

文章编号 1006-8147(2019)02-0124-04

论 著

MST4 表达对 MHCC97H 肝癌细胞细胞因子、ERK 蛋白、p-ERK 蛋白表达的影响及其意义

赵小丽,高 鹏,刘俊华,周凤蕊,王佳乐,李广明
(郑州市第六人民医院肝病五科,郑州 450000)

摘要 目的:探讨 MHCC97H 肝癌细胞中丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 4(MST4)的表达与细胞因子、ERK 蛋白、p-ERK 蛋白表达的关系及其意义。方法:将 MHCC97H 肝癌细胞培养至对数生长期后,接种于 96 孔板上培养,分为空白组、高表达组(MST4 转染高表达)、低表达组(MST4 转染 siRNA),采用 Western-blot 法检测各组共培养 24 h 后的 MST4 蛋白表达水平,采用 ELISA 法检测各组培养 24 h 后上清液中白细胞介素-2(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、趋化因子-2(CCL2),采用 Western-blot 法检测各组的细胞外信号调节激酶(ERK)、磷酸化细胞外信号调节激酶(p-ERK)蛋白的表达,采用 MTT 实验检测 3 组肿瘤细胞的增殖能力,采用 Transwell 实验检测各组细胞的侵袭迁移能力。结果:高表达组的 MST4 蛋白表达显著高于空白组和低表达组($P<0.05$);空白组和低表达组的 MST4 蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$);高表达组的上清液中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2 水平均显著高于空白组和低表达组($P<0.05$);空白组和低表达组的上清液中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2 水平差异无统计学意义($P>0.05$);空白组、高表达组和低表达组的 ERK 蛋白表达差异无统计学意义($P>0.05$);高表达组的 p-ERK 蛋白显著高于空白组和低表达组($P<0.05$);空白组和低表达组的 p-ERK 蛋白差异无统计学意义($P>0.05$);高表达组的 MTT 实验吸光度值、Transwell 实验 MHCC97H 肝癌细胞迁移数目高于空白组和低表达组($P<0.05$);空白组和低表达组的 MTT 实验吸光度值、Transwell 实验 MHCC97H 肝癌细胞迁移数目差异无统计学意义($P>0.05$)。结论:MHCC97H 肝癌细胞中 MST4 高表达,将会激活 p-ERK 蛋白表达,从而提高细胞因子的表达,提高 MHCC97H 肝癌细胞的增殖、侵袭能力。

关键词 MHCC97H 肝癌细胞;丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 4;增殖;侵袭迁移

中图分类号 R735.7

文献标志码 A

Effect of MST4 expression on the expression of cytokines, ERK protein and p-ERK protein in MHCC97H hepatoma cells and its significance

ZHAO Xiao-li, GAO Peng, LIU Jun-hua, ZHOU Feng-rui, WANG Jia-le, LI Guang-ming

(Five Department of Liver Disease, The Sixth People's Hospital of Zhengzhou, Zhengzhou 450000, China)

Abstract Objective: To investigate the relationship between MST4 expression and cytokines, ERK protein and p-ERK protein expression in MHCC97H hepatoma cells and its significance. **Methods:** After the MHCC97H hepatoma cells were cultured at the logarithmic growth stage, they were inoculated on 96 orifice plates and divided into blank group-high expression group (MST4 transfection high expression) and low expression group (MST4 transfection siRNA). The ELISA method was used to detect interleukin -2 (IL-6), interleukin -1 beta (IL-1 beta) and tumor necrosis factor - alpha (TNF- alpha) and chemokine -2 (CCL2) were used to detect the expression of extracellular signal regulated kinase(ERK) and phosphorylated extracellular signal regulated kinase (p-ERK) protein in each group by Western-blot method. The increment ability of tumor cells of three groups was detected by MTT test and the invasion of the cells was detected by Transwell test. Migration ability. **Results:** The expression of MST4 protein in the high expression group was significantly higher than that in the blank group and the low expression group ($P<0.05$). There was no significant difference in the expression of MST4 protein between the blank group and the low expression group ($P>0.05$). The levels of IL-6, IL-1 beta, TNF- α , and CCL2 in the supernatant of high expression group were significantly higher than those in the blank group and low expression group ($P<0.05$), and the differences in IL-6, IL-1 beta, TNF- α and CCL2 levels of the supernatant of the blank group and low expression group were not significant($P>0.05$), but the negative expressions of the ERK protein in the blank group, the high expression group and the low expression group were poor. The p-ERK protein in the high expression group was significantly higher than that in the blank group and the low expression group($P<0.05$), and the difference in the p-ERK protein of the blank group and the low expression group was not statistically significant ($P>0.05$); the MTT experimental absorbance value of the high expression group and the number of migration of the liver cancer cells in the Transwell experiment MHCC97H were higher than those of the empty group ($P>0.05$). In the blank group and the low expression group ($P<0.05$), there was no significant difference between the MTT experimental absorbance value of the blank group and the low expression

group and the number of MHCC97H hepatoma cell migration in the Transwell experiment ($P>0.05$). **Conclusion:** The high expression of MST4 in MHCC97H hepatoma cells may activate the expression of p-ERK protein, enhance the expression of cytokines, and increase the value added and invasion of MHCC97H hepatoma cells.

Key words MHCC97H hepatoma cells; serine / threonine protein kinase 4; value added; invasion and migration

肝癌在我国恶性肿瘤的发病率中居于高位,尽管目前临床具有放疗、化疗及手术等多种有效方法,但由于原发性肝癌早期临床症状较为隐匿,确诊时患者多存在肝癌细胞转移并多处于晚期,手术治疗的效果显著降低,而由于放疗、化疗较大的毒副作用在临床使用受限^[1]。因此,探寻肝癌的侵袭、转移机制对制订有效的治疗方案具有重要意义。研究^[2-3]提示丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 4(mammalian Ste20-like kinase 4, MST4) 对肝癌的预后不良具有提示作用并可加速肿瘤细胞的侵袭、生长及转移,还可调节炎性细胞因子而介导肝癌的转移和侵袭,而肝癌细胞上皮间质(epithelial mesenchymal transitional, EMT)转化可被 MST4 激活,进而增加肝癌严重程度^[4]。因此,本研究深入探讨了 MHCC97H 肝癌细胞中 MST4 的表达与癌细胞增殖、侵袭迁移的关系,旨在为肝癌的转移、侵袭机制提供新的思路。

1 材料与方法

1.1 MHCC97H 肝癌细胞系 MHCC97H 肝癌细胞系购买于复旦大学医学院基础医学院教研室;实验所用质粒均由南京建成生物研究所提供。

1.2 实验药品、仪器 胎牛血清及 DMEM 培养液购于美国 Hyclone 公司;MST4 (1:500)、EDTA 消化液(0.02%)及胰蛋白酶(0.25%)购于美国 Proteintech 公司;Western blot 试剂盒及细胞核蛋白、总蛋白试剂盒购于 Millipore 公司;白细胞介素-2(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、趋化因子-2(CCL2)ELISA 试剂盒及 Transwell 小室试剂盒均购于南京建成生物研究所;大鼠 ERK 及大鼠抗人磷酸化 ERK 多克隆抗体均购于美国上海康城生物公司;辣根过氧化物酶标记羊抗大鼠 IgG 美国 BD 公司;酶标仪购于美国 GE 公司。

1.3 实验方法 胎牛血清(10%)高糖 DMEM 于 5% CO₂ 及 37 °C 条件培养箱传代培养,3 d 传代 1 次;将 MHCC97H 肝癌细胞培养至对数生长期后,接种于 96 孔板上培养,分为空白组、高表达组(MST4 转染高表达)、低表达组(MST4 转染 siRNA)。

1.4 指标检测方法 采用 ELISA 法检测各组培养 24 h 后上清液中白细胞介素-2(IL-6)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、趋化因子-2(CCL2)。

采用 Western-blot 法检测各组的 ERK、p-ERK 的表达情况,提取总蛋白后,取 20 g 总蛋白行 SDS-PAGE 电泳,常规转膜后 5%脱脂奶粉 2 h 室温封闭,分别加入大鼠 ERK 及大鼠抗人磷酸化 ERK 一抗,次日常规洗膜后加入辣根过氧化物酶标记羊抗大鼠 IgG,室温 1 h 孵育,暗室曝光显色。

采用 MTT 实验检测 3 组肿瘤细胞的增殖能力。取对数生长期 MHCC97H 肝癌细胞,接种于 96 孔板,每孔约 2 000 个,每组设 5 个平行孔,5% CO₂、37 °C 条件培养箱培养,细胞贴壁后每孔加入 5 g/L MTT 10 μ L,37 °C 4 h 孵育,弃除上清培养基后每孔加 150 μ L DMSO,振荡后酶标仪(492 nm 波长)检测吸光度。

采用 Transwell 实验检测各组细胞的侵袭迁移能力。转染的 MHCC97H 肝癌细胞 48 h 培养后消化,取 1 \times 10⁵ 个细胞于灭菌 EP 管(1.5 mL),细胞重悬后具体操作依据 Transwell 小室试剂盒说明书,24 h 常规培养后取出小室,乙醇(95%)固定,结晶紫染色后取 5 个视野 200 倍显微镜下观察侵袭情况并计数。

1.5 统计学方法 统计软件采用 SPSS16.0 版本,数据表述采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据统计分析采用单因素方差分析法,组间比较采用 LSD-*t* 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 3 组细胞 MST4 蛋白表达比较 高表达组的 MST4 蛋白表达显著高于空白组和低表达组($P<0.05$);空白组和低表达组的 MST4 蛋白表达水平差异无统计学意义($P>0.05$,表 1)。

表 1 3 组细胞的 MST4 蛋白表达水平比较($\bar{x}\pm s$, 相对表达强度)

Tab 1 Comparison of MST4 protein expression levels in cells of 3 groups of patients($\bar{x}\pm s$, relative expression intensity)

组别	IL-6/(pg/mL)	<i>F</i>	<i>P</i>
空白组	0.109 \pm 0.053*	51.392	0.000
高表达组	0.778 \pm 0.180		
低表达组	0.117 \pm 0.059*		

与高表达比较 * $P<0.05$

2.2 3 组细胞的上清液中细胞因子水平比较 高表达组的上清液中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2 水平均显著高于空白组和低表达组($P<0.05$);空白组和低表达组的上清液中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2 水平差异无统计学意义($P>0.05$,表 2)。

表 2 3 组细胞的上清液中细胞因子水平比较($\bar{x} \pm s$)Tab 2 Comparison of cytokine levels in the supernatant of three groups of cells($\bar{x} \pm s$)

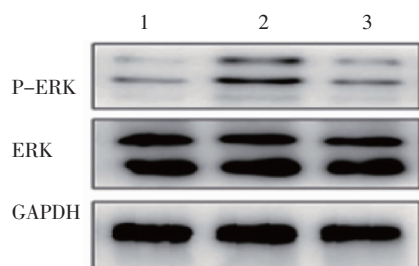
组别	IL-6(pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)	CCL2(pg/mL)
空白组	44.7 \pm 12.0*	41.6 \pm 11.3*	28.5 \pm 6.9*	38.3 \pm 11.2*
高表达组	143.8 \pm 39.5	182.5 \pm 28.0	395.6 \pm 55.3	190.5 \pm 44.0
低表达组	40.0 \pm 10.5*	36.8 \pm 9.3*	27.0 \pm 6.3*	37.0 \pm 9.8*
F	31.692	44.528	96.417	52.004
P	0.000	0.000	0.000	0.000

与高表达比较 * $P < 0.05$

2.2 3 组细胞中的 ERK、p-ERK 蛋白表达情况 空白组、高表达组和低表达组的 ERK 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$);高表达组的 p-ERK 蛋白显著高于空白组和低表达组($P < 0.05$),空白组和低表达组的 p-ERK 蛋白表达差异无统计学意义($P > 0.05$,表 3,图 1)。

表 3 3 组细胞的中 ERK、p-ERK 蛋白表达情况($\bar{x} \pm s$)Tab 3 Expression of medium ERK, P-ERK protein in three groups of cells($\bar{x} \pm s$)

组别	ERK(相对表达强度)	p-ERK(相对表达强度)
空白组	0.831 \pm 0.117	0.269 \pm 0.105*
高表达组	0.859 \pm 0.133	0.622 \pm 0.145
低表达组	0.840 \pm 0.108	0.280 \pm 0.086*
F	2.259	35.598
P	0.177	0.000

与高表达比较 * $P < 0.05$ 

1 为空白组,2 为高表达组,3 为低表达组;P-ERK 蛋白是由 P-ERK1 和 P-ERK2 构成,ERK 蛋白是由 ERK1、ERK2 蛋白构成,所以均显示 2 条电泳带。

图 1 Western-blot 法检测结果

Fig 1 Detection result Western-blot

2.3 3 组细胞的 MTT 实验检测结果 高表达组的 MTT 实验吸光度值高于空白组和低表达组($P < 0.05$);空白组和低表达组的 MTT 实验吸光度值差异无统计学意义($P > 0.05$,表 4)。

表 4 3 组细胞的 MTT 实验检测结果($\bar{x} \pm s$)Tab 4 Results of MTT assay in three groups of cells($\bar{x} \pm s$)

组别	MHCC97H 肝癌细胞(吸光度值)	F	P
空白组	0.206 \pm 0.077*	25.826	0.000
高表达组	0.375 \pm 0.083		
低表达组	0.214 \pm 0.069*		

与高表达比较 * $P < 0.05$

2.4 3 组细胞的 Transwell 实验检测结果 高表达组的 Transwell 实验 MHCC97H 肝癌细胞迁移数目高于空白组和低表达组($P < 0.05$);空白组和低表达组的 Transwell 实验 MHCC97H 肝癌细胞迁移数目差异无统计学意义($P > 0.05$,表 5)。

表 5 3 组细胞的 Transwell 实验检测结果($\bar{x} \pm s$)Tab 5 Transwell test results of three groups of cell($\bar{x} \pm s$)

组别	MHCC97H 肝癌细胞(细胞数)	F	P
空白组	88.3 \pm 14.6*	35.174	0.000
高表达组	308.6 \pm 47.2		
低表达组	92.0 \pm 18.6*		

与高表达比较 * $P < 0.05$

3 讨论

肝癌是指起源于肝间叶组织和肝脏上皮细胞的恶性肿瘤,肝癌患者早期临床症状多隐匿,被诊断时已多为晚期并伴有乏力、消瘦、肝区疼痛及肝大等临床症状,临床治疗困难^[5-6]。此外,肝癌细胞极易出现转移、浸润,这给肝癌的根治造成了严重障碍。因此,研究肝癌细胞侵袭、转移的相关机制并探寻灵敏、准确抑制肝癌转移的治疗靶点及方法对改善和提高肝癌患者预后意义显著。

MST4 属于机体的重要激酶,可参与细胞骨架的形态形成、重排、细胞分化及凋亡等多种细胞活动,可促进细胞的转化及生长^[7-8]。高表达组的 MST4 蛋白表达显著高于空白组和低表达组;空白组和低表达组的 MST4 蛋白表达水平差异无统计学意义。文献^[9-10]提示前列腺及乳腺癌患者肿瘤的恶性程度及侵袭性与 MST4 的高表达具有高度相关性,这也与本研究结果一致。

研究^[11-12]证实肿瘤的转移及侵袭过程与炎症因子具有密切联系,炎症因子可激活肿瘤细胞及炎症细胞,对抑制免疫介导的肿瘤监视作用显著。IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2 均为重要的促癌炎症因子,认为上述炎症因子的分泌失调可促进肝癌的早期发生及进展^[13]。本研究结果显示,高表达组的上清液中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2 水平均显著高于空白组和低表达组;而空白组和低表达组的上清液中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2 水平差异无统计学意义。上述结果提示,肝癌细胞存在较高的炎症因子水平,可能促进肝癌细胞的增殖、转移及侵袭。动物实验^[14]证实,肝癌模型小鼠机体 IL-1 β 及 TNF- α 表达水平明显升高,这也与本研究结果相符。炎症因子由免疫细胞和某些非免疫细胞产生和分泌,具有免疫调节作用,参与细胞生长、分化、修复和免疫过程。而慢性病大多为炎症因子参与的病理生理过程,肿

瘤的发生均是由于一个长期的慢性炎症刺激而导致的。故而, MST4 可能是通过调控 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 、CCL2 等炎症因子的分泌而影响肿瘤组织的病理发展。

本研究结果显示,空白组、高表达组和低表达组的 ERK 蛋白表达差异无统计学意义;高表达组的 p-ERK 蛋白显著高于空白组和低表达组;空白组和低表达组的 p-ERK 蛋白差异无统计学意义。上述结果提示,MHCC97H 肝癌细胞中 MST4 高表达,将会激活 p-ERK 蛋白表达,从而提高细胞因子的表达,促进肝癌细胞的增殖和侵袭。MST4 可通过 MAPK 通路的激活诱导 EMT 肝癌细胞转化,对肝癌的预后不良具有显著的提示作用。ERK 属于 MAPK 家族最重要的蛋白激酶,其磷酸化后形成 p-ERK 才能成为具有活性的蛋白激酶,进而调节包括细胞分化、增殖、衰老及凋亡等多种细胞调节作用,并调节炎症因子的分泌及产生^[15]。

增殖及侵袭实验结果显示,高表达组的 MTT 实验吸光度值、Transwell 实验 MHCC97H 肝癌细胞迁移数目高于空白组和低表达组;空白组和低表达组的 MTT 实验吸光度值、Transwell 实验 MHCC97H 肝癌细胞迁移数目差异无统计学意义。上述结果证实 MHCC97H 肝癌细胞中 MST4 高表达与癌细胞的迁移具有密切联系,与上述研究结果一致。

综上所述,MHCC97H 肝癌细胞中 MST4 高表达,将会激活 p-ERK 蛋白表达,从而提高细胞因子的表达,提高 MHCC97H 肝癌细胞的增殖和侵袭能力。

参考文献:

- [1] 黄静怡,廖锦堂.肝癌分化程度与临床因素的关系探究[J].湖南师范大学学报(医学版),2016,13(2):55
- [2] 张志杨,朱磊,贾平,等.柯里拉京对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响[J].中国实验方剂学杂志,2017,22(21):153
- [3] Gong J, Shen S, Yang Y, et al. Inhibition of FASN suppresses migration, invasion and growth in hepatoma carcinoma cells by deregulating the HIF-1 α /IGFBP1 pathway[J]. International J Oncol, 2017, 50(3):88
- [4] 张思,刘元林,李雪,等.顺铂通过抑制转移抑制基因 1-细胞外信号调节激酶及丝氨酸/苏氨酸激酶激活抑制 HeLa 细胞增殖[J].中国药理学与毒理学杂志,2016,30(4):350
- [5] 梁彦玲,崔付超,姬广森.原发性肝癌患者行肝癌介入化疗栓塞术的可行性及安全性研究[J].癌症进展,2018,16(7):858
- [6] 吴爱兵,黎明春,麦宗炯,等. CK2 α 通过 PI3K/Akt/GSK-3 β 信号通路调控肺腺癌 A549 细胞的侵袭及迁移[J]. 中国肺癌杂志, 2017, 20(4):233
- [7] Sun J, Luo Q, Liu L, et al. Biomechanical profile of cancer stem-like cells derived from MHCC97H cell lines[J]. J Biomechanics, 2016, 49(1):45
- [8] 李天然,黄晓斌,黄楚恒,等.骨髓间充质干细胞对经转化生长因子 β 1、骨桥蛋白基因沉默肝癌细胞 MHCC97-H 的影响[J]. 中国组织工程研究,2017,38(5):687
- [9] Lin W, Zhong M, Liang S, et al. Emodin inhibits migration and invasion of MHCC-97H human hepatocellular carcinoma cells[J]. Exper Therap Med, 2016, 12(5):3369
- [10] 李聪,邢秀亚,张巍,等.肝癌中星形细胞上调基因 1 作用于 mi-croRNA-885-5p/基质金属蛋白酶 9 信号通路促进肝癌转移的机制研究[J]. 中华消化外科杂志, 2016, 15(2):161
- [11] Cui L, Gao B O, Cao Z, et al. Downregulation of B7-H4 in the MHCC97-H hepatocellular carcinoma cell line by arsenic trioxide[J]. Mol Med Rep, 2016, 13(3):2032
- [12] 陈翔,陆宝华,袁杰,等.老年结直肠癌血清可溶性细胞间黏附分子-1 及炎症因子表达的临床意义[J].重庆医学,2016,45(16):2202
- [13] Chen X, Xu H, Wu N, et al. Interaction between granulin A and enolase 1 attenuates the migration and invasion of human hepatoma cells[J]. Oncotarget, 2017, 8(18):30305
- [14] 张莉莉,陈伟,梁国强.北虫草素对体外小鼠肝癌 H22 细胞增殖及肝癌鼠血清中 IL-2/TNF- α 水平的影响[J].吉林中医药, 2015, 35(2):184
- [15] Feng X J, Pan Q, Wang S M, et al. MAP4K4 promotes epithelial-mesenchymal transition and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Tumor Biol, 2016, 37(8):11457

(2018-05-09 收稿)