

DOI:10.3724/SP.J.1008.2014.00944

· 论 著 ·

Shc1 在肝癌组织中的表达及对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖迁移能力的影响

戴敏¹, 刘俊¹, 朱海燕², 顾澄宇³, 陶汉川³, 乔谦³, 杨树东⁴, 蔡兵^{3*}

1. 南通大学附属海安医院普通外科, 南通 226600
2. 南通大学附属海安医院肿瘤科, 南通 226600
3. 南京医科大学附属无锡市人民医院肝胆外科, 无锡 214000
4. 南京医科大学附属无锡市人民医院病理科, 无锡 214000

[摘要] **目的** 探讨 Shc1 在肝癌组织中的表达情况及其对肝癌 SMMC-7721 细胞增殖、迁移能力的影响。**方法** 采用实时定量 PCR、蛋白质印迹法、免疫组织化学法检测 33 例肝癌及其对应的癌旁组织中 Shc1 的表达情况, 并分析 Shc1 蛋白表达量与临床特征间的关系; 培养肝癌 SMMC-7721 细胞, 以 siRNA 技术干扰 Shc1 的表达, 采用 MTT 法和细胞划痕试验分别检测干扰 Shc1 对细胞增殖活力和迁移能力的影响。**结果** 在 33 对样本中, 肝癌组织中 Shc1 的表达高于癌旁组织 ($P < 0.05$); Shc1 表达于肝癌细胞的胞质中。无肝硬化的患者 Shc1 阳性率(100%)高于伴肝硬化者(54.2%), 术前 Child-Pugh 分级 A 级的患者 Shc1 阳性率(75.9%)高于 B 级或 C 级的患者(0%), 术前血 AFP 阳性患者 Shc1 阳性率(79.2%)高于 AFP 阴性患者(33.3%), 术后病理 Edmondson III、IV 级患者 Shc1 阳性率(84.2%)高于 I、II 级的患者(42.9%), 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。干扰 Shc1 表达后, 随时间延长, SMMC-7721 细胞增殖、迁移明显受到抑制 ($P < 0.05$)。**结论** Shc1 在肝癌组织中高表达, 且 Shc1 的阳性率与有无肝硬化、Child-Pugh 分级、术前 AFP、病理 Edmondson 分级相关; 干扰 Shc1 的表达可抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖、迁移能力。

[关键词] Shc1; 肝细胞癌; 细胞增殖; 细胞迁移; RNA 干扰**[中图分类号]** R 735.7 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2014)09-0944-08

Expression of Shc1 in hepatocellular carcinoma tissues and its effect on proliferation and migration of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells

DAI Min¹, LIU Jun¹, ZHU Hai-yan², GU Cheng-yu³, TAO Han-chuan³, QIAO Qian³, YANG Shu-dong⁴, CAI Bing^{3*}

1. Department of General Surgery, Haian Hospital of Nantong University, Nantong 226600, Jiangsu, China
2. Department of Oncology, Haian Hospital of Nantong University, Nantong 226600, Jiangsu, China
3. Department of Hepatobiliary Surgery, Wuxi People's Hospital, Nanjing Medical University, Wuxi 214000, Jiangsu, China
4. Department of Pathology, Wuxi People's Hospital, Nanjing Medical University, Wuxi 214000, Jiangsu, China

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of Shc1 in hepatocellular carcinoma tissues and its effect on the proliferation and migration of human hepatocarcinoma SMMC-7721 cells. **Methods** The expression of Shc1 in 33 hepatocellular carcinoma tissues and corresponding adjacent tissues was examined by real-time PCR, Western blotting analysis and immunohistochemistry method; the relationship between the expression and clinical features was also analyzed. Shc1 was silenced by RNA interference technique in SMMC-7721 cells to determine its effect on proliferation and migration; MTT assay and wound healing assay were used to examine the effect of Shc1 knockdown on cell vitality and migration. **Results** Real-time PCR, Western blotting analysis and immunohistochemistry demonstrated that Shc1 expression in hepatocellular carcinoma tissues was significantly higher than that in the adjacent tissues ($P < 0.05$); the expression of Shc1 was mainly in the cytoplasm. Shc1 positive rates in the patients without cirrhosis (100%), of Child-Pugh class A before operation (75.9%), AFP-positive before operation (79.2%) and pathology Edmondson III/IV level after operation (84.2%) were significantly higher than those with cirrhosis (54.2%), of Child-Pugh class B or C (0%), AFP-negative (33.3%),

[收稿日期] 2013-11-26 **[接受日期]** 2014-04-30**[基金项目]** 国家自然科学基金青年项目(81302105), 无锡市科技计划项目(CYE00917). Supported by Youth Project of National Natural Science Foundation of China (81302105) and Project of Science and Technology of Wuxi Municipality(CYE00917).**[作者简介]** 戴敏, 硕士生. E-mail: daimin12@126.com

* 通信作者(Corresponding author). Tel: 0510-85351093, E-mail: caibingwuxi@126.com

and pathology Edmondson I/II (42.9%, P all < 0.05). Shc1 expression silence resulted in significant decrease in the proliferation and migration of SMMC-7721 cells ($P < 0.05$). **Conclusion** Shc1 is overexpressed in hepatocarcinoma tissue. The expression of Shc1 is associated with cirrhosis, Child-Pugh class, preoperation AFP and pathology Edmondson grades of the hepatocarcinoma. Inhibition of Shc1 expression can inhibit the proliferation and migration of human hepatocarcinoma cell SMMC-7721 *in vitro*.

[Key words] Shc1; hepatocellular carcinoma; cell proliferation; cell migration; RNA interference

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2014, 35(9): 944-951]

肝细胞癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是常见的恶性肿瘤之一,尤其以亚太地区居多,严重危害人类健康^[1]。深入研究肝细胞癌发生发展过程中重要的基因对肝癌细胞增殖、迁移等机制的影响,对疾病诊治具有重大意义。Shc1 (Src homology 2 domain containing transforming protein 1)基因位于人类1号染色体2区1带,编码蛋白为 p52ShcA、p46ShcA 和 p66ShcA(其中 p66Shc 在人肝组织中表达量极少),早年被认为具有参与抑制神经细胞凋亡及调节受体酪氨酸激酶通路等功能。随着对其研究的深入,人们发现 Shc1 基因在乳腺癌^[2]、胃肠肿瘤细胞^[3-4]、肺癌^[5]等多种肿瘤细胞生长中具有重要作用。Shc1 基因在肝癌中的研究刚刚起步, Yoshida 等^[6]发现 p52ShcA、p46ShcA 高表达于 LEC (Long-Evans Cinnamon) 大鼠肝细胞癌中,并且 p46ShcA 的酪氨酸磷酸化参与 LEC 大鼠慢性乙型肝炎发展为肝细胞癌的过程。目前对人肝细胞癌中 Shc1 的研究较少,本研究观察了人肝癌组织中 Shc1 的表达情况,分析其表达与临床特征之间的关系,并采用基因干扰的方法抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的 Shc1 表达水平,观察其对肝癌细胞增殖、迁移等生物学特性的影响,探讨 Shc1 在人肝癌发生、发展中的作用。

1 材料和方法

1.1 病例资料 收集 2013 年 1 月至 2013 年 6 月南京医科大学附属无锡市人民医院肝胆外科手术切除的肝癌及癌旁组织标本 33 例和相应的临床资料(性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤数目、TNM 分期、有无肝硬化、Child-Pugh 分级、AFP、病理 Edmondson 分级、血管脉管侵犯癌栓等方面)。所有标本的病理诊断均由 3 位以上高年资病理医师进行诊断核对。每例患者术前均未接受任何抗肿瘤治疗,采集癌组织及相应癌旁组织(距肿瘤边缘 2 cm)各 200 g,立即置于液氮中保存。所取标本均经患者本人及家属同意。

1.2 主要材料 人正常肝细胞 HL-7702(以下简称

L-02)及 5 种肝癌细胞 MHCC-97L、MHCC-LM3、SMMC-7721、PLC/PRF/5 及 Hep-G2 均为本实验室存储。DMEM 高糖培养液购自 Hyclone 公司;无支原体优级胎牛血清购自杭州四季青公司;0.25% 胰酶-EDTA、Opti-MEM 无血清培养基购自 Invitrogen 公司;青霉素、链霉素溶液购自 Hyclone 公司;MTT 试剂购自 Biosharp 公司;TRIzol 试剂、Lipofectamine 2000、无核酶水购自 Invitrogen 公司,反转录试剂盒、SYBR[®] Premix EX Taq[™] II 实时定量 PCR 试剂盒购自 TaKaRa 公司, Shc1、 β -actin 基因 PCR 引物(HPLC 级制品)由 TaKaRa 公司设计、合成;Shc1 抗体、GAPDH 抗体购自 R&D system 公司;二抗羊抗鼠 IgG 购自康为公司;Shc1_siRNA 购自 GenePharma 公司。

1.3 肝组织和肝细胞中 Shc1 基因、蛋白的检测

将 33 例肝癌和 33 例癌旁组织各分成 2 份,分别用于实时定量 PCR 和蛋白质印迹检测。

1.3.1 实时定量 PCR 检测 用 TRIzol 试剂提取总 RNA,参照反转录试剂盒说明合成 cDNA。人 Shc1 引物序列 F: 5'-ATG GCC GCA GAC TGC AAA C-3', R: 5'-GTC TTT GGC AAC ATA GGC GAC ATA C-3'; β -actin 引物序列 F: 5'-AGA GCC TCG CCT TTG CCG ATC C-3', R: 5'-CTG GGC CTC GTC GCC CAC ATA-3'。参照 SYBR[®] Premix EX Taq[™] II 实时荧光定量 PCR 试剂盒使用说明,应用 ABI-PCR 仪行实时 PCR 反应,每个模板设 3 个复孔,取平均 CT 值,以 $2^{-\Delta CT}$ ($\Delta CT = CT_{Shc1} - CT_{\beta-actin}$) 表示 Shc1 基因的相对表达量。

1.3.2 蛋白质印迹检测 RIPA 裂解液提取上述各组织和细胞中的总蛋白,BCA 法分别测其浓度,加 4× 上样缓冲液后 100℃ 5 min 煮沸。行 SDS-PAGE 后,湿转至硝酸纤维素膜,将膜用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h,加入 Shc1 一抗(1:1 000, R&D system)、GAPDH 一抗(1:5 000, R&D system)于 4℃ 共同孵育过夜,加入二抗(羊抗鼠抗体,1:5 000, 康为公司)

室温孵育 1 h, ECL 增强发光, 应用凝胶成像仪 (AlphaImager HP) 拍照, 采集的曝光时间为 4 s、8 s 和 16 s。在肝癌细胞中筛选出 Shc1 蛋白表达量最高的一种细胞进行基因干扰实验。

1.3.3 免疫组织化学检测 33 例肝癌和 33 例癌旁组织标本经 10% 中性甲醛溶液固定后常规组织处理, 4 μm 厚连续切片, 采用免疫组化 SP 法进行免疫组化染色, 严格参照试剂盒说明操作。一抗采用鼠抗人 Shc1 抗体 (1 : 50, R&D system), 二抗为生物素标记的羊抗鼠抗体 (1 : 1 000, 北京中杉金桥生物技术有限公司)。染色时用已知阳性切片作阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。结果判定以胞质内出现棕黄色颗粒为 Shc1 蛋白阳性, 胞质内不出现黄色颗粒为阴性。图像采用 Olympus 显微照相系统采集。

1.4 细胞基因干扰 Shc1 的小干扰 RNA (small interference RNA, siRNA)、阴性对照 siRNA 和荧光 FAM-siRNA 由 GenePharma 公司设计、合成。特异性 Shc1-siRNA 序列: sense 5'-CAC CUG ACC AUC AGU ACU ATT-3', antisense 5'-UAG UAC UGA UGG UCA GGU GTT-3'。阴性对照 siRNA 序列: sense 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3', antisense 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。FAM-siRNA 序列: sense 5'-UUC UCC GAA CGU GUC ACG UTT-3', antisense 5'-ACG UGA CAC GUU CGG AGA ATT-3'。FAM 是一种绿色荧光基因, 由蓝光激发, 激发波长 480 nm, 发射波长 520 nm, 转染效率的高低可以通过荧光标记的 siRNA (FAM-siRNA) 实现。将细胞分为 4 组: 空白组、对照组、干扰组、荧光组。肝癌细胞培养于含 10% 胎牛血清、 1×10^8 U/L 青霉素和 100 mg/L 链霉素的 DMED 培养液中, 置于 37℃、5% CO₂ 的培养箱中培养, 0.25% 胰酶-EDTA 消化传代。将细胞分别接种于 6 孔板中, 每孔细胞密度为 5×10^5 / 2 mL。利用 Lipofectamine 2000 将上述 siRNA 按每孔 100 pmol 分别添加至各组细胞中, 空白组不转染。转染 6 h 后, 使用倒置荧光显微镜观察转染效率, 并拍照记录。转染 24 h 后通过实时定量 PCR 反应检测各组细胞 Shc1 基因的表达情况, 用蛋白质印迹法检测各组细胞 Shc1 蛋白 (p52ShcA、p46ShcA 和 p66ShcA) 的表达情况。

1.5 细胞增殖与迁移能力的测定

1.5.1 细胞增殖测定 将肝癌细胞以 3 000/100 μL 的密度接种于 96 孔板, 设 3 个分组 (空白组、干扰组、对照组), 每组设 8 个复孔。采用 MTT 法连续 8 d 检测各组细胞的光密度 (D_{450}) 值。以 D_{450} 值为纵坐标、时间为横坐标绘制细胞生长曲线图。

1.5.2 细胞划痕愈合实验 将肝癌细胞以 5×10^5 / 2 mL 的密度接种于 6 孔板 (板的背面划横线, 间隔 1 cm 一道, 横穿过孔。每孔 3 条线), 设 3 个分组 (空白组、干扰组、对照组)。24 h 后用 200 μL 黄吸头进行垂直于背面横线的划痕 (每孔划痕 3 道, 并与背面横线交叉, 形成 9 个观察点)。PBS 洗细胞 3 次, 去除划下的细胞, 加入无血清培养液。放入 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养, 在 0、12、24 h 取样, 10 倍镜下拍照。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算划痕面积和长度, 划痕距离 = 面积 / 长度, 迁移距离 = 0 h 距离 - 当前距离。

1.6 统计学处理 利用 Excel 软件计算 PCR 结果, AlphaView SA 软件计算各组蛋白条带的相对灰度值, 使用 GraphPad Prism-5.0 软件对 Shc1 表达差异、siRNA 干扰效率、细胞生长曲线、细胞划痕实验进行计算、分析、制图等, 采用 Image-Pro Plus 6.0 分析计算细胞划痕愈合实验图片。采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异的比较采用 t 检验; 计数资料以百分比表示, 组间差异的比较采用 Fisher 精确法检验。检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 Shc1 基因及其蛋白在人肝癌组织和癌旁组织中的表达 实时定量 PCR 结果显示, 33 例肝癌组织中 Shc1 的表达 (0.105 ± 0.018) 高于相应的癌旁组织 (0.057 ± 0.005 , $P < 0.05$), 见图 1A; 在 33 对标本中, 22/33 (66.7%) 例 Shc1 基因上调 (癌组织表达量 / 癌旁组织表达量 ≥ 1), 其中 12/33 (36.4%) Shc1 基因明显上调 (癌组织表达量 / 癌旁组织表达量 ≥ 2), 11/33 (33.3%) Shc1 基因存在轻度下调 (癌组织表达量 / 癌旁组织表达量 < 1), 见图 1B。蛋白质印迹结果显示, 33 例肝癌和相应的癌旁组织中, Shc1 蛋白 3 个亚型 (p52ShcA、p46ShcA 和 p66ShcA) 中的 p52ShcA、p46ShcA 均有表达, 未检测到 p66ShcA

在人肝组织中表达(图 1C),故本实验主要检测的是 p52ShcA 和 p46ShcA 的蛋白总量。将癌组织 Shc1 相对表达量/癌旁组织 Shc1 相对表达量 ≥ 1 定义为

Shc1 阳性表达(+),癌组织 Shc1 相对表达量/癌旁组织 Shc1 相对表达量 < 1 定义为 Shc1 阴性表达(-),则肝癌组织 Shc1 阳性率为 66.7%(22/33)。

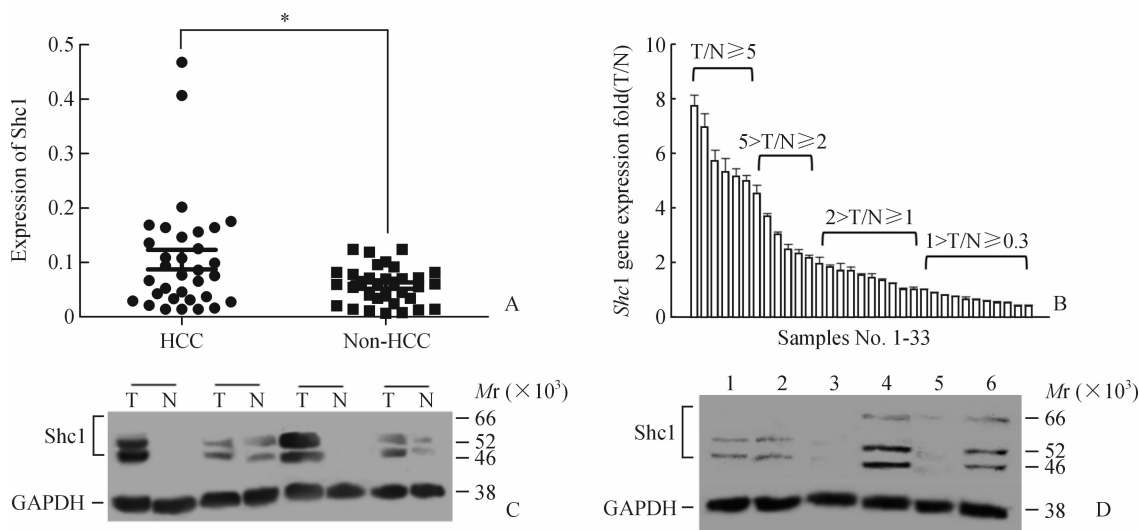


图 1 肝细胞癌标本及肝癌细胞系中 Shc1 的表达

Fig 1 Expression of Shc1 in hepatocellular carcinoma (HCC) specimens and cell lines

A: The RNA levels of Shc1 in 33 HCCs specimens and adjacent tissue detected by RT-PCR. * $P < 0.05$. B: Shc1 gene expression ratio of HCC(T)/adjacent tissue(N) to cancer. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. C: Expression of Shc1 protein (p52ShcA, p46ShcA and p66ShcA) in HCC(T) and adjacent tissue(N) from 4 random samples. D: Expression of Shc1 protein in normal liver cells and hepatoma cells. 1: HL-7702; 2: MHCC-97L; 3: MHCC-LM3; 4: SMMC-7721; 5: PLC/PRF/5; 6: Hep-G2

免疫组化结果显示,Shc1 在肝细胞癌组织和癌旁组织中的表达阳性率分别为 75.8%(25/33)、15.2%(5/33)。Shc1 主要表达在肝细胞癌组织的胞质中,且明显强于癌旁组织(图 2)。

2.2 Shc1 蛋白表达与临床病理特征的关系 将 Shc1 蛋白的表达情况(阳/阴性)与相应临床病理特征(性别、年龄、肿瘤大小、肿瘤数目、TNM 分期、HBVAg、有无肝硬化、Child-Pugh 分级、AFP、病理 Edmondson 分级、血管脉管主干的侵犯等)采用 SPSS 软件进行 Fisher 精确法计算 P 值。结果显示:33 对样本中,无肝硬化的患者 Shc1 阳性率(100%)高于伴肝硬化的患者(54.2%),术前 Child-Pugh 分级 A 级的患者 Shc1 阳性率(75.9%)高于 B 级或 C 级的患者(0%),术前检测血中 AFP 阳性患者 Shc1 阳性率(79.2%)高于 AFP 阴性患者(33.3%),术后病理 Edmondson III、IV 级患者 Shc1 阳性率(84.2%)高于 I、II 级的患者(42.9%),且以上差异均有统计学意义($P < 0.05$)。Shc1 蛋白阳性率与性别、年龄(≤ 55 岁和 > 55 岁)、肿瘤大小(< 5 cm 和 ≥ 5 μ m)、肿瘤数目(单个和多个)、TNM 分期(I/II 和 III/IV)、HBVAg(阳性/阴性)、血管脉管主干的侵犯(有/无)差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 1。

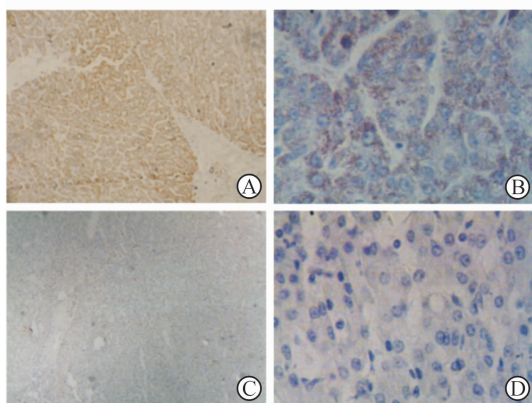


图 2 肝细胞癌(A, B)和癌旁组织(C, D) Shc1 表达的免疫组化染色结果

Fig 2 Immunohistochemical staining of Shc1 protein expression in hepatocellular carcinoma(HCC, A, B) and adjacent tissues (Non-HCC, C, D)

Original magnification: $\times 40$ (A, C), $\times 200$ (B, D)

表 1 Shc1 蛋白表达情况与临床病理特征之间的关系

Tab 1 Relationship between Shc1 protein expression and clinical characteristics of hepatocellular carcinoma

N=33

Item	n	Shc1(+) <i>n</i>	Shc1(-) <i>n</i>	Positive rate(%)	Pearson χ^2	P
Gender					2.27	0.132
Male	26	19	7	73.1		
Female	7	3	4	42.9		
Age(year)					1.02	0.313
≤ 55	13	10	3	76.9		
> 55	20	12	8	60		
Tumor size <i>d</i> /cm					0.99	0.32
< 5	14	8	6	57.1		
≥ 5	19	14	5	73.7		
Tumor number					0.59	0.442
Single	21	15	6	71.4		
Multiple	12	7	5	58.3		
TNM staging					1.15	0.284
I / II	23	14	9	60.9		
III / IV	10	8	2	80		
HBVAg					0.12	0.729
+	28	19	9	67.9		
-	5	3	2	60		
Liver cirrhosis					6.19	0.013
-	9	9	0	100		
+	24	13	11	54.2		
Child-Pugh score					9.1	0.003
A	29	22	7	75.9		
B/C	4	0	4	0		
Serum AFP					6.19	0.013
-	9	3	6	33.3		
+	24	19	5	79.2		
Pathological Edmondson grade					6.2	0.013
I / II	14	6	8	42.9		
III / IV	19	16	3	84.2		
Vascular invasion					0.12	0.729
-	28	19	9	67.9		
+	5	3	2	60		

HBV: Hepatitis B virus; AFP: Alpha fetal protein

2.3 Shc1 蛋白在正常肝细胞和肝癌细胞中的表达
 蛋白质印迹结果显示,在 5 种肝癌细胞及 1 种正常肝细胞中,SMMC-7721 细胞中 Shc1 蛋白表达量(主要检测 p52ShcA 和 p46ShcA 的蛋白总量)高于其他 4 种肝癌细胞及正常人肝 HL-7702 细胞(图 1D)。

遂采用 SMMC-7721 细胞行下一步细胞学增殖与迁移实验。

2.4 干扰肝癌细胞 Shc1 表达对细胞增殖和迁移的影响
 使用 Lipofectamine 2000 瞬时转染 siRNA 至 SMMC-7721 细胞中,6 h 后观察荧光细胞转染效

率,利用荧光显微镜自带计数软件进行分析,结果如图3所示,转染效率为65%。转染24 h后通过荧光定量PCR检测3组细胞(空白组、对照组、干扰组) Shc1 的表达水平,结果显示,干扰组 SMMC-7721 细胞中 Shc1 的表达低于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图4A);同时采用蛋白质印迹法验证了对照组与干扰组 SMMC-7721 细胞中 Shc1 蛋白的表达情况(图4B)。上述结果说明采用 siRNA 成功干扰了 SMMC-7721 细胞中 Shc1 的表达。

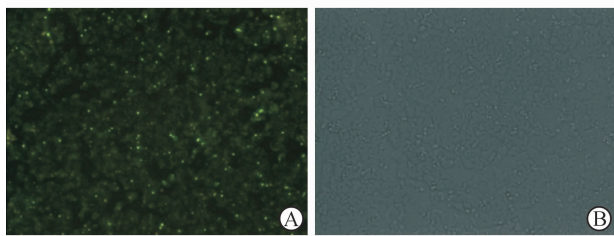


图3 转染6 h后观察荧光细胞转染效率

Fig 3 Fluorescent cell transfection efficiency after 6 hours

A: Fluorescence microscopy; B: Ordinary microscope. Original magnification: $\times 100$

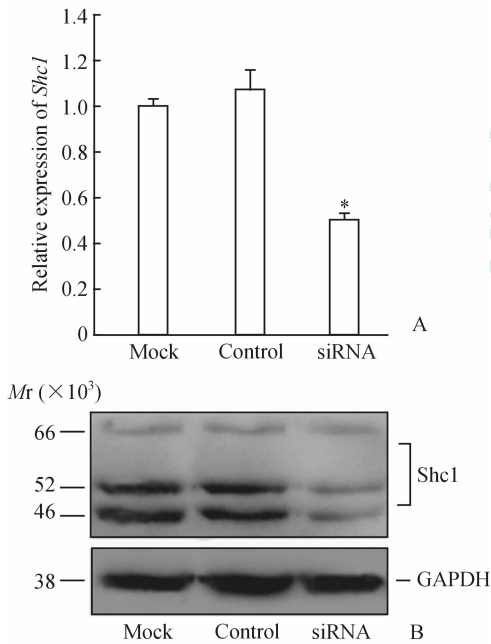


图4 转染24 h后各组细胞中 Shc1 基因(A)、蛋白(B)的表达情况

Fig 4 Expression of Shc1 gene (A) and protein(B) in SMMC-7721 cells 24 h after transfection

* $P < 0.05$ vs control group; $n = 6, \bar{x} \pm s$

的表达后,随着时间的延长,与对照组、空白组相比, SMMC-7721 细胞的生长明显受到抑制($P < 0.05$),而空白组与对照组 SMMC-7721 细胞生长差异无统计学意义($P > 0.05$)。见图5。

2.4.2 干扰 Shc1 表达对肝癌细胞迁移的影响 细胞划痕实验结果显示,干扰 Shc1 的表达后12和24 h, SMMC-7721 细胞的迁移距离比对照组、空白组减少,差异有统计学意义($P < 0.05$,图6)。

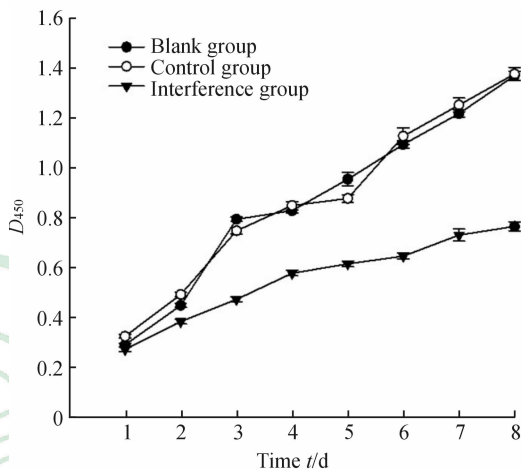


图5 MTT 法测细胞生长曲线

Fig 5 Cell growth curve by MTT method

* $P < 0.05$ vs blank group and control group; $n = 8, \bar{x} \pm s$

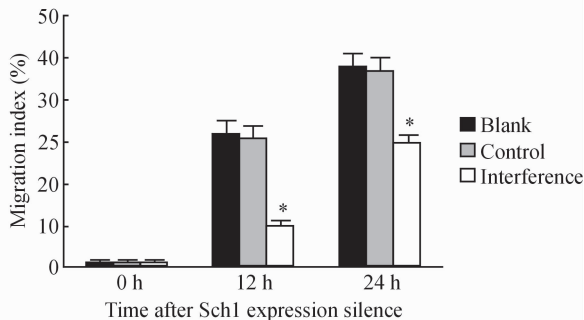
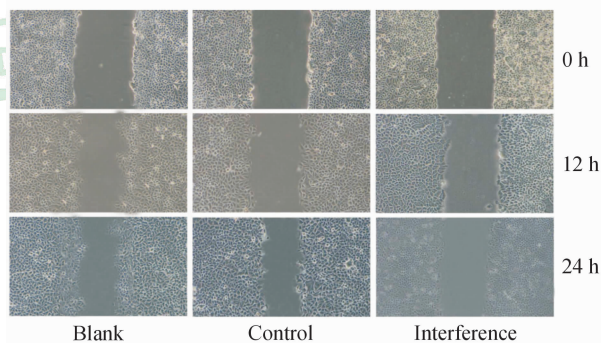


图6 细胞划痕愈合实验结果

Fig 6 Cell wound healing assay

* $P < 0.05$ vs blank or control group; $n = 9, \bar{x} \pm s$

2.4.1 干扰 Shc1 表达对肝癌细胞增殖的影响 采用 MTT 法测细胞生长曲线,结果显示,干扰 Shc1

3 讨论

Shc (Src homologue and collagen protein) 基因家族包括 *Shc1* (即 *ShcA*)、*Shc2* 和 *Shc3* (即 *N-Shc*) 3 个成员。其中 *Shc1* 编码 3 个分子: p52*ShcA*、p46*ShcA* 和 p66*ShcA*。*Shc* 家族蛋白在结构上都具有特有结构域 PTB-CH1-SH2, PTB (phosphotyrosine-binding) 和 SH2 (Src homology 2) 是两个磷酸酪氨酸结合区域, CH1 (collagen-homology 1) 含有酪氨酸磷酸化位点, 是 *Shc* 蛋白信号输出的区域^[7]。p46*ShcA*、p52*ShcA* 作为典型的接头蛋白在传递受体型酪氨酸蛋白激酶信号中有重要作用, 通过 GRB2/SOS 链接着激活受体酪氨酸激酶的 Ras 通路但其在肿瘤中的机制探索还需进一步研究^[7]。p66*Shc* 蛋白则参与氧化应激、细胞凋亡及衰老等过程的调控。例如, Koch 等^[8] 发现 p66*shcA* 能降低酒精性肝病患者的抗氧化防御系统, 促进肝病发展。*Shc* 高表达于早期的神经组织^[9] (主要包含神经干细胞和神经祖细胞), 且通过抑制细胞凋亡保护神经细胞。Trinei 等^[10] 指出, 在外界氧应激引起的细胞凋亡过程中, p66*ShcA* 被证明是 p53 的下游分子并对其介导的凋亡过程有着重要的作用。*Shc1* 在老年大鼠的肝脏、大脑中选择性上调, 提示 *Shc* 促进了正常细胞衰老过程^[11]。

近年来, *Shc* 过表达与癌变的关系逐渐引起人们的重视, 其中以 *Shc1* (即 *ShcA*) 最为突出。有研究者发现甲状腺癌细胞中存在高水平的 *Shc*^[12]。在成神经细胞瘤的研究中发现, 敲除 *N-Shc* 后癌细胞的自发凋亡率明显增加, 说明 *N-Shc* 在肿瘤中的过表达抑制了肿瘤细胞的凋亡^[7]。Veeramani 等^[13] 发现, p66*ShcA* 在肿瘤细胞中似乎具有促进增殖的作用。目前在肝细胞癌中 *Shc1* 的表达以及细胞学影响等方面的研究较少。

本研究发现, 在人肝细胞癌组织中的 *Shc1* 基因明显高表达于癌旁组织 ($P < 0.05$), 提示 *Shc1* 的高表达能促进肝细胞癌形成, 这与 Yoshida 等^[6] 在动物实验中研究结果相符合。此外, Yoshida 等^[6] 还发现在 LEC 大鼠正常肝脏和肝细胞癌组织中无 p66*ShcA*, 而本研究采用蛋白质印迹法也未在人肝癌、癌旁组织中发现 p66*ShcA* 蛋白表达。本研究还发现, 无肝硬化的患者 *Shc1* 阳性率 (100%) 高于伴

肝硬化的患者 (54.2%), 这可能与非肝硬化所致肝癌的发病机制有关, 为探索治疗此类肝癌新方法提供了有效的信息。Child-Pugh 分级是评判患者肝脏手术术前肝功能情况的准确指标, 肝癌手术要求患者术前为 Child-Pugh A 级, 或 Child-Pugh B 级调整后为 Child-Pugh A 级, 术前 Child-Pugh 分级 A 级的患者 *Shc1* 阳性率 (75.9%) 高于 B 级或 C 级的患者 (0%), 而 Child-Pugh A 级患者的肝功能优于 B 级或 C 级, 在肝功能较优的肝癌患者中 *Shc1* 表达水平较高, 但由于本研究中 B/C 级患者较少 (仅 4 例), 该结果还需加大样本进一步验证。AFP 作为肝癌的特异性肿瘤指标, 已在临床诊断、病理诊断中得到了广泛的应用, 术前检测血中 AFP 阳性患者 *Shc1* 阳性率 (79.2%) 高于 AFP 阴性患者 (33.3%), 说明 *Shc1* 基因的表达与 AFP 水平有关, 为研究 AFP 阳性肝细胞癌的发病机制提供线索。病理检查是肝癌诊断的金标准, 术后病理 Edmondson III、IV 级患者 *Shc1* 阳性率 (84.2%) 高于 I、II 级的患者 (42.9%), 提示 *Shc1* 的表达与肝细胞癌的分化程度有关。并且免疫组化发现 *Shc1* 主要表达于肝癌细胞的胞质中, 在癌旁组织中表达较少, 为肝癌的 *Shc1* 免疫组化诊断进一步发展奠定基础。对正常肝细胞和肝癌细胞进行研究, 发现肝癌 SMMC-7721、Hep-G2、MHCC-97L 细胞中 *Shc1* 表达量高于正常肝细胞 L-02, 而在肝癌 MHCC-LM3、PLC/PRF/5 细胞中的表达量低于 L-02 细胞, 说明肝癌 *Shc1* 上调现象存在于一部分肝癌细胞。笔者选取 *Shc1* 表达量最高的 SMMC-7721 细胞进行研究, 利用 siRNA 干扰 SMMC-7721 细胞 *Shc1* 的表达, 发现其生物学特性如生长增殖、细胞迁移等受到抑制, 说明降低 *Shc1* 的表达能抑制肝癌细胞的生长。

综上所述, *Shc1* 基因在肝细胞癌组织中高表达, 且与是否肝硬化、术前 Child 分级、术前 AFP 水平、病理 Edmondson 分级相关。干扰 *Shc1* 的表达可以抑制肝癌 SMMC-7721 细胞的增殖、迁移能力。

目前 *Shc1* 参与乳腺癌、前列腺癌、肺癌、胃肠道肿瘤细胞增殖的过程已经比较明确, 但其致癌机制仍未完全清楚。Yoshida 等^[6] 发现, p46*ShcA* 的酪氨酸磷酸化参与了大鼠慢性乙型肝炎发展为肝细胞癌的过程。Veeramani 等^[14] 发现, 前列腺癌中 p66*Shc* 水平的升高与细胞内活性氧簇 (ROS) 有关。

Galimov 等^[4]研究发现,雌激素及其受体可能与 ShcA 共同参与了结肠癌的发生、发展,并且这个过程中也涉及 ROS 通路。这或许会为研究人肝癌细胞中 Shc1 作用机制方面提供帮助。

4 利益冲突

所有作者声明本文不涉及任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] Forner A, Llovet J, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *Lancet*, 2012, 379: 1245-1255.
- [2] Jackson J G, Yoneda T, Clark G, Yee D. Elevated levels of p66 Shc are found in breast cancer cell lines and primary tumors with high metastatic potential [J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6: 1135-1139.
- [3] Murayama Y, Miyagawa J, Oritani K, Yoshida H, Yamamoto K, Kishida O, et al. CD9-mediated activation of the p46 Shc isoform leads to apoptosis in cancer cells [J]. *J Cell Sci*, 2004, 117(Pt 15): 3379-3388.
- [4] Galimov E R, Sidorenko A S, Tereshkova A V, Pletyushkina O Y, Chernyak B V, Chumakov P M. The effect of p66shc protein on the resistance of the RKO colon cancer cell line to oxidative stress [J]. *Mol Biol*, 2012, 46: 126-133.
- [5] 陈娜, 王晓洋, 杜玮, 孙亚楠, 李西川, 马振毅, 等. 在 A549 细胞中靶向 p66^{Shc} shRNA 的沉默效应 [J]. *天津医科大学学报*, 2012, 18: 10-13.
- [6] Yoshida S, Masaki T, Feng H, Yuji J, Miyauchi Y, Funaki T, et al. Enhanced expression of adaptor molecule p46 Shc in nuclei of hepatocellular carcinoma cells: study of LEC rats [J]. *Int J Oncol*, 2004, 25: 1089-1096.
- [7] 田芳, 胡长春, 朱婉儿. N-Shc 蛋白功能的研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2009, 29: 3303-3306.
- [8] Koch O R, Fusco S, Ranieri S C, Maulucci G, Palozza P, Larocca L M, et al. Role of the life span determinant P66(shcA) in ethanol-induced liver damage [J]. *Lab Invest*, 2008, 88: 750-760.
- [9] Conti L, Sipione S, Magrassi L, Bonfanti L, Rigamonti D, Pettirossi V, et al. Shc signaling in differentiating neural progenitor cells [J]. *Nat Neurosci*, 2001, 4: 579-586.
- [10] Trinei M, Giorgio M, Cicalese A, Barozzi S, Ventura A, Migliaccio E, et al. A p53-p66Shc signalling pathway controls intracellular redox status, levels of oxidation-damaged DNA and oxidative stress-induced apoptosis [J]. *Oncogene*, 2002, 21: 3872-3878.
- [11] Sone K, Mori M, Mori N. Selective upregulation of p66-Shc gene expression in the liver and brain of aged rats [J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2012, 55: 744-748.
- [12] De Falco V, Guarino V, Malorni L, Cirafici A M, Troglio F, Erreni M, et al. RAI (ShcC/N-Shc)-dependent recruitment of GAB 1 to RET oncoproteins potentiates PI-3-K signalling in thyroid tumors [J]. *Oncogene*, 2005, 24: 6303-6313.
- [13] Veeramani S, Yuan T C, Lin F F, Lin M F. Mitochondrial redox signaling by p66Shc is involved in regulating androgenic growth stimulation of human prostate cancer cells [J]. *Oncogene*, 2008, 27: 5057-5068.
- [14] Veeramani S, Chou Y W, Lin F C, Muniyan S, Lin F F, Kumar S, et al. Reactive oxygen species induced by p66Shc longevity protein mediate nongenomic androgen action via tyrosine phosphorylation signaling to enhance tumorigenicity of prostate cancer cells [J]. *Free Radic Biol Med*, 2012, 53: 95-108.

[本文编辑] 孙岩