

徐涛,顾鹏,陈傍柱,等. 利用 CRISPR/Cas9 系统构建 *HMGA2* 敲除肝癌细胞株及其功能鉴定 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(12): 23-29.

Xu T, Gu P, Chen BZ, et al. Use of CRISPR/Cas9 system for establishment and characterization of *HMGA2* knockout hepatoma carcinoma cell line [J]. Chin J Comp Med, 2020, 30(12): 23-29.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2020.12.004

利用 CRISPR/Cas9 系统构建 *HMGA2* 敲除肝癌细胞株及其功能鉴定

徐涛^{1,2}, 顾鹏^{1,2}, 陈傍柱^{1,2}, 叶行^{1,2}, 梁春锦^{1,2}, 张映辉^{3*}, 顾为望^{1,2,3*}

(1.南方医科大学实验动物管理中心暨比较医学研究所,广州 510515; 2.东莞松山湖明珠实验动物科技有限公司,广东 东莞 523808; 3.五邑大学生物科技与大健康学院,广东 江门 529020)

【摘要】 目的 采用 CRISPR/Cas9 系统敲除肝癌细胞系 HepG2 的高迁移率蛋白 A2 (*HMGA2*) 基因,探讨 *HMGA2* 敲除对于肝癌细胞生长、增殖、迁移以及侵袭的影响。**方法** 根据 GenBank 数据库搜索人 *HMGA2* 序列,利用在线 sgRNA 设计软件针对 *HMGA2* 的第一外显子以及第二外显子各设计一条 sgRNA,构建靶向 *HMGA2* 的 sgRNA 重组敲除载体 sgE1 和 sgE2,将 sgRNA 载体转染细胞,通过有限稀释法筛选得到 *HMGA2*^{-/-} 细胞株。通过 CCK8 实验以及平板克隆形成实验检测 *HMGA2* 敲除对于 HepG2 细胞生长以及克隆形成能力的影响;采用 Transwell 实验检测 *HMGA2* 敲除对于 HepG2 细胞迁移与侵袭的影响。**结果** 相比于野生型,*HMGA2*^{-/-} 细胞株的生长速率减慢,克隆形成能力(121.83 ± 21.68 vs 59.50 ± 20.68, $P < 0.01$)、迁移(359.67 ± 32.53 vs 245.61 ± 24.23, $P < 0.05$)与侵袭(251.33 ± 43.43 vs 47.00 ± 10.00, $P < 0.01$)能力显著下降。**结论** *HMGA2* 敲除降低了肝癌细胞 HepG2 的体外生存能力以及转移能力,*HMGA2* 基因可以作为一个肝癌治疗的潜在靶点。

【关键词】 肝癌;*HMGA2*;CRISPR/Cas9

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2020)12-0023-07

Use of CRISPR/Cas9 system for establishment and characterization of *HMGA2* knockout hepatoma carcinoma cell line

XU Tao^{1,2}, GU Peng^{1,2}, CHEN Bangzhu^{1,2}, YE Xing^{1,2}, LIANG Chunjin^{1,2}, ZHANG Yinghui^{3*}, GU Weiwang^{1,2,3*}
(1. Laboratory Animal Center & Institute of Comparative Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China.
2. Songshan Lake Pearl Laboratory Animal Science and Technology Ltd., Dongguan 523808.
3. School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, Jiangmen 529020)

【Abstract】 Objective To knock out the high-mobility group AT-hook 2 (*HMGA2*) gene using the CRISPR/Cas9 system in HepG2 cells and investigate the effect of *HMGA2* knockout on the growth, proliferation, migration, and invasion of hepatoma carcinoma cells. **Methods** The human *HMGA2* gene sequence was obtained from GenBank. Two sgRNAs were designed for each of the first and second exons of the *HMGA2* gene using online sgRNA design software. The recombinant

【基金项目】 广东省科技计划项目(2016A020208004);国家自然科学基金项目(31271042);国家科技部国际合作项目(2011DFA33290);江门市创新团队项目(2017TD02);广州市科技计划项目(201704020012)。

【作者简介】 徐涛(1994—),男,硕士研究生,研究方向:基因修饰动物模型研究。E-mail: hzxutao94@126.com

【通信作者】 张映辉(1973—),男,副教授,硕士生导师,研究方向:生物化学与遗传学。E-mail: zhangyh@wyu.edu.cn

顾为望(1956—),男,教授,博士生导师,研究方向:实验动物培育、人类疾病动物模型制备与比较医学。

E-mail: Guww100@163.com * 共同通信作者

sgRNA vectors sgE1 and sgE2 were constructed and transfected into HepG2 cells to obtain the *HMGA2*^{-/-} cell line. The effects of *HMGA2* knockout on the growth and proliferation of HepG2 cells were investigated via CCK8 and clone formation assays, while the migration and invasion abilities were measured using Transwell assays. **Results** Compared with wild-type HepG2 cells, the knockout cell line showed reduced proliferation, clone formation (121.83 ± 21.68 vs 59.50 ± 20.68 , $P < 0.01$), invasion (359.67 ± 32.53 vs 245.61 ± 24.23 , $P < 0.05$), and migration (251.33 ± 43.43 vs 47.00 ± 10.00 , $P < 0.01$). **Conclusions** *HMGA2* knockout in hepatoma carcinoma cells inhibited both cellular proliferation and tumor metastasis *in vitro*. Therefore, *HMGA2* may constitute a target for hepatoma gene therapy.

【Keywords】 liver cancer; *HMGA2*; CRISPR/Cas9

高迁移率蛋白 A2 (high-mobility group AT-hook 2, *HMGA2*) 属于高迁移率蛋白超家族成员, 是一种非组蛋白染色质结合蛋白, 主要包括三个 AT-hook 区以及一个酸性 C 末端^[1]。AT-hook 区可以高亲和力的结合到基因组中 AT 富集区域, 这些区域一般都是相关基因表达调控元件, 从而调控靶基因的表达。*HMGA2* 基因位于 12 号染色体长臂, 由 5 个外显子构成。*HMGA2* 一般在胚胎发育早期以及未分化的细胞中高表达, 而在成体正常细胞或高度分化的细胞中基本不表达或表达量很低^[2]。但是, 研究发现在肺癌^[3]、乳腺癌^[4]、胃癌^[5]、结直肠癌^[6]等肿瘤组织中 *HMGA2* 的表达均显著升高, 提示 *HMGA2* 可能是一个致癌基因, 可以作为癌症早期诊断的潜在分子靶标^[7]。*HMGA2* 的异常表达通常与肿瘤发生相关, 它主要影响肿瘤细胞的增殖、上皮-间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT)、转移以及肿瘤组织内的微血管生成等过程^[8-9]。

肝癌作为一种常见肿瘤, 其发病率与致死率均在各种肿瘤中名列前茅, 而且肝癌细胞转移性强^[10]、对常规化疗药物耐受性较强^[11]、预后较差等特点进一步加剧了治疗难度。因此, 筛选肝癌治疗的潜在分子靶点, 对于肝癌的早期诊断、临床治疗以及预后评估具有重大意义^[12]。虽然 *HMGA2* 已证明在多种肿瘤中均可作为分子靶标以及预后评估的潜在分子, 但 *HMGA2* 在肝癌中的作用目前研究较少。本研究采用 CRISPR/Cas9 系统引起肝癌细胞系 HepG2 中的 *HMGA2* 基因大片段删除, 进而失活该基因, 建立 *HMGA2* 敲除细胞株, 并对此进行了相关功能的鉴定, 探讨 *HMGA2* 对于肝癌细胞增殖、迁移与侵袭的影响, 从而为肝癌的靶向治疗提供一定的思路。

1 材料和方法

1.1 实验细胞

人肝癌细胞系 HepG2 购自美国 ATCC。

1.2 主要试剂

PX458 质粒购自 Addgene; 高糖 DMEM (8115247)、胎牛血清 (42A0378 K)、双抗 (21442)、0.25% 胰蛋白酶 (25200) 购自 Gibco; Lipofectamine[®] 2000 (2004957)、Opti-MEM[®] (1119701)、TRIzol (15596026) 购自 Thermo; 反转录试剂盒 (A140826A)、荧光定量 PCR 试剂盒 (AJ51622A)、细胞基因组提取试剂盒 (AK2101)、Premix Taq[™] 酶 (A191625A)、T4 连接酶 (AH70103A) 购自 TaKaRa; DH5 α 感受态细胞 (180428) 与质粒小提试剂盒 (S7923) 购自 TIANGEN; Bbs I 内切酶 (00397116)、T4 PNK 磷酸化酶 (10020296) 购自 NEB; Transwell 小室 (11919023)、Matrigel 胶 (9119018) 购自 Corning; 全蛋白提取试剂盒 (20190213) 购自凯基生物; *HMGA2* 一抗 (79h6360) 及 Western blot 二抗 (12v9698) 购自 Affinity; GAPDH 一抗 (AH08191878) 购自 Bioss; CCK8 试剂盒 (EG20180126) 购自南京恩晶生物。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

HepG2 细胞培养在含有 10% FBS、1% 青/链霉素的高糖 DMEM 培养基中, 于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂, 饱和湿度条件下培养, 每隔 3 d 换一次液。取生长状态良好的细胞用于后续实验。

1.3.2 sgRNA 寡核苷酸链设计

根据 GenBank 中发表的 *HMGA2* 序列信息 (ID: NM_003483), 利用 CRISPR/Cas9 sgRNA 在线设计软件 (<http://crispor.tefor.net/>) 分别在 *HMGA2* 基因的第一外显子与第二外显子处各设计一条 sgRNA, 分别命名为 sgE1 与 sgE2 (如图 1), 并在正义链的 5' 端添加 CACC 接头, 在反义链的 5' 端添加 AAAC 接头, 便于与酶切载体连接; 此外, 由于 sgE2 不是以 G 开头, 所以需在接头与 sgE2 的 5' 端之间加上 G, 以提高 U6 启动子的转录活性。最终 oligo 序列如表 1 所示。

1.3.3 重组载体 PX458-sgRNA 构建

两条 sgRNA 进行末端磷酸化与退火反应,反应体系为:sgRNA-T 1 μL, sgRNA-B 1 μL, T4 PNK 0.5 μL, T4 Ligase Buffer 1 μL, ddH₂O 6.5 μL, 37°C 反应 30 min 后于沸水中加热 5 min, 自然冷却至室温。用 T4 连接酶将退火产物与经 Bbs I 酶切的 PX458 质粒连接, 16°C 连接 30 min, 并将连接产物转化入大肠杆菌 DH5α 中, 均匀涂布于含氨苄青霉素的 LB 固体平板上 37°C 过夜培养, 挑取单克隆鉴定并由睿博兴科广州分公司采用 Sanger 测序法进一步鉴定正确插入。

1.3.4 细胞转染与单克隆筛选

将状态良好的细胞铺到 24 孔板中, 待细胞汇合度达到 80% 时采用 Lipo2000 将两个 sgRNA 重组质粒混合转染 HepG2 细胞, 转染 2 d 后于荧光显微镜下观测转染效率。将细胞悬液稀释至每毫升 100 个细胞, 以每孔 10 μL 加入 96 孔板, 进行单克隆筛选, 待克隆长至合适大小后挑取克隆于 24 孔板中, 并进行敲除鉴定。

1.3.5 细胞敲除株鉴定

采用 NP40 裂解细胞, 程序为: 56°C 1 h, 95°C 10 min。扩增 *HMGA2* 基因敲除后的短序列片段, PCR 引物序列为: *HMGA2*-F: 5'-GACGTCCGGTGTGATGGTG-3', *HMGA2*-R: 5'-CAAATTCCTGGCTGCCGAGT-3', 扩增程序为: 95°C 3 min; 94°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 30 s, 36 个循环; 72°C 2 min。PCR 产物经

1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并送睿博兴科广州分公司进行 Sanger 测序。对经测序鉴定为可能 Indel 的片段采用 pMD19-T Vector Cloning Kit 进行 TA 克隆, 随机挑取 10 个单克隆进行 Sanger 测序, 并通过 BLAST 在线软件比对, 鉴定敲除株基因型。

1.3.6 实时荧光定量 PCR

采用 TRIzol 法提取 RNA, 并利用反转录试剂盒将 RNA 反转录成 cDNA, 采用嵌合荧光法对 *HMGA2* 的表达情况进行定量分析, 以 *GAPDH* 为内参。qPCR 反应条件为: 95°C 30 s; 95°C 5 s, 60°C 30 s, 40 个循环; 60°C 2 min。采用 2^{-ΔΔCt} 法分析基因相对表达情况。所用引物如表 2 所示。

1.3.7 蛋白表达水平检测

将对照组与敲除株细胞铺于六孔板, 待细胞长至 80% 汇合度时, 用冷的 PBS 洗两遍, 加入 200 μL 细胞裂解液于冰上裂解 30 min。4°C, 12000 r/min 离心 5 min。吸取上清, 用 BCA 法进行蛋白定量, 并用 5×Loading buffer 调整蛋白至适当浓度, 100°C 水浴 5 min。SDS-PAGE 电泳, 恒压 80 V 30 min, 120 V 60 min, 切下目的条带与内参条带, 转 PVDF 膜。用 5% BSA 室温封闭 1 h, 一抗 4°C 过夜孵育, TBST 洗膜 5 min×4 次, 二抗室温孵育 1 h, TBST 洗膜 5 min×4 次。采用 ECL 化学发光法显影。

1.3.8 CCK8 细胞增殖实验

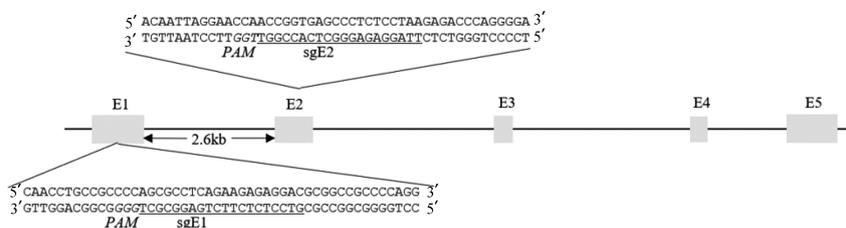


图 1 sgRNA 位点

Figure 1 Locus of sgRNA

表 1 sgRNA oligo 序列

Table 1 Sequence of sgRNA oligo

序列名称 Sequence name	序列 (5'→3') Sequence
sgE1-T	<u>CACCGTCTCTCTTCTGAGGGCT</u>
sgE1-B	<u>AAACAGCGCCTCAGAAGAGAGAC</u>
sgE2-T	<u>CACCGTTAGGAGAGGGCTACCGGT</u>
sgE2-B	<u>AAACACCGGTGAGCCCTCTCTAAC</u>

注: 下划线为接头序列; 斜体为额外添加的 G。
 Note. Adaptor is marked by underline. Additional G is marked by italic.

表 2 qPCR 引物

Table 2 qPCR amplification primers

基因 Gene	方向 Direction	序列 (5'→3') Sequence
<i>HMGA2</i>	F	CAGCAAGAACCAACCGGTGA
	R	CTTGGCCGTTTTTCTCCAGTG
<i>GAPDH</i>	F	GGCAAATTCATGGCACCGT
	R	TGTTTCACACCCATGACGAA

用 0.25% 胰酶消化细胞,制成单细胞悬液。将细胞密度调整为每毫升 1×10^4 个,每孔 200 μL 。加入 96 孔板中,每个样品 6 个重复,置于 37°C , 5% CO_2 培养箱中培养。分别在 0 h, 24 h, 48 h, 72 h 和 96 h 每孔加入 10 μL CCK8, 37°C 避光孵育 4 h, 用酶标仪测定 450 nm 处吸光度。用样品吸光度减去空白吸光度得到相对吸光度值,采用 Graphpad prism 5 软件绘制生长曲线。

1.3.9 克隆形成实验

用 0.25% 胰酶消化细胞,制成单细胞悬液,以 1000 个/孔将细胞均匀铺到六孔板中,每 3 d 换一次液。待长出肉眼可见单克隆后,采用 4% 多聚甲醛固定细胞,1% 结晶紫溶液染色,计数细胞数大于 50 的单克隆数量。

1.3.10 肿瘤迁移与侵袭实验

用胰酶消化细胞后,将细胞移入离心管中,1000 r/min 离心 5 min, PBS 洗两遍并用无血清培养基重悬细胞,将细胞密度调整为每毫升 5×10^5 个。对于迁移实验,每个 Transwell 上室加入 100 μL 细胞悬液,下室加入 600 μL 含 10% FBS 的全培,培养箱中孵育 24 h; 对于侵袭实验,先以 1:8 的比例于冰上采用无血清培养基稀释 Matrigel 胶,每个 Transwell 上室加 70 μL 稀释的 Matrigel 胶,培养箱中孵育 6 h, 待胶完全凝固后,下室加入 600 μL 含 10% FBS 的全培,培养箱中孵育 30 min, 向上室中轻柔加入 200 μL 细胞悬液,培养箱中孵育 24 h。取出上室, PBS 洗 3 遍后用棉签擦去上室孔内的细胞与 Matrigel 胶,4% 多聚甲醛固定 15 min, 结晶紫溶液染色 10 min, 在 10×10 倍镜下随机选取十个视野,计数细胞数量。

1.4 统计学方法

用 SPSS 24.0 进行数据处理以及统计学分析,结果以平均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。组间比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 认为有统计学意义。

2 结果

2.1 PX458-sgRNA 载体鉴定

将两对 sgRNA oligo 退火形成双链后连接到经 Bbs I 酶切的 PX458 质粒上,转化入大肠杆菌并挑取单克隆菌落,经 PCR 鉴定后将阳性质粒测序。测序结果显示两对 sgRNA 均正确插入到酶切位点内(图 2)。

2.2 细胞敲除株鉴定

将两对 PX458-sgRNA 载体混合转染 HepG2 细胞,采用有限稀释法获得单克隆细胞集落,用一对鉴定引物,采用短片段扩增程序进行 PCR 鉴定,敲除株由于大片段删除可以得到 400 bp 左右的片段(图 3A)。将扩增片段测序,结果显示在 sgRNA 位点处存在套峰,即插入/缺失突变(图 3B)。进一步基因型分析显示,敲除株的基因组存在大片段缺失(表 3)。对敲除株细胞进行 RT-qPCR 检测,结果表明在 mRNA 水平上 *HMGA2* 的表达已有大幅度下降 ($P < 0.01$, 图 3C)。Western blot 检测显示已经完全没有 *HMGA2* 蛋白的表达(图 3D)。综合结果可知,获得的细胞株为 *HMGA2*^{-/-} 细胞株。

2.3 *HMGA2* 敲除引起细胞增殖速率的改变

采用 CCK8 细胞增殖实验以及克隆形成实验检测细胞的增殖能力以及克隆形成能力。CCK8 实验表明,*HMGA2* 敲除后细胞的增殖速率明显减慢(图 4A); 而克隆形成实验也表明 *HMGA2* 敲除引起克隆形成能力减弱,细胞存活率降低 (121.83 ± 21.68 vs 59.50 ± 20.68 , $P < 0.01$, 图 4B)

2.4 *HMGA2* 敲除对于肿瘤细胞迁移与侵袭的影响

Transwell 迁移实验表明,相对于野生型,*HMGA2* 敲除后 HepG2 的迁移能力明显减弱 (359.67 ± 32.53 vs 245.61 ± 24.23 , $P < 0.05$) (图 5)。Transwell 侵袭实验也表明 *HMGA2* 的敲除也会导致 HepG2 细胞体外侵袭能力减弱 (251.33 ± 43.43 vs 47.00 ± 10.00 , $P < 0.01$) (图 5)。

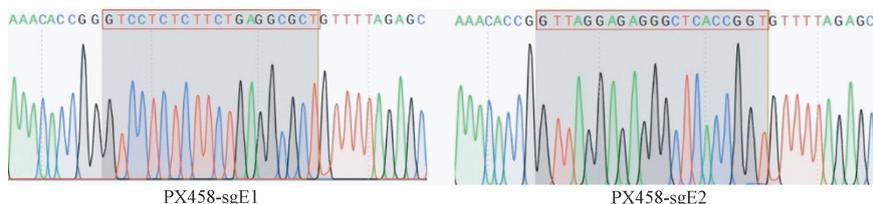
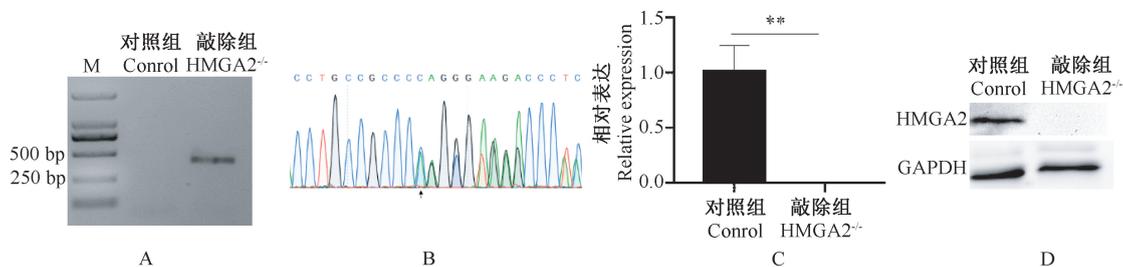


图 2 PX458-sgRNA 载体测序结果

Figure 2 Sequencing results of PX458-sgRNA vectors



注:A:PCR 鉴定大片删除(M:DL1000 marker);B:Sanger 测序显示在 sgRNA 位点处存在插入/缺失突变;C:RT-qPCR 检测 mRNA 表达水平;D:Western blot 检测 HMGA2 蛋白水平表达。与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 3 细胞敲除株鉴定结果

Note. A, Larger fragment deletion was tested by RCR (M, DL 1000 marker). B, Indel in sgRNA locus was investigated by Sanger sequencing. C, Expression levels were measured by RT-qPCR. D, Western blot to analyze HMGA2 protein upon knockout *HMGA2*. Compared with control group, ** $P < 0.01$.

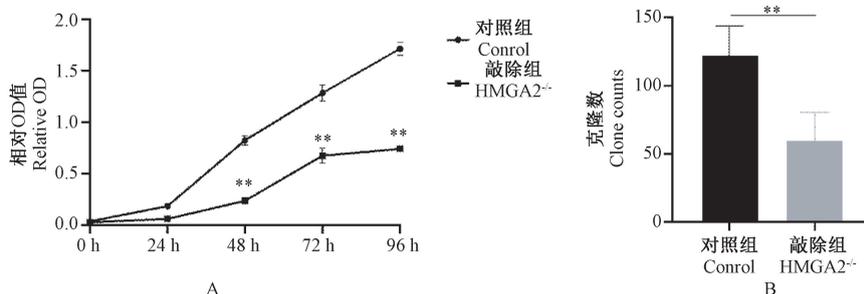
Figure 3 Identification of knockout cell line

表 3 细胞株基因型
Table 3 Genotypes of cell line

表型 Phenotype	序列(5'→3') Sequence	基因型 Genotype
对照组 Control	CCTGCCGCCCCAGCGCCTCAGAAGAGAGGAC GCGGCCGCCCCAGGAAGCAGCAGCAA TCACAATTAGGAACCAACCGGTGAGCCCTCTCCTAAGAGA CCCAGGGGAAGACCCAAA GGCAGCAAAAA	WT 2.61 kb
敲除组 HMGA2 ^{-/-}	CCTGCCGCC-----G----- ---CCCAGGGGAAGACCCAAAGGCAGCAAAAA CCTGCCGCCCCAGCG----- -GTGAGCCCTCTCCTAAGAGACCCAGGGGAAGACCCAAAGGCAGCAAAAA	-2.696 kb / -2.671 kb

注:下划线为 sgRNA 位点。

Note. The sgRNA locus were marked by underline.

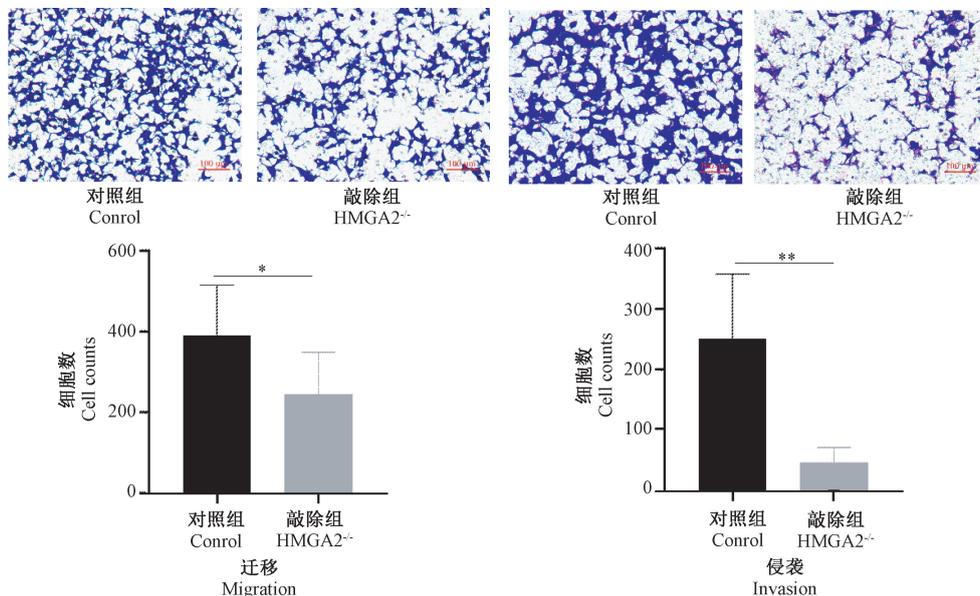


注:A:CCK8 实验检测细胞增殖速率;B:克隆形成实验检测细胞克隆形成能力。与对照组比较, ** $P < 0.01$ 。

图 4 HMGA2 敲除对于细胞增殖的影响

Note. A, Proliferation rates were evaluated via CCK8 trial. B, Ability of clone formation was investigated by clone formation assay. Compared with control, ** $P < 0.01$.

Figure 4 Effect of proliferation in HMGA2 knockout



注:与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

图5 HMGA2 敲除对于细胞迁移与侵袭的影响

Note. Compared with control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

Figure 5 Effect of HMGA2 knockout on migration and invasion

3 讨论

人类 *HMGA2* 基因位于染色体 12q15 区域,其编码的蛋白属于高迁移率蛋白家族成员,主要作为一种转录调控因子,通过蛋白-蛋白或者蛋白-DNA 互作调控靶基因的表达。有研究表明,*HMGA2* 主要在胚胎早期以及肿瘤细胞中高表达,而在正常成体组织中则表达量很低或不表达,提示 *HMGA2* 对于胚胎早期的正常发育极为重要,同时也是一个重要的致瘤因子。Yang 等^[13]发现沉默 *HMGA2* 抑制急性髓性白血病细胞的迁移、侵袭以及生存能力,增强其凋亡速率以及对药物的敏感性。同样的,Zhu 等^[14]沉默鳞状细胞癌中的 *HMGA2* 也引起细胞中 EMT 有关基因的下调,而过表达则可使癌细胞获得干细胞样特征。对胃癌的病例研究发现,*HMGA2* 有助于胃癌的血管生成,从而促进癌细胞的生长,此外还与肿瘤患者的预后不良有关^[15]。但是对自发性胰腺癌小鼠的研究发现,*HMGA2* 敲除鼠与野生型鼠在胰腺癌的发生率、对药物的敏感性以及预后等指标上并没有太大差别,表明 *HMGA2* 作为胰腺癌分子标记以及预后标志物还有待商榷^[16]。本研究发现在肝癌细胞系 HepG2 中敲除 *HMGA2* 后细胞的迁移与侵袭能力显著降低,表明 *HMGA2* 也与肝癌细胞的迁移与侵袭有关。此外,通过对原发性

肝癌的病例研究也发现 *HMGA2* 阳性患者明显预后不良^[17],提示 *HMGA2* 也可能作为评估肝癌预后的分子标记。

HMGA2 除了与细胞的迁移、侵袭以及肿瘤预后有关外,还与肿瘤细胞的增殖与抗凋亡有关。研究表明,在急性髓性白血病细胞中,*HMGA2* 主要通过 PI3K/Akt/mTOR 通路促进癌细胞的生长增殖,*HMGA2* 的敲除会引起细胞 G2/M 期阻滞^[18]。在膀胱癌中,*HMGA2* 抑制了 TGF- β /Smad 通路以及 Wnt/ β -catenin 通路,同时沉默 *HMGA2* 降低了 MMP2 以及 MMP9 的表达水平,提高了癌细胞的凋亡速率^[9]。与此类似,李鹏等^[19]发现敲减 *HMGA2* 抑制了 TGF- β 1 诱导的人胚肾成纤维细胞的胶原合成,促进了 ROS 的产生。ROS 的产生则会引发细胞的凋亡反应,有助于阻止癌细胞的生长。Wang 等^[20]研究发现 *HMGA2* 的三个 AT-hook 区可以与 P53 结合,从而提高 P53 泛素化水平,加快 P53 蛋白的降解。本研究通过 CCK8 实验以及克隆形成实验表明,*HMGA2* 敲除也同样引起了 HepG2 细胞的增殖速率以及克隆形成能力的显著降低,但具体的分子机制还有待进一步阐明。

综上所述,*HMGA2* 在多种肿瘤中均发挥了促进肿瘤细胞增殖,增强迁移与侵袭能力以及降低细胞凋亡速率等作用。与此类似,本研究发现 *HMGA2*

在肝癌细胞 HepG2 中也发挥相似的功能, 敲除 HMGA2 显著抑制了 HepG2 细胞的增殖速率、克隆形成能力、迁移与侵袭能力, 表明 HMGA2 也可能作为一个肝癌治疗的潜在分子靶标。

参考文献:

- [1] Reeves R. Molecular biology of HMGA proteins: hubs of nuclear function [J]. *Gene*, 2001, 277(1-2): 63-81.
- [2] Hock R, Furusawa T, Ueda T, et al. HMG chromosomal proteins in development and disease [J]. *Trends Cell Biol*, 2007, 17(2): 72-79.
- [3] Sarhadi VK, Wikman H, Salmenkivi K, et al. Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer [J]. *J Pathol*, 2006, 209(2): 206-212.
- [4] Oliveira-Mateos C, Sánchez-Castillo A, Soler M, et al. The transcribed pseudogene RPSAP52 enhances the oncofetal HMGA2-IGF2BP2-RAS axis through LIN28B-dependent and independent let-7 inhibition [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 3979.
- [5] Zha L, Wang Z, Tang W, et al. Genome-wide analysis of HMGA2 transcription factor binding sites by ChIP on chip in gastric carcinoma cells [J]. *Mol Cell Biochem*, 2012, 364(1-2): 243-251.
- [6] 徐广薷, 张海娜, 姜丹, 等. 沉默 HMGA2 表达对人结肠癌 HCT116 细胞增殖及侵袭能力的影响 [J]. *癌症进展*, 2019, 17(19): 2255 - 2258, 2325.
- [7] Chen RX, Chen X, Xia LP, et al. N(6)-methyladenosine modification of circNSUN2 facilitates cytoplasmic export and stabilizes HMGA2 to promote colorectal liver metastasis [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 4695.
- [8] Morishita A, Zaidi MR, Mitoro A, et al. HMGA2 is a driver of tumor metastasis [J]. *Cancer Res*, 2013, 73(14): 4289-4299.
- [9] Shi Z, Li X, Wu D, et al. Silencing of HMGA2 suppresses cellular proliferation, migration, invasion, and epithelial-mesenchymal transition in bladder cancer [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(6): 7515-7523.
- [10] Sung YC, Liu YC, Chao PH, et al. Combined delivery of sorafenib and a MEK inhibitor using CXCR4-targeted nanoparticles reduces hepatic fibrosis and prevents tumor development [J]. *Theranostics*, 2018, 8(4): 894-905.
- [11] Mou SJ, Yang PF, Liu YP, et al. BCLAF1 promotes cell proliferation, invasion and drug-resistance through targeting lncRNA NEAT1 in hepatocellular carcinoma [J]. *Life Sci*, 2020, 242: 117177.
- [12] Jiang Y, Sun A, Zhao Y, et al. Proteomics identifies new therapeutic targets of early-stage hepatocellular carcinoma [J]. *Nature*, 2019, 567(7747): 257-261.
- [13] Yang S, Gu Y, Wang G, et al. HMGA2 regulates acute myeloid leukemia progression and sensitivity to daunorubicin via Wnt/beta-catenin signaling [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 44(2): 427-436.
- [14] Zhu M, Zhang C, Chen D, et al. MicroRNA-98-HMGA2-POSTN signal pathway reverses epithelial-to-mesenchymal transition in laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 117: 108998.
- [15] Sun J, Sun B, Sun R, et al. HMGA2 promotes vasculogenic mimicry and tumor aggressiveness by upregulating Twist1 in gastric carcinoma [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 2229.
- [16] Chiou SH, Dorsch M, Kusch E, et al. Hmga2 is dispensable for pancreatic cancer development, metastasis, and therapy resistance [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14008.
- [17] 杨晋, 夏先明, 贺凯, 等. 高迁移率族蛋白 A2 与原发性肝细胞癌患者临床病理特征及其预后的关系 [J]. *中国现代医学杂志*, 2019, 29(24): 49-53.
- [18] Tan L, Wei X, Zheng L, et al. Amplified HMGA2 promotes cell growth by regulating Akt pathway in AML [J]. *J Cancer Res Clin Oncol*, 2016, 142(2): 389-399.
- [19] 李鹏, 刘咏梅, 刘振华. 敲减 HMGA2 基因抑制 TGF-β1 诱导的人胚肺成纤维细胞生长及胶原合成 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(9): 1648-1653.
- [20] Wang Y, Hu L, Wang J, et al. HMGA2 promotes intestinal tumorigenesis by facilitating MDM2-mediated ubiquitination and degradation of p53 [J]. *J Pathol*, 2018, 246(4): 508-518.

[收稿日期] 2020-02-28