

RIP1 在肝癌组织中的表达意义及其对细胞侵袭、迁移的影响

李 健*, 周 峥, 熊立新, 邓科平, 尹清华, 何恒正

(长沙市第一医院普外一科, 湖南 长沙 410005)

摘 要: 探讨受体相互作用蛋白激酶-1(RIP1)在肝癌组织及癌旁组织中的表达情况,并探索其对肝癌细胞侵袭和迁移的分子调控机制。收集肝癌和癌旁组织,免疫组化检测 RIP1 蛋白的表达,筛选高表达 RIP1 的肝癌细胞系。对肝癌细胞系进行 RIP1 沉默处理并设置阴性对照。采用 western blot 及 RT-PCR 法检测 RIP1 的表达量;Tranwell 观察细胞侵袭能力;细胞划痕观察细胞迁移能力。结果显示,48 例肝癌组织中,22 例存在 RIP1 蛋白阳性表达,阳性率为 45.83%,其中,强阳性患者为 15 例,中等及弱阳性 7 例,该研究中有 6 例复发患者。RIP1 在肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织($P<0.05$),高表达 RIP1 患者的总生存率和无复发生存率显著低于低表达 RIP1 的患者(均 $P<0.05$)。抑制 RIP1 基因后其相对表达量、细胞侵袭、迁移能力均下降($P<0.05$)。RIP1 在肝癌中存在高表达,可能参与肝癌细胞侵袭与迁移过程。

关键词: 肝癌; 受体相互作用蛋白激酶-1; 组织病理; 细胞侵袭; 细胞迁移

中图分类号:R735.2

文献标识码:A

The clinicopathological study of receptor-interacting protein kinase-1(rip1) on liver cancer and its effect on cell invasion and migration

LI Jian*, ZHOU Zheng, XIONG Lixin, DENG Keping, YIN Qinghua, HE Hengzheng

(Department of Hepatobiliary Surgery, the First Hospital of Changsha, Changsha 410005, Hunan, China)

Abstract: This study is aimed to investigate the expression of receptor-interacting protein kinase-1(RIP1) in hepatocellular carcinoma and its relationship with histopathology, and to explore its effect on the invasion and migration of hepatoma cells. Tumor tissues and paracancerous tissues were collected; the expression of RIP1 in the hepatocellular carcinoma cell line was screened and the cell line with the highest expression of RIP1 was collected for subsequencing experiments. The RIP1 gene was inhibited and normal control group was set. Western blotting and RT-PCR were used to detect the expression of RIP1. Tranwell was used to observe the invasive ability of the cells. Cell migration was observed in cell scratches. Of the 48 patients with liver cancer, 22 were stained, and the positive rate of staining was 45.83%. Of these, 15 were strongly positive, 7 were moderately and weakly positive, and 6 were relapsed. The expression of RIP1 in hepatocellular carcinoma was significantly higher than that in paracancerous tissue($P<0.05$). Total survival rate and relapse-free survival rate in patients with high expression of RIP1 was significantly higher than that in patients with low expression of RIP1($P<0.05$). After inhibiting RIP1 gene, its relative expression, cell invasion and migration ability were all decreased($P<0.05$). RIP1 is high expressed in liver cancer and it may participate in the invasion and migration of liver cancer cells.

Key words: Liver cancer; Receptor-interacting protein kinase-1; Histopathology; Cell invasion; Cell migration

肝癌是当前常见的肝脏恶性肿瘤,主要分为原发性和继发性两类,恶性程度极高,发现较晚,对患者生命健康造成严重威胁^[1]。目前针对肝癌治疗的方法主要包括手术治疗、化学药物治疗、放射治疗以及生物治疗等,但由于该病易出现复发和远处

转移,肝癌患者的预后仍不理想^[2]。受体相互作用蛋白激酶 1(RIP1)是 RIP 家族最新成员,是一组具有同源激酶结构域但功能域不同的相似蛋白亚型^[3]。研究发现,RIP1 蛋白质,参与细胞凋亡,控制炎症反应,影响细胞周期及维持组织或生物体的稳态^[4]。Lin^[5]指出,RIP1 与非小细胞性肺癌的形成以及癌细胞侵袭过程有关。同时也有研究指出抑制 RIP1 的表达能够促进大肠癌细胞的凋亡^[6]。以

上研究结果均在一定程度上提示 RIP1 具有促癌基因的效应,但 RIP1 与肝癌的关系尚不明确。因此,本研究结合组织病理染色及基因抑制实验进行相关研究,通过体外抑制该基因的表达,并观测 RIP1 基因被抑制后对肝癌细胞侵袭、迁移能力的影响。

1 资料与方法

1.1 免疫组织化学染色与分析

收集 48 例肝癌组织及其对应癌旁组织并制作成石蜡切片,组织均来自于病理科,相关研究符合伦理学标准。取材及病理:肝癌标本按照肿瘤的实际侵犯位置取材,每个瘤块取三个不同方位,在距离肿瘤取材周围 2 cm 处留取癌旁组织,然后将肝癌及癌旁取材标本放入 4% 多聚甲醛溶液中固定,石蜡包埋,制成蜡块。免疫组化方法:石蜡切片脱蜡和水化,修复抗原,滴加封闭液。加滴 RIP1 一抗液,4 ℃ 过夜。再滴加二抗,DAB 显色,苏木素复染,中性树胶封固。每次实验均做阳性与阴性对照,阳性细胞染色为棕黄色,每例均设有 HE 切片作对照观察。免疫组化结果判断标准:采用双盲法观察切片,RIP1 免疫组化在细胞膜上染黄色或褐色。实验样本根据细胞染色强度和细胞染色比例独立评分。根据被染色细胞在细胞总数中所占的比例进行评分,阳性细胞<5% 记 0 分,5% ~ 25% 记 1 分,26% ~ 50% 记 2 分,51% ~ 75% 记 3 分,76% ~ 100% 记 4 分。该细胞染色的强度由颜色程度来确定,即无、弱、中、强评分分别为 0、1、2 和 3 分。每个病人综合得分为 0 ~ 7 分,将 RIP1low 组的分数定为 ≤3 分,RIP1high 组得分>3 分^[5]。

1.2 仪器

人肝癌细胞株 Hep3B、SMMC-7721、Huh-7 购于中科院昆明细胞库;PLC/PRF/5、HepG2、HCCLM3 购于中国科学院上海细胞库;Trizol 试剂和慢病毒转染试剂 polybrene 购于上海翊圣生物科技有限公司;RNA 提取试剂盒和逆转录试剂盒购于大连宝生物工程公司;目的基因 shRNA-1 序列:5'-CACCG-GAGGTGAATGAGGACTATAACGAATTATAGTCCTCATTACCTCCTTTTT-3', shRNA-2 序列:5'-CACCG-TATATCAAAGTACAGAAATCCGAAGATTCTGTGATTTGATATACTTTTT-3'。RIP1 兔抗单克隆抗体,购自美国 Abcam 公司;ECL 成像系统,由 Bio-Rad Laboratories 科技公司提供;Transwell 小室购自于美国 Corning 公司。

1.3 肝癌细胞培养、筛选及沉默

Hep3B、SMMC-7721 细胞使用 RPMI-1640 培养基 10% FBS 培养,HCCLM3、HepG2 细胞用 DMEM 高糖培养基,10% FBS 培养,以上细胞均置于 37 ℃、5% CO₂ 细胞培养箱中培养。待以上各细胞处于融合达 70% ~ 80% 时,收取细胞蛋白,使用 WB 法,筛选出高表达 RIP1 的细胞株。将该细胞株使用上述方法,行慢病毒转染。将所培养的细胞随机分为三组:对照组、shRNA-1 抑制组、shRNA-2 抑制组。待各组细胞融合率达 70% ~ 80% 时,经行转染操作。其中,shRNA-1 组、shRNA-2 组分别转染对应的 RIP1 慢病毒抑制基因序列,对照组加转染试剂但不予干扰序列。使用并收集转染 72 h 时的各肝癌细胞经行后续实验。本研究 RNA 干扰设计图见图 1。

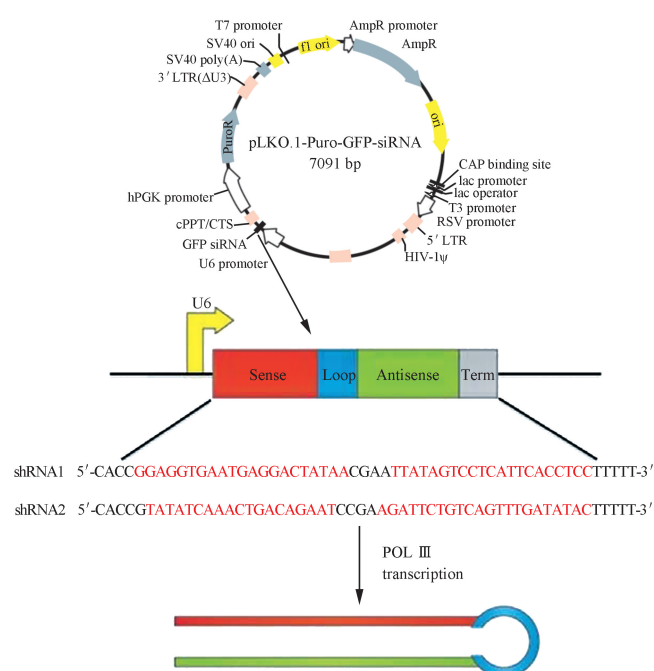


图 1 RNA 干扰设计图

1.4 慢病毒载体沉默 RIP1 表达

采用 WB 法及 RT-PCR 法检测。取各组转染 72 h 细胞,提取蛋白,并进行定量测定。按照每孔约 30 μg,按 110 V 恒压电泳,220 mA 恒流条件转膜,转膜时间约 100 min。然后脱脂牛奶封闭 1 h 备用,再孵育 RIP1 抗体及内参,4 ℃ 条件下孵育过夜,第二日滴加二抗,室温孵育 1 h,曝光条带并分析结果。经过实验,挑选出 HCCLM3 肝癌细胞进行下一步实验,RT-PCR 法结果也验证了该结论。

1.5 细胞侵袭及迁移能力测定

采用 Transwell 细胞侵袭试验和细胞划痕试验测定细胞相关运动能力。细胞侵袭试验, Transwell 小室放置于预先制备好 Matrigel 基质胶的 24 孔板中,按上述条件在培养箱中过夜,向 Transwell 小室下室中加入 500 μ L 含 10% FBS 的 DMEM 高糖培养基。用无血清的 DMEM 高糖培养液重悬各组细胞,取 100 μ L 细胞悬液(细胞总数约 1×10^5 个)加至 Transwell 的上室。48 h 后将小室置于 4% 的多聚甲醛中固定 15 min,擦去小室内室膜上的细胞,结晶紫溶液(0.1%)染色 10 min 后显微镜下观察,每孔随机选取 5 个视野拍照,统计并分析。细胞划痕试验,在 6 孔板中培养前述肝癌细胞,将细胞在无血清中持续饥饿 24 h 后使用移液枪头进行划伤,再用 PBS 洗涤,在 0、24 和 48 h 时使用相差显微镜进行拍照。随后通过手动计数进行细胞抑制率的测定,相关结果用百分比表示,上述所有实验均常规进行三次。

1.6 统计方法

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析处理。多组比较采用单因素方差分析,两组间比较采用成组 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 免疫组化染色及病理分析

48 例肝癌患者中,22 例被染色,染色阳性率为 45.83%,其中,强阳性患者为 15 例,中等及弱阳性 7 例,同时,有 6 例复发患者。观察免疫组化染色结果,可见 RIP1 主要在细胞核中表达,RIP1 在肝癌组织中的表达明显高于癌旁组织且在复发患者中的表达显著高于未复发患者(均 $P < 0.05$) (图 2、图 3)。RIP1 的阳性表达与患者的总生存率密切相关($OR = 0.560, 95\% CI: 0.383 \sim 0.818, P = 0.003$)且与无复发生存率($OR = 0.540, 95\% CI: 0.369 \sim 0.791, P = 0.002$)密切相关。

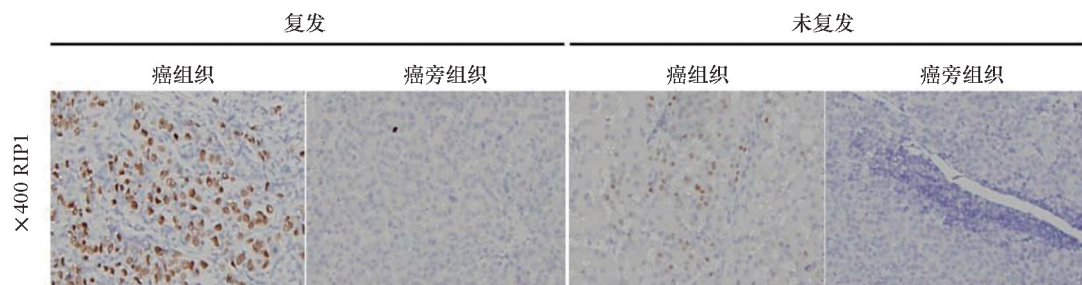


图 2 肝癌患者中的 RIP1 表达情况

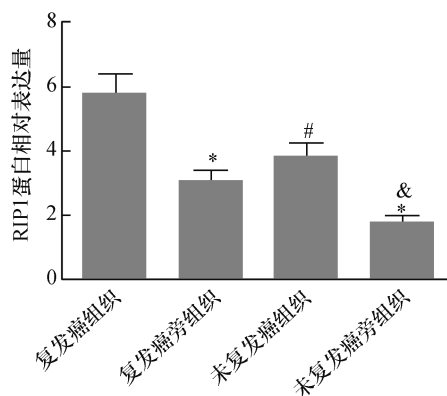


图 3 复发和未复发肝癌组织中 RIP1 蛋白表达情况定量图
与同组癌组织比较, * $P < 0.05$; 与复发癌组织比较, # $P < 0.05$;
与复发癌旁组织比较, & $P < 0.05$

2.2 肝癌细胞系 RIP1 表达筛选

对各肝癌细胞系 RIP1 蛋白表达进行检测,可见 4 个细胞株中,HCCLM3 的 RIP1 蛋白相对表达量

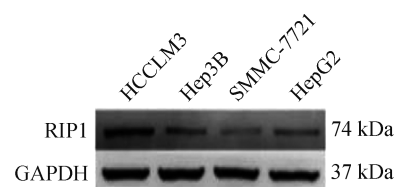


图 4 不同肝癌细胞系中的 RIP1 表达情况

最高,可以用于后续实验(图 4)。

2.3 肝癌细胞 HCCLM3 的 RIP1 抑制

观察慢病毒载体抑制 HCCLM3 的 RIP1 的表达情况,可见 shRNA-1 组、shRNA-2 组 RIP1 表达明显被抑制,且 shRNA-2 组抑制效果更为明显(均 $P < 0.05$,图 5)。

2.4 肝癌细胞 HCCLM3 的 RIP1 抑制后侵袭能力改变

与对照组相比较,shRNA-2 组可明显抑制 HCCLM3 的细胞侵袭能力($P < 0.01$,图 6)。

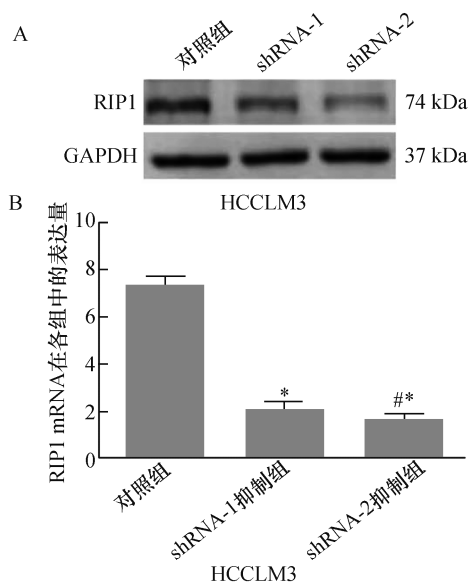


图5 肝癌细胞 HCCLM3 慢病毒载体抑制

A: WB 观察不同 RNA 抑制剂对 RIP1 的抑制效果;
B: RT-PCR 定量观察各组 RIP1 被抑制后相对表达量
与对照组比较, * $P < 0.05$; 与 shRNA-1 抑制组比较, # $P < 0.05$

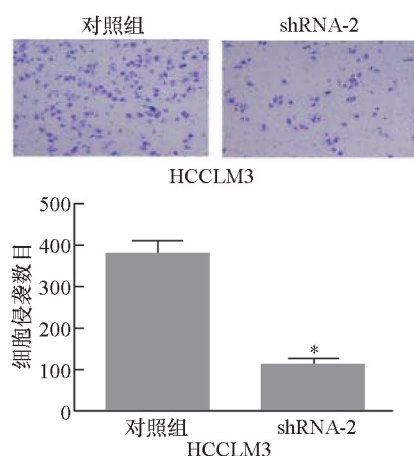


图6 肝癌细胞 HCCLM3 慢病毒载体抑制后的各组
侵袭情况 与对照组比较, * $P < 0.05$

2.5 肝癌细胞 HCCLM3 的 RIP1 抑制后迁移能力改变

与对照组相比较, shRNA-2 组可明显抑制 HCCLM3 的细胞迁移能力 ($P < 0.05$, 图 7)。

3 讨 论

在以往的研究中, 多数学者认为 RIP1 有助于肿瘤的抑制, 因为该基因可以参与各种细胞应激, 从而诱导细胞凋亡和程序性坏死^[7]。如 Qiu 等^[8]发现 RIP1 参与卵巢癌细胞 CD40 配体所驱动的坏死细胞样细胞凋亡。在关于骨肉瘤的研究中, Fu

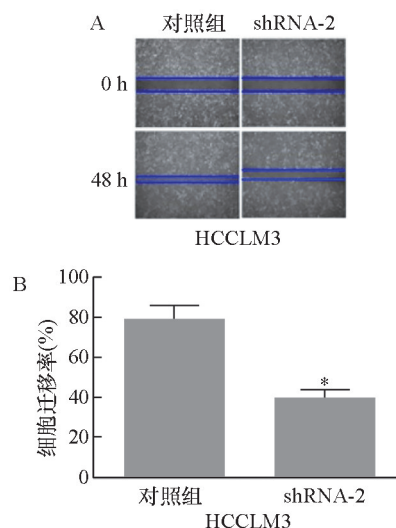


图7 慢病毒载体抑制肝癌细胞 HCCLM3 中 RIP1
表达后的各组迁移情况

A: 慢病毒抑制 HCCLM3 细胞中
RIP1 表达后细胞迁移情况; B: 各组细胞迁移情况定量图
与对照组比较, * $P < 0.05$

等^[9]也指出, 紫草素正是通过激活 RIP1 和 RIP3 来发挥对骨肉瘤细胞的抑制作用。然而近期的研究却发现, RIP1 在肿瘤发病机制中可能有不同的生物学功能。部分学者在检查了胃癌和正常胃组织中 RIP1 的表达情况后发现, 与正常胃组织相比, RIP1 在胃癌组织中表达显著增强并且其表达程度与胃癌患者预后密切相关^[10]。同时研究也发现, RIP1 在黑色素瘤中也呈高表达, 并通过调节 NF- κ B 信号通路进而加速黑色素瘤细胞的生长^[11]。基于以上研究, 本研究设计了 RIP1 与肝癌细胞的实验, 并探讨其表达程度与肝癌之间的关系。

首先本研究通过免疫组化实验证实, 48 例肝癌患者 22 例均表现为 RIP1 阳性表达, 阳性染色率为 45.83%。同时, RIP1 阳性表达程度与患者术后生存率以及无复发生存率密切相关, RIP1 表达越高, 患者术后生存时间越短且复发可能性越大。这也进一步证实了 RIP1 可能与肝癌患者的发病和预后存在关联。之后本研究通过筛选出 RIP1 表达量最高的肝癌细胞系, HCCLM3 中 RIP1 表达量最高并被应用于后续实验。另外为了实验的稳定性特选择了两条 RNA 抑制序列且 shRNA-2 抑制效果更明显。肿瘤的侵袭和迁移指的是肿瘤细胞脱离原发部位向其他部位发生远处转移, 并形成继发性的新的肿瘤过程^[12]。侵袭和迁移是目前恶性肿瘤最主要的特征也是引起患者死亡的重要原因^[13]。随着分子生物学以及基因靶向治疗研究的不断发展, 越来越多的基因和细胞分子被证实在癌细胞的侵袭

和转移中起着不同的调控作用^[14]。有研究证实抑制 RIP1 的表达能够抑制皮肤黑色素瘤细胞的增殖^[15]。Pietkiewicz 等^[16]在关于胰腺癌的研究中发现,沉默 RIP1 的表达可促进胰腺癌细胞的凋亡,对于胰腺癌具有保护作用。为探究 RIP1 与肝癌细胞生物学特性的影响,本研究设计了 Transwell 细胞侵袭试验和细胞划痕试验,结果证实,抑制肝癌细胞中 RIP1 的表达后,肝癌细胞的侵袭和迁移也被显著抑制。这也进一步证实了 RIP1 抑制对于肝癌细胞侵袭和迁移的保护作用。然而对于 RIP1 抑制肝癌细胞侵袭和迁移的具体机制尚未完全明确,今后仍然需要进一步从分子作用以及信号通路等层面进行后续研究。

综上所述,RIP1 在肝癌中存在高表达,可能参与了肝癌细胞的侵袭和迁移过程。慢病毒载体抑制 HCCLM3 肝癌细胞中 RIP1 的表达可抑制肝癌细胞侵袭及迁移能力,RIP1 可能会发展并成为 HCC 患者预后不良的新型生物标志物以及今后肝癌治疗的潜在靶点。

参考文献:

- [1] 杜文杰,刘祖炳,刘华生. 原发性肝癌介入治疗中经导管肝动脉栓塞与肝动脉灌注化疗栓塞的远期疗效比较[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2016(s2):169-71.
- [2] 黄乾荣,张玲. 原发性肝癌治疗研究新进展[J]. 实用医学杂志, 2016, 32(14):2275-8.
- [3] 崔凯,耿慧武,姬强,等. 受体相互作用蛋白激酶 1 在食管鳞状细胞癌中的表达及临床意义[J]. 安徽医科大学学报, 2016, 51(8):1175-9.
- [4] 王书乐,成祥,陈国柱,等. 肿瘤坏死因子 α 通过抑制线粒体呼吸链复合体Ⅲ诱导 I929-A 细胞发生 RIP1 激酶依赖性细胞凋亡[J]. 军事医学, 2017, 41(5):346-51.
- [5] LIN X, CHEN Q, CHEN H, et al. CYLD promotes TNF- α -induced cell necrosis mediated by RIP-1 in human lung cancer cells [J]. *Mediat Inflamm*, 2016, 2016(4, article 400):1-11.
- [6] WU P, SHI K J, AN J J, et al. The LEF1/CYLD axis and cIAPs regulate RIP1 deubiquitination and trigger apoptosis in selenite-treated colorectal cancer cells [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(2):e1085.
- [7] 章余妹,吴萍,张林杰,等. RIP1 增强顺铂诱导食管癌细胞的凋亡[J]. 安徽医科大学学报, 2015, (2):172-6.
- [8] QIU X, KLAUSRN C, CHENG JC, et al. CD40 ligand induces RIP1-dependent, necroptosis-like cell death in low-grade serous but not serous borderline ovarian tumor cells[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(8):e1864.
- [9] FU ZZ, DENG BY, LIAO YX, et al. The anti-tumor effect of shikonin on osteosarcoma by inducing RIP1 and RIP3 dependent necroptosis[J]. *BMC Cancer*, 2013, 13: 580-7.
- [10] ZHU G, YE J, HUANG Y, et al. Receptor-interacting protein-1 promotes the growth and invasion in gastric cancer[J]. *Int J Oncol*, 2016, 48(6):2387.
- [11] LIU X Y, LAI F, YAN X G, et al. RIP1 kinase is an oncogenic driver in melanoma[J]. *Cancer Res*, 2015, 75(8):1736.
- [12] 张金灿,胡丹,贺礼进,等. 干扰 miR-21 表达抑制胶质瘤 U251 细胞增殖迁移与侵袭[J]. 中南医学科学杂志, 2016, 44(2):143-6.
- [13] 王攀,谢教文,范钦桥,等. miR-139-5p 靶向转化生长因子- β 1 抑制肝癌细胞侵袭转移的机制[J]. 中华肝胆外科杂志, 2016, 22(1):17-23.
- [14] 别彩群,黄秋燕,颜英,等. 转染沉默 IGF1R 基因的肝癌细胞株增殖、迁移及侵袭能力观察[J]. 山东医药, 2016, 56(11):1-4.
- [15] LEI F X, JIN L, LIU X Y, et al. RIP1 protects melanoma cells from apoptosis induced by BRAF/MEK inhibitors[J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(6): 679.
- [16] PIETKIEWICZ S, EILS R, KRAMMER P H, et al. Combinatorial treatment of CD95L and gemcitabine in pancreatic cancer cells induces apoptotic and RIP1-mediated necroptotic cell death network[J]. *Exp Cell Res*, 2015, 339(1):1-9.

(本文编辑:蒋湘莲)