

# 基于CRISPR/Cas9基因编辑系统构建敲除*TSPAN4*基因的非小细胞肺癌细胞系

刘雁<sup>1</sup> 杜亚蓉<sup>2\*</sup> 孙坤<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>西北师范大学生命科学院, 兰州 730000; <sup>2</sup>中国科学院近代物理研究所, 兰州 730000)

**摘要** 利用CRISPR/Cas9基因编辑系统敲除*TSPAN4*基因, 构建*TSPAN4*基因稳定敲除的非小细胞肺癌A549细胞株, 并检测其对A549细胞迁移、侵袭能力的影响, 为后期探讨迁移体在非小细胞肺癌转移过程中的作用提供实验基础。以质粒pSpCas9(BB)-2A-Puro(px459)为载体, 与设计好的引物连接后得到敲除载体px459-sgRNA-TSPAN4。以jetPRIME<sup>®</sup>为转染试剂, 将构建好的质粒转染至A549细胞系, 嘌呤霉素筛选单克隆细胞株并使用Western blot实验鉴定A549细胞系中*TSPAN4*基因的敲除效果, 细胞划痕实验和Transwell实验检测敲除*TSPAN4*基因对A549细胞迁移、侵袭能力的影响。该研究成功构建了*TSPAN4*基因编辑质粒px459-sgRNA-TSPAN4。Western blot结果显示敲除*TSPAN4*基因能够显著降低A549细胞株中*TSPAN4*蛋白表达量; 敲除*TSPAN4*基因对A549细胞迁移、侵袭能力的影响在统计学上无显著性差异, 降低了N-cadherin的表达, 对E-cadherin表达的影响不大。以上研究表明, 使用CRISPR/Cas9基因编辑技术成功构建了敲除*TSPAN4*基因的A549细胞系, 且单独敲除*TSPAN4*基因不会影响A549细胞迁移能力。

**关键词** *TSPAN4*; CRISPR/Cas9; 非小细胞肺癌; 迁移体

## Establishment of *TSPAN4* Gene Knockout of Non-Small Cell Lung Cancer Cell Line by CRISPR/Cas9

LIU Yan<sup>1</sup>, DU Yarong<sup>2\*</sup>, SUN Kun<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Northwest Normal University, Lanzhou 730000, China;

<sup>2</sup>Institute of Modern Physics, Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China)

**Abstract** The CRISPR/Cas9 gene editing system was used to knockdown the *TSPAN4* gene and construction of *TSPAN4* stable knockdown non-small cell lung cancer A549 cell line. The role of *TSPAN4* was detected in invasion and migration of A549 cell line by means of the biological research methods. Results of this study may provide an experimental basis in exploring the role of migrasome in the metastatic process of non-small cell lung cancer. The plasmid pSpCas9(BB)-2A-Puro(px459) was used as the vector, and the knockdown vector px459-sgRNA-TSPAN4 was obtained by ligating it with the designed primers. Px459-sgRNA-TSPAN4 were transfected into A549 cell lines through jetPRIME<sup>®</sup>. Monoclonal cells were obtained by puromycin pressure screening, and the efficiency of *TSPAN4* knockout was identified by Western blot in the A549 cell lines. The cell scratch and Transwell experiment were used to analysis the effect of the invasion and migration in knockout *TSPAN4* cell lines. Here, the

收稿日期: 2022-10-28

接受日期: 2023-02-06

甘肃省重点研发计划(批准号: 18YF1NA051)和甘肃省重点实验室基金(批准号: 145RTSA012)资助的课题

\*通讯作者。Tel: 18093115849, E-mail: duyrlive@impcas.ac.cn; Tel: 13919280080, E-mail: kunsun@nwnu.edu.cn

Received: October 28, 2022 Accepted: February 6, 2023

This work was supported by the Key Research and Development Program of Gansu Province (Grant No.18YF1NA051) and the Science and Technology Research Project of Gansu Province (Grant No.145RTSA012)

\*Corresponding authors. Tel: +86-18093115849, E-mail: duyrlive@impcas.ac.cn; Tel: +86-13919280080, E-mail: kunsun@nwnu.edu.cn

*TSPAN4* knockout plasmid pX459-sgRNA-*TSPAN4* was successfully constructed. Western blot results showed that the expression of *TSPAN4* protein in A549 cell line was significantly decreased after *TSPAN4* gene knockout. Compared with the wild cell lines, there is no statistical difference on the ability of migration and invasion in knockout cell line of *TSPAN4*, but the *TSPAN4* knockout reduces the expression of N-cadherin and has little impact on the expression of E-cadherin. The above study demonstrated that A549 cell lines with knockdown of *TSPAN4* gene were successfully constructed using CRISPR/Cas9 gene editing technology, and knockdown of *TSPAN4* gene alone did not affect the migration ability of A549 cells.

**Keywords** *TSPAN4*; CRISPR/Cas9; non-small cell lung cancer; migrasome

迁移体(migrasome)作为一种新发现的细胞器,是细胞迁移过程中,由细胞尾部产生收缩丝的顶端或是分叉点形成的单层膜包裹的细胞器,可能在细胞间通讯过程中具有重要功能<sup>[1-2]</sup>。*TSPAN*(tetraspanin)蛋白家族是一类四次跨膜蛋白,在哺乳动物中已经发现的*TSPAN*蛋白有33个成员<sup>[3]</sup>,可调节与细胞迁移相关的重要蛋白如整合素、基质金属蛋白酶、钙黏素以及Rac/Rho蛋白功能<sup>[1]</sup>,LU等<sup>[4]</sup>通过实验验证了整合素与其特异性细胞外基质蛋白结合能够使细胞具有适当黏附能力,而这也正是迁移体形成的决定因素。清华大学俞立教授实验室<sup>[5]</sup>在2015年的研究中发现*TSPAN4*作为迁移体的标记蛋白在迁移体形成过程中必不可少。

肺癌是全球发病率最高的恶性肿瘤之一,具有死亡率高、治愈率低等特点<sup>[6]</sup>。肺癌是中国最常见的癌症类型和癌症死亡的主要原因<sup>[7]</sup>,HIRSCH等<sup>[8]</sup>报道肺癌患者的5年生存率因时期和地区差异在4%~17%不等。其中非小细胞肺癌(non-small cell lung cancer, NSCLC)作为肺癌中主要病理类型,其浸润和转移是治疗失败和导致病人死亡的主要原因。在肿瘤转移过程中,伴随肿瘤细胞从原发部分扩散的转移、伴随渗入循环系统的转移、伴随血管新生离开内皮细胞的转移等,在肿瘤学研究中,肿瘤转移一直是肿瘤治疗中不可忽视的问题,大部分癌症患者死亡的主要原因是癌细胞转移带来的致命打击,而肿瘤转移的发生与细胞迁移密切相关。近年来,越来越多的学者将目光投向了对肿瘤转移机制的研究,自从迁移体被报道以来,其在肿瘤发生发展过程中的功能逐渐得到重视。因此,本研究为进一步探讨迁移体在肿瘤转移中的信号传递作用,使用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除迁移体标记蛋白*TSPAN4*,构建*TSPAN4*缺失的非小细胞肺癌A549细胞系,并通过细胞划痕实验检测了敲除*TSPAN4*

基因后A549细胞迁移能力的变化,为进一步探究*TSPAN4*蛋白在非小细胞肺癌细胞中的作用机制提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与试剂

非小细胞肺癌A549细胞系购自上海细胞库;DMEM/F12基础培养基、0.25%胰蛋白酶溶液(含EDTA)和双抗均购自美国Gibco公司;胎牛血清购自兰州荣晔生物科技有限责任公司;感受态细胞Trans5 $\alpha$ 购自北京全式金生物技术公司。

琼脂粉购自德国BioFroxx公司;Super GelRed<sup>TM</sup>核酸染料购自苏州宇恒生物科技有限公司;内切酶*Bbs* I、T4 PNK、T4 DNA Ligase均购自美国NEB公司;甘油、嘌呤霉素、结晶紫、4%多聚甲醛均购自北京索莱宝科技有限公司;蛋白酶抑制剂购自上海罗氏制药有限公司;甘氨酸、Tris-base购自美国Amresco公司;EDTA及SDS购自德国BioFroxx公司;RIPA裂解液、Bradford蛋白浓度测定试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;PVDF膜(0.22  $\mu$ m)购自美国GE公司;30%丙烯酰胺、TEMED购自武汉赛维尔生物科技有限公司;APS购自中国生工生物工程股份有限公司;NaCl、甲醇、乙醇和氯仿均购自中国天津市盛鑫源化工公司;牛血清白蛋白(BSA)购自上海昂一生物科技有限公司;蛋白预染Marker购自上海雅酶生物医药科技有限公司;增强型的化学发光剂购自美国Advansta公司;Matrigel基质胶购自美国BD公司。

质粒提取试剂盒购自美国OMEGA公司;胶回收试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司;转染试剂jetPRIME<sup>®</sup>购自美国Polyplus公司。

抗体*TSPAN4*购自英国Abcam公司;抗体GAPDH、E-cadherin、N-cadherin购自武汉三鹰生物技术

有限公司; 辣根酶标记山羊抗兔IgG二级抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

## 1.2 sgRNA的设计及合成

sgRNA由在线网站(<https://zlab.bio/guide-design-resources>)免费设计。sgRNA序列由奥科鼎盛生物公司合成(表1)。

## 1.3 构建敲除载体px459-sgRNA-TSPAN4

环状的质粒载体px459经限制性内切酶*Bbs*I酶切后, 会形成线性化的开放结构, 由于其分子结构不如超螺旋紧密, 在琼脂糖凝胶电泳中跑的较慢, 因此能够采用琼脂糖凝胶电泳鉴定酶切效果。酶切产生的线性质粒使用胶回收试剂盒进行纯化以去除杂质。设计好的两对sgRNA(表1)正向序列和反向互补序列退火成双链后, 双链Oligos与胶回收产物连接, 构建形成质粒载体px459-sgRNA-TSPAN4, 具体实验步骤如下。

**1.3.1 质粒载体px459酶切和回收** 载体px459经限制性内切酶*Bbs*I酶切后线性化形成黏性末端。酶切体系为5  $\mu$ L px459载体、1  $\mu$ L *Bbs*I(NEB)、2  $\mu$ L 10 $\times$  NEB Buffer、12  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 酶切体系总体积为20  $\mu$ L, 将配制好的体系于37  $^{\circ}$ C过夜酶切。配制1%的琼脂糖凝胶, 按比例加入1:10 000的Super Gel-Red<sup>TM</sup>核酸染料, 酶切产物在恒压110 V条件下进行琼脂糖凝胶电泳, 电泳完成后在凝胶成像系统下观察条带位置并拍照, 用胶回收试剂盒进行目的片段的回收和纯化。

**1.3.2 合成oligos** oligos合成体系为1  $\mu$ L TSPAN4-sgRNA-F(100  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ L TSPAN4-sgRNA-R(100  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ L 10 $\times$  T4连接酶缓冲液(NEB)、0.5  $\mu$ L T4 PNK(NEB)、6.5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 合成体系总体积为10  $\mu$ L。配制好的体系在37  $^{\circ}$ C水浴30 min, 95  $^{\circ}$ C金属浴5 min, 金属浴外敷冰袋降温至25  $^{\circ}$ C, 该过程大约需要20 min。

**1.3.3 连接** 连接体系为2  $\mu$ L px459酶切载体、1  $\mu$ L oligo(1:250稀释)、1  $\mu$ L 10 $\times$  T4连接酶缓冲液(NEB)、1  $\mu$ L T4 Ligase(NEB)、5  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O, 连接体系总体积为10  $\mu$ L, 于16  $^{\circ}$ C恒温条件下过夜连接。

**1.3.4 转化** 感受态细胞Trans5 $\alpha$ 于冰浴上融化, 将5  $\mu$ L连接产物加入到50  $\mu$ L融化后的感受态细胞中, 轻轻混匀, 冰浴放置30 min; 42  $^{\circ}$ C水浴中热激45 s, 然后迅速将离心管转移到冰浴中2 min, 该过程不要晃动离心管; 向每个离心管中加入500  $\mu$ L无菌且不含抗生素的LB培养基, 混匀后置于37  $^{\circ}$ C摇床200 r/min振荡培养1 h, 使细菌复苏; 吸取15  $\mu$ L已转化的感受态细菌加到含有氨苄的LB固体培养基上, 均匀涂开; 将平板正置于37  $^{\circ}$ C细菌培养箱中约30 min, 待菌液全部被吸收后, 倒置平板过夜培养, 次日挑单克隆菌落, 加5 mL含氨苄的LB液体培养基37  $^{\circ}$ C摇菌12 h~16 h。

**1.3.5 菌落PCR** 菌落PCR能快速鉴定菌落是否为含有目的基因的阳性菌落, 具有高效、操作简单的优势。反应体系包括0.25  $\mu$ L Ex Taq (5 U/ $\mu$ L)、5  $\mu$ L 10 $\times$  Ex Taq Buffer(Mg<sup>2+</sup> plus)、4  $\mu$ L dNTP Mixture、1  $\mu$ L hu6-F(10  $\mu$ mol/L)、1  $\mu$ L TSPAN4-sgRNA-R(10  $\mu$ mol/L), 补充ddH<sub>2</sub>O至25  $\mu$ L, 用沾有菌液的枪头在反应体系中反复吹打, 将模板DNA加入。PCR仪设置扩增条件为94  $^{\circ}$ C预变性4 min; 95  $^{\circ}$ C变性10 s, 52.5  $^{\circ}$ C退火30 s, 72  $^{\circ}$ C延伸1 min, 30个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min延伸完整; 4  $^{\circ}$ C保存。

使用PCR技术快速扩增基因, 使用琼脂糖凝胶电泳观察扩增条带的位置, 来确定目的条带连接成功与否。

**1.3.6 质粒提取** 挑取菌落PCR鉴定结果为阳性的单克隆菌落, 加入至5 mL含氨苄的LB液体培养基, 于37  $^{\circ}$ C摇菌12 h~16 h。根据质粒提取试剂盒说明书操作, 得到无菌质粒, 测定质粒浓度和纯度后将其储存于-20  $^{\circ}$ C备用。

表1 TSPAN4-sgRNA oligo序列  
Table 1 TSPAN4-sgRNA oligo sequence

引物名称 Primer names	序列 Sequences
TSPAN4-sgRNA-F1	5'-CAC CGC TGC ACG TGT CCC GAT ACG-3'
TSPAN4-sgRNA-R1	5'-AAA CCG TAT CGG GAC ACG TGC AGC-3'
TSPAN4-sgRNA-F2	5'-CAC CGC GAC CAA CAT GGA CGA CCA C-3'
TSPAN4-sgRNA-R2	5'-AAA CGT GGT CGT CCA TGT TGG TCG C-3'
hU6-F	5'-CTC GAG CCC CAG TGG AAA GAC GCC-3'

## 1.4 敲除*TSPAN4*基因的单克隆细胞的转染和筛选

**1.4.1 细胞培养** A549细胞使用含有10%胎牛血清、1%青霉素和链霉素的DMEM/F12完全培养基,置于37 °C、CO<sub>2</sub>体积分数为5%的饱和湿度培养箱中培养。

**1.4.2 筛选嘌呤霉素的最佳浓度** 将生长状态良好的A549细胞传至6孔板中,密度以50%为宜,12 h后将培养基分别更换为含有0.1 μg/mL、0.3 μg/mL、0.5 μg/mL、1 μg/mL、2 μg/mL、4 μg/mL嘌呤霉素的培养基,保持嘌呤霉素浓度不变筛选4~7天,导致全部细胞死亡的最低嘌呤霉素浓度就是应用于A549细胞筛选的最佳浓度。筛选期间每天观察细胞状态,细胞出现大量死亡时更换培养基,以减少大量细胞死亡所产生的有毒因子对转染细胞带来的损伤。

**1.4.3 细胞转染与筛选** 将生长状态良好的A549细胞传至6孔板中,密度以50%为宜,37 °C孵育24 h后更换新的DMEM/F12培养基,选择jetPRIME<sup>®</sup>作为转染试剂,根据其使用说明配制转染试剂进行转染,转染48 h后更换含2 μg/mL嘌呤霉素的完全培养基筛选7天。

**1.4.4 筛选分离单克隆细胞株** 嘌呤霉素筛选7天后,消化存活的细胞,以4个/mL的细胞浓度将细胞传代至96孔板中,定期更换培养基。5天后观察孔板中的细胞,排除多克隆株孔,10~12天后将单克隆细胞传代至12孔板单独培养。待细胞扩增起来后,一部分冻存细胞株,剩余细胞继续培养收取蛋白样品,使用Western blot实验来鉴定*TSPAN4*基因是否被成功敲除。

## 1.5 Western blot

使用RIPA裂解液提取细胞蛋白,按照Bradford蛋白定量试剂盒说明书进行蛋白样品定量。根据蛋白浓度计算蛋白上样体积,加入蛋白上样缓冲液后,100 °C加热10 min使蛋白样品变性。配制10%的SDS-PAGE凝胶,恒流45 mA电泳分离蛋白;140 mA恒流转膜150 min,将蛋白转至PVDF膜上;转膜完成后,将PVDF膜置于含5% BSA的封闭液中室温封闭1 h;室温孵育一抗(抗体与5% BSA的比例为1:1 000)3 h或4 °C过夜孵育;用洗液清洗PVDF膜3次,10 min/次;室温孵育辣根酶标记的山羊抗兔IgG二级抗体1 h(二级抗体与5% BSA的比例为1:2 500);用洗液清洗PVDF膜3次,10 min/次。加适量显影,于凝胶成像仪下进行

拍照。使用ImageJ软件进行灰度分析,计算相对蛋白含量。

## 1.6 划痕实验检测敲除*TSPAN4*基因对A549细胞迁移能力的影响

将A549-NC、A549-TSPAN4-KO细胞分别消化,以10<sup>5</sup>个/mL接种到6孔板中,待细胞均匀铺满6孔板时,用无菌枪头垂直于标记线匀速划出3条直线。吸除旧培养基后用PBS缓慢清洗掉残留的漂浮细胞,然后加入无血清的DMEM/F12完全培养基进行细胞培养。分别于0 h、24 h、48 h在光学显微镜下进行拍照观察,计算划痕愈合度。

(1) 以划痕宽度为计算标准时,使用ImageJ测量细胞的迁移距离,计算划痕愈合度。

$$\text{Scratch healing rate} = [(L_0 - L_1) / L_0] \times 100\%$$

注:  $L_0$ 为0 h划痕间距离,  $L_1$ 为24 h或48 h划痕间距离。

(2) 以划痕面积为计算标准时,使用ImageJ软件测量划痕的面积,计算划痕愈合度。

$$\text{Scratch healing rate} = [(S_0 - S_1) / S_0] \times 100\%$$

注:  $S_0$ 为0 h划痕间面积,  $S_1$ 为24 h或48 h划痕间面积。

## 1.7 Transwell实验检测敲除*TSPAN4*基因对A549细胞迁移、侵袭能力的影响

Transwell迁移实验操作步骤为:消化A549-NC、A549-TSPAN4-KO细胞后,各取1 mL 1000 r/min室温离心5 min,离心完成后将培养基更换为无血清无双抗的DMEM/F12培养基,计数后稀释细胞至5 000个/200 μL接种于24孔板上的Transwell小室中,于小室外加入500 μL含10%胎牛血清的DMEM/F12完全培养基,培养24 h后去培养基,用4%多聚甲醛室温固定20 min,加0.1%结晶紫染色30 min, PBS清洗3次,用棉签轻轻擦去非特异性结合于小室上表面的染料及小室上侧的细胞,风干后在显微镜下分别选取5个视野拍照并计数。

Transwell侵袭实验中,Transwell小室需要用Matrigel基质胶进行包被,具体实验步骤为:用无血清培养基配制浓度为2 mg/mL的Matrigel基质胶,充分混匀,取100 μL稀释的Matrigel胶加入Transwell上室,置于37 °C细胞培养箱孵育,直至基质胶凝固,其余实验操作步骤同上。

## 1.8 统计学处理

使用Origin 2021软件进行实验数据处理。本研

究中各实验均独立重复三次, 各组实验数据以平均值 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示。使用 $t$ 检验分析显著性差异, \* $P<0.05$ 表示组内差异显著, \*\* $P<0.01$ 和\*\*\* $P<0.001$ 表示组内差异极显著。

## 2 结果

### 2.1 px459-TSPAN4-sgRNA的构建与鉴定

TSPAN4作为迁移体的标志蛋白, 为进一步研究TSPAN4蛋白在非小细胞肺癌迁移过程中的作用与影响, 我们采用CRISPR/Cas9技术构建了TSPAN4基因敲除的非小细胞肺癌A549细胞系。质粒载体px459经限制性内切酶Bbs I酶切后, 与设计好的两对sgRNA(表1)连接, 构建形成质粒载体px459-TSPAN4-sgRNA(图1A)。酶切产物经琼脂糖凝胶电泳鉴定结果如图1B所示。

构建的质粒载体转化至感受态细胞Trans5 $\alpha$ 后, 进行菌落PCR扩增, 能够以载体自带基因hU6-F与TSPAN4-sgRNA-R扩增出260 bp左右的片段, 则证明序列已经成功插入载体, 琼脂糖凝胶电泳结果如图1C所示, 鉴定结果中除px459-sg1-clone 4外, 均为阳性克隆株菌落。

### 2.2 嘌呤霉素的最佳浓度

设定嘌呤霉素终浓度为0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , 保持嘌呤霉素浓度不变处理细胞4~7天后, 所有细胞死亡的嘌呤霉素最低浓度为应用于A549细胞筛选的最佳浓度。显微镜下观察, 嘌呤霉素浓度大于2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时A549细胞全部死亡, 因此确定嘌呤霉素的最佳筛选浓度为2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

### 2.3 TSPAN4基因敲除细胞株的鉴定

将构建好的质粒载体px459-sgRNA1和px459-sgRNA2转染至A549细胞中, 转染48 h后进行嘌呤霉素筛选, 对筛选7天后的群体细胞进行Western blot鉴定。结果如图2A所示, 与px459-sgRNA1质粒相比, 构建的px459-sgRNA2质粒对A549细胞的敲除效率较好, 因此选择px459-sgRNA2质粒转染的群体细胞进行单克隆细胞株的筛选与鉴定。

于96孔板中挑选px459-sgRNA2质粒转染单克隆细胞株进行蛋白鉴定, 结果如图2B所示, 与转染空质粒px459的单克隆细胞株相比, 4个敲除细胞株中TSPAN4的蛋白表达量均明显降低。以上结果表明, 用CRISPR/Cas9基因编辑技术成功构建了

TSPAN4基因敲除的质粒, 达到了获得敲除TSPAN4基因的A549稳转细胞系的目的。

由于癌细胞系的基因组呈现不稳定的特点, 不同细胞个体之间的遗传背景存在差异, 为了消除细胞间差异对后续实验带来干扰, 我们根据Western blot蛋白鉴定结果, 选择敲除效果更好的编号为1~3的三个单克隆细胞株进行混合培养, 获得混合克隆株。

### 2.4 敲除TSPAN4基因对A549细胞迁移、侵袭能力的影响

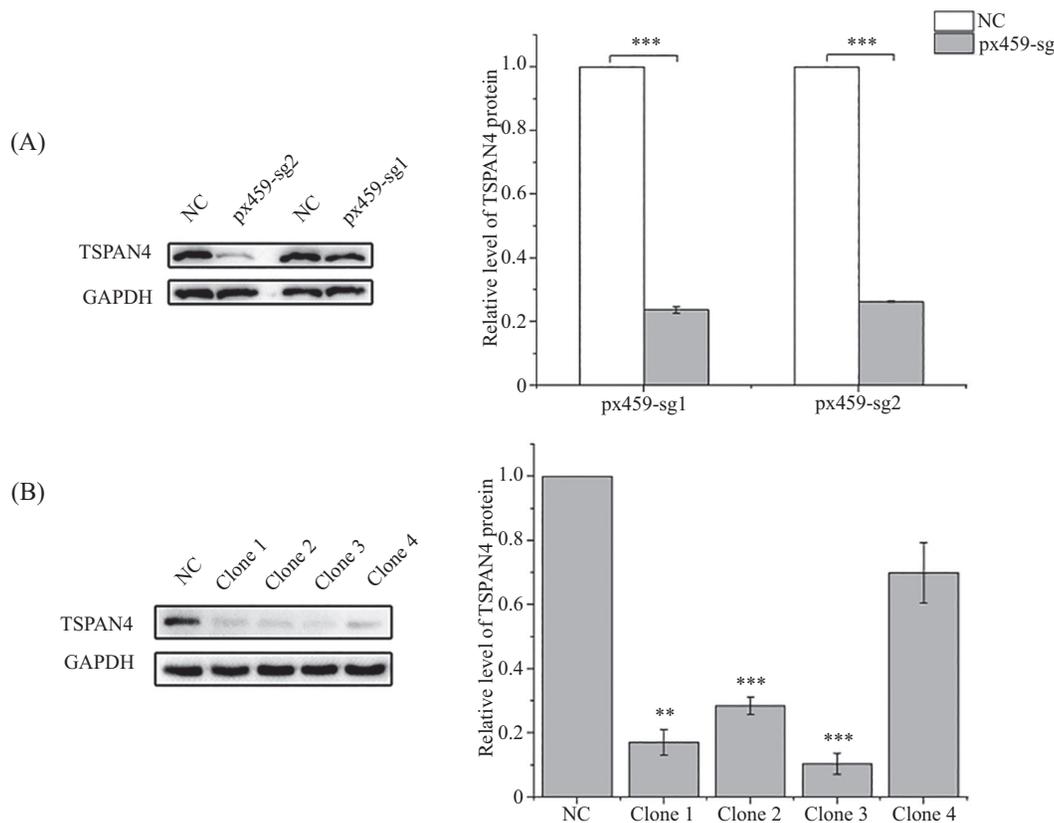
2.4.1 划痕实验 选用划痕实验检测敲除TSPAN4基因对A549细胞迁移能力的影响, 在细胞划痕后的0 h、24 h、48 h在光学显微镜下拍照, 通过测量划痕宽度(图3A)或是划痕面积(图3B)的方法计算划痕愈合度, 实验结果如图3所示。结果显示, TSPAN4基因缺失的A549细胞迁移能力与对照组相比, 统计上无显著性差异( $P>0.05$ ), 表明单独敲除TSPAN4基因对A549细胞的迁移能力没有影响。

2.4.2 Transwell实验 实验中, 使上室中的细胞处于低营养的环境中, 细胞为获取更多的营养, 会穿过Transwell小室上的膜, 进入高营养的一端, 为探究肿瘤细胞的迁移、侵袭提供了便利。按照1.7中的方法对Transwell小室的细胞固定染色后, 擦去上室的细胞和残留的染料, 显微镜拍照并统计数据, 结果如图4和图5所示。实验结果表明, 与对照组相比, 单独敲除TSPAN4基因对A549细胞的迁移、侵袭能力的影响在统计学上无显著性差异( $P>0.05$ ), Transwell实验在细胞划痕实验的基础上再次验证了这一结论。

### 2.5 TSPAN4基因敲除细胞株中E-cad和N-cad的鉴定

上皮钙黏素(E-cadherin, E-cad)作为一种细胞黏附性分子, 在肿瘤转移过程中发挥重要作用, 其下调、缺失或是功能障碍均可导致细胞间黏附力下降, 导致肿瘤细胞发生侵袭转移<sup>[9-10]</sup>。神经钙黏素(N-cadherin, N-cad)是一种能够进行信号传递的功能性跨膜蛋白, 目前研究发现N-cad的异常表达与肿瘤细胞的迁移、浸润及侵袭等相关<sup>[11]</sup>。因此选择敲除效果明显的px459-sg2质粒转染单克隆细胞株对E-cad、N-cad的表达量进行鉴定, 结果如图6所示, 敲除TSPAN4基因降低了A549细胞中N-cad的表达量, 但是对E-cad的表达量影响不明显, 我们在细胞划痕实验和Transwell实验中已经证明单独敲除TSPAN4基因并不会影响A549细胞的迁移侵袭能力, 这一





A: *TSPAN4*基因敲除的A549混合细胞株中TSPAN4蛋白表达量; B: px459-sg2质粒转染的A549单克隆细胞株中TSPAN4蛋白表达量。\*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ , 与NC组比较。

A: TSPAN4 protein expression in A549 mixed cell line with *TSPAN4* gene knockout; B: TSPAN4 protein expression in A549 monoclonal cell line transfected with px459-sg2 plasmid. \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  compared with NC group.

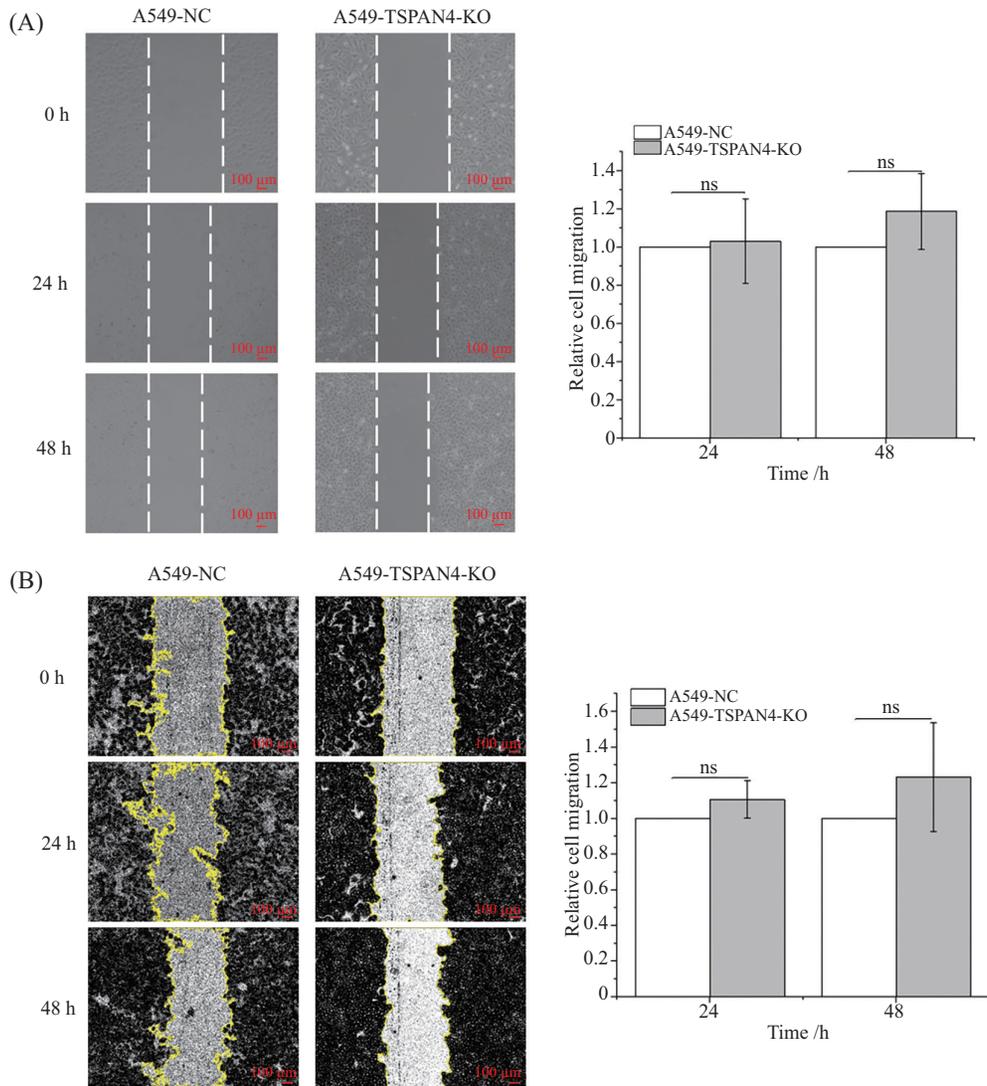
### 图2 Western blot检测A549细胞系中TSPAN4的表达差异

Fig.2 Difference of TSPAN4 expression in the A549 cell detected by Western blot

囊泡状结构,最早由清华大学俞立教授实验室发现并正式报道<sup>[5]</sup>。马亮等<sup>[5]</sup>研究发现,细胞产生的迁移体能够在特定位置释放细胞内容物至细胞外环境中或是直接被传入细胞获取,直接或间接参与细胞间通讯过程包括血管稳态、机体免疫、组织再生以及肿瘤细胞转移等活跃的生物过程的调控<sup>[16]</sup>。

俞立教授团队<sup>[1]</sup>在2019年的研究中发现四次跨膜蛋白家族和胆固醇对迁移体的形成是必要且充分的条件,四次跨膜蛋白家族中的33个成员都包含4个跨膜结构域,并且广泛分布于各类细胞中,同时研究还发现在33种已知的哺乳动物的四次跨膜蛋白中,有14个成员的过表达能够不同程度促进迁移体的形成,其中包括TSPAN1、TSPAN2、TSPAN4、TSPAN6、TSPAN7、TSPAN9、TSPAN18、CD82和CD81在内的9种蛋白作用效果突出。黄雨薇等<sup>[17]</sup>在纯化TSPAN4蛋白并将其整合进含有胆固醇的单层脂质体的研究中,发现TSPAN4对迁移体的生成具有

促进作用。TSPAN4是最早被证明在迁移体中表达丰富的蛋白<sup>[5]</sup>,在迁移体的生长阶段从收缩纤维上被招募到迁移体中,一旦进入迁移体中就无法再移出。我们结合TCGA数据库分析发现,TSPAN4在多种癌症中均有高表达,是个预后危险因子,同时分析了迁移体在癌症治疗中的作用,发现多种抗癌药物与TSPAN4紧密相关,比如抗癌药物福瑞替尼、马赛替尼、TL-1-85以及Y-39983的耐药性均与TSPAN4有关<sup>[18]</sup>。结合以上报道,我们发现TSPAN4在迁移体形成过程中的作用不容忽视,而且能够影响癌症治疗结果。FAN等<sup>[19]</sup>探究了细胞迁移与迁移体形成之间的关系,发现细胞迁移方向与速度的改变均能影响迁移体的形成,迁移体的数量会随着细胞迁移的增加而增加<sup>[5,20]</sup>。在不同细胞系中敲除TSPAN4在抑制迁移体形成中表现出显著差异,张绍进等<sup>[1]</sup>的研究显示敲除TSPAN4能够显著抑制MGC-803细胞和NRK细胞中迁移体的形成,但在L929细胞中,单

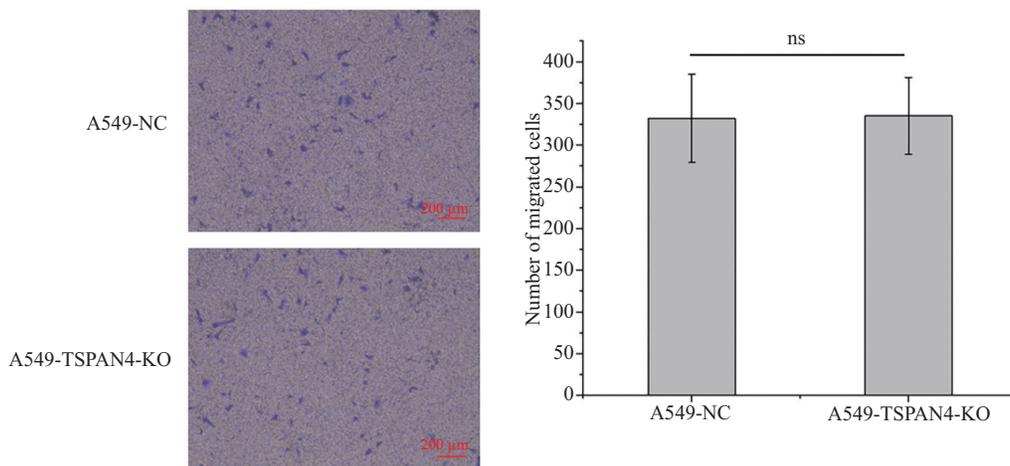


A: 测量划痕宽度计算划痕愈合度; B: 测量划痕面积计算划痕愈合度。ns:  $P>0.05$ 。

A: measure the scratch width to calculate the scratch healing degree; B: measure the scratch area to calculate the scratch healing degree. ns:  $P>0.05$ .

图3 划痕实验检测TSPAN4对A549细胞迁移能力的影响

Fig.3 The effect of TSPAN4 on the migration of A549 cells detected by scratch assay



ns:  $P>0.05$ .

图4 Transwell实验检测TSPAN4对A549细胞迁移能力的影响

Fig.4 The effect of TSPAN4 on migration of A549 cells detected by Transwell assay

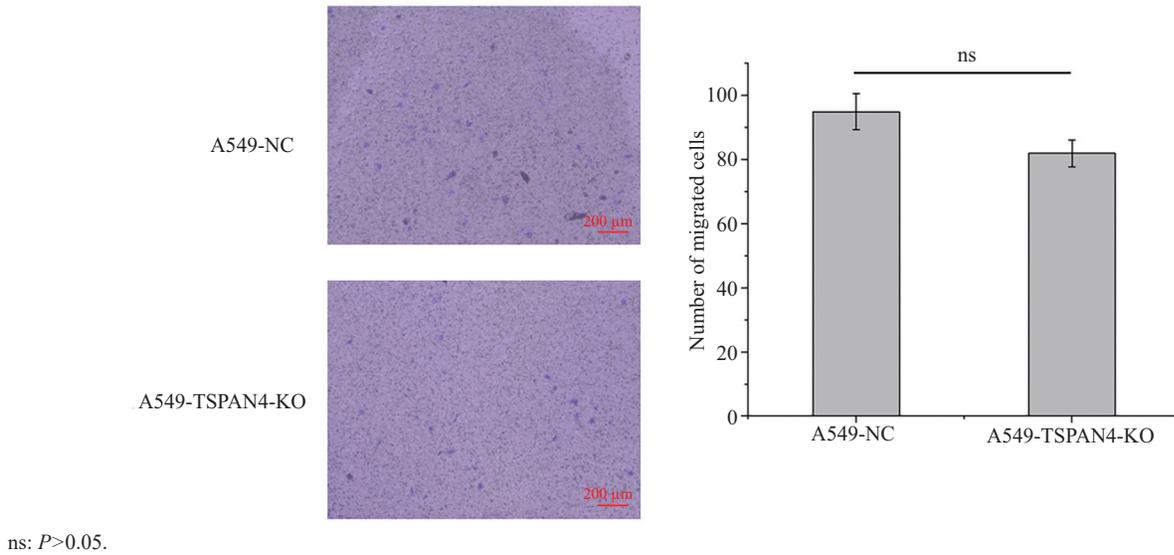
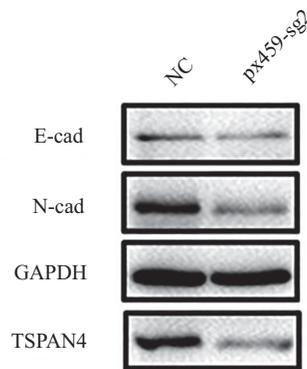
图5 Transwell实验检测*TSPAN4*对A549细胞侵袭能力的影响Fig.5 The effect of *TSPAN4* on invasion of A549 cells detected by Transwell assay

图6 Western blot检测A549细胞中E-cad/N-cad的表达差异

Fig.6 Difference of E-cad/N-cad expression in the A549 cell detected by Western blot

单独敲除*TSPAN4*或是敲低*CD81*都不会影响迁移体的形成。我们在研究中使用基因编辑技术单独敲除A549细胞中的*TSPAN4*基因,通过划痕实验和Transwell实验进行验证,初步判断敲除*TSPAN4*基因对非小细胞肺癌A549细胞侵袭迁移能力的影响并不显著,结合已有的报道,我们在后期的研究工作中,可能需要协同敲除某些TSPAN家族基因,使其生成迁移体的数量与野生型肿瘤细胞相比有所下降,才能够进一步揭示*TSPAN4*基因在迁移体形成过程中的作用机制。

#### 4 结论

本研究成功构建敲除*TSPAN4*基因的A549稳转细胞系,划痕实验和Transwell实验均证明单独敲除*TSPAN4*基因不会使A549细胞的迁移、侵袭能力发

生变化,为后续深入探究敲除*TSPAN4*基因在非小细胞肺癌细胞系中的调控作用奠定了基础,有利于更进一步探索*TSPAN4*在非小细胞肺癌迁移过程中的分子机制。

#### 参考文献 (References)

- [1] HUANG Y, ZUCKER B, ZHANG S, et al. Migrasome formation is mediated by assembly of micron-scale tetraspanin macrodomains [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(8): 991-1002.
- [2] 马永宾, 赵乐羽, 周丹, 等. 迁移体的生物学功能研究进展[J]. *江苏大学学报(医学版)*(MA Y B, ZHAO L Y, ZHOU D, et al. Advances in biological function of migrasomes [J]. *Journal of Jiangsu University, Medicine Edition*), 2022, 32(5): 450-60.
- [3] HUANG S, YUAN S, DONG M, et al. The phylogenetic analysis of tetraspanins projects the evolution of cell-cell interactions from unicellular to multicellular organisms [J]. *Genomics*, 2005, 86(6): 674-84.
- [4] LU P, LIU R, LU D, et al. Chemical screening identifies ROCK1

- as a regulator of migrasome formation [J]. *Cell Discov*, 2020, 6(1): 51.
- [5] MA L, LI Y, PENG J, et al. Discovery of the migrasome, an organelle mediating release of cytoplasmic contents during cell migration [J]. *Cell Res*, 2015, 25(1): 24-38.
- [6] ZHU J, JIANG Y, WANG T, et al. Integrative analysis of m6A RNA methylation regulators and the tumor immune microenvironment in non-small-cell lung cancer [J]. *Dis Markers*, 2022, 2022: 2989200.
- [7] CAO W, CHEN H D, YU Y W, et al. Changing profiles of cancer burden worldwide and in China: a secondary analysis of the global cancer statistics 2020 [J]. *Chin Chin Med J*, 2021, 134(7): 783-91.
- [8] HIRSCH F R, SCAGLIOTTI G V, MULSHINE J L, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments [J]. *Lancet*, 2017, 389(10066): 299-311.
- [9] DING G, PENG Z, SHANG J, et al. LincRNA-p21 inhibits invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma through miR-9/E-cadherin cascade signaling pathway molecular mechanism [J]. *OncoTargets Ther*, 2017, 10: 3241-7.
- [10] ZHAO H, ZHANG D, YANG L, et al. p0071 interacts with E-cadherin in the cytoplasm so as to promote the invasion and metastasis of non-small cell lung cancer [J]. *Mol Carcinog*, 2018, 57(1): 89-96.
- [11] 陈虹, 潘琦文, 李建湘, 等. RNAi沉默N-cadherin通过MEK-ERK信号通路抑制卵巢癌细胞增殖、侵袭、迁移及上皮-间质转化过程[J]. 西部医学(CHEN H, PAN Q W, LI J X, et al. RNAi silencing N-cadherin inhibits the proliferation, invasion, migration and epithelial-mesenchymal transition of ovarian cancer cells through the MEK-ERK signaling pathway [J]. *Medical Journal of West China*, 2022, 34(8): 1140-6.
- [12] WANG H, HU X, HUANG M, et al. Mettl3-mediated mRNA m6A methylation promotes dendritic cell activation [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1898.
- [13] HAN D, LIU J, CHEN C, et al. Anti-tumour immunity controlled through mRNA m6A methylation and YTHDF1 in dendritic cells [J]. *Nature*, 2019, 566(7743): 270-4.
- [14] COLAPRICO A, SILVA T C, OLSEN C, et al. TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data [J]. *Nucleic Acids Res*, 2016, 44(8): e71.
- [15] LI Y, GU J, XU F, et al. Molecular characterization, biological function, tumor microenvironment association and clinical significance of m6A regulators in lung adenocarcinoma [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22(4): bbaa225.
- [16] ZHANG Y, WANG J, DING Y, et al. Migrasome and tetraspanins in vascular homeostasis: concept, present, and future [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2020, 8: 438.
- [17] HUANG Y, ZUCKER B, ZHANG S, et al. Publisher correction: migrasome formation is mediated by assembly of micron-scale tetraspanin macrodomains [J]. *Nat Cell Biol*, 2019, 21(10): 1301.
- [18] QIN Y, YANG J, LIANG C, et al. Pan-cancer analysis identifies migrasome-related genes as a potential immunotherapeutic target: a bulk omics research and single cell sequencing validation [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 994828.
- [19] FAN C, SHI X, ZHAO K, et al. Cell migration orchestrates migrasome formation by shaping retraction fibers [J]. *J Cell Biol*, 2022, 221(4): e202109168.
- [20] 陈扬. 细胞的“新细胞器”——迁移体[J]. 中国生物化学与分子生物学报(CHEN Y. Migrasome: a new cellular organelle [J]. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*), 2021, 37(5): 551-5.