

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250632

· 论 著 ·

基于CRISPR/Cas9技术构建HNF4A-EmGFP-P2A-blasticidin报告人胚胎干细胞系

张吉芊竹¹, 孙平新², 陆俊宇², 朱江波^{1*}, 李文林^{2*}

1. 海军军医大学(第二军医大学)海军医学系, 上海 200433

2. 海军军医大学(第二军医大学)基础医学院, 上海 200433

[摘要] **目的** 开发一种简便、高效的基于CRISPR/Cas9的基因编辑策略,以推动人多能干细胞在基础研究和再生医学中的应用。**方法** 采用基于脂质体转染试剂LipofectamineTM 3000的CRISPR/Cas9基因编辑方法,以人胚胎干细胞(hESC)为模型,在肝细胞核因子4 α (HNF4A)基因定点敲入祖母绿绿色荧光蛋白(EmGFP)-P2A-杀稻瘟素(blasticidin)报告模块,通过优化脂质体转染条件并结合双重抗性筛选策略以及Sanger测序分析,获得纯合编辑克隆。最后将该报告细胞系进行肝向诱导并检测分化过程中EmGFP信号。**结果** 该方法成功实现了在hESC中的高效基因敲入,并获得纯合编辑克隆。肝向分化结果表明,该报告细胞系可特异性激活EmGFP荧光信号,且其表达与肝细胞标志物白蛋白和甲胎蛋白同步。**结论** 本研究建立了一种使用脂质体瞬时转染CRISPR/Cas9与供体质粒载体的便捷策略,获得了HNF4A-EmGFP-P2A-blasticidin报告hESC细胞系,且该细胞系可用于示踪hESC的肝细胞分化。

[关键词] 人胚胎干细胞; 基因编辑; CRISPR-Cas9系统; 同源重组; 肝细胞核因子4 α

[引用本文] 张吉芊竹, 孙平新, 陆俊宇, 等. 基于CRISPR/Cas9技术构建HNF4A-EmGFP-P2A-blasticidin报告人胚胎干细胞系[J]. 海军军医大学学报, 2026, 47(4): 497-503. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250632.

Establishment of an HNF4A-EmGFP-P2A-blasticidin reporter human embryonic stem cell line using CRISPR/Cas9 technology

ZHANG Jiqianzhu¹, SUN Pingxin², LU Junyu², ZHU Jiangbo^{1*}, LI Wenlin^{2*}

1. Faculty of Naval Medicine, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

2. College of Basic Medical Sciences, Naval Medical University (Second Military Medical University), Shanghai 200433, China

[Abstract] **Objective** To develop a simple and efficient CRISPR/Cas9-based gene editing strategy to broaden the application of human pluripotent stem cell in basic research and regenerative medicine. **Methods** A CRISPR/Cas9-mediated gene editing approach was established using the lipofection reagent LipofectamineTM 3000. With human embryonic stem cell (hESC) as a model, an emerald green fluorescent protein (EmGFP)-P2A-blasticidin reporter module was precisely knocked into hepatocyte nuclear factor 4 alpha (HNF4A) gene. Transfection conditions were systematically optimized, and a dual antibiotic selection strategy was employed to obtain homozygous edited clones, which were validated by Sanger sequencing. The reporter cell line was then subjected to chemical induction toward hepatic differentiation, during which EmGFP expression was detected. **Results** The method achieved efficient gene knock-in in hESC and yielded homozygous edited clones. During hepatic differentiation, the reporter cell line specifically activated EmGFP fluorescence signals, and its expression was highly consistent with hepatocyte markers albumin and alpha-fetoprotein. **Conclusion** This study has established a convenient strategy using liposome-mediated transient transfection of CRISPR/Cas9 and donor plasmid vectors, and has achieved a HNF4A-EmGFP-P2A-blasticidin reporter hESC cell line, which can be used to trace hepatic differentiation of hESC.

[Key words] human embryonic stem cells; gene editing; CRISPR-Cas9 systems; homologous recombination; hepatocyte nuclear factor 4 alpha

[收稿日期] 2025-09-11 [接受日期] 2025-11-10

[基金项目] 国家自然科学基金重大研究计划培育项目(92168118), 国家自然科学基金面上项目(32170851, 32100642, 32370890, 32571334), 国家自然科学基金青年科学基金项目(32200971). Supported by Major Research Plan Cultivation Project of National Natural Science Foundation of China (92168118), General Program of National Natural Science Foundation of China (32170851, 32100642, 32370890, 32571334), and Youth Project of National Natural Science Foundation of China (32200971).

[作者简介] 张吉芊竹, 讲师. E-mail: zjqztox@163.com

*通信作者(Corresponding authors). E-mail: jiangbozhu1@smmu.edu.cn; liwenlin@smmu.edu.cn

[Citation] ZHANG J, SUN P, LU J, et al. Establishment of an *HNF4A*-EmGFP-P2A-blasticidin reporter human embryonic stem cell line using CRISPR/Cas9 technology[J]. Acad J Naval Med Univ, 2026, 47(4): 497-503. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20250632.

人多能干细胞 (human pluripotent stem cell, hPSC), 包括人胚胎干细胞 (human embryonic stem cell, hESC) 和人诱导多能干细胞 (human induced pluripotent stem cell, hiPSC), 具有无限自我更新和向多种细胞类型分化的潜能, 在发育生物学研究、疾病建模、药物筛选及再生医学等领域中展现出巨大的应用价值^[1-2]。为了深入解析干细胞分化机制、追踪特定谱系的发生过程, 研究者往往需要构建带有分化标志基因报告的细胞系, 如在基因组特定位点敲入荧光蛋白或药物抗性标记, 可以在细胞分化的动态过程中实时监测细胞命运。这类报告细胞系的建立不仅为发育生物学研究提供了强有力的工具, 也为临床转化研究奠定了基础^[3]。

CRISPR/Cas9 系统的出现使得在 hPSC 中进行定点基因组改造成为可能^[4], 且该系统设计简便、编辑效率高、适用范围广^[5]。目前主流的 hPSC 报告细胞系构建方法大多依赖于 CRISPR/Cas9 介导的同源修复^[6]。在这一策略中, 研究者通常将 Cas9 与向导 RNA (guide RNA, gRNA) 导入细胞, 同时提供带有同源臂的供体片段, 以便在靶基因位点实现精确敲入^[7]。然而在 hPSC 中实现高效敲入仍面临较大挑战, 与成体细胞系 (如 HEK 293T) 不同, hPSC 对外源 DNA 的导入格外敏感, 转染过程中易发生凋亡或分化, 从而降低细胞存活率和编辑效率^[8-9]; 在具体操作时常采用电穿孔或核转染等方式将 CRISPR 组件递送入细胞。对于 hPSC 这类对环境变化高度敏感的细胞, 电穿孔往往会降低细胞活性, 且设备昂贵、操作复杂, 限制了其在一般实验室的应用^[10]。此外, 部分实验室为追求更高的效率使用病毒载体系统 (如慢病毒) 来递送 CRISPR 组件, 然而病毒载体方法存在生产复杂、基因组插入风险等问题^[11]。相比之下, 脂质体介导的转染 (如 Lipofectamine 试剂) 因其操作简便、成本低, 在常规哺乳动物细胞中被广泛使用^[12-13]。但在 hPSC 中脂质体转染效率普遍较低, 且高剂量脂质体试剂容易引起细胞毒性, 因此长期以来并未被作为构建基因编辑 hPSC 的主流途径^[14]。

肝细胞核因子 4 α (hepatocyte nuclear factor 4

alpha, HNF4A) 是核受体超家族中高度保守的转录因子, 在肝脏中 HNF4A 仅在肝细胞内表达, 是调节肝脏增殖和分化过程的关键因子, 被认为是肝发生的中枢调节因子^[15]。已有研究显示, 敲除 *HNF4A* 可引起肝细胞特异性基因的表达发生变化, 导致去分化和增殖增加^[16], 因此, HNF4A 被广泛用作成熟肝细胞的标志物。

本研究建立了一种使用脂质体瞬时转染质粒 CRISPR/Cas9 与供体的便捷策略, 获得了在 hESC 的 *HNF4A* 基因插入报告基因祖母绿绿色荧光蛋白 (emerald green fluorescent protein, EmGFP) -P2A-杀稻瘟素 (blasticidin) 的细胞系, 并通过诱导该细胞系分化为肝细胞, 对报告基因的表达进行了验证。这一细胞系的建立为实时监测 hESC 向肝细胞的定向分化过程、分选功能成熟的肝细胞以及优化分化诱导体系提供了细胞模型。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株及细胞株 pSpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 购自美国 Addgene 公司, pEGFP-C1 和 pUC18 质粒为本实验室保存。hESC 系 H1 细胞为本实验室保存。Trans1-T1 感受态大肠埃希菌购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 实验试剂及仪器 MatrigelTM 基质胶购自美国 Corning 公司; NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix 试剂盒购自美国 NEB 公司; 限制性内切酶、LipofectamineTM 3000 转染试剂、TrueTagTM 供体 DNA 试剂盒、细胞培养试剂、Alexa Fluor 555 标记的二抗均购自美国 ThermoFisher Scientific 公司; 嘌呤霉素和 G418 购自上海赛徕克生物科技有限公司; PrimeSTAR[®] HS DNA 高保真聚合酶购自大连 TaKaRa 公司; DNA 片段纯化回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒和基因组提取试剂盒均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 白蛋白一抗购自英国 Abcam 公司; 甲胎蛋白一抗购自美国 R&D Systems 公司; 荧光显微镜购自日本 Nikon 公司。

1.3 gRNA 设计和载体质粒构建 利用美国麻省理工学院张峰实验室的在线工具 (<https://zlab.bio>。

guide-design-resources) 设计针对人 *HNF4A* 基因 TAG 终止密码子位置的 gRNA, gRNA 序列为 5'-CACCGAAGTTATCTAGCAAGCCGCT-3'、5'-AAACAGCGGCTTGCTAGATAACTTC-3'。PX459 载体可以同时表达 Cas9 蛋白、gRNA 和嘌呤霉素抗性筛选基因。使用张峰实验室的构建方法^[17]将 gRNA 序列连接至 PX459 载体, 转染 Trans1-T1 感受态大肠埃希菌, 挑取单克隆菌落进行扩增, 获得重组载体质粒并标记为 PX459-*HNF4A* gRNA。

1.4 供体质粒载体的构建 本研究共构建了 2 个供体质粒载体, 一个使用 pUC18, 另一个使用去除了 CMV-EGFP 片段的 pEGFP-C1。pEGFP-C1 经 *Ase I* 和 *Bgl II* 双酶切去除 CMV-EGFP 片段, 然后使用 T4 DNA 聚合酶补平, 并用 T4 DNA 连接酶环化, 该质粒载体保留了 pEGFP-C1 的 Psv40-Neo 抗性基因表达片段, 并命名为 pC1 载体。构建基于

pC1 载体的供体质粒方案如下: 首先通过人基因组 PCR 扩增 *HNF4A* 基因上下游同源臂 (产物长度分别为 899 bp 和 898 bp), PCR 引物分别为 *HNF4A*-5'-Arm F/R 和 *HNF4A*-3'-Arm F/R, 引物序列包含了 pC1 载体序列, 用于后续通过 Gibson 重组构建质粒载体。EmGFP-P2A-blasticidin 序列通过 EmGFP-P2A-blasticidin F/R 引物、采用 TrueTagTM 供体 DNA 试剂盒、使用 PrimeSTAR HS DNA 高保真聚合酶进行 PCR 扩增。引物序列见表 1。pC1 载体经 *EcoR I* 线性化后与 *HNF4A* 基因上下游同源臂片段和 EmGFP-P2A-blasticidin 片段通过 NEBuilder HiFi DNA Assembly Master Mix 试剂盒组装构建供体质粒载体, 该载体命名为 pC1 donor *HNF4A* EmGFP-P2A-blasticidin。通过同样的策略构建基于 pUC18 的供体质粒载体, 命名为 pUC18 donor *HNF4A* EmGFP-P2A-blasticidin。

表 1 目的片段引物序列

Tab 1 Primer sequences of target fragments

| Name | Sequence (5'-3') |
|-------------------------|--|
| <i>HNF4A</i> -5'-Arm-F | ACTCAGATCTCGAGCTCAAGCTTCGAATTCATCCATTAGACAATTAGATGAGA |
| <i>HNF4A</i> -5'-Arm-R | CTGCGCTGGAGAAGATGTCTCCGATGCGGGGATAAAGCTTCTGCTTGGTGATGG |
| EmGFP-P2A-blasticidin-F | TCCCCAGCCGACCATCACCAAGCAGGAAGTTATCGGAAGTGGCTCAGGTTCTGGA |
| EmGFP-P2A-blasticidin-R | GGCTGGGGGAGCCAGTGGAGCCCCAAGCCCCAGCGGCTTGCTACTTGGCCGATCGCA TACAGAG |
| <i>HNF4A</i> -3'-Arm-F | ATGAAAGTCAAAAGAAACCTCCCAAAACACAAGCCGCTGGGGCTTGGGGGCT |
| <i>HNF4A</i> -3'-Arm-R | GATCCCGGGCCCGCGGTACCGTCGACTGCATTCTCAAAGGCCTGGTGGATGG |

HNF4A: Hepatocyte nuclear factor 4 alpha; EmGFP: Emerald green fluorescent protein; F: Forward; R: Reverse.

1.5 hESC 培养、转染及基因型鉴定 在 hESC 传代后培养 24 h, 细胞密度达到 50%~70% 时进行转染。使用 LipofectamineTM 3000 转染试剂将 PX459-*HNF4A* gRNA 质粒及供体质粒载体共转染至 hESC, pEGFP-C1 质粒作为转染对照。转染 24 h 后将细胞传代至 MatrigelTM 基质胶包被的 10 cm 培养皿, 转染 48 h 后开始嘌呤霉素 (0.5 μg/mL) 或嘌呤霉素 (0.5 μg/mL) 联合 G418 (300 μg/mL) 进行筛选, 筛选 2~3 d 后去除嘌呤霉素, 筛选 7 d 后去除 G418。挑单克隆至 MatrigelTM 基质胶包被的 24 孔培养板, 继续培养 1 周后按 1:2 比例传代至 2 板 24 孔培养板。继续培养 1 周后, 一板细胞用于抽提 DNA 以鉴定细胞的基因型; 另一板细胞冻存, 待鉴定后挑取并扩增阳性克隆。*HNF4A* 基因型的鉴定引物为 HNF4A-genotyping primer

plus (5'-GAAGCCATTGTTGGGATGAGG-3')、*HNF4A*-genotyping primer minus (5'-TCA-TCCCTCTCCCACACCAT-3')。使用 ImageJ 1.53k 软件分析 pEGFP-C1 质粒转染后绿色荧光细胞的阳性率, 在显微镜下分别采集明场和 GFP 荧光通道图像, 对图像进行背景去噪处理, 随后将图像转换为 8-bit 格式。采用阈值算法设定 GFP 阳性信号阈值, 并在所有图像中保持一致。利用 Analyze Particles 功能分别统计明场图像中的总细胞数和 GFP 阳性细胞数, 计算转染效率 (GFP 阳性细胞数 / 总细胞数 × 100%)。

1.6 *HNF4a*-EmGFP-P2A-blasticidin 报告细胞系的肝向分化 将筛选得到的 *HNF4a*-EmGFP-P2A-blasticidin 报告细胞系以 70% 的密度接种于 MatrigelTM 基质胶包被的 6 孔板中, 按前期本课题组发表的肝细

胞诱导方案进行肝向诱导^[18], 共分为5个阶段, 分别为hESC→原条(primitive streak)→定型内胚层(definitive endoderm)→原始肠管(primitive gut tube)→肝母细胞(hepatoblast)→肝细胞(hepatocyte)。诱导过程结束后对得到的肝细胞进行免疫荧光检测: 细胞经4%多聚甲醛溶液室温固定10 min, 用PBST(含0.2% Triton X-100的PBS)清洗3次, 每次5 min; 加入含有5%驴血清的PBST封闭液室温破膜封闭30 min, 分别加入白蛋白和甲胎蛋白一抗4℃过夜孵育; 然后用PBST清洗3次, 加入Alexa Fluor 555标记的相应二抗, 室温孵育1 h, DAPI复染细胞核后使用荧光显微镜拍摄, 观察EmGFP表达情况。

1.7 统计学处理 应用GraphPad Prism 10.1软件

进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两个时间点转染效率的比较采用配对 t 检验。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 *HNF4 α* -EmGFP-P2A-blasticidin 报告 hESC 细胞系的构建策略 本研究通过CRISPR/Cas9技术构建了*HNF4 α* -EmGFP-P2A-blasticidin 报告 hESC 细胞系, 基本构建策略是针对*HNF4A*基因TAG终止密码子附近位置设计gRNA, 并以此位置设计上下游同源臂, 构建包含EmGFP-P2A-blasticidin报告基因的供体质粒载体。其中EmGFP与内源*HNF4A*基因融合表达, blasticidin抗性基因通过P2A自剪切肽与*HNF4 α* -EmGFP相连。如图1所示。

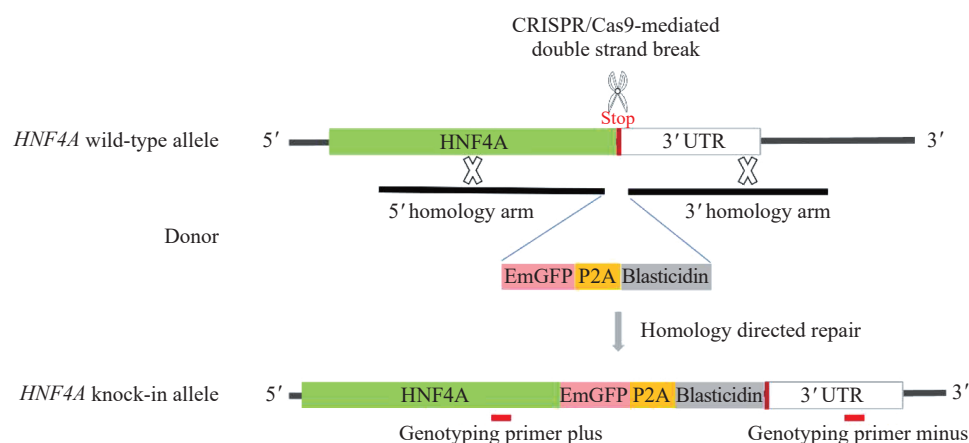


图1 *HNF4 α* -EmGFP-P2A-blasticidin 报告 hESC 细胞系的构建策略

Fig 1 Construction strategy of *HNF4 α* -EmGFP-P2A-blasticidin reporter hESC cell lines

HNF4A: Hepatocyte nuclear factor 4 alpha; EmGFP: Emerald green fluorescent protein; hESC: Human embryonic stem cell; UTR: Untranslated region.

2.2 转染前24 h传代提高hESC的转染效率 使用LipofectamineTM 3000转染试剂将pEGFP-C1质粒递送至传代24 h和72 h的hESC, 72 h组绿色荧光信号少且主要位于克隆边缘(图2)。定量分析结果显示, 24 h组的转染效率为(6.40±0.38)%, 高于72 h组的(2.47±0.95)%($n=3$, $P<0.01$)。因此, 本研究后续实验均于传代24 h开始hESC转染。

2.3 CRISPR/Cas9和供体质粒载体的双抗性筛选提高纯合编辑克隆的效率 首先利用LipofectamineTM 3000转染试剂共转染了PX459-*HNF4A* gRNA和pUC18 donor *HNF4A* EmGFP-P2A-blasticidin。在经嘌呤霉素筛选后成功扩增的102个

克隆中, 有8个克隆呈现杂合编辑的条带, 未鉴定到纯合编辑的克隆。进一步利用LipofectamineTM 3000转染试剂共转染了PX459-*HNF4A* gRNA和pC1 donor *HNF4A* EmGFP-P2A-blasticidin, 基因型鉴定显示双抗性筛选提高了克隆编辑的比例, 从经嘌呤霉素和G418筛选后成功扩增的20个hESC克隆中鉴定到2个纯合编辑克隆(图3A, 7号和18号克隆), 6个克隆为杂合编辑。对7号克隆进行Sanger测序验证, 发现其基因序列与预期相符(图3B)。

2.4 *HNF4 α* -EmGFP-P2A-blasticidin 报告细胞系可用于示踪hESC向肝细胞分化 将筛选得到的*HNF4 α* -EmGFP-P2A-blasticidin细胞系(7号克隆)进行诱导分化培养。*HNF4 α* -EmGFP-P2A-blasticidin

报告 hESC 细胞在诱导前无绿色荧光 (图 4A), 但在向肝细胞诱导分化 25 d 后部分细胞有明显的核定位绿色荧光, 且这些细胞共表达肝细胞标志分子白蛋白 (图 4B) 和甲胎蛋白 (图 4C)。上述结果证

实本实验成功构建了 *HNF4A*-EmGFP-blasticidin 报告 hESC 细胞系, EmGFP 报告基因可以示踪 hESC 向肝细胞分化过程。

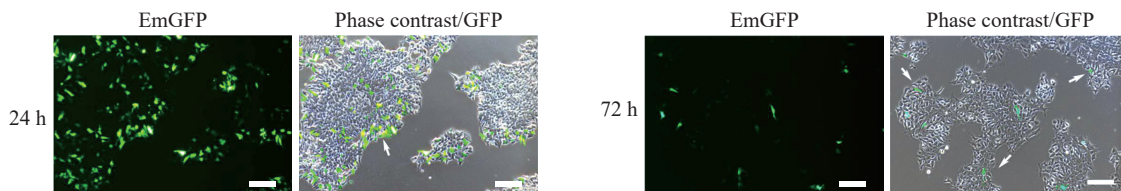


图 2 转染前培养不同时间传代 hESC 的转染效率

Fig 2 Transfection efficiency of passaged hESC cultured for different durations before transfection

Strong GFP expression was observed in the hESC cultured for 24 h, which markedly diminished by 72 h. Arrows indicate EmGFP-expressing areas. Scale bar=100 μm. hESC: Human embryonic stem cell; EmGFP: Emerald green fluorescent protein.

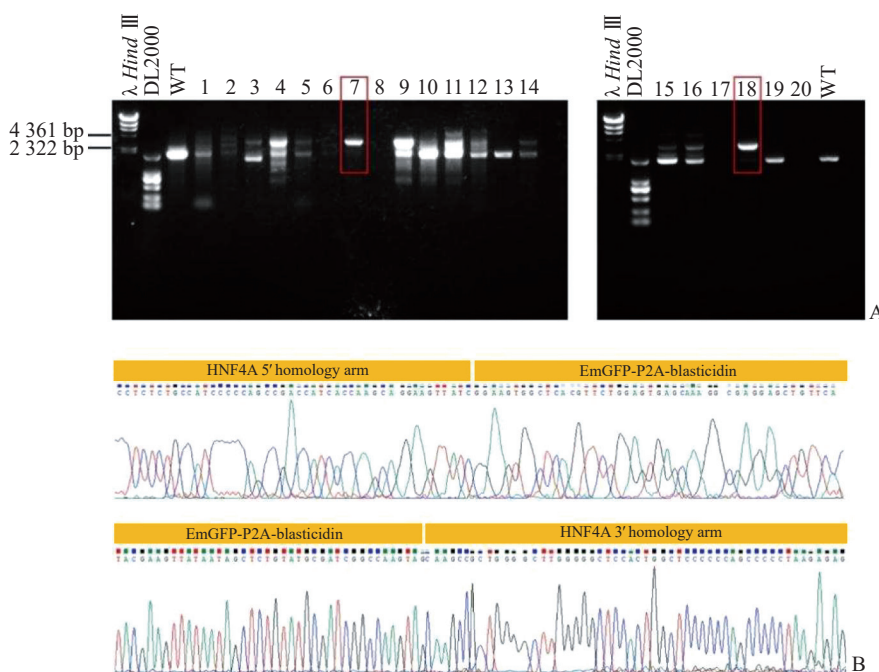


图 3 CRISPR/Cas9 和供体质粒载体的双抗性筛选提高纯合编辑克隆的效率

Fig 3 Dual antibiotic selection with CRISPR/Cas9 and donor plasmid vector enhances efficiency of homozygous edited clones

A: Agarose gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction products amplified from genomic DNA of transfected hESC. λ *Hind* III is a DNA molecular weight marker. DL2000 is a commonly used DNA marker with a band size range covering 2 000 bp and below. Lanes labeled “WT” represent wild-type samples. Lanes 1-20 represent candidate clones, among which lanes 7 and 18 (highlighted with red boxes) correspond to homozygous edited clones. B: Sanger sequencing chromatogram and corresponding nucleotide sequence spanning the junction regions of the knock-in site. HNF4A: Hepatocyte nuclear factor 4 alpha; EmGFP: Emerald green fluorescent protein.

3 讨论

本研究利用脂质体介导的转染方法, 结合 CRISPR/Cas9 基因编辑系统和双抗性筛选策略, 成功在 hESC 中实现了 *HNF4A* 基因的 EmGFP-P2A-blasticidin 报告基因敲入, 建立了一种可用于监测

肝细胞分化过程的工具细胞系。与现有方法相比, 该方案具有以下优势: (1) 完全摆脱了对昂贵电穿孔设备的依赖^[19], 仅依靠常规实验室中普遍使用的转染试剂即可操作, 极大降低了实验门槛和成本; (2) 利用质粒形式的 Cas9 组件和供体片段, 使操作流程更加简化; (3) 通过优化脂质体转染

条件提升了敲入效率。该方案突破了长期以来脂质体转染不适用于 hPSC 高效基因编辑的局限,为构建报告细胞系提供了一种更为稳健且低成本的替代方案。

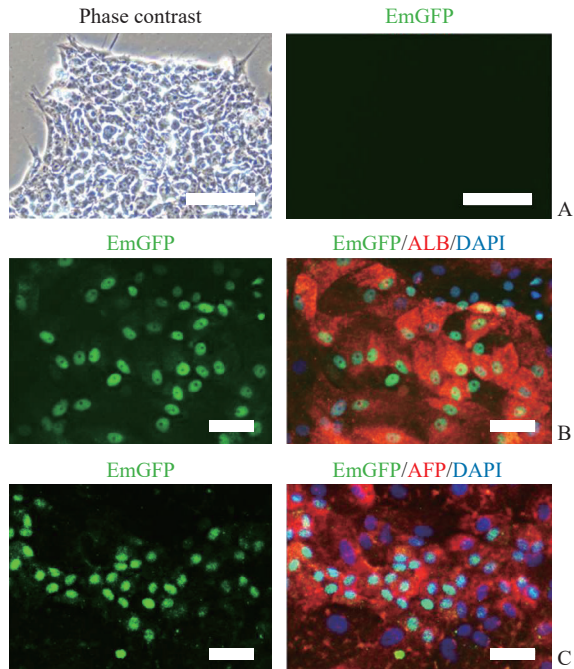


图4 *HNF4α*-EmGFP-P2A-blasticidin 报告细胞系可用于示踪 hESC 向肝细胞分化

Fig 4 *HNF4α*-EmGFP-P2A-blasticidin reporter cell line enables tracing of hepatocyte differentiation from hESC

A: EmGFP expression is undetectable in *HNF4α*-EmGFP-P2A-blasticidin reporter hESC before hepatic induction; B, C: Immunofluorescence analysis of ALB/AFP and EmGFP expression in *HNF4α*-EmGFP-P2A-blasticidin reporter hESC after 25 d of hepatic differentiation. Scale bar=50 μm. HNF4A: Hepatocyte nuclear factor 4 alpha; EmGFP: Emerald green fluorescent protein; hESC: Human embryonic stem cell; ALB: Albumin; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole; AFP: Alpha-fetoprotein.

首先,本研究证明了通过优化脂质体转染条件可以在 hESC 中获得可观的转染效率。长期以来,脂质体转染在 hPSC 中的应用受限于其低效率和高毒性。在既往研究中使用 Lipofectamine 只能转染零星的细胞,且被转染的细胞绝大部分分布于 hESC 的克隆边缘,可能是紧密的上皮细胞连接影响了转染效率^[20]。因此,设想在细胞传代后(细胞克隆相对松散),尽快进行转染有可能会提高细胞的转染效率。本研究验证结果显示,在传代后 24 h 即进行转染改善了转染效果,这可能与此时细胞间

连接尚未完全形成、细胞膜更易摄入外源 DNA 有关。这一结果提示,在进行 hPSC 基因编辑时细胞状态和转染时机的选择至关重要,为后续进一步优化条件提供了新思路。

其次,本研究中采用了 CRISPR/Cas9 与供体质粒载体的双重抗性筛选策略,有效提高了纯合克隆的筛选效率。在传统的基因编辑实验中,往往需要筛选大量克隆才能获得少数阳性细胞^[21],而双重抗性策略通过对 Cas9 质粒和供体质粒同时施加选择压力,提升了定点整合的成功率。这对于提高实验效率和降低成本均具有积极意义,也为后续在其他基因位点进行敲入实验提供了借鉴。

更为重要的是,本研究构建的 *HNF4A*-EmGFP-P2A-blasticidin 报告细胞系在功能验证中表现出良好的可靠性。在分化诱导过程中报告基因的激活与肝细胞标志基因的表达高度一致,表明该模型能够准确示踪 hESC 向肝细胞分化的进程。这不仅有助于研究肝细胞分化的分子机制,也为肝脏疾病建模和药物筛选提供了有价值的工具。尤其在肝脏再生和干细胞治疗研究中,该细胞系可用于实时监测分化效率,进而优化诱导条件,提高获得成熟肝细胞的效率和一致性。需要指出的是,尽管本研究所建立的方法对 hESC 的转染效率和编辑效率相较于传统脂质体方法有明显提升,但与电穿孔等方法相比仍存在差距,在大规模构建编辑细胞系时可能仍需借助其他递送策略。

综上所述,本研究通过脂质体介导的 CRISPR/Cas9 基因编辑系统和双抗性筛选成功在 hESC 中构建了 *HNF4A*-EmGFP-P2A-blasticidin 报告细胞系,突破了脂质体转染在 hPSC 基因编辑中的应用瓶颈。该策略不仅在技术层面提供了一种更为低成本、易操作的方案,也在应用层面为研究肝细胞分化机制、肝脏疾病建模以及再生医学研究提供了工具。

[参考文献]

- [1] LUCE E, DUCLOS-VALLEE J C. Stem cells and organoids: a paradigm shift in preclinical models toward personalized medicine[J]. *Pharmaceuticals (Basel)*, 2025, 18(7): 992. DOI: 10.3390/ph18070992.
- [2] ABOUL-SOUD M A M, ALZHRANI A J, MAHMOUD A. Induced pluripotent stem cells (iPSCs)-roles in regenerative therapies, disease modelling and

- drug screening[J]. *Cells*, 2021, 10(9): 2319. DOI: 10.3390/cells10092319.
- [3] CHIRIKIAN O, GOODYER W R, DZILIC E, et al. CRISPR/Cas9-based targeting of fluorescent reporters to human iPSCs to isolate atrial and ventricular-specific cardiomyocytes[J]. *Sci Rep*, 2021, 11(1): 3026. DOI: 10.1038/s41598-021-81860-x.
- [4] CANALS I, AHLENIUS H. CRISPR/Cas9 genome engineering in human pluripotent stem cells for modeling of neurological disorders[J]. *Methods Mol Biol*, 2021, 2352: 237-251. DOI: 10.1007/978-1-0716-1601-7_16.
- [5] SHARMA G, SHARMA A R, BHATTACHARYA M, et al. CRISPR-Cas9: a preclinical and clinical perspective for the treatment of human diseases[J]. *Mol Ther*, 2021, 29(2): 571-586. DOI: 10.1016/j.ymthe.2020.09.028.
- [6] BYRNE S M, MALI P, CHURCH G M. Genome editing in human stem cells[J]. *Methods Enzymol*, 2014, 546: 119-138. DOI: 10.1016/B978-0-12-801185-0.00006-4.
- [7] DI STAZIO M, FOSCHI N, ATHANASAKIS E, et al. Systematic analysis of factors that improve homologous direct repair (HDR) efficiency in CRISPR/Cas9 technique[J]. *PLoS One*, 2021, 16(3): e0247603. DOI: 10.1371/journal.pone.0247603.
- [8] PARK J C, KIM Y J, HWANG G H, et al. Enhancing genome editing in hPSCs through dual inhibition of DNA damage response and repair pathways[J]. *Nat Commun*, 2024, 15(1): 4002. DOI: 10.1038/s41467-024-48111-9.
- [9] PARK J C, PARK M J, LEE S Y, et al. Gene editing with 'pencil' rather than 'scissors' in human pluripotent stem cells[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2023, 14(1): 164. DOI: 10.1186/s13287-023-03394-5.
- [10] LI X L, LI G H, FU J, et al. Highly efficient genome editing via CRISPR-Cas9 in human pluripotent stem cells is achieved by transient BCL-XL overexpression[J]. *Nucleic Acids Res*, 2018, 46(19): 10195-10215. DOI: 10.1093/nar/gky804.
- [11] WANG J H, GESSLER D J, ZHAN W, et al. Adeno-associated virus as a delivery vector for gene therapy of human diseases[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 78. DOI: 10.1038/s41392-024-01780-w.
- [12] JAHANAFROOZ Z, BAKHSHANDEH B, SHIRZADI E. Comparative evaluation of lipofectamine and dendrimer for transfection of short RNA into human T47D and MCF-10A cell lines[J]. *Adv Pharm Bull*, 2023, 13(2): 385-392. DOI: 10.34172/apb.2023.022.
- [13] WANG T, LARCHER L M, MA L, et al. Systematic screening of commonly used commercial transfection reagents towards efficient transfection of single-stranded oligonucleotides[J]. *Molecules*, 2018, 23(10): 2564. DOI: 10.3390/molecules23102564.
- [14] OCHOA-SÁNCHEZ C, RODRÍGUEZ-LEÓN E, IÑIGUEZ-PALOMARES R, et al. Brief comparison of the efficacy of cationic and anionic liposomes as nonviral delivery systems[J]. *ACS Omega*, 2024, 9(47): 46664-46678. DOI: 10.1021/acsomega.4c06714.
- [15] WATT A J, GARRISON W D, DUNCAN S A. HNF4: a central regulator of hepatocyte differentiation and function[J]. *Hepatology*, 2003, 37(6): 1249-1253. DOI: 10.1053/jhep.2003.50273.
- [16] WALESKY C, APTE U. Role of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) in cell proliferation and cancer[J]. *Gene Expr*, 2015, 16(3): 101-108. DOI: 10.3727/105221615X14181438356292.
- [17] CONG L, ANN RAN F, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823. DOI: 10.1126/science.1231143.
- [18] ZHANG M, SUN P, WANG Y, et al. Generation of self-renewing hepatoblasts from human embryonic stem cells by chemical approaches[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2015, 4(11): 1275-1282. DOI: 10.5966/sctm.2015-0051.
- [19] LINO C A, HARPER J C, CARNEY J P, et al. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches[J]. *Drug Deliv*, 2018, 25(1): 1234-1257. DOI: 10.1080/10717544.2018.1474964.
- [20] TSCHEIK C, BLASIG I E, WINKLER L. Trends in drug delivery through tissue barriers containing tight junctions[J]. *Tissue Barriers*, 2013, 1(2): e24565. DOI: 10.4161/tisb.24565.
- [21] WANG S, LI Y, ZHONG L, et al. Efficient gene editing through an intronic selection marker in cells[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2022, 79(2): 111. DOI: 10.1007/s00018-022-04152-1.

[本文编辑] 尹 茶