3 敲除 Etk 和过表达 Etk 对 HUVECs 增殖的影响

利用 CCK-8 法检测细胞增殖情况, 将不同组细胞接种至 96 孔板中。分别在接种后的 0 小时、12 小时、24 小时、48 小时、72 小时的时间点用 CCK-8 法测量各孔的 OD 值。在每个时间点设置 3 个复孔, 分别对比 Etk 敲除细胞与对照细胞和 Etk 过表达细胞与对照细胞的细胞增殖情况。如图 5 A, 相比对照组 Etk 敲除组在 12 小时后细胞的增殖能力明显减弱 ($P<0.01$)。相比于对照组, Etk 过表达组在 48 小时后细胞的增殖能力明显增强 ($P<0.01$), 如图 5 B。Etk 敲除降低 HUVECs 增殖能力, 而 Etk 过表达增加 HUVECs 增殖能力, 说明 Etk 促进 HUVECs 增殖调控。

3 讨论

心血管疾病连续多年来排在致死疾病的首位, 并进一步有年轻化的趋势^[16]。当今社会, 诸如高血压、糖尿病、动脉粥样硬

化等心血管疾病严重危害着人类健康^[17]。由于心血管疾病的发病机制不明导致心血管疾病预防不利, 单一药物治疗效果欠佳。因此, 心血管疾病的综合防治和治疗显得尤为必要^[18]。这就要求我们更加透彻的了解心血管疾病发病的分子机制。血管内皮细胞和血管功能与血管疾病的发生发展有着极为密切的联系^[19,20]。外界刺激因素以及各种疾病引起内皮细胞功能性损伤, 引起内皮细胞氧化应激反应和炎症反应, 导致内皮细胞增殖能力减弱^[21,22]。同时引起细胞衰老及凋亡, 最终引起和加剧心血管疾病的发生^[23-25]。我们的研究应用了 CRISPR-Cas9 技术以及慢病毒过表达系统在 HUVECs 中构建了 Etk 敲除和过表达的稳态细胞株, 并进一步研究了 Etk 敲除以及过表达后对 HUVECs 细胞增殖的影响, 证明了 Etk 促进 HUVECs 增殖能力。

CRISPR-Cas9 基因编辑技术是一种可针对基因特定位点进行编辑的技术^[1]。Cas9 作为这个系统的核心, 通过与一段 sgRNA 的结合由非活性状态转变为活性状态, 通过 sgRNA 的

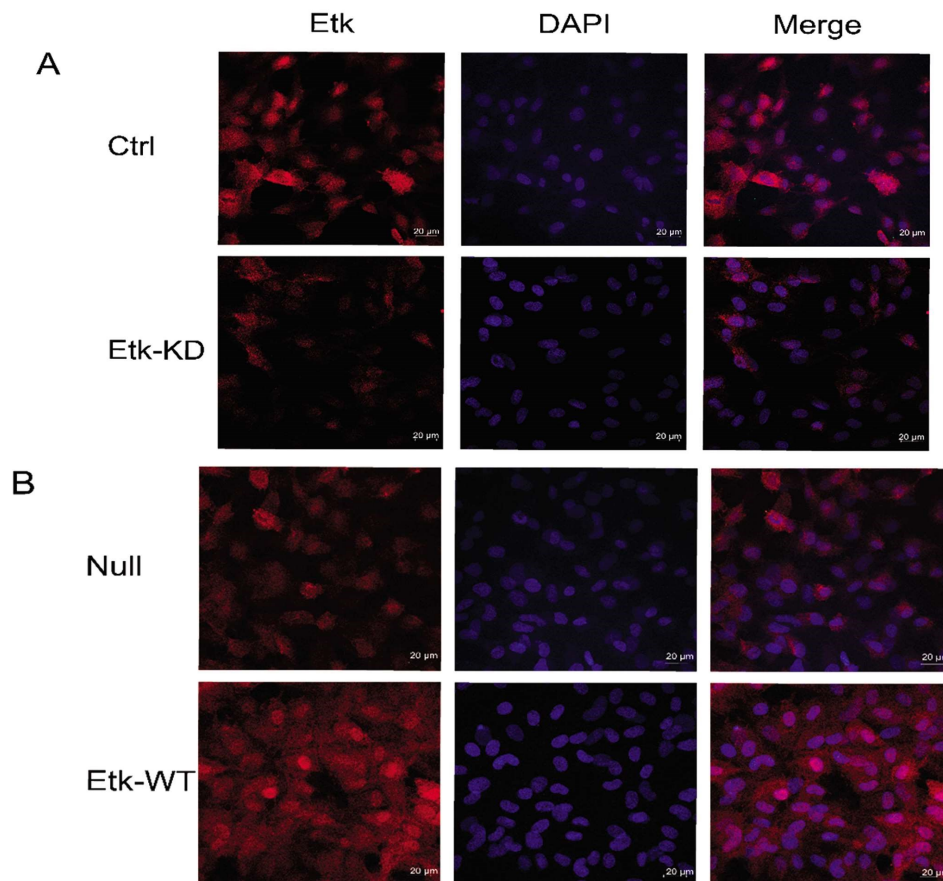


图 4 A. CRISPR-Cas9 敲除 Etk 后免疫荧光检测;B. 慢病毒过表达 Etk 后免疫荧光检测

Fig.4 A: Immunofluorescence of Etk in Etk Knockdown HUVECs; B: Immunofluorescence of Etk in Etk overexpression HUVECs

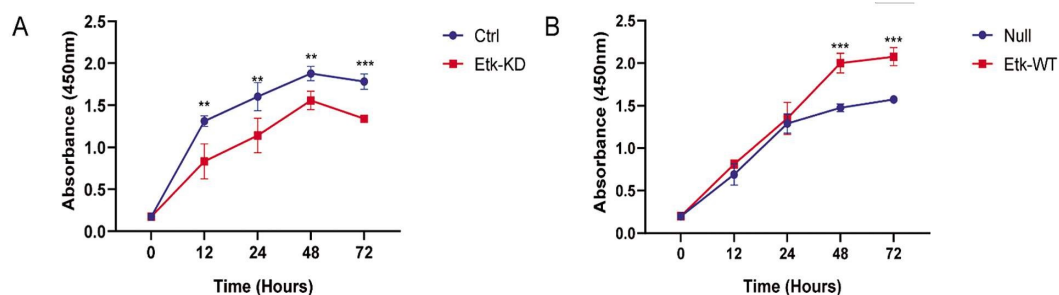


图 5 A. CCK-8 检测 Etk 敲除后 HUVEC 细胞增殖情况;B. CCK-8 检测 Etk 过表达后 HUVEC 细胞增殖情况

Fig.5 A: Detection of proliferation of Etk knockout HUVECs by CCK-8 kit; B: Detection of proliferation of Etk overexpression HUVECs by CCK-8 kit

靶点序列,打开目的基因的 DNA 双链,剪切双链,最终造成目的基因失活^[26]。本研究中将这一新兴的基因编辑技术与目的基因研究相结合,针对 Etk 的不同外显子设计了三条不同的 sgRNA,可以有效地避免脱靶效应并且提高了系统识别 Etk 的特异性。最终我们获得了 Etk 敲除的稳定细胞株,并可以开展一系列的后续研究。同时,我们利用慢病毒系统在 HUVECs 中成功的构建了 Etk 过表达的细胞株并开展相关研究。

Etk 作为 Tec 家族的非受体酪氨酸激酶广泛分布在心内膜以及大血管的内膜细胞中^[5]。在小鼠中删除 Etk 基因并不会对小鼠的生长发育造成明显的影响^[27]。研究报道在小鼠模型中,Etk 在调节因缺血诱导的血管生成中发挥重要作用。相较于正常的小鼠,敲除小鼠在经过后肢灌注以及缺血恢复后的能力严重减弱^[28]。Etk 通过对多个基因以及信号通路的调节参与到多种细胞的增殖过程。有研究报道,Etk 活化 Wnt/ β -catenin 信号通路促进细胞增殖以及迁移,Etk 通过上调 p- β -catenin (Y142),

p- β -catenin (Y654) 的蛋白水平,并且抑制 p- β -catenin (S33/37) 的蛋白水平。Etk 还可促进 GSK3 β 的磷酸化,进而抑制 β -catenin 的降解最终促进细胞的增殖^[29]。Etk 通过与转录因子 SP1 的结合,进而促进 VEGFR2 在细胞内的转录活性,最终导致细胞迁移能力增强^[30]。Etk 通过 PI3K/AKT/mTOR 和 STAT3 信号通路促进细胞增殖,Etk 的 PH 结构域结合 PIP3 并作为 PI3K 的下游基因被激活,进而 Etk 激活磷酸化的 AKT 和 STAT3 信号通路,最终促进细胞增殖^[31]。在 SCLC 细胞中抑制 PI3K/Etk 导致细胞对药物的耐受性大大较低,细胞的生长增殖受到抑制^[32]。

虽然 Etk 在调节细胞增殖过程中发挥着重要的作用,但 Etk 在调节血管内皮细胞增殖等方面中的具体机制仍然不是十分明朗,并且 Etk 的功能存在一定的细胞特异性。Etk 在肿瘤与心血管中参与调控多条信号通路,Etk 既可作为上游调控基因也可作为下游靶点基因参与到细胞的生理活动中。血管内皮细

胞作为人体血管的重要屏障,在维持血管稳态发挥着无可比拟的重要作用。我们在内皮细胞中构建 Etk 敲除以及过表达的细胞株,为进一步探讨 Etk 调节内皮细胞增殖方面的具体分子机制提供了良好的细胞模型以及实验基础,我们将继续致力于 Etk 在内皮细胞中的作用研究,进一步探讨 Etk 对维持血管稳态及相关疾病发生中的分子机制。

本文通过利用 CRISPR-Cas9 技术和慢病毒过表达技术成功的构建了 Etk 敲除和过表达的 HUVECs 细胞株。通过对 HUVECs 细胞增殖的检测,发现 Etk 敲除抑制 HUVECs 增殖。而 Etk 过表达促进细胞增殖。提示了 Etk 在内皮细胞增殖中发挥重要作用。

参考文献(References)

- [1] Joseph P, Leong D, McKee M, et al. Reducing the Global Burden of Cardiovascular Disease, Part 1: The Epidemiology and Risk Factors [J]. *Circ Res*, 2017, 121(6): 677-94
- [2] Sturtzel C. Endothelial Cells[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2017, 1003:71-91
- [3] Tanja Holopainen, Markus Räsänen, Andrey Anisimov, et al. Endothelial Bmx tyrosine kinase activity is essential for myocardial hypertrophy and remodeling[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2015, 112(42): 13063-13068
- [4] Mitchell-Jordan SA, Holopainen T, Ren S, et al. Loss of Bmx nonreceptor tyrosine kinase prevents pressure overload-induced cardiac hypertrophy[J]. *Circ Res*, 2008, 103(12): 1359-62
- [5] Ekman N1, Lymboussaki A, Västriik I, et al. Bmx tyrosine kinase is specifically expressed in the endocardium and the endothelium of large arteries[J]. *Circulation*, 1997, 96(6): 1729-32
- [6] Robinson D, He F, Pretlow T, Kung HJ, et al. A tyrosine kinase profile of prostate carcinoma[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996, 93(12): 5958-62
- [7] Tamagnone L, Lahtinen I, Mustonen T, et al. BMX, a novel nonreceptor tyrosine kinase gene of the BTK/ITK/TEC/TKK family located in chromosome Xp22.2[J]. *Oncogene*, 1994, 9(12): 3683-8
- [8] van Oosterwijk JG, Buelow DR, Drenberg CD, et al. Hypoxia-induced upregulation of BMX kinase mediates therapeutic resistance in acute myeloid leukemia[J]. *J Clin Invest*, 2018, 128(1): 369-80
- [9] Chen S, Cai C, Sowalsky AG, et al. BMX-Mediated Regulation of Multiple Tyrosine Kinases Contributes to Castration Resistance in Prostate Cancer[J]. *Cancer research*, 2018, 78(18): 5203-15
- [10] Cenni B, Gutmann S, Gottar-Guillier M. BMX and its role in inflammation, cardiovascular disease, and cancer[J]. *Int Rev Immunol*, 2012, 31(2): 166-73
- [11] Ran FA, Hsu PD, Lin CY, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity[J]. *Cell*, 2013, 154(6): 1380-1389
- [12] 苏甲林, 阙彪, 张继勤, 等. 建立 CRISPR/Cas9 慢病毒系统高效敲除人源 AIP1 基因[J]. *生物技术通报*, 2015, 31(08): 219-224
- [13] Jin H, Ying X, Que B, et al. N-methyladenosine modification of ITGA6 mRNA promotes the development and progression of bladder cancer[J]. *EBioMedicine*, 2019, 47: 195-207
- [14] Li T, Tsukada S, Satterthwaite A, et al. Activation of Bruton's tyrosine kinase (BTK) by a point mutation in its pleckstrin homology (PH) domain[J]. *Immunity*, 1995, 2(5): 451-60
- [15] Ekman N, Arighi E, Rajantie I, et al. The Bmx tyrosine kinase is activated by IL-3 and G-CSF in a PI-3K dependent manner[J]. *Oncogene*, 2000, 19(36): 4151-8
- [16] Andersson C, Vasan RS. Epidemiology of cardiovascular disease in young individuals[J]. *Nature reviews Cardiology*, 2018, 15(4): 230-40
- [17] Ohishi M. Hypertension with diabetes mellitus: physiology and pathology[J]. *Hypertens Res*, 2018, 41(6): 389-93
- [18] Aggarwal M, Aggarwal B, Rao J. Integrative Medicine for Cardiovascular Disease and Prevention[J]. *Med Clin North Am*, 2017, 101(5): 895-923
- [19] Cong X, Kong W. Endothelial tight junctions and their regulatory signaling pathways in vascular homeostasis and disease[J]. *Cellular signalling*, 2019, 66: 109485
- [20] Gimbrone MA Jr, García-Cardena G. Endothelial Cell Dysfunction and the Pathobiology of Atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2016, 118(4): 620-36
- [21] Ji Q, Wang YL, Xia LM, et al. High shear stress suppresses proliferation and migration but promotes apoptosis of endothelial cells co-cultured with vascular smooth muscle cells via down-regulating MAPK pathway[J]. *J Cardiothorac Surg*, 2019, 14(1): 216
- [22] Wang Y, Boerma M, Zhou D. Ionizing Radiation-Induced Endothelial Cell Senescence and Cardiovascular Diseases[J]. *Radiat Res*, 2016, 186(2): 153-61
- [23] Shimizu I, Minamino T. Cellular senescence in cardiac diseases[J]. *J Cardiol*, 2019, 74(4): 313-9
- [24] Jia G, Aroor AR, Jia C, et al. Endothelial cell senescence in aging-related vascular dysfunction[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2019, 1865(7): 1802-9
- [25] Rossman MJ, Kaplon RE, Hill SD, et al. Endothelial cell senescence with aging in healthy humans: prevention by habitual exercise and relation to vascular endothelial function[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 313(5): H890-H5
- [26] Ma Y, Zhang L, Huang X. Genome modification by CRISPR/Cas9[J]. *FEBS J*, 2014, 281(23): 5186-93
- [27] Rajantie I, Ekman N, Iljin K, et al. Bmx tyrosine kinase has a redundant function downstream of angiopoietin and vascular endothelial growth factor receptors in arterial endothelium[J]. *Mol Cell Biol*, 2001, 21(14): 4647-55
- [28] He Y, Luo Y, Tang S, et al. Critical function of Bmx/Etk in ischemia-mediated arteriogenesis and angiogenesis[J]. *J Clin Invest*, 2006, 116(9): 2344-55
- [29] Li K, Pan WT, Ma YB, et al. BMX activates Wnt/beta-catenin signaling pathway to promote cell proliferation and migration in breast cancer[J]. *Breast Cancer*, 2019, [Epub ahead of print]
- [30] Liu T, Li Y, Su H, et al. Nuclear localization of the tyrosine kinase BMX mediates VEGFR2 expression[J]. *Journal of cellular and molecular medicine*, 2020, 24(1): 126-38
- [31] Li Y, Cui N, Zheng PS, et al. BMX/Etk promotes cell proliferation and tumorigenicity of cervical cancer cells through PI3K/AKT/mTOR and STAT3 pathways[J]. *Oncotarget*, 2017, 8(30): 49238-52
- [32] Potter DS, Galvin M, Brown S, et al. Inhibition of PI3K/ BMX Cell Survival Pathway Sensitizes to BH3 Mimetics in SCLC[J]. *Molecular cancer therapeutics*, 2016, 15(6): 1248-60