

• 论 著 •

人附睾蛋白 4 通过上调 MMP9 及 VEGF 降低顺铂对卵巢癌细胞增殖和迁移的影响

汪义泳¹, 陈友国^{2△}, 管玉宇¹, 李亚梅¹, 杜景云¹

(1. 宝山区罗店医院/复旦大学附属肿瘤医院宝山分中心妇产科, 上海 201908;

2. 苏州大学附属第一医院妇产科, 江苏苏州 215002)

摘要:目的 探讨人附睾蛋白 4(HE4)对顺铂作用后卵巢癌细胞增殖和迁移的影响及潜在机制。方法 构建 HE4 质粒,脂质体 Lipofectamine 2000 转染人卵巢癌细胞系 HO8910PM,通过 Western blot 验证稳定转染细胞株构建成功。通过 CCK8 实验检测 HE4 过表达对顺铂作用后细胞增殖的影响;通过 Transwell 实验检测 HE4 过表达对顺铂作用后细胞迁移的影响;同时通过 Western blot 实验检测促迁移相关蛋白基质金属蛋白酶 9(MMP9)和血管内皮生长因子(VEGF)的表达。结果 过表达 HE4 人卵巢癌细胞系 HO8910PM 构建成功;相比于转染空载体的 HO8910PM 细胞,HE4 可明显降低顺铂对细胞增殖的抑制作用,促进 HO8910 细胞的增殖;同时,HE4 过表达细胞中 MMP9 及 VEGF 蛋白表达水平也相应提高。结论 HE4 可能通过上调 MMP9 及 VEGF 表达降低顺铂对卵巢癌细胞增殖和迁移的影响。

关键词:卵巢癌; 人附睾蛋白 4; 血管内皮生长因子; 体外实验

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2020.01.022 **中图法分类号:**R737.31

文章编号:1673-4130(2020)01-0087-04

文献标识码:A

HE4 decreases the effect of cisplatin on proliferation and migration of ovarian cancer cell by up-regulating MMP9 and VEGF

WANG Yiyong¹, CHEN Youguo^{2△}, GUAN Yuyu¹, LI Yamei¹, DU Jingyun¹

(1. Department of Gynecology and Obstetrics, Luodian Hospital of Baoshan District/Baoshan Branch of Cancer Hospital Affiliated to Fudan University, Shanghai 201908, China; 2. Department of Obstetrics and Gynecology, the First Affiliated Hospital of Suzhou University, Suzhou, Jiangsu 215002, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect and mechanism of Human epididymal protein 4 (HE4) on proliferation and migration of ovarian cancer cell after cisplatin treatment. **Methods** HE4 plasmid was constructed and Lipofectamine 2000 was transfected into human ovarian cancer cell line HO8910PM. Western blot was used to verify the successful construction of stable cell line. The effect of HE4 overexpression on cisplatin induced cell proliferation was detected by CCK8 assay, the effect of HE4 overexpression on cell migration after cisplatin treatment was detected by Transwell test, and the expression of matrix metalloproteinase-9 and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by Western blot. **Results** Compared with HO8910PM cells transfected with empty vector, HE4 could significantly reduce the inhibition of cisplatin on cells and promote the proliferation of HO8910 cells. At the same time, the expression of MMP9 and VEGF protein in the overexpressed cells of HE4 were also increased. **Conclusion** HE4 decreases the effect of cisplatin on proliferation and migration of ovarian cancer cell by up-regulating MMP9 and VEGF.

Key words: ovarian cancer; human epididymal protein 4; vascular endothelial growth factor; in vitro studies

卵巢恶性肿瘤是三大女性生殖系统恶性肿瘤之一。因卵巢位于女性盆腔深处,早期病变通常难以察觉。70%患者初诊时已是晚期,而晚期卵巢癌恶性肿瘤患者5年生存率仅为30%,远低于早期卵巢癌患者的5年生存率(80%)^[1-2]。因此,有效的早期诊断,卵巢癌治疗后转移复发的有效监控并进行早期干预至关重要。

已被食品药品监督管理局(FDA)批准用于临床的人附睾蛋白 4(HE4)是一种新型的血清免疫标志物,在卵巢癌早期诊断中越来越被重视。HE4 属于乳酸蛋白(WAP)结构域家族蛋白,是一种小分子分泌性蛋白。在正常卵巢组织中极少表达,而在卵巢上皮癌细胞中,HE4 呈现高表达^[-3-4]。研究发现,浆液性腺癌和子宫内

作者简介:汪义泳,女,主治医师,主要从事妇科肿瘤方面的研究。△ **通信作者,** E-mail: chenyouguo@suda.edu.cn.

本文引用格式:汪义泳,陈友国,管玉宇,等. 人附睾蛋白 4 通过上调 MMP9 及 VEGF 降低顺铂对卵巢癌细胞增殖和迁移的影响[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(1): 87-90.

膜样腺癌两类常见的上皮性卵巢癌组织中 HE4 的阳性率高达 90%~100%。HE4 在浆液性上皮性卵巢癌组织中的阳性表达率在 93%~100%，在子宫内膜样上皮性卵巢癌组织中性表达率约为 80%~100%，在透明细胞癌组织中阳性表达率约 50%~83%^[4]。当前，血清糖类抗原 125(CA125)是临床常用的卵巢癌检测肿瘤标记物。然而，由于较多良性病变中 CA125 也呈高表达，导致很多假阳性产生^[5-6]。尽管众多研究表明 HE4 相对 CA125 等指标而言是一个更合适的卵巢上皮性癌肿瘤标记物^[7-8]，对于卵巢癌的诊断、监测和预后均具有较高的临床价值。但是目前尚无法明确卵巢癌发展中 HE4 的作用和机制。国内关于 HE4 在卵巢癌中生物学行为的相关研究报道非常少见。HE4 是一种与卵巢癌相关的差异表达基因，HE4 具有蛋白酶抑制剂的活性。本研究在细胞株中表达 HE4，旨在探讨 HE4 基因对卵巢癌细胞增殖和转移作用的影响及其意义。

1 材料与方法

1.1 细胞株 实验所用细胞株为人上皮性卵巢癌(EOC)细胞系 HO8910PM,购买自中国科学院上海细胞所。培养液为 RPMI-1640(Gibco,美国),添加 10% 优质胎牛血清(Gibco,美国)和双抗(100 U/mL,青霉素和 100 μg/mL 链霉素)。置于 37℃,5% CO₂ 及加湿条件下的培养箱常规培养。

1.2 实验材料 CCK-8 试剂盒购于日本 Dojindo 公司。顺铂购买自 Sigma 公司,Matrigel 基质购买自美国 BD 公司。抗金属基质蛋白酶 9(MMP9)、血管内皮生长因子(VEGF)、HE4 抗体和 β-actin 抗体购买自 Santa Cruz 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 实验分组 (1)对照组:未作处理的细胞。(2)HE4 过表达组:HE4 基因 PcDNA3.1/HFA 载体质粒转染。(3)空载体组。

1.3.2 质粒转染 实验细胞接种 6 孔板,待细胞密度为 70%~80%后,按 lip2000 质粒转染试剂盒说明书操作,转染 6 h 后吸出含质粒和脂质体 Lipofectamine 2000 的培养液,更换新鲜培养液,继续培养 24 h 或 48 h。蛋白裂解液提取细胞总蛋白,BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度,-80℃保存,进行后续实验。

1.3.3 Western blot 检测 一抗及稀释度分别为 HE4 抗体(1:500)、抗 α-tubulin 抗体(1:200)、MMP9 抗体(1:200)和 VEGF 抗体(1:200)。

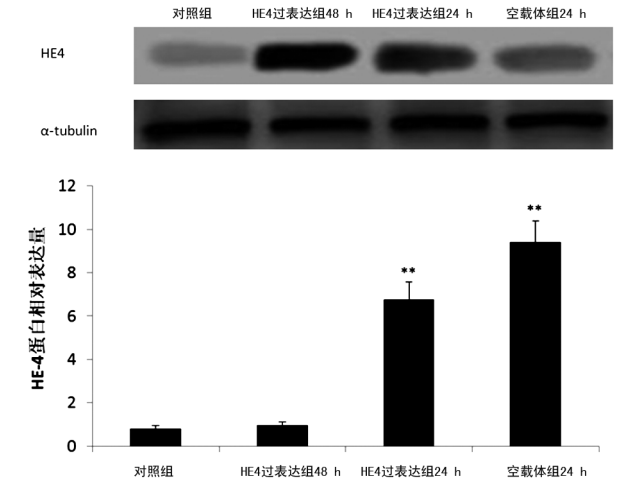
1.3.4 CCK-8 细胞增殖抑制实验 按试剂盒说明书操作,细胞按照 1 000/孔/100 μL 的密度接种 96 孔板,质粒转染后作用 24 h,在各组细胞按 1:10 比例加入 CCK-8 试剂,37℃孵育 2 h。酶标仪测定 450 nm 处的吸光度值 A₄₅₀,按下列公式计算细胞存活率。细胞存活率=(A_{实验组}-A_{空白组})/(A_{对照组}-A_{空白组})×100%。

1.3.5 Transwell 迁移实验 在 Transwell 小室的上室中加入 200 μL 细胞悬液,Matrigel 置于小室下层,浓度 1:50,置于常温培养箱内,继续培养 24 h 后取出细胞板。4%多聚甲醛固定后,结晶紫染色,晾干后于 200 倍视野下随机选取 5 个视野拍照,计算穿出小室的细胞数。

1.4 统计学处理 将所有数据输入到 Excel 软件,计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD 法,独立因素的两组间比较常用 *t* 检验,以 *P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HE4 高表达稳转细胞株 HO8910PM 的构建 HE4 基因载体质粒转染 HO8910PM 细胞后,继续培养 24 h 和 48 h 后,如图 1 所示,对照组的 HE4 蛋白相对表达量为 0.81±0.13,空载体组 24 h HE4 的相对表达量为 0.97±0.15,过表达组 24 h HE4 的相对表达量为 6.75±0.83 和过表达组 48 h HE4 的相对表达量为 9.41±0.96。空载体 24 h 组 HE4 蛋白的相对表达量与对照组比较差异无统计学意义(*t*=1.360,*P*>0.05),而 HE4 过表达组 24 h(*t*=12.231,*P*<0.01)和 HE4 过表达组 48 h(*t*=15.362,*P*<0.01)的 HE4 蛋白相对表达量明显高于对照组,HE4 蛋白相对表达量分别是对照组的 8.32 倍和 11.59 倍,说明 HE4 转染已经成功。考虑到 24 h 和 48 h 的 HE4 相对表达量差异无统计学意义(*P*>0.05)。故后续实验选用转染 24 h 后的细胞进行。



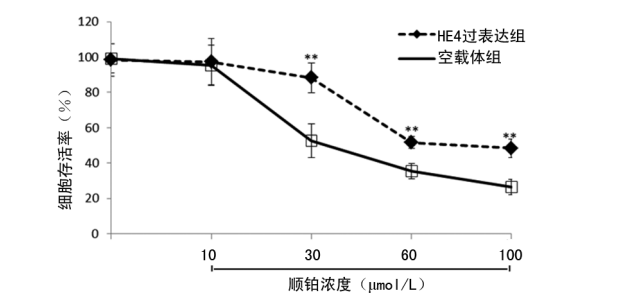
注:与对照比较,**P*<0.001。
图 1 在 HO8910PM 细胞中通过 Western blot 及 RT-PCR 验证 HE4 过表达细胞株构建成功

2.2 HE4 过表达显著降低顺铂对细胞增殖的影响 从表 1 和图 2 可知,低浓度顺铂(10 μmol/L)对 HE4 过表达组和空载体组细胞的增殖抑制作用不明显,两组间细胞存活率比较差异无统计学意义(*P*>0.05)。高浓度顺铂(30、60、100 μmol/L)处理后,细胞增殖出现明显的抑制,HE4 过表达组和空载体组比较细胞存活率差

异有统计学意义($P<0.01$),HE4 过表达使顺铂对细胞的增殖抑制作用明显缓解。

表 1 HE4 过表达显著降低顺铂对细胞增殖的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

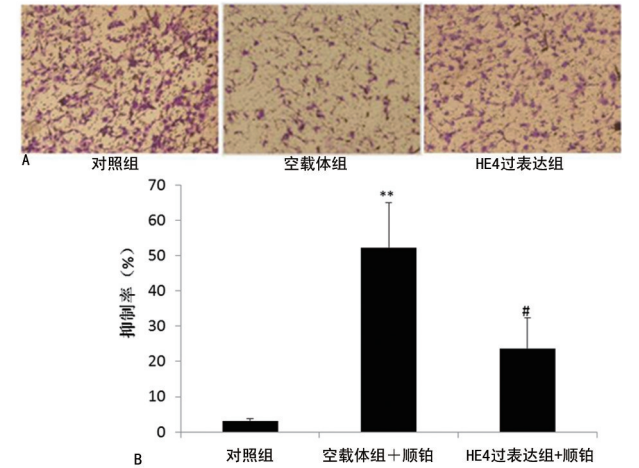
组别	未加顺铂组	10 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂	30 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂	60 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂	100 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂
HE4 过表达组	98.34 $\pm$ 9.35	97.32 $\pm$ 13.18	88.37 $\pm$ 8.43	51.61 $\pm$ 3.33	50.37 $\pm$ 5.16
空载体组	99.18 $\pm$ 8.29	95.35 $\pm$ 11.35	52.68 $\pm$ 9.65	35.38 $\pm$ 4.37	26.34 $\pm$ 4.38
<i>t</i>	0.116	0.196	4.824	5.117	6.149
<i>P</i>	0.913	0.854	0.004	0.007	0.004



注:与空载体组 24 h 比较, ** $P<0.01$ 。

图 2 空载体组及过表达 HE4 组细胞在不同浓度顺铂处理下的细胞存活率

2.3 HE4 过表达显著减弱顺铂对细胞迁移的影响 与对照组[(3.16 $\pm$ 0.68)%]比较,60 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂可显著抑制 HO8910PM 细胞迁移,空载体组+顺铂的抑制率为(52.34 $\pm$ 12.65)%,较对照组明显升高,差异有统计学意义($t=6.724, P<0.01$);HE4 过表达组+顺铂迁移抑制率为(23.65 $\pm$ 8.65)%,较空载体组+顺铂明显降低,差异有统计学意义($t=3.243, P<0.05$)。见图 3。

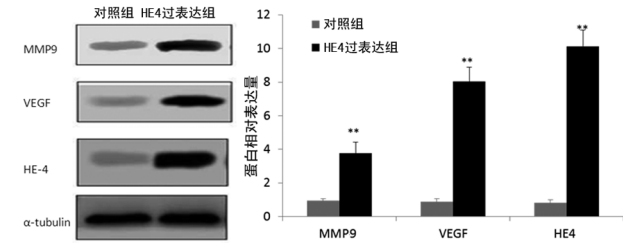


注:A 表示迁移出 transwell 小室后细胞结晶紫染色图片;B 表示细胞迁移抑制率统计图;与对照组比较, ** $P<0.01$;与空载体组比较, # $P<0.05$ 。

图 3 HE4 过表达对顺铂处理细胞迁移的影响

2.4 HE4 过表达后迁移相关蛋白表达改变 在 HE4 过表达组,MMP9 及 VEGF 相对表达量比对照组显著升高($P<0.05$),见图 4。由此可见,HE4 通过促进 MMP9 及 VEGF 表达起到削弱顺铂对细胞增殖和迁移

的抑制影响。



注:与对照组比较, ** $P<0.01$ 。

图 4 HE4 过表达对 MMP9 及 VEGF 蛋白表达的影响

3 讨 论

HE4 基因首次在人的附睾远端上皮细胞中被发现。随后,国内外的研究表明,HE4 与卵巢癌的早期诊断及预测复发方面具有重要的临床价值^[9-10]。基于此,笔者提出血清中 HE4 检测可以用于卵巢癌,尤其是上皮性卵巢癌早期诊断和复发的监测。

关于血 HE4 在卵巢癌诊断中的应用价值及组织学方面临床研究较多。但对 HE4 基因表达与卵巢癌细胞增殖和转移的相关性的研究较少见。国内学者陈瑶等^[11]和 KONG 等^[12]采用质粒转染方法分别在 HO8910 和 SKOV3 卵巢癌细胞系中过表达 HE4 蛋白,陈瑶等^[11]的研究显示 HE4 过表达对细胞增殖无明显影响,而 KONG 等^[12]研究发现 HE4 过表达显著抑制 SKOV3 细胞增殖,结论不一致。研究还发现 HE4 通过抑制 PI3K/AKT 和 ERK1/2/MAPK 细胞信号转导通路的激活,参与抑制细胞增殖,此外,JNK/SAPK 和 p38/MAPK 信号通路也可能参与这一过程。LU 等^[13]通过沉默 SKOV3 细胞 HE4 表达和过表达 HE4,研究了 HE4 对卵巢癌细胞增殖及黏附能力的影响,结果表明 HE4 能够影响 ERK1/2 的磷酸化水平。以上研究均证明,HE4 表达与卵巢癌细胞增殖有直接关系。

研究显示,低浓度顺铂对 HE4 过表达组细胞增殖抑制不明显,而相比于对照组,高浓度顺铂对细胞增殖产生明显的抑制,而 HE4 过表达 HO8910PM 细胞的增殖抑制作用明显的缓解。这表明 HE4 可明显降低顺铂对细胞的抑制,促进 HO8910 细胞的增殖。该结果与 MOORE 等^[14]研究结果较一致。微阵列分析显示,HE4 过表达抑制顺铂介导的 Egr1/MAPK 上调,该信号通路参与促进细胞凋亡的基因调控。

MMP9 基因位于染色体 20q11.1~13.1、26~27 kbp,具有 13 个外显子和 9 个内含子,属于基质金属蛋白酶家族主要功能是降解和重塑细胞外基质的动态平衡。MMP9 可通过促进 VEGF 释放参与细胞增殖、转移和血管形成^[15]。肿瘤细胞分泌 VEGF 和 MMP9,可促毛细血管形成,进而促进肿瘤快速生长及转移^[16]。本研究首次观察到 HE4 高表达的同时,VEGF 和 MMP9 均有高表达的现象。具体机制尚不明确,有待进一步研究确认。有研究通过对卵巢癌患者血清中 VEGF,HE4 和 CA125 水平检测发现,CA125 联合 HE4 可以作为卵巢癌早期诊断的指标。而 VEGF 对早期卵巢癌诊断无参考价值,仅对原位有症状而未发生转移的卵巢癌有诊断价值^[17]。本次研究中,笔者对 HE4 高表达削弱顺铂对细胞增殖和迁移影响的机制进行了进一步的研究。结果研究发现,在 HE4 过表达 HO8910PM 细胞中,MMP9 及 VEGF 表达水平显著升高。表明 HE4 通过促进 MMP9 及 VEGF 表达削弱了顺铂对细胞增殖和迁移的抑制作用。

4 结 论

HE4 在卵巢癌组织中有特异性高表达,HE4 过表达后拮抗顺铂对细胞增殖的抑制作用,同时对顺铂引起的细胞迁移抑制也有减弱作用。HE4 过表达的同时,新生血管形成相关的蛋白 VEGF 和 MMP9 也有相应的高表达,表明 HE4 可能有促血管生成活性。潜在作用机制有待进一步研究确定。

参考文献

- [1] ZHOU L, DAI C, TIAN T, et al. Prognostic values of LAPTM4B-35 in human cancer: a meta-analysis[J]. J Cancer, 2018, 9(23): 4355-4362.
- [2] ENROTH S, BERGGRUND M, LYCKE M, et al. A two-step strategy for identification of plasma protein biomarkers for endometrial and ovarian cancer [J]. Clin Proteomics, 2018, 15(1): 38.
- [3] DRAPKIN R, VON HORSTEN H H, LIN Y, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) is a secreted glycoprotein that is overexpressed by serous and endometrioid ovarian carcinomas [J]. Cancer Res, 2005, 15, 65(6): 2162-2169.
- [4] CAPRIGLIONE S, LUVERO D, PLOTTI F, et al. Ovarian cancer recurrence and early detection: may HE4 play a key role in this open challenge? A systematic review of literature [J]. Med Oncol, 2017, 34(9): 164.
- [5] LI J, WANG X, QU W, et al. Comparison of serum human epididymis protein 4 and CA125 on endometrial cancer detection: a meta-analysis[J]. Clin Chim Acta, 2018, 488(3): 215-220.
- [6] SÖLÉTORMOS G, DUFFY M J, OTHMAN ABU, et al. Clinical use of cancer biomarkers in epithelial ovarian cancer: updated guidelines from the european group on tumor markers[J]. Int J Gynecol Cancer, 2016, 26(1): 43-51.
- [7] RUSTIN G, VAN DER BURG M, GRIFFIN C, et al. Early versus delayed treatment of relapsed ovarian cancer[J]. Lancet, 2011, 377(9763): 380-381.
- [8] ANGIOLI R, CAPRIGLIONE S, ALOISI A, et al. Can HE4 predict platinum response during first-line chemotherapy in ovarian cancer[J]. Tumour Biol, 2014, 35(7): 7009-7015.
- [9] INNAO P, POTHISUWAN M, PENGSA P. Does human epididymis protein 4 (HE4) have a role in prediction of recurrent epithelial ovarian cancer[J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2016, 17(9): 4483-4486.
- [10] QI X, DU L, CHEN X, et al. VEGF-D-enhanced lymph node metastasis of ovarian cancer is reversed by vesicular stomatitis virus matrix protein[J]. Int J Oncol, 2016, 49(1): 123-132.
- [11] 陈瑶, 牟霞, 王穗海, 等. HE4 基因表达载体的构建及对卵巢癌细胞 HO8910 生长侵袭的影响[J]. 热带医学杂志, 2009, 9(6): 606-607.
- [12] KONG X, CHANG X, CHENG H, et al. Human epididymis protein 4 inhibits proliferation of human ovarian cancer cells via the mitogen-activated protein kinase and phosphoinositide 3-kinase/AKT pathways[J]. Int J Gynecol Cancer, 2014, 24(3): 427-436.
- [13] LU R, SUN X, XIAO R, et al. Human epididymis protein 4 (HE4) plays a key role in ovarian cancer cell adhesion and motility[J]. BiochemBiophys Res Commun, 2012, 419(2): 274-280.
- [14] MOORE R G, HILL E K, HORAN T, et al. HE4 (WFDC2) gene overexpression promotes ovarian tumor growth[J]. Sci Rep, 2014, 6(4): 3574.
- [15] MOORE R G, BROWN A K, MILLER M C, et al. The use of multiple novel tumor biomarkers for the detection of ovarian carcinoma in patients with a pelvic mass[J]. Gynecol Oncol, 2008, 108(4): 402-408.
- [16] ZAJKOWSKA M, GACUTA E, KOZŁOWSKA S, et al. Diagnostic power of VEGF, MMP-9 and TIMP-1 in patients with breast cancer. A multivariate statistical analysis with ROC curve[J]. Adv Med Sci, 2018, 64(1): 1-8.
- [17] LAWICKI S, BEDKOWSKA G E, GACUTA-SZUMARSKA E, et al. The plasma concentration of VEGF, HE4 and CA125 as a new biomarkers panel in different stages and sub-types of epithelial ovarian tumors[J]. J Ovarian Res, 2013, 6(1): 45.

(收稿日期: 2019-05-18 修回日期: 2019-08-25)