

Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1 促进肝癌细胞的转移

倪庆锋¹,孔连宝²,刘 静¹,蔡卫华^{1*}

(¹南通大学附属南通第三医院普外科,江苏 南通 226000;²南京医科大学第一附属医院肝脏外科,江苏 南京 210029)

[摘要] 目的:探讨 Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1(ROCK1)在肝癌中的表达及在肝癌侵袭中的作用。方法:荧光定量 PCR(real-time PCR)检测肝癌及癌旁组织中 ROCK1 的 mRNA 表达水平,同时检测肝癌细胞系及正常人肝细胞中 ROCK1mRNA 表达水平,免疫组织化学染色(IHC)法检测肝癌及癌旁组织中 ROCK1 蛋白的表达量,并通过在肝癌细胞株中过表达及干扰 ROCK1 分析 ROCK1 蛋白对肝癌细胞转移的作用。结果:60 对样本中有 42 对 ROCK1 的 mRNA 表达水平在肝癌组织中高于癌旁组织,免疫组织化学染色提示肝癌组织中 ROCK1 蛋白表达量高于癌旁组织。在体外肝癌细胞的功能实验中,过表达 ROCK1 能促进 HepG2 细胞的侵袭和转移,而干扰 ROCK1 的表达能减少 SMMC-7721 细胞的侵袭和转移。结论:ROCK1 在肝癌组织中高表达,过表达 ROCK1 能促进肿瘤的侵袭及转移,ROCK1 可能成为临床治疗中抑制肿瘤侵袭和转移的靶点。

[关键词] ROCK1;肝细胞性肝癌;肿瘤侵袭

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2013)10-1377-06

doi:10.7655/NYDXBNS20131009

Ectopic overexpression of ROCK1 promotes cellular invasion of hepatocellular carcinoma

Ni Qingfeng¹,Kong Lianbao²,Liu Jing¹,Cai Weihua^{1*}

(¹Department of General Surgery,the Third Affiliated Hospital of Nantong University,Nantong 226000;²Department of Hepatic Surgery,the First Affiliated Hospital of NJMU,Nanjing 210029,China)

[Abstract] **Objective:**To detect the expression and explored the role of ROCK1 in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods:**The expression of ROCK1 mRNA in HCC samples and cell lines was detected by real-time PCR,while the expression of ROCK1 protein in HCC tissues and adjacent non-cancer tissues was assessed by immunohistochemistry. In addition,invasion of HCC cells was observed after overexpressing or silencing ROCK1. **Results:**In the total of 60 paired HCC specimens,compared with the adjacent non-cancer tissues,the expression of ROCK1 mRNA was up-regulated in 42 cases ($P < 0.05$),and the expression of ROCK1 protein in HCC tissues was higher than that in adjacent non-cancer tissues. Overexpression of ROCK1 enhanced HCC-derived HepG2 cellular invasion *in vitro*. In contrast,ROCK1 knockdown via RNAi markedly suppressed these phenotypes in SMMC-7721. **Conclusion:**This study indicates ROCK1 is frequently overexpressed in hepatocellular carcinoma,and contributes to tumor cell invasion. ROCK1 may be a novel therapeutic target for prevention and treatment of invasion in HCC.

[Key words] ROCK1;hepatocellular carcinoma;tumor invasion

[Acta Univ Med Nanjing,2013,33(10):1377-1382]

肝细胞性肝癌是世界上恶性程度最高的肿瘤之一,特别是在东南亚及非洲沙哈拉沙漠以南地区,肝癌的发生率较高^[1-2]。近年来,中国肝癌的发生率也明显增高^[3-4],肝癌发生的主要危险因素包括慢性乙型肝炎病毒感染、病毒性肝硬化和进食含黄曲霉素

的食物^[5]。目前,肝部分切除和肝移植术仍然是治疗原发性肝癌的主要手段,但由于术后的高转移及高复发率,患者术后的五年生存率只有 30%~40%^[6],因此,需要了解肝细胞肝癌复发及转移的分子机制,希望可以找到一个肝癌治疗的有效手段。Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1(ROCK1)属于丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,是 Rho 蛋白下游分子中最重要中的一个,Rho 蛋白激酶家族有 2 种亚型:ROCK1 和 ROCK2,它们有 65%的同源性^[7],细胞间黏附的丢

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81272229)

*通信作者 (Corresponding author),E-mail:weihuacai196508@163.com

失,细胞骨架的解体和转移能力的获得是肿瘤转移的第一步。越来越多的证据表明 Rho/ROCK 在很多细胞功能中发挥重要作用:如血管平滑肌细胞的收缩,细胞的迁移,增殖和细胞骨架的重新排列,包括弹力纤维的合成和肿瘤的侵袭等^[7-9]。然而 Rho/ROCK 通路在肝细胞性肝癌中的作用并没有深入研究。本实验通过 real-time PCR 及免疫组织化学染色检测肝癌及癌旁组织中 ROCK1 的 mRNA 和蛋白量的表达水平,并通过在肝癌细胞株中过表达及干扰 ROCK1,分析 ROCK1 蛋白对肝癌细胞转移的作用,为肝细胞癌的转移机制及治疗提供新的线索及思路。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织标本

在南通大学附属第三医院收集了 2010 年 3 月~2012 年 10 月间肝癌手术切除的 60 对肝癌及癌旁组织标本,所有标本的病理结果均通过常规切片及免疫组化结果确认,标本均通过液氮保存,实验得到患者本人及南通大学附属第三医院伦理委员会的同意。

1.1.2 肝癌细胞培养

人类肝癌细胞系(SMMC-7721、LM6、MHCC-L、Huh7、HepG2)及正常人肝细胞 L02 来自南通大学实验室,所有的细胞都在恒温 37℃,含 5%CO₂ 的细胞培养箱中进行培养,培养基为添加了 10%胎牛血清、50 U/ml 青霉素和 50 μg/ml 庆大霉素的 DMEM。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学染色

60 对原发性肝癌及癌旁组织经 4%中性福尔马林固定,石蜡包埋,切成 4 μm 的石蜡切片,免疫组化染色的步骤包括:脱蜡,水化,3%过氧化氢灭活内源性过氧化物酶,柠檬酸抗原修复,封闭液封闭非特异性结合位点,兔抗 ROCK1 抗体 4℃孵育过夜(Santa Cruz 公司,美国),加生物素二抗,加辣根酶标记链霉卵白素工作液,DAB 显色,苏木紫复染,脱水,透明,中性树脂封片,显微镜下观察。具体的步骤参照免疫组化试剂盒的说明书(ZSGB-BIO)。

1.2.2 构建 ROCK1 过表达质粒

pcDNA3.1B 来自南通大学实验室,从人类肝脏 cDNA 文库中找到 ROCK1 的开放读码框(GenBank: NM_005406.2),通过 PCR 扩增 ROCK1 的 cDNA,

PCR 的正向引物序列:5'-AGGCGGCCGCATGTC-GACTGGGGACAGTTT-3',反向引物序列:5'-AGGATATCTTAAGTAGTTTTCCAGATGTAT-3'。最后通过限制性核酸内切酶 *Not* I 和 *Eco*R V 酶切,solution I 连接,将 ROCK1 的 cDNA 插入 pcDNA3.1B,构建完成 pcDNA3.1B-ROCK1,构建的过表达质粒送金斯瑞公司测序证实构建成功(引物由南京金斯瑞合成)。

1.2.3 小干扰 RNA 的准备

利用 Invitrogen 网站获得 ROCK 的小干扰 RNA 序列如下:siRNA-1410:5'-CCUGGUGGAGAUCU-UGUAAAdTdT-3'(sense),5'-UUACAAGAUCUCCAC-CAGGdTdT-3'(antisense),Negative control:5'-UUC-UCCGAACGUGUCACGUTT-3'(sense),5'-ACGUGA-CACGUUCGGAGAATT-3'(antisense),均由上海吉玛公司合成。

1.2.4 质粒及小干扰 RNA 的转染

质粒及小干扰 RNA 都是通过 Lipofectamine2000(Invitrogen 公司,美国)进行转染,具体的转染步骤参照试剂商的说明书,转染时的细胞密度分别是 80%~90%和 30%~50%。

1.2.5 RNA 的提取及 Real-time PCR

所有组织及细胞系的 RNA 都是通过 TRIzol(Invitrogen 公司,美国)提取,具体的 RNA 提取步骤参照试剂商的说明书,然后通过反转录试剂盒(TaKaRa 公司,日本)将 RNA 逆转录成 cDNA,反转录体系:RNA 模板 1 μg,5× PrimeScript® Buffer 2 μl,PrimeScript® RT Enzyme Mix I 0.5 μl,Oligo dT Prime 0.5 μl,Random 6 mers 2 μl,ddH₂O 4 μl。反转录反应条件:37℃ 15 min,85℃ 5 s,4℃ forever。最后通过定量 PCR 试剂盒(TaKaRa 公司,日本)进行定量检测,Real-time PCR 体系:cDNA 2 μl,SYBR 10 μl,Forward Primer 0.4 μl,Reverse Primer 0.4 μl,ddH₂O 7.2 μl。Real-time PCR 反应条件:95℃ 30 s 预变性,95℃ 5 s 变性,60℃ 30 s 退火延伸,40 个循环。ROCK1 的 Forward Primer:5'-AGGAAGCG-GACATATTAGTCCCT-3',Reverse Primer:5'-AGAC-GATAGTTGGGTCCCGGC-3';β-Actin 的 Forward Primer:5'-AGTGTGACGTGGACATCCGCAAAG-3',Reverse Primer:5'-ATCCACATCTGCTGGAAGGTG-GAC-3'(引物由南京金斯瑞合成)。

1.2.6 Western blot 实验

通过含 25 mmol/L Tris-Cl (pH 7.5),5 mmol/L EDTA,1% SDS 和 1%蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液

将细胞裂解,具体的蛋白提取步骤参照试剂商的说明书,蛋白样品在 10% SDS-PAGE 中电泳,然后将蛋白转移至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶在室温下封闭 1 h,加一抗在 4℃过夜,然后在室温下加二抗孵育 1 h,一抗包括:兔抗 ROCK1 和鼠抗 β -actin (Santa Cruz 公司,美国)。结果进行图像扫描分析。

1.2.7 细胞增殖能力检测

在 96 孔板内接种转染过小干扰 RNA 或过表达质粒的细胞,每孔加 2 000~5 000 个细胞,培养 5 d,每孔加入 10 μ l 的 Cell Counting Kit-8 (Dojindo Labs, 日本),在 37℃孵育 1 h,在 450 nm 紫外光下测吸光值,绘制生长曲线。

1.2.8 细胞迁移能力检测

Transwell (BD Biosciences, 美国)小室纤维膜孔径为 8 mm,下室中加入含 10%胎牛血清的 DMEM 750 μ l,上室中加入不含胎牛血清的 DMEM 500 μ l,同时每个上室中加入含 1×10^5 个细胞的悬液,在恒温 37℃,含 5%CO₂ 的细胞培养箱中连续培养 48 h,取出小室,擦净上表面的基质胶及残留细胞,小室下表面的细胞用 4%多聚甲醛固定,0.5%结晶紫染色,显微镜下每个小室随机观察 6 个视野并拍照,计数穿膜细胞数。

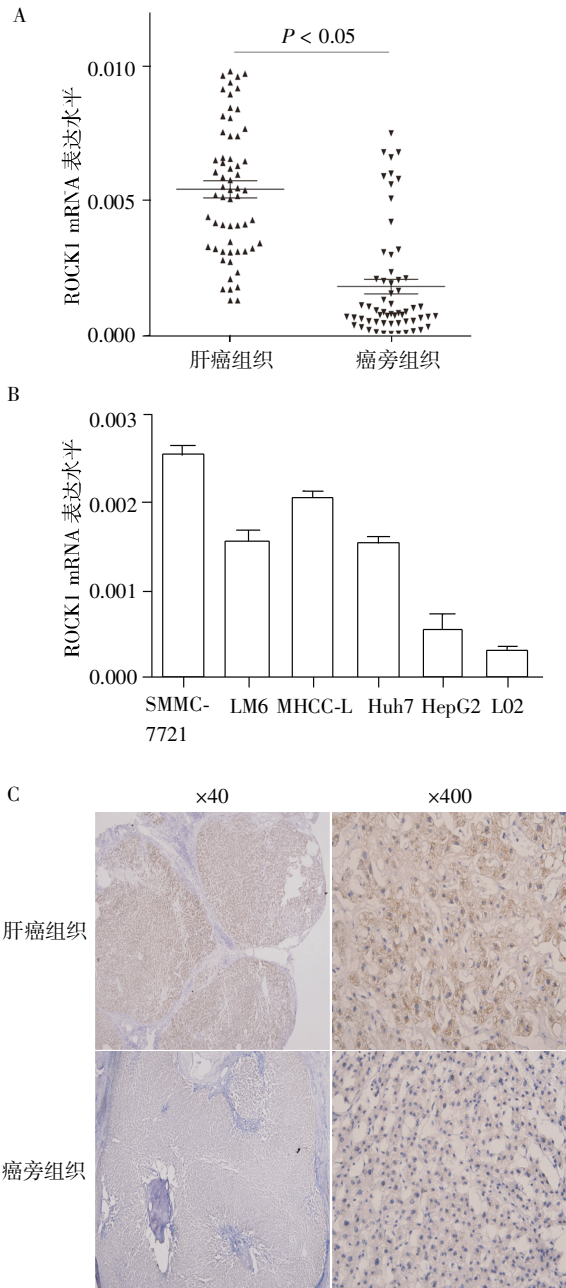
1.3 统计学方法

运用 SPSS18.0 软件进行分析,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,两组间均数比较采用 *t* 检验,分类资料比较采用卡方检验, $P \leq 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ROCK1 在肝癌组织及肝癌细胞株中高表达

Real-time PCR 检测 60 对肝癌及癌旁组织,其中有 42 对肝癌组织中 ROCK1 的 mRNA 水平高于癌旁组织 ($P < 0.05$, 图 1A)。免疫组织化学染色结果显示在 60 例肝癌组织中,有 37 例 ROCK1 表达强阳性,8 例阳性,9 例弱阳性,6 例阴性,而在癌旁组织中,有 8 例 ROCK1 表达强阳性,11 例阳性,16 例弱阳性,25 例阴性 (图 1C)。以上数据说明 ROCK1 在肝癌中表达上调。此外,检测肝癌细胞系 (SMMC-7721、LM6、MHCC-L、Huh7、HepG2) 中 ROCK1 mRNA 表达水平 (图 1B)。结果证实其 ROCK1 mRNA 表达均高于正常肝细胞,并发现其中以 SMMC-7721 表达最高,HepG2 最低。据此,选择前者作为干扰 ROCK1 表达的细胞模型,后者作为 ROCK1 过表达的细胞模型,以观察 ROCK1 对肝癌



A: 60 对肝癌及癌旁组织,有 42 对肝癌组织中 ROCK1 的 mRNA 水平高于癌旁组织 ($P < 0.05$); B: 肝癌细胞系 (SMMC-7721、LM6、MHCC-L、Huh7、HepG2) 与正常人肝细胞 L02 中 ROCK1 mRNA 水平; C: 免疫组织化学染色肝癌组织中 ROCK1 蛋白表达量高于癌旁组织。

图 1 ROCK1 在临床肝癌标本和肝癌细胞系中表达上调
Figure 1 ROCK1 is overexpressed in HCC and HCC-derived cells

细胞侵袭力的影响。

2.2 ROCK1 mRNA 表达水平与临床指标的关系

分析 ROCK1 mRNA 的表达水平与患者的性别、年龄、肝癌肿块大小、是否合并乙型肝炎病毒感染、是否有淋巴结或远处转移、Edmondson 分级、肝功能 Child 分级、甲胎蛋白水平之间的关系。60 例患者中

有33例伴有淋巴结或远处转移,ROCK1阳性有26例,占78.8%,而无淋巴结或远处转移的27例患者中,ROCK1阳性仅有11例,占40.7%,表明高表达ROCK1与肿瘤转移有明显相关性($P < 0.05$),而高表达ROCK1与患者的性别、年龄、肝癌肿块大小、是否合并乙肝病毒感染、Edmondson分级、肝功能Child分级、甲胎蛋白水平无明显相关性($P > 0.05$,表1)。

表1 ROCK1 mRNA的表达水平与临床指标间的关系
Table 1 The expression of ROCK1 mRNA versus clinical parameters (n)

临床指标	总计	ROCK1(+)	ROCK1(-)	χ^2	P
n	60	37	23		
性别					
男	38	23	15		
女	22	14	8	0.057	0.811
年龄(岁)					
≥ 45	32	20	12		
< 45	28	17	11	0.020	0.887
肿块大小(cm)					
≥ 3	21	12	9		
< 3	39	25	14	0.280	0.597
病毒学					
HBV +	46	30	16		
HBV -	14	7	7	1.051	0.305
肿瘤转移					
是	33	26	7		
否	27	11	16	9.093	0.003
Edmondson 分级					
I~II	26	14	12		
III~IV	34	23	11	1.187	0.276
肝功能 Child 分级					
A~B	43	26	17		
C	17	11	6	0.093	0.761
AFP level (ng/ml)					
≥ 100	33	22	11		
< 100	27	15	12	0.776	0.379

ROCK1 (+):ROCK1 mRNA 表达水平升高 0.5 倍以上;ROCK1 (-):ROCK1 mRNA 表达水平不升高或升高 0.5 倍以下。

2.3 pcDNA3.1B-ROCK1-GFP 质粒的转染效率及 ROCK1 蛋白的表达

构建的 pcDNA3.1B-ROCK1 质粒转染入 HepG2 细胞,48 h 后荧光显微镜下观察转染效率达 60% (图 2A),Western blot 检测 ROCK1 蛋白在转染过表达质粒的细胞中明显上升($P < 0.05$, $n = 3$,图 2B),小干扰 RNA 转染入 SMMC-7721 细胞,Western blot

检测 ROCK1 蛋白在转染小干扰 RNA 的细胞中明显下降($P < 0.05$, $n = 3$,图 2C)。

2.4 ROCK1 促进肝癌细胞的侵袭

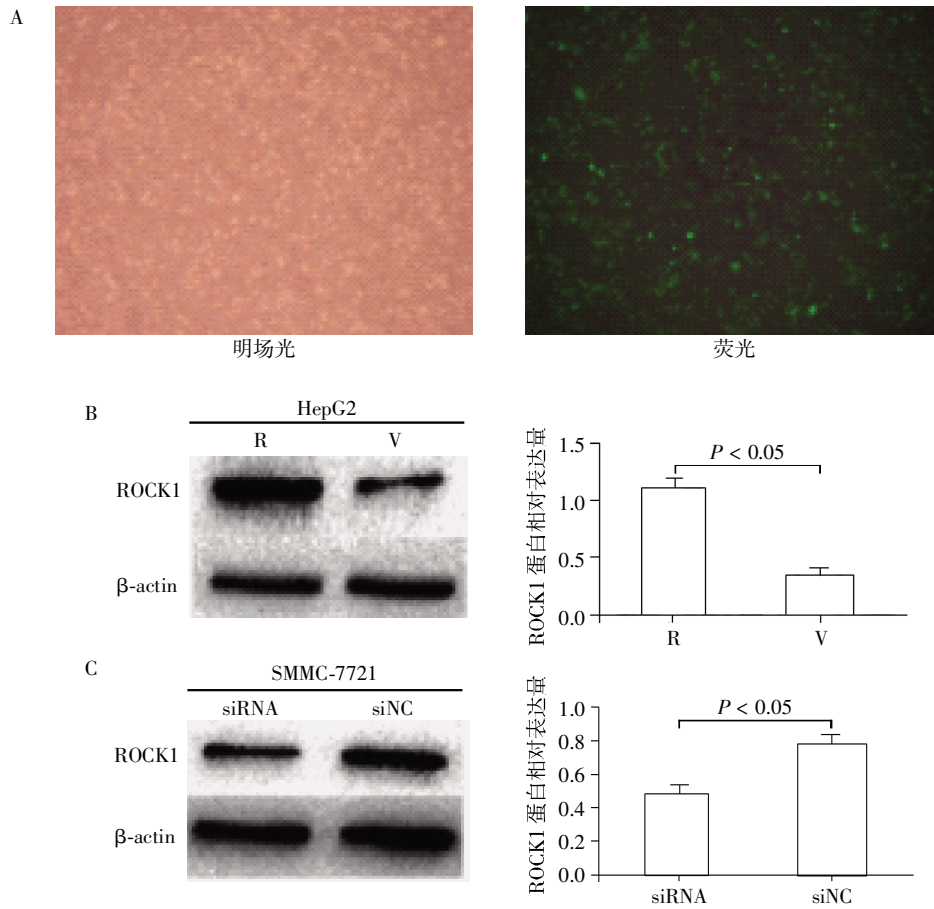
由于 HepG2 细胞中 ROCK1 表达水平相对较低,本研究用小室侵袭实验检测 ROCK1 对肝癌细胞 HepG2 侵袭的影响。pcDNA3.1B-ROCK1 质粒转染入 HepG2,以 pcDNA3.1B 作为对照。染色后在显微镜下观察发现,转染了 pcDNA3.1B-ROCK1 质粒的细胞穿过小室基底膜的数目明显多于转染空载质粒的细胞($P < 0.05$, $n = 3$,图 3A)。而在转染了小干扰 RNA 的 SMMC-7721 细胞中,可以观察到相反的现象($P < 0.05$, $n = 3$,图 3B)。在生长曲线实验中,观察到 ROCK1 对 HepG2、SMMC-7721 细胞的增殖没有明显的影响 ($P > 0.05$,图 4)。以上数据说明 ROCK1 促进肝癌细胞的侵袭。

3 讨论

在大多数恶性肿瘤中,往往会出现染色体的断裂、缺失、扩增及染色体转位等,这些染色体的异常会导致抑癌基因的失活和原癌基因的过表达^[10]。已经有文献表明:在乳腺癌及肺癌中,ROCK1 蛋白的过表达可使细胞骨架蛋白重新排列,增加细胞的侵袭力^[11]。同时,也有文献表明 ROCK2 基因的多态性和乳腺癌转移的风险之间是高度相关的^[12]。ROCK 蛋白通过破坏钙黏蛋白介导的细胞间连接和降解细胞外基质促进肿瘤细胞转移^[13]。在高转移性的消化系统恶性肿瘤细胞系中,通过小干扰 RNA 减少 ROCK 蛋白的表达,会使转移的细胞数降低 2 倍甚至更多^[14]。在结肠癌细胞系中,特异性的 ROCK 蛋白抑制剂可以明显减少基质金属蛋白酶 2 的分泌,减少肿瘤细胞转移^[15]。因此,本文推测 ROCK1 基因可能在肝癌的发生中也起到一定作用。

本研究证实与癌旁组织相比,肝癌组织中 ROCK1 表达上调,提示 ROCK1 在肝癌的发展中起到促进作用。进一步的体外实验表明过表达 ROCK1 增加了 HepG2 细胞的侵袭能力,而干涉 ROCK1 则降低 SMMC-7721 细胞的侵袭能力,表明 ROCK1 能促进肝癌细胞的侵袭及转移。

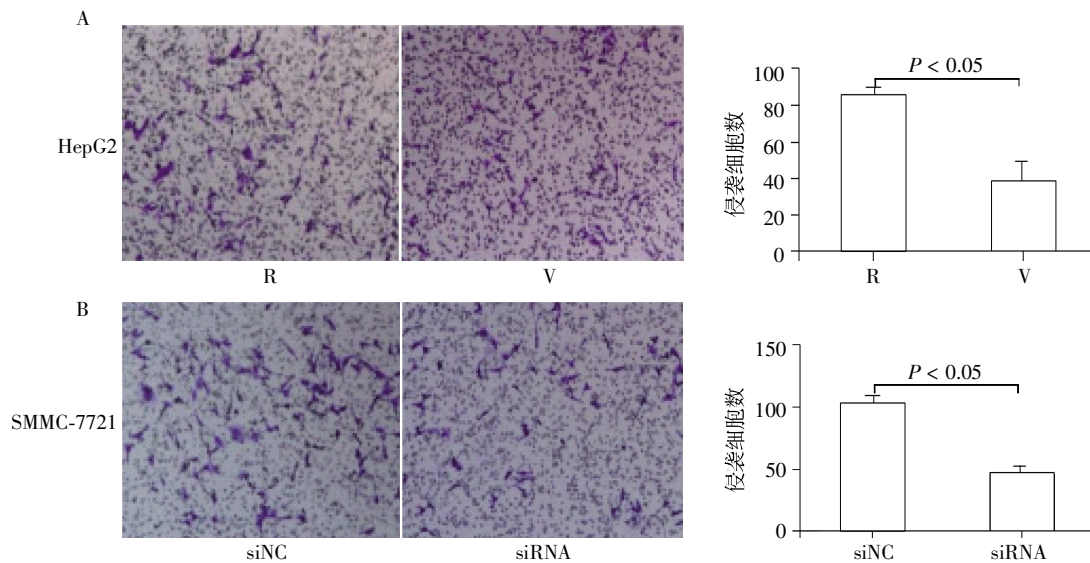
通过以上的研究可以得出结论,ROCK1 在肝癌的侵袭及转移中发挥重要作用,它可能是通过细胞骨架蛋白重新排列,促进钙黏蛋白及细胞外基质的降解,破坏细胞间连接等发挥作用,但具体机制有待进一步研究,ROCK1 可能成为治疗原发性肝癌的一个新靶点。



A: pcDNA3.1B-ROCK1 在 HepG2 中的转染效率($\times 100$); B: 转染过表达载体和空载质粒 48 h 后, Western blot 检测 HepG2 中 ROCK1 的表达水平(R: 过表达载体); V: 空载质粒; C: 转染 siRNA 和 siNC 48 h 后, Western blot 检测 SMMC-7721 中 ROCK1 的表达水平(siRNA: 干扰 RNA; siNC: 阴性对照)。

图 2 pcDNA3.1B-ROCK1 质粒的转染效率及转染后的 ROCK1 表达水平

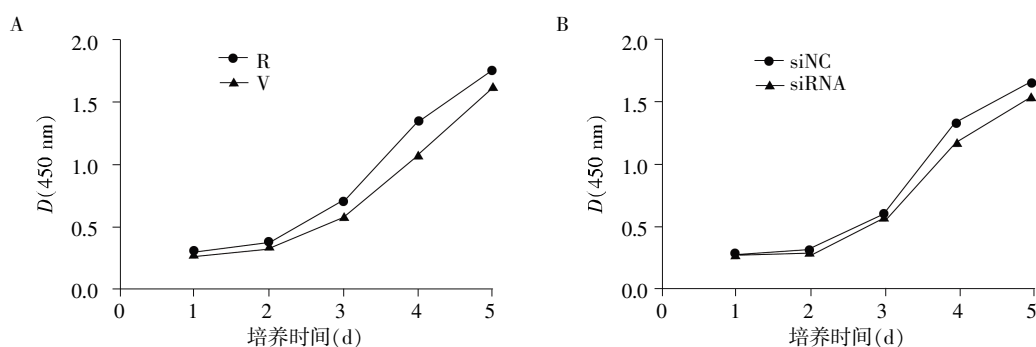
Figure 2 The efficiency of pcDNA3.1 B-ROCK1 plasmid transfection and the expression of ROCK1 after transfection



A: 过表达 ROCK1 增加 HepG2 细胞侵袭[R: 过表达载体; V: 空载质粒($n = 3$)]; B: 干扰 ROCK1 能减少 SMMC-7721 细胞侵袭[siRNA: 干扰 RNA; siNC: 阴性对照($n = 3$)]。

图 3 ROCK1 对细胞侵袭的影响

Figure 3 Effects of ROCK1 overexpression or knockdown on cell invasion



A:过表达 ROCK1 对 HepG2 细胞增殖无影响[R:过表达载体;V:空载质粒($P > 0.05, n = 3$)];B:干涉 ROCK1 对 SMMC-7721 细胞增殖无影响[siRNA:干涉 RNA;siNC:阴性对照($P > 0.05, n = 3$)]。

图4 ROCK1 对细胞增殖的影响

Figure 4 Effects of ROCK1 overexpression or knockdown on cell proliferation

[参考文献]

- [1] Li GC, Ye QH, Dong QZ, et al. TGF beta1 and related-Smads contribute to pulmonary metastasis of hepatocellular carcinoma in mice model[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2012, 14(31):93-99
- [2] Zheng L, Liang P, Li J, et al. ShRNA-targeted COMMD7 suppresses hepatocellular carcinoma growth [J]. PLoS One, 2012, 7(9):e45412
- [3] Wu Y, Jiang W, Wang Y, et al. Breast cancer metastasis suppressor 1 regulates hepatocellular carcinoma cell apoptosis via suppressing osteopontin expression [J]. PLoS One, 2012, 7(8):e42976
- [4] Wang JS, Huang T, Su J, et al. Hepatocellular carcinoma and aflatoxin exposure in Zhuqing Village, Fusui County, People's Republic of China [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 10(2):143-146
- [5] Coleman WB. Mechanism of human hepatocarcinogenesis [J]. Curr Mol Med, 2003, 3(6):573-588
- [6] Adercal I, Moser CD, Veerasamy M, et al. The JNK inhibitor SP600129 enhances apoptosis of HCC cells induced by the tumor suppressor WWOX [J]. J Hepatol, 2008, 49(3):373-383
- [7] Riento K, Ridley AJ. Rocks: multifunctional kinases in cell behaviour[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003, 4(6):446-456
- [8] Sahai E, Marshall CJ. RHO-GTPases and cancer [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2(2):133-142
- [9] Nguyen QD, De Wever O, Bruyneel E, et al. Commutators of PAR-1 signaling in cancer cell invasion reveal an essential role of the Rho-Rho kinase axis and tumor microenvironment[J]. Oncogene, 2005, 24(56):8240-8251
- [10] Kim TM, Yim SH, Shin SH, et al. Clinical implication of recurrent copy number alterations in hepatocellular carcinoma and putative oncogenes in recurrent gains on 1q [J]. Int J Cancer, 2008, 123(12):2808-2815
- [11] Lochhead PA, Wickman G, Mezna M, et al. Activating ROCK1 somatic mutations in human cancer. Oncogene, 2010, 29(17):2591-2598
- [12] Kalender ME, Demiryurek S, Oztuzcu S, et al. Association between the Thr431Asn polymorphism of the ROCK2 gene and risk of developing metastases of breast cancer [J]. Oncol Res, 2010, 18(11-12):583-591
- [13] Chang YW, Bean RR, Jakobi R. Targeting RhoA/Rho kinase and p21-activated kinase signaling to prevent cancer development and progression [J]. Recent Pat Anticancer Drug Discov, 2009, 4(2):110-124
- [14] Vishnubhotla R, Sun S, Huq J, et al. ROCK-II mediates colon cancer invasion via regulation of MMP-2 and MMP-13 at the site of invadopodia as revealed by multiphoton imaging[J]. Lab Invest, 2007, 87(11):1149-1158
- [15] Paduch R, Kandefer-Szerszeń M, Szuster-Ciesielska A, et al. Transforming growth factor-beta1 modulates metalloproteinase-2 and -9, nitric oxide, RhoA and alpha-smooth muscle actin expression in colon adenocarcinoma cells [J]. Cell Biol Int, 2010, 34:(2)213-223

[收稿日期] 2013-06-03