

过表达TIMP3对肝癌细胞生物功能的影响

曹丽¹ 吴菲² 王晓霏^{3*} 秦桢楠^{1*}

(¹西安交通大学基础医学院, 西安 710061; ²西安交通大学第二附属医院, 西安 710004;

³西安交通大学生物医学实验中心, 西安 710061)

摘要 组织金属蛋白酶抑制因子3(TIMP3)在肝癌中的具体作用机制尚不明确。该文探讨了TIMP3在肝癌细胞中的表达及其对细胞增殖、细胞凋亡、细胞周期的影响。通过qRT-PCR和Western blot检测肝癌细胞株(97H、97L和HUH7)和人正常肝细胞(LO2)中TIMP3的表达情况。将过表达TIMP3的质粒转染进97H和HUH7细胞, 利用qRT-PCR和Western blot检测转染后细胞的TIMP3表达情况。通过MTT实验和活细胞工作站检测过表达TIMP3对肝癌细胞增殖的影响。此外, 通过流式细胞术检测过表达TIMP3对肝癌细胞凋亡和细胞周期的影响, 通过划痕实验检测表达TIMP3对肝癌细胞迁移的影响。最后, 利用GSEA软件进行基因富集分析以及IntAct数据库构建相互作用蛋白网络图对TIMP3相关生物学功能进行探索。研究表明, 97H、97L和HUH7细胞中TIMP3的表达比LO2细胞中低。97H和HUH7细胞转染TIMP3质粒后RNA及蛋白水平明显升高, 且过表达TIMP3可以促进细胞增殖, 促进G₁期向S期转化, 抑制细胞凋亡, 下调Bax的表达, 上调Bcl-2、Bcl-xl的表达。总之, 过表达TIMP3表达明显促进肝癌细胞增殖, 抑制细胞凋亡, 且TIMP3相关信号通路及存在相互作用蛋白密切参与肿瘤的进展, TIMP3可能是肝癌的潜在诊断标志物和治疗靶点。

关键词 TIMP3基因; 肝癌; 增殖; 凋亡; 转移; 基因富集分析

Overexpression of TIMP3 Affects Biological Functions of Liver Cancer Cells

CAO Li¹, WU Fei², WANG Xiaofei^{3*}, QIN Yannan^{1*}

(¹School of Basic Medical Sciences, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China; ²The Second Affiliated Hospital of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710004, China; ³Biomedical Experimental Center of Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract The role of TIMP3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3) in hepatocellular carcinoma is still unclear. This study aims to explore the expression of TIMP3 in HCC (hepatocellular carcinoma) cell lines, and its effect on cell proliferation, apoptosis and cell cycle in 97H and HUH7. The expression of TIMP3 in HCC cell lines (97H, 97L and HUH7) and normal human hepatocytes (LO2) was detected by qRT-PCR and Western blot. The overexpressing plasmids were transfected into 97H and HUH7 cells, and the expression of TIMP3 in the transfected cells was examined by qRT-PCR and Western blot. The effect of TIMP3 overexpression on the proliferation of 97H and HUH7 cell was detected by MTT assay and further monitored by cell imaging multi-mode reader. In addition, the effect of TIMP3 overexpression on apoptosis, cell cycle, and cell migration was detected by flow cytometry and wound-healing assay. Finally, GSEA (gene enrichment analysis) and IntAct database were used to explore the biological functions of TIMP3 in HCC. The results showed that expression of TIMP3 in 97H, 97L and HUH7 cells was lower than that in LO2 cells. The levels of RNA and protein in 97H and HUH7 cells transfected with TIMP3 plasmid were significantly higher, and overexpression of TIMP3 could promote cell proliferation, promoting the transition from G₁ phase to S phase, and inhibit cell apoptosis (downregulation of Bax expression, upregulation of Bcl-2 and Bcl-xl expression). All in all, TIMP3 overexpression significantly promotes the proliferation and

收稿日期: 2022-07-21 接受日期: 2022-12-30

陕西省自然科学基金(批准号: 2017JM8112)资助的课题

*通讯作者。Tel: 029-88965077, E-mail: wxiaofei@xjtu.edu.cn; Tel: 029-82655077, E-mail: yannan159@xjtu.edu.cn

Received: July 21, 2022 Accepted: December 30, 2022

This work was supported by the Natural Science Foundation of Shaanxi Province (Grant No.2017JM8112)

*Corresponding authors. Tel: +86-29-88965077, E-mail: wxiaofei@xjtu.edu.cn; Tel: +86-29-82655077, E-mail: yannan159@xjtu.edu.cn

inhibits cell apoptosis in HCC, and TIMP3-related signaling pathways and interacting proteins are closely involved in tumor progression. TIMP3 may be a potential diagnostic marker and therapeutic target for hepatocellular carcinoma.

Keywords *TIMP3* gene; liver cancer; proliferation; apoptosis; metastasis; gene enrichment analysis

肝细胞肝癌(hepatocellular carcinoma, HCC)是一种高死亡率原发性肝癌。根据最新全球癌症统计报告数据显示,全球新增肝癌占全球癌症总病例的4.7%,死亡占癌症总死亡的8.3%^[1]。亚洲地区是全球五大洲肝癌发病率最高的地区,占全球肝癌发病人数的72.5%,而中国是全球肝癌发病负担最为沉重的国家,占全球新发肝癌病例的45.3%^[2]。2020年,中国新发肝癌病例数为410 038例,因肝癌死亡人数为391 152例,其发病率和死亡率分别居中国癌症新发数和死亡的第5位和第2位^[3]。肝癌是一种在临床和生物学上具有高度异质性的疾病,其发生是多因素参与、多步骤长期发展的结果。肝癌的主要发病原因包括肝炎病毒感染、过量酒精摄入、黄曲霉毒素暴露以及遗传性肝硬化等^[4]。目前,手术、消融、放疗、介入、靶向、免疫治疗等多种方式被引入到肝细胞癌的治疗当中。此外,基于向靶组织或者细胞导入外源片段,从而使治疗基因表达增强或者致癌基因表达水平降低的基因治疗方法得到越来越多的关注。因此,寻找有用且可靠的靶标分子将助力于癌症的诊断,深入的作用机制探索也将为肝癌的治疗提供新的理论依据。

组织金属蛋白酶抑制因子3(tissue inhibitor of metalloproteases 3, TIMP3)定位于22号染色体短臂1区2带3亚带上,含有5个外显子,属于TIMPs基因家族^[5],在胎盘、肾脏、肝脏以及心肌等多种组织中广泛表达,同时根据HPA数据库显示,TIMP3在细胞内主要定位于高尔基体。TIMPs为基质金属蛋白酶的天然抑制剂,近年来引起了众多学者的关注。尽管TIMPs最初被描述为分泌型内源性金属蛋白酶抑制剂,但近期的研究表明其可能与不良预后相关,一定程度上促进癌症的发生和转移^[6-9]。HUANG等^[10]的研究表明,TIMP1可能通过FAK-PI3K/AKT和MAPK信号通路促进结肠癌的发生和转移,并且TIMP1可以作为结肠癌的潜在预后指标。一些研究表明,TIMP3在各种心血管疾病中表达降低,而过表达TIMP3可以促进血管生成,改善心肌梗死和心脏功能^[11-13]。另有研究发现,在结直肠癌组织及细胞中TIMP3表达升高,其表达与复发时间、生存时间呈现负相关,而在其诱导剂MPT0B390的作用下可

抑制肿瘤的生长和转移。而CRUZ-MUNOZ等^[15]的研究表明,TIMP3可以抑制不同癌细胞向多个器官的转移扩散,而不会增强炎症细胞反应。与此同时,尽管TIMP3在子宫颈癌^[16]、乳腺癌^[17]、胰腺癌^[18]中已有研究报道,但目前关于TIMP3在肝癌中的研究仅有少数报道,更多地将TIMP3视为下游分子,研究其在癌症的发生发展中的调控作用。ZHANG等^[19]研究TIMP3对人肝癌细胞系HCC-7721侵袭和转移能力的影响,发现转染过表达TIMP3可以抑制裸鼠体外侵袭以及转移。

综上所述,TIMP3在肝癌中的具体功能和作用机制尚未深入研究。因此,本研究旨在研究过表达TIMP3对肝癌细胞增殖、迁移、凋亡的影响,并通过分析与TIMP3相关的细胞通路及相互作用蛋白进一步探索TIMP3的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 肝癌细胞株(97H、97L和HUH7)和永生化肝细胞株(LO2)由西安交通大学生物医学实验中心实验室提供。DMEM培养基、胎牛血清购于澳大利亚PAA公司。胰蛋白酶、QuickFreezing细胞冻存液购于北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。RNA提取、Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis试剂盒、Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix、蛋白Marker、Western blot化学发光液购于上海Genestar公司。TIMP3引物由上海生工生物工程公司合成。RIPA蛋白裂解液购于北京碧云天科技有限公司。兔抗人TIMP3抗体(ab39184)购于美国Abcam公司。actin抗体以及HRP标记二抗购自武汉Proteintech公司。TIMP3过表达质粒购于上海吉玛制药技术有限公司。质粒提取试剂盒购于美国Omega公司。转染试剂购于法国Polyplus公司。细胞板和培养皿购于美国Corning公司。

1.1.2 主要仪器设备 恒温培养箱购于美国ThermoElectron公司;超净工作台购于天津泰斯特仪器有限公司;5810R高温低速离心机购于美国Eppendorf公司;实时定量PCR仪购于瑞士Roche公司;化学发光成像系统购于美国GeneBox公司;酶标仪购

于德国BMG公司;活细胞工作站购于美国Biote公司;流式细胞仪购于美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 肝癌细胞株(97H、97L和HUH7)和永生化肝细胞株(LO2)复苏后,置于含10% FBS的DMEM培养基于37 °C、5% CO₂的环境中培养,每24 h换液,待细胞长满后用胰酶消化传代。实验所用细胞为对数期生长的细胞。

1.2.2 qRT-PCR检测RNA表达水平 根据制造商的说明,用TRIzol试剂从细胞中提取总RNA,使用Hifair® II 1st Strand cDNA Synthesis试剂将RNA逆转录为cDNA,反应条件:42 °C逆转录30 min,85 °C孵育5 min灭活逆转录酶。qRT-PCR使用Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix进行。反应体系:2 μL cDNA模板,上下游引物各1 μL,10 μL SYBR Green,后用ddH₂O补充至20 μL;引物:TIMP3-F(5'-CAT GTG CAG TAC ATC CAT ACG G-3'),TIMP3-R(5'-CAT CAT AGA CGC GAC CTG TCA-3'),GAPDH-F(5'-GCC GTA TCG CTC AGA CAC-3'),GAPDH-R(5'-GCC TAA TAC GAC CAA ATC C-3');反应条件:95 °C变性5 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,40个循环。实验设置五个复孔,所有实验重复三次。

1.2.3 Western blot 检测蛋白表达水平 细胞中加入适量的RIPA缓冲液并置于冰上裂解30 min后,用细胞刮子将细胞刮下置于1.5 mL离心管中,4 °C、14 000 ×g离心20 min,收集到的上清即为所提取蛋白质。用BCA蛋白检测试剂盒进行定量。20 μg的蛋白质在10% SDS-PAGE凝胶中分离,恒压转移到PVDF膜上,脱脂牛奶(5%)室温封闭2 h,TIMP3、actin抗体(1:1 000稀释)4 °C孵育过夜,漂洗,同源二抗(1:5 000稀释)室温孵育2 h,充分漂洗后进行显色。

1.2.4 质粒转染 取生长状态良好的细胞系重悬后,计数,按照每孔 2×10^5 个细胞接种到无菌6孔板中进行培养,培养24 h后。将4 μL jet、2 μg过表达质粒和200 μL jet buffer轻轻混匀,室温静置10 min后滴加到6孔板中。4~6 h后换液,转染24~48 h后收集RNA,转染48~72 h后收集蛋白。

1.2.5 活细胞工作站检验细胞增殖能力 将97H和HUH7细胞(5 000个/孔)接种到96孔板中并培养24 h。接下来,用质粒处理细胞,并在4 h后更换培养基。使用Cytation™5 Cell Imaging Multi-Mode Reader连续监测细胞增殖,使用Gen5 Image软件对细胞进行

计数分析。

1.2.6 流式细胞术检测细胞凋亡能力 将97H和HUH7细胞进行质粒转染48 h,收集。先用PBS洗涤细胞三次,用胰酶消化后1000 ×g离心5 min得到沉淀,后继续使用PBS洗涤两次。然后,根据说明用Annexin-V-FITC凋亡检测试剂对细胞进行染色,并通过流式细胞仪测量和分析细胞凋亡水平。实验重复三次。

1.2.7 流式细胞术检测细胞周期 97H和HUH7细胞转染质粒如上述方法离心收集细胞沉淀。然后,根据说明加入等体积的RNase以及PI染料对细胞进行染色,避光4 °C孵育15 min后上机检测,并通过流式细胞仪分析细胞周期变化。实验重复三次。

1.2.8 划痕实验检测细胞迁移 将97H和HUH7细胞(50 000个/孔)接种到6孔板中并培养24 h。接下来,用转染试剂进行瞬时转染,4 h后更换培养基,并利用枪头进行划痕。用PBS清洗两次后加入无血清的DMEM培养基,之后放回培养箱中继续培养,在24 h、48 h、72 h拍照记录。

1.2.9 TIMP3基因富集分析 基因集富集分析(GSEA)是将疾病表型与一组基蛋白质表达相关联的强大工具,已被广泛应用于识别潜在作用途径。为了研究TIMP3在肝癌中发生发展的潜在机制,我们通过TCGA数据库获得肝癌表达矩阵,分别用clusterProfiler R软件包中的gseGO和gseKEGG函数进行基因富集分析^[14],用1 000次迭代计算验证显著改变的通路。将TIMP3的表达水平作为表型标记,并基于净富集评分(normalize enrichment scores, NESs)、基因比率和P值来评价具有显著富集的KEGG通路。 $|NES| > 1$ 、 $P < 0.05$ 和 $Q < 0.05$ 被认为具有统计学意义。

1.2.10 互作蛋白分析 为了预测与TIMP3存在相互作用的蛋白分子,我们利用IntAct在线软件(<https://www.ebi.ac.uk/intact/home>)分析,选取数据库中的TIMP3蛋白,构建相关的网络图。

1.2.11 统计学分析 采用Graphpad Prism 9进行分析,计量资料采用均数±标准差表示,两组间比较采用t检验。 $P < 0.05$ 认为差异具有统计学意义(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$)。

2 结果

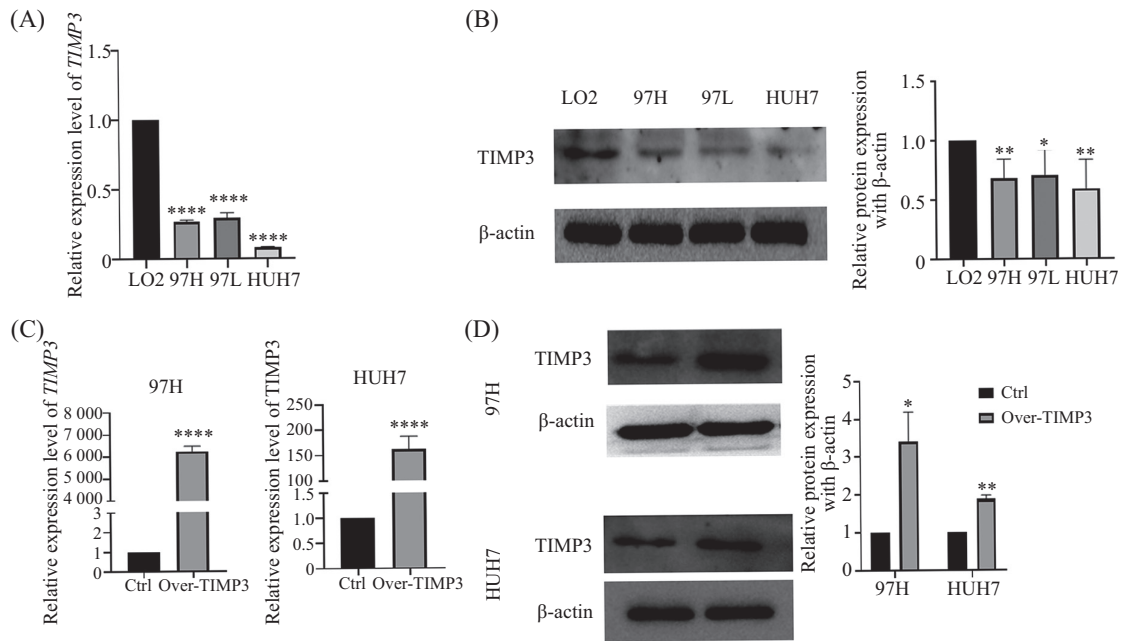
2.1 TIMP3过表达对肝癌细胞生物学功能的影响

2.1.1 TIMP3在肝癌细胞中低表达 传代肝癌细

胞株(97H、97L和HUH7)和永生化肝细胞株(LO2), 取对数期生长良好的细胞, 利用qRT-PCR和Western blot检测TIMP3的表达情况, 结果如图1A和图1B所示。与LO2相比, TIMP3在97H、97L和HUH7细胞中呈现一致的低表达。后续选择97H和HUH7细胞开展实验。将过表达质粒顺时转染进97H和HUH7细胞后, 通过qRT-PCR和Western blot检测TIMP3表达水平。结果表明, 与对照组相比, 过表达组的TIMP3

mRNA及蛋白表达水平均明显升高(图1C和图1D)。

2.1.2 过表达TIMP3对肝癌细胞增殖活力的影响
转染过表达质粒到97H和HUH7细胞中, 通过MTT实验检测吸光度值以及活细胞工作站连续监测转染后78 h内细胞数目和总覆盖面积变化, 从而评价过表达TIMP3对97H和HUH7细胞增殖能力的影响。如图2所示, MTT检测结果表明, 过表达组48 h后细胞增殖明显高于对照组, 差异具有统计学意义。同

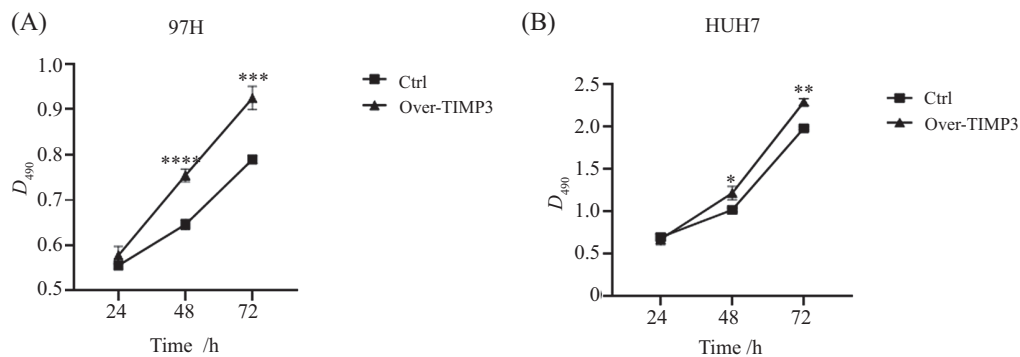


A: qRT-PCR检测TIMP3 mRNA表达水平; B: Western blot检测TIMP3蛋白表达水平; C: qRT-PCR检测质粒转染后TIMP3 mRNA表达水平; D: Western blot检测质粒转染后TIMP3蛋白表达水平。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, 与LO2组或Ctrl组比较。

A: quantification of TIMP3 mRNA levels using qRT-PCR; B: the expression of TIMP3 protein was measured by Western blot; C: quantification of TIMP3 mRNA levels using qRT-PCR after plasmid transfection; D: the expression of TIMP3 protein was measured by Western blot after plasmid transfection. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ compared with LO2 or Ctrl group.

图1 qRT-PCR和Western blot检测肝癌细胞TIMP3以及质粒转染后TIMP3表达

Fig.1 The expression of TIMP3 in liver cancer cells and after plasmid transfection by qRT-PCR and Western blot



A: MTT实验检测97H细胞增殖情况; B: MTT实验检测HUH7细胞增殖情况。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, 与Ctrl组比较。

A: MTT assay was used to evaluate the proliferation of 97H cells; B: MTT assay was used to evaluate the proliferation of HUH7 cells. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ compared with Ctrl group.

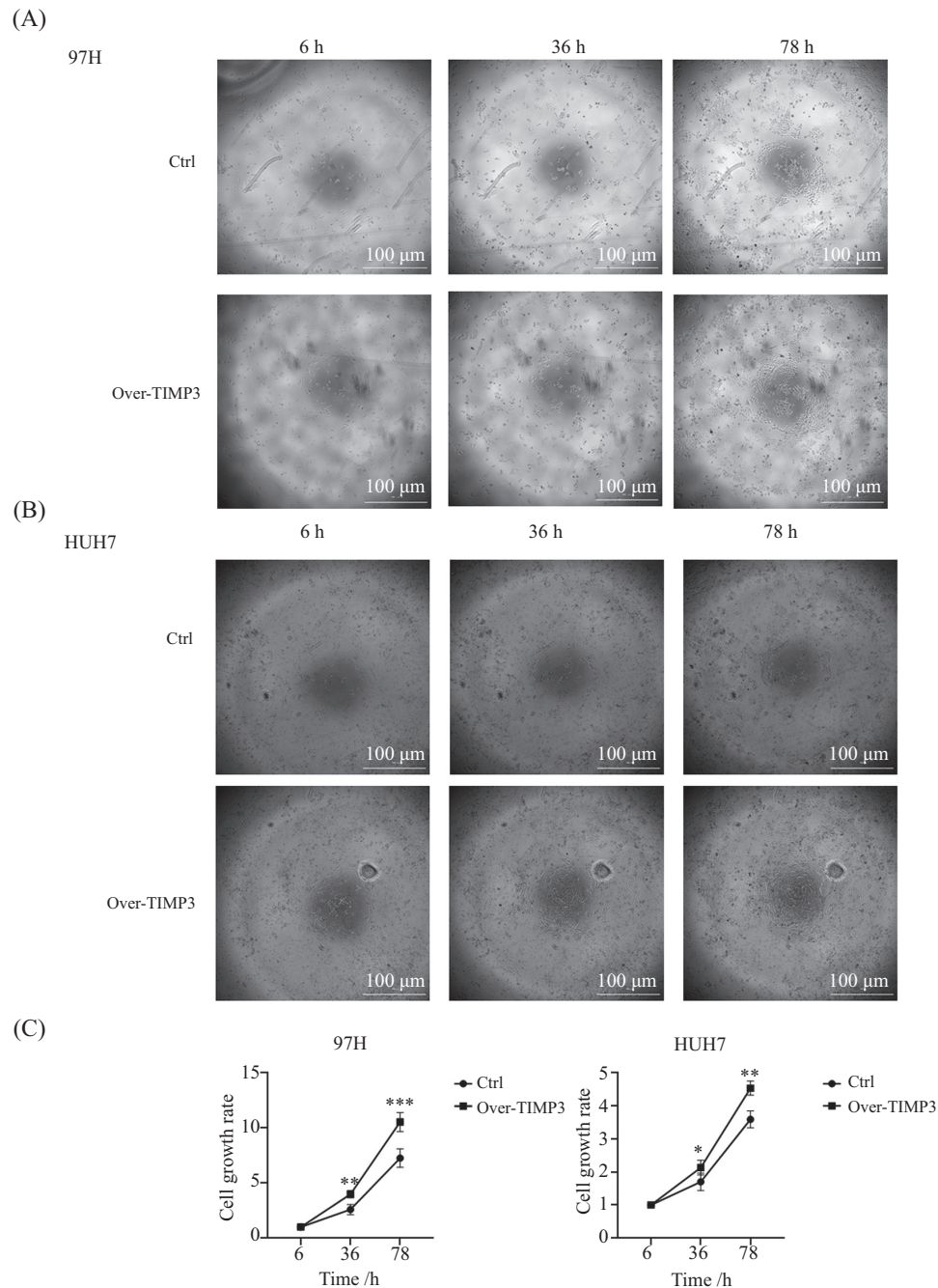
图2 MTT检测过表达TIMP3对97H和HUH7细胞增殖的影响

Fig.2 The effect of TIMP3 overexpression on the proliferation in 97H and HUH7 cells detected by MTT assay

时, 利用活细胞工作站检测过表达TIMP3对97H和HUH7细胞增殖能力的影响, 结果同样证实过表达TIMP3能够促进97H和HUH7的增殖(图3)。

2.1.3 过表达TIMP3对肝癌细胞凋亡的影响 采用Annexin V-FITC/PI双染色法检测过表达TIMP3对97H细胞和HUH7细胞凋亡率的影响, 结果表明, 在

97H细胞和HUH7细胞中过表达TIMP3后, 细胞凋亡率降低, 与对照组比较差异具有统计学意义(图4)。同时, 利用Western blot检测凋亡相关蛋白的表达情况, 结果显示, Bcl-2、Bcl-xl表达量显著增加, Bax表达量减少(图4)。这表明在一定程度上, TIMP3的过表达抑制细胞的凋亡。



A: 活细胞工作站监测97H细胞增殖情况; B: 活细胞工作站监测HUH7细胞增殖情况; C: 图A、B的统计分析图。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, 与Ctrl组比较。

A: Cell Imaging Multi-Mode Reader was used to monitor the proliferation of 97H cells; B: Cell Imaging Multi-Mode Reader was used to monitor the proliferation of HUH7 cells; C: statistical analysis diagrams of Figures A and B. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ compared with Ctrl group.

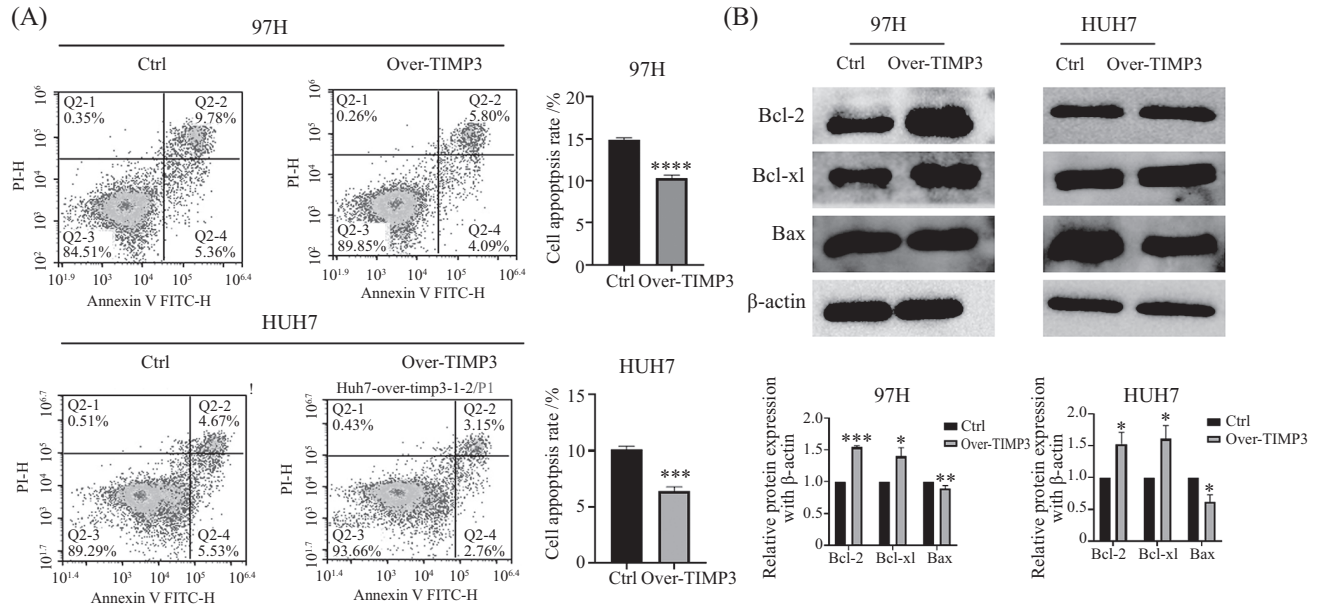
图3 活细胞工作站监测过表达TIMP3对97H和HUH7细胞增殖的影响

Fig.3 The effect of TIMP3 overexpression on the proliferation in 97H and HUH7 cells monitored by Cell Imaging Multi-Mode Reader

2.1.4 过表达TIMP3对肝癌细胞周期的影响 采用PI染色法检测过表达TIMP3对97H细胞和HUH7细胞周期的影响, 结果表明, 在97H细胞和HUH7细胞

中过表达TIMP3能够起到促进细胞周期由G₁期向S期转化的作用(图5)。

2.1.5 过表达TIMP3对肝癌细胞迁移的影响 利

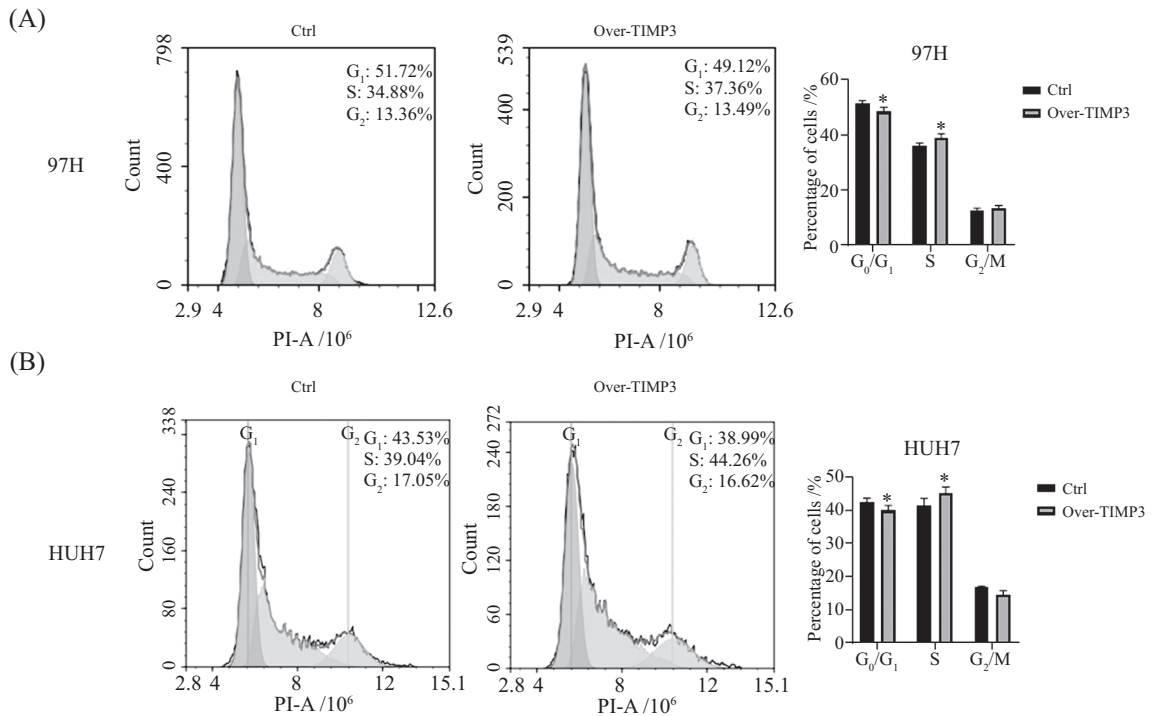


A: 流式细胞术检测细胞凋亡; B: Western blot检测凋亡相关蛋白表达水平。**P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001, 与Ctrl组比较。

A: analysis of cell apoptosis by flow cytometry; B: the expression of apoptosis-related protein was measured by Western blot. **P*<0.05, ***P*<0.01, ****P*<0.001 compared with Ctrl group.

图4 流式细胞术和Western blot检测过表达TIMP3对97H和HUH7细胞凋亡的影响

Fig.4 The apoptosis of 97H and HUH7 cells was detected by flow cytometry and Western blot

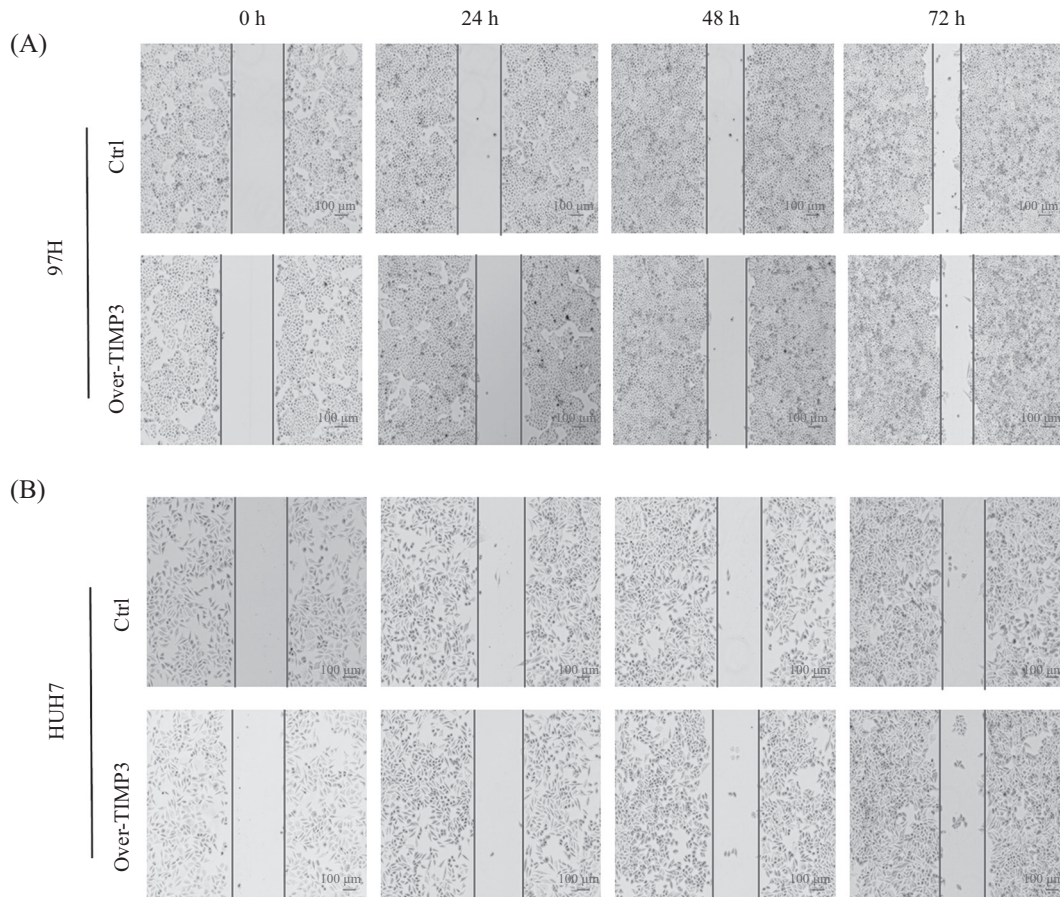


A: 流式细胞术检测97H细胞周期; B: 流式细胞术检测HUH7细胞周期。**P*<0.05, 与Ctrl组比较。

A: analysis of cell cycle in 97H cells by flow cytometry; B: analysis of cell cycle in HUH7 cells by flow cytometry. **P*<0.05 compared with Ctrl group.

图5 流式细胞术检测过表达TIMP3对97H和HUH7细胞周期的影响

Fig.5 The cell cycle of 97H and HUH7 cells was detected by flow cytometry



A: 划痕实验检测97H细胞迁移; B: 划痕实验检测HUH7细胞迁移。

A: wound healing assay was used to detect the migration of 97H; B: a wound healing assay was used to detect the migration of HUH7.

图6 划痕实验检测过表达TIMP3对97H和HUH7细胞迁移的影响

Fig.6 The migration of 97H and HUH7 cells was detected by wound healing assay

用细胞划痕实验检测过表达TIMP3对97H细胞和HUH7细胞迁移能力的影响,实验结果表明,与对照组相比,过表达组愈合程度没有明显的变化,统计学结果无统计学差异。这表明TIMP3对肝癌细胞迁移无明显作用(图6)。

2.2 GSEA富集分析

从TCGA公共数据库中获取数据集,将其中与TIMP3存在相关性的分子进行GO基因功能注释,结果提示这些基因富集在胞质核糖体、靶向膜的共翻译蛋白、呼吸链复合体、细胞基质黏附、上皮细胞迁移的调节等生物学过程中(图7)。通过对KEGG信号通路分析,发现TIMP3主要参与了61条信号通路(附表1),包括核糖体核糖、Ecm受体相互作用、黏着斑形成、凋亡等信号通路(图8)。在这里,我们也发现TIMP3与凋亡的发生存在密切关系,其P值为0.006 665,具有显著统计学差异,这与我们前面实验结果呈现一致趋势,进一步提示了相关的功能注释

在探究TIMP3分子机制上的重要作用。

2.3 相互作用的蛋白

为了明确TIMP3的可能作用途径,我们利用IntAct数据库分析预测与TIMP3存在相互作用的蛋白分子。结果发现有29种蛋白分子与TIMP3存在相互作用,且各别相互作用分数较大,其中相互作用排名前十的分别是AGTR2蛋白(MI score=0.58)、ADAMTS5蛋白(MI score=0.44)、VIM蛋白(MI score=0.4)、ADPGK蛋白(MI score=0.35)、APP蛋白(MI score=0.35)、ASGR2蛋白(MI score=0.35)、COLEC10蛋白(MI score=0.35)、COLEC11蛋白(MI score=0.35)、CRP蛋白(MI score=0.35)、CSN1S1蛋白(MI score=0.35)(图9)。

3 讨论

尽管各国对肝癌的重视程度越来越高,索拉非尼和阿帕替尼等多种靶向药物的研究也在临床治疗

上取得一定进展;但肝癌作为一种容易侵袭转移的恶性肿瘤,其临床就诊者中晚期病人,未经治疗的肝癌患者5年生存率极低,即使早期切除,术后5年复发率也在60%以上^[20]。正是基于此,针对肿瘤相关基因开展分子功能、调节机制的研究具有重要意义。本研究通过qRT-PCR和Western blot证实了TIMP3在肝癌细胞系中的表达明显比正常肝细胞低,进一步在肝癌细胞系97H、HUH7中进行TIMP3的生物学功能验证。活细胞工作站、MTT实验表明发现在肝癌细胞系中过表达TIMP3能有效促进细胞增殖,通过细胞凋亡实验也发现其能抑制凋亡,细胞周期实验发现过表达TIMP3促进细胞周期由G₁期向S期转

化。但进一步划痕实验检测TIMP3对肝癌细胞97H、HUH7迁移的影响时,发现过表达TIMP3对迁移无明显的影响。提示TIMP3可能通过细胞凋亡途径参与肝癌的发生、发展。

为了进一步对TIMP3的生物学功能及调控机制进行分析,我们通过从TCGA数据库中收集与TIMP3具有相关性的基因集信息,并利用GSEA进行数据分析,结果发现TIMP3可能参与61条信号通路,其中包括凋亡通路、Ecm受体相互作用、黏着斑形成等。IntAct数据分析TIMP3互作蛋白情况,发现TIMP3与AGTR2、ADAMTS5、VIM、ADPGK、APP、ASGR2、COLEC10、COLEC1、CRP、CSN1S1等



图7 TIMP3及其相关基因的GO分析

Fig.7 GO analysis of TIMP3 and its related genes

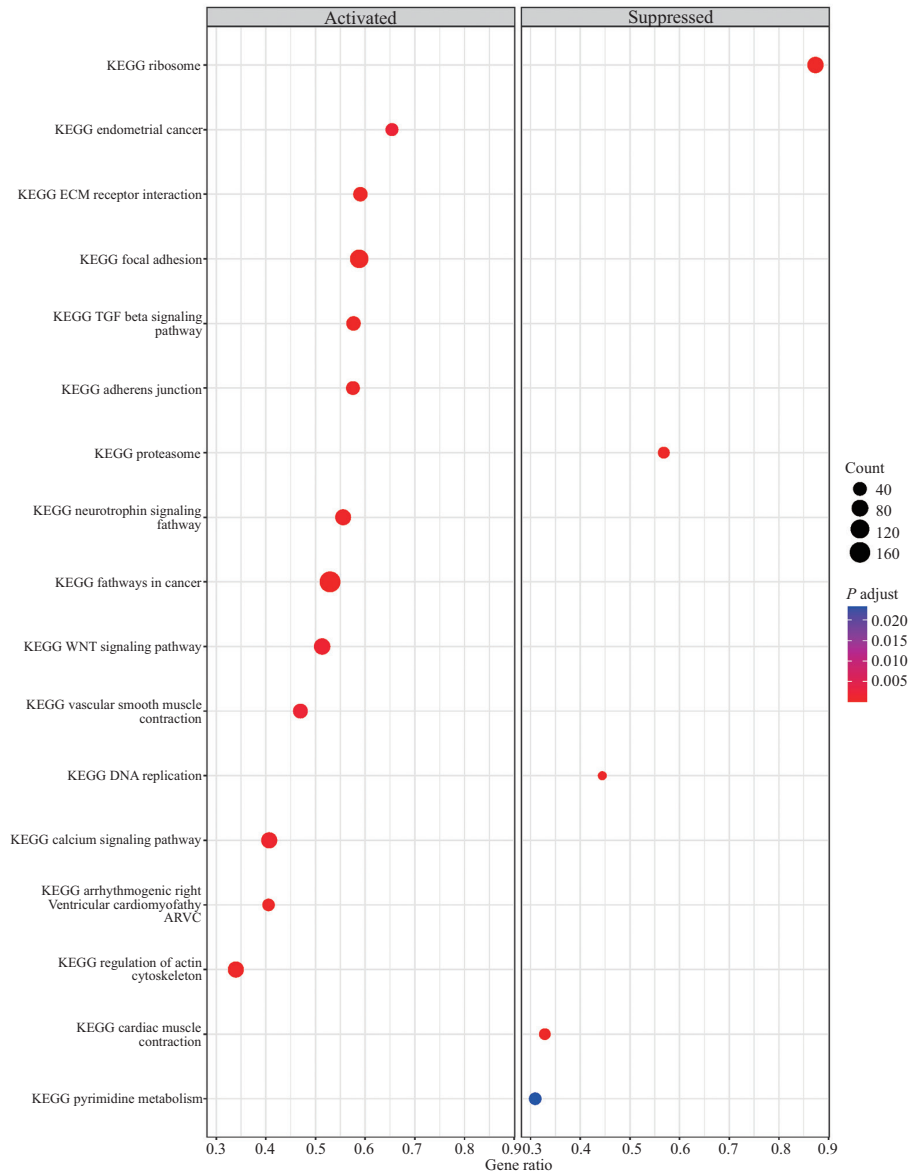


图8 TIMP3及其相关基因的KEGG信号通路分析

Fig.8 KEGG signaling pathway analysis of TIMP3 and its related genes

存在相互作用。其中AGTR2是血管紧张素2型受体,许多研究表明其可以介导细胞程序性死亡,从而在器官发育、细胞分化和组织修复中发挥重要作用^[21]。CLERE等^[22]的研究也表明,AGTR2的缺少或阻断将会抑制肿瘤细胞的增殖以及血管的生成,从而延缓肿瘤的发生。ADAMTS5是血小板反应蛋白解整合素金属肽酶家族的重要成员之一,可以在正常生理以及癌症等疾病中起到重要作用^[23]。ADAMTS5表达上调可以促进胶质母细胞瘤细胞的迁移,而其在肝癌^[24]、结直肠癌^[25]、胃癌^[26]等中低表达,并且LI等^[24]发现ADAMTS在肝癌中通过抑制血管生成从而抑制肿瘤的生长。但TIMP3在肝癌中的生物学功

能的实现是否与AGTR2或ADAMTS5等相互作用蛋白相关,这仍需要更多的研究进行深入探索。

4 结论

总而言之,肝癌细胞中TIMP3表达降低,过表达TIMP3则促进肝癌细胞增殖,抑制细胞凋亡。TIMP3可能是肝癌的潜在诊断标志物和治疗靶点,TIMP3在肝癌中的具体作用机制仍需要进一步的研究。

参考文献 (References)

- [1] SUNG H, FERLAY J, SIEGEL R L, et al. Global cancer statistics

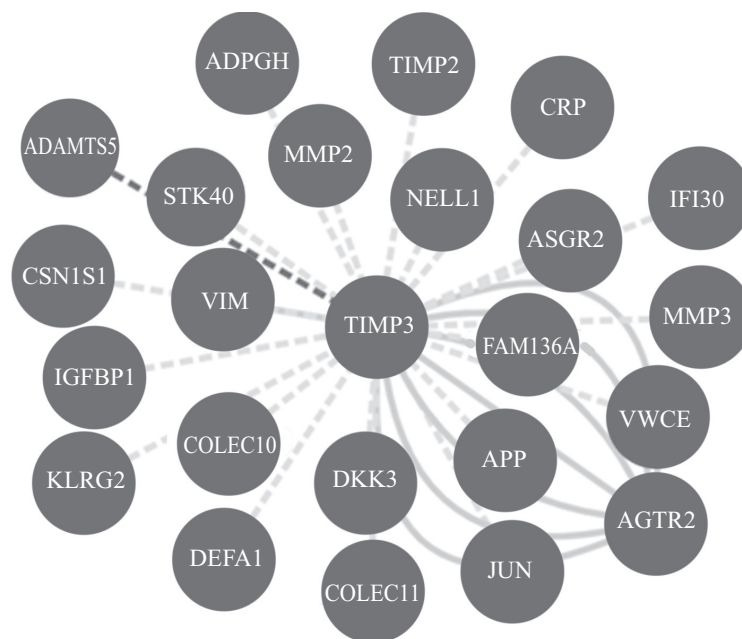


图9 TIMP3相互作用蛋白图

Fig.9 TIMP3 interacting protein map

- 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] 曾慧岚, 陈敏山. 2021年肝癌治疗进展[J]. *肿瘤综合治疗电子杂志* (ZENG H L, CHEN M S. Year-end review of liver cancer treatment in 2021 [J]. *Journal of Multidisciplinary Cancer Management, Electronic Version*), 2022, 8(1): 72-7.
- [3] 曹毛毛, 李贺, 孙殿钦, 等. 全球肝癌2020年流行病学现状[J]. *中华肿瘤防治杂志* (CAO M M, LI H, SUN D Q, et al. Global epidemiology of liver cancer in 2020 [J]. *Chin J Cancer Prev Treat*), 2022, 29(5): 322-8.
- [4] 吕桂帅, 陈磊, 王红阳. 我国肝癌研究的现状与前景[J]. *生命科学* (LÜ G S, CHEN L, WANG H Y. Research progress and prospect of liver cancer in china [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*), 2015, 27(3): 237-48.
- [5] FAN D, KASSIRI Z. Biology of tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (TIMP3), and its therapeutic implications in cardiovascular pathology [J]. *Front Physiol*, 2020, 11: 661.
- [6] KOPITZ C, GERG M, BANDAPALLI O R, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 promotes liver metastasis by induction of hepatocyte growth factor signaling [J]. *Cancer Res*, 2007, 67(18): 8615-23.
- [7] SCHELTER F, GRANDL M, SEUBERT B, et al. Tumor cell-derived Timp-1 is necessary for maintaining metastasis-promoting Met-signaling via inhibition of Adam-10 [J]. *Clin Exp Metastasis*, 2011, 28(8): 793-802.
- [8] SEUBERT B, GRUNWALD B, KOBUCH J, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 creates a premetastatic niche in the liver through SDF-1/CXCR4-dependent neutrophil recruitment in mice [J]. *Hepatology*, 2015, 61(1): 238-48.
- [9] CUI H, SEUBERT B, STAHL E, et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 induces a pro-tumorigenic increase of miR-210 in lung adenocarcinoma cells and their exosomes [J]. *Oncogene*, 2015, 34(28): 3640-50.
- [10] HUANG H L, LIU Y M, SUNG T Y, et al. TIMP3 expression associates with prognosis in colorectal cancer and its novel arylsulfonamide inducer, MPT0B390, inhibits tumor growth, metastasis and angiogenesis [J]. *Theranostics*, 2019, 9(22): 6676-89.
- [11] TAKAWALE A, ZHANG P, AZAD A, et al. Myocardial overexpression of TIMP3 after myocardial infarction exerts beneficial effects by promoting angiogenesis and suppressing early proteolysis [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2017, 313(2): H224-H36.
- [12] CHINTALGATTU V, GREENBERG J, SINGH S, et al. Utility of glycosylated TIMP3 molecules: inhibition of MMPs and TACE to improve cardiac function in rat myocardial infarct model [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2018, 6(6): e00442.
- [13] ECKHOUSE S R, PURCELL B P, MCGARVEY J R, et al. Local hydrogel release of recombinant TIMP-3 attenuates adverse left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction [J]. *Sci Transl Med*, 2014, 6(223): 223ra21.
- [14] HUANG H L, LIU Y M, SUNG T Y, et al. TIMP3 expression associates with prognosis in colorectal cancer and its novel arylsulfonamide inducer, MPT0B390, inhibits tumor growth, metastasis and angiogenesis [J]. *Theranostics*, 2021, 11(5): 2079.
- [15] CRUZ-MUNOZ W, SANCHEZ O H, DI GRAPPA M, et al. Enhanced metastatic dissemination to multiple organs by melanoma and lymphoma cells in *timp-3^{-/-}* mice [J]. *Oncogene*, 2006, 25(49): 6489-96.
- [16] ZHANG Z, WANG J, WANG X, et al. MicroRNA-21 promotes proliferation, migration, and invasion of cervical cancer through targeting TIMP3 [J]. *Arch Gynecol Obstet*, 2018, 297(2): 433-42.
- [17] BALKHI S, MASHAYEKHI F, SALEHZADEH A, et al. TIMP1 and TIMP3 circulating levels and promoter polymorphisms in breast cancer [J]. *Br J Biomed Sci*, 2021, 78(4): 236-8.
- [18] NAGAO Y, HISAOKA M, MATSUYAMA A, et al. Association of microRNA-21 expression with its targets, PDCC4 and TIMP3,

- in pancreatic ductal adenocarcinoma [J]. *Mod Pathol*, 2012, 25(1): 112-21.
- [19] ZHANG H, WANG Y S, HAN G, et al. TIMP-3 gene transfection suppresses invasive and metastatic capacity of human hepatocarcinoma cell line HCC-7721 [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007, 6(5): 487-91.
- [20] 宗静静, 卿鑫, 樊哲, 等. 原发性肝癌治疗进展[J]. *东南大学学报(医学版)*(ZONG J J, QING X, FAN Z, et al. Advances in the treatment of primary liver cancer [J]. *J Southeast Univ, Med Sci Edi*), 2021, 40(4): 542-7.
- [21] KASCHINA E, UNGER T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function [J]. *Blood Press*, 2003, 12(2): 70-88.
- [22] CLERE N, CORRE I, FAURE S, et al. Deficiency or blockade of angiotensin II type 2 receptor delays tumorigenesis by inhibiting malignant cell proliferation and angiogenesis [J]. *Int J Cancer*, 2010, 127(10): 2279-91.
- [23] KINTAKAS C, MCCULLOCH D R. Emerging roles for ADAMTS5 during development and disease [J]. *Matrix Biol*, 2011, 30(5/6): 311-7.
- [24] LI C, XIONG Y, YANG X, et al. Lost expression of ADAMTS5 protein associates with progression and poor prognosis of hepatocellular carcinoma [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2015, 9: 1773-83.
- [25] KIM Y H, LEE H C, KIM S Y, et al. Epigenomic analysis of aberrantly methylated genes in colorectal cancer identifies genes commonly affected by epigenetic alterations [J]. *Ann Surg Oncol*, 2011, 18(8): 2338-47.
- [26] HUANG J T, SUN Y, CHEN H, et al. ADAMTS5 acts as a tumor suppressor by inhibiting migration, invasion and angiogenesis in human gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2019, 22(2): 287-301.

附表1

信号通路 Pathway	富集分数 Enrichment score	标准化富集分数 Normalize enrichment scores	P值 P value	校正P值 P adjust	Q值 Q value
Ribosome	-0.882 6	-4.598 1	1.00×10^{-10}	8.95×10^{-9}	8.95×10^{-9}
Focal adhesion	0.532 8	1.876 2	1.00×10^{-10}	8.95×10^{-9}	8.95×10^{-9}
Proteasome	-0.646 8	-2.880 7	5.64×10^{-10}	3.36×10^{-8}	3.36×10^{-8}
Cardiac muscle contraction	-0.469 9	-2.400 3	2.65×10^{-18}	1.18×10^{-6}	1.18×10^{-6}
TGF- β signaling pathway	0.549 4	1.830 9	6.57×10^{-7}	2.35×10^{-5}	2.35×10^{-5}
ECM receptor interaction	0.545 7	1.819 8	2.72×10^{-6}	0.000 1	0.000 1
Pathways in cancer	0.410 1	1.468 1	6.53×10^{-6}	0.000 2	0.000 2
Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy arc	0.540 3	1.770 9	1.68×10^{-5}	0.000 4	0.000 4
DNA replication	-0.523 9	-2.213 6	2.91×10^{-5}	0.000 5	0.000 5
Adherens junction	0.533 1	1.742 7	3.20×10^{-5}	0.000 5	0.000 5
Regulation of actin cytoskeleton	0.429 4	1.516 0	3.17×10^{-5}	0.000 5	0.000 5
Neurotrophin signaling pathway	0.465 3	1.603 9	4.7×10^{-5}	0.000 7	0.000 7
Calcium signaling pathway	0.430 9	1.511 8	0.000 1	0.001 2	0.001 2
WNT signaling pathway	0.447 2	1.556 4	0.000 1	0.001 7	0.001 7
Vascular smooth muscle contraction	0.468 6	1.607 2	0.000 2	0.001 9	0.001 9
Endometrial cancer	0.541 0	1.698 5	0.000 2	0.002 2	0.002 2
Inositol phosphate metabolism	0.535 2	1.692 9	0.000 2	0.002 2	0.002 2
Ubiquitin mediated proteolysis	0.451 1	1.556 5	0.000 2	0.002 2	0.002 2
Chronic myeloid leukemia	0.505 3	1.652 0	0.000 3	0.002 3	0.002 3
Phosphatidylinositol signaling system	0.502 0	1.651 6	0.000 3	0.002 3	0.002 3
MAPK signaling pathway	0.403 5	1.435 5	0.000 3	0.002 3	0.002 3
Axon guidance	0.449 3	1.549 3	0.000 3	0.002 4	0.002 4
Colorectal cancer	0.517 2	1.665 2	0.000 3	0.002 4	0.002 4
ErbB signaling pathway	0.477 2	1.597 1	0.000 5	0.003 7	0.003 7
Prostate cancer	0.473 7	1.589 0	0.000 7	0.004 8	0.004 8
Small cell lung cancer	0.474 5	1.580 9	0.000 8	0.005 4	0.005 4
Leukocyte transendothelial migration	0.448 4	1.537 7	0.000 8	0.005 4	0.005 4
Gap junction	0.470 2	1.577 3	0.000 9	0.005 5	0.005 5
T cell receptor signaling pathway	0.453 5	1.548 9	0.001 0	0.006 0	0.006 0
Pancreatic cancer	0.488 6	1.591 4	0.001 0	0.006 1	0.006 1
Renal cell carcinoma	0.487 3	1.587 1	0.001 1	0.006 1	0.006 1
Apoptosis	0.463 4	1.551 0	0.001 2	0.006 7	0.006 7

续附表1

信号通路 Pathway	富集分数 Enrichment score	标准化富集分数 Normalize enrichment scores	P值 P value	校正P值 P adjust	Q值 Q value
Dorso ventral axis formation	0.610 4	1.681 5	0.002 0	0.010 9	0.010 9
Valine leucine and isoleucine degradation	0.520 1	1.602 5	0.002 7	0.014 3	0.014 3
Chemokine signaling pathway	0.389 8	1.367 9	0.003 2	0.016 4	0.016 4
Dilated cardiomyopathy	0.448 7	1.504 6	0.003 4	0.016 4	0.016 4
Fc gamma R-mediated phagocytosis	0.434 3	1.463 2	0.003 4	0.016 4	0.016 4
Long term depression	0.465 7	1.517 0	0.003 8	0.018 0	0.018 0
B cell receptor signaling pathway	0.461 4	1.517 2	0.004 2	0.019 4	0.019 4
Notch signaling pathway	0.505 7	1.563 3	0.004 4	0.019 4	0.019 4
Insulin signaling pathway	0.410 2	1.417 0	0.004 4	0.019 4	0.019 4
JAK-STAT signaling pathway	0.411 6	1.435 3	0.004 9	0.020 8	0.020 8
Pyrimidine metabolism	-0.283 1	-1.495 6	0.005 6	0.023 3	0.023 3
Glioma	0.466 6	1.509 7	0.005 9	0.023 9	0.023 9
Acute myeloid leukemia	0.480 5	1.530 5	0.006 2	0.024 5	0.024 5
mTOR signaling pathway	0.475 1	1.491 5	0.008 1	0.031 6	0.031 6
Fc epsilon RI signaling pathway	0.445 2	1.472 1	0.008 5	0.031 6	0.031 6
Tight junction	0.402 7	1.388 3	0.008 5	0.031 6	0.031 6
Lysine degradation	0.494 2	1.522 5	0.008 9	0.032 4	0.032 4
Vasopressin regulated water reabsorption	0.491 2	1.513 4	0.009 7	0.034 6	0.034 6
O glycan biosynthesis	0.522 0	1.514 7	0.011 2	0.039 3	0.039 3
Hedgehog signaling pathway	0.470 5	1.493 0	0.012 4	0.041 5	0.041 5
Toll-like receptor signaling pathway	0.421 1	1.423 9	0.012 5	0.041 5	0.041 5
Progesterone mediated oocyte maturation	0.425 4	1.417 5	0.012 1	0.041 5	0.041 5
VEGF signaling pathway	0.432 1	1.421 5	0.013 1	0.042 6	0.042 6
Sphingolipid metabolism	0.495 8	1.498 2	0.013 8	0.044 0	0.044 0
Aldosterone regulated sodium reabsorption	0.489 0	1.496 2	0.014 8	0.046 4	0.046 4
Long term potentiation	0.440 5	1.434 9	0.015 9	0.048 3	0.048 3
Hypertrophic cardiomyopathy hcm	0.428 1	1.427 7	0.015 8	0.048 3	0.048 3
Non-small cell lung cancer	0.455 7	1.441 6	0.016 3	0.048 6	0.048 6
Adipocytokine signaling pathway	0.440 9	1.432 2	0.016 9	0.049 5	0.049 5