



DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2023.230050

过表达 *PAX6* 抑制肝癌细胞生长和促进自然杀伤细胞杀伤能力的机制

朱权¹, 黄柏胜², 邬力祥², 罗奇志¹

(1. 中南大学基础医学院免疫学系, 长沙 410008; 2. 中南大学基础医学院生理学系, 长沙 410008)

[摘要] 目的: 配对盒基因6(paired box gene 6, *PAX6*)主要在胚胎发育中发挥调控作用, 其异常表达与多种肿瘤的发生、发展有关, 在不同肿瘤中可发挥促癌或抑癌的作用。本研究旨在观察过表达 *PAX6* 对肝癌细胞生长及自然杀伤(natural killer, NK)细胞对肝癌细胞杀伤能力的影响及其分子机制。方法: 采用ELISA技术检测68例肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)患者和10例健康人外周血的 *PAX6*、可溶性主要组织相容性复合体I类样蛋白A(soluble major histocompatibility complex class I-like protein A, sMICA)和可溶性UL16结合蛋白2(soluble UL16 binding protein 2, sULBP2)的表达水平; 体外培养肝癌细胞HepG2和LM3及人正常肝细胞LO2, 将 *PAX6* 过表达质粒(*PAX6*-OE)和空载体(NC)转入HepG2和LM3细胞中构建稳定细胞株, 分别采用real-time PCR、蛋白质印迹法、免疫荧光等方法检测HepG2和LM3细胞中 *PAX6* 的表达水平; 在HepG2和LM3细胞中过表达 *PAX6*, 采用CCK-8法和细胞划痕实验检测细胞生长和迁移能力, ELISA法检测其上清液中sMICA和sULBP2的分泌水平, 蛋白质印迹法检测基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)、基质金属蛋白酶9(matrix metalloproteinase 9, MMP9)、去整合素样金属蛋白酶10(disintegrin and metalloproteinase 10, ADAM10)的蛋白质表达水平; 采用流式细胞术检测NK细胞对2种肝癌细胞的杀伤能力。结果: 与健康人相比较, HCC患者血清中 *PAX6* 表达水平显著降低($P=0.002$), 而sMICA和sULBP2的表达水平显著增高($P=0.004$ 和 $P<0.001$)。Real-time PCR、蛋白质印迹法结果显示: 与正常肝细胞LO2相比, HepG2和LM3细胞 *PAX6* 的mRNA和蛋白质表达水平均显著降低(均 $P<0.05$)。免疫荧光结果亦可见肝癌细胞HepG2和LM3中 *PAX6* 的表达均低于正常肝细胞LO2。与NC组比较, *PAX6*-OE组肝癌细胞HepG2和LM3的增殖及迁移能力下降(均 $P<0.05$); *PAX6*-OE组的HepG2和LM3细胞中MMP2、MMP9、ADAM10的蛋白质表达水平均显著降低(均 $P<0.05$), 且 *PAX6*-OE组的HepG2和LM3细胞上清液中sMICA和sULBP2的分泌水平均显著低于NC组(均 $P<0.05$)。流式细胞术显示: 与NC组比较, *PAX6*-OE组NK细胞对HepG2和LM3细胞的杀伤率显著增高(均 $P<0.05$)。结论: *PAX6*在HCC患者血清及肝癌细胞系中表达降低, 过表达 *PAX6*可抑制肝癌细胞生长, 增强NK细胞对肝癌细胞的杀伤效率, 其机制与 *PAX6*抑制金属蛋白酶的表达、降低sMICA和sULBP2的分泌水平有关。

[关键词] 配对盒基因6; 肝细胞癌; 细胞生长; 金属蛋白酶; 自然杀伤细胞

Mechanism of *PAX6* overexpression in inhibiting the growth of hepatocellular carcinoma cells and promoting the killing ability of the natural killer cells

ZHU Quan¹, HUANG Baisheng², WU Lixiang², LUO Qizhi¹

收稿日期(Date of reception): 2023-02-14

第一作者(First author): 朱权, Email: 243790933@qq.com, ORCID: 0000-0002-7568-4916

通信作者(Corresponding author): 罗奇志, Email: luoqz1025@163.com, ORCID: 0000-0003-1868-9363

基金项目(Foundation item): 湖南省自然科学基金(2019JJ40398, 2020JJ4768); 长沙市指导性科技计划项目(kzd22002)。This work was supported by the Natural Science Foundation of Hunan Province (2019JJ40398, 2020JJ4768) and the Changsha Guiding Science and Technology Project (kzd22002), China.

- (1. Department of Immunology, School of Basic Medicine, Central South University, Changsha 410008;
2. Department of Physiology, School of Basic Medicine, Central South University, Changsha 410008, China)

ABSTRACT

Objective: Paired box gene 6 (*PAX6*) plays a major role in the regulation of embryonic development. Abnormal expression of *PAX6* is associated with the development of various tumors. *PAX6* can play a role in promoting or suppressing cancer in different tumors. This study aim to observe the effect of overexpression of *PAX6* on the growth of hepatocellular carcinoma cells, and the killing of hepatocellular carcinoma cells via natural killer (NK) cell and the possible mechanism.

Methods: The protein levels of *PAX6*, soluble major histocompatibility complex class I-like protein A (sMICA) and soluble UL16 binding protein 2 (sULBP2) in peripheral blood from 68 cases of hepatocellular carcinoma (HCC) patients and 10 healthy volunteers were detected by ELISA. Hepatocellular carcinoma cell line (HepG2, LM3) and human normal liver cells (LO2) were cultured at 37 °C and 5% CO₂ condition in vitro. The *PAX6* overexpressed plasmid (*PAX6*-OE) and empty vector (NC) were transferred into HepG2 and LM3 cells to construct stable cell lines. The mRNA and protein expression levels of *PAX6* in HepG2 and LM3 cells were detected by real-time PCR, Western blotting and immunofluorescence, respectively. *PAX6* was overexpressed in HepG2 and LM3 cells, the cell growth and migration ability were detected by CCK-8 method and cell scratch assay, and the levels of sMICA and sULBP2 in the supernatant were detected by ELISA. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2), matrix metalloproteinase 9 (MMP9) and disintegrin and metalloproteinase 10 (ADAM10) in HepG2 and LM3 cells were detected by Western blotting. The killing ability of NK cells against these 2 HCC cells was detected by flow cytometry.

Results: Compared with the healthy volunteers, the expressions of *PAX6* in the HCC patients were significantly decreased ($P=0.002$), while the expression of sMICA and sULBP2 were significantly increased ($P=0.004$ and $P<0.001$, respectively). Real-time PCR and Western blotting results showed that compared with LO2 cells, mRNA and protein expressions of *PAX6* in HepG2 and LM3 cells were significantly decreased (all $P<0.05$). Immunofluorescence results also showed that the expressions of *PAX6* in HepG2 and LM3 were lower than those of LO2 cells. Compared with the NC group, the ability of proliferation and migration of HepG2 and LM3 cells were decreased (both $P<0.05$). The protein expressions of MMP2, MMP9 and ADAM10 in HepG2 and LM3 cells in the *PAX6*-OE group were significantly decreased, and the levels of sMICA and sULBP2 in superneant of HepG2 and LM3 cells in the *PAX6*-OE group were significantly lower than those in the NC group (all $P<0.05$). Flow cytometry results showed that compared with the NC group, the proportion of NK cells killing HepG2 and LM3 cells in *PAX6*-OE group was significantly increased (both $P<0.05$).

Conclusion: The expression of *PAX6* is decreased in serum of HCC patients and hepatocellular carcinoma cell lines. Overexpression of *PAX6* can inhibit the growth of hepatocellular carcinoma cells, enhance the killing efficiency of NK cells against hepatoma cells. The mechanism is related to the inhibition of the expression of metalloproteinase via *PAX6* and the decrease of the secretion levels of sMICA and sULBP2.

KEY WORDS paired box gene 6; hepatocellular carcinoma; cell growth; metalloproteinase; natural killer cells

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是高度恶性实体瘤, 具有很强的生长侵袭和转移能力, 对大多数化学治疗药物不敏感, 全球HCC患者整体5年生存率不足5%^[1]。肝移植是一种治疗肝癌的有效手段, 但肝移植后终身使用的免疫抑制剂使得肿瘤复发率更高^[2]。此外, HCC还具有非常复杂的免疫逃逸机制, 固有免疫系统是体内抗HCC的主要机制之一, 执行此过程的主要是自然杀伤(natural killer, NK)细胞^[3], NK细胞杀伤靶细胞的作用依赖于其表面的自然杀伤细胞活化性受体2D(natural killer group 2 member D, NKG2D)的激活, NKG2D结合相应的配体分子后活化, NKG2D的配体包括主要组织相容性复合体I类样蛋白A/B(major histocompatibility complex class I-like protein A/B, MICA/MICB)和UL16结合蛋白1-6(UL16 binding protein 1-6, ULBP1-6)等^[4]。本课题组在前期研究^[5]中发现HCC患者体内可分泌可溶性MICA(soluble MICA, sMICA), 它可与NKG2D结合但不能活化NKG2D分子通路, 同时还阻碍NKG2D受体与靶细胞上的配体分子结合, 抑制NK细胞发挥细胞毒作用, 从而有利于肿瘤细胞逃机体免疫监视得以生长和转移。虽然近年来治疗HCC取得了一定的进展^[6], 但目前临床上尚无能彻底治愈HCC的治疗方式, HCC依然是严重威胁人类健康与生命的疾病之一。

HCC发病机制非常复杂, 涉及多种基因表达水平的改变。配对盒基因6(paired box gene 6, PAX6)是人类进化过程中高度保守的基因, 定位于人类11号染色体^[7], 主要调控胚胎发育和肿瘤发生、发展, 在不同肿瘤中发挥抑癌基因或促癌基因的作用。Huang等^[8]研究发现PAX6在胶质瘤组织和细胞中的表达降低, 过表达PAX6抑制胶质瘤细胞的生长侵袭。Zhao等^[9]报道PAX6在肺癌中的表达水平与肺癌细胞恶性程度呈高度正相关。Shih等^[10]对肝癌细胞进行高通量测序后发现PAX6基因启动子在肝癌中存在高度甲基化, 但未能阐明该甲基化的生物学意义。目前国内外关于PAX6在HCC中的生物学功能尚未见报道, 对PAX6在HCC中的作用尚缺乏了解。因此, 本研究拟探讨过表达PAX6对肝癌细胞生长及NK细胞对肝癌细胞杀伤能力的影响, 并初步探索其可能的分子机制, 以期为深入阐明HCC发病机制和临床治疗HCC手段的改进提供有价值的参考数据。

1 材料与方法

1.1 材料

HepG2细胞、LM3细胞、LO2细胞、293FT细胞、NK细胞均购自中科院上海生化细胞所; DMEM培养基和RPMI 1640培养基购自美国Hyclone公司; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)购自美国Gibco公司; RNA提取试剂盒购自美国Eco-top公司, 反转录试剂盒购自美国AG公司; 抗PAX6、抗基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)、抗MMP9、抗去整合素样金属蛋白酶10(disintegrin and metalloproteinase 10, ADAM10)、抗GAPDH抗体、辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase, HRP)标记的羊抗兔IgG、FITC标记的羊抗兔IgG购自广州华美生物科技有限公司; 人外周血PAX6、MICA、ULBP2的ELISA试剂盒购自江苏盐城市晶美生物有限公司; BCA试剂和人源化白细胞介素-2(interleukin-12, IL-2)购自美国Thermo公司; PLVX质粒及其辅助质粒购自长沙快迈生物科技有限公司; real-time PCR试剂盒购自美国Eco-top公司; 细胞计数试剂盒-8(cell counting kit-8, CCK-8)、羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester, CFSE)、7-氨基放线菌素D(7-amino-actinomycin D, 7-AAD)购自美国Invitrogen公司, 慢病毒浓缩液购自长沙HonorGene公司; ECL超敏化学发光液购自上海雅酶公司。

1.2 方法

1.2.1 ELISA检测HCC患者外周血中PAX6、sMICA及sULBP2的表达水平

本研究从湖南省肿瘤医院收集68例经病理学确诊的HCC患者和10例健康人的抗凝外周血标本, 所有临床标本都经过中南大学基础医学院伦理委员会批准(审批号: 2022-KT16)。样本经1 000 r/min离心10 min后收集血清, 吸取10 μ L血清和40 μ L稀释液(由ELISA试剂盒提供)混合后, 每孔分别加入100 μ L HRP标记的抗PAX6抗体, 于37 $^{\circ}$ C下孵育1 h后弃掉上清液, 用洗涤液洗涤5次后加入底物, 于37 $^{\circ}$ C下避光孵育15 min后每孔加入50 μ L终止液, 在450 nm波长条件下测定各孔的吸光度值并绘制标准曲线计算相应物质的浓度。外周血sMICA和可溶性UL16结合蛋白2(soluble UL16 binding protein 2, sULBP2)表

达水平的检测方法与上述步骤完全相同。

1.2.2 细胞培养

从液氮中取出冻存的待培养细胞并迅速置于37 °C恒温水浴箱中解冻复苏, 随后加入终浓度为10% FBS的DMEM培养基于肝癌细胞(HepG2、LM3)和293FT细胞中, 而正常肝细胞(LO2)和NK细胞则加入终浓度为10% FBS的RPMI 1640培养基, 其中NK细胞还需要加入终浓度为2 µg/mL的IL-2; 将上述各细胞置于37 °C、5% CO₂的培养箱内培养, 待细胞贴壁生长达80%~90%融合时, 使用0.25%胰酶消化, 进行细胞传代培养。

1.2.3 构建肝癌细胞PAX6过表达的稳定细胞模型

用PLVX慢病毒质粒系统构建过表达PAX6(PAX6-OE)及空载体(NC)的肝癌HepG2、LM3细胞稳定细胞株。首先将合成好的过表达PAX6质粒组成重组质粒, 取9 µg目的质粒、3 µg psPAX2质粒和3 µg pMD2.G质粒, 加入500 µL无血清的DMEM培养基中混合, 再将50 µL体积的辅助转染剂聚乙烯亚胺(polyethylenimine, PEI)加入到500 µL无血清的DMEM培养基中, 随后将2种溶液混合, 于室温下避光静置15 min后, 缓慢加入293FT细胞中, 培养6 h后更换含有10% FBS的DMEM培养基, 3种质粒在293FT细胞内将组装成具有感染能力的慢病毒(其中psPAX2质粒组装成病毒的外壳, pMD2.G组装成病毒的刺突蛋白)。48 h后收集上清液, 用0.45 µm滤器过滤后加入病毒浓缩液(上清液与浓缩液的体积比为3:1)浓缩病毒并用浓缩后的病毒液分别感染已铺于6孔板中的HepG2和LM3细胞, 每孔加入2 mL病毒液和2 µL的聚凝胺, 48~72 h后在荧光显微镜下检测细胞的荧光强度, 并用0.5 µg/mL的嘌呤霉素筛选4~8 d, 剩余存活的细胞为稳定细胞株。

1.2.4 Real-time PCR检测细胞中PAX6的mRNA表达水平

利用RNA提取试剂盒抽提HepG2、LM3和LO2细胞的总RNA, 所有步骤严格按说明书操作。收集细胞用无菌PBS溶液重悬, 裂解细胞, 用反转录试剂盒将总RNA反转录成为cDNA, 再用real-time PCR Mix在人源PAX6引物作用下经荧光定量PCR仪反应后得到扩增阈值(Ct值), 按公式 $N=2^{-\Delta\Delta Ct}$ (N为表达量)计算PAX6的mRNA表达水平。相应引物序列如表1所示。

1.2.5 蛋白质印迹法检测PAX6和金属蛋白酶的蛋白质表达水平

收集各处理组肝癌细胞, 采用细胞蛋白质提取试剂盒提取细胞总蛋白质, BCA试剂盒对蛋白质进行定量。每组取上述蛋白质样本35 µg并用PBS补齐到

30 µL, 再加入7.5 µL的5×上样缓冲液并煮沸5 min后进行SDS-PAGE(100 V, 1.5 h), 随后在200 mA恒定电流条件下将凝胶中的蛋白质转移至PVDF膜上, 用5%脱脂奶粉在37 °C条件下封闭1.5 h后分别加入兔抗PAX6、兔抗MMP2、兔抗MMP9、兔抗ADAM10及兔抗GAPDH一抗, 在4 °C条件下反应过夜后用含有0.1% PBST溶液洗涤3次, 每次10 min; 再按1:6 000的比例加入HRP标记的羊抗兔IgG, 在37 °C条件下反应1 h后用PBST洗涤3次, 每次10 min; 随后使用ECL试剂检测蛋白质的表达水平。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物名称	序列(5'-3')
PAX6	F: TCTTTGCTTGGGAAATCCG
PAX6	R: CTGCCCCGTTCAACATCCCTTAG
GAPDH	F: GGCCTGAGAAGCGGGGCCG
GAPDH	R: GAAGATGGTGTATGGGATTTTC

1.2.6 免疫荧光检测细胞中PAX6的表达水平

将胰蛋白酶消化下来的NC组、PAX6-OE组肝癌细胞均匀铺在预先放置细胞爬片的24孔板上, 待细胞融合度达到80%时用PBS清洗, 加入4%多聚甲醛在4 °C环境下固定20 min, 用预冷的PBS洗涤后加入0.3%曲拉通进行细胞破膜, 随后用5% BSA溶液在37 °C封闭40 min, 再加入按1:400比例稀释的兔抗PAX6抗体于4 °C过夜, 随后用PBS洗涤后分别加入用FITC标记的羊抗兔IgG在37 °C条件下避光孵育1 h, 随后直接加入4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)染色液对细胞核进行染色15 min, 最后在荧光显微镜下观察各组细胞的荧光强度。

1.2.7 CCK-8实验检测肝癌细胞增殖

将HepG2和LM3细胞各自分成2组, PAX6-OE组和NC组, 用含有10% FBS的DMEM培养基将各组细胞调整密度为 5×10^4 个/mL, 各组细胞在96孔板中都设置4个复孔, 每孔加入100 µL细胞悬液, 待细胞贴壁后每孔更换100 µL新鲜的DMEM完全培养基并开始计时, 在0~7 d内, 每天于相同时间点抽取一块96孔板, 用无菌PBS洗涤后加入20 µL CCK-8试剂, 继续置于37 °C、5% CO₂培养箱中孵育4 h, 最后用酶标仪检测450 nm波长处每孔的吸光度值。

1.2.8 细胞划痕实验检测肝癌细胞迁移能力

将NC组、PAX6-OE组的HepG2和LM3细胞均匀铺在6孔板中, 待细胞密度达100%时, 用直径为

0.5 mm 的无菌划痕棒从 6 孔板中间划出一片无细胞区域, 并更换为无血清的 DMEM 培养基, 分别于 0 h 和 24 h 在显微镜下记录无细胞区域的宽度并拍照保存, 采用 ImageJ 软件测量划痕的宽度并计算迁移率, 计算公式为: 迁移率=(0 h 划痕宽度-24 h 划痕宽度)/0 h 划痕宽度 \times 100%。

1.2.9 流式细胞术检测 NK 细胞对肝癌细胞的杀伤率

培养 NC 组、PAX6-OE 组的 HepG2 和 LM3 细胞至对数生长期时, 收集细胞并将细胞浓度调整为 5×10^6 个/mL, 这些细胞预先用终浓度为 0.2 $\mu\text{mol/L}$ 的 CFSE 染色, 然后分别按 NK 细胞:靶细胞(HepG2 或 LM3)为 0:1、1:1、5:1、10:1、20:1、40:1 的比例在培养箱中共同孵育 4 h, 收集细胞后用 PBS 洗涤 3 次, 随后加入 5 μL 的 7-AAD 染料, 室温避光孵育 10 min 后用流式细胞仪检测活细胞比例以代表 NK 细胞对靶细胞的杀伤率, 其计算公式为: 杀伤率=CFSE 阳性细胞数/(CFSE 阳性细胞数+7-AAD 阳性细胞数) \times 100%。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 18.0 软件和 GraphPad 8.0 软件对数据进行统计学分析; 所有计量数据采用 3 次实验取平均值, 采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示; 不同组间数据分析采用独立样本 *t* 检验; $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PAX6 在肝癌中的表达水平

ELISA 检测结果显示: 与健康人相比, HCC 患者外周血 PAX6 水平显著低于健康人($t=3.267$, $P=0.002$, 图 1A); real-time PCR 结果显示: 与 LO2 细胞比较, HepG2 和 LM3 细胞中 PAX6 的 mRNA 表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$, 图 1B); 蛋白质印迹法和免疫荧光实验结果显示: 与 LO2 细胞比较, HepG2 和 LM3 细胞中 PAX6 的蛋白质表达水平均显著降低(均 $P < 0.05$, 图 1C、1D)。

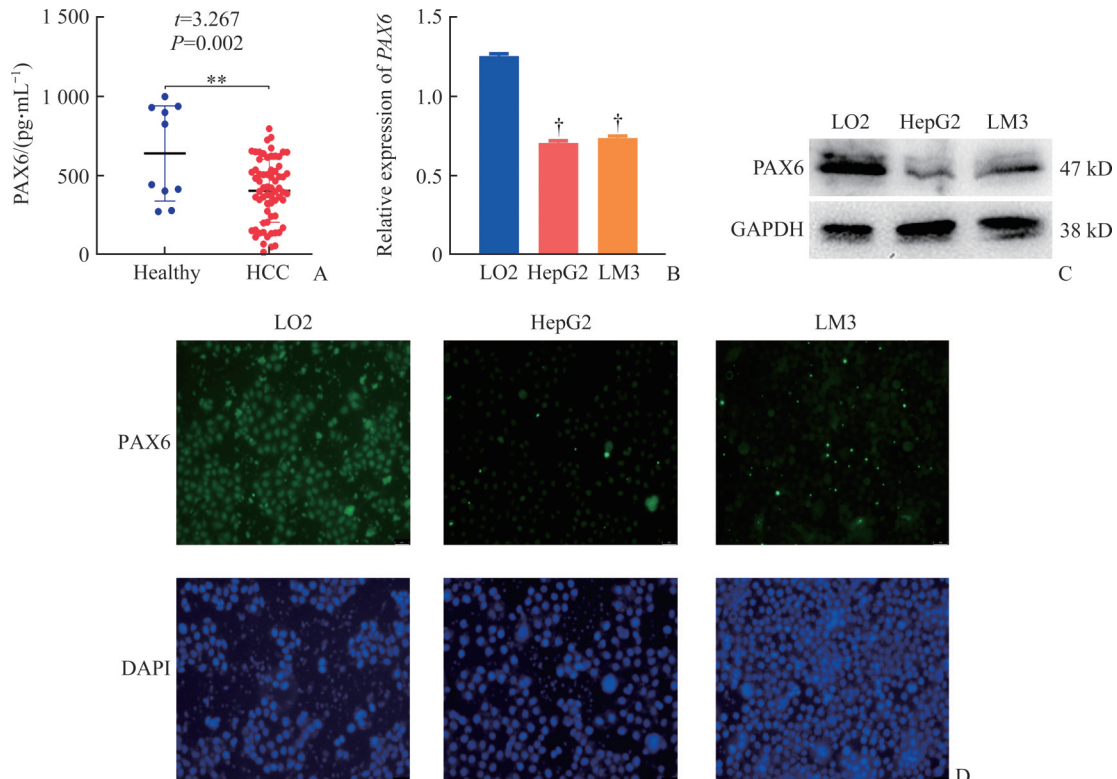


图 1 PAX6 在 HCC 患者和肝癌细胞系中的表达水平

Figure 1 Expression of PAX6 in HCC patients and HCC cell lines

A: Concentration of PAX6 in the serum of HCC patients detected by ELISA; B: Relative expression levels of PAX6 in HCC cell lines detected by real-time PCR; C: Expression levels of PAX6 in HCC cell lines detected by Western blotting; D: Expression of PAX6 in HCC cell lines detected by immunofluorescence ($\times 200$). ** $P < 0.01$ vs the healthy group; † $P < 0.05$ vs the LO2 cell. HCC: Hepatocellular carcinoma; PAX6: Paired box gene 6; DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole.

2.2 过表达 PAX6 对肝癌细胞增殖及迁移的影响

CCK-8 结果显示: 与 NC 组相比, PAX6-OE 组 HepG2 和 LM3 细胞的生长速度均显著低于 NC 组细胞

(均 $P < 0.05$, 图 2A、2B)。细胞划痕实验结果显示: PAX6-OE 组的 HepG2 和 LM3 稳定细胞株在 24 h 的划痕间距均显著大于 NC 组(均 $P < 0.05$, 图 2C、2D)。

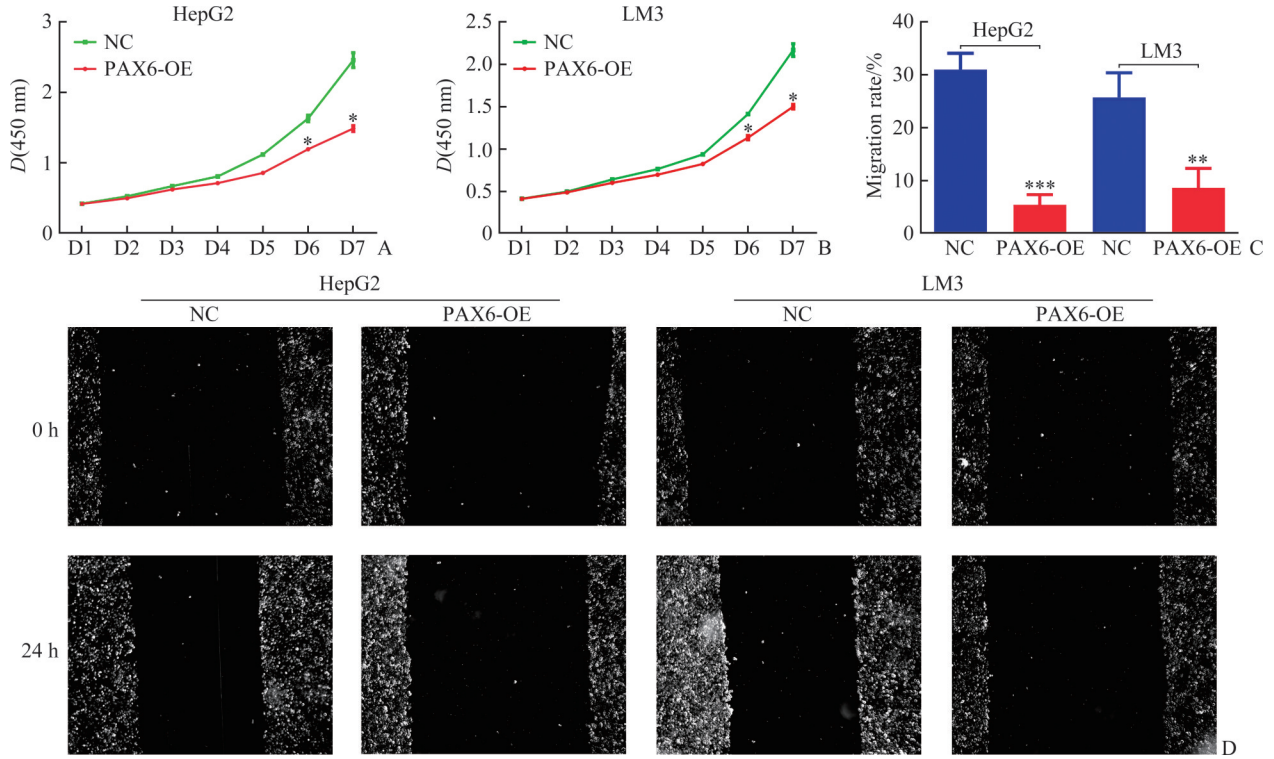


图2 过表达 PAX6 对肝癌细胞系生长迁移的影响

Figure 2 Effects of PAX6 overexpression on growth and migration of HCC cell lines

A and B: Growth curves of HCC cell lines under different treatments; C and D: Migration capacity of HCC cell lines under different treatments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the NC group. HCC: Hepatocellular carcinoma; PAX6: Paired box gene 6.

2.3 过表达 PAX6 对肝癌细胞金属蛋白酶表达水平的影响

蛋白质印迹法结果显示: 与 NC 组相比, 过表达 PAX6-OE 组可显著抑制 HepG2 和 LM3 细胞的 ADAM10、MMP2 和 MMP9 蛋白质表达水平(图3)。

对 PAX6-OE 组的 HepG2(5.48% vs 40.60%)和 LM3 细胞 (6.94% vs 48.30%) 杀伤率均显著增高(均 $P < 0.05$, 图5)。

2.4 过表达 PAX6 对 sMICA 和 sULBP2 分泌水平的影响

ELISA 结果显示: 与健康人相比, HCC 患者外周血中 sMICA 和 sULBP2 的分泌水平显著高于健康人(均 $P < 0.05$, 图 4A、4C); 与 NC 组相比, PAX6-OE 组 HepG2 和 LM3 细胞的 sMICA 和 sULBP2 分泌量均显著降低(均 $P < 0.05$, 图 4B、4D)。

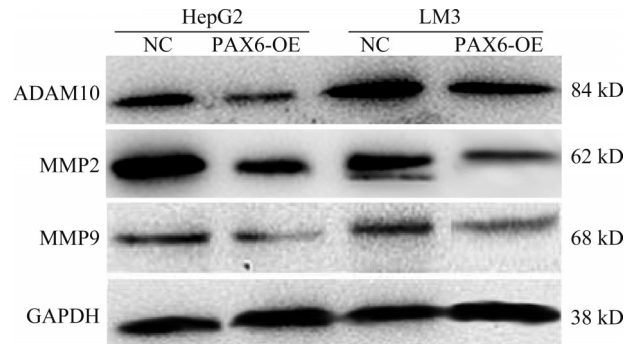


图3 过表达 PAX6 对肝癌细胞金属蛋白酶表达水平的影响

Figure 3 Effect of PAX6 overexpression on metalloproteinase expression in HCC cell lines

HCC: Hepatocellular carcinoma; PAX6: Paired box gene 6.

2.5 过表达 PAX6 对 NK 细胞体外杀伤肝癌细胞效率的影响

流式细胞术结果显示: 与 NC 组相比, NK 细胞

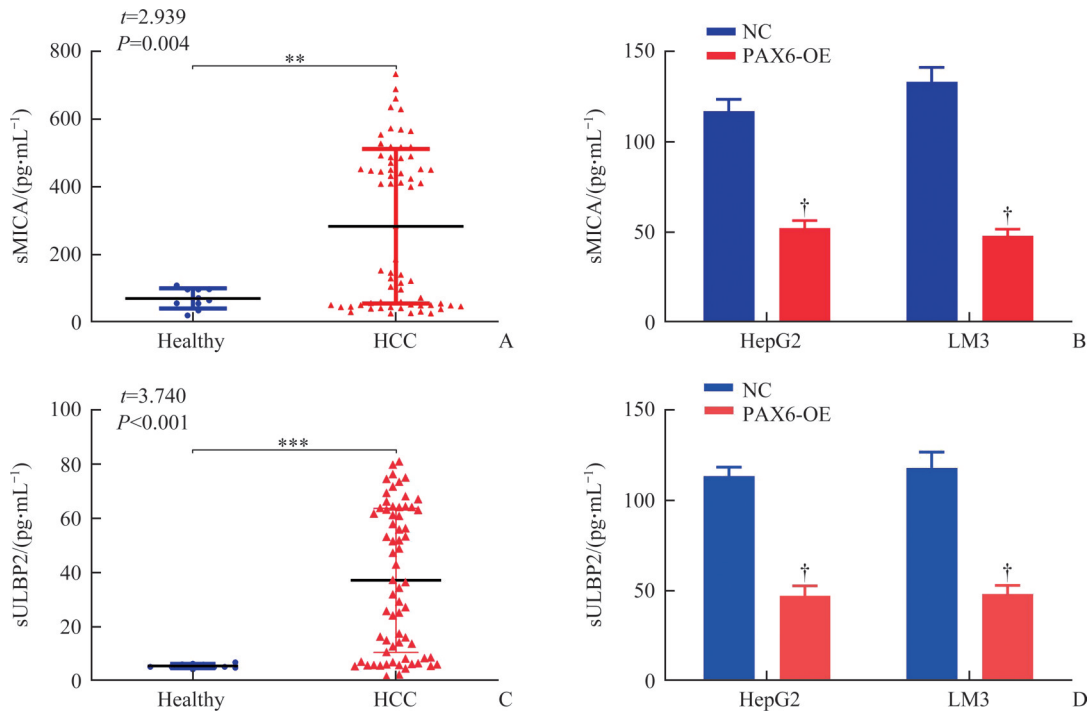


图4 过表达 PAX6 对肝癌细胞系分泌 sMICA 和 sULBP2 的影响

Figure 4 Effects on secretion of sMICA and sULBP2 from HCC cell lines under PAX6 overexpression

A: Concentration of sMICA in the serum of HCC patients and healthy volunteers detected by ELISA; B: Concentration of sMICA in HCC cell lines; C: Concentration of sULBP2 in the serum of HCC patients and healthy volunteers detected by ELISA; D: Concentration of sULBP2 in HCC cell lines. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs the healthy group; † $P < 0.05$ vs the NC group. sMICA: Soluble major histocompatibility complex class I-like protein A; sULBP2: Soluble UL16 binding protein 2; HCC: Hepatocellular carcinoma; PAX6: Paired box gene 6.

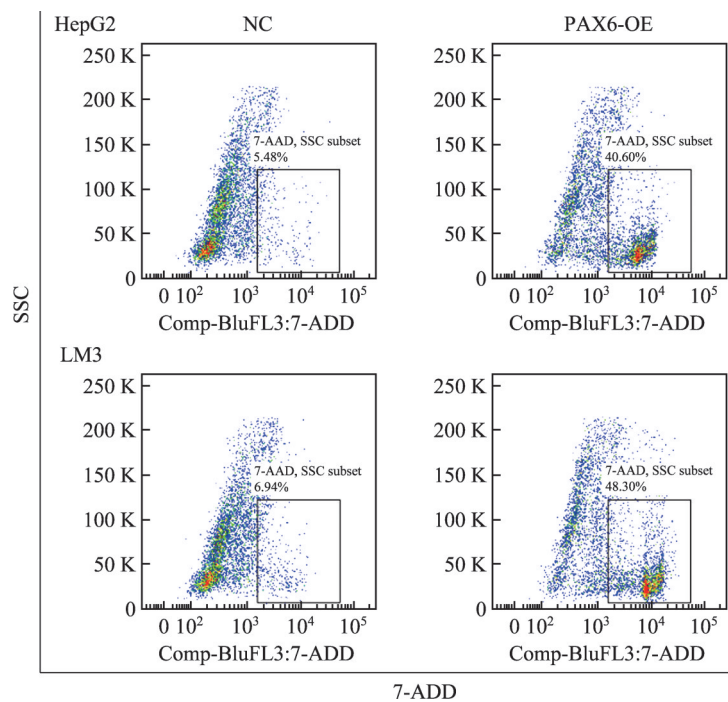


图5 过表达 PAX6 对 NK 细胞杀伤肝癌细胞效率的影响

Figure 5 Effect of PAX6 overexpression on the killing efficiency of NK cells against HCC cell lines

PAX6: Paired box gene 6; NK: Natural killer; 7-ADD: 7-Amino-actinomycin D; SSC: Side scatter.

3 讨论

随着环境污染和人们生活压力不断加剧, HCC 的发病率逐年增高, 根据国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)全球癌症统计数据库 GLOBOCAN 统计(<https://gco.iarc.fr>), 2020 年全球 HCC 发病率为 8.7 人/10 万人, 中国 HCC 发病率为 17.2 人/10 万人, 约为全球平均水平的 2 倍。随着分子生物学技术的不断进步, 近年来 HCC 的免疫治疗和靶向治疗, 尤其是针对 HCC 特异性抗原的嵌合抗原受体 T 细胞疗法在很大程度上延长了患者的生存时间^[11-12], 但这些治疗手段存在不良反应大、无法彻底清除肿瘤细胞和不能阻止肝癌复发等弊端。因此, 进一步探索 HCC 发生、发展的分子机制, 阐明 HCC 中异常表达基因的生物学功能, 对深入认识 HCC 发病机制和改进治疗手段具有重要意义。

HCC 等多种肿瘤细胞基因表达谱通常表现为原癌基因表达上调而抑癌基因表达受抑制, 使得肿瘤细胞具有生长迅速、侵袭性强、逃避机体免疫监视等特征, 由于存在一系列基因表达失调, 从而促进 HCC 生长转移^[13-15]。本研究发现 PAX6 在肝癌细胞 HepG2、LM3 中的表达显著低于正常肝细胞 LO2, 过表达 PAX6 抑制肝癌细胞增殖及迁移, 即 PAX6 基因的功能之一是可抑制肝癌细胞的生长, 这是抑癌基因的重要特征之一, 因此笔者推测 PAX6 可能是 HCC 中一种潜在的抑癌基因, 但 PAX6 究竟通过何种方式和途径发挥抑制肝癌细胞生长的作用, 有待更深入的研究。

抑癌基因能抑制肿瘤细胞增殖, 同时抑制肿瘤细胞逃避机体免疫监视也是抑癌基因的重要功能之一。肝癌细胞不仅具有很强的增殖能力, 也存在复杂而高效的逃避机体免疫监视的能力; 机体执行免疫监视的 NK 细胞是人体免疫系统抵抗 HCC 的主要免疫细胞, NK 细胞通过其表面 NKG2D 结合肝癌细胞表面的 MICA 或 ULBP2 等配体分子后, 启动细胞毒效应杀伤肝癌细胞^[16-17]。肝癌细胞为逃避 NK 细胞的杀伤作用, 细胞内的基质金属蛋白酶和去整合素样金属蛋白酶的表达水平显著升高, 与 HCC 和多种恶性肿瘤免疫逃逸有关的金属蛋白酶包括 MMP2、MMP9 和 ADAM10^[18-20], 这 3 种金属蛋白酶的表达水平与非小细胞肺癌、胶质瘤、胃癌等多种肿瘤的生存率呈显著负相关^[21-23]。MMP2 和 MMP9 可将 MICA 分子的跨膜区氨基酸水解, 从而形成 sMICA, MICA 与 NKG2D 结合的区域为胞外的 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 结构域^[24], MMP2 和 MMP9 水解的位点位于跨膜区, 因此

sMICA 包含了与 NKG2D 结合的结构域, 也能与 NKG2D 结合, 但由于缺乏跨膜区结构域, 不能在 NK 细胞表面形成类似于免疫突触的 MICA-NKG2D 集群, 因此不能触发 NKG2D 下游的信号通路, 不能活化 NK 细胞以杀伤肝癌细胞, 相反由于 sMICA 与 NKG2D 结合后占据了 NKG2D 的识别位点, 从而导致 NKG2D 不能与肝癌细胞表面的膜 MICA 结合, 使得肝癌细胞逃避了 NK 细胞的杀伤作用。本课题组在前期研究^[5]中发现肝癌细胞可分泌大量的 sMICA, 且 sMICA 在 HCC 患者体内的水平与患者的生存时间呈负相关。本研究发现过表达 PAX6 可显著抑制肝癌细胞 HepG2 和 LM3 的 sMICA 分泌水平; 同时过表达 PAX6 可显著抑制肝癌细胞 sULBP2 的分泌水平。ULBP2 与 MICA 一样, 也是 NKG2D 的重要配体分子, ADAM10 可特异性水解肿瘤细胞表面的 ULBP2 生成 sULBP2, 后者与 sMICA 类似, 能与 NKG2D 结合但不能活化 NKG2D 信号通路, 并且阻碍 NKG2D 识别肝癌细胞表面的 ULBP2 等配体分子, 也是 HCC 逃避 NK 细胞杀伤的重要原因之一^[25]。本研究还发现: NK 细胞对过表达 PAX6 的 HepG2 和 LM3 细胞杀伤效率显著高于对照组细胞, 其原因可能是由于过表达 PAX6 抑制了 sMICA 和/或 sULBP2 的分泌, 解除了 sMICA 和/或 sULBP2 对 NKG2D 信号通路活化的抑制作用。

本研究通过在肝癌细胞 HepG2、LM3 中导入外源性 PAX6 基因, 提高了肝癌细胞中 PAX6 的表达水平, 结果发现 PAX6 可抑制 HepG2 和 LM3 细胞的生长和迁移, 推测 PAX6 可能是肝癌中的抑癌基因。进一步研究发现 PAX6 可显著抑制 sMICA 和 sULBP2 的分泌, 增强 NK 细胞对 HepG2 和 LM3 细胞的杀伤能力, 最后发现 PAX6 抑制 sMICA 和/或 sULBP2 分泌的分子机制之一可能是过表达 PAX6 抑制了 MMP2、MMP9 和 ADAM10 的表达水平。因此, 笔者推测在肝癌细胞中过表达 PAX6 可能是临床治疗 HCC 的一条潜在新途径; 然而, PAX6 的功能十分复杂且尚未完全明确, 其在 HCC 中是否还有其他的生物学作用, 下游的分子通路有哪些, 以及基因治疗技术尚未完全成熟和普及等, 过表达 PAX6 治疗 HCC 这项技术广泛应用于临床还有待进一步研究。

作者贡献声明: 朱权 实验操作、数据分析; 黄柏胜 论文撰写、基金支持; 鄢力祥 论文设计指导; 罗奇志 基金支持、论文修改。所有作者阅读并同意最终的文本。

利益冲突声明: 作者声称无任何利益冲突。

参考文献

- [1] 陈杰, 赵斌, 李俊, 等. 腹腔镜肝癌切除术对患者免疫功能、炎症因子及预后的影响[J]. 中国综合临床, 2019, 35(4): 350-353. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1008-6315.2019.04.013>. CHEN Jie, ZHAO Bin, LI Jun, et al. Effect of laparoscopic hepatectomy on immune function, inflammatory factors and prognosis of patients with hepatocellular carcinoma[J]. Clinical Medicine of China, 2019, 35(4): 350-353. <https://doi.org/10.3760/cma.j.issn.1008-6315.2019.04.013>.
- [2] Kim M, Rhu J, Choi GS, et al. Risk factors for poor survival after recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation[J]. Ann Surg Treat Res, 2021, 101(1): 28-36. <https://doi.org/10.4174/astr.2021.101.1.28>.
- [3] Wang S, Wu QC, Chen TC, et al. Blocking CD47 promotes antitumor immunity through CD103⁺ dendritic cell-NK cell axis in murine hepatocellular carcinoma model[J]. J Hepatol, 2022, 77(2): 467-478. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2022.03.011>.
- [4] Fan J, Shi JW, Zhang Y, et al. NKG2D discriminates diverse ligands through selectively mechano-regulated ligand conformational changes[J/OL]. EMBO J, 2022, 41(2): e107739 [2023-02-02]. <https://doi.org/10.15252/embj.2021107739>.
- [5] Luo QZ, Luo WG, Zhu Q, et al. Tumor-derived soluble *MICA* obstructs the NKG2D pathway to restrain NK cytotoxicity[J]. Aging Dis, 2020, 11(1): 118-128. <https://doi.org/10.14336/AD.2019.1017>.
- [6] Ma WK, Voss DM, Scharner J, et al. ASO-based PKM splice-switching therapy inhibits hepatocellular carcinoma growth[J]. Cancer Res, 2022, 82(5): 900-915. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-20-0948>.
- [7] Robinson DO, Howarth RJ, Williamson KA, et al. Genetic analysis of chromosome 11p13 and the *PAX6* gene in a series of 125 cases referred with aniridia[J]. Am J Med Genet A, 2008, 146A(5): 558-569. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.32209>.
- [8] Huang BS, Luo QZ, Han Y, et al. miR-223/PAX6 axis regulates glioblastoma stem cell proliferation and the chemo resistance to TMZ via regulating PI3K/akt pathway[J]. J Cell Biochem, 2017, 118(10): 3452-3461. <https://doi.org/10.1002/jcb.26003>.
- [9] Zhao XT, Yue WT, Zhang LN, et al. Downregulation of *PAX6* by shRNA inhibits proliferation and cell cycle progression of human non-small cell lung cancer cell lines[J/OL]. PLoS One, 2014, 9(1): e85738 [2023-02-02]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085738>.
- [10] Shih YL, Kuo CC, Yan MD, et al. Quantitative methylation analysis reveals distinct association between *PAX6* methylation and clinical characteristics with different viral infections in hepatocellular carcinoma[J]. Clin Epigenetics, 2016, 8: 41. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0208-3>.
- [11] Zou F, Tan JZ, Liu T, et al. The CD39⁺ HBV surface protein-targeted CAR-T and personalized tumor-reactive CD8⁺ T cells exhibit potent anti-HCC activity[J]. Mol Ther, 2021, 29(5): 1794-1807. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2021.01.021>.
- [12] Batra SA, Rathi P, Guo LJ, et al. Glypican-3-specific CAR T cells coexpressing IL15 and IL21 have superior expansion and antitumor activity against hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Immunol Res, 2020, 8(3): 309-320. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-19-0293>.
- [13] Guo D, Zhang D, Ren MD, et al. THBS4 promotes HCC progression by regulating ITGB1 via FAK/PI3K/AKT pathway [J]. FASEB J, 2020, 34(8): 10668-10681. <https://doi.org/10.1096/fj.202000043R>.
- [14] Pu J, Wang JC, Qin ZB, et al. IGF₂BP₂ promotes liver cancer growth through an m6A-FEN1-dependent mechanism[J]. Front Oncol, 2020, 10: 578816. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.578816>.
- [15] Luo YD, Fang L, Yu HQ, et al. p53 haploinsufficiency and increased mTOR signalling define a subset of aggressive hepatocellular carcinoma[J]. J Hepatol, 2021, 74(1): 96-108. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2020.07.036>.
- [16] Mantovani S, Varchetta S, Mele D, et al. An anti-*MICA*/B antibody and IL-15 rescue altered NKG2D-dependent NK cell responses in hepatocellular carcinoma[J]. Cancers, 2020, 12(12): 3583. <https://doi.org/10.3390/cancers12123583>.
- [17] Weng J, Han X, Liu KY, et al. CD44 3'-untranslated region functions as a competing endogenous RNA to enhance NK sensitivity of liver cancer stem cell by regulating ULBP2 expression[J]. Int J Biol Sci, 2019, 15(8): 1664-1675. <https://doi.org/10.7150/ijbs.35216>.
- [18] Yang FQ, Liu M, Yang FP, et al. Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) mediates MHC class I polypeptide-related sequence A (*MICA*) shedding in renal cell carcinoma[J]. Actas Urol Esp, 2014, 38(3): 172-178. <https://doi.org/10.1016/j.acuro.2013.09.015>.
- [19] Han XY, Geng X, Li ZZ, et al. The relationship between phospho-p38, matrix metalloproteinase 9, and major histocompatibility complex class I chain-related molecule A expression in pituitary adenomas demonstrates a new mechanism of pituitary adenoma immune escape[J/OL]. World Neurosurg, 2019, 123: e116-e124 [2023-02-02]. <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.11.077>.
- [20] Barsoum IB, Hamilton TK, Li X, et al. Hypoxia induces escape from innate immunity in cancer cells via increased expression of ADAM10: role of nitric oxide[J]. Cancer Res, 2011, 71(24): 7433-7441. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-2104>.
- [21] Jin GF, Miao RF, Hu ZB, et al. Putative functional polymorphisms of MMP9 predict survival of NSCLC in a Chinese population[J]. Int J Cancer, 2009, 124(9): 2172-2178. <https://doi.org/10.1002/ijc.24190>.
- [22] Bi YM, Li H, Yi DZ, et al. Cordycepin augments the chemosensitivity of human glioma cells to temozolomide by activating AMPK and inhibiting the AKT signaling pathway[J]. Mol Pharm, 2018, 15(11): 4912-4925. <https://doi.org/10.1021/acs.molpharmaceut.8b00551>.
- [23] Jia Y, Cao BP, Yang YS, et al. Silencing NKD2 by promoter region hypermethylation promotes gastric cancer invasion and metastasis by up-regulating SOX18 in human gastric cancer[J]. Oncotarget, 2015, 6(32): 33470-33485. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5272>.

- [24] Li P, Morris DL, Willcox BE, et al. Complex structure of the activating immunoreceptor NKG2D and its MHC class I-like ligand *MICA*[J]. *Nat Immunol*, 2001, 2(5): 443-451. <https://doi.org/10.1038/87757>.
- [25] Cadoux M, Caruso S, Pham S, et al. Expression of NKG2D ligands is downregulated by β -catenin signalling and associates

with HCC aggressiveness[J]. *J Hepatol*, 2021, 74(6): 1386-1397. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2021.01.017>.

(本文编辑 田朴)

本文引用: 朱权, 黄柏胜, 邬力祥, 罗奇志. 过表达 *PAX6* 抑制肝癌细胞生长和促进自然杀伤细胞杀伤能力的机制[J]. 中南大学学报(医学版), 2023, 48(7): 947-956. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2023.230050

Cite this article as: ZHU Quan, HUANG Baisheng, WU Lixiang, LUO Qizhi. Mechanism of *PAX6* overexpression in inhibiting the growth of hepatocellular carcinoma cells and promoting the killing ability of the natural killer cells[J]. *Journal of Central South University. Medical Science*, 2023, 48(7): 947-956. DOI: 10.11817/j.issn.1672-7347.2023.230050

欢迎订阅 2024 年《中南大学学报(医学版)》

《中南大学学报(医学版)》原名《湖南医科大学学报》，创刊于1958年，为教育部主管、中南大学主办的医药卫生类综合性学术期刊。本刊已被美国医学文献分析和联机检索系统(MEDLINE, PubMed)、荷兰《医学文摘》(EM)、Scopus、WHO西太平洋地区医学索引(WPRIM)、中国科学引文数据库(核心库)(CSCD)、《WJCI报告》等国内外多家重要数据库或权威文摘期刊收录；是中国科技论文统计源期刊、中文核心期刊及中国期刊方阵“双效”期刊；为中国高校百佳科技期刊、中国精品科技期刊、RCCSE中国权威学术期刊(A+)和湖南省十佳科技期刊。

本刊为月刊，国际标准开本(A4幅面)，每月月末出版。内芯采用进口亚光铜版纸印刷，图片彩色印刷。定价45元/册，全年540元。国内外公开发行。国内统一连续出版物号：CN 43-1427/R；国际标准连续出版物号：ISSN 1672-7347；国内邮发代号：42-10，国外邮发代号：BM422。欢迎新老用户向当地邮局(所)订阅，漏订或需增订者也可直接与本刊编辑部联系订阅。

欢迎投稿

欢迎订阅

地址：湖南省长沙市湘雅路110号湘雅医学院内

邮编：410078

电话：0731-84805495, 0731-84805496, 0731-84454931

Email: xbyxb@csu.edu.cn, xyxb2005@vip.163.com, xyxb2005@126.com

[Http://xbyxb.csu.edu.cn](http://xbyxb.csu.edu.cn)

《中南大学学报(医学版)》编辑部