

CYP2C9对肝细胞癌的迁移、侵袭和增殖的影响



张 拓, 李达军, 王海涛, 张 鹏

武汉大学泰康医学院(基础医学院)(武汉 430071)

【摘要】目的 探究 CYP2C9 是否参与肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 的发生发展及其对肝癌细胞迁移、侵袭和增殖的影响。**方法** 从 TCGA 数据库中提取 HCC 的转录组数据, 分析 CYP2C9 在 HCC 中的表达和预后相关性; 构建 HepG2 和 MHCC97H 的 CYP2C9 稳定过表达细胞系, 通过 Transwell 迁移实验、Transwell 侵袭实验和 Western Blot 实验分别检测过表达 CYP2C9 对肝癌细胞系迁移、侵袭能力以及上皮间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 过程的影响; 通过 CCK-8 实验、平板克隆形成实验和 Western Blot 实验检测过表达 CYP2C9 对肝癌细胞系增殖能力的影响。**结果** 通过生信分析发现, CYP2C9 在 HCC 中的表达显著下调, 且 CYP2C9 的表达与 HCC 患者的临床预后呈正相关; 细胞及分子实验结果显示, 过表达 CYP2C9 显著抑制 HepG2 细胞和 MHCC97H 细胞的迁移、侵袭能力和 EMT 过程, 而对细胞的增殖能力没有显著影响。**结论** CYP2C9 可能通过抑制肝癌细胞的迁移、侵袭以及 EMT 过程, 进而影响 HCC 的进展。

【关键词】 CYP2C9; 肝细胞癌; 迁移; 侵袭; 增殖

Effect of CYP2C9 on the migration, invasion and proliferation of hepatocellular carcinoma cells

ZHANG Tuo, LI Dajun, WANG Haitao, ZHANG Peng

Wuhan University TaiKang Medical School (School of Basic Medical Sciences), Wuhan 430071, China

Corresponding author: ZHANG Peng, Email: zhp@whu.edu.cn

【Abstract】Objective To explore whether CYP2C9 is involved in the occurrence and development of hepatocellular carcinoma (HCC) and its function in the migration, invasion and proliferation of HCC cells. **Methods** The transcriptome data of HCC were retrieved from the TCGA database to analyze the expression of CYP2C9 and role of CYP2C9 in the prognosis of HCC; Constructing stable CYP2C9 overexpression cell lines of HepG2 and MHCC97H, detecting the effects of CYP2C9 overexpression on the migration, invasion and epithelial mesenchymal transition (EMT) process of HCC cells through Transwell migration assay, Transwell invasion assay, and Western Blot assay, respectively; The effect of CYP2C9 overexpression on the proliferation ability of HCC cells was detected through CCK-8 assay, colony formation assay, and Western Blot assay. **Results** Bioinformatics analysis showed that the expression of CYP2C9 was significantly downregulated in HCC,

DOI: 10.12173/j.issn.1004-5511.202404060

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81970011)

通信作者: 张鹏, 博士, 教授, 博士研究生导师, Email: zhp@whu.edu.cn

and the expression of CYP2C9 was positively correlated with the clinical prognosis of HCC patients; The results of cellular and molecular experiments showed that CYP2C9 overexpression significantly inhibited the migration, invasion and EMT process of HepG2 and MHCC97H cells, whereas had no significant effect on cell proliferation. **Conclusion** CYP2C9 may affect the progression of HCC by inhibiting the migration, invasion, and EMT processes of HCC cells.

【Keywords】 CYP2C9; HCC; Migration; Invasion; Proliferation

2020 年全球癌症统计数据显示, 肝癌在癌症中的发病率和死亡率分别排名第六和第三^[1]。大约 80%~90% 的原发性肝癌是肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)^[2]。HCC 的分布因地域而异, 约 72% 的 HCC 发生在亚洲^[3]。虽然蒙古的 HCC 发病率最高^[4], 但由于人口众多, 中国的 HCC 病例数最多^[4]。大多数 HCC 患者预后较差, 根治性治疗只能用于少数患者, 因为大多数 HCC 被发现时已经是晚期^[5], 使得肝癌的治疗充满挑战。尽管基础和临床研究推动了肝癌的靶向治疗, 但由于肿瘤切除后复发率高、肿瘤在肝内和肝外转移率高, 肝癌仍然是一种死亡率较高的疾病^[6-7]。阐明肝癌发生和侵袭转移的潜在分子机制, 寻找癌症治疗的新靶点至关重要。

细胞色素 P450 (cytochrome P450, CYP450) 酶超家族是重要的药物代谢酶, 负责 90% 以上外源药物的氧化代谢^[8-9], 其与癌症风险具有相关性^[10]。CYP2C9 是人体肝脏中含量最丰富的 CYP450 酶之一, 占肝脏总 CYP450 蛋白含量的 20%, 在 CYP450 酶超家族负责的药物代谢中占 15%~20%^[11]。在早期食管腺癌中可检测到 CYP2C9 的异常高表达, CYP2C9 可能通过促进食管腺癌细胞的增殖而与早期食管癌发展有关^[12]。研究表明, CYP2C9 抑制食管鳞状细胞癌的迁移和侵袭^[13]。此外, CYP2C9 还与 HCC 的发生发展具有相关性^[14-15], 但其在 HCC 中的功能尚未明确。本研究旨在探讨 CYP2C9 在 HCC 中的表达及其对 HCC 的迁移、侵袭和增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞及主要试剂

HEK 293T 细胞和人源肝癌细胞系 HepG2 购自美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC), 人源肝癌细胞系

MHCC97H 购自中国典型培养物保藏中心 (China Center for Type Culture Collection, CCTCC)。DMEM 高糖培养基 (PM150210)、青霉素-链霉素溶液 (PB180120) 购自普诺赛公司, 胎牛血清 (FBS-S500) 购自 NewZerum 公司, 培养皿购自 NEST 公司, Transwell 小室 (3422) 购自康宁公司, 4% 多聚甲醛 (G1101) 购自赛维公司, 结晶紫 (71012314) 购自中国医药集团上海化学试剂公司, CCK-8 试剂 (C0038) 购自碧云天公司。抗体 Cyclin D1 (A19038)、PCNA (A12427)、E-Cadherin (A22333)、N-Cadherin (A19083) 和 β -actin (AC026) 抗体均购自爱博泰克公司, FLAG 抗体 (M185-3L) 购自 MEDICAL & BIOLOGICAL LABORATORIES CO., LTD. (MBL) 公司, 二抗 (115-035-003) 购自 Jackson 公司。

1.2 生物信息学分析

在 The Cancer Genome Atlas (TCGA) 数据库中调取 HCC 的 374 个肿瘤样本和 50 个正常肝脏样本的转录数据, 用 ggplot2 R 包绘制表达箱形图, 分析 CYP2C9 的表达变化; 调取 HCC 中 255 个 I-II 期的样本和 83 个 III-IV 期的样本、234 个 G1-G2 期样本和 127 个 G3-G4 期样本的转录数据, 用 ggplot2 R 包绘制表达箱形图, 分析 CYP2C9 随着肿瘤分期、分级的表达变化; 调取 HCC 中 369 例 HCC 患者的生存随访数据, 用 survival R 包进行 Kaplan-Meier 分析和多因素 Cox 回归分析, 使用 survminer R 包进行绘图, 分析 HCC 患者的生存时间与 CYP2C9 表达的相关性。

1.3 质粒构建

人的 CYP2C9 DNA 片段被克隆连接到 phage-3x flag-linker-c 载体上, 接着被转化到感受态大肠杆菌 (生工, B528413) 中, 菌液被涂布到带有氨卞抗生素的 LB 固体平板上, 在 37 °C 恒温培养箱 (上海精宏, DNP-9052) 中过夜培养,

第二天经过菌落 PCR, 挑选阳性克隆送测序, 选择测序正确的克隆提取目的质粒。扩增人的 CYP2C9DNA 片段所用的引物为: H-CYP2C9-F: TCGGGTTTAAACGGATCCATGGATTCTCTTGTGG TCCTTGTGC; H-CYP2C9-R: GGGCCCTCTAGAC TCGAGTCAGACAGGAATGAAGCACAGCTG。

1.4 细胞系构建

293T 细胞在 10% 胎牛血清、1% 青霉素-链霉素的 DMEM 培养基培养, 放置于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱 (松下, MCO-170) 中。转移质粒 phage-3x flag-CYP2C9、包装质粒 pSPAX2 和包膜质粒 pMD2.G 共转染到 6 孔板的 293T 细胞中, 6~8 h 后换液, 换液后 48 h 收取上清得到 2 mL 慢病毒。将 1 mL 病毒和终浓度为 10 μg · mL⁻¹ 的聚凝胺 (Polybrene) 加入到 HepG2 或 MHCC97H 肝癌细胞中, 6 h 后换液, 24 h 后消化细胞重新接种, 并设立野生型细胞作为对照, 用 2 μg · mL⁻¹ 的嘌呤霉素 (碧云天, ST551) 筛选直到所有对照的野生型细胞被杀死, 更换培养基, 这时筛选得到能稳定过表达 CYP2C9 的细胞, 并用 Western Blot 验证稳转细胞系是否构建成功。

1.5 Transwell 迁移实验

将 Transwell 小室置于 24 孔细胞培养板, 上室接种 100 μL 细胞悬液 (不含 FBS), 密度为 8 × 10⁴ 个 / 孔, 下室中添加含有 10% FBS 的 600 μL DMEM 培养基。将细胞培养板放在培养箱中 48 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 并用 0.2% 结晶紫溶液染色, 使用棉签去除滤膜顶部的细胞。使用倒置荧光显微镜 (MI52-N, 成像系统 MDX10) 随机挑选 3 个视野观察细胞迁移情况并成像记录。用 Image J 1.45 计数迁移的细胞数量。

1.6 Transwell 侵袭实验

将 Transwell 小室置于 24 孔细胞培养板, 上室中平铺用 DMEM 基础培养基稀释的基质胶, 并在室温下风干备用。上室接种 100 μL 细胞悬液 (不含 FBS), 密度为 8 × 10⁴ 个 / 孔, 下室中添加含有 10% FBS 的 600 μL DMEM。将细胞培养板放在培养箱中 48 h 后, 用 4% 多聚甲醛固定细胞, 并用 0.2% 结晶紫溶液染色, 使用棉签去除滤膜顶部的细胞。使用倒置荧光显微镜 (MI52-N, 成像系统 MDX10) 随机挑选 3 个视野观察细胞侵袭情况并成像记录。用 Image J 1.45 计数侵袭的细胞数量。

1.7 平板克隆形成实验

将稳定过表达细胞系接种于 6 孔板, 每孔 3 000 个细胞。在培养箱中静置培养细胞 14 d 左右, 当对照组大部分单克隆中细胞数大于 50 时终止细胞培养。4% 多聚甲醛固定细胞, 0.2% 结晶紫溶液染色, 用 Image J 1.45 计数每孔克隆数量。

1.8 CCK-8 实验

将稳定过表达细胞系接种于 96 孔板, 每孔 3 000 个细胞, 细胞悬液量为 100 μL, 复种 5 孔。并于不同检测时间点 (0 h、24 h、48 h、72 h、96 h) 将每孔培养基替换为 100 μL CCK-8 溶液 (10 μL CCK-8 试剂 + 90 μL 培养基), 培养箱内孵育 2 h 后用酶标仪 (Thermo, Multiskan FC) 测定各组吸光度值, 检测波长 450 nm。

1.9 Western Blot 实验

用 120 μL SDS (国药集团化学试剂有限公司, 151-21-3) 裂解液裂解收集 6 cm 皿的细胞, 将收集到的样品在 95 °C 下煮 15 min 变性蛋白, 经过 BCA (abbkine 亚科因, KTD3001) 定量后, 每孔上样 25 μg 蛋白, 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳。电泳完毕后将凝胶中的蛋白转移到 PVDF 膜 (Millipore, IPVH00010) 上, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 一抗 (1 : 1 000) 孵育过夜。第二天洗膜后, 使用二抗 (1 : 25 000) 室温孵育 PVDF 膜 1 h, 用 Tanon5200 显影仪成像。用 Image J 1.45 软件进行蛋白条带的灰度值分析。

1.10 实时荧光定量 PCR 实验

使用 Trizol 反应液 (T9424, Sigma-Aldrich) 提取总 RNA, 随后用 HiScript III RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper) (诺唯赞, R323-01) 将其逆转录为 cDNA, 使用 ChamQ SYBR qPCR Master Mix (诺唯赞, Q311-02) 在 Light Cycler 480 Instrument II 仪器 (Roche) 中进行实时荧光定量 PCR 实验。所用 qPCR 引物为 H-CYP2C9-F: GGACATGAACAACCCTCAGGA; H-CYP2C9-R: TCAACTGCAGTGTTCCTCAAGC。

1.11 统计学分析

使用 SPSS 25 软件进行统计学分析, GraphPad Prism 8.0 软件作图。采用 Shapiro-Wilk 检验进行数据正态性检验, 所有数据符合正态分布, 以均数和标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。采用 *t* 检验评估组间差异, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CYP2C9在HCC组织的表达

为了检测 CYP2C9 是否参与 HCC 的发生发展,本研究从 TCGA 数据库提取 HCC 的转录组数据进行比较分析,相比于正常肝脏组织样本,CYP2C9 的基因表达在 HCC 组织样本中显著下调 ($P < 0.001$, 图 1-A);从肿瘤的临床分期来看,相比早期(I期至 II 期)HCC 组织样本,晚期(III 期至 IV 期)HCC 组织样本 CYP2C9 基因表达显著下调 ($P < 0.001$, 图 1-B);肿瘤分级体现肿瘤异型性的大小,随着肿瘤分化程度提高,G3-G4 级 HCC 样本中 CYP2C9 的表达显著低于 G1-G2 级 HCC 样本 ($P < 0.001$, 图 1-C)。以上结果表明 CYP2C9 在 HCC 中表达显著下调,CYP2C9 表达与 HCC 的肿瘤分期、分级具有负相关性。

2.2 CYP2C9的表达与HCC患者的临床预后呈正相关

为进一步验证 CYP2C9 与 HCC 的相关性,本研究提取 TCGA 数据库中 HCC 患者的生存随访数据进行 Kaplan-Meier 生存分析和多因素 Cox 回归分析。结果发现 CYP2C9 低表达患者的总生存期显著低于 CYP2C9 高表达患者 ($P < 0.001$, 图 2-A),表明 CYP2C9 的表达与 HCC 患者的生存时间显著相关。使用多因素 Cox 回归模型,联合分析了 CYP2C9 表达和 HCC 患者的年龄、性别、肿瘤分期、肿瘤分级等因素与 HCC 患者生存时间的相关性,绘制森林图(图 2-B),结果显示 CYP2C9 的表达 [HR=0.92, 95%CI (0.85, 0.99), $P < 0.05$] 是 HCC 患者预后的保护性因素,提示 CYP2C9 的表达与肝细胞癌患者的临床预后呈正相关。

2.3 CYP2C9对肝癌细胞的迁移、侵袭和增值能力的影响

为了探讨 CYP2C9 如何调控 HCC 的发生发展,本研究检测了 CYP2C9 的过表达对 HCC 的迁移、侵袭和增殖能力的影响。首先检测了 CYP2C9 在 MHCC97H、HepG2、MHCC97L、Huh7 和 PLC/PRF/5 这 5 种细胞系中的表达水平,结果显示,CYP2C9 在 HepG2 和 MHCC97H 这两种肝癌细胞系中的表达相对较低(图 3-A)。因此,本研究选择 HepG2 与 MHCC97H 构建 CYP2C9 稳定过表达细胞系来评估 CYP2C9 对肝癌的影响。将 CYP2C9

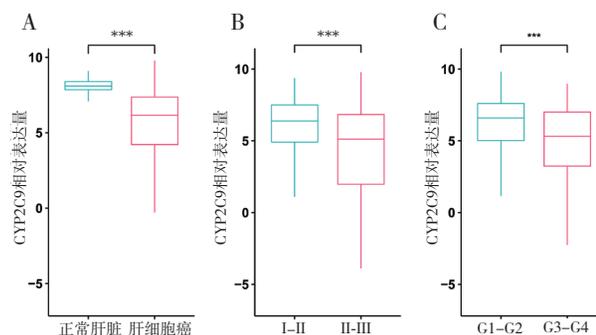


图1 CYP2C9在肝细胞癌组织的表达
Figure 1. The expression of CYP2C9 in hepatocellular carcinoma

注: A.TCGA转录组数据显示CYP2C9在HCC和正常肝脏组织样本中的表达 ($n=424$); B.TCGA转录组数据显示CYP2C9在HCC不同临床分期的表达 ($n=338$); C.TCGA转录组数据显示CYP2C9在HCC不同肿瘤分级的表达 ($n=361$); *** $P < 0.001$ 。

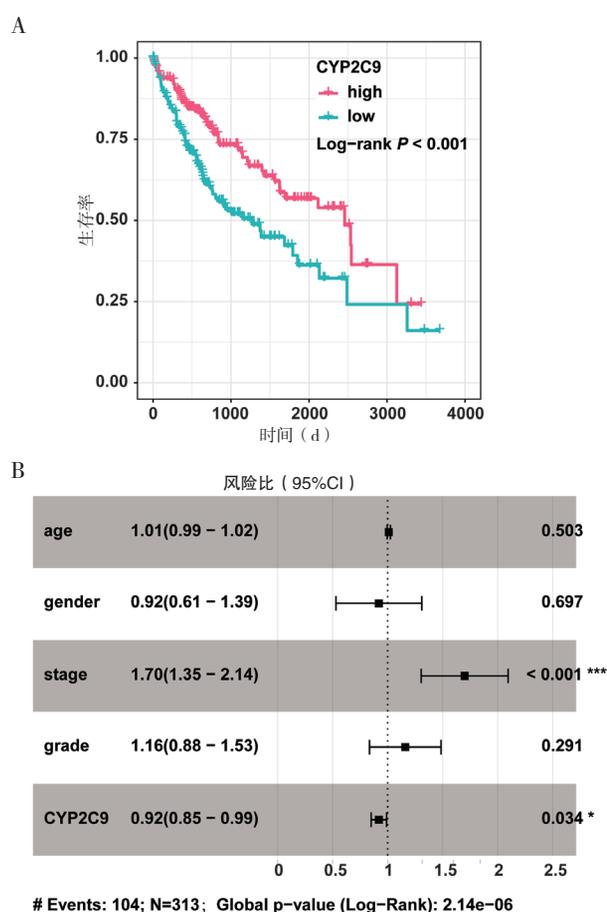


图2 CYP2C9的表达与临床预后相关性
Figure 2. The correlation between the expression of CYP2C9 and clinical prognosis

注: A. Kaplan-Meier分析显示CYP2C9的表达与HCC患者生存时间的相关性 ($n=369$); B. 多因素Cox回归分析显示CYP2C9的表达、HCC患者的年龄、性别、肿瘤分期、肿瘤分级与HCC患者生存时间的相关性 ($n=313$); *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$ 。

过表达质粒以及相应的空载对照质粒,分别与包装质粒共转到293T细胞中,GFP质粒作为阳性对照,通过观察绿色荧光判断CYP2C9慢病毒质粒和包装质粒的转染情况。转染24h后,阳性对照组中可观察到70%~80%的细胞有明显的绿色荧光(图3-B),表明质粒顺利转染到293T细胞中。随后将包装成功的慢病毒分别感染HepG2与MHCC97H细胞,感染结束后用 $2\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的puro筛选,以得到稳定表达目的质粒的细胞。qPCR结果显示在HepG2和MHCC97H两种细胞系中,相对于Ctrl组,CYP2C9显著高表达,Western Blot结果显示用FLAG抗体成功检测到带FLAG标签的CYP2C9蛋白(图3-C、图3-D),表明HepG2和MHCC97H的CYP2C9稳定过表达细胞系构建成功。

2.3.1 CYP2C9对肝癌细胞迁移能力的影响

为了检测CYP2C9对肝癌细胞迁移能力的影响,本研究采用HepG2和MHCC97H的CYP2C9稳定过表达细胞系进行迁移实验,结晶紫染色结果显示相比于对照组,两种CYP2C9稳定过表达细胞系迁移的细胞数量减少,迁移能力减弱;定量分析显示HepG2和MHCC97H的CYP2C9稳定过表达细胞系的迁移细胞数量显著低于对照组($P < 0.001$),表明过表达CYP2C9能显著抑制HepG2和MHCC97H肝癌细胞系的迁移能力(图4-A、图4-B)。

2.3.2 CYP2C9对肝癌细胞侵袭能力的影响

本研究进一步检测了CYP2C9对肝癌细胞系侵袭能力的影响。HepG2-CYP2C9和MHCC97H-CYP2C9两种肝癌细胞系被用于进行侵袭实验,结晶紫染色结果显示两种CYP2C9稳定过表达细胞系穿过人工基底膜的细胞数量均比对照组少,侵袭能力减弱;定量分析结果显示HepG2和MHCC97H

的CYP2C9稳定过表达细胞系穿过人工基底膜的细胞数量显著低于对照组($P < 0.001$),表明过表达CYP2C9能显著抑制HepG2和MHCC97H肝癌细胞系的侵袭能力(图5-A、图5-B)。

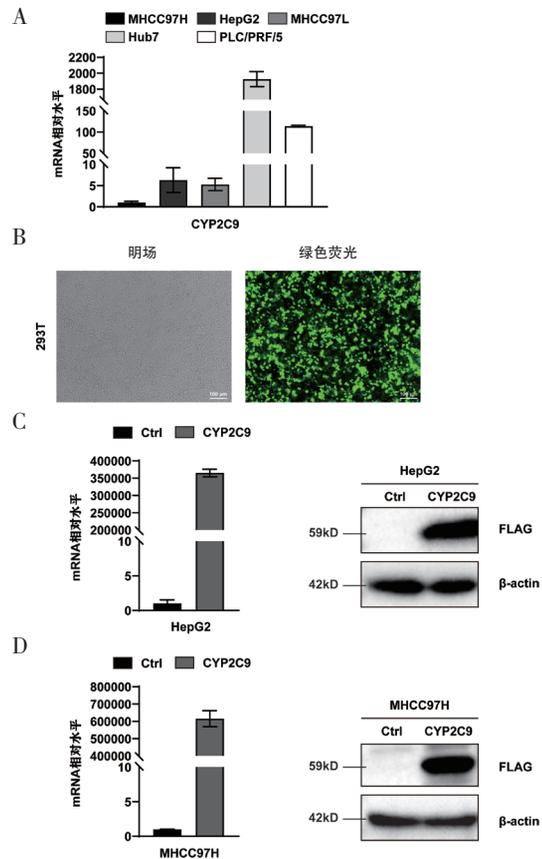


图3 CYP2C9稳定过表达的HepG2和MHCC97H细胞系的构建

Figure 3. Construction of HepG2 and MHCC97H cell lines stably expressing CYP2C9

注: A. qPCR结果显示CYP2C9在MHCC97H、HepG2、MHCC97L、Hub7和PLC/PRF/5中的表达; B.在包装慢病毒过程中,293T细胞转染阳性对照质粒GFP 24h后,于明场显微镜(左)与荧光显微镜(右)下观察GFP转染效率; C. qPCR和Western Blot显示HepG2细胞系中CYP2C9的过表达; D. qPCR和Western Blot显示MHCC97H细胞系中CYP2C9的过表达。

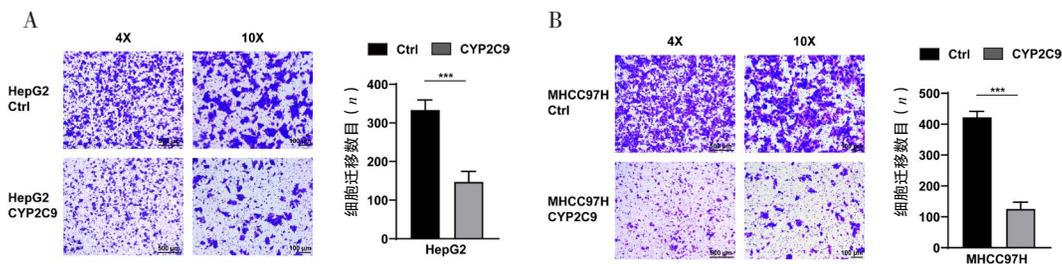


图4 CYP2C9对HepG2和MHCC97H迁移能力的影响

Figure 4. Influence of CYP2C9 on the migration of HepG2 and MHCC97H

注: A. 结晶紫染色代表性图片显示HepG2的CYP2C9稳定过表达及对照细胞系的迁移实验结果,右侧为迁移实验结果(10x)的定量统计图($n=3$); B. 结晶紫染色代表性图片显示MHCC97H的CYP2C9稳定过表达及对照细胞系的迁移实验结果,右侧为迁移实验结果(10x)的定量统计图($n=3$); *** $P < 0.001$ 。

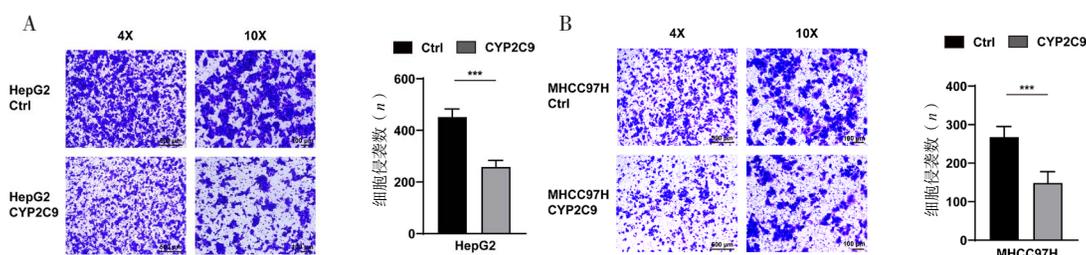


图5 CYP2C9对HepG2和MHCC97H侵袭能力的影响

Figure 5. Influence of CYP2C9 on the invasion of HepG2 and MHCC97H

注：A. 结晶紫染色代表性图片显示HepG2的CYP2C9稳定过表达及对照细胞系的侵袭实验结果，右侧为侵袭实验结果（10x）的定量统计图（n=3）；B. 结晶紫染色代表性图片显示MHCC97H的CYP2C9稳定过表达及对照细胞系的侵袭实验结果，右侧为侵袭实验结果（10x）的定量统计图（n=3）；***P<0.001。

2.3.3 CYP2C9对肝癌细胞EMT过程的影响

Western Blot实验检测 HepG2 和 MHCC97H 的 CYP2C9 稳定过表达细胞系的 EMT 指标 E-Cadherin 和 N-Cadherin 的变化，结果显示在 HepG2 和 MHCC97H 这两种细胞系中，相比于对照组，CYP2C9 过表达均上调了 E-Cadherin 的表达（ $P < 0.01$ ），同时降低了 N-Cadherin 的表达（ $P < 0.001$ ），说明过表达 CYP2C9 显著抑制了 HepG2 和 MHCC97H 肝癌细胞系的 EMT 过程（图 6-A、图 6-B）。

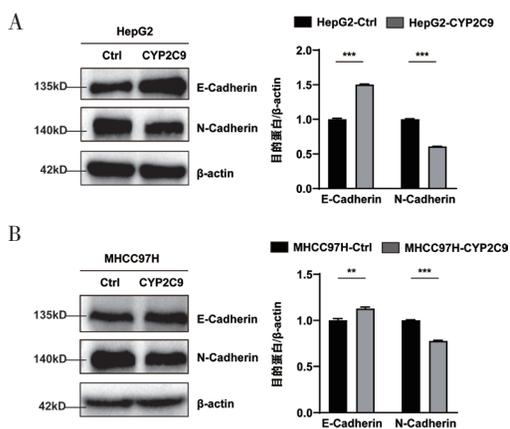


图6 CYP2C9对HepG2和MHCC97H EMT过程的影响

Figure 6. Influence of CYP2C9 on the EMT process of HepG2 and MHCC97H

注：A. Western Blot结果及其定量分析显示过表达CYP2C9对HepG2 EMT过程的影响；B. Western Blot结果及其定量分析显示过表达CYP2C9对MHCC97H EMT过程的影响；** $P < 0.01$ ，*** $P < 0.001$ 。

2.3.4 CYP2C9对肝癌细胞增殖能力的影响

本研究检测了 HepG2 和 MHCC97H 的 CYP2C9 稳定过表达细胞系增殖能力变化。CCK-8 实验表明，相比于对照组，在 24 h、48 h、72 h 和 96 h 这 4 个时间点上，CYP2C9 稳定过表达细胞系未表现出明显细胞数量的变化（ $P \geq 0.05$ ，图 7-A）；平板克隆形成实验结果表明，相比于对照组，

CYP2C9 稳定过表达细胞系的克隆数量没有显著变化（ $P \geq 0.05$ ，图 7-B）；Western Blot 实验检测 PCNA、Cyclin D1 增殖指标的变化，结果显示相比于对照组，CYP2C9 过表达对 PCNA、Cyclin D1 的表达没有显著影响（ $P \geq 0.05$ ，图 7-C）。这些结果表明 CYP2C9 对 HepG2 和 MHCC97H 两种肝癌细胞系的增殖能力没有显著影响（图 7-C、图 7-D）。

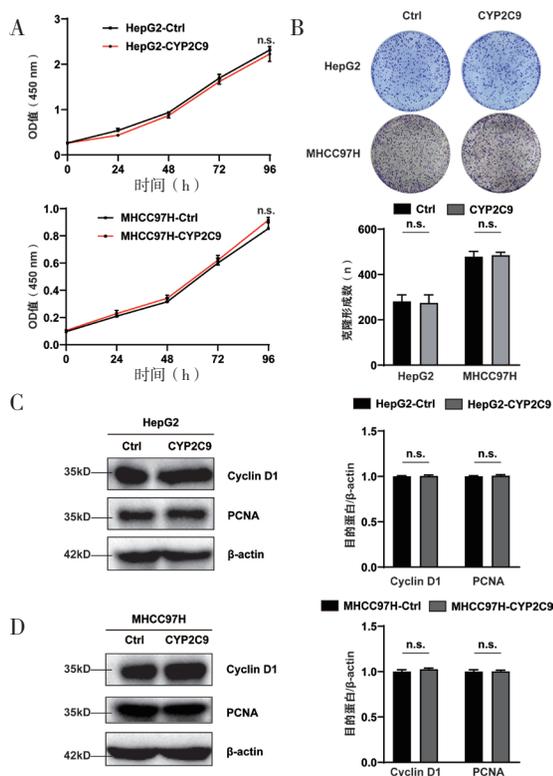


图7 CYP2C9对HepG2和MHCC97H 增殖能力的影响

Figure 7. Influence of CYP2C9 on the proliferation of HepG2 and MHCC97H

注：A. CCK-8实验显示HepG2和MHCC97H的CYP2C9稳定过表达细胞系及其对照细胞系的增殖情况；B. 平板克隆形成实验结果显示HepG2和MHCC97H的CYP2C9稳定过表达细胞系及其对照细胞系的增殖情况（n=3）；C. Western Blot结果及其定量分析显示过表达CYP2C9对HepG2增殖能力的影响；D. Western Blot及其定量分析显示过表达CYP2C9对MHCC97H增殖能力的影响；n.s.表示 $P \geq 0.05$ 。

3 讨论

本研究发现 CYP2C9 的表达在 HCC 组织中显著下调, CYP2C9 低表达的 HCC 患者总生存期要显著低于 CYP2C9 高表达的 HCC 患者, 表明 CYP2C9 参与了 HCC 的发生发展。为进一步探讨 CYP2C9 在 HCC 中的作用, 本研究检测了过表达 CYP2C9 对肝癌细胞迁移、侵袭和增殖的影响, 结果表明过表达 CYP2C9 抑制 HepG2 和 MHCC97H 的 EMT 过程, 进而抑制迁移和侵袭, 但对增殖没有显著影响。以上实验结果揭示了 CYP2C9 在 HCC 发展中的重要作用。

癌细胞在组织内的迁移是癌症发展的关键过程^[16], 当癌症进展和转移时, 细胞能够通过单独迁移或集体迁移的方式, 扩散到其他器官^[17]。除了运动能力外, 癌细胞的另一个特性是侵袭性, 这为它们提供了攻击性行为。癌细胞分泌的基质金属蛋白酶 (MMP) 会分解细胞外基质, 从肿瘤的原发部位扩散到周围组织, 进一步促进癌症进展^[18]。而 EMT 是癌细胞迁移和侵袭的关键过程^[19-20]。在 EMT 期间, 上皮细胞丧失极性, E-Cadherin 表达下降, 进而导致细胞的黏附力降低, 使细胞易于侵袭和转移, 同时细胞获得间质表型, Vimentin, N-Cadherin 等表达升高^[21]。本研究发现过表达 CYP2C9 使 HepG2 与 MHCC97H 的迁移和侵袭细胞数显著减少, 证实了 CYP2C9 显著抑制了肝癌细胞系的迁移和侵袭能力。并且过表达 CYP2C9 还使 E-Cadherin 表达增加, N-Cadherin 表达降低, 表明 CYP2C9 抑制了 EMT 过程。有研究报道 CYP2C9 可以抑制食管鳞状细胞癌的迁移与侵袭能力^[13], 与本研究结果一致。以上结果提示 CYP2C9 在调控肿瘤细胞的迁移、侵袭以及 EMT 过程中具有重要作用。

不受约束的细胞生长在恶性肿瘤的发生和发展中同样起着关键作用^[22], 但本研究中, CYP2C9 对肝癌细胞的增殖没有显著影响, 而 Schmelzle 团队提出, CYP2C9 在食管腺癌以及邻近食管黏膜组织的表达较高, 并且可通过调节细胞周期促进食管腺癌中的肿瘤细胞增殖^[12]。出现不同实验结果的原因, 可能与不同肿瘤微环境的变化影响基因表达相关^[13]。

以上实验虽然揭示了 CYP2C9 对肝癌细胞的调控作用, 但仍需构建 CYP2C9 稳定敲低细

胞系, 反向验证 CYP2C9 对肝癌细胞系迁移和侵袭的影响。同时构建小鼠肝癌肺转移模型, 于体内验证 CYP2C9 对 HCC 的影响。此外, CYP2C9 如何调控 HCC 的迁移和侵袭尚不明确, 已知几种信号通路, 如 TGF- β , Wnt/ β -catenin, Notch 和 PI3K/AKT 信号通路参与调节 EMT^[19], 其中 PI3K/AKT 通路在控制肿瘤侵袭和转移方面具有关键意义^[21, 23]。CYP2C9 是否通过调节 PI3K/AKT 等信号通路抑制肝癌细胞系的迁移和侵袭, 仍需要进一步实验去探讨。

综上所述, 本研究揭示了 CYP2C9 在 HCC 发展进程中的生物学功能, 研究发现 CYP2C9 在 HCC 中表达显著下调, CYP2C9 的低表达提示 HCC 的不良预后, 表明 CYP2C9 可能参与了 HCC 的发生发展; 过表达 CYP2C9 显著抑制 HepG2 和 MHCC97H 肝癌细胞系的迁移和侵袭能力以及 EMT 过程。本研究的结果提示 CYP2C9 有望成为一个治疗 HCC 的潜在靶点。

参考文献

- 1 Sung H, Ferlay J, Siegel RL, et al. Global cancer statistics 2020: Globocan estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries[J]. *CA Cancer J Clin*, 2021, 71(3): 209-249. DOI: [10.3322/caac.21660](https://doi.org/10.3322/caac.21660).
- 2 Villanueva A. Hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(15): 1450-1462. DOI: [10.1056/NEJMra1713263](https://doi.org/10.1056/NEJMra1713263).
- 3 Singal AG, Lampertico P, and Nahon P. Epidemiology and surveillance for hepatocellular carcinoma: new trends[J]. *J Hepatol*, 2020, 72(2): 250-261. DOI: [10.1016/j.jhep.2019.08.025](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2019.08.025).
- 4 GBD 2019 Diseases and Injuries Collaborators. Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990-2019: a systematic analysis for the global burden of disease study 2019[J]. *Lancet*, 2020, 396(10258): 1204-1222. DOI: [10.1016/S0140-6736\(20\)30925-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30925-9).
- 5 In der Stroth L, Tharehalli U, Günes C, et al. Telomeres and telomerase in the development of liver cancer[J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(8): 2048. DOI: [10.3390/cancers12082048](https://doi.org/10.3390/cancers12082048).
- 6 Brar G, Greten TF, Graubard BI, et al. Hepatocellular carcinoma survival by etiology: a seer-medicare database analysis[J]. *Hepatol Commun*, 2020, 4(10): 1541-1551. DOI: [10.1002/hep4.1564](https://doi.org/10.1002/hep4.1564).
- 7 Goulté N, Sogni P, Bendersky N, et al. Geographical

- variations in incidence, management and survival of hepatocellular carcinoma in a western country[J]. *J Hepatol*, 2017, 66(3): 537–544. DOI: [10.1016/j.jhep.2016.10.015](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.10.015).
- 8 Nebert DW, Russell DW. Clinical importance of the cytochromes p450[J]. *Lancet*, 2002, 360(9340): 1155–1162. DOI: [10.1016/S0140-6736\(02\)11203-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(02)11203-7).
- 9 Zhao M, Ma J, Li M, et al. Cytochrome p450 enzymes and drug metabolism in humans[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(23): 12808. DOI: [10.3390/ijms222312808](https://doi.org/10.3390/ijms222312808).
- 10 Guo Z, Johnson V, Barrera J, et al. Targeting cytochrome p450-dependent cancer cell mitochondria: cancer associated cyps and where to find them[J]. *Cancer Metastasis Rev*, 2018, 37(2–3): 409–423. DOI: [10.1007/s10555-018-9749-6](https://doi.org/10.1007/s10555-018-9749-6).
- 11 Isvoran A, Louet M, Vladioiu D L, et al. Pharmacogenomics of the cytochrome p450 2c family: Impacts of amino acid variations on drug metabolism[J]. *Drug Discov Today*, 2017, 22(2): 366–376. DOI: [10.1016/j.drudis.2016.09.015](https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.09.015).
- 12 Schmelzle M, Dizdar L, Matthaei H, et al. Esophageal cancer proliferation is mediated by cytochrome p450 2c9 (cyp2c9)[J]. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, 2011, 94(1–2): 25–33. DOI: [10.1016/j.prostaglandins.2010.12.001](https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2010.12.001).
- 13 Jiang Z, Zheng X, Wang W, et al. Cyp2c9 inhibits the invasion and migration of esophageal squamous cell carcinoma via downregulation of hdac[J]. *Mol Cell Biochem*, 2021, 476(5): 2011–2020. DOI: [10.1007/s11010-021-04050-3](https://doi.org/10.1007/s11010-021-04050-3).
- 14 Shuaichen L, Guangyi W. Bioinformatic analysis reveals CYP2C9 as a potential prognostic marker for HCC and liver cancer cell lines suitable for its mechanism study[J]. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 2018, 64(7): 70–74. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29974848/>.
- 15 Xu K, Xia P, Liu P, et al. A six lipid metabolism related gene signature for predicting the prognosis of hepatocellular carcinoma[J]. *Sci Rep*, 2022, 12(1): 20781. DOI: [10.1038/s41598-022-25356-2](https://doi.org/10.1038/s41598-022-25356-2).
- 16 Campbell K and Casanova J. A common framework for EMT and collective cell migration[J]. *Development*, 2016, 143(23): 4291–4300. DOI: [10.1242/dev.139071](https://doi.org/10.1242/dev.139071).
- 17 Elisha Y, Kalchenko V, Kuznetsov Y, et al. Dual role of E-cadherin in the regulation of invasive collective migration of mammary carcinoma cells[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 4986. DOI: [10.1038/s41598-018-22940-3](https://doi.org/10.1038/s41598-018-22940-3).
- 18 Chen Y, Rao X, Huang K, et al. FH535 inhibits proliferation and motility of colon cancer cells by targeting wnt/ β -catenin signaling pathway[J]. *J Cancer*, 2017, 8(16): 3142–3153. DOI: [10.7150/jca.19273](https://doi.org/10.7150/jca.19273).
- 19 Huang Y, Hong W, and Wei X. The molecular mechanisms and therapeutic strategies of EMT in tumor progression and metastasis[J]. *J Hematol Oncol*, 2022, 15(1): 129. DOI: [10.1186/s13045-022-01347-8](https://doi.org/10.1186/s13045-022-01347-8).
- 20 Mittal V. Epithelial mesenchymal transition in tumor metastasis[J]. *Annu Rev Pathol*, 2018, 13: 395–412. DOI: [10.1146/annurev-pathol-020117-043854](https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-020117-043854).
- 21 Xu Q, Liu X, Liu Z, et al. MicroRNA-1296 inhibits metastasis and epithelial-mesenchymal transition of hepatocellular carcinoma by targeting SRPK1-mediated PI3K/AKT pathway[J]. *Mol Cancer*, 2017, 16(1): 103. DOI: [10.1186/s12943-017-0675-y](https://doi.org/10.1186/s12943-017-0675-y).
- 22 Gao F, Xu T, Wang X, et al. CIP2A mediates fibronectin-induced bladder cancer cell proliferation by stabilizing β -catenin [J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017, 36(1): 70. DOI: [10.1186/s13046-017-0539-8](https://doi.org/10.1186/s13046-017-0539-8).
- 23 Tian W, Li J, Wang Z, et al. HYD-PEP06 suppresses hepatocellular carcinoma metastasis, epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cell-like properties by inhibiting PI3K/AKT and WNT/ β -catenin signaling activation[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2021, 11(6): 1592–1606. DOI: [10.1016/j.apsb.2021.03.040](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.03.040).

收稿日期: 2024 年 04 月 14 日 修回日期: 2024 年 05 月 24 日
本文编辑: 桂裕亮 曹越

引用本文: 张拓, 李达军, 王海涛, 等. CYP2C9对肝细胞癌的迁移、侵袭和增殖的影响[J]. 医学新知, 2024, 34(6): 674–681. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202404060](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202404060)
Zhang T, Li DJ, Wang HT, et al. Effect of CYP2C9 on the migration, invasion and proliferation of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Yixue Xinzhi Zazhi*, 2024, 34(6): 674–681. DOI: [10.12173/j.issn.1004-5511.202404060](https://doi.org/10.12173/j.issn.1004-5511.202404060)