

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2017.30.004

文章编号: 1005-8982(2017)30-0021-05

上调 XB130 表达对人肝癌 HepG2 细胞凋亡和增殖的影响

陆林, 李东升, 白光

(锦州医科大学附属第一医院 普外科, 辽宁 锦州 121001)

摘要: **目的** 观察 XB130 表达上调后人肝癌细胞 HepG2 增殖和凋亡的变化, 并探讨其作用机制。**方法** Western blot 及实时荧光定量聚合酶链反应(qRT-PCR)检测肝癌细胞株中 XB130 表达;构建过表达质粒 pCMV-EGFP-XB130 转染 HepG2 细胞, 实验分为 pCMV-EGFP-XB130 组(pCMV-EGFP-XB130 转染), 空白对照组(EGFP 转染)。以免疫荧光、Western blot 法及 qRT-PCR 法检测上调效率。Western blot 法检测 PI3K/Akt 通路相关基因表达;采用 MTT 法检测转染后细胞增殖, 流式细胞术检测细胞凋亡。**结果** XB130 蛋白及其 mRNA 在肝癌细胞株 Hep3B、Huh7、HepG2 和 MHCC97H 中均有表达, 在 HepG2 细胞株中表达量最低($F=6.342$ 和 5.424 , 均 $P=0.001$)。与 EGFP 组比较, pCMV-EGFP-XB130 组中 p-p21、p-p27、p-FOXO3a 及 Pro Caspase-9 蛋白表达上调($t=4.652, 3.558, 6.743$ 和 3.021 , 均 $P<0.05$);XB130 表达上调后在 72 及 96 h HepG2 细胞增殖能力增强($t=4.752$ 和 8.542 , 均 $P=0.001$);XB130 表达上调后 HepG2 细胞凋亡率降低($t=7.467, P=0.001$)。**结论** XB130 表达上调通过 PI3K/Akt 信号通路促进肝细胞癌细胞增殖, 抑制凋亡。

关键词: XB130; 肝细胞癌; 增殖; 凋亡

中图分类号: R657.3

文献标识码: A

Effect of XB130 on human hepatocellular carcinoma HepG2 cells

Lin Lu, Dong-sheng Li, Guang Bai

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Jinzhou Medical University, Jinzhou, Liaoning 121001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of XB130 on proliferation and apoptosis of human hepatocellular carcinoma HepG2 cell lines. **Methods** Western blot and qRT-PCR were utilized to determine expression of XB130 in hepatocellular carcinoma cells. Over expressed plasmid pCMV-EGFP-XB130 was transfected into HepG2 cells. Expression of XB130 was identified by Immunofluorescence, Western blot, and qRT-PCR. PI3K/Akt pathway related proteins were measured by Western blot; proliferation and apoptosis rate were measured by MTT assay and Flow cytometry, respectively. **Results** XB130 protein and mRNA were detected in different hepatocellular carcinoma cell-lines including Hep3B, Huh7, HepG2 and MHCC97H while HepG2 showed the lowest concentration of XB130 ($P=0.001$). p-p21, p-p27, p-FOXO3a and pro-Caspase 9 protein in pCMV-EGFP-XB130 group was up-regulated significantly when compared with EGFP control group ($t=4.652, 3.021, 3.558$ and $6.743, P<0.05$); XB130 overexpression increased cellular proliferation ($P=0.001$) while decreased apoptosis at the 72nd and 96th ($P=0.001$) in HepG2. **Conclusion** Up-regulation of XB130 increases proliferation while inhibits apoptosis via modulating PI3K/Akt signal pathway in hepatocellular carcinoma HepG2.

Keywords: XB130; hepatocellular carcinoma; proliferation; apoptosis

以提高早期发现率为目的的筛查手段的改进和对不能手术切除肝细胞癌的治疗靶点的检测,是目前肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)研究的主要方向^[1-2]。研究显示,丝裂原活化蛋白激酶(mitogenactivated protein kinase,MAPK)、表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor)、胰岛素样生长因子受体(insulin-like growth factor receptor,IGFR)、磷脂酰肌醇 3 激酶/蛋白激酶 B(phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B,PI3K/Akt)、雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin,mTOR)、NOTCH 和 HEDGEHOG 等信号通路均与肝细胞癌形成、进展及预后相关^[3-4]。针对某些信号通路中靶点的分子靶向药物也逐渐在临床得到应用,更多患者受益^[5]。PI3K/Akt 对肝癌细胞的增殖及凋亡等行为具有调控作用,是目前肝癌中已知的信号通路中最为重要的之一^[6],而 XB130 位于 PI3K/Akt 上游,在甲状腺癌及结直肠癌等恶性肿瘤中对 PI3K/Akt 信号通路具有调控作用^[7],但在肝细胞癌中没有相关研究。本研究采用 XB130 过表达质粒转染肝细胞癌细胞,上调 XB130 表达,目的在于观察肝细胞癌细胞增殖及凋亡变化,并探讨其机制。

1 材料与方法

1.1 材料

肝细胞癌细胞株 Huh7、Hep3B、MHCC97H、HepG2(由锦州医科大学基础外科实验室惠赠)采用贴壁细胞培养法进行培养及传代。XB130 多克隆抗体、p21、p-p21、p-p27、p-FOXO3a、Pro Capase-8、Cleaved Capase-8、Pro Capase-9 及 Cleaved Capase-9 抗体(购自北京中杉金桥生物制品有限公司),BCA 蛋白定量试剂盒及 ECL 发光液(购自日本 TaKaRa 公司),pCMV-EGFP-XB130 质粒及空载 EGFP 质粒(江苏浩博生物技术有限公司),实时荧光定量聚合酶链反应(quantitative real-time polymerase chain reaction,qRT-PCR)逆转录试剂盒(购自美国 Sigma 公司),MTT 及 Annexin V-FITC/PI 试剂盒(购自美国 Invitrogen 公司),qPCR Mix 试剂盒及 Lipofectamine 2000™ 试剂盒(购自武汉默沙克生物技术有限公司),miRNA 提取试剂盒(购自哈尔滨海基生物科技有限公司),引物由江苏浩博生物技术有限公司。实验分为 pCMV-EGFP-XB130 组(pCMV-EGFP-XB130 转染),空白对照组(EGFP 转染)。

1.2 方法

1.2.1 Western blot 采用裂解液裂解贴壁细胞,按蛋白抽提试剂盒步骤进行蛋白抽提,收集蛋白样品,对蛋白浓度进行定量,采用商用 SDS-PAGE 凝胶试剂盒步骤进行蛋白上样,采用普通的电泳仪电压设置为 100 V,时间 100 min,选用 PVDF 膜在冰浴中进行转膜。转膜后立即进行蛋白膜漂洗 1~2 min,封膜后室温封闭 60 min,按一抗说明书步骤稀释一抗,吸尽封闭液,加入稀释的一抗,4℃在摇床上并孵育 1 h,回收一抗后并洗涤。加二抗,4℃在摇床上孵育 1 h,回收二抗并洗涤 10 min 后使用 Beyo ECL 检测蛋白及发光,对灰度值进行定量分析。

1.2.2 qRT-PCR 检测 经 Trizol 试剂裂解的细胞在室温下放置 5 min 使其完全溶解,然后进行 RNA 抽提。采用紫外吸收法测定 RNA 液浓度及纯度,采用变性琼脂糖凝胶电泳进行 RNA 完整性测定。然后进行样品 cDNA 合成、梯度稀释标准品及待测样品管家基因(β -actin)的 qRT-PCR、制备用来绘制梯度稀释标准曲线的 DNA 模板,然后对待测基因进行 qRT-PCR 检测,反应体系如下:①SYBR Green 1 染料 10 μ l;②正向引物 1 μ l;③反向引物 1 μ l;④dNTP 1 μ l;⑤Taq 聚合酶 2 μ l;⑥待测样品 cDNA 5 μ l;⑦ddH₂O 30 μ l,⑧总体积 50 μ l,将配制好的 PCR 反应溶液置于 Real time PCR 仪上进行 PCR 扩增反应。反应条件:93℃预变性 2 min,然后按 94℃ 1 min,56℃ 1 min,73℃ 1 min,共 40 个循环,最后 73℃ 7min 延伸。 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法对扩增曲线进行分析。

1.2.3 pCMV-EGFP-XB130 及 EGFP 转染 转染前 24 h 用胰酶将对数生长期细胞消化成为单细胞悬液于 24 孔板进行接种,70%以上融合度细胞株按照试剂盒步骤进行转染,转染后继续培养 48 h,以荧光倒置显微镜、Western blot 及 qRT-PCR 进行转染效率检测。

1.2.4 MTT(methyl-thiazolyl-tetrazolium)检测转染 HepG2 细胞增殖 对转染后细胞依据 MTT 试剂盒操作步骤,4 \times 10⁴~6 \times 10⁴ 个/ml 细胞密度接种于 96 孔板,设立 3 个复孔,继续在培养基中培养 96 h,在 24、48、72 及 96 h 时,加入 MTT 液,于 37℃温箱继续孵育 4 h,弃上清液,加 150 μ l DMSO,震荡后上酶标定量仪测定并记录光密度值,实验重复 3 次,取平均值进行对照分析。

1.2.5 流式细胞仪检测细胞凋亡 取转染 48 h 的对数期 HepG2 细胞,依照 Annexin V-FITC/PI 双染色

凋亡检测试剂盒说明书进行操作,通过流式细胞仪检测凋亡,检测结果通过 Cell Quest 软件分析,区分细胞早期凋亡、晚期凋亡及继发坏死区,早期凋亡及晚期凋亡阳性细胞百分比例和为凋亡率,实验重复 3 次,对平均值进行对照分析。

1.3 统计学方法

数据分析采用 SPSS 22.0 统计软件,计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,率的比较采用 χ^2 检验,多组间比较进行单因素方差分析,采用 LSD-*t* 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 XB130 在肝癌细胞中的表达情况

Western blot 及 qRT-PCR 显示,肝癌细胞株 Hep3B、HepG2、Huh7、MHCC97H 中 XB130 在蛋白及其 mRNA 水平均有表达,与其他细胞株比较,HepG2 细胞中 XB130 mRNA 的表达量最低,差异有统计学意义 ($F=5.424, P=0.028$),见图 1A;HepG2 细胞中 XB130 蛋白表达最低,差异有统计学意义 ($F=6.342, P=0.006$),见图 1B。

2.2 转染效率情况

采用荧光倒置显微镜进行免疫荧光检测,转染成功荧光现象细胞数占转染总细胞数的百分率为 70% ~ 90%,转染效率满意,见图 2A。qRT-PCR 及 Western blot 显示,EGFP 组 XB130 在 mRNA 及蛋白水平表达均低于 pCMV-EGFP-XB130 转染组,差异有统计学意义 ($t=12.634$ 和 $13.642, P=0.002$ 和 0.001)。见图 2B。

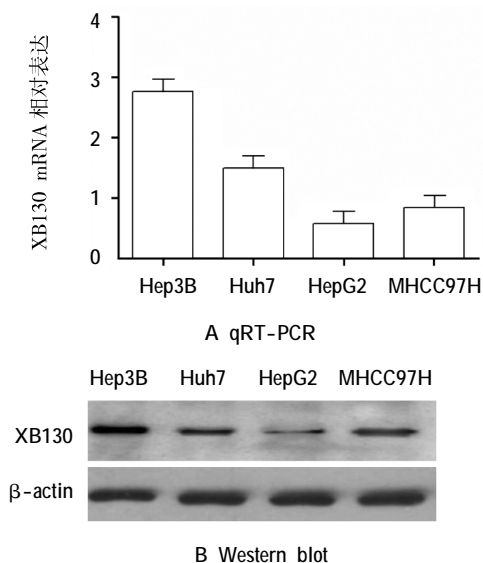


图 1 肝癌细胞株 XB130 表达情况

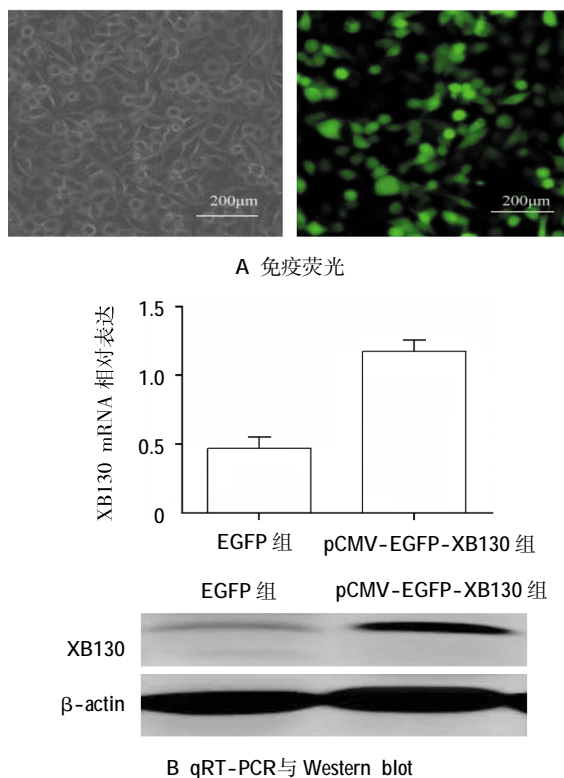


图 2 pCMV-EGFP-XB130 转染细胞系的构建情况

2.3 转染后 PI3K/Akt 信号通路相关基因表达

Western blot 显示,与 EGFP 组比较,pCMV-EGFP-XB130 组中 p-p21、p-p27、p-FOXO3a 及 Pro Capase-9 蛋白表达上调 ($t=4.652, 3.021, 3.558$ 及 $6.743, P=0.031, 0.042, 0.039$ 及 0.027),p27 蛋白表达下调 ($t=3.057, P=0.041$),p21、FOXO3a、Pro Capase-8、Cleaved Capase-8 及 Cleaved Capase-9 蛋白表达无变化 ($t=0.983, 1.007, 1.201, 1.104$ 及 $1.052, P=0.746, 0.563, 0.685, 0.339$ 及 0.438)。见图 3。

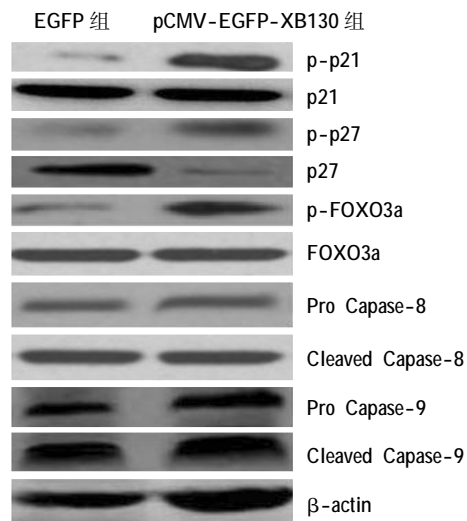


图 3 转染后 PI3K/Akt 相关基因的表达 (Western blot)

2.4 转染后 HepG2 细胞增殖率

MTT 显示,通过采集 HepG2 细胞培养 0、24、48、72 及 96 h 的生存率,EGFP 组及 pCMV-EGFP-XB130 组细胞生存率在 72 h: $(52.47 \pm 1.09)\%$ vs $(67.18 \pm 3.67)\%$ 及 96 h: $(58.36 \pm 0.16)\%$ vs $(79.72 \pm 0.19)\%$, 差异有统计学意义 ($t=4.752$ 和 8.542 , $P=0.025$ 和 0.0164),XB130 表达上调后 HepG2 细胞增殖能力增强,见图 4。

2.5 转染后 HepG2 细胞株凋亡率

EGFP 组与 pCMV-EGFP-XB130 组 HepG2 细胞凋亡率分别为 $(45.75 \pm 9.38)\%$ 和 $(27.83 \pm 7.26)\%$, 差异有统计学意义 ($t=7.467$, $P=0.005$),XB130 表达上调后 HepG2 细胞凋亡率降低。见图 5。

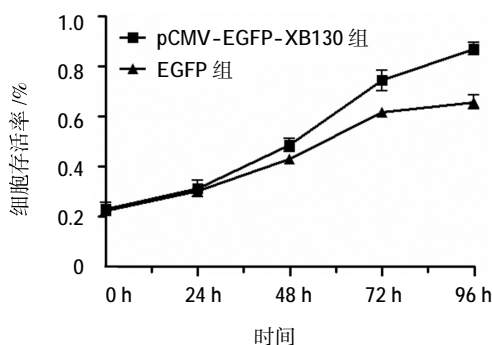


图 4 转染后 HepG2 细胞增殖情况 (MTT)

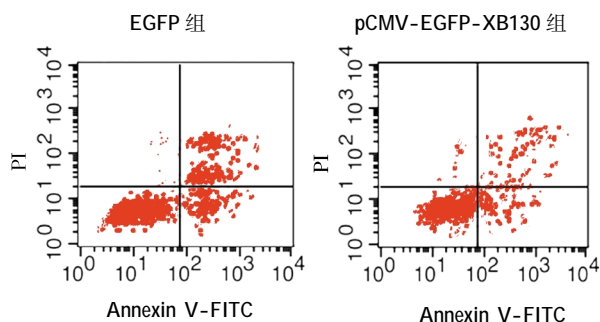


图 5 转染后 HepG2 细胞凋亡 (流式细胞仪)

3 讨论

肝细胞癌的以恶性度高、肿瘤增殖活跃、早期转移率高、复发率高及预后差为特点^[9]。肝细胞癌对放疗及化疗敏感性差,肿瘤进展迅速,大部分患者不能手术或者进行射频消融等介入手段治疗^[9-10]。索拉非尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司及利尼伐尼是目前临床已经应用的靶向药物,达到延长或者生存期或将不可切除肿瘤转化为可切除肿瘤的目的^[11]。但应用靶向药物的近远期分析结果表明,靶向药物的有效率低于 40%^[12],其原因在于肝细胞癌是多因素

及多基因共同作用的结果,针对单一靶点的治疗可能不能达到控制肿瘤发展的目的,对新的治疗靶点的探索是肝细胞癌治疗的方向^[13]。PI3K/Akt 通路对肝细胞癌细胞生物学行为具有调控作用,尤其在增殖及凋亡方面^[14],在 PI3K/Akt 通路中,XB130 位于上游,对该通路具有调控作用,p21 磷酸化 PI3K/Akt 信号通路调控的主要形式之一,而 XB130 在多种肿瘤中通过在上游调节 PI3K/Akt 通路进而调控 p21 磷酸化而改变细胞行为^[7,15]。

本研究首先通过检测 Hep3B、Huh7、HepG2 及 MHCC97H 4 个肝细胞癌细胞株中 XB130 表达,筛选出表达量最低的 HepG2 细胞进行 XB130 表达的上调,成功构建 XB130 过表达细胞株,进一步检测 PI3K/Akt 信号通路下游基因表达,结果显示,p-p21、p-p27、p-FOXO3a 及 Pro Capase-9 蛋白水平表达上调,p27 蛋白表达下调。XB130 表达上调后在 72 及 96h HepG2 细胞增殖能力增强,XB130 表达上调后 HepG2 细胞凋亡率降低。有研究显示,PI3K/Akt 通过 p21、p27 及 FOXO3a 磷酸化调控细胞增殖,通过 Cleaved Capase-8 及 Cleaved Capase-9 调控细胞凋亡^[16],本研究结果提示,在蛋白水平,p21、p27 及 FOXO3a 磷酸化水平升高,PI3K/Akt 信号通路可能作为 XB130 的下游信号通路调控以上基因的磷酸化水平而影响细胞增殖行为,通过下游提高 Pro Capase-9 表达引起细胞凋亡率降低。WANG^[17]研究认为,在肝细胞癌中,PI3K/Akt 信号通路对调节下游基因转录及翻译从而从表观上改变细胞的增殖及凋亡行为,这种调控作用即受到上游效应因子的调控,又会将调控效应作用于下游的效应因子,影响细胞的分子生物学行为。XB130 通过与 p85 α 形成复合物激活 Akt,Akt 上的丝氨酸及苏氨酸位点通过磷酸化改变激活 Akt,激活后的 Akt 对下游通路上的 p21 及 p27 等基因进行磷酸化调节,导致细胞增殖及凋亡行为改变^[18]。p21 表达缺失或下调可引起细胞过度增殖^[19]。XB130 在 HCG 中可能作为靶点控制 PI3K/Akt 下游基因磷酸化水平,p21、p27 及 FOXO3a 磷酸化增加后 HepG2 细胞增殖能力增强。Pro Capase-9 水平升高后 HepG2 细胞凋亡减少。

本研究通过上调 XB130 表达,观察 PI3K/Akt 通路基因 p21、p27 及 Pro Capase-9 等表达水平的改变,并观察其磷酸化后蛋白水平的变化,从肝癌离体细胞株凋亡及增殖表观对 XB130 上调后细胞分子生物学行为改变进行实验研究,发现 XB130 过表达

可能通过改变 p21、p27 及 Pro Capase-9 等的磷酸化水平而影响 PI3K/Akt 信号通路,从而对肝癌细胞的增殖及凋亡进行调控,肝癌细胞的增殖活性减弱,凋亡率增加。通过进一步的实验研究可以探讨 XB130 是否可以作为肝癌靶向治疗的靶点或候选基因。

参 考 文 献:

- [1] TAKAMOTO T, SUGAWARA Y, HASHIMOTO T, et al. Evaluating the current surgical strategies for hepatocellular carcinoma[J]. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 2015, 10(3): 1-17.
- [2] GAVANIER M, AYAV A, SELLAL C, et al. CT imaging findings in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib: Alternative response criteria (Choi, European Association for the Study of the Liver, and modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumor (mRECIST) versus RECIST 1.1[J]. *Eur J Radiol*, 2016, 85(1): 103-112.
- [3] TANG H, LI R P, LIANG P, et al. MiR-125a inhibits the migration and invasion of liver cancer cells via suppression of the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway[J]. *Oncol Lett*, 2015, 10(2): 681-686.
- [4] CHEN B, SHEN S, WU J, et al. CISD2 associated with proliferation indicates negative prognosis in patients with hepatocellular carcinoma[J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2015, 8(10): 13725-13738.
- [5] WADA Y, TAKAMI Y, TATEISHI M, et al. The efficacy of continued sorafenib treatment after radiologic confirmation of progressive disease in patients with advanced hepatocellular carcinoma[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146456.
- [6] TANG Y, LV P, SUN Z, et al. 14-3-3 β promotes migration and invasion of human hepatocellular carcinoma cells by modulating expression of MMP2 and MMP9 through PI3K/Akt/NF- κ B pathway[J]. *PLoS One*, 2016, 11(1): e0146070.
- [7] SHIOZAKI A, LODYGA M, BAI X H, et al. XB130, a novel adaptor protein, promotes thyroid tumor growth[J]. *Am J Pathol*, 2011, 178(1): 391-401.
- [8] 许远,王兆洪,吴志豪,等.肝内胆管细胞癌患者肝切除术预后影响因素[J].*中华肝胆外科杂志*, 2015, 21(1): 52-53.
- [9] ZHANG Y F, WEI W, GUO Z X, et al. Hepatic resection versus transcatheter arterial chemoembolization for the treatment of hepatocellular carcinoma with hepatic vein tumor thrombus[J]. *Jpn J Clin Oncol*, 2015, 45(9): 837-843.
- [10] MANINI M A, SANGIOVANNI A, MARTINETTI L, et al. Transarterial chemoembolization with drug-eluting beads is effective for the maintenance of the Milan-in status in patients with a small hepatocellular carcinoma[J]. *Liver Transpl*, 2015, 21(10): 1259-1269.
- [11] 李克跃,石承先,汤可立.索拉非尼对人肝癌细胞生长抑制作用的体外研究[J].*中国普通外科杂志*, 2015, 24(7): 958-962.
- [12] YOKOO H, KAMIYAMA T, KAKISAKA T, et al. Efficacy of sorafenib for extrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after liver resection[J]. *Gan to Kagaku Ryoho*, 2015, 42(12): 1497-1499.
- [13] WAGHRAY A, MURALI A R, MENON K N. Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment [J]. *World J Hepatol*, 2015, 7(8): 1020-1029.
- [14] ZHANG Y, ZHENG L, DING Y, et al. MiR-20a induces cell radioresistance by activating the PTEN/PI3K/Akt signaling pathway in hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2015, 92(5): 1132-1140.
- [15] SHIOZAKI A, SHEN-TU G, BAI X, et al. XB130 mediates cancer cell proliferation and survival through multiple signaling events downstream of Akt[J]. *PLoS One*, 2012, 7(8): e43646.
- [16] LODYGA, de FALCO V, BAI X H, et al. Xb130, a tissue-specific adaptor protein that couples the RET/PTC oncogenic kinase to PI 3-kinase pathway[J]. *Oncogene*, 2009, 28(12): 937-949.
- [17] WANG X, HAN L, ZHANG J, et al. Down-regulated NRSN2 promotes cell proliferation and survival through PI3K/Akt/mTOR pathway in hepatocellular carcinoma[J]. *Dig Dis Sci*, 2015, 60(10): 3011-3018.
- [18] 刘博,戚诚,刘学臣,等. AFAP-1L2 对胰腺癌细胞侵袭及转移的影响及机制[J].*中国普通外科杂志*, 2015, 24(9): 1257-1262.
- [19] CHEN Y, LIN C, LIU Y, et al. HMGB1 promotes HCC progression partly by downregulating p21 via ERK/c-Myc pathway and upregulating MMP-2[J]. *Tumour Biol*, 2015, 24(10): 1232-1237.

(王荣兵 编辑)