

· 基础医学 ·

## 利用 CRISPR/Cas9 建立 PIN1 基因敲除的成体神经干细胞系

胡廷栋, 王 蒙, 刘晓蕊, 杨海元, 戴一凡\*, 王 盈\*

江苏省异种移植重点实验室, 南京医科大学医学遗传学系, 江苏 南京 211166

**[摘要]** 目的: 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术敲除成体神经干细胞(neural stem cell, NSC) PIN1 基因, 建立 PIN1 基因敲除的成体神经干细胞系。方法: 取 8 周龄 C57BL/6 小鼠脑室下区的脑组织进行体外培养; 设计靶向小鼠 PIN1 基因的单导向 RNA (single guide RNA, sgRNA), 以 PX330 质粒为骨架, 构建 PIN1 的 Cas9 打靶载体, 转染小鼠的成体神经干细胞, 通过 puromycin 筛选和测序鉴定获得 PIN 敲除的单克隆细胞; 利用免疫荧光染色和 Western blot 测定 PIN1 蛋白表达水平, 免疫荧光染色鉴定神经干细胞的特征性标志物巢蛋白(Nestin)的表达, Beta III Tubulin 免疫荧光染色鉴定神经干细胞分化为神经元的能力。结果: 成功构建 PIN1 基因的 Cas9/sgRNA 表达载体, 转染后获得 PIN1 敲除的神经干细胞克隆 9 个。免疫荧光染色及 Western blot 显示 PIN1 蛋白无表达, 免疫荧光染色显示 PIN1 敲除的神经干细胞 Nestin 阳性, 神经干细胞分化培养时可部分分化为 Beta III Tubulin 阳性的神经元细胞。结论: CRISPR/Cas9 基因编辑技术可实现对小鼠成体神经干细胞 PIN1 基因的编辑。在 PIN1 基因敲除后 PIN1 蛋白无表达, 初步表型分析显示, 神经干细胞仍表达特征性标志物 Nestin, 并具有向神经元分化的能力。

**[关键词]** 成体神经干细胞; CRISPR/Cas9; PIN1

**[中图分类号]** R329.2

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2021)04-483-07

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20210402

## Establishment of neural stem cells line with PIN1 gene knockout by CRISPR/Cas9

HU Tingdong, WANG Meng, LIU Xiaorui, YANG Haiyuan, DAI Yifan\*, WANG Ying\*

Jiangsu Key Laboratory of Xenotransplantation, Department of Medical Genetics, Nanjing Medical University, Nanjing 211166, China

**[Abstract]** **Objective:** CRISPR/Cas9 gene editing technology was employed to knockout the PIN1 gene of adult neural stem cells (NSCs) and finally established a PIN1 gene knockout adult neural stem cell line. **Methods:** The tissue from the subventricular zone of 8-week-old C57BL/6 mice was dissected and cultured *in vitro*; single guide RNA (sgRNA) targeting PIN1 gene in mice was designed, and the PX330 plasmid was used as the skeleton to construct PIN1 Cas9 target vector. PIN1-knockout monoclonal cells were obtained after transfection and puromycin screening. The expression level of PIN1 protein was verified by immunofluorescence and Western blot. The expression of nestin was used to identify the neural stem cell characteristics. The differentiation ability to neuronal lineage was determined by beta III tubulin immunofluorescence. **Results:** Cas9/sgRNA expression vector of PIN1 gene was successfully constructed, and nine PIN1 knockout neural stem cells were cloned after transfection. Immunofluorescence and Western blot showed no expression of PIN1 protein, immunofluorescence showed positive expression of nestin in PIN1 knockout neural stem cells, and neural stem cells could differentiate into beta III tubulin positive neurons in differentiation culture. **Conclusion:** CRISPR/Cas9 gene editing technology can realize the editing of PIN1 gene in mouse adult neural stem cells. After knock-out of PIN1 gene, PIN1 protein is not expressed, but neural stem cells still partially express the specific marker nestin and have the ability to differentiate toward neurons.

**[Key words]** adult neural stem cell; CRISPR/Cas9; PIN1

[J Nanjing Med Univ, 2021, 41(04):483-488, 521]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(31701283, 81874144)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: ywang@njmu.edu.cn; daiyifan@njmu.edu.cn

肽基脯氨酰顺/反异构酶NIMA 交互蛋白1(peptidyl-prolyl cis/trans isomerases, NIMA-interacting1, PIN1)能特异性识别磷酸化的丝氨酸/苏氨酸-脯氨酸(pSer/Thr-Pro)基序并与其结合,通过催化磷酸化底物的顺反异构来调节酶的活性、蛋白质的稳定性或目的蛋白的亚细胞定位。PIN1的表达受到严格的调控,其表达失调在许多病理状态下发挥着重要的作用,尤其是癌症及多种神经退行性疾病。在大多数癌症中PIN1呈高度表达状态并促进了癌症的发展,在多数神经退行性疾病中,PIN1表达却被下调<sup>[1]</sup>。据报道,PIN1激活超过50种癌症信号通路,并下调超过20种肿瘤抑制因子及生长抑制因子<sup>[2]</sup>。在神经元中,PIN1可抑制神经纤维缠结和 $\beta$ -淀粉样蛋白斑块的形成,从而阻止阿尔兹海默症的发生<sup>[3]</sup>。在神经干细胞的发育后期,PIN1通过抑制 $\beta$ -catenin的降解,调控成体神经干细胞(neural stem cell, NSC)的分化<sup>[4]</sup>。而在氧化应激或谷氨酸兴奋性毒性中,抑制PIN1的表达可促进神经细胞的存活<sup>[5]</sup>。这些结果表明PIN1在与氧化应激相关的神经系统疾病中发挥着重要的作用。

NSC具有高度的自我更新能力、多向分化潜能和迁移能力,当神经系统受到损伤,如神经退行性疾病、缺血缺氧损伤时,NSC可以增殖、迁移、分化为新生神经细胞,以代偿结构和功能损伤<sup>[6]</sup>。因此在NSC的体外培养条件下,对其分子调节机制、中枢神经系统疾病模型及神经组织工程的研究具有重要的价值<sup>[7]</sup>。CRISPR/Cas9基因编辑技术由于载体构建简单、靶向位点选择灵活等优点,被广泛用于各类细胞的基因编辑,通过CRISPR/Cas9技术对NSC特定基因进行编辑,可在体外揭示相关基因对NSC的影响及其功能,并为基因分析提供重要的依据。但目前针对成体NSC的靶向基因编辑鲜有报道。

本实验通过CRISPR/Cas9基因编辑技术对成体NSC的PIN1基因进行敲除,测定基因敲除效率及蛋白表达水平,并对PIN1敲除NSC特征性标志物巢蛋白(Nestin)的表达、分化能力进行了初步研究,为后续利用条件敲除的小鼠模型研究PIN1基因在成体神经发生和神经系统疾病发生、发展中的作用打下基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

8周龄C57BL/6小鼠,由南京医科大学医药实验动物中心提供,实验经南京医科大学实验动物福利伦理委员会批准。DMEM/F12培养基、胎牛血清、

PBS(Gibco公司,美国);葡萄糖、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、表皮生长因子(EGF)、Accutase、HEPES Buffer、Progesterone、Putrescine、Heparin、二甲基亚砜、多聚赖氨酸(Sigma公司,美国);B-27 Growth Supplement、胰岛素铁硒传递蛋白(ITSS)、胰酶(Invitrogen公司,美国);层黏连蛋白(Roche公司,德国);PX330(Addgene公司,美国);DH5 $\alpha$ 感受态、质粒中提试剂盒(北京天根生化科技公司);DNA Marker DL2000、pMD18-T载体(TaKaRa公司,日本);胶回收试剂盒(Qiagen公司,德国);Bbs I限制性内切酶(New England Biolabs公司,美国);Basic Nucleofector™ kit和细胞电转仪(Lonza公司,德国);Mix Taq酶(南京诺唯赞公司);Mouse anti-Nestin(BD Biosciences公司,美国);Chicken anti-Beta III Tubulin(Chemicon公司,德国);Goat anti-Chicken IgY Alexa Fluor 488(Sigma公司,美国);Goat anti-rabbit IgG Alexa Fluor 594、Goat anti-mouse IgG Alexa Fluor 488(Abcam公司,英国);Rabbit anti-PIN1、Mouse anti- $\beta$ -actin(Proteintech公司,美国);DAPI(Teddia公司,美国);SurePAGE™预制胶(南京金斯瑞公司)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 NSC的体外分离、培养

根据张正卫<sup>[8]</sup>体外培养NSC的方法予以改进,取8周小鼠断头处死,用75%酒精消毒后,在无菌条件下取出大脑。将大脑置于预冷的PBS中进行纵切,并于显微镜下分离侧脑室下区外两侧壁。将分离的组织放置于预冷的无血清培养基中,用剪刀充分剪碎后,离心350 g 5 min,取出上清,加入0.05%胰酶于37℃培养箱中消化成单个细胞,加入胰酶终止剂终止消化后离心350 g 5 min,取出上清,加入NSC无血清培养基(DMEM/F12、6 mg/mL葡萄糖、5 mmol/L HEPES Buffer、2  $\mu$ mol/L Progesterone、0.6  $\mu$ mol/L Putrescine、1 $\times$ B-27 Growth Supplement、0.02  $\mu$ g/mL EGF、0.005  $\mu$ g/mL bFGF、10  $\mu$ g/mL ITSS、1.8  $\mu$ g/mL Heparin),于37℃、5% CO<sub>2</sub>培养箱中培养。

#### 1.2.2 NSC的传代与培养

原代NSC于无血清培养基中每2~3 d进行半量换液,7 d左右可形成神经球。吸取原代神经球于离心管中,离心300 g 5 min,取出上清,加入500  $\mu$ L Accutase,轻柔吹打后置于37℃热台消化3 min,离心500 g 5 min,取出上清后加入500  $\mu$ L无血清培养基吹打至单个细胞。将单细胞悬液置于12孔板中进行悬浮培养。此后每2~3 d进行半量换液,5 d左

右进行传代。

NSC单层贴壁培养:将包被液(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  多聚赖氨酸、0.25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  层黏连蛋白)加入至12孔板,于37  $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中包被过夜,次日超净台中去除包被液,干燥30 min, PBS清洗3遍。将NSC单细胞悬液以 $5\times 10^5$ 个/mL的密度接种于包被的孔板中,约2 h NSC贴壁。此后每2~3 d进行半量换液,约5 d NSC可长满培养皿,对其进行传代。

### 1.2.3 sgRNA的设计与CRISPR/Cas9载体构建

根据NCBI数据库中小鼠PIN1(Gene ID: 23988)的基因序列,使用sgRNA在线设计软件(<https://zlab.bio/guide-design-resources>),针对PIN1的第2个外显子设计sgRNA, PIN1-sgRNA-F: 5'-CACCGAGCCAGTGGGAGCGGCCAG-3', PIN1-sgRNA-R: 5'-AAACCTGGGCCGCTCCCACTGGCTC-3',进行5'端磷酸化修饰,并在两端加上可与Bbs I酶切位点相连接的黏性末端(由南京金斯瑞生物公司合成)。

经引物退火、Bbs I酶切PX330载体使其线性化,线性化的PX330载体与sgRNA连接构建CRISPR/Cas9载体,然后将载体转化进入DH5 $\alpha$ 中,涂布于LB固体培养基进行培养,37  $^{\circ}\text{C}$ 过夜。次日挑取单克隆菌落,扩增培养后提取质粒并进行测序。

### 1.2.4 细胞转染及单克隆细胞的获得及鉴定

取成球状态的NSC,传代分散成单细胞悬液,加入无血清培养基在37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 培养箱中继续培养2 h。按照Lonza转染试剂盒说明书配制核转液,后加入2  $\mu\text{g}$  PIN1-Cas9-sgRNA及2  $\mu\text{g}$ 的PGK/puro抗性质粒。调整细胞量至 $2\times 10^6$ 个,加至核转液中重悬。将细胞悬液转移至电转杯,放入Lonza核转仪杯槽内,选择T-030程序进行转染。转染结束后将细胞悬液转移至2 mL的无血清培养基中,轻轻吹打分散均匀后,转移至6孔板中进行培养。转染24 h后用含有0.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  Puro的无血清培养基进行培养。每2 d进行半数换液,约5 d后,可获得单细胞克隆的神经球,利用吸卵针在显微镜下随机吸取神经球至96孔板中进行传代。待传代至12孔板后,挑取3/4细胞冻存,1/4细胞用NP40裂解提基因组,进行TA克隆鉴定细胞基因型。将提取的基因组进行PCR扩增,反应条件为预变性95  $^{\circ}\text{C}$  5 min,变性95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;退火56  $^{\circ}\text{C}$  30 s,延伸72  $^{\circ}\text{C}$  30 s,35个循环;总延伸72  $^{\circ}\text{C}$  7 min,4  $^{\circ}\text{C}$ 保存。琼脂糖凝胶电泳后切胶回收,用胶回收试剂盒提取胶回收产物,再与pMD18-T载体连接,将连接产物转化进入DH5 $\alpha$

中,涂菌,挑取单克隆菌落进行测序。将野生型序列与测序结果对比得到敲除基因型。

### 1.2.5 Western blot验证敲除效果

分别提取PIN1敲除NSC和野生型NSC的蛋白,加热变性后,等量上样,采用120 V电压进行电泳,使待检测蛋白进入最佳分辨区。将转膜槽置于冰中,采用湿转法,经250 mA、90 min将凝胶上的蛋白转移至PVDF膜上,5%脱脂奶粉溶液室温封闭1 h后,孵育一抗Rabbit anti-PIN1(1:1 000),4  $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜,次日取出,PBST清洗3遍,加入二抗(1:5 000),室温摇床孵育1 h后PBST清洗3遍,加入ECL结合1 min,暗室曝光。

### 1.2.6 PIN1敲除NSC PIN1的免疫荧光染色

将PIN1敲除NSC和野生型NSC进行单层贴壁培养,待NSC贴壁完全后,去除培养基,预冷的4%多聚甲醛室温固定30 min, PBS清洗3遍,加入0.5%的Triton X-100通透5 min后, PBS清洗3遍,10%山羊血清室温封闭1 h,加入一抗Rabbit anti-PIN1(1:500),4  $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜, PBST清洗3遍,加入Alexa Fluor 594标记二抗(1:200),室温摇床避光孵育1 h, PBST清洗3遍,荧光显微镜下观察、拍照。

### 1.2.7 PIN1敲除NSC Nestin的免疫荧光染色

将PIN1敲除的NSC进行单层贴壁培养,待NSC贴壁完全后,去除培养基,预冷的4%多聚甲醛室温固定30 min, PBS清洗3遍,加入0.5%的Triton X-100通透5 min后, PBS清洗3遍,10%山羊血清室温封闭1 h,加入一抗Mouse anti-Nestin(1:500),4  $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜, PBST清洗3遍,加入Alexa Fluor 488标记二抗(1:200),室温摇床避光孵育1 h, PBST清洗3遍,荧光显微镜下观察、拍照。

### 1.2.8 PIN1敲除NSC的定向分化测定

将PIN1敲除的NSC进行单层贴壁培养,并将培养基换为神经元诱导分化培养基(在无血清培养基基础上,去掉EGF, bFGF浓度降低一半,加入1  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 视黄酸和1% FBS)继续培养,约10 d后吸除培养基,加入0.2%的Triton X-100通透5 min后, PBS清洗3遍,10%山羊血清室温封闭1 h,加入一抗Chicken anti-Beta III Tubulin(1:500),4  $^{\circ}\text{C}$ 摇床过夜, PBS清洗3遍,加入Alexa Fluor 488标记二抗(1:200),室温摇床避光孵育1 h, PBST清洗3遍,荧光显微镜下观察、拍照。

## 2 结果

### 2.1 NSC体外培养形态

8周龄小鼠大脑纵切,分离侧脑室下区外两侧

壁,剪碎消化后于无血清培养基中培养。7 d左右大多数组织细胞死亡,NSC可存活并分裂成团形成NSC球(图1A)。在无血清培养基中,NSC呈悬浮状态;在多聚赖氨酸和层黏连蛋白处理的培养皿中,NSC变为单层贴壁细胞(图1B)。

2.2 CRISPR/Cas9 敲除位点选择和打靶载体构建

使用sgRNA在线设计软件,针对PIN1的第2个外显子设计sgRNA(图2A)。将sgRNA与PX330载体质粒连接后,进行测序,结果显示sgRNA与PX330成功连接(图2B)。

2.3 PIN1 基因敲除 NSC 克隆的获得与鉴定

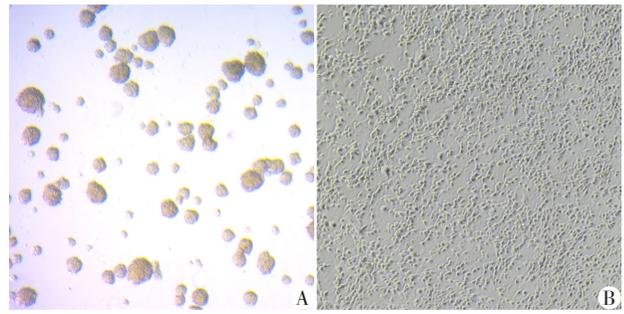
Puro 筛选 5 d 后,随机挑选了 16 个单细胞克隆,选取其中 9 个状态好的单细胞克隆进行冻存,经过基因型鉴定,9 个细胞克隆均发生基因突变(表1)。

2.4 PIN1 的免疫荧光染色和 Western blot 验证敲除效果

PIN1 的免疫荧光染色(图3A)及 Western blot(图3B)分析 PIN1 蛋白表达量,结果显示野生型 NSC PIN1 蛋白正常表达,而 PIN1 敲除 NSC 的 PIN1 蛋白无表达。表明 CRISPR/Cas9 基因编辑技术可有效敲除 NSC PIN1 基因,使蛋白无法表达。

2.5 PIN1 敲除 NSC Nestin 表达情况

PIN1 敲除 NSC 单层贴壁培养后进行 Nestin 免



A: 悬浮培养神经球;B: 贴壁培养单层神经干细胞。

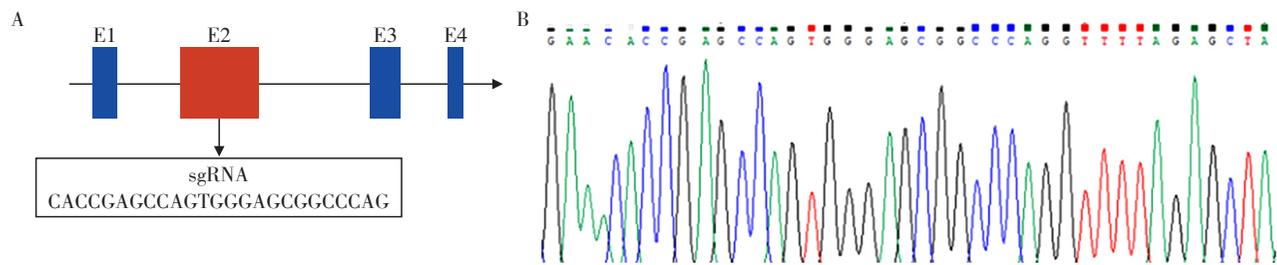
图1 8周龄小鼠神经干细胞体外培养形态(×100)

Figure 1 Morphology of cultured adult neural stem cells from 8-weeks old mice(×100)

疫荧光染色,结果显示,PIN1 基因敲除后的 NSC 仍为 Nestin 阳性(图4),表明 PIN1 基因敲除后的 NSC 仍然表达 Nestin。

2.6 PIN1 敲除 NSC 分化情况

在分化培养基中添加视黄酸可诱导 NSC 向神经细胞定向分化<sup>[9]</sup>,当单层贴壁培养的 PIN1 敲除 NSC 在定向分化培养基中培养时,可观察到细胞形态发生改变,大约 3 d 时,细胞生成突起,并形成网络,连接各个细胞。待细胞培养 2 周时,进行免疫荧光染色,结果显示,分化后的细胞大部分呈现 Beta III Tubulin(神经元)阳性(图5),表明 PIN1 敲除后的 NSC 仍具有分化的能力。



A: PIN1 基因的 sgRNA 靶点设计;B: 基因重组载体测序图。

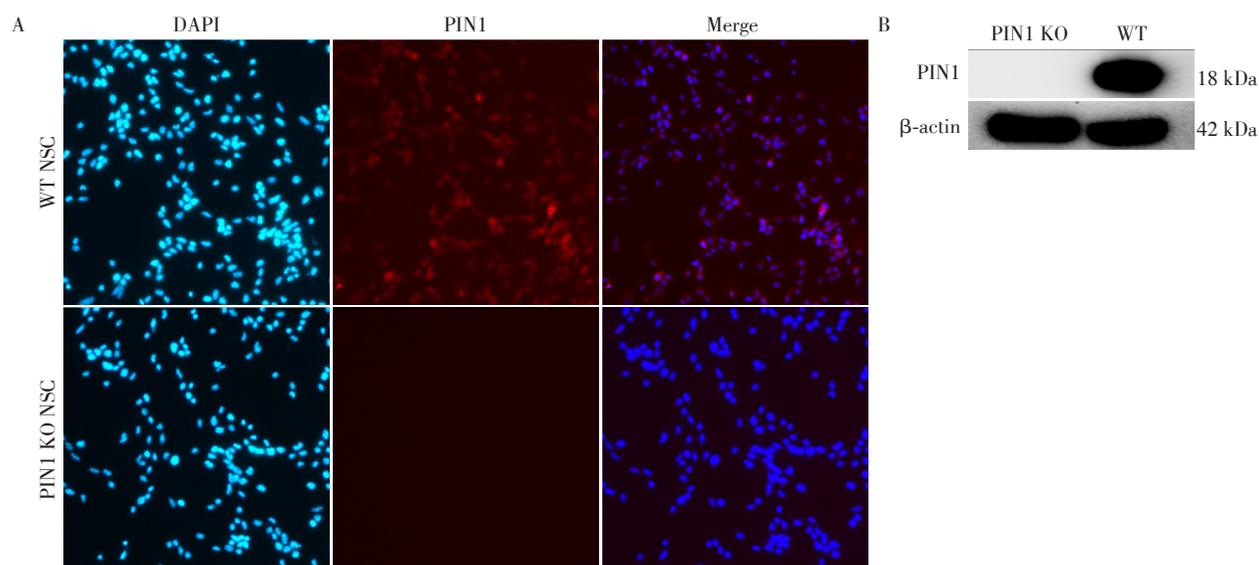
图2 CRISPR/Cas9 敲除位点选择和打靶载体构建

Figure 2 CRISPR/Cas9 knockout site selection and construction of vector

表1 PIN1<sup>-/-</sup>神经干细胞单细胞克隆基因型

Table 1 Genotypes of neural stem cell PIN1<sup>-/-</sup> colonies

序号	PIN1(5'→3')	类型
野生型	ACGCCAGCCAGTGGGAGCGGCCAGCGGCG	WT
克隆1	ACGCCAGCCAGTGGGAGCGGC-----	-9 bp
克隆2、6、9	ACGCCAGCCAGTGGGAGCGGCC-AGCGGCG	-1 bp
克隆3、8	ACGCCAGCCAGTGGGAGCGGCCAGCGGCG	+1 bp
克隆4	ACGCCAGCCAG-----CGGCG	-14 bp
克隆5	ACGCCAGCCAGTGG-----	-16 bp
克隆7	ACGCCAGC-----GGCG	-18 bp



A: 免疫荧光染色观察WT及PIN1敲除神经干细胞PIN1蛋白表达( $\times 200$ ); B: Western blot检测PIN1敲除和野生型神经干细胞中PIN1蛋白表达。

图3 免疫荧光染色及Western blot分析WT及PIN1敲除神经干细胞PIN1蛋白表达变化

Figure 3 Immunofluorescence and Western blot analysis of PIN1 protein expression in WT and PIN1 knockout neural stem cells

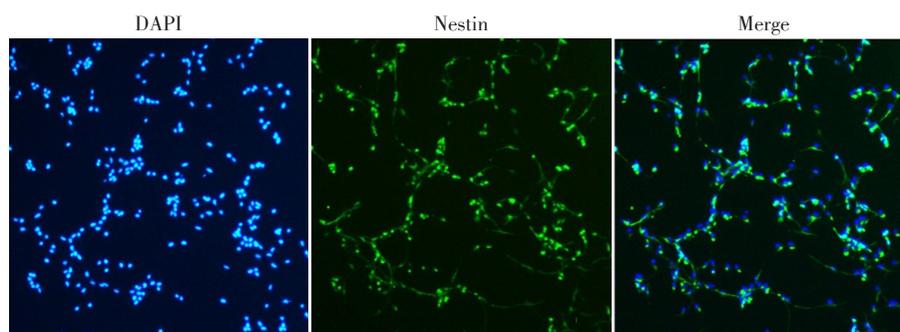


图4 免疫荧光染色显示神经干细胞为Nestin阳性( $\times 100$ )

Figure 4 Neural stem cells are nestin positive revealed by immunofluorescence ( $\times 100$ )

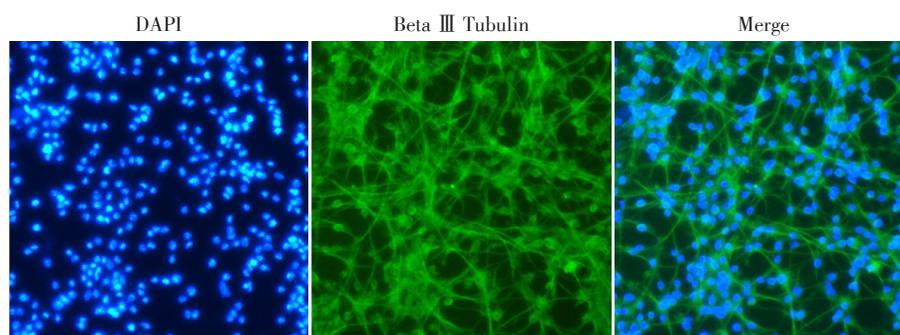


图5 免疫荧光染色显示神经干细胞可分化为神经元( $\times 200$ )

Figure 5 Neural stem cells could differentiate into neurons revealed by immunofluorescence ( $\times 200$ )

### 3 讨论

成年哺乳动物体内发现成体神经干细胞的存在,改变了人们长期以来认为神经不可再生的观

点。神经干细胞具有自我更新、无限增殖和多向分化的能力,通过体外培养,为研究神经系统的发育、分化等提供了有效手段,并为治疗神经系统损伤如神经退行性疾病、缺血缺氧损伤提供了新的思路和

途径。本实验从8周龄的小鼠脑室下区中提取神经干细胞,采用无血清培养基,通过悬浮培养及贴壁单层培养,进行传代、增殖。通过对多个代次神经干细胞的分析,采用的培养方法可有效维持神经干细胞的特性。PIN1在多种类型的细胞中发挥着重要的作用,在细胞的增殖、分化及存活等多种生物学过程中产生影响。PIN1不仅可作为分子开关,通过介导构象的改变,使得特定的蛋白激活或失活<sup>[1-3]</sup>;还可在细胞的不同阶段调节多个靶点,对多个目的蛋白的构象及功能进行调节,协同控制反应强度及时间,起到分子计时器的作用<sup>[10]</sup>。在神经系统中,PIN1的表达不仅与细胞的增殖相关,还与神经干细胞的分化、神经元的功能有密切关系<sup>[11-13]</sup>。而现在针对NSC的靶向基因编辑鲜有报道,因此,建立PIN1基因敲除成体神经干细胞系对研究PIN1在神经系统中的作用具有重要意义。

CRISPR/Cas9基因编辑技术为基因编辑创造了前所未有的发展机遇,由于其快速有效且相对容易对特定基因进行编辑,现被广泛应用于生物、基因治疗等领域。利用CRISPR/Cas9基因编辑技术在神经干细胞中进行精确的基因编辑,将为干细胞生物学、神经科学和再生医学等领域提供重要的思路 and 机会。在本实验中,通过CRISPR/Cas9基因编辑技术对神经干细胞中PIN1基因进行敲除。测序结果显示,在设计靶点位置会出现不同形式的碱基缺失和插入突变,随机挑选并进行测序的单克隆神经干细胞PIN1基因均发生了突变,说明CRISPR/Cas9技术在神经干细胞基因编辑中的高效性。利用免疫荧光染色和Western blot对PIN1蛋白的表达进行测定,结果表明,在野生型神经干细胞中,PIN1蛋白正常表达,而PIN1基因敲除后蛋白无表达,说明CRISPR/Cas9基因编辑技术有效地敲除了神经干细胞中PIN1基因,并抑制了其蛋白的表达。

利用CRISPR/Cas9基因编辑技术在成体神经干细胞中特异性敲除目的基因,通过基因测序、免疫荧光染色及Western blot证实了其高效性和有效性。但经过CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除PIN1基因后的神经干细胞会有什么样的表型变化尚未可知。神经干细胞的鉴定可通过特征性标志物Nestin及分化潜能进行。Nestin具有一般中间丝特征,又被称为神经上皮干细胞蛋白,其分布在神经干细胞的细胞质中,呈一过性表达,当神经干细胞发生迁移、分化后,Nestin便停止表达,因此其可作为未分化神经干细胞的抗原标志,用于神经干细胞的

鉴定<sup>[14]</sup>。通过免疫荧光染色鉴定结果,可发现大部分细胞仍然表达神经干细胞特征性标志物Nestin。神经干细胞具有分化潜能,当从神经干细胞的无血清培养基中去除生长因子后,体外培养的神经干细胞逐渐开始分化,并由悬浮状态变为贴壁生长,经过10 d左右,可分化为3类神经细胞:神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞。分化后的神经细胞折光性较强,分出许多突起,连接各个细胞形成网络,并存在趋向生长的特点<sup>[15]</sup>。神经元常用的特异性抗原标志物有NeuN、Beta III Tubulin及微管相关蛋白等,其中Beta III Tubulin为神经元及部分肿瘤细胞中表达的微管蛋白,而非神经元的其他神经细胞均不表达,其主要表达在新生神经元中,遍布于整个突起,因此可用于神经元鉴定的特异性标志物。PIN1敲除的神经干细胞向神经元定向分化后,虽然仍可表达神经元的特异性标志物Beta III Tubulin,但其往神经元方向分化的能力较正常细胞是否有变化,依然需要更多实验来验证,以及向星形胶质细胞和少突胶质细胞方向的分化能力也有待进一步研究。本实验中,通过对NSC PIN1基因的敲除及特异性标志物Nestin及分化潜能的测定,为我们后续利用条件敲除的小鼠模型研究PIN1基因在成体神经发生中的作用以及参与阿尔兹海默病的发生、发展的机制研究打下基础。

CRISPR/Cas9技术在神经干细胞基因编辑具有巨大的潜力,本研究表明,利用CRISPR/Cas9技术,可以在神经干细胞中进行有针对性、精确且高效的基因编辑。通过挑选单克隆细胞,可保证细胞基因型的单一稳定,为针对机制方面的体外研究提供很好的工具,CRISPR/Cas9技术在神经干细胞基因编辑方面具有非常大的可行性和良好的应用前景。

#### [参考文献]

- [1] ZHOU X Z, LU K P. The isomerase PIN1 controls numerous cancer-driving pathways and is a unique drug target [J]. *Nat Rev Cancer*, 2016, 16(7):463-478
- [2] CHEN Y, WU Y R, YANG H Y, et al. Prolyl isomerase Pin1: a promoter of cancer and a target for therapy [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(9):883
- [3] DRIVER J A, ZHOU X Z, LU K P. Pin1 dysregulation helps to explain the inverse association between cancer and Alzheimer's disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2015, 1850(10):2069-2076
- [4] NAKAMURA K, KOSUGI I, LEE D Y, et al. Prolyl isomerase Pin1 regulates neuronal differentiation via  $\beta$ -catenin

(下转第521页)

- tion by inhibiting microglia activation[J]. *Front Cell Neurosci*, 2019, 13: 191
- [18] VIZUETE M L, MERINO M, VENERO J L, et al. Histamine infusion induces a selective dopaminergic neuronal death along with an inflammatory reaction in rat substantia nigra[J]. *J Neurochem*, 2000, 75(2): 540-552
- [19] PARK S M, CHOI M S, SOHN N W, et al. Ginsenoside Rg3 attenuates microglia activation following systemic lipopolysaccharide treatment in mice[J]. *Biol Pharm Bull*, 2012, 35(9): 1546-1552
- [20] WANG Y, SHA H, ZHOU L, et al. The mast cell is an early activator of lipopolysaccharide-induced neuroinflammation and blood-brain barrier dysfunction in the hippocampus[J]. *Mediators Inflamm*, 2020, 2020: 8098439
- [21] WOHLEB E S, FENN A M, PACENTA A M, et al. Peripheral innate immune challenge exaggerated microglia activation, increased the number of inflammatory CNS macrophages, and prolonged social withdrawal in socially defeated mice[J]. *Psychoneuroendocrinology*, 2012, 37(9): 1491-1505
- [22] NORDEN D M, TROJANOWSKI P J, VILLANUEVA E, et al. Sequential activation of microglia and astrocyte cytokine expression precedes increased Iba-1 or GFAP immunoreactivity following systemic immune challenge [J]. *Glia*, 2016, 64(2): 300-316
- [23] KOHMAN R A, NEUROGENESIS R J. Inflammation and behavior[J]. *Brain Behav Immun*, 2013, 27(1): 22-32
- [收稿日期] 2020-08-05

(上接第488页)

- [J]. *Mol Cell Biol*, 2012, 32(15): 2966-2978
- [5] HU Y, DENG H, XU S, et al. Micro RNAs regulate mitochondrial function in cerebral ischemia - refusion injury [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(10): 24895-24917
- [6] JOO S, YEON K J, LEE E, et al. Effects of ECM protein micropatterns on the migration and differentiation of adult neural stem cells[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13043
- [7] GAGE F H, TEMPLE S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain[J]. *Neuron*, 2013, 80(3): 588-601
- [8] 张正卫, 俞俊峰, 王荣根, 等. 成年小鼠神经干细胞培养、鉴定以及多不饱和脂肪酸含量的测定[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2017, 37(4): 394-398
- [9] PARK J C, JEONG W J, KIM M Y, et al. Retinoic-acid-mediated HRas stabilization induces neuronal differentiation of neural stem cells during brain development [J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(15): 2997-3007
- [10] LU K P, ZHOU X Z. The prolyl isomerase PIN1: a pivotal new twist in phosphorylation signalling and disease [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007, 8(11): 904-916
- [11] BECKER E B, BONNI A. Pin1 in neuronal apoptosis [J]. *Cell Cycle*, 2007, 6(11): 1332-1335
- [12] HAMDANE M, DOURLLEN P, BRETTEVILLE A, et al. Pin1 allows for differential Tau dephosphorylation in neuronal cells[J]. *Mol Cell Neurosci*, 2006, 32(1/2): 155-160
- [13] YC L, SUN A, RYO A, et al. Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration[J]. *Nature*, 2003, 424(6948): 556-561
- [14] CAI J, WU Y, MIRUA T, et al. Properties of a fetal multipotent neural stem cell (NEP cell) [J]. *Dev Biol*, 2002, 251(2): 221-240
- [15] LACHYANKAR M B, CONDON P J, QUESENBERRY P J, et al. Embryonic precursor cells that express Trk receptors: induction of different cell fates by NGF, BDNF, NT-3, and CNTF[J]. *Exp Neurol*, 1997, 144(2): 350-360
- [收稿日期] 2020-10-27