

网络出版时间: 2020-12-2 10:35 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20201201.1526.011.html>

APE-1 对肝癌细胞裸鼠成瘤能力及 PKM2 表达的影响及机制探索

孙志鹏, 许光中*, 阿民布和, 樊庆, 彭吉润, 张能维

摘要 目的 探索脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶-1 (APE-1) 对肝癌细胞裸鼠成瘤能力及丙酮酸激酶 M2 (PKM2) 表达的影响及机制。方法 基于沉默 APE-1 表达的肝癌 Hep 3B 稳定细胞株, 进行 BALB/c-Nude 裸鼠皮下成瘤。APE-1 沉默组接种 APE-1 沉默表达的细胞, 对照组接种转染空白质粒的细胞, 每组 10 只裸鼠。8 周后处死裸鼠, 计算成瘤率, 完整剥离肿瘤组织, 称瘤体重量并计算肿瘤体积。免疫组化及 Western blot 法检测肿瘤组织中 APE-1 及细胞增殖标志蛋白增殖细胞核抗原 (PCNA)、核 Ki-67 抗原 (Ki-67) 表达。同样方法检测 PKM2 蛋白表达后, 基于 TCGA 数据库中 374 例肝癌患者数据, 分析 APE-1 与 PKM2 表达相关性, 并比较 PKM2 不同表达肝癌患者中生存曲线差异。结果 2 组裸鼠成瘤率均为 100%, APE-1 沉默组的肿瘤重量及体积均小于对照组 ($P < 0.05$)。APE-1 沉默组肿瘤组织中 APE-1、PCNA、Ki-67 和 PKM2 蛋白表达均低于对照组 ($P < 0.05$)。APE-1 和 PKM2 表达线性正相关 ($P < 0.001$), 且 PKM2 在肝癌患者中高表达组和低表达组整体生存曲线分布比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 低表达组生存期更长。结论 APE-1 可能通过影响 PKM2 抑制肝癌细胞裸鼠成瘤能力, 具有较强的抗肿瘤潜能。

关键词 APE-1; 肝癌; 裸鼠成瘤; PKM2 表达

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2020)12-1872-05
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.12.011

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是原发性肝癌中最常见的肿瘤, 目前主要治疗手段为手

术治疗, 且放化疗效果较差^[1]。同大部分肿瘤一样, HCC 的早期诊断和手术的比例仅 10% ~ 20%, 大多数患者在诊断时已是晚期或终末期^[2]。肝癌的发生由多种因素共同作用, 通过多种途径引起, 具体的发病机制尚不清楚。深入研究 HCC 的发病机制, 寻找关键性的分子作为分子治疗的靶点, 对于肝癌的治疗具有重要的意义。脱嘌呤脱嘧啶核酸内切酶-1 (apurinic-apyrimidinic endonuclease 1, APE-1) 是一种可以发挥 DNA 修复功能和氧化还原功能的蛋白, 可调节肿瘤相关途径的多种转录因子^[3]。前期基于细胞水平研究^[4]发现 APE-1 在肝癌组织和细胞中高表达, 且其高表达与 TNM 分期、组织病理分级存在差异, 沉默 APE-1 表达可降低肝癌细胞 Hep 3B 的增殖活性, 提高细胞凋亡率。该研究基于动物模型水平, 进一步探究 APE-1 对肝癌细胞裸鼠成瘤能力的影响及机制探索。

1 材料与方法

1.1 组织样本及主要试剂

1.1.1 实验动物及细胞 20 只 4 周龄 SPF 级 BALB/c 品系雄性健康裸鼠, 体质量 17 ~ 18 g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司。在首都医科大学附属北京世纪坛医院 (北京大学第九临床医学院) SPF 级实验动物房饲养。所有饲料、水、空气、铺垫物及各种用品均需经过高温高压等灭菌处理。裸鼠处死取材后, 用于免疫组化的样品保存于组织固定液中, 用于 Western blot 的组织立即转入液氮保存。沉默 APE-1 表达的肝癌 Hep 3B 稳定细胞株及其对照由实验室构建后保存^[4]。

1.1.2 主要试剂 SP-0023-SP 免疫组化检测试剂盒购自北京索莱宝公司; APE-1 (ab189474, 免疫组化 1 : 500; Western blot 1 : 1 000)、增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) (ab92552, 免疫组化 1 : 500; Western blot 1 : 2 000)、Ki-67 (ab16667, 免疫组化 1 : 200; Western blot 1 : 1 000) 和 PKM2 (ab137852, 免疫组化 1 : 300; Western blot 1 : 2 000) 一抗抗体、GAPDH (ab181602, Western blot

2020-07-20 接收

基金项目: 中国铁路总公司科技研究开发课题 (编号: J2017Z609); 首都医科大学附属北京世纪坛医院医院课题基金 (编号: 2019-C10); 首都医科大学肿瘤治疗性疫苗北京市重点实验室开放课题 (编号: 2019-KF02); 北京市教委科技计划一般项目 (编号: KM202010025008)

作者单位: 首都医科大学附属北京世纪坛医院 (北京大学第九临床医学院) 胃肠肝胆肿瘤外科, 北京 100038

作者简介: 孙志鹏, 男, 主治医师, 博士;

彭吉润, 男, 主任医师, 博士, 责任作者, E-mail: pengjr@medmail.com.cn;

张能维, 男, 主任医师, 博士, 责任作者, E-mail: zhangnw1@sohu.com

* 对本文具有同等贡献

1:10 000) 抗体购自英国 abcam 公司; 蛋白提取 RIPA 裂解液、蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂购自江苏碧云天公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与收集 复苏沉默 APE-1 和对照组肝癌 BEL-7402 细胞, 使用 RPMI-1640 完全培养基培养液(含 10% FBS + 1% 双抗), 在 37 °C, 5% CO₂ 细胞培养箱里培养, 待细胞铺满培养瓶的瓶底时, 用 5% 胰蛋白酶消化细胞, 优质胎牛血清终止消化, 轻轻吹打至细胞全部离壁, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃上清液。再用生理盐水洗涤细胞 2 次。洗涤完成后生理盐水重悬细胞, 调整细胞浓度为 1×10^7 /ml, 备皮下成瘤用。

1.2.2 模型制备 SPF 条件下 20 只 BALB/c-Nude 裸鼠适应性饲养 2 周, 待至第三周时将裸鼠随机均分为 2 组, 分别编号。裸鼠右侧腋窝皮下接种注射 1×10^7 /ml 细胞悬液 200 μ l。接种细胞悬液 8 周后脱臼处死裸鼠, 计算成瘤率。完整剥离肿瘤组织, 称瘤体质量并计算肿瘤体积。肿瘤体积(mm^3) = $1/2$ (长径 \times 短径 \times 短径)

1.2.3 免疫组化检测 APE-1、PCNA、Ki-67 和 PKM2 在 2 组成瘤组织中表达。组织经过切片、水化、抗原修复, 分别滴加一抗和二抗, DAB 显色, 中性树胶封片。光学显微镜拍照, 采用 IPP 软件对图片进行积分光吸光度(integrated option density, IOD) 分析。

1.2.4 Western blot 检测蛋白表达 收集 2 组成瘤组织, RIPA 蛋白裂解液提取蛋白, Bradford 法蛋白定量。SDS-PAGE 凝胶电泳后 NC 膜恒流湿法进行转膜。转膜成功的 NC 膜转移到 5% 脱脂奶粉-TBST 封闭液于室温封闭 1 h。再将 PVDF 膜分别加入稀释的 APE-1、PCNA、Ki-67、PKM2 和 GADPH 一抗, 4 °C 轻摇过夜; 随后加入相应的二抗(1:2 000), 37 °C 恒温摇床孵育 1 h。蛋白的相对表达量用待测蛋白与 GADPH 的灰度值比值计算。

1.2.5 基因表达相关性和生存曲线分析 基于 TCGA 数据库中 374 例肝癌患者数据, 通过可视化 GEPIA 软件(<http://starbase.sysu.edu.cn/panGene-CoExp.php>)^[5] 分析 APE-1 和 PKM2 表达相关性及其生存曲线分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 进行统计分析, 采用 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述。组间差异采用单因素方差分析进行比较, 如方差分析结果显示组间差异有统计学意义, 则进一步采用 *t* 检验进行组间差异的两两比较。APE-1 和 PKM2 表达量的关系采用

Spearman 相关分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 APE-1 沉默抑制肝癌细胞裸鼠成瘤能力 饲养至第 8 周, 2 组裸鼠成瘤率均为 100%, 且体重呈现增长后趋于平稳趋势, 成瘤体积呈现持续增长趋势。结果显示 APE-1 沉默组的裸鼠体质量及成瘤体积均小于对照组($P < 0.01$), 见图 1。第 8 周末处死裸鼠, 称量瘤体重量并计算肿瘤体积, 结果显示 APE-1 沉默组和对照组瘤体重量分别为(0.203 ± 0.028)、(1.00 ± 0.105) g, 肿瘤体积分别为(0.209 ± 0.039)、(0.921 ± 0.148) cm^3 ; APE-1 沉默组成瘤重量及体积均小于对照组($F = 13.65$ 、 $P < 0.01$, $F = 14.00$ 、 $P < 0.01$), 见图 2。

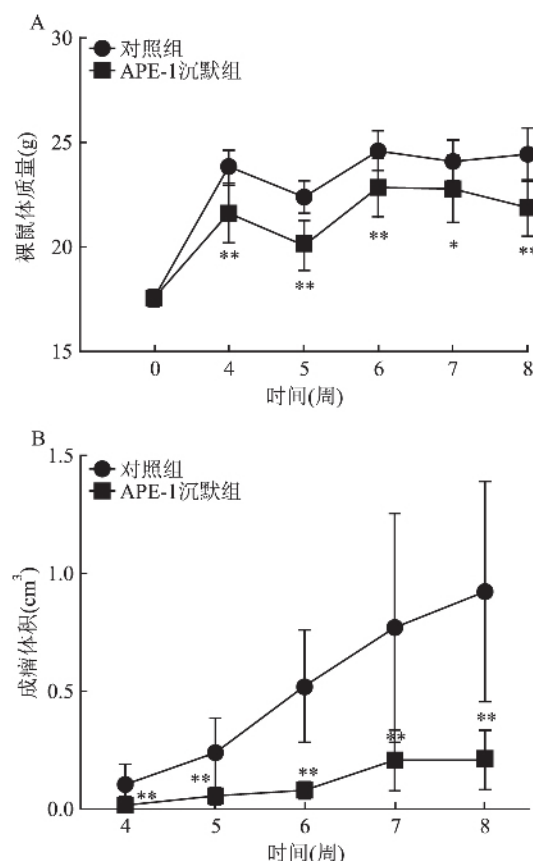


图1 成瘤过程中2组裸鼠体质量及成瘤体积
与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 成瘤组织中 APE-1、PCNA、Ki-67 和 PKM2 表达检测 免疫组化和 Western blot 方法检测 2 组成瘤组织中 APE-1, 细胞增殖标志性蛋白 PCNA、Ki-67 和 PKM2 的表达。结果显示 APE-1 沉默组中蛋白表达均小于对照组($P < 0.05$), 见图 3、图 4。

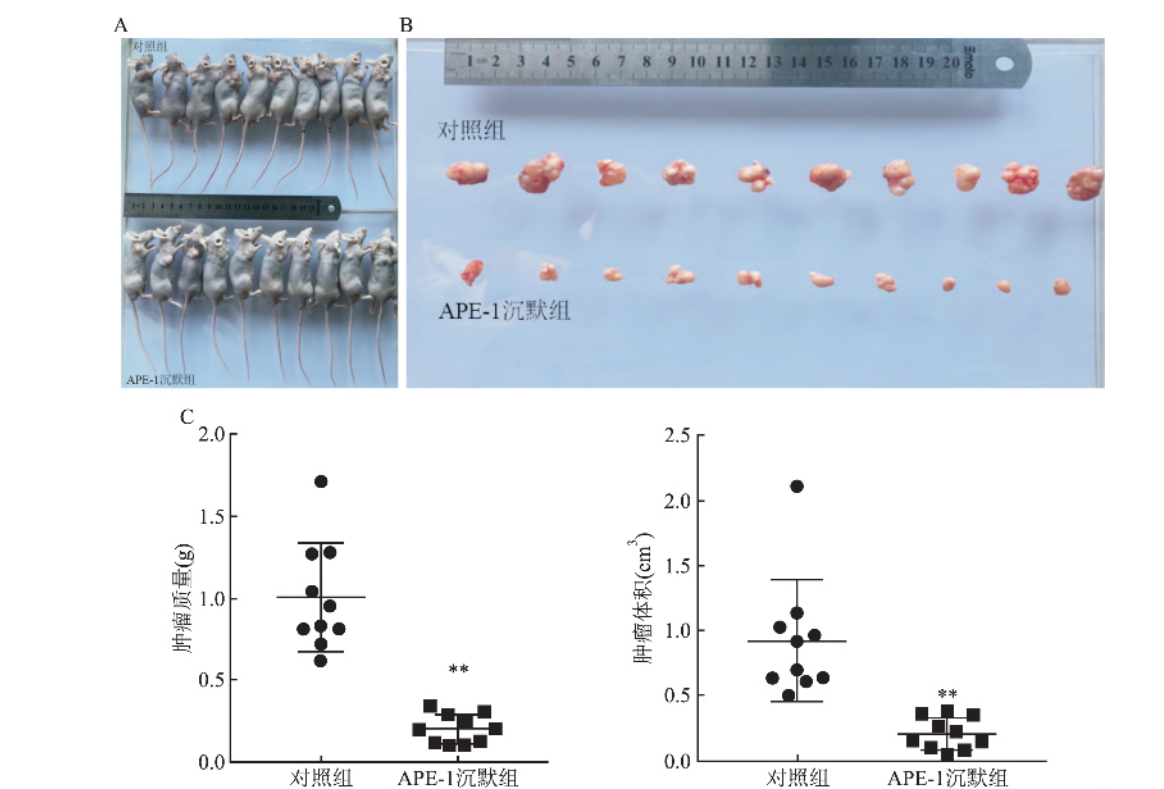


图2 2组裸鼠成瘤瘤体质量及体积比较

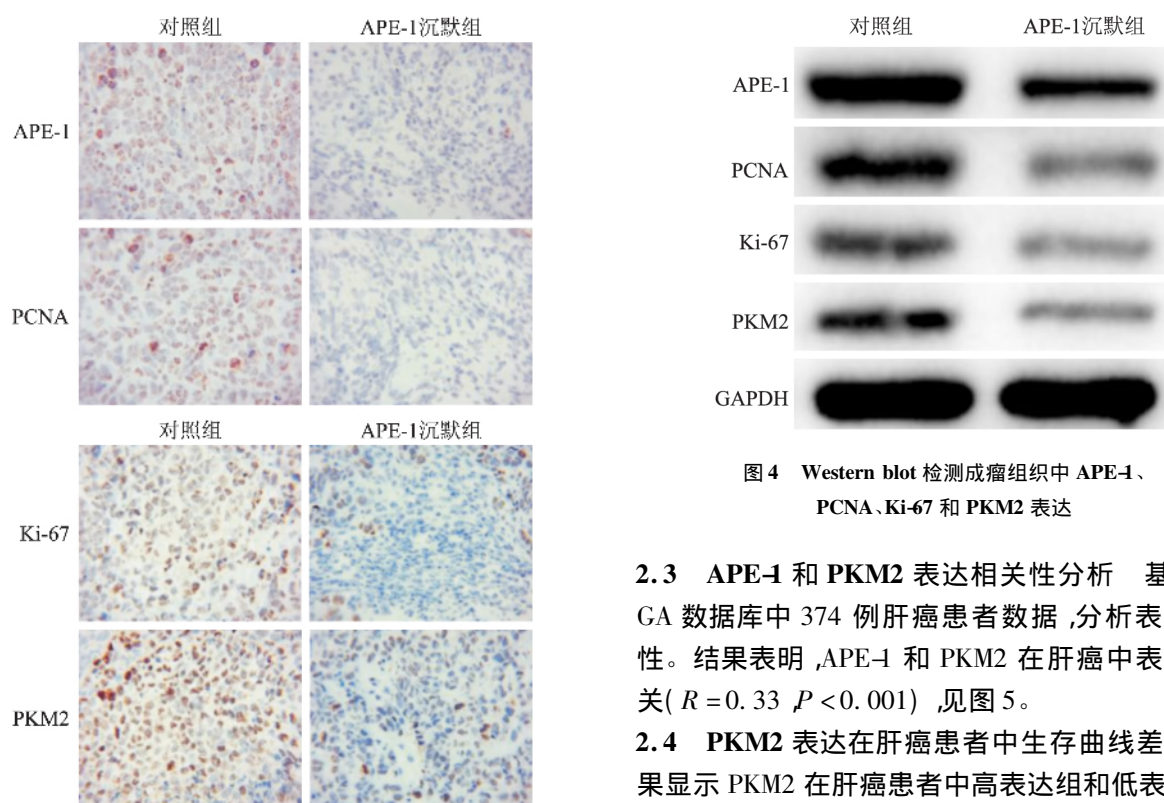
A: 2组裸鼠; B: 2组裸鼠瘤体; C: 2组裸鼠瘤体的质量以及体积比较; 与对照组比较: $**P < 0.01$ 

图4 Western blot 检测成瘤组织中 APE-1、PCNA、Ki-67 和 PKM2 表达

图3 免疫组化检测成瘤组织中 APE-1、PCNA、Ki-67 和 PKM2 表达 $\times 100$

2.3 APE-1 和 PKM2 表达相关性分析 基于 TC-GA 数据库中 374 例肝癌患者数据, 分析表达相关性。结果表明, APE-1 和 PKM2 在肝癌中表达正相关 ($R = 0.33$, $P < 0.001$), 见图 5。

2.4 PKM2 表达在肝癌患者中生存曲线差异 结果显示 PKM2 在肝癌患者中高表达组和低表达组整体生存曲线分布比较差异有统计学意义 ($P < 0.001$), 低表达组生存期更长, 见图 6。

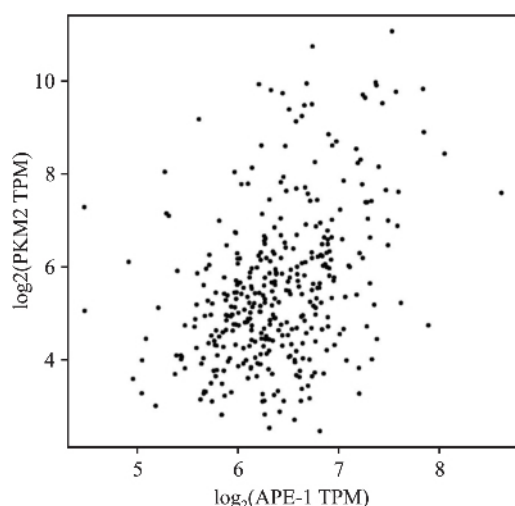


图5 APE-1 和 PKM2 表达相关性分析

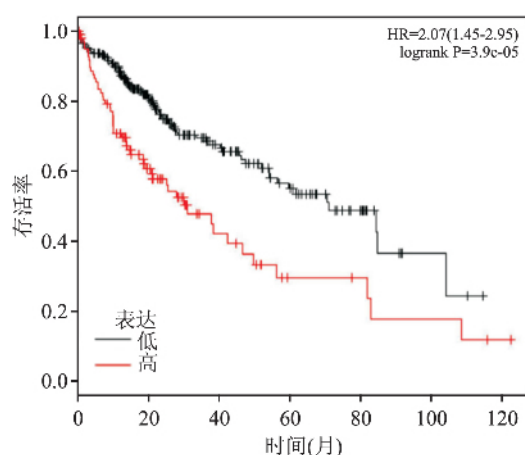


图6 PKM2 表达在肝癌患者中生存曲线差异

3 讨论

HCC 是预后较差的肿瘤之一,其在分子水平上由多种遗传、表观遗传和信号通路的失调,与肿瘤微环境相互作用导致肿瘤的发生、进展和转移^[6]。氧化还原因子 APE-1 已经被证实在多种肿瘤发生发展中发挥关键作用^[7]。Choi et al^[8]通过检测 277 例膀胱癌(BCa)患者尿液中 APE-1 表达,发现 BCa 患者的 APE-1 水平显著升高,并且与肿瘤分级和分期相关,暗示基于无创获得的体液测量尿 APE-1 水平在临床上可用于诊断 BCa;这与 Shin et al^[9]研究成果血清 APE-1 可用作膀胱癌的潜在血清生物标志物一致。

在肝癌研究中,Di Maso et al^[10]通过临床样本证实 APE-1 mRNA 含量随着肝病的进展而增加,肝癌中 APE-1 转录水平的上调显著增加。本课题组前期研究结果显示 APE-1 在肝癌组织和细胞中均表达升高,其表达与 TNM 分期、组织病理分级存在

差异。沉默 APE-1 表达可降低肝癌细胞 Hep 3B 细胞增殖活性,提高细胞凋亡率。APE-1 在肝癌细胞中表现出了较强的抗肿瘤潜能^[4]。与其它有关 APE-1 研究进展一致。

裸鼠肿瘤模型由于其保留原发肿瘤本身的形态特征及遗传性,是研究人类肿瘤生物特性以及肿瘤治疗的常用手段;且因为裸鼠肿瘤模型具有成瘤率高、均一性好,能够准确反应肿瘤的生物学特性等优点,因此通过培养瘤细胞来建立裸鼠皮下移植瘤模型,可以为肿瘤治疗的相关研究提供可靠的动物模型。基于前期细胞水平研究,通过建立裸鼠成瘤模型探索 APE-1 对肝癌发生的影响。结果显示在动物体内成瘤过程中,APE-1 沉默组的裸鼠体质量及成瘤重量/体积均小于对照组,表明 APE-1 沉默抑制肝癌细胞成瘤能力。增殖细胞核抗原 PCNA 与细胞 DNA 合成关系密切,在细胞增殖的启动上起重要作用,是反映细胞增殖状态的良好指标^[11];Ki67 是一种增殖细胞相关的核抗原,其功能与有丝分裂密切相关,在细胞增殖中不可缺少,其表达越高,说明细胞增殖越活跃,肿瘤生长越快,组织分化越差,对化疗也越敏感^[12]。通过免疫组化检测成瘤组织,显示 APE-1 沉默组中细胞增殖标志蛋白 PCNA、Ki-67 表达均小于对照组,暗示成瘤抑制作用是由沉默 APE-1 降低肝癌细胞 Hep 3B 细胞增殖活性所导致的,与前期研究基础一致^[4]。

此外还显示 APE-1 沉默组肿瘤组织中 PKM2 蛋白表达低于对照组。丙酮酸激酶 M2,也称为 PKM,是糖酵解过程最后一步的限速酶。PKM2 以无活性单体、低活性二聚体和活性四聚体形式存在,通过高活性四聚体及低活性二聚体之间的转换,调节肿瘤细胞能量和底物供给之间的平衡,对于肿瘤发生至关重要^[13]。Dayton et al^[14]通过构建 PKM2 缺失小鼠,发现 PKM2 的丧失导致具有高渗透性的 HCC 的自发发展,并伴随着以系统性葡萄糖稳态、炎症和脂肪变性改变为特征的全身代谢的逐步变化。基于癌症和 TCGA 肿瘤标本数据库中 374 例肝癌患者数据,证明 APE-1 和 PKM2 表达线性正相关,且 PKM2 在肝癌患者中高表达组和低表达组整体生存曲线分布比较差异有统计学意义,低表达组生存期更长。暗示 PKM2 作为抑癌基因,APE-1 可能通过影响 PKM2 抑制肝癌细胞裸鼠成瘤能力。

综上所述,APE-1 在体内同样具有较强的抗肿瘤潜能,其可能通过影响 PKM2 抑制肝癌细胞裸鼠成瘤能力。

参考文献

- [1] Budny A, Kozłowski P, Kamińska M, et al. Epidemiology and risk factors of hepatocellular carcinoma[J]. *Pol Merkuriusz Lekarski*, 2017, 43(255): 133–9.
- [2] Sapisochin G, Bruix J. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: outcomes and novel surgical approaches[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2017, 14(4): 203–17.
- [3] Pei D S, Jia P P, Luo J J, et al. AP endonuclease 1(Apex1) influences brain development linking oxidative stress and DNA repair[J]. *Cell Death Dis* 2019, 10(5): 348.
- [4] 孙志鹏, 朱昱冰, 阿民布和, 等. APE1 在肝癌中的差异表达及其对肝癌细胞增殖、凋亡的影响[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2018, 47(6): 660–5.
- [5] Tang Z, Li C, Kang B, et al. GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses[J]. *Nucleic Acids Res* 2017, 45(W1): W98–102.
- [6] Kudo M. Systemic therapy for hepatocellular carcinoma: 2017 update[J]. *Oncology* 2017, 93(1): 135–46.
- [7] Choi S, Joo H K, Jeon B H. Dynamic regulation of APE1/Ref-1 as a therapeutic target protein[J]. *Chonnam Med J*, 2016, 52(2): 75–80.
- [8] Choi S, Shin J H, Lee Y R, et al. Urinary APE1/Ref-1: a potential bladder cancer biomarker[J]. *Dis Markers*, 2016, 2016: 7276502.
- [9] Shin J H, Choi S, Lee Y R, et al. APE1/Ref-1 as a serological biomarker for the detection of bladder cancer[J]. *Cancer Res Treat* 2015, 47(4): 823–33.
- [10] Di Maso V, Mediavilla M G, Vascotto C, et al. Transcriptional up-regulation of APE1/Ref-1 in hepatic tumor: role in hepatocytes resistance to oxidative stress and apoptosis[J]. *PLoS One* 2015, 10(12): e0143289.
- [11] Ripley B M, Gildenberg M S, Washington M T. Control of DNA damage bypass by ubiquitylation of PCNA[J]. *Genes(Basel)*, 2020, 11(2): 138.
- [12] 王圣坦, 朱根海, 洪 澜, 等. 长链非编码 CCAT1 靶向 miR-219a 对宫颈癌 Hela 细胞生长、侵袭和迁移的调节作用[J]. *安徽医科大学学报* 2018, 53(9): 1348–53.
- [13] Li Y H, Li X F, Liu J T, et al. PKM2, a potential target for regulating cancer[J]. *Gene* 2018, 668: 48–53.
- [14] Dayton T L, Gocheva V, Miller K M, et al. Germline loss of PKM2 promotes metabolic distress and hepatocellular carcinoma[J]. *Genes Dev* 2016, 30(9): 1020–33.

Effect of APE-1 on tumorigenic ability and expression of PKM2 in hepatocellular carcinoma nude mice and its mechanism

Sun Zhipeng, Xu Guangzhong, A minbuhe, et al

(Dept of Oncology Surgery, Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038)

Abstract Objective To explore the effect of apurinic-apyrimidinic endonuclease 1(APE-1) on the tumorigenic ability and PKM2 expression of hepatocellular carcinoma cells in nude mice and its mechanism. **Methods** Based on silencing APE-1 expression of hepatocellular carcinoma Hep 3B stable cell line, BALB/c-Nude nude mice were subcutaneously tumorigenic. The APE-1 silencing group was inoculated with APE-1 silenced cells, and the control group was inoculated with cells transfected with blank plasmids, 10 nude mice per group. After 8 weeks, the nude mice were sacrificed, the tumor formation rate was calculated, the tumor tissue was completely excised, the tumor weight was weighed, and the tumor volume was calculated. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of APE-1 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 in tumor tissues. After detecting the expression of PKM2 protein, based on the data of 374 patients with liver cancer in the TCGA database, the correlation between APE-1 and PKM2 expression was analyzed, and the difference in survival curves of PKM2 expression was compared. **Results** The tumor formation rate of the nude mice in both groups was 100%. The tumor weight and volume of the APE-1 silenced group were lower than those of the control group ($P < 0.05$). The expressions of APE-1, PCNA, Ki-67 and PKM2 in APE-1 silencing group were lower than those in the control group ($P < 0.05$). There was a linear positive correlation between APE-1 and PKM2 expression ($P < 0.001$), and there was a difference in the overall survival curve between PKM2 in the high expression group and the low expression group ($P < 0.001$). The low expression group had a longer survival time. **Conclusion** APE-1 may inhibit the tumorigenic ability of hepatocarcinoma cells in nude mice by affecting PKM2, which has strong anti-tumor potential.

Key words APE-1; liver cancer; tumor formation in nude mice; expression of PKM2