



· 论 著 ·

MARK2在肝癌中的表达及其对肝癌细胞迁移的影响

李会琴, 吴欣爱, 董文杰, 汤光冉

郑州大学第一附属医院肿瘤科, 河南 郑州 450052

[摘要] **背景与目的:** 肝细胞癌是我国常见恶性肿瘤之一, 其发生机制目前尚未明确。该研究旨在探讨微管亲和性调节激酶2 (microtubule affinity-regulating kinase 2, MARK2) 在肝癌中的表达及其对肝癌细胞迁移能力的影响。**方法:** 通过组织芯片和免疫组织化学法对肝癌组织中MARK2的表达进行分析; 将MARK2基因真核表达载体及其空载体转染至肝癌HepG2细胞中, 采用蛋白质印迹法 (Western blot) 检测转染后MARK2蛋白表达水平; 采用Transwell实验及细胞划痕实验检测MARK2对HepG2细胞迁移能力的影响; 通过癌症基因组图谱 (the Cancer Genome Atlas, TCGA) 分析MARK2在肝癌组织和正常组织中的表达差异, 及其与肝癌患者临床病理特征的关系; 运用网络在线生存期分析软件Kaplan-Meier plotter分析MARK2表达与肝癌患者生存预后的关系。**结果:** MARK2在肝癌组织中表达明显高于癌旁组织, 肝癌组织中MARK2高表达与TNM分期及病理分级显著相关 ($P<0.001$); 生存分析结果表明, MARK2高表达患者5年生存率明显低于MARK2低表达组 ($P<0.01$); 将MARK2基因真核表达载体转染肝癌HepG2细胞后, MARK2蛋白表达上调, 肝癌细胞的迁移能力增强。**结论:** MARK2在肝癌组织中高表达, 并促进肝癌细胞的迁移。

[关键词] 肝癌; 微管亲和性调节激酶2; 预后; 迁移

DOI: 10.19401/j.cnki.1007-3639.2018.10.003

中图分类号: R73-37 文献标志码: A 文章编号: 1007-3639(2018)10-0733-07

Expression of MARK2 in hepatocellular carcinoma and its effect on the migration of hepatocellular carcinoma cells LI Huiqin, WU Xinai, DONG Wenjie, TANG Guangran (Department of Oncology, First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, Henan Province, China)

Correspondence to: WU Xinai E-mail: wxahello@163.com

[Abstract] **Background and purpose:** Hepatocellular carcinoma (HCC) is one of the common malignancies in China. The mechanism of its occurrence is not yet clear. The aim of this study was to investigate the expression of microtubule affinity-regulating kinase 2 (MARK2) in hepatocellular carcinoma and its effect on the migration of hepatoma cells. **Methods:** The expression of MARK2 in HCC tissues was analyzed by tissue microarray and immunohistochemistry. MARK2 gene eukaryotic expression vector and its empty vector were transfected into hepatoma HepG2 cells, and the expression of MARK2 protein after transfection was detected by Western blot. Transwell assay and cell scratch test were used to detect the effect of MARK2 on the migration ability of HepG2 cells. We analyzed MARK2 expression in liver cancer tissues and normal tissues using the Cancer Genome Atlas (TCGA), and the relationship between MARK2 and clinicopathological features of liver cancer patients. Kaplan-Meier plotter, an online survival analysis software, was used to analyze the relationship between MARK2 expression and prognosis of liver cancer patients. **Results:** The expression of MARK2 in HCC tissues was significantly higher than that in adjacent tissues. The high expression of MARK2 in HCC tissues was significantly associated with TNM stage and pathological grade ($P<0.001$). The survival analysis showed that the 5-year survival rate of MARK2 high expression patients was significantly lower than that of MARK2 low expression groups ($P<0.01$). After the MARK2 gene eukaryotic expression vector was transfected into HepG2 cells, the expression of MARK2 protein was up-regulated, and the migration ability of hepatoma cells was enhanced. **Conclusion:** MARK2 is highly expressed in

HCC and promotes the migration of hepatoma cells.

[Key words] Hepatocellular carcinoma; Microtubule affinity-regulating kinase 2; Prognosis; Migration

肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是原发性肝癌最常见的类型, 在全世界常见恶性肿瘤中发病率为第5位, 死亡率居第3位^[1]。肝细胞癌恶性程度高, 发展隐匿, 进展速度快, 大多数患者确诊时已进入中晚期, 同时肝细胞癌具有侵袭和转移的能力, 预后往往不佳^[2]。目前, 肿瘤切除及肝脏移植是最有效的治疗手段, 射频消融及化学治疗等可改善癌症患者的预后, 尽管这些治疗可减少患者的病死率, 但肝癌患者术后的复发及化学治疗的耐药仍是需要解决的问题^[3]。微管亲和性调节激酶2 (microtubule affinity-regulating kinase 2, MARK2) 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 参与微管相关蛋白的磷酸化, 如Tau蛋白、细胞周期调节的磷酸酶 (CDC25), 以及II a类组蛋白去乙酰化酶 (如HDAC7)。在哺乳动物中, MARK家族由四个成员 (MARK1-MARK4) 组成。Matenia揭示了MARK2具有多种功能, 包括在神经分化、神经退行性、细胞极性、细胞内转运和细胞迁移中的作用, 其中一些功能通常在癌细胞中被解除管制^[4]。有研究发现MARK2在肺癌细胞系中显示高度频繁的DNA和RNA水平破坏, 这些改变导致获得细胞系中的致癌性质, 如增加的生存力和不依赖锚定的生长^[5]。另有研究表明在肿瘤抑制因子LKB1缺陷的人宫颈癌细胞系HeLa中高表达MARK2, 可以通过AMPK抑制HeLa细胞的生长, 逆转上皮-间质转化^[6]。但MARK2在肝癌中的表达及其作用尚未完全清楚。基于上述背景, 本研究分析MARK2在肝癌中的表达, 旨在为HCC的临床治疗提供新的靶点和思路。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

胎牛血清和DMEM细胞培养基均购自美

国Gibco公司, ECL化学发光试剂盒购自美国Milipore公司, Transwell迁移小室购自美国Becton Dickinson Labware公司。MARK2基因的真核表达载体及其空载体、EndoFectinTM-Max转染试剂均购自广州复能基因有限公司。兔抗人MARK2单克隆抗体及兔抗人 β -actin抗体均购自美国Santa Cruz公司。

1.1.2 组织芯片

组织芯片 (HLivH030PG03-M-250) 购自上海芯超生物科技有限公司, 包含65例肝癌组织及其对应的癌旁组织标本, 其中肝癌患者男性55例, 女性10例, 年龄32~73岁。

1.2 方法

1.2.1 免疫组织化学分析

组织标本经常规脱水、石蜡包埋, 制作切片, 经二甲苯脱蜡, 梯度酒精水化后, 96 °C微波柠檬酸盐抗原热修复15 min, 采用3% H₂O₂灭活内源性过氧化物酶10 min; 用5%山羊血清封闭, 兔抗人MARK2 (1:1 000) 4 °C温育过夜; 洗涤后加生物素标记的山羊抗兔二抗 (1:1 000), 于37 °C温育60 min, 洗涤后, 加过氧化物酶标记的链霉亲和素 (1:500), 37 °C温育30 min, DAB显色, 复染, 脱水, 透明, 封片。以PBS代替一抗作为阴性对照。由2位以上病理科医师观察, 在高倍镜 ($\times 400$) 下随机选取5个视野, 阳性细胞的百分率为“0” (0%)、 “1” (1%~25%)、 “2” (26%~50%)、 “3” (51%~75%)、 “4” (76%~100%)。强度评分0分为阴性; 1分为弱阳性; 2分为中度阳性; 3分为强阳性。每视野评分=染色强度评分 \times 阳性细胞百分比评分, 取平均分作为切片终评分。

1.2.2 细胞培养及质粒转染

人肝癌HepG2细胞系购自中国科学院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所细胞库。在含10%胎牛血清的DMEM培养液中, 置

于37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养，2~3 d换液1次，取对数生长期细胞进行实验。细胞接种于6孔板中，待细胞融合率达80%，按EndoFectinTM-Max转染试剂说明书配置转染混悬液，质粒与转染试剂比例为2.5 μg : 7.5 μL，分别用250 μL不含血清的培养液稀释质粒及转染试剂，将MARK2真核表达质粒(MARK2-exp)及空载体(mock)、只加转染试剂的空白对照转染至HepG2细胞中，在37℃、CO₂体积分数为5%的培养箱中培养，倒置相差荧光显微镜下观察绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)在细胞中的表达。转染48 h后将细胞传代至新鲜培养基中，加入G418进行抗性筛选，4~6 d后荧光显微镜下观察细胞，对阳性克隆进行稀释，再给予G418筛选后，扩大培养获得稳定转染的细胞株。

1.2.3 蛋白质印迹法(Western blot)检测

收集蛋白样品后，在10%的凝胶中制备并分离蛋白质样品，10%SDS-PAGE电泳分离后转移至PVDF膜，5%脱脂奶粉封闭2 h，加MARK2和β-actin抗体4℃温育过夜。TBST洗膜3次×5 min，山羊抗兔二抗室温温育2 h，TBST洗膜3次×5 min，ECL化学发光剂暗室显影。

1.2.4 细胞划痕实验

以浓度为20 nmol/L和30 nmol/L MARK2及其阴性对照组的质粒转染HepG2细胞分别接种于24孔板上，每组设置3个复孔，置于培养箱内培养，待细胞融合度达80%~90%，使用移液器吸嘴对准24孔板下端中央部位向上轻推形成划痕。磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline, PBS)冲洗2~3次，充分洗去所刮擦下来的细胞，加入无血清培养基培养，0 h作为对照，之后放入在CO₂体积分数为5%的培养箱中培养，48 h后取出，用荧光显微镜拍照。

1.2.5 Transwell实验

取对数期细胞转染质粒，继续培养24 h后收集细胞，以无血清DMEM重悬细胞。向Transwell小室上部培养嵌室内加入100 μL细胞悬液，向底部培养室加入600 μL含10%FBS的DMEM，每组设3个副孔，在37℃、CO₂体积分数为5%的环境下培养48 h。吸去嵌室内液体，用棉棒擦去嵌室

底部内表面的细胞，以多聚甲醛固定，结晶紫染色，PBS漂洗，于光镜下观察并统计数据。

1.2.6 生物信息学分析

运用TCGA数据库(<http://www.oncomine.org>)分析MARK2在肝癌与正常肝组织表达的差异性；运用网络在线生存期分析软件Kaplan-Meier plotter(KM plotter,<http://kmplot.com>)对364例肝癌患者MARK2的表达及其总生存期的关系进行分析。

1.3 统计学处理

用SPSS 21.0统计软件分析数据，计数资料用例数表示，采用χ²检验分析MARK2表达和肝癌临床病理特征之间的关系，用Kaplan-Meier分析MARK2表达与患者预后的关系，*P*<0.05为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 MARK2在肝癌组织及癌旁组织中的表达情况

免疫组织化学分析MARK2蛋白表达，发现MARK2在肝癌中的表达明显高于癌旁组织(图1)。分析TCGA数据库中MARK2在肝癌组织(371例)和正常肝组织(50例)表达的差异，结果显示MARK2在肝癌中表达显著高于正常肝组织，差异有统计学意义(*P*<0.001, 图2)。

2.2 MARK2表达与肝细胞癌临床病理特征的相关性

通过组织芯片检测MARK2在肝癌中的表达结果见表1，MARK2的表达在不同年龄、性别、肿瘤数目、是否有HBV感染、是否有肝硬化、不同TNM分期、肿瘤大小患者中的差异无统计学意义(*P*>0.05)。考虑样本量较少，因此我们分析了TCGA数据库，发现肝癌中MARK2的表达和临床TNM分期(图3)、病理分级(图4)相关。结果显示，MARK2表达量随肝癌肿瘤分级升高而升高，差异有统计学意义(*P*<0.001)。另外MARK2在TNM分期为Ⅳ期(6例)的患者中的表达较Ⅰ期(168例)、Ⅱ期(84例)、Ⅲ期(82例)升高，差异有统计学意义(*P*<0.001)。

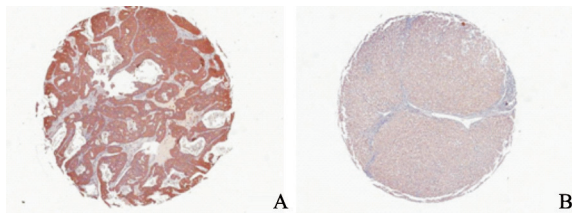


图 1 免疫组织化学法检测MARK2在肝癌组织及癌旁组织中的表达 (DAB, ×100)

Fig. 1 Immunohistochemical detection of MARK2 expression in HCC and adjacent tissues

A: HCC tissue; B: Paracancerous tissue

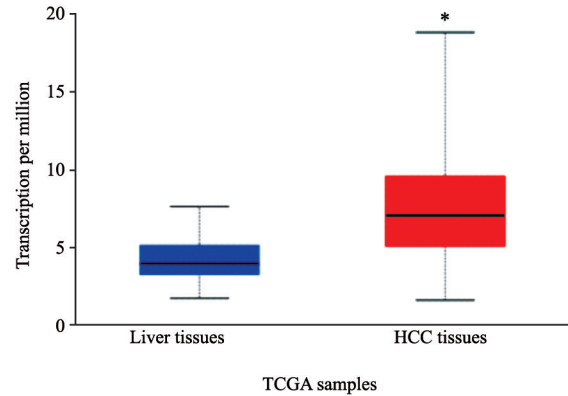


图 2 肝癌与正常肝组织中MARK2差异性表达的比较
Fig. 2 Comparison of MARK2 differential expression in HCC and normal liver tissues

*: $P < 0.001$, as compared with normal liver tissues (TCGA database)

表 1 MARK2表达和肝癌临床病理特征的关系

Tab. 1 The correlation between clinical parameters and MARK2 expression in HCC tissues

Clinical parameters	MARK2 expression		χ^2	P value
	Low(N=29)	High (N=36)		
Age/year				
<50	12	15	0.010	0.981
≥50	17	21		
Gender				
Male	23	32	1.132	0.287
Female	6	4		
Tumor size D/cm				
<5	11	9	1.261	0.262
≥5	18	27		
Tumor number				
Solitary	24	30	0.040	0.951
Multiple	5	6		
Liver cirrhosis				
Positive	5	3	1.181	0.277
Negative	24	33		
HBsAg				
Positive	5	11	1.534	0.215
Negative	24	25		
TNM stage				
I - II	17	15	1.847	0.174
III - IV	12	21		

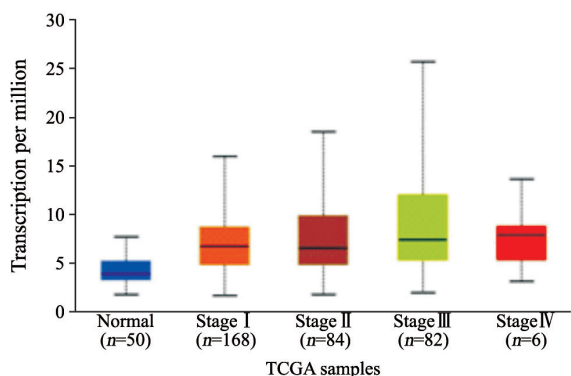


图3 MARK2表达和肝癌临床TNM分期的相关性

Fig. 3 Correlation between MARK2 expression and clinical TNM staging of HCC

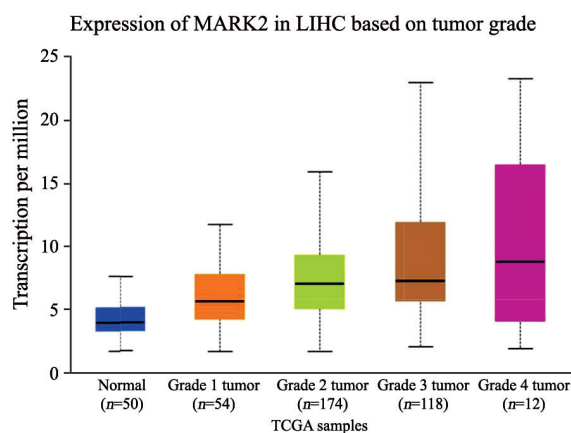


图4 MARK2表达与肝癌病理分级的相关性

Fig. 4 Correlation between MARK2 expression and histological grade of HCC

2.3 MARK2的表达与肝癌患者预后的关系

运用Kaplan–Meier plotter分析364例肝癌患者MARK2表达与患者总生存期的关系。结果显示，MARK2高表达的肝癌患者比低表达患者总生存期短 ($P < 0.01$)，即MARK2高表达者预后不佳(图5)。

2.4 MARK2–exp质粒转染HepG2细胞的效率

将MARK2–exp质粒稳定转染至HepG2细胞，通过荧光显微镜观察细胞转染效率。实验结果表明，以质粒与转染试剂比例为2.5 μg : 7.5 μL 稀释感染HepG2细胞，细胞转染效率达到90%(图6)。

2.5 转染后HepG2细胞中MARK2的表达变化

MARK2–exp稳定转染HepG2细胞后，提取蛋白，通过Western blot法检测MARK2蛋白水平的变化，与转染阴性对照组相比，转染MARK2真核表达质粒蛋白水平明显上调(图7)。

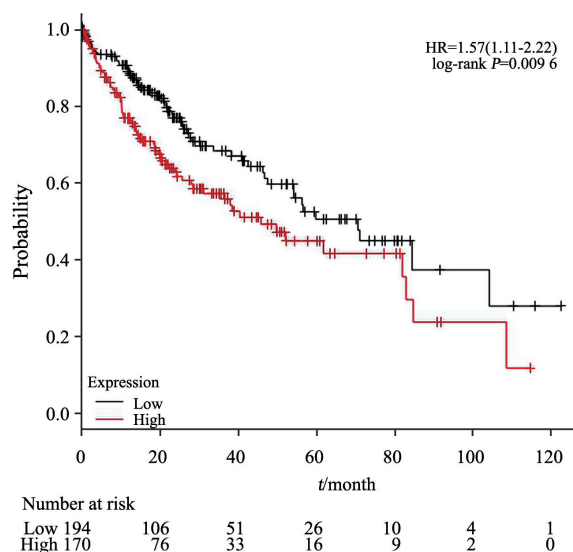


图5 不同MARK2表达水平肝癌患者的生存曲线

Fig. 5 Survival curves of HCC patients with different MARK2 expression levels

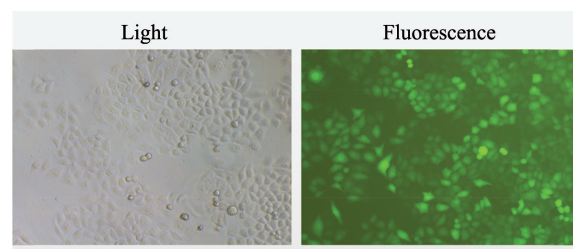


图6 MARK2–exp质粒转染HepG2细胞

Fig. 6 Transfection of HepG2 cells with MARK2–exp plasmid

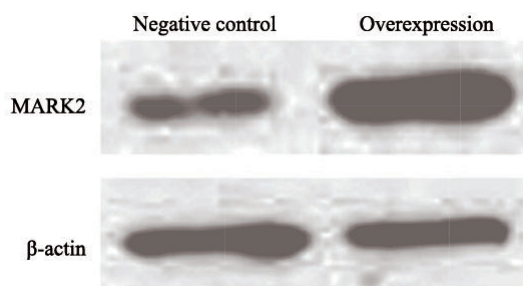


图7 Western blot法检测MARK2蛋白的表达水平

Fig. 7 MARK2 protein expression levels detected by Western blot

2.6 MARK2过表达对HepG2细胞迁移能力的影响

Transwell结果显示，与转染空载体对照组相比，过表达MARK2后，通过滤膜迁移至下室的细胞明显增多，表明MARK2能够促进HepG2细

胞的迁移 (226.330 ± 10.017 vs 98.000 ± 10.536 , $t=15.290$, $P<0.05$, 图8)。

划痕实验结果: 过表达MARK2的HepG2细胞48 h划痕愈合率为53.8%, 而转染空载体对照

组48 h划痕愈合率为32.3%, 差异有统计学意义 ($P<0.05$), 表明过表达MARK2后, HepG2细胞迁移能力增强(图9)。

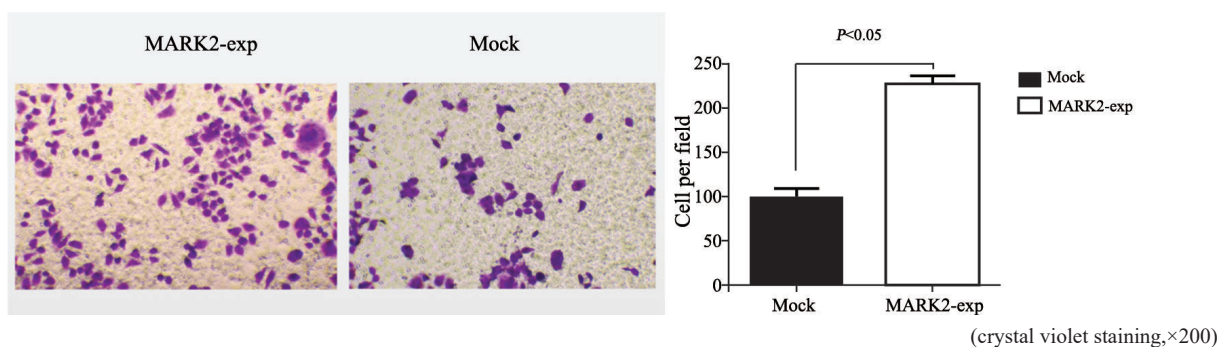


图8 Transwell实验检测MARK2对HepG2细胞迁移能力的影响

Fig. 8 Effect of MARK2 on the migration of HepG2 cells detected by transwell assay

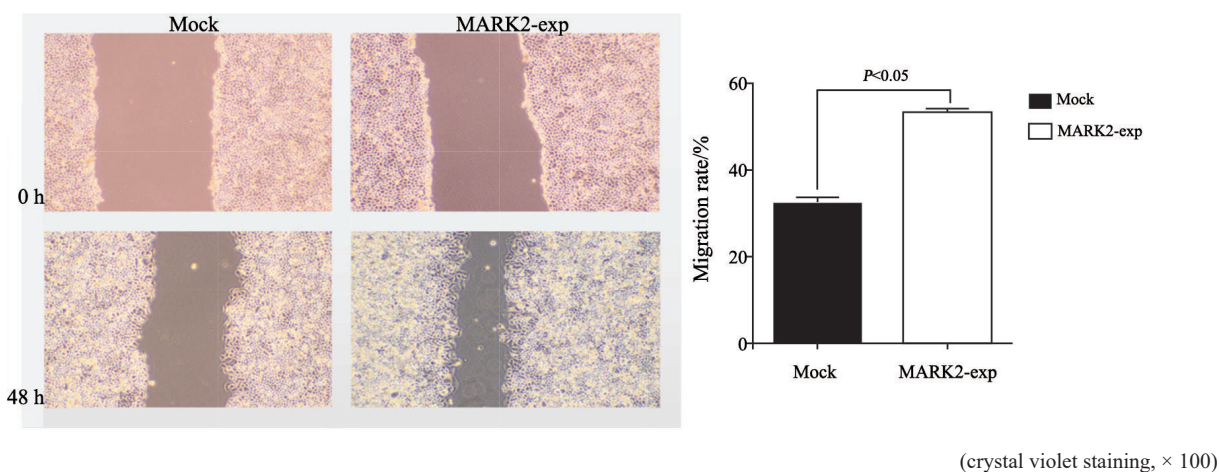


图9 细胞划痕实验检测MARK2对HepG2细胞迁移能力的影响

Fig. 9 Effect of MARK2 on migration of HepG2 cells detected by cell scratch test

3 讨 论

我国是肝癌的高发区, 2015年约有466 100人发病, 422 100例患者因肝癌死亡^[7]。因此研究肝癌的发生、发展机制并寻找新的特异性HCC分子标志物对我国HCC诊断和治疗可望提供新的线索^[8-10]。

在人类癌症中改变的许多分子机制中, 涉及细胞分裂周期控制的那些被认为是肿瘤发生的基础^[11]。在哺乳动物中, MARK2定位于细胞膜并通过磷酸化微管相关蛋白来控制微管的稳定性^[12]。这种蛋白最初与一类基因产物相关, 调节线虫的细胞极性^[13]。Hubaux等^[14]揭示了

MARK2在非小细胞肺癌中过表达并参与细胞活力和锚定非依赖性生长, 它的过表达是由DNA改变介导的, 特别是DNA低甲基化和在较低程度上的DNA复制增益, 确定了MARK2在细胞周期活化和DNA修复中的潜在作用, 并提供了其与DNA损伤和顺铂敏感性相关的证据。此外, 通过荧光素酶测定鉴定了MARK2与E2F、Myc/Max和NF- κ B通路之间的关联, 并且对NF- κ B通路的深入评估表明由于非经典活化的激活, MARK2敲低后NF- κ B活化增加, 后者显著降低了肺癌细胞活力, NF- κ B可通过上调或抑制其靶基因发挥促凋亡或抗凋亡作用^[15-16]。然而, 有研究表明, 利用可诱导的慢病毒表达系统, 在LKB1基因缺陷的HeLa细胞中过表达MARK2, 导致细

胞生长减少,抑制集落形成和在G₁期细胞周期停滞,AMPK作为下游效应器上调p21和p16的表达。另外发现MARK2在F-肌动蛋白重组中发挥作用,并有助于逆转上皮-间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT),如HeLa细胞出现表型改变、细胞迁移和侵袭能力下降。

本研究通过免疫组织化学法发现MARK2在肝癌组织中的表达高于癌旁组织,并且分析了TCGA数据库中MARK2在肝癌和正常肝组织表达的差异性,发现MARK2在肝癌中的表达水平显著高于正常肝组织,这与前期组织标本中的结果一致。应用组织芯片检测MARK2在肝癌中的表达,但是通过实验发现MARK2的表达在不同年龄、性别、肿瘤数目、是否有HBV感染、是否有肝硬化、不同TNM分期、肿瘤大小患者中的差异无统计学意义($P>0.05$),考虑样本量较少,因此我们分析了TCGA数据库中MARK2在不同病理分级及TNM分期的肝癌患者中表达的差异性,结果显示,MARK2在低分化(Ⅲ/Ⅳ级)患者中的表达高于高分化(Ⅰ/Ⅱ级)的患者,另外,MARK2在TNM分期为Ⅳ期的患者中的表达较Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ期升高。运用Kaplan-Meier plotter分析了364例肝癌患者的总生存期发现,MARK2高表达的患者总生存期较短,预后不良。通过质粒转染HepG2细胞,我们发现MARK2过表达可增强HepG2细胞的迁移能力。我们推测,由于肿瘤的组织特异性及肿瘤细胞所在微环境不同,可能导致MARK2在不同肿瘤中发挥作用的途径不同。

综上所述,本研究首次报道了MARK2在肝癌中的表达显著高于正常肝组织,并且高表达MARK2预示患者预后不良。体外研究表明,MARK2促进肝癌细胞的迁移能力,可能为HCC的临床治疗提供一个新的靶点,但是MARK2在HCC中的作用机制尚需深入研究。

[参 考 文 献]

[1] SIEGE R L, MILLER K D, JEMAL A. Cancer statistics [J]. CA Cancer J Clin, 2015, 65(1): 5-29.

- [2] LIU L, ZHENG Y H, HAN L, et al. Efficacy and safety of the oxaliplatin-based chemotherapy in the treatment of advanced primary hepatocellular carcinoma [J]. Medicine, 2016, 65(2): 87-108.
- [3] BRUIX J, GORES G J, MAZZAFERRO V. Hepatocellular carcinoma: clinical frontiers and perspectives [J]. Gut, 2014, 63(5): 844-855.
- [4] MATENIA D, MANDELKOW E M. The tau of MARK: a polarized view of the cytoskeleton [J]. Trends Biochem Sci, 2009, 34(7): 332-342.
- [5] MARSHALL E A, NG K W, ANDERSON C. Gene expression analysis of microtubule affinity-regulating kinase 2 in non-small cell lung cancer [J]. Genom Data, 2015, 6: 145-148.
- [6] XU G, GE Y, TAO X. MARK2 inhibits the growth of HeLa cells through AMPK and reverses epithelial-mesenchymal transition [J]. Oncol Rep, 2017, 38(1): 237-244.
- [7] CHEN W, ZHENG R, BAADE P D, et al. Cancer statistics in China, 2015 [J]. CA Cancer J Clin, 2016, 66(2): 115-132.
- [8] HE T C, ZHOU S, DA COSTA L T, et al. A simplified system for generating recombinant adenoviruses [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95(5): 2509-2514.
- [9] BOSCH F X, RIBES J, DIAZ M, et al. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends [J]. Gastroenterology, 2004, 127(5 Suppl 1): 5-16.
- [10] GALUN D, BASARIC D, ZUVELA M, et al. Hepatocellular carcinoma: from clinical practice to evidence-based treatment protocols [J]. World J Hepatol, 2015, 7(20): 2274-2291.
- [11] MANNING A L, DYSON N J. pRB, a tumor suppressor stabilizing presence [J]. Trends Cell Biol, 2011, 21(8): 433-441.
- [12] MCRAE R, LAPIERRE L A, MANNING E H, et al. Rab11-FIP1 phosphorylation by MARK2 regulates polarity in MDCK cells [J]. Cell Logist, 2017, 7(1): e1271498.
- [13] AHRARI S, MOGHARRAB N. Effects of T208E activating mutation on MARK2 protein structure and dynamics: modeling and simulation [J]. Mol Biol Res Commun, 2014, 3(3): 149-164.
- [14] HUBAUX R, THU K L, VUCIC E A, et al. Microtubule affinity-regulating kinase 2 is associated with DNA damage response and cisplatin resistance in non-small cell lung cancer [J]. Int J Cancer, 2015, 137(9): 2072-2082.
- [15] PERKINS N D. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor [J]. Trends Cell Biol, 2004, 14(2): 64-69.
- [16] RADHAKRISHNAN S K, KAMALAKARAN S. Pro-apoptotic role of NF-kappaB: implications for cancer therapy [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1766(1): 53-62.

(收稿日期: 2018-04-05 修回日期: 2018-08-15)