

# 应用CRISPR-Cas9技术构建*NFIB*敲除的膀胱癌细胞株及其转录组学分析

沈鹭<sup>1</sup> 孙越<sup>1</sup> 邬燕倩<sup>2</sup> 蒋莹<sup>2</sup> 洪叶挺<sup>2</sup> 吕建新<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>温州医科大学检验医学院、生命科学学院, 温州 325000; <sup>2</sup>杭州医学院检验医学院、生物工程学院, 杭州 311399)

**摘要** 为了探究*NFIB*(nuclear factor I/B)基因在膀胱癌中的生物学功能, 该研究应用CRISPR-Cas9技术构建*NFIB*敲除的膀胱癌细胞株, 然后通过转录组学技术分析对照细胞*NFIB*-NC与*NFIB*敲除细胞株*NFIB*-KO-I和*NFIB*-KO-II之间的差异表达基因, 同时对其进行KEGG富集分析, 并通过Western blot和qRT-PCR技术对转录组学结果进行验证。结果显示, 与对照细胞*NFIB*-NC相比, *NFIB*敲除细胞株*NFIB*-KO-I中有134个差异表达基因, 其中上调基因62个, 下调基因72个; *NFIB*-KO-II中有131个差异表达基因, 表达上调和下调的基因分别为50个和81个。KEGG分析结果显示, 差异表达基因与PI3K-AKT信号通路密切相关, Western blot结果证实敲除*NFIB*基因后, 膀胱癌细胞中的p-AKT水平显著上调。qRT-PCR结果表明, 敲除*NFIB*后, *ITGA4*基因表达水平上调, *TNC*和*ANGPT4*基因表达水平下调。该研究初步揭示了*NFIB*基因在膀胱癌细胞中调控的分子信号通路, 也为后续研究*NFIB*基因介导膀胱癌发生发展的分子机制提供了依据。

**关键词** *NFIB*基因; CRISPR-Cas9; 膀胱癌; 转录组学分析; 差异表达基因

## Construction of *NFIB* Knock-Out Bladder Cancer Cell Line by CRISPR-Cas9 Technology and Its Transcriptomics Analysis

SHEN Lu<sup>1</sup>, SUN Yue<sup>1</sup>, WU Yanqian<sup>2</sup>, JIANG Ying<sup>2</sup>, HONG Yeting<sup>2</sup>, LYU Jianxin<sup>1,2\*</sup>

(<sup>1</sup>School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325000, China;

<sup>2</sup>School of Laboratory Medicine and Bioengineering, Hangzhou Medical College, Hangzhou 311399, China)

**Abstract** In order to explore the biological function of *NFIB* gene in bladder cancer, CRISPR-Cas9 technology was utilized to knock out *NFIB* gene in bladder cancer cell line, and transcriptomics analysis was used to detect the DEGs (differentially expressed genes) between control cell *NFIB*-NC and *NFIB* knock out cells *NFIB*-KO-I and *NFIB*-KO-II, and KEGG enrichment analysis was performed. The results of transcriptomics analysis were also verified by Western blot and qRT-PCR. Compared with the control cell *NFIB*-NC, there were 134 DEGs in *NFIB* knock-out cell line *NFIB*-KO-I, including 62 upregulated genes and 72 downregulated genes, and 131 DEGs in *NFIB* knock-out cell line *NFIB*-KO-II, including 50 upregulated genes and 81 downregulated genes. The results of KEGG enrichment analysis showed that DEGs were tightly related to PI3K-AKT signaling pathway, and

收稿日期: 2022-03-02

接受日期: 2022-05-05

领军创新团队-重大疾病分子机制和检验诊断医疗器械研发项目(批准号: CXLJ202101)、国家自然科学基金(批准号: 81801513)和浙江省高校基本科研经费(批准号: KYZD202003)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 0571-87692820, E-mail: ljx@hmc.edu.cn

Received: March 2, 2022

Accepted: May 5, 2022

This work was supported by the Project for Leading Innovation Team-Molecular Mechanism of Major Diseases and Development of Medical Devices for Inspection and Diagnosis (Grant No.CXLJ202101), the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81801513) and the Basic Scientific Research Funds of Department of Education of Zhejiang Province (Grant No.KYZD202003)

\*Corresponding author. Tel: +86-571-87692820, E-mail: ljx@hmc.edu.cn

the results of Western blot confirmed that the expression level of p-AKT was significantly upregulated in bladder cancer cell after knocking out *NFIB*. The results of qRT-PCR showed that after knocking out *NFIB*, the expression level of *ITGA4* was upregulated, and the levels of *TNC* and *ANGPT4* were downregulated. The study revealed the regulated molecular signaling pathways of *NFIB*, which could provide a basis for the follow-up research on the molecular mechanism of *NFIB* mediating the occurrence and development of bladder cancer.

**Keywords** *NFIB* gene; CRISPR-Cas9; bladder cancer; transcriptomics analysis; differentially expressed gene

NFI(nuclear factor I)家族包括NFIA(nuclear factor I/A)、NFIB(nuclear factor I/B)、NFIC(nuclear factor I/C)和NFIX(nuclear factor I/X) 4个成员, 是一类DNA特异性结合蛋白。NFI蛋白家族的N末端序列高度保守, 其可以以同源或异源二聚体的形式结合双链DNA上的回文序列5'-TTGGC(N5)GCCAA-3', 而在其C末端存在多个剪切点和翻译后修饰位点, 因此NFI家族基因在不同种族中存在多种亚型<sup>[1]</sup>, 并在腺病毒体外复制和细胞、病毒基因组的转录调节, 以及肿瘤的发生发展中发挥着重要的作用<sup>[2-3]</sup>。有文献报道, *NFIA*基因的染色体易位或重排会导致NFIA蛋白被破坏, 致使人体中枢神经系统异常, 并伴有脑室肿大、积水等症状, 进而引起个体行为异常、行动迟缓等, 因此NFIA在神经系统发育中发挥着重要的作用<sup>[4-5]</sup>。近年来有研究表明, NFIA可以作为抑癌因子, NFIA蛋白缺失会显著缩短胶质瘤小鼠的存活时间, 并增强肿瘤的侵袭性<sup>[6]</sup>。ZHU等<sup>[7]</sup>发现, miRNA-671-5p通过靶向NFIA/CRYAB轴促进前列腺癌的发展和转移, NFIA蛋白的表达与前列腺癌患者的临床特征和转移状态均呈负相关。NFIC被报道主要在牙齿发育过程中发挥作用, 影响牙成釉细胞的增殖分化<sup>[8]</sup>, 除此之外, NFIC在肿瘤的发生发展中也发挥了一定的作用, 有研究报道NFIC可作为抑癌基因抑制食管鳞状细胞癌细胞的增殖和转移<sup>[9]</sup>, 另有研究发现NFIC能促进胃癌(gastric cancer, GC)的发生发展<sup>[10]</sup>。目前关于NFIX的报道较少, 有研究发现NFIX在大脑和神经发育中发挥重要的作用<sup>[11]</sup>, 并在造血干细胞的生成中发挥调节功能<sup>[12]</sup>。NFI家族成员NFIB作为重要的转录因子, 位于人类9号染色体短臂2区, 在人类组织中广泛表达, 已被证实可调节多种器官系统的生长发育, 有研究表明, NFIB的缺失会导致呼吸系统发育不良、中枢神经系统和大脑发育异常, 并影响黑色素细胞、脂肪细胞和巨核细胞的成熟发育<sup>[13-16]</sup>。近年来, 已有研究表明NFIB在

肿瘤的发生发展中发挥重要作用, 并且发现NFIB在不同肿瘤或同一种肿瘤的不同亚型中扮演不同的角色, 比如NFIB会促进小细胞肺癌、乳腺癌和黑色素瘤等肿瘤的发生发展, 但抑制非小细胞肺癌、神经胶质瘤和骨肉瘤等肿瘤的生长<sup>[17]</sup>。然而, 关于NFIB是否参与膀胱癌发生发展至今很少有研究报道。

膀胱癌是泌尿系统的常见恶性肿瘤之一, 具有转移率高、预后差等特点, 男性在膀胱癌发病中占主导地位, 占76%<sup>[18-19]</sup>。膀胱尿路上皮癌起源于膀胱移行上皮, 是最常见的膀胱癌, 又称为移行上皮癌。2022年美国癌症新发病例数和死亡率预测结果显示, 在男性中, 膀胱癌病例数排名第3, 死亡率排名第8<sup>[9]</sup>。临床上常用的膀胱癌治疗手段为化疗、手术切除、卡介苗灌注和免疫抑制剂治疗等, 多数膀胱癌患者晚期易发生术后转移, 转移类型包括周围器官转移、淋巴结转移以及血行转移至肺、肝脏和骨等, 而膀胱癌一旦发生转移就会增加临床治疗的难度<sup>[20]</sup>。因此目前亟需筛选治疗膀胱癌的潜在靶点, 为临床治疗膀胱癌提供科学依据。

目前, *NFIB*在膀胱癌中的生物学作用及其分子机制尚未明确报道, 因此本研究应用CRISPR-Cas9技术构建*NFIB*基因敲除的膀胱癌细胞株, 通过转录组学分析差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs), 进一步对DEGs的功能进行KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)富集分析, 初步揭示了*NFIB*基因在膀胱癌细胞中调控的潜在基因及分子信号通路, 为后续研究NFIB蛋白在膀胱癌中的生物学功能提供了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 细胞、质粒与菌种来源 人移行膀胱癌细胞UM-UC-3、293T细胞、Lenti CRISPR V2质粒、Lenti CRISPR V2-control质粒均由本实验室前期保

存。膀胱癌敲除细胞株 NFIB-KO-I 和 NFIB-KO-II 由本课题组构建。大肠埃希菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  购自上海生工生物工程有限公司。

1.1.2 主要试剂 胎牛血清(货号: 04-001-1ACS)购自以色列 Biological Industries 公司; DMEM 高糖培养基(货号: C11995500BT)购自美国 Gibco 公司; 限制性内切酶 *BsmBI*-v2(货号: R0739S)购自美国 NEB 公司; 质粒小提试剂盒(货号: D6950-01)购自美国 Omega 公司; 细胞基因组 DNA 提取试剂盒(货号: MAG2460)购自上海迈基生物技术有限公司; Trizol 分离试剂(货号: 15596018)、逆转录试剂盒(货号: RR047A)、TB Green Fast qPCR Mix(货号: RR430)、DNA 连接试剂盒(货号: 6022Q)购自日本 TaKaRa 公司; DNA 凝胶回收试剂盒(货号: AP-GX-250)、PCR 产物纯化试剂盒(货号: AP-PCR-50)购自美国 Axygen 公司; NFIB 抗体(货号: HPA003956)购自美国 Sigma 公司; GAPDH 抗体(货号: 60004-1-Ig)购自 Proteintech 公司; AKT 抗体(货号: ab179463)、p-AKT(phosphorylation-AKT)抗体(货号: ab192623)购自英国 Abcam 公司。

## 1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人移行膀胱癌细胞株 UM-UC-3 和 293T 用含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素和 100  $\mu$ g/mL 链霉素的高糖培养基 DMEM 培养, 当细胞密度达到 90% 左右时, 以 1:3 的比例传代, 将细胞置于 37  $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 及饱和湿度的环境下培养。

1.2.2 *NFIB* 基因编辑靶点的选择和 sgRNA 引物的设计 通过 NCBI 数据库搜索人源 *NFIB* 基因序列(ID: ENSG00000147862), 通过 CRISPR 设计工具网站(<https://www.benchling.com/primers/>)设计针对 *NFIB* 的 sgRNA, 利用在线工具“CRISPR guides”寻找针对 *NFIB* 基因外显子 2 的包含 CAS9 识别位点 PAM 的序列。以靶序列 NGG 之前的 20 nt 的互补序列为 sgRNA 序列, 根据靶点位置、中靶效应和脱靶效应筛选出 2 条针对 *NFIB* 基因 CDS 区外显子 2 的最优的 sgRNA,

sgRNA 寡核苷酸链由浙江尚亚生物科技有限公司合成, 序列如表 1。

1.2.3 sgRNA 引物退火和 CRISPR V2-sgRNA 质粒的构建 取表 1 中 sgRNA-NFIB-1 和 sgRNA-NFIB-2 各自相应的等量的正向引物(10  $\mu$ mol/L)和反向引物(10  $\mu$ mol/L), 经程序性退火后形成双链 DNA。取 2  $\mu$ g CRISPR V2 质粒、1  $\mu$ L 限制性内切酶 *BsmBI*-v2 和 3  $\mu$ L NEBuffer<sup>TM</sup> 3.1 缓冲液, 混匀后放至 55  $^{\circ}$ C 水浴中进行 30 min 酶切, 酶切产物经过 0.8% 琼脂糖凝胶电泳后, 利用 DNA 凝胶回收试剂盒进行割胶回收, 获取 CRISPR V2 的酶切产物。

取 CRISPR V2 的酶切产物与 sgRNA 退火产物混合后, 加入 DNA 连接体酶进行连接, 取连接产物转化到大肠埃希菌感受态细胞 DH5 $\alpha$  中, 37  $^{\circ}$ C 振荡培养 1 h 后, 将菌液涂布在含 100  $\mu$ g/mL 的氨苄青霉素的 LB 固体培养基上培养, 过夜后挑取单菌落送至浙江尚亚生物科技有限公司测序, 将鉴定成功的菌株扩大培养后提取质粒, 测定其浓度后保存于 -20  $^{\circ}$ C。

1.2.4 慢病毒包装和病毒感染 将待 293T 细胞接种到 6 孔板中, 37  $^{\circ}$ C 培养 16~24 h, 当细胞密度达到 80% 左右时进行转染, 具体步骤: 取 2.5  $\mu$ g CRISPR V2-control 或者 CRISPR V2-sgRNA、1.5  $\mu$ g psPAX2 和 0.75  $\mu$ g pMD2.G 质粒, 使用 Lipo3000 一起转染到 293T 细胞中, 8 h 后换液, 继续培养 48 h 后收集含有病毒的上清液, 离心过滤后备用。

将 UM-UC-3 细胞接种到 6 孔板中, 待细胞密度达到 50% 左右时, 使用病毒感染细胞, 感染 48 h 后, 使用嘌呤霉素(1.5  $\mu$ g/mL)筛选出稳定表达的细胞株, 并通过 Western blot 检测 *NFIB* 基因的敲除情况。

1.2.5 *NFIB*<sup>-/-</sup> UM-UC-3 细胞系的筛选 均匀接种 50 个细胞至直径为 10 cm 的细胞培养皿中, 培养 14 天, 挑取单克隆细胞团至 96 孔板中, 逐渐扩大培养, 收集细胞进行 Western blot 分析和测序鉴定。

1.2.6 *NFIB*<sup>-/-</sup> UM-UC-3 细胞系的 Western blot 鉴定

表 1 sgRNA 引物序列

Table 1 Primer sequences of sgRNA

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
sgRNA-NFIB-1	Forward: CAC CGT ATT CGC CAG GAG TAT CGA G Reverse: AAA CCT CGA TAC TCC TGG CGA ATA C
sgRNA-NFIB-2	Forward: CAC CGG ATT GGA TAA GAC ACA GCA C Reverse: AAA CGT GCT GTG TCT TAT CCA ATC C

表2 用于PCR扩增*NFIB*基因的引物序列Table 2 Primer sequences of *NFIB* gene used for PCR amplification

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
Genome-NFIB-exon 2	Forward: GAT GAA TTT CAC CCA TTC ATC GAG G Reverse: CTT GCT CCT GCA CGT AGT ATG

表3 *ITGA4*、*TNC*、*ANGPT4*和*GAPDH*基因引物序列Table 3 Primer sequences of *ITGA4*, *TNC*, *ANGPT4* and *GAPDH* genes

引物名称 Primer name	序列(5'→3') Sequence (5'→3')
ITGA4-PF	Forward: GCA TAC AGG TGT CCA GCA GAG A
ITGA4-PR	Reverse: AGG ACC AAG GTG GTA AGC AGC T
TNC-PF	Forward: ATG TCC TCC TGA CAG CCG AGA A
TNC-PR	Reverse: AGT CAC GGT GAG GTT TTC CAG C
ANGPT4-PF	Forward: GTG GTG TCT ACA CCA TCC AGG T
ANGPT4-PR	Reverse: TCC GCT GAA AAT TCA CGG TGC C
GAPDH-PF	Forward: CGA GCC ACA TCG CTC AGA CA
GAPDH-PR	Reverse: GTG GTG AAG ACG CCA GTG GA

收集细胞加入适量的RIPA裂解液裂解细胞,提取总蛋白并测定浓度,通过聚丙烯酰胺凝胶电泳将蛋白进行分离,然后将蛋白转印至PVDF膜上,5%脱脂奶粉室温封闭1 h后,加入*NFIB*(1:1 000)和*GAPDH*(1:4 000)抗体,4 °C过夜孵育,后用TBST洗3次,每次10 min,加入带辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的二抗(1:4 000),室温孵育1 h,后用TBST洗3次,每次10 min, ECL发光法进行显色,使用化学发光成像系统(ChemiDoc Touch, Bio-Rad)进行拍照。

1.2.7 *NFIB*<sup>-/-</sup> UM-UC-3细胞的测序鉴定 通过Western blot实验,筛选出2株*NFIB*敲除的单克隆细胞株,提取其基因组DNA,利用表2中的引物扩增*NFIB*基因中的外显子2片段,扩增的PCR产物经过回收纯化,送浙江尚亚生物科技有限公司进行测序。

1.2.8 *NFIB*调控基因的预测和生物信息学分析 基因表达水平通过FPKM(fragments per kilobase of transcript per million mapped reads)方法进行标准化,然后对DEGs进行KEGG通路富集分析,差异表达量的倍数变化 $\geq 2$ 且 $P < 0.05$ 的基因被确定为DEGs。

1.2.9 *NFIB*下游DEGs的实时荧光定量PCR分析 通过qRT-PCR(quantitative real-time PCR)技术分析*NFIB*的潜在调控基因*ITGA4*、*TNC*、*ANGPT4*的mRNA水平,采用Trizol法提取细胞RNA,以*GAPDH*为内参(表3)。通过TB Green法检测mRNA表达水平,

mRNA表达水平计算采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法。

1.2.10 统计分析 采用GraphPad Prism 8软件进行统计学分析,实验数据采用均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间的差异显著性使用*t*检验进行分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

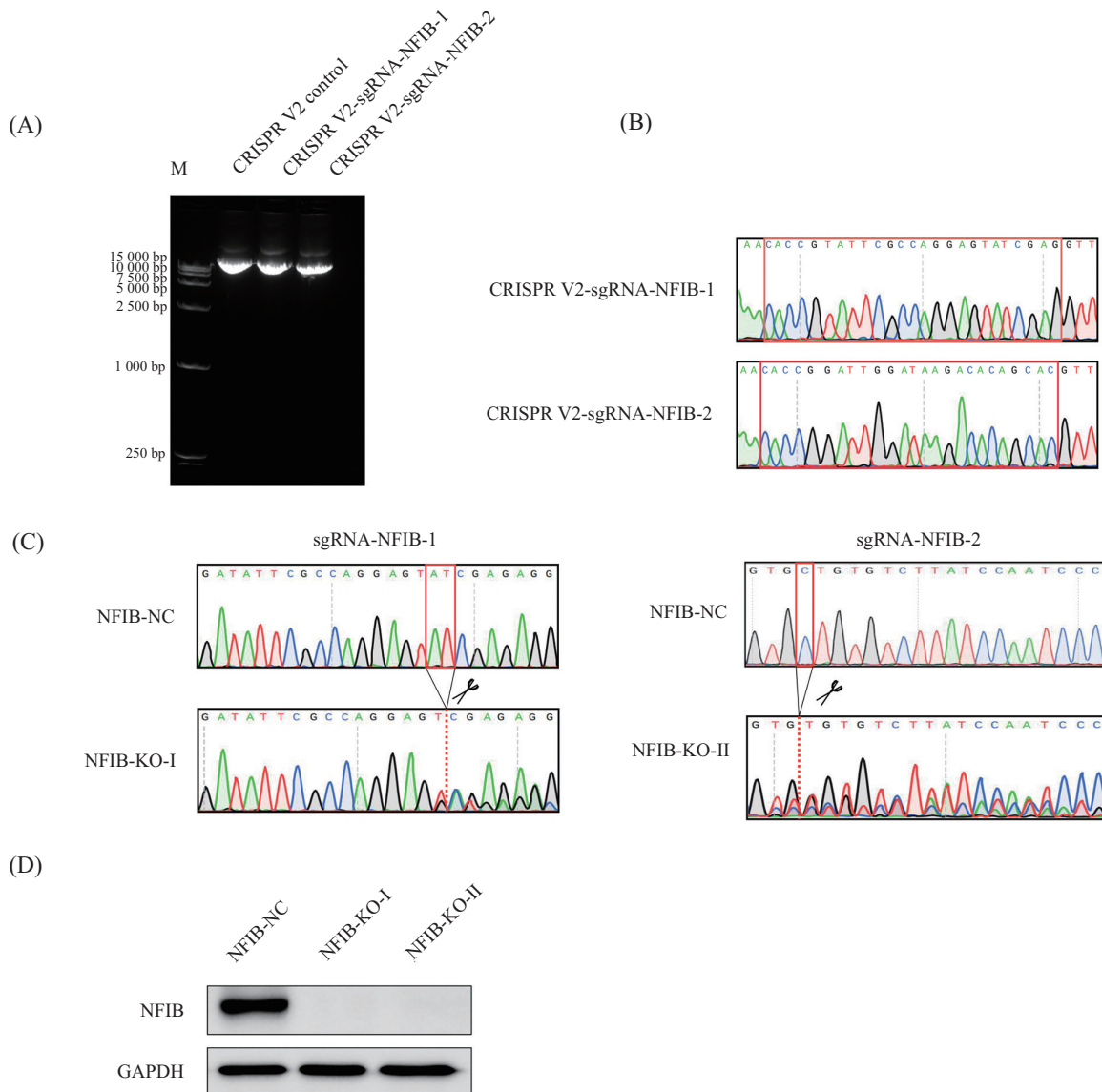
## 2 结果

### 2.1 CRISPR V2-sgRNA-NFIB质粒的构建和*NFIB*<sup>-/-</sup> UM-UC-3细胞的鉴定

如图1A和图1B所示,琼脂糖凝胶电泳和测序结果显示,CRISPR V2-sgRNA-NFIB-1和CRISPR V2-sgRNA-NFIB-2质粒构建成功。如图1C所示,测序结果表明,与对照细胞*NFIB*-NC相比,*NFIB*-KO-I在外显子2序列sgRNA-NFIB-1作用的靶标位点缺失2个碱基A和T,*NFIB*-KO-II在外显子2序列sgRNA-NFIB-2作用的靶标位点缺失1个碱基C,造成*NFIB*基因发生移码突变且位点附近出现杂乱的多峰。Western blot结果显示,与对照细胞*NFIB*-NC相比,*NFIB*-KO-I和*NFIB*-KO-II细胞的*NFIB*蛋白缺失(图1D)。

### 2.2 DEGs分析

对*NFIB*-KO-I细胞、*NFIB*-KO-II细胞和对照细胞*NFIB*-NC进行转录组学分析,并构建火山图(图2A和2B)。与对照细胞相比,*NFIB*-KO-I细胞中发现有134个DEGs,其中上调基因62个,下调基因72个,在*NFIB*-KO-II细胞中发现有131个DEGs,包括50个上



A: DNA琼脂糖凝胶电泳显示CRISPR V2-sgRNA-NFIB-1和CRISPR V2-sgRNA-NFIB-2质粒构建成功; B: 测序结果显示sgRNA成功插入到Lenti CRISPR V2载体中; C: 测序结果表明*NFIB*外显子2靶标序列处出现移码突变; D: Western blot检测*NFIB*蛋白表达水平, 以GAPDH作为内参。

A: the result of DNA agarose gel electrophoresis showed that CRISPR V2-sgRNA-NFIB-1 and CRISPR V2-sgRNA-NFIB-2 plasmids were successfully constructed; B: sequencing results demonstrated that sgRNA was successfully inserted into Lenti CRISPR V2 vector; C: sequencing results indicated a frameshift mutation at the target sequence of *NFIB* exon 2; D: Western blot analysis of the expression level of *NFIB*, and GAPDH was measured as loading control.

图1 CRISPR V2-sgRNA-NFIB载体的验证和*NFIB*<sup>-/-</sup> UM-UC-3细胞的鉴定

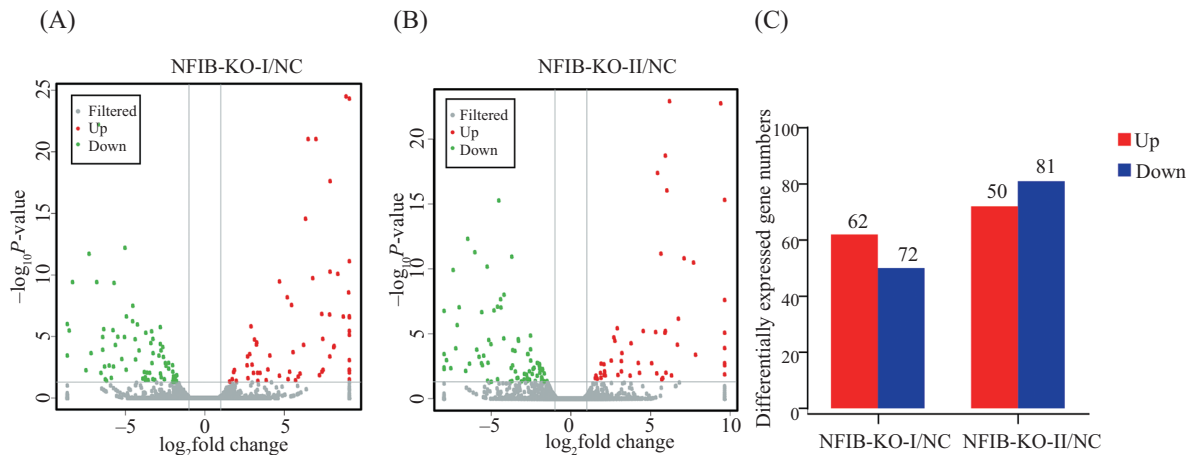
Fig.1 Validation of CRISPR V2-sgRNA-NFIB vector and identification of *NFIB*<sup>-/-</sup> UM-UC-3 cell line

调基因和81个下调基因(图2C)。

### 2.3 KEGG富集分析

对*NFIB*<sup>-/-</sup> UM-UC-3细胞系的DEGs进行KEGG富集分析, 结果表明, 与对照细胞相比, *NFIB*-KO-I细胞中的DEGs主要富集到了PI3K-AKT信号通路、Rap1信号通路、MAPK信号通路、AGE-RAGE信号通路和Relaxin信号通路等中, 还与蛋白消化和吸收、细胞黏附、细胞外基质受体相互作用、细胞的焦

点黏连和谷氨酸能突触等密切相关(图3A)。*NFIB*-KO-II细胞中的DEGs富集到了PI3K-AKT信号通路、Apelin信号通路和神经营养因子信号通路等中, 并与细胞外基质受体相互作用、细胞的焦点黏连和谷氨酸能突触等相关(图3B)。这表明, *NFIB*-KO-I和*NFIB*-KO-II细胞中DEGs同时富集到PI3K-AKT信号通路, 这也提示*NFIB*可能通过PI3K-AKT信号通路参与肿瘤细胞的增殖、凋亡和侵袭等生物学功能。



A: NFIB-KO-I细胞的差异表达基因火山图; B: NFIB-KO-II细胞的差异表达基因火山图; C: NFIB-KO-I细胞和NFIB-KO-II细胞的差异表达基因的柱状统计图。

A: volcanic map of DEGs in NFIB-KO-I cells; B: volcanic map of DEGs in NFIB-KO-II cells; C: histogram of the number of DEGs in NFIB-KO-I cells and NFIB-KO-II cells.

图2 NFIB-KO-I和NFIB-KO-II细胞中的差异表达基因分析

Fig.2 Analysis of DEGs in NFIB-KO-I cells and NFIB-KO-II cells

与对照细胞相比, NFIB-KO-I细胞中有8个与PI3K-AKT信号通路相关的DEGs, 包括6个上调基因(*COL4A5*、*COL4A6*、*ITGA4*、*ERBB4*、*EREG*和*KITLG*), 以及2个下调基因(*TNC*和*ANGPT4*); 在NFIB-KO-II细胞中有9个与PI3K-AKT信号通路相关的DEGs, 包括3个上调基因(*ITGA4*、*LAMB3*和*KITLG*), 以及6个下调基因(*PIK3API*、*TNC*、*FNI*、*ANGPT4*、*BDNF*和*GNG11*)。因此, NFIB-KO-I细胞和NFIB-KO-II细胞中的共同上调基因是*ITGA4*, 共同下调基因包括*TNC*和*ANGPT4*(图3C和图3D)。该结果提示, *NFIB*可能通过调节PI3K-AKT信号通路及相关基因*ITGA4*、*TNC*和*ANGPT4*, 进而影响膀胱癌细胞的生物学功能。

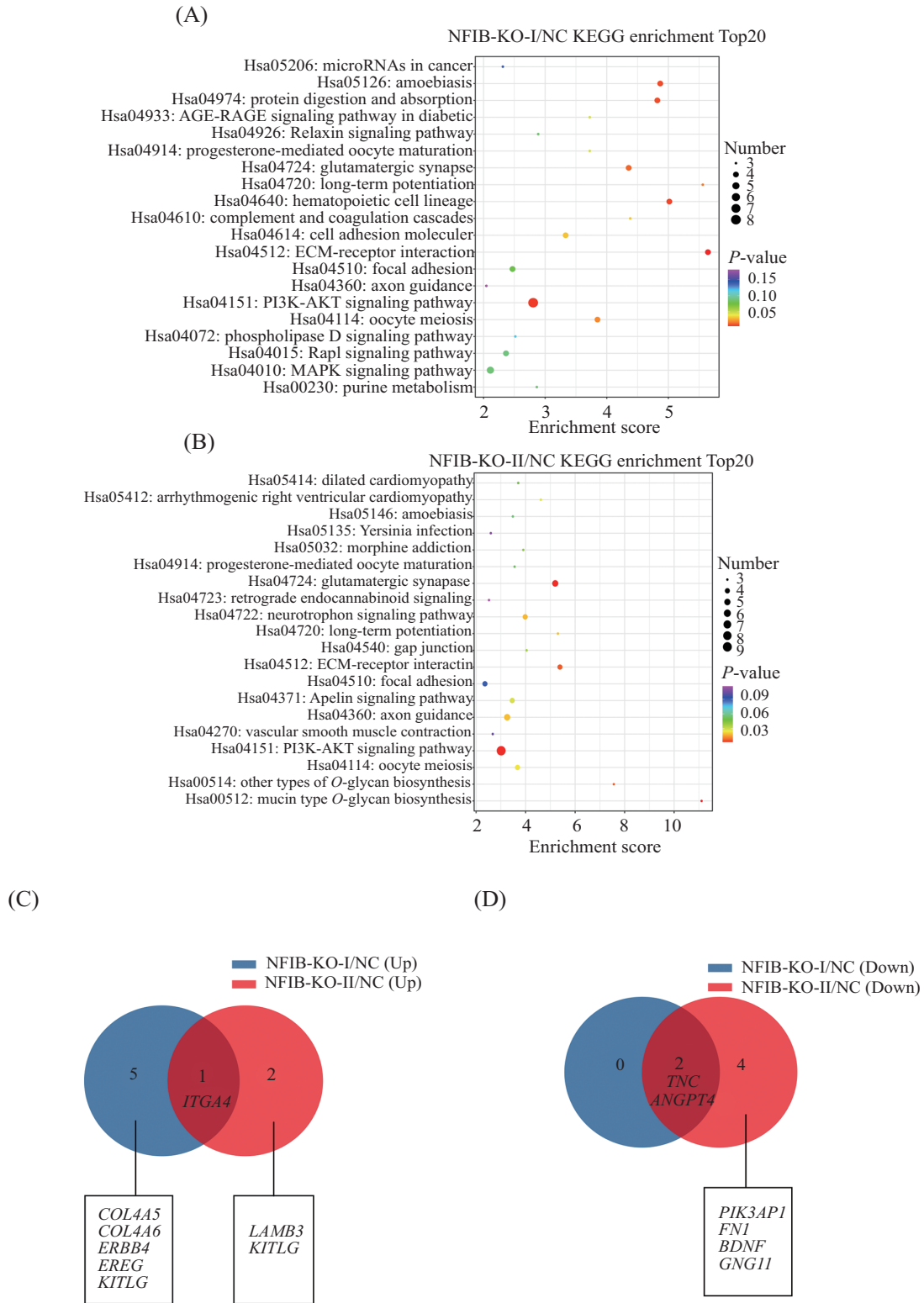
#### 2.4 PI3K-AKT信号通路蛋白的检测及对转录组学结果的qRT-PCR验证

为了验证*NFIB*对PI3K-AKT信号通路的影响, 用Western blot检测了NFIB-KO-I细胞和NFIB-KO-II细胞中AKT及p-AKT蛋白表达水平的变化。结果显示, 相比于NFIB-NC细胞, NFIB-KO-I细胞和NFIB-KO-II细胞中的p-AKT表达水平显著上调, 说明敲除*NFIB*后, PI3K-AKT信号通路被显著激活, 该结果提示*NFIB*极有可能抑制了膀胱癌细胞中的PI3K-AKT信号通路(图4A)。用qRT-PCR对*ITGA4*、*TNC*和*ANGPT4*进行检测分析发现, 其结果与转录组学分析结果一致(图4B和图4C), 即敲除*NFIB*基因后, *ITGA4* mRNA表达水平显著升高, *TNC*和*ANGPT4*的mRNA表达水平显著降低。

这些结果进一步证实, *NFIB*极有可能通过抑制PI3K-AKT信号通路进而调控膀胱癌细胞的生物学功能。

### 3 讨论

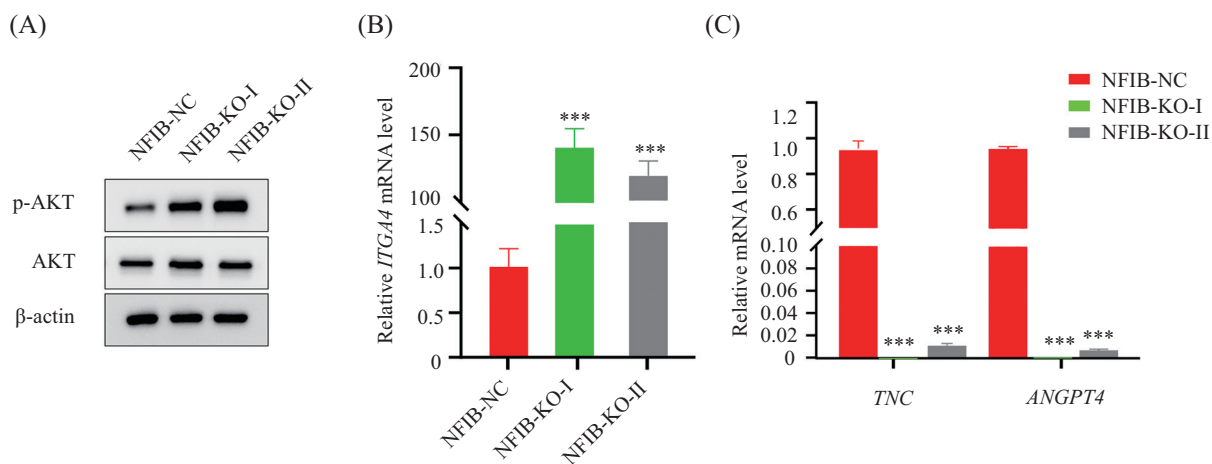
*NFIB*在肿瘤的发生发展中发挥促癌或抑癌作用。研究表明, *NFIB*在三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)、小细胞肺癌(small cell lung cancer, SCLC)、黑色素瘤(melanoma, MM)、GC和结直肠癌(colorectal cancer, CRC)中作为一种促癌因子, 促进肿瘤的发生发展。HAN等<sup>[21]</sup>和LIU等<sup>[22]</sup>团队发现在TNBC中, *NFIB*的拷贝数和表达量显著升高, 高水平*NFIB*与高肿瘤分级和不良预后均显著相关。此外, 我们先前研究发现, *NFIB*在雌激素受体(estrogen receptor, ER)阳性乳腺癌中作为一类促癌因子, 促进了乳腺癌细胞的周期进展、增殖, 抑制了细胞凋亡<sup>[23]</sup>。DENNY等<sup>[24]</sup>发现, *NFIB*促进了SCLC细胞中的促转移神经元基因的表达, 进而增强了SCLC细胞的转移能力。EKATERINA等<sup>[25]</sup>研究表明, 转录因子*NFIB*是SCLC小鼠模型的驱动因子, 能促进肿瘤的转移与侵袭, 除此之外, 该团队还发现, *NFIB*基因在大部分人类转移性高级别神经内分泌肺肿瘤中都存在过表达现象。因此, *NFIB*可能可以作为SCLC的肿瘤进展标志物, 为临床治疗提供依据。FANE等<sup>[26]</sup>研究表明, *NFIB*能够促进黑色素瘤细胞的染色质状态的动态变化, 从而促进黑色素瘤的迁移和侵



A: NFIB-KO-I细胞的KEGG富集分析; B: NFIB-KO-II细胞的KEGG富集分析; C: NFIB-KO-I和NFIB-KO-II细胞中与PI3K-AKT通路相关的上调基因的韦恩图; D: NFIB-KO-I和NFIB-KO-II细胞中与PI3K-AKT通路相关的下调基因的韦恩图。

A: KEGG enrichment analysis of NFIB-KO-I cells; B: KEGG enrichment analysis of NFIB-KO-II cells; C: Venn diagram of upregulated genes associated with PI3K-AKT signaling pathway in NFIB-KO-I and NFIB-KO-II cells; D: Venn diagram of downregulated genes associated with PI3K-AKT signaling pathway in NFIB-KO-I and NFIB-KO-II cells.

图3 NFIB-KO-I和NFIB-KO-II细胞中DEGs的KEGG富集分析  
Fig.3 KEGG enrichment analysis of DEGs in NFIB-KO-I and NFIB-KO-II cells



A: Western blot检测膀胱癌细胞中p-AKT和AKT的蛋白表达水平,以 $\beta$ -actin作为内参;B、C: qRT-PCR检测*ITGA4*、*TNC*和*ANGPT4*的mRNA水平,以*GAPDH*作为内参,\*\*\* $P < 0.001$ ,与NFIB-NC细胞相比。

A: Western blot analysis of the expression levels of p-AKT and AKT in bladder cancer cells; B,C: qRT-PCR analysis of the mRNA levels of *ITGA4*, *TNC* and *ANGPT4* genes, *GAPDH* was measured as loading control, \*\*\* $P < 0.001$  vs NFIB-NC cells.

图4 PI3K-AKT信号通路蛋白的检测及对转录组学结果的qRT-PCR验证

Fig.4 Detection of proteins associated with PI3K-AKT signaling pathway and qRT-PCR verification for transcriptome results

袭。CHENG等<sup>[27]</sup>也发现, *NFIB*通过调节ZEB1蛋白促进MM的上皮-间充质转化。最近一项研究还发现, *NFIB*的上调能促进GC的生长、迁移和侵袭, 促进GC的上皮-间充质转化<sup>[28]</sup>。有研究发现, *NFIB*在CRC细胞系和肿瘤组织中表达显著增高, *NFIB*的表达量与预后相关, 下调*NFIB*的表达能抑制CRC的转移<sup>[29]</sup>。而*NFIB*在非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)、胶质母细胞瘤(glioblastoma, GBM)、皮肤鳞状细胞癌(cutaneous squamous cell carcinoma, CSCC)和骨肉瘤(osteosarcoma, OS)中作为肿瘤抑制因子, 能够抑制肿瘤细胞的增殖、侵袭和转移。BECKER等<sup>[30]</sup>发现, *NFIB*是肺发育必不可少的转录因子, 其可能作为多种癌胚miRNA(包括miR-486、miR-139、miR-101、miR-424、miR-212和miR-503等)的潜在调控靶标, 其中miR-486和miR-139已被确定为NSCLC患者血液或痰中的预后及诊断生物标志物, 除此之外, miR-92b-3p可以直接靶向*NFIB*基因的3' UTR, 导致NSCLC中*NFIB*的低表达, 而*NFIB*的低表达与肺腺癌的高侵袭性和短生存期密切相关。在GBM中, *NFIB*高表达, 与良好的预后和高生存率相关<sup>[31]</sup>。有研究表明, 在CSCC中, miR-365靶向调控*NFIB*基因的3' UTR, 使得*NFIB*蛋白表达水平下降, 从而促进肿瘤的发生<sup>[32]</sup>。有文献报道, OS中*NFIB*表达下调, 可促进骨肉瘤细胞的增殖、转移<sup>[33-34]</sup>, SUN等<sup>[35]</sup>发现LINC00319通过调控miR-455-3p/*NFIB*

轴促进骨肉瘤的发生发展。因此, *NFIB*作为人体内重要的转录因子, 能够影响肿瘤细胞的迁移、侵袭、增殖与凋亡等生物学发展, 在不同的肿瘤中扮演促癌或抑癌因子的角色, 然而目前关于*NFIB*在膀胱癌中的作用至今很少有文献报道。

因此本研究利用CRISPR-Cas9技术构建*NFIB*稳定敲除的膀胱癌细胞株, 通过KEGG富集分析发现, *NFIB*-KO-I、*NFIB*-KO-II细胞中的DEGs与PI3K-AKT信号通路显著相关。PI3K-AKT信号通路是细胞内重要的信号转导途径, 能介导细胞增殖、侵袭、凋亡和血管生成等过程。磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol-3-kinase, PI3K)是由1个调节亚基p58和1个催化亚基蛋白构成的二聚体, 参与细胞的增殖、凋亡、葡萄糖转运等生物过程, 能正向促进AKT的表达<sup>[36]</sup>。AKT是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 是PI3K主要的下游因子之一, 能磷酸化下游蛋白的丝氨酸或苏氨酸位点。目前已知的AKT下游靶分子有雷帕霉素靶点复合物、核糖体S6激酶、促凋亡蛋白FOXO蛋白、NF- $\kappa$ B、CREB转录因子、凋亡相关蛋白Bad和Caspase 9等, *P TEN*是AKT的抑制基因, 可使AKT去磷酸化, 进而抑制PI3K-AKT信号通路<sup>[37]</sup>。PI3K-AKT信号通路在肿瘤进展中发挥重要作用, 能调控肿瘤细胞增殖、侵袭、转移与凋亡等。本研究发现, 与对照细胞相比, 在*NFIB*-KO-I和*NFIB*-KO-II细胞中筛选出3个相同的与PI3K-AKT信号通路相关的基因, 包括下调的*TNC*、*ANGPT4*和上调



的*ITGA4*。

TNC是细胞外基质糖蛋白,参与细胞基质相互作用和细胞外基质形成、细胞黏附、细胞迁移和肿瘤转移等<sup>[38-40]</sup>。有研究报道,尿液TNC的含量与膀胱癌分级和分期呈正相关<sup>[41]</sup>。TNC在肿瘤尿路上皮细胞中不表达,而在正常尿路上皮细胞中表达,尤其在肌肉浸润性淋巴结和间质浸润灶周围高表达<sup>[42-43]</sup>。SILVERS等<sup>[44]</sup>研究发现,肌肉浸润性膀胱癌患者发生淋巴结转移时,淋巴结中的TNC表达水平升高,导致患者生存率降低。另一项研究发现,TNC大量沉积在膀胱癌间质内,与肿瘤恶性程度、分期和增殖活性相关,提示TNC可能是一个良好的监测膀胱癌患者复发和预测预后的生物标志物<sup>[45]</sup>。在本研究中,敲除*NFIB*后,膀胱癌细胞中*TNC*的表达水平显著下降,推测*NFIB*可能通过介导PI3K-AKT信号通路调节*TNC*的表达,或通过调控*TNC*的表达调节PI3K-AKT信号通路,影响膀胱癌的侵袭、转移等生物学功能,然而目前*NFIB*、*TNC*与PI3K-AKT信号通路之间的联系在膀胱癌中尚未被明确阐述。ANGPT4是血管生成素家族的成员之一,能促进血管生成、运输氧气和营养物质,从而影响肿瘤生长。有研究报道,在人类浆液性卵巢癌中,ANGPT4表达水平升高,进而促进了肿瘤细胞的增殖、侵袭,以及血管生成<sup>[46]</sup>。在胶质母细胞瘤中,ANGPT4可促进肿瘤血管的生成和体内生长<sup>[47]</sup>。在胰腺癌中,缺氧刺激会促进ANGPT4的表达,促进血管生成,进而导致预后不良<sup>[48]</sup>。然而,目前ANGPT4与膀胱癌的相关研究较少。ITGA4作为细胞黏附因子,可以介导细胞之间或细胞与细胞外基质之间的相互识别和黏附,进而激活AKT级联反应。PI3K-AKT信号通路是引起miRNA表达水平失调的重要通路之一,在CRC中,miR-230a能与*ITGA4*的3' UTR结合,引起*ITGA4*的转录抑制,导致PI3K-AKT通路失调,最终影响肿瘤的发生<sup>[49]</sup>。因此,我们推测,*NFIB*可能通过*ITGA4*及PI3K-AKT通路参与膀胱癌的生物学过程。

PI3K-AKT信号通路可能调控膀胱癌细胞的侵袭、转移,一项研究对131例尿路上皮癌患者的组织样本进行了RNA测序,结果发现在69%的患者中存在潜在的治疗靶点,其中42%的靶点位于PI3K-AKT-mTOR通路中<sup>[50]</sup>。在本研究中,我们应用CRISPR-Cas9技术在人移行膀胱癌细胞UM-UC-3中敲除*NFIB*,通过转录组学技术分析下游潜在的调控基因和信号通路,发现*NFIB*抑制PI3K-AKT信号通路的激

活,这提示*NFIB*很有可能通过介导PI3K-AKT信号通路和*TNC*、*ANGPT4*、*ITGA4*等关键基因的表达进而调控膀胱癌的侵袭、转移和凋亡等生物学过程,该结果也为后续研究膀胱癌的发生发展及筛选潜在的治疗靶点提供了依据。

### 参考文献 (References)

- [1] LEEGWATER P A, VAN DRIEL W, VAN DER VLIET P C. Recognition site of nuclear factor I, a sequence-specific DNA-binding protein from HeLa cells that stimulates adenovirus DNA replication [J]. EMBO J, 1985, 4(6): 1515-21.
- [2] GRONOSTAJSKI R M. Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development [J]. Gene, 2000, 249(1/2): 31-45.
- [3] CHEN K S, LIM J W C, RICHARDS L J, et al. The convergent roles of the nuclear factor I transcription factors in development and cancer [J]. Cancer Lett, 2017, 410: 124-38.
- [4] MIKHAIL F M, LOSE E J, ROBIN N H, et al. Clinically relevant single gene or intragenic deletions encompassing critical neurodevelopmental genes in patients with developmental delay, mental retardation, and/or autism spectrum disorders [J]. Am J Med Genet A, 2011, 155A(10): 2386-96.
- [5] REVAH-POLITI A, GANAPATHI M, BIER L, et al. Loss-of-function variants in NFIA provide further support that NFIA is a critical gene in 1p32-p31 deletion syndrome: a four patient series [J]. Am J Med Genet A, 2017, 173(12): 3158-64.
- [6] CHEN K S, LYNTON Z, LIM J W C, et al. NFIA and NFIB function as tumour suppressors in high-grade glioma in mice [J]. Carcinogenesis, 2021, 42(3): 357-68.
- [7] ZHU Z, LUO L, XIANG Q, et al. MiRNA-671-5p promotes prostate cancer development and metastasis by targeting NFIA/CRYAB axis [J]. Cell Death Dis, 2020, 11(11): 949.
- [8] LEE D S, ROH S Y, PARK J C. The Nfic-osterix pathway regulates ameloblast differentiation and enamel formation [J]. Cell Tissue Res, 2018, 374(3): 531-40.
- [9] WANG H, SHI X, WU S. miR-550a-3/NFIC plays a driving role in esophageal squamous cell cancer cells proliferation and metastasis partly through EMT process [J]. Mol Cell Biochem, 2020, 472(1/2): 115-23.
- [10] XU G, ZHANG Y, LI N, et al. LBX2-AS1 up-regulated by NFIC boosts cell proliferation, migration and invasion in gastric cancer through targeting miR-491-5p/ZNF703 [J]. Cancer Cell Int, 2020, 20: 136.
- [11] HENG Y H, MCLEAY R C, HARVEY T J, et al. NFIX regulates neural progenitor cell differentiation during hippocampal morphogenesis [J]. Cereb Cortex, 2014, 24(1): 261-79.
- [12] HALL T, WALKER M, GANUZA M, et al. Nfix promotes survival of immature hematopoietic cells via regulation of c-Mpl [J]. Stem Cells, 2018, 36(6): 943-50.
- [13] WAKI H, NAKAMURA M, YAMAUCHI T, et al. Global mapping of cell type-specific open chromatin by FAIRE-seq reveals the regulatory role of the NFI family in adipocyte differentiation [J]. PLoS Genet, 2011, 7(10): e1002311.
- [14] CHEN L, KOSTADIMA M, MARTENS J H A, et al. Transcriptional diversity during lineage commitment of human blood progenitors [J]. Science, 2014, 345(6204): 1251033.
- [15] CHANG C Y, PASOLLI H A, GIANNOPOULOU E G, et al.

- NFIB is a governor of epithelial-melanocyte stem cell behaviour in a shared niche [J]. *Nature*, 2013, 495(7439): 98-102.
- [16] MASON S, PIPER M, GRONOSTAJSKI R M, et al. Nuclear factor one transcription factors in CNS development [J]. *Mol Neurobiol*, 2009, 39(1): 10-23.
- [17] BECKER-SANTOS D D, LONERGAN K M, GRONOSTAJSKI R M, et al. Nuclear factor I/B: a master regulator of cell differentiation with paradoxical roles in cancer [J]. *EBioMedicine*, 2017, 22: 2-9.
- [18] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2019 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2019, 69(1): 7-34.
- [19] SIEGEL R L, MILLER K D, FUCHS H E, et al. Cancer statistics, 2022 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2022, 72(1): 7-33.
- [20] SEIDL C. Targets for therapy of bladder cancer [J]. *Semin Nucl Med*, 2020, 50(2): 162-70.
- [21] HAN W, JUNG E M, CHO J, et al. DNA copy number alterations and expression of relevant genes in triple-negative breast cancer [J]. *Genes Chromosomes Cancer*, 2008, 47(6): 490-9.
- [22] LIU R Z, VO T M, JAIN S, et al. NFIB promotes cell survival by directly suppressing p21 transcription in TP53-mutated triple-negative breast cancer [J]. *J Pathol*, 2019, 247(2): 186-98.
- [23] CHEN H, YU C, SHEN L, et al. NFIB functions as an oncogene in estrogen receptor-positive breast cancer and is regulated by miR-205-5p [J]. *Pathol Res Pract*, 2020, 216(12): 153236.
- [24] DENNY S, YANG D, CHUANG C H, et al. Nfib promotes metastasis through a widespread increase in chromatin accessibility [J]. *Cell*, 2016, 166(2): 328-42.
- [25] SEMENOVA E A, KWON M C, MONKHORST K, et al. Transcription factor NFIB is a driver of small cell lung cancer progression in mice and marks metastatic disease in patients [J]. *Cell Rep*, 2016, 16(3): 631-43.
- [26] FANE M E, CHHABRA Y, HOLLINGSWORTH D E J, et al. NFIB mediates BRN2 driven melanoma cell migration and invasion through regulation of EZH2 and MITF [J]. *EBioMedicine*, 2017, 16: 63-75.
- [27] CHENG R, GAO S, HU W, et al. Nuclear factor I/B mediates epithelial-mesenchymal transition in human melanoma cells through ZEB1 [J]. *Oncol Lett*, 2021, 21(2): 81.
- [28] WU C, ZHU X, LIU W, et al. NFIB promotes cell growth, aggressiveness, metastasis and EMT of gastric cancer through the Akt/Stat3 signaling pathway [J]. *Oncol Rep*, 2018, 40(3): 1565-73.
- [29] SUN L, FANG Y, WANG X, et al. miR-302a inhibits metastasis and cetuximab resistance in colorectal cancer by targeting NFIB and CD44 [J]. *Theranostics*, 2019, 9(26): 8409-25.
- [30] BECKER-SANTOS D D, THU K L, ENGLISH J C, et al. Developmental transcription factor NFIB is a putative target of oncofetal miRNAs and is associated with tumour aggressiveness in lung adenocarcinoma [J]. *J Pathol*, 2016, 240(2): 161-72.
- [31] STRINGER B W, BUNT J, DAY B W, et al. Nuclear factor one B (NFIB) encodes a subtype-specific tumour suppressor in glioblastoma [J]. *Oncotarget*, 2016, 7(20): 29306-20.
- [32] ZHOU M, ZHOU L, ZHENG L, et al. miR-365 promotes cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC) through targeting nuclear factor I/B (NFIB) [J]. *PLoS One*, 2014, 9(6): e100620.
- [33] XU L, NI J, WANG Y, et al. Genetic variant of NFIB is associated with the metastasis of osteosarcoma in Chinese population [J]. *Technol Cancer Res Treat*, 2019, 18(5): 153303381987480.
- [34] MIRABELLO L, KOSTER R, MORIARITY B S, et al. A genome-wide scan identifies variants in NFIB associated with metastasis in patients with osteosarcoma [J]. *Cancer Discov*, 2015, 5(9): 920-31.
- [35] SUN F, YU Z, WU B, et al. LINC00319 promotes osteosarcoma progression by regulating the miR-455-3p/NFIB axis [J]. *J Gene Med*, 2020, 22(11): e3248.
- [36] KAPLAN D R, WHITMAN M, SCHAFFHAUSEN B, et al. Common elements in growth factor stimulation and oncogenic transformation: 85 kd phosphoprotein and phosphatidylinositol kinase activity [J]. *Cell*, 1987, 50(7): 1021-9.
- [37] MARTINI M, DE SANTIS M C, BRACCINI L, et al. PI3K/AKT signaling pathway and cancer: an updated review [J]. *Ann Med*, 2014, 46(6): 372-83.
- [38] JONES F S, JONES P L. The tenascin family of ECM glycoproteins: structure, function, and regulation during embryonic development and tissue remodeling [J]. *Dev Dyn*, 2000, 218(2): 235-59.
- [39] JONES P L, JONES F S. Tenascin-C in development and disease: gene regulation and cell function [J]. *Matrix Biol*, 2000, 19(7): 581-96.
- [40] OREND G. Potential oncogenic action of tenascin-C in tumorigenesis [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2005, 37(5): 1066-83.
- [41] GUAN Z, ZENG J, WANG Z, et al. Urine tenascin-C is an independent risk factor for bladder cancer patients [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(3): 961-6.
- [42] BRUNNER A, MAYERL C, TZANKOV A, et al. Prognostic significance of tenascin-C expression in superficial and invasive bladder cancer [J]. *J Clin Pathol*, 2004, 57(9): 927-31.
- [43] BOOTH C, HARNDEN P, SELBY P J, et al. Towards defining roles and relationships for tenascin-C and TGFbeta-1 in the normal and neoplastic urinary bladder [J]. *J Pathol*, 2002, 198(3): 359-68.
- [44] SILVERS C R, MESSING E M, MIYAMOTO H, et al. Tenascin-C expression in the lymph node pre-metastatic niche in muscle-invasive bladder cancer [J]. *Br J Cancer*, 2021, 125(10): 1399-407.
- [45] GAZZANIGA P, NOFRONI I, GANDINI O, et al. Tenascin C and epidermal growth factor receptor as markers of circulating tumoral cells in bladder and colon cancer [J]. *Oncol Rep*, 2005, 14(5): 1199-202.
- [46] BRUNCKHORST M K, XU Y, LU R, et al. Angiopoietins promote ovarian cancer progression by establishing a pro-cancer microenvironment [J]. *Am J Pathol*, 2014, 184(8): 2285-96.
- [47] BRUNCKHORST M K, WANG H, LU R, et al. Angiopoietin-4 promotes glioblastoma progression by enhancing tumor cell viability and angiogenesis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(18): 7283-93.
- [48] GUPTA N, PARK J E, TSE W, et al. ERO1alpha promotes hypoxic tumor progression and is associated with poor prognosis in pancreatic cancer [J]. *Oncotarget*, 2019, 10(57): 5970-82.
- [49] JOSSE C, BOUZNAD N, GEURTS P, et al. Identification of a microRNA landscape targeting the PI3K/Akt signaling pathway in inflammation-induced colorectal carcinogenesis [J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2014, 306(3): G229-43.
- [50] WEINSTEIN J N, AKBANI R, BROOM B M, et al. Comprehensive molecular characterization of urothelial bladder carcinoma [J]. *Nature*, 2014, 507(7492): 315-22.