

MBL2 作为男性肝癌患者预后标志物的分析与验证

王延峰^{1,2}, 韩嘉奇^{1*}, 张 静¹

摘要 目的 探究甘露糖结合凝集素 2 (MBL2) 基因表达对肝细胞癌 (HCC) 细胞系增殖和预后的影响。方法 采用生物信息学方法分析 MBL2 在不同性别 HCC 患者中的表达及其对 HCC 患者预后的影响。利用 qRT-PCR 和 Western blot 检测基因的 mRNA 和蛋白表达水平。MTT 实验和细胞克隆形成实验检测细胞增殖能力;采用流式细胞术检测细胞周期和细胞凋亡的变化。基因集富集分析 (GSEA) 筛选 MBL2 富集的相关信号通路。结果 生物信息学分析和 qRT-PCR 结果显示, MBL2 在男性 HCC 患者中的表达高于女性患者, 并且与 HCC 患者预后相关;与对照组比较, MBL2 过表达后 Huh7 细胞和 MHCC-97H 细胞的活力和克隆形成率下降, 细胞周期转化受阻, 细胞凋亡数增加;GSEA 和 Western blot 结果表明, MBL2 富集在细胞周期信号通路上, 过表达 MBL2 能够抑制 CDK4 蛋白表达, 促进 P16 和 BAX 蛋白表达。结论

MBL2 在 HCC 组织中表达下调, 与男性 HCC 患者预后相关, 并且参与细胞增殖过程。MBL2 可能是男性 HCC 患者治疗的潜在靶点。

关键词 肝癌; MBL2; 预后; 增殖; 凋亡

中图分类号 R 735.7

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2023)05-0787-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.05.014

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是原发性肝癌的主要组织学亚型, 原发性肝癌是 2020 年全球第六大最常见的癌症和第三大癌症死亡原因, 男性的发病率和病死率比女性高 2~3 倍, 且预后较差^[1]。HCC 的发生是一个涉及多种风险因素的复杂过程。慢性肝炎病毒感染、吸烟和过度饮酒是男性患者常见的危险因素^[2]。早期筛查、诊断和治疗是改善 HCC 预后的关键。然而, 性别相关的诊断、预后标志物的缺乏, 高转移和复发率等因素直接降低了手术切除后 HCC 患者的生存率^[3-4]。甘露糖结合凝集素 2 (mannose binding lectin 2, MBL2) 位于人类 10 号染色体, 在先天免疫系统中起着重要作用, 而在恶性肿瘤中的关键作用是免疫监测, MBL2 基因变异是癌症风险增加的因素之一^[5]。目前, 在儿童血液肿瘤中发现, MBL2 基因的多态性与中性粒细胞减少症发生相关^[6]。而 MBL2 在 HCC 中的作用尚不清楚。该研究利用生物信息学技术分析 MBL2 在不同性别 HCC 患者中的表达, 细胞实验探究其对 HCC 细胞增殖的作用, 为不同性别 HCC 患者个性化治疗提供新的靶点。

2023-02-03 接收

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 81860444)

作者单位: ¹ 延安大学医学院, 延安 716000

² 延安大学附属医院检验科, 延安 716000

作者简介: 王延峰, 男, 主管检验师;

张 静, 男, 教授, 硕士生导师, 责任作者, E-mail: yadxzj@

yau.edu.cn

* 对本文具有同等贡献

and the changes of TAMs surface markers were detected by qPCR, cellular immunofluorescence and flow cytometry. Cytokines secreted by TAMs after co-culture were detected by ELISA. ESCC cells were cultured using conditioned medium of co-cultured TAMs, and the effects of TAMs on the proliferation, migration and invasion of esophageal cancer cells were evaluated by CCK-8, Wound-healing assay and Transwell assay. **Results** The expression quantity of IL-6 and IL-10 of Pg-infected ESCC cells increased ($P < 0.01$). The contents of CD163 and CD206 on the surface of TAMs co-cultured with Pg-infected ESCC cells increased ($P < 0.001$). The cytokines IL-6 and IL-10 secreted by TAMs co-cultured with Pg-infected ESCC cells relatively increased ($P < 0.01$). TAMs co-cultured with Pg-infected ESCC cells were able to enhance ESCC cells proliferation, migration and invasion (all $P < 0.05$). **Conclusion** Pg infection of ESCC cells can induce the secretion of cytokines, remodel TAMs to polarize toward the M2-type immunosuppressive phenotype, thereby promoting the malignant biological behavior of ESCC cells. This study provides data support for the etiology of esophageal cancer and potential target molecules for clinical immunotherapy targeting TAMs.

Key words esophageal squamous cell carcinoma; *Porphyromonas gingivalis*; cytokines; THP-1 cells; macrophages

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 HCC 组织 收集 2021 年 6 月—2022 年 6 月在延安大学附属医院治疗的 46 例 HCC 患者组织和癌旁组织(男性 23 例,女性 23 例),患者术前未经治疗。本研究获得了患者签署的知情同意书和延安大学医学院伦理委员会批准。

1.1.2 HCC 细胞系 本实验所使用的人 HCC 细胞系 Huh7 和 MHCC-97H 购买于上海中乔新舟生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 生物信息学分析 利用 UALCAN (<http://ualcan.path.uab.edu/index.html>) 在线工具探究 MBL2 在不同 HCC 组织样本中的表达,选择 TCGA dataset 中的“Liver hepatocellular carcinoma”模块进行分析。HCC 患者总体生存率在 Kaplan-Meier plotter (<http://kmplot.com/analysis>) 数据库中进行。在 UCSC Xena (<http://xena.ucsc.edu/>) 数据库中下载 HCC 样本的 RNA-seq 数据,使用基因集富集分析(gene set enrichment Analysis, GSEA) 软件 (<http://www.gsea-msigdb.org/gsea/index.jsp>) 进行单基因富集信号通路分析。

1.2.2 细胞培养与细胞转染 HCC 细胞系 Huh7 和 MHCC-97H 用含有 10% 胎牛血清(澳大利亚 PAA 公司)的 DMEM 的培养基(澳大利亚 PAA 公司),置于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中进行培养。用于过表达 MBL2 基因的质粒购买于上海吉凯生物有限公司,根据 jetPRIME 试剂使用手册在 HCC 细胞中进行过表达质粒的转染。

1.2.3 MTT 实验 将 Huh7 和 MHCC-97H 细胞以 3×10^3 个/孔的密度接种到 96 孔板中。质粒分别转染 24、48、72 h 后,每孔加入 0.01 ml MTT 试剂,培养 3~4 h。每孔加入 0.15 ml 二甲基亚砷后,使用酶标仪进行吸光度值的检测。

1.2.4 细胞克隆形成实验 将 Huh7 和 MHCC-97H 细胞按照 2×10^3 个/孔的密度接种到 6 孔板中。质粒转染 24 h 后,在 12 孔细胞培养板中接种,接种密度为 1×10^3 个/孔,置于培养箱中培养 2 周。细胞集落用 0.1% 结晶紫进行染色,PBS 清洗 3 遍后,在图像采集系统中拍照。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞周期与凋亡 细胞周期:将 Huh7 和 MHCC-97H 细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种到 6 孔板中,转染过表达质粒 24 h 后,用

70% 乙醇收集细胞,置于 4 °C 冰箱过夜。用 RNase A 和 PI 使细胞再悬浮,避光收集悬浮液于检测管中。通过流式细胞术进行细胞周期测定。

细胞凋亡:将 Huh7 和 MHCC-97H 细胞以 1×10^6 个/孔的密度接种到 6 孔板中,过表达质粒转染 48 h 后,收集细胞,并按照 PI/FITC-AnnexinV 凋亡检测试剂盒说明书对细胞进行处理。通过流式细胞术进行细胞凋亡测定。

1.2.6 qRT-PCR 实验 使用 TRIzol 试剂从细胞系和冷冻组织中提取总 RNA。逆转录试剂盒用于 cDNA 的合成,根据 SYBR green Premix Ex Taq II 操作说明书进行 qRT-PCR 实验。人 MBL2 引物(上游 5'-GTATGGCAGCGTCTTAC-3', 下游 5'-TGTAGCCTCTGGCCCTTG-3')和 GAPDH 引物(上游 5'-GAGGTGAAGGTCGGAGT-3'; 下游 5'-CATGGGTGAATCATGGAA-3')在上海生工生物有限公司合成。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 MBL2 基因的表达量。

1.2.7 Western blot 实验 使用 RIPA 裂解液从细胞系和冷冻组织中提取蛋白质样品后,BCA 试剂盒检测进行蛋白浓度测定,加入 20 μ l 5 \times 的蛋白缓冲液,煮沸 10 min。应用 10% SDS-PAGE 凝胶电泳分离等量的蛋白质,转移到 PVDF 膜上。5% 脱脂乳孵育 1 h 后,使用一抗(1:1 000,武汉三鹰生物技术有限公司)孵育,置于 4 °C 冰箱过夜。TBST 洗膜 3 次后,使用 HRP 标记的羊抗兔二抗(1:5 000,武汉三鹰生物技术有限公司)在室温下孵育 2 h。再次洗膜 3 次后,置于化学发光仪中检测。 β -actin 作为内参。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,Student's *t* 检验用于两组之间的比较,多组间比较采用单因素方差分析,所有实验至少重复 3 次。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MBL2 表达与患者性别的关系 通过肿瘤数据库探究 MBL2 在 HCC 患者组织中的表达与性别的相关性。在 TCGA 数据库中分析表明,HCC 组织中的 MBL2 表达低于正常组织($P < 0.05$,图 1A),男性患者中 MBL2 的表达高于女性患者($P < 0.05$,图 1B),MBL2 在 HCC 中的表达存在明显的性别差异。

2.2 MBL2 表达对患者预后的影响 利用生存分析探究 MBL2 表达对不同性别 HCC 患者预后的影响。Kaplan-Meier plotter 数据库中分析显示:与 MBL2

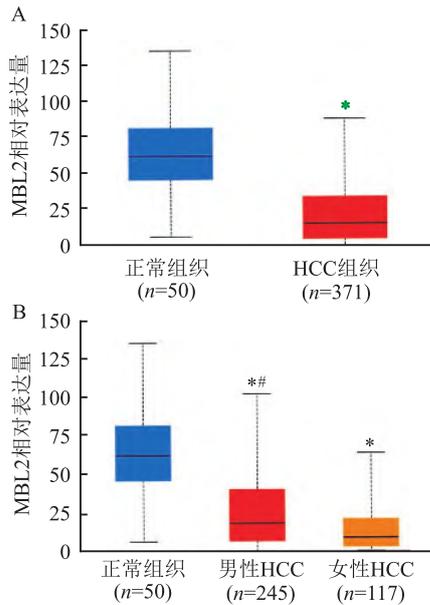


图1 TCGA 数据库中分析 HCC 中 MBL2 的表达

A: MBL2 在正常肝脏组织和 HCC 组织中的表达; B: MBL2 在不同性别 HCC 患者中的表达; 与正常组织比较: * $P < 0.05$; 与女性 HCC 组织比较: # $P < 0.05$

低表达组比较, MBL2 高表达组与男性 HCC 患者良好的预后显著相关 (Log-rank $P = 0.017$, 图 2A), 而与女性 HCC 患者预后无关 (Log-rank $P = 0.42$, 图 2B), MBL2 高表达对 HCC 患者预后影响存在着显著的性别差异。

2.3 MBL2 在 HCC 组织中的表达 通过在临床上收集不同性别 HCC 患者的组织, 分析 MBL2 表达在 HCC 患者中的性别差异。qRT-PCR 结果显示: 与女性 HCC 患者比较, MBL2 在男性 HCC 患者中的 mRNA 表达水平显著增高 ($P < 0.05$, 图 3A), 与数据库中的结果一致。Western blot 结果表明 MBL2 在 HCC 组织中的蛋白表达水平显著下降 (图 3B)。

2.4 MBL2 在 HCC 细胞系中的过表达效率检测 在 HCC 细胞系中转染 MBL2 过表达质粒, 分为对照组和 MBL2 过表达组。实验结果显示: 与对照组比较, Huh7 (图 4A) 和 MHCC-97 (图 4B) 细胞中 MBL2 的 mRNA 和蛋白表达水平在 MBL2 过表达组中显著升高 ($t_{\text{Huh7}} = 12.050$, $t_{\text{MHCC-97H}} = 13.216$, 均 $P < 0.01$), MBL2 过表达质粒可用于细胞功能实验。

2.5 MBL2 表达上调对 HCC 细胞系增殖的影响 MTT 实验结果显示: MBL2 表达升高后, 转染过表达质粒 48 h 以后 Huh7 和 MHCC-97H 细胞的活性显著下降 ($t_{\text{Huh7-48h}} = 4.231$, $t_{\text{MHCC-97H-48h}} = 5.780$, $t_{\text{Huh7-72h}} = 6.124$, $t_{\text{MHCC-97H-72h}} = 6.690$, 均 $P < 0.05$,

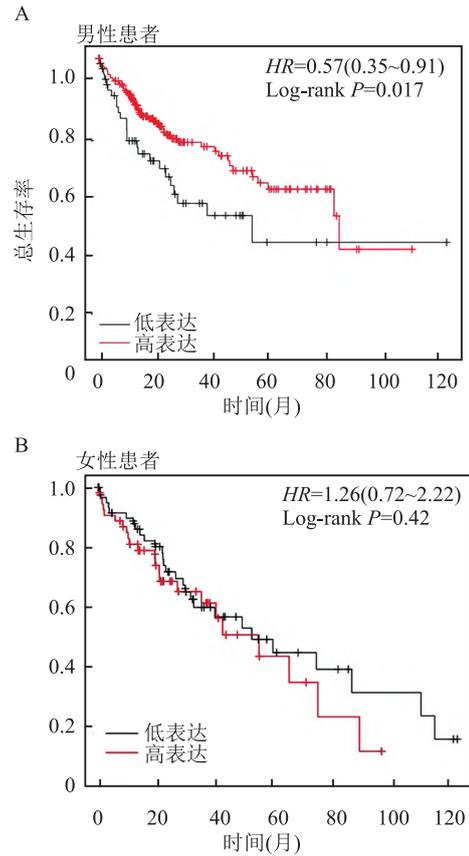


图2 MBL2 表达与 HCC 患者总生存率的相关性分析

A: MBL2 表达对男性 HCC 患者总生存率的影响; B: MBL2 表达对女性 HCC 患者总生存率的影响

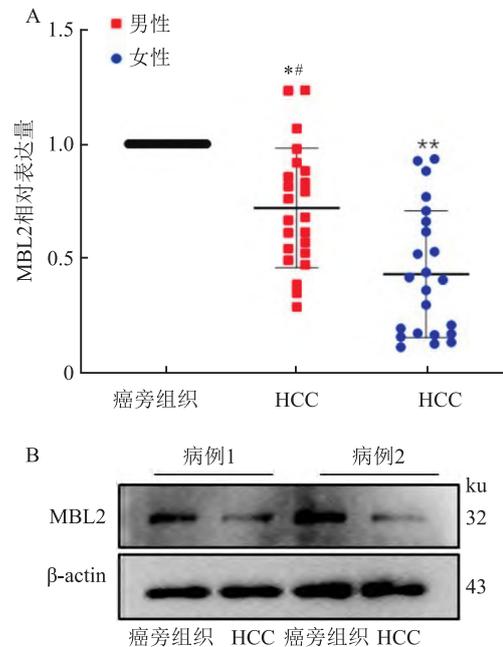


图3 HCC 组织中 MBL2 的表达情况

A: qRT-PCR 检测不同性别 HCC 组织中 MBL2 的 mRNA 表达水平; B: Western blot 检测 HCC 组织中 MBL2 的蛋白表达水平; 与癌旁组织比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与女性 HCC 组织比较: # $P < 0.05$

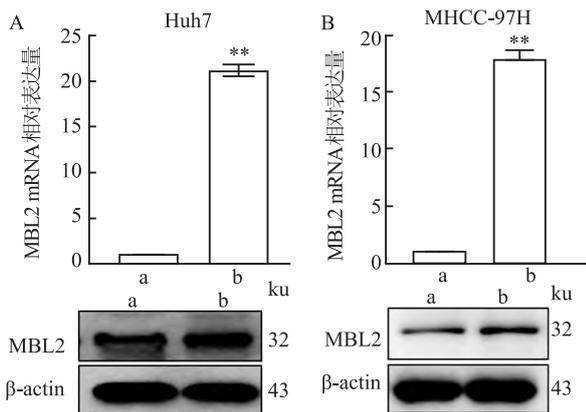


图4 qRT-PCR、Western blot 检测 HCC 细胞中
转染 MBL2 过表达质粒后 mRNA 和蛋白表达水平

A: Huh7; B: MHCC-97H; a: 对照组; b: MBL2 过表达组; 与对照组
比较: ** $P < 0.01$

图5)。细胞克隆形成实验表明, MBL2 表达下调显著的抑制了 Huh7 和 MHCC-97H 细胞的克隆形成能力 ($t_{\text{Huh7}} = 12.311, t_{\text{MHCC-97H}} = 6.015; P_{\text{Huh7}} < 0.01, P_{\text{MHCC-97H}} < 0.05$, 图6)。

2.6 MBL2 表达上调对 HCC 细胞系周期和凋亡的影响 流式细胞仪检测细胞周期和凋亡的结果显示: 上调 MBL2 表达后, 显著的抑制了 Huh7 (图7A) 和 MHCC-97H 细胞 (图7B) 的分裂 ($G_1: t_{\text{Huh7}} = 7.030, t_{\text{MHCC-97H}} = 6.961; S: t_{\text{Huh7}} = 4.230, t_{\text{MHCC-97H}} = 3.652; G_2: t_{\text{Huh7}} = 3.001, t_{\text{MHCC-97H}} = 4.132$; 均 $P < 0.05$), 促进了 Huh7 (图8A) 和 MHCC-97H (图8B) 细胞的早凋和晚凋 [(早凋: $t_{\text{Huh7}} = 2.990, t_{\text{MHCC-97H}} = 3.512$; 均 $P < 0.05$); (晚凋: $t_{\text{Huh7}} = 7.625, t_{\text{MHCC-97H}} = 4.311; P_{\text{Huh7}} < 0.01, P_{\text{MHCC-97H}} < 0.05$)]。

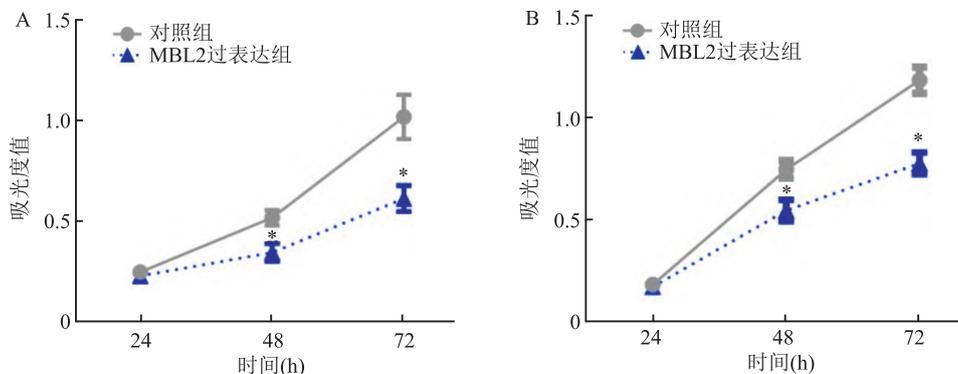


图5 MBL2 过表达质粒对 HCC 细胞系活性的影响

A: Huh7; B: MHCC-97H; 与对照组比较: * $P < 0.05$

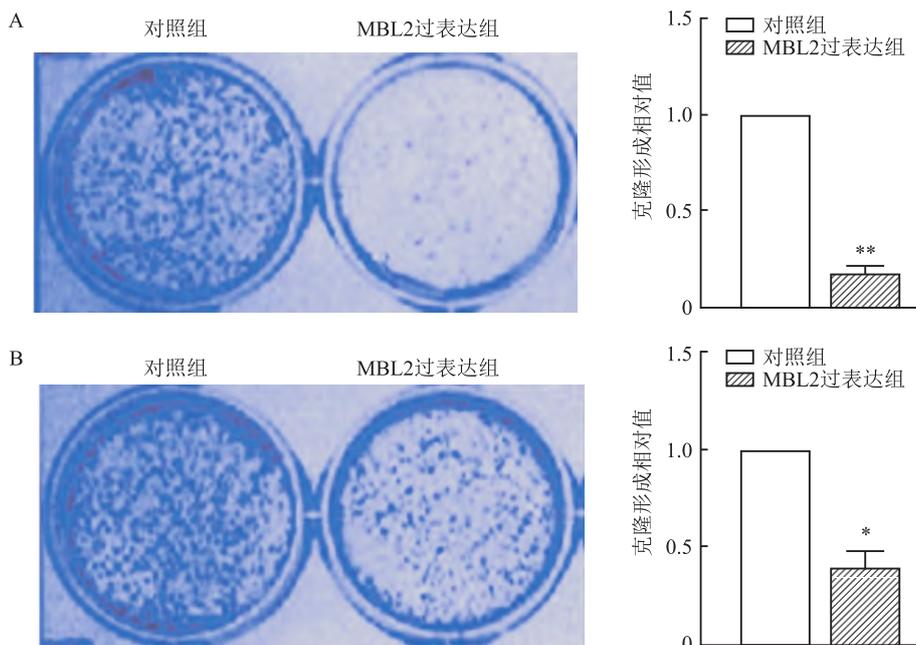


图6 MBL2 过表达质粒对 HCC 细胞系克隆形成能力的影响

A: Huh7; B: MHCC-97H; 与对照组比较: * $P < 0.05, ** P < 0.01$

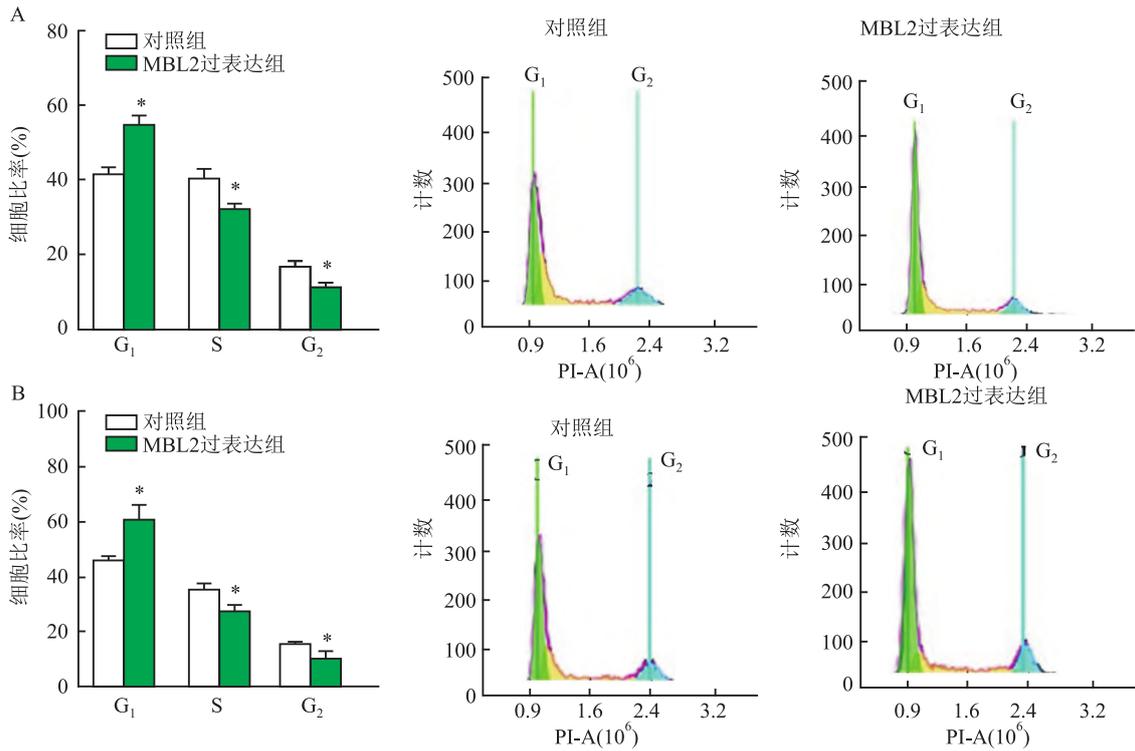


图7 MBL2 过表达质粒对 HCC 细胞系细胞周期的影响

A: Huh7; B: MHCC-97H; 与对照组比较: * $P < 0.05$

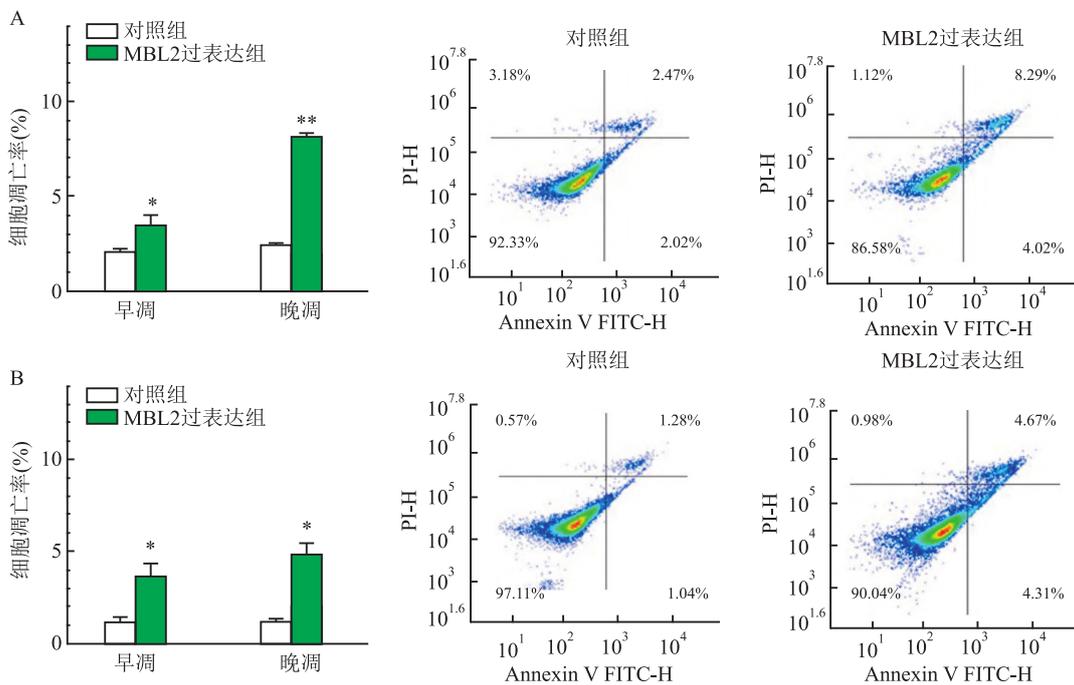


图8 MBL2 过表达质粒对 HCC 细胞系凋亡的影响

A: Huh7; B: MHCC-97H; 与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.7 MBL2 表达调控的信号通路分析 GSEA 分析显示, MBL2 表达上调显著的富集在细胞周期信号通路上 ($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, 上调

MBL2 能够调控细胞周期信号通路的 CDK4、P16、BAX 蛋白的表达。见图 9。

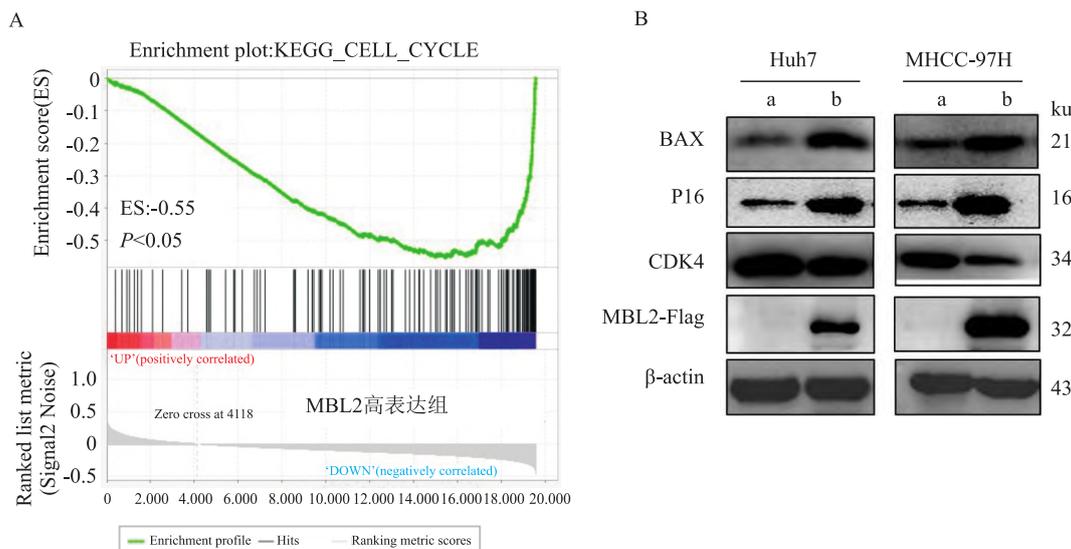


图9 上调 MBL2 表达对细胞周期信号通路的影响

a:对照组;b:MBL2 过表达组

3 讨论

研究^[7]表明,HCC 患者 HBV 感染的流行病学和临床特征方面存在显著的性别差异,这与男性 HCC 发病率和病死率的增高密切相关。然而,对人类 HCC 中性别依赖性基因表达的认识仍然稀少,研究 HCC 性别相关的基因可能具有重要的生物学和医学意义。MBL2 位于人类 10 号染色体,在乙型肝炎病毒感染中发挥重要作用^[8],MBL2 突变与 HCC 风险之间的关系尚不清楚。为了改善男性 HCC 患者的预后,有必要探究 MBL2 表达对 HCC 患者预后的影响和作用机制。通过生物信息学分析发现 MBL2 在不同患者中的表达和预后存在着明显的性别差异,对男性 HCC 患者的预后有着显著的影响,而与女性患者预后无相关性,这可能是由于公共数据库中女性 HCC 患者的数据量较小导致的,因此,MBL2 对女性 HCC 患者生存的影响需要进一步探究。同时,临床 HCC 组织样本中检测 MBL2 的表达结果与公共数据库分析结果一致,提示其在男性 HCC 患者的发生和预后中有着重要的作用。本研究对 HCC 细胞 Huh7 和 MHCC-97H 转染 MBL2 过表达质粒,进一步分析了 MBL2 对 HCC 细胞系增殖的影响。MTT 和细胞克隆实验表明,MBL2 基因的表达上调能够显著的抑制 Huh7 和 MHCC-97H 细胞的增殖,同时细胞周期和凋亡实验提示 MBL2 基因表达的上调能够阻滞 Huh7 和 MHCC-97H 细胞的分裂,增加细胞的凋亡率。上述研究表明,MBL2 在

HCC 中发挥着抑癌作用。

细胞周期是一个高度调节的过程,能够促进细胞生长、遗传物质的复制和细胞分裂,而细胞周期调节失控是肿瘤细胞过度增殖的重要原因^[9]。CDK4、BAX 和 P16 蛋白是细胞周期机制的关键组成部分,通过调控 G₁ 至 S 期转变在癌症中发挥关键作用,如控制增殖、衰老、迁移、凋亡和血管生成^[10-11]。研究^[12]显示,微染色体维护家族基因被认为是细胞周期 S/G₂ 进展的驱动因素,可做为 HCC 的潜在诊断和预后标志物。另有研究^[13]表明,ASF1B 通过影响 HCC 细胞周期和增殖,可能成为 HCC 患者治疗的新靶点。本研究通过 GSEA 分析发现,MBL2 表达显著的富集在细胞周期信号通路上,且过表达 MBL2 能够影响细胞周期信号通路中的 CDK4、BAX 和 P16 蛋白的表达。综上结果推测 MBL2 可能是通过调控细胞周期信号通路影响了 HCC 细胞系的增殖和凋亡,这将为 HCC 分子机制的研究提供新的方向。

综上所述,MBL2 在 HCC 患者中的低表达,且与男性 HCC 患者的预后密切相关。过表达 MBL2 能够抑制 HCC 细胞的增殖,增加细胞凋亡率。MBL2 可能是男性 HCC 患者治疗的一个新靶点,MBL2 表达在 HCC 的性别差异机制仍需要进一步探究。

参考文献

[1] Sung H, Ferlay J, Siegel R L, 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):209-49.
- [2] Chen Z, Xie H, Hu M, et al. Recent progress in treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Am J Cancer Res*,2020,10(9):2993-3036.
- [3] Wang G, Bai X, Jiang G, et al. GIT1 overexpression promotes epithelial-mesenchymal transition and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma[J]. *Bioengineered*,2021,12(1):30-43.
- [4] Lurje I, Czigany Z, Bednarsch J, et al. Treatment strategies for hepatocellular carcinoma (-) a multidisciplinary approach[J]. *Int J Mol Sci*,2019,20(6):1465.
- [5] Li Z, Xu J, Cui H, et al. Bioinformatics analysis of key biomarkers and potential molecular mechanisms in hepatocellular carcinoma induced by hepatitis B virus[J]. *Medicine (Baltimore)*,2020,99(20):e20302.
- [6] Dobi M, Szilagy A, Csuka D, et al. The Role of Mannose-binding lectin in infectious complications of pediatric hemato-oncologic diseases[J]. *Pediatr Infect Dis J*,2021,40(2):154-8.
- [7] Liu M, Li L, Zhao J, et al. Gender differences in demographic and clinical characteristics in patients with HBV-related liver diseases in China[J]. *Peer J*,2022,10:e13828.
- [8] Su C, Lin Y, Cai L, et al. Association between mannose-binding lectin variants, haplotypes and risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study[J]. *Sci Rep*,2016,6:32147.
- [9] Suski J M, Braun M, Strmiska V, et al. Targeting cell-cycle machinery in cancer[J]. *Cancer Cell*,2021,39(6):759-78.
- [10] Gao X, Leone G W, Wang H. Cyclin D-CDK4/6 functions in cancer[J]. *Adv Cancer Res*,2020,148:147-69.
- [11] Du K, Zhang X, Lou Z, et al. MicroRNA485-3p negatively regulates the transcriptional co-repressor CtBP1 to control the oncogenic process in osteosarcoma cells[J]. *Int J Biol Sci*,2018,14(11):1445-56.
- [12] Liu Z, Li J, Chen J, et al. MCM family in HCC: MCM6 indicates adverse tumor features and poor outcomes and promotes S/G2 cell cycle progression[J]. *BMC Cancer*,2018,18(1):200.
- [13] Ouyang X, Lv L, Zhao Y, et al. ASF1B serves as a potential therapeutic target by influencing cell cycle and proliferation in hepatocellular carcinoma[J]. *Front Oncol*,2021,11:801506.

Analysis and validation of MBL2 as a prognostic marker of male hepatocellular carcinoma

Wang Yanfeng^{1,2}, Han Jiaqi^{1*}, Zhang Jing¹

(¹*Dept of Cell Biology and Genetics, Medical College of Yan'an University, Yan'an 716000;*

²*Dept of Laboratory, Affiliated Hospital of Yan'an University, Yan'an 716000)*

Abstract Objective To investigate the expression of mannose binding lectin 2 (MBL2) in hepatocellular carcinoma(HCC) cell lines and its effects on the proliferation and prognosis. **Methods** MBL2 expression levels in patients of different sexes and survival analysis of patients were subsequently performed using bioinformatics method. The mRNA and protein expression levels were detected with the qRT-PCR and Western blot. Cell proliferation was examined by MTT assay and cell clone formation assay; Flow cytometry was used to detect the cell apoptosis and cell cycle. Gene set enrichment analysis(GSEA) was used to analyze the signal pathways of MBL2 enrichment. **Results**

Bioinformatics analysis and qRT-PCR results showed that MBL2 was highly expressed in male HCC patients compared with female HCC patients, and was related to the prognosis of HCC patients. Compared with the control group, over-expression of MBL2 inhibited the viability and clone formation rate of Huh7 cells and MHCC-97H cells; In addition, cell cycles were arrested and cell apoptosis increased. GSEA and Western blot results showed that MBL2 was enriched in the cell cycle signal pathway. Overexpression of MBL2 inhibited the expression of CDK4 protein and promoted the expression of P16 and BAX protein. **Conclusion** The expression of MBL2 is down regulated in HCC, which is related to the prognosis of male patients with HCC and participates in the process of cell proliferation. MBL2 may be a potential therapeutic target for male patients with HCC.

Key words hepatocellular carcinoma; MBL2; prognosis; proliferation; apoptosis