

eEF-2K 基因沉默对肝癌细胞增殖、侵袭和凋亡的影响

肖瑞雪¹, 路 帅², 杨鹏辉³, 康毅敏^{1*}

(1. 内蒙古医科大学 分子病理学重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010059;

2. 首都医科大学附属北京世纪坛医院, 北京 100038; 3. 解放军总医院 第一医学中心, 北京 100853)

【摘要】目的 检测 eEF-2K 基因在肝癌组织(HCC)内的表达并分析其表达水平对 HCC 细胞增殖、侵袭和凋亡的影响。**方法** 用 RT-qPCR 和 Western Blot 检测了 64 例肝癌组织及癌旁肝组织, 5 种 HCC 细胞系 LM3、Hep3B、Huh7、97H、HepG2 及人正常肝细胞系 LO2 中 eEF-2K 基因在 mRNA 及蛋白水平的表达。用 eEF-2K 特异性 siRNA 沉默 LM3 及 Hep3B 细胞性中 eEF-2K 基因后, 经 qPCR 检测确认。随后用 CCK-8、Transwell 方法及流式细胞技术检测 eEF-2K 基因沉默对增殖、侵袭与凋亡的影响。**结果** 相较癌旁组织, HCC 组织内 eEF-2K mRNA 与蛋白表达显著上调, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与正常人肝细胞系 LO2 相比, 肝癌细胞系 LM3、Hep3B、97H、HepG2、Huh7 中的 eEF-2K mRNA 和蛋白表达分别升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 LM3 及 Hep3B 细胞系中用特异性 siRNA 沉默 eEF-2K 后, 与非特异性 siRNA 对照组相比, 细胞增殖活性和侵袭能力显著降低 ($P < 0.05$), 凋亡率显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。TCGA 数据库分析结果表明 eEF-2K 高表达与肝癌预后不良相关, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** eEF-2K 蛋白在肝癌组织和细胞中高表达且与预后不良相关; 沉默 eEF-2K 后肝癌细胞增殖和侵袭能力降低并诱发凋亡, 提示 eEF-2K 可用作 HCC 潜在的预后标志物和治疗靶点。

【关键词】 肝细胞癌; eEF-2K; siRNA; 增殖; 侵袭; 凋亡

中图分类号: R363.1

文献标识码: A

文章编号: 2095-512X(2023)03-0240-06

EFFECTS OF eEF-2K GENE SILENCING ON PROLIFERATION, INVASION AND APOPTOSIS OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA CELLS

XIAO Ruixue¹, LU Shuai², YANG Penghui³, KANG Yimin^{1*}

(1. Key Laboratory of Molecular Pathology, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010059, China;

2. Beijing Shijitan Hospital of Capital Medical University, Beijing 100038, China;

3. The First Medical Center, PLA General Hospital, Beijing 100853, China)

【Abstract】Objective To detect the expression level of eEF-2K in hepatocellular carcinoma (HCC) and the effect of its silencing on proliferation, invasion and apoptosis of HCC cells. **Methods** RT-qPCR and Western Blot were used to examine the expression of eEF-2K gene at mRNA and protein levels in HCC and their adjacent liver tissues resected from 64 HCC patients, as well as in five HCC lines (LM3, Hep3B, Huh7, 97H, HepG2) and normal human liver cell line LO2. LM3 and Hep3b cells were transfected with eEF-2K specific and non-specific siRNAs respectively. The silencing of eEF-2K gene after siRNA trasfection in LM3 and Hep3B cell lines was confirmed by RT-qPCR. The effect of silencing of eEF-2K gene on proliferation, invasion and apoptosis of HCC were detected by CCK-8 assay, Transwell assay and flow-cytometry. **Results** The expression of eEF-2K was significantly up-regulated both at mRNA and protein levels in HCC tissues as well as in LM3, HEP3B, 97H, Hepg2, Huh7 lines compared to the expressions in adjacent tissues ($P < 0.05$) and in normal LO2 line ($P < 0.05$). The proliferation rates of eEF-2K-silenced groups were decreased compared to control group ($P < 0.05$), and the percentages of transmem-

收稿日期: 2022-09-12; 修回日期: 2023-04-20

基金项目: 内蒙古医科大学致远人才计划治学人才团队项目(ZY0130011)

第一作者: 肖瑞雪(1989—), 女, 2019级硕士研究生。E-mail: 2334838657@qq.com

*通信作者: 康毅敏, 男, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师。研究方向: 分子病理学。E-mail: kangym@immu.edu.cn

brane cells in eEF-2K-silenced groups were decreased compared to control group ($P < 0.05$). Silencing of eEF-2K by siRNA also led to increased apoptosis in HCC ($P < 0.05$). The analysis of TCGA database showed that the high expression of eEF-2K was associated with poor prognosis of HCC ($P < 0.05$). **Conclusions** eEF-2K was highly expressed in HCC tissues and cell lines, which is associated with poor prognosis. Knock-down of eEF-2K gene by siRNA inhibited the proliferation and invasion ability, and induced apoptosis in HCC cells. This study provided evidence that eEF-2K is potential prognostic marker and therapeutic target for HCC.

[Keywords] Hepatocellular carcinoma; eEF-2K; siRNA; Proliferation; Invasion; Apoptosis

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是全球第六大常见癌症。由于HCC起病隐匿,大多数患者在确诊时已处于疾病的中晚期,从而错过了手术切除的最佳时期^[1]。手术治疗是目前公认最有效的肝癌治疗方法,但即使接受手术治疗,患者5年总体生存率仍低于10%^[2]。临床症状出现晚是诊断晚、预后差的原因。靶向基因疗法为现今HCC治疗的研究主流之一,而HCC分子发生机制则是此疗法的基础^[3]。鉴定可靠的HCC生物标志物尤为重要,筛选HCC的新靶点和相应的药物是此领域医学研究的一项重要任务^[4]。

真核延伸因子2激酶(eEF-2K)属于非典型 α -激酶家族,是一类进化方面具有保守性的蛋白质合成调节剂^[5],对于信使RNA(messengerRNA, mRNA)翻译的延伸阶段施以负向调控,由此对蛋白质合成进行调节。eEF-2K参与多种信号通路,具有调节细胞周期、增殖、凋亡、自噬、侵袭和糖酵解的功能。eEF-2K在癌细胞的迁移与存活及肿瘤发展方面发挥着关键作用。eEF-2K的功能异常使肿瘤细胞适应微环境条件,包括缺氧、营养耗竭和酸中毒^[6],因而与肿瘤的形成、迁移与侵袭具有相关性^[6],相当于癌基因的作用^[7]。

目前的研究已证明^[8], eEF-2K在乳腺癌、胰腺癌、肺癌和脑肿瘤等癌细胞中表达上调且其高表达与乳腺癌、胰腺癌和肺癌患者的总体生存率较低有关,被认为是治疗这些癌症的一个新兴分子靶点。但其在HCC中的表达水平及作用研究尚少。因此,本研究拟探索eEF-2K基因在人肝癌细胞中的表达情况,并利用RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术沉默eEF-2K基因后观察对HCC细胞增殖、侵袭和凋亡的影响,旨在为临床HCC新疗法的开发提供更多参考。

1 材料与方法

1.1 TCGA数据分析 eEF-2K在肝癌中表达与远期生存(overall survival, OS)的相关性

使用TCGA数据(<https://xena.ucsc.edu>)肝癌

样本,共计424例,其中374例肝癌样本、50例正常样本。分析eEF-2K在肝癌组织中表达的临床意义, eEF-2K表达与远期生存的相关性分析数据来源于Kaplan-Meier数据库(<https://kmplot.com/analysis/>)。

1.2 实验材料

本研究自2014年6月至2021年11月于中国人民解放军总医院第一医学中心肝胆外科收集肝癌患者术后的肝癌组织和癌旁肝组织样本64例,患者年龄为34~78岁,男性56例、女性8例。5种肝癌细胞系LM3、Hep3B、Huh7、97H、HepG2及人正常肝细胞系LO2均由中国人民解放军第五医学中心感染病医学部研究提供。

1.3 主要试剂和仪器

DMEM、MEM和血清购于北京百普赛斯公司; CCK8购于日本同仁公司; eEF-2K siRNA由上海吉玛公司合成; Annexin V-FITC凋亡试剂盒购于南京诺唯赞公司; eEF-2K一抗及二抗均购于美国Abcam公司; β -actin一抗及二抗均购于北京华兴博创公司; ECL化学发光底物试剂盒为北京华兴博创公司产品; PowerUp™ SYBR™ Green 预混液为赛默飞公司产品; RIPA裂解液、TRIzol Reagent皆为北京华兴博创公司产品; 逆转录试剂盒为北京全式金公司产品; Lipofectamine2000为北京索莱宝公司产品。

二氧化碳培养箱、实时荧光定量qPCR仪(QuantStudio 6 Flex)皆为Thermo Fisher公司(美国)产品; 双稳态电泳仪(DYY-6C型)为北京六一仪器厂产品; 倒置显微镜(Ti-s)为日本尼康公司产品; 多功能酶标仪(Synergy H4)为美国BIO-TEK公司产品; 流式细胞仪(facs cantoi)为美国BD公司产品; 全自动化学发光(5200 Multi)为上海天能公司产品; 微量核酸浓度测定仪为美国Pultron Technology公司产品。

1.4 实验分组及细胞的培养

LM3、Hep3B这两类细胞分别划分成以下3组: siRNA#1组、siRNA#2组, 以及非特异性siRNA对照组(si-NC组), 分别转染si-eEF-2K#1 7.5 μ L

(20p mol/L)/si-eEF-2K#2 7.5 μ L(20p mol/L)与 si-NC 7.5 μ L(20p mol/L)。肝癌 LM3 和 Hep3B 细胞分别培养于含 10% 血清的 DMEM 和含 10% 血清的 MEM 培养基中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养。

1.5 siRNA 合成和转染

siRNA 由上海吉玛公司合成,基于转染试剂(Lipofectamine TM2000)说明书所示,分别通过培养基 DMEM、MEM 对 LM3、Hep3B 进行重悬处理,先调节细胞浓度,再向 6 孔板内植入,接着移至孵箱内,在 37 $^{\circ}$ C 下培养一整夜。将 si-eEF-2K#1、si-eEF-2K#2、si-NC 分别瞬时转染 LM3 细胞和 Hep3B 细胞,培养 24 h 后进行检测。具体序列见表 1。

表 1 靶向沉默 eEF-2K siRNA 核苷酸序列
Tab. 1 Targeted silencing of eEF-2K siRNA nucleotide sequences

基因名称	正义链	反义链
si-eEF-2K#1	GGAAGAUUUGCCA CCGAATT	UUCGGUGGCAUA UCUUCCTT
si-eEF-2K#2	CCUGGAAGUGCAAA GGCUUTT	AAGCCUUUGCACU UCCAGGTT
si-NC	UUCUCCGAACGUGU CACGUTT	ACGUGACACGUUC GGAGAATT

1.6 实时荧光定量 PCR 检测转染 eEF-2K siRNAs 后肝癌细胞中 eEF-2K mRNA 表达

以“1.4”分组进行细胞培养及转染,细胞在转染 24 h 时加入 Trizol。通过氯仿、异丙醇(IPA)等进行总 RNA 的提取。基于逆转录试剂盒说明书所示步骤进行加样,25 $^{\circ}$ C 下计时 5 min;42 $^{\circ}$ C 下计时 30 min;85 $^{\circ}$ C 下计时 5 s,结束反应。在 RT-qPCR 反应方面,基于人 eEF-2K 序列,对 RT-PCR 引物进行设计。eEF-2K 上游引物是:5' - CAGCTCTGGACGGG-TATGTG - 3',下游引物是:5' - CCCC AAAATG-GACTTCCCGA - 3'; GAPDH 上游引物是:5' - GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA - 3',下游引物是:5' - GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT - 3'。扩增条件:50 $^{\circ}$ C 下 2 min 升温,95 $^{\circ}$ C 下 10 min 变性;95 $^{\circ}$ C 下计时 15 s,60 $^{\circ}$ C 下计时 1 min,重复 40 个循环。对于 Real-Time PCR 所得数据,经由 2^{- $\Delta\Delta$ C_t} 法开展分析。

1.7 蛋白质印迹分析检测 HCC 患者组织及转染 eEF-2K siRNAs 后肝癌细胞中 eEF-2K 蛋白的表达

采用 RIPA 裂解液提取细胞总蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。取各样本等量蛋白进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,湿转将蛋白转移至 PVDF 膜。BSA

室温封闭 1 h 后,分别孵育 eEF-2K(1:1000)或者 β -actin(1:1500)一抗 4 $^{\circ}$ C 过夜。洗膜后,室温孵育二抗 1 h。采用 ECL 发光液检测蛋白条带, β -actin 为内参。

1.8 CCK8 细胞增殖-毒性检测试剂盒检测 eEF-2K siRNAs 对肝癌细胞增殖的影响

基于“1.4 分”组开展细胞培养与转染,将 LM3、Hep3B 细胞转移至 96 孔板内,各孔植入量皆为 5 \times 10³ 个,各孔培养基皆为 0.2 mL。各组设置 5 个复孔,先转染,再分别培养 0.5 d、1 d、2 d,接着向各孔添加 0.01 mL 的 CCK8 溶液(10 mg/mL),进行 2 h 培养,借助酶标仪对 OD 值展开测定,测定波长是 450 nm。

1.9 Transwell 检测 eEF-2K siRNAs 对肝癌细胞侵袭的影响

取转染后培养 2 d 的各组分细胞,胰蛋白酶(trypsin)消化,制备细胞悬液,将细胞浓度调节成 1 \times 10⁵ 个/mL,向 Transwell 小室上室(铺有 Matrigel 胶)内接种,同时将 0.8 mL 完全培养基添加至下室内,于 37 $^{\circ}$ C 下进行 2 d 培养,将上室培养液清理掉,通过棉签将未迁移的细胞以及残留的 Matrigel 胶擦除掉,多聚甲醛(POM)固定 30 min,结晶紫溶液(0.1%)染色 20 min,借助倒置显微镜查看各组细胞的侵袭状况。

1.10 流式细胞仪检测 eEF-2K siRNAs 对肝癌细胞凋亡的影响

基于“1.4”分组开展细胞培养与转染,收集转染 24 d 后的各组细胞,通过预冷的 PBS 对细胞实施 2 遍洗涤,每遍的温度、速度与时间皆为 4 $^{\circ}$ C、1000 rpm、5 min,将上清倒掉。添加 0.1 mL 的 Binding Buffer(1 \times),小心吹匀,得到单细胞悬液。将 5 μ L Annexin V-FITC 和 5 μ L PI Staining Solution 加进去,轻轻吹匀;遮光、室温下进行 10 min 孵育;接着添加 0.4 mL 的 Binding Buffer(1 \times),小心混合均匀。待完成染色,样品于 60 min 内借助流式细胞仪测定,通过软件 Flow J 对数据展开处理。

2 实验结果

2.1 TCGA 数据库中 eEF-2K 在 HCC 组织内高表达且与总生存期呈负相关。

相较于癌旁组织,HCC 组织内 eEF-2K mRNA 与蛋白表达上调,表现出显著区别(* P < 0.05,如图 1A、1B 所示)。TCGA 数据分析结果表明 eEF-2K 高表达与肝癌患者生存率呈负相关(* P < 0.05,见图 1C)。

2.2 eEF-2K siRNA 在不同HCC细胞系内的表达状况

与正常肝细胞系 LO2 相比, HCC 细胞系中 LM3 和 Hep3B 的 eEF-2K mRNA 表达显著升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见图 2A)。与正常肝细胞株 LO2 相比, LM3 和 Hep3B 两种 HCC 细胞系中的 eEF-2K 蛋白水平较高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$, 见图 2B)。

2.3 eEF-2K siRNAs 在肝癌细胞中的沉默效率

在 LM3、Hep3B 细胞内, 相较于转染 si-NC 组, si-eEF-2K#1 和 si-eEF-2K#2 降低了 eEF-2K mRNA 和蛋白的表达, 差异具有统计学意义 ($P < 0.05$, 见图 3)。

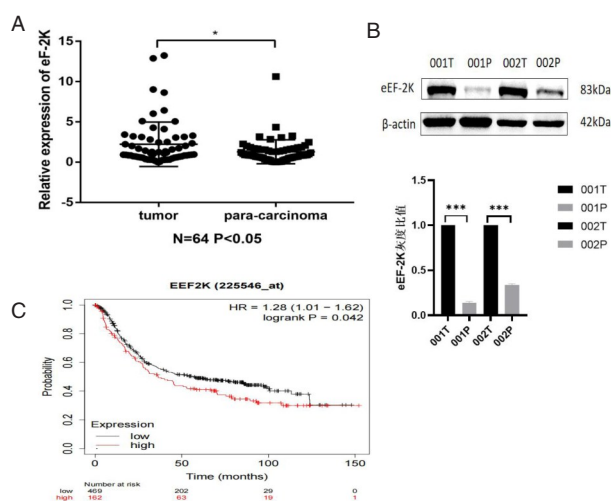


图1 eEF-2K在肝癌组织中的表达及生存分析

Fig. 1 Expression and survival analysis of eEF-2K in liver cancer tissue

(A. 通过 RT-qPCR 检测 64 例患者 HCC 样本和配对的癌旁组织中 eEF-2K 的 mRNA 水平; B. 通过蛋白质印迹分析确定 2 例 HCC 患者组织中 eEF-2K 蛋白水平。T 代表 HCC 组织, P 代表癌旁组织。β-肌动蛋白用作内参照 (左图: 典型蛋白印迹结果, 右图: 3 次蛋白印迹结果灰度与内参调定之后相对值的量化图); C. TCGA 数据分析 eEF-2K 在肝癌中表达与远期生存的相关性。Tumor: 肝癌组织, Para-carcinoma: 癌旁正常肝组织)

(A. Detection of eEF-2K mRNA levels in HCC samples from 64 patients and paired adjacent cancer tissues using RT qPCR; B. Determine the levels of eEF-2K protein in the tissues of two HCC patients through Western Blot analysis. T represents HCC tissue, and P represents paracancerous tissue. β-actin is used as internal reference (left: typical protein imprinting results, right: quantitative diagram of the gray scale of three protein imprinting results and the relative value after internal parameter setting); C. TCGA data analysis of the correlation between eEF-2K expression and long-term survival in liver cancer. Tumor: Liver cancer tissue, Para-carcinoma: Normal liver tissue adjacent to cancer)

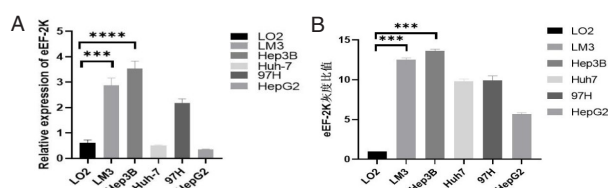


图2 eEF-2K在不同肝癌细胞系中的表达情况

Fig. 2 Expression of eEF-2K in different liver cancer cell lines

A. 通过 RT-qPCR 检测正常肝细胞系 LO2 和 5 种 HCC 细胞系 (LM3、Hep3B、Huh7、97H、HepG2) 中 eEF-2K mRNA 表达水平; B. 通过蛋白质印迹分析正常肝细胞系 LO2 和 5 种 HCC 细胞系 (LM3、Hep3B、Huh7、97H、HepG2) 中 eEF-2K 蛋白水平 (上图: 典型蛋白印迹结果, 下图: 3 次蛋白印迹结果灰度与内参调定之后相对值的量化图)

A. Detection of eEF-2K mRNA expression levels in normal liver cell line LO2 and five HCC cell lines (LM3, Hep3B, Huh7, 97H, HepG2) using RT qPCR; B. Analysis of eEF-2K protein levels in normal liver cell line LO2 and 5 HCC cell lines (LM3, Hep3B, Huh7, 97H, HepG2) using Western blot analysis (Upper: Typical Western blot results, Below: Quantification of relative values after three Western Blot results and internal parameter settings)

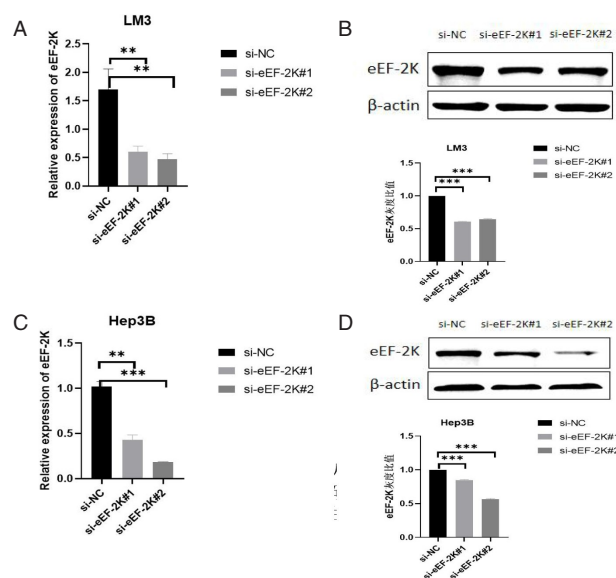


图3 在不同肝癌细胞中转染eEF-2K siRNAs后eEF-2K表达变化
Fig. 3 Changes in eEF-2K expression after transfection with eEF-2K siRNAs in different liver cancer cells

A、B: 在 LM3 细胞中转染 eEF-2K siRNA 后, 各分组中 eEF-2K mRNA 和蛋白的表达情况; C、D: 在 Hep3B 细胞中转染 eEF-2K siRNA 后, 各分组中 eEF-2K mRNA 和蛋白的表达情况 (其中 B、D 中上图: 典型蛋白印迹结果, 下图: 3 次蛋白印迹结果灰度与内参调定之后相对值的量化图)

A、B: The expression of eEF-2K mRNA and protein in each group after transfection with eEF-2K siRNA in LM3 cells; C、D: Expression of eEF-2K mRNA and protein in each group after transfection with eEF-2K siRNA in Hep3B cells (where B、D, top figure: typical protein blotting results, bottom figure: quantification of gray scale and relative values after internal parameter setting of three protein blotting results)

2.4 降低eEF-2K表达可降低LM3和Hep3B细胞增殖

在LM3细胞和Hep3B细胞中,与转染si-NC组相比,转染siRNA 12 h、24 h、48 h时细胞增殖活性显著降低,差异有统计学意义(* $P < 0.05$,见图4)。

2.5 降低eEF-2K表达可抑制LM3和Hep3B细胞侵袭

相较于转染si-NC组,转染siRNA后,si-eEF-2K#1和si-eEF-2K#2组均降低了LM3和Hep3B细胞的侵袭能力,差异有统计学意义(* $P < 0.05$,见图4)。

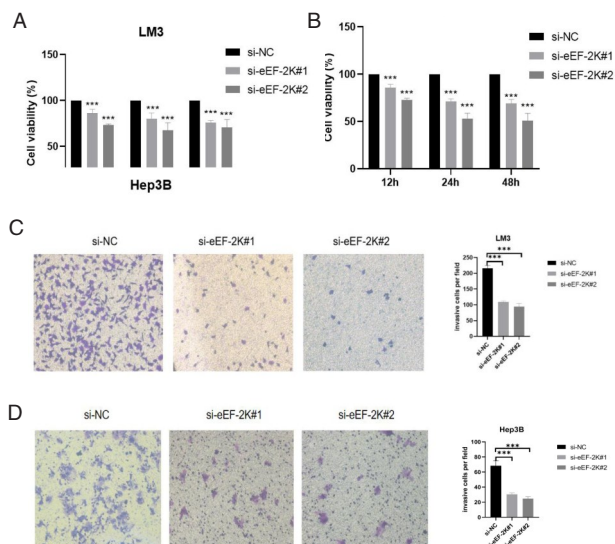


图4 eEF-2K siRNAs 对不同肝癌细胞增殖和侵袭的影响
Fig. 4 Effects of eEF-2K siRNAs on proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells

A、B: 在LM3和Hep3B细胞中转染eEF-2K siRNA后,通过CCK8法测定12,24,48 h时各分组对细胞增殖活性的影响; C、D: 转染eEF-2K siRNA后,各分组对LM3和Hep3B细胞侵袭的影响(其量化用柱状图表示)

A、B: After transfection of eEF-2K siRNA in LM3 and Hep3B cells, the effects of each group on cell proliferation activity at 12,24,48 h were measured by CCK8 method. C、D: Effects of each subgroup on invasion of LM3 and Hep3B cells after transfection of eEF-2K siRNA (quantified by histogram)

2.6 降低eEF-2K表达促进LM3和Hep3B细胞凋亡

与转染si-NC组相比,LM3和Hep3B转染siRNA后,si-eEF-2K#1和si-eEF-2K#2组中细胞凋亡率明显增加,差异有统计学意义(* $P < 0.05$,见图5)。

3 讨论

HCC的发生发展是一个多基因、多步骤参与的复杂活动^[9]。尽管分子靶向药物等全身治疗方法取

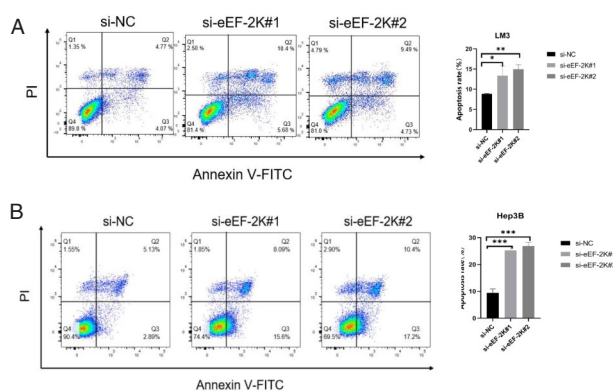


图5 eEF-2K siRNA对不同肝癌细胞凋亡的影响
Fig. 5 Effect of eEF-2K siRNA on apoptosis of different liver cancer cells

A.转染eEF-2K siRNA后,各分组对LM3细胞凋亡的影响; B.转染eEF-2K siRNA后,各分组对Hep3B细胞凋亡的影响

A. The effect of each group on LM3 cell apoptosis after transfection with eEF-2K siRNA; B. Effects of different groups on Hep3B cell apoptosis after transfection with eEF-2K siRNA

得了很大进展,但HCC由于耐药和频繁复发转移,是预后较差的肿瘤之一^[10]。越来越多的研究人员开始关注RNA干扰(RNA interference, RNAi)、小分子干扰RNA片段(small interfering RNA, siRNA)。siRNA能够使基因mRNA被双链RNA分子敲除,当前siRNA已经能被人工合成,它在基因治疗和基因功能研究中有广泛应用^[11]。

相关研究已经观察到各种肿瘤细胞中eEF-2K的高表达,抑制这种激酶的活性会降低肿瘤细胞的活力^[12]。最近的一些研究表明eEF-2K在促进肿瘤细胞迁移和侵袭中也起着重要作用^[13]。研究表明^[13]eEF-2K可以通过PI3K/Akt和STAT3促进肝细胞癌血管生成。

Bircan等^[14]研究在不同的肺癌细胞系中转染两种不同序列的eEF-2K siRNA,抑制了肺癌细胞的增殖。本研究发现用siRNA技术沉默eEF-2K基因后肝癌细胞株增殖活性降低,随着转染时间延长,增殖活性逐渐降低,较si-NC组有显著区别,与上述其他肿瘤组织类型中的研究结论存在共性。这可能与细胞增殖的关键介质,包括NF- κ B和cyclin D1,它们在细胞增殖和分化中发挥重要作用有关^[15]。

Erdogan等^[16]发现敲除eEF-2K可降低卵巢癌细胞的侵袭能力,靶标siRNA序列对eEF-2K的沉默显著抑制了HeyA8、SKOV3ip1和SKOV3-TR细胞的迁移和侵袭水平。本研究结果表明,eEF-2K siRNA组穿膜细胞数较siRNA-NC组低,表明沉默eEF-2K

基因后肝癌细胞侵袭能力降低。由于eEF-2K可能通过调节Src信号通路促进细胞迁移和侵袭,而Src信号是促进细胞迁移和侵袭的重要途径之一^[17],因此其分子机制可能是沉默eEF-2K基因表达可抑制癌基因信号因子转录,进而影响细胞迁移及侵袭能力,减少穿膜细胞数量。

Ashour等^[18]研究发现eEF-2K促进胰腺癌(Pa-Ca)细胞存活,其抑制可通过多种凋亡途径引发凋亡细胞死亡。下调eEF-2K可显著降低PANC-1和MIAPaCa-2细胞的活力,并通过受体介导的(外源性途径)、线粒体介导的(内源性途径)和aif介导的途径显著诱导细胞凋亡。本研究通过siRNA技术沉默eEF-2K基因后肝癌细胞株LM3和Hep3b的凋亡率明显增加,与si-NC组有显著差异,与上述结论一致,表明siRNA沉默eEF-2K基因表达可诱导肝癌细胞的凋亡,其确切的分子机制尚待进一步研究。

本研究通过生物信息学分析及其体外实验表明,eEF-2K基因沉默会使肝癌细胞的增殖和侵袭能力降低,凋亡率升高,提示eEF-2K基因沉默能有效抑制肝癌的部分恶性生物学行为。因此它可能是肝癌的潜在治疗靶点,但其确切的分子机制及其在肝癌治疗方面的应用价值需要进一步深入研究。本研究仅在体外条件下分析了eEF-2K对肝癌细胞功能的影响,下一步我们会进一步扩大样本量进行验证,并且将eEF-2K基因敲除以后进行体内实验,进一步探索eEF-2K在肝癌发生发展中的相关机制。

4 结论

本研究结果显示,eEF-2K在肝癌组织和不同肝癌细胞系中显著上调,特异性沉默eEF-2K基因表达可抑制肝癌细胞增殖及侵袭,促进肝癌细胞凋亡。

参考文献

- [1] Song C, Zhang J, Wen R, et al. Improved anti-hepatocellular carcinoma effect by enhanced Co-delivery of Tim-3 siRNA and sorafenib via multiple pH triggered drug-eluting nanoparticles [J]. *Mater Today Bio*, 2022, **16**: 100350
- [2] 王学斌,董勤. 原发性肝癌行肝癌根治术前后循环肿瘤细胞(CTC)、血清甲胎蛋白(AFP)测定值变化分析[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2022, **44**(2): 139-142
- [3] Mantovani S, Oliviero B, Lombardi A, et al. Deficient natural killer cell NKp30-mediated function and altered NCR3 splice variants in hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2019, **69**(3): 1165-1179
- [4] Liu X, Li J, Yu Z, et al. miR-935 promotes liver cancer cell proliferation and migration by targeting SOX7[J]. *Oncol Res*, 2017, **25**(3): 427-435
- [5] Das JK, Ren Y, Kumar A, et al. Elongation factor-2 kinase is a critical determinant of the fate and antitumor immunity of CD8 (+) T cells[J]. *Sci Adv*, 2022, **8**(5): eabl9783
- [6] Zhang B, Zou J, Zhang Q, et al. Progress in the development of eukaryotic elongation factor 2 kinase (eEF2K) natural product and synthetic small molecule inhibitors for cancer chemotherapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(5): 2408
- [7] Li S, Li Y, Bai Y. What is the impact of eukaryotic elongation factor 2 kinase on cancer: a systematic review[J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, **857**: 172470
- [8] Comert OF, Durdagi S, Sahin K, et al. Design, Synthesis, and Molecular Modeling Studies of Novel Coumarin Carboxamide Derivatives as eEF-2K Inhibitors[J]. *J Chem Inf Model*, 2020, **60**(3): 1766-1778
- [9] Zhang Y, Tao R, Wu SS, et al. TRIM52 up-regulation in hepatocellular carcinoma cells promotes proliferation, migration and invasion through the ubiquitination of PPM1A[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2018, **37**(1): 116
- [10] Oura K, Morishita A, Tani J, et al. Tumor Immune Microenvironment and Immunosuppressive Therapy in Hepatocellular Carcinoma: A Review[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, **22**(11): 5801
- [11] 刘洋,陈立军,靳秋月,等. STAT3-siRNA表达载体对肝癌细胞pim-2基因表达的影响[J]. *内蒙古医科大学学报*, 2021, **43**(3): 301-304
- [12] Yu P, Wang HY, Tian M, et al. Eukaryotic elongation factor-2 kinase regulates the cross-talk between autophagy and pyroptosis in doxorubicin-treated human melanoma cells in vitro[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, **40**(9): 1237-1244
- [13] Zhou Y, Li Y, Xu S, et al. Eukaryotic elongation factor 2 kinase promotes angiogenesis in hepatocellular carcinoma via PI3K/Akt and STAT3[J]. *Int J Cancer*, 2020, **146**(5): 1383-1395
- [14] Bircan HA, Gurbuz N, Pataer A, et al. Elongation factor-2 kinase (eEF-2K) expression is associated with poor patient survival and promotes proliferation, invasion and tumor growth of lung cancer[J]. *Lung Cancer*, 2018, **124**: 31-39
- [15] Chen F, Castranova V, Shi X. New insights into the role of nuclear factor-kappaB in cell growth regulation[J]. *Am J Pathol*, 2001, **159**(2): 387-397
- [16] Erdogan MA, Ashour A, Yuca E, et al. Targeting eukaryotic elongation factor-2 kinase suppresses the growth and peritoneal metastasis of ovarian cancer[J]. *Cell Signal*, 2021, **81**: 109938
- [17] Summy JM, Gallick GE. Src family kinases in tumor progression and metastasis[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2003, **22**(4): 337-358
- [18] Ashour AA, Abdel AAA, Mansour AM, et al. Targeting elongation factor-2 kinase (eEF-2K) induces apoptosis in human pancreatic cancer cells[J]. *Apoptosis*, 2014, **19**(1): 241-258