

WWOX 对肝内胆管细胞癌转移的影响

方 雯¹, 徐三荣^{2*}, 李相成³, 张 海²

(¹ 江苏大学附属医院体检中心, ² 肝胆外科, 江苏 镇江 212001; ³ 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: 检测包含 WW 域的氧化还原酶(WW domain containing oxidoreductase, WWOX) 在肝内胆管癌(intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC)组织及细胞的表达情况, 分析其表达水平与 ICC 临床特征的相关性, 并探索其对 ICC 细胞迁移、侵袭能力的影响。方法: 采用半定量/定量 PCR 测定 ICC 组织及细胞中 WWOX 的表达水平; 转染重组质粒 pcDNA3.1B-WWOX-Flag, 过表达 ICC 细胞内的 WWOX 水平; 采用细胞划痕及侵袭实验, 观察过表达 WWOX 对 ICC 迁移、侵袭能力的影响; 蛋白免疫印迹检测迁移、侵袭通路相关分子。结果: WWOX 在 ICC 组织及细胞中表达下调, 其下调与 ICC 的转移明显相关($P < 0.05$); 转染 pcDNA3.1B-WWOX-Flag 质粒可上调 ICC 细胞 WWOX 蛋白的表达; 过表达 WWOX 抑制 ICC 细胞迁移、侵袭能力($P < 0.001$); 过表达 WWOX 可激活细胞外调节蛋白激酶(extracellular regulated protein kinases, ERK)磷酸化, 进而下调基质金属蛋白酶 9 的活性, 最终抑制 ICC 的转移过程。结论: WWOX 在 ICC 中表达下调, 体外实验证实过表达 WWOX 抑制 ICC 的迁移、侵袭能力。

[关键词] WWOX; 肝内胆管癌; 转移; ERK1/2

[中图分类号] R735.8

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)11-1491-07

doi: 10.7655/NYDXBNS20141107

Effects of WWOX on metastasis of intrahepatic cholangiocarcinoma

Fang Wen¹, Xu Sanrong^{2*}, Li Xiangcheng³, Zhang Hai²

(¹Department of Physical Examination Center, ²Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital of Jiangsu University, Zhenjiang 212001; ³Department of Hepatic Surgery, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

[Abstract] **Objective:** To detect the expression of WW domain containing oxidoreductase (WWOX) in intrahepatic cholangiocarcinoma (ICC) tissues and cells, to analyze the correlation between WWOX expression and clinical features of ICC, and to investigate its effect on cellular migration and invasion of ICC. **Methods:** The expression level of WWOX in ICC tissues and cell lines were measured by semi-quantitative real-time PCR and quantitative real-time PCR. The expression of WWOX in ICC cells was overexpressed by recombinant plasmid pcDNA3.1B-WWOX-Flag transfection. The effect of WWOX overexpression on migration and invasion of ICC was performed by wound healing and matrigel invasion assays. The potential signaling molecules involved in migration and invasion was measured by Western blot assay. **Results:** WWOX was down-regulated in ICC tissues and cell lines, and the downregulated WWOX was significantly associated with the metastasis of ICC ($P < 0.05$). The expression of WWOX was upregulated by pcDNA3.1B-WWOX-Flag transfection in ICC cells. Overexpression of WWOX inhibited cellular migration and invasion of ICC ($P < 0.001$). The overexpression of WWOX stimulated the activation of extracellular regulated protein kinases 1/2 (ERK1/2) phosphorylation, which in turn reduced the activity of matrix metalloproteinases 9, resulting in metastasis suppression of ICC. **Conclusion:** WWOX was down-regulated in ICC, and overexpression of WWOX was proved to inhibit the ability of migration and invasion of ICC cells *in vitro*.

[Key words] WWOX; intrahepatic cholangiocarcinoma; metastasis; ERK1/2

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(11): 1491-1497]

[基金项目] 镇江市科技计划项目(SH2011023)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: harzangnjmu@126.com

肝内胆管癌 (intrahepatic cholangiocarcinoma, ICC) 是起源于肝内胆管上皮的恶性肿瘤, 是肝脏第二大高发恶性肿瘤, 其发病率占肝脏肿瘤的 4%~6%^[1-2]。由于其高度侵袭性和早期远处转移, ICC 患者预后一般较差^[3]。近年来, 尽管诸如 CA19-9、CEA 等分子的发现, 对 ICC 的诊断起到一定作用^[4], 但由于其缺乏组织特异性, 而使得 ICC 的早期诊断仍十分困难。因此, 寻求 ICC 特异性肿瘤标志物可能为 ICC 的诊断及预后评估提供有力的理论依据。

包含 WW 域的氧化还原酶 (WW domain containing oxidoreductase, WWOX) 基因是目前研究较为广泛的肿瘤抑制因子^[5], 其在众多肿瘤组织中表达下调或缺失^[6]。而 WWOX 的失活已被证实与肿瘤的侵袭性明显相关^[5,7]。目前 WWOX 在肝内胆管癌中的研究尚为数不多, 其对 ICC 侵袭能力的影响尚无报导。本研究主要探索 WWOX 在 ICC 中的表达情况, 进而探索其对 ICC 细胞迁移、侵袭能力的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验涉及的 48 对肿瘤组织及对应的癌旁组织来自于南京医科大学第一附属医院肝胆外科及江苏大学附属医院肝胆外科 ICC 患者的手术切除标本。该研究使用的 ICC 细胞系 (RBE、HCCC-9810、HUCCT1) 及正常肝内胆管上皮细胞 (IBEpiC) 购于上海细胞库, 用高糖修饰的极限必需培养基 (其中含有 10% 胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 g/L 链霉素) 在 37℃、含 5%CO₂ 的培养箱中培养。该研究涉及的实验器材及试剂如下: DMEM 培养液 (HyClone 公司, 美国), 胎牛血清 (Gibco 公司, 美国), TRIzol 和 Lipofectamine 2000 转染试剂 (Invitrogen 公司, 美国), PCR 试剂 Taq DNA 聚合酶、dNTP、SYBR Premix EXTaq (TaKaRa 公司, 日本); 酶标仪 (Bio Tech 公司, 美国); 实时荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 仪 (TaKaRa 公司, 日本)、侵袭实验试剂盒 (BD 公司, 美国)、Flag、细胞外调节蛋白激酶 (extracellular regulated protein kinases, ERK1/2)、基质金属蛋白酶 9 (matrix metalloproteinase 9, MMP-9) 及 β -actin 的抗体 (SanTa 公司, 美国)。引物由美国 Invitrogen 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及逆转录

本研究采用 TRIzol 裂解液 (Invitrogen 公司, 美

国) 提取组织、细胞 RNA, 并逆转录为 cDNA。其简要过程如下: ①RNA 提取, 取少量组织 (研磨成粉末) 或细胞, 转入预先加入适量 TRIzol 试剂的离心管并充分匀浆, 依次加入氯仿、异丙醇、75%乙醇, DEPC 水溶解 RNA 沉淀后测定 RNA 浓度, 电泳鉴定有无降解后超低温保存; ②RNA 逆转录为 cDNA, 用 M-MLV 逆转录酶 (Promega 公司, 美国) 逆转录 cDNA, 反应体系如下: RNA 2.0 μ g、随机引物 0.5 μ l、DEPC H₂O 15.0 μ l, 体系在 70℃ 下加热 5~10 min, 然后立即在冰上冷却 10 min。体系中再加入 dNTP Mix 1.25 μ l、M-MLV 5 \times Reaction Buffer 5 μ l、Ribonuclease Inhibitor 25 U、M-MLV 逆转录酶 200 U, 在 37℃ 下孵育 60 min。逆转录后的 cDNA 超低温保存待用。

1.2.2 定量 PCR 反应

定量 PCR 反应使用 TP800 实时荧光定量 PCR 仪及 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒进行。反应体系如下: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 12.5 μ l、cDNA 模板 2.0 μ l、上下游引物各 0.3 μ l、dd H₂O 补至 25.0 μ l。反应条件: 95℃ 预变性 10 s; 95℃ 5 s, 60℃ 30 s 二步法扩增 40 循环。每个反应管内的荧光信号达到设定阈值时所经历的循环数定义为 Ct 值, 每个模板做 3 个复管, 得到 Ct 值取平均值, WWOX 基因的 Ct 平均值减去相对应模板的内参基因 (β -actin) 的 Ct 平均值, 得到 Δ Ct。癌组织的 Δ Ct 减去相应癌旁组织的 Δ Ct, 得到 $\Delta\Delta$ Ct 值, 癌组织和癌旁组织中的 WWOX 基因的倍数关系用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示^[8]。所使用的引物如下: WWOX (190bp): 5'-AGTCGCCTCTCTCCAACAAA-3' (上游), 5'-GCAGTGTGTACACCCACCAG-3' (下游); β -actin (416bp): 5'-CCTAGAAGCATTTGCGGTGG-3' (上游); 5'-GAGCTACGAGCTGCCTGACG-3' (下游)。

1.2.3 半定量 PCR 反应

管家基因 β -actin 作为内参基因对逆转录后 cDNA 进行 PCR 质量评估, PCR 反应体系如下: 模板 cDNA 1.0 μ l, 10 \times Taq Buffer 1.5 μ l, dNTP 0.4 μ l, 上下游引物各 0.3 μ l, Taq 酶 0.1 μ l, dd H₂O 补至 15.0 μ l。反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30 s; β -actin 经过 28 个循环数的扩增, WWOX 经过 35 个循环的扩增后, 2% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。所使用的引物同 1.2.2。

1.2.4 重组质粒构建

通过构建 pcDNA3.1B-WWOX-Flag 重组质粒, 上调 ICC 细胞内 WWOX 的表达水平。由 cDNA 文库扩增 WWOX 目的片段 ORF, 扩增后的产物片段

经 *EcoR I* / *BamH I* 双酶切后, 经 DNA 连接酶连接入 pcDNA3.1B-Flag 质粒载体, 重组质粒由 DNA 测序验证其正确性。

1.2.5 细胞转染

质粒转染采用脂质体转染法, 所用试剂为 Lipofectamine 2000 (Invitrogen 公司, 美国)。接种细胞于待转染培养皿, 37℃ 培养箱生长, 使转染前细胞铺板密度达 80%~90%。转染前将细胞培养液换成不含血清及抗生素的 DMEM-free 培养液, 加入转染复合物, 混匀; 细胞置于 37℃、5% CO₂ 中培养 4~6 h 后, 更换培养液为含血清及抗生素的完全培养液 DMEM++, 收集转染 24~72 h 的细胞进行分析。

1.2.6 质粒转染效率评估

ICC 细胞株转染 pcDNA3.1B-WVOX-Flag 质粒 72 h, 采用荧光显微镜及 Western blot 检测转染效率。取转染后细胞, 荧光显微镜下观察荧光数量并拍照, 初步评估转染效率; 取转染后细胞, 蛋白裂解液 (上海碧云天公司) 提取细胞总蛋白, Western blot 检测转染后细胞中 WVOX-Flag 蛋白的表达情况。取 150 μg 蛋白样品经 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳后, 恒压 (30 V) 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉溶液封闭 2 h, 加入一抗 (Flag 抗体, Santa 公司, 美国), 4℃ 孵育过夜, PBST 洗膜 3 次, 每次 5 min, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 37℃ 摇床孵育 1h。洗膜后 ECL 化学发光系统显影, X 线片曝光。

1.2.7 细胞划痕实验

采用 6 孔板培养皿作细胞划痕实验, 预先在 6 孔板底以记号笔划 3 条平行于 6 孔板长边的直线; 将转染后一定数量的细胞接种于 6 孔板 (一般作划痕前, 细胞密度达 70%~90%), 细胞置于培养箱培养 24 h; 吸弃培养液, 以 200 μl 枪头垂直于记号笔标记线划去盘中细胞, 用 1×PBS 清洗 6 孔板, 以去除划痕后脱落的细胞, 将完全培养液 DMEM++ 换为不含血清的培养液 DMEM free, 置于培养箱培养; 设定时间点 (0、24、48、72 h) 分别观察划痕闭合情况, 并在显微镜下拍照, 选取记号笔所画直线与细胞划痕交叉点上下作为固定观察点, 以保证不同时间点所观察划痕点一致性。

1.2.8 侵袭实验

细胞侵袭能力试验采用美国 BD 公司的 Bio-Coat Matrigel Invasion Chamber, 参考文献 [9] 进行试验。将转染后的细胞行饥饿预处理, 实验前 24 h 将细胞完全培养液 DMEM++ 换为无血清 DMEM free 培养液; 将饥饿预处理后的细胞消化后, 用无血清

DMEM free 培养液重悬后计数, 按量 (5~10) × 10⁵ 个/孔接种于 Chamber 上层, Chamber 下层 24 孔板中加入一定量含 10% FBS 的培养液, 每个实验组设置 3 个重复孔, 置于培养箱培养 48 h; 48 h 后取出 Chamber, 用棉签轻轻取出 Chamber 上层膜上细胞, Chamber 置于 4% 甲醛溶液中, 室温固定 15 min; 弃去固定液, 1×PBS 清洗, 将 Chamber 置于 0.5% 结晶紫溶液, 室温染色 30 min, 1×PBS 清洗, 晾干; 显微镜下观察穿过底膜的细胞, 选取不同视野拍照, 计数每个视野细胞数作统计分析。

1.2.9 Western blot

使用蛋白提取液提取细胞蛋白, 利用 Western blot 检测过表达 WVOX 质粒后, ICC 细胞中 WVOX-Flag、ERK1/2、pERK1/2、MMP-9 及 β-actin 蛋白的表达变化, 分析细胞迁移、侵袭相关通路分子的表达。所用一抗如下: Flag、ERK1/2、pERK1/2、MMP-9 及 β-actin 抗体。细胞蛋白经电泳、转膜、封闭、一抗/二抗孵育后显影、曝光 (具体过程参见方法 1.2.6)。

1.3 统计学方法

应用 SPSS16.0 软件分析, 定量资料数据采用均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 采用方差分析, 组间样本均数比较采用 *t* 检验; 定性资料采用 χ^2 检验。P ≤ 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

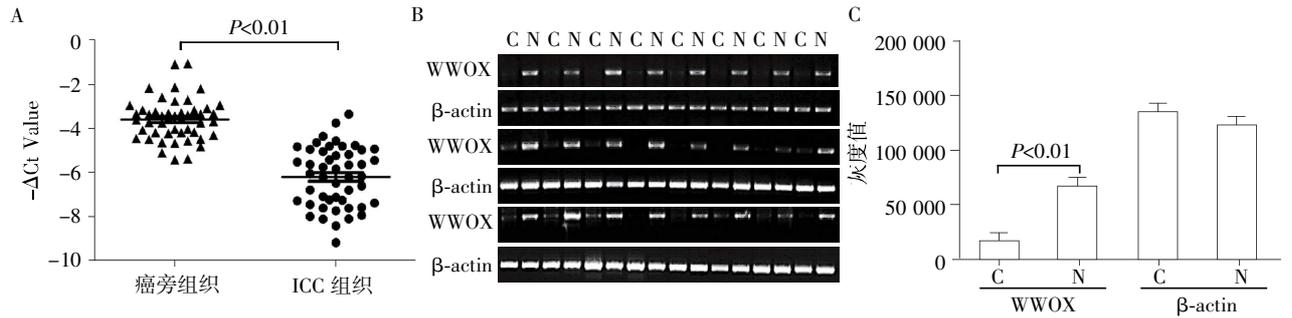
2.1 WVOX 在 ICC 组织及细胞系中表达下调

利用半定量/定量 PCR, 检测 WVOX 基因在 ICC 组织及细胞株中的表达水平。结果发现, 在 48 对 ICC 组织中, 24 对癌组织中 WVOX 基因的 mRNA 表达水平明显下降 (P < 0.001, 图 1)。另外, 在 3 种 ICC 细胞株中, WVOX 基因的 mRNA 表达水平亦明显低于正常肝内胆管上皮细胞 (P < 0.001, 图 2)。由此可见, WVOX 在 ICC 组织及细胞内表达下调。

2.2 WVOX 表达水平与 ICC 转移相关性分析

为了进一步寻求 WVOX 表达与 ICC 临床相关性, 对收集的 48 例 ICC 组织中 WVOX 表达与 ICC 临床特征进行分析。结果发现, WVOX 的表达与性别、年龄、HBV 感染无明显相关性, 而与肿瘤淋巴结侵犯、肿瘤大小以及分期有显著统计学关联性 (P < 0.05, 表 1)。由此, 推测 WVOX 可能参与了 ICC 的发生、发展过程。

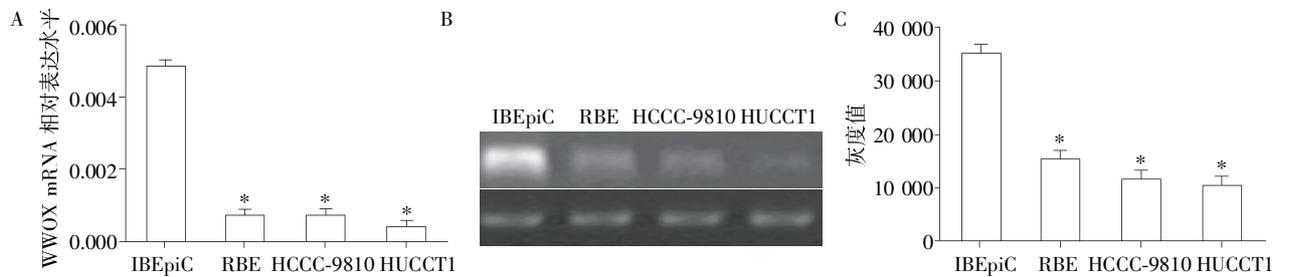
2.3 重组质粒 pcDNA3.1B-WVOX-Flag 转染 ICC 细胞后效率评估



A: 荧光定量 PCR 结果显示 WWOX mRNA 在 48 例 ICC 组织及癌旁组织中的表达;B:RT-PCR 结果显示 WWOX mRNA 在 24 对典型 ICC 组织(C)及癌旁组织(N)中的表达;C:RT-PCR 电泳条带灰度值分析统计结果。

图 1 WWOX mRNA 低表达于 ICC 组织

Figure 1 The mRNA of WWOX was low-expressed in ICC tissues



A: 荧光定量 PCR 结果显示 WWOX mRNA 在 3 种 ICC 细胞及正常肝内胆管细胞中的表达;B:RT-PCR 结果显示 WWOX mRNA 在 3 种 ICC 细胞及正常肝内胆管细胞中的表达;C:RT-PCR 电泳条带灰度值分析统计结果。与正常胆管细胞 IBEpiC 比较, * $P < 0.001$ 。

图 2 WWOX mRNA 低表达于 ICC 细胞

Figure 2 The mRNA of WWOX was low-expressed in ICC cells

表 1 WWOX mRNA 表达水平与 ICC 临床参数间的统计学相关性分析

Table 1 The mRNA expression of WWOX versus clinical features of ICC

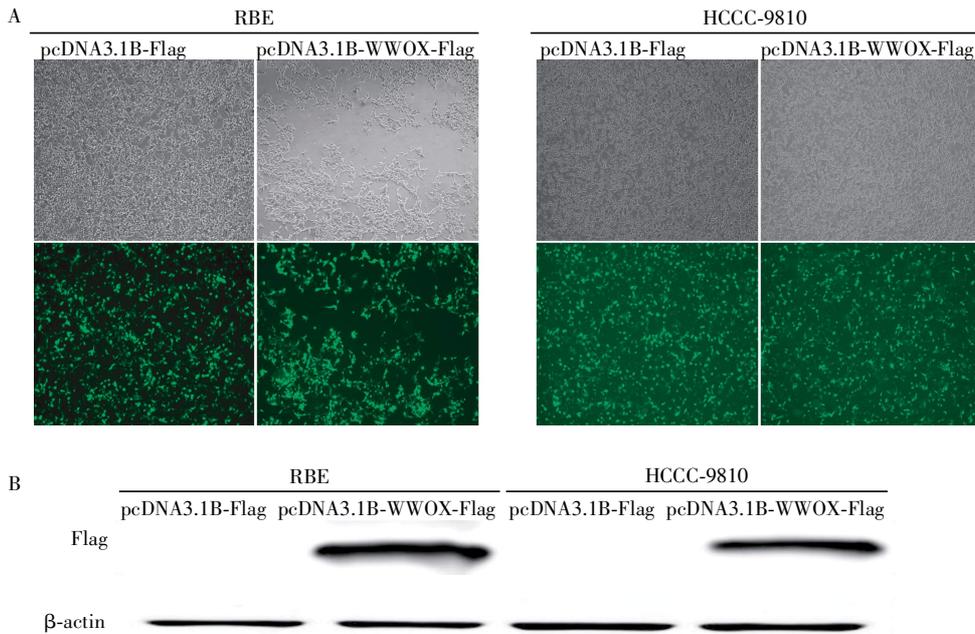
临床参数	病例数	WWOX(+)	WWOX(-)	χ^2 值	P 值
性别				1.50	0.22
男	32	18 (56.25)	14 (43.75)		
女	16	6 (37.50)	10 (62.50)		
年龄				0.51	0.48
≥ 45 岁	38	18 (47.37)	20 (52.63)		
< 45 岁	10	6 (60.00)	4 (40.00)		
病毒感染				1.34	0.25
HBV(+)	26	15 (57.69)	11 (42.31)		
HBV(-)	22	9 (40.91)	13 (59.09)		
肿瘤大小				6.86	0.01
≥ 3 cm	27	9 (33.33)	18 (66.67)		
< 3 cm	21	15 (71.43)	6 (28.57)		
淋巴结侵犯				4.59	0.03
是	16	4 (25.00)	12 (75.00)		
否	32	20 (62.50)	12 (37.50)		
病理分级				5.49	0.02
I ~ II	28	10 (35.71)	18 (64.29)		
III ~ IV	20	14 (70.00)	6 (30.00)		

WWOX(+): 癌组织 wwox 水平 ≥ 3 倍癌旁组织; WWOX(-): 癌组织 wwox 水平 < 3 倍癌旁组织。

为了检验重组质粒转染效率,首先取转染 72 h 后细胞行荧光显微镜观察。由于质粒载体 pcDNA3.1B-Flag 内含 GFP 独立表达序列,成功转染重组质粒的细胞可表达 GFP 蛋白,在荧光显微镜下显绿色荧光。图 3A 显示 ICC 细胞 RBE、HCCC-9810 转染质粒后,成功表达绿色荧光蛋白 GFP,该结果提

示质粒转染成功;为了进一步验证转染重组质粒后目的蛋白 WWOX-Flag 的表达情况,采用 Western blot 检测 Flag 蛋白表达水平,结果显示(图 3B)转染重组质粒后,ICC 细胞均可有效表达目的蛋白 WWOX-Flag。

2.4 WWOX 对 ICC 细胞迁移、侵袭能力的影响



A: ICC 细胞 RBE 及 HCCC-9810 转染重组质粒 pcDNA3.1B-WWOX-Flag 后效率评估; B: 转染 pcDNA3.1B-WWOX-Flag 质粒于 RBE 及 HCCC-9810 后, WWOX 蛋白表达情况。

图 3 转染重组质粒 pcDNA3.1B-WWOX-Flag 可过表达 WWOX-Flag 蛋白水平

Figure 3 The WWOX-Flag protein was overexpressed by recombinant plasmid pcDNA3.1B-WWOX-Flag transfection

肿瘤的转移涉及癌细胞从原发灶的迁移以及转移灶的侵袭。为了研究 WWOX 对 ICC 迁移能力的影响,首先采用细胞划痕实验观察 WWOX 对 ICC 迁移的作用。通过转染 pcDNA3.1B-WWOX-Flag 至 ICC 细胞株 RBE、HCCC-9810,上调 WWOX 的表达水平后,ICC 细胞的划痕愈合能力明显下降(图 4A)。该结果表明,过表达 WWOX 可以抑制 ICC 的迁移;为了研究 WWOX 对 ICC 细胞侵袭能力的影响,采用细胞侵袭实验,研究过表达的 WWOX 对 ICC 细胞侵袭能力的影响。如图 4B、C 所示,RBE、HCCC-9810 细胞转染 pcDNA3.1B-WWOX-Flag 后,过表达 WWOX 组侵袭细胞数明显少于转染 pcDNA3.1B-Flag 质粒的对照组($P < 0.001$)。由此可见,体外实验过表达 WWOX 可抑制 ICC 细胞的迁移及侵袭能力。

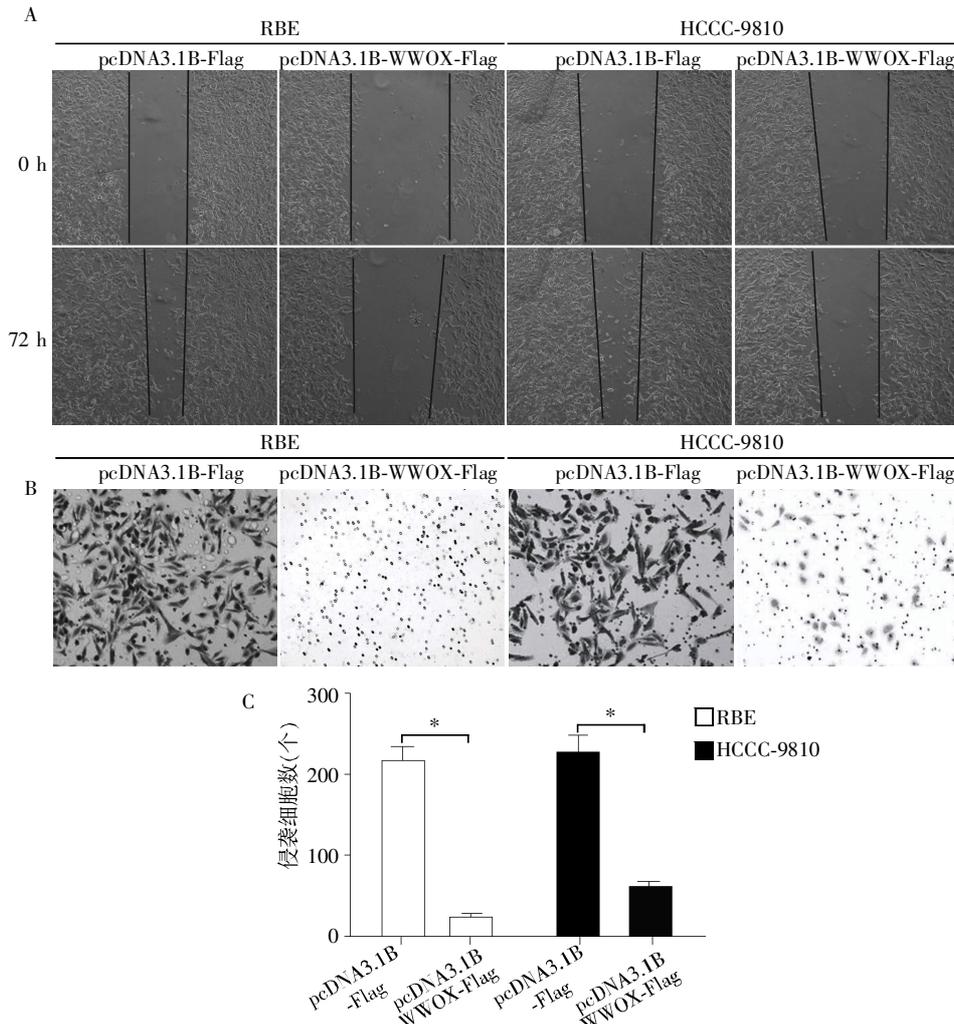
2.5 WWOX-ERK 介导的细胞迁移、侵袭通路

上述实验结果证实,WWOX 参与了 ICC 的迁

移、侵袭过程,但其分子机制尚不明确。为了进一步研究其可能的分子机制,对过表达 WWOX 的 ICC 细胞行蛋白免疫印迹分析,检测可能变化的通路分子。如图 5 所示,在 RBE、HCCC-9810 细胞,过表达 WWOX 后,pERK1/2 水平升高($P < 0.05$),而 MMP-9 水平明显降低($P < 0.001$),ERK1/2 总蛋白水平均无明显变化。此结果提示,过表达 WWOX 可能激活 ERK1/2 磷酸化,进而降解 MMP-9,最终实现对 ICC 细胞的迁移、侵袭过程。

3 讨论

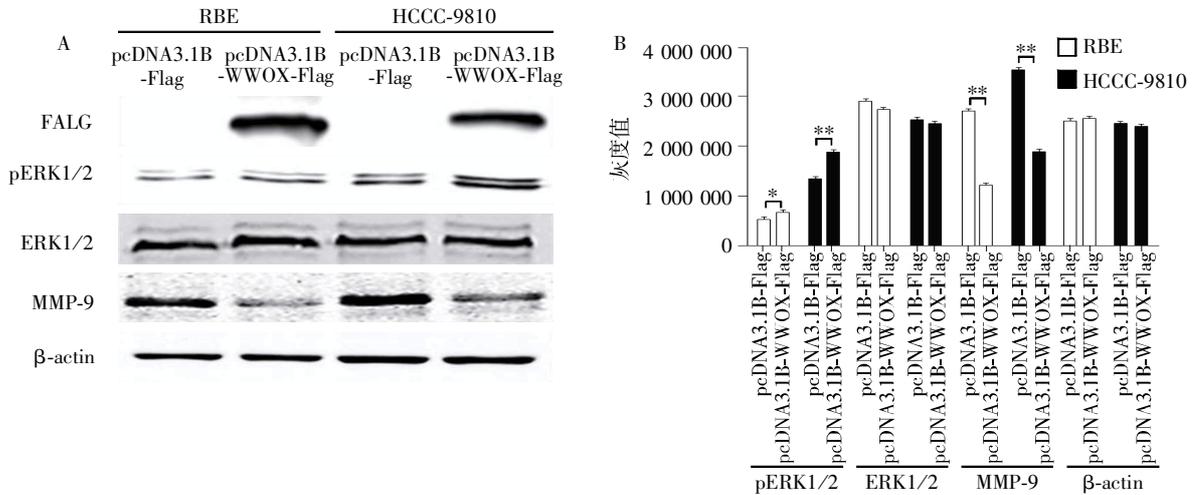
WWOX 是 2000 年由 Bednarek 等^[10]在染色体普通脆性位点 FRA16D 区域克隆出的基因,其读框长度为 2 264 bp,编码一个长 414 个氨基酸,相对分子量为 46 000 的蛋白。WWOX 蛋白含有 2 个 N 端的 WW 结构域和一个 C 端的短链脱氢还原酶位点,C 端氨基酸与脱氢酶还原酶的短链同源,故命名为



A:过表达 WWOX 后,ICC 细胞 RBE 及 HCCC-9810 迁移情况;B:过表达 WWOX 后,ICC 细胞 RBE 及 HCCC-9810 侵袭情况;C:WWOX 过表达后 ICC 细胞侵袭数量统计学结果,两组比较, * $P < 0.001$ 。

图4 过表达 WWOX 抑制 ICC 细胞迁移、侵袭能力

Figure 4 Overexpression of WWOX suppressed migration and invasion of ICC cells



A:Wester blot 结果表明,过表达 WWOX 后,ICC 细胞内 ERK1/2 磷酸化水平升高、MMP-9 表达水平降低,而 ERK 蛋白总量表达无明显变化;B:蛋白条带灰度值分析统计结果,两组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ 。

图5 过表达 WWOX 可促进 ERK1/2 磷酸化、降解 MMP-9

Figure 5 Overexpression of WWOX could promote ERK1/2 phosphorylation, which induced MMP-9 degradation

包含 WW 域的氧化还原酶(WVOX)。WVOX 在肿瘤发生、发展中扮演抑癌作用,其在绝大多数实体瘤内低表达,并且这种表达水平的缺失与肿瘤的恶性程度明显相关^[1],但其在 ICC 中的表达情况目前报道尚少。本研究通过荧光定量 PCR 等技术,发现 WVOX mRNA 水平在 ICC 组织内水平表达下调(图 1),进一步的统计学结果显示,其表达下调与 ICC 肿瘤大小、淋巴结侵犯及病理分级有统计学相关性($P < 0.05$,表 1)。该结果提示,WVOX 在 ICC 中的低表达可能参与 ICC 的形成、发展过程。

近期文献报道 WVOX 参与多种肿瘤的转移过程。Gourley 等^[12]通过黏附试验、侵袭试验及整合素结合试验等证实 WVOX 能够减少卵巢癌细胞中的整合素 $\alpha 2$ 、 $\alpha 3$ 的表达,从而抑制与纤连蛋白(fibronectin,Fn)的黏附及迁移,同时减弱了癌细胞侵袭能力。另外,Matteucci 等^[13]研究表明,在乳腺癌细胞中,WVOX 可以通过对 E-钙粘蛋白的调控,抑制其骨转移能力。在本研究中,首先通过 PCR 技术检测了 WVOX 在 3 种 ICC 细胞中的表达,结果显示,其在 3 种癌细胞中广泛低表达(图 2)。通过过表达技术,上调 ICC 细胞内 WVOX 的表达后(图 3),细胞划痕愈合能力及侵袭能力均受到明显抑制(图 4),该细胞学实验进一步佐证 WVOX 参与 ICC 的迁移、侵袭过程。

肿瘤细胞的浸润转移是一个多步骤的复杂过程,其首先必须脱离原发部位,浸入细胞外基质(extracellular matrix,ECM),与基底膜及 ECM 中一些大分子蛋白成分黏附,如胶原、纤粘连蛋白、层粘连蛋白等,并激活细胞合成分泌各种降解酶类,降解基底膜及 ECM,进而移动并穿过 ECM。在此过程中,基质金属蛋白酶起着非常重要的作用,很多研究表明在肿瘤转移过程中都伴有基质金属蛋白酶及其组织抑制因子的表达失衡^[14]。目前研究表明,ERK 通路的激活不仅参与肿瘤细胞的增殖,并且广泛参与细胞迁移、侵袭,该通路的激活可通过调节下游基质金属蛋白酶的活性,实现肿瘤细胞的迁移、侵袭。本研究通过 Western blot 发现,过表达 WVOX 可上调 ERK1/2 蛋白磷酸化水平,抑制 MMP-9 的表达,该结果与 Lan 等^[15]近期研究结果一致。借此,本文推断上调 WVOX 可能通过激活 ERK1/2 蛋白磷酸化,进而降解 MMP-9,最终实现对 ICC 细胞转移过程的抑制。

[参考文献]

[1] Jemal A,Bray F,Center MM,et al. Global Cancer Statis-

tics[J]. CA Cancer J Clin,2011,61(2):69-90

[2] Zhou XD,Tang ZY,Fan J,et al. Intrahepatic cholangiocarcinoma:report of 272 patients compared with 5,829 patients with hepatocellular carcinoma[J]. J Cancer Res Clin Oncol,2009,135(8):1073-1080

[3] 董娜娜,段晓峰,张 倜. 103 例肝内胆管癌临床病理及诊治分析[J]. 中国肿瘤临床,2012,39(6):340-347

[4] Malaguamera G,Paladina I,Giordano M,et al. Serum markers of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. Disease Markers,2013,34(4):219-228

[5] Del Mare S,Salah Z,Aqeilan RI. WVOX:its genomics, partners,and functions[J]. Cell Biochem,2009,108(4):735-745

[6] 郭 炜,董稚明,郭艳丽. WVOX 基因在贲门腺癌中的异常甲基化及其表达[J]. 肿瘤,2012,32(4):275-280

[7] Salah Z,Aqeilan R,Huebner K. WVOX gene and gene product:tumor suppression through specific protein interactions[J]. Future Oncol,2010,6(2):249-259

[8] Livak KJ,Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(-Delta Delta C (T)) method[J]. Methods,2001,25(4):402-208

[9] Busk M,Pytela R,Sheppard D. Characterization of the integrin alpha v beta 6 as a fibronectin-binding protein[J]. J Biol Chem,1992,267(9):5790-5796

[10] Bednarek AK,Lafin KJ,Daniel RL,et al. WVOX,a novel WW domain-containing protein mapping to human chromosome 16q23.3-24.1,a region frequently affected in breast cancer[J]. Cancer Res,2000,60(8):2140-2145

[11] 张庆莉,张庆慧,丛 华. BRCA1 和 WVOX 在年轻女性乳腺浸润性导管癌中的表达及临床病理意义[J]. 中华病理学杂志,2013,42(2):90-94

[12] Gourley C,Paige AJ,Taylor KJ,et al. WVOX gene expression abolishes ovarian cancer tumorigenicity in vivo and decreases attachment to fibronectin via integrin alpha3[J]. Cancer Res,2009,69(11):4835-4842

[13] Matteucci E,Maroni P,Luzzati A,et al. Bone metastatic process of breast cancer involves methylation state affecting E-cadherin expression through TAZ and WVOX nuclear effectors[J]. Eur J Cancer,2013,49(1):231-244

[14] 孙亚伟,王一波,薛文波. 胃癌组织中 MMP-14 蛋白的表达及在腹腔转移中的临床意义[J]. 南京医科大学学报:自然科学版,2014,34(2):183-187

[15] Lan YY,Wu SY,Lai HC,et al. WW domain-containing oxidoreductase is involved in upregulation of matrix metalloproteinase 9 by Epstein-Barr virus latent membrane protein 2A [J]. Biochem Biophys Res,2013,436(4):672-676

[收稿日期] 2014-02-25