

刘艳, 顾鹏, 叶行, 等. *FAH/GSTZ1* 双基因突变肝细胞模型的建立 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(8): 71-78.

Liu Y, Gu P, Ye X, et al. Establishment of *FAH/GSTZ1* dual-gene knockout hepatocyte cell lines [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(8): 71-78.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.08.010

## *FAH/GSTZ1* 双基因突变肝细胞模型的建立

刘艳<sup>1,3</sup>, 顾鹏<sup>4</sup>, 叶行<sup>4</sup>, 梁春锦<sup>4</sup>, 关雅今<sup>1,3</sup>, 张映辉<sup>1,3</sup>,  
邹庆剑<sup>1,3\*</sup>, 顾为望<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1.五邑大学生物科技与大健康学院, 广东 江门 529020; 2.江门市大健康国际创新研究院, 广东 江门 529040;  
3.华南生物医药大动物模型研究院, 广东省医学大动物模型重点实验室, 广东 江门 529728;  
4.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)

**【摘要】** 目的 采用 CRISPR/Cas9 技术敲除人 LO2 肝细胞系的谷胱甘肽 S-转移酶 Z1 (GSTZ1) 和延胡索酰乙酰乙酸水解酶 (FAH), 探讨 *GSTZ1* 和 *FAH* 基因敲除对于肝细胞生长、增殖、迁移的影响。方法 分别构建靶向 *GSTZ1* 和 *FAH* 基因的向导 RNA (sgRNA) 载体, 与 CRISPR/Cas9 载体共转染 LO2 细胞, 通过有限稀释法筛选, 基因型鉴定和 Western blot 实验证实获得的 *FAH* 和 *GSTZ1* 基因的单基因敲除和双基因敲除三种细胞株。进一步对敲除细胞株表型进行鉴定, 通过平板克隆形成实验检测基因敲除肝细胞克隆形成能力; CCK8 实验和 EdU 分析实验测试细胞增殖能力; 划痕实验检测细胞迁移能力。结果 成功获得 *GSTZ1*<sup>-/-</sup>、*FAH*<sup>-/-</sup> 和 *FAH*<sup>-/-</sup>/*GSTZ1*<sup>-/-</sup> 三种基因敲除细胞株。相比于野生型细胞, 三种细胞株在增殖能力, 克隆形成能力、迁移能力均有显著增加, 其中 *FAH* 敲除对细胞表型的影响相对较小, *GSTZ1* 敲除对肝细胞活性提高最强, 双基因敲除细胞活性处于两个单基因敲除之间。结论 我们首次成功建立了 *FAH/GSTZ1* 双基因突变肝细胞株, 为酪氨酸代谢通路研究和 I 型遗传性酪氨酸血症治疗研究提供了一个新型的细胞模型。

**【关键词】** CRISPR/Cas9 技术; 双基因敲除; *GSTZ1*; *FAH*; LO2 细胞系

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 08-0071-08

## Establishment of *FAH/GSTZ1* dual-gene knockout hepatocyte cell lines

LIU Yan<sup>1,3</sup>, GU Peng<sup>4</sup>, YE Xing<sup>4</sup>, LIANG Chunjin<sup>4</sup>, GUAN Yajin<sup>1,3</sup>, ZHANG Yinghui<sup>1,3</sup>,  
ZOU Qingjian<sup>1,3\*</sup>, GU Weiwang<sup>1,2,3,4\*</sup>

(1. School of Biotechnology and Health Sciences, Wuyi University, Jiangmen 529020, China. 2. International Healthcare Innovation Institute, Jiangmen 529040. 3. Guangdong Provincial Key Laboratory of Large Animal models for Biomedicine, South China Institute of Large Animal Models for Biomedicine, Jiangmen 529728.  
4. Laboratory Animal Center & Institute of Comparative Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515)

**【Abstract】** **Objective** CRISPR/Cas9 technology was used to knock out glutathione S-transferase zeta 1 (GSTZ1) and fumarate acetoacetate hydrolase (FAH) in human LO2 liver cell line, to explore the effect of *GSTZ1* and *FAH* on the growth, proliferation and migration of hepatocytes. **Methods** Guide RNAs (sgRNAs) targeting *GSTZ1* and *FAH* genes were constructed, and co-transfected with CRISPR/Cas9 vector into LO2 cells. Three cell lines *GSTZ1*<sup>-/-</sup>, *FAH*<sup>-/-</sup> and

[基金项目] 江门市创新团队项目 (2017TD02)。

[作者简介] 刘艳 (1994—), 女, 硕士研究生, 研究方向: 基因修饰细胞模型研究。E-mail: 1473509368@qq.com

[通信作者] 邹庆剑 (1982—), 男, 副教授, 硕士生导师, 研究方向: 大动物模型与干细胞治疗。E-mail: wyuchemzqj@126.com

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

FAH<sup>-/-</sup>/GSTZ1<sup>-/-</sup> were identified by sequencing and Western blot. The cells were used for further analysis, including the ability of hepatocyte clone formation, cell proliferation and cell migration. **Results** Three cell lines GSTZ1<sup>-/-</sup>, FAH<sup>-/-</sup> and FAH<sup>-/-</sup>/GSTZ1<sup>-/-</sup> were successfully established. Compared with wild-type cells, all of three edited cell lines showed higher ability of proliferation, clone formation and migration. FAH mutation has limited effect on cell phenotype, while GSTZ1 deletion greatly improved activity of the hepatocytes. The dual-gene knockout cells demonstrated moderate activity between two single mutants. **Conclusions** FAH/GSTZ1 dual-mutated hepatocyte cell lines were established for the first time, which provides a new cell model for the study of tyrosine metabolism pathway and hereditary tyrosinemia type I (HT1) therapy.

**【Keywords】** CRISPR/Cas9; dual-gene knockout; GSTZ1; FAH; LO2 cell line

人延胡索酰乙酰乙酸水解酶 (fumaroylacetate hydrolase, FAH) 位于染色体 15q25.1, 主要在肝和肾中表达, 是酪氨酸代谢通路最后一步的酶<sup>[1]</sup>。FAH 缺失会导致其上游中间代谢产物在肝细胞中积累, 并通过旁代谢通路转化为琥珀酰乙酰乙酸 (succinylacetate, SAA) 和琥珀酰丙酮 (succinylacetone, SA)<sup>[2]</sup>。这两种代谢产物与其它蛋白的巯基结合, 影响其功能, 最终造成肝、肾损伤, 形成 I 型遗传性酪氨酸血症 (HT1)<sup>[3]</sup>, 大多数 HT1 患者在婴儿早期就会死于急性严重的肝肾功能衰竭<sup>[4]</sup>。HT1 目前的治疗方法主要通过饮食、药物或肝移植治疗控制疾病, 降低血酪氨酸及其代谢产物水平, 减轻酪氨酸及其代谢产物对机体的损伤, 目前没有简便且有效的治愈方法。

肝中的谷胱甘肽 S-转移酶-Z1 (glutathione S-transferase zeta 1, GSTZ1) 是酪氨酸代谢通路的倒数第二个酶, 属于谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 超家族新成员。催化马来酰乙酰乙酸酯 (maleylacetate, MAA) 异构化为延胡索酰乙酰乙酸 (fumarylacetate, FAA)<sup>[5]</sup>。作为 GST 家族的一员, GSTZ1 还能催化二氯乙酸盐 (dichloroacetate, DCA) 氧化生成乙醛酸, 并可能参与外源  $\alpha$ -卤酸代谢<sup>[6-7]</sup>。人 GSTZ1 基因定位于人类染色体 14q24.3, 长度为 10.9 kb<sup>[8]</sup>, 主要在肝中表达, 编码 216 个氨基酸组成, 分子量在  $24 \times 10^3$  左右<sup>[9]</sup>。研究发现 GSTZ1 在肝细胞癌 (HCC) 中显著下调<sup>[10]</sup>, 提示 GSTZ1 的表达降低可能导致了细胞的活性增强, 但具体机制未知。

HT1 主要病因是 FAH 的功能缺失, 酪氨酸代谢通路中其它酶的作用需要进一步了解。通过基因编辑分析各个基因对该疾病的影响, 可以更好地了解该疾病的具体发病机制。然而, 受到伦理道德的限制, 很多研究无法直接在人体中进行, 必须首先通过细胞以及动物实验对疾病做相应的研究论证。

本研究拟通过建立 FAH/GSTZ1 双突变肝细胞模型, 研究 GSTZ1 的敲除对 FAH 缺失所导致的肝损伤是否具有影响, 进一步研究两个基因在肝损伤中的作用, 以及探索新的 HT1 肝损伤治疗方案。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

#### 1.1.1 细胞系

人正常肝细胞系 LO2 来自南方医科大学实验室, 人胚肾细胞 HEK293T、感受态细胞 DH5 $\alpha$  由本实验室保存。

#### 1.1.2 载体质粒

LentiCRISPR V2 和 PX458 载体均购自 Addgene。

### 1.2 主要试剂与仪器

DMEM 高糖培养基 (Gibco; C11995500BT)、胎牛血清 (Gibco; 10270106)、Opti-MEM<sup>®</sup> (Gibco; 1119701)、0.25% 胰酶 (Gibco; 25200056); 无血清细胞冻存液 (新赛美生物科技有限公司; C40100); 转染试剂 lipofectamine 2000 (Invitrogen; 2004957); 嘌呤霉素无菌溶液 (Meilunbio; MA0318); 全蛋白提取试剂盒 (凯基生物; KGP250); 蛋白 BCA 定量试剂盒 (Biosharp; BL521A)、ECL 化学发光试剂盒 (Biosharp; BL520A); PVDF 膜 (Millipore; TPVH00011); GSTZ1 单克隆抗体 (Proteintech; 14889-1-AP); FAH 抗体 (K004637P)、GAPDH 抗体 (K200057 M)、二抗羊抗兔 (SE134) 和二抗羊抗小鼠 (SE131)、CCK8 试剂 (CA1210)、1% 结晶紫染液 (G1062) 均购自 Solarbio; T4 PNK 磷酸酶 (M0201 S)、BsmBI (R0580 L) 和 BbsI (00397116) 限制性内切酶均购自 NEB; T4DNA 连接酶 (TaKaRa; M0202 S); EdU 检测试剂盒 (BBI; E607204-0100); 基因组 DNA 提取试剂盒 (TIANGEN; DP304); 无内毒素质粒大提试剂盒 (TIANGEN; DP117-TA)。

细胞培养皿、Transwell 小室、离心管、细胞冻存管 (Corning); CO<sub>2</sub> 细胞培养箱、生物安全柜和 NanoDrop 2000 (Thermo Scientific); PCR 扩增仪、电泳仪、凝胶自动成像仪、荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad); 超纯水仪 (ELGA); 低速离心机 (Eppendorf); 旋涡振荡器 (QILINBEIER); 倒置荧光显微镜 (Nikon)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 基因敲除载体构建

##### (1) GSTZ1 位点基因编辑质粒的构建

通过 GeneBank 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 查找人的 GSTZ1 基因组序列。在人 GSTZ1 基因第 6 号外显子 (E6) 上找到 N<sub>20</sub>NGG 的靶向序列, 合成相应的两条互补的单链引物 (表 1), 退火形成双链 DNA 片段。LentiCRISPR V2 载体用 BsmBI 酶切, 回收后与双链 DNA 片段在 T4 DNA 连接酶作用下, 16℃ 进行连接反应。将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态后涂板, 利用无内毒素质粒提取试剂盒提取质粒 DNA, 并送测序分析。测序正确的质粒称为 LentiCRISPR-V2-sgRNA<sup>GSTZ1</sup>, 将用于细胞转染。

##### (2) FAH 位点基因编辑质粒的构建

在 GeneBank 网站查找人的 FAH 基因组序列。在人 FAH 基因第 7、8 号外显子 (E7、E8) 上找到两个 N<sub>20</sub>NGG 的靶向序列, 合成相应的两条互补的单链引物 (表 1), 退火形成双链 DNA 片段。PX458 载体用 BbsI 酶切, 回收后与双链 DNA 片段在 T4 DNA 连接酶作用下, 16℃ 进行连接反应。将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态后涂板, 利用无内毒素质粒提取试剂盒提取质粒 DNA, 并送测序分析, 将序列正确的质粒 (PX458-sgRNA<sup>FAH</sup>) 用于细胞转染。

#### 1.3.2 GSTZ1 基因敲除细胞的构建

##### (1) 慢病毒包装

HEK293 T 细胞培养基为 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 培养条件为 37℃、5% CO<sub>2</sub>。转

染前 1 d 铺 60% 汇合度的 HEK293 T 细胞于 60 mm 培养皿中, 24 h 后进行转染, 转染试剂为脂质体 lipofectamine 2000, 将 LentiCRISPR-V2-sgRNA<sup>GSTZ1</sup> 与包装质粒 pMD2. G、pSPAX2 按照质量比 4:1:3 的比例混合后转染 HEK293 T 细胞, 8 h 后换成新鲜培养基培养, 于 48、72 h 后分别收集培养基上清液, 3000 r/min 离心 5 min 去除细胞碎片, 0.45 μm 滤膜过滤, 并将病毒上清液分装为每管 1 mL, -80℃ 冰箱保存备用。

##### (2) 慢病毒感染 LO2 细胞

LO2 细胞培养基为 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基, 培养条件为 37℃、5% CO<sub>2</sub>。慢病毒感染前 1 d 铺 40% 汇合度的 LO2 细胞于 6 孔板, 12 h 后加入 1 mL 的慢病毒上清液感染 LO2 细胞。

##### (3) 摸索嘌呤霉素杀伤 LO2 细胞的最适工作浓度

将 40% 汇合度的 LO2 细胞铺于 6 孔板中, 12 h 后加入不同浓度梯度的嘌呤霉素 (0、0.1、1、4.5 μg/mL) 至细胞培养基中。48 h 后观察细胞存活情况, 选取细胞全部死亡的最低浓度为后续筛选的工作浓度。

#### 1.3.3 筛选 GSTZ1 敲除细胞株

慢病毒感染 LO2 细胞 2 d 后, 加含嘌呤霉素的培养基筛选。待对照组 LO2 细胞全部被杀死后, 将感染慢病毒的 LO2 细胞用胰酶消化, 利用有限稀释法将细胞稀释成每毫升 100 个细胞, 取 10 μL 加入 96 孔板中继续培养。1 周后待单个细胞长成细胞团后, 消化传代继续扩增培养。取单克隆细胞株部分细胞提取基因组 DNA, 利用鉴定引物 (表 2) 进行 PCR 扩增并测序分析。将具有目标基因突变的细胞株进行扩大培养和冻存保存。

#### 1.3.4 FAH 基因敲除细胞株的筛选

将构建好的 PX458-sgRNA<sup>FAH</sup> 共转染进野生型 (wild type, WT) LO2 细胞和 GSTZ1 敲除的 LO2 细胞, 转染试剂为 lipofectamine 2000, 转染过程按照说明书操作。转染 12 h 后, 换成 10% 胎牛血清的 DMEM 高糖培养基继续培养。48 h 后, 用胰酶消

表 1 基因编辑引导 RNA 引物

Table 1 Design of primers for guide RNA construction

引物 Primers	序列 (5'-3') Sequence
gGSTZ1-F	caccGCCGAGAACGCCATCACTTG
gGSTZ1-R	aaacCAAGTGATGGCGTTCTGGGC
gFAH e7-F	caccGTGTCTGGCACCCTCAATCCGA
gFAH e7-R	aaacTCGGATTTGGGTGCCAGACAC
gFAH e8-F	caccGTTGCAGGCACCATATACGGG
gFAH e8-R	aaacCCCGTATATGGTGCCTGCAAC

表 2 基因编辑鉴定引物

Table 2 Primers for gene editing identification

引物 Primers	序列 (5'-3') Sequence	产物大小 Product size
GSTZ1-F	CACTCCCTCTCCTCAGAA	814 bp
GSTZ1-R	CTCCGCACAGACAATCAC	
FAH-F	TTTCTCAGGCTGCCTTACC	673 bp
FAH-R	CATGGCACCGAATAGACTACAA	

化,利用有限稀释法将细胞稀释成每毫升 100 个细胞,取 10  $\mu$ L 加入 96 孔板中继续培养。一周后待单个细胞长成细胞团后,消化传代继续扩增培养。取单克隆细胞株部分细胞提取基因组 DNA,利用鉴定引物(表 2)进行 PCR 扩增并测序分析。将具有目标基因突变的细胞株进行扩大培养和冻存保存。

### 1.3.5 敲除细胞株功能学实验

#### (1) Western blot 检测 GSTZ1、FAH 蛋白表达情况

收集细胞后,利用全蛋白提取试剂盒提取细胞总蛋白,取 10  $\mu$ L 进行凝胶电泳。SDS-PAGE 分离胶和浓缩胶分别按照浓度为 10% 和 5% 配制,电压为恒压 80 V, 30 min; 120 V, 40 min。再电转入 PVDF 膜,电流 200 mA, 120 min。5% BSA 封闭 2 h, GSTZ1、FAH 的抗体以及 GAPDH 内参抗体作为一抗分别 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用 TBST 室温摇床洗膜 4 次,加入二抗后室温孵育 1 h。最后加入 ECL 显色后,观察拍照。

#### (2) CCK8 检测细胞增殖

将 GSTZ1、FAH 敲除细胞及亲本对照组细胞胰酶消化后计数,以每孔  $1 \times 10^4$  密度铺至 96 孔板中,每个样品 6 个重复。同时以全培为空白对照,分别在 0、6、12、24 和 48 h 加入 10  $\mu$ L CCK8 溶液,37 $^{\circ}$ C 避光孵育 4 h。用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度,用细胞的吸光度扣除空白对照的吸光度,得到相对吸光度值,并进行统计学分析。

#### (3) 克隆形成实验检测细胞增殖

将 GSTZ1、FAH 敲除细胞及亲本对照组细胞胰酶消化后计数,以每孔  $1 \times 10^3$  密度铺至 6 孔板中,正常培养 14 d。待细胞长至肉眼可见的细胞克隆时,去除培养基,采用 PBS 轻柔清洗细胞两次后用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min。然后弃去多聚甲醛,用清水清洗细胞表面,晾干后用 1% 结晶紫染色 10 min。最后用清水洗净染液,于体视显微镜下计数。

#### (4) 划痕实验检测细胞迁移

将 GSTZ1、FAH 敲除细胞及亲本对照组细胞胰酶消化后计数,以每孔  $5 \times 10^4$  密度铺置 6 孔板中。待细胞长满后,使用 200  $\mu$ L 枪头划痕细胞,洗去细胞碎片,换成 2% 胎牛血清的新鲜培养基继续培养。间隔 72 h 后再次拍照,计算细胞相对迁移距离比(0 h 距离-72 h 距离)/0 h 距离。

#### (5) EdU 分析

将 GSTZ1、FAH 敲除细胞及亲本对照组细胞使

用 EdU 细胞增殖试剂盒评估其增殖能力。将 60% 汇合度细胞铺至 24 孔板中,12 h 后换成  $1 \times \text{EdU}$  标记培养基继续孵育细胞 2 h,采用 PBS 轻柔清洗细胞两次后用 4% 多聚甲醛固定细胞 15 min,弃去多聚甲醛,利用 PBS 清洗细胞两次。按照说明书将  $1 \times$  反应缓冲液、催化剂溶液、TAMRA 红色荧光溶液和缓冲添加剂按照一定比例配制检测混合液,将其加入细胞中并室温避光孵育 30 min,利用 PBS 清洗细胞。检测前,用 PBS 将 Hoechst 稀释成  $1 \times$  染色液,室温避光孵育 30 min,用荧光显微镜拍照观察。

### 1.4 统计学方法

用 Graphpad prism 8.0 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 LO2 细胞筛选条件测试

LO2 细胞为正常人源肝细胞,目前还没有文献对其进行嘌呤霉素敏感性实验。我们在正常培养的 LO2 细胞培养基中设置了 4 组不同浓度梯度的嘌呤霉素,发现最高浓度 4.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  嘌呤霉素可在 48 h 杀死全部野生型 LO2 细胞(图 1)。因此在后续实验中,筛选基因编辑细胞系均采用终浓度 4.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的嘌呤霉素。

### 2.2 细胞敲除模型的构建

#### 2.2.1 GSTZ1 基因敲除细胞株的构建

LO2 细胞的 GSTZ1 基因敲除位点设计在基因的第 6 号外显子(图 2A)。LentiCRISPR V2-sgRNA<sup>GSTZ1</sup> 构建成功,并包装获得慢病毒颗粒,进而感染 LO2 细胞,获得 10 株细胞克隆。基因组 PCR 和测序显示除了野生型序列外,共有 6 种突变形式,从缺失 1~35 bp 不等(图 2B)。其中克隆 #6 在 gRNA 靶位点删除了 5 bp,导致移码突变,提前形成终止密码 TAA(图 2C),将会导致表达出截短的无功能的 GSTZ1 蛋白。将这个细胞克隆株进行扩大培养,作为后续实验使用。

#### 2.2.2 FAH 基因敲除细胞株的构建

进一步在 FAH 基因的第 7 和第 8 外显子分别设计两个基因编辑靶位点。将两个基因编辑质粒共转染到野生型 LO2 细胞和 GSTZ1 突变的 LO2 细胞中。通过有限稀释法筛选,分别获得了 6 株细胞克隆,PCR 和测序结果显示主要有 7 种突变形式,包括大片段删除(如删除 159 bp 和 163

bp), 以及单位点或双位点基因编辑(图 2D)。野生型和 *GSTZ1* 突变的 LO2 细胞通过编辑都分别在 *FAH* 基因位点获得了 159 bp 大片段删除的细胞克隆(图 2E)。将这两株细胞分别扩大培养, 进行进一步鉴定实验。

### 2.3 基因编辑 LO2 细胞株 *GSTZ1* 与 *FAH* 蛋白表达

首先对 *GSTZ1* 基因敲除细胞进行 Western blot

检测, 发现与野生型对照组比较, *GSTZ1* 基因敲除后, 相应的蛋白无法检出(图 3A)。随后检测野生型、单个基因敲除和双基因敲除细胞的 *FAH* 蛋白, 发现 *FAH* 基因敲除后, 细胞内源 *FAH* 蛋白不再表达(图 3B)。结果说明通过基因编辑手段可以将 LO2 细胞中的 *GSTZ1* 和 *FAH* 基因进行单独和双敲除, 实现相应蛋白的彻底失活。

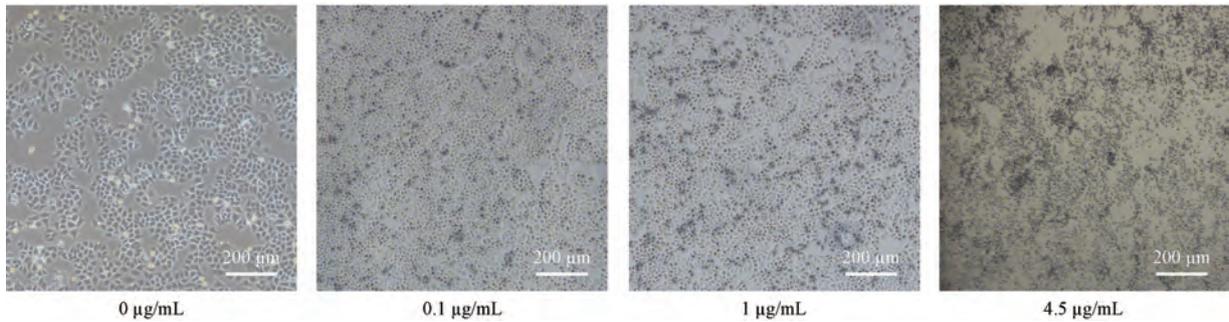
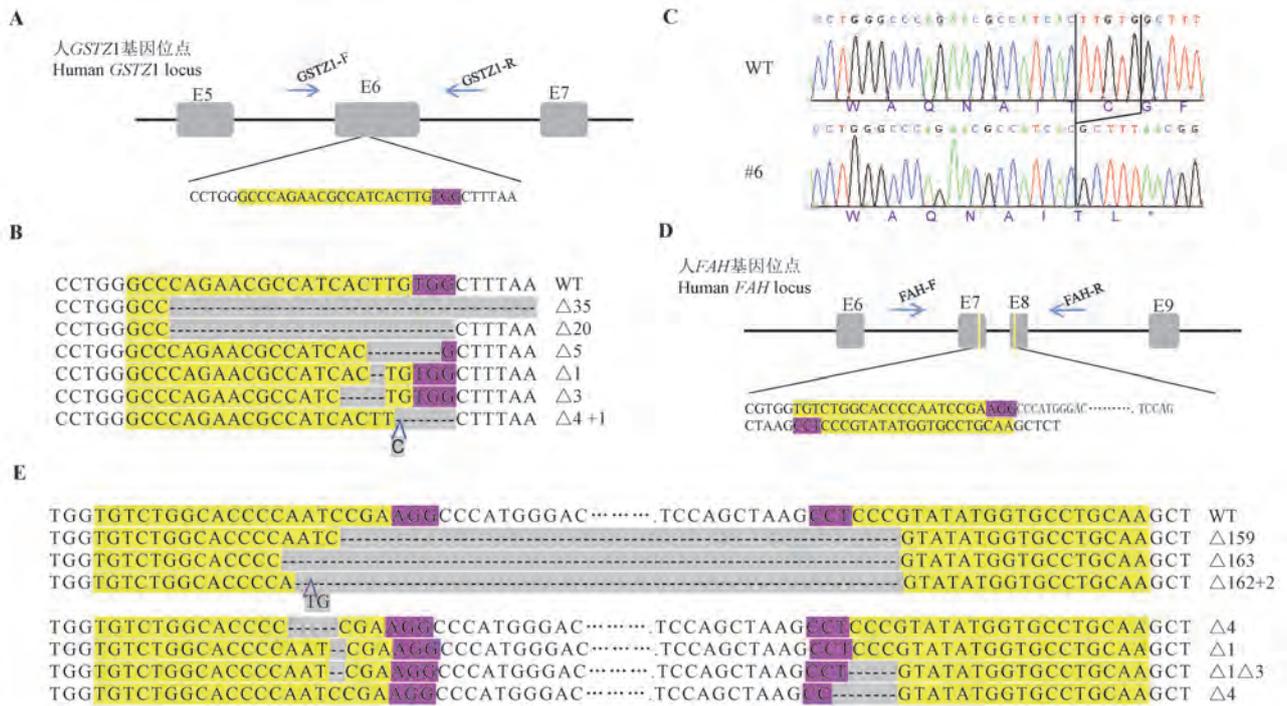


图 1 LO2 细胞对 puromycin 药物浓度的耐受测试

Figure 1 Sensitivity of LO2 cells to puromycin



注: A: 人 *GSTZ1* 基因打靶位点设计示意图; B: 筛选的 *GSTZ1* 基因敲除细胞克隆基因型鉴定; C: 野生型与基因编辑细胞基因打靶位点的测序比较以及相应密码子比较; D: 人 *FAH* 基因打靶位点设计示意图; E: 筛选的 *FAH* 基因敲除细胞克隆基因型鉴定。

图 2 人 *GSTZ1* 和 *FAH* 双基因敲除 LO2 细胞株的建立

Note. A, Schematic diagram of the design at human *GSTZ1* gene locus. B, Genotype analysis of *GSTZ1* knockout cell clones. C, Sequencing analysis at gene targeting sites in wild-type and gene-targeted cells. D, Schematic diagram of gene targeting site design at human *FAH* gene locus. E, Genotype analysis of *FAH* knockout cell clones.

Figure 2 Establishment of LO2 cell line with human *GSTZ1* and *FAH* dual-gene knockout

## 2.4 GSTZ1、FAH 敲除对 LO2 细胞增殖能力的影响

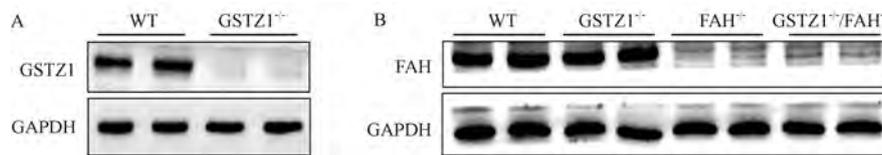
CCK8 细胞增殖实验显示 *GSTZ1*、*FAH* 基因敲除会显著的增加肝细胞的增殖速率(图 4A)。进一步,我们利用克隆形成实验检测,同样发现敲除 *GSTZ1*、*FAH* 基因后,肝细胞克隆形成能力也明显增加(图 4B~4C)。另外,我们还通过 EdU 染色实验再次证实 *GSTZ1*、*FAH* 基因敲除均显著增加 LO2 细胞的增殖能力(图 4D~4E)。

3 个独立的测试方式均显示 *GSTZ1* 基因的敲除可大幅提高肝细胞 LO2 的增殖活性。*FAH* 基因的敲除也能显著提高 LO2 细胞的活力,但提高幅度大

大低于 *GSTZ1* 敲除。并且在 *FAH* 敲除细胞的基础上,敲除 *GSTZ1* 可进一步提高 LO2 细胞的增殖活力。

## 2.5 划痕实验检测细胞增殖能力

为验证基因敲除是否影响 LO2 细胞的迁移能力,我们利用划痕实验观察到 72 h 的 *GSTZ1* 敲除细胞株的相对迁移比为  $(0.4 \pm 0.012)$ , 是野生型 LO2 细胞的 10 倍(图 5)。*FAH* 敲除细胞株的相对迁移比为  $(0.2 \pm 0.014)$ , 显著高于野生型细胞株。*GSTZ1* 和 *FAH* 双敲除细胞株的相对迁移比为  $(0.25 \pm 0.021)$ , 并且 *GSTZ1* 和 *FAH* 双敲除可进一步提高细胞迁移能力。

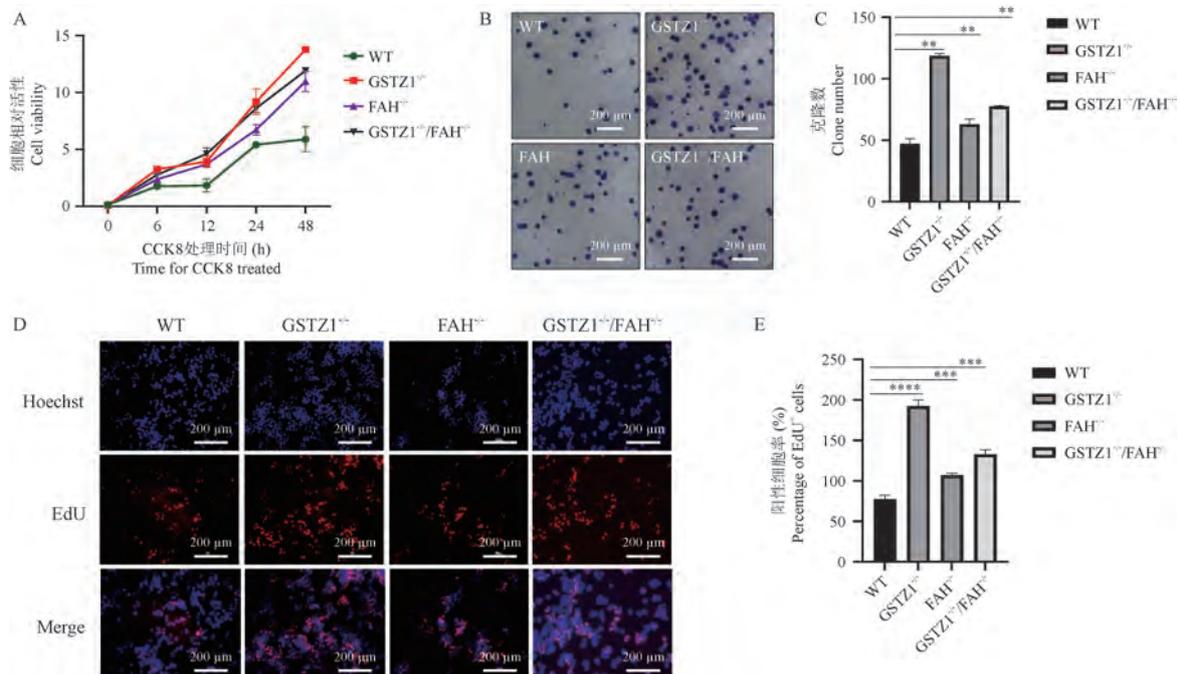


注:A;Western blot 检测 GSTZ1 蛋白的表达情况;B;Western blot 检测 FAH 蛋白的表达情况。

图 3 蛋白水平检测 GSTZ1 和 FAH 的表达

Note. A, GSTZ1 protein detected by Western blot. B, FAH protein detected by Western blot.

Figure 3 GSTZ1 and FAH protein test by Western blot assay



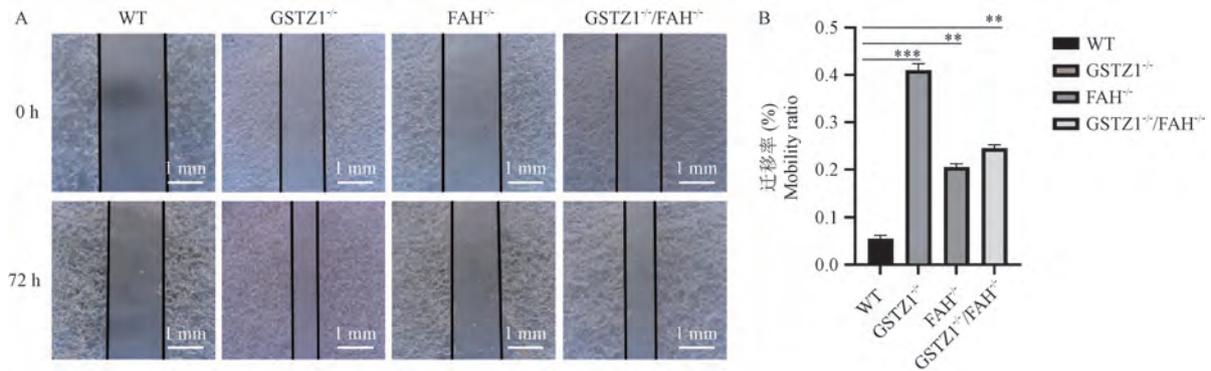
注:A;CCK8 实验测试基因突变细胞的增殖能力;B;结晶紫染色测定克隆形成能力;C;细胞克隆数目比较;D;EdU 染色在荧光显微镜下成像;E;EdU 阳性细胞含量比较。与野生组比较, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ 。

图 4 *GSTZ1* 和 *FAH* 基因敲除对 LO2 细胞增殖能力的影响

Note. A, Proliferation rates were evaluated via CCK8 trial. B, Colony formation was determined by crystal violet staining. C, Ability of clone formation was investigated by clone formation assay. D, EdU assay for different cell lines. E, percentage of EdU positive cells.

Compared with WT, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

Figure 4 Effect of *GSTZ1* and *FAH* gene knockout on the proliferation of LO2 cells



注:A:显微镜下观察细胞迁移能力;B:细胞迁移速率定量测定。与野生组比较,\*\* $P<0.01$ \*\*,\*\*\* $P<0.001$ 。

图5 *GSTZ1* 和 *FAH* 基因敲除对 LO2 细胞迁移能力的影响

Note. A, Cell migration was observed under a microscope. B, Quantitative determination of cell migration rate. Compared with WT, \*\* $P<0.01$ \*\*, \*\*\* $P<0.001$ .

Figure 5 Effect of *GSTZ1* and *FAH* gene knockout on the migration ability of LO2 cells

### 3 讨论

本研究成功构建了 *GSTZ1* 和 *FAH* 单个基因和双基因敲除肝细胞模型,并比较了不同基因编辑细胞在细胞增殖能力、克隆形成能力、迁移能力等方面的差异。*FAH* 和 *GSTZ1* 都是肝中酪氨酸代谢通路的关键酶<sup>[11]</sup>。*FAH* 的缺乏会导致遗传性 I 型酪氨酸血症,并且会增加肝细胞癌风险<sup>[12]</sup>。迄今为止,关于酪氨酸分解代谢的倒数第二个酶 *GSTZ1* 的研究较少。有研究报道 *GSTZ1* 序列变异引起轻度高琥珀酰丙酮血症,但没有肝功能障碍的证据<sup>[13]</sup>。*GSTZ1* 缺乏导致 GSH 耗竭,随后氧化应激升高和持续的 Nrf2 激活,从而促进肝癌细胞的增殖。但目前为止,*GSTZ1* 在人正常肝细胞中缺失对酪氨酸代谢通路的影响仍然没有确切研究。我们首次在人正常肝细胞中进行 *GSTZ1* 基因突变研究,发现 *GSTZ1* 蛋白功能的缺失对肝细胞活性具有提升作用,并且对 *FAH* 基因突变的肝细胞的活性也有改善作用。

通过对酪氨酸代谢通路的另一个关键酶——羟苯丙酮酸二加氧酶 (4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase, HPD) 的研究,发现 *HPD* 基因敲除能够成功阻止因 *FAH* 基因缺失所导致的急性致死性肝损伤<sup>[14-15]</sup>。*HPD* 基因阻断治疗可以有效促进酪氨酸代谢的重编程,并恢复该条代谢途径中 TAT、HGD 和 *GSTZ1* 的表达,进而减少肝的炎症反应和氧化应激反应。那么同样作为酪氨酸代谢通路上游的酶 *GSTZ1* 是否能达到 *HPD* 对酪氨酸代谢的重编程的效果? 研究首次在人正常肝细胞 LO2 中敲除了 *GSTZ1* 和 *FAH* 基因,在 *FAH* 突变的基础上,进一步

突变了 *GSTZ1*,分别构建了 *FAH* 突变、*GSTZ1* 突变和 *FAH/GSTZ1* 双突变肝细胞模型,Western blot 证实基因突变导致相应蛋白缺失。进一步通过细胞增殖实验和细胞迁移实验,首次发现 *GSTZ1* 基因的敲除可增加 *FAH* 基因突变细胞的活性,并且研究发现 *FAH* 和 *GSTZ1* 双突变肝细胞比 *FAH* 突变肝细胞具有更强的增殖活性和迁移能力。由于 *FAH* 的突变,HT1 患者肝细胞内积累大量有毒物质 FAA,引起肝细胞损伤。此外,FAA 还具有诱变作用,可导致 HT1 中所见的肝癌<sup>[16-17]</sup>。*GSTZ1* 是低毒物质 MAA 转变为 FAA 的关键酶,由于 *GSTZ1* 敲除会激活其依赖的谷胱甘肽非酶通路,积累的 MAA 可以继续转化为 FAA,相比于 *GSTZ1* 正常通路减少了有毒产物 FAA 的积累,因此对肝细胞活性和功能影响较小<sup>[18]</sup>。本实验中,我们发现 *FAH* 的敲除并不会造成 LO2 肝细胞的死亡,相反,细胞活性有一定程度的增强。我们推测 *FAH* 突变导致积累的毒素物质 FAA 和 SA 被释放到了培养基中,稀释了 FAA 对细胞毒性的作用;另一方面,*FAH* 的缺失也会影响细胞周期,促进细胞增殖<sup>[4]</sup>。除此之外,本研究还发现肝细胞系 LO2 中敲除 *GSTZ1* 后细胞的增殖和迁移能力进一步增加,可能是由于毒性中间产物减少造成。另有其它研究证实 *GSTZ1* 基因是一个重要的抑癌因子,突变后也会促进细胞增殖<sup>[19]</sup>。

总之,我们的实验研究发现 *GSTZ1* 基因可能成为 HT1 治疗的潜在靶点。未来的研究可以进一步在 HT1 动物模型上开发针对 *GSTZ1* 的小分子抑制剂或基因编辑治疗,阻断 FAA 的形成,探索 HT1 疾病的治疗新方案。

## 参考文献:

- [ 1 ] Awata H, Endo F, Tanoue A, et al. Structural organization and analysis of the human fumarylacetoacetate hydrolase gene in tyrosinemia type I [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1994, 1226(2): 168-172.
- [ 2 ] Kvittingen EA. Hereditary tyrosinemia type I-an overview [J]. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1986, 184: 27-34.
- [ 3 ] Jorquera R, Tanguay RM. The mutagenicity of the tyrosine metabolite, fumarylacetoacetate, is enhanced by glutathione depletion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 232(1): 42-48.
- [ 4 ] Russo P, O' Regan S. Visceral pathology of hereditary tyrosinemia type I [J]. *Am J Hum Genet*, 1990, 47(2): 317-324.
- [ 5 ] Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, et al. Newborn screening: toward a uniform screening panel and system-executive summary [J]. *Pediatrics*, 2006, 117(2): S296-S307.
- [ 6 ] Cornett R, James MO, Henderson GN, et al. Inhibition of glutathione S-transferase zeta and tyrosine metabolism by dichloroacetate: a potential unifying mechanism for its altered biotransformation and toxicity [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 262(3): 752-756.
- [ 7 ] Tong Z, Board PG, Anders MW. Glutathione transferase zeta-catalyzed biotransformation of dichloroacetic acid and other alpha-haloacids [J]. *Chem Res Toxicol*, 1998, 11(11): 1332-1338.
- [ 8 ] Blackburn AC, Woollatt E, Sutherland GR, et al. Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding the human Zeta class glutathione transferase and maleylacetoacetate isomerase [J]. *Cytogenet Cell Gene*, 1998, 83(1-2): 109-114.
- [ 9 ] Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G, et al. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans [J]. *Biochem J*, 1997, 328(3): 929-935.
- [ 10 ] Wang Z, Dong C. Gluconeogenesis in Cancer: function and regulation of PEPCK, FBPase, and G6Pase [J]. *Trends Cancer*, 2019, 5(1): 30-45.
- [ 11 ] Tessari P, Vettore M, Millioni R, et al. Effect of liver cirrhosis on phenylalanine and tyrosine metabolism [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2010, 13(1): 81-86.
- [ 12 ] Van Spronsen FJ, Thomasse Y, Smit GP, et al. Hereditary tyrosinemia type I: a new clinical classification with difference in prognosis on dietary treatment [J]. *Hepatology*, 1994, 20(5): 1187-1191.
- [ 13 ] Yang H, Al-Hertani W, Cyr D, et al. Hypersuccinylacetoanaemia and normal liver function in maleylacetoacetate isomerase deficiency [J]. *J Med Genet*, 2017, 54(4): 241-247.
- [ 14 ] 顾鹏, 陈傍柱, 徐涛, 等. Hpd 基因修饰制备高酪氨酸血症 III 型巴马小型猪模型 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(5): 11-16.
- [ 15 ] Gu P, Yang Q, Chen B. et al. Genetically blocking HPD via CRISPR/Cas9 protects against lethal liver injury in a pig model of tyrosinemia type I [J]. *Mol Ther Methods Clin Dev*, 2021, 21: 530-547.
- [ 16 ] Jorquera R, Tanguay RM. The mutagenicity of the tyrosine metabolite, fumarylacetoacetate, is enhanced by glutathione depletion [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1997, 232(1): 42-48.
- [ 17 ] Manning K, Al-Dhalimy M, Finegold M, et al. *In vivo* suppressor mutations correct a murine model of hereditary tyrosinemia type I [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, 96(21): 11928-11933.
- [ 18 ] Fernández-Cañón JM, Baetscher MW, Finegold M, et al. Maleylacetoacetate isomerase (MAAI/GSTZ) - deficient mice reveal a glutathione-dependent nonenzymatic bypass in tyrosine catabolism [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, 22(13): 4943-4951.
- [ 19 ] Li J, Wang Q, Yang Y. et al. GSTZ1 deficiency promotes hepatocellular carcinoma proliferation via activation of the KEAP1/NRF2 pathway [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 438.

[ 收稿日期 ] 2022-02-25