消化系统疾病

DOI:10.13406/j.cnki.cyxb.000991

MYH9在肝细胞癌中的临床意义及生物学功能研究

严 君,刘 勇
(重庆市中医院肝病科,重庆 400021)

【摘 要】**目的**:检测非肌性肌球蛋白重链 9(non-muscle myosin heavy chain 9,MYH9)在人肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)中的表达及对 HCC 细胞迁移侵袭能力的影响。**方法**:收集 2013 年 1 月 1 日至 2014 年 1 月 1 日间于我院肝胆外科行手术切除的 65 例 HCC 及对应癌旁组织,qRT-PCR 检测 MYH9 的 mRNA 水平,免疫组织化学染色检测组织中 MYH9 的蛋白表达水平,分析 MYH9 蛋白表达与肿瘤临床特征间的相关性。采用 siRNA 敲低 MHCC-97H 细胞中 MYH9 的表达分别采用划痕愈合试验及 Transwell 侵袭小室检测沉默 MYH9 之后 MHCC-97H 细胞迁移及侵袭能力的变化。**结果**:MYH9 在 HCC 组织中表达水平均明显高于对应癌旁组织;HCC 组织中 MYH9 高表达与肿瘤数量(≥2 个)及高 TNM 分期(Ⅲ+Ⅳ期)显著相关;siRNA 可明显降低 MHCC-97H 细胞中 MYH9 的表达水平;下调 MYH9 表达能够明显抑制 MHCC-97H 细胞的迁移及侵袭能力。**结论**:MYH9 在肝细胞癌组织中表达上调并与肿瘤恶性临床病理特征有关,下调 MYH9 能够通过抑制肝癌细胞的迁移及侵袭而实现抗肿瘤效应。

【关键词】非肌性肌球蛋白重链 9;肝细胞癌;临床意义;迁移;侵袭
【中图分类号】R735.7 【文献标志码】A 【收稿日期】2016-01-29

Clinical and biological significance of MYH9 in human hepatocellular carcinoma and its role in cell migration and invasion

Yan Jun, Liu Yong
(*Department of Hepatopathy, Chinese Medicine Hospital in Chongqing*)

【Abstract】***Objective***: To detect the expression of non-muscle myosin heavy chain 9(MYH9) in human hepatocellular carcinoma(HCC) and its role in cell invasion. ***Methods***: qRT-PCR and immunohistochemistry was applied to detect the expression of MYH9 in HCC (n=65) and matched tumor-adjacent tissues. The correlation between MYH9 expression and clinical features was analyzed by Pearson chi-square test. siRNA was used to knock-down the expression of MYH9 in MHCC-97H cells. The effects of MYH9 on cell migration and invasion were measured by wound healing assay and transwell assay, respectively. ***Results***: Both the mRNA and protein expression of MYH9 were significantly up-regulated in HCC tissues, and the positive expression of MYH9 was associated with the number of nodules(≥2) and advanced TNM stage(Ⅲ+Ⅳ stage). Down-regulating the expression of MYH9 could inhibit migration and invasion in MHCC-97H cells. ***Conclusion***: The expression of MYH9 is significantly higher in HCC tissues. Down-regulation of MYH9 could achieve an anti-cancer role through inhibiting cell migration and invasion.

【Key words】non-muscle myosin heavy chain 9; hepatocellular carcinoma; clinical significance; migration; invasion

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC,简称肝癌)是肝脏最常见的恶性肿瘤[1],HBV 感染是导致 HCC 发生的主要危险因素之一。在我国,由 HBV 感染所导致的肝癌已成为危害人民群众健康的重大公共卫生问题[2]。尽管目前针对各临床分期肝癌患者的治疗方法众多,但是肝癌的肝内及远处转移[3]仍旧是限制患者治疗效果及总体预后的重要因素之一。因而,寻找能够遏制肝癌细胞转移的分子治疗靶点成为突破肝癌治疗瓶颈的重要途径之一。

非肌肉型肌球蛋白重链-9(non-muscle myosin heavy chain 9,MYH9)基因定位于人染色体22q22.1上,其所表达的蛋白产物也称为非肌肉肌球蛋白Ⅱ

作者介绍:严 君,Email:JUNyan47855@163.com,
研究方向:肝细胞癌的基础与临床研究。

优先出版:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1046.r.20160601.1549.006.html
(2016-06-01)

A（non-muscle myosin ⅡA，NMⅡA）[4]。既往研究确认 MYH9 在遗传性疾病[5]、血栓性疾病[6]及炎症[7]等方面都发挥着重要的调控作用。近年来研究发现，MYH9 对于肿瘤细胞侵袭转移过程也具有一定的促进作用。例如，Katono 等[8]在非小细胞肺癌中的研究发现，阳性表达MYH9 的肺癌组织具有更高的瘤内血管浸润及肿瘤淋巴结转移比例，且肿瘤组织 MYH9 阳性表达的患者的预后更差，说明 MYH9 在肿瘤预后评价及肿瘤转移方面具有一定的研究价值。然而，MYH9 在人肝细胞癌组织中的表达及其对肿瘤细胞侵袭能力的影响尚不完全清楚。

本研究通过 qRT-PCR 及免疫组织化学染色检测了肝癌组织中 MYH9 的表达情况，并分析 MYH9 表达状态与肿瘤临床特征及患者预后间的相关性；在体外，利用 siRNA 技术沉默肝癌 MHCC-97H 细胞中 MYH9 的表达水平，检测下调 MYH9 表达对肝癌细胞侵袭能力的影响。以期为 MYH9 成为肝细胞癌患者预后评价指标及生物治疗靶点提供一定的实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

收集 2013 年 1 月 1 日至 2014 年 1 月 1 日期间于我院肝胆外科行手术切除的肝细胞癌及对应癌旁组织标本 65 例，其中男 45 例，女 20 例，年龄 39~70 岁，中位年龄 53 岁，所有入组患者均签署知情同意书。手术切除标本行多部位取材，分别置入 4%多聚甲醛溶液或液氮中保存。RNA 提取试剂盒 Fast200 购自上海飞捷生物技术有限公司。qRT-PCR 试剂盒（SYBR Green Quant qRT-PCR kit，FP302）购自北京天根生化科技有限公司。MYH9 及 β-actin 引物由北京奥科生物科技有限公司按表 1 序列合成。SP 免疫组化检测试剂盒购自北京中杉金桥生物技术有限公司。人肝癌 MHCC-97H 细胞由西安交通大学第一附属医院肝胆外科实验室保存。胎牛血清（fetal bovine serum，FBS）购自 Gibco 公司。DMEM 液体细胞培养基购自 Mediatech 公司。转染试剂 LipofectamineTM 2000 购自美国 Invitrogen 公司。MYH9 特异性 siRNA 及阴性对照（negative control，NC）siRNA、兔抗人 MYH9 多克隆抗体和小鼠抗人 β-actin 单克隆抗体均购自美国 Santa Cruz 公司。ECL 化学发光试剂盒购自 Milipore 公司。Transwell 小室购自美国康宁公司，基质胶购自美国 BD 公司。

1.2 方法

1.2.1 qRT-PCR 按 Fast200 试剂说明书采用柱层析法提取肝癌组织、癌旁组织及 MHCC-97H 细胞总 RNA。按试剂说明书首先配制 20 μl 反转录 PCR 体系，37 ℃孵育 60 min 合成 cDNA。取 2 μl cDNA 为模板，配制 20 μl qRT-PCR 反应体系，使用 Bio-Rad Real-time PCR 扩增仪进行 PCR 扩增，按如下条件进行 PCR 反应：95 ℃预变性 15 min，95 ℃变性 10 s，60 ℃退火延伸 30 s，扩增 40 个循环，扩增结束后制作融解曲线。以 β-actin（编号 sc-47778，美国 Santa cruz 公司，美国）为内参，采用 $2^{-\Delta\Delta Q}$ 法计算 MYH9 mRNA 的相对表达量。见表1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Tab.1 Sequences for qRT-PCR primer

基因	位置	引物序列
MYH9	上游	5'-AGAGCTCACGTGCCTCAACG-3'
	下游	5'-TGACCACACAGAACAGGCCTG-3'
β-actin	上游	5'-CTC CATCCTGGCCTCGCTGT-3'
	下游	5'-GCTGTCACCTTCACCGTTCC-3'

1.2.2 免疫组化染色 石蜡组织切片经脱蜡、水化后进行抗原热修复，采用 3% H_2O_2 抑制内源性过氧化物酶活性，10%L 山羊血清封闭非特异性位点结合；以 1×PBS 溶液配制 1:100 兔抗人 MYH9 抗体（编号 sc-98978，美国 Santa cruz 公司，美国）工作液充分覆盖组织切片；4 ℃孵育过夜后仔细洗去残余一抗，滴加生物素标记的山羊抗兔二抗；洗去多余二抗后滴加辣根过氧化物酶-链酶卵白素复合物进行结合反应后使用 DAB 进行显色。每张切片在 400×放大下随机选取 10 个视野，按文献[9]所述标准评分。最终评分≥1 分者评判为 MYH9 阳性表达。

1.2.3 siRNA 转染 MHCC-97H 细胞在含 10% FBS 的 1×DMEM 培养基（货号：356234，美国 BD 公司，美国）中培养至稳定传代 2~3 代后进行实验。MHCC-97H 细胞接种于 6 孔细胞培养板中，使用完全培养基培养细胞至汇合度达 50%~60%后，倾去培养基，PBS 溶液充分洗涤细胞。转染分组：MYH9 组每孔加入 DMEM 配制的 MYH9 siRNA（编号 sc-61120，美国 Santa cruz 公司，美国）200 pmol 及 5 μl Lipofectamine™ 2000（货号：11668019，美国赛默飞世尔公司，美国）；NC 组每孔加入 DMEM 配制的 NC siRNA（编号 37007，美国 Santa cruz 公司，美国）200 pmol 及 5 μl Lipofectamine™ 2000。以 1×DMEM 培养基调整终体积至 2 ml/孔，置于适宜条件的培养箱中进行培养 6 h 后，更换完全培养基继续培养。

1.2.4 Western blot 收集转染 48 h 后的 MHCC-97H 细胞，RIPA 法提取细胞总蛋白。垂直电泳分离蛋白，采用 BIO-RAD 半干转印系统，20 V 恒压转膜 1 h，5%脱脂牛奶室温封闭 1 h；加入兔抗人 MYH9 抗体（1:1 000）及小鼠抗人 β-actin 抗体（1:1 000），4 ℃孵育过夜，PBST 工作液洗去残余一抗，分别加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗或辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗（1:5 000），室温孵育 1 h，PBST 工作液洗去未结合二抗。于暗室内，在膜上滴加 ECL（货号：WBKLS0500，美国密理博公司，美国）溶液，并使胶片曝光，全自动洗片机洗片。

1.2.5 划痕愈合试验 取转染 24 h 后的 MHCC-97H 细胞培养于 6 孔板中过夜培养至融合度 90%以上。吸除原有培养基，PBS 溶液洗涤细胞两遍，使用 100 μl 枪头制作细胞划痕后使用 PBS 溶液洗去残余细胞，使用含 5%血清的 1×DMEM培养基培养细胞 48 h，使用倒置显微镜观察细胞划痕愈合情况。

1.2.6 Transwell 侵袭小室检测 按 1:8 比例采用 DMEM 培养液稀释基质胶后，每孔 100 μl 包被 Transwell 小室（货号：3422，美国康宁公司，美国）膜的上室面，取转染 72 h 后的 MHCC-97H 细胞，使用无血清培养基重悬细胞至 5×10^5 个/ml，上层小室每室加入 250 μl 细胞悬液，下层小室中加入含10%胎牛血清的培养基，置于 37 ℃、5%CO_2 孵箱中培养 12 h。用棉签擦净膜上未发生侵袭的细胞和 Matril 基质胶，用 PBS 液漂洗两次，4%多聚甲醛固定，结晶紫染液染色。100 倍光镜下随机选择 10 个视野计数侵袭到小室表面的细胞个数，取平均值代表 MHCC-97H 细胞的侵袭能力。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析，计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示，组间比较采用 t 检验，采用 Pearson 卡方检验分析 MYH9 蛋白表达与肿瘤临床特征间的相关性。检验水准 α=0.05。

2 结 果

2.1 肝细胞癌组织中的 MYH9 的表达

qRT-PCR 结果显示，HCC 组织中 MYH9 mRNA 的相对表达量为(5.756±0.291)，而癌旁组织中的相对表达量为(2.183±0.106)，统计学分析证实二者表达量有统计学差异(P=0.000，图 1A)。进一步对 65 例 HCC 及对应癌旁组织中 MYH9 蛋白进行免疫组化染色检测，结果如图 1B 所示，MYH9 蛋白主要定位于细胞质及细胞膜中。统计学结果显示，HCC 组织中 MYH9 阳性表达率为 75.38%(49/65)，而癌旁组织中 MYH9阳性表达率仅为 32.31%(21/65)。卡方分析结果表明 MYH9 在 HCC 组织中表达显著增高(χ^2=24.267，P=0.000)。

2.2 肝细胞癌组织 MYH9 阳性表达与患者临床特征相关性分析

将 HCC 组织中 MYH9 蛋白的表达情况与相应患者的临床病理资料进行相关性分析。统计结果表明，HCC 组织中 MYH9 蛋白阳性表达与门静脉癌栓(χ^2=7.127，P=0.008)及高 TNM分期(Ⅲ+Ⅳ期，χ^2=5.639，P=0.018)呈显著正相关关系，提示 MYH9 蛋白可能与肿瘤侵袭转移相关。见表 1。

表 1 MYH9 表达与 HCC 患者临床病理特征的关系(n=65)

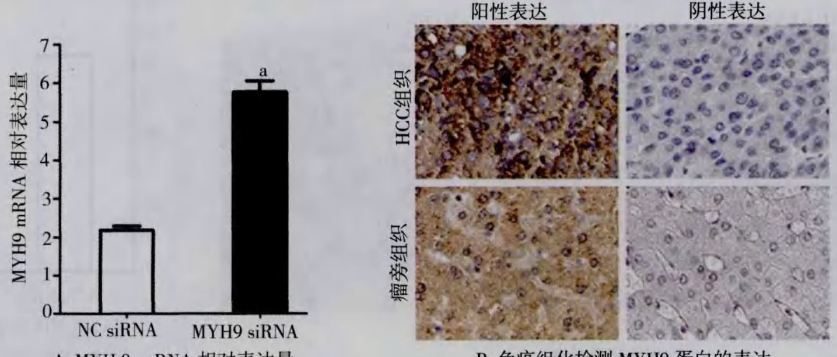
Tab.1 Relationship between clinical pathological features in HCC patients and MYH9 expression(n=65)

项目	类别	MYH9阴性（n=16）	MYH9阳性（n=49）	χ^2 值	P 值
年龄	<50岁	6	32	3.840	0.050
	≥50 岁	10	17		
性别	男	9	36	0.968	0.325
	女	7	13		
肿瘤体积	<5 cm	9	19	2.942	0.086
	≥5 cm	7	30		
肿瘤数量	1 个	12	24	3.305	0.069
	≥2 个	4	25		
组织学分级	G1~G2	10	18	3.265	0.071
	G3	6	31		
门脉癌栓	无	13	21	7.127	0.008[a]
	有	3	28		
TNM分期	Ⅰ~Ⅱ	12	20	5.639	0.018[a]
	Ⅲ~Ⅳ	4	29		

注：a，P<0.05

2.3 siRNA 沉默 MHCC-97H 细胞内 MYH9 表达

采用脂质体法，向 MHCC-97H 细胞中转入 MYH9特异性 siRNA 及 NC siRNA。qRT-PCR 检测发现 MYH9 特异性 siRNA 能够显著下调细胞内 MYH9 mRNA 表达(1.000 vs.(0.347±0.023)，P=0.000，图 2A)。Western blot 也证实 MYH9 特异性 siRNA 可显著下调细胞中蛋白的表达水平(图 2B)。

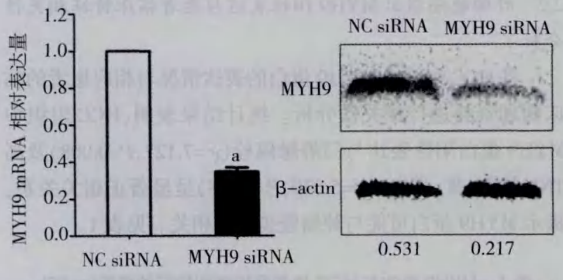


A. MYH 9 mRNA 相对表达量　　B. 免疫组化检测 MYH9 蛋白的表达

a：与 NC siRNA 组相比，P=0.000

图 1 MYH9 在 HCC 组织中的表达

Fig.1 Expression of MYH9 in HCC tissues



A. MYH 9 mRNA 表达水平检测　　B . MYH 9 蛋白表达检测

a：与 NC siRNA 组相比，P=0.000

图 2　siRNA 下调 HCC 细胞中 MYH9 的表达水平

Fig.2　siRNA down-regulates MYH9 expression in HCC cells

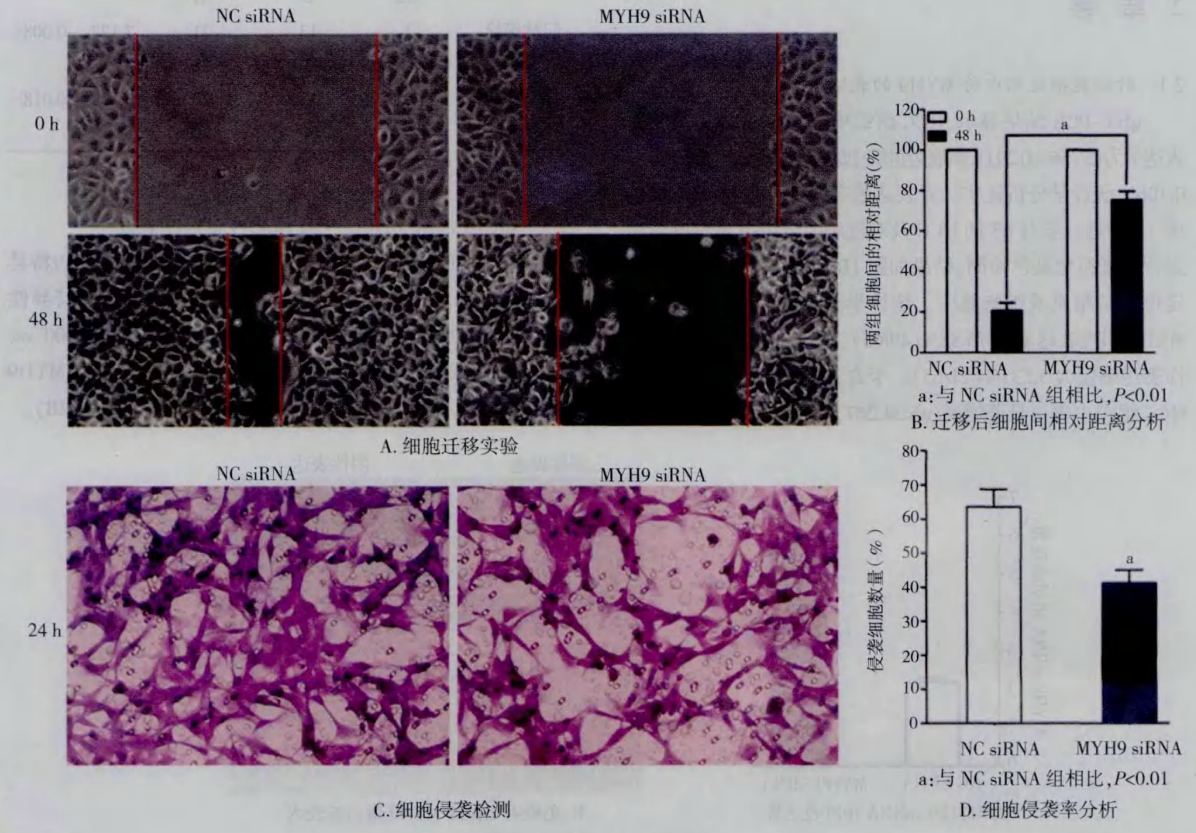
2.4　沉默 MYH9 表达抑制 MHCC-97H 细胞的迁移及侵袭

沉默 MHCC-97H 细胞内 MYH9 表达后，划痕愈合试验结果发现，与 NC 组相比，MYH9 组的 MHCC-97H 细胞迁移能力显著降低（21.481 ± 2.327 vs. 72.285 ± 3.332，P=0.006，图 3A、3B）。进一步采用 Transwell 侵袭小室检测发现 24 h 内 MYH9 组细胞侵袭数量较 NC 组明显减少（38.438 ± 3.181 vs. 61.074 ± 4.257，P=0.007，图 3C、3D）。

3　讨　论

HCC 是我国最常见的也是病死率最高的消化道肿瘤之一。由于 HCC 发生、发展的生物学机制较为复杂，难以找到有效的分子治疗靶点，因而大部分患者难以从靶向治疗中获益[10]。MYH9 作为一种Ⅱ型肌球蛋白，在细胞内激活后能够装配成具有双向极性的肌球蛋白丝，进而其头部与肌动蛋白结合[11]。并且，其球状头部的 Mg^{+}-ATP 酶能够水解 ATP 产能而移动肌丝，产生收缩力，进而介导细胞的迁移、分裂等过程[12]。肿瘤细胞迁移是肿瘤转移的主要分子基础之一，而在肿瘤细胞的运动和趋化过程中发挥主要功能的就是Ⅱ型肌球蛋白[13]。因而 MYH9 在肿瘤迁移、侵袭过程中具有重要研究价值。

在本研究中，不仅通过 qRT-PCR 检测发现 MYH9 mRNA 表达水平在 HCC 组织中显著升高，并且免疫组化结果也证实，高达 75.38%的 HCC 组织



A. 细胞迁移实验

a：与 NC siRNA 组相比，P<0.01

B. 迁移后细胞间相对距离分析

C. 细胞侵袭检测

a：与 NC siRNA 组相比，P<0.01

D. 细胞侵袭率分析

图 3　不同 siRNA 对 HCCMHCC-97H 细胞迁移侵袭能力的影响

Fig.3　Effects of different siRNA on invasion and migration ability of HCCMHCC-97H cells

中也存在 MYH9 的阳性表达，进一步对患者的临床病理资料分析发现，MYH9 蛋白的阳性表达与出现门脉癌栓及较晚的 TNM 分期显著相关。上述结果表明，MYH9 的高表达在 HCC 发展过程中可能是一个普遍现象，并对患者转移相关症状具有一定的预测价值。Liu 等[14]学者在胃癌中的研究同样也发现，高表达的 MYH9 蛋白与肿瘤远处转移及较晚的 TNM 分期等肿瘤转移指标密切相关。抑制细胞的迁移及侵袭能力是抗肿瘤转移的主要微观机制之一[15]。在体外，应用 siRNA 沉默了具有高转移潜能的 MHCC-97H 细胞中 MYH9 的表达后，通过细胞划痕愈合试验和 Transwell 侵袭小室结果表明，沉默 MYH9 的表达对 MHCC-97H 细胞的侵袭能力具有明显的抑制作用，在一定程度上揭示了临床资料中与高 MYH9 表达所相关的侵袭转移征象的微观机制。

上皮细胞间质化（epithelial-mesenchymal transition，EMT）的发生是癌症发生远处转移重要的分子机制之一[16]，DERYCKE 等[17]在乳腺癌中的研究表明，MYH9 可抑制乳腺癌 MCF-7 细胞中上皮标志物 E-钙粘蛋白（E-cadherin）和粘着斑蛋白（catenin）复合体的形成，从而诱导 MCF-7 细胞发生上皮细胞间质化，最终促进了肿瘤转移的发生。microRNA 是继 siRNA 后最有研究价值的分子靶向治疗核苷酸之一，研究[18]表明，经典 microRNA let7 家族中的 let-7f 能够通过与 MYH9mRNA 的 3'-UTR 区特异性结合来沉默其表达，最终在体内、体外均可抑制胃癌细胞的侵袭转移。

综上所述，MYH9 在结肠癌中异常高表达，其表达水平与肿瘤恶性临床病理学特征显著相关，下调 MYH9 的表达可显著抑制结肠癌细胞的增殖并促进细胞凋亡。MYH9 可能成为结肠癌早期诊断的重要标志物及分子靶向治疗的有效靶点之一。

参 考 文 献

[1] 张 松，潘树波，谢 坤，等. 精准肝脏外科理念在肝细胞肝癌治疗中的价值[J]. 安徽医科大学学报，2016，51(1)：94-97.

[2] 付广双，张晶芬，袁 静，等. 乙型和丙型肝炎病毒感染与原发性肝癌术后预后的相关性[J]. 中国临床研究，2015，28(11)：1433-1435.

[3] 王晓耘，王健东. 肝癌淋巴结转移手术治疗进展[J]. 中国实用外科杂志，2015，35(4)：454-456.

[4] Palandri F，ZoliM，Polverelli N，et al. MYH9-related thrombocytopenia and intracranial bleedings：a complex clinical/surgical management and review of the literature[J]. Br J Haematol，2015，170(5)：729-731.

[5] Okano S，Takase M，Iseki K，et al. Genotype-phenotype correlation of the p.R1165C mutation in the MYH9 disorder：report of a Japanese pedigree[J]. J PediatrHematolOncol，2015，37(6)：e352-355.

[6] Girolami A，Sambado L，Bonamigo E，et al. Occurrence of thrombosis in congenital thrombocytopenic disorders：a critical annotation of the literature[J]. Blood Coagul Fibrinolysis，2013，24(1)：18-22.

[7] Arora S，Saha S，Roy S，et al. Role of nonmuscle myosin II in migration of Wharton's Jelly-derived mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Dev，2015，24(17)：2065-2077.

[8] Katono K，Sato Y，Jiang SX，et al. Prognostic significance of MYH9 expression in resected non-small cell lung cancer[J]. PLoS One，2015，10(3)：e0121460.

[9] 郭 成，段建峰，刘青光，等. 野生型-p53 与 JunB 融合基因对裸鼠肝细胞肝癌移植瘤的抑制作用[J]. 华中科技大学学报(医学版)，2013，42(6)：703-706.

[10] 邵 平，宋欢欢，高振明. 肝癌干细胞靶向治疗的研究进展[J]. 临床肝胆病杂志，2015，31(11)：1933-1936.

[11] Verver EJ，Topsakal V，Kunst HP，et al. Nonmuscle myosin heavy chain IIA mutation predicts severity and progression of sensorineural hearing loss in patients with MYH9-related disease[J]. Ear Hear，2016，37(1)：112-120.

[12] Kovács M，Tóth J，Nyitray L，et al. Two-headed binding of the unphosphorylatednonmuscle heavy meromyosin. ADP complex to actin [J]. Biochemistry，2004，43(14)：4219-4226.

[13] Badirou I，Pan J，Souquere S，et al. Distinct localizations and roles of non-muscle myosin II during proplatelet formation and platelet release[J]. J ThrombHaemost，2015，13(5)：851-859.

[14] Liu D，Zhang L，Shen Z，et al. Clinicopathological significance of NMIIA overexpression in human gastric cancer[J]. Int J MolSci，2012，13(11)：15291-15304.

[15] Sun H，Wang X，Zhang Y，et al. Biglycan enhances the ability of migration and invasion in endometrial cancer[J]. Arch GynecolObstet，2016，293(2)：429-438.

[16] Riethdorf S，Frey S，Santjer S，et al. Diverse expression patterns of the EMT suppressor grainyhead-like 2(GRHL2) in normal and tumour tissues[J]. Int J Cancer，2016，138(4)：949-963.

[17] Derycke L，Stove C，Vercoutter-Edouart AS，et al. The role of non-muscle myosin IIA in aggregation and invasion of human MCF-7 breast cancer cells[J]. Int J Dev Biol，2011，55(7-9)：835-840.

[18] Liang S，He L，Zhao X，et al. MicroRNA let-7f inhibits tumor invasion and metastasis by targeting MYH9 in human gastric cancer[J]. PLoS One，2011，6(4)：e18409.

（责任编辑：张辉洁）