

doi:10.3971/j.issn.1000-8578.2014.01.009

• 临床研究 •

# 原发性肝癌细胞中Rock2调控MMP2对其侵袭迁移的作用

陈磊峰<sup>1</sup>, 刘天德<sup>1</sup>, 杜晓红<sup>2</sup>, 胡俊文<sup>1</sup>, 黄子曦<sup>1</sup>, 邵江华<sup>1,3</sup>**Effects of Rock2 Regulating MMP2 on Invasion and Metastasis in Hepatocellular Carcinoma**CHEN Leifeng<sup>1</sup>, LIU Tiande<sup>1</sup>, DU Xiaohong<sup>2</sup>, HU Junwen<sup>1</sup>, HUANG Zixi<sup>1</sup>, Shao Jianghua<sup>1,3</sup>*1. Department of Hepatobiliary Surgery, The Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China, 2. Department of Anesthesiology; 3. Jiangxi Province Key Laboratory of Molecular Medicine**Corresponding Author: SHAO Jianghua, E-mail: shao5022@163.com*

**Abstract: Objective** To investigate the effects of Rho associated coiled coil containing protein kinase2 (Rock2) on matrix metalloproteinase2 (MMP2) in hepatocellular carcinoma (HCC). **Methods** The expressions of Rock2 and MMP2 protein were detected by Western blot in 30 cases of HCC tissues, and the correlation between them was also analyzed. The mRNA and protein expression of MMP2 were detected by qRT-PCR and Western blot in ROCK2 stable knockdown cells. The silent mutation plasmid of Rock2 was constructed by PCR site-directed mutagenesis. The expression of MMP2 protein was determined after the Rock2 expression restored in stable knockdown Rock2 cells. The invasion and migration abilities of HepG2 in blank control group, shRock2 group and Rock2 restored group were measured by Transwell assay and wound healing assay. **Results** Compared with corresponding adjacent tissues, Rock2 and MMP2 were remarkably overexpressed in HCCs and demonstrated a significantly positive correlation. The expressions of MMP2 mRNA and protein were significantly downregulated in Rock2 stable knockdown cells. We also confirmed that Rock2 regulated cell invasion and migration abilities through regulating MMP2 expression. **Conclusion** Reduction of Rock2 could decrease the expression of MMP2 in HCC cells, thereby inhibiting HCC cell invasion and migration.

**Key words:** Rho associated coiled coil containing protein kinase2 (Rock2); Matrix metalloproteinase2 (MMP2); Primary hepatocellular carcinoma

**摘要: 目的** 探讨Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶2 (Rho associated coiled coil containing protein kinase 2, Rock2)调控基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase 2, MMP2)对肝癌细胞侵袭迁移能力的影响。**方法** 用Western blot法检测30例肝癌组织及对应癌旁组织中Rock2和MMP2的蛋白表达,同时分析它们之间的关联;用荧光定量PCR和Western blot法观察稳定降低Rock2细胞中MMP2 mRNA及蛋白表达变化;利用PCR定点突变技术构建Rock2同义突变质粒“恢复”稳定干扰Rock2的肝癌细胞中Rock2表达后检测MMP2蛋白表达变化;采用Transwell侵袭实验和划痕实验观察空白对照组、稳定低表达Rock2组、“恢复”Rock2组HepG2细胞侵袭和迁移能力变化。**结果** Rock2和MMP2蛋白在肝癌组织中均比对应癌旁组织明显增高,且两者的表达呈正相关性。稳定降低肝癌细胞中Rock2的表达后发现MMP2的mRNA和蛋白表达也随之降低;另外,“恢复”稳定干扰Rock2的肝癌细胞中Rock2的表达, MMP2表达也“恢复”;同时证实Rock2通过调节MMP2表达从而影响肝癌细胞的侵袭和迁移。**结论** 在原发性肝癌细胞中降低Rock2可引起MMP2表达下降,进而抑制肝癌细胞的侵袭和迁移。

**关键词:** Rho相关卷曲螺旋形成蛋白激酶2;基质金属蛋白酶2;肝细胞性肝癌

**中图分类号:** R735.7 **文献标识码:** A

收稿日期: 2013-07-09; 修回日期: 2013-10-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30860272); 江西省自然科学基金对外科技合作计划资助项目(20132BDH80031)

作者单位: 1.330006 南昌, 南昌大学第二附属医院肝胆外科, 2.麻醉科; 3.江西省分子医学重点实验室

通信作者: 邵江华, E-mail: shao5022@163.com

作者简介: 陈磊峰(1989-), 硕士, 住院医师, 主要从事肝癌发生机制的研究

## 0 引言

原发性肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 简称肝癌, 是我国乃至世界上常见且极具危害性的恶性肿瘤之一, 而引起患者死亡的主要原因是侵袭和转移。因此, 研究肝癌侵袭转移的

相关机制具有重要意义。

Rock2是Rho/Rock信号转导通路的关键信号分子<sup>[1]</sup>。我们的研究发现<sup>[2]</sup>Rock2在肝癌中过表达,而且Rock2与肝癌侵袭转移密切相关。有研究证实,基质金属蛋白酶2(matrix metalloproteinase2, MMP2)与肝癌的侵袭转移密切相关。然而, Rock2与MMP2两者在肝癌侵袭转移中的关联尚不清楚,因此,本实验主要探讨原发性肝癌细胞中Rock2通过调控MMP2对肝癌细胞侵袭和迁移的影响。

## 1 资料和方法

### 1.1 材料

DMEM培养液、胎牛血清(Gibco公司),脂质体Lipofectamine™ LTX and Plus Reagent, RNA提取试剂Trizol(Invitrogen公司);限制性内切酶BamH I、Xho I、Xba I, T4DNA连接酶, pyrobest DNA聚合酶, DpnI酶, 质粒提取试剂盒, DNA凝胶回收试剂盒, 一步法RT反转录试剂盒及大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态细胞(大连宝生物公司);蛋白提取试剂盒(北京普利莱公司);BCA法蛋白测定试剂盒(江苏碧云天公司);MMP2一抗(Protein-tech公司);设计的Rock2序列及相关引物由上海生工公司合成;pcDNA5-FRT质粒、Rock2稳定低表达的肝癌细胞株及“恢复”Rock2突变质粒和HepG2细胞由江西省分子医学重点实验室传代保存。

### 1.2 肝癌标本收集

收集南昌大学第二附属医院肝胆外科2012年1月至2013年2月肝癌及癌旁组织标本各30例,其中男20例,女10例,患者平均年龄(60 $\pm$ 6.20)岁,标本收集后立即液氮保存,经病理切片证实为原发性肝细胞癌。以上标本采集均由患者本人知情同意并通过南昌大学第二附属医院伦理委员会审核通过。

### 1.3 细胞培养及转染

HepG2细胞株在37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>条件下于含10%胎牛血清的DMEM培养液中培养。按新型脂质体Lipofectamine™ LTX and Plus Reagent转染试剂说明用不含10%胎牛血清的DMEM培养液进行转染,于转染4~6 h后更换含有10%胎牛血清的DMEM培养液中继续培养,48 h后质粒高表达期提取细胞RNA和总蛋白。

### 1.4 实时荧光定量PCR检测Rock2和MMP2的mRNA的表达

将HepG2细胞分成: control、PBS、

siRNA(-)、Rock2-siRNA四组,提取mRNA,反转录cDNA,用SYBR Green I法,在ABI PRISM 7500自动荧光PCR仪进行荧光定量PCR检查MMP2的mRNA表达水平,每个样品均做3个复孔,设定阈值,测定平均的Ct值。

### 1.5 构建pcDNA5-FRT-Rock2重组质粒和“恢复”质粒

参照GenBank中Rock2的基因序列(NM\_004850.3)设计引物。提取人肝癌细胞HepG2中的总RNA,以总RNA为模板反转录为cDNA。进行PCR扩增反应,利用T4 DNA连接酶连接ROCK2全长片段与pcDNA5-FRT空载体,然后将连接产物转化到DH5 $\alpha$ 感受态大肠杆菌,扩增后抽提质粒DNA,酶切及测序验证。此外,为消除RNA干扰技术中的脱靶效应,我们针对Rock2干扰序列,以pcDNA5-FRT-Rock2质粒为模板,利用PCR定点突变技术,构建Rock2同义突变质粒。

### 1.6 Western blot检测Rock2及MMP2表达

实验分为空白对照组、稳定低表达Rock2组、“恢复”Rock2组。提取各组肝癌细胞总蛋白,通过BCA法测定蛋白浓度,取等量50  $\mu$ g蛋白质样品煮沸10 min后行10% SDS-PAGE电泳,转膜,然后分别结合对应MMP2的一抗及辣根过氧化物酶标记的二抗,最后利用化学发光法观察MMP2的表达情况。

### 1.7 Transwell侵袭实验和划痕实验检测细胞侵袭和迁移能力

Transwell侵袭实验:取对数期生长的HepG2细胞,经胰酶消化后按 $2 \times 10^4$ 细胞数加入每个小室,用无血清的培养液进行培养,放置于含有10%的FBS的培养液的24孔板上,5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ C孵育24 h,甲醛固定10~20 min,用0.1%结晶紫染色20 min,用棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞,用PBS洗3遍。显微镜下观察细胞,计数。

划痕实验:制备HepG2细胞悬液,通过细胞计数,种植相同数量HepG2细胞于5 cm板中,培养过夜后细胞均匀成单层铺满于每孔中,用相同大小枪头进行划痕,每孔划痕粗细均匀, PBS清洗划下的细胞,放入37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>不含血清的培养液,细胞培养箱中培养,倒置显微镜下于0、12、24 h拍照。

### 1.8 统计学方法

采用SPSS17.0统计软件,数据以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,癌及癌旁组织比较采用配对样本t检验,多组均数之间比较采用单因素方差分析,两

两比较采用LSD-*t* 检验,  $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 Rock2与MMP2蛋白在肝癌组织中的表达及两者的相关性

Western blot法检测30例肝癌及癌旁组织中Rock2和MMP2蛋白表达。结果发现: 76.67% (23/30) 的患者肝癌组织中Rock2和MMP2蛋白的表达明显高于癌旁组织, 23.33% (7/30) 的患者肝癌组织中Rock2和MMP2蛋白的表达与癌旁组织相比差异无统计学意义。说明Rock2和MMP2蛋白在肝癌组织中呈过表达。另外, 我们进一步发现Rock2和MMP2蛋白在肝癌组织中的表达呈正相关 ( $P=0.04$ ,  $r=0.69$ ), 见图1、表1。

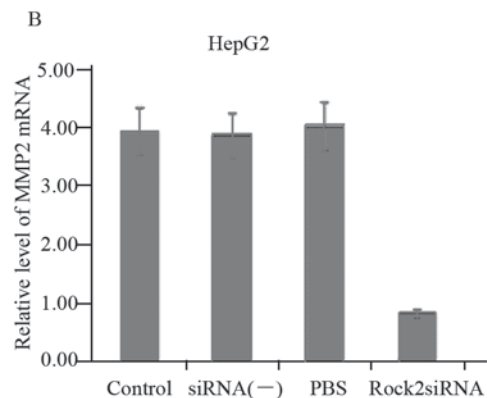
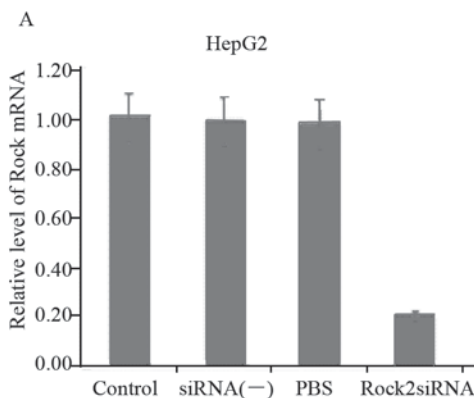
表1 Rock2与MMP2蛋白在肝癌组织中表达的相关性

Table1 Correlation of Rock2 and MMP2 expressions in hepatocellular carcinoma tissue

Rock2(n)	MMP2(n)		Total
	Over-expression	Non-overexpression	
Overexpression	20	3	23
Nonoverexpression	3	4	7
Total	23	7	30

### 2.2 降低Rock2对MMP2表达的影响

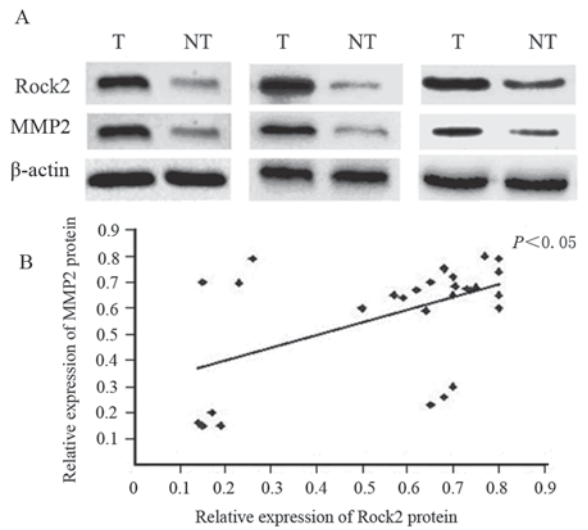
荧光定量PCR结果发现Rock2-siRNA组中Rock2的mRNA表达较空白对照组、无义干扰组及PBS组明显降低 ( $P=0.02$ ), 而空白对照组、无义干扰组和PBS组之间Rock2的mRNA表达量差异无统计学意义。另外, MMP2的mRNA表达量随着



A: QT-PCR showed Rock2 RNA expression in Rock2-siRNA group was significantly lower than other three groups, control group, siRNA (-) group or PBS group, with statistically significant difference ( $P=0.02$ ); B: MMP2 RNA expression in Rock2-siRNA group was significantly lower than control group, siRNA group or PBS group, with statistical significance ( $P=0.03$ )

图2 干扰Rock2组Rock2和MMP2的mRNA水平的变化

Figure2 Rock2 and MMP2 mRNA level changes in Rock2-siRNA group



A:Rock2 and MMP2 protein expression in hepatocellular cancer tissue and adjacent tissue. Rock2 and MMP2 protein expressions in cancer tissue were higher than those in adjacent tissues (partial results); B:Rock2 and MMP2 expressions in cancer tissues showed high expression and positive correlation;T:tumor;NT:normal tissue

图1 Rock2与MMP2蛋白在肝癌和癌旁组织中的表达

Figure1 Rock2 and MMP2 expressions in hepatocellular carcinoma and adjacent tissues

Rock2表达的降低而减少。说明降低Rock2可以抑制MMP2的表达, 见图2。

为了进一步明确Rock2对MMP2的调控, 将转染Rock2“恢复”质粒转染至稳定干扰Rock2的肝癌细胞, Western blot结果发现Rock2“恢复”质粒可以明显恢复Rock2蛋白的表达, 同时MMP2蛋白的表达随之明显增高, 见图3。

### 2.3 Rock2调节MMP2对肝癌细胞侵袭能力的影响



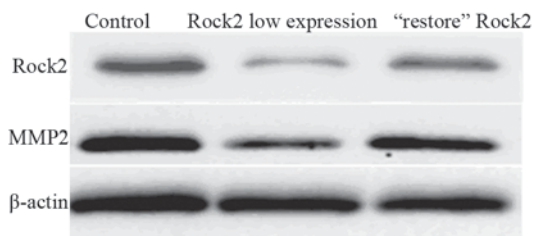


图3 MMP2在正常、稳定低表达、“恢复”Rock2的HepG2细胞中的表达情况

Figure3 MMP2 expressions in HepG2 cells in normal group, shRock2 group and "restore" Rock2 group

Transwell侵袭实验结果显示: Rock2稳定低表达组HepG2细胞穿膜细胞数(20±3.24)明显低于空白对照组(69±7.83)及“恢复”Rock2组(59±6.69)(组间 $F=9.36$ ,  $P=0.04$ ), 空白对照组与“恢复”Rock2组细胞穿膜细胞数差异无统计学意义, 见图4。

划痕实验结果显示: Rock2稳定低表达组HepG2细胞的划痕愈合率比空白对照组和“恢复”Rock2组细胞划痕愈合率明显下降, 差异具有统计

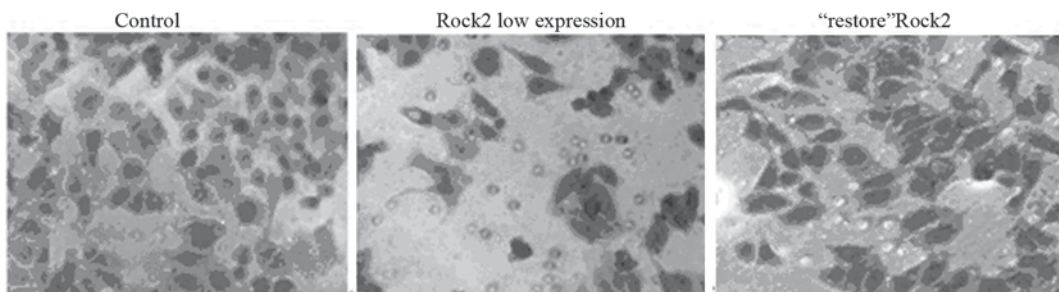


图4 Rock2调节MMP2对肝癌细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色 ×400)

Figure4 Effects of Rock2 regulating MMP2 on invasion of hepatocellular carcinoma (crystal violet staining ×400)

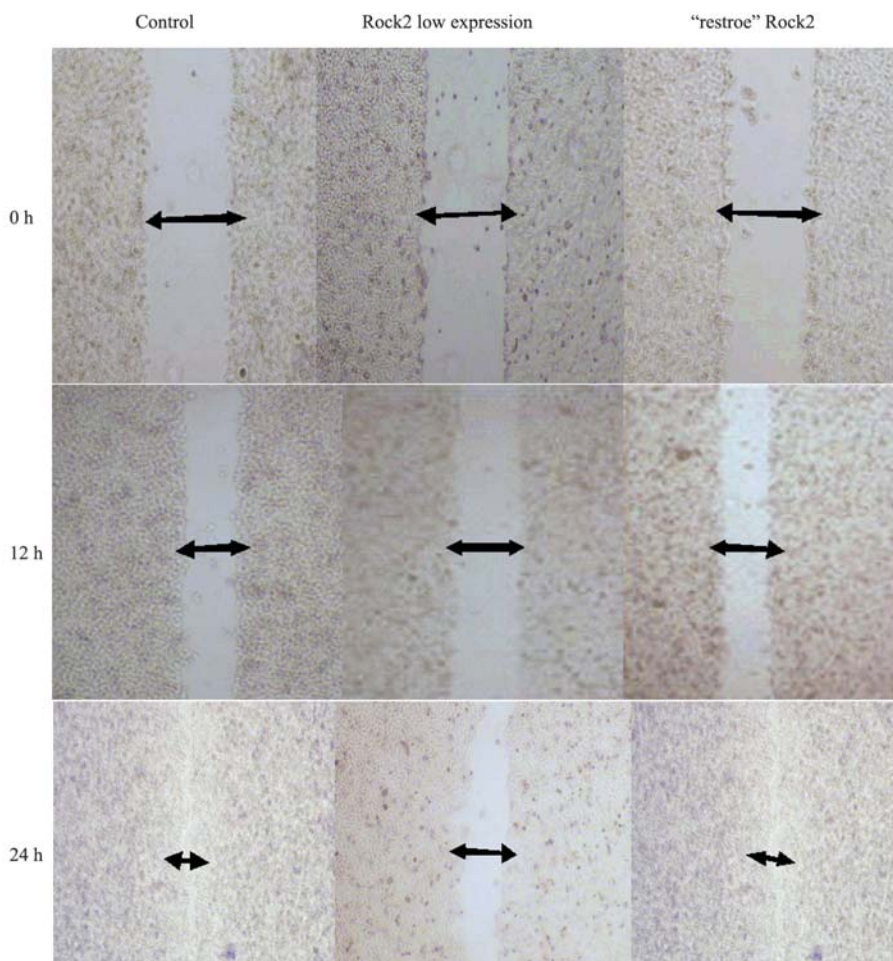


图5 稳定低表达Rock2的HepG2细胞与正常和“恢复”Rock2的HepG2细胞迁移能力的比较

Figure 5 Comparison of HepG2 migration abilities in shRock2 group with normal group and "restore" Rock2 group

学意义(组间 $F=6.87$ ,  $P=0.03$ ), 见图5。

### 3 讨论

肿瘤的侵袭和转移是影响原发性肝癌患者生存期的重要因素, 在临床治疗过程中发现, HCC的高转移和复发率是直接导致肝癌患者死亡的主要原因, 然而, 关于原发性肝癌侵袭转移的具体机制还不清楚, 因此, 对原发性肝癌侵袭转移相关机制的研究显得十分重要<sup>[3]</sup>。

Rock是Rho/Rock信号转导途径的一个重要信号分子。哺乳类动物Rock家族包括两个成员: Rock1和Rock2, 相对分子量为160~170 kD, 两者65%部分存在完全一致性, 90%的激酶区域存在同一性<sup>[1,4]</sup>。Wong等<sup>[3]</sup>报道Rock2在原发性肝癌组织的表达明显增高且与肿瘤的转移密切相关。同时发现抑制Rock2的表达可明显降低肝癌细胞的侵袭和转移能力。本研究前期也发现Rock2蛋白在肝癌组织中明显上调。总之, Rock2在肝癌的侵袭转移中起重要作用。然而, 其具体的作用机制有待进一步研究<sup>[5-6]</sup>。

基质金属蛋白酶(matrix metalloproteinase, MMPs)是 $Ca^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 依赖的内源性蛋白酶家族。它们在肿瘤生长、侵袭、转移及新生血管形成中起着重要的作用<sup>[7]</sup>。MMP2是MMPs家族中重要的成员, 研究证实MMP2与肿瘤的侵袭和转移密切相关<sup>[8]</sup>。MMP2被激活后可以形成IV型胶原酶降解和破坏靠近肿瘤表面的细胞外基质, 使肿瘤细胞向周围组织浸润, 最终导致肿瘤的局部侵袭和远处转移<sup>[9]</sup>。上述研究表明MMP2在肿瘤的侵袭转移中起关键作用。本研究发现MMP2在肝癌组织中过表达, 但是Rock2与MMP2共表达在肝癌发生侵袭和转移中的作用仍不清楚。

本研究首次分析Rock2与MMP2蛋白在肝癌组织中表达的关联情况, 结果发现Rock2和MMP2蛋白在肝癌组织中表达存在正相关性。另外, 我们在肝癌细胞HepG2中利用RNA干扰技术降低Rock2表达, 结果发现随着Rock2表达下降, MMP2 mRNA和蛋白表达也随之下降。而且通过“恢复实验”进一步证实恢复稳定干扰肝癌细胞中Rock2的表达后MMP2 mRNA和蛋白表达均明显增加。上述结果表明Rock2可特异性调控MMP2的表达。同

时我们还发现在肝癌细胞HepG2中降低Rock2表达, 肝癌细胞的侵袭及迁移能力明显减弱, 而在稳定干扰Rock2表达的肝癌细胞中“恢复”Rock2表达后, 其迁移和侵袭能力也明显增强。上述结果表明Rock2通过调节MMP2的表达可以影响肝癌细胞的迁移和侵袭。

综上所述, 本研究证实在原发性肝癌细胞中降低Rock2表达可以降低MMP2的表达, 从而抑制肝癌细胞侵袭和迁移。目前, 本课题组正在深入寻找肝癌细胞中Rock2调控MMP2的具体分子生物学机制, 将可能为原发性肝癌的治疗提供新思路。

### 参考文献:

- [1] Matsui T, Amano M, Yamamoto T, *et al.* Rho-associated kinase, a novel serine/threonine kinase, as a putative target for small GTP binding protein Rho[J]. *EMBO J*, 1996, 15(9):2208-16.
- [2] Liu T, Yu X, Li G, *et al.* Rock2 regulates Cdc25A through ubiquitin proteasome system in hepatocellular carcinoma cells[J]. *Exp Cell Res*, 2012, 318(16):1994-2003.
- [3] Wong CC, Wong CM, Tung EK, *et al.* Rho-kinase 2 is frequently overexpressed in hepatocellular carcinoma and involved in tumor invasion [J]. *Hepatology*, 2009, 49(5):1583-94.
- [4] Vigil D, Kim TY, Plachco A, *et al.* ROCK1 and ROCK2 are required for non-small cell lung cancer anchorage-independent growth and invasion[J]. *Cancer Res*, 2012, 72(20): 5338-47.
- [5] Herder C, Swiercz JM, Müller C, *et al.* ArhGEF18 regulates RhoA-Rock2 signaling to maintain neuro-epithelial apico-basal polarity and proliferation[J]. *Development*, 2013, 140(13): 2787-97.
- [6] Lock FE, Ryan KR, Poulter NS, *et al.* Differential regulation of adhesion complex turnover by ROCK1 and ROCK2[J]. *PLoS one*, 2012, 7(2):e31423.
- [7] Hofmann UB, Westphal JR, Van Muijen GN, *et al.* Matrix metalloproteinases in human melanoma[J]. *J Invest Dermatol*, 2000, 115(3):337-44.
- [8] Wong JC, Chan SK, Schaeffer DF, *et al.* Absence of MMP2 expression correlates with poor clinical outcomes in rectal cancer, and is distinct from MMP1-related outcomes in colon cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(12): 4167-76.
- [9] Jacob A, Jing J, Lee J, *et al.* Rab40b regulates trafficking of MMP2 and MMP9 during invadopodia formation and invasion of breast cancer cells[J]. *J Cell Sci*, 2013, 126(Pt 20):4647-58.

[编辑: 周永红; 校对: 邱颖慧]