

## 技术与方法

# 基于CRISPR/Cas9技术构建Cyr61敲低HEK293T稳定细胞株及其生物学功能检测

王俊杰<sup>1</sup> 姜艳<sup>2</sup> Soulixay Senouthai<sup>1</sup> 付冬冬<sup>1</sup> 尤燕舞<sup>1\*</sup><sup>1</sup>右江民族医学院附属医院肾内科, 百色 533000; <sup>2</sup>右江民族医学院科学实验中心, 百色 533000)

**摘要** 为了探讨Cyr61的生物学功能, 该研究利用CRISPR/Cas9基因编辑技术构建Cyr61敲低的HEK293T稳定细胞株, 并在体外研究Cyr61对HEK293T细胞增殖和凋亡的影响。根据CRISPR/Cas9靶点设计原则, 应用<http://crispr.mit.edu/>在线设计3条Cyr61的导向RNA(guide RNA, gRNA), 用LentiCRISPRv2作为载体构建LentiCRISPRv2-gRNA重组质粒并转化至感受态的Stbl3菌体中, 经筛选后包装成Cyr61 CRISPR/Cas9 KO质粒, 利用Cyr61 CRISPR/Cas9 KO质粒和HDR质粒转染HEK293T细胞, 加入嘌呤霉素(8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )进行筛选, 通过实时荧光定量PCR技术及蛋白质免疫印迹(Western blot)鉴定出HEK293T敲低Cyr61细胞株; 常规培养细胞, 利用细胞计数检测试剂盒(CCK8)检测细胞增殖情况, 流式细胞技术检测细胞凋亡情况。该研究成功构建出Cyr61敲低HEK293T细胞株, 与对照组相比, Cyr61敲低细胞株的增殖明显升高( $P < 0.05$ ), 凋亡率明显减少( $P < 0.05$ )。通过CRISPR/Cas9基因编辑系统成功构建Cyr61敲低HEK293T稳定细胞株, 为研究Cyr61基因提供了有效的工具。

**关键词** CRISPR/Cas9; Cyr61; 基因编辑; 增殖; 凋亡

## Construction of Stable HEK293T Cell with Cyr61 Knocked Down Based on CRISPR/Cas9 Technology and Its Biological Function Detection

WANG Junjie<sup>1</sup>, JIANG Yan<sup>2</sup>, Soulixay Senouthai<sup>1</sup>, FU Dongdong<sup>1</sup>, YOU Yanwu<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Department of Nephrology, Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 53300, China;<sup>2</sup>Science Lab Center, Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, China)

**Abstract** To investigate the biological function of Cyr61 (Cysteine-rich protein 61, Cyr61), HEK293T cell stable strain which knocked down Cyr61 was constructed by the technology of CRISPR/Cas9, detected the effect of Cyr61 on the proliferation and apoptosis *in vitro* in present study. According to the principle of CRISPR/Cas9 target design, three pairs of gRNA of Cyr61 were designed online at <http://crispr.mit.edu/>. LentiCRISPRv2 was used

收稿日期: 2019-01-21 接受日期: 2019-05-16

广西自然科学基金重点项目(批准号: 2017GXNSFDA198005)、广西高等学校科研重点项目(批准号: KY2015ZD092)、右江民族医学院校级科研课题(批准号: YY2016KY011)和右江民族医学院2016年度第二批广西高校重点实验室开放课题(批准号: KFKT20160055)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 13977621808, E-mail: youyanwu@163.com

Received: January 21, 2019 Accepted: May 16, 2019

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangxi (Grant No.2017GXNSFDA198005), Key Project of Scientific Research of the Guangxi Colleges and Universities (Grant No.KY2015ZD092), Scientific Research of the Youjiang Medical University for Nationalities (Grant No.YY2016KY011) and Opening Project of Key Laboratories of Youjiang Medical University for Nationalities in Guangxi Universities (Grant No.KFKT20160055).

\*Corresponding author. Tel: +86-13977621808, E-mail: youyanwu@163.com

网络出版时间: 2019-09-30 12:11:24 URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20190930.1137.024.html>

as the vector to construct lenticrisprv2-gRNA recombinant plasmid and transformed into Stb13. Then the recombinant plasmids were screened and packaged as Cyr61 CRISPR/Cas9 KO plasmid. Transfected the HEK293T cells by CRISPR/Cas9 KO plasmid and HDR plasmid and selected by puromycin (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). HEK293T knocked down Cyr61 cell strain was identified by quantitative PCR and Western blot. The HEK293T cells were cultured normally, then detected the proliferation by cell counting kit (CCK8), and detected the apoptosis by flow cytometry. Cyr61 knocked down HEK293T cell strain was successfully constructed. Compared with the control group, the proliferation of Cyr61 knocked down cell strain was significantly increased ( $P < 0.05$ ), and the apoptosis rate was significantly decreased ( $P < 0.05$ ). The present study demonstrated that Cyr61 knocked down HEK293T stable cell strain was successfully constructed through CRISPR/Cas9 gene editing system, which providing a useful tool for the study of *Cyr61* gene.

**Keywords** CRISPR/Cas9; Cyr61; gene editing; proliferation; apoptosis

细胞内通信网络 (cellular communication network, CCN) 蛋白家族由CCN1-6组成, 该蛋白家族在细胞生长、增殖、分化、黏附、迁移以及在软骨形成、软骨骨化、血管生成、肾脏生成及伤口愈合等过程中起着重要调节作用<sup>[1]</sup>。作为CCN家族最具代表性之一的CCN1又被命名为富含半胱氨酸蛋白61(cysteine-rich protein 61, Cyr61), 由内皮细胞及成纤维细胞分泌产生的细胞基质蛋白<sup>[2]</sup>。研究表明, Cyr61具有调节多条信号通路的能力, 能够在不同的过程中扮演重要角色, 可通过调控细胞迁移、黏附、增殖、凋亡介导细胞存活<sup>[3]</sup>。参与了包括肿瘤<sup>[4]</sup>、缺血再灌注损伤<sup>[5]</sup>、心血管疾病<sup>[6]</sup>、肺部疾病<sup>[7]</sup>及各种感染及慢性炎症性疾病<sup>[8]</sup>发生与发展。

Cyr61表达量的改变会导致处于其下游的信号通路发生级联反应, 并在疾病的发生发展过程中扮演着重要作用。但是, 目前关于Cyr61参与疾病的发生与发展的具体机制尚不完全清楚, 所以通过构建过表达或者低表达Cyr61的细胞或动物模型可能为进一步研究Cyr61的作用机制奠定基础。本研究利用近年来在古细菌中发现的成簇的有规律间隔交织的短回文重复序列CRISPR/Cas9(clustered regulatory interspaced short palindromic repeats/Cas9)技术成功构建了HEK293T细胞系*Cyr61*基因敲低稳定细胞株, 并从细胞增殖、凋亡等方面初步探索Cyr61在HEK293T细胞的生长分化中可能作用, 为深入研究Cyr61在疾病发生发展中的功能和机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 重要试剂

HEK293T细胞株(南加利福尼亚大学Keck医学中心), 冻存于右江民族医学院科学实验中心, HDR

转染质粒、Ultracruz转染试剂购自Santa Cruz生物技术公司; 嘌呤霉素购自Sigma生物公司; DMEM细胞培养基、胎牛血清购自Gibco生物公司; CCK8试剂盒购自日本同仁化学研究所; Annexin V-FITC、PI凋亡试剂检测盒购自BD医疗技术公司; 兔抗Cyr61一抗购自Santa Cruz生物技术公司; 鼠抗GAPDH一抗购自Proteintech生物技术公司; 羊抗鼠、羊抗兔IgG抗体(二抗)购自碧云天生物技术公司; 蛋白酶抑制剂混合物购自康为世纪公司; BCA蛋白定量试剂盒购自碧云天生物技术公司; RNAiso Plus RNA提取试剂盒(9108)购自日本TaKaRa生物公司; Prime-ScriptTMRT reagent Kit with gDNA Eraser(RR047A)购自日本TaKaRa生物公司; Mir-X miRNA First Strand Synthesis Kit(638315)购自美国Clontech生物公司; SYBR Premix Ex TaqTMII(RR820A)购自日本TaKaRa生物公司; PCR引物由上海生工生物工程有 限公司合成, 引物序列见表1。寡核苷酸链由Santa Cruz 生物技术公司合成。

### 1.2 主要方法

1.2.1 gRNA靶点选择及寡核苷酸链设计合成 应用<http://crispr.mit.edu/>设计Cyr61的guide RNA, 在线设计好引物序列后, 选取得分排名前三的序列, 具体结果如表2。

1.2.2 LentiCRISPR-sgRNA载体 构建LentiCRISPRv2载体根据Genome-scale CRISPR Knock-Out (GeCKO) 协议设计<sup>[9-10]</sup>, 由Santa Cruz Biotechnolog公司合成, 用BsmB I(购自NEB公司)消化lentiCRISPRv2载体, 将合成的Oligo单链粉末(由Santa Cruz Biotechnolog公司合成)稀释成100  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 并分装, 利用T4多核苷酸激酶对合成的寡核苷酸进行退火和磷酸化, 将退火后的gRNA靶序列连接到已消化的lentiCRISPRv2载

表1 实时荧光定量PCR引物序列

Table 1 Primers of quantitative real-time PCR

基因	上游引物(5'→3')	下游引物(5'→3')
<i>GAPDH</i>	GAG GAG GCA TTG CTG ATG AT	GAA GGC TGG GGC TCA TTT
<i>Cyr61</i>	GCG GTT CCG ATG CAG AGA TGG	GAT GCT TGC GCT TCT CCT CTG TC

表2 gRNAs序列

Table 2 gRNAs sequences

gRNA序号	片段名称	序列
Cyr61-gRNA1	Cyr61-A	5'-GTT GTC ATT GGT AAC TCG TG-3'
Cyr61-gRNA2	Cyr61-B	5'-ATG CGG TTC CGC TGC GAA GA-3'
Cyr61-gRNA3	Cyr61-C	5'-CAA GTA CTG CGG TTC CTG CG-3'

体中, 将连接产物转化至感受态的Stbl3细胞(Santa Cruz Biotechnolog公司提供)中培养, 并在LB-Amp板上进行筛选。挑取单克隆进行测序(Santa Cruz Biotechnolog公司完成)。对正确将gRNA整合到lentiCRISPRv2载体后的载体扩大培养后包装成Cyr61 CRISPR/Cas9 KO质粒。

1.2.3 细胞转染及筛选 按每孔 $2 \times 10^5$ 个/mL在6孔板接种HEK293T细胞, 常规培养至70%融合时更换无血清培养液, 将1.0  $\mu\text{g}$  Cyr61 CRISPR/Cas9 KO质粒和1.0  $\mu\text{g}$  HDR质粒加入到150  $\mu\text{L}$ 无血清无抗生素的培养基中并充分混匀, 于室温下孵育5 min; 将10  $\mu\text{L}$  Ultracruz转染试剂加入140  $\mu\text{L}$ 无血清无抗生素的培养基中充分混匀, 于室温下孵育5 min; 将上述两种混合液一起混匀后于常温下混合孵育10 min后加入无抗生素含10% FBS的培养基使最终体积为2 mL加入含293T细胞的六孔板内。转染24 h和48 h后于荧光显微镜下观察转染情况。转染成功后48~96 h观察细胞状态, 生长状态良好时, 加入8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的嘌呤霉素(puromycin)选择转染细胞, 直至正常细胞完全死亡, 得到稳定转染细胞系。扩大培养至可用来qRT-PCR和Western blot 验证。

1.2.4 Quantitative Real-time PCR检测 将转染Cyr61 CRISPR/Cas9 KO质粒的HEK293T细胞及正常HEK293T培养48 h后, 按照RNAiso Plus RNA提取试剂盒操作说明提取总RNA。取1  $\mu\text{g}$ 总RNA反转录合成cDNA, 具体操作按照试剂盒说明书进行。使用LightCycler<sup>®</sup> 96实时荧光定量PCR仪进行检测。选取*GAPDH*作为内参, 检测*Cyr61*和*GAPDH*的mRNA表达。以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算相对表达量,  $\Delta\Delta CT = (\text{CT实验组目的} - \text{CT实验组内参}) - (\text{CT对照组目的} - \text{CT对照组$

内参)。重复实验3次。

1.2.5 Western blot检测蛋白的表达 将转染Cyr61 CRISPR/Cas9 KO质粒的HEK293T细胞及正常HEK293T细胞培养48 h后, 收取细胞, 提取总蛋白。以二喹啉甲酸法测定蛋白浓度, 取30  $\mu\text{g}$ 蛋白加入5 $\times$ SDS上样缓冲液煮沸变性后, 于十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳, 300 mA恒流湿转至PVDF膜, 封闭液室温封闭1 h, 分别加入一抗稀释液稀释的Cyr61(1:500)及*GAPDH*(1:2 000)抗体, 4  $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗涤3次, 加入相应的山羊抗兔或抗鼠IgG-HRP二抗, 室温孵育1 h, 洗涤3次, 增强化学发光(ECL)显影, 利用ImageJ软件进行半定量分析, 以目的蛋白条带与*GAPDH*蛋白条带灰度值的比值表示其相对含量。重复实验3次。

1.2.6 CCK8法检测细胞增殖 将构建成功的Cyr61敲低HEK293T细胞及正常HEK293T细胞按 $1 \times 10^5$ 个/孔接种于96孔板, 每孔终体积为100  $\mu\text{L}$ , 每组设3个副孔, 同时设置空白孔。细胞生长至亚融合时加无血清培养液同步24 h, 分别按各组要求处理细胞0、12、24和48 h, 每孔加CCK8溶液10  $\mu\text{L}$ , 37  $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育2 h, 置酶标仪450 nm波长测定各孔吸光度值, 以只加培养液的孔为空白对照组。重复实验3次。细胞存活率 $=[(\text{实验组}D\text{值} - \text{空白组}D\text{值}) \div (\text{对照组}D\text{值} - \text{空白组}D\text{值})] \times 100\%$ 。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 将构建成功的Cyr61敲低HEK293T细胞及正常HEK293T细胞常规培养48 h后收集各孔上清液于离心管中备用, 然后再将各组细胞用4  $^{\circ}\text{C}$  PBS清洗2次, 胰酶消化后与前述上清液共同制成单细胞悬液, 调整细胞密度为 $1 \times 10^6$ 个/mL, 取100  $\mu\text{L}$ 细胞悬液加入5  $\mu\text{L}$  AnnexinV-

FITC和5  $\mu$ L PI溶液混匀, 室温避光孵育 15 min, 加入 400  $\mu$ L PBS, 流式细胞仪进行检测。重复实验3次。

### 1.3 统计学处理

采用SPSS 23.0统计软件进行数据分析, 所有数据均进行正态分布和方差齐性检验。服从正态分布的数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 两组间比较采用独立样本 $t$ 检验, 多组间采用单因素方差分析。非正态分布则以中位数和极值表示, 采用秩和检验。每个实验组重复3次。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Cyr61 CRISPR/Cas9 KO质粒的构建

LentiCRISPR-sgRNA载体(图1A), *Bbs* I(Santa Cruz Biotechnolog公司提供)酶切后回收的空载体lentiCRISPRv2与gRNA退火后的双链DNA(ds-DNA)进行连接反应, 将连接产物转化至Stbl3细胞中培养, 并在LB-Amp板上进行筛选。挑取单克隆

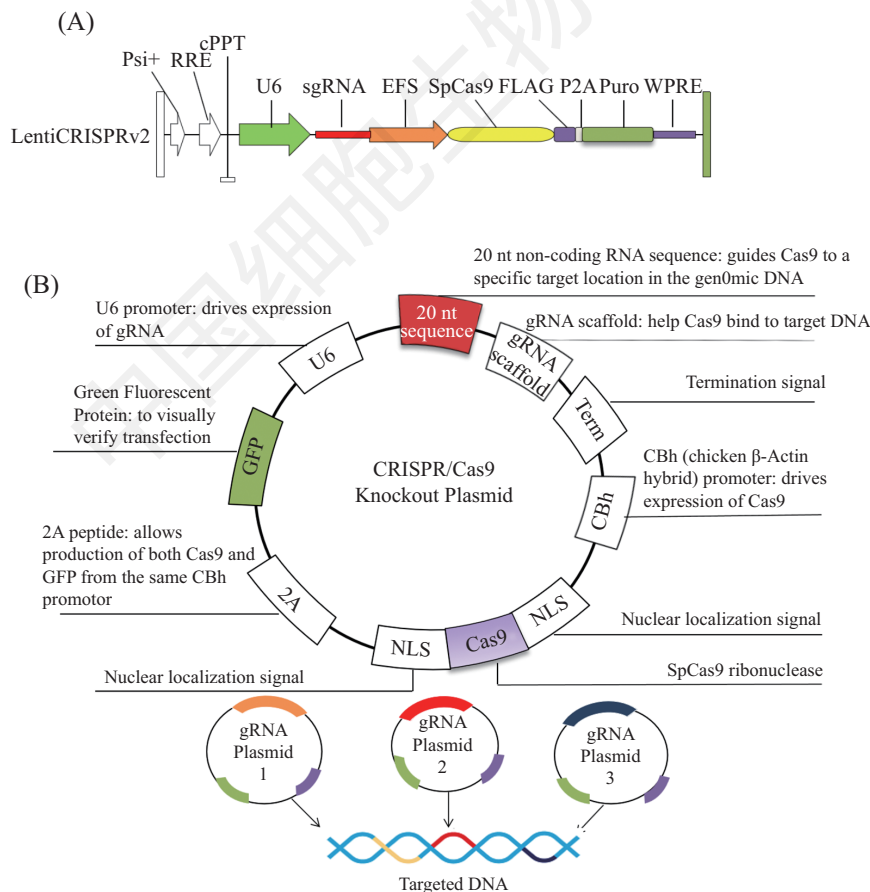
进行测序(由Santa Cruz Biotechnolog公司完成), 选取连接正确的载体进行扩大培养。由Santa Cruz Biotechnolog公司包装成Cyr61 CRISPR/Cas9 KO质粒。图1B所示为Cyr61 CRISPR/Cas9 KO质粒工作原理。

### 2.2 Cyr61转染效率鉴定

按照Cyr61 CRISPR/Cas9 KO质粒操作书面转染细胞24 h和48 h后用倒置荧光显微镜观察, 转染组细胞可见绿色荧光蛋白均匀分布于细胞内, 表明转染成功, 48 h后绿色荧光表达强度明显强于24 h时(图2)。

我们利用基因测序进一步验证是否将gRNA序列成功转入HEK293T细胞内, 序列对比结果显示, Cyr61-gRNA2及Cyr61-gRNA3两条gRNA成功转入细胞内(图3)。

转染48 h后, Quantitative Real-time PCR结果显示, 与对照组相比, 敲低Cyr61组的HEK293T细胞的*Cyr61*



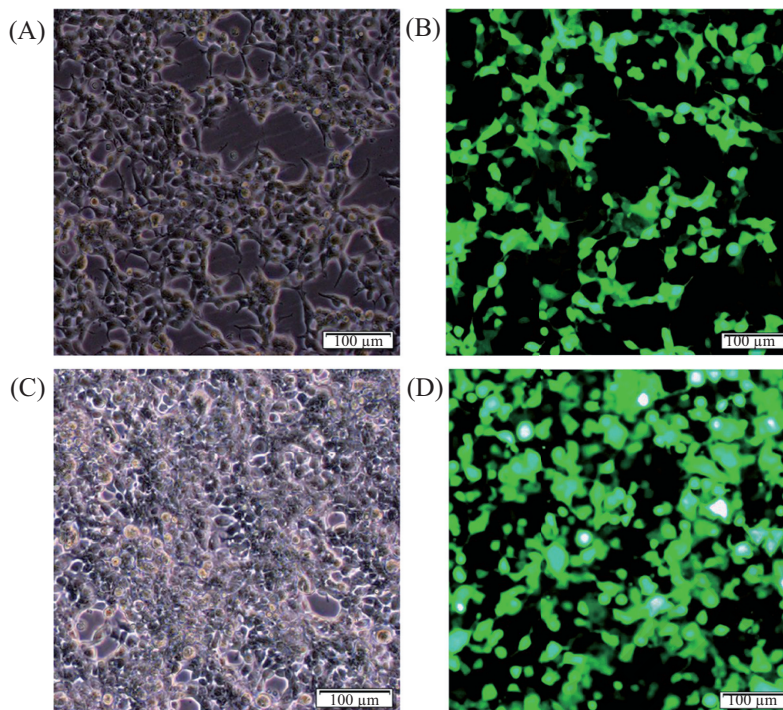
A: LentiCRISPRv2质粒图谱; B: Cyr61 CRISPR/Cas9 KO质粒图谱。

A: diagram of LentiCRISPRv2 plasmid; B: diagram of Cyr61 CRISPR/Cas9 KO plasmid.

图1 LentiCRISPRv2质粒图谱和Cyr61 CRISPR/Cas9 KO质粒图谱

Fig.1 Diagram of LentiCRISPRv2 plasmid and Cyr61 CRISPR/Cas9 KO plasmid

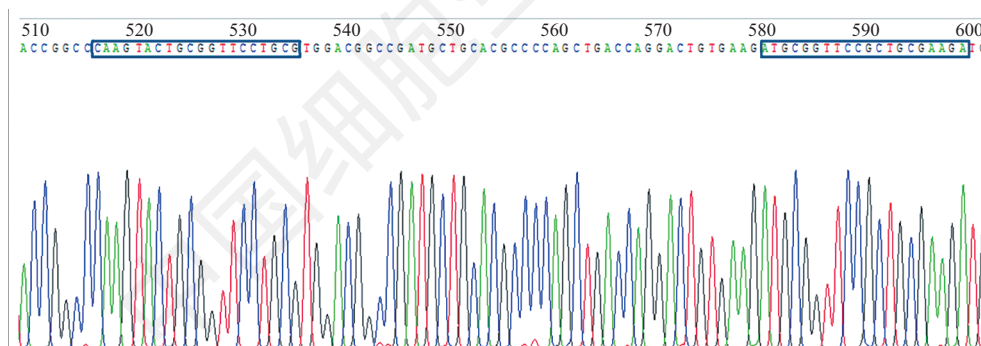




A: 24 h明场观察的细胞; B: 转染24 h后相差荧光显微镜下观察的细胞; C: 48 h明场观察的细胞; D: 转染48 h后相差荧光显微镜下观察的细胞。  
 A: cells observed at 24 hours of light field; B: cells observed under phase contrast fluorescence microscope after 24 hours of transfection; C: cells observed at 48 hours of light field; D: cells observed under phase contrast fluorescence microscope after 48 hours of transfection.

图2 转染后HEK293T细胞绿色荧光蛋白表达情况

Fig.2 Expression of green fluorescent protein in transfected cells



蓝色框中显示gRNA序列。

The gRNA sequences are shown in the blue box.

图3 HEK293T细胞基因测序结果

Fig.3 Sequencing result of HEK293T cells

mRNA表达明显下降( $P < 0.05$ )(图4), 说明该方法确实可能干扰了Cyr61基因的转录, 但最后是否真正起到影响Cyr61基因翻译成蛋白还有待进一步验证。

为了进一步验证敲低Cyr61后对Cyr61蛋白表达的影响, 我们采用Western blot检测Cyr61蛋白表达。结果显示, 与对照组细胞相比, 敲低Cyr61组的HEK293T细胞的Cyr61蛋白表达明显下降( $P < 0.05$ )(图5)。证实HEK293T细胞的Cyr61基因已成功被敲

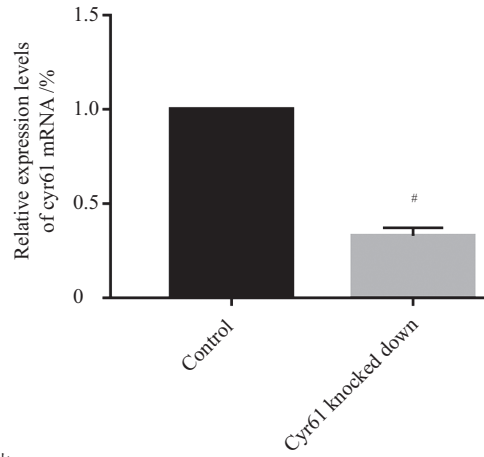
低。

### 2.3 基因测序结果

敲低Cyr61基因后, 常规培养细胞, 提取RNA, 经PCR扩增后外送进行基因测序。测序结果与原序列进行对比(图6), 结果显示, 敲低Cyr61基因后的细胞存在多个位点的碱基突变和缺失, 图中红色框所示。

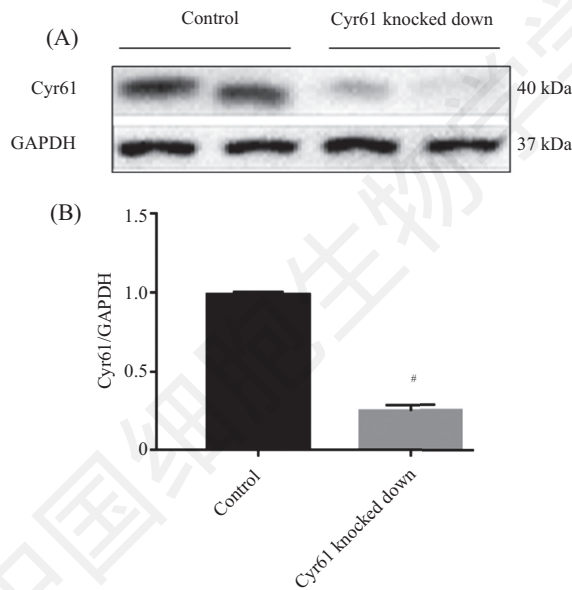
### 2.4 Cyr61对HEK293T细胞活力的影响

为了检测敲低Cyr61后对HEK293T细胞增殖的



平均值±标准差,  $n=3$ 。<sup>#</sup> $P<0.05$ , 与对照组相比。  
 $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ 。<sup>#</sup> $P<0.05$  vs control.

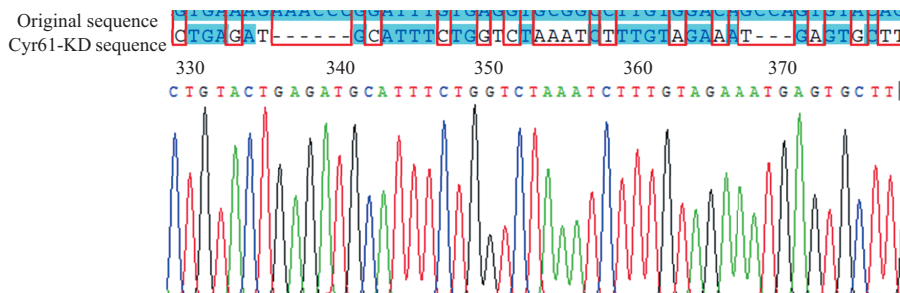
图4 敲低Cyr61后Cyr61 mRNA的表达水平  
**Fig. 4** Cyr61 expression level after Cyr61 knocked down



A: 原始蛋白条带图; B: 目的蛋白相对灰度值。  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ 。<sup>#</sup> $P<0.05$ , 与对照组相比。

A: primitive protein band; B: relative gray value of target protein.  $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ 。<sup>#</sup> $P<0.05$  vs control.

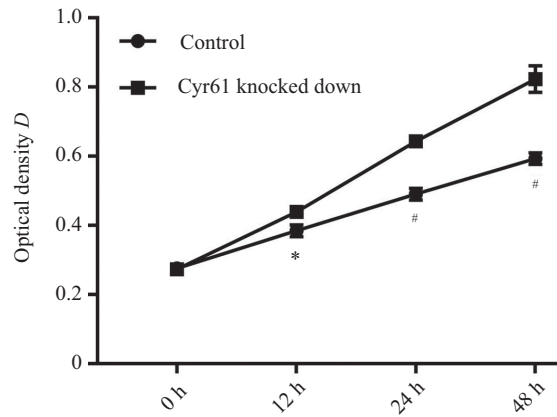
图5 敲低Cyr61后Cyr61蛋白表达变化  
**Fig.5** Expression of Cyr61 protein after knocking down Cyr61



红色框中显示突变碱基。

The mutant bases are shown in the red boxes.

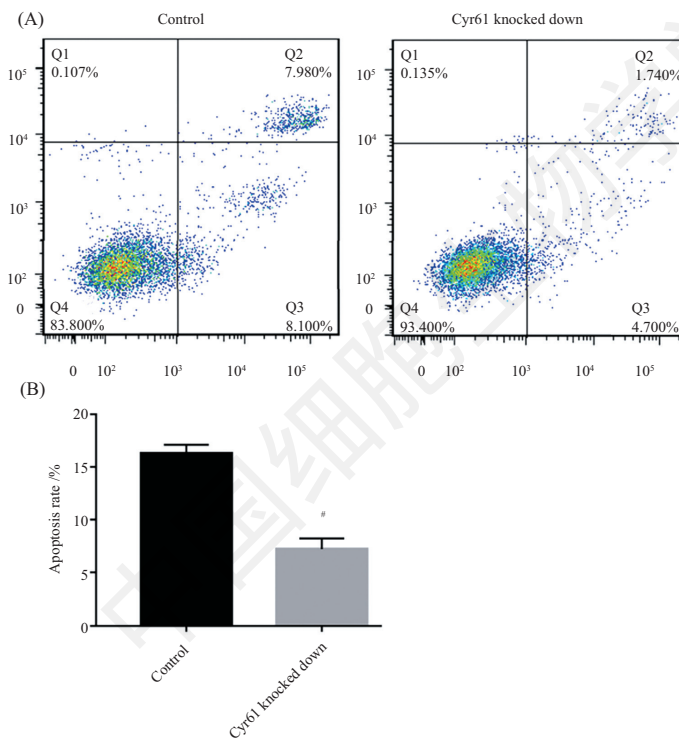
图6 敲低Cyr61后与原基因序列对比分析  
**Fig.6** Comparison of Cyr61 knocked down with original gene sequence



平均值±标准差,  $n=3$ 。\* $P<0.05$ , 与对照组相比。  
 $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ 。# $P<0.05$  vs control.

图7 CCK8检测敲低Cyr61对HEK293T细胞活力的影响

Fig.7 CCK8 method was used to detect the viability of Cyr61 knocked down HEK293T cells



平均值±标准差,  $n=3$ 。\* $P<0.05$ , 与对照组相比。  
 $\bar{x}\pm s$ ,  $n=3$ 。# $P<0.05$  vs control.

图8 流式检测敲低Cyr61对HEK293T细胞凋亡的影响

Fig.8 Flow cytometry was used to detect the apoptosis of Cyr61 knocked down HEK293T cells

影响, 我们采用CCK8法检测HEK293T细胞活力情况。与对照组相比, *Cyr61*基因敲低后CCK8检测活力明显增高(图7)。

### 2.5 *Cyr61*对HEK293T细胞凋亡的影响

为了检测敲低*Cyr61*后对HEK293T细胞凋亡的影响, 我们采用流式细胞技术及Annexin V-FITC/PI染色法

检测HEK293T细胞凋亡情况。结果显示, 与对照组相比, *Cyr61*基因敲低后凋亡率明显降低( $P<0.05$ )(图8)。

### 3 讨论

*Cyr61*又称CCN1, 由内皮细胞、成纤维细胞和

平滑肌细胞分泌产生,是细胞外基质的重要组成部分<sup>[2]</sup>。Cyr61是近年来国内外生物医学领域研究的热点之一。它是细胞外基质相关的信号分子,具有调节多种信号通路的能力,在不同的生物过程中发挥着重要作用。在体外,CCN1蛋白可通过与细胞表面不同受体整合素相结合,介导不同细胞细胞外基质的重塑、细胞增殖、分化和黏附、促进细胞迁移,血管形成和诱导细胞凋亡。在体内,Cyr61也在胚胎的发育、血管的形成、软骨的分化及肿瘤的发生发展中起着重要的作用<sup>[11]</sup>。近年来研究发现,Cyr61参与了动脉粥样硬化、类风湿性关节炎、慢性炎症性疾病等疾病的发生与发展<sup>[8,12-13]</sup>。更重要的是,大量研究表明,Cyr61在不同类型的肿瘤中发挥着不同的作用。例如,Cyr61在乳腺癌<sup>[14]</sup>、卵巢癌<sup>[15]</sup>、骨肉瘤<sup>[16]</sup>中过表达,且与癌细胞的增殖、转移及肿瘤预后密切相关;但是另外的研究却发现,Cyr61在非小细胞肺癌<sup>[17]</sup>、前列腺癌<sup>[18]</sup>中的表达量降低。

虽然Cyr61的功能被逐步研究发现,但目前对其发挥作用的分子机制尚不完全清楚。更重要的是,Cyr61在不同的细胞或环境中与不同的受体整合素相结合可能发挥着完全相反的作用<sup>[19]</sup>。所以找到一种有效的研究工具对深入研究Cyr61的功能尤为重要。

基因功能分析对于理解正常生理和疾病发病机制至关重要。迅速发展的基因编辑技术通过改造细胞的遗传特性已成为在细胞水平上研究基因功能的重要手段之一。近来,在体外和体内模型中,锌指核酸酶(zinc-finger nucleases, ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(transcription activator-like effector nucleases, TALEN)和CRISPR/Cas9系统已被广泛地应用于各种基因功能的研就<sup>[20-21]</sup>。与ZNF和TALEN相比,CRISPR/Cas9系统具有设计更方便、更灵活、成本更低等优点<sup>[10]</sup>。更重要的是CRISPR/Cas9系统是一种在gRNA的指导下,在基因组水平上对目的基因DNA序列进行改造的定点编辑技术,转染结果更稳定,所以更适合应用于实验周期较长的研究中<sup>[22-24]</sup>。即便如此,CRISPR/Cas9系统由于序列较短、基因中存在较多相似之处,所以转染时可能出现较高的脱靶率<sup>[25]</sup>。在我们的实验中,为了保证敲低效率,我们设计了三个gRNA靶点。我们的实验结果显示,利用CRISPR/Cas9技术可以实现Cyr61基因在HEK293T细胞稳定低表达,所筛选出的稳定转染细胞株可用

于后续细胞水平的实验研究。

既往的研究表明,作为CCN家族的成员,Cyr61通过直接结合整联蛋白和硫酸肝素蛋白多糖或激活多种信号转导途径介导细胞存活、增殖、分化、迁移、黏附和细胞外基质的合成<sup>[3]</sup>。Sun等<sup>[26]</sup>研究发现,Cyr61可以通过PI3K/Akt信号通路促进脉络膜新生血管形成。Gao等<sup>[27]</sup>研究发现,在肺动脉高压中高表达的Cyr61可以通过Akt途径促进肺动脉平滑肌细胞增殖。Cyr61在细胞凋亡的调节中的作用至今没有统一的结论。Pilarsky等<sup>[18]</sup>研究发现,Cyr61在前列腺癌中表达降低,过表达的Cyr61可以抑制前列腺癌细胞增殖,促进其凋亡;然而Jin等<sup>[28]</sup>的研究却发现,在前列腺癌DU145细胞中降低的Cyr61可以抑制该胞增殖,促进其凋亡。所以,Cyr61具体功能需要进一步研究证实。本研究通过CRISPR/Cas9技术构建了Cyr61敲低的HEK293T细胞株。我们进一步研究敲低Cyr61后对HEK293T细胞增殖及凋亡的影响,我们发现,敲低Cyr61以后可明显促进HEK293T细胞的增殖,降低凋亡。这将为深入揭示Cyr61在疾病的发生发展中的机制奠定良好的基础。但是,Cyr61的作用机制及疾病的发生发展机制均是极其复杂的过程,所以要真正揭示Cyr61在疾病的发生发展过程中的详细机制,还有待进一步研究。

## 参考文献 (References)

- 1 Takigawa M. The CCN proteins: an overview. *Meth Mol Biol* 2017; 1489(1): 1-8.
- 2 Emre Y, Imhof BA. Matricellular protein CCN1/CYR61: a new player in inflammation and leukocyte trafficking. *Semin Immunopathol* 2014; 36(2): 253-9.
- 3 Yang R, Chen Y, Chen D. Biological functions and role of CCN1/Cyr61 in embryogenesis and tumorigenesis in the female reproductive system. *Mol Med Rep* 2018; 17(1): 3-10.
- 4 杨华宇, 马秀梅. 肿瘤中CCN蛋白的表达及作用机制. *临床与实验病理学杂志*(Yang Huayu, Ma Xiumei. The expression and mechanism of CCN protein in tumors. *Chinese Journal of Clinical and Experimental Pathology*) 2013; 29(12): 1341-3.
- 5 Li C, Zhao L, Wang Y, Che L, Luan H, Luo C, *et al.* Cyr61, a specific ultra-early biomarker in kidney ischemia/reperfusion injury. *Nephrology (Carlton)* 2019; 24(8): 798-805.
- 6 Zhao J, Zhang C, Liu J, Zhang L, Cao Y, Wu D, *et al.* Prognostic significance of serum cysteine-rich protein 61 in patients with acute heart failure. *Cell Physiol Biochem* 2018; 48(3): 1177-87.
- 7 董年, 宋晨剑, 裘丹萍, 陈成水. 基质蛋白CCN1与肺部疾病的研究进展. *中国病理生理杂志*(Tong Nian, Song Chenjian, Qiu Danping, Chen Chengshui. Progress on role of CCN1 in pulmonary diseases. *Chinese Journal of Pathophysiology*)2018; 34(1): 188-92.



- 8 Xu T, He YH, Wang MQ, Yao HW, Ni MM, Zhang L, *et al.* Therapeutic potential of cysteine-rich protein 61 in rheumatoid arthritis. *Gene* 2016; 592(1): 179-85.
- 9 Sanjana NE, Shalem O, Zhang F. Improved vectors and genome-wide libraries for CRISPR screening. *Nat Methods* 2014; 11(8): 783-4.
- 10 Shalem O, Sanjana NE, Hartenian E, Shi X, Scott DA, Mikkelsen T, *et al.* Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout screening in human cells. *Science* 2014; 343(6166): 84-7.
- 11 Lau LF. Cell surface receptors for CCN proteins. *J Cell Commun Signal* 2016; 10(2): 121-7.
- 12 Zhang J, Wu G, Dai H. The matricellular protein CCN1 regulates TNF-alpha induced vascular endothelial cell apoptosis. *Cell Biol Int* 2016; 40(1): 1-6.
- 13 Lebas B, Galley J, Renaud-Gabardos E, Pujol F, Lenfant F, Garmy-Susini B, *et al.* Therapeutic benefits and adverse effects of combined proangiogenic gene therapy in mouse critical leg ischemia. *Ann Vasc Surg* 2017; 40(2): 252-61.
- 14 Lin MT, Chang CC, Chen ST, Chang HL, Su JL, Chau YP, *et al.* Cyr61 expression confers resistance to apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by a mechanism of NF-kappaB-dependent XIAP up-regulation. *J Biol Chem* 2004; 279(23): 24015-23.
- 15 Lee KB, Byun HJ, Park SH, Park CY, Lee SH, Rho SB. CYR61 controls p53 and NF-kappaB expression through PI3K/Akt/mTOR pathways in carboplatin-induced ovarian cancer cells. *Cancer Lett* 2012; 315(1): 86-95.
- 16 Liu Y, Zhang F, Zhang Z, Wang D, Cui B, Zeng F, *et al.* High expression levels of Cyr61 and VEGF are associated with poor prognosis in osteosarcoma. *Pathol Res Pract* 2017; 213(8): 895-9.
- 17 Tong X, O'Kelly J, Xie D, Mori A, Lemp N, McKenna R, *et al.* Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells via the beta-catenin-c-myc-p53 pathway. *Oncogene* 2004; 23(28): 4847-55.
- 18 Pilarsky CP, Schmidt U, Eissrich C, Stade J, Froschermaier SE, Haase M, *et al.* Expression of the extracellular matrix signaling molecule Cyr61 is downregulated in prostate cancer. *Prostate* 1998; 36(2): 85-91.
- 19 Lau LF. CCN1/CYR61: The very model of a modern matricellular protein. *Cell Mol Life Sci* 2011; 68(19): 3149-63.
- 20 Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends Biotechnol* 2013; 31(7): 397-405.
- 21 Niu Y, Shen B, Cui Y, Chen Y, Wang J, Wang L, *et al.* Generation of gene-modified cynomolgus monkey via Cas9/RNA-mediated gene targeting in one-cell embryos. *Cell* 2014; 156(4): 836-43.
- 22 钟顺顺, 李凯, 杨阳, 缪时英, 王琳芳, 宋伟. 利用CRISPR/CAS9技术构建QKI敲除GC1-spg细胞株及其生物学功能检测. *基础医学与临床*(Zhong Shunshun, Li Kai, Yang Yang, Miu Shiyang, Wang Linfang, Song Wei. Construction and characterization of QKI knockout GC1-spg cell strain with CRISPR/CAS9. *Basic & Clinical Medicine*) 2018; 38: 589-93.
- 23 常丽贤, 孙聪聪, 陈晓娟, 杨文钰, 张家源, 张英弛, 等. 利用CRISPR/Cas9n double nick系统构建人DNAH2基因敲除的U2OS细胞株. *生物工程学报*(Chang Lixian, Sun Congcong, Chen Xiaojuan, Yang Wenyu, Zhang Jiayuan, Zhang Yingchi, *et al.* Knocking out of human DNAH2 gene in U2OS cells by CRISPR/Cas9n double nick system. *Chinese journal of biotechnology*) 2017; 33: 284-93.
- 24 Wang F, Guo T, Jiang H, Li R, Wang T, Zeng N, *et al.* A comparison of CRISPR/Cas9 and siRNA-mediated ALDH2 gene silencing in human cell lines. *Mol Genet Genomics* 2018; 293(3): 769-83.
- 25 Trevino AE, Zhang F. Genome editing using Cas9 nickases. *Methods Enzymol* 2014; 546(1): 161-74.
- 26 Sun L, Huang T, Xu W, Sun J, Lü Y, Wang Y. Advanced glycation end products promote VEGF expression and thus choroidal neovascularization via Cyr61-PI3K/AKT signaling pathway. *Sci Rep* 2017; 7(1): 14925.
- 27 Gao L, Fan Y, Hao Y, Yuan P, Liu D, Jing Z, *et al.* Cysteine-rich 61 (Cyr61) upregulated in pulmonary arterial hypertension promotes the proliferation of pulmonary artery smooth muscle cells. *Int J Med Sci* 2017; 14(9): 820-8.
- 28 Jin X, Zhao W, Zhou P, Niu T. YAP knockdown inhibits proliferation and induces apoptosis of human prostate cancer DU145 cells. *Mol Med Rep* 2018; 17(3): 3783-8.