

孙建海,马燕凌,魏武杰,等. FCRL3 在原发性肝癌中的表达及其对肝癌细胞 HepG2 增殖和迁移的影响[J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(8): 88-92.

Sun JH, Ma YL, Wei WJ, et al. Expression of Fc receptor-like protein 3 in hepatocellular carcinoma and its effect on the proliferation and migration of HepG2 cells [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(8): 88-92.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2019.08.014

FCRL3 在原发性肝癌中的表达及其对肝癌细胞 HepG2 增殖和迁移的影响

孙建海,马燕凌*,魏武杰,晏菲,方红艳,瞿姣

(江汉大学附属湖北省第三人民医院肿瘤科,武汉 430033)

【摘要】 目的 探讨 Fc 受体样蛋白 3 (Fc receptor-like protein 3, FCRL3) 在原发性肝癌中的表达及其对肝癌细胞 HepG2 增殖和迁移的影响。方法 检测肝癌组织、正常肝组织、肝癌细胞 HepG2 FCRL3 mRNA 及蛋白的表达,用 MTT 法、细胞划痕实验检测 FCRL3 特异性 siRNA 及 FCRL3 过表达组对肝癌细胞 HepG2 增殖率和迁移能力的影响。结果 肝癌组织内 FCRL3 mRNA 表达量和蛋白量均较正常肝组织增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);与 FCRL3 干扰表达组比较,FCRL3 阴性对照组和 FCRL3 过表达组肝癌细胞 HepG2 内 FCRL3 mRNA 表达量和蛋白量均增加,增殖率和迁移能力增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$);与 FCRL3 阴性对照组比较,FCRL3 过表达组肝癌细胞 HepG2 内 FCRL3 mRNA 表达量和蛋白量均增加,增殖率和迁移能力增加,差异具有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论 肝癌组织中 FCRL3 的表达增加,抑制 FCRL3 的表达可抑制肝癌细胞的增殖和迁移,提示 FCRL3 可能在肝癌发生过程中发挥重要的作用。

【关键词】 Fc 受体样蛋白 3;肝癌;细胞增殖;细胞迁移

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2019) 08-0088-05

Expression of Fc receptor-like protein 3 in hepatocellular carcinoma and its effect on the proliferation and migration of HepG2 cells

SUN Jianhai, MA Yanling*, WEI Wujie, YAN Fei, FANG Hongyan, QU Jiao

(Department of Oncology, Hubei No. 3 People's Hospital of Jianghan University, Wuhan 430033, China)

【Abstract】 Objective To investigate the expression level of Fc receptor-like protein 3 (FCRL3) in hepatocellular carcinoma and to determine its effect on the proliferation and migration of hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **Methods** The expression of FCRL3 mRNA and protein was detected in hepatocellular carcinoma tissues, healthy liver tissues, and HepG2 cells by RT-PCR. The effects of FCRL3-specific small interfering (si)RNA on the proliferation and migration of HepG2 cells were detected by an MTT assay and cell scratch test. **Results** FCRL3 mRNA and protein expression was significantly higher in hepatocellular carcinoma tissues than in healthy liver tissues ($P < 0.05$). FCRL3 mRNA and protein expression levels were significantly lower following siRNA in HepG2 cells, and the proliferation rate and migration ability were significantly decreased ($P < 0.05$). Additionally, the expression of FCRL3 mRNA and protein in HepG2 cells overexpressing FCRL3 was significantly increased compared with controls, as well the proliferation rate and migration

【基金项目】 2016 年武汉卫计委科研重点项目 (WX16B23)。

【作者简介】 孙建海 (1973—) 男,医学硕士,主任医师,教授,研究方向:肿瘤综合治疗。E-mail: sunjian.hai@163.com

【通信作者】 马燕凌 (1977—) 女,主任医师,教授,医学硕士,研究方向:肿瘤综合治疗。E-mail: 1904227737@qq.com

ability ($P < 0.05$). **Conclusions** The expression of FCRL3 in hepatocellular carcinoma is up-regulated compared with healthy liver tissue. FCRL3 inhibition reduces the proliferation and migration of hepatoma cells, suggesting that FCRL3 plays an important role in the progression of hepatocellular carcinoma.

【Keywords】 FCRL3; hepatocellular carcinoma; cell proliferation; cell migration

肝癌是常见的恶性肿瘤,其发病率和病死率均位于肿瘤前列。全球每年新增肝癌患者约为 70 万例,仅次于肺癌;我国每年新增肝癌患者 30 万左右,占全球肝癌总患者 50% 左右^[1-3]。由于肝细胞具有较强的代偿功能,80% 的患者发现时已经处于中晚期,手术和放疗的效果较差,术后有超过 60% 的患者发生了肝癌细胞的转移,其术后 5 年生存率不超过 5%,癌症复发和转移成为肝癌主要的致死原因^[4-5]。目前研究者一直致力于从肝癌细胞增殖和迁移的分子机制去改善肝癌的预后与治疗。通过 Oncomine 数据库整合疾病基因表达谱发现,Fc 受体样蛋白(Fc receptor like proteins, FCRL)家族蛋白在原发性肝癌中显著升高,但其作用机制至今未明^[6-7]。FCRL3 是 FCRL 家族的重要一员,通过 Oncomine 数据库整合原发性肝癌组织(对比于正常肝脏组织)表达谱分析发现,FCRL3 在原发性肝癌中显著升高,提示 FCRL3 蛋白可能在原发性肝癌中起关键作用,FCRL3 蛋白与多种免疫相关性疾病,如类风湿性关节炎、甲亢等,但其在肝癌中的作用尚未清楚^[8-10]。基于上述依据,探讨 FCRL3 在原发性肝癌中的表达及其对肝癌细胞 HepG2 增殖和迁移的影响,为 FCRL3 成为肝癌治疗靶点提供一定的研究依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

48 例肝癌组织来源于我院外科手术切除肝癌患者的癌组织,40 例人正常肝组织来源于我院外科因外伤切除的正常肝脏组织。癌组织和正常组织均通过病理学进行确诊(本研究得到江汉大学附属湖北省第三人民医院医学伦理委员会的批准(伦理审批号:20180215),病人及家属均签署知情同意书。

1.2 主要试剂与仪器

肝癌细胞 HepG2(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库,中国),脂质体 Lipofectamine 2000, FCRL3 过表达病毒载体和 siRNA 干扰表达病毒载体(上海吉凯生物公司,中国),青链霉素溶液、胰酶(Corning 公司,美国),RPMI-1640 和胎牛血清(Gibco 公司,美国),Trizol Reagent RNA 提取试剂盒

(Invitrogen 公司,美国)、PrimeScript RT reagent Kit Perfect Real Time RNA 反转录试剂盒(大连 TaKaRa 公司,中国)、UltraSYBR One Step RNA PCR Kit 荧光定量 PCR 试剂盒(宝生物工程大连有限公司,中国)、FCRL3 和 GAPDH 引物(大连 TaKaRa 公司,中国)、PCR 引物序列(上海生工生物工程有限公司,中国): FCRL3 引物序列:上游引物为 5'-AACAGGAAAATAATACAAATGTACAGACCA-3',下游引物为:5'-GGGAAAGAAGACACGAAAGCA-3'; GAPDH 引物序列:上游引物为 5'-TCCCATCACCATCTTCCAG-3',下游引物为:5'-GGTATCCATCGCCATGCTC-3',四噻唑蓝(Methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)(Amresco 公司,美国)、细胞蛋白抽提试剂(碧云天生物技术研究,中国),鼠抗 FCRL3 单克隆抗体(Santa Cruz 公司,美国),辣根过氧化物酶 HRP 标记亲和纯化山羊抗小鼠 IgG 二抗、鼠抗 GAPDH 单克隆抗体(武汉艾美捷科技有限公司,中国),二氧化碳细胞培养箱(Thermo Revco,美国),NanoDrop2000c 型蛋白核酸检测仪(Thermo 公司,美国),实时荧光定量 PCR 仪(Bio-Rad 公司,美国),倒置显微镜(Nikon 公司,日本),基质胶、Bio-Rad 垂直电泳仪(BD 公司,美国),凝胶成像仪(UVP 公司,美国)。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养及转染

用含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基培养肝癌细胞 HepG2,条件为 37℃、5% CO₂,隔天换液,当细胞处于对数生长期时用胰酶消化后进行实验。实验分为 FCRL3 干扰表达组、FCRL3 阴性对照组和 FCRL3 过表达组。FCRL3 干扰表达组加入 FCRL3 siRNA 干扰表达病毒载体和脂质体、阴性对照组只加入脂质体、FCRL3 过表达组加入过表达病毒载体和脂质体,转染成功后继续培养 24 h 收获细胞,进行相关检测。

1.3.2 实时荧光 RT-PCR 检测 FCRL3 mRNA 的表达

取肝癌组织、正常肝组织和 HepG2 各组细胞,根据 RNA 提取试剂盒操作说明书进行总 RNA 提取,测定 mRNA 浓度和纯度,将提取的总 RNA 根据

反转录试剂盒说明合成 cDNA, 根据 SYBR Premix Ex Taq™ II 荧光定量 PCR 试剂盒说明, 用制备 20 μL 反应体系, 在 CFX-96 PCR 扩增仪中进行扩增。反应条件为预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s、变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 5 s、60 $^{\circ}\text{C}$ 44 s、40 个循环, 61 $^{\circ}\text{C}$ 时采集荧光, 用实时荧光定量 PCR 仪检测对其表达量进行结果分析, 以 GADPH 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算 FCRL3 mRNA 的相对表达量。

1.3.3 Western blot 法检测 FCRL3 蛋白水平

取肝癌组织、正常肝组织和肝癌细胞 HepG2 各组细胞, 根据组织和细胞量加入胞蛋白抽提试液, 冰浴 2 h; 4 $^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min、15 min, 取上清, 进行蛋白定量; 调整蛋白浓度, 加入 1/5 体积的 5 \times Buffer, 沸水进行变性, -80 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。采用 Bio-Rad 湿转系统 SDS-PAGE 胶进行电泳、切胶; 孵育一抗、4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育相应条带过夜、孵育相对于二抗, 采集图像, 用凝胶成像仪对免疫印迹条带灰度值并进行分析。

1.3.4 MTT 法检测肝癌细胞 HepG2 增殖率

各组细胞在转染成功后进行消化, 以每孔 5×10^3 接种于 96 孔板中, 每孔 200 μL , 继续培养 24 h, 加入 MTT 每孔 50 μL 。培养 4 h, 弃上清液, 加入 DMSO 每孔 200 μL , 振荡 10 min, 用检测的吸光度值 (OD 值), 计算 HepG2 细胞增殖率 [细胞增殖率 =

(实验组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值)]。每各剂量组设 3 个平行孔。

1.3.5 细胞划痕法检测肝癌细胞 HepG2 迁移能力

各组细胞在转染成功后进行消化, 调整细胞浓度, 以每孔 5×10^4 接种于 6 孔板内, 每孔 200 μL , 加入 1 mL 含血清的 RPMI-1640 培养基, 继续培养 24 h 左右, 使细胞形成单层细胞爬满孔板底部, 用 100 μL 灭菌枪头在单层细胞上呈“—”字划痕, 用无血清的 RPMI-1640 培养基清洗 3 次, 加无血清培养基温育细胞 24 h, 用显微镜下拍照, 每孔 3~5 个视野。用图像分析仪测量测量划痕宽度, 实验重复 3 次。

1.4 统计学方法

用 SPSS 19.0 统计软件进行统计分析。实验结果采用均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$), 采用单因素方差分析和 *t* 检验进行判断, 组间两两比较用 SNK-*q* 检验, 以 $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌组织和正常肝组织内 FCRL3 mRNA 及蛋白的表达

与正常肝组织比较, 肝癌组织内 FCRL3 mRNA 和蛋白表达量均增加, 差异具有统计学意义 ($t = 4.54, 3.87, P < 0.05$) (表 1, 图 1)。

表 1 肝癌组织和正常肝组织内 FCRL3 mRNA 及蛋白的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Expression of FCRL3 mRNA and protein in the liver cancer and normal liver tissues

分组 Groups	例数 Number of cases	FCRL3 mRNA	FCRL3 蛋白 FCRL3 protein
正常肝组织 Normal liver tissue	40	1.00 \pm 0.03	1.79 \pm 0.15
肝癌组织 Liver cancer tissue	48	3.15 \pm 0.37 ^a	3.57 \pm 0.43 ^a

注: 与正常肝组织比较, ^a $P < 0.05$ 。

Note. Compared with normal liver tissue, ^a $P < 0.05$.

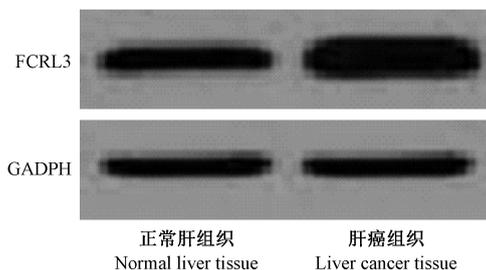


图 1 肝癌组织和正常肝组织内 FCRL3 蛋白的表达

Figure 1 Expression of FCRL3 protein in liver cancer and normal liver tissues

2.2 FCRL3 干扰表达组、FCRL3 阴性对照组和 FCRL3 过表达组肝癌细胞 HepG2 内 FCRL3 mRNA 及蛋白的表达

与 FCRL3 干扰表达组比较, FCRL3 阴性对照组

和 FCRL3 过表达组肝癌细胞 HepG2 内 FCRL3 mRNA 表达量和蛋白量均增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 FCRL3 阴性对照组比较, FCRL3 过表达组肝癌细胞 HepG2 内 FCRL3 mRNA 表达量和蛋白量均增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 2, 图 2)。

2.3 FCRL3 表达对肝癌细胞 HepG2 增殖率和迁移能力的影响

与 FCRL3 干扰表达组比较, FCRL3 阴性对照组和 FCRL3 过表达组肝癌细胞 HepG2 增殖率和迁移能力增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 FCRL3 阴性对照组比较, FCRL3 过表达组肝癌细胞 HepG2 增殖率和迁移能力增加, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$) (表 3, 图 3)。

表 2 FCRL3 干扰表达组、FCRL3 阴性对照组和 FCRL3 过表达组肝癌细胞 HepG2 内 FCRL3 mRNA 及蛋白的表达($\bar{x}\pm s$)

Table 2 The expression of FCRL3 mRNA and protein in hepatocellular carcinoma cells in different groups

分组 Groups	例数 Number of cases	FCRL3 mRNA	FCRL3 蛋白 FCRL3 protein
FCRL3 干扰表达组 FCRL3 interference expression group	3	0.57±0.06	0.67±0.11
FCRL3 阴性对照组 FCRL3 negative control group	3	0.98±0.04 ^a	1.84±0.18 ^a
FCRL3 过表达组 FCRL3 overexpression group	3	1.86±0.53 ^{ab}	2.54±0.22 ^{ab}

注:与 FCRL3 干扰表达组比较,^a $P<0.05$;与 FCRL3 阴性对照组比较,^b $P<0.05$ 。

Note. Compared with the normal FCRL3 interference expression group, ^a $P<0.05$. Compared with the normal FCRL3 negative control group, ^b $P<0.05$.

表 3 FCRL3 表达对肝癌细胞 HepG2 增殖率和迁移能力的影响($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Influence of FCRL3 expression on the proliferation rate and migration ability of HepG2 cells

分组 Groups	例数 Number of cases	细胞增殖(%) Cell proliferation	迁移能力(μm) Migration ability
FCRL3 干扰表达组 FCRL3 interference expression group	3	71.63±5.67	45.38±3.81
FCRL3 阴性对照组 FCRL3 negative control group	3	96.22±14.31 ^a	40.57±12.19 ^a
FCRL3 过表达组 FCRL3 overexpression group	3	175.48±15.19 ^{ab}	22.34±5.66 ^{ab}

注:FCRL3 干扰表达组比较,^a $P<0.05$;与 FCRL3 阴性对照组比较,^b $P<0.05$ 。

Note. Compared with the normal FCRL3 interference expression group, ^a $P<0.05$. Compared with the normal FCRL3 negative control group, ^b $P<0.05$.

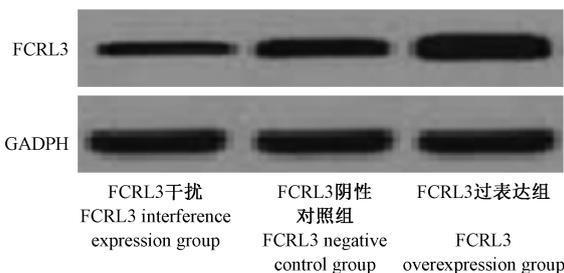


图 2 各组肝癌细胞 HepG2 内 FCRL3 mRNA 及蛋白的表达

Figure 2 The expression of FCRL3 mRNA and protein in hepatocellular carcinoma cells in different groups

3 讨论

肝癌的发生发展是一个参与因素多、多阶段的复杂过程,同时与基因、环境等密切相关。肿瘤细胞的增殖和迁移严重影响肿瘤患者的预后^[11]。FCRL 基因位于人类染色体 1q21-23 区域,与 Fc 受体相邻,具有与 Fc γ 受体高度结构同源性,因此认为 FCRL 受体与 Fc γ 受体有类似功能,参与了多种自身免疫性疾病^[12]。FCRL 主要在 B 细胞上表达,参与了 B 细胞的活化和免疫应答等,在 NK 细胞及 T 细胞亚群上也有一定的表达^[13]。FCRL 家族主要包括 FCRL1-6、FCRLA 和 FCRLB,通过 Oncomine 数据库整合原发性肝癌组织表达谱发现 FCRL 蛋白家族多个分子(FCRL1、FCRL3、FCRL4、FCRL5)在原发性肝癌中显著升高。

FCRL3 基因是一种新的免疫调节基因,长度约 24 kb 碱基序列,包含 16 个外显子和 15 个外含子,其编码蛋白用 3~9 个免疫球蛋白(Ig)样结构域,包含免疫受体酪氨酸活化和抑制基序(ITAM 和 ITIM),通过细胞信号传导参与免疫调节功能^[14-15]。FCRL3 是唯一在 B 系细胞以外还表达的 FCRL 家族成员,同时还可以 T 细胞群和 NK 细胞上表达,主要表达在淋巴结、扁桃体和胸腺等二级淋巴器官上,参与了机体自身免疫性疾病的过程,与自身免疫性甲状腺疾病、风湿性关节炎及系统性红斑狼疮等病遗传易感性相关^[16-17]。研究表明,核转录因子 NF- κ B 能影响 FCRL3 在 B 细胞的表达水平,而 NF- κ B 参与机体防御反应、组织损伤和应激、细胞分化和凋亡以及肿瘤生长抑制过程的信息传递^[18]。既往主要集中在 FCRL 家族对免疫性疾病,本研究创新性研究 FCRL3 与肝癌的关系。本研究发现,肝癌组织内 FCRL3 mRNA 和蛋白表达量均较正常肝组织增加。本研究通过调控肝癌细胞 HepG2 内 FCRL3 表达,通过细胞增殖和迁移能力检测发现,降低 FCRL3 表达后,细胞增殖率和迁移能力均降低,同时,增加 FCRL3 表达后,细胞增殖率和迁移能力均增加。

综上所述,肝癌组织中 FCRL3 的表达水平升高,抑制 FCRL3 的表达可抑制肝癌细胞的增殖和迁移,提示 FCRL3 可能在肝癌发生过程中发挥重要的作用,其作用机制有待进一步研究。

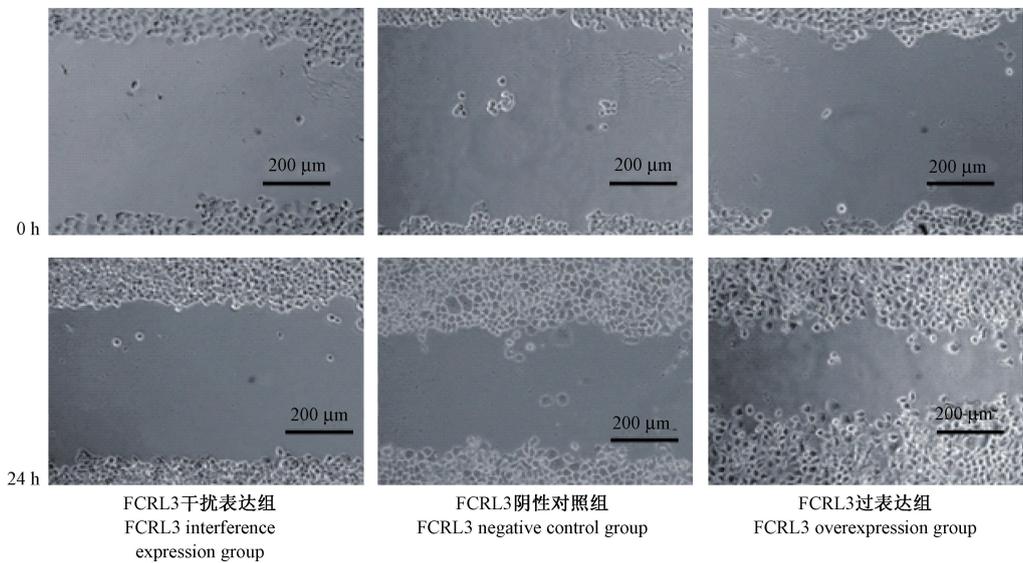


图 3 FCRL3 表达对肝癌细胞 HepG2 迁移能力的影响

Figure 3 Effect of FCRL3 expression on migration ability of HepG2 cells

参考文献:

- [1] Bruix J, Merle P, Granito A, et al. Efficacy and safety of regorafenib versus placebo in patients with hepatocellular carcinoma (HCC) progressing on sorafenib: results of the international, randomized phase 3 RESORCE trial [J]. *Ann Oncol*, 2016, 27(2):140-141.
- [2] 冯因克, 刘亚敏, 陈启龙. 慢性乙型肝炎后肝硬化中西医结合治疗研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2016, 13(29): 28-31.
- [3] 张爽, 王锋, 孟庆玲, 等. 原发性肝癌患者流行病学与乙型肝炎病毒感染调查 [J]. *中国疫苗和免疫*, 2018, 24(2): 133-136.
- [4] 何运, 罗嘉, 陈攀, 等. 原发性肝癌患者 1838 例预后因素分析 [J]. *肿瘤学杂志*, 2017, 23(9):789-793.
- [5] 原强, 靳勇, 白旭明, 等. 经肝动脉化疗栓塞联合射频消融治疗原发性肝癌及术后复发性肝癌的疗效比较及预后因素分析 [J]. *中国介入影像与治疗学*, 2016, 13(3): 146-150.
- [6] Venkatesh V, Laig M, Varma K, et al. Abstract 739: Orthogonal validation of oncomine cDNA panel data with digital PCR using TaqMan Rare Mutation Assays [J]. *Cancer Res*, 2017, 77(13): 739-739.
- [7] Dekkers G, Aeh B, Stegmann TC, et al. Affinity of human IgG subclasses to mouse Fc gamma receptors [J]. *Mabs*, 2017, 9(5):767.
- [8] Mendoza Rincón JF, Rodriguez Elias AK, Fragoso JM, et al. *MHC2TA* and *FCRL3* genes are not associated with rheumatoid arthritis in Mexican patients [J]. *Rheumatol Int*, 2016, 36(2): 1-6.
- [9] Zhang H, Zhang Z, Li G, et al. Association of FCRL3 genetic polymorphisms with endometriosis-related infertility risk: an independent study in Han Chinese [J]. *Medicine*, 2015, 94(35):e1168.
- [10] Antiochos P, Marques-Vidal P, Virzi J, et al. Anti-apolipoprotein A-1 IgG predict all-cause mortality and are associated with Fc receptor-like 3 polymorphisms [J]. *Front Immunol*, 2017, 8(6): 437-442.
- [11] 王兴童, 陈洪岩, 韩凌霄. 抗原处理相关转运体基因多态性与疾病相关性的研究进展 [J]. *实验动物与比较医学*, 2017, 37(3): 252-256.
- [12] 孙舒岚, 李晓曦, 苏楠, 等. NK 细胞表面 Fcγ 受体 3A 的基因多态性对 NK 细胞功能的影响 [J]. *中国医科大学学报*, 2017, 46(5): 439-443.
- [13] Capone M, Bryant JM, Sutkowski N, et al. Fc receptor-like proteins in pathophysiology of B-cell disorder [J]. *J Clin Cell Immunol*, 2016, 7(3): 427-436.
- [14] Aslanian-Kalkhoran L, Elieh-Ali-Komi D, Sadeghi-Shabestari M, et al. Investigation of Fc receptor-like 3 (FCRL-3) gene polymorphism (rs7528684) with susceptibility to allergic asthma in Iranian North-Western Azeri population [J]. *Clin Lab*, 2017, 63(7): 1301-1305.
- [15] 卢宇璇, 毛耀南, 周红梅, 等. FcRL3(-169T/C)和 FOXP3(-2383T/C)基因多态性与子宫内膜异位症的发病风险 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2017, 44(4):476-480.
- [16] Lin X, Zhang Y, Chen Q. FCRL3 gene polymorphisms as risk factors for rheumatoid arthritis [J]. *Hum Immunol*, 2016, 77(2): 223-229.
- [17] Wojciechowska-Durczynska K, Krawczyk-Rusiecka K, Zygmunt A, et al. In children with autoimmune thyroiditis CTLA4 and FCRL3 genes-but not PTPN22-are overexpressed when compared to adults [J]. *Neuro Endocrinol Lett*, 2016, 37(1): 65-69.
- [18] Bouhenna M M, Orlikova B, Talhi O, et al. Anti-proliferative, cytotoxic and NF-κB inhibitory properties of spiro (lactone-cyclohexanone) compounds in human leukemia [J]. *Anticancer Res*, 2017, 37(9): 5225-5233.