

文章编号 1006-8147(2019)05-0429-07

论著

SUZ12 过表达及敲减恶性外周神经鞘瘤稳定细胞株的建立及其意义

张静¹,高雅²,李新宇²,朱香熹³,孙硕遥¹,肖可⁴,王静²,刘嘉岳²,赵玉龙¹,李光明¹,朱泽¹

(1.天津医科大学病原生物学系,天津 300070;2.天津医科大学基础医学院,天津 300070;3.遵义医科大学珠海校区临床医学系,珠海 519090;4.多伦多大学圣乔治校区,多伦多 ONM5S)

摘要 目的:构建SUZ12基因过表达和敲减的恶性外周神经鞘瘤(MPNST)稳定细胞株并探讨其意义。方法:PCR合成SUZ12基因全长并设计合成SUZ12基因的3对特异性sgRNA干扰靶点序列(sgRNA-1、sgRNA-2、sgRNA-3),构建重组表达质粒,转染293T细胞,包装慢病毒颗粒并用荧光法测定其滴度。确定慢病毒感染的最佳MOI以及嘌呤霉素筛选的最佳剂量,转染ST88-14细胞,构建过表达及敲减的MPNST稳定细胞株。荧光显微镜观察稳定株绿色荧光蛋白的表达情况,RT-qPCR在mRNA水平进行验证,MTT法检测SUZ12过表达和敲减组增殖活性的改变。结果:LV-SUZ12和LV-SUZ12-sgRNA转导入ST88-14细胞并稳定表达绿色荧光蛋白,RT-qPCR结果显示过表达稳定株SUZ12表达量明显升高($P<0.05$),CRISPR/Cas9敲减稳定株SUZ12表达量明显下降($P<0.05$)。MTT结果显示过表达SUZ12基因抑制MPNST细胞的增殖。结论:SUZ12过表达和敲减的稳定细胞株构建成功,初步验证结果表明过表达SUZ12基因抑制MPNST细胞的增殖,为针对SUZ12在MPNST中的生物学功能、作用机制和疾病诊断治疗的进一步研究提供了实验基础。

关键词 SUZ12;恶性外周神经鞘瘤;CRISPR/Cas9;慢病毒

中图分类号 R739.43

文献标志码 A

Establishment and significance of SUZ12 overexpression and knockdown of stable malignant peripheral nerve sheath tumor cell lines

ZHANG Jing¹, GAO Ya², LI Xin-yu², ZHU Xiang-xi³, SUN Shuo-yao¹, XIAO Ke⁴, WANG Jing², LIU Jia-yue², ZHAO Yu-long¹, LI Guang-ming¹, ZHU Ze¹

(1. Department of Pathogen Biology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. School of Basic Medical Sciences, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 3. Department of Clinical Medicine, Zhuhai Campus of Zunyi Medical University, Zhuhai 519090, China; 4. University of Toronto-St. George Campus, Toronto ONM5S, Canada)

Abstract Objective: To establish the malignant peripheral nerve sheath tumor (MPNST) stable cell lines for over-expressed SUZ12 and knockdown SUZ12 and explore its significance. **Methods:** The full length SUZ12 gene was synthesized by PCR method, and three specific sgRNA interfere target sequences (sgRNA-1, sgRNA-2 and sgRNA-3) were designed and synthesized. Then to construct recombinant expression plasmids, 293T cells were transfected with these recombinant plasmids to package lentivirus, of which the titer were measured by fluorescence method. The optimal MOI for lentiviral infection and the optimal dose for puromycin screening were determined, and ST8814 cells were transfected to construct the MPNST stable cell lines for overexpression and knockdown. The expression of green fluorescent protein in stably transfected strains was observed by fluorescence microscopy, and RT-qPCR was verified at the gene level. MTT assay was used to verify the proliferative activity of SUZ12 overexpression and knockdown groups. **Results:** LV-SUZ12 and LV-SUZ12-sgRNA were transduced into ST8814 cells and stably expressed green fluorescent protein. The results of RT-qPCR showed that the expression of SUZ12 overexpression stably increased ($P<0.05$), and the expression of CRISPR/Cas9 knockdown strain SUZ12 decreased significantly ($P<0.05$). MTT results show that overexpression of SUZ12 gene inhibits proliferation of MPNST cells. **Conclusion:** The stably transfected cell lines with overexpression and knockdown of SUZ12 were successfully constructed, and preliminary validation results indicate that overexpression of SUZ12 gene may indicate the growth of MPNST cells, providing experimental basis for further study on the biological function, mechanism and diagnosis and treatment of SUZ12 in MPNST.

Key words SUZ12; MPNST; CRISPR/Cas9; lentivirus

恶性外周神经鞘瘤(malignant peripheral nerve

sheath tumor, MPNST)是一类具有高度恶性,发展迅速,易转移复发且预后差的侵袭性软组织肉瘤,约占所有软组织肉瘤的5%~10%,其中将近50%的MPNST与NF1基因相关,NF1的病人一生中有

基金项目 国家自然科学基金资助项目(81672650)

作者简介 张静(1994-),女,硕士在读,研究方向:恶性外周神经鞘瘤发病与发展的分子机制;通信作者:朱泽,E-mail:zhuze@tjmu.edu.cn,李光明,E-mail:li-guangming@hotmail.com。

10%~15%的风险转变成 MPNST^[1-4]。另外,肿瘤抑制因子(TP53 和 p16^{INK4A})的丧失和生长因子受体信号(例如 EGFR 或 PDGFR)过度激活在神经纤维瘤的恶性转化中也起着重要作用。因此,基于这种关联,MPNST 最经典基因学研究大多集中在 NF1 基因的缺失以及 TP53 和 CDKN2A/p16 基因的缺失上^[5]。然而最近的一些对 MPNST 病人的组织标本进行二代测序的研究结果显示,在 MPNST 中 PRC2 的组成单元 SUZ12 和 EDD 的突变失活也属频发事件^[5-9]。PRC2 可以调节组蛋白 H3 的 27 位点上的酪氨酸三甲基化,而 SUZ12 作为 PRC2 复合体的重要组分,可以通过稳定 PRC2 复合体保证 H3K27me3 在表观遗传修饰过程中功能正常发挥。

CRISPR/Cas9 是在细菌和古细菌中发现的一种获得性免疫系统,通过 crRNA 识别、Cas 蛋白裂解来抵抗病毒和噬菌体的入侵,因其敲除效率高,脱靶率低,敲除效果稳定的优点被用于替代传统的 TALEN 技术和 ZEN 技术,已成为一种主流的基因编辑工具^[10-11]。因此,为了进一步研究 SUZ12 基因在 MPNST 中的作用,笔者使用慢病毒载体构建 SUZ12 过表达及 CRISPR/Cas9 敲减的 MPNST 稳定细胞株,为针对 SUZ12 在 MPNST 中的生物学功能、作用机制和疾病诊断治疗的进一步研究提供了实验基础。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂 ST88-14 细胞株由天津医科大学肿瘤医院杨吉龙教授馈赠;293T 细胞和大肠杆菌由本实验保存;胎牛血清、DMEM 培养基购自美国 Gibco 公司;慢病毒载体系统(GV492、GV371、pHelper1.0、pHelper2.0),Lenti-CAS9-puro 慢病毒购自上海吉凯公司;质粒抽提试剂盒购自 Promega 公司;TOP10 感受态细胞购自 Genechem 公司;FastQuant RT Kit、SuperRealPreMix Plus 购自天根公司;SUZ12 引物由北京索真公司合成;MTT 试剂盒购自索莱宝公司。

1.2 细胞培养 MPNST 细胞系 ST88-14 在含 10% 的胎牛血清和 1% 的双抗的 DMEM 完全培养基中培养,37℃,7.5%CO₂ 温箱中孵育。

1.3 SUZ12 基因过表达载体的构建

1.3.1 SUZ12 目的基因 PCR 扩增 SUZ12 基因 PCR 扩增引物,正向引物:5'-AGGTGCGACTCTAGAGGATCCCGCCACCATGGCGCCTCAGAAGCACGGC GGTG-3',反向引物:5'-TCCTTGTAAGTCCATACCGAGTTTTTGTGTTTTTGTCTGTTTTG-3',扩增产物为 2261bp。PCR 体系反应条件:98℃ 5 min,98℃ 10 s,

55℃ 10 s,72℃ 90 s,循环 30 次,72℃ 8 min。扩增完成后,1.5%琼脂糖凝胶电泳测定结果。

1.3.2 过表达载体的构建 将 GV492 载体用 *Bam*HI/*A**ge*I 酶切,PCR 产物与载体进行交换,构建重组质粒(设置一组不含 SUZ12 片段的质粒作为对照组)。重组质粒转化入感受态细胞,将其涂布在含有氨苄青霉素的平板上,在 37℃ 培养箱中培养过夜,之后进行菌落 PCR 的鉴定,正义链:5'-GATGTTAATGAAGGAGAGAAAG-3',反义链:5'-CCTTATAGTCCTTATCATCGTC-3'。产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,选取阳性克隆进行转化,挑菌,质粒抽提,进行测序鉴定。

1.4 SUZ12 敲减载体的构建

1.4.1 sgRNA 靶位点的设计与合成 在 NCBI 中明确 SUZ12 基因的 CDS 外显子区域,使用麻省理工学院的 CRISPR 设计工具(<http://crispr.mit.edu/>)设计 3 对 SUZ12 基因的 sgRNA 序列,并在其两端加入 *Bbs*I 位点,序列见表 1。引物退火形成带有粘性末端的双链,稀释 200 倍后使用。

表 1 3 对特异性 sgRNA 序列

Tab 1 3 pairs of specific sgRNA sequences

名称	序列(5'-3')
sgRNA-1 正义链	CACCGCGGCTTCGGGGTTCGGCGG
sgRNA-1 反义链	AAACCCGCCGAACCCCGAAGCCGC
sgRNA-2 正义链	CACCGAGAGTTCTGTGCAAAATAT
sgRNA-2 反义链	AAACATATTTTGCACAGAACTCTC
sgRNA-3 正义链	CACCGGGCGGGGCTGCGGTGTTAC
sgRNA-3 反义链	AAACGTAACACCGCAGCCCCGCCC

1.4.2 sgRNA 载体的构建 将 GV371 载体用 *Bbs*I 酶切,与退火形成双链的 sgRNA 混合,配置酶切连接反应体系进行连接,酶切体系:Vector plasmid (100 ng/μL) 1 μL, Oligo 双链 DNA (0.089 μmol/L) 2 μL, 10×Buffer Tango 2 μL, DTT (10 mmol/L) 1 μL, ATP (10 mmol/L) 1 μL, T7 DNA Ligase 0.5 μL, *Bbs*I 1 μL, H₂O 11.5 μL;将上述反应物置于 PCR 仪,37℃ 5 min,21℃ 5 min,16℃ 30 min,共 6 个循环。将连接产物转化至 TOP10 感受态细胞中,接种到含 Amp 抗性的 LB 固体培养基上,37℃ 培养箱中过夜。挑菌,质粒抽提,进行测序鉴定。

1.5 慢病毒包装与滴度测定

1.5.1 慢病毒包装 将 GV 载体质粒、pHelper1.0 载体质粒、pHelper 2.0 载体质粒按照一定比例(20 μg:15 μg:10 μg)加到 2.4 mL 的 Opti-MEM 和 100 μL 的 Lipofectamine 2000 中,共同转染 293T 细胞,37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。48 h 后收集 293T 细胞上清液,超速离心去除上清,加入病毒保存液,充分溶解

后,高速离心,分装上清, -80°C 保存。

1.5.2 慢病毒的滴度检测 测定前 24 h, 接种 293T 细胞到 96 孔板 (4×10^4 个/孔): 在 EP 管中加入 90 μL 的无血清培养基, 取待测的病毒原液 10 μL 加入到 EP 管中, 倍比稀释到最后一管; 弃去 293T 细胞培养基, 加入 90 μL 稀释好的病毒溶液, 37°C 培养箱培养; 24 h 后加入完全培养基, 96 h 后观察绿色荧光蛋白的表达情况。

1.6 确定慢病毒感染的最适 MOI, 以及嘌呤霉素 (Puro) 筛选的最适剂量

1.6.1 感染预实验 ST88-14 细胞在病毒感染前一天铺板, 至细胞汇合度为 20%~30%; 病毒于冰上融化, 依次将病毒稀释至滴度 1×10^8 TU/mL, 1×10^7 TU/mL, 1×10^6 TU/mL, 吸弃培养液加入病毒及相应感染增强液, 混匀, 继续培养, 12 h 后换回常规培养基, 继续培养; 感染 72 h 后, 用荧光显微镜观察感染效率。

1.6.2 确定嘌呤霉素的最适剂量 将 ST88-14 细胞接种于 48 孔板中, 48 h 后加入 Puro 进行筛选, Puro 浓度梯度设置为 0、0.5、1、2、4、6 $\mu\text{g/mL}$; Puro 处理 48 h 后细胞全部死亡的最低药物浓度作为筛选稳定株的药物浓度。

1.7 慢病毒感染 ST88-14 细胞及稳定细胞株的建立

1.7.1 过表达稳定株的构建 制备密度为 $3 \sim 5 \times 10^4$ 个/mL 的 ST88-14 细胞悬液, 每孔 100 μL 接种到 96 孔板中, 37°C 培养 24 h; 病毒冰上融化, 根据预实验 MOI 值进行稀释; 吸弃培养液加入病毒及相应感染增强液, 在 37°C 、7.5% CO_2 温箱中培养, 12 h 后换回常规培养基, 继续培养; 感染 72 h 后, 加入 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 Puro 筛选 48 h 以上。之后降低 Puro 浓度到 1 $\mu\text{g/mL}$, 继续对细胞进行筛选和扩增, 同时收集细胞行下游 RT-qPCR 检测。

1.7.2 CRISPR/Cas9 敲除稳定株的构建 制备密度为 $3 \sim 5 \times 10^4$ 个/mL 的细胞悬液, 每孔 100 μL 接种到 96 孔板中, 37°C 培养 24 h; Cas9 病毒冰上融化, 根据预实验 MOI 值适当稀释; 吸弃培养液加入病毒及相应感染增强液, 在 37°C 、7.5% CO_2 温箱中培养, 12 h 后换回常规培养基, 继续培养; 感染 72 h 后, 加入 2 $\mu\text{g/mL}$ 的 puromycin 筛选至少 48 h 以上, 得到 ST88-14-Cas9 细胞。将 ST88-14-Cas9 细胞铺 6 孔板, 用含 1 $\mu\text{g/mL}$ 剂量的 Puro 的完全培养基培养至 30%, 按照预实验感染条件分别感染 3 个 sgRNA 的 Lenti-sgRNA-GFP 病毒, 12 h 后换回常规培养液, 感染 48~72 h 后, 在荧光显微镜下观察绿色荧光的表达情况。用含 1 $\mu\text{g/mL}$ 的 Puro 的完全培养基扩大培养, 继续传代、扩增进行鉴定。

1.8 SUZ12 过表达和敲减稳定株的鉴定

1.8.1 荧光显微镜观察 用含 1 $\mu\text{g/mL}$ Puro 筛选两周后, 用倒置荧光显微镜观察绿色荧光蛋白的表达效率, 并拍照。

1.8.2 RT-qPCR 鉴定 用 TRIzol 提取 SUZ12 过表达组和敲减组总 RNA, 反转录得到 cDNA, 进行 RT-qPCR 检测, SUZ12 引物序列为: SUZ12-F: AGAAAACGAAATCGTGAGGATGG; SUZ12-R: GCACGTAGGTCCCTGAGAAA。PCR 反应体系为: cDNA template 4 μL , Primer F (20 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , Primer R (20 $\mu\text{mol/L}$) 2 μL , SYBR qPCR Master Mix 10 μL , Rox Dye 0.04 μL , 加水至 20 μL ; PCR 反应条件: 98°C 2 min, 98°C 10 s, 68°C 30 s, 循环 40 次, 95°C 15 s, 60°C 1 min, 99°C 15 s。每组实验独立重复 3 次。

1.9 SUZ12 过表达和敲减组细胞增殖活性的测定 胰酶消化各组细胞, 调整细胞浓度为 1×10^4 个/mL, 每孔 200 μL 接种到 96 孔板; 分别在 24、48、72 h 后弃上清, 加入 90 μL 完全培养基和 10 μL MTT 溶液, 孵箱内继续培养 4 h; 弃上清, 每孔加入 110 μL DMSO 溶液, 避光震荡 10 min, 490 nm 处测吸光度, 绘制增长曲线。每组实验独立重复 3 次。

1.10 统计学处理 采用 SPSS20.0 处理数据, 多组间均数比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达重组质粒的鉴定结果 过表达重组质粒 SUZ12 的 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测后得到一个 2 261bp 的特异性条带, 与预期大小一致, 见图 1。GV492 载体经 *Bam*HI/*Age*I 酶切后与 SUZ12 基因构建重组质粒, 转化、涂板、挑菌后进行 PCR 鉴定, 经琼脂糖凝胶电泳分析, 得到 469bp 的阳性转化子, 见图 2。酶切鉴定阳性的克隆经过测序, 结果与 NCBI 中的人 SUZ12 基因 (ID:23512) 进行比对, 序列一致, 表明过表达重组载体构建成功。

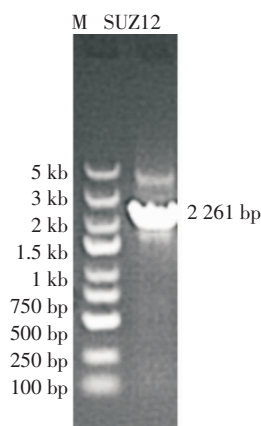


图1 SUZ12 基因扩增电泳图

Fig 1 PCR amplification of SUZ12

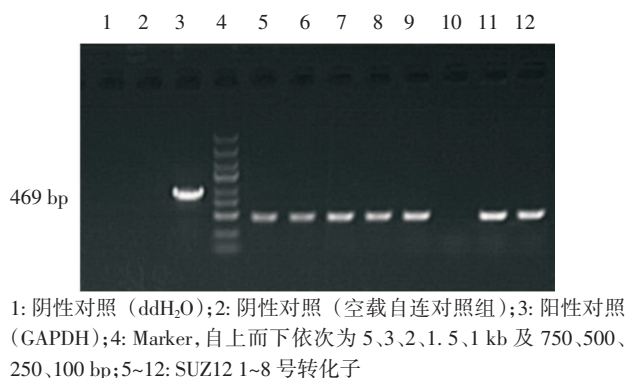


图 2 重组载体 PCR 产物鉴定及琼脂糖凝胶电泳图

Fig 2 Identification of recombinant vector and agarose gel electrophoresis

2.2 CRISPR/Cas9 表达载体的构建 为了提高敲除效率,设计并合成了 3 条 sgRNA 靶向序列,载体 GV371 (U6-sgRNA-SV40-EGFP)*Bbs* I 酶切后,分别与退火获得的 3 个目的片段 sgRNA 连接过夜,转化 TOP10 感受态细胞、涂板、挑菌、质粒抽提、送测序鉴定。测序结果表明插入的片段序列与设计合成的靶向 SUZ12 序列一致,见图 3。

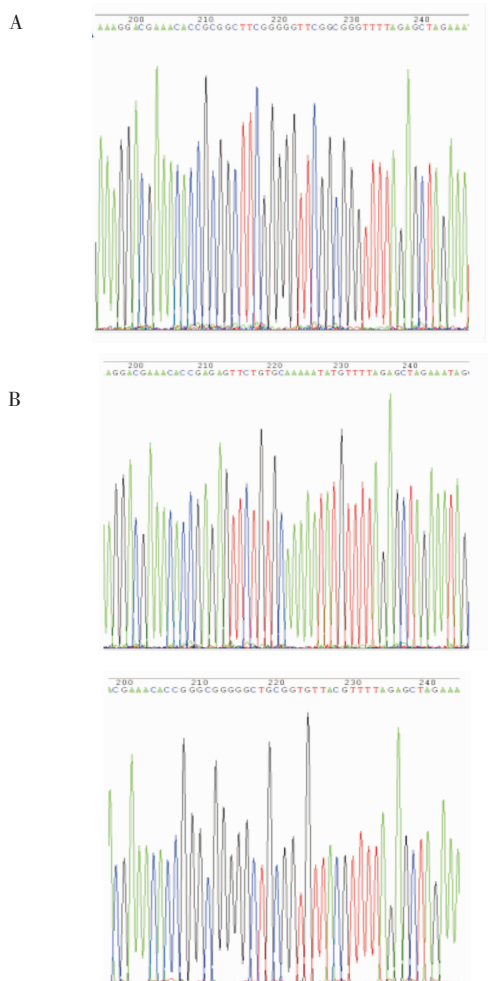


图 3 sgRNA 表达载体阳性克隆转化子测序峰图

Fig 3 sgRNA expression vector positive clone transformant sequencing peak map

2.3 病毒滴度的测定 在倒置荧光显微镜下观察加入不同稀释倍数病毒原液的 293T 细胞荧光表达情况显示,荧光细胞的数目随病毒稀释倍数的增加而逐渐减少,估算过表达慢病毒和 3 种 Lenti-sgRNA 的病毒滴度分别为 5×10^8 TU/mL、 1×10^9 TU/mL、 1×10^9 TU/mL 和 1.5×10^9 TU/mL,见图 4。

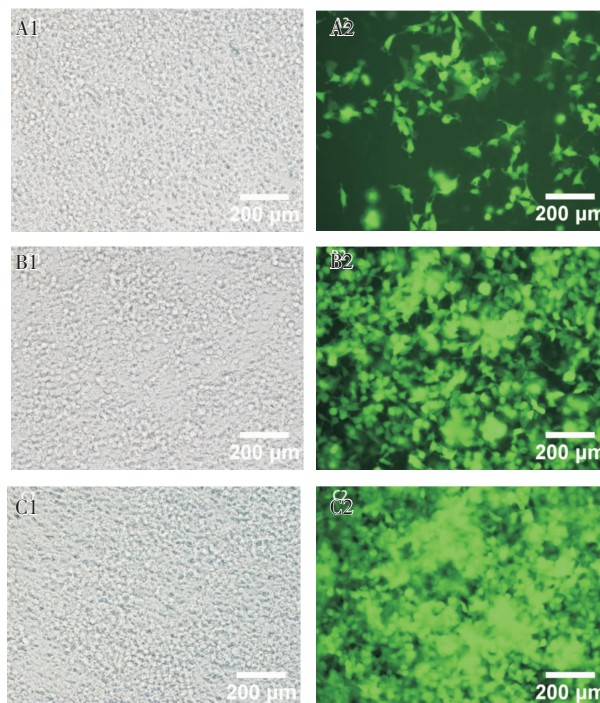


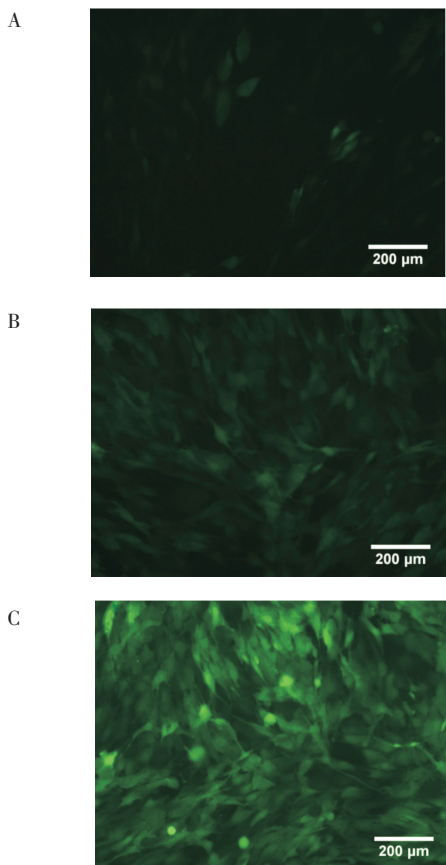
图 4 不同稀释倍数的慢病毒感染 293T 细胞的荧光表达情况($\times 200$)

Fig 4 Fluorescence expressions of 293T cells infected with lentiviruses at different dilutions ($\times 200$)

2.4 慢病毒感染的最适 MOI 及嘌呤霉素筛选的最适剂量 在不同浓度病毒感染 ST88-14 细胞 72 h 后,用显微镜观察荧光表达丰度,感染效率 80% 左右,细胞生长良好的组所对应的 MOI 值即可作为后续感染实验的依据,确定 MOI=10 为 CRISPR/Cas9 慢病毒的最佳感染条件,MOI=100 为过表达慢病毒的最佳感染条件,见图 5。待 ST88-14 细胞生长至 70%~80% 时加入不同浓度的 Puro,筛选 48 h 以上,当 Puro 的浓度大于等于 2μ g/mL 时,ST88-14 细胞全部死亡,因而确定 Puro 最适剂量为 2μ g/mL,见图 6。

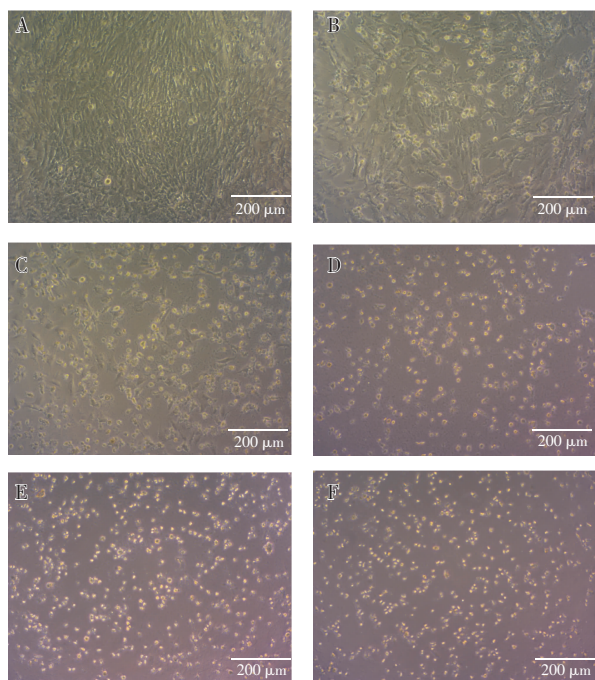
2.5 慢病毒转染 ST88-14 细胞的结果 慢病毒转染 ST88-14 细胞 2 周后,用倒置荧光显微镜进行观察,镜下均可见大量绿色荧光蛋白,并且荧光随着细胞传代可持续表达(图 7)。

2.6 稳定株细胞的筛选及鉴定 构建好的 SUZ12 过表达及敲减慢病毒分别感染 ST88-14 细胞后,经 Puro 筛选获得稳定细胞株,提取 RNA 进行 RT-

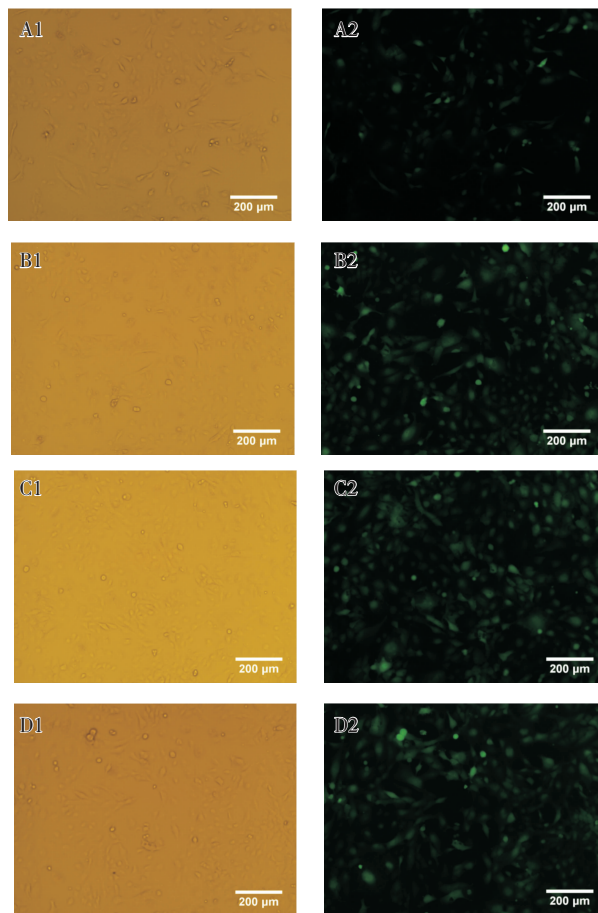


A. 病毒滴度为 1×10^6 TU/mL (MOI=1); B. 病毒滴度为 1×10^7 TU/mL (MOI=10); C. 病毒滴度为 1×10^8 TU/mL (MOI=100)

图 5 过表达组相同感染条件下不同浓度病毒感染效率比较($\times 200$)
Fig 5 Comparison of virus infection efficiency at different concentrations in the same infection conditions ($\times 200$)



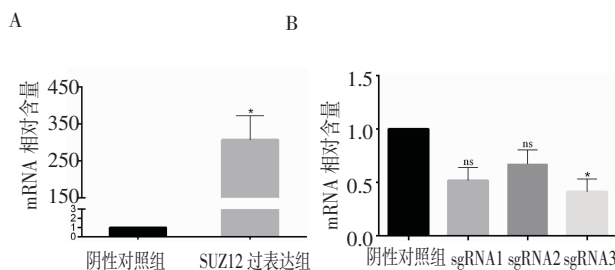
A. 0 $\mu\text{g/mL}$; B. 0.5 $\mu\text{g/mL}$; C. 1 $\mu\text{g/mL}$; D. 2 $\mu\text{g/mL}$; E. 4 $\mu\text{g/mL}$; F. 6 $\mu\text{g/mL}$
图 6 不同浓度嘌呤霉素筛选 48 h 后 ST88-14 的细胞状态
Fig 6 Cell state of ST88-14 after 48 hours at different concentrations of puromycin



A. SUZ12 过表达慢病毒感染组; B. Lenti-sgRNA1 慢病毒感染组; C. Lenti-sgRNA2 慢病毒感染组; D. Lenti-sgRNA3 慢病毒感染组

图 7 慢病毒转染 ST88-14 细胞后稳定表达绿色荧光蛋白($\times 200$)
Fig 7 Stable expression of green fluorescent protein after transfection of ST88-14 cells with lentivirus ($\times 200$)

qPCR 检测。PT-qPCR 结果显示过表达组 SUZ12 mRNA 表达量明显较对照组高 ($P < 0.05$), 敲减组 SUZ12 mRNA 表达量相比对照组明显减少 ($P < 0.05$)。由此说明, SUZ12 过表达和敲减的 ST88-14 稳定细胞株构建成功, 见图 8。

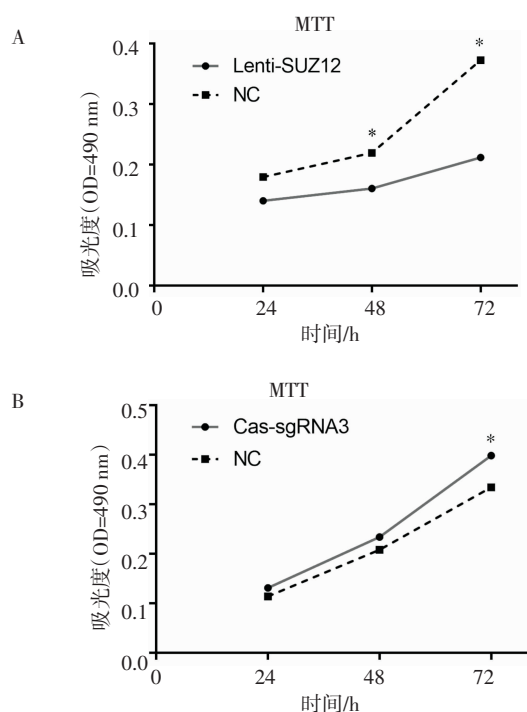


A. SUZ12 过表达组; B. SUZ12 敲减组

图 8 过表达和敲减组 SUZ12 mRNA 相对表达情况

Fig 8 Relative expression of SUZ12 mRNA in overexpressed and knockdown groups

2.7 SUZ12 基因过表达抑制 MPNST 细胞增殖 SUZ12 过表达和敲减稳定株构建完成后, 用 MTT 法测定各组细胞增殖活性的改变。MTT 结果显示, 过表达组的细胞增殖活性与阴性对照组相比明显降低 ($P < 0.05$), 敲减组的细胞增殖活性与阴性对照组相比明显升高 ($P < 0.05$)。表明 SUZ12 基因过表达抑制 MPNST 细胞增殖。见图 9。



A.SUZ12 过表达组; B.SUZ12 敲减组

图 9 过表达和敲除组细胞增殖活性的测定

Fig 9 Determination of cell proliferation activity in overexpression and knockout groups

3 讨论

SUZ12 是多梳抑制复合物 2 (PRC2) 必不可少的组成部分, 它可以通过调控组蛋白和 DNA 甲基化修饰转录过程, 借此以稳定 PRC2, 使 PRC2 的功能正常发挥^[12], 除此之外, SUZ12 还可以影响组蛋白三甲基化的活性, 参与 EED-EZH2 复合物的功能沉默过程^[13]。有研究表明 SUZ12 在胃癌、结肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌、乳腺癌、套淋巴瘤细胞癌等肿瘤中表达明显高于癌旁组织, 并且, SUZ12 表达量的增加提高了肿瘤细胞无限增殖、转移及侵袭的能力, 影响了患者的预后^[14-18]。SUZ12 在上述肿瘤中表达量增加, 促进了肿瘤的发展, 然而其在血液系统肿瘤、神经胶质瘤等肿瘤中的表达量明显低于癌旁组织, 这表明 SUZ12 表达量的减少也促进了肿瘤的发展, 同时具有抑癌的作用^[19-20], 因而, SUZ12 在肿瘤的发

生发展过程中发挥了双向功能。

本研究组在对 12 例 MPNST 全基因组进行深度测序后发现, 在 NF1 阴性的散发性 MPNST 中, SUZ12 基因往往呈现缺失状态^[9], 这提示我们 SUZ12 可能在散发性 MPNST 的发生发展过程中起到了关键作用。Andrew 等结合了全外显子测序队列的分析、TCGA 提供的公开数据, 以及对该疾病的前几代测序研究的回顾, 分析计算出了 MPNST 特异性基因突变率, 分别为 NF1 (56/64=87.5%), SUZ12 (69/123=56.1%), EED (40/123=32.5%), TP53 (29/72=40.3%), CDKN2A (54/72=75.0%)^[5-9], 也证实了在 MPNST 中大多存在 SUZ12 基因的缺失。研究发现大多数 MPNST 患者中存在 PRC2 不同组分功能丧失性突变, 而 SUZ12 和 EED 的缺失性突变又阻断了 H3K27me3 的甲基化进程, 导致 H3K27me3 缺失, 引起 PRC2 染色质调节信号通路失活^[21]。研究者们在 10%~25% 的肾癌、肺癌、胃癌和神经胶质瘤中发现了 H3K36me3 的缺失^[22-25], 而 H3K36me3 的缺失与细胞周期检查点相关基因存在协同致死效应, WEE1 抑制剂 AZD1775 对 H3K36me3 缺失的细胞更加敏感^[26], 本课题组之前对 43 例 MPNST 的组织标本进行免疫组化染色, 发现 H3K27me3 在 65.11% 的 MPNST 患者中均缺失^[27], 而 H3K36me3 缺失可以作为用药靶点也为由 PRC2 组分突变所致 H3K27me3 缺失的肿瘤提供了一个表观遗传学的治疗策略。

本课题组所用的肿瘤细胞系属于神经细胞, 而神经细胞具有不可分裂的特性, 使外源片段的导入比较困难, 慢病毒载体是由人类免疫缺陷病毒 (HIV-1) 改造后产生, 具有感染效率高、基因片段容量大、持续稳定表达且可感染分裂和非分裂细胞的特点, 因此选用慢病毒载体作为基因操作的工具。CRISPR/Cas9 是一项新兴的基因编辑技术, 自问世以来, 已广泛应用于肿瘤领域的科学研究, 而且有研究表明, CRISPR/Cas9 即使不进行单克隆筛选, 也可永久显著敲低目的基因的表达水平^[28]。本实验通过慢病毒包装系统制备了 SUZ12 过表达和 CRISPR/Cas9 敲减慢病毒, 分别转染 ST88-14 细胞后, 成功获得了能稳定表达绿色荧光蛋白的 SUZ12 过表达和敲减稳定细胞株, RT-qPCR 的结果也证明过表达组 SUZ12 mRNA 表达量明显较对照组高 ($P < 0.05$), 敲减组 SUZ12 mRNA 表达量相比对照组明显减少 ($P < 0.05$)。MTT 结果显示, 过表达组的细胞增殖活性与阴性对照组相比明显降低 ($P < 0.05$), 敲减组的细胞增殖活性与阴性对照组相比明显升

高($P<0.05$)。由此说明,SUZ12基因过表达抑制MPNST细胞增殖。

综上所述,笔者通过本课题组和其他实验室的研究数据确定了SUZ12基因在MPNST中处于缺失状态,而H3K36me3缺失可以作为治疗靶点也为PRC2组分缺失突变所致的H3K27me3缺失提供了治疗策略,因此笔者构建了SUZ12过表达和敲减的MPNST稳定细胞株,初步探索SUZ12基因表达状态的变化所引起细胞增殖的改变,本课题组将进一步在体内和体外实验中探索细胞侵袭迁移、周期等功能的改变,以阐明PRC2功能失活在MPNST的发病演进中的作用及其分子机制,并为MPNST的治疗提供了一个基于表观遗传学的治疗策略。

参考文献:

- [1] Evans D G, Baser M E, McLaughran J, et al. Malignant peripheral nerve sheath tumours in neurofibromatosis 1[J]. *J Med Genet*, 2002, 39(5): 311
- [2] Bradford D, Kim A. Current treatment options for malignant peripheral nerve sheath tumors[J]. *Curr Treat Options Oncol*, 2015, 16(3): 328
- [3] Yang J, Du X. Genomic and molecular aberrations in malignant peripheral nerve sheath and their roles in personalized target therapy[J]. *Surg Oncol*, 2013, 22(3): e53
- [4] Valentin T, Le Cesne A, Ray-Coquard I, et al. Management and prognosis of malignant peripheral nerve sheath: The experience of the French Sarcoma Group (GSF-GETO)[J]. *Eur J Cancer*, 2016, 56:77
- [5] Brohl A S, Kahen E, Yoder S J, et al. The genomic landscape of malignant peripheral nerve sheath tumors: diverse drivers of Ras pathway activation[J]. *Sci Rep*, 2017,7(1): 14992
- [6] Zhang M, Wang Y, Jones S, et al. Somatic mutations of SUZ12 in malignant peripheral nerve sheath tumors[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(11):1170
- [7] Lee W, Teckie S, Wiesner T, et al. PRC2 is recurrently inactivated through EED or SUZ12 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(11): 1227
- [8] Sohler P, Luscan A, Lloyd A, et al. Confirmation of mutation landscape of NF1-associated malignant peripheral nerve sheath tumors[J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2017, 56(5): 421
- [9] De Raedt T, Beert E, Pasmant E, et al. PRC2 loss amplifies Ras-driven transcription and confers sensitivity to BRD4-based therapies[J]. *Nature*, 2014, 514(7521): 247
- [10] Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity [J]. *Science*, 2012,337(6096): 816
- [11] Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, et al. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2012,109(39): E2579
- [12] Pasini D, Bracken A P, Jensen M R, et al. Suz12 is essential for mouse development and for ezh2 histone methyltransferase activity [J]. *EMBO J*, 2004, 23(20):4061
- [13] Cao R, Zhang Y. Suz12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex[J]. *Mol Cell*, 2004,15(1):57
- [14] Wang H, Ge S, Qian G, et al. Restoration of IGF2 imprinting by polycomb repressive complex 2 docking factor SUZ12 in colon cancer cells[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 338(2):214
- [15] Xu X T, Tao Z Z, Song Q B, et al. SUZ12 RNA Interference Inhibits the Invasion of Gastric Carcinoma Cells[J]. *Hepatogastroenterology*, 2014,61(136):2416
- [16] Panagopoulos I. Absence of the JAZF1/SUZ12 chimeric transcript in the immortalized non-neoplastic endometrial stromal cell T HESCs[J]. *Oncol Lett*, 2010,1(6):947
- [17] Li H, Cai Q, Wu H, et al. Suz12 promotes human epithelial ovarian cancer by suppressing apoptosis via silencing HRK[J]. *Mol Cancer Res*, 2012,10(11):1462
- [18] Iliopoulos D, Lindahl-Allen M, Polytharchou C, et al. Loss of miR-200 inhibition of suz12 leads to polycomb-mediated repression required for the formation and maintenance of cancer stem cells[J]. *Mol Cell*, 2010, 39(5):761
- [19] Martin D, Sanchez E, Maestre L, et al. Deregulated expression of the polycomb-group protein SUZ12 target genes characterize mantle cell lymphoma[J]. *Am J Pathol*, 2010,177(2): 930
- [20] Lee W, Teckie S, Wiesner T, et al. PRC2 is recurrently inactivated through EED or SUZ12 loss in malignant peripheral nerve sheath tumor[J]. *Nat Genet*, 2014, 46(11):1227
- [21] Prieto G, Wiesner T, Messina J L, et al. Loss of H3K27me3 Expression Is a Highly Sensitive Marker for Sporadic and Radiation-induced MPNST[J]. *Am J Surg Pathol*, 2016,40(4): 479
- [22] Simon J M, Hacker K E, Singh D, et al. Variation in chromatin accessibility in human kidney cancer links H3K36 methyltransferase loss with widespread RNA processing defects [J].*Genome Res*, 2014, 24(2): 241
- [23] Walter D M, Venancio O S, Buza E L, et al. Systematic In Vivo Inactivation of Chromatin-Regulating Enzymes Identifies Setd2 as a Potent Tumor Suppressor in Lung Adenocarcinoma[J]. *Cancer Res*, 2017, 77(7):1719
- [24] Zhao J X, Li X W, Shi B Y, et al. Effect of histone modifications on hMLH1 alternative splicing in gastric cancer[J]. *Tumour Biol*, 2017, 39(4):1010428317697546
- [25] Bjerke L, Mackay A, Nandhabalan M, et al. Histone H3.3 mutations drive pediatric glioblastoma through upregulation of MYCN [J]. *Cancer Discov*, 2013,3(5): 512
- [26] Pfister S X, Markkanen E, Jiang Y, et al. Inhibiting WEE1 Selectively Kills Histone H3K36me3-Deficient Cancers by dNTPStarvation[J].*Cancer Cell*, 2015,28(5): 557
- [27] 宋紫喧,李光明,张静,等. H3K27 三甲基化蛋白可作为 MPNST 的重要诊断标记物[J]. *天津医科大学学报*, 2017, 24(4): 353
- [28] 薛才林. SUZ12 在肝癌增殖及转移中具体作用及其机制研究[D]. 广州,广州医科大学, 2017

(2018-12-18 收稿)