

· 论著 ·

## 烟酰胺磷酸核糖转移酶基因编辑对人胚胎干细胞生长影响的研究

王 治, 王淑娜, 徐添颖, 李志勇, 张赛龙, 缪朝玉 (海军军医大学药学院药理学教研室, 上海 200433)

**[摘要]** **目的** 研究烟酰胺磷酸核糖转移酶(nicotinamide phosphoribosyl transferase, Nampt)基因在人胚胎干细胞生长中的作用。**方法** 采用 CRISPR/Cas9 技术对人胚胎干细胞 H9 细胞系的 Nampt 基因进行移码突变; 随后, 筛选 Nampt 基因突变细胞系进行基因测序, 同时在显微镜下观察其生长状态。另外, 给予 H9 细胞不同浓度的 Nampt 抑制剂 FK866 进行干预, 采用 CCK-8 试剂盒检测细胞活力。**结果** Nampt 基因发生突变后, 人胚胎干细胞会逐渐死亡。同样, Nampt 抑制剂 FK866 也会抑制胚胎干细胞的活力, 使细胞逐渐死亡。**结论** Nampt 基因对维持人胚胎干细胞生长具有不可或缺的重要作用。

**[关键词]** 烟酰胺磷酸核糖转移酶; 胚胎干细胞; CRISPR/Cas9 技术; 基因编辑

**[中图分类号]** R34 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2019)03-0237-04

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.03.009

## The effect of Nampt gene editing on the growth of human embryonic stem cells

WANG Zhi, WANG Shuna, XU Tianying, LI Zhiyong, ZHANG Sailong, MIAO Chaoyu (Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Naval Medical University, Shanghai 200433, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the role of nicotinamide phosphoribosyltransferase(Nampt)gene in the growth of human embryonic stem cells. **Methods** CRISPR/Cas9 technology was used for Nampt gene knockout in human embryonic stem cells by introducing frame-shift mutation to gene coding region. Then, the mutational cells were screened with gene sequencing and observed for the growth situation under the microscope. In addition, Nampt inhibitor FK866 was introduced at different concentrations to interfere the growth of human embryonic stem cells, followed by the cell viability test with CCK-8 kit. **Results** Human embryonic stem cells gradually died after the mutation of Nampt gene with CRISPR/Cas9 technology. Likewise, Nampt inhibitor FK866 significantly inhibited the cell viability and gradually led to the death of cells. **Conclusion** Nampt gene plays an indispensable role in maintaining the growth of human embryonic stem cells.

**[Key words]** Nampt; embryonic stem cells; CRISPR/Cas9 technology; gene editing

多能干细胞主要包括人胚胎干细胞(hESC)和诱导性多能干细胞(iPSC), 这类干细胞具有分化形成多种细胞和器官的潜能。随着干细胞培养技术的不断进步, 尤其是类器官培养技术的出现, 极大地拓宽了干细胞在疾病模拟、疾病机制研究和药物筛选等领域的应用<sup>[1-2]</sup>。另外, 基因编辑技术的快速发展使得研究者能够在干细胞上直接引入特定基因的突变, 进而开展相应基因的研究, 也极大地促进了科学研究发现。CRISPR/Cas9 技术作为一项新兴的基因编辑技术, 与传统的锌指核酸内切酶和转录激活

因子效应物核酸酶等基因编辑技术相比, 其成本更低, 方法更加简单高效<sup>[3-4]</sup>。因此, CRISPR/Cas9 技术被更广泛的运用于各种基因研究和相关疾病模型的构建。

Nampt 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD)生物合成的限速酶, 决定着细胞产生 NAD 的水平和速率, 在细胞的能量代谢中具有重要作用<sup>[5-6]</sup>。同时, 研究表明 Nampt 在促进细胞的增殖分化, 调控细胞凋亡等方面也有重要作用<sup>[7-8]</sup>。Van 等研究证实 Nampt 可以促进血管平滑肌细胞的成熟分化, 还可以延长血管平滑肌细胞的寿命<sup>[8-9]</sup>。另外, Stein 等通过构建 Nampt 缺陷细胞证实了 Nampt 在神经干细胞的增殖分化和自我更新中的重要作用<sup>[10]</sup>。目前, Nampt 对人胚胎干细胞增殖分化的作用还鲜有报道, 本实验主要通过 CRISPR/Cas9 技术在人胚胎干细胞上

**[基金项目]** 军事医学创新工程重点项目(16CXZ009); 国家自然科学基金重点项目(81730098); 上海市科委项目(16431901400, 16140904500)

**[作者简介]** 王 治, 硕士研究生, Email: 13968466559@163.com

**[通讯作者]** 缪朝玉, 教授, 博士生导师, 研究方向: 药理学、心脑血管药理学, Email: cymiao@smmu.edu.cn

进行 Nampt 基因的敲除,进而研究 Nampt 基因敲除对人胚胎干细胞的存活及生长的影响。另外,使用 Nampt 抑制剂 FK866 对人胚胎干细胞进行干预,观察其对人胚胎干细胞生长的影响。

## 1 实验材料

### 1.1 细胞

hESCs(WA09, Wicell, Madison, WI)

### 1.2 实验仪器

电穿孔仪(Bio-Rad, USA),三气培养箱(Healforce HF100),多功能酶标仪(TECAN Infinite M200)。

### 1.3 药物与试剂

mTesRTM1 maintenance medium (STEM-CELL), Matrigel (Corning), Accutase 酶 (STEM-CELL Technologies), ROCK 抑制剂 Y27632 (Santa Cruz Biotechnologies), Trans Easy 电转试剂盒 (Cellapy), CCK-8 试剂盒(日本同仁),嘌呤霉素 (Sciencell),蛋白酶 K(碧云天),EDTA、NaCl、SDS、Tris-HCl、DMSO 均购自上海博光生物科技有限公司,乙醇(75%、95%)购自国药集团化学试剂有限公司,FK866(MedChem Express)。

## 2 方法

### 2.1 CRISPR/Cas9 载体构建

根据 gRNA 靶基因的设计原则,在 Pubmed 网站 ([www.Ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/](http://www.Ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/)) 找到 Nampt 基因序列;通过 CRISPR Design 软件(<http://crispr.mit.edu/>),针对特定基因组区域进行 CRISPR 靶向序列设计和脱靶位点预测,得到 gRNA 序列为 5'-GGGATGGAAC TACATTCT-TG-3'。随后,赛贝生物技术有限公司构建 CRISPR/Cas9 载体。

### 2.2 人胚胎干细胞培养和质粒电穿孔转染

人胚胎干细胞在铺有 Matrigel 的 6 孔板中,使用 mTeSR1 培养基进行培养,每隔 24 h 换液。在细胞密度达到 80%左右时,使用 Accutase 酶将其消化成单个细胞,800 r/min,离心 3 min,吸弃上清液。取 100  $\mu$ l 电转液加入 5  $\mu$ g 质粒混匀。使用上述 100  $\mu$ l 电转液重悬细胞沉淀(动作尽量迅速且不要产生气泡)。将上述的细胞重悬液转移到电转杯中,将电转杯放入电转仪进行电穿孔转染。电转完成后迅速取出电转杯,将细胞接种到 Matrigel 包被的培养板中进行培养。

### 2.3 细胞筛选和单克隆分离

胚胎干细胞电穿孔转染 24 h 后,使用含

0.3  $\mu$ g/ml 嘌呤霉素的 mTeSR1 培养基进行抗药性筛选,每天换液,直到出现耐药克隆。挑选耐药克隆,将其接种到 96 孔板中,待克隆长大后进行传代。传代时,留出一部分细胞进行 DNA 提取,用于后续 PCR 验证。设计 PCR 引物,进行 PCR 克隆测序验证。重复上述步骤,直到获得目的细胞。

### 2.4 基因型鉴定

用于基因型鉴定的胚胎干细胞(96 孔板),在其细胞密度长到 70%左右时,加入 1 $\times$ PBS 洗去培养基。紧接着,每孔加入 50  $\mu$ l 细胞裂解液(40  $\mu$ g/ml 蛋白酶 K,10 mmol/L NaCl,10 mmol/L Tris pH 7.5,0.5%SDS,10 mmol/L EDTA),50 $^{\circ}$ C 水浴消化过夜。随后,每孔加入 100  $\mu$ l 预冷的 95%乙醇和 75 mmol/L NaCl,在室温孵育 1 h 后,10 000 $\times$ g 离心 1 min,弃上清液。加入 75%乙醇洗涤 DNA 沉淀 2 次,室温晾干,每孔用 30  $\mu$ l 的重蒸馏水(ddH<sub>2</sub>O)溶解 DNA。获得的 DNA 用于下一步 PCR 鉴定基因型,所用的鉴定引物为:

NAMPT-JD-1:CTCTGCTGTTGACTCTGGGTG

NAMPT-JD-2:CAGCTACTAAGGAGGCTAAGG

### 2.5 Nampt 抑制剂 FK866 给药

选取同一批次的生长状态良好的胚胎干细胞(6 孔板),待其长到 70%左右时,培养基中给予不同浓度的 FK866(DMSO 溶解)。FK866 给药组设 0.3、1.0、3.0、10 nmol/L 4 个浓度梯度,对照组给予相应体积的 DMSO。上述各组均设 4 个复孔。给药后,继续培养 48 h,采用 CCK-8 试剂盒进行检测。所有组的 DMSO 浓度均 $\leq$ 1%。

### 2.6 细胞活力检测及细胞生长抑制率计算

给药 48 h 后,按照 CCK-8 试剂盒使用说明书,每孔加入含 10% CCK-8 的检测液,在培养箱中继续孵育 2 h。2 h 后,用酶标仪测定波长为 450 nm 的吸光度值(OD)。生长抑制率计算公式为:

$$\text{生长抑制率} = \frac{\text{对照组 OD} - \text{实验组 OD}}{\text{对照组 OD} - \text{空白组 OD}} \times 100\%$$

### 2.7 统计学处理

实验数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示,使用 GraphPad Prism 软件进行作图处理,采用单因素方差分析统计检验差异的显著性。以  $P < 0.05$  作为统计学差异指标。

## 3 结果

### 3.1 构建 CRISPR/Cas9 载体

根据 Nampt 基因序列,设计 gRNA 序列,得到如下质粒载体(图 1)。质粒载体大小为 14 030bp,主要包含:Hu6 启动子序列、nampt-gRNA 序列和

EFS 启动子驱动的包含 Cas9、Puro(嘌呤霉素抗性基因)和 P2A 多肽的融合序列。另外,质粒载体还包含绿色荧光蛋白基因和用于质粒在真核细胞中自我复制的 EBNA-1 和 ORI 部件。

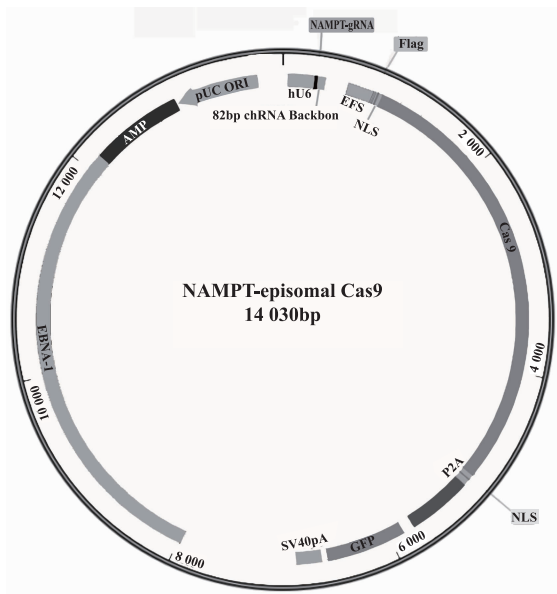


图1 Nampt-CRISPR-Cas9 质粒载体示意图

### 3.2 Nampt 基因敲除对人胚胎干细胞生长的影响

(1) 人胚胎干细胞电穿孔转染后,给予 0.3  $\mu\text{g/ml}$  嘌呤霉素筛选 5 d,待细胞系扩增后,提取 DNA,进行 sanger 测序,结果显示 Nampt 基因没有被编辑。多次重复仍无法获得 Nampt 基因被编辑的细胞系。

(2) 为了保证能够快速获得细胞系,人胚胎干细胞电转后降低嘌呤霉素筛选浓度(0.1  $\mu\text{g/ml}$ )筛选 5 d。待细胞系扩增后,挑取上述的单克隆提取 DNA,进行 PCR 扩增后测序。结果显示也无被编辑的细胞系。

(3) 为减少细胞死亡,在电转后第 1 天添加 ROCK 抑制剂 Y27632(10  $\mu\text{mol/L}$ )(仅第 1 天使用)<sup>[11]</sup>,同时进行 0.3  $\mu\text{g/ml}$  嘌呤霉素抗性筛选,3 d 后得到混合细胞系,提取 DNA 后,进行 PCR 扩增测序。测序结果显示 Nampt 基因 3 个碱基被删除,见图 2。7 d 后再次对该混合细胞系提取 DNA 进行 sanger 测序,结果显示 Nampt 基因未被编辑。上述结果提示,Nampt 基因突变是成功的,因为在电转后的较早期(第 3 天),细胞 DNA 测序结果显示 Nampt 基因的 3 个碱基被删除。但是电转后期(第 5 天、第 7 天)检测不到 Nampt 基因突变的细胞,说明该基因突变细胞已死亡。

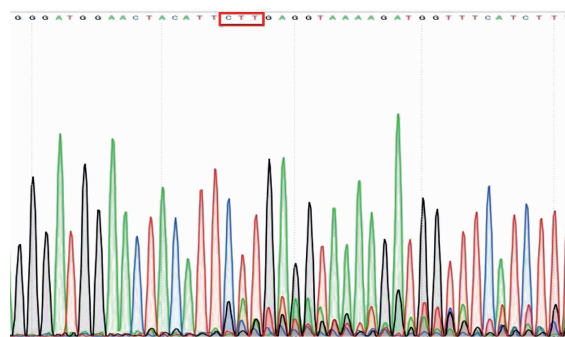


图2 基因测序结果

注:框内为删除的 3 个碱基

### 3.3 Nampt 抑制剂 FK866 给药结果

如图 3 所示,0.3、1、3 和 10 nmol/L 的 Nampt 抑制剂 FK866 对胚胎干细胞的生长抑制率分别为(2.95  $\pm$  0.01)%、(13.75  $\pm$  0.01)%、(90.05  $\pm$  0.01)%和(95.61  $\pm$  0.02)% ,各剂量组均有统计学差异,且 FK866 抑制人胚胎干细胞的生长呈剂量依赖性。从 3 nmol/L 剂量开始,FK866 几乎完全抑制胚胎干细胞生长。

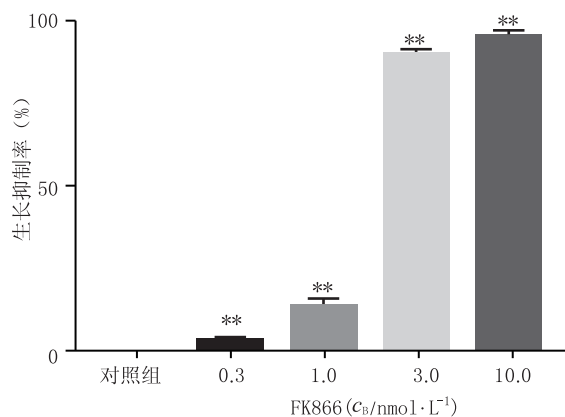


图3 FK866 对胚胎干细胞生长的影响

\*\* $P < 0.05$ ,与对照组比较

## 4 讨论

Nampt 是哺乳动物体内 NAD 生物合成的重要限速酶,在生物体内具有多种生理功能<sup>[6,12]</sup>。另外,Nampt 基因全身敲除的小鼠无法存活也说明了 Nampt 在生物体内的重要性<sup>[13]</sup>。本课题组在 Nampt 相关研究上做了大量工作,尤其是发现其在缺血性脑卒中的亚急性期和慢性期可以通过促进血管新生和神经再生从而促进神经功能的恢复<sup>[14-15]</sup>。这些结果都提示 Nampt 在细胞的增殖分化上具有重要作用,但是目前 Nampt 在胚胎干细胞上作用的研究鲜有报道。本实验通过 CRISPR/Cas9 技术对人胚胎干细胞的 Nampt 基因进行移码突变,进而研究 Nampt 在胚胎干细胞生长中的作用。

转染的质粒中包含嘌呤霉素抗性基因,故成功转染的胚胎干细胞具有嘌呤霉素抗性。但由于胚胎干细胞本身对嘌呤霉素具有一定抗性,筛选得到的目的细胞具有假阳性的可能,因此需要经过基因测序最终确定 Nampt 基因是否被敲除。本实验在胚胎干细胞电穿孔转染后第 1 天添加嘌呤霉素进行细胞筛选。嘌呤霉素筛选 5 d 后提取细胞 DNA 进行基因测序,并未发现 Nampt 基因发生突变,降低嘌呤霉素的筛选浓度也未能获得目的细胞。上述结果提示以下两种可能:①人胚胎干细胞的 Nampt 基因并未被成功敲除;②Nampt 基因突变的人胚胎干细胞在前 5 d 内就已经死亡,而第 5 天时存活的是 Nampt 基因未被编辑但具有一定嘌呤霉素抗性的假阳性细胞。故而,基因测序结果均显示为 Nampt 基因未被编辑。

为验证上述两种猜想,本实验在人胚胎干细胞电转后第 1 天添加 ROCK 抑制剂 Y27632 以减少细胞凋亡,同时在嘌呤霉素筛选的第 3 天就提取部分细胞 DNA 进行基因测序,剩余细胞继续培养。结果显示 Nampt 基因被删除了 3 个碱基。随后,在电转后第 7 天再次对上述剩余细胞提取 DNA 进行基因测序,结果并未发现 Nampt 基因有任何突变。上述结果说明 Nampt 基因突变的人胚胎干细胞 5 d 内就会发生死亡,因此在第 5 天进行基因测序时显示 Nampt 基因未被编辑。上述结果说明了 Nampt 基因被删除后,胚胎干细胞在早期就会失去活力逐渐死亡,也间接说明了 Nampt 基因的重要性。

为进一步验证 Nampt 对胚胎干细胞生长的重要性,本实验随后对正常培养的人胚胎干细胞添加了不同浓度的 Nampt 抑制剂 FK866,并在 48 h 后观察其生长状态。实验结果显示,在 1 nmol/L 的 FK866 作用下细胞就会发生明显凋亡。当 FK866 浓度达到 3 nmol/L 时,超过 90% 的细胞发生凋亡。

由此可见,Nampt 基因在胚胎干细胞的存活和生长中发挥极为重要的作用。Nampt 基因表达异常会使胚胎干细胞的生长受到严重抑制,并逐渐发生凋亡。本实验证明了 Nampt 基因在生物体内是不可或缺的,Nampt 基因敲除具有致死性,但其具体机制仍需要进一步研究。同时,本实验也为后续 Nampt 相关的基因编辑研究提供了参考。

## 【参考文献】

[1] WANG Z, WANG S N, XU T Y, et al. Organoid technology

for brain and therapeutics research[J]. *CNS Neurosci Ther*, 2017, 23(10): 771.

- [2] FATEHULLAH A, TAN S H, BARKER N. Organoids as an in vitro model of human development and disease[J]. *Nat Cell Biol*, 2016, 18(3): 246-254.
- [3] HSU P D, LANDER E S, ZHANG F. Development and applications of CRISPR-cas9 for genome engineering [J]. *Cell*, 2014, 157(6): 1262-1278.
- [4] CONG L, ZHANG F. Genome Engineering Using CRISPR-Cas9 System[J]. *Methods Mol Biol*, 2015, 1239: 197.
- [5] BELENKY P, BOGAN K L, BRENNER C. NAD<sup>+</sup> metabolism in health and disease[J]. *Trends Biochem Sci*, 2007, 32(1): 12-19.
- [6] WANG P, MIAO C Y. NAMPT as a therapeutic target against stroke [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36 (12): 891-905.
- [7] XU R, YUAN Z, YANG L, et al. Inhibition of NAMPT decreases cell growth and enhances susceptibility to oxidative stress[J]. *Oncol Rep*, 2017, 38(3): 1767-1773. .
- [8] YIN H, VAN DER VEER E, FRONTINI M J, et al. Intrinsic directionality of migrating vascular smooth muscle cells is regulated by NAD<sup>+</sup> biosynthesis[J]. *J Cell Sci*, 2012, 125 (23): 5770-5780.
- [9] VAN DER VEER E, HO C, ONEIL C, et al. Extension of human cell lifespan by nicotinamide phosphoribosyltransferase [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(15): 10841-10845.
- [10] STEIN L R, IMAI S I. Specific ablation of Nampt in adult neural stem cells recapitulates their functional defects during aging[J]. *Embo J*, 2014, 33: 1321-1340.
- [11] HENG B C. Effect of Rho-associated kinase (ROCK) inhibitor Y-27632 on the post-thaw viability of cryopreserved human bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Tissue Cell*, 2009, 41(5): 376-380.
- [12] GARTEN A, PETZOLD S, KÖRNER A, et al. Nampt: linking NAD biology, metabolism and cancer[J]. *Trends Endocrinol Metab*, 2009, 20(3): 130-138.
- [13] REVOLLO J R, KÖRNER A, MILLS K F, et al. Nampt/PBEF/Visfatin regulates insulin secretion in  $\beta$  cells as a systemic NAD biosynthetic enzyme[J]. *Cell Metab*, 2007, 6(5): 363-375.
- [14] WANG P, DU H, ZHOU C C, et al. Intracellular NAMPT-NAD<sup>+</sup>-SIRT1 cascade improves post-ischaemic vascular repair by modulating Notch signalling in endothelial progenitors [J]. *Cardiovasc Res*, 2014, 104(3): 477-488.
- [15] WANG P, XU T Y, GUAN Y F, et al. Nicotinamide phosphoribosyltransferase protects against ischemic stroke through SIRT1-dependent adenosine monophosphate-activated kinase pathway[J]. *Ann Neurol*, 2011, 69(2): 360-374.

【收稿日期】 2018-12-05 【修回日期】 2019-04-04

【本文编辑】 陈盛新