

沉默 HE4 对结肠癌细胞增殖、侵袭、凋亡和 JAK/STAT3 信号通路的影响

王 韬 王一飞 李 磊 田宝华 李 璐 费建东

摘要 目的 探讨沉默人附睾蛋白 4(HE4)对结肠癌细胞增殖、侵袭、凋亡和 JAK/STAT3 信号通路的影响。方法 选取 124 例结肠癌患者和 40 例健康人。用 Western blot 和免疫组织化学染色法检测结肠癌组织和癌旁组织中 HE4 的表达水平。酶联免疫吸附试验(ELISA)检测结肠癌患者和健康人血清中 HE4 的表达水平。Western blot 检测结肠癌细胞株 Caco-2、SW480、HT-29、HCT-116 和正常结肠上皮细胞株 HCoePic 中 HE4 的表达水平。用 HE4 si-RNA 或 si-control 分别转染 HT-29 细胞, CCK-8 法检测细胞增殖能力, Transwell 小室实验检测细胞侵袭能力, Annexin-V-FITC/PI 流式细胞术检测细胞凋亡情况。Western blot 检测 JAK1、p-JAK1、JAK2、p-JAK2、STAT3 和 p-STAT3 的蛋白表达水平。结果 结肠癌组织 HE4 蛋白相对表达量高于癌旁组织($P < 0.05$)。HE4 在结肠癌组织中呈阳性表达, 其中高表达 78 例(62.90%)而癌旁组织中高表达仅 24 例(19.35%), 差异有统计学意义($P < 0.05$)。结肠癌患者血清 HE4 浓度高于健康人($P < 0.05$)。结肠癌 Caco-2、SW480、HT-29、HCT-116 细胞的 HE4 蛋白相对表达量均高于正常结肠上皮 HCoePic 细胞(均 $P < 0.05$)。HE4 表达水平与性别、年龄、肿瘤大小无关而与分化程度、TNM 分期、淋巴结转移和远处转移有关($P < 0.05$)。沉默 HE4 后, HT-29 细胞的增殖和侵袭能力下降而凋亡率提高(均 $P < 0.05$)。沉默 HE4 对 JAK1、JAK2 和 STAT3 总蛋白无明显影响, 但是可以下调 p-JAK1、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白表达量(均 $P < 0.05$)。结论 沉默 HE4 可以抑制结肠癌细胞增殖、侵袭、凋亡, 并且下调 JAK/STAT3 信号通路相关蛋白的表达。

关键词 人附睾蛋白 4; 结肠癌; 增殖; 侵袭; 凋亡; JAK; STAT3

中图分类号 R 735

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2021)07-1064-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.07.012

结肠癌是消化系统中最常见的恶性肿瘤之

2021-01-13 接收

基金项目: 河北省卫健委 2020 年度医学科学研究课题计划(编号: 20200522)

作者单位: 河北北方学院附属第一医院胃肠外科, 张家口 075000

作者简介: 王 韬, 男, 主治医师, 硕士, 责任作者, E-mail: wotukong81810@163.com

一^[1]。人附睾蛋白 4(human epididymis protein 4, HE4)在肺癌^[2]、乳腺癌^[3]、卵巢癌^[4]和子宫内膜癌^[5]中高表达, 并且参与了肿瘤的恶性增殖和进展。HE4 在结肠癌中的报道相对较少, Kemal et al^[6]研究表明, 结直肠癌患者外周血清中 HE4 表达水平明显高于健康人, 对结直肠癌的早期诊断有一定价值。赵渊博等^[7]应用表面增强激光解吸电离飞行时间质谱蛋白质芯片联合激光显微切割技术, 证实了 HE4 是大肠癌肝转移的早期标志蛋白。Janus 激酶/信号转导子和转录激活子 3(janus kinase/signal transducers and activators of transcription 3, JAK/STAT3)信号通路与结肠癌细胞的进展密切相关^[8], HE4 可以靶向调控 JAK/STAT3 信号通路^[9]。该研究旨在探讨沉默 HE4 对结肠癌细胞增殖、侵袭、凋亡和 JAK/STAT3 信号通路的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 结肠癌细胞株 Caco-2、SW480、HT-29、HCT-116 和正常结肠上皮细胞株 HCoePic 均购自中科院上海细胞库。

1.1.2 仪器 胎牛血清和 DMEM 培养基购自上海生工生物工程股份有限公司; BCA 蛋白定量检测试剂盒、凝胶快速制备试剂盒、SP 免疫组化试剂盒均购自武汉艾美捷科技有限公司; HE4、JAK1、p-JAK1、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3、 β -actin 内参抗体均购自北京安诺伦生物科技有限公司; Lipofiter™ 脂质体转染试剂购自上海科维创生物科技有限公司; HE4 si-RNA 和 si-control 均购自上海吉马制药有限公司; CCK-8 试剂盒、Transwell 小室、Annexin-V-FITC/PI 凋亡检测试剂盒均购自上海沪震实业有限公司。

1.1.3 试剂 Axio Imager M2M 全自动显微镜为德国卡尔蔡司公司生产; 164-5050 型电泳仪、CFX Connect 荧光定量 PCR 仪和 680 型酶标仪均为美国 Bio-Rad 公司生产; VILBER INFINITY 3026 凝胶成像系

统为法国 VILBER 公司生产; FACSCanto II 型流式细胞仪为美国 BD 公司生产。

1.2 细胞培养 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中进行培养,置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中。当细胞融合度达 80% 时进行传代,用胰蛋白酶消化,以 1:3 传代。取对数生长期且生长状态良好的细胞进行后续实验。

1.3 病例资料 选取 2016 年 6 月—2018 年 6 月在该院择期根治术治疗的结肠癌患者 124 例,术前均未接受放化疗,术后均经组织病理学检查确诊。术前采集患者晨起空腹肘静脉血,1 500 r/min、4 °C 条件下离心 15 min,收集血清,存储于 -70 °C 冰箱。术中留取癌组织及配对的癌旁正常黏膜组织(距离癌组织 ≥5 cm),迅速放于液氮中冷冻,存储于 -70 °C 冰箱。124 例患者中男 72 例,女 52 例;年龄 46 ~ 78(56.03 ± 10.03) 岁。另选取同期在该院进行健康体检的正常人 40 例作为健康对照,入组时抽取空腹肘静脉血,留存血清,其中男 29 例,女 21 例;年龄 33 ~ 64(55.10 ± 8.78) 岁。所有受试者均签署知情同意书。

1.4 Western blot 检测细胞和组织中 HE4 的表达水平 细胞:取对数生长期细胞,加入细胞裂解液,冰上裂解 20 min 后再离心 15 min,收集细胞上清液。用 BCA 法检测蛋白浓度。经 SDS-PAGE 凝胶电泳后将蛋白转移至 PVDF 膜上,用脱脂奶粉封闭 1 h,孵育一抗(鼠抗人 HE4 单克隆抗体,1:500) 4 °C 过夜后弃去一抗,TBST 洗膜 3 次。随后室温孵育二抗 2 h 后弃去二抗,TBST 洗膜 3 次。以 β-actin 作为内参,用 ECL 发光仪对蛋白进行成像,用 Image J 软件分析灰度值。组织:随机选取 6 例癌组织和癌旁组织进行检测。取组织 100 mg 加入组织裂解液,充分研碎后冰上裂解 20 min,离心 15 min,收集上清液。其余步骤同上。

1.5 免疫组织化学染色法检测组织中 HE4 的表达水平 124 例组织石蜡标本由该院病理科完成(石蜡切片厚度为 4 μm),取石蜡切片,常规脱蜡水化。将切片放置于枸橼酸盐缓冲液中微波煮沸 5 min,冷却至室温。用 PBS 洗涤 2 次,再用蒸馏水洗涤 2 次。滴加 3% 过氧化氢除去内源性过氧化物酶,室温孵育 10 min。随后用山羊血清封闭 10 min,滴加鼠抗人 HE4 单克隆抗体 4 °C 孵育过夜。滴加生物素标记的二抗,37 °C 下孵育 1 h,用 PBS 洗涤 3 次。滴加

DAB 显色液,苏木精复染。经过脱水、透明、封片处理后在显微镜下观察。根据细胞的染色强度及阳性细胞比例判断 HE4 表达情况:① 阴性染色记 0 分,浅黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分;② 阳性细胞数为 0% ~ 10% 记 1 分,11% ~ 50% 记 2 分,51% ~ 80% 记 3 分,81% ~ 100% 记 4 分。将上述 2 个评分相乘得出最终结果:0 ~ 3 分为 HE4 低表达;4 ~ 12 分为 HE4 高表达。

1.6 ELISA 法检测血清中 HE4 的表达水平 严格按照 ELISA 试剂盒说明书进行操作,酶标仪检测时波长设置为 450 nm,通过绘制标准曲线计算血清 HE4 表达水平。

1.7 细胞转染 以 2 × 10⁵ 个/孔密度将 HT-29 细胞接种于 6 孔板中。转染前用 PBS 洗涤细胞 2 次,加入 1.8 ml 无血清培养基。分别用 100 μl 无血清培养基稀释 10 μl LipoFiter 和 10 ml HE4 si-RNA(或者 si-control),静置 5 min 后将二者混匀,随后将混合物加入 6 孔培养板中。转染 24 h 后进行后续实验。HE4 si-RNA 序列为 5'-CTCGCTATTCTCGTAC-CTTCC-3'; si-control 序列为 5'-GGACGTCCCCACG-GCCCTGGAGG-3'。

1.8 CCK-8 细胞增殖实验 将 HT-29 细胞以 1 × 10⁴ 个细胞/孔的密度接种于 24 孔板中,用 CCK-8 试剂盒检测细胞活性,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。细胞培养 24、48、72 和 96 h 后,向每孔中添加 10 μl CCK-8,培养 4 h。用酶标仪在 490 nm 波长处读取吸光度,反映细胞增殖活性。

1.9 Transwell 小室实验检测 HT-29 细胞侵袭 首先在 Transwell 迁移板上室铺基质胶,然后将 HT-29 细胞接种于 Transwell 小室,以 2 × 10⁵ 个/ml 密度将 HT-29 细胞加入上室;下室中加入培养基。培养 48 h 后取出小室,用棉签拭去微孔膜上室的细胞。用 PBS 冲洗小室 3 遍。用 4% 多聚甲醛固定黏附于下室微孔膜下面的细胞,用结晶紫染色 15 min,待干燥后用显微镜进行观察,并计算侵袭细胞数。

1.10 Annexin-V-FITC/PI 流式细胞术检测 HT-29 细胞凋亡 取转染 24 h 后处于对数生长期的 HT-29 细胞,制成 1 × 10⁶ 个/ml 的细胞悬液。随后加入 5 μl 异硫氰酸荧光素,混匀后孵育 15 min;再加入 2.5 μl 碘化丙啶,孵育 5 min。最后用流式细胞仪检测凋亡率。

1.11 Western blot 检测 HT-29 细胞中 JAK/

STAT3 通路相关蛋白的变化 检测方法同 1.4。实验中 JAK1、p-JAK1、JAK2、p-JAK2、STAT3、p-STAT3 抗体稀释 500 ~ 1 000 倍。

1.12 统计学处理 该研究中各项实验均重复 5 次。应用 SPSS 20.0 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用独立样本 *t* 检验; 多组间比较用单因素方差分析; 计数资料用 % 表示, 组间比较用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE4 在结肠癌细胞、组织和外周血中的表达

结肠癌 Caco-2、SW480、HT-29、HCT-116 细胞的 HE4 蛋白相对表达量均高于正常结肠上皮细胞 HCoePic, 差异有统计学意义 ($F = 56.893$, 均 $P < 0.05$, 图 1A)。结肠癌组织 HE4 蛋白相对表达量高于癌旁组织, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1B)。

免疫组织化学染色结果显示, HE4 在结肠癌组织中呈阳性表达, 组间比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1C)。结肠癌患者血清 HE4 浓度高于健康人, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 1D)。

2.2 结肠癌组织中 HE4 表达水平与临床病理特征的关系 HE4 表达水平与性别、年龄、肿瘤大小无关, 而与分化程度、TNM 分期、淋巴结转移和远处转移有关 ($P < 0.05$)。见表 1。

2.3 沉默 HE4 对 HT-29 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响 沉默 HE4 后, HT-29 细胞的 HE4 蛋白表达水平下降 (图 2)。si-control 组细胞增殖活力高于 HE4 si-RNA 组, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3A)。si-control 组侵袭细胞数高于 HE4 si-RNA 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3B)。si-control 组凋亡率低于 HE4 si-RNA 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 图 3C)。

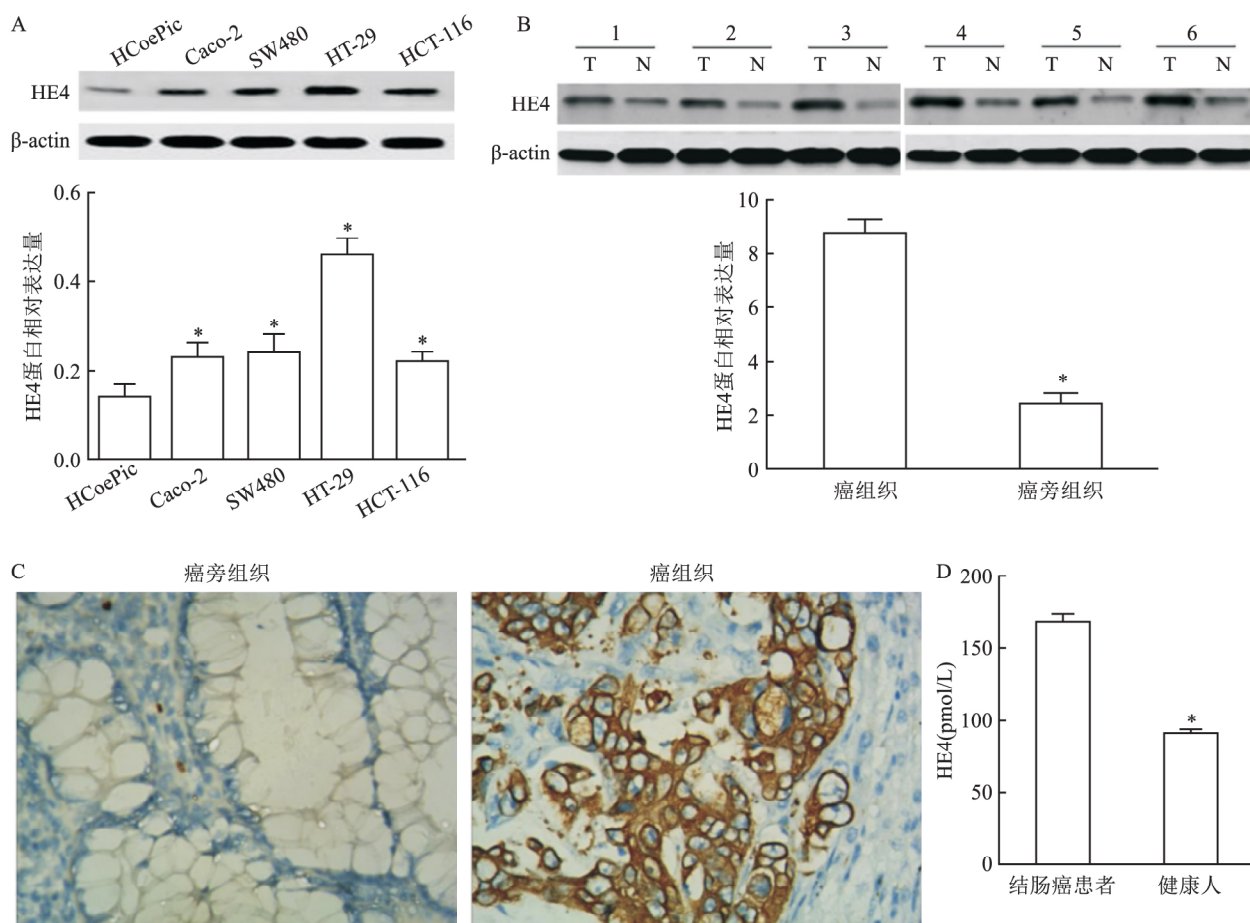


图 1 HE4 在细胞、组织和血清中的表达

A: Western blot 检测细胞中 HE4 蛋白相对表达量; 与 HCoePic 比较: * $P < 0.05$; B: Western blot 检测组织中 HE4 蛋白相对表达量; T: 癌组织, N: 癌旁组织; 1~6: 6 个代表性样本组别; 与癌组织比较: * $P < 0.05$; C: 免疫组织化学染色法检测组织中 HE4 的表达 $\times 200$; D: ELISA 检测血清中 HE4 的表达; 与结肠癌患者比较: * $P < 0.05$

表1 结肠癌组织中 HE4 表达水平与临床病理特征的关系

项目	n	高表达 (n=78)	低表达 (n=46)	χ^2 值	P 值
年龄(岁)				1.574	0.210
≥55	71	48	23		
<55	53	30	23		
性别				1.537	0.215
女	52	36	16		
男	72	42	30		
肿瘤大小(cm)				0.236	0.627
≥5	52	34	18		
<5	72	44	28		
分化程度				22.638	<0.001
低中分化	79	62	17		
高分化	45	16	29		
TNM 分期				18.831	<0.001
I ~ II	55	23	32		
III ~ IV	69	55	14		
淋巴结转移				23.798	<0.001
是	82	64	18		
否	42	14	28		
远处转移				4.562	0.033
是	64	46	18		
否	60	32	28		

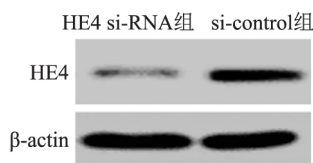


图2 沉默 HE4 对 HT-29 细胞 HE4 蛋白表达的影响

2.4 沉默 HE4 对 JAK/STAT3 通路相关蛋白的影响 si-control 组和 HE4 si-RNA 组 JAK1、JAK2、STAT3 总蛋白的比较差异无统计学意义。si-control 组 p-JAK1、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白相对表达量均高于 HE4 si-RNA 组,差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, 图4)。

3 讨论

结肠癌是全世界面临的一个严峻的健康问题, 尽管近年来结肠癌的诊治手段有了飞速发展, 但是患者的总体生存率仍未明显提高。寻找结肠癌的新型分子生物学标志具有重要意义。该研究结果显示, HE4 可能成为结肠癌潜在的诊治靶点。

HE4 位于人染色体 20q12-13, 约 12 kb, 由 5 个外显子和 4 个内含子组成。HE4 是蛋白酶抑制剂家族成员, 广泛表达于人体各个组织, 具有免疫调节作用^[10]。近年来 HE4 在肿瘤中的作用引起了广泛

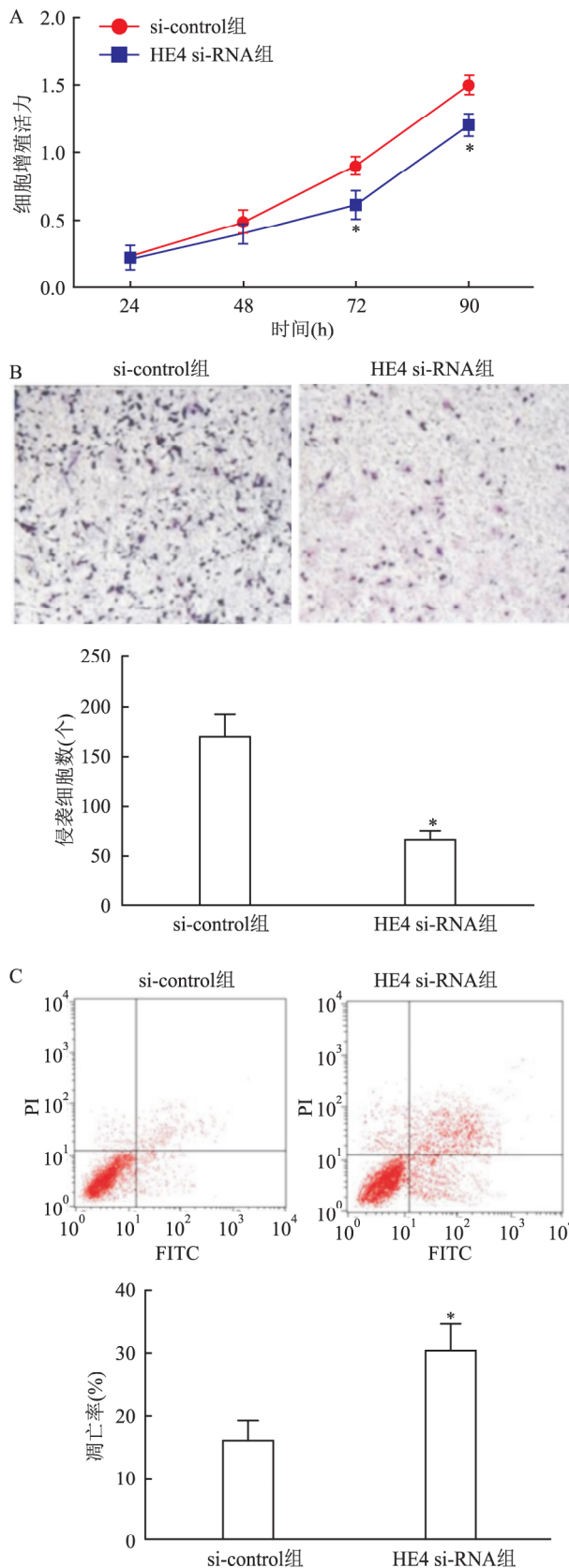


图3 沉默 HE4 对 HT-29 细胞的影响

A: 增殖; B: 侵袭; C: 凋亡; 与 si-control 组比较: * $P < 0.05$

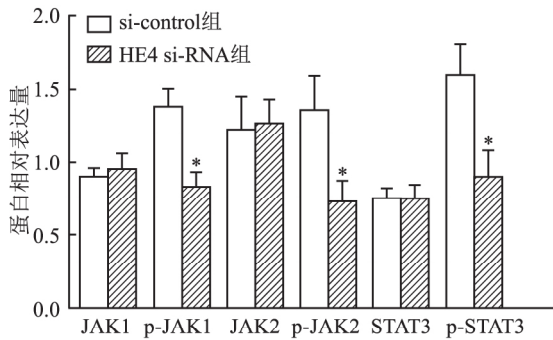
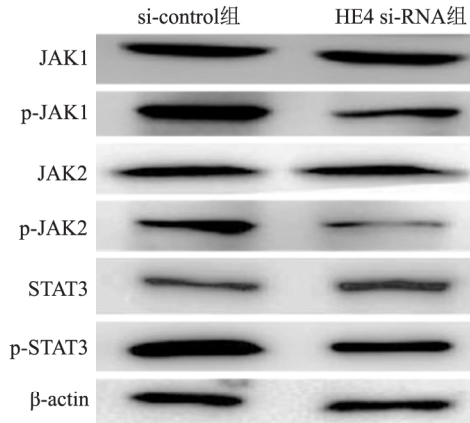


图4 沉默 HE4 对 JAK/STAT3 通路相关蛋白的影响
与 si-control 组比较: * P < 0.05

注意 HE4 在卵巢癌、子宫内膜癌、肺癌、泌尿系统移行细胞癌和乳腺癌患者的外周血中高表达^[11], 该研究表明 结肠癌患者外周血清中 HE4 表达水平高于健康人, 这与 Kemal et al^[6] 报道一致。另外, 该研究 Western blot 和免疫组织化学染色检测结果也证实 HE4 在结肠癌细胞和组织中高表达。以上提示 HE4 可能参与了结肠癌的发生, 对其早期诊断有重要价值。

HE4 与多种肿瘤的进展有关^[12-13]。该研究表明 HE4 表达水平与分化程度、TNM 分期、淋巴结转移和远处转移有关, 提示 HE4 可能与结肠癌进展有关。HE4 在肿瘤中作用的分子生物学机制既往报道较少。Ribeiro et al^[14] 研究表明, HE4 可以通过调控细胞外基质蛋白 (SERPINB2、GREM1、LAMC2 和 LAMB3) 促进卵巢癌细胞的增殖、迁移和黏附。国内周岩等^[15] 研究表明, HE4 能够通过影响胞外调节蛋白激酶与蛋白激酶 B 信号通路促进乳腺癌细胞的增殖并抑制凋亡。

HE4 在结肠癌中的作用机制既往鲜有报道。JAK/STAT3 是肿瘤的经典通路, 可介导增殖、分化、迁移和凋亡, 并且与机体免疫调节有关, 该通路是结

肠癌药物开发的热门靶点^[9]。既往卵巢癌中的研究^[9] 表明, HE4 可以靶向作用于 JAK/STAT3 信号通路, 敲除 HE4 可以通过抑制 JAK/STAT3 信号通路而抑制卵巢癌细胞的增殖和恶性进展。该研究表明沉默 HE4 后结肠癌 HT-29 细胞增殖、侵袭力降低, 并且凋亡率增加, 另外 p-JAK1、p-JAK2 和 p-STAT3 蛋白相对表达量下降, 提示 HE4 可能通过 JAK/STAT3 而发挥作用。

参考文献

- [1] 杨永江, 武雪亮, 屈明, 等. NET-1 在结肠癌中的表达、临床意义和预后分析 [J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(6): 963-7.
- [2] He Y P, Li L X, Tang J X, et al. HE4 as a biomarker for diagnosis of lung cancer: a meta-analysis [J]. Medicine, 2019, 98(39): e17198.
- [3] Lu M, Ju S, Shen X, et al. Combined detection of plasma miR-127-3p and HE4 improves the diagnostic efficacy of breast cancer [J]. Cancer Biomark, 2017, 18(2): 143-8.
- [4] 朱连成, 高健, 胡珍华, 等. 人附睾蛋白 4 和 Lewis y 抗原在上皮性卵巢癌组织中的表达及其与化疗耐药和预后的关系 [J]. 现代肿瘤医学, 2019, 27(22): 4048-52.
- [5] Benati M, Montagnana M, Danese E, et al. The clinical significance of DJ-4 and HE4 in patients with endometrial cancer [J]. J Clin Lab Anal, 2018, 32(1): e22223.
- [6] Kemal Y N, Demirag G N, Bedir A M, et al. Serum human epididymis protein 4 levels in colorectal cancer patients [J]. Mol Clin Oncol, 2017, 7(3): 481-5.
- [7] 赵渊博, 王云海, 阿不都外力·吾守尔. SELDI-TOF-MS 联合 LCM 技术筛选大肠癌肝转移早期诊断标志蛋白 [J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(4): 296-303.
- [8] Ren W, Shen S, Sun Z, et al. Jak-STAT3 pathway triggers DICER1 for proteasomal degradation by ubiquitin ligase complex of CUL4A (DCAF1) to promote colon cancer development [J]. Cancer Lett, 2016, 375(2): 209-20.
- [9] Wang A, Jin C, Tian X, et al. Knockdown of HE4 suppresses aggressive cell growth and malignant progression of ovarian cancer by inhibiting the JAK/STAT3 pathway [J]. Biol Open, 2019, 8(9): bio043570.
- [10] Wang J, Zhao H, Xu F, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) protects against cystic pulmonary fibrosis associated-inflammation through inhibition of NF-κB and MAPK signaling [J]. Genes Genomics, 2019, 41(9): 1045-53.
- [11] 唐雨曦, 罗晨辉, 王瑛, 等. 人附睾蛋白 4 (HE4) 在恶性肿瘤中的表达与临床进展 [J]. 肿瘤药学, 2015, 5(2): 87-91.
- [12] Sha R, Badhulika S. Recent advancements in fabrication of nanomaterial based biosensors for diagnosis of ovarian cancer: a comprehensive review [J]. Mikrochim Acta, 2020, 187(3): 181.
- [13] Espiau R A, Cuesta G T, Benito V M, et al. HE4 tumor marker

- as a predictive factor for lymphatic metastasis in endometrial cancer [J]. *Int J Gynaecol Obstet*, 2020, 149(3): 265-8.
- [14] Ribeiro J R, Gaudet H M, Khan M, et al. Human epididymis protein 4 promotes events associated with metastatic ovarian cancer via regulation of the extracellular matrix [J]. *Front Oncol*, 2017, 7: 332.
- [15] 周岩, 宋伟杰, 张飞, 等. 人附睾蛋白4在乳腺癌发生发展中的机制研究 [J]. *天津医科大学学报*, 2015, 90(6): 466-8.

Effects of HE4 silencing on proliferation, invasion, apoptosis and JAK/STAT3 signaling pathway in colon cancer cells

Wang Tao, Wang Yifei, Li Lei, et al

(Dept of Gastrointestinal Surgery, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

Abstract Objective To explore the effect of silencing human epididymal protein 4 (HE4) on the proliferation, invasion, apoptosis and JAK/STAT3 signaling pathway of colon cancer cells. **Methods** 124 patients with colon cancer and 40 healthy people were selected. Western blot and immunohistochemical staining were used to detect the expression of HE4 in colon cancer and adjacent tissues. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the expression of HE4 in serum of patients with colon cancer and healthy people. Western blot was used to detect the expression of HE4 in colon cancer cell lines Caco-2, SW480, HT-29, HCT-116 and hcoepic. HT-29 cells were transfected with HE4 si-RNA or si-control respectively. Cell proliferation was detected by CCK-8 method, invasion ability was detected by Transwell assay, and apoptosis was detected by Annexin-V-FITC/PI flow cytometry. Western blot was used to detect the protein expression levels of JAK1, p-JAK1, JAK2, p-JAK2, STAT3 and p-STAT3. **Results** The relative expression of HE4 protein in colon cancer tissues was higher than that in adjacent tissues ($P < 0.05$). The expression of HE4 was positive in colon cancer tissues, of which 78 cases (62.90%) were highly expressed, while only 24 cases (19.35%) were overexpressed in the adjacent tissues ($P < 0.05$). The serum HE4 concentration in patients with colon cancer was higher than that in normal subjects ($P < 0.05$). The relative expression of HE4 protein in Caco-2, SW480, HT-29 and HCT-116 cells was higher than that in hcoepic cells (all $P < 0.05$). The expression level of HE4 was not related to gender, age and tumor size, but related to differentiation degree, TNM stage, lymph node metastasis and distant metastasis ($P < 0.05$). After silencing HE4 gene, the proliferation and invasion ability of HT-29 cells decreased, while the apoptosis rate increased ($P < 0.05$). Silencing HE4 gene had no effect on the total protein of JAK1, JAK2 and STAT3, but could down regulate the expression of p-JAK1, p-JAK2 and p-STAT3 (all $P < 0.05$). **Conclusion** Silencing HE4 can inhibit colon cancer cell proliferation, invasion, and apoptosis, and down-regulate the expression of related proteins in the JAK/STAT3 signaling pathway.

Key words human epididymis protein 4; colon cancer; proliferation; invasion; apoptosis; JAK; STAT3