

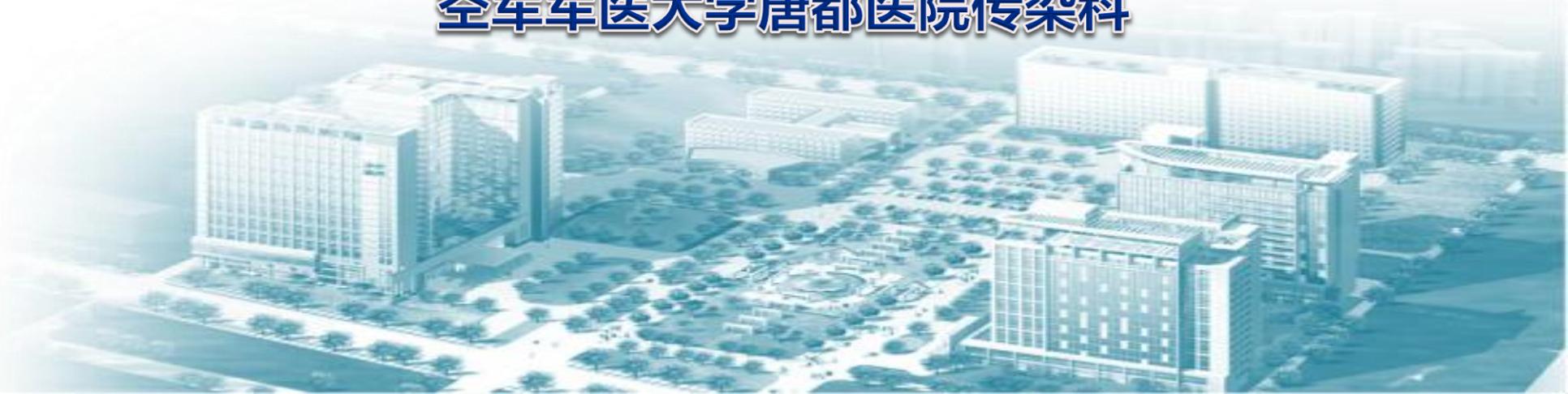


唐都醫院  
TANGDU HOSPITAL

# 应用CRISPR/Cas9构建Hutat2:Fc基因 修饰的单核细胞及其功能评价

康文, 王博文, 孙永涛

空军军医大学唐都医院传染科





唐都醫院  
TANGDU HOSPITAL

# 研究背景

# HIV相关神经认知功能紊乱 (HAND)

**HAND** 患病率达74%



无症状性神经认知损害

日常功能不受影响，反应迟钝，两项认知领域低于同龄

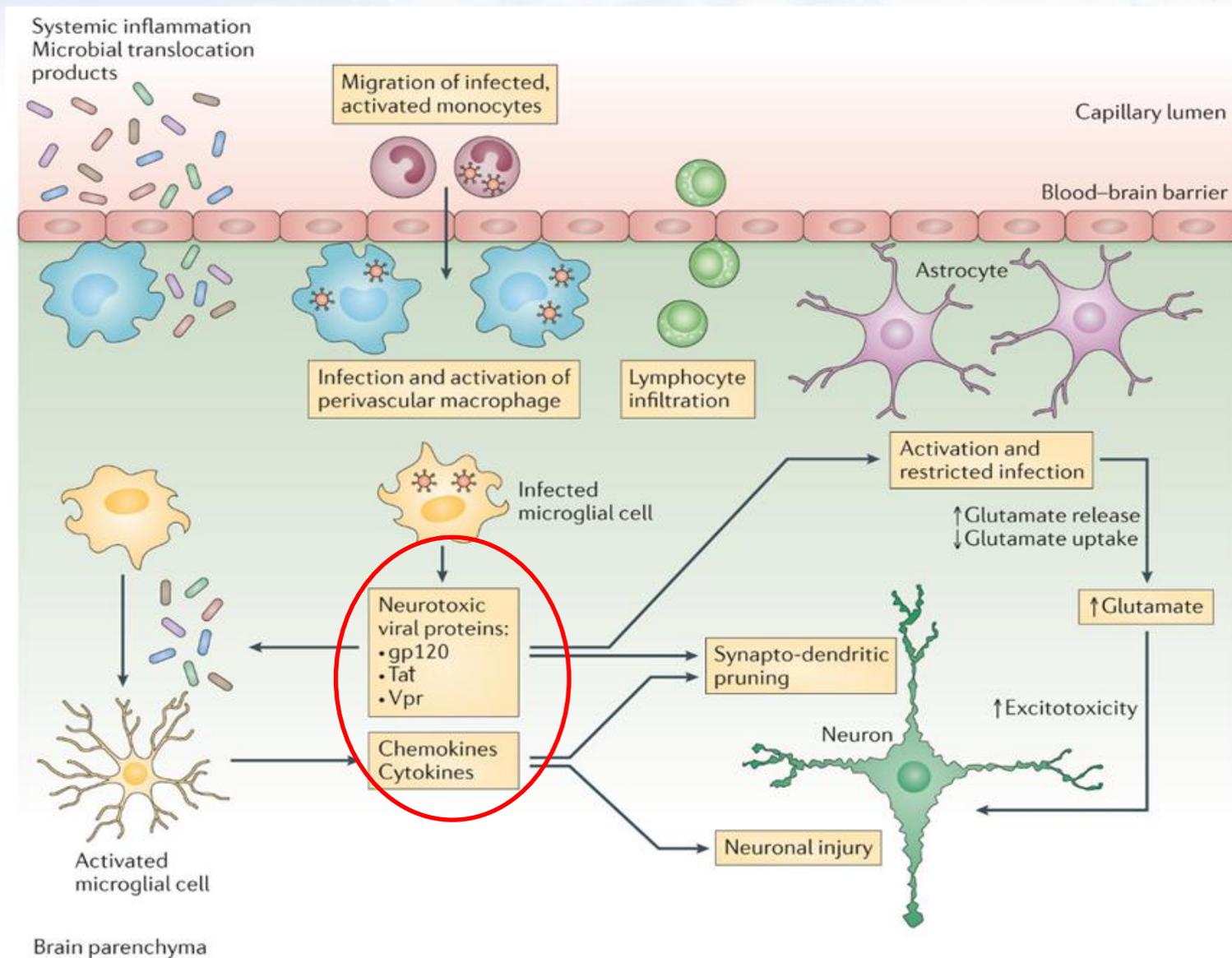
轻度神经认知紊乱

日常功能受损，步态不稳，细颤及手部精细活动能力减退

HIV相关痴呆症

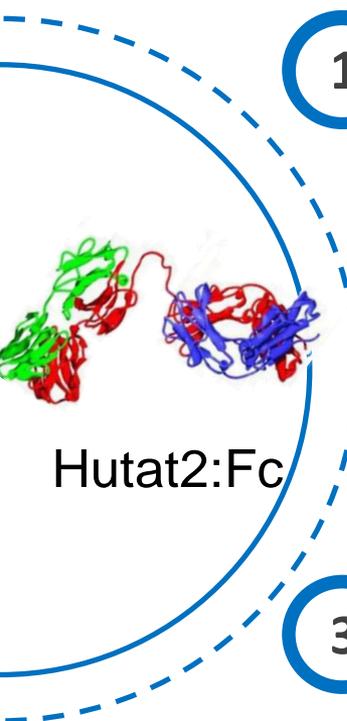
日常功能显著受损，出现神经病理学改变如脑萎缩、白质变性

# HAND的发病机制





# HAND的发病机制



1

## 单核细胞

外周受感染的单核细胞受到炎症诱导进入大脑是中枢神经系统感染HIV的主要途径之一

2

## 神经毒性蛋白

受感染的胶质细胞分泌的毒性蛋白如gp120  等引起神经元直接损伤和炎症性损伤

3

## 感染扩散

 Tat可激活病毒的转录和翻译，促进病毒的进一步扩散，形成恶性循环



# 慢病毒转导单核细胞的缺陷



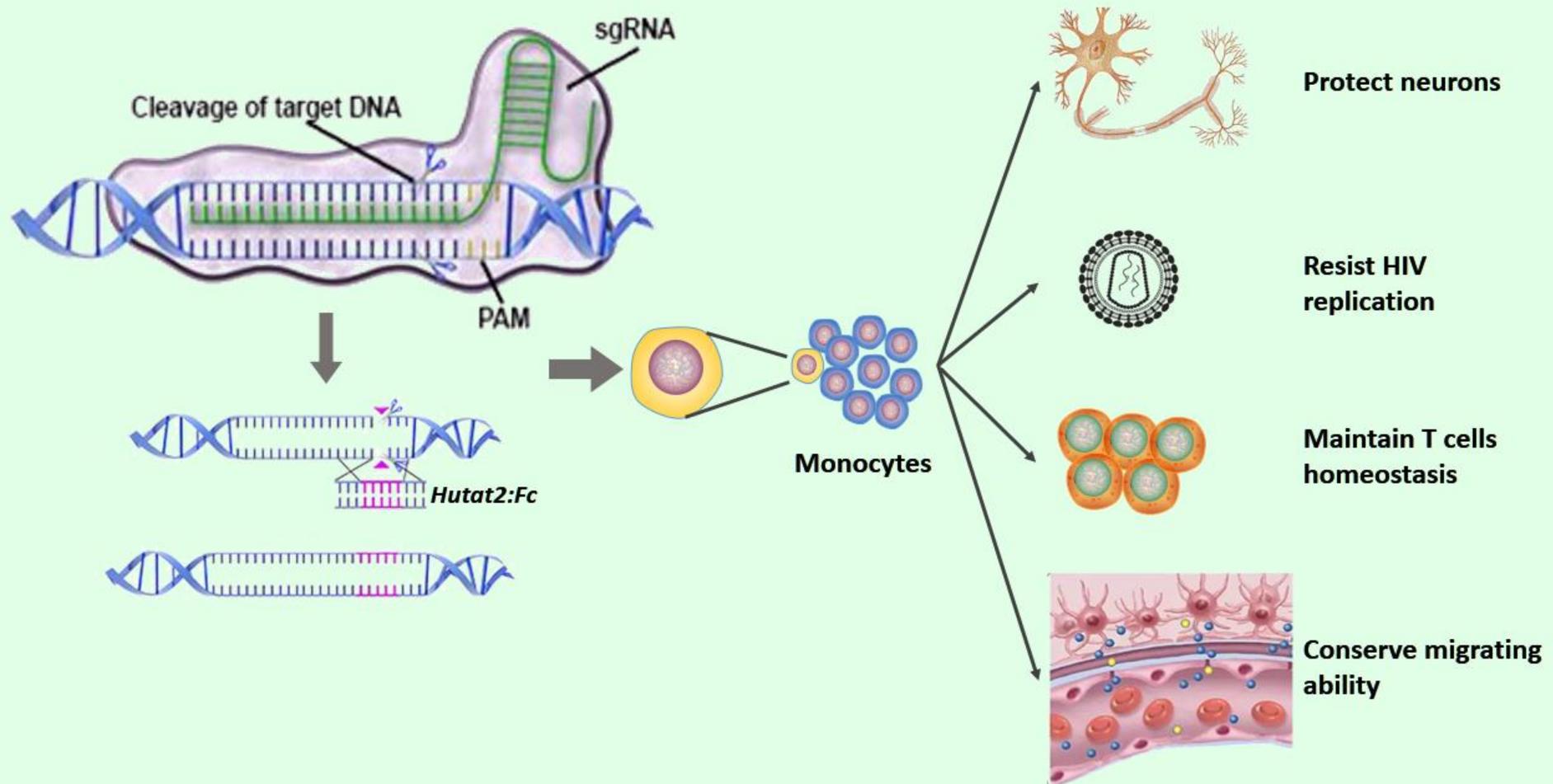
慢病毒感染介导外源基因的多拷贝插入，可能影响正常细胞的基因组稳定性



慢病毒感染介导外源性基因的整合更易发生在转录活跃区域，可能影响正常基因的表达

# 研究目的

1. 构建并验证基于CRISPR/Cas9的单核细胞基因敲入系统
2. 评估转基因单核细胞的功能





唐都醫院  
TANGDU HOSPITAL

# 研究 02 方法



# 研究设计

## Part I

### 一、CRISPR/Cas9构建Hutat2:Fc基因敲入原代单核细胞

构建CRISPR/Cas9介导Hutat2:Fc定点敲入的Hela, 293T, U937和人原代单核细胞, 并评价其脱靶效率

## Part II

### 二、转染细胞表达Hutat2:Fc 生物学活性的体外评估

验证转基因细胞表达的Hutat2结合Tat的能力, 对小鼠神经元的保护作用, 对淋巴细胞的保护作用, 对HIV感染抵抗作用以及维持免疫稳态的能力

## Part III

### 三、CRISPR和慢病毒转导单核细胞的效率和副作用比较

比较两种不同基因编辑方法对原代单核细胞的整合效率, 对单核细胞功能性分子的表达和分泌的影响, 及对单核细胞跨膜能力的影响

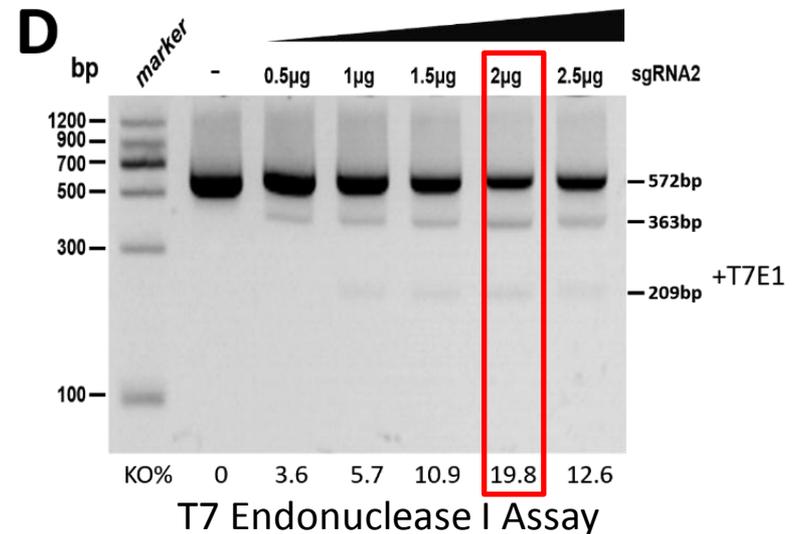
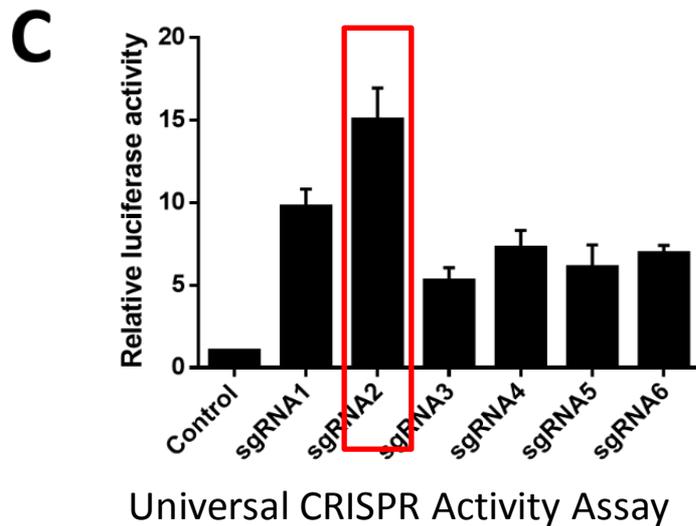
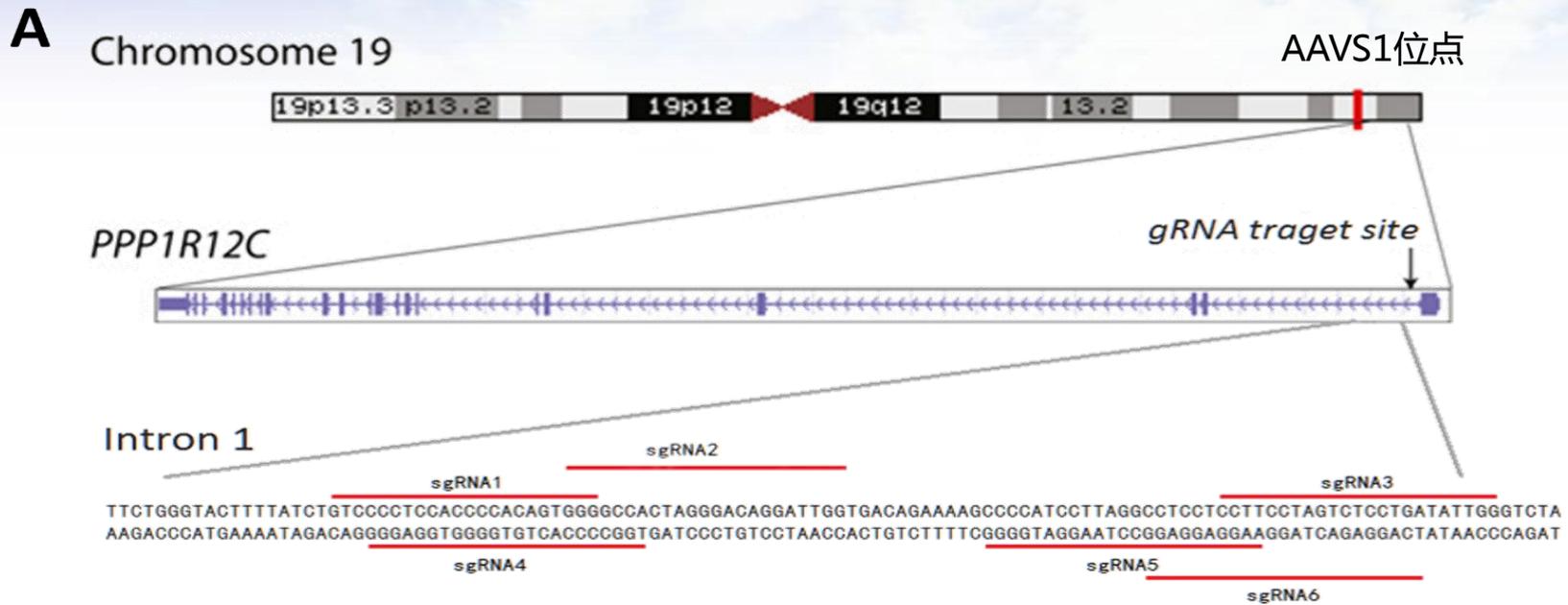


唐都醫院  
TANGDU HOSPITAL

# 研究结果

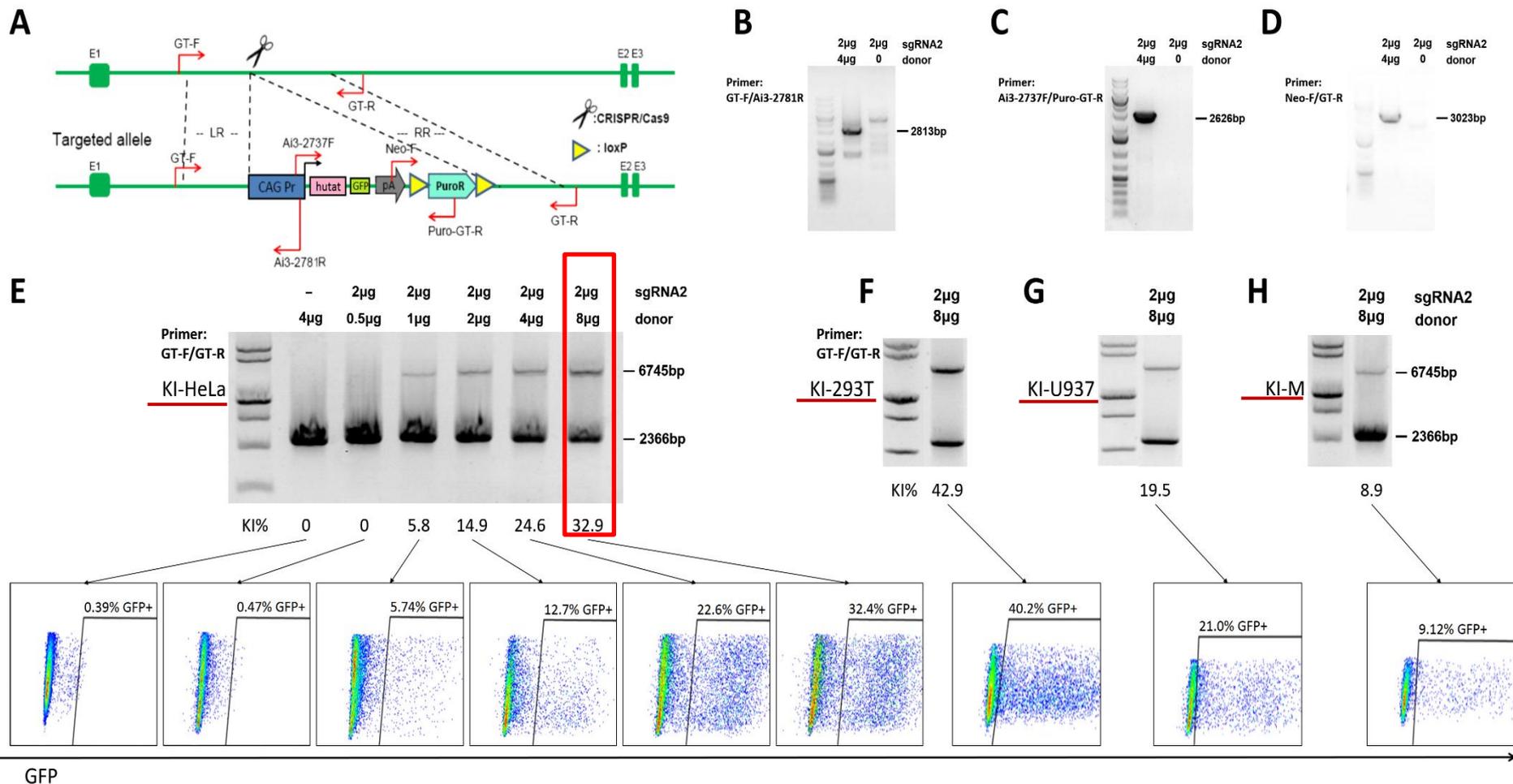
03

# 1. 筛选sgRNA1-6的切割效率

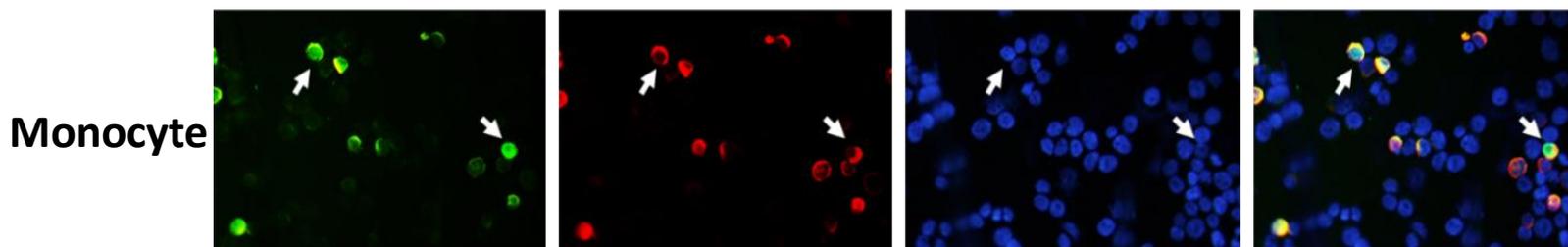
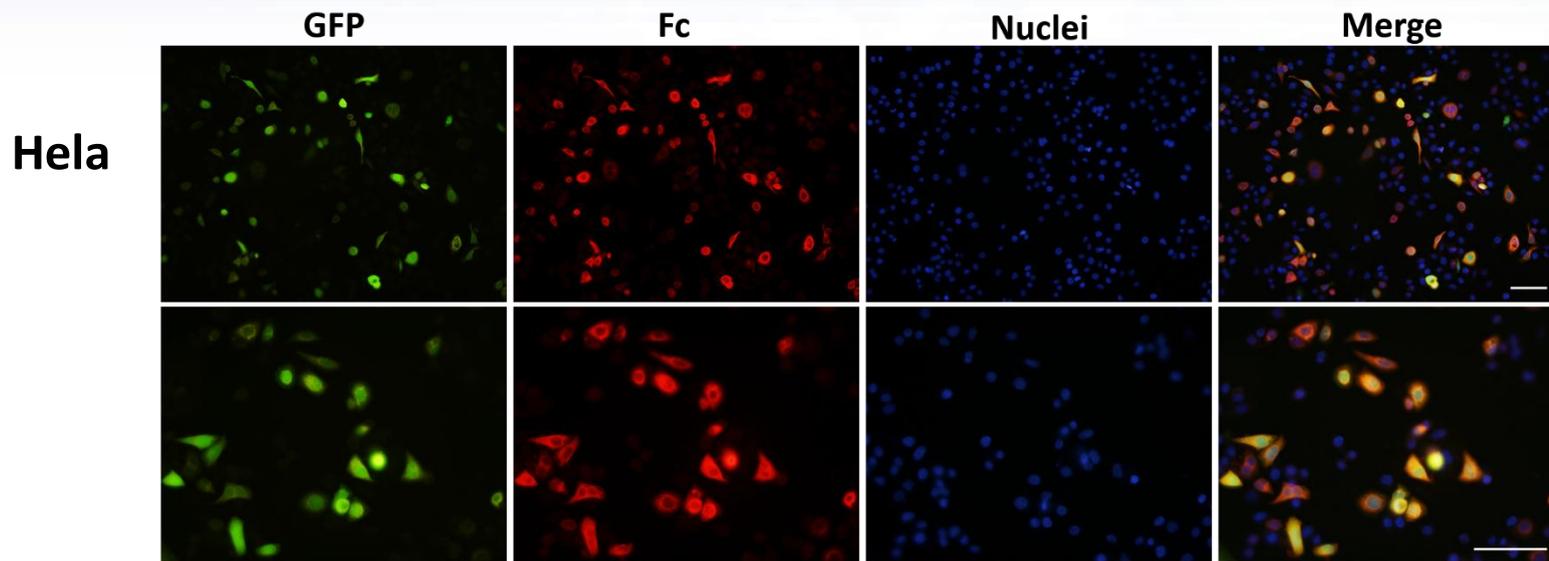


# 2. 构建Hutat2:Fc基因敲入的

## HeLa, 293T, U937和人单核细胞



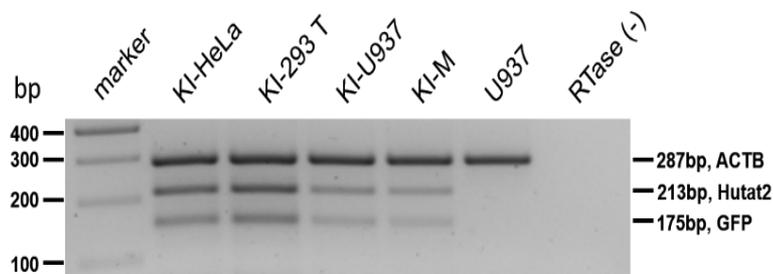
# 3.Hutat2:Fc在转基因细胞的定位



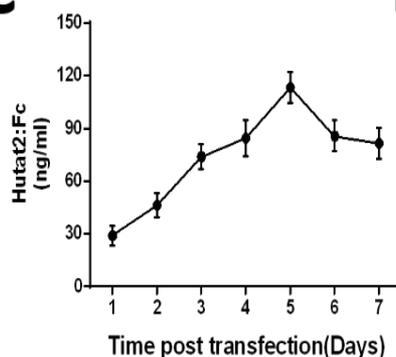
**GFP分布于细胞核和细胞质，Hutat2:Fc分布于细胞质**

# 4. Hutat2:Fc在转基因细胞的表达和分泌

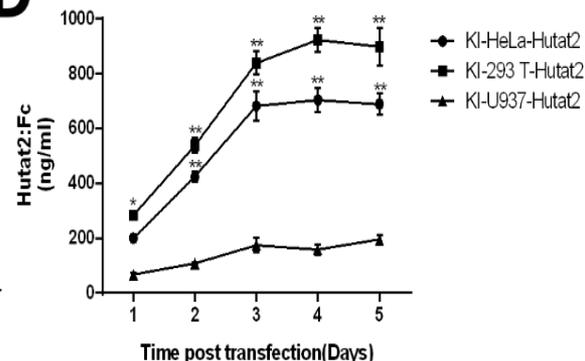
## B RT-PCR



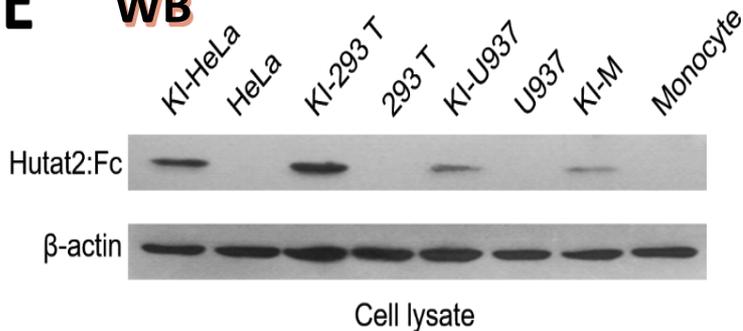
## C ELISA



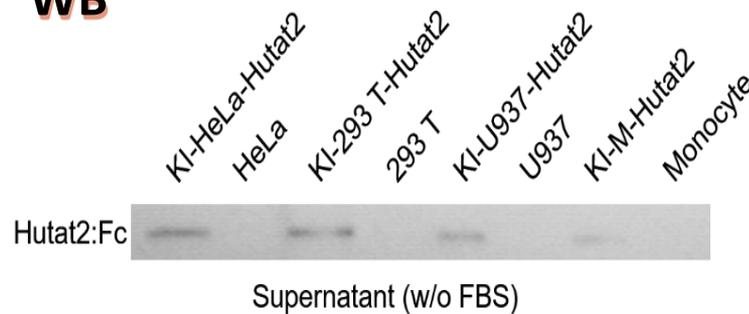
## D



## E WB

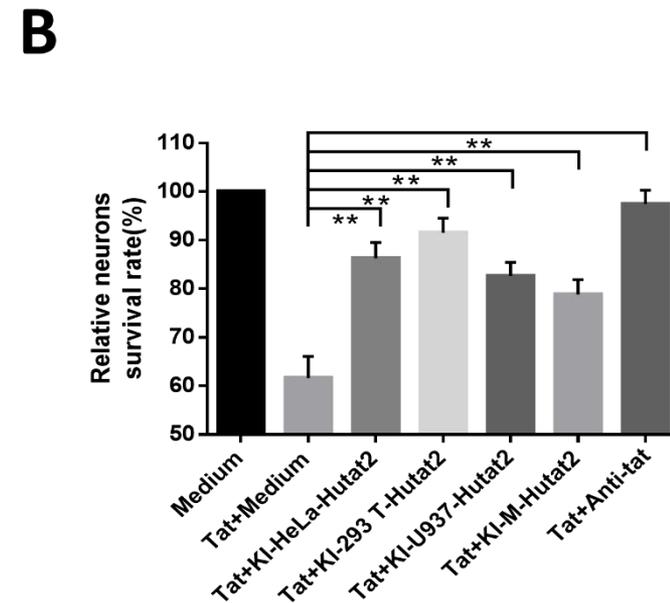
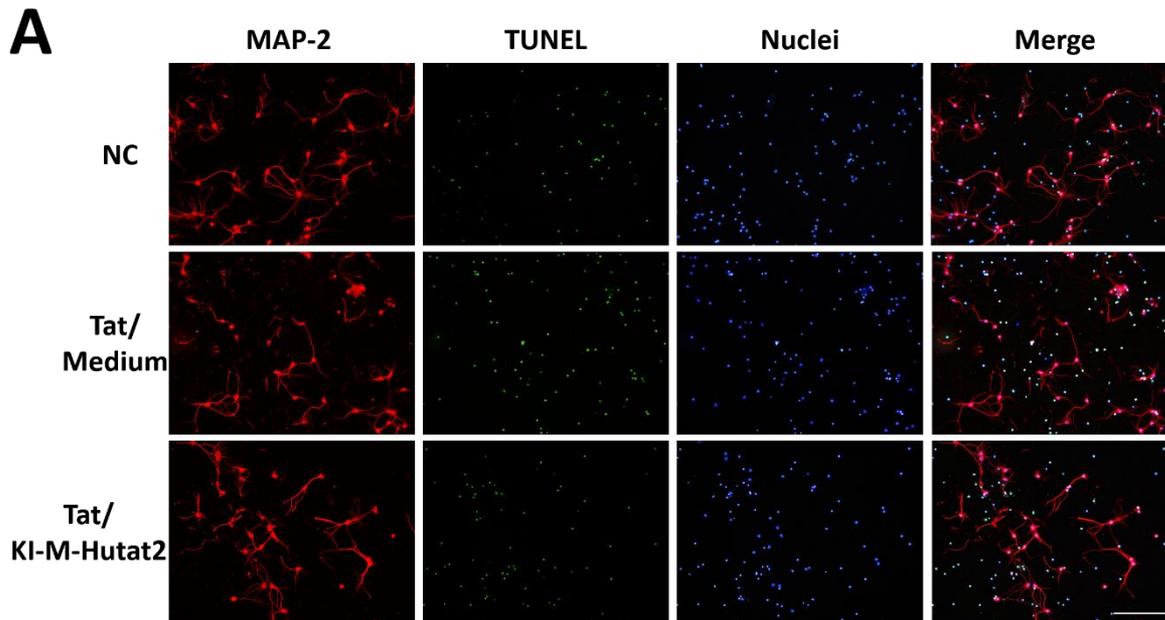


## F WB



敲入的Hutat2:Fc基因可在细胞中稳定整合、持续表达和分泌

# 5. Hutat2:Fc敲入的单核细胞对小鼠神经元的保护作用

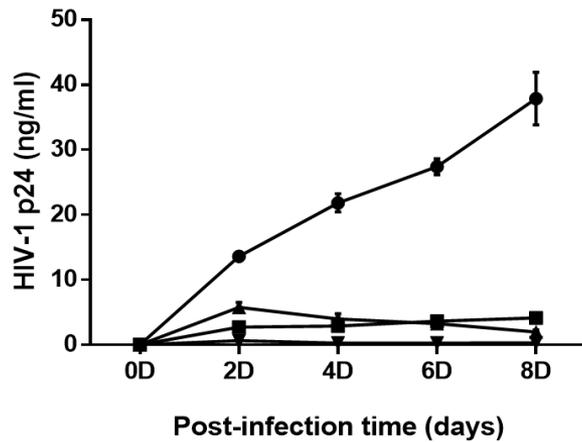


细胞上清的Hutat2:Fc可以部分中和HIV-Tat引起的神经毒性作用

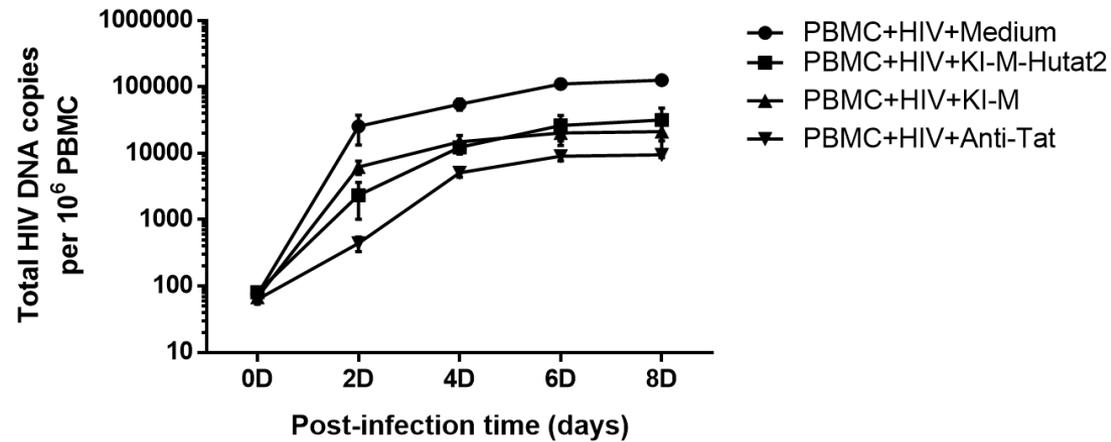
# 6. Hutat2:Fc敲入的单核细胞抑制HIV复制



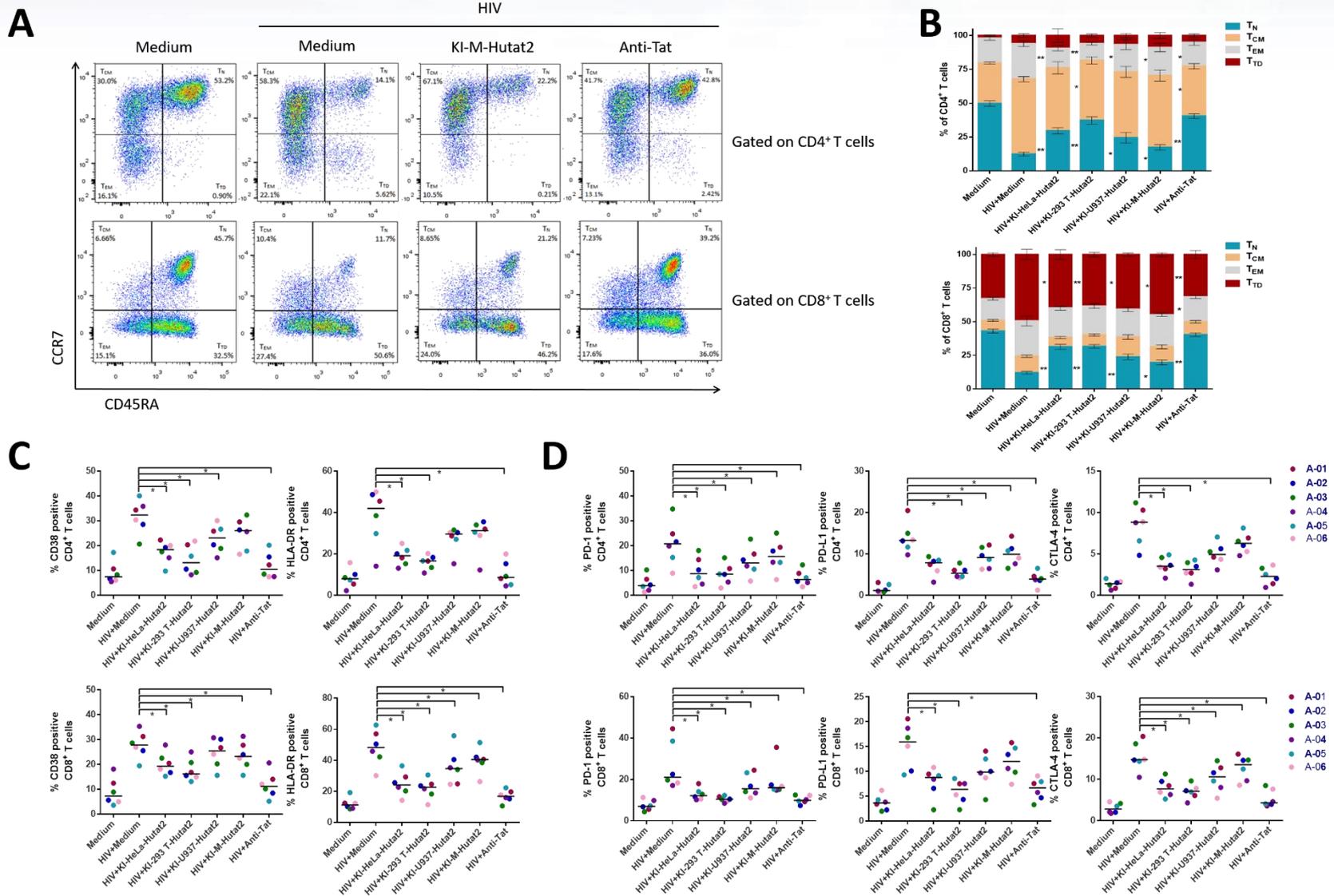
**A**



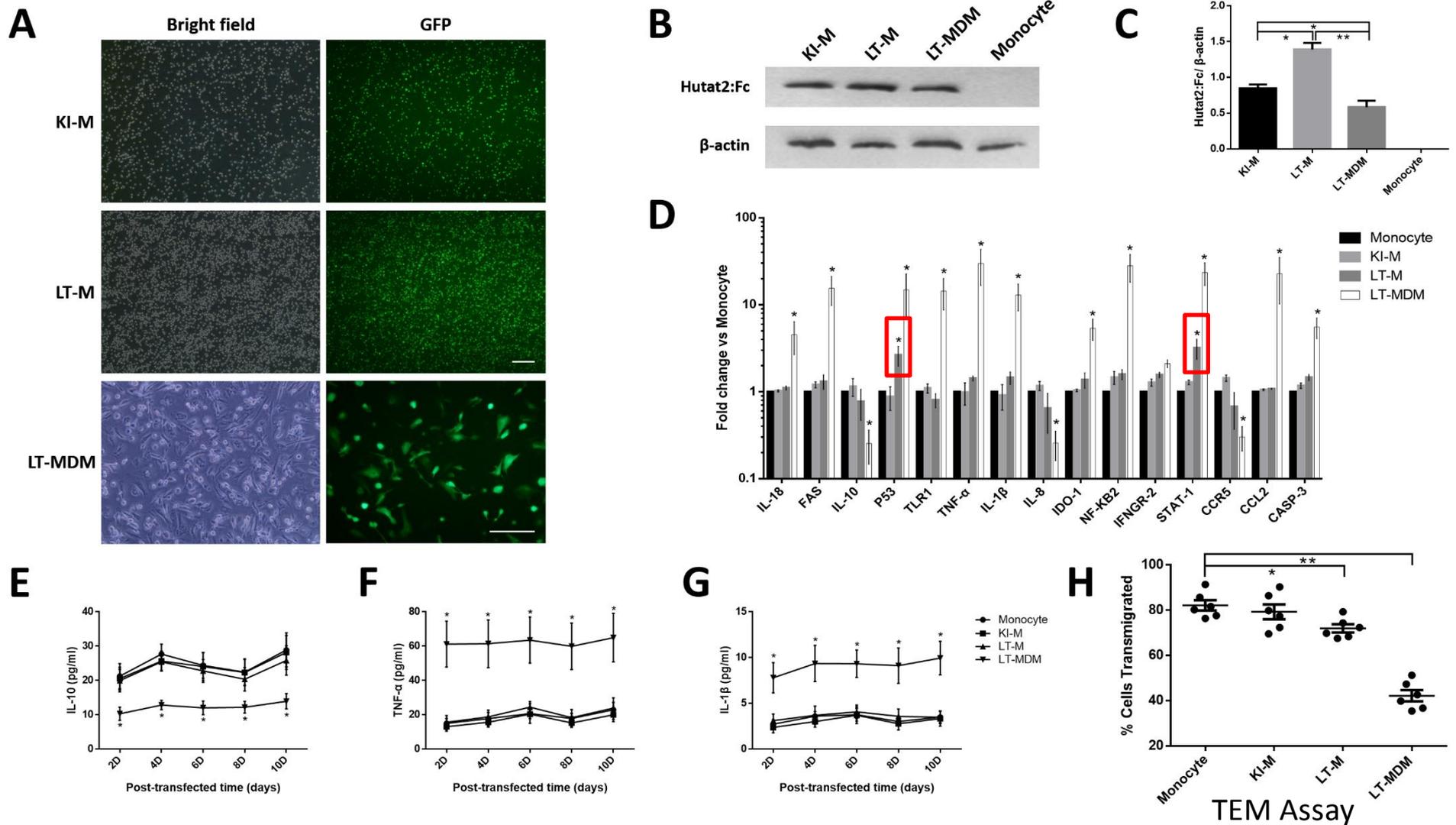
**B**



# 7. Hutat2:Fc敲入的单核细胞对淋巴细胞的保护作用



# 8.不同的基因编辑方法对原代单核细胞功能的影响



KI-M, CRISPR/Cas9-mediated Hutat2:Fc KI monocytes; LT-M, lentivirus-transfected monocytes; LT-MDM, lentivirus-transfected monocyte-derived macrophages.



唐都醫院  
TANGDU HOSPITAL

# 04 讨论

## 编辑单核细胞

1

发挥单核细胞作为细胞载体的优势  
大片段基因敲入 ( 1.5kb )  
单拷贝基因插入

## 筛选

2

筛选过程的简化，提高了基于单核细胞的细胞治疗的可行性

## 分泌量

3

敲入的单核细胞抗体分泌量较少，对局部微环境的影响较小，增加安全性

## 保持功能

4

非病毒系统，最大限度的保存单核细胞的正常功能，尤其是跨膜能力，提高了单核细胞进入脑组织的可能性

# 不足



唐都醫院  
TANGDU HOSPITAL

基因编辑效率仍需进一步提升

由于细胞种属差异，未评估转基因单核细胞在动物体内的迁徙及蛋白表达功能

对于HIV感染者的单核细胞基因编辑效率如何未进行测试



唐都醫院  
TANGDU HOSPITAL

# 05 结论

- ➔ 成功建立了利用CRISPR/Cas9技术将 *Hutat2:Fc* 基因敲入人原代单核细胞 *AAVS1* 位点基因编辑方法
- ➔ 基因修饰后的单核细胞可以表达并分泌 *Hutat2:Fc*，并在上清中积累至有效浓度
- ➔ 上清中的 *Hutat2:Fc* 能够保护神经元，抑制HIV的复制和转录，并且维持T细胞的稳态
- ➔ CRISPR/Cas9介导的基因修饰能够最大程度的保护单核细胞的正常功能



唐都醫院  
TANGDU HOSPITAL

# 06 致 谢

本研究得到国家自然科学基金(81501041)的资助  
和Dr. Yuanan Lu (University of Hawaii)的帮助  
王博文硕士为第一作者





唐都醫院  
TANGDU HOSPITAL



# 敬请各位专家指导

Thanks for Your Attention