

NDR1 对肝癌患者预后和肝癌细胞增殖、迁移的影响

林燕妮^{1,2}, 吴淑蒙^{1,2}, 任鑫鑫^{1,2}, 谢天², 李玲², 叶棋浓^{1,2}

摘要 目的 分析核 Dbf2 相关激酶 1 (NDR1) 在肝癌中的表达和临床预后的意义, 探究 NDR1 在肝癌细胞中的生物学功能及其调控机制。方法 利用 ENCORI 数据库分析 NDR1 在肝癌组织及正常组织中的表达水平及其与肝癌患者生存率的关系。构建 MYC-NDR1 真核表达载体, 转染肝癌 HepG2 细胞, 通过蛋白质印迹法 (Western blot) 验证其表达; 利用 CCK-8 法、细胞克隆形成实验和划痕实验分别检测细胞增殖和迁移能力。利用 ENCORI 数据库分析 NDR1 与 c-Myc 表达的相关性, 并利用蛋白质合成抑制剂环己酰亚胺 (CHX) 加药实验研究 NDR1 与 c-Myc 蛋白的关系。结果 ENCORI 数据库分析显示, NDR1 在肝癌组织中的表达高于正常组织且 NDR1 高表达患者总生存率低于低表达患者, 差异有统计学意义 ($P < 0.001$); Western blot 检测到 MYC-NDR1 蛋白条带; CCK-8 法结果显示, MYC-NDR1 组细胞生长速度快于空载体组 ($P < 0.001$); 细胞克隆形成实验显示, MYC-NDR1 组的克隆数高于空载体组 ($P < 0.001$); 细胞划痕实验显示, MYC-NDR1 组平均迁移距离大于空载体组 ($P < 0.001$); ENCORI 数据库分析显示, NDR1 与 c-Myc 表达有着相关性 ($R = 0.184, P < 0.001$); CHX 加药实验显示, 在相同时间内, MYC-NDR1 组中 c-Myc 蛋白的减少量低于空载体组。结论 NDR1 在肝癌组织中高表达, 与肝癌患者预后不良紧密相关, 并与 c-Myc 基因的表达呈正相关; 该研究成功构建了 MYC-NDR1 真核表达载体, 表达产物 MYC-NDR1 能够增加 c-Myc 蛋白的稳定性, 促进人肝癌细胞增殖和迁移。

关键词 NDR1; 真核表达载体; 肝癌; c-Myc

中图分类号 R 34

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)04-0637-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.04.019

肝癌在我国的发病率和病死率仍处于较高的水平^[1]。核 Dbf2 相关激酶 1 (nuclear Dbf2-related ki-

nase 1, NDR1) 是 NDR 蛋白激酶家族成员之一, 属于进化上高度保守的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶家族成员^[2]。磷酸化是 NDR1 的激活修饰, 主要包括催化域中心、催化域外 C 端和疏水基序的磷酸化^[3]。NDR1 通过校正染色体和调控中心体复制参与稳定染色体组、诱导凋亡等发挥抑癌作用, 也可以通过干扰 E3 连接酶的泛素化和降解来增强 c-Myc 的稳定性发挥促癌作用^[4]。该研究分析了 NDR1 在肝癌中的表达对肝癌预后的影响, 初步探索了其调控肝癌细胞增殖和迁移的机制, 为进一步研究 NDR1 的促癌机制及抗癌药物靶点提供了研究方向。

1 材料与方法

1.1 材料 pXJ-40-myc 载体、人肝癌 HepG2 细胞系由军事医学研究院生物工程研究所细胞工程研究室保存; 限制性内切酶、DNA 连接酶购于日本 TaKaRa 公司; MYC 抗体购于武汉三鹰生物技术有限公司; 引物和测序由北京博迈德公司完成; BM2000 + DNA Marker 购于北京博迈德公司; 环己酰亚胺 (cycloheximide, CHX) 购于美国 MedChemexpress 公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 选取 ENCORI 数据库分析 NDR1 在肝癌中的表达水平、与肝癌患者总生存率的关系及与 c-Myc 表达的相关性。

1.2.2 重组质粒的构建与测序 以乳腺文库 (由军事医学研究院生物工程研究所细胞工程研究室保存) 为模板, 根据已知的 NDR1 的编码序列设计所需引物: 5'-CGGGATCCATGGCAATGACAGGCTCAACA C-3', 5'-CCGCTCGAGCTATTTTGCTGCTTTCATGTAG GA-3' (下划线为酶切位点)。PCR 产物检测正确后回收; 用 BamH I、Xho I 对回收的 PCR 片段进行双酶切, 获得带有黏性末端的双链; 对 pXJ-40-myc 载体用 BamH I、Xho I 进行双酶切, 胶回所需要的片段; 将 pXJ-40-myc 载体与双酶切后的片段连接。连接产物转化感受态细胞, 挑取单个菌落接种于相应抗性的液体 LB 培养基中, 37 °C 摇床培养 12 h, 收集菌液进行质粒提取, 双酶切质粒, 若电泳结果在 1 500 bp 处出现条带则送公司测序。

2023-02-27 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81902838, 81872246); 北京市自然科学基金 (编号: 7204284)

作者单位: ¹ 山西医科大学基础医学院生物学教研室, 太原 030000

² 军事科学院军事医学研究院生物工程研究所细胞工程研究室, 北京 100850

作者简介: 林燕妮, 女, 硕士研究生;

叶棋浓, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 责任作者, E-mail: yeqn66@yahoo.com;

李玲, 女, 博士, 助理研究员, 责任作者, E-mail: lizi09@163.com

1.2.3 Western blot 验证 MYC-NDR1 的表达 将 HepG2 细胞铺于 6 孔板中,待密度适宜后进行转染。按转染试剂的剂量要求配置所需的溶液,将 2 μ l VigoFect 和 98 μ l 生理盐水混匀,静置 5 min,再将 5 μ g 质粒与生理盐水充分混匀,并补至 100 μ l。将上述两种溶液混合,静置 15 min,同时转染空质粒 MYC,将混合液加入人肝癌 HepG2 细胞中,正常培养 4~6 h 后换液。培养 24~48 h 后收集细胞,加入约 3 倍细胞体积的裂解液后充分混匀,置于冰上 30 min,再加入对应量的 2 \times SDS 缓冲液,沸水煮 15 min,常温离心取上清液进行电泳,根据分子量确定电泳时间。将蛋白胶进行半干法转膜 1 h 后,5% 脱脂奶粉封闭 1 h 后加入稀释好的带 HRP 标记的抗 MYC 标签抗体,4 $^{\circ}$ C 冰箱内过夜,再放于摇床加入 1 \times TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,进行 ECL 法显影。

1.2.4 HepG2 细胞增殖实验 MYC 空载体、MYC-NDR1 质粒转染人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后,铺于 96 孔板中,每组设置 3 个复孔,每孔接种 3 000 个细胞,分别在连续 5 d 同一时间点加入 10 μ l CCK-8 与 90 μ l DMEM 的混合液,并置于孵箱 1 h 后,检测相应 450 nm 处吸光度值。以吸光度值为纵坐标,以时间为横坐标绘制增殖曲线。

1.2.5 HepG2 细胞克隆形成实验 将转染 24 h 后的人肝癌 HepG2 细胞接种于 6 孔板中,每个孔接种 3 000 个细胞,MYC-NDR1 组和空载体组分别设置 3 个复孔。37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 常规培养 2 周后,吸弃培养基后用 PBS 清洗 3 遍,使用 4% 多聚甲醛固定和 0.5% 结晶紫染色,拍照后进行克隆计数。

1.2.6 HepG2 细胞划痕实验 在 6 孔板中接种 HepG2 细胞,待细胞密度达到 80% 后,将 MYC-NDR1 和空载体分别转染至相应的 HepG2 细胞中。待转染 24 h 后用灭菌的 200 μ l 枪头进行划痕,再用 PBS 缓冲液充分冲洗,直至镜下无漂浮细胞,并加入无血清培养基,显微镜下拍照记录划痕情况。将细胞放回培养箱培养 24 h 后,选取相同部位再次进行拍照记录,并用 Image J 软件分析划痕宽度。

1.2.7 HepG2 细胞侵袭实验 将 MYC 空载体、MYC-NDR1 质粒转染人肝癌 HepG2 细胞 24 h 后,用 PBS 清洗 2 次后用无血清的培养基重悬。将稀释好的细胞接种在提前铺有基质胶的 Transwell 小室上层,每孔加入 300 μ l 细胞悬液。小室下层加 500 μ l 含 20% 血清的培养基后放入细胞培养箱培养。36 h 后取出培养箱中的 Transwell 小室后多聚甲醛固定,0.1% 的结晶紫染色后拍照记录细胞侵袭能力。

1.2.8 CHX 加药实验 在 HepG2 细胞中过表达 MYC-NDR1 和空载体,24 h 后加入 100 mg/ml CHX,计为 0 h,收集不同加药时间的细胞进行 Western blot 实验分析 c-Myc 蛋白的稳定性。

1.3 统计学处理 使用 SPSS 13.0 软件进行分析,每组数据重复 3 次。计量资料服从正态分布且方差齐,两组间用 *t* 检验进行比较,多组间采用方差分析进行比较。以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 NDR1 表达在肝癌组织中的临床价值 EN-CORI 数据库 (<https://starbase.sysu.edu.cn/>) 分析显示 NDR1 在肝癌肿瘤样本中的表达高于正常样本,差异有统计学意义 (*P* < 0.001)。见图 1A。EN-CORI 数据库分析 NDR1 表达与肝癌患者总生存率的关系,结果显示, NDR1 高表达患者总生存率低于低表达患者,差异有统计学意义 (*P* < 0.001)。见图 1B。

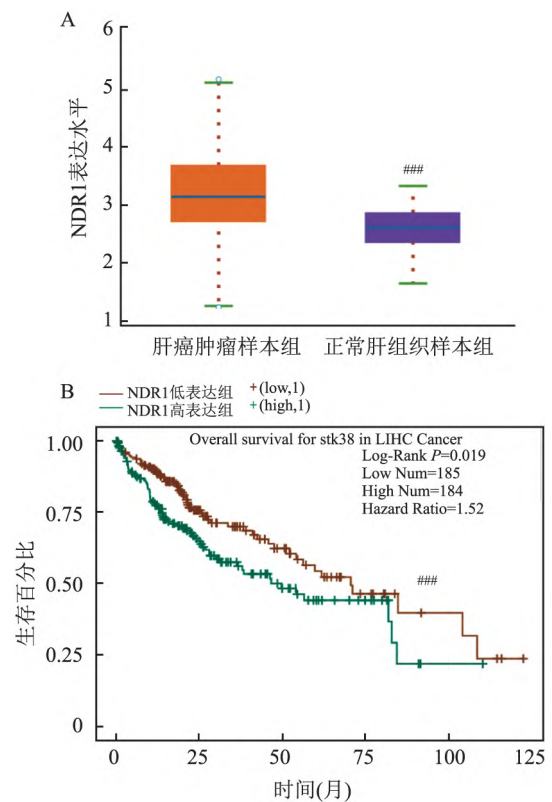


图 1 NDR1 与肝癌患者预后关系分析

A: NDR1 在肝癌肿瘤样本中的表达; B: NDR1 表达与肝癌患者预后的生存分析曲线;与 NDR1 低表达组比较:###*P* < 0.001

2.2 NDR1 真核表达载体的构建

2.2.1 NDR1 基因编码序列的扩增 以乳腺文库

为模板,PCR 扩增 *NDR1* 的序列,获得相应的片段位置。结果显示,在 1 500 bp 左右,与预期结果一致。见图 2。

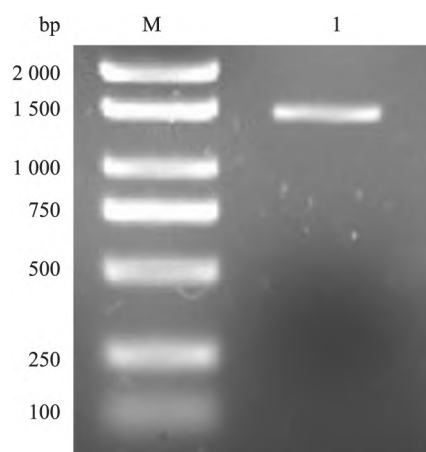


图2 目的基因 *NDR1* PCR 扩增产物
M: BM2000 + DNA 标志物; 1: PCR 扩增产物

2.2.2 重组质粒的构建和测序鉴定 将 pXJ-40-myc 载体与 PCR 产物同时经 *Bam*H I 和 *Xho* I 酶切后,进行连接。将连接产物转化并选取一定数量的克隆用于 PCR 验证。电泳位置大小为 1 500 bp 左右的克隆初步判断为带有人 *NDR1* 基因的阳性克隆,见图 3。阳性克隆提取质粒,再使用上述酶进行双酶切验证。结果显示,实验组中出现 2 条大小不一的条带,小片段条带与 *NDR1* 大小一致,而对应的空载体经酶切未见小片段条带。见图 4。测序结果表明目的基因序列无位点突变,符合预期结果。

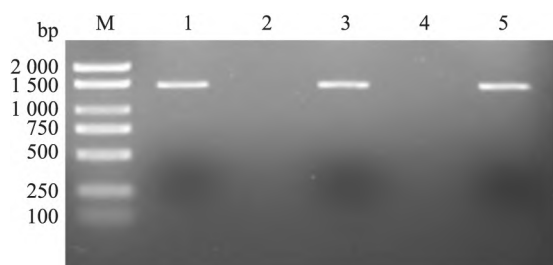


图3 *MYC-NDR1* 的菌液 PCR 鉴定结果
M: BM2000 + DNA 标志物; 1~3: 挑取的不同克隆; 4: 阴性对照; 5: 阳性对照

2.3 Western blot 检测 *MYC-NDR1* 在 HepG2 细胞中的表达 将构建成功的 *NDR1* 重组质粒和空载体分别转染 HepG2 细胞,验证 *MYC-NDR1* 在细胞中表达。Western blot 结果显示转染 *NDR1* 重组质粒的细胞在 45~60 ku 间出现条带,说明构建的 *MYC-*

NDR1 能在 HepG2 细胞中正确表达。见图 5。

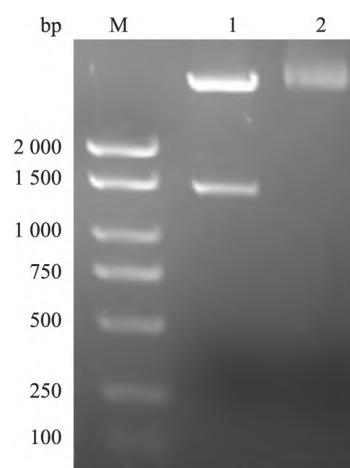


图4 *MYC-NDR1* 的双酶切鉴定结果
M: BM2000 标志物; 1: *MYC-NDR1* 重组质粒; 2: 空载体

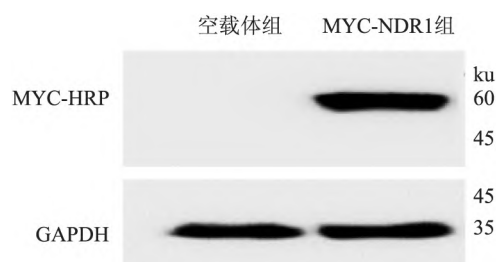


图5 Western blot 检测 *MYC-NDR1* 融合蛋白表达

2.4 CCK-8 法和克隆形成实验检测 *MYC-NDR1* 对 HepG2 细胞的增殖的影响 将 *MYC-NDR1* 及 pXJ-40-myc 载体转染人肝癌 HepG2 细胞,进行细胞增殖曲线和克隆形成实验。结果显示,*MYC-NDR1* 能够促进 HepG2 细胞增殖 ($P < 0.001$)。见图 6。

2.5 划痕实验检测 *MYC-NDR1* 对 HepG2 细胞的迁移的影响 在 HepG2 细胞中分别过表达 *MYC-NDR1* 和空载体,划痕实验结果显示,与空载体组相比,转染 *MYC-NDR1* 后 HepG2 细胞的平均迁移距离增加 ($P < 0.001$),说明 *NDR1* 促进 HepG2 细胞的迁移能力。见图 7。

2.6 侵袭实验检测 *MYC-NDR1* 对 HepG2 细胞的侵袭的影响 划痕实验结果显示,与空载体组相比,转染 *MYC-NDR1* 后穿过 Transwell 小室的 HepG2 细胞的数量增加 ($P < 0.001$),说明 *NDR1* 促进 HepG2 细胞的侵袭能力。见图 8。

2.7 *NDR1* 与 c-Myc 表达相关性,并对 c-Myc 蛋白稳定性的影响 用 ENCORI 数据库对 374 例肝癌标本进行相关性分析,结果显示 $R = 0.184$ ($P <$

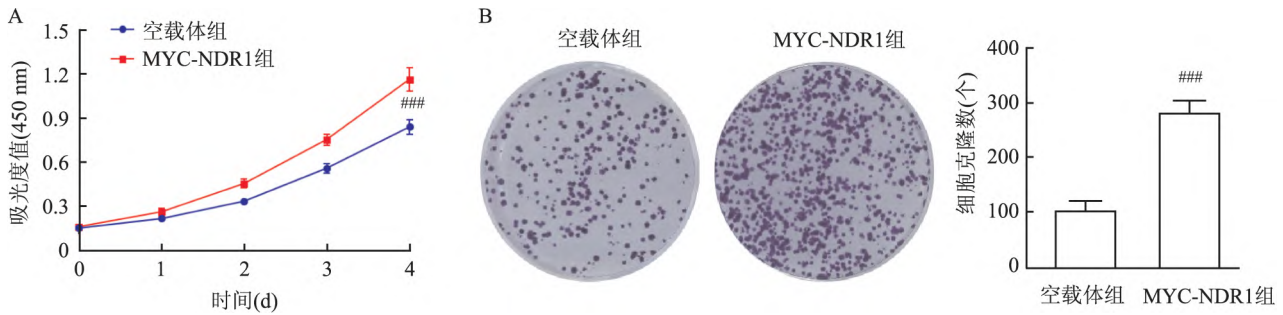


图6 CCK-8 细胞增殖实验和克隆形成实验检测 MYC-NDR1 对 HepG2 细胞增殖能力的影响

A: CCK-8 实验; B: 克隆形成实验肉眼观察结果; 与空载体组比较: ### $P < 0.001$

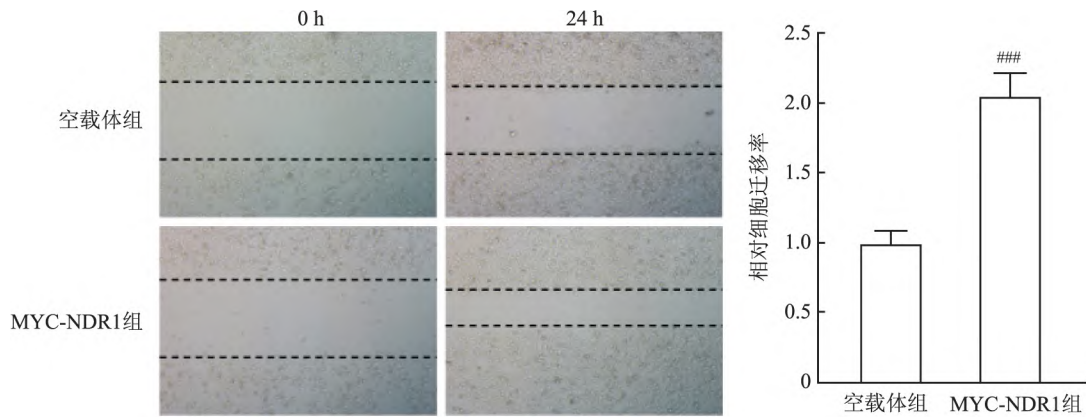


图7 划痕实验检测肝癌 HepG2 细胞的迁移能力

与空载体组比较: ### $P < 0.001$

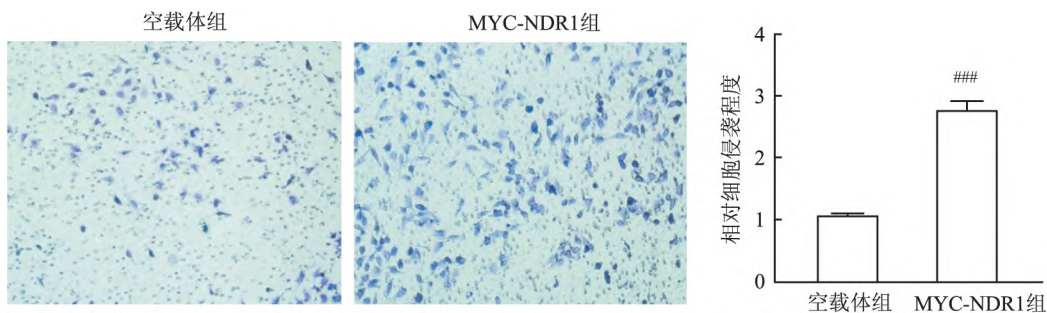


图8 侵袭实验检测肝癌 HepG2 细胞的侵袭能力 ×10

与空载体组比较: ### $P < 0.001$

0.001), 说明 NDR1 与 c-Myc 呈轻度正相关。见图 9A。在 HepG2 细胞中过表达 MYC-NDR1 和空载体 24 h 后加入 100 mg/ml CHX, 记为 0 h, 收集不同加药时间的细胞进行 Western blot 实验分析 c-Myc 蛋白的稳定性。结果显示, 在相同时间内, MYC-NDR1 组中 c-Myc 蛋白的减少量低于空载体组, 这说明 NDR1 可减慢 c-Myc 蛋白降解速度。见图 9B。

3 讨论

蛋白激酶是数量最大和功能最多样的基因家族

之一, 控制着生物体内许多关键过程, 包括基因表达、细胞周期、细胞生长、细胞凋亡和分化^[5]。当细胞内蛋白激酶的表达受到影响时, 通常会导致疾病的产生, 如自身免疫系统疾病、哮喘、肿瘤、神经发育障碍等。近年来, 蛋白激酶研究成为肿瘤治疗研究热点之一, 了解完整的人类蛋白激酶的功能将有助于发现新的疾病基因和设计出新的治疗方法。

NDR1 作为蛋白激酶家族的一员在中心体复制、细胞增殖和凋亡、神经元发育、自噬等重要的生理和病理过程中发挥着重要作用^[6-7]。NDR1 可以

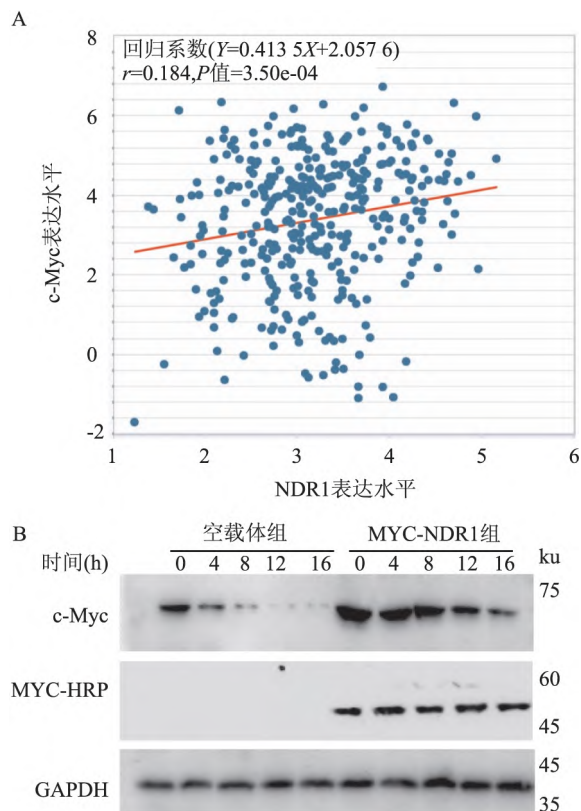


图9 NDR1 与 c-Myc 稳定性的关系

A: NDR1 与 c-Myc 表达呈正相关; B: NDR1 增加 c-Myc 蛋白稳定性

作为自噬过程中重要蛋白 Beclin1 的分子伴侣促进自噬体形成^[8]。NDR1 与细胞周期蛋白 D1 相互作用,增加 NDR1 从 G₁ 期到 S 期转变所需的激酶活性从而调节细胞周期进程^[9]。NDR1 是 RASSF1A/MST1 信号级联的关键成员,该信号通路可通过激活 NDR1 促进细胞凋亡^[10]。此外,NDR1 与传染病的发生发展也存在一定联系^[11-12]。NDR1 与肿瘤的联系也较为密切,在前列腺癌、乳腺癌、肺癌、黑色素瘤、胃癌等肿瘤细胞中发挥重要作用^[4,13]。尽管 NDR1 被报道在众多肿瘤细胞中发挥作用,但 NDR1 对于肝癌细胞的调控作用尚不明确。

原癌基因 Myc 家族是重要的癌基因家族之一,过表达 Myc 蛋白家族能够促进细胞增殖并加速肿瘤发生^[14]。近 30 年来肝病领域对 c-Myc 研究表明,在肝癌细胞中 c-Myc 失调比预期更常见^[15]。因此,发现能够调节肝癌细胞中 c-Myc 蛋白的调节因子对于肝癌的治疗和预后具有重要意义。

本研究通过生物信息学分析结果显示,NDR1 在肝癌组织中高表达,与肝癌患者预后不良紧密相关。本实验构建了带有 Myc 标签的 NDR1 真核表达载体,为后续在细胞实验中开展 NDR1 与肿瘤关键

蛋白相互作用、NDR1 对于信号通路的影响提供了研究工具,同时也对 NDR1 对肝癌发生发展的影响进行了初步研究。CCK-8 法、细胞克隆形成实验、细胞划痕实验结果显示,NDR1 可以提高肝癌 HepG2 细胞的增殖、迁移和侵袭能力,这说明 NDR1 在肝癌细胞中发挥促癌作用。为了研究 NDR1 促进肝癌细胞增殖和迁移的分子机制,本研究通过生物信息学分析和 CHX 加药实验初步探究了 NDR1 与 c-Myc 的关系。生物信息学结果显示,NDR1 与 c-Myc 表达呈轻度正相关,这说明 NDR1 与 c-Myc 之间具有一定的联系,并且有可能是通过影响 c-Myc 的稳定性在肝癌的发生发展中发挥着重要作用。CHX 加药实验结果显示,NDR1 可以增加肝癌细胞中 c-Myc 蛋白的稳定性,这很可能是 NDR1 在肝癌细胞中发挥促癌作用的机制之一。上述研究说明 NDR1 可能在今后的肝癌治疗中作为一个潜在的治疗靶点。预计随着研究的进展和深入,NDR 激酶家族可能成为肝癌患者个性化治疗的潜在靶点,也可能为肿瘤的免疫治疗提供新的有效靶点。

参考文献

- [1] Zhou H, Song T. Conversion therapy and maintenance therapy for primary hepatocellular carcinoma [J]. Biosci Trends, 2021, 15 (3): 155-60.
- [2] Gundogdu R, Hergovich A. MOB (mps one binder) proteins in the hippo pathway and cancer [J]. Cells, 2019, 8(6): 569.
- [3] Xing C, Shen W, Gong B, et al. Maternal factors and nodal auto-regulation orchestrate gene expression for embryonic mesoderm induction in the zebrafish [J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 887-987.
- [4] Martin A P, Camonis J H. The hippo kinase STK38 ensures functionality of XPO1 [J]. Cell Cycle, 2020, 19(22): 2982-95.
- [5] Gogl G, Kornev A P, Remenyi A, et al. Disordered protein kinase regions in regulation of kinase domain cores [J]. Trends Biochem Sci, 2019, 44(4): 300-11.
- [6] Ye X, Ong N, An H, et al. The emerging roles of NDR1/2 in infection and inflammation [J]. Front Immunol, 2020, 11: 534.
- [7] Wang S, Zhou L, Ling L, et al. The crosstalk between hippo-YAP pathway and innate immunity [J]. Front Immunol, 2020, 11: 323.
- [8] Joffre C, Dupont N, Hoa L, et al. The pro-apoptotic STK38 kinase is a new beclin1 partner positively regulating autophagy [J]. Curr Biol, 2015, 25(19): 2479-92.
- [9] Du Z, Tong X, Ye X. Cyclin D1 promotes cell cycle progression through enhancing NDR1/2 kinase activity independent of cyclin-dependent kinase 4 [J]. J Biol Chem, 2013, 288(37): 26678-87.
- [10] Joffre C, Codogno P, Fanto M, et al. STK38 at the crossroad

- between autophagy and apoptosis[J]. *Autophagy* ,2016 ,12(3) : 594 – 5.
- [11] Devroe E ,Silver P A ,Engelman A. HIV-1 incorporates and proteolytically processes human NDR1 and NDR2 serine-threonine kinases[J]. *Virology* 2005 ,331(1) :181 – 9.
- [12] Atkins C , Evans C W , Nordin B , et al. Global human-kinase screening identifies therapeutic host targets against influenza[J]. *J Biomol Screen* 2014 ,19(6) :936 – 46.
- [13] Wang L L , Wan X Y , Liu C Q , et al. NDR1 increases NOTCH1 signaling activity by impairing Fbw7 mediated NICD degradation to enhance breast cancer stem cell properties[J]. *Mol Med* 2022 ,28(1) :49.
- [14] Liu X , Zuo X , Sun X , et al. Hexokinase 2 promotes cell proliferation and tumor formation through the Wnt/ β -catenin pathway-mediated cyclin D1/c-myc upregulation in epithelial ovarian cancer [J]. *J Cancer* 2022 ,13(8) :2559 – 69.
- [15] Zheng K ,Cubero F J ,Nevzorova Y A. c-MYC-making liver sick: role of c-MYC in hepatic cell function , homeostasis and disease [J]. *Genes* 2017 ,8(4) :123.

Influence of NDR1 on prognosis of patients with hepatocellular carcinoma and effect on proliferation and migration of hepatocellular carcinoma cells

Lin Yanni^{1,2} ,Wu Shumeng^{1,2} ,Ren Xinxin^{1,2} ,Xie Tian² ,Li Ling² ,Ye Qinong²

(¹Dept of Biology ,School of Basic Medicine ,Shanxi Medical University ,Taiyuan 030000;

²Dept of Cell Engineering ,Institute of Biotechnology ,Academy of Military Medical Sciences , Academy of Military Sciences ,Beijing 100850)

Abstract Objective To analyze the expression and clinical prognostic significance of nuclear Dbf2-related kinase 1 (NDR1) in hepatocellular carcinoma , and to investigate the biological function and regulatory mechanism of *NDR1* in hepatocellular carcinoma cells. **Methods** ENCORI database was used to analyze the correlation of *NDR1* and c-Myc. Cycloheximide (CHX) experiment analyzed the relationship between *NDR1* and c-Myc protein stability. The expression levels of *NDR1* in liver cancer tissues and normal tissues and its relationship with the survival rate of liver cancer patients were analyzed using the ENCORI database. MYC-*NDR1* eukaryotic expression vector was constructed ,transfected with hepatocellular carcinoma HepG2 cells , and its expression was verified by protein immuno blotting (Western blot) ; cell proliferation and migration ability were detected by CCK-8 assay , cell clone formation assay and scratch assay , respectively. The correlation between *NDR1* and c-Myc expression was analyzed using the ENCORI database , and the relationship between *NDR1* and c-Myc protein was investigated using a protein synthesis inhibitor CHX dosing assay. **Results** The results of the ENCORI database showed that the expression of *NDR1* in liver cancer tissues was higher than that in normal tissues and the overall survival rate of patients with high *NDR1* expression was lower than that of patients with low *NDR1* expression , and the difference was statistically significant ($P < 0.001$) . The results of the CCK-8 assay showed that the MYC-*NDR1* group grew faster than the empty vector group ($P < 0.001$) . The clone formation assay showed that the number of clones in the MYC-*NDR1* group was higher than that in the empty vector group ($P < 0.001$) . The cell scratch assay showed that the mean migration distance in the MYC-*NDR1* group was greater than that in the empty vector group ($P < 0.001$) . ENCORI database analysis showed that *NDR1* correlated with c-Myc expression ($R = 0.184$, $P < 0.001$) ; CHX dosing assay showed that the reduction of c-Myc protein in the MYC-*NDR1* group was lower than that in the empty vector group during the same time. **Conclusion** *NDR1* is highly expressed in hepatocellular carcinoma tissues , closely correlated with poor prognosis of hepatocellular carcinoma patients , and positively correlated with the expression of c-Myc gene. The study successfully constructs MYC-*NDR1* eukaryotic expression vector , and the expression product MYC-*NDR1* can increase the stability of c-Myc protein and promote the proliferation and migration of human hepatocellular carcinoma cells.

Key words NDR1; eukaryotic expression vector; liver cancer; c-Myc