

网络出版时间: 2019-1-11 14:06 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.014.html>

HK2 在肝癌中的差异表达及其对肝癌细胞的影响

张宇¹ 蒙轩² 王勋²

摘要 目的 探究己糖激酶 2 (HK2) 在肝癌组织中的差异表达及其对肝癌细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡的影响。方法 收集 48 例肝癌组织及对应的癌旁组织,免疫组化检测 HK2 表达量;Western blot 法检测人肝癌细胞 HepG2 及正常肝细胞 L-02 中 HK2 表达量。统计并分析 HK2 表达与肝癌临床病理特征关系。构建 4 个 HK2 小发卡 RNA (shRNA) 载体,Western blot 法检测干扰效率,选择沉默最优的建立稳定转染的细胞株。针对空白组(正常培养、未转染质粒)、control shRNA 组(转染 control shRNA)、HK2 shRNA 组(转染 shRNA_3) HepG2 细胞,MTT 法检测细胞增殖活性,流式细胞仪检测细胞周期,Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡。结果 HK2 在肝癌组织中表达显著升高,其表达与肿瘤直径、TNM 分期、组织病理分级存在相关性。HK2 表达的降低可显著降低 HepG2 细胞增殖活性,使得细胞周期发生明显转变,更少停滞在 S 期;显著升高 HepG2 细胞凋亡率。结论 HK2 表现出了较强的抗肿瘤潜能,具有一定的临床意义,为将来基于 HK2 进行肝癌临床诊断、预后判断及分子靶向治疗提供新的思路 and 理论依据。

关键词 HK2;肝细胞癌;shRNA 沉默

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)02-0231-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.014

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种临床上高死亡率的原发性肝癌^[1-2]。癌细胞的失控生长是癌症高致死率的主要原因,探讨肝癌发生发展分子机制,寻找肝细胞癌恶性增殖的生物标志和干预治疗靶点,已成为近年来肝癌研究的热点^[3]。研究^[4]表明己糖激酶(hexokinase, HK)是生

物糖酵解途径限速酶,己糖激酶 2 (HK2) 与诸多恶性肿瘤发生存在关系。目前 HK2 与肝癌发生发展的关系少见报道,通过高通量测序发现其可能高表达,但缺乏深入的研究^[5]。该研究旨在探讨 HK2 在肝癌中的表达特点并分析其表达与临床特征参数的关系,检测其对肝癌高转移细胞株 HepG2 细胞增殖、周期、凋亡的影响。

1 材料与方法

1.1 组织样本及主要试剂

1.1.1 病例资料及实验细胞 选取 2015 年 6 月~2018 年 10 月中国人民解放军总医院肝胆外科、中国人民解放军第 302 医院肝胆外科肝细胞肝癌手术患者,共计 48 例,取肝癌组织(非坏死区肿瘤组织)及癌旁组织(距肿瘤边缘 2 cm 肝硬化组织,约 0.5 cm×0.5 cm×0.5 cm)。所有新鲜组织获取后立即转入液氮固定。人肝癌高转移细胞株 HepG2 细胞购自北京协和基础研究所细胞中心。

1.1.2 主要试剂 蛋白提取 RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、SDS-PAGE 凝胶配制试剂、细胞周期检测碘化丙啶染色试剂购自江苏碧云天公司;细胞转染试剂 Lipo 3000 购自美国 Invitrogen 公司;Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒购自江苏凯基生物公司;HK2 抗体、GAPDH 抗体购自英国 abcam 公司。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化检测肝癌组织 HK2 表达量 所有组织标本(48 例肝癌组织,48 例癌旁组织)常规甲醛固定及石蜡包埋,将蜡块切成 5 μm 厚的组织切片,覆盖于预先经过防脱处理的载玻片上,经过烤片、水化、抗原修复,分别滴加一抗和二抗,DAB 显色,中性树脂封片。光学显微镜拍照,采用 IPP 软件对图片进行积分光密度(integrated optical density, IOD)值。

1.2.2 HK2 shRNA 载体构建 设计并合成 4 对小发卡 RNA(short hairpin RNA, shRNA)序列,分别命名为 shRNA_1、shRNA_2、shRNA_3、shRNA_4,其序列见表 1。克隆连接实验室改造的 pLKO.1-GFP 质

2018-09-27 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81502376);北京市自然科学基金面上项目(编号:7172201);北京市科技新星计划(编号:Z181100006218089)

作者单位:¹中国人民解放军第 302 医院肝胆外科,北京 100039

²中国人民解放军总医院肝胆外科,北京 100853

作者简介:张宇,男,主治医师,硕士;

王勋,男,主治医师,博士,责任作者,E-mail: wangx-un8346@sina.com;

蒙轩,男,主治医师,博士,责任作者,E-mail: mengxu-an301@yeah.net

表 1 4 对候选 HK2 shRNA 序列

ShRNA 名称	序列信息(5'-3')
shRNA_1	F: CCGGTGGAGCTCAACCATGACCAATTCAAGAGATTGGTCATGGTTGAGCTCCTTTTTTG
shRNA_1	R: AATTCAAAAAAGGAGCTCAACCATGACCAATCTCTTGAATTGGTCATGGTTGAGCTCCA
shRNA_2	F: CCGGTGCAGAAAGGTTGACCACTATTTCAGAGAAATACTGGTCAACCTTCTGCTTTTTTG
shRNA_2	R: AATTCAAAAAAGCAGAAAGGTTGACCACTATTCTCTTGAATACTGGTCAACCTTCTGCA
shRNA_3	F: CCGGTGGAGATGGAGAAAGGGCTTTTCAAGAGAAAGCCCTTTCTCCATCTCCTTTTTTG
shRNA_3	R: AATTCAAAAAAGGAGATGGAGAAAGGGCTTTCTCTTGAAGAAAGCCCTTTCTCCATCTCCA
shRNA_4	F: CCGGTGGACAGAACACGGAGAGTTTCAAGAGAAACTCTCCGTGTTCTGCTTTTTTG
shRNA_4	R: AATTCAAAAAAGGACAGAACACGGAGAGTTTCTCTTGAAGAACTCTCCGTGTTCTGCTCCA

粒。测序验证后,转染至 HepG2 细胞。

1.2.3 Western blot 检测 HK2 表达 收集人正常肝细胞 L-02、人肝癌细胞 HepG2; 以及 control RNA、shRNA_1、shRNA_2、shRNA_3、shRNA_4 组 HepG2 细胞, RIPA 细胞蛋白裂解液提取蛋白, BCA 法用于蛋白定量。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 NC 膜分别加入稀释的 HK2 和 GADPH 一抗 4 °C 轻摇过夜; 随后加入相应的二抗(1:100 稀释) 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。

1.2.4 MTT 法检测细胞增殖 将空白组(正常培养、未转染质粒)、control shRNA 组(转染 control shRNA)、HK2 shRNA 组(转染 shRNA_3) HepG2 细胞稳定培养后传代于 96 孔板, 完全培养基培养, 分别于第 0、24、36、72 小时进行 MTT 检测。每组 4 个复孔。96 孔板每孔加入 20 μ l MTT(5 mg/ml PBS 溶解), 孵育 4 h 然后弃除上清液。每孔里面再加入 150 μ l Formazan 溶解液, 振荡 10 min, 充分溶解结晶物。酶标仪(570 nm)测定吸光度(optical density, OD)值。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期 各组细胞完全培养基培养, 用胰酶消化收集细胞, 加入 1 ml 75% 预冷乙醇中, 吹打均匀 4 °C 固定 12 h 以上, 再加入 PBS 洗涤, 1 000 r/min 离心 5 min, 清洗 2 次。重悬细胞用 0.5 ml PBS, 每孔加入 PI 和 RNaseA 至终浓度 50 μ g/ml 37 °C 温浴 30 min。流式细胞仪检测细胞周期。

1.2.6 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测细胞凋亡 收集各组细胞, 置于 100 目铜网上轻搓, 生理盐水冲洗 2 500 r/min 离心弃去上清液及细胞碎片, 收集细胞悬液。参照 Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒说明, 通过流式细胞仪进行分析。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 17.0 软件进行统计

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。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HK2 在肝癌中差异表达 免疫组化结果显示: 相对于癌旁组织, HK2 在肝癌组织中表达显著升高; IOD 值量化结果表明肝癌组织中 HK2 相对表达值为 (643.00 ± 79.17) , 癌旁组织中 HK2 相对表达值为 (441.80 ± 31.32) , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1A。Western blot 结果显示: 相对于人正常肝细胞 L-02, HK2 在人肝癌细胞 HepG2 中表达显著升高; 灰度值量化结果表明 L-02 细胞 HK2 相对表达值为 (1.08 ± 0.14) , HepG2 中 HK2 相对表达值为 (1.46 ± 0.18) , 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见图 1B。

2.2 HK2 表达与肝癌临床病理特征关系 48 例肝组织中 HK2 表达与患者性别、年龄、血清甲胎蛋白(alpha-feto protein, AFP)含量、乙肝表面抗原(Hepatitis B surface antigen, HBsAg)感染差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 与肿瘤直径、TNM 分期、组织病理分级差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。

2.3 HepG2 细胞中 HK2 沉默表达与效率评价 Western blot 检测 HK2 shRNA_1、shRNA_2、shRNA_3、shRNA_4 转染 HepG2 细胞后 HK2 蛋白表达情况: HK2 shRNA_3 沉默效率最佳, 其 HK2 蛋白表达均显著低于 control shRNA 组。建立稳定转染的细胞株 HK2 shRNA、control shRNA, 荧光显微镜检测转染效率, 用于后面实验检测。见图 2。

2.4 沉默 HK2 表达对肝癌 HepG2 细胞增殖的影响 MTT 法检测各组细胞增殖活性: 48 h 起, HK2 shRNA 组细胞增殖活性明显低于 control shRNA 组和空白组, 72 h 时差异有统计学意义 ($F = 55.6, P < 0.01$), 空白组 HepG2 细胞和 control shRNA 组细胞

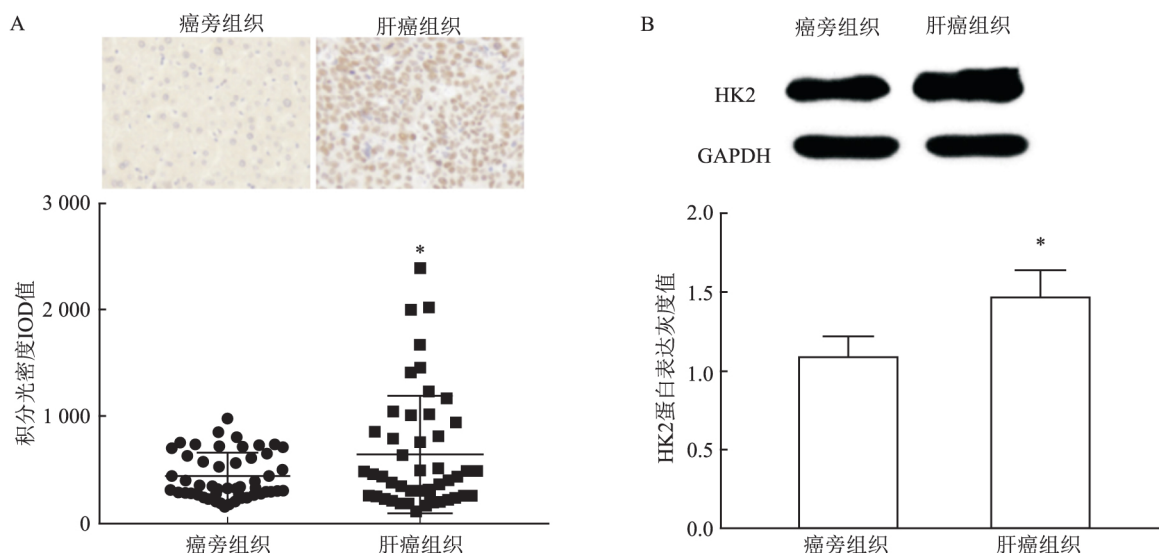


图1 HK2在肝癌中差异表达

A:免疫组化 ×200;B:Western blot 检测;与癌旁组织比较:* $P < 0.05$

增殖活性差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图3。表明 HK2 表达的降低可显著降低 HepG2 细胞增殖活性。

2.5 沉默 HK2 表达对肝癌 HepG2 细胞周期的影响 流式细胞仪检测各组细胞周期: HK2 shRNA 组、control shRNA 组、空白组 S 期细胞百分比分别

表2 HK2 表达与肝癌临床病理特征关系 (n)

项目	n	HK2 表达		χ^2 值	P 值
		阳性表达 ($n = 27$)	阴性表达 ($n = 21$)		
性别					
男	40	22	18	0.152	0.696
女	8	5	3		
年龄(岁)					
≤50	26	15	11	0.048	0.827
>50	22	12	10		
肿瘤直径(cm)					
≤5	22	9	13	3.884	0.048
>5	26	18	8		
TNM 分期					
I ~ II	19	7	12	4.813	0.028
III ~ IV	29	20	9		
组织病理分级					
良(I)	5	0	5	9.351	0.009
中(II、III)	32	18	14		
差(IV)	11	9	2		
血清 AFP(ng/ml)					
≤400	31	17	14	0.071	0.790
>400	17	10	7		
HBsAg					
阳性	40	22	18	0.152	0.696
阴性	8	5	3		

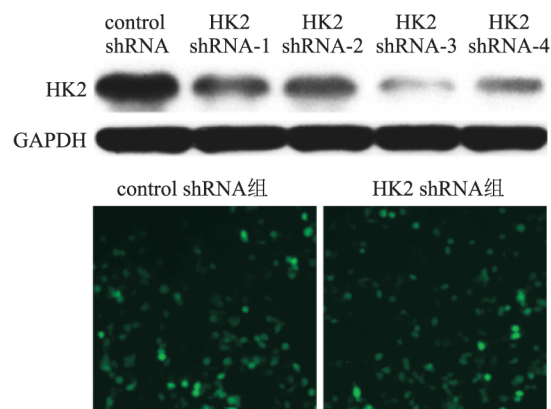


图2 HepG2 细胞中 HK2 沉默表达与效率评价

为 ($24.48\% \pm 4.25\%$)、($32.32\% \pm 3.98\%$)、($38.68\% \pm 5.17\%$) 经单因素方差分析, 组间差异有统计学意义 ($F = 7.51$, $P < 0.05$)。表明 HK2 shRNA 组细胞更少停滞在 S 期, 细胞周期发生明显转变, 见图4。

2.6 沉默 HK2 表达对肝癌 HepG2 细胞凋亡的影响 Annexin V-FITC/PI 双标记法检测各组细胞凋亡: HK2 shRNA 组、control shRNA 组、空白组的细胞总凋亡率分别为分别为 ($17.74 \pm 2.67\%$)、($8.97 \pm 1.02\%$)、($6.83 \pm 0.95\%$) 经单因素方差分析, 组间差异具有统计学意义 ($F = 33.16$, $P < 0.01$)。HK2 表达的降低可显著升高 HepG2 细胞凋亡率, 且与 control shRNA 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。空白组 HepG2 细胞和 control shRNA 组细胞凋亡率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图5。提示 HK2 可能通过抑制凋亡促进肿瘤生长。

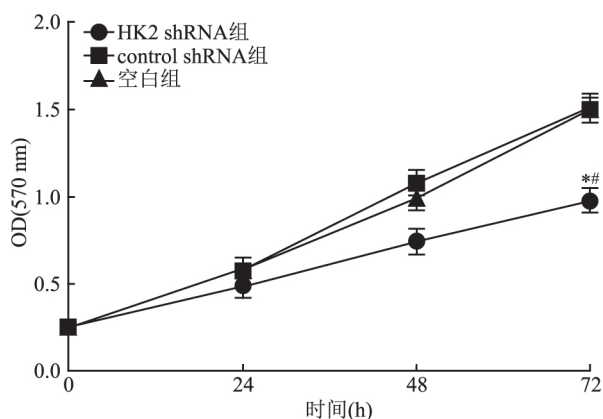


图3 沉默HK2表达对肝癌HepG2细胞增殖的影响
与空白组比较: * $P < 0.05$; 与 control shRNA 组比较: # $P < 0.05$

3 讨论

HK2 作为机体糖酵解途径的第一个关键限速酶,其与线粒体外膜电压依赖性阴离子通道蛋白相结合促进糖酵解的发生和肿瘤细胞的形成^[6],HK2 在肿瘤发生进展中的作用及如何抑制 HK2 成为了当前研究的热点。研究^[7]表明 HK2 的表达与喉鳞癌肿瘤部位、临床分期有关,在声门上型喉鳞癌标本中 HK2 多呈高表达,而在声门型喉鳞癌中多呈中到

低度表达, HK2 表达随肿瘤分期的升高而增加。此外,多项研究^[8-9]表明应用 HK2 抑制剂如 3-溴丙酮酸(3-Bromopyruvic acid, 3BrPA)、2-脱氧-D-葡萄糖,在肿瘤细胞和动物模型中有效干预了肿瘤的进程。研究^[10]表明 3-BrPA 可以削弱 HepG2 细胞有氧糖酵解相关基因及关键酶的表达,抑制葡萄糖下游步骤和谷氨酰胺代谢,发挥抗肿瘤作用。

随着分子生物学技术的迅猛发展,一些新手段用于靶向干预 HK2,如 shRNA 技术。shRNA 由于其高度的序列专一性,可以实现特异性沉默特定基因的表达,已被广泛用于探索基因功能及恶性肿瘤基因治疗领域^[11-12]。有学者^[13]针对己糖激酶基因(HK1、HK2、HK3)在结直肠癌(HT-29、SW 480、HCT-15、RKO、HCT 116)和黑色素瘤(MDA-MB-435S 和 SK-MEL-28)细胞系中使用 shRNA 病毒载体沉默,分别转染或共转染后结果显示 HK2 沉默失活与结直肠癌细胞系中 HK1 的表达增加有关, HK1 和 HK2 同时表达衰减导致细胞活力下降,共转染 HK1、HK2 和 HK3 shRNA 可导致细胞迅速凋亡,提示 HK1 和 HK2 同时失活足以减少黑色素瘤和结直肠癌细胞的增殖和存活,其可作为癌症潜在治疗靶

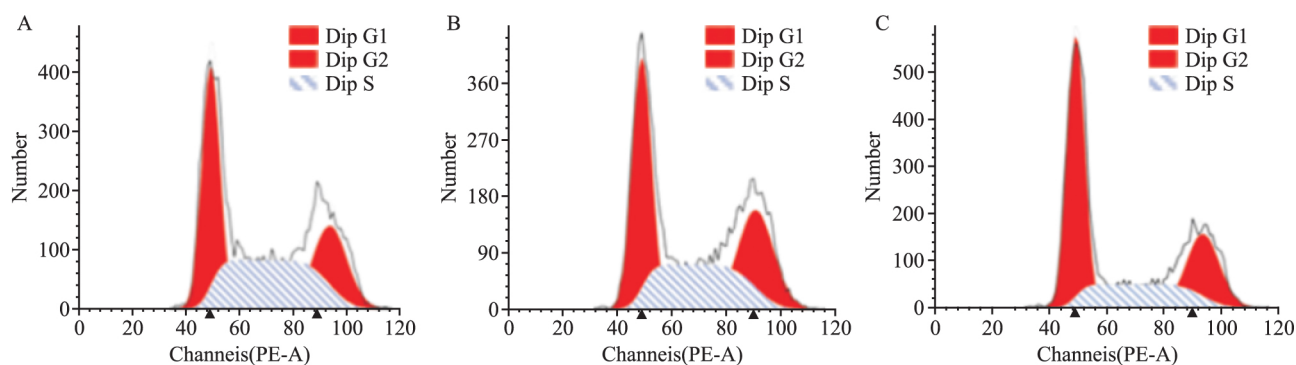


图4 沉默HK2表达对肝癌HepG2细胞周期的影响
A:空白组;B:control shRNA 组;C:HK2 shRNA 组

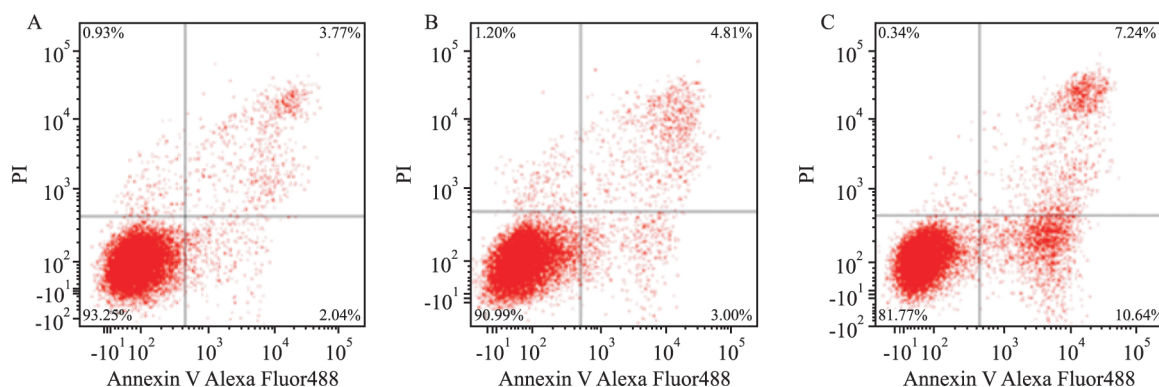


图5 沉默HK2X表达对肝癌HepG2细胞凋亡的影响
A:空白组;B:control shRNA 组;C:HK2 shRNA 组

点。张丹等^[14]观察 shRNA 沉默 HK2 对乳腺癌细胞 MDA-MB231 放疗敏感性的影响,结果表明给予不同剂量的 X 线照射后,细胞存活率呈剂量依赖性递减的趋势,且 shRNA 处理组的存活率较对照组明显下降,细胞凋亡率明显高于对照组,表明沉默乳腺癌细胞 HK2 基因可增加其对放疗的敏感性。

由于当前尚无有关 HK2 与肝细胞肝癌发生发展关系的研究报道,本研究通过沉默 HK2 研究其在人肝癌高转移细胞株 HepG2 中功能。首先,通过检测肝癌组织和细胞中 HK2 蛋白表达,结果显示 HK2 在肝癌组织中表达显著升高,与 Zhang et al^[5]通过高通量测序手段发现 HK2 可能在肝细胞肿瘤中高表达结论一致。临床病理特征统计分析显示 HK2 表达与肿瘤直径、TNM 分期、组织病理分级存在相关性,与 HK2 在其它肿瘤中表达意义一致。随后,建立稳定转染的细胞株 HK2 shRNA,检测细胞周期变化可以看出 HK2 沉默干扰使得细胞周期发生明显转变,更少停滞在 S 期。此外,沉默 HK2 表达可显著降低 HepG2 细胞增殖活性,显著升高 HepG2 细胞凋亡率,与 HK2 在结直肠癌^[13]、喉鳞状细胞癌^[15]等肿瘤中作用机制一致。细胞凋亡是细胞生长分化调节的重要手段,又是机体免受肿瘤危害的重要保护机制,癌变了的细胞发生凋亡的能力通常极低,而增殖能力则相应增强,这直接导致了瘤细胞快速而病态的分裂增殖,暗示 HK2 可能通过抑制凋亡促进肿瘤生长。

以上实验结果提示 HK2 具有抗肿瘤潜能,为肝细胞癌患者的肿瘤靶向治疗提供理论基础,并为后续的肝细胞癌侵袭转移机制研究提供了实验依据。但是本研究还没有从动物水平探讨沉默 HK2 对裸鼠移植瘤可能的影响及治疗作用,有待在后续实验中完善,有关 HK2 在肝癌中作用的详细机制有待更加深入的探讨。

参考文献

- [1] Pascual S, Herrera I, Irurzun J. New advances in hepatocellular carcinoma[J]. *World J Hepatol*, 2016, 8(9):421-38.
- [2] Grandhi M S, Kim A K, Ronnekleiv-Kelly S M, et al. Hepatocellular carcinoma: from diagnosis to treatment [J]. *Surg Oncol*, 2016, 25(2):74-85.
- [3] Tsai T J, Chao W Y, Chen C C, et al. Gelsolin-like actin-capping protein(CapG) overexpression in the cytoplasm of human hepatocellular carcinoma, associated with cellular invasion, migration and tumor prognosis[J]. *Anticancer Res*, 2018, 38(7):3943-50.
- [4] Wang H, Wang L, Zhang Y, et al. Inhibition of glycolytic enzyme hexokinase II (HK2) suppresses lung tumor growth [J]. *Cancer Cell International*, 2016, 16(1):1-2.
- [5] Zhang J, Baddoo M, Han C, et al. Gene network analysis reveals a novel 22-gene signature of carbon metabolism in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(31):49232-45.
- [6] Zhang D, Yip Y M, Li L. In silico construction of HK2-VDAC1 complex and investigating the HK2 binding-induced molecular gating mechanism of VDAC1 [J]. *Mitochondrion*, 2016, 30:222-8.
- [7] Chen J, Zhang S, Li Y, et al. Hexokinase 2 overexpression promotes the proliferation and survival of laryngeal squamous cell carcinoma [J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(4):3743-53.
- [8] Jiao L, Zhang H L, Li D D, et al. Regulation of glycolytic metabolism by autophagy in liver cancer involves selective autophagic degradation of HK2 (hexokinase 2) [J]. *Autophagy*, 2018, 14(4):671-84.
- [9] Penny H L, Sieow J L, Adriani G, et al. Warburg metabolism in tumor-conditioned macrophages promotes metastasis in human pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Oncoimmunology*, 2016, 5(8):e1191731.
- [10] Jardim-Messeder D, Moreira-Pacheco F. 3-bromopyruvic acid inhibits tricarboxylic acid cycle and glutaminolysis in HepG2 cells [J]. *Anticancer Res*, 2016, 36(5):2233-41.
- [11] Wu C, Shopsowitz K E, Hammond P T. Engineering periodic shRNA for enhanced silencing efficacy [J]. *Mol Ther*, 2016, 24(6):1070-7.
- [12] 金锐,王芳,栾康等. 甲羟戊酸激酶基因真核及 shRNA 表达载体构建及其对 BxPC-3 细胞周期蛋白表达的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2016, 51(1):22-6.
- [13] Kudryavtseva A V, Fedorova M S, Zhavoronkov A, et al. Effect of lentivirus-mediated shRNA inactivation of HK1, HK2, and HK3 genes in colorectal cancer and melanoma cells [J]. *BMC Genet*, 2016, 17(Suppl 3):156.
- [14] 张丹,徐慧琴,汪会等. siRNA 沉默己糖激酶-2 基因对 MDA-MB231 细胞放疗敏感性的影响 [J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(1):95-9.
- [15] 陈健. 己糖激酶 2 在喉鳞状细胞癌中的作用和机制研究 [D]. 武汉:华中科技大学, 2013.

Differential expression of HK2 in HCC and its effect on HCC cells

Zhang Yu¹, Meng Xuan², Wang Xun²

(¹Dept of Hepatobiliary Surgery, No. 302 Hospital of PLA, Beijing 100039;

²Dept of Hepatobiliary Surgery, General Hospital of PLA, Beijing 100853)

Abstract Objective To investigate the differential expression of HK2 in liver cancer tissues and its effects on cell proliferation, cell cycle and apoptosis of liver cancer cells. **Methods** 48 cases of liver cancer tissues and

网络出版时间: 2019-1-11 14:06 网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.r.20190109.1117.015.html>

转录因子 GRHL3 促进皮肤鳞癌细胞迁移和侵袭

邓庆梅^{1,2}, 周利利¹, 郭思佳¹, 陈津津¹, 郭立钰¹, 曾凡军¹, 周海胜^{1,3}

摘要 目的 研究转录因子果蝇头状因子 3 (GRHL3) 对皮肤鳞癌(SCC)细胞系 A431 细胞迁移和侵袭的影响。方法 利用免疫组织化学检测皮肤癌组织 GRHL3 表达,分析皮肤鳞状细胞癌中 GRHL3 表达水平与临床病理分期的关系;利用脂质体介导 GRHL3 过表达载体转染 A431 细胞,建立过量表达 GRHL3 的 A431 细胞系;通过 Transwell 检测 GRHL3 对 A431 细胞迁移和侵袭能力的影响;利用表达谱芯片技术分析过量表达 GRHL3 对 A431 细胞迁移、侵袭等相关基因表达变化;采用染色质免疫共沉淀-测序(ChIP-seq)的方法分析 GRHL3 调控的靶基因及 GRHL3 的结合位点;比较基因表达谱芯片和染色质免疫共沉淀-测序的结果,以确定 GRHL3 参与调控细胞迁移和侵袭相关的靶基因。结果 免疫组化结果显示 SCC 组织及癌旁组织 GRHL3 表达水平较正常皮肤组织明显增加,且与临床病理分期有关;Western blot 结果证实 GRHL3 在 A431 细胞过量表达,由此成功建立稳定过量表达 GRHL3 的 A431 细胞株;Transwell 侵袭和迁移试验显示

GRHL3 过量表达增强了 A431 细胞迁移和侵袭能力;表达谱芯片结果显示有 128 个基因与细胞运动和黏附相关;ChIP-seq 结果显示 GRHL3 结合基因组 DNA 的主要位置是在基因间区(55.65%),而只有 2.49% 分布于结构基因的启动子区域;表达谱芯片显示差异表达的 128 个基因和 ChIP-seq 显示的 GRHL3 调控 149 个候选基因,均与细胞迁移和侵袭有关,其中有 26 个基因具有一致性。提示 GRHL3 通过调控 26 个候选基因促进皮肤鳞癌细胞的迁移和侵袭。结论 GRHL3 通过调控皮肤鳞癌细胞的与迁移和侵袭相关基因表达,促进细胞迁移和侵袭,有助于后续研究 GRHL3 调控肿瘤细胞迁移和侵袭的分子机制。

关键词 皮肤鳞癌;GRHL3;A431;迁移;侵袭

中图分类号 R 319;R 739.5

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2019)02-0236-06
doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.02.015

果蝇头状因子 (grainyhead-like, GRHL) 基因家族高度保守,所编码的转录因子在胚胎发育过程中发挥关键的调控作用。果蝇头状因子 3 (grainyhead like-3, GRHL3) 是 Grainyhead 基因家族成员之一,参与哺乳动物表皮的发展和修复^[1-5]。基因组测序发现在非综合性腭裂的家族发生 GRHL3 基因突变并影响血管内皮细胞的迁移过程^[6-8]。

研究^[9]证实,在早期乳腺癌中 GRHL3 表达量

2018-10-22 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81372911)

作者单位:¹安徽医科大学生物化学与分子生物学教研室,合肥 230032

²中国科学院合肥肿瘤医院检验科,合肥 230031

³皮肤病学国家重点实验室培养基地,合肥 230032

作者简介:邓庆梅,女,主任检验师,硕士研究生;

周海胜,男,教授,责任作者, E-mail: haishengs@ahmu.edu.cn

corresponding para cancer tissues were collected, and the expression of HK2 was detected by immunohistochemistry. At the same time, Western blot was used to detect the expression of HK2 in human hepatoma cell HepG2 and in normal liver cell L-02. The relationship between HK2 expression and clinic pathological characteristics of hepatocellular carcinoma was analyzed statistically. Four HK2 shRNA vectors were constructed, Western blot was used to detect the interference efficiency, and the best HK2 shRNA was selected for transfecting cell. For blank group (normal culture, non-transfected plasmid), control shRNA group (transfected control shRNA), HK2 shRNA group (transfected shRNA_3) HepG2 cells, MTT was used to detect cell proliferation activity, flow cytometry was used for cell cycle, Annexin V-FITC/PI double labeling method was used to detect cell apoptosis. **Results** The expression of HK2 increased significantly in HCC tissues, and the expression was correlated with tumor diameter, TNM stage and histopathological grade. The decrease of HK2 expressionsignificantly reduced the proliferation activity of HepG2 cells, obviously changed the cell cycle and make cells less stagnant at S stage, significantly increased the apoptosis of HepG2 cells. **Conclusion** HK2 shows strong anti-tumor potential and has a certain clinical significance. It provides a new idea and theoretical basis for the clinical diagnosis of liver cancer, prognosis judgment and molecular targeting therapy based on HK2.

Key words HK2; hepatocellular carcinoma; shRNA silence