

分类号 R9

学号 210621S219

UDC 616-008

密级 公开

# 军事科学院

## 硕士学位论文

### 基因编辑巨噬细胞治疗高尿酸血症 的应用研究

Investigation of gene-edited macrophages in treating  
hyperuricemia

作者姓名 程昊

学科专业 微生物与生化药学

学位类型 学术学位

指导教师 陈惠鹏 研究员

答辩主席 付学奇 教授

学位授予单位 军事科学院

论文提交日期 2024年05月30日

# 目 录

第一章 前言.....	1
1.1 高尿酸血症.....	1
1.1.1 尿酸.....	1
1.1.2 尿酸产生与代谢.....	2
1.1.3 高尿酸血症的概念.....	3
1.1.4 高尿酸血症的病因.....	3
1.1.5 高尿酸血症的传统治疗方案.....	4
1.1.6 Uox 类药物治疗高尿酸血症的研究进展.....	5
1.1.7 高尿酸血症与巨噬细胞.....	6
1.2 巨噬细胞疗法.....	6
1.2.1 巨噬细胞.....	6
1.2.2 巨噬细胞疗法的定义及研究内容.....	6
1.2.3 巨噬细胞疗法的研究进展.....	7
1.3 选题依据.....	8
1.4 拟解决的科学问题.....	9
1.5 研究思路及方法.....	9
1.6 理论意义及实用价值.....	10
第二章 Uox 质粒载体与慢病毒载体的构建及验证 .....	11
2.1 实验材料.....	11
2.1.1 质粒、菌株和细胞.....	11
2.1.2 主要试剂耗材.....	12
2.1.3 培养基及主要溶液.....	13
2.1.4 主要仪器.....	14
2.2 实验方法.....	15
2.2.1 pLVX-mus Uox 质粒载体的构建.....	15
2.2.2 pLVX-hUox 质粒载体的构建.....	18
2.2.3 感染性慢病毒获得.....	20
2.3 实验结果.....	22
2.3.1 pLVX-mus Uox 质粒的构建和测序结果.....	22
2.3.2 pLVX-hUox 质粒的构建和测序结果 .....	24
2.3.3 表达 Uox 基因的慢病毒的获得和滴度确认.....	26
2.4 本章小结.....	26
2.5 实验讨论.....	26
第三章 工程巨噬细胞的构建及表达验证 .....	28

3.1 实验材料.....	28
3.1.1 质粒和细胞.....	28
3.1.2 主要试剂耗材.....	29
3.1.3 培养基及主要溶液.....	29
3.1.4 主要仪器.....	30
3.2 实验方法.....	31
3.2.1 慢病毒感染巨噬细胞 RAW264.7.....	31
3.2.2 慢病毒感染巨噬细胞 THP-1.....	32
3.2.3 qPCR 检测 Uox 基因 mRNA 表达.....	32
3.2.4 Western blotting 检测 Uox 蛋白表达.....	36
3.2.5 工程巨噬细胞体外降尿酸效果评价.....	37
3.3 实验结果.....	38
3.3.1 流式检测 EGFP 确定慢病毒对 RAW264.7 的感染效率...38	
3.3.2 流式检测 EGFP 确定慢病毒对 THP-1 的感染效率.....40	
3.3.3 巨噬细胞表达 mus Uox 和 hUox mRNA.....42	
3.3.4 巨噬细胞表达 mus Uox 和 hUox 蛋白.....43	
3.3.5 工程巨噬细胞体外降低溶液尿酸水平.....43	
3.4 本章小结.....	46
3.5 实验讨论.....	46
第四章 工程巨噬细胞体内降尿酸评价.....	47
4.1 实验材料.....	47
4.1.1 细胞、菌株和实验动物.....	47
4.1.2 主要试剂耗材.....	48
4.1.3 培养基及主要溶液.....	49
4.1.4 主要仪器.....	49
4.2 实验方法.....	49
4.2.1 高尿酸血症小鼠模型的建立.....	49
4.2.2 工程巨噬细胞干预高尿酸血症动物模型的评价.....	50
4.2.3 工程乳酸菌 NZ9000 灌胃溶液的制备.....	51
4.2.4 小鼠肝肾功能生化指标检测.....	52
4.2.5 小鼠肝脏和肾脏组织切片.....	52
4.2.6 小鼠血清炎性细胞因子检测.....	52
4.3 实验结果.....	53
4.3.1 高尿酸血症造模小鼠血尿酸水平升高.....	53
4.3.2 工程巨噬细胞阻止高尿酸血症小鼠血尿酸升高.....	54
4.3.3 工程巨噬细胞对小鼠肝肾功能的影响.....	56
4.3.4 工程巨噬细胞对肝脏和肾脏组织结构的影响.....	57
4.3.5 工程巨噬细胞对小鼠炎性细胞因子的影响.....	60

4.4 本章小结.....	60
4.5 实验讨论.....	61
第五章 总结.....	62
5.1 结论.....	62
5.2 展望.....	63
参考文献.....	66
附录 A.....	72

## 缩略语表

缩略词	英文全称	中文全称
ALT	Alanine aminotransferase	谷丙转氨酶
AST	Aspartate aminotransferase	谷草转氨酶
Amp	Ampicillin	氨苄青霉素
bp	Base pair	碱基对
CAR-M	Chimeric antigenreceptor-macrophage	嵌合抗原受体巨噬细胞
Crea	Creatinine	肌酐
d	Day	天
DBIL	Direct Bilirubin	直接胆红素
ddH <sub>2</sub> O	Double distilled water	双蒸馏水
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium	达尔伯克改良培养基
DNA	Deoxynucleic acid	脱氧核糖核酸
EGFP	Enhanced green fluorescent protein	增强型绿色荧光蛋白
FBS	Fetal bovine serum	胎牛血清
h	Hour	小时
HUA	Hyperuricemia	高尿酸血症
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	甘油醛-3-磷酸脱氢酶
L	Liter	升
LB	Luria-Bertani	胰蛋白胨酵母提取物培养基
MEM	Minimum essential medium eagle	最小必需培养基
min	Minute	分钟
mL	Milliliter	毫升
PBS	Phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
qPCR	Realtime fluorescence quantitative PCR	荧光定量聚合酶链式反应
rpm	Rotation per minute	每分钟转数
s	Second	秒
TBIL	Total bilirubin	总胆红素
UA	Uric acid	尿酸
μL	Microliter	微升
Uox	Urate oxidase	尿酸氧化酶

## 摘要

### 研究背景与目的:

尿酸 (uric acid, UA) 是人体内嘌呤代谢过程的终产物。机体产生尿酸过多和 (或) 排泄降低, 都会使尿酸在体内积聚, 血液中的尿酸浓度异常增高, 从而导致高尿酸血症 (hyperuricemia, HUA) 的发生。目前, 临床常规治疗高尿酸血症药物存在不良反应多, 依从性低, 疗程长等问题, 而尿酸氧化酶 (urate oxidase, Uox) 类药物由于是异源蛋白, 受机体免疫排斥所限, 难以长期广泛地应用于临床。因此, 目前缺乏一种可以长期有效且安全的高尿酸血症治疗手段, 迫切需要从其他策略入手研究新的治疗方案。

巨噬细胞疗法属于细胞疗法范畴, 指通过对自体或者异体巨噬细胞进行定向编辑改造, 在依托巨噬细胞本身特性的基础上使之获得额外能力, 之后回输患者体内, 针对特定疾病发挥治疗效果。目前巨噬细胞疗法主要用于肿瘤治疗, 并已扩展到炎症性疾病。本研究选择巨噬细胞作为底盘, 导入外源 Uox 基因并使其稳定表达, 构建可以表达外源 Uox 的工程巨噬细胞。进一步对工程巨噬细胞在体内和体外的降尿酸效果进行评价, 并对其肝脏和肾脏安全性以及可能诱发免疫反应进行评估。本研究采取的策略优势在于: 采用细胞作为载体使 Uox 在细胞内表达, Uox 发挥降低血尿酸作用的同时, 避免外源 Uox 蛋白直接暴露于机体系统, 确保了更高的安全性。该设计解决了目前临床 Uox 类降尿酸药物的痛点, 为临床高尿酸血症的治疗提供一种新的策略。

### 研究方法 with 结果:

#### 1. 慢病毒载体的构建和慢病毒制备

实验选择鼠源巨噬细胞 RAW264.7 和人源单核细胞 THP-1 作为底盘, 将密码子优化后的鼠源尿酸氧化酶 (mouse urate oxidase, mus Uox) 和“复活”的人源尿酸氧化酶 (“revived” human urate oxidase, hUox) 基因连接到慢病毒载体 pLVX-EGFP 上。在 HEK293T 细胞上转染病毒载体获得包装的慢病毒, 为巨噬细胞过表达外源 Uox 基因提供转染载体。

#### 2. 工程巨噬细胞表达 Uox 及体外降尿酸活性检测

慢病毒转染 RAW264.7 细胞效率可达 41.4%, 转染 THP-1 细胞效率可达 52.8%。对构建成功的工程巨噬细胞进行 Uox 表达进行验证, qPCR 实验和 Western blotting 证明 Uox 基因在 mRNA 和蛋白水平都能正常表达。工程巨噬细胞体外降尿酸实验结果表明, 在 72 h 内, 表达 mus Uox 的 RAW264.7 能够将环境中的尿酸从  $(300 \pm 1) \mu\text{mol/L}$  降至  $(100 \pm 5) \mu\text{mol/L}$ ; 表达 hUox 的 THP-1 在相同时间内可将尿酸浓

度降至  $(170 \pm 8) \mu\text{mol/L}$ 。两种工程细胞降尿酸效应都具有时间依赖性；*mus Uox* 活性要略高于 *hUox* 活性。

### 3. 工程巨噬细胞体内降尿酸功能验证

通过酵母膏连续 14 天灌胃 (20 g/kg/d)，小鼠血尿酸水平可达正常值两倍，成功构建高尿酸血症小鼠模型。我们将表达 *mus Uox* 的 RAW264.7 工程巨噬细胞输注造模小鼠体内，在实验第 7 天和第 14 天小鼠血尿酸平均水平较 RAW264.7-Ctrl 组分别下降 34.5% 和 40.5%，成功抑制了酵母膏诱发的血尿酸升高，使小鼠血尿酸维持在正常水平，其作用效果与临床一线用药别嘌醇相当，优于实验室前期构建的工程乳酸乳球菌 NZ9000-*mus Uox*。

### 4. 工程巨噬细胞的安全性验证

将工程巨噬细胞与别嘌醇进行安全性对比。通过 14 天实验，小鼠肝脏生化指标 ALT、AST、TBIL、DBIL 及肝脏组织切片均未显示异常，说明二者对肝脏无明显影响。肾脏生化指标方面，别嘌醇给药组的小鼠 Urea 和 Crea 水平较正常值分别升高 18.8% 和 23.1%，说明连续使用别嘌醇加重了肾功能紊乱；进一步肾脏组织切片显示别嘌醇给药组小鼠肾脏组织出现了坏死和炎症细胞浸润。相比之下，注射工程巨噬细胞组小鼠肾功能生化指标和肾脏组织病理切片与空白对照组小鼠一致，均未见异常。在评价是否引起机体异常免疫应答方面，对炎症相关细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10 进行检测，均未出现异常上调或降低。上述结果表明体内输注工程巨噬细胞具有良好安全性。

### 研究结论：

本研究采用巨噬细胞疗法，将巨噬细胞作为底盘细胞，将 *mus Uox* 和 *hUox* 基因分别导入 RAW264.7 和 THP-1 细胞基因组中，成功构建工程巨噬细胞。工程巨噬细胞在体外均可以降低溶液中尿酸水平；其中表达 *mus Uox* 的 RAW264.7 在高尿酸血症小鼠体内有显著降尿酸效果。我们的研究为高尿酸血症的安全治疗提供了新的策略。

**关键词：**巨噬细胞疗法；高尿酸血症；尿酸氧化酶；工程化细胞；安全性

---

---

## Abstract

### Background and Objective

Uric acid (UA) is the final product of purine metabolism in the human body. Excessive production and/or decreased excretion of UA can lead to an abnormal increase in UA level in the blood, resulting in the occurrence of hyperuricemia (HUA). Currently, the application of conventional agents for treating HUA are commonly accompanied by adverse reactions and low compliance requirements, especially in a long-term treatment. Besides, use of the emerging novel urate oxidase (Uox)-based agents is also confined in clinical treatment due to immune rejection to heterogenous protein. Therefore, it is necessary to develop new strategies to treat HUA specially for the patients that cannot tolerance current treatment.

Macrophage-based therapy refers to the targeted editing and modification of macrophages to equip them with ability to kill tumor cells or treat certain diseases, and then to transfer them back into the patient's body to achieve therapeutic effects. This study, macrophage is selected as a chassis to be engineered to stably express exogenous Uox. The UA lowering efficacy of the engineered macrophages is assessed *in vitro* and in HUA mice, and then the safety to the liver and kidney and the inflammatory response induced by the engineered macrophages are evaluated as well. The advantage of macrophage as a chassis is that the expression of Uox is intracellular, thus avoiding direct encounter of the exogenous protein to body immune system. We propose that the engineered macrophages are capable of lowering UA level in the body without causing safety issues. Our design provides a novel strategy to treat HUA, aiming to solve the bottleneck problems that hamper the use of current agents.

### Methods and Results

1. Construction of lentivirus vectors and generation of lentivirus for macrophage transfection

In this study, mouse-derived macrophage RAW264.7 cell and human-derived macrophage THP-1 cell were selected as chassis. Codon-optimized mouse urate oxidase (*mus Uox*) and the “revived” human urate oxidase (*hUox*)—were cloned into the vector pLVX-EGFP, which has an enhanced green fluorescence protein (EGFP) as screening indicator. A lentivirus with a titer of  $10^8$  was successfully obtained from HEK293T cells by using a lentivirus packaging kit, providing an essential material for macrophage transfection.

2. Uox expression and UA-lowering efficacy assay of engineered macrophages

Transfection and expression of *Uox* genes and evaluation of the UA-lowering efficacy *in vitro* Macrophages are difficult to be transfected by lipofectamine but can be infected by lentivirus. Lentivirus with EGFP as screening indicator containing *mus Uox* and *hUox* were transfected into RAW264.7 cell and THP-1 cell, respectively. The

transfection efficiency could reach 41.4 percent in RAW264.7 cells and 68.3 percent in THP-1 cells. The mRNA and protein expression levels of *mus Uox* and *hUox* genes were then confirmed by quantitative PCR assay and western blotting assay. Incubation of engineered macrophages expressing *mus Uox* with a solution containing high level of UA resulted in a reduction of UA concentration in the solution in a time dependent manner, with the UA level decreasing from  $300 \pm 1 \mu\text{mol/L}$  to  $100 \pm 5 \mu\text{mol/L}$  at 72 hours after incubation. In engineered THP-1 cell assay, the UA level was decreased to  $170 \pm 8 \mu\text{mol/L}$  at 72 hours after incubation. The result suggested a better activity of *mus Uox* than *hUox in vitro*.

### 3. Urate lowering efficacy assay of engineered macrophages *in vivo*

HUA mouse model was established by oral gavage of yeast extract (20 g/kg/d) to mice for 14 consecutive days. At day 14, serum UA level in yeast extract intake mice doubled than that in the control mice given normal diet. Therapeutic engineered macrophages and mock macrophages were injected intravenous into the mice at day 0 and day 7. The increment of serum UA levels by yeast extract at day 7 and day 14 were significantly inhibited by engineered macrophage expressing *mus Uox* but not by mock macrophages. The therapeutic efficacy of the engineered macrophages is approximately equivalent to the first line anti-HUA agent allopurinol, and superior to engineered *Lactobacillus* NZ9000-*mus Uox*, which was established in our precedent research.

### 4. Safety assays for engineered macrophages

We compared the safety of engineered macrophages with allopurinol, an agent which is prone to cause hepatic or renal damage after a long term treatment. The liver biochemical indicators ALT, AST, TBIL and DBIL, and the H&E staining of liver tissue section showed no disorder and injury in the liver from both engineered macrophage intake mice and allopurinol intake mice. By contrast, renal bio-indicators Urea and Crea were abnormally elevated in mice intake allopurinol. In addition, kidney section H&E staining showed cell necrosis and immune cell infiltration in the kidney in mice intake allopurinol. Mice taking engineered macrophages showed no renal disorder and injury, indicating a better safety of engineered macrophage than allopurinol to the kidney. At last, to assess if there is an abnormal immune response to the injection of *mus Uox*-expressed macrophages, cytokines reflecting inflammation were determined. The result showed that the levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and IL-10 were equal to that in control mice in which engineered macrophages were not given. The data collectively suggested a good safety of the engineered macrophage in the body.

### Conclusion:

A macrophage-based cell therapy strategy was adopted in this study: RAW264.7 and THP-1 cells were selected as chassis to express exogenous *Uox* genes, including mouse-derived *Uox* and human-derived *Uox*. Both RAW264.7 cell and THP-1 cell carrying exogenous *Uox* could reduce UA level *in vitro*, indicating a UA-lowering

activity of both engineered macrophages. In mice HUA model, twice administrations of RAW264.7 with mus Uox expression significantly lowered the serum UA level without causing liver and renal disorder and injury. Our study provides a new approach for the treatment of HUA with efficacy and safety.

**Keywords: macrophage therapy, hyperuricemia, urate oxidase, engineered cells, safety**

## 第一章 前言

### 1.1 高尿酸血症

#### 1.1.1 尿酸

尿酸(uric acid, UA)是一种由嘧啶和咪唑亚结构以及氧分子组成的有机弱酸,化学名称为2,6,8-三羟基嘌呤(图1.1),其分子式为 $C_5H_4N_4O_3$ , pKa为5.75,属于难溶性化合物,在体内易析出形成晶体<sup>[1]</sup>。作为人体内嘌呤氧化分解过程的最终产物,尿酸不但具备生物活性,也是人体内重要的亲水性强抗氧化剂,对于人体微环境具有非常重要的调节作用<sup>[2]</sup>。

在正常生理条件下,尿酸为机体提供了超过50%的抗氧化能力。血液中的氧自由基、过氧化物和单线态氧能够损伤红细胞膜,引起红细胞膜脂质过氧化和溶血。尿酸抵御氧化的作用主要体现在其能够直接或者间接清理机体内的氧自由基,从而降低了氧自由基对红细胞造成的氧化损伤<sup>[3-4]</sup>。同时,尿酸还可发挥螯合剂的作用,与铁和铜等金属离子结合,将其转化为不能催化氧自由基反应的低活性形式,这种抗氧化作用被认为是延长原始人类预期寿命、提高机体免疫力和防止疾病侵袭的原因<sup>[5]</sup>。

尿酸与咖啡因、可可碱和茶碱化学结构相似,具有兴奋大脑皮层,改善认知功能的作用<sup>[6-7]</sup>。大脑是人体调节神经和机能的重要器官,对氧气和能量需求量极高,每天约消耗摄入氧气总量的五分之一,且富含大量的不饱和脂肪酸,易受到氧化损伤。血液中的尿酸通过拮抗过氧亚硝酸盐的活性,保护大脑免受氧化应激的损伤<sup>[8]</sup>。研究表明,进化和生理学并没有将尿酸视为有害的废物,而是将其视为必须保留的有益物质,因此,尿酸水平的升高可能与进化过程中原始人类智力的提升有关,是一种进化优势<sup>[9]</sup>。

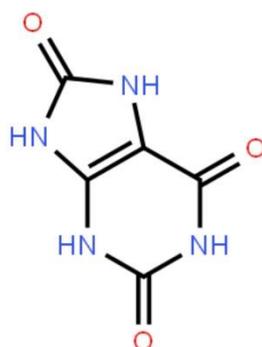


图 1.1 尿酸分子结构式

1.1.2 尿酸产生与代谢

尿酸在体内主要分布于血液，少量存在于尿液中<sup>[10]</sup>。人体内的尿酸约三分之二源于内源性的嘌呤合成与代谢，约三分之一来自于外源性的高嘌呤饮食<sup>[11]</sup>。内源性尿酸主要由嘌呤从头合成途径产生，该过程起始于磷酸戊糖途径的 5-磷酸核糖，在 PRPP（phosphoribosyl diphosphate, PRPP）合成酶的催化下转化为 5-磷酸核糖-1-焦磷酸，继而在 PRPP 酰胺转移酶等多种酶的参与下合成了 5-磷酸核糖胺肌苷酸（inosine monophosphate, IMP）<sup>[12]</sup>。IMP 分别在次黄嘌呤核苷-5-磷酸脱氨基酶和腺苷酸代琥珀酸合成酶的作用下转化为鸟苷酸（guanosine monophosphate, GMP）和腺苷酸（adenosine monophosphate, AMP）。生成的嘌呤核苷酸经水解脱氨等反应，生成次黄嘌呤。再经黄嘌呤氧化酶（xanthine oxidase, XO）的连续催化反应，最终生成尿酸（图 1.2）<sup>[13-14]</sup>。外源性尿酸主要来源自食物中嘌呤的降解。食物中富含核蛋白，人体摄入后胃酸会将这些核蛋白水解成核酸和蛋白质，进入小肠后在核酸酶的作用下继续被分解成为核苷酸，大部分的核苷酸在肠黏膜细胞中被分解，形成戊糖、碱基等物质，并最终排出体外。只有少部分核苷酸被细胞重新吸收利用后，通过一系列反应代谢生成尿酸。

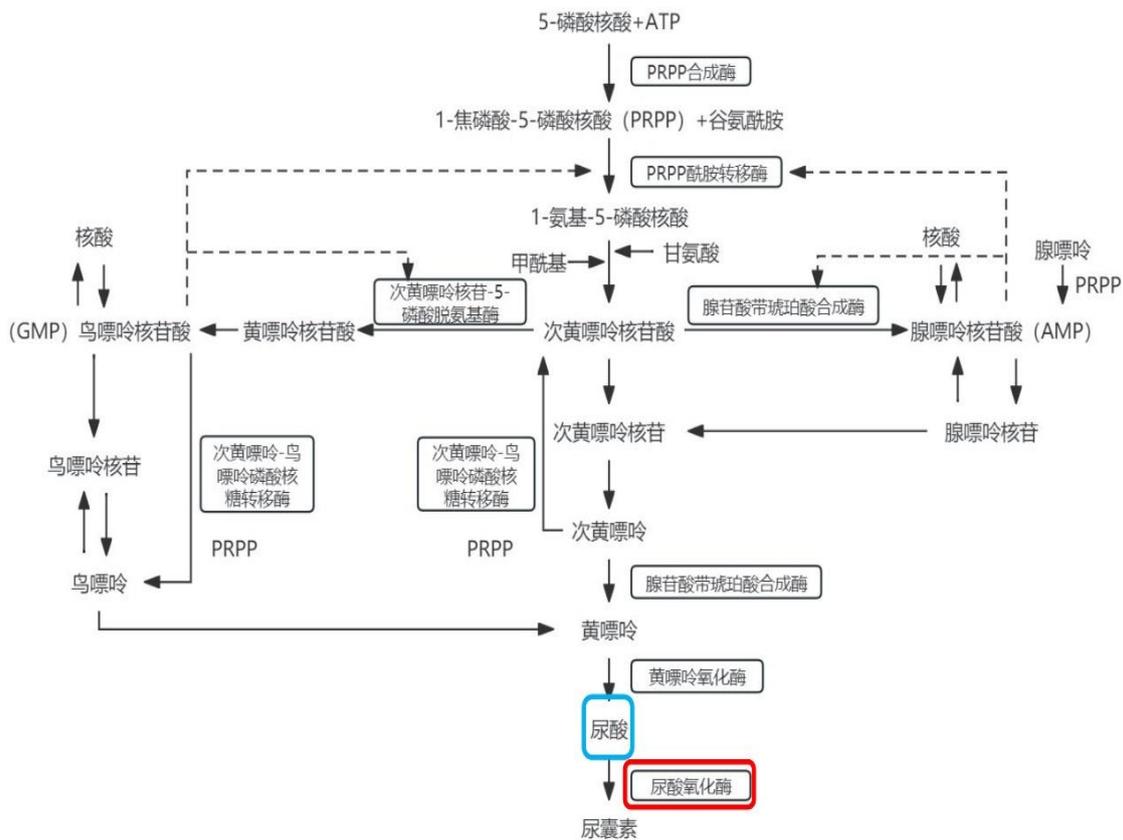


图 1.2 尿酸的产生与代谢

### 1.1.3 高尿酸血症的概念

正常情况下,人体能够通过肾脏和胃肠道等器官有效地将多余的尿酸排出体外,维持血尿酸在一定范围内。然而,当体内嘌呤代谢失调和(或)肾脏代谢功能异常,导致血尿酸水平长期异常升高时,就会引发高尿酸血症(hyperuricemia, HUA)<sup>[15-16]</sup>。现行的临床诊断标准中,将女性血尿酸水平高于 6.0 mg/dL (357  $\mu\text{mol/L}$ ),男性血尿酸水平高于 7.0 mg/dL (416  $\mu\text{mol/L}$ ) 定义为高尿酸血症<sup>[17]</sup>。大量研究表明高尿酸血症是引发痛风、糖尿病、高血压、高脂血症、代谢综合征及慢性肾功能衰竭的危险因素<sup>[16-18]</sup>。

世界多国的高尿酸血症患病率调查数据显示,高尿酸血症患病人数呈持续增长趋势。美国自 1988 年至 2016 年,高尿酸血症患病率增幅超过 12%<sup>[19]</sup>。以意大利为代表的欧洲国家,高尿酸血症患病率从 2005 年的 8.5% 上升至 2009 年的 11.9%<sup>[20]</sup>。在我国,随着人民生活水平的日益提高和饮食结构的改变,高尿酸血症患病率激增,根据统计结果显示,1948 年我国仅报道 2 例高尿酸血症患者,而截至 2019 年,我国高尿酸血症患病率为 14.1%,高尿酸血症患者数约 1.9 亿<sup>[21-22]</sup>。据统计,1990 年我国痛风患者约 586.4 万人,2019 年增加至 1,616.1 万人,相比 1990 年增长了 175.6%<sup>[23-24]</sup>。报告同时指出,高尿酸血症在年轻人群体中的患病率上升明显。因此,加强对高尿酸血症的预防和管理,改善生活方式和饮食结构,加快新型药物的研发,对于控制高尿酸血症的发生发展具有重要意义。

### 1.1.4 高尿酸血症的病因

尿酸并非所有动物嘌呤代谢过程中的最终产物,不同种类的生物在嘌呤代谢的最终阶段存在差异<sup>[25-26]</sup>,大多数哺乳动物体内存在尿酸氧化酶(urate oxidase, Uox),该酶是维持尿酸新陈代谢稳定的关键酶<sup>[27]</sup>。Uox 能够将尿酸转化成尿囊素,后者的溶解度较前者提高了 5 - 10 倍,能够更顺利地排出,进而降低血液中的尿酸水平<sup>[28]</sup>。但是由于灵长类动物和人类在进化过程中的需要,Uox 基因第 33 位密码子发生无义突变,第 119 位密码子发生错义突变,导致 Uox 基因沉默和蛋白失活,人体不能正常表达 Uox,无法快速有效的对尿酸进行调控<sup>[29-32]</sup>。

由于人体内无法产生具有生物活性的 Uox,体内的尿酸只能通过胃肠道和肾脏进行排泄,其中约 75% 的尿酸经肾脏排泄,另外约 25% 的尿酸经胃肠道排泄<sup>[33-34]</sup>。尿酸在肾脏排泄主要受有机阴离子转运蛋白的调控,例如葡萄糖转运蛋白 9 (glucose transporter 9, GLUT9)、人尿酸转运蛋白 1 (urate transporter 1, URAT1) 和有机阴离子转运蛋白 1 (organic anion transporters 1, OAT1) 等,这些蛋白能够运输尿酸并将其重吸收<sup>[35]</sup>。GLUT9 主要调控尿酸在肾小管上皮细胞的基底侧向远

端侧的转运；URAT1 的主要作用则是促进肾小管对尿酸进行重吸收；OAT1 主要位于肾脏的近曲小管中，其功能为调节包括尿酸在内的众多负电荷代谢物与药物跨膜转运的过程。在这些转运蛋白的作用下，肾脏中约 99% 的尿酸被重吸收，因此，这些转运蛋白成为了高尿酸血症相关研究的药物靶点<sup>[36]</sup>。

此外，当机体患有肝炎、糖尿病和恶性肿瘤等疾病时，体内嘌呤代谢紊乱，导致尿酸的生成异常增加，血尿酸水平升高<sup>[37]</sup>。肾脏功能异常时，也会对尿酸的排泄产生影响，尿酸的排泄量降低，增加在体内的蓄积，血尿酸水平升高。这与临床研究结果一致<sup>[38]</sup>，约 90% 的高尿酸血症和痛风患者可能存在肾小球滤过和肾小管分泌功能障碍。因此，当尿酸生成过多和（或）肾功能异常导致尿酸排泄减少时，尿酸平衡被打破，导致高尿酸血症的发生。

### 1.1.5 高尿酸血症的传统治疗方案

高尿酸血症的治疗方案主要分为非药物治疗和药物治疗。非药物治疗方案在饮食方面提倡患者多食用蔬菜鸡蛋，增加饮水，适量食用豆制品和乳制品，减少含糖饮料及酒精的摄入；在生活方面建议患者每日适量运动，控制体重，减少吸烟，作息规律。

非药物治疗往往难以有效控制血尿酸水平，经非药物治疗疗效不佳时，采用药物治疗方案。药物治疗方案须遵循个体化、分层、达标、长程管理的原则，逐步调整剂量。血尿酸水平达标后，以药物最小有效量继续使用，定期监测，根据血尿酸控制情况以及用药后相关副作用的情况决定是否停药。目前我国临床上使用的治疗高尿酸血症的药物分为促进尿酸排泄药物与抑制尿酸合成药物，具体用药根据患者具体病情以及肝肾功能等状态选择。

促尿酸排泄药物主要作用于有机阴离子转运蛋白，通过抑制肾脏内如 URAT1、GLUT9 和 OAT1 等转运蛋白，减少肾小管对尿酸的重吸收作用，增加尿酸在尿液中的排出，进而降低血液中尿酸水平，达到治疗高尿酸血症及痛风的效果。其中典型的药物包括苯溴马隆、雷西纳德、曲尼司特和丙磺舒等<sup>[39]</sup>。苯溴马隆通过抑制 URAT1 发挥降尿酸作用，适用于轻中度肾病及肾脏移植患者，对原发性和继发性高尿酸血症及痛风等疾病均有显著疗效<sup>[40]</sup>。丙磺舒属于磺胺类药物，通过竞争性抑制肾脏近端小管对尿酸的重吸收发挥降尿酸作用，常应用慢性痛风的治疗<sup>[41-42]</sup>。Ardea Biosciences 公司开发的雷西纳德是一款特异性的抑制尿酸重吸收药物，该药通过阻断 URAT1 来促进尿酸的排出，减少血尿酸的浓度。然而，随着体内尿酸未被肾小管重新吸收，大量尿酸渗入尿液中，导致尿液中尿酸浓度激增，更易引发尿酸性肾结石的发生，因此，在用药时须密切监测患者尿液 pH，增加患者每日饮水量，若通过饮水不能有效调控，则联用碱化尿液药物进行干预。

抑制尿酸生成药物主要通过抑制嘌呤代谢过程中 XO 等关键酶的活性，阻断嘌呤代谢途径发挥降尿酸作用，代表药物包括别嘌醇、非布司他和托匹司他等。葛兰素史克公司研发出的黄嘌呤氧化酶阻断剂（xanthine oxidase inhibitor, XO）别嘌醇，是美国食品药品监督管理局（food and drug administration, FDA）批准上市的首个 XO 类药物。目前，多个国家的高尿酸血症或痛风治疗指南依旧推荐别嘌醇作为治疗高尿酸血症的一线首选用药。别嘌醇能够有效抑制 XO 活性，减少机体尿酸生成，降低血尿酸。然而，在使用此药前，必须先行评估病人的肾功能并检测 *HLA-B\*5801* 基因，有研究指出肾功能不全和 *HLA-B\*5801* 基因是严重皮肤不良反应（severe cutaneous adverse reactions, SCARs）的高发因素，该不良反应在临床上致死率可达 27%<sup>[43]</sup>。非布司他属于新型选择性 XO 阻断剂，对肾脏功能障碍的患者显示出较高的安全性和适用性<sup>[44]</sup>。然而在 2020 年，FDA 对非布司他添加了黑框警告，警示该药存在心血管死亡风险。托匹司他的优势在于药物大部分经肝脏代谢，通过胆汁酸的形式排出，对肾脏安全性高，但由于该药缺少充足的临床治疗数据，尚未通过 FDA 审批<sup>[45]</sup>。

#### 1.1.6 Uox 类药物治疗高尿酸血症的研究进展

随着微生物学、细胞学、基因组学、工程学和信息学等学科不断发展，Uox 基因编辑类药物开始应用于高尿酸血症的治疗。1968 年，法国赛诺菲公司第一次在黄曲霉中提取了 Uox 并通过注射给药用于治疗严重的高尿酸血症，由于技术限制，Uox 蛋白分离纯化回收率低，使用过程中存在一定副作用。1993 年赛诺菲公司在酿酒酵母中异源表达了黄曲霉源的重组 Uox，药品名为拉布立酶，主要应用于肿瘤溶解综合征引发的高尿酸血症的治疗和预防<sup>[46-47]</sup>。临床结果表明高尿酸血症患者使用拉布立酶治疗，尿酸可迅速降至正常水平。然而，拉布立酶的降尿酸作用虽然显著，但其半衰期为 17 - 21 h，这意味着患者可能需要频繁注射拉布立酶<sup>[48]</sup>。拉布立酶属于重组蛋白分子，与人源 Uox 相比同源性不足 40%，反复用药后增加产生抗体的风险，导致疗效降低<sup>[49]</sup>。2010 年，FDA 批准普瑞凯希用于难治性痛风或对传统降尿酸药物不耐受的高尿酸血症患者的治疗。普瑞凯希是一种聚乙二醇化的猪-狒狒嵌合体重组 Uox，药代动力学性质和免疫原性良好<sup>[50-51]</sup>。然而，普瑞凯希的临床使用具有严格的限制和要求。首先，该药物不能口服，仅限于静脉注射方式使用，而且注入过程至少需要持续 2 h。其次，该药疗程较长，每 2 - 4 周用药一次，连续用药时间不少于六个月<sup>[52]</sup>。此外，尽管进行了免疫原性优化，但普瑞凯希仍为异源蛋白，用药期间需要联用甲氨蝶呤等免疫抑制剂以缓解可能产生的免疫反应<sup>[53]</sup>。目前，在世界范围内，尚未有使用安全、长效的 Uox 类药物上市。

### 1.1.7 高尿酸血症与巨噬细胞

高尿酸血症患者体内的尿酸水平长期超过正常标准时，血尿酸过饱和，易形成尿酸单钠（monosodium urate, MSU）晶体。MSU 晶体容易黏附沉积于关节腔、软组织、肾小管和输尿管等部位，反复引发炎症反应。研究表明，巨噬细胞（macrophage）膜表面的 TLR2、TLR4 及 CD44 受体能够特异性识别 MSU 晶体<sup>[54]</sup>，同时细胞膜表面 CD206、CX3CR1 和 CCR2 的表达水平显著下调，促进巨噬细胞向 M1 型极化，并对 MSU 晶体进行吞噬。巨噬细胞胞内不具备将 MSU 晶体分解的酶，因此巨噬细胞会大量释放 IL-1 $\beta$  和 IL-6 等炎症因子，并招募中性粒细胞等炎症细胞聚集，进一步加重炎症反应，导致痛风症状。痛风治疗药物秋水仙碱能够抑制 C 型凝集素样受体的活性和细胞因子 IL-18 的分泌，从而抑制巨噬细胞和中性粒细胞向痛风部位趋化<sup>[55]</sup>。与此同时，秋水仙碱还具有抑制巨噬细胞向 M1 型极化的作用，并推动其向 M2 型转变，有利于缓解炎症的发生。有研究表明，丙磺舒同样能够抑制尿酸诱导巨噬细胞向 M1 极化，降低炎症因子分泌，削弱细胞吞噬功能。秋水仙碱和丙磺舒等药物均通过抑制巨噬细胞吞噬 MSU 晶体，减轻炎症反应，提示巨噬细胞对尿酸晶体具有特异性，是治疗高尿酸血症的药物靶点。

## 1.2 巨噬细胞疗法

### 1.2.1 巨噬细胞

巨噬细胞是人体内先天免疫系统的重要组成部分，具有吞噬抗原、递呈抗原和调节免疫反应等多种功能，属于白细胞亚群的一种<sup>[56]</sup>。它们在抵御胞内细菌感染、维护组织完整性、参与免疫调节等方面发挥着关键作用。巨噬细胞具有多样性，它们能够根据周围微环境与刺激种类的影响，分化为具有促进炎症特性的 M1 型巨噬细胞，以及具备抗炎功能的 M2 型巨噬细胞<sup>[57-58]</sup>。巨噬细胞的 M1/M2 型极化是免疫系统中一个复杂而精细的过程，在免疫过程中发挥着调节炎症反应和维持免疫稳态的作用<sup>[59]</sup>。M1 型巨噬细胞主要参与促炎反应，能够释放 IL-1 $\beta$  和 IL-6 等促炎因子，M2 型巨噬细胞主要发挥抗炎反应和组织修复作用，能够分泌 IL-10 和 TGF- $\beta$  等抗炎因子<sup>[60-61]</sup>。研究表明，巨噬细胞在免疫性疾病、代谢性疾病和癌症的发病过程中发挥重要作用。

### 1.2.2 巨噬细胞疗法的定义及研究内容

巨噬细胞疗法是指通过提取自体或异体的巨噬细胞，在体外进行定向诱导或编辑改造，回输宿主体内，对炎症反应、细胞因子分泌及肿瘤免疫杀伤功能进行

调控的细胞疗法。巨噬细胞在血液中能够存活较长时间，其半衰期可达数月<sup>[62]</sup>，因此是进行细胞疗法的理想对象。由于巨噬细胞具有吞噬特性，可以利用其装载药物，靶向性地将药物递送至病变部位，目前已在血液肿瘤治疗中取得巨大进展。巨噬细胞疗法起步较晚，但自诞生之初就受到了科学界的重视，随着基因编辑等技术的迅速发展，巨噬细胞疗法的研究方向逐步扩展到靶向蛋白改造、吞噬能力调控、表达装载药物等方面，由于巨噬细胞天然的靶向性和吞噬作用，相较于干细胞疗法、T 细胞疗法和 NK 细胞疗法，巨噬细胞疗法在药物递送方面具有更大的潜力和优势，因此设计工程化巨噬细胞用于药物递送成为当下研究的热点。常见的巨噬细胞药物递送策略有三种：

#### （1）巨噬细胞作为药物载体

巨噬细胞作为药物载体可分为直接作为药物载体、间接作为药物载体、将巨噬细胞改造为药物递送载体三种方式。直接作为药物载体是指将巨噬细胞与所递送药物共孵育，利用细胞的吞噬作用负载药物<sup>[63]</sup>。间接作为药物载体是指利用巨噬细胞装载含有药物的纳米颗粒（nanoparticles, NPs），这种载药方法可以有效降低药物的毒副作用<sup>[64-67]</sup>。将巨噬细胞改造为药物载体是指通过基因编辑技术来工程化的改造巨噬细胞，使巨噬细胞能够定向表达某个治疗分子，对疾病进行个性化治疗<sup>[68-71]</sup>。

#### （2）巨噬细胞衍生的外泌体作为药物载体

巨噬细胞衍生的外泌体是一种能够包裹药物的囊泡，这种囊泡与巨噬细胞细胞膜特性类似，能够顺利通过细胞膜。巨噬细胞携带包裹药物的囊泡至靶组织，释放药物发挥治疗作用<sup>[72-73]</sup>。

#### （3）巨噬细胞细胞膜包被的纳米颗粒作为药物载体

巨噬细胞细胞膜表面存在许多受体蛋白，能够特异性识别病变部位。提取巨噬细胞的细胞膜，将细胞膜包被在含有药物的纳米颗粒上，增强药物的靶向性，将药物递送至病变处发挥治疗作用<sup>[74-76]</sup>。

### 1.2.3 巨噬细胞疗法的研究进展

巨噬细胞疗法的提出于 20 世纪 60 年代。早期的研究集中在巨噬细胞在免疫系统中如何发挥作用，以及探究它们在感染调控和癌症治疗中的潜力。Isaiah Fidler 倡导使用巨噬细胞干预肿瘤转移。他从患黑色素瘤 C57BL/6 小鼠的腹腔积液中分离出巨噬细胞，并用淋巴细胞提取物刺激提取的巨噬细胞，增强细胞免疫能力。接着，他将“激活”的小鼠巨噬细胞通过静脉输注重新注射到之前的小鼠体内，结果表明小鼠肿瘤肺转移现象得到显著改善<sup>[77]</sup>。德国的 Reinhard Andreesen 研究团队采用体外培养的巨噬细胞来治疗晚期癌症患者。研究人员从患者的血液中分离

出巨噬细胞，激活分离所得巨噬细胞的免疫活性，将处理后的巨噬细胞重新回输患者体内后，能够明显抑制肿瘤生长速度并延缓病程进展<sup>[78]</sup>。

合成生物学的发展为巨噬细胞的深入研究提供了理论与技术基础。通过工程化编辑使巨噬细胞表达特定蛋白，从而对疾病进行个性化治疗。例如，Boehler 研究团队通过慢病毒转染增强了 RAW264.7 细胞系中的 IL-10 表达，促进 M1 型巨噬细胞向 M2 型巨噬细胞转化<sup>[79]</sup>，Yang 研究团队则利用慢病毒转染将应激诱导蛋白 Sestrin2 整合至 BMDM 巨噬细胞基因组中，成功表达 Sestrin2，发挥抗炎和修复心脏组织的作用<sup>[80]</sup>。

巨噬细胞研究不仅限于体外模型，在体内研究也取得一系列进展。Kenneth E. Bernstein 研究团队从小鼠骨髓中提取巨噬细胞进行体外扩增，通过基因工程改造巨噬细胞过表达血管紧张素转换酶，将工程巨噬细胞回输患黑色素瘤的小鼠体内后，能够明显降低肿瘤细胞的耐药性，抑制肿瘤生长<sup>[81]</sup>。Oliver Dorigo 研究团队设计研发了一种能够表达荧光素酶的巨噬细胞，这种巨噬细胞能够在小鼠中遗传，提供了一种以非侵入性的方式研究疾病发生发展过程巨噬细胞作用和机制的动物模型，实现巨噬细胞体内研究的可视化<sup>[82]</sup>。

Saar Gill 和 Michael Klichinsky 创建了 CARISMA Therapeutics 公司，该公司主要致力于开发 CAR-巨噬细胞疗法（chimeric antigenreceptor-macrophage, CAR-M）治疗肿瘤。他们构建了靶向 HER2 的 CAR-M 工程巨噬细胞，在小鼠模型上观察到了良好的肿瘤杀伤效果，并发现该细胞能够诱导 M2 型巨噬细胞向 M1 型巨噬细胞进行转化，促进炎症性肿瘤微环境的形成，增强免疫细胞的抗肿瘤作用。实验结果表明，CT-0508 作为一种工程化的巨噬细胞，具有显著的治疗潜力，目前已经进入了临床试验阶段，并且获得了美国 FDA 的快速通道资格<sup>[83]</sup>。

### 1.3 选题依据

Uox 作为一种生物催化剂，在治疗高尿酸血症方面相比无机催化剂具有更显著的优势。首先，Uox 类药物能够高效的降低血浆中的尿酸水平。临床结果表明，使用拉布立酶治疗 4 h 后，尿酸水平即可达到正常，而使用别嘌醇则需要 24 h 才能达到正常水平。其次，Uox 能够特异性结合尿酸分子，并将其转化为尿囊素，这一过程几乎不产生副产物。这种高度特异性使得 Uox 在处理可溶性尿酸和沉积在关节的 MSU 晶体时都能发挥作用，同时减少了副反应的发生。再者，Uox 广泛存在于大部分生物体内，为治疗高尿酸血症提供了丰富的生物学基础。然而，由于 Uox 是异源蛋白，外源性 Uox 在人体内的应用受到免疫排斥反应的限制。为了克服这一限制，研究者们开发了多种策略来提高 Uox 的稳定性和降低其免疫原性。例如，陈建华研究团队对已经失活的人源 Uox 基因序列进行改造，成功“复活”

了人源 Uox (“revived” human urate oxidase, hUox)<sup>[84]</sup>；李永胜团队利用乙二胺四乙酸对重组黄曲霉源 Uox 进行化学修饰，降低了其免疫原性<sup>[85]</sup>；张春研究团队设计突变了犬源 Uox 半胱氨酸残基，获得了更高活性的 Uox 突变体<sup>[86]</sup>。

尽管通过改造提高了 Uox 对人体的适用性，但 Uox 作为异源蛋白的问题依然存在，极大限制了 Uox 类药物的生物利用度。因此，除对 Uox 本身进行改进外，目前研究还聚焦于设计药物载体递送 Uox 进入体内发挥降尿酸作用。胡杨波团队将 *Uox* 基因导入大肠杆菌 Nissle 1917 中，成功构建稳定表达 Uox 的工程化大肠杆菌，通过喂食该工程菌，有效降低高尿酸血症小鼠的血尿酸水平<sup>[87]</sup>。本实验室前期通过构建基于乳酸乳球菌 NZ9000 的工程菌株，使其表达外源 Uox，该工程菌株能够作用于肠道，靶向尿酸的肠道排泄途径对高尿酸血症进行干预，起到降低血尿酸的效果。上述实验结果表明利用底盘细胞表达外源 Uox 或可成为治疗高尿酸血症的新策略。

## 1.4 拟解决的科学问题

工程化大肠杆菌 Nissle 1917 及本实验室前期研究的工程化益生菌 NZ9000 已证明工程化微生物能够发挥治疗高尿酸血症的作用，但两种生物制品治疗靶点为胃肠道，其中生成的尿酸仅占人体生成尿酸总量的三分之一，这也造成了其降尿酸效果与目前应用的一线降尿酸药物别嘌醇相比仍有差距。本研究利用巨噬细胞对 MSU 晶体具有趋化性和吞噬性，以及巨噬细胞本身具有良好的可获取和可操作性等特点，构建一株可以在细胞内表达外源 Uox 的工程巨噬细胞。过表达的 Uox 不具有信号肽，因此主要是在细胞内发挥作用，避免了外源 Uox 蛋白刺激机体产生的免疫排斥反应。进一步对该工程化巨噬细胞在体外和在动物体内降尿酸的效果以及其对主要尿酸代谢器官的安全性进行评价，为后续生物制品的研发奠定基础。

## 1.5 研究思路及方法

本研究旨在利用巨噬细胞疗法的原理，将鼠源尿酸氧化酶 *mus Uox* 基因整合到鼠源巨噬细胞 RAW264.7 基因组中，将“复活”的人源尿酸氧化酶 *hUox* 基因整合到人源巨噬细胞 THP-1 中，构建工程化巨噬细胞治疗高尿酸血症。

本课题研究内容如下：

1. 选取 *mus Uox* 和 *hUox* 作为目的基因，进行密码子优化，以此为基础构建慢病毒载体，为后续细胞转染实验奠定基础。

2. 通过文献调研发现巨噬细胞属于难转染细胞，本实验采用慢病毒转染构建稳

转工程化巨噬细胞株。

3.利用酵母膏连续灌胃的方法构建小鼠高尿酸血症模型，通过检测血尿酸水平评估模型的建立情况。

4.通过流式分选富集筛选标记阳性的巨噬细胞，采用尾静脉注射将工程巨噬细胞输入高尿酸血症小鼠体内，通过检测小鼠血尿酸水平评价工程巨噬细胞的降尿酸效果。

5.将工程化巨噬细胞与高尿酸血症临床一线治疗药物以及工程益生菌进行对比，横向评估工程细胞的降尿酸效果和安全性。

## 1.6 理论意义及实用价值

巨噬细胞疗法是一种新兴的细胞治疗技术，其原理是通过将自体或异体巨噬细胞在体外进行工程化编辑改造，继而回输病人体内，以发挥治疗作用。大量研究表明，巨噬细胞因其具有强大的免疫激活/调节功能和相对较长的细胞寿命，已经在某些特定肿瘤的靶向治疗中取得显著疗效。巨噬细胞疗法在其他领域中的应用有待进一步扩展。

高尿酸血症是一种慢性代谢性疾病，易反复发作，往往需要长期甚至终身服药，目前临床上的治疗药物长期应用有效性和安全性都存在不足，对患者的身体状态和依从性要求高，难以满足治疗需求。Uox 类药物降尿酸效果优异但容易引起免疫副反应。本研究采用巨噬细胞为外源 Uox 蛋白的表达载体，使其在胞内表达，意图避免产生针对 Uox 的免疫反应。实验结果表明，工程化巨噬细胞在小鼠高尿酸血症模型中具有良好的降尿酸效果，与临床一线用药别嘌醇效果接近，优于同样过表达外源 Uox 蛋白的 NZ9000 益生菌；同时工程巨噬细胞的应用未引起小鼠肝肾功能 and 免疫功能的明显改变，提示其具有良好的安全性。本研究取得的阶段性成果可进一步展望：巨噬细胞被报道具有吞噬和消蚀尿酸盐晶体的能力，未来工作可将本研究建立的工程化巨噬细胞进一步改造，使其能在尿酸盐结晶消除和较少痛风发作等方面体现作用。

## 第二章 Uox 质粒载体与慢病毒载体的构建及验证

本研究选取鼠源的尿酸氧化酶 (mouse urate oxidase, *mus Uox*) 基因和“复活”的人源尿酸氧化酶基因 (“revived” human urate oxidase, *hUox*) 作为目的基因构建真核表达载体。其中插入优化 *hUox* 基因的真核表达载体由本实验室之前构建并保存; 将 *mus Uox* 基因序列委托北京擎科生物科技有限公司进行密码子优化并进行从头合成, 连接至真核表达载体, 命名为 pcDNA3.1-*mus Uox*。对真核表达载体经细胞系表达验证后, 以此序列为基础构建慢病毒载体, 用以在后续实验中转染巨噬细胞。

### 2.1 实验材料

#### 2.1.1 质粒、菌株和细胞

(1) 质粒载体: pLVX-EGFP 为实验室保存; pET-hUox 为实验室保存; pcDNA3.1-*mus Uox* 由北京擎科生物科技股份有限公司提供, 本章所构建质粒简称和描述详见表 2.1。

表 2.1 主要构建质粒

质粒简称	质粒主要结构	描述
pLVX- <i>mus Uox</i>	CMV-Kozak- <i>mus Uox</i>	以慢病毒载体 pLVX 为骨架, 以 <i>mus Uox</i> 和 <i>hUox</i> 为表达基因构建慢病毒质粒。
pLVX- <i>hUox</i>	CMV-Kozak-FLAG- <i>hUox</i>	

(2) 菌种: 大肠杆菌感受态细胞 Trans5 $\alpha$  (Cat.No.CD201) 购自北京全式金生物技术有限公司。

(3) 细胞株: HEK293T 细胞, 购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心, 用于慢病毒载体转染和构建病毒。

## 2.1.2 主要试剂耗材

表 2.2 主要试剂耗材

试剂名称	货号	公司
PBS 缓冲液	10010001	赛默飞世尔科技
胎牛血清	C0225	赛默飞世尔科技
HEPES 缓冲液	2085648	赛默飞世尔科技
DMEM	31331093	赛默飞世尔科技
Opti-MEM	31985070	赛默飞世尔科技
0.25%胰酶	2323491	赛默飞世尔科技
青/链霉素双抗	15140163	赛默飞世尔科技
异丙醇	80109296	中国医药集团
75%乙醇	20221216	北京飞谱瑞科技
Gel Red 核酸染料	GS101	北京全式金生物
DNA Marker	J10812	北京全式金生物
DNA loading buffer	GH101	北京全式金生物
胶回收试剂盒	K0692	赛默飞世尔科技
Q5 <sup>®</sup> 超保真 2×Master Mix	M0492L	NEB
Taq 1×Master Mix	M0491L	NEB
限制性内切酶 <i>Xho</i> I	R0146S	NEB
限制性内切酶 <i>Bam</i> H I	R0136S	NEB
闪电克隆试剂盒	M2200S	苏州博奥龙科技
EndoFree Plasmid Maxi Kit	12362	QIAGEN
质粒小提试剂盒	DP103	天根生化科技
普通 DNA 产物纯化试剂盒	DP204	天根生化科技
二氧化碳气体		北京环宇京辉
Lipofectamine 2000	11668-027	赛默飞世尔科技
台盼蓝染色液 (0.4%)	C004-100ml	北京索莱宝科技
碱性清洗液	93002	山东博科生物产业
酸性清洗液	93004	山东博科生物产业
EDTA	25200056	赛默飞世尔科技
慢病毒包装试剂盒	YK-LVP-05	广州源井生物

---

---

### 2.1.3 培养基及主要溶液

(1) LB 液体培养基：用电子天平称取 NaCl 10 g、蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g，用去离子水溶解定容至 1 L，平均分装至 5 个锥形瓶中，每瓶 200 mL，用封瓶膜封口，121°C 高压灭菌 20 min，降为室温后添加氨苄青霉素钠母液 2 mL（终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）。

(2) LB 固体培养基：用电子天平称取 NaCl 10 g、蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、琼脂粉 15 g，用去离子水溶解定容至 1 L，平均分装至 5 个锥形瓶中，每瓶 200 mL，用封瓶膜封口，121°C 高压灭菌 20 min。

(3) 50×TAE：用量筒称取乙酸 57.1 mL，用电子天平称取 EDTA 37.2 g、Tris 242 g，混匀后用去离子水溶解定容至 1 L，调节 pH = 8.5，使用时用去离子水稀释为 1×TAE 工作液。

(4) 1% 琼脂糖凝胶：用电子天平称取 1 g 琼脂糖，放入 100 mL 1×TAE 工作液中，加热溶解后加入 10  $\mu\text{L}$  Gel Red 染料。

(5) DMEM 完全培养基：向 500 mL DMEM 培养基中添加 50 mL 胎牛血清、5 mL HEPES（终浓度为 10 mM）、5 mL 青/链霉素（双抗终浓度分别为 100 Units/mL 和 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ），配置完成后 4°C 储存。

## 2.1.4 主要仪器

表 2.3 主要仪器

试剂名称	型号	公司
水平离心机	Centrifuge 5804	德国艾本德
台式离心机	Centrifuge 5810R	德国艾本德
细胞计数仪	Countess FL	赛默飞世尔科技
流式细胞仪	BD FACSVers	Becton,Dickinson and Company
PCR 仪	GeneAmp®PCR System970	Applied Biosystems
电泳仪	DYY-6C	北京六一电泳仪器厂
凝胶成像仪	2020D	北京宾达英创公司
核酸定量分析仪	Nanodrop 2000	赛默飞世尔科技
多模式酶标仪	EnSpire	PerkinElmer
全温振荡培养箱	HZQ-F160	苏州培英
高速冷冻离心机	Avanti J-25i	Beckman Coulter
生物安全柜	NU-543-400S	NuAire
生物安全柜	HR1200-A2-E	海尔集团
超净工作台	YT-CJ-2ND	北京亚泰科隆仪器技术
微波炉	M1-211A	美的电器
冰箱	BCD-343WDPM	海尔集团
二氧化碳培养箱	IP610	雅马拓
二氧化碳培养箱	Heracell 150i	赛默飞世尔科技
全温振荡培养箱	HZQ-F160	苏州培英实验室设备
倒置荧光显微镜	Axio Observer 3	Carl Zeiss
微量离心机	Pico17	赛默飞世尔科技
高压灭菌锅	5050	Tuttnauer
高压蒸汽灭菌器	FLS-1000	TOMY
紫外分析仪	UV-4 型	北京宾达英创公司
CO <sub>2</sub> 恒温培养箱	Heracell™ 150i	赛默飞世尔科技
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒科学仪器

## 2.2 实验方法

### 2.2.1 pLVX-mus Uox 质粒载体的构建

(1) 对质粒 pLVX-EGFP 进行双酶切并回收目的产物  
酶切体系如下：

50 $\mu$ L 反应体系	
限制性内切酶 <i>Xho</i> I	1 $\mu$ L
限制性内切酶 <i>Bam</i> HI	1 $\mu$ L
CutSmart buffer	5 $\mu$ L
pLVX-EGFP	1 $\mu$ g
ddH <sub>2</sub> O	To 50 $\mu$ L

将样品充分混匀，37 $^{\circ}$ C 静置 30 min。向 50  $\mu$ L 酶切产物中加入 10  $\mu$ L 6 $\times$ DNA loading buffer，混合均匀后上样于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳，Trans 15K Marker 上样 3  $\mu$ L，电泳仪参数设置为：150 V，200 mA，使用胶回收试剂盒对目的产物进行胶回收。

具体步骤如下：

- 电泳结束后，在凝胶成像仪中观察并切取包含目的条带的凝胶，将所切凝胶放入 5 mL 离心管中；
- 向离心管中以 1:1 的比例加入与凝胶重量相同体积的 Binding buffer，放入水浴锅中 50 $^{\circ}$ C 水浴加热至胶体完全融化；
- 每次将不超过 500  $\mu$ L 样品倒入纯化柱中，12,000 rpm 离心 1 min，去除离心废液，再次加入剩余样品重复本实验步骤；
- 向纯化柱中滴加 700  $\mu$ L Wash buffer 洗涤盐粒子，12,000 rpm 离心 1 min，去除离心废液，本实验步骤重复两次；
- 离心完成后，去除离心废液，12,000 rpm 空离 1 min；
- 纯化柱室温静置晾干 2 min，底部滤管更换为无核酸酶的 1.5 mL EP 管，向纯化柱中加入 50  $\mu$ L 预热的洗脱液，室温静置 1 min，12,000 rpm 离心 1 min，离心洗脱液即为包含目的片段的溶液；
- 使用核酸定量分析仪，检测载体片段的浓度，样品 -20 $^{\circ}$ C 保存。

## (2) PCR 扩增

引物序列如下：

引物名称	序列 (5'-3')
mus Uox-F	TCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGCCACCCCG GACTCAGATCTCGAGGCCACCATGGCCCACTAC CACGACAACTACGG
mus Uox-R	TATGATCAGTTATCTAGATCCGGTGGATCCTCAC AGGCGGGATGGCAGCTTCC
Check-F	CGGCAACTACAAGACCCGCGC
Check-R	GTGCGAGGCCAGAGGCCAC

PCR 体系如下：

50 $\mu$ L 反应体系	
mus Uox-F	2 $\mu$ L
mus Uox-R	2 $\mu$ L
2 $\times$ Q5 Mix	25 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	20 $\mu$ L
pcDNA3.1-mus Uox	1 $\mu$ L

PCR 参数如下：

预变性	98 $^{\circ}$ C	30 s
	98 $^{\circ}$ C	10 s
扩增 (34 cycles)	65 $^{\circ}$ C	30 s
	72 $^{\circ}$ C	2 min
补充延伸	72 $^{\circ}$ C	2 min
降温	4 $^{\circ}$ C	2 min

取 PCR 产物 50  $\mu$ L 加入 10  $\mu$ L 6 $\times$ DNA loading buffer，混合均匀后上样于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳，Trans 2K Marker 上样 3  $\mu$ L，电泳仪参数设置为：150 V，200 mA，使用胶回收试剂盒对目的产物进行回收。

## (3) 胶回收产物利用博奥龙闪电克隆试剂盒进行同源重组

连接体系如下：

	10 $\mu$ L 反应体系
mus Uox 胶回收片段	120 ng
pLVX-EGFP 胶回收片段	30 ng
2 $\times$ Lightening Cloning Master Mix	5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	To 10 $\mu$ L

充分混匀，50 $^{\circ}$ C水浴 15 min，重组质粒命名为 pLVX-mus Uox。

(4) 连接后将重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞 Trans5 $\alpha$ ，具体步骤如下：

- 将大肠杆菌感受态细胞 Trans5 $\alpha$  冰浴保存，向感受态细胞中加入 5  $\mu$ L 重组质粒，用移液枪吹吸混匀，冰浴静置 30 min，使质粒载体黏附至细胞膜上；
- 42 $^{\circ}$ C水浴锅中热激 45 s，使重组质粒通过细胞膜上孔隙进入胞内，热激后迅速将大肠杆菌感受态细胞 Trans5 $\alpha$  冰浴 2 min，修复细胞膜孔隙；
- 向离心管中加入 1 mL 无抗 LB 液体培养基，吹吸均匀后置于 37 $^{\circ}$ C 210 rpm 恒温摇床中振荡培养 1 h，使细胞复苏；
- 将试管内的细菌充分混匀，取出 150  $\mu$ L 经转化处理的大肠杆菌感受态细胞 Trans5 $\alpha$ ，均匀涂布于含有 Amp 抗性（10  $\mu$ g/mL）的 LB 固体培养基上，培养皿倒置于 37 $^{\circ}$ C 的恒温培养箱内进行过夜培养；
- 15 h 后，从固态培养基上随机挑取单克隆菌落，转接于 1 mL 含 Amp 抗性（10  $\mu$ g/mL）的 LB 液体培养基中，37 $^{\circ}$ C 210 rpm 恒温摇床中震荡培养 3 h；
- 吸取 1  $\mu$ L 菌液进行 PCR，向 PCR 产物中加入 6 $\times$ DNA loading buffer 后上样于 1% 琼脂糖凝胶进行电泳，检测是否表达目的基因。

菌液 PCR 体系：

	20 $\mu$ L 反应体系
Check-F	1.0 $\mu$ L
Check-R	1.0 $\mu$ L
2 $\times$ Q5 Mix	12.5 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	9.5 $\mu$ L
pLVX-mus Uox 转化菌液	1.0 $\mu$ L

菌液 PCR 参数:

预变性	98°C	30 s
扩增 (34 cycles)	98°C	10 s
	65°C	30 s
	72°C	2 min
补充延伸	72°C	2 min
降温	4°C	2 min

(5) 琼脂糖凝胶电泳后, 将目的条带正确的菌液样品送擎科生物进行序列测定。

### 2.2.2 pLVX-hUox 质粒载体的构建

#### (1) PCR 扩增获取 *hUox* 基因片段

由于后续 Western blotting 实验需要, 设计引物时在 *hUox* 基因前添加 FLAG-tag 序列。

引物序列如下:

引物名称	序列 (5'-3')
hUox-F	TCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTGCCACCCCG GACTCAGATCTCGAGGCCACCATGGATTACAAG GATGACGACGATAAGGCC
hUox-R	TATGATCAGTTATCTAGATCCGGTGGATCCTCAC TCCAGCAGTCTGCTGCTCAGC
Check-F	CGGCAACTACAAGACCCGCGC
Check-R	GTGCGAGGCCAGAGGCCAC

PCR 体系如下:

50 $\mu$ L 反应体系	
hUox-F	2 $\mu$ L
hUox-R	2 $\mu$ L
2 $\times$ Q5 Mix	25 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	20 $\mu$ L
pET-hUox	1 $\mu$ L

## PCR 参数:

预变性	98°C	30 s
扩增 (34 cycles)	98°C	10 s
	64°C	30 s
	72°C	2 min
补充延伸	72°C	2 min
降温	4°C	2 min

取 PCR 产物 50  $\mu\text{L}$  加入 10  $\mu\text{L}$  6 $\times$ DNA loading buffer, 混合均匀后上样于 1% 琼脂糖凝胶中进行电泳, Trans 2K Marker 上样 3  $\mu\text{L}$ , 电泳仪参数设置为: 150 V, 200 mA, 使用胶回收试剂盒对目的产物进行胶回收。

(2) 胶回收产物利用博奥龙闪电克隆试剂盒进行同源重组连接体系如下:

10 $\mu\text{L}$ 反应体系	
hUox 胶回收片段	120 ng
pLVX-EGFP 胶回收片段	30 ng
2 $\times$ Lightening Cloning Master Mix	5 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	To 10 $\mu\text{L}$

将样品充分混匀, 50°C 水浴 15 min, 重组质粒命名 pLVX-hUox。

(3) 将重组质粒转化至大肠杆菌感受态细胞 Trans5 $\alpha$ , 进行菌液 PCR。

菌液 PCR 体系:

25 $\mu\text{L}$ 反应体系	
Check-F	1.0 $\mu\text{L}$
Check-R	1.0 $\mu\text{L}$
2 $\times$ Q5 Mix	12.5 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	9.5 $\mu\text{L}$
pLVX-hUox 转化菌液	1.0 $\mu\text{L}$

菌液 PCR 参数:

预变性	98°C	30 s
	98°C	10 s
扩增 (34 cycles)	65°C	30 s
	72°C	2 min
补充延伸	72°C	2 min
降温	4°C	2 min

(4) 向 PCR 产物中加入 6×DNA loading buffer, 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 目的条带正确的菌液样品送擎科生物进行序列测定。

### 2.2.3 感染性慢病毒获得

#### (1) 重组质粒的扩增提取

上述菌液测序序列正确后, 将两种菌液分别接种于 200 mL Amp 抗性 (10 µg/mL) LB 液体培养基中扩大培养, 于 37°C 220 rpm 恒温摇床培养 14 h, 用 QIAGEN Plasmid Kits 提取质粒, 提取步骤如下:

- a. 将菌液倒入离心桶中, 使用落地式离心机于 4°C 6,000 ×g 条件下离心 15 min, 尽量去净上清;
- b. 将 10 mL P1 溶液加入含有菌体沉淀的离心筒中, 使用涡旋振荡器重悬菌体沉淀, 充分裂解菌体(使用之前需在 P1 溶液中混合 RNase A 和 LyseBlue 试剂);
- c. 向离心桶中加入 10 mL P2 溶液, 温和地上下翻转 6-8 次, 观察细胞悬液是否完全变蓝, 变蓝后才说明菌体彻底裂解, 室温孵育 5 min;
- d. 在孵育阶段, 使用白色活塞关闭滤过管出口, 放在 QIARack 吸头架上;
- e. 向离心桶中加入预冷的 10 mL P3 溶液, 立即轻轻上下翻转 6-8 次, 充分混匀, 观察细胞悬液是否完全变成无色, 管内出现白色絮状物, 此步骤不需在冰上进行;
- f. 使用落地式离心机于 4°C 6,000 ×g 条件下离心 5 min, 离心后去除沉淀;
- g. 将离心所得滤液转移至滤过管中, 室温静置 10 min;
- h. 打开白色活塞, 使管内液体过滤至 50 mL 离心管中;
- i. 将 2.5 mL ER 溶液加入 50 mL 离心管中, 迅速且轻柔地颠倒混合 10 次后, 置于冰上孵育 30 min;
- j. 向 QIAGEN-tip 500 中加入 10 mL 平衡液 QBT 缓冲液, 凭借重力因素过滤 QBT 缓冲液;
- k. 将冰上孵育的液体转移至 QIAGEN-tip 500 中, 凭借重力因素过滤液体;

- l. 分别向 QIAGEN-tip 500 中加入两次 30 mL QC 缓冲液, QC 过滤完后向 QIAGEN-tip 500 中加入 15 mL QN 缓冲液, 用以洗脱 DNA, 使用无菌无核酸酶的 50 mL 离心管收集滤液;
- m. 将 10.5 mL 室温下储存的异丙醇加入收集的滤液中, 轻轻颠倒瓶身 6-8 次以混合均匀, 使用落地式离心机于 4°C 8,000 ×g 条件下离心 30 min, 弃掉上层清液;
- n. 向 50 mL 离心管中加入室温条件下 70% 的无内毒素酒精 (向试剂盒中装有无内毒素水的瓶子中加入 40 mL 100% 的乙醇), 温和地上下翻转 6-8 次, 使用落地式离心机于 4°C 8,000 ×g 条件下离心 10 min, 去除上清液;
- o. 在室温条件下放置 10 min, 向沉淀中加入 TE 溶液溶解 DNA;
- p. 使用核酸定量分析仪, 对提取质粒浓度进行测定, 所得质粒-20°C 保存。

## (2) 慢病毒包装及提取

使用源井生物慢病毒包装试剂盒对提取的重组质粒进行慢病毒包装。

实验步骤如下:

- a. 向细胞培养皿 (10 cm) 内转移  $6 \times 10^5$  cells/mL HEK293T 细胞进行培养, 细胞生长汇合度达到 70%-80% 时开启实验;
- b. 包装前将细胞从培养箱中拿出, 换液后加入 8 mL Opti-MEM 培养基, 并放入 37°C 细胞恒温培养箱;
- c. 制备 DNA-Lipofectamine 2000 复合物: A 液: 取 14  $\mu$ L pLVX-EGFP (1  $\mu$ g/ $\mu$ L)、4.4  $\mu$ L pLVX-mus Uox (3.2  $\mu$ g/ $\mu$ L) 和 5  $\mu$ L pLVX-hUox (2.8  $\mu$ g/ $\mu$ L) 分别与 20  $\mu$ L LV PacMix 混合均匀, 加 Opti-MEM 补足 1.5 mL, B 液: 取 60  $\mu$ L Lipofectamine 2000 与 1.44 mL Opti-MEM 混合, 轻柔颠倒混合均匀。A 液和 B 液室温孵育 5 min 后混合, 轻柔颠倒混合均匀, 在室温复苏 30 min, 形成 DNA-Lipofectamine 2000 复合物;
- d. 向 HEK293T 细胞培养皿中加入 DNA-Lipofectamine 2000 复合体, 然后缓缓摇动以便均匀混合, 将其置于 37°C 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养;
- e. 转染后 6 h 换液, 将培养基更换为 DMEM 完全培养基, 随后将培养皿放入 37°C 5% CO<sub>2</sub> 的恒温培养箱中, 继续培养 48 h;
- f. 经过 48 h 后, 将富含慢病毒的上层培养液转移到 50 mL 离心管中, 1,500 rpm 离心 10 min;
- g. 将上清液用 0.45  $\mu$ m 的针头滤器过滤, 除去细胞碎片;
- h. 依照所得滤液总量的五分之一体积, 加入等量的 50% PEG 6000 溶液, 充分搅拌均匀后, 将混合物放入 4°C 的冰箱中, 静置过夜。
- i. 次日, 4°C 1,500 ×g 离心 30 min, 去除上清;

j. 加入 2×HBSS 重悬慢病毒并进行分装，慢病毒-80℃储存。

### (3) 荧光计数法检测慢病毒滴度

重组质粒中包含报告基因 EGFP，可采用荧光计数法测定慢病毒滴度。

测定步骤如下：

- a. 滴度检测前一天，将 HEK293T 细胞以  $5 \times 10^3$  cells/mL 接种至 96 孔板中；
- b. 预先准备好六支 1.5 mL 的无菌 EP 管，分别标号 1-6。随后在每个管内加入 90  $\mu$ L DMEM 完全培养基。取 10  $\mu$ L 的待检测慢病毒原液加入编号为 1 的 EP 管内，搅拌均匀。之后从该管中吸取 10  $\mu$ L 混合液体注入至编号为 2 的 EP 管中，依照此种方法逐步稀释至第 6 个 EP 管；
- c. 吸去 96 孔板中的旧培养基并加入稀释好的 100  $\mu$ L 慢病毒溶液，置于 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱培养 48 h；
- d. 培养 48 h 后，每孔加入 100  $\mu$ L 的 DMEM 完全培养基继续培养 24 h；
- e. 培养 24 h 后，除去旧培养基，加入 DMEM 完全培养基 150  $\mu$ L 继续培养 24 h；
- f. 培养 24 h 后，对荧光细胞进行数量观测与统计；
- g. 最后 1 个孔中含有荧光细胞个数为 N，N 乘以相应的稀释倍数即为慢病毒原液的滴度值。

## 2.3 实验结果

### 2.3.1 pLVX-mus Uox 质粒的构建和测序结果

使用限制性内切酶 *Xho*I、*Bam*H I 对 pLVX-EGFP 双酶切，凝胶电泳图观察到目的条带并对其进行回收，成功获得 pLVX-EGFP 线性载体片段（图 2.1A）。从质粒载体 pcDNA3.1-mus Uox 上将 *mus Uox* 序列进行 PCR 扩增，对所得 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳，胶图观察到明显的条带（图 2.1B），该长度与预期的目标基因大小吻合，随后对该条带进行了回收提取。通过引物设计，目的基因片段与载体片段含有同源臂，能够利用快速连接酶连接到 pLVX-EGFP 线性载体上，从而得到重组质粒 pLVX-mus Uox（图 2.1C，D）。

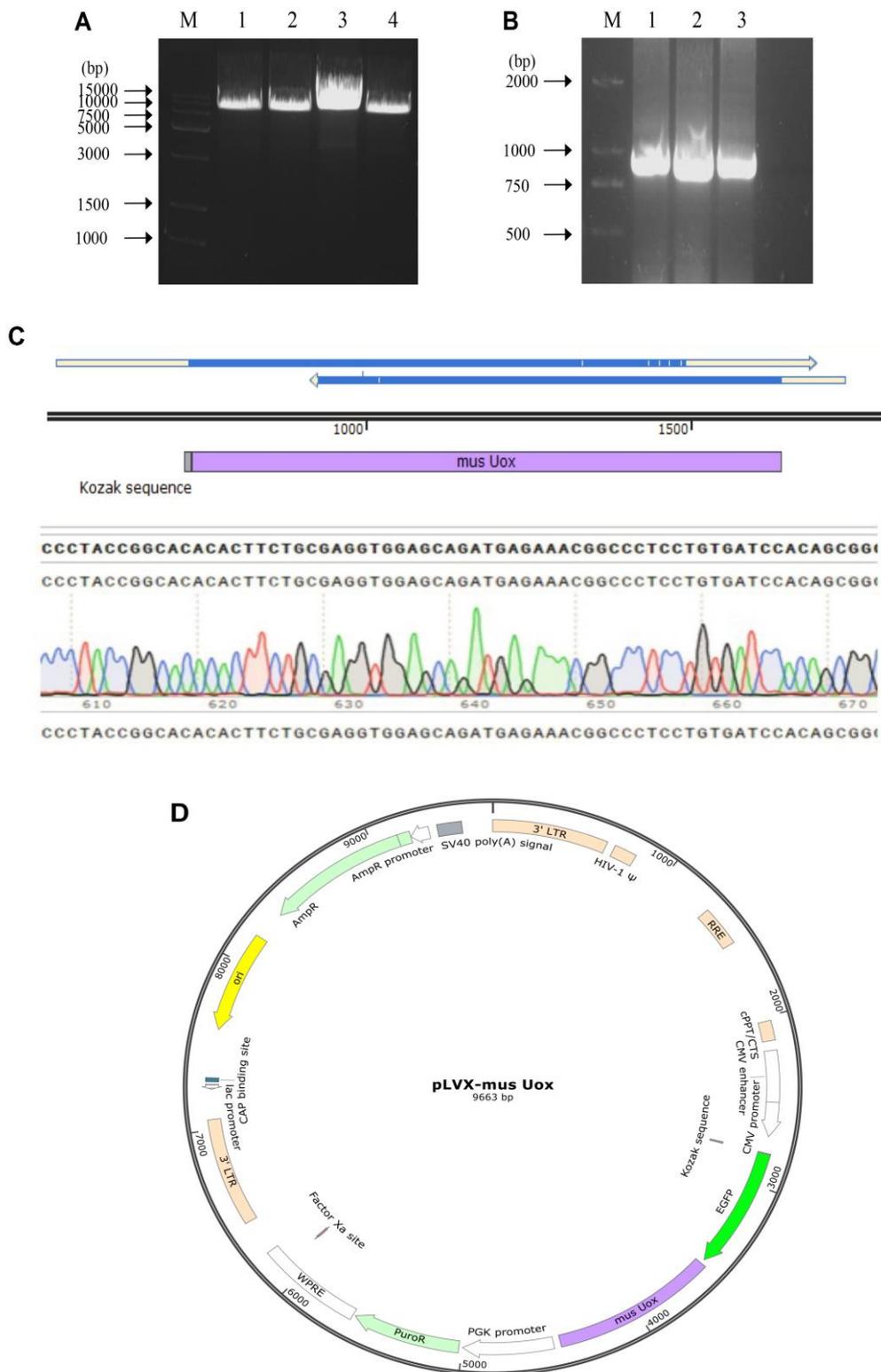


图 2.1 pLVX-mus Uox 慢病毒表达载体构建

图 2.1 A. 双酶切获取 pLVX-EGFP 线性载体, M: Trans 15K Marker, 1-4: pLVX-EGFP 线性载体; B. pcDNA3.1-mus Uox PCR 扩增产物, M: Trans 2K Marker, 1-3: PCR 扩增 *mus Uox* 基因片段; C. 测序结果和序列比对; D. pLVX-mus Uox 质粒图谱。

### 2.3.2 pLVX-hUox 质粒的构建和测序结果

从载体 pET-hUox 上对 *hUox* 序列进行 PCR 扩增,对 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,胶图观察到明显的条带(图 2.2A),该长度与预期的目标基因大小吻合,随后对该条带进行了回收提取。片段及载体之间具有同源臂,可以通过快速连接酶连接到 pLVX-EGFP 线性载体上,从而得到重组质粒 pLVX-hUox(图 2.2B, C)。

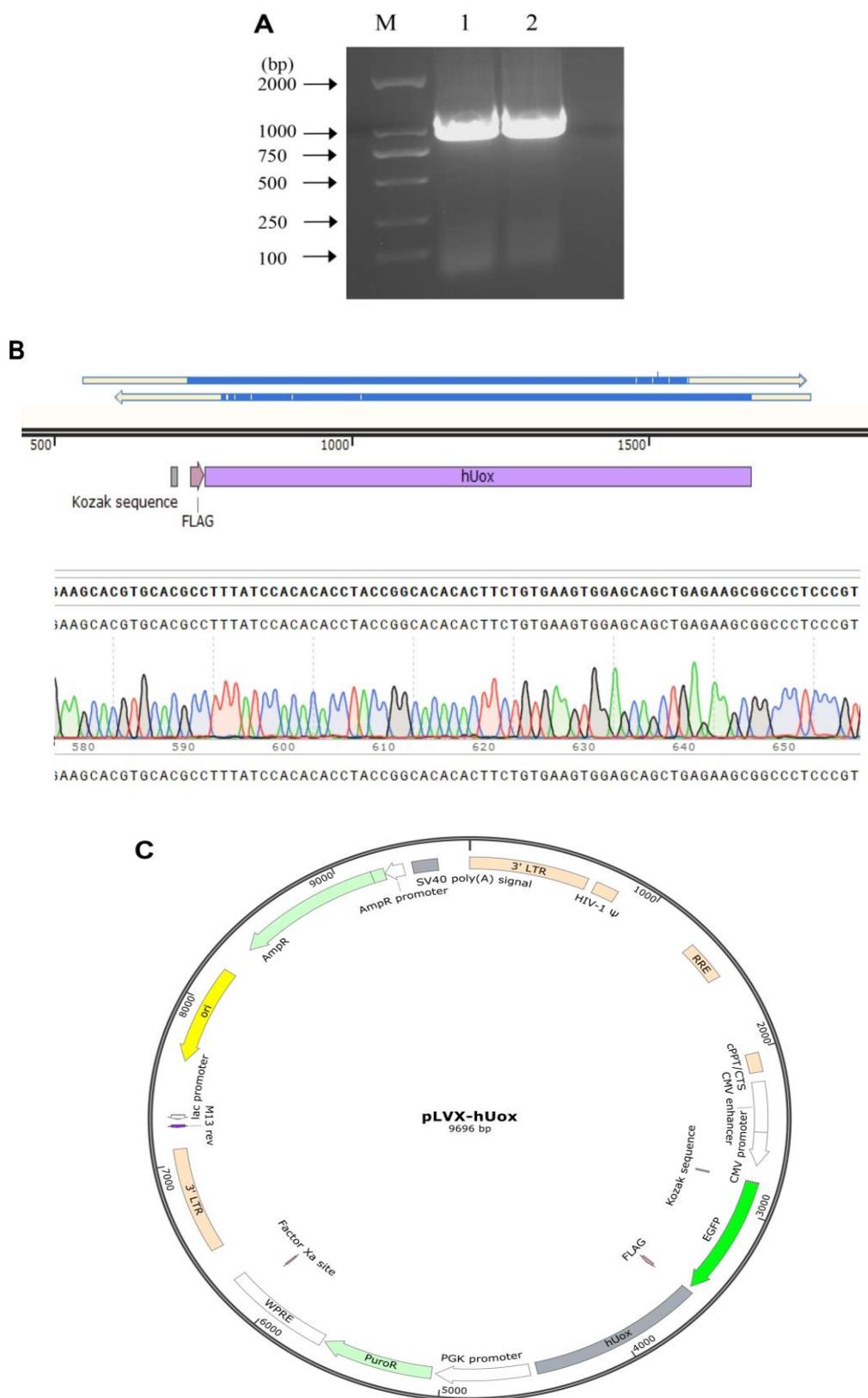


图 2.2 pLVX-hUox 慢病毒表达载体构建

图 2.2 A. pET-hUox PCR 扩增产物，M: Trans 2K Marker，1-2: PCR 扩增 hUox 基因片段；B. 测序结果和序列比对；C. pLVX-hUox 质粒图谱。

### 2.3.3 表达 Uox 基因的慢病毒的获得和滴度确认

通过将重组质粒转染 HEK293T 细胞成功获取三种慢病毒载体。其中包含 *mus Uox* 基因序列的慢病毒命名为 YOE-*mus Uox*, 包含 *hUox* 基因序列的慢病毒命名为 YOE-*hUox*, 以 pLVX-EGFP 为基础构建的慢病毒命名为 YOE-Ctrl。分别将三种慢病毒转染 HEK293T 细胞, 通过计数荧光细胞数量, 获得三种慢病毒滴度值。

各慢病毒滴度值经测定如下:

慢病毒名称	滴度值 (transducing units/mL)
YOE- <i>mus Uox</i>	$5 \times 10^8$
YOE- <i>hUox</i>	$4 \times 10^8$
YOE-Ctrl	$1 \times 10^8$

## 2.4 本章小结

本章以 *mus Uox* 和 *hUox* 作为目的基因, 对两种基因分别进行对鼠源和人源表达系统的密码子优化, 同时以 pLVX-EGFP 质粒为载体, 将目的基因成功构建到 pLVX-EGFP 载体上, 得到两个重组质粒 pLVX-*mus Uox* 和 pLVX-*hUox*。随后尝试在模式生物大肠杆菌感受态细胞 Trans5 $\alpha$  体内进行扩增, 并通过 QIAGEN Plasmid Kits 提取到高浓度质粒。以重组质粒 pLVX-*mus Uox*、pLVX-*hUox* 和 pLVX-EGFP 为基础构建慢病毒, 荧光计数测出三种慢病毒滴度, 符合后续实验要求。通过上述实验, 我们构建了以 *mus Uox* 基因和 *hUox* 基因的表达载体, 并成功转至慢病毒载体中, 为后续的实验奠定了基础。

## 2.5 实验讨论

本实验将 *mus Uox* 和 *hUox* 基因序列进行密码子优化, 以提升目的基因在底盘细胞内的稳定性, 提高蛋白质表达效率与产量。我们将 *mus Uox* 导入小鼠巨噬细胞 RAW264.7 内, 旨在构建表达 Uox 工程化巨噬细胞进行体内实验, 评价巨噬细胞在体内的降尿酸作用及安全性。*hUox* 作为通过突变获得的 Uox, 其在胞内的表达效果尚未明确, 因此, 我们将 *hUox* 基因序列导入人源巨噬细胞 THP-1 中, 检测目的基因在胞内的表达效果。进一步, 我们设计了携带 Uox 基因序列的慢病毒转染质粒 pLVX-*mus Uox* 与 pLVX-*hUox*, 质粒上携带 EGFP 报告基因, 目的在于: 通过报告基因能够对慢病毒的转染效率进行检测; 在细胞传代中监测工程巨噬细胞的遗传稳定性; EGFP 可作为流式富集筛选阳性细胞的标记, 便于后续实验的开展。巨噬细胞为免疫细胞, 脂质体转染、电穿孔转染等转染方式效率较低, 因而我们将慢病毒质粒 pLVX-EGFP、pLVX-*mus Uox* 和 pLVX-*hUox* 分别与

DNA-Lipofectamine 2000 复合物共转染于 HEK293T 细胞, 成功获得了包含 mus Uox 基因片段的慢病毒 YOE-mus Uox, 包含 hUox 基因片段的慢病毒 YOE-hUox, 以及对照质粒 pLVX-EGFP 构建的慢病毒 YOE-Ctrl。同时采用荧光计数检测不同慢病毒滴度, 以确定后续转染实验中慢病毒的加入量。

## 第三章 工程巨噬细胞的构建及表达验证

本章实验通过慢病毒转染构建了工程巨噬细胞 RAW264.7-mus Uox 和 THP-1-hUox，并且对所构建工程巨噬细胞是否能正常表达 Uox 及其生物学活性进行验证。通过 qPCR 和 Western blotting 实验，我们检测了工程巨噬细胞中 Uox 基因的表达情况。同时将工程巨噬细胞置于高尿酸环境，评估了其在细胞水平的降尿酸能力。实验结果表明，工程巨噬细胞能够正常表达 Uox 蛋白，并能在体外以时间依赖性的方式降低培养基溶液尿酸水平。这些结果为后续研究提供了重要依据，为工程巨噬细胞的体内研究奠定了基础。

### 3.1 实验材料

#### 3.1.1 质粒和细胞

(1) 质粒：空载质粒 pLVX-EGFP，上述实验已构建完成的 pLVX-mus Uox 和 pLVX-hUox。

(2) 细胞：本章主要细胞株详见表 3.1

细胞株：RAW264.7 和 THP-1 细胞，购自中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心，用于慢病毒载体转染和构建工程化巨噬细胞。

表 3.1 主要细胞株

细胞	中文全称	主要作用
RAW264.7	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞	底盘巨噬细胞
THP-1	人单核细胞白血病细胞	底盘巨噬细胞
RAW264.7-Ctrl	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞感染对照慢病毒载体	本章构建的工程巨噬细胞
RAW264.7-mus Uox	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞感染 mus Uox 过表达慢病毒载体	本章构建的工程巨噬细胞
THP-1-Ctrl	人单核细胞白血病细胞感染对照慢病毒载体	本章构建的工程巨噬细胞
THP-1- hUox	人单核细胞白血病细胞感染 hUox 过表达慢病毒载体	本章构建的工程巨噬细胞

## 3.1.2 主要试剂耗材

表 3.2 主要试剂耗材

试剂名称	货号	公司
预染蛋白 marker	MA0342	美仑生物
6 × Protein loading buffer	DL101	北京全式金生物
SurePAGE™蛋白预制胶（梯度 4%-12%）	M00653	金斯瑞生物
脱脂奶粉	D8340	北京索莱宝科技
尿酸	C17129	赛默飞世尔科技
Uricase antibody	sc-166214	圣克鲁斯生物技术
m-IgGλ BP-HRP	sc-166214 HRP	圣克鲁斯生物技术
FLAG-Tag rabbit polyclonal antibody	B1020	苏州博奥龙
HRP-山羊抗兔 IgG（H+L）	BF03008X	苏州博奥龙
增强型 ECL 化学发光液	BF06053	苏州博奥龙
TBST 速溶颗粒	T7209S	兰博利德生物
NC 膜	HATF00010	Millipore
eBlot L1 转膜试剂盒	L00728C	金斯瑞生物
BCA protein quantification	E112-02	诺唯赞生物
Tris-MOPS-SDS running buffer	M00138	金斯瑞生物
TRIzol 试剂	368903	Ambion
三氯甲烷（氯仿）	10006818	中国医药集团
异丙醇	80109296	中国医药集团
75%乙醇	20221216	飞谱瑞
尿酸检测试剂盒	70925	博科生物

## 3.1.3 培养基及主要溶液

本章中主要使用的培养基和主要溶液与第二章相同，见第二章 2.1.3。其他本章中用到的试剂如下：

（1）蛋白电泳缓冲液：取一份 Tris-MOPS-SDS running buffer（干粉），加入去离子水定容至 1 L，加热搅拌使干粉完全溶解。

（2）TBST（tris buffered saline with tween-20, TBST）缓冲液：取一份 TBST 速溶颗粒，加入去离子水定容至 1 L，加热搅拌使干粉完全溶解。

(3) 5%脱脂奶粉溶液: 称取 2 g 脱脂奶粉, 加入的 TBST 缓冲液定容至 40 mL, 加热搅拌使奶粉充分溶解, 放入试管架中静置, 使用时尽量吸取上层液体进行实验。

(4) 尿酸溶液 (2 mM): 称取尿酸标准品 0.336 g, 磷酸氢二钾 2 g, 氯化钠 9 g, 加入去离子水定容至 1 L, 121°C 高压灭菌 20 min, 灭菌后用全自动生化分析仪检测样品尿酸浓度是否达标。

(5) Uricase antibody 工作液: 与 TBST 溶液按照 1:4,000 比例进行配置, 即将 2  $\mu$ L 的 Uricase antibody 加入 8 mL 的 TBST 溶液中。

(6) FLAG-Tag rabbit polyclonal antibody 工作液: 与 TBST 溶液按照 1:4,000 比例进行配置, 即将 2  $\mu$ L 的 Flag-Tag rabbit polyclonal antibody 加入 8 mL 的 TBST 溶液中。

(7) m-IgG $\lambda$  BP-HRP 工作液: 与 TBST 溶液按照 1:5,000 比例稀释, 即将 2  $\mu$ L 的 m-IgG $\lambda$  BP-HRP 加入 10 mL 的 TBST 溶液中。

(8) HRP-山羊抗兔 IgG (H+L) 工作液: 与 TBST 溶液按照 1:5,000 比例稀释, 即将 2  $\mu$ L 的 HRP-山羊抗兔 IgG (H+L) 加入 10 mL 的 TBST 溶液中。

(9) RPMI 1640 完全培养基: 向 RPMI 500 mL 1640 培养基中加入 50 mL 胎牛血清、5 mL HEPES (终浓度为 10 mM)、5 mL 青/链霉素双抗 (双抗终浓度分别为 100 Units/mL 和 100  $\mu$ g/mL), 加入终浓度 5 mM 的  $\beta$ -巯基乙醇, 4°C 储存。

### 3.1.4 主要仪器

本章中使用的主要仪器与第二章相同, 见第二章 2.1.4。其他本章中用到的仪器如表 3.3:

表 3.3 主要仪器

试剂名称	型号	公司
电子天平	PD-10	Sartorius
流式细胞仪	BD FACSVers	BD
eStain® L1 蛋白染色	L00657C	金斯瑞生物
eBlot™ L1 快速湿转仪	L00686C	金斯瑞生物
脱色摇床	TS-100	其林贝尔仪器
蛋白电泳仪	PowerPacBasic	Bio-Rad
蛋白电泳槽	Mini-PROTEAN® Tetra	Bio-Rad
隔水式恒温培养箱	GHP-9160	上海一恒

## 3.2 实验方法

### 3.2.1 慢病毒感染巨噬细胞 RAW264.7

将上述实验所得的慢病毒 YOE-mus Uox 和 YOE-Ctrl 对 RAW264.7 进行转染。

#### (1) RAW264.7 细胞的病毒转染

实验步骤如下：

- a. 将 RAW264.7 细胞以  $2 \times 10^5$  cells/孔均匀接种在 6 孔板中，置于 37°C 细胞恒温培养箱中培养；
- b. 当细胞汇合率处于 30% - 50% 时，将细胞消化成细胞悬液并进行细胞计数，计算平均每个孔的细胞量约为  $6.9 \times 10^5$  cells/孔；
- c. 病毒用量的计算公式为： $V (\mu\text{L}) = 1,000 \times \text{MOI} \times N/T$ ，其中 N 为细胞个数，T 为病毒滴度 (TU/mL)。根据维真生物慢病毒转染细胞推荐，转染 RAW264.7 的 MOI 值一般为 50，计算可得需加入 YOE-mus Uox 70  $\mu\text{L}$ ，需加入 YOE-Ctrl 350  $\mu\text{L}$ ；
- d. 将病毒从 -80°C 冰箱取出置于冰上融化，用移液器轻柔吹打混匀，吸去原有 DMEM 细胞培养基，加入 1/2 体积的 DMEM 完全培养基，同时加入终浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  polybrene。吸取相应量 YOE-mus Uox 病毒原液加入两孔细胞中，吸取相应量 YOE-Ctrl 病毒液加入另外两孔细胞中，摇晃均匀后放入细胞培养箱内继续培养；
- e. 病毒转染 24 h 后，吸出含有慢病毒和 polybrene 的培养液，更换新鲜的 DMEM 完全培养基；
- f. 在病毒感染 48 h 后可通过荧光显微镜观察细胞荧光表达效果；
- g. YOE-mus Uox 慢病毒转染后细胞命名为 RAW264.7-mus Uox，YOE-Ctrl 慢病毒转染后细胞命名为 RAW264.7-Ctrl。

#### (2) RAW264.7 细胞的慢病毒转染效率检测

- a. 配置含 5% FBS 的 PBS 缓冲液；
- b. 除去 6 孔板的细胞培养基，用 PBS 重悬细胞，800 rpm 离心 5 min；
- c. 去除离心后 PBS 溶液，每孔加入 500  $\mu\text{L}$  5% FBS 的 PBS 缓冲液重悬细胞；
- d. 将细胞悬液加入 70  $\mu\text{m}$  孔径无菌细胞筛网，通过重力作用过滤细胞悬液，将所得滤液加入流式管中，未上样时流式管应放置于冰盒上；
- e. 用流式细胞仪检测 RAW264.7 细胞慢病毒转染效率，上样前将样品通过涡旋振荡器混匀。

### 3.2.2 慢病毒感染巨噬细胞 THP-1

将上述实验所得的慢病毒 YOE-hUox 和 YOE-Ctrl 对 THP-1 细胞进行转染。

#### (1) 实验步骤:

- a. 将 THP-1 细胞以  $5 \times 10^4$  cells/孔均匀接种在 6 孔板中, 置于 37°C 细胞恒温培养箱中培养;
- b. 当细胞汇合率处于 30%-50% 时, 对细胞进行细胞计数, 计算平均每个孔的细胞量约为  $4.6 \times 10^5$  cells/孔;
- c. 病毒用量的计算公式为:  $V(\mu\text{L}) = 1,000 \times \text{MOI} \times N/T$ 。根据维真生物慢病毒转染细胞推荐, 转染 THP-1 的 MOI 值一般为 20, 计算可得需加入 YOE-hUox 23  $\mu\text{L}$ , 需加入 YOE-Ctrl 92  $\mu\text{L}$ ;
- d. 将病毒从 -80°C 冰箱取出置于冰上融化, 用移液器轻柔吹打混匀;
- e. 将 THP-1 细胞离心, 更换新鲜的 1640 完全培养基, 加入终浓度为 5  $\mu\text{g/mL}$  polybrene, 吸取相应量的 YOE-hUox 病毒原液加入两孔细胞中, 吸取相应量 YOE-Ctrl 病毒液加入另外两孔细胞中, 摇晃均匀后放入细胞培养箱内继续培养;
- f. 病毒转染 24 h 后, 离心去除含有病毒和 polybrene 的培养液, 更换 1640 完全培养基;
- g. 在病毒感染 48 h 后可通过荧光显微镜观察荧光表达效果;
- h. YOE-hUox 慢病毒转染后细胞命名为 THP-1-hUox, YOE-Ctrl 慢病毒转染后细胞命名为 THP-1-Ctrl。

#### (2) RAW264.7 细胞的慢病毒转染效率检测

- a. 配置含 5% FBS 的 PBS 缓冲液;
- b. 将 6 孔板中细胞吹吸均匀, 800 rpm 离心 5 min;
- c. 去除细胞培养基, 用 PBS 重悬细胞, 800 rpm 离心 5 min;
- d. 去除离心后 PBS 溶液, 加入 500  $\mu\text{L}$  5% FBS 的 PBS 缓冲液重悬细胞;
- e. 将细胞悬液加入 70  $\mu\text{m}$  孔径无菌细胞筛网, 通过重力作用过滤细胞悬液, 将所得滤液加入流式管中, 未上样时流式管应放置于冰盒上;
- f. 用流式细胞仪检测 THP-1 细胞慢病毒转染效率, 上样前将样品通过涡旋振荡器混匀。

### 3.2.3 qPCR 检测 Uox 基因 mRNA 表达

#### (1) 巨噬细胞 RNA 的提取

本实验所用的 RAW264.7 细胞为鼠源巨噬细胞, 使用时需要排除细胞本身表

达 Uox 的干扰以及需要与转染后 mRNA 表达情况进行对比；THP-1 细胞为人源细胞，本身不表达 Uox，需要对转染后表达进行检测。因此需要提取工程巨噬细胞 mRNA 进行 qPCR 验证。具体步骤如下：

- a. 将 RAW264.7-Ctrl、RAW264.7-mus Uox、THP-1-Ctrl、THP-1-hUox 的细胞接种至细胞培养皿（6 cm）中，细胞汇合度达到 70%-80% 开始实验；
- b. 将培养皿中的细胞吹吸均匀，800 rpm 离心 5 min，去除培养基，加入 1 mL TRIzol 裂解细胞；
- c. 裂解细胞后将裂解混合物吸取至 1.5 mL EP 管中，涡旋振荡 10 s；
- d. 向 EP 管中加入 200  $\mu$ L 氯仿，轻柔振荡混匀后室温放置 3 min（氯仿为有机溶剂，应先吹吸均匀再进行使用，使有机相和无机相之间迅速分离。有机相中的酚能够和蛋白结合，从而使得蛋白和 RNA 分离，RNA 进入水相）；
- e. 12,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 15 min；
- f. 离心后可以将样品层分为三层，最下层为红色的苯酚—氯仿层，中间和顶部是水样层。其中的 RNA 主要存在于顶部水样层中。吸取上层水相至无菌无核酸酶的 EP 管中（吸取样品时切勿吸取中间界面）；
- g. 将等体积的异丙醇（约 500  $\mu$ L）加入样品，充分混合并振荡均匀后，室温静置 3 min；
- h. 12,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min，小心使用枪头吸走上层液体，切勿触碰底层 RNA 沉淀；
- i. 使用 1 mL 75% 乙醇（DEPC 水，现用现配）对 RNA 沉淀进行洗涤，温和地振荡离心管，使沉淀重新悬浮；
- j. 8,000 rpm 4 $^{\circ}$ C 离心 5 min，弃去乙醇后，将 RNA 沉淀室温干燥 10 min；
- k. 用 50  $\mu$ L 去离子水溶解 RNA 样品，55 $^{\circ}$ C 水浴 10 min，-20 $^{\circ}$ C 保存样品。

#### （2）小鼠肝脏 RNA 的提取

经查阅数据库可知，小鼠肝脏细胞高表达 Uox，因此我们从小鼠肝脏组织中提取 RNA 作为阳性对照。具体提取步骤如下：

- a. 将实验中昆明小鼠（Kunming mice, KM 小鼠）断颈处死，解剖取出小鼠肝脏；
- b. 取 100 mg 小鼠肝脏组织放入 1.5 mL EP 管中，液氮冻存；
- c. 待肝脏组织完全处于冷冻状态后，将组织放入研钵中研磨成粉末，将粉末收集至 1.5 mL EP 管中；
- d. 加入 1 mL TRIzol 裂解细胞，室温静置 5 min。

后续具体实验步骤与 RAW264.7 细胞提取 RNA 操作相同。

#### （3）qPCR 测定 RAW264.7-Ctrl、RAW264.7-mus Uox 及肝脏组织 Uox 表达，

根据 *Uox* 基因序列设计探针及引物，同时设计 GAPDH 序列引物作为内参。

mus *Uox* qPCR 引物序列如下：

引物名称	序列 (5'—3')
mus <i>Uox</i> -F	TCACTACCCTCCCTGAGGTG
mus <i>Uox</i> -R	CTTTGTCATAGGGCCCAGCA
mus <i>Uox</i> -probe	FAM-5'GGCGCTGTCCGGGACATTGT-BHQ2

mus GAPDH qPCR 引物序列如下：

引物名称	序列 (5'—3')
GAPDH-mus F	AACGGATTTGGCCGTATTGG
GAPDH-mus R	CATTCTCGGCCTTGACTGTG
GAPDH-mus probe	FAM-5'CGCCTGGTCACCAGGGCTGC-BHQ2

mus *Uox* qPCR 体系为：

	50 $\mu$ L 反应体系
2 $\times$ FastKing One Step Probe RT-qPCR Mix	25.00 $\mu$ L
25 $\times$ FastKing Enzyme Mix	2.00 $\mu$ L
mus <i>Uox</i> -F	1.25 $\mu$ L
mus <i>Uox</i> -R	1.25 $\mu$ L
mus <i>Uox</i> -probe	1.00 $\mu$ L
RNA	1.00 $\mu$ g
50 $\times$ ROX Reference Dye	1.00 $\mu$ L
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	To 50.00 $\mu$ L

mus GAPDH qPCR 体系为：

	50 $\mu$ L 反应体系
2 $\times$ FastKing One Step Probe RT-qPCR Mix	25.00 $\mu$ L
25 $\times$ FastKing Enzyme Mix	2.00 $\mu$ L
GAPDH-mus F	1.25 $\mu$ L
GAPDH-mus R	1.25 $\mu$ L
GAPDH-mus probe	1.00 $\mu$ L
RNA	1.00 $\mu$ g
50 $\times$ ROX Reference Dye	1.00 $\mu$ L
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	To 50.00 $\mu$ L

qPCR 参数为:

逆转录	50°C	10 min
预变性	95°C	3 min
扩增 (40 cycles)	95°C	15 s
	60°C	30 s

(4) qPCR 测定 THP-1 及 THP-1-hUox 尿酸氧化酶表达

hUox qPCR 引物序列如下:

hUox 引物名称	序列 (5'—3')
hUox-F	ATGAGCAAGATGGGCCTGAT
hUox-R	TCTGCTGCTCAGCTTTCTCT
hUox-probe	FAM-5'TCCAGTGGCAGCAGCACCTCT-BHQ2

hGAPDH qPCR 引物序列如下:

引物名称	序列 (5'—3')
hGAPDH-F	ACCCAGAAGACTGTGGATGG
hGAPDH-R	TCAGCTCAGGGATGACCTTG
hGAPDH-probe	FAM-5'CCCACAGCCTTGGCAGCGCC-BHQ2

hUox qPCR 体系为:

	50 μL 反应体系
2×FastKing One Step Probe RT-qPCR Mix	25.00 μL
25×FastKing Enzyme Mix	2.00 μL
hUox-F	1.25 μL
hUox-R	1.25 μL
hUox-probe	1.00 μL
RNA	1.00 μg
50×ROX Reference Dye	1.00 μL
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	To 50 μL

hGAPDH qPCR 体系为:

50 $\mu$ L 反应体系	
2 $\times$ FastKing One Step Probe RT-qPCR Mix	25.00 $\mu$ L
25 $\times$ FastKing Enzyme Mix	2.00 $\mu$ L
hGAPDH-F	1.25 $\mu$ L
hGAPDH-R	1.25 $\mu$ L
hGAPDH-probe	1.00 $\mu$ L
RNA	1.00 $\mu$ g
50 $\times$ ROX Reference Dye	1.00 $\mu$ L
RNase-Free ddH <sub>2</sub> O	To 50.00 $\mu$ L

qPCR 参数为:

逆转录	50 $^{\circ}$ C	10 min
预变性	95 $^{\circ}$ C	3 min
扩增 (40 cycles)	95 $^{\circ}$ C	15 s
	60 $^{\circ}$ C	30 s

### 3.2.4 Western blotting 检测 Uox 蛋白表达

#### (1) 细胞蛋白提取

将工程巨噬细胞 RAW264.7-Ctrl 和 RAW264.7-mus Uox 接种至细胞培养皿中, 待细胞汇合度达到 70%-80% 时开始裂解细胞提取蛋白进行 Western blotting 实验。提取步骤如下:

- 用 PBS 冲洗细胞三次, 第四次重悬细胞;
- 收集细胞悬浊液, 800 rpm 离心 10 min;
- 去除上清液, 加入 500  $\mu$ L RIPA 裂解液, 冰浴 30 min, 4 $^{\circ}$ C 12,000 rpm 离心 10 min;
- 离心后上清液即为蛋白溶液, 通过 BCA 法测定不同细胞蛋白含量, 所得样品-20 $^{\circ}$ C 保存。

(2) RAW264.7-Ctrl 和 RAW264.7-mus Uox 所提蛋白进行 Western blotting 实验, 具体步骤如下:

- 将 RAW264.7 (23.7  $\mu$ g/ $\mu$ L) 和 RAW264.7-mus Uox (28.5  $\mu$ g/ $\mu$ L) 蛋白量浓度统一, 加入 6 $\times$  Protein loading buffer, 水浴煮沸 5 min;
- 室温下 12,000 rpm 离心 2 min, 吹吸均匀后取 20  $\mu$ g 样品上清上样于 SurePAGE<sup>TM</sup> 蛋白预制胶 (4%-12%) 中进行凝胶电泳, 电泳参数为电压 140 V, 电泳 1 h;

- c. 电泳结束后取出预制胶于快速湿转仪中转膜，运行预设程序使蛋白转移至平衡后的 NC 膜上；
- d. 用 TBST 缓冲液冲洗 NC 膜，正面朝上放入 5 % 脱脂奶粉溶液中，脱色摇床室温振荡孵育 1 h；
- e. 用去离子水冲洗 NC 膜，随后用 TBST 缓冲液漂洗，5 min 换液一次，共换液 3 次；
- f. 除去 TBST 缓冲液，向 NC 膜中加入一抗工作液（Uricase antibody 工作液）对膜进行孵育，4°C 过夜；
- g. 用 TBST 缓冲液漂洗，5 min 换液一次，共换液 3 次
- h. 除去 TBST 缓冲液，向 NC 膜中加入二抗工作液（m-IgG $\lambda$  BP-HRP 工作液），脱色摇床室温振荡孵育 2 h；
- i. 用 TBST 缓冲液漂洗，5 min 换液一次，共换液 4 次；
- j. 分别取 500  $\mu$ L 增强型 ECL 化学发光液 I 和增强型 ECL 化学发光液 II 于 1.5 mL 离心管中混合均匀，于暗盒中均匀滴加至 NC 膜上，避光孵育 2 min；
- k. 将 NC 膜置于化学发光成像系统中显影观察并拍照保存。

### (3) THP-1-Ctrl 和 THP-1-hUox 细胞蛋白的提取和 Western blotting

- a. 将工程巨噬细胞 THP-1-Ctrl 和 THP-1-hUox 接种至细胞培养皿中，待细胞汇合度达到 70%-80% 时开始裂解细胞提取蛋白进行 Western blotting 实验。具体步骤与 RAW264.7 细胞操作相同。抗体方面：一抗工作液使用（FLAG-Tag rabbit polyclonal antibody 工作液）；二抗工作液使用（HRP-山羊抗兔 IgG（H+L）工作液）。

### 3.2.5 工程巨噬细胞体外降尿酸效果评价

构建好的工程巨噬细胞 RAW264.7-Ctrl、RAW264.7-mus Uox、THP-1-Ctrl 和 THP-1-hUox 扩增培养，800 rpm 离心 5 min，去除培养基，RAW264.7-Ctrl、RAW264.7-mus Uox 用 DMEM 完全培养基重悬细胞，THP-1-Ctrl 和 THP-1-hUox 用 1640 完全培养基重悬细胞，将细胞浓度统一调整至  $3 \times 10^5$  cells/mL，吹吸均匀后加入 6 孔板中，每种细胞接种 3 孔，每孔加入细胞悬液 3 mL，将 6 孔板放入 5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱培养 6 h。细胞状态稳定后，分别向各孔中各中加入等量尿酸溶液（2 mM），使细胞培养基尿酸终浓度达到 300  $\mu$ mol/L。每 12 h 对每孔细胞取样一次，每次取样 100  $\mu$ L，至培养 72 h。将样品 3,000 rpm 离心 5 min，吸取上清液加入全自动生化分析仪检测尿酸水平。

### 3.3 实验结果

#### 3.3.1 流式检测 EGFP 确定慢病毒对 RAW264.7 的感染效率

本实验中，为了将 *mus Uox* 基因序列整合到 RAW264.7 基因组上，采用慢病毒载体对 RAW264.7 转染，该慢病毒载体携带绿色荧光蛋白 EGFP 基因，可以采用流式细胞术检测转染效率并长期监测阳性细胞率。一般将 EGFP 阳性细胞认为表达外源 Uox。通过流式细胞仪对转染前后的细胞进行评价，发现 YOE-Ctrl 的转染效率约为 48.0%（图 3.1A, B），YOE-mus Uox 的转染效率约为 41.1%，二者效率接近（图 3.1C）。实验表明构建的慢病毒载体可以成功感染 RAW264.7 细胞，且感染效率可观，可用于后续实验。

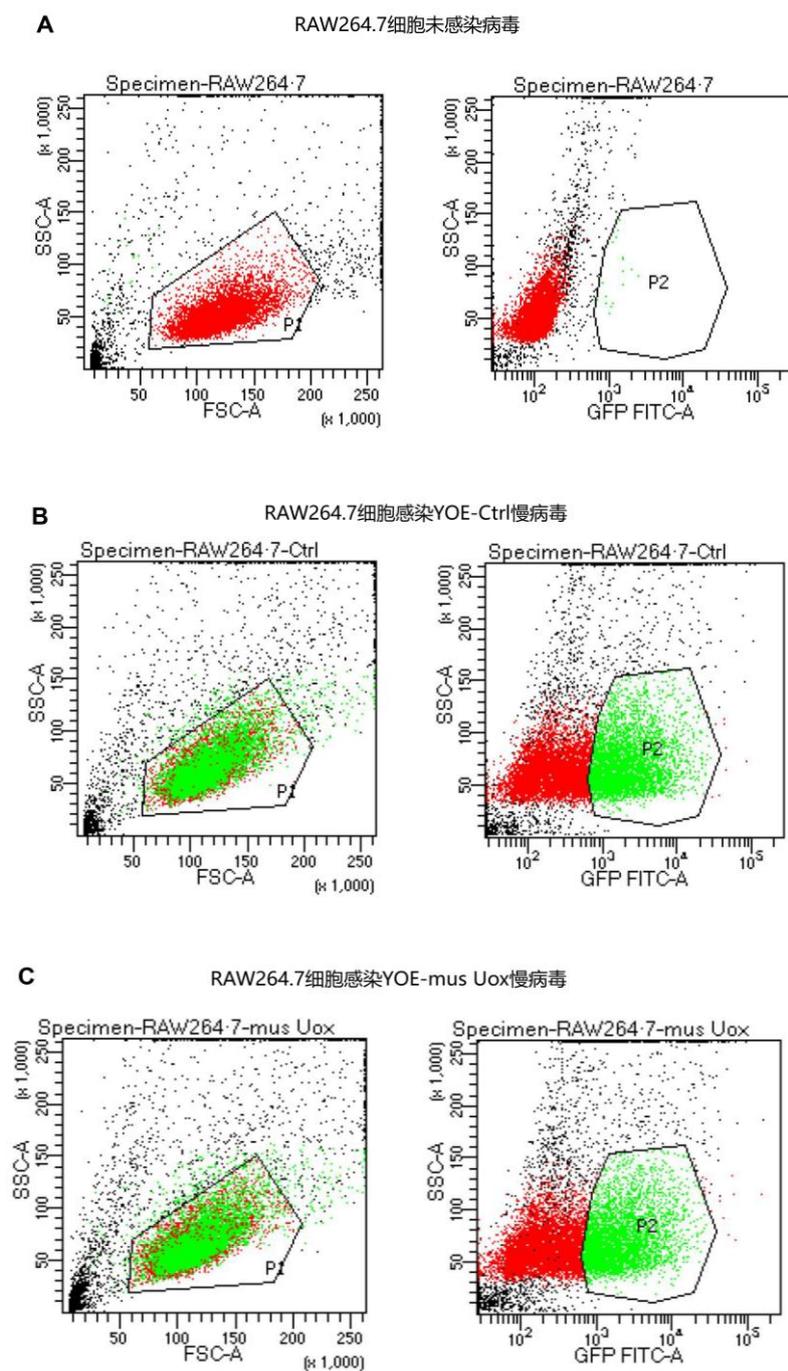


图 3.1 RAW264.7 细胞的慢病毒感染

图 3.1 A. 正常状态下 RAW264.7 细胞；B. 转染慢病毒 YOE-Ctrl 的 RAW264.7 细胞；C. 转染慢病毒 YOE-mus Uox 的 RAW264.7 细胞，P1 框为细胞圈门；红色点指示 EGFP 阴性细胞；绿色点指示 EGFP 阳性细胞。

### 3.3.2 流式检测 EGFP 确定慢病毒对 THP-1 的感染效率

与 RAW264.7 细胞相似，利用构建好的慢病毒对 THP-1 细胞进行感染。通过流式细胞仪对转染前后的细胞进行评价，发现 YOE-Ctrl 的转染效率为 50.9%（图 3.2A, B），YOE-hUox 的转染效率为 52.8%（图 3.2.C）。实验表明构建的慢病毒载体可以成功感染 THP-1 细胞，感染效率可观，可用于后续实验。

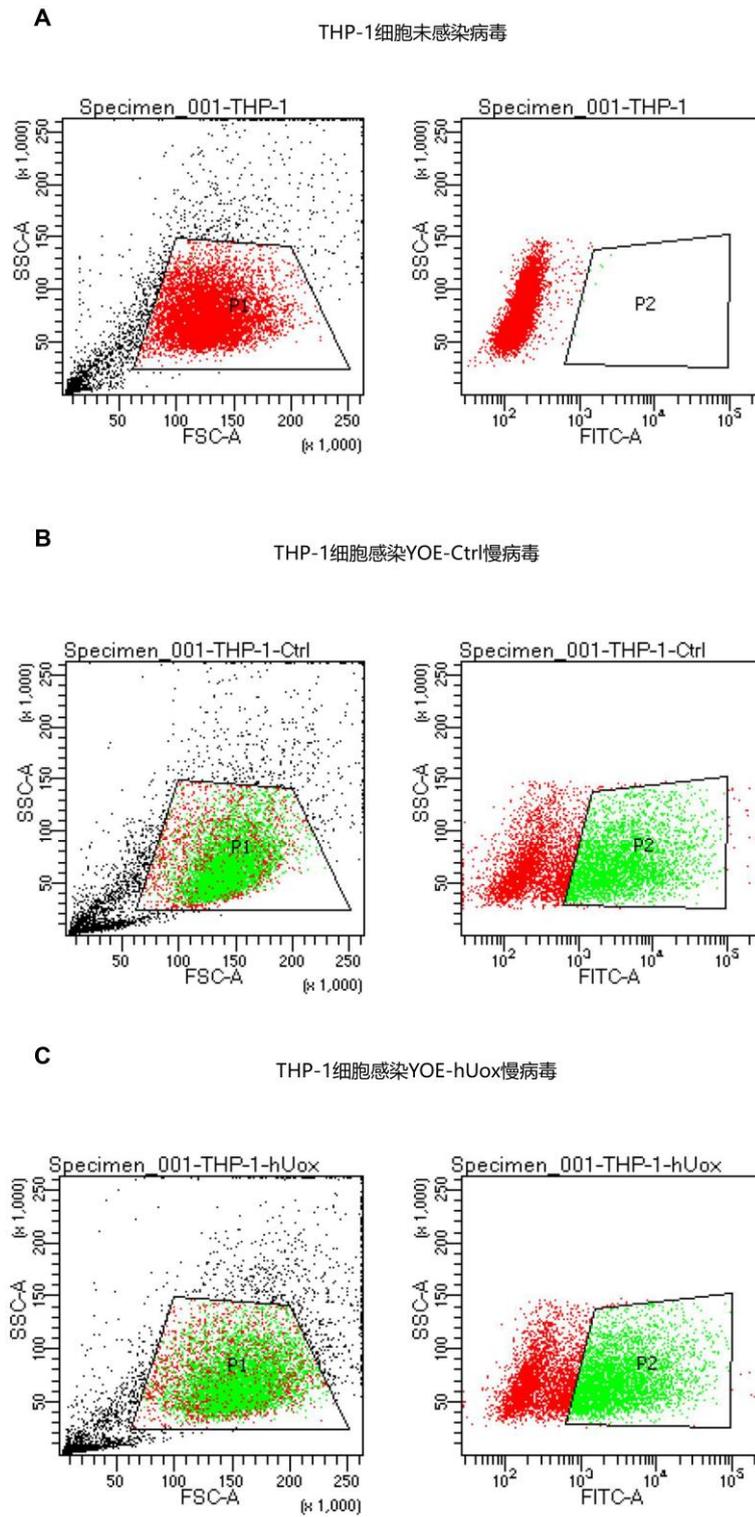


图 3.2 THP-1 细胞的慢病毒感染

图 3.2 A. 未感染病毒的 THP-1 细胞；B. 慢病毒 YOE-Ctrl 转染 THP-1 细胞；C. 慢病毒 YOE-hUox 转染 THP-1 细胞。P1 框为细胞圈门；红色点指示 EGFP 阴性细胞；绿色点指示 EGFP 阳性细胞。

### 3.3.3 巨噬细胞表达 *mus Uox* 和 *hUox* mRNA

我们构建过表达外源 *Uox* 的工程巨噬细胞，需要检测巨噬细胞 *Uox* 的本底表达水平。因为如果巨噬细胞本身表达较高丰度的 *Uox*，则过表达外源 *Uox* 的意义有限。我们首先通过基因表达网站对小鼠各组织或细胞类型表达 *Uox* 情况进行查询。结果表明，*Uox* 主要集中在肝脏细胞表达，除肝脏定植巨噬细胞外其余巨噬细胞均不表达 *Uox* 基因（图 3.3）。

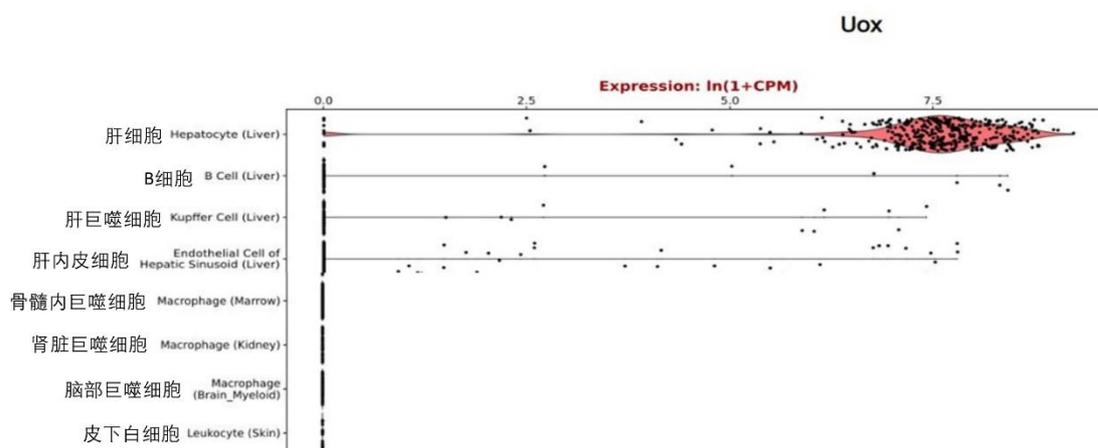


图 3.3 *Uox* 在小鼠各组织表达情况

进一步，通过 qPCR 实验结果，我们可以看到 RAW264.7 细胞本身不表达 *Uox*（图 3.4A），这与 *Tabula Muris* 数据库中的查询结果一致（图 3.3）。这意味着 RAW264.7 细胞作为鼠源巨噬细胞，在没有外源基因编辑的情况下，内源不表达 *Uox*。转染对照慢病毒的 RAW264.7 细胞 (RAW264.7-Ctrl) 不表达 *Uox*，而转染表达 *mus Uox* 慢病毒的巨噬细胞，其 *Uox* mRNA 表达水平显著上调，与肝脏细胞表达 *Uox* 水平接近（图 3.4A）。这一结果也排除了 RAW264.7 细胞本身可能对 *Uox* 表达的影响，从而确保了效应来源于导入基因。THP-1 细胞属于人源巨噬细胞，其 *Uox* 基因天然失活，不能正常表达 *Uox*，qPCR 结果得到了证实（图 3.4B）。THP-1-h*Uox* 细胞中 *hUox* 基因表达显著上调（图 3.4B），表明 *hUox* 基因序列整合到了 THP-1 细胞中，能够正常转录和表达。

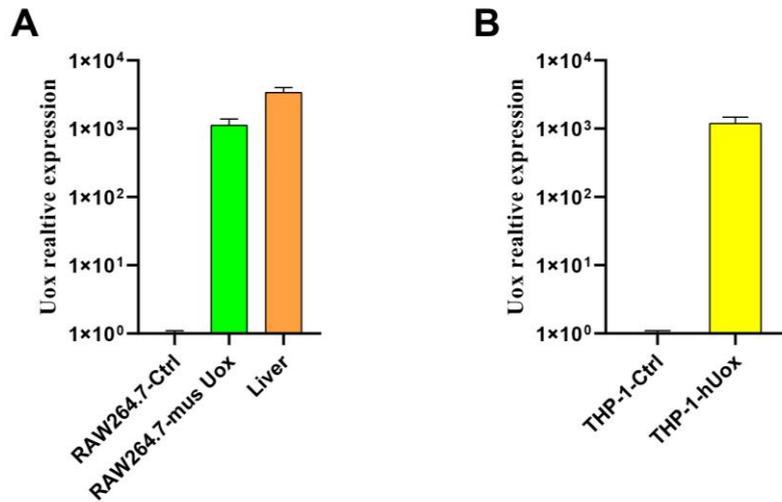


图 3.4 工程巨噬细胞 mRNA 表达

图 3.4 A. RAW264.7 工程细胞表达 mus Uox mRNA; B. THP-1 工程细胞表达 hUox mRNA。

### 3.3.4 巨噬细胞表达 mus Uox 和 hUox 蛋白

进一步，我们利用 Western blotting 对工程巨噬细胞表达的外源 Uox 蛋白进行了检测。实验结果显示，RAW264.7-mus Uox 和 THP-1-hUox 工程巨噬细胞分别检测到特异性条带（图 3.5A, B），这表明 Uox 蛋白产物在工程巨噬细胞中得到了表达。

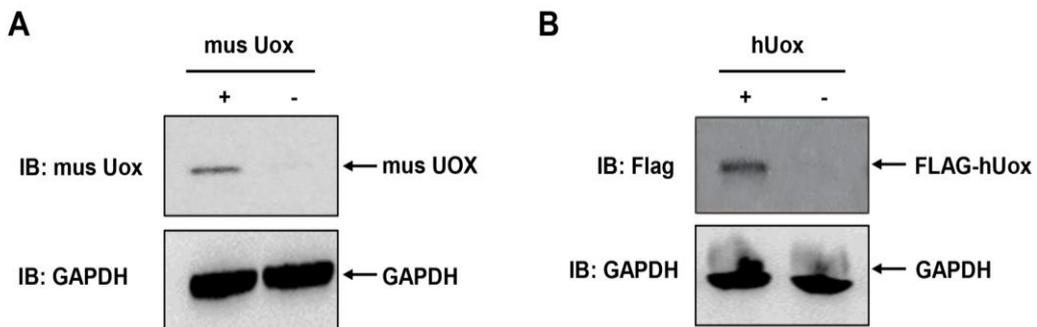


图 3.5 RAW264.7 和 THP-1 细胞表达 Uox 蛋白

图 3.5 A. mus Uox 蛋白 Western blotting 检测，(+)RAW264.7-mus Uox 细胞；(-)RAW264.7-Ctrl 细胞；B. hUox 蛋白 Western blotting 检测，(+) THP-1-hUox 细胞，(-) THP-1-Ctrl 细胞。

### 3.3.5 工程巨噬细胞体外降低溶液尿酸水平

上述实验结果证明，工程巨噬细胞 RAW264.7-mus Uox 和 THP-1-hUox 能够正常表达 Uox 蛋白。本实验利用尿酸和培养基配制了含尿酸水平较高的培养基溶液，将工程巨噬细胞在培养基溶液中培养，评价其在高尿酸溶液中的降尿酸活性。实

验数据显示，工程巨噬细胞在高尿酸环境中显示出良好的降尿酸活性。RAW264.7-mus Uox 能在 72 h 内将细胞培养基尿酸浓度从  $(300 \pm 1) \mu\text{mol/L}$  降至约  $(100 \pm 5) \mu\text{mol/L}$ ，下降趋势在 36 h 后更加明显（图 3.6A）。THP-1-hUox 在 72 h 内将尿酸浓度降至约  $(170 \pm 8) \mu\text{mol/L}$ （图 3.6B），效果不及 RAW264.7 工程细胞显著。上述结果表明两种工程巨噬细胞均具有良好的降尿酸活性，其降尿酸呈现时间依赖性的动力学特征。而 RAW264.7-Ctrl 和 THP-1-Ctrl 细胞培养基中的尿酸水平无变化，进一步证实了 RAW264.7-mus Uox 和 THP-1-hUox 的降尿酸活性是由外源 Uox 的表达和活性所致。

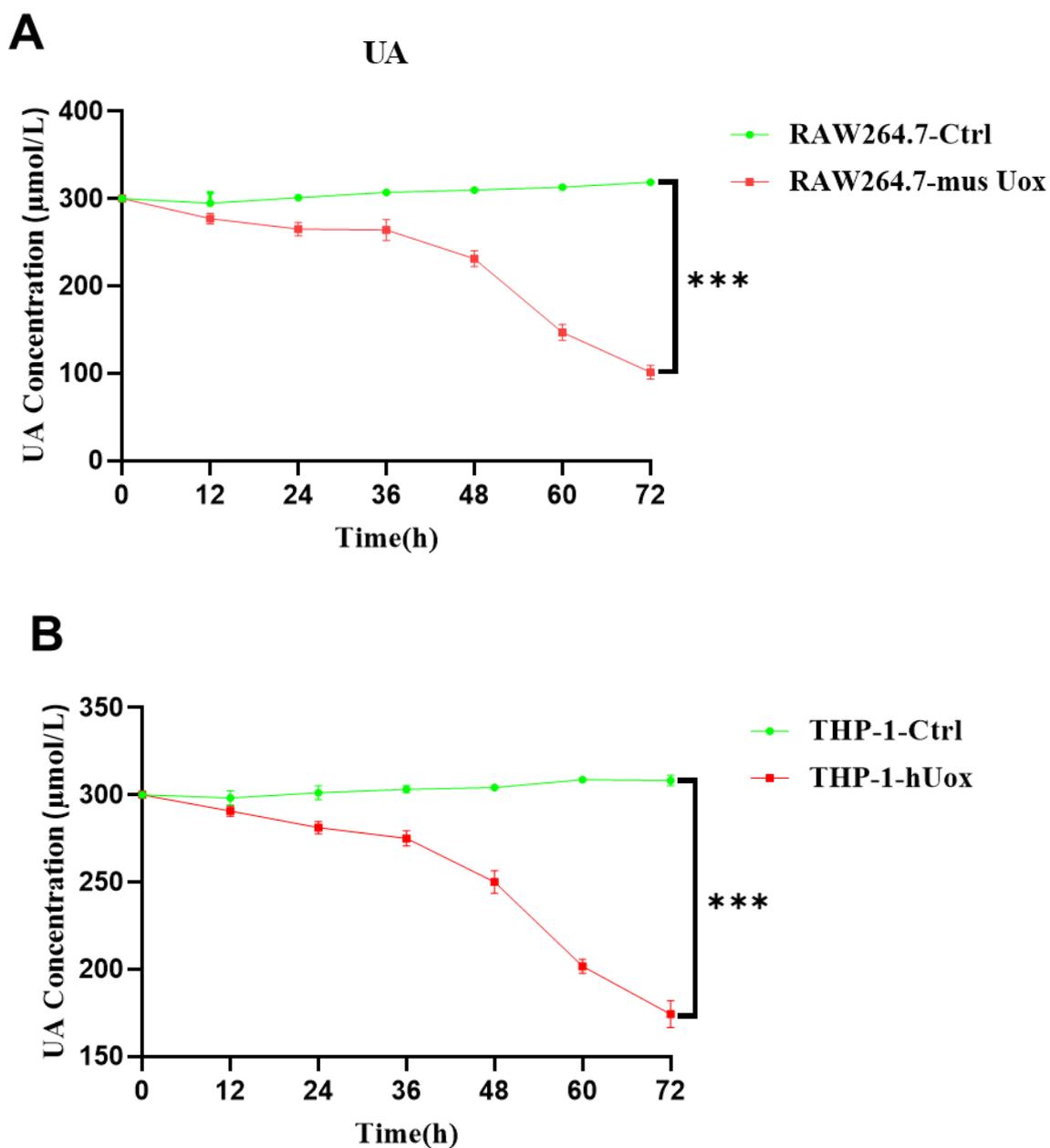


图 3.6 工程巨噬细胞体外降尿酸效果

图 3.6 A. RAW264.7-Ctrl 和 RAW264.7-mus Uox 在  $300 \mu\text{mol/L}$  尿酸的 DMEM 完全培养基中降尿酸效果; B. THP-1 Ctrl 和 THP-1 hUox 在  $300 \mu\text{mol/L}$  尿酸的 1640 完全培养基中降尿酸效果; \*\*\*:  $P < 0.001$ , RAW264.7-Ctrl 组与 RAW264.7-mus Uox 组对比, THP-1-Ctrl 组与 THP-1 hUox 与组对比,  $n=3$ 。

### 3.4 本章小结

本章实验通过慢病毒转染成功获得了 RAW264.7-Ctrl、RAW264.7-mus Uox、THP-1-Ctrl、THP-1-hUox 四种工程巨噬细胞。其中，工程巨噬细胞 RAW264.7-mus Uox 和 THP-1-hUox 分别携带了 *mus Uox* 和 *hUox* 基因，用于进一步探究这两种基因在巨噬细胞中的表达情况及其生物活性。

首先，通过 qPCR 实验验证了 RAW264.7 本身不表达 Uox；THP-1 细胞作为人源细胞，在进化过程中 *Uox* 基因失活，排除了底盘细胞对实验结果的干扰。qPCR 结果显示，工程化巨噬细胞 RAW264.7-mus Uox 和 THP-1-hUox 表达 Uox 基因水平显著增高。进一步进行 Western blotting 实验，结果显示，转入 Uox 基因序列的工程巨噬细胞出现特异性目的条带，而 THP-1-Ctrl 和 RAW264.7-Ctrl 未出现目的条带。最后，对工程巨噬细胞所表达的 Uox 生物活性进行检测，发现 RAW264.7-mus Uox 和 THP-1-hUox 均显示出良好的降尿酸活性，并且降尿酸效果具有时间依赖性。RAW264.7-mus Uox 在 72 h 内可以将尿酸溶液浓度从  $(300 \pm 1) \mu\text{mol/L}$  降至约  $(100 \pm 5) \mu\text{mol/L}$ ，尿酸平均水平降低约 66.7%，而 THP-1-hUox 在同一时间将尿酸浓度降至约  $(170 \pm 8) \mu\text{mol/L}$ ，尿酸平均水平降低约 43.3%。

综上所述，本章实验成功构建了携带 *mus Uox* 和 *hUox* 基因的工程巨噬细胞，并通过一系列实验验证了这些细胞能够正常表达 Uox 并具有良好的生物活性，为后续进一步进行动物体内实验奠定了基础。

### 3.5 实验讨论

本实验利用慢病毒 YOE-mus Uox、YOE-hUox 和 YOE-Ctrl 成功转染巨噬细胞，获得四种工程巨噬细胞 RAW264.7-Ctrl、RAW264.7-mus Uox、THP-1-Ctrl 和 THP-1-hUox。qPCR 和 Western blotting 和细胞水平降尿酸实验结果表明，工程巨噬细胞 RAW264.7-mus Uox 和 THP-1-hUox 正常表达 Uox，而 RAW264.7-Ctrl 和 THP-1-Ctrl 不表达 Uox。说明目的基因 *Uox* 成功转染至巨噬细胞基因组。体外降尿酸实验表明工程巨噬细胞表达的 Uox 蛋白具有降尿酸活性，RAW264.7-mus Uox 在 72 h 内将尿酸溶液浓度降低约 66.7%；而 THP-1-hUox 在同一时间将尿酸浓度降低约 43.3%。尽管两种工程巨噬细胞都展示了降尿酸的能力，但 RAW264.7-mus Uox 的降尿酸效果优于 THP-1-hUox。其原因可能有两方面，一方面，*mus Uox* 本身为小鼠体内活跃基因，确保其具有良好降尿酸活性；而人源 *Uox* 基因为由人的失活基因“复活”，其活性并不清楚。

## 第四章 工程巨噬细胞体内降尿酸评价

本章实验中，我们对工程巨噬细胞的体内降尿酸功效和安全性进行了评价。首先以 KM 小鼠为实验对象，采用酵母膏灌胃的方法进行造模。已有研究显示，小鼠经酵母膏灌胃后血尿酸浓度达到 200  $\mu\text{mol/L}$  即可认为高尿酸血症造模成功。在高尿酸血症模型基础上，采用尾静脉注射方式将工程巨噬细胞 RAW264.7-Ctrl 和 RAW264.7-mus Uox 输注至小鼠体内，观察对血尿酸升高的抑制作用。由于既往 Uox 类药物容易刺激机体产生免疫排斥反应，因此对输入工程巨噬细胞小鼠机体主要炎症细胞因子进行检测。最后我们对工程巨噬细胞的安全性进行评价，高尿酸血症一线药物别嘌醇可以引起肾脏和肝脏损伤，我们将别嘌醇、实验室前期构建的表达外源 Uox 的工程乳酸菌 NZ9000 和工程巨噬细胞同时进行动物实验，通过检测血清肝肾生化指标和组织病理切片反映各组治疗方法的安全性。

### 4.1 实验材料

#### 4.1.1 细胞、菌株和实验动物

(1) 细胞株：本章主要细胞株详见表 4.1

表 4.1 主要细胞株

细胞	中文全称	主要作用
RAW264.7-Ctrl	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞表 达对照慢病毒载体	本实验构建，用于降 尿酸实验对照研究
RAW264.7- mus Uox	小鼠单核巨噬细胞白血病细胞表 达携带 mus Uox 的慢病毒载体	本实验构建，用于降 尿酸实验研究

(2) 菌株：表达 Uox 的工程乳酸乳球菌 NZ9000，由本实验室构建并保存。

(3) 实验动物：18-20 g 雄性 KM 鼠，购自北京维通利华实验动物技术有限公司。本研究动物实验经军事医学研究院实验动物管理与使用委员会批准，批准号为 IACUC-DWZX-2023-007，实验动物来源符合法律规范，实验操作严格保障动物福利。

## 4.1.2 主要试剂耗材

本章中主要使用的试剂与第三章相同，见第三章 3.1.2。其他本章中用到的试剂见下表 4.2:

表 4.2 主要试剂耗材

试剂名称	货号	公司
别嘌呤醇	H31020334	上海信谊万象药业
羧甲基纤维素钠	C8621	北京索莱宝科技
酵母膏	R095346	上海易恩化学技术
M17 肉汤（不含糖）	PM0710-LAC-25 0G	北京酷来搏科技
尿素检测试剂盒	70124	山东博科生物产业
肌酐检测试剂盒	70127	山东博科生物产业
天门冬氨酸氨基转移酶检测试剂盒	701138	山东博科生物产业
丙氨酸氨基转移酶检测试剂盒	70111	山东博科生物产业
总胆红素检测试剂盒	70114	山东博科生物产业
直接胆红素检测试剂盒	70115	山东博科生物产业
生化复合质控品	92065	山东博科生物产业
生化复合校准品	91072	山东博科生物产业
小鼠 IL-1 $\beta$ 酶联免疫吸附试剂盒	SEKM-0002-96T	北京索莱宝科技
小鼠 Mouse IL-10 预包被 ELISA Kit	1211002	达科为生物技术
小鼠 Mouse IL-1 $\beta$ 预包被 ELISA Kit	1210122	达科为生物技术
小鼠 Mouse IL-6 预包被 ELISA Kit	1210602	达科为生物技术
尿酸检测试剂盒	MAK077-1KT	SIGMA
无水葡萄糖	63005518	中国医药集团
$\alpha$ -乳糖	63008060	中国医药集团
氯霉素	C8050	北京索莱宝科技
甲醛水溶液	10010018	中国医药集团
切片石蜡	YA0015-500g	北京索莱宝科技
一次性针头式过滤器（0.2 $\mu$ m）	4612	Pall Corporation

### 4.1.3 培养基及主要溶液

(1) 酵母膏混悬液配制：0.5%羧甲基纤维素钠做溶剂，制备浓度为 1.5 g/mL 的混悬液，121℃，20 min 高压灭菌备用<sup>[88]</sup>。

(2) M17 液体培养基：M17 液体培养基：称量 8.46 g 的 M17 肉汤干粉，溶于 190 mL 的去离子水中，定容至 200 mL，121℃高压蒸汽灭菌 20 min。

(3) Nisin 诱导剂母液 (10 mg/mL)：称取 0.1 g 的 Nisin，溶于 10 mL 的 0.05% 醋酸溶液中。

(4) GM17 液体培养基：灭菌后的 200 mL 的 M17 液体培养基中加入 2 mL 的 50% 葡萄糖溶液和 5 mL 的 20% 乳糖溶液。

(5) M17 固体培养基：称量 8.46 g 的 M17 肉汤干粉，琼脂 3.0 g，溶于 190 mL 的去离子水中，定容至 200 mL，121℃高压蒸汽灭菌 20 min，温度降至室温时加入 2 mL 的 50% 葡萄糖溶液和 5 mL 的 20% 乳糖溶液，温度降至室温后加入 10 μg/mL 氯霉素，振荡均匀。在培养基凝固之前倒入无菌平皿，待其凝固、晾干后存放于 4℃ 冰箱待用。

(6) 氯霉素母液 (10 mg/mL)：称取 0.1 g 氯霉素，溶于 10 mL 无水乙醇中，-20℃保存备用。

### 4.1.4 主要仪器

本章中主要使用的仪器与第三章相同，见第三章 3.1.4。其他本章中用到的仪器见表 4.3：

表 4.3 主要仪器

试剂名称	型号	公司
多模式酶标仪	EnSpire	PerkinElmer
菌落计数器	Scan 300	INTERSCIENCE
全自动螺旋接种仪	easySpiral Dilute	INTERSCIENCE

## 4.2 实验方法

### 4.2.1 高尿酸血症小鼠模型的建立

(1) 选择 10 只 18-20 g 的雄性 KM 鼠为实验对象，随机分为两组，模型组 (HUA) 进行酵母膏混悬液灌胃造模实验，剂量参考相关文献设定为 20 g/kg/d，空白对照组灌胃等体积 0.5%羧甲基纤维素钠溶液<sup>[89-91]</sup>。

(2) 分别在第 0 天、第 7 天、第 14 天剪尾采血并测量血尿酸值。

## 4.2.2 工程巨噬细胞干预高尿酸血症动物模型的评价

### (1) 实验分组和材料制备

实验选择 18-20 g 的雄性 KM 鼠 35 只，随机分为 7 组，包括空白对照组、模型组 (HUA)、阳性对照组 (HUA+别嘌醇)、阴性对照组 (HUA+PBS)、工程巨噬细胞 RAW264.7-Ctrl 组 (HUA+RAW264.7-Ctrl)、工程巨噬细胞 RAW264.7-mus Uox 组 (HUA+RAW264.7-mus Uox) 以及工程乳酸乳球菌 NZ9000 组 (HUA+NZ9000-mus Uox)。阳性对照组别嘌醇给药剂量为 25 mg/kg/d，酵母膏混悬液的使用剂量为 20 g/kg/d，除空白对照组之外，其他六组都灌胃给予酵母膏造模。实验前通过流式细胞分选仪对 RAW264.7-Ctrl 与 RAW264.7-mus Uox 进行分选，富集阳性细胞后用 PBS 重悬，制备成密度为  $2 \times 10^7$  cells/mL 的细胞悬液。工程乳酸菌 NZ9000 经过培养和 Nisin 诱导后，制备成密度为  $2 \times 10^{11}$  cfu/mL 的细菌悬液<sup>[92]</sup>。

### (2) 实验方案

在实验过程中，所有小鼠在实验前一天进行尾静脉取血，保留样品进行初始血尿酸值检测。除空白对照组外，每天给予各组小鼠酵母膏混悬液一次，连续 14 天，空白对照组给予等量 PBS 溶液灌胃。酵母膏灌胃各组处理如下：

- a. 工程巨噬细胞 RAW264.7-Ctrl 和 RAW264.7-mus Uox 组，在实验第 1 天和第 7 天，分别尾静脉注射 100  $\mu$ L RAW264.7-Ctrl 细胞悬液 ( $2 \times 10^7$  cells/mL) 和 100  $\mu$ L 的 RAW264.7-mus Uox 细胞悬液 ( $2 \times 10^7$  cells/mL)。阴性对照组尾静脉注射 100  $\mu$ L PBS 溶液；
- b. 工程菌组，每天给予该组小鼠 100  $\mu$ L NZ9000 工程菌悬液，灌胃给药，连续 14 天；
- c. 别嘌醇组，每天给予该组小鼠 100  $\mu$ L 别嘌醇溶液，灌胃给药，连续 14 天。具体分组见表 4.4。

表 4.4 实验动物分组与灌胃方案

分组	实验方案
空白对照	无
HUA	20 g/kg/d 的酵母膏悬液连续灌胃 14 天
HUA+PBS	实验第 1 天和第 7 天尾静脉注射 100 $\mu$ L 的 PBS 溶液
HUA+别嘌醇	20 g/kg/d 的酵母膏悬液联合 20 mg/kg/d 的别嘌醇连续灌胃 14 d
HUA+RAW264.7-Ctrl	实验第 1 天和第 7 天尾静脉注射 100 $\mu$ L RAW264.7-Ctrl ( $2 \times 10^6$ cells)
HUA+RAW264.7-mus Uox	实验第 1 天和第 7 天尾静脉注射 100 $\mu$ L RAW264.7-mus Uox ( $2 \times 10^6$ cells)
HUA+NZ9000-mus Uox	工程乳酸乳球菌 NZ9000 ( $2 \times 10^{10}$ cfu)

### (3) 实验样品收集

在实验第 0 天, 第 7 天, 第 14 天对每只小鼠剪尾取血, 获得血样 4°C 静置 15 min, 3,000 rpm 离心 10 min, 所获血清-80°C 保存。

## 4.2.3 工程乳酸菌 NZ9000 灌胃溶液的制备

### (1) 工程菌乳酸菌 NZ9000 的生长曲线测定

细菌在对数期生长速率远远大于死亡速率, 因此我们尝试对工程乳酸菌 NZ9000-mus Uox 的生长曲线进行测定, 在对数生长后期收集工程菌进行实验。具体实验步骤如下:

- 取 1 mL 工程乳酸菌 NZ9000-mus Uox 冻存菌 12,000 rpm 离心 1 min, 去除上清液;
- 用 GM17 液体培养基重悬乳菌体沉淀, 并将重悬菌液加入 10 mL GM17 含氯霉素 (10  $\mu$ g/mL) 抗性的液体培养基, 30°C 静置培养;
- 取样时将菌液吹吸均匀, 每次取样 1 mL, 取 500  $\mu$ L 菌液用紫外分光光度计测量 OD<sub>600</sub>;
- 另取 500  $\mu$ L 菌液用 GM17 培养基进行梯度稀释, 将稀释后的菌液取 100  $\mu$ L 涂布在氯霉素 (10  $\mu$ g/mL) 抗性的 GM17 固体平板上 30°C 培养箱静置培养;
- 培养 30 h 后, 用菌落计数器对 GM17 板上的菌落进行计数;
- 浓度最低菌液涂板的菌落数为 N, N 乘以相应的稀释倍数即为该 OD<sub>600</sub> 下乳酸活菌的数量。

## (2) 工程乳酸菌 NZ9000 实验菌液的制备

- a. 按照体积分数 3% 将工程乳酸菌 NZ9000 接种于 50 mL GM17 含氯霉素(10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 抗性的液体培养基中, 放入 30°C 恒温培养箱中静置培养;
- b. 培养 6 h 后加入终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 Nisin 诱导剂诱导 4 h;
- c. 诱导完成后收集 10 mL 菌液于离心管中, 4°C 8,000  $\times g$  条件下离心 10 min, 尽量去除上清;
- d. 用 1 mL 无菌水重悬菌体沉淀, 所得菌液动物实验备用, 实验菌液需现配现用。

### 4.2.4 小鼠肝肾功能生化指标检测

选择谷丙转氨酶 (alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶 (aspartate transaminase, AST)、总胆红素 (total bilirubin, TBIL)、直接胆红素 (direct bilirubin, DBIL)、肌酐 (creatinine, Crea)、尿素 (Urea) 作为肝功能和肾功能生化检测指标, 这些指标在临床上常用于肝脏和肾脏疾病的诊断, 能够特异且准确的反映肝肾功能状态。实验第 14 天对小鼠进行剪尾取血, 离心后获取血清, 用全自动生化分析仪检测选定生化指标。

### 4.2.5 小鼠肝脏和肾脏组织切片

将实验中 KM 小鼠断颈处死, 解剖取出小鼠肝脏和肾脏, 放入 4% 多聚甲醛中浸泡 24 h。待组织固定充分后进行石蜡包埋, 并以 5  $\mu\text{m}$  的厚度切片。切片组织用苏木精和伊红 (hematoxylin and eosin staining, H&E) 进行染色, 并在 37°C 下孵育 24 h。用 Panoramic DESK 对切片进行扫描和成像, 对组织发生的病变程度进行评估。

### 4.2.6 小鼠血清炎性细胞因子检测

使用 ELISA 试剂盒对第 14 天血清样本中的细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10 进行检测, 测定其在各组小鼠血清中的水平。

#### (1) 实验前试剂准备:

- a. 提前 20 min 将 Washing buffer (50  $\times$ ) 和即用溶液从试剂盒中取出, 以平衡至室温;
- b. 将标准品冻干粉溶解至说明书规定浓度, 静置 5 min, 再用 Dilution buffer R (1 $\times$ ) 稀释到推荐检测浓度。标准品溶解后混匀, 进行倍比稀释, 标准品浓度梯度为: 1000  $\text{pg}/\text{mL}$ 、500  $\text{pg}/\text{mL}$ 、250  $\text{pg}/\text{mL}$ 、125  $\text{pg}/\text{mL}$ 、62.5  $\text{pg}/\text{mL}$ 、31.3  $\text{pg}/\text{mL}$ 、15.6  $\text{pg}/\text{mL}$ ;

- c. Biotinylated antibody 用 Dilution buffer R (1×) 以按 1: 100 稀释, 混匀制成 antibody 工作液;
- d. Streptavidin-HRP 用 Dilution buffer R (1×) 以按 1: 100 稀释, 混匀制成 HRP 工作液。

(2) ELISA 实验操作:

使用前, 将所有试剂充分混匀, 去除泡沫, 根据实验孔数量, 确定所需的板条数目, 样品 (含标准品) 和空白设置复孔。

- a. 加样: 按 100  $\mu\text{L}$ /孔加入稀释后的标准品至标准品孔, 按 100  $\mu\text{L}$ /孔加入样品至样品孔, 设置空白孔, 用 Dilution buffer R (1×) 代替样本和标准品;
- b. 加检测抗体: 按 50  $\mu\text{L}$ /孔加入稀释后的 Biotinylated antibody, 轻轻摇晃混合均匀后, 盖上封板膜, 37°C 孵育 90 min;
- c. 洗板: 去除孔内液体, 按 300  $\mu\text{L}$ /孔加入 1 × Washing buffer, 1 min 后弃去孔内液体。此步骤重复 4 次, 每一次在滤纸上扣干;
- d. 加酶: 按 100  $\mu\text{L}$ /孔加入稀释后的 Streptavidin-HRP, 盖上封板膜, 37°C 孵育 30 min;
- e. 洗板: 去除孔内液体, 按 300  $\mu\text{L}$ /孔加入 1 × Washing buffer, 1 min 后弃去孔内液体。此步骤重复 4 次, 每一次在滤纸上扣干;
- f. 显色: 按 100  $\mu\text{L}$ /孔加入 TMB, 37°C 避光孵育 20 min, 根据孔内颜色的深浅 (深蓝色) 来判定终止反应;
- g. 终止反应: 按 100  $\mu\text{L}$ /孔迅速加入 Stop solution 终止反应;
- h. 读板: 终止后 10 min 内, 用检测波长 450 nm 读值;
- i. 通过检测数据绘制标准曲线并计算各样品细胞因子含量。

## 4.3 实验结果

### 4.3.1 高尿酸血症造模小鼠血尿酸水平升高

通过连续对小鼠灌胃酵母膏 14 天, 模型组小鼠血尿酸水平显著升高, 第 7 天时血尿酸较对照组上升 80%, 尿酸平均水平达到 202  $\mu\text{mol/L}$ , 第 14 天时血尿酸较对照组上升 76%, 尿酸平均水平达到 218  $\mu\text{mol/L}$ 。根据参考文献提示, 当小鼠血尿酸达到 200  $\mu\text{mol/L}$  以上时即可认为造模成功, 实验结果表明, 通过连续 14 天灌胃酵母膏, 成功构建了高尿酸血症小鼠模型。

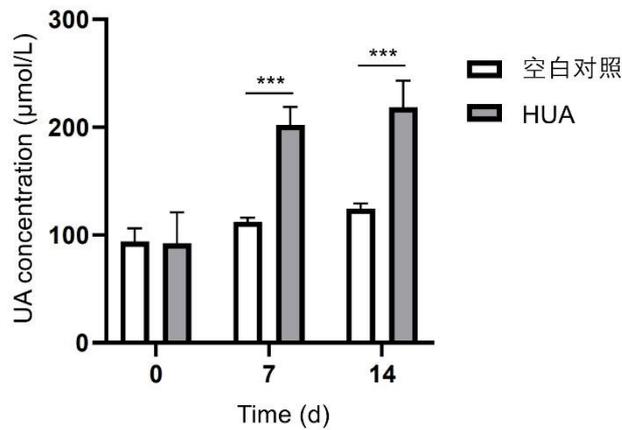


图 4.1 酵母膏造模小鼠高尿酸血症模型

图 4.1 \*\*\*:  $P < 0.001$ , HUA 组与空白对照组相比,  $n=5$ , HUA: 酵母膏灌胃处理 14 天。

#### 4.3.2 工程巨噬细胞阻止高尿酸血症小鼠血尿酸升高

工程巨噬细胞携带 EGFP 筛选标记, 一般认为 EGFP 阳性细胞表达外源 Uox。我们实验构建的工程巨噬细胞 RAW264.7-Ctrl 和 RAW264.7-mus Uox 细胞在体外培养传代过程中, EGFP 阳性率维持在 30% 以上, 说明外源基因不随细胞传代丢失, 单次扩大培养后可富集获得足量动物实验所需细胞数 ( $4 \times 10^7$  cells)。为减少体内实验中小鼠对外源输入细胞的负担, 实验前对 RAW264.7-Ctrl 和 RAW264.7-mus Uox 进行流式细胞纯化, 分选富集 EGFP 阳性工程巨噬细胞进行动物体内实验 (图 4.2A, B, C)。

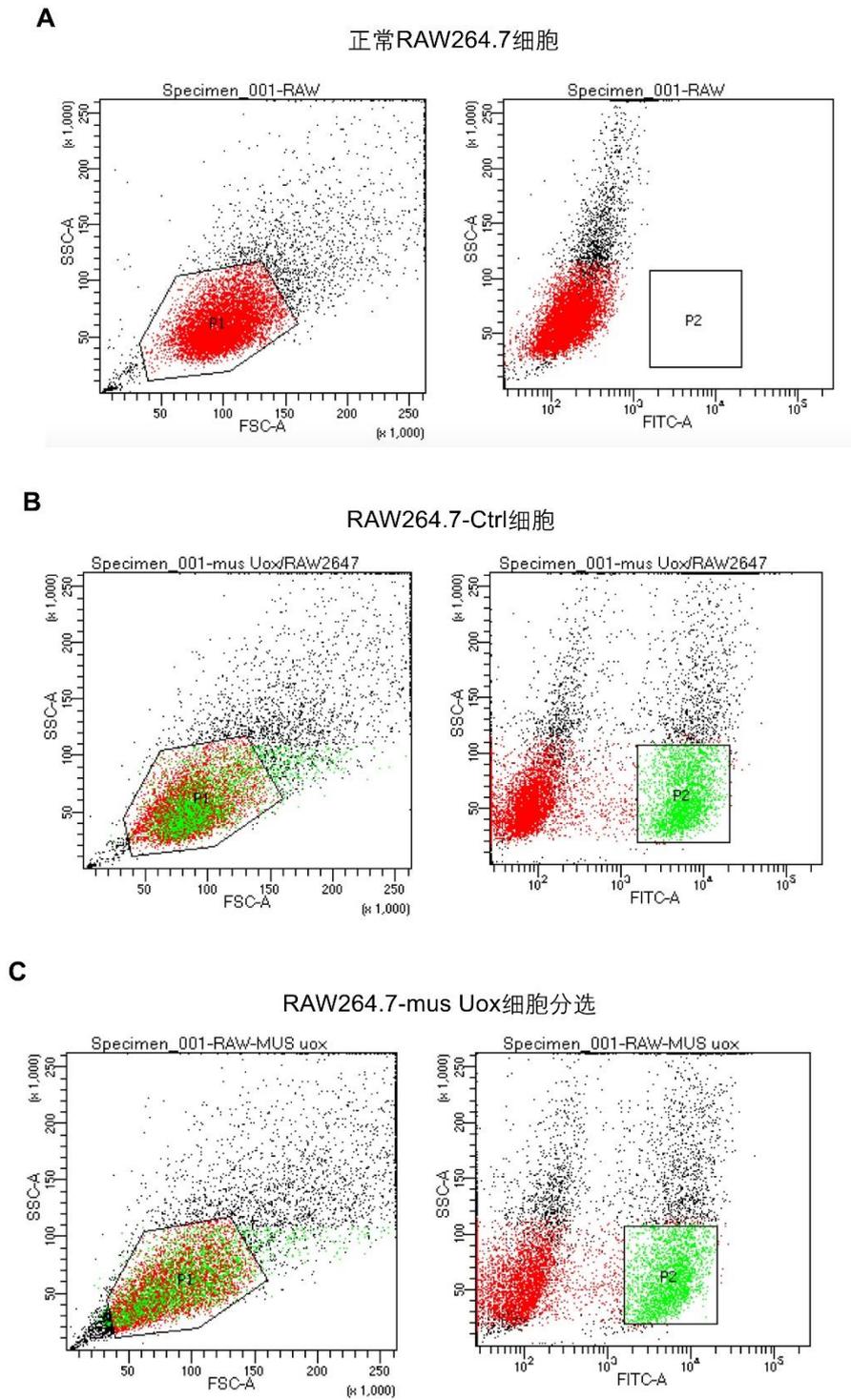


图 4.2 流式细胞分选富集 EGFP 阳性巨噬细胞

图 4.2 A. 野生型巨噬细胞圈门标定 EGFP 阴性细胞团位置；B. RAW264.7-Ctrl 巨噬细胞分选圈门，收集门 P2 内细胞；C. RAW264.7-mus Uox 巨噬细胞分选圈门，收集门 P2 内细胞

造模成功后，工程巨噬细胞组、工程菌组、别嘌醇组和对照组按实验方法所述对各组小鼠分别进行治疗。结果表明，工程巨噬细胞 RAW264.7-mus Uox 输注

高尿酸血症小鼠体内，显著抑制了小鼠血尿酸的升高，细胞输入两次后，小鼠血尿酸水平与未造模组相当（图 4.3）；与 RAW264.7-Ctrl 细胞治疗组相比，血尿酸平均水平在第 7 天降低 35%，在第 14 天降低 43%，说明 RAW264.7-mus Uox 工程细胞有显著的降尿酸效果，降尿酸效果来自外源表达的 mus Uox，而不是 RAW264.7 细胞本身。别嘌醇治疗组小鼠，在第 7 天和第 14 天的血尿酸水平分别为  $(118 \pm 6) \mu\text{mol/L}$  和  $(109 \pm 18) \mu\text{mol/L}$ ，而 RAW264.7-mus Uox 工程细胞治疗组的值分别为  $(117 \pm 7) \mu\text{mol/L}$  和  $(110 \pm 16) \mu\text{mol/L}$ ，表明工程巨噬细胞在降尿酸效果上达到临床一线用药水平。此外，实验室前期实验构建的工程乳酸菌 NZ9000-mus Uox，在相同时间点的血尿酸水平分别为  $(146 \pm 13) \mu\text{mol/L}$  和  $(159 \pm 16) \mu\text{mol/L}$ ，与模型组相比有所改善，但效果较工程巨噬细胞和别嘌醇略弱（图 4.3）。

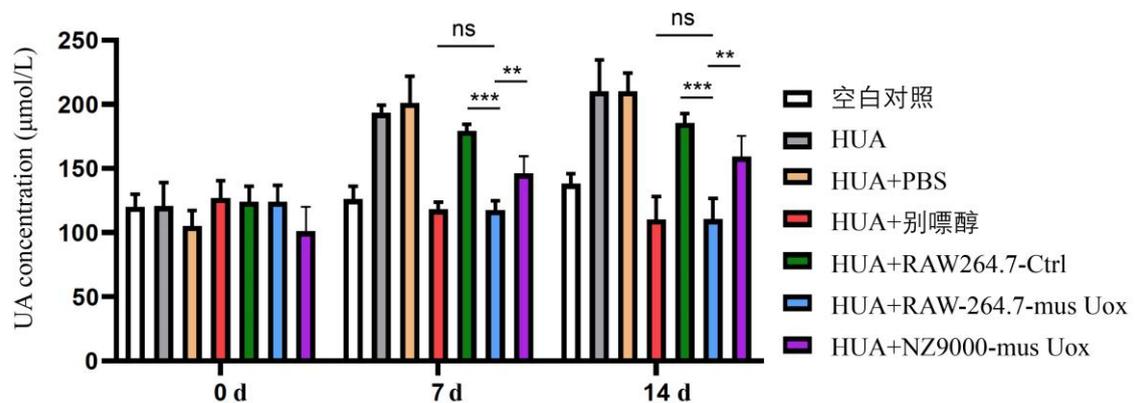


图 4.3 各治疗组降尿酸效果比较

图 4.3 各组小鼠只数  $n=5$ 。\*\*:  $P < 0.01$ ; \*\*\*:  $P < 0.001$ ; ns: non-significant, 无统计学差异。

#### 4.3.3 工程巨噬细胞对小鼠肝肾功能的影响

别嘌醇是临床控制尿酸一线用药。在小鼠高尿酸血症模型中，降尿酸效果最为显著。然而，别嘌醇长期使用会导致肝脏肾功能紊乱和肾损伤问题，限制了其在部分存在肝肾功能不全的患者中的长期应用。因此需对构建的工程巨噬细胞进行肝肾功能方面的评价，进一步明确其安全性。实验对比了包含空白对照、酵母膏造模以及各个治疗组在治疗第 14 天后的肝脏和肾脏生化指标，结果显示，各组小鼠在反映肝功能的四项主要指标 ALT、AST、TBIL、DBIL 上无明显差异，表明 14 天连续酵母膏造模以及三种不同类型的降尿酸药物均未对肝脏产生不良影响。

（图 4.4A）。在反映肾功能的两项指标 Crea 和 Urea 上，工程巨噬细胞给药组和 NZ9000 工程菌给药组未见异常。而别嘌醇给药组 Crea 和 Urea 两项值较空白对照组分别升高 18.8% 和 23.1%，结果具有统计学差异，表明别嘌醇给药造成肾功能紊

乱（图 4.4B）。

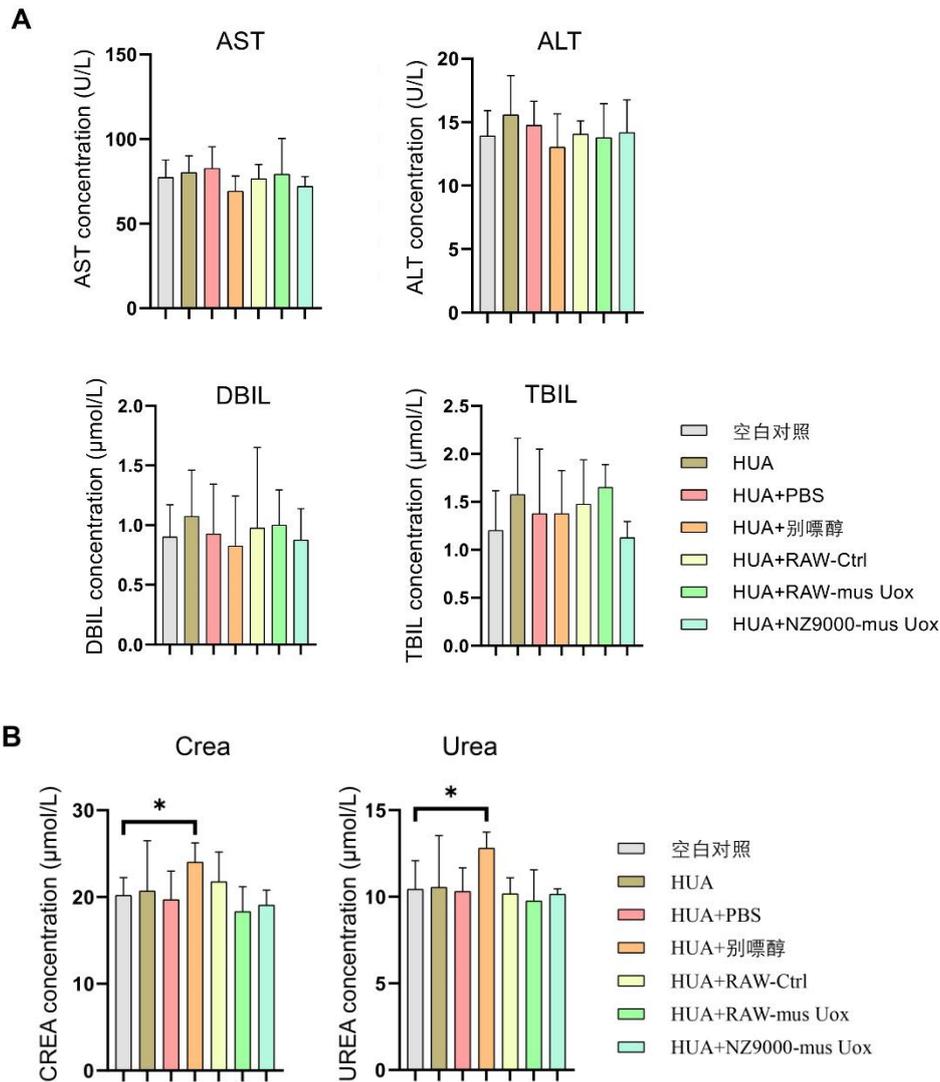


图 4.4 肝肾功能生化指标检测

图 4.4 各组小鼠只数  $n = 5$ 。A. 肝功能评价四项指标，AST、ALT、TBIL 和 DBIL；B. 肾功能评价两项指标，Crea 和 Urea。\*：  $P < 0.05$ ，别嘌醇治疗组与空白对照组相比

#### 4.3.4 工程巨噬细胞对肝脏和肾脏组织结构的影响

上述实验从生化指标反映工程巨噬细胞给药不会导致小鼠肝肾功能异常。进一步，我们通过对给药各组小鼠肝脏和肾脏进行病理切片并进行 H&E 染色，进一步从形态学上评估各治疗组对肝脏和肾脏的影响。在肝脏形态方面，与肝功能生化指标一致，各组肝脏切片染色均提示肝细胞形态正常，分布均匀，肝血管壁处无明显免疫细胞迁移浸润，提示给药各组都具备良好的肝脏安全性（图 4.5A）。肾脏切片结果显示，对照组、酵母膏造模组、工程菌给药组和工程巨噬细胞给药

组中，肾脏组织染色正常，肾小球结构和分布正常，少见免疫细胞浸润（图 4.5B）。而别嘌醇给药组明显可见肾脏组织结构紊乱，局部放大可见部分肾小管损伤，反映在肾小管细胞凋亡（蓝色箭头）；肾脏组织皮质区内局部可见损伤坏死，毛细血管充血（绿色箭头）；肾小球间隙内可见大量不规则空泡（黑色箭头）伴有炎性细胞弥散性浸润（红色箭头）。该结果提示别嘌醇在发挥疗效的同时，的确对肾脏产生较大不良影响；而工程巨噬细胞在与别嘌醇疗效接近的情况下，未见明显肾脏病变，相较于别嘌醇有更好的安全性。

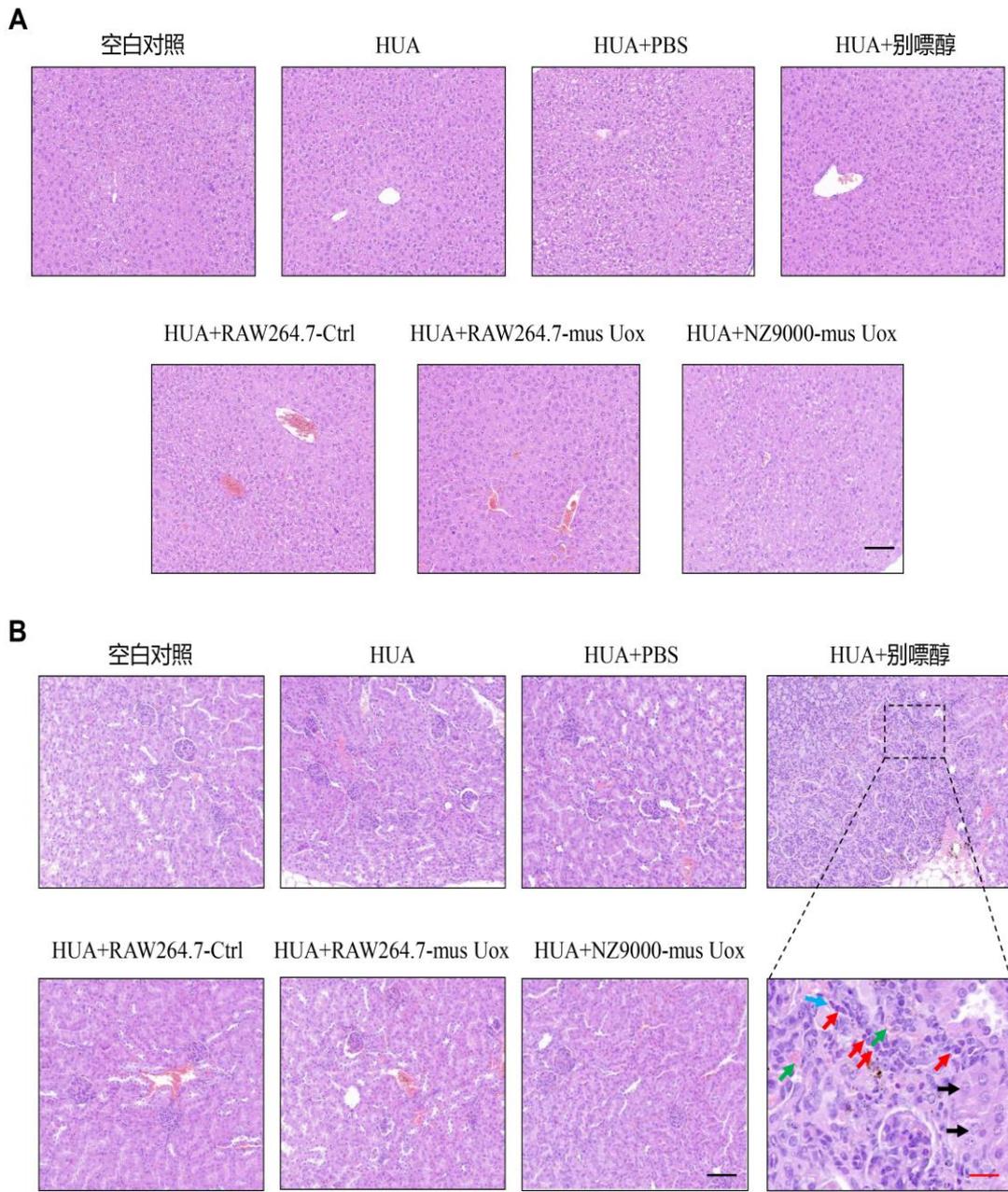


图 4.5 肝脏和肾脏组织病理学评价

图 4.5 A. 各组实验小鼠肝脏组织切片；B. 各组小鼠肾脏组织切片；右下图为 HUA+别嘌醇组局部放大，红色箭头指示免疫细胞浸润，绿色箭头指示毛细血管充血，蓝色箭头指示肾小管细胞凋亡，黑色箭头指示不规则空泡。黑色标尺：100  $\mu\text{m}$ ，红色标尺：20  $\mu\text{m}$ 。

### 4.3.5 工程巨噬细胞对小鼠炎症细胞因子的影响

Uox 类药物拉布立酶和普瑞凯希是蛋白类药物，对人体而言是异源蛋白。尽管这两种药的降尿酸效果显著，但由于给药方式是直接静脉注射，会激发机体产生抗体，使后期药效显著下降。本实验所构建的工程巨噬细胞 RAW264.7-mus Uox，所采取策略是用巨噬细胞“包裹”Uox，使其不会直接暴露于机体免疫系统。因此，对输注工程巨噬细胞小鼠血清免疫细胞因子进行测定，间接评估是否发生了不良免疫反应。ELISA 结果显示，工程巨噬细胞给药组小鼠血清中，IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10 三种主要反映炎症水平的细胞因子均未出现明显变化（图 4.6A, B, C），表明工程巨噬细胞给药后小鼠机体未发生系统性炎症，提示其在引发机体免疫反应方面优于目前临床应用的 Uox 类药物。

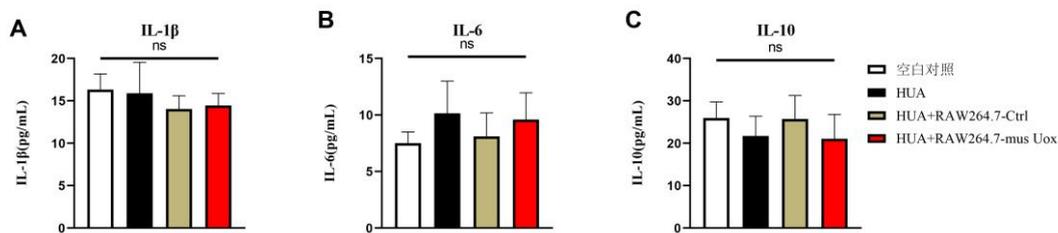


图 4.6 各组小鼠血清细胞因子评价

图 4.6 A. 血清 IL-1 $\beta$  水平; B. 血清 IL-6 水平; C. 血清 IL-10 水平

## 4.4 本章小结

在本章中，通过酵母膏灌胃小鼠成功构建了高尿酸血症动物模型，实验结果显示，高尿酸血症小鼠的血尿酸水平能够达到并维持在 200  $\mu\text{mol/L}$  以上。随后，通过流式细胞仪对工程巨噬细胞 RAW264.7-mus Uox 进行富集纯化，并通过尾静脉注射方式输注到小鼠体内。为了评估工程巨噬细胞的疗效，同时进行了别嘌醇和工程乳酸菌 NZ9000 的降尿酸评价实验。结果表明，这三组治疗均能阻止高尿酸血症小鼠的血尿酸升高，其中工程巨噬细胞 RAW264.7-mus Uox 的效果优于工程乳酸菌 NZ9000，与临床一线用药别嘌醇相当。

在安全性方面，通过对各组小鼠血液样品中的肝脏和肾脏生化指标进行检测，发现各组小鼠的 ALT、AST、TBIL、DBIL 等肝脏生化指标均正常，肝脏组织切片也未显示病理性改变。肾脏生化指标检测显示，别嘌醇处理小鼠的 Urea 和 Crea 明显升高，肾脏组织切片显示出现组织坏死和炎症细胞浸润等病理性变化。此外，尾静脉输注工程巨噬细胞不会引起细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6、IL-10 的异常变化，表明

工程巨噬细胞具有良好的安全性。

本章实验表明工程巨噬细胞 RAW264.7-mus Uox 在有效降低血尿酸的同时，显示出良好的安全性。这一发现为高尿酸血症的治疗提供了新的策略，尤其是在安全性方面的表现，为其未来在临床的应用提供了可能。

## 4.5 实验讨论

在本章中，通过酵母膏灌胃小鼠成功构建了高尿酸血症动物模型。通过尾静脉注射将工程巨噬细胞 RAW264.7-Ctrl 和 RAW264.7-mus Uox 输注到小鼠体内。为了评估工程巨噬细胞的疗效，同时进行了别嘌醇和工程乳酸乳球菌 NZ9000-mus Uox 的降尿酸评价实验。结果表明，RAW264.7-mus Uox、别嘌醇和工程乳酸乳球菌 NZ9000-mus Uox 均能阻止高尿酸血症小鼠的血尿酸升高。工程乳酸乳球菌 NZ9000-mus Uox 降尿酸效果相比工程巨噬细胞和别嘌醇略弱。这种结果可能是工程乳酸乳球菌 NZ9000-mus Uox 定植在肠腔，仅对肠道排出的尿酸产生代谢作用，别嘌醇和工程巨噬细胞随血流分布，对整个机体的尿酸代谢起作用，因而降尿酸效果更显著。肾脏生化指标 Crea, Urea 及肾脏组织切片均显示别嘌醇处理小鼠出现肾功能损伤，这可能是别嘌醇代谢产物羟嘌呤醇在肾脏积聚增加肾脏代谢负荷<sup>[93]</sup>，长期使用可能增加肾脏损伤风险。而工程巨噬细胞处理小鼠肝脏和肾脏生化指标、组织切片及炎性细胞因子检测均未出现异常，提示工程巨噬细胞有用高效降尿酸能力同时，具有良好的安全性。由于小鼠本身能够表达 Uox，考虑到这一因素，我们实验上采用连续 14 天灌胃酵母膏构建急性高尿酸血症小鼠模型并采用变造模边给药的方式进行给药治疗，目的在于能够更加准确的评价工程巨噬细胞的疗效。实验结果证明，工程巨噬细胞具有良好的降尿酸效果，能够有效抑制血尿酸的升高。

## 第五章 总结

### 5.1 结论

本研究采用巨噬细胞疗法,选择 *mus Uox* 和 *hUox* 作为目的基因,尝试将巨噬细胞作为底盘细胞进行定向改造,通过对巨噬细胞的基因编辑,使工程化细胞具有治疗高尿酸血症的能力,避免了传统药物治疗可能带来的不良反应,展现了较好的安全性和治疗潜力,体现了工程巨噬细胞在治疗高尿酸血症方面的应用前景。目前,本研究已取得如下成果:

1. 通过将 *mus Uox* 和 *hUox* 的基因序列连接到 pLVX-EGFP 载体上,成功构建了重组质粒 pLVX-*mus Uox* 和 pLVX-*hUox*。随后,通过扩增培养提取这些重组质粒进行慢病毒构建,成功获得了包含 *mus Uox* 基因的慢病毒 YOE-*mus Uox* 和包含 *hUox* 基因的慢病毒 YOE-*hUox*, 以及对照慢病毒 YOE-Ctrl。本实验通过慢病毒转染成功构建了过表达稳转细胞株 RAW264.7-*mus Uox* 和 THP-1-*hUox*。

2. 对工程巨噬细胞表达目的基因进行验证。首先 qPCR 结果表明,RAW264.7 和 THP-1 细胞本身不表达 *Uox* 基因,排除了本底酶活干扰;慢病毒感染后可在两种工程细胞中分别检测到 *mus Uox* 和 *hUox* 基因 mRNA 的高表达,其中 RAW264.7 细胞表达 *Uox* 与小鼠肝脏表达 *Uox* mRNA 水平属同数量级,说明工程巨噬细胞内可以高效转录 *Uox* 基因。其次,通过流式细胞技术检测 EGFP 发现,两种来源巨噬细胞中 EGFP 阳性率都不低于 30%,说明构建的慢病毒可以高效感染巨噬细胞。最后,通过 Western blotting 实验进一步证实了工程化巨噬细胞分别表达了 *Uox* 蛋白。

3. 通过将工程化细胞加入含高水平尿酸的培养基中培养可以检测细胞对溶液中尿酸的直接降解活性。培养 72 h 内,转染对照慢病毒巨噬细胞组培养基尿酸始终维持初始水平;而加入 RAW264.7-*mus Uox* 工程巨噬细胞组培养基中尿酸浓度随培养时间延长呈逐渐下降趋势,培养至 72 h,尿酸浓度从  $(300 \pm 1) \mu\text{mol/L}$  降至约  $(100 \pm 5) \mu\text{mol/L}$ 。相应而 THP-1-*hUox* 细胞组培养基中尿酸浓度降至约  $(170 \pm 8) \mu\text{mol/L}$ 。说明两种工程化巨噬细胞均具有良好的降尿酸活性。

4. 构建的工程巨噬细胞已证明在体外具备降尿酸能力,进一步利用小鼠实验验证鼠源巨噬细胞 RAW264.7-*mus Uox* 在体内是否具有降尿酸疗效。利用酵母膏连续灌胃小鼠 14 天成功建立了高尿酸血症动物模型,小鼠平均血尿酸水平可达  $(209 \pm 15) \mu\text{mol/L}$ 。利用该模型,我们在酵母膏连续灌胃期间两次尾静脉给药工程化巨噬细胞,在造模终点检测血尿酸水平。结果表明,输注 RAW264.7-*mus Uox* 一次后第 7 天,酵母膏灌胃小鼠的血尿酸维持在  $(117 \pm 7) \mu\text{mol/L}$ ,两次细胞给

药后血尿酸进一步降低至  $(110 \pm 16) \mu\text{mol/L}$ ，而给予对照 RAW264.7-Ctrl 细胞组小鼠血尿酸值分别为  $(181 \pm 6) \mu\text{mol/L}$  和  $(192 \pm 7) \mu\text{mol/L}$ 。表达外源 Uox 的 RAW264.7 工程巨噬细胞降尿酸效果与临床一线治疗药物别嘌醇相当。给予工程乳酸乳球菌 NZ9000-mus Uox 的小鼠血尿酸水平在第 7 和 14 天分别为  $(146 \pm 13) \mu\text{mol/L}$  和  $(159 \pm 16) \mu\text{mol/L}$ ，能够阻止小鼠血尿酸升高，但降尿酸效果弱于工程巨噬细胞与别嘌醇。

5. 最后对工程巨噬细胞在体内使用的安全性进行了初步评估。肝功能生化指标 ALT、AST、TBIL、DBIL 和肾功能指标 Crea、Urea 结果显示，工程巨噬细胞输入不会造成小鼠肝肾功能紊乱。而高尿酸血症治疗的临床一线用药别嘌醇给药则出现 Crea 和 Urea 的异常升高。肾脏组织病理切片结果同时还表明别嘌醇组存在肾小管上皮细胞坏死和免疫细胞浸润等现象，而工程巨噬细胞组未见类似病变。最后 ELISA 检测血清细胞因子 IL-1 $\beta$ 、IL-6 和 IL-10，结果显示工程巨噬细胞输入体内不会引起主要炎症相关细胞因子水平的异常波动。一系列结果表明工程巨噬细胞具备良好的安全性。

## 5.2 展望

我国高尿酸血症患病率高达 14.1%，患病人数约 1.9 亿，且发病呈年轻化趋势。高尿酸血症作为慢性代谢性疾病，不仅是对心脑血管疾病的潜在威胁，还与痛风、糖尿病、高血压、高脂血症、代谢综合征及慢性肾功能衰竭等疾病有关。因此，针对高尿酸血症的治疗和有效调控极为重要。

目前，临床上主要通过化学药物来降低血尿酸水平，包括抑制尿酸生成药物和促进尿酸排泄药物等。然而，现有的治疗方法存在一些难以克服的问题，如靶向性差、副反应多、依从性低、疗程长等。2020 年，高尿酸血症治疗药物非布司他由于存在心血管相关死亡风险，被 FDA 添加黑框警告；然而同年非布司他国内销售额仍突破 10 亿元，销量占据痛风药市场 66.31%，可见高尿酸血症药物研发领域存在巨大空白。

Uox 作为高尿酸血症治疗药物，具有更加强效降尿酸能力。然而，Uox 类药物作为异源蛋白，在临床应用中存在一定的限制。首先，输注药物后，人体会较快产生抗体，导致药效大打折扣。因此，临床上应用 Uox 类药物时通常搭配甲氨蝶呤等免疫抑制剂联合使用，以减少机体免疫反应和抗体产生，维持药效，对机体免疫功能产生影响<sup>[94]</sup>。其次，普瑞凯希等 Uox 类药物代谢效率不确定，难以维持血药浓度稳态。一项临床研究数据表明，26 名普瑞凯希受试者第一次临床输注时，所有患者都出现了低尿酸血症的情况<sup>[95]</sup>。

巨噬细胞作为机体重要的免疫细胞，存在于体内的各组织器官中。研究表明，

巨噬细胞对 MSU 晶体具有趋向性并可以对其进行吞噬；此外，巨噬细胞寿命可达数月甚至更久，改造后的巨噬细胞能够长期发挥疗效。这些优势使得巨噬细胞成为治疗高尿酸血症的理想底盘细胞。然而，尽管巨噬细胞在治疗高尿酸血症方面展现出潜力，但是相关研究和技术仍处于起步阶段，面临诸多难题。首先，原代巨噬细胞属于髓系免疫细胞，它们对病毒载体具有天然的抗性，这导致病毒转染巨噬细胞的效率较低，增加了工程化改造的难度。其次，巨噬细胞的增殖能力较弱，在体外扩增困难，难以获取大量细胞，现有技术多是捕获成体多功能干细胞然后进行定向分化。最后，巨噬细胞易受微环境的影响，导致基因表达的改变。目前，大多数实验都利用永生化的细胞系(如 THP-1 和 RAW264.7 等)，这些细胞系能够更方便地进行工程化操作和改造，极大的代替原代细胞进行新策略的探索性研究<sup>[96]</sup>。

近期，Sethuraman Subramanian 研究团队研究发现，小鼠肺泡巨噬细胞能够在体外长期培养和扩增，虽然体外培养的巨噬细胞与体内的巨噬细胞产生了 3,000 多个差异表达基因，但是将体外培养的巨噬细胞回输体内后，基因表达差异消失，巨噬细胞恢复正常表达<sup>[97]</sup>。此研究只进行了初步探索，却提示了巨噬细胞能够在体外长期培养和扩增的可能性，为通过基因工程技术改造自体巨噬细胞提供了科学依据和技术路径。

基于以上研究现状，本研究采取了基于巨噬细胞的细胞疗法，对高尿酸血症的新治疗策略进行探索。通过慢病毒将 *Uox* 基因整合到巨噬细胞，构建了工程化巨噬细胞，能够稳定表达 *Uox*；通过在体外和体内实验验证了巨噬细胞能够发挥降尿酸作用，两次给药的体内降尿酸效果与临床一线用药别嘌醇相当；肝肾功能评估以及免疫细胞因子的测定初步显示工程巨噬细胞在体内应用具有良好的安全性。在现有治疗方法存在局限性的情况下，本方案可能为高尿酸血症提供一种新的治疗策略。然而，本论文中提出的工程化巨噬细胞策略距离临床应用仍然需要大量实验性研究：

1. 考虑到 RAW264.7 是一种永生化的细胞系，存在致瘤风险性，且难以完全模拟自然状态下的巨噬细胞行为和功能。后续研究可尝试提取机体自身巨噬细胞，验证自体巨噬细胞在体外进行工程化编辑回输体内后，其数量和活性是否还可以保持；

2. 对进入体内的工程巨噬细胞进行示踪，探究其进入体内后的分布与靶向性，进一步确保巨噬细胞治疗的安全性和有效性；

3. 巨噬细胞表达的 TLRs 和 CD44 能够特异性识别并吞噬 MSU 晶体，可能在痛风的治疗中发挥作用。后续实验中可构建痛风动物模型，探索工程巨噬细胞对痛风的治疗效果；

4. 现有的 Uox 类药物常应用于肿瘤和化疗导致的高尿酸血症，而巨噬细胞作为免疫细胞对肿瘤细胞具有一定杀伤作用，尝试开发这种联合治疗方法，同时发挥对肿瘤的杀伤作用和降尿酸作用。

本研究对巨噬细胞疗法治疗高尿酸血症进行了初步探索，证明了工程巨噬细胞在动物实验中具有一定的安全性和有效性。但全球目前尚未有应用于临床的工程巨噬细胞，这表明将巨噬细胞疗法从实验室研究转化为临床应用需要克服一系列技术和安全问题。基因工程改造巨噬细胞治疗特定的疾病，这一领域的研究不仅有助于开发新的治疗方法，也有利于探索巨噬细胞在疾病发生发展中的作用。随着技术的进步和研究的深入，基于基因工程改造的巨噬细胞疗法在未来有望为更多疾病治疗提供可能。

## 参考文献

- [1] Cabău G, Crișan TO, Klück V, Popp RA, Joosten LAB. Urate-induced immune programming: Consequences for gouty arthritis and hyperuricemia. *Immunol Rev.* 2020 Mar;294(1):92-105.
- [2] Ratautaite V, Samukaite-Bubniene U, Plausinaitis D, et al. Molecular imprinting technology for determination of uric acid [J]. *International Journal Of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 1-18.
- [3] Glantzounis G K, Tsimoyiannis E C, Kappas A M, et al. Uric acid and oxidative stress [J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2005, 11(32): 4145-4151.
- [4] Dissanayake L V, Spires D R, Palygin O, et al. Effects of uric acid dysregulation on the kidney [J]. *American Journal of Physiology-renal Physiology*, 2020, 318(5): 1252-1257.
- [5] Kaushal N, Vohora D, Jalali R K, et al. Review of the Literature Examining the Association of Serum Uric Acid with Osteoporosis and Mechanistic Insights into Its Effect on Bone Metabolism [J]. *Endocrine Metabolic & Immune Disorders-drug Targets*, 2019, 19(3): 259-273.
- [6] Orowan E. The origin of man [J]. *Nature*, 1955, 175(4459): 683-684.
- [7] Cervini C, Burrioni M, Zampa A M. Genes for super-intelligence? [J]. *Journal of Medical Genetics*, 1982, 19(5): 392-393.
- [8] Scott G S, Hooper D C. The role of uric acid in protection against peroxynitrite-mediated pathology [J]. *Medical Hypotheses*, 2001, 56(1): 95-100.
- [9] Vogel W, Broverman D M, Draguns J G. The role of glutamic acid in cognitive behaviors [J]. *Psychological Bulletin*, 1966, 65(6): 367-382.
- [10] Mandal AK, Mount DB. The molecular physiology of uric acid homeostasis. *Annu Rev Physiol.* 2015;77:323-45.
- [11] Kang D H, Chen W. Uric acid and chronic kidney disease: new understanding of an old problem [J]. *Seminars in Nephrology*, 2011, 31(5): 447-452.
- [12] Cammalleri L, Malaguarnera M. Rasburicase represents a new tool for hyperuricemia in tumor lysis syndrome and in gout [J]. *International Journal of Medical Sciences*, 2007, 4(2): 83-93.
- [13] Suzuki S, Yoshihisa A, Yokokawa T, et al. Comparison between febuxostat and allopurinol uric acid-lowering therapy in patients with chronic heart failure and hyperuricemia: a multicenter randomized controlled trial [J]. *Journal of International Medical Research*, 2021, 49(12):1-15.
- [14] Fathallah-Shaykh S A, Cramer M T. Uric acid and the kidney [J]. *Pediatric Nephrology (Berlin, Germany)*, 2014, 29(6): 999-1008.
- [15] Doherty M. New insights into the epidemiology of gout [J]. *Rheumatology (Oxford, England)*, 2009, 48 Suppl 2: ii2-ii8.
- [16] Feig D I, Kang D H, Johnson R J. Uric acid and cardiovascular risk [J]. *New England Journal of Medicine*, 2008, 359(17): 1811-1821.
- [17] TÁTRAI P, ERDŐ F, Dörnyei G, et al. Modulation of Urate Transport by Drugs [J]. *Pharmaceutics*, 2021, 13(6):1-22.
- [18] Annemans L, Spaepen E, Gaskin M, et al. Gout in the UK and Germany: prevalence, comorbidities and management in general practice 2000-2005 [J]. *Annals of The Rheumatic Diseases*, 2008, 67(7): 960-966.
- [19] Roman Y M. The Daniel K. Inouye College of Pharmacy Scripts: Perspectives

- on the Epidemiology of Gout and Hyperuricemia [J]. *Hawai'i journal of medicine & public health : a journal of Asia Pacific Medicine & Public Health*, 2019, 78(2): 71-76.
- [20] Trifirò G, Morabito P, Cavagna L, et al. Epidemiology of gout and hyperuricaemia in Italy during the years 2005-2009: a nationwide population-based study [J]. *Annals of The Rheumatic Diseases*, 2013, 72(5): 694-700.
- [21] 秦文浩, 钱桐荪. 正常人血尿酸调查及其与血脂的关系 [J]. *南通大学学报(医学版)*, 1987, (01): 35-37+46.
- [22] Zhang M, Zhu X, Wu J, et al. Prevalence of Hyperuricemia Among Chinese Adults: Findings From Two Nationally Representative Cross-Sectional Surveys in 2015-16 and 2018-19 [J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 1-13.
- [23] 方宁远, 吕力为, 吕晓希, 等. 中国高尿酸血症相关疾病诊疗多学科专家共识(2023年版) [J]. *中国实用内科杂志*, 2023, 43(06): 461-480.
- [24] 赵敏, 陈婷, 黄振光, 等. 1990—2019年中国痛风疾病负担研究 [J]. *现代预防医学*, 2021, 48(21): 3974-3978.
- [25] Terjesen B F, Chadwick T D, Verreth J A, et al. Pathways for urea production during early life of an air-breathing teleost, the African catfish *Clarias gariepinus* Burchell [J]. *Journal of Experimental Biology*, 2001, 204(Pt 12): 2155-2165.
- [26] Noguchi T, Fujiwara S, Hayashi S. Evolution of allantoinase and allantoicase involved in urate degradation in liver peroxisomes. A rapid purification of amphibian allantoinase and allantoicase complex, its subunit locations of the two enzymes, and its comparison with fish allantoinase and allantoicase [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261(9): 4221-4223.
- [27] Kahn K, Tipton P A. Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction [J]. *Biochemistry*, 1998, 37(33): 11651-11659.
- [28] Ramazzina I, Folli C, Secchi A, et al. Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes [J]. *Nature Chemical Biology*, 2006, 2(3): 144-148.
- [29] Richette P, Bardin T. Gout [J]. *Lancet (London, England)*, 2010, 375(9711): 318-328.
- [30] Riches P L, Wright A F, Ralston S H. Recent insights into the pathogenesis of hyperuricaemia and gout [J]. *Human Molecular Genetics*, 2009, 18(R2): R177-R184.
- [31] Zhang C, Fan K, Zhang W, et al. Structure-based characterization of canine-human chimeric uricases and its evolutionary implications [J]. *Biochimie*, 2012, 94(6): 1412-1420.
- [32] Wu X W, Muzny D M, Lee C C, et al. Two independent mutational events in the loss of urate oxidase during hominoid evolution [J]. *Journal of Molecular Evolution*, 1992, 34(1): 78-84.
- [33] Sekirov I, Russell S L, Antunes L C, et al. Gut microbiota in health and disease [J]. *Physiological Reviews*, 2010, 90(3): 859-904.
- [34] Weiner I M, Fanelli G M, Jr. Renal urate excretion in animal models [J]. *Nephron*, 1975, 14(1): 33-47.
- [35] So A, Thorens B. Uric acid transport and disease [J]. *The Journal of clinical investigation*, 2010, 120(6): 1791-1799.
- [36] 丁雪东, 彭成璐, 李曼曼, 等. 尿酸转运蛋白与血清尿酸平衡 [J]. *国际药学*

- 研究杂志, 2018, 45(09): 665-669.
- [37] Hu D E, Moore A M, Thomsen L L, et al. Uric acid promotes tumor immune rejection [J]. *Cancer Research*, 2004, 64(15): 5059-5062.
- [38] Jalal D I. Hyperuricemia, the kidneys, and the spectrum of associated diseases: a narrative review [J]. *Current Medical Research And Opinion*, 2016, 32(11): 1863-1869.
- [39] Li L, Zhang Y, Zeng C. Update on the epidemiology, genetics, and therapeutic options of hyperuricemia [J]. *American Journal of Translational Research*, 2020, 12(7): 3167-3181.
- [40] Chou H W, Chiu H T, Tsai C W, et al. Comparative effectiveness of allopurinol, febuxostat and benzbromarone on renal function in chronic kidney disease patients with hyperuricemia: a 13-year inception cohort study [J]. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 2018, 33(9): 1620-1627.
- [41] LI S, YANG H, GUO Y, et al. Comparative efficacy and safety of urate-lowering therapy for the treatment of hyperuricemia: a systematic review and network meta-analysis [J]. *Scientific reports*, 2016, 6: 1-12.
- [42] Castrejon I, Toledano E, Rosario M P, et al. Safety of allopurinol compared with other urate-lowering drugs in patients with gout: a systematic review and meta-analysis [J]. *Rheumatology International*, 2015, 35(7): 1127-1137.
- [43] Xie P, Tao M, Zhao H, et al. Successful Treatment of Allopurinol-Induced Severe Skin Reactions with Double Filtration Plasmapheresis: A Case Report [J]. *Blood Purification*, 2020, 49(6): 748-752.
- [44] Shibagaki Y, Ohno I, Hosoya T, et al. Safety, efficacy and renal effect of febuxostat in patients with moderate-to-severe kidney dysfunction [J]. *Hypertension Research*, 2014, 37(10): 919-925.
- [45] 刘鹏, 靳京, 孟晓燕, 等. 高尿酸血症及其治疗药物与肾脏疾病相关性的研究进展 [J]. *药物评价研究*, 2021, 44(09): 2013-2019.
- [46] 傅毅. 高尿酸血症治疗药 拉布立酶(rasburicase) [J]. *国外医药(合成药生化药制剂分册)*, 2002, (06): 383-384.
- [47] Lopez-Olivo M A, Pratt G, Palla S L, et al. Rasburicase in tumor lysis syndrome of the adult: a systematic review and meta-analysis [J]. *American Journal of Kidney Diseases*, 2013, 62(3): 481-492.
- [48] Pui C H. Rasburicase: a potent uricolytic agent [J]. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2002, 3(4): 433-442.
- [49] Allen K C, Champlain A H, Cotliar J A, et al. Risk of anaphylaxis with repeated courses of rasburicase: a Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) project [J]. *Drug Safety*, 2015, 38(2): 183-187.
- [50] Hershfield M S, Ganson N J, Kelly S J, et al. Induced and pre-existing anti-polyethylene glycol antibody in a trial of every 3-week dosing of pegloticase for refractory gout, including in organ transplant recipients [J]. *Arthritis Research & Therapy*, 2014, 16(2): R63-R63.
- [51] Reinders M K, Jansen T L. New advances in the treatment of gout: review of pegloticase [J]. *Therapeutics And Clinical Risk Management*, 2010, 6: 543-550.
- [52] Botson J K, Tesser J R P, Bennett R, et al. Pegloticase in Combination With Methotrexate in Patients With Uncontrolled Gout: A Multicenter, Open-label Study (MIRROR) [J]. *Journal of Rheumatology*, 2021, 48(5): 767-774.
- [53] Keenan R T, Botson J K, Masri K R, et al. The effect of immunomodulators on the efficacy and tolerability of pegloticase: a systematic review [J]. *Seminars in*

- Arthritis And Rheumatism, 2021, 51(2): 347-352.
- [54] Bousoik E, Qadri M, Elsaid K A. CD44 Receptor Mediates Urate Crystal Phagocytosis by Macrophages and Regulates Inflammation in A Murine Peritoneal Model of Acute Gout [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 1-15.
- [55] Zhang F S, He Q Z, Qin C H, et al. Therapeutic potential of colchicine in cardiovascular medicine: a pharmacological review [J]. Acta Pharmacologica Sinica, 2022, 43(9): 2173-2190.
- [56] Wynn T A, Vannella K M. Macrophages in Tissue Repair, Regeneration, and Fibrosis [J]. Immunity, 2016, 44(3): 450-462.
- [57] Mills C D, Kincaid K, Alt J M, et al. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm [J]. Journal of Immunology, 2000, 164(12): 6166-6673.
- [58] Orecchioni M, Ghosheh Y, Pramod A B, et al. Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages [J]. Frontiers in Immunology, 2019, 10: 1-14.
- [59] Specht H, Emmott E, Koller T, et al. High-throughput single-cell proteomics quantifies the emergence of macrophage heterogeneity [J]. bioRxiv, 2019: 1-23.
- [60] Murray P J, Allen J E, Biswas S K, et al. Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines [J]. Immunity, 2014, 41(1): 14-20.
- [61] West A P, Brodsky I E, Rahner C, et al. TLR signalling augments macrophage bactericidal activity through mitochondrial ROS [J]. Nature, 2011, 472(7344): 476-480.
- [62] Spector W G, Ryan G B. New evidence for the existence of long lived macrophages [J]. Nature, 1969, 221(5183): 860-860.
- [63] Murray P J, Wynn T A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets [J]. Nature Reviews Immunology, 2011, 11(11): 723-737.
- [64] Li S, Feng S, Ding L, et al. Nanomedicine engulfed by macrophages for targeted tumor therapy [J]. International Journal of Nanomedicine, 2016, 11: 4107-4124.
- [65] Fan C H, Lee Y H, Ho Y J, et al. Macrophages as Drug Delivery Carriers for Acoustic Phase-Change Droplets [J]. Ultrasound in Medicine And Biology, 2018, 44(7): 1468-1481.
- [66] Pang L, Zhu Y, Qin J, et al. Primary M1 macrophages as multifunctional carrier combined with PLGA nanoparticle delivering anticancer drug for efficient glioma therapy [J]. Drug Delivery, 2018, 25(1): 1922-1931.
- [67] Zhang W, Wang M, Tang W, et al. Nanoparticle-Laden Macrophages for Tumor-Tropic Drug Delivery [J]. Advanced Materials, 2018, 30(50): 1-20.
- [68] Kim M S, Haney M J, Zhao Y, et al. Engineering macrophage-derived exosomes for targeted paclitaxel delivery to pulmonary metastases: in vitro and in vivo evaluations [J]. Nanomedicine-nanotechnology Biology And Medicine, 2018, 14(1): 195-204.
- [69] Cao H, Wang H, He X, et al. Bioengineered Macrophages Can Responsively Transform into Nanovesicles To Target Lung Metastasis [J]. Nano Letters, 2018, 18(8): 4762-4770.
- [70] Aalipour A, Chuang H Y, Murty S, et al. Engineered immune cells as highly sensitive cancer diagnostics [J]. Nature Biotechnology, 2019, 37(5): 531-539.
- [71] Ray M, Lee Y W, Hardie J, et al. CRISPRed Macrophages for Cell-Based Cancer Immunotherapy [J]. Bioconjugate Chemistry, 2018, 29(2): 445-450.
- [72] Bungulawa E J, Wang W, Yin T, et al. Recent advancements in the use of

- exosomes as drug delivery systems [J]. *Journal of Nanobiotechnology*, 2018, 16(1): 836-849.
- [73] Haney M J, Zhao Y, Jin Y S, et al. Macrophage-Derived Extracellular Vesicles as Drug Delivery Systems for Triple Negative Breast Cancer (TNBC) Therapy [J]. *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, 2020, 15(3): 487-500.
- [74] Lai J, Deng G, Sun Z, et al. Scaffolds biomimicking macrophages for a glioblastoma NIR-Ib imaging guided photothermal therapeutic strategy by crossing Blood-Brain Barrier [J]. *Biomaterials*, 2019, 211: 48-56.
- [75] Zhao H, Li L, Zhang J, et al. C-C Chemokine Ligand 2 (CCL2) Recruits Macrophage-Membrane-Camouflaged Hollow Bismuth Selenide Nanoparticles To Facilitate Photothermal Sensitivity and Inhibit Lung Metastasis of Breast Cancer [J]. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2018, 10(37): 31124-31135.
- [76] Nie W, Wu G, Zhang J, et al. Responsive Exosome Nano-bioconjugates for Synergistic Cancer Therapy [J]. *Angewandte Chemie-international Edition*, 2020, 59(5): 2018-2022.
- [77] Fidler I J. Inhibition of pulmonary metastasis by intravenous injection of specifically activated macrophages [J]. *Cancer Research*, 1974, 34(5): 1074-1078.
- [78] Andreesen R, Scheibenbogen C, Brugger W, et al. Adoptive transfer of tumor cytotoxic macrophages generated in vitro from circulating blood monocytes: a new approach to cancer immunotherapy [J]. *Cancer Research*, 1990, 50(23): 7450-7456.
- [79] Boehler R M, Kuo R, Shin S, et al. Lentivirus delivery of IL-10 to promote and sustain macrophage polarization towards an anti-inflammatory phenotype [J]. *Biotechnology And Bioengineering*, 2014, 111(6): 1210-1221.
- [80] Yang K, Xu C, Zhang Y, et al. Sestrin2 Suppresses Classically Activated Macrophages-Mediated Inflammatory Response in Myocardial Infarction through Inhibition of mTORC1 Signaling [J]. *Frontiers in Immunology*, 2017, 8: 1-13.
- [81] Shen X Z, Li P, Weiss D, et al. Mice with enhanced macrophage angiotensin-converting enzyme are resistant to melanoma [J]. *American Journal of Pathology*, 2007, 170(6): 2122-2134.
- [82] He H, Chiu A C, Kanada M, et al. Imaging of Tumor-Associated Macrophages in a Transgenic Mouse Model of Orthotopic Ovarian Cancer [J]. *Molecular Imaging And Biology*, 2017, 19(5): 694-702.
- [83] Huo Y, Zhang H, Sa L, et al. M1 polarization enhances the antitumor activity of chimeric antigen receptor macrophages in solid tumors [J]. *Journal of Translational Medicine*, 2023, 21(1):1-15.
- [84] Jiang N, Xu C, Zhang L, et al. "Resurrected" human-source urate oxidase with high uricolytic activity and stability [J]. *Enzyme And Microbial Technology*, 2021, 149: 1-24.
- [85] Li H L, Gao X F, Li J J, et al. Characterization and Immunogenicity of Recombinant *A. flavus* Uox Modified by Co/EDTA Carbon Dots [J]. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 2023,25(2):230-246.
- [86] Guo Y, Huo J, Bai R, et al. The effects of free Cys residues on the structure, activity, and tetrameric stability of mammalian uricase [J]. *Applied Microbiology And Biotechnology*, 2023, 107(14): 4533-4542.
- [87] He L, Tang W, Huang L, et al. Rational design of a genome-based insulated

- system in *Escherichia coli* facilitates heterologous uricase expression for hyperuricemia treatment [J]. *Bioengineering & Translational Medicine*, 2023, 8(2): 1-13.
- [88] 裴忆雪, 刘永杰, 张笛, 等. 建立高尿酸血症性肾损害小鼠模型的实验研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2018, 28(09): 46-54.
- [89] Dai H, Lv S, Qiao Z, et al. The Active Components of Sunflower (*Helianthus annuus* L.) Calathide and the Effects on Urate Nephropathy Based on COX-2/PGE2 Signaling Pathway and the Urate Transporter URAT1, ABCG2, and GLUT9 [J]. *Frontiers in nutrition*, 2021, 8: 1-16.
- [90] 岳义松, 张雯, 谢逸菲, 等. 高尿酸血症实验动物模型研究进展 [J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(02): 201-206.
- [91] 王琳, 沈嘉艳, 谢招虎, 等. 高尿酸血症动物模型研究进展 [J]. *中国实验动物学报*, 2023, 31(01): 112-119.
- [92] Cubillos-Ruiz A, Alcantar M A, Donghia N M, et al. An engineered live biotherapeutic for the prevention of antibiotic-induced dysbiosis [J]. *Nature Biomedical Engineering*, 2022, 6(7): 910-921.
- [93] Murrell G A, Rapeport W G. Clinical pharmacokinetics of allopurinol [J]. *Clinical pharmacokinetics*, 1986, 11(5): 343-353.
- [94] Schlesinger N, Yasothan U, Kirkpatrick P. Pegloticase [J]. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2011, 10(1): 17-18.
- [95] Hershfield M S, Roberts L J, 2nd, Ganson N J, et al. Treating gout with pegloticase, a PEGylated urate oxidase, provides insight into the importance of uric acid as an antioxidant in vivo [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2010, 107(32): 14351-14356.
- [96] Chen Z, Hu Y, Mei H. Advances in CAR-Engineered Immune Cell Generation: Engineering Approaches and Sourcing Strategies [J]. *Advanced Science*, 2023, 10(35): 1-26.
- [97] Subramanian S, Busch C J, Molawi K, et al. Long-term culture-expanded alveolar macrophages restore their full epigenetic identity after transfer in vivo [J]. *Nature Immunology*, 2022, 23(3): 458-468.

附录 A

*mus Uox* 基因序列:

ATGGCCCACTACCACGACAACACTACGGCAAGAATGATGAAGTTGAATTCGTG  
AGAACCGGATATGGTAAAGACATGGTGAAGGTGCTCCATATCCAAAGGGAC  
GGCAAGTACCACAGCATCAAAGAGGTGGCCACCTCTGTGCAGCTGACCCTG  
AGGAGCAAGAAAGACTATCTGCACGGCGACAACAGCGACATCATCCCTACC  
GACACCATCAAGAATACTGTGCACGTGCTGGCCAAGCTGAGGGGCATCCGG  
AACATCGAGACCTTCGCCATGAACATCTGCGAGCACTTCCTGAGCAGCTTTA  
ACCACGTGACCAGGGCCCACGTGTACGTGGAGGAGGTGCCCTGGAAGAGGT  
TTGAGAAGAACGGCATCAAGCACGTGCACGCCTTCATCCACACCCCTACCG  
GCACACACTTCTGCGAGGTGGAGCAGATGAGAAACGGCCCTCCTGTGATCC  
ACAGCGGCATCAAGGACCTGAAGGTGCTGAAAACCAACCAGAGCGGCTTCG  
AGGGCTTCCTGAAGGACCAGTTCACCACCCTGCCTGAGGTGAAGGACCGGT  
GTTTCGCGACCCAGGTGTACTGTAAGTGGAGGTACCAGCGCAGGGACGTGG  
ACTTTGAGGCCATCTGGGGCGCCGTGAGAGATATCGTGCTGCAGAAGTTCC  
CCGGCCCTACGACAAGGGGGAGTACAGCCCCAGCGTGCAGAAAACACTGT  
ACGACATCCAGGTGCTGAGCCTGAGCCAGCTGCCTGAGATCGAGGACATGG  
AGATCTCCCTGCCTAACATCCACTACTTTAACATCGACATGAGCAAGATGGG  
CCTGATCAATAAGGAGGAGGTGCTGCTGCCACTGGACAACCCCTACGGCAA  
GATCACCGGCACCGTGAAGAGGGAAGCTGCCATCCCGCCTGTGA

*hUox* 基因序列:

ATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGCCCACTATCACAATAATTATAAG  
AAGAACGATGAGGTGGAATTTGTGAGAACAGGCTACGGCAAGGATATGGT  
GAAGGTGCTGCACATCCAGAGAGATGGAAAGTACCATAGCATCAAGGAGG  
TGGCCACCTCCGTGCAGCTGACCCTGAGCTCTAAGAAGGATTATCTGCACG  
GCGATAATTCTGATATCATCCCTACTGACACCATCAAGAATACAGTGCATGT  
GCTGGCCAAGTTTAAGGGCATCAAAAGCATCGAGGCCCTTCGCCGTGAATAT  
CTGTGAGCACTTCCTGAGCTCTTTTAATCATGTGATCAGAGCCCAGGTGTAT  
GTGGAGGAGATTCCATGGAAGAGGCTGGAGAAGATTGGCGTGAAGCACGT  
GCACGCCTTTATCCACACACCTACCGGCACACACTTCTGTGAAGTGGAGCA  
GCTGAGAAGCGGCCCTCCCGTGATCCACAGCGGCATTAAGGATCTGAAGGT  
GCTGAAAACAACACAGAGCGGATTTGAGGGCTTCATCAAGGATCAGTTTAC  
AACCTGCCTGAAGTGAAGGACAGATGCTTTGCCACCCAGGTGTACTGTAA  
GTGGAGATATCACCAGGGCAGAGATGTGGATTTTGAGGCCACCTGGGATAC  
AGTGAGAGATATTGTGCTGGAGAAGTTCGCCGGCCCCTACGATAAAGGCGA  
GTATAGCCCAAGCGTGCAGAAAACACTGTACGATATTCAGGTGCTGAGCCT

---

---

GTCTAGAGTGCCAGAAATCGAGGATATGGAGATCAGCCTGCCTAACATCCA  
CTACTTTAACATCGATATGAGCAAGATGGGCCTGATCAATAAGGAAGAGGT  
GCTGCTGCCACTGGATAATCCTTACGGCAAGATCACCGGCACAGTGAAGAG  
AAAGCTGAGCAGCAGACTGCTGGAGTGA