

# MLCK 敲除对 FaDu 细胞凋亡的影响

熊 垒, 黄建尚, 周 青, 汪 渊, 左 莉

**摘要** 目的 构建肌球蛋白轻链激酶 (MLCK) 敲除的下咽癌 FaDu 细胞株, 并探讨敲除 MLCK 对 FaDu 细胞凋亡的影响。方法 脂质体转染 sgRNA 和 Cas9 2NLS Nuclease 构建 MLCK 敲除的 FaDu 细胞株, 提 DNA 测序确定敲除细胞株, 分为对照组、MLCK KO 1 组、MLCK KO 2 组; 采用 RT-qPCR、Western blot 检测 MLCK 敲除效率; 流式细胞术检测 MLCK 敲除对细胞周期和凋亡的影响; Western blot 检测 MLCK 敲除对细胞凋亡的影响。结果 DNA 测序显示在 sgRNA 序列识别处, MLCK 碱基序列发生了缺失或替换; RT-qPCR 和 Western blot 显示 MLCK 敲除细胞株 mRNA 和蛋白质水平低于对照组 ( $P < 0.0001$ ); 流式细胞术实验显示敲除 MLCK 对 FaDu 细胞的周期无明显变化, 但凋亡率增加 ( $P < 0.0001$ ); Western blot 检测显示, MLCK 敲除组 Bax/Bcl-2 ( $P < 0.0001$ ) 和 Cleaved Caspase-3/Caspase-3 ( $P = 0.0007$ ) 增加。结论 敲除 MLCK 诱导细胞凋亡, 但具体机制需进一步研究。

**关键词** 下咽癌; 肌球蛋白轻链激酶; 增殖; 凋亡

**中图分类号** R 739.63

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2023)05-0748-06  
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.008

下咽癌是头颈部肿瘤中预后最差的鳞状细胞癌之一<sup>[1]</sup>。在发达国家并不常见, 它主要在吸烟和酗酒的男性中被诊断出来, 在女性中很少见; 但是在发展中国家, 近年来下咽癌的发病率在男性和女性中都有所增加<sup>[2]</sup>。通常在晚期被发现, 且是多灶性的, 尽管诊断成像、放射治疗、化疗和外科手术技术已经得到改善, 但 5 年存活率仍然很低<sup>[1]</sup>。因此迫切需要找到一个新的治疗靶点。肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, MLCK) 是一种调节一系列细胞骨架调节蛋白的关键酶, 被认为是细胞凋亡的关键调节因子<sup>[3-4]</sup>。该课题组前期研究<sup>[1]</sup>发现与健康组织比较, MLCK 在下咽肿瘤组织中的表达上调, 该研究旨在通过 CRISPR/Cas 9 技术构建 ML-

CK 敲除细胞株, 并探讨其对下咽癌 FaDu 细胞凋亡的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验试剂** DMEM 高糖培养基和胎牛血清 (以色列 Biological Industries 公司); Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒和细胞周期检测试剂盒 (PI) (上海贝博生物科技有限公司); 胰酶、青-链霉素、蛋白酶抑制剂、RIPA 裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司); SteadyPure 通用型基因组 DNA 提取试剂盒 (湖南艾科瑞生物工程有限公司); Lipofectamine™ CRISPRMAX™ Cas 9 转染试剂、Modified sgRNA、Cas9 2NLS Nuclease (美国 Synthego 公司); 2xS6 Universal SYBR qPCR MIX、HyperScript™ III RT SuperMix for qPCR with gDNA Remover (上海新贝生物科技有限公司); anti-Bax、anti-Bcl-2、anti-Caspase-3、anti-Cleaved Caspase-3 (美国 CST 公司); anti-Actin (美国 Affinity 公司); 山羊抗兔 IgG-HRP、山羊抗小鼠 IgG-HRP 抗体 (美国 Santa Cruz 公司)。

**1.1.2 实验仪器** LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪 (瑞士罗氏公司)、酶标仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 化学发光凝胶成像分析系统 ChemiDoc Touch Imaging System (美国 Bio-Rad 公司); -80 °C 超低温冰箱 (日本三洋电器股份有限公司); 正置生物显微镜 (德国 Leica 公司); pH 仪 (上海雷磁仪器厂); 电泳仪 (北京六一生物技术有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 FaDu 细胞培养** FaDu 细胞购自于中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 传代至第三代, 培养于含 10% 胎牛血清、1% 青-链霉素的 DMEM 培养基中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养, 每隔 24 h 换液, 待细胞融合至 80% 左右时传代, 并取对数生长期细胞进行相关实验。

**1.2.2 FaDu 细胞 MLCK 的敲除** 利用 Synthego 公司提供的在线设计网站, 设计出 MLCK 特异性 sgRNA 序列 UGUGUCCCAAGCUUCCUUG, sgRNA

2022-12-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 82270589、82070548、81800464)

作者单位: 安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室, 合肥 230032

作者简介: 熊 垒, 男, 硕士研究生;

左 莉, 女, 副教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: zuoli@ahmu.edu.cn

由达科为生物技术股份有限公司代理购买。

取对数生长期的 FaDu 细胞按照  $1 \times 10^4$  个细胞/孔接种于 24 孔板,待细胞长到 30% ~ 70% 融合度时进行转染,分为对照组(不加 Cas9 2NLS Nuclease 和 sgRNA)和实验组(加 0.5  $\mu$ l Cas9 2NLS Nuclease 和 1.5  $\mu$ l sgRNA),对照组和实验组中均加入 25  $\mu$ l Opti-MEM 培养基和 1  $\mu$ l Lipofectamine Cas 9 Plus Reagent,同时将 1.5  $\mu$ l CRISPRMAX™ Reagent 加入 25  $\mu$ l 的 Opti-MEM 培养基中,5 min 后将两者混合并轻轻混匀,室温孵育 10 min 后加到需要转染的细胞培养孔中,培养 2 ~ 3 d 后将细胞消化接种于 96 孔板中,每孔 1 个细胞。

**1.2.3 MLCK 敲除单克隆细胞株的 PCR 鉴定** 当 96 孔板内细胞生长到 2 000 个左右时,用胰酶消化细胞,将其接种于 24 孔板培养,待细胞生长到 80% ~ 90% 融合度时,用胰酶消化细胞,留取一半细胞提取 DNA 进行 PCR 验证,另一半细胞继续扩大培养。提取基因组 DNA 的方法如下:胰酶消化 FaDu 细胞后取一半细胞 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,加入 200  $\mu$ l 的 PBS 悬浮细胞;加入 180  $\mu$ l Buffer BS-2、20  $\mu$ l 的 Proteinase K 和 10  $\mu$ l RNaseA (10 mg/ml),收集细胞悬液,充分吸打混匀,于 56  $^{\circ}$ C 水浴加热 10 min 至溶液完全裂解成澄清透明状态;向裂解液中加入 200  $\mu$ l 无水乙醇,充分吸打混匀;然后将上述溶液转移至吸附柱中,具体操作参见 DNA 提取试剂盒说明书。PCR 扩增体系为:Premix Taq 25  $\mu$ l,上游引物 1  $\mu$ l,下游引物 1  $\mu$ l,DNA 模板 1  $\mu$ l,ddH<sub>2</sub>O 22  $\mu$ l。PCR 扩增条件为:98  $^{\circ}$ C 变性 10 s,55  $^{\circ}$ C 退火 30 s,72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环。将 PCR 扩增产物通过 120 V 电压、1.5% 琼脂糖凝胶进行分离鉴定。将 PCR 鉴定为阳性的扩增产物送北京擎科生物科技有限公司测序。

**1.2.4 RT-qPCR 检测 MLCK mRNA 表达** 收集经测序确定 MLCK 敲除的 2 株细胞和对照组细胞,使用 ES Science 公司的 RNA 快速提取试剂盒提取总 RNA,测定 RNA 纯度和浓度后,用上海新贝生物科技有限公司的反转录试剂盒合成 cDNA,用安徽医科大学基础医学院公共实验室罗氏 LightCycler 96 实时荧光定量 PCR 仪进行扩增,按照试剂盒操作方法检测各组细胞 MLCK mRNA 表达水平,采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法计算 MLCK mRNA 相对表达量。MLCK 引物序列 F: 5'-ATGTCAGCATAAGGGGAAGGGG-3', R: 5'-GCTCATTTCACTAAGCATGTTCC-3'; GAPDH 引物序列 F: 5'-ACAACCTTTGGTATCGTGGAAGG-3',

R: 5'-GCCATCACGCCACAGTTTC-3'。

**1.2.5 流式细胞术检测细胞周期** 细胞按照  $5 \times 10^5$  个细胞/孔接种在 6 孔板中,待细胞融合密度达到 90% 时,胰酶消化收集细胞,以 1 000 r/min 离心 5 min;取沉淀细胞,用冷 PBS 洗涤细胞 2 次,用 500  $\mu$ l PBS 重悬细胞,滴加 2 ml 冷乙醇 4  $^{\circ}$ C 固定过夜;取  $5 \times 10^6$  个细胞,在 15 ml 锥形离心管中 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,收集细胞;用冷 PBS 洗涤细胞 2 次,用 500  $\mu$ l 冷 PBS 重悬细胞,加入 RnaseA 溶液 20  $\mu$ l,37  $^{\circ}$ C 水浴 30 min;用 400 目细胞筛网过滤,在 2 000 r/min 离心 10 min,弃上清液,收集细胞;加入 400  $\mu$ l PI 染液重悬细胞,轻轻混匀后 4  $^{\circ}$ C 避光孵育 1 h,最后用流式细胞仪检测细胞周期分布情况,实验重复 3 次。

**1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡** 细胞按照  $5 \times 10^5$  个细胞/孔接种在 6 孔板中,待细胞融合密度达到 90% 时,用不含 EDTA 的胰酶消化细胞,用冷 PBS 洗涤 2 次,用 400  $\mu$ l  $1 \times$  Annexin V 结合液重新悬浮细胞,在细胞悬液中加入 5  $\mu$ l Annexin V-FITC 染色液,轻轻混匀后于 4  $^{\circ}$ C 避光条件下孵育 15 min,加入 5  $\mu$ l PI 染色液后轻轻混匀于 4  $^{\circ}$ C 避光条件下孵育 5 min,通过流式细胞仪对 MLCK 敲除组和对照组的细胞凋亡情况进行检测并分析细胞凋亡率的变化,实验重复 3 次。

**1.2.7 Western blot 实验** 取对数生长期的 MLCK 敲除和对照组细胞,按照  $5 \times 10^5$  个细胞/孔接种在 6 孔板中,待细胞融合密度达到 90% 时,吸弃培养基,用 PBS 洗 3 次,每孔加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液于冰上充分裂解细胞,14 000 r/min 4  $^{\circ}$ C 离心 20 min。吸取上清液,用 BCA 试剂盒进行蛋白浓度测定。以 4 : 1 的比例加入相应体积的总蛋白和  $5 \times$  蛋白上样缓冲液,震荡混匀后在 100  $^{\circ}$ C 水浴中煮沸 15 min 使蛋白完全变性,冷却后置于 -80  $^{\circ}$ C 冰箱中保存。电泳时每泳道加入 10  $\mu$ g 的蛋白样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳完成后将蛋白转移至 PVDF 膜,5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,加一抗 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜,用 TBST 溶液洗涤 3 次,每次 5 min,室温孵育二抗 2 h,再用 TBST 洗涤 3 次后,即可进行曝光,检测蛋白的表达情况,使用 Image J 分析条带灰度值。

**1.3 统计学处理** 采用 Graphpad Prism 软件进行分析,各组实验重复 3 次,数据均采用  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 FaDu 细胞 MLCK 敲除的测序结果** 根据 Synthego 公司网站上提供的在线 CRISPR Design Tool,选择靶向 MLCK 基因第 2 外显子上的 sgRNA,提取 DNA 后进行 PCR 鉴定,并将阳性样本送测序,测序结果显示 MLCK KO 1 细胞株在 sgRNA 识别序列处缺失了 4 个碱基(图 1A),MLCK KO 2 细胞株则在识别序列发生了碱基的插入与替换(图 1B),表明成功构建了 MLCK KO 1 和 MLCK KO 2 细胞株。

**2.2 敲除 MLCK 对 FaDu 细胞 MLCK mRNA 和蛋白表达的影响** 收集培养的 FaDu 细胞株,RT-

qPCR 方法检测细胞中 MLCK mRNA 的表达。结果显示,MLCK 敲除细胞株中 mRNA 表达量降低( $F = 903.8, P < 0.0001$ ,图 2A)。Western blot 方法鉴定细胞中 MLCK 蛋白表达,MLCK 敲除组中蛋白水平降低( $F = 2742, P < 0.0001$ ,图 2B)。

**2.3 敲除 MLCK 对 FaDu 细胞周期的影响** 在 FaDu 细胞中敲除 MLCK,通过流式细胞技术检测细胞周期。结果显示,与对照组比较,MLCK 敲除组细胞周期各时期变化并不明显,这说明敲除 MLCK 不影响细胞的增殖(图 3)。

**2.4 敲除 MLCK 对 FaDu 细胞凋亡的影响** 在 FaDu 细胞中敲除 MLCK,通过流式细胞术检测细胞



图1 MLCK 敲除的 FaDu 细胞测序

A: MLCK KO 1 细胞株,1:野生型碱基序列,2:MLCK KO 1 细胞株碱基序列,3:sgRNA 碱基序列;B: MLCK KO 2 细胞株,1:野生型碱基序列,2:MLCK KO 2 细胞株碱基序列,3:sgRNA 碱基序列

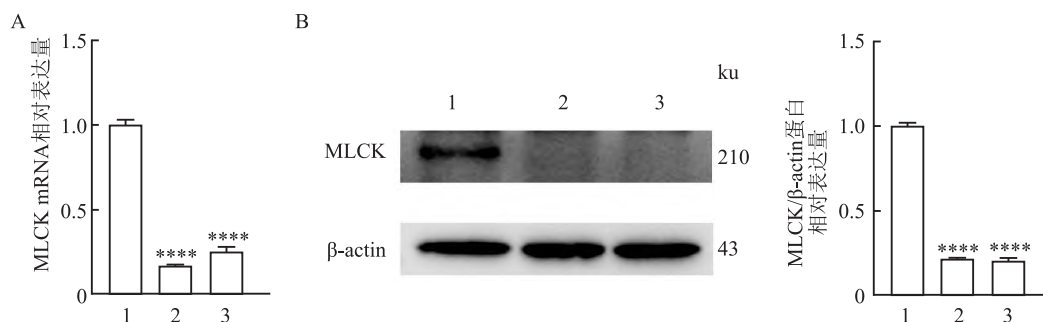


图2 MLCK 敲除对 FaDu 细胞 MLCK mRNA 和蛋白表达的影响

A: RT-qPCR 检测 FaDu 细胞中 MLCK mRNA 的表达;B: Western blot 检测 MLCK 蛋白表达;1:对照组;2: MLCK KO 1 组;3: MLCK KO 2 组;与对照组比较:\*\*\*\* $P < 0.0001$

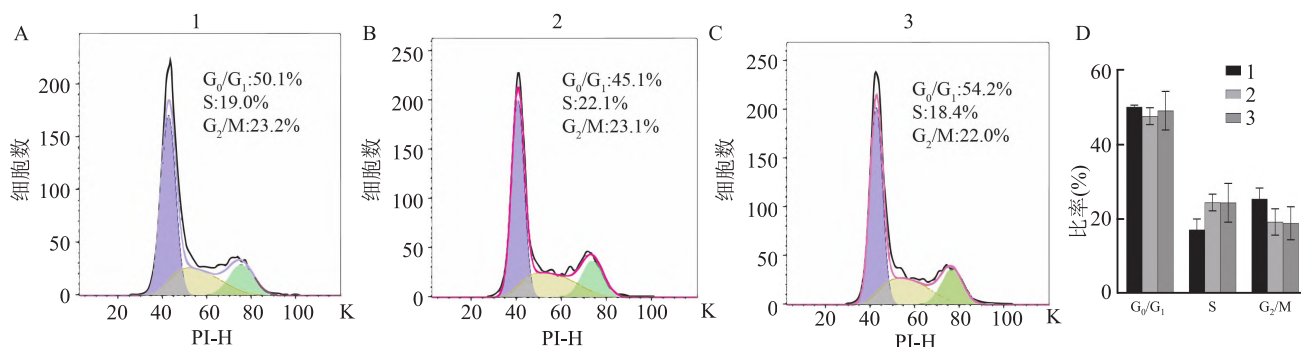


图3 MLCK 敲除对 FaDu 细胞周期的影响

A、B、C:流式检测细胞周期;D:周期分析;1:对照组;2: MLCK KO 1 组;3: MLCK KO 2 组

凋亡。结果显示,与对照组比较,MLCK 敲除组凋亡增加,这说明敲除 MLCK 会诱发细胞凋亡 ( $F = 93.52, P < 0.0001$ , 图4)。

**2.5 敲除 MLCK 对 FaDu 细胞中凋亡相关蛋白 Bax、Bcl-2、Caspase-3 以及 Cleaved Caspase-3 表达的影响** Western blot 方法检测细胞中凋亡相关蛋白表达。结果显示,MLCK 敲除组 Bax 和 Bcl-2 的比值 ( $F = 99.40, P < 0.0001$ ) 以及 Cleaved Caspase-3 与 Caspase-3 的比值 ( $F = 31.17, P = 0.0007$ ) 均增加,说明 MLCK 敲除诱发细胞凋亡 (图5)。

### 3 讨论

下咽癌相对罕见,约占所有头颈部恶性肿瘤的3%,恶性程度高,为头颈部预后最差的恶性肿瘤之一<sup>[5]</sup>。早期无特征性临床表现,一般下咽癌患者总是在中晚期才被诊断出来,预后较差。因此,有必要寻找新的标志物,为患者提供早期发现和治疗。本课题组前期研究<sup>[1]</sup>发现 MLCK 在人下咽癌组织中的表达高于正常的邻近组织,且与5年生存率有关,

MLCK 高表达患者的生存率较低,提示 MLCK 可能是潜在治疗肿瘤的有效靶点。MLCK 蛋白由 MYLK 基因编码,MYLK 基因是一个单拷贝基因,含有2个启动子,分别转录长 MLCK 和短 MLCK,短 MLCK 又称平滑肌 MLCK<sup>[6]</sup>。研究<sup>[7]</sup>报道,MLCK 是免疫介导的屏障丧失的主要调节因子,MLCK 特异性抑制剂可缓解 TNF 和抗 CD3 抗体诱导的屏障丧失,而 MLCK 敲除可保护 TNF 和抗 CD3 诱导的结肠炎的发生。研究<sup>[8-9]</sup>表明,溃疡性结肠炎和克罗恩病中 MLCK 的表达明显增加。免疫活化诱导的移植宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) 的研究<sup>[10]</sup>显示 MLCK 在 GVHD 患者组织中明显升高,而 MLCK 敲除限制 GVHD 的进展。此外,同型半胱氨酸可增加 Caco 2 细胞中 MLCK 蛋白的表达,从而引起跨上皮电阻的降低,增加上皮细胞通透性<sup>[11]</sup>。MLCK 除了在维持上皮细胞屏障通透性平衡中具有重要作用外,另外一些研究<sup>[3-4,12]</sup>显示 MLCK 影响细胞的增殖和凋亡。研究<sup>[13]</sup>表明,在肝癌细胞中,过表达 MLCK 减少细胞凋亡,而抑制 MLCK 增加细胞

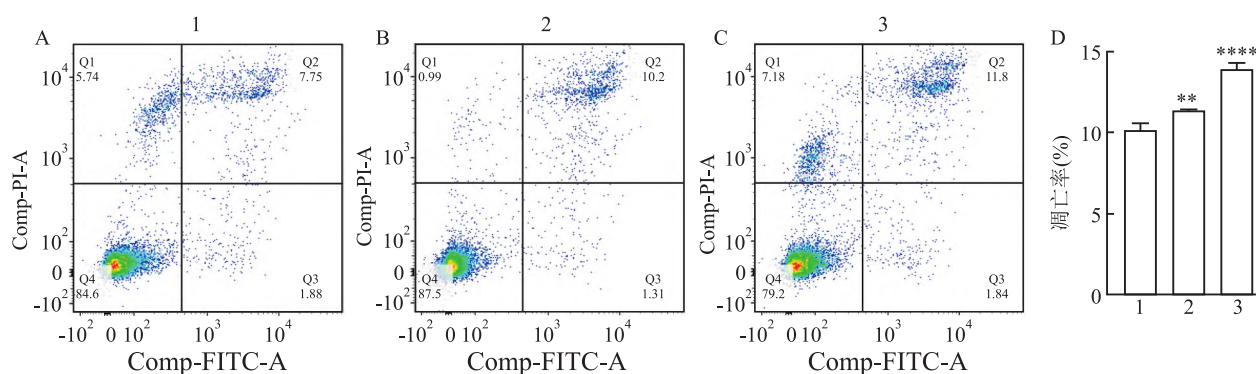


图4 敲除 MLCK 对 FaDu 细胞增殖的影响

A、B、C: 流式检测细胞凋亡; D: 凋亡分析; 1: 对照组; 2: MLCK KO 1 组; 3: MLCK KO 2 组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

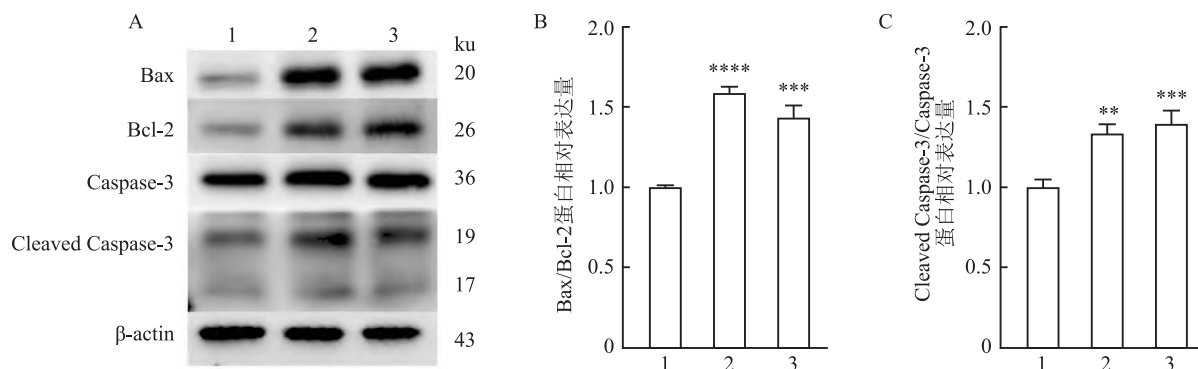


图5 敲除 MLCK 对 FaDu 细胞中凋亡相关蛋白的影响

A: Western blot 检测 FaDu 细胞 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Cleaved Caspase-3 蛋白表达; B: Bax/Bcl-2 蛋白表达直方图; C: Cleaved Caspase-3/Caspase-3 蛋白表达直方图; 1: 对照组; 2: MLCK KO 1 组; 3: MLCK KO 2 组; 与对照组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$

凋亡。

细胞凋亡的主要途径有死亡受体途径和以线粒体凋亡途径,线粒体信号通路在调节细胞凋亡中起着重要作用。线粒体凋亡途径上 Bcl-2 蛋白家族作为参与细胞凋亡的核心家族,对凋亡的意义尤为重要<sup>[14]</sup>。

目前尚无报道对下咽癌 MLCK 敲除引起细胞凋亡的研究,本课题组为了进一步探索 MLCK 在下咽癌发生发展中的作用,首先利用 CRISPR/Cas 9 技术敲除 MCLK,构建 MLCK 敲除的 FaDu 细胞株。通过测序发现 MLCK 敲除细胞株碱基序列发生缺失或替换,并通过 RT-qPCR 和 Western blot 检测敲除效率,发现 MLCK 敲除组 mRNA 和蛋白水平低于对照组,说明 MLCK 敲除株构建成功。通过流式细胞术发现,MLCK 敲除并不影响细胞增殖,但诱导细胞凋亡,这决定了 MLCK 在下咽癌中起癌基因的作用。此外,敲除 MLCK,Western blot 结果显示凋亡相关蛋白:Bax、Caspase-3 以及 Cleaved Caspase-3 表达增加,然而,本研究中课题组发现一个现象,即 MLCK 敲除组中 Bcl-2 的表达水平与对照组相比增高,而不是降低。造成这种现象的原因可能为 MLCK 敲除引起细胞启动自身的应急保护机制,调用自身抗凋亡系统来抵抗损伤,但是 Bax 与 Bcl-2 的比值 MLCK 敲除组与对照组相比增高,说明 MLCK 敲除组细胞发生凋亡,结合 Cleaved Caspase-3/Caspase-3 增高,进一步说明敲除 MLCK 诱导下咽癌细胞的凋亡,但具体机制需进一步研究。

综上所述,本研究构建了 MLCK 敲除的 2 株细胞,通过流式细胞术和 Western blot 实验证明 MLCK 敲除诱导细胞凋亡,为进一步开展 MLCK 在下咽癌的功能和作用机制奠定了重要基础。

#### 参考文献

[1] Cao F, Zhu L, Zhang J, et al. Myosin light chain kinase is a poten-

tial target for hypopharyngeal cancer treatment[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131: 110665.

[2] Bradley P J. Epidemiology of hypopharyngeal cancer[J]. *Adv Otorhinolaryngol*, 2019, 83: 1 - 14.

[3] Xu Y, Liu S, Zhu L, et al. Green tea protects against hippocampal neuronal apoptosis in diabetic encephalopathy by inhibiting jnk/mlck signaling[J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(2): 575.

[4] Zhang X, Yu H. Matrine inhibits diethylnitrosamine-induced hcc proliferation in rats through inducing apoptosis via p53, bax-dependent caspase-3 activation pathway and down-regulating mlck overexpression[J]. *Iran J Pharm Res*, 2016, 15(2): 491 - 9.

[5] Kwon D I, Miles B A. Hypopharyngeal carcinoma: do you know your guidelines? [J]. *Head & Neck*, 2019, 41(3): 569 - 76.

[6] Graham W V, He W, Marchiando A M, et al. Intracellular mlck1 diversion reverses barrier loss to restore mucosal homeostasis[J]. *Nat Med*, 2019, 25(4): 690 - 700.

[7] He W, Wang J, Sheng J, et al. Contributions of myosin light chain kinase to regulation of epithelial paracellular permeability and mucosal homeostasis[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(3): 993.

[8] Yao Y, Feng Q, Shen J. Myosin light chain kinase regulates intestinal permeability of mucosal homeostasis in crohn's disease[J]. *Expert Rev Clin Immunol*, 2020, 16(12): 1127 - 41.

[9] Huang S, Fu Y, Xu B, et al. Wogonoside alleviates colitis by improving intestinal epithelial barrier function via the mlck/pmlc2 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153179.

[10] Nalle S C, Zuo L, Ong M L D M, et al. Graft-versus-host disease propagation depends on increased intestinal epithelial tight junction permeability[J]. *J Clin Invest*, 2019, 129(2): 902 - 14.

[11] 姚成云, 丁少桢, 杨青, 等. 同型半胱氨酸影响 caco-2 细胞通透性的机制研究[J]. *安徽医科大学学报*, 2020, 55(1): 95 - 9.

[12] Kuo C, Chou T, Chen C, et al. Hepatitis b virus x protein disrupts stress fiber formation and triggers apoptosis[J]. *Virus Res*, 2013, 175(1): 20 - 9.

[13] Zhang X, Yu H, Xiong Y, et al. Resveratrol down-regulates myosin light chain kinase, induces apoptosis and inhibits diethylnitrosamine-induced liver tumorigenesis in rats[J]. *Int J Mol Sci*, 2013, 14(1): 1940 - 51.

[14] Song C, Han Y, Luo H, et al. Hoxa10 induces Bcl2 expression, inhibits apoptosis, and promotes cell proliferation in gastric cancer [J]. *Cancer Med*, 2019, 8(12): 5651 - 61.

## Effect of MLCK knockout on apoptosis in FaDu cells

Xiong Lei, Huang Jianshang, Zhou Qing, Wang Yuan, Zuo Li

(Dept of Biochemistry and Laboratory of Molecular Biology of Anhui Medical University, Hefei 230032)

**Abstract Objective** To construct a myosin light chain kinase (MLCK) knockout hypopharyngeal carcinoma FaDu cell line and discuss the knockout effect of MLCK on apoptosis of FaDu cells. **Methods** MLCK knockout FaDu cell lines were constructed by liposome transfection of sgRNA and Cas9 2NLS Nuclease, and the knockout (下转第 759 页)

## Research on Wnt2/ $\beta$ -catenin pathway changes in liver regeneration and repair in C57BL/6 mice

Yao Luyuan<sup>1,2</sup>, Liu Yun<sup>1</sup>, Yang Qian<sup>1,2</sup>, Bao Xin<sup>1</sup>, Wang Yan<sup>1</sup>, Zhao Xiaoying<sup>1</sup>, Tang Junming<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Hubei Key Laboratory of Embryonic Stem Cell Research, Faculty of Basic Medical Sciences, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000; <sup>2</sup>Dept of Anesthesiology, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000)

**Abstract** **Objective** To explore the changing characteristics of Wnt2/ $\beta$ -catenin pathway in liver regeneration and repair in C57BL/6 mice. **Methods** Male C57BL/6 mice were randomly divided into a sham-operated group (Sham group), 1 d post-operative group, 2 d post-operative group, 4 d post-operative group, 6 d post-operative group, and 8 d post-operative group. Mice in the operated group underwent partial hepatectomy (PHx) to remove the left and middle lobes of the liver, respectively. Plasma and liver tissues were collected on postoperative days 1, 2, 4, 6, and 8, and plasma ALT and AST activity was measured by ALT (alanine aminotransferase) and AST (aspartate aminotransferase) biochemical analysis kits; Ki67-positive cells were identified by immunohistochemistry in each group; the number of HNF4- $\alpha$  and Ki67 double positive cells, the number of LYVE1 and Ki67 double positive cells, and the number of  $\beta$ -catenin transferred into the nucleus were determined by immunofluorescence method. The expression of Wnt2 protein in each group was detected by Western blot, and the time characteristics of its expression during liver regeneration were analyzed. **Results** Liver weight and liver/body weight ratio peaked on day 6 after PHx and approached the level of the Sham group. After PHx, there was severe liver damage on day 1, but it had normalized by day 4. On day 2 after PHx, mainly hepatocytes proliferated; and on days 4 and 6, mainly liver sinusoidal endothelial cells proliferated, while the Wnt2/ $\beta$ -catenin pathway was activated. **Conclusion** The liver has a powerful regenerative repair ability, which is closely related to the rapid proliferation of hepatocytes and liver sinusoidal endothelial cells, and the activation of the Wnt2/ $\beta$ -catenin pathway is activated in the regenerative repair of the mouse liver.

**Key words** partial hepatectomy; liver regeneration and repair; Wnt2;  $\beta$ -catenin

(上接第 752 页)

cell lines were identified by DNA sequencing and divided into control group, MLCK KO 1 group and MLCK KO 2 group. The knockout efficiency of MLCK was assessed by RT-qPCR and Western blot, and the effect of MLCK knockout on cell cycle and apoptosis was detected by flow cytometry while Western blot was conducted to detect the effect of MLCK knockout on cell apoptosis. **Results** DNA sequencing showed that MLCK base sequences were missing or substituted at the sgRNA sequence recognition, and RT-qPCR and Western blot showed lower mRNA and protein levels in MLCK knockout cell lines than those in the control group ( $P < 0.0001$ ). Furthermore, the flow cytometry assay showed that MLCK knockout did not significantly change the cycle of FaDu cells, but the rate of apoptosis increased ( $P < 0.0001$ ). Western blot showed that Bax/Bcl-2 ( $P < 0.0001$ ) and Cleaved Caspase-3/Caspase-3 ( $P = 0.0007$ ) ratios raised in the MLCK knockout group. **Conclusion** The knockout of MLCK induced apoptosis in FaDu cells, but the exact mechanism needs further study.

**Key words** hypopharyngeal carcinoma; myosin light chain kinase; proliferation; apoptosis