

Rev-erb β 基因敲除对肝癌 HepG2 细胞增殖和迁移侵袭的影响^{*}

陈芳^{1,2,3}, 赵俊丽², 夏海滨²

1. 安康学院现代农业与生物科技学院(安康 725000); 2. 陕西师范大学生命科学学院 基因治疗研究室(西安 710062);
3. 安康学院陕南生态经济研究中心(安康 725000)

【摘要】 目的 探讨核受体 *Rev-erb β* 基因敲除对肝癌 HepG2 细胞增殖和迁移的影响。方法 首先采用对靶向基因进行特定 DNA 修饰的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术构建 *Rev-erb β* 基因敲除的 HepG2 细胞系。用 *Rev-erb β* 打靶载体共转染到 HepG2 细胞,通过筛选、克隆化构建 *Rev-erb β* 基因敲除 HepG2 细胞系,并采用 PCR、测序和 Western blot 鉴定。以正常 HepG2 细胞为对照,采用实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)检测 *Rev-erb β* 基因敲除对肿瘤迁移、侵袭相关基因表达的影响,采用 MTT、细胞划痕、Transwell 等实验检测 *Rev-erb β* 基因敲除对 HepG2 细胞增殖、迁移及侵袭的影响。结果 成功构建一株 *Rev-erb β* 基因完全敲除单克隆细胞系(经 PCR、测序和 Western blot 鉴定),命名为 HepG2 C5(*Rev-erb β* ^{-/-})。qRT-PCR 结果显示,*Rev-erb β* 基因敲除可以导致基质金属蛋白酶-2,-9 基因(*MMP2*,*MMP9*)、细胞外基质蛋白 1 基因(*ECM1*)表达上调(*P* 均<0.05),细胞黏附相关基因 E-钙黏蛋白基因(*CDH1*)下降(*P*=0.05);MTT、细胞划痕、Transwell 实验显示,并且 HepG2 C5 比对照细胞有更强的增殖、迁移与侵袭能力(*P*<0.05)。结论 *Rev-erb β* 基因敲除可以改变 HepG2 细胞与迁移、黏附相关基因的表达,进而影响 HepG2 细胞增殖、迁移与侵袭能力。

【关键词】 CRISPR/Cas9 HepG2 细胞 *Rev-erb β* 基因敲除 增殖 迁移

Rev-erb β Knock-out Affects the Proliferation, Migration and Invasion Ability of Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cell Line in vitro CHEN Fang^{1,2,3}, ZHAO Jun-li², XIA Hai-bin². 1. School of Modern Agriculture and Biotechnology, Ankang University, Ankang 725000, China; 2. Gene Therapy Lab, College of Life Sciences, Shaanxi Normal University, Xi'an 710062, China; 3. Shaanan Eco-economy Research Center, Ankang University, Ankang 725000, China

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of nuclear receptor *Rev-erb β* knockout on proliferation and migration ability of human hepatocellular carcinoma cell line HepG2. **Methods** The *Rev-erb β* gene knockout HepG2 cell line was obtained by CRISPR/Cas9 genome editing technique with specific DNA modification of the target gene. The *Rev-erb β* gene targeting vectors were co-transfected into HepG2 cells. Through cloning and screening, the *Rev-erb β* gene knockout HepG2 cell line was constructed, PCR, sequencing and Western blot methods were carried out for the identification of the *Rev-erb β* gene knockout HepG2 cell line. The expression level of tumor migration and invasion-associated gene in *Rev-erb β* gene knockout cell was determined by real-time quantitative PCR (qRT-PCR) and was compared with normal cell as control. MTT, cell scratch and Transwell experiments were conducted in order to explore the effect of *Rev-erb β* gene on HepG2 cell's ability of proliferation, migration and invasion. **Results** A *Rev-erb β* gene knockout monoclonal cell line, which was identified by PCR, sequencing and Western blot, was successfully constructed and named HepG2 C5 (*Rev-erb β* ^{-/-}). qRT-PCR results showed that *Rev-erb β* knockout resulted in up-regulation of matrix metalloproteinase-2 (*MMP2*), matrix metalloproteinase-9 (*MMP9*) and extracellular matrix protein-1 (*ECM1*) gene expression (*P*<0.05) and down-regulation of E-cadherin (*CDH1*) gene expression (*P*=0.05). Results of MTT, cell scratch and transwell experiments showed that HepG2 C5 had stronger proliferation, migration and invasion ability than control cells (*P*<0.05). **Conclusion** *Rev-erb β* gene knockout could change the expression of migration and adhesion-associated genes in HepG2 cell, and then affect the proliferation, migration and invasion ability of HepG2 cells.

【Key words】 CRISPR/Cas9 HepG2 cell lines *Rev-erb β* Gene knockout Proliferation Migration

^{*} 国家自然科学基金(No. 81471772)、陕西省教育厅自然科学基金项目(No. 16JK1014)、安康市科技局科学技术研究项目(No. 2017AK05-07)和安康学院高层次人才项目(No. 2017AYQDZR05)资助

核受体 *Rev-erb β* (又称 NR1D2、EAR-1R、RVR、BD-73) 是 1994 年被首次发现的核受体 *Rev-erbs* 家族的第二个成员^[1-4]。人 *Rev-erb β* 基因定位于 3 号染色体 3p24.2, 编码 579 个氨基酸残基的核蛋白^[2,4]。*Rev-erb β* 与该家族的另一成员 *Rev-erb α* 在结构和功能上具有相似性, 共同协作参与维持机体正常的生物节律、细胞分化、炎症及糖脂代谢等生理、病理过程^[3,5]。*Rev-erb β* mRNA 在机体多数细胞和组织中均有表达, 尤其在肝、肾、大脑、骨骼肌以及脂肪细胞等中表达量高^[4,6]。新近研究结果发现, *Rev-erb β* 在一些肿瘤细胞, 特别是恶性肿瘤细胞系 (如: HepG2, BT-474, MDA-MB-361, LNCap, A-375 等) 中的表达异常升高^[7-8], 提示, *Rev-erb β* 可能在肿瘤发生、发展过程中有重要调节作用。但其与肿瘤的确切关系以及其参与调节恶性肿瘤发生、发展的机制尚不清楚。因此, 本研究首先采用对靶向基因进行特定 DNA 修饰的 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术^[9-12] 构建 *Rev-erb β* 基因敲除的 HepG2 细胞系, 再通过实时荧光定量 PCR (qRT-PCR)、MTT、细胞划痕及 Transwell 等实验检测和分析 *Rev-erb β* 基因敲除对肿瘤 HepG2 细胞的增殖和迁移的影响, 为揭示 *Rev-erb β* 参与肿瘤发生、发展的分子机制奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 质粒与细胞株

感受态细胞 *Escherichia coli* 1-T1 由陕西师范大学基因治疗研究室制备并保存; 原核克隆载体 pGEMT easy 购自 Promega 公司; pAd5-E1/*Rev-erb β* 和 pCMV-Cas9-U6-*Rev-erb β* sgRNA1 由本课题组前期^[13] 构建; 人肝癌 HepG2 细胞系购自美国典型培养物保藏中心 (American type culture collection, ATCC)。

1.2 主要试剂与仪器

细胞基因组提取试剂盒 (天根生化试剂公司); 8.0 μ m 的 Transwell 小室、AXYPrep DNA Gel Extraction 试剂盒 (Corning 公司); DNA 转染试剂 (Roche 公司); Prime ScriptTM RT 反转录试剂盒、SYBR[®] Premix RT-PCR 试剂盒及核酸限制性核酸内切酶、LA-*Taq* 聚合酶 (TaKaRa 公司); 小鼠抗人 *Rev-erb β* 单克隆抗体 (Sigma 公司); 小鼠抗人 GAPDH 单克隆抗体 (Proteintech 公司); Matrigel 基质基底膜 (美国 BD 公司); PCR 引物的合成、核酸序列测序由杭州金唯智公司完成; Master cycler

PCR 仪、5415D 高速微型离心机 (Eppendorf 公司); 实时定量 PCR 仪、蛋白核酸电泳系统、785 型半干法转膜仪 (Bio-Rad 公司); MK3 酶标仪 (Thermo 公司); 凝胶成像仪 (上海复日公司); 全自动化学发光成像系统 (上海天能公司)。

1.3 *Rev-erb β* 基因敲除 HepG2 细胞系的建立

人肝癌 HepG2 细胞 *Rev-erb β* 基因敲除方法参见文献^[13]。具体方法: 首先 24 孔板培养 HepG2 细胞至对数生长期, 用脂质体转染试剂将 0.5 μ g 去内毒素的打靶载体 pCMV-Cas9-U6-*Rev-erb β* sgRNA1 和 1.0 μ g 去内毒素的供体载体质粒 pAd5-E1/*Rev-erb β* 共转染至 HepG2 细胞。转染后 48 h, 将转染细胞移接至 60 mm 细胞培养皿中进行恢复培养。待转染细胞密度达 70%~80% 时, 先后分别用 150 μ g/mL 新霉素 (geneticin, G418) 和 1.0 mg/mL 羟甲基鸟嘌呤 (ganciclovir, GCV) 进行药物筛选。3~4 周细胞筛选稳定后, 收集打靶细胞的基因组检测打靶效果, 并将明显有打靶效果的细胞进行克隆化操作, 以期获得 *Rev-erb β* 基因敲除的单克隆阳性细胞系。

1.4 *Rev-erb β* 基因敲除 HepG2 细胞系的鉴定

1.4.1 *Rev-erb β* 基因型的鉴定 分别提取对照和 *Rev-erb β* 基因敲除 HepG2 细胞的基因组。通过内外巢两轮 PCR 扩增 *Rev-erb β* 基因打靶区的 DNA 序列 (PCR 扩增引物序列见文献^[13])。用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物, 通过比较, 将含有 *Rev-erb β* 基因突变型的基因打靶区 DNA 扩增片段进行测序分析。最终由测序结果确定上述筛选到的阳性细胞株是否为 *Rev-erb β* 基因敲除的单克隆细胞株。

1.4.2 Western blot 检测 用细胞裂解液 RIPA 裂解 *Rev-erb β* 基因敲除的 HepG2 细胞和对照 HepG2 细胞 (未进行基因敲除), 提取细胞总蛋白, 并用 BAC 试剂盒测定蛋白质提取液的浓度。分别取 75 μ g 对照和基因敲除组细胞蛋白提取液, 经 100 g/L SDS-PAGE 电泳分离, 12 V, 1 h 转移电泳转移印记, 将分离的蛋白条带转移印记到聚偏二氟乙烯膜 (PVDF) 上。将含待测蛋白的 PVDF 膜经 5.0% 脱脂牛奶、室温封闭 1~2 h, 经小鼠抗人 *Rev-erb β* (1:240) 一抗或小鼠抗人 GAPDH (1:500) 一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 PBST 彻底洗涤 PVDF 膜, 用辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (1:10 000) 室温孵育 PVDF 膜 1 h, 再用 PBST 彻底洗涤 PVDF 膜。最后采用化学发光法检

测蛋白质印迹条带。

1.4.3 qRT-PCR 检测肿瘤迁移、侵袭相关基因的表达 取一定量对照和基因敲除 HepG2 细胞,经 TRIzol 试剂处理提取细胞总 RNA,mRNA 反转录。与肿瘤细胞迁移、侵袭相关基因〔基质金属蛋白酶-2,-9 (MMP2, MMP9)、细胞外基质蛋白基因 (ECM1)〕,细胞黏附相关基因 E-钙黏蛋白(CDH1)的引物序列见表 1,反应条件参见文献^[13]。目的基因的表达采用相对定量法,即以 GAPDH 作为内参照,计算 ΔCt,以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值计算各基因的相对表达量,并以对照组细胞目的基因的表达为 1,计算基因敲除 HepG2 细胞各基因的相对表达量。

表 1 qRT-PCR 实验所用的引物

Table 1 Primers used in qRT-PCR experiments

Primer name	Primer sequence (5'-3')
MMP2 RT-PCR forward	CAAGTTTCCATTCCGCTTC
MMP2 RT-PCR reverse	CTGGTGCAGCTCTCATATT
MMP9 RT-PCR forward	ACAGTTTGTTCTCGTGGC
MMP9 RT-PCR reverse	CCATTACAGTCGTCCTTAT
ECM1 RT-PCR forward	AGGGACAGAGTCAAGTGCAG
ECM1 RT-PCR reverse	TGGCTCTGGTCCCCAAAT
CDH1 RT-PCR forward	CAAAGCACCTGTGAGCTTGC
CDH1 RT-PCR reverse	CAAAATTCACCTGCCCCAGGAC
GAPDH RT-PCR forward	GCACCGTCAAGGCTGAGAAC
GAPDH RT-PCR reverse	TGGTGAAGACGCCAGTGA

1.5 MTT 法检测 HepG2 细胞增殖活性

将 200 μL 1×10^4 L⁻¹对数期的 HepG2 细胞接种于 96 孔细胞培养平板中,置 37℃、体积分数为 5%CO₂ 培养箱中静止培养。24 h、48 h、72 h 和 96 h 后,向每孔细胞加入 5.0 mg/mL MTT 溶液 (20 μL/孔),继续培养 4 h。吸弃培养液,细胞用无菌 PBS 洗涤 3 次。再向细胞中加入 200 μL/孔 DMSO,37℃低速摇床 100 r/min,10 min。最后将细胞混匀,置酶标仪中分别检测 630 nm 和 570 nm 处吸光度值(A₅₇₀和 A₆₃₀),每组设 6 孔平行实验。以待测细胞的相对吸光值 $\Delta A=A_{570}-A_{630}$ 为纵坐标,以细胞培养时间为横坐标作图,分析各组细胞的相对增殖活性。

1.6 Rev-erbβ 基因敲除对 HepG2 细胞迁移能力的影响

1.6.1 细胞划痕实验 取 4.0×10^6 L⁻¹个对数期 Rev-erbβ 基因敲除和对照 HepG2 细胞分别接种到 35 mm 的培养平皿中,24 h 后细胞密度达 85%~90%。将细胞培养液更换为无血清 DMEM,37℃、体积分数为 5%CO₂ 培养箱继续饥饿培养 24 h。用无菌移液器枪头在贴壁的 HepG2 细胞表面上划出

1.5~2.0 mm 的划痕。再用 1.0 mL 无菌 1×PBS 小心轻柔洗涤细胞 2~3 次,洗去划掉的细胞。再向细胞培养平皿中加入 2.0 mL 无血清 DMEM,细胞继续培养 24 h、48 h 和 72 h。观察细胞迁移情况,并显微观察拍照。

1.6.2 Transwell 小室迁移实验 将用无血清 DMEM 培养基中和过的 Transwell 小室放进 24 孔细胞培养平板的孔里。取 200 μL 对数期无血清 DMEM Rev-erbβ 基因敲除和对照 HepG2 细胞悬液 (1×10^5 L⁻¹) 分别加到 Transwell 小室里。再向 Transwell 小室外细胞培养孔里加入 700 μL/孔的 10% FBS DMEM 培养基。24 孔细胞培养板放入 37℃、体积分数为 5%CO₂ 培养箱培养 48 h。取出 Transwell 小室,吸去小室内培养液,用无菌棉签轻柔擦去 Transwell 小室内底面的细胞。再将 Transwell 小室外底层细胞浸入体积分数为 4.0% 甲醛溶液中,室温固 10 min,然后倒置 Transwell 小室室温晾干。Transwell 小室外底层细胞用 0.5% 的结晶紫,室温染 15 min。染色结束迅速用无菌水轻柔洗涤 3~5 次。最后小室外底层细胞置于倒置显微镜成像系统下,观察并拍照,选取 4~6 个视野计数和数据分析。

1.7 Rev-erbβ 基因敲除对 HepG2 细胞侵袭能力的影响

将 Transwell 小室放入 24 孔细胞培养板里。取 100 μL 200 μg/mL Matrigel 基底膜无血清 DMEM 稀释液包被 Transwell 小室,培养板置 37℃培养箱孵育 4 h 使 Matrigel 基底膜形成凝胶。向包被 Matrigel 基底膜的 Transwell 小室里分别加入 200 μL 5×10^5 L⁻¹无血清 DMEM 基因敲除和对照 HepG2 细胞悬浮液,再向 Transwell 小室外细胞培养孔中加 700 μL 10%FBS DMEM 培养基。细胞培养板置于 37℃、体积分数为 5%CO₂ 培养箱,培养 48 h。取出 Transwell 小室,细胞固定、染色以及显微观察拍照等操作方法同 1.6.2。

1.8 统计学方法

每组实验均重复至少 3 次,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示。多个样本数据的分析采用单因素方差分析,组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Rev-erbβ 基因敲除人肝癌 HepG2 细胞系的构建与鉴定

2.1.1 基因组水平的鉴定 HepG2 细胞经脂质体

共转染 pAd5-E1/*Rev-erbβ* 供体载体和 pCMV-Cas9-U6-*Rev-erbβ* sgRNA1 打靶载体, 进行 *Rev-erbβ* 基因打靶敲除后, 经两轮药物筛选和克隆化, 得到 14 株阳性单克隆细胞株。对筛选的 14 株阳性单克隆细胞株进行 *Rev-erbβ* 基因型鉴定(图 1), 由图 1 可见, C1、C5、C9、C10、C12 和 C14 单克隆细胞的 *Rev-erbβ* 基因存在两条 DNA 条带(2.7 kb 和 1.1 kb)。初步推测 2.7 kb 条带为插入突变型条带、1.1 kb 条带为与野生型大小一致的 DNA 条带。分别凝胶回收 2.7 kb 和 1.1 kb 的 PCR 扩增片段, 并将基因回收片段连结 pGEMT 载体, 提取阳性克隆质粒进行进一步测序分析。测序结果发现上述 6 株阳性单克隆细胞株中 C5 号细胞株的 *Rev-erbβ* 基因一条链(2.7 kb)为在 TSF 区插入外源基因的插入突变型, 另一条链(1.1 kb)为在 TSF 片段的 *Rev-erbβ* sgRNA1 打靶处缺失 8 bp 碱基的缺失突变型(图 2)。由此可知获得的 C5 号克隆为 *Rev-erbβ* 基因敲除(*Rev-erbβ*^{-/-})的单克隆细胞系。

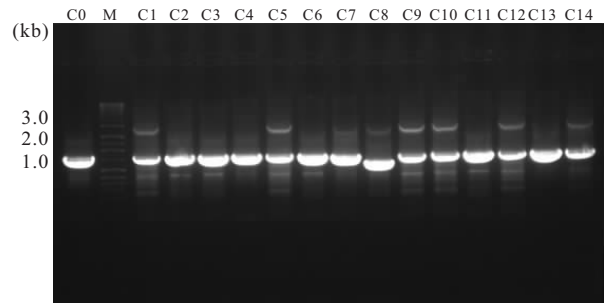


图 1 PCR 鉴定阳性单克隆细胞株 *Rev-erbβ* 基因型

Fig 1 Identification of the *Rev-erbβ* genotype of positive clone cell lines with PCR

C0: PCR amplification of the TSF of control HepG2 cells; M: DNA marker; C1-C14: PCR amplification of the TSF of C1-C14 positive clone cells HepG2 with *Rev-erbβ* gene knockout

2.1.2 蛋白表达水平分析 为进一步验证 *Rev-erbβ* 基因敲除 HepG2 C5 细胞系是否是真正的 *Rev-erbβ* 基因完全敲除的单克隆细胞系, 提取 HepG2 C5 和对照细胞的总蛋白, 用 Western blot 分析细胞 *Rev-erbβ* 蛋白的表达情况。结果显示, 在 HepG2 C5 细胞系中未检测到 *Rev-erbβ* 蛋白表达(图 3)。

以上结果提示: 经基因打靶、药物筛选和克隆化等操作成功获得了一株 *Rev-erbβ* 基因完全敲除 HepG2 系, 命名为 HepG2 C5 (*Rev-erbβ*^{-/-}) 细胞系。该 HepG2 C5 (*Rev-erbβ*^{-/-}) 株可作为 *Rev-erbβ*

基因在肿瘤细胞中功能研究的细胞模型。

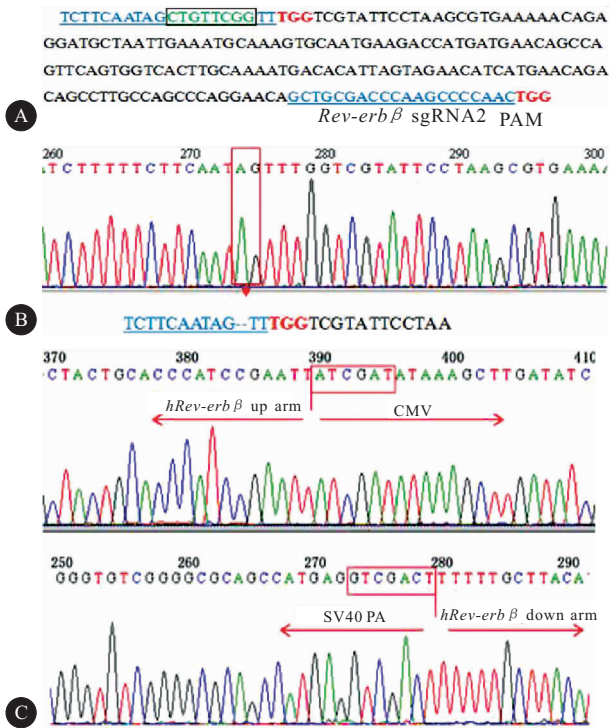


图 2 HepG2 C5 基因敲除细胞系 *Rev-erbβ* 基因突变型鉴定

Fig 2 Identification of *Rev-erbβ* gene mutants of HepG2 C5

A: The *Rev-erbβ* target sequence of wild-type; B: The deletion mutant chain; lacks of 8 bp in *Rev-erbβ* sgRNA1 gene targeting area (the green 8 bp in the rectangle); C: The insertion mutant chain; the exogenous gene fragment insert between *Rev-erbβ* up arm and *Rev-erbβ* down arm in insertion mutation chain

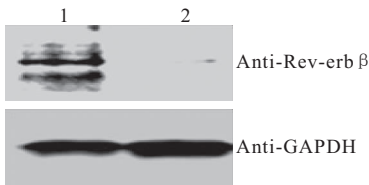


图 3 不同 HepG2 细胞系中 *Rev-erbβ* 蛋白的表达

Fig 3 *Rev-erbβ* protein expression in different HepG2 cell lines

1: The lysate of control HepG2 cells; 2: The lysate of *Rev-erbβ* gene knockout HepG2 C5 (*Rev-erbβ*^{-/-}) cells

2.2 *Rev-erbβ* 对 HepG2 细胞增殖的影响

由图 4 可见, 培养 24 h、72 h、96 h 和 120 h 的 HepG2 C5 (*Rev-erbβ*^{-/-}) 细胞较对照 HepG2 细胞增殖活性强 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 初步说明敲除肝癌 HepG2 细胞 *Rev-erbβ* 基因可以导致细胞增殖活性增强。

2.3 迁移、侵袭相关基因在不同 HepG2 细胞系中的表达

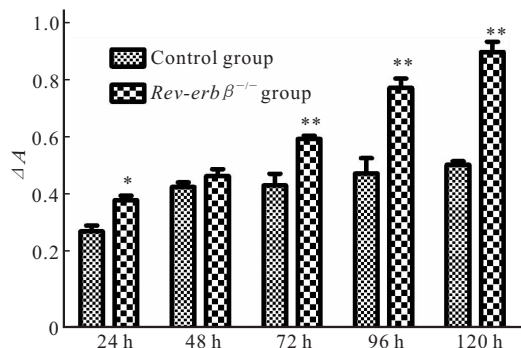


图 4 *Rev-erbβ* 基因敲除对 HepG2 细胞增殖的影响

Fig 4 The effect of *Rev-erbβ* gene knockout on the proliferation of HepG2 cells

$\Delta A = A_{570} - A_{630}$; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, vs. control group

qRT-PCR 检测结果显示(图 5), HepG2 C5 细胞中与肿瘤细胞迁移、侵袭相关基因 *MMP2*、*MMP9*、*ECM1* mRNA 表达均高于对照细胞 ($P < 0.05$), 尤其是 *MMP9* mRNA 的表达较对照细胞升高大约 3.5 倍; 而细胞黏附相关基因 *CDH1* mRNA 表达则较对照细胞低 ($P = 0.05$)。

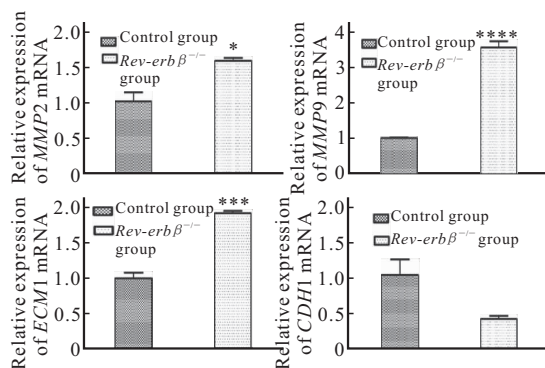


图 5 迁移相关基因在不同 HepG2 细胞系中的表达

Fig 5 Expression of migration related genes in different HepG2 cell lines

* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, vs. control group

2.4 *Rev-erbβ* 对 HepG2 细胞迁移和侵袭的影响

2.4.1 划痕实验结果 见图 6。结果表明在划痕后 24 h、48 h 和 72 h 时, HepG2 C5 细胞的迁移距

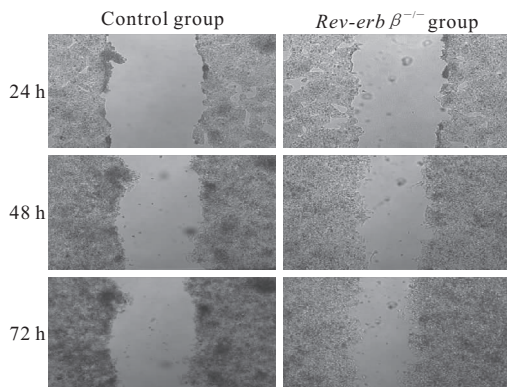
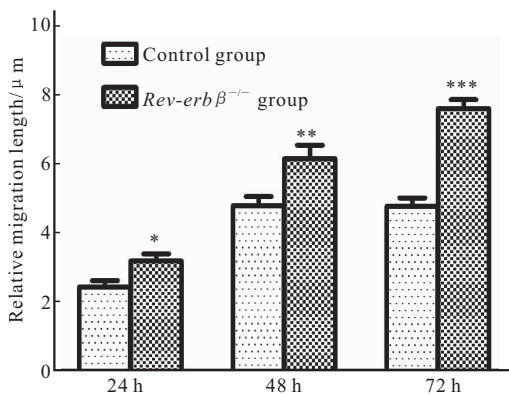


图 6 划痕实验分析不同 HepG2 细胞系的迁移能力

Fig 6 Analysis of migration ability of different HepG2 cell lines by scratch test

* $P < 0.01$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, vs. control group



离均明显大于对照 HepG2 细胞。而且随着划痕后细胞培养时间的增加, 两种 HepG2 细胞的相对迁移距离差异越来越大。说明 *Rev-erbβ* 基因敲除的 HepG2 细胞比对照 HepG2 细胞具有更强的迁移能力。

2.4.2 Transwell 实验结果 见图 7。Transwell 细胞迁移和侵袭实验表明 *Rev-erbβ*^{-/-} HepG2 细胞 (迁移 147 ± 12 和侵袭 266 ± 22) 较对照 HepG2 细胞 (迁移 36 ± 2 和侵袭 74 ± 2) 更容易发生迁移和侵袭 ($P < 0.001$)。

3 讨论

新近研究结果^[7-8]发现, *Rev-erbβ* 在一些肿瘤

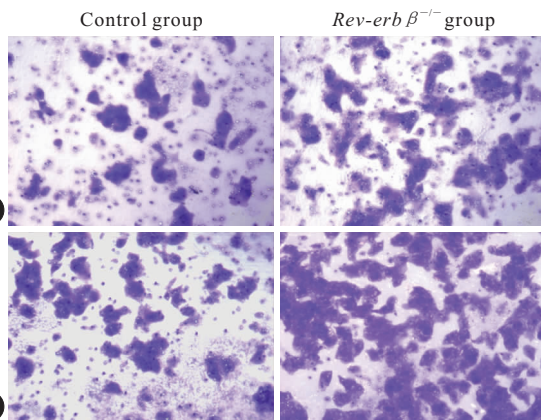


图 7 Transwell 实验检测不同 HepG2 细胞迁移(A)和侵袭(B)能力

Fig 7 Detection of the migration (A) and invasion (B) ability of different HepG2 cells with transwell assay

细胞系中表达量显著升高,提示 *Rev-erb β* 可能在肿瘤发生、发展过程中具有重要功能。如 WANG 等^[8]发现在恶性乳腺癌细胞系(MCF10, MDA MB231, BT474, SKBR3)中, *Rev-erb β* 能直接参与细胞周期蛋白基因 *Cyclin A* 表达的调控,起到抑制乳腺癌细胞增殖的作用。因此这方面的研究已成为 *Rev-erb β* 功能研究的热点,但截至目前 *Rev-erb β* 在肿瘤发生、发展过程的确切功能仍不清楚。鉴于此,本研究首次利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术对肝癌 HepG2 细胞的 *Rev-erb β* 基因进行打靶敲除,成功获得一株 *Rev-erb β* 基因完全敲除的肝癌 HepG2 C5(*Rev-erb β* ^{-/-})细胞系。与传统的小发夹 RNA(siRNA)技术相比,获得的 HepG2 C5 细胞系为 *Rev-erb β* 基因功能研究提供了更加有效的研究工具^[14-15]。同时,本研究采用 qRT-PCR、MTT、细胞划痕及 Transwell 等现代生物技术手段^[16-21],在不同肝癌 HepG2 细胞系(*Rev-erb β* 基因敲除与未敲除细胞系)中检测和分析 *Rev-erb β* 基因参与肿瘤发生、发展过程的作用和可能的分子机制。研究结果发现, HepG2 C5(*Rev-erb β* ^{-/-})细胞较对照 HepG2 细胞增殖能力增强,说明 *Rev-erb β* 具有抑制肝癌 HepG2 细胞增殖的功能,这一研究结果与 WANG 等^[8]结果一致。qRT-PCR 实验结果首次发现在 HepG2 C5 细胞系中肿瘤细胞黏附、迁移相关基因 *MMP2*、*MMP9*、*ECM1* mRNA 表达水平较对照细胞升高($P < 0.05$),而与细胞黏附有关基因 *CDH1* mRNA 表达水平下降($P = 0.05$)。细胞划痕、Transwell 迁移和侵袭实验结果表明 HepG2 C5 细胞系的迁移和侵袭能力较对照细胞增强($P < 0.001$)。

综上所述,本研究成功构建了 *Rev-erb β* 基因敲除 HepG2 C5(*Rev-erb β* ^{-/-})细胞系。*Rev-erb β* 基因可能通过直接调控与肿瘤细胞迁移、侵袭相关基因 *MMP2*、*MMP9* 等基因的表达,参与抑制肝癌 HepG2 细胞的迁移、侵袭等肿瘤发生、发展过程。利用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术构建的 *Rev-erb β* 基因完全敲除 HepG2 细胞系,能较好研究 *Rev-erb β* 参与调节肝癌 HepG2 细胞的增殖、迁移及侵袭等肿瘤发展过程,为深入阐明 *Rev-erb β* 参与调节肿瘤细胞的迁移、侵袭及相关过程分子机制奠定基础。我们将进一步通过基因回补、染色质免疫沉淀(ChIP)等实验手段深入研究 *Rev-erb β* 参与调节肿瘤发生、发展过程的分子机制。

参 考 文 献

- [1] BONNELYE E, VANACKER JM, DESBIENS X, *et al.* *Rev-erb β* , a new member of the nuclear receptor superfamily, is expressed in the nervous system during chicken development. *Cell Growth Differ*, 1994, 5(12):1357-1365.
- [2] DUMAS B, HARDING HP, CHOI HS, *et al.* A new orphan member of the nuclear hormone receptor superfamily closely related to *Rev-Erb*. *Mol Endocrinol*, 1994, 8(8):996-1005.
- [3] RETNAKARAN R, FLOCK G, GIGUÈRE V. Identification of RVR, a novel orphan nuclear receptor that acts as a negative transcriptional regulator. *Mol Endocrinol*, 1994, 8(9):1234-1244.
- [4] WANG JD, LIU NS, LIU ZL, *et al.* The orphan nuclear receptor *Rev-erb β* recruits Tip60 and HDAC1 to regulate apolipoprotein C III promoter *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1783(2):224-236.
- [5] BUGGE A, FENG D, EVERETT LJ, *et al.* *Rev-erb α* and *Rev-erb β* coordinately protect the circadian clock and normal metabolic function. *Genes Dev*, 2012, 26(7):657-667.
- [6] RAMAKRISHNAN SN, LAU P, BURKE LJ, *et al.* *Rev-erb β* regulates the expression of genes involved in lipid absorption in skeletal muscle cells: evidence for cross-talk between orphan nuclear receptors and myokines. *J Biol Chem*, 2005, 280(10):8651-8659.
- [7] DE MEI C, ERCOLANI L, PARODI C, *et al.* Dual inhibition of *REV-ERB β* and autophagy as a novel pharmacological approach to induce cytotoxicity in cancer cells. *Oncogene*, 2015, 34(20):2597-2608.
- [8] WANG YJ, KOJETIN D, BURRIS TP. Anti-proliferative actions of a synthetic *Rev-erb α/β* agonist in breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*, 2015, 96(4):315-322.
- [9] CONG L, RAN FA, COX D, *et al.* Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121):819-823.
- [10] YANG H, WANG HY, SHIVALILA CS, *et al.* One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, 154(6):1370-1379.
- [11] WANG T, WEI JJ, SABATINI DM, *et al.* Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. *Science*, 2014, 343(6166):80-84.
- [12] XIAO D, ZHANG WF, LI Y, *et al.* A novel luciferase knock-in reporter system for studying transcriptional regulation of the human *Sox2* gene. *J Biotechnol*, 2016, 219:110-116[2018-09-02]. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.12.026>.
- [13] 陈芳, 张伟锋, 赵俊丽, 等. 应用 CRISPR/Cas9 系统构建 *Rev-erb β* 基因敲除的 HEK293 细胞系. *细胞与分子免疫学杂志*, 2016, 32(11):1446-1452.
- [14] WADE M. High-throughput silencing using the CRISPR-

- Cas9 system: a review of the benefits and challenges. *J Biomol Screen*, 2015, 20(8): 1027-1039.
- [15] WANG F, GUO T, JIANG HM, *et al.* A comparison of CRISPR/Cas9 and siRNA-mediated ALDH2 gene silencing in human cell lines. *Mol Genet Genomics*, 2018, 293(3): 769-783.
- [16] XU ZW, YAN SX, WU HX, *et al.* The influence of TNF- α and Ang II on the proliferation, migration and invasion of HepG2 cells by regulating the expression of GRK2. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 79(4): 747-758.
- [17] ROOMI MW, MONTERREY JC, KALINOVSKY T, *et al.* Patterns of MMP-2 and MMP-9 expression in human cancer cell lines. *Oncol Rep*, 2009, 21(5): 1323-1333.
- [18] INGRAHAM CA, PARK GC, MAKARENKOVA HP, *et al.* Matrix metalloproteinase (MMP)-9 induced by Wnt signal increases the proliferation and migration of embryonic neural stem cells at low O₂ levels. *J Biol Chem*, 2011, 286(20): 17649-17657.
- [19] FUJIMOTO N, TERLIZZI J, AHO S, *et al.* Extracellular matrix protein1 inhibits the activity of matrix metalloproteinase9 through high-affinity protein/protein interactions. *Exp Dermatol*, 2006, 15(4): 300-307.
- [20] FARINA AR, MACKAY AR. Gelatinase B/MMP-9 in tumour pathogenesis and progression. *Cancers*, 2014, 6(1): 240-296.
- [21] POMO JM, TAYLOR RM, GULLAPALLI RR. Influence of TP53 and CDH1 genes in hepatocellular cancer spheroid formation and culture; a model system to understand cancer cell growth mechanics. *Cancer Cell Int*, 2016, 16(1): 44-58.
- (2018-12-07 收稿, 2019-04-27 修回)
- 编辑 沈 进