

WWP2 干扰对 Huh7 肝癌细胞的增殖、凋亡及细胞周期的影响研究

徐胜前 秦 勇 王超君 叶冠雄 吴成军 王 世 潘德标 王 俊

摘 要 **目的** 探讨 WWP2 对 Huh7 肝癌细胞系的增殖、凋亡及细胞周期的影响研究。**方法** 通过实时定量 PCR (qPCR)、RNA 干扰、流式细胞仪分析细胞周期及凋亡,了解 WWP2 在 Huh7 肝癌细胞周期的中作用。**结果** 在肝癌组织中,WWP2 mRNA 水平显著性表达;敲除细胞中的 WWP2 会抑制细胞增殖、使细胞停滞在 G₁ 期,并诱导细胞凋亡。**结论** WWP2 有可能通过调控细胞凋亡而促进肝癌细胞生长。

关键词 WWP2 干扰 Huh7 肝癌细胞系 增殖 凋亡

中图分类号 R3 **文献标识码** A **DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2017.11.021

Effects of WWP2 Interference on Proliferation, Apoptosis and Cell Cycle of Hepatocellular Carcinoma Cell Huh7. Xu Shengqian, Qin Yong, Wang Chaojun, et al. Department of Hepatobiliary Surgery, People Hospital of Lishui, The Sixth Affiliated Hospital of Wenzhou Medical University, Zhejiang 323000, China

Abstract **Objective** To explore this effects of WWP2 interference on proliferation, apoptosis and cell cycle of hepatocellular carcinoma cell Huh7. **Methods** We used the experimental techniques of real-time quantitative PCR (qPCR), RNA interference and flow cytometry to investigate the role of WWP2 in the cell cycle of hepatocellular carcinoma (Huh7). **Results** WWP2 mRNA levels expressed significantly in hepatocellular carcinoma (HCC). Knock except cells of WWP2 will inhibited cell proliferation, the cell arrest in the G₁ phase, and induce cell apoptosis. **Conclusion** WWP2 may promote the growth of hepatocellular carcinoma cells through the regulation of apoptosis in vitro.

Key words WWP2 interference; Hepatocellular carcinoma cell Huh7; Proliferation; Apoptosis

原发性肝癌主要包括肝细胞癌、胆管癌、肝血管肉瘤。在导致死亡的癌症排行榜中,肝细胞癌位列第3,而且是全世界第5大最常见的恶性肿瘤,占据所有原发性肝癌的85%~90%^[1]。它的主要特点是:在乙型肝炎病毒相关肝硬化性肝病以及其他风险因素,如丙型肝炎病毒、黄曲霉毒素、性别、激素和某些代谢疾病中表现出的高发生率^[2,3];在过去的几十年里,肝癌的研究主要集中在阐明与肝癌的发生和发展有关的基因和蛋白质上^[4,5]。在肝癌中,许多参与细胞周期调控的促癌基因蛋白和抑癌基因往往表达异常,从而促进肝癌细胞增殖^[6-9]。

近年来,越来越多的研究报道一个新的与肝癌的进展有关的分子——WWP2,人类 WWP2 (含 E₃ 泛素-连接酶蛋白 2 的 WW 结构域)最初是由 Pirozzi

等人在筛选含有 WW 结构域的蛋白质时鉴别的^[10]。与肿瘤发生相关的多个 WWP2 底物已被鉴定和描述,包括 PTEN 肿瘤抑制基因以及在 Smad 蛋白的转化生长因子 β (TGF- β) 途径内关键信号成分,并且在动物模型中,WWP2 的异位过表达也促进了肿瘤细胞的扩散^[11,12]。本研究探讨了 WWP2 对肝癌的细胞的细胞周期以及凋亡的影响。

材料与方法

1. 患者及组织样本:肝癌样本和正常人体肝脏样本来自丽水市人民医院正在接受手术治疗的肝癌患者。该研究方案得到了丽水市人民医院伦理委员会的批准,并且此项研究中所有的参与者都签署了书面知情同意书。进行的所有研究都符合 1975 年的赫尔辛基宣言。所有的病人都没有接受过放疗和化疗。通过对患者组织样本的组织学玻片的病理检查,每个样本中肿瘤细胞至少占肝癌患者组织切片的 70%。肝癌和正常组织收集后立即放在液氮中冷冻并储存在 -80℃ 冰箱中,用于提取总 RNA。在组

基金项目:浙江省科技厅公益应用性项目(2014C3316)

作者单位:323000 温州医科大学附属第六医院、丽水市人民医院肝胆胰外科

通讯作者:秦勇,电子信箱:bingmayong811@163.com

织学评估上,肿瘤样本至少有 80% 是由可见的肿瘤细胞组成。

2. 细胞培养及 WWP2 siRNA 转染:这项研究中的 Huh7 肝癌细胞系购自中央研究院细胞库(上海,中国),细胞放在含有 10% 胎牛血清(FBS)的 DMEM 培养基中,置于 37℃、含 5% CO₂ 的孵育箱中培养;WWP2 siRNA 用于靶向结合 WWP2。3 种 siRNA 靶向人 WWP2 mRNA 的位置为:1521 ~ 1543(5′ - GGT-GCTCAACCCTATGTATTT - 3′, siRNA1),2866 ~ 2888(5′ - AGGAGTTTCTGCCTGTAATTT - 3′, siRNA2),749 ~ 771(5′ - ACGGACGTGTCTATTATGTTT - 3′, siRNA3)。按照产品说明书,使用 Lipofectamine 2000(美国 Invitrogen 公司)将 siRNA 转染细胞中;非特异性 siRNA 用作阴性对照,通过实时定量 PCR(qPCR)来检测 WWP2 的选择性沉默,转染 48h 后分析;实验分组为对照组,空白对照组(NC 组)及 WWP2 干扰组。

3. 实时定量 PCR(qPCR):正常人的肝脏组织、肝癌组织及细胞中的总 RNA 使用 Trizol 试剂(Invitrogen Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA)按照文献[13]描述的方法进行提取,并储存在 - 80℃ 的冰箱中。互补性 DNA 是用 cDNA 合成试剂盒(美国 Thermo Fisher Scientific 公司, Rockford, IL)来合成的;根据说明书,使用 DyNAmo Flash SYBR Green qPCR 试剂盒(Finnzymes Oy, Espoo, 芬兰)对样本进行定量检测,实时 PCR 用来检测目的基因的 mRNA 表达水平;所使用的引物序列如下:WWP2,上游引物:5′ - GAGATGGACAACGAGAAG - 3′,下游引物:5′ - CTCCTCAATGGCATAACAG - 3′;GAPDH:上游引物:5′ - CACCCACTCCTCCACCTTTG - 3′,下游引物:5′ - CCACCACCCTGTTGCTGTAG - 3′;目的基因 mRNA 水平的相对定量是通过将不同基因的信号与 GAPDH 信号标准化来计算。

4. 细胞活力实验:通过细胞计数试剂盒 8(CCK - 8; Dojindo, Kumamoto, 日本)来评估^[14,15]。简言之,对照、阴性对照及 WWP2 siRNA 处理过的细胞以 5 × 10³/孔种植在 96 孔细胞培养板上。在特定的时间点,向细胞培养板的每孔加入 100μl CCK - 8 溶液,然后孵育 1h。细胞活力通过 450nm 的酶标仪(美国 Bio - Rad Laboratories 公司, Hercules, CA)检测。

5. 流式细胞仪进行细胞周期分析:在特定的时间收集大约 1 × 10⁶ 个细胞,用 PBS 清洗两次并在预冷的乙醇中固定 30min,然后与 PI 染料共孵育 30min。

最后用流式细胞仪(BD, San Diego, CA, USA)分析细胞周期。

6. 细胞凋亡检测:用流式细胞仪检测细胞凋亡,根据相应的产品说明书(BioVision, Mountain View, 美国),用 annexin - V 和 PI 对细胞进行双染色,简言之,将细胞进行处理后,收集 5 × 10⁵ 个细胞并用 500μl 含有 5μl annexin - V 和 5μl PI 的结合缓冲液重悬,然后室温避光孵育 5min,立即用流式细胞仪检测。

7. 统计学方法:所有数据都以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。采用 SPSS 17.0 统计学软件完成统计分析,结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用随机成组 *t* 检验、单因素方差分析及 SNK_q 检验法进行分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

结 果

1. 肝癌组织中 WWP2 表达上调:使用实时 PCR 技术来分析肝癌组织和癌旁组织中 WWP2 的 mRNA 表达水平。与丽水人民医院中患者的癌旁组织相比较,肝癌组织中 WWP2 mRNA 的表达显著上升(*P* = 0.000),详见表 1。

表 1 WWP2 在肝癌组织中 mRNA 是表达水平			
组别	WWP2 mRNA 表达水平($\bar{x} \pm s$)	<i>t</i>	<i>P</i>
癌旁组织	0.0285 ± 0.0102	- 5.084	0.000
肝癌组织	0.0409 ± 0.0133	- 5.084	0.000

2. 肝癌细胞系中 WWP2 表达的抑制:将 siRNA 2 转染到 Huh7 细胞中,检测经 siRNA2 处理后 WWP2 的 mRNA 表达情况。结果显示,Huh7 细胞经 siRNA2 处理后,WWP2 mRNA 的表达分别减少了 63.000% ± 0.029% 和 64.000% ± 0.044% (*P* < 0.01);阴性对照之间差异无统计学意义(*P* > 0.05)。

3. 在肝癌细胞 Huh7 中抑制 WWP2 会抑制细胞增殖、阻滞细胞周期并诱导细胞凋亡:用 siRNA 处理 Huh7 细胞 48 及 72h 后,细胞增殖分别抑制了 20.17% ± 0.05% 和 37.000% ± 0.023%,本研究运用单因素方差分析进行 3 组比较,差异有统计学意义(*F* = 8760.63, *P* = 0.000),利用 SNK_q 检验法发现,WWP2 干扰组与对照组及空白对照组两两比较,差异有统计学意义(表 2、表 3),说明抑制 WWP2 的表达,可抑制肝癌细胞 Huh7 的增殖;没有用 WWP siRNA 处理时,细胞分布在 G₁、S、G₂,当转染 siRNA 后,Huh7 细胞处在 G₁ 期的数目增加了 25.000% ±

0.036% (表5 ~ 表7)。转染 siRNA 后, WWP2 干扰组细胞主要集中在 G₁ 期, 这个发现显示 G₁ 细胞周期阻滞; 当细胞转染 siRNA 后孵育 48h, 然后用流式细胞仪检测细胞凋亡。结果显示, 3 组间比较, 差异有统计学意义 ($F = 4633.11, P = 0.000; F = 660.68, P = 0.000; F = 3115.95, P = 0.000$, 表 5 ~ 表 7), 与对照组及空白对照组两两比较, 肝癌细胞 Huh7 细胞的细胞凋亡数目显著增加。这些数据说明 WWP2 在肝脏中可能通过抑制细胞周期进展及细胞凋亡而发挥肿瘤促进剂的作用。

表 2 WWP2 干扰 48h 在肝癌细胞 Huh7 中的增殖反应	
组别	增殖百分比(%, $\bar{x} \pm s$)
对照组	69.17 ± 0.44
NC 组	69.03 ± 0.38
WWP2 干扰组	48.93 ± 0.35

3 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 8760.63, P = 0.000$); 两两比较, WWP2 干扰组细胞增殖要低于对照组及 NC 组, 差异有统计学意义; 对照组与 NC 组两两比较, 差异无统计学意义

表 3 WWP2 干扰 72h 在肝癌细胞 Huh7 中的增殖反应	
组别	增殖百分比(%, $\bar{x} \pm s$)
对照组	100.30 ± 0.49
NC 组	100.00 ± 0.30
WWP2 干扰组	62.30 ± 0.35

3 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 31240.52, P = 0.000$); 两两比较, WWP2 干扰组细胞增殖要低于对照组及 NC 组, 差异有统计学意义, 对照组与 NC 组两两比较, 差异无统计学意义

表 4 WWP2 干扰在肝癌细胞 Huh7 中的早期凋亡反应	
组别	早期凋亡数(%, $\bar{x} \pm s$)
对照组	3.47 ± 0.06
NC 组	3.27 ± 0.05
WWP2 干扰组	32.13 ± 0.67

3 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 16652.65, P = 0.000$); 两两比较, WWP2 干扰组细胞增殖要低于对照组及 NC 组, 差异有统计学意义; 对照组与 NC 组两两比较, 差异无统计学意义

表 5 WWP2 干扰在肝癌细胞 Huh7 中细胞周期 (G ₁ 期) 的变化	
组别	细胞周期中 G ₁ 期(%, $\bar{x} \pm s$)
对照组	48.49 ± 0.24
NC 组	48.11 ± 0.15
WWP2 干扰组	60.17 ± 0.47

3 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 4633.11, P = 0.000$); 两两比较, WWP2 干扰组细胞增殖要低于对照组及 NC 组, 差异有统计学意义; 对照组与 NC 组两两比较, 差异无统计学意义

表 6 WWP2 干扰在肝癌细胞 Huh7 中细胞周期 (S 期) 的变化	
组别	细胞周期中 S 期(%, $\bar{x} \pm s$)
对照组	28.02 ± 0.29
NC 组	28.20 ± 0.38
WWP2 干扰组	24.07 ± 0.12

3 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 660.68, P = 0.000$); 两两比较, WWP2 干扰组细胞周期中 S 期数目低于对照组及 NC 组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 对照组与 NC 组比较, 差异无统计学意义

表 7 WWP2 干扰在肝癌细胞 Huh7 中细胞周期 (G ₂ 期) 的变化	
组别	细胞周期中 G ₂ 期(%, $\bar{x} \pm s$)
对照组	19.06 ± 0.10
NC 组	19.11 ± 0.04
WWP2 干扰组	11.86 ± 0.39

3 组比较, 差异有统计学意义 ($F = 3115.95, P = 0.000$); 两两比较, WWP2 干扰组细胞周期中 G₂ 期数目低于对照组及 NC 组, 差异有统计学意义; 对照组与 NC 组两两比较, 差异无统计学意义

讨 论

WW 结构域蛋白 2 (WW domain - containing protein 2, WWP2) 属于 E₃ 泛素化连接酶 (E3 ubiquitin - protein ligase, NEDD - 4) 蛋白家族, NEDD4 家族蛋白已经被证明在许多癌症中起到重要作用, WWP2 能够调控细胞的凋亡并且在细胞的肿瘤形成中具有重要作用^[16]; 而且, WWP2 可以通过介导 PTEN 的泛素化降解来调控肿瘤细胞的生存^[17,18], WWP2 还能够介导八聚体转录因子 4 (octamer - binding transcription factor 4, Oct4) 的降解, 而 Oct4 的过表达是和肝细胞肝癌的发生有关的。

本研究的目的是阐明在肝癌细胞系 Huh7 中, WWP2 诱导细胞凋亡效果。笔者发现, 在肿瘤组织中的 WWP2 表达量升高。有研究显示用 cDNA 阵列分析显示 WWP2 - N 亚型在黑色素瘤和前列腺癌早期或晚期阶段, 其表达模式显著不同, 而且在一些乳腺癌中, WWP2 的表达也升高^[19~22]。在这项研究中, 在肝癌组织中, WWP2 mRNA 水平的表达明显升高 (表 1), 这说明 WWP2 可能在肝癌的发生、发展中起着重要的作用; 在肝癌细胞系 Huh7 中, 干扰 siRNA2 使 WWP2 沉默后, 能使 WWP2 在 mRNA 水平上减少 63.000% ± 0.029%, 这表明 siRNA2 是敲掉 WWP2 最有效的分子。

先前的研究表明, WWP2 - N 亚型可能作为一种新的肿瘤转移抑制基因产物, 通过其功能, 抑制正常 TGFβ 的诱导与 EMT 和肿瘤转移相关的分化进

展^[23,24]。在进一步的流式细胞仪分析中,笔者发现使 WWP2 沉默,能显著性地抑制肝癌细胞 Huh7 的活性,这是诱导细胞凋亡的结果;实验数据显示,Huh7 细胞经 WWP2 siRNA 处理后,细胞增殖水平显著下降,3 组两两比较,差异有统计学意义,说明抑制 WWP2 的表达,可抑制肝癌细胞 Huh7 的增殖(表 2、表 3)。笔者通过转染 siRNA 后,WWP2 干扰组细胞主要集中在 G₁ 期,暗示 G₁ 细胞周期阻滞;用流式细胞仪进一步检测细胞凋亡显示肝癌细胞 Huh7 细胞的细胞凋亡数目显著增加,3 组两两比较,差异有统计学意义(表 4 ~ 表 7)。以前的研究也表明,有 WWP2 shRNA 表达的前列腺癌 DU145 细胞与对照 shRNA 的 DU145 细胞比较,其细胞增殖率有明显的降低,与本研究表达的观点一致,说明在肝癌细胞系 Huh7 中,抑制 WWP2 的表达能显著性抑制细胞生长并阻滞细胞周期,而且还可能通过调节凋亡标志物的表达来诱导细胞凋亡^[11]。

笔者的研究表明,WWP2 在肝癌中的表达是显著性升高的,通过敲除细胞中的 WWP2 会抑制细胞增殖、使细胞停滞在 G₁ 期,并诱导细胞凋亡,WWP2 有可能通过调控细胞凋亡而对促进肝癌细胞生长,因此,笔者认为 WWP2 可以作为进一步研究肝癌治疗的一个新靶标,下一步需进一步完善实验确定 WWP2 作为肝癌治疗的一个新靶标,为临床实践提供理论依据。

参考文献

- Farazi PA, DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment[J]. Nat Rev Cancer, 2006, 6(9): 674 - 687
- Johnson PJ. The epidemiology of hepatocellular carcinoma[J]. Eur J Gastroen Hepat, 1996, 8(9): 845 - 849
- Curry GW, Beattie AD. Pathogenesis of primary hepatocellular carcinoma[J]. Eur J Gastroen Hepat, 1996, 8(9): 850 - 855
- Huang S, He X. The role of microRNAs in liver cancer progression [J]. Brit J Cancer, 2011, 104(2): 235 - 240
- Aravalli RN, Steer CJ, Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatology, 2008, 48(6): 2047 - 2063
- Kota J, Chivukula RR, O'Donnell KA, et al. Therapeutic microRNA delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model[J]. Cell, 2009, 137(6): 1005 - 1017
- Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, et al. Cyclin G1 is a target of miR - 122a, a microRNA frequently down - regulated in human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 2007, 67(13): 6092 - 6099
- Furuta M, Kozaki K - i, Tanaka S, et al. miR - 124 and miR - 203 are epigenetically silenced tumor - suppressive microRNAs in hepatocellular carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2010, 31(5): 766 - 776
- Lan FF, Wang H, Chen YC, et al. Hsa - let - 7g inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by downregulation of c - Myc

- and upregulation of p16(INK4A) [J]. Int J Cancer, 2011, 128(2): 319 - 331
- Pirozzi G, McConnell SJ, Uveges AJ, et al. Identification of novel human WW domain - containing proteins by cloning of ligand targets [J]. J Biol Chem, 1997, 272(23): 14611 - 14616
- Maddika S, Kavela S, Rani N, et al. WWP2 is an E3 ubiquitin ligase for PTEN[J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(13): 728 - 733
- Soond S, Chantry A. Selective targeting of activating and inhibitory Smads by distinct WWP2 ubiquitin ligase isoforms differentially modulates TGF β signalling and EMT [J]. Oncogene, 2011, 30(21): 2451 - 2462
- Payton JE, Grieselhuber NR, Chang LW, et al. High throughput digital quantification of mRNA abundance in primary human acute myeloid leukemia samples [J]. J Clin Invest, 2009, 119(6): 1714 - 1726
- Morita Y, Naka T, Kawazoe Y, et al. Signals transducers and activators of transcription (STAT) - induced STAT inhibitor - 1 (SSI - 1) / suppressor of cytokine signaling - 1 (SOCS - 1) suppresses tumor necrosis factor α - induced cell death in fibroblasts [J]. P Natl Acad Sci USA, 2000, 97(10): 5405 - 5410
- Wang Y - Y, Zhou G - B, Yin T, et al. AML1 - ETO and C - KIT mutation/overexpression in t (8; 21) leukemia: implication in stepwise leukemogenesis and response to Gleevec [J]. P Natl Acad Sci USA, 2005, 102(4): 1104 - 1109
- Andrew C. WWP2 ubiquitin ligase and its isoforms: New biological insight and promising disease targets [J]. Cell Cycle, 2011, 10(15): 2437 - 2439
- Subbareddy M. Sridhar K. Neelam R, et al. WWP2 is an E3 ubiquitin ligase for PTEN [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(6): 728 - 733
- Bing Liao, Ying Jin. WWP2 mediates Oct4 ubiquitination and its own auto - ubiquitination in a dosage - dependent manner [J]. Cell Res, 2010, 20(5): 332 - 334
- Soond SM, Smith PG, Wahl L, et al. Novel WWP2 ubiquitin ligase isoforms as potential prognostic markers and molecular targets in cancer [J]. BBA - Mol Basis Dis, 2013, 1832(12): 2127 - 2135
- Subik K, Shu L, Wu C, et al. The ubiquitin E3 ligase WWP1 decreases CXCL12 - mediated MDA231 breast cancer cell migration and bone metastasis [J]. Bone, 2012, 50(4): 813 - 823
- Hopkins BD, Hodakoski C, Barrows D, et al. PTEN function: the long and the short of it [J]. Trends Biochem Sci, 2014, 39(4): 183 - 190
- Ma S, Kosorok MR. Detection of gene pathways with predictive power for breast cancer prognosis [J]. BMC Bioinformatics, 2010, 11(2): 1 - 11
- Xu J, Lamouille S, Derynck R. TGF - β - induced epithelial to mesenchymal transition [J]. Cell Res, 2009, 90(2): 156 - 172
- Heldin CH, Landstrom M, Moustakas A. Mechanism of TGF - beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial - mesenchymal transition [J]. Curr Opin Cell Biol, 2009, 21(2): 166 - 176

(收稿日期: 2016 - 09 - 29)

(修回日期: 2017 - 03 - 14)