

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.04.003

GTPBP4 对肝细胞癌生物学行为影响及其机制的研究*

章诺贝¹, 陈 新^{2△}

(南昌大学第二附属医院:1. 消化内科;2. 核医学科, 南昌 330006)

[摘要] **目的** 探讨肝癌细胞株 SMMC-7721 中 GTD 连接蛋白(GTPBP)4 基因的表达下调对细胞体内外生物学行为的影响及其作用机制。**方法** 采用免疫组织化学方法比较肝癌组织和癌旁组织 GTPBP4 的表达水平差异。运用实时荧光定量 PCR 技术检测 4 种人肝癌细胞株(SMMC-7721、HEPG2、HUH-7、HEP3B)中 GTPBP4 mRNA 的表达。利用 RNA 干扰技术下调肝癌细胞株 SMMC-7721 中 GTPBP4 的表达水平,并观察细胞的生物学行为变化。**结果** 在肝癌组织芯片中,GTPBP4 蛋白在肝癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织。GTPBP4 在 4 种肝癌细胞株中均明显上调。下调 GTPBP4 的表达后,肝癌细胞增殖能力减弱;细胞凋亡增多;处于 S 期、G₁ 期的细胞无明显变化,处于 G₂ 期的细胞增多;细胞体外克隆形成能力减弱;裸鼠体内成瘤能力减弱。表达谱基因芯片结果显示 GTPBP4 敲减后 SMMC-7721 细胞内基因发生改变的有 333 个,其中上调的有 134 个,下调的有 199 个。通路富集分析找到富集的差异基因所在的 10 条信号通路。Western blot 显示 GTPBP4 表达下调后与细胞周期调控相关的基因 CCND1、CCND2、CDK6、MDM2 的表达水平发生明显变化。**结论** GTPBP4 作为一促肝癌基因,其可能通过调控细胞周期关键基因的表达从而影响肝细胞癌的生物学行为。

[关键词] GTPBP4;癌,肝细胞;生物学行为;细胞周期
[中图法分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)04-0439-07

Research on effect of GTPBP4 on biological behavior of hepatocellular carcinoma and its mechanism*

ZHANG Nuobei¹, CHEN Xin^{2△}

(1. Department of Gastroenterology; 2. Department of Nuclear Medicine, Second Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 33006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the influence of GTPBP4 gene expression down-regulation in hepatocellular carcinoma (HCC) cell line SMMC-7721 on the intracellular and extracellular biological behaviors and its action mechanism. **Methods** The differences of GTPBP4 expression level in HCC tissues and paracancerous tissues were compared by using the immunohistochemical method. The expression of GTPBP4 mRNA in 4 kinds of HCC cell line(SMMC-7721, HEPG2, HUH-7, HEP3B) was detected by using the real-time fluorescent quantitative PCR(RT-PCR). The expression of GTPBP4 in HCC cell line SMMC-7721 was down-regulated by using the RNA interference technique and the cellular biological behavior change was observed. **Results** In HCC histological chip, the expression level of GTPBP4 protein in HCC tissue was significantly higher than that in para-cancerous tissue. GTPBP4 was also significantly up-regulated in 4 kinds of HCC cell line. After the expression of GTPBP4 was down-regulated, the proliferation ability of HCC cells was weakened and apoptosis was increased. The cells in S phase and G₁ phase had no significant changes, but which in G₂ phase were increased, the ability of in vitro clone formation was weakened, the nude mouse in vivo tumor formation capacity was weakened. The expressional profiles microarray results showed that 333 genes were changed in SMMC-7721 cells after GTPBP4 knockdown, in which the up-regulated genes were 134, the down-regulated genes were 199. The channel enrichment analysis found 10 signal transduction pathways of the enriched differential genes. Western blot showed that the expression levels of CCND1, CCND2, CDK6 and MDM2 were changed significantly after GTPBP4 expression down-regulation. **Conclusion** GTPBP4 as a promoting HCC gene may influence HCC biological behavior possibly by regulating the expression of key gene in cell cycle.

[Key words] GTPBP4; carcinoma, hepatocellular; biological behavior; cell cycle

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是威胁人类健康的主要恶性肿瘤之一,是全球第五大常见的恶性肿瘤,在我国, HCC 的病死率更是高居恶性肿瘤病死率的第 2 位^[1]。HCC 的发生、发展是多因素、多阶段、多基因相互作用的结果,包括病毒感染、致癌物的作用、癌基因激活和抑癌基因失活、细胞凋亡和增殖调节失控等。尽管人们对 HCC 已经进行了大量的研究,但关于 HCC 发生、发展的确切机制仍有待进一步阐明。GTP 连接蛋白(guanosine 5'-triphosphate-binding proteins, GTPBP)是指能与鸟嘌呤核苷酸结合,具有 GTP 水解酶活性的一类信号转导蛋白,由 α、β、γ 3 个不同亚基组成,其在

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81760427);江西省自然科学(青年)基金资助项目(20161BAB215243);江西省卫生计生委科技计划资助项目(20161078)。 作者简介:章诺贝(1982—),副主任医师,博士,主要从事消化系统肿瘤基因治疗的研究。 △ 通信作者, E-mail: zn-bicx@163.com。

细胞信号传递转导、细胞骨架形成、蛋白质合成等细胞的多种生命活动中均发挥重要作用^[2]。GTPBP4 是 GTPBP 家族成员之一,其编码基因是一广泛存在于从酵母到人类各种真核生物中的高度保守基因^[3]。近来有研究报道,GTPBP4 表达减弱可使人结肠癌细胞的增殖受到抑制,而 GTPBP4 的表达升高又与结肠癌和乳腺癌患者生存率下降有关^[4-5]。但关于 GTPBP4 在 HCC 发生、发展中作用及其机制的研究仍鲜有报道。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 临床标本 75 例 HCC 患者的肝癌组织芯片购自上海芯超生物科技有限公司,人肝癌组织芯片编号:HLiv-HCC150CS-02。其中,男 63 例,女 12 例;年龄 34~77 岁,平均 52.10 岁。

1.1.2 人肝癌细胞株 人 HCC 细胞株 SMMC-7721、HEPG2、HUH-7、HEP3B 均购自上海吉凯公司。

1.1.3 实验动物 BALB/cA 裸小鼠,4 周龄,购自上海斯泰克实验动物有限公司[动物合格证号 SCXK(沪)2012-0002],寄养于上海同济大学实验动物中心。

1.1.4 主要试剂 10%胎牛血清(FBS)、DMEM 购自美国 Gibco 公司,脂质体 Lipofectamine™ 2000 购自美国 Invitrogen 公司,GTPBP4 的小干扰 RNA(siRNA)购自上海吉凯公司,RNeasy Mini 试剂盒、Sensiscript RT 试剂盒购自德国 Qiagen 公司,SYBR Green PCR Master Mix 购自美国 Thermo 公司,ABI Prism 7900 序列检测系统购自美国应用生物有限公司,蛋白酶抑制剂购自美国 Promega 公司,裂解缓冲液购自美国 Sigma 公司,Mini Trans-Blot 系统购自美国 Bio-Rad 公司,聚偏二氟乙烯膜购自美国 Millipore 公司,抗 GTPBP4 抗体、抗 CDK6 抗体、抗 CCND1 抗体、抗 CCND2 抗体、抗 MDM2 抗体、抗 GAPDH 抗体购自美国 Abcam 公司,Pierce ECL 化学发光底物购自美国 Thermo 公司,细胞凋亡检测试剂盒购自美国 Invitrogen 公司。

1.1.5 主要仪器及计算机软件 倒置显微镜购自上海蔡康光学仪器有限公司,荧光显微镜购自日本奥林帕斯公司,Mini Trans-Blot 系统、凝胶成像系统购自美国 Bio-RAD 公司,Cello-mics ArrayScan 系统购自美国 Thermo 公司,FACS Calibur 流式细胞仪购自美国 BD 公司,高速离心机购自美国 Beckman 公司,Genechip miRNA v. 2.0、miRNAQC 软件购自美国 Affymetrix 公司,FLOWJO 软件、Genespring 7.2 软件购自美国 Agilent 公司,TargetScan 软件(美国)。

1.2 方法

1.2.1 组织芯片的 GTPBP4 免疫组织化学检测 GTPBP4 抗体稀释比例为 1:6 000,以 PBS 作为阴性对照,免疫组织化学采用 SP 法,烤片,常规二甲苯脱蜡,梯度乙醇脱水,阻断灭活内源性过氧化物酶,抗原修复,正常羊血清工作液封闭 37℃ 10 min,一抗 4℃ 冰箱孵育过夜,PBS 冲洗 3×5 min,生物素标记二抗,37℃ 孵育 30 min,PBS 冲洗 3×5 min,滴加辣根过氧化物酶标记的链霉素卵白素工作液,37℃ 孵育 30 min,PBS 冲洗 3×5 min,DAB/H₂O₂ 反应染色,自来水充分冲洗,苏木素复染,常规脱水,透明,干燥,封片。

1.2.2 细胞培养和 siRNA 转导 细胞在含有 10% FBS 和 100 U/mL 青霉素-链霉素的 DMEM 中进行培养,细胞培养箱条件为 5% CO₂,37℃。GTPBP4 的 siRNA 双链体如下:5'-

CAU GUC GGA CGG UUU CGA UdTdT-3'和 5'-GCU GCA AAA GGG GAU GAA GdTdT-3'。应用倒置的 4E-TsiRNA 作为阴性对照 siRNA(Control)。转导流程按照 Lipofectamine™ 2000 进行。

1.2.3 实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 使用 RNeasy Mini Kit 从人类 HCC 细胞系中提取总 RNA,为了测量 GTPBP4 的 mRNA 水平,使用 Sensiscript RT 试剂盒将总 RNA 逆转录成 cDNA,使用 SYBR Green PCR Master Mix 在 ABI Prism 7900 序列检测系统上进行 qRT-PCR 反应。用于扩增 GTPBP4 的引物如下:正向引物为 5'-TCA GGA TCC GCT AAG CCC CAG GTG GTT-3',反向引物为 5'-GGC TCG AGT TAC TGT TTT CGC TTA CG-3',以 GAPDH 作为参照物。

1.2.4 Western blot 分析 使用含蛋白酶抑制剂的裂解缓冲液进行细胞裂解,通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)分离含有蛋白质的细胞裂解物,并通过 Mini Trans-Blot 系统转移到聚偏二氟乙烯膜。将印迹在 TBST 制备的 5%脱脂奶粉中封闭 1 h,然后将封闭的膜在 4℃ 下与以下抗体一起孵育:抗 GTPBP4 抗体,抗 CDK6 抗体,抗 CCND1 抗体,抗 CCND2 抗体,抗 MDM2 抗体和抗 GAPDH 抗体。第 2 天,将膜洗涤并与偶联辣根过氧化物酶的第二抗体在室温下孵育 1 h,随后用 TBST 洗涤几次以除去未结合的抗体。最后,使用化学发光进行显像。GAPDH 作为内参。

1.2.5 细胞生长情况检测 进行 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTT)测定以测量活细胞的相对数量。细胞在 siRNA 转导后于 96 孔板中培养 24 h。在指定的时间点,用补充有 MTT(0.5 mg/mL)的新鲜培养基替换培养基。使用 Cello-mics ArrayScan 系统测量波长为 490 nm 的吸光度。绿色荧光蛋白(GFP)表达细胞每天定量 1 次,持续 5 d。

1.2.6 细胞周期检测 细胞周期检测首先将细胞重悬于冰冷的 PBS 中,用碘化丙啶(PI)溶液(50 μg/mL PI,100 μg/mL 核糖核酸酶 A,0.05% Triton X-100 在 NaCl/PI 中)染色细胞,然后在 37℃ 下在黑暗中孵育 30 min 后测量 DNA 水平。使用 FACS Calibur 流式细胞仪观察 DNA 水平,并使用 FLOWJO 软件进行分析。

1.2.7 细胞凋亡检测 使用特异性 FITC 标记 AnnexinV/PI 的细胞凋亡检测试剂盒及流式细胞仪检测 SMMC-7721 细胞的凋亡。

1.2.8 细胞克隆形成检测 用 GTPBP4-siRNA 或阴性对照 siRNA 感染 SMMC-7721 细胞,培养 24 h。然后收集细胞,并以 5×10² 个/孔细胞的密度接种在 6 孔板中。10 d 后,用 PBS 洗涤细胞,然后用甲醇/乙酸(3:1)固定,最后用 Giemsa 染色,在显微镜下计数菌落数。

1.2.9 动物实验 裸鼠右前肢腋下注射感染了 GTPBP4-siRNA 的 SMMC-7721 细胞(5×10⁶ 个/mL,GTPBP4-siRNA 组)或阴性对照 siRNA 感染的 SMMC-7721 细胞(5×10⁶ 个/mL,对照组);在接种细胞成功后,开始对裸鼠的成瘤情况进行观察,观察并详细记录移植瘤的生长状况,每隔 1 天 1 次,每组为 10 只裸鼠;皮下注射细胞 28 d 后,处死裸鼠,计算瘤体大小,对肿瘤的长径(L)及短径(W)进行测量,瘤体体积=3.14/6×L×W×W,并且称取瘤体质量。

1.2.10 MicroRNA 芯片分析 使用 RNeasy Mini Kit 从上述

SMMC-7721 异种移植肿瘤中提取总 RNA,将 RNA(2 μ g) 进行标记并与 Genechip miRNA v. 2.0 微阵列杂交,然后使用 miRNAQC 软件对原始数据进行四分位标准化后输入到 Genespring 7.2 软件进行分析。此后,应用方差分析来鉴定对照组和 GTPBP4-siRNA 组样品之间差异表达的成熟人类 miRNA。

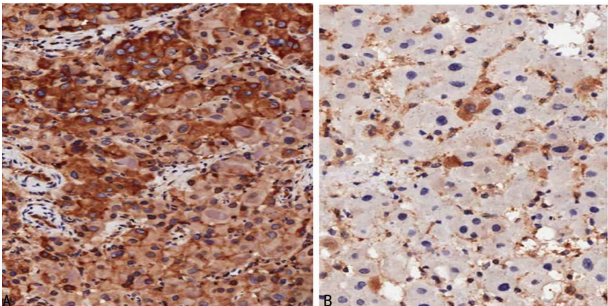
1.2.11 KEGG 通路分析 应用 TargetScan 软件预测对照组和 GTPBP4-siRNA 组之间差异表达的成熟人类 miRNA 的推定靶基因,然后使用京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)数据库来分析这些推定的靶基因显著富集的生物学途径。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,GTPBP4 蛋白在肝癌组织和癌旁组织中表达水平的比较,采用配对等级资料 Wilcoxon 检验。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,数据资料满足正态性与方差齐性时,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验;方差不齐则采用 Dunnett T3

进行检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 GTPBP4 蛋白在肝癌组织和癌旁组织中表达水平的比较 GTPBP4蛋白在肝癌组织中表达水平高于癌旁组织($P=0.031,Z=-2.2$),免疫组织化学的典型图片,见图 1。



A:癌组织;B:癌旁组织

图 1 GTPBP4 的免疫组织化学典型图片($\times 400$)

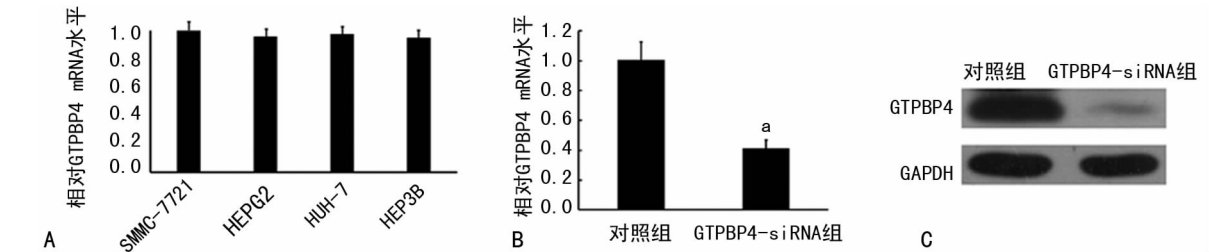


图 2 GTPBP4 在肝癌细胞株中的表达

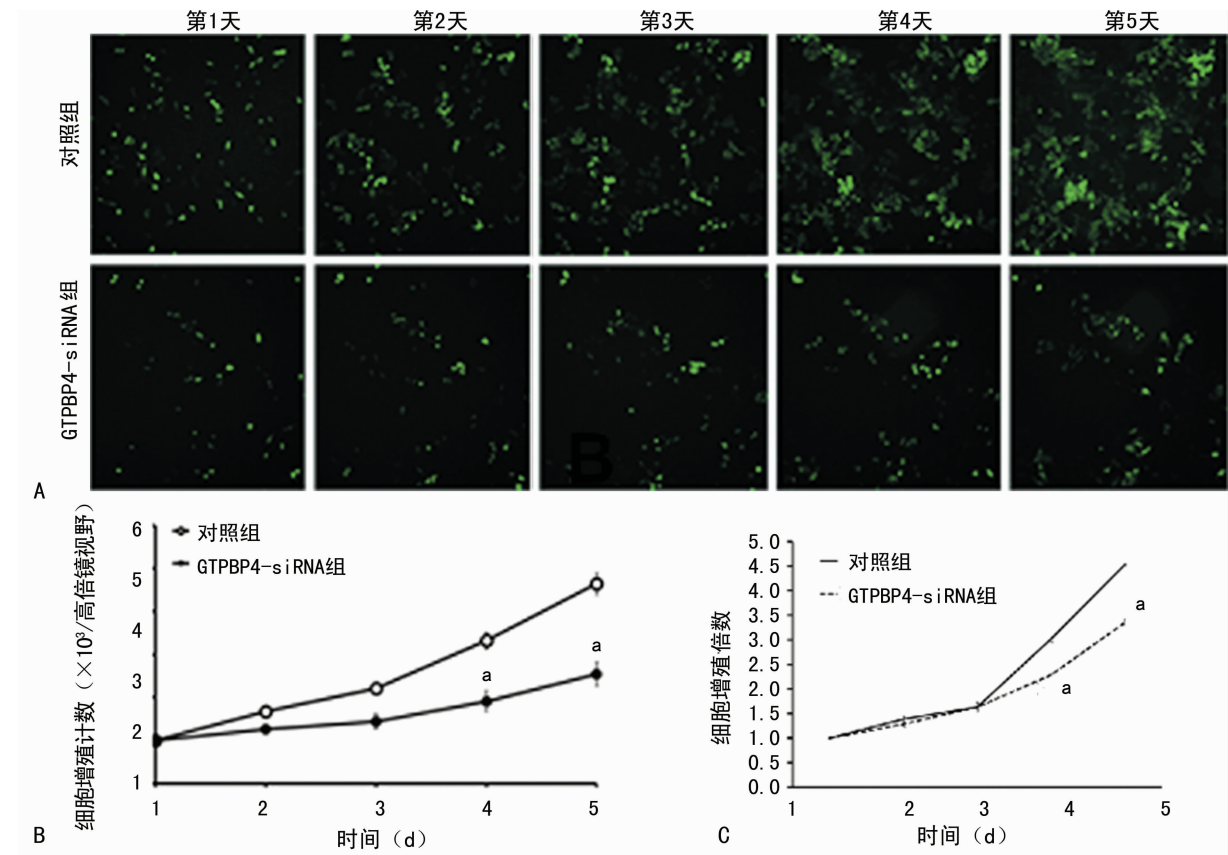


图 3 GTPBP4 表达下调对 SMMC-7721 细胞增殖的影响

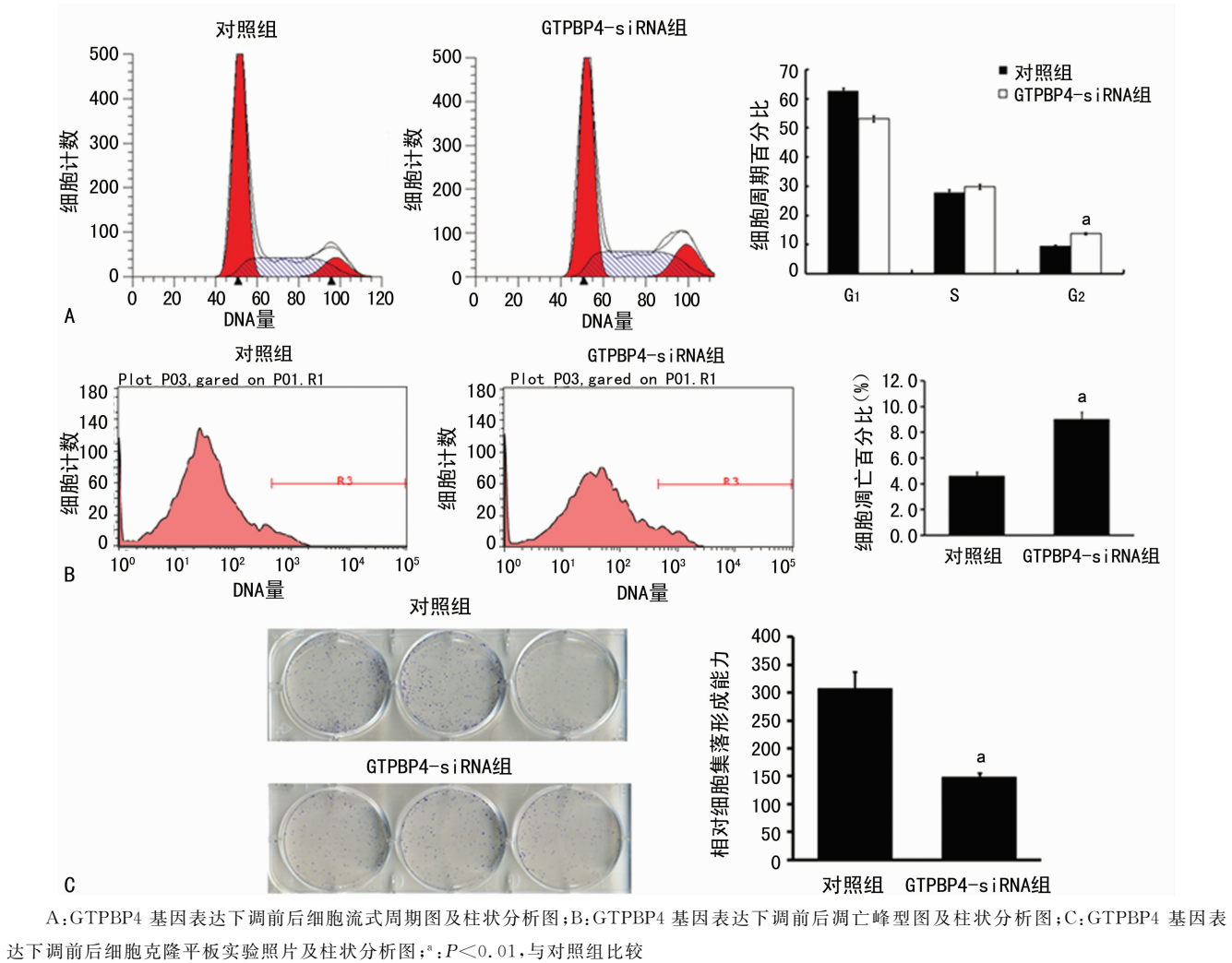


图 4 GTPBP4 表达下调对细胞周期、细胞凋亡和集落形成的影响

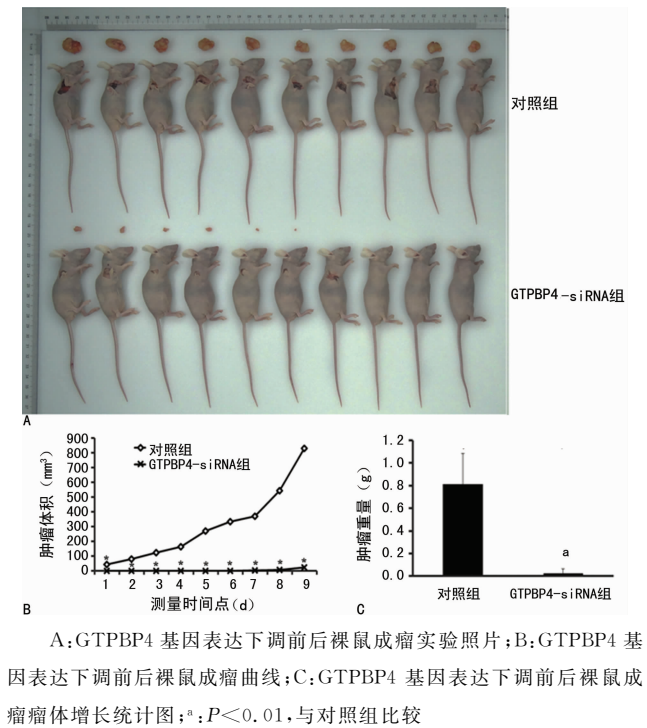


图 5 GTPBP4 敲除对体外异种移植瘤致瘤性的影响

2.2 GTPBP4 在肝癌细胞株中表达上调及 siRNA 诱导 GT-

PBP4 的表达下调 GTPBP4 在 4 个 HCC 细胞株 (SMMC-7721、HEPG2、HUH-7、HEP3B) 中表达均上调 (图 2A)。与对照组比较, siRNA 诱导 GTPBP4 敲减后, GTPBP4-siRNA 组中 GTPBP4 mRNA 表达水平明显降低 ($P < 0.01$, 图 2B)。Western blot 显示, siRNA 诱导 GTPBP4 敲减后, 细胞中 GTPBP4 蛋白表达水平也明显降低, 见图 2C。

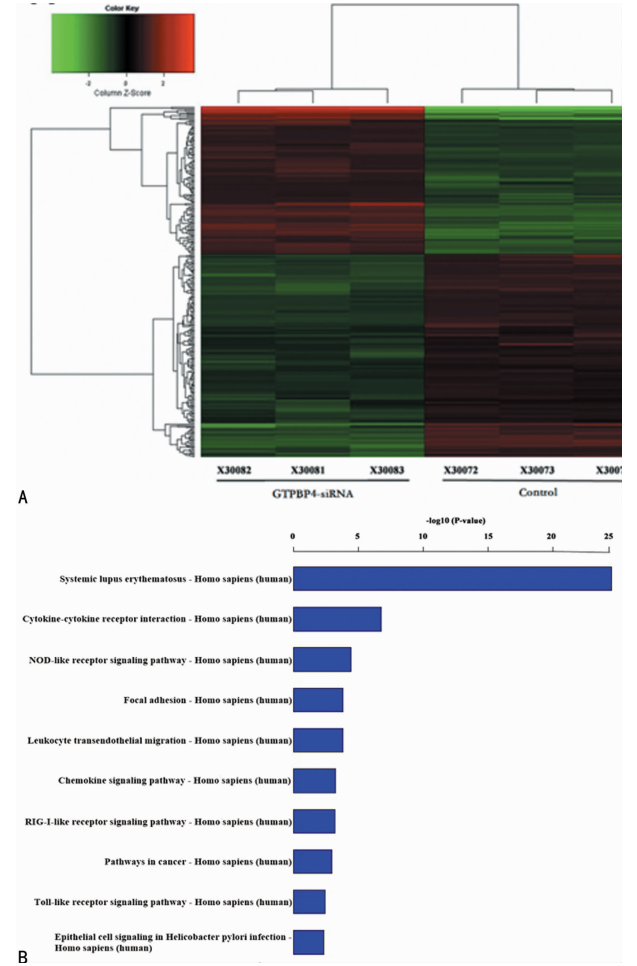
2.3 GTPBP4 基因表达下调对 SMMC-7721 细胞增殖能力的影响 与对照组比较, GTPBP4-siRNA 转导后第 4、5 天, GTPBP4-siRNA 组的细胞增殖速率受到明显抑制 ($P < 0.01$), 见图 3。

2.4 GTPBP4 基因表达下调对 SMMC-7721 细胞周期、细胞凋亡及克隆形成能力的影响 与对照组比较, GTPBP4-siRNA 组细胞周期发生改变, 处于 G_2 期的细胞明显增多 ($P < 0.01$); 而 S、 G_1 期的细胞无明显变化 ($P > 0.05$, 图 4A)。流式细胞仪检测发现, GTPBP4-siRNA 组中细胞凋亡比例明显高于对照组 ($P < 0.01$, 图 4B)。克隆形成实验检测细胞克隆形成能力发现, GTPBP4-siRNA 组细胞集落数目明显少于对照组 ($P < 0.01$), 见图 4C。

2.5 GTPBP4 基因表达下调对 SMMC-7721 细胞裸鼠体内成瘤能力的影响 接种细胞 14 d 后, 对照组肉眼即可见肿瘤小结节形成, GTPBP4-siRNA 组在 20 d 可见肿瘤结节形成。GTPBP4-siRNA 组肿瘤生长较对照组缓慢。接种 4 周后处死

小鼠,测量肿瘤体积和质量,与对照组相比,GTPBP4-siRNA 组瘤体体积较小,质量较轻,两组比较差异有统计学意义($P<0.01$),见图 5。

2.6 GTPBP4 下游应答基因的聚类分析及 KEGG 途径分析 使用 miRNA 微阵列分析检查对照组和 GTPBP4-siRNA 组之间差异表达的成熟人类 miRNA。聚类分析能够清楚地区分对照组和 GTPBP4-siRNA 组肿瘤的 miRNA 微阵列谱,结果显示,GTPBP4 敲减后 SMMC-7721 细胞内基因发生改变的有 333 个,其中上调的有 134 个,下调的有 199 个(图 6A)。然后,应用 TargetScan 分析来预测对照组和 GTPBP4-siRNA 组之间差异表达的成熟人类 miRNA 的推定靶基因。结果显示,这些推定的靶基因在 KEGG 途径数据库中指定的特定生物学途径,找到富集差异基因所在的 10 条信号通路,见图 6B。

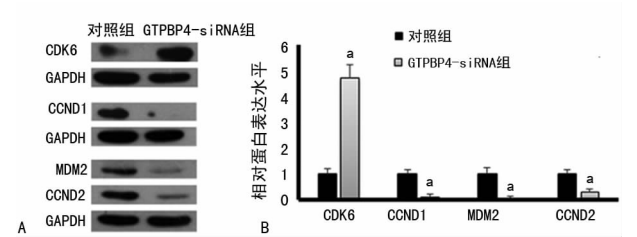


A:由 GTPBP4 表达下调所致的 miRNA 聚类分析,每行代表不同的 miRNA,每列代表单个样本($n=3$),红色或绿色分别表示表达升高或表达抑制;B:KEGG 途径分析显示前 10 名排名的 KEGG 途径

图 6 生物信息学分析

2.7 GTPBP4 表达下调后差异表达基因的验证 基于以上 TargetScan 分析发现 KEGG 通路中的细胞基质黏附(focal adhesion)和癌症相关通路(pathways in cancer)显著失调,本研究确定了黏附/癌症相关细胞周期蛋白 D 通路作为 HCC 细胞中 GTPBP4 调控的目标通路。在此基础上,验证 GTPBP4 敲除是否显著影响 4 个细胞周期关键蛋白(即 CDK6、CCND1、CCND2、MDM2)的表达。与对照组比较,GTPBP4-siRNA 组细胞 CCND1 蛋白、MDM2 蛋白及 CCND2 蛋白表达下调,而 CDK6

蛋白表达上调($P<0.01$),见图 7。



A:CDK6、CCND1、CCND2 和 MDM2 的免疫印迹图;B:4 种蛋白质的相对表达水平;*: $P<0.01$,与对照组比较

图 7 GTPBP4 下游基因的 Western blot 验证结果

3 讨 论

人类 GTPBP4 基因位于染色体 10p15.2-15.3,其编码 635 个氨基酸,与鼠、兔的 GTPBP4 基因同源体均保持 93%的同源性,其中一个与 GTP 结合的超二级结构 GYPNVGKS 在酵母、鼠类及人类均保持一致^[6]。此前,因发现其在慢性肾脏病中表达发生改变,故也曾被称为慢性肾衰竭基因(chronic renal failure gene,CRFG)^[6]。GTPBP4 在核糖体 60S 的生物发生过程中发挥关键作用^[7]。有研究发现,将 GTPBP4 在酿酒酵母中的同源体敲除后酿酒酵母也随之停止生长,由此现象提示,GTPBP4 可能与细胞的生长有关^[6]。

本研究表明,GTPBP4 蛋白在肝癌组织中的表达水平明显高于癌旁组织,GTPBP4 mRNA 在肝癌细胞株中也呈现高表达状态,以上结果提示 GTPBP4 可能与 HCC 的发生、发展有关。为了进一步明确 GTPBP4 对 HCC 生物学行为的影响,本研究运用 RNA 干扰技术下调肝癌细胞株 SMMC-7721 的 GTPBP4 基因表达后,发现肿瘤细胞的增殖、克隆形成和裸鼠体内成瘤能力均受到明显的抑制,细胞的凋亡率明显增加,细胞周期亦发生改变,以上研究结果进一步显示 GTPBP4 可能在 HCC 的发生、发展过程中发挥重要作用。

GTPBP4 基因表达敲减后,SMMC-7721 细胞内多个基因的表达水平发生改变。KEGG 通路富集分析表明,GTPBP4 表达下调后表达水平发生改变的基因富集在多条信号通路上,其中与肿瘤发生密切相关的调控细胞周期的数个关键基因(CCND1、CCND2、CDK6、MDM2)的表达水平发生明显改变。

细胞周期蛋白 D(CCND/cyclin D),包括 CCND1/cyclin D1、CCND2/cyclin D2、CCND3/cyclin D3 与 CDK4 或 CDK6 的活性复合物,其可使视网膜母细胞瘤(retinoblastoma,Rb)蛋白磷酸化并驱动细胞由 G₁ 期进入到 S 期^[8]。此外,Rb 在 G₁ 期末期还可被细胞周期蛋白 ECDK2 磷酸化。Rb 过磷酸化可促使其对 E2F 的亲合力降低,从而允许 E2F 的激活和细胞分裂所需的基因转录^[9]。CCND 可使得细胞周期进展与细胞外刺激(如生长因子、营养成分、整合素衍生黏附信号等)相协调^[10]。细胞外刺激可通过 CCND 介导细胞增殖,因此,过表达的 CCND 或其同源 CDKs 的过度活化可推动肿瘤生长。在人类癌症中,CCND1 比 CCND2 或 CCND3 更容易出现失调。CCND1 的过表达可导致 CDKs 活性的失调,细胞在有丝分裂信号传导条件下的快速生长,绕过关键的细胞检查点,最终导致肿瘤生长^[11]。

CCND1 在大部分人类癌症中均出现过表达和(或)扩增。在多种肿瘤中均出现 CCND1 基因组的改变,如 25%~82%的

胰腺癌,约 76% 的非小细胞肺癌,15%~70% 的乳腺癌和 55% 左右的结肠直肠癌患者^[11-15]。在 90% 以上的套细胞淋巴瘤患者中可出现 t(11;14)(q13;q32) 的重排,此重排即可导致 CCND1 过度表达^[12]。30%~50% 多发性骨髓瘤患者的 CCND1 的 IgH 易位可导致 CCND1 的过表达^[11]。

CCND2 位于染色体 12p13,其主要介导细胞外信号与细胞周期进展的相一致^[16]。CCND2 在调节细胞周期的 G₁/S 转换中起重要作用^[17]。CCND2 的过表达已报道与结肠癌和胃癌的进展及预后不良有关^[18-19]。此外,CCND2 还是 Hedgehog 和 PI3K/Akt 信号通路的直接转录靶标之一^[20-21]。这两种途径的异常活化可导致细胞增殖、代谢、生长和存活失控。

CDKs 是丝氨酸/苏氨酸的家族蛋白激酶,其参与细胞周期、基因转录、翻译和其他生物过程,如,神经发生和凋亡。CDKs 的表达失调与肿瘤发生直接相关。CDKs 激活依赖其与细胞周期蛋白相结合。到目前为止,至少发现有 20 个 CDKs。其中,CDK1、CDK2、CDK4 和 CDK6 可调控细胞周期的转化^[22]。CDK6 基因位于人类第 7 号染色体,其可编码具有 326 个氨基酸的激酶。此基因在多种类型的癌症中均出现表达上调。CDK6 是参与 G₁ 期到 S 期的细胞周期进程并对细胞分化产生负性调控的 CDK6-CCND 复合物的催化亚单位。其活性首先出现在 G₁ 期中期,以磷酸化方式调节肿瘤抑制蛋白 Rb 的活性^[22]。越来越多的证据表明肿瘤细胞的增殖依赖于 CDK6 的表达失调。CDK6 在哺乳动物细胞增殖中发挥关键作用,其有助于驱动细胞进入细胞分裂周期的 DNA 合成(S) 期。CDK6 在 G₁ 期的酶活性受到由各种细胞外信号(包括刺激性有丝分裂原、抑制性细胞因子、分化诱导物、细胞-细胞接触等)所诱导表达的细胞周期蛋白所调控。CCND1、CCND2 和 CCND3 单独或组合地在不同的细胞谱系中差异表达,它们可与 CDK6 组装形成具有酶促活性的全酶复合物^[23]。

MDM2 是 p53 的最知名的调节剂之一,它是一种 E3 泛素连接酶,能够泛素化 p53,导致 p53 发生蛋白酶体降解。MDM2 也可通过结合 p53 的反式激活结构域从而直接抑制 p53 的转录活性^[24]。MDM2 在体内外均可持续性表达泛素连接酶活性从而导致 p53 的降解。因此,虽然 p53 被称为基因组“守护者”,而 MDM2 却被认为是“基因组守护者”的监护人。在多种类型的肿瘤中,MDM2 常处于过表达状态。MDM2-p53 途径的改变在 HCC 中十分常见。p53 在 HCC 中的突变主要发生在 p53 的 DNA 结合结构域中,导致其与靶基因的序列特异性应答元件亲和力降低,从而降低 p53 诱导的 MDM2 表达。在正常条件下,MDM2 和 p53 中的关键位点不被磷酸化。而 MDM2 表达的增加可导致 p53 转录活性的直接抑制,并通过逃避细胞周期检查点控制从而促进致癌性细胞生长^[25]。

本研究结果表明,GTPBP4 可影响 CCND1、CCND2、CDK6、MDM2 这 4 个调控细胞周期的关键基因的表达,而细胞周期调控又与 HCC 的发生、发展等密切相关^[26-27]。因此,有理由认为 GTPBP4 可通过调控细胞周期从而影响 HCC 的发生、发展,而针对 GTPBP4 的靶向治疗也许能成为 HCC 治疗的一个新靶点。相信随着研究的不断深入,将能为肿瘤的诊断、预后及靶向治疗等提供更多更有力的理论依据。

参考文献

[1] LIU L, DONG Z, LIANG J, et al. As an Independent

prognostic factor, FAT10 promotes hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma progression via Akt/GSK3 β pathway[J]. *Oncogene*, 2014, 33(7): 909-920.

- [2] CHUNG K Y, RASMUSSEN S G, LIU T, et al. Conformational changes in the G protein Gs induced by the β 2 adrenergic receptor[J]. *Nature*, 2011, 477(7366): 611-615.
- [3] KIM Y I, BANDYOPADHYAY J, CHO I, et al. Nucleolar GTPase NOG-1 regulates development, fat storage, and longevity through insulin/IGF signaling in *C. elegans*[J]. *Mol Cells*, 2014, 37(1): 51-57.
- [4] LUNARDI A, DI MININ G, PROVERO P, et al. A genome-scale protein interaction profile of *Drosophila* p53 uncovers additional nodes of the human p53 network[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(14): 6322-6327.
- [5] YU H, JIN S, ZHANG N, et al. Up-regulation of GTPBP4 in colorectal carcinoma is responsible for tumor metastasis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 480(1): 48-54.
- [6] LAPING N J, OLSON B A, ZHU Y. Identification of a novel nuclear guanosine triphosphate-binding protein differentially expressed in renal disease[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2001, 12(5): 883-890.
- [7] JENSEN B C, WANG Q, KIFER C T, et al. The NOG1 GTP-binding protein is required for biogenesis of the 60 S ribosomal subunit[J]. *J Biol Chem*, 2003, 278(34): 32204-32211.
- [8] KATO J, MATSUSHIME H, HIEBERT S W, et al. Direct binding of cyclin D to the retinoblastoma gene product(pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4[J]. *Genes Dev*, 1993, 7(3): 331-342.
- [9] SHERR C J, BEACH D, SHAPIRO G I. Targeting CDK4 and CDK6: from discovery to therapy[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(4): 353-367.
- [10] COLEMAN M L, MARSHALL C J. A family outing: small GTPases cyclin' through G₁[J]. *Nat Cell Biol*, 2001, 3(11): 250-251.
- [11] MUSGROVE E A, CALDON C E, BARRACLOUGH J, et al. Cyclin D as a therapeutic target in cancer[J]. *Nat Rev Cancer*, 2011, 11(8): 558-572.
- [12] SANTARIUS T, SHIPLEY J, BREWER D, et al. A census of amplified and overexpressed human cancer genes[J]. *Nat Rev Cancer*, 2010, 10(1): 59-64.
- [13] GARCEA G, NEAL C P, PATTENDEN C J, et al. Molecular prognostic markers in pancreatic cancer: a systematic review[J]. *Eur J Cancer*, 2005, 41(15): 2213-2236.
- [14] GAUTSCHI O, RATSCHILLER D, GUGGER M, et al. Cyclin D1 in non-small cell lung cancer: a key driver of malignant transformation[J]. *Lung Cancer*, 2007, 55(1): 1-14.

- [15] ARNOLD A, PAPANIKOLAOU A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis[J]. *J Clin Oncol*, 2005, 23(18): 4215-4224.
- [16] ZHANG Q, SAKAMOTO K, WAGNER K U. D-type Cyclins are important downstream effectors of cytokine signaling that regulate the proliferation of normal and neoplastic mammary epithelial cells[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2014, 382(1): 583-592.
- [17] CHILES T C. Regulation and function of cyclin D2 in B lymphocyte subsets[J]. *J Immunol*, 2004, 173(5): 2901-2907.
- [18] MERMELSHTEIN A, GERSON A, WALFISCH S, et al. Expression of D-type cyclins in colon cancer and in cell lines from colon carcinomas[J]. *Br J Cancer*, 2005, 93(3): 338-345.
- [19] TAKANO Y, KATO Y, VAN DIEST P J, et al. Cyclin D2 overexpression and lack of p27 correlate positively and cyclin E inversely with a poor prognosis in gastric cancer cases[J]. *Am J Pathol*, 2000, 156(2): 585-594.
- [20] KATOH Y, KATOH M. Hedgehog signaling pathway and gastric cancer[J]. *Cancer Biol Ther*, 2005, 4(10): 1050-1054.
- [21] KATOH Y, KATOH M. Integrative genomic analyses on GLI1: positive regulation of GLI1 by Hedgehog-GLI, TGF-beta-Smads, and RTK-PI3K-AKT signals, and negative regulation of GLI1 by Notch-CSL-HES/HEY, and GPCR-Gs-PKA signals[J]. *Int J Oncol*, 2009, 35(1): 187-192.
- [22] MALUMBRES M, BARBACID M. Mammalian cyclin-dependent kinases[J]. *Trends Biochem Sci*, 2005, 30(11): 630-641.
- [23] SHERR C J, BEACH D, SHAPIRO G I. Targeting CDK4 and CDK6: from discovery to therapy[J]. *Cancer Discov*, 2016, 6(4): 353-367.
- [24] OLINER J D, PIETENPOL J A, THIAGALINGAM S, et al. Oncoprotein MDM2 conceals the activation domain of tumour suppressor p53[J]. *Nature*, 1993, 362(6423): 857-860.
- [25] MOLL U M, PETRENKO O. The MDM2-p53 interaction[J]. *Mol Cancer Res*, 2003, 1(14): 1001-1008.
- [26] WANG W, ZHAO L J, TAN Y X, et al. MiR-138 induces cell cycle arrest by targeting cyclin D3 in hepatocellular carcinoma[J]. *Carcinogenesis*, 2012, 33(5): 1113-1120.
- [27] WANG X, MENG X, SUN X, et al. Wnt/beta-catenin signaling pathway May regulate cell cycle and expression of cyclin A and cyclin E protein in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cell Cycle*, 2009, 8(10): 1567-1570.

(收稿日期: 2017-06-18 修回日期: 2017-09-26)

(上接第 438 页)

- 体对小鼠急性酒精性肝损伤的保护作用[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(36): 8260-8261.
- [6] 张建, 唐红敏, 刘厚钰, 等. 甘草甜素多相脂质体对非酒精性脂肪肝肝功能的影响[J]. *肝脏*, 2003, 8(3): 30-32.
- [7] 马中春. 甘草甜素对四氯化碳诱发大鼠肝脏损伤的作用及其机制[J]. *毒理学杂志*, 2005, 19(3): 250-251.
- [8] 李龙辉, 李龙江, 汤为学, 等. 甘利欣作用前后体外酒精性脂肪肝细胞模型甘油三酯水平变化及其可能作用机制[J]. *重庆医科大学学报*, 2010, 35(2): 179-182.
- [9] 张红锋, 杨慧萍, 王耀发. 乙醇和软脂酸诱导的脂肪肝离体细胞模型[J]. *华东师范大学学报(自然科学版)*, 2002(4): 88-95.
- [10] 阮雪青. 体外酒精性脂肪肝模型的建立和评价[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [11] SHI D, ZHAN X, YU X, et al. Inhibiting CBI receptors improves lipogenesis in an in vitro non-alcoholic fatty liver disease model[J]. *Lipids Health Dis*, 2014, 13(1): 173.
- [12] KAPIL S, DUSEJA A, SHARMA B K, et al. Genetic polymorphism in CD14 gene, a co-receptor of TLR4 associated with non-alcoholic fatty liver disease[J]. *World J Gastroenterol*, 2016, 22(42): 9346-9355.
- [13] BOONVISUT S, NAKAYAMA K, MAKISHIMA S, et al. Replication analysis of genetic association of the NCAN-CILP2 region with plasma lipid levels and non-alcoholic fatty liver disease in Asian and Pacific ethnic groups[J]. *Lipids Health Dis*, 2016, 15(1): 8.
- [14] DA SILVA R P, KELLY K B, LEONARD K A, et al. Creatine reduces hepatic TG accumulation in hepatocytes by stimulating fatty acid oxidation[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1841(11): 1639-1646.
- [15] TOMIZAWA M, KAWANABE Y, SHINOZAKI F, et al. Elevated levels of alanine transaminase and triglycerides within normal limits are associated with fatty liver[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(3): 759-762.
- [16] SHI H, LUO J, ZHU J, et al. PPAR γ regulates genes involved in triacylglycerol synthesis and secretion in mammary gland epithelial cells of dairy goats[J]. *PPAR Res*, 2013, 2013(6): 310948.
- [17] YOU M, JOGASURIA A, TAYLOR C, et al. Sirtuin 1 signaling and alcoholic fatty liver disease[J]. *Hepatobiliary Surg Nutr*, 2015, 4(2): 88-100.

(收稿日期: 2017-06-22 修回日期: 2017-09-30)