

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2020.04.007

TCTP 在肝癌细胞增殖过程中的作用及机制研究 *

林智斌¹ 汪建林¹ 刘 奇² 程天一³ 窦科峰^{1Δ}

(1 空军军医大学附属西京医院肝胆胰脾外科 陕西 西安 710032; 2 东部战区空军医院普外科 江苏 南京 210001;

3 空军军医大学附属西京医院妇产科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:研究翻译控制肿瘤蛋白(TCTP)在肝癌细胞增殖过程中的作用及相关机制。**方法:**通过 western blot 技术检测 14 对肝癌与癌旁组织中 TCTP 的蛋白表达水平。通过 siRNA(small interference RNA)技术在肝癌细胞系 SMMC-7721 和 BEL-7404 中下调 TCTP 的表达,然后通过 CCK-8 实验、克隆形成实验和 EdU 实验观察下调 TCTP 对肝癌细胞增殖的影响。通过 western blot 技术分析 TCTP 促进肝癌发生这一过程中可能涉及的分子通路。**结果:**相比于对应的癌旁组织,TCTP 在肝癌组织中显著高表达。用 siRNA 技术下调 TCTP 水平后能够明显抑制肝癌细胞的增殖能力。下调 TCTP 的表达之后,AKT 和 ERK 蛋白的磷酸化水平也随之降低。**结论:**TCTP 在肝癌组织中显著高表达,并且在肝癌细胞的增殖过程中发挥着极其重要作用,其作用机制可能与 AKT 和 ERK 通路的磷酸化激活有关。

关键词:翻译控制肿瘤蛋白;肝癌;增殖;AKT;ERK

中图分类号:R-33;R735.7;Q291 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2020)04-634-04

Effects and Mechanisms of Translationally Controlled Tumor Protein on the Proliferation of Hepatoma Cells*

LIN Zhi-bin¹, WANG Jian-lin¹, LIU Qi², CHENG Tian-yi³, DOU Ke-feng^{1Δ}

(1 Department of Hepatobiliary, Pancreatic and Splenic Surgery, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China;

2 Department of General Surgery, Air Force hospital of eastern theater, Nanjing, Jiangsu, 210001, China;

3 Department of Obstetrics and Gynecology, Xijing Hospital, Air Force Medical University, Xi'an Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To study the effects and mechanisms of translation control protein (TCTP) on the proliferation of hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods:** Western blot was used to detect the protein levels of TCTP in 14 pairs of liver cancer and adjacent tissues. Small interference RNA was used to down-regulate TCTP in liver cancer cell lines SMMC-7721 and BEL-7404, and CCK-8 assays, colony formation assays and EdU assays were used to observe the effect of TCTP-knockdown on the proliferation of liver cancer cells. Western blot was used to analyze the possible molecular pathways involved in TCTP's role in promoting the proliferation of hepatoma carcinoma cells. **Results:** Compared with the corresponding para-cancer tissues, TCTP was significantly over-expressed in liver cancer tissues. TCTP-knockdown by siRNA can significantly inhibit the proliferation of liver cancer cells. Furthermore, phosphorylation of AKT and ERK were hampered by the down-regulation of TCTP. **Conclusions:** TCTP is highly expressed in HCC tissues and plays a crucial role in the proliferation of HCC cells, which may be related to the activation of AKT and ERK pathways.

Key words: Translationally controlled tumor protein; Hepatocellular carcinoma; Proliferation; AKT; ERK

Chinese Library Classification(CLC): R-33; R735.7; Q291 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2020)04-634-04

前言

肝细胞癌是一类恶性程度高、早期诊断难、极易复发的疾病,持续危害着人类的生命健康。尤其是在中国,每年有超过 38 万人死于肝癌,并且有 46 万的新发病例^[1]。因此探究肝癌发生和发展的分子机制,找到治疗肝癌的新靶点在我国显得更为迫切。翻译控制肿瘤蛋白(translationally controlled tumor protein, TCTP)是由 tpt1 基因编码的一种广泛表达、高度保守的多

功能蛋白,也被称为 P23、P21、HRF、fortilin^[2]。现研究发现 TCTP 表达于 500 多种细胞和组织中,并且执行着包括促进细胞增殖、抗细胞凋亡、调节细胞周期、参与炎症反应和调节细胞多能性等重要功能^[3-6]。

目前对 TCTP 的研究主要集中在癌症领域。研究表明 TCTP 在结肠癌、宫颈癌、黑色素瘤、胶质瘤等多种癌细胞和组织中高度表达^[7-11],提示 TCTP 在癌症的发生发展中起着关键作用。尽管如此,TCTP 在恶性转化中涉及的分子机制仍然未被

* 基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFC0905902)

作者简介:林智斌(1993-),硕士研究生,主要研究方向:肝癌基础研究,E-mail:17829000126@163.com

Δ 通讯作者:窦科峰,男,博士生导师,教授,主要研究方向:肝胆胰脾外科学,E-mail: doukef@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2019-09-23 接受日期:2019-10-18)

清楚阐明。并且关于 TCTP 与肝癌关系的研究也十分稀少。截止目前,仅有一项研究系统地证明了 TCTP 对肝癌的发展起重要作用^[12]。然而肝癌的发生发展的过程及其复杂,涉及的分子通路数不胜数,因此 TCTP 与肝癌的关系亟待进一步探究。

本课题组通过分析 TCTP 在肝癌中的表达水平以及 TCTP 敲除对肝癌细胞增殖的影响等方法揭示了 TCTP 在肝癌发生发展中的作用以及其中涉及的分子通路,为设计新型高效的肝癌靶向药提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

人肝癌细胞 BEL-7404 和 SMMC-7721 细胞系均购买自 ATCC (美国);胎牛血清购自 Gibco 公司;DMEM 培养基、0.25%胰酶、二甲基亚砜(DMSO)及 TRIZOL 购自美国 Invitrogen 公司;CCK-8 试剂盒、RIPA 裂解液、BCA 定量试剂盒、SDS-PAGE 胶体购自中国碧云天公司;EdU 试剂盒购买自中国锐博公司;siRNA 由中国吉玛公司设计合成;光学显微镜、全自动酶标仪(BIO-RAD550)及 western blot 电泳、转膜、曝光设备购自美国 Bio-rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 TCTP 在肝癌与癌旁组织中表达量的测定 本研究所用 14 对肝癌和癌旁组织样本均来自 2019 年就诊于空军军医大学附属西京医院肝胆外科的肝癌患者。所有肝癌患者经病理检查证实为肝癌,采集样本前已获得患者知情同意和医院伦理委员会的批准。在液氮中研磨组织,加入 RIPA 裂解液后低温离心。取上清液进行 BCA 定量。利用 SDS-PAGE 电泳分离蛋白质后转至 PVDF 膜,用 5% BSA 封闭后加入相应的一抗在 4℃ 孵育过夜。第二天加入相应二抗室温孵育 1 h,然后曝光条带,用 Image Lab 软件分析灰度值。

1.2.2 细胞培养 BEL-7404 和 SMMC-7721 细胞系的培养基为含 10%胎牛血清的 DMEM。细胞置于 37℃、含 5%的 CO₂ 的细胞培养箱培养。细胞生长融合至单层时,用 PBS 洗涤三遍,再用 0.25%胰酶-0.02%EDTA 消化,离心(800 r/min, 3 min)后传代。

1.2.3 通过 siRNA 敲减细胞中的 TCTP 用于本实验的两条 siRNA 序列分别为 siRNA1:GGGCGCAGAACAAU-

CAATT, siRNA2: CUGCAGGAAACAAGUUUCATT。转染步骤为:提前一天将细胞种至六孔板,使细胞在第二天生长到 50~60%。取 2.5 μg siRNA、6 μL lipo2000 至 OPTI-MEM 培养基中,使总体积为 100 μL,孵育 15 min 后加入到 1.9 mL 的培养基中。倒去细胞原有培养基,然后将此 2 mL 培养基加入六孔板中的单个孔。6-8 h 后换含 10%胎牛血清的 DMEM 培养基,48 h 后进行细胞功能学实验或提取蛋白质。

1.2.4 CCK-8 法检测肝癌细胞增殖 将 100 μL/孔的含约 2×10³ 个细胞的细胞悬液传至 96 孔板中(5 副孔),置于培养箱中培养。7 h 细胞贴壁后进行第一次测量,方法为:每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37℃ 孵育 1 h 后,用酶标仪测定在 450 nm(参考波长 630 nm)处的吸光值。此后每 24 h 测定一次 OD450,用 Prism 7 软件绘制成增殖曲线。

1.2.5 克隆形成实验 将 1×10³ 个/孔的细胞接种至六孔板中,培养 15 天后将培养液吸出,用 PBS 洗涤后加入 3%的多聚甲醛固定 10 min。再用 PBS 洗涤后加入 0.5%的结晶紫染色 30 min。清水洗净后晾干,拍照后计数分析。

1.2.6 EdU 法检测肝癌细胞增殖 将 2×10³ 个/孔的细胞接种于 96 孔板中,培养过夜后加入 1:1000 稀释的 EdU 试剂,孵育 2 h 后用 PBS 清洗细胞,然后用 3%的多聚甲醛固定 10 min。之后加入 2 mg/mL 甘氨酸孵育 5 min,洗涤后加入 0.5% TritonX-100 孵育 10 min。清洗后加入 Apollo 染色液,避光孵育 30 min。然后用 Hoechst 染细胞核 10 min。清洗后在显微镜下拍照后计数分析。

1.3 统计学分析

本实验的数据分析均用 SPSS 23.0 软件处理,相关数据均用均数±标准差(Mean±SD)表示,组间差异用 t 检验进行比较,*: $P<0.05$,**: $P<0.01$,***: $P<0.001$ 。3 次独立重复实验。

2 结果

2.1 TCTP 在肝癌组织中高表达

从在本科室接受治疗的肝癌患者中随机挑选出 14 对肝癌和癌旁组织,通过 western blot 实验检测 TCTP 在 14 对肝癌组织和相应的癌旁组织中的表达水平。结果显示,TCTP 在肝癌组织中的蛋白水平显著高于癌旁组织(图 1)。

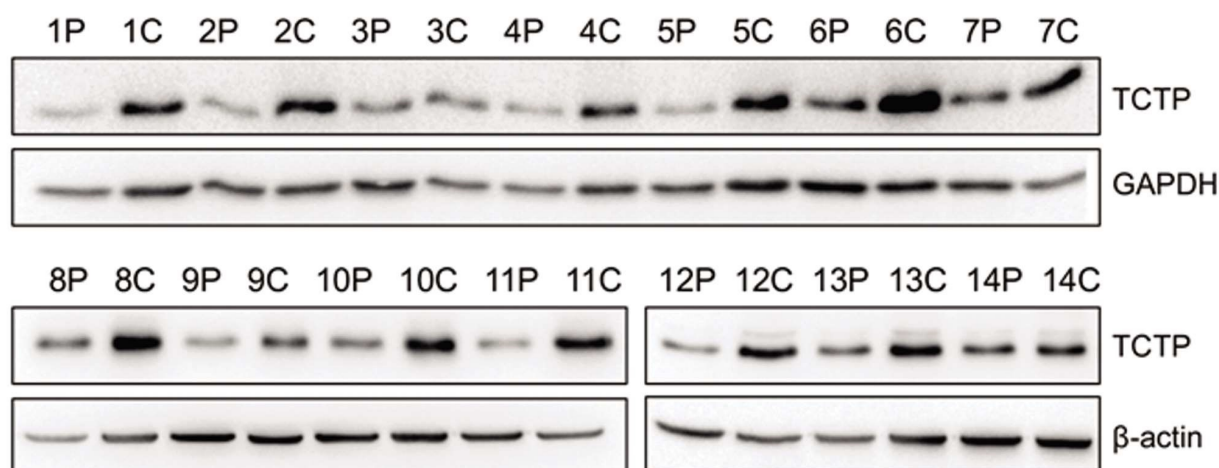


图 1 TCTP 在肝癌(C)和癌旁组织(P)中的蛋白水平

Fig.1 The protein level of TCTP in liver cancer tissues (C) and para-cancer tissues (P)

2.2 TCTP 的敲减显著抑制了肝癌细胞的增殖

用 siRNA 敲减 BEL-7404 和 SMMC-7721 肝癌细胞系中的 TCTP, 结果表明 siRNA 可显著降低两细胞系中的 TCTP 蛋白表达水平(图 4)。为了探究 TCTP 对肝癌细胞增殖的影响我

们进行了 CCK-8、克隆形成和 EdU 实验。结果如图 2 和图 3 所示, TCTP 敲减后肝癌细胞的增殖能力显著降低。并且由 TCTP 敲减造成的增殖抑制在 SMMC-7721 细胞中表现得较明显。

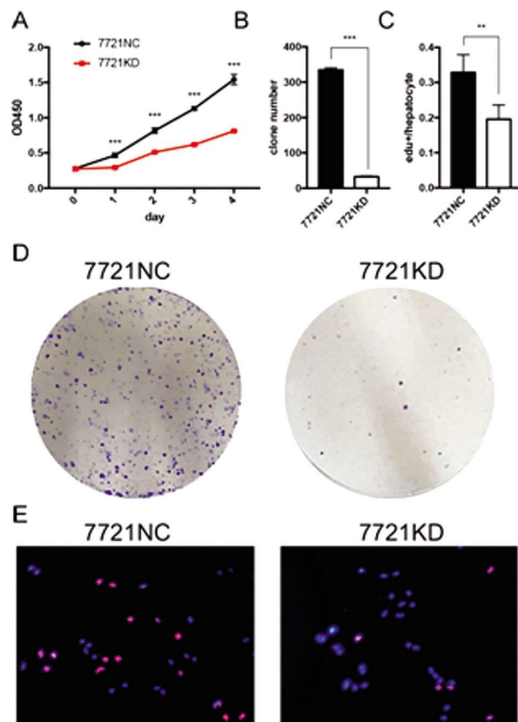


图 2 TCTP 敲减显著抑制 SMMC-7721 的增殖

Fig.2 TCTP-knockdown impaired the proliferation of SMMC-7721 cells

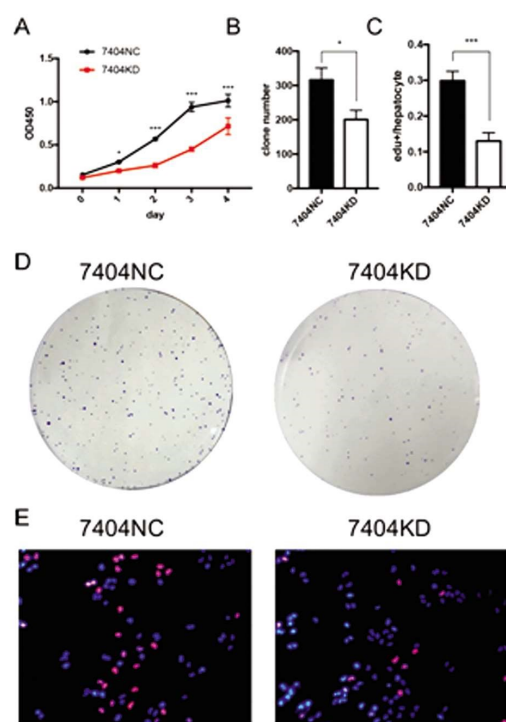


图 3 TCTP 敲减显著抑制 BEL-7404 的增殖

Fig.3 TCTP-knockdown impaired the proliferation of BEL-7404 cells

2.3 TCTP 的敲减显著抑制了 AKT 和 ERK 的磷酸化

用 siRNA 敲减 BEL-7404 和 SMMC-7721 肝癌细胞系中的 TCTP 之后, 用 western blot 实验分析 AKT 和 ERK 以及它们的磷酸化水平。结果表明, AKT 和 ERK 磷酸化的程度随着 TCTP 敲减而降低, 而 AKT 和 ERK 的总蛋白水平不受 TCTP 的敲减影响(图 4)。提示 TCTP 可能通过影响 AKT 和 ERK 的磷酸化水平来影响肝癌的增殖能力。

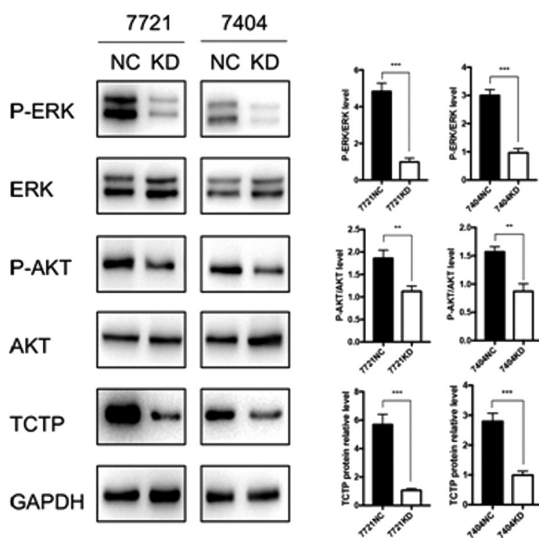


图 4 TCTP 敲减抑制 AKT 和 ERK 的磷酸化

Fig.4 TCTP-knockdown impaired the phosphorylation of AKT and ERK

3 讨论

肝癌的发生和发展是一个及其复杂的过程, 受到各种互相交错的分子通路协同调控。现研究发现参与肝细胞癌变的信号通路有 MAPK、PI3K/AKT^[13]、EGF/EGFR^[14]。尽管如此, 对于肝癌的发生过程我们仍然知之甚少。因此更进一步研究肝癌发生发展的机制是发现肝癌治疗新靶点、降低肝癌发生率和死亡率的最有效手段。

TCTP 与癌症的关系密不可分, 特别是体现在肿瘤逆转中, 即肿瘤细胞经过重编程而失去恶性表形的过程。Tuynder 等人^[15]通过分析肿瘤细胞和回复株的基因表达谱, 发现肿瘤细胞 TCTP 的表达量是回复子的 124 倍。而当干扰了 TCTP 的表达后, 肿瘤回复子提高到了 30%, 逆转的发生率远高于自然状态下的 1×10^{-6} 。目前仅有极少数研究报道 TCTP 在肝癌中的作用。Chan 等人^[12]发现原癌基因 CHD1L 能激活 TCTP 转录从而促进 CDc25C 的泛素化降解, 抑制 Cdk1 的活性, 导致细胞周期 M 期提前结束, 造成有丝分裂缺陷, 最终诱发肝细胞癌变。然而本课题组认为 TCTP 与肝癌的关系远不止于此, 因此开展本项研究。本研究结果显示 TCTP 高表达于肝癌组织, 并且能调控肝癌细胞的增殖, 再次验证了 TCTP 与肝癌的密切关系。此外, 研究发现下调 TCTP 后抑制了 AKT 与 ERK 的磷酸化激活, 提示 TCTP 很可能通过调控 AKT、ERK 以及其下游通路来促进肝癌细胞增殖。

AKT 通路是目前基础研究中热门的通路之一,以 AKT 为中心的庞大而复杂的分子通路网络调控着细胞内外各种病理生理过程,其中包括肝细胞癌变^[16]。Horie 等人^[17]研究发现,敲除肝细胞中的抑癌基因 PTEN 后会激活 AKT 的磷酸化,促进肝癌形成。mTORC2-AKT1 信号轴在由 c-Myc 基因异常表达引起的肝癌中发挥着关键作用^[18]。多项研究发现 TCTP 与 AKT 通路有着复杂的调控关系。如在结肠癌细胞和宫颈癌细胞中,PI3K/AKT/mTORC1 通路通过调控 TCTP 的翻译来影响癌细胞的恶性行为^[19]。并且在黑色素瘤细胞中 TCTP 通过激活 mTORC2/AKT/GSK3 β / β -catenin 通路来调控 EMT 过程从而促进癌细胞肺转移^[20]。而本研究提示在肝癌中 TCTP 控制着 AKT 的激活。可以看出,TCTP 与 AKT 的关系十分复杂,并不仅仅是单纯的上游与下游的关系,很可能存在着正反馈或负反馈,甚至更深层次的调控网络。因此,仍需要对 TCTP 与 AKT 的调控关系进行更进一步的研究。

ERK 通路的异常激活也是肝癌发生的重要推动因素。研究发现 ETC2/Rho/ERK 信号通路的激活可以促进肝癌的早期复发^[21]。MEK-ERK 信号通路与肝癌对索拉非尼的抗药性密切相关^[22]。然而仅有为数不多的研究报道 TCTP 与 ERK 通路关系。研究发现在人宫颈癌细胞中,TCTP 过表达可激活 AKT 和 ERK 通路,促进癌细胞增殖。但是过表达的 ERK 通路促进细胞增殖的作用不如 AKT 通路明显^[23]。本研究结果表明在肝癌细胞中下调 TCTP 可抑制 AKT 和 ERK 通路的激活,造成细胞增殖速度降低,再次印证了 TCTP 对 AKT、ERK 通路的激活有着重大作用。但本研究并未比较 AKT 和 ERK 通路的作用大小,这也将成为我们后续研究的重点。

综上所述,本研究再次表明了 TCTP 对肝癌细胞增殖的促进作用,同时也在分子机制层面上提出了新的观点。随着对 TCTP 下游通路的更深入挖掘,相信 TCTP 很有希望成为诊断肝癌的新标志物以及治疗肝癌的新靶标。

参考文献(References)

- [1] Torre L A, Bray F, Siegel R L, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(2): 87-108
- [2] Bommer U A, Thiele B J. The translationally controlled tumour protein (TCTP)[J]. Int J Biochem Cell Biol, 2004, 36(3): 379-385
- [3] Susini L, Besse S, Duflaut D, et al. TCTP protects from apoptotic cell death by antagonizing bax function[J]. Cell Death Differ, 2008, 15(8): 1211-1220
- [4] Thebault S, Agez M, Chi X K, et al. TCTP contains a BH3-like domain, which instead of inhibiting, activates Bcl-xL[J]. Sci Rep, 2016, 6: 19725
- [5] Li Y, Sun H, Zhang C, et al. Identification of translationally controlled tumor protein in promotion of DNA homologous recombination repair in cancer cells by affinity proteomics [J]. Oncogene, 2017, 36(50): 6839-6849
- [6] Hsu Y C, Chern J J, Cai Y, et al. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase[J]. Nature, 2007, 445(7129): 785-788
- [7] Koziol M J, Gurdon J B. TCTP in development and cancer [J]. Biochem Res Int, 2012, 2012: 105203
- [8] Jung J, Kim H Y, Maeng J, et al. Interaction of translationally controlled tumor protein with Apaf-1 is involved in the development of chemoresistance in HeLa cells[J]. BMC Cancer, 2014, 14: 165
- [9] Gu X, Yao L, Ma G, et al. TCTP promotes glioma cell proliferation in vitro and in vivo via enhanced beta-catenin/TCF-4 transcription [J]. Neuro Oncol, 2014, 16(2): 217-227
- [10] Bommer U A, Vine K L, Puri P, et al. Translationally controlled tumour protein TCTP is induced early in human colorectal tumours and contributes to the resistance of HCT116 colon cancer cells to 5-FU and oxaliplatin[J]. Cell Communication and Signaling, 2017, 15: 9
- [11] Boia-Ferreira M, Basilio A B, Hamasaki A E, et al. TCTP as a therapeutic target in melanoma treatment [J]. Br. J. Cancer, 2017, 117(5): 656-665
- [12] Chan T H, Chen L, Liu M, et al. Translationally controlled tumor protein induces mitotic defects and chromosome missegregation in hepatocellular carcinoma development [J]. Hepatology, 2012, 55(2): 491-505
- [13] Kim B R, Ha J, Lee S, et al. Anti-cancer effects of ethanol extract of Reynoutria japonica Houtt. radix in human hepatocellular carcinoma cells via inhibition of MAPK and PI3K/Akt signaling pathways [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 245: 112179
- [14] Lanaya H, Natarajan A, Komposch K, et al. EGFR has a tumour-promoting role in liver macrophages during hepatocellular carcinoma formation[J]. Nat Cell Biol, 2014, 16(10): 972-977
- [15] Tuynder M, Susini L, Prieur S, et al. Biological models and genes of tumor reversion: cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002, 99(23): 14976-14981
- [16] Wang Q, Chen X, Hay N. Akt as a target for cancer therapy: more is not always better (lessons from studies in mice)[J]. Br J Cancer, 2017, 117(2): 159-163
- [17] Horie Y, Suzuki A, Kataoka E, et al. Hepatocyte-specific Pten deficiency results in steatohepatitis and hepatocellular carcinomas [J]. J Clin Invest, 2004, 113(12): 1774-1783
- [18] Xu Z, Xu M, Liu P, et al. The mTORC2-Akt1 Cascade Is Crucial for c-Myc to Promote Hepatocarcinogenesis in Mice and Humans [J]. Hepatology, 2019[Epub ahead of print]
- [19] Bommer U A, Iadevaia V, Chen J, et al. Growth-factor dependent expression of the translationally controlled tumour protein TCTP is regulated through the PI3-K/Akt/mTORC1 signalling pathway [J]. Cell Signal, 2015, 27(8): 1557-1568
- [20] Bae S Y, Kim H J, Lee K J, et al. Translationally controlled tumor protein induces epithelial to mesenchymal transition and promotes cell migration, invasion and metastasis[J]. Sci Rep, 2015, 5: 8061
- [21] Chen J, Xia H, Zhang X, et al. ECT2 regulates the Rho/ERK signalling axis to promote early recurrence in human hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2015, 62(6)[Epub ahead of print]
- [22] Rudalska R, Dauch D, Longerich T, et al. In vivo RNAi screening identifies a mechanism of sorafenib resistance in liver cancer [J]. Nat Med, 2014, 20(10): 1138-1146
- [23] Kim M, Jung J, Lee K. Roles of ERK, PI3 kinase, and PLC- γ pathways induced by overexpression of translationally controlled tumor protein in HeLa cells[J]. Arch Biochem Biophys, 2009, 485(1): 82-87