

IDH1 基因在肝内胆管癌细胞 HuCCT1 增殖与迁移中的作用及其初步机制

林美佳^{1,2}, 雷宇清^{2,3,4}, 叶洲杰^{2,5}, 朱丽萍^{2,6}, 王心睿^{2,7*}, 黄雄飞^{1,8*}

¹福建医科大学基础医学院病理学系, 福建福州 350004; ²国家卫健委非人灵长类生育调节技术评价重点实验室/福建省妇幼保健院, 福建福州 350000; ³福建医科大学妇产临床医学院, 福建福州 350004; ⁴福建省儿童医院心脏外科, 福建福州 350011; ⁵福建省妇幼保健院, 福建福州 350001; ⁶福建省儿童医院, 福建福州 350011; ⁷福建医科大学附属第一医院福建省妇幼保健院医学研究中心, 福建福州 350001; ⁸福建医科大学消化道恶性肿瘤教育部重点实验室, 福建福州 350108

[中图分类号] R735.8 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2561.2023.0731
[声明] 本文所有作者声明无利益冲突
[引用本文] 林美佳, 雷宇清, 叶洲杰, 等. IDH1 基因在肝内胆管癌细胞 HuCCT1 增殖与迁移中的作用及其初步机制[J]. 解放军医学杂志, 2024, 49(2): 194-203.
[收稿日期] 2022-12-08 [录用日期] 2023-04-06 [上线日期] 2023-07-31

[摘要] 目的 探讨异柠檬酸脱氢酶 1(IDH1)在肝内胆管癌(iCCA)细胞 HuCCT1 增殖与迁移中的作用及其可能的分子机制。方法 采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术构建 IDH1 基因敲除的 HuCCT1 细胞(HuCCT1^{IDH1-/-}); CCK-8 法和克隆形成实验检测 IDH1 野生型 HuCCT1(HuCCT1^{WT})细胞和 HuCCT1^{IDH1-/-}细胞的增殖能力; 细胞划痕和 Transwell 实验检测细胞的迁移和侵袭能力; Western blotting 检测细胞上皮间质转化(EMT)相关蛋白 E-钙黏蛋白(E-cadherin)、N-钙黏蛋白(N-cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)、Wnt3a、 β -连环蛋白(β -catenin)的表达水平。生物信息学方法分析上述两种 HuCCT1 细胞的转录组测序结果, Western blotting 验证转录组信息通路相关蛋白的表达。结果 与 HuCCT1 细胞比较, HuCCT1^{IDH1-/-}细胞增殖和克隆形成数目明显减少($P<0.05$), 阻滞在 G₂/M 期细胞的比例明显增加($P<0.01$), 划痕愈合率明显降低($P<0.01$), 迁移细胞数目($P<0.001$)和侵袭细胞数目($P<0.05$)明显减少; qRT-PCR 检测结果显示, HuCCT1^{IDH1-/-}细胞 IDH1、Vimentin、MMP-9 和调控 G₂/M 期增殖相关基因 Cyclin A2、Cyclin B1 及 CDK1 mRNA 表达水平降低($P<0.05$), 编码 E-cadherin 的 CDH1 mRNA 表达水平升高($P<0.01$); Western blotting 检测结果显示, HuCCT1^{IDH1-/-}细胞中 E-cadherin 表达水平升高($P<0.05$), N-cadherin、Vimentin 及 MMP-9 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。转录组测序结果显示, HuCCT1^{WT} 与 HuCCT1^{IDH1-/-}存在 1476 个差异表达基因(DEGs); 基因本体论(GO)分析显示上述 DEGs 显著富集在炎症反应、细胞信号转导和细胞代谢等生物学过程; KEGG 通路分析显示上述 DEGs 显著富集在 Wnt、MAPK、Rap1、Hippo、TNF 等与肿瘤细胞增殖和侵袭转移密切相关的信号通路。Western blotting 验证结果显示, 与 HuCCT1^{WT} 比较, HuCCT1^{IDH1-/-}细胞 Wnt 信号通路的 Wnt3a 和 β -catenin 蛋白表达水平降低($P<0.05$)。结论 IDH1 基因参与调控 iCCA 细胞 HuCCT1 的迁移、侵袭及 EMT 过程, 其机制可能与激活 Wnt/ β -catenin 信号通路有关。

[关键词] 肝内胆管癌; 异柠檬酸脱氢酶 1; 细胞迁移; 细胞侵袭; 转录组

The biological function and mechanism of IDH1 gene in intrahepatic cholangiocarcinoma cell HuCCT1

Lin Mei-Jia^{1,2}, Lei Yu-Qing^{2,3,4}, Ye Zhou-Jie^{2,5}, Zhu Li-Ping^{2,6}, Wang Xin-Rui^{2,7*}, Huang Xiong-Fei^{1,8*}

¹Department of Pathology, School of Basic Medical Sciences, ³College of Clinical Medicine for Obstetrics and Gynecology and Pediatrics, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350004, China

²NHC Key Laboratory of Technical Evaluation of Fertility Regulation for Non-Human Primate/Fujian Maternity and Child Health Hospital, Fuzhou, Fujian 350000, China

[基金项目] 福建省自然科学基金(2022J01662)

[作者简介] 林美佳, 硕士研究生, 主要从事肝脏肿瘤病理相关的研究

[通信作者] 王心睿, E-mail: wanxiru@sytu.edu.cn; 黄雄飞, E-mail: xiongfeihuang@fjmu.edu.cn

⁴Department of Cardiac Surgery, ⁶Fujian Children's Hospital, Fuzhou, Fujian 350011, China

⁵Fujian Maternity and Child Health Hospital, Fuzhou, Fujian 350001, China

⁷Medical Research Center, Fujian Maternity and Child Health Hospital, Affiliated Hospital of Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350001, China

⁸Key Laboratory of Gastrointestinal Malignancy of Ministry of Education, Fujian Medical University, Fuzhou, Fujian 350108, China

*Corresponding author, Wang Xin-Rui, E-mail: wanxiru@sytu.edu.cn; Huang Xiong-Fei, E-mail: xiongfeihuang@fjmu.edu.cn

This work was supported by the Natural Science Foundation of Fujian Province (2022J01662)

[Abstract] Objective To explore the role and possible molecular mechanism of Isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) gene in proliferation and migration of intrahepatic cholangiocarcinoma (iCCA) cell HuCCT1. **Methods** HuCCT1 cells with *IDH1* gene knockout (HuCCT1^{IDH1^{-/-}}) were constructed by CRISPR/Cas9 gene editing technology. To investigate the capacities of proliferation, migration and invasion of HuCCT1^{WT} (HuCCT1 cells with wild-type *IDH1* gene) and HuCCT1^{IDH1^{-/-}} cells, assays of CCK-8, clone formation, scratch and transwell were performed. Western blotting was used to detect the expression levels of epithelial-mesenchymal transition (EMT) associated proteins E-cadherin, N-cadherin, Vimentin, MMP-9, Wnt3a and β -catenin in two groups of cells. The transcriptome sequencing data of HuCCT1^{WT} and HuCCT1^{IDH1^{-/-}} cells were analyzed by bioinformatics methods, Western blotting was used to verify the expression of signaling pathway-related proteins. **Results** Compared with HuCCT1^{WT} cells, HuCCT1^{IDH1^{-/-}} cells showed the number of proliferation and clone formation significantly reduced ($P < 0.05$), the proportion of cells blocked in G₂/M phase was significantly increased ($P < 0.01$), the rate of scratch healing was significantly decreased ($P < 0.01$), and the number of migrated cells ($P < 0.001$) and invaded cells ($P < 0.05$) was significantly reduced. qRT-PCR assay showed that the expression levels of *IDH1*, *Vimentin*, *MMP-9* and genes related to the regulation of G₂/M cycle proliferation, *Cyclin A2*, *Cyclin B1* and *CDK1* mRNA were down-regulated in HuCCT1^{IDH1^{-/-}} cells ($P < 0.05$), and the expression of *CDH1* mRNA encoding E-cadherin was up-regulated ($P < 0.01$); Western blotting assay showed that the expression level of E-cadherin in HuCCT1^{IDH1^{-/-}} cells was significantly increased ($P < 0.05$), and the expression level of N-cadherin, Vimentin and MMP-9 protein was significantly decreased ($P < 0.05$) than that in HuCCT1^{WT} cells. Data of transcriptome sequencing revealed 1476 differentially expressed genes (DEGs) between two groups of HuCCT1 cells. Go enrichment analysis showed the DEGs were significantly enriched in cell biological processes associated with inflammatory response, cell signaling and cell metabolism. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis suggested that the DEGs may be involved in some signaling pathways such as Wnt, MAPK, Rap1, Hippo and TNF, which are closely related to the regulation of proliferation and invasion of tumor cells. Western blotting verification results showed that compared with HuCCT1^{WT} cells, the relative expression of Wnt3a and β -catenin proteins of HuCCT1^{IDH1^{-/-}} cells was significantly decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** *IDH1* gene may participate in the control of biological functions of HuCCT1 cells, including cell proliferation, migration, invasion and epithelial mesenchymal transition. The mechanism may be related to the activation of the Wnt/ β -catenin signaling pathway.

[Key words] intrahepatic cholangiocarcinoma; isocitrate dehydrogenase 1; cell migration; cell invasion; transcriptome sequencing

肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, iCCA) 是指位于肝内二级胆管至最小胆管分支的被覆上皮及管周腺体发生的具有高度侵袭性的恶性肿瘤, 占原发性肝癌的 10%~20%^[1]。近 30 多年来, 全球 iCCA 发病率和病死率皆呈上升趋势, 目前其治愈的首选是根治性手术, 但因早期发现困难, 仅约 35% 的患者具有手术治疗的机会, 5 年生存率 < 20%^[2-3]。近年来, iCCA 的治疗已逐渐从单纯手术过渡到以手术为基石的多学科综合治疗模式; 由于 iCCA 发病机制尚不明确, 晚期患者从综合治疗中的获益仍存在较多争议^[4]。

异柠檬酸脱氢酶 (isocitrate dehydrogenase, IDH) 是三羧酸循环的关键酶, 包含 IDH1、IDH2 和 IDH3 三个同工酶。其中 IDH1 位于细胞质和过氧化物酶体中, IDH2 和 IDH3 位于线粒体中^[5-6]。iCCA 具有较高频率的 *IDH1* 和 *IDH2* 基因突变^[7-9], 其中 *IDH1* 基因突

变更常见, 发生率为 4.5%~55.6%^[8,10-14]。针对 *IDH1* 基因突变的靶向药物治疗 iCCA 的相关临床试验正在进行^[15]。晚期 iCCA 患者的药物治疗尚未出现突破性进展, 药物的具体作用机制也不明确。有研究报道, *IDH1* 可能通过诱导乙醛脱氢酶 1 的表达来促进 iCCA 细胞增殖、迁移和侵袭^[16]。对 *IDH1* 基因参与调控的重要基因和信号通路的深入研究, 将有助于开发更有效的 iCCA 靶向药物。本研究采用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术和生物信息学方法探讨 iCCA 细胞 HuCCT1 中 *IDH1* 基因的生物功能及可能的分子机制, 旨在为揭示 *IDH1* 基因在 iCCA 发病中的作用提供参考。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 人 iCCA 细胞系 HuCCT1 购自河南商城北纳创联生物科技有限公司。CRISPR 基

因敲除质粒 pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)保存于本实验室；RPMI 1640 培养基(8121083)、胎牛血清(2138109RP)、0.25% 胰蛋白酶(2192619)、Opti-MEM®(2120763) T₄ DNA Ligase(00276732)购自美国赛默飞世尔科技公司；Trizol(338110)购自美国赛默飞 Ambion 公司；反转录试剂盒(R323-01)、荧光定量 PCR 试剂盒(Q511-02/03)、2xPhanta® Max Master Mix (P515-01/02/03)、5 min™ TA/Blunt-Zero Cloning Kit (L/N 7E480H0)购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司；StbI3 感受态细胞(WD0443143)购自上海唯地生物技术有限公司；细胞周期检测试剂盒(FKRP9JT6 QT)购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；Puromycin(QLL-38-03A)购自法国 InvivoGen 公司；Matrigel 基底膜基质(082704)购自上海诺唯医药科技有限公司；细胞基因组 DNA 提取试剂盒(DP304)、DNA 纯化回收试剂盒(DP214)、无内毒素质粒小提中量试剂盒(DP118)购自天根生化科技(北京)有限公司；IDH1 抗体(A13245)购自武汉爱博泰克生物技术有限公司；Wnt3a(AF8352)、β-连环蛋白(β-catenin)(AF0066)抗体购自上海碧云天生物技术有限公司；GAPDH、β-actin、E-钙黏蛋白(E-Cadherin)、N-钙黏蛋白(N-Cadherin)、波形蛋白(Vimentin)、基质金属蛋白酶-9(Matrix metalloproteinase-9, MMP-9)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HuCCT1 细胞使用含 10% FBS 的 RPMI 1640 进行培养，培养条件为：37 ℃、5% CO₂，并保持一定的湿度。

1.2.2 向导 RNA(guide RNA, gRNA)的合成与设计 利用 CRISPR 设计网站(<http://crispr.mit.edu/>)针对 IDH1 的基因序列(NM_001282386.1)第 4 外显子设计 gRNA，在 gRNA 的上下游 5'端分别加上 Bbs I 酶切位点的黏性末端(CACC/AAAC)，由福州尚亚生物技术有限公司合成引物。引物序列为：上游 5'-CAC CCATGACGACCTATGATGAT-3'；下游 5'-AAACAT CATCATAGGTCGTCATGC-3'。

1.2.3 重组载体 PX459-gRNA 的构建 稀释 gRNA 上下游序列浓度至 10 μmol/L，反应体系为：gRNA-F 9 μl，gRNA-R 9 μl，10×PCR Buffer 2 μl。退火形成双链，退火程序为：95 ℃ 10 min，85 ℃ 1 s，25 ℃ 1 min；降温至 4 ℃。用 T₄ 连接酶将退火产物与经 Bbs I 酶切并纯化的 PX458 质粒于 22 ℃ 连接，将连接产物转化入大肠杆菌 StbI3 感受态细胞中，均匀涂布于含有氨苄青霉素的 TB 固体平板上，37 ℃ 过夜培养。挑取单克隆菌落接种于含有氨苄青霉素的 TB 液体培养基中，37 ℃ 恒温振荡培养，将菌液送至福州博尚生物技术有限公司测序。

1.2.4 IDH1 敲除细胞株的构建 将 HuCCT1 细胞铺入 6 孔板中，待细胞生长至 80% 融合时，PEI 转染法将重组载体转染到细胞中，pLEGFP-N1 质粒作为阳性对照，转染 8 h 后更换新鲜培养基。PX459 携带嘌呤霉素抗性，转染 48 h 后，使用嘌呤霉素筛选转染成功的细胞，以未转染质粒的细胞作为阴性对照。抽提敲除细胞基因组，目的片段 PCR 扩增测序鉴定基因敲除情况。根据人 IDH1 基因的序列(NM_001282386.1)设计验证引物，引物序列为：上游 5'-ACGACCAAGTCACCAAGGA-3'；下游 5'-CCTATT GTGCAGCCAGTGT-3'。送至福州博尚生物技术有限公司进行一代测序。有限稀释法获得单克隆细胞，挑取单克隆细胞进行 PCR 扩增测序再次验证，5 min™ TA/Blunt-Zero Cloning Kit TA 克隆鉴定敲除株基因型，最后在 mRNA 和氨基酸水平验证 IDH1 的表达情况。

1.2.5 qRT-PCR 检测 Trizol 法提取对数生长期的细胞总 RNA 进行 RNA 反转录。实时荧光定量 PCR 检测基因相对表达量，2^{-ΔΔCt} 法对 mRNA 的定量结果进行归一化处理。所用引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列
Tab.1 Primer sequences for qRT-PCR

基因	引物序列(5'-3')
β-actin	上游: CTCCATCTGGCCTCGCTGT
	下游: GCTGTCACCTTCACCGTTCC
IDH1	上游: GGCTTGTGAGTGGATGGGTA
	下游: GCAACACCACCACCTTCTTC
Cyclin A2	上游: CGCTGGCGGTACTGAAGTC
	下游: GAGGAACGGTGACATGCTCAT
Cyclin B1	上游: AATAAGGCGAAGATCAACATGGC
	下游: TTTGTTACCAATGTCCCAAGAG
CDK1	上游: AAACACAGGTCAAGTGGTAGCC
	下游: TCCTGCATAAGCACATCCTGA
CDH1	上游: CGAGAGCTACACGTTACCGG
	下游: GGGTGTGCGAGGGAATAAGG
VIM	上游: GACGCCATCAACACCGAGTT
	下游: CTTTGTGCTGTGGTTAGCTGGT
MMP-9	上游: TCTATGGTCCTCGCCCTGAA
	下游: CATCGTCCACCGACTCAA

1.2.6 Western blotting 检测细胞 IDH1、E-cadherin、N-cadherin、Vimentin、MMP-9、Wnt3a 和 β-catenin 蛋白表达水平 收集处于对数生长期的细胞，蛋白裂解液促使细胞沉淀中的蛋白质游离至上清中，吸取上清，蛋白上清与 5× 上样缓冲液按照 4:1 体积混合，96 ℃ 变性 10 min，得到变性后的蛋白样品。随后上样电泳、转膜，转膜后用 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h。

一抗4℃过夜孵育, TBST洗膜10 min×3次, 二抗室温孵育2 h, TBST洗膜10 min×3次, 采用ECL化学发光法显影。

1.2.7 CCK-8细胞增殖实验 收集处于对数生长期的细胞, 按2000个细胞/孔接种于96孔板, 每组重复3次。细胞培养一定时间后加入含10% CCK-8试剂的RPMI1640培养基, 采用酶标仪在450 nm处检测吸光度(OD)值, 收集数据, 根据记录的数据进行统计分析并绘制细胞生长曲线。

1.2.8 克隆形成实验 取对数生长期的细胞消化重悬, 以1000个细胞/孔均匀铺于6孔培养板, 正常培养9~10 d, 待细胞形成肉眼可见的细胞集落后, PBS清洗, 甲醇固定30 min, 0.4%结晶紫溶液染色后拍照并计算克隆形成数。

1.2.9 细胞划痕实验 收集处于对数生长期的细胞, 胰酶消化后吹打至单细胞悬液, 调整细胞密度为 $5 \times 10^5/L$, 接种于12孔板上, 置于37℃、5%CO₂及饱和湿度条件下的细胞培养箱中培养24 h至细胞基本融合。弃去培养基, 用10 μl无菌枪头在孔板底部中央垂直划线, PBS冲洗脱落细胞, 分别于0、8 h进行拍照, 观察划痕愈合情况, 计算划痕愈合率。划痕愈合率(%)=(0 h划痕距离-8 h划痕距离)/0 h划痕距离×100%。

1.2.10 Transwell迁移、侵袭实验 (1)细胞迁移实验: 收集处于对数生长期的细胞, Transwell小室中各加入 5×10^4 个/孔的细胞及200 μl 1%FBS培养基, 小室外加入500 μl正常培养基。16 h后取出小室, 甲醇固定30 min, 0.4%结晶紫溶液染色, 棉签擦拭小室内未迁移的细胞, 自然风干后拍照计数。(2)细胞侵袭实验: 使用加入Matrigel基底膜基质的Transwell小室, 培养时间为48 h, 其余操作同迁移实验。

1.2.11 细胞周期检测 收集处于对数生长期的细胞各 5×10^5 个, 在冰冷的PBS中洗涤一次, -20℃、75%乙醇固定过夜。PBS洗涤细胞后, 加入核糖核酸酶(10 μg/ml), 室温下用5 μg/ml碘化丙啶染色30 min。用美国BD公司的流式细胞仪进行流式细胞术(FCM), 用Modfit软件计算细胞周期分布。实验重复3次。

1.2.12 RNA抽提与转录组测序 收集HuCCT1^{WT}、HuCCT1^{IDH1^{-/-}}细胞, 每个样品 1×10^6 个细胞, PBS磷酸盐缓冲液清洗2次, 离心取细胞沉淀, 加入1 ml Trizol重悬裂解细胞, 将样品送至上海欧易生物科技有限公司进行RNA抽提、建库测序。抽提完成的RNA样品使用NanoDrop 2000测定核酸浓度, 实验组与对照组各重复3次。Illumina建库试剂盒TruSeq Stranded mRNA LTSample Prep Kit对质检合格

的RNA样品进行建库, 构建好的文库用Agilent 2100 Bioanalyzer质检合格后, 使用Illumina HiSeq X Ten测序仪进行测序, 产生150 bp的双端数据。

1.2.13 差异表达基因(differentially expressed genes, DEGs)筛选 将得到的原始测序数据进行过滤筛选, 得到高质量的测序数据(clean data)用于后续分析。使用软件RSEM(<http://deweylab.github.io/RSEM/>)分别对基因和转录本的表达水平进行定量分析, 获得基因读数(read counts)后, 进行样本间基因的表达差异分析。使用edgeR根据基因读数进行差异表达水平计算, 筛选条件为FDR<0.01、差异倍数(fold-change, FC) $|\log_2|FC|>2$ 。筛选出DEGs。

1.2.14 DEGs的GO和KEGG富集分析 得到DEG后, 通过使用g: Profiler和Goatools的功能注释工具对DEGs进行GO注释, 并采用KEGG数据库进行信号通路富集分析, Bonferroni校正的 $P < 0.05$, 以判定差异基因主要影响的生物学功能或通路。对差异基因进行非监督层次聚类, 利用热图的形式展示差异基因在不同样本间的表达模式。

1.3 统计学处理 采用GraphPad Prism9进行统计分析。符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用双侧t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 IDH1基因敲除细胞株HuCCT1^{IDH1^{-/-}}的构建 将PX459-sgRNA载体转染至HuCCT1细胞, 为检测细胞敲除效率, 抽提嘌呤霉素筛选后的细胞基因组DNA, 经PCR扩增后测序, 在IDH1基因靶点序列出现套峰(图1A)。无限稀释法获得单克隆细胞株, 对单克隆细胞基因组DNA再次验证, 结果显示4号单克隆在sgRNA序列中插入1个碱基导致细胞基因组移码突变(图1B)。qRT-PCR检测结果显示, 与HuCCT1细胞比较, 敲除细胞株IDH1 mRNA表达水平明显下降($P < 0.0001$, 图1C)。Western blotting结果显示, HuCCT1^{IDH1^{-/-}}细胞IDH1蛋白相对表达量明显低于HuCCT1^{WT}细胞($P < 0.0001$, 图1D)。

2.2 IDH1基因敲除对HuCCT1细胞增殖的影响 与HuCCT1^{WT}细胞比较, HuCCT1^{IDH1^{-/-}}细胞的增殖和克隆形成数明显减少($P < 0.05$, 图2A、B), 阻滞在G₂/M期细胞的比例明显增大($P < 0.01$, 图3A-B), 且调控G₂/M周期增殖相关基因Cyclin A2、Cyclin B1和CDK1的表达水平明显降低($P < 0.05$, 图3C)。

2.3 IDH1基因敲除对HuCCT1迁移、侵袭能力及上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)的影响 与HuCCT1^{WT}细胞比较, HuCCT1^{IDH1^{-/-}}细胞的划痕愈合率明显降低($P < 0.01$, 图4A), 迁移细胞数($P < 0.001$)和侵袭细胞数($P < 0.05$, 图4B)明显减少;

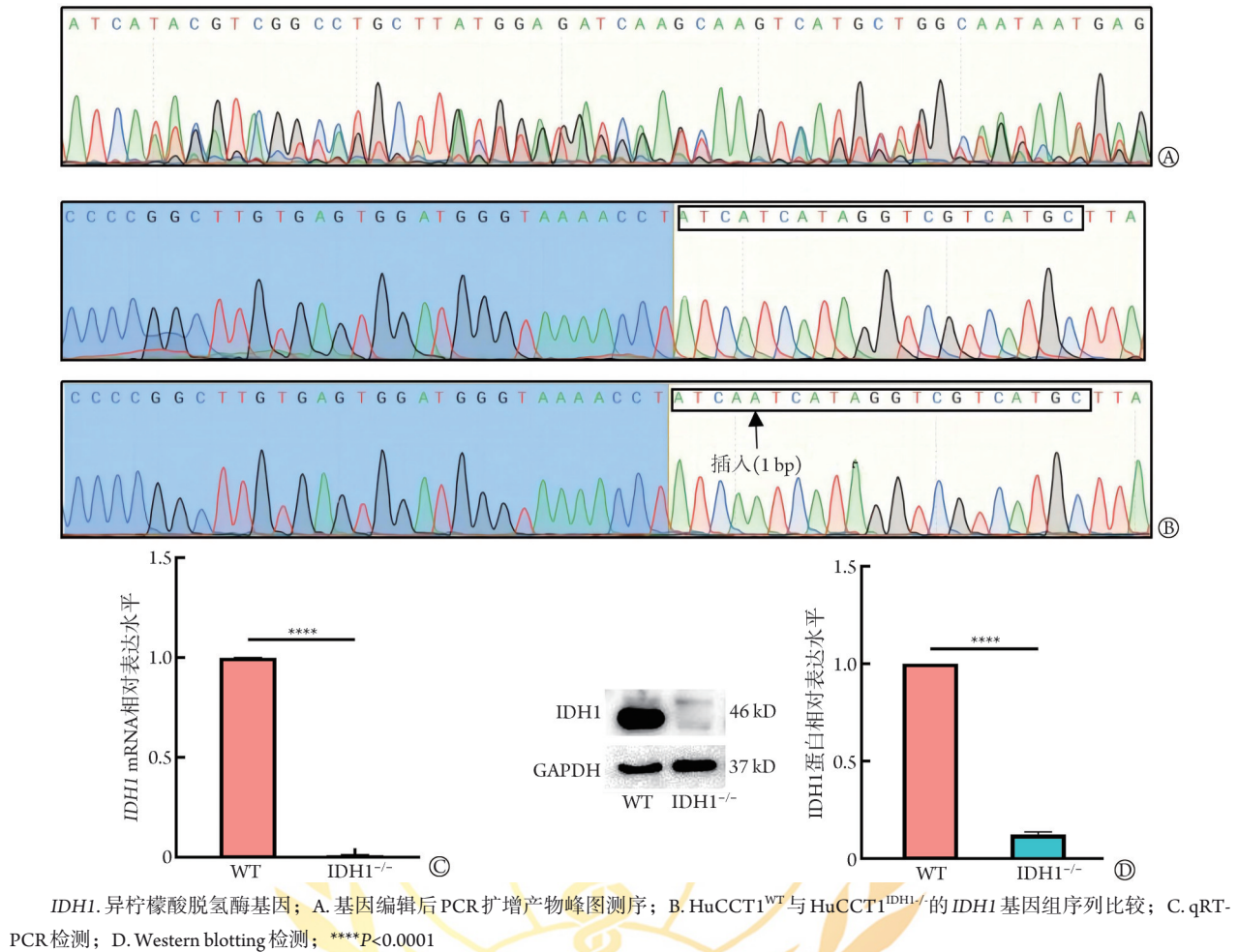
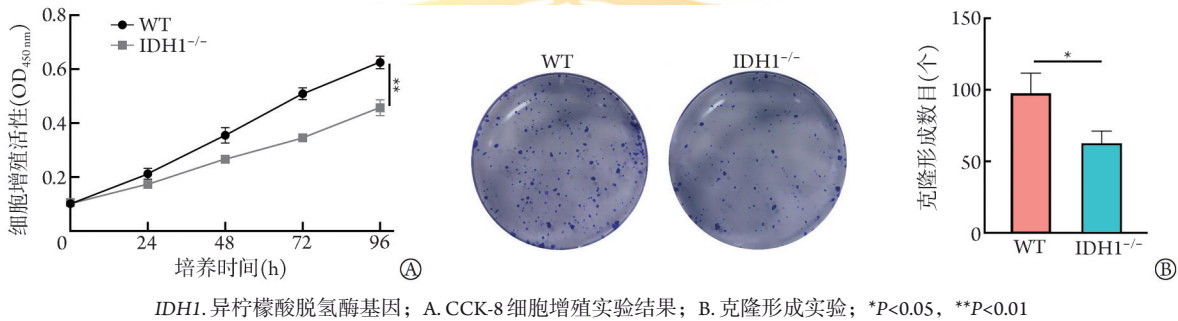


图1 *IDH1* 基因敲除肝胆管癌细胞株构建和鉴定

Fig.1 Construction and identification of iCCA cells with *IDH1* knock out



IDH1 异柠檬酸脱氢酶基因; A. CCK-8 细胞增殖实验结果; B. 克隆形成实验; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图2 CCK-8法和克隆形成实验检测*IDH1*敲除对HuCCT1细胞增殖能力的影响

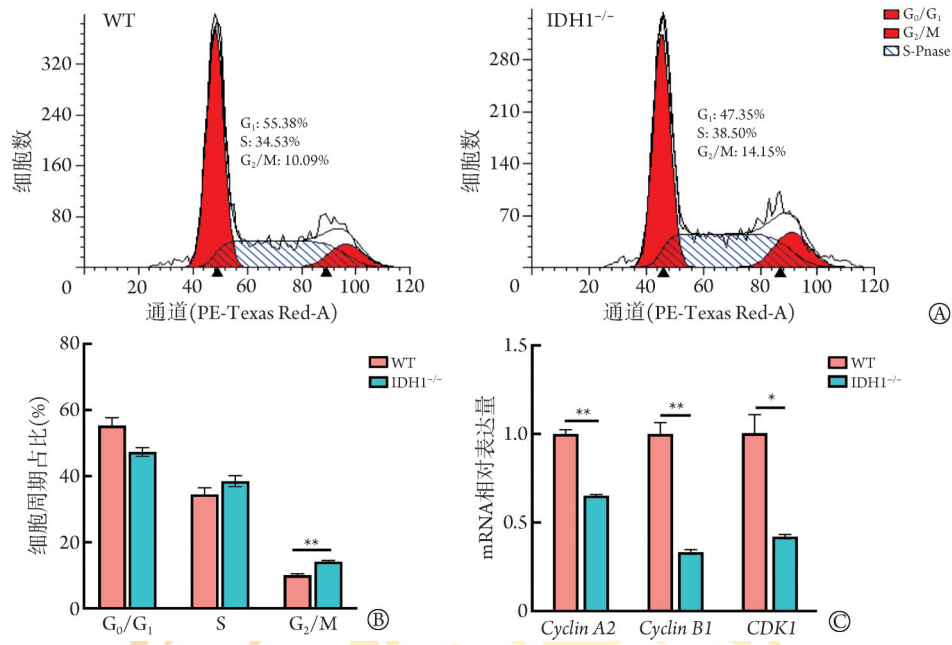
Fig.2 Effects of *IDH1* knockout on the proliferative capacity of HuCCT1 cells detected by CCK-8 and colony formation assay

RT-qPCR 检测结果显示, HuCCT1^{IDH1^{-/-}} 细胞 EMT 相关基因 *Vimentin* 和 *MMP-9* 表达水平明显降低 ($P < 0.05$), 编码 E-Cadherin 的 *CDH1* 基因表达水平明显升高 ($P < 0.01$, 图 5A); Western blotting 结果显示, HuCCT1^{IDH1^{-/-}} 细胞中 E-Cadherin 表达水平明显升高 ($P < 0.05$), 而 N-Cadherin、*Vimentin* 和 *MMP-9* 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$, 图 5B)。

2.4 HuCCT1 细胞转录组测序的结果及生物信息学分析

2.4.1 DEG_s 分析 通过对 HuCCT1^{WT}、HuCCT1^{IDH1^{-/-}} 细胞的转录组测序数据进行对比分析, 构建 DEG_s 的火山图(图 6)。以差异倍数 > 2 且 $P \leq 0.01$ 为筛选条件, 共筛选 DEG_s 1476 个, 包括上调基因 563 个, 下调基因 913 个。对这两组细胞之间的 DEG_s 进行分层聚类热图分析, 结果显示这两组细胞明显区分开(图 7)。

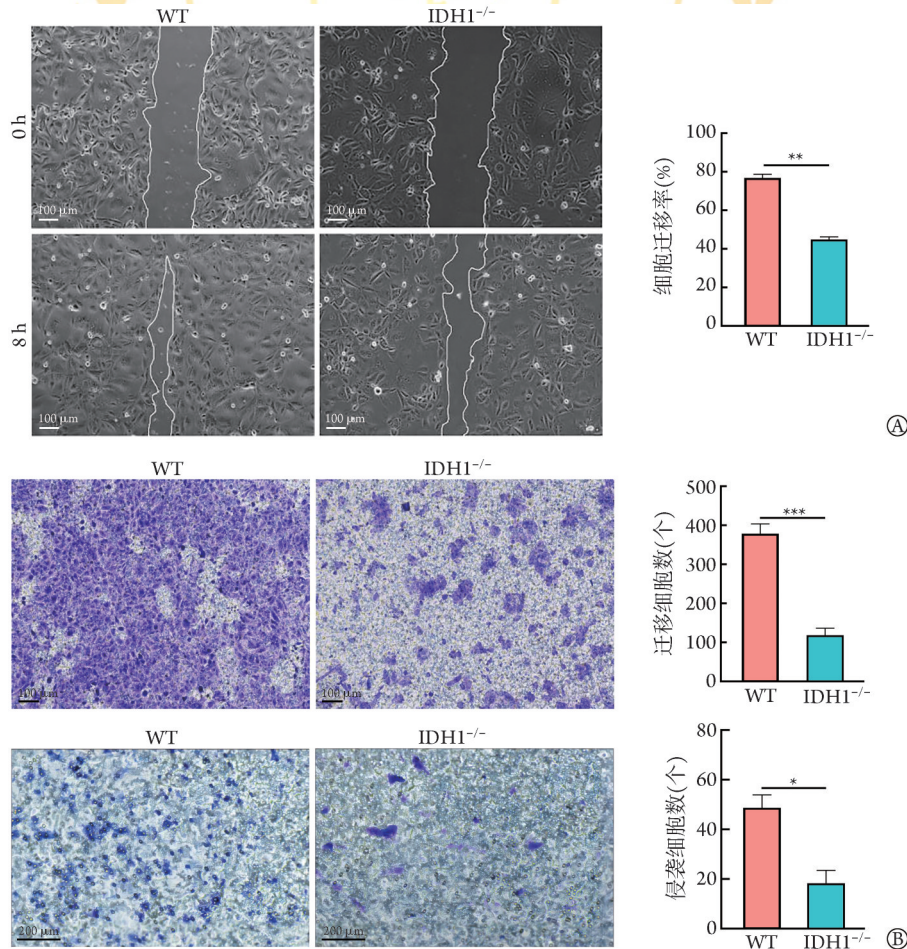
2.4.2 GO 富集分析 对 HuCCT1^{WT}、HuCCT1^{IDH1^{-/-}} 细胞进行 DEG_s 的 GO 功能分析, 从基因生物学过程(BP)、细胞组分(CC)和分子功能(MF)3 个功能类单



IDH1 异柠檬酸脱氢酶基因；WT. 野生型；A. 流式细胞仪测定细胞周期；B. 细胞周期分布直方图；C. qRT-PCR 检测 mRNA 表达水平；**P*<0.05, ***P*<0.01

图3 *IDH1* 敲除对HuCCT1细胞周期的影响

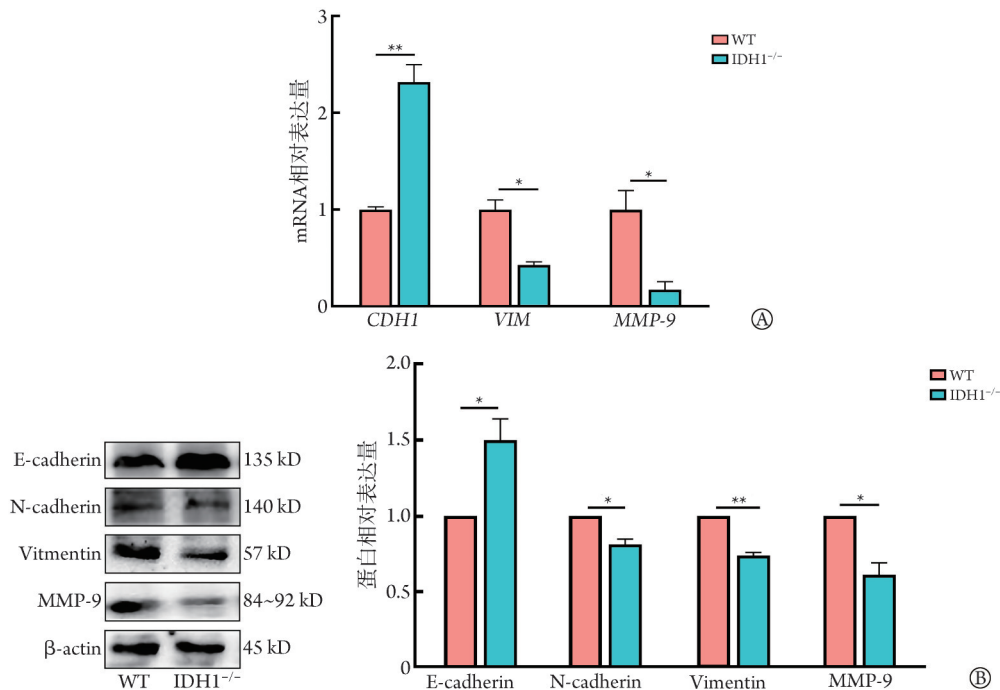
Fig.3 Effect of *IDH1* knockout on cell cycle of HuCCT1 cells



IDH1 异柠檬酸脱氢酶基因；A. 划痕实验；B. Transwell 实验；**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001

图4 *IDH1* 敲除对HuCCT1细胞迁移、侵袭能力的影响

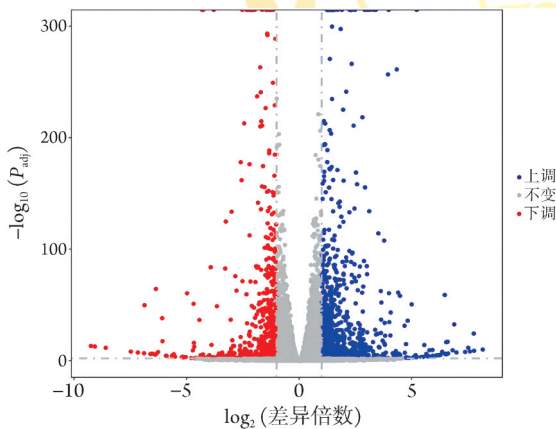
Fig.4 Effect of *IDH1* knockout on the migratory and invasive ability of HuCCT1 cells



IDH1, 异柠檬酸脱氢酶基因; WT, 野生型; EMT, 上皮-间质转化; E-cadherin, E-钙黏蛋白; N-cadherin, N-钙黏蛋白; Vimentin, 波形蛋白; MMP-9, 基质金属蛋白酶-9; A, qRT-PCR检测mRNA表达水平; B, EMT蛋白的相对表达水平(Western blotting); * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图5 IDH1 敲除对 HuCCT1 细胞 EMT 的影响

Fig.5 Effect of IDH1 knockout on the EMT ability of HuCCT1 cells



IDH1, 异柠檬酸脱氢酶基因; WT, 野生型; 蓝点为表达明显上调基因, 红点为表达明显下调基因

图6 HuCCT1^{IDH1^{-/-}}与HuCCT1^{WT}细胞的差异表达基因火山图

Fig.6 Volcanic map of differentially expressed genes between HuCCT1^{IDH1^{-/-}} and HuCCT1^{WT} cell

独进行进一步的分类与富集分析。在BP的差异基因主要富集外部封装结构组织、肾脏系统发育、牙齿发育与发育有关的功能;在CC的差异基因主要富集于含细胞外基质的胶原蛋白、肌膜、高尔基内腔、T-小管、细胞体膜等条目;在MF的DEGs则主要富集于信号受体激活剂活性、受体-配体活性、细胞因子活性、糖胺聚糖结合、生长因子受体结合等(图8)。

2.4.3 KEGG 信号通路富集分析 对 HuCCT1^{WT} 与 HuCCT1^{IDH1^{-/-}} 细胞 DEGs 的 KEGG 信号通路分类及富集分析结果显示, 显著富集的信号通路有 14 条 ($P \leq 0.05$), 富集程度最高的前 5 个信号通路为有丝分裂原-活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路、Rap1 信号通路、Wnt 信号通路、Hippo 信号通路、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路(图9)。

2.5 Wnt 信号通路中 Wnt3a、 β -catenin 蛋白表达情况 随机选取 KEGG 分析排名前 3 位的与 iCCA 密切相关的 Wnt 信号通路进行验证。Western blotting 检测结果显示, 与 HuCCT1^{WT} 细胞比较, HuCCT1^{IDH1^{-/-}} 细胞的 Wnt3a 和 β -catenin 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05$, 图10)。

3 讨论

IDH1 和 IDH2 可催化异柠檬酸氧化脱羧生成 α -酮戊二酸和 NADPH, 为细胞能量代谢和生物合成提供前体物质^[6]; 且在葡萄糖感知通路、谷氨酰胺代谢、脂肪生成和细胞氧化还原等细胞信号转导过程中发挥重要作用^[5]。当 IDH1 和 IDH2 基因发生突变时 IDH 的酶活性也发生改变, 导致细胞中肿瘤代谢物 2-羟基戊二酸 (2-hydroxyglutaric acid, 2-HG) 大量蓄积^[7,17-19], 可引起严重的表观遗传调控紊乱和基因表达失调^[7,20], 从而促进肿瘤发生。IDH1 是调控细胞

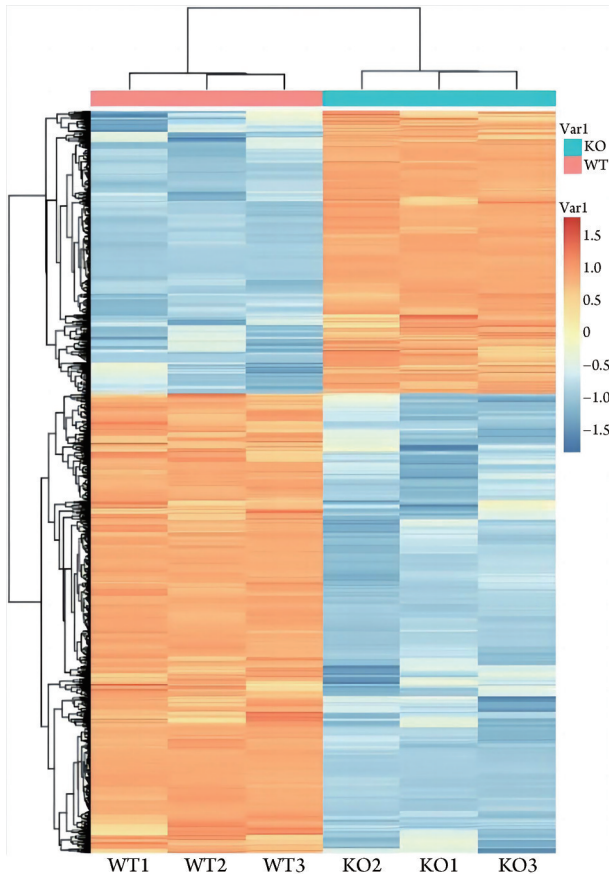


图7 HuCCT1^{IDH1}^{-/-}与HuCCT1^{WT}细胞的差异表达基因聚类热图

Fig. 7 Heatmap of clustering of differentially expressed genes between HuCCT1^{IDH1}^{-/-} and HuCCT1^{WT} cell

代谢、表观遗传调控、氧化还原状态和DNA修复的关键酶^[21]；*IDH1*基因突变常见于胶质瘤、iCCA、急性髓系白血病(acute myeloid leukemia, AML)等肿瘤细胞^[18,22]。*IDH1* R132C是iCCA中常见的突变位点^[23]。有研究报道，突变型*IDH1*对于胶质瘤、AML的发生发展具有重要作用，*IDH1*突变产物2-HG可抑制氧戊二酸脱氢酶(oxoglutarate dehydrogenase, OGDH)活性，减少琥珀酰辅酶A(succinyl-coenzyme A, CoA)生成，从而损害血红蛋白的生物合成，阻碍血细胞分化成熟，促进髓系肿瘤发生^[24]。Saha等^[9]报道，iCCA中突变的*IDH1*通过产生D-2羟基戊二酸(D-2-HG)及抑制肝细胞核因子4 α (HNF-4 α)活性，可阻断肝脏前体细胞向肝细胞分化，促进细胞增殖。*IDH1* R132S基因缺失可降低iCCA细胞人肝胆管癌细胞(RBE)的增殖、迁移、侵袭能力及EMT^[20]。目前的研究关注*IDH1*基因突变的致病机制较多，而*IDH1*基因缺失对iCCA生物学行为的影响报道较少。

本研究在iCCA细胞HuCCT1中利用CRISPR/Cas9基因编辑技术敲除*IDH1*基因。细胞功能试验显

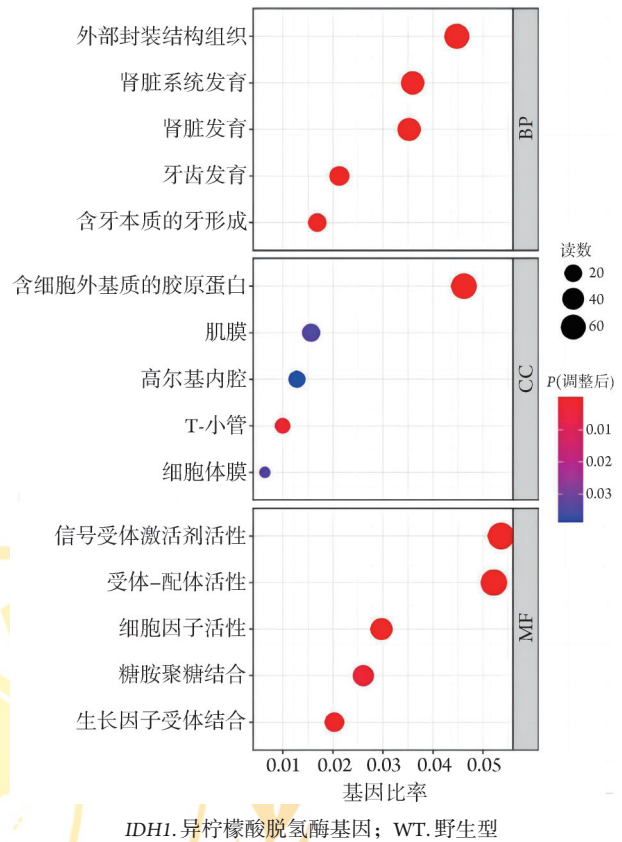


图8 HuCCT1^{IDH1}^{-/-}与HuCCT1^{WT}细胞的差异表达基因GO功能分类

Fig. 8 GO functional classification of differentially expressed genes between HuCCT1^{IDH1}^{-/-} and HuCCT1^{WT} cell

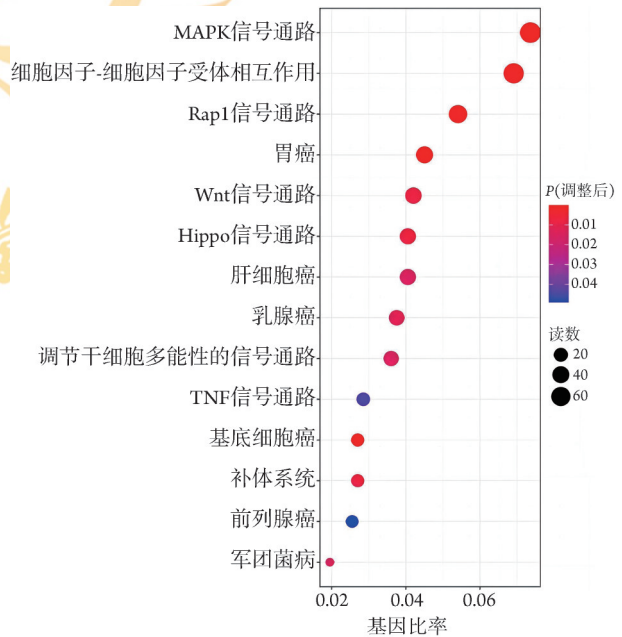


图9 HuCCT1^{IDH1}^{-/-}与HuCCT1^{WT}细胞的差异表达基因KEGG信号通路分类

Fig. 9 KEGG biological pathway classification of differentially expressed genes between HuCCT1^{IDH1}^{-/-} and HuCCT1^{WT} cell

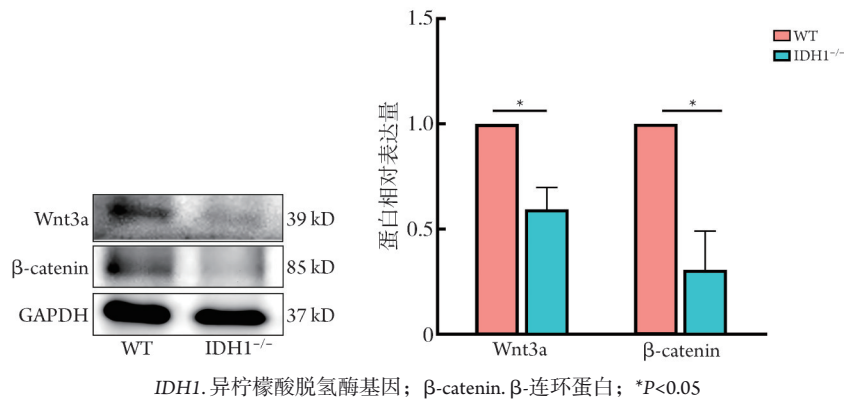


图10 HuCCT1^{WT}与HuCCT1^{IDH1^{-/-}}细胞的Wnt信号通路Wnt3a和β-catenin蛋白表达水平比较(Western blotting)

Fig. 10 Comparison of the expression levels of Wnt3a, β-catenin in Wnt signaling pathway between HuCCT1^{WT} and HuCCT1^{IDH1^{-/-}} cell (Western blotting)

示, *IDH1* 基因缺失可能通过影响细胞周期的调控和EMT的过程, 抑制HuCCT1细胞的增殖和侵袭迁移。转录组学测序结果显示, HuCCT1^{WT}和HuCCT1^{IDH1^{-/-}}细胞之间DEGs有1476个, 显著富集在MAPK、Rap1、Wnt、Hippo、TNF等与肿瘤细胞增殖与侵袭转移密切相关的信号通路。随机选取KEGG分析排名前3位、与iCCA密切相关的Wnt信号通路进行验证, Western Blotting检测结果显示, 与HuCCT1^{WT}比较, HuCCT1^{IDH1^{-/-}}细胞Wnt通路的Wnt3a和β-catenin蛋白相对表达量明显降低。这一结果提示, *IDH1*基因可能通过激活Wnt/β-catenin信号通路参与调控iCCA细胞HuCCT1的迁移、侵袭及EMT过程。

EMT是一个复杂、可塑、可逆的细胞过程, 是指上皮细胞获得间质细胞的特征, 使细胞间的黏附性变弱, 迁移能力增强^[25]。研究显示, EMT过程参与调控胚胎发育、组织修复肿瘤的侵袭与转移、化疗耐药等恶性表型^[26]。Wnt信号通路包括Wnt/β-catenin, Wnt-PCP和Wnt-Ca²⁺3种信号通路, 其中Wnt/β-catenin信号通路在调控细胞增殖、迁移侵袭、EMT过程、细胞凋亡和自噬中发挥重要作用^[27]; Wnt3a为典型Wnt配体, 与肿瘤侵袭转移密切相关^[28]。Wei等^[29]报道, 真核翻译起始因子3H(EIF3H)可通过Wnt/β-catenin信号通路稳定CCND1蛋白结构, 促进iCCA细胞迁移, 并抑制细胞凋亡。本研究结果显示, HuCCT1细胞中*IDH1*缺失后细胞的迁移和侵袭能力及EMT受到抑制; 转录组测序结果显示HuCCT1^{WT}和HuCCT1^{IDH1^{-/-}}细胞的DEGs在Wnt通路上显著富集; Western blotting检测结果显示, 与HuCCT1^{WT}比较, HuCCT1^{IDH1^{-/-}}细胞Wnt通路的Wnt3a和β-catenin蛋白相对表达量明显降低, 以上结果均提示*IDH1*基因可能通过激活Wnt/β-catenin信号通路参与调控iCCA细胞HuCCT1的增殖、迁移、侵

袭及EMT过程。

本研究结果显示, HuCCT1细胞*IDH1*基因敲除后, 细胞增殖受抑制, 表现为阻滞于G₂/M期。转录组测序结果显示, HuCCT1^{WT}和HuCCT1^{IDH1^{-/-}}细胞的DEGs在MAPK通路上显著富集。MAPK是一组进化高度保守的丝氨酸-苏氨酸激酶, 常见的MAPK包括细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-Jun氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK)和p38激酶。MAPK级联反应参与多种细胞生物学过程, 是调控细胞增殖、分化、凋亡及生理与病理性应激反应的关键信号通路^[27-29]。已有研究报道, *IDH1*基因缺失可通过活性氧激活MAPK包括ERK、JNK和p38信号通路, 从而显著抑制卵巢颗粒细胞的增殖、迁移, 阻滞细胞于G₂/M期, 促进细胞衰老^[30]。HuCCT1细胞中*IDH1*基因缺失后是否通过MAPK通路影响细胞周期的调控而抑制细胞的增殖能力, 仍有待进一步研究。

iCCA起病隐匿、易转移, 缺乏特异性诊断指标, 多数病例确诊时已属晚期, 错过手术时机, 加之对常规放疗化疗不敏感, 因此该病缺乏有效的治疗手段, 预后差^[30-32]。目前针对*IDH1*基因突变的靶向药物已进入临床Ⅲ期研究, 但效果不尽人意, 药物的具体作用机制也不明确。本研究显示, *IDH1*缺失可显著抑制HuCCT1细胞的迁移、侵袭能力和EMT过程, 其机制可能与Wnt/β-catenin信号通路有关。对*IDH1*基因功能的深入了解, 将有助于开发新的靶向药物, 提高晚期iCCA患者的疗效。

【参考文献】

- [1] Bergquist A, von Seth E. Epidemiology of cholangiocarcinoma[J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2015, 29(2): 221-232.
- [2] Rizvi S, Khan SA, Hallemeier CL, et al. Cholangiocarcinoma - evolving concepts and therapeutic strategies[J]. Nat Rev Clin Oncol, 2018, 15(2): 95-111.

- [3] Banales JM, Marin JGG, Lamarca A, *et al.* Cholangiocarcinoma 2020: the next horizon in mechanisms and management[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2020, 17(9): 557-588.
- [4] 齐中, 程石. 肝内胆管癌综合治疗的进展与争议[J]. *腹部外科*, 2022, 35(4): 236-240.
- [5] Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas[J]. *Neuro Oncol*, 2016, 18(1): 16-26.
- [6] Tommasini-Ghelfi S, Murnan K, Kouri FM, *et al.* Cancer-associated mutation and beyond: The emerging biology of isocitrate dehydrogenases in human disease[J]. *Sci Adv*, 2019, 5(5): eaaw4543.
- [7] Grassian AR, Pagliarini R, Chiang DY. Mutations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 in intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2014, 30(3): 295-302.
- [8] Massironi S, Pilla L, Elvevi A, *et al.* New and emerging systemic therapeutic options for advanced cholangiocarcinoma[J]. *Cells*, 2020, 9(3): 688.
- [9] Saha SK, Parachoniak CA, Ghanta KS, *et al.* Mutant IDH inhibits HNF-4 α to block hepatocyte differentiation and promote biliary cancer[J]. *Nature*, 2014, 513(7516): 110-114.
- [10] Ross JS, Wang K, Gay L, *et al.* New routes to targeted therapy of intrahepatic cholangiocarcinomas revealed by next-generation sequencing[J]. *Oncologist*, 2014, 19(3): 235-242.
- [11] Wang P, Dong Q, Zhang C, *et al.* Mutations in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 occur frequently in intrahepatic cholangiocarcinomas and share hypermethylation targets with glioblastomas [J]. *Oncogene*, 2013, 32(25): 3091-3100.
- [12] Ma B, Meng H, Tian Y, *et al.* Distinct clinical and prognostic implication of IDH1/2 mutation and other most frequent mutations in large duct and small duct subtypes of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *BMC Cancer*, 2020, 20(1): 318.
- [13] Boscoe AN, Rolland C, Kelley RK. Frequency and prognostic significance of isocitrate dehydrogenase 1 mutations in cholangiocarcinoma: a systematic literature review[J]. *J Gastrointest Oncol*, 2019, 10(4): 751-765.
- [14] Kipp BR, Voss JS, Kerr SE, *et al.* Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cholangiocarcinoma[J]. *Hum Pathol*, 2012, 43(10): 1552-1558.
- [15] Lowery MA, Burris HA 3rd, Janku F, *et al.* Safety and activity of ivosidenib in patients with IDH1-mutant advanced cholangiocarcinoma: a phase I study[J]. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2019, 4(9): 711-720.
- [16] Su L, Zhang X, Zheng L, *et al.* Mutation of isocitrate dehydrogenase 1 in cholangiocarcinoma impairs tumor progression by inhibiting isocitrate metabolism[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2020, 11: 189.
- [17] Reitman ZJ, Yan H. Isocitrate dehydrogenase 1 and 2 mutations in cancer: alterations at a crossroads of cellular metabolism[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2010, 102(13): 932-941.
- [18] Cairns RA, Mak TW. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: mechanisms, models, and clinical opportunities[J]. *Cancer Discov*, 2013, 3(7): 730-741.
- [19] Harding JJ, Lowery MA, Shih AH, *et al.* Isoform switching as a mechanism of acquired resistance to mutant isocitrate dehydrogenase inhibition[J]. *Cancer Discov*, 2018, 8(12): 1540-1547.
- [20] Rizvi S, Gores GJ. Pathogenesis, diagnosis, and management of cholangiocarcinoma[J]. *Gastroenterology*, 2013, 145(6): 1215-1229.
- [21] Molenaar RJ, Maciejewski JP, Wilmink JW, *et al.* Wild-type and mutated IDH1/2 enzymes and therapy responses[J]. *Oncogene*, 2018, 37(15): 1949-1960.
- [22] Dogan S, Frosina D, Geronimo JA, *et al.* Molecular epidemiology of IDH2 hotspot mutations in cancer and immunohistochemical detection of R172K, R172G, and R172M variants[J]. *Hum Pathol*, 2020, 106: 45-53.
- [23] Wang J, Zhang ZG, Ding ZY, *et al.* IDH1 mutation correlates with a beneficial prognosis and suppresses tumor growth in IHCC IDH1 mutation correlates with a beneficial prognosis and suppresses tumor growth in IHCC[J]. *J Surg Res*, 2018, 231: 116-125.
- [24] Gu Y, Yang R, Yang Y, *et al.* IDH1 mutation contributes to myeloid dysplasia in mice by disturbing heme biosynthesis and erythropoiesis[J]. *Blood*, 2021, 137(7): 945-958.
- [25] Marconi GD, Fonticoli L, Rajan TS, *et al.* Epithelial-mesenchymal transition (EMT): the type-2 EMT in wound healing, tissue regeneration and organ fibrosis[J]. *Cells*, 2021, 10(7): 1587.
- [26] Mohammadinejad R, Biagioni A, Arunkumar G, *et al.* EMT signaling: potential contribution of CRISPR/Cas gene editing[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2020, 77(14): 2701-2722.
- [27] Zhao H, Ming T, Tang S, *et al.* Wnt signaling in colorectal cancer: pathogenic role and therapeutic target [J]. *Mol Cancer*, 2022, 21(1): 144.
- [28] Chen Y, Fang R, Yue C, *et al.* Wnt-induced stabilization of KDM4C is required for Wnt/ β -catenin target gene expression and glioblastoma tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 2020, 80(5): 1049-1063.
- [29] Wei Y, Chen W, Li Z, *et al.* EIF3H stabilizes CCND1 to promotes intrahepatic cholangiocarcinoma progression via Wnt/ β -catenin signaling[J]. *FASEB J*, 2022, 36(12): e22647.
- [30] de Jong MC, Nathan H, Sotiropoulos GC, *et al.* Intrahepatic cholangiocarcinoma: an international multi-institutional analysis of prognostic factors and lymph node assessment[J]. *J Clin Oncol*, 2011, 29(23): 3140-3145.
- [31] Endo I, Gonen M, Yopp AC, *et al.* Intrahepatic cholangiocarcinoma: rising frequency, improved survival, and determinants of outcome after resection[J]. *Ann Surg*, 2008, 248(1): 84-96.
- [32] Tan JC, Coburn NG, Baxter NN, *et al.* Surgical management of intrahepatic cholangiocarcinoma - a population-based study[J]. *Ann Surg Oncol*, 2008, 15(2): 600-608.

(责任编辑: 蒋铭敏)