

肝 疾 病

DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.002223

基于 CRISPR-Cas9 系统构建 GSTZ1 基因敲除模型
并探索其对肝癌细胞增殖和迁移能力的影响

雷 冲,王秋杰,李晶晶,杨 帆,梁 利,汪 凯,唐 霓

(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室,重庆 400016)

【摘要】目的:通过 CRISPR/Cas9 系统在 HepG2 肝癌细胞系中构建人谷胱甘肽 S-转移酶 ζ 1 (glutathione S-transferase zeta, GSTZ1) 基因敲除模型并探索 GSTZ1 敲除对肝癌细胞增殖和迁移能力的影响。**方法:**设计并合成长度 20 bp 的靶向 GSTZ1 的 sgRNA 寡核苷酸序列,退火后克隆到 LentiCRISPR-V2 载体上,与慢病毒包装质粒共转染 HEK293T 细胞,包装慢病毒并感染 HepG2 细胞,用合适浓度的嘌呤霉素筛选阳性细胞株,有限稀释法获得单克隆细胞。所有实验均分成 3 组:parental 组、KO1 组和 KO2 组,采用 MTS 实验、克隆形成实验和划痕实验分别检测细胞增殖和迁移能力。**结果:**Western blot 和 DNA 测序鉴定 GSTZ1 敲除的单克隆细胞构建成功;MTS 检测不同时间点下各组 HepG2 细胞的增殖能力变化情况。结果显示,48 h 时,KO1 组[(24.758 ± 1.508)%]相比亲本组[(20.185 ± 0.720)%],增殖能力明显增强,差异有统计学意义($P=0.002$)。72 h 时,相比亲本组[(23.903 ± 0.840)%],KO1 组[(28.634 ± 1.848)%]增殖能力明显增强($P=0.014$)。96 h 和 120 h 时,KO1 组相比亲本对照组,其增殖能力也明显增强($P<0.05$)。在 KO2 细胞中观察到同样现象,说明敲除 GSTZ1 后能够促进 HepG2 细胞的增殖能力。克隆形成实验表明,GSTZ1 敲除细胞株(KO1 和 KO2)克隆形成数(73.330 ± 1.528、82.330 ± 4.163)相比亲本细胞克隆形成数(42.330 ± 2.517)增多,差异有统计学意义($P=0.000$, $P=0.000$),提示 GSTZ1 基因敲除可以明显促进肝癌细胞的增殖能力。划痕实验结果显示,GSTZ1 敲除细胞株 KO1 和 KO2 在 48 h 的迁移相对比分别为 0.327 ± 0.041、0.371 ± 0.013,与亲本细胞(0.184 ± 0.045)相比明显增加($P=0.003$, $P=0.001$),提示 GSTZ1 基因敲除可明显促进肝癌细胞的迁移能力。**结论:**GSTZ1 缺失明显促进肝癌细胞的增殖和迁移能力,提示 GSTZ1 可能作为抑癌基因调控肝癌的发生和进程。

【关键词】GSTZ1;HepG2 细胞;肝癌;细胞迁移;细胞增殖**【中图分类号】**R73-3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2019-04-12Construction of GSTZ1 knockout model based on CRISPR-Cas9 system and
its effect on the proliferation and migration of hepatoma cells

Lei Chong, Wang Qiujie, Li Jingjing, Yang Fan, Liang Li, Wang Kai, Tang Ni

(Key Laboratory of Molecular Biology of Infectious Diseases, Ministry of Education,
Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To construct a human glutathione S-transferase zeta 1 (GSTZ1) gene knockout model in the HepG2 cell line based on the CRISPR/Cas9 system and to investigate the effect of GSTZ1 knockout on the proliferation and migration of HepG2 cells. **Methods:** A 20-bp sgRNA oligonucleotide sequence targeting GSTZ1 was designed and synthesized. After annealing, it was cloned into the lentiCRISPR-V2 vector. And HEK293T cells were co-transfected with lentivirus packaging plasmids. Then the lentivirus was

作者介绍:雷 冲,Email:1924499014@qq.com,

研究方向:GSTZ1 在肝癌发生发展过程中的重要作用。

通信作者:唐 霓,Email:nitang809@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81872270、81572683);
重庆市委基础与前沿研究资助项目(编号:cstc2018jcy-jAX0254);重庆市“三百”科技领军人才支持计划资助项目(编号:CSTCCXLJRC201719);重庆高校创新团队建设计划资助项目(编号:CXTDX201601015);重庆市研究生科研创新资助项目(编号:CYS18207)。

优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20190918.1718.019.html
(2019-09-19)

packaged and HepG2 cells were infected. The positive cell lines were screened for by an appropriate concentration of puromycin, and monoclonal cells were obtained by limited dilution method. All the experiments were divided into three groups, namely parental group, KO1 group, and KO2 group. MTS assay, colony-forming assay, and wound healing assay were used to determine cell proliferation and migration capacity. **Results:** The successful construction of GSTZ1 knockout monoclonal cells was verified by Western blot and DNA sequencing, while MTS assay was used to determine changes in the proliferation capacity of

HepG2 cells in each group at different time points. The results showed that the KO1 group had significantly increased proliferation capacity compared with the parental group at 48 h[(24.758 ± 1.508)% vs. (20.185 ± 0.720)%, $P=0.002$]. The proliferation capacity in the KO1 group was significantly higher than that in the parental group at 72 h[(23.903 ± 0.840)% vs. (28.634 ± 1.848)%, $P=0.014$]. The proliferation capacity in the KO1 group was also significantly elevated compared with the parental group at both 96 h and 120 h ($P<0.05$). The same effects were observed in KO2 cells, indicating that GSTZ1 knockout could promote the proliferation of HepG2 cells. Colony-forming assay showed that the colony-forming numbers in GSTZ1 knockout cell lines(KO1 and KO2) were significantly higher than that in their parental cell line(73.330 ± 1.528 and 82.330 ± 4.163 vs. 42.330 ± 2.517, $P=0.000$, $P=0.000$), suggesting that GSTZ1 knockout remarkably increased the proliferation capacity of hepatoma cells. In addition, wound healing assay showed that both GSTZ1 knockout cell lines had a significant increase in relative migration ratio compared with the parental cell line at 48 h (0.327 ± 0.041 and 0.371 ± 0.013 vs. 0.184 ± 0.045, $P=0.003$, $P=0.001$), suggesting that GSTZ1 knockout enhanced the migration capacity of hepatoma cells. **Conclusion:** GSTZ1 knockout significantly promotes the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells, suggesting that GSTZ1 may regulate the development and progression of hepatocellular carcinoma as a tumor suppressor gene.

[Key words] GSTZ1; HepG2 cells; hepatoma; cell migration; cell proliferation

谷胱甘肽硫转移酶(glutathione S-transferases, GSTs)超家族主要存在于肝脏和肾脏内,能够催化各种外来亲电子异源物质(化学致癌物质、环境污染物和抗肿瘤制剂等)及机体内在氧化应激过程中产生的二级产物(α , β -不饱和醛、醌类、环氧化合物和氢环氧化物等)和还原性谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)结合为加合物。这些加合物通过跨膜的多药抵抗相关蛋白(multidrug resistance-associated protein, MRP)被转运出细胞,起到给机体解毒的作用。此外,这些酶也与机体内一些物质的合成相关^[1]。谷胱甘肽 S-转移酶 $\zeta 1$ (glutathione S-transferase zeta 1, GSTZ1)是近年来发现的 GSTs 家族新成员之一,也被称为马来酰乙酰乙酸异构酶(maleylacetoacetate isomerase, MAAI),存在于一些植物、真菌和哺乳动物内,人谷胱甘肽 S-转移酶 $\zeta 1$ (human glutathione S-transferase zeta 1, hGSTZ1)基因长度大约为 10.9 kb,由 9 个外显子和 8 个内含子组成,定位在人类染色体 14q24.3,由 216 个氨基酸组成,分子量在 24 kD 左右^[2-3]。GSTZ1 主要有 2 大生物学功能,其一可以参与苯丙氨酸和酪氨酸(phenylalanine/tyrosine, Phe/Tyr)的分解代谢,催化马来酰乙酰乙酸(maleylacetoacetate, MAA)转化为延胡索酰乙酰乙酸(fumarylacetoacetate, FAA);其二催化二氯乙酸盐(dichloroacetate, DCA)、氟乙酸盐(fluoroacetate)、二氯丙酸酯(2-chloropropionate)与 GSH 加成。

前期实验证实 GSTZ1 在肝癌组织中表达明显降低,为进一步研究其生物学功能,本研究利用

CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/Cas9)技术建立人 GSTZ1 基因敲除的 HepG2 肝癌细胞系,通过体外功能学实验,研究 GSTZ1 敲除后对肝癌细胞增殖和迁移能力的影响,为进一步探索 GSTZ1 在肝细胞肝癌发生发展中的作用奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 细胞系、菌株及质粒

人肝癌细胞 HepG2 购自美国 ATCC,感受态细胞 DH10B、人胚肾细胞 HEK293T 由本实验室保存, HepG2、HEK293T 2 种细胞均于 37 ℃、5%CO₂ 条件下培养于含 10%胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、100 mg/mL 青链霉素的 MEM 培养基中。Cas9 表达载体 lentiCRISP-V2 及慢病毒包装质粒 pMD2.G、psPAX2 由清华大学生命科学院薛定教授馈赠。

1.2 主要试剂

DMEM 高糖培养基、MEM 低糖培养基、青链霉素购自 Hyclone 公司;胎牛血清购自 Gibco 公司;转染试剂 Lipofectamine 3000 购自 Invitrogen 公司;蛋白 BCA 定量试剂盒、PMSF、结晶紫染料均购于碧云天公司,ECL 发光试剂、PVDF 膜购于 Millipore 公司;GSTZ1 单克隆抗体(兔)购于 GeneTex 公司(货号:GTX106109),GAPDH 抗体购自碧云天公司。二抗(羊抗兔,羊抗鼠)抗体购自 Abcam 公司;限制性内切酶 BsmB I 购自 NEB 公司;T4 DNA 连接酶购自 Promega 公司。基因组 DNA 提取试剂盒购自吉锐生物。

1.3 构建 GSTZ1 敲除细胞模型

1.3.1 lentiCRISP V2-sgRNA 的构建 查询 GSTZ1 基因组序列,利用 sgRNA 设计网站(<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>)

designcrispr.html)设计合成 2 条含 *BsmB* I 酶切位点的 GSTZ1 Oligo 单链 DNA(引物序列见表 1, GSTZ1-sg),将设计合成的靶向 GSTZ1 的寡核苷酸单链退火成双链 DNA,用 *BsmB* I 酶切 Lenti CRISPR-V2 质粒并去磷。将酶切后的 LentiCRISPR-V2 质粒和双链 DNA 进行连接,体系为:4 μ L DNA,1 μ L LentiCRISPR-V2 质粒,1 μ L T4 DNA 连接酶;2 μ L T4DNA 连接酶 Buffer,12 μ L 无酶水。16 $^{\circ}$ C 连接过夜,将连接产物电转入大肠杆菌 DH10B 感受态后涂板,用试剂盒提取质粒 DNA,送检测序(引物序列见表 1, GSTZ1-seq)。

1.3.2 HEK293T 细胞中包装并收集慢病毒 转染前 1 d 将 HEK293T 细胞铺 60%左右密度至 6 cm 培养皿中,12 h 后进行转染,采用脂质体介导的转染法,按照质量 1:2:3 的比例混合重组质粒 pMD2.G(2 μ g)/psPAX2(4 μ g)/lentiCRISPR-V2-sgRNA(6 μ g)后转染 HEK293T 细胞,6 h 后换含 10%血清的新鲜培养基培养 2~3 d 后,收取病毒上清后用 0.45 μ m 过滤膜过滤。

1.3.3 慢病毒感染 HepG2 细胞 慢病毒感染前 1 d 铺 50%左右密度的 HepG2 细胞于 6 孔板,12 h 后加 1 mL 左右的慢病毒上清感染 HepG2 肝癌细胞,辅加 5 μ g/mL 浓度的 polybrene。

1.3.4 摸索嘌呤霉素杀伤 HepG2 细胞的最适工作浓度 以 40%左右密度将 HepG2 细胞重铺于 12 孔细胞培养板中,12 h 待细胞贴壁后加嘌呤霉素至细胞培养基中,使终浓度依次为 0、1、2、3、4 μ g/mL,共 5 个浓度,观察 48 h 后细胞存活情况,选取细胞全部死亡的最低浓度为后续筛选的工作浓度。

1.3.5 筛选稳定细胞株 慢病毒感染 HepG2 细胞 2~3 d,将细胞重铺后加 1 μ g/mL 嘌呤霉素筛选,待对照组 HepG2 细胞全部被杀死后,将感染慢病毒的 HepG2 细胞用 EDTA-胰酶消化,用 MEM 培养基将细胞稀释成 100 个/mL 的细胞悬液,并在 96 孔板中依次倍比稀释细胞,直到稀释出现单个细胞,单个细胞长成细胞团后,体外继续扩大培养,提取细胞蛋白并用 Western blot 检测 GSTZ1 表达情况,提取 GSTZ1 表达缺失的单克隆细胞株基因组 DNA,进行 TA 克隆并送检测序。

1.4 GSTZ1 敲除细胞株功能学实验

1.4.1 MTS 检测细胞增殖 将 GSTZ1 敲除细胞及亲本对照组细胞 TDTA-胰酶消化后计数,以 3×10^3 个细胞/室密度重铺至 96 孔板中,每组设 3 个复孔,分别于种板后 0 h、24 h、48 h、72 h、96 h 和 120 h 测量培养板细胞底面积,实验重复 3 次。

1.4.2 克隆形成实验检测细胞增殖 将 GSTZ1 敲除细胞及亲本对照组细胞 TDTA-胰酶消化后计数,以 3×10^3 个细胞/室密度铺至 6 孔板中,正常培养 14 d 左右,待细胞生长成肉眼可见的细胞集落后,终止培养,用 4%多聚甲醛固定 15 min,结晶紫染色 2 min 左右,镜下成像,计数单克隆细胞集落数,重复 3 次实验。

1.4.3 划痕实验检测细胞迁移 将 GSTZ1 敲除细胞及亲本对照组细胞 TDTA-胰酶消化后计数,以 6×10^4 个细胞/室密

度铺至 96 孔板中,待细胞长满后,使用划痕器划痕,然后换液,将 96 孔板放入 IncuCyte Zoom 仪器下拍照,记为 0 h,间隔 48 h 后再次拍照,记为 48 h,计算 HepG2 细胞相对迁移距离比(0 h 距离-48 h 距离)/0 h 距离,重复 3 次实验。

1.5 Western blot 检测 GSTZ1 表达情况

细胞处理后,按照试剂说明书要求提取细胞总蛋白,10%SDS-PAGE 凝胶电泳,再电转入 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,TBST 室温摇床洗膜 8 min $\times$ 3,加入二抗 37 $^{\circ}$ C 室温孵育 1 h,TBST 室温摇床洗膜 8 min $\times$ 3,加 ECL 显色后成像, β -actin 为内参。该实验至少重复 3 次。

1.6 统计学处理

用 SPSS 20.0 统计软件分析实验结果。数据均采用均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,3 组均数比较先采用单因素方差分析,然后再进行多重比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。每种实验均进行 3 次独立重复实验。

2 结果

2.1 GSTZ1 敲除细胞模型的构建

Lenti CRISPR V2-sgRNA 质粒构建成功, GSTZ1-sgRNA 与慢病毒包装质粒 pMD2.G、psPAX2 用 Lipo3000 共转染 HEK293T 细胞,2 d 后收取慢病毒上清并感染 HepG2 细胞系,用 1 μ g/mL 嘌呤霉素筛选单克隆细胞系,提取细胞基因组 DNA,TA 克隆并送检测序,测序引物见表 1。鉴定到 2 株单克隆细胞系,命名为 KO1、KO2,测序列比对比如图 1 所示, KO1 相比野生型序列缺失了 7 个碱基(GTGGCTT), KO2 相比野生型序列缺失了 5 个碱基(CACTT),分别造成各自编码蛋白质的移码突变(图 1)。用 Western blot 检测 KO1、KO2 细胞 GSTZ1 蛋白的表达,发现 GSTZ1 蛋白表达缺失(图 2)。

表 1 引物序列

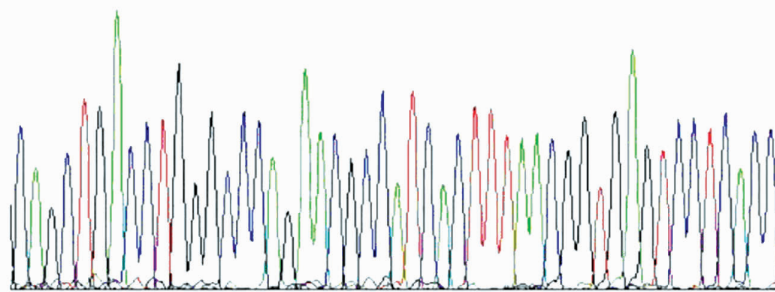
引物名称	引物序列
GSTZ1-sg	Forward: CACCGCCCAGAACGCCATCACTTG
	Reverse: AAACCAAGTGATGGCGTTCTGGGC
GSTZ1-seq	Forward: GGACCATGCAAGGGAGAA
	Reverse: TTAAGACGGTTTACTGGGAGTG

2.2 GSTZ1 敲除对 HepG2 细胞增殖能力的影响

MTS 检测不同时间点下各组 HepG2 细胞的增殖能力变化情况。结果显示,48 h 时, KO1 组(24.758 ± 1.508)相比亲本组(20.185 ± 0.72),增殖能力明显增强,差异有统计学意义($P=0.002$)。72 h 时,相比亲本组(23.903 ± 0.840), KO1 组(28.634 ± 1.848)增殖能力明显增强,差异有统计学意义($P=0.014$)。96 h 和 120 h 时, KO1 组相比亲本对照组,其增殖能力也明显增强($P<0.05$)。在 KO2 中观察到同样现象(图 3),细胞在不同时间点相对活力均值及统计学分析见表 2。说明敲除 GSTZ1 后能够促进 HepG2 细胞的增殖能力。

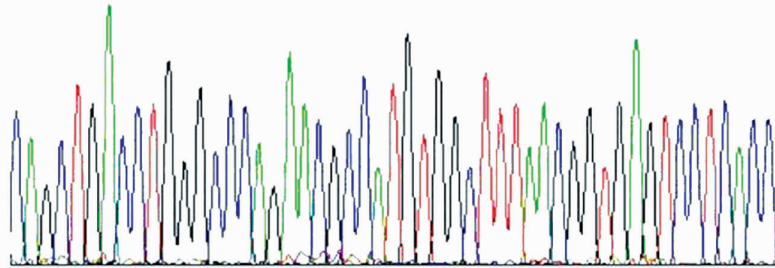
WT: CAGCTGACCTGGGCCCAGAACGCCATCACTTTGGCTTTAACGGTGAGTCCTCACC
K01: CAGCTGACCTGGGCCCAGAACGCCATCACTT TAACGGTGAGTCCTCACC
K02: CAGCTGACCTGGGCCCAGAACGCCATGTGGCTTTAACGGTGAGTCCTCACC

CAGCTGACCTGGGCCCAGAACGCCATCACTTTAACGGTGAGTCCTCACC



K01: -7 bp

CAGCTGACCTGGGCCCAGAACGCCATGTGGCTTTAACGGTGAGTCCTCACC



K02: -5 bp

注:PAM 序列以绿色下划线标识,靶向序列以红色标识,突变序列以蓝色标识

图 1 GSTZ1 敲除细胞株基因组 DNA 与野生型 GSTZ1 基因组 DNA 序列比对结果

表 2 不同时间点的细胞相对活力

组别	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
parental	16.286 ± 0.383	18.412 ± 0.647	20.185 ± 0.720	23.903 ± 0.840	28.058 ± 0.940	35.457 ± 2.623
K01	16.673 ± 0.357	19.394 ± 1.129	24.758 ± 1.508	28.634 ± 1.848	33.301 ± 2.293	43.215 ± 4.156
K02	16.424 ± 0.447	19.103 ± 0.519	23.408 ± 0.680	27.805 ± 2.084	33.829 ± 0.871	46.594 ± 1.605
F 值	0.730	1.168	15.248	6.787	13.276	10.981
P 值	0.520	0.373	0.004	0.029	0.006	0.010

注:0 h K01 组与 parental 组相比, $P=0.278$,K02 组与 parental 组相比, $P=0.686$;24 h K01 组与 parental 组相比, $P=0.187$,K02 组与 parental 组相比, $P=0.335$;48 h K01 组与 parental 组相比 $P=0.002$,K02 组与 parental 组相比, $P=0.009$;72h K01 组与 parental 组相比, $P=0.014$,K02 组与 parental 组相比, $P=0.029$;96 h K01 组与 parental 组相比, $P=0.005$,K02 组与 parental 组相比, $P=0.003$;120 h K01 组与 parental 组相比, $P=0.019$,K02 组与 parental 组相比, $P=0.004$

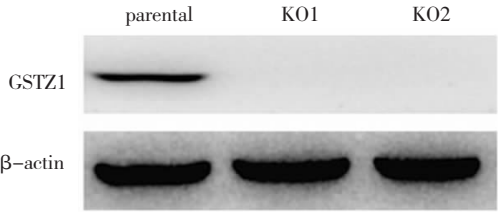


图 2 蛋白水平鉴定 GSTZ1 敲除稳定细胞系

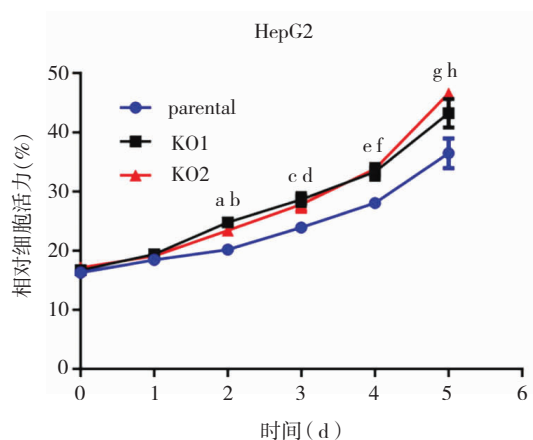
2.3 GSTZ1 敲除对 HepG2 细胞增殖能力的影响

克隆形成实验表明,GSTZ1 敲除细胞株(K01)克隆形成数(73.330 ± 1.528)相比亲本(parental) 克隆形成数(42.33 ± 2.517)增多,差异有统计学意义($P=0.000$),GSTZ1 敲除细胞

株(K02)克隆形成数(82.330 ± 4.163)相比亲本也明显增多($P=0.000$),提示 GSTZ1 基因敲除可以明显促进肝癌细胞的增殖能力(图 4)。各组细胞克隆形成数均值及统计学分析见表 3。

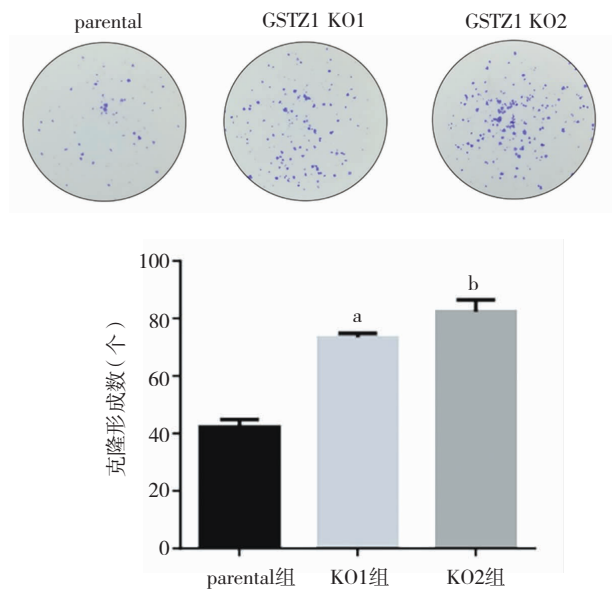
2.4 GSTZ1 敲除对 HepG2 细胞迁移能力的影响

划痕实验结果显示,GSTZ1 敲除细胞株(K01)在 48 h 的相对迁移比为(0.327 ± 0.041)与亲本细胞株(0.184 ± 0.045)相比明显增加($P=0.003$);GSTZ1 敲除细胞株(K02)在 48 h 的相对迁移比(0.371 ± 0.013)与亲本细胞株(0.184 ± 0.045)相比明显增加($P=0.001$),提示 GSTZ1 基因敲除可以明显促进肝癌细胞的迁移能力(图 5)。各组细胞划痕愈合率均值及统计学分析见表 4。



注:a,KO1 组与 parental 组相比, $P=0.002$; b:KO2 组与 parental 组相比, $P=0.009$;c:KO1 组与 parental 组相比, $P=0.014$;d:KO2 组与 parental 组相比, $P=0.029$;e:KO1 组与 parental 组相比, $P=0.005$;f:KO2 组与 parental 组相比, $P=0.003$;g:KO1 组与 parental 组相比, $P=0.019$;h:KO2 组与 parental 组相比, $P=0.004$

图 3 敲除 GSTZ1 促进 HepG2 细胞的增殖能力



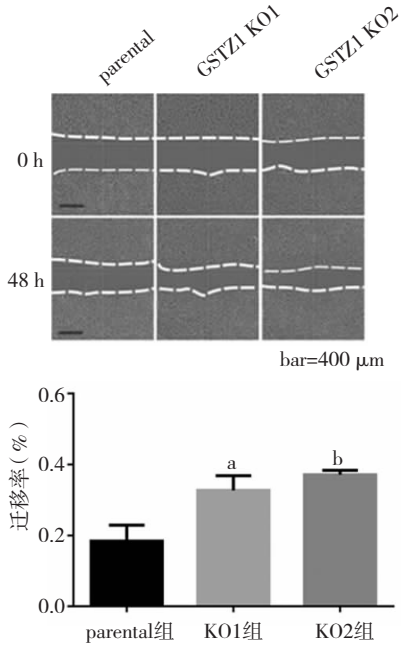
注:a,KO1 组与 parental 组相比, $P=0.000$;b:KO2 组与 parental 组相比, $P=0.000$

图 4 GSTZ1 敲除促进 HepG2 细胞的增殖能力

表 3 各组克隆形成数

组别	克隆形成数
parental组	42.330 ± 2.517
KO1组	73.330 ± 1.528
KO2组	82.330 ± 4.163
F 值	152.423
P 值	0.000

注:KO1 组与 parental 组相比, $P=0.000$,KO2 组与 parental 组相比, $P=0.000$



注:a,KO1 组与 parental 组相比, $P=0.003$;b:KO2 组与 parental 组相比, $P=0.001$

图 5 GSTZ1 敲除促进 HepG2 细胞的迁移能力

表 4 各组的划痕愈合率

组别	划痕愈合率
parental组	0.184 ± 0.045
KO1组	0.327 ± 0.041
KO2组	0.371 ± 0.013
F 值	21.985
P 值	0.002

注:KO1 组与 parental 组相比, $P=0.003$,KO2 组与 parental 组相比, $P=0.001$

3 讨论

肝癌是全球最常见的恶性肿瘤之一,2018 年全球癌症年报显示,肝癌发病率在肿瘤中位列第 6 位,死亡率列第 4 位^[4],已成为威胁人类健康的重要疾病之一。恶性肿瘤的典型特征包括不受控制的增殖、高迁移和侵袭能力等。肿瘤的发生除了相关癌基因和抑癌基因发生突变外,肿瘤的代谢也发生了重编程,代谢物本身能通过影响细胞信号转导和阻断细胞分化而促进癌症的发生^[5-6]。而 GSTZ1 作为一个代谢酶,广泛参与机体内的多种代谢过程,不仅与体内外多种物质代谢相关,也参与氨基酸(苯丙氨酸/酪氨酸)的分解代谢过程。苯丙氨酸和酪氨酸代

谢通路相关酶缺乏都会引起相关疾病的发生,比如延胡索酰乙酐乙酸水解酶缺乏会引起 I 型酪氨酸血症,苯丙氨酸羟化酶缺乏会引起苯丙酮尿症等^[7]。

目前关于 GSTZ1 与人类肿瘤的关系报道较少。Jahn 等^[8]的研究表明,相比癌旁组织,GSTZ1 在肝细胞肝癌组织中低表达且与患者预后不良密切相关,但具体机制仍然有待解析。

有关 GSTs 家族分子敲除小鼠的动物模型研究较多。有研究指出,相比野生型小鼠,GSTP1/2 基因敲除小鼠有更高的皮肤癌发生率^[9]。然而,野生型的 GSTM1 却与高乳腺癌风险相关^[10]。GSTZ1 基因敲除小鼠饮用水里面添加 3% 苯丙氨酸时,成年小鼠肝脏组织坏死,而且观察到小鼠血清里面琥珀酰丙酮酸含量增高,小鼠肝脏组织中其家族的其他成员 GSTA1/2、GSTM1、GSTP1/2 和还原型辅酶 Q 氧化还原酶(NAD(P)H:quinone oxidoreductase,NQO1)被诱导升高^[11],并且表达受 Keap1-Nrf2 信号通路调控^[12]。提示 GSTs 家族分子的缺失可能与不同疾病的发生密切相关。因此,通过体外实验深入研究 GSTZ1 基因敲除后肝癌细胞的生物学行为,具有重要的意义。

本研究通过 CRISPR/Cas9 技术,在野生型 HepG2 细胞中敲除 GSTZ1,通过 DNA 测序和 Western blot 分析鉴定细胞模型构建成功,使用 2 株单克隆 HepG2-KO 细胞系,通过 MTS 实验,克隆形成实验,划痕实验均证明 GSTZ1 敲除能明显增加 HepG2 细胞的增殖和迁移能力。但其具体分子机制目前不是特别清楚。本次实验构建的 GSTZ1 敲除细胞株为后续深入研究 GSTZ1 在肝细胞肝癌发生发展中的分子机制奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR. Glutathione transferases[J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005, 45: 51–88.
- [2] Blackburn AC, Woollatt E, Sutherland GR, et al. Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding the human Zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase[J]. Cytogenet Cell Genet, 1998, 83(1–2): 109–114.
- [3] Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G, et al. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans[J]. Biochem J, 1997, 328 (Pt 3): 929–935.
- [4] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2018; GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. CA Cancer J Clin, 2018, 68(6): 394–424.
- [5] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. Cell, 2011, 144(5): 646–674.
- [6] Ward PS, Thompson CB. Metabolic reprogramming: a cancer hallmark even warburg did not anticipate[J]. Cancer Cell, 2012, 21(3): 297–308.
- [7] Sade D, Shaham-Niv S, Arnon ZA, et al. Seeding of proteins into amyloid structures by metabolite assemblies may clarify certain unexplained epidemiological associations[J]. Open Biol, 2018, 8(1), 170229.
- [8] Jahn SC, Solayman MH, Lorenzo RJ, et al. GSTZ1 expression and chloride concentrations modulate sensitivity of cancer cells to dichloroacetate[J]. Biochim Biophys Acta, 2016, 1860(6): 1202–1210.
- [9] Henderson CJ, Smith AG, Ure J, et al. Increased skin tumorigenesis in mice lacking PI class glutathione S-transferases[J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95(9): 5275–5280.
- [10] Roodi N, Dupont WD, Moore JH, et al. Association of homozygous wild-type glutathione S-transferase M1 genotype with increased breast cancer risk[J]. Cancer Res, 2004, 64(4): 1233–1236.
- [11] Lim CE, Matthaei KI, Blackburn AC, et al. Mice deficient in glutathione transferase zeta/maleylacetoacetate isomerase exhibit a range of pathological changes and elevated expression of alpha, mu, and PI class glutathione transferases[J]. Am J Pathol, 2004, 165(2): 679–693.
- [12] Hayes JD, Chanas SA, Henderson CJ, et al. The Nrf2 transcription factor contributes both to the basal expression of glutathione S-transferases in mouse liver and to their induction by the chemopreventive synthetic antioxidants, butylated hydroxyanisole and ethoxyquin[J]. Biochem Soc Trans, 2000, 28(2): 33–41.

(责任编辑:唐秋姗)