肝癌分子机制研究 DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.001314

GSTZ1重组腺病毒的构建及影响肝癌细胞迁移能力的研究

杨　翼,李晶晶,梁　利,高庆祝,郑亚秋,潘　娥,汪　凯,唐　霓,单幼兰
(重庆医科大学附属第二医院传染科、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**:构建人谷胱甘肽-S-转移酶 Z1(glutathione S-transferase zeta 1,GSTZ1)重组腺病毒,并初步研究 GSTZ1 调控粘附连接信号通路(adhesion junction pathway)靶基因 SMAD3、IGF1R 等影响肝癌细胞的迁移能力。**方法**:PCR 扩增 GSTZ1 cDNA 序列并克隆到腺病毒载体 pAdTrack-TO4,构建重组腺病毒质粒 pAdTrack-GSTZ1,将重组质粒用 Lipofectamine 2000 转染至 HEK293 细胞中,包装、扩增成高滴度重组腺病毒 AdGSTZ1。首先,将 SMMC-7721 细胞设为 3 组:Mock 组、AdGFP 组和AdGSTZ1 组,Mock 组为空白对照组,AdGFP 组为感染腺病毒 AdGFP 的对照组,AdGSTZ1 组为感染腺病毒 AdGSTZ1 的实验组。然后,通过 Transwell 实验和 MTS 实验观察其对肝癌细胞迁移增殖能力的影响,进一步经 qRT-PCR 及 Western blot 技术研究GSTZ1通过调控粘附连接信号通路关键分子影响肝癌细胞的迁移。**结果**:成功构建了高滴度重组腺病毒 AdGSTZ1,经 Western blot 鉴定 GSTZ1 在 SMMC-7721 细胞中的表达。Transwell 实验结果表明,AdGSTZ1 组与 Mock 组及 AdGFP 组相比,能够明显抑制人肝癌细胞的迁移能力;与 Mock 组相比,抑制率为(68.10 ± 1.63)%(P=0.000),与 AdGFP 组相比,抑制率为(50.70 ± 0.99)%(P=0.000)。MTS 实验结果表明,AdGSTZ1 组在 72 h 和 96 h 的吸光度值分别为(1.13 ± 0.08)和(1.28 ± 0.07),AdGFP 组 72 h 和 96 h 的吸光度值分别为(1.28 ± 0.03)和(1.45 ± 0.03),AdGSTZ1 组在 96 h 的吸光度值与对照组相比明显降低,差异有统计学意义(P<0.01)。另外 qRT-PCR 及 Western blot 结果显示,与 Mock 组和 AdGFP 组相比,AdGSTZ1 感染细胞内粘附连接信号通路中靶基因 SMAD3、IGF1R 等的表达明显降低。qRT-PCR 结果显示,AdGSTZ1 组与 AdGFP 组相比,TGFBR1 相对表达量为(0.58 ± 0.13)(t=4.609,P=0.010),SMAD3 相对表达量为(0.51 ± 0.08)(t=8.030,P=0.000),ERBB2 相对表达量为(0.46 ± 0.09)(t=9.384,P=0.000),IGF1R 相对表达量为(0.45 ± 0.02)(t=14.480,P=0.000),FARP2 相对表达量为(0.37 ± 0.13)(t=7.082,P=0.028)。Western blot 表明,SMAD3 组中,AdGFP 组的蛋白相对表达量为(0.96 ± 0.18),AdGSTZ1 实验组的蛋白相对表达量(0.39 ± 0.01)(P=0.001)。IGF1R 组中,AdGFP 组的蛋白相对表达量为(0.97 ± 0.05),AdGSTZ1 实验组的蛋白相对表达量(0.44 ± 0.02)(P=0.000)。**结论**:GSTZ1 通过调控粘附连接信号通路相关靶基因的表达抑制肝癌细胞的迁移。

【关键字】GSTZ1;SMMC-7721 细胞;粘附连接信号通路;肝癌;细胞迁移
【中图分类号】R73-3　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2016-10-21

Construction of GSTZ1 recombinant adenovirus and its effect on migration of hepatocarcinoma cells

Yang Yi, Li Jingjing, Liang Li, Gao Qingzhu, Zheng Yaqiu, Pan E, Wang Kai, Tang Ni, Shan Youlan
(Department of infectious Diseases, the Second Affiliated Hospital and The Key Laboratory of Molecular Biology on Infectious Diseases, Ministry of Education, Chongqing Medical University)

【Abstract】***Objective***:To observe the effects of Glutathione S-transferase Zeta 1(GSTZ1) gene on cell migration through regulating target genes of adhesion junction signal pathway such as SMAD3 and IGF1R. ***Methods***:The GSTZ1 cDNA sequence was amplified and cloned into adenoviral plasmid pAdTrack-TO4. Recombinant adenovirus plasmid pAdTrack-GSTZ1 was transfected into HEK-293 cells to package and generate high titer recombinant adenoviruses encoding GSTZ1(Ad-GSTZ1). First, the SMMC-7721 cells were set into three groups, which Mock group as blank control group, AdGFP group as control group infected with adenovirus AdGFP, AdGSTZ1 group as experimental group infected with adenovirus AdGSTZ1. The effect on the migration of hepatocarcinoma cells was observed by Transwell assay, the effect on the proliferation was observed by MTS assay. Further, genes in adhesion junction signal pathway were analyzed by qRT-

作者介绍:杨　翼,Email:yangyi199006@163.com,
研究方向:GSTZ1 在肝癌发生发展过程中的重要作用。
通信作者:单幼兰,Email:shanyoulan11@163.com。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:81602417、81572683、81371827);重庆市科委基础与前沿重点资助项目(编号:cstc2015jcyjBX0011);重庆高校创新团队建设计划资助项目(编号:CXTDX201601015)。
优先出版:http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1046.R.20170518.0938.002.html (2017-06-22)

PCR and Western blot. ***Results***: A high-titer recombinant adenovirus AdGSTZ1 was successfully constructed. Western blot showed GSTZ1 overexpression in AdGSTZ1 infected cells. GSTZ1 inhibited the migration of hepatocarcinoma cells significantly compared with Mock and AdGFP control group. The inhibition rate of AdGSTZ1 group was (68.10 ± 1.63)%(P=0.000) and (50.7 ± 0.99)%(P=0.000) compared with Mock group and AdGFP control respectively. MTS assay showed that the absorbance values at 490 nm were decreased at 96 h compared with AdGFP. In addition, qRT-PCR and Western blot showed that the expressions of genes in adhesion junction signal pathway such as SMAD3, IGF1R were significantly decreased in AdGSTZ1 infected cells than in Mock and AdGFP infected cells. qRT-PCR showed that compared with those of AdGFP control group, in AdGSTZ1 group the relative expression of TGFBR1 was (0.58 ± 0.13)(t=4.609, P=0.010), the relative expression of SMAD3 was (0.51 ± 0.08)(t=8.030, P=0.000), the relative expression of ERBB2 was (0.46 ± 0.09)(t=9.384, P=0.000), the relative expression of IGF1R was (0.45 ± 0.02)(t=14.480, P=0.000), the relative expression of FARP2 was (0.37 ± 0.13)(t=7.082, P=0.028). Western blot showed that in SMAD3 group, the relative quantity of protein expression was (0.96 ± 0.18) and (0.39 ± 0.01)(P=0.001) of AdGFP and AdGSTZ1 respectively. In IGF1R group, the relative quantity of protein expression was (0.97 ± 0.05) and (0.44 ± 0.02)(P=0.000) of AdGFP and AdGSTZ1 respectively. ***Conclusion***: GSTZ1 inhibited the migration of hepatocarcinoma cells through regulating the expression of target genes in adhesion junction pathway.
【Key words】GSTZ1; SMMC-7721 cell; adhesion junction; hepatocellular carcinoma; cell migration

谷胱甘肽硫-转移酶(glutathione S-transferas-es, GST)是一组具有多种生理功能的蛋白质，主要存在于肝脏内，能够降解体内各种有潜在毒性的物质。某些 GST 还具有抗脂质过氧化作用，亲电子致癌物可被 GST 解毒，所以 GST 有保护细胞、抑制细胞癌变的功能[1-2]。其同工酶有 2 个不同的超家族：细胞溶质 GST 和微粒体 GST，其中细胞溶质 GST 依据底物特异性和初级结构被分为 8 个家族，分别命名为 GSTA、GSTK、GSTM、GSTP1、GSTS、GSTT、GSTO 和 GSTZ1[3]。

人谷胱甘肽硫-转移酶 Z1(GSTZ1)又称为马来酰乙酰乙酸异构酶(maleylacetoacetate isomerase, MAAI)，是谷胱甘肽硫-转移酶超家族中的一员，编码基因位于 14 号染色体上，编码分子量为 24 kD的蛋白质[4]。其主要生物活性为：①与 GSTs 相同，参与亲电子解毒，催化还原性谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)与有害物质包括致癌物质、诱变剂等的结合；②参与苯丙氨酸和酪氨酸的分解代谢，催化马来酰乙酰乙酸转化为延胡索酰乙酰乙酸[5-6]。目前 GSTZ1 在肿瘤特别是肝细胞肝癌发生发展过程中的作用尚不明确。

本实验首先成功构建 GSTZ1 的重组腺病毒质粒，并包装成腺病毒[7-8]。然后通过 Transwell 实验及 MTS 实验分析 GSTZ1 对肝癌细胞迁移增殖能力的影响，进一步探究 GSTZ1 对粘附连接信号通路相关靶基因如 SMAD3、IGF1R 等表达的影响，为今后研究 GSTZ1 影响肝细胞癌迁移机制的研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和细胞 GSTZ1cDNA 质粒 pOTB7-GSTZ1 购自 Genecopoeia 公司(货号：FL09522)；pAd-Track-TO4 质粒、BJ5183、DH10B 菌株及人肝癌细胞 SMMC-7721、人胚肾细胞 HEK293 为本实验室保存。2 种细胞均于 37 ℃、5%CO_2 条件下培养于含 10%胎牛血清(fatal bovine serum, FBS)、100 mg/mL 青霉素及 100 mg/mL 链霉素的 DMEM 培养基中。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ、*Pac* Ⅰ、*Pme* Ⅰ购于 NEB 公司；DNA marker 2000、λ-14 购于 Takara 公司；T4 DNA 连接酶和质粒小抽提取试剂盒、MTS 反应液购于 Promega 公司；转染试剂 Lipofectamine 2000 购于 Invitrogen 公司；蛋白 BCA 定量试剂盒、PMSF、结晶紫染料购于碧云天公司；ECL 发光试剂(增强化学发光试剂)、PVDF 膜购于 Millipore 公司；GSTZ1 单克隆抗体(兔)购于 bioworld 公司(货号：BS7924)；SMAD3 与 IGF1R 单克隆抗体(兔)购于 CST 公司(货号：8828S；9750P)；二抗(羊抗兔)抗体购自 Abcam 公司；GAPDH 抗体购自碧云天公司；胎牛血清购自 Gibco 公司；DMEM 培养基、青链霉素购自 Hyclone 公司；Transwell 小室购自百赛公司；iTaq Universal SYBR Green Supermix 酶购自BIO-RAD公司(货号：1725122)。

1.2 方法

1.2.1 GSTZ1 腺病毒穿梭质粒的构建 根据 GSTZ1 CDS 基因序列设计引物序列(表 1)，以购自 Genecopoeia 公司的 GSTZ1 cDNA 质粒为模板，扩增 DNA 片段大小为 600 bp。乙醇沉淀法纯化回收 PCR 产物后，经限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ、*Hind* Ⅲ双酶切，回收 PCR 产物和载体 pAd-Track-TO4 质粒，凝胶电泳确定酶切条带位置正确，用 T4 连接酶连接 16 h，电转入感受态 DH10B 中，涂板后置于 37 ℃孵箱中过夜，经菌落 PCR 挑选出疑似阳性菌落送华大基因测序分析。

表 1 引物序列

Tab.1 Sequences of the primers

基因	引物序列
GSTZ1	正义链 5' -CGCGGATCCACCATGGGC CAGGCGGGG AAGCCCATCCTCTAT-3'
	反义链 5' -CCCAAGCTTCTAGGCCCTCAGCTCAGT GGGTGT-3'
GAPDH	正义链 5' -GTATGACAACGAATTTGGCTACAG-3'
	反义链 5' -TGAGGGTCTCTCTCTTCCTCTTGT-3'
SMAD3	正义链 5' -CCCAACTGTAACCAGCGCTA-3'
	反义链 5' -CTTTGACGAAGCTCATGCGG-3'
IGF1R	正义链 5' -GAACTTGCAGCAACTGTGCG-3'
	反义链 5' -CGTCACTTTCACAGCAGGCT-3'
ERBB2	正义链 5' -GACAATGGAGACCCGCTGAA-3'
	反义链 5' -GCCAGCTGGTTGTTCTTGTG-3'
FARP2	正义链 5' -AGAACCTCATTGCTCCTGGC-3'
	反义链 5' -TTCTTCCACCAGCATGCCTT-3'
TGFBR1	正义链 5' -ACCGCACTGTCATTCACCAT-3'
	反义链 5' -ACAGCACTTCTTCTCCCCG-3'

1.2.2 GSTZ1 腺病毒的构建 测序成功以后,用限制性内切酶 *Pme* Ⅰ酶切,将重组质粒线性化,再电转入腺病毒同源穿梭质粒 BJ-AdEasy 中,电转涂板后 37 ℃孵箱过夜,在 LB 平板上挑选约 15 个偏小的单克隆菌,接种于 2 mL 含 100 mg/L 卡那霉素的 LB 液体中,37 ℃ 摇床过夜。用质粒小抽提取试剂盒提质粒,凝胶电泳后筛选出阳性克隆质粒。再电转入感受态菌 DH10B 中,扩大培养,进一步用限制性内切酶 *Pac* Ⅰ对重组腺病毒质粒进行酶切鉴定。

1.2.3 GSTZ1 重组腺病毒的包装扩增 GSTZ1 重组腺病毒质粒酶切鉴定成功后,质粒小抽提取试剂盒提质粒,*Pac* Ⅰ酶切,乙醇沉淀法纯化,加 20 μL 无核酶水。2 mL 空培养基轻轻洗涤重铺贴壁后的 HEK293 细胞,吸干后加入 2 mL 含血清不含青链霉素的已预热 DMEM 培养基,置于 37 ℃、5% CO_2 孵箱中。将 7.5 μL Lipofectamine 2000、250 μL Opti-MEM 混匀,孵箱孵育 5 min,然后加入 3 μg AdEasy-GSTZ1 质粒轻轻混匀,继续孵箱孵育 17~20 min,最后将混合物加入准备好的 HEK293 细胞中,4 h 后换液,加入 4 mL 含 10%血清的完全培养基。转染成功后 10~14 d,收取细胞上清液,然后用约 1/2 的量继续感染下一轮 HEK293 细胞,如此重复扩增 5~6 次后方可获得高滴度的 GSTZ1 重组腺病毒(AdGSTZ1)。

1.2.4 GSTZ1 重组腺病毒的鉴定 将 SMMC-7721 细胞以 40%的密度重铺于 24 孔培养板,设置 3 个复孔,6 h 后将 GSTZ1 重组腺病毒以 10 μL 为初始量按 1/2 等比稀释,即 6 个孔加入腺病毒的量分别为 10、5、2.5、1.25、0.75、0.375 μL。48 h 左右于显微镜下观察细胞感染状况,将细胞状态良好、荧光适中的病毒量作为 GSTZ1 重组腺病毒的最适滴度。然后将 SMMC-7721 细胞按 40%密度接种于 10 cm 培养皿中,6~8 h 后加入最适滴度的重组腺病毒 AdGSTZ1 及 AdGFP。感染第 2 天换液,48 h 后提取细胞总蛋白,BCA 定量测出细胞蛋白浓度,用 Western blot 方法鉴定重组腺病毒,取 50 μg 上样量,经 80 min 蛋白电泳后,转移至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,按照 Bioworld 抗体说明书孵育 1:1 000 的GSTZ1 抗体,4 ℃ 过夜。第 2 天 1×TBST 洗膜 8 min×4 次,加入 1:5 000 稀释的二抗羊抗兔孵育 1 h,TBST 再次洗膜 8 min×4 次,加入 ECL 发光试剂曝光,比较 AdGSTZ1 与 AdGFP 及 Mock 细胞的表达情况。本实验重复 3 次。

1.2.5 Tanswell 实验检测 SMMC-7721 细胞的迁移能力 将 SMMC-7721 细胞设为 3 组,分别是 Mock 组、AdGFP 组、AdGSTZ1 组。细胞感染病毒 24 h 后,无血清培养基垂悬细胞,台盼蓝计数,每组分别加入 4×10^4 个/孔的细胞数与 200 μL 不含血清的 DMEM 培养基至 Transwell 小室中,小室外加入含 10%FBS 的培养基 600 μL。培养 24 h 后弃培养基,PBS 清洗,4%多聚甲醛固定 30 min,倒置小室,自然风干后结晶紫染色 3 min,PBS 洗 2 次,擦除小室内未穿出的细胞,倒置显微镜下观察每组穿出的细胞数,随机选取 5 个 200 倍的视野,计算其平均值,以此得出 AdGSTZ1 组和 Mock、AdGFP 对照组之间细胞数的差异,观察 GSTZ1 对细胞迁移能力的影响。该实验重复 3 次。

1.2.6 MTS 实验检测 SMMC-7721 细胞的生长 将 SMMC-7721 细胞以 40%的密度接种于 10 cm 培养皿中,贴壁后感染最适滴度的 AdGFP 和 AdGSTZ1。病毒感染 24 h,将细胞以 2×10^3 个/小室重铺于 96 孔培养板中,各设 3 个复孔,每组共 12 个孔。分别于铺板后 24、48、72、96 h 避光加入 20 μL MTS 反应液,轻轻混匀,于 37 ℃、5%CO_2 孵箱中避光静置 2 h,检测各时点的吸光度(absorbance,A)值。本实验重复 3 次。

1.2.7 qRT-PCR 检测 GSTZ1 过表达后粘附连接信号通路中靶基因 mRNA 的表达变化 AdGSTZ1 与 AdGFP 感染 SMMC-7721细胞 36 h 后,用 Trizol 法提取细胞总 RNA,凝胶电泳可见 28、18、5 s 附近 3 条带,然后 Promega 逆转录试剂盒将RNA 逆转录为 cDNA,iTaq Universal SYBR Green Supermix 酶进行 real-time PCR。选取与粘附连接相关的几个关键靶基因,如 SMAD3、IGF1R 等,设计引物序列见表 1。反应条件为:95 ℃ 30 s,95 ℃ 5 s,63 ℃ 30 s,72 ℃ 40 s,35 个循环,72 ℃ 5 min。GAPDH 作为对照,各基因的平均 Ct 值与 GAPDH 基因 Ct 平均值相比,即可得到各基因的相对表达量。本实验重复 3 次。

1.2.8 Western blot 检测 GSTZ1 过表达后粘附连接信号通路中靶基因 SMAD3 和 IGF1R 的表达变化 将 SMMC-7721 细胞按 40%密度接种于 6 cm 培养皿中,6~8 h 后加入最适滴度的重组腺病毒 AdGSTZ1 以及 AdGFP。感染第 2 天换液,48 h 后提取细胞总蛋白,BCA 定量测细胞蛋白浓度,取 50 μg 上样量,经 80 min 蛋白电泳后,转移至 PVDF 膜,5%脱脂牛奶室温封闭 1 h,孵育适宜比例的 SMAD3 和 IGF1R 抗体,4 ℃ 过夜。第 2 天 1×TBST 洗膜 8 min×4 次,加入 1:5 000 稀释的二抗羊抗兔孵育 1 h,TBST 再次洗膜 8 min×4 次,加入 ECL 发光试剂曝光,比较 GSTZ1 过表达后 SMAD3 和 IGF1R 的表达情况。本实验重复 3 次。

1.3 统计学方法

每种实验都进行 3 次独立重复实验。采用 SPSS 19.0 统计分析软件分析每种实验结果。数据采用均数±标准差($\bar{x}\pm$

s）表示。两组间比较采用独立样本 t 检验，多组间（2 组以上）比较先采用单因素方差分析，再进行多重比较。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 GSTZ1 重组腺病毒质粒的构建与鉴定

将构建好的 GSTZ1 重组质粒电转入 BJ-AdEasy 感受态中，挑菌摇菌，提取 DNA。用 *Pac* Ⅰ酶切后凝胶电泳，可见 2 条带分别位于 19 kb 与 4.5 kb，表明重组腺病毒质粒构建成功（图 1）。

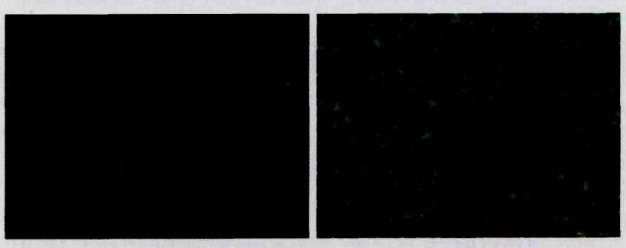


图 1 限制性内切酶 *Pac* Ⅰ酶切鉴定重组质粒

Fig.1 Identification of recombinant adenoviruses by *Pac* Ⅰ digestion

2.2 GSTZ1 重组腺病毒的构建

将构建好的 5 号 GSTZ1 重组腺病毒质粒用 Lipofectamine 2000 转染至 HEK293 细胞，7 d 后在荧光显微镜下可见明显的绿色荧光，且呈“彗星状”，10 d 后细胞已全部感染，14 d 后大约 1/3 贴壁细胞已漂浮，收集并冻存含病毒的上清液（图 2）。



A. AdGSTZ1 7 d　　B. AdGSTZ1 10 d

图 2 HEK293 细胞中包装重组腺病毒（100×）

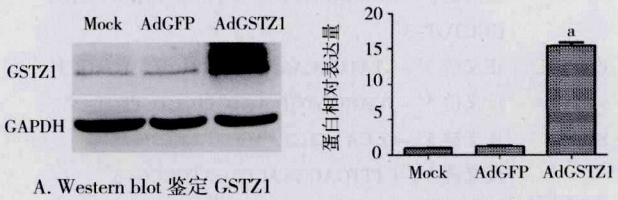
Fig.2 Package of recombinant adenoviruses in HEK293 cells; Transfected HEK293 cells were observed under fluorescence field on 7 d and 10 d (100×)

2.3 Western blot 鉴定 GSTZ1 重组腺病毒的过表达效率

用 GSTZ1 重组腺病毒感染 SMMC-7721 细胞，同时设置对照组 Mock 组和 AdGFP 组，48 h 后提取细胞总蛋白，BCA 定量测出其浓度，Western blot 鉴定 AdGSTZ1 组与 Mock 组和 AdGFP 组的表达差异。结果显示，GSTZ1 重组腺病毒有明显的过表达效果，AdGFP 组的蛋白相对表达量为（1.09±0.05），AdGSTZ1 组的蛋白相对表达量为（14.09±0.15）（F=15 225.55，P=0.000），如图 3 所示。

2.4 GSTZ1 对 SMMC-7721 细胞迁移侵袭能力的影响

将 SMMC-7721 细胞感染最适滴度的 AdGSTZ1 与 AdGFP，铺入 Transwell 小室 24 h 后检测其迁移能力。结果显示，AdGSTZ1 实验组能够明显抑制 SMMC-7721 细胞的迁移侵袭能力，与 Mock 组相比，抑制率为（68.1±1.63）%（P=0.000），与 AdGFP 组相比较，抑制率为（50.7±0.99）%（P=0.000）。如图 4 所示。



A. Western blot 鉴定 GSTZ1 过表达效果　　B. 各组蛋白相对表达量

a：与 AdGFP 组比较，P=0.000

图 3 Western blot 实验验证 GSTZ1 重组腺病毒的过表达效果

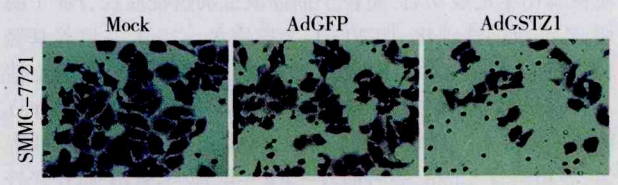
Fig.3 Western blot identified GSTZ1 overexpression in AdGSTZ1 infected cells

表 2 Western blot 实验各组蛋白相对表达量

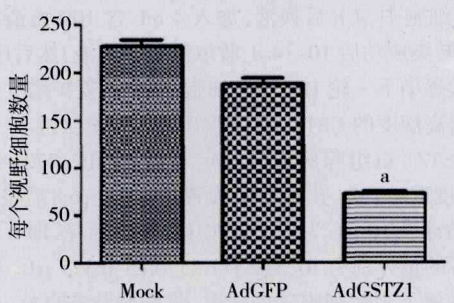
Tab.2 Relative quantity of protein expression detected by Western blot

组别	GSTZ1
Mock	1.000±0.089
AdGFP	1.091±0.053
AdGSTZ1	14.098±0.151
F 值	15 225.550
P 值	0.000

注：Mock 组与 AdGFP 组比，P=0.332；Mock 组与 AdGSTZ1 组比，P=0.000



A. SMMC-7721 细胞细胞迁移能力的检测



a：与 AdGFP 组比较，P=0.000

B. 每个视野下细胞平均个数

图 4 GSTZ1 对 SMMC-7721 细胞迁移侵袭能力的影响

Fig.4 Transwell assay detected the migration of SMMC-7721 cell infected Mock, AdGFP, AdGSTZ1

表 3 Transwell 实验每个视野下细胞平均个数

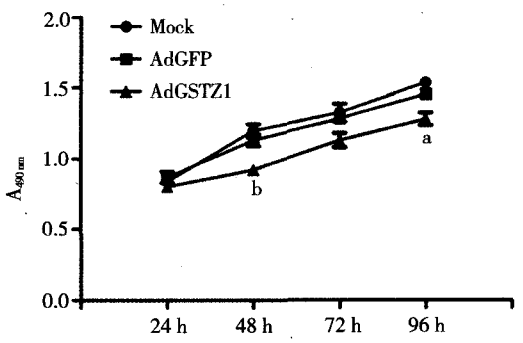
Tab.3 The cells number per field in Transwell assay

组别	细胞平均个数
Mock	227.600 ± 6.841
AdGFP	188.000 ± 5.522
AdGSTZ1	72.800 ± 3.114
F 值	1 111.868
P 值	0.000

注：Mock 组与 AdGSTZ1 组相比，*P*=0.000

2.5 GSTZ1 对 SMMC-7721 细胞增殖能力的影响

MTS检测不同时间点下各组对肝癌细胞增殖的影响，结果显示，AdGSTZ1 组在 72 h 和 96 h 的 $A_{490\ nm}$ 值分别为（1.13 ± 0.08）和（1.28 ± 0.07），Mock 组 72 h 和 96 h 的吸光度值分别为（1.32 ± 0.10）和（1.53 ± 0.03），AdGFP 组 72 h 和 96 h 的吸光度值分别为（1.28 ± 0.03）、（1.45 ± 0.03）。通过以上数值可以看出 AdGSTZ1 组在 96 h 的 $A_{490\ nm}$ 值与对照组相比明显降低，差异有统计学意义（*F*=17.819，*P*=0.000），说明 GSTZ1 能够抑制肝癌细胞的增殖，如图 5 所示。



a：与 AdGFP 组比较，*P*=0.007；b：与 AdGFP 组比较，*P*=0.012

图 5 GSTZ1 对 SMMC-7721 细胞迁移侵袭能力的影响

Fig.5 Effects of AdGSTZ1 on the proliferation of SMMC-7721 cells

2.6 qRT-PCR 检测 GSTZ1 过表达后粘附连接信号通路中靶基因 mRNA 的表达变化

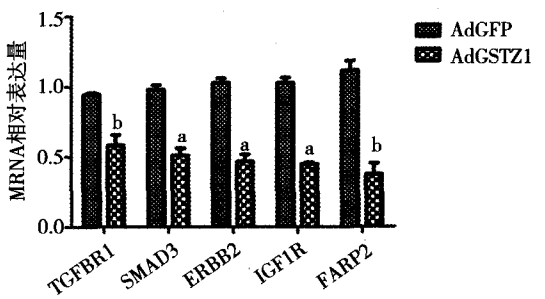
AdGSTZ1 与 AdGFP 感染 SMMC-7721 细胞后 36 h 提取细胞总 RNA，逆转录为 cDNA，用 qRT-PCR 的方法检测粘附连接信号通路中靶基因 TGFBR1、SMAD3、ERBB2、IGF1R、FARP2 的 mRNA 表达变化。结果显示，AdGSTZ1 组与 AdGFP 组相比，TGFBR1 相对表达量为（0.58 ± 0.13）（*t*=4.609，*P*=0.010），SMAD3 相对表达量为（0.51 ± 0.08）（*t*=8.030，*P*=0.000），ERBB2 相对表达量为（0.46 ± 0.09）（*t*=9.384，*P*=0.000），IGF1R 相对表达量为（0.45 ± 0.02）（*t*=14.480，*P*=0.000），FARP2 相对表达量为（0.37 ± 0.13）（*t*=7.082，*P*=0.028），说明过表达GSTZ1 后，选取的粘附连接信号通路中靶基因均表达明显降低。该实验重复 3 次。如图 6 所示。

表 4 不同时间点的吸光度

Tab.4 The absorbance of different time points

组别	24 h	48 h	72 h	92 h
Mock	0.841 ± 0.014	1.201 ± 0.081	1.326 ± 0.108	1.537 ± 0.039
AdGFP	0.870 ± 0.069	1.134 ± 0.072	1.285 ± 0.035	1.457 ± 0.034
AdGSTZ1	0.800 ± 0.045	0.923 ± 0.062	1.131 ± 0.088	1.282 ± 0.076
F 值	1.532	11.948	4.626	17.819
P 值	0.132	0.012	0.063	0.007

注：24 h，Mock 组与 AdGFP 组比，*P*=0.491，Mock 组与 AdGSTZ1 组比，*P*=0.352；48 h：Mock 组与 AdGFP 组比，*P*=0.303，Mock 组与 AdGSTZ1 组比，*P*=0.003；72 h：Mock 组与 AdGFP 组比，*P*=0.565，Mock 组与 AdGSTZ1 组比，*P*=0.028；96 h：Mock 组与 AdGFP 组比，*P*=0.116，Mock 组与 AdGSTZ1 组比，*P*=0.001



a：与 AdGFP 组比较，*P*=0.000；b：与 AdGFP 组比较，*P*=0.000

图 6 Real-time PCR 检测粘附连接信号通路中靶基因 mRNA 的表达变化

Fig.6 Target genes in adhesion junction signal pathway were analyzed by real-time PCR

2.7 Western bolt 验证粘附连接信号通路靶基因蛋白表达变化

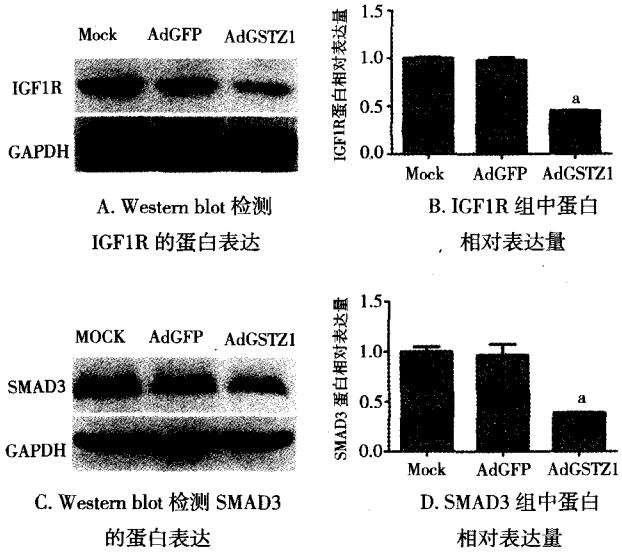
从上述与 GSTZ1 表达呈负相关的粘附连接信号通路靶基因中选取 2 个关键分子 SMAD3、IGF1R，用 Western bolt 方

表 5 Real-time PCR 实验中各组相对表达量

Tab.5 Relative quantity of mRNA expression of Real-time PCR

组别	TGFBR1	SMAD3	ERBB2	IGF1R	FARP2
AdGFP	0.947 ± 0.027	0.981 ± 0.053	1.030 ± 0.056	1.030 ± 0.065	1.116 ± 0.119
AdGSTZ1	0.583 ± 0.134	0.507 ± 0.083	0.463 ± 0.090	0.447 ± 0.023	0.373 ± 0.138
t 值	4.609	8.030	9.384	14.480	7.082
P 值	0.010	0.000	0.000	0.000	0.003

法验证其蛋白表达变化。用 SMMC-7721 细胞感染 GSTZ1 重组腺病毒，同时设置对照组 Mock 组和 AdGFP 组，48 h 后提取细胞总蛋白，Western bolt 检测 SMAD3、IGF1R 的表达。与预期相符，结果显示，与 AdGFP 组相比，AdGSTZ1 组表达显著降低。IGF1R 组中，AdGFP 对照组的蛋白相对表达量为（0.97 ± 0.05），AdGSTZ1 实验组的蛋白相对表达量（0.44 ± 0.02）（F=306.297，P=0.000）。SMAD3 组中，AdGFP 对照组的蛋白相对表达量为（0.96 ± 0.18），AdGSTZ1 实验组的蛋白相对表达量（0.39 ± 0.005）（F=26.016，P=0.001）。如图 7 所示。



A. Western blot 检测 IGF1R 的蛋白表达　B. IGF1R 组中蛋白相对表达量

C. Western blot 检测 SMAD3 的蛋白表达　D. SMAD3 组中蛋白相对表达量

a：与 AdGFP 组比较，P=0.000

图 7　Western bolt 检测 SMAD3、IGF1R 的蛋白表达变化

Fig.7　IGF1R and SMAD3 protein expression detected by Western blot

表 6　Western bolt 检测 SMAD3、IGF1R 的蛋白表达变化

Tab.6　IGF1R and SMAD3 protein expression detected by Western blot

组别	IFG1R	SMAD3
Mock	0.999 ± 0.016	0.999 ± 0.082
AdGFP	0.979 ± 0.049	0.964 ± 0.184
AdGSTZ1	0.448 ± 0.011	0.388 ± 0.005
F 值	306.297	26.016
P 值	0.000	0.001

注：IFG1R，Mock 组与 AdGFP 组比，P=0.443，Mock 组与 AdGSTZ1 组比，P=0.000；SMAD3：Mock 组与 AdGFP 组比，P=0.725，Mock 组与 AdGSTZ1 组比，P=0.001

3　讨　论

肝细胞肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一，其发病快、病死率高、机制复杂。影响其形成与发展的因素众多，其中肿瘤转移是影响肿瘤恶性程度及预后的首要因素[9]，与细胞粘附有着密切的关系。粘附连接（adhesion junction）是细胞间连接的一种，主要包括与邻近上皮细胞形成的带状粘着带和与成熟成纤维细胞形成的点状粘着斑 2 种形式，其对细胞的迁移、侵袭能力都有重要的作用[10]。其通路中相关靶基因 SMAD3、IGF1R、TGFBR1 等可通过基因突变等导致细胞粘附连接能力减弱，从而促进肿瘤细胞的转移和侵袭。此外，这些靶基因还参与了 TGF-β、Wnt、mTOR 等肿瘤相关的信号通路异常活化，进而从不同的途径影响肿瘤的发生发展，如 SMAD3 作为 TGF-β 信号通路中的关键靶基因，能显著增强乳腺癌等恶性肿瘤的迁徙侵袭能力[11-12]。IGF1R 参与了 IGF1Rβ/PI3K/AKT 信号通路，被发现在多种恶性肿瘤中高表达，包括肺癌、乳腺癌、膀胱癌、大肠癌等[13]。这些研究均表明，SMAD3、IGF1R 等靶基因能够促进肿瘤的发展，而本实验提示 GSTZ1 的过表达能够引起 SMAD3、IGF1R 表达下调从而抑制肝癌细胞的迁移，这将有助于进一步研究它们之间的相互关系。

另外，GSTZ1 主要是影响苯丙氨酸及酪氨酸代谢通路的酶，研究表明，此通路中的其他酶缺乏可引起严重的代谢紊乱，包括遗传性酪氨酸血症 1 型、苯丙酮尿症、尿黑酸尿等[14]。然而 GSTZ1 对疾病的影响尚未阐明。近年来，肿瘤与代谢的相互关系逐渐成为研究的热点。研究发现，恶性程度较高的肿瘤细胞比恶性程度低的肿瘤细胞糖酵解能力更强，提示肿瘤的转移能力与其代谢异常有着密切的关系[15]。此外，丙酮酸代谢、乳酸代谢、氨基酸代谢、脂质代谢等都与肿瘤的转移相关[16-18]。

有报道称，延胡索酸水合酶缺失能产生过量的延胡索酸，导致阻止癌细胞转移的 miR-200 受到抑制，启动上皮-间质转化（epithelial to mesenchymal transition，EMT）的基因表达，从而促进一种遗传性肾癌的发生[19]。琥珀酰丙酮的堆积可作为遗传性酪氨酸血症 1 型的诊断病症，此疾病可引起肝衰竭、肝硬化甚至肝癌[20]。上述报道为本实验提供了理论依据，表明代谢产物的积累对肿瘤形成的影响，提示 GSTZ1 涉及的代谢产物与肝癌的发生发展可能有一定联系。那么 GSTZ1 在一定程度上是否通过改变代谢产物的浓度从而影响粘附连接信号通路来抑制肝癌细胞的迁移值得我们继续研究探讨。

所以，GSTZ1 作为参与氨基酸代谢通路的酶，有可能影响肝癌细胞的转移能力。本研究首先通过分析 GSTZ1 序列，成功构建了 GSTZ1 的重组腺病毒，Transwell 实验证实 GTSZ1 可以明显抑制肝癌细胞的迁移侵袭能力。进一步通过 real-time PCR 实验，我们观察到 GSTZ1 过表达细胞中与粘附连接相关的 SMAD3、IGF1R、ERBB2、TGFBR1、FARP2 基因转录水平均下调。然后，本研究选取了其中具有代表性的 SMAD3、IGF1R 基因用 Western blot 实验进行验证，结果与 qRT-PCR 结果相符，上述蛋白的表达水平明显下调。

综上所述，本实验利用成功构建的 GSTZ1 重组腺病毒，在体外培养的肝细胞中证明了 GSTZ1 能够抑制肝癌细胞的迁移增殖，并提示其通过调控粘附连接信号通路相关靶基因 SMAD3、IGF1R 等的表达抑制肝癌细胞的迁移能力。接下来，将用 CHIP、CoIP 等方法分析 GSTZ1 与粘附连接信号通路靶基因的相互关系，代谢组学质谱找出与 GSTZ1 表达密切相关的代谢中间产物和终产物，提取 GSTZ1 组及对照组细胞裂解液检测胞内各代谢产物的浓度等。由此进一步应用代谢组学分析手段，结合分子生物学试验方法研究 GSTZ1 是否通过代谢影响细胞的迁移以及如何调控粘附连接相关靶基因及相关的分子机制。

参 考 文 献

[1] Hayes JD, Pulford DJ. The glutathione S-transferase super -gene family: regulation of GST and the contribution of theisoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance[J]. Crit Rev Biochem Mol Biol, 1995, 30(6): 445-600.

[2] Seidegard J, Ekstrom G. The role of human glutathione trans-ferases and epoxide hydrolasesinthe metabolismof xenobiotices[J]. Environ Health Perspect, 1997, 105(S4): 791-799.

[3] Blackburn AC, Tzeng HF, Anders MW, et al. Discovery of a functional polymorphism in human glutathione transferase zeta by expressed sequence tag database analysis[J]. Pharmacogenetics, 2000, 10(1): 49-57.

[4] Board PG, Anders MW. Glutathione transferase zeta: discovery, polymorphic variants, catalysis, inactivation, and properties of Gstz1 -/- mice[J]. Drug Metab Rev, 2011, 43(2): 215-225.

[5] Karakas-Çelik S, Aras N, Ates C. Glutathione S-transferase Z1 (GSTZ1) gene polymorphism in gastric cancer: a preliminary study in a Turkish population[J]. Lab Med, 2014, 45(1): 37-42.

[6] Blackburn AC, Woollatt E, Sutherland GR, et al. Characterization and chromosome location of the gene GSTZ1 encoding the human Zeta class glutathione transferanse and maleylacetoacetate isomerase[J]. Cytogene Cell Genet, 1998, 83(1-2): 109-114.

[7] Luo J, Deng ZL, Luo X, et al. A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1236-1247.

[8] 邱 林，吴清华，肖 军，等. 转化生长因子-β3 基因重组腺病毒载体的构建及表达[J]. 重庆医科大学学报，2012，37(8)：668-672.

[9] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generat [J]. Cell, 2011, 144(5): 646-674.

[10] Meng W, Takeichi M. Adherens junction: molecular architecture and regulation[J]. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2009, 1(6): a002899.

[11] Do TV, Kubba LA, Du H, et al. Transforming growth factor-beta1, transforming growth factor-beta2, and transforming growth factor beta3 enhance ovarian cancer metastatic potential by inducing a Smad3 dependent epithelial-to-mesenchymal transition[J]. Mol Cancer Res, 2008, 6(5): 695-705.

[12] Tracz AF, Szczylik C, Porta C, et al. Insulin-like growth factor-1 signaling in renal cell carcinoma[J]. BMC Cancer, 2016, 16: 453.

[13] Nurwidya F, Andarini S, Takahashi F, et al. Implications of insulin-like growth factor 1 receptor activation in lung cancer[J]. Malays J Med Sci, 2016, 23(3): 9-21.

[14] Lim CE, Matthaei KI, Blackburn AC, et al. Mice deficient in glutathione transferase zeta/maleylacetoacetate isomerase exhibit a range of pathological changes and elevated expression of alpha, mu, and pi class glutathione transferases[J]. Am J Pathol, 2004, 165(2): 679-693.

[15] Villa E, Ricci JE. How does metabolism affect cell death in cancer[J]. FEBS J, 2016, 283(14): 2653-2660.

[16] Goldberg MS, Sharp PA. Pyruvate kinase M2-specific siRNA induces apoptosis and tumor regression[J]. J Exp Med, 2012, 209(2): 217-224.

[17] Goodwin ML, Jin H, Straessler K, et al. Modelling alveolar soft part sarcomagenesis in the mouse: a role for lactate in the tumor microenvirinment[J]. Cancer Cell, 2014, 26(6): 851-862.

[18] 王祥宇，郑 燕，鲁 明，等. 肿瘤代谢与肿瘤转移[J]. 复旦学报(医学版)，2016，43(1)：86-93.

[19] Sciacovelli M, Gonçalves E, Johnson TI, et al. Fumarate is an epigenetic modifier that elicits epithelial-to-mesenchymal transition [J]. Nature, 2016, 537(7621): 544-547.

[20] Yang H, Al-Hertani W, Cyr D, et al. Hypersuccinylacetonaemia and normal liver function in maleylacetoacetate isomerase deficiency[J]. J Med Genet, 2016[Epub ahead of print].

（责任编辑：张辉洁）