

肝 癌

DOI:10.13406/j.cnki.cyx.001696

SH3BP4 基因对肝癌细胞迁移和增殖作用的实验研究

郑亚秋, 潘 琦, 梁 利, 张桂冀, 向 进, 夏 杰, 汪 凯, 丁克越, 唐 霓

(重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室, 重庆 400016)

【摘要】目的:构建 SH3 结构域结合蛋白 4 (SH3-domain binding protein 4, SH3BP4) 重组腺病毒载体及 shSH3BP4 慢病毒载体, 初步探索 SH3BP4 对肝癌细胞迁移增殖能力的影响。**方法:**PCR 扩增 SH3BP4 cDNA 序列并构建腺病毒重组质粒 pAdEasy-SH3BP4, HEK293 细胞包装重组腺病毒 AdSH3BP4; 构建 SH3BP4 基因短发夹型 RNA 干扰慢病毒载体, 转染至 HEK293T 细胞, 包装重组慢病毒 shSH3BP4。采用 Western blot 检测 SH3BP4 在人正常肝脏细胞及肝癌细胞的内源性表达, 将 SH3BP4 过表达实验部分设为 3 个组: Mock 组、AdGFP 组和 AdSH3BP4 组, Mock 组为空白对照组, AdGFP 组为感染腺病毒 AdGFP 的对照组, AdSH3BP4 组为感染腺病毒 AdSH3BP4 的实验组; 将 SH3BP4 敲低实验部分设为 2 个组: shControl 组和 shSH3BP4 组, shControl 组为感染慢病毒 shPLL3.7 的对照组, shSH3BP4 组为感染慢病毒 shSH3BP4 的实验组。通过 Transwell 和划痕实验检测 SH3BP4 过表达和敲低对肝癌细胞迁移能力的影响; MTS 和直接克隆形成实验检测 SH3BP4 过表达和敲低对肝癌细胞的增殖能力的影响。**结果:**经限制性内切酶酶切及 DNA 测序验证, 成功构建 AdSH3BP4 重组腺病毒载体和 shSH3BP4 慢病毒载体。Transwell 结果表明, AdSH3BP4 组 (74.800 ± 0.544) 相较于空白对照组 (219.467 ± 2.640) 与 AdGFP 组 (210.533 ± 8.498), 迁移的细胞数明显减少 ($P=0.000$); 而 shSH3BP4 组 (191.467 ± 3.906) 比 shControl 组 (91.733 ± 2.763) 细胞的迁移数目明显增加 ($P=0.000$)。划痕实验结果表明, AdSH3BP4 组的细胞修复率 [$(10.400 \pm 0.036)\%$] 明显低于空白对照组 [$(37.500 \pm 0.063)\%$] 与 AdGFP 组 [$(50.000 \pm 0.063)\%$] ($P=0.000$); 而 shSH3BP4 组 [$(55.00 \pm 0.05)\%$] 明显高于 shControl 组 [$(23.3 \pm 0.029)\%$] ($P=0.000$)。MTS 结果表明: AdSH3BP4 组在 96 h 的吸光度值 (0.921 ± 0.053) 与空白对照组 (1.091 ± 0.043) 及 AdGFP 组 (1.062 ± 0.024) 相比明显降低 ($P=0.005$)。shSH3BP4 组在 96 h 的吸光度值 (1.497 ± 0.020) 与 shControl 对照组 (1.142 ± 0.103) 相比明显升高 ($P=0.004$)。直接克隆形成实验结果表明, AdSH3BP4 组的细胞克隆形成数 (34.333 ± 2.082) 相较于空白对照组 (86.333 ± 4.726) 与 AdGFP 组 (87.333 ± 1.528) 明显减少 ($P=0.000$), 而 shSH3BP4 组 (65.000 ± 6.557) 却明显高于 shControl 组 (31.000 ± 2.000) ($P=0.001$)。上述实验结果说明 SH3BP4 过表达能显著抑制肝癌细胞的迁移、侵袭和增殖能力, 而 SH3BP4 敲低能明显促进肝癌细胞的迁移、侵袭和增殖能力。**结论:**SH3BP4 可抑制肝癌细胞迁移、侵袭和增殖, 可能为肝癌的诊治提供一个新靶标。

【关键词】SH3BP4; 肝细胞肝癌; 细胞迁移; 细胞增殖**【中图分类号】**R735.7; R73-3**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2017-07-09

Effects of SH3BP4 gene on the migration and proliferation of hepatocarcinoma cells

Zheng Yaqiu, Pan Qi, Liang Li, Zhang Guiji, Xiang Jin, Xia Jie, Wang Kai, Ding Keyue, Tang Ni

(Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases, Ministry of Education,

Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effect of SH3BP4 on the migration and proliferation of hepatocarcinoma cells by the construction of SH3BP4 recombinant adenovirus vector and lentiviral vector. **Methods:** The SH3BP4 cDNA sequence was amplified and

then the recombinant Adplasmid pAdTrack-SH3BP4 was constructed. The recombinant adenovirus Ad-SH3BP4 was packaged and amplified by using HEK293 cells. The short hairpin RNA recombinant lentiviral vector of SH3BP4 was constructed and transfected into HEK293T cells, then the recombinant lentiviruses shSH3BP4 was packaged and amplified. The endogenous expression of SH3BP4 in normal human hepatocytes and hepatocarcinoma cells was examined by the Western blot. The SH3BP4 overexpression experiment was divided into three groups: mock group (the blank control group), AdGFP group (the control group

作者介绍:郑亚秋, Email: zhengyaqiu1990@163.com,

研究方向: 乙型肝炎病毒与肝癌。

通信作者:唐 霓, Email: nitang809@163hotmail.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (编号: 81371827, 81572683); 重庆市第十八批市科技计划资助项目 (编号: cstc2015jcyjBX0011); 重庆市“三百”科技领军人才支持计划资助项目 (编号: CSTCCXLJRC201719); 重庆高校创新团队建设计划资助项目 (编号: CXTDX201601015)。

优先出版: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20180514.0906.005.html> (2018-05-14)

of those were infected with adenovirus AdGFP) and AdSH3BP4 group(the experimental group of those were infected with adenovirus AdSH3BP4);the SH3BP4 knockdown experiment was divided into two groups,shControl group,the control group of those were infected with lentiviruses PLL3.7 vector,and shSH3BP4 group,the experimental group of those were infected with lentiviruses shSH3BP4. The effect on the migration of hepatocarcinoma cells was observed by the Transwell and wound healing assay,and the effect on the proliferation was observed by the MTS and colony formation assay. **Results:** A recombinant adenovirus AdSH3BP4 and a recombinant lentiviral shSH3BP4 were successfully constructed,verified by the restriction endonuclease and DNA sequencing. The Transwell assay showed that the number of cell migration in AdSH3BP4 group(74.800 ± 0.544) significantly decreased compared with that in mock group(219.467 ± 2.640) and AdGFP group(210.533 ± 8.498)($P=0.000$). In contrast,the number of cell migration in shSH3BP4 group(191.467 ± 3.906) increased significantly compared with that in shControl group(91.733 ± 2.763)($P=0.000$). The wound healing assay showed that the cell repair rate in AdSH3BP4 group[(10.400 ± 0.036)%] was lower than that in mock group[(37.500 ± 0.063)%] and AdGFP group[(50.000 ± 0.063)%]($P<0.000$),but it was significantly higher in shSH3BP4 group[(55.00 ± 0.05)%] compared with that in shControl group[(23.300 ± 0.029)%]($P=0.000$). The MTS assay showed that the absorbance value at 96 h in AdSH3BP4 group(0.921 ± 0.053) decreased significantly compared with that in black control group(1.091 ± 0.043) and AdGFP group(1.062 ± 0.024), while it was significantly higher in shSH3BP4 group(1.497 ± 0.020) compared with that in shControl group(1.142 ± 0.103)($P=0.004$). The colony formation assay showed that the number of clone forming cells in AdSH3BP4 group(34.333 ± 2.082) significantly decreased compared with that in mock group(86.333 ± 4.726) and AdGFP control group(87.333 ± 1.528)($P=0.000$),but it was significantly higher in shSH3BP4 group(65.000 ± 6.557) compared with that in shControl(31.000 ± 2.000)($P=0.001$). **Conclusion:** SH3BP4 can inhibit the migration,invasion and proliferation of hepatocarcinoma cells,and it may provide a new target for the diagnosis and treatment of liver cancers.

[Key words] SH3BP4;hepatocellular carcinoma;cell migration;cell proliferation

SH3 结构域结合蛋白 4(SH3-domain binding protein 4,SH3BP4)是由 Dunlevy 等首次在人眼角膜成纤维细胞中发现的,其定位于人类染色体2q37.1-q37.2,由 963 个氨基酸残基组成,因其具有调控转铁蛋白内化的作用,又被称为转铁蛋白受体运输蛋白(transferrin receptor trafficking protein,TTP)。SH3BP4 包含 1 个 Src 同源 3(SH3)结构域,1 个 WxxF 基序,1 个靠近 C 末端的 death 结构域,1 个 ZU5 结构域和 3 个 NPF 氨基酸重复基序,在 SH3、LIDL 和 NPF 结构域附近还存在多个磷酸化位点,具有调节细胞内吞、内分选及调控细胞增殖生长的重要功能^[1-3]。

近年来,SH3BP4 参与肿瘤进程引起了学者们新的关注。Beroukhim 等^[4-5]根据 TCGA 数据库的分析发现在乳腺癌、肾癌、非小细胞型肺癌和神经母细胞瘤中 SH3BP4 基因存在缺失突变。同时,Kim 等^[6]学者发现 SH3BP4 可以抑制 HEK293T 及 Hela 细胞的生长增殖,促进细胞的凋亡。Francavilla 等^[7]发现 SH3BP4 还可以与 PI3K(phosphoinositide 3-kinase)形成蛋白复合物来调控成纤维生长因子受体 2b(fibroblast growth factor receptor 2b,FGFR2b)的降解和循环,从而抑制乳腺癌细胞的迁移。由此可见,SH3BP4 与肿瘤的发生发展密切相关,但其在肝癌发生发展过程中的作用目前还未有相关文献报道。

鉴于此,本实验拟利用 SH3BP4 过表达及干扰沉默技术^[8-9],通过 Transwell、划痕实验及 MTS、直接克隆形成实验观察 SH3BP4 对肝癌细胞迁移、侵袭和增殖能力的影响,以初步探讨 SH3BP4 与肝癌细胞生物功能学之间的关系,将为肝癌的临床诊治提供新思路。

1 材料与方法

1.1 细胞株及质粒

人正常肝细胞(LO2、MIHA 细胞由香港理工大学柯子斌教授馈赠),肝癌细胞(HepG2、PLC/PRF/5、SK-Hep1、Hep3B、HP14.5)购于美国 ATCC;SMMC-7721、Huh7、HEK293T 及 HEK293 细胞由本实验室保存;BJ5183、DH10B 感受态细胞由本实验室制备并保存。SH3BP4 质粒购自 ORIGENE 公司(货号 SC108606)。慢病毒包装质粒载体 PLL3.7 由中科院上海巴斯德研究所孙兵教授馈赠。pAd-Track-TO4 质粒为本实验室保存。

1.2 主要试剂

DMEM 高糖培养基、青链霉素购于 Hyclone 公司;胎牛血清购于 Gibco 公司;转染试剂 Lipofectamine 2000 购自 Invitrogen 公司;CellTiter 购于 Promega 公司,Transwell 小室购于 Corning 公司;BCA 蛋白定量试剂盒、Western 制胶试剂盒及结晶紫染料均购于碧云天生物技术公司;兔抗 SH3BP4 单克隆抗体购自 Novus BIOLOGICALS 公司(货号 NBPI-86274);

羊抗兔二抗购于 Abcam 公司;ECL 化学发光试剂购于 Millipore 公司;限制性内切酶 *Kpn* I、*Xba* I、*Xho* I 和 *Hpa* I 购于 NEB 公司;T4 DNA 连接酶购于 Promega 公司;DNA marker 2000、 λ -14 购于 Takara 公司;Taq Universal SYBR Green Supermix 酶购于 BIO-RAD 公司(货号:1725122);氯仿、异丙醇试剂购于科龙化工;引物合成和基因测序由成都擎科梓熙生物技术有限公司完成。

1.3 方法

1.3.1 不同肝癌细胞株中 SH3BP4 的内源性表达 提取 2 种人正常肝脏细胞系(LO2,MIHA)和 7 种肝癌细胞系(SMMC-7721、HepG2、Huh7、PLC/PRF/5、SK-Hep1、Hep3B、HP14.5)总蛋白,BCA 法测蛋白质浓度,取 50 μ g 蛋白质用 10%的分离胶和浓缩胶进行电泳分离,电转移至 PVDF 膜。5%脱脂牛奶室温摇床封闭 1 h,孵育 1:2 000 比例 SH3BP4 一抗 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜。次日,回收一抗,1 $\times$ TBST 洗膜 8 min/次,3 次,室温孵育 1:5 000 比例二抗 1 h,再次用 1 $\times$ TBST 洗膜 8 min/次,3 次,ECL 发光试剂曝光。比较 SH3BP4 在人正常肝脏细胞和肝癌细胞内源性表达水平,选择过表达及敲低 SH3BP4 细胞株做生物功能学实验。

1.3.2 SH3BP4 shRNA 慢病毒载体的构建及包装 根据 Gen Bank 中 SH3BP4 的基因序列(NM_014521),利用 Invitrogen 公司在线设计软件(Block-IT RNAi Designer),按照 RNA 干扰设计原则,设计 2 对针对 SH3BP4 RNA 干扰序列(表 1)送成都擎科梓熙生物技术有限公司进行引物合成。将单链的引物退火成双链 Oligos 序列,连接入经 *Xho* I 和 *Hpa* I 限制性内切酶对表达载体进行双酶切得到线性化的 RNA 干扰载体。将连接产物电转入 DH10B 感受态后,接种到氨苄霉素抗性的 LB 琼脂平板,挑取平板上长出的单克隆菌落重悬于 2 mL 对应抗性的 LB 液中摇菌,次日用质粒小抽提取质粒,进行酶切鉴定,筛选的阳性克隆送检测序。将测序成功的慢病毒载体经 Lipofectamine 2000 转染进 HEK293T 细胞进行慢病毒包装,培养 48、72 h 后收集细胞上清,用超滤装置收集、浓缩病毒。收集的病毒上清感染 SK-Hep1 细胞,12 h 后换 10%胎牛血清的完全培养基,构建成稳定感染 shSH3BP4 的肝癌细胞株。

1.3.3 SH3BP4 目的基因的获取 以 SH3BP4 cDNA 质粒为模板进行 PCR 扩增,所用上游引物为 5'-GGGGTACCTGGG-CGCGGCTCAGCGGATCC-3',下游引物为 5'-GCTCTAGATC-AAATCACGAAGTCGTCCTGGTC-3'。PCR 产物用 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳分离确认目的条带位置正确,按照 DNA 胶回

收试剂盒说明书操作,回收目的片段并纯化。

1.3.4 SH3BP4 重组腺病毒的构建 回收的 DNA 片段及 pAd-Track-TO4 载体用 *Kpn* I、*Xba* I、限制性内切酶 37 $^{\circ}$ C 水浴双酶切 60 min 后,10 g/L 琼脂糖凝胶电泳并定量酶切产物。将酶切后的目的片段和载体用 T4 DNA 连接酶 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。将连接产物电转入 DH10B 感受态中,用含卡那霉素的 LB 平板筛选阳性克隆。挑取平板上的单克隆菌落,经菌落 PCR 挑选出疑似阳性菌落送至华大基因测序鉴定。将测序成功的重组质粒用限制性内切酶 *Pme* I 酶切线性化,再电转入 BJ5183 菌(带 AdEasy 质粒)进行同源重组,涂板后 37 $^{\circ}$ C 孵箱过夜,在 LB 平板上挑选偏小的单克隆菌,接种于 2 mL 含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 液体中,37 $^{\circ}$ C 恒温,200 r/min 摇床过夜。用质粒小抽提取试剂盒提取质粒并酶切鉴定,凝胶电泳后筛选出阳性克隆质粒,再次将重组质粒电转入 DH10B 感受态菌中,扩大培养,挑取阳性克隆菌落用质粒小抽提取质粒,-20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.3.5 SH3BP4 重组腺病毒的包装、扩增及滴度测定 用限制性内切酶 *Pac* I 将 SH3BP4 重组腺病毒质粒酶切线性化,乙醇沉淀法纯化,加 20 μ L 无核酶水溶解。转染 12 h 前将 HEK293 细胞以 40%的密度铺于 25 cm 培养瓶中,待细胞融合至 70%~80%,将线性化的重组腺病毒质粒用 Lipofectamine 2000 转染进 HEK293 细胞中。转染 24 h 后在荧光显微镜下观察绿色荧光表达情况,以确定转染效率。细胞在 10%胎牛血清的完全培养基于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 孵箱中孵育 10~14 d 后,收取细胞。用 PBS 洗涤细胞后,于液氮和 37 $^{\circ}$ C 水浴反复冻融 4 次后,4 $^{\circ}$ C 离心机 14 000 r/min 离心 5 min 后,细胞上清液即为腺病毒初始原液,加相应比例的病毒储存液后,于-80 $^{\circ}$ C 保存备用。取腺病毒原液继续感染下一轮 HEK293 细胞,经 5~6 次扩增后可获得高滴度的 SH3BP4 重组腺病毒(AdSH3BP4)。测定重组腺病毒滴度前 4~6 h,将 PLC/PRF/5 细胞以 40%的密度重铺于 24 孔培养板,细胞贴壁后将 SH3BP4 重组腺病毒按不同浓度梯度加入培养板孔中,且在每孔中加入 4 μ L 1 mg/mL 的 Polybrene 帮助病毒穿过细胞膜,12 h 后换 10%胎牛血清的完全培养基,后分别于 24、48 h 在荧光显微镜下观察细胞感染病毒情况,以确定最适的病毒感染浓度。

1.3.6 Transwell 实验检测细胞迁移 将空白对照组、AdGFP 组及 AdSH3BP4 组的 PLC/PRF/5 以 8×10^4 个/孔和稳定感染 shControl、shSH3BP4 的 SK-Hep1 以 2×10^4 个/孔均匀铺于小室中(上层为无血清的培养基),在 24 孔培养板中每孔加入 1 mL 含 10%胎牛血清的正常培养基,细胞穿膜 24 h 后,取

表 1 shSH3BP4 引物序列

Tab.1 primer sequence of shSH3BP4

名称	正反义链(5'→3')
shSH3BP4-F1	TGCCACCATCTCTACGTCTTTTCAAGAGAAAGAACTCGACGATGTGTTTTC
shSH3BP4-R1	TGCAGAAAAAGCGACCATCTCTACGTCTTTCTCTTGAAAAAGAACTCGACGATGTGGA
shSH3BP4-F2	TGTACTGTGGATTTGCTCCTTTCAAGAGAAGGAGCAATCCACAGTACTTTTTTC
shSH3BP4-R2	TGCAGAAAAAGTACTGTGGATTTGCTCCTTTCTCTTGAAAGGAGCAATCCACAGTACA

出小室, PBS 清洗小室 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 结晶紫染色 3 min, PBS 再次清洗 3 次, 用棉签轻轻擦拭掉小室内未穿出的细胞, 风干后, 200 倍倒置显微镜下随机选取 5 个视野拍照, 并计数穿出细胞数。本实验重复 3 次。

1.3.7 细胞划痕实验检测细胞迁移 将空白对照组、AdGFP 组及 AdSH3BP4 组的 PLC/PRF/5 和稳定感染 shControl、shSH3BP4 的 SK-Hep1 以 2×10^6 个/孔均匀铺于 6 孔培养板中, 于 37 °C、5% CO₂ 孵箱中孵育至细胞贴壁并形成均匀单层后, 进行划痕; 用空培养基轻轻洗涤细胞 2 次, 去除脱落细胞, 加入 5% 胎牛血清的培养基培养, 分别于 0、6、12、24 h 在倒置显微镜下拍照记录细胞迁移情况。本实验重复 3 次。

1.3.8 MTS 法检测细胞增殖 将空白对照组、AdGFP 组及 AdSH3BP4 组的 PLC/PRF/5 和稳定感染 shControl、shSH3BP4 的 SK-Hep1 以 1×10^3 个/孔均匀铺于 96 孔培养板中, 每孔 200 μ L, 每个处理组设置 3 个副孔, 后分别在 24、48、72、96 h 避光加入 20 μ L Cell Titer, 轻摇混匀, 置于孵箱孵育 2 h, 检测各时间点的吸光度 (absorbance, A) 值 ($\lambda=490$ nm)。本实验重复 3 次。

1.3.9 直接克隆形成实验检测细胞增殖 将空白对照组、AdGFP 组及 AdSH3BP4 组的 PLC/PRF/5 和稳定感染 shControl、shSH3BP4 的 SK-Hep1 以 500 个/孔均匀铺于 6 孔培养板中, 正常培养 10~14 d, 待细胞形成肉眼可见的细胞集落后, PBS 清洗 3 次, 4% 多聚甲醛固定 30 min, 0.4% 结晶紫染色 8 min, PBS 再次清洗 3 次, 风干后拍照, 并计数克隆形成数。本实验重复 3 次。

1.4 统计学处理

各实验均进行至少 3 次独立重复实验, 采用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。数据以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。两独立样本均数的比较运用 *t* 检验, 多组均数间比较先采用单因素方差分析, 再进行多重比较。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 SH3BP4 在人正常肝脏细胞及肝癌细胞中的内源性表达

Western blot 结果 (图 1) 显示, SH3BP4 在 PLC/PRF/5 细胞呈低表达, 在 SK-Hep1 呈高表达, 因此选择 PLC/PRF/5 来做 SH3BP4 过表达实验, SK-Hep1 来做敲低实验。

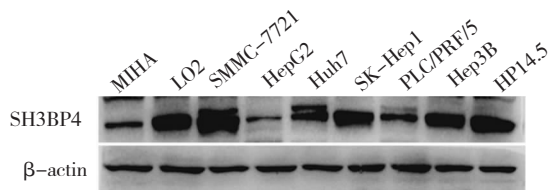
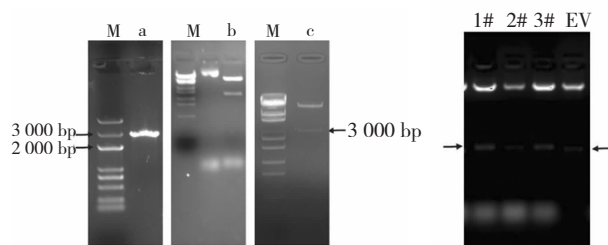


图 1 Western blot 检测 SH3BP4 在人正常肝脏细胞和肝癌细胞的蛋白表达

Fig.1 The protein expression of SH3BP4 in human normal liver cells and hepatocarcinoma cells by Western blot

2.2 SH3BP4 重组腺病毒载体及 shRNA 慢病毒载体的构建

琼脂糖凝胶电泳结果显示, 目的基因 SH3BP4 经 PCR 扩增的片段大小约 3 000 bp, 构建的 pAd-Track-SH3BP4 载体经 *Kpn* I 和 *Xba* I 限制性内切酶双酶切后切下的片段大小与扩增片段大小一致, pAdEasy-SH3BP4 重组腺病毒质粒经 *Pac* I 酶切的片段大小与扩增片段大小也一致, 将 DNA 序列送检测序, 经 DNA ssist2.2 软件比对验证正确, 表明 SH3BP4 重组腺病毒载体构建成功 (图 2A)。将构建的 shSH3BP4 及空载体 PLL3.7 经 *Xho* I 和 *Hpa* I 限制性内切酶双酶切, 可见 shSH3BP4 酶切下的片段大小相较于空载体酶切下的片段大约 40 bp, 然后将序列送至公司测序, 经 DNA ssist 2.2 软件比对验证正确, 表明 shSH3BP4 慢病毒载体构建成功 (图 2B)。



M: DNA Marker; a: 目的基因 PCR 扩增, 3 000 bp; b: pAd-Track-SH3BP4 双酶切鉴定结果; 1#、2#、3# 分别为 3 对引物对应的慢病毒质粒酶切产物; EV: 空载体

A. 过表达重组腺病毒构建的琼脂糖凝胶电泳

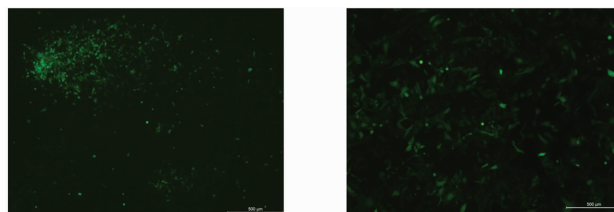
B. 慢病毒构建的琼脂糖凝胶电泳

图 2 限制性内切酶酶切鉴定重组质粒

Fig.2 Identification of recombinant adenoviruses

2.3 SH3BP4 重组腺病毒及 shRNA 慢病毒的构建

将构建成功的重组腺病毒载体转染至 HEK293 细胞, 7 d 后在荧光显微镜下可见“彗星”状荧光, 提示病毒构建包装成功 (图 3A)。将慢病毒载体转染至 HEK293T 细胞, 荧光显微镜下可见 80%~90% 的细胞感染绿色荧光, 转染效果好 (图 3B)。



A. 重组腺病毒转染

B. 慢病毒载体转染

HEK293 细胞

HEK293T 细胞

图 3 包装病毒 (50 ×)

Fig.3 Package of recombinant adenoviruses (50 ×)

2.4 SH3BP4 对肝癌细胞迁移侵袭能力的影响

PLC/PRF/5 细胞感染最适滴度的 AdGFP 和 AdSH3BP4, 铺入 Transwell 小室 48 h 后检测细胞迁移能力。实验结果显

示:空白对照组(219.467 ± 2.640)、AdGFP 组(210.533 ± 8.498)和 AdSH3BP4 组(74.800 ± 0.544)3 组具有统计学差异($F=3\ 048.00, P=0.000$),其中空白对照组与 AdGFP 组无统计学意义($P=0.214$),而 AdSH3BP4 组侵袭和迁移数目明显低于空白对照组、AdGFP 组(均 $P=0.000$,图4A)。将稳定感染shControl和 shSH3BP4 的 SK-Hep1 细胞铺入 Transwell 小室 24 h 后检测细胞迁移能力。结果显示:相较于 shControl 组(91.733 ± 2.763),shSH3BP4 组(191.467 ± 3.906)明显促进细胞的迁移($t=45.170, P=0.000$,图 4B)。

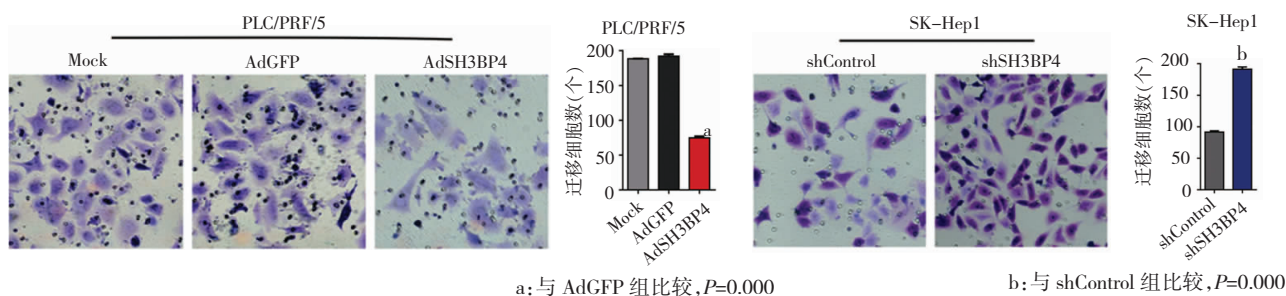
划痕实验结果显示,空白对照组在 24 h 的细胞迁移率为(37.500 ± 0.063)%,AdGFP 组为(50.000 ± 0.063)%,AdSH3BP4 组为(10.400 ± 0.036)%,三者明显具有统计学差异($F=40.430, P=0.000$),进一步组间比较发现,空白对照组与 AdGFP 组比较无统计学意义($P=0.070$),而 AdSH3BP4 组与空白对照组、AdGFP 组比较,细胞迁移率明显降低(均 $P=0.000$),提示 SH3BP4 过表达具有抑制肝癌细胞迁移的能力;敲低 SH3BP4 后,shSH3BP4 组在 24 h 的细胞迁移率[(23.300 ± 0.029)%]比 shControl 组[(55.000 ± 0.050)%]明显增加($t=9.500, P=0.001$),

提示 SH3BP4 敲低可以促进细胞迁移(图 5)。

2.5 SH3BP4 对肝癌细胞增殖能力的影响

直接克隆形成实验结果显示,空白对照组(86.333 ± 4.720)、AdGFP 组(87.333 ± 1.528)和 AdSH3BP4 组(34.333 ± 2.082)三组存在统计学差异($F=285.200, P=0.000$),其中空白对照组和 AdGFP 组差异无统计学意义($P=0.745$),AdSH3BP4 组细胞克隆形成数相较于空白对照组、AdGFP 组明显减少($P=0.000$);而 shSH3BP4 组(65.000 ± 6.557)相对于 shControl 组(31.000 ± 2.000)明显增加($t=8.590, P=0.001$)(图 6)。

MTS 实验结果采用重复测量方差分析方法进行统计, Mauchly 的 $W=0.000, P=0.000$,因为 $P<0.05$,不符合球形度检验,采用 ε 校正系数来校正自由度,校正后的“球对称”系数 $\varepsilon=0.216$;Greenhouse-Geisser, $F=7.319, P=0.021$,各处理组间比较有差别, $F=12.696, P=0.007$;与空白对照组和 AdGFP 组相比,AdSH3BP4 组从正常培养 24 h 开始细胞生长速度减慢,且在 72 h 时表现最明显,空白对照组(0.981 ± 0.001)、AdGFP 组(0.949 ± 0.013)和 AdSH3BP4 组(0.782 ± 0.008)相比较, $F=290.314, P=0.000$,其中空白对照组和 AdGFP 组差异

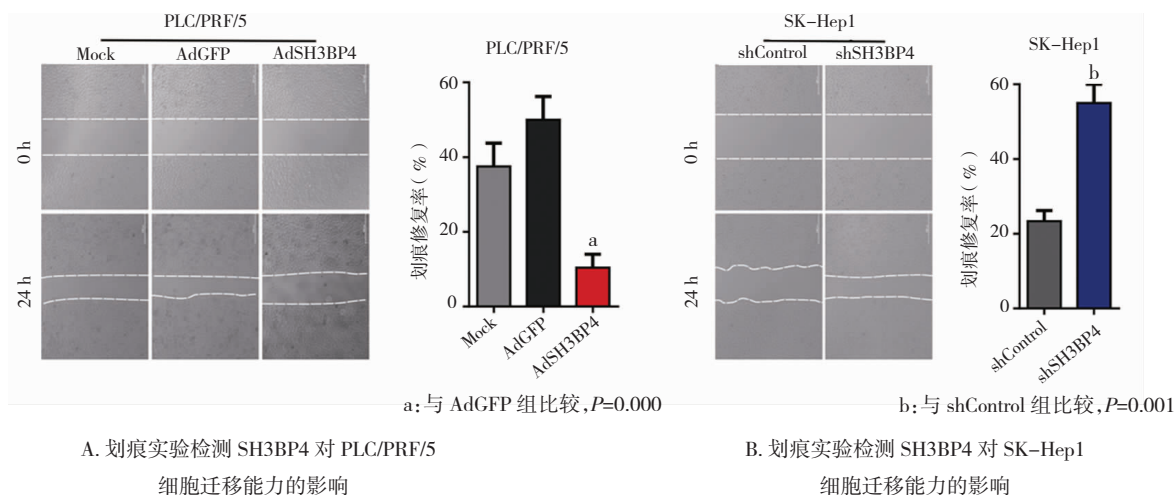


A. Transwell 小室检测 SH3BP4 对 PLC/PRF/5 细胞迁移能力的影响

B. Transwell 小室检测 SH3BP4 对 SK-Hep1 细胞迁移能力的影响

图 4 SH3BP4 抑制肝癌细胞的迁移

Fig.4 SH3BP4 inhibits the migration of hepatocarcinoma cells



A. 划痕实验检测 SH3BP4 对 PLC/PRF/5 细胞迁移能力的影响

B. 划痕实验检测 SH3BP4 对 SK-Hep1 细胞迁移能力的影响

图 5 SH3BP4 抑制肝癌细胞的迁移

Fig.5 SH3BP4 inhibits the migration of hepatocarcinoma cells

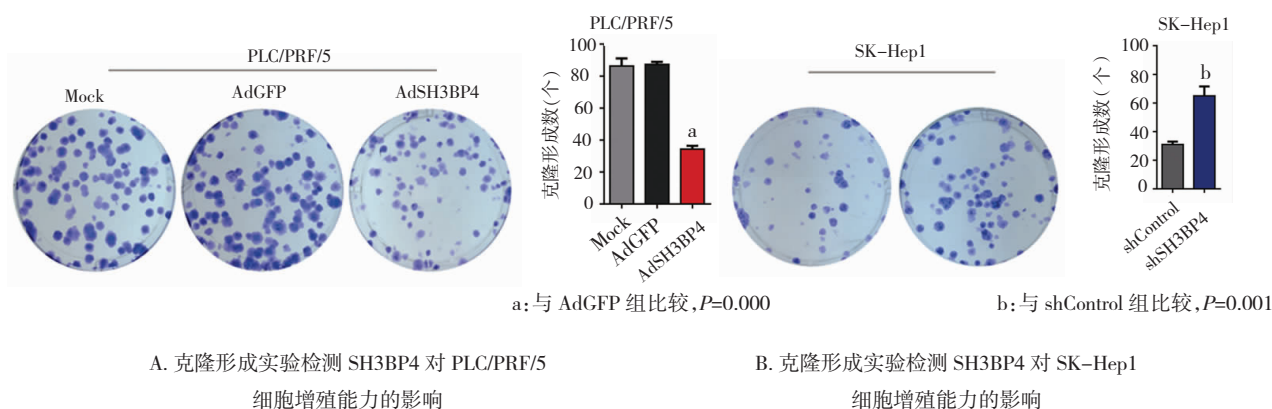


图 6 SH3BP4 抑制肝癌细胞的增殖

Fig.6 SH3BP4 inhibits the proliferation of hepatocarcinoma cells

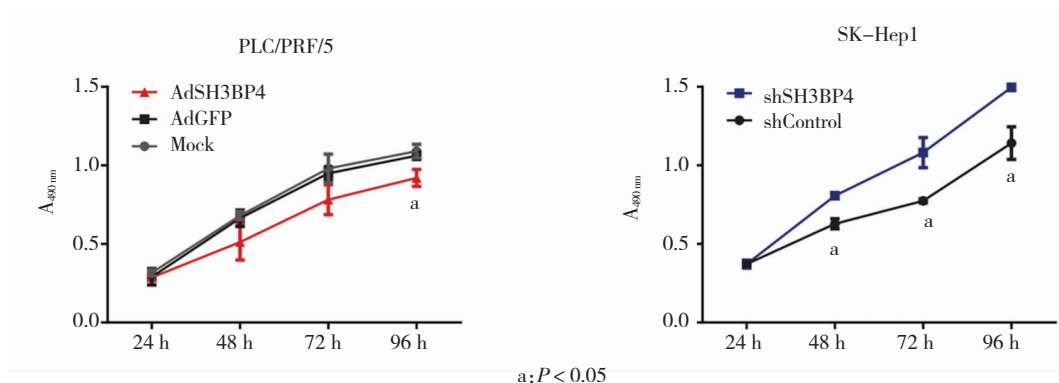


图 7 SH3BP4 抑制肝癌细胞的增殖

Fig.7 SH3BP4 inhibits the proliferation of hepatocarcinoma cells

表 2 AdSH3BP4 MTS 法检测不同时间点细胞 A 值

Tab.2 AdSH3BP4 the A values at different time points by MTS

组别	Mock	AdGFP	AdSH3BP4	F 值	P 值
24 h	0.328 ± 0.021	0.314 ± 0.052	0.277 ± 0.020	1.814	0.242
48 h	0.680 ± 0.027	0.664 ± 0.023	0.512 ± 0.006	37.464	0.003
72 h	0.981 ± 0.001	0.949 ± 0.013	0.782 ± 0.008	290.314	0.000
96 h	1.105 ± 0.043	1.062 ± 0.024	0.921 ± 0.053	15.852	0.004

注: 24 h 组, Mock 组与 AdGFP 组比, $P=1.000$, AdGFP 组与 AdSH3BP4 组比, $P=0.684$; 48 h 组, Mock 组与 AdGFP 组比, $P=1.000$, AdGFP 组与 AdSH3BP4 组比, $P=0.007$; 72 h 组, Mock 组与 AdGFP 组比, $P=0.110$, AdGFP 组与 AdSH3BP4 组比, $P=0.001$; 96 h 组, Mock 组与 AdGFP 组比, $P=0.760$, AdGFP 组与 AdSH3BP4 组比, $P=0.019$

无统计学意义 ($P=1.000$), AdSH3BP4 组相较于空白对照组、AdGFP 组, P 分别为 0.000、0.001, 提示 SH3BP4 过表达具有抑制肝癌细胞增殖的能力。敲低 SH3BP4 后, shSH3BP4 组与 shControl 组比较, 随着细胞培养时间的延长, 且在 96 h 增殖最明显, shSH3BP4 组 (1.497 ± 0.020) 相较于 shControl 对照组 (1.142 ± 0.103) ($F=27.600$, $P=0.004$), 提示 SH3BP4 敲低可以促进细胞增殖 (图 7、表 2、表 3)。

表 3 shSH3BP4 MTS 法检测不同时间点细胞 A 值

Tab.3 shSH3BP4 the A values at different time points by MTS

组别	shControl	shSH3BP4	F 值	P 值
24 h	0.372 ± 0.014	0.372 ± 0.025	3.309	> 0.999
48 h	0.629 ± 0.031	0.807 ± 0.008	16.610	0.002
72 h	0.774 ± 0.013	1.208 ± 0.095	53.130	0.005
96 h	1.142 ± 0.103	1.497 ± 0.020	27.600	0.004

3 讨 论

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是全球发病率较高的一种恶性肿瘤, 具有发病隐匿、易侵袭转移及预后差等特点, 因此早期诊断和有效治疗尤为重要。肝癌发生发展过程十分复杂, 主要涉及原癌基因激活、抑癌基因失活以及多种信号转导通路异常^[10]。SH3 结构域是真核生物的一种相互作用蛋白质结构域, 其可以通过结合受体酪氨酸激酶磷酸化残基来控制蛋白质亚细胞定位、酶的活性、调节蛋白质的底物特异性以及多蛋白复合物的组成, 从而调节生物信息在信号传导系统中的传递。目前越来越多的研究表明, 具有 SH3 结构域的蛋白质参与信号通路的异常与多种肿瘤及遗传性疾病关系紧密。Kim 等^[11]研究证实 SH3BP4 通过其自身 SH3 结构域, 能与 Rag GTP 酶产生相互作用, 抑制氨基酸依赖型 mTORC1 (mammalian target of Rapamycin complex 1) 信号转导, 从而调控细胞增殖和自噬; 此外 SH3BP4 还可以通过调节囊泡运输有助于 mTORC1 的细胞定位, 基于此提出了 SH3BP4 在氨基酸依赖型 mTORC1 信号通路中可能是一个潜在的抑癌基因。目前有关于 SH3BP4 在肝癌发生发展中的作用还鲜有报道, 因此观察其在肝癌细胞的生物学功能显得很有价值。

本实验首先利用 AdEasy 腺病毒载体系统及 PLL3.7 慢病毒载体系统成功构建 AdSH3BP4 重组腺病毒和 shSH3BP4 慢病毒, 将过表达腺病毒和干扰慢病毒分别转染至 PLC/PRF/5 及 SK-Hep1 肝癌细胞, 观察其是否对肝癌细胞有一定的迁移和增殖抑制作用, 经 Transwell、划痕实验、MTS 和直接克隆形成实验, 对比实验组和空白对照组发现 SH3BP4 对肝癌细胞的迁移、侵袭和增殖具有显著抑制作用。

综上所述, 本研究采用体外细胞实验方法, 初步证实了 SH3BP4 在肝癌细胞中可以被视为一个抑癌基因, 具有抑制肝癌细胞迁移、侵袭和增殖的能力, 这是一个新的探索, 提供了 SH3BP4 在肝癌细胞

中调控细胞生物学行为的理论基础, SH3BP4 有望成为肝癌基因治疗的新靶点。下一步将深入研究 SH3BP4 调控肝癌细胞的具体生物学功能相关分子机制。

参 考 文 献

- [1] Dunlevy JR, Berryhill BL, Vergnes JP, et al. Cloning, chromosomal localization, and characterization of cDNA from a novel gene, SH3BP4, expressed by human corneal fibroblasts[J]. Genomics, 1999, 62(3): 519-524.
- [2] Tosoni D, Puri C, Confalonieri S, et al. TTP specifically regulates the internalization of the transferrin receptor[J]. Cell, 2005, 123(5): 875-888.
- [3] Bhandari V, Lim KL, Pallen CJ, et al. Physical and functional interactions between receptor-like protein-tyrosine phosphatase alpha and p59fyn[J]. J Biol Chem, 1998, 273(15): 8691-8698.
- [4] Beroukhi R, Getz G, Nghiemphu L, et al. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2007, 104(50): 20007-20012.
- [5] Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers[J]. Nature, 2010, 463(7283): 899-905.
- [6] Kim YM, Stone M, Hwang TH, et al. SH3BP4 is a negative regulator of amino acid-Rag GTPase-mTORC1 signaling[J]. Mol Cell, 2012, 46(6): 833-846.
- [7] Francavilla C, Rigbolt KT, Emdal KB, et al. Functional proteomics defines the molecular switch underlying FGF receptor trafficking and cellular outputs[J]. Mol Cell, 2013, 51(6): 707-722.
- [8] Luo JY, Deng ZL, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nature, 2007, 2(5): 1236-1247.
- [9] Robinson DA, Dillon CP, Kwiatkowski AV, et al. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference[J]. Nat Genet, 2003, 33(3): 401-406.
- [10] Maluccio M, Covey A. Recent progress in understanding, diagnosing, and treating hepatocellular carcinoma[J]. CA Cancer J Clin, 2012, 62(6): 394-399.
- [11] Kim YM, Kim DH. dRAGging amino acid-mTORC1 signaling by SH3BP4[J]. Mol Cells, 2013, 35(1): 1-6.

(责任编辑: 张辉洁)