

论著·基础研究

## 利用 CRISPR/Cas9 靶向敲除 *Piezo1* 基因对小鼠间充质干细胞成骨分化的影响研究

高昕<sup>1\*</sup>, 杨屹羚<sup>1\*</sup>, 黄湘如<sup>1</sup>, 代庆刚<sup>2</sup>, 江凌勇<sup>1</sup>

1. 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔颌面科, 上海交通大学口腔医学院, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011; 2. 上海交通大学医学院附属第九人民医院口腔第二门诊部, 国家口腔医学中心, 国家口腔疾病临床医学研究中心, 上海市口腔医学重点实验室, 上海市口腔医学研究所, 上海 200011

**[摘要]** 目的·应用 CRISPR/Cas9 系统对小鼠间充质干细胞 C3H10T1/2 进行靶向 *Piezo1* 基因稳定敲除, 探究 *Piezo1* 对间充质干细胞成骨分化能力的影响。方法·根据 CRISPR/Cas9 原理, 设计 2 条靶向 *Piezo1* 基因的单链指导 RNA (single guide RNA, sgRNA), 利用 Lenti-Cas9-GFP 和 Lenti-U6-sgRNA-mCherry 载体分别构建表达 Cas9 的慢病毒和表达 sgRNA 的慢病毒。将 2 种慢病毒感染 C3H10T1/2 细胞, 利用流式细胞分选技术对 GFP 和 mCherry 阳性的细胞进行筛选; 挑取单克隆细胞, 经 PCR 扩增及琼脂糖凝胶电泳验证, 最终得到 *Piezo1* 基因片段敲除的单克隆细胞系。序列测定、实时荧光定量 PCR (quantitative real-time PCR, qPCR) 及细胞免疫荧光技术对构建的 *Piezo1* 基因敲除细胞 (*Piezo1* knockout C3H10T1/2, CPK) 进行敲除效率验证。CCK-8 实验检测敲除 *Piezo1* 对细胞增殖的影响; 对构建成功的 *Piezo1* 基因敲除细胞进行体外成骨诱导分化, 并进行碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP) 染色及茜素红染色, 利用 qPCR 探究敲除 *Piezo1* 对细胞的成骨相关基因 mRNA 水平的影响。结果·琼脂糖凝胶电泳结果显示, 敲除 *Piezo1* 的单克隆细胞菌液通过 PCR 扩增后产物出现阳性克隆。单克隆细胞的测序结果显示, 敲除 *Piezo1* 的单克隆细胞的 *Piezo1* 基因在第 4 外显子中提前形成终止密码子 TGA, 无法正确翻译蛋白; qPCR 验证了 CPK 中 *Piezo1* 基因在 mRNA 水平被抑制; 免疫荧光显示 CPK 中 *Piezo1* 基因的敲除效率较高, 基本阻碍 *Piezo1* 在细胞中的表达。CCK-8 实验显示敲除 *Piezo1* 后细胞增殖能力下降 ( $P<0.05$ ); ALP 染色及茜素红染色结果显示敲除 *Piezo1* 后细胞成骨能力降低 ( $P<0.05$ ), 且 CPK 中成骨相关基因如 I 型胶原蛋白 A1 ( $\alpha 1$  type I collagen, *Coll1*)、Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, *Runx2*)、成骨细胞特异性转录因子 (osterix, *Osx*) 以及碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, *Alp*) 的 mRNA 表达水平降低 (均  $P<0.05$ )。结论·利用 CRISPR/Cas9 基因编辑系统成功构建靶向敲除 *Piezo1* 基因的 C3H10T1/2 细胞系。敲除 *Piezo1* 能抑制小鼠间充质干细胞 C3H10T1/2 的成骨分化。

**[关键词]** *Piezo1*; CRISPR/Cas9; 间充质干细胞; 成骨分化

**[DOI]** 10.3969/j.issn.1674-8115.2023.09.002 **[中图分类号]** Q291 **[文献标志码]** A

## Effect of *Piezo1* on osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells C3H10T1/2 based on CRISPR/Cas9

GAO Xin<sup>1\*</sup>, YANG Yiling<sup>1\*</sup>, HUANG Xiangru<sup>1</sup>, DAI Qinggang<sup>2</sup>, JIANG Lingyong<sup>1</sup>

**[基金项目]** 国家自然科学基金 (82071083, 81870740, 82101048, 82271006); 上海市自然科学基金 (21ZR1436900, 22ZR1436700); 上海市优秀学术/技术带头人计划 (20XD1422300); 上海交通大学医学院附属第九人民医院交叉研究基金 (JYJC202116, JYJC201902); 上海申康医院发展中心临床创新三年行动计划 (SHDC2020CR4084); 上海交通大学医学院附属第九人民医院生物样本库项目 (YBKB201919, YBKB202216); 上海交通大学医学院附属第九人民医院原创探索项目 (JYYC003); 上海交通大学医学院生物材料与再生医学研究院联合攻关项目 (2022LHB02); 上海交通大学医学院“双百人”项目 (20221809)。

**[作者简介]** 高昕 (1996—), 女, 硕士生; 电子信箱: gxgaixin@sjtu.edu.cn。杨屹羚 (1994—), 女, 硕士生; 电子信箱: yangyiling2017@foxmail.com。\*为并列第一作者。

**[通信作者]** 江凌勇, 电子信箱: jianglingyong@sjtu.edu.cn。

**[Funding Information]** National Natural Science Foundation of China (82071083, 81870740, 82101048, 82271006); Natural Science Foundation of Shanghai (21ZR1436900, 22ZR1436700); Program of Shanghai Academic/Technology Research Leader (20XD1422300); Cross-disciplinary Research Fund of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (JYJC202116, JYJC201902); Clinical Research Plan of Shanghai Hospital Development Center (SHDC2020CR4084); Project of Biobank of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (YBKB201919, YBKB202216); Original Exploration Project of Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (JYYC003); Biomaterials and Regenerative Medicine Institute Cooperative Research Project of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (2022LHB02); "Two-hundred Talents" Program of Shanghai Jiao Tong University School of Medicine (20221809)。

**[Corresponding Author]** JIANG Lingyong, E-mail: jianglingyong@sjtu.edu.cn.

1. Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; College of Stomatology, Shanghai Jiao Tong University; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai Research Institute of Stomatology, Shanghai 200011, China; 2. The 2nd Dental Centre, Shanghai Ninth People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine; National Center for Stomatology; National Clinical Research Center for Oral Diseases; Shanghai Key Laboratory of Stomatology, Shanghai 200011, China

**[Abstract]** **Objective** To investigate the effect of *Piezo1* on osteogenic differentiation of mouse mesenchymal stem cells C3H10T1/2 cell line based on CRISPR/Cas9 system that can achieve stable gene knockout. **Methods** According to the principle of CRISPR/Cas9 target design principle, two single guide RNAs (sgRNAs) were designed to construct lentivirus expressing Cas9 and lentivirus expressing sgRNA by using Lenti-Cas9-GFP and Lenti-U6-sgRNA-mCherry vectors. After the C3H10T1/2 cells were transfected with two types of lentiviruses, flow cytometry was used to screen mCherry- and GFP-positive cells. The monoclonal cells were selected, and amplified by PCR and agarose gel electrophoresis, and finally the monoclonal cell line with *Piezo1* gene fragment knocked out was obtained. Sequencing, quantitative realtime PCR (qPCR) and immunofluorescence were performed to verify the the knockout efficiency of the constructed *Piezo1* knockout C3H10T1/2 cells (CPK). CCK-8 assay was used to detect the effect of knocking out *Piezo1* on cell proliferation; *in vitro* osteogenic induction differentiation was performed on successfully constructed *Piezo1* gene knockout cells, and alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red staining were used to investigate the effect of *Piezo1* on osteogenic ability. **Results** Positive clone was obtained in bacterial fluid of monoclonal cell lines with *Piezo1* knocked out after PCR amplification and agarose gel electrophoresis. Sequencing analysis showed that a stop codon TGA was produced in exon 4 of *Piezo1* gene in advance, so that the protein could not be translated correctly. qPCR verified that *Piezo1* gene in CPK was inhibited at mRNA level; Immunofluorescence showed that the knockout efficiency of *Piezo1* gene in CPK was high, which basically hindered the expression of *Piezo1* in cells. CCK-8 assay showed that the cell proliferation ability decreased after knocking out *Piezo1* ( $P < 0.05$ ); The results of ALP staining and alizarin red staining showed that the osteogenic ability of cells decreased after knocking out *Piezo1* ( $P < 0.05$ ). The mRNA expression levels of osteogenetic-related genes such as  $\alpha 1$  type I collagen (*Coll1*), Runt-related transcription factor 2 (*Runx-2*), osterix (*Osx*) and alkaline phosphatase (*Alp*) in CPK decreased significantly (all  $P < 0.05$ ). **Conclusion** *Piezo1* knockout C3H10T1/2 cells based on CRISPR/Cas9 system is constructed successfully and the osteogenic activity of stable *Piezo1* knockout cell line is hindered significantly.

**[Key words]** Piezo1; CRISPR/Cas9; mesenchymal stem cell; osteogenesis

机械力转导是生命体中细胞增殖、分化以及凋亡等生理功能的基础。细胞可通过力学传感器将细胞接收到的信号转导为生物信号,从而发生膜电位的改变、离子内流改变等短期效应,或者产生细胞功能上的长期改变<sup>[1]</sup>。机械力转导在人体的骨骼改建,尤其是口腔颌面系统中的牙槽骨改建中起到不可或缺的作用。细胞中的力学感受器包括机械敏感的离子通道蛋白、细胞骨架、G蛋白偶联受体等<sup>[2]</sup>。机械敏感的离子通道蛋白介导的机械力转导过程具有快速转导的特性,且机械敏感的离子通道蛋白分布于机体大部分组织中,如肌梭、血管内皮等。机械敏感的离子通道蛋白受力,改变细胞膜张力,使得通道得以开放或关闭,并随着细胞膜张力的变化而呈现相应变化<sup>[3]</sup>。机械敏感的离子通道主要包括钠离子通道、双孔钾离子通道(tandem-pore-domain potassium channel, K2P)、瞬时感受器电位通道(transient receptor potential, TRP)以及压电离子通道(Piezo)。Piezo1作为一种与机械刺激高度相关的新型离子通道蛋白近

年来备受瞩目。

由于Piezo1分布广泛,涉及众多生理过程,其在机械力转导领域的机制研究已成为热点。研究表明, Piezo1可介导牵张力<sup>[4-6]</sup>、重力<sup>[7-8]</sup>、压力<sup>[9-10]</sup>、流体剪切力<sup>[11-12]</sup>等多种不同形式的力学刺激。Piezo1可通过影响间充质干细胞、成骨细胞、软骨细胞等细胞的增殖、分化与凋亡调控骨改建过程。SUGIMOTO等<sup>[13]</sup>利用人骨髓间充质干细胞UE7T-13以及转染反转录病毒载体(pBABE-neo-hTERT)的人牙髓来源的间充质干细胞SDP11,通过小干扰RNA(small interfering RNA, siRNA)阻碍Piezo1的表达,发现可抑制由于静水压力所介导的成骨分化能力。ZHOU等<sup>[14]</sup>发现 $Prrx1^{Cre};Piezo1^{fl/fl}$ 小鼠骨量下降,体内成骨能力受到抑制;利用腺病毒敲除Piezo1<sup>fl/fl</sup>小鼠骨髓间充质干细胞中的Piezo1,发现小鼠间充质干细胞的成骨分化能力减弱。WANG等<sup>[7]</sup>发现 $Prrx1^{Cre};Piezo1^{fl/fl}$ 小鼠出现骨量下降,成骨细胞中的Piezo1通过改变YAP的核定位来影响破骨细胞

的分化进而调控骨改建。SUN等<sup>[8]</sup>研究发现成骨细胞中Piezo1作为力学感受器,能够影响骨的形成。LEE等<sup>[15]</sup>利用siRNA以及Piezo1的特异性抑制剂GsMTx4抑制软骨细胞中Piezo1的表达后,发现软骨细胞的凋亡水平大幅降低。关于Piezo1基因在骨改建中的功能研究切入点十分多元,体外细胞类型以及抑制基因功能的手段不同,结果也不尽相同。因此,获得一个可以在体外研究Piezo1基因功能的稳定的工具显得尤为重要。

随着技术的发展,CRISPR/Cas9系统用于基因编辑日益成熟。CRISPR/Cas9是细菌所特有的一种获得性免疫系统。基因编辑中CRISPR/Cas9系统的作用原理主要是CRISPR相关蛋白(CRISPR-associated protein 9, Cas 9)通过单链指导RNA(single guide RNA, sgRNA)识别靶基因并与其结合,在目的位点使DNA双链断裂,激活内源性DNA修复机制<sup>[16]</sup>;但这种修复往往会导致碱基插入或缺失,从而导致基因的编码蛋白突变最终导致基因敲除。由于具有操作简便、效率高的特点,目前CRISPR/Cas9系统在研究基因功能、基因治疗及建立靶向基因敲除动物模型中已具有广泛应用。

因此,本文基于CRISPR/Cas9系统,拟构建靶向敲除Piezo1基因的小鼠间充质干细胞C3H10T1/2细胞系,并与细胞体外成骨分化实验相结合,观察敲除Piezo1对细胞成骨能力的影响,希冀为进一步揭示机械离子通道蛋白Piezo1在机械力介导的骨改建中的功能,提供一种有效的工具并建立一定的研究基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料

**1.1.1 细胞** 小鼠间充质干细胞C3H10T1/2来源于中国科学院细胞库。

**1.1.2 试剂与仪器** MEM培养基(Hyclone, 美国),胎牛血清(FBS)、青霉素/链霉素溶液(Gibico, 美国),4%多聚甲醛(武汉赛维尔生物科技有限公司),Lenti-U6-sgRNA-mCherry质粒、Lenti-Cas9-GFP质粒(Addgene, 美国),质粒小提试剂盒(Tiagen, 中国),BsmB I酶、T4 DNA连接酶(Thermo Scientific, 美国),反转录试剂盒(TaKaRa,

日本),SYBR Green Master Mix试剂盒(上海惠凌生物技术有限公司),CCK-8试剂盒、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)染色试剂盒、茜素红染色试剂盒、柠檬酸抗原修复液、QuickBlock™封闭液(上海碧云天生物技术有限公司),DAPI染色液、Piezo1抗体(货号NBP1-78446)(Novus, 美国),Cy3标记山羊抗兔IgG(H+L)(货号A0516,上海碧云天生物技术有限公司),成骨诱导分化培养基(Cyagen, 美国);PCR仪(BioRad, 美国),凝胶成像系统(GE Healthcare, 美国),流式细胞分析仪Fortessa X-20(BD Biosciences, 美国),微孔板分光光度计(Bio Tek, 美国),体视显微镜、倒置荧光显微镜(Olympus, 日本),激光共聚焦显微镜(Zeiss, 德国)。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 Lenti-U6-sgRNA1-U6-sgRNA5-mCherry载体构建** 通过NCBI网站查询Piezo1基因信息,在Piezo1基因片段的两端设计2个sgRNA(序列见表1);设计PCR引物(序列见表1),对目的片段进行PCR扩增,琼脂糖凝胶电泳回收目的基因片段后,BsmB I酶切PCR产物。将酶切后的PCR产物通过T4 DNA连接酶连接到Lenti-U6-sgRNA-mCherry质粒中,构建Lenti-U6-sgRNA1-U6-sgRNA5-mCherry重组质粒。设计测序引物(序列见表1),利用Snapgene软件对构建的Lenti-U6-sgRNA1-U6-sgRNA5-mCherry重组质粒测序后进行序列比对。将构建好的Piezo1敲除的重组质粒转化至大肠埃希菌DH5a感受态细胞,涂板。参考小鼠Piezo1基因序列设计PCR引物,将菌液进行PCR扩增后进行琼脂糖凝胶电泳验证,再将此菌液PCR产物送测序。

表1 sgRNA寡核苷酸序列及引物序列

Tab 1 sgRNA oligonucleotide sequences and primers

Name	Sequences (5'→3')
sgRNA-1	GTTGAGACACCTTCACCCAA
sgRNA-5	TCTGCCGGGCTTTCCTCGTG
Piezo1 forward primer	ATCAGCATTCTGAATCACGGATG
Piezo1 reverse primer	CTAGGGCTCTGTTACGCAGAG
Sequencing primer	GGAAAGAATAGTAGACATAATAGC



**1.2.2 慢病毒包装与转染** 利用第3代慢病毒包装系统,将Lenti-Cas9-GFP质粒或Lenti-U6-sgRNA1-U6-sgRNA5-mCherry质粒分别转入293T细胞,于转染后48 h收集慢病毒上清液,经过0.45 μm膜过滤后,超速离心浓缩。

**1.2.3 细胞感染、流式分选及单克隆培养、挑选与鉴定** C3H10T1/2细胞以完全培养基(MEM+10% FBS+1%青霉素/链霉素),于5% CO<sub>2</sub>、37 °C恒温培养箱培养,每48~72 h按照1:3的比例传代。将构建好的Lenti-Cas9-GFP慢病毒和Lenti-U6-sgRNA1-U6-sgRNA5-mCherry慢病毒感染C3H10T1/2细胞,感染后24 h更换为新鲜完全培养基。病毒感染后72 h的细胞,用流式细胞仪进行分选。先用未感染的细胞作为对照进行设门,分选红色和绿色荧光双阳性的C3H10T1/2细胞——Piezo1基因敲除细胞至96孔板,在37 °C培养箱中培养;培养7~10 d后,每孔挑选出单克隆细胞系进行鉴定。提取Piezo1基因敲除细胞的基因组DNA进行PCR扩增(引物序列见表1)后,将PCR产物经琼脂糖凝胶电泳后进行测序鉴定(苏州金唯智生物科技有限公司),并利用Snapgene软件比对测序结果后确定Piezo1基因敲除成功的单克隆细胞系。

**1.2.4 CCK-8细胞增殖检测** 将未敲除Piezo1的C3H10T1/2细胞及Piezo1基因敲除细胞接种于96孔板中,分别于4 h、48 h及7 d进行CCK-8细胞增殖检测。每孔加入10 μL CCK-8溶液,于培养箱中继续孵育2 h。利用微孔板分光光度计于450 nm波长处检测吸光度值。

**1.2.5 细胞体外成骨诱导分化** 将未敲除Piezo1的C3H10T1/2细胞及Piezo1基因敲除细胞分别以5×10<sup>4</sup>个接种至48孔板中,待细胞贴壁后加入成骨诱导分化培养基,隔日更换1次成骨诱导液。成骨诱导分

化7 d后,进行ALP染色并进行成骨能力相关基因的qPCR检测;成骨诱导分化14 d后,进行茜素红染色。

**1.2.6 ALP染色** 未敲除Piezo1的C3H10T1/2细胞及Piezo1基因敲除细胞经体外成骨诱导分化7 d后,分别进行ALP染色。将孔板内原有液体吸去,PBS清洗3次后加入4%多聚甲醛固定5 min,再用PBS清洗3次后,加入按照说明书配置好的ALP染色液,于37 °C避光孵育约30 min,染色结束后用双蒸水清洗残留染色液,用体视显微镜拍照。

**1.2.7 茜素红染色** 未敲除Piezo1的C3H10T1/2细胞及Piezo1基因敲除细胞经体外成骨诱导分化14 d后,分别进行茜素红染色。将孔板内原有液体吸去,PBS清洗3次后加入4%多聚甲醛固定5 min,再用PBS清洗残余固定液,加入按照说明书配置好的茜素红染色液,于室温下孵育10~15 min,染色结束后用双蒸水清洗残留染色液,用体视显微镜拍照。

**1.2.8 RNA抽提、反转录及实时荧光定量PCR** 未敲除Piezo1的C3H10T1/2细胞及Piezo1基因敲除细胞经体外成骨诱导分化7 d,分别提取总RNA,应用微量紫外分光计测量总RNA浓度,利用反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA,再利用SYBR Green Master Mix试剂盒进行实时荧光定量PCR(quantitative realtime PCR, qPCR)检测,结果均以次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核苷转移酶(hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, HPRT)作为参考进行归一化处理,Piezo1、I型胶原蛋白A1(α1 type I collagen, Colla1)、Runt相关转录因子2(Runt-related transcription factor 2, Runx2)、成骨细胞特异性转录因子(osterix, Osx)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, Alp)的相对表达量以2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup>值表示。引物序列见表2。

表2 qPCR引物序列信息

Tab 2 Primer sequences for qPCR

Gene	Forward sequence (5'→3')	Reverse sequence (5'→3')
HPRT	GTTAAGCAGTACAGCCCCAAA	AGGGCATATCCAACAACAAACTT
Runx2	CCTCCAGCATCCCTTTCTT	CCTCCAGCATCCCTTTCTT
Osx	CCTCCCTCACTCATTCTCTGG	TGTTGCCTGGACCTGGTGAGAT
Alp	CGGGACTGGTACTCGGATAA	ATTCCACGTCGGTTCTGTTC
Colla1	GCTCCTCTTAGGGGCCACT	CCACGTCTCACCATTGGGG

**Note:** HPRT—hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase; Runx2—Runt-related transcription factor 2; Osx—osterix; Alp—alkaline phosphatase; Colla1—α1 type I collagen.

**1.2.9 免疫荧光染色** 将未敲除 *Piezo1* 的 C3H10T1/2 细胞及 *Piezo1* 基因敲除细胞分别用 4% 多聚甲醛固定 20 min, 利用柠檬酸抗原修复液修复抗原 1 h, 室温下孵育抗原封闭液 1 h, 孵育 *Piezo1* 一抗 (1:200), 4 °C 过夜。PBS 清洗后, 室温孵育二抗 Cy3 标记山羊抗兔 IgG (H+L) 1 h, PBS 清洗后 DAPI 染色 10 min, PBS 清洗后激光共聚焦显微镜拍照。

### 1.3 统计学分析

使用 SPSS 24.0 软件进行数据的统计分析。定量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用独立样本 *t* 检验进行 2 组间比较。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Lenti-U6-sgRNA1-U6-sgRNA5-mCherry 重组质粒的测序鉴定

利用 Snapgene 软件对构建的 Lenti-U6-sgRNA1-U6-sgRNA5-mCherry 重组质粒进行测序。质粒构建结果 (图 1) 如下: sgRNA1 与 sgRNA5 正确插入 U6 sgRNA-mCherry 中, 插入的 sgRNA 序列及方向与实验设计相符合, 表明 Lenti-U6-sgRNA1-U6-sgRNA5-mCherry 重组质粒构建成功。

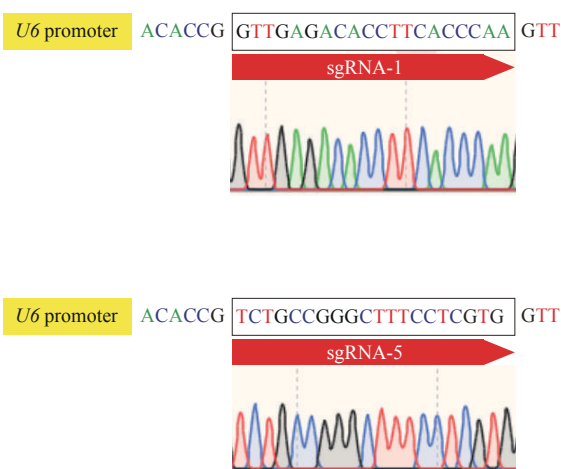


图 1 Lenti-U6-sgRNA1-U6-sgRNA5-mCherry 重组质粒测序鉴定结果

Fig 1 Sequencing identification of Lenti-U6-sgRNA1-U6-sgRNA5-mCherry recombinant plasmid

### 2.2 稳定敲除 *Piezo1* 的小鼠间充质干细胞系的构建

敲除 *Piezo1* 基因的单克隆细胞能够通过 PCR 扩

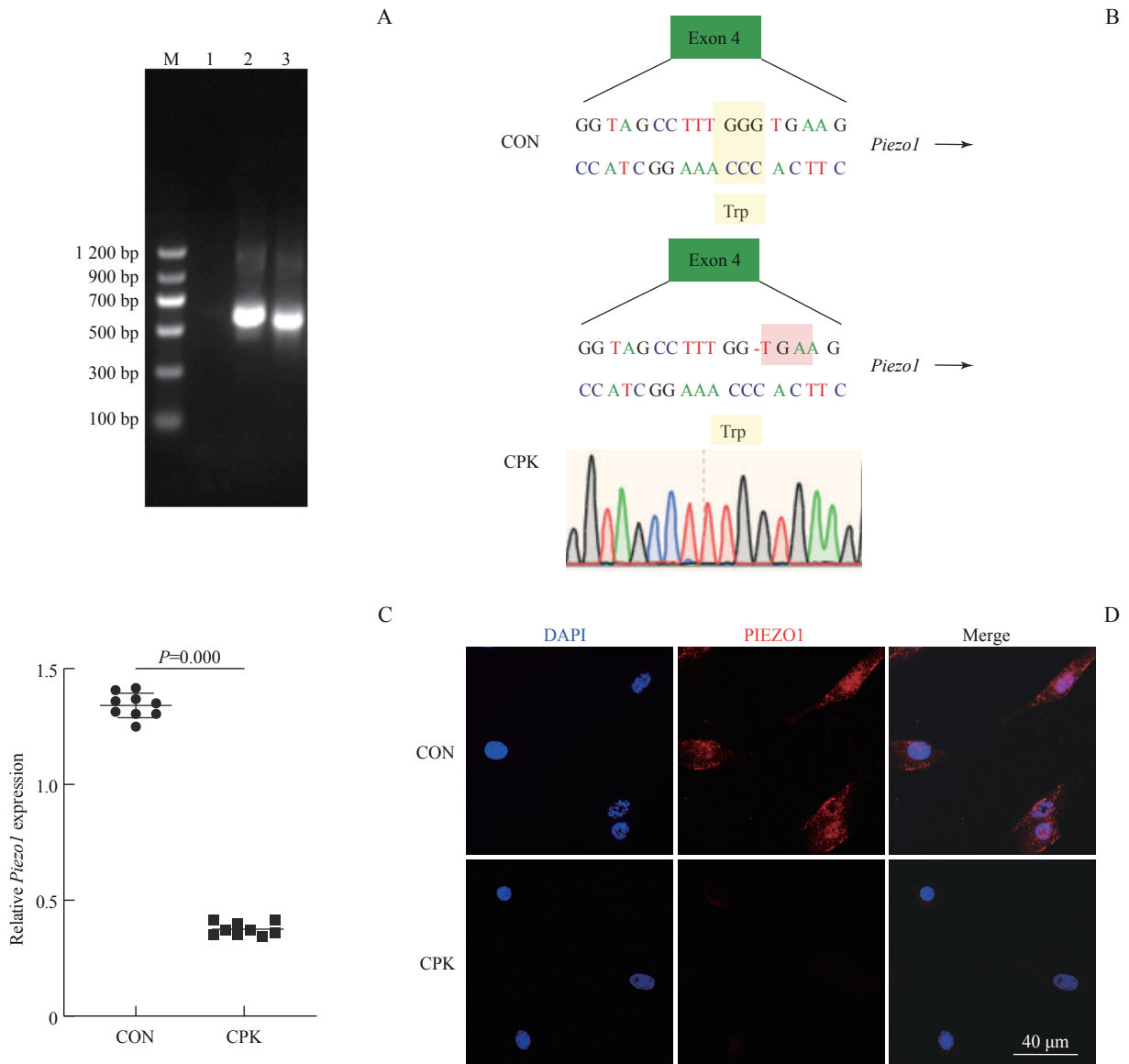
增出和阳性克隆具有同样大小的目的片段 (约 600 bp), 琼脂糖凝胶电泳 (图 2A) 结果证实 PCR 产物条带大小正确。将 PCR 产物送测序, 结果如图 2B 所示。未敲除 *Piezo1* 的 C3H10T1/2 (Control, CON) 组细胞在第 4 外显子可以正常编码氨基酸; 而 *Piezo1* 基因敲除的 C3H10T1/2 (*Piezo1* knockout C3H10T1/2, CPK) 组细胞在第 4 外显子中产生 1 个碱基缺失, 并在第 4 外显子中提前形成终止密码子 TGA, 无法正确翻译蛋白, 表明 CPK 中 *Piezo1* 基因被敲除。提取 CON 组及 CPK 组细胞的 RNA 进行 qPCR 检测, 结果如图 2C 所示。与 CON 组细胞相比, CPK 组细胞中 *Piezo1* 在 mRNA 水平明显降低, 差异具有统计学意义 ( $P=0.000$ )。我们又利用免疫荧光检测 CPK 中 *Piezo1* 的表达。如图 2D 所示, CON 组 *Piezo1* 在细胞膜处表达, 而敲除 *Piezo1* 后, 红色荧光减弱, 提示稳定敲除 *Piezo1* 的 C3H10T1/2 细胞可实现 *Piezo1* 在蛋白层面的敲除。

### 2.3 敲除 *Piezo1* 对小鼠间充质干细胞增殖能力的影响

利用 CCK-8 试剂盒对 CON 组细胞及 CPK 组细胞进行增殖能力检测, 结果如图 3 所示。与 CON 组相比, 敲除 *Piezo1* 基因后, CPK 组小鼠间充质干细胞的增殖能力减弱, 且差异具有统计学意义 ( $P=0.000$ )。

### 2.4 敲除 *Piezo1* 对小鼠间充质干细胞成骨能力的影响

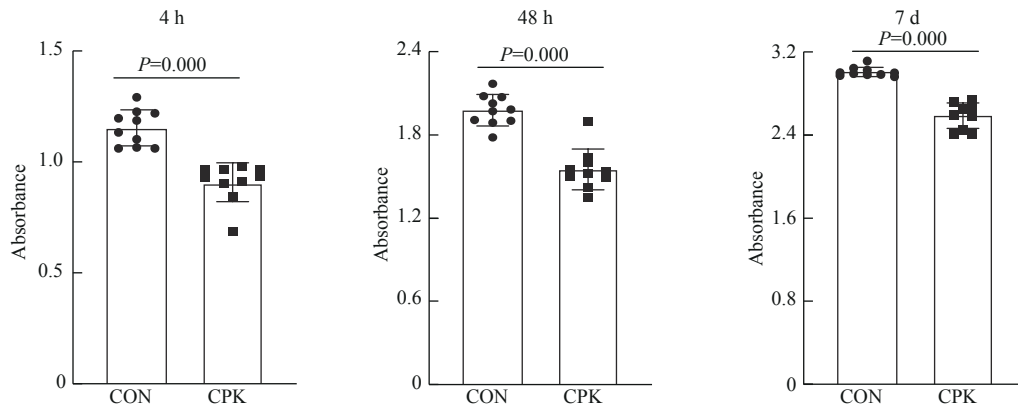
CON 组细胞及 CPK 组细胞在成骨诱导分化 7 d 后进行 ALP 染色, 结果如图 4A 所示。在敲除 *Piezo1* 后, CPK 组的 ALP 活性相较于 CON 组明显降低 ( $P=0.000$ )。2 组细胞在成骨诱导分化 14 d 后进行茜素红染色, 结果如图 4B 所示。在敲除 *Piezo1* 后, 相较于 CON 组, CPK 组细胞中钙结节的形成明显减少 ( $P=0.000$ )。成骨诱导分化 7 d 后, 利用 qPCR 对成骨相关基因的表达水平进行检测, 结果如图 4C 所示。与 CON 组比较, 敲除 *Piezo1* 基因后, CPK 组成骨相关基因 *Colla1*、*Runx2*、*Alp*、*Osx* 的 mRNA 表达水平明显下降, 且差异均具有统计学意义 (均  $P=0.000$ ), 提示敲除 *Piezo1* 导致小鼠间充质干细胞的成骨分化能力减弱。



**Note:** A. PCR identification of CPK. M—Marker; Lane 1—negative control; Lane 2—wild cell; Lane 3—CPK. B. Base sequence of exon 4 of CON group cells and CPK group cells. C. qPCR results of *Piezo1* expression. D. Immunofluorescence staining in CON group and CPK group.

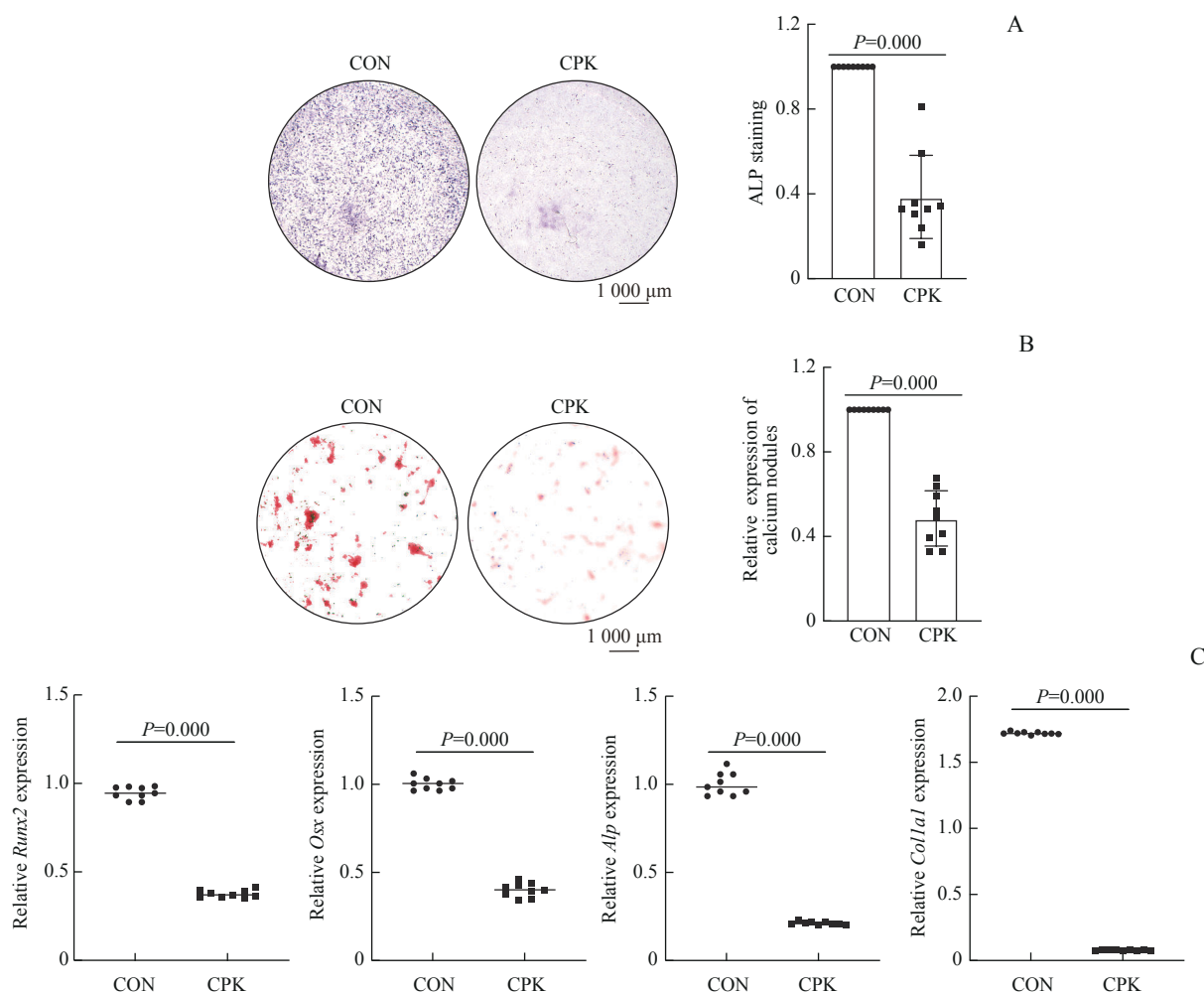
**图2** *Piezo1* 基因敲除细胞系的成功构建

**Fig 2** Successful construction of *Piezo1*-knockout cell line



**图3** CCK-8检测*Piezo1*敲除细胞系的增殖能力

**Fig 3** Cell proliferation of *Piezo1* knockout cell line detected by CCK-8



**Note:** A. ALP staining of CON group and CPK group after osteogenic differentiation induction *in vitro*. B. Alizarin red staining of CON group and CPK group after osteogenic differentiation induction *in vitro*. C. qPCR results of osteogenetic-related genes in CON group and CPK group.

**图4** 敲除 *Piezo1* 基因对 C3H10T1/2 细胞成骨分化的影响

**Fig 4** Effect of *Piezo1* knockout on the osteogenic differentiation of mouse bone marrow mesenchymal stem cells C3H10T1/2

### 3 讨论

*Piezo1* 作为重要的机械敏感的离子通道蛋白, 在骨发育和力学相关的骨改建中都起着不可替代的作用 [13-15, 17-21]。研究 [7] 表明, 全身性 *Piezo1* 基因敲除小鼠有胚胎致死的表型。在研究 *Piezo1* 对骨发育的影响时, 需要根据骨发育的各个阶段有针对性地采用组织特异性的敲除手段及工具进行研究。在总结 *Piezo1* 对骨改建的影响的研究时发现, 大量文献是根据骨发育的不同阶段以细胞为切入点进行研究的。SUGIMOTO 等 [13] 证明 *Piezo1* 可以作为间充质干细胞系中感受静水压力的受体, 通过激活 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路促进成骨细胞分化, 抑制脂肪细胞分化。SUN 等 [8] 研究发现 *Piezo1* 离子通道介导成骨细胞的机械响应从而影响骨形成, 并通过激活成骨

细胞中 CaMK II /Creb 信号通路, 促进成骨细胞分化。WANG 等 [7] 发现成骨细胞中 *Piezo1* 可通过影响 YAP 的核定位而改变细胞外基质中的 2 型胶原蛋白和 9 型胶原蛋白表达, 从而影响破骨细胞的分化调控骨改建。骨细胞系 MLO-Y4 [17] 以及成骨细胞系 MC3T3-E1 [16] 中均可见 *Piezo1* 大量表达, *Piezo1* 与骨发育及力学相关骨改建的机制研究往往具有细胞特异性的特点。

在体外机制研究中, 常利用原代细胞研究 *Piezo1* 基因对于成骨分化能力的影响。这种方法虽可行, 但原代细胞相较于细胞系需要更长的生长时间, 且由于其生长潜力有限, 原代细胞可能会随细胞传代数量增加而改变特性。在研究某一基因对于细胞功能的影响时, 体外研究常采用药物 (如激动剂或抑制剂) 实现对于该基因功能的激活或抑制, 进而探究某一基因对



于细胞功能的影响。这样的方式虽然简便易行,但对细胞的影响并无特异性,很难排除药物对细胞增殖、分化的影响。因此,构建Piezo1基因稳定敲除的细胞系,对于研究Piezo1基因在细胞功能上的影响具有重要意义。

随着基因编辑技术的日益成熟,CRISPR/Cas9系统作为一种设计简便、高特异性、高精度的基因编辑手段,可实现多种动物和细胞的基因敲除、敲入以及诱导突变,这对基因功能的研究有了巨大的推动。通过对某一基因设计特定的sgRNA,可使得Cas9在sgRNA的引导下与特定的DNA序列结合,在目的位点使DNA双链断裂,以达到基因敲除的效果。这也为本课题设计小鼠间充质干细胞C3H10T1/2稳定敲除Piezo1的细胞系提供了有力工具。

本文主要针对Piezo1基因设计2条sgRNA,利用Lenti-Cas9-GFP和Lenti-U6-sgRNA-mCherry载体构建表达Cas9的慢病毒和表达sgRNA的慢病毒;收集2种慢病毒感染的C3H10T1/2细胞,经筛选后得到Piezo1基因片段敲除的单克隆细胞系。经序列测定、qPCR及细胞免疫荧光技术证实了Piezo1基因敲除细胞系CPK的构建成功。为进一步探究Piezo1基因对细胞增殖的影响,本文利用CCK-8实验检测CON组和CPK组细胞的增殖分化情况,结果表明敲除Piezo1基因后CPK细胞增殖能力下降。研究表明,Piezo1可通过影响间充质干细胞的增殖、分化与凋亡调控骨改建过程<sup>[13-14]</sup>。故本文还通过对2组细胞进行体外成骨诱导分化实验,进行ALP染色、茜素红染色以及利用qPCR探究Piezo1基因对细胞成骨分化的影响。结果表明,敲除小鼠间充质干细胞中的Piezo1基因,会阻碍细胞的成骨分化。CPK组细胞的ALP活性、体

外成骨诱导分化后形成钙结节的数量、成骨相关基因的mRNA水平的表达,均明显下降。这提示Piezo1可能是介导间充质干细胞成骨分化的关键分子。但本研究局限于仅发现敲除小鼠间充质干细胞的Piezo1基因后,小鼠间充质干细胞的成骨分化能力下降。影响成骨分化能力的深层机制还有待于进一步研究。与此同时,Piezo1作为重要的机械敏感的离子通道蛋白,在介导力学相关的骨改建发挥重要作用。而Piezo1基因敲除细胞在力学状态下的成骨分化能力如何改变尚不清楚,也有待进一步研究与验证。

综上,本研究获得了敲除Piezo1基因的小鼠间充质干细胞稳转株,并利用该细胞初步探索了Piezo1基因对于细胞成骨分化能力的影响。该稳转株或将成为探索Piezo1在骨改建中作用的良好实验工具。

#### 利益冲突声明/Conflict of Interests

所有作者均声明不存在利益冲突。

All authors disclose no relevant conflict of interests.

#### 作者贡献/Authors' Contributions

高昕负责实验操作、数据分析整理以及论文撰写;杨屹玲和黄湘如参与论文的修改;江凌勇、代庆刚参与了实验设计、指导及最终的论文审阅。所有作者均阅读并同意了最终稿件的提交。

GAO Xin was responsible for experiment operations, data analysis and paper writing. YANG Yiling and HUANG Xiangru participated in the revision of the paper. JIANG Lingyong and DAI Qinggang participated in the experimental design, guidance, and final paper review. All the authors have read the last version of paper and consented for submission.

- Received: 2023-03-21
- Accepted: 2023-09-08
- Published online: 2023-09-28

#### 参 · 考 · 文 · 献

- [1] HUANG H, KAMM R D, LEE R T. Cell mechanics and mechanotransduction: pathways, probes, and physiology[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2004, 287(1): C1-C11.
- [2] MATTHEWS B D, THODETI C K, TYTELL J D, et al. Ultra-rapid activation of TRPV4 ion channels by mechanical forces applied to cell surface  $\beta 1$  integrins[J]. Integr Biol (Camb), 2010, 2(9): 435-442.
- [3] OAKLEY A J, MARTINAC B, WILCE M C. Structure and function of the bacterial mechanosensitive channel of large conductance[J]. Protein Sci, 1999, 8(10): 1915-1921.
- [4] SERVIN-VENCES M R, MORONI M, LEWIN G R, et al. Direct measurement of TRPV4 and PIEZO1 activity reveals multiple mechanotransduction pathways in chondrocytes[J]. eLife, 2017, 6: e21074.
- [5] LI X F, ZHANG Z, CHEN Z K, et al. Piezo1 protein induces the apoptosis of human osteoarthritis-derived chondrocytes by activating caspase-12, the signaling marker of ER stress[J]. Int J Mol Med, 2017, 40(3): 845-853.
- [6] JIANG L, ZHAO Y D, CHEN W X. The function of the novel mechanical activated ion channel Piezo1 in the human osteosarcoma cells[J]. Med Sci Monit, 2017, 23: 5070-5082.
- [7] WANG L J, YOU X L, LOTINUN S, et al. Mechanical sensing protein PIEZO1 regulates bone homeostasis via osteoblast-osteoclast crosstalk[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 282.
- [8] SUN W J, CHI S P, LI Y H, et al. The mechanosensitive Piezo1 channel is required for bone formation[J]. eLife, 2019, 8: e47454.





- [9] ZHANG Y Y, HUANG Y P, ZHAO H X, et al. Cementogenesis is inhibited under a mechanical static compressive force *via* Piezo1[J]. *Angle Orthod*, 2017, 87(4): 618-624.
- [10] FRIEDRICH E E, HONG Z G, XIONG S Q, et al. Endothelial cell Piezo1 mediates pressure-induced lung vascular hyperpermeability *via* disruption of adherens junctions[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2019, 116(26): 12980-12985.
- [11] 闫亮, 姜金, 张小辉, 等. 不同加载时间流体剪切力对成骨细胞中 piezo1 机械敏感型蛋白表达的影响[J]. *中国医学物理学杂志*, 2018, 35(7): 839-842.
- YAN L, JIANG J, ZHANG X H, et al. Effects of loading time of fluid shear stress on expression of piezo1 mechanosensitive protein in osteoblasts[J]. *Chinese Journal of Medical Physics*, 2018, 35(7): 839-842.
- [12] 郭萌萌, 余洋, 叶重, 等. 流体剪应力对成骨分化不同阶段细胞 Piezo1 基因表达的影响[J]. *医用生物力学*, 2018, 33(6): 537-543.
- GUO M M, YU Y, YE C Y, et al. Effects of fluid shear stress on gene expression of piezo1 in the cells during osteogenic differentiation[J]. *Journal of Medical Biomechanics*, 2018, 33(6): 537-543.
- [13] SUGIMOTO A, MIYAZAKI A, KAWARABAYASHI K, et al. Piezo type mechanosensitive ion channel component 1 functions as a regulator of the cell fate determination of mesenchymal stem cells[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 17696.
- [14] ZHOU T F, GAO B, FAN Y, et al. Piezo1/2 mediate mechanotransduction essential for bone formation through concerted activation of NFAT-YAP1- $\beta$ -catenin[J]. *eLife*, 2020, 9: e52779.
- [15] LEE W, LEDDY H A, CHEN Y, et al. Synergy between Piezo1 and Piezo2 channels confers high-strain mechanosensitivity to articular cartilage[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2014, 111(47): E5114-E5122.
- [16] MA N, SHAN Y L, LIAO B J, et al. Factor-induced reprogramming and zinc finger nuclease-aided gene targeting cause different genome instability in  $\beta$ -thalassemia induced pluripotent stem cells (iPSCs)[J]. *J Biol Chem*, 2015, 290(19): 12079-12089.
- [17] GNANASAMBANDAM R, BAE C, GOTTLIEB P A, et al. Ionic selectivity and permeation properties of human PIEZO1 channels[J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0125503.
- [18] 康婷. 机械敏感性离子通道 Piezo 在正畸牙周组织中表达和功能的研究[D]. 西安: 第四军医大学, 2014.
- KANG T. The expression and function of Piezo mechanosensitive ion channel in orthodontic periodontal tissue[D]. Xi'an: the Fourth Military Medical University, 2014.
- [19] SUGISAWA E, TAKAYAMA Y, TAKEMURA N, et al. RNA sensing by gut Piezo1 is essential for systemic serotonin synthesis[J]. *Cell*, 2020, 182(3): 609-624. e21.
- [20] LI X H, HAN L, NOOKAEW I, et al. Stimulation of Piezo1 by mechanical signals promotes bone anabolism[J]. *eLife*, 2019, 8: e49631.
- [21] SYEDA R, FLORENDO M N, COX C D, et al. Piezo1 channels are inherently mechanosensitive[J]. *Cell Rep*, 2016, 17(7): 1739-1746.

[本文编辑] 崔黎明

## “双一流”暨高水平地方高校建设项目

### 一流学科——临床医学

面向人民健康重大需求, 聚焦学科前沿发展方向, 推动多学科联合攻关, 以学科特色为导向深化临床科研支撑体系建设, 推动转化医学大科学设施高效运行, 重点打造特色鲜明、引领全国、具有全球影响力的若干学科领域方向。针对危害我国人民健康的重大疾病, 围绕全生命周期健康管理、恶性肿瘤精准治疗和临床诊治技术突破3个重点领域, 开展“一流学科培优行动”, 全面激发学科发展新动力, 为全方位、全周期维护和保障人民健康贡献智慧并提供优质服务。力争成为顶尖名医大师集聚地、卓越医学人才培养地、原始创新策源地和成果转化应用高产地, 学科整体实力继续保持全国领先优势, 跻身国际一流。

