

文章编号 1006-8147(2023)05-0500-07

论 著

# FOXQ1 敲除乳腺癌 MCF7 细胞株的构建及其功能初探

杨欢,冯玉梅

(天津医科大学肿瘤医院肿瘤研究所生物化学与分子生物化学研究室; 国家肿瘤临床医学研究中心; 天津市“肿瘤防治”重点实验室; 天津市恶性肿瘤临床医学研究中心; 乳腺癌防治教育部重点实验室, 天津 300060)

**摘要** 目的:通过 CRISPR/Cas9 基因编辑技术在乳腺癌细胞 MCF7 中稳定敲除 FOXQ1,并初探其在缺氧环境中的功能。方法:Cas9 慢病毒感染 MCF7 构建工具细胞,在工具细胞中分别转染靶向 3 个不同靶位点的 FOXQ1-crRNA+tracrRNA,用 T7E1 酶筛选出编辑效率高的细胞挑取单克隆细胞株;利用 T7E1 酶、Sanger 测序和 Western 印迹检测 FOXQ1 基因的编辑和表达情况;Western 印迹检测常氧/缺氧条件下细胞 FOXQ1 表达情况;在常氧/缺氧条件下通过划痕实验和 transwell 实验检测细胞迁移能力;通过 METABRIC 数据库分析乳腺癌中 FOXQ1 与 HIF1A 及其编码蛋白靶基因 LOX、LDHA 和 GLUT3 表达的相关性。结果:筛选出转染靶向 CCCGTGCGCATCCAGGACAT 序列的 FOXQ1-crRNA 的细胞具有最高编辑效率;T7E1 酶切、Sanger 测序和 Western 印迹结果显示稳定敲除 FOXQ1 的乳腺癌 MCF7 细胞构建成功;缺氧促进 MCF7 细胞 FOXQ1 的表达;缺氧促进 MCF7 的迁移能力( $t=3.78, P<0.01$ ;  $t=11.94, P<0.001$ ),敲除 FOXQ1 后缺氧对 MCF7 迁移能力的促进作用被抑制( $t=0.63, P=0.55$ ;  $t=2.54, P=0.064$ ), ( $t=2.46, P<0.05$ ;  $t=4.95, P<0.05$ ),乳腺癌中 FOXQ1 与 HIF1A、LOX、LDHA 和 GLUT3 的表达均显著正相关( $P<0.0001$ )。结论:通过 CRISPR/Cas9 系统成功构建了 FOXQ1 基因稳定敲除的乳腺癌 MCF7 细胞株,并发现 FOXQ1 介导了缺氧对 MCF7 细胞迁移能力的促进作用,为进一步探究乳腺癌的缺氧微环境中 FOXQ1 的功能及其机制奠定了基础。

**关键词** CRISPR/Cas9; FOXQ1; 基因敲除; 乳腺癌; 缺氧

中图分类号 R737.9

文献标志码 A

## Construction of FOXQ1 knockout MCF7 breast cancer cell line and its preliminary functional exploration

YANG Huan, FENG Yu-mei

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Cancer Institute and Hospital, Tianjin Medical University; National Clinical Research Center for Cancer; Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy; Tianjin, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer; Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy, Tianjin Medical University, Ministry of Education, Tianjin 300060, China)

**Abstract** **Objective:** To stably knock out FOXQ1 using CRISPR/Cas9 gene editing technology in MCF7 breast cancer cells and to explore its function in hypoxic conditions. **Methods:** Cas9 lentivirus was infected with MCF7 cells to create tool cells, and FOXQ1-crRNA+tracrRNA targeting three different target sites were transfected into the tool cells. T7E1 enzyme was used to screen for cells with high editing efficiency, and single clone cell lines were selected. T7E1 enzyme, Sanger sequencing, and Western blotting were used to detect the editing and expression of the FOXQ1 gene. Western blotting was used to detect FOXQ1 expression in cells under normoxic/hypoxic conditions. The wound healing and transwell assay were used to detect cell migration ability under normoxic/hypoxic conditions. The METABRIC database was used to analyze the correlation between FOXQ1 and HIF1A, as well as its encoded protein target genes LOX, LDHA and GLUT3 in breast cancer. **Results:** Cells transfected with FOXQ1-crRNA targeting the CCCGTGCGCATCCAGGACAT sequence showed the highest editing efficiency. T7E1 enzyme cleavage, Sanger sequencing, and Western blotting results confirmed the successful construction of stable FOXQ1-knockout MCF7 breast cancer cells. Hypoxia promoted the expression of FOXQ1 in MCF7 cells and also promoted their migration ability ( $t=3.78, P<0.01$ ;  $t=11.94, P<0.001$ ). Knocking out FOXQ1 inhibited the promoting effect of hypoxia on MCF7 migration ( $t=0.63, P=0.55$ ;  $t=2.54, P=0.064$ ), ( $t=2.46, P<0.05$ ;  $t=4.95, P<0.05$ ). FOXQ1 expression in breast cancer was significantly positively correlated with HIF1A, LOX, LDHA, and GLUT3 ( $P<0.0001$ ). **Conclusion:** A stable FOXQ1-knockout MCF7 breast cancer cell line has been successfully constructed using the CRISPR/Cas9 system. It is found that FOXQ1 mediates the promoting effect of hypoxia on MCF7 cells migration ability, laying the foundation for further exploration of the function and mechanism of FOXQ1 in the hypoxic microenvironment of breast cancer.

**Key words** CRISPR/Cas9; FOXQ1; gene knockout; breast cancer; hypoxia

基金项目 国家自然科学基金资助项目(82173349)

作者简介 杨欢(1996-),女,硕士在读,研究方向:肿瘤与分子生物学;通信作者:冯玉梅, E-mail: ymfeng@tmu.edu.cn。

缺氧微环境是实体瘤的普遍特征。Voss 等<sup>[1]</sup>研究发现,缺氧环境可导致乳腺癌细胞迁移能力的增加。此外,多个研究表明,原发性肿瘤氧合不良的患者转移率和死亡率增加<sup>[2-4]</sup>。缺氧诱导因子 1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ ) 是体内多器官系统中细胞缺氧反应的主要转录因子和调节因子<sup>[5]</sup>。在常氧环境中 HIF-1 $\alpha$  的脯氨酸残基发生羟基化使其被泛素化降解,而缺氧环境中 HIF-1 $\alpha$  脯氨酸不再发生羟基化,从而导致 HIF-1 $\alpha$  蛋白的积累<sup>[6]</sup>。

叉头框(forkhead box, FOX)蛋白是在进化上保守的转录因子超家族,在癌症的发生、发展中发挥重要作用<sup>[7]</sup>。许多 FOX 蛋白被报道直接或间接响应缺氧信号而被激活表达<sup>[8-11]</sup>。FOXQ1 是 FOX 转录因子家族成员之一,其在包括乳腺癌在内的多个癌种中被表征为上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的主要激活剂,赋予细胞转移和侵袭的能力<sup>[12-15]</sup>;并且其在间充质基质细胞(mesenchymal stromal cells, MSCs)中被报道可能间接响应于缺氧信号而表达上调<sup>[11]</sup>。因此推测,在乳腺癌中,处于缺氧微环境的癌细胞其可能响应于缺氧信号导致 FOXQ1 表达上调,从而产生具备较高转移或侵袭能力的亚克隆。

为了构建有效的实验模型,选择通过成簇的规则间隔短回文重复序列(clustered regularly interspaced short palindromic repeats, CRISPR)/CRISPR 相关蛋白 9 (CRISPR-associated protein 9, Cas9) 系统来构建 FOXQ1 基因敲除的 MCF7 细胞株。该系统由 Cas9 蛋白、CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活 CRISPR RNA (trans-activating crRNA, tracrRNA) 组成。其中,crRNA 作为识别模块能够识别相应的特异性靶序列;tracrRNA 和 crRNA 的核苷酸链能互补配对构成单指导 RNA (single guide RNA, sgRNA), sgRNA 与 Cas9 一同形成核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein, RNP)并同时激活 Cas9 作为核酸内切酶的功能<sup>[16-17]</sup>;Cas9 切断目的区域的双链核酸,诱导细胞内源 DNA 损伤修复机制工作,最终借助该机制达到编辑遗传信息的目的<sup>[18]</sup>。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 人乳腺癌细胞系 MCF7 来自 American Type Culture Collection;DMEM 高糖培养基、胎牛血清和青霉素/链霉素购于美国 Gibco 公司;Leti-CAS9-puro 单载体慢病毒购于吉凯基因;crRNA 和 tracrRNA 由广州锐博生物合成;Lipofectamine 3000 转染试剂购于美国 Invitrogen;T7 核酸内切酶 I (T7 Endonuclease I, T7E1) 和 NE Buffer 购于美国

NEB 公司;DNA 提取试剂盒、DNA 纯化试剂盒、PrimeSTAR Max DNA Polymerase 均购于日本 Takara 公司;FOXQ1 抗体购于美国 Santa 公司;HIF-1 $\alpha$  抗体购于美国 CST 公司; $\beta$ -Actin 抗体购于武汉 ABclonal 公司;transwell 购于美国 Corning 公司;结晶紫染液购于上海碧云天公司。

## 1.2 实验方法

1.2.1 crRNA 设计合成 从 NCBI 中检索人 FOXQ1 基因的外显子序列,根据 Cas9 靶点设计原则,即待编辑的区域附近存在相对保守的 PAM 序列(NGG),并针对其外显子碱基序列设计 3 个敲除位点(表 1)。根据敲除位点设计合成相应的 crRNA 以及与之配套的 tracrRNA, KO#1、KO#2 和 KO#3 3 个敲除位点对应的 crRNA 分别命名为 FOXQ1-crRNA#1、FOXQ1-crRNA#2 和 FOXQ1-crRNA#3。

表 1 敲除位点识别序列

Tab 1 Knockout site recognition sequences

位点编号	敲除位点识别序列(5'→3')
KO#1	GCAGCAAGCCATATACGCGG
KO#2	CGCTGTCGGCGGCGGAGAC
KO#3	CCCGTGCGCATCCAGGACAT

1.2.2 构建 Cas9 工具细胞株 将  $1 \times 10^5$  个 MCF7 细胞接种于 24 孔板,待细胞融合度达到约 30% 时,加入 2  $\mu$ L Leti-CAS9-puro 慢病毒。细胞感染 12 h 观察细胞状态,如果没有明显的细胞毒性作用,继续培养 24 h 后弃去含有病毒的培养基,更换为新鲜 DMEM 完全培养基。感染 2 d 后更换培养基为含 2  $\mu$ g/mL 嘌呤霉素的 DMEM 完全培养基进行连续 3 d 的药物筛选,由此获得 Cas9 稳定表达 MCF7 细胞株,作为 MCF7-Cas9 工具细胞待用。

1.2.3 转染 FOXQ1-crRNA+tracrRNA 接种  $1 \times 10^5$  个 MCF7-Cas9 工具细胞于 24 孔板,待细胞融合度达到 50%~70% 时进行 FOXQ1-crRNA+tracrRNA 的转染。取一支 1.5 mL EP 管,加入 25  $\mu$ L Opti-MEM 减血清培养基,再分别加入 2  $\mu$ L FOXQ1-crRNA 和 EP 管,加入 25  $\mu$ L Opti-MEM 减血清培养基,再加入 3  $\mu$ L lipo3000 转染试剂;而后将 FOXQ1-crRNA+tracrRNA、Opti-MEM 混合物加入到 Opti-MEM 减血清培养基稀释的 lipo3000 转染试剂中,室温孵育 5 min。孵育结束后,将上述制备好的转染混合物加入到细胞培养基中,于 37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub> 条件下培养,48 h 后更换新鲜 DMEM 完全培养基,并继续扩增培养,供后续实验使用。

1.2.4 T7E1 酶切检测靶位点编辑效率 目的基因片段经 PCR 扩增后重新变性退火变成异源双链

DNA, T7E1 酶能够识别不完全匹配的双链 DNA, 从不匹配的位置将其酶切, 利用这个性质能够鉴定 CRISPR/Cas9 编辑形成的突变体, 评估 crRNA 的编辑效率。转染 *FOXQ1*-crRNA+tracrRNA 的 MCF7-Cas9 细胞扩至 12 孔板后, 取一半细胞按试剂盒步骤提取基因组 DNA, 并用微量紫外分光光度计定量。PCR: 吸取 50 ng 基因组 DNA 用 PrimeSTAR Max DNA Polymerase 进行 PCR 扩增, 扩增出含 crRNA 靶序列的片段, 其引物信息见表 2; PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒进行纯化, 并用微量紫外分光光度计进行定量。PCR 产物变性退火: 取 200 ng 纯化后的 PCR 产物, 加入 2  $\mu$ L NE Buffer, 并补充无核酸水至 19  $\mu$ L, 并根据 T7E1 试剂盒提供的变温条件进行变性退火。T7E1 酶切: 向退火后的 PCR 产物加入 1  $\mu$ L T7E1 酶, 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 15 min, 加入 1  $\mu$ L 的 proteinase K, 37 $^{\circ}$ C 温育 5 min 终止酶切。2% 的琼脂糖凝胶电泳检测退火后的 PCR 产物的酶切效率, 酶切率越高则细胞靶位点编辑效率越高。

表 2 引物序列

Tab 2 Primer sequences

靶位点	上游引物/下游引物	片段总长(bp)	剪切片段(bp)
KO#1	ACGAGTACCTCATGGGCAAG/ ATGCTGTCGATGGCGAAGG	391	311/60
KO#2	CGGAAGAGGACTCCGGA AAA/ AGGTACTCGTTGATCTCCGC	616	261/335
KO#3	CGGAAGAGGACTCCGGA AAA/ AGGTACTCGTTGATCTCCGC	616	498/98

1.2.5 *FOXQ1* 基因敲除单克隆细胞株的筛选 用 1.2.4 中筛选出的靶位点编辑效率较高的细胞消化后计数, 计数后按 1 cell/孔的量接种至 96 孔板进行培养, 12 h 内于镜下观察, 舍去多细胞孔, 单细胞孔继续扩增培养; 待单克隆细胞扩至 12 孔板取一半细胞提取基因组 DNA, 再次用 T7E1 酶鉴定单克隆细胞靶基因的编辑状态, 实验方法同 1.2.4。将有酶切效率的 PCR 产物送至生工生物工程公司进行 Sanger 测序, 从 DNA 水平鉴定 *FOXQ1* 的敲除情况; 根据 DNA 测序结果筛选出 *FOXQ1* 基因稳定敲除的 MCF7 单克隆细胞株。而后, 通过 Western 印迹从蛋白水平进一步鉴定 *FOXQ1* 的敲除。

1.2.6 Western 印迹 将细胞种于 6 孔板, 待细胞长满后加入适量细胞裂解液提取总蛋白, 用 BCA 法测定细胞蛋白浓度; 各取 40  $\mu$ g 蛋白, 用 10% 的 SDS-PAGE 凝胶进行电泳, 80 V 30 min, 100 V 90 min; 转膜, 80 V 120 min; 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h; 分别加入一抗 *FOXQ1* (1:1 000)、HIF1- $\alpha$  (1:1 000) 和  $\beta$ -Actin (1:5 000) 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜; 次日 TBST

洗膜后加入对应的二抗 (1:2 000), 室温孵育 1 h 后 TBST 洗膜, 加入 ECL 试剂化学显色。

1.2.7 划痕实验 将 MCF7-*FOXQ1*<sup>-1</sup> 和 MCF7-*FOXQ1*<sup>-2</sup> 及其野生对照 MCF7-WT 细胞均匀接种于 6 孔板中, 待细胞融合度达到 100%, 用枪头在每个孔内划出 2 $\times$ 2 横竖交叉的 4 条线, PBS 清洗脱落细胞, 更换新鲜 DMEM 培养基, 镜下拍照, 记为 0 h; 常氧组和缺氧组分别置于 20% O<sub>2</sub> 和 1% O<sub>2</sub> 条件下培养, 往后每 12 h 拍照记录一次, 并测量划痕间距; 划痕愈合率=(0 h 划痕间距-培养后划痕间距)/0 h 划痕间距 $\times$ 100%。

1.2.8 transwell 实验 于 24 孔板中加入 750  $\mu$ L 含 20% 血清的 DMEM 培养基, 并将 transwell 小室置于孔中; 分别设置常氧 (20% O<sub>2</sub>) 和缺氧 (1% O<sub>2</sub>) 组, 每组取生长状态良好的 MCF7-*FOXQ1*<sup>-1</sup> 和 MCF7-*FOXQ1*<sup>-2</sup> 细胞及其野生对照 MCF7-WT 细胞各 5 $\times$ 10<sup>4</sup> 个, 重悬于 500  $\mu$ L DMEM 培养基中并接种于小室内, 每个细胞设 3 个重复。48 h 后取出小室, 用棉签轻轻擦拭小室内部去除未发生迁移的细胞, 4% 多聚甲醛室温固定 30 min, 结晶紫室温染色 30 min, PBS 清洗后置于室温风干。显微镜观察染色细胞, 随机选取 5 个视野拍照并统计细胞数。

1.2.9 生物信息学分析 从 METABRIC 数据库中下载并整理了 1 980 例乳腺癌患者的 RNA-seq 数据, 用于分析 *FOXQ1* 与缺氧相关基因的表达相关性。

1.3 统计学处理 采用 GraphPad Prism 8.0 软件进行数据分析和作图。数据符合正态分布, 采用单因素方差分析和 *t* 检验进行差异分析, 采用 Pearson 相关性分析评估基因间 mRNA 表达的相关性。P<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 *FOXQ1* 基因敲除单克隆细胞株的获取 转染 *FOXQ1*-crRNA+tracrRNA 的 MCF7-Cas9 细胞经 T7E1 酶切检测出 *FOXQ1*-crRNA#3 对细胞靶位点有最高的编辑效率。用该细胞进行单克隆培养后经 T7E1 酶切验证出 4 株有靶基因编辑效率的单克隆细胞 (图 1A)。通过进一步比对 sanger 测序结果, 从 4 株有 *FOXQ1* 基因编辑效率的单克隆细胞中鉴定出一株纯合子细胞和 3 株杂合子细胞, 依次命名为 MCF7-*FOXQ1*<sup>-1</sup>、MCF7-*FOXQ1*<sup>-2</sup>、MCF7-*FOXQ1*<sup>-3</sup> 和 MCF7-*FOXQ1*<sup>-4</sup>。纯合子细胞株测序结果显示, 与野生型 MCF7 相比, 其缺失了包括 *FOXQ1*-crRNA#3 识别区域在内的 57 个碱基, 并在缺失序列后的第 10 个碱基位点发生 G-A 碱基突变 (图 1B)。

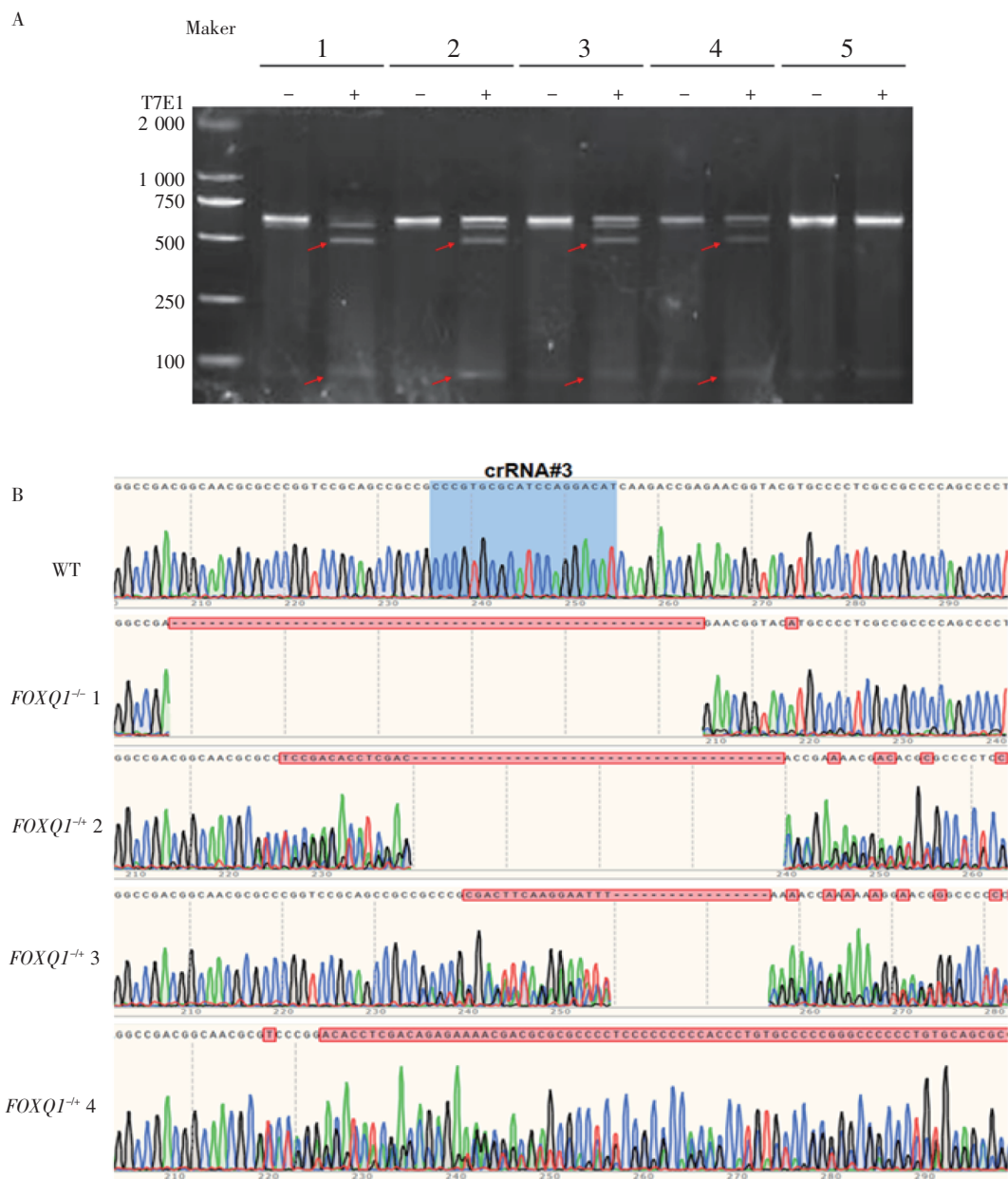


**2.2 *FOXQ1* 基因敲除细胞株的蛋白表达验证** 尽管基因移码突变对翻译过程有极大影响,但此4株 *FOXQ1* 敲除的细胞株中 *FOXQ1* 蛋白的表达是否确切受到影响还需进一步验证。Western 印迹结果显示,与野生型 MCF7-WT 细胞相比,纯合子 MCF7-*FOXQ1*<sup>-/-</sup>1 和杂合子 MCF7-*FOXQ1*<sup>-/+</sup>2 细胞株已完全不表达 *FOXQ1* 蛋白,而杂合子 MCF7-*FOXQ1*<sup>-/+</sup>3 和 MCF7-*FOXQ1*<sup>-/+</sup>4 还能检测到一部分 *FOXQ1* 蛋白的表达。理论上,基因敲除的杂合子细胞对基因的编辑效率应为 50%,但 *FOXQ1* 在 MCF7 细胞中本身是低表达或不表达的,因此 MCF7-*FOXQ1*<sup>-/+</sup>2 可能

是一个 *FOXQ1* 本底表达足够低的单克隆。所以,成功构建了两个 *FOXQ1* 基因稳定敲除的 MCF7 细胞,即纯合子 MCF7-*FOXQ1*<sup>-/-</sup>1 和杂合子 MCF7-*FOXQ1*<sup>-/+</sup>2 细胞株,故后续实验选取此两株进行(图2)。

**2.3 缺氧促进 MCF7 细胞中 *FOXQ1* 的表达** Western 印迹结果显示,与常氧相比,缺氧环境中,MCF7-WT 细胞 *FOXQ1* 蛋白表达显著上调。相应的,*FOXQ1* 敲除杂合子细胞 MCF7-*FOXQ1*<sup>-/+</sup>2 也显示出部分 *FOXQ1* 蛋白的上调(图3)。

**2.4 *FOXQ1* 介导缺氧引起的 MCF7 细胞迁移能力**



注:A:单克隆细胞 T7E1 酶切验证,红色箭头所指为 T7E1 酶有效切割后产生的条带,1 号为纯合子,2~4 号为杂合子;B:单克隆细胞株 sanger 测序结果,蓝色方框显示 *FOXQ1*-crRNA#3 的识别序列

图1 *FOXQ1* 基因敲除单克隆细胞株的获取

Fig 1 Acquisition of *FOXQ1* gene knock out monoclonal cell lines

的增加。划痕实验和 transwell 实验结果显示,与常氧相比,缺氧显著上调 MCF7-WT 的转移能力( $t=3.78$ ,  $P<0.01$ ;  $t=11.94$ ,  $P<0.001$ ),而 *FOXQ1* 敲除的纯合子细胞 MCF7-*FOXQ1*<sup>-/-</sup> 在缺氧条件下的转移能力基本与常氧条件下持平( $t=0.63$ ,  $P=0.55$ ;  $t=2.54$ ,  $P=0.06$ )。相应的, *FOXQ1* 敲除的杂合子细胞 MCF7-*FOXQ1*<sup>+/-</sup> 2 其在缺氧条件下的转移能力有一定程度的上调( $t=2.46$ ,  $P<0.05$ ;  $t=4.95$ ,  $P<0.05$ ),但其上调程度远不及 MCF7-WT。该结果表明, *FOXQ1* 介导了缺氧引起的 MCF7 细胞迁移能力的增加(图 4)。

**2.5 HIF-1 $\alpha$  可能直接转录调控 *FOXQ1* 的表达** 分析来源于 METABRIC 数据库的人类乳腺癌数据,发现 *FOXQ1* 与 *HIF1A* ( $r=0.099$ ,  $P<0.000\ 1$ ) 以及 HIF-1 $\alpha$  的代表性下游靶基因 *LOX*<sup>[19]</sup> ( $r=0.375$ ,  $P<0.000\ 1$ )、*LDHA*<sup>[20]</sup> ( $r=0.136$ ,  $P<0.000\ 1$ ) 和 *GLUT3*<sup>[21]</sup> ( $r=0.213$ ,  $P<0.000\ 1$ ) 的 mRNA 表达有显著相关性;此外,在 *FOXQ1* 的启动子上存在 HIF-1 $\alpha$  的结合位点(图 5)。

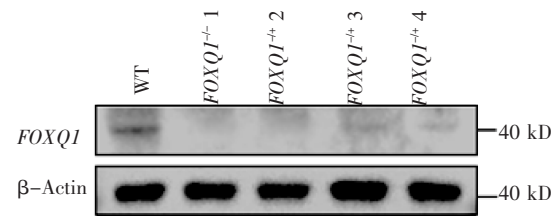


图 2 *FOXQ1* 基因敲除细胞株的蛋白表达验证

Fig 2 Verification of protein expression in *FOXQ1* knockout cell lines

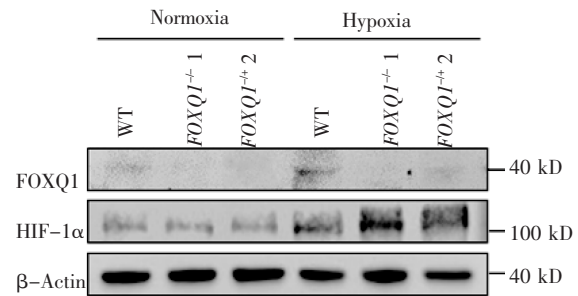
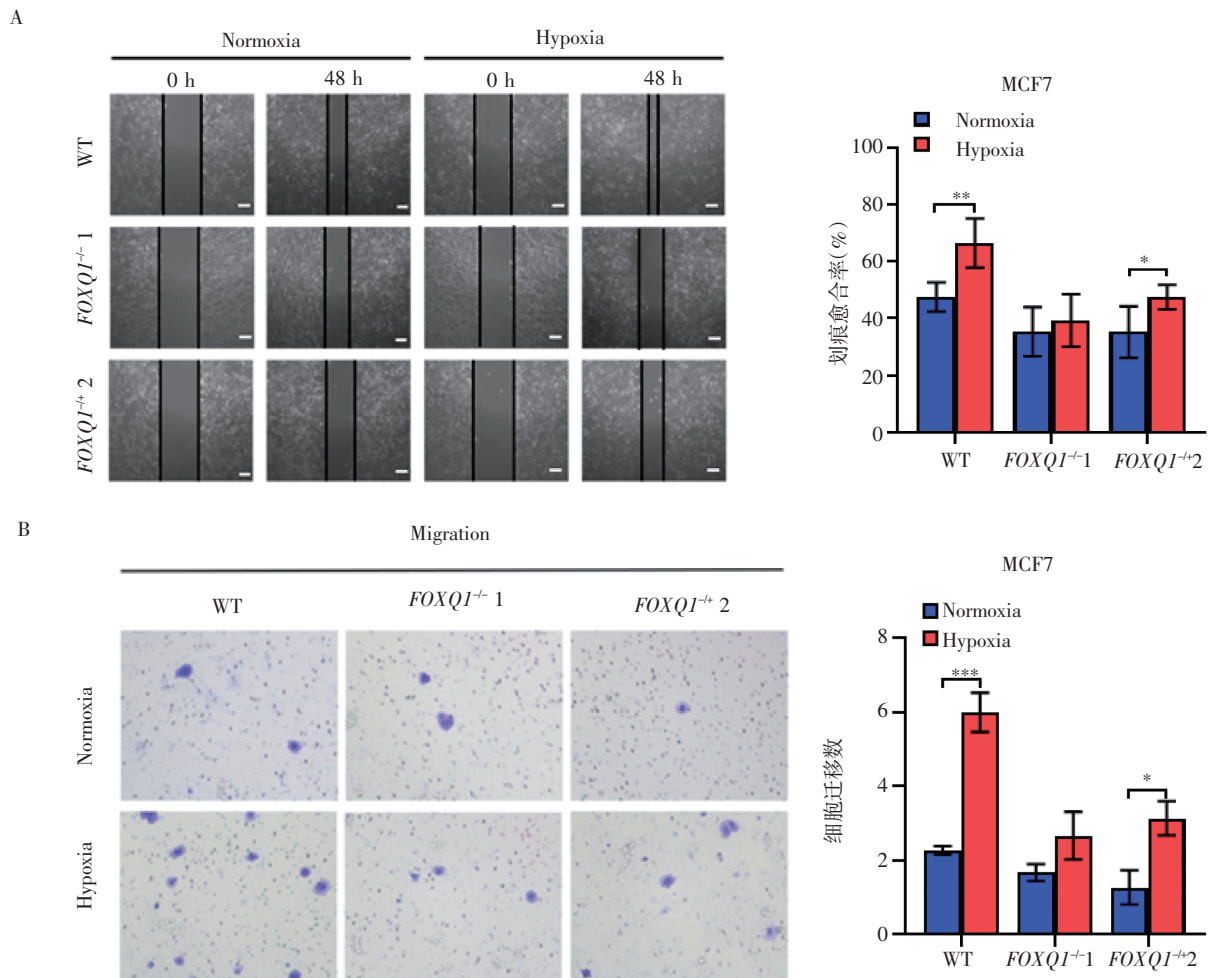


图 3 缺氧促进 MCF7 细胞中 *FOXQ1* 的表达

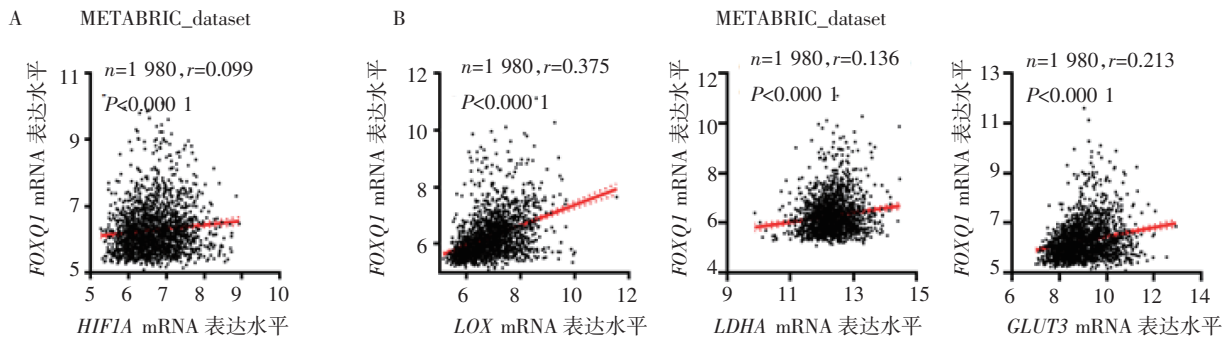
Fig 3 Hypoxia promotes *FOXQ1* expression in MCF7 cells



注:A 划痕实验 0h 和 48h 代表性视野照片(左),48 h 划痕愈合率结果统计(右);B:transwell 实验 48h 代表性视野照片(左),48h 迁移细胞数结果统计(右);比例尺:100  $\mu\text{m}$ ; \*  $P<0.05$ ; \*\*  $P<0.01$ ; \*\*\*  $P<0.001$

图 4 *FOXQ1* 介导缺氧引起的 MCF7 细胞迁移能力的增加

Fig 4 *FOXQ1* mediates the increased migration of MCF7 cells induced by hypoxia



注:A: *FOXQ1* 与 *HIF1A* 的表达相关性分析;B: *FOXQ1* 与 *LOX*、*LDHA* 和 *GLUT3* 的表达相关性分析

图5 HIF-1 $\alpha$  可能直接转录调控 *FOXQ1* 的表达

Fig 5 HIF-1 $\alpha$  may directly regulate the expression of *FOXQ1*

### 3 讨论

自2013年首次被应用于哺乳动物基因组编辑以来,CRISPR/Cas9技术凭借其高效、精准的特点,被广泛应用于探索癌症相关基因的功能、建立荷瘤动物模型、探索药物靶点等,极大地增进了我们对癌症基因组学的认识<sup>[22-23]</sup>。在本研究中,笔者实践了一种更为方便、省时、高效的CRISPR/Cas9解决方案,使用商品化Cas9慢病毒和纯化的crRNA、tracrRNA来构建CRISPR/Cas9基因编辑体系,省去前期构建gRNA载体或Cas9载体的工作,极大的简化了基因编辑实验步骤。最终通过该技术,成功的构建了*FOXQ1*基因敲除的MCF7细胞株,克服了*FOXQ1*在MCF7中无法以siRNA或shRNA进行降表达的难题,并以此为模型在体外初步探究了*FOXQ1*对缺氧环境中乳腺癌细胞迁移能力的影响。结果表明,缺氧能显著上调MCF7细胞中*FOXQ1*的表达,同时也能在体外增加MCF7细胞的迁移能力,并且该过程被*FOXQ1*所介导。这初步印证了笔者的假设。

HIF-1 $\alpha$ 是介导缺氧反应的中心转录因子,其已被广泛认为在肿瘤侵袭、转移中起关键作用<sup>[24]</sup>。在对临床数据的研究中发现,在乳腺癌中*FOXQ1*与*HIF1A*的mRNA表达具有显著的相关性。同时,笔者还进一步分析了HIF-1 $\alpha$ 的已知靶基因*LOX*、*LDHA*和*GLUT3*与*FOXQ1*表达的相关性,发现仍然显著相关。并且*FOXQ1*的启动子上存在HIF-1 $\alpha$ 的结合位点,因此推测*FOXQ1*可能作为HIF-1 $\alpha$ 的直接靶基因而被调节。

研究发现, Twist1、Snail、Slug、ZEB1和ZEB2等EMT调节因子直接或间接受HIF-1 $\alpha$ 的调控<sup>[25]</sup>。而据报道, Twist1、Snail和ZEB2也同样作为*FOXQ1*的下游因子调控肿瘤细胞的迁移侵袭<sup>[26-28]</sup>。同时,笔

者的结果表明, *FOXQ1*完全敲除后缺氧对MCF7迁移能力的促进作用几乎完全被抑制,并且MCF7细胞的迁移能力与*FOXQ1*的表达具有一定的剂量依赖性, *FOXQ1*在缺氧信号所调控的一系列细胞迁移相关下游因子中起关键作用。

总之,通过CRISPR/Cas9系统成功构建了*FOXQ1*基因稳定敲除的乳腺癌MCF7细胞株,并发现*FOXQ1*介导了缺氧对MCF7细胞迁移能力的促进作用。这些工作为今后深入研究乳腺癌的缺氧微环境中*FOXQ1*的功能及其机制提供了良好的实验基础。

#### 参考文献:

- [1] VOSS M J, MÖLLER M F, POWE D G, et al. Luminal and basal-like breast cancer cells show increased migration induced by hypoxia, mediated by an autocrine mechanism[J]. BMC Cancer, 2011, 11: 158.
- [2] VAUPEL P, MAYER A, HOCKEL M. Tumour hypoxia and malignant progression[J]. Methods Enzymol, 2004, 381: 335-354.
- [3] VAUPEL P. Prognostic potential of the pre-therapeutic tumour oxygenation status[J]. Adv Exp Med Biol, 2009, 645: 241-246.
- [4] RANKIN E B, GIACCIA A J. Hypoxic control of metastasis[J]. Science, 2016, 352(6282): 175-180.
- [5] DENGLER V L, GALBRAITH M D, ESPINOSA J M. Transcriptional regulation by hypoxia inducible factors[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2014, 49: 1-15.
- [6] LIU Z J, SEMENZA G L, ZHANG H F. Hypoxia-inducible factor 1 and breast cancer metastasis[J]. J Zhejiang Univ Sci B, 2015, 16(1): 32-43.
- [7] WANG J, LI W, ZHAO Y, et al. Members of FOX family could be drug targets of cancers[J]. Pharmacol Ther, 2018, 181: 183-196.
- [8] RAEIS V, PHILIP-COUDERC P, ROATTIA, et al. Central venous hypoxemia is a determinant of human atrial ATP-sensitive potassium channel expression; evidence for a novel hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$ -Forkhead box class O signaling pathway[J]. Hypertension, 2010, 55(5): 1186-1192.
- [9] ABDELHAFIZ A S, FOUAD M A, SAYED-AHMED M M, et al. Up-regulation of FOXP3 is associated with severity of hypoxia and poor outcomes in COVID-19 patients[J]. Virology, 2021, 563: 74-81.
- [10] WANG X H, JIANG Z H, YANG H M, et al. Hypoxia-induced FOX-

- O4/LDHA axis modulates gastric cancer cell glycolysis and progression[J]. Clin Transl Med, 2021, 11(1): e279.
- [11] TAO Y, LIU Q, WU R, et al. Long noncoding RNA LUCAT1 enhances the survival and therapeutic effects of mesenchymal stromal cells post-myocardial infarction[J]. Mol Ther Nucleic Acids, 2021, 27: 412–426.
- [12] FENG J, ZHANG X, ZHU H, et al. FoxQ1 overexpression influences poor prognosis in non-small cell lung cancer, associates with the phenomenon of EMT[J]. PLoS ONE, 2012, 7: e39937.
- [13] QIAO Y, JIANG X, LEE S T, et al. FOXQ1 regulates epithelial-mesenchymal transition in human cancers[J]. Cancer Res, 2011, 71(8): 3076–3086.
- [14] GAO M, SHIH IEM, WANG T L. The role of forkhead box Q1 transcription factor in ovarian epithelial carcinomas[J]. Int J Mol Sci, 2012, 13: 13881–13893.
- [15] ZHANG H, MENG F, LIU G, et al. Forkhead transcription factor foxq1 promotes epithelial-mesenchymal transition and breast cancer metastasis[J]. Cancer Res, 2011, 71(4): 1292–301.
- [16] MALI P, YANG L, ESVELT K M, et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9[J]. Science, 2013, 339(6121): 823–826.
- [17] DELTCHEVA E, CHYLINSKI K, SHARMA C M, et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III[J]. Nature, 2011, 471(7340): 602–607.
- [18] WYMAN C, KANAAR R. DNA double-strand break repair: all's well that ends well[J]. Annu Rev Genet, 2006, 40: 363–383.
- [19] SAATCI O, KAYMAK A, RAZA U, et al. Targeting lysyl oxidase (LOX) overcomes chemotherapy resistance in triple negative breast cancer[J]. Nat Commun, 2020, 11(1): 2416.
- [20] HU D, LINDERS A, YAMAK A, et al. Metabolic maturation of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes by inhibition of HIF1 $\alpha$  and LDHA[J]. Circ Res, 2018, 123(9): 1066–1079.
- [21] MIMURA I, NANGAKU M, KANKI Y, et al. Dynamic change of chromatin conformation in response to hypoxia enhances the expression of GLUT3 (SLC2A3) by cooperative interaction of hypoxia-inducible factor 1 and KDM3A[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32(15): 3018–3032.
- [22] CONG L, RAN F A, COX D, et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems[J]. Science, 2013, 339(6121): 819–823.
- [23] WANG S W, GAO C, ZHENG Y M, et al. Current applications and future perspective of CRISPR/Cas9 gene editing in cancer[J]. Mol Cancer, 2022, 21(1): 57.
- [24] ZHU H, WANG D, ZHANG L, et al. Upregulation of autophagy by hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  promotes EMT and metastatic ability of CD133+ pancreatic cancer stem-like cells during intermittent hypoxia[J]. Oncol Rep, 2014, 32(3): 935–942.
- [25] YANG M H, WU K J. TWIST activation by hypoxia inducible factor-1 (HIF-1): implications in metastasis and development[J]. Cell Cycle, 2008, 7: 2090–2096.
- [26] ABBA M, PATIL N, RASHEED K, et al. Unraveling the role of FOXQ1 in colorectal cancer metastasis[J]. Mol Cancer Res, 2013, 11(9): 1017–1028.
- [27] ZHANG J, LIU Y, ZHANG J, et al. FOXQ1 promotes gastric cancer metastasis through upregulation of Snail[J]. Oncol Rep, 2016, 35(6): 3607–3613.
- [28] XIA L, HUANG W, TIAN D, et al. Forkhead box Q1 promotes hepatocellular carcinoma metastasis by transactivating ZEB2 and VersicanV1 expression[J]. Hepatology, 2014, 59(3): 958–973.

(2023-02-17 收稿)

欢迎投稿

欢迎订阅