



[DOI] 10.3969/j.issn.1001-9057.2020.04.017

http://www.lcnkzz.com/CN/10.3969/j.issn.1001-9057.2020.04.017

· 临床研究 ·

# CRISPR/Cas9 系统靶向敲除多溴蛋白 1 基因对肝癌细胞功能的影响

宋金鸽 焦宇辰

**[摘要]** **目的** 探讨应用规律成簇的间隔短回文重复 (CRISPR)/CRISPR 相关蛋白 9 (Cas9) 系统靶向敲除多溴蛋白 1 (PBRM1) 基因对肝癌细胞功能的影响。**方法** 应用 CRISPR/Cas9 系统靶向敲除 Huh7 细胞的 PBRM1 基因。采用 Sanger 测序和蛋白质印迹法 (Western blot) 检测基因敲除情况。基于转录组测序 (RNA-seq) 结果,对 Huh7 敲除 (KO) 细胞株与 Huh7 野生 (WT) 细胞系差异表达基因进行功能富集。采用流式细胞术分析细胞周期的改变。通过 CCK-8 法和克隆形成实验研究细胞增殖情况。采用不同浓度的  $\gamma$ -干扰素 (IFN- $\gamma$ ) 处理 Huh7-KO 细胞株和 Huh7-WT 细胞系,验证 GO 富集中 IFN- $\gamma$  应答通路的改变。**结果** 成功构建 PBRM1 基因敲除的 Huh7 细胞株。Huh7-KO 细胞株的生长曲线和克隆形成率均显著慢于 Huh7-WT 细胞系 ( $P < 0.0001$ )。Huh7-KO 细胞株中下调基因主要与细胞周期相关,上调基因主要与免疫应答相关。Huh7-KO 细胞株处于  $G_1$  期的细胞比例明显高于 Huh7-WT 细胞系 ( $P = 0.0166$ ),而处于 S 期的细胞比例明显低于 Huh7-WT 细胞系 ( $P = 0.0002$ )。浓度为 1 000 U/ml 的 IFN- $\gamma$  对 Huh7-KO 细胞株组的细胞抑制作用明显高于 Huh7-WT 细胞系组 ( $P = 0.0091$ )。**结论** 在 Huh7 肝癌细胞株中敲除 PBRM1 可以导致  $G_1/S$  阻滞从而抑制细胞增殖。高浓度 IFN- $\gamma$  可以更加有效地杀伤 PBRM1 缺失的肿瘤细胞。

**[关键词]** CRISPR/Cas9; 基因敲除; 多溴蛋白 1; Huh7 细胞系

## Effect of PBRM1 gene knock-out via CRISPR/Cas9 on hepatocellular carcinoma cell

Song Jingge, Jiao Yuchen. State Key Lab of Molecular Oncology, Cancer Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100021, China

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of polybromol (PBRM1) gene knock-out by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR associated protein 9 (Cas9) system on the function of hepatocellular carcinoma cell. **Methods** We used CRISPR/Cas9 technique to knock out PBRM1 gene in Huh7 cell line. Sanger sequencing and Western blotting were performed to verify the knockout of the target region. Based on the results of RNA-seq, the function of the differentially expressed gene between Huh7 knock-out (KO) cells and Huh7 wild-type (WT) cell line were enriched. The change of cell cycle was detected by flow cytometry. The cell proliferation was explored by CCK-8 assay and clone forming test. In addition, Huh7-KO cells and Huh7-WT cell line were treated with different concentrations of Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) to verify the change of IFN- $\gamma$  response pathway. **Results** PBRM1 gene knock-out cell line was successfully constructed. The growth curve and colony forming efficiency of Huh7-KO cells significantly slower than those of Huh7-WT cell line ( $P < 0.0001$ ). The down-regulated genes in Huh7-KO cells were mainly related to cell cycle. And the up-regulated genes were involved in immune response. The proportion of Huh7-KO cells in  $G_1$  phase was higher than that in Huh7-WT cells ( $P = 0.0166$ ), while the proportion of Huh7-KO cells in S phase was significantly less ( $P = 0.0002$ ). The inhibition effect of 1 000 U/ml IFN- $\gamma$  on Huh7-KO cells group was significantly higher than that of Huh7-WT cell line group ( $P = 0.0091$ ). **Conclusion** PBRM1 knockout in Huh7 hepatocellular carcinoma cell line inhibits cell proliferation through  $G_1/S$  phase arrest. PBRM1 deficient tumor cells are killed by high concentration of IFN- $\gamma$  more effectively.

**[Key words]** CRISPR/Cas9; Gene knockout; Polybromol; Huh7 cell line

基金项目:中国科学院医学创新基金资助项目(2019-I2M-1-003)

作者单位:100021 北京,北京协和医学院 中国医学科学院肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室

通讯作者:焦宇辰, E-mail: jiaoyuchen@ cicams. ac. cn

肝癌是全世界发病率最高的恶性肿瘤之一,其死亡率在肿瘤中位居第二位<sup>[1]</sup>。肝癌的肿瘤基因组研究已取得很大进展, TERT 启动子、TP53、CTNNB1 均为肝癌中的高频突变基因<sup>[2]</sup>, 而抑癌基因 AT 丰富结合域 1A (ARID1A) 作为染色质重塑的相关基因, 在肝癌中也经常发生突变, 且肝癌中 ARID1A 的表达量远低于癌旁组织<sup>[3]</sup>。但目前尚未发现其他染色质重塑相关基因对肝癌发生发展的作用。多溴蛋白 1 (PBRM1) 基因编码 ATP 依赖的 SWI/SNF 染色质重塑复合物的亚单位, 该亚单位控制 DNA 转录的可接近性<sup>[4]</sup>。既往研究表明, 肝内胆管细胞癌中也存在 17% 的 PBRM1 基因突变<sup>[5]</sup>。在黄曲霉相关肝细胞肝癌中也发现 8.2% 的样本存在 PBRM1 基因突变<sup>[6]</sup>。因此, 本研究通过应用规律成簇的间隔短回文重复 (CRISPR)/CRISPR 相关蛋白 9 (Cas9) 系统基因编辑技术敲除人肝癌细胞系 Huh7 的 PBRM1 基因, 构建 PBRM1 基因敲除的肝癌细胞模型, 以进一步探讨 PBRM1 基因敲除后肝癌细胞的功能变化。

## 材料与方法

1. 材料: 人肝癌细胞株 Huh7 购自中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心; Huh7 细胞、Huh7-KO 细胞和 HEK293T 细胞均在添加 10% 胎牛血清、50 U/ml 链霉素和青霉素的 DMEM 培养基中培养。

## 2. 方法

(1) 构建基因 PBRM1 双拷贝敲除的 Huh7 细胞株: 从在线数据库 (<https://www.addgene.org/crispr/libraries/#geckov2>) 获得 CRISPR-sgRNA 序列, PBRM1-sgRNA 上游引物: 5'-CACCGAGTTGTCGAATAACCA-3', 下游引物: 5'-AAACTGTTTTCCGACTCCTC-3'。EcoRI (美国, New England Biolabs 公司) 将 LentiCRISPRv2 (美国, Addgene 公司) 载体截切形成粘性末端, 用 T4DNA 连接酶 (美国, New England Biolabs 公司) 将剪切后的载体与退火后的 sgRNAs 通过粘性末端连接, 得到一个稳定的表达载体。待 HEK293 细胞复苏后进行传代培养以确保细胞达到稳定状态, 然后按每孔  $1 \times 10^5$  个细胞传至六孔板中, 培养 1 d 后, 将表达载体、包装质粒 pMD2. G (美国, Addgene 公司) 和 psPAX2 (美国, Addgene 公司) 共转染 HEK293T 细胞, 培养 48 h 后收集包含病毒的细胞上清, 以 1 000 r/min 离心 10 min 后保存于 -80 °C 冰箱。病毒感染 Huh7 细胞 48 h 后用 4  $\mu$ g/ml 嘌呤霉素筛选阳性克隆。为获得基因 PBRM1 双拷贝敲除克隆, 将所选细胞置于 96 孔板上, 每孔 1 个细胞, 15 d 后提取 DNA, 而后进行 Sanger 测序鉴定。PBRM1 上游引物: 5'-GTCTTCAGCCAGCCA-

TA-3', 下游引物: 5'-CCAAAGTGAACCCAGTC-3'; 扩增条件如下: 95 °C 10 min 共 1 个循环; 94 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 30 s, 共 35 个循环; 72 °C 5 min 共 1 个循环。

(2) 蛋白质印迹法 (Western blot) 检测 PBRM1 基因表达: 用 1% 十二烷基硫酸钠处理细胞沉淀, 然后在 100 °C 下煮沸 10 min, 以 1 2000 r/min 离心 10 min 至溶液澄清。布拉德福德蛋白检测试剂盒 (中国, 普利莱基因技术有限公司) 用于蛋白质浓度定量。随后, 在 MES 缓冲液 (美国, Life Technologies 公司) 中将 50 ~ 150  $\mu$ g 蛋白质装载于 4% ~ 12% 的 Bolt Bis Tris Plus 凝胶 (美国, Life Technologies 公司) 上。将蛋白质转移至 0.45  $\mu$ m 硝化纤维素膜 (美国, BioRad 公司) 中。在含 5% 脱脂奶粉的 Tris 缓冲盐水和 0.1% 吐温 20 (TBST) 中, 室温下将膜封闭 1 h, 然后在 4 °C 下用一级抗体过夜培养。用 TBST 清洗膜, 并在室温下用辣根过氧化物酶 (HRP) 结合的二级抗体孵育 1 h。采用超敏化学发光法进行蛋白检测。应用 Adobe Photoshop 软件分析印迹。

(3) CCK-8 法检测细胞增殖: 以每孔 5 000 个细胞 (100  $\mu$ l 细胞悬液) 接种至 96 孔板, 将 96 孔板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中预培养。避光环境下, 分别于 24 h、48 h、72 h、96 h 时间点向每孔加入 10  $\mu$ l 的 CCK-8 溶液 (日本, Dojindo 公司), 将 96 孔板在培养箱内放置 4 h, 使用酶标仪检测 450 nm 处的吸光度 (OD 值)。

(4) 克隆形成实验: 在 96 孔细胞板中按照每孔 200 个细胞进行铺板, 每组设置 3 个复孔。将 96 孔板置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的细胞培养箱中培养。定期查看, 当培养皿中出现肉眼可见的克隆时, 终止培养, 吸出并弃掉各孔的培养基, 终止培养。用磷酸盐缓冲液 (PBS) 漂洗 2 次, 4% 多聚甲醛固定 20 min, 0.1% 结晶紫 (甲醇配制, PBS 稀释) 染色 10 min, 自来水冲洗后晾干, 计算集落数 (50 个细胞以上)。采用酶联斑点图像自动分析仪进行拍照分析。

(5) 细胞周期检测: 10  $\mu$ mol/L BrdU 孵育细胞 30 min, 胰酶消化收集细胞后, 用预冷的 70% 乙醇固定细胞, 过夜。2 mol/L 盐酸 (含 0.1 mg/ml 胃蛋白酶) 室温孵育 20 min 后 PBS 清洗, 用 50  $\mu$ g/ml 碘化丙啶 (PI, 美国, Sigma 公司) 和 2 mg/ $\mu$ l 4', 6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI, 美国, Sigma 公司) 染色。随后进行流式细胞仪检测。

(6) 转录组测序技术 (RNA-seq): 分别取 Huh7 敲除 (KO) 细胞株和 Huh7 野生型 (WT) 细胞系的 3 组细胞, 每组细胞分别提取 RNA, 进行后续操作。首先将提取后的 RNA 通过 NanoDrop™ One/OneC 检测纯度 (OD<sub>260/280</sub>、OD<sub>260/230</sub> 比值), 经过 Life Invitrogen Qubit® 3.0

荧光定量仪精确定量及 Agilent 4200 TapeStation 系统精确检测 RNA 完整性(RIN 值)。随后进行文库构建,采用带 Oligo(DT)的磁珠,对具有 polyA 结构的 mRNA 进行捕获。合成 cDNA 第 1 条链需要片段化 mRNA(模板)、随机寡核苷酸(引物)及 M-MuLV 逆转录酶体系。合成 cDNA 第 2 条链需要先通过 RNaseH 降解 RNA 链,随后需要 dNTPs(原料)和 DNA Polymerase I 体系。将纯化后的 cDNA 进行末端修复、连接 A 尾和测序接头。使用 AMPure XP beads 筛选 200 bp 左右的 cDNA,聚合酶链反应(PCR)扩增后需要再次使用 AMPure XP beads 纯化 PCR 产物,以获得最终的测序文库。质控合格后,按相应浓度和需求混合文库,随后进行 Illumina X10 测序仪 PE150 测序。待数据下机质控合格后,对两组样本的差异表达基因分别进行 GO 和 KEGG 功能富集,GO 富集主要描述差异基因富集的生物过程(BP)、分子功能(MF)和细胞组成(CC)。KEGG 富集分析主要查看差异基因所集中的信号通路。在 GO 和 KEGG 富集结果中选取校正  $P$  值(多重假设检验经过 BH<sup>[7]</sup>方法校正后的  $P$  值)小于 0.05 且富集基因数排名靠前的结果进行进一步讨论。

(7)  $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )刺激实验:将 Huh7-WT、Huh7-KO 细胞分组,以每孔 5 000 个细胞(100  $\mu$ l 细胞悬液)接种至 96 孔板,将 96 孔板置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下预培养。6 h 细胞贴壁后,吸出并弃掉培养基,按组加入含 0 U/ml、10 U/ml、100 U/ml、1 000 U/ml IFN- $\gamma$  的 DMEM 培养基,于培养箱中培养 48 h。避光环境下,分别向每组的每孔加入 10  $\mu$ l 的 CCK-8 溶液,将培养板置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的条件中培养 4 h,用酶标仪检测在 450 nm 处的 OD 值。计算抑制率,抑制率 =  $[(Ac-As)/(Ac-Ab)] \times 100\%$  [As:实验孔(含有培养基、CCK-8、IFN- $\gamma$ );Ac:对照孔(含有培养基、CCK-8,不含 IFN- $\gamma$ );Ab:空白孔(不含细胞和 IFN- $\gamma$  的培养基、CCK-8)]。

3. 统计学处理:应用 GraphPad Prism 6.0 软件进行实验绘图和统计分析。应用 Modfit LT 3.2 软件对流式细胞数据进行分析。符合正态分布的计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验;以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

1. PBRM1 双拷贝敲除 Huh7 细胞株的构建:Sanger 测序显示目的区域被成功敲除(图 1A),表明设计的 sgRNA 可高效编辑 PBRM1 基因。Western blot 检测转染后的单克隆细胞株 Huh7-KO,结果显示 Huh7-KO 细胞株中 PBRM1 蛋白表达缺失,而 Huh7-WT 细胞系

PBRM1 蛋白表达正常,内参 GAPDH 表达量正常且基本一致(图 1B),说明本研究在 Huh7 细胞系中成功敲除了 PBRM1 基因。

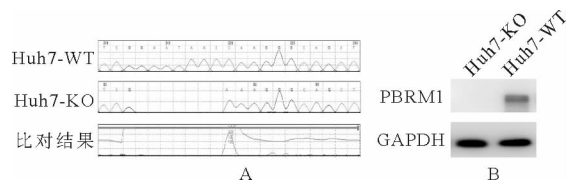


图 1 PBRM1 基因敲除细胞株的成功构建 [A: Huh7-KO 细胞株与 Huh7-WT 细胞系的 DNA 在 PBRM1 基因目的区域的 Sanger 测序峰图对比;B: Western blot 检测 Huh7-KO 细胞株和 Huh7-WT 细胞系的 PBRM1 蛋白表达]

2. PBRM1 基因的敲除抑制肝癌细胞增殖:培养 48 h 后,与 Huh7-WT 细胞系比较,Huh7-KO 细胞株增殖活性明显受到抑制( $1.254 \pm 0.035$  比  $0.843 \pm 0.029$ ,  $P < 0.0001$ );72 h 后抑制效果更加显著( $1.858 \pm 0.050$  比  $0.945 \pm 0.028$ ,  $P < 0.0001$ ,图 2A)。克隆形成实验结果显示,与 Huh7-WT 细胞系比较,Huh7-KO 细胞株的克隆形成数偏低,克隆形成明显受到抑制(图 2B)。

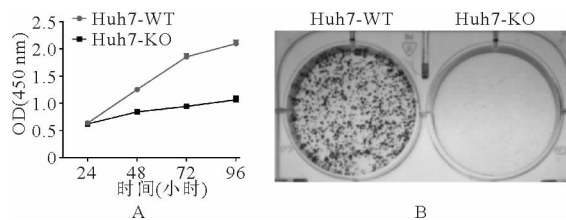


图 2 Huh7-KO 细胞株的细胞增殖情况 [A:CCK-8 测定的 OD 值 96 h 内在 Huh7-KO 细胞株和 Huh7-WT 细胞系中的变化( $P < 0.0001$ );B:平板克隆形成实验结果]

3. 表达差异基因的功能富集:Huh7-KO 细胞株与 Huh7-WT 细胞系相比共筛选出 5 603 个差异表达基因,其中 3 303 个基因表达上调,2 300 个基因下调。GO 富集结果显示,表达下调的相关 BP 主要关于细胞周期,如 DNA 复制( $P < 0.0001$ ,富集基因数 = 90)、染色体分离( $P < 0.0001$ ,富集基因数 = 100)、核分裂( $P < 0.0001$ ,富集基因数 = 96)、细胞时相过渡的下调( $P < 0.0001$ ,富集基因数 = 98)、核糖体的合成( $P < 0.0001$ ,富集基因数 = 74);表达下调的 CC 主要与细胞分裂有关,包括中心体( $P < 0.0001$ ,富集基因数 = 83)、染色体( $P < 0.0001$ ,富集基因数 = 100)、纺锤丝( $P < 0.0001$ ,富集基因数 = 77)等;MF 出现下调的通路主要包括核糖体结构组成( $P < 0.0001$ ,富集基因数 = 67)、微管蛋白的结合( $P < 0.0001$ ,富集基因数 = 56)等(图 3A);而表达上调的 BP 包括适应性免疫应答( $P < 0.0001$ ,富集基因数 = 86)及细胞对 IFN- $\gamma$  的反应( $P < 0.0001$ ,富集基因数 = 45)。KEGG 富集结

果显示,细胞周期( $P < 0.0001$ , 基因富集数 = 46)、DNA 复制( $P < 0.0001$ , 富集基因数 = 28)及核糖体相关通路( $P < 0.0001$ , 富集基因数 = 56)明显下调;而 JAK-STAT 相关基因表达上调( $P = 0.028$ , 基因富集数 = 38)。

4. PBRM1 基因的敲除使 Huh7 肝癌细胞出现  $G_1/S$  阻滞:Huh7-WT 细胞系中处于  $G_1$  期细胞的平均比例为( $57.23 \pm 1.71$ )%, 而 Huh7-KO 细胞株为( $74.9 \pm 1.61$ )%, 明显高于 Huh7-WT 细胞系( $P = 0.0166$ )。Huh7-WT 细胞系中处于 S 期细胞的平均比例为( $36.5 \pm 1.36$ )%, 而 Huh7-KO 细胞株为( $19.8 \pm 1.58$ )%, 明显低于 Huh7-WT 细胞系( $P = 0.0002$ )。Huh7-WT 细胞系和 Huh7-KO 细胞株处于  $G_2/M$  期细胞的平均占比分别为( $6.27 \pm 0.37$ )% 和( $5.26 \pm 0.59$ )%, 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。见图 3。

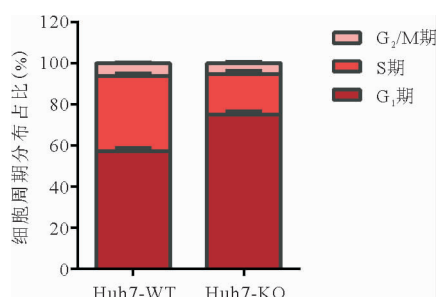


图3 Huh7-WT 细胞系和 Huh7-KO 细胞株在细胞周期中各时期细胞所占比例

5. PBRM1 敲除可增强 Huh7 细胞对 IFN- $\gamma$  治疗的敏感性:与此同时,在 GO 通路富集中,表达上调的 BP 还包括细胞对 IFN- $\gamma$  的反应( $P < 0.0001$ )。并且在 KEGG 分析中,我们发现上调基因富集于 JAK-STAT 通路,而该通路为 IFN- $\gamma$  介导的信号通路<sup>[8]</sup>, 因此将 Huh7-WT 细胞系和 Huh7-KO 细胞株分别在不同浓度梯度的 IFN- $\gamma$  中进行培养,验证 GO 和 KEGG 功能富集的结果。结果显示,1 000 U/ml IFN- $\gamma$  对 Huh7-KO 细胞株组的细胞抑制作用明显高于 Huh7-WT 细胞系组[抑制率分别为( $58.32 \pm 3.28$ )% 和( $48.67 \pm 1.32$ )%,  $P = 0.0091$ ];未加 IFN- $\gamma$  的 Huh-WT 细胞系组的增殖率明显高于 Huh7-KO 组[增殖率分别为( $23.53 \pm 4.75$ )% 和( $45.88 \pm 5.46$ )%,  $P = 0.0059$ ]。见图 4。

## 讨 论

本研究首次在肝癌细胞株中敲除 PBRM1 基因, 并发现该基因的敲除可以导致细胞  $G_1/S$  期阻滞从而抑制细胞株增殖。而 PBRM1 基因通常作为抑癌基因参与染色质重塑在肾透明细胞癌中具有较高的突变频率<sup>[9-10]</sup>, 有研究报道,约 40% 的肾透明细胞癌患者存在

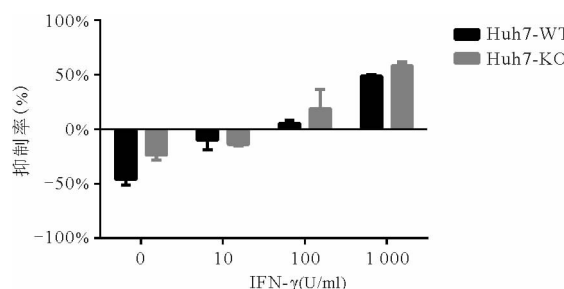


图4 不同浓度 IFN- $\gamma$  对 Huh7-WT 和 Huh7-KO 的抑制作用(y 轴中负值表示细胞生长未受到抑制,依旧处于增殖阶段,对应数值为增殖率)

PBRM1 基因突变<sup>[11]</sup>, 且 PBRM1 和 BAP1 的缺失与患者较差的预后相关<sup>[12]</sup>。在肾透明细胞癌的治疗方面, PBRM1 基因的功能缺失性突变与程序性死亡受体 1 (PD-1) 治疗有效显著相关<sup>[13]</sup>。在肾透明细胞癌中进行 PBRM1 基因的敲除可以导致 80% 肾癌细胞增殖显著增加<sup>[11]</sup>, 与本研究的结果相反。这可能由于 PBRM1 基因在不同肿瘤中的功能存在差异。且 PBRM1 基因的表达量和预后关系在不同类型肿瘤中也不尽相同,在肾透明细胞癌、结肠癌中 PBRM1 基因表达量较低的患者预后较差<sup>[14-15]</sup>, 但在子宫内膜癌中, PBRM1 表达量的阳性率随病理分级和临床分期的增高而增加<sup>[16]</sup>。从网站 The Human Protein Atlas 中的 PBRM1 蛋白免疫组化染色结果也可以发现,肝癌中 PBRM1 基因的表达量高于正常肝脏组织。而 PBRM1 基因的表达量与肝癌的预后相关性研究尚有待开展。

众所周知,肝脏切除和肝脏移植是早期肝癌的主要治疗手段,对于不适合肝脏切除、肝脏移植或局部治疗的患者,主要选择索拉菲尼和乐伐替尼进行多靶点分子治疗<sup>[17]</sup>。即使这些治疗可以提高患者生存期,但较大程度的细胞抑制和治疗耐药也是患者长期生存的重大限制。因此,有研究对晚期肝癌患者采用免疫检查点阻断治疗。曲美母单抗是首次用于晚期丙型肝炎病毒(HCV)相关的肝细胞肝癌患者的细胞毒性 T 淋巴细胞相关蛋白 4 (CTLA-4) 单抗,其治疗应答率适中(17%),应答持续中位时间为 6.5 个月<sup>[18]</sup>。也有在亚洲地区进行的临床试验采用 PD-1 抗体纳武利尤单抗治疗索拉菲尼经治的晚期肝癌患者,客观应答率为 15%<sup>[19]</sup>。本研究结果显示,敲除 PBRM1 基因的细胞株中表达上调的基因主要富集于免疫应答,提示 PBRM1 基因敲除可能有助于免疫系统的活化,免疫治疗的有效性可能会由于 PBRM1 的缺失得到进一步提升。在其他类型肿瘤中,也有证据表明 PBRM1 缺失与免疫治疗获益相关。PBRM1 基因中的功能缺失性突变使黑色素瘤模型小鼠对免疫检查点阻断治疗的联合用药反应更加敏感,若无该突变,则会产生对免疫治

疗的耐药<sup>[20]</sup>。在肾透明细胞癌中也发现, PBRM1 缺失与免疫检查点阻断治疗的临床获益相关<sup>[13]</sup>。

本研究还发现, Huh7-KO 细胞株对 IFN- $\gamma$  的抑制作用更敏感, 且 IFN- $\gamma$  介导的 JAK-STAT 通路相关基因表达上调。曾有研究表明 JAK2 的缺失会使 PD-L1 及主要组织相容性复合体 I 类分子 (MHC-I) 表达下调从而产生免疫阻断治疗耐受<sup>[21]</sup>, 本研究的 RNA-seq 结果显示, Huh7-KO 细胞株 JAK2 表达上调, 提示 PBRM1 基因的敲除可能通过促进免疫应答从而影响免疫检查点阻断对肝癌治疗的疗效。IFN- $\gamma$  的体外治疗可通过与受体结合并激活 JAK-STAT 信号通路, 直接抑制肿瘤细胞生长并促进肿瘤细胞凋亡<sup>[22]</sup>。随后有研究表明, 在非小细胞肺癌中, 不同浓度 IFN- $\gamma$  对肿瘤细胞的作用不尽相同, 低浓度 IFN- $\gamma$  优先激活 ICAM1-磷酸肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B (PI3K-Akt)-Notch1 通路诱导肿瘤的发展和转移, 高浓度 IFN- $\gamma$  优先激活 JAK-STAT 通路, 诱导肿瘤细胞凋亡<sup>[23]</sup>。我们通过 IFN- $\gamma$  刺激实验也发现低浓度 IFN- $\gamma$  促进肿瘤细胞增殖、高浓度抑制增殖的现象。同时, IFN- $\gamma$  信号通路还可以在抗肿瘤免疫中发挥免疫调控作用, 可能会使免疫治疗产生原发性耐药和获得性耐药<sup>[24-25]</sup>。IFN- $\gamma$  信号通路的功能丧失会使肿瘤对 CTLA4 阻断治疗产生原发性耐药导致治疗无效。而长期的 IFN- $\gamma$  暴露会使肿瘤细胞产生免疫逃逸, 对免疫检查点治疗产生获得性耐受, 通过 JAK 抑制剂关闭干扰素途径, 可以改善免疫检查点阻断治疗的耐受问题<sup>[24]</sup>。还有研究表明, RIG-I 表达量高的肝癌患者对于 IFN- $\alpha$  治疗更加有效<sup>[26]</sup>。但是在肝癌细胞株中 PBRM1 基因的敲除与免疫治疗的相关性还有待探索。

综上所述, 在人肝癌细胞系 Huh7 中敲除 PBRM1 基因可以通过 G<sub>1</sub>/S 期阻滞抑制细胞增殖, 且 IFN- $\gamma$  的杀伤作用在敲除 PBRM1 基因后的 Huh7 细胞株中更加显著。本研究结果为进一步探讨 PBRM1 基因在肝癌中的功能和作用奠定基础, 为肝癌的治疗提供了新的思路。

## 参 考 文 献

- [1] Kim DW, Talati C, Kim R. Hepatocellular carcinoma (HCC): beyond sorafenib-chemotherapy [J]. J Gastrointest Oncol, 2017, 8 (2): 256-265.
- [2] Zucman-Rossi J, Villanueva A, Nault JC, et al. Genetic Landscape and Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma [J]. Gastroenterology, 2015, 149 (5): 1226-1239. e1224.
- [3] 万家哈. ARID1A 和 CD133 蛋白在肝细胞肝癌中的表达及意义 [D]. 郑州: 郑州大学, 2016.
- [4] Su D, Singer EA, Srinivasan R. Molecular pathways in renal cell carcinoma: recent advances in genetics and molecular biology [J]. Curr Opin Oncol, 2015, 27 (3): 217-223.
- [5] Jiao Y, Pawlik TM, Anders RA, et al. Exome sequencing identifies frequent inactivating mutations in BAP1, ARID1A and PBRM1 in intrahepatic cholangiocarcinomas [J]. Nat Genet, 2013, 45 (12): 1470-1473.
- [6] Zhang W, He H, Zang M, et al. Genetic Features of Aflatoxin-Associated Hepatocellular Carcinoma [J]. Gastroenterology, 2017, 153 (1): 249-262. e2.
- [7] Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling The False Discovery Rate-A Practical And Powerful Approach To Multiple Testing [J]. J R Stat Soc Series B Stat Methodol, 1995, 57 (1): 289-300.
- [8] Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, et al. Primry, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy [J]. Cell, 2017, 168 (4): 707-723.
- [9] Haga H, Patel T. Molecular diagnosis of intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2015, 22 (2): 114-123.
- [10] Ruzzenente A, Fassan M, Conci S, et al. Cholangiocarcinoma Heterogeneity Revealed by Multigene Mutational Profiling: Clinical and Prognostic Relevance in Surgically Resected Patients [J]. Ann Surg Oncol, 2016, 23 (5): 1699-1707.
- [11] 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.
- [12] da Costa WH, da Cunha IW, Fares AF, et al. Prognostic impact of concomitant loss of PBRM1 and BAP1 protein expression in early stages of clear cell renal cell carcinoma [J]. Urol Oncol, 2018, 36 (5): 243. e1-243. e8.
- [13] Miao D, Margolis CA, Vokes NI, et al. Genomic correlates of response to immune checkpoint blockade in microsatellite-stable solid tumors [J]. Nat Genet, 2018, 50 (9): 1271-1281.
- [14] Pawlowski R, Muhl SM, Sulser T, et al. Loss of PBRM1 expression is associated with renal cell carcinoma progression [J]. Int J Cancer, 2013, 132 (2): E11-E17.
- [15] 李永良. FOXP1 和 PBRM1 在结肠癌中的表达及临床意义 [J]. 现代肿瘤医学, 2020, 28 (5): 770-775.
- [16] 丁聪聪, 董悦. PBRM1 和 P53 在子宫内膜癌中的表达及其与病理分期的相关性研究 [J]. 中国妇幼保健, 2014, 29 (31): 5046-5048.
- [17] Kudo M, Finn RS, Qin S, et al. Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial [J]. Lancet, 2018, 391 (10126): 1163-1173.
- [18] Sangro B, Gomez-Martin C, de la Mata M, et al. A clinical trial of CTLA-4 blockade with tremelimumab in patients with hepatocellular carcinoma and chronic hepatitis C [J]. J Hepatol, 2013, 59 (1): 81-88.
- [19] Yau T, Hsu C, Kim TY, et al. Nivolumab in advanced hepatocellular carcinoma: Sorafenib-experienced Asian cohort analysis [J]. J Hepatol, 2019, 71 (3): 543-552.
- [20] Pan D, Kobayashi A, Jiang P, et al. A major chromatin regulator determines resistance of tumor cells to T cell-mediated killing [J]. Science, 2018, 359 (6377): 770-775.
- [21] Zaretsky JM, Garcia-Diaz A, Shin DS, et al. Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1 Blockade in Melanoma [J]. N Engl J Med, 2016, 375 (9): 819-829.
- [22] Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. The roles of IFN gamma in protection against tumor development and cancer immunoediting [J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2002, 13 (2): 95-109.
- [23] Song M, Ping Y, Zhang K, et al. Low-Dose IFN-gamma Induces Tumor Cell Stemness in Tumor Microenvironment of Non-Small Cell Lung Cancer [J]. Cancer Res, 2019, 79 (14): 3737-3748.
- [24] Benci JL, Xu B, Qiu Y, et al. Tumor Interferon Signaling Regulates a Multigenic Resistance Program to Immune Checkpoint Blockade [J]. Cell, 2016, 167 (6): 1540-1554. e12.
- [25] Gao J, Shi LZ, Zhao H, et al. Loss of IFN-gamma Pathway Genes in Tumor Cells as a Mechanism of Resistance to Anti-CTLA-4 Therapy [J]. Cell, 2016, 167 (2): 397-404. e9.
- [26] Hou J, Zhou Y, Zheng Y, et al. Hepatic RIG-I predicts survival and interferon-alpha therapeutic response in hepatocellular carcinoma [J]. Cancer Cell, 2014, 25 (1): 49-63.

(收稿日期: 2020-03-20)

(本文编辑: 张一冰)