

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.06.004

葡萄糖调节蛋白-78 在肝癌组织中的表达及其意义分析*

马 颖¹, 马 玲², 马 明^{3△}

(1. 新疆医科大学第一附属医院医学检验中心, 乌鲁木齐 830054; 2. 新疆维吾尔自治区胸科医院药剂科, 乌鲁木齐 830001; 3. 新疆维吾尔自治区人民医院肝胆外科, 乌鲁木齐 830054)

[摘要] **目的** 探讨葡萄糖调节蛋白-78(GRP-78)在肝细胞癌(HCC)组织中的表达情况及其对肝癌细胞增殖的影响。**方法** 统计 83 例肝癌患者的 HCC 组织、癌旁组织及正常肝组织中 GRP-78 的阳性表达率。测定不同肝癌细胞系中 GRP-78 mRNA 的相对表达水平,将表达水平最高的肝癌细胞系进行扩增培养。将扩增后的细胞分为未转染的空白组、小干扰 RNA(siRNA)-NC 组及 GRP-78-siRNA 组,分析 3 组细胞的增殖抑制率、凋亡率及磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/丝氨酸蛋白激酶(AKT)信号通路中相关蛋白的表达水平。**结果** 3 种组织中 HCC 组织中 GRP-78 的阳性表达率最高($P<0.05$),且与 HCC 患者的 TNM 分期呈正相关($P<0.05$);在 SMMC-7721 肝癌细胞系中,GRP-78 mRNA 的相对表达水平最高;在干扰 48 h 及 72 h 时,GRP-78-siRNA 组的细胞抑制率显著高于空白组及 siRNA-NC 组,差异有统计学意义($P<0.05$);而在干扰 48 h 时,GRP-78-siRNA 组的细胞凋亡率高于另外两组,差异有统计学意义($P<0.05$);与空白组、siRNA-NC 组比较,GRP-78-siRNA 组的 E-cadherin 表达升高,vimentin、磷酸化-PI3K(p-PI3K)、磷酸化-AKT(p-AKT)表达降低,组间差异有统计学意义($P<0.05$)。**结论** GRP-78 可通过 PI3K/AKT 信号通路促进肝癌的发生。

[关键词] 葡萄糖调节蛋白-78;肝肿瘤;细胞凋亡;PI3K/AKT 通路

[中图法分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)06- 917-05

Expression and significance of glucose regulatory protein-78 in hepatocellular carcinoma*

MA Ying¹, MA Ling², MA Ming^{3△}

(1. Medical Laboratory Center, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi, Xinjiang 830054, China; 2. Department of Pharmacy, Chest Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830001, China; 3. Department of Hepatobiliary Surgery, People's Hospital of Xinjiang Uygur Autonomous Region, Urumqi, Xinjiang 830054, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of glucose-regulated protein -78 (GRP-78) in hepatocellular carcinoma (HCC) and its effect on the proliferation of liver cancer. **Methods** The positive expression rate of GRP-78 in HCC tissues, adjacent tissues and normal liver tissues of 83 patients with HCC was analyzed. The relative expression of GRP-78 mRNA in different liver cancer cell lines was measured, and the liver cancer cell line with the highest expression level of GRP-78 were amplified and cultured. The amplified cells were divided into the blank group, the siRNA-NC group and the GRP-78-siRNA group, and the proliferation inhibition rate, apoptosis rate and expression level of related proteins in the PI3K/AKT signaling pathway were analyzed in the three groups. **Results** The positive expression rate of GRP-78 in HCC tissues was the highest ($P<0.05$), and it was positively correlated with TNM stage of HCC patients ($P<0.05$). The expression of GRP-78 mRNA was the highest in SMMC-7721 cell line. At 48 h and 72 h, the cell inhibition rate of the GRP-78-siRNA group was significantly higher than that of the blank group and the siRNA-NC group ($P<0.05$). At 48 h, the apoptosis rate of the GRP-78-siRNA group was higher than that of the other two groups ($P<0.05$). Compared with the blank group and the siRNA-NC group, the expression level of E-cadherin in the GRP-78-siRNA group was increased, while the expression levels of vimentin, p-PI3K and p-AKT were down-

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金(2018D01C186)。 作者简介:马颖(1983—),主管技师,硕士,主要从事检验医学工作。

△ 通信作者, E-mail: 429415875@qq.com。

regulated, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusion** GRP-78 can promote the development of liver cancer through PI3K/AKT signaling pathway.

[Key words] glucose regulatory protein-78; liver neoplasms; cell apoptosis; PI3K/AKT signaling pathway

在世界范围内,肝癌是癌症第四大死亡原因,而肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是最常见的类型,也是造成我国癌症相关死亡人数上升快的原因之一^[1-2]。HCC 细胞生长极为活跃,侵袭性强,易侵犯包膜和血管导致局部扩散和血道转移。尽管近年来 FDA 已经批准了一些二线药物,但 HCC 确诊时往往已为晚期,急需开发新的治疗靶点及治疗方案^[3-4]。

葡萄糖调节蛋白-78(glucose regulatory protein-78, GRP-78)属于热休克蛋白 70 家族,在多种恶性肿瘤中异常表达^[5-6],但在 HCC 中的相关研究较少。基于此,本研究旨在通过探讨 GRP-78 在 HCC 组织中的表达及对肝癌细胞增殖的影响,为肝癌的防治提供更多依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选择 2016 年 1 月至 2019 年 5 月新疆医科大学第一附属医院收治的 83 例 HCC 患者为研究对象。其中男 60 例,女 23 例,平均年龄(56.7 ± 8.3)岁。纳入标准:(1)术后均经病理学确诊为 HCC;(2)于该院首次确诊并进行治疗;(3)临床资料完整并可获得 HCC 组织及癌旁、正常肝组织。排除标准:(1)术前接受了放疗等其他抗肿瘤治疗;(2)临床资料不完全。同时,收集患者一般临床资料,包括年龄、性别及 TNM 分期等,用于后续统计学分析。本研究临床样本的获取经过本院伦理委员会的批准,所有患者及家属均签署知情同意书。

1.2 取材、细胞和主要试剂

根据《原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015 年版)》中的取材法对肿瘤组织进行取材^[7],取材于肿瘤中心区域的标本为 HCC 组织,取材于距离肿瘤 $>0 \sim 1$ cm 的肝组织为癌旁组织,取材于距离肿瘤大于 1 cm 的肝组织为正常肝组织。人正常肝上皮细胞 LO2,肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721、Huh-7、MHCC-97H 均由所在实验室传代培养并保存。PCR 引物、SYBR Green 试剂盒购自北京宝日医生物技术(北京)有限公司;GRP-78 抗体(ab108615)、E 钙黏蛋白(E-cadherin)抗体(ab194982)、波形蛋白(vimentin)抗体(ab92547)、磷酸化-磷脂酰肌醇 3 激酶(p-PI3K)抗体(ab32089)、磷酸化-丝苏氨酸蛋白激酶(p-AKT)(ab8805)抗体购于美国 Abcam 公司。

1.3 方法

1.3.1 免疫组织化学检测各组织中 GRP-78 的表达

对 4%多聚甲醛固定后的组织进行石蜡包埋,并使用切片机制备成 $4 \mu\text{m}$ 切片。依次对切片进行脱蜡、水化处理;随后,使用 10 mmol/L 的枸橼酸缓冲液($\text{pH}=6.0$)在高压加热 30 min 进行抗原修复。静置至室温并用 PBS 洗涤 3 次后,滴加 2%的 H_2O_2 于室温下孵育 1 h 以封闭内源性过氧化物酶。PBS 洗涤 3 次后,向标本中滴加 $100 \mu\text{L}$ 鼠抗人 GRP-78 单克隆抗体($1:1000$), 4°C 冰箱过夜。次日, PBS 冲洗 3 次后滴加辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗($1:5000$), 37°C 孵育 30 min。最后,使用二氨基联苯胺(DAB)显色,并采用苏木素对细胞核进行复染。在明场显微镜下采集图片,并使用 Image pro plus 对 GRP-78 的表达进行半定量分析。

1.3.2 实时荧光定量 PCR(RT-PCR)

分别提取细胞及患者组织中的总 RNA,将细胞 RNA 反转录成 cDNA,然后扩增成 DNA,所有步骤严格按照逆转录试剂盒和扩增试剂盒说明书操作。GRP-78 引物序列:上游 $5'$ -CAG ATC ACG CCA ATG ATG AAT A- $3'$,下游 $5'$ -GTA AGC TTA TCC GTA TCC TGT CA- $3'$,以 GAPDH 作为内参。根据 PCR 反应体系配制各种试剂,RT-PCR 反应条件如下: 95°C 预变性 10 min; 95°C 变性 30 s, 50°C 退火 30 s, 40 个循环;最后 70°C 延伸 10 min 结束。

1.3.3 细胞培养及转染

将人肝癌细胞株 HepG2、SMMC-7721、Huh-7、MHCC-97H 置于含 10%胎牛血清及 1%青霉素+链霉素双抗的培养基中,并于 37°C 、5% CO_2 孵箱中进行培养。待细胞生长至 80%后进行传代培养。选取 GRP-78 mRNA 相对表达水平最高的肝癌细胞系进行干扰实验。取第三代处于对数生长期的肝癌细胞,将细胞以 $5 \times 10^4/\text{mL}$ 的浓度接种于 24 孔板中。根据实验目的分为以下 3 组:(1)未转染的空白对照组;(2)siRNA-NC 组;(3)GRP-78-siRNA 组。其中,未转染的空白对照组不做处理,siRNA-NC 组取 $50 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的 siRNA-NC 和 LipofectinTM 2000 混合后进行转染;siRNA-GRP-78 组取 $50 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 的 siRNA-GRP-78 和 LipofectinTM 2000 混合后进行转染。转染后培养 6 h,并进行后续实验。

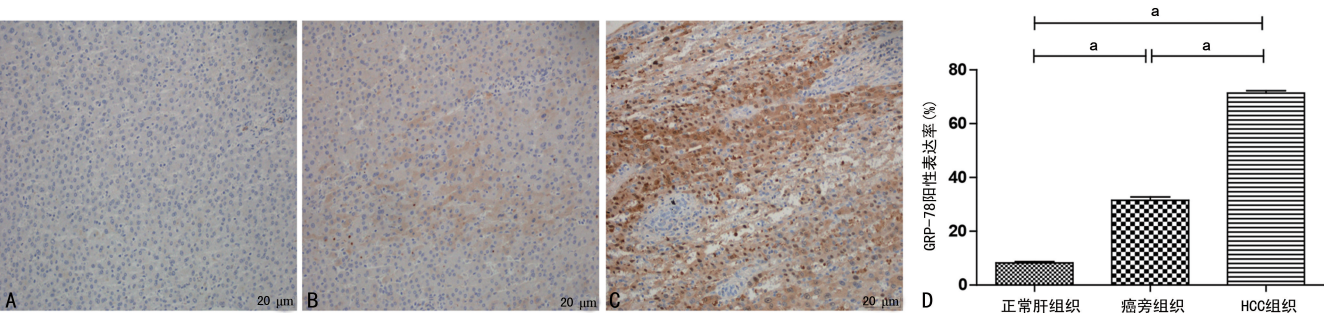
1.3.4 四甲基偶氮唑蓝(MTT)检测细胞增殖

各组细胞培养 24、48、72 h 后,收集各组细胞并调整浓度为 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 。根据分组,向每孔中加入 $100 \mu\text{L}$ 细胞悬液,同时每孔加入 $20 \mu\text{L}$ MTT 溶液。培养 4 h 后,每孔加入 $150 \mu\text{L}$ 二甲基亚砜(DMSO), 37°C

孵育 10 min,检测 570 nm 波长处的吸光度(A)值。计算细胞生长抑制率:细胞生长抑制率=1-干预组 A 值/对照组 A 值。

1.3.5 Western blot 检测

收集分组细胞,应用 RIPA 裂解液裂解细胞样品并提取总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取相同质量的各组样本的蛋白与上样缓冲液混匀,煮沸变性后进行 12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),依次转膜、封闭后,加入 E-cadherin、vimentin、p-P13K、p-Akt 一抗以及对应的二抗孵育。最后使用电化学发光(ECL)法显影。通过 Image J 软件分析条带灰度值,以 GAPDH 为内参,计算各个蛋白的相对表达水平。



A:正常肝组织;B:癌旁组织;C:HCC 组织;D:GRP-78 阳性率统计图;^a: $P<0.01$ 。
图 1 GRP-78 在 HCC 组织、癌旁组织、正常组织中的表达分析(免疫组织化学,400×)

2.2 GRP-78 表达对肝癌临床病理特征的影响

HCC 患者 GRP-78 阳性表达率在不同 TNM 分期中差异有统计学意义($P<0.05$)。在不同性别、年龄段、病理分级中差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 GRP-78 表达对 HCC 临床病理特征的影响[n(%)]

项目	GRP-78 阳性组 (n=59)	GRP-78 阴性组 (n=24)	χ^2	P
年龄(岁)			0.230	0.631
≤55	31(52.54)	14(58.33)		
>55	28(47.46)	10(41.67)		
性别			0.036	0.850
男	43(72.88)	17(70.83)		
女	16(27.12)	7(29.17)		
TNM 分期(2017 AJCC 第八版)			5.528	0.019
I~II	25(42.37)	17(70.83)		
III~IV	34(57.63)	7(29.17)		
病理分级			0.002	0.968
1~2 级	44(74.57)	18(75.00)		
3 级	15(25.43)	6(25.00)		

2.3 GRP-78 mRNA 在不同肝癌细胞系及正常肝细

1.4 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行统计分析。计量资料采用 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GRP-78 在 HCC 组织、癌旁组织、正常肝组织的表达

GRP-78 在 HCC 组织、癌旁组织、正常组织中的阳性表达率分别为 71.1%(59/83)、32.5%(27/83)、8.4%(7/83),HCC 组织中 GRP-78 阳性表达率显著高于癌旁组织及正常肝组织($P<0.05$)。见图 1。

胞系中的表达

与 LO2 比较,GRP-78 mRNA 在肝癌细胞系 HepG2、SMMC-7721、Huh-7、MHCC-97H 中的相对表达水平分别为 2.84 ± 0.36 、 6.84 ± 0.98 、 4.84 ± 0.43 、 3.87 ± 0.36 ,其中 SMMC-7721 中 GRP-78 mRNA 的相对表达水平最高,因此选择 SMMC-7721 细胞进行后续实验,见图 2。

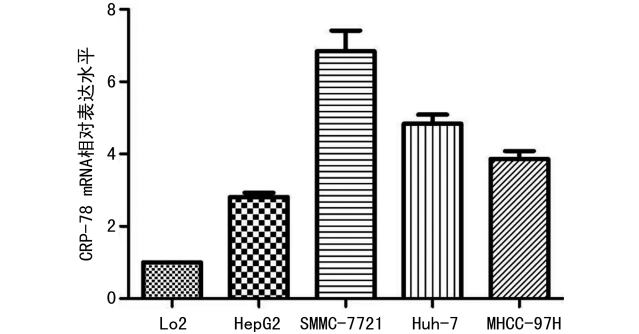


图 2 GRP-78 mRNA 在不同 HCC 细胞系及正常肝细胞系中的表达

2.4 转染 GRP-78 siRNA 后 SMMC-7721 细胞中 GRP-78 的表达

Western blot 检测发现,空白组与 siRNA-NC 组的 GRP-78 相对表达水平差异无统计学意义($P>0.05$),而 GRP-78-siRNA 组细胞中 GRP-78 相对表达水平较以上两组显著下降($P<0.05$),见图 3。

2.5 各组细胞增殖活性比较

MTT 检测显示,48 h 时,空白组、siRNA-NC 组、GRP-78-siRNA 组细胞增殖抑制率分别为 0、2.68%、16.79%,72 h 时分别为 0、3.02%、43.60%,GRP-78-siRNA 组细胞的细胞增殖抑制率各时点显著高于其他两组($P<0.05$)。

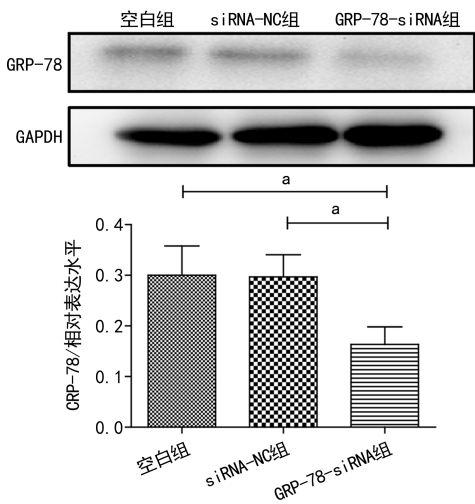
2.6 各组细胞凋亡率比较

48 h 时,空白组、siRNA-NC 组、GRP-78-siRNA 组的细胞凋亡率分别为(4.6±1.3)%、(13.2±1.5)%、(44.9±4.9)%。GRP-78-siRNA 组的细胞凋亡率显著高于空白组及 siRNA-NC 组($P<0.05$, $P<0.01$),见图 4。

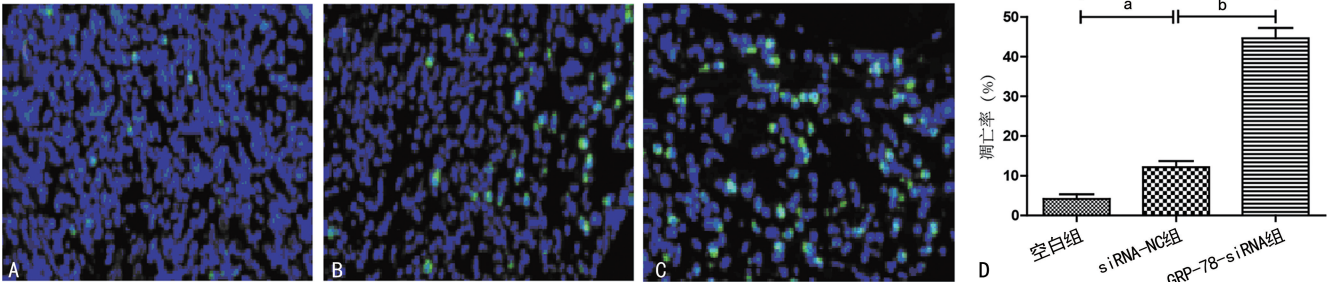
2.7 各组细胞中 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达比较

与空白组、siRNA-NC 组比较,GRP-78-siRNA 组的 E-cadherin 相对表达水平明显升高,vimentin、p-P13K、p-Akt 相对表达水平明显降低,差异均有统计

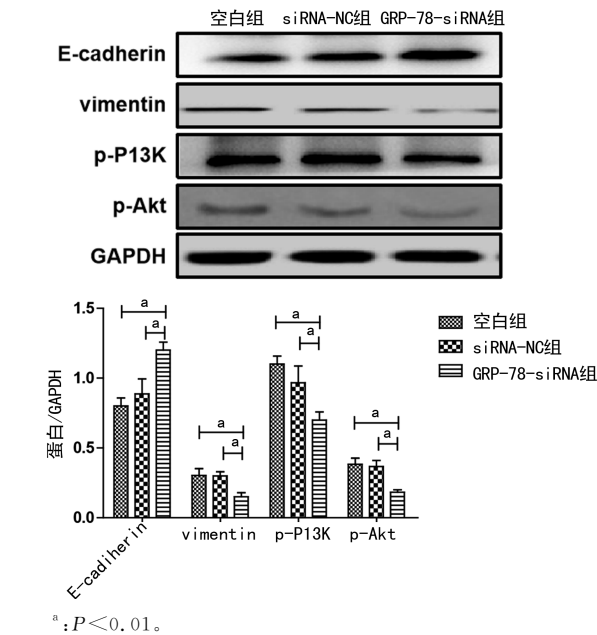
学意义($P<0.01$),见图 5。



^a: $P<0.01$ 。
图 3 各组细胞 GRP-78 的相对表达水平



A:空白组;B:siRNA-NC 组;C:GRP-78-siRNA 组;D:细胞凋亡率统计分析;^a $P<0.05$;^b $P<0.01$ 。
图 4 各组细胞凋亡率比较



^a: $P<0.01$ 。
图 5 3 组细胞中 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达情况

3 讨论

目前,肝癌的治疗方法包括外科治疗、内科治疗、

放疗等。外科治疗方式包括手术切除及肝脏移植,目前认为可取得潜在的治愈机会,但要遵循严格的适应证^[8-9]。内科治疗包括化疗、免疫治疗、靶向治疗等。靶向治疗是整个肿瘤领域中的一个新的研究热点,也是最有治疗潜力的研究方向,而高效靶点的选择则是决定靶向治疗疗效的关键之一^[10-11]。GRP-78 定位于内质网,在维持细胞功能正常运转方面发挥着重要作用^[12]。在恶性肿瘤发生时,新生血管速度及蛋白合成速度难以满足肿瘤细胞对营养物质的需求,会导致细胞内部内质网应激,从而诱发 GRP-78 和其他伴侣蛋白表达上调^[13]。

本研究从临床样本及细胞两个方面对 GRP-78 的表达进行研究。通过免疫组织化学检测发现,GRP-78 在 HCC 组织中阳性表达率显著高于癌旁组织及正常肝组织,表明 GRP-78 可能参与了 HCC 的发生发展。同时,GRP-78 表达与 HCC 患者的 TNM 分期相关,TNM 分期越高,患者的 GRP-78 阳性表达率越高。另外,在多种肝癌细胞系中,GRP-78 mRNA 的相对表达水平均显著高于正常肝细胞 LO2,表明 GRP-78 与肝癌的发生发展密切相关。

细胞凋亡受一系列基因的调控^[14]。本研究进一步探讨了 GPR-78 促进 HCC 生长和转移的分子机制。PI3K/AKT 信号通路参与了许多细胞基本进程的调控,包括细胞生长、增殖等,其信号通路的异常活化会引起癌症与糖尿病等多种疾病^[15-16]。同时,E-cadherin 异常与 PI3K/AKT 信号转导相关。本研究发现,与空白组、siRNA-NC 组比较,GRP-78-siRNA 细胞的 E-cadherin 表达明显升高,这表明 HCC 组织中的 GRP-78 可通过抑制 E-cadherin 促进 HCC 细胞发生转移。另外,在 PI3K/AKT 信号通路中,Akt 一旦被激活,可通过磷酸化底物而发挥抑制细胞凋亡、促进增殖等作用,活化后的 Akt 也可通过磷酸化 vimentin,参与细胞迁移和侵袭。在本研究中,使用 siRNA 技术沉默 GRP-78 的表达可以同时下调 PI3K 及 AKT 的磷酸化水平,并抑制 vimentin 的表达,这间接证明 HCC 组织中 GRP-78 的高水平可以持续活化 PI3K/AKT 信号通路,进而促进 HCC 细胞增殖。

综上所述,本研究发现 GRP-78 在 HCC 患者中的阳性表达率明显较高。下调 GRP-78 表达水平可通过降低 PI3K/AKT 信号通路的活性实现抑制 HCC 细胞的增殖。本研究同样也存在不足,本课题的实验结果仅能证明 GRP-78 与 PI3K/AKT 的持续活化相关,而 GRP-78 表达异常后作用的下游分子尚不清楚,需要后续进行深入研究。

参考文献

- [1] SERHAL R,SALIBA N,HILAL G,et al. Effect of adipose-derived mesenchymal stem cells on hepatocellular carcinoma;In vitro inhibition of carcinogenesis[J]. World J Gastroenterol,2019,25(5):567-583.
- [2] HUANG J,QIU M,WAN L,et al. TGF- β 1 Promotes hepatocellular carcinoma invasion and metastasis via ERK pathway-mediated FGFR4 expression[J]. Cell Physiol Biochem,2018,45(4):1690-1699.
- [3] PERSONENI N,RIMASSA L,PRESSIANI T,et al. Cabozantinib for the treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Expert Rev Anticancer Ther,2019,19(10):847-855.
- [4] NI Y,YE X. Apatinib for hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Ther,2019,15(4):741-742.
- [5] SAMSON A A S,PARK S,KIM S Y,et al. Liposomal co-delivery-based quantitative evaluation of chemosensitivity enhancement in breast cancer stem cells by knockdown of GRP78/CLU[J]. J Liposome Res,2019,29(1):44-52.
- [6] LUO C,QIU J. miR-181a inhibits cervical cancer development via downregulating GRP78[J]. Oncol Res,2017,25(8):1341-1348.
- [7] 中国抗癌协会肝癌专业委员会,中华医学会肝病学分会肝癌学组,中国抗癌协会病理专业委员会,等. 原发性肝癌规范化病理诊断指南(2015年版)[J]. 中华肝胆外科杂志,2015,21(3):145-151.
- [8] WANG C,YANG L,LIANG Z,et al. Long-term survival and prognostic factors of pulmonary metastectomy in liver cancer:a systematic review and meta-analysis[J]. World J Surg,2018,42(7):2153-2163.
- [9] CAI M,SUN X,WANG W,et al. Disruption of peroxisome function leads to metabolic stress, mTOR inhibition, and lethality in liver cancer cells[J]. Cancer Letters,2018,225(4):322-330.
- [10] ESO Y,MARUSAWA H. Novel approaches for molecular targeted therapy against hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology Research,2018,48(8):597-607.
- [12] DONG R,HU D,YANG Y,et al. EETs reduces LPS-induced hyperpermeability by targeting GRP78 mediated Src activation and subsequent Rho/ROCK signaling pathway[J]. Oncotarget,2017,8(31):50958-50971.
- [13] ZHUO S M,LI S C,LIN Y Q,et al. The effects of anti-Fas ribozyme on T lymphocyte apoptosis in mice model with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Iran J Basic Med Sci,2017,20(10):1102-1108.
- [14] ZHANG B,ZHOU P,LI X,et al. Bitterness in sugar:O-GlcNAcylation aggravates pre-B acute lymphocytic leukemia through glycolysis via the PI3K/AKT/c-Myc pathway [J]. Am J Cancer Res,2017,7(6):1337-1349.
- [15] ZHOU M F,FENG Z P,OU Y C,et al. Endoplasmic reticulum stress induces apoptosis of arginine vasopressin neurons in central diabetes insipidus via PI3K/AKT pathway [J]. CNS Neurosci Ther,2019,25(5):562-574.
- [16] CHEN S H,LIU X N,PENG Y. MicroRNA-351 eases insulin resistance and liver gluconeogenesis via the PI3K/AKT pathway by inhibiting FLOT2 in mice of gestational diabetes mellitus[J]. J Cell Mol Med,2019,23(9):5895-5906.