

• 论 著 •

SHP2 在难治性肝细胞癌中的水平变化及作用

刘金菊, 李钦勇[△]

临沂市肿瘤医院内三科, 山东临沂 276001

摘 要:目的 探讨 SHP2 在难治性肝细胞癌中的水平变化及作用。方法 建立裸鼠难治性肝细胞癌模型, 随机分为对照组和顺铂组, 每组 8 只, 顺铂组给予顺铂瘤内注射治疗, 对照组给予等量磷酸盐缓冲盐水替代, 比较 2 组第 0、3、6、9 天的肿瘤体积和 SHP2 的相对表达水平。取在该院就诊的 2 例难治性肝细胞癌患者的癌组织, 切片后移植至裸鼠, 每位患者的肿瘤组织移植 8 只裸鼠。随机选取 4 只裸鼠给予索拉非尼治疗, 分别列为索拉非尼 1 组和索拉非尼 2 组, 其余给予等量磷酸盐缓冲盐水替代, 分别列空白组 1 组和空白 2 组。采用 PCR 检测裸鼠癌组织 SHP2 的相对表达水平。观察表达 SHP2 的慢病毒感染肝细胞癌细胞株中肝细胞癌干细胞的比例。并将被慢病毒感染的细胞接种于 NOD/SCID 鼠, 观察致肿瘤率。结果 随着饲养时间增加, 对照组裸鼠肿瘤体积明显增加($F=30.964, P<0.001$), 且明显高于同时时间段顺铂组; 而顺铂组肿瘤体积随着时间增加无明显变化($F=1.194, P=0.330$)。顺铂组 SHP2 蛋白水平和 mRNA 的相对表达水平均明显高于对照组($P<0.001$), 空白 1 组、空白 2 组 SHP2 蛋白水平和 mRNA 的相对表达水平均明显低于索拉非尼 1 组和索拉非尼 2 组, 差异有统计学意义($P<0.001$)。在肝细胞癌细胞株 SMMC-7721、LM3、HepG2 和 Huh7 中, 相较于贴壁细胞, 肝细胞癌干细胞中 SHP2 的相对表达水平明显增加($P<0.001$)。与 RNA 序列置乱的对照相比, shSHP2 稳定转染的肝细胞癌细胞中球状体的比例降低, 差异有统计学意义($P<0.01$)。接种于 NOD/SCID 鼠后, 相较于 SMMC-7721 对照组, SMMC-7721 shSHP2 组致肿瘤数更少, 但 2 组数据差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 SHP2 在难治性肝细胞癌中表达明显增加, 同时 SHP2 的表达能够增强肝细胞癌干细胞的扩增, 临床上可通过检测 SHP2 预测患者的治疗效果。

关键词: SHP2; 难治性肝细胞癌; 干细胞; 扩增

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2021.09.016

中图法分类号: R735.7

文章编号: 1673-4130(2021)09-1094-04

文献标志码: A

The changes and effects of SHP2 in refractory hepatocellular carcinoma

LIU Jinju, LI Qinyong[△]

Third Department of Internal Medicine, Linyi Cancer Hospital, Linyi, Shandong 276001, China

Abstract: **Objective** To investigate the changes and effects of SHP2 in refractory hepatocellular carcinoma. **Methods** The model of refractory hepatocellular carcinoma in nude mice was established and randomly divided into control group and cisplatin group, with 8 mice in each group. Cisplatin group was given cisplatin intratumoral injection, and the control group was given the same amount of phosphate buffered saline. The tumor volume on day 0, 3, 6, 9 and the relative expression level of SHP2 in the two groups were compared. The tumor tissue of 2 patients with refractory hepatocellular carcinoma were taken and transplanted to nude mice after sectioning, and 8 nude mice were transplanted to each patient. Four nude mice were randomly selected for sorafenib treatment and were classified as the sorafenib group 1, and sorafenib group 2, and the rest were given equal amount of phosphate buffer saline and were classified as the blank group 1 and blank group 2. The relative expression levels of SHP2 in tumor tissues of nude mice were compared between the two groups. The proportion of hepatoma stem cells in hepatoma cell lines infected by lentivirus expressing SHP2 was observed, and the cells infected by lentivirus were inoculated into NOD/SCID mice to observe the tumorigenicity. **Results** With the increase of feeding time, the tumor volume of the control group increased significantly ($F=30.964, P<0.001$), which was significantly higher than that of the cisplatin group at the same time. In cisplatin group, tumor volume did not change with time ($F=1.194, P=0.330$). The level of SHP2

作者简介: 刘金菊, 女, 主治医师, 主要从事消化道肿瘤研究。 [△] 通信作者, E-mail: 491327923@qq.com。

本文引用格式: 刘金菊, 李钦勇. SHP2 在难治性肝细胞癌中的水平变化及作用[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(9): 1094-1097.

protein and relative expression level of SHP2 mRNA in cisplatin group were significantly higher than those in control group ($P < 0.001$), the level of SHP2 protein and relative expression level of SHP2 mRNA in blank group 1 and blank group 2 were significantly higher than those in sorafenib group 1 and sorafenib group 2 ($P < 0.001$). In SMMC-7721, LM3, HepG2 and Huh7 cell lines, the relative expression level of SHP2 was significantly higher than that of adherent cells ($P < 0.001$). Compared with the control group of RNA sequence scrambling, the proportion of spheroids in hepatoma cells stably transfected by SHP2 expressing lentivirus (shSHP2) decreased ($P < 0.01$). After inoculating NOD/SCID mice, compared with SMMC-7721 control group, SMMC-7721 shSHP2 group caused fewer tumors, but there was no significant difference between the two groups ($P > 0.05$). **Conclusion** SHP2 expression in refractory hepatocellular carcinoma increased significantly, and SHP2 expression can enhance the expansion of liver cancer stem cells. Clinical detection of SHP2 level can predict the response and outcome of patients.

Key words: SHP2; refractory hepatocellular carcinoma; stem cells; expansion

肝细胞癌可由慢性肝病和肝硬化发展而来^[1-2]。尽管这种疾病可通过手术切除进行治疗,但由于肿瘤范围或潜在的肝功能不全,大多数患者不符合手术条件^[3-4]。现阶段还可通过肝移植、经皮乙醇或乙酸消融、经动脉化疗栓塞等方法治疗,治疗方案的选择取决于疾病病程和潜在肝脏疾病的严重程度^[4]。但由于手术切除后频繁复发及患者对常规化疗的反应较差,肝细胞癌长期生存情况并不理想。调查显示,每年肝细胞癌的病死与全球发病人数相似,这也突显了这种侵略性疾病的高病死率^[5]。越来越多的证据显示,肝细胞癌的化学抗性、频繁复发均与肝细胞癌干细胞存在关联,因此,探讨肝细胞癌干细胞关联的分子机制可制订出更有效的治疗策略^[6-8]。由 PTPN11 编码的含 Src-homology 2 结构域的磷酸酶 SHP2 是完全激活细胞外信号调节激酶所必需的,在细胞存活和生长中起正调节作用^[9-10]。NEEL 等^[11]研究显示,有条件的 SHP2 消融可显著减弱部分肝切除术后细胞外信号调节激酶激活和肝脏再生。还有研究表明,肝细胞特异性 SHP2 消融增加胆汁酸分泌,这一过程促进相关蛋白的合成和肝细胞癌的发展^[12]。本文主要研究难治性肝细胞癌中 SHP2 的水平变化及其对肝细胞癌干细胞扩增的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 SMMC-7721 裸鼠模型建立 人肝细胞癌细胞株 SMMC-7721 购自中国科学院典型培养物保藏中心。BALB/c-nu 裸鼠,雌性,4~6 周龄,体重(16±3)g,购自上海斯莱克实验动物有限公司,许可证:SCXK(沪)2012-0002,SPF 级饲养。在 37℃、5% CO₂ 条件下,DMEM 培养基中培养 SMMC-7721 细胞。将对数生长期的 SMMC-7721 细胞胰酶消化、离心和计数后,用生理盐水制成细胞悬液。按 2×10⁵ 的剂量将细胞悬液接种于裸鼠背部皮下,约 2 周后分离肿块,将其切为 0.1 cm³ 的立方体,接种于裸鼠右腋下,共 16 只。随机将裸鼠分为顺铂组和对照组,每组 8 只。放归饲养后,顺铂组裸鼠每隔 1 d 瘤内注射

2 mg/kg 顺铂,对照组以等体积磷酸盐缓冲盐水替代。期间观察第 0、3、6、9 天的肿瘤体积,测量长度和宽度。肿瘤体积(cm³)=1/2×长度×宽度²。喂养 7 周后处死裸鼠,完全切除富含顺铂耐药细胞的残留癌组织(顺铂组)和完整癌组织(对照组)。

1.1.2 患者组织裸鼠模型建立 随机取本院就诊的 2 例难治性肝细胞癌患者肿瘤组织标本。将癌组织切成 0.1 cm³ 的体积,并分别皮下接种裸鼠,1 例患者的标本接种 8 只,分开饲养,其中 4 只裸鼠使用索拉非尼(购自德国 Bayer 公司)进行治疗,剂量 30 mg/kg,列为索拉非尼 1 组($n=4$);另 1 例患者标本接种裸鼠后同样处理,列为索拉非尼 2 组($n=4$)。其余 8 只使用等体积磷酸盐缓冲盐水替代索拉非尼,列为空白组 1 组($n=4$)和空白 2 组($n=4$)。难治性肝细胞癌纳入标准:初确诊时诊断为肝细胞癌,经穿刺活检病理确认;为复发疾病,或存在转移病灶;手术取样或有活检留样。本研究动物实验经本院伦理委员会批准且符合伦理学要求。

1.2 方法

1.2.1 引物序列和 Western blot 检测 计算肿瘤体积后,将一部分组织标本置于液氮中,进行实时荧光定量 PCR 和 Western blot 检测。使用 ABI PRISM 7300 序列检测器(Applied Biosystems)通过 PCR 确定特定转录本的原始量。使用 IRDye 800CW 偶联抗体和 LI-COR 成像系统通过 Western blot 分析肝细胞癌细胞的蛋白质提取物。SHP2(人)PCR 上游引物序列:5'-CTG CCT CCA CAC CAG TGA TA-3',下游引物序列:5'-GGA GCC TGA GCA AGG AGC-3'。SHP2 序列置乱:5'-GGA CTC AA-TTT GTG AGA AT-3'。SHP2 抗体(兔多克隆抗体)购自 Abcam 公司(中国,ab17940)。

1.2.2 肝细胞癌干细胞中 SHP2 相对表达水平的检测 人肝细胞癌细胞株于 37℃、5% CO₂ 条件下培养,贴壁细胞 80%密度时除去培养基,胰蛋白酶消化。消化完成后加入新鲜培养基,按 1:4 进行传代培养。待 80%贴壁细胞从培养瓶壁完全消化下来后,离心收

集细胞,缓冲液洗涤后加入无血清含双抗培养基培养。待悬浮细胞长至 70~80 nm 稳定传代肝细胞癌干细胞。选择肝细胞癌细胞株 SMMC-7721、LM3、HepG2 和 Huh7 按照上述方法培养,PCR 检测 SHP2 的相对表达水平,以培养的贴壁细胞作为对照。上述细胞株均购自中国科学院典型培养物保藏中心。相对表达水平采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 计算。

1.2.3 SHP2 对肝细胞癌干细胞扩增的影响 表达 SHP2 的腺病毒购自 Vigene Bioscience 公司(中国)。SMMC-7721 shSHP2 稳定细胞株使用表达 shSHP2 的慢病毒构建,RNA 序列置乱作为对照组。在 96 孔培养板中培养肝细胞 7 d,在显微镜下计数。将原代肝细胞癌的单细胞悬液接种在 6 孔超低附着培养板中,并感染 Lenti-shSHP2 和对照。使用体外有限稀释法比较 SMMC-7721、LM3 细胞株 Lenti-shSHP2 和对照组中肝细胞癌干细胞频率。使用泊松分布统计数据和 L-Calc 软件程序(版本 1.1)分析肝细胞癌干细胞的 比例。将被慢病毒感染的细胞接种于 NOD/SCID 鼠(购自上海斯莱克实验动物有限公司,3~8 周龄,许可证同 BALB/c-nu 裸鼠)皮下,注射细胞量为 1 000~100 000,7 周后评估肿瘤发生情况,处死并取出肿瘤,比较肿瘤大小。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 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-*t* 检验,两组比较采用 *t* 检验。计数资料以频数和构成比表示,组间两两比较采用 χ^2 分割法或 Wilcoxon 秩和检验。*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 对照组和顺铂组裸鼠肿瘤体积、SHP2 水平比较 随着饲养时间增加,对照组裸鼠肿瘤体积明显增加(*F*=30.964,*P*<0.001),且明显高于同时间段顺铂组;而顺铂组肿瘤体积随着时间增加无明显变化(*F*=1.194,*P*=0.330)。比较 2 组裸鼠 SHP2 蛋白水平和 mRNA 的相对表达水平,结果显示,顺铂组 SHP2 蛋白水平和 mRNA 的相对表达水平均明显高于对照组,差异有统计学意义(*P*<0.001),见表 1、2。

表 1 不同饲养时间对照组和顺铂组肿瘤体积比较($\bar{x} \pm s, \text{cm}^3$)

时间	对照组	顺铂组	<i>t</i>	<i>P</i>
第 0 天	0.11±0.04	0.10±0.03	0.566	0.581
第 3 天	0.40±0.12	0.12±0.05	6.092	<0.001
第 6 天	0.63±0.18	0.14±0.06	7.304	<0.001
第 9 天	0.82±0.22	0.17±0.13	7.195	<0.001
<i>F</i>	30.964	1.194		
<i>P</i>	<0.001	0.330		

2.2 空白组和索拉非尼组裸鼠 SHP2 水平比较 空白 1 组和空白 2 组 SHP2 蛋白水平和 mRNA 的相对

表达水平均明显低于索拉非尼 1 组和索拉非尼 2 组,差异有统计学意义(*P*<0.001)。见表 3。

表 2 对照组和顺铂组 SHP2 蛋白水平和 mRNA 的相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	蛋白	mRNA
对照组	1.00±0.03	1.00±0.02
顺铂组	1.85±0.26	2.17±0.53
<i>t</i>	9.186	6.239
<i>P</i>	<0.001	<0.001

表 3 对照组和索拉非尼组裸鼠 SHP2 蛋白水平和 mRNA 的相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	蛋白	mRNA
空白 1 组	1.00±0.01	0.97±0.02
索拉非尼 1 组	2.25±0.24	2.15±0.37
<i>t</i>	14.719	6.369
<i>P</i>	<0.001	<0.001

组别	蛋白	mRNA
空白 2 组	1.01±0.30	0.98±0.01
索拉非尼 2 组	2.16±0.43	2.54±0.40
<i>t</i>	6.204	7.798
<i>P</i>	<0.001	<0.001

2.3 不同细胞株贴壁细胞和肝细胞癌干细胞中 SHP2 mRNA 的相对表达水平比较 在肝细胞癌细胞株 SMMC-7721、LM3、HepG2 和 Huh7 中,相较于贴壁细胞,肝细胞癌干细胞中 SHP2 mRNA 的相对表达水平明显增加,差异有统计学意义(*P*<0.001)。见表 4。

表 4 不同细胞株贴壁细胞和肝细胞癌干细胞中 SHP2 mRNA 的相对表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

细胞株	贴壁细胞	肝细胞癌干细胞	<i>t</i>	<i>P</i>
SMMC-7721	1.00±0.12	6.85±1.23	9.467	<0.001
LM3	0.98±0.14	8.71±1.40	10.988	<0.001
HepG2	1.01±0.01	5.32±0.11	78.042	<0.001
Huh7	1.00±0.02	3.83±0.22	25.622	<0.001

2.4 SHP2 对肝细胞癌干细胞扩增的影响 与 RNA 序列置乱的对照比较,shSHP2 稳定转染的肝细胞癌细胞中球状体的比例降低,差异有统计学意义(*P*<0.01),见表 5。接种于 NOD/SCID 鼠后,相较于 SMMC-7721 对照组,SMMC-7721 shSHP2 组致肿瘤数更少,但 2 组数据差异无统计学意义(*P*>0.05),见表 6。

表 5 SMMC-7721 和 LM3 细胞株球状体比例比较(%)

细胞株	对照	shSHP2	<i>t</i>	<i>P</i>
SMMC-7721	14.24±2.33	7.46±2.15	4.277	0.005
LM3	15.69±2.61	4.98±1.30	7.346	<0.001

表 6 不同细胞注射量 SMMC-7721 对照组和 SMMC-7721 shSHP2 组在 NOD/SCID 鼠中的致肿瘤数(n/n)

细胞注射量	SMMC-7721 对照组	SMMC-7721 shSHP2 组	χ^2	P
1 000	1/6	0/6	1.091	0.296
10 000	5/6	2/6	3.086	0.079
100 000	6/6	4/6	2.400	0.121

3 讨 论

许多肝细胞癌患者就诊时即被诊断为晚期,错过了进行手术治疗的机会^[13]。由于肝细胞癌的化学耐药性,包括肝动脉化疗栓塞术在内的常规化疗很大程度上对患者无效^[14]。对于那些接受手术切除的患者,频繁的复发会导致生存期较差。因此,针对此类患者癌组织特异性指标变化的研究尤为重要,可用于临床早期疾病诊断。

本研究结果显示,随着时间的增加,给予治疗的顺铂组裸鼠的肿瘤体积未明显增加,而未给予顺铂的对照组肿瘤体积变化明显。处死裸鼠后,比较 2 组 SHP2 蛋白水平和 mRNA 的相对表达水平,结果显示,SH P2 的表达在顺铂耐药的肝细胞癌癌组织中显著增加,这说明 SHP2 的表达与化学耐药性相关。为了验证这一结果,笔者取 2 例难治性肝细胞癌患者(索拉非尼耐药)病理组织标本建立移植瘤模型。比较 2 组裸鼠 SHP2 的表达发现,相较于对照组裸鼠,难治性肝细胞癌移植瘤组织 SHP2 蛋白水平和 mRNA 的相对表达水平更高。因此,笔者推测 SHP2 表达与化学抗性或肝细胞癌复发相关。

肝细胞癌干细胞的存在被认为是肿瘤化学抗药性和肝细胞癌复发的起源^[15]。因此,破译肝细胞癌干细胞调控的分子机制,是开发针对肝细胞癌干细胞新型治疗策略的热点和重点。考虑 SHP2 在难治性肝细胞癌中的异常表达和肝细胞癌干细胞在难治性肿瘤中的重要性,本研究用贴壁细胞作对照,比较其与肝细胞癌干细胞中 SHP2 mRNA 的相对表达水平。结果显示,肝细胞癌细胞株 SMMC-7721、LM3、HepG2 和 Huh7 的肝细胞癌干细胞中 SHP2 mRNA 的相对表达水平明显增加。为了验证这一结果,笔者构建 shSHP2 表达稳定肝细胞癌细胞株(SMMC-7721 和 LM3),以 RNA 序列置乱为对照,比较肝细胞癌干细胞比例。结果显示,shSHP2 稳定转染的肝细胞癌细胞中球状体的计数比例降低。接种于 NOD/SCID 鼠后,相较于 SMMC-7721 对照组,SMMC-7721 shSHP2 组致肿瘤数更少。因此,shSHP2 稳定转染的肝细胞癌细胞中干细胞的比例降低,说明 SHP2 耗竭降低了肝细胞癌干细胞的比例。尽管如此,SH P2 在肝

细胞癌干细胞中的作用仍不清楚,需要进一步研究讨论。

参考文献

[1] ZHANG C, WANG H, CHEN Z, et al. Carbonic anhydrase 2 inhibits epithelial-mesenchymal transition and metastasis in hepatocellular carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2018, 39(4): 562-570.

[2] 肖永胜, 周俭. 非酒精性脂肪性肝病与肝细胞癌[J]. 外科理论与实践, 2018, 23(3): 210-213.

[3] 邹卫龙, 朱雄伟, 李自强, 等. 挽救性肝移植治疗肝切除术后复发性肝细胞癌临床效果分析[J]. 中国实用外科杂志, 2018, 38(2): 200-204.

[4] 施长鹰, 沈伟峰, 杨甲梅. 肝细胞癌围手术期抗复发治疗进展[J]. 中国实用外科杂志, 2019, 39(12): 1347-1350.

[5] 高梦丹, 张永宏, 赵艳. STAT1 与 STAT3 在肝细胞癌及肝衰竭发病机制中的作用[J]. 临床肝胆病杂志, 2018, 34(9): 209-212.

[6] 孙为民, 查勇. 乙型肝炎 X 蛋白调控肝癌干细胞维持肝细胞癌生物学行为的研究进展[J]. 中国普通外科杂志, 2019, 28(1): 100-106.

[7] WANG K, SUN D. Cancer stem cells of hepatocellular carcinoma[J]. Oncotarget, 2018, 9(33): 23306-23314.

[8] HARSHUL P, YAN L, XUANYI L, et al. Enrichment of cancer stem cells via β -catenin contributing to the tumorigenesis of hepatocellular carcinoma [J]. BMC Cancer, 2018, 18(1): 783-795.

[9] CARMINE F, HAO R, BRIAN D, et al. SHP2 inhibition prevents adaptive resistance to MEK inhibitors in multiple cancer models[J]. Cancer Discov, 2018, 8(10): 1237-1249.

[10] NICHOLS R J, FRANZISKA H, CARLOS S, et al. RAS nucleotide cycling underlies the SHP2 phosphatase dependence of mutant BRAF-, NF1- and RAS-driven cancers[J]. Nat Cell Biol, 2018, 20(9): 1064-1073.

[11] NEEL G, GU H, PAO L. The "Shp"ing news: SH2 domain-containing tyrosine phosphatases in cell signaling [J]. Trends Biochem Sci, 2003, 28(6): 284-293.

[12] LI S, HSU D F, LI B, et al. Cytoplasmic tyrosine phosphatase SHP2 coordinates hepatic regulation of bile acid and FGF15/19 signaling to repress bile acid synthesis [J]. Cell Metab, 2014, 20(2): 320-332.

[13] 方可薇, 张莉, 岳茜, 等. 磁共振介入在肝细胞癌治疗中的应用[J]. 影像诊断与介入放射学, 2018, 27(2): 147-150.

[14] 周坦洋, 孙军辉, 张岳林, 等. 肝动脉化学疗法栓塞联合选择性门静脉栓塞在肝癌二期切除术中的应用[J]. 中华消化杂志, 2014, 9(34): 582-588.

[15] 杨力侠, 邢书娟, 董明清. 基于靶向肿瘤干细胞抗肿瘤策略的研究进展[J]. 山东医药, 2019, 59(17): 91-94.