

肿瘤防治研究

Cancer Research on Prevention and Treatment

ENO3在肝癌中的表达及其对奥沙利铂化疗敏感度的影响

崔红磊, 张笑丹, 郭丹凤, 闫志平, 郭文治, 张水军

引用本文:

崔红磊,张笑丹,郭丹凤,闫志平,郭文治,张水军. ENO3在肝癌中的表达及其对奥沙利铂化疗敏感度的影响[J]. 肿瘤防治研究, 2022, 49(5): 438–443.

CUI Honglei,ZHANG Xiaodan,GUO Danfeng,YAN Zhiping,GUO Wenzhi,ZHANG Shuijun. Expression of ENO3 and Its Effect on Sensitivity of Hepatocellular Carcinoma Cells to Oxaliplatin[J]. *Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu*, 2022, 49(5): 438–443.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2022.21.1020>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

Cyclin G1对肝癌细胞HepG2放射敏感度的影响及其机制

Effect of Cyclin G1 on Radiosensitivity of Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells and Its Mechanism

肿瘤防治研究. 2017, 44(9): 590–595 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0039>

芦丁联合奥沙利铂激活FKN/SYK/p38通路促进胃癌细胞凋亡

Effect of Rutin Combined with Oxaliplatin on Activation of FKN/SYK/p38 Pathway to Promote Apoptosis of Gastric Cancer Cells

肿瘤防治研究. 2017, 44(11): 719–723 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2017.17.0603>

TEC酪氨酸蛋白激酶在肝癌组织中高表达并参与肝癌耐药

TEC Expresses Highly in Hepatocellular Carcinoma and Is Involved in Drug Resistance

肿瘤防治研究. 2018, 45(09): 660–665 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.18.0107>

敲低EN2诱导肝癌细胞凋亡并提高PTEN蛋白的表达

Knockdown of EN2 Induces Apoptosis and Enhances PTEN Protein Expression in Hepatocellular Carcinoma Cells

肿瘤防治研究. 2019, 46(04): 316–321 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2019.18.1295>

下调MLLT3/AF9基因对肝癌SMMC-7721细胞增殖与侵袭能力的影响

Effect of Down-regulation of MLLT3/AF9 Expression on Proliferation and Invasion Abilities of Hepatoma SMMC-7721 Cells

肿瘤防治研究. 2018, 45(05): 300–305 <https://doi.org/10.3971/j.issn.1000-8578.2018.17.1569>



杂志官网



微信公众号

ENO3在肝癌中的表达及其对奥沙利铂化疗敏感度的影响

崔红磊¹, 张笑丹², 郭丹凤², 闫志平², 郭文治¹, 张水军¹

Expression of ENO3 and Its Effect on Sensitivity of Hepatocellular Carcinoma Cells to Oxaliplatin

CUI Honglei¹, ZHANG Xiaodan², GUO Danfeng², YAN Zhiping², GUO Wenzhi¹, ZHANG Shuijun¹

1. Department of Hepatobiliary and Pancreatic Surgery, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China; 2. Henan Engineering Technology Research Center of Organ Transplantation, Zhengzhou 450052, China

Corresponding Author: ZHANG Shuijun, E-mail: zhangshuijun@zzu.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the expression of ENO3 gene in hepatocellular carcinoma and its effect on the sensitivity of hepatocellular carcinoma cell lines to OXA, and to explore the possible mechanism.

Methods qRT-PCR and immunohistochemical analysis were used to detect the expression of ENO3 in 48 pairs of hepatocellular carcinoma tissues and normal liver tissues. Overexpression plasmid was constructed and transfected into MHCC97H and HepG2 cells. The experiments were divided into empty group (Vector group), ENO3 overexpression group (ENO3 group), empty+OXA group (Vector+OXA group) and ENO3 overexpression+OXA group (ENO3+OXA group). The proliferation ability of MHCC97H and HepG2 cells were detected by CCK-8 assay and cell colony formation assay. The apoptosis rate was determined by flow cytometry assay. Protein expressions of Bcl-2, Bax and Caspase-3 were detected by Western blot assay. **Results** The expression of ENO3 was significantly decreased in hepatocellular carcinoma tissues, compared with normal liver tissues adjacent to the carcinoma. The expression of ENO3 gene in the ENO3 overexpression group was significantly higher than that in the empty group. Compared with the Vector+OXA group, cell viability was decreased, apoptosis rate was increased, Bcl-2 protein expression was decreased, Bax and Caspase-3 protein expression were increased in the ENO3+OXA group. **Conclusion** The expression of ENO3 is down-regulated in hepatocellular carcinoma tissues, and the overexpression of ENO3 can enhance the sensitivity of hepatocellular carcinoma cell lines to oxaliplatin by promoting cell apoptosis.

Key words: ENO3; Oxaliplatin; Hepatocellular carcinoma; Apoptosis

Funding: National Natural Science Foundation of China (No. 81901571); China Postdoctoral Science Foundation (No. 2020M672265); Henan Provincial Medical Science and Technology Research Plan (No. SBGJ2018002)

Competing interests: The authors declare that they have no competing interests.

摘要: 目的 研究ENO3基因在肝癌中的表达及其是否可能影响肝癌细胞对奥沙利铂的敏感度并探讨可能机制。**方法** qRT-PCR、免疫组织化学法检测48例肝细胞肝癌组织和正常肝组织中ENO3的表达。构建ENO3过表达质粒, 转染MHCC97H细胞和HepG2细胞; 实验分为空载组(Vector组)、ENO3过表达组(ENO3组)、空载+OXA组(Vector+OXA组)和ENO3过表达+OXA组(ENO3+OXA组)。CCK-8法、克隆形成法检测细胞增殖能力, 流式细胞术检测细胞凋亡率; Western blot法检测细胞中凋亡相关蛋白Bcl-2、Bax和Caspase-3的表达水平。**结果** 肝癌组织中ENO3的表达量明显低于正常肝组织。ENO3过表达组细胞ENO3的mRNA水平与蛋白水平较空载组均明显升高。过表达ENO3联合奥沙利铂后, 与空载+OXA组

相比, ENO3过表达+OXA组细胞活力降低、凋亡增加; Bcl-2蛋白表达减少, Bax、Caspase-3蛋白表达增加。**结论** ENO3在肝癌组织中表达下降, 过表达ENO3可通过促进凋亡增强肝癌细胞对奥沙利铂的敏感度。

关键词: 烯醇化酶-3; 奥沙利铂; 肝癌; 凋亡

中图分类号: R735.7

开放科学(资源服务)

标识码(OSID):



收稿日期: 2021-09-10; 修回日期: 2021-12-30

基金项目: 国家自然科学基金青年项目(81901571); 中国博士后科学基金面上项目(2020M672265); 河南省卫生健康委医学科攻关计划省部共建项目(SBGJ2018002)

作者单位: 1. 450052 郑州, 郑州大学第一附属医院肝胆胰外科; 2. 450052 郑州, 河南省器官移植研究中心

通信作者: 张水军(1958-), 男, 博士, 主任医师, 教授, 主要从事肝脏肿瘤和肝脏移植的研究, E-mail: zhangshuijun@zzu.edu.cn

作者简介: 崔红磊(1994-), 男, 硕士在读, 主要从事肝脏肿瘤和肝脏损伤研究

0 引言

原发性肝癌是目前我国第四位常见的恶性肿瘤及第二位肿瘤致死病因,肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)约占原发性肝癌总数的90%^[1]。由于起病隐匿且生长迅速,大部分肝癌患者确诊时已进展至中晚期,失去了手术切除的机会^[2]。对于这部分患者,药物治疗是其为数不多的选择之一。相比各类分子靶向药物和免疫治疗药物,含奥沙利铂(Oxaliplatin, OXA)的系统化疗方案更经济,且被证实同样有效而被多数晚期HCC患者接受^[3-5]。奥沙利铂可通过与DNA相互作用,阻断DNA复制,引起细胞周期阻滞和细胞死亡;也可通过氧化应激反应生成氧自由基,导致DNA氧化损伤^[6]。肝癌细胞易产生耐药性,是晚期HCC化疗面临的主要问题。靶向分子治疗联合化疗是治疗肿瘤的新思路^[7],寻找可与奥沙利铂协同作用的分子,提高HCC对奥沙利铂的敏感度有重要临床意义。

烯醇化酶(enolase, ENO),在糖酵解代谢途径中发挥催化作用,肌肉特异性烯醇化酶(ENO3)是ENO三种同工酶之一,与糖原代谢、脂质代谢密切相关^[8-9]。ENO3在HCC与激活的肝星状细胞中表达下调^[10-11],预示着其可能与HCC的发生发展有关。ENO3是否影响肝癌细胞对奥沙利铂敏感度的研究尚未见报道。本实验通过过表达ENO3基因,检测奥沙利铂处理后的细胞活力和凋亡率,明确ENO3在肝癌细胞对奥沙利铂敏感度中的作用,探讨其可能的机制,以期为提高HCC对奥沙利铂的敏感度提供新的分子靶点。

1 资料与方法

1.1 资料

收集2019—2020年郑州大学第一附属医院48例患者(其中男29例、女19例;年龄44岁~58岁,平均年龄52.5岁,中位年龄50岁)术后新鲜肝细胞肝癌组织和正常肝组织标本。所有患者术前均未接受任何放化疗等抗肿瘤治疗,患者临床病理信息和随访记录均完整。本试验经郑州大学第一附属医院伦理委员会批准,由患者本人或家属签署知情同意书。MHCC97H与HepG2细胞株来自本实验室留存;胎牛血清购自美国Gibco公司;DMEM高糖培养基、CCK-8试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司;TRIzol总RNA提取试剂盒、逆转录试剂盒购自南京诺唯赞医疗科技有限公司;2x SYBR Green qPCR扩增试剂盒购自美国Bimake生物科技有限公司;奥沙利铂购自美国Selleck生物科技有

限公司;ENO3过表达质粒pcDNA-ENO3及空载质粒pcDNA-con购自江苏PPL质粒与蛋白共享库;LipoMax转染试剂购自南京南晶生物技术有限公司;Annexin V-APC/7-AAD细胞凋亡检测试剂盒购自南京凯基生物技术有限公司;兔抗Bcl-2、Bax及Caspase-3多克隆抗体购自上海泊湾生物科技有限公司;兔抗ENO3多克隆抗体、鼠抗GAPDH单克隆抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 qRT-PCR法检测ENO3 mRNA在肝癌中表达 根据TRIzol试剂盒说明书提取肝癌及正常肝组织中的总RNA,测定RNA浓度及纯度,参照反转录及荧光定量试剂盒说明书将mRNA反转录合成cDNA,然后进行荧光定量PCR反应。ENO3的上游引物序列:5'-TCTGGGGAGACTGAGGACAC-3',下游引物序列:5'-GCCTTCGGGTACGGAACCTT-3';GAPDH上游引物序列:5'-TGATTCCACCCATGGCAAATTC-3',下游引物序列:5'-CATGGTGGTGAAGACGCAG-3'。反应条件:95℃ 10 min预变性,然后95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40个循环。结果按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算ENO3的相对表达量,实验重复3次。

1.2.2 免疫组织化学法检测ENO3蛋白在肝癌中的表达 蜡块包埋的肝癌组织与正常肝组织经切片、制片后,依次用二甲苯脱蜡、浓度梯度乙醇脱水,然后用高压锅煮沸枸橼酸盐溶液进行抗原修复10 min。室温自然冷却后用3%过氧化氢室温孵育20 min,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤3次,加入ENO3抗体(稀释比为1:300),4℃过夜。次日常温孵育二抗1 h, PBS洗涤后用二氨基联苯胺(DAB)显色,苏木精对比染色,脱水透明后中性树胶封片。根据细胞染色强度分为4级:无阳性着色(阴性)计0分,淡黄色(弱阳性)计1分,棕黄色(阳性)计2分,棕褐色(强阳性)计3分;根据阳性细胞百分比分为4级:≤25%计1分, >25%~50%计2分, >50%~75%计3分, >75%计4分。将两项评分相乘得出最终评分结果。

1.2.3 细胞培养和转染 将MHCC97H细胞接种于DMEM高糖细胞培养基(含10%胎牛血清, 100 u/ml青霉素、0.1 mg/ml链霉素),置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。细胞密度达到80%~90%时,加2.5 g/L胰蛋白酶溶液消化,进行传代培养或后续实验。实验分为空载组(Vector组)和ENO3过表达组(ENO3组)。将处于对数生长期的MHCC97H与HepG2细胞接种于6孔板,细胞密度达到约70%时,换液,按说明书将空载质粒和过表达质粒分

别转入空载组和ENO3过表达组细胞。继续培养24 h后,胰酶消化收集各组细胞,提取mRNA及蛋白质,Western blot和qRT-PCR验证转染效果。

1.2.4 ENO3质粒转染对肝癌细胞奥沙利铂药物毒性的影响 转染质粒24 h后,将细胞接种于96孔板,每孔 5×10^3 个细胞。细胞贴壁后换液,Vector组和ENO3组细胞分别加入含奥沙利铂浓度为0、5、10、20、40、60、80 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基,继续培养48 h后,每孔分别加入10 μl CCK-8试剂,细胞培养箱中孵育2 h,于酶标仪450 nm波长处测定吸光度值,根据以下公式计算细胞抑制率。相对抑制率(%)=[1-(实验孔OD值-空白孔OD值)/(对照孔OD值-空白孔OD值)] $\times 100\%$ 。

1.2.5 CCK-8法检测细胞活力 转染质粒24 h后,将细胞接种于96孔板,每孔 5×10^3 个细胞。细胞贴壁后换液,Vector+OXA组和ENO3+OXA组加入奥沙利铂浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基,其余两组加入不含奥沙利铂的培养基。继续培养48 h后,每孔分别加入10 μl CCK-8试剂,细胞培养箱中孵育2 h,于酶标仪450 nm波长处测定细胞吸光度值。每个浓度设4个复孔,实验重复3次。

1.2.6 克隆形成实验检测细胞增殖能力 转染质粒24 h后,将细胞接种于6孔板中,每孔 1×10^3 个细胞。细胞贴壁后换液,Vector+OXA组和ENO3+OXA组加入奥沙利铂浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基,其余两组加入不含奥沙利铂的培养基。继续培养14天后,移除培养基,PBS洗涤3次,4%多聚甲醛室温固定10 min,1%结晶紫染色10 min,PBS洗涤干净后室温晾干,显微镜下计数形成的克隆球数。

1.2.7 流式细胞术检测细胞凋亡 转染质粒24 h后将细胞接种于24孔板中,每孔 1×10^5 个细胞,每组设3个复孔。细胞贴壁后换液,Vector+OXA组和ENO3+OXA组加入含20 $\mu\text{mol/L}$ 奥沙利铂的培养基,其余两组加入不含奥沙利铂的培养基。继续培养48 h后用不含EDTA的胰酶消化、收集各孔细胞。按照Annexin V-APC/7-AAD细胞凋亡检测

试剂盒说明书,每孔细胞依次加入500 μl 结合缓冲液Binding Buffer悬浮细胞,5 μl Annexin V-APC染液,5 μl 7-AAD染液,混匀,室温避光反应15 min,流式细胞术检测细胞凋亡率。

1.2.8 Western blot法检测Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白 转染质粒24 h后,Vector+OXA组和ENO3+OXA组细胞加入奥沙利铂浓度为20 $\mu\text{mol/L}$ 的培养基,其余两组加入不含奥沙利铂的培养基,继续培养48 h。胰酶消化收集各组细胞,离心后除去上清液,加入RIPA细胞裂解液,冰上裂解30 min,然后4 $^{\circ}\text{C}$,12 000 r/min离心10 min得到细胞总蛋白。蛋白定量后,取30 μg 蛋白样品上样,进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,浓缩胶与分离胶浓度均为10%;电泳结束后,将含有目标蛋白的凝胶在300 mA,恒流条件下作用90 min,将蛋白转至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。转膜后,将膜置于5%脱脂奶粉中,室温封闭2 h,TBST洗涤后加入Bcl-2、Bax和Caspase-3抗体,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。次日取出一抗,洗涤后室温避光孵育荧光二抗1 h。利用Odyssey LICOR双色红外激光成像系统检测目标蛋白,并分析条带灰度值。

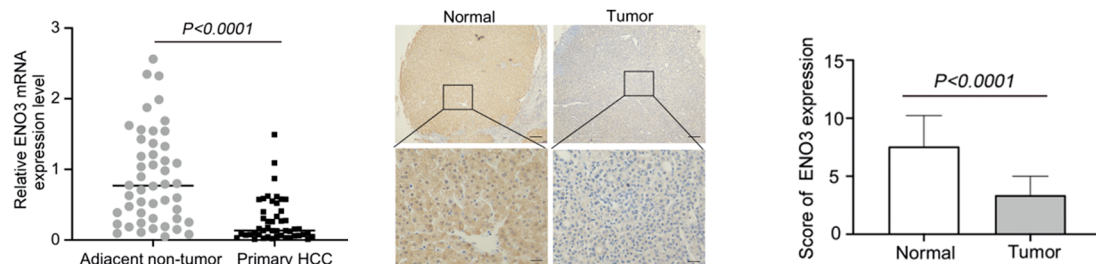
1.3 统计学方法

应用Graphpad prism8.0软件对数据进行统计学处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。肝癌组织和正常肝组织中ENO3表达差异的比较采用配对 t 检验;多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 ENO3在肝癌组织中的表达情况

肝癌组织中ENO3 mRNA相对表达量为 0.270 ± 0.307 ,正常肝组织为 0.885 ± 0.665 ,两组差异有统计学意义($P < 0.0001$);肝癌组织中ENO3蛋白表达为 3.375 ± 1.632 ,正常肝组织为 7.563 ± 2.665 ,两组差异有统计学意义($P < 0.0001$),见图1。



HCC: hepatocellular carcinoma.

图1 肝细胞肝癌组织中ENO3的表达水平

Figure 1 Expression of ENO3 in hepatocellular carcinoma tissues

2.2 ENO3过表达水平的验证

与Vector组相比, ENO3组ENO3 mRNA和蛋白表达水平均明显提高。在MHCC97H细胞中, Vector组mRNA相对表达量为 1.028 ± 0.162 , ENO3组为 9.261 ± 0.855 ; Vector组蛋白相对表达量为 0.361 ± 0.031 , ENO3组为 0.816 ± 0.051 , 二者差异均有统计学意义 (均 $P < 0.0001$) ; HepG2细胞中, Vector组mRNA相对表达量为 0.948 ± 0.126 , ENO3组为 14.540 ± 1.155 ; Vector组细胞蛋白表达量为 0.180 ± 0.033 , ENO3组为 0.720 ± 0.056 , 二者差异均有统计学意义 (均 $P < 0.0001$) , 见图2。

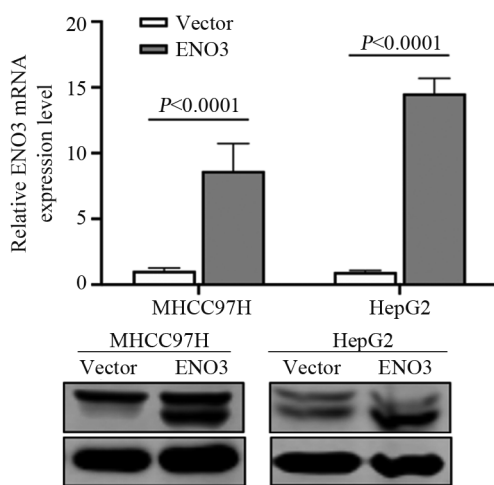


图2 ENO3过表达水平的验证

Figure 2 Verification of ENO3 overexpression

2.3 CCK-8法和克隆形成法检测过表达ENO3联合OXA对肝癌细胞增殖的影响

随奥沙利铂浓度的升高, 两组细胞的抑制率均逐渐升高, 奥沙利铂浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 时, Vector组细胞抑制率为 $(43.81 \pm 1.6) \%$,

ENO3组为 $(58.76 \pm 1.1) \%$, 两组差异最为显著 ($P < 0.0001$) , 见图3A。此浓度既可充分抑制细胞增殖能力, 又不至于完全杀死细胞, 使用此浓度进行后续实验。奥沙利铂分别处理各组细胞48 h后, 两种细胞Vector+OXA组和ENO3+OXA组细胞活力均降低 (均 $P < 0.0001$) 。过表达ENO3联合奥沙利铂时, 在MHCC97H细胞中, Vector+OXA组细胞活力为 $(56.03 \pm 1.21) \%$, ENO3+OXA组为 $(39.91 \pm 1.40) \%$, 与Vector+OXA组相比, ENO3+OXA组细胞活力可进一步下降, 差异有统计学意义 ($P < 0.0001$) 。在HepG2细胞中, Vector+OXA组细胞活力为 $(62.90 \pm 3.43) \%$, ENO3+OXA组为 $(50.69 \pm 2.12) \%$, 差异有统计学意义 ($P = 0.0014$) , 见图3B。克隆形成实验结果显示, 过表达ENO3后, ENO3组细胞较Vector组增殖能力下降; 用奥沙利铂处理后, 细胞生长受到抑制, 无法形成克隆球; 显微镜下观察, 两组细胞均仅有少量细胞增殖, 其中ENO3+OXA组细胞增殖能力弱于Vector+OXA组, 见图3C、3D。

2.4 过表达ENO3联合OXA对肝癌细胞凋亡的影响

单独过表达ENO3时, 与Vector组相比, 两种细胞ENO3组细胞凋亡均无明显变化。奥沙利铂处理48 h后, 在MHCC97H细胞中, Vector+OXA组细胞凋亡率为 $(20.58 \pm 1.46) \%$, ENO3+OXA组细胞凋亡率为 $(27.87 \pm 1.45) \%$, 差异有统计学意义 ($P = 0.0004$) 。在HepG2细胞中, Vector+OXA组细胞凋亡率为 $(5.33 \pm 0.32) \%$, ENO3+OXA组细胞凋亡率为 $(11.07 \pm 0.55) \%$, 差异有统计学意义 ($P < 0.0001$) , 见图4。

2.5 过表达ENO3联合OXA对肝癌细胞Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白表达影响

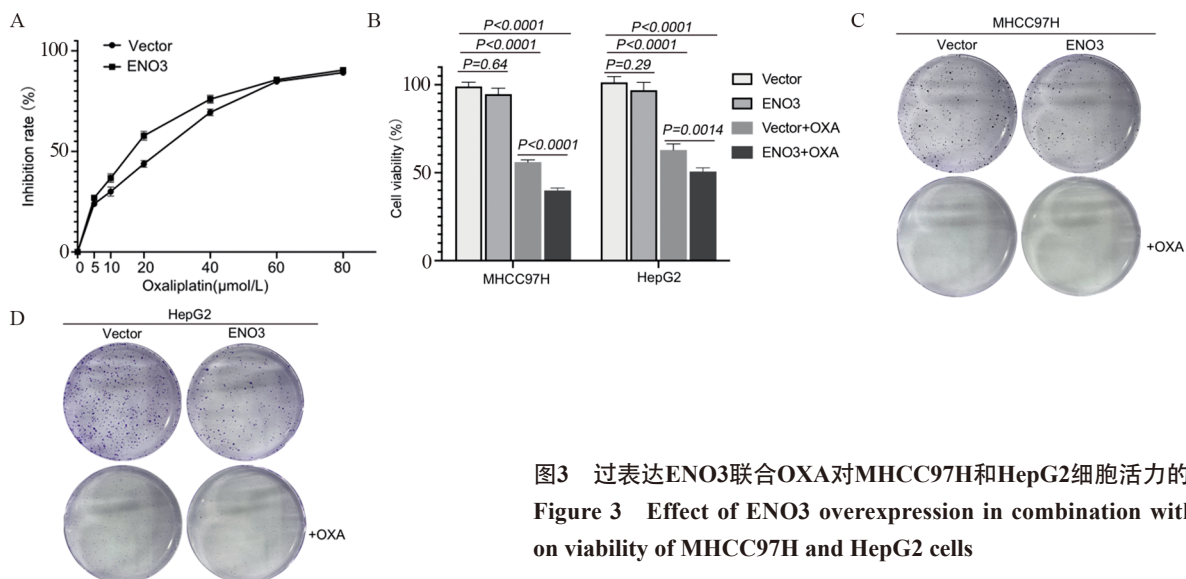


图3 过表达ENO3联合OXA对MHCC97H和HepG2细胞活力的影响

Figure 3 Effect of ENO3 overexpression in combination with OXA on viability of MHCC97H and HepG2 cells

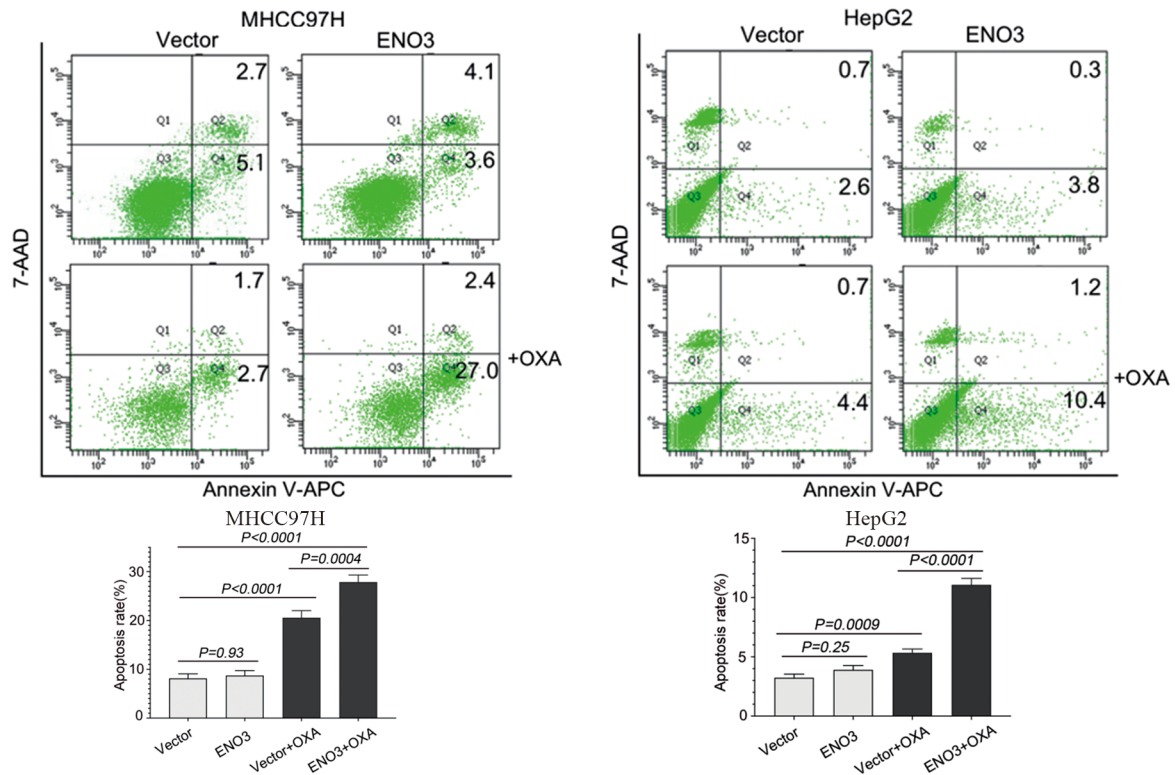


图4 过表达ENO3联合OXA对MHCC97H和HepG2细胞凋亡的影响

Figure 4 Effect of ENO3 overexpression in combination with OXA on apoptosis of MHCC97H and HepG2 cells

奥沙利铂处理后, 两种细胞加药组Bcl-2蛋白表达均降低, Bax和Caspase-3蛋白表达均增高。过表达ENO3联合奥沙利铂时, 与Vector+OXA组相比, ENO3+OXA组细胞Bcl-2蛋白表达进一步降低 (MHCC97H: $P=0.025$; HepG2: $P=0.0008$), 而Bax (MHCC97H: $P=0.0118$; HepG2: $P=0.0433$) 和Caspase-3 (MHCC97H: $P<0.0001$; HepG2: $P=0.0127$) 蛋白表达进一步增高, 见图5。

3 讨论

含奥沙利铂的系统性化疗是临床治疗中晚期HCC的一线方案^[1], 应用奥沙利铂对HCC患者姑息性化疗, 可提高患者的总体生存率^[12]。化疗过程中细胞容易出现耐药, 大大降低了治疗效果^[4]。随着分子生物学技术的发展和运用, 肝癌组织中越来越多的异常表达基因被人们发现可影响肝癌的发生发展以及化疗效果和预后^[10]。

ENO3在正常肝脏组织中表达较高, 可参与糖原代谢和脂质代谢, 其表达缺失可造成糖原代谢障碍^[10]。ENO3在肿瘤中的研究较少, 仅有研究发现其在非小细胞肺癌与结直肠癌中表达上调^[13-14], 而在胰腺癌与肝癌中表达下调^[10, 15]。目前尚未有证据明确ENO3在肿瘤中的作用及其是否可增强化疗药物的杀伤作用。肝星状细胞与肝癌的发生密切相关, 其过度激活可致肝纤维化和肝硬

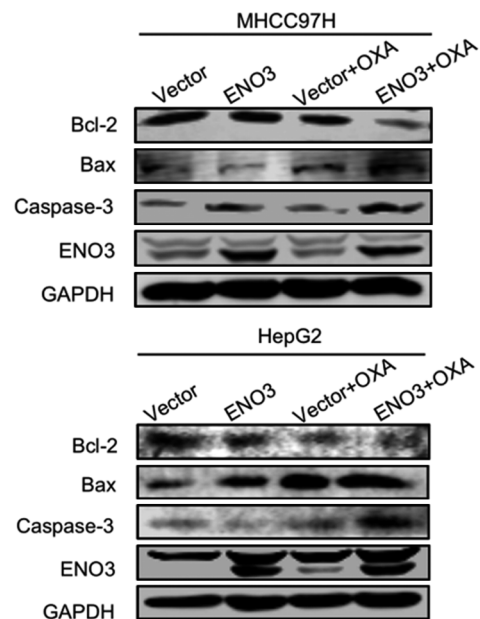


图5 过表达ENO3联合OXA对MHCC97H和HepG2细胞Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白表达的影响

Figure 5 Effect of ENO3 overexpression in combination with OXA on protein expression of Bcl-2, Bax and Caspase-3 in MHCC97H and HepG2 cells

化^[16], ENO3在激活的肝星状细胞与肝癌中表达均下调^[10-11], 预示着其可能在早期肝癌的发生发展中扮演重要角色。

本研究结果显示ENO3在肝细胞肝癌组织中表达下调, 与研究报道一致^[10]。克隆形成实验表

明过表达ENO3后,细胞的增殖能力下降;过表达ENO3联合奥沙利铂,细胞增殖能力可以在过表达的基础上进一步降低,证明了二者有协同作用。我们在MHCC97H和HepG2细胞中分别单独过表达ENO3以及过表达ENO3联合奥沙利铂后检测各组细胞的活力与凋亡率,发现过表达ENO3后,细胞活力与凋亡率变化不明显。然而过表达ENO3联合奥沙利铂后,细胞活力可在单独使用奥沙利铂的基础上进一步下降,凋亡率进一步增加,说明过表达ENO3可以增强肝癌细胞对奥沙利铂的敏感度。

诱导细胞凋亡是奥沙利铂发挥作用的机制之一^[12]。Bcl-2蛋白家族成员在凋亡过程中起关键作用,其家族成员Bax蛋白可从细胞质转移到线粒体膜上,引起线粒体外膜通透性改变,启动caspase级联反应,最终由Caspase-3执行凋亡^[17-18]。Bcl-2作为抗凋亡基因,可抑制Bax蛋白在线粒体膜上形成复合物,减轻细胞凋亡^[18]。本研究结果显示奥沙利铂可以诱导MHCC97H和HepG2细胞凋亡,使细胞Bcl-2蛋白表达减少,Bax和Caspase-3蛋白表达增加。我们发现过表达ENO3后,细胞Bcl-2、Bax和Caspase-3蛋白变化不明显,然而过表达ENO3联合奥沙利铂后,细胞Bcl-2蛋白较奥沙利铂单独作用条件下进一步下降,Bax和Caspase-3蛋白则进一步增加,提示ENO3可能通过下调Bcl-2,上调Bax和Caspase-3来促进凋亡进而增强肝癌细胞对奥沙利铂的敏感度。

综上所述,ENO3在肝癌组织中表达下调,过表达ENO3可以通过促进肝癌细胞凋亡并增强其对奥沙利铂的敏感度。本研究为临床提高HCC对奥沙利铂的敏感度提供了新的分子靶点和理论依据。

参考文献:

- [1] 中华人民共和国国家卫生健康委员会医政医管局. 原发性肝癌诊疗规范(2019年版)[J]. 中华肝脏病杂志, 2020, 28(2): 112-128. [Bureau of Medical Administration, National Health Commission of the People's Republic of China. Guidelines for diagnosis and treatment of primary liver cancer in China (2019 edition)[J]. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2020, 28(2): 112-128.]
- [2] Wang Z, Zhou J, Fan J, *et al.* Oxaliplatin induces apoptosis in hepatocellular carcinoma cells and inhibits tumor growth[J]. Expert Opin Investig Drugs, 2009, 18(11): 1595-1604.
- [3] Chen S, Zhang K, Liu W, *et al.* Hepatic arterial infusion of oxaliplatin plus raltitrexed in patients with intermediate and advanced stage hepatocellular carcinoma: A phase II, single-arm, prospective study[J]. Eur J Cancer, 2020, 134: 90-98.
- [4] 王妍, 谢晓莺, 陈荣新, 等. IL-17RA表达对肝细胞癌(HCC)患者的预后意义及其对HCC细胞株生物学特性的影响[J]. 复旦学报(医学版), 2019, 46(5): 625-630, 636. [Wang Y, Xie XY, Chen RX, *et al.* The prognostic effect of IL-17RA for hepatocellular carcinoma (HCC) patients and its impact on the biological characteristics of HCC cell lines[J]. Fudan Xue Bao(Yi Xue Ban), 2019, 46(5): 625-630, 636.]
- [5] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 原发性肝癌诊疗指南(2022年版)[J]. 肿瘤防治研究, 2022, 49(3): 251-276. [National Health Commission of the People's Republic of China. Standardization for diagnosis and treatment of primary hepatic carcinoma (2022 edition)[J]. Zhong Liu Fang Zhi Yan Jiu, 2022, 49(3): 251-276.]
- [6] Martinez-Balibrea E, Martínez-Cardús A, Ginés A, *et al.* Tumor-Related Molecular Mechanisms of Oxaliplatin Resistance[J]. Mol Cancer Ther, 2015, 14(8): 1767-1776.
- [7] Wei TT, Lin YT, Tang SP, *et al.* Metabolic targeting of HIF-1 α potentiates the therapeutic efficacy of oxaliplatin in colorectal cancer[J]. Oncogene, 2020, 39(2): 414-427.
- [8] Jia X, Zhai T. Integrated Analysis of Multiple Microarray Studies to Identify Novel Gene Signatures in Non-alcoholic Fatty Liver Disease[J]. Front Endocrinol(Lausanne), 2019, 10: 599.
- [9] Tarnopolsky MA. Myopathies Related to Glycogen Metabolism Disorders[J]. Neurotherapeutics, 2018, 15(4): 915-927.
- [10] Liu ZK, Zhang RY, Yong YL, *et al.* Identification of crucial genes based on expression profiles of hepatocellular carcinomas by bioinformatics analysis[J]. Peer J, 2019, 7: e7436.
- [11] Zhong Y, Zhang J, Yu H, *et al.* Characterization and sub-cellular localization of GalNAc-binding proteins isolated from human hepatic stellate cells[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2015, 468(4): 906-912.
- [12] 陈渠发, 陈毅斌, 张锡迎, 等. PBK/TOPK在HCC组织中的表达与HCC对奥沙利铂敏感性的关系研究[J]. 解放军预防医学杂志, 2019, 37(3): 35-37. [Chen QF, Chen YB, Zhang XY, *et al.* The relationship between the expression of PBK/TOPK in HCC tissues and the sensitivity of HCC to oxaliplatin[J]. Jie Fang Jun Yu Fang Yi Xue Za Zhi, 2019, 37(3): 35-37.]
- [13] Park C, Lee Y, Je S, *et al.* Overexpression and Selective Anticancer Efficacy of ENO3 in STK11 Mutant Lung Cancers[J]. Mol Cells, 2019, 42(11): 804-809.
- [14] Pan X, Wu H, Chen G, *et al.* Prognostic Value of Enolase Gene Family in Colon Cancer[J]. Med Sci Monit, 2020, 26: e922980.
- [15] Tan Z, Lei Y, Xu J, *et al.* The value of a metabolic reprogramming-related gene signature for pancreatic adenocarcinoma prognosis prediction[J]. Aging(Albany NY), 2020, 12(23): 24228-24241.
- [16] Huang JL, Fu YP, Gan W, *et al.* Hepatic stellate cells promote the progression of hepatocellular carcinoma through microRNA-1246-ROR α -Wnt/ β -Catenin axis[J]. Cancer Lett, 2020, 476: 140-151.
- [17] Flores-Ronero H, Ros U, Garcia-Saez AJ. Pore formation in regulated cell death[J]. EMBO J, 2020, 39(23): e105753.
- [18] Singh R, Letai A, Sarosie K. Regulation of apoptosis in health and disease: the balancing act of BCL-2 family proteins[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2019, 20(3): 175-193.

[编辑校对: 黄国玲]

作者贡献:

崔红磊: 实施实验、数据分析、论文撰写
张笑丹、郭丹凤、闫志平: 实验设计及写作指导
郭文治: 指导研究设计和论文写作
张水军: 指导研究设计和实施、论文指导