

LHX3 基因调控 Sonic hedgehog 信号通路影响原发性肝癌发生和发展的研究

李荣军 游忠岚 徐春霞 王 健 杨小丽 向洪志 杨伟兴

【摘要】目的 探究 LHX3 基因在原发性肝癌（以下简称肝癌）发生和发展中的作用及机制。**方法** 收集 2017 年 1 月至 2019 年 1 月在泸州市中医医院接受手术治疗的 54 例肝癌患者的肿瘤组织及癌旁组织（距肿瘤边缘 >3 cm），采用免疫组织化学染色法检测组织中 LHX3 表达水平。将 HepG2 细胞随机分为空白对照组（正常培养细胞）、NC-shRNA 组（转染阴性对照 NC-shRNA 慢病毒质粒）、LHX3-shRNA 组（转染 LHX3-shRNA 慢病毒质粒）和 LHX3-shRNA+Pur 组（转染 LHX3-shRNA 慢病毒质粒后用 Purmorphamine 试剂处理 24 h）。采用实时荧光定量 PCR（real-time qPCR）和蛋白质印迹法（Western blotting）检测细胞中 LHX3 表达水平，Western blotting 法检测 Sonic hedgehog（Shh）信号通路相关蛋白 Shh、Gli-1 的表达，CCK-8 法检测细胞增殖能力，Transwell 实验检测细胞侵袭和迁移能力。选取 30 只 SPF 级雌性 BALB/c 裸鼠随机分为对照组、NC-shRNA 组和 LHX3-shRNA 组，分别接种空白对照组、NC-shRNA 组和 LHX3-shRNA 组 HepG2 细胞，以构建移植瘤裸鼠模型。在接种后第 21 天处死裸鼠，采用 H-E、TUNEL 染色法观察各组肿瘤组织的病理变化，免疫组织化学染色法检测 Gli-1 表达，Western blotting 法检测 Shh、Gli-1 蛋白表达。**结果** 肝癌患者肿瘤组织中 LHX3 阳性表达率较癌旁组织显著升高（ $P < 0.05$ ）。与空白对照组比较，沉默 LHX3 表达的 LHX3-shRNA 组 HepG2 细胞中 LHX3 mRNA 和蛋白相对表达量均显著下降（ P 均 < 0.05 ），Shh、Gli-1 蛋白相对表达量均显著下降（ $P < 0.05$ ），细胞增殖能力显著减弱（ $P < 0.05$ ），细胞侵袭数量与迁移数量均显著减少（ P 均 < 0.05 ）。与 LHX3-shRNA 组比较，LHX3-shRNA+Pur 组细胞的增殖能力显著增强（ $P < 0.05$ ），细胞侵袭数量与迁移数量均显著增加（ P 均 < 0.05 ）。与对照组比较，LHX3-shRNA 组裸鼠肿瘤组织体积显著减小、湿重显著降低（ P 均 < 0.05 ），肿瘤组织细胞密度降低，细胞凋亡率显著升高（ $P < 0.05$ ），Shh 和 Gli-1 蛋白相对表达量均显著下降（ P 均 < 0.05 ），Gli-1 蛋白阳性表达率显著下降（ $P < 0.05$ ）。**结论** LHX3 在肝癌组织中呈高表达，沉默 LHX3 表达可抑制 HepG2 细胞的增殖、侵袭和迁移，并可抑制肿瘤生长，其机制可能与调控 Shh 信号通路有关。

【关键词】 肝癌；LHX3；Sonic hedgehog 信号通路；肿瘤生长

DOI: 10.3969/j.issn.1673-534X.2022.02.007

Influence of LHX3 gene on occurrence and development of primary liver cancer by regulating Sonic hedgehog signaling pathway LI Rongjun, XU Chunxia, WANG Jian, YANG Xiaoli, XIANG Hongzhi. Department of spleen, stomach and liver diseases, Luzhou Hospital of Traditional Chinese

基金项目：重庆市基础研究与前沿探索项目（重庆市自然科学基金）（cstc2018jcyjAX0473）

作者单位：646000 泸州市中医医院脾胃肝病科（李荣军、徐春霞、王健、杨小丽、向洪志）；400038 重庆，中国人民解放军陆军军医大学第一附属医院感染科 感染病研究重庆市重点研究室（游忠岚）；646000 四川泸州，西南医科大学附属中医医院脾胃病科（杨伟兴）

通信作者：杨伟兴，Email: 43029065@qq.com

Medicine, Luzhou 646000, China; YOU Zhonglan. Department of Infectious Diseases, Chongqing Key Laboratory for Research of Infectious Diseases, First Affiliated Hospital of PLA Army Medical University, Chongqing 400038, China; YANG Weixing. Department of Spleen and Stomach Diseases, Affiliated Hospital of Traditional Chinese Medicine, Southwest Medical University, Luzhou 646000, China

【Abstract】 Objective This paper attempts to explore the role and mechanism of *LHX3* gene in the occurrence and development of primary liver cancer (hereafter referred to as liver cancer). **Methods** The tumor tissues and adjacent tissues (>3 cm from the tumor edge) of 54 patients with liver cancer who received surgical treatment in Luzhou Hospital of Traditional Chinese Medicine from January 2017 to January 2019 were collected, and the expression of *LHX3* in the tissues was detected by immunohistochemical staining. HepG2 cells were randomly divided into the blank control group (normal cultured cells), the NC-shRNA group (transfected with negative control NC-shRNA lentiviral plasmid), the *LHX3*-shRNA group (transfected with *LHX3*-shRNA lentiviral plasmid), and the *LHX3*-shRNA+Pur group (treated with Purmorphamine for 24 h after transfection with *LHX3*-shRNA lentiviral plasmid). The expression levels of *LHX3* in cells were detected by real-time qPCR and Western blotting. The expressions of Sonic hedgehog (Shh) signaling pathway-related proteins Shh and Gli-1 were detected by Western blotting. Cell proliferation was detected by CCK-8 assay. Cell invasion and migration were detected by Transwell assay. Thirty SPF female BALB/c nude mice were randomly divided into the control group, the NC-shRNA group, and the *LHX3*-shRNA group, and were inoculated with HepG2 cells to construct the transplanted tumor nude mouse model. The nude mice were sacrificed on day 21 after inoculation. The pathological changes of tumor tissues in each group were observed by H-E and TUNEL staining, while the expression of Gli-1 was detected by immunohistochemical staining, and the protein expressions of Shh and Gli-1 were detected by Western blotting. **Results** The positive expression rate of *LHX3* in tumor tissues of patients with liver cancer is significantly higher than that in adjacent tissues ($P<0.05$). Compared with the blank control group, the relative expressions of *LHX3* mRNA and protein in HepG2 cells in the *LHX3*-shRNA group with silenced *LHX3* expression are significantly decreased ($P<0.05$), the relative expressions of Shh and Gli-1 proteins are significantly decreased ($P<0.05$), the cell proliferation ability and the number of cell invasion and migration are significantly decreased ($P<0.05$). Compared with the *LHX3*-shRNA group, the cell proliferation ability and the number of cell invasion and migration of the *LHX3*-shRNA+Pur group are significantly increased ($P<0.05$). Compared with the control group, the tumor tissue volume and wet weight of the nude mice in the *LHX3*-shRNA group are significantly decreased ($P<0.05$), the tumor tissue cell density is decreased, and the apoptosis rate is significantly increased ($P<0.05$). The relative expressions of Shh and Gli-1 proteins are significantly decreased ($P<0.05$), and the positive expression rate of Gli-1 protein is decreased ($P<0.05$). **Conclusions** *LHX3* is highly expressed in liver cancer tissues. Silencing *LHX3* expression can inhibit the proliferation, invasion, and migration of HepG2 cells and inhibit tumor growth. The mechanism may be related to the regulation of the Shh signaling pathway.

【Key words】 Liver cancer; *LHX3*; Sonic hedgehog signaling pathway; Tumor growth

原发性肝癌（以下简称肝癌）是常见的恶性肿瘤，全球范围内肝癌的发病率和病死率呈持续升高趋势，且患者的预后较差，每年约有 100 万例肝癌患者死亡^[1-3]。目前手术切除仍是治疗肝癌的主要方法，但多数患者确诊时已处于晚期或已发生转移从而失去了手术机会，而化学治疗因受到多种因素（如药物不良反应和耐药性）的影响而效果有限^[4]。因此，亟需通过探究肝癌发病机制和分子靶点以期寻找有效且安全的肝癌治疗策略。

LIM 基因主要参与调控细胞骨架相关蛋白、蛋白激酶和转录因子的表达，并在胚胎发育中发挥着重要作用^[5]，其还参与了多种肿瘤的发生^[6]。*LHX3* 基因为 *LIM* 同源盒基因家族成员，在垂体和神经系统发育过程中起着关键的基因调控作用^[7]。研究表明 *LHX3* 是预测晚期肝癌患者预后的生物标志物^[8]。本研究通过检测肝癌患者肿瘤及癌旁组织中 *LHX3* 表达水平，并构建移植瘤裸鼠模型，从而探究沉默 *LHX3* 表达对肝癌发生、发展的影响，并初步探究了其分子机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 患者的一般资料 收集 2017 年 1 月至 2019 年 1 月在泸州市中医医院接受手术治疗的 54 例肝癌患者的肿瘤组织及癌旁组织（距离肿瘤边缘 > 3 cm）。54 例患者中，男性 39 例，女性 15 例，年龄 35~68 岁，平均年龄为 (44.81±5.36) 岁，所有患者均未曾接受放射治疗、化学治疗、免疫治疗及靶向药物治疗。按照 Edmondson-Steiner 病理分级标准，分为 I 级 9 例，II 级 13 例，III 级 23 例，IV 级 9 例。按照肝癌分化程度，分为高分化 17 例，中分化 22 例，低分化 15 例。上述病理诊断均由 2 位及以上经验丰富的病理科医生判定。所有患者均签署知情同意书，本研究经医院医学伦理委员会批准。

1.1.2 实验材料 选取 30 只 4 周龄 SPF 级雌性 BALB/c 小鼠，购自北京维通利华实验动物技术有限公司，体质量为 18~20 g，用标准饲料喂养，自由饮水摄食，光照与黑暗环境 12 h 交替。人肝癌细胞株 HepG2 购自中国科学院细胞库（上海）。主要试剂：Sonic hedgehog (Shh) 信号通路激动剂 Purmorphamine、Polybrene 试剂购自美国 Sigma 公司，免疫组织化学染色试剂盒和 H-E 染色试剂盒购自南京凯基生物公司，总 RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和 SYBR®Premix Ex Taq™ II 试剂盒购自日本 TaKaRa 公司，CCK-8 试剂盒、TUNEL 试剂盒和 Transwell 小室购自美国 Invitrogen 公司，BCA 蛋白检测试剂盒和 PVDF 膜购自上海碧云天生物研究所，兔抗 LHX3、Shh、Gli-1 单克隆抗体购自美国 Santacruz 公司，兔抗 GAPDH 单克隆抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 单克隆抗体购自武汉博士德生物公司。引物合成、NC-shRNA 和 LHX3-shRNA 慢病毒载体的构建、包装及效价测定由上海吉凯基因公司完成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与转染 在 HepG2 细胞中添加含 10% 胎牛血清、1% 青霉素 / 链霉素的 DMEM 培养液，置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养，每 2~3 d 换液，待细胞融合度达 80% 时传代。取对数生长期细胞，用 0.25% 胰蛋白酶消化，将 HepG2 细胞 (4×10⁵ 个 / mL) 接种于 24 孔板中，每孔加 100 μL。将 HepG2 细胞随机分为空白对照组（正常培养细胞）、

NC-shRNA 组（转染阴性对照 NC-shRNA 慢病毒质粒）、LHX3-shRNA 组（转染 LHX3-shRNA 慢病毒质粒沉默 LHX3）和 LHX3-shRNA+Pur 组（转染 LHX3-shRNA 慢病毒质粒后用终浓度为 1 μmol/L 的 Purmorphamine 试剂处理 24 h）。转染时，当细胞感染复数 (MOI) 为 100 时加入 5 μg/mL 的 Polybrene 试剂，培养 12 h 后更换为新鲜培养液，用 0.5 mg/L 的嘌呤霉素持续筛选，期间每隔 1 d 换液 1 次，2 周后获得稳定转染细胞株。

1.2.2 实时荧光定量 PCR 法 使用 TRIzol 试剂提取各组 HepG2 细胞的总 RNA，用紫外分光光度计检测总 RNA 的纯度和浓度。用反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA，并以 cDNA 为模板，用 SYBR®Premix Ex Taq™ II 试剂盒采用实时荧光定量 PCR (real-time qPCR) 法检测 LHX3 mRNA 表达量，以 β-actin 作为内参。扩增条件：95 °C 5 min，循环 1 次；95 °C 30 s，60 °C 30 s，58 °C 30 s，共循环 38 次。采用 2^{-ΔΔCt} 法计算 LHX3 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

引物名称	序列
LHX3	正向：5'-GACAAGGGAGACCTGGAGAA-3'
	反向：5'-GAGAAGGACAAGAAAGCCACA-3'
β-actin	正向：5'-ATGGTGGGAATGGGTCAAGAAG-3'
	反向：5'-TCTCCATGTCGTCCCAGTTG-3'

1.2.3 CCK-8 法 将各组 HepG2 细胞接种于 96 孔板 (1×10⁴ 个 / 孔)，置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中过夜培养，每孔设置 3 个复孔，分别于 24 h、48 h 和 72 h 时每孔加入 10 μL CCK-8 试剂，混匀后于培养箱中继续培养 4 h，用全自动酶标仪在 450 nm 处检测各孔细胞的光密度 (OD) 值。

1.2.4 Transwell 实验 侵袭实验：在 Transwell 小室上室中加入 50 μL 稀释的 Matrigel 胶，置于 37 °C 培养箱中 40 min。分别吸取 100 μL 各组 HepG2 细胞悬液 (1×10⁶ 个 / mL) 加入 Transwell 小室上室，下室加入 600 μL 含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液，培养至细胞贴壁时，更换为无血清培养液继续培养 12 h，置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中孵育 12 h，取出小室弃去培养液，轻轻擦去上室多余细胞，用 4% 多聚甲醛固定 15 min，0.1% 结晶紫染色 10 min，PBS 洗涤后封片，在显微镜下观察并统计

侵袭细胞数量。迁移实验:除不加入 Matrigel 胶外,其余操作均与侵袭实验相同。

1.2.5 移植瘤裸鼠模型构建 将 30 只裸鼠随机分为对照组、NC-shRNA 组和 LHX3-shRNA 组,每组 10 只,分别接种 HepG2 细胞、转染 NC-shRNA 慢病毒质粒的 HepG2 细胞和转染 LHX3-shRNA 慢病毒质粒的 HepG2 细胞。细胞用 PBS 漂洗并重悬,吸取 0.5 mL 细胞悬液 (1×10^7 个/mL) 在裸鼠右侧腋窝皮下接种(全程接种 1 次)。接种后第 6 天观察接种部位移植瘤的生长状况,接种后第 21 天处死裸鼠,解剖取出肿瘤,测量体积并称重,一部分肿瘤用 10% 甲醛溶液固定,用于 H-E 染色、TUNEL 染色及免疫组织化学染色以检测肿瘤组织内细胞生长、凋亡及 Gli-1 阳性表达率,另一部分肿瘤置于液氮后保存于 -80°C 冰箱中,用于蛋白质印迹法(Western blotting)检测 Shh 和 Gli-1 蛋白表达水平。

1.2.6 H-E 染色和 TUNEL 染色 取各组裸鼠的肿瘤组织,用 10% 甲醛溶液固定,脱水、透明,石蜡包埋,然后切成 $4\ \mu\text{m}$ 厚的切片,切片经脱蜡、脱水后行 H-E 染色,脱水、透明后用中性树胶封片,在显微镜下($\times 400$)观察病理变化。将肿瘤组织的石蜡切片脱水后,加入蛋白酶 K, 37°C 下孵育 30 min,室温下孵育 20 min, PBS 冲洗后在切片上滴加 TUNEL 检测液, 37°C 孵育 1 h,加过氧化物酶转化剂, 37°C 孵育 30 min。在切片上滴加 DAB 显色,用苏木精复染,脱水、透明后用中性树胶封片,在显微镜下($\times 400$)观察计数 TUNEL 染色阳性细胞数:随机选取 5 个视野(取均值),计数凋亡细胞和肿瘤细胞总数,计算肿瘤细胞凋亡率(肿瘤细胞凋亡率 = 凋亡细胞数量 / 肿瘤细胞总数量 $\times 100\%$)。

1.2.7 免疫组织化学染色 将切除的患者肝癌组织、癌旁组织及各组裸鼠的肿瘤组织用 4% 多聚甲醛溶液固定 24 h 后以石蜡包埋,切成 $4\ \mu\text{m}$ 厚度的组织切片,脱蜡复水后,加入 3% H_2O_2 溶液室温孵育 10 min,置于 4°C 枸橼酸盐缓冲液中微波高温进行抗原修复,自然冷却,在切片上分别滴加兔抗 LHX3 单克隆抗体(1:200)、兔抗 Gli-1 单克隆抗体(1:200), 4°C 孵育过夜。次日弃去一抗, PBS 清洗切片后滴加辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:1000),室温孵育 1 h, PBS 再次清洗后用 DAB 显色,自来水冲洗干净,苏木精复染,盐酸乙醇分化,脱水、透明后用中性树胶封片,在显微镜下($\times 400$)观察。细胞质着色呈棕黄色至褐

色为阳性细胞。随机选取 5 个视野计数细胞(取均值),计算阳性细胞数占总细胞数的百分比即阳性细胞比例并计分: $<5\%$ 记 0 分, $5\% \sim 25\%$ 记 1 分, $26\% \sim 50\%$ 记 2 分, $51\% \sim 75\%$ 记 3 分, $>75\%$ 记 4 分。按照细胞质着色强度计分:未着色记 0 分,淡黄色记 1 分,棕黄色记 2 分,棕色至棕褐色记 3 分。两项得分的乘积为总分, <4 分判定为免疫组织化学阴性表达, ≥ 4 分判定为免疫组织化学阳性表达。

1.2.8 Western blotting 法 在各组 HepG2 细胞及研磨后的各组裸鼠肿瘤组织中加入预冷的 RIPA 缓冲液裂解后提取总蛋白,采用 BCA 法检测蛋白水平。取提取的等量各组 HepG2 细胞或各组裸鼠肿瘤组织蛋白样品,用 10% SDS-PAGE 分离蛋白质并转移至 PVDF 膜,室温下在 5% 脱脂奶粉中封闭 2 h,加入兔抗 LHX3(1:1000)、Shh(1:1000)、Gli-1(1:1000)单克隆抗体作为一抗,以 GAPDH 为内参, 4°C 孵育过夜。次日弃去一抗, TBST 洗膜,加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG(1:5000)作为二抗,室温孵育 1 h, TBST 再次洗膜,滴加 ECL 化学发光液显色曝光,凝胶成像系统拍照, Quantity One 图像分析软件分析各条带的灰度值。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 21.0 软件对数据进行统计学分析,计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝癌组织和癌旁组织中 LHX3 表达水平比较

免疫组织化学染色结果显示,肝癌组织中 LHX3 阳性表达率 [97.74% (49/54)] 较癌旁组织 [5.56% (3/54)] 明显升高,两者的差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 1。

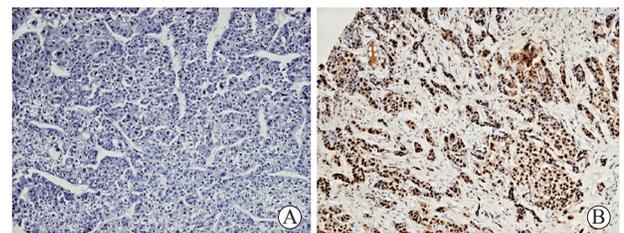


图 1 免疫组织化学染色法检测肝癌组织和癌旁组织中 LHX3 表达水平 $\times 100$ A 肝癌组织 B 癌旁组织

2.2 各组 HepG2 细胞中 LHX3、Shh、Gli-1 表达水平比较

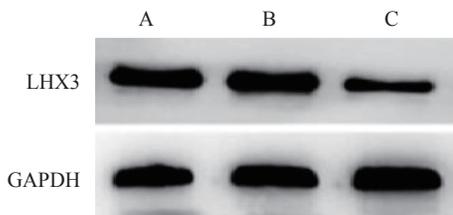
Real-time qPCR 和 Western blotting 检测结果

显示,与空白对照组比较,LHX3-shRNA 组细胞中 LHX3 mRNA 和蛋白相对表达量均显著下降 (P 均 <0.05),NC-shRNA 组与空白对照组细胞中 LHX3 mRNA 和蛋白相对表达量的差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。见表 2、图 2。

表 2 各组 HepG2 细胞中 LHX3 mRNA 和蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	LHX3 mRNA	LHX3 蛋白
空白对照组	1.00 ± 0.06	1.24 ± 0.10
NC-shRNA 组	0.99 ± 0.06	1.31 ± 0.12
LHX3-shRNA 组	0.32 ± 0.02 ^a	0.36 ± 0.03 ^a
<i>F</i> 值	34.016	28.771
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$



注:A为空白对照组,B为NC-shRNA组,C为LHX3-shRNA组
图 2 Western blot 法检测各组 HepG2 细胞中 LHX3 蛋白表达水平

Western blotting 检测结果显示,与空白对照组比较,LHX3-shRNA 组细胞中 Shh、Gli-1 蛋白相对表达量均显著下降 (P 均 <0.05);与 LHX3-shRNA 组比较,LHX3-shRNA+Pur 组细胞中 Shh、Gli-1 蛋白相对表达量均显著升高 (P 均 <0.05);NC-shRNA 组与空白对照组细胞中 Shh、Gli-1 蛋白相对表达量的差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。见表 3、图 3。

表 3 各组 HepG2 细胞中 Shh、Gli-1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

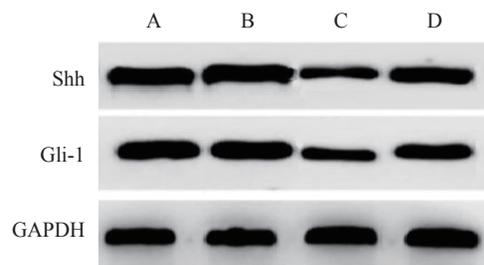
组别	Shh 蛋白	Gli-1 蛋白
空白对照组	1.51 ± 0.13	1.42 ± 0.12
NC-shRNA 组	1.60 ± 0.14	1.44 ± 0.11
LHX3-shRNA 组	0.45 ± 0.03 ^a	0.42 ± 0.02 ^a
LHX3-shRNA+Pur 组	0.93 ± 0.06 ^b	0.82 ± 0.05 ^b
<i>F</i> 值	33.118	49.703
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注:与空白对照组比较,^a $P < 0.05$;与 LHX3-shRNA 组比较,^b $P < 0.05$

2.3 各组 HepG2 细胞的增殖能力比较

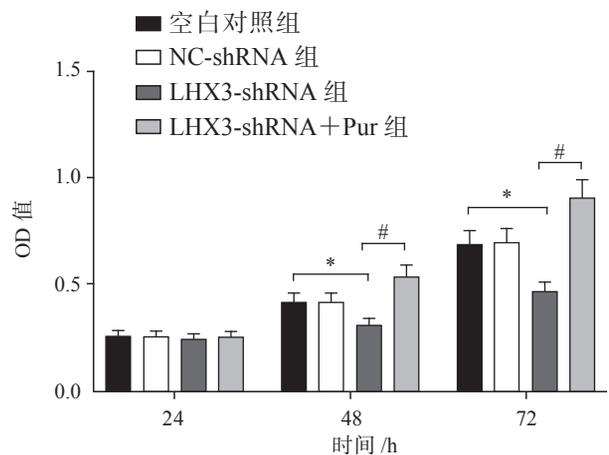
采用 CCK-8 法检测各组细胞的增殖能力,结

果显示,与空白对照组比较,LHX3-shRNA 组细胞在培养 48 h、72 h 时,OD 值均显著下降 (P 均 <0.05),表明细胞的增殖能力均显著减弱。与 LHX3-shRNA 组比较,LHX3-shRNA+Pur 组细胞在培养 48 h、72 h 时,OD 值均显著升高 (P 均 <0.05),表明细胞增殖能力均显著增强。NC-shRNA 组与空白对照组的各时间点 OD 值差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。见图 4。



注:A为空白对照组,B为NC-shRNA组,C为LHX3-shRNA组,D为LHX3-shRNA+Pur组

图 3 Western blotting 法检测各组 HepG2 细胞中 Shh、Gli-1 蛋白表达水平



注:与空白对照组比较,^{*} $P < 0.05$;与 LHX3-shRNA+Pur 组比较,[#] $P < 0.05$

图 4 CCK-8 法检测各组 HepG2 细胞的增殖能力

2.4 各组 HepG2 细胞侵袭和迁移能力比较

采用 Transwell 实验检测各组细胞的侵袭和迁移能力,结果如图 5 所示,HX3-shRNA 组的侵袭和迁移细胞数量均较空白对照组显著减少 (P 均 <0.05),LHX3-shRNA+Pur 组的侵袭和迁移细胞数量均较 LHX3-shRNA 组显著增加 (P 均 <0.05),NC-shRNA 组与空白对照组的侵袭和迁移细胞数量的差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。

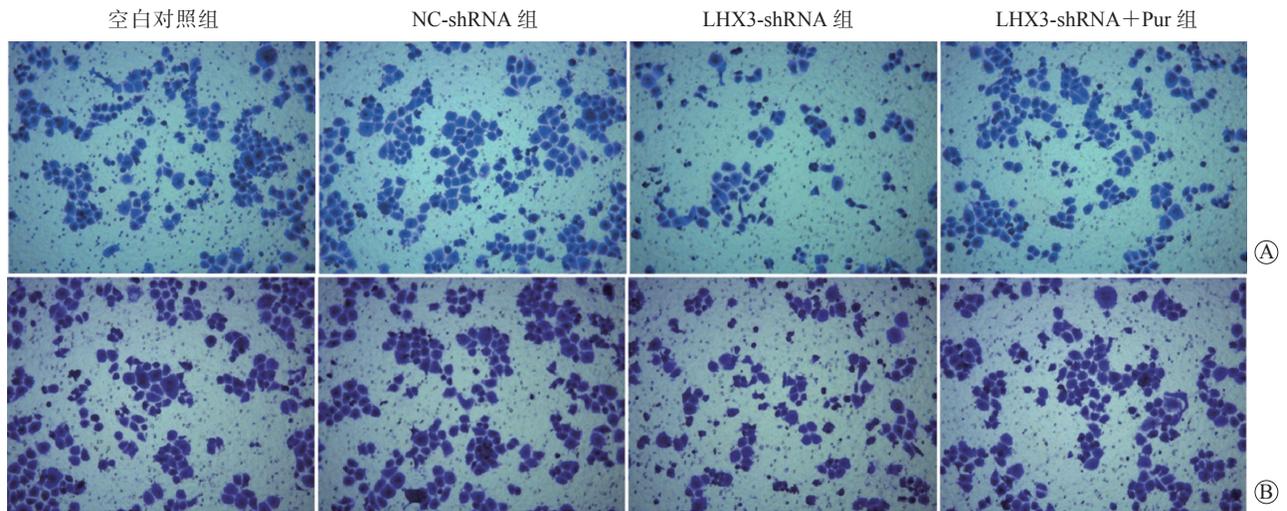


图 5 Transwell 实验检测各组 HepG2 细胞的侵袭和迁移能力 $\times 100$ A 侵袭实验 B 迁移实验

2.5 各组裸鼠的肿瘤体积及肿瘤细胞生长情况比较

如图 6A 所示, LHX3-shRNA 组裸鼠肿瘤的体积较对照组明显缩小 [$(0.35 \pm 0.02) \text{ cm}^3$ 比 $(0.96 \pm 0.08) \text{ cm}^3$, $P < 0.05$], 湿重较对照组明显降低 [$(0.25 \pm 0.02) \text{ g}$ 比 $(0.45 \pm 0.04) \text{ g}$, $P < 0.05$]; 对照组与 NC-shRNA 组裸鼠肿瘤的体积及湿重差异均无统计学意义 (P 均 > 0.05)。

肿瘤组织经 H-E 染色或 TUNEL 染色后在显微镜下观察, 如图 6B、6C 所示, 对照组和 NC-shRNA 组裸鼠的肿瘤组织中细胞均较密集, 核仁均较厚, 细胞凋亡率差异无统计学意义 [$(8.23 \pm 0.68) \%$ 比 $(8.73 \pm 0.72) \%$, $P > 0.05$]; 与对照组比较, LHX3-shRNA 组裸鼠的肿瘤组织中细胞密度较低, 细胞凋亡率 [$(47.97 \pm 3.58) \%$] 较对照组显著升高 ($P < 0.05$)。

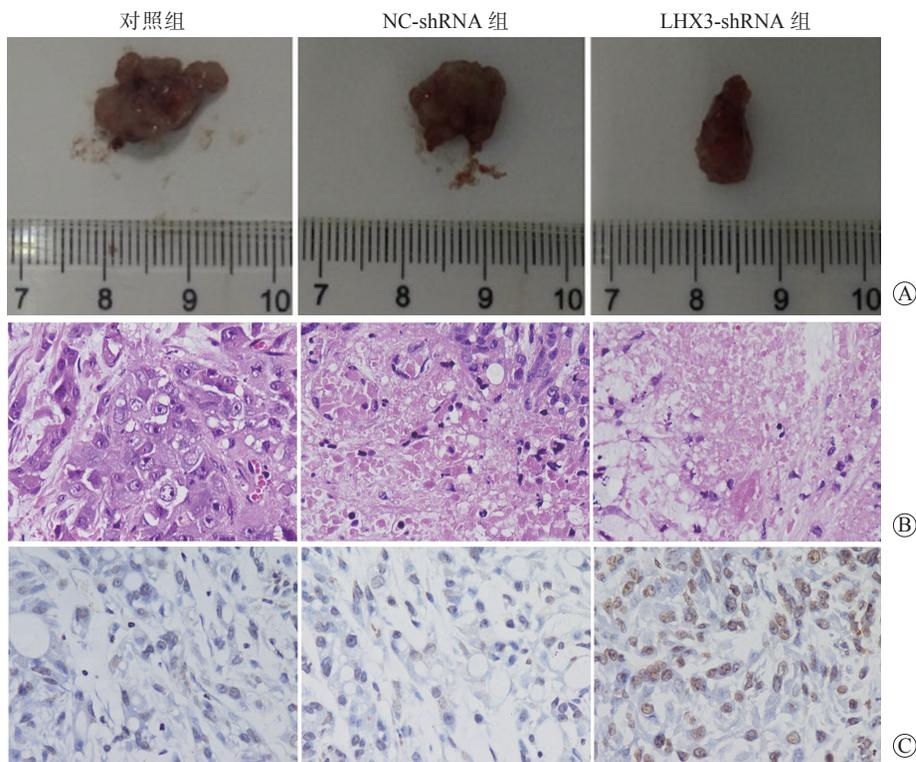


图 6 各组裸鼠的肿瘤体积和肿瘤细胞生长及凋亡情况 A 肿瘤体积 B 肿瘤组织病理图 H-E 染色 $\times 400$ C 肿瘤组织病理图 TUNEL 染色 $\times 400$

2.6 各组裸鼠肿瘤组织中 Shh 和 Gli-1 蛋白表达情况比较

免疫组织化学染色结果显示, 对照组和 NC-shRNA 组裸鼠肿瘤组织染色均较深, 着色细胞均较多, Gli-1 蛋白阳性表达率分别为 (28.42±1.88)%

和 (30.73±2.27)%, 两组的差异无统计学意义 ($P>0.05$); LHX3-shRNA 组裸鼠肿瘤组织染色较浅, 着色细胞较少, Gli-1 蛋白阳性表达率 [(18.24±1.23)%] 较对照组显著下降 ($P<0.05$)。见图 7。

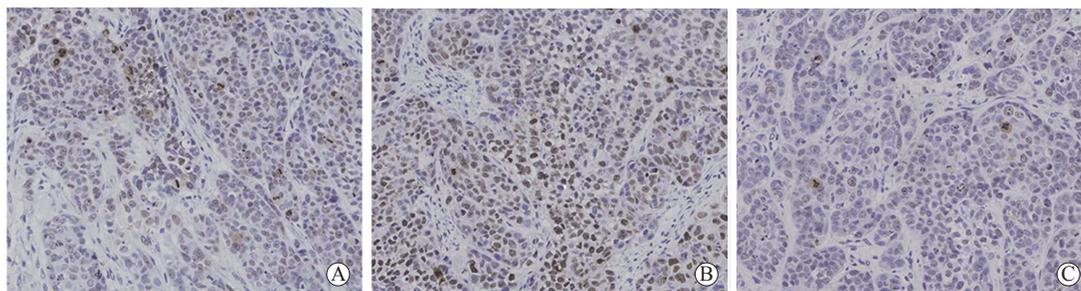


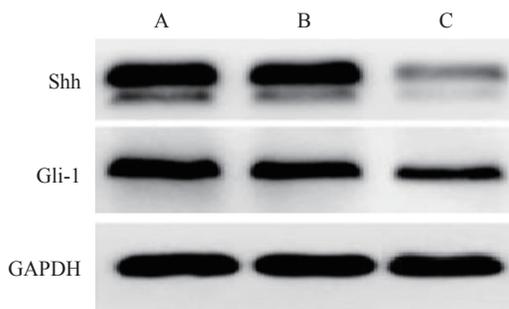
图 7 免疫组织化学染色法检测各组裸鼠肿瘤组织中 Gli-1 蛋白表达情况 ×200 A 对照组 B NC-shRNA 组 C LHX3-shRNA 组

Western blotting 检测结果显示, 与对照组比较, LHX3-shRNA 组裸鼠肿瘤组织中 Shh 和 Gli-1 蛋白相对表达量均显著下降 (P 均 <0.05); NC-shRNA 组与对照组裸鼠肿瘤组织中 Shh 和 Gli-1 蛋白相对表达量的差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。见表 4、图 8。

表 4 各组裸鼠肿瘤组织中 Shh 和 Gli-1 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	Shh 蛋白	Gli-1 蛋白
对照组	1.18±0.09	0.84±0.06
NC-shRNA 组	1.17±0.08	0.80±0.05
LHX3-shRNA 组	0.23±0.01 ^a	0.33±0.02 ^a
<i>F</i> 值	36.880	31.772
<i>P</i> 值	0.000	0.000

注: 与对照组比较, ^a $P<0.05$



注: A为对照组, B为NC-shRNA组, C为LHX3-shRNA组

图 8 Western blotting 法检测各组裸鼠肿瘤组织中 Shh、Gli-1 蛋白表达量

3 讨论

肝癌是全球范围内常见的恶性肿瘤, 其恶性程度较高, 病情进展迅速且容易发生转移, 患者的预后较差^[2]。肝癌的发病机制涉及多个重要的基因和多条信号通路, 具体分子机制尚不清楚。近年来学者们逐渐关注到肝癌在细胞和分子水平的病理学调控机制^[9]。本研究对肝癌的发病机制进行了探讨, 以期了解参与肝癌发病的关键因子, 为寻找特异性靶向治疗方法提供新的思路。

转录因子是通过不同的调控网络影响多种基因表达的全局性调控因子, 可影响机体的各种生物学过程和功能。LIM 同源盒基因是一类具有 LIM 结构的基因家族, 该基因家族编码的蛋白序列中含有 LIM 结构域和同源蛋白序列, 其蛋白质翻译产物为 LIM 同源盒转录因子, 可在多种组织发育和细胞分化中发挥作用^[5]。LHX3 基因作为 LIM 同源盒基因家族的重要成员, 是细胞分化过程中的主要调控基因。此外, 有研究表明 LHX 基因与一些恶性肿瘤相关。Cha 等^[10]的研究发现 LHX4 表达在结直肠癌中显著上调, 可促进肿瘤细胞增殖, 并可促使转录因子 4 (TCF4) 与 β -连环蛋白 (β -catenin) 结合形成稳定的 LHX4/TCF4/ β -catenin 复合物, 从而激活下游靶标 Wnt/ β -catenin 信号通路以促进肿瘤发展。Dietrich 等^[11]的研究表明 LHX3 的 DNA 甲基化与乳腺癌明显相关。在本研究中, 肝癌组织中 LHX3 的表达水平显著升高, 表明 LHX3 可能参与了肝癌的发生、发展; 进一步通过体外实验

沉默 LHX3 表达以探究其对肝癌细胞生物学行为的影响, 研究表明, 在沉默 LHX3 表达后, 肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移均明显受到抑制。给予裸鼠接种沉默 LHX3 表达的肝癌细胞后, 肿瘤体积缩小、湿重降低, 肿瘤组织中凋亡细胞增多, 说明肿瘤的生长受到了抑制。本研究结果表明, 抑制 LHX3 的异常高表达可阻遏肝癌的发生、发展。

Hedgehog (Hh) 是一种分泌性局域蛋白质配体, 其在肿瘤中被异常激活, 参与肿瘤的发生、侵袭和转移^[12]。Shh 信号通路是 Hh 通路的重要分支, 在细胞增殖和分化中起着至关重要的作用, Shh 通路涉及胚胎发育、维护成熟器官内环境和肿瘤发生等过程^[13-16]。Shh 从细胞中输出后能与跨膜蛋白 Patched1 (PTCH1) 结合, 促进跨膜蛋白 Smoothened (SMO) 的活性, 激活 SMO 启动信号转导级联, 活化的 SMO 从细胞质隔离中释放出与神经胶质瘤相关的转录因子, 进而导致 Gli 在核内定位, 从而调节各种基因表达^[17]。在本研究中, 沉默 LHX3 表达的肝癌细胞中 Shh、Gli-1 蛋白表达水平均下降, 使用 Shh 信号通路激动剂 Purmorphamine 处理细胞后, 肿瘤细胞的增殖、侵袭和迁移能力增强; 在沉默 LHX3 表达的肝癌移植瘤裸鼠模型的肿瘤组织中, Shh、Gli-1 蛋白表达水平也下降了。由此推测, LHX3 可能通过调控 Shh 信号通路参与肝癌的发生、发展。

综上所述, LHX3 在肝癌组织中表达上调, 沉默该基因的表达可抑制肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移能力, 并可抑制裸鼠模型肝癌移植瘤的生长, 其机制可能与调控 Shh 信号通路相关。本研究表明, LHX3 在肝癌组织中呈高表达, 沉默 LHX3 表达可抑制肝癌发生和发展, 为肝癌的诊治提供了理论依据。

参 考 文 献

- Liu Z, Lin Y, Zhang J, et al. Molecular targeted and immune checkpoint therapy for advanced hepatocellular carcinoma[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2019, 38(1): 447.
- Sarveazad A, Agah S, Babahajian A, et al. Predictors of 5 year survival rate in hepatocellular carcinoma patients[J]. *J Res Med Sci*, 2019, 24: 86.
- Couri T, Pillai A. Goals and targets for personalized therapy for HCC[J]. *Hepatol Int*, 2019, 13(2): 125-137.
- 徐克, 邵海波. 肝癌介入治疗新进展 [J]. *肝癌电子杂志*, 2020, 7(3): 2-6.
- Sibbritt T, Ip CK, Khoo PL, et al. A gene regulatory network anchored by LIM homeobox 1 for embryonic head development[J]. *Genesis*, 2018, 56(9): e23246.
- Dormoy V, Béraud C, Lindner V, et al. LIMclass homeobox gene Lim1, a novel oncogene in human renal cell carcinoma[J]. *Oncogene*, 2011, 30(15): 1753-1763.
- Hunter CS, Malik RE, Witzmann FA, et al. LHX3 interacts with inhibitor of histone acetyltransferase complex subunits LANP and TAF-1 β to modulate pituitary gene regulation[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e68898.
- 游忠岚, 田展飞, 洪怡, 等. LHX3 基因在肝癌中的表达、临床意义及生物学功能研究 [J]. *第三军医大学学报*, 2018, 40(19): 1741-1747.
- 张化涛, 高丽萍, 李秀君, 等. MYPT1 在肝细胞癌组织中的表达及意义 [J]. *国际消化病杂志*, 2021, 41(5): 390-393.
- Cha N, Liu W, Yang N, et al. Oncogenicity of LHX4 in colorectal cancer through Wnt/ β -catenin/TCF4 cascade[J]. *Tumour Biol*, 2014, 35(10): 10319-10324.
- Dietrich D, Lesche R, Tetzner R, et al. Analysis of DNA methylation of multiple genes in microdissected cells from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues[J]. *J Histochem Cytochem*, 2009, 57(5): 477-489.
- Bhat A, Sharma A, Bharti AC. Upstream Hedgehog signaling components are exported in exosomes of cervical cancer cell lines[J]. *Nanomedicine(Lond)*, 2018, 13(17): 2127-2138.
- Tong Q, Wang XL, Li SB, et al. Combined detection of IL-6 and IL-8 is beneficial to the diagnosis of early stage esophageal squamous cell cancer: a preliminary study based on the screening of serum markers using protein chips[J]. *Onco Targets Ther*, 2018, 11: 5777-5787.
- Yang C, Yong L, Liang C, et al. Genetic landscape and ligand-dependent activation of sonic hedgehog-Gli1 signaling in chordomas: a novel therapeutic target[J]. *Oncogene*, 2020, 39(24): 4711-4727.
- Antonelli F, Casciati A, Pazzaglia S. Sonic hedgehog signaling controls dentate gyrus patterning and adult neurogenesis in the hippocampus[J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(1): 59-61.
- Fotios M, Panagiotis P, Christiana P, et al. Sonic-hedgehog pathway inhibition normalizes desmoplastic tumor microenvironment to improve chemo-and nanotherapy[J]. *J Control Release*, 2017, 261: 105-112.
- Chun HW, Hong R. Significance of the hedgehog pathway-associated proteins Gli-1 and Gli-2 and the epithelial-mesenchymal transition-associated proteins Twist and E-cadherin in hepatocellular carcinoma[J]. *Oncol Lett*, 2016, 12(3): 1753-1762.

(收稿日期: 2021-05-10)

(本文编辑: 林磊)