

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.004

· 基础研究 ·

通过 CRISPR/Cas9 技术抑制 TFDP3 基因对前列腺癌 PC3 细胞生物学功能的影响

李蕊, 杨柳, 李金洁, 刁艳君, 苏明权, 郝晓柯, 刘家云 (空军军医大学附属西京医院 全军临床医学检验研究所, 陕西 西安 710032)

[摘要] **目的:**通过 CRISPR/Cas9 技术构建前列腺癌 PC3 细胞 TFDP3 基因敲除的稳转株, 探讨抑制 TFDP3 表达对 PC3 细胞周期、凋亡、迁移和侵袭能力的影响。**方法:**通过生物信息学筛选 sgRNA, 通过 CRISPR/Cas9 技术、构建抑制 TFDP3 基因表达的 sgRNA-Cas9 共转染慢病毒, 感染 PC3 细胞后筛选获取稳转细胞株。通过流式细胞术对 TFDP3 基因敲除 (knock-out, KO) 实验组与空白对照组进行细胞周期和凋亡检测, 并进一步通过划痕实验和 Transwell 实验进行细胞迁移和侵袭能力检测。**结果:**通过生物信息学筛选获得 3 条 sgRNA, 其中 sgRNA2 有明显的抑制前列腺癌细胞基因表达的功能; 通过 CRISPR/Cas9 技术成功构建了基于 CRISPR/Cas9 介导的 TFDP3 低表达的 PC3 细胞稳转株。抑制 TFDP3 基因表达后, 相比于对照组, KO 组中 G0/G1 期细胞百分比增加、G2/M 期细胞百分比下降 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.05$), 细胞迁移率明显下降 [24 h 迁移率: $(44.00 \pm 1.60)\%$ vs $(65.00 \pm 4.40)\%$, $P < 0.01$], 穿过聚碳酸酯膜的侵袭细胞数明显下降 [(185.89 ± 11.71) vs (248.33 ± 11.95) 个, $P < 0.01$]。**结论:**通过 CRISPR/Cas9 技术抑制 TFDP3 基因表达后, PC3 细胞发生周期阻滞、凋亡率也有所增加、迁移和侵袭能力显著减弱, 提示 TFDP3 是一个前列腺癌促癌基因。

[关键词] CRISPR/Cas9; TFDP3 基因; 前列腺癌; PC3 细胞; 凋亡; 细胞周期; 迁移; 侵袭

[中图分类号] R737.25; R730.54 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2021)05-0443-08

Effects of TFDP3 knock-out by CRISPR/Cas9 on biological function of prostate cancer PC3 cells

LI Rui, YANG Liu, LI Jinjie, DIAO Yanjun, SU Mingquan, HAO Xiaoke, LIU Jiayun (Institute for Clinical Laboratory Medicine of PLA, Xijing Hospital Affiliated to the Air Force Medical University, Xi'an 710032, Shaanxi, China)

[Abstract] **Objective:** CRISPR/Cas9 technology was used to construct a stable transgenic strain of prostate cancer PC3 cells with TFDP3 gene knock-out (KO) to explore the effect of inhibiting TFDP3 expression on cell cycle, apoptosis and invasion of PC3 cells. **Methods:** The sgRNAs were screened by bioinformatics, and the sgRNA-cas9 co-transfection lentivirus with TFDP3 gene knockout was constructed by CRISPR/Cas9 technology. The constructed lentivirus was used to infect PC3 cells, and the stable transgenic strain was screened. Flow cytometry was used to detect the cell cycle distribution and apoptosis of cells in KO group (with TFDP3 KO) and control group. Cell migration and invasion capabilities were further detected by Scratch and Transwell assays. **Results:** Three sgRNAs were obtained through bioinformatics screening. Among them, the sgRNA2 obviously inhibited the prostate cancer gene expression. By using the CRISPR/Cas9 technology, a stable transgenic strain of PC3 prostate cancer cells with low expression of TFDP3 was obtained. The results of Flow cytometry showed that after the expression of TFDP3 gene was inhibited, compared with the control group, the percentage of cells in G0/G1 phase increased while the percentage of cells in G2/M stage decreased in the KO group, and the cell apoptosis rate significantly increased in the KO group ($P < 0.05$); the migration rate of the PC3 cells in the KO group was significantly decreased (24 h migration rate: $[44.00 \pm 1.60]\%$ vs $[65.00 \pm 4.40]\%$, $P < 0.01$); the number of migrated cells in the KO group that passed through the polycarbonate membrane was significantly lower than that of the control group (185.89 ± 11.71 vs 248.33 ± 11.95 , $P < 0.01$). **Conclusion:** In this study, a stable transgenic strain of PC3 prostate cancer cell line with TFDP3 gene KO was constructed through CRISPR/Cas9 technology. It was confirmed that after the expression of TFDP3 gene was inhibited, PC3 cell cycle was blocked and the apoptosis rate was increased. Furthermore, the ability of migration and invasion was significantly weakened, suggesting that TFDP3 is a tumor-promoting gene in prostate cancer.

[Key words] CRISPR/Cas9; TFDP3 gene; prostate cancer; PC3 cell; cell cycle; apoptosis; migration; invasion

[Chin J Cancer Biother, 2021, 28(5): 443-450. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385x.2021.05.004]

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 81372747)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81372747)

[作者简介] 李蕊(1988-), 女, 硕士, 主管技师, 主要从事前列腺癌分子机制的研究, E-mail: lirui10305566@126.com

[通信作者] 刘家云 (LIU Jiayun, corresponding author), 博士, 副主任医师, 副教授, 硕士生导师, 主要从事临床微生物病原学和肿瘤分子机制的研究, E-mail: 1187871836@qq.com

基因编辑技术是通过基因的定点突变,以小片段的删除及目的基因的插入等方式对基因组进行精确修饰的一种技术,是研究基因功能的重要手段。常见的基因编辑技术包括锌指核酸酶(zinc finger nuclease, ZFN)、转录激活子样效应因子核酸酶(transcription activator-like effector nuclease, TALEN)和规律性重复短回文序列簇(CRISPR/Cas9)等3种^[1-3]。其中CRISPR/Cas9(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-Associated Proteins)是一种细菌和古生菌中抵御外源性病毒或质粒入侵的获得性免疫系统,来源于外源性病毒或质粒序列片段的导向RNA(sgRNA),可介导Cas9特异性识别相应病原的DNA分子并进行双链切割,具有制备简单、特异性高等优点,使得它在基因编辑过程中具有极大的发挥空间^[4]。

转录因子二聚化配体(transcription factor dimerization partner, TFDP)家族成员是能与转录因子E2F(E2 factor)结合形成异源二聚体的一类分子。与TFDP1和TFDP2的功能相反,TFDP3可以抑制E2F蛋白与DNA的结合及转录激活功能^[5]。TFDP3最早被发现高表达于肝癌,而在正常肝组织中不表达^[6],推测其可能是潜在的致癌因子。目前已有研究表明,TFDP3与急性淋巴细胞白血病^[7]和乳腺癌^[8]的发生发展相关。本课题组前期发现TFDP3在多种癌组织中表达增强,尤其是相对于正常情况下不表达TFDP3的前列腺组织,但其在前列腺癌肿瘤的发生发展中扮演的角色尚不明确^[9]。本研究通过CRISPR/Cas9技术构建前列腺癌细胞TFDP3基因敲除的稳转株,研究抑制TFDP3表达对

前列腺癌细胞周期、凋亡和侵袭转移能力的影响,旨在进一步阐明TFDP3在前列腺癌发生发展中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

人胚肾细胞株293T和人前列腺癌细胞株PC3购于中国科学院,质粒LentiCRISPRv2GFP、辅助载体pSPAX2和pMD2G、Luciferase SSA由武汉擎科生物公司提供,载体感受态细菌DH5 α 、T4多聚磷酸酶、BsmBI内切酶、T4连接酶均购自TaKaRa公司,DMEM培养基、胎牛血清和胰酶均购自Gibco公司,质粒提取试剂盒购自QIAGEN公司,TFDP3抗体购自Abcam公司,细胞周期检测试剂盒购自KeyGEN BioTECH公司,Annexin V-APC单染法细胞凋亡检测试剂盒购自eBioscience公司,侵袭试剂盒购自美国Corning公司,GIEMSA染色液购自上海鼎国生物技术有限公司,引物合成和测序服务由西安擎科生物公司提供。

1.2 sgRNA寡核苷酸链序列的设计

利用CRISPR在线设计工具网站<http://crispr.mit.edu/>,根据系统评分,各自选取评分比较高的sgRNA(sgRNA1, sgRNA2, sgRNA3)。TFDP3基因只有1个转录本,需要在起始转录位点的上游区域设计CRISPR/cas9靶点。通过切割与修改产生的移码突变,对翻译肽链造成的破坏最大。以sgRNA序列为模板,设计其互补链,分别在编码链模板5'端添加CACC、非编码链模板5'端添加AAAC。设计的sgRNA序列见表1。

表1 TFDP3的sgRNA靶位点的核苷酸序列
Tab.1 Nucleotide sequences of sgRNA targeting TFDP3

Target	sgRNA sequence	5'- guide sequence	Oligo sequence
sgRNA1	GCCGGGCAGCACAACAGGAA	CACC AAAC	GCCGGGCAGCACAACAGGAA TTCCTGTTGTGCTGCCCGGC
sgRNA2	GCCGTCTTTCCATGAAGGTC	CACC AAAC	GCCGTCTTTCCATGAAGGTC GACCTTCATGGAAAGACGGC
sgRNA3	GGAGGTGTGTTACGACGGC	CACC AAAC	GGAGGTGTGTTACGACGGC GCCGTCGTGAACACACCTCC

1.3 Cas9/sgRNA表达载体构建

根据选择的sgRNA分别合成oligo片段,采用T4多聚磷酸酶对oligo片段进行磷酸化后退火形成双链。退火体系为正、反义链,各取其10 μ l(浓度10 μ mol/L),加水至50 μ l,混匀放入500 ml沸水中,自然冷却至室温。Oligo二聚体插入载体,反

应体系为LentiCRISPRv2回收产物1 μ l、退火产物4 μ l, T4连接酶5 μ l。取上述连接产物10 μ l,加入100 μ l DH5 α 感受态细胞中吹匀,放置冰中静置30 min,再放入42 $^{\circ}$ C水浴90 s,迅速置于冰浴中3 min,加入500 μ l LB液体培养基,放置摇床180 r/min 37 $^{\circ}$ C 1 h,取菌液100 μ l均匀涂布于LB固

体培养基 (含 50 ng/ μ l 氨苄青霉素), 37 °C 培养过夜。挑取菌落, 测序验证。

1.4 Luciferase-SSA 报告载体的活性检测

将终止子和靶位点插入 Luciferase 载体中, 靶位点位于终止子前, 以转染试剂共转染 CRISPR/sgRNA 载体及新构建的 Luciferase 报告基因和内参 donor 质粒, 对照组转染空载体, 检测 Luciferase 信号 (图 1)。具体的工作原理: 一个终止子在 Luciferase 的编码区中央 (红色标记) 则 Luciferase 没有活性。为检测 CRISPR/Cas9 剪切活性, 将一个 CRISPR/Cas9 的靶点位置序列插在终止子后 (蓝色标记)。在 CRISPR/Cas9 的作用下, 靶点位置产生 DSB, 细胞通过同源重组方式修复 DNA, 形成一个有活性的 Luciferase。通过与参照的比值变化反应 CRISPR/Cas9 剪切的活性水平。

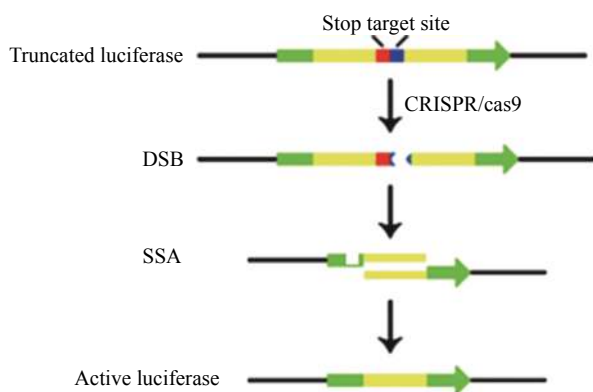


图 1 Luciferase-SSA 报告载体活性检测结构示意图
Fig.1 The structural representation of the detection of Luciferase-SSA activity

1.5 Lenti CRISPR-TFDP3-T2 过表达慢病毒包装

利用 HIV 病毒将自身基因组插入整合到宿主基因组的特性, 在 293T 细胞内先转染三个质粒, 慢病毒包装质粒 Mix (包含包装质粒 psPAX2 和 pMD2.G) 和重组质粒。24 h 后换新鲜慢病毒生产培养基继续培养 48 h 后收集细胞培养液, 离心去除杂质后即得慢病毒原液。利用浓缩柱超滤法进行病毒浓缩, 并用稀释计数法进行病毒滴度测定。

1.6 构建 TFDP3 基因敲除的 PC3 细胞株

慢病毒 lenti CRISPR-TFDP3-T2 感染 PC3 细胞, 以 MOI=20 进行感染, 感染后 48 h, 将细胞极度稀释, 进行筛选。将感染并筛选后的细胞挑选至少 5 个克隆进行细胞扩增。将筛选扩增后的细胞提取蛋白, 进行 WB 验证 TFDP3 蛋白的表达, 并送测序进一步验证。将成功敲除 TFDP3 的细胞作为敲除 (knock-out, KO) 组, 将野生型 PC3 细胞作为对照组。

1.7 细胞周期检测

细胞生长至覆盖率约为 80% 时, 胰酶消化,

完全细胞培养基重悬成细胞悬液。收集细胞至 15 ml 离心管中, 每组设置 3 个复孔。1 000 \times g 离心 10 min, 弃上清液, PBS 洗涤细胞 1 次 (离心 2 000 r/min, 5 min), 收集并调整细胞密度为 1 \times 10⁶/ml, 取 1 ml 细胞悬液; 制备的单细胞悬液离心后, 在细胞中加入体积分数为 70% 冷乙醇 500 μ l 固定 (2 h 至过夜), 4 °C 保存。染色前用 PBS 洗去固定液, 并将细胞悬液用 200 目筛网过滤一次; 加入 500 μ l PI/Rnase A 染色工作液, 室温避光 30~60 min; 流式细胞仪检测, 记录激发光 488 nm 处红色荧光。

1.8 Annexin V-APC 单染法检测各组细胞凋亡率

细胞生长至覆盖率约为 70% 时, 胰酶消化, 完全细胞培养基重悬成细胞悬液, 细胞收集于 15 ml 离心管中, 每组设 3 个复孔。离心 5 min 后弃上清液, 用 4 °C 预冷的 D-Hanks (pH=7.2~7.4) 洗涤细胞沉淀。1 \times 结合缓冲液洗涤细胞沉淀 1 次, 离心 3 min, 收集细胞。200 μ l 1 \times 结合缓冲液重悬细胞沉淀, 加入 10 μ l Annexin V-APC 染色, 室温避光 10~15 min, 根据细胞量, 补加 400~800 μ l 1 \times 结合缓冲液, 上机检测。

1.9 划痕实验检测 TFDP3 低表达对细胞迁移能力的影响

在细胞培养板中加入约 3 \times 10⁴ 个细胞, 次日换低浓度血清培养基, 使用划痕仪对准 96 孔板的下端中央部位, 向上轻推形成划痕, 使用无血清培养基轻轻漂洗 2~3 次, 加入低浓度血清培养基 (含 0.5% FBS), 拍照。置 37 °C、5% 培养箱中培养 8、24 h 后, 置于荧光显微镜下拍照并测量划痕宽度, 计算细胞迁移率。

1.10 Transwell 实验检测 TFDP3 低表达对 PC3 细胞侵袭能力的影响

从 -20 °C 冰箱中取出 Corning 侵袭试剂盒, 将小室置于新的 24 孔板中, 放置无菌操作台内使其恢复至室温。上、下小室各加 500 μ l 无血清培养基, 37 °C 培养箱中放置 2 h 使 Matrigel 基质层再水化, 然后将小室全部转移至新的孔板中, 小心除去上室中培养基并加入 500 μ l 细胞悬液 (1 \times 10⁵ 个/孔), 下室内加入 750 μ l 含 30% FBS 的培养基, 培养 24 h。倒扣小室于吸水纸上以去除培养基, 用棉拭子轻轻移去小室内未穿膜细胞, 滴 2 或 3 滴 Giemsa 染色液到膜的下表面, 染色穿膜细胞 3~5 min 后, 将小室浸泡冲洗数次, 晾干后, 显微镜拍照, 计数穿膜细胞。

1.11 统计学处理

采用 SPSS 19.0 软件进行分析, 所有实验均独立重复 3 次, 符合正态分布的计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较采用 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表

示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 测序验证了重组质粒载体成功构建

将单核苷酸序列退火连成双链后与线性化的 Lenti CRISPRv2 连接, 转化到 DH5α 感受态中, 挑取阳性单克隆菌落, 通过测序验证。测序结果 (图 2) 显示, 载体中均成功携带了目的片段。

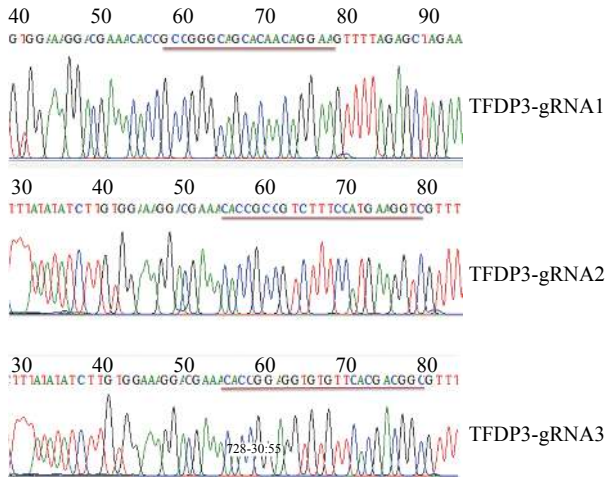


图 2 Cas9/sgRNA 载体的测序结果
Fig.2 Sequencing validation of the construction of Cas9/sgRNA vector

2.2 CRISPR/Cas9 具有良好的基因敲除活性

为了检测构建的 Cas9/sgRNA 基因敲除载体是否具有敲除活性, 将敲除载体与 Luciferase-SSA 报告载体以及 donor 载体共转染人胚肾细胞株 293T 细胞, 48 h 后收集细胞, 检测 Luciferase 活性。检测结果 (图 3) 显示, 3 组载体 (lenti CRISPR-TFDP3-T1、lenti CRISPR-TFDP3-T2 和 lenti CRISPR-TFDP3-T3) 转染后的荧光活性值与对照组相比均有增加, 且差异具有统计学意义 ($P < 0.01$), 其中 lenti CRISPR-TFDP3-T2 低表达慢病毒包装组增加 7 倍左右, 这说明载体能够有效地敲除 Luciferase-SSA 报告载体中对应的靶位点, Luciferase-SSA 报告载体通过同源末端重组形成完整的 Luciferase, 后续选用此载体作为工具载体。

2.3 LentiCRISPR-TFDP3-T2 慢病毒滴度

采用稀释计数法对构建的慢病毒进行滴度检测。将 293T 细胞消化计数后稀释至 1×10^5 个/ml, 加 100 μ l 细胞悬液 (即 1×10^4 个细胞) 到 96 孔板 1 个孔中, 为每个病毒准备 16 个孔 (8 个病毒稀释梯度, 每个梯度 2 个复孔), 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱过夜培养; 在 1.5 ml 离心管中, 用完全培养基对慢病毒浓缩液做连续 8 个梯度的 10 倍稀释, 每个梯度 2 个复孔; 往每个离心管中加入 90 μ l 含 5 μ g/ml 促病

毒感染试剂的完全培养基, 往第一个管中加入 10 μ l 慢病毒浓缩液, 混匀后, 吸取 10 μ l 加入第二个管中混匀, 以此类推, 做 8 个梯度稀释 ($10^{-2} \sim 10^{-9}$), 复孔操作一样; 去掉 96 孔板中的旧培养基, 加入稀释好的梯度病毒稀释液, 并做好标记; 72 h 后在荧光显微镜下观察 (图 4) 最后两个有荧光的稀释梯度的孔里面所有荧光细胞总数, 假设为 X 和 Y, 则

$$\text{滴度 (TU/ml)} = \frac{(X + Y \times 10) \times 100}{2 \times X \text{孔病毒含量} (\mu\text{l})}$$

计算复孔平均值即为最终的病毒滴度。测定的 lenti CRISPR-TFDP3-T2 滴度为 1.2×10^8 TU/ml。

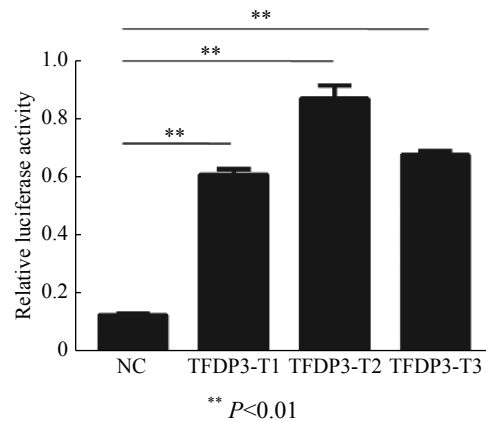


图 3 LuciferaseSSA 报告载体法检测基因敲除效率
Fig.3 Knock-out efficiency detected by Luciferase-SSA activity assay

2.4 成功构建 TFDP3 基因敲除 PC3 细胞株

lenti CRISPR-TFDP3-T2 慢病毒感染前列腺癌 PC3 细胞后, 继续培养细胞 48 h, 将细胞 96 孔板梯度稀释法选取单细胞克隆培养 (图 5A)。挑取 11 个细胞克隆进行蛋白表达水平鉴定, 筛选得到 2 株 TFDP3 蛋白敲除的细胞株 (图 5B), 并进一步对上述蛋白表达阴性的细胞株与野生型基因序列进行测序比对, 结果 (图 5C、D) 显示敲除 TFDP3 成功。

2.5 TFDP3 敲除诱导前列腺癌 PC3 细胞的凋亡和 G1 期阻滞

流式细胞术检测细胞凋亡结果 (图 6A) 显示, KO 组 PC3 细胞凋亡率显著高于对照组 [$(5.94 \pm 0.63)\%$ vs $(3.62 \pm 0.62)\%$, $P < 0.05$], 表明 TFDP3 基因敲除后, 可以诱导细胞凋亡。流式细胞术检测细胞周期分布结果 (图 6B) 显示, 相比对照组, KO 组 PC3 细胞发生了 G1 期阻滞。TFDP3 基因敲除组 G0/G1 期细胞比例为 $(82.33 \pm 4.16)\%$, 显著高于阴性对照组的 $(62.33 \pm 2.08)\%$ ($P < 0.01$); TFDP3 基因敲除组 S 期细胞比例为 $(12.33 \pm 1.53)\%$, 显著低于阴性对照组的 $(25.33 \pm 1.53)\%$ ($P < 0.05$), 而 TFDP3 基因敲除组 G2/M 期细胞比例为 $(5.33 \pm 3.79)\%$, 显著低于阴性对照组的 $(12.33 \pm 1.15)\%$ ($P < 0.05$) (图 6B)。

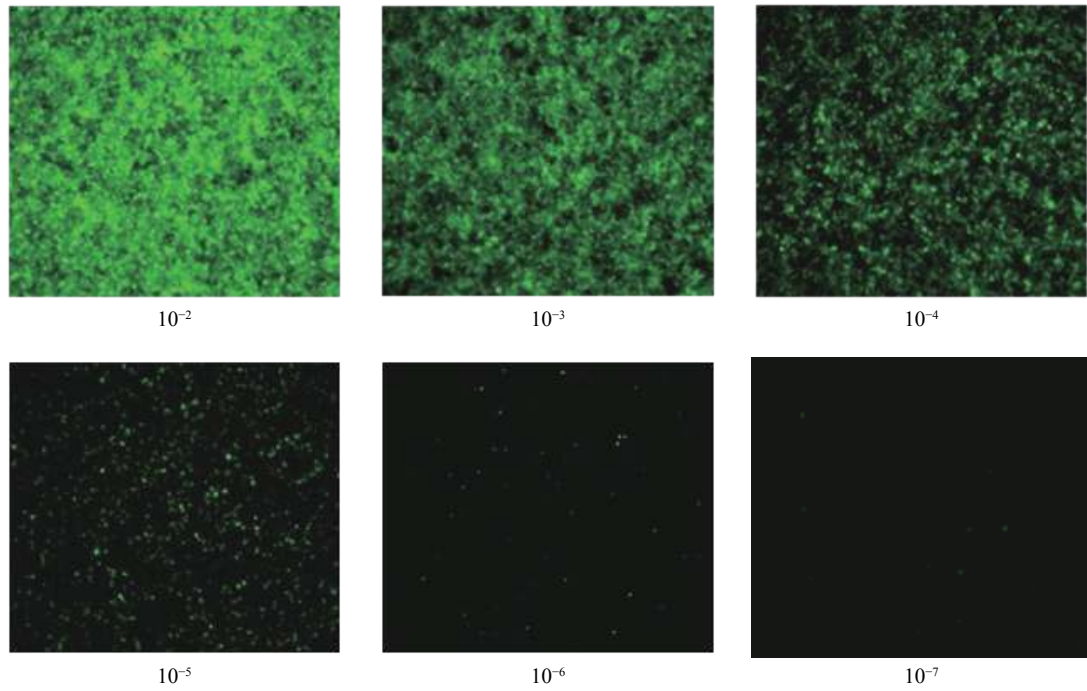
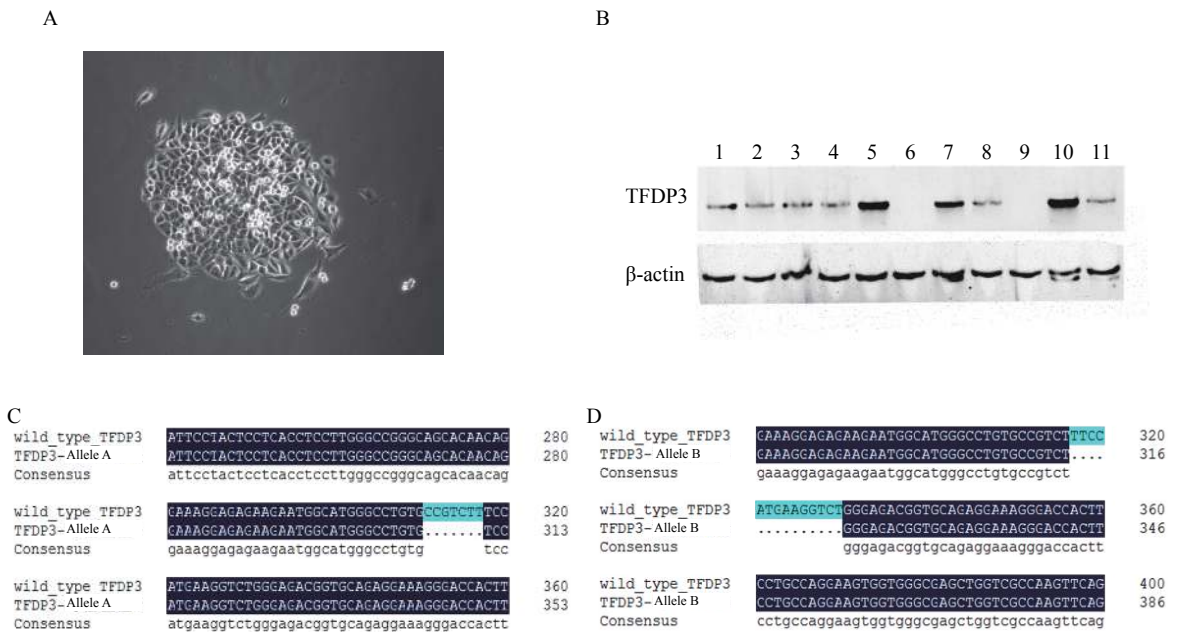


图 4 lenti CRISPR-TFDP3-T2 慢病毒滴度检测荧光

Fig.4 Fluorescence detection of Lenti CRISPR-TFDP3-T2 concentration



A: Cell monoclone after LENTI CRISPR-TFDP3-T2 infection; B: WB screening of TFDP3 knock-out positive cell clones; C: TFDP3 KO cell clone, allele A deletion mutation (-7 bp); D: TFDP3 KO cell clone, allele B deletion mutation (-7 bp)

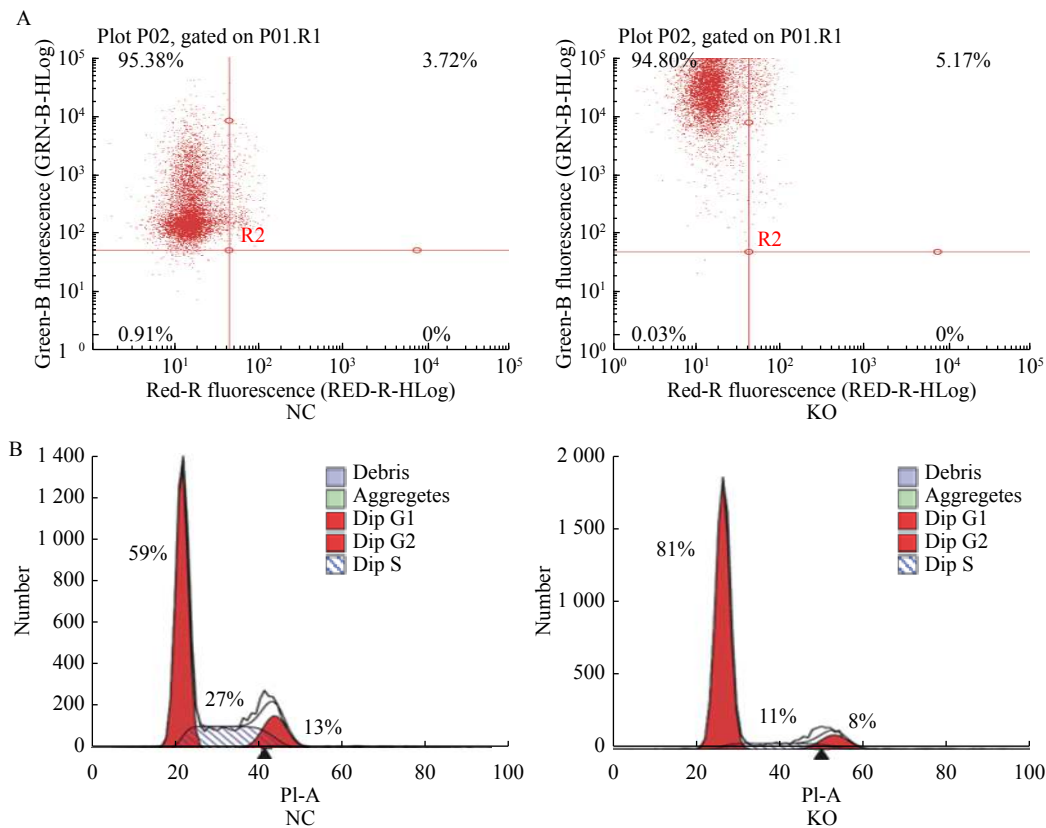
图 5 细胞单克隆基因型鉴定

Fig.5 Identification of cell genotype

2.6 TFDP3 敲除可抑制前列腺癌 PC3 细胞迁移和侵袭能力

细胞划痕实验检测结果 (图 7A) 显示, TFDP3 基因敲除组细胞的 24 h 细胞迁移率低于阴性对照组, 而两组 8 h 细胞迁移率无明显差异 [24 h 时迁移率: (44.00±1.60)% vs (65.00±4.40)%, $P < 0.01$; 8 h 时迁移率: (12.33±1.50)% vs (10.0±0.82)%, $P = 0.2977$], 提示 TFDP3 基因沉默可降低前列腺癌

PC3 细胞的迁移能力。Transwell 实验检测结果 (图 7B) 显示, 在同样时间内, 阴性对照组和 TFDP3 基因敲除组细胞穿过聚碳酸酯膜的平均细胞数分别为 (248.33±11.95) 个、(185.89±11.71) 个, TFDP3 基因敲除组侵袭细胞数明显低于阴性对照组 ($P < 0.01$), 证明 TFDP3 基因敲除可降低前列腺癌 PC3 细胞的侵袭能力。



A: The results of flow cytometry showed that the apoptotic rate of PC3 cells in the KO group was higher than that in the NC group;
 B: Compared with the NC group, the percentage of the cells in the G1 phase was significantly higher in the KO group, while the percentage of cells in the S phase and G2/M phase decreased, indicating that cells were blocked at G1 phase after TFDP3 KO (NC: Normal control group; KO: TFDP3 gene KO group)

图 6 TFDP3 基因敲除后 PC3 细胞周期和凋亡的改变

Fig.6 Changes of PC3 cell cycle and apoptosis after TFDP3 gene KO

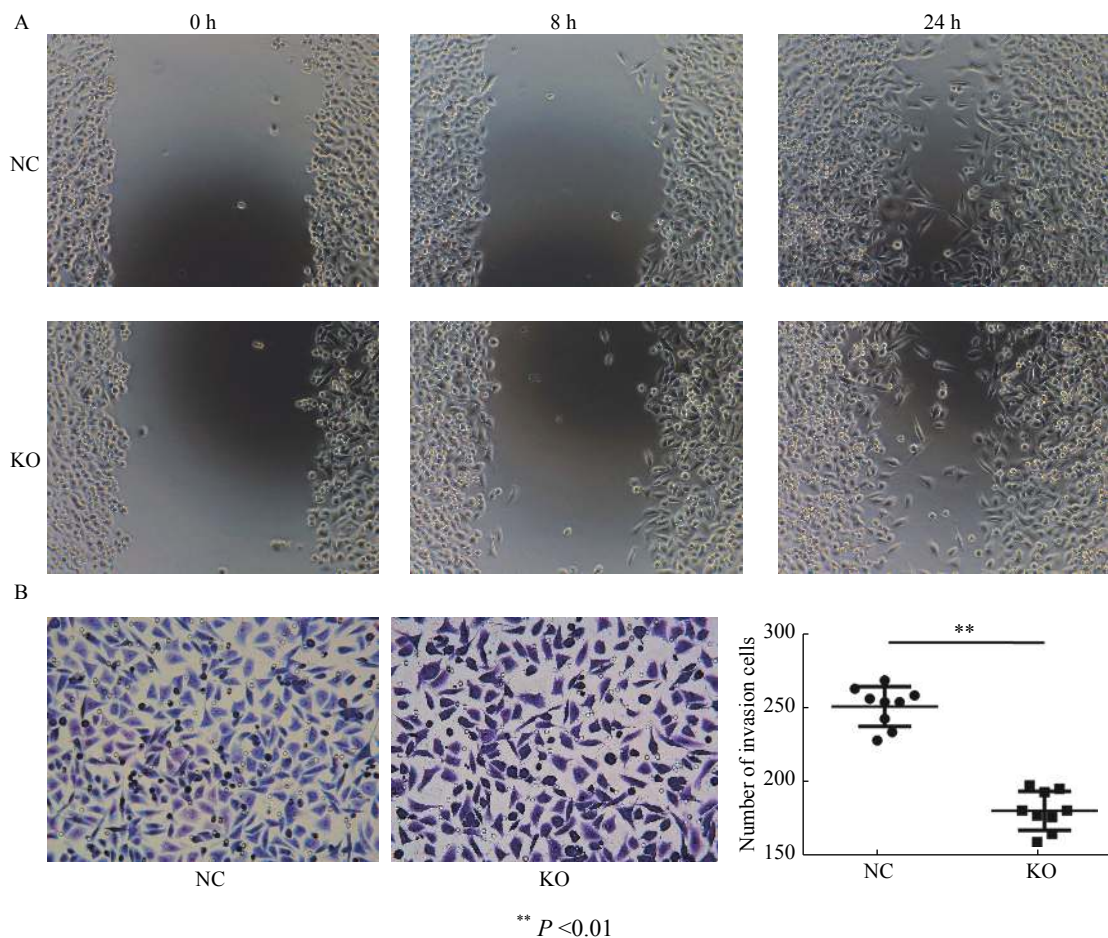
3 讨论

传统的基因编辑技术 ZFN 和 TALEN 技术, 由于操作复杂和成本昂贵, 很难应用于临床实际^[10-11]。CRISPR/Cas9 基因编辑技术相比 ZFN 和 TALEN 技术, 通过 RNA 与目的 DNA 识别, 引导 cas9 核酸酶切割互补 DNA, 可高效、简便地抑制相关基因的表达, 引入缺失或插入, 被认为是当前最有潜力的基因编辑工具^[12]。同时, CRISPR/Cas9 技术本身可对人类基因进行编辑来治疗相关疾病, 因此可利用该技术对相关基因进行修饰, 抑制肿瘤细胞的增殖、迁移和分化, 为晚期肿瘤的治疗提供新的方向。前不久, 美国生物科技公司 Editas 与制药公司 Allergan 联合开展了通过 AAV 递送 CRISPR 体内敲除 CEP290 突变内含子的方式治疗先天性黑矇 10 (LCA10) 的 I / II 期临床试验^[13]。近年来, 由北京大学邓宏魁研究组等多个研究团队首次利用 CRISPR/Cas9 基因编辑的成体 HSCs 治疗艾滋病和白血病患者, 实现了 CCR5 突变的 HSPC 在患有艾滋病合并急性淋巴细胞患者中同种异体移植, 急性淋巴母细胞性白血病仅在移植后 4 周就得到了完全缓解^[14]。

前列腺癌是欧洲男性第二大致死原因, 在中国的发病率也呈逐年升高趋势, 严重危害人类的健康^[15]。因此研究前列腺癌新的靶向分子作为肿瘤标志物或药物靶点十分重要。TFDP3 作为癌睾丸抗原在 2007 年被发现^[6], 仅在正常胰腺及睾丸组织中有表达, 在肿瘤组织中的高表达多集中在原发性肝癌及前列腺癌等。由于 TFDP3/E2F1 复合物不能与 DNA 结合, 进而抑制下游基因的转录活性。因此, TFDP3 可导致 E2F1 参与的凋亡信号通路被阻断, 细胞凋亡受到抑制^[16]。有文献^[17]表明, TFDP3 在乳腺癌的发病调控网络中扮演非常重要的角色, 并且可以增强乳腺癌细胞侵袭和迁移能力。最新的研究结果^[18]表明, TFDP3 在乳腺癌耐药过程中也起着重要作用, 它可以抑制化疗引起的肿瘤细胞凋亡, 并且诱导细胞发生自噬, TFDP3 相关的基因靶向治疗可能减少乳腺癌患者的耐药性的发生, 进而延长患者的生存期。前列腺癌和乳腺癌作为两类与激素相关的肿瘤, 具有一些相似的致病特征, 这也提示 TFDP3 可能与参与了前列腺癌的发病过程中。E2F1 有促进细胞增殖和诱导细胞凋亡的双重作用, 在大多数种类的癌细胞中起促癌作用, 然而, 有研究^[19]提

出, 在前列腺癌中 E2F1 是抑癌作用。课题组前期工作发现, 过表达 TFDP3 可以抑制 E2F1 诱导的前列腺癌 PC3 细胞凋亡^[20]。为了进一步研究 TFDP3

在前列腺癌发生发展中的作用, 本研究通过 CRISPR/Cas9 技术获得了 TFDP3 低表达的 PC3 前列腺癌细胞稳转株。



A: Migration of the PC3 cells in the NC and KO groups at 0, 8 and 24 h detected by scratching test (magnification: 100 times);

B: Invasion of PC3 cells in the NC and KO groups detected by Transwell assay (magnification: 200 times);

NC: normal control group; KO: TFDP3 gene KO group

图 7 TFDP3 对前列腺癌细胞 PC3 迁移能力的影响

Fig.7 The effect of TFDP3 on the metastatic ability of prostate cancer PC3 cells

研究结果^[21-23]表明, 肿瘤的发生和发展与细胞的异常增生、分化停滞, 以及细胞凋亡调节失衡密切相关, 诱导肿瘤细胞凋亡已成为抗癌药研究的新靶点, 而阻断细胞增殖周期进程可引起凋亡, 而凋亡也常伴随有细胞生长阻滞。本研究的功能实验研究结果显示, TFDP3 基因的敲除可使 G1 细胞增加, S 期细胞减少, 说明 TFDP3 基因敲除能阻滞细胞于 G1 期, 从而阻止细胞 DNA 的合成, 进而可能干扰肿瘤细胞蛋白质生成, 从而抑制肿瘤生长。本研究结果与其他文献报道结果不太一致。有文献^[1]报道, TFDP3 的表达对乳腺癌细胞周期不会产生影响; 更有研究表明, T 外源性的 TFDP3 表达可以抑制 E2F3 对细胞的影响, 进而使细胞发生 G1 期阻滞^[1]。考虑是否由于外源性增高的 E2F3 以及不同细胞系的影响, 总而言之, 其调控细胞周期的机制及进一步

的体外功能还需探讨。本研究结果显示, 敲除 TFDP3 后对凋亡虽有影响, 但影响不是特别明显, 而有研究表明, TFDP3 可以抑制 E2F1 诱导的、p53 介导的细胞凋亡^[12]。这提示 TFDP3 是否在 E2F1 高表达的情况下才能对细胞凋亡产生影响, 是否存在其他的凋亡途径, 以及 TFDP3 受到哪些通路的影响, 仍然有待进一步实验研究和验证。此外, 本研究结果发现 TFDP3 的低表达能有效抑制前列腺癌 PC3 细胞的迁移和侵袭能力, 这与其在乳腺癌中的研究结果一致, 提示其在临床应用和临床试验中作为肿瘤治疗靶点具有巨大潜力。

综上所述, TFDP3 低表达可以减低前列腺癌 PC3 细胞的迁移和侵袭能力, 并且可以诱导其发生细胞周期阻滞。本课题在体外功能实验细胞系选取比较单一和缺乏体内实验问题, 造成了一定的局限

性, 后期将解决这些问题来进一步验证, 并构建裸鼠模型, 继续研究 TFDP3 基因在前列腺癌中的作用及机制。

[参 考 文 献]

- [1] 胡小丹, 游敏, 罗文新. 基因编辑技术[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2018, 34(3): 267-277. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2018.03.06.
- [2] 陈力权, 李谦. ZFNs、TALENs和CRISPR-Cas基因编辑技术在肿瘤治疗中的应用[J]. *药物生物技术*, 2018, 25(6): 537-541. DOI: 10.19526/j.cnki.1005-8915.20180617.
- [3] 李成功, 梅恒, 胡豫. 基因编辑技术在CAR-T治疗中的研究进展[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2019, 26(3): 338-345. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2019.03.015.
- [4] 李佰伦, 黄书琴, 王奕众. CRISPR/Cas系统的研究进展及前沿应用[J]. *生命的化学*, 2020, 40(1): 16-24. DOI: 10.13488/j.smhx.20190108.
- [5] QIAO H, DI STEFANO L, TIAN C, et al. Human TFDP3, a novel DP protein, inhibits DNA binding and transactivation by E2F[J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(1): 454-466. DOI: 10.1074/jbc.M606169200.
- [6] WANG Y, HAN K J, PANG X W, et al. Large scale identification of human hepatocellular carcinoma-associated antigens by autoantibodies[J]. *J Immunol*, 2002, 169(2): 1102-1109. DOI: 10.4049/jimmunol.169.2.1102.
- [7] CHU M, YIN K L, DONG Y J, et al. TFDP3 confers chemoresistance in minimal residual disease within childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia[J/OL]. *Oncotarget*, 2017, 8(1): 1405-1415[2020-09-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5352064/>. DOI: 10.18632/oncotarget.13630.
- [8] TOVAR H, GARCÍA-HERRERA R, ESPINAL-ENRÍQUEZ J, et al. Transcriptional master regulator analysis in breast cancer genetic networks[J]. *Comput Biol Chem*, 2015, 59(Pt B): 67-77. DOI: 10.1016/j.compbiolchem.2015.08.007.
- [9] MA Y Y, XIN Y J, LI R, et al. TFDP3 was expressed in coordination with E2F1 to inhibit E2F1-mediated apoptosis in prostate cancer[J]. *Gene*, 2014, 537(2): 253-259. DOI: 10.1016/j.gene.2013.12.051.
- [10] BRAHMER J, RECKAMP K L, BAAS P, et al. Nivolumab versus docetaxel in advanced squamous-cell non-small-cell lung cancer[J/OL]. *N Engl J Med*, 2015, 373(2): 123-135[2020-01-04]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4681400/>. DOI: 10.1056/NEJMoa1504627.
- [11] LI C, GUAN X M, DU T, et al. Inhibition of HIV-1 infection of primary CD4⁺ T-cells by gene editing of CCR5 using adenovirus-delivered CRISPR/Cas9[J]. *J Gen Virol*, 2015, 96(8): 2381-2393. DOI: 10.1099/vir.0.000139.
- [12] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J/OL]. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823[2020-09-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3795411/>. DOI: 10.1126/science.1231143.
- [13] RUAN G X, BARRY E, YU D, et al. CRISPR/Cas9-mediated genome editing as a therapeutic approach for leber congenital amaurosis 10[J]. *Mol Ther*, 2017, 25(2): 331-341. DOI: 10.1016/j.yimthe.2016.12.006.
- [14] XU L, WANG J, LIU Y L, et al. CRISPR-edited stem cells in a patient with HIV and acute lymphocytic leukemia[J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(13): 1240-1247. DOI: 10.1056/NEJMoa1817426.
- [15] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2): 115-132. DOI: 10.3322/caac.21338.
- [16] TIAN C, LV D, QIAO H, et al. TFDP3 inhibits E2F1-induced, p53-mediated apoptosis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 361(1): 20-25. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.06.128.
- [17] YIN K L, LIU Y C, CHU M, et al. TFDP3 regulates epithelial-mesenchymal transition in breast cancer[J/OL]. *PLoS One*, 2017, 12(1): e0170573[2020-09-09]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5256886/>. DOI: 10.1371/journal.pone.0170573.
- [18] DING L Y, CHU M, JIAO Y S, et al. TFDP3 regulates the apoptosis and autophagy in breast cancer cell line MDA-MB-231[J]. *PLoS One*, 2018, 13(9): e0203833. DOI: 10.1371/journal.pone.0203833.
- [19] CHUN J N, CHO M, PARK S, et al. The conflicting role of E2F1 in prostate cancer: a matter of cell context or interpretational flexibility?[J]. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer*, 2020, 1873(1): 188336. DOI: 10.1016/j.bbcan.2019.188336.
- [20] 李蕊, 马越云, 辛艺娟, 等. E2F1对TFDP3表达的调控及其对前列腺癌PC3细胞凋亡的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2014, 21(2): 125-129. DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.02.002.
- [21] FERREIRA DE OLIVEIRA J M P, SANTOS C, FERNANDES E. Therapeutic potential of hesperidin and its aglycone hesperetin: Cell cycle regulation and apoptosis induction in cancer models[J]. *Phytomedicine*, 2020, 73: 152887. DOI: 10.1016/j.phymed.2019.152887.
- [22] ZHANG W W, LI L J, LI D G, et al. The first approved gene therapy product for cancer ad-p53 (gencicene): 12 years in the clinic[J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(2): 160-179. DOI: 10.1089/hum.2017.218.
- [23] HAMMER S, HAGEMANN U B, ZITZMANN-KOLBE S, et al. Preclinical efficacy of a PSMA-targeted thorium-227 conjugate (PSMA-TTC), a targeted alpha therapy for prostate cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2020, 26(8): 1985-1996. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-19-2268.

[收稿日期] 2020-09-09

[修回日期] 2021-04-09

[本文编辑] 黄静怡