

## 肾母细胞瘤过表达基因促进肝癌细胞的侵袭与转移

卢叶挺,丁文周,于建军,谭龙威,孔连宝\*

(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:**探讨肾母细胞瘤过表达基因(NOV CCN3)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的 CCN3 的 mRNA 表达水平,同时检测肝癌细胞系及正常人肝细胞中 CCN3 的 mRNA 表达水平,Western blot 检测肝癌及癌旁组织中 CCN3 蛋白的表达量;通过肝癌细胞过表达 CCN3 分析 CCN3 蛋白对肝癌细胞转移的作用;运用 Transwell 侵袭实验和划痕迁移实验研究 CCN3 过表达对肝癌细胞侵袭和迁移能力的影响。**结果:**50 对样本中有 39 对 CCN3 的 mRNA 表达水平在肝癌组织中高于癌旁组织,Western blot 提示肝癌组织中 CCN3 蛋白表达量高于癌旁组织。体外肝癌细胞的功能试验中,过表达 CCN3 能促进 MHCC-97H、SMMC-7721 细胞的侵袭与转移。**结论:**CCN3 在肝癌组织中高表达,过表达 CCN3 能促进肝癌的侵袭与转移,CCN3 发挥作用机制的研究能为肝细胞肝癌的治疗提供新的思路。

**[关键词]** CCN3;肝细胞肝癌;肿瘤侵袭

**[中图分类号]** Q786

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2015)08-1087-05

**doi:**10.7655/NYDXBNS20150807

## Nephroblastoma overexpressed gene promotes migration and invasion of hepatocellular carcinoma

Lu Yeting, Ding Wenzhou, Yu Jianjun, Tan Longwei, Kong Lianbao\*

(Department of Liver Transplantation Center, the First Affiliated Hospital of NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:**To detect the expression and study the role of nephroblastoma overexpressed gene(NOV CCN3)in hepatocellular carcinoma(HCC). **Methods:**The expressions of CCN3 mRNA in HCC samples and cell lines were detected by real-time PCR, and the expressions of CCN3 protein in HCC tissues and adjacent non-cancer tissues were assessed by Western blot. In addition, invasion of HCC cells was observed after overexpressing CCN3 by Transwell invasion assay and wound healing assay. **Results:**In the total of 50 paired HCC specimens, compared with the adjacent non-cancer tissues, the expression of CCN3 mRNA was up-regulated in 39 cases, and the expression of CCN3 protein in HCC tissues was higher than that in adjacent non-cancer tissues. Overexpression of CCN3 enhanced HCC-derived MHCC-97H, SMMC-7721 cellular invasion *in vitro*. **Conclusion:**This study indicates CCN3 is frequently overexpressed in hepatocellular carcinoma, and contributes to tumor cell invasion. The study of CCN3 may provide a novel therapeutic idea for prevention and treatment of invasion in HCC.

**[Key words]** CCN3; hepatocellular carcinoma; tumor invasion

[Acta Univ Med Nanjing, 2015, 35(08): 1087-1091]

肝细胞肝癌是世界范围内最常见的一种恶性肿瘤,尤其是在非洲和亚洲,肝细胞肝癌是因恶性肿瘤死亡的主要原因<sup>[1-2]</sup>。肝细胞肝癌的最常见病因是病毒感染,如乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒<sup>[3]</sup>。目前,肝癌的根治性治疗仅限于手术切除和肝移植<sup>[4]</sup>。

然而,只有小部分肝癌患者可以做到手术切除<sup>[5]</sup>。肝癌可以通过门静脉及肝内其他系统发生肝内外转移,导致术后有较高的复发率和远处转移率,患者术后的 5 年生存率仍只有 30%~40%<sup>[6]</sup>。因此,有必要对肝癌发展机制做进一步研究,从而找到一个治疗肝癌的有效手段。肾母细胞瘤过表达基因(nephroblastoma overexpressed gene, NOV CCN3)是 CCN 家族的一个成员,参与多种细胞功能,包括细

**[基金项目]** 卫生部医药发展项目(W2012Fz058)

\*通信作者(Corresponding author), E-mail: lbkong@njmu.edu.cn

胞生长、分化,血管生成,黏附等<sup>[7]</sup>。现有研究发现,CCN3与多种肿瘤的发生和发展有关,如骨肉瘤、食管癌等<sup>[8-9]</sup>。然而CCN3在肝癌中的表达及其作用并没有深入研究。本文检测了肝癌组织、癌旁组织和肝癌细胞中的CCN3的表达水平,并通过肝癌细胞株中过表达CCN3,研究其对肝癌细胞生长及侵袭的作用,为肝癌的侵袭转移机制及肝癌的治疗提供新的方向。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

收集南京医科大学第一附属医院2012年1月至2013年12月肝癌手术切除的50例肝癌及相应癌旁组织标本,所有标本的病理结果通过常规切片及免疫组化确认,均为肝细胞肝癌,其中有病理或免疫组化证实的脉管癌栓或门静脉癌栓为脉管转移组,否则为非脉管转移组。新鲜标本通过液氮保存,实验得到患者本人及南京医科大学第一附属医院伦理委员会的同意。人类肝癌细胞系(MHCC-97H, SMMC-7721, HepG2, Huh7, MHCC-97L)及正常人肝细胞LO2均为本实验室冻存。

胎牛血清、DMEM高糖培养基、0.25%胰酶(Gibco公司,美国);TRIzol、Lipofectamine2000(Invitrogen公司,美国);反转录试剂盒、SYBR Green定量PCR试剂盒(TaKaRa公司,日本);CCN3、GAPDH一抗(Santa Cruz公司,美国);ECL发光液(Pierce公司,美国);基质胶(BD公司,美国),Cell Counting Kit-8(Dojindo Labs,日本)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养

所有细胞都在恒温37℃、含5%CO<sub>2</sub>的细胞培养箱中进行培养,培养基添加了10%胎牛血清、50 U/mL青霉素和50 μg/mL庆大霉素的DMEM。

#### 1.2.2 质粒的转染

过表达CCN3的载体质粒GV230-CCN3购自上海吉凯基因化学技术有限公司。通过Lipofectamine2000进行转染,具体转染步骤参照试剂商说明书,转染时的细胞密度为80%~90%。

#### 1.2.3 RNA的提取和real-time PCR

所有组织及细胞系的RNA都是通过TRIzol提取,具体的RNA提取步骤参照试剂盒说明书,然后通过反转录试剂盒将RNA转录成cDNA,最后用SYBR Green定量PCR试剂盒进行定量检测,引物上下游序列为:CCN3上游5'-TCCGCACCAAGAAG-TCACTC-3',下游5'-CCCAATGACCATCACTGGCT-

3';GAPDH上游5'-GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT-3';下游:5'-GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG-3'。所有实时定量反应均在ABI StepOnePlus real-time PCR system上进行,每个反应设3个复孔。数据用2<sup>-ΔΔCt</sup>法分析。

#### 1.2.4 Western blot

通过含25 mmol/L Tris-Cl (pH7.5)、5 mmol/L EDTA、1%SDS和1%蛋白酶抑制剂的蛋白裂解液将细胞及组织裂解,蛋白样品在10% SDS-PAGE中电泳,然后将蛋白转移至PVDF膜,5%脱脂奶粉在室温下封闭1 h,加一抗(anti-CCN3, anti-GAPDH)在4℃过夜,然后在室温下加HRP标记的二抗孵育1 h。常规ECL曝光、扫描成像。

#### 1.2.5 Transwell 侵袭实验

Transwell小室纤维膜孔径为8 mm,下室中加入含10%胎牛血清的DMEM 750 μL,上室中加入不含胎牛血清的DMEM 500 μL,同时每个上室中加入含1×10<sup>5</sup>个细胞的悬液,在恒温37℃ 5%CO<sub>2</sub>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。

#### 1.2.6 划痕迁移实验

将转染的细胞分别铺6孔板,每孔细胞数为5×10<sup>5</sup>个。待细胞90%贴壁后,撤血清饥饿24 h,用10 μL的白色枪头在6孔板中均匀划痕,并加入无血清培养基,每隔12 h观察并拍照记录。

### 1.3 统计学方法

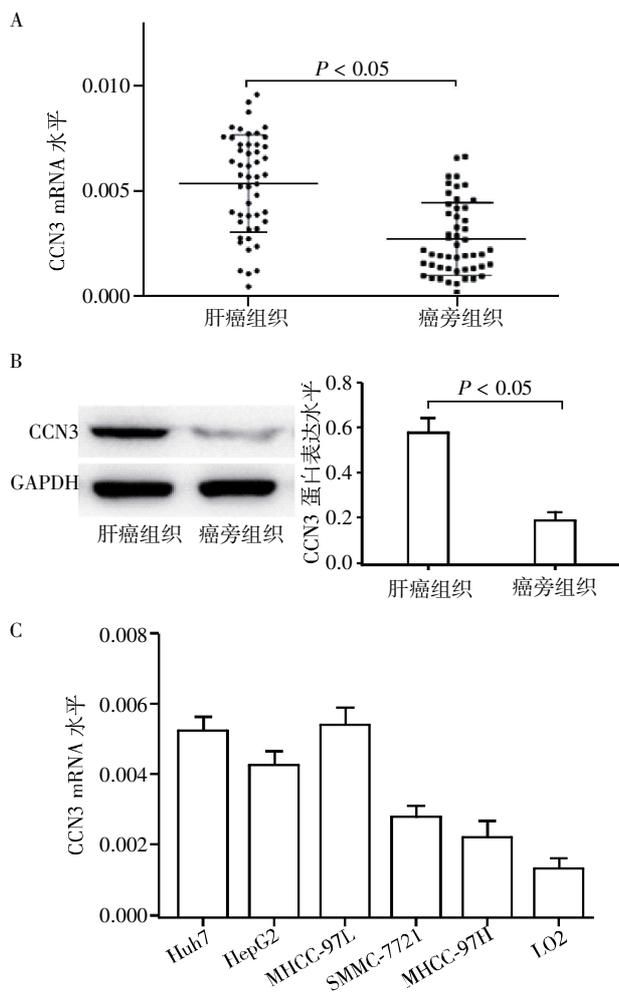
运用SPSS18.0统计软件进行分析,计量资料以均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间均数比较采用t检验,分类资料比较采用卡方检验, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 CCN3在肝癌组织及肝癌细胞株中高表达

Real-time PCR检测50例肝癌及癌旁组织,发现其中39例肝癌组织中的CCN3的mRNA水平高于癌旁组织(0.005 30 ± 0.002 30 vs 0.002 66 ± 0.001 73,  $P < 0.05$ ,图1A)。Western blot结果显示36例肝癌组织中的CCN3的蛋白水平高于癌旁组织(0.582 50 ± 0.056 19 vs 0.185 00 ± 0.041 23,图1B)。以上数据说明CCN3在肝癌中表达上调。此外,检测肝癌细胞系(MHCC-97H, SMMC-7721, HepG2, Huh7, MHCC-97L)及人正常肝细胞(LO2)中的CCN3表达

水平,结果证实肝癌细胞株中 CCN3 的 mRNA 水平均高于正常肝细胞,并发现其中以 SMMC-7721 及 MHCC-97H 相对较低(图 1C)。因此,选择这 2 株细胞作为 CCN3 过表达的细胞模型,以观察 CCN3 对肝癌细胞侵袭能力的影响。



A:PCR 检测 CCN3 mRNA 水平;B:Western blot 检测 CCN3 蛋白水平;C:肝癌细胞系(MHCC-97H、SMMC-7721、HepG2、Huh7、MHCC-97L)及人正常肝细胞(LO2)中的 CCN3 mRNA 水平。

图 1 CCN3 在肝癌标本和肝癌细胞系中表达上调

Figure 1 CCN3 is overexpressed in HCC and HCC-derived cells

## 2.2 CCN3 mRNA 表达水平与临床指标的关系

分析 CCN3 mRNA 的表达水平与患者的性别、年龄、肝癌肿块大小、是否合并乙肝病毒感染、是否有淋巴结或远处转移、肝功能 Child 分级、甲胎蛋白水平之间的关系。50 例患者中有 29 例伴有淋巴结或远处转移,CCN3 阳性有 22 例,占 75.9%,而无淋巴结或远处转移的 21 例患者中,CCN3 阳性仅有 7 例,占 33.3%,表明高表达 CCN3 与肿瘤转移有明显相关性( $P < 0.05$ ),而高表达 CCN3 与患者的性别、年龄、肝癌肿块大小、是否合并乙肝病毒感染、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 CCN3 mRNA 的表达水平与临床指标的关系

Table 1 Clinical parameters in samples with or without CCN3 mRNA versus

临床指标	总体	CCN3(+)	CCN3(-)	P 值
例数	50	29	21	
性别				
男	28	16	12	
女	22	13	9	0.962
年龄(岁)				
$\geq 50$	35	22	13	
$< 50$	15	7	8	0.495
肿块大小(cm)				
$\geq 5$	19	11	8	
$< 5$	31	18	13	0.461
肿瘤转移				
是	29	22	7	
否	21	7	14	0.002
乙肝病史				
HBV(+)	39	23	16	
HBV(-)	11	6	5	0.967
肝功能 Child 分级				
A~B	39	25	14	
C	11	4	7	0.193
甲胎蛋白(ng/mL)				
$\geq 100$	28	16	12	
$< 100$	22	13	9	0.890

CCN3(+):CCN3 mRNA 表达水平升高 0.5 倍以上;CCN3(-):CCN3 mRNA 表达水平不升高或者升高 0.5 倍以下。

## 2.3 过表达载体质粒 GV230-CCN3 转染后 CCN3 的蛋白表达

将过表达载体质粒 GV230-CCN3 转染入 SMMC-7721、MHCC-97H 细胞 48 h 后 Western blot 检测 CCN3 蛋白,结果显示在转染过表达载体质粒的细胞中 CCN3 蛋白表达明显上升(SMMC-7721:  $0.977 50 \pm 0.060 20$  vs  $0.427 50 \pm 0.043 49$ ,MHCC-97H:  $1.065 00 \pm 0.068 55$  vs  $0.362 50 \pm 0.063 96$ , $P < 0.05$ , $n=3$ ,图 2)。

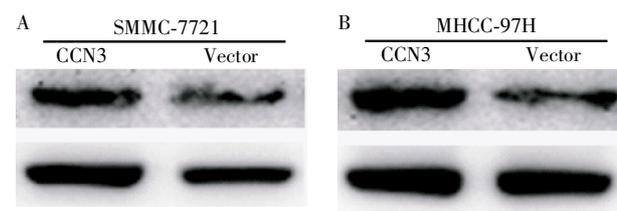


图 2 过表达载体质粒 GV230-CCN3 转染后的 CCN3 表达水平

Figure 2 The expression of CCN3 after GV230-CCN3 plasmid transfection

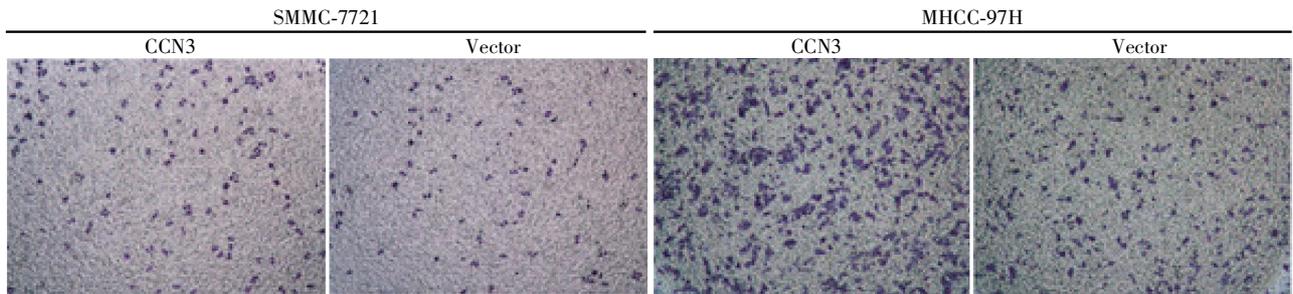
### 2.4 CCN3 促进肝癌细胞的侵袭

通过构建 CCN3 过表达的细胞模型,本研究用小室侵袭实验及细胞划痕实验检测 CCN3 对肝癌细胞 SMMC-7721、MHCC-97H 侵袭的影响。过表达载体质粒 GV230-CCN3 转染入 SMMC-7721、MHCC-97H 细胞,以空载质粒 GV230 作为对照。染色后在显微镜下观察发现,转染了 GV230-CCN3 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(SMMC-7721:363 ± 23 vs 179 ± 28, MHCC-

97H:399 ± 24 vs 225 ± 20,  $P < 0.05, n=3$ ,图 3)。划痕结果显示,与阴性对照组相比,转染了 GV230-CCN3 质粒的迁移能力明显增强( $n=3$ ,图 4)。

### 3 讨论

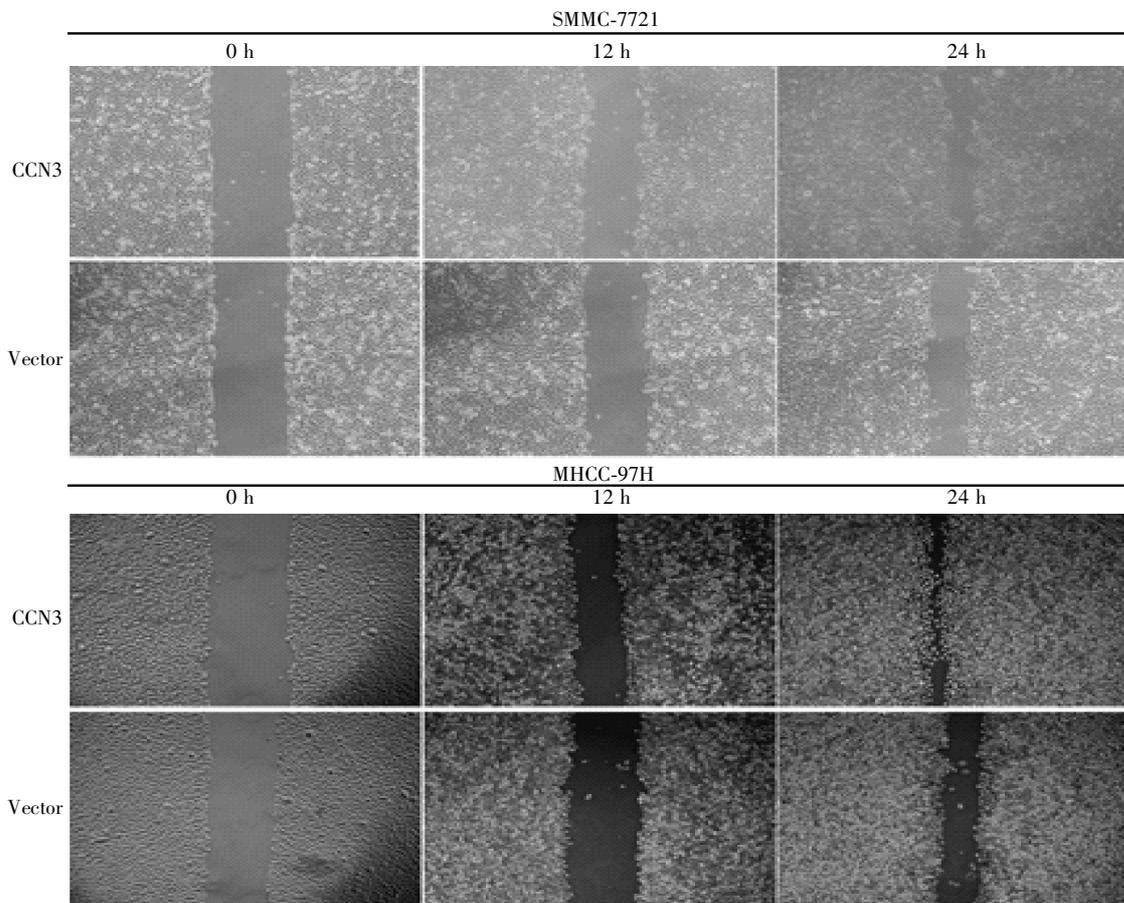
CCN3 是 CCN 家族的一个成员,富含半胱氨酸,CCN3 能与细胞外基质相互作用,从而调节许多细胞功能<sup>[10]</sup>。CCN3 在人体肾脏、软骨、肌肉、肝脏等多种脏器中均有表达,当组织脏器发生肿瘤时,



过表达 CCN3 增加了 SMMC-7721 和 MHCC-97H 的细胞侵袭能力( $n=3$ )。

图 3 CCN3 对细胞侵袭的影响( $\times 40$ )

Figure 3 Effects of CCN3 overexpression on cell invasion( $\times 40$ )



过表达 CCN3 增加了 SMMC-7721 和 MHCC-97H 的细胞迁移能力( $n=3$ )。

图 4 CCN3 对细胞迁移的影响( $\times 40$ )

Figure 4 Effects of CCN3 overexpression on cell migration( $\times 40$ )

CCN3 出现异常表达<sup>[11]</sup>。CCN3 可以与多种细胞表面受体结合,在不同的细胞类型,CCN3 作用的信号途径可能有差异。已有文献指出,CCN3 在肿瘤形成中起着重要作用,包括肿瘤细胞的增殖、黏附和侵犯。研究发现,在骨肉瘤组织中,CCN3 的异常升高与预后呈明显负相关,意味着在疾病诊断过程中,CCN3 表达水平的检测可以用来对患者的预后进行有效评估<sup>[12]</sup>。同时,在恶性程度最高的肾癌细胞系 PC-3 中,CCN3 的表达量最高<sup>[7,13]</sup>。在软骨肉瘤细胞中,CCN3 的上调增加了细胞的迁移和侵袭力,进一步研究表明,CCN3 的高表达促进细胞表面相关基质金属蛋白-13(matrix metalloproteinase-13, MMP-13)的表达升高<sup>[14]</sup>。同时,有研究表明转染了 CCN3 过表达质粒的 ES 细胞 MMP-9 的表达也升高<sup>[15]</sup>,这可能是 CCN3 促进细胞迁移能力升高的分子基础。在纤维母细胞中,CCN3 与  $\alpha 5\beta 1$ 、 $\alpha 6\beta 1$  形成联接体调节细胞黏附,与  $\alpha v\beta 3$  结合调节细胞迁移<sup>[16]</sup>。肝癌中的 CCN2 表达量显著升高,并且促进肝癌细胞的侵袭和转移,这与 CCN2 参与上皮-间质转化有关<sup>[17]</sup>。因此,本文推测 CCN3 基因可能在肝癌的发展中也起到一定作用。

尽管 CCN3 在多种肿瘤的发生和发展中起重要作用,但是尚未有 CCN3 与肝癌之间相关性的研究。本研究证实与癌旁组织相比,肝癌组织中的 CCN3 表达明显上调,提示 CCN3 在肝癌发展中起促进作用。体外实验进一步表明过表达 CCN3 增加肝癌细胞 MHCC-97H、SMMC-7721 的侵袭与迁移能力,表明 CCN3 能促进肝癌细胞的侵袭与转移。对 CCN3 mRNA 的表达水平与临床指标进行分析,也显示 CCN3 与肿瘤转移有明显相关性。

通过以上的研究可以认为,CCN3 在肝癌的发生发展中发挥重要作用。CCN3 可以促进肝癌细胞的侵袭,从而提高肝癌的转移力,其生物学功能可能是通过调节整合素的功能来促进肝癌细胞的侵袭和迁移。CCN3 发挥作用的具体机制仍待进一步研究,但已能为肝细胞肝癌的治疗提供新的思路。

#### [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 nodel[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2012, 14(31):93-99

[2] Bosch FX, Ribes J, Diaz M, et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends[J]. Gastroenterology, 2004, 127(5 Suppl 1):S5-S16

[3] Malek NP, Schmidt S, Huber P, et al. The diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. Dtsch Arztebl Int, 2014, 111(7):101-106

[4] Imamura H, Matsuyama Y, Tanaka E, et al. Risk factors contributing to early and late phase intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after hepatectomy[J]. J Hepatol, 2003, 38(2):200-207

[5] Strong RW. Transplantation for liver and biliary cancer[J]. Semin Surg Oncol, 2000, 19(2):189-99

[6] 倪庆锋,孔连宝,刘静,等. Rho 相关卷曲螺旋形成蛋白激酶 1 促进肝癌细胞的转移[J]. 南京医科大学学报:自然科学版, 2013, 33(10):1377-1382

[7] Chen PC, Lin TH, Cheng HC, et al. CCN3 increases cell motility and ICAM-1 expression in prostate cancer cells[J]. Carcinogenesis, 2012, 33(4):937-945

[8] Huang CY, Lee CY, Chen MY, et al. Nephroblastoma overexpressed gene (NOV) enhances cell motility and COX-2 upregulation of human osteosarcoma involves  $\alpha v\beta 5$  integrin, ILK and AP-1-dependent pathways[J]. Biochem Pharmacol, 2011, 81(5):577-585

[9] 刘建军. 过表达 NOV/CCN3 可促进食管癌细胞的生长、迁移和侵袭[J]. 中国癌症杂志, 2012, 22(10):746-750

[10] Perbal B. NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues[J]. Mol Pathol, 2001, 54(2):57-79

[11] Perbal B. The CCN3 protein and cancer[J]. Adv Exp Med Biol, 2006, 587(1):23-40

[12] Perbal B, Zuntini M, Zambelli D, et al. Prognostic value of CCN3 in osteosarcoma[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(3):701-709

[13] Maillard M, Cadot B, Ball RY, et al. Differential expression of the ccn3 (nov) protooncogene in human prostate cell lines and tissues[J]. Mol Pathol, 2001, 54(4):275-280

[14] Tzeng HE, Chen JC, Tsai CH, et al. CCN3 increases cell motility and MMP-13 expression in human chondrosarcoma through integrin-dependent pathway[J]. J Cell Physiol, 2011, 226(12):3181-3189

[15] Benini S, Perbal B, Zambelli D, et al. In Ewing's sarcoma CCN3(NOV) inhibits proliferation while promoting migration and invasion of the same cell type[J]. Oncogene, 2005, 24(27):4349-4361

[16] Lin CG, Chen CC, Leu SJ, et al. Integrin-dependent functions of the angiogenic inducer NOV(CC3): implication in wound healing[J]. J Biol Chem, 2005, 280(9):8229-8237

[17] Xiu M, Liu YH, Brigstock DR, et al. Connective tissue growth factor is overexpressed in human hepatocellular carcinoma and promotes cell invasion and growth[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(47):7070-7078