

技术与方法

敲除端粒酶TERC基因的人Calu3细胞模型的构建及功能验证

张晓娜¹ 郭鸿斌² 程龙³ 徐山茸⁴ 金蕊^{3*} 田沈^{1*}¹首都师范大学生命科学学院, 北京 100048; ²陆军边防第三六一团卫生队, 西藏 859600;³军事科学院军事医学研究院生物工程研究所, 北京 100089; ⁴安庆师范大学生命科学学院, 安庆 246133)

摘要 该文基于一种可诱导的DD-Cas9系统构建敲除端粒酶TERC基因的人Calu3细胞模型, 并对其功能进行验证。将靶向TERC序列的sgRNA克隆至载体pLenti-DD-Cas9-Flag上, 慢病毒包装后感染Calu3细胞, 对筛选获得的单克隆细胞添加小分子化合物甲氧苄啶(trimethoprim, TMP)药物诱导Cas9蛋白表达, 实现对端粒酶RNA组分的敲除。单克隆细胞培养后鉴定其端粒酶活性、端粒长度的变化, 并进行细胞衰老染色的实验。结果显示成功构建了pLenti-DD-Cas9-Flag-sgTERC重组质粒, 并利用DD-Cas9高效、便捷的特点完成了对TERC基因的可诱导性编辑。测序结果表明, 单克隆细胞中TERC序列部分敲除; TRAP实验显示端粒酶活性均有下调; 提取细胞基因组用qPCR的方法进行端粒长度检测, 结果显示其端粒长度明显缩短; 同时, 与野生型细胞相比较, TERC序列敲除的细胞出现明显衰老。总之, TERC基因的缺失导致细胞出现端粒酶活性下降、端粒长度缩短及衰老的现象, 可诱导敲除端粒酶TERC基因的人Calu3细胞模型为后续对细胞衰老相关研究奠定了基础。

关键词 CRISPR/Cas9系统; 端粒酶RNA; 基因敲除; 细胞衰老

Construction and Functional Verification of human Calu3 Cell Model with Telomerase TERC Gene knockout

ZHANG Xiaona¹, GUO Hongbin², CHENG Long³, XU Shanrong⁴, JIN Rui^{3*}, TIAN Shen^{1*}¹College of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100048, China; ²The 361th Regiment Health Team of the Army Frontier Defense, Tibet 859600, China; ³Department of Medical Molecular Biology, Institute of Biotechnology,

Academy of Military Medical Sciences, Academy of Military Sciences, Beijing 100089, China;

⁴School of Life Sciences, Anqing Normal University, Anqing 246133, China)

Abstract This study aimed to construct a human Calu3 cell model with telomerase TERC gene knockout based on an inducible DD-Cas9 system, and its function was verified. The sgRNA targeting TERC sequence was cloned into the vector pLenti-DD-Cas9-Flag, and the lentivirus was packaged and infected with Calu3 cells. The monoclonal cells obtained by screening were added with the small molecule compound TMP (trimethoprim) to

收稿日期: 2021-11-24 接受日期: 2022-02-23

国家自然科学基金(批准号: 82072717)和北京市新星交叉课题(批准号: Z191100001119020)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13691190327, E-mail: jin_jin@aliyun.com; Tel: 13641367010, E-mail: cnu_tianshen@sina.com

Received: November 24, 2021 Accepted: February 23, 2022

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.82072717) and Beijing New-Star Plan of Science and Technology (Grant No.Z191100001119020)

*Corresponding authors. Tel: +86-13691190327, E-mail: jin_jin@aliyun.com; Tel: +86-13641367010, E-mail: cnu_tianshen@sina.com

induce the expression of Cas9 protein to achieve the knockout of telomerase RNA components. The telomerase activity, changes in telomere length and experiments for cell senescence staining were identified after culture. The results showed that the pLenti-DD-Cas9-Flag-sg*TERC* recombinant plasmid was successfully constructed, and the inducible editing of the *TERC* gene was completed by utilizing the high efficiency and convenience of DD-Cas9. Sequencing results showed that the *TERC* sequence in the monoclonal cells was partially knocked out; TRAP experiment showed that the telomerase activity was down-regulated; the cell genome was extracted and the telomere length was detected by qPCR, and the results showed that the telomere length was shortened significantly. Compared with wild-type cells, *TERC* knockout cells showed obvious senescence. In conclusion, deletion of *TERC* gene leads to the phenomenon of decreased telomerase activity, shortened telomere length and senescence in cells. Human Calu3 cell model with deletion of *TERC* gene can be induced, which lays a foundation for subsequent studies on cell senescence.

Keywords CRISPR/Cas9 system; telomerase RNA; gene knockout; cell senescence

端粒是染色体末端的一段串联重复序列,由蛋白质和DNA构成的“末端保护帽”,其不同物种细胞中对于保持染色体稳定性和细胞活性有重要作用,染色体DNA复制时,DNA聚合酶不能复制末端的端粒重复片段,因此随着细胞的每一次分裂,端粒长度约缩短50~100 bp,当端粒缩短到临界长度时,细胞的复制能力就会受到阻滞^[1]。已有大量的实验结果表明,端粒的缩短可以引发细胞的复制性衰老,即正常细胞经过一定次数的分裂后不再继续分裂,且细胞形态和生理代谢活动发生显著改变。这就是“细胞衰老-端粒学说”,端粒也因此被命名为“生命之钟”^[2-3]。端粒酶是一种可以延长端粒末端的细胞逆转录酶,它不需要外源模板来合成DNA。人类端粒酶由两个重要部分组成:催化亚基(hTERT)和451 nt长的RNA组分(hTERC),后者包含一个11 nt的端粒DNA互补序列。hTERT以hTERC为模板在端粒末端添加六碱基重复序列(TTAGGG)来维持端粒长度^[4-5]。在人细胞中*TERC*基因是组成型表达的,将端粒酶催化蛋白组分导入端粒酶阴性的人类细胞中,可恢复端粒酶活性,延长细胞寿命,引入端粒酶的人类细胞可维持正常的染色体补充,并继续以正常的方式生长^[6]。实际上,端粒维持基因包括*TERT*、*TERC*、*TINF2*和*POT1*的缺陷可在一定程度上导致端粒病变,加速衰老细胞的积累,从而多方面影响机体的正常功能^[7]。衰老作为机体必经的生物学阶段,必然伴随着衰老相关疾病的发生,人类衰老机制的研究不仅有希望延缓机体衰老,且可以预防众多衰老相关疾病,实现人口健康老龄化。鉴于*TERC*是端粒酶不可或缺的组成部分,敲除细胞内*TERC*基因,会使细胞丧失或下调端

粒酶活性,从而造成细胞衰老;构建*TERC*基因敲除细胞系对于衰老相关研究显得尤为必要。

随着基因编辑技术的发展成熟,转基因衰老细胞模型也逐渐得到广泛应用。因此,本研究利用一种改进的CRISPR/Cas9系统人工诱导基因编辑功能。通过添加TMP实现对Cas9蛋白表达的控制,在Calu3细胞中成功实现端粒酶*TERC*基因的可诱导性编辑,对挑取的单克隆细胞进行端粒酶活性、端粒长度以及衰老染色实验,发现由于*TERC*基因序列的部分敲除,该细胞端粒酶活性出现一定程度的减弱,端粒长度明显缩短,并且导致细胞发生衰老;这有力证明了端粒酶活性的维持对于细胞增殖的重要性,该系统的建立成为一种直接、快速地诱导体外细胞衰老的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株和质粒 293T细胞由本实验保存;Calu3细胞购于北京协和细胞资源中心;Trans 5 α 感受态细胞购自北京擎科生物科技有限公司;pLenti-Cas9-v2质粒来自麻省理工学院博德研究所的张锋团队;后期本实验室将原质粒的Cas9蛋白与FKBP12衍生的不稳定结构域DD进行重组,构建出pLenti-DD-Cas9-Flag质粒。

1.1.2 主要试剂 sgRNA由北京博迈德基因技术有限公司合成;限制性内切酶*BsmBI*购自New England Biolabs公司;胶回收试剂盒以及PBM23-TOPO-Clone Smart Kit均购自北京博迈德基因技术有限公司;质粒小提试剂盒购自Axygen公司;基

基因组提取试剂盒购自Bimake公司; DMEM培养基购自Macgene公司; 胎牛血清购自ExCell Bio公司; 兔抗Flag-HRP(A8592)抗体购自Sigma公司; 兔抗 β -actin(40008)抗体购自proteintech公司; β -半乳糖苷酶活性检测试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司; TRAPeze(S7700)购自Millipore公司; 基因组DNA提取试剂盒购自NanoMagBio公司; 鼠尾直接PCR试剂盒购自Biomake公司。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA的设计与寡核苷酸链的合成 在NCBI中找到TERC的基因序列(Gene ID: 7012), 我们靶向TERC序列分别设计两条sgRNA, 根据网站中的评分选择得分高、脱靶效应较低的sgRNA序列, 于北京博迈德基因技术有限公司进行寡核苷酸链的合成, 如表1所示, 并将其命名为sgTERC-NAR和sgTERCp-2。

1.2.2 载体构建 用BsmBI内切酶切割线性化质粒pLenti-DD-Cas9-Flag(1~2 μ g), 按照胶回收试剂盒说明书进行切胶回收。sgTERCp-2与sgTERC-NAR两条寡核苷酸单链分别退火形成双链: 取等量的上游链和下游链各5 μ L混合(终浓度为10 μ mol/L), 10 \times T4 DNA连接酶缓冲液5 μ L, 补水至50 μ L。程序如下: 95 $^{\circ}$ C 5 min, 72 $^{\circ}$ C 10 min自然降温至室温。连接体系: 线性化pLenti-DD-Cas9-Flag质粒50 ng, sgTERC寡核苷酸双链1 μ L, 10 \times T4 DNA连接酶缓冲液1 μ L, T4 ligase 1 μ L, 补水至10 μ L, 25 $^{\circ}$ C室温连接2 h后进行转化, 于含氨苄抗性的LB平板上涂布, 次日挑取单克隆菌落, 按照质粒小提试剂盒说明书进行质粒提取并将其送至北京博迈德基因技术有限公司测序验证。

1.2.3 细胞培养与构建稳定敲除TERC的单细胞克隆 Calu3细胞培养条件: DMEM培养基(含10%胎牛血清), 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂恒温培养。正常培养的293T细胞待细胞密度至60%~70%时, 将质粒pAX2、

pVSVG、pLenti-DD-Cas9-Flag-sgTERCp-2、pLenti-DD-Cas9-Flag-sgTERC-NAR以及PEI转染试剂进行慢病毒包装。72 h后收集病毒上清, 0.45 μ m滤器过滤后获得的病毒上清液悬浮感染Calu3细胞, 48 h后加入嘌呤霉素(终浓度为2 μ g/mL)进行目的克隆的筛选, 每天进行一次换液, 5天后将筛选得到的细胞进一步计数接种于12孔板, 培养后挑取单克隆细胞接种于24孔板中, 待细胞扩增至6孔板时, 将单克隆细胞分为两份, 选取其中一份加入TMP(终浓度为10 μ mol/L)处理7天, 诱导Cas9蛋白行使基因编辑功能。收取处理好的细胞采用RIPA裂解液于冰上进行裂解操作30 min, 4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min离心15 min后取上清加入5 \times 蛋白上样缓冲液混匀, 沸水中煮样15 min, 12 000 r/min离心5 min, 取上清液进行SDS-PAGE(80 V, 30 min; 130 V, 1 h), 转NC膜(250 mA, 2.5 h), 配制5%~10%脱脂牛奶室温封闭1 h, 分别孵育Flag-HRP抗体(1:2 000)以及 α R-Actin抗体(1:4 000) 2 h, TBST洗膜(5 min, 三次)后凝胶成像仪进行显影, 显色结果灰度值采用Image Lab软件分析。

1.2.4 单克隆细胞基因组的提取 采用鼠尾直接PCR试剂盒对筛选获得的Calu3/DD-Cas9-sgTERC单克隆细胞进行裂解, 55 $^{\circ}$ C裂解细胞30 min, 95 $^{\circ}$ C灭活5 min, 12 000 r/min离心5 min, 取上清液作为基因组模板, 设计扩增TERC基因的引物序列为primer1、primer2; PCR扩增体系: 2 \times Gflex Buffer 25 μ L, primer1 2 μ L, primer2 2 μ L, Gflex 0.5 μ L, Genome 5 μ L, ddH₂O 15.5 μ L; 扩增程序: 95 $^{\circ}$ C预变性5 min; 95 $^{\circ}$ C变性30 s, 57 $^{\circ}$ C退火30 s, 68 $^{\circ}$ C延伸1 min, 共30个循环, 68 $^{\circ}$ C充分延伸10 min, 扩增产物于4 $^{\circ}$ C保存。取其中3 μ L进行琼脂糖凝胶电泳检测其特异性, 用胶回收试剂盒进行PCR产物回收, 将回收产物与PBM23-TOPO载体进行连接、转化, 送平板至北京博迈德基因技术有限公司进行测序, 测序结果与野生型Calu3细胞TERC基因序列进行比对, 鉴定靶向敲除TERC基因是否成

表1 合成的寡核苷酸序列

Table 1 Synthetic oligonucleotide sequence

引物名称	序列(5'→3')
Primer name	Sequence (5'→3')
sgTERC-NAR	Forward: 5'-cac cga gcg aga aaa aca gcg cgc g-3'
sgTERC-NAR	Reverse: 5'-aaa ccg cgc gct gtt ttt ctc gct c-3'
sgTERCp-2	Forward: 5'-cac cga cta cag cag aat ctt gtc t-3'
sgTERCp-2	Reverse: 5'-aaa cag aca aga ttc tgc tgt agt c-3'

功。

1.2.5 单克隆细胞端粒酶活性、端粒长度的鉴定 采用TRAP法对TMP处理前后的单克隆细胞端粒酶活性进行检测: 提前用进口EP管收集细胞样品, 配制好的CHAPS裂解液按TRAPeze(S7700)试剂盒说明书提前加入RNA酶抑制剂(1 mL加入200 U), 在冰上进行30 min细胞裂解, 裂解后的细胞离心取上清后进行10倍稀释, 同时将BioRad蛋白定量试剂稀释5倍, 取200 μ L加入10 μ L稀释好的样品混匀迅速加入96孔板中, 于酶标仪中读取 D_{595} 值, 根据标准曲线算出各样品的蛋白浓度并将浓度稀释至50 ng/ μ L, 换用另外一个超净工作台配制PCR体系: 10 \times TRAP反应缓冲液2.0 μ L、50 \times dNTP混合物(10 mol/L) 0.4 μ L、TS引物(0.1 μ g/ μ L) 0.4 μ L、TRAP引物混合物0.4 μ L、Taq DNA聚合酶(NEB) 0.2 μ L、RNA酶抑制剂0.2 μ L、蛋白样品1 μ L、DEPC H₂O 15.4 μ L、总体系为20 μ L; PCR扩增程序为30 $^{\circ}$ C延伸端粒序列30 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 59 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸1 min, 30个循环, 72 $^{\circ}$ C充分延伸5 min, 4 $^{\circ}$ C保存, 取出PCR样品后进行电泳检测。

端粒长度的测定: 使用KingFisher Flex DNA提取仪(Thermo Fisher)、基因组DNA提取试剂盒(NanoMagBio)从细胞中分离基因组DNA。端粒PCR的扩增引物为Tel1b: 5'-CGG TTT (GTT TGG)₅ GTT-3', Tel2b: 5'-GGC TTG (CCT TAC)₅ CCT-3' (引物使用浓度为300 nmol/L)。内参基因36B4的PCR引物为36B4u: 5'-CAG CAA GTG GGA AGG TGT AAT CC-3', 36B4d: 5'-CCC ATT CTA TCA TCA ACG GGT ACA A-3' (引物使用浓度为500 nmol/L)。使用CFX-96 qPCR仪进行qPCR检测, 端粒PCR程序设置为95 $^{\circ}$ C预变性10 min, 95 $^{\circ}$ C变性15 s, 56 $^{\circ}$ C退火/延伸1 min, 20个循环, 4 $^{\circ}$ C保存。36B4 (S) PCR程序设置为95 $^{\circ}$ C预变性10 min, 95 $^{\circ}$ C变性15 s, 60 $^{\circ}$ C退火/延伸1 min, 30个循环, 4 $^{\circ}$ C保存。每个样本测量两次, 用各组Tel引物和36B4引物扩增的Ct值计算出 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 计算各个样本的相对端粒长度。

1.2.6 衰老相关的 β -半乳糖苷酶活性检测 细胞铺板培养后取出6孔板, 弃培养液, PBS清洗10 min, 加入1 mL β -半乳糖苷酶染色固定液, 固定约15 min, 弃去固定液, PBS洗涤三次后加入配好的染色液, 于37 $^{\circ}$ C恒温箱(非CO₂孵箱)孵育, 3 h左右取出6孔板, PBS洗涤后采用倒置显微镜拍照记录染色结果, Image Lab

软件对每个视野中至少200个细胞进行统计量化, 以阳性细胞的平均百分比表示。比例尺: 20 μ m。

1.2.7 统计学分析 各实验均独立重复三次, 使用GraphPad Prism 8软件进行数据统计以及图片的绘制。定量结果数据以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 两组间数据比较采用 t 检验, 多组间数据采用方差分析, 用 $*P<0.05$ 表示差异显著, $**P<0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 重组质粒pLenti-DD-Cas9-Flag-sgTERC的构建

合成的寡核苷酸单链先通过退火形成双链, 同时用限制性内切酶BsmBI对空载质粒pLenti-DD-Cas9-Flag进行酶切, 构建出pLenti-DD-Cas9-Flag-sgTERC载体, 菌液PCR鉴定后对阳性克隆进行质粒提取, 并送至北京博迈德基因技术有限公司进行测序, 根据测序结果选择正确序列的重组质粒用于下一步实验。

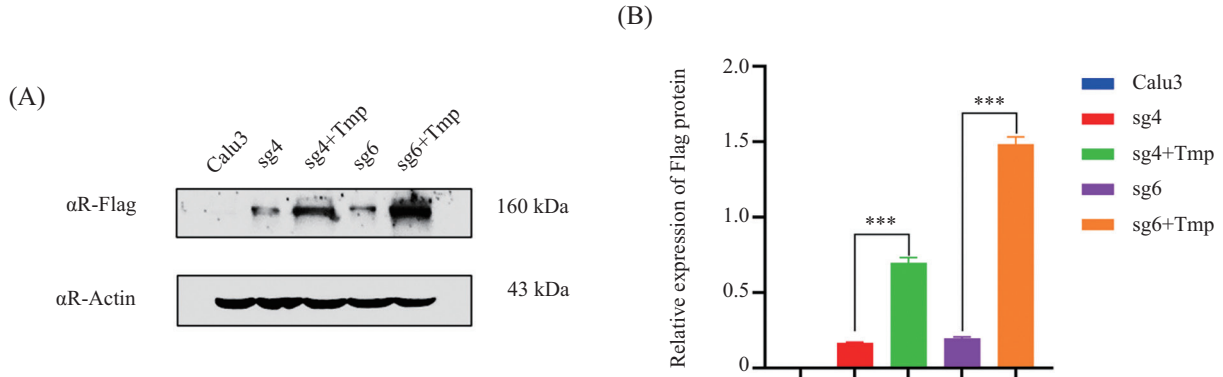
2.2 pLenti-DD-Cas9-Flag-sgTERC的成功表达以及对单克隆细胞TERC基因敲除功能的鉴定

pLenti-DD-Cas9-Flag-sgTERC包装慢病毒后感染Calu3细胞, 经Puromycin筛选后获得单克隆细胞, 对分离获得的单克隆细胞加入TMP药物诱导处理7天后, Western blot进行DD-Cas9-Flag融合蛋白的表达鉴定, 以野生型Calu3细胞为阴性对照, 如图1所示TMP诱导7天后得到的单克隆细胞中DD-Cas9-Flag表达显著上调($P<0.001$), 表明TMP的处理成功介导Cas9蛋白的稳定表达。

同时为了鉴定DD-Cas9系统对细胞TERC基因序列的切割效率, 采用鼠尾直接PCR试剂盒提取单克隆细胞基因组DNA, 进行TERC区域的扩增, 切胶回收后连接、转化感受态细胞, 送平板至北京博迈德基因技术有限公司测序。测序结果与野生型TERC序列对比后显示单克隆细胞TERC部分序列被敲除(图2), 表明该系统能够有效介导Cas9蛋白对TERC序列进行编辑。

2.3 TERC敲除细胞系的端粒酶活性检测

为检测DD-Cas9系统敲除TERC基因对端粒酶活性的影响, 进行TRAP实验对单克隆细胞的端粒酶活性进行检测, 未加入TMP诱导的单克隆细胞作为阴性对照。如图3所示, 加入TMP处理后的单克隆细胞出现较为明显的端粒酶活性下降($P<0.0001$), 证



A: Western blot检测TMP诱导处理后DD-Cas9-Flag表达上调; B: Flag相对表达水平的定量分析。*** $P < 0.001$ 。

A: Western blot detected the up-regulation of DD-Cas9-Flag after TMP induction; B: quantitative analysis of the relative expression level of Flag. *** $P < 0.001$.

图1 DD-Cas9-Flag系统的可诱导表达
Fig.1 Inducible expression of the DD-Cas9-Flag system

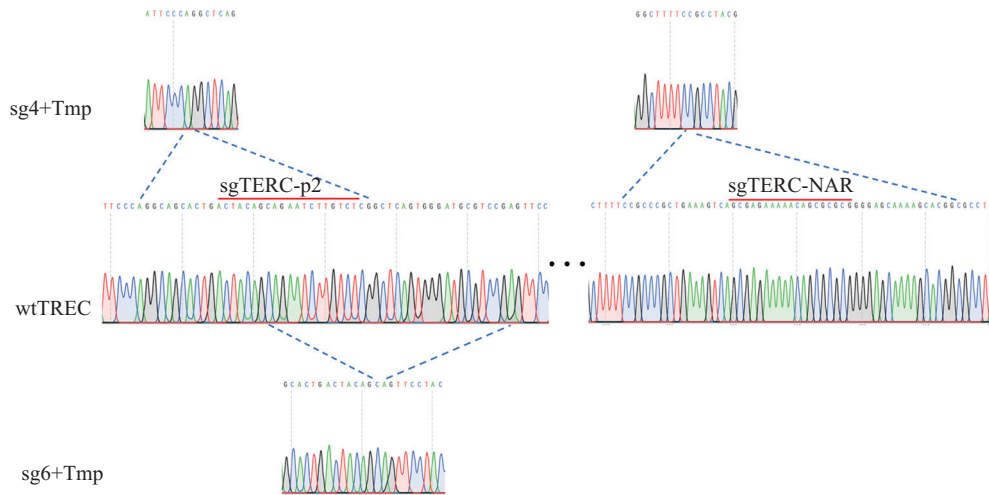
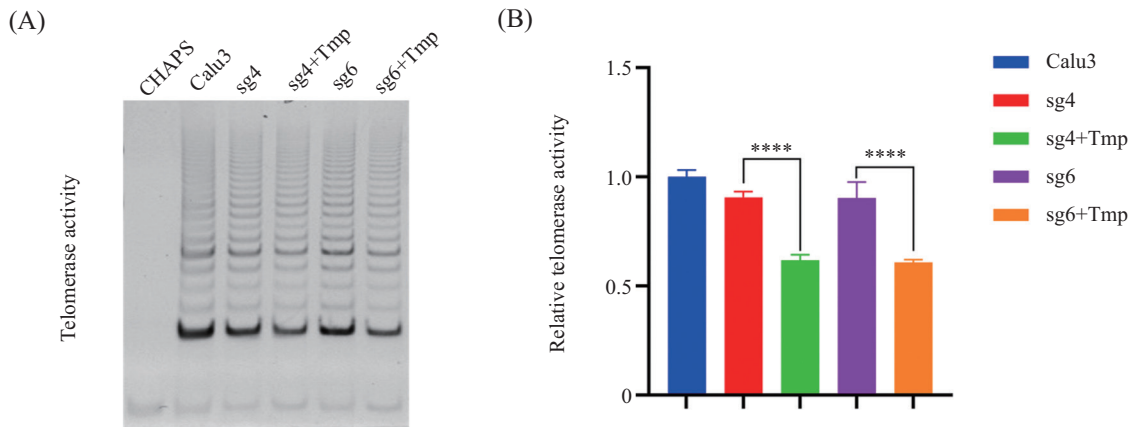


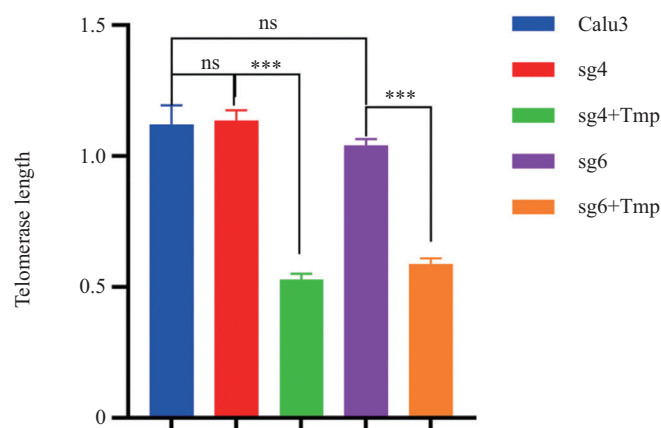
图2 TERC基因序列的靶向敲除
Fig.2 Targeted knockout of TERC gene sequences



A: TRAP法检测单克隆细胞加TMP药物诱导前后的端粒酶活性; B: TMP诱导前后端粒酶活性的定量分析。**** $P < 0.0001$ 。

A: TRAP assay to detect telomerase activity in monoclonal cells before and after TMP induction; B: quantitative analysis of telomerase activity before and after TMP induction. **** $P < 0.0001$.

图3 TERC基因的缺失导致端粒酶活性的下降
Fig.3 Deletion of TERC results in decreased telomerase activity



qPCR方法对细胞端粒长度进行测定。ns: 无统计学意义, *** $P < 0.001$ 。

Cell telomere length was measured by qPCR. ns: not statistically significant, *** $P < 0.001$.

图4 *TERC*基因的缺失导致端粒长度的缩短

Fig.4 Deletion of the *TERC* gene results in shortened telomere length

明*TERC*基因序列的部分缺失导致了细胞端粒酶活性的降低。

2.4 *TERC*敲除细胞系的端粒长度检测

在端粒酶阳性的细胞中, 端粒长度的维持需要端粒酶的参与, 即端粒酶在细胞中负责延长缩短的端粒, 从而增强体外细胞的增殖能力, 为分析并比较端粒酶*TERC*基因被部分敲除后其端粒长度的变化情况。使用基因组DNA提取试剂盒对各细胞进行基因组提取, 浓度测定后进行实时定量PCR, 根据所得的CQ值, 对细胞端粒长度进行定量分析。以野生型Calu3细胞作为对照组, 如图4所示, 加入TMP诱导后, 继端粒酶活性降低的同时, 该部分细胞的端粒长度也明显缩短。

2.5 衰老相关的 β -半乳糖苷酶活性检测

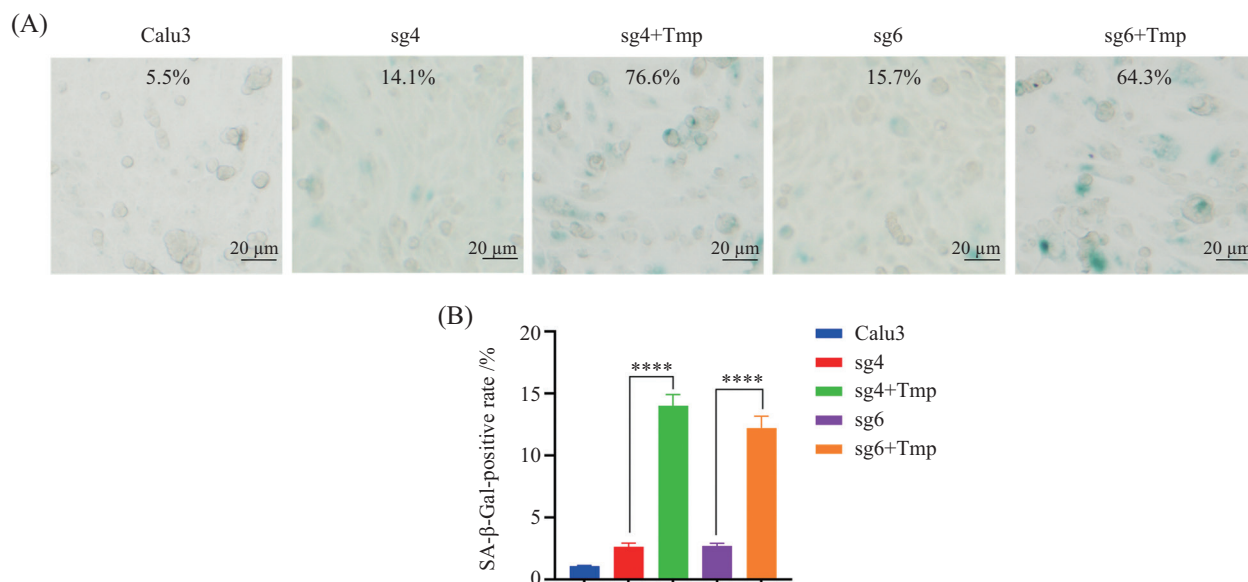
由于细胞的DNA复制程序无法完全复制染色体DNA末端, 在没有端粒维持机制的情况下, 端粒随着每一轮DNA复制而缩短。在端粒长度缩短到临界长度后会触发DDR反应(DNA损伤应答), 一个或几个DDR信号足以触发复制性衰老, 因此端粒酶活性不足也可能会导致多种遗传性早衰综合征。 β -半乳糖苷酶活性是检测细胞衰老的重要指标, 如图5所示, 在光学显微镜下挑取的sg4与sg6单克隆细胞在进行TMP处理7天后, 显示出较多高表达 β -半乳糖苷酶的细胞, 即与野生型细胞相比, 该部分细胞出现较大程度的衰老。

3 讨论

近年来, CRISPR/Cas9技术已广泛应用于多种

生物基因组的研究, 因其高度特异性以及强效打靶的特点, 不仅快速成为基因靶向研究的新型手段, 且在基因组筛选、基因转录调控、基因组成像、基因诊疗、生态应用等领域的研究中兴起^[8-10]。但目前限制该技术使用的主要问题是利用CRISPR/Cas9组成型表达系统, 很难获得一些影响细胞生存能力的基因编辑模型。此外, 已经证明Cas9的组成型表达会增加脱靶突变的数量, 并触发DNA损伤反应^[11]。我们将FKBP12衍生的不稳定结构与Cas9蛋白进行融合, 一方面利用了CRISPR/Cas9系统高效的基因编辑功能, 通过添加化学药物TMP以一种快速的、可逆的、剂量依赖性方式控制基因编辑功能。另一方面该系统更易于在同一启动子的控制下将DD-Cas9蛋白与其他任何目的基因共表达, 而无需单独对后者进行调控。这不但可用于目的基因的本质表征和鉴定, 也为功能基因之间相互作用提供有效的工具^[12-14]。此外, 基因编辑后, Cas9蛋白的快速失活可在一定程度上防治脱靶问题; 该可诱导模型使我们可对*TERC*的基因编辑进行时间控制, 其功能性更强。

如今, 世界人口老龄化问题日趋加重, 衰老与慢性病之间的联系促使人们对衰老机制和延缓衰老策略进行基础性研究。细胞衰老是机体生理功能紊乱下降的生命退化过程, 由多种生理和病理压力因子诱导的适应性反应, 其中细胞依然保持代谢活性但呈现出细胞周期停滞的状态^[15]。大量研究表明, 衰老通常由损伤性刺激引起, 包括端粒缩短、DNA损伤剂和癌基因诱导的衰老^[16-18]。其中, 端粒酶组



A: SA-β-Gal对Calu3-DD-cas9-sgTERC细胞染色检测细胞衰老情况; B: β-半乳糖苷酶染色阳性细胞的定量分析。**** $P < 0.0001$ 。

A: SA-β-Gal staining of Calu3-DD-cas9-sgTERC monoclonal cells to detect cell senescence; B: quantitative analysis of β-galactosidase positive cells. **** $P < 0.0001$.

图5 *TERC*基因的缺失导致单克隆细胞发生衰老

Fig.5 Deletion of the *TERC* gene causes senescence in monoclonal cells

成成分TERC、端粒酶蛋白或TERT启动子元件发生突变所引起的端粒或端粒酶功能异常将引起多种遗传性疾病(先天性角化障碍和特发性肺纤维化)^[19-21]。端粒缩短或端粒结构破坏已成为细胞衰老的主要启动因素。同时,研究也表明端粒酶在肿瘤细胞的凋亡和基因组稳定的调控过程中也发挥重要的作用,因此,端粒酶介导的端粒长度的调控不仅对细胞和组织正常运作很重要,而且对预防和治疗衰老及与年龄相关的疾病具有重要意义。

传统的细胞复制性衰老模型主要通过体外连续传代培养使细胞端粒逐渐缩短进而发生自然衰老,但其耗时长,难以在短时间内获取大量衰老细胞。另外,使正常细胞暴露于衰老相关的应激条件如活性氧、自由基活跃的外界环境下易引起早熟性衰老。其中涉及的DNA损伤反应是一个较为复杂的网络^[22-23]。因此需要建立高效、便捷、稳定的衰老细胞模型以完善衰老相关研究。本文选择端粒酶核心组分*TERC*进行敲除,构建了重组质粒pLenti-DD-Cas9-Flag-sgTERC,并利用DD-Cas9系统获得了*TERC*基因敲除的Calu3稳定细胞株,成功地解决了该基因序列缺失后细胞自身生长的阻滞问题,保证细胞状态良好的同时完成对基因的靶向研究。研究结果证明了端粒功能障碍是驱动细胞衰老的重要诱

因,敲除端粒酶TERC组分构建可诱导的衰老模型有利于各实验室的推广与应用,也为后期对衰老相关疾病的研究及防治提供了技术支持。

参考文献 (References)

- [1] CHAKRAVARTI D, LABELLA K A, DEPINHO R A. Telomeres: history, health, and hallmarks of aging [J]. *Cell*, 2021, 184(2): 306-22.
- [2] XIE Z, JAY K A, SMITH D L, et al. Early telomerase inactivation accelerates aging independently of telomere length [J]. *Cell*, 2015, 160(5): 928-39.
- [3] ARMANIOS M, BLACKBURN E H. The telomere syndromes [J]. *Nat Rev Genet*, 2012, 13(10): 693-704.
- [4] XI L, CECH T R. Inventory of telomerase components in human cells reveals multiple subpopulations of hTR and hTERT [J]. *Nucleic Acids Res*, 2014, 42(13): 8565-77.
- [5] ZHAO Y, HOSHIYAMA H, SHAY J W, et al. Quantitative telomeric overhang determination using a double-strand specific nuclease [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(3): e14.
- [6] SHAY J W. Role of telomeres and telomerase in aging and cancer [J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(6): 584-93.
- [7] CODD V, NELSON C P, ALBRECHT E, et al. Identification of seven loci affecting mean telomere length and their association with disease [J]. *Nat Genet*, 2013, 45(4): 422-7, 7e1-2.
- [8] RAN F A, HSU P D, WRIGHT J, et al. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system [J]. *Nat Protoc*, 2013, 8(11): 2281-308.
- [9] WU Y, LIANG D, WANG Y, et al. Correction of a genetic disease in mouse via use of CRISPR-Cas9 [J]. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(6): 659-62.

- [10] LIANG P, XU Y, ZHANG X, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human tripronuclear zygotes [J]. *Protein Cell*, 2015, 6(5): 363-72.
- [11] SUN N, PETIWALA S, WANG R, et al. Development of drug-inducible CRISPR-Cas9 systems for large-scale functional screening [J]. *BMC Genomics*, 2019, 20(1): 225.
- [12] WANG D, ZHANG F, GAO G. CRISPR-based therapeutic genome editing: strategies and *in vivo* delivery by AAV vectors [J]. *Cell*, 2020, 181(1): 136-50.
- [13] MAJI B, MOORE C L, ZETSCHKE B, et al. Multidimensional chemical control of CRISPR-Cas9 [J]. *Nat Chem Biol*, 2017, 13(1): 9-11.
- [14] SENTURK S, SHIROLE N H, NOWAK D G, et al. Rapid and tunable method to temporally control gene editing based on conditional Cas9 stabilization [J]. *Nat Commun*, 2017, 8: 14370.
- [15] DI MICCO R, KRIZHANOVSKY V, BAKER D, et al. Cellular senescence in ageing: from mechanisms to therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2021, 22(2): 75-95.
- [16] NOVAKOVA Z, HUBACKOVA S, KOSAR M, et al. Cytokine expression and signaling in drug-induced cellular senescence [J]. *Oncogene*, 2010, 29(2): 273-84.
- [17] BODNAR A G, OUELLETTE M, FROLKIS M, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells [J]. *Science*, 1998, 279(5349): 349-52.
- [18] BARTKOVA J, REZAEI N, LIONTOS M, et al. Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints [J]. *Nature*, 2006, 444(7119): 633-7.
- [19] LIU H, YANG Y, GE Y, et al. TERC promotes cellular inflammatory response independent of telomerase [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(15): 8084-95.
- [20] BELLON M, NICOT C. Regulation of telomerase and telomeres: human tumor viruses take control [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2008, 100(2): 98-108.
- [21] MANCINI A, XAVIER-MAGALHAES A, WOODS W S, et al. Disruption of the beta1L isoform of GABP reverses glioblastoma replicative immortality in a TERT promoter mutation-dependent manner [J]. *Cancer Cell*, 2018, 34(3): 513-28, e8.
- [22] BONAB M M, ALIMOGHADDAM K, TALEBIAN F, et al. Aging of mesenchymal stem cell *in vitro* [J]. *BMC Cell Biol*, 2006, 7: 14.
- [23] DUGGAL S, BRINCHMANN J E. Importance of serum source for the *in vitro* replicative senescence of human bone marrow derived mesenchymal stem cells [J]. *J Cell Physiol*, 2011, 226(11): 2908-15.