

• 基础研究 •

ME3 对肝癌细胞增殖、迁移和侵袭的影响及机制研究

何俊波¹, 袁一铭¹, 罗振国¹, 马冰沁¹, 钱唯韵¹, 魏 岚¹, 陆一峰^{2*}¹苏州大学附属第三医院全科医学科, ²介入放射科, 江苏 常州 213003

[摘要] 目的: 分析苹果酸酶3(malic enzyme 3, ME3)在肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)组织以及HCC细胞系中的表达水平, 并研究ME3对HCC细胞增殖、迁移和侵袭等方面的影响及其可能机制。方法: 使用癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库分析ME3在HCC组织中的表达; 使用RT-qPCR和Western blot技术检测HCC细胞系中ME3的mRNA以及蛋白的表达水平; 在下调或者上调HCC细胞系中ME3后, 借助CCK-8、平板克隆法、Transwell、侵袭实验研究ME3在肝癌细胞增殖、迁移和侵袭方面的作用; 运用Western blot检测PI3K/AKT信号通路相关蛋白的表达情况。结果: 与癌旁正常组织和正常肝细胞相比, ME3在人类HCC组织和HCC细胞系中表达显著升高, 降低ME3表达能减弱HCC细胞的增殖、迁移及侵袭, 过表达ME3则会导致相反结果; 此外, ME3可以激活PI3K/AKT信号通路。结论: ME3在HCC组织中呈高表达, 促进HCC细胞增殖、迁移以及侵袭, 并可能通过启动PI3K/AKT信号通路在HCC中发挥其促癌基因的作用。

[关键词] ME3; 肝细胞肝癌; 增殖; 迁移; 侵袭; PI3K/AKT信号通路**[中图分类号]** R735.7**[文献标志码]** A**[文章编号]** 1007-4368(2024)08-1062-07**doi:** 10.7655/NYDXBNSN231100

Effects and mechanisms of ME3 on cell proliferation, migration and invasion of hepatocellular carcinoma

HE Junbo¹, YUAN Yiming¹, LUO Zhenguo¹, MA Bingqin¹, QIAN Weiyun¹, WEI Lan¹, LU Yifeng^{2*}¹Department of General Medicine, ²Department of Interventional Radiology, the Third Affiliated Hospital of Soochow University, Changzhou 213003, China

[Abstract] **Objective:** To analyze the expression of malic enzyme 3 (ME3) in hepatocellular carcinoma (HCC) tissues and cell lines, and explore the effects of ME3 on the proliferation, migration, and invasion of HCC cells, as well as its underlying mechanism. **Methods:** The Cancer Genome Atlas (TCGA) database was used to study the expression of ME3 in HCC tissues. RT-qPCR and Western blot were performed to detect the mRNA and protein expression levels of ME3 in HCC cells. After knocking down or over expressing ME3 in HCC cell lines, the effects of ME3 on the proliferation, migration and invasion of HCC cells were detected by CCK-8 assay, colony formation assay, transwell assay, and invasion assay. Western blot was used to detect the expression of proteins related to the PI3K/AKT signaling pathway. **Results:** Compared with adjacent normal tissues and normal liver cell line, ME3 was significantly up-regulated in HCC tissues and cell lines. Knockdown of ME3 markedly inhibited the ability of proliferation, migration and invasion of HCC cells, while overexpression of ME3 resulted in the opposite effects. Furthermore, we found that the activity of PI3K/AKT signaling pathway was significantly activated by ME3. **Conclusion:** ME3 is highly expressed in HCC tissues, promoting the proliferation, migration and invasion of HCC cells, and may function as an oncogene in HCC by activating the PI3K/AKT signaling pathway.

[Key words] ME3; hepatocellular carcinoma; proliferation; migration; invasion; PI3K/AKT signaling pathway

[J Nanjing Med Univ, 2024, 44(08): 1062-1068]

[基金项目] 国家自然科学基金(81672402); 常州市应用基础研究(CJ20230057)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail: luyifeng19810104@163.com

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球范围内最常见的恶性肿瘤之一, 在中国所有肿瘤病例中, HCC的发病率位列第4, 但是死亡人数却高居第3位^[1]。HCC生长速度快, 患者早期常无特

殊症状,治疗效果差,5年生存率低,已成为全球严重的健康负担^[2]。因此,从分子水平研究HCC的发病机理,寻找重要的作用分子,阐明HCC发生与发展的机制迫在眉睫。

肿瘤细胞的生长和转移过程中常伴随着细胞能量代谢重编程,其中有氧糖酵解是重要途径之一^[3-4]。苹果酸酶(malic enzyme, ME)是一类催化苹果酸氧化脱羧为丙酮酸和二氧化碳的氧化脱羧酶,能够调控烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH)的生成从而影响肿瘤细胞的糖酵解过程^[5-6]。ME3是ME家族成员之一,在人体不同肿瘤中的表达和作用机制已被逐渐研究报道,如ME3在胰腺癌组织中高表达,且与患者的不良预后呈正相关,其可能通过激活TGF- β /Smad信号通路促进胰腺癌细胞上皮间质转化^[7]。此外,ME3能促进脑神经胶质瘤增殖、迁移、侵袭和间质转换等恶性行为^[8]。然而,关于ME3对肝癌细胞的生物学功能及其分子调控机制尚不明确。本研究通过生物信息学分析ME3在HCC组织中的表达及与HCC患者预后的关系。随后,采用CCK-8、平板克隆形成、Transwell及侵袭实验、Western blot方法检测ME3对HCC细胞增殖、迁移和侵袭的影响及其可能机制。

1 材料和方法

1.1 材料

正常肝细胞系LO2以及3种HCC细胞系HepG2、BEL-7402及SMMC-7721购于上海中国科学院细胞库。胎牛血清和DMEM培养基(Gibco公司,美国);PCR试剂盒(TaKaRa公司,日本);转染试剂Lipo-fectamine 2000(Invitrogen公司,美国);CCK-8试剂盒(上海翊圣公司);兔抗人ME3、PI3K、p-AKT、AKT抗体(Cell Signaling公司,美国);鼠抗人 β -tubulin抗体(Bioworld公司,美国)。

1.2 方法

1.2.1 数据库分析

分析癌症基因组图谱(The Cancer Genome Atlas, TCGA)数据库中HCC患者肿瘤组织和癌旁正常组织的ME3表达量差异,并通过基因表达谱数据动态分析(Gene Expression Profiling Interactive Analysis, GEPIA)网站分析ME3表达量与HCC患者总体生存率的关系。根据GEPIA数据库中ME3表达中位数,将HCC患者分为高表达组和低表达组,进行预后研究。

1.2.2 细胞培养与转染

细胞培养于37℃、含有5% CO₂、95%湿度的培养箱内,用含10%胎牛血清的DMEM培养基培养。干扰质粒sh-ME3及过表达质粒Flag-ME3均由本实验室构建,对照质粒分别为sh-EGFP和Vector。将正处在对数增长阶段的肝癌细胞种植在6孔板上,接种密度为 2×10^5 个/孔,培养20 h后根据Lipo-fectamine 2000说明书进行细胞转染,转染6 h后,更换DMEM培养基,继续培养48 h,收集细胞进行后续实验。

1.2.3 实时荧光定量PCR (quantitative real time polymerase chain reaction, RT-qPCR)

Trizol试剂使用指南步骤,实施使用Trizol试剂提取细胞RNA,随后将RNA反转录成cDNA。采用RT-qPCR法,以 β -actin为内参检测ME3的mRNA水平。ME3上游引物序列:5'-CTTGTTTCGCTTTCCTGG-3',下游引物序列:5'-CAGGTGCTCCCAAAGGGTTA-3'; β -actin上游引物序列:5'-AGATGTGATCAGCAAGCAG-3',下游引物序列:5'-GCGCAAGTTAGGTTTTGTCA-3'。

1.2.4 蛋白免疫印迹实验(Western blot)

HCC细胞转染48 h后,收集细胞并裂解提取蛋白。100℃煮沸10 min后,12 000 r/min离心5 min收取上清。10%的SDS-PAGE电泳分离蛋白质,并以300 mA的电流转到PVDF膜。5%的脱脂牛奶常温封闭1 h。一抗孵育4℃过夜,TBST洗膜3次,每次10 min。二抗常温孵育1 h,TBST再次洗膜3次,每次10 min。采用ECL化学发光法曝光,检测目的条带。

1.2.5 CCK-8实验

将转染后生长48 h的HCC细胞用胰酶消化后重新接种至96孔板中,接种密度为 2×10^3 个/孔,分为对照组和实验组,每组设置5个复孔,另外设置无细胞的空白对照组作为参照。每天向96孔板中加入CCK-8试剂盒;第4天CCK-8试剂加入后,将孔板放入培养箱避光继续孵育1~2 h,随后酶标仪测量各孔在450 nm波长处的吸光度值,实验重复3次并绘制细胞增殖曲线。

1.2.6 平板克隆形成实验

HCC细胞转染48 h后种植到6孔板上,每孔500个细胞,并分为实验组和对照组。将6孔板置入恒温培养箱培养10~15 d后,观察细胞克隆,用4%多聚甲醛固定细胞后结晶紫染色,PBS清洗染液后常温干燥,拍照统计细胞克隆的数目。

1.2.7 细胞迁移和侵袭实验

将肝癌细胞转染24 h后消化,用不含胎牛血清的DMEM培养基重悬,细胞计数。将Transwell小室置于24孔板中,在小室上方加入 1×10^6 个细胞,200 μ L无血清培养基,小室下方加入500 μ L含血清的DMEM新鲜培养基。1 d后,取出Transwell细胞培养器,用棉签轻轻擦掉顶部小室表面细胞,然后使用4%多聚甲醛固定30 min, PBS溶液洗净后涂上结晶紫染色30 min, PBS溶液清洗后拍照并计数。侵袭实验中,将Transwell小室更换为含BD凝胶的小室,其他步骤与细胞迁移实验相同。

1.3 统计学方法

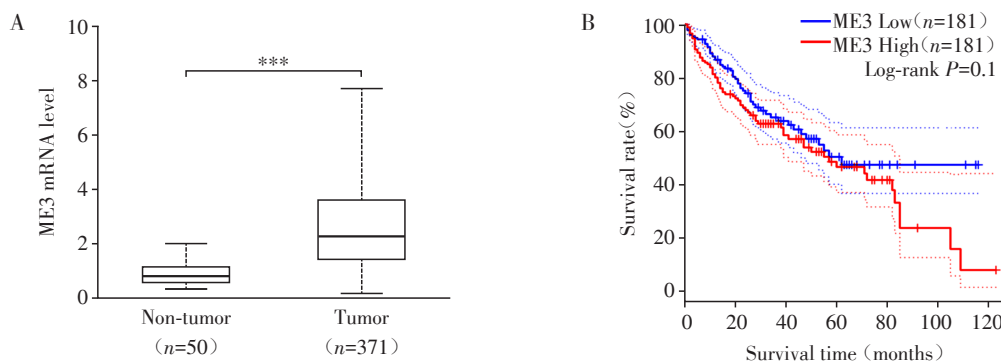
使用SPSS 20.0和GraphPad Prism 8软件进行统

计学分析,所有数据用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间差异比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ME3与肝癌预后的相关性分析

TCGA数据库分析显示HCC患者肿瘤组织中ME3的表达较癌旁正常组织显著上调(图1A, $P < 0.001$)。通过GEPIA数据库分析HCC组织中ME3 mRNA表达量与HCC患者生存率的关系,结果显示与ME3 mRNA低表达患者相比,高表达患者预后相对较差,但差异无统计学意义(图1B, $P > 0.05$)。



A: Comparison of ME3 levels between tumor tissues and adjacent normal tissues of HCC patients in TCGA database. B: Analysis of the correlation between ME3 expression and the prognosis of HCC patients by the GEPIA database. *** $P < 0.001$.

图1 HCC患者中ME3的表达及其对预后的影响

Figure 1 Expression of ME3 in HCC patients and its effect on prognosis

2.2 ME3在肝癌细胞株中的表达及质粒sh-ME3和Flag-ME3的效果验证

对人正常肝细胞LO2以及HCC细胞系Bel-7402、SMMC-7721、HepG2中ME3的mRNA和蛋白表达进行检测。结果表明,与LO2细胞相比,HCC细胞系Bel-7402、SMMC-7721、HepG2中ME3表达较高(图2A、B)。在相对高表达ME3的HepG2中转染干扰质粒sh-ME3,ME3的mRNA和蛋白表达均显著降低($P < 0.01$),验证了干扰效率(图2C)。在相对低表达ME3的SMMC-7721中转染过表达质粒Flag-ME3,其过表达效果同样得到证实(图2D)。

2.3 干扰ME3的表达下调肝癌细胞增殖、迁移与侵袭能力

在HepG2中转染sh-ME3干扰质粒,CCK-8实验结果表明,敲低ME3的HepG2细胞增殖活性受到抑制(图3A),平板克隆实验表明敲低ME3的细胞克隆形成能力下降(图3B)。同时,Transwell和侵袭实验

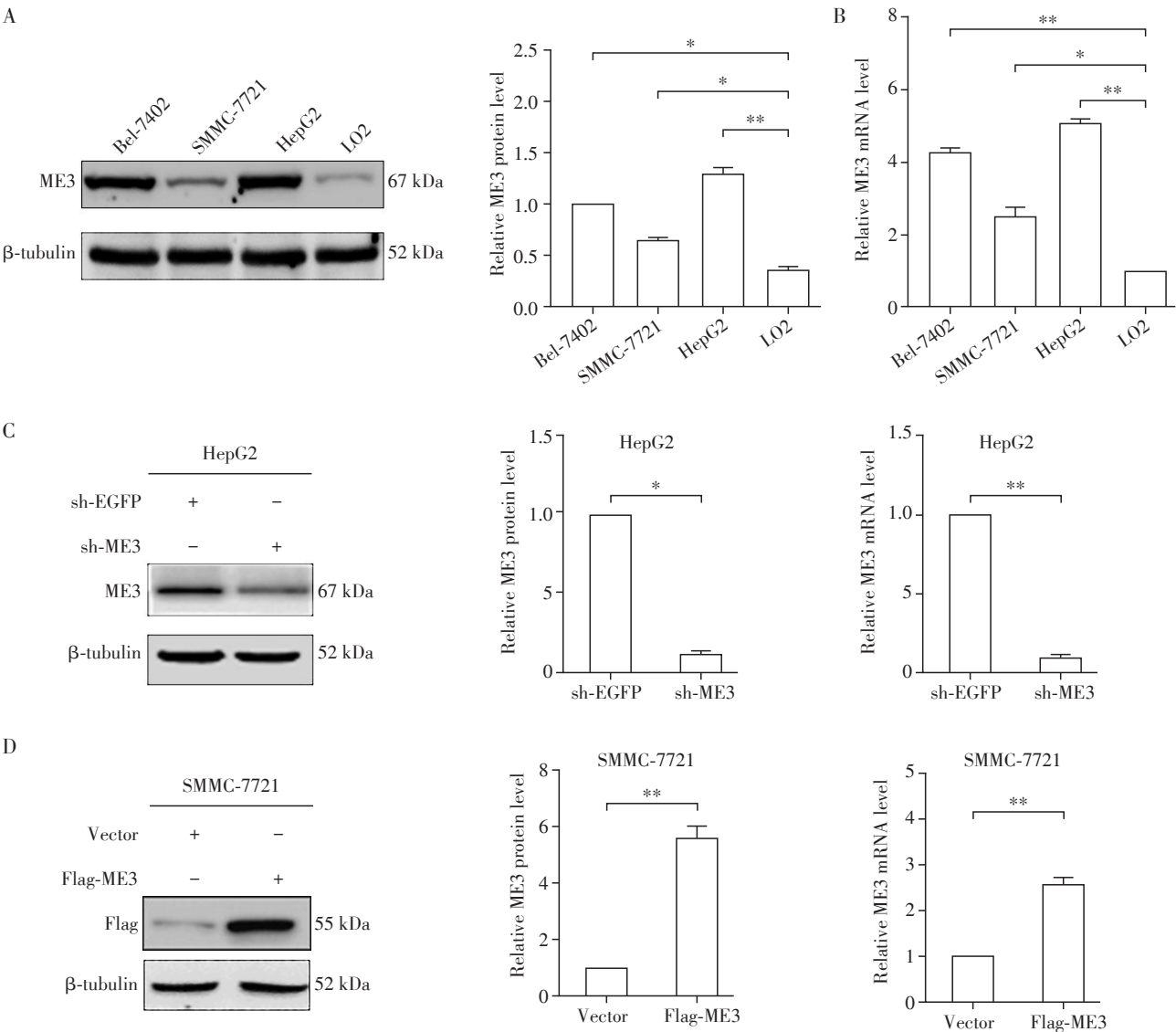
也表明下调ME3可以减弱肝癌细胞的迁移及侵袭能力(图3C)。这表明,敲低ME3的表达能够抑制肝癌细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

2.4 上调ME3的表达增强HCC细胞增殖、迁移与侵袭能力

在SMMC-7721中转染Flag-ME3过表达质粒,CCK-8实验的数据显示ME3过表达的SMMC-7721细胞的增殖活性提高(图4A),平板克隆实验证明过表达ME3的细胞克隆形成能力增强(图4B)。与此同时,Transwell和侵袭实验表明上调ME3可以促进HCC细胞的迁移及侵袭(图4C)。因此,过表达ME3可以增强HCC细胞增殖、迁移和侵袭能力。

2.5 ME3在HCC细胞中通过活化PI3K/AKT通路发挥促癌基因作用

为深入探究ME3增强HCC细胞增殖、迁移及侵袭能力可能的分子机制,检测上调或下调ME3对PI3K/AKT通路的影响。结果表明,敲低ME3后,



A: The protein expression levels of ME3 in LO2, Bel-7402, SMMC-7721 and HepG2 cells were examined by Western blot ($n=3$). B: The mRNA expression levels of ME3 in LO2, Bel-7402, SMMC-7721 and HepG2 cells were assessed using RT-qPCR ($n=3$). C: ME3 protein and mRNA expression levels were reduced in HepG2 cells transfected with sh-ME3 ($n=3$). D: ME3 protein and mRNA expression levels were increased in SMMC-7721 cells transfected with Flag-ME3 ($n=3$). * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$.

图2 ME3在HCC细胞中表达上调
Figure 2 ME3 was up-regulated in HCC cells

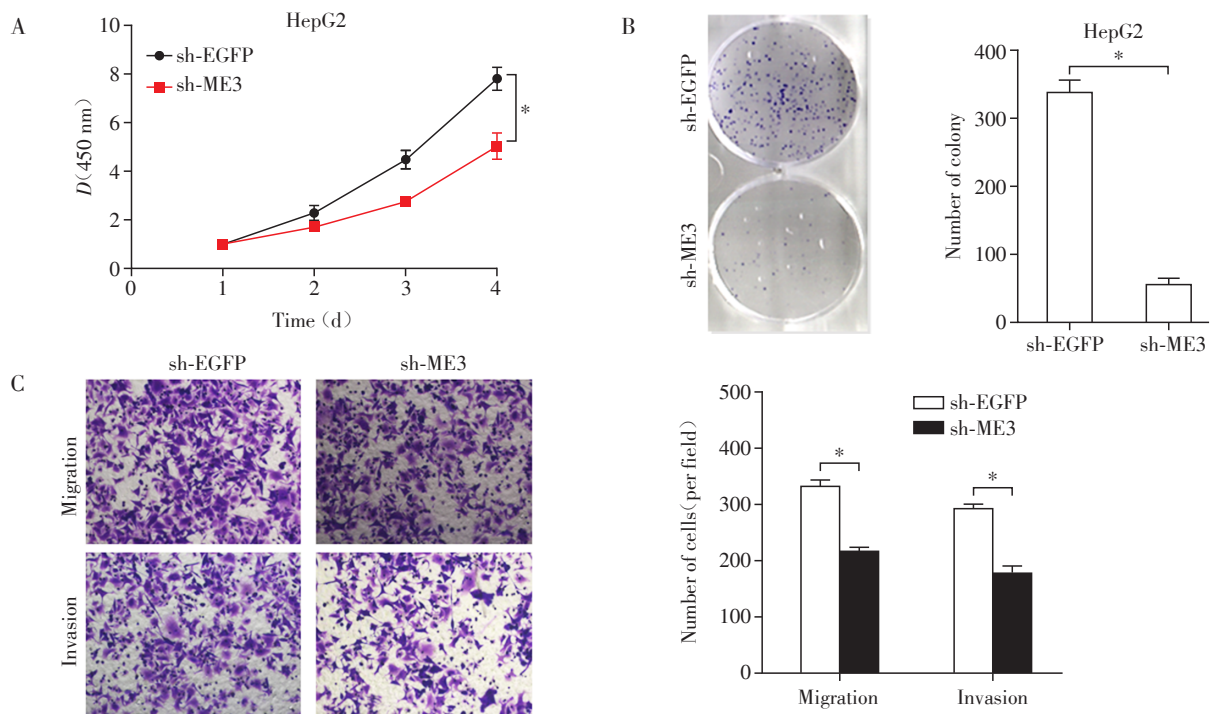
AKT表达不变,PI3K、p-PI3K和p-AKT的表达明显减弱。相反,过表达ME3后,AKT表达不变,PI3K、p-PI3K和p-AKT的表达明显增强(图5)。

3 讨论

HCC是全球最常见的恶性肿瘤类型之一,尤其在发展欠缺的国家,它是恶性肿瘤相关死亡的主要原因之一。HCC发现一般较晚,进展快,被确诊时经常已发生转移,因此治疗效果差,其5年存活率仅为3%~25%,对人类的健康构成了严重威胁^[9]。所

以,迫切需要探究肝癌增殖和转移的潜在分子机制,这将有助于研发新的诊疗方案并延长肝癌患者的生存时间。

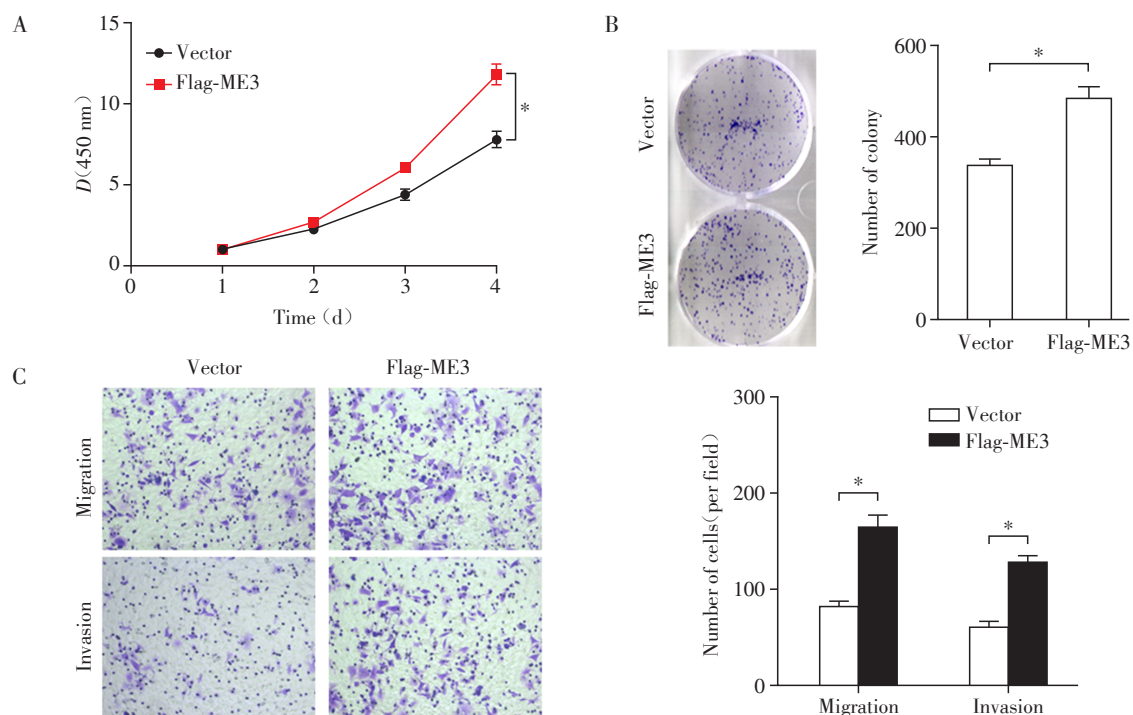
细胞能量代谢重编程是肿瘤发生发展的重要标志之一,大量研究表明有氧糖酵解的持续激活(Warburg效应)与包括HCC在内的各种肿瘤的发生发展有关,而ME家族在此过程中重要发挥作用^[10-11]。已有研究表明,ME1和ME2在HCC中表达升高,能促进HCC细胞的生长,且其表达水平与患者的不良预后有关^[12-13]。作为ME家族中重要的一员,ME3已



A: CCK-8 assay showed that treatment with sh-ME3 decreased the cell viability of HepG2 cells at 1, 2, 3 and 4 days ($n=3$). B: ME3 knockdown inhibited cell clone formation in HepG2 cells ($n=3$). C: Transwell and invasion assays indicated that ME3 knockdown inhibited the migration and invasion abilities of HepG2 cells ($\times 40$, $n=3$). $^*P < 0.05$.

图3 敲低ME3可以抑制HCC细胞的增殖、迁移和侵袭

Figure 3 ME3 knockdown inhibited the proliferation, migration and invasion of HCC cells



A: CCK-8 assay showed that treatment with Flag-ME3 increased the cell viability of SMMC-7721 cells at 1, 2, 3 and 4 days ($n=3$). B: ME3 over expression promoted cell clone formation in SMMC-7721 cells ($n=3$). C: Transwell and invasion assays indicated that ME3 over expression promoted the migration and invasion abilities of SMMC-7721 cells ($\times 40$, $n=3$). $^*P < 0.05$.

图4 过表达ME3可以促进HCC细胞的增殖、迁移和侵袭

Figure 4 ME3 overexpression promoted the proliferation, migration, and invasion of HCC cells

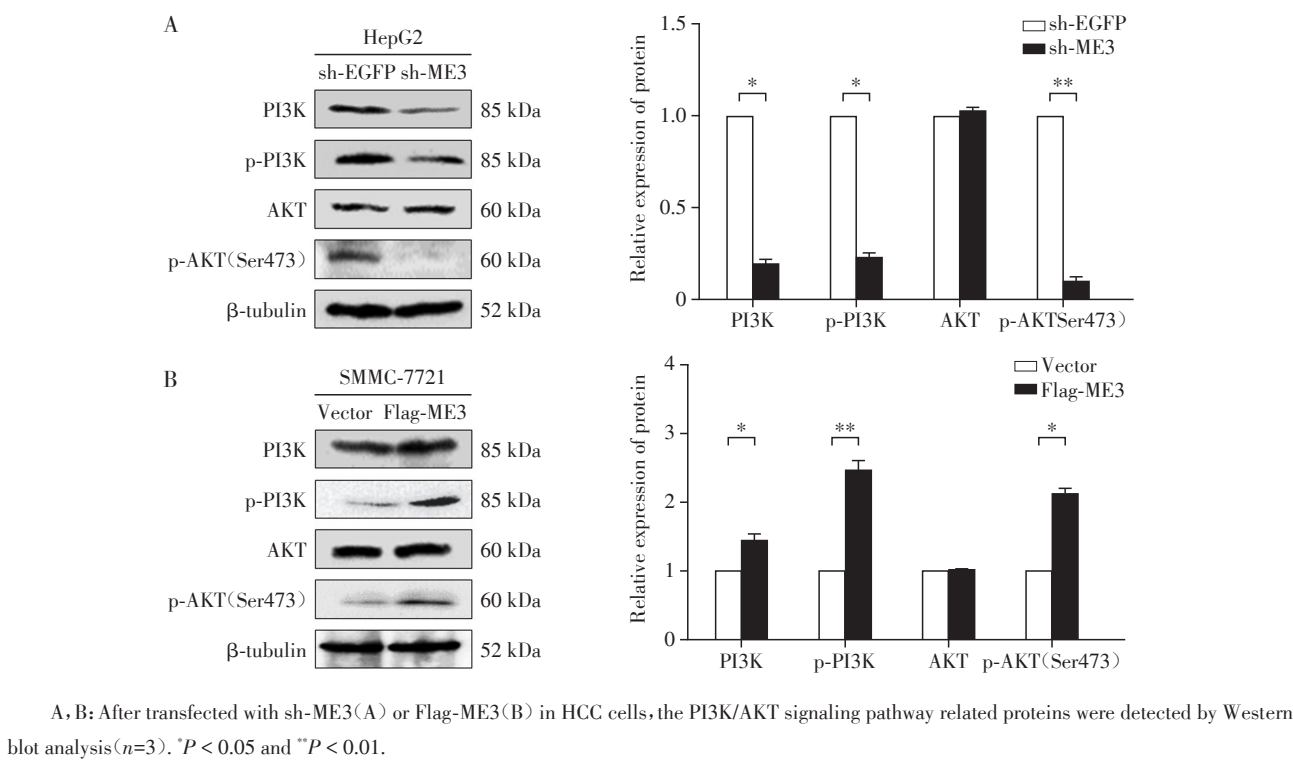


图5 ME3活化HCC细胞PI3K/AKT通路
Figure 5 ME3 activated the PI3K/AKT signaling pathway in HCC cells

被发现在脑神经胶质瘤和胰腺癌等恶性肿瘤发生发展中发挥作用,然而其在HCC中的表达水平及其作用尚不清楚。为研究ME3在HCC中的作用,首先对TCGA数据库中肝癌患者ME3的表达水平进行分析,结果发现在HCC组织中ME3的水平明显高于癌旁正常组织,为进一步研究ME3对HCC细胞的功能,通过RT-qPCR和Western blot检测ME3在正常肝细胞和HCC细胞中的表达量,发现在HCC细胞中ME3的水平明显高于正常肝脏细胞。利用干扰质粒sh-ME3和过表达质粒Flag-ME3下调或者上调HCC细胞中ME3的表达,通过CCK-8、克隆平板法、Transwell、侵袭实验探索ME3对HCC细胞增殖、迁移和侵袭功能的影响,结果发现抑制ME3表达可降低HCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力,而过表达ME3可以增强HCC细胞的增殖、迁移和侵袭能力。

在大部分人类恶性肿瘤的产生和发展过程中,磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/AKT)信号通路被视为经典信号传导方式之一^[14]。此通路在肿瘤细胞中的活性较高,能够参与肿瘤细胞的生长、死亡、侵袭以及转移等各种过程。PI3K是脂质激酶家族重要成员之一,被激活后可以合成磷脂酰肌醇第二信使,然后与下游的AKT结合相互作用,使AKT蛋白发生磷酸化^[15]。AKT的磷酸化有助于触

发或抑制信号通道下游的目标蛋白,例如Bcl-2蛋白家族,Cyclin蛋白家族等,进而影响肿瘤细胞的扩增或凋亡^[16]。更重要的是,先前的研究表明,PI3K/AKT信号通道在肝癌的生成和发展过程中起着决定性的作用,过度激活此信号通道能促进肝癌细胞的生长和迁移,且与患者的不良预后呈正相关^[17]。有研究表明,下调ME2可以诱导肺癌细胞死亡和分化,并影响PDK1和PTEN的表达从而抑制PI3K/AKT通路^[18]。而ME3与PI3K/AKT信号转导通路的关系研究较少。因此,本研究为进一步探究ME3促进HCC细胞增殖和迁移侵袭的机制,检测了ME3是否对PI3K/AKT信号通路具有调节作用。结果显示,敲低ME3后,PI3K、p-PI3K表达下降,从而抑制下游AKT的磷酸化,即敲低ME3后PI3K/AKT信号通路被明显抑制。过表达ME3后,PI3K、p-PI3K表达增加,促进p-AKT的表达增加,即上调ME3后PI3K/AKT信号通路被显著激活。

综上所述,本研究显示ME3在HCC组织中表达显著升高。在体外实验中,ME3能促进HCC细胞的增殖、迁移和侵袭,从而促进HCC的发生发展,其机制可能通过激活PI3K/AKT信号通路来实现,因此它可能会成为针对HCC靶向治疗新的潜在靶点。然而,本研究局限于体外实验,下一步研究将通过

动物模型验证 ME3 对 HCC 发生发展的影响及其可能机制。

[参考文献]

- [1] QIU H B, CAO S M, XU R H. Cancer incidence, mortality, and burden in China: a time-trend analysis and comparison with the United States and United Kingdom based on the global epidemiological data released in 2020[J]. *Cancer Commun*, 2021, 41(10): 1037–1048
- [2] 朱德明, 孔连宝, 贾文博, 等. ANKRD1 通过介导上皮细胞间充质转化促进肝细胞肝癌增殖与转移[J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2023, 43(4): 484–491
- [3] HANAHAN D, WEINBERG R A. Hallmarks of cancer: the next generation[J]. *Cell*, 2011, 144(5): 646–674
- [4] POFF A, KOUTNIK A P, EGAN K M, et al. Targeting the Warburg effect for cancer treatment: ketogenic diets for management of glioma[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 56: 135–148
- [5] WANG Y P, SHARDA A, XU S N, et al. Malic enzyme 2 connects the Krebs cycle intermediate fumarate to mitochondrial biogenesis[J]. *Cell Metab*, 2021, 33(5): 1027–1041
- [6] LEE W C, JI X, NISSIM I, et al. Malic enzyme couples mitochondria with aerobic glycolysis in osteoblasts [J]. *Cell Rep*, 2020, 32(10): 108108
- [7] ZHANG Q, LI J, TAN X P, et al. Effects of ME3 on the proliferation, invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through epithelial-mesenchymal transition[J]. *Neoplasma*, 2019, 66(6): 896–907
- [8] 陈 曦, 韩 秀, 唐 宇, 等. 苹果酸酶 3(ME3)对人脑胶质瘤细胞的增殖、迁移、侵袭及间质转换的影响[J]. *中国细胞生物学学报*, 2018, 40(6): 867–875
- [9] SHAH M M, MEYER B I, RHEE K, et al. Conditional survival analysis of hepatocellular carcinoma[J]. *J Surg Oncol*, 2020, 122(4): 684–690
- [10] ZHOU Y M, LIN F R, WAN T, et al. ZEB1 enhances warburg effect to facilitate tumorigenesis and metastasis of HCC by transcriptionally activating PFKM [J]. *Theranostics*, 2021, 11(12): 5926–5938
- [11] LEE D, ZHANG M S, TSANG F H, et al. Adaptive and constitutive activations of malic enzymes confer liver cancer multilayered protection against reactive oxygen species[J]. *Hepatology*, 2021, 74(2): 776–796
- [12] ZHANG S, CHENG Z M, YU J L, et al. Malic enzyme 2 promotes the progression of hepatocellular carcinoma via increasing triglyceride production[J]. *Cancer Med*, 2021, 10(19): 6795–6806
- [13] MIHARA Y, AKIBA J, OGASAWARA S, et al. Malic enzyme 1 is a potential marker of combined hepatocellular cholangiocarcinoma, subtype with stem-cell features, intermediate-cell type [J]. *Hepatol Res*, 2019, 49(9): 1066–1075
- [14] EDIRIWEERA M K, TENNEKOON K H, SAMARAKOON S R. Role of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in ovarian cancer: Biological and therapeutic significance[J]. *Semin Cancer Biol*, 2019, 59: 147–160
- [15] LIEN E C, DIBBLE C C, TOKER A. PI3K signaling in cancer: beyond AKT[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2017, 45: 62–71
- [16] ZHANG Y, LIU S, MA J L, et al. Apocynumvenetum leaf extract alleviated doxorubicin - induced cardiotoxicity through the AKT/Bcl-2 signaling pathway[J]. *Phytomedicine*, 2022, 94: 153815
- [17] TIAN L Y, SMIT D J, JÜCKER M. The role of PI3K/AKT/mTOR signaling in hepatocellular carcinoma metabolism[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(3): 2652
- [18] REN J G, SETH P, CLISH C B, et al. Knockdown of malic enzyme 2 suppresses lung tumor growth, induces differentiation and impacts PI3K/AKT signaling [J]. *Sci Rep*, 2014, 4: 5414

[收稿日期] 2023–11–27

(本文编辑: 戴王娟)