



中国临床医学

Chinese Journal of Clinical Medicine

ISSN 1008-6358

CN 31-1794/R

Radil在肝癌组织中的表达及对肝癌发展的影响

孙海香, 史颖弘, 樊嘉, 杨柳晓

引用本文:

孙海香, 史颖弘, 樊嘉, 等. Radil在肝癌组织中的表达及对肝癌发展的影响[J]. 中国临床医学, 2020, 27(4): 624–627.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20201091>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

钠钙交换器1对肝细胞肝癌增殖与侵袭的影响

The role and mechanisms of NCX1 on proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma

中国临床医学. 2017, 24(6): 873–878 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20170291>

蛋白质精氨酸甲基化转移酶5在肝细胞肝癌中的表达及其临床意义

Expression of PRMT5 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance

中国临床医学. 2018, 25(5): 710–715 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2018.20180473>

原发性肝细胞肝癌中核不均一核糖核蛋白A1的定位及临床意义

The location and significance of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A 1 in hepatocellular carcinoma

中国临床医学. 2016, 23(6): 720–724 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2016.20160996>

肝细胞肝癌组织异黏蛋白的表达变化及临床意义

Expression and clinical significance of metadherin in hepatocellular carcinoma

中国临床医学. 2017, 24(3): 334–338 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20170364>

肝细胞核因子1B体外抑制前列腺癌细胞的增殖和迁移

Hepatocyte nuclear factor 1B suppresses the proliferation and migration of prostate cancer cells in vitro

中国临床医学. 2017, 24(2): 171–175 <https://doi.org/10.12025/j.issn.1008-6358.2017.20170208>

DOI:10.12025/j.issn.1008-6358.2020.20201091

Radil 在肝癌组织中的表达及对肝癌发展的影响

孙海香¹, 史颖弘², 樊 嘉^{1,2}, 杨柳晓^{2*}

1. 复旦大学附属中山医院肝癌研究所, 上海 200032

2. 复旦大学附属中山医院肝外科, 上海 200032

[摘要] **目的:**探讨肝癌组织中 Radil(Ras association and DIL domains)的表达水平,并进一步分析其对肝癌发展的影响。**方法:**采用免疫组化和 Western blot 对手术切除的癌组织及对应的癌旁组织进行蛋白质水平检测;用 Western blot 方法分析各肝癌细胞系中 Radil 的表达,并利用敲低或过表达的方法分析 Radil 表达水平的变化对肝癌细胞生长、运动的影响。**结果:**Radil 在肝癌组织中表达均显著高于对应癌旁组织,高表达 Radil 可以促进肝癌细胞生长、迁移,而抑制凋亡相关分子的表达。**结论:**Radil 在肝癌组织中高表达,可显著促进肝癌细胞的生长、迁移,有望为肝癌的治疗和预后判断提供参考。

[关键词] Radil;肝癌;增殖;转移**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标志码]** A

Expression of Ras association and DIL domains (Radil) and its effect on hepatocellular carcinoma

SUN Hai-xiang¹, SHI Ying-hong², FAN Jia^{1,2}, YANG Liu-xiao^{2*}

1. Liver Cancer Institute, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

2. Department of Liver Surgery, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

[Abstract] **Objective:** To assess the expression level of Ras association and DIL domains (Radil), and its effect on hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:** The expression of Radil was measured by immunohistochemistry and Western blot in HCC tissue samples. Then the expression of Radil was measured in several HCC cell lines by Western blot, and Knock-down and over-expression were carried out in HCC cell lines respectively to test cell proliferation and movement ability. **Results:** The expression of Radil in HCC tissues was significantly higher than that in corresponding adjacent tissues. The expression of Radil promoted HCC cell proliferation and migration ability, and the apoptosis-related protein expression levels were decreased. **Conclusions:** This study suggests that Radil is overexpressed in HCC. It may play an important role in carcinogenesis or aggression and may be a useful marker for the prognosis evaluation of HCC.

[Key Words] Radil; HCC; proliferation; migration

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,在我国肝癌发病率列恶性肿瘤第4位,死亡率占据第2位,对人类的健康造成严重威胁,因此深入探索分析肝癌的发病、发展机制对于肝癌治疗具有非常重要的指导意义^[1]。Radil(Ras association and DIL domains)是小G分子Rap的效应分子,研究发现其对细胞的黏附、运动起着重要的作用,但其在肝癌组织中的表达及其意义研究较少。本研究旨在通过免疫组化及蛋白质印迹(Western blot, WB)方法分析肝癌组织标本中 Radil 的表达水平,通过过表达或敲低

Radil 表达水平分析其对肝癌细胞生长及运动的影响,探讨其对肝癌发展的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞系 肝癌细胞 Hep3B、Huh7 购自中科院上海生化细胞所, MHCC97L、MHCC97H 和 HCCLM3 细胞株由复旦大学附属中山医院肝癌研究所提供。所有肝癌细胞系均用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养液于 5% CO₂, 37℃ 下进行培养。细胞生长至 90% 融合度用 0.25% 的胰蛋白酶

[收稿日期] 2020-05-14**[接受日期]** 2020-07-15

[基金项目] 国家自然科学基金(81302100, 81502028, 81572884d, 81372317), 复旦大学附属中山医院优秀青年基金(2015ZSYXQN03). Supported by National Natural Science Foundation of China (81302100, 81502028, 81572884d, 81372317), Zhongshan Hospital Outstanding Youth Fund (2015ZSYXQN03).

[作者简介] 孙海香, 博士, 助理研究员. E-mail: sun.haixiang@zs-hospital.sh.cn

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 021-64041990, E-mail: yang.liuxiao@zs-jospital.sh.cn

进行消化传代。Radil 过表达和敲低病毒购自上海吉凯基因化学技术有限公司。

1.2 临床标本 选取复旦大学附属中山医院肝外科手术切除的肝癌标本,癌旁标本作为对照,并经液氮速冻后立即置入-80℃冰箱中保存。组织标本经10%甲醛固定,常规石蜡包埋,连续切片,切片厚度4 μm,备染。

1.3 免疫组化 石蜡切片经二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,微波修复抗原,漂洗后置于磷酸盐缓冲液(PBS)中。5% H₂O₂ 室温孵育30 min,血清封闭后加入 Radil 抗体4℃孵育过夜,PBS 漂洗后加二抗室温孵育,最后加入氧化二氨基联苯胺(DAB)常温显色,蒸馏水漂洗,逐级脱水,最后复染及封片,光镜观察。

1.4 实时荧光定量 PCR(RT-PCR) 取对数生长期细胞,每 T25 培养瓶加入1 mL TRIzol 试剂进行裂解,氯仿乙醇法进行抽提。所有 RT-PCR 反应所需要的试剂均购自 TaKaRa 公司。

1.5 蛋白质印迹法 取对数生长期细胞约1×10⁶个,PBS 洗后加入放射免疫沉淀法缓冲液(RIPA)裂解液,冰上裂解30 min。利用 BCA 法检测蛋白质浓度,应用酶标仪检测562 nm 波长的光密度,根据标准曲线计算样品的蛋白浓度。按照说明书配制分离胶和浓缩胶,上样量为80 μg。Radil、actin、E-

cadherin、fibronectin,抗体购自英国 Abcam 公司。

1.6 细胞增殖实验 取实验组和对照组的对数生长期的细胞,调整成3×10⁴个/mL 密度,96 孔板每孔接种100 μL,接种后每隔24 h 加入10 μL 细胞计数盒8(CCK8)检测液,用酶标仪进行吸光值检测。

1.7 细胞迁移实验 用 DMEM 将实验组和对照组的细胞稀释成1×10⁶/mL 单细胞悬液,取100 μL 细胞悬液加入上室,下室加入300 μL 悬液,并在 DMEM 培养液加10%胎牛血清;72 h 后经4%多聚甲醛固定、Giemsa 染液染色,显微镜下计数并拍照。

1.8 统计学处理 采用 SPSS 13.0 统计分析软件处理,以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间采用 *t* 检验,检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 Radil 在肝癌及癌旁组织中的表达情况 免疫组化染色发现,Radil 主要表达在细胞质中,少量分布于细胞膜上(图1A)。该蛋白在肝癌和癌旁组织中均有表达,其中肝癌组织中的表达量显著高于癌旁组织;WB 结果也表明不同患者的 Radil 表达量不同,癌旁组织中的表达量显著低于癌组织(图1B)。这些数据表明,Radil 可能对肝癌的发展具有促进作用。

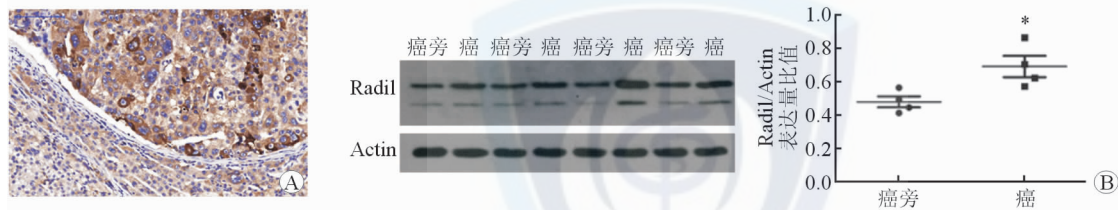


图1 Radil 在肝癌组织中的表达

A:Radil 的免疫组化染色(200×);B:Radil(相对分子质量为117 000)的 WB 染色及灰度分析,*表示差异显著, $P=0.04$

2.2 Radil 在肝癌细胞中的表达 通过 RT-PCR 和 WB 检测分析肝癌细胞系中 Radil 的表达水平,结果发现具有转移潜能的 MHCC97L、MHCC97H 和 HCCLM3 细胞系中 Radil 的 RNA 和蛋白水平均显著较高(图2A、2B)。构建高表达 Radil 载体,转染 Huh7 细胞,WB 验证得到高表达 Radil 的 Huh7 细胞系(图2C);转染 shRNA 至 LM3 细胞中,筛选得到低表达水平的 LM3 细胞系(图2D)。

2.3 Radil 对肝癌细胞增殖的影响 细胞增殖实验结果发现,高表达 Radil 的 Huh7 细胞生长速度显著高于对照组,而敲低 Radil 的表达则导致 LM3 细胞的生长速度显著降低(图3)。

2.4 Radil 对肝癌细胞运动的影响 对照组和实验组细胞的运动实验表明,高表达 Radil 导致 Huh7 细胞的运动能力显著增加(图4A、4B);降低 Radil 的表达显著降低 LM3 细胞的运动能力(图4C、4D)。

2.5 Radil 促进肝癌发展可能的机制 进一步研究发现,Radil 表达促进 fibronectin 的表达,E-cadherin 的表达量降低,凋亡分子 Bax 的表达量减少。Radil 低表达的细胞则高表达 E-cadherin 和 Bax(图5)。这些数据表明,Radil 可能通过促进细胞上皮细胞-间充质转分化(EMT),降低细胞凋亡来促进肝癌细胞的增殖和迁移,促进肝癌的发展。

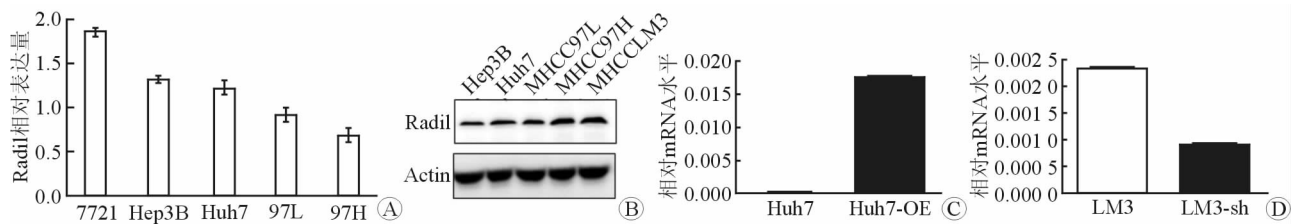


图2 Radil在肝癌细胞中的表达

A: Radil在肝癌细胞系中的RNA水平; B: Radil的蛋白表达水平; C: 过表达转染后 Radil表达水平; D: 敲低后 Radil表达水平

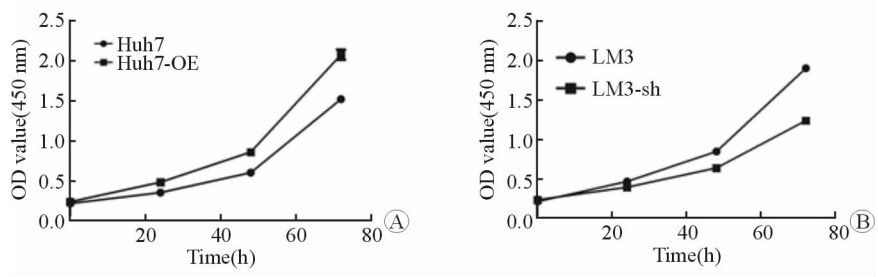


图3 Radil对肝癌细胞增殖的影响

A: Radil对Huh7细胞增殖的影响; B: Radil对LM3细胞增殖的影响

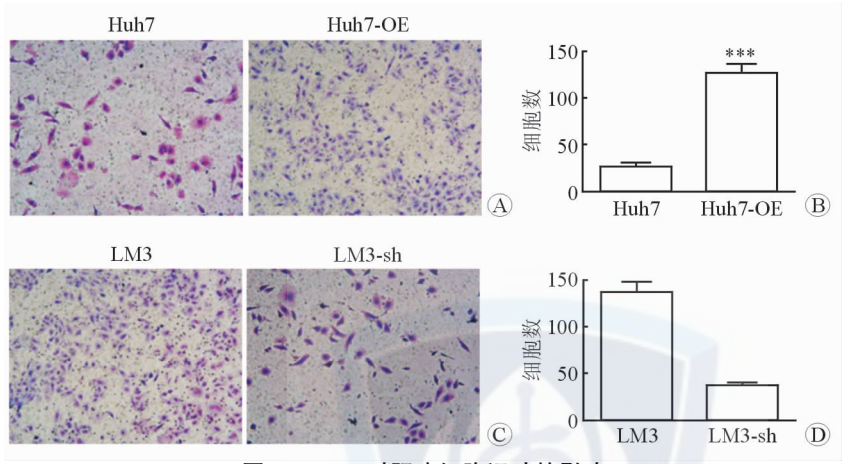


图4 Radil对肝癌细胞运动的影响

A: Radil过表达对Huh7运动的影响; B: 柱状图统计Huh7细胞数。*表示差异极显著, $P=0.0003$; C: 敲低表达Radil对LM3运动的影响; D: 柱状图统计LM3细胞数目, *表示差异极显著, $P=0.0008$

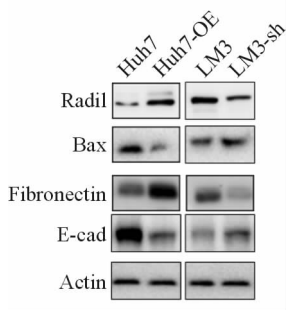


图5 WB检测EMT和凋亡分子的表达水平

3 讨论

肝癌是全球发病率和死亡率均较高的恶性肿瘤之一,虽然诊断和治疗技术的进步使肝癌患者的生存率有了较大的提高,但是术后的转移与复发比

例仍居高不下,探索肝癌转移、复发的机制对于肝癌的治疗具有重要的理论和临床意义^[1]。

肿瘤转移是复杂的过程,需要多个步骤:肿瘤细胞间的黏附连接被破坏,肿瘤与胞外基质的黏附增加,金属蛋白酶分泌增多,肿瘤细胞穿过基底膜进入血管,之后随着血液流动进入其他组织形成新的转移灶。可见,肿瘤细胞间连接和细胞与基质间的黏附连接对于肿瘤的转移具有重要的意义。研究发现,Rap1通过结合下游效应分子Radil影响整合素激活、聚集,进而影响细胞延展、黏附和迁移过程,对肿瘤转移有着重要的作用。敲低Radil可以有效降低乳腺癌细胞的迁移、侵袭能力,并阻断乳腺癌的发展。过表达Radil可以促进乳腺癌细胞的

增殖,并促进乳腺癌到肺脏的转移^[2],本研究发现 Radil 在肝癌组织中高表达,其高表达可促进肝癌细胞增殖,增加肝癌细胞的运动能力,对肝癌发展具有促进作用。

Rap1 是小分子 G 蛋白 Ras 家族中的一员,研究发现其活化后构象发生改变,与下游效应分子结合将信号转导到细胞核中,参与激活多种信号通路,促进黏附连接的形成,影响细胞的增殖、极性、运动等多种生物学功能。Radil 是新发现的 Rap1 分子下游效应分子之一,首次在神经鞘前体细胞中发现,低表达时可以显著降低细胞的黏附能力,是神经鞘前体细胞黏附、运动的必需分子^[3]。Radil 可与 Rap1、G $\beta\gamma$ 亚基结合形成复合物,并使其从胞质转移到细胞与基质黏附处,促进细胞与基质的黏附连接。Radil 过表达可以激活整合素,通过与胞外基质的黏附影响中性粒细胞的趋化作用。并激活局部黏着斑激酶(FAK)信号通路,促进间质细胞对纤连蛋白的黏附。敲低 Radil 可以减弱 fMLP 受体对细胞黏附的影响^[4]。Rap1 有多个效应分子,其他常见的效应分子有以下 3 种。(1)B-Raf,可以与 Rap1 结合,并被激活,但其具体的生物学功能与细胞类型、生长条件有关;(2)Ra-1,其可以与 Rap1 结合,但不被激活,与 Rap1 的结合导致了其不能与 Ras 结合,从而阻断了 Ras 信号的转导;(3)AF-6,其与

Rap1 结合后促进 Rap1 从核膜转而定位到细胞膜,进而通过整合素调节细胞的黏附作用。研究发现,这些效应分子中只有 Radil 对细胞延伸有作用,但不同效应分子间功能是否有交叉和不同,仍需要更多的研究。

综上所述,Radil 通过影响细胞延伸、黏附连接影响肿瘤细胞的运动能力,进而影响肿瘤的转移、复发,通过对 Radil 水平的检测,将有助于了解肿瘤的恶性程度和转移能力。

参考文献

- [1] LLOVET J M, MONTAL R, SIA D, et al. Molecular therapies and precision medicine for hepatocellular carcinoma [J]. *Nat Rev Clin Oncol*, 2018,15(10):599-616.
- [2] AHMED S M, THERIAULT B L, UPPALAPATI M, et al. KIF14 negatively regulates Rap1a-Radil signaling during breast cancer progression[J]. *J Cell Biol*, 2012,199(6):951-67.
- [3] SMOLEN G A, SCHOTT B J, STEWART R A, et al. A Rap GTPase interactor, Radil, mediates migration of neural crest precursors[J]. *Genes Dev*, 2007,21(17):2131-2136.
- [4] AHMED S M, DAULAT A M, MEUNIER A, et al. G protein betagamma subunits regulate cell adhesion through Rap1a and its effector Radil[J]. *J Biol Chem*, 2010,285(9):6538-6551.

[本文编辑] 王 迪,贾泽军

