

· 研究原著 ·

文章编号:1000-2790(2005)12-1105-03

Fos 蛋白参与 PGE₂ 引起 HepG2 肝癌细胞中 VEGF mRNA 的表达上调

李永奇¹, 任 宁¹, 张学庸², 樊代明² (第四军医大学西京医院:¹综合诊疗中心,²消化内科,陕西 西安 710033)

Fos protein is involved in prostaglandin E₂-induced upregulation of vascular endothelial growth factor mRNA in the human hepatocellular carcinoma HepG2 cells

Li Yong-Qi¹, REN Ning¹, ZHANG Xue-Yong², FAN Dai-Ming²¹Center of Rehabilitation Medicine, ²Department of Gastroenterology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, China

【Abstract】 AIM: To examine if c-fos is involved in the effects of prostaglandin E₂ (PGE₂) on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA in the human hepatocellular carcinoma HepG2 cells. **METHODS:** Antisense oligodeoxynucleotide and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) techniques were used. **RESULTS:** Administration of PGE₂ resulted in the increased expression of c-fos and VEGF mRNA in HepG2 cells. The expression of c-fos mRNA reached the peak level at 3 h after PGE₂ treatment, which was significantly higher than that at 0 h ($P < 0.01$). Whereas, the highest expression level of VEGF mRNA was observed at 6 h after PGE₂ treatment, which was significantly higher than that at 0 h ($P < 0.01$). c-fos ASO significantly reduced PGE₂-induced upregulation of VEGF mRNA expression ($P < 0.01$). **CONCLUSION:** PGE₂ could increase the expression and secretion of VEGF in hepatocellular carcinoma cells by activating the transcription factor c-fos, then promote the angiogenesis of hepatocellular carcinoma and thus play an important role in the pathogenesis of liver cancer.

【Keywords】 carcinoma, hepatocellular; dinoprostone; genes fos; vascular endothelial growth factors; antisense oligodeoxynucleotide

【摘要】目的:研究前列腺素 E₂(PGE₂)对人肝癌细胞中血管内皮生长因子(VEGF)mRNA 表达的影响。方法:反义脱氧寡核苷酸(ASO)及反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术。

收稿日期 2005-03-31; 修回日期 2005-04-05

作者简介:李永奇(1964-),男(汉族),河北省赞皇县人,博士,主治医师。Tel. (029) 83375153 Email: yongqil33@yahoo.com.cn

结果:PGE₂ 增强了 c-fos 及 VEGF mRNA 在肝癌细胞系 HepG2 中的表达。c-fos mRNA 的表达在 PGE₂ 作用 3 h 时达到高峰,显著高于 PGE₂ 作用 0 h 时($P < 0.01$)。在 PGE₂ 作用 6 h 时,VEGF mRNA 的表达水平达到最高,显著高于 PGE₂ 作用 0 h 时($P < 0.01$)。c-fos ASO 能明显降低 PGE₂ 诱导的 VEGF mRNA 的表达上调($P < 0.01$)。结论:PGE₂ 可能通过增强转录因子 c-fos 的表达,进而促进 VEGF mRNA 在肝癌细胞中的表达和分泌,促进肝癌新生血管的生成,参与肿瘤的生长。

【关键词】癌,肝细胞,地诺前列酮,基因, fos, 血管内皮生长因子类,反义脱氧寡核苷酸

【中图分类号】 R734.2 **【文献标识码】** A

0 引言

前列腺素 E₂(PGE₂)通过自分泌方式产生后子,对肿瘤细胞的生长和转移有促进作用^[1]。但是促进的机制尚有许多未解之处。血管内皮细胞生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)能通过促进肿瘤新生血管生成而促进肿瘤的生长。肝癌细胞能产生 VEGF,通过旁分泌促进肝癌血管的生成^[2]。多种肿瘤生长促进因子均能增强 VEGF 的分泌。但 PGE₂ 对 VEGF 在肝癌细胞中的表达有何作用尚未清楚。我们利用反义脱氧寡核苷酸(antisense oligodeoxynucleoside, ASO)结合反转录聚合酶链式反应(RT-PCR)技术观察 PGE₂ 对人 HepG2 肝癌细胞中 VEGF mRNA 表达的影响以及 c-fos 癌基因的参与机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人肝癌细胞系 HepG2 为我室保存; RPMI 1640 培养基、胎牛血清购自美国 Gibco 公司; Trizol 试剂、DTT、RNasin、oligo(DT)₁₂₋₁₅ 和 Superscript II 反转录酶为 Invitrogen 公司产品; Taq DNA 聚合酶为日本 Toyobo 公司产品; PGE₂ 购自美国 Sigma 公司。ASO 及 PCR 引物由上海生工生物技术公司合成; 根据报道的人 c-fos 的 mRNA 序列设计 ASO, 长度为 15 bp, 序列为: 5'-GAACATCATCGTGGC-3'。同时设计并合成正义寡核苷酸(sense oligodeoxynucleoside, SO)作为对照, 序列为: 5'-GCCACGATGATGTTTC-3'。上述寡核苷酸均进行全碱基硫代磷酸修饰。

1.2 方法 将 HepG2 细胞系复苏后分别加入含 100

mL/L 胎牛血清、100 ku/L 青霉素、0.1 g/L 链霉素和 1.2 mg/L 谷氨酰胺的 RPMI 1640 培养基,在 50 mL/L CO₂ 37℃ 恒温箱内培养 4 ~ 6 d 传代 1 次.在细胞达到对数生长期后,分别接种于 35 mm 培养皿中,3 × 10⁵ 细胞/培养皿 继续培养 24 h.向每个培养皿中加入终浓度为 1 μmol/L 的 PGE₂,分别培养 0,1,3,6,12 和 24 h 后收集细胞,提取总 RNA.细胞系在达到对数生长期后,分成 4 组,每组有 4 个样品.分别接种于 35 mm 培养皿中 3 × 10⁵ 细胞/培养皿,继续培养 24 h.各组处理如下:① 对照组加生理盐水 10 mL;② 单纯 PGE₂ 处理组加入终浓度为 1 mol/L 的 PGE₂;③ SO 处理组加入 SO 10 μL (50 μg) 孵育 30 min 后加入终浓度为 1 μmol/L 的 PGE₂;④ ASO 处理组加入 ASO 10 μL (50 μg) 孵育 30 min 后加入终浓度为 1 mol/L 的 PGE₂.各组细胞在培养 6 h 后进行收集,提取总 RNA.利用 Trizol 试剂裂解细胞后,加入 0.2 mL 氯仿,震荡混匀,以 6000 g 离心 10 min.取上层水相,加等体积异丙酮混合,室温孵育 10 min.于 4℃ 以 13 000 g 离心 15 min,弃上清.沉淀块用 400 mL/L 乙醇冲洗后,以 20 μL 去离子水溶解,并用分光光度计测量 RNA 浓度,于 -80℃ 保存备用.在 50 μL 的反应体积中加入 2 μg 总 RNA,5 × 反应缓冲液 10 μL,10 mmol/L dNTPs 5 μL,RNasin (4 × 10⁵ U/L) 0.5 μL,oligo(DT)₁₂₋₁₅ 0.25 μg,Superscript II 反转录酶 (2 × 10⁴ U/L) 2 μL,0.1 mol/L DTT 0.5 μL,置 37℃ 孵育 1 h,然后在 65℃ 加热 5 min.反转录合成的 cDNA 储存于 -20℃.按照已报道的人 *c-fos* 及 VEGF mRNA 序列设计相应的特异性引物(*c-fos*:上游 5'-TGC TGA AGG AGA AGG AAA AA -3';下游:5'-TGC ATA GAA GGA CCC AGA TA -3';VEGF:上游:5'-ACC CAT GGC AGA AGG AGG AG -3';下游:5'-ACG CGA GTC TGT GTT TTT GC-3').同时合成 b-actin 引物(上游:5'-TGG TGG GTA TGG GTC AGA AGG ACT C -3';下游:5'-CAT GGC TGG GGT GTT GAA GGT CTC A -3'),作为 PCR 反应时的内参照.*c-fos*,VEGF 和 b-actin 扩增产物的大小分别为 344 bp,433 bp 和 265 bp.在 25 μL 的反应体积中加入合成的 cDNA 0.1 μg,10 × PCR 缓冲液 2.5 mL,d NTPs (2 mmol/L) 2.5 μL,MgCl₂ (25 mmol/L) 2.5 μL,各引物 (20 μmol/L) 1 μL,Taq DNA 聚合酶 (5 × 10⁶ U/L) 0.5 μL.热循环条件:93℃ 1 min,56℃ 30 s,72℃ 1 min,进行 1 个循环;93℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 1 min,进行 35 个循环,72℃ 延伸 8 min.取各扩增产物 10 μL,经 30 g/L 琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭染色后,用 UVP 凝胶成像系统进行检测,并用 Lab-

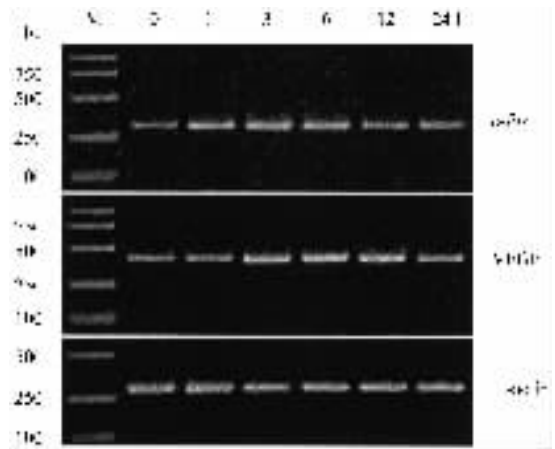
works 软件对各阳性条带进行光量子强度测定.将 *c-fos* 或 VEGF 阳性条带的密度与 β-actin 条带密度的比值作为 VEGF mRNA 的相对表达量.

统计学处理:采用 SPSS10.1 分析软件对获得的数据进行方差分析及多重比较.

2 结果

2.1 PGE₂ 对 *c-fos* 和 VEGF mRNA 在 HepG2 细胞系中表达的影响

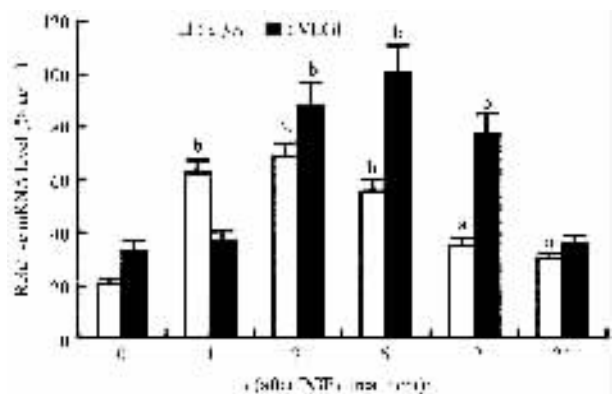
向 HepG2 细胞系中加入 PGE₂ 后,*c-fos* 和 VEGF mRNA 均呈现时程依赖性的表达上调 (Fig 1).其中,*c-fos* mRNA 在 PGE₂ 作用 1 h 和 3 h 表达水平较高,与 PGE₂ 作用 0 h 相比有显著差异 ($P < 0.01$).6 h 仍然具有较高的表达水平 ($P < 0.05$, Fig 2).



M : DL2000 DNA marker 0,1,3,6,12,24 h : Expression of the different cell cultured times.

Fig 1 Effect of PGE₂ on the expression of *c-fos* and VEGF mRNA in HepG2 cells cultured in different times

图 1 PGE₂ 对 *c-fos* 和 VEGF mRNA 在经不同时间培养的 HepG2 细胞中表达的影响

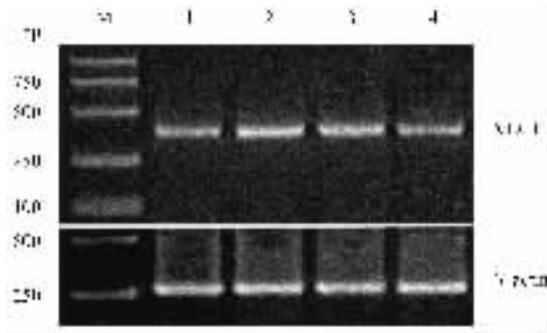


^a $P < 0.05$ ^b $P < 0.01$ vs 0 h respectively ($n = 4 \bar{x} \pm s$).

Fig 2 Relative expression level of *c-fos* and VEGF mRNA in HepG2 cells after PGE₂ treatment

图 2 PGE₂ 作用后 *c-fos* 和 VEGF mRNA 在 HepG2 细胞中的相对表达量

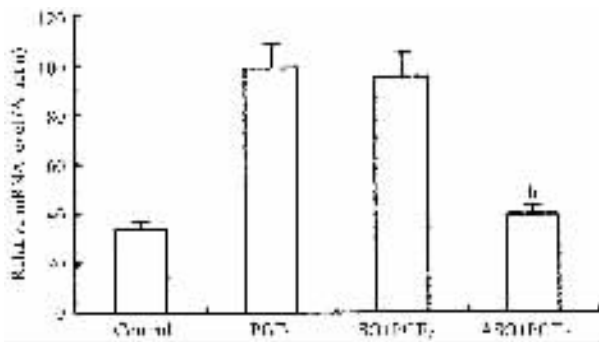
在 PGE₂ 作用 3 h VEGF mRNA 表达水平开始增高, 至 6 h 达到最高, 与 0 h 相比有显著差异 ($P < 0.01$). PGE₂ 作用 24 h, VEGF mRNA 的表达水平基本上回落到 0 h 水平 (Fig 2). 作为内对照的 β -actin 表达水平在各时间点基本一致, 表明在 PCR 反应中所加的模板量是相等的.



M: DL2000 DNA marker; 1: Control; 2: PGE₂-treated; 3: *c-fos* SO + PGE₂; 4: *c-fos* ASO + PGE₂ ($n = 4 \bar{x} \pm s$)

Fig 3 Effects of *c-fos* ASO on PGE₂-induced upregulation of VEGF mRNA in HepG2 cells

图3 *c-fos* ASO 对 PGE₂ 诱导的 HepG2 细胞中 VEGF mRNA 表达上调的影响



^b $P < 0.01$ vs control ($n = 4 \bar{x} \pm s$).

Fig 4 Effects of *c-fos* ASO on PGE₂-induced upregulation of VEGF mRNA in HepG2 cells

图4 *c-fos* ASO 对 PGE₂ 诱导的 HepG2 细胞中 VEGF mRNA 表达上调的影响

2.2 *c-fos* ASO 对 PGE₂ 诱导的 VEGF mRNA 在 HepG2 细胞系中表达上调的影响 由于 PGE₂ 增强 VEGF mRNA 在 HepG2 细胞中的表达高峰在 6 h, 所

以我们选择该时间点来观察 *c-fos* ASO 的作用. 结果显示, 在 *c-fos* ASO 处理组, VEGF mRNA 的表达明显降低 (Fig 3), 与单纯 PGE₂ 处理组相比差异显著 ($P < 0.01$, Fig 4). 在 *c-fos* SO 处理组, VEGF mRNA 的表达与单纯 PGE₂ 处理组相比无明显差异.

3 讨论

目前, 前列腺素在肿瘤中确切的病理生理作用及其机制还不很清楚. 癌肿组织内 PGE₂ 的含量显著高于正常组织^[3]. 动物实验证明, 肿瘤产生的 PGE₂ 能抑制荷瘤机体的体液免疫和细胞免疫, 有利于肿瘤的生长, 发展和转移^[4]. 我们观察到, PGE₂ 能促进 VEGF mRNA 在肝癌细胞系 HepG2 中的表达, 而且呈时程依赖性的特点, 表明 PGE₂ 能增强 VEGF 在肝癌细胞中的表达, 促进其分泌, 提示 PGE₂ 能促进肝癌新生血管的生成, 这可能是 PGE₂ 参与肝癌生长的机制之一. 我们还观察到: PGE₂ 能够增强 *c-fos* 基因在 HepG2 肝癌细胞中的表达, 在 PGE₂ 作用 1 h 和 3 h 时达到高峰, 早于 VEGF mRNA 的表达高峰出现时间. 而且, *c-fos* ASO 能够明显反转 PGE₂ 所诱导的 VEGF mRNA 的上调表达. 上述结果提示 *c-fos* 可能参与了 PGE₂ 诱导的 VEGF mRNA 在肝癌细胞中的表达.

【参考文献】

- [1] Ushio A, Takikawa Y, Lin SD, *et al.* Induction of Bcl-xL is a possible mechanism of anti-apoptotic effect by prostaglandin E2 EP4-receptor against in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells [J]. *Hepatol Res*, 2004 29(2): 173-179.
- [2] Shepherd FA, Sridhar SS. Angiogenesis inhibitors under study for the treatment of lung cancer [J]. *Lung Cancer*, 2003; 41 (Suppl 1) 63-72.
- [3] Majima M, Amano H, Hayashi I. Prostanoid receptor signaling relevant to tumor growth and angiogenesis [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2003 24(10): 524-529.
- [4] Harris SG, Padilla J, Koumas L, *et al.* Prostaglandins as modulators of immunity [J]. *Trends Immunol*, 2002 23(3): 144-150.

编辑 甄志强