

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.09.007

网络首发 http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20190301.1506.028.html(2019-03-04)

## COL4A1 在肝癌中的表达及其对肝癌细胞迁移、侵袭能力的影响\*

王译文<sup>1</sup>, 李 民<sup>2</sup>, 阿布都艾合提·买买提明<sup>2</sup>, 程方雄<sup>1</sup>, 罗少锋<sup>1</sup>, 何 峰<sup>1</sup>, 王必蓉<sup>3△</sup>

(1. 武汉市第四医院/华中科技大学同济医学院附属武汉普爱医院检验科, 武汉 430077; 2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院肝胆外科, 武汉 430022; 3. 武汉市第四医院/华中科技大学同济医学院附属武汉普爱医院甲乳外科, 武汉 430077)

**[摘要]** 目的 探讨血清Ⅳ型胶原蛋白基因  $\alpha 1$ (COL4A1)在肝癌组织中的表达,分析敲低 COL4A1 表达对肝癌细胞迁移及侵袭能力的影响。方法 采用 Western blot 法检测 COL4A1 在 68 例肝癌及配对癌旁组织的表达水平;运用 siRNA 技术敲低肝癌细胞 COL4A1 表达,采用 CCK-8 试验检测其对肝癌细胞增殖能力的影响,采用 Transwell 试验检测其对肝癌细胞迁移和侵袭能力的影响。结果 生物信息学分析提示 COL4A1 mRNA 在肝癌中高表达( $P < 0.01$ );COL4A1 在肝癌组织表达水平明显高于癌旁组织( $P < 0.05$ ),敲低 COL4A1 表达明显降低肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力( $P < 0.05$ )。结论 COL4A1 在肝癌组织中高表达,并促进肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭。

**[关键词]** 肝肿瘤;Ⅳ型胶原蛋白基因  $\alpha 1$ ;细胞运动;侵袭

**[中图法分类号]** R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2019)09-1472-04

### The expression of COL4A1 and its effect on migration and invasion in hepatocellular carcinoma\*

WANG Yiwēn<sup>1</sup>, LI Mīn<sup>2</sup>, ABUDUAIHETI Maimaitiming<sup>2</sup>, CHENG Fangxiōng<sup>1</sup>,  
LUO Shaofēng<sup>1</sup>, HE Fēng<sup>1</sup>, WANG Birong<sup>3△</sup>

(1. Clinical Laboratory, Wuhan Fourth Hospital/Wuhan Puai Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430077, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Union Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430022, China; 3. Department of Breast and Thyroid Surgery, Wuhan Fourth Hospital, Wuhan Puai Hospital Affiliated to Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan, Hubei 430077, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the expression of collagen type Ⅳ alpha 1 (COL4A1) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its effects on migration and invasion of HCC cells. **Methods** The expression of COL4A1 in 68 cases of HCC and its matched adjacent tissue were detected by Western blot. The effect of COL4A1 knockdown by siRNA on proliferation, migration and invasion was evaluated by CCK-8 assay and Transwell. **Results** The mRNA expression of COL4A1 is significantly upregulated in HCC tissues for the first time ( $P < 0.01$ ). As compared to the adjacent tissues, COL4A1 significantly overexpressed in HCC tissues ( $P < 0.05$ ). Downregulation of COL4A1 could inhibit the proliferation, migration and invasion ability of HCC cells ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** COL4A1 is significantly upregulated in HCC and contributes to the proliferation, migration and invasion of HCC cells.

**[Key words]** liver neoplasms; collagen type Ⅳ alpha 1; cell movement; invasion

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是世界范围内癌症相关致死率排名第 2 位的恶性肿瘤, 每年大约有 782 500 例新发病例<sup>[1-2]</sup>。虽然手术、肝移植和射频消融等治疗手段可以延长患者的生存期, 但其高复发率及远处转移最终导致患者预后不良<sup>[3]</sup>。因此, 研究 HCC 的发生、发展及转移、侵袭的分子机制, 对提高 HCC 的治疗水平具有重要意义。Ⅳ型胶原蛋

白基因  $\alpha 1$  (collagen type Ⅳ alpha 1, COL4A1) 是新近发现的一种原癌基因, 其编码的血清Ⅳ型胶原  $\alpha 1$  链是基底膜的重要组成部分<sup>[4]</sup>。已有研究证实 COL4A1 在胃癌、结肠癌、乳腺癌、头颈部鳞状细胞癌及甲状腺乳头状癌中明显高表达, 并与肿瘤细胞的增殖、分化和迁移密切相关<sup>[5-6]</sup>。然而, COL4A1 在 HCC 中的表达及其功能国内外鲜有报道。本研究旨

\* 基金项目: 湖北省自然科学基金资助项目(2015CFB527)。 作者简介: 王译文(1983-), 检验技师, 本科, 主要从事肿瘤与分子生物学研究。 △ 通信作者: E-mail: whpawywbr@sina.com。

在阐明 COL4A1 在人 HCC 中的表达情况,并探讨其在 HCC 发生、发展中的作用,为 HCC 的诊断与治疗提供新的思路。

### 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2008 年 1 月至 2015 年 12 月武汉市第四医院/华中科技大学同济医学院附属武汉普爱医院手术切除的 68 例 HCC 组织标本,切取肝癌组织及其配对的癌旁组织(距离肿瘤边缘 5 cm 以上),所有病例均经组织病理学诊断确认,所有患者术前均未接受放疗及靶向治疗。新鲜离体标本均置于液氮中保存。本实验经该院医学伦理委员会批准,所有患者均签署知情同意书。在 68 例肝癌患者中,男 51 例,女 17 例,患者中位年龄为 51 岁;28 例肿瘤直径大于或等于 5 cm; I + II 期 53 例, III + IV 期 15 例。

### 1.2 方法

**1.2.1 生物信息学** 访问 GEO 数据集,下载 HCC GSE14520 数据,分析 COL4A1 mRNA 在 HCC 及癌旁组织表达差异性。

**1.2.2 COL4A1 蛋白表达检测** 取出组织并按 80 mg/mL 浓度加入裂解液裂解细胞,提取总蛋白。取得上清液采用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒(美国 Pierce 公司)测定蛋白水平。采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,使用等体积的上样缓冲液加样,经过电泳后将蛋白电转至硝酸纤维素膜;室温封闭 2 h,孵育稀释的一抗 COL4A1(美国 Santa Cruz 公司)和  $\beta$ -actin(美国 Thermo 公司),室温 1 h 后 4 °C 过夜。洗膜后孵育稀释的二抗,室温 2 h;洗膜后曝光检测。

**1.2.3 细胞培养与转染** 培养人 HCC 细胞系 HepG2,培养基选用 DMEM(美国 Gibco 公司),内含 10% 胎牛血清、100 U/mL 青霉素、100 U/mL 链霉素。将对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,培养过夜待细胞贴壁即可转染。按照 Lipofectamine 2000(美国 invitrogen 公司)转染试剂盒说明书上的步骤进行操作,转染后使用反转录 PCR(RT-PCR)评估转染效果。

**1.2.4 细胞增殖试验** 使用胰酶消化、重悬、调整细胞密度后加入 96 孔板,置于培养箱中培养;每孔加入 CCK-8 溶液(日本 Dojindo 公司)10  $\mu$ L 后,继续孵育 1 h;将 96 孔板放入酶标仪中,在 450 nm 波长处读取吸光度值。检测细胞在第 1~4 天时的吸光度值,并绘制生长曲线。

**1.2.5 细胞迁移和侵袭试验** 迁移试验步骤为:使用对数生长期的 HepG2 细胞,用胰酶消化、重悬、调整细胞密度后,加入 Transwell 小室,并加入无血清培养基 100  $\mu$ L;下室加入 800  $\mu$ L 完全培养基。常规培养 48 h 后,取出 Transwell 小室,丢弃培养液,并用无菌棉签小心拭去上室底部的细胞,4% 多聚甲醛固定细胞 20 min,0.1% 结晶紫染色 15 min,磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗后将 Trasnwell 小室置于显微镜下观察计数。侵袭试验与迁移试验基本相同,不同点为侵袭实

验使用滤膜附有 Matrigel 的 Transwell 小室。

**1.3 统计学处理** 使用 SPSS17.0 统计软件分析,所有检测试验均重复 3 次,计量数据以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间数据采用 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 生物信息学** 通过统计学分析 GSE14520 数据库,结果显示 HCC 组织 COL4A1 mRNA 表达水平明显高于配对癌旁组织( $P < 0.01$ ),见图 1。

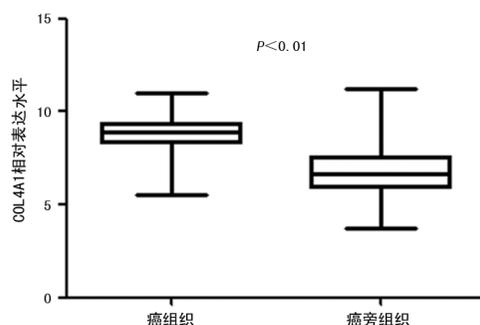


图 1 COL4A1 mRNA 在 HCC 组织及癌旁组织表达水平

**2.2 COL4A1 在 HCC 组织和癌旁组织中的表达** COL4A1 在 HCC 组织中的表达水平为  $0.912 \pm 0.153$ ,明显高于癌旁组织的  $0.725 \pm 0.138$ ,二者比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见图 2。

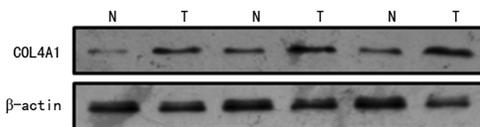


图 2 Western blot 检测 COL4A1 在 HCC 组织(T)及癌旁组织(N)中的表达

**2.3 COL4A1 表达水平与临床特征的关系** 按 COL4A1 表达水平高低将患者排序,并分为高表达组和低表达组各 34 例,分析 COL4A1 表达与患者临床特征的关系。结果显示,COL4A1 的表达水平与肿瘤分期明显相关,高 COL4A1 表达患者 TNM 分期高( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 COL4A1 表达与 HCC 患者临床特征的关系 [n(%), n=34]

项目	n	高表达	低表达	P
年龄(岁)				0.220
$\geq 50$	39	22(56.41)	17(43.59)	
$< 50$	29	12(41.38)	17(58.62)	
性别				0.110
男	48	27(56.25)	21(43.75)	
女	20	7(35.00)	13(65.00)	
肿瘤大小(cm)				0.355
$< 5$	55	26(47.27)	29(52.73)	
$\geq 5$	13	8(61.54)	5(38.46)	
肿瘤个数				0.209
单个	43	19(44.19)	24(55.81)	

续表 1 COL4A1 表达与 HCC 患者临床特征的关系  
[ $n(\%)$ ,  $n=34$ ]

项目	$n$	高表达	低表达	$P$
多个	25	15(60.00)	10(40.00)	
TNM 分期				0.041
I + II	53	23(43.40)	30(56.60)	
III + IV	15	11(73.33)	4(26.67)	
AFP(ng/mL)				0.401
<400	51	24(47.06)	27(52.94)	
$\geq 400$	17	10(58.82)	7(41.18)	

**2.4 敲低 COL4A1 后对 HCC 细胞增殖能力的影响** 敲低 COL4A1 可明显抑制 HepG2 细胞的增殖能力,且抑制作用随着作用时间的延长而增加( $P < 0.01$ ),见图 3。

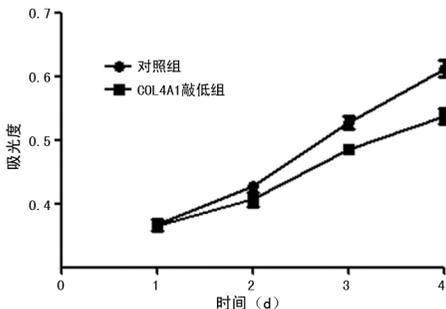


图 3 CCK-8 试验检测敲低 COL4A1 对 HepG2 细胞增殖的影响

**2.5 敲低 COL4A1 后对 HCC 细胞迁移能力的影响** 敲低 COL4A1 可明显降低 HepG2 细胞的迁移能力( $P < 0.01$ ),见图 4。

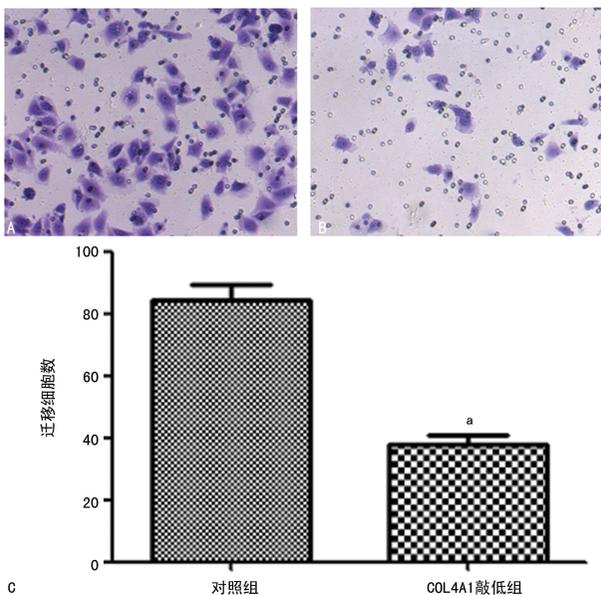


图 4 两组 HCC 细胞迁移能力比较  
A: 对照组( $\times 200$ ); B: COL4A1 敲低组( $\times 200$ ); C: 迁移实验统计图;  $a: P < 0.01$ , 与对照组比较

**2.6 敲低 COL4A1 后对 HCC 细胞侵袭能力的影**

响 敲低 COL4A1 可明显降低 HepG2 细胞的侵袭能力( $P < 0.05$ ),见图 5。

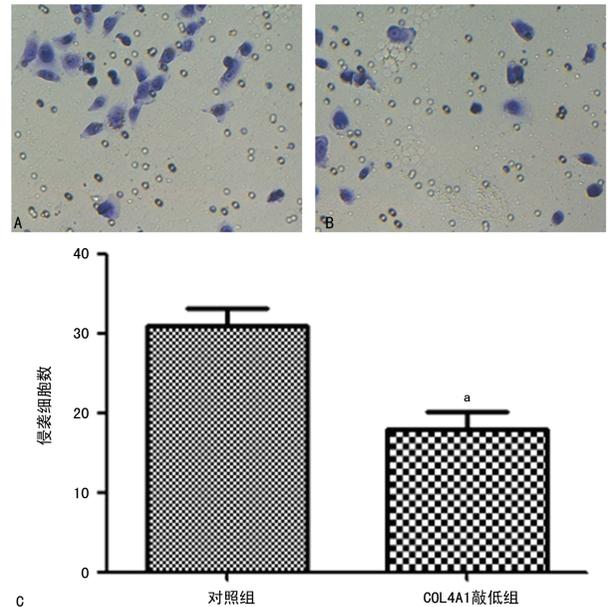


图 5 两组 HCC 细胞侵袭能力比较  
A: 对照组( $\times 200$ ); B: COL4A1 敲低组( $\times 200$ ); C: 侵袭实验统计图;  $a: P < 0.05$ , 与对照组比较

### 3 讨论

HCC 是世界范围内最常见的恶性肿瘤之一,其恶性程度高、进展迅速、预后差,严重地威胁着人类的健康。由于 HCC 起病隐匿,大多数患者就诊时因早期浸润生长并发远处转移而失去根治性手术机会,此外癌细胞的迁移和侵袭是 HCC 治疗失败和复发的重要原因。因此,研究 HCC 细胞的迁移和侵袭能力,对于后续探索 HCC 发生、发展的分子机制及降低 HCC 细胞转移风险具有重要意义。

COL4A1 蛋白由氨基末端 7S 结构域、三螺旋形成胶原结构域和羧基末端非胶原结构域共同组成,并与其他细胞外基质成分,如基底膜蛋白多糖、蛋白聚糖及层连蛋白相互作用<sup>[7]</sup>。COL4A1 的羧基末端非胶原结构域经过溶蛋白性裂解生成具有生物活性片段,在血管生成和肿瘤发展过程中发挥重要作用,其表达受趋化因子受体 7(CXCR7)及其下游的磷脂酰肌醇-3-激酶/丝苏氨酸蛋白激酶(PI3K/AKT)、核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)调节<sup>[7-8]</sup>。此外,COL4A1 基因的突变与脑出血、遗传性血管病、肾病、动脉瘤及肌肉痉挛等密切相关<sup>[9]</sup>。MIYAKE 等<sup>[10]</sup>研究发现,膀胱尿路上皮癌细胞可通过产生 COL4A1 与 COL13A1,激活细胞内的 AKT 信号通路,使 E-cadherin 转换为 N-cadherin,从而增加癌细胞的侵袭能力。SALEM 等<sup>[11]</sup>发现 COL4A1 在乳腺癌中亦高表达,且在体外试验中过表达 COL4A1 可促进乳腺癌细胞增殖及迁移;敲低其表达可明显降低癌细胞存活率并导致癌细胞细胞周期停滞。另有研究证实,在乳腺癌发生及发展中 COL4A1 的表达与 P4HA2 的表达密切相关;异常高

表达的 P4HA2 可通过上调下游 COL4A1 的表达促进肿瘤细胞增殖及转移<sup>[12]</sup>。此外,亦有研究报道 COL4A1 是头颈部鳞状细胞癌<sup>[13]</sup>、甲状腺乳头状癌<sup>[14]</sup>潜在治疗的靶基因。

近期研究证实, COL4A1 亦在消化道恶性肿瘤中有重要意义。曲妥珠单抗是针对人表皮生长因子受体 2 (HER2) 的靶向抗体, 用于治疗 HER2 过表达的胃癌患者。HUANG 等<sup>[5]</sup>研究发现, COL4A1 在胃癌组织和曲妥珠单抗胃癌细胞中高表达, COL4A1 可能赋予胃癌对曲妥珠单抗的耐药性。此外, COL4A1 被证实可作为肝内胆管细胞癌的诊断标志物<sup>[15]</sup>。迄今尚未有关于 COL4A1 的表达与 HCC 发生、发展相关的研究报道。本课题组通过分析 HCC 数据库及检测临床配对 HCC 标本, 首次发现 COL4A1 在 HCC 组织中明显高表达, 且其表达水平与 TNM 分期相关, 高 COL4A1 表达患者 TNM 分期高。随后本课题组通过细胞增殖、迁移及侵袭等体外实验证实, 敲低 COL4A1 表达可明显降低 HepG2 细胞的增殖、迁移和侵袭能力。据此, 本课题推测 COL4A1 可能在 HCC 细胞的增殖、迁移及侵袭中发挥重要作用。

综上所述, 本课题组首次提出 COL4A1 可能是肝细胞癌的潜在癌基因, 并可能通过影响肿瘤细胞的增殖、迁移及侵袭参与 HCC 的发生、发展。COL4A1 可能作为 HCC 诊断和治疗的新的生物靶点。本课题组拟后续深入探讨 COL4A1 参与 HCC 发生、发展的具体信号通路, 为 COL4A1 的靶向治疗提供理论基础。

## 参考文献

- [1] SIEGEL R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics, 2017[J]. CA Cancer J Clin, 2017, 67(1): 7-30.
- [2] TORRE L A, BRAY F, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108.
- [3] MILLER K D, SIEGEL R L, LIN C C, et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2016[J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(4): 271-289.
- [4] BROWN K L, CUMMINGS C F, VANACORE R M, et al. Building collagen IV smart scaffolds on the outside of cells[J]. Protein Sci, 2017, 26(11): 2151-2161.
- [5] HUANG R, GU W, SUN B, et al. Identification of COL4A1 as a potential gene conferring trastuzumab resistance in gastric cancer based on bioinformatics analysis[J]. Mol Med Rep, 2018, 17(5): 6387-6396.
- [6] JIN R, SHEN J, ZHANG T, et al. The highly expressed COL4A1 gene contributes to the proliferation and migration of the invasive ductal carcinoma [J]. Oncotarget, 2017, 8(35): 58172-58183.
- [7] KALLURI R. Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis [J]. Nat Rev Cancer, 2003, 3(6): 422-433.
- [8] ZHANG H, TENG X, LIU Z, et al. Gene expression profile analyze the molecular mechanism of CXCR7 regulating papillary thyroid carcinoma growth and metastasis [J]. J Exp Clin Cancer Res, 2015, 34(1): 16-27.
- [9] LABELLE-DUMAIS C, DILWORTH D J, HARRINGTON E P, et al. COL4A1 mutations cause ocular dysgenesis, neuronal localization defects, and myopathy in mice and Walker-Warburg syndrome in humans [J]. Plos Genet, 2011, 7(5): e1002062.
- [10] MIYAKE M, HORI S, MORIZAWA Y, et al. Collagen type IV alpha 1 (COL4A1) and collagen type VIII alpha 1 (COL13A1) produced in cancer cells promote tumor budding at the invasion front in human urothelial carcinoma of the bladder [J]. Oncotarget, 2017, 8(22): 36099-36114.
- [11] SALEM O, ERDEM N, JUNG J, et al. The highly expressed 5' isomiR of hsa-miR-140-3p contributes to the tumor-suppressive effects of miR-140 by reducing breast cancer proliferation and migration [J]. BMC Genomics, 2016, 17(1): 566-581.
- [12] XIONG G, DENG L, ZHU J, et al. Prolyl-4-hydroxylase  $\alpha$  subunit 2 promotes breast cancer progression and metastasis by regulating collagen deposition [J]. BMC Cancer, 2014, 14(1): 1-12.
- [13] KUANG J, ZHAO M, LI H, et al. Identification of potential therapeutic target genes and mechanisms in head and neck squamous cell carcinoma by bioinformatics analysis [J]. Oncol Lett, 2016, 11(5): 3009-3014.
- [14] CONG D, HE M, CHEN S, et al. Expression profiles of pivotal microRNAs and targets in thyroid papillary carcinoma: an analysis of The Cancer Genome Atlas [J]. Onco Targets Ther, 2015, 8(1): 2271-2277.
- [15] SULPICE L, RAYAR M, DESILLE M, et al. Molecular profiling of stroma identifies osteopontin as an independent predictor of poor prognosis in intrahepatic cholangiocarcinoma [J]. Hepatology, 2013, 58(6): 1992-2000.

(收稿日期: 2018-07-26 修回日期: 2018-12-06)