肝癌分子机制研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001325

# HLJ1在肝癌细胞系中的表达及其对肝癌 SK-Hep1 细胞生物学行为的影响

谭茜茜，汤　华

（重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：研究人肝脏 DnaJ-like 蛋白（human liver DnaJ-like protein，HLJ1）在肝癌细胞中的表达，探讨 HLJ1 对肝癌细胞 SK-Hep1 生物学行为的影响。**方法**：首先，qRT-PCR 和 Western blot 检测 HLJ1 在肝癌细胞中的表达情况。其次，过表达或干扰 HLJ1 后转染 SK-Hep1 细胞株，MTS 和克隆形成实验检测细胞增殖能力的变化；流式细胞术检测细胞早期凋亡率；划痕实验检测细胞迁移能力；Transwell 小室检测细胞侵袭能力的变化。**结果**：qRT-PCR 和 Western blot 结果显示 HLJ1 的 mRNA 水平和蛋白水平在 3 种肝癌细胞系中均呈低表达。MTS 和克隆形成结果显示 HLJ1 能抑制肝癌细胞的增殖。流式细胞术结果显示 HLJ1 能促进细胞早期凋亡。划痕和 Transwell 实验显示，HLJ1 能抑制肝癌细胞的迁移和侵袭。**结论**：HLJ1 在肝癌细胞系中低表达，且能抑制 SK-Hep1 细胞增殖、迁移和侵袭，促进细胞凋亡。

【关键词】肝癌；SK-Hep1；人肝脏 DnaJ-like 蛋白；生物学行为

【中图分类号】R735.7　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2017-02-16

# Expression of HLJ1 in hepatocellular carcinoma cell lines and its biologic function in SK-Hep1

*Tan Xixi, Tang Hua*

(*Key Laboratory of Molecular Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To investigate the expression of HLJ1 in hepatocellular carcinoma (HCC) cells and to explore the effect of HLJ1 on the biological behavior in SK-Hep1cells. ***Methods***: The expressions of HLJ1 mRNA and protein were determined by qRT-PCR and Western blot in hepatocellular carcinoma cells(SMMC-7721, SK-Hep1 and HepG2). MTS, Colony formation and apoptosis assay were performed to determine the cell proliferation and apoptosis; wound healing and Transwell assay were used to detect the migration and invasion in SK-Hep1. ***Results***: qRT-PCR showed HLJ1 mRNA expression were lower in HCC cell lines, and HLJ1 protein level was also lower in HCC cell lines; MTS and Colony formation assay indicated HLJ1 decreased HCC cells proliferation. FCM showed that HLJ1 promoted cell apoptosis. Wound healing and Transwell assay revealed HLJ1 inhibited HCC cell migration. ***Conclusion***: HLJ1 is low expression in HCC cell lines, which could inhibit the proliferation, migration and invasion, while promote cell apoptosis in SK-Hep1.

【Key words】hepatocellular carcinoma; SK-Hep1; human liver DnaJ-like protein; biologic function

肝癌（hepatocellular carcinoma，HCC）是全球第五大常见肿瘤，是导致死亡的第三大癌症[1]。我国肝癌发病率和死亡率均高于世界平均水平，术后复发和侵袭转移是促使肝癌高死亡率的主要原因[2]。肝癌的发生发展是一个复杂的渐进过程，涉及很多基因和信号分子的改变，从而构成一个复杂的分子谱[3]。随着分子生物学的快速发展，进一步研究肝癌相关的基因改变、探明其发生发展的分子机制，对于诊断、治疗肝癌，判断预后，实行精准医疗提供新的方法。

人肝脏 DnaJ-like 蛋白（human liver DnaJ-like protein，HLJ1）是 DnaJ 类热休克蛋白 40（Hsp40）家

作者介绍：谭茜茜，Email：344896471@qq.com，研究方向：HLJ1 对肝癌发生发展的影响。

通信作者：汤　华，Email：tanghua86162003@cqmu.edu.cn。

基金项目：重庆医科大学培育基金资助项目（编号：201416）；重庆市渝中区科技计划项目基础与前沿研究计划资助项目（编号：20140122）。

优先出版：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170622.1632.034.html（2017-06-22）

族成员之一，定位于人类染色体 1p31.1，由 337 个氨基酸残基组成，分子量约 38 kD[4]。有学者报道 HLJ1 存在一个可以增强其转录活性的区域，此区域有 4 个转录因子 YY1 结合位点，YY1 过表达能增强其启动子活性[5]。目前，HLJ1 的研究主要集中在结直肠癌和非小细胞肺癌，HLJ1 低表达与肿瘤预后不良显著相关[6-8]。本课题组前期研究表明 HBV 可以诱导转录因子 YY1 的表达，继而使 HLJ1 启动子激活使 HLJ1 表达上调，提示 HLJ1 可能在肝癌的发展过程中发挥作用[9]。本研究了解 HLJ1 在肝癌细胞株中的表达量，通过过表达或干扰 HLJ1 后转染肝癌 SK-Hep1 细胞株，探讨 HLJ1 对 SK-Hep1 细胞生物学行为的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

正常肝细胞系 L-02、肝癌细胞系（SMMC-7721，SK-Hep1 and HepG2）为本实验室保存；DMEM 细胞培养基购自 Hyclone 公司；FBS 购自 Gibco 试剂公司；去内毒素质粒抽提试剂盒购自 OMEGA 公司；Lipofectamine2000 购自 Invitrogen 公司；pcDNA5/FRT/TO V5 HLJ1 购自 Addgene 公司；siHLJ1 由 Biotend 公司合成；逆转录试剂和定量 PCR 试剂盒均购自 Takara 公司；anti-HLJ1 和 anti-β-tubulin 购自 Proteintech；MTS 试剂购自 Promega 公司；克隆形成定量检测试剂盒购自 Gen Med Scientifics 公司；Transwell 小室购自 Costar 公司。

### 1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 将肝癌细胞 SK-Hep1 置于 37 ℃，5% $CO_2$ 和常规湿度的细胞培箱中，500 mL DMEM 基础培养基加入 50 mL FBS、1%青霉素/链霉素。根据细胞的生长状况及后续实验目的取对数生长期的细胞及时换液和传代。

1.2.2 细胞转染 分为过表达质粒转染（对照组 pCMV sport6 和实验组 pcDNA5/FRT/TO V5 HLJ1）和干扰 RNA 转染（对照组 siNC 和 siHLJ1）。转染前 1 d，将 SK-Hep1 细胞接种于 6 孔板，待第 2 天细胞密度至 70%~90%。吸取 7.5 μL Lipofectamine2000 加入 100 μL OPTI-MEM 中混匀得混合物 1，吸取 2.5 μg 质粒（或 75 pmol siRNA）加入 100 μL OPTI-MEM 中混匀得混合物 2，将混合物 1 和 2 混匀，室温孵育 25 min，将 6 孔板中培养基换成 400 μL 无血清无抗性的 OPTI-MEM，再加入 200 μL 上述混合液，放入培养箱 5~6 h 更换为完全培养基，24~48 h 后进行后续实验。

1.2.3 qRT-PCR 检测 HLJ1 mRNA 的表达 采用 Trizol 提取总 RNA，利用 Takara 试剂盒逆转录 RNA 成 cDNA 再进行 qRT-PCR。实验组相对于对照组表达量的变化倍数用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。HLJ1 上游引物：5'-AAAGGCTAAACGCTGATG-3'，下游引物：5'-AACAATGTCTGCTGGAAT-3'，内参 GAPDH 上游引物：5'-CGACCACTTTGTCAAGCTCA-3'，下游引物：5'-AGGGGTCTACATGGCAACTG-3'。该实验至少做 3 次。

1.2.4 Western blot 检测 HLJ1 蛋白的表达 按照碧云天试剂盒提取蛋白，10%~12%SDS-PAGE 凝胶电泳，再电转至 PVDF 膜，5%脱脂牛奶室温封闭 1 h，一抗（兔抗 HLJ1/鼠抗 β-tubulin）4 ℃孵育过夜，TBST 室温摇床洗膜 3×10 min，加入二抗 37 ℃孵育 1~2 h，加 ECL 显色液后凝胶成像系统显色。β-tubulin 为内参。该实验至少做 3 次。

1.2.5 MTS 法检测细胞增殖 将转染过表达质粒或 siRNA 的 SK-Hep1 细胞铺于 96 孔板，100 μL 细胞悬液中含细胞数约 4 000 个/孔。待细胞全部贴壁后，加入 20 μL MTS 试剂，继续孵育 2 h，用酶标仪在 490 nm 处测吸光度（absorbance，A）值，记为 24 h 数值，并依次测定 48、72、96 h 的 A 值（每天同一时间测量），分析结果。该实验至少做 3 次。

1.2.6 克隆形成实验检测细胞增殖 将转染过表达质粒或 siRNA 的 SK-Hep1 细胞铺在 6 孔板里，细胞数约 10 000 个/孔，根据细胞生长状况更换培养基。培养 4 d 后，细胞呈 1 个个肉眼可见的细胞团，取出 6 孔板，倒掉培养基，按照试剂盒说明书进行染色，取 1 mL A 液洗细胞 2 次，吸掉 A 液后，加入 B 液室温染色 20 min，再用 PBS 洗 3 次，晾干，拍照；定量检测时再加入 1.5 mL C 液室温孵育 5 min，测量 570 nm 处 A 值。该实验至少做 3 次。

1.2.7 Annexin V-FITC/PI 双标记流式细胞术检测细胞凋亡 将转染过表达质粒或 siRNA 的 SK-Hep1 细胞以 $2\times10^5$ 个/孔铺于 6 孔板内，用胰酶消化细胞，离心收集上述各组细胞，用预冷 PBS 洗 1 次，再用 PBS 直接悬浮细胞即刻送生科院检测细胞凋亡。

1.2.8 Transwell 侵袭实验检测细胞侵袭能力 将转染过表达质粒或 siRNA 的 SK-Hep1 细胞稀释成 $3\times10^5$ 个/mL 细胞悬液。将 Transwell 小室置于 24 孔板内，上室加入 100 μL 无血清培养基细胞悬液，下室加入 800 μL 含 10% FBS 的 DMEM，常规培养 24 h，用棉签擦去上室内的细胞，PBS 洗 2 次，4%多聚甲醛固定 30 min，结晶紫染 10 min，然后用 PBS 洗净，在 200× 倒置显微镜下分别计数穿膜细胞并拍照，随机选取 3 个视野取均值。

1.2.9 划痕实验检测细胞迁移能力 将转染过表达质粒或 siRNA 的 SK-Hep1 细胞以 $2\times10^5$ 个/孔铺于 6 孔板内，密度为 70%~90%，待细胞全部贴壁后，用 200 μL 枪头在 6 孔板内底部划一条直线，PBS 洗净游离细胞，更换完全培养基为 2% FBS 的 DMEM，显微镜下拍照，记为 0 h，并依次拍摄 24、48 h 的划痕距离变化（每天同一时间拍摄），计算 SK-Hep1 细胞的相对迁移距离比[(0 h 距离-48 h 距离)/0 h 距离)]来分析细胞迁移能力的变化。

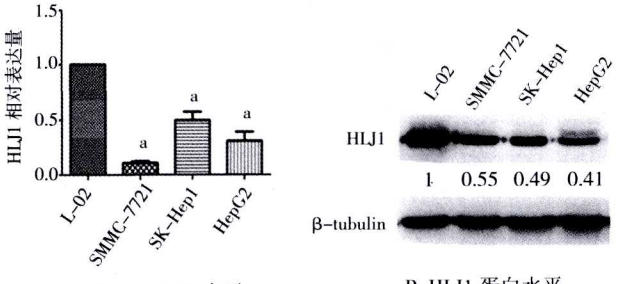
### 1.3 统计方法

数据采用 SPSS 19.0 统计软件进行分析，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，2 组均数间比较采用独立样本 $t$ 检验分析，多组均数间比较采用单因素方差分析，检验水准分别选取 $\alpha$=0.05 或 $\alpha$=0.01。

## 2 结 果

### 2.1 HLJ1 在肝癌细胞系中低表达

采用 qRT-PCR 和 Western blot 检测 HLJ1 在正常肝细胞系 L-02 和不同肝癌细胞系（SMMC-7721，SK-Hep1 and HepG2）中的表达情况。qRT-PCR 结果显示：HLJ1 mRNA 表达水平在 3 种肝癌细胞中（SMMC-7721：0.107 ± 0.015；SK-Hep1：0.497 ± 0.077；HepG2：0.307 ± 0.086）均较正常肝细胞系 L-02（1.002 ± 0.002）明显降低，差异有统计学意义（SMMC-7721：$t$=60.310，$P$=0.000；SK-Hep1：$t$=6.600，$P$=0.003；HepG2：$t$=8.121，$P$=0.001，图 1A）。Western blot 结果显示 HLJ1 蛋白水平在不同肝癌细胞系中亦呈低表达（$F$=159.400，$P$=0.000，图 1B）。




A. HLJ1 mRNA 水平　　B. HLJ1 蛋白水平

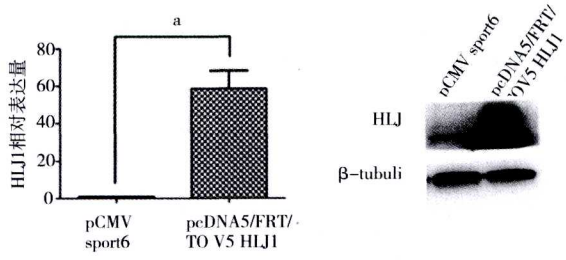
a：与 L-02 比较，$P$<0.01

**图 1 HLJ1 在正常肝细胞系和不同肝癌细胞系中的表达**

Fig.1 Expression of HLJ1 in HCC cells compared with the hepatic immortal cell line

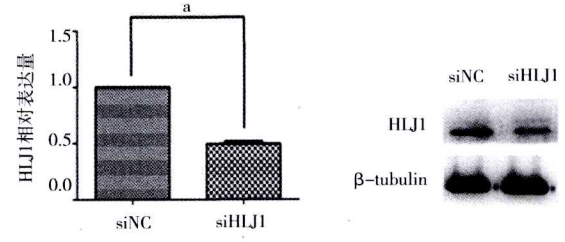
### 2.2 SK-Hep1 细胞中转染 HLJ1 过表达质粒或 siHLJ1 后转染效率检测

SK-Hep1 细胞瞬时转染 pcDNA5/FRT/TO V5 HLJ1 后，qRT-PCR 结果显示 HLJ1 mRNA 表达水平相对于对照组 pCMV sport6[(58.580 ± 9.741) vs. (1.007 ± 0.004)]明显增加，差异有统计学意义（$t$=5.910，$P$=0.004）；Western blot 结果显示 HLJ1 蛋白表达量相对于对照组也明显增加（图 2A）。转染 siHLJ1 后，SK-Hep1 细胞中 HLJ1 mRNA 的表达水平相对于对照组 siNC 明显降低[(0.494 ± 0.022) vs. (1.001 ± 0.000)]，差异有统计学意义（$t$=23.560，$P$=0.000）；转染 siHLJ1 后蛋白表达量也明显下调（图 2B）。




a：与 pCMV sport6 组比较，$P$<0.01

A. HLJ1 过表达效果




a：与 siNC 组比较，$P$<0.01

B. HLJ1 干扰效果

**图 2 HLJ1 的过表达效率和干扰效率**

Fig.2 Expression of HLJ1 in SK-Hep1 cells after overexpression or siHLJ1

### 2.3 HLJ1 抑制 SK-Hep1 细胞增殖

MTS 检测过表达或干扰 HLJ1 后 SK-Hep1 细胞增殖能力的变化为：转染 pcDNA5/FRT/TO V5 HLJ1 72 h 后，检测 $A_{490\ nm}$ 为（0.939 ± 0.013），与对照组 pCMV sport6（1.159 ± 0.024）相比，细胞增殖能力减弱，差异有统计学意义（$t$=8.173，$P$=0.001）；转染 96 h 后抑制作用仍持续存在，过表达 HLJ1 组（1.101 ± 0.024）与对照组（1.323 ± 0.040）相比有统计学意义（$t$=4.753，$P$=0.009），如图 3A、表 1 所示。转染 siHLJ1 72 h 后，$A_{490\ nm}$ 为（0.869 ± 0.011），与对照组 siNC（0.795 ± 0.013）相比促进了 SK-Hep1 细胞生长，差异有统计学意义（$t$=4.345，$P$=0.012）；96 h 后增强作用仍持续存在，siHLJ1（1.286 ± 0.033）与 siNC（1.053 ± 0.029）相比有统计学意义（$t$=5.291，$P$=0.006），

**表 1 过表达 HLJ1 细胞的增殖活性（$A_{490\ nm}$）**

Tab.1 Detection of cell proliferation activity after overexpression HLJ1（$A_{490\ nm}$）

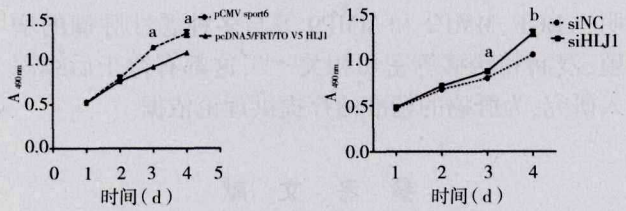
| 组别 | 24 h 测定值 | 48 h 测定值 | 72 h 测定值 | 96 h 测定值 |
|---|---|---|---|---|
| pCMV sport6 | 0.535 ± 0.022 | 0.805 ± 0.030 | 1.159 ± 0.024 | 1.323 ± 0.040 |
| pcDNA5/FRT/TO V5 HLJ1 | 0.525 ± 0.007 | 0.772 ± 0.018 | 0.939 ± 0.013 | 1.101 ± 0.024 |
| $t$ 值 | 0.428 | 0.958 | 8.173 | 4.753 |
| $P$ 值 | 0.691 | 0.393 | 0.001 | 0.009 |

如图 3A、表 2 所示。克隆形成实验检测过表达或干扰 HLJ1 后，SK-Hep1 细胞增殖能力的变化为：转染 pcDNA5/FRT/TO V5 HLJ1 72 h 后，细胞增殖能力减弱，检测 $A_{570\ nm}$ 为（0.195 ± 0.016），与对照组 pCMV sport6（0.473 ± 0.051）相比抑制了细胞增殖，差异有统计学意义（$t$=5.216，$P$=0.006，图 3B）。转染siHLJ1 72 h 后，$A_{570\ nm}$ 为（0.658 ± 0.058），与对照组 siNC（0.371 ± 0.024）相比细胞增殖能力提高，差异有统计学意义（$t$=4.531，$P$=0.011，图 3B）。

表 2　干扰 HLJ1 细胞的增殖活性（$A_{490\ nm}$）

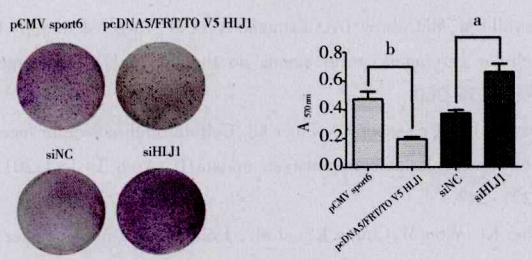
Tab.2　Detection of cell proliferation activity after siHLJ1（$A_{490\ nm}$）

| 组别 | 24 h 测定值 | 48 h 测定值 | 72 h 测定值 | 96 h 测定值 |
|---|---|---|---|---|
| siNC | 0.466 ± 0.017 | 0.675 ± 0.014 | 0.795 ± 0.013 | 1.053 ± 0.029 |
| siHLJ1 | 0.479 ± 0.021 | 0.714 ± 0.019 | 0.869 ± 0.011 | 1.286 ± 0.033 |
| $t$ 值 | 0.477 | 1.624 | 4.345 | 5.291 |
| $P$ 值 | 0.658 | 0.180 | 0.012 | 0.006 |




a：与 pCMV sport6 组比较，$P$<0.05；
b：与 siNC 组比较，$P$<0.05

A. MTS 实验




a：与 siNC 组比较，$P$<0.01；
b：与 pCMV sport6 组比较，$P$<0.01

B. 克隆形成实验

**图 3　过表达和干扰 HLJ1 后 SK-Hep1 细胞增殖能力的检测**

**Fig.3　Detection of cells proliferation after overexpression HLJ1 or siHLJ1 by MTS and colony formation assay in SK-Hep1 cells**

## 2.4　HLJ1 促进 SK-Hep1 细胞凋亡

将过表达或干扰 HLJ1 后的 SK-Hep1 细胞用流式细胞术检测其对细胞凋亡的影响。结果显示，转染 pcDNA5/FRT/TO V5 HLJ1 后能够促进 SK-Hep1 细胞早期凋亡率（16.32%），与对照组早期凋亡率（7.01%）相比提高了 2.33 倍（图 4）。干扰 HLJ1 后早期凋亡率为 2.49%，对照组 siNC 早期凋亡率为 4.03%（图 4）。表明 HLJ1 抑制 SK-Hep1 细胞增殖可能通过诱导细胞凋亡实现。

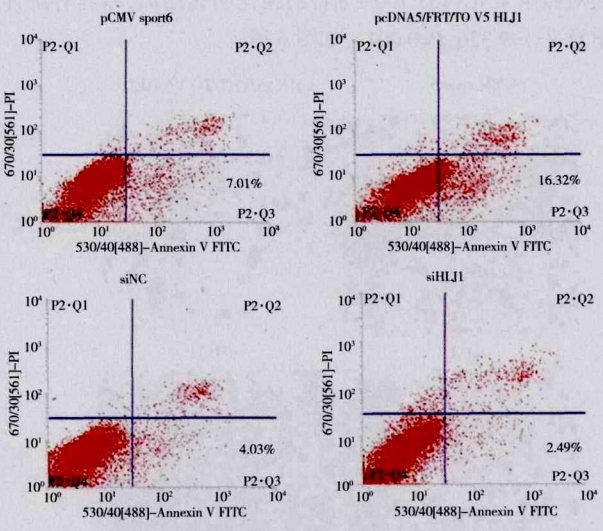
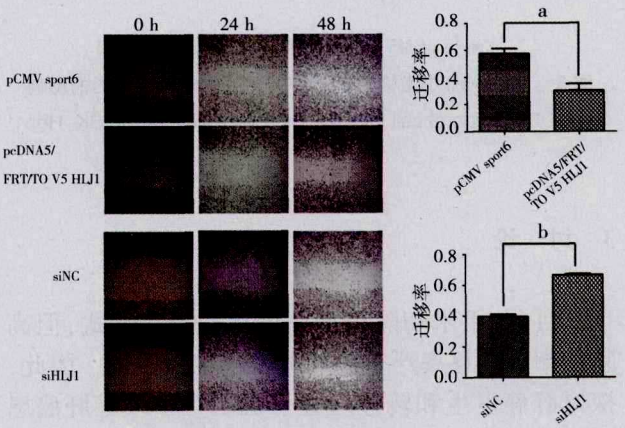



**图 4　过表达或干扰 HLJ1 后对 SK-Hep1 细胞凋亡的影响**

**Fig.4　Effect of HLJ1 on apoptosis in SK-Hep1 cells**

## 2.5　HLJ1 抑制 SK-Hep1 细胞迁移

划痕实验结果显示，转染 pcDNA5/FRT/TO V5 HLJ1 后的相对迁移距离比（0.302 ± 0.049）与对照组（0.573 ± 0.037）相比，SK-Hep1 细胞迁移能力明显减弱，差异有统计学意义（$t$=4.379，$P$=0.012，图 5A）。而 siHLJ1 相对迁移距离比为0.666 ± 0.006（siNC 为 0.393 ± 0.015），SK-Hep1 细胞的迁移能力明显增强，差异有统计学意义（$t$=16.740，$P$=0.000，图 5B）。




a：与 pCMV sport6 组比较，$P$<0.05；b：与 siNC 组比较，$P$<0.01

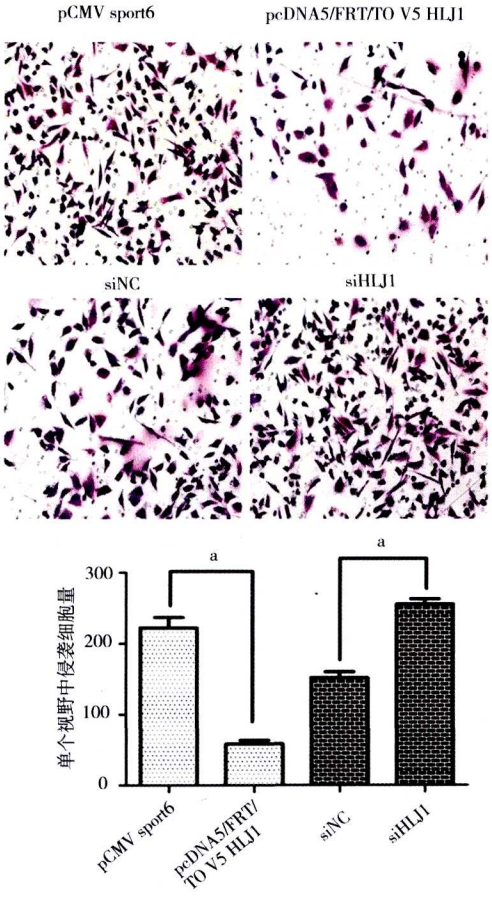
**图 5　划痕实验检测 HLJ1 对 SK-Hep1 迁移能力的影响**

**Fig.5　Detection of cell migration by scratch assay in SK-Hep1**

## 2.6　HLJ1 抑制 SK-Hep1 细胞侵袭

接下来利用 Transwell 小室检测细胞侵袭能力的变化。结果显示，转染 pcDNA5/FRT/TO V5 HLJ1 后与对照组相比，SK-Hep1 细胞侵袭能力明显减弱，穿膜细胞个数为（58.00 ± 5.686），与对照组（222.0 ± 15.14）相比差异有统计学意义（$t$=10.140，$P$=0.001）。同时，siHLJ1 穿膜细胞数为（255.300 ± 7.535），

与对照组 siNC(151.700 ± 8.172)相比明显增加，差异有统计学意义($t$=9.326，$P$=0.001)，如图 6 所示。




a：与 pCMV sport6 组或 siNC 组比较，$P$<0.01

**图 6 Transwell 小室检测 HLJ1 对 SK-Hep1 侵袭能力的影响**

**Fig.6 Detection of cell invasion by transwell assay in SK-Hep1**

## 3 讨 论

目前，手术切除仍是肝癌首选治疗方式，但高复发率和转移率严重影响患者的生活质量。因此，探讨肝癌发生和转移的分子机制对于改善肝癌患者的生存具有重要现实意义[10]。

HLJ1 作为抑癌基因，具有抑制细胞生长、增殖、侵袭、迁移，促进细胞凋亡，参与细胞周期调控等作用，并与肿瘤的复发和转移密切相关。研究发现，非小细胞肺癌和结直肠癌中 HLJ1 呈低表达，且与患者预后不良密切相关[6-8]。在非小细胞肺癌中，二甲基亚砜 DMSO 可通过激活蛋白(AP-1)调控 HLJ1的生物学功能[11]。HLJ 能够上调 STAT1 和 P21WAF1的表达，同时下调 Cyclin D1，通过 STAT1 和P21WAF1 途径减缓细胞分裂和肿瘤细胞生长[8]。研究指出，HLJ1 的低表达可导致上皮性钙黏附蛋白 E(ecadherin，E-Cad)的上调，这是上皮-间充质转化的关键环节，肿瘤的侵袭转移密切相关[12]。HLJ1 还可以通过加强c-jun 氨基端激酶活性和激酶 Caspase-3 来促进细胞凋亡，并通过影响肌动蛋白的聚合重组进而调控肿瘤细胞的侵袭和迁移[13]。

大量研究结果证实 HLJ1 作为抑癌基因在多种肿瘤中发挥抑制作用，本研究提示 HLJ1 与正常肝细胞相比，在 3 种肝癌细胞系中显著低表达，且抑制肝癌细胞 SK-Hep1 增殖、迁移和侵袭，促进细胞凋亡等生物学行为。在后续的实验中发现，过表达 HLJ1 后，血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor，VEGF)、基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2，MMP2)和基质金属蛋白酶-9(matrix metalloproteinase-9，MMP9)等基因 mRNA水平下降，干扰 HLJ1 后表达水平有所回升。大量研究表明，VEGE、MMP2 和 MMP9 等与多种恶性肿瘤的增殖、浸润和转移等密切相关[14-15]，这都有待于后续深入研究，为肝癌的精准治疗提供理论依据。

## 参 考 文 献

[1] Jemal A，Bray F，Center MM，et al. Global cancer statistics[J]. CA Cancer J Clin，2011，6192)：69-90.

[2] Cervello M，McCubrey JA，Cusimano A，et al. Targeted therapy for hepatocellular carcinoma：novel agents on the horizon[J]. Oncotarget，2012，3(3)：236-260.

[3] Aravalli RN，Cressman EN，Steer CJ. Cellular and molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma：an update[J]. Arch Toxicol，2013，87(2)：227-247.

[4] Hoe KL，Won M，Chung KS，et al. Isolation of a new member of DnaJ-like heat shock protein 40(Hsp40) from human liver[J]. Biochimica et Biophysica Acta，1998，1383(1)：4-8.

[5] Wang CC，Tsai MF，Hong TM，et al. The transcriptioional factor YY1 upregulates the novel invasion suppressor HLJ1 expression and inhibits cancer cell invasion[J]. Oncogene，2005，24(25)：4081-4093.

[6] Liu Y，Zhou J，Zhang C，et al. HLJ1 is a novel biomarker for colorectal carcinoma progression and overall patient survival[J]. Int J Clin Exp Pathol，2014，7(3)：969-977.

[7] Tsai MF，Wang CC，Chen JJ. Tumour suppressor HLJ1：a potential diagnostic，preventive and therapeutic target in non-small cell lung cancer[J]. World J Clin Oncol，2014，5(5)：865-873.

[8] sai MF，Wang CC，Chang GC，et al. A new tumor suppressor Dna J-like heat shock protein，HLJ1，and survival of patients with non-small-cell lung carcinoma[J]. J Natl Cancer Inst，2006，98(12)：825-838.

[9] Zhang L，Cai X，Chen K，et al. Hepatitis B virus protein up-regulated HLJ1 expression via the transcription factor YY1 in human hepa-

肝癌分子机制研究

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001347

# 组蛋白去乙酰化酶抑制剂 FK228 治疗小鼠肝硬化的实验研究

李梦辉[2]，周恒宇[1]，刘迪娜[1]，蔡　莹[1]，龚建平[2]，唐　霓[1]，黄爱龙[1]，夏　杰[1]
（1. 重庆医科大学感染性疾病分子生物学教育部重点实验室，重庆　400016；
2. 重庆医科大学第二附属医院肝胆外科，重庆　400016）

【摘　要】**目的**：观察组蛋白去乙酰化酶抑制剂罗米地辛（Romidepsin，FK228）对四氯化碳（carbon tetrachloride，$CCl_4$）诱导小鼠肝纤维化模型的治疗性作用，初步探讨 FK228 对减轻小鼠肝纤维化的机制。**方法**：将 30 只 8 周龄 C57BL/6 雄性小鼠随机分为对照组、造模组和治疗组，每组 10 只；对照组腹腔注射生理盐水；造模组腹腔注射 10% CCl4 溶液诱导肝纤维化，持续 24 周；治疗组在诱导纤维化第 20 周开始采用 FK228 进行治疗。检测各组小鼠血清谷丙转氨酶（alanine aminotransferase，ALT）、谷草转氨酶（aspartate transaminase，AST）含量水平；对肝组织进行 HE 染色和天狼星红染色，观察假小叶形态结构；进行 α-平滑肌肌动蛋白（α-smooth muscle actin，α-SMA）免疫组化染色，观察肝星状细胞活化程度及肝纤维化进程；Western blot 半定量分析 α-SMA 蛋白在肝脏中的表达情况。**结果**：造模组血清 ALT（67.270 ± 11.109）IU/L，而治疗组小鼠的血清 ALT（37.670 ± 8.461）IU/L 显著下降（$P$=0.019）；肝组织切片 HE 染色和天狼星红染色显示造模组纤维化程度高、假小叶形成明显，而治疗组纤维化程度明显减弱；免疫组化染色和 Western blot 结果显示治疗组 α-SMA 水平相对于造模组明显降低（$P$=0.001）。**结论**：研究结果首次证实 FK228 对降低小鼠肝纤维化程度有治疗性作用，而且其机制可能与抑制星状细胞活化和降低 α-SMA 蛋白表达水平有关。

【关键词】组蛋白去乙酰化酶抑制剂；FK228；肝纤维化；α-平滑肌肌动蛋白
【中图分类号】R322.47　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2017-02-15

# Experimental study of romidepsin in reducing liver cirrhosis

*Li Menghui*[2], *Zhou Hengyu*[1], *Liu Dina*[1], *Cai Ying*[1], *Gong Jianping*[2], *Tang Ni*[1], *Huang Ailong*[1], *Xia Jie*[1]
(*1. Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Diseases Founded by Ministry of Education, Chongqing Medical University; 2. Department of Liver, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】***Objective***: To observe the effect of histone deacetylase inhibitor romidepsin (FK228) on liver cirrhosis in mice, and to investigate the underlying mechanism of renoprotective effect of FK228. ***Methods***: Thirty experimental mice were randomly divided into three groups: control group (group A), model group (group B) and treatment group (group C). To set up the liver cirrhosis model, mice in group B and C were treated with intraperitoneal injection of CCl4 for 24 weeks. From the 21th week, group C were treated with intraperitoneal injection of FK228 weekly. The levels of serum ALT and AST were detected

**作者介绍**：李梦辉，Email：lmh979913595@hotmail.com，研究方向：肝脏疾病。
**通信作者**：夏　杰，Email：xiajie2014@foxmail.com。
**基金项目**：国家自然科学基金资助项目（编号：81602045、81471946）；重庆市科学技术委员会资助项目（编号：cstc2016jcyjA0206）；重庆医科大学"优秀青年学者"资助项目（编号：CYYQ201503）。
**优先出版**：http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20170626.1145.016.html（2017-06-26）

tocarcinoma cell[J]. Virus Res, 2011, 157(1): 76-81.
[10] 吕桂帅，陈　磊，王红阳. 我国肝癌研究的现状与前景[J]. 生命科学，2015，27(3)：237-248.
[11] Wang CC, Lin SY, Lai YH, et al. Dimethylsulfoxide promotes the multiple functions of the tumor suppressor HLJ1 through activator protein-1 activation in NSCLC cells[J]. PLOS One, 2012, 7(4): e33772.
[12] Bremnes RM, Veve R, Hirsch FR, et al. The E-cadherin cell-cell adhesion complex and lung cancer invasion, metastasia, and prognosis [J]. Lung Cancer, 2002, 36(2): 115-124.
[13] Lin SY, Hsueh CM, Yu SL, et al. HLJ1 is a novel caspase-3 substrate and its expression enhances UV-induced apoptosis innon-small cell lung carcinoma[J]. Nucleic Acids Res, 2010, 38(18): 6148-6158.
[14] Bianco R, Rosa R, Damiano V, et al. Vascular endothelial growth-factor receptor-1 contributes to resistance to antiepidermal growth factor receptor drugs in human cancer cells[J]. Clin Cancer Res, 2008, 14(16): 5069-5080.
[15] Ozaki I, Mizuta T, Zhao G, et al. Induction of multiple matrix metalloproteinase genes in human hepatocellular carcinoma by hepatocyte growth factor via a transcription factor Ets-1[J]. Hepatol Res, 2003, 27(4): 289-301.

（责任编辑：张辉洁）