

TALENs 介导的 Nanog 基因表达下调对宫颈癌 HeLa 细胞恶性行为的影响

于爱清¹, 李成林², 杨毅¹, 严世荣^{1,3△}

1. 武汉大学中南医院 基因诊断中心(武汉 430000);

2. 湖北医药学院附属太和医院 胚胎干细胞研究湖北重点实验室(十堰 442000);

3. 湖北医药学院 生化教研室(十堰 442000)

【摘要】目的 研究 Nanog 表达下调对宫颈癌 HeLa 细胞恶性行为的影响。**方法** 通过基因编辑工具转录激活样效应器核酸酶(TALENs)介导 Nanog 下调表达,基因测序分析 Nanog 的突变情况;挑取单个细胞培养以筛选出 Nanog 明显下调表达的单克隆 HeLa 细胞;RT-PCR 检测 mRNA 表达水平;Western blot 检测蛋白表达水平;HeLa 细胞的集落形成能力、侵袭性及耐药性分别通过集落形成实验、Transwell 侵袭实验及药物敏感性实验检测。**结果** TALENs 成功介导 Nanog 基因突变并导致其下调表达,Nanog 突变的单克隆 HeLa 细胞 Nanog mRNA 和蛋白表达水平较野生型 HeLa 细胞均下调表达($P<0.05$)。Nanog 突变单克隆 HeLa 细胞相对于野生型 HeLa 细胞表现出明显减弱的侵袭、集落形成及化疗药物抵抗能力($P<0.05$)。**结论** Nanog 突变减弱 HeLa 细胞的恶性行为,下调或沉默 Nanog 表达有望成为一种新型的治疗宫颈癌策略。

【关键词】 TALENs Nanog HeLa 细胞 宫颈癌

The Effect of TALENs-mediated Downregulation Expression of Nanog on Malignant Behavior of Cervical Cancer HeLa Cells YU Ai-qing¹, LI Cheng-lin², YANG-Yi¹, YAN Shi-rong^{1, 3△}. 1. Center for Gene Diagnosis, Zhongnan Hospital of Wuhan University, Wuhan 430000, China; 2. Hubei Key Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Taihe Hospital, the Affiliated Hospital of Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China; 3. Department of Biochemistry, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, China

△ Corresponding author, E-mail: graceyan@163.com

【Abstract】Objective To study the effect of downregulation expression of Nanog on malignant behavior of cervical cancer HeLa cells. **Methods** Gene editing tool TALENs was employed to induce downregulation expression of Nanog, and Nanog mutation was evaluated by sequencing. RT-PCR and Western blot was used to detect the mRNA and protein expression level, respectively. Colony-formation assay, Transwell invasion assay, and chemotherapy sensibility assay was carried out to assess the capacity of colony-formation, invasion, and chemoresistance, respectively. **Results** TALENs successfully induced Nanog mutation and downregulated Nanog expression. Nanog mRNA and protein expression of Nanog-mutated monoclonal HeLa cells downregulated 3 times compared to thoses of wild-type HeLa cells ($P<0.05$). Additionally, significant weakened abilities of colony-formation, invasion, and chemoresistance in monoclonal HeLa cells were observed when compared to those of wild-type HeLa cells ($P<0.05$). **Conclusion** Nanog mutation attenuates the malignant behavior of HeLa cells. Importantly, downregulation or silencing of Nanog is promising to be a novel strategy for the treatment of cervical carcinoma.

【Key words】 TALENs Nanog HeLa cells Cervical cancer

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一。近年来,随着早期筛查方法的改进及治疗方案的更新,宫颈癌的发病率及死亡率有一定程度的下降,但在因癌症死亡的发展中国家女性中,宫颈癌仍是排名第二的死亡原因^[1-3]。研究表明持续的人乳头瘤病毒(HPV)感染是宫颈癌发生的起始原因^[4]。然而,相关研究表明许多分子调控机制和表观遗传变化与宫

颈癌的发生密切相关^[4,5]。Nanog 是维持胚胎干细胞自我更新、多能性及未分化状态的必需调控因子^[6-9]。大量研究表明 Nanog 也参与维持肿瘤细胞的生物学行为,Nanog 过表达与肿瘤细胞的转移、侵袭及转化密切相关^[10-13]。转录激活样效应器核酸酶(TALENs)是一种重要的基因靶向编辑工具,它主要由 DNA 结合域与 Fok I 核酸酶构成。TALENs 介导的 DNA 双链断裂能启动内源性的 DNA 通过非末端同源重组(NHEJ)方式进行修复,

TALENs 通过这种机制成功实现对靶基因的编辑^[14,15]。与 RNA 干扰技术相比,TALENs 能更彻底和稳定的扰乱目的基因表达。

本研究旨在利用 TALENs 介导 Nanog 下调表达,采用 Transwell 侵袭实验、集落形成实验及化疗药物敏感实验以证明 Nanog 下调表达对 HeLa 细胞恶性生物学行为的影响。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

TALENs 试剂盒购自上海斯丹赛生物技术有限公司;Trizol 试剂和胎牛血清购自 Invitrogen 公司;DMEM 购自 Sigma 公司;逆转录试剂盒和基因组提取试剂盒购自天根生化科技有限公司;T7E1 内切核酸酶购自北京唯尚立德生物科技有限公司;Transwell 小室购自 Corning 公司;Nanog 抗体购自 Santa Cruz 公司;电转染仪购自 NEPA GENE 公司;生物安全柜和细胞培养箱购自 Thermo Scientific 公司;凝胶成像系统购自 Bio-Rad 公司;小动物活体成像系统购自 IVIS Spectrum 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 TALENs 质粒构建 Nanog TALENs 质粒臂根据试剂公司的建议而设计,而 TALENs 骨架通过使用快速 TALENs 组装试剂盒进行构建。实验步骤按试剂盒说明进行。

1.2.2 细胞培养 带有荧光素酶质粒的 HeLa 细胞(来源于 University of British Columbia)培养于含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基中,并提供 37℃ 和 5%CO₂ 的培养条件。

1.2.3 TALENs 质粒转染 约 10 μg Nanog TALENs 质粒对(左、右臂各 5 μg)与 1×10⁶ 个细胞在 90 μL Opti-MEM 培养基中均匀混合,随后将混合物转移至电击杯中 150 V 电压进行电转染。

1.2.4 基因组提取与 T7E1 酶切分析 转染 Nanog 质粒 15 d 后,提取野生型细胞与转染 Nanog 质粒的 HeLa 细胞的基因组,随后 PCR 扩增 TALENs 打靶位点前后的片段(约 500 bp)进行 T7E1 酶切分析和基因测序分析(基因测序由上海生物工程有限公司完成),以分析 Nanog 基因的突变情况。PCR 扩增程序为:95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 循环数 32,最后 72℃ 孵育 10 min,反应体系为 10 μL。相关引物序列由上海生工生物工程有限公司合成,Nanog 基因扩增引物序列为,正向引物:5'-

GGCAACTCACTTTATCC-3',反向引物:5'-TTT GAGAACCTATGGGCTT-3'。T7E1 内切核酸酶识别并切割不完全匹配的 DNA,能将突变的 Nanog 基因扩增靶点片段进行切割,野生型 HeLa 细胞基因组不能被 T7E1 酶切割,而 Nanog 突变的 HeLa 细胞基因组被 T7E1 酶切割产生 3 条带(1 条野生型带,2 条突变带),通过计算突变带灰度值占 3 条带灰度值的比例计算打靶效率。T7E1 内切核酸酶实验步骤按试剂盒说明进行。

1.2.5 筛选 Nanog 突变的单克隆 HeLa 细胞 从含有 Nanog 突变的混合细胞中挑取单个细胞至 96 孔板培养,通过 T7E1 酶切与基因测序筛选出 Nanog 突变的单克隆 HeLa 细胞。

1.2.6 RT-PCR Trizol 试剂提取野生型 HeLa 细胞与 Nanog 突变的单克隆 HeLa 细胞总 RNA,通过逆转录试剂盒合成 cDNA,随后以 cDNA 为模板进行 RT-PCR。PCR 扩增程序为:95℃ 预变性 5 min, 95℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s,循环数 28,最后 72℃ 孵育 10 min,反应体系为 10 μL。相关引物序列由上海生工生物工程有限公司合成,Nanog 正向引物:5'-CTCTCCTCTT CCTTCCTCCAT-3',反向引物:5'-TTGCGACACT CTTCTCTGC-3';β-actin:5'-CTGGAACGGTGAA GGTGACA-3',反向引物:5'-AAGGGACTTCCT GTAACAACGCA-3'。采用 Gel-Pro Analyzer 软件进行灰度分析,以目的基因灰度值与内参灰度值的比值作为目的基因的相对表达量进行半定量分析。

1.2.7 Western blot 提取野生型 HeLa 细胞与 Nanog 突变的单克隆 HeLa 细胞的总蛋白,随后进行 120 g/L SDS-PAGE 胶分离和转 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后,含目的蛋白的膜与相应一抗 4℃ 过夜封闭,TBST 洗 3 次(每次 5 min),随后含目的蛋白的膜与碱性磷酸酶标记的二抗孵育 1 h, TBST 再洗 3 次(每次 5 min),最后蛋白条带进行凝胶系统成像。采用 Gel-Pro Analyzer 软件进行灰度分析,以目的蛋白灰度值与内参蛋白灰度值的比值作为目的基因的相对表达量进行半定量分析。

1.2.8 Transwell 侵袭实验 依据文献^[16]的描述,本研究通过 Transwell 侵袭实验来评价野生型 HeLa 细胞与 Nanog 突变的单克隆 HeLa 细胞的侵袭能力。含 1×10⁵ 个细胞的无血清悬液加入到提前铺好 matrigel 胶的 Transwell 小室上层,而下层则加入 500 μL 完全培养基,培养 24 h 后,用湿棉签擦去 matrigel 胶,而穿过 Transwell 膜的细胞用无

水乙醇固定 30 min,然后 0.1%结晶紫染色 30 min,最后用显微镜拍照并计数侵袭细胞数。实验独立重复 3 次。

1.2.9 集落形成实验 1×10^3 个细胞以单个细胞形式培养于 6 孔板的孔中,待集落形成足够大而又未互相融合时加入荧光素酶底物,用小动物活体成像系统检测集落荧光强度以评价集落数目及大小。实验独立重复 3 次。

1.2.10 化疗药物敏感分析 1×10^4 个野生型 HeLa 细胞与 Nanog 突变的单克隆 HeLa 细胞培养于 96 孔板中,培养 24 h 后,吸去正常培养基,分别加入含 $1.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 顺铂和 60 ng/mL 紫杉醇的完全培养基,培养 48 h 后,向 96 孔板中加入荧光素酶底物,通过荧光强度以反映活细胞数。实验独立重复 3 次。

1.3 统计学方法

实验结果用 $\bar{x}\pm s$ 描述。采用 *t* 检验进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

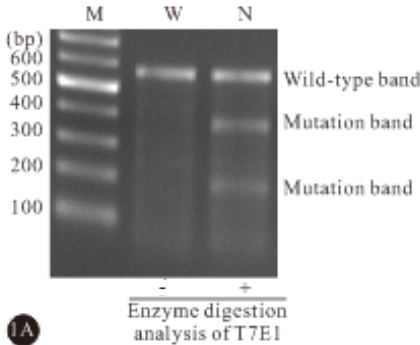


图 1 TALENs 介导 Nanog 基因突变

Fig 1 TALEN-mediated mutation of Nanog gene by PCR (A) and Western blot (B)

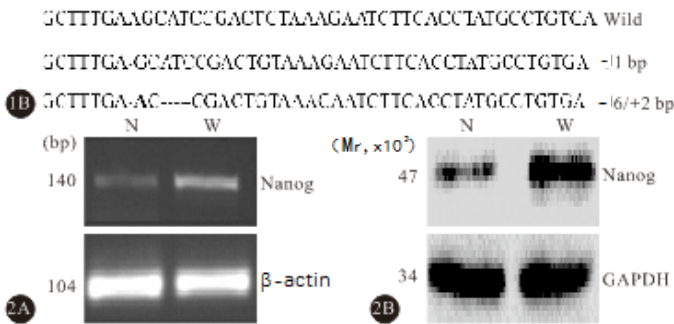


图 2 RT-PCR(A)和 Western blot(B)检测 TALENs 介导的 Nanog 基因下调表达

Fig 2 Detection of TALEN-mediated downregulation expression of Nanog gene by RT-PCR (A) and Western blot (B)

1A: The analysis of mutation efficiency of Nanog by T7E1; 1B: Genomic sequencing results of monoclonal HeLa cells. The black dotted line represents nucleotide deletion and the black bold font represents nucleotide insertion, and the number of nucleotides deletion and insertion is indicated on the right; M: Marker; W: Wild HeLa; N: Nanog-mutated HeLa

Nanog 突变单克隆 HeLa 细胞穿过 Transwell 膜的细胞数(14 ± 3)较野生型 HeLa 细胞(38 ± 7)减少 ($P<0.05$),见图 3。

2.4 Nanog 下调表达对 HeLa 细胞集落形成能力的影响

集落形成实验结果显示, Nanog 突变单克隆 HeLa 细胞为 $(0.78\pm 0.21)\times 10^6$, 而野生型 HeLa 细胞集落荧光强度值为 $(1.35\pm 0.39)\times 10^6$, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 表明 Nanog 下调表达减弱 HeLa 细胞的集落形成能力。

2.5 Nanog 下调表达对 HeLa 细胞化疗药物敏感性的影响

结果显示, Nanog 突变的单克隆 HeLa 细胞培

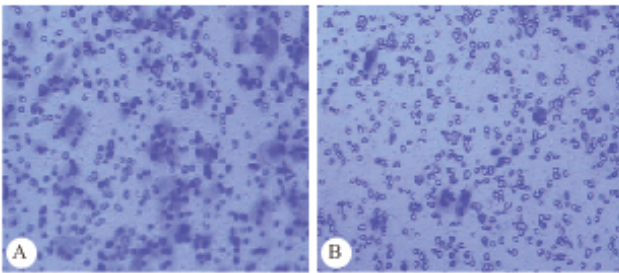


图 3 HeLa 细胞侵袭实验。×100

Fig 3 Invasion experiment of HeLa cells. ×100

A: Wild HeLa; B: Nanog-mutated HeLa

养于含顺铂($1.5 \mu\text{g}/\text{mL}$)的培养基中 48 h 后荧光强度值为 $(0.23 \pm 0.06) \times 10^7$, 而相应的野生型 HeLa 细胞 48 h 后为 $(0.42 \pm 0.08) \times 10^7$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); Nanog 突变的单克隆 HeLa 细胞培养于含紫杉醇($60 \text{ ng}/\text{mL}$)的培养基中 48 h 后荧光强度值为 $(0.19 \pm 0.03) \times 10^7$, 而相应的野生型 HeLa 细胞 48 h 后为 $(0.45 \pm 0.07) \times 10^7$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 表明 Nanog 下调表达增强 HeLa 细胞对化疗药物的敏感性。

3 讨论

宫颈癌分子靶向治疗极具临床意义, 特别是针对晚期及复发宫颈癌。然而关于宫颈癌恶性行为的分子机制调控目前依旧知之甚少。

多能性因子 Nanog 是胚胎干细胞多能性维持和自我更新的主要调控因子之一, 它与 Oct4、Klf4、SOx2 及 c-Myc(OKSM) 共同组成胚胎干细胞多能性调控网络, 一起参与调控胚胎干细胞的多能性及维持胚胎干细胞的未分化状态^[17]。近年来, 许多研究表明 Nanog 同样在调控和维持肿瘤细胞恶性行为方面起到了重要的作用, 参与调控肝癌、肺癌、乳腺癌、前列腺癌、胃癌及舌鳞癌等肿瘤细胞的恶性行为^[18-20]。此外, Nanog 与肿瘤患者预后存在相关性, Meng 等^[21]检测了 175 例结直肠癌患者肿瘤组织样本中 Nanog 蛋白的表达水平, 发现 Nanog 过表达能促进结直肠癌的发展且与结直肠癌患者预后不良相关联。但 Nanog 对宫颈癌肿瘤细胞恶性行为的影响尚不明确。本研究通过最新基因编辑工具 TALENs 介导 HeLa 细胞 Nanog 基因突变而下调其表达, 并证实了 Nanog 的下调表达对 HeLa 细胞侵袭能力、集落形成能力及化疗药物抵抗能力等恶性表型的影响。

我们首先通过 T7E1 酶切和基因测序证实了 Nanog 基因的突变, 随后筛选出 Nanog 基因突变的单克隆 HeLa 细胞, 通过 RT-PCR 和 Western blot 证实了 Nanog 基因突变的单克隆 HeLa 细胞较野生型 HeLa 细胞 Nanog 表达明显下调。为了证明 Nanog 的下调表达对 HeLa 细胞恶性行为的影响, 本研究采用 Transwell 侵袭实验、集落形成实验及药物敏感性实验分别检测 Nanog 基因突变的单克隆 HeLa 细胞的侵袭能力、集落形成能力及化疗药物抵抗能力等恶性行为。Transwell 侵袭实验结果表明 Nanog 下调表达减弱了 HeLa 细胞的侵袭能力, 与 Sun 等^[11]发现的 Nanog 参与影响肝癌等肿

瘤细胞的侵袭能力的结果相符。Chiou 等^[22]证实增强 Nanog 与 Oct4 共表达可促进肺癌细胞集落形成能力。本研究亦发现 Nanog 下调表达的单克隆 HeLa 细胞表现出减弱的集落形成能力, 此结果进一步支持了 Chiou 等的结论, 表明 Nanog 参与调节肿瘤细胞的集落形成能力。既往研究已证明 Nanog 参与介导肿瘤细胞对化疗药物(顺铂、五氟尿嘧啶和紫杉醇)的耐受^[20,23,24]。本研究的药物敏感性实验结果表明, Nanog 的下调表达减弱了 HeLa 细胞对顺铂与紫杉醇等化疗药物的抵抗力, 增强了对这些化疗药物的敏感性, 提示打靶 Nanog 基因结合服用常规化疗药物可能进一步增加 HeLa 细胞对化疗药物的敏感性, 以改善宫颈癌患者的预后与生存率。综合本研究数据, 我们认为 Nanog 参与调控 HeLa 细胞的恶性行为, 此作用与维持胚胎干细胞多能性类似, 这一结论与之前关于 Nanog 对肿瘤细胞恶性行为影响的研究结论一致。

总之, 本研究通过 TALENs 介导的 Nanog 突变而下调其表达, 通过比较野生型 HeLa 细胞与 Nanog 下调表达的单克隆 HeLa 细胞在侵袭、集落形成及化疗药物抵抗等方面的能力, 证实了 Nanog 在维持 HeLa 细胞恶性表型方面的重要作用, 打靶 Nanog 基因有望成为一种新型的改善宫颈癌患者预后和生存率的基因疗法。

参 考 文 献

- 1 Missaoui N, Hmissa S, Trabelsi A, *et al.* Promoter hypermethylation of CDH13, DAPK1 and TWIST1 genes in precancerous and cancerous lesions of the uterine cervix. *Pathol Res Pract*, 2011; 207(1): 37-42.
- 2 Wang JT, Ding L, Jiang SW, *et al.* Folate deficiency and aberrant expression of DNA methyltransferase 1 were associated with cervical cancerization. *Curr Pharm*, 2014; 20(11): 1639-1646.
- 3 Punt S, Thijssen VL, Vrolijk J, *et al.* Galectin-1, -3 and -9 expression and clinical significance in squamous cervical cancer. *PLoS One*, 2015; 10(6): e0129119. doi: 10.1371/journal.pone.0129119.
- 4 Attaleb M, El-hamadani W, Khyatti M, *et al.* Status of p16 (INK4a) and E-cadherin gene promoter methylation in Moroccan patients with cervical carcinoma. *Oncol Res*, 2009; 18(4): 185-192.
- 5 Zhang Y, Chen FQ, Sun YH, *et al.* Effects of DNMT1 silencing on malignant phenotype and methylated gene expression in cervical cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011; 30: 98. doi: 10.1186/1756-9966-30-98.
- 6 Go MJ, Takenaka C, Ohgushi H. Forced expression of Sox2

- or Nanog in human bone marrow derived mesenchymal stem cells maintains their expansion and differentiation capabilities. *Exp Cell Res*,2008;314(5):1147-1154.
- 7 Pan G, Pei D. The stem cell pluripotency factor NANOG activates transcription with two unusually potent subdomains at its C terminus. *J Biol Chem*,2005;280(2):1401-1407.
- 8 Wu J, Tzanakakis ES. Distinct allelic patterns of Nanog expression impart embryonic stem cell population heterogeneity. *PLoS Comput Biol*,2013;9(7):e1003140. doi: 10.1371/journal.pcbi.1003140.
- 9 Luo Y, Lim CL, Nichols J, *et al.* Cell signalling regulates dynamics of Nanog distribution in embryonic stem cell populations. *J R Soc Interface*,2012 Oct 10. [Epub ahead of print].
- 10 Bourguignon LY, Earle C, Wong G, *et al.* Stem cell marker (Nanog) and Stat-3 signaling promote MicroRNA-21 expression and chemoresistance in hyaluronan/CD44-activated head and neck squamous cell carcinoma cells. *Oncogene*,2012;31(2):149-160.
- 11 Sun C, Sun L, Jiang K, *et al.* NANOG promotes liver cancer cell invasion by inducing epithelial-mesenchymal transition through NODAL/SMAD3 signaling pathway. *Int J Biochem Cell Biol*,2013;45(6):1099-1108.
- 12 Santaliz-Ruiz LE, Xie X, Old M, *et al.* Emerging role of nanog in tumorigenesis and cancer stem cells. *Int J Cancer*,2014;135(12):2741-2748.
- 13 Ji W, Jiang Z. Effect of shRNA-mediated inhibition of Nanog gene expression on the behavior of human gastric cancer cells. *Oncol Lett*,2013;6(2):367-374.
- 14 Katsuyama T, Akmammedov A, Seimiya M, *et al.* An efficient strategy for TALEN-mediated genome engineering in *Drosophila*. *Nucleic Acids Res*,2013;41(17):e163. doi: 10.1093/nar/gkt638.
- 15 Li T, Huang S, Zhao X, *et al.* Modularly assembled designer TAL effector nucleases for targeted gene knockout and gene replacement in eukaryotes. *Nucleic Acids Res*,2011;39(14):6315-6325.
- 16 Lu Y, Zhu H, Shan H, *et al.* Knockdown of Oct4 and Nanog expression inhibits the stemness of pancreatic cancer cells. *Cancer Lett*,2013;340(1):113-123.
- 17 Bar-Nur O, Brum baugh J, Verheul C, *et al.* Small molecules facilitate rapid and synchronous iPSC generation. *Nat Methods*,2014;11(11):1170-1176.
- 18 Wang D, Lu P, Zhang H, *et al.* Oct-4 and nanog promote the epithelial-mesenchymal transition of breast cancer stem cells and are associated with poor prognosis in breast cancer patients. *Oncotarget*,2014;5(21):10803-10815.
- 19 Jeter CR, Liu B, Liu X, *et al.* NANOG promotes cancer stem cell characteristics and prostate cancer resistance to androgen deprivation. *Oncogene*,2011;30(36):3833-3845.
- 20 Huang CE, Yu CC, Hu FW, *et al.* Enhanced chemosensitivity by targeting Nanog in head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Mol Sci*,2014;15(9):14935-14948.
- 21 Meng HM, Zheng P, Wang XY, *et al.* Overexpression of Nanog predicts tumor progression and poor prognosis in colorectal cancer. *Cancer Biol Ther*,2010;9(4):295-302.
- 22 Chiou SH, Wang ML, Chou YT, *et al.* Coexpression of Oct4 and Nanog enhances malignancy in lung adenocarcinoma by inducing cancer stem cell-like properties and epithelial-mesenchymal transdifferentiation. *Cancer Res*,2010;70(24):10433-10444.
- 23 Lee M, Nam EJ, Kim SW, *et al.* Prognostic impact of the cancer stem cell-related marker NANOG in ovarian serous carcinoma. *Int J Gynecol Cancer*,2012;22(9):1489-1496.
- 24 Zhi QM, Chen XH, Ji J, *et al.* Salinomycin can effectively kill ALDH (high) stem-like cells on gastric cancer. *Biomed Pharmacother*,2011;65(7):509-515.

(2015-03-30 收稿, 2015-08-14 修回)

编辑 余琳