

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2020.17.009

肝内胆管癌细胞 X 染色体耦联锌指蛋白的表达 及复方苦参注射液的调控作用

宋昌兴¹, 李 新², 马春兰¹, 张常虹¹, 安贵忠¹

(1. 青海省第五人民医院, 青海 西宁 810007; 2. 青海省政务服务监督管理局, 青海 西宁 810007)

摘要:目的 探讨 X 染色体耦联锌指蛋白(ZFX)在肝内胆管癌(ICC)细胞中的生物学作用和复方苦参注射液对 ICC 细胞的生长控制。
方法 采用组织微阵列技术、免疫细胞化学(IHC)、逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质印迹(WB)法检测 ZFX 在 ICC 癌组织及相应癌旁肝组织中的表达状况;通过培养 ICC 细胞、慢病毒介导 RNA 干扰技术平板克隆、CCK-8 细胞增殖检测分析 ICC 细胞中 ZFX 的功能。**结果** 癌组织中的 mRNA 显著高于其对应癌旁组织和正常肝组织($P < 0.05$);ZFX 在癌组织中表达状态很高,对应的癌旁组织出现相应阳性染色区域,但癌旁组织中 ZFX 蛋白高低表达无明显差异;慢病毒介导的 shRNA 感染癌细胞能完全阻止 ZFX 的表达;正常培养条件下,ZFX 蛋白的干扰对 LM3 细胞和 RBE 细胞的生长无影响;在培养基中除去糖成分可阻止干扰细胞和对照细胞的增殖;将培养基中的血清降低至 3% 时,干扰 ZFX 的细胞增殖能力显著高于对照细胞($P < 0.05$);干扰 ZFX 蛋白的细胞在低血清环境下增殖和存活能力较强;p-JNK, p-p38, p-ERK 在干扰细胞的磷酸化水平高于对照细胞($P < 0.05$)。**结论** ZFX 蛋白在 ICC 癌组织中呈现高表达状态,对 ICC 细胞的增殖和对抗凋亡等生物行为产生影响,从而影响 ICC 的进程。复方苦参注射液可通过影响 ZFX 在 MAPKs 的信号通路来抑制胆管癌细胞的生长。

关键词:复方苦参注射液;X 染色体耦联锌指蛋白;MAPKs 通路;肝内胆管癌

中图分类号:R932;R285.5;R273

文献标识码:A

文章编号:1006-4931(2020)17-0035-04

Expression of ZFX in the Intrahepatic Cholangiocarcinoma Cells and Regulation of Compound Kushen Injection on Its Growth

SONG Changxing¹, LI Xin², MA Chunlan¹, ZHANG Changhong¹, AN Guizhong¹

(1. The Fifth People's Hospital of Qinghai Province, Xining, Qinghai, China 810007; 2. Administration of Qinghai Provincial Government Service Supervision, Xining, Qinghai, China 810007)

Abstract: **Objective** To study the biological role of X-chromosome-coupled zinc finger protein(ZFX) in intrahepatic cholangiocarcinoma(ICC) cells and the control of Compound Kushen injection on intrahepatic cholangiocarcinoma cells. **Methods** The expression of ZFX in ICC cancer tissues and corresponding adjacent liver tissues was detected by tissue microarray technique, immune histochemistry(IHC), real-time quantitative polymerase chain reaction(RT-PCR) and Western blot(WB); ICC cell culturing, lentiviral-mediated RNA interference technology plate cloning, and CCK-8 cell proliferation assay were used to analyze the function of ZFX in ICC cells. **Results** The mRNA in cancer tissues was significantly higher than that in adjacent tissues and normal liver tissues($P < 0.05$). ZFX expression was higher in cancer tissues; corresponding positive staining areas appeared in the corresponding adjacent tissues, while there was no significant difference in the expression of ZFX protein in adjacent tissues. Infection of cancer cells with lentiviral-mediated shRNA could completely block the expression of ZFX. The interference of ZFX protein had no significant effect on the growth of LM3 and RBE cells under normal culture conditions; removal of sugar components in the medium prevented the proliferation of interfering cells and control cells. When the serum in the medium was reduced to 3%, the cell proliferation ability that interfered with ZFX was significantly higher than that of the control cells($P < 0.05$). Cells that interfere with ZFX proteins were more proliferative and viable in low serum environments. The phosphorylation levels of key proteins in the MAPKs signaling pathway were detected, and the levels of p-JNK, p-p38 and p-ERK were significantly higher in the interfering cells than in the control cells($P < 0.05$). **Conclusion** ZFX protein has a high expression state in ICC cancer tissues, which affects the proliferation of ICC cells and the biological behaviors such as anti-apoptosis, thus affecting the progress of ICC. Compound Kushen injection can inhibit the growth of cholangiocarcinoma cells by affecting ZFX in the MAPKs pathway.

Key words: Compound Kushen Injection; X-chromosome-coupled zinc finger protein; MAPKs pathway; intrahepatic cholangiocarcinoma

肝内胆管癌(ICC)是原发性肝癌中的第二高发恶性肿瘤,发病率仅次于肝细胞肝癌的肝脏原发恶性肿瘤,在东南亚地区较常见^[1-2]。其确切病因尚不明确,常见诱因有寄生虫侵入、酒精刺激、肝病恶化、胆管炎等^[3]。X 染色体耦联锌指蛋白(ZFX)对人体细胞的生长、繁殖、更

新可产生作用,能使人远离各种疾病带来的困扰^[4]。复方苦参注射液是一种抗癌药物,由纯中药搭配调和制成,方中苦参对肿瘤细胞有抑制作用。本研究中探讨了复方苦参注射液能否通过调控 ZFX 的 MAPKs 通路来抑制肝内胆管癌细胞的生长。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料^[1]

组织蜡块:收集2015年7月至2017年7月于医院肝胆外科进行手术治疗且病情资料完整的120例ICC患者的组织蜡块,其中邻近癌旁组织的正常胆管组织80例,肝内胆管结石标本40例。纳入研究患者全身无扩散转移且未经任何放射治疗,其中男89例,女31例;年龄38~65岁,平均 (43.23 ± 9.5) 岁;淋巴转移22例,无淋巴转移98例。排除血清癌胚抗原较低患者。所有患者对该研究均知情,自愿无偿参加。

试剂:ZFX蛋白抗体(美国Abgent公司,批号为A-A110955);GAPDH抗体(批号为3777-100),PARP抗体(批号为3002-100),均购自美国Bio Vision公司;p-JNK抗体(武汉益普生物科技有限公司,批号为CY42771);p-p38抗体(美国Santa Cruz公司,批号为SC-7973);DAB显色试剂盒(上海如吉生物科技有限公司,批号为SJH1047);TRIZOL试剂盒(北京天漠科技发展有限公司,批号为TM180208);CCK-8试剂(上海沪震实业有限公司,批号为HZ2771);Transwell小室(北京优尼康生物科技有限公司,批号为353090);慢病毒(上海汉恒生物科技有限公司,批号为TL-738)。

1.2 方法

蛋白质印迹(WB)法检测ZFX及MAPKs通路蛋白:将ICC组织放入新EP管中,加入裂解液,混匀。待裂解完成后,离心操作30 min。去上清液,放入EP管中,冰上保存待用。用BCA试剂盒检测蛋白浓度,相关步骤按说明书进行。完成后与上样缓冲液混合、离心、低温保存。根据实验要求的数量配胶。在冰箱中取出SDS-PAGE,按说明配制需要的质量浓度溶液,配制好后放入电泳液中,4℃保存。电泳后,用无水乙醇活化PVDF膜,活化后放入超纯水中。用转模仪转模,电压为25 V,电流为0.8 mA。配制p-JNK, p-p38, p-ERK一抗溶液。孵育后洗膜,用TBST溶液清洗30 min。洗完孵育二抗,完成后同样用TBST溶液清洗,方法同上。洗膜后,拍照,显影后分析。

慢病毒shRNA介导对ZFX的干扰实验:在6孔板中接种ICC细胞,当细胞的密度升至50%时进行慢病毒感染,MOI值为20(若需加快转染速率,可接入适量polybrene试剂);细胞成对生长后用嘌呤霉素进行筛选;癌组织细胞放入1.5 mL离心管中,加入buffer混匀。静置5 min,加入氯仿震荡,离心,用吸附柱提取总RNA,然后放入逆转录仪器中,按说明书设定程序;逆转录操作结束后,取cDNA进行PCR扩增ZFX和 β -catin,置-20℃冰箱中保存;将实验中的细胞和荧光试剂放在冰上解冻,解冻后加入相应试剂震荡混合,然后放入荧光定量仪中按设定程序进行荧光定量。基因表达水平操作按

试剂盒说明书进行,ICC肿瘤细胞接种在6孔板中,在低血清环境中培养(培养基12 h后需进行更换)。培养结束后,采用多聚甲醛固定、结晶紫染色,通过光学显微镜下观察细胞的颜色、大小,拍照后对细胞进行计数。

CCK-8细胞增殖实验^[3]:用0.5%胰酶消化处于对数生长期的细胞5 min,离心操作3 min,转速为800 r/min。每个96孔板放入大约5 000个细胞,每孔加入100 μ L培养基,让细胞在培养液中迅速繁殖。当繁殖密度为40%时,更换培养液,在37℃及5% CO₂中继续培养,到待测时间点时,加入CCK-8试剂,每孔加入约10 μ L。培养1 h,测定吸光度值,波长为450 nm。

免疫组化染色法检测ICC细胞中ZFX蛋白分布:免疫组化染色采用DAB显色,操作步骤按试剂盒说明书严格进行。

Transwell法检测ICC细胞迁移能力:用培养基稀释实验所需的Matrigel胶,待浓度下降至原来的1/5时,用滴管取40 μ L放入Transwell中,在37℃环境下等待约1 h孵育完成。用干细胞培养液调整浓度后置37℃及5% CO₂中孵育24 h。计算ICC细胞的数量和占比。

2 结果

2.1 ZFX蛋白在ICC癌组织中的表达

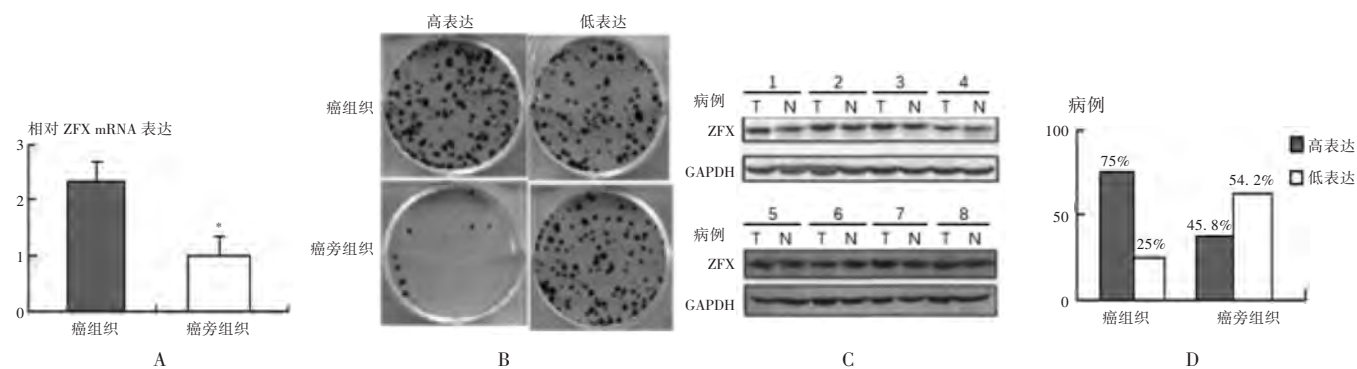
与癌旁组织中的正常肝细胞相比,癌组织中的mRNA含量较高。与癌旁组织中ZFX蛋白表达水平相比,癌组织中的明显更高。癌旁组织在染色后,出现阳性区域。ICC组织染色情况显示,75%癌组织存在高表达状态,而癌旁组织中ZFX蛋白高低表达无明显差异。详见图1。

2.2 抑制ZFX表达对肝内胆管癌细胞生长能力的影响

shRNA的导入显著抑制了ZFX蛋白的表达;正常培养条件下,ZFX蛋白的干扰不会影响LM3和RBE细胞的生长;在无糖环境下,干扰细胞和对照细胞的增殖能力减弱;在低血清浓度和干扰ZFX细胞的条件下,胆管癌细胞增殖和存活能力受到抑制。详见图2。

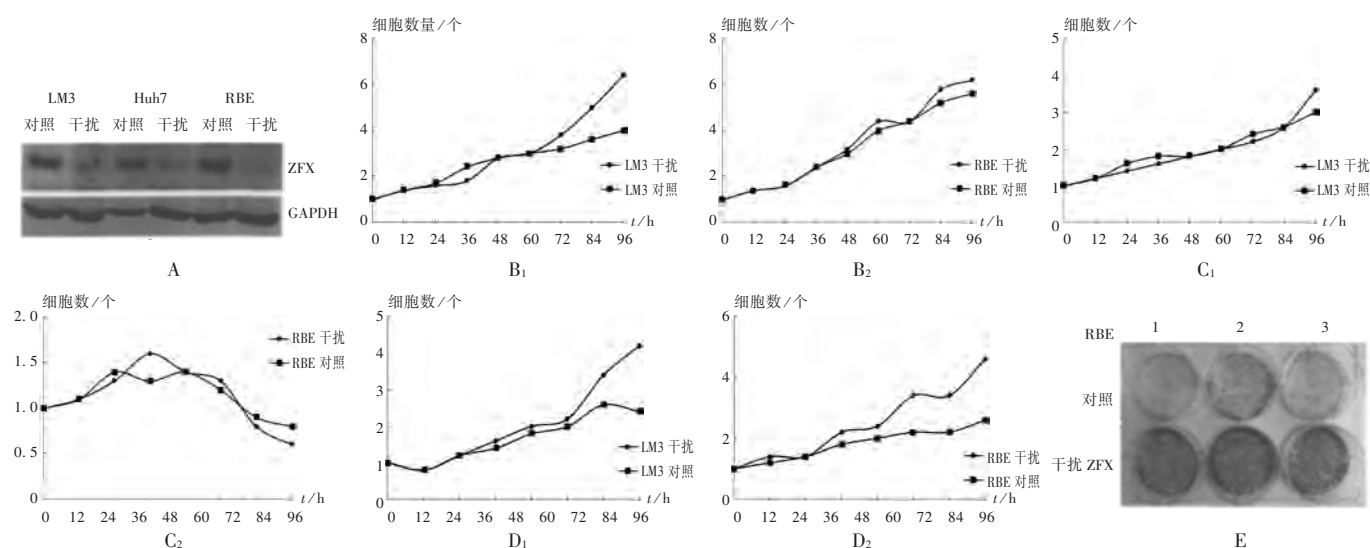
2.3 复方苦参注射液对ZFX的调控作用

采用肿瘤坏死因子 α (TNF- α)联合放线菌酮(CHX)刺激对照细胞和干扰ZFX的胆管癌细胞进行探讨。单用TNF- α 处理细胞,细胞无形态改变;但经TNF- α +CHX处理3 h后,细胞形态产生变化,处理6 h后对照细胞凋亡,而ZFX干扰组细胞凋亡数量很少。聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶(PARP)水平的检测是在经TNF- α +CHX处理的细胞裂解液中进行。由图3可见,对照细胞中PARP比shZFX蛋白细胞高,且差异显著。检测MAPKs信号通路中关键蛋白p-JNK, p-p38, p-ERK的磷酸化。结果显示,p-JNK, p-p38, p-ERK在干扰细胞中的磷酸化水平高于对照细胞,表明ZFX蛋白在MAPKs通路中调节细胞存活能力。其中,感受氧化应激的p38的活化最明显,表明复方苦参注射液可



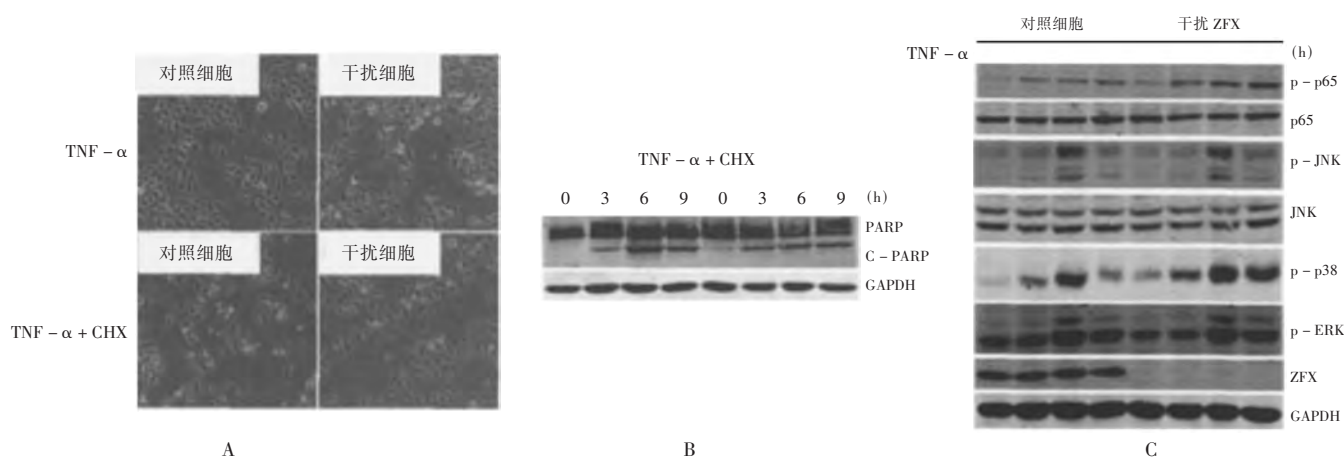
A. 癌组织和癌旁组织 ZFX mRNA 相对表达量 B. 癌组织和癌旁组织 ZFX 病毒转染结果
C. 组织 ZFX 蛋白表达结果 D. ICC 癌组织 ZFX 蛋白高表达与低表达比较结果
注:与癌组织比较, * $P < 0.05$ 。

图1 ZFX 蛋白在 ICC 癌组织中的表达^[6]



A. ZFX 蛋白表达结果 B₁, B₂. 正常培养细胞生长曲线 C₁, C₂. 无糖培养细胞生长曲线
D₁, D₂. 低血清培养细胞生长曲线 E. RBE 细胞生长结果

图2 抑制 ZFX 蛋白表达对胆管癌细胞在不同培养环境中生长能力的影响



A. TNF- α 联合 CHX 刺激对照细胞和干扰细胞 ZFX 蛋白的影响 B. PARP 和 C-PARP 蛋白相对表达量
C. MAPKs 信号通路相关蛋白相对表达量

图3 ZFX 蛋白调节细胞存活可能通过影响 MAPKs 信号通路

调控 ZFX 在 MAPKs 通路中的表达来抑制细胞的存活能力。

3 讨论

锌指蛋白基因家族是人类基因家族中不可缺少的一员^[5],主要由X染色体编码而成。ZFX属锌指蛋白家族,与ZFT及ZFA为同一家族,其在结构上非常相似^[6]。ZFX内部含有多个C₂H₂结构,使其结构拥有细胞转录激活区、核定位序列和DNA结合点^[7],具有保守性。ZFX通过与锌离子结合成“手指”状,使基因在细胞、人类胚胎发育、造血干细胞自我更新中有重要作用^[8-9]。ZFX在参与干细胞自我更新的同时,可将癌细胞变大变多,加速其增殖和转移,促进癌症恶化,导致患者病情恶化,影响预后^[10-11]。但通过下调细胞MAPKs通路使ZFX基因表达受阻,使ICC细胞无法在体内外增殖^[12-14]。

复方苦参注射液可通过促进淋巴细胞的免疫功能来抑制和杀死肿瘤细胞。现代研究发现,苦参碱可通过影响端粒酶作用^[15-16]来发挥上述功能,尤其对T细胞作用极明显^[17]。ICC在早期无明显症状,患者发现并确诊为该病时已错过最佳治疗时期^[18-19]。由于淋巴组织细胞转移和扩散速度快,常规治疗和手术对其无决定性作用,因此大部分患者经手术治疗的预后效果不佳^[20]。

本研究结果显示,在ICC癌组织中ZFX表达水平很高,癌旁组织中也有表达,但明显低于癌组织。干扰ZFX的细胞在低血清环境下拥有较高的繁殖能力;在低糖环境下,ZFX蛋白生长状况较差,表明糖是ICC细胞生长的必备条件。平板克隆实验显示,ZFX可抑制细胞凋亡,表明ZFX蛋白对细胞凋亡有调节作用。信号通路MAPKs研究结果显示,在ZFX蛋白干扰情况下,p38在感受氧化应激条件下蛋白活性异常增强,提示干扰ZFX蛋白细胞在不良环境下更有存活优势。

本研究中,将ICC细胞置低糖含量、低血浓度的培养环境下,以探讨ZFX蛋白的功能。虽然实验条件仍有不足,但对下一步的研究有较大参考意义。本研究中探讨了抑制ZFX的表达对ICC细胞的影响,但并未研究增加ZFX后的效果,可在今后的研究中继续观察。

综上所述,ZFX在ICC中处于高表达状态,复方苦参注射液通过对ZFX在MAPKs信号通路中的控制,可有效抑制ICC细胞的生长。ZFX可能是ICC的潜在新型生物治疗靶点。

参考文献:

[1] GUPTAA A, DIXON E. Epidemiology and risk factors: intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2017, 6(2): 101-104.
[2] BRIDGEWATER J, GALLE PR, KHAN SA, et al. Guidelines for the diagnosis and management of intrahepatic cholangiocarcinoma[J]. *J Hepatol*, 2014, 60(6): 1268-1289.
[3] 谭永辉,吕品,聂盛丹,等. 肝内胆管癌中ErbB4的表达及临床意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(2): 180-184.

[4] GALAN-CARIDAD J M, HAREL S, ARENZANA TL, et al. ZFX controls the self-renewal of embryonic and hematopoietic stem cells[J]. *Cell*, 2017, 129(2): 345-357.
[5] GOU DM, SUN Y. Cloning and characterization of a novel kruppel-like zinc finger gene, ZNF268, expressed in early human embryo[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2014, 1518(3): 306-310.
[6] 郭武华,张吉翔. ZFX基因与干细胞自我更新[J]. *生命的化学*, 2018, 28(3): 245-247.
[7] SCHNEIDER-GÄDICKE A, BEER-ROMERO P, BROWN LG, et al. Putative transcription activator with alternative isoforms encoded by human ZFX gene[J]. *Nature*, 1989, 342(6520): 708-711.
[8] KUMAR S, VALLEY CM. Proprietary science, open science and the role of patent disclosure: the case of zinc-finger proteins[J]. *Nat Biotechnol*, 2014, 27(2): 140-144.
[9] BROWN LG, BEER-ROMERO P. Epidermal growth factor receptor signaling synergizes with Hedgehog GLI in oncogenic transformation via activation of the MEK/ERK1/JUN pathway[J]. *Cancer Res*, 2016, 69(4): 1284-1292.
[10] RHIE SK, YAO L, LUO Z, et al. ZFX acts as a transcriptional activator in multiple types of human tumors by binding downstream of transcription start sites at the majority of CpG island promoters[J]. *Genome Res*, 2018, 28(3): 310-320.
[11] WENG H, WANG X, LI M, et al. Zinc finger X-chromosomal protein (ZFX) is a significant prognostic indicator and promotes cellular malignant potential in gallbladder cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2015, 16(10): 1462-1470.
[12] WU S, LAO XY, SUN T, et al. Knockdown of ZFX inhibits gastric cancer cell growth *in vitro* and *in vivo* via downregulating the ERK-MAPK pathway[J]. *Cancer Lett*, 2014, 337(2): 293-300.
[13] LI C, LI H, ZHANG T, et al. ZFX is a strong predictor of poor prognosis in renal cell carcinoma[J]. *Med Sci Monit*, 2015, 21: 3380-3385.
[14] WANG C, FU SY, WANG MD, et al. Zinc finger protein X-linked promotes expansion of EpCAM+ cancer stem like cells in hepatocellular carcinoma[J]. *Mol Oncol*, 2017, 11(5): 455-469.
[15] 周绪堂. 实用肿瘤手册[M]. 南昌:江西科技出版社, 2017: 1007-1017.
[16] 张莉萍,蒋纪恺,谭荣安,等. 苦参碱对K562细胞株端粒酶活性细胞周期的影响[J]. *中华肿瘤杂志*, 2018, 20(5): 328.
[17] 陈耀华,尹时生,田喜顺,等. 复方苦参对恶性肿瘤T细胞亚群的影响[J]. *肿瘤研究与临床*, 2019, 11(3): 191.
[18] 沈新生,王燕蓉. 氧化苦参碱对CCL₄所致小鼠肝细胞损伤修复作用的形态学研究[J]. *解剖科学进展*, 2017, 3(3): 244-246.
[19] YAN X, SHAN Z, YAN L, et al. High expression of Zinc finger protein X-linked promotes tumor growth and predicts a poor outcome for stage II/III colorectal cancer patients[J]. *Oncotarget*, 2016, 7(15): 19680-19692.
[20] 张勇,张炳远. MUC1/E-cadherin在肝内胆管癌组织中的表达及其临床意义[J]. *青岛医药卫生*, 2014, 43(3): 166-168.

(收稿日期:2019-12-03;修回日期:2020-02-05)