

摘 要

肝癌是一种常见的恶性肿瘤。原发性肝癌发病率世界第四位，死亡率世界第三位。中国是肝癌大国，占世界发病率的 45%-55%，严重威胁患者的生命健康。近年来，中国肝癌的整体治疗水平已达到欧美发达国家水平。然而，肝癌复发和转移的原因尚未完全阐明。因此，探索肝癌复发和转移过程中的分子机制，对于开发新的治疗方法，改善患者预后具有重要意义。

人源蛋白质酪氨酸磷酸酶 *PTPN12* 由 *PTPN12* 基因编码，其异常表达或活性降低与多种癌症密切相关。但是，目前关于 *PTPN12* 在肝癌发生发展中作用的报道还十分有限。通过对 GEPIA 和 Kaplan-Meier Plotter 数据库进行分析，我们发现 *PTPN12* 高表达的肝细胞肝癌（LIHC）患者总生存期缩短，提示 *PTPN12* 高表达是 LIHC 预后的危险因素，这一发现促使我们在细胞水平开展相关机制研究。

首先，我们将实验室保存的 PX459-*PTPN12*-sgRNA1 和 PX459-*PTPN12*-sgRNA2 共转染 HepG2 肝癌细胞。通过嘌呤霉素筛选、Western Blot、PCR 和基因测序鉴定，成功获得了 *PTPN12* 敲除的 HepG2 细胞系。随后，通过克隆形成实验、CCK-8 实验、活细胞计数实验、细胞悬滴实验、周期性检测等实验，我们发现敲除 *PTPN12* 基因后，HepG2 细胞增殖能力显著增强。通过细胞划痕和 Transwell 侵袭实验，我们发现 *PTPN12* 基因缺失后，HepG2 细胞的迁移和侵袭能力明显增强。随后的回补实验也验证了上述结果。但是，皮下异种移植瘤实验结果显示，与 HepG2 野生型细胞相比，接种 *PTPN12* 基因敲除细胞的免疫缺陷小鼠的成瘤能力未见明显改变。RNA-Seq 结果表明，*PTPN12* 基因缺失影响 EMT、细胞生长和增殖、细胞迁移和侵袭等相关信号的通路。最后，通过免疫印迹对相关信号通路进行验证，我们发现 *PTPN12* 基因通过调控 JNK、Cadherin、FAK 等信号通路影响细胞的增殖、迁移和侵袭。

综上所述，我们成功构建了 *PTPN12* 基因敲除的 HepG2 细胞系，体外实验结果表明，*PTPN12* 敲除后，HepG2 细胞的增殖、迁移和侵袭能力明显增强，但是体内成瘤能力无显著变化。本研究初步揭示了 *PTPN12* 在 HepG2 细胞中的作用及分子机制，为进一步研究 *PTPN12* 在肝细胞癌中的生物学功能奠定了基础。

关键词：

PTPN12, PTP-PEST, CRISPR/Cas9, HepG2 细胞, RNA-seq, 细胞迁移

Abstract

Liver cancer is a common malignant tumor. The incidence rate of primary liver cancer is the fourth in the world, and the mortality rate is the third. China is a major country of liver cancer, accounting for 45%-55% of the world's incidence rate, seriously threatening patients' health and life. In recent years, the overall treatment level of liver cancer in China has reached the level of developed countries in Europe and America. However, the reasons for recurrence and metastasis of liver cancer have not been fully elucidated. Therefore, exploring the molecular mechanism of liver cancer recurrence and metastasis is of great significance for developing new treatments and improving patients' prognosis.

Protein tyrosine phosphatase PTP-PEST is encoded by the *PTPN12* gene, and its abnormal expression or decreased activity is closely related to a variety of diseases. Currently, there are very limited reports on the role of *PTPN12* in the occurrence and development of liver cancer. Through analysis of the GEPIA and Kaplan-Meier Plotter databases, we found that high expression of *PTPN12* is associated with a shortened overall survival period in hepatocellular carcinoma (LIHC) patients, indicating that high expression of *PTPN12* is a prognostic risk factor for LIHC. This finding has prompted us to carry out related mechanism research at the cellular level.

In this study, the plasmid of *PX459-PTPN12-sgRNA1* and *PX459-PTPN12-sgRNA2* preserved in the laboratory were co-transfected into HepG2 cells. HepG2 cell lines with *PTPN12* knockout were successfully obtained by purinomycin screening, Western Blot, PCR and gene sequencing. Through clonal formation experiment, CCK-8 experiment, live cell counting experiment, cell suspension drops experiment, periodic detection and other experiments, we found that the proliferation ability of HepG2 cells was significantly enhanced after knockout of *PTPN12* gene. By cell scratch and Transwell invasion experiments, we found that the migration and invasion ability of HepG2 cells was also significantly enhanced after deletion of *PTPN12* gene. The subsequent rescue experiment also validated the above results. However, the results of subcutaneous xenograft experiments showed that there was no significant change in

tumorigenic ability in immunodeficient mice implanted with *PTPN12* gene knockout cells compared with HepG2 wild-type cells. RNA-Seq results showed that *PTPN12* gene deletion affected Pathways related to EMT, cell growth and proliferation, and cell migration and invasion. Finally, Western blotting was used to verify relevant signaling Pathways, and we found that *PTPN12* gene affects cell proliferation, migration and invasion by regulating JNK, Cadherin, FAK and other signaling Pathways.

In summary, we successfully generated HepG2 cells with *PTPN12* knockout. The characterization results *in vitro* showed that the proliferation, migration and invasion of HepG2 cells were significantly enhanced after *PTPN12* knockout, but there was no significant change in the tumor-forming ability of HepG2 cells. The present study preliminarily revealed the role and molecular mechanism of PTPN12 in HepG2 cells, which laid a foundation for further study of the biological function of PTPN12 in liver cancer.

Key word:

PTPN12, PTP-PEST, CRISPR/Cas9, HepG2 cells, RNA-seq, Cell migration

关于学位论文使用授权的声明

本人完全了解吉林大学有关保留、使用学位论文的规定，同意吉林大学保留或向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅；本人授权吉林大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或其他复制手段保存论文和汇编本学位论文。

论文级别：■硕士□博士

学科专业：生物与医药

论文题目： *PTPN12* 敲除的 HepG2 稳定细胞株的构建及表征

作者签名：



指导教师签名：



英文缩写词

英文缩写	英文全称	中文全称
PTPN12	Protein tyrosine phosphatase nonreceptor type 12	非受体型蛋白质酪氨酸磷酸酶 12
PPP	Serine/Threonine protein phosphatases	蛋白质丝氨酸/苏氨酸磷酸酶
PEST	Pro、Glu、Ser、Thr	PTPN12 表达蛋白特征序列
PTP	Protein tyrosine phosphatase	蛋白质酪氨酸磷酸酶
CRISPR	Clustered regularly interspaced short palindromic repeats	规律成簇间隔的短回文重复序 列
Cas9	CRISPR associated associated protein 9	CRISPR 相关蛋白 9
PTK	Protein Tyrosine Kinases	蛋白质酪氨酸激酶
DSP	Dual specificitytein phosphatases	双底物特异型磷酸酶
PAM	Protospacer adjacent motif	原间隔序列临近基序
crRNA	CRISPR-derived RNA	CRISPR 引导 RNA
sgRNA	Single guide RNA	单链引导 RNA
NHEJ	Non-homologous end joining	非同源末端连接
HCC	Hepatocellular carcinoma	肝细胞癌
HDR	Homology directed repair	同源修复
tracrRNA	Trans-acting crRNA	反式转录 crRNA
EMT	Epithelial to mesenchymal transitions	上皮间充质转化
DSB	DNA double-strand break	DNA 双链断裂

目 录

摘 要.....	I
英文缩写词.....	V
第 1 章 绪 论.....	10
1.1 蛋白质磷酸酶及 PTP-PEST/ <i>PTPN12</i> 概述	10
1.1.1 蛋白质磷酸酶的概述及分类.....	10
1.1.2 PTP-PEST/ <i>PTPN12</i>	12
1.2 CRISPR/Cas9 基因编辑技术	14
1.2.1 CRISPR/Cas9 系统的组成和机理.....	14
1.2.2 CRISPR/Cas9 技术的应用	16
1.3 肝癌简介	16
1.3.1 肝癌进展概述	16
1.3.2 HepG2 肝癌细胞系	17
1.4 研究目的及意义	17
第 2 章 <i>PTPN12</i> 基因敲除 HepG2 稳定细胞株的构建.....	18
2.1 实验材料	18
2.1.1 实验试剂与检测试剂盒	18
2.1.2 菌株、载体和细胞培养	19
2.1.3 实验耗材与仪器设备	19

2.1.4 试剂配置	20
2.2 实验方法	21
2.2.1 PTPN12 在肝细胞肝癌 (LIHC) 中表达情况.....	21
2.2.2 重组质粒的筛选与鉴定	21
2.2.3 细胞培养	23
2.2.4 重组质粒共转染	25
2.2.5 稳定细胞系的单克隆筛选	26
2.2.6 <i>PTPN12</i> 基因敲除 HepG2 稳定细胞株的鉴定	27
2.2.7 <i>PTPN12</i> 回补实验	28
2.3 结果与分析	28
2.3.2 <i>PTPN12</i> 在 HepG2 细胞中的表达量	29
2.3.3 PX459 质粒测序鉴定	30
2.3.4 HepG2- <i>PTPN12</i> -KO 稳定细胞株的 Western Blot 鉴定.....	31
2.3.5 HepG2- <i>PTPN12</i> -KO 稳定细胞株的 PCR 及基因测序鉴定 ..	32
2.4 <i>PTPN12</i> 回补的 HepG2 细胞株的鉴定.....	33
2.5 本章小结	34
第 3 章 <i>PTPN12</i> 对 HepG2 细胞的影响	35
3.1 实验材料	35
3.1.1 实验试剂与检测试剂盒	35

3.1.2 实验耗材与仪器	35
3.1.3 溶液配制	35
3.1.4 细胞株	35
3.2 实验方法	35
3.2.1 平板克隆形成实验	35
3.2.2 CCK-8 实验	36
3.2.3 活细胞计数	36
3.2.4 细胞悬滴实验	37
3.2.5 细胞划痕实验	37
3.2.6 细胞周期实验	38
3.2.7 细胞侵袭实验	38
3.2.8 体内成瘤实验	39
3.2.9 切片&HE 染色	40
3.2.10 RNA-Seq 分析	40
3.2.11 信号通路分析	41
3.2.12 统计学分析	42
3.3 结果与分析	42
3.3.1 平板克隆形成实验	42
3.3.2 CCK-8 实验	43

3.3.3 活细胞计数实验	44
3.3.4 细胞悬滴实验	45
3.3.5 细胞划痕实验	47
3.3.6 细胞周期实验	48
3.3.7 细胞侵袭实验	49
3.3.8 体内成瘤	50
3.3.9 组织切片及 HE 染色	52
3.3.10 RNA-seq 转录组测序分析	53
3.3.11 相关信号通路	57
3.3.12 PTPN12 回补实验结果	59
3.5 本章小结	65
第四章 结论与讨论	67
参考文献	70

第1章 绪论

1.1 蛋白质磷酸酶及 PTP-PEST/PTPN12 概述

1.1.1 蛋白质磷酸酶的概述及分类

蛋白质磷酸酶 (Protein phosphatases, PPs) 是一类可以去除蛋白质分子上的磷酸基团的酶。它们通过水解肽链中的磷酸酯键, 将磷酸基团与蛋白质分子分离开来, 从而影响蛋白质的结构和功能。蛋白质磷酸酶在细胞的基础生化过程中起着关键作用, 包括代谢、信号转导、细胞凋亡等。最初, PPs 被认为在细胞信号转导中发挥负调控作用。然而, 随着研究的不断深入, 现在我们知道 PPs 既可以作为正调控分子促进细胞信号传导, 也可以作为负调控分子抑制细胞信号传导^[1-4]。在真核生物中, 蛋白质的磷酸化状态是由蛋白质激酶 (Protein kinases, PKs) 和 PPs 共同调控的^[5]。其中, 蛋白酪氨酸磷酸酶 (Protein tyrosine phosphatases, PTPs) 是具有多种底物特异性的一类酶, 具有酪氨酸去磷酸化特性的蛋白质被统称为酪氨酸磷酸酶组 (PTPome)^[4], 包括来自 PTPs 超家族的蛋白质以及来自其他基因家族的酶 (基于 Asp 的磷酸酶, 基于 His 的磷酸酶)。在基于半胱氨酸 PTPome 成员中, 经典 PTPs 使蛋白质底物中的特异性磷酸化酪氨酸 (pTyr) 残基去磷酸化, 而 VH1 双特异性 PTPs 能使 pTyr、pSer 和 pThr 残基以及非蛋白质底物 (包括磷酸肌醇) 去磷酸化^[6]。此外, 由于活性位点的氨基酸被取代, 一些 PTPs 的催化活性受损, 但保留了与酪氨酸磷酸化信号转导相关的调节功能^[7]。研究表明, 许多 PTPs 与人类疾病有关, 包括癌症、神经发育和代谢疾病, 因此, PTPs 现已成为临床上重要的药物靶标^[8]。

根据底物分子上磷酸化的氨基酸残基类型, 蛋白质磷酸酶主要分为三种类型:

(一) 蛋白质丝氨酸/苏氨酸磷酸酶 (Serine/threonine protein phosphatases, PPP)

蛋白质丝氨酸/苏氨酸磷酸酶 (PPP) 是一种特异地催化蛋白质上磷酸化丝氨酸/苏氨酸残基去磷酸化的酶, 在真核生物进化过程中具有不同的保守类型。起初, 哺乳动物 PPP 分为两大类, 即 type-1 和 type-2^[9]。后来, 分子克隆揭示了多种类型的 PPP, 进一步的功能分析定义了 Ser/Thr 磷酸酶的三大家族——PPP、

PPM 和 HAD^[10]。哺乳动物 PPP 家族和 Mg^{2+} 依赖的蛋白磷酸酶 (PPM) 家族均由大约 40 个基因编码, 比编码哺乳动物蛋白 Ser/Thr 激酶的基因数量少 10 倍。然而, 过去 15 年的研究表明, PPP 很少作为游离催化亚基存在, 而是被并入催化亚基结合的多亚基复合物 (全酶) 中, 由一个或多个调控亚基决定其催化活性并决定底物特异性、亚细胞定位和调控^[11]。迄今为止, 研究人员已经确定了 200 多种蛋白磷酸酶 1 (PP1) 的调节因子, 以及 PP2A 的十几种基因和亚型^[12]。因此, 真核细胞中 PPP 复合物的数量约等于 Ser/Thr 激酶的数量。PP2C 是单独的 PPM 家族的成员, 与 PPP 的序列不同。动力学和结构研究表明, PPM 磷酸酶在其活性位点使用三种金属离子, 第三种离子以相对较低的亲和力结合^[13]。PPM 在原核和真核物种中广泛表达, 包括分枝杆菌和植物, 与 16 种哺乳动物 PPM 基因相比, 植物拥有 80 到 90 个 PPM 基因^[14]。因此, PPM 是植物中 Ser/Thr 磷酸酶的一个主要家族, 它们将激素信号作为脱落酸受体的亚基进行转导, 并调节各种应激反应。尽管 PPM 的 Ser/pThr 磷酸酶活性较低, 但是, PPM 在哺乳动物细胞的生长调节和应激信号传导中仍具有突出和重要的作用^[15]。Ser/Thr 磷酸酶家族的卤代酸脱氢酶 (HAD) 同样表现出相对较低的活性。与 PPP 和 PPM 不同, HAD 不是金属酶, 但在其催化位点具有保守的 DXDX (T/V) 序列^[16]。除了底物周转率低之外, 与 PPP 或 PPM 相比, HAD 还显示出更专一的底物特异性, 仅限于位于 RNA 聚合酶 IIC 末端尾部的特定的 pSer 残基的去磷酸化^[17]。根据催化亚基的不同, 人体中的 PPP 可分为七种不同类型, 称为 PPP1 至 PPP7^[18]。其中, PPP7 功能丧失会导致视网膜变性^[19], 可能的机制为: (1) 亚基和底物识别的分子决定因素; (2) 调控 PPP 功能的因素, 特别是各种翻译后修饰 (PTM); (3) PPP 通信或者调控信号网络的方式^[20]。

(二) 蛋白质酪氨酸磷酸酶 (Protein tyrosine phosphatases, PTPs)

蛋白质酪氨酸磷酸酶 (PTPs) 是一类具有特异性水解 pTyr 残基上的磷酸基团的酶^[21]。在信号传导过程中, PTPs 主要发挥负调控作用, 但也有正调控功能^[22-23]。例如酪氨酸磷酸酶 CD45、PTP α 、PTP ϵ 和 SHP2 通过去除 Src 家族 C 末端抑制性酪氨酸残基上的磷酸基团, 进而激活 Src 激酶^[24]。研究表明, PTPs 即可以发挥肿瘤抑制的作用, 又可以促进肿瘤的形成^[25-26]。某些 PTPs 的过度表达、功能丧失或者甲基化直接有助于提高肿瘤细胞的存活率^[27]。研究发现, PTP1B

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/857022062160006050>