

MIG7 调节肝细胞癌中血管生成拟态的形成及其对肝癌转移潜能的影响*

屈波^{1,2}, 余飞^{1△}, 盛冠男¹, 陈冠男¹, 吕琪³, 谷彦军⁴, 郭龙²

1. 武警后勤学院附属医院 肿瘤外科 锦州医科大学武警后勤学院附属医院培养基地(天津 300162);

2. 西安交通大学第一附属医院 肝胆外科(西安 710061); 3. 武警后勤学院附属医院 救援医学研究所(天津 300162);

4. 武警后勤学院附属医院 病理科(天津 300162)

【摘要】 目的 探讨肝细胞癌(HCC)中迁移诱导基因 7(MIG7)的表达与血管生成拟态(VM)形成的相关性,以及 MIG7 的表达与不同肝癌细胞株 VM 形成能力及转移潜能的关系。**方法** 应用免疫组织化学方法分析配对的 40 例 HCC 原发灶及其转移灶标本中 MIG7 蛋白的表达和 VM 形成情况;应用三维培养技术培养不同转移潜能的人肝癌细胞株(高转移潜能肝癌细胞 MHCC-97H、低转移潜能肝癌细胞 MHCC-97L 和非转移肝癌细胞 Huh-7)及人正常肝细胞 L-02,分别检测 VM 形成情况;应用 RT-PCR 技术检测不同转移潜能肝癌细胞中 MIG7 mRNA 的水平;应用 Western blot 技术检测不同转移潜能肝癌细胞株中 MIG7 蛋白表达水平。**结果** ①40 例配对的 HCC 原发灶和相应转移灶中,MIG7 蛋白的表达与 VM 形成呈正相关($r_s=0.595, P<0.01$)。对照组中正常肝脏组织 MIG7 蛋白无表达,且未见 VM 形成。②体外三维培养提示,高转移潜能肝癌细胞株 MHCC-97H 的 MIG7 mRNA 和蛋白表达及 VM 的形成能力均大于低转移潜能肝癌细胞株 MHCC-97L 及非转移肝癌细胞株 Huh-7。人正常肝细胞 L-02 未见 VM 形成。**结论** MIG7 高表达的肝癌组织中 VM 形成能力强,MIG7 通过调节 VM 的形成影响 HCC 的侵袭转移,MIG7 是抑制 HCC 侵袭转移的潜在靶点。

【关键词】 血管生成拟态 迁移诱导基因 7 肿瘤血管生成 肝细胞癌 侵袭转移

MIG7 Regulates the Vasculogenic Mimicry Formation in Hepatocellular Carcinoma then Effects the Metastasis Potential of HCC QU Bo^{1,2}, YU Fei^{1△}, SHENG Guan-nan¹, CHEN Guan-nan¹, LÜ Qi³, GU Yan-jun⁴, GUO Long². 1. Department of Surgical Oncology, Affiliated Hospital of Logistics University of PAPF, Training Base of Jinzhou Medical University, Tianjin 300162, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; 3. Institute for Disaster and Emergency Rescue Medicine, Affiliated Hospital of Logistics University of PAPF, Tianjin 300162, China; 4. Department of Pathology, Affiliated Hospital of Logistics University of PAPF, Tianjin 300162, China

△ Corresponding author, E-mail: 513775512@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the expression of migration-inducing gene 7 (MIG7) in different HCC lines and its relationship with vasculogenic mimicry (VM) formation and metastatic potentiality. **Methods** Employing immunostaining to detect MIG7 protein expression and VM formation in 40 matched pairs of primary and metastatic HCC specimens from 40 patients, and investigating the correlation of VM formation with MIG7 protein expression. Detecting VM formation in HCC lines with different metastatic ability (MHCC-97H, MHCC-97L, Huh-7) and human normal hepatocyte line (L-02) through three-dimensional culture, and detecting MIG7 mRNA expression with RT-PCR, investigating the correlation of MIG7 protein expression with VM formation and HCC metastatic potentiality with Western blot assay; screening the HCC cell line with high MIG7 expression. **Results** In 40 matched pairs of HCC tissue, there was a significant positive correlation between MIG7 protein expression and VM formation ($r_s=0.595, P<0.01$). The capability of VM formation of MHCC-97H with high metastatic potentiality was stronger than that of MHCC-97L with low metastatic potentiality and Huh-7 with non-metastatic potentiality, and there was no VM formation in L-02. The result of RT-PCR and Western blot assay indicated the same. **Conclusion** MIG7 expression in HCC tissue is high and correlated positively with VM formation. MIG7 expression in different HCC cell lines is coincident with theirs VM formation, invasion and metastasis. MIG7 is a potential target for inhibiting the invasion and metastasis of HCC.

【Key words】 Vasculogenic mimicry MIG7 Angiogenesis Hepatocellular carcinoma Invasion and metastasis

我国肝癌死亡者约占世界肝癌死亡总数的

53%,而肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)又占肝癌的 91.5%,因多数患者确诊时已属晚期,故 5 年生存率不足 5%^[1-3]。其主要原因是 HCC 高侵袭、转移率及术后高复发率^[4]。因此,HCC 的

* 国家自然科学基金面上项目(No. 81272547)资助

△ 通信作者, E-mail: 513775512@qq.com

复发转移成为 HCC 研究的重中之重。

在 HCC 转移复发的研究中,“抗肿瘤血管生成的治疗”是一大研究热点。肿瘤血管生成拟态(vasculogenic mimicry, VM)理论的提出使“抗肿瘤血管生成的治疗”比原来想象的更为复杂^[5]。VM 理论向经典的“内皮依赖性肿瘤血管生成理论”提出了挑战,并受到众多学者的重视,逐步成为近年来肿瘤研究的热点。

有研究显示^[6-7],在分化程度较低的 HCC 中也存在 VM 现象,VM 可能是恶性程度较高的 HCC 细胞的一种特性,可增加肿瘤细胞侵袭转移的机会,有 VM 形成的 HCC 预后很差。迁移诱导基因(migration-inducing gene 7, MIG7)表达一种在多种恶性肿瘤细胞膜定位的富含半胱氨酸的蛋白质,在正常组织中不表达^[8]。目前,国内外尚无 HCC 中 MIG7 的表达调节 VM 的形成及影响 HCC 的生长、侵袭转移相关的研究报道。我们推测 MIG7 可能通过诱导 VM 形成而增加 HCC 细胞侵袭性和促进 HCC 细胞扩散^[5],为了初步证实这一观点,我们进行了以下研究。

1 材料与方法

1.1 研究对象

1.1.1 病理标本 配对的 40 例 HCC 手术切除石蜡包埋标本(原发灶及其相应转移灶)和 10 例正常肝组织石蜡包埋标本均由陕西超英临床病理研究院、陕西超英生物科技有限公司提供。

1.1.2 细胞株 人高转移潜能 HCC 细胞株 MHCC-97H、人低转移潜能 HCC 细胞株 MHCC-97L、人非转移 HCC 细胞株 Huh-7 均购自上海复旦大学中山医院 HCC 研究所;人正常肝细胞株 L-02 购自中国科学院细胞库。

1.2 主要试剂

兔抗人 MIG7 多克隆抗体按照文献方法制备^[9]。CD34 鼠抗人单克隆抗体、 β -actin 鼠抗人单克隆抗体、荧光(FITC)标记羊抗兔 IgG 以及荧光(TRITC)标记羊抗小鼠 IgG 均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。人工基底膜基质凝胶(Matrigel)购自美国 B&D 公司。DAB 酶底物显色试剂盒购自西安托克生物技术有限公司。SP 试剂盒 KIT-9706 购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

1.3 免疫组织化学法检测 HCC 组织和正常肝组织 MIG7 蛋白的表达和 VM 形成情况

应用免疫组织化学方法(辣根酶标记链酶卵白素免疫法,SP 法)检测 HCC 组织和正常肝组织中 MIG7 蛋白的表达。常规免疫组织化学方法检测 HCC 组织和正常肝组织中 VM 的形成情况。分别由两位病理科医师双盲阅片。在 HCC 组织中 MIG7 蛋白的表达水平和 VM 的形成水平均采用染色强度评定,染色强度分(-)、(+)、(++) 三级:(+)为弱阳性染色信号,淡黄色,高于背景; (++) 为强阳性染色信号,呈棕褐色;(-)为阴性。

1.4 通过三维培养不同转移潜能肝癌细胞观察 VM 的形成情况

在 6 孔板中置入 18 mm \times 18 mm 盖玻片,加入 50 μ L Matrigel,室温下静置 20 min,待 Matrigel 凝固后,分别加入含有人高转移 HCC 细胞株 MHCC-97H、人低转移 HCC 细胞株 MHCC-97L、人非转移 HCC 细胞株 Huh-7 及人肝细胞株 L-02 的 100 μ L 完全培养液(DMEM+100 mL/L FBS),细胞浓度均为 1×10^6 mL⁻¹。再加入完全培养液 2 mL,置于 37 $^{\circ}$ C、50 mL/L CO₂ 培养箱中培养。培养 6、12、18 h 时于倒置显微镜下观察、拍照。

1.5 RT-PCR 检测不同转移潜能肝癌细胞的 MIG7 mRNA 水平

常规培养 1.1.2 中 4 种细胞,应用 Trizol 溶液提取总 RNA。以 β -actin 为内参,正向:5'-ATCGTGCGTGACATTAAGGAGAAG-3',反向:5'-AGGAAGGAAGGCTGGAAGAGTG-3'; MIG7 引物,正向:5'-TCTCAGGCAGTCAGTGGG-3',反向:5'-GTTGGATGGGATGTCTCG-3'。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,98 $^{\circ}$ C 变性 10 s,55 $^{\circ}$ C 退火 15 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 30 个循环,最后以 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。以 MIG7 条带光密度值与内参 β -actin 条带光密度值的比值作为目的基因相对表达量。

1.6 Western blot 检测不同转移潜能的肝癌细胞株 MIG7 蛋白表达水平

将 1.1.2 中 4 种细胞进行常规培养,运用 RIPA 裂解液裂解细胞并提取细胞总蛋白,BCA 蛋白质定量试剂盒测定总蛋白的浓度。采用 0.1% SDS-10% 聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳,湿式法转膜,所用膜为硝酸纤维素膜(NC 膜),恒流 40 mA,转膜 4 h。以含 5% 脱脂奶粉的 TBST 封闭 2 h,加入以封闭液稀释的一抗(MIG7, 1:200; β -actin, 1:500),封闭杂交袋,4 $^{\circ}$ C 过夜;TBST 洗膜后分别加入以牛奶封闭的 HRP 标记二抗(anti-rabbit, 1:1000, anti-mouse 1:1000),室温下孵育 2 h;TBST

洗膜。将 NC 膜加入 ECL 发光剂,反应 3 min;暗室内曝光,常规方法显影定影;凝胶成像系统扫描记录,以 MIG7 蛋白/ β -actin 光密度比值来表示蛋白的相对表达量,全自动凝胶成像系统对结果进行分析,拍照。

1.7 统计学方法

等级资料相关性分析采用 Spearman 秩相关。多个样本均数的比较采用 F 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HCC 组织中 MIG7 蛋白表达与 VM 形成情况

配对的 40 例 HCC 原发灶及转移灶中 MIG7

蛋白的表达和 VM 形成见图 1、图 2。相关性分析结果显示 MIG7 蛋白的表达和 VM 形成呈正相关 ($r_s = 0.595, P < 0.001$),如附表所示。正常的肝脏组织未见 MIG7 蛋白的表达及 VM 形成。

2.2 不同转移潜能的肝癌细胞株三维培养 VM 的形成情况

见图 3。利用 Matrigel 对 HCC 细胞进行体外三维培养,6 h 后即可观察到不同细胞的不同生长趋势,12 h 后不同细胞的不同生长趋势差别开始明显,培养 18 h 后,高转移潜能的 HCC 细胞株 MHCC-97H 形成的 VM 密度高于低转移潜能 HCC 细胞 MHCC-97L 及非转移 HCC 细胞 Huh-7 ($P < 0.05$),如图 4 所示。正常人肝细胞 L-02 于相

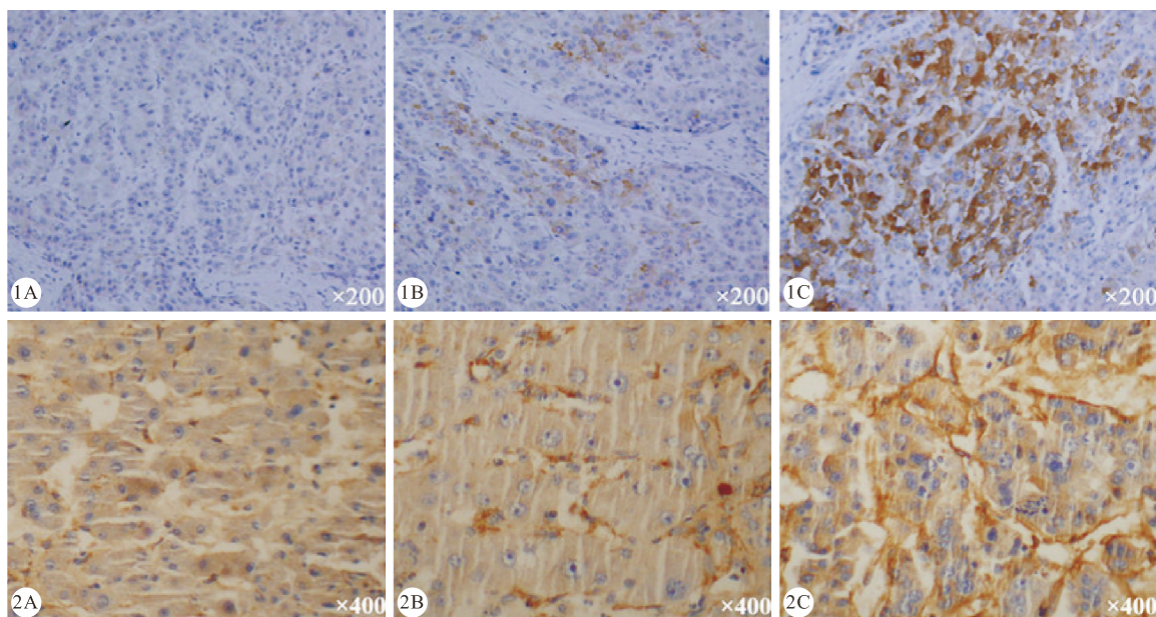


图 1 HCC 组织中 MIG7 蛋白表达情况。SP $\times 200$

图 2 HCC 组织中 VM 形成情况。 $\times 400$

Fig 1 The expression of MIG7 protein in the tissue of HCC. SP $\times 200$

Fig 2 The VM formation in the tissue of HCC. $\times 400$

A: Normal hepatic tissue; B: Primary hepatocellular tumor tissue; C: Metastatic hepatocellular tumor tissue

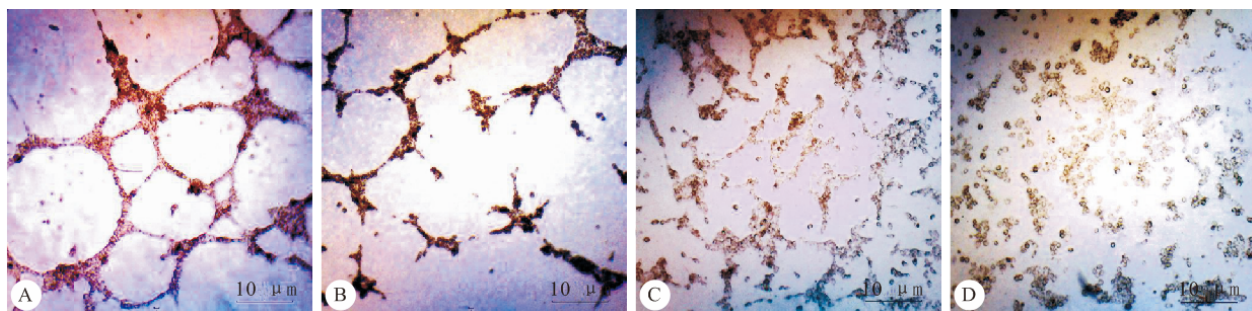


图 3 不同转移潜能肝癌细胞体外三维培养 18 h 观察到的 VM

Fig 3 VM formation was detected in different metastatic potential groups by 3D culture at 18 h (Bar: 10 μ m)

A: L-02 cell; B: Huh-7 cell; C: MHCC-97L cell; D: MHCC-97H cell

附表 HCC 组织中 MIG7 蛋白表达与 VM 形成/例数(%)
Table MIG7 protein expression and VM formation in HCC specimens/case (%)

Tissue	MIG7			VM		
	-	+	++	-	+	++
Primary HCC tumor	8/40 (20.0)	13/40 (32.5)	19/40 (47.5)	7/40 (17.5)	13/40 (32.5)	20/40 (50.0)
Metastatic tumor	9/40 (22.5)	11/40 (27.5)	20/40 (50.0)	9/40 (22.5)	13/40 (32.5)	18/40 (45.0)

Positive relation was found between MIG7 expression and VM formation ($r_s=0.554$, $P<0.001$)

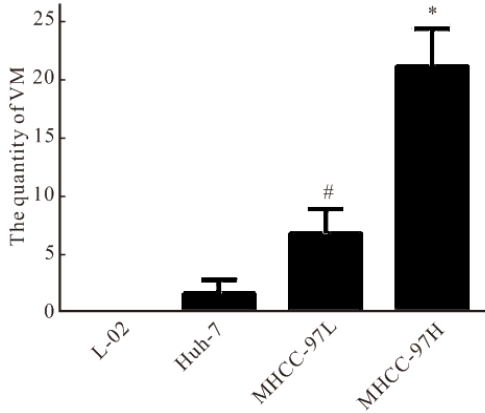


图 4 三维培养 18 h 时各 HCC 细胞株中 VM 的形成情况

Fig 4 The VM formation in all HCC cell lines by 3D culture at 18 h

* $P<0.05$, vs. MHCC-97L and Huh-7; # $P<0.05$, vs. Huh-7 and L-02

同环境培养 6 h、12 h 及 18 h 均未见 VM 形成。

2.3 不同转移潜能肝癌细胞株中 MIG7 mRNA 水平及 MIG7 蛋白表达水平

MIG7 mRNA 在不同转移潜能人 HCC 细胞株中具有不同程度的表达(图 5A),其中高转移潜能 HCC 细胞株 MHCC-97H 中 MIG7 mRNA 的水平高于低转移潜能 HCC 细胞株 MHCC-97L 和非转移 HCC 细胞株 Huh-7($P<0.05$)。MIG7 mRNA

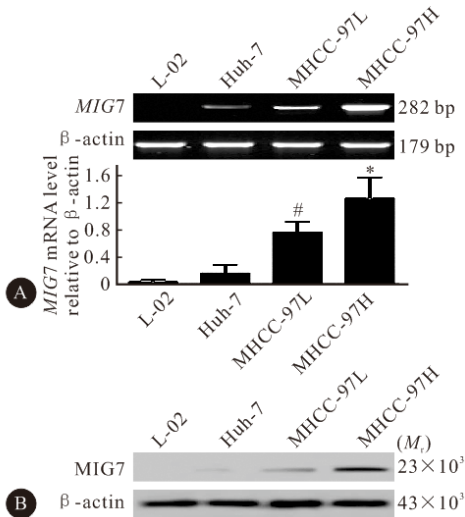


图 5 不同转移潜能 HCC 细胞株中 MIG7 表达水平

Fig 5 The level of the MIG7 expressed in different HCC cells

A: The result of RT-PCR; B: The result of Western blot; #

and * denote as same as fig 4

在正常人肝细胞株 L-02 中无表达。

MIG7 蛋白在不同转移潜能 HCC 细胞株中具有不同程度的表达(图 5B),高转移潜能 HCC 细胞株 MHCC-97H 的 MIG7 蛋白表达水平高于低转移潜能 HCC 细胞株 MHCC-97L 及非转移 HCC 细胞株 Huh-7。正常人肝细胞株 L-02 中无 MIG7 蛋白表达。HCC 细胞株中 MIG7 mRNA 与 MIG7 蛋白表达水平一致。

3 讨论

肝癌的侵袭转移是治疗失败和患者死亡的主要原因,因此研究 HCC 侵袭转移的机制,进而探索有效的治疗方法十分重要。肿瘤的转移是一个复杂的生物学过程,多个因素参与了转移的调控^[10]。

长期以来,人们一直认为血管生成是肿瘤获得血供的唯一方式。但是一种完全不同于经典的肿瘤内皮血管生成模式 VM 的提出^[11],不仅解释了传统血管生成理论难以说明的一些问题,而且为抗肿瘤血液供应提供了新的思路与方法。传统的抗肿瘤血管生成治疗作用有限,一个可能原因是其仅针对肿瘤内皮依赖性血管,而对肿瘤 VM 未加以考虑。同时,传统的血管内皮细胞(vascular endothelial cell, VEC)靶向抗癌药物必然导致肿瘤局部缺血缺氧。然而,肿瘤局部缺血缺氧又是促进 VM 形成的重要原因^[12],故传统的靶向 VEC 的治疗反而可能促进 VM 的形成,进而可能增加肿瘤细胞侵袭转移的机会^[13]。因此,在设计抗肿瘤血液供应治疗方案时,必须同时考虑对 VM 的抑制作用。

在分化程度较低的 HCC 中也存在 VM 现象^[6],VM 可能是恶性程度较高的 HCC 的一种特性,可增加肿瘤细胞侵袭转移的机会,有 VM 形成的 HCC 预后很差,故推测 MIG7 在 HCC 转移中具有重要的作用。MIG7 只在多种恶性肿瘤细胞表达,在正常组织中不表达^[8]。目前,尚无有关 HCC 中 MIG7 表达对 VM 的形成及 HCC 的生长和侵袭转移存在影响的相关研究报道。我们推测 MIG7 可能通过诱导 VM 形成而增加 HCC 细胞侵袭性和促进 HCC 细胞扩散^[5]。

本研究发现 MHCC-97H 为 MIG7 高表达且转移能力较高的 HCC 细胞,是 MIG7 高表达的一个代表性 HCC 细胞株,对下一步以 MHCC-97H 作为效应细胞,研究 MIG7 功能的发挥以及其在 VM 形成中的机制具有重要意义。另外,本研究结果证实 HCC 中 MIG7 蛋白的表达与 VM 的形成呈正相关 ($r_s=0.595, P<0.001$),据此推测 MIG7 与 VM 形成具有某种内在的联系性,但其具体机制需要进一步实验探讨。MIG7 蛋白高表达于 HCC 组织,并且 MIG7 与 VM 形成呈正相关,说明 MIG7 可能通过调控 VM 形成进而诱导 HCC 细胞的侵袭转移。转移的出现是影响 HCC 患者预后的一个重要的指标,因此, MIG7 可能是 HCC 预后判断的一个潜在的重要指标, MIG7 异常表达的 HCC 患者临床预后较差。由于正常的肝脏组织无 MIG7 的表达及 VM 形成,故 MIG7 亦可作为 HCC 基因治疗的一个潜在的特异性靶点,通过抑制 VM 的形成而抑制 HCC 的侵袭转移^[5]。

随着科技的不断进步,人们对肝癌基因型及其治疗研究的不断深入,将来很有希望找到一种新的非毒性的靶向治疗药物来治疗肝癌。最近的一项研究显示^[10],肝癌患者的基因存在异质性,即肝内多发病灶的基因型存在差异。这为单基因、单靶点治疗方案效果不佳提供了有力的解释。同时,也为联合多靶点抗肿瘤治疗方案提供了依据。本研究证实了肝癌中 MIG7 与 VM 及肿瘤转移潜能的相关性,为肝癌的治疗提供了新靶点,为联合多靶点抗肿瘤治疗方案提供了新的思路。

参 考 文 献

- [1] DE SOUZA JA, HUNT B, ASIRWA FC, *et al.* Global Health Equity: Cancer Care Outcome Disparities in High-, Middle-, and Low-Income Countries. *J Clin Oncol*, 2016, 34(1):6-13.
- [2] CHEN W, ZHENG R, BAADE PD, *et al.* Cancer statistics in China, 2015. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(2):115-132.
- [3] TORRE LA, SAUER AM, CHEN MS, *et al.* Cancer statistics for Asian Americans, Native Hawaiians, and Pacific Islanders, 2016: converging incidence in males and females. *CA Cancer J Clin*, 2016, 66(3):182-202.
- [4] NUTHALAPATI AKHSI, THULUVATH PJ. Recurrence of hepatocellular carcinoma following liver transplantation within milan criteria. //Disease recurrence after liver transplantation. New York: Springer, 2016;153-164.
- [5] QU B, GUO L, MA J, *et al.* Antiangiogenesis therapy might have the unintended effect of promoting tumor metastasis by increasing an alternative circulatory system. *Med Hypotheses*, 2010, 74(2):360-361.
- [6] AGGAN HE, YOUNIES L, HASSONA E, *et al.* P0342: cancer stem cells and vasculogenic mimicry in hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma: relation to tumor progression. *J Hepatol*, 2015, 62:S438[2016-10-12]. [http://doi.org/10.1016/s0168-8278\(15\)30556](http://doi.org/10.1016/s0168-8278(15)30556).
- [7] SUN B, ZHANG S, ZHANG D, *et al.* Vasculogenic mimicry is associated with high tumor grade, invasion and metastasis, and short survival in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep*, 2006, 16(4):693-698.
- [8] HO MY, LIANG CM, LIANG SM. MIG-7 and phosphorylated prohibitin coordinately regulate lung cancer invasion/metastasis. *Oncotarget*, 2015, 6(1):381-393.
- [9] PETTY AP, GARMAN KL, WINN VD, *et al.* Overexpression of carcinoma and embryonic cytotrophoblast cell-specific Mig-7 induces invasion and vessel-like structure formation. *Am J Pathol*, 2007, 170(5):1763-1780.
- [10] XUE R, LI R, GUO H, *et al.* Variable extent of intra-tumor heterogeneity revealed by genomic sequencing of multiple lesions in patients with hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology*, 2016, 150(1):998-1008.
- [11] MANIOTIS AJ, FOLBERG R, HESS A, *et al.* Vascular channel formation by human melanoma cells *in vivo* and *in vitro*: vasculogenic mimicry. *Am J Pathol*, 1999, 155(3):739-752.
- [12] LIU K, SUN B, ZHAO X, *et al.* Hypoxia promotes vasculogenic mimicry formation by the Twist1-Bmi1 connection in hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Med*, 2015, 36(3):783-791.
- [13] STEEG PS. Angiogenesis inhibitors: motivators of metastasis? *Nat Med*, 2003, 9(7):822-823.

(2016-10-28 收稿, 2017-02-27 修回)

编辑 汤洁