

## 研究论文

## UCHL1基因缺失突变A549肿瘤细胞单克隆株的建立与特性分析

张瑜<sup>1</sup>, 石燕<sup>2</sup>, 松迪<sup>1</sup>, 张璇<sup>2</sup>, 郁琳<sup>2</sup>, 何亚萍<sup>2</sup>, 孙兆贵<sup>2,\*</sup><sup>1</sup>复旦大学上海医学院, 上海 200032; <sup>2</sup>上海市计划生育科学研究所, 国家人口计生委计划生育药具重点实验室, 上海 200032

**摘要:** 本研究旨在探索泛素羧基末端水解酶L1 (ubiquitin C-terminal hydrolase-L1, UCHL1)对非小细胞肺癌细胞系A549细胞的作用。用CRISPR-CAS9基因编辑技术构建UCHL1基因敲除的A549细胞株, 用RT-PCR和Western blot检测A549细胞中UCHL1基因敲除情况, 用CCK-8检测细胞增殖能力的变化, 用流式细胞仪检测细胞周期的变化, 用CCK-8检测A549细胞对顺铂药物敏感性的改变, 用划痕与Transwell实验检测A549细胞迁移能力的变化, 用Western blot检测与A549细胞迁移有关的蛋白表达变化。结果显示, 使用CRISPR-CAS9技术构建的基因移码突变导致A549细胞株UCHL1 mRNA和蛋白缺失, UCHL1基因功能缺失后A549细胞增殖和各细胞周期比例没有明显变化, 但对顺铂的药物敏感性降低, 迁移能力下降, Erk1/2蛋白磷酸化水平升高。以上结果提示, UCHL1基因功能缺失可导致A549细胞顺铂耐药性提高, 细胞迁移能力降低, 其机制可能涉及Erk1/2信号通路的激活。

**关键词:** UCHL1; CRISPR-CAS9; 非小细胞肺癌; 耐药性; 迁移**中图分类号:** Q291

## Establishment and characterization of A549 tumor monoclonal cell line with UCHL1 gene deletion

ZHANG Yu<sup>1</sup>, SHI Yan<sup>2</sup>, SONG Di<sup>1</sup>, ZHANG Xuan<sup>2</sup>, YU Lin<sup>2</sup>, HE Ya-Ping<sup>2</sup>, SUN Zhao-Gui<sup>2,\*</sup><sup>1</sup>Shanghai Medical College, Fudan University, Shanghai 200032, China; <sup>2</sup>National Population and Family Planning Key Laboratory of Contraceptive Drugs & Devices, Shanghai Institute of Planned Parenthood Research, Shanghai 200032, China

**Abstract:** The purpose of this study was to investigate the effects of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 (UCHL1) on non-small cell lung cancer cell line A549. UCHL1 gene knockout A549 cell line was constructed by CRISPR-CAS9 gene editing technique. The mRNA and protein levels of UCHL1 were examined by RT-PCR and Western blot, respectively. Cell proliferation and cycles were analyzed by CCK-8 method and flow cytometry, respectively. The sensitivity of A549 cells to cisplatin was detected by CCK-8 method. Migration ability of A549 cells was detected by scratch assay and Transwell test, and p-Erk expression level was assessed by Western blot. The results showed that UCHL1 gene knockout A549 cells were successfully constructed by CRISPR-CAS9 gene editing technique. After UCHL1 gene knockout, there was no significant change in cell proliferation and cell cycle ratios in A549 cells. UCHL1 gene knockout A549 cells exhibited decreased sensitivity to cisplatin and migration activity, as well as increased p-Erk expression level. These results suggest that the loss of UCHL1 gene function may reduce the sensitivity and migration ability of A549 cells, and this effect may be related to the activation of Erk1/2 signaling pathway.

**Key words:** UCHL1; CRISPR-CAS9; non-small cell lung cancer; drug resistance; migration

肺癌是导致全球男性癌症死亡的主要原因, 也是导致女性癌症死亡的第二大原因<sup>[1]</sup>。非小细胞肺

癌约占全部肺癌类型的80%, 约有75%的患者发现时已处于中晚期, 5年生存率很低。多种基因参

Received 2017-09-26 Accepted 2018-02-05

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81370682, 81170569) and Scientific Project from Science and Technology Commission of Shanghai Municipality, China (No. 17140901700).

\*Corresponding author. Tel: +86-21-64438467; E-mail: sunzgbio@126.com

与了非小细胞肺癌的发病机制, 但具体分子机制尚不清楚<sup>[2-4]</sup>。研究这些基因对阐明致瘤机制具有重要意义, 有助于新生物标志物的发现, 以便癌症的早期发现和准确诊断。

各种蛋白质参与真核生物细胞结构的形成, 这些蛋白的产生和降解受到精确的调控。在多种蛋白降解途径中, 泛素-蛋白酶体系统能降解异常、错误折叠以及异常聚集的蛋白质。泛素羧基末端水解酶 L1 (ubiquitin C-terminal hydrolase-L1, UCHL1) 是泛素-蛋白酶体系统中的一员, 特异性分布于脑、卵巢和睾丸, 其可通过连接单泛素或释放泛素分子的方式来调控蛋白的降解以及维持泛素平衡<sup>[5-8]</sup>。过去的研究显示 UCHL1 可能在帕金森综合征、阿尔茨海默病等神经退行性疾病中发挥一定作用<sup>[8]</sup>。近期的研究显示 UCHL1 参与肿瘤的发生、发展过程, 且在不同肿瘤中所起的作用也不同<sup>[9]</sup>。UCHL1 作为一种致癌基因, 可促进结肠癌、胃癌等癌细胞的增殖、转移与侵袭<sup>[10-13]</sup>; 而其作为一种抑癌基因, 可抑制乳腺癌和卵巢癌等癌细胞的增殖, 促进癌细胞的凋亡<sup>[14, 15]</sup>。UCHL1 在正常肺组织中不表达, 但在原发性肺癌以及肺癌细胞系中高表达<sup>[16]</sup>。Kim 等利用 RNAi 技术沉默 H157 非小细胞肺癌细胞中 *UCHL1* 基因的表达, 发现 UCHL1 表达降低后, 细胞转移能力降低<sup>[17]</sup>。A549 细胞也是一种具有高转移能力的非小细胞肺癌细胞系, 且 UCHL1 在该细胞系中高表达, 所以我们推测 *UCHL1* 可能在该细胞系中发挥致癌基因的作用。由于 RNAi 基因编辑技术并不能使 *UCHL1* 基因完全丧失生物学功能, 为进一步验证 *UCHL1* 在非小细胞肺癌发生、发展中的作用, 我们通过 CRISPR-CAS9 基因编辑技术构建了一个 *UCHL1* 敲除的 A549 细胞模型, 并观察细胞增殖、迁移、耐药性等能力的变化, 为非小细胞肺癌的治疗提供更多的参考信息。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞培养** 非小细胞肺癌细胞系 A549 为本研究组保存, 培养液为含 10% 胎牛血清 (Gibco, 美国)、100 mmol/L 青链霉素 (Gibco, 美国)、100 mmol/L GlutaMAX (Gibco, 美国) 的 RPMI-1640 培养基 (Gibco, 美国), 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养。

**1.2 重组真核表达质粒的构建** pHMG-sgRNA 表达质粒与人 UCHL1 sgRNA 购自上海君伯生物

技术有限公司, sgRNA 设计在 *UCHL1* 基因的 3 号外显子上, 引物序列: F: 5'-CACCGTGGCGCTTC-GTGGACGTGC-3', R: 5'-AAACGCACGTCCAC-GAAGCGCCAC-3'。将合成的引物退火形成二聚体, 并与 pHMG-sgRNA 线性质粒连接, 连接产物转化 TOP10 感受态 (天根生化科技有限公司) 后, 涂于含有氨苄抗性的 LB 培养板上, 次日挑取单克隆送样至 Invitrogen 公司测序鉴定。

**1.3 细胞转染** 将 A549 细胞接种于 24 孔板, 每孔  $5 \times 10^4$  个细胞, 用 Opti-MEM (Gibco, 美国) 培养至细胞融合度达到 70%, 以 Lipofectamine<sup>®</sup> 2000 (Invitrogen, 美国) 为转染试剂, 按说明书进行细胞转染, 转染 6 h 后将培养基换成完全培养基并继续培养 24 h。为得到稳定转染的细胞系, 用浓度为 1 μg/mL 的嘌呤霉素 (Invitrogen, 美国) 筛选 48~72 h, 之后用有限稀释法进行单克隆筛选。挑取单克隆用 Western blot 鉴定 *UCHL1* 是否被敲除, 继而将敲除细胞株扩大培养。

**1.4 基因组水平鉴定** 收集细胞, 按 EasyPure Genomic DNA Kit (北京全式金生物技术有限公司) 说明书提取 A549 细胞基因组 DNA。通过 NCBI-Prime BLAST 工具设计鉴定引物: F: 5'-CGATG-GAGATCAACCCCGAG-3'; R: 5'-CCAGGGAGTAG-GTACCACGA-3'。分别以野生型 A549 与 *UCHL1* 基因敲除单克隆细胞基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 按普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (天根生化科技有限公司) 说明书割胶回收 DNA 并送至 Invitrogen 公司测序。

**1.5 Real-time PCR** 收集细胞, 按 Trizol (Invitrogen, 美国) 说明书提取总 RNA 并测定其浓度。取 1 μg RNA 反转录成 cDNA, 操作步骤按 ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO, 日本) 说明书进行。通过 NCBI Primer-BLAST 工具设计鉴定引物: F: 5'-CCTAGGCTATTTCT-GCCGGG-3', R: 5'-TGGCCACTGCGTGAATA-AGT-3'。分别以野生型 A549 与 *UCHL1* 基因敲除单克隆细胞的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增, PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 用琼脂糖凝胶成像系统拍照。

**1.6 细胞增殖检测** 以 1 000 个细胞/孔的密度将细胞接种于 96 孔板, 每组设置 5 个复孔, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养。分别在接种后的第 1、2、3、4 和 5 天的时间点, 向每孔细胞中

加入 100  $\mu\text{L}$  新鲜培养基与 5  $\mu\text{L}$  CCK-8 (Cell Counting Kit-8, TOYOBO, 日本), 置 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱孵育 1.5 h 后测量  $A_{450}$ , 绘制细胞生长曲线。

**1.7 细胞周期检测** 将各组细胞按相同数目接种至 10 cm 培养皿中, 待细胞增殖并融合至 70% 时, 去掉旧培养基, 用 RPMI-1640 培养液血清饥饿细胞 48 h, 去除无血清培养液, 加入新鲜培养基继续培养至细胞融合度为 90% 左右。收集细胞并用 70% 乙醇 4  $^{\circ}\text{C}$  固定过夜, 按细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒 (上海碧云天) 说明书对细胞进行 PI 染色, 细胞流式检测由复旦大学基础医学院公共技术平台完成, 用 CELL Quest 软件获取 10 000 个细胞数据, 并用 ModFit LT- 细胞周期软件分析。

**1.8 细胞耐药性检测** 以 5 000 个细胞 / 孔的密度将细胞接种于 96 孔板, 每组设 4 个复孔, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养 24 h。将顺铂 (Sigma, 美国) 溶于 PBS, 储存液浓度为 1 mg/mL, 使用时用培养基将储存液稀释成不同终浓度 (0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 并加入相应孔中, 每孔 100  $\mu\text{L}$ , 培养 24 h 后去掉含药培养基, 用 PBS 洗 3 次, 每孔加入 100  $\mu\text{L}$  新鲜培养基与 5  $\mu\text{L}$  CCK-8, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱孵育 1.5 h 后测量  $A_{450}$ , 计算细胞存活率 = 每组细胞各药物浓度的吸光度平均值 / 该组细胞药物浓度为 0 时的吸光度平均值。

**1.9 细胞划痕实验** 将细胞接种于 24 孔板, 每组设 6 个复孔, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养至细胞增殖融合至 95% 以上时, 用 20  $\mu\text{L}$  的无菌枪头在培养皿底部划直线, 用 PBS 冲掉未贴壁的细胞, 换成新鲜培养基, 在划痕后的 0、7 和 12 h 时用倒置显微镜观察拍照。使用 Photoshop 软件测量每组伤口距离 (S) 并计算伤口愈合率 (wound healing rate, WHR),  $\text{WHR} = (S_{0\text{h}} - S_{12\text{h}}) / S_{0\text{h}} \times 100\%$ 。

**1.10 Transwell 迁移实验** 将 Transwell 小室 (不含 Matrigel 基质胶) 放入 24 孔板中, 每组细胞设 3 个复孔, 下室加入 600  $\mu\text{L}$  含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基, 上室加入 100  $\mu\text{L}$  细胞密度为  $3 \times 10^4 / \text{mL}$  的无血清细胞悬液, 置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养 17 h。取出小室, 用棉签擦去上室内的细胞, 用 PBS 洗 3 次, 4% 多聚甲醛室温固定 15 min, 用 PBS 洗 3 次, 用 0.1% 结晶紫染色液 (上海碧云天) 染色 20 min, 用 PBS 洗 3 次, 风干后在倒置显微镜下观察细胞穿过小室的数量并拍照。将拍照后的小室放于 24 孔板中, 加入 600

$\mu\text{L}$  甲醇, 4  $^{\circ}\text{C}$  洗脱 30 min, 将洗脱液转移至比色皿中, 用分光光度计测量  $A_{560}$ 。

**1.11 Western blot** 收集细胞, 用细胞裂解液 (上海碧云天) 裂解各组细胞提取总蛋白, 然后进行 SDS-PAGE 电泳并转移至 PVDF 膜, 用封闭液 (6% 脱脂奶粉 / TBST) 封闭 3~5 h, 加入一抗 ( $\beta$ -actin, Proteintech, 1:4 000;  $\beta$ -tubulin, Proteintech, 1:4 000; UCHL1, Invitrogen, 1:2 000; Erk1/2, Cell Signaling Technology, 1:1 000; p-Erk1/2, Cell Signaling Technology, 1:1 000) 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 室温复温 1 h, TBST 洗膜 6 次, 加入相应二抗 (1:5 000) 室温孵育 1 h, TBST 洗膜 6 次, 加入 High-sig ECL Western Blotting Substrate 发光试剂 (上海天能) 进行发光反应, 然后用化学发光成像系统分析仪拍照, 并用 ImageJ 软件分析灰度值。

**1.12 数据分析** 实验数据用  $\text{mean} \pm \text{SD}$  表示, 采用 SPSS 21.0 分析数据。两组间比较采用配对  $t$  检验或独立样本  $t$  检验,  $P < 0.05$  时认为差别具有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 构建 UCHL1 基因敲除 A549 细胞系

将 pHMG-sgRNA 线性表达载体与 UCHL1 的 sgRNA 连接并转化感受态后进行测序, 测序结果显示 sgRNA 正确插入表达载体中。从菌液中抽提质粒并用转染试剂转染 A549 细胞, 用嘌呤霉素进行抗性筛选后挑取单克隆, 扩大培养并对 UCHL1 进行基因组、mRNA、蛋白水平的鉴定。结果显示 1、2 和 3 号单克隆的 UCHL1 基因在第 775 个碱基与第 776 个碱基间插入了一个碱基, 即在 UCHL1 三号外显子中发生移码突变 (图 1B), 导致 UCHL1 在 mRNA 与蛋白水平都不再表达 (图 1C、D)。以上结果说明 A549 细胞中的 UCHL1 基因被成功敲除。3 个单克隆的基因突变序列一致, 我们选取了 3 个单克隆当中的两个 (1、2 号单克隆) 进行后续研究。

### 2.2 UCHL1 基因敲除不影响细胞增殖与细胞周期

CCK-8 细胞增殖实验结果显示, 随着时间的延长, 细胞密度逐渐升高, 野生型 A549 细胞与 UCHL1 基因敲除单克隆细胞在增殖上无显著性差异 (图 2A)。收集野生型 A549 细胞与 UCHL1 基因敲除单克隆 A549 细胞, 通过 PI 染色以及流式细胞仪对细胞进行细胞周期的检测, 结果显示 A549 对照组与 UCHL1 基因敲除的单克隆实验组在细胞周

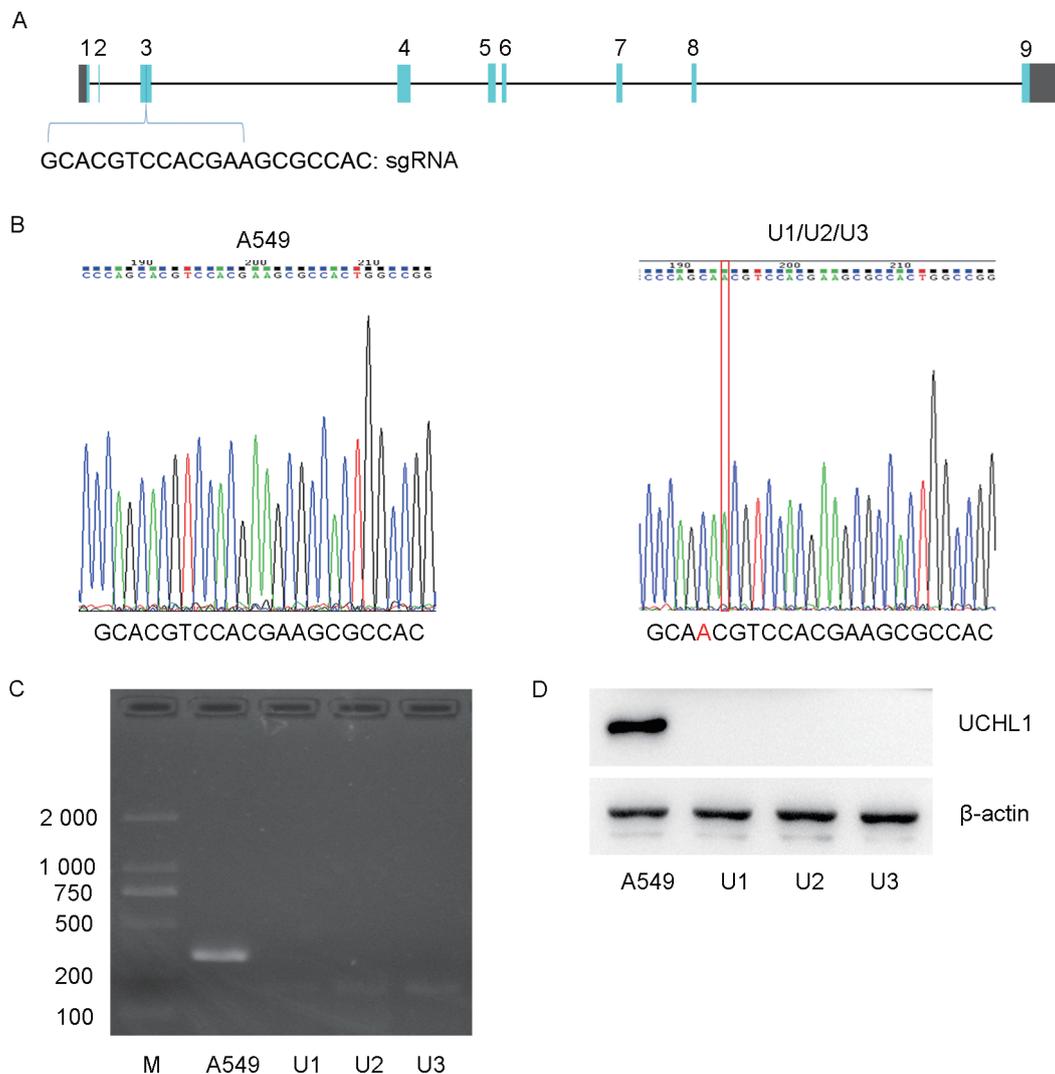


图 1. *UCHL1*基因敲除A549细胞株成功构建

Fig. 1. *UCHL1* gene knockout A549 cell lines were successfully constructed. A: The sgRNA was designed on the region of third exon of human *UCHL1*. B: The sequencing result of A549 cells and clones 1, 2, 3. Base A in red color represented frameshift mutation. C: The *UCHL1* mRNA levels of A549 cells and clones 1, 2, 3. D: The *UCHL1* protein expression levels in A549 cells and clones 1, 2, 3. U1/U2/U3 represent *UCHL1* knockout clones 1/2/3, respectively. M represents Marker.

期各个时期的细胞比例之间无显著性差异(图2B),表明 *UCHL1* 并不影响 A549 细胞的增殖与周期进程。

### 2.3 *UCHL1* 基因敲除降低 A549 细胞对顺铂的敏感性

为验证 *UCHL1* 基因敲除是否影响 A549 细胞对顺铂的敏感性,我们设置了 8 个顺铂药物浓度梯度,检测 A549 细胞与 *UCHL1* 基因敲除单克隆细胞的存活率之间差异,结果显示 A549 细胞与 *UCHL1* 基因敲除单克隆细胞的存活率均随着顺铂药物浓度的增加而降低。当顺铂浓度为 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时, *UCHL1* 基因敲除单克隆细胞存活率显著高于野生型 A549

细胞(均  $P < 0.01$ )(图3),表明 *UCHL1* 基因敲除降低 A549 细胞对顺铂的敏感性。

### 2.4 *UCHL1* 基因敲除降低 A549 细胞迁移能力

细胞划痕实验结果显示:与野生型 A549 细胞相比,1 号单克隆细胞在 7、12 h 时的迁移率均显著降低( $P < 0.01$ );而 2 号单克隆细胞在 7 h 的迁移率无显著变化,在 12 h 的迁移率显著降低( $P < 0.05$ )(图4A)。Transwell 实验结果显示:*UCHL1* 基因敲除的 A549 细胞迁移数目显著低于 A549 细胞(均  $P < 0.001$ )(图4B)。以上结果表明 *UCHL1* 基因敲除后可降低 A549 细胞的迁移能力。

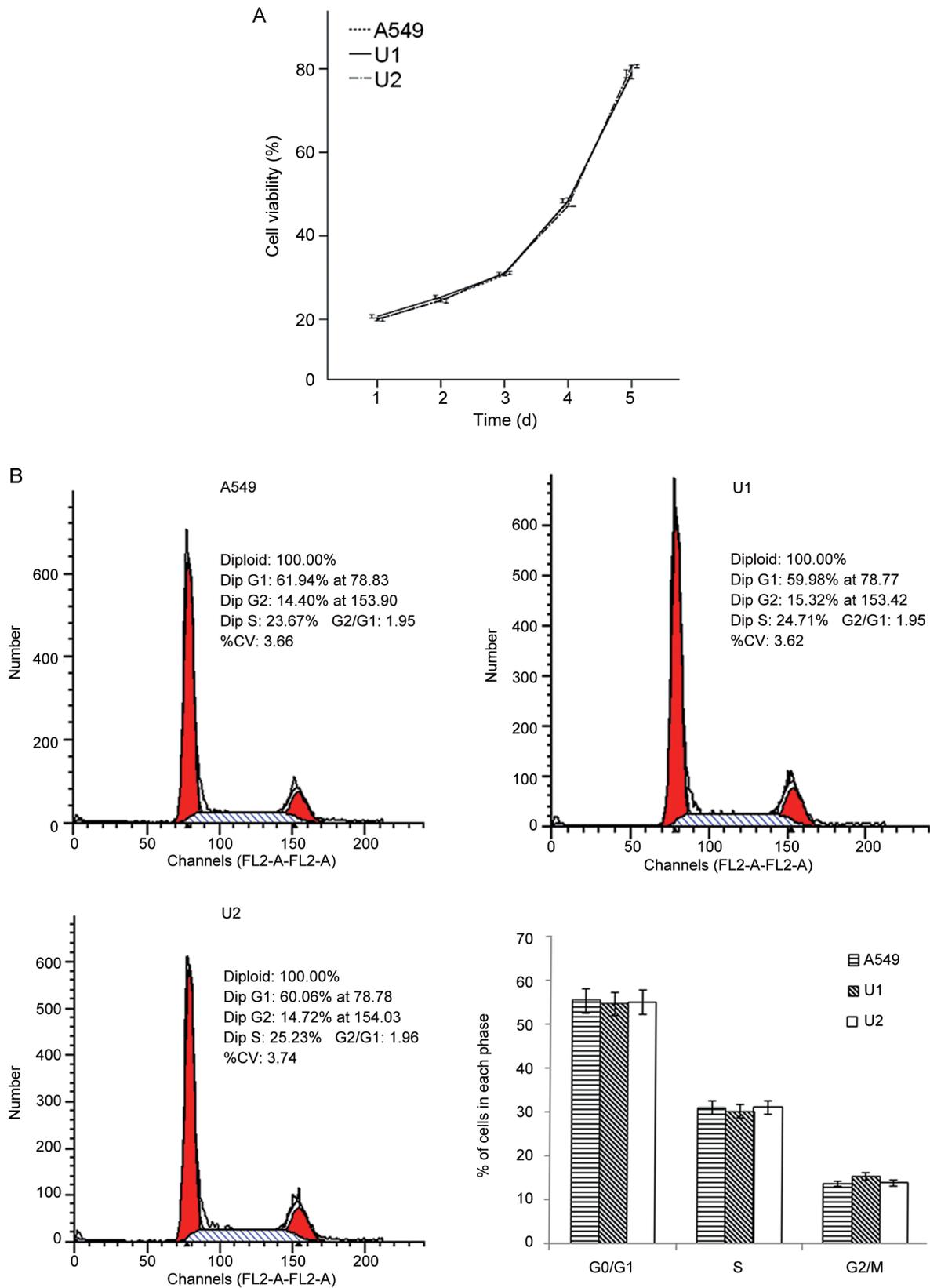


图 2. *UCHL1*基因敲除对A549细胞增殖和细胞周期的影响

Fig. 2. Effect of *UCHL1* gene knockout on cell proliferation and cell cycle distribution of A549 cells. A: Cell proliferation analyzed by CCK-8 method. B: Cell cycle distribution detected by flow cytometry. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ .

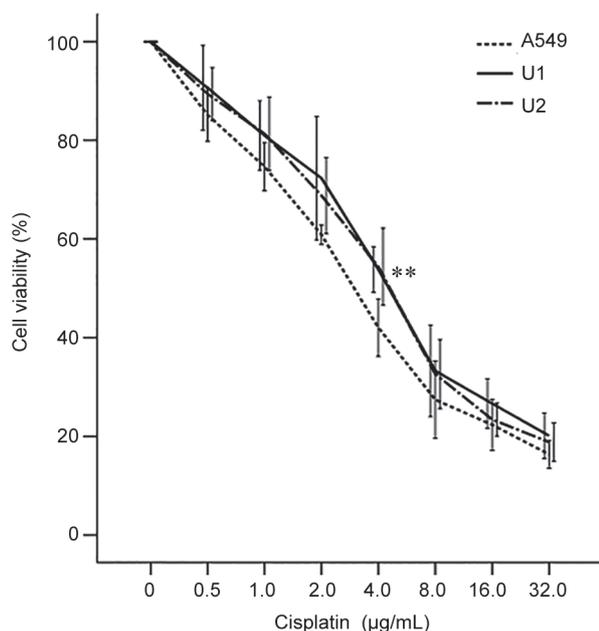


图 3. *UCHL1* 基因敲除降低 A549 细胞对顺铂的药物敏感性  
Fig. 3. *UCHL1* gene knockout reduces sensitivity of A549 cells to cisplatin. A549 cells and *UCHL1* knockout A549 cells (U1, U2) were treated with 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, and 32 µg/mL cisplatin for 24 h. Cell proliferation was analyzed by CCK-8 method to assess drug sensitivity. Mean ± SD,  $n = 5$ . \*\* $P < 0.01$  vs A549.

### 2.5 *UCHL1* 基因敲除提高 Erk1/2 蛋白磷酸化水平

为了检验 *UCHL1* 介导的细胞迁移过程是否涉及 Erk1/2 信号通路, 我们通过蛋白免疫印迹的方法检测了野生型 A549 细胞与 *UCHL1* 基因敲除的单克隆细胞中 Erk1/2 蛋白磷酸化水平的变化。结果显示, 野生型 A549 细胞与 *UCHL1* 基因敲除细胞的 Erk 磷酸化水平具有显著性差异 ( $P < 0.05$ ), *UCHL1* 基因敲除后 A549 细胞的 Erk1/2 磷酸化水平升高 (图 5)。

## 3 讨论

近年来, *UCHL1* 在肿瘤中的作用逐渐受到研究者们的关注。肿瘤细胞可通过影响细胞周期、葡萄糖代谢与蛋白质稳态来改变正常细胞功能, 其生长与存活很大程度上依赖于持续的蛋白表达转变。*UCHL1* 作为一种去泛素化的水解酶, 它可以调节蛋白的平衡, 因此 *UCHL1* 的表达与肿瘤的发生、发展可能具有一定联系。本研究结果显示 *UCHL1* 高表达于非小细胞肺癌细胞系 A549 细胞中, 利用 CRISPR-CAS9 基因编辑技术敲除 *UCHL1* 基因后,

A549 细胞的增殖能力和细胞周期未受影响, 但其迁移能力降低, 对顺铂的药物敏感性也降低。

肿瘤转移是指恶性肿瘤细胞从原发部位, 经淋巴道, 血管或体腔等途径, 到达其他部位继续生长的过程<sup>[18-20]</sup>。肿瘤细胞迁移与侵袭能力的改变与多种因素有关。研究显示 Erk1/2 的激活通常与细胞迁移和侵袭有关。激活的 Erk 可以直接磷酸化一系列与细胞迁移有关的蛋白, 比如 FAK 与 Paxillin<sup>[21]</sup>。另外, Erk 也可进入细胞核并激活一系列转录因子, 这些转录因子能激活与细胞迁移有关的靶基因的转录, 从而促进肿瘤细胞的迁移<sup>[22, 23]</sup>。本研究结果显示 *UCHL1* 敲除后 A549 细胞迁移能力降低, p-Erk1/2 表达量增加。然而, 在 Gu 等研究显示, 在不表达 *UCHL1* 的 MNK45 与 BGC823 胃癌细胞系中过表达 *UCHL1*, 细胞的迁移与侵袭能力提高, p-Erk 表达量升高<sup>[13]</sup>。Gu 等认为 *UCHL1* 作为一个致癌基因, 通过上调 Erk1/2 磷酸化而促进了肿瘤细胞的迁移, 这与我们的研究结果存在差异。但也有文献报道与我们的结果一致, 即在不表达 *UCHL1* 的乳腺癌 MCF-7 细胞系中过表达 *UCHL1* 基因时, 细胞的迁移与侵袭能力提高, 伴随 p-Erk 的表达水平降低<sup>[10]</sup>。因而我们推测, 在野生型 A549 细胞中, p-Erk 发挥功能后不会一直存在, 需要在去磷酸化酶的作用下维持 Erk 蛋白的磷酸化水平, *UCHL1* 是泛素蛋白酶系统中的一员, 其受损后可能影响去磷酸化酶发挥作用, 其具体机制是发挥去泛素化酶功能, 还是通过与蛋白结合形成复合物而发挥作用需要进一步的研究。另一方面, 以上研究结果之间出现差异, 也可能与细胞株不同有关。对于以上几种细胞系来说, *UCHL1* 均发挥致癌基因的作用, 促进肿瘤细胞的迁移与侵袭, 但其是否通过 p-Erk 途径来影响细胞迁移, 还需要更多的研究证实。

顺铂作为第一代铂类抗肿瘤药物, 具有较强的广谱抗癌作用, 其在配合放疗治疗晚期非小细胞肺癌时疗效突出。有文献报道 *UCHL1* 的表达与顺铂耐药性相关, 即在卵巢癌细胞系 A2780 中敲低 *UCHL1* 基因后, 该肿瘤细胞的顺铂耐药性增加<sup>[14]</sup>。本研究结果表明, 在 A549 细胞中敲除 *UCHL1* 基因后肿瘤细胞的耐药性增加。对于顺铂的抗肿瘤作用机制, 目前取得较多共识的是, 顺铂跨膜进入细胞后发生解离反应, 其氯配体被水分子取代而形成带正电的分子, 之后带正电的顺铂分子会靶向 DNA, 与嘌呤碱基的 N7 位点结合形成加合物, 进

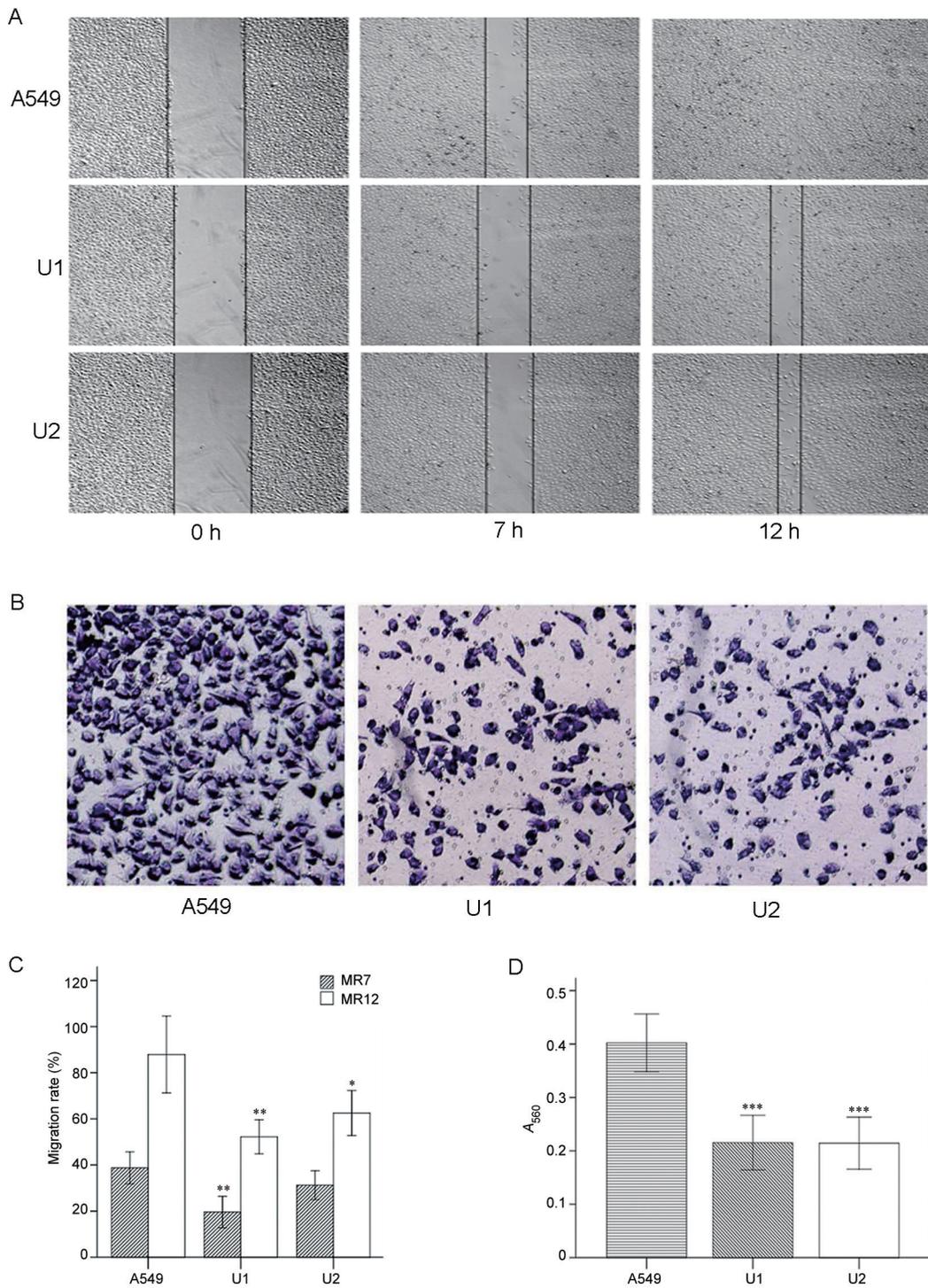


图 4. *UCHL1* 基因敲除降低 A549 细胞迁移能力

Fig. 4. *UCHL1* gene knockout reduced the migration ability of A549 cells. *A, C*: Wound healing assay. Mean  $\pm$  SD,  $n = 6$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs A549 cells. MR7 and MR12 represent cell migration rates at 7 and 12 h after scratch, respectively. *B, D*: Transwell assay. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs A549 cells.

而抑制细胞 DNA 的复制与转录过程，最终诱导癌细胞的凋亡<sup>[24]</sup>。任何影响顺铂与 DNA 结合的因素都有可能致肿瘤细胞产生耐药性。有研究显示

细胞膜上的铜转运蛋白 (copper transporter, CTR) 对顺铂的摄取具有重要作用<sup>[25]</sup>，敲除 *CTR* 基因会导致细胞内顺铂的积累量大大降低，同时耐药性

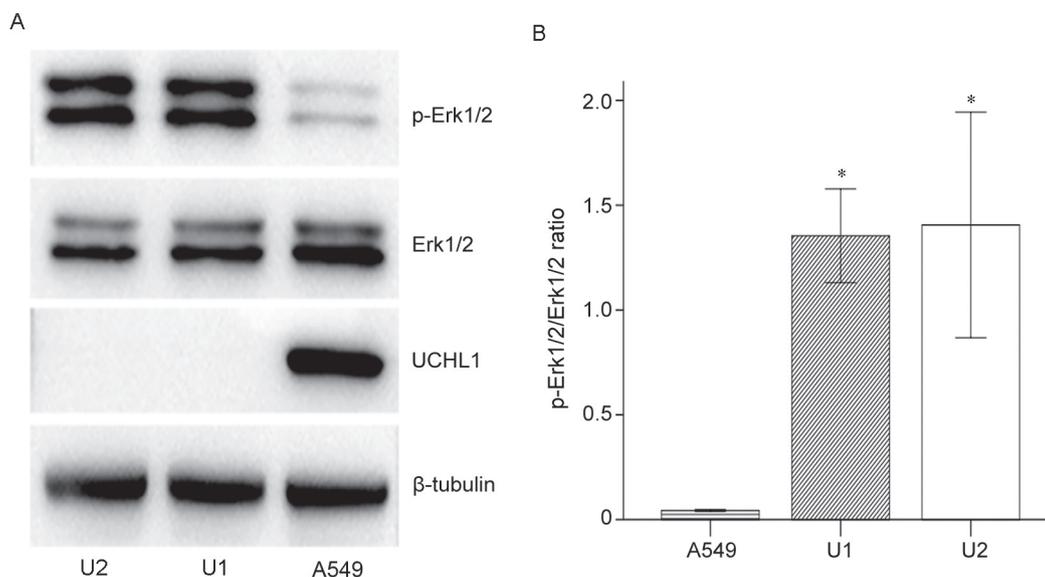


图 5. *UCHL1*基因敲除上调Erk1/2 蛋白磷酸化水平

Fig. 5. *UCHL1* gene knockout up-regulated Erk1/2 protein phosphorylation. A: Image of representative Western blot. B: Analysis results. Mean  $\pm$  SD,  $n = 3$ . \* $P < 0.05$  vs A549 cells.

增强<sup>[26, 27]</sup>。另外,近期的研究表明,铜伴侣蛋白Atox1能够调节CTR对顺铂的摄取,缺失Atox1的细胞对顺铂的摄取能力减弱,同时也使细胞内的顺铂积累量减少<sup>[28]</sup>。*UCHL1*作为一个去泛素化蛋白酶,可使泛素化的靶蛋白去泛素化,逃脱被泛素-蛋白酶体系统降解的命运。所以我们猜测,由于*UCHL1*基因敲除导致去泛素化酶功能缺失,促进顺铂摄取的蛋白降解增多,从而使细胞对顺铂的摄取量减少,最终导致A549细胞的顺铂耐药性增加。除此之外,有文献报道*UCHL1*并不是通过去泛素化水解酶作用来影响靶蛋白的降解,而是通过与靶蛋白结合来发挥作用的<sup>[10]</sup>,所以*UCHL1*也可能是通过结合CTR或Atox1蛋白来调节其功能,进而影响A549对顺铂的耐药性。*UCHL1*基因敲除后A549对顺铂的耐药性增加,即*UCHL1*蛋白对于用顺铂治疗该类非小细胞肺癌来说是有利的。这提示我们,若检测到非小细胞肺癌患者体内*UCHL1*基因高表达,可尝试优先使用铂类药物进行药物治疗。

除此之外,以往关于*UCHL1*在肿瘤中的研究,大部分都是运用基因过表达或siRNA沉默基因表达的基因表达人工调控技术,siRNA是从转录水平上对基因进行编辑来沉默基因表达,基因敲除效率低,不能完全除去基因的功能,所产生的沉默作用持续时间较短。本研究运用CRISPR-CAS9技术对*UCHL1*基因的DNA序列进行直接编辑,测序结果显示

DNA序列发生移码突变。DNA发生单碱基的变异一般不影响其mRNA的转录,但本研究显示DNA发生移码突变后*UCHL1*基因在mRNA和蛋白水平不再表达,而导致其表达缺失,具体是发生在转录期间还是发生在转录后的剪接过程仍需进一步的研究。

综上所述,我们通过CRISPR-CAS9基因编辑技术使A549细胞内*UCHL1*基因组DNA发生移码突变,使其在mRNA与蛋白水平均不表达。*UCHL1*基因功能缺失可导致A549细胞顺铂耐药性的提高和细胞迁移能力的降低,其机制可能涉及Erk1/2信号通路的功能上调。对于*UCHL1*在非小细胞肺癌中发挥作用所涉及的具体分子机制,需要通过全基因组转录本测序的方式进行进一步综合研究。

### 参考文献

- 1 Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin* 2017; 67(1): 7–30.
- 2 Mar N, Vredenburg JJ, Wasser JS. Targeting HER2 in the treatment of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2015; 87(3): 220–225.
- 3 Xie KJ, He HE, Sun AJ, Liu XB, Sun LP, Dong XJ. Expression of ERCC1, MSH2 and PARP1 in non-small cell lung cancer and prognostic value in patients treated with platinum-based chemotherapy. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(6): 2591–2596.

- 4 Fan CF, Miao Y, Lin XY, Zhang D, Wang EH. Expression of a phosphorylated form of ATF4 in lung and non-small cell lung cancer tissues. *Tumour Biol* 2014; 35(1): 765–771.
- 5 Christianson MS, Gerolstein AL, Lee HJ, Monseur BC, Robinson DN, Evans JP. Effects of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCH-L1) inhibition on sperm incorporation and cortical tension in mouse eggs. *Mol Reprod Dev* 2016; 83(3): 188–189.
- 6 Koyanagi S, Hamasaki H, Sekiguchi S, Hara K, Ishii Y, Kyuwa S, Yoshikawa Y. Effects of ubiquitin C-terminal hydrolase L1 deficiency on mouse ova. *Reproduction* 2012; 143(3): 271–279.
- 7 Gu YQ, Chen QJ, Gu Z, Shi Y, Yao YW, Wang J, Sun ZG, Tso JK. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 contributes to the oocyte selective elimination in prepubertal mouse ovaries. *Acta Physiol Sin (生理学报)* 2009; 61(2): 175–184.
- 8 Osaka H, Wang YL, Takada K, Takizawa S, Setsuie R, Li H, Sato Y, Nishikawa K, Sun YJ, Sakurai M, Harada T, Hara Y, Kimura I, Chiba S, Namikawa K, Kiyama H, Noda M, Aoki S, Wada K. Ubiquitin carboxy-terminal hydrolase L1 binds to and stabilizes monoubiquitin in neuron. *Hum Mol Genet* 2003; 12(16): 1945–1958.
- 9 Fang Y, Shen X. Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolases: involvement in cancer progression and clinical implications. *Cancer Metastasis Rev* 2017; 36(4): 669–682.
- 10 Luo Y, He J, Yang C, Orange M, Ren X, Blair N, Tan T, Yang JM, Zhu H. UCH-L1 promotes invasion of breast cancer cells through activating Akt signaling pathway. *J Cell Biochem* 2018; 119(1): 691–700.
- 11 Zheng S, Qiao G, Min D, Zhang Z, Lin F, Yang Q, Feng T, Tang L, Sun Y, Zhao H, Li H, Yu W, Yang Y, Shen Z, Yao Y. Heterogeneous expression and biological function of ubiquitin carboxy-terminal hydrolase-L1 in osteosarcoma. *Cancer Lett* 2015; 359(1): 36–46.
- 12 Kim HJ, Magesh V, Lee JJ, Kim S, Knaus UG, Lee KJ. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 increases cancer cell invasion by modulating hydrogen peroxide generated via NADPH oxidase 4. *Oncotarget* 2015; 6(18): 16287–16303.
- 13 Gu YY, Yang M, Zhao M, Luo Q, Yang L, Peng H, Wang J, Huang SK, Zheng ZX, Yuan XH, Liu P, Huang CZ. The de-ubiquitinase UCHL1 promotes gastric cancer metastasis via the Akt and Erk1/2 pathways. *Tumour Biol* 2015; 36(11): 8379–8387.
- 14 Jin C, Yu W, Lou X, Zhou F, Han X, Zhao N, Lin B. UCHL1 is a putative tumor suppressor in ovarian cancer cells and contributes to cisplatin resistance. *J Cancer* 2013; 4(8): 662–670.
- 15 Xiang T, Li L, Yin X, Yuan C, Tan C, Su X, Xiong L, Putti TC, Oberst M, Kelly K, Ren G, Tao Q. The ubiquitin peptidase UCHL1 induces G0/G1 cell cycle arrest and apoptosis through stabilizing p53 and is frequently silenced in breast cancer. *PLoS One* 2012; 7(1): e29783.
- 16 Hibi K, Westra WH, Borges M, Goodman S, Sidransky D, Jen J. PGP9.5 as a candidate tumor marker for non-small-cell lung cancer. *Am J Pathol* 1999; 155(3): 711–715.
- 17 Kim HJ, Kim YM, Lim S, Nam YK, Jeong J, Kim HJ, Lee KJ. Ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 is a key regulator of tumor cell invasion and metastasis. *Oncogene* 2009; 28(1): 117–127.
- 18 Friedl P, Wolf K. Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(5): 362–374.
- 19 Bacac M, Stamenkovic I. Metastatic cancer cell. *Annu Rev Pathol* 2008; 3: 221–247.
- 20 Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 2006; 127(4): 679–695.
- 21 Huang C, Jacobson K, Schaller MD. MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 2004; 117(20): 4619–4628.
- 22 Cargnello M, Roux PP. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev* 2011; 75(1): 50–83.
- 23 Klemke RL, Cai S, Giannini AL, Gallagher PJ, de Lanerolle P, Cheresch DA. Regulation of cell motility by mitogen-activated protein kinase. *J Cell Biol* 1997; 137(2): 481–492.
- 24 Jordan P, Carmo-Fonseca M. Molecular mechanisms involved in cisplatin cytotoxicity. *Cell Mol Life Sci* 2000; 57(8–9): 1229–1235.
- 25 Howell SB, Safaei R, Larson CA, Sailor MJ. Copper transporters and the cellular pharmacology of the platinum-containing cancer drugs. *Mol Pharmacol* 2010; 77(6): 887–894.
- 26 Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anti-cancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(22): 14298–14302.
- 27 Holzer AK, Manorek GH, Howell SB. Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin. *Mol Pharmacol* 2006; 70(4): 1390–1394.
- 28 Safaei R, Maktabi MH, Blair BG, Larson CA, Howell SB. Effects of the loss of Atox1 on the cellular pharmacology of cisplatin. *J Inorg Biochem* 2009; 103(3): 333–341.