肝癌分子机制研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001310

基于 CRISPR/Cas9 系统构建 ARID2 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

高庆祝，汪　凯，梁　利，张韵致，郑亚秋，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　400010）

【摘　要】**目的**：通过成簇的规律间隔的短回文重复序列（clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9，CRISPR/Cas9）系统在 SK-Hep1 肝癌细胞系中构建 AT 富集作用域 2（AT-rich interaction domain 2，ARID2）基因敲除模型，并初步观察 ARID2 敲除对肝癌细胞增殖和迁移能力的影响。**方法**：设计并合成靶向 ARID2 的向导 RNA（single guide RNA，sgRNA）寡核苷酸序列，长度为 20 bp，构建到 CRISPR 表达载体上，转染 HEK293T 细胞包装慢病毒并筛选稳定细胞株，采用克隆形成、Transwell 和划痕实验分别检测细胞增殖和迁移能力。**结果**：目的 sgRNA 寡核苷酸双链成功插入酶切后的 LentiCRISPER-V2 质粒载体中且测序正确；经 Western blot 鉴定 ARID2 敲除的细胞株筛选成功；ARID2 基因敲除后，与亲本细胞系相比，其蛋白表达缺失；克隆形成实验结果示 ARID2 敲除细胞株（1#6）培养至 10 d 时克隆形成数为（125.600 ± 5.131）个，亲本细胞株克隆形成数为（69.000 ± 5.567）个（t=12.962，P=0.000）；ARID2 敲除细胞株（2#1）培养至 8 d 时克隆形成数为（94.000 ± 8.737）个，亲本细胞株克隆形成数为（67.000 ± 5.292）个（t=4.635，P=0.010），差异有统计学意义。Transwell 结果示 ARID2 敲除细胞株（1#6）在 24 h 的迁移细胞数为（180.000 ± 5.542）个，亲本细胞组的迁移细胞数为（90.400 ± 5.031）个（t=20.731，P=0.000）；ARID2 敲除细胞株（2#1）在 24 h 的迁移细胞数为（138.600 ± 5.749）个，亲本细胞组的迁移细胞数为（78.400 ± 5.703）个（t=12.891，P=0.000），差异有统计学意义。划痕实验结果示 ARID2 敲除细胞株（1#6）16 h 划痕愈合度为（88.000 ± 0.011）%，亲本细胞组划痕愈合度为（52.500 ± 0.047）%（t=12.490，P=0.000）；ARID2 敲除细胞株（2#1）16 h 划痕愈合度为（71.900 ± 0.020）%，亲本细胞组划痕愈合度为（55.200 ± 0.024）%（t=9.190，P=0.001），差异有统计学意义。**结论**：ARID2 敲除可明显促进肝癌细胞的增殖和迁移能力，证实 ARID2 作为抑癌基因参与肝癌的发生和进程。ARID2 敲除细胞模型为肝癌的深入研究提供新的手段。

【关键词】AT 富集作用域 2；CRISPER/Cas9；SK-Hep1；增殖；迁移
【中图分类号】R735.7　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-12-18

Effects of ARID2 knockout on hepatoma cells proliferation and migration based on CRISPR/Cas9

Gao Qingzhu，Wang Kai，Liang Li，Zhang Yunzhi，Zheng Yaqiu，Tang Ni
(Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases，Ministry of Education，Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***：To construct ARID2 gene knockout model using CRISPR-Cas9 system and to investigate the effects of ARID2 knockout on SK-Hep1 cell proliferation and migration. ***Methods***：Three pairs of 20 bp sgRNAs targeting ARID2 were chemically synthesized and inserted into CRISPR expression vectors. The lentiviral was then packaged in HEK293T cell lines. The ARID2 knockout cell lines were selected in SK-Hep1 cells and identified by gene sequencing and Western blot. The effects of ARID2 knockout on proliferation and migration of SK-Hep1 cells were evaluated by colony formation，Transwell and Wound-Healing assays. ***Results***：Western blot showed that SK-Hep1 cell lines with ARID2 knockout were successfully established by the usage of CRISPR-Cas9 system. Colony formation assay showed that the colony number of ARID2 knockout cell lines（1#6）were significantly increased on 10 d（125.600 ± 5.131），compared with parental cell lines（69.000 ± 5.567）（t=12.962，P=0.000），meanwhile，the colony number of ARID2 knockout cell lines（2#1）were increased on 8 d（94.000 ± 8.737），compared with parental cell lines（67.000 ± 5.292）（t=4.635，P=0.010）. Transwell assay showed that the migration number of ARID2 knockout cell lines（1#6）（180.000 ± 5.542）was significantly increased than that of parental cell lines（90.400 ± 5.031）（t=20.731，P=0.000）；the migration number of ARID2 knockout cell lines（2#1）（138.600 ± 5.749）was increased than that of parental cell lines（78.400 ± 5.703）（t=12.891，P=0.000）. Wound-healing assay showed that the wound

作者介绍：高庆祝，Email：gaoqingzhu1991@163.com，研究方向：ARID2 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：81371827、81572683、81602417）；重庆市科委基础与前沿重点资助项目（编号：cstc2015jcyjBX0011）；重庆高校创新团队建设计划资助项目（编号：CXTDX201601015）。
优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170622.1114.004.html（2017-06-22）

closure of ARID2 knockout cell lines(1#6)(88.000±0.011)% was higher than that of parental cell lines(52.500 ± 0.047)%(t=12.490, P=0.000), meanwhile, the wound closure of ARID2 knockout cell lines(2#1)(71.900 ± 0.020)% was higher than that of parental cell lines(55.200 ± 0.024)%(t=9.190, P=0.001). ***Conclusion***: ARID2 knockout results in an enhanced proliferation and migration of SK-Hep1 cells, suggesting that ARID2 may be involved with the initiation and progress of hepatocarcinoma. Our study provides a new tool for further investigation of HCC.

【Key words】AT-rich interaction domain 2; clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9; SK-Hep1; proliferation; migration

AT富集作用域2(AT-rich interaction domain 2, ARID2)是哺乳动物酵母交换型转换/蔗糖不发酵复合物(yeast mating-type switching/sucrose non-fermenting, SWI/SNF)中 PBAF(polybromo-associated BRG1-associated factor)家族的一个亚基，人类 ARID2 基因位于 12 号染色体长臂，含 21 个外显子。ARID2 含 2 个典型的结构域，包括 N 端 ARID 结构域和 C 端 2 个保守的 C2H2 锌指结构基序[1]。锌指结构能结合 DNA、RNA 和蛋白质等[2]。ARID 相关蛋白通过核受体参与配体依赖的转录激活，具有胚胎发育、细胞系基因调节、细胞周期控制等多种生物学功能[3]。

近年来，ARID2 作为抑癌基因在多种肿瘤中存在失活突变如肝癌[4-5]、黑色素瘤[6]、非小细胞肺癌、胃癌[7]等。2011 年，Li 等[5]报道在肝癌中存在 ARID2 基因失活突变。同年，Zhao 等[8]报道 ARID2 在肝细胞肝癌中存在失活突变，并参与调节人类干扰素反应基因的产生和抑制肝癌细胞增殖的作用。You 等[9]报道 ARID2 蛋白表达水平与肝癌的复发密切相关。综上所述，ARID2 的失活突变在肝癌的起始和进程中发挥非常重要的作用。然而，ARID2 突变所引起的功能学改变和潜在的促进肝癌发生发展的分子机制还不是很清楚。

成簇的规律间隔的短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9, CRISPR/Cas9)系统是目前常用的基因组编辑技术，来源于古细菌和细菌免疫系统，经人为改造后，可对真核细胞基因组实现高度灵活且特异的编辑[10]。该系统主要由核酸内切酶 Cas9 和向导 RNA(single guide RNA, sgRNA)构成，sgRNA 紧邻前间区序列邻近基序(protospacer adjacent motif, PAM)结构。人为设计的特异性 sgRNA 序列通过互补配对识别靶序列，从而引导核酸内切酶 Cas9 蛋白结合并切割靶序列[11]，目标基因的切割引入 DNA 双链断裂(double-strand breaks, DSBs)，DSBs 通过非同源末端连接(non-homologous endjoining, NHEJ)或同源重组(homologous recombination, HR)修复机制对断裂的 DNA 进行插入缺失、修复或替换[12]。

本课题利用 CRISPER/Cas9 技术建立 ARID2 基因敲除的 SK-Hep1 肝癌细胞系，旨在为探索 ARID2 与肝癌发生发展机制提供基础。

1 材料和方法

1.1 细胞系、菌株及质粒

SK-Hep1 购自美国 ATCC；HEK293T 细胞由本实验室保存；DH10B 感受态细胞由本实验室制备并保存。Cas9 表达载体 lentiCRISPR-v2 以及慢病毒包装质粒 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、青链霉素购自 Hyclone 公司；血清购自 Gibco 公司；转染试剂 Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen；BCA 蛋白定量试剂盒、Western 制胶试剂盒购自碧云天生物技术公司；ARID2 单克隆抗体(兔)、山羊抗兔多克隆二抗 IgG 购自 Abcam 公司；ECL 化学发光试剂购自 Millipore 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；质粒大抽试剂盒(无内毒素)购自 TIANGEN 公司；氯仿、异丙醇试剂购自科龙化工；DNA 测序由成都擎科梓熙生物技术有限公司完成。CellTiter 购自 Promega 公司，Transwell 小室购自 Corning 公司，划痕实验专用插件(Culture insert)购自 Ibidi 公司。基因组 DNA 提取试剂盒构自吉锐生物。

1.3 构建 ARID2 敲除细胞模型

1.3.1 lentiCRISPRv2-sgRNA 的构建　查询 NCBI 基因库中人 ARID2 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 6 条 ARID2 Oligo单链(含 *BsmB* Ⅰ酶切位点)：ARID2-1 正义链：5'-CACCGGATTAAAACAAGATGAACC-3'，反义链：5'-AAACGGTTCATCTTGTTTTAATCC-3'；ARID2-2 正义链：5'-CACCGTGATATCTAAAGTCCCTTG-3'，反义链：5'-AAACCAAGGGACTTTAGATATCAC-3'；ARID2-3 正义链：5'-CACCGCTATACATGCTCACGGAAA-3'，反义链：5'-AAACTTTCCGTGAGCATGTATAGC-3'。

将 sgRNA 寡核苷酸单链退火形成双链 DNA；用限制性内切酶 *BsmB* Ⅰ酶切 LentiCRISPER-v2 质粒，使慢病毒Lenti-

CRISPER-v2 质粒线性化和去磷；连接酶切后的 LentiCRISP-ER-v2 质粒和退火后的双链 sgRNA，连接体系：3 μL plasmid；1 μL vector；1 μL T4 DNA 连接酶；1.5 μL T4 ligation buffer；8.5 μL 无酶水。16 ℃连接 12~16 h，连接产物转化大肠杆菌 DH10B 涂板，提取质粒，送检测序。

1.3.2　HEK293T 细胞中包装慢病毒　转染前 1 d 将 HEK-293T 细胞重铺 60%~70%密度至 T25 培养皿，待细胞处于对数生长期时进行转染。采用脂质体介导转染法，按一定比例混合 pMD2.G、psPAX2、lentiCRISPRv2-sgRNA 后转染 HEK293T 细胞，2~3 d 收取病毒上清。

1.3.3　收集慢病毒并感染 SK-Hep1 细胞　腺病毒收集后用 0.45 μm 滤膜过滤，6 孔板感染肝癌细胞 SK-Hep1，辅加 8 μg/mL 的 polybrene。

1.3.4　筛选稳定细胞株　细胞感染 2~3 d 后加嘌呤霉素（0.5 μg/mL）筛选，待 SK-Hep1 空细胞全部杀死后，将感染慢病毒的细胞正常培养，重铺至 96 孔板以筛选单克隆，将筛选到的单克隆细胞传代，冻存细胞，同时提取细胞蛋白检测 ARID2 的敲除效果，提取基因组 DNA（方法见说明书）进行 TA 克隆并送检测序。PCR 扩增引物如下：ARID2-1 正义链：5'-GTACAACTGATGATTCCACT-3'，反义链：5'-GG-AGATGC-TGACTCGTATA-3'；ARID2-2 正义链：5'-ACCATAACAG-TTGTGCCA-3'，反义链：5'-TTTCCCTA-TCAGTATCCTCT-3'。

1.4　ARID2 敲除细胞株功能学实验

1.4.1　克隆形成实验检测细胞增殖　将处于对数期的 ARID2 敲除细胞株及亲本细胞株胰酶消化后计数，以 1.0×10^3 个/小室密度铺至 6 孔板中，正常培养 7~10 d，待细胞形成集落后行结晶紫染色，镜下成像，重复 3 次实验。

1.4.2　Transwell 检测细胞迁移和侵袭　将处于对数期的 ARID2 敲除细胞株及亲本细胞株胰酶消化后计数，以 2×10^4 个/小室密度铺至 24 孔板中的 Transwell 小室上层（共 200 μL 空培养基），小室下层加正常培养基 800 μL，每组设 3 个副孔，培养至 24 h 后行结晶紫染色 2.5 min，显微镜下观察细胞迁移情况，重复 3 次实验。

1.4.3　划痕实验检测细胞迁移　将处于对数期的 ARID2 敲除细胞株及亲本细胞株用胰酶消化后计数，以 3.5×10^4 个/小室密度铺至 Culture insert 的一侧共 75 μL 正常培养基，另一侧条件一样，每组设 3 个副孔，培养至 24 h 待细胞铺满后移除 Culture insert，用含 1%的血清培养基培养，显微镜下观察不同时间点的细胞迁移情况，重复 3 次实验。

1.5　统计学处理

每种实验均进行至少 3 次独立重复实验；计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x}\pm s$）表示；用 SPSS 17.0 统计软件分析实验数据，两组比较采用两独立样本 t 检验，检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　ARID2 敲除细胞模型构建

LentiCRISPER v2-sgRNA 质粒构建成功，序列比对如图 1 所示。

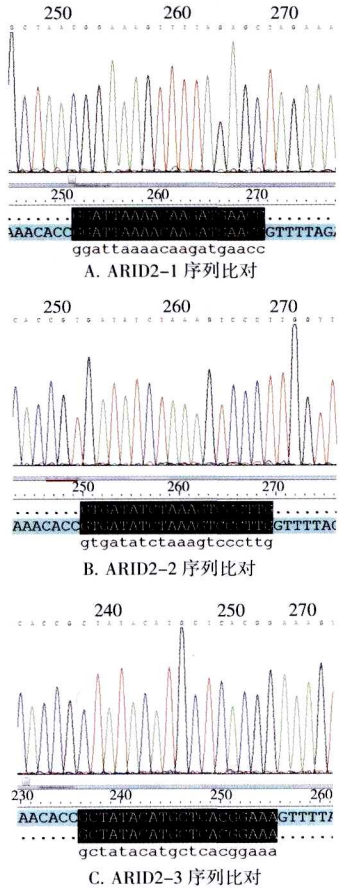


图 1　LentiCRISPER v2-sgRNA 重组质粒测序结果

Fig.1　DNA sequence of LentiCRISPER v2-sgRNA plasmids

2.2　ARID2 敲除细胞模型的鉴定

96 孔板细胞长满后消化细胞，提取基因组 DNA，TA 克隆后送检测序。将 1#6 细胞扩增的 ARID2 基因组序列与野生型 ARID2 基因组序列比对，结果如图 2 所示，1#6 细胞ARID2 基因 2 个核苷酸（CA）缺失造成移码突变，导致翻译提前终止，从而造成 ARID2 表达的敲除。

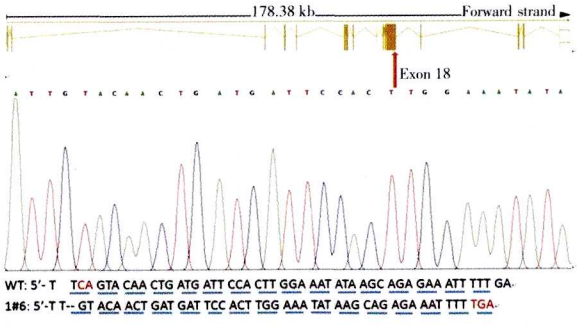


图 2　ARID2 敲除细胞株（1#6）基因组 DNA 与野生型 ARID2 基因组 DNA 序列比对结果

Fig.2　DNA sequence alignment between ARID2 knockout cells (1#6) genome DNA and the wild-type genome DNA

培养皿中细胞长至 85%~90%时提取细胞蛋白，Western blot 检测筛选出稳定细胞株的 ARID2 蛋白敲除情况，由测序比对可知翻译终止在 18 号外显子，由于 ARID2 C 端的功能

非常重要(其包含 2 个 C2H2 锌指结构基序,不仅能结合DNA,还能结合 RNA 和蛋白质,被认为是 ARID2 发挥其生物学功能的关键作用域),现商业化抗体的抗原表位多标记在 C 端,因此 Western blot 可检测到 ARID2 表达的缺失,结果如图 3 所示,1#6 为 ARID2 完全敲除细胞株。

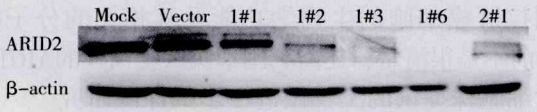
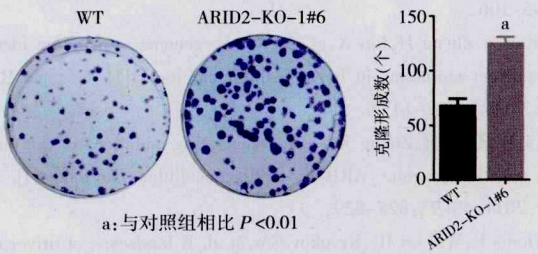


图 3　蛋白水平验证可能的 ARID2 敲除稳定细胞系

Fig.3　ARID2 protein expression in possible ARID2 knockout cell lines by Western blot

2.3　ARID2 敲除对 SK-Hep1 细胞增殖能力的影响

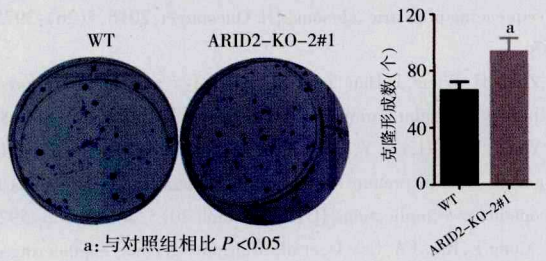
克隆形成实验结果显示,ARID2 敲除细胞株(1#6)正常培养至 10 d 时克隆形成数为(125.600 ± 5.131)个,相比亲本细胞株[(69.000 ± 5.567)个]明显增高,差异有统计学意义(t=12.962,P=0.000);ARID2 敲除细胞株(2#1)克隆形成数为(94.000 ± 8.737)个,相比亲本细胞株[(67.000 ± 5.292)个]明显增高(t=4.635,P=0.010),提示 ARID2 基因敲除可以明显促进肝癌细胞的增殖能力,如图 4 和图 5 所示。



a:与对照组相比 P<0.01

图 4　ARID2 敲除促进 SK-Hep1 细胞的增殖能力

Fig.4　ARID2 knockout promotes the proliferation of SK-Hep1 cells as detected by colony formation assay



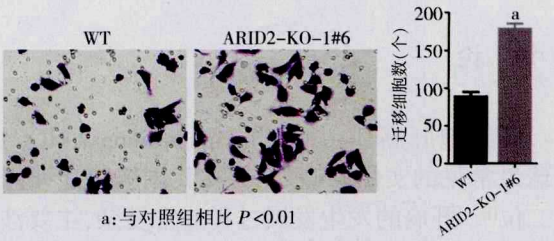
a:与对照组相比 P<0.05

图 5　ARID2 敲除促进 SK-Hep1 细胞的增殖能力

Fig.5　ARID2 knockout promotes the proliferation of SK-Hep1 cells as detected by colony formation assay

2.4　ARID2 敲除对 SK-Hep1 细胞迁移和侵袭能力的影响

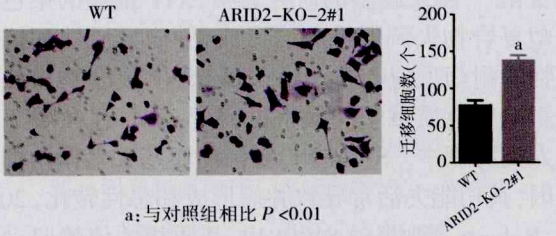
Transwell 结果显示,ARID2 敲除细胞株(1#6)在 24 h 的迁移细胞数为(180.000 ± 5.542)个,亲本细胞株的迁移细胞数为(90.400 ± 5.031)个(t=20.731,P=0.000);ARID2 敲除细胞株(2#1)在 24 h 的迁移细胞数为(138.600 ± 5.749)个,亲本细胞株的迁移细胞数为(78.400 ± 5.703)个(t=12.891,P=0.000),提示 ARID2 敲除细胞株在 24 h 时穿过小室底膜的细胞数与亲本细胞株相比明显增高,ARID2 基因敲除可促进肝癌细胞的迁移和侵袭能力,如图 6 和图 7 所示。



a:与对照组相比 P<0.01

图 6　ARID2 敲除促进 SK-Hep1 细胞的迁移和侵袭能力(200×)

Fig.6　ARID2 knockout promotes the migration and invasion of SK-Hep1 cells as detected by Transwell assay(200×)



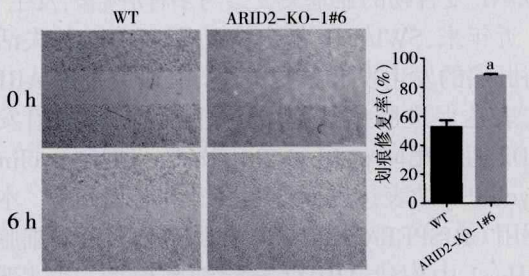
a:与对照组相比 P<0.01

图 7　ARID2 敲除促进 SK-Hep1 细胞的迁移和侵袭能力(200×)

Fig.7　ARID2 knockout promotes the migration and invasion of SK-Hep1 cells as detected by Transwell assay(200×)

2.5　ARID2 敲除对 SK-Hep1 细胞迁移能力的影响

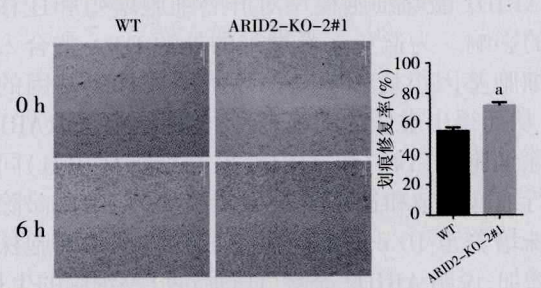
划痕实验结果显示,ARID2 敲除细胞株(1#6)在 16 h 的细胞迁移率为(88.000 ± 0.011)%,与亲本细胞株[(52.500 ± 0.047)%]相比增加明显(t=12.490,P=0.000);ARID2 敲除细胞株(2#1)在 16 h 的细胞迁移率为(71.900 ± 0.020)%,与亲本细胞株(55.200 ± 0.024)%相比明显增加(t=9.190,P=0.001),提示 ARID2 基因敲除可以促进肝癌细胞的迁移能力,如图 8 和图 9 所示。



a:与对照组相比 P<0.01

图 8　ARID2 敲除促进 SK-Hep1 细胞的迁移能力(50×)

Fig.8　ARID2 knockout promotes the migration of SK-Hep1 cells as detected by wound-healing assay(50×)



a:与对照组相比 P<0.01

图 9　ARID2 敲除促进 SK-Hep1 细胞的迁移能力(50×)

Fig.9　ARID2 knockout promotes the migration of SK-Hep1 cells as detected by wound-healing assay(50×)

3 讨 论

肝细胞肝癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是全球最常见的实体肿瘤之一，在我国居癌症死因的第二位[13]。肝癌的发生发展过程非常复杂，主要涉及细胞信号传导通路失调和一系列细胞内分子事件，如基因组 DNA 结构改变和基因组 DNA 表观修饰的变化[14]。越来越多的研究表明，ATP 依赖的染色质重塑复合物失调促进肿瘤形成、肿瘤异质性和抗癌药物的耐药反应[14-15]。其中 SWI/SNF 复合物被认为是影响染色质重塑的最常见突变基因，存在于 20% 的人类肿瘤中。SWI/SNF 复合物亚基大多作为抑癌基因，其功能失活常导致肿瘤形成和恶性转化。2000 年，Roberts 等[16]报道 SWI/SNF 基质相关依赖肌动蛋白染色质调节因子（SWI/SNF related、matrix associated、actin dependent regulator of chromatin、subfamily B、member 1、SMARCB1）等位基因失活突变（SWI/SNF 复合物的一个核心亚基）存在于几乎 100% 的恶性杆状瘤中。随后 Jones 等报道 AT 富集作用域 1A（AT-Rich Interaction Domain 1A，ARID1A）失活突变存在于 50% 的卵巢透明细胞癌和卵巢内膜癌[17]。在肾透明细胞癌中，多同源调节域蛋白 1（polybromo 1，PBRM1）基因失活突变率占 41%[18]。此外还有很多 SWI/SNF 复合物的亚基突变参与多种肿瘤的发生[19]。

近年来，SWI/SNF 复合物亚基 ARID2 的失活突变与肝癌的发生发展备受关注。有研究报道 ARID2 缺失表达促进肝癌细胞增殖[20]。我们课题组发现 ARID2 通过靶向 p-Rb-E2F 信号通路抑制 cyclinD1 和 cyclinE1 的表达进而抑制肝癌细胞增殖[21]。本研究利用 CRISPER/Cas9 技术，在野生型人肝癌细胞株 SK-Hep1 中构建 ARID2 敲除细胞模型，通过蛋白免疫印迹法和 DNA 测序证实 ARID2 敲除细胞模型构建成功，本研究进一步拟通过细胞功能学实验观察 ARID2 敲除细胞模型对肝癌细胞增殖和迁移能力的影响。为避免病毒携带的外源 DNA 整合入宿主细胞基因组后影响其他癌基因或抑癌基因的功能，从而得出虚假的细胞表型，本课题组选取 ARID2 敲除细胞株（1#6）和 ARID2 敲除细胞株（2#1）同时进行细胞增殖和迁移实验，结果发现 ARID2 敲除细胞株培养至 10 d 时其克隆形成数较亲本细胞株显著增加，说明 ARID2 敲除可以促进肝癌细胞的生长，与之前报道一致。细胞迁移是恶性肿瘤侵袭和转移的关键步骤之一，通过细胞迁移和划痕实验，本课题组发现相对于野生型肝癌细胞株，ARID2 敲除细胞株迁移和侵袭能力明显增强。

综上所述，本研究成功构建了 ARID2 敲除肝癌细胞株，发现 ARID2 基因的失活突变可以促进肝癌细胞的增殖和迁移能力，再次证实了 ARID2 作为抑癌基因参与肝癌的发生和进程，但对于 ARID2 是如何调控肝癌细胞的生物学功能及其相关的分子机制目前不是很清楚，还需利用本次试验构建的 ARID2 敲除细胞株提供的工具做进一步的深入研究。

参 考 文 献

[1] Mohrmann L, Langenberg K, Krijgsveld J, et al. Differential targeting of two distinct SWI/SNF-related Drosophila chromatin-remodeling complexes[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(8): 3077-3088.

[2] Hatayama M, Aruga J. Characterization of the tandem CWCH2 sequence motif: a hallmark of inter-zinc finger interactions[J]. BMC Evol Biol, 2010, 10: 53.

[3] Wilsker D, Patsialou A, Dallas PB, et al. ARID proteins: a diverse family of DNA binding proteins implicated in the control of cell growth, differentiation, and development[J]. Cell Growth Differ, 2002, 13(3): 95-106.

[4] Kan Z, Zheng H, Liu X, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in hepatocellular carcinoma[J]. Genome Res, 2013, 23(9): 1422-1433.

[5] Li M, Zhao H, Zhang X, et al. Inactivating mutations of the chromatin remodeling gene ARID2 in hepatocellular carcinoma[J]. Nat Genet, 2011, 43(9): 828-829.

[6] Hodis E, Watson IR, Kryukov GV, et al. A landscape of driver mutations in melanoma[J]. Cell, 2012, 150(2): 251-263.

[7] Lim CH, Cho YK, Kim SW, et al. The chronological sequence of somatic mutations in early gastric carcinogenesis inferred from multiregion sequencing of gastric adenomas[J]. Oncotarget, 2016, 7(26): 39758-39767.

[8] Zhao H, Wang J, Han Y, et al. ARID2: a new tumor suppressor gene in hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2011, 2(11): 886-891.

[9] You J, Yang H, Lai Y, et al. AT-rich interactive domain 2, p110α, p53, and β-catenin protein expression in hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications[J]. Hum Pathol, 2015, 46(4): 583-592.

[10] Cong L, Ran FA, Cox D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819-823.

[11] Cho SW, Kim S, Kim JM, et al. Targeted genome engineering in human cells with the Cas9 RNA-guided endonuclease[J]. Nat Biotechnol, 2013, 31(3): 230-232.

[12] van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, et al. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems[J]. Nat Rev Microbiol, 2014, 12(7): 479-492.

[13] Maluccio M, Covey A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(6): 394-399.

[14] Iizuka N, Tamesa T, Sakamoto K, et al. Different molecular pathways determining extrahepatic and intrahepatic recurrences of hepatocellular carcinoma[J]. Oncol Rep, 2006, 16(5): 1137-1142.

脂糖代谢研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001324

慢性炎症加重肥胖小鼠肝糖代谢紊乱机制初探

罗　旋,谭　伟,刘　军,杜琳敏,陈压西,阮雄中,杨　萍
(重庆医科大学脂糖代谢性疾病重庆市重点实验室,重庆　400016)

【摘　要】**目的**:探讨慢性炎症是否可加剧肥胖状态小鼠糖代谢紊乱,及是否影响肝脏糖异生及相关机制。**方法**:野生 C57BL/6J 小鼠随机分为正常饮食组、高脂饮食组、高脂饮食合并炎症组(高脂饮食加酪蛋白注射组)。小鼠巨噬细胞标志物 F4/80 免疫组化染色检测肝脏巨噬细胞浸润情况,实时荧光定量 PCR 检测单核细胞趋化蛋白-1(Mcp1),糖异生相关基因葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-pase)和磷酸烯醇式丙酮酸(Pepck)mRNA 相对表达量,过碘酸-希夫染色和蒽酮法检测肝脏糖原含量,蛋白免疫印迹法检测肝脏组织叉头框蛋白 O1(FoxO1),蛋白激酶 B(Akt)及其磷酸化蛋白表达。**结果**:高脂饮食加酪蛋白注射组较高脂饮食组肝脏组织炎症明显升高(P=0.000),且空腹血糖及胰岛素耐量曲线下面积均明显升高(P=0.040,P=0.025),肝脏糖原积聚亦明显增加(P=0.000),肝糖异生相关基因 G-6-pase、Pepck mRNA 表达明显升高(P=0.001,P=0.001),而肝脏 Akt 及 FoxO1 蛋白磷酸化程度均明显下降(P=0.021,P=0.003)。高脂饮食组较正常饮食组肝脏 Akt、FoxO1 蛋白磷酸化降低,糖异生基因表达增加,但血糖仍维持在正常水平。**结论**:慢性炎症可进一步加剧肥胖小鼠肝糖代谢紊乱,诱导肥胖小鼠高血糖。

【关键词】慢性炎症;肥胖;肝脏糖异生
【中图分类号】R589.1　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2017-2-21

Chronic inflammation aggravates hepatic glucose metabolism disorder in obese mice

Luo Xuan, Tan Wei, Liu Jun, Du Linmin, Chen Yaxi, Ruan Xiongzhong, Yang Ping
(*Chongqing Key Laboratory of Lipid and Glucose Metabolism, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate whether inflammation plays a role in accelerating glucose metabolism disorder in obese mice and whether the mechanism is regulated by liver gluconeogenesis. ***Methods***: The C57BL/6J mice were randomly divided into normal chaw diet group, high fat diet group, high fat diet with chronic inflammation group(high fat diet with casein injection group). The macrophage infiltration in the liver was detected by F4/80 staining. The mRNA relative expression levels of Mcp1, G-6-pase and Pepck were examined using real-time quantitative PCR. The liver glycogen content was detected qualitatively by Periodic acid-Schiff staining and quantitatively by anthrone-sulfuric acid method. The FoxO1 and Akt protein levels were analyzed by Western blot. ***Results***: Casein injection induced obvious liver inflammation in high fat diet-fed mice(P=0.000). The fasting blood glucose levels and the area under the insulin tolerance curve were higher in the casein-injected mice(P=0.040, P=0.025). The liver glycogen content and the gluconeogenesis related gene G-6-pase and Pepck expression were also increased significantly(P=0.001, P=

作者介绍:罗　旋,Email:1510079138@qq.com,
研究方向:脂糖代谢与炎症、肿瘤发生发展关系。
通信作者:杨　萍,Email:yp_apple@yeah.net。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81400786);重庆市科委基础与前沿研究计划资助项目(编号:cstc2015jcyjA10001)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170622.1631.032.html (2017-06-22)

[15] Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome-biological and translational implications[J]. Nat Rev Cancer, 2011, 11(10): 726-734.
[16] Versteege I, Sevenet N, Lange J, et al. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer[J]. Nature, 1998, 394(6689): 203-206.
[17] Jones S, Wang TL, Shih IeM, et al. Frequent mutations of chromatin remodeling gene ARID1A in ovarian clear cell carcinoma[J]. Science, 2010, 330(6001): 228-231.
[18] Varela I, Tarpey P, Raine K, et al. Exome sequencing identifies frequent mutation of the SWI/SNF complex gene PBRM1 in renal carcinoma[J]. Nature, 2011, 469(7331): 539-542.
[19] Yaniv M.. Chromatin remodeling: from transcription to cancer[J]. Cancer Genet, 2014, 207(9): 352-357.
[20] You J, Yang H, Lai Y, et al. ARID2, p110α, p53, and β-catenin protein expression in hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications[J]. Hum Pathol, 2015, 46(7): 1068-1077.
[21] Duan Y, Tian L, Gao Q, et al. Chromatin remodeling gene ARID2 targets cyclin D1 and cyclin E1 to suppress hepatoma cell progression [J]. Oncotarget, 2016, 7(29): 45863-45875.

(责任编辑:张辉洁)