

利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Smad3* 基因敲除 MPC5 细胞系

杨秀¹, 史姜珊¹, 王洪连², 王丽², 粟宏伟², 陈晨^{2*}, 赵长英^{2*}

1 西南医科大学 中西医结合学院, 四川 泸州 646000

2 西南医科大学附属中医医院, 四川 泸州 646000

杨秀, 史姜珊, 王洪连, 王丽, 粟宏伟, 陈晨, 赵长英. 利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *Smad3* 基因敲除 MPC5 细胞系[J]. 生物工程学报, 2025, 41(4): 1658-1670.

YANG Xiu, SHI Jiangshan, WANG Honglian, WANG Li, SU Hongwei, CHEN Chen, ZHAO Changying. Construction of mouse podocyte clone-5 cell lines with *Smad3* knockout by CRISPR/Cas9[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2025, 41(4): 1658-1670.

摘 要: 本研究旨在利用 CRISPR/Cas9 构建 *Smad3* 基因敲除的 MPC5 小鼠足细胞系细胞模型, 并探讨 TGF- β 1 刺激对 *Smad3* 基因敲除后 MPC5 细胞去分化的影响, 为 *Smad3* 在小鼠足细胞中的功能研究提供工具细胞。根据 CRISPR/Cas9 设计原理设计针对靶向小鼠 *Smad3* 基因单向导 sgRNA 序列, 将连接后的 pX458-*Smad3* 载体转化至感受态细胞中, 提取质粒并转染 MPC5 细胞。将转染后的细胞采用流式细胞分选仪分选出转染成功的细胞, 经单克隆细胞扩增后采用 PCR 扩增 *Smad3* 基因敲除靶点附近序列并测序, 分析筛选出潜在敲除细胞并在蛋白水平上验证 *Smad3* 蛋白缺失情况来确定敲除效果。在 RNA 水平和蛋白水平上采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transcription-polymerase chain reacting, RT-PCR)和 Western blotting、细胞免疫荧光检测分析 *Smad3* 敲除对 TGF- β 1 诱导的 MPC5 的去分化的影响。根据 CRISPR/Cas9 设计原理, sgRNA 最终设计在 *Smad3* 第 5 个外显子。成功构建 pX458-*Smad3* 质粒, 并将质粒转染 MPC5 细胞 24 h 后, 根据 EGFP 荧光蛋白的表达情况确定质粒转染是否成功, 将转染成功的细胞经流式细胞分析转染效率, 成功率约为 0.1%。采用流式细胞分选仪筛选出带有绿色荧光标签转染成功的细胞, 经单克隆扩增培养, 最终可以得到 21 个细胞克隆。对 *Smad3* 基因位点上 sgRNA 靶点附近序列 PCR 扩增测序分析, 发现了 2 个双等位基因移码突变细胞克隆, 在蛋白水平上验证其 *Smad3* 蛋白表达缺失, 表明成功获得 2 株 *Smad3* 基因敲除 MPC5 细胞株。在正常 MPC5 细胞中, TGF- β 1 刺激促进纤维化基因 *fibronectin* 和 *Col1a1* (collagen I) mRNA 和蛋白的表达, 同时抑制足细胞分子标记蛋白 *synaptopodin* 和 *podocin* 的表达, 提示足细胞的上皮-间质转分化。然而, 在 2 株 *Smad3* 敲除 MPC5 细胞中, TGF- β 1 诱导上皮-间质转分化基因表

资助项目: 四川省科技计划(2022YFS0407, 2022YFS0621, 2022YFS0635); 泸州市科技计划(2024WGR205)

This work was supported by the Sichuan Province Science and Technology Program (2022YFS0407, 2022YFS0621, 2022YFS0635) and the Luzhou City Science and Technology Program (2024WGR205).

*Corresponding authors. E-mail: ZHAO Changying, zhaocy540@163.com; CHEN Chen, chen.chen@uq.edu.au

Received: 2024-10-11; Accepted: 2025-01-21; Published online: 2025-01-22

达特征被显著抑制。本研究成功构建了 2 株 *Smad3* 基因敲除 MPC5 小鼠足细胞系, 为进一步研究 *Smad3* 蛋白的功能建立了细胞模型, 为研究 *Smad3* 在 MPC5 细胞去分化中的作用提供了思路。

关键词: CRISPR/Cas9; *Smad3*; 基因敲除; MPC5 细胞

Construction of mouse podocyte clone-5 cell lines with *Smad3* knockout by CRISPR/Cas9

YANG Xiu¹, SHI Jiangshan¹, WANG Honglian², WANG Li², SU Hongwei², CHEN Chen^{2*}, ZHAO Changying^{2*}

¹ College of Integration of Traditional Chinese and Western Medicine to Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China

² The Affiliated Traditional Chinese Medicine Hospital of Southwest Medical University, Luzhou 646000, Sichuan, China

Abstract: This study established the mouse podocyte clone-5 (MPC5) with *Smad3* knockout and studied the effect of transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) on the dedifferentiation of the MPC5 cells with *Smad3* knockout, aiming to provide a cell tool for studying the role of *Smad3* in mouse podocytes. The single-guide RNA (sgRNA) sequence targeting *Smad3* was designed according to the principles of CRISPR/Cas9 design. The pX458-*Smad3* vector was constructed and introduced into competent cells, and then the vector was extracted and used to transfect MPC5 cells. The successfully transfected cells were sorted by a flow cytometer. After single-cell clone expansion, PCR amplification of sequences adjacent to the edition site of *Smad3* and sequencing were performed to identify potential cells with gene knockout. Western blotting was employed to verify the knockout efficiency of *Smad3*. Finally, the effect of *Smad3* knockout on TGF- β 1-induced dedifferentiation of MPC5 cells was analyzed by reverse transcription-polymerase chain reacting (RT-PCR), Western blotting, and the immunofluorescence method. The sgRNA was designed to target the fifth exon of *Smad3*. EGFP expression was observed 24 h after transfection of the pX458-*Smad3* plasmid into MPC5 cells, with the transfection efficiency of 0.1% as determined by flow cytometry. From the transfected cells, 21 cell clones were obtained through flow cytometric sorting and single-cell clone expansion. PCR amplification and sequencing of the region around the sgRNA target site in *Smad3* identified two cell clones with biallelic frameshift mutations. Western blotting results confirmed the absence of *Smad3* expression in these clones, indicating successful establishment of the MPC5 cell line with *Smad3* knockout. In normal MPC5 cells, TGF- β 1 stimulation promoted the expression of fibrosis-related genes *fibronectin* and *Col1a1* (collagen I) and inhibited the expression of the podocyte marker proteins synaptopodin and podocin, which suggested epithelial-mesenchymal transition and podocyte injury. However, in the two MPC5 cell lines with *Smad3* knockout, TGF- β 1-induced expression of epithelial-mesenchymal transition markers was significantly suppressed. The MPC5 cell lines with *Smad3* knockout that were constructed by CRISPR/Cas9 provide a valuable cell model for functional studies of

Smad3 protein and highlight the critical role of Smad3 in cell dedifferentiation.

Keywords: CRISPR/Cas9; *Smad3*; gene knockout; MPC5 cells

近年来,全球糖尿病患者人数呈逐年上升趋势^[1],2021年糖尿病患者已占全球成年人人数的10.5%,且有相当一部分(约40%)的糖尿病会逐渐进展为糖尿病肾病(diabetic nephropathy, DN)^[2]。DN是主要的慢性肾脏病类型,其中蛋白尿是DN患者临床症状之一,而足细胞损伤是导致DN蛋白尿病变的关键病理机制^[3]。足细胞损伤的重要形式为足细胞上皮-间质转分化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),表现为间质特征基因和纤维化基因表达增多,足细胞标志基因表达丢失^[4]。转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)信号在各种上皮细胞EMT过程中发挥了关键调节作用^[5],其中转录因子3(smads family member 3, Smad3)作为TGF- β 信号最重要的传导介质,在肾脏炎症和纤维化进程中均具有明确的致病作用。

足细胞附着在肾小球基底膜的外表面,与构成肾小球滤过屏障的内皮细胞及肾小球基底膜一起发挥滤过屏障作用,是一种高度特化的肾小囊上皮细胞。蛋白尿病变的关键因素是肾小球滤过屏障功能破坏,而足细胞及其足突的完整性以及狭缝隔膜是防止出现蛋白尿的关键^[6]。EMT是足细胞损伤的病理特征之一,而EMT是一个短暂且可逆的过程,既往研究表明抑制TGF- β 1/Smads通路可以改善糖尿病肾病足细胞EMT^[7]。

Smad3是一种细胞内信号转导蛋白,负责将信号从细胞表面传递到细胞核,调节下游基因表达。Smad3已被证实是TGF- β 信号调节器官炎症和纤维化的主要下游信号分子^[8]。TGF- β 因子,尤其是TGF- β 1^[9-10],可以调节细胞生长、增殖、凋亡、分化和细胞外基质生成,导致纤维化、功能受损等病变。Smad3转录调控许多

下游靶基因,包括microRNA和长链非编码RNA,导致细胞死亡、炎症和纤维化。同时,众多基因和EMT相关基因的表达也受Smad3调控^[11-12]。在包括DN在内的许多啮齿动物模型中,Smad3的缺失能够抑制肾纤维化,这一发现证实了Smad3在纤维化过程中的重要作用^[13]。因此,靶向Smad3或其下游基因,可以为对抗肾脏疾病提供一种新的治疗策略^[14]。

成簇规律间隔短回文重复(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)序列是一系列重复的DNA序列,是细菌(大肠杆菌)和病毒的免疫工具。Cas9(CRISPR-associated protein 9)是一种核酸酶,能够在向导RNA的指引下对特定的DNA序列进行切割和编辑^[15]。CRISPR/Cas9介导的基因敲除是通过Cas9导入细胞,靶向目标基因序列的小向导RNA(small guide RNA, sgRNA),对目标基因序列进行切割,引发随机插入或缺失的切割位点突变,从而实现基因敲除^[16]。CRISPR/Cas9是一种广泛应用于生命科学领域研究多物质记忆基因编辑^[17]的非常高效、快速、简便的技术^[18-19]。

本研究以CRISPR/Cas9技术为基础,利用流式细胞分选技术、单克隆细胞PCR扩增、DNA测序,将Smad3敲除质粒转染至小鼠MPC5足细胞,筛选并建立Smad3敲除的MPC5细胞系,以期研究Smad3敲除对TGF- β 1刺激的MPC5细胞EMT的影响,并为Smad3在足细胞中的功能研究提供细胞模型。

1 材料与方 法

1.1 材料

MPC5细胞由西南医科大学附属中医医院

中西医结合研究中心提供; sgRNA 克隆的普通 PCR 和 RT-PCR 引物委托生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 细胞基因组 DNA 提取试剂盒和去内毒素质粒提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司; 载体骨架质粒 pX458 购自 Addgene 公司; 胎牛血清、Opti-MEM 培养基、RPMI-1640 培养基, *Bbs* I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、PNK 激酶、lipofectamine 3000 转染试剂盒、普通 PCR 逆转录试剂盒均购自 ThermoFisher Scientific 公司; PCR 所用 *Taq* DNA 聚合酶和 RT-PCR 所用 SYBR Green 预混剂均购自南京诺唯赞生物有限公司, Western blotting 制胶所用试剂均购于北京索莱宝科技有限公司。本研究所用抗体包括: *Smad3* (Cell Signaling Technology 公司)、 β -actin (ThermoFisher Scientific 公司)、fibronectin (Abways 公司)、collagen I (Bioss 公司)、synaptopodin (Abcam 公司)、podocin (ThermoFisher Scientific 公司)。

1.2 方法

1.2.1 sgRNA 的设计

在 CRISPR 在线设计网站(<https://zlab.bio/guide-design-resources>)输入鼠源 *Smad3* 编码基因序列, 查找符合 CRISPR/Cas9 设计原理的 sgRNA 靶点序列, 末尾 3 个碱基为前间隔序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)序列。通过 NCBI 的 BLAST 软件(<https://basic.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), 对所选 sgRNA 靶点基因序列的进行特异性分析, 最终选择 sgRNA 靶点序列: 5'-GTCCCCAGCACACAATAACTTGG-3' (末尾 TGG 碱基为 PAM 序列)。在 sgRNA 序列两端添加黏性末端与载体形成互补(黏性末端碱基采用下划线标注)可以更好地将质粒克隆到指定的位点, 提交设计寡脱氧核苷酸序列(表 1)至生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

表 1 小向导 RNA (sgRNA) 序列

Table 1 Small guide RNA (sgRNA) sequences

sgRNA	Sequences (5'→3')
Smad3-sgRNA-F	<u>CACCGTCCCCAGCACACAATAACT</u>
Smad3-sgRNA-R	<u>AAACAGTTATTGTGTGCTGGGGAC</u>

Underline: The sticky end bases.

1.2.2 pX458-Smad3 敲除质粒的构建

采用 PCR 仪将 T4 DNA 连接酶缓冲液中的双链 sgRNA 寡脱氧核苷酸 95 °C 下变性 5 min, 扩增 30 s, 随后退火, 以 5 °C/min 的速率逐步降低温度, 直至稳定至 25 °C, 从而实现双链寡聚脱氧核苷酸的退火。进行双链寡脱氧核苷酸 5' 末端磷酸化修饰, 于 37 °C 加入多聚核苷酸激酶 (polynucleotide kinase, PNK), 孵育 30 min。将修饰过的双链寡脱氧核苷酸通过 T4 DNA 连接酶克隆至 *Bbs* I 内切酶线性化的 pX458 载体, 随后转化入大肠杆菌 DH5 α 感受态细菌中。在无菌条件下将已转化的感受态细菌划线于含有氨苄青霉素的琼脂固体培养基上, 倒置 37 °C 过夜培养后, 挑取琼脂平板中适宜的单个单克隆菌落进行振荡过夜扩增培养, 随后进行质粒提取。进行琼脂糖凝胶电泳鉴定并测序, 将测序正确的质粒重复上述操作扩增后提取, 扩增后的质粒用于下游细胞的转染。

1.2.3 MPC5 细胞培养与 pX458-Smad3 质粒转染

将 MPC5 细胞培养在 1640 培养基含(10% 胎牛血清和 10 IU/mL 重组 IFN- γ)中, 永生化细胞培养条件为 33 °C、5% CO₂^[20]。在细胞汇合度 80%–90% 时传代用于转染, 将准备转染的细胞接种至 6 孔板, 接种量按 10 cm 细胞培养皿传代时的细胞总量 1/6 接种。待细胞汇合度达到 50%–60% 时更换新鲜培养基, 并使用转染试剂 Lipofectamine 3000 转染 2.5 μ g pX458-Smad3 质粒于细胞中, 转染 24 h 后更换新鲜培养基。在荧光显微镜下, 根据观察细胞中载体荧光(绿色)蛋白标签 EGFP 的表达, 来判断转染是否成功。

1.2.4 流式细胞分选、单克隆细胞扩增、PCR 扩增测序 *Smad3* 基因敲除细胞和脱靶效应检测

利用流式细胞分选技术在转染后的细胞中筛选出带有绿色荧光 EGFP 标签的 MPC5 细胞，按照约 0.5 个细胞/孔的比例接种在 3 个 96 孔板进行培养，并于第 5–7 天对孔板中单克隆细胞群落生长情况进行观察，出现存活细胞的孔板更换新鲜培养基继续培养。单克隆细胞在增殖成细胞群后，分别在 24 孔板进行消化接种，待孔板的细胞汇合度达到 80%–90%后再进行 6 孔板的消化接种；待 6 孔板细胞汇合度达到 80%–90%后消化，一半细胞冻存，一半细胞使用基因组提取试剂盒提取 DNA，使用 PCR 仪扩增 *Smad3* 敲除位点附近基因组片段，扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳分析扩增是否成功后，再将扩增成功产物进行测序结果分析。测序结果序列与 sgRNA-F 寡脱氧核苷酸比对，若序列突变发生在 *Smad3* 靶点时，即判定为潜在 *Smad3* 敲除细胞。序列突变判断标准为移码突变同时发生在 2 个等位基因上(缺失、插入和或更换碱基)且突变碱基数非 3 的倍数。提取潜在

Smad3 敲除细胞的 DNA 并使用蛋白酶剪切出脱靶位点附近基因片段，随后使用 PCR 仪扩增脱靶位点附近基因组片段，扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳分析扩增是否成功后，再进行测序结果分析。测序结果与脱靶检测引物-F 寡脱氧核苷酸比对，若序列突变发生在脱靶位点时，即判定 sgRNA 存在脱靶效应，细胞敲除 *Smad3* 失败。普通 PCR 扩增引物碱基序列见表 2。

1.2.5 RT-PCR 检测 *Smad3* 基因敲除对 TGF-β1 诱导足细胞 EMT 的影响

将 MPC5 正常细胞和 *Smad3* 敲除细胞分别接种于同一个 6 孔板中，且培养在 37 °C、5% CO₂ 细胞培养箱。待细胞汇合度至 70%–80%时，更换培养基(含有 0.5%胎牛血清)饥饿 6 h，在原有的培养基中加入 TGF-β1 (5 ng/mL)，刺激 24 h。收样时提前使用 PBS 溶液清洗 1 次，以去除状态差的细胞。每孔加入 1 mL TRIzol 试剂，室温提取细胞总 RNA，随后将总 RNA 根据试剂说明书逆转录为 cDNA，以 *β-actin* 为内参利用 RT-PCR 检测纤维化相关基因 *Col1a1* 和 *fibronectin* 的表达。RT-PCR 引物碱基序列见表 2。

表 2 本研究所用引物

Table 2 Primers used in this study

Genes	Primer name	Sequences (5'→3')	Purpose
<i>Smad3</i>	m.Sm3KO.iden-F	TGCTAAGGTGGAAGGTGGTTA	Knockout
	m.Sm3KO.iden-R	CGTGTGTCTGAAGCAAGCTTCT	check
<i>Smad3</i>	m.X.cDNA-F	CACATCTTGTCATCAGGCT	Off-target effects
	m.X.cDNA-R	GTTTGTGAGACATCACTCAC	check
	m.11.cDNA-F	CAGACGTTCTTCTCACTTCA	
	m.11.cDNA-R	GCCAAGGCTGATTTCATGTG	
	m.1.cDNA-F	CATGTATCCAGAAGAGGCTT	
	m.1.cDNA-F	AGAAGGCCAGTTAACATCTG	
	m.10.cDNA-F	CAGATAAGATCACTGACTGC	
	m.10.cDNA-F	TCTGGCCTTCACAGTATCG	
<i>Col1a1</i>	RT.m. Col1a1-F	ATCCAACGAGATCGAGCTCA	Real-time qPCR
	RT.m. Col1a1-R	AAGGGAGCCACATCGATGAT	
<i>fibronectin</i>	RT.m.fibronectin-F	ATGTGGACCCCTCCTGATAGT	
	RT.m.fibronectin-R	GCCCAGTGATTTTCAGCAAAGG	
<i>β-actin</i>	RT.m. β-actin-F	AGAGGGAAATCGTGCGTGAC	
	RT.m. β-actin-R	CAATAGTGATGACCTGGCCGT	

1.2.6 Western blotting 检测 *Smad3* 基因敲除细胞中 *Smad3* 和 TGF- β 1 诱导的 EMT 和 *Smad2* 通路相关蛋白的表达

根据 1.2.5 中的描述进行细胞收样前处理, 使用 200 μ L 含有蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟 (phenylmethylsulfonyl fluoride, PMSF) 的蛋白 (radio-immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液冰上裂解提取细胞总蛋白, 利用 BCA 方法测定蛋白浓度。取 25 μ g 蛋白样本电泳于 10% 的聚丙烯酰胺凝胶中分离, 然后转印至印记膜聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 上。PVDF 膜采用 5% 脱脂奶粉 (TBST 溶液稀释) 为封闭液室温摇床封闭 1 h, 一抗根据抗体稀释比例用封闭液稀释, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 溶液洗膜 5 次, 每次 6 min, 加入 HRP 标记二抗 (根据抗体稀释比例用封闭液稀释), 室温摇床孵育 1 h, TBST 溶液洗膜 5 次, 每次 6 min, 使用超敏 ECL 化学发光底物, 曝光并拍照分析 (勤翔化学发光成像系统)。

1.2.7 细胞免疫荧光检测 *Smad3* 基因敲除对 TGF- β 1 诱导的足细胞 EMT 的影响

采用细胞爬片方法接种细胞, 根据 1.2.5 中的方法进行细胞收样前处理。细胞使用 4% 多聚甲醛溶液每孔 500 μ L 室温固定 10 min, PBS 溶液洗涤 2 次, 每次 5 min。接着每孔加入 1 mL 含 2% Triton X-100 溶液室温透膜 10 min, PBS 溶液洗涤 2 次, 每次 5 min。再使用每孔 1 mL 2.5% BSA (1 $\times$ PBS 溶液稀释) 封闭液室温静置封闭 1 h。封口膜平铺于 15 cm 培养皿内, 滴加一抗 (根据抗体稀释说明, 封闭液稀释) 于封口膜上, 将细胞爬片倒扣在一抗溶液上, 每个爬片 20 μ L, 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日, PBS 溶液洗涤 2 次, 每次 5 min。二抗孵育方法如一抗选择倒扣孵育, 荧光二抗 (使用封闭液稀释) 使用前 13 000 r/min 离心 2 min, 每爬片 40 μ L, 室温孵育 1 h, PBS 溶液

洗涤 2 次, 每次 5 min。最后使用 DAPI 溶液室温染核 10 min, 反渗透 (reverses osmosis, RO) 水漂洗 3 次, 每爬片滴加 10 μ L 20% 甘油封片, 荧光显微镜观察并拍照分析。

1.2.8 统计学分析

使用 GraphPad Prism 9.4.1 软件进行数据统计分析制图, 数据处理结果以 mean $\pm$ SD 表示, 使用 *t*-test 和单因素方差 (one-way ANOVA) 分析多组间比较, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计意义。

2 结果与分析

2.1 成功构建靶向 *Smad3* 基因敲除质粒

在小鼠 *Smad3* 基因组第 5 个外显子上选择 sgRNA 序列 (图 1A), 根据 spCas9 G(N19)NGG 的序列识别原则, 序列为 5'-GTCCCCAGCACA CAATAACTTGG-3', 通过 NCBI BLAST 软件对序列进行比对分析, 结果显示在小鼠基因组范围内不存在其他潜在的脱靶位点。构建好的载体 (pX458-*Smad3*) 经测序分析发现, sgRNA 成功克隆到 U6 启动子下游 *Bbs* I 克隆位点, 即成功构建了以 pX458 载体的 sgRNA 骨架序列 (图 1B)。

2.2 *Smad3* 敲除 MPC5 细胞系的构建和鉴定

将构建成功的 pX458-*Smad3* 质粒转染 MPC5 细胞 24 h, 在转染成功的细胞中可以观察到 EGFP 荧光蛋白表达 (图 1C), 流式细胞分选仪分析结果显示转染细胞的转染效率约为 0.1% (图 1D)。进一步利用流式细胞仪分选出转染成功的 MPC5 细胞 (EGFP 阳性), 按照 0.5 个细胞/孔的比例接种在 96 孔板中, 依次在 24 孔板、6 孔板传代进行单克隆细胞培养扩增, 最终得到 21 个细胞克隆。对细胞克隆基因组 *Smad3* 位点进行剪切并使用 PCR 技术扩增, 扩增产物通过琼脂糖凝胶电泳分析发现, 21 个细胞克隆全部 PCR 扩增成功 (图 2A)。经测序比对

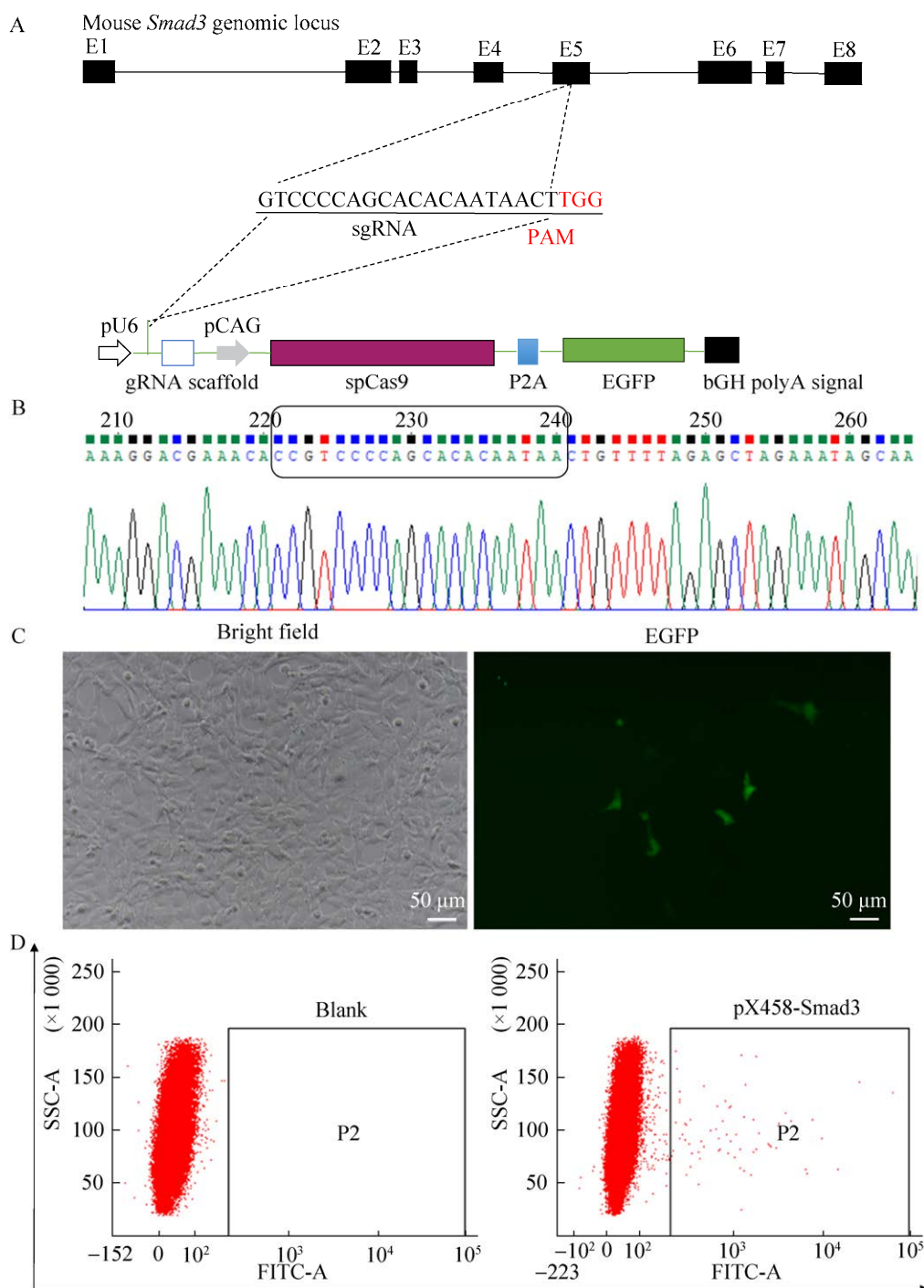


图1 靶向小鼠 *Smad3* 基因 sgRNA 设计与敲除载体 pX458-*Smad3* 的 MPC5 细胞转染 A: 小鼠 *Smad3* 位点基因结构和 pX458-*Smad3* 载体结构示意图; B: pX458-*Smad3* 载体测序结果图; C: MPC5 细胞转染 pX458-*Smad3* 质粒 24 h 后镜下明场图和荧光图; D: 转染细胞流式细胞分选仪分析图。

Figure 1 Design of sgRNA targeting mouse *Smad3* gene and transfection of pX458-*Smad3* into MPC5 cells with knockout vector. A: Schematic diagram of the gene structure of mouse *Smad3* locus and the structure of pX458-*Smad3* vector; B: Plot of the sequencing results of pX458-*Smad3* vector; C: Microscopy images of bright-field and EGFP fluorescence of MPC5 cells transfected with pX458-*Smad3* plasmid for 24 h; D: Flow cytometry analysis of MPC5 cells transfected with pX458-*Smad3* plasmid.

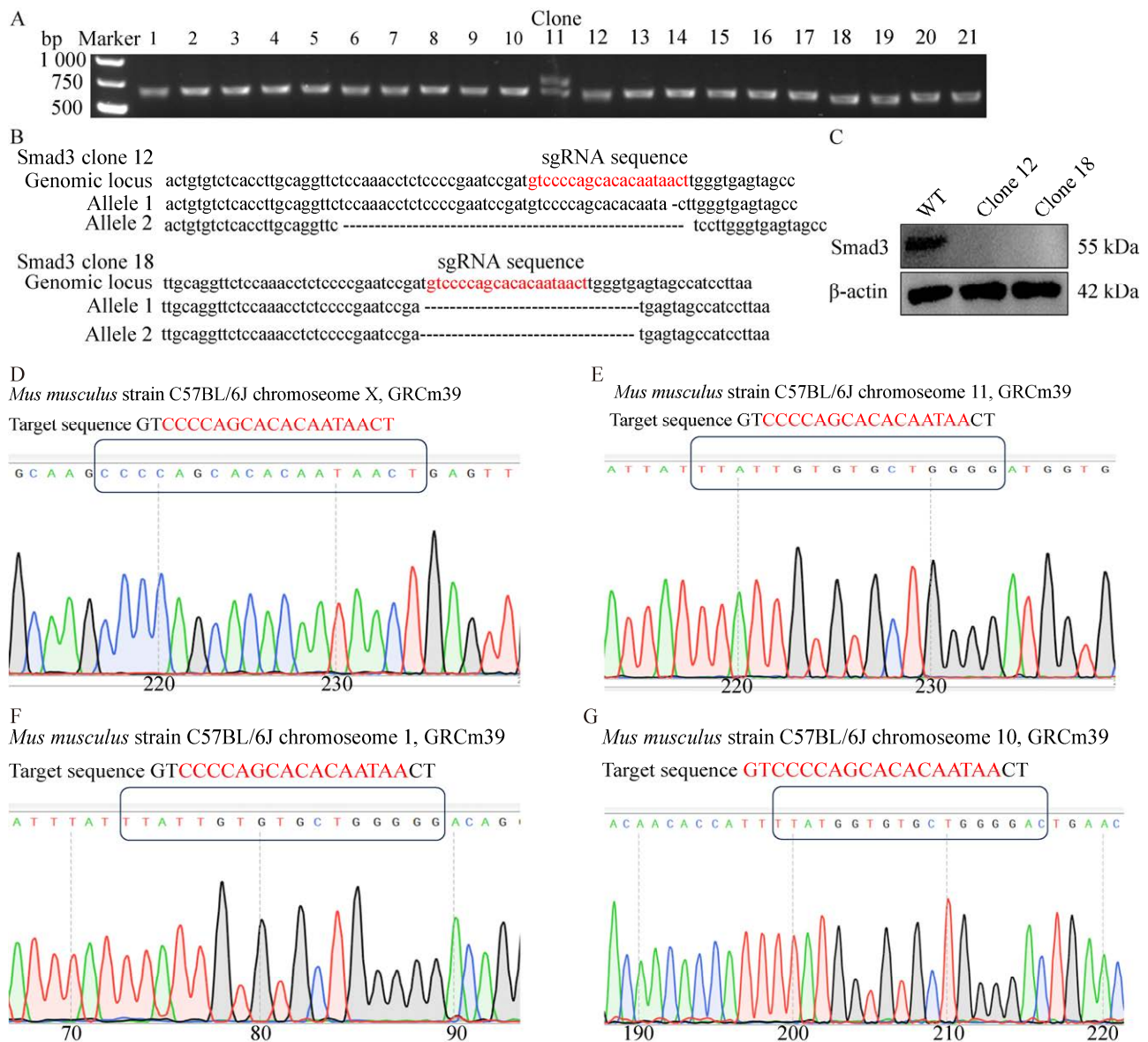


图 2 *Smad3* 基因敲除 MPC5 细胞克隆的筛选与验证 A: 21 个 MPC5 细胞中 *Smad3* 基因 Cas9 作用位点邻近 DNA 序列 PCR 扩增产物琼脂糖凝胶电泳图; B: MPC5 细胞 clone 12 和 clone 18 *Smad3* 基因序列突变测序分析结果; C: Western blotting 检测正常 MPC5 细胞(WT)和 clone 12、clone 18 *Smad3* 蛋白表达情况; D-G: 脱靶效应测序结果图, 目的靶点序列中标红的为重合的序列。D 图中目的靶点序列为正向序列; E-G 图中目的靶点序列为反向互补序列。

Figure 2 Validation and screening of *Smad3* knockout MPC5 cell clones. A: Agarose gel electrophoresis of PCR amplicons of DNA sequences adjacent to the Cas9-targeting site of *Smad3* gene in 21 MPC5 cell clones; B: The sequence mutation analysis of the *Smad3* gene in clone 12 and clone 18; C: Western blotting to detect *Smad3* protein in normal MPC5 cells (WT) and mutant MPC5 cells (clone 12 and clone 18); D-G: Sequencing results of off-target effects are plotted, the target sequences marked in red are overlapping sequences, the target sequences in the mother of D plots are forward sequences, and the target sequences in the E-G plots are reverse complementary sequences.

sgRNA-F 寡脱氧核苷酸碱基发现, 潜在的蛋白表达缺失突变发生在 21 个细胞克隆中 clone 12 和 clone 18 的 *Smad3* 基因位点。其中 clone 12 的第 1 个等位基因存在 1 个碱基的缺失突变, 而第 2 个等位基因出现 40 个碱基的缺失、2 个碱基插入突变; clone 18 双等位基因存在相同突变, 均为 25 个碱基的缺失突变(图 2B)。预计在 2 个突变细胞克隆双等位基因蛋白编码区会有 1 个非 3 的倍数的碱基缺失/插入突变, 导致后续多肽序列的紊乱或提前终止蛋白翻译, 从而导致 *Smad3* 蛋白序列和功能的缺失。Western blotting 进一步分析发现, 细胞克隆中 clone 12 和 clone 18 的 *Smad3* 蛋白表达缺失(图 2C)。对 clone 12 和 clone 18 细胞克隆基因组脱靶位点序列进行 PCR 扩增及产物测序。经测序比对脱靶检测引物-F 寡脱氧核苷酸碱基发现, 在 clone 12 和 clone 18 细胞中未检出突变序列(图 2D–2G), 因此判定 sgRNA 不存在脱靶效应。综上, 提示 clone 12 和 clone 18 MPC5 细胞 *Smad3* 基因敲除成功, 敲除细胞成功率为 9.5% (2/21)。

2.3 *Smad3* 基因敲除对 TGF- β 1 诱导的 MPC5 细胞 EMT 的影响

为了研究敲除 *Smad3* 是否影响 TGF- β 1 诱导的 MPC5 细胞 EMT, 采用 RT-PCR、Western blotting 和细胞免疫荧光方法检测了纤维化和足细胞分子标志基因的表达。RT-PCR 分析显示 TGF- β 1 处理显著刺激正常 MPC5 细胞 *fibronectin* 和 *Col1a1* 基因 mRNA 表达, Western blotting 分析同样证实 TGF- β 1 刺激促进 *fibronectin* 和 1 型胶原(collagen I)蛋白表达。然而, 在 2 株 *Smad3* 敲除的 MPC5 细胞中, TGF- β 1 刺激的 *fibronectin* 和 1 型胶原(*Col1a1* 或 collagen I) mRNA 和蛋白水平显著低于正常 MPC5 细胞(图

3A)。同时, Western blotting 分析显示 TGF- β 1 刺激的 MPC5 细胞足细胞分子标记蛋白 *synaptopodin* 表达水平下调, 而 2 株 *Smad3* 基因敲除 MPC5 细胞克隆 *synaptopodin* 蛋白表达不受 TGF- β 1 影响, 且 *Smad2* 通路相关蛋白的表达受 *Smad3* 基因敲除影响不明显(图 3B)。细胞免疫荧光分析显示 TGF- β 1 刺激的 MPC5 细胞足细胞分子标记蛋白 *podocin* 表达水平下调, 而 2 株 *Smad3* 基因敲除 MPC5 细胞 *podocin* 蛋白表达不受 TGF- β 1 影响(图 3C)。

3 讨论

CRISPR/Cas9 技术自 2013 年被首次应用以来, 已成为包括微生物、植物、动物甚至人类的跨物种基因修饰领域最常用的基因组编辑技术, 因其操作简单、基因编辑效率高、脱靶效应可控且应用成本低, 在各领域广泛应用^[21]。研究显示, 利用 CRISPR/Cas9 技术最快 2 周便能够建立小鼠基因敲除模型, 而且成功率高^[22]。Longhurst 等^[23]利用 CRISPR/Cas9 技术靶向编辑 *KLKB1* 基因治疗遗传性血管性水肿。Sun 等^[24]利用 CRISPR/Cas9 介导的 *EcBCO2* 基因敲除提高了对虾在副溶血性弧菌或嗜水气单胞菌攻击下的存活率。Feng 等^[25]利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术, 成功构建了 *MTA1* 敲除的 RAW264.7 细胞系, 为研究基因 *MTA1* 功能提供细胞模型。本研究利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在小鼠足细胞系 MPC5 中的敲除 *Smad3* 基因, 通过 Western blotting 验证 *Smad3* 蛋白表达的缺失, 成功建立 2 株稳定的 *Smad3* 基因敲除单克隆 MPC5 细胞系。既往研究表明 CRISPR/Cas9 介导的敲除细胞株成功率在 0.8%–18.7%^[26–28], 与之相似, 本研究单细胞克隆筛选敲除细胞成功率约为 9.5% (2/21)。

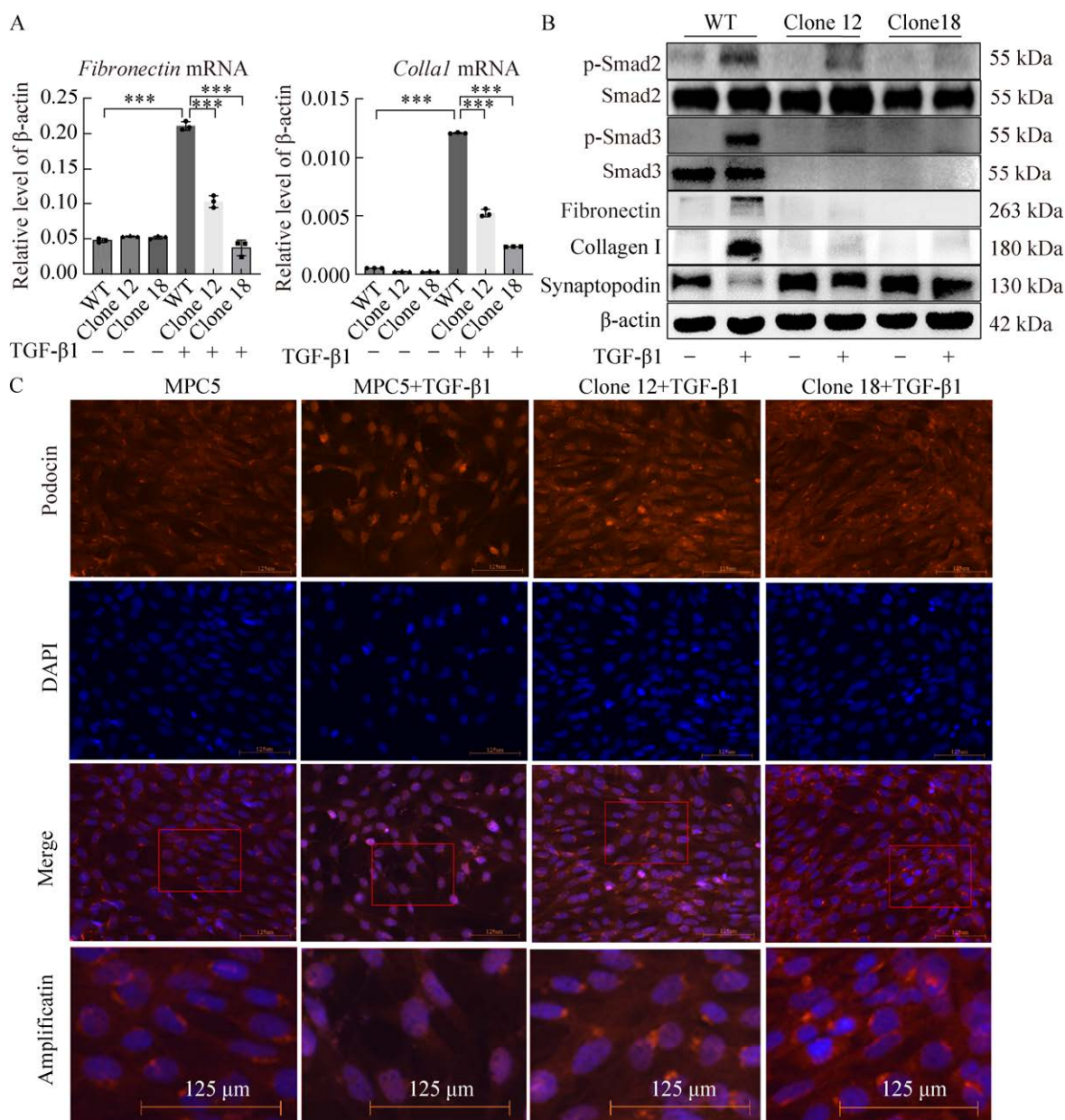


图 3 *Smad3* 敲除抑制 TGF- β 1 诱导的 MPC5 细胞纤维化基因表达和足细胞分子标记的丢失 A: RT-PCR 检测 MPC5 敲除 *Smad3* 细胞中(clone 12/18) TGF- β 1 诱导的纤维化基因 *fibronectin* 和 *Col1a1* mRNA 表达。***: $P < 0.001$ 。B: Western blotting 检测 MPC5 敲除 *Smad3* 细胞中(clone 12/18) TGF- β 1 刺激对纤维化蛋白(fibronectin 和 collagen I)和足细胞分子标志蛋白(synaptopodin)及 Smad2 通路相关蛋白表达的影响。C: 细胞免疫荧光检测 MPC5 敲除 *Smad3* 细胞中(KO-12/18) TGF- β 1 刺激对足细胞分子标志蛋白(podocin)表达的影响。

Figure 3 *Smad3* knockout counterbalances TGF- β 1-induced fibrotic gene expression and podocyte marker impairment. A: RT-PCR to detect the expression of fibrosis-related genes *fibronectin* and *Col1a1* in *Smad3* knockout MPC5 cell clone 12 and clone 18. ***: $P < 0.001$. B: Western blotting to detect the expression of fibrosis-related proteins fibronectin and collagen I and podocyte marker synaptopodin in *Smad3* knockout MPC5 cell clones and proteins associated with the Smad2 pathway. C: Cell immunofluorescence to detect the expression of podocyte marker podocin in *Smad3* knockout MPC5 cell clones.

SMAD的命名源自线虫 Sma 和果蝇(mother against decapentaplegic, MAD)名称的缩写,在哺乳动物中发现存在 8 种 Smad 蛋白,按功能可划分为 3 类:受体蛋白 R-SMAD、辅助蛋白 Co-SMAD 和抑制蛋白 I-SMAD。Smad3 是 TGF- β 家族信号传导分子中最主要的受体蛋白 R-SMAD,能够与丝氨酸/苏氨酸的受体结合,并被其激酶活性活化,活化的 Smad3 进入细胞核参与调控下游相关基因的表达^[29]。TGF- β 信号是调控 DN 疾病发展的重要信号^[30],TGF- β 因子(TGF- β 1、TGF- β 2 和 TGF- β 3),特别是 TGF- β 1 能够调节细胞生长、分化、胶原生成、细胞外基质生成和细胞凋亡,导致肾脏纤维化和功能受损,促进 DN 进展^[10,31-32]。TGF- β 下游信号的激活是通过 2 种相关的跨膜丝氨酸/苏氨酸激酶受体(I 型和 II 型受体)来实现的。TGF- β 配体与 II 型受体结合时,信号传导程序启动,随后 I 型受体开始募集异聚复合物。在异聚复合物中,II 型受体发生磷酸化并激活 I 型受体,此时 I 型受体激酶则激活下游信号传导组。Smad2 和 Smad3 与 TGF- β 1 型受体特异性相互作用,并在保守的 C 末端 SSXS 氨基酸序列的最后 2 个丝氨酸上被磷酸化^[33-34]。既往研究显示,TGF- β 1 是通过激活下游 Smad 蛋白,特别是 Smad3,调节组织修复、炎症和纤维化的因子促进慢性肾脏病的肾纤维和炎症进程。Smad3 是肾纤维化发病机制的关键介质^[35],而敲除 Smad3 可以通过改善肾纤维化和炎症使 DN 进程延缓。小鼠 DN 足细胞损伤和肾小球硬化可以通过 Smad3 基因敲除得到改善^[36];通过改善包括 DN 疾病病程在内的肾纤维化和炎症延迟,Smad3 敲除可使保护糖尿病肾脏结构和功能^[37],使糖尿病肾损伤得以缓解^[38-39],同时考虑到 Smad3 在 TGF- β 1 信号传导的关系,分析了 Smad3 基因敲除是否可以保护在 MPC5 细

胞免受 TGF- β 信号活化引起的细胞 EMT 损伤。

实验结果显示,TGF- β 1 信号的活化促使 MPC5 细胞足细胞分子标志蛋白丢失并促进纤维化基因的表达,而 Smad3 敲除显著抑制了 TGF- β 1 诱导的足细胞分子标志蛋白的丢失并逆转纤维化表型,表明 Smad3 敲除抑制了 TGF- β 1 诱导的足细胞 EMT 损伤。实验结果表明在 TGF- β 1 刺激 Smad3 敲除细胞与未敲除 Smad3 细胞中,Smad2 蛋白表达无显著差异。在 TGF- β 1/Smads 的通路中,Smad2 和 Smad3 共同介导纤维化,但 Smad3 是 TGF- β 1 信号的第一信号传导介质。Smad2 和 Smad3 虽然在氨基酸构成上高度同源,但结构上存在显著差异。Smad2 在氨基酸 Mad 结构域 1 (MH1)上比 Smad3 多了 2 个片段,且在 MH1 上有阻止 DNA 结合的插入段,所以敲除 Smad3 并不会影响 Smad2 蛋白的表达和 Smad2 介导的纤维化基因正常表达。实验结果中 fibronectin 和 Col1a1 基因 mRNA 表达上调,可能存在其他非 Smad 介导纤维化基因表达的 TGF- β 1 信号通路。同时本研究结果也提示,Smad3 在 DN、局灶性肾小球硬化(focal segmental glomerulosclerosis, FSGS)等足细胞病变中是一个重要的干预靶点。Smad3 敲除细胞系的建立可以为足细胞病变中的纤维化的研究提供细胞模型。关于 Smad3 基因敲除的 MPC5 小鼠足细胞系的功能研究还需要在动物实验中进一步验证。

4 结论

通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术,经 RT-PCR、Western blotting 和细胞免疫荧光方法检测分析,本研究成功构建了 2 株 Smad3 敲除的 MPC5 细胞系。在 2 株敲除细胞系中,Smad3 敲除抑制了 TGF- β 1 诱导的 MPC5 足细胞 EMT 损伤。本研究为 Smad3 蛋白在足细胞中的功能

研究提供了重要的细胞模型。

作者贡献声明

杨秀：方案设计、实验操作、初稿写作；
史姜珊、王洪连、王丽、粟宏伟：数据管理、
实验操作、提供材料；陈晨：监督指导、稿件
润色修改；赵长英：数据管理、方案设计、经
费支持、稿件润色修改。

作者利益冲突公开声明

作者声明没有任何可能会影响本文所报告
工作的已知经济利益或个人关系。

REFERENCES

- [1] SUN H, SAEEDI P, KARURANGA S, PINKEPANK M, OGURTSOVA K, DUNCAN BB, STEIN C, BASIT A, CHAN JCN, MBANYA JC, PAVKOV ME, RAMACHANDARAN A, WILD SH, JAMES S, HERMAN WH, ZHANG P, BOMMER C, KUO S, BOYKO EJ, MAGLIANO DJ. IDF Diabetes Atlas: global, regional and country-level diabetes prevalence estimates for 2021 and projections for 2045[J]. *Diabetes Research and Clinical Practice*, 2022, 183: 109119.
- [2] WEI Y, OUYANG Q. Adiponectin improves diabetic nephropathy by inhibiting necrotic apoptosis[J]. *Archives of Medical Science*, 2019, 15(5): 1321-1328.
- [3] LU QM, HOU Q, CAO K, SUN XL, LIANG Y, GU MR, XUE X, ZHAO AZ, DAI CS. Complement factor B in high glucose-induced podocyte injury and diabetic kidney disease[J]. *JCI Insight*, 2021, 6(19): e147716.
- [4] 石格, 毛志敏, 万毅刚, 沈山梅, 吴薇, 杨晶晶, 姚建. 糖尿病肾病足细胞损伤的病理机制及中药的干预作用[J]. *中国中药杂志*, 2016, 41(13): 2416-2421.
- [5] SHI G, MAO ZM, WAN YG, SHEN SM, WU W, YANG JJ, YAO J. Pathomechanisms of podocyte injury in diabetic nephropathy and interventional effects of Chinese herbal medicine[J]. *China Journal of Chinese Materia Medica*, 2016, 41(13): 2416-2421 (in Chinese).
- [6] LEE JH, MASSAGUÉ J. TGF- β in developmental and fibrogenic EMTs[J]. *Seminars in Cancer Biology*, 2022, 86: 136-145.
- [7] BRINKKOETTER PT, ISING C, BENZING T. The role of the podocyte in albumin filtration[J]. *Nature Reviews Nephrology*, 2013, 9(6): 328-336.
- [8] WANG XL, GAO YB, TIAN NX, ZOU DW, SHI YM, ZHANG N. Astragaloside IV improves renal function and fibrosis via inhibition of miR-21-induced podocyte dedifferentiation and mesangial cell activation in diabetic mice[J]. *Drug Design, Development and Therapy*, 2018, 12: 2431-2442.
- [9] LAN HY. The Yin and Yang role of transforming growth factor- β in kidney disease[J]. *Integrative Medicine in Nephrology and Andrology*, 2021, 8(1): 1.
- [10] KAJDANIUK D, MAREK B, BORGIEL-MAREK H, KOS-KUDŁA B. Transforming growth factor β 1 (TGF β 1) in physiology and pathology[J]. *Endokrynologia Polska*, 2013, 64(5): 384-396.
- [11] MENÈ P, PIROZZI N. Potassium channels, renal fibrosis, and diabetes[J]. *Diabetes*, 2013, 62(8): 2648-2650.
- [12] PIEK E, JU WJ, HEYER J, ESCALANTE-ALCALDE D, STEWART CL, WEINSTEIN M, DENG C, KUCHERLAPATI R, BOTTINGER EP, ROBERTS AB. Functional characterization of transforming growth factor beta signaling in *Smad2*- and *Smad3*-deficient fibroblasts[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(23): 19945-19953.
- [13] VERRECCHIA F, CHU ML, MAUVIEL A. Identification of novel TGF- β /Smad gene targets in dermal fibroblasts using a combined cDNA microarray/promoter transactivation approach[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(20): 17058-17062.
- [14] FUJIMOTO M, MAEZAWA Y, YOKOTE K, JOH K, KOBAYASHI K, KAWAMURA H, NISHIMURA M, ROBERTS AB, SAITO Y, MORI S. Mice lacking *Smad3* are protected against streptozotocin-induced diabetic glomerulopathy[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2003, 305(4): 1002-1007.
- [15] WU WJ, WANG XQ, YU XQ, LAN HY. *Smad3* signatures in renal inflammation and fibrosis[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2022, 18(7): 2795-2806.
- [16] CONG L, RAN FA, COX D, LIN SL, BARRETTO R, HABIB N, HSU PD, WU XB, JIANG WY, MARRAFFINI LA, ZHANG F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823.
- [17] WANG SW, GAO C, ZHENG YM, YI L, LU JC, HUANG XY, CAI JB, ZHANG PF, CUI YH, KE AW. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer[J]. *Molecular Cancer*, 2022, 21(1): 57.
- [18] GUPTA D, BHATTACHARJEE O, MANDAL D, SEN MK, DEY D, DASGUPTA A, KAZI TA, GUPTA R, SINHARROY S, ACHARYA K, CHATTOPADHYAY D, RAVICHANDIRAN V, ROY S, GHOSH D. CRISPR-Cas9 system: a new-fangled dawn in gene editing[J]. *Life Sciences*, 2019, 232: 116636.
- [19] ZHANG Z, ZHOU L, LIU QY, ZHENG YC, TAN X, HUANG ZX, GUO M, WANG X, CHEN XY, LIANG SM, LI WK, SONG K, YAN K, LI JL, LI QH, ZHANG YZ, YANG SM, CAI Z, DAI M, XIAN QY, et al. The lethal K18-hACE2 knock-in mouse model mimicking the severe pneumonia of COVID-19 is practicable for antiviral development[J]. *Emerging Microbes & Infections*, 2024, 13(1): 2353302.
- [20] LV L, YANG CD, ZHANG X, CHEN TX, LUO MF, YU G, CHEN QH. Autophagy-related protein PIATG2 regulates the vegetative growth, sporangial cleavage, autophagosome formation, and pathogenicity of *peronophythora litchii*[J]. *Virulence*, 2024, 15(1): 2322183.

- Q, SU HW, KANTAWONG F, LAN HY, WANG L. Btg2 promotes focal segmental glomerulosclerosis via Smad3-dependent podocyte-mesenchymal transition[J]. *Advanced Science*, 2023, 10(32): 2304360.
- [21] AKRAM F, SAHREEN S, AAMIR F, HAQ IU, MALIK K, IMTIAZ M, NASEEM W, NASIR N, WAHEED HM. An insight into modern targeted genome-editing technologies with a special focus on CRISPR/Cas9 and its applications[J]. *Molecular Biotechnology*, 2023, 65(2): 227-242.
- [22] MITTERMÜLLER D, OTTO L, KILIAN AL, SCHNORMEIER AK, LITTWITZ-SALOMON E, HASENBERG A, DITTMER U, GUNZER M. PD-1 knockout on cytotoxic primary murine CD8⁺ T cells improves their motility in retrovirus infected mice[J]. *Frontiers in Immunology*, 2024, 15: 1338218.
- [23] LONGHURST HJ, LINDSAY K, PETERSEN RS, FIJEN LM, GURUGAMA P, MAAG D, BUTLER JS, SHAH MY, GOLDEN A, XU YX, BOISELLE C, VOGEL JD, ABDELHADY AM, MAITLAND ML, McKEE MD, SEITZER J, HAN BW, SOUKAMNEUTH S, LEONARD J, SEPP-LORENZINO L, et al. CRISPR-Cas9 *in vivo* gene editing of *KLKB1* for hereditary angioedema[J]. *New England Journal of Medicine*, 2024, 390(5): 432-441.
- [24] SUN YY, LIU MF, YAN CC, YANG H, WU ZX, LIU YJ, SU NK, HOU JL, ZHANG JH, YANG FS, ZHANG JQ. CRISPR/Cas9-mediated deletion of β , β -carotene 9',10'-oxygenase gene (*EcBCO2*) from *Exopalaemon carinicauda*[J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 151: 168-177.
- [25] FENG MZ, LIU L, QU ZC, ZHANG B, WANG YJ, YAN L, KONG LB. CRISPR/Cas9 knockout of MTA1 enhanced RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cells partly via increasing ROS activities[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2023, 27(5): 701-713.
- [26] SRILA W, BAUMANN M, RIEDL M, RANGNOI K, BORTH N, YAMABHAI M. Glutamine synthetase (GS) knockout (KO) using CRISPR/Cpf1 diversely enhances selection efficiency of CHO cells expressing therapeutic antibodies[J]. *Scientific Reports*, 2023, 13(1): 10473.
- [27] GROCHOWSKA MM, BONIFATI V, MANDEMAKERS W. CRISPR/Cas9-mediated LRP10 knockout in HuTu-80 and HEK 293T cell lines[J]. *Bio-protocol*, 2022, 12(19): e4521.
- [28] ZHANG X, ZHAO LH, JIN RB, LI M, LI MS, LI RF, LIANG XB. CRISPR/Cas9-mediated α -ENaC knockout in a murine pancreatic β -cell line[J]. *Frontiers in Genetics*, 2021, 12: 664799.
- [29] XU FY, LIU CW, ZHOU DD, ZHANG L. TGF- β /SMAD pathway and its regulation in hepatic fibrosis[J]. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 2016, 64(3): 157-167.
- [30] PENG DD, FU MY, WANG MN, WEI YQ, WEI XW. Targeting TGF- β signal transduction for fibrosis and cancer therapy[J]. *Molecular Cancer*, 2022, 21(1): 104.
- [31] LICHTMAN MK, OTERO-VINAS M, FALANGA V. Transforming growth factor beta (TGF- β) isoforms in wound healing and fibrosis[J]. *Wound Repair and Regeneration*, 2016, 24(2): 215-222.
- [32] GOVINDEN R, BHOOLA KD. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-B[J]. *Pharmacology & Therapeutics*, 2003, 98(2): 257-265.
- [33] WRANA JL. TGF-beta receptors and signalling mechanisms[J]. *Mineral and Electrolyte Metabolism*, 1998, 24(2/3): 120-130.
- [34] FLANDERS KC. Smad3 as a mediator of the fibrotic response[J]. *International Journal of Experimental Pathology*, 2004, 85(2): 47-64.
- [35] LI H, CHANG HM, SHI ZD, LEUNG PCK. ID3 mediates the TGF- β 1-induced suppression of matrix metalloproteinase-1 in human granulosa cells[J]. *The FEBS Journal*, 2019, 286(21): 4310-4327.
- [36] WANG A, ZIYADEH FN, LEE EY, PYAGAY PE, SUNG SH, SHEARDOWN SA, LAPING NJ, CHEN S. Interference with TGF-beta signaling by Smad3-knockout in mice limits diabetic glomerulosclerosis without affecting albuminuria[J]. *American Journal of Physiology Renal Physiology*, 2007, 293(5): F1657-F1665.
- [37] XU BH, SHENG JY, YOU YK, HUANG XR, MA RCW, WANG QW, LAN HY. Deletion of Smad3 prevents renal fibrosis and inflammation in type 2 diabetic nephropathy[J]. *Metabolism*, 2020, 103: 154013.
- [38] ZHOU Q, GUO HH, YU CL, HUANG XR, LIANG LY, ZHANG PH, YU JW, ZHANG JZ, CHAN TF, MA RCW, LAN HY. Identification of Smad3-related transcriptomes in type-2 diabetic nephropathy by whole transcriptome RNA sequencing[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, 25(4): 2052-2068.
- [39] WANG HL, WEI B, HE HJ, HUANG XR, SHENG JY, CHEN XC, WANG L, TAN RZ, LI JC, LIU J, YANG SJ, MA RC, LAN HY. Smad3 deficiency improves islet-based therapy for diabetes and diabetic kidney injury by promoting β cell proliferation via the E2F3-dependent mechanism[J]. *Theranostics*, 2022, 12(1): 379-395.