



王宝鑫, 张文华, 董霞, 等. 基于 CRISPR/Cas9 技术的 *SIRT3* 基因敲除猪肺泡巨噬细胞系的构建与鉴定[J]. 江西农业大学学报, 2024, 46(4): 991–1000.

WANG B X, ZHANG W H, DONG X, et al. Construction and identification of 3D4/21 cell line with *SIRT3* gene knockout based on CRISPR/Cas9 technology[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2024, 46(4): 991–1000.

基于 CRISPR/Cas9 技术的 *SIRT3* 基因敲除猪肺泡巨噬细胞系的构建与鉴定

王宝鑫^{1,2}, 张文华^{1,2}, 董霞^{1,2}, 郑好^{1,2}, 张晶^{1,2}, 陈洪波^{1,2}, 周傲^{1,2*}

(1. 武汉轻工大学 动物科学与营养工程学院/动物遗传繁育与精准养殖实验室, 湖北 武汉 430023; 2. 湖北省家畜种业技术创新中心, 湖北 武汉 430023)

摘要:【目的】旨在构建稳定敲除 *SIRT3* 基因的猪肺泡巨噬细胞系, 分析 *SIRT3* 敲除对病毒诱导的炎症反应的调控作用, 为探究 *SIRT3* 基因在宿主抗病毒感染中的作用奠定试验基础。【方法】研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 针对猪 *SIRT3* 基因第 2 号外显子设计 sgRNA, 连接 pb-U6-puro-BFP 质粒后转染 3D4/21 细胞, 筛选单克隆细胞, 结合 Sanger 测序、qPCR 和 Western blot 技术对获得的单克隆细胞进行鉴定, 进而获得 *SIRT3* 基因敲除的猪肺泡巨噬细胞系 (3D4/21-*SIRT3*-KO), 并以流感病毒 A/WSN/33 为研究对象, 感染野生型和 3D4/21-*SIRT3*-KO 猪肺泡巨噬细胞, 利用 qPCR 方法检测炎症相关因子 *IL-6*、*IL-8* 的表达水平, 初步分析 *SIRT3* 基因在流感病毒感染诱导炎症反应的影响。【结果】Sanger 测序结果显示, 在挑选获得的敲除 *SIRT3* 基因的猪肺泡巨噬细胞克隆中, *SIRT3* 基因第 2 号外显子位点产生了碱基缺失, 并导致移码突变; 同时, 利用 qPCR 和 Western blot 检测猪肺泡巨噬细胞中 *SIRT3* mRNA 和蛋白水平的表达, 结果显示与野生型细胞相比, 3D4/21-*SIRT3*-KO 细胞中 *SIRT3* mRNA 和 *SIRT3* 蛋白均不表达; 流感病毒感染 *SIRT3* 基因敲除的猪肺泡巨噬细胞时发现, 敲除 *SIRT3* 能显著加剧流感病毒感染诱导的炎症反应。【结论】研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功构建了 *SIRT3* 基因敲除的猪肺泡巨噬细胞系, 并初步分析了 *SIRT3* 在流感病毒感染中的作用。

关键词: 猪肺泡巨噬细胞系; *SIRT3*; CRISPR/Cas9; 炎症反应; 抗病育种; 基因编辑

中图分类号: S852.4⁺3 文献标志码: A

开放科学(资源服务)标识码(OSID):

文章编号: 1000-2286(2024)04-0991-10



Construction and identification of 3D4/21 cell line with *SIRT3* gene knockout based on CRISPR/Cas9 technology

WANG Baoxin^{1,2}, ZHANG Wenhua^{1,2}, DONG Xia^{1,2}, ZHENG Hao^{1,2},
ZHANG Jing^{1,2}, CHEN Hongbo^{1,2}, ZHOU Ao^{1,2*}

(1. School of Animal Science and Nutritional Engineering, Laboratory of Genetic Breeding, Reproduction and Precision Livestock Farming, Wuhan Polytechnic University, Wuhan 430023, China; 2. Hubei Provincial Center of Technology Innovation for Domestic Animal Breeding, Wuhan 430023, China)

收稿日期: 2023-12-22 修回日期: 2024-05-07

基金项目: 国家自然科学基金项目(81902073)

Project supported by the National Natural Science Foundation of China(81902073)

作者简介: 王宝鑫, 硕士生, orcid.org/0009-0006-7364-7114, wbx15246413359@163.com; *通信作者: 周傲, 副教授, 博士, 主要从事猪抗病育种研究, orcid.org/0000-0002-9819-0599, aoqiu@whpu.edu.cn.

©《江西农业大学学报》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 协议

Abstract: [Objective] The aim is to construct a porcine alveolar macrophage cell line with stable knockdown of *SIRT3* gene and analyze the regulatory effect of *SIRT3* knockdown on virus-induced inflammatory response, thus laying the experimental foundation for an in-depth study of the role of *SIRT3* gene in host antiviral infection. [Method] In this study, CRISPR/Cas9 gene editing technology was used to design sgRNA against exon 2 of porcine *SIRT3* gene and transfected 3D4/21 cells after ligating pb-U6-puro-BFP plasmid. The monoclonal cells was screened, and the monoclonal cells were identified by combining Sanger sequencing, qPCR, and Western blot, and then obtained the porcine alveolar macrophage cell line with knockout of *SIRT3* gene (3D4/21-*SIRT3*-KO). Influenza virus A/WSN/33 was used to infect wild-type and 3D4/21-*SIRT3*-KO porcine alveolar macrophages, and the expression levels of inflammation-associated factors IL-6 and IL-8 were detected by qPCR to preliminarily analyze the role of the *SIRT3* gene in the inflammatory response induced by influenza virus infection. [Result] Sanger sequencing results showed that in the porcine alveolar macrophage clones selected to obtain knockout of the *SIRT3* gene, a base deletion was generated at exon 2 locus of the *SIRT3* gene and resulted in a shifted-code mutation; Meanwhile, the expression of *SIRT3* mRNA and protein levels in porcine alveolar macrophages were detected using qPCR and Western blot, and the results showed that neither *SIRT3* mRNA and *SIRT3* protein was expressed in 3D4/21-*SIRT3*-KO cells compared with wild-type cells. Influenza virus infection of *SIRT3* knockout porcine alveolar macrophages revealed that knockout of *SIRT3* significantly exacerbated the inflammatory response induced by influenza virus infection. [Conclusion] In this study, a *SIRT3* knockout porcine alveolar macrophage cell line was successfully constructed using CRISPR/Cas9 gene editing technology and preliminarily analyzed the role of *SIRT3* in influenza virus infection.

Keywords: *SIRT3*; CRISPR/Cas9; inflammatory reaction; disease-resistance breeding; gene editing

【研究意义】猪肺泡巨噬细胞(porcine alveolar macrophage cell line)是猪呼吸系统相关病毒(伪狂犬病毒、猪圆环病毒和猪繁殖与呼吸系统综合征病毒等)的第一靶细胞,其是肺部抵御外来入侵的屏障,是肺宿主防御和组织耐受性的重要细胞类型,在炎症反应以及免疫调控中起重要作用^[1]。病毒感染后肺泡巨噬细胞发生极化,促进炎症反应,杀伤病原体^[2];同时,极化后的巨噬细胞也能发挥抗炎修复作用,修复组织损伤,维持肺正常结构和功能^[3]。因此深入分析猪肺泡巨噬细胞在病原体感染中的分子机制,可以为有效提高机体免疫力提供理论依据。【前人研究进展】簇状规则间隔短回文重复序列相关蛋白9(clustered regularly interspaced short palindromic repeats associated sequences 9, CRISPR/Cas9)技术是新型基因编辑技术, Cas9 核酸酶在 sgRNA 引导下识别靶序列,并在前间隔序列邻近基序(proto spacer adjacent motif, PAM)序列上游3个碱基处诱导DNA产生双链断裂,利用修复机制产生碱基的插入或缺失,造成靶基因发生移码突变或通过同源重组精确插入、替换一段序列进而破坏基因功能。因其具有成本低、操作简单、敲除效率高等优势,目前已经广泛应用于基因组编辑^[4]。研究报道,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术成功制备了猪分化抗原163基因(cluster of differentiation 163, *CD163*)突变的基因编辑猪,能有效抵御猪繁殖与呼吸系统综合症病毒感染^[5]。沉默信息调节因子3(silence information regulator 3, *SIRT3*)定位于线粒体,在炎症调节、免疫调控等方面发挥重要作用^[6]。研究发现, *SIRT3* 敲除小鼠更易表现出心脏微血管稀疏和功能性缺氧,且心肌纤维化标志物表达增强,并表现出明显线粒体功能障碍^[7]。 *SIRT3* 敲除小鼠会表现出线粒体功能的障碍,导致ATP的生成少,活性氧产生增加^[8-9]。此外, *SIRT3* 能够调控慢性乙肝病毒(hepatitis B virus, HBV)微染色体组蛋白的乙酰化和甲基化水平,进而抑制HBV转录和复制^[10];而且 *SIRT3* 介导编码NLR家族含CARD蛋白4(NLR-family CARD-containing protein 4, NLRC4)脱乙酰化参与调控鼠伤寒沙门氏菌感染^[11]。

【本研究切入点】*SIRT3* 如何参与调控猪肺泡巨噬细胞炎症反应的分子机制还不清楚。因此,深入研究 *SIRT3* 与猪肺泡巨噬细胞炎症反应相关的生物学机制,可以为 *SIRT3* 作为抗病靶标提供理论依据。目前缺乏可用于功能研究的 *SIRT3* 基因敲除的猪肺泡巨噬细胞系模型。【拟解决的关键问题】研究通过

CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 *SIRT3* 基因敲除的猪肺泡巨噬细胞系(3D4/21-*SIRT3*-KO), 并利用该细胞系感染甲型流感病毒, 分析 *SIRT3* 缺失对病毒感染的影响, 为研究 *SIRT3* 基因与猪肺泡巨噬细胞炎症反应相关的生物学机制提供细胞素材。

1 材料与方法

1.1 试验材料

猪肺泡巨噬细胞系(3D4/21)、载体 pb-*U6*-puro-BFP、甲型流感病毒 A/WSN/33 由武汉轻工大学遗传繁育与精准养殖实验室保存提供。

1.2 试验方法

1.2.1 sgRNA 序列设计

进入 NCBI(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)网站, 下载猪 *SIRT3* 编码基因(Gene ID: 100125971)。利用 CRISPOR(<http://crispor.tefor.net/>)网站针对 *SIRT3* 基因第 2 号外显子设计多对 sgRNA, 选择评分相对较高的两对 sgRNA(表 1)。在其两端加上 pb-*U6*-puro-BFP 载体的 *Bbs*I 酶切粘性末端序列, 在 sgRNA 所在外显子两端设计 PCR 扩增引物, 用于扩增该区域的 DNA 序列, 委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 sgRNA 序列与 PCR 扩增引物序列信息

Tab.1 Information of sgRNA sequence and PCR amplification of primer sequence

引物名称 Primer names	引物序列 Primer Sequence(5'-3')
SIRT3-sgRNA1-F	CACCGTGAAGTCTGGAATGCCGCTGT
SIRT3-sgRNA1-R	TAAAACAGCGGCATTCCAGACTTCAC
SIRT3-sgRNA2-F	CACCGGTTCTGGGTGTAGAGCCGCGT
SIRT3-sgRNA2-R	TAAAACGCGGCTCTACACCCAGAACC
SIRT3-PCR-F	AGGTGTCTGTGGAAGTGGAG
SIRT3-PCR-R	GCCTCAGCCCTCCTAGAAAT

1.2.2 pb-*U6*-puro-BFP 线性化载体制备与重组质粒的构建

参考杨霞等^[12]方法将 *SIRT3*-sgRNA1 上下游引物分别稀释至 10 $\mu\text{mol/L}$, 各取 5 μL 等体积混合, 加入 5 μL MgCl_2 、1 μL Tris HCl。ddH₂O 补足体积至 50 μL , 吹打混匀, 瞬离, 95 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5 min, 冷却至室温, 获得双链 DNA。使用限制性内切酶 *Bbs*I 对载体进行酶切, 反应体系如下: pb-*U6*-puro-BFP 载体 1 μg , *Bbs*I 1 μL , Buffer 2 μL , ddH₂O 补足至 20 μL , 混合后于 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 5~15 min, 65 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。酶切产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳检测后, 通过 DNA 纯化回收试剂盒(DP210, 天根公司)回收线性载体 DNA。以 T4 DNA 连接酶连接线性化载体与退火引物。参考黄秋艳等^[13]方法转化感受态细胞 DH5 α [CB101, 天根生化科技(北京)公司], 接种于无抗性的 LB 液体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$, 200 r/min 复苏 1 h 后, 取适量菌液接种于含氨苄西林(ampicillin, Amp)抗性的 LB 固体培养基, 37 $^{\circ}\text{C}$ 倒置过夜培养。挑取单个菌落克隆, 于 Amp 抗性 LB 液体培养基扩增培养后使用去内毒素小提质粒提取试剂盒提取质粒并测序。

1.2.3 *SIRT3* 基因的敲除及定向筛选

将在含有 10%FBS 的 1640 培养基中的 Cas9-3D4/21 细胞系培养至汇合度达 70%~80% 时进行转染^[14]。参考李雅婷等^[15]方法将 pb-*U6*-*SIRT3*-sgRNA-puro-BFP 转入 Cas9-3D4/21 细胞系, 转染后于 37 $^{\circ}\text{C}$, 5%CO₂ 培养箱中继续培养, 24 h 后换液。48 h 后使用含 1.5 $\mu\text{g/mL}$ 嘌呤霉素(puromycin, puro)的培养基进行筛选。根据实际情况, 每隔 1~2 d 更换含有嘌呤霉素的培养基, 持续药筛 7 d, 当空白对照组细胞全部死亡, 继续培养转染组存活细胞。挑取单细胞团, 接种于 96 孔板中培养, 观察细胞生长状态, 待细胞密度至约 80% 时, 扩大培养, 部分细胞提取 DNA, 进行 PCR 检测并测序, 引物序列见表 1。

1.2.4 *SIRT3* 基因组水平鉴定

提取经过以上处理的单克隆细胞 DNA, 分别使用 *SIRT3*-PCR-F、*SIRT3*-PCR-R 引物进行 PCR 扩增(表 1), 退火温度为 66 $^{\circ}\text{C}$ 。若细胞株出现大范围的 *SIRT3* 基因缺失, 应出现 217 bp 大小的条带。选择有可能发生纯合缺失细胞的 PCR 产物进行胶回收, 送至生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序, 将测序结果与 3D4/21 序列进行对比, 确定是否在 gRNA 靶点间发生大片段缺失。

1.2.5 SIRT3 基因转录组水平鉴定

根据 DNA 测序比对结果,选择出现有效敲除的细胞系进一步扩大培养,部分冻存后,参考 RNA simple 总 RNA 提取试剂盒说明书[DP419,天根生化科技(北京)公司]提取细胞总 RNA 进行转录组水平检测。(1)向细胞培养皿中加入 1 mL Trizol,反复吹打至细胞全部脱落,收集样本;(2)向收集的样本中加入 200 μ L 氯仿,剧烈震荡混匀,室温静置 2 min;(3)4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min;(4)吸取最上层含有 RNA 溶液的水相至无酶管,加入等体积异丙醇,混匀后室温静置 10 min;(5)4 $^{\circ}$ C, 12 000 r/min 离心 10 min,弃上清;(6)加入 1 mL75% 乙醇,轻柔翻转使沉淀悬浮;(7)4 $^{\circ}$ C, 7 500 r/min 离心 5 min,弃上清,室温下晾干;(8)加入 30 μ L 无酶水溶解 RNA,测定浓度,进行反转录。参考周泉勇等^[16]方法配制基因组 DNA 去除与反转录体系,程序为 50 $^{\circ}$ C 15 min,85 $^{\circ}$ C 5 s。反转录完成后,使用引物(表 2)通过 qPCR 检测 SIRT3 基因转录组水平,进一步验证是否敲除成功,以 GAPDH 为内参基因。参考实时荧光定量 PCR 试剂盒说明书(Q712,南京诺唯赞生物科技股份有限公司)配制反应体系,轻轻吹打混匀,瞬离。42 $^{\circ}$ C 孵育 2 min。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 30 s,95 $^{\circ}$ C 10 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,60 $^{\circ}$ C 1 min,95 $^{\circ}$ C 15 s,40 个循环。

表 2 qPCR 引物序列信息
Tab.2 qPCR Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	退火温度/ $^{\circ}$ C Annealing temperature
GAPDH-Pig-qPCR-F	TCCGAGTGAACGGATTTG	60
GAPDH-Pig-qPCR-R	CCTGGAAGATGGTGATGG	
SIRT3-Pig-qPCR-F	CTCTCATTTTCTTCCACAATCCCA	60
SIRT3-Pig-qPCR-R	GGCGGAGGAAGTAGTGAGCAGT	
IL-6-Pig-PCR-F	CCAGGAACCCAGCTATGAAC	60
IL-6-Pig-qPCR-R	CTGCACAGCCTCGACATT	
IL-8-Pig-qPCR-F	TCTTGGCAGTTTTCCTGCTTT	60
IL-8-Pig-qPCR-R	AATTTGGGCTGAAAGGTGT	
TNF- α -Pig-qPCR -F	GCTCTTCTGCCTACTGCACTTC	60
TNF- α -Pig-qPCR-R	GTCCCTCGGCTTTGACATT	

1.2.6 SIRT3 基因蛋白表达水平鉴定

根据 DNA 测序比对结果,选择出现有效敲除的细胞系进一步扩大培养,部分冻存后,提取细胞蛋白。参考刘金玲等^[17]方法通过 BCA 法测定蛋白浓度,SDS-PAGE Loading Buffer 混合煮沸变性后进行 SDS-PAGE 电泳。湿转法转膜(100 V, 50 min)后用 1 $\times$ TBS 溶液漂洗 5 min。5% 脱脂奶粉封闭 2 h。1 $\times$ TBS 溶液漂洗 3 次,每次约 10 min;加入单克隆抗体 SIRT3(1:1 000 稀释,6105R,博奥森抗体公司)。一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜后 1 $\times$ TBST 溶液漂洗 3 次,每次约 10 min;室温避光孵育 1 h 辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔二抗(1:10 000 稀释,7074P2, CST)。1 $\times$ TBST 溶液漂洗 3 次,每次约 10 min。采用 ECL 化学发光液(PW30601,莫纳生物科技有限公司)显色,化学发光成像仪成像(QuickChemi 5200,莫纳生物科技有限公司)。

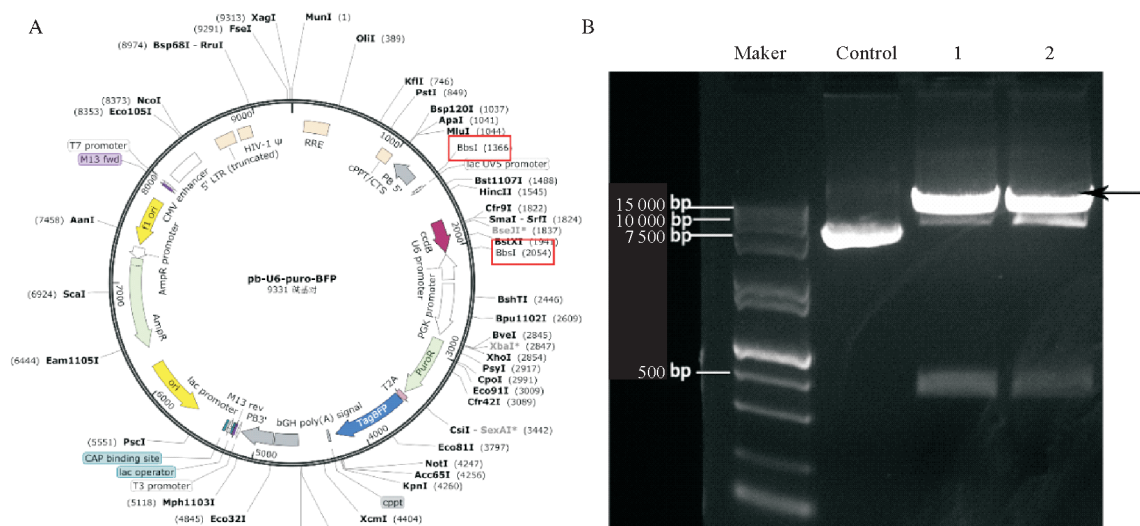
1.2.7 数据分析

试验数据采用 SPSS 20.0 进行 Student's *t* 检验及单因素方差分析(one-way ANOVA)。*P*<0.05 认为差异具有统计意义(“*”为 *P*<0.05,“**”为 *P*<0.01,“***”为 *P*<0.001)。

2 结果与分析

2.1 pb-U6-gRNA-puro-BFP 慢病毒载体的构建及测序鉴定结果

经限制性内切酶 *Bbs*I 酶切后的载体(图 1)与 sgRNA 连接,构建 pb-U6-gRNA-puro-BFP 慢病毒载体。连接后转化感受态细胞 DH5 α ,挑取单个菌落克隆,扩增培养后提取质粒并测序。序列分析结果显示,sgRNA 成功插入载体,可用于下一步细胞转染试验(图 2)。

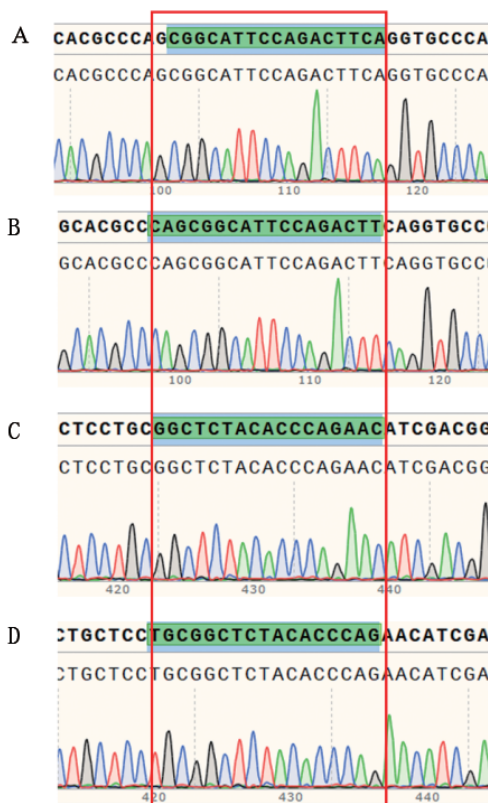


A:pb-*U6*-puro-BFP质粒图谱;B:pb-*U6*-puro-BFP质粒*Bbs*I酶切线性化电泳图;实线框为载体线性化酶切位点*Bbs*I;
M:DL100;Control:pb-*U6*-puro-BFP;1,2:*Bbs*I单酶切产物。箭头所指为酶切后目的条带。

A: Plasmid map of pb-*U6*-puro-BFP; B: Linear electrophoretic map of pb-*U6*-puro-BFP plasmid *Bbs*I digested by enzyme; Solid frame as carrier linear enzyme cutting site *Bbs*I; M: DL100 D; Control: pb-*U6*-puro-BFP; 1, 2: product of *Bbs*I single enzyme digestion. The arrow refers to the end band after restriction enzyme digestion.

图1 pb-*U6*-puro-BFP质粒图谱与*Bbs*I酶切线性化验证

Fig.1 Plasmid map of pb-*U6*-puro-BFP and by *Bbs*I plasmid after digestion



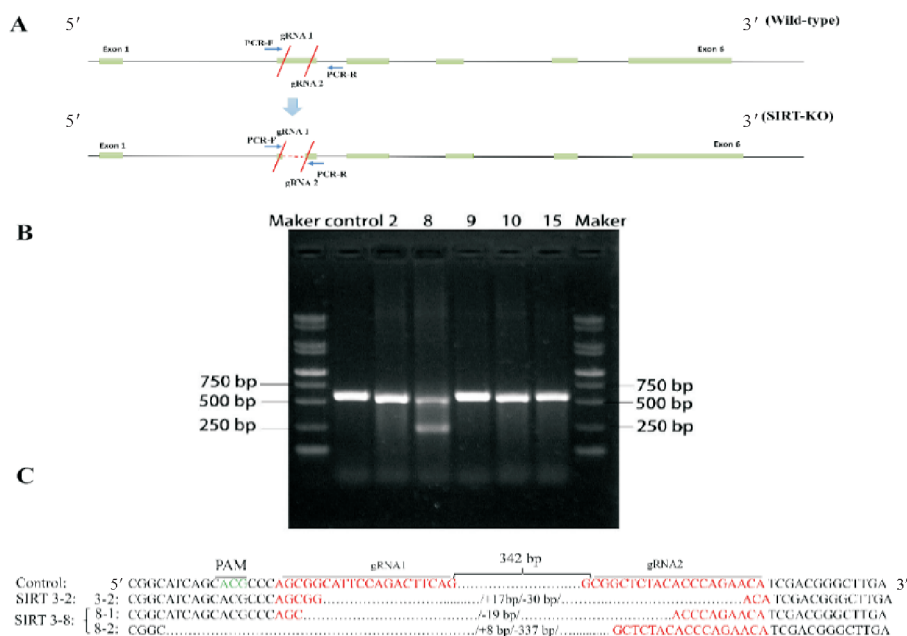
A: *SIRT3*-sgRNA1-F 测序结果; B: *SIRT3*-sgRNA1-R 测序结果; C: *SIRT3*-sgRNA2-F 测序结果; D: *SIRT3*-sgRNA2-R 测序结果; 红色框为 sgRNA 序列。

图2 *SIRT3*-sgRNA 慢病毒载体测序验证结果

Fig.2 Sequencing verification of *SIRT3*-sgRNA lentivirus carrier

2.2 *SIRT3* 基因敲除单克隆细胞系敲除效果

参考许雅萍等^[18]研究,未发生 *SIRT3* 基因缺失或插入的基因组 DNA 可以扩增出 559 bp 的条带,若细胞株出现大范围的基因缺失,应出现 217 bp 大小的条带(图 3A)。结果显示,野生型 3D4/21 细胞扩增出 559 bp 的条带,而 *SIRT3* 基因敲除细胞(*SIRT3*-KO)扩增出了 217 bp 的条带(图 3B)。Sanger 测序结果也证实了 *SIRT3* 基因敲除细胞中 *SIRT3* 基因出现了片段缺失(图 3C),表明成功获得 *SIRT3* 基因缺失的单克隆细胞系。



A: *SIRT3* 基因结构及 gRNA 打靶位点; B: PCR 鉴定结果(M: DL100 DNA Marker; Control: 3D4/21; 2, 8, 9, 10, 15: 3D4/21-*SIRT3*-KO); C: 3D4/21-*SIRT3*-KO 细胞 *SIRT3* 基因缺失测序结果。

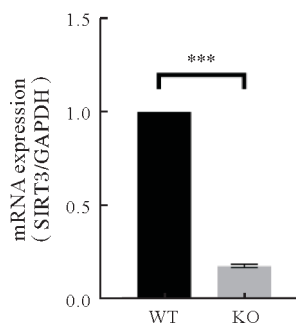
A: *SIRT3* gene structure and gRNA targeting site B: PCR detection electrophoresis of monoclonal cells *SIRT3*-KO(M: DL100 DNA Marker; control: 3D4/21; 2, 8, 9, 10, 15: *SIRT3*-KO); C: Sequencing plot of monoclonal cells *SIRT3*-KO.

图3 *SIRT3* 基因敲除 3D4/21 细胞的筛选及鉴定

Fig.3 Screening and identification of *SIRT3* knockout 3D4/21 cell

2.3 *SIRT3* 基因敲除单克隆细胞中 *SIRT3* 的转录和蛋白表达的影响

qPCR 检测结果所示, *SIRT3* 基因敲除细胞中 *SIRT3* 转录组表达水平显著降低($P < 0.01$), *SIRT3* 基因敲除细胞中显著降低了 *SIRT3* 的表达水平(图 4)。Western blotting 试验结果所示, *SIRT3* 基因敲除细胞中 *SIRT3* 蛋白表达水平显著降低(图 5)。

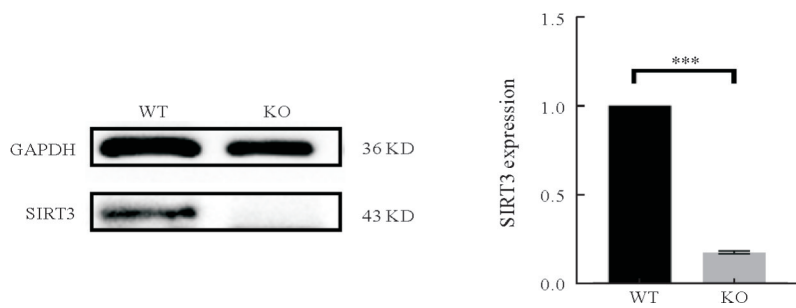


WT: 3D4/21; KO: *SIRT3*-KO; ***表示差异 0.1% 水平显著性。

WT: 3D4/21; KO: *SIRT3*-KO; ***significant at 0.001 level.

图4 *SIRT3* 基因敲除对 3D4/21 细胞 *SIRT3* 基因转录水平的影响

Fig.4 Effect of *SIRT3* knockdown on the transcriptional level of *SIRT3* gene in 3D4/21 cells

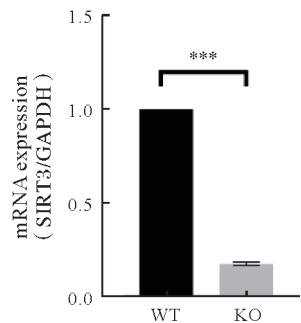


WT;3D4/21;KO;*SIRT3*-KO;***表示差异0.1%水平显著性。
WT;3D4/21;KO;*SIRT3*-KO;***significant at 0.001 level.

图5 *SIRT3*-KO 中 *SIRT3* 蛋白表达水平
Fig.5 *SIRT3* protein expression levels in *SIRT3*-KO

2.4 *SIRT3* 基因敲除细胞对流感病毒基因表达的影响

为了研究 *SIRT3* 在病毒感染中的作用,野生型 3D4/21 和 *SIRT3* 基因敲除细胞感染流感病毒结果显示:*SIRT3* 敲除后流感病毒 mRNA 水平显著升高,并且流感病毒 np 蛋白表达水平比野生型高(图6),表明 *SIRT3* 敲除能显著促进流感病毒复制。



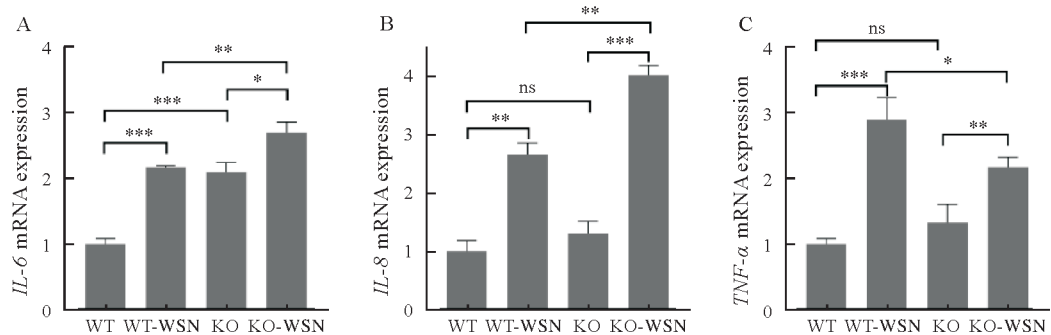
A: WSN 基因转录组表达水平;B: WSN 基因蛋白表达水平;WT: 3D4/21; WT: 3D4/21-WSN; KO: *SIRT3*-KO 细胞; KO-WSN: *SIRT3*-KO-WSN; ***表示差异0.1%水平显著性。

A: Expression level of WSN gene transcriptome; B: Expression level of WSN gene transcriptome; WT: 3D4/21; WT: 3D4/21-WSN cells; KO: *SIRT3*-KO; WT: *SIRT3*-KO-WSN; ***significant at 0.001 level.

图6 *SIRT3* 基因敲除细胞对流感病毒基因 np 表达的影响
Fig.6 Effect of *SIRT3*-KO on np expression of influenza virus genes

2.5 *SIRT3* 基因敲除细胞对炎症因子 *IL-6*、*IL-8*、*TNF-α* 基因转录的影响

进一步分析炎症因子表达水平发现, *SIRT3* 敲除能上调 *IL-6* 表达,但是 *IL-8*、*TNF-α* 表达水平与野生型相同;感染流感病毒后, *SIRT3* 敲除能显著上调流感病毒诱导的 *IL-6* 和 *IL-8* 表达(图7),试验表明 *SIRT3* 缺失促进了流感病毒诱导的炎症反应。



A: 炎症因子 *IL-6* 表达水平;B: 炎症因子 *IL-8* 表达水平;C: 炎症因子 *TNF-α* 表达水平;D: WSN 表达水平; *表示差异5%水平显著性, **表示差异1%水平显著性, ***表示差异0.1%水平显著性。

A: relative expression levels of inflammatory factors *IL-6*; B: relative expression levels of inflammatory factors *IL-8*; C: relative expression levels of inflammatory factors *TNF-α*; D: relative expression levels of inflammatory factors WSN; *significant at 0.05 level, **significant at 0.01 level, ***significant at 0.001 level.

图7 WSN 刺激对 3D4/21 猪肺泡巨噬细胞炎症因子基因相对表达量的影响

Fig.7 Effect of WSN on the relative expression of inflammatory factor genes in 3D4/21 porcine alveolar macrophages

3 讨论与结论

SIRT3 是烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+)依赖的脱乙酰酶家族成员,定位于线粒体,能利用其去乙酰化酶活性调控蛋白表达,减少活性氧、超氧化物等对细胞造成的损伤^[19],在稳定线粒体结构和功能中发挥重要作用^[20]。*STRT3* 基因也能参与炎症反应和免疫应答,*SIRT3* 敲除小鼠表现出心脏纤维化和炎症,小鼠 *SIRT3* 基因缺失促进血管功能障碍和高血压^[21-22];*SIRT3* 缺失促进内皮功能障碍,增加平滑肌细胞肥大,引发血管炎症^[23]。此外,猪 *SIRT3* 表达能抑制病原体诱导的氧化损伤和炎症反应,*SIRT3* 表达增强鼠伤寒沙门氏菌诱导的 NLRC4 炎症小体激活和细胞焦亡显著受损,提示 *STRT3* 可能调控下游基因影响细胞功能,参与病原体感染^[24]。猪 *SIRT3* 基因在不同组织中都表达,且其基因序列存在多态性,能影响猪代谢和肉质^[25]。但是猪 *SIRT3* 在肺和肺泡巨噬细胞炎症中的作用还不清楚,且无可用于猪 *SIRT3* 功能研究的猪肺泡巨噬细胞模型。

CRISPR/Cas9 技术是一种高效、操作简单的基因编辑系统,能实现基因敲入、敲除、沉默等多种形式的编辑^[26],在功能基因筛选和鉴定、动物品种改良等方面具有广泛的应用^[27]。在 CRISPR/Cas9 系统中,Cas9 核酸酶与 gRNA 结合,按照碱基互补配对原则,被引导到靶位点进行 DNA 双链切割,造成 DNA 双链断裂,激活 DNA 修复机制^[28]。当非同源重组末端链接修复时 DNA 双链会发生碱基的随机插入或缺失,导致移码突变,从而引起基因敲除。利用 CRISPR/Cas9 系统在猪上进行基因敲除研究多有报道,如敲除猪肠道上皮细胞系 *APN* 基因^[29],猪睾丸细胞中 *IRF3* 和 *IRF7* 基因敲除等^[30],本团队前期利用 CRISPR/Cas9 技术成功对猪 *COG8* 基因进行编辑^[31]。通过 CRISPR/Cas9 技术产生了 *SIRT3* 缺陷的小鼠永生化骨髓衍生巨噬细胞(im-mortalized bone marrow-derived macrophages, iBMDMs)^[11]。本研究中,在 *SIRT3* 基因的第二外显子设计 sgRNA,构建 *SIRT3* 基因 gRNA 载体,经转染猪肺泡巨噬细胞系、嘌呤霉素药物筛选、挑选单克隆细胞、PCR 扩增和测序鉴定,成功获得了猪 *SIRT3* 基因敲除的单克隆细胞,并通过荧光定量 PCR 和免疫印迹试验证实敲除细胞中 *SIRT3* 不表达,可以为后续进一步研究 *SIRT3* 基因功能提供遗传性状稳定的细胞。

猪肺泡巨噬细胞是猪抵抗病原体感染的重要免疫细胞,对肺部免疫反应的启动和执行非常重要^[32]。猪肺泡巨噬细胞位于肺上表皮层,能通过胞吞作用清除肺泡腔中的病原体^[33]。此外,肺泡巨噬细胞也是重要的炎性细胞,病原体感染后能刺激活性氧和炎性因子大量产生,诱导细胞炎症反应^[34]。研究发现抑制 *SIRT3* 能导致肥胖患者促炎巨噬细胞激活,*SIRT3* 缺失增强了炎症反应和线粒体功能障碍,导致分枝杆菌感染期间宿主防御缺陷和病理性炎症^[35-36]。研究还发现,脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)诱导大鼠急性肺损伤导致肺泡壁大范围显著增厚、伴大量炎症细胞浸润,巨噬细胞向 M1 表型分化,*SIRT3* 蛋白表达减少^[37-38]。然而 *SIRT3* 在猪肺泡巨噬细胞中的作用及其调控机制研究较少。因此,本项目以流感病毒为感染模型,刺激 *SIRT3* 缺失细胞和野生型细胞,研究发现敲除 *SIRT3* 后能诱导 *IL-6* 表达,且感染病毒后 *IL-6*、*IL-8* 表达水平显著高于 WT 感染组,表明 *SIRT3* 基因缺失加剧了流感病毒感染诱导的炎症,但具体分子机制还有待进一步研究。

综上所述,本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术成功构建了 *SIRT3* 基因敲除细胞系,并且通过感染流感病毒,初步发现敲除 *SIRT3* 基因能增加炎症反应。研究结果为后续进一步在细胞水平深入研究 *SIRT3* 在肺泡巨噬细胞中的功能及作用机制提供基础。

参考文献 References:

- [1] BURGHER PULGARON Y, PROVOST C, PESANT M J, et al. Porcine circovirus modulates swine influenza virus replication in pig tracheal epithelial cells and porcine alveolar macrophages[J]. Viruses, 2023, 15(5): 1207.
- [2] 吴雅兰,王圳玥,王道远,等.猪肺泡巨噬细胞极化的异质性与可逆性[J].农业生物技术学报,2021,29(4):619-630.
WU Y L, WANG Z Y, WANG Y D, et al. Polarization heterogeneity and reversibility of porcine (*Sus scrofa*) alveolar macrophages[J]. Journal of agricultural biotechnology, 2021, 29(4): 619-630.
- [3] 张晨,蒲翔,苏进,等.肺泡巨噬细胞诱导免疫应答对肺组织炎性损伤作用机制的研究进展[J].基础医学与临床,2023,43(10):1585-1589.
ZHANG C, PU X, SU J, et al. Advances in the mechanism of alveolar macrophage-induced immune response to inflammation

- injury of lung tissue[J].Basic and clinical medicine,2023,43(10):1585-1589.
- [4] WANG H, LA RUSSA M, QI L S. CRISPR/Cas9 in genome editing and beyond[J].Annual review of biochemistry,2016,85(1):227-264.
- [5] WHITWORTH K M, ROWLAND R R, EWEN C L, et al. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J].Nature biotechnology,2016,34(1):20-22.
- [6] TYAGI A, PUGAZHENTHI S. A promising strategy to treat neurodegenerative diseases by SIRT3 activation[J].International journal of molecular sciences,2023,24(2):1615.
- [7] WEI T, HUANG G, GAO J, et al. Sirtuin 3 deficiency accelerates hypertensive cardiac remodeling by impairing angiogenesis[J].Journal of the american heart association,2017,6(8):6114.
- [8] AHN B H, KIM H S, SONG S, et al. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis[J].Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America,2008,105(38):14447-14452.
- [9] ZENG H, VAKA V R, HE X, et al. High-fat diet induces cardiac remodelling and dysfunction: assessment of the role played by SIRT3 loss[J].Journal of cellular and molecular medicine,2015,19(8):1847-1856.
- [10] 徐红艳,姜慧,秦一萍,等. SIRT3激动剂对乙型肝炎病毒转录和复制的影响[J].中国细胞生物学学报,2020,42(2):276-285.
- XU H Y, JIANG H, QIN Y P, et al. Effects of the SIRT3 activator on HBV transcription and replication[J].Chinese journal of cell biology,2020,42(2):276-285.
- [11] GUAN C, HUANG X, YUE J, et al. SIRT3-mediated deacetylation of NLRC4 promotes inflammasome activation[J].Theranostics,2021,11(8):3981-3995.
- [12] 杨霞,王爽云,于林洋,等.猪流行性腹泻病毒 nsp1、nsp5 和 N 蛋白的重组腺病毒载体的构建及免疫原性比较[J].黑龙江畜牧兽医,2024(3):73-78.
- YANG X, WANG S Y, YU L Y, et al. Construction of recombinant adenovirus vectors of porcine epidemic diarrhea virus nsp1, nsp5 and N proteins and their immunogenicity comparison[J].Heilongjiang animal science and veterinary medicine,2024(3):73-78.
- [13] 黄秋艳,杨烨城,张昆丽,等.基于CRISPR/Cas9技术构建 *STING* 基因敲除猪肺泡巨噬细胞系及其对 I 型干扰素转录的影响[J].南方农业学报,2022,53(4):891-898.
- HUANG Q Y, YANG Y C, ZHANG K L, et al. *STING* gene knockout pig alveolar macrophage cell model constructed by CRISPR/Cas9 technology and its effect on type I interferon transcription[J].Journal of southern agriculture,2022,53(4):891-898.
- [14] 张佳佳,王辉,夏能文,等.利用CRISPR/Cas9系统构建 *STING* 基因敲除的猪肺泡巨噬细胞系及其功能验证[J].中国兽医科学,2022,52(5):617-624.
- ZHANG J J, WANG H, XIA N W, et al. Construction of *STING* knockout porcine alveolar macrophages via CRISPR/Cas9 and the functional characterization of the *STING*^{-/-} cells.[J].Chinese veterinary science,2022,52(5):617-624.
- [15] 李雅婷,张靖,江海圳,等.小鼠 *Nr1d1* 基因生物信息学分析及其慢病毒干扰载体的构建[J].江西农业大学学报,2022,44(1):186-197.
- LI Y T, ZHANG J, JIANG H Z, et al. Bioinformatics analysis of mouse *Nr1d1* gene and construction of its lentiviral interference vectors[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2022,44(1):186-197.
- [16] 周泉勇,刘晨龙,季华员,等.猪 *ISG15* 基因表达、多态性及其与繁殖性状的关联分析[J].江西农业大学学报,2022,44(3):662-669.
- ZHOU Q Y, LIU C L, JI H Y, et al. Expression and polymorphism of porcine *ISG15* gene and its association with reproductive traits[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2022,44(3):662-669.
- [17] 刘金玲,魏澍,潘树德.高致病性猪蓝耳病病毒 GST-Nsp2 融合蛋白的原核表达[J].江西农业大学学报,2012,34(3):546-549.
- LIU J L, WEI F, PAN S D. Prokaryotic expression of GST-Nsp2 fusion protein of highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2012,34(3):546-549.
- [18] 许雅萍,王语涵,陈婷婷,等.肝细胞特异性 *Sirt3* 基因敲除小鼠模型的构建[J].安徽医科大学学报,2024,59(3):384-390.
- XU Y P, WANG Y H, CHEN T T, et al. Construction of hepatocyte-specific *Sirt3* gene knockout mouse model[J].Acta universitatis medicinalis Anhui,2024,59(3):384-390.
- [19] 黄波,丁洁,郭红荣,等.低氧条件下 *SIRT3* 调控 ROS 介导的氧化应激反应对肺癌细胞凋亡的影响[J].安徽医科大学学报,2023,58(12):2045-2050.
- HUANG B, DING J, GUO H R, et al. The effect of *SIRT3* on lung cancer cell apoptosis by regulating ROS-mediated oxida-

- tive stress under hypoxic conditions[J].Acta universitatis medicinalis Anhui, 2023, 58(12): 2045-2050.
- [20] SAMANT S A, ZHANG H J, HONG Z, et al. SIRT3 deacetylates and activates OPA1 to regulate mitochondrial dynamics during stress[J].Molecular and cellular biology, 2014, 34(5): 807-819.
- [21] 刘明华, 申卉, 汪小兰, 等. 二氢杨梅素通过 Sirt3 抑制 NLRP3 炎性小体活性改善血管内皮细胞损伤[J]. 陆军军医大学学报, 2023, 45(9): 964-974.
- LIU M H, SHEN H, WANG X L, et al. Dihydromyricetin ameliorates vascular endothelial damage by inflammation activity through Sirtuin3[J].Journal of army medical university, 2023, 45(9): 964-974.
- [22] DIKALOV S, DIKALOVA A. Mitochondrial deacetylase Sirt3 in vascular dysfunction and hypertension[J].Current opinion in nephrology and hypertension, 2022, 31(2): 151-156.
- [23] 吴新宁, 卜培莉, 刘军妮, 等. Sirt3 抑制血管紧张素 II 诱导的小鼠血管平滑肌细胞增殖[J]. 细胞与分子免疫学杂志, 2013, 29(3): 237-241.
- WU X N, BU P L, LIU J N, et al. Inhibitory effect of Sirt3 on proliferation of vascular smooth muscle cells induced by angiotensin II[J].Chinese journal of cellular and molecular immunology, 2013, 29(3): 237-241.
- [24] D'ONOFRIO N, PRATTICHIZZO F, MARFELLA R, et al. SIRT3 mediates the effects of PCSK9 inhibitors on inflammation, autophagy, and oxidative stress in endothelial cells[J].Theranostics, 2023, 13(2): 531-542.
- [25] 崔清明, 高峰, 彭英林. SIRT3 基因多态性与猪肉品质性状的关联分析[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2019, (1): 54-57.
- CUI Q M, GAO F, PENG Y L. Correlation analysis between SIRT3 gene polymorphism and meat quality traits of pig[J].Heilongjiang animal science and veterinary, 2019, (1): 54-57.
- [26] BLICHARSKA D, SZUĆKO-KOCIUBA I, FILIP E, et al. CRISPR/Cas as the intelligent immune system of bacteria and archaea[J].Postępy biochemii, 2022, 68(3): 235-245.
- [27] PETERSEN B. Basics of genome editing technology and its application in livestock species[J].Reproduction in domestic animals zuchtthygiene, 2017, 52(S3): 4-13.
- [28] MA Y, ZHANG L, HUANG X. Genome modification by CRISPR/Cas9[J].The FEBS journal, 2014, 281(23): 5186-5193.
- [29] WANG S, XU C, SHI J, et al. Regulatory effect and mechanism of APN gene on porcine epidemic diarrhea virus resistance[J].Gene, 2021, 775: 145448.
- [30] SUN X, WANG J, MOU C, et al. Knockout of IRF3 and IRF7 genes by CRISPR/Cas9 technology enhances porcine virus replication in the swine testicular (ST) cell line[J].Biotechnology journal, 2023, 19(1): e2300389.
- [31] ZHOU A, ZHANG W, DONG X, et al. Porcine genome-wide CRISPR screen identifies the golgi apparatus complex protein COG8 as a pivotal regulator of influenza virus infection[J].The CRISPR journal, 2021, 4(6): 872-883.
- [32] 李思琪. 猪肺泡巨噬细胞系对不同毒力猪链球菌抗感染特性的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2024.
- LI S Q. Study on anti-infective characteristics of porcine alveolar macrophage cell line against streptococcus suis strains of different virulence[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2024.
- [33] 孟春花, 曹少先, 苏磊, 等. 猪肺泡巨噬细胞的分离、纯化和冷冻保存研究[J]. 江苏农业科学, 2012, 40(11): 198-201.
- MENG C H, CAO S X, SU L, et al. Isolation, purification and cryopreservation of porcine alveolar macrophages[J].Jiangsu agricultural sciences, 2012, 40(11): 198-201.
- [34] LUO X, CHANG X, ZHOU H, et al. Glaesserella parasuis induces inflammatory response in 3D4/21 cells through activation of NLRP3 inflammasome signaling pathway via ROS[J].Veterinary microbiology, 2021, 256: 109057.
- [35] KIM T S, JIN Y B, KIM Y S, et al. SIRT3 promotes antimycobacterial defenses by coordinating mitochondrial and autophagic functions[J].Autophagy, 2019, 15(8): 1356-1375.
- [36] ZHOU Q, WANG Y, LU Z, et al. Mitochondrial dysfunction caused by SIRT3 inhibition drives proinflammatory macrophage polarization in obesity[J].Obesity, 2023, 31(4): 1050-1063.
- [37] JIAN Y, YANG Y, CHENG L, et al. Sirt3 mitigates LPS-induced mitochondrial damage in renal tubular epithelial cells by deacetylating YME1L1[J].Cell proliferation, 2022, 56(2): e13362.
- [38] 廖先建, 文静, 段家翔, 等. 甲硫氨酸摄入限制对 LPS 诱导急性肺损伤小鼠巨噬细胞的影响及作用机制[J]. 陆军军医大学学报, 2024, 46(7): 688-694.
- LIAO X J, WEN J, DUAN J X, et al. Effects and mechanism of methionine restriction on macrophage for lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice[J].Journal of army medical university, 2024, 46(7): 688-694.