

SNX9基因敲除小鼠模型的构建及表型分析

林恒¹, 蒋晓倩¹, 胥元博², 潘宗岳², 任洋², 杨朝鲜¹

西南医科大学: 1. 基础医学院解剖教研室; 2. 医学影像系(泸州 646000)

【摘要】目的 利用CRISPR/Cas9技术构建分选连接蛋白9(sorting nexin 9, SNX9)基因敲除小鼠模型并对其表型进行分析。**方法** 针对C57BL/6小鼠SNX9基因第3~5外显子,设计gRNA靶位点并在体外转录获得sgRNA,与编码Cas9的mRNA混合后通过受精卵显微注射方法获得F0代阳性敲除小鼠。通过繁育及基因型鉴定获得SNX9基因敲除纯合子小鼠(SNX9^{-/-}小鼠);取小鼠尾部组织提取DNA,用PCR和琼脂糖凝胶电泳进行基因型鉴定;提取SNX9基因敲除小鼠脑组织蛋白,用Western blot检测SNX9蛋白和小胶质细胞标志蛋白的表达水平;记录SNX9基因敲除小鼠的繁殖率和体重,并与野生型小鼠比较;步态系统分析SNX9基因敲除小鼠的步态情况;苏木精-伊红(HE)染色观察小鼠脑组织的形态结构。**结果** F1代杂合子(SNX9^{+/-})小鼠繁育后可获得3种基因型:野生型(SNX9^{+/+})、杂合子(SNX9^{+/-})、纯合子(SNX9^{-/-});鼠尾提取的DNA用聚合酶链反应(PCR)能鉴定出小鼠的基因型,SNX9敲除小鼠脑组织的SNX9蛋白表达显著低于野生型小鼠;SNX9基因敲除小鼠可正常生长繁殖,但繁殖率显著低于野生型小鼠($P < 0.001$),体重无显著差异($P > 0.05$);SNX9基因敲除小鼠脑组织形态学特征与野生型小鼠相比无明显差异;SNX9基因敲除小鼠脑组织的小胶质细胞标志蛋白表达水平与野生型小鼠相比差异无统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 利用CRISPR/Cas9技术成功获得SNX9基因敲除小鼠,为研究SNX9基因的生物学功能和调控机制提供了实验动物模型。

【关键词】 分选连接蛋白9;CRISPR/Cas9;基因敲除;表型分析

【中图分类号】 R-332

文献标志码 A

DOI:10.3969/j.issn.2096-3351.2024.04.005

Construction and phenotypic analysis of SNX9 gene knockout mouse model

LIN Heng¹, JIANG Xiaoqian¹, XU Yuanbo², PAN Zongyue², REN Yang², YANG Chaoxian¹

1. Department of Anatomy, School of Basic Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China; 2. Department of Medical Imaging, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

【Abstract】Objective To construct sorting nexin 9 (SNX9) gene knockout mouse model using CRISPR/Cas9 technology and analyze its phenotype. **Methods** sgRNA target sites were designed for exon 3 ~ 5 of SNX9 gene, and gRNA was transcribed in vitro. After mixing with mRNA encoding Cas9, F0 generation positive knockout mice were obtained by microinjection of fertilized eggs. SNX9 gene knockout homozygous (SNX9^{-/-}) mice were obtained by breeding and genotype identification. DNA was extracted from the tail tissue of mice, and genotypes were determined by polymerase chain reaction (PCR) and agarose gel electrophoresis. The expressional levels of SNX9 and microglia marker proteins were detected by Western blot in SNX9 gene knockout mice. The reproductive rate and body weight of the SNX9 gene knockout mice were recorded. The gait of SNX9 gene knockout mice was analyzed by gait system. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the brain structure of mouse. **Results** F1 heterozygous (SNX9^{+/-}) mice mated to obtain three genotypes: wild type (SNX9^{+/+}), heterozygous (SNX9^{+/-}), and homozygous (SNX9^{-/-}). DNA derived from mouse tail was used to identify mouse genotypes by PCR, and the level of SNX9 protein of SNX9 knockout mice was significantly lower than that of the wild-type mice. SNX9 gene knockout mice could grow and reproduce normally, but its reproduction rate was lower than that of wild-type mice, with normal body weight index. There were no significant differences ($P > 0.05$) in the brain morphology and expressions of microglial marker proteins between SNX9 gene knockout mice and wild-type mice. **Conclusion** SNX9 gene knockout mouse model was successfully constructed using CRISPR/Cas9 techniques, which provided an experimental animal model for studying the biological function and regulatory mechanism of SNX9 gene.

【Key words】 Sorting nexin 9; CRISPR/Cas9; Gene knockout; Phenotype analysis

基金项目:四川省自然科学基金(2022NSFSC0718);西南医科大学应用基础面上项目(2021ZKMS011)

通信作者:杨朝鲜, E-mail:lyycx@foxmail.com

引用本文:林恒,蒋晓倩,胥元博,等.SNX9基因敲除小鼠模型的构建及表型分析[J].西南医科大学学报,2024,47(4):93-97.DOI:10.3969/j.issn.2096-3351.2024.04.005.

基因敲除(knockout, KO)技术是利用同源重组,敲除靶基因中一些重要外显子或者功能结构域,甚至全部外显子,从而使靶基因表达缺失。条件性基因敲除技术能够敲除所关注的特异性组织或者细胞内的基因而不会导致生物自身死亡。随着分子生物学及生物化学的不断发展与完善,基因敲除已经成为一个崭新的研究热点和前沿课题。利用CRISPR/Cas9和gRNA技术对大鼠或小鼠进行条件性基因敲除已经成为该领域研究的新途径^[1]。

分选连接蛋白(sorting nexins, SNXs)是一类参与蛋白分选和调节细胞内膜运输的蛋白大家族。SNX9是其成员之一,含有PX、BAR、SH3三种结构域^[2-4]。PX结构域可以与磷脂和磷酸化衍生物相结合,使蛋白在这种磷脂浓缩的薄膜中定位而起薄膜定位作用。BAR结构域可诱导细胞膜弯曲,参与膜重塑和曲率调节^[5-6]。SNX9在网格蛋白介导的内吞作用中起着关键作用^[7-10],被认为是参与基本细胞活动的重要蛋白质,与动力蛋白紧密结合,部分负责将该GTPase招募到内吞作用位点。SNX9在膜上组装后,刺激动力蛋白的GTPase活性,促进分裂反应。SNX9能够以膜依赖性的方式激活肌动蛋白调节因子N-WASP,以协调肌动蛋白聚合与囊泡释放^[11-14]。近年不断有研究表明SNX9在癌^[15-17]、白血病^[18]、肠道屏障^[19]、败血症^[20]、炎症^[21-22]等疾病免疫调控机制中发挥作用。小胶质细胞是中枢神经系统关键的免疫效应细胞,受内外环境刺激可导致大量炎症因子的释放,包含肿瘤坏死因子 α (TNF α)、白介素-1 β (IL-1 β)、白介素-6(IL-6)、白介素-8(IL-8)、硝酸氧化合酶2(NOS2)、环氧合酶-2(COX2)、活性氧(ROS)等^[23-26]。小胶质细胞被激活后有两种极化状态即M1表型和M2表型,M1表型小胶质细胞释放高水平的炎症因子加重炎症反应,M2表型能够分泌抗炎因子及上调神经保护因子发挥抗炎作用^[27-31]。

为了更深入研究SNX9的生物学功能,本课题组拟通过CRISPR/Cas9技术建立SNX9基因敲除小鼠模型,初步探讨SNX9基因在小鼠遗传表型以及脑组织形态和小胶质细胞等方面的作用,并且为SNX9基因相关的研究提供实验动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SNX9基因敲除小鼠品种为C57BL/6, SPF级,委托赛业生物科技有限公司构建,在西南医科大学动物实验中心繁殖扩群。动物房相对湿度(55 \pm 5)%,温度25 $^{\circ}$ C,光照遵循昼夜节律。经西南医科大学实验动物中心审批(伦理批号:20210927-009),并且严格遵循实验动物3R使用原则。

1.1.2 主要试剂 DNA提取试剂盒(TaKaRa);琼脂糖

粉末(广州赛国);TAE(50X)电泳缓冲液(碧云天);HE染色试剂盒(索莱宝);BCA试剂盒(索莱宝);SNX9抗体(Abcam);Arg1抗体(Proteintech);TNF α (Proteintech);Iba1抗体(Affinity); β -actin抗体(Abcam);HRP标记山羊抗兔/小鼠IgG(索莱宝);PVDF膜(Immobilon)。

1.2 方法

1.2.1 SNX9基因敲除小鼠的制备 SNX9基因敲除小鼠由广州赛业生物科技有限公司构建。具体过程简述如下:SNX9位于第17号染色体上(NCBI ID:66616;参考序列:NM_025664;集合:ENSMUSG0000002365),包含18个外显子。选择敲除区域为外显子3~5(exon3~5),在外显子1(exon1)非编码区和外显子5(exon5)下游序列中分别设计gRNA将此段基因进行剪切,gRNA序列信息见表1。

表1 gRNA序列信息

Table 1 Sequence information of gRNA

gRNA序列	序列信息(5'-3')
gRNA1	GTGGAGCCGGGTAGGTTCCCAGG
gRNA2	CTTAGCAATAAACGGGCGACAGG
gRNA3	AGGTTCATCCCGGAAACATAGG
gRNA4	GCACAGTGACTCCGGATGCAGGG

外显子3~5占编码区20.73%,有效敲除区大小为10142 bp,且敲除区没有任何其他已知基因。首先合成gRNA引物,引物退火后将退火产物与基本载体连接,连接产物转化感受态,涂平板过夜培养,再通过PCR筛选阳性克隆菌落并进行测序验证,以此构建sgRNA表达载体。载体质粒转化大肠杆菌后摇菌提取适量质粒,质粒纯化后进行测序鉴定,保存正确的阳性克隆。对sgRNA和Cas9表达载体进行体外转录后,将Cas9 mRNA和sgRNA混合物通过显微注射到C57BL/6野生型小鼠(Wild-type, WT)的受精卵中,并将注射后的受精卵移植到假孕雌鼠子宫中,从而发育成杂合子SNX9^{+/-}小鼠。出生后,小鼠饲养条件为SPF级。小鼠的性成熟期约为6~7w,妊娠期约为20 d,将性成熟期的雄雌鼠各一合笼繁殖子代。

1.2.2 基因敲除小鼠的鉴定 SNX9基因敲除杂合子(SNX9^{+/-})小鼠繁殖的子代有可能出现野生型SNX9^{+/+}、杂合子SNX9^{+/-}及纯合子SNX9^{-/-}3种表型。剪去小鼠尾巴末端0.3 cm左右,按照说明书的操作要求进行DNA提取,用双蒸水溶解后4 $^{\circ}$ C保存并进行琼脂糖凝胶电泳,确定SNX9基因敲除小鼠子代基因型,鉴定引物P1/P2序列信息见表2。聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)反应体系:上游及下游引物各1 μ L,模板DNA 1.5 μ L,灭菌ddH₂O 9 μ L, Premix Taq 12.5 μ L。循环条件:94 $^{\circ}$ C预变性3 min;94 $^{\circ}$ C变性30 s, 60 $^{\circ}$ C退火35 s;72 $^{\circ}$ C延伸35 s;72 $^{\circ}$ C再延伸5 min,

共35个循环,4℃保存。通过琼脂糖凝胶电泳,对小鼠基因型进行鉴定。WT型目的条带在602 bp处出现,KO型目的条带在614 bp处出现,杂合子目的条带在614 bp和602 bp处同时出现。

表2 引物序列信息

Table 2 Sequence information of primers

引物	序列信息(5'-3')
Primers1: F1	GACACAGTATTGACTACACTCAACC
Primers1: R1	CAGATGTAGTCGGGTTTTCTGGA
Primers2: F2	GACACAGTATTGACTACACTCAACC
Primers2: R2	AACATCGGGTGCTCTTCCTTG

1.2.3 Western blot 腹腔注射戊巴比妥钠麻醉小鼠,快速取出小鼠脑组织并进行蛋白提取,采用BCA法进行蛋白浓度测定;电泳、转膜,脱脂奶粉(5%)封闭1 h;一抗SNX9(1:1 000)/Arg1(1:1 000)/TNF α (1:1 000)/Iba1(1:1 000)/ β -actin(1:1 000),PBST洗膜10 min,重复3次;二抗(1:10 000)室温孵育1 h,PBST洗膜10 min,重复3次;ECL避光显色曝光显影。用Image J软件分析,各目的蛋白条带灰度值与内参条带灰度值之比为该蛋白的相对表达量。

1.2.4 生育率和体重 SPF级饲养环境,相对湿度(55 \pm 5)%,温度(23 \pm 2)℃,光照遵循昼夜节律,收集野生型小鼠和SNX9基因敲除小鼠的繁殖数量,定期测量体重。

1.2.5 步态分析 用Tread Scan™步态分析系统获取各组小鼠的站立时间和足底压力步态参数。在测试前,将Tread Scan™跑步机开灯预热5 min以减少照明波动。跑步机由一个透明的电动跑步机带组成,下面安装一面倾斜的镜子。安装高速数码相机,记录镜子反射的跑步机背带的腹侧,并在每只小鼠放上跑步机之前采集背景图像。每只小鼠在跑步机上的奔跑速度为6 cm/s,最大捕获帧数为2 000帧,频率为100帧/s,分析前加载或生成校准和足迹数据文件。

1.2.6 苏木精-伊红染色 小鼠脑组织标本用4%多聚甲醛固定,石蜡包埋切片,苏木精-伊红(HE)染色,观察SNX9基因敲除小鼠脑组织结构变化。

1.3 统计学处理

用SPSS 27统计学软件进行数据分析,以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用非配对Student's *t*检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 SNX9基因敲除小鼠构建方案

SNX9基因敲除小鼠由广州赛业生物科技公司构建,方案如图1所示。

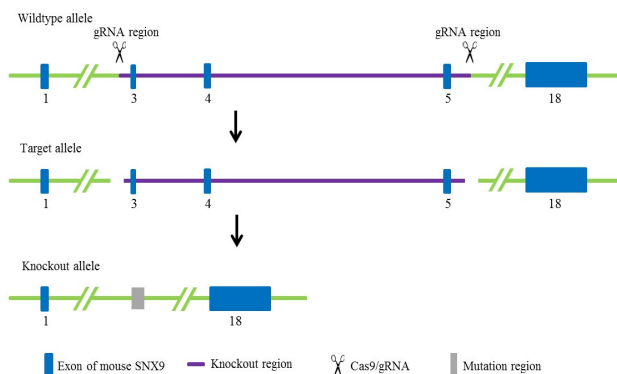


图1 SNX9基因敲除小鼠构建方案

Figure 1 Construction scheme of SNX9 gene knockout mouse

2.2 SNX9基因敲除小鼠的基因型鉴定

PCR扩增小鼠尾部DNA,并进行琼脂糖凝胶电泳,仅扩增出Primers2的602 bp片段为SNX9^{+/+}野生型小鼠,仅扩增出Primers1的614 bp片段为SNX9^{-/-}纯合子小鼠,同时扩增出Primers1的614 bp片段和Primers2的602 bp片段为SNX9^{+/-}杂合子小鼠(见图2A)。对PCR扩增产物进行测序比对,证实敲除成功(见图2B)。

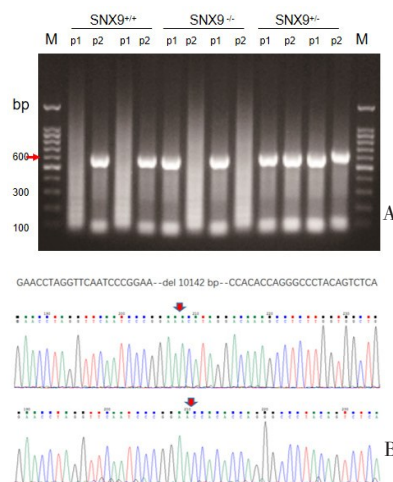


图2 SNX9基因敲除小鼠的DNA鉴定PCR产物电泳图及测序图

Figure 2 DNA identification of PCR products of SNX9 gene knockout mice by electrophoresis and sequencing

注:图A为PCR产物电泳图,图B为PCR产物测序结果。M为marker;P1为primer1,条带是614 bp;P2为primer2,条带是602 bp。

2.3 SNX9基因敲除小鼠脑SNX9蛋白的水平

SNX9蛋白的相对分子质量为78 kDa,Western blot结果显示SNX9基因敲除小鼠脑组织的SNX9蛋白表达水平显著低于野生型小鼠(见图3)。

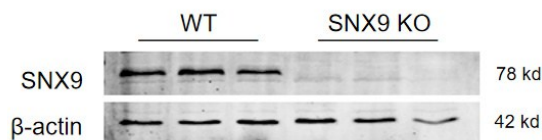


图3 Western blot检测SNX9基因敲除小鼠脑组织SNX9蛋白的表达水平

Figure 3 The expression of SNX9 protein in brain tissue of SNX9 gene knockout mice determined by Western blot

2.4 SNX9基因敲除小鼠的生长繁殖和体重情况

SNX9基因敲除小鼠已成功繁殖扩群,子代小鼠生长状况良好。小鼠约6~7w进入性成熟期,性周期为4~5d,妊娠期约20d,哺乳期约20d,每胎产仔数为2~6只,低于野生型小鼠每胎产仔数4~9只,但成活率均>98%(见图4A)。此外,SNX9基因敲除小鼠和野生型小鼠成年后体重差异无统计学意义($P > 0.05$),见图4B。

2.5 基因敲除小鼠的步态分析

步态系统设置跑步机上的奔跑速度为6 cm/s,最大捕获帧数为2000帧,频率为100帧/s,生成数据文件分析站立时间和足部压力,差异均无统计学意义($P > 0.05$),见图5。

2.6 SNX9基因敲除小鼠脑组织结构

将SNX9基因敲除小鼠和野生型小鼠脑组织制作石蜡切片,HE染色后对结果进行对比,两者脑组织结构无明显差异,见图6。

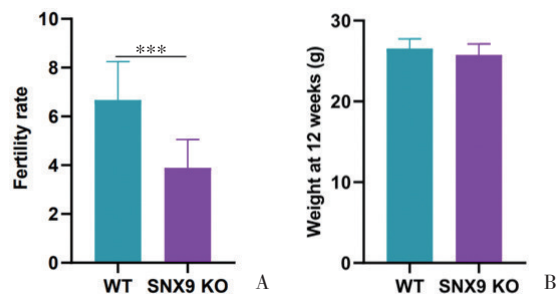


图4 SNX9基因敲除小鼠与野生型小鼠出生率、体重比较

Figure 4 Comparison of birth rate and body weight between SNX9 gene knockout mice and wildtype mice

注:A: SNX9基因敲除小鼠与野生型小鼠出生率比较,***表示 $P < 0.001$; B: SNX9基因敲除小鼠与野生型小鼠体重比较。

2.7 SNX9基因敲除小鼠脑小胶质细胞标志蛋白的表达

Arg1、TNF α 、Iba1蛋白的相对分子质量分别为38、22、17,Western blot结果显示SNX9敲除小鼠脑组织的Arg1、TNF α 、Iba1蛋白表达水平与野生小鼠差异无统计学意义($P > 0.05$),见图7。

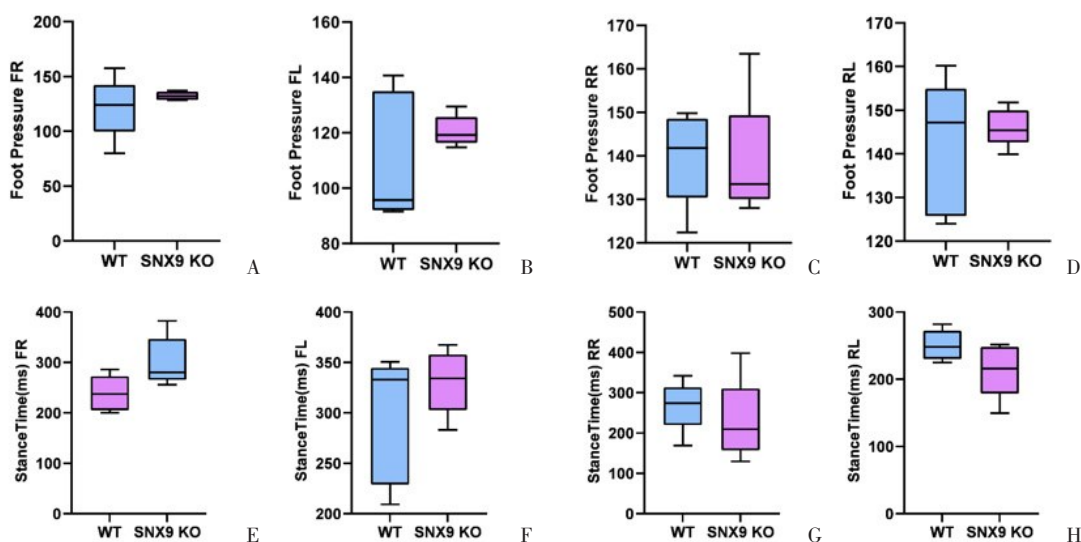


图5 SNX9基因敲除小鼠与野生型小鼠步态参数比较

Figure 5 Comparison of gait parameters between SNX9 gene knockout mice and wildtype mice

注:A-D:SNX9基因敲除小鼠与野生型小鼠足压的比较;E-H:SNX9基因敲除小鼠与野生型小鼠站立时间的比较。FR、FL、RR和RL分别代表右前肢、左前肢、右后肢和左后肢。

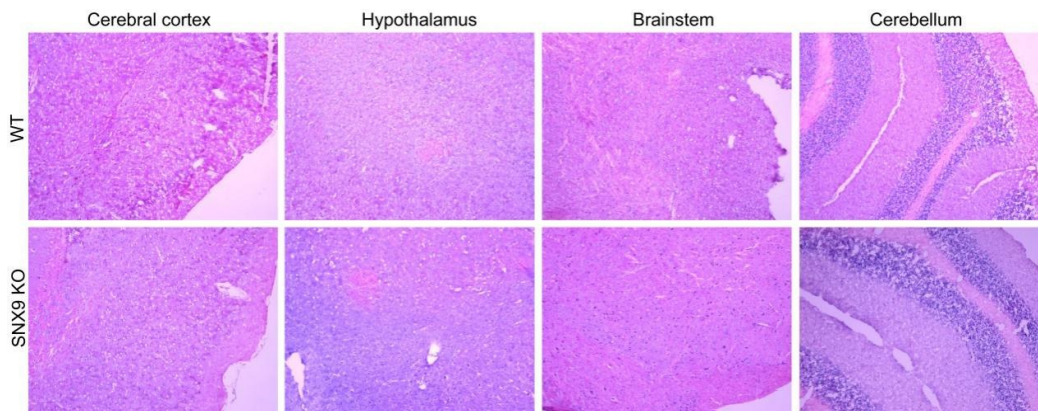


图6 HE染色显示SNX9基因敲除小鼠与野生型小鼠脑组织结构(100 \times)

Figure 6 HE staining was used to visualize the brain tissue structure of SNX9 gene knockout mice and wildtype mice (100 \times)

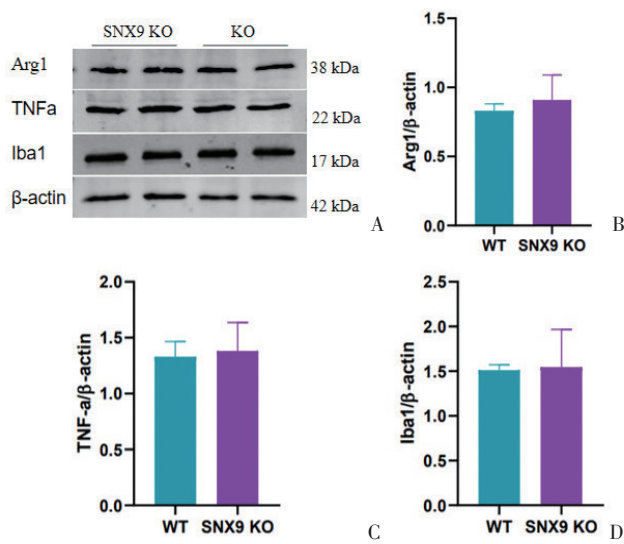


图7 Western blot检测SNX9基因敲除小鼠脑组织小胶质细胞标志蛋白的表达水平

Figure 7 The expression of microglia marker protein in brain tissue of SNX9 gene knockout mice determined by Western blot

3 讨论

CRISPR/Cas9介导的非同源重组(non-homologous end joining, NHEJ)基因敲除技术的效率比传统同源重组系统高4~6倍以上^[32-35],多项研究已成功利用CRISPR/Cas9技术对大鼠或小鼠进行基因敲除^[36-37],进一步证明CRISPR/Cas9技术介导目的基因敲除高效并具有良好的可靠性。此外,该方法获得的品系后续繁育保种的子代具有遗传稳定性的特点。

本研究小组运用CRISPR/Cas9技术,设计并在离体条件下进行了gRNA的转录。在小鼠受精卵中同时注射Cas9和gRNA,随后在gRNA的引导下,Cas9蛋白与靶位点的第3~5个外显子结合,导致DNA双链断裂,以此达到靶位点第3~5个外显子碱基序列缺失,最终实现SNX9基因的敲除,成功构建SNX9敲除小鼠模型。在繁殖中发现子代每胎产仔数为2~6只,低于野生型小鼠每胎产仔数4~9只,子代健康状况良好;毛色、体重等无差异。通过PCR鉴定证实SNX9在繁育的纯合子小鼠中不表达,这说明该基因缺失具有遗传稳定性。利用Western blot检测小鼠脑SNX9蛋白表达水平,野生型小鼠脑组织SNX9蛋白表达正常,而SNX9 KO小鼠脑组织几乎无SNX9蛋白表达,说明完成SNX9基因敲除,与PCR鉴定结果相符合。此外,SNX9 KO小鼠脑组织结构与野生型小鼠无明显差异;SNX9 KO小鼠脑组织的小胶质细胞标志蛋白表达与野生型相比也无明显差异。综上表明,SNX9基因敲除后没有引起脑组织的结构变化以及小胶质细胞的增生。

小胶质细胞来源于中胚层的细胞,可感知脑实质微环境。在生理状态下通常保持静息状态,是中枢神经系统(central nervous system, CNS)对应损伤的前

哨^[38]。在多种CNS疾病中,可检测到小胶质细胞的活性增强,并转化为不同表型(M1/M2),其在CNS疾病的进展中发挥着重要的作用。M1型小胶质细胞持续产生促炎因子,如诱导型一氧化氮合酶(iNOS)、白细胞介素1 β (IL-1 β)等;M2型小胶质细胞分泌抗炎因子和神经营养因子,如精氨酸酶-1(Arg-1)、脑源性神经营养因子(BDNF)等^[39]。脑缺血再灌注(cerebral ischemic reperfusion, CIR)后,相应神经组织出现进一步损伤及结构破坏,大量动物实验表明炎症反应参与了CIR的发生进展。现有观点认为,促进M1型小胶质细胞转化为M2型可改善周围神经元的炎症,进而发挥神经保护作用。小胶质细胞在CIR中何时开始活化,如何在受不同细胞因子影响之下发生M1/M2极性转化,并发挥怎样的作用,相关机制仍不能得到很明确的阐释。目前国内外对SNX9与免疫反应之间的关系研究很少,但近期国外有研究报道,SNX9受慢性炎症调节及其与免疫抑制相关联,强调了其用作检测宿主免疫状态和炎症阶段的诊断和预后生物标志物的可行性^[22]。本课题组以SNX9为切入点进行了前期实验,证实了单纯的SNX9敲除没有引起脑组织的结构变化以及小胶质细胞的增生。为进一步探究SNX9与小胶质细胞的联系,课题组后续将构建脑缺血再灌注动物模型,探究SNX9在脑缺血再灌注后神经炎症中发挥的作用及机制。

4 结论

本研究基于CRISPR/Cas9技术,用C57BL/6小鼠成功建立SNX9基因敲除小鼠模型并对其表型进行了初步分析。此外,经过1年多的饲养繁殖、鉴定,已获得一定数量的SNX9敲除小鼠,为进一步研究SNX9基因的生物功能奠定了前期基础,也为SNX9在免疫、炎症相关疾病发病机制中的作用研究提供了实验动物模型。

5 参考文献

- [1] 何晓玲,刘鹏程,马伯军,等.基于CRISPR/Cas9的基因编辑技术研究进展及其在植物中的应用[J].植物学报,2022,57(4): 508-531.
- [2] 杨伟,潘通然,郭元彪.分选连接蛋白及其相关细胞信号通路[J].中国生物化学与分子生物学报,2016,32(7): 768-774.
- [3] LO WT, VUJIĆIĆ ŽAGAR A, GERTH F, et al. A coincidence detection mechanism controls PX-BAR domain-mediated endocytic membrane remodeling via an allosteric structural switch[J]. Dev Cell, 2017, 43(4): 522-529.e4.
- [4] KARJALAINEN M, TOSSAVAINEN H, HELLMAN M, et al. HACANCOi: a new H(α)-detected experiment for backbone resonance assignment of intrinsically disordered proteins[J]. J Biomol NMR, 2020, 74(12): 741-752.
- [5] WANG HB, LO WT, VUJIĆIĆ ŽAGAR A, et al. Autoregulation of class II alpha PI3K activity by its lipid-binding PX-C2 domain module[J]. Mol Cell, 2018, 71(2): 343-351.e4.
- [6] ECKER M, SCHREGLE R, KAPOOR-KAUSHIK N, et al. SNX9-induced membrane tubulation regulates CD28 cluster sta-

- bility and signalling[J]. *Elife*, 2022, 11: e67550.
- [7] TAPIA R, KRALICEK SE, HECHT GA. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) recruitment of PAR polarity protein atypical PKC ζ to pedestals and cell-cell contacts precedes disruption of tight junctions in intestinal epithelial cells[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(2): 527.
- [8] BENDRIS N, SCHMID SL. Endocytosis, metastasis and beyond: multiple facets of *SNX9*[J]. *Trends Cell Biol*, 2017, 27(3): 189-200.
- [9] SASAKI Y, HIDAKA T, UENO T, *et al.* Sorting Nexin 9 facilitates podocin endocytosis in the injured podocyte[J]. *Sci Rep*, 2017, 7: 43921.
- [10] BADOUR K, MCGAVIN MKH, ZHANG JY, *et al.* Interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required for CD28 endocytosis and cosignaling in T cells[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(5): 1593-1598.
- [11] LUNDMARK R, CARLSSON SR. *SNX9* - a prelude to vesicle release[J]. *J Cell Sci*, 2009, 122(Pt 1): 5-11.
- [12] ZECCHINI V, PAUPE V, HERRANZ-MONTOYA I, *et al.* Fumarate induces vesicular release of mtDNA to drive innate immunity[J]. *Nature*, 2023, 615(7952): 499-506.
- [13] SHIN N, LEE S, AHN N, *et al.* Sorting nexin 9 interacts with dynamin 1 and N-WASP and coordinates synaptic vesicle endocytosis[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(39): 28939-28950.
- [14] GALLOP JL, WALRANT A, CANTLEY LC, *et al.* Phosphoinositides and membrane curvature switch the mode of actin polymerization via selective recruitment of toca-1 and Snx9[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(18): 7193-7198.
- [15] BENDRIS N, STEARNS CJS, REIS CR, *et al.* Sorting nexin 9 negatively regulates invadopodia formation and function in cancer cells[J]. *J Cell Sci*, 2016, 129(14): 2804-2816.
- [16] TANIGAWA K, MAEKAWA M, KIYOI T, *et al.* *SNX9* determines the surface levels of integrin β 1 in vascular endothelial cells: implication in poor prognosis of human colorectal cancers overexpressing *SNX9*[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(10): 17280-17294.
- [17] 姜洋, 刘青青, 张峰, 等. 鸡血藤通过调控 *SNX9* 及 β -catenin 抑制三阴性乳腺癌细胞转移的作用机制[J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(11): 1356-1359.
- [18] SARDOU-CEZAR I, LOPES BA, ANDRADE FG, *et al.* Therapy-related acute myeloid leukemia with *KMT2A-SNX9* gene fusion associated with a hyperdiploid karyotype after hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Cancer Genet*, 2021, 256-257: 86-90.
- [19] GARBER JJ, MALLICK EM, SCANLON KM, *et al.* Attaching-and-effacing pathogens exploit junction regulatory activities of N-WASP and *SNX9* to disrupt the intestinal barrier[J]. *Cell Mol Gastroenterol Hepatol*, 2018, 5(3): 273-288.
- [20] LEE D, LEE E, JANG S, *et al.* Discovery of *Mycobacterium tuberculosis* Rv3364c-Derived Small Molecules as Potential Therapeutic Agents to Target *SNX9* for Sepsis[J]. *J Med Chem*, 2022, 65(1): 386-408.
- [21] 杨侃侃. 基于TMT蛋白定量和串联质谱筛选关键分子 *SNX9* 介导 FAdV-4 感染免疫调控 cGAS-STING 通路作用机制[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2022.
- [22] ISH-SHALOM E, MEIROW Y, SADE-FELDMAN M, *et al.* Impaired *SNX9* expression in immune cells during chronic inflammation: prognostic and diagnostic implications[J]. *J Immunol*, 2016, 196(1): 156-167.
- [23] LI XY, MA N, XU JP, *et al.* Targeting ferroptosis: pathological mechanism and treatment of ischemia-reperfusion injury[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 1587922.
- [24] FAN H, WU Q, PENG LP, *et al.* Phyllobilobium chinense flavonoids (PCFF) suppresses the M1 polarization of LPS-stimulated RAW_{264.7} macrophages by inhibiting NF- κ B/iNOS signaling pathway[J]. *Front Pharmacol*, 2020, 11: 864.
- [25] 龚举鑫, 燕鹏, 郑传华, 等. 脑出血后炎症反应中小胶质细胞及其相关炎症介质的作用研究进展[J]. *临床神经外科杂志*, 2022, 19(2): 228-231.
- [26] 简晓莉, 尹思源, 张德绸. 缺血性脑卒中后免疫细胞变化的研究进展[J]. *西南医科大学学报*, 2020, 43(5): 524-527.
- [27] 宫继鹏, 贾会玉, 李睿, 等. 安非博肽调控小胶质细胞 M1/M2 极化抑制脑缺血再灌注损伤后炎症反应研究[J]. *中国药理学杂志*, 2023, 58(5): 426-434.
- [28] ARABPOUR M, SAGHAZADEH A, REZAEI N. Anti-inflammatory and M2 macrophage polarization-promoting effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 97: 107823.
- [29] JIANG CT, WU WF, DENG YH, *et al.* Modulators of microglia activation and polarization in ischemic stroke (Review)[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(5): 2006-2018.
- [30] 卢仁睿, 张莉, 王慧慧, 等. 桃叶珊瑚苷通过调节小胶质细胞 M1/M2 极化抑制神经炎症[J]. *中国新药杂志*, 2023, 32(9): 934-940.
- [31] 周琦, 孙慧娟, 于栋华, 等. 巨噬细胞 M1/M2 型极化在不同疾病中的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(11): 1502-1506.
- [32] ZHENG W, GU F. Progress of application and off-target effects of CRISPR/Cas9[J]. *Yi Chuan*, 2015, 37(10): 1003-1010.
- [33] MA YW, CHEN W, ZHANG X, *et al.* Increasing the efficiency of CRISPR/Cas9-mediated precise genome editing in rats by inhibiting NHEJ and using Cas9 protein[J]. *RNA Biol*, 2016, 13(7): 605-612.
- [34] DU J, YIN NR, XIE T, *et al.* Quantitative assessment of HR and NHEJ activities via CRISPR/Cas9-induced oligodeoxynucleotide-mediated DSB repair[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2018, 70: 67-71.
- [35] 龙黎, 罗新华, 张茜. CRISPR/Cas9 敲除 HBV pre S1 段对肝癌细胞中 HBV 病毒复制的影响[J]. *贵州医科大学学报*, 2022, 47(10): 163-168+188.
- [36] 江涛, 高婧, 岳欢, 等. IL-31RA 基因敲除小鼠纯合子模型的建立[J]. *贵阳医学院学报*, 2015, 40(03): 229-233.
- [37] TREFNY MP, KIRCHHAMMER N, AUF DER MAUR P, *et al.* Deletion of *SNX9* alleviates CD8 T cell exhaustion for effective cellular cancer immunotherapy[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 86.
- [38] THURGUR H, PINTEAUX E. Microglia in the neurovascular unit: blood-brain barrier-microglia interactions after central nervous system disorders[J]. *Neuroscience*, 2019, 405: 55-67.
- [39] 王梦雅, 刘曼, 马泽刚. 激活 CB₂ 受体对 MPP⁺ 诱导 BV2 小胶质细胞 iNOS 和 Arg-1 表达的影响[J]. *青岛大学学报(医学版)*, 2023, 59(2): 195-198.

(利益冲突: 无)

(收稿日期: 2023-10-08; 修回日期: 2024-03-23)