

ACTN4 对肝癌细胞侵袭转移的影响

于皎¹, 李玉华²

1. 山东省临沂市中医医院肝病科, 山东 临沂 276002;

2. 山东省临沂市中医医院内科, 山东 临沂 276002

摘要: 目的 探索 α -辅肌动蛋白 4 (α -actinin-4, ACTN4) 在肝细胞癌 HepG2 细胞及人正常肝细胞系 LO2 中的表达及沉默 ACTN4 对肝癌细胞 HepG2 侵袭和转移能力的影响。方法 通过 qRT-PCR 技术及 Western blot 技术检测 ACTN4 在肝细胞癌细胞 HepG2 及人正常肝细胞系 LO2 中的表达情况; 利用 RNAi 技术下调 HepG2 细胞中的 ACTN4 表达, 并应用 qRT-PCR 及 Western blot 技术检测 HepG2 细胞中 ACTN4 的沉默效果; Transwell 实验检测细胞侵袭及转移能力的变化。结果 ACTN4 在肝细胞癌 HepG2 细胞中明显高表达; ACTN4-siRNA 可有效沉默 HepG2 细胞中 ACTN4 的表达, 沉默 ACTN4 的表达可以明显降低 HepG2 细胞的侵袭、转移能力。结论 ACTN4 与肝细胞癌细胞的侵袭、转移密切相关。

关键词: α -辅肌动蛋白 4; HepG2 细胞; LO2 细胞; 侵袭; 转移; 肝癌

中图分类号: R 735.7 **文献标识码:** B **文章编号:** 1674-8182(2016)11-1498-03

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是最常见的原发性、恶性肝胆系统肿瘤, 我国每年原发性肝癌死亡人数约 12 万, 其中肝细胞癌占 90%^[1]。根治性切除术是首选的治疗方法, 但一些肝细胞癌患者就诊时已处于中晚期或经治疗后肿瘤发生转移而无法行根治性切除术。因此, 研究肝细胞癌侵袭转移的分子机制, 对肝细胞癌的治疗及寻找有效的治疗靶点具有重大临床意义。

α -辅肌动蛋白 4 (α -actinin-4, ACTN4) 是血影蛋白超家族的一员, 构成细胞骨架蛋白的膜相关的肌动蛋白交联蛋白^[2], 研究发现 ACTN 在多种肿瘤组织中呈高表达, 并可通过介导多种蛋白分子参与肿瘤进展过程中 EMT 的发生, 且因此与肿瘤的侵袭转移密切相关^[3]。但目前尚无研究报道 ACTN4 在肝细胞癌侵袭和转移中所起的作用。本研究通过检测 ACTN4 在肝细胞癌细胞系 HepG2 中的表达及其在肝细胞癌细胞侵袭和迁移中所发挥的作用, 为肝细胞癌侵袭转移的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 ACTN4 一抗及内参 β -actin 一抗购自 Abcam 公司; TRIzol 细胞裂解液购自碧云天公司; RNA 反转录试剂购自 TaKaRa 公司; MTT 试剂盒购自 Promega 公司; Transwell 小室购自 Milipore 公司; LipofectamineTM2000 购于美国 Invitrogen 公司; 干扰 RNA

由上海吉玛公司合成; HepG2 细胞、LO2 细胞购自中科院上海细胞库。

1.2 方法

1.2.1 设计并合成 ACTN4-siRNA 委托上海吉玛公司设计并合成 ACTN4 的干扰序列 ACTN4-siRNA 及对照序列 ACTN4-NC。

1.2.2 细胞培养和转染 用 DMEM 培养基 (含 100 ml/L 胎牛血清), 于 37 °C、CO₂ (50 ml/L) 培养箱中培养 HepG2 细胞、LO2 细胞。当细胞密度 70% 左右时, 经 LipofectamineTM2000 将 ACTN4-siRNA 及对照序列 ACTN4-NC 转染至 HepG2 细胞, 具体操作见 LipofectamineTM2000 说明书。转染后的 HepG2 细胞分别命名为 ACTN4-siRNA 组、ACTN4-NC 组。

1.2.3 qRT-PCR 收集需要检测的处于对数生长期的各组细胞, TRIzol 细胞裂解液裂解细胞, 提取细胞的总 RNA, 并通过反转录试剂盒将其 RNA 反转录为 cDNA。qRT-PCR 反应条件为: 95 °C 3 min, 95 °C 13 s, 61 °C 36 s, 循环 40 次。

1.2.4 Western blot 收集需要检测的处于对数生长期的各组细胞, 胰酶消化, 离心, 提取蛋白; 煮沸使蛋白质发生变性; SDS-PAGE 对蛋白样品进行电泳分离, 通过半干转将蛋白电转移到 PVDF 膜上, 将其放入 50 g/L 的脱脂奶粉溶液中室温条件下封闭 2 h, 加入一抗 ACTN4 (1:1 000) 及内参 β -actin (1:3 000), 4 °C 冰箱中孵育过夜。用 PBST 洗涤细胞 (5 min \times 3 次), 加入相应的二抗 (1:3 000) 室温条件下孵育 2 h, 用 PBST 洗涤细胞 (5 min \times 3 次) 后, 滴加发光液, 成像仪成像。

1.2.5 Transwell 实验检测 HepG2 细胞侵袭转移能力 通过 Transwell 实验检测转染 ACTN4-siRNA 对 HepG2 细胞侵袭力的影响,每组设置 5 个复孔。用胰酶消化处理细胞,利用无菌 PBS 洗 2 遍,用含浓度为 10 g/L BSA 的无血清培养液重悬细胞,并调整细胞密度为 1×10^5 个/ml,预先用 Matrigel 包被小室上室的基底膜,每组取上述制备的细胞悬液 150 μ l 加入其中,下室中加入 500 μ l 含血清 (200 ml/L) 的培养基,培养 48 h 后,取出小室,无菌 PBS 淋洗,并用棉签小心擦去微孔膜内层的细胞,用 95% 的乙醇固定细胞 6 min,4 g/L 结晶紫溶液染色后,倒置显微镜下计数染色细胞并拍照,每个样本随机选取 5 个视野的平均值,分析各组间的差异并绘制柱状图。检测沉默 ACTN4 对 HepG2 细胞转移力的影响时,Transwell 小室的上室中无 Matrigel 包被,其他操作相同。

1.3 统计学处理 实验数据通过 SPSS 21.0 软件进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

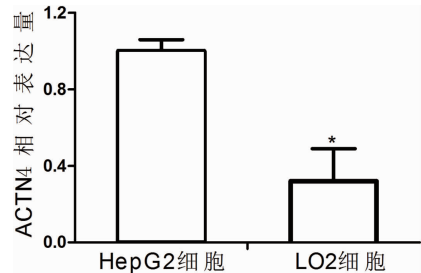
2 结果

2.1 ACTN4 在肝癌 HepG2 细胞中高表达 收集处于对数生长期的肝细胞癌细胞系 HepG2 细胞及人正常肝细胞系 LO2 细胞,分别提取两组细胞的总 RNA 及总蛋白,分别通过荧光实时定量 qRT-PCR 技术及 Western blot 技术检测两组细胞 ACTN4 的 mRNA 及蛋白表达情况,结果显示,与人正常肝细胞系 LO2 相比,ACTN4 在肝细胞癌细胞系 HepG2 细胞中 mRNA ($t = 9.187, P = 0.011$) 及蛋白表达显著升高。见图 1、图 2。

2.2 ACTN4-siRNA 在 HepG2 细胞中的沉默效率 分别转染 ACTN4-siRNA 及对照序列于肝细胞癌 HepG2 细胞,培养 48 h 后,提取两组细胞总 RNA 及总蛋白,利用 qRT-PCR 及 Western blot 技术检测两组细胞 mRNA 及蛋白水平 ACTN4 的表达情况。结果显示,与 ACTN4-NC 组相比,ACTN4-siRNA 组 ACTN4 的表达显著下调 ($t = 19.430, P = 0.000$)。见图 3、图 4。

2.3 ACTN4 对 HepG2 细胞的侵袭转移能力的影响 通过 Transwell 实验检测沉默肝细胞癌 HepG2 细胞中 ACTN4 的表达对细胞侵袭的影响。结果显示:与对照组相比,沉默 ACTN4 表达的肝细胞癌 HepG2 细胞穿过微孔膜的细胞数目显著减少,其中 ACTN4-NC 组细胞数 45.6 ± 9.0 ,ACTN4-siRNA 组细胞数 22.6 ± 6.1 ,两组比较差异有统计学意义 ($t = 22.649, P = 0.000$)。见图 5。通过 Transwell 实验检测沉默肝细

胞癌 HepG2 细胞中 ACTN4 的表达对细胞转移力的影响。结果显示,沉默 ACTN4 表达的 HepG2 细胞穿过微孔膜的细胞数目同样显著减少,其中 ACTN4-NC 组细胞数 36.3 ± 7.5 ,ACTN4-siRNA 组细胞数 19.3 ± 5.5 ,两组间差异有统计学意义 ($t = 10.331, P = 0.007$)。见图 6。



注:与对照组比较,* $t = 9.187, P = 0.011$ 。

图 1 qRT-PCR 检测细胞中 ACTN4 的 mRNA 水平表达情况

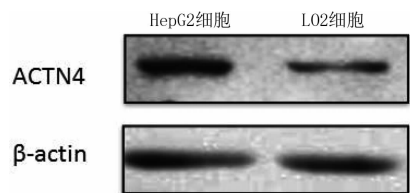
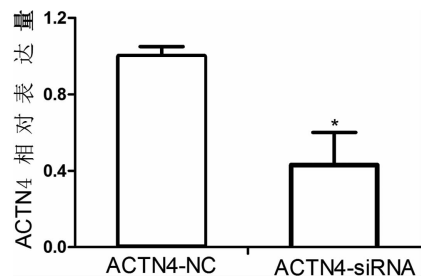


图 2 Western blot 检测细胞中 ACTN4 蛋白水平表达情况



注:与对照组比较,* $t = 19.430, P = 0.000$ 。

图 3 qRT-PCR 检测 ACTN4-siRNA 水平表达情况

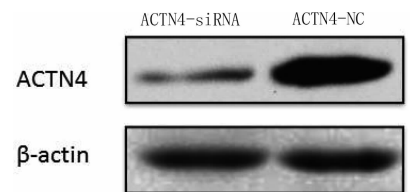
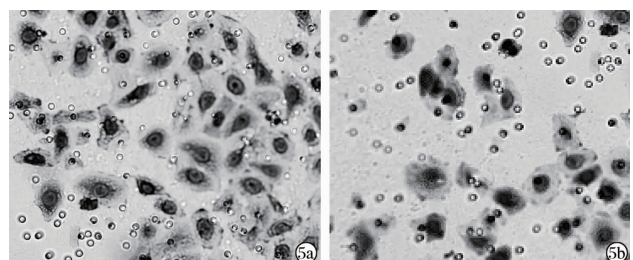
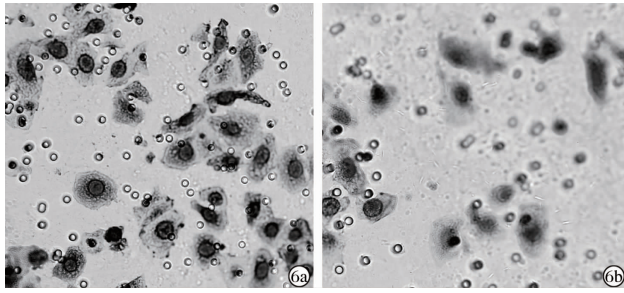


图 4 Western blot 检测 ACTN4-siRNA 的沉默效率



注:5a:ACTN4-NC;5b:ACTN4-siRNA。

图 5 Transwell 实验检测沉默 ACTN4 对肝癌细胞侵袭力影响



注:6a:ACTN4-NC;6b:ACTN4-siRNA。

图 6 Transwell 实验检测沉默 ACTN4 对肝癌细胞转移力影响

3 讨论

ACTN4 是一种非肌肉的细胞骨架蛋白,早在 1998 就有研究表明 ACTN4 可增加细胞运动能力并同肿瘤的转移能力及不良预后密切相关^[4]。多项研究证实 ACTN4 同多种肿瘤的进展及转移密切相关,包括乳腺癌^[5]、结肠癌^[6]、胰腺癌^[7]、肺癌^[8]等。在人类表皮癌细胞、膀胱癌、肺癌及卵巢癌中高表达,被认为是候选的癌基因,促进肿瘤的侵袭转移^[3]。此外研究表明在骨肿瘤中高分子量激肽原结构域 5 调节细胞粘附及侵袭与 ACTN4 相关^[9];沉默 ACTN4 的表达可以明显降低口腔鳞状细胞癌的侵袭能力^[10]。更为重要的是,研究发现 ACTN4 在非小细胞肺癌患者组织中高表达且同患者的不良预后密切相关,该研究提示 ACTN4 可作为肿瘤患者独立的预后指标^[8]。有文献报道 ACTN4 可通过与 Rho 家族分子联合而调控细胞骨架的组织粘着而影响细胞的活动力和肿瘤转移^[11]。由此可见,ACTN4 与肿瘤的发生发展及侵袭转移密切相关。

本研究发现 ACTN4 在肝细胞癌细胞系 HepG2 中的表达显著高于人正常肝细胞系 LO2 细胞中的表达;为明确 ACTN4 对肝细胞癌细胞侵袭和转移的影响,我们沉默了肝细胞癌细胞系 HepG2 中 ACTN4 的表达,并检测 HepG2 细胞侵袭和迁移能力的变化。发现沉默 ACTN4 的表达后,HepG2 细胞的侵袭及转移能力明显减弱。

综上所述,沉默 ACTN4 表达可以抑制肝细胞癌细胞的迁移与侵袭能力,提示 ACTN4 在肝细胞癌患

者肿瘤转移过程中发挥着至关重要的作用。为 ACTN4 在肝细胞癌 EMT 过程中的分子机制相关研究提供了一定的前期基础,为肝细胞癌患者预后判定及靶向治疗提供新的思路。

参考文献

- [1] Wang K, Eguchi S, Hidaka M, et al. Comparison of the outcomes of hepatocellular carcinoma after hepatectomy between two regional medical centers in China and Japan[J]. *Asian J Surg*, 2016. [Epub ahead of print].
- [2] Viel A. Alpha-actinin and spectrin structures; an unfolding family story[J]. *FEBS Lett*, 1999, 460(3):391-394.
- [3] Honda K. The biological role of actinin-4 (ACTN4) in malignant phenotypes of cancer[J]. *Cell Biosci*, 2015, 5:41.
- [4] Honda K, Yamada T, Endo R, et al. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion[J]. *J Cell Biol*, 1998, 140(6):1383-1393.
- [5] Khurana S, Chakraborty S, Cheng X, et al. The actin-binding protein, actinin alpha 4 (ACTN4), is a nuclear receptor coactivator that promotes proliferation of MCF-7 breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(3):1850-1859.
- [6] Honda K, Yamada T, Hayashida Y, et al. Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer[J]. *Gastroenterology*, 2005, 128(1):51-62.
- [7] Kikuchi S, Honda K, Tsuda H, et al. Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas[J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(17):5348-5356.
- [8] Yamagata N, Shyr Y, Yanagisawa K, et al. A training-testing approach to the molecular classification of resected non-small cell lung cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2003, 9(13):4695-4704.
- [9] Hatoh T, Maeda T, Takeuchi K, et al. Domain 5 of high molecular weight kininogen inhibits collagen-mediated cancer cell adhesion and invasion in association with alpha-actinin-4[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 427(3):497-502.
- [10] Yamada S, Yanamoto S, Yoshida H, et al. RNAi-mediated down-regulation of alpha-actinin-4 decreases invasion potential in oral squamous cell carcinoma[J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2010, 39(1):61-67.
- [11] Quick Q, Skalli O. Alpha-actinin 1 and alpha-actinin 4; contrasting roles in the survival, motility, and RhoA signaling of astrocytoma cells[J]. *Exp Cell Res*, 2010, 316(7):1137-1147.

收稿日期:2016-06-01 修回日期:2016-07-10 编辑:王国品