

基于 CRISPR/Cas9 技术 *AEG-1* 基因敲除神经细胞系的构建及 *AEG-1* 基因敲除介导的神经细胞周期阻滞和细胞凋亡抑制

王 斌^{1),2)}, 刘昆梅¹⁾*, 郭 乐²⁾*, 张 春¹⁾, 和祯泉¹⁾,
丁 娜¹⁾, 杨 华²⁾*, 孙之鹏²⁾, 王 晓¹⁾

(¹⁾宁夏医科大学宁夏颅脑疾病重点实验室 省部共建国家重点实验室培养基地, 银川 750004;

²⁾宁夏医科大学临床医学院医学检验学系, 银川 750004)

摘要 星形胶质细胞上调基因-1 (*AEG-1*) 是近年来研究较多的癌基因,但在神经系统疾病方面研究尚少。*AEG-1* 与神经退行性疾病有关,然而其具体作用机制尚不明确。本研究通过设计靶向 *AEG-1* sgRNA 序列并合成相应寡核苷酸,将其克隆到 GV392 质粒中,构建 sgRNA/Cas9 二合一表达载体,并进行慢病毒包装纯化。用慢病毒感染小鼠海马神经元 HT22 细胞,进行药物筛选和 sgRNA 活性鉴定,建立稳定的 *AEG-1* 基因敲除的细胞系;并进一步观察神经元 HT22 细胞的增殖与凋亡能力。结果显示,成功构建了 3 种靶向 *AEG-1* 基因的 sgRNA/Cas9 二合一表达载体。所设计的 sgRNA 的插入序列和开放阅读框架完全正确,成功建立了 *AEG-1* 基因敲除的稳转神经细胞系。进一步研究表明,*AEG-1* 敲除后的神经 HT22 细胞与正常神经 HT22 细胞相比,细胞突起数目减少,细胞周期阻滞,细胞凋亡率减少。以上结果为后续进一步研究 *AEG-1* 与神经系统疾病关系奠定了基础。

关键词 星形胶质细胞上调基因-1; CRISPR/Cas9; HT22 细胞; 细胞周期; 细胞凋亡
中图分类号 Q789

Construction of the *AEG-1* Knockout Neural Cell Line Based on the CRISPR/Cas9 Technique and Inhibition of Cell Cycle and Cell Apoptosis Mediated by *AEG-1* Knockout

WANG Bin^{1),2)}, LIU Kun-Mei¹⁾*, GUO Le²⁾*, ZHANG Chun¹⁾, HE Zhen-Quan¹⁾, DING Na¹⁾,
YANG Hua²⁾*, SUN Zhi-Peng²⁾, WANG Xiao¹⁾

(¹⁾Ningxia Key Laboratory of Cerebrocranial Diseases, Incubation Base of National Key Laboratory, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China;

²⁾Department of Laboratory Medicine, Clinical Medical College of Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

收稿日期: 2018-06-05; 修回日期: 2018-08-18; 接受日期: 2018-09-12

宁夏高等学校科学技术研究项目 (No. NGY201591); 国家自然科学基金项目 (No. 31660267); 宁夏自治区“十三五”重大科技项目 (No. 2016BZ07) 和宁夏青年科技人才托举工程 (No. TJGC2018033) 资助

* 通讯作者 Tel: 15209577729; E-mail: yanghua-126@163.com; Tel: 15769507506; E-mail: lkm198507@126.com; Tel: 18395186396; E-mail: guoletian1982@163.com

Received: June 5, 2018; Revised: August 18, 2018; Accepted: September 12, 2018

Supported by Ningxia High School Science and Technology Research Project (No. NGY201591); National Natural Science Fund Project (No. 31660267); Ningxia Autonomous Region "Thirteenth Five-Year Plan" Major Science and Technology Project (No. 2016BZ07) and Technology Talents Lifting Project (No. TJGC2018033)

* Corresponding author Tel: 15209577729; E-mail: yanghua-126@163.com; Tel: 15769507506; E-mail: lkm198507@126.com; Tel: 18395186396; E-mail: guoletian1982@163.com

Abstract Astrocyte elevated gene-1 (*AEG-1*) is an oncogene that has been linked with neurological diseases, but the specific mechanism remains unclear. Herein we designed the sgRNA targeting *AEG-1* sequences and synthesized the corresponding oligonucleotides. The sgRNA/Cas9 two-in-one expression vector was constructed and cloned into the GV392 plasmid. The constructed plasmid was packaged and purified, and transfected into the HT22 cells. The puromycin was used for cell selection to construct the stable *AEG-1*-knockout cell lines and test the activity of sgRNA. Further studies were performed to observe the effect of *AEG-1* on the proliferation and apoptosis of the HT22 cells. *AEG-1* knockout neurons displayed decreased synapsis, arrested cell cycle, reduced cell proliferation, and decreased apoptosis compared with the normal neurons. These results implicate *AEG-1* in the neurological diseases and lay a foundation for further research.

Key words astrocyte elevated gene-1 (*AEG-1*); CRISPR/CAS9; HT22 cells; cell cycle; cell apoptosis

星形胶质细胞上调基因-1 (astrocyte elevated gene-1, *AEG-1*), 也称为 MTDH、LYRIC/3D3。在细胞膜、细胞质、内质网、核仁以及细胞核中存在, 与多种信号通路有关。最初发现在 HIV 病毒引起的老年痴呆, 以及偏头痛患者的星形胶质细胞中表达上调。研究证实, *AEG-1* 可以促进肿瘤细胞的扩散, 转移侵袭, 以及血管生成, 还可以提高肿瘤细胞耐药性^[1-2]。目前, 对于 *AEG-1* 的研究主要集中于对肿瘤发生发展作用机制的研究, 而在神经系统相关疾病上的研究尚少。随着关于 *AEG-1* 在肿瘤诊断, 治疗以及分子机制方面的更深一步的研究, 对于 *AEG-1* 的研究也逐渐衍生到了神经系统方面的疾病。有研究证实, *AEG-1* 其实与很多神经退行性疾病都密切相关, 如亨廷顿氏舞蹈症和 HIV 导致的神经意识紊乱有关。此外, 在衰老的大脑中的发现提示, *AEG-1* 可能调节整个神经系统的稳态和老化过程^[3]。全基因组分析也显示, *AEG-1* 与偏头痛有关^[4]。更有文献提到癫痫发生与基因组 8q21 号基因改变有关, 而 *AEG-1* 恰好位于染色体 8q21 上^[5]。另有文献指出, *AEG-1* 通过下调 EAAT-2 启动子活性引起谷氨酸兴奋性中毒, 最终与 HIV 相关的神经退行性疾病有关^[6], 而谷氨酸兴奋性中毒与很多神经相关性疾病如癫痫, 老年痴呆以及帕金森病有关。事实证明, *AEG-1* 的调控作用可能不仅局限于对肿瘤的发生发展中, 在神经系统疾病方面也具有不容忽视的作用。

神经系统疾病很多都与神经元改变有关。其中, 癫痫以海马神经元凋亡及海马硬化为主要特征^[7,8], 阿尔茨海默病与神经元功能障碍有关^[9], 帕金森病也被认为是多巴胺能神经元选择性退化导致^[10]。事实证明, 神经元功能障碍是很多神经退行性疾病病因。有报道称, 在包括自闭症以及癫痫等几种神经系统疾病中的动物模型中, 都存在有神经

元大小和形态的不规则以及树突状棘突的数目变化^[11-13]。另有研究证实, 海马神经元形态与细胞膜阻抗有关系, 而电阻抗对于神经元这种可兴奋细胞非常重要, 因为电阻抗通过影响跨膜离子电流来改变膜电位^[14]。以上研究显示, 不仅是神经元选择性退化, 凋亡以及功能障碍, 连形态以及大小的变化都是神经系统疾病中常见病变。将 *AEG-1* 与小鼠海马神经元形态以及功能学联系起来, 探究 *AEG-1* 在神经系统疾病中所起作用, 以此希冀为神经系统疾病治疗找到一个新的靶点。

CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9) 是继 ZFN 以及 TALEN 技术之后迅速发展起来的第 3 代基因组编辑技术, 由广泛存在于古细菌和细菌基因组中的适应性免疫系统人工改造而成。整个系统的工作原理是将 tracrRNA 和 crRNA 整合成一个 tracrRNA/crRNA 复合体, 即具有引导功能的 sgRNA。sgRNA 5' 端与靶 DNA 的 20 个核苷酸特异性结合, 3' 端可以结合并激活核酸内切酶 Cas9, 引导 Cas9 对 DNA 进行定点切割。DNA 链缺损之后的修复过程分为两种: 同源介导的修复 (homology-directed repair, HDR) 和非同源性末端接合 (non-homologous end joining, NHEJ)。在同源介导的修复过程中, 利用同源重组、替换以及插入片段, 最终导致基因条件敲除、基因敲入以及点突变。在非同源性末端接合的过程中, 发生片段插入或丢失, 导致基因失活, 最终导致基因敲除。

本文利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *AEG-1* 慢病毒敲除载体并进行病毒包装, 感染小鼠海马神经元 HT22 细胞, 构建 *AEG-1* 敲除的 HT22 稳转细胞系, 观察 *AEG-1* 对神经元 HT22 细胞的形态、周期和凋亡能力的影响, 为后续研究 *AEG-1* 与神经系统疾病关系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

Primer(R&F)购自上海吉凯基因化学技术有限公司;Oligo 引物购自上海捷瑞生物工程有限公司;TOP10 购自上海吉凯基因化学技术有限公司;2 × Taq Plus Master Mix 购自 Vazyme;T4 DNA Ligase 购自 Fermentas;琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;Tryptone 购自 OXOID;Yeast Extract 购自 OXOID;NaCl 购自生工生物工程(上海)股份有限公司;Agar Powder 购自 OXOID;Agarose 购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;DTT(二硫苏糖醇)购自生工生物工程(上海)股份有限公司。HT22(小鼠海马神经元细胞系)细胞为本实验室保存。DNA 提取试剂盒购自 Omega 公司。用于检测 CRISPR/Cas9 基因敲除效率的 PCR 和 q-PCR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 引物设计

NCBI 中查找小鼠的 AEG-1 基因有 12 个转录本(ENSMUSG00000022255),12 个外显子。通过蛋白质保守序列选择对应外显子区域进行靶点筛选。通过(<http://crispr.mit.edu/>)分析,选择其中得分较高的作为备选序列。在 sgRNA 两端加入 Bsm B I 位点切割后产生的互补黏端,设计获得 sgRNA 序列,见 Table 1。

Table 1 AEG-1 sgRNA oligos

Name	Sequence
M- AEG-1-sgRNA-1	5'-CACCGACTTCAACAGTCCGTCCATT-3' 3'-CTGAAGTTGTCAGGCAGGTAACAAA-5'
M-AEG-1-sgRNA-2	5'-AAACAATGGACGGACTGTTGAAGT-3' 3'-CAGTAACCTAAGTTGATAGGGCAAA-5'
M-AEG-1-sgRNA-3	5'-CACCGCAAAACAGTTCACGCCATGA-3' 3'-CGTTTTGTCAAGTGC GG TACTGAAA-5'

1.3 质粒构建

1.3.1 CRISPR 质粒酶切 将 CRISPR/Cas9 质粒 GV392(Fig. 1A)用限制性核酸内切酶 Bsm B I(Fig. 1B)酶切。酶切后,进行琼脂糖凝胶电泳并进行酶切鉴定,回收酶切后线性化的质粒。再次进行琼脂糖凝胶电泳鉴定是否回收成功。留酶切回收产物供之后连接使用。

1.3.2 Oligo 退火形成双链 DNA 首先把合成的 Oligo 稀释,最终稀释成浓度 10 μmol/L,取出 20 μL Oligo 溶液,加入 20 μL 退火缓冲液,再加入 160 μL

双蒸水,使其终体积为 200 μL。混匀之后,在水浴煮沸 5 min。冷却至室温,双链 DNA 形成。

1.3.3 克隆和鉴定 将 1 μL 酶切回收线性化的 GV392 载体和 5 μL 退火之后的双链 DNA,加入 1 μL T4 连接酶和缓冲液,16 ℃ 连接过夜,将 AEG-1 sgRNA Oligo 双链 DNA 连接到线性化载体内。将连接反应液转化至 DH5α 感受态细胞,转化到感受态细胞中,涂板,37 ℃ 过夜。挑取单克隆菌,在具有氨苄抗性的 LB 培养基中培养,37 ℃ 恒温箱震荡培养,12 h 后提取质粒。

1.4 慢病毒包装

将小鼠 AEG-1 慢病毒表达载体、病毒包装辅助质粒(Helper 1.0 和 Helper 2.0)共转染 293T 细胞,48 h 后收获病毒(即未纯化的细胞上清液),4 ℃ 超速离心浓缩纯化病毒,通过肉眼判定颜色和黏稠度进行物理指标,并将病毒加入 293T 细胞验证,正常培养 24 h 后镜检,进行无菌检测。

1.5 HIV-1 p24 抗原 ELISA 法测定慢病毒滴度

稀释待测病毒,在稀释梯度为 10⁶、10⁷ 的病毒液中每孔各加入 50 μL 裂解缓冲液,混匀。标准品稀释,选取 5 个浓度进行点样检测,分别是:125、31.3、15.6 和 7.8 pg/mL, Assay Diluent 空白孔。然后,进行样品检测。使用 350 μL 洗涤缓冲液清洗微孔 3 遍,将标准样品和稀释的病毒样品加入微孔,每孔 200 μL,封板膜密封微孔板,37 ℃ 静置 1.5 h。吸出样品,350 μL 洗涤缓冲液清洗微孔板 4 遍。洗板后每孔加入 100 μL HIV-1 P24 检测抗体,对照孔除外,封板膜密封微孔板,37 ℃ 静置 1 h。吸弃 HIV-1 P24 检测抗体。重复上述洗板过程。吸弃洗涤缓冲液后,每孔加入 100 μL 底物,无需密封,室温避光放置 30 min,含 p24 样品的孔会慢慢发蓝。每孔加入 100 μL 终止液终止反应,孔中的液体会变成黄色。15 min 内,使用酶标仪测定 A₄₅₀。根据 ELISA 试剂盒提供的病毒浓度与滴度换算关系,即 10 TU/mL = 1 pg/mL,换算获得病毒滴度。

1.6 构建稳转细胞系(AEG-1 敲除细胞系的构建)

培养 HT22 细胞,处于对数生长期的细胞进行胰酶消化,制成细胞悬液,将细胞悬液稀释,将 6 孔板内每孔加入细胞数为 1 × 10⁵/每孔,24 h 后加入病毒。以 MOI 值 50 进行转染(预实验证实,此 MOI 值下可以达到最好的转染效果),其中病毒 M-AEG-1-sgRNA-1 与 M-AEG-1-sgRNA-2 阴性对照病毒(滴度为 2 × 10⁸/mL)加入量为 50 μL。病毒 M-AEG-1-sgRNA-3(滴度为 3 × 10⁸/mL)加入量为 33 μL,

polybrene 加入量为感染体积的 1/10,12 h 换液。培养 3 d 后进行胰酶消化,转到培养瓶中进行培养。用含有 6 μg/mL 嘌呤霉素培养液筛选 3 d,之后用含有 4 μg/mL 嘌呤霉素的培养液继续培养,杀死未转染成功细胞,构建稳转细胞系,为下一步实验打好基础。

1.7 sgRNA 活性鉴定以及 CRISPR 敲除效率检验

1.7.1 sgRNA 活性鉴定 将构建好的病毒转染到小鼠 HT22 细胞中,经过嘌呤霉素筛选,构建稳转细胞后,提取基因组 DNA。设计 sgRNA 对应的上下游引物(见 Table 2),利用设计的引物进行 PCR 扩增。PCR 产物长度分别为 282 bp、

Table 2 PCR primers for activity identification of sgRNA

Primer	Sequence	Size of the primer(bp)
M-AEG-1-sgRNA-1	5'- TTTTCATTGTTGTATATGTTATTTCC -3'	282
	5'- AGACTACACTCTTATTAACCATGAA -3'	
M-AEG-1-sgRNA-2	5'- CTTTATACCACACACCTCAGTTTA -3'	238
	5'- AGTTGTCAGTTTCATACATTTTCATT -3'	
M-AEG-1-sgRNA-3	5'- TCAGCACAAAGTTAGCAGTTCAAAA -3'	282
	5'- TCAGGAGCCTGGGAAACTAAATTA -3'	

Table 3 The q-PCR primers for mouse AEG-1

q-PCR primer	Sequence	
AEG-1	Forward	5'-CCGCAAGAAGCGAAGGAGC -3'
	Reverse	5'-CCGTCCATTTGTTTGGGCT-3'
GAPDH	Forward	5'-GAGTCAACGGATTTGGTCGT-3'
	Reverse	5'-GACAAGCTTCCCGTTCTCAG-3'

1.7.3 小鼠 CRISPR-CAS9 病毒感染小鼠神经元细胞后检测蛋白质表达情况 培养稳转细胞,提取总蛋白质,Western 印迹检测 AEG-1 表达情况。首先从转染了病毒 M-AEG-1-sgRNA-1, M-AEG-1-sgRNA-2, M-AEG-1 -sgRNA-3,阴性对照病毒的 HT22 细胞,以及未转染的 HT22 细胞提取总蛋白质,加入细胞裂解液,每 5 min,震荡 1 次,连续震荡 5 次,之后 1 500 r/min,离心 15 min,收集上清液。测定蛋白质浓度,100 ℃ 5 min 变性。进行 PAGE,转膜,脱脂奶粉封闭,一抗孵育过夜,二抗孵育 2 h,转膜结果进行扫描分析。

1.8 细胞行为学检测

1.8.1 流式细胞术分析细胞周期 对转染了病毒的细胞以及 HT22 细胞进行饥饿处理 12 ~ 24 h,收集细胞,每个样本 500 μL 工作液孵育。临用前将 RNaseA: PI 工作液按 19 体积配制成染色工作液。PBS 洗涤,收集细胞,最终调整细胞浓度为 1 × 10⁶/μL,细胞悬液离心去上清,细胞固定。加入 70% 冷乙醇过夜,染色前用 PBS 洗去。加入 PI/RNase A 染

238 bp、282 bp,经过凝胶回收,纯化,将其克隆在载体 PMD19-T 之中,选取阳性克隆,提取质粒,送公司测序鉴定。

1.7.2 小鼠 AEG-1 CRISPR-CAS9 病毒感染小鼠神经元细胞后用 q-PCR 检测 AEG-1 mRNA 表达水平 合成 q-PCR 引物,用 RNA 提取试剂盒将未转染病毒的 HT22 细胞,以及转染病毒 M-AEG-1-sgRNA-1, M-AEG-1-sgRNA-2 与 M-AEG-1-sgRNA-3 阴性对照病毒细胞中的 RNA 提取,之后测 RNA 浓度,进行逆转录。RNA 5 μg,5 × mix 液 2 μL,无酶水补齐共 10 μL。进行 q-PCR,每个病毒转染的细胞平行 3 孔,实验重复 3 次。

色工作液,避光室温放置 30 min。上机检测并分析结果。

1.8.2 流式细胞术分析细胞凋亡 收集细胞,用不含 EDTA 胰酶消化液消化,室温离心 2 000 r/min,5 min;洗涤细胞,用 PBS 预冷并重悬细胞,再离心。加入 300 μL 1 × 结合缓冲液悬浮细胞,用 AnnexinV-FITC 标记,上机前 5 min 再加 5 μL PI 染色,同时补加 200 μL 1 × 结合缓冲液。上机检测分析。由于 sgRNA 活性鉴定中 M-AEG-1-sgRNA-1 缺失和突变概率最大,后面的流式细胞术结果以 M-AEG-1-sgRNA-1 为例。

1.9 统计学方法

每次实验至少重复 3 次,Western 印迹结果使用 Image J 软件分析,计算灰度值。用 *T* 检验进行统计学分析,利用 Execl 绘图。q-PCR 结果将 CQ 值转化成 2^{-ΔΔCt}通过计算,绘图,比较。流式细胞术分析细胞周期与凋亡运用了单因素方差分析进行比较和绘图。

2 结果

2.1 小鼠 *AEG-1* CRISPR/CAS9 表达载体鉴定, 序列测定与设计的一致

在 sgRNA 两端加入 *Bsm*B I 位点酶切后产生的互补粘端, 引物退火形成带有粘性末端的双链。

与带有嘌呤霉素抗性基因的载体质粒 GV392 相连接, 转进大肠杆菌中。小鼠 *AEG-1* CRISPR/CAS9 表达载体构建成功。测序结果如 Fig. 1, 表明本文所构建的小鼠 *AEG-1* CRISPR/CAS9 表达载体有 *AEG-1* sgRNA Oligo 的插入, 并且序列与所设计的一致。

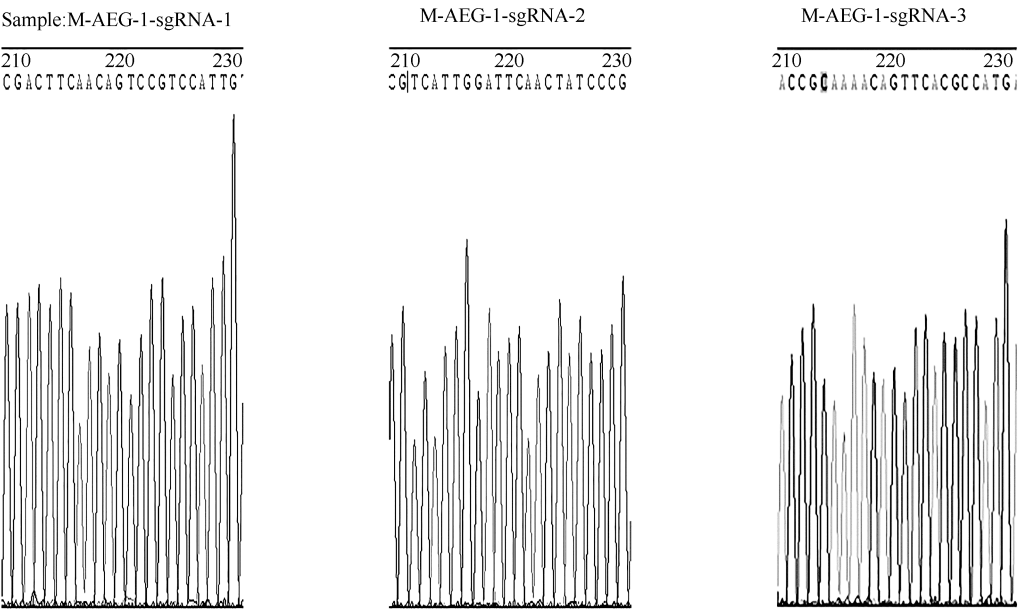


Fig. 1 Identification of the *AEG-1* CRISPR/Cas9 expression vectors is consistent with our design The results demonstrated that all the plasmids had donor DNA insert with correct ORF

2.2 sgRNA 活性的鉴定显示在细胞基因组内进行定点切割可造成错配修复

为了进一步验证病毒在细胞基因组内达到了定点切割的作用, 短链 PCR 克隆到 PM-19 克隆载体中, 选取阳性克隆进行序列分析, 检查序列的插入或缺失突变情况。测序结果见 Fig. 2, 提取稳转细胞基因组 DNA, 进行序列测定。测序结果显示, DNA 序列存在一定程度突变和缺失, 说明 CRISPR-CAS9 病毒转入之后, 对 DNA 进行定点切割, 并且进而造成了细胞基因组的错配修复。进一步验证了 sgRNA 序列不仅体外构建成功, 而且在细胞内也发挥了作用。

2.3 筛选稳转细胞系 *AEG-1* 敲除后神经细胞可观测到突起数目变少

病毒转染 HT22 细胞后, 嘌呤霉素筛选出稳转细胞系。如 Fig. 3, 明场下观察, M-AEG-1-sgRNA-1 组, M-AEG-1-sgRNA 组及 M-AEG-1-sgRNA 组与对照组相比, 最大的变化是细胞突起数目变少, 尤其以 M-AEG-1-sgRNA 组最为明显。

2.4 病毒 M-AEG-1-SgRNA 感染小鼠神经元细胞后 *AEG-1* mRNA 以及蛋白质表达水平明显降低

将 M-AEG-1-sgRNA-1 与 M-AEG-1-sgRNA-3 病毒感染小鼠神经元细胞 HT22, 提取细胞总 RNA, 测定 RNA 浓度并进行检测。结果显示, M-AEG-1-sgRNA-1 与 M-AEG-1-sgRNA-3 病毒对于 *AEG-1* 的敲除效率分别为 85% 以及 89%, 可以显著降低 *AEG-1* 表达水平, 见 Fig. 4。

检测病毒感染 HT22 细胞之后的 *AEG-1* 蛋白的表达情况, 结果如 Fig. 5 所示。病毒 M-AEG-1-SgRNA-1 及 M-AEG-1-SgRNA-3 转染的 Western 印迹结果基本与 q-PCR 结果一致。M-AEG-1-SgRNA-2 转染的 Western 印迹结果则不一致。一方面, 由于 mRNA 水平与蛋白质水平在许多情况下相关性较差, 特别是类似于本文中的低丰度蛋白质, 它们之间的相关性则更差。另一方面, M-AEG-1-2 有可能在翻译方面出现问题, 最终造成不相符的结果。另外, 蛋白质产物不稳定都会造成不一致的情况发生。所以整体而言, 在敲除细胞系中 *AEG-1* 的表达效率

M-AEG-1-sgRNA-1 Sequence ID:Query_48915 Ident:89%

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
315 bits (170)	80-90	228/256(89%)	3/256(1%)	Plus/Minus
Query 136	CCAGTTATAAACTTTTGGTTTATCTGTCAGTCGGTTTGACATTACATTGTTTTCCTGTT	195		
Sbjct 302	CCAGTTATAAAATATTGGTGTACTTTGTCAGTAAAGGAGACATTACATTGT-CCCACCTTT	244		
Query 196	ACCTATACAGCCAAATGGACGGACTGTTGAAGTACCCGAGGATGAAGTTGTTAGAAATCC	255		
Sbjct 243	ACCT-TCCAGCCAAAT-GACGGACTGTTGAAGTACCCGACGAGGAAGTAGTCAGAAATCC	186		
Query 256	CCGAAGTATAACTGCAAAACAGCACCAGAGACAGACAAGAAAAATGAAAAGGTAAGCTT	315		
Sbjct 185	CCGAAGTATAAGTGCAAAACAGCACCAGAGACAGCCAAGAAAAATGAAAAGGTAAGCTT	126		
Query 316	GGGAACGCATATGTACAAAGTTTTTAATAAAGCTAATGACATAAAATTATGCTTTCATGG	375		
Sbjct 125	GGGAACGCATATGTACAAAGTTTGTAAATAAAGGTAATGACATAAAATTATGCTTTCATGG	66		
Query 376	TTAATAAGAGTGTAGT 391			
Sbjct 65	TTAATAAGAGTGTAGT 50			

M-AEG-1-sgRNA-2 Sequence ID:Query_215837 Ident:94%

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
176 bits (95)	3e-48	110/117(94%)	1/117(0%)	Plus/Minus
Query 179	TATTTTCAGTCAAGAAAAATAAGAAGAAATCAAAGTCAGATGCTAAAGCAGTGCAAAACA	238		
Sbjct 207	TATTTTCAGTCAAGAAAAATAAGAAGAAATCCAAGTCAGAAAGCTTAAGCAGTGCAAAATCA	148		
Query 239	GTTTCACGCCATGATGGAAAGGAAGTTGATGAAGGTATTTGAGCAAGGGAAAGGCCTA	295		
Sbjct 147	TTTCACGCCATGATGGAAAGGAAGTTGATGAAGGTATT-GAGCAAGGGAAAGGCGTA	92		

Range 2:208 to 283 Graphics			▼ Next Match	▲ Previous Match
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
91.6 bits (49)	1e-22	68/77(88%)	2/77(2%)	Plus/Minus
Query 264	TGATGAAGGTATTTGAGCAAGGG-AAAGGCCTATAGAAAAATATTTAAGTTTTTAACTGA	322		
Sbjct 208	TGATGAAGGAATATGA-CTTGGGTAAAAGACTATAGAAAAATATTTAAGTTTTTAACTGA	266		
Query 323	GGTGTGTGGTATAAAAG 339			
Sbjct 267	TGTGTGTGGTATAAAAG 283			

M-AEG-1-sgRNA-3 Sequence ID:Query_35311 Ident:99%

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
521 bits (282)	4e-152	284/285(99%)	0/285(0%)	Plus/Minus
Query 127	ATGTCAGGAGCCTGGGAAACTAAAATTAGTCACAGAGAGAAACGACAACAGCGTAAACGT	186		
Sbjct 47	ATTTTCAGGAGCCTGGGAAACTAAAATTAGTCACAGAGAGAAACGACAACAGCGTAAACGT	106		
Query 187	GATAAAGTGCTGACTGATTCTGGTTCATTGGATTCAACTATCCCTGGGATAGAAAATATC	246		
Sbjct 107	GATAAAGTGCTGACTGATTCTGGTTCATTGGATTCAACTATCCCTGGGATAGAAAATATC	166		
Query 247	ATCACAGTTACCACCGAGCAACTTACAACATGCATCATTTCCCTGTTGGTTCCAAGAAGAAT	306		
Sbjct 167	ATCACAGTTACCACCGAGCAACTTACAACATGCATCATTTCCCTGTTGGTTCCAAGAAGAAT	226		
Query 307	AAAGGTATATTAGTGGAACATAAGAGTGGTACATCAAATCAAACCTCCTTTAAGCCAGATG	366		
Sbjct 227	AAAGGTATATTAGTGGAACATAAGAGTGGTACATCAAATCAAACCTCCTTTAAGCCAGATG	286		
Query 367	TACAAAATATGTCACAATCTTTTTGAACGCTAACTTTTGCTGA 411			
Sbjct 287	TACAAAATATGTCACAATCTTTTTGAACGCTAACTTTTGCTGA 331			

Fig.2 Identification of sgRNA activity The sequencing results of the three groups of PCR products showed that there were mutations and deletions at different levels, which was in line with our experimental design. The sgRNA activity was successfully identified

是较低的,并且在后续稳转细胞系中检测蛋白质表达量显示,均证实 *AEG-1* CRISPR-CAS9 病毒敲除比较稳定。构建稳转细胞之后,经细胞多次传代,检测了细胞的 *AEG-1* 蛋白表达量,结果显示所构建的小鼠 CRISPR/Cas9 病毒敲除稳定。

2.5 敲除 *AEG-1* 后神经元的细胞周期被阻滞
为了探讨敲除 *AEG-1* 后细胞功能有何改变,本文对细胞进行预处理,由于 M-AEG-1-sgRNA-1 sgRNA 各方面指标最符合要求,所以流式细胞术检测细胞周期以 M-AEG-1-sgRNA-1 为例,与未转

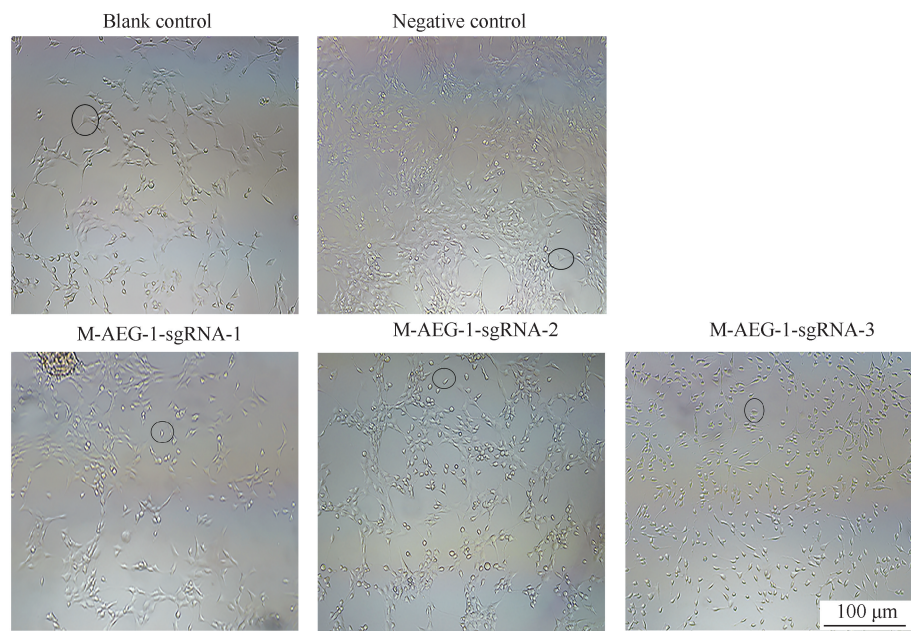


Fig. 3 The cell neurites decrease after *AEG-1* knockout Morphology of HT22 cells after transfection of virus M-AEG-1-sgRNA-1, M-AEG-1-sgRNA-2, M-AEG-1-sgRNA-3 and the negative control virus in the field of 10 X fields of bright fields. The blank control is HT22 cells without viruses in the 10 X fields of bright fields. Circles indicate individual cells for comparison. Visual observation revealed that cell neurites of the HT22 cell after transfection of the virus had decreased

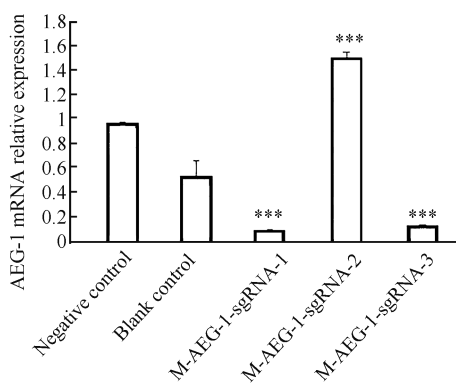


Fig. 4 Silencing efficiency of CRISPR/Cas9 virus-infected mouse neuronal cells The *AEG-1* gene expression was assessed by qPCR. The mRNA level of *AEG-1* in the HT22 cell line transfected with M-AEG-1-sgRNA-1 and M-AEG-1-sgRNA-3 were reduced. *** $P < 0.001$, compared with the control (HT22 transfected negative control virus) to exclude the influence of the vector

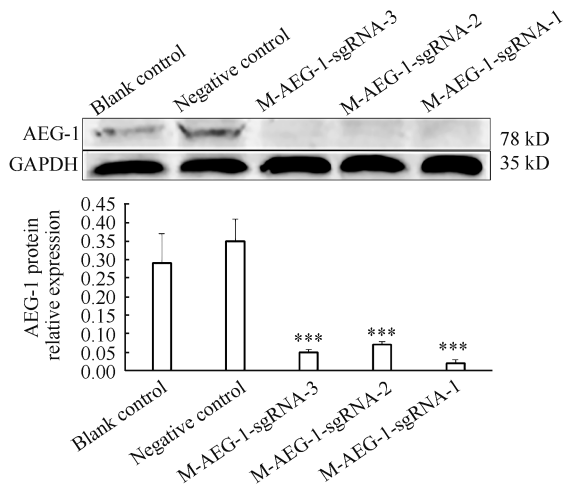


Fig. 5 A significant decrease in *AEG-1* was observed in virus-infected cells Western blotting analysis of *AEG-1* protein expression levels was generally consistent with the q-PCR results. In the *AEG-1* knockout cell line *AEG-1* protein levels were significantly reduced. *** $P < 0.001$ compared to HT22 cells that were transfected with negative control viruses. GAPDH was used as a loading control

染病毒的细胞以及转染了阴性对照病毒的细胞比较。结果显示,细胞周期阻滞,敲除 *AEG-1* 的神经发生了 G₂ 期阻滞,G₂ 期细胞占比相较于对照组细胞明显升高,细胞增殖能力下降。结果如 Fig. 6 所示。

2.6 敲除 *AEG-1* 的神经元细胞的凋亡率减低

为了探讨敲除 *AEG-1* 后细胞凋亡有何改变,本文对细胞进行了处理,用流式细胞技术检测细

胞凋亡的变化。与检测细胞周期相同,仍以 M-AEG-1-sgRNA-1 为例,结果如 Fig. 7 所示,进行统计学分析。结果显示,与未转染病毒的细胞以及转染了阴性对照病毒的细胞比较,细胞凋亡率减少。

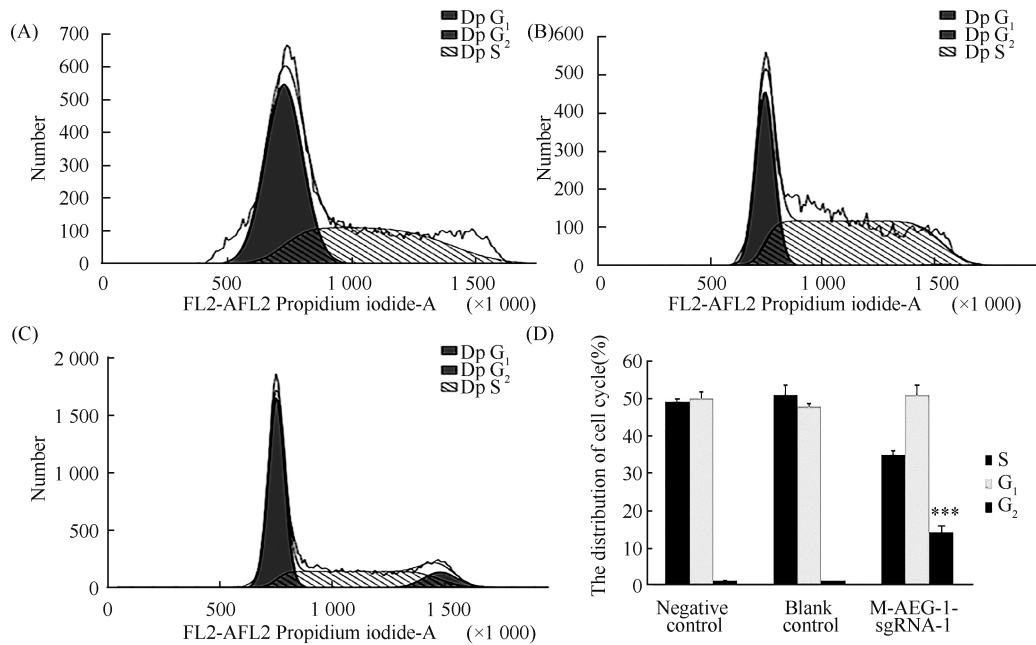


Fig. 6 Flow cytometry for cell cycle detection (A) Negative control virus infected HT22 cell line flow cell cycle results. (B) HT22 cell line flow cell cycle results. (C) *AEG-1* knockout HT22 cell line flow cell cycle results. (D) The distribution of cell cycle. Reduced S phase, increased G₂ phase, represents cell cycle arrest, cell proliferation decreased. The percentage of cells in each phase is shown in the histogram. One way ANOVA was performed using SPSS 13.0. Significant difference was indicated as *** $P < 0.001$ ($n = 3$)

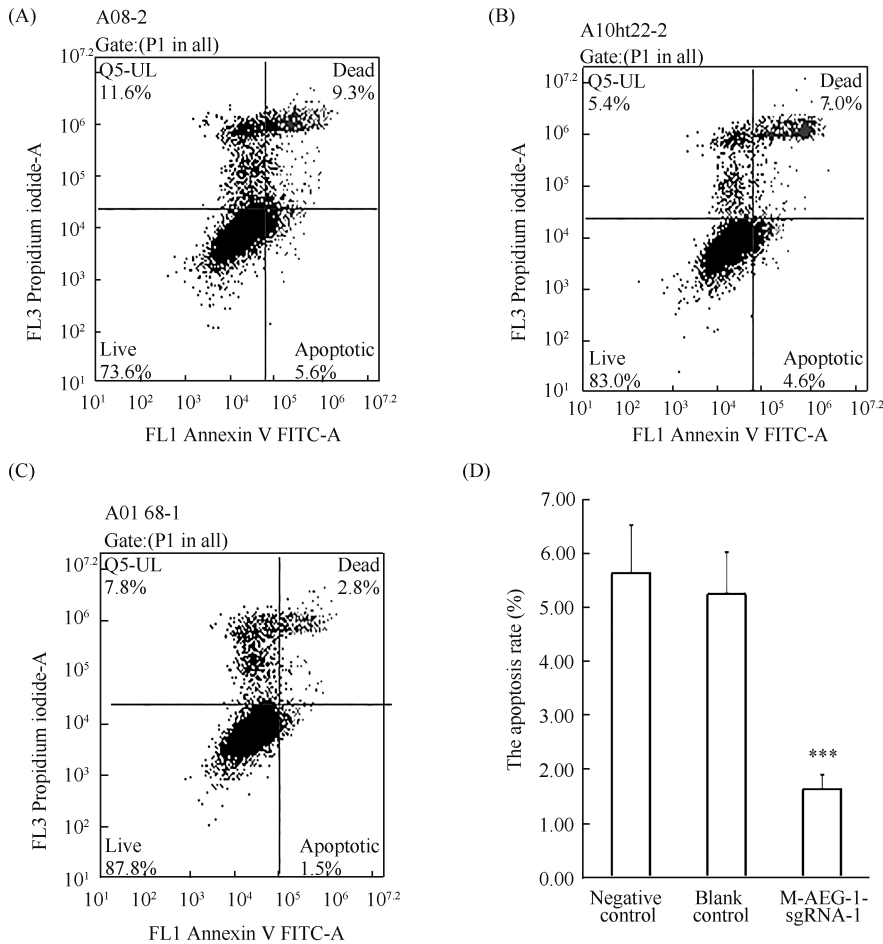


Fig. 7 Flow cytometry detection of apoptosis (A) Flow cytometry results of the negative control virus-infected HT22 cell lines. (B) Flow cytometry results of the HT22 cell line. (C) Flow cytometry results of *AEG-1*-knockout HT22 cell lines. (D) The cell apoptotic rate is shown in the histogram. One-way ANOVA was performed using SPSS 13.0. Significant difference was indicated as *** $P < 0.001$ ($n = 3$). From the results, the apoptosis rate of the *AEG-1* knockout neuronal cell line can be observed, and the apoptosis rate is decreased compared to the HT22 cells transfected with the negative control virus and the untransfected HT22 cells

3 讨论

神经系统疾病发病机制复杂,病程较长,对病人身心造成了极大的危害,给社会和家庭带来沉重负担,而且近年来有发病率升高的趋势。对于某些神经退行性疾病,只能对症治疗,未能影响到疾病潜在的病理生理过程,仅有少数几种药物可用于治疗,寻找一个新的治疗靶点迫在眉睫。近年来研究发现,作为原癌基因 AEG-1 是一个和许多神经系统疾病相关的基因。据文献报道,AEG-1 与神经损伤调控^[15],胶质瘤相关的神经退行性疾病等有关^[16]。另有研究证实,AEG-1 不仅和中枢神经系统疾病相关^[17],也与周围神经系统疾病相关^[18]。事实证明,AEG-1 在正常生理过程及在病理过程中,都是一个多功能的调控者。另有研究证实,神经退行性疾病与神经元改变有关^[19],例如在帕金森中神经元凋亡就被认为参与了其中^[20],肌萎缩侧索硬化症也与神经元异常有关^[21]。探究 AEG-1 是否能成为神经退行性疾病新的治疗靶点也是我们正在研究的方向。故此本研究利用 CRISPR/Cas9 技术构建 AEG-1 敲除的小鼠海马神经元 HT22 稳转细胞系,并在此基础上研究 AEG-1 对于神经元 HT22 细胞形态及细胞周期与细胞凋亡的影响。

本文证实,AEG-1 敲除后神经细胞凋亡率是降低的,而神经元凋亡又是很多神经疾病的病理表现。作为一种常见的神经退行性疾病的阿尔茨海默病,就会出现神经元凋亡的病理表现,而且许多围绕治疗的研究均以抗凋亡作为药物治疗有效的标志^[22-27]。更有文献证实,有些抑郁症亚型与神经炎症有关,而神经炎症最终会影响神经元凋亡^[28-29]。另外,在缺血再灌注损伤以及在海洛因成瘾中都涉及到了神经元凋亡^[30-31]。抑制神经元凋亡是许多神经疾病治疗的靶点,同时也是难点,而 AEG-1 敲除后对于神经细胞凋亡的抑制有望为众多神经系统疾病的治疗发挥作用。我们现阶段的研究主要集中在细胞以及体外研究,同时,我们正在构建 AEG-1 条件性敲除小鼠,后期会在动物水平上开展研究,进一步验证我们的设想。

参考文献 (References)

[1] Emdad L, Sarkar D, Su ZZ, *et al.* Astrocyte elevated gene-1: recent insights into a novel gene involved in tumor progression, metastasis and neurodegeneration[J]. *Pharmacol Ther*, 2007, **114**(2): 155-170

[2] Zhang C, Li HZ, Qian BJ, *et al.* MTDH/AEG-1-based DNA vaccine suppresses metastasis and enhances chemosensitivity to

paclitaxel in pelvic lymph node metastasis [J]. *Biomed Pharmacother*, 2015, **70**: 217- 226

[3] Vartak-Sharma N, Nooka S, Ghorpade A. Astrocyte elevated gene-1 (AEG-1) and the A (E) Ging HIV/AIDS- HAND [J]. *Prog Neurobiol*, 2017, **157**: 133-157

[4] Anttila V, Wessman M, Kallela M, *et al.* Towards an understanding of genetic predisposition to migraine [J]. *Genome Med*, 2011, **3**(3): 17

[5] de Kovel CG, Pinto D, Tauer U, *et al.* Whole-genome linkage scan for epilepsy-related photosensitivity: a mega-analysis [J]. *Epilepsy Res*, 2010, **89**(2-3): 286-294

[6] Kang DC, Su ZZ, Sarkar D, *et al.* Cloning and characterization of HIV-1-inducible astrocyte elevated gene- 1, AEG-1 [J]. *Gene*, 2005, **353**(1): 8-15

[7] Han CL, Ge M, Liu YP, *et al.* Long non-coding RNA H19 contributes to apoptosis of hippocampal neurons by inhibiting let-7b in a rat model of temporal lobe epilepsy [J]. *Cell Death Dis*, 2018, **9**(6): 617

[8] Mendez-Armenta M, Nava-Ruiz C, Juarez-Rebollar D, *et al.* Oxidative stress associated with neuronal apoptosis in experimental models of epilepsy [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, **2014**: 293689

[9] Song H, Huang LP, Li Y, *et al.* Neuroprotective effects of cordycepin inhibit Abeta-induced apoptosis in hippocampal neurons [J]. *Neurotoxicology*, 2018, **68**: 73-80

[10] Stoker TB, Barker RA. Regenerative therapies for Parkinson ' s disease: An Update [J]. *BioDrugs*, 2018, **32**(4): 357-366

[11] Jacot-Descombes S, Uppal N, Wicinski B, *et al.* Decreased pyramidal neuron size in Brodmann areas 44 and 45 in patients with autism [J]. *Acta Neuropathol*, 2012, **124**(1): 67-79

[12] Lasarge CL, Danzer SC. Mechanisms regulating neuronal excitability and seizure development following mTOR pathway hyperactivation [J]. *Front Mol Neurosci*, 2014, **7**: 18

[13] Luikart BW, Schnell E, Washburn EK, *et al.* Pten knockdown in vivo increases excitatory drive onto dentate granule cells [J]. *J Neurosci*, 2011, **31**(11): 4345-4354

[14] Matsumura R, Yamamoto H, Hayakawa T, *et al.* Dependence and homeostasis of membrane impedance on cell morphology in cultured Hippocampal Neurons [J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 9905

[15] Vartak-Sharma N, Ghorpade A. Astrocyte elevated gene-1 regulates astrocyte responses to neural injury: implications for reactive astrogliosis and neurodegeneration [J]. *J Neuroinflammation*, 2012, **9**: 195

[16] Lee SG, Kim K, Kegelman TP, *et al.* Oncogene AEG-1 promotes glioma-induced neurodegeneration by increasing glutamate excitotoxicity [J]. *Cancer Res*, 2011, **71**(20): 6514-6523

[17] Noch EK, Khalili K. The role of AEG-1/MTDH/LYRIC in the pathogenesis of central nervous system disease [J]. *Adv Cancer Res*, 2013, **120**: 159-192

[18] Wang Y, Zhang W, Zhu X, *et al.* Upregulation of AEG-1 involves in Schwann cell proliferation and migration after Sciatic nerve crush [J]. *J Mol Neurosci*, 2016, **60**(2): 248-257

[19] Namsi A, Nury T, Hamdouni H, *et al.* Induction of neuronal differentiation of murine N2a cells by two polyphenols present in the mediterranean diet mimicking neurotrophins activities: resveratrol and apigenin [J]. *Diseases*, 2018, **6**(3). pii:E67

[20] Novikova L, Garris BL, Garris DR, *et al.* Early signs of neuronal apoptosis in the substantia nigra pars compacta of the progressive neurodegenerative mouse 1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine/ probenecid model of Parkinson ' s disease [J]. *Neuroscience*, 2006, **140**(1): 67-76

[21] Azuma Y, Mizuta I, Tokuda T, *et al.* Amyotrophic lateral sclerosis model [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2018, **1076**: 79-95

[22] Gu C, Chen C, Wu R, *et al.* Long Noncoding RNA EBF3-AS promotes neuron apoptosis in Alzheimer ' s disease [J]. *DNA Cell Biol*, 2018, **37**(3): 220-226

[23] Sureda A, Xavier C, Tejada S. Neuroprotective effects of flavonoid compounds on neuronal death associated to Alzheimer's

- disease[J]. *Curr Med Chem*, 2017 Dec 25. doi:10.2174/0929867325666171226103237. [Epub ahead of print]
- [24] Li Q, Wang J, Li Y, *et al.* Neuroprotective effects of salidroside administration in a mouse model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Med Rep*, 2018, **17**(5): 7287-7292
- [25] Zhang Y, Wang J, Wang C, *et al.* Pharmacological basis for the use of evodiamine in Alzheimer's disease: antioxidation and antiapoptosis[J]. *Int J Mol Sci*, 2018, **19**(5). pii: E1527
- [26] Cai H, Luo Y, Yan X, *et al.* The Mechanisms of Bushen-Yizhi Formula as a therapeutic agent against Alzheimer's disease[J]. *Sci Rep*, 2018, **8**(1): 3104
- [27] Ma QH, Jiang LF, Mao JL, *et al.* Vildagliptin prevents cognitive deficits and neuronal apoptosis in a rat model of Alzheimer's disease[J]. *Mol Med Rep*, 2018, **17**(3): 4113-4119
- [28] Zhou Y, Ma C, Li BM, *et al.* Polygala japonica Houtt. reverses depression-like behavior and restores reduced hippocampal neurogenesis in chronic stress mice[J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, **99**: 986-996
- [29] Jeon SW, Kim YK. The role of neuroinflammation and neurovascular dysfunction in major depressive disorder[J]. *J Inflamm Res*, 2018, **11**: 179-192
- [30] Pu H, Wang X, Zhang J, *et al.* Cerebellar neuronal apoptosis in heroin-addicted rats and its molecular mechanism[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, **8**(7): 8260-8267
- [31] Xiao P, Liu XW, Zhao NN, *et al.* Correlations of neuronal apoptosis with expressions of c-Fos and c-Jun in rats with post-ischemic reconditioning damage[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, **22**(9): 2832-2838