

· 技术与方法 ·

CRISPR-Cas9介导AAVS1安全港敲入构建稳定表达hMSR1与细胞膜锚定荧光蛋白的HEK293A细胞系

黄雅冰^{1,2} 李正航^{1,2} 池铭威³ 贝祝春^{2*} 徐勤^{1*} 宋亚彬^{2*}⁽¹⁾广州中医药大学青蒿研究中心, 广州 510000; ⁽²⁾军事医学研究院病原微生物生物安全全国重点实验室, 北京 100071; ⁽³⁾广州中医药大学科技创新中心, 广州 510000)

摘要 该研究旨在通过定点敲入人巨噬细胞清道夫受体1(human macrophage scavenger receptor 1, *hMSR1*)和细胞膜锚定荧光蛋白基因以提高HEK293A细胞的黏附性能, 并对细胞膜进行荧光标记。采用成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白9基因编辑技术, 将*hMSR1*和荧光蛋白双顺反子表达基因盒定点整合至HEK293A细胞的安全港位点腺相关病毒整合位点1(adeno-associated virus integration site 1, *AAVS1*)构建稳定细胞系。通过PBS冲洗后的结晶紫染色测定细胞黏附性能; 用CCK-8染色法检测细胞增殖活性; 通过荧光素酶报告基因检测细胞转染效率及其对信号通路的应答; 通过荧光显微成像分析荧光蛋白细胞定位。研究筛选获得4个目的基因正确整合的重组细胞克隆系, 其贴壁性均远高于野生型HEK293A细胞, 并有正确定位于细胞膜的荧光蛋白表达, 且没有增殖活性的显著改变与基础信号通路应答的缺失。

关键词 巨噬细胞清道夫受体; HEK293A细胞; 细胞黏附; CRISPR-Cas9基因编辑; *AAVS1*安全港

Establishing a HEK293A Cell Line Stably Expressing hMSR1 and a Membrane-Anchored Fluorescent Protein via CRISPR-Cas9-Mediated AAVS1 Safe Harbor Knock-in

HUANG Yabing^{1,2}, LI Zhenhang^{1,2}, CHI Mingwei³, BEI Zhuchun^{2*}, XU Qin^{1*}, SONG Yabin^{2*}⁽¹⁾Artemisinin Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China;⁽²⁾State Key Laboratory of Pathogen and Biosecurity, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071, China;⁽³⁾Science and Technology Innovation Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510000, China)

Abstract This study aimed to enhance the adhesion and label the plasma membrane of HEK293A cell line by knocking in the *hMSR1* (human macrophage scavenger receptor 1) and membrane-anchored fluorescent protein genes at a specified site. Using the CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)-Cas9 (CRISPR-associated protein 9) gene editing technology, the *hMSR1* and membrane-anchored fluorescent protein bicistronic expression cassette was precisely integrated into the *AAVS1* (adeno-associated virus integration site 1). Cell adherence was determined by crystal violet staining following PBS washing; cell proliferation was measured using CCK-8 assay; transfection efficiency

收稿日期: 2026-05-12

接受日期: 2026-09-01

新发突发与重大传染病防控国家科技重大专项(批准号: 2025ZD01904100)资助的课题

*通信作者。E-mail: beizhuchun@hotmail.com; xuqin@gzucm.edu.cn; songyb@126.com

Received: May 12, 2026

Accepted: September 1, 2026

This work was supported by the National Science and Technology Major Project on Prevention and Control of Emerging, Outbreak, and Major Infectious Diseases (Grant No.2025ZD01904100)

*Corresponding authors. E-mail: beizhuchun@hotmail.com; xuqin@gzucm.edu.cn; songyb@126.com

and response to signaling pathway activation in cells were assessed by luciferase reporter assays; and fluorescent protein localization was analyzed by fluorescence microscopy. Four recombinants with correct integration of the target genes were selected, all of which showed significantly stronger adherence to tissue culture plastic than wild-type HEK293A cells and correct membrane localization of the fluorescent protein, with no significant changes in proliferation profile or loss of responsive to basic signaling pathway activation.

Keywords macrophage scavenger receptor; HEK293A cell; cell adhesion; CRISPR-Cas9 gene editing; *AAVSI* safe harbor

人胚胎肾细胞293(human embryonic kidney 293 cell, HEK293)是由原代人胚胎肾细胞转染5型腺病毒DNA片段而建立的永生化细胞系。因转染效率高,易于稳定转染,且表达几乎所有信号转导通路的组成蛋白,HEK293及其衍生细胞系被广泛应用于重组蛋白表达,载体病毒包装与扩增,及信号转导、蛋白质相互作用等研究,也是高通量筛选系统最常选用的模型细胞。然而,其黏附性低,在常规细胞培养表面的贴壁不牢,给一些需多次换液或细胞单层洗涤的研究带来了不便。特别是对于药物高通量筛选、基于“细胞绘画”(Cell Painting)的高内涵筛选^[1-2]及细胞-基底锚定依赖的无标记细胞检测^[3],操作过程中不可控的细胞数量损失,或细胞-基底附着不够紧密,会大大降低检测灵敏度、放大数据波动,严重影响研究方法的稳健性与结果的可靠性。

某些HEK293亚克隆细胞系,如HEK293H、HEK293A,黏附性相对较强,可在培养表面贴壁生长,但并不耐受较严苛的洗涤或多次洗涤。培养表面的多聚赖氨酸包被处理是提高低黏附细胞贴壁性能的最常用方法^[4]。然而,标准的多聚赖氨酸或其他多聚物的包被通常涉及长时间孵育及随后的漂洗、干燥步骤,较为繁琐耗时,均一性欠佳且成本较高。虽然有研究表明,标准浓度(100 µg/mL)多聚-D-赖氨酸(poly-D-lysine, PDL)或10~30 µg/mL聚乙烯亚胺(poly-ethylenimine, PEI)简短包被(室温孵育5 min后直接弃去,不漂洗、不干燥),以及直接在培养基中添加更低浓度的PDL(2 µg/mL)或PEI(1.5 µg/mL),均可达到与标准包被流程相当的效果^[5];但后者在无血清或低血清条件下效果大幅下降,且细胞耐受性不佳,而前者无法避免包被效果不均一的问题。

1998年,Robbins与Horlick^[6]通过人巨噬细胞清道夫受体1(human macrophage scavenger receptor 1, *hMSR1*;也称*SR-A*或*CD204*)基因的稳定转染,构建了在细胞培养微孔板、滚瓶及未处理玻璃基底中均

展现出良好贴壁性能的HEK293 EBNA细胞系,为提高HEK293细胞系黏附性提供了新的思路。之后,Ojala等^[7]发现异源表达小鼠A类清道夫受体5(scavenger receptor class A member 5, SCARA5)同样可显著增强HEK293 EBNA和CHO细胞在明胶包被玻璃或细胞培养塑料基底的黏附性,且可有效逆转重组层粘连蛋白α3链C-端G1~G3结构域表达引起的黏附抑制,显著改善细胞在无血清条件下的贴壁与存活情况,提高重组蛋白产量。后续研究还表明,hMSR1共表达可显著提高HEK293T细胞在传感表面的黏附性,缩短细胞膜-基底间距,从而在基于界面阻抗或倏逝场的无标记检测中大幅提升细胞对H1受体刺激的信号响应强度和信噪比^[3]。而以hMSR1稳定过表达HEK293细胞构建自动化高通量药物筛选平台,也可显著减少换液、洗涤步骤中的细胞损失,降低操作相关的数据波动,提高系统稳健性^[8]。

然而,瞬时转染表达短暂且不稳定,实验批次间波动较大,也无法提供可长期复用的稳定细胞资源;而传统依赖于随机非靶向整合的稳定细胞系构建方法,外源基因整合位点不可控,可能因随机插入突变破坏内源基因功能,导致非预期的细胞表型改变(如信号转导通路功能受损等)。为获得稳定表达目的基因且无其他不利表型改变的稳定细胞系,通常需筛选、鉴定大量单克隆,耗时费力且成功率不高。基因组安全港(genomic safe harbors),即基因组中能够支持外源基因稳定整合、可预测表达,且不会对细胞功能造成不良影响的特定位点,是转基因插入的理想靶点,广泛应用于功能遗传学与基因治疗研究^[9]。借助成簇规律间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)及其相关蛋白9(CRISPR-associated protein 9, Cas9)介导的DNA双链定点断裂及同源定向修复(homology directed repair, HDR)^[10-11],可实现外源基因在安全港的高效定点敲入,显著降低随机插入突变风险。位于人类19号染

色体蛋白磷酸酶1调节亚基12C(protein phosphatase 1 regulatory subunit 12C, *PPP1R12C*)基因内含子1的腺相关病毒整合位点1(adeno-associated virus integration site 1, *AAVSI*)是人类细胞转基因研究广泛选用的安全港之一^[9,12]。有研究表明,在HEK293细胞中,*AAVSI*相比其他安全港位点,可支持外源基因更高水平、更均一且更稳定的表达^[13]。

为了增强HEK293细胞系的黏附性,提高其在高通量筛选、高内涵筛选及其他需要细胞良好贴壁的研究中的性能,本研究采用CRISPR-Cas9介导的*AAVSI*安全港定点敲入及内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)介导的双顺反子表达策略,构建了稳定表达hMSR1和细胞膜锚定单体青绿荧光蛋白1(monomeric teal fluorescent protein 1, mTFP1)^[14]的HEK293A-hMSR1细胞系。其在保持野生型细胞相近增殖特性和基础信号通路应答能力的同时,表现出更强的黏附力和更高的外源基因转染效率,并可为细胞成像分析提供免染色的细胞膜标记。

1 材料和方法

1.1 细胞与质粒

HEK293A细胞购自河南商城北纳创联生物科技有限公司; AAVS1 gRNA/Cas9表达质粒(EF1-hspCas9-H1-AAVS1-gRNA)和*AAVSI*安全港转基因供体骨架质粒(AAVS1-SA-puro-MCS donor)为*AAVSI*安

全港靶向系统组分,购自美国System Biosciences公司。*hMSR1*编码序列(coding sequence, CDS)(GenBank: D90187.1; 核苷酸47—1 402, 编码451个氨基酸,经沉默突变去除*Pst* I、*Ava* I位点)、*mTFP1* CDS均由金斯瑞生物科技股份有限公司合成,并克隆于pUC-SP载体中。IRES介导双顺反子表达质粒pEXKA3, 荧光素酶报告质粒pEXHA3-hCluc-mKOk-hGluc、pEXHA3-hCluc-mScarlet3-hGluc、pEXHK-hCluc及I/II型干扰素响应元件驱动报告基因质粒pMC-ISRE-mScarlet3_A、pMC-GAS-mLemon_A均为实验室前期构建。所有引物(表1)合成及克隆插入片段的Sanger测序均由生工生物工程(上海)股份有限公司完成。

1.2 试剂耗材

所用试剂耗材:限制性内切酶、T4 DNA连接酶、Monarch DNA胶回收试剂盒、Monarch质粒小提试剂盒和Monarch PCR/DNA纯化试剂盒(New England Biolabs, 美国), PrimeSTAR Max DNA聚合酶(TaKaRa, 日本), Platinum™ SuperFi™ II Master Mix(Invitrogen, 美国), 海萤荧光素 vargulin(上海诺宁生物科技有限公司), CTZ(coelenterazine)、CTZ-h(coelenterazine-h)、IFN-γ和IFN-β(MedChemExpress, 美国), 6-氮杂-2-硫代胸腺嘧啶(6-Aza-2-thiothymine, ATT)和嘌呤霉素(北京索莱宝科技有限公司), 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、DMEM(Dulbecco's modified Eagle medium)培养基、Opti-MEM™培养基、青霉素-链霉素混合液

表1 PCR引物序列

Table 1 Sequences of primers for PCR

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
CAAX_F	GTA CAA GGG CCG GCT CCG GTG GCT CCA AGA AAA AGA AGA AGT CAA AAA CCA AGT GTG TTA TCA TGT AAC TGC A
CAAX_R	GTT ACA TGA TAA CAC ACT TGG TTT TTG ACT TCT TCT TCT TTT TCT TGG AGC CAC CGG AGC CGC CCT T
mTFP1-CAAX_F	GAA ACC GGT GC CAC CAT GGT GAG CAA GGG CGA G
mTFP1-CAAX_R	CCC ACG CGT TTA CAT GAT AAC ACA CTT GGT TTT TGA
CMV-hMSR1_F	AAT TCT AGA GAC ATT GAT TAT TGA CTA GTT
CMV-hMSR1_R	TAT TAT CAT CGT GTT TTT CAA AGG AA
5' junction_F	TCC TGA GTC CGG ACC ACT TT
5' junction_R	CAC CGC ATG TTA GAA GAC TTC C
3' junction_F	CAG TGG CAG CCA GGT TTA GC
3' junction_R	CCT GGG ATA CCC CGA AGA GT
hMSR1-mTFP1_F	AAA GAA GAA CAA GTG CAT TTG GAA CAG GAA ATA AA
hMSR1-mTFP1_R	ACG CGT TTA CAT GAT AAC ACA CTT GGT TTT TGA

F:正向引物; R: 反向引物。

F: forward primer; R: reverse primer.

(100 U/mL)、TrypLETM Express酶(1×/10×)及锥虫蓝染色剂(0.4%)(Gibco, 美国), 磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)、CelLytic™ M、二甲基亚砜、结晶紫染色液、甲醇和冰醋酸(Sigma-Aldrich, 美国), CCK-8(Cell Counting Kit-8; Dojindo Laboratories, 日本), PureLink HiPure质粒大提试剂盒、Lipofectamine™ 3000转染试剂及MitoTracker® Deep Red FM、Hoechst 33342染料、预染蛋白分子量标准品(Marker)和SuperSignal West Pico PLUS化学发光底物(ThermoFisher Scientific, 美国), SF Cell Line 4D-Nucleofector® X试剂盒(Lonza, 瑞士), 白色不透明96孔半区微孔板(Greiner, 奥地利), 黑色不透明6孔玻璃底/共聚焦培养板(北京兰杰柯科技有限公司), 透明6孔细胞培养板、透明96孔细胞培养板(Corning, 美国), 克隆环用密封硅脂、玻璃克隆环(海德创业北京生物科技有限公司), PDL(Sigma-Aldrich, 美国), RIPA裂解缓冲液、苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF)和BCA蛋白浓度测定试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司), 5×蛋白上样缓冲液(北京阳光英锐生物科技有限公司), Adamas-life® 8%~16% Tris-甘氨酸预制胶(上海泰坦科技股份有限公司), 10× Tris-甘氨酸电泳缓冲液、10× Western blot转膜缓冲液及10× TBST(北京康润生物科技有限公司), 无蛋白快速封闭液(北京兰博利德商贸有限公司), 聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride, PVDF)膜(GE Healthcare, 美国), 兔抗hMSR1抗体(货号: ARG41009)和小鼠抗β-actin抗体(货号: ARG62346)(恩瑞科生物科技有限公司), 辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的山羊抗兔IgG二抗(货号: 111-035-003)和HRP标记的山羊抗小鼠IgG二抗(货号: 115-035-003)(Jackson ImmunoResearch, 美国)。

1.3 仪器

所用仪器: Veriti 96 PCR仪(Applied Biosystems, 美国)、CO₂培养箱(SANYO, 日本)、DYY-6C电泳仪(北京六一生物科技有限公司)、CK40倒置显微镜(Olympus, 日本)、SpectraMax i3x多功能酶标仪(Molecular Devices, 美国)、4D-Nucleofector®细胞转染系统(Lonza, 瑞士)、EVOS FLoid细胞成像系统(ThermoFisher Scientific, 美国)、Cytation 5多功能细胞成像检测系统(Agilent BioTek, 美国)、MiniChemii 2化学发光成像仪(北京森西赛智科技有限公司)。

1.4 质粒构建

通过将编码细胞膜锚定CAAX基序的寡核苷酸

(CAAX_F、CAAX_R)退火形成具有5'突出末端的双链, 并插入至*mTFPI*编码区3'端(*Bsr*G I、*Pst* I位点之间), 获得含*mTFPI*-CAAX目的片段质粒。IRES介导的*hMSR1*、*mTFPI*-CAAX双顺反子表达元件经传统分子克隆方法分步克隆至AAVS1-SA-puro-EF1-MCS donor质粒, 替换原有EF1-MCS表达盒, 获得AAV/SSI转基因供体质粒AAVS1-SA-puro-CMV-hMSR1-IRES-mTFPI-CAAX。具体步骤如图1所示。涉及的分子生物学实验操作均按试剂生产商说明书进行, 获得的质粒均通过限制性酶切和Sanger测序验证。

1.5 细胞培养与转染

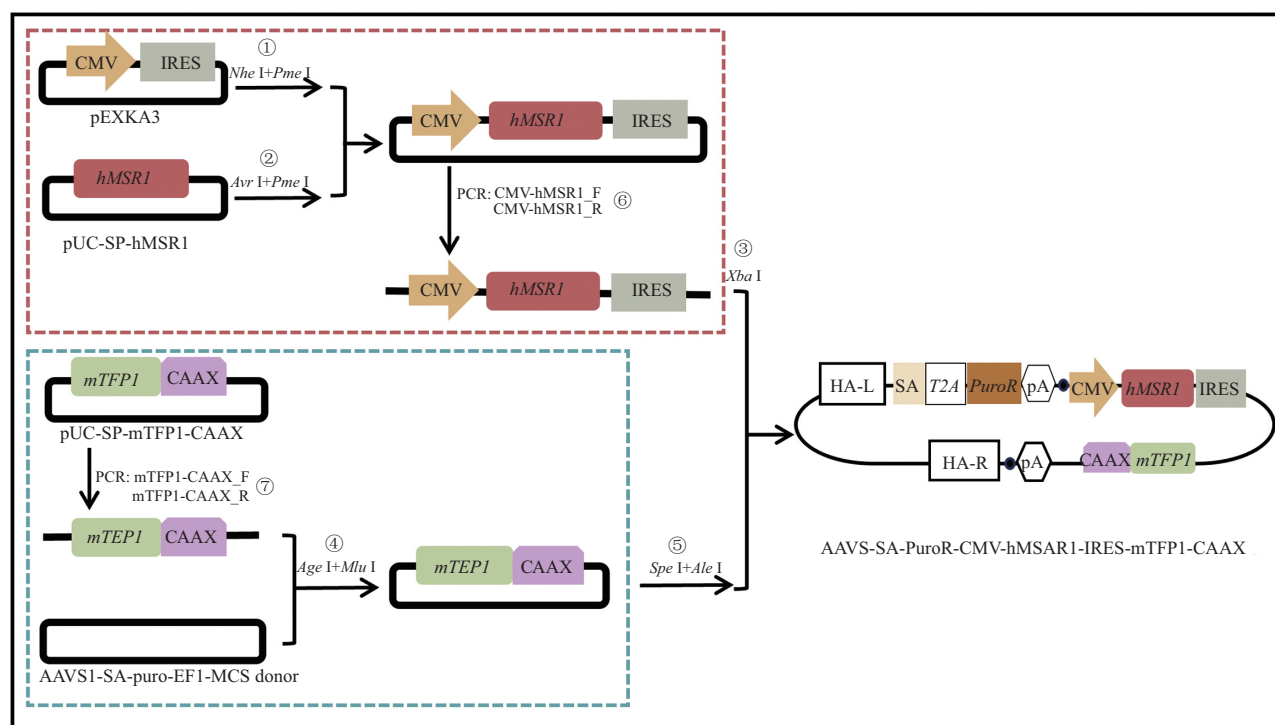
HEK293A细胞在37 °C、5% CO₂条件下, 使用添加了10%胎牛血清和100 U/mL青霉素-链霉素双抗的高糖DMEM培养基进行培养, 每周传代培养2~3次。

电转染用4D-Nucleofector®系统及SF Cell Line 4D-Nucleofector® X试剂盒完成。具体如下: HEK293A细胞经0.4%锥虫蓝染色确认活细胞占比>90%后, 以1×10⁷/mL的密度重悬于Nucleofector® SF溶液, 加入0.8~2.0 μg质粒DNA并混匀, 然后移入Nucleocuvette®反应板, 采用FS-100程序进行电转。转染后细胞以预温培养基重悬, 接种于培养板, 于37 °C、5% CO₂条件下继续培养。

脂质体转染采用Lipofectamine™ 3000转染试剂进行。转染前一天将细胞接种于培养板中, 使其在转染时密度达到70%~90%汇合度。转染时, 用Opti-MEM™培养基稀释Lipofectamine™ 3000试剂和DNA, 并在后者稀释液中加入P3000™试剂(2 μL/μg DNA)制备DNA-P3000预混液, 室温孵育5 min后将二者等体积混合, 继续室温静置10~15 min形成DNA-脂质体复合物。随后将复合物加入含完全培养基的待转染细胞培养孔中, 于37 °C、5% CO₂条件下继续培养。

1.6 稳定细胞系的筛选与单克隆化

HEK293A细胞以4D-Nucleofector®系统共转染EF1-hspCas9-H1-AAVS1-gRNA(2.5 μg)和AAVS1-SA-puro-CMV-hMSR1-IRES-mTFPI-CAAX(2.5 μg) 24 h后, 按照1:10至1:20的比例将其重新接种于6孔板中并继续培养24 h, 使细胞状态充分恢复。继续培养至转染后1周, 开始加入嘌呤霉素(终浓度1 μg/mL)进行稳定克隆筛选。随后, 每2~3 d换液1次, 持续培养10~14 d, 直至未转染对照组细胞全部死亡, 共转染组



①~⑤酶切反应及相应限制性内切酶; ⑥、⑦: PCR反应及相应引物; HA-L/HA-R: 左/右同源臂; SA: 剪接受体; T2A: T2A自剪切肽CDS; PuroR: 嘌呤霉素抗性基因CDS; pA: 多聚腺苷酸终止信号; CMV: 人巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)启动子; IRES: 内部核糖体进入位点; 其他彩色方块为对应基因的CDS; 黑色圆点为绝缘子序列。

①~⑤: restriction enzyme digestion reactions and the enzymes used; ⑥, ⑦: PCR reactions and the primers used; HA-L/HA-R: left/right homology arms; SA: splice receptor; T2A: CDS for T2A self-cleaving peptide; PuroR: CDS for puromycin resistance gene; pA: polyadenylation signal; CMV: cytomegalovirus promoter; IRES: internal ribosome entry site; other colored boxes indicate the CDSs as labeled, black dot represents core insulator.

图1 供体质粒构建示意图

Fig.1 Schematic diagram of donor plasmid construction

细胞出现清晰的抗性克隆。待抗性克隆长大至可见米粒大小(500~1 000个细胞)时,用克隆环挑取独立克隆,扩增培养、冻存。

1.7 基因型鉴定

挑取单个嘌呤霉素抗性克隆群落扩大培养,用Monarch®基因组DNA提取试剂盒从各单克隆细胞中提取基因组DNA。通过整合位点连接区及插入片段的聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)验证目的基因的插入与整合位点的准确性。

5'-连接区和3'-连接区的PCR鉴定按AAVS1安全港靶向系统产品说明书所述方法进行。插入片段hMSR1-mTFP1的PCR鉴定使用Platinum™ SuperFi™ II Master Mix,反应体系及两步法PCR程序按试剂说明书设置。所用PCR引物及序列见图2和表1。PCR产物均通过2%琼脂糖凝胶电泳进行分析。

1.8 蛋白免疫印迹(Western blot)

收集细胞后,于冰上用含1 mmol/L PMSF的

RIPA裂解液裂解细胞,4℃、16 000 ×g离心20 min提取总蛋白。BCA法测蛋白浓度后,取等量(20 μg)总蛋白,经8%~16%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳进行分离,并将其转移至PVDF膜。膜经无蛋白快速封闭液室温封闭15 min后,与hMSR1抗体(1:1 000稀释)或β-actin抗体(1:2 500稀释)4℃孵育过夜,随后与HRP标记的二抗(1:100 000稀释)室温孵育1.5 h。SuperSignal West Pico PLUS化学发光底物显影后,用Fiji(ImageJ 1.54s)软件^[15]进行分析。目的条带分子量用MolecularWeightEstimator插件根据蛋白Maker条带迁移位置估算。目的条带积分灰度值以同膜β-actin条带为内参进行归一化。以重组细胞样品相对于野生型细胞样品的归一化积分灰度比值比较不同克隆样品间的差异。

1.9 表型鉴定

1.9.1 细胞活性检测 细胞增殖用CCK-8试剂盒检测。细胞以 $1 \times 10^4 \sim 1.5 \times 10^4$ /孔的密度接种在96孔细胞培养板中,每孔体积100 μL,置于37℃、5% CO₂

培养箱中培养。分别于接种后6、24、48及72 h 4个时间点进行检测。每个检测时间点,在相应孔板中每孔直接加入10 μ L CCK-8溶液,轻摇混匀后继续于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中孵育2 h,立即使用多功能酶标仪在450 nm波长下测定各孔的吸光度(D_{450})值。4个时间点均设独立的检测孔板,避免反复操作影响细胞的生长。用 D_{450} 值对培养时长的对数值进行四参数非线性拟合,比较两种细胞的增殖曲线。

1.9.2 细胞黏附性测定 将细胞以适宜密度接种于4块96孔细胞培养板,培养24~48 h,至细胞形成均匀单层(约90%汇合度),于PBS冲洗后进行结晶紫染色以评估细胞黏附强度。冲洗操作如下:沿孔壁缓慢加入预热至37 $^{\circ}$ C的PBS,水平摇晃约30 s,轻柔吸除液体后,记此步骤为1次冲洗。不同细胞培养板分别进行0、3、5和7次重复冲洗。冲洗完成后,每孔加入100 μ L预冷甲醇,于-20 $^{\circ}$ C固定10 min。弃去甲醇,加入100 μ L 0.1%的结晶紫染色液,室温避光染色15 min。染色结束后,用去离子水轻柔漂洗至背景无色。拍照记录染色情况后,每孔加入100 μ L 33%冰醋酸,摇床振荡10 min至紫色结晶完全溶解后,于570 nm波长处测定吸光度(D_{570})值。以0次洗涤细胞样品为对照(100%),评估不同次数洗涤后的细胞损失情况。每板平行设置野生型HEK293A细胞对照,包括:未经任何处理组、PDL预包被(100 μ g/mL PDL室温孵育5 min)组和培养基含2 μ g/mL PDL组。

1.9.3 转染效率及基础信号通路应答能力检测 以荧光素酶报告质粒pEXHA3-hCluc-mKOk-hGluc、pEXHA3-hCluc-mScarlet3-hGluc进行脂质体转染检测细胞对外源基因的转染效率。具体如下:细胞转染48 h后,先取培养上清用CCK-8检测活细胞数,随后弃上清并用CellLytic™ M裂解细胞。每个样品取10 μ L细胞裂解液至白色不透明96孔半区微孔板中,每孔加入90 μ L检测缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl、70 mmol/L NaCl、5 mmol/L MgCl₂、125 μ mol/L CTZ)后,于多功能酶标仪上检测全波长下的发光强度值。以发光强度值除以同一样品CCK-8检测的 D_{450} 值,计算相对发光单位值(relative luminescence unit, RLU),以评估转染效率。细胞对I/II型干扰素(interferon, IFN)信号通路的应答,通过转染pMC-ISRE-mScarlet3_A、pMC-GAS-mLemon_A荧光素酶报告质粒进行检测。为消除转染效率差异带来的影响,检测信号均以共转染pEXHK-

Cluc质粒的信号为内参进行归一化处理。细胞转染24 h后分别加入IFN- γ 或IFN- β 至终浓度为1 μ g/mL或1 ng/mL。继续培养48 h后,先取上清以Cluc检测缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl、70 mmol/L NaCl、5 mmol/L MgCl₂、50 μ mol/L vargulin)检测全波长下的发光强度值,弃上清后收集细胞裂解液样品,以检测缓冲液(100 mmol/L Tris-HCl、70 mmol/L NaCl、5 mmol/L MgCl₂、125 μ mol/L CTZ-h)同上检测530 nm(IFN- γ 激活)或612 nm(IFN- β 激活)波长处的发光强度值,并以所测发光强度值除以同样品Cluc检测的发光强度值计算RLU,以激活细胞RLU相对于未激活细胞RLU的增加值衡量细胞对激活剂刺激的应答水平。

1.9.4 细胞荧光成像分析 采用荧光显微成像技术,结合特异性细胞器染料观察荧光蛋白的表达定位并分析其与细胞关键结构的共定位情况。

将HEK293A-hMSR1细胞接种于6孔玻璃底细胞培养板,待其生长至合适密度后进行染色。先以37 $^{\circ}$ C预温的PBS轻柔洗涤3次,然后加入2 mL含25~100 nmol/L MitoTracker® Deep Red FM染料的细胞培养基,于37 $^{\circ}$ C、5% CO₂条件下避光孵育30 min。随后,吸除上清液,用预温的PBS洗涤3次后,每孔加入2 mL含Hoechst 33342(终浓度为1 μ g/mL)的新鲜培养基,室温避光孵育5~10 min。完成染色后,用预温的PBS洗涤细胞3次,于每孔中加入3 mL细胞培养基,用Cytation 5多功能细胞成像检测系统进行显微成像。成像时,依次使用不同通道采集信号。CFP[激发波长(excitation, Ex): 445/45 nm; 发射波长(emission, Em): 510/42 nm]或GFP(Ex: 469/45 nm; Em: 525/42 nm)通道捕获mTFP1-CAAX荧光信号; CY5通道(Ex: 628/40 nm; Em: 685/40 nm)捕获MitoTracker® Deep Red FM染色信号(线粒体); DAPI通道(Ex: 377/50 nm; Em: 447/60 nm)捕获Hoechst 33342染色信号(细胞核)。利用系统配套的Gen5软件(Agilent, 美国)采集、处理图像。mTFP1-CAAX与细胞核或线粒体的共定位分析采用Fiji(ImageJ 1.54s)^[15]完成。

1.10 统计学分析

数据以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x}\pm s$)表示。使用GraphPad Prism 10.6软件(GraphPad Software, 美国)进行统计学分析。两组间比较采用独立样本 t 检验,多组比较采用单因素方差分析(One-Way ANOVA),以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义的判定标准。

2 结果

2.1 AAVS1安全港特异性整合的单克隆稳转细胞株

转染后一周起,以含1 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素的培养基连续培养15 d,从gRNA/Cas9表达质粒与供体质粒共转染的细胞筛选获得20个嘌呤霉素抗性,且表达mTFP1荧光蛋白的克隆(图2B),而未转染细胞无克隆形成。从中随机选取4个独立克隆(克隆a~d)扩大培养,提取基因组DNA进行整合位点连接区及插入序列的PCR鉴定。结果显示,4个重组单克隆细胞系基因组DNA样本PCR均可扩增出预期大小的5'-连接区、3'-连接区和插入序列(hMSR1-mTFP1)特异性产物,而野生型HEK293A细胞(WT) DNA样本无相应特异性扩增产物(图2C)。

进一步的蛋白免疫印迹(图2D)显示,靶向hMSR1胞外域(氨基酸残基192至451)的抗体在野生型HEK293细胞样品仅检测到约62 kDa的条带,而在4个重组单克隆细胞样品中可检测到约62 kDa和90 kDa的2个条带。3次生物独立重复实验的结果显示,重组单克隆细胞样品hMSR1条带(62 kDa、90 kDa)经 β -actin归一化后的总积分灰度均值是同膜野生型HEK293细胞样品hMSR1条带(62 kDa)的2.27~2.76倍。单因素方差分析表明,4个克隆的hMSR1表达水平无统计学意义上的差异($F=0.1879$, $P=0.9017$)。

2.2 hMSR1过表达赋予细胞强黏附表型

单层细胞经PBS冲洗后结晶紫染色的结果显示,未包被培养孔中的野生型HEK293A细胞(Un-treated)随着PBS冲洗次数的增加,留存细胞染色大幅减弱。其经3次PBS冲洗后,即出现细胞大片脱落,结晶紫染色的平均 D_{570} 值为未冲洗细胞对照的45%;5次冲洗后不到24%;7次冲洗后,除个别孔外,大部分孔 D_{570} 接近于空白对照孔数值,其平均 D_{570} 不到未冲洗细胞对照的15%(图3)。常规的孔板PDL预包被处理(PDL pre-coated)或直接用含2 $\mu\text{g/mL}$ PDL的培养基培养(Soluble PDL)可明显增强野生型细胞在培养表面的黏附。其经5次冲洗后,留存细胞染色的平均 D_{570} 值有未冲洗细胞对照的90%以上,7次冲洗后仍有对照均值的85%以上。但在预包被孔培养的细胞冲洗后可见多个孔有较大面积的成片未着色透明区,均一性相比直接在培养基中加入PDL时明显更差(图3A)。HEK293A-hMSR1细胞黏附性较野生型HEK293A细胞大幅提高。4个重组单克隆细胞在

5次冲洗后,留存细胞染色的平均 D_{570} 值均达到了未冲洗细胞对照均值的80%~95%,7次冲洗后仍有对照值的64%~88%。克隆c和d的黏附性与在PDL预包被孔板或含PDL培养基中培养的野生型HEK293A相当。克隆a和b在每次冲洗后留存细胞染色相对偏弱,其每次冲洗后相对于未冲洗细胞对照的 D_{570} 百分率相比克隆c和d低4到24个百分点不等;同时其未冲洗细胞对照染色 D_{570} 值也相对偏低,约为克隆c和d的70%~77%(图3A)。

2.3 mTFP1-CAAX荧光蛋白膜定位功能

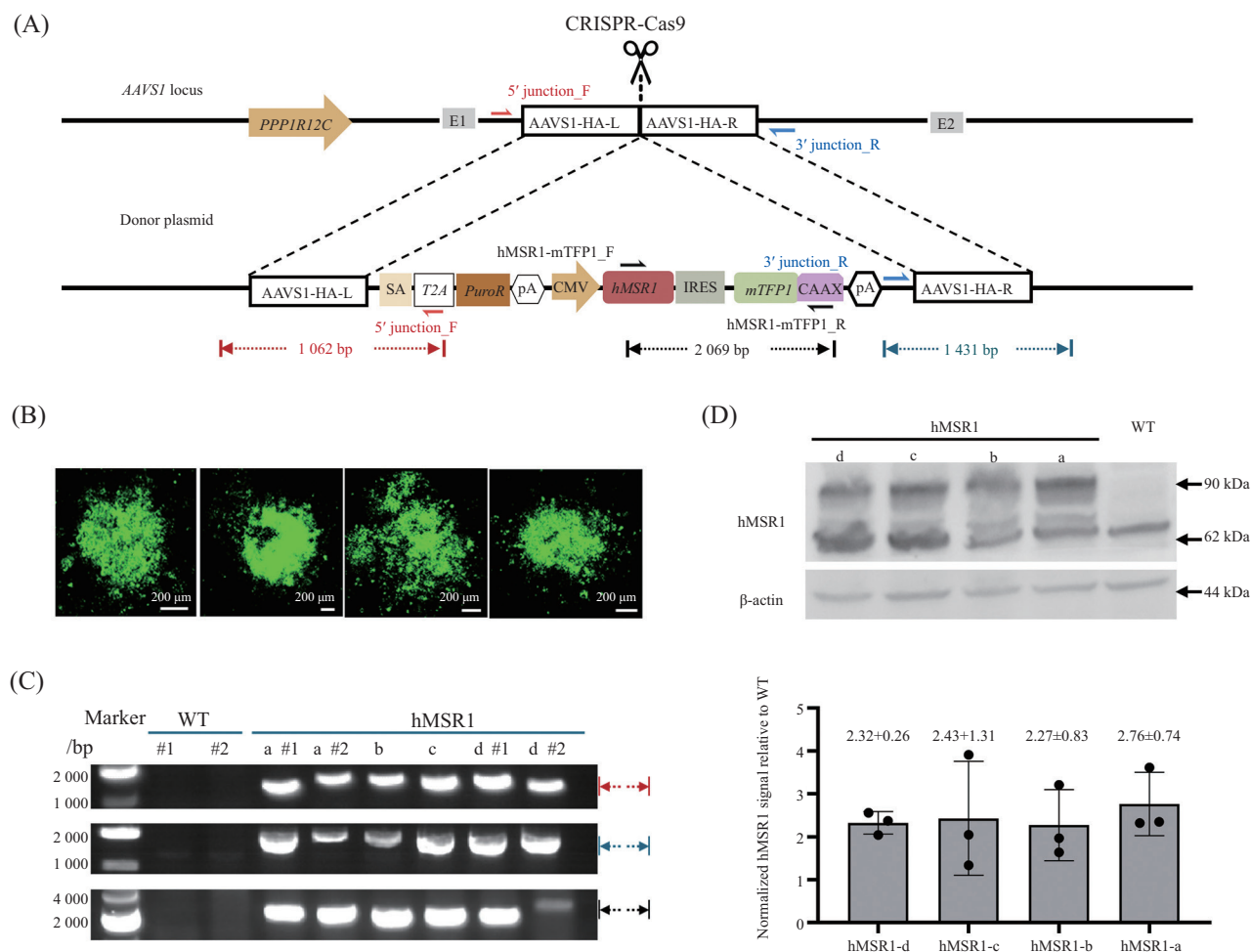
多通道荧光显微成像(图4)观察到HEK293A-hMSR1细胞中表达的mTFP1-CAAX荧光蛋白主要定位于细胞膜,其荧光信号清晰、界限分明,可很好地描绘细胞轮廓(通道GFP),且与MitoTracker® Deep Red FM标记的线粒体(通道CY5)及Hoechst 33342标记的细胞核(通道DAPI)无明显重叠。采用Fiji软件对三通道荧光叠加成像(图4B)进行共定位检测(colocalization test, 随机方法: Costes),显示mTFP1-CAAX信号与细胞核染色及线粒体染色的皮尔逊相关系数(Pearson correlation coefficient, PCC)均小于0.5(0.283、0.187),表明两者在空间分布上无明显重叠,信号区分度良好。

2.4 hMSR1表达显著提高了细胞的转染效率

荧光素酶报道基因质粒转染实验表明HEK293A-hMSR1对外源基因的转染效率相较HEK293A细胞有显著提高。pEXHA3-hCluc-mScarlet3-hGluc质粒(mScarlet3-Gluc)转染48 h后,HEK293A-hMSR1(hMSR1)的荧光素酶表达水平显著高于野生型HEK293A细胞(WT)($t=5.214$, $df=10$, $P=0.0004$),前者检测到的信号强度约为后者的1.9倍(RLU: 1 160 716.86 $\pm$ 194 772.35 vs 608 818.07 $\pm$ 171 169.82)。pEXHA3-hCluc-mKOk-hGluc质粒(mKOk-Gluc)转染48 h后,两种细胞的荧光素酶表达的差异同样达到了显著水平($t=4.297$, $df=10$, $P=0.0016$),HEK293A-hMSR1测得荧光素酶信号强度约为HEK293A细胞的2.3倍(RLU: 1 512 713.52 $\pm$ 340 527.80 vs 666 495.71 $\pm$ 341 634.48)(图5)。

2.5 hMSR1表达对细胞增殖活性与基础信号通路应答能力无明显负面影响

CCK-8法检测HEK293A-hMSR1细胞(hMSR1)与野生型HEK293A细胞(WT)的增殖曲线如图6A所示。二者均呈典型的“S”型。采用四参数logistic回归对培养时间-细胞增殖(D_{450})进行的非线性拟合分



A: *AAVS1*安全港位点CRISPR-Cas9介导的基因定点敲入示意图。块状箭头PPP1R12C标示*AAVS1*基因座上游PPP1R12C基因启动子, E1和E2标示PPP1R12C基因的第一和第二外显子; 彩色单侧小箭头指示整合连接区和插入序列PCR引物结合位点, 相背双箭头指示PCR扩增产物长度; 供体质粒示意图如图1所示。B: 嘌呤霉素抗性单克隆的典型显微形态(4×物镜, GFP荧光通道)。C: 基因组DNA PCR产物的琼脂糖凝胶电泳。WT: 野生型HEK293A样品, #1、#2为2个独立样品(下同), hMSR1: HEK293A-hMSR1重组细胞样品; a~d为随机选取的4个单克隆。红色、蓝色和黑色相背双箭头分别对应5'-连接区、3'-连接区和插入片段扩增产物。D: 蛋白免疫印迹检测hMSR1在HEK293A-hMSR1(hMSR1)和野生型HEK293A细胞(WT)中的表达情况。上方为典型显影图, 下方为hMSR1表达量的定量分析: 以β-actin为内参归一化, 并相对于野生型细胞计算比值($n=3$)。柱高为平均值, 误差棒和圆点分别为标准差、单次实验值。

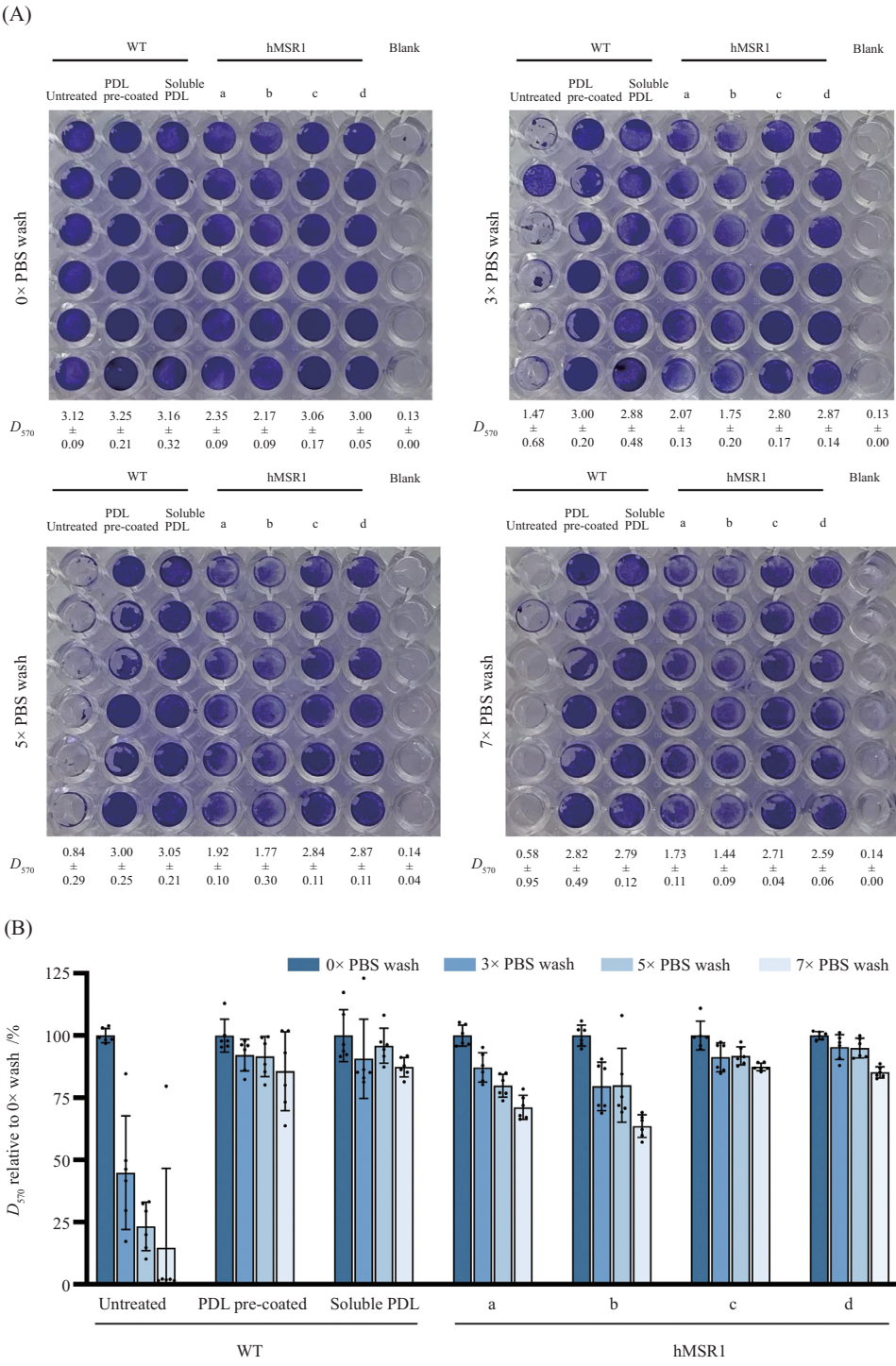
A: schematic diagram of the CRISPR-Cas9-mediated site-specific gene knock-in at the *AAVS1* safe harbor locus. PPP1R12C arrow box indicates the *PPP1R12C* promoter, boxes E1 and E2 indicate exon 1 and exon 2 of *PPP1R12C*. Colored arrows indicate binding site of primers for PCR of the junction region and inserted fragment, the opposing arrows denote the sizes of the PCR products, labeled elements in the donor plasmid as described in Fig.1. B: typical microphotographs of puromycin-resistant clones (4× objective, GFP channel). C: agarose gel electrophoresis of PCR products from genomic DNA. WT: samples from wild-type HEK293A, #1 and #2 for two independent biological samples (the same hereinafter); hMSR1: samples from HEK293A-hMSR1 recombinants, a-d for four randomly picked clones. The red, blue, and black opposing arrows indicate replicons of the 5' junction, 3' junction and inserted hMSR1-mTFP1 fragment PCR, respectively. D: Western blot analysis of hMSR1 expression in wild-type HEK293A (WT) and recombinant HEK293A-hMSR1 (hMSR1) cells. Upper panel: one representative plot. Lower panel: hMSR1 bands intensities were normalized to β-actin and expressed relative to wild-type cells ($n=3$). Bars represent the mean value, error bars and points indicate the standard errors and individual values, respectively.

图2 重组单克隆细胞系整合位点连接区及插入片段PCR与hMSR1蛋白免疫印迹结果

Fig.2 Results from PCR of the integration site junction region and the inserted fragment, and Western blot of hMSR1

析显示, 二者增殖曲线无统计学差异 ($F_{(4, 40)}=1.056$, $P=0.3908$), 其增殖曲线斜率参数95%置信区间 (confidence interval, CI) 完全重叠 (2.829 [1.318, 5.011] vs 2.375 [1.514, 3.220]), 增殖曲线中点时间

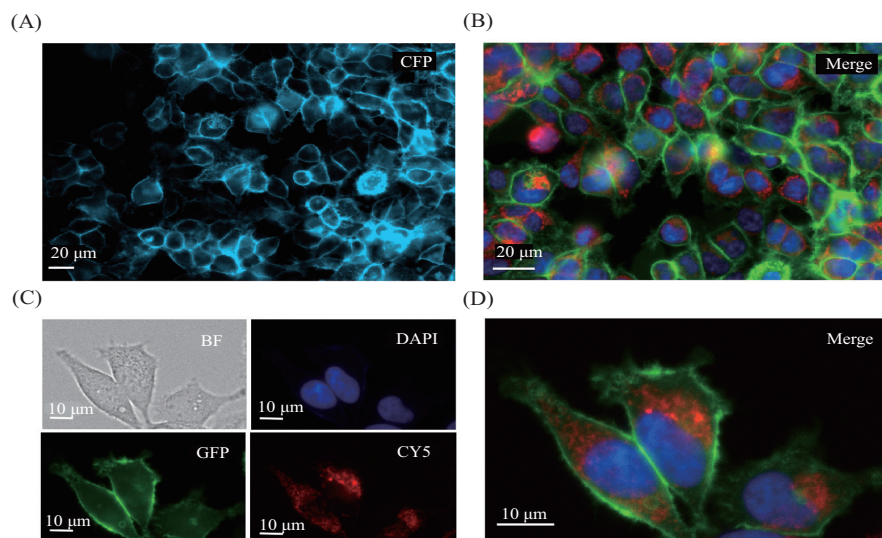
值分别为31.19 [26.15, 53.12]和37.84 [32.04, 57.46] h, 置信区间值存在大范围重叠, 表明相比野生型HEK293A细胞, HEK293A-hMSR1的增殖速度未发生明显改变。



A: 结晶紫染色图, D_{570} 所示为对应列的 $\bar{x} \pm s$ 。B: PBS冲洗后细胞结晶紫染色定量分析。y轴为相对于未冲洗(0× PBS wash)细胞染色 D_{570} (扣背景值后)的百分比。柱高代表均值, 误差棒和圆点分别为标准差、单孔原始数值。 $n=6$ 。每孔接种细胞数: 1×10^4 , 细胞接种约48 h后进行结晶紫染色; PBS wash: 染色前PBS冲洗次数; WT: 野生型HEK293A细胞; Untreated: 未经任何处理; PDL pre-coated: 培养孔经100 $\mu\text{g/mL}$ PDL预包被5 min; Soluble PDL: 培养基含2 $\mu\text{g/mL}$ PDL; hMSR1: HEK293A-hMSR1重组细胞; a~d: 克隆a~d; Blank指示无细胞对照孔。

A: image of crystal violet staining, D_{570} given as $\bar{x} \pm s$ for the corresponding column. B: quantitative analysis of crystal violet staining on cells post PBS washing. The y-axis is the percentage of net D_{570} relative to that of unwashed cells (0× PBS wash). The height of bars represents the mean value, error bars and points indicate the standard error and the raw value from individual well, respectively. $n=6$. Number of cells seeded per well: 1×10^4 ; crystal violet staining performed about 48 h post cell seeded; PBS wash: times of PBS washing before staining; WT: wild-type HEK293A cells; Untreated: without any treatment; PDL pre-coated: wells coated with 5 min incubation of 100 $\mu\text{g/mL}$ PDL; Soluble PDL: 2 $\mu\text{g/mL}$ PDL in culture medium; hMSR1: HEK293A-hMSR1 recombinant cells; a-d: clone a-d; Blank: cell-free well as background controls.

图3 PBS洗涤后结晶紫染色结果
Fig.3 Crystal violet staining after PBS washing



A~D: 20× 物镜(A、B)、40× 物镜(C、D)下, HEK293A-hMSR1细胞的多通道荧光显微成像图。BF: 明场; CFP: CFP通道(mTFP1-CAAX); GFP: GFP通道(mTFP1-CAAX); DAPI: DAPI通道(细胞核); Merge: 三通道叠加。

A-D: multi-channel fluorescence microscopy images of HEK293A-hMSR1 cells under 20× objectives (A, B) and 40× objectives (C, D). BF: bright field; CFP: CFP channel (mTFP1-CAAX); GFP: GFP channel (mTFP1-CAAX); DAPI: DAPI channel (nucleus); Merge: three-channel overlay.

图4 HEK293A-hMSR1细胞多通道荧光显微成像

Fig.4 Multi-channel fluorescence microscopy imaging of HEK293A-hMSR1 cells

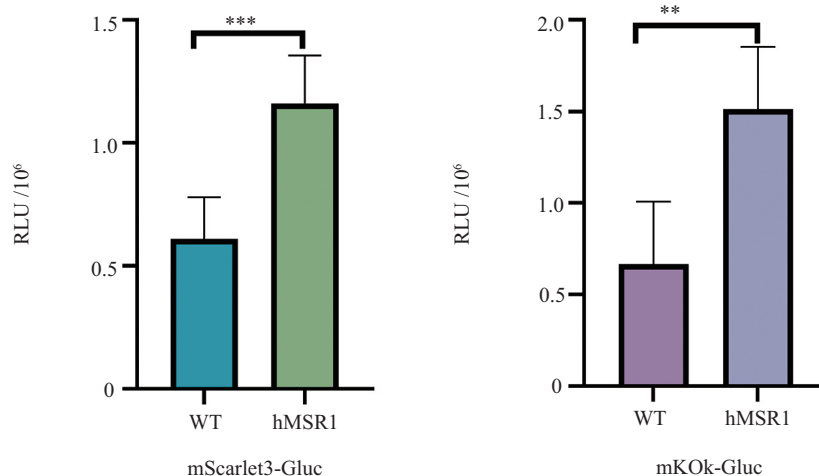
细胞对 I/II 型 IFN 信号通路激活应答检测显示, HEK293A-hMSR1 细胞(hMSR1)对于两条信号通路激活的应答水平平均高于 HEK293A 野生型(WT)。细胞转染 pMC-GAS-mLemon_A 质粒 24 h 后, 加入 IFN- γ (1 μ g/mL) 刺激 48 h, 前者荧光素酶表达水平显著高于后者 ($t=2.540$, $df=10$, $P=0.0294$), 其相对于未刺激对照细胞平均 RLU 的增加值约为后者的 1.80 倍 (RLU: 204.97 ± 61.97 vs 113.66 ± 62.57)。细胞转染 pMC-ISRE-mScarlet3_A 质粒 24 h 后, 加入 IFN- β (1 ng/mL) 刺激 48 h, HEK293A-hMSR1 细胞荧光素酶表达水平亦显著高于野生型细胞 ($t=2.317$, $df=10$, $P=0.0430$), 其相对于未刺激对照细胞平均 RLU 的增加值约为后者的 1.78 倍 (RLU: 196.14 ± 89.12 vs 109.93 ± 18.99)。而两种细胞 I/II 型 IFN 信号通路的本底信号均不存在统计学差异 (IFN- β /ISRE: 7.03 ± 3.46 vs 6.28 ± 3.87 , $t=0.352$, $df=10$, $P=0.7321$; IFN- γ /GAS: 9.77 ± 2.84 vs 12.15 ± 7.41 , $t=-0.736$, $df=10$, $P=0.4877$)。

3 讨论

本研究利用 CRISPR-Cas9 介导的 AAV/ST 安全港定点敲入成功构建了稳定表达 hMSR1 和 mTFP1 的 HEK293A-hMSR1 细胞系。相比既往研究所用传统真核表达质粒转染的方法^[6-8], CRISPR-Cas9 介导定点敲入结合筛选标记外显子捕获的方案(图 2A)大大

提高了稳定细胞系构建的效率和靶向重组细胞的筛选成功率。从 20 个嘌呤霉素抗性克隆中随机选取 4 个, 通过整合位点连接区及插入序列的 PCR 鉴定, 确认其均有正确的靶向重组发生(图 2C)。诚然, 仅凭整合位点连接区 PCR 阳性不能完全排除脱靶重组共存的可能; 但 CRISPR-Cas9 介导靶位点 DNA 双链断裂后的 HDR 重组效率远高于随机非同源重组^[10-11], 且因供体质粒上的筛选标记(SA-PuroR)并无启动子, 在嘌呤霉素筛选时, 仅供体重组整合至内含子的重组体方可存活。因此, 靶向重组阳性克隆中同时有随机脱靶重组发生应属小概率事件。此外, 目的基因表达框两侧均有绝缘子(core insulator)序列(图 1), 整合后的转基因表达应不受邻近染色质环境影响。因此, 4 个克隆的 hMSR1 表达上调幅度(图 2D)及黏附增强表型(图 3)均无明显差别, 提示各克隆整合的目的基因总拷贝数基本一致。倘若存在靶向重组之外的脱靶整合或串联重复, 要在 4 个独立克隆中维持总拷贝数一致, 同样是小概率事件。

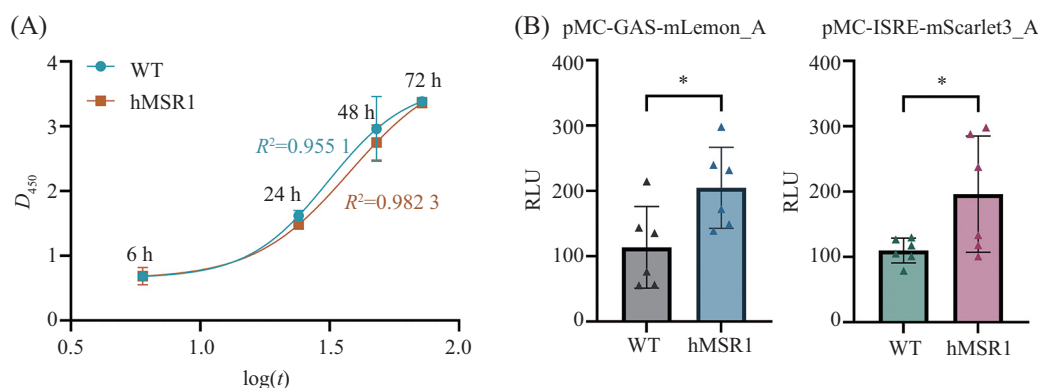
值得注意的是, 蛋白免疫印迹结果(图 2D)显示, HEK293A-hMSR1 细胞不仅 hMSR1 表达水平高于 HEK293A 细胞的内源性表达, 且其表达产物的表观分子量也与后者不同 [(62 kDa+90 kDa) vs 62 kDa], 提示 hMSR1 表达水平和/或细胞贴壁状态可能影响 hMSR1 的糖基化加工过程。Tian 等^[16]研究发现, 在



RLU: 以CCK-8所测 D_{450} 值为内参归一化后的RLU值。WT: HEK293A; hMSR1: HEK293A-hMSR1克隆a细胞。** $P<0.01$, *** $P<0.001$ 。n=6。
RLU: relative luminescence units normalized to the D_{450} measured by CCK-8 assay. WT: HEK293A; hMSR1: HEK293A-hMSR1 clone a cells. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$. n=6.

图5 HEK293A与HEK293A-hMSR1细胞脂质体转染效率对比

Fig.5 Comparison of liposome transfection efficiency between HEK293A and HEK293A-hMSR1 cells



A: 细胞增殖曲线比较。y轴为CCK-8检测 D_{450} 值, x轴为细胞培养时长(h)的对数值。B: I和II型干扰素信号转导通路激活应答水平比较。y轴为相对于未激活细胞对照的标准化RLU增加值。* $P<0.05$ 。WT: HEK293A, hMSR1: HEK293A-hMSR1克隆a细胞。n=6。

A: comparison of cell proliferation curves. y-axis: D_{450} measured by the CCK-8 assay; x-axis: logarithmic value of cell culture duration (h). B: comparison of type I and type II interferon signaling pathway activation. y-axis: normalized RLU increment relative to unstimulated control cells. * $P<0.05$. WT: HEK293A; hMSR1: HEK293A-hMSR1 clone a cells. n=6.

图6 细胞增殖与基础信号通路应答能力比较

Fig.6 Comparison of cell proliferation and basal signaling pathway responsiveness

小鼠单核巨噬细胞系RAW 264.7中, 成熟MSR1需经历与内质网钙联蛋白的结合及后续的N-糖链加工与唾液酸化过程, 表观分子量在90 kDa左右; 当 α -葡萄糖苷酶I和II被抑制时, MSR1不能结合钙联蛋白, 半衰期显著延长, 且因无法完成复杂型N-糖链加工, 表观分子量降至约66 kDa, 但仍可组装为成熟三聚体并转运至细胞膜发挥受体功能。hMSR1序列与小鼠MSR1高度相似(序列一致性为70.8%), 其7个潜在

N-糖基化位点中有5个与后者共有, 且所在结构域保守^[16]。因此, 二者可能有相似的N-糖基化与糖蛋白稳态调控机制。hMSR1与小鼠MSR1理论分子量(49.8 kDa vs 49.7 kDa)相近, 其在两种细胞均存在的62 kDa产物, 与RAW 264.7细胞中 α -葡萄糖苷酶I和II受抑制后表达的66 kDa产物相差约4 kDa, 可能是已脱葡萄糖基的高甘露糖型或杂合型糖基化产物。而HEK293A-hMSR1细胞中存在的90 kDa产物, 应是

经历了后续N-糖链加工与唾液酸化的复杂糖基化产物。上述发现提示hMSR1过表达影响了高尔基体N-糖链加工功能,其机制可能与细胞-基质黏附对高尔基体结构组织化与功能的调控有关^[17]。野生型HEK293A细胞贴壁不佳,高尔基体结构有序性不足,N-糖链加工效率较低,内源性表达的hMSR1主要以62 kDa的高甘露糖型或杂合型糖基化产物形式存在;而HEK293A-hMSR1细胞贴壁良好,细胞-基质黏附增强,高尔基体结构有序性及N-糖链加工效率大幅提升,hMSR1得以完成复杂型N-糖基化,生成90 kDa的产物,而检测到的62 kDa条带则可能是外源性高表达的hMSR1超出高尔基体N-糖链加工通量所致。

此外,hMSR1过表达介导的细胞-基质黏附增强,提高高尔基体N-糖基化效率,在理论上也可促进其他糖蛋白分子在高尔基体内的加工与成熟。虽然,MSR1介导的细胞黏附与铺展本身并不依赖二价阳离子^[18],而是涉及抑制型或其他异源三聚体G蛋白($G_{i/o}$)信号激活、黏着斑复合物形成^[19],及后续的酪氨酸激酶Lyn与磷脂酰肌醇3-激酶的激活^[20];但其他黏附分子的N-糖基化成熟增多,也将有助于增强细胞黏附功能^[21]。HEK293A-hMSR1细胞脂质体介导转染效率的提升(图5),可能同样受益于相关糖蛋白受体的糖基化改善。

PBS冲洗后结晶紫染色的结果显示,4株HEK293A-hMSR1单克隆细胞均表现出远高于野生型细胞的黏附性,黏附水平达到或接近后者在PDL包被培养表面的水平(图3)。克隆a和b每次冲洗后的残留细胞染色较克隆c和d偏浅,但其未冲洗细胞对照 D_{570} 同样偏低。实验中各克隆均用同批细胞悬液铺板,且4个克隆的hMSR1表达上调不存在统计学差异(图2D)。因此,推测克隆a、b更易被洗脱,并非因hMSR1表达量差异,而更可能是因细胞密度较低条件下细胞-细胞相互作用更弱所致^[5,22]。而未冲洗细胞对照组结晶紫染色偏浅的克隆a,其增殖曲线与野生型细胞无统计学差异(图6A),排除了细胞增殖差异导致洗脱后染色不同的可能。这同时表明重组单克隆细胞未发生严重有害的脱靶重组事件,且AAV/Sl安全港将近5 kb的外源基因插入,以及外源hMSR1和mTFP1-CAAX的过表达未对细胞产生明显不良影响。

IFN- γ /GAS和IFN- β /ISRE荧光素酶报告检测的结果(图6B)表明,AAV/Sl安全港定点敲入hMSR1没

有造成细胞I/II型IFN信号转导缺陷;但hMSR1过表达可显著增强细胞对IFN- γ /GAS和IFN- β /ISRE通路激活的应答。HEK293A-hMSR1与HEK293A细胞的本底IFN- γ /GAS和IFN- β /ISRE信号无统计学差异,说明hMSR1过表达并未造成I/II型IFN信号通路的基础激活;刺激条件下的应答增强提示hMSR1与I/II型IFN信号通路可能存在交互(crosstalk)。MSR1作为先天免疫的重要参与者,可通过与其他膜受体或胞内组分结合、借助翻译后修饰招募信号转导复合物的方式与多种免疫与炎症相关信号通路发生交互,但有关其与IFN信号通路交互作用的报道较少^[23-27]。仅有一项基于小鼠树突状细胞的研究报道,MSR1可抑制CD40抗体与IFN- γ 共刺激条件下的信号通路激活^[27]。

基于蛋白免疫印迹的发现(图2D)及前述分析,我们推测,hMSR1过表达通过细胞-基质黏附对高尔基体结构组织化与功能的调控^[17],可能也改善了干扰素受体的N-糖基化加工与成熟。I型IFN受体IFNAR1和IFNAR2的胞外结构域分别存在4个和5个潜在N-糖基化位点,其高度糖基化成熟产物的表观分子量可达理论分子量的两倍左右,近一半表观分子量由糖链基团贡献^[28]。已有研究证实,抑制IFNAR1的糖基化会干扰其从反式高尔基网到细胞膜的输送,进而影响细胞表面功能性受体密度与I型IFN信号转导^[29]。抑制IFN- γ 受体的N-糖基化或糖链加工虽不会阻碍其到细胞膜的运输,但会阻断其与IFN- γ 结合的能力^[30]。因此,hMSR1过表达提高细胞高尔基体的N-糖基化加工效率,促进干扰素受体的N-糖基化加工,改善其在细胞表面的成熟表达及配体结合能力,可能是其提升细胞对IFN- γ /GAS和IFN- β /ISRE激活应答水平的一个合理解释。这种非通路特异性的机制也解释了HEK293A-hMSR1细胞对两条通路应答增强幅度趋于一致的现象(1.78倍vs 1.80倍)。但这一推测有待进一步研究的证实。

总而言之,本研究通过CRISPR-Cas9介导AAV/Sl安全港定点敲入和外显子捕获筛选成功构建了稳定表达hMSR1和mTFP1-CAAX的HEK293A-hMSR1细胞系;其整合位点明确,目的基因表达与细胞表型稳定。外源hMSR1过表达显著增强了细胞黏附性和I/II型IFN信号转导通路应答能力,并提高了脂质体介导转染效率,加之共表达mTFP1-CAAX在细胞膜的正确定位(图6),也显示了HEK293A-

hMSR1细胞在高通量筛选、高内涵筛选及其他需要细胞良好贴壁的研究中的潜在优势。

参考文献 (References)

- [1] Gustafsdottir S M, Ljosa V, Sokolnicki K L, et al. Multiplex cytological profiling assay to measure diverse cellular states [J]. PLoS One, 2013, 8(12): e80999.
- [2] Seal S, Trapotsi M A, Spjuth O, et al. Cell painting: a decade of discovery and innovation in cellular imaging [J]. Nature Methods, 2025, 22(2): 254-268.
- [3] Lieb S, Michaelis S, Plank N, et al. Label-free analysis of GPCR-stimulation: the critical impact of cell adhesion [J]. Pharmacological Research, 2016, 22(2): 254-268.
- [4] Mazia D, Schatten G, Sale W. Adhesion of cells to surfaces coated with polylysine. Applications to electron microscopy [J]. Journal of Cell Biology, 1975, 66(1): 198-200.
- [5] Faussner A, Deininger M M, Weber C, et al. Direct addition of poly-lysine or poly-ethylenimine to the medium: a simple alternative to plate pre-coating [J]. PLoS One, 2022, 17(7): e0260173.
- [6] Robbins A K, Horlick R A. Macrophage scavenger receptor confers an adherent phenotype to cells in culture [J]. BioTechniques, 1998, 25(2): 240-244.
- [7] Ojala J R M, Pikkarainen T, Domogatskaya A, et al. A novel scavenger receptor 5-based antibiotic-independent selection method for generation of stable recombinant protein-producing mammalian cell lines especially suitable for proteins affecting cell adhesion [J]. BioTechniques, 2012, 53(4): 221-230.
- [8] Saraon P, Snider J, Kalaidzidis Y, et al. A drug discovery platform to identify compounds that inhibit EGFR triple mutants [J]. Nature Chemical Biology, 2020, 16(5): 577-586.
- [9] Papapetrou E, Schambach A. Gene insertion into genomic safe harbors for human gene therapy [J]. Molecular Therapy, 2016, 24(4): 678-684.
- [10] Mali P, Yang L H, Esvelt K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9 [J]. Science, 2013, 339(6121): 823-826.
- [11] Ran F A, Hsu P D, Lin C Y, et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity [J]. Cell, 2013, 154(6): 1380-1389.
- [12] Kotin R M, Linden R M, Berns K I. Characterization of a preferred site on human chromosome 19q for integration of adeno-associated virus DNA by non-homologous recombination [J]. EMBO Journal, 1992, 11(13): 5071-5078.
- [13] Shin S, Kim S H, Shin S W, et al. Comprehensive analysis of genomic safe harbors as target sites for stable expression of the heterologous gene in HEK293 cells [J]. ACS Synthetic Biology, 2020, 9(6): 1263-1269.
- [14] Ai H, Henderson J N, Remington S J, et al. Directed evolution of a monomeric, bright and photostable version of *Clavularia* cyan fluorescent protein: structural characterization and applications in fluorescence imaging [J]. Biochemical Journal, 2006, 400: 531-540.
- [15] Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji: an open source platform for biological image analysis [J]. Nature Methods, 2012, 9(7): 676-682.
- [16] Tian G, Wilcockson D, Perry V, et al. Inhibition of α -glucosidases I and II increases the cell surface expression of functional class A macrophage scavenger receptor (SR-A) by extending its half-life [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279: 39303-39309.
- [17] Singh V, Erady C, Balasubramanian N. Cell-matrix adhesion controls Golgi organization and function through Arf1 activation in anchorage-dependent cells [J]. Journal of Cell Science, 2018, 131(16): jcs215855.
- [18] Fraser I, Hughes D, Gordon S. Divalent cation-independent macrophage adhesion inhibited by monoclonal antibody to murine scavenger receptor [J]. Nature, 1993, 364(6435): 343-346.
- [19] Post S R, Gass C, Rice, et al. Class A scavenger receptors mediate cell adhesion via activation of Gi/o and formation of focal adhesion complexes [J]. Journal of Lipid Research, 2002, 43(11): 1829-1836.
- [20] Nikolic D M, Cholewa J, Gass C, et al. Class A scavenger receptor-mediated cell adhesion requires the sequential activation of Lyn and PI3-kinase [J]. American Journal of Physiology-Cell Physiology, 2007, 292: C1450-C1458.
- [21] Gu J G, Isaji T, Xu Q S, et al. Potential roles of N-glycosylation in cell adhesion [J]. Glycoconjugate Journal, 2012, 29: 599-607.
- [22] Jötten A M, Angermann S, Stamp M E M, et al. Correlation of *in vitro* cell adhesion, local shear flow and cell density [J]. RSC Advances, 2019, 9(1): 543-551.
- [23] Gudgeon J, Marín-Rubio J L, Trost M. The role of macrophage scavenger receptor 1 (MSR1) in inflammatory disorders and cancer [J]. Frontiers in Immunology, 2022, 13: 1012002.
- [24] Li L, Luo J L, Zhu Z Y M, et al. SRA suppresses antiviral innate immune response in macrophages by limiting TBK1 K63 ubiquitination via deubiquitinase USP15 [J]. Microbiology Spectrum, 2022, 10(6): e0202822.
- [25] Yang L, Geng T T, Yang G, et al. Macrophage scavenger receptor 1 controls Chikungunya virus infection through autophagy in mice [J]. Communications Biology, 2020, 3: 556.
- [26] Xie M Y, Yin Y, Chen L Q, et al. Scavenger receptor A impairs interferon response to HBV infection by limiting TRAF3 ubiquitination through recruiting OTUB1 [J]. The FEBS Journal, 2020, 287(2): 310-324.
- [27] Yi H F, Zuo D M, Yu X F, et al. Suppression of antigen-specific CD4⁺ T cell activation by SRA/CD204 through reducing the immunostimulatory capability of antigen-presenting cell [J]. Journal of Molecular Medicine, 2012, 90(4): 413-426.
- [28] Ling L E, Zafari M, Reardon D, et al. Human type I interferon receptor, IFNAR, is a heavily glycosylated 120-130 kD membrane protein [J]. Journal of Interferon & Cytokine Research, 1995, 15(1): 55-61.
- [29] Lubick K J, Robertson S J, McNally K L, et al. Flavivirus antagonism of type I interferon signaling reveals prolidase as a regulator of IFNAR1 surface expression [J]. Cell Host Microbe, 2015, 18(1): 61-74.
- [30] Fischer T, Thoma B, Scheurich P, et al. Glycosylation of the human interferon- γ receptor. N-linked carbohydrates contribute to structural heterogeneity and are required for ligand binding [J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, 265(3): 1710-1717.