



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.011
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.011
Chinese Journal of General Surgery, 2016, 25(1):68-76.

· 基础研究 ·

IFITM3 在原发性肝癌中的表达及其对 MMP-9 调控效应

吴荣寿¹, 邬林泉¹, 李科浩¹, 李恩亮¹, 冯潜¹, 刘万伟¹, 袁荣发¹, 张惊玲²

(1. 南昌大学第二附属医院 肝胆外科, 江西 南昌 330006; 2. 南昌大学第一附属医院 麻醉科, 江西 南昌 330006)

摘要

目的: 探讨干扰素诱导跨膜蛋白 3 (IFITM3) 在原发性肝癌中的表达及作用。

方法: 用免疫组化与 Western blot 检测 60 例肝癌组织及对应癌旁组织中 IFITM3 以及基质金属蛋白酶 9 (MMP-9) 蛋白的表达; 构建 IFITM3 小干扰 RNA 片段 (psilencer3.1-shIFITM3) 转染肝癌 HepG2 细胞, 用实时荧光定量 PCR 及 Western blot 法、CCK8 法、Transwell 试验和划痕试验分别检测细胞转染后 IFITM3 和 MMP-9 mRNA 及蛋白表达、增殖能力以及侵袭与迁移能力的变化。

结果: 与癌旁组织比较, 肝癌组织中 IFITM3 与 MMP-9 的蛋白的阳性表达率与表达量均明显升高 (81.67% vs. 13.33%; 88.33% vs. 8.33%, 均 $P < 0.05$); psilencer3.1-shIFITM3 转染后, HepG2 细胞 IFITM3 和 MMP-9 的 mRNA 与蛋白表达水平、细胞增殖率均明显降低, 穿膜细胞数明显减少, 划痕融合速率明显减慢。以上定量指标间的差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

结论: 原发性肝癌中 IFITM3 表达增高, 高表达的 IFITM3 可能通过调控 MMP-9 的表达而促进肝癌细胞的增殖、侵袭和迁移。

关键词

癌, 肝细胞; 干扰素诱导跨膜蛋白 3; 基质金属蛋白酶 9

中图分类号: R735.7

IFITM3 expression and its regulatory action over MMP-9 in hepatocellular carcinoma

WU Rongshou¹, WU Linquan¹, LI Kehao¹, LI Enliang¹, FENG Qian¹, LIU Wanwei¹, YUAN Rongfa¹, ZHANG Jingling²

(1. Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, Nanchang University, Nanchang 330006, China)

Abstract

Objective: To investigate the expression of interferon-induced transmembrane protein 3 (IFITM3) in hepatocellular carcinoma (HCC), and its significance.

Methods: The protein expression of IFITM3 along with matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) in 60 specimens of HCC and paired cancer adjacent tissues were determined by immunohistochemical staining and Western blot analysis. IFITM3 small interfering RNA fragments (psilencer3.1-shIFITM3) were constructed and transfected into HCC HepG2 cells, and after transfection, the changes in mRNA and protein expressions of IFITM3 and MMP-9, proliferative capacity, as well as invasion and migration ability of the HepG2 cells were examined by qRT-PCR, Western blot, CCK8 assay, and Transwell and scratch wound-healing assay, respectively.

基金项目: 江西省自然科学基金资助项目 (20151BAB205101)。

收稿日期: 2015-10-06; **修订日期:** 2015-12-08。

作者简介: 吴荣寿, 南昌大学第二附属医院硕士研究生, 主要从事肝胆胰疾病方面的研究。

通信作者: 邬林泉, Email: Wulqnc@163.com

Results: Both positive expression rate and expression level of IFITM3 and MMP-9 protein expressions in HCC tissue were significantly increased compared with cancer adjacent tissue (positive expression rate: 81.67% vs. 13.33%; 88.33% vs. 8.33%, all $P < 0.05$); in HepG2 cells after psilencer3.1-shIFITM3 transfection, both IFITM3 and MMP-9 expression were decreased at either mRNA or protein level, proliferation rate and the number of invaded cells were reduced, and wound closure was significantly delayed. The differences in all quantitative parameters had statistical significance (all $P < 0.05$).

Conclusion: IFITM3 expression is increased in HCC, and the high expressed IFITM3 may promote the proliferation, invasion and migration of HCC cells through regulating MMP-9 expression.

Key words

Carcinoma, Hepatocellular; Interferon-Induced Transmembrane Protein 3; Matrix Metalloproteinase 9

CLC number: R735.7

肝细胞性肝癌(简称肝癌)是世界范围内发病率最高恶性肿瘤之一,每年新发病例约有100万^[1]。它也是我国最常见且恶性程度最高的恶性肿瘤之一^[2]。人类干扰素诱导跨膜蛋白3(IFITM3)属于IFITM基因家族中的一员,该基因家族在免疫细胞信号传导、细胞黏附及干细胞迁移等过程中起重要作用^[3-4]。基质金属蛋白酶9(MMP-9)与肝癌的侵袭转移密切相关。基质金属蛋白酶(MMP)可以通过降解细胞外基质(ECM)的分子物质,调节细胞的黏附性^[5];配合其他酶类降解血管基底膜和血管周围基质,加速癌细胞突破组织,癌旁组织及其他组织侵袭和转移到远处^[6]。近年来,IFITM3在肿瘤中异常表达引起人们关注,在乳腺癌、结直肠癌、神经胶质瘤、黑色素瘤等均发现IFITM3过表达。但是IFITM3在肝癌中的异常表达国内外罕见报道。本研究通过免疫组化方法、Western blot、实时荧光定量PCR、CCK8等方法来检测IFITM3基因在肝癌组织和细胞中的表达情况及其对细胞增殖能力的影响,并探讨IFITM3与MMP-9的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

收集南昌大学第二附属医院2014年3月—2015年3月60例肝癌及对应癌旁组织标本,其中男38例,女22例,年龄43~72岁,平均年龄(55.6 ± 2.8)岁。所有患者术前均未接受任何放化疗。标本收集后立即液氮中保存。标本术后均经病理学检查确诊,标本的采集均由患者本人知情同意并由南昌大学第二附属医院伦理委员会审核通过。

DMEM培养液、胎牛血清和胰酶(Gibco公

司),RNA提取试剂(Invitrogen公司)、RIPA裂解液(普利莱公司),蛋白上样缓冲液、蛋白Marker(长城公司),BCA法蛋白测定试剂盒(碧云天),RNA逆转录试剂盒、GoTaq[®] qPCR Master Mix试剂盒购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司,CCK8检测试剂盒(Sigma公司),兔抗人IFITM3和MMP-9多克隆抗体以及鼠抗人 β -actin单克隆抗体(Proteintech公司),辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或抗鼠IgG(二抗)(康为世纪公司),脂质体Lipfectamine 2000(Invitrogen公司),PCR引物序列由南京金斯瑞生物科技有限公司设计和合成:IFITM3引物序列:上游引物为5'-ACT GTC CAA ACC TTC TTC TCT CC-3',下游引物为5'-TCG CCA ACC ATC TTC CTG TC-3';MMP-9引物序列:上游引物为5'-TTT GAG TCC GGT GGA CGA TG-3',下游引物为5'-TTG TCG GCG ATA GGA AGG G-3';GAPDH引物序列:上游引物为5'-CAG GGC TGC TTT TAA CTC TGG T-3',下游引物为5'-GAT TTT GGA GGG ATC TCG CT-3'。psilencer3.1-shIFITM3质粒由百奥迈科公司设计合成,肝癌HepG2细胞由江西省分子医学重点实验室传代保存。

1.2 方法

1.2.1 免疫组化染色 将收集的原发性肝癌患者的癌组织和癌旁组织在福尔马林中固定后石蜡包埋,制成石蜡切片后置于67℃烘箱中;烘片2h,切片放入3%双氧水室温孵育20min消除过氧化物酶活性,PBS(pH7.4)溶液冲洗3次,切片甩干后加入IFITM3和MMP-9一抗(兔抗),放于湿盒内4℃孵育过夜。PBS(pH7.4)溶液冲洗3次,再加入与一抗相应种属的二抗(HRP标记)覆盖组织,在室温孵育50min,用PBS溶液冲洗3次,切片甩干后滴加新鲜配置DAB显色剂显色,

用自来水充分冲洗后染色,最后常规脱水,透明,封片。判断标准:以细胞质内出现棕黄色颗粒为阳性细胞,每张切片随机观察 5 个视野计算染色强度及阳性细胞率。结合阳性细胞百分比和染色强度两个参数综合评价阳性染色:首先根据阳性细胞数所占细胞百分比分类:0 分未见阳性细胞;1 分 <25% 阳性细胞;2 分 25%~50% 阳性细胞;3 分 51%~75% 阳性细胞;4 分 >75% 阳性细胞。再按染色强度进行分级:0 分无染色评分;1 分弱染色评分;2 分中等强度染色评分;3 分强染色评分。

1.2.2 Western blot 检测 通过 RIPA 裂解液收集癌组织和癌旁组织蛋白,BCA 法检测总蛋白的浓度,各孔加入等量总蛋白进行垂直电泳,转膜,TBS 漂洗,封闭液封闭 2 h, β -actin 作为内对照。加入稀释的兔抗人 IFITM3 和 MMP-9 多克隆抗体以及鼠抗人 β -actin 单克隆抗体,4 °C 孵育过夜,TBST 洗涤后加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔或抗鼠 IgG,室温孵育 1 h,TBST 洗涤后,化学发光法显影。

1.2.3 psilencer3.1-shIFITM3 质粒构建 (1) 构建质粒:根据 IFITM3 基因的 cDNA 全序列,在 ambion、invitrogen 等公司的网站上,利用软件分析设计出最佳的靶序列,同时参考文献上所用的靶序列,将潜在的靶序列和基因组数据库进行比较,排除和其他基因编码序列同源的序列。将选定的靶序列按 psilencer3.1-H1 neo 的载体要求,设计 64 个碱基的模板 DNA 序列(template DNA sequence),交由百奥迈科公司合成并成功构建重组的 psilencer3.1 载体(hs-IFITM3-si-1、hs-IFITM3-si-2、hs-IFITM3-si-3)(表 1),进行 DNA 序列测定。同时设计无义序列重组载体作为阴性对照。(2) 筛选序列:采用脂质体 Lipfectamine 2000 介导将构建的 3 种 psilencer3.1-shIFITM3 及无义序列重组同时转染对数期肝癌 HepG2 细胞,培养 48 h 后提取 HepG2 的蛋白,通过 BCA 法测定蛋白浓度,取等量 25 μ g 蛋白质进行 Western blot 分析,分别检测 3 种 psilencer3.1-shIFITM3 沉默效果,从中选出沉默效果最佳序列。

1.2.4 细胞培养及转染 将 HepG2 在 5%CO₂、37 °C 条件下接种于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中培养,待细胞数量达到 70%~80%,遵照脂质体 Lipofectamine 2000 转染试剂说明,用不含胎牛血清的 DMEM 培养液来进行转染,转染 4~6 h 后,更换至含有 10% 胎牛血清的培养液中继续培

养 24~48 h。期间可相应提取细胞中的总 RNA 和总蛋白,使用逆转录试剂盒将总 RNA 反转录成 cDNA,可用于进行实时荧光定量 PCR 检测,获得的总蛋白可进行 Western blot 检测。

表 1 IFITM3 的 3 种 siRNA 片段
Table 1 Three IFITM3 siRNA fragments

siRNA	序列 (5'-3')	修饰
hs-IFITM3-si-1		
正义链	CUUCUCUCCUGUCAACAGUdTdT	无
反义链	ACUGUUGACAGGAGAGAAGdTdT	
hs-IFITM3-si-2		
正义链	CAUUCAUUAAAGUGCACGUdTdT	无
反义链	ACGUGCACUUUAUUGAAUGdTdT	
hs-IFITM3-si-3		
正义链	CUGAGAACCAUCCAGUAAdTdT	无
反义链	UUACUGGGAUGGUUCUCAGdTdT	

1.2.5 实时荧光定量 PCR 检测转染后 IFITM3 和 MMP-9 的 mRNA 的表达 将沉默序列最佳的 psilencer3.1-shIFITM3 和无义序列重组质粒通过脂质体转染 HepG2 细胞,分成空白对照组、低表达 IFITM3 组和无义序列组 3 组,转染 24 h 后提取 mRNA,紫外分光光度计测定各细胞 RNA 浓度后逆转录成 cDNA,反应条件为 25 °C 10 min,42 °C 30 min,85 °C 5 min。用 BRYT Green 法,以 GAPDH 为内参照,反应体系为 20 μ L: ddH₂O 7 μ L,上下游引物各 0.4 μ L,GoTaq[®] qPCR Master Mix, 2 \times 10 μ L, CXR 100 \times 0.2 μ L, cDNA 2 μ L。用 ABI PRISM 7500 自动荧光 PCR 仪进行荧光定量 PCR 测定 IFITM3 和 MMP-9 的 mRNA 表达水平,反应条件为 95 °C 2 min,95 °C 15 s,60 °C 1 min,共进行 40 个循环,于 75~95 °C 范围内绘制溶解曲线。实验结果以 GAPDH 为内参照,Option 3 软件计算 $\Delta C(t)$ 值 ($2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示目的基因相对表达值,对照组相对表达值为 1)。各组均做 3 个复孔,试验重复 3 次。

1.2.6 CCK8 实验检测 HepG2 细胞增殖情况 将各组转染后 24 h 的 HepG2 细胞悬液在离心管内反复充分打匀,按 2×10^3 个细胞 (100 μ L/孔) 接种到 96 孔培养板,每组设有 4 个复孔,分别于接种后 0、1、2、3、4、5 d 进行 CCK8 检测:每孔加入 CCK8 溶液 10 μ L,在 5%CO₂、37 °C 条件下培养 4 h。测定各孔吸光值 (波长 490 nm)。上述试验重复 3 次。

1.2.7 Transwell 侵袭试验和划痕试验检测细胞侵袭和迁移能力 (1) Transwell 试验:在细胞对数期将 psilencer3.1-shIFITM3 和无义序列重组质粒转

染至 HepG2 细胞中, 培养 24 h 后胰酶消化, 离心管内反复充分打匀, 按 2×10^4 细胞数加入每个 Transwell 小室, 用无血清的培养液在小室上面进行培养后, 24 孔板放置在含 10% 胎牛血清的培养液, 37°C , 5% CO_2 孵育 24 h, 后 10 min 甲醛固定, 0.1% 结晶紫染色, 倒置显微镜下观察细胞, 随机选取 16 个视野, 计数穿过微孔的细胞数。

(2) 划痕试验: 培养细胞至均匀成单层铺满于每孔后进行转染 IFITM3 至 HepG2 细胞中, 24 h 后用 10 μL 枪头进行划痕, 每孔划痕粗细均匀, PBS 清洗细胞, 放置在 10% 胎牛血清的培养液中, 37°C , 5% CO_2 孵育, 在倒置显微镜下拍下 0、24、48 h 后划痕愈合情况。

1.3 统计学处理

统计分析采用 SPSS 19.0 统计软件, 正态分

布、方差齐的测量数据, 以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 用单因素方差分析或重复测量做多组均数间比较, 进一步两两比较用 LSD-*t* 检验, 百分数的比较采用 *r* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测 IFITM3、MMP-9 表达

结果显示, 肝癌组织中 IFITM3 蛋白表达阳性率为 81.67% (49/60), 而癌旁组织中阳性率仅为 13.33% (8/60), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。MMP-9 蛋白在肝癌组织中阳性率为 88.33% (53/60), 而在癌旁组织中阳性率为 8.33% (5/60), 差异有统计学意义 ($P < 0.05$) (图 1)。

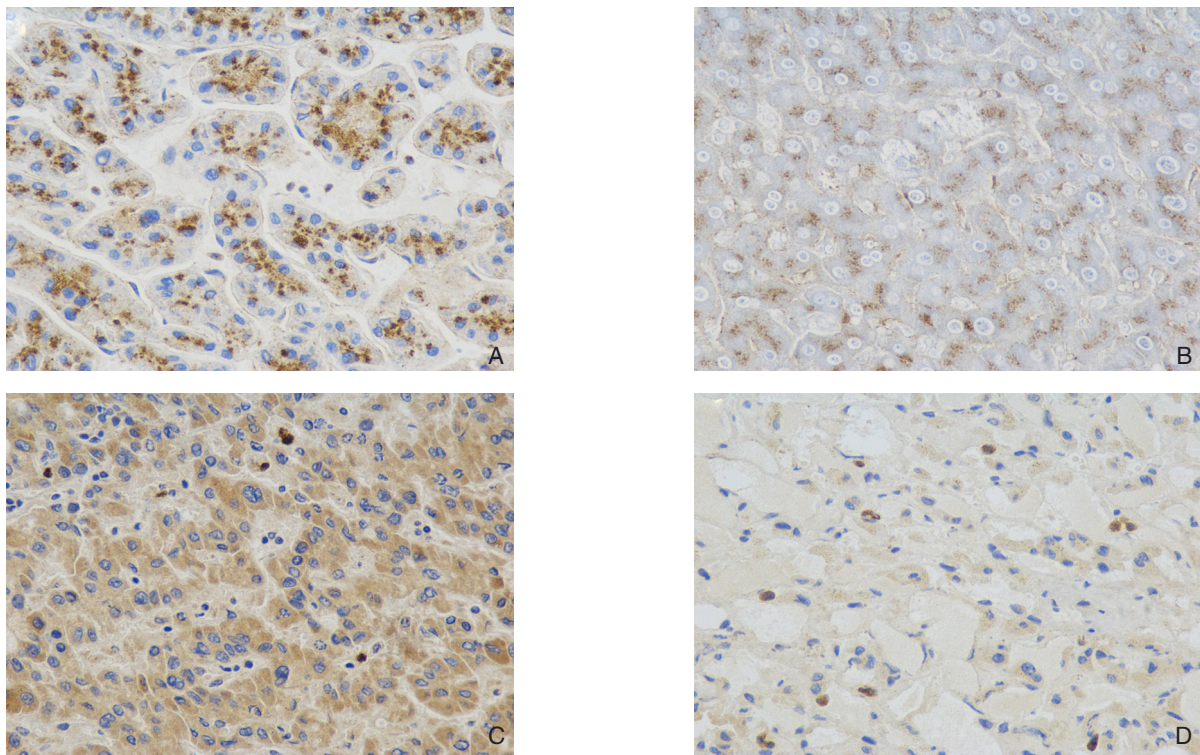


图 1 免疫组化检测结果 ($\times 400$) A: 肝癌组织 IFITM3 的表达; B: 癌旁组织 IFITM3 的表达; C: 肝癌组织 MMP-9 的表达; D: 癌旁组织 MMP-9 的表达

Figure 1 Results of immunohistochemical staining ($\times 400$) A: IFITM3 expression in HCC tissue; B: IFITM3 expression in cancer adjacent tissue; C: MMP-9 expression in HCC tissue; D: MMP-9 expression in cancer adjacent tissue

2.2 肝癌组织与癌旁组织中 IFITM3、MMP-9 蛋白的表达

Western blot 检测 60 例肝癌患者肝癌组织和癌旁组织中 IFITM3、MMP-9 蛋白表达情况发现, 肝癌组织中 IFITM3、MMP-9 蛋白表达明显高于对应癌旁组织 (图 2)。

2.3 沉默效果最佳序列

将 3 种 psilencer3.1-shIFITM3 片段对肝癌 HepG2 细胞进行转染, 48 h 后提取蛋白并进行 Western blot 检测 IFITM3 蛋白表达, 结果筛选出 hs-IFITM3-si-2 为沉默效果最佳序列 (图 3)。

2.4 转染后 HepG2 细胞 IFITM3、MMP-9 的 mRNA 与蛋白的表达

实时荧光定量PCR检测IFITM3的mRNA结果显示，空白对照组、无义序列组、IFITM3 siRNA组的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分别为 1.00 ± 0.00 、 0.96 ± 0.07 、 0.32 ± 0.04 ，差异具有统计学意义 ($F=251.589$, $P=0.000$)；IFITM3 siRNA组IFITM3的mRNA表达量较空白对照组和无义序列组比较明显降低 (均 $P<0.05$)，而空白对照组、无义序列组之间差异无统计学意义 ($P>0.05$)；MMP-9的mRNA在空白对照组、无义序列组、IFITM3 siRNA组中的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 分别为 1.00 ± 0.00 、 0.98 ± 0.04 、 0.18 ± 0.06 ，差异有统计学意义 ($F=253.685$, $P=0.000$)；IFITM3 siRNA组与空白对照组和无义序列组比较也明显降低 ($P<0.05$)。Western blot结果显示，IFITM3 siRNA组的IFITM3和MMP-9蛋白表达量较空白对照组和无义序列组比较均明显

降低 (均 $P<0.05$) (图4)。

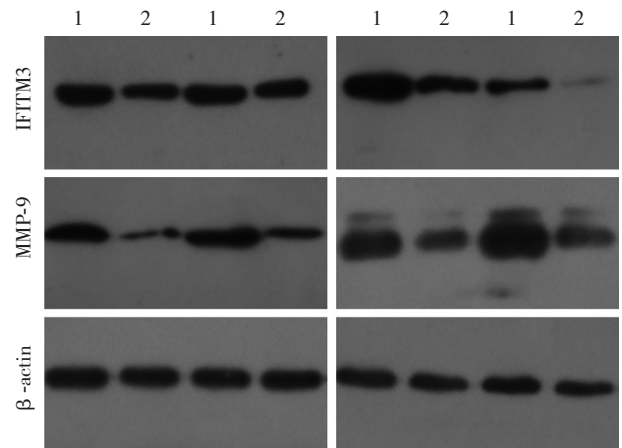


图2 Western blot 检测 IFITM3、MMP-9 蛋白的表达

1: 肝癌组织; 2: 癌旁组织

Figure 2 Western blot analysis for IFITM3 and MMP-9 protein expressions 1: HCC tissue; 2: Cancer adjacent tissue

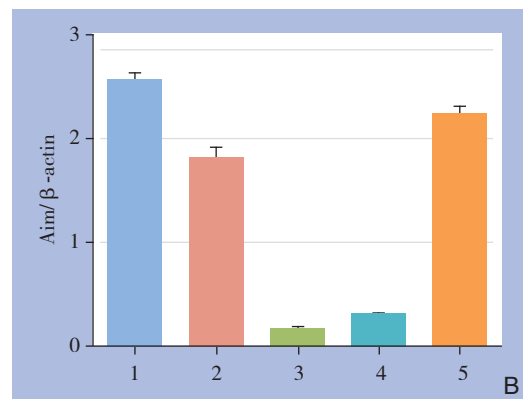
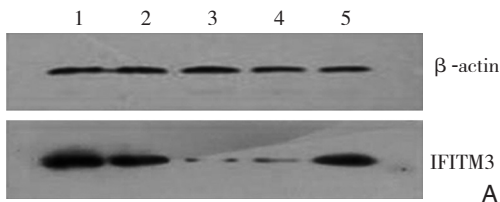


图3 psilencer3.1-shIFITM3 最佳序列筛选 A: Western blot 检测转染后 IFITM3 蛋白表达; B: 灰度值比较 1: 无转染组; 2: hs-IFITM3-si-1 转染组; 3: hs-IFITM3-si-2 转染组; 4: hs-IFITM3-si-3 转染组; 5: 空载体转染组

Figure 3 Selection of the best silent fragment for IFITM3 silencing A: Western blot analysis for of IFITM3 protein expression in HepG2 cells after transfection; B: Comparison of the gray-scale values 1: Non-transfection group; 2: hs-IFITM3-si-1 transfection group; 3: hs-IFITM3-si-2 transfection group; 4: hs-IFITM3-si-3 transfection group; 5: Empty vector transfection group

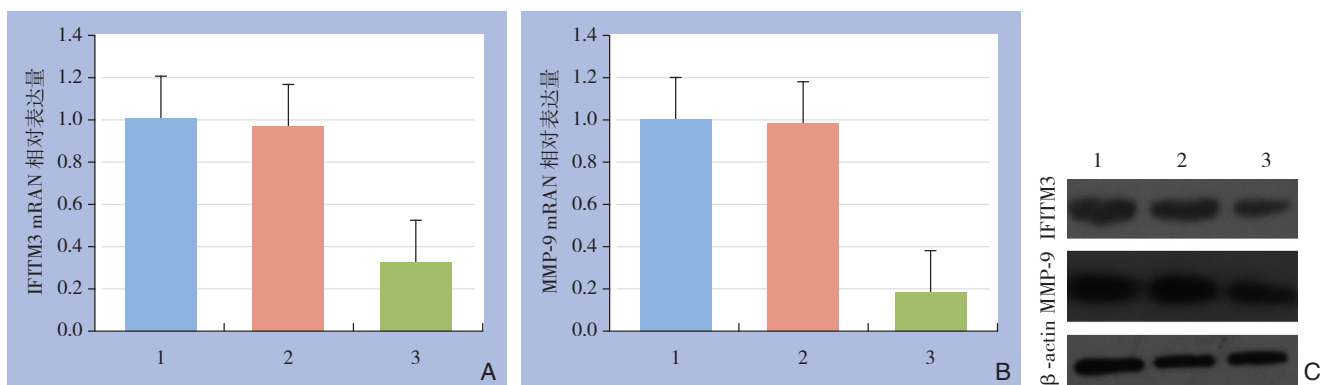


图4 转染后 HepG2 细胞中 IFITM3 和 MMP-9 表达 A: IFITM3 mRNA 表达; B: MMP-9 mRNA 表达; C: IFITM3、MMP-9 的蛋白表达 1: 空白对照组; 2: 无义序列组; 3: IFITM3 siRNA 组

Figure 4 IFITM3 and MMP-9 expressions in HepG2 cells after transfection A: IFITM3 mRNA expression; B: MMP-9 mRNA expression; C: IFITM3 and MMP-9 protein expressions 1: Blank control group; 2: Scrambled siRNA group; 3: IFITM3 siRNA group

2.5 CCK8 检测细胞增值情况

CCK8检测结果显示, IFITM3 siRNA组细胞存活率明显低于无义序列组和空白对照组, 差异具有统计学意义(1 d: $F=23.518, P=0.001$; 2 d: $F=109.675, P=0.000$; 3 d: $F=116.278, P=0.000$; 4 d: $F=157.658, P=0.000$; 5 d: $F=211.865, P=0.000$); 而无义序列组和对照组无统计学差异 ($P>0.05$) (图5)。

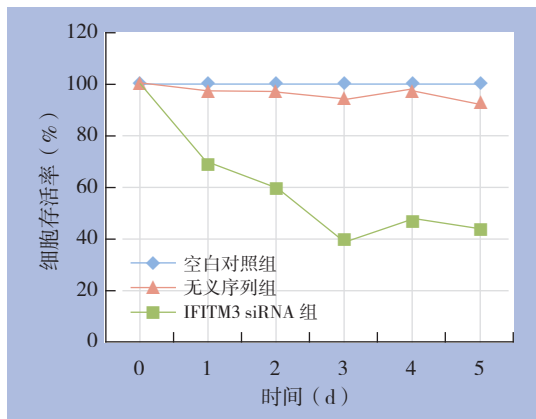


图5 CCK8 检测转染后细胞增殖能力

Figure 5 Cell proliferation detection after transfection by CCK8 assay

2.6 Transwell 侵袭试验与划痕试验结果

Transwell侵袭试验结果显示, IFITM3 siRNA组较无义序列组和空白对照组穿膜细胞数明显减少, 差异有统计学意义(均 $P<0.05$) (表2)。细胞划痕试验结果显示, IFITM3 siRNA组48 h细胞的划痕融合速率比空白对照组明显减慢(图6)。

表2 Transwell 试验检测转染后细胞侵袭能力

Table 2 Cell invasion ability after transfection detected by Transwell assay

组别	穿膜细胞数(个)
空白对照组	$170.1 \pm 7.6^{1)}$
无义序列组	$164.2 \pm 5.8^{1)}$
IFITM3 siRNA 组	92.0 ± 3.5
F	83.236
P	0.00

注: 1) 与 IFITM3 siRNA 组比较, $P<0.05$
Note: 1) $P<0.05$ vs. IFITM3 siRNA group

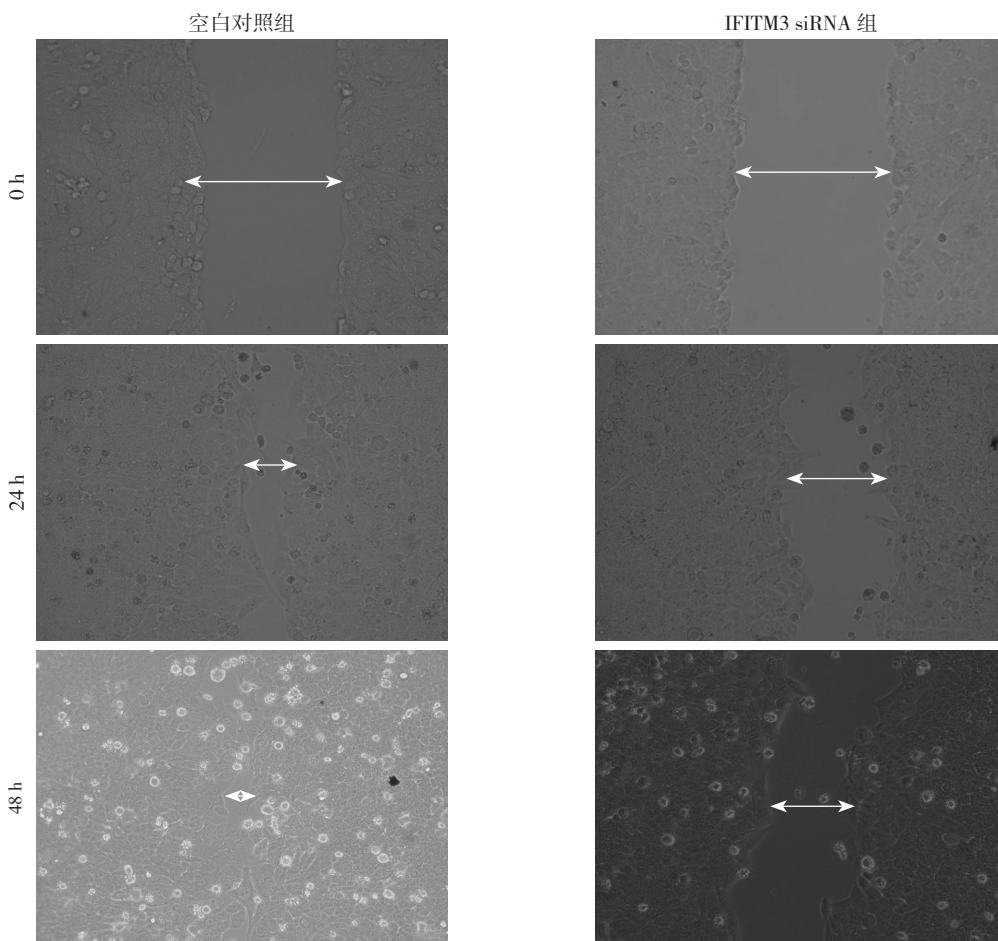


图6 划痕试验结果 (×200)

Figure 6 Results of scratch wound healing assay (×200)

3 讨论

原发性肝癌是我国最常见且恶性程度最高的恶性肿瘤之一，发病率和病死率均占癌症中第二位。虽然目前肝癌早期诊断提高及治疗手段多样化，但不少肝癌患者在治疗过程中或治疗后不久就发生了肝内转移或远处转移，能手术切除的肝癌患者，术后5年复发率也高达60%，因此肝癌的侵袭和转移是决定患者预后和导致患者死亡的主要原因^[7-8]。

肿瘤侵袭转移的发生发展是一个多步骤、多阶段、多基因参与的复杂过程，且每一个过程受多个基因或蛋白精确调控。肝癌的侵袭和转移涉及多种信号通路如JAK/STAT，PI3K/Akt^[9]，WNT/ β -catenin^[10]，NF- κ B^[11]等，涉及到多种黏附分子^[12]、基质金属蛋白酶、细胞因子及其所参与的信号传导、癌基因和抑癌基因的表达和调控的改变。

IFITM3位于人染色体11p5.5，碱基长度约1.5 kb，在5'启动子/增强子区含有干扰素刺激反应元（interferon-stimulable response elements, RSRE），可以被I型（IFN- α /IFN- β ）和II型（IFN- γ ）干扰素诱导，编码干扰素诱导的跨膜蛋白3^[13]。IFITM3编码蛋白分子量约14 kD，由133个氨基酸构成^[14]，参与调节原始生殖细胞的迁移、丙型肝炎病毒（HCV）感染及内胚层定位，介导调节内皮细胞、白细胞的黏附和凋亡等生物学过程^[15-17]。除了上述生物学作用外，IFITM3基因在肿瘤中的作用日益受到重视。研究^[18]发现IFITM3基因在结肠癌组织中的表达明显高于正常结肠组织，在转移性淋巴结中的表达明显高于癌组织和正常结肠组织。下调IFITM3表达可以明显抑制结肠癌的增殖、迁移和侵袭，抑制动物模型中肿瘤的生长和转移，在mRNA和蛋白水平上都明显下调。IFITM3不仅在结肠癌中表现为侵袭基因，在乳腺癌、神经胶质瘤、黑色素瘤、胃癌、宫颈癌等多数肿瘤中也高表达，并与肿瘤的病理分化程度呈正相关，同时参与肿瘤发生、发展及扩散、转移过程^[19-22]。然而IFITM3在肝癌中的异常表达国内外罕见报道，是否也参与肝癌的发生发展以及侵袭转移？这是本实验要研究的主要内容之一。

ECM的破坏是肿瘤细胞侵袭和转移的关键过程。MMP-9被认为是肿瘤侵袭和转移的一个

重要分子标记，而且抑制其表达会有效地抑制肿瘤的侵袭和转移^[23]。研究^[24]表明MMP-9在肝癌组织中表达明显高于癌旁组织和正常肝组织，并与肿瘤体积分化程度、淋巴结转移、脉管浸润、被膜侵犯和增殖组核抗原的表达密切相关^[25]。所以MMP-9在肝细胞癌侵袭和转移中的作用已得到广泛的认可。

本研究通过运用免疫组织化学方法及Western blot检测肝癌及癌旁组织中IFITM3和MMP-9蛋白表达情况，结果发现和癌旁组织比较，IFITM3和MMP-9在肝癌组织中均过表达，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），提示IFITM3和MMP-9高表达与肝癌的发生、发展有关。下调IFITM3表达后，运用实时荧光定量PCR和Western blot检测结果发现IFITM3的mRNA及蛋白的表达均明显降低，而且MMP-9 mRNA及蛋白表达量随着IFITM3表达的降低而明显降低，差异具有统计学意义（ $P < 0.05$ ），提示IFITM3与MMP-9在肝癌中存在正相关性，即沉默IFITM3可以抑制MMP-9的表达。本研究结果还发现低表达IFITM3后，肝癌细胞HepG2的增殖能力明显下降，肝癌细胞的侵袭和迁移能力也明显下降，提示IFITM3可能通过调控MMP-9的表达来影响肝癌细胞的侵袭和迁移能力。

IFITM3如何通过调控MMP-9的表达来影响肝癌细胞的侵袭和迁移能力的具体分子生物机制尚不清楚。研究^[26]表明，抑制IFITM3可以通过影响骨桥蛋白（OPN）mRNA的稳定性来降低OPN的表达，OPN是一种具有多种功能的分泌性磷酸化糖蛋白，可促进细胞的黏附和迁移，被认为是恶性转化的分泌性蛋白，而OPN在肝癌中高表达，沉默OPN基因对肝癌侵袭转移具有抑制作用^[27-28]。OPN可以激活JAK/STAT3通路影响肿瘤进展，STAT3可以促进类似MMP-9、MMP2这样的基因发挥促进肝癌侵袭作用^[29]。所以推测IFITM3可能通过JAK/STAT3通路调控MMP-9影响肝癌细胞增殖和侵袭。

综上所述，本研究首次证实了IFITM3在原发性肝癌中呈高表达，并与肿瘤细胞的增殖能力有关，下调IFITM3表达可引起细胞增殖减弱，同时引起MMP-9表达下降，进而抑制肝癌细胞的侵袭和迁移能力。深入探究肝癌细胞中IFITM3调控MMP-9的具体分子生物机制，将可能为原发性肝癌基因治疗提供有效的靶点和途径。

参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, et al. Global cancer statistics, 2012[J]. *CA Cancer J Clin*, 2015, 65(2):87-108.
- [2] Gory I, Fink M, Bell S, et al. Radiofrequency ablation versus resection for the treatment of early stage hepatocellular carcinoma: a multicenter Australian study[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2015, 50(5):567-576.
- [3] Chutiwitoonchai N, Hiyoshi M, Hiyoshi-Yoshidomi Y, et al. Characteristics of IFITM, the newly identified IFN-inducible anti-HIV-1 family proteins[J]. *Microbes Infect*, 2013, 15(4):280-290.
- [4] Diamond MS, Farzan M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins[J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(1):46-57.
- [5] Tummalapalli P, Spomar D, Gondi CS, et al. RNAi-mediated abrogation of cathepsin B and MMP-9 gene expression in a malignant meningioma cell line leads to decreased tumor growth, invasion and angiogenesis[J]. *Int J Oncol*, 2007, 31(5):1039-1050.
- [6] 徐靖, 易炜, 万百顺, 等. MMP-2和MMP-9在肝内胆管细胞癌组织中的表达及意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(8):1107-1111. Xu J, Yi W, Wan BS, et al. MMP-2 and MMP-9 expressions in intrahepatic cholangiocarcinoma tissue and the significance[J]. *Chinese Journal of General Surg*, 2015, 24(8):1107-1111.
- [7] Wong DJ, Liu H, Ridky TW, et al. Module map of stem cell genes guides creation of epithelial cancer stem cells[J]. *Cell Stem Cell*, 2008, 2(4):333-344.
- [8] 邱志东, 罗芳兰, 舒洋, 等. 二氢杨梅素对肝癌细胞黏附、侵袭及迁移的抑制作用及机制[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(9):1263-1268. Qiu ZD, Luo FL, Shu Y, et al. Inhibitory effect of dihydromyricetin on adhesion, invasion and migration in hepatocellular carcinoma cells and the mechanism[J]. *Chinese Journal of General Surg*, 2015, 24(9):1263-1268.
- [9] Saxena NK, Sharma D, Ding X, et al. Concomitant activation of the JAK/STAT, PI3K/AKT, and ERK signaling is involved in leptin-mediated promotion of invasion and migration of hepatocellular carcinoma cells[J]. *Cancer Res*, 2007, 67(6):2497-2507.
- [10] Yuan R, Wang K, Hu J, et al. Ubiquitin-like protein FAT10 promotes the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by modifying β -catenin degradation[J]. *Cancer Research*, 2014, 74(18):5287-5300.
- [11] Wang YH, Dong YY, Wang WM, et al. Vascular endothelial cells facilitated HCC invasion and metastasis through the Akt and NF-kappaB pathways induced by paracrine cytokines[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2013, 32(1):51.
- [12] Zhou ZJ, Dai Z, Zhou SL, et al. Overexpression of HnRNP A1 promotes tumor invasion through regulating CD44v6 and indicates poor prognosis for hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Cancer*, 2013, 132(5):1080-1089.
- [13] Bailey CC, Kondur HR, Huang IC, et al. Interferon-induced transmembrane protein 3 is a type II transmembrane protein[J]. *J Biol Chem*, 2013, 288(45):32184-32193.
- [14] Andreu P, Colnot S, Godard C, et al. Identification of the IFITM family as a new molecular marker in human colorectal tumors[J]. *Cancer Res*, 2006, 66(4):1949-1955.
- [15] Shen C, Wu XR, Jiao WW, et al. A functional promoter polymorphism of IFITM3 is associated with susceptibility to pediatric tuberculosis in Han Chinese population[J]. *PLoS One*, 2013, 8(7):e67816. doi: 10.1371/journal.pone.0067816.
- [16] Bailey CC, Zhong G, Huang IC, et al. IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense[J]. *Annu Rev Virol*, 2014, 1:261-283.
- [17] Wakim LM, Gupta N, Mintern JD, et al. Enhanced survival of lung tissue-resident memory CD8(+) T cells during infection with influenza virus due to selective expression of IFITM3[J]. *Nat Immunol*, 2013, 14(3):238-245.
- [18] Li D, Peng Z, Tang H, et al. KLF4-mediated negative regulation of IFITM3 expression plays a critical role in colon cancer pathogenesis[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(11):3558-3568.
- [19] Yang M, Gao H, Chen P, et al. Knockdown of interferon-induced transmembrane protein 3 expression suppresses breast cancer cell growth and colony formation and affects the cell cycle[J]. *Oncol Rep*, 2013, 30(1):171-178.
- [20] Wu F, Dassopoulos T, Cope L, et al. Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive pathogenesis[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2007, 13(7):807-821.
- [21] Zhao B, Wang H, Zong G, et al. The role of IFITM3 in the growth and migration of human glioma cells[J]. *BMC Neurol*, 2013, 13: 210. doi: 10.1186/1471-2377-13-210.
- [22] Scott R, Siegrist F, Foser S, et al. Interferon-alpha induces reversible DNA demethylation of the interferon-induced transmembrane protein-3 core promoter in human melanoma cells[J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31(8):601-608.
- [23] Dilly M, Hambruch N, Haeger J D, et al. Epidermal growth factor (EGF) induces motility and upregulates MMP-9 and TIMP-1 in bovine trophoblast cells[J]. *Mol Reprod Dev*, 2010, 77(7):622-629.
- [24] Chen R, Cui J, Xu C, et al. The significance of MMP-9 over MMP-2 in HCC invasiveness and recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection[J]. *Ann Surg Oncol*, 2012, 19(Suppl 3):S375-S384.
- [25] 刘敏, 曾霞, 侯恩存, 等. Glypican3、MMP-9和MMP-14在原发性肝癌中的表达与临床意义[J]. *重庆医学*, 2014, 43(2):173-176. Liu M, Zeng X, Hou EC, et al. Expressions and clinical significance of Glypican3, MMP-9 and MMP-14 in primary hepatocellular carcinoma[J]. *Chongqing Medical Journal*, 2014, 43(2):173-176.

- [26] El-Tanani MK, Jin D, Campbell FC, et al. Interferon-induced transmembrane 3 binds osteopontin in vitro: expressed in vivo IFITM3 reduced OPN expression[J]. *Oncogene*, 2010, 29(5):752-762.
- [27] 林帆, 夏金堂, 温敏杰, 等. OPN在不同转移潜能肝癌中的表达及意义的初步研究[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2007, 13(10):675-677.
Lin F, Xia JT, Wen MJ, et al. A preliminary study on expression of OPN in hepatocellular carcinoma with different metastatic potencies and its significance[J]. *Chinese Journal of Hepatobiliary Surgery*, 2007, 13(10):675-677.
- [28] 林帆, 李瑜元, 夏金堂, 等. 骨桥蛋白基因沉默对肝癌侵袭转移的抑制作用[J]. *中华肝脏病杂志*, 2009, 17(6):422-425.
Lin F, Li YY, Xia JT, et al. Interference of osteopontin expression inhibits the invasion and metastasis of human hepatocellular carcinoma cell lines[J]. *Chinese Journal of Hepatology*, 2009, 17(6):422-425.
- [29] Behera R, Kumar V, Lohite K, et al. Activation of JAK2/STAT3 signaling by osteopontin promotes tumor growth in human breast cancer cells[J]. *Carcinogenesis*, 2010, 31(2):192-200.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 吴荣寿, 郭林泉, 李科浩, 等. IFITM3在原发性肝癌中的表达及其对MMP-9调控效应[J]. *中国普通外科杂志*, 2016, 25(1):68-76. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.011

Cite this article as: WU RS, WU LL, LI KH, et al. IFITM3 expression and its regulatory action over MMP-9 in hepatocellular carcinoma[J]. *Chin J Gen Surg*, 2016, 25(1):68-76. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2016.01.011

本刊常用词汇英文缩写表

C-反应蛋白	CRP	甲型肝炎病毒	HAV	心电图	ECG
Toll样受体	TLRs	碱性成纤维细胞转化生长因子	bFGF	心脏监护病房	CCU
氨基末端激酶	JNK	聚合酶链反应	PCR	血管紧张素 II	AngII
白细胞	WBC	抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	ABC法	血管内皮生长因子	VEGF
白细胞介素	IL	辣根过氧化物酶	HRP	血管性血友病因子	vWF
半数抑制浓度	IC ₅₀	链霉抗生物素蛋白-生物素酶复合物法	SABC法	血红蛋白	Hb
变异系数	CV	磷酸盐缓冲液	PBS	血肌酐	SCr
标记的链霉抗生物素蛋白-生物素法	SP法	绿色荧光蛋白	GFP	血尿素氮	BUN
表皮生长因子	EGF	酶联免疫吸附测定	ELISA	血小板	PLT
丙氨酸转氨酶	ALT	美国食品药品监督管理局	FDA	血压	BP
丙二醛	MDA	脑电图	EEG	血氧饱和度	SO ₂
丙型肝炎病毒	HCV	内毒素/脂多糖	LPS	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	NADPH
超氧化物歧化酶	SOD	内皮型一氧化氮合酶	eNOS	严重急性呼吸综合征	SARS
磁共振成像	MRI	内生肌酐清除率	CCr	一氧化氮	NO
极低密度脂蛋白胆固醇	VLDL-C	尿素氮	BUN	一氧化氮合酶	NOS
低密度脂蛋白胆固醇	LDL-C	凝血酶时间	TT	乙二胺四乙酸	EDTA
动脉血二氧化碳分压	PaCO ₂	凝血酶原时间	PT	乙酰胆碱	ACh
动脉血氧分压	PaO ₂	牛血清白蛋白	BSA	乙型肝炎病毒	HBV
二甲亚砜	DMSO	热休克蛋白	HSP	乙型肝炎病毒e抗体	HBeAb
反转录-聚合酶链反应	RT-PCR	人类免疫缺陷病毒	HIV	乙型肝炎病毒e抗原	HBeAg
辅助性T细胞	Th	人绒毛膜促性腺激素	HCG	乙型肝炎病毒表面抗体	HBsAb
肝细胞生长因子	HGF	三磷酸腺苷	ATP	乙型肝炎病毒表面抗原	HBsAg
干扰素	IFN	三酰甘油	TG	乙型肝炎病毒核心抗体	HBeAb
高密度脂蛋白胆固醇	HDL-C	生理氯化钠溶液	NS	乙型肝炎病毒核心抗原	HBeAg
谷胱甘肽	GSH	世界卫生组织	WHO	异硫氰酸荧光素	FLTC
固相pH梯度	IPG	双蒸水	ddH ₂ O	诱导型一氧化氮合酶	iNOS
核糖核酸	RNA	丝裂原活化蛋白激酶	MAPK	原位末端标记法	TUNEL
核因子-κB	NF-κB	四甲基偶氮唑盐微量酶反应	MTT	杂合性缺失	LOH
红细胞	RBC	苏木精-伊红染色	HE	增强化学发光法	ECL
红细胞沉降率	ESR	胎牛血清	FBS	肿瘤坏死因子	TNF
环氧酶-2	COX-2	体质指数	BMI	重症监护病房	ICU
活化部分凝血活酶时间	APTT	天冬氨酸氨基转移酶	AST	转化生长因子	TGF
活性氧	ROS	脱氧核糖核酸	DNA	自然杀伤细胞	NK细胞
获得性免疫缺陷综合征	AIDS	细胞间黏附分子	ICAM	直接胆红素	DBIL
肌酐	Cr	细胞外基质	ECM	总胆固醇	TC
基质金属蛋白酶	MMP	细胞外调节蛋白激酶	ERK	总胆红素	TBIL
计算机X线断层照相技术	CT	纤连蛋白	FN		