

ACTN4 通过靶向 NDUFV1 对食管鳞状细胞癌的细胞增殖的影响

冯成^{1*}, 程晓敏^{1*}, 谢一清², 康利平¹, 孙璋然¹, 范旭¹, 耿慧武¹, 刘晓颖¹

摘要 目的 探究 α -辅肌动蛋白-4 (ACTN4) 在食管鳞状细胞癌 (ESCC) 中的表达情况及其对 ESCC 细胞增殖的影响。方法 采用免疫组化实验检测 ESCC 组织及配对正常组织中 ACTN4 的表达, 统计学方法分析 ACTN4 与临床病理特征的相关性; 构建 ACTN4 shRNA 慢病毒表达载体, 利用慢病毒包装技术建立 ACTN4 稳定低表达的 ESCC 细胞株, Western blot 检测敲低效果, 克隆形成实验检测 ACTN4 敲低对细胞增殖的影响; 基于前期黑色素瘤 A375 细胞中 ACTN4 敲低的蛋白质组学分析结果, 选取候选下游靶蛋白并在 ESCC 细胞中进行验证。结果 免疫组化实验结果显示, ESCC 组织中的 ACTN4 表达量高于正常组织 ($P < 0.0001$); 成功构建 ACTN4 shRNA 慢病毒质粒并获得稳定低表达 ACTN4 的 ECA109 细胞株; 克隆形成实验结果表明, ACTN4 敲低抑制 ECA109 细胞的增殖; ESCC 细胞中 ACTN4 的敲低下调 NADH: 泛素氧化还原酶核心亚基 V1 (NDUFV1) 蛋白的表达。结论 ESCC 细胞中, 高表达的 ACTN4 能够促进细胞增殖, 并上调 NDUFV1 的蛋白表达。

关键词 食管鳞状细胞癌; α -辅肌动蛋白-4; 细胞增殖; NADH: 泛素氧化还原酶核心亚基 V1

中图分类号 R 735.1

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1790-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.018

食管鳞状细胞癌 (esophageal squamous cell carcinoma, ESCC) 是我国常见的消化道恶性肿瘤, 发病率和病死率居高不下, 急需有效的诊断和治疗手段。 α -辅肌动蛋白 (α -actinins, ACTNs) 定位于细胞-细胞和细胞-细胞外基质的接触部位, 通过将膜受体与细胞骨架相连来调节不同信号通路的转导途

径^[1]。 α -辅肌动蛋白家族有四个成员, α -辅肌动蛋白-4 (α -actinin-4, ACTN4) 作为成员之一, 在细胞中的分布广泛, 并能够参与多种细胞生命活动, 如细胞增殖、细胞运动及上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transformation, EMT) 等^[2-3]。同时, 在细胞信号转导过程中 ACTN4 也发挥着重要作用, 如参与核因子 κ B (nuclear factor kappa-B, NF- κ B)、Wnt/ β -catenin 等多种信号通路的调控^[4-5]。在肝癌细胞中, ACTN4 能够调控 AKT/mTOR 通路促进癌症的进展^[6]。ACTN4 已经被证实可以通过影响 NF- κ B 的活性促进肿瘤细胞的迁移能力。该研究在 ESCC 中探究 ACTN4 的表达情况及其对细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 试剂与抗体 RPMI-1640 培养基、DMEM (高糖) 培养基和 Opti-MEM 购于美国 GE 公司; 胎牛血清购于美国 CLARK Bioscience 公司; 胰酶消化液购于德国 Bio-Froxx 公司; Lipofectamine RNAiMAX 和 Lipofectamine 2000 试剂购于美国 Thermo-Fisher 公司; 一抗稀释液、青链霉素溶液、Western 及 IP 细胞裂解液、苯甲基磺酰氟 (PMSF) 购自上海碧云天生物技术有限公司; DAB 显色试剂盒购于北京中杉金桥生物技术有限公司; 二甲亚砜 (DMSO) 购于德国 Sigma-Aldrich 公司; ACTN4、NADH: 泛素氧化还原酶核心亚基 V1 (NADH: ubiquinone oxidoreductase core subunit V1, NDUFV1) 和 β -actin 抗体购于武汉 Proteintech 公司。

1.1.2 主要仪器 BSC-2 级生物安全柜 (1300 SERIES A2)、二氧化碳恒温培养箱 (VIOS160i) (美国 Thermo Fisher 公司); 倒置光学显微镜 (TS-100, 日本尼康公司); 倒置荧光显微镜 (Dmi6 LED, 德国 Leica 公司); 高速冷冻离心机 (Allegra 30r, 美国 Beckman Coulter 公司); 恒压电泳仪 (PowerPac Basic, 美国 BIO-RAD 公司)。

1.1.3 shRNA ACTN4 shRNA 质粒由本实验室保存, 序列见表 1。

2022-05-10 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81772908)

作者单位: ¹ 安徽医科大学生命科学院细胞生物学系, 合肥 230032

² 蚌埠医学院临床医学院 2018 级临床医学专业, 蚌埠 233030

作者简介: 冯成, 男, 硕士研究生;

刘晓颖, 女, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: liuxiaoying@ahmu.edu.cn

* 对本文具有同等贡献

表1 针对 ACTN4 的 shRNA 序列

shRNA 名称	序列(5'-3')
shACTN4-1	CCGGCCTGTACCAACCTGAACAATCTCGAGATTG TTCAGGTTGCTGACAGGTTTTTG
shACTN4-2	CCGGCCAGACTATCGGACATCAAACCTCGAGTTTG ATGTCCGATACTGTGGCTTTTTTG

1.1.4 组织和细胞 91 例食管鳞状细胞癌组织于 2016—2017 年分批取自安徽医科大学第一附属医院普胸外科经胸腹腔镜根治术切除的食管组织,在确保病理检测的前提下切取小部分组织分别保存于 -80°C 及福尔马林固定、包埋。所有患者于术前已阅读并签署“组织取材知情同意书”,并上报所在医院医学伦理部备案。食管鳞状细胞癌细胞 ECA109 和人胚胎肾细胞 HEK 293T 细胞为本实验室保存。

1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化实验 选取 91 例 ESCC 的组织芯片梯度复温;将组织芯片置于 45°C 二甲苯溶液中脱蜡 25 min,重复 1 次;将组织芯片依次放入 100% 乙醇 10 min,100% 乙醇 3 min,95% 乙醇 3 min,85% 乙醇 3 min,75% 乙醇 3 min,双蒸水 1 中 3 min,双蒸水 2 中 3 min,梯度脱蜡至水;3% H_2O_2 去除内源过氧化氢酶 30 min,PBS 清洗 3 次;1% 脱脂牛奶封闭 30 min; 4°C 孵育一抗过夜,次日 PBS 清洗 3 次;室温孵育二抗 30 min,PBS 清洗 3 次;DAB 溶液显色(时间根据情况而定),双蒸水终止反应;苏木精溶液染核 1 min,双蒸水清洗,烘干后封片,镜下观察并委托武汉塞维尔生物技术有限公司进行扫描。

1.2.2 免疫组化实验结果打分细则 对 TMA 芯片扫描结果进行打分,根据组织的染色强度和染色数目不同,将染色强度分为弱染色、中等染色和强染色三个等级,分别计为 1~3 分;将染色数目分为 0~25%、26%~50%、51%~75%、76%~100% 四个等级,分别计为 1~4 分。将二者相乘可得 ACTN4 在组织中的相对表达量得分。

1.2.3 细胞培养 ECA109 细胞使用含 8% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基,HEK 293T 细胞使用含 8% 胎牛血清的 DMEM(高糖)培养基,置于 37°C 、5% CO_2 、95% 湿度的培养箱中分别培养;培养的细胞每 2 d 更换培养基,细胞汇合度大于 90% 时进行传代,使用胰酶消化液对细胞进行消化,用培养基终止消化反应并计数。

1.2.4 shRNA 敲低实验 将 HEK 293T 细胞以 1×10^6 个/孔的数量接种到 6 孔板。次日观察细胞状态及汇合度合适即可进行慢病毒包装,将 shACTN4-

1/shACTN4-2/pLKO.1(空载)、Rev、GAG 和 VSVG 按 2:2:2:1 的比例用 Opti-MEM 混合;再以 1:1 的比例稀释 Lipofectamine 2000 试剂,将二者混合静置 15 min;弃去 6 孔板中的培养基,加入上述混合液继续培养 24 h;将 ECA109 细胞以 2×10^5 个/孔的数量接种到 6 孔板。第 3 日观察 ECA109 细胞状态及汇合度;HEK 293T 细胞培养到 24 h 时,收取培养基离心保留上清液;弃尽 ECA109 细胞 6 孔板中的培养基,加入上述上清液并标记为 4 组:①未处理组(正常培养基);②pLKO.1 组(阴性对照,pLKO.1 慢病毒颗粒感染);③shACTN4-1 组(shACTN4-1 慢病毒颗粒感染);④shACTN4-2 组(shACTN4-2 慢病毒颗粒感染)。继续培养 6 h 后更换新鲜培养基;继续培养 48 h 后,可通过荧光显微镜观察慢病毒感染效率;若感染效率良好,则将细胞消化后转移至 T25 细胞培养瓶中,并用嘌呤霉素($4 \mu\text{g}/\text{ml}$)药筛 2 d,之后梯度降低嘌呤霉素浓度继续药筛,1 周后检测 shRNA 敲低效果。

1.2.5 Western blot 实验 加入适量 Western 及 IP 细胞裂解液(含 1% PMSF)裂解细胞,冰上静置 30~40 min; 4°C 、14 000 r/min 离心 20 min;转移上清液,Bradford 法测定蛋白浓度;样品加入上样缓冲液沸水浴 5~10 min,每个样品取 $30 \mu\text{g}$ 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,转移蛋白至 PVDF 膜;5% 脱脂牛奶封闭 1.5 h,TBST 清洗 3 次,每次 10 min;孵育一抗 4°C 过夜,次日 TBST 清洗 3 次;再室温孵育二抗 1.5 h,TBST 清洗 3 次;显影。

1.2.6 细胞克隆形成实验 按照步骤 1.2.4 中进行操作,转染后 48 h 胰酶消化细胞后进行计数。按照 1 000~2 000 个/每孔将细胞接种到新的 6 孔板进行克隆形成实验,每 3 d 更换培养基,持续培养 10 d 后,观察单个克隆直径达到 1 mm 取出 6 孔板弃尽培养基,PBS 清洗 2 次,预冷的 70% 甲醇固定 10 min,结晶紫染色 20 min,流动水洗去浮色,烘干后拍照记录。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件对实验数据进行统计分析。实验重复 3 次,所有计量资料取小数点后 3 位并用表示,使用 t 检验分析两组结果之间的差异性, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;相关性分析采用斯皮尔曼相关(Spearman)系数法进行分析,依据两列成对等级的各对等级数之差来进行计算的相关系数用 ρ 表示。

2 结果

2.1 ACTN4 在 ESCC 组织中表达情况 ESCC 组

织与正常食管上皮组织交替排列($n = 91$) (图 1A) , 在 ESCC 组织中 ACTN4 呈现普遍的特异性高表达 , 且主要在细胞质内表达; 在正常食管上皮组织中 ACTN4 同样在细胞质中存在 , 但表达量较低 , 并且随着食管上皮继续向表层分化 , ACTN4 的表达量逐渐减少(图 1B) 。 TMA 芯片打分结果显示 ESCC 组织中 ACTN4 的表达量高于正常食管上皮组织 , 二者差异有统计学意义(图 1C) 。 进一步通过 Spearman 相关系数对打分结果和病例的病理信息进行统计分析(表 2) 结果显示 ACTN4 的表达与 ESCC 病例中临床病理特征均无相关性 , 但 ACTN4 在 ESCC 组织中的表达量高于正常食管上皮组织。 据此推测 ACTN4 在 ESCC 中的表达上调是一个早期事件。

2.2 ACTN4 稳定低表达 ECA109 细胞株的构建

荧光显微镜观察慢病毒的感染效率 , 如图 2A 所示 , 绿色荧光占比可达约 85% , 表明 ACTN4 shRNA 慢病毒良好的感染效率。 经过嘌呤霉素药筛后 , 细胞培养至汇合度 90% ~ 95% 时收集细胞沉淀进行 Western blot 结果显示 shRNA 敲低组相比于阴性对照组(pLKO. 1) ACTN4 的蛋白水平降低(图 2B) 。 该结果表明 , ACTN4 稳定低表达的 ECA109 细胞株构建成功。

表 2 TMA 芯片打分和病理资料间的统计学分析

参数	n	统计结果		
		$\bar{x} \pm s$	ρ	P 值
性别			0.121	0.255
男	69	8.718 ± 3.892		
女	22	9.636 ± 3.971		
手术时年龄(岁)			0.125	0.238
< 65	43	9.558 ± 3.574		
≥ 65	48	8.490 ± 4.129		
分化程度			0.091	0.392
高分化	7	9.143 ± 3.625		
中~高分化	17	8.471 ± 3.338		
中分化	44	9.023 ± 4.401		
中~低分化	10	8.100 ± 4.533		
低分化	13	10.231 ± 2.455		
肿瘤侵袭分期(T分期)			0.071	0.505
T ₁	13	8.917 ± 4.102		
T ₂	18	8.500 ± 4.301		
T ₃	60	9.197 ± 3.759		
淋巴结转移分期			0.033	0.759
N ₀	51	8.920 ± 4.080		
N ₁	26	9.333 ± 3.397		
N ₂	10	8.500 ± 4.899		
N ₃	4	8.000 ± 4.899		
肿瘤分期			0.011	0.916
I	9	9.750 ± 4.200		
II	43	8.628 ± 4.385		
III	39	9.300 ± 3.398		

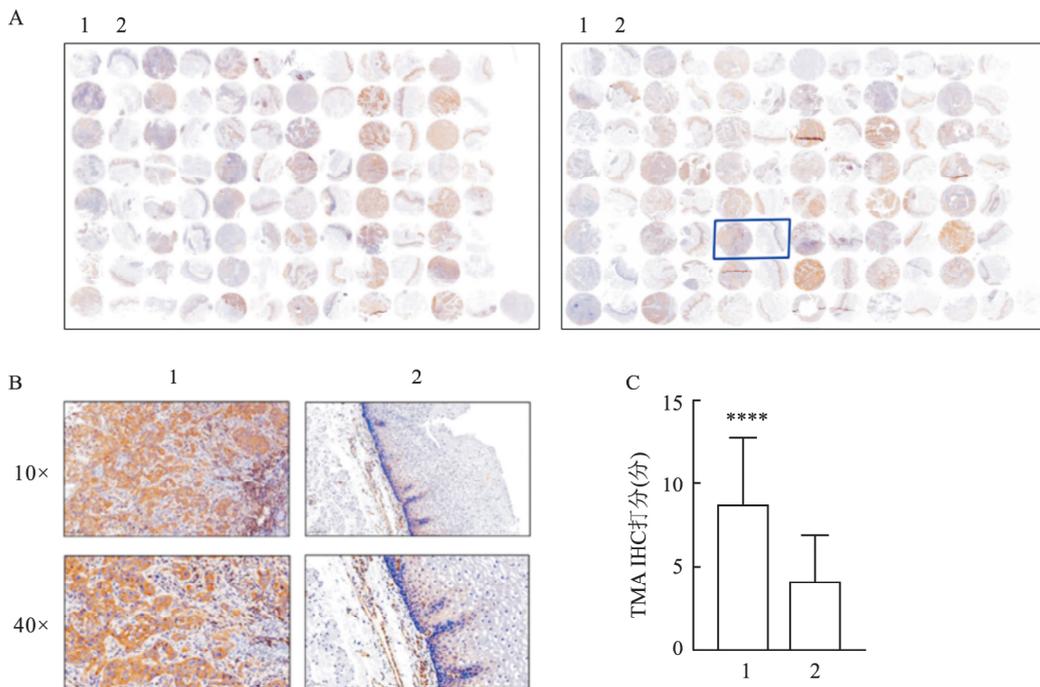


图 1 IHC 法检测 ESCC 组织中 ACTN4 的表达

A: TMA 组织芯片扫描图; B: ESCC 组织和正常食管上皮组织 ACTN4 DAB 显色结果; C: TMA 组织芯片 IHC 结果打分柱状图; 1: ESCC 组织; 2: 正常食管上皮组织; 与正常食管上皮组织比较: **** $P < 0.0001$

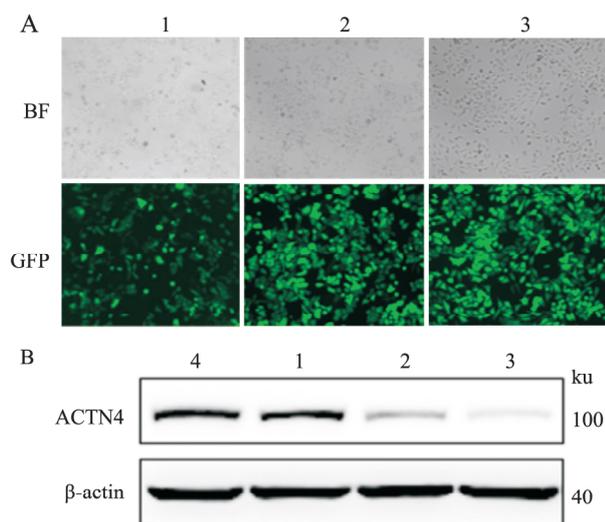


图2 ACTN4 稳定低表达的 ECA109 细胞株的构建

A: ECA109 细胞感染 ACTN4 shRNA 慢病毒质粒 48 h 的感染效率图; BF: 自然光; GFP: 绿色荧光; B: ECA109 细胞感染 ACTN4 shRNA 慢病毒质粒嘌呤霉素药筛后蛋白表达; 1: pLKO.1 组(阴性对照); 2: shACTN4-1 组; 3: shACTN4-2 组; 4: 未处理组

2.3 ACTN4 shRNA 敲低对 ECA109 的细胞增殖的影响 克隆形成实验结果显示, 相比于阴性对照组, ACTN4 shRNA 敲低组克隆的数量和大小都有明显降低(图 3)。该结果提示, 敲低 ACTN4 抑制了 ESCC 细胞的增殖, 即 ACTN4 能够促进 ESCC 的细胞增殖。

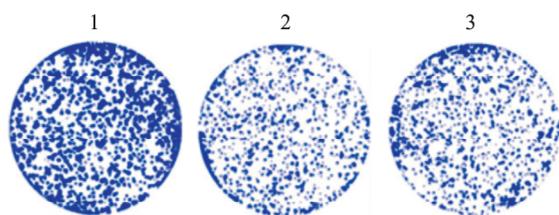


图3 ACTN4 稳定低表达 ECA109 细胞克隆形成染色结果
1: pLKO.1 组(阴性对照); 2: shACTN4-1 组; 3: shACTN4-2 组

2.4 ACTN4 shRNA 敲低对 NDUFV1 蛋白表达的影响 利用之前构建的 ACTN4 稳定低表达 ECA109 细胞株进行 Western blot, 结果显示, ACTN4 敲低的 ECA109 细胞中 NDUFV1 蛋白水平降低。见图 4。

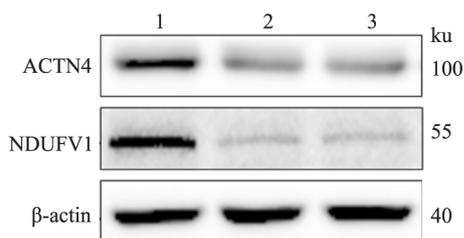


图4 ACTN4 shRNA 敲低下调 NDUFV1 蛋白表达
1: pLKO.1 组(阴性对照); 2: shACTN4-1 组; 3: shACTN4-2 组

3 讨论

癌症是威胁人类健康的主要杀手, 食管鳞状细胞癌作为病死率极高的癌症, 深入研究其发生发展并寻找有效的诊断和治疗手段非常必要。ACTN4 属于肌动蛋白结合蛋白家族, 最初被认为是一种与癌细胞运动密切相关的非肌肉型 α -肌动蛋白。ACTN4 具有许多不同功能, 如参与细胞骨架的构建、调节核转录因子的活性及病毒的复制等^[7-8]。研究显示, 在多种肿瘤中 ACTN4 表达升高: 在唾液腺癌和舌癌中发现其基因拷贝数存在异常, 且其基因所在的染色体 19q 区域发生了异常扩增^[9]; 在结直肠癌和肺癌中 ACTN4 呈现高表达且与淋巴结转移存在相关性^[10]。ACTN4 基因可能作为促癌因子参与某些肿瘤的侵袭、转移及细胞周期调控。研究^[11]显示, ACTN4 能够与远端上游元件结合蛋白 1 (FUBP1) 相互作用调节原癌基因 MYC 的表达促进乳腺癌的发生发展; ACTN4 已经被证实与 EMT 密切相关, 能够调控 NF- κ B 信号转导促进 EMT 的激活和发展, 从而促进肿瘤细胞的迁移和侵袭。本课题组前期研究^[12]表明, 在黑色素瘤中 ACTN4 可以参与调节受体相互作用蛋白激酶 1 (RIPK1) 的稳定性并激活 NF- κ B 从而促进黑色素瘤的细胞增殖。这些研究表明 ACTN4 在肿瘤发生发展和转移中的重要性。本研究结果显示 ACTN4 在 ESCC 组织中表达上调, 但其表达与目前掌握的病理资料中的临床病理特征无相关性; shRNA 技术和克隆形成实验结果表明, ACTN4 敲低抑制 ESCC 细胞的克隆形成能力, 即 ACTN4 能够促进 ESCC 的细胞增殖。表明在 ESCC 发生的早期 ACTN4 就发生了高表达并通过促进细胞增殖促进 ESCC 的发展, 且一直持续到恶性阶段, 提示 ACTN4 作为 ESCC 早期诊断的预测标志物的可能; ACTN4 促进细胞增殖的具体机制仍待探究。值得注意的是多项研究^[13-14]表明 ACTN4 可影响细胞周期及细胞迁移能力, 从而影响其生物学行为, 进一步表明 ACTN4 可能为潜在的肿瘤治疗靶点。

研究显示, NDUFV1 能够参与线粒体呼吸链氧化磷酸化为细胞提供能量的过程, NDUFV1 的缺陷是线粒体功能障碍的常见原因, 且与肌病、脑肌病和神经退行性疾病(如帕金森病和利氏综合征)有关^[15]; 在肺癌细胞中敲除 NDUFV1, 细胞的存活和耐药能力显著降低^[16]。本研究表明, 在 ESCC 细胞中 ACTN4 敲低抑制了 NDUFV1 的蛋白表达。由此

推测,ACTN4 敲低所致的 NDUFV1 表达降低可能导致 ESCC 细胞内线粒体功能障碍,从而抑制 ESCC 细胞的增殖。这为进一步探究 ACTN4 在 ESCC 中的具体分子机制奠定了基础。

ACTN4 参与了不同信号通路的调控,且越来越多的 ACTN4 相互作用蛋白被发现,丰富了 ACTN4 在肿瘤中的蛋白调控网络及作用机制研究,推动了以 ACTN4 为靶点的抗癌化合物的研发。如鞣花酸能够破坏 ACTN4 与 β -catenin 的相互作用从而抑制乳腺癌的转移^[17]。基于不同肿瘤存在异质性及化疗药物存在毒副作用等问题,以及 ACTN4 可否作为肿瘤治疗的靶点仍需进一步探究。

参考文献

- [1] Sjöblom B, Salmazo A, Djinović-Carugo K. Alpha-actinin structure and regulation [J]. *Cell Mol Life Sci* 2008, 65(17) : 2688 – 701.
- [2] Tentler D, Lomert E, Novitskaya K, et al. Role of ACTN4 in tumorigenesis, metastasis, and EMT [J]. *cells*, 2019, 8(11) : 1427.
- [3] Huang Z, Zhou J K, Wang K, et al. PDLIM1 inhibits tumor metastasis through activating hippo signaling in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology* 2020 71(5) : 1643 – 59.
- [4] Ji J, Xu R, Ding K, et al. Long noncoding RNA SchLAP1 forms a growth-promoting complex with HNRNPL in human glioblastoma through stabilization of ACTN4 and activation of NF- κ B signaling [J]. *Clin Cancer Res* 2019 25(22) : 6868 – 81.
- [5] Wang Q, Qin Q, Song R, et al. NHERF1 inhibits beta-catenin-mediated proliferation of cervical cancer cells through suppression of alpha-actinin-4 expression [J]. *Cell Death Dis* 2018, 9(6) : 668.
- [6] Zhu M X, Wei C Y, Zhang P F, et al. Elevated TRIP13 drives the AKT/mTOR pathway to induce the progression of hepatocellular carcinoma *via* interacting with ACTN4 [J]. *J Exp Clin Cancer Res* 2019, 38(1) : 409.
- [7] Chen Q, Wang H, Li Z, et al. Circular RNA ACTN4 promotes intrahepatic cholangiocarcinoma progression by recruiting YBX1 to initiate FZD7 transcription [J]. *J Hepatol* 2022, 76(1) : 135 – 47.
- [8] Su W, Shen Y, Wang Y, et al. circPHIP promotes oral squamous cell carcinoma progression by sponging miR-142-5p and regulating PHIP and ACTN4 expression [J]. *Mol Ther Nucleic Acids* 2020, 23: 185 – 99.
- [9] Berania I, Cardin G B, Clément I, et al. Four PTEN-targeting co-expressed miRNAs and ACTN4-targeting miR-548b are independent prognostic biomarkers in human squamous cell carcinoma of the oral tongue [J]. *Int J Cancer* 2017, 141(11) : 2318 – 28.
- [10] Liao Q, Li R, Zhou R, et al. LIM kinase 1 interacts with myosin-9 and alpha-actinin-4 and promotes colorectal cancer progression [J]. *Br J Cancer* 2017, 117(4) : 563 – 71.
- [11] Wang X, Xing L, Yang R, et al. The circACTN4 interacts with FUBP1 to promote tumorigenesis and progression of breast cancer by regulating the expression of proto-oncogene MYC [J]. *Mol Cancer* 2021 20(1) : 91.
- [12] Zhang Y Y, Tabataba H, Liu X Y, et al. ACTN4 regulates the stability of RIPK1 in melanoma [J]. *Oncogene* 2018, 37(29) : 4033 – 45.
- [13] Nolan J C, Salvucci M, Carberry S, et al. A context-dependent role for MiR-124-3p on cell phenotype, viability and chemosensitivity in neuroblastoma *in vitro* [J]. *Front Cell Dev Biol* 2020; 8: 559553.
- [14] Jung J, Kim S, An H T, et al. α -Actinin-4 regulates cancer stem cell properties and chemoresistance in cervical cancer [J]. *Carcinogenesis* 2020; 41(7) : 940 – 9.
- [15] Li B, Yang Y, Wang Y, et al. Acetylation of NDUFV1 induced by a newly synthesized HDAC6 inhibitor HGC rescues dopaminergic neuron loss in Parkinson models [J]. *iScience* 2021 24(4) : 102302.
- [16] Benej M, Hong X, Vibhute S, et al. Papaverine and its derivatives radiosensitize solid tumors by inhibiting mitochondrial metabolism [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 2018, 115(42) : 10756 – 61.
- [17] Wang N, Wang Q, Tang H, et al. Direct inhibition of ACTN4 by ellagic acid limits breast cancer metastasis *via* regulation of β -catenin stabilization in cancer stem cells [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017 36(1) : 172.

Effect of ACTN4 on cell proliferation of esophageal squamous cell carcinoma by targeting NDUFV1

Feng Cheng¹, Cheng Xiaomin¹, Xie Yiqing², Kang Liping¹, Sun Zhangran¹, Fan Xu¹,
Geng Huiwu¹, Liu Xiaoying¹

(¹Dept of Cell Biology, School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032;

²School of Clinical Medicine, Bengbu Medical College, Bengbu 233030)

Abstract Objective To investigate the expression of alpha-actinin-4 (ACTN4) and the effect on cell proliferation in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). **Methods** The expression of ACTN4 in ESCC tissues and paired normal tissues was detected by immunohistochemistry, and the correlation between ACTN4 and the clinicopathological features was analyzed statistically. The ACTN4 shRNA lentiviral plasmids were constructed, and the stable

网络出版时间: 2022-09-15 08:40 网络出版地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/34.1065.R.20220913.1746.018.html>

lbp 基因敲除改善脓毒症大鼠肝脏炎症性损伤及其作用机制

马文潇^{1,2*} 陈姝文^{1,2*} 刘海峰^{1,2} 易昕睿¹ 王永³ 贺智翔^{1,2},
何茂章¹ 薛敏¹ 唐云书¹ 闫妍¹ 程文慧¹ 朱亚玲¹

摘要 目的 探究脂多糖结合蛋白(*lbp*)基因对大鼠脓毒症的作用及其重要调节机制。方法 利用脂多糖(LPS)诱导急性肝脏炎症损伤模型,采用生化分析仪检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天冬氨酸氨基转移酶(AST)水平评估肝损伤程度,利用RT-PCR检测促炎因子TNF- α 和IL-6评估炎症水平,肝脏苏木精-伊红染色观测肝组织炎症细胞浸润和肝细胞损伤情况,并通过RNA-Seq技术对比*lbp*基因敲除(*lbp*^{-/-})大鼠和野生型(WT)大鼠的转录组表达差异情况,挖掘*lbp*基因在LPS诱导的肝脏炎症损伤中调控的下游基因,通过GO功能注释和KEGG富集分析探索其生物学过程和信号通路。结果 与WT组相比,*lbp*^{-/-}大鼠血清中ALT、AST和促炎因子水平降低($P < 0.05$),组织学观察显示炎症细胞浸润减少。肝组织转录组学分析显示,敲除*lbp*基因后共有168个基因差异性表达($P < 0.05$),其中*Cyp7a1*、*Cyp4a2*等上调基因富集于过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号通路和类固醇激素合成途径($P < 0.05$)。结论

lbp^{-/-}可能通过促进PPAR信号通路参与细菌清除及脂质代谢等生物学过程,从而减轻肝脏炎症性损伤,减缓脓毒症的发生发展。

关键词 脓毒症; LBP; LPS; 差异基因; RNA-Seq; 肝脏失调
中图分类号 R 363.21

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2022)11-1795-07

doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2022.11.019

脓毒症是由炎症反应引起宿主器官功能障碍的疾病,具有发病率高、病死率高等特点,是急危重症医学面临的重要临床问题^[1]。脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)又称内毒素,是脓毒症的主要致病因素之一^[2],而LPS结合蛋白(lipopolysaccharide-binding protein, LBP)是肝脏分泌的急性反应期蛋白,可特异性结合LPS,并促进形成脂多糖/Toll样受体4/分化群14(lipopolysaccharide/toll-like receptor 4/cluster of differentiation 14, LPS/TLR4/CD14)复合物,激活Toll样受体4/髓样分化蛋白88/核因子 κ B(toll-like receptor 4/myeloid differentiation-88/nuclear factor kappa-B, LR4/MyD88/NF- κ B)信号通路^[3],引起炎症反应,并诱发肝脏损伤^[4]。研究表明*lbp*基因敲除(*lbp*^{-/-})或可减轻LPS诱导的肝脏炎症损伤^[5],然而其具体的调节机制并未阐明。该研究以*lbp*^{-/-}大鼠为对象,通过注射LPS刺激诱导肝损伤为模型,基于转录组测序揭示*lbp*基因在脓毒症相关肝脏炎症损伤发生中的作用及其机制,为脓毒症的防治提供一定的理论基础。

2022-07-14 接收

基金项目: 安徽医科大学校级科研基金(编号: 2019xkj003、2020xkj007);
安徽医科大学博士科研资助基金(编号: XJ201925); 安徽省
高校科学研究项目(编号: KJ2021A0205)

作者单位: 安徽医科大学¹基础医学院、²第一临床医学院,合肥
230032

³安徽池州市人民医院妇产科,池州 247000

作者简介: 马文潇,女,本科生;

程文慧,女,硕士,助理实验师,责任作者, E-mail: chengwenhui@ahmu.edu.cn;

朱亚玲,女,博士,校聘副教授,责任作者, E-mail: zhuyaling@ahmu.edu.cn

* 对本文具有同等贡献

ECA109 strain with ACTN4 shRNA knockdown was established using lentivirus packaging technology. The knock-down efficiency on protein level was checked by Western blot, and cell proliferation was detected by colony formation assays. The downstream target proteins were validated in ESCC cell line ECA109 based on the previous proteomics analyses in melanoma cell line A375 with or without ACTN4 shRNA knockdown. **Results** The expression of ACTN4 in ESCC tissues was significantly higher than that of normal tissues. ACTN4 shRNA stable knockdown ECA109 cell strains were successfully constructed. The results of colony formation assays showed that ACTN4 knockdown inhibited the cell proliferation and down-regulated NADH : Ubiquinone oxidoreductase core subunit V1 (NDUFV1) protein expression in ECA109 cells. **Conclusion** Upregulation of ACTN4 in ESCC cells promotes the cell proliferation and enhances the protein expression of NDUFV1.

Key words esophageal squamous cell carcinoma; alpha-actinin-4; cell proliferation; NADH : ubiquinone oxidoreductase core subunit V1