

Cytohesin-2 在肝癌细胞株中的表达及调控 Hep3B 细胞增殖作用的研究

许克东, 高洁, 杨雪, 姚英民, 刘青光
(西安交通大学医学院第一附属医院肝胆外科, 陕西 西安 710061)

[摘要] **目的** 探讨 Cytohesin-2 在肝癌细胞株中的表达情况以及对肝癌细胞增殖的影响. **方法** 应用 western blot 法检测 6 种细胞株中 Cytohesin-2 的表达情况, 筛选出高表达细胞株后, 给予 Cytohesin-2 的特异性抑制剂 SecinH3 了解 Cytohesin-2 对 Hep3B 细胞增殖的影响. **结果** Cytohesin-2 蛋白在 Hep3B、HepG2、SMCC-7721、BEL-7402、Huh-7 中的表达均高于人正常肝细胞系 HL-7702 中的表达. 应用 Cytohesin-2 抑制剂 SecinH3 后, Hep3B 细胞的增殖能力受到显著抑制, 并且 Hep3B 细胞的凋亡数量明显增加. **结论** Cytohesin-2 在多种肝癌细胞系中均具有显著地高表达, 并可以通过抑制 Hep3B 细胞凋亡的方式促进 Hep3B 细胞的增殖. Cytohesin-2 可能作为肝细胞肝癌生物治疗的新的靶点.

[关键词] 肝癌; Cytohesin-2; 增殖/凋亡; 靶向治疗

[中图分类号] R735.7 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1003-4706(2013)02-0016-04

Expression of Cytohesin-2 in Hepatoma Cells and Its Role in Proliferation of Hep3B Cells

XU Ke-dong, GAO Jie, YANG Xue, YAO Ying-min, LIU Qing-guang
(Dept. of Hepatobiliary Surgery, The First Affiliated Hospital of Medical College of Xi'an Jiaotong University, Xi'an Shanxi 710061, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression of Cytohesin-2 protein in hepatoma cells and its role in proliferation of hepatoma cells. **Methods** Cytohesin-2 protein expression was examined by western blot. Cytohesin-2 antagonist SecinH3 was used to Hep3B, and proliferation of hep3B was detected by MTT and flowcytometry. **Results** The expression levels of Cytohesin-2 were higher in Hep3B, HepG2, SMCC-7721, BEL-7402 and Huh-7 than those in HL-7702. And the proliferation of Hep3B cells was significantly inhibited after treatment with SecinH3, while the apoptosis of was increased in Hep3B cells. **Conclusion** Cytohesin-2 has extremely high expression in hepatoma cells, and it can promote proliferation and inhibit apoptosis of Hep3B cell. It should be a novel target for biotherapy of hepatocellular carcinoma in the future

[Key words] Liver cancer; Cytohesin-2; Proliferation and apoptosis; Targeted therapy

肝细胞肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是发生于肝脏的原发性肿瘤中最常见的类型. 在世界范围内, 男性的发病率居所有肿瘤中的第 5 位 (每年新发 523, 000 例, 占全部肿瘤的 7.9%), 而肿瘤相关死亡中为第 3 位; 在女性中的发病率居

所有肿瘤的第 7 位 (每年新发 226, 000 例, 占全部肿瘤的 6.5%)^[1]. 尽管近年来对于 HCC 的治疗取得了很大的进展, 但总体的生存率提高仍不明显, 未经治疗的患者的 5 a 生存率只有 5%^[2]. HCC 中可以检测到大量的癌基因的过表达以及抑癌基因

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (81071897)

[作者简介] 许克东 (1984~), 男, 吉林白城市人, 在读博士研究生, 主要从事肿瘤的发生、发展、浸润以及转移的机制研究.

[通讯作者] 刘青光. E-mail: 158094157@qq.com

的低表达^[3], 这也是 HCC 高发病率以及预后差的主要原因, 尽管如此, 新的 HCC 的治疗靶点的研究仍是目前研究的热点。

Cytohesin-2 由位于 17q 的 B2-1 基因编码, 属于小 GTP-ase 家族, 主要参与 ADP 核糖基化因子 (ARF) 中 GTP 与 GDP 之间的转化。最早由 Bussey 等于 1996 年在人体内发现与果蝇体内 B2-1 基因编码的蛋白具有高度同源性的蛋白^[4], 命名为 Cytohesin。Bill 等^[5]发现 Cytohesin-2 在非小细胞肺癌中明显高表达, 而抑制 Cytohesin-2 的作用可以明显抑制移植瘤细胞的增殖; Lim 等^[6]发现 Cytohesin-2 在 Hep3B 细胞中具有显著地促进细胞增殖的作用。虽然关于 Cytohesin-2 在肿瘤中的研究的报道近年来日渐增多, 但是 Cytohesin-2 在肝细胞肝癌中的相关作用机制的研究未见报道。

本实验旨在通过研究 Cytohesin-2 在肝癌细胞中的表达情况以及对肿瘤细胞的增殖情况的调节明确 Cytohesin-2 在肝癌细胞中的作用以期 Cytohesin-2 作为肝细胞肝癌新的治疗靶点提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

肿瘤细胞: 人肝癌细胞系 Hep3B、HepG2、SMCC-7721、BEL-7402、Huh-7 及人正常肝细胞系 HL-7702 购自中国科学院细胞库, 由西安交通大学医学院生物医学基础研究中心保存。

1.2 主要试剂

RPMI-1640 培养基为美国 GIBCO 产品; 小牛血清 (BCS) 杭州四季青生物工程材料研究所; 噻唑蓝 (MTT) 购自于美国 Sigma 公司; Annexin V-FITC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒为南京凯基科技生物发展有限公司产品; 鼠抗人多克隆 Cytohesin-2 抗体以及鼠抗人多克隆 β -actin 均购自美国 proteintech 公司; HRP 标记山羊抗鼠 IgG 抗体以及 BCA 蛋白质定量试剂盒均购自于美国 pierce biotechnology 公司; Cytohesin-2 特异性抑制剂 SecinH3 购于圣克鲁斯生物有限公司 (上海)。

1.3 方 法

1.3.1 细胞培养 人肝癌细胞以及正常肝细胞常规培养于 37℃ 恒温, 5%CO₂ 培养箱中, 培养液为含 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养液。当细胞覆盖率达到 70% ~ 80% 时, 以 0.25% 的胰蛋白酶 (含 0.03% EDTA) 溶液消化, 通常按照 1:3 ~ 5 的比例传代。细胞冻存时, 加入新鲜配制的冻存液,

按照程序降温后将细胞置于冻存管并于液氮中保存。采用快速复苏法复苏细胞, 于 37℃ 水浴快速溶解细胞, 离心除去冻存液后加入培养基。实验所用细胞均处于对数增长期, 以台盼蓝常规染色检测细胞死亡率, 死亡率均 $\leq 5\%$ 的细胞方可进入实验。

1.3.2 细胞株筛选 弃去上述六种细胞株的培养液, 预冷 PBS 液洗涤 3 次。按照 6 孔板每孔加 150 μ L RIPA 蛋白裂解液 (含 PMSF, 1 mM), 冰上充分裂解 20 min, 超声波粉碎 30s, 4℃ 12 000 rpm 离心 15 min, 收集上清液; 采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白质浓度。取含有蛋白质 50 μ g 的各种细胞裂解液上样行 western blot 检测各种细胞中 Cytohesin-2 以及 β -actin 表达情况。选取 Cytohesin-2 表达量最高的细胞株进行下一步实验。实验重复 3 次。

1.3.3 MTT 法检测细胞增殖 将上一实验中筛选出的高表达 Cytohesin-2 的细胞株分为 2 组, 其中一组给予 Cytohesin-2 的抑制剂 SecinH3, 另一组不给予任何处理。分别于处理后 24、48、72 及 96h 检测细胞增殖, 每待测孔加入 20 μ L MTT 溶液 (5 mg/mL, 即 0.05% MTT) 和 180 μ L RPMI 1640 培养液, 细胞培养箱中继续培养 4 h 终止, 弃去上清培养液。每待测孔加入 150 μ L 二甲亚砜 (DMSO), 置于微振荡器上低振荡 10 min, 使蓝紫色结晶物充分溶解。选择 OD 490 nm 波长, 在酶联免疫检测仪上检测各孔的光吸收值, 取各组的 5 孔平均值。以只加培养液、MTT 和 DMSO 的 3 孔作为调零孔。间隔 24 h 为一个实验检测点, 连续测定 4 d 的细胞生长增殖状况, 以 MTT 所测得的比色值为纵轴, 检测时间点为横轴, 绘制出各组细胞的生长曲线。实验重复 3 次。

1.3.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 于药物处理 24 h 后消化并收集 2 组不同处理的 Hep3B 细胞, 制成单细胞悬液后, 移入 5 mL 离心管中, 1 000 rpm 离心 5 min, 弃去上清, 冷 PBS 液洗涤细胞 2 次。用去离子水按 1:4 稀释结合缓冲液 (20 mL 结合缓冲液 + 60 mL 去离子水)。用 250 μ L 稀释后的结合缓冲液重悬细胞, 调整细胞密度为 1×10^6 /mL。取 100 μ L 细胞悬液于 5 mL 流式管中, 加入 5 μ L Annexin V 和 10 μ L PI 染料, 室温避光染色 15 min。对照管中不加 Annexin V 作校正因子。在流式管中加入 400 μ L 结合缓冲液, 立即上流式细胞仪检测, 光源为 488 nm 氩离子激光器, Annexin V 受激发后发绿色荧光, PI 发红色荧光。流式细胞仪检测获得由四个象限组成的细胞直方图, 每个象

限的细胞数目就是在检测细胞总数所在点的组分。左下象限代表正常活细胞 (An - PI -)，右下象限代表早期凋亡细胞 (An+PI -)，右上象限代表晚期凋亡细胞和坏死细胞 (An+PI+)，左上象限代表细胞收集过程中出现的损伤细胞 (An - PI+)。结果用随机软件分析。实验重复 3 次。

1.4 统计学分析

全部数据经 SPSS 统计软件进行统计分析。计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用 *t* 检验，*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 检测 6 种细胞株中 Cytohesin-2 蛋白表达情况

应用 western blot 检测 6 种细胞株中 Cytohesin-2 蛋白表达情况，实验结果显示，在选择 6 种细胞株中，肝癌细胞 Hep3B 中 Cytohesin-2 的表达量最高(见图 1)，因此选择 Hep3B 细胞作为进一步实验的细胞株。

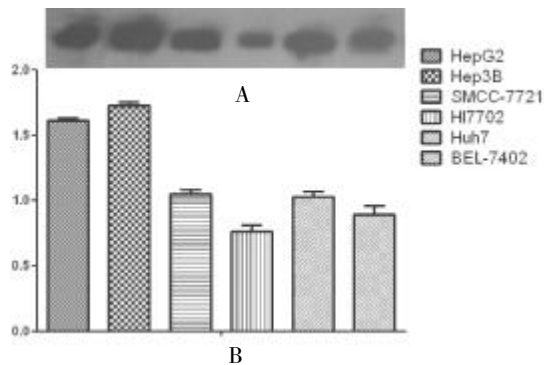


图 1 Cytohesin-2 蛋白在 6 种细胞系中的表达情况

Fig. 1 The expression of Cytohesin-2 in six cell lines

A: Cytohesin-2 在 6 种细胞系中显影结果；B: Cytohesin-2 蛋白的相对表达量 (Cytohesin-2/ β -actin 光密度比值)。

2.2 抑制 Cytohesin-2 蛋白的作用对于 Hep3B 细胞增殖作用的影响

以时间为横轴，光吸收度为纵轴绘制的细胞生长曲线图，图 2 中显示实验干扰组 Hep3B 细胞 SecinH3 处理后 24 h 起吸光度值开始逐渐低于对照组细胞的吸光度值 (*P* < 0.05)。MTT 检测结果提示抑制 Cytohesin-2 蛋白作用后 Hep3B 生长过程中活细胞数量有明显下降。

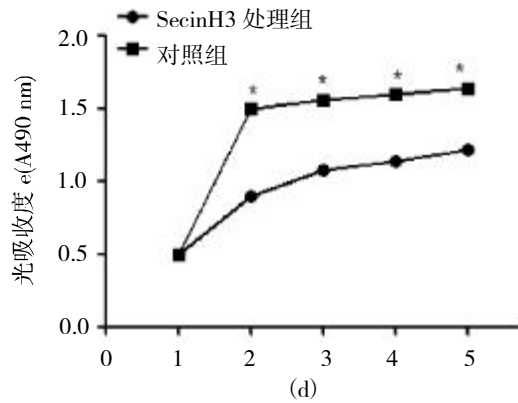


图 2 2 组细胞生长曲线

Fig. 2 The growth curve of cells in two groups 与 SecinH3 比较，**P* < 0.05.

2.3 抑制 Cytohesin-2 蛋白作用对于 Hep3B 细胞凋亡作用的影响

流式细胞仪测定凋亡结果显示实验干扰组细胞凋亡率 (早凋亡 + 晚凋亡) 为 65.11 ± 1.76 ，与对照组结果相比差异具有统计学意义 (*P* < 0.05) (见图 3，表 1)。结果提示抑制 Cytohesin-2 作用后促进了肝癌细胞 Hep3B 的凋亡。

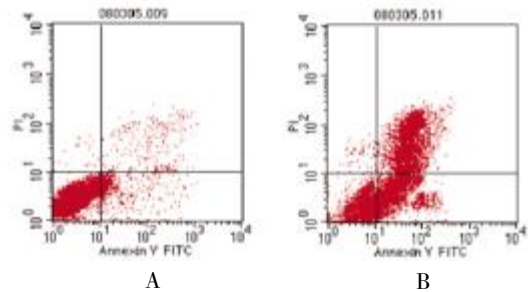


图 3 不同处理组细胞凋亡的检测情况

Fig. 3 The cell apoptosis in different treatment groups

A: 空白组；B: SecinH3 处理组。

表 1 不同处理组中细胞的凋亡率 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 The cell apoptosis rate in different treatment groups ($\bar{x} \pm s$)

组 别	凋亡率 (%)
对照组	16.32 ± 1.28
SecinH3 组	$65.11 \pm 1.76^*$

与对照组比较，**P* < 0.05。

3 讨论

世界范围内的 HCC 的发病率呈逐年增高的趋势, 目前针对于肝癌的治疗方法主要包括根治性的手术切除、射频消融术、肝脏移植术以及姑息性的化疗栓塞术、化学治疗、生物治疗、分子靶向治疗、无水酒精注射以及中医中药治疗^[7]等。但 HCC 起病隐匿, 一般首次发现的病例能接受手术治疗的在发达国家不足 40%^[8], 而在发展中国家这个比例降低至 12%左右^[9], 致使肝癌的预后极差, 未经治疗的患者的 5 a 生存率只有 5%^[2]; 即使是早期接受手术治疗的患者的 5 a 生存率也仅为 54.6%^[10], 而这与肝癌术后的高复发、高转移密切相关, 复发与转移是肝癌患者致死的主要原因^[11]。HCC 具有较强的增殖能力, 是目前关于 HCC 增殖能力研究为最大热点之一的主要原因。Cytohesin-2 作为真核细胞生物中参与调节蛋白质合成及运输的重要分子, 既往的研究主要集中与其在正常生理过程中发挥的作用, 而关于其在病理状态下的作用, 近年来才引起人们的重视, Bill 等^[5]研究发现 Cytohesin-2 在非小细胞肺癌中明显高表达, 并具有显著地促进肺癌细胞株 A549 增殖的能力, 抑制 Cytohesin-2 的作用后可以显著减小移植瘤的体积。但关于 Cytohesin-2 在肝癌细胞株中的作用尚未见报道。本研究中发现 Cytohesin-2 可以促进肝癌细胞株 Hep3B 细胞的增殖, 而抑制 Cytohesin-2 的作用后, Hep3B 的增殖能力显著降低并且凋亡细胞数明显增加。

本研究发现, Cytohesin-2 蛋白在多种肝癌细胞株中的表达均较永生化的正常肝脏细胞显著增高, 推测 Cytohesin-2 在肝癌的发生、发展、浸润、转移中发挥重要的作用。进一步的研究发现 Cytohesin-2 在 Hep3B 细胞中可以显著地促进肿瘤细胞的增殖, 而应用 Cytohesin-2 的抑制剂 SecinH3 后该增殖作用可以被显著抑制; 该作用与 Bill 等^[5]报道的 Cytohesin 在 A549 细胞株以及 PC9 细胞株中的作用相一致。进一步明确 Cytohesin-2 是通过何种途径促进肝癌细胞株的增殖, 通过流式细胞仪检测 Hep3B 的凋亡情况可以发现, Cytohesin-2 促进肝癌细胞的增殖的一个主要途径为抑制 Hep3B 的凋亡实现, 应用 SecinH3 后, 这种抑制作用被显著降低。推测 Cytohesin-2 可能参与到一些肝癌细胞中经典的抗凋亡的通路中, 而进一步通过调节一些癌基因或抑癌基因的作用发挥其抑制肿瘤细胞凋亡的作用, 而这也作为笔者进一步研究的

重点。

综上所述, Cytohesin-2 在多种肝癌细胞株中具有明确的高表达, 而在 Hep3B 细胞株中表达较高, 其在肿瘤的发生、发展、浸润、转移中发挥了重要的作用, 而该作用主要是通过抑制肿瘤细胞的凋亡进而促进增殖实现的。因此, 笔者推测 Cytohesin-2 可以作为肝细胞肝癌靶向治疗的新的靶点, 而 Cytohesin-2 在肝癌细胞中的具体的作用途径以及新的作用途径仍需进一步的研究。

[参考文献]

- [1] ELAZREQ M A, GARCEAU V, HARBOUR D, et al. Cytohesin-1 regulates the Arf6-phospholipase D signaling axis in human neutrophils: impact on superoxide anion production and secretion[J]. *J Immunol*, 2010, 184:637 - 649.
- [2] SHIRAHATA A, FAN W, SAKURABA K, et al. MACC 1 as a marker for vascular invasive hepatocellular carcinoma [J]. *Anticancer research*, 2011, 31(2):777 - 780.
- [3] BRUIX J, LLOVET J M. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma [J]. *Hepatology*, 2002, 35:519 - 524.
- [4] BUSSEY H, SAVILLE D, GREENE D, et al. Secretion of *Saccharomyces cerevisiae* killer toxin: processing of the glycosylated precursor [J]. *Molecular and cellular biology*, 1983, 3(5):1 362 - 1 370.
- [5] BILL A, SCHMITZ A, ALBERTONI B, et al. Cytohesins are cytoplasmic ErbB receptor activators [J]. *Cell*, 2010, 143:201 - 211.
- [6] LIM J, ZHOU M, VEENSTRA T D, et al. The CNK1 scaffold binds cytohesins and promotes insulin pathway signaling [J]. *Genes Dev*, 2010, 24:1 496 - 1 506.
- [7] DUBRAY B J, JR CHAPMAN W C, ANDERSON C D. Hepatocellular carcinoma: a review of the surgical approaches to management [J]. *Mo Med*, 2011, 108:195 - 198.
- [8] JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al. Cancer statistics, 2009 [J]. *CA: a cancer journal for clinicians*, 2009, 59: 225 - 249.
- [9] KITISIN K, PISHVAIAN M J, JOHNSON L B, et al. Liver stem cells and molecular signaling pathways in hepatocellular carcinoma [J]. *Gastrointest Cancer Res*, 2007, 1: 13 - 21.
- [10] IKAI I, ARII S, OKAZAKI M, et al. Report of the 17th nationwide follow up survey of primary liver cancer in japan [J]. *Hepatology Research*, 2007, 37(1):676 - 691.
- [11] SONG P, TANG W, TAMURA S, et al. The management of hepatocellular carcinoma in Asia: a guideline combining quantitative and qualitative evaluation [J]. *Bioscience trends*, 2010, 4(7):283.

(2012 - 11 - 14 收稿)