

# $\alpha$ 干扰素对人高转移肝癌细胞系 HCCLM3 血管形成因子表达的影响

赵铭锋, 王鲁, 许祖德, 赵燕, 汤钊猷

赵铭锋, 复旦大学附属华山医院外科病理室 上海市 200040  
王鲁, 赵燕, 汤钊猷, 复旦大学中山医院肝癌研究所 上海市 200032  
许祖德, 复旦大学上海医学院病理学系 上海市 200032  
赵铭锋, 男, 1974-11-08 生, 山东省滨州市人, 汉族, 2001 年复旦大学附属华山医院病理学硕士  
国家自然科学基金资助项目, No. 30100077; 上海市科技发展基金资助项目, No. 03QD14008; 高等学校全国优秀博士学位论文作者专项资金资助项目, No. 200263  
项目负责人: 王鲁, 200032, 上海市医学院路 136 号, 复旦大学中山医院肝癌研究所. wlu@zshospital.net  
电话: 021-54233058  
收稿日期: 2003-12-10 接受日期: 2004-02-09

## Effects of IFN- $\alpha$ on expression of angiogenic factors in highly metastatic human hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 cells

Ming-Feng Zhao, Lu Wang, Zu-De Xu, Yan Zhao, Zhao-You Tang

Ming-Feng Zhao, Department of Surgical Pathology, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China  
Lu Wang, Yan Zhao, Zhao-You Tang, Liver Cancer Institute and Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China.  
Zu-De Xu, Department of Pathology, Fudan University, Shanghai 200032, China  
Supported by the Natural Scientific Foundation of China, No. 30100077  
Correspondence to: Wang Lu, Liver Cancer Institute and Zhongshan Hospital, Fudan University, 136 Yixueyuan Road, Shanghai 200032, China. wlu@zshospital.net  
Received: 2003-12-10 Accepted: 2004-02-09

## Abstract

**AIM:** To study the effects of IFN- $\alpha$  on the expression of vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and IL-8 in human hepatocellular carcinoma (HCC) cell line HCCLM3 cells and to explore the mechanism of antiangiogenic activity of IFN- $\alpha$ .

**METHODS:** The HCCLM3 cells were incubated for 72 h in high glucose Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM) (GibcoBRL, NY) or the medium containing different doses of IFN- $\alpha$  (30, 300 or 3 000 kU/L). The concentrations of VEGF, bFGF, MMP-2, MMP-9 and IL-8 in cell culture supernatants were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

**RESULTS:** IFN- $\alpha$  treatment significantly decreased the expression of VEGF and MMP-2 in HCCLM3 cells. The concentrations of VEGF, MMP-2, bFGF, and IL-8 were  $2\ 666.0 \pm 122.6$ ,  $4\ 400 \pm 1\ 000$ ,  $28.0 \pm 5.1$  and  $1\ 160.0 \pm 69.4$  ng/L respectively in the control group, whereas those of VEGF, MMP-2, bFGF, and IL-8 were  $2\ 476.5 \pm 125.7$

( $P < 0.05$ ),  $2\ 400 \pm 600$  ( $P < 0.01$ ),  $25.8 \pm 1.6$  and  $1\ 079 \pm 5$  ng/L when the concentration of IFN- $\alpha$  was 300 kU/L. But MMP-9 protein was not detected in all the groups.

**CONCLUSION:** IFN- $\alpha$  treatment significantly inhibits the expression of VEGF and MMP-2 in HCCLM3 cells in a dose-dependent manner. However, no significant difference is found in the levels of bFGF, IL-8 and MMP-9 among the control and the groups of different doses of IFN- $\alpha$  ranging from 30-3 000 kU/L. The down-regulation of VEGF and MMP-2 levels contributes, at least in part, to the antiangiogenic activity of IFN- $\alpha$ .

Zhao MF, Wang L, Xu ZD, Zhao Y, Tang ZY. Effects of IFN- $\alpha$  on expression of angiogenic factors in highly metastatic human hepatocellular carcinoma cell line HCCLM3 cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(6):1277-1279

## 摘要

**目的:** 研究 IFN- $\alpha$  对高转移潜能的人肝癌细胞系 HCCLM3 细胞血管内皮生长因子(VEGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)和白介素-8(IL-8)表达的影响, 探索 IFN- $\alpha$  抗肿瘤血管形成的机制。

**方法:** 将 HCCLM3 细胞在高糖 DMEM 培养液(Dulbecco's modified Eagle medium)和加入了不同剂量(30, 300 或 3 000 kU/L)IFN- $\alpha$  的 DMEM 培养液中孵育 72 h. ELISA 法检测 IFN- $\alpha$  干预组与对照组(未加入 IFN- $\alpha$ )中 VEGF, bFGF, MMP-2, MMP-9 和 IL-8 的表达情况。

**结果:** HCCLM3 细胞空白对照组中 VEGF, MMP-2, bFGF 和 IL-8 的表达浓度分别为  $2\ 666 \pm 122.6$ ,  $4\ 400 \pm 1\ 000$ ,  $28.0 \pm 5.1$  和  $1\ 160 \pm 69.4$  ng/L. 同时 IFN- $\alpha$  为 300 kU/L 时, VEGF, MMP-2, bFGF 和 IL-8 的浓度分别为  $2\ 476.5 \pm 125.7$  ( $P < 0.05$ ),  $2\ 400 \pm 600$  ( $P < 0.01$ ),  $25.8 \pm 1.6$  和  $1\ 079 \pm 5$  ng/L; IFN- $\alpha$  为 3 000 kU/L 时, VEGF, MMP-2, bFGF 和 IL-8 的浓度分别为  $2\ 289.5 \pm 119.5$  ( $P < 0.01$ ),  $2\ 000 \pm 500$  ( $P < 0.01$ ),  $25.1 \pm 2.9$  和  $1\ 087.9 \pm 83.9$  ng/L. 各组中均未检测到 MMP-9 的表达。

**结论:** IFN- $\alpha$  对 HCCLM3 细胞 VEGF 和 MMP-2 蛋白的表达均具有明显的抑制作用, 并呈剂量依赖性. bFGF, IL-8 和 MMP-9 的表达浓度在 IFN- $\alpha$  各剂量组与对照组间无

显著性差别. IFN- $\alpha$ 对肝癌细胞中VEGF和MMP-2表达水平的下调在其抗肝癌血管形成机制中发挥重要作用.

赵铭锋, 王鲁, 许祖德, 赵燕, 汤钊猷.  $\alpha$ 干扰素对人高转移肝癌细胞系HCCLM3血管形成因子表达的影响. 世界华人消化杂志 2004;12(6):1277-1279  
http://www.wjgnet.com/1009-3079/12/1277.asp

## 0 引言

肝癌在我国常见<sup>[1-2]</sup>, 大剂量长疗程的IFN- $\alpha$ 可剂量依赖性的抑制裸鼠人肝癌转移模型(LCI-D20)肿瘤的转移复发和肿瘤生长, 临床随机对照临床试验也证实IFN- $\alpha$ 可提高肝癌切除术后3a无瘤生存率10%<sup>[3]</sup>. 在裸鼠角膜接种LCI-D20肝癌组织后, 可诱导角膜形成新生血管, 应用IFN- $\alpha$ 治疗后, 肿瘤血管形成受到明显抑制<sup>[4]</sup>; IFN- $\alpha$ 还可有效的抑制血管内皮细胞的增生和迁移<sup>[4-5]</sup>. 这些结果提示抗肝癌血管形成是IFN- $\alpha$ 作用的主要机制. 我们利用自发性肺转移人肝癌细胞系HCCLM3细胞, 检测IFN- $\alpha$ 干预后血管形成因子VEGF, bFGF, MMP-2, MMP-9, IL-8的表达水平, 探索IFN- $\alpha$ 的抗肝癌血管形成机制.

## 1 材料和方法

1.1 材料 使用复旦大学肝癌研究所建立的自发性肺转移人肝癌细胞系HCCLM3细胞<sup>[6]</sup>. IFN- $\alpha$ 1b购自深圳科兴生物制品有限公司. VEGF, bFGF, MMP-9和IL-8 ELISA试剂盒购自R&D公司, MMP-2 ELISA试剂盒购自Oncogene公司.

1.2 方法 取 $1 \times 10^6$  HCCLM3细胞在25 cm<sup>2</sup>培养瓶中培养, 加高糖DMEM培养液(Giboco)7 mL, 在37 °C, 50 mL/L CO<sub>2</sub>条件下, 培养6 h, 待细胞贴壁后分别加入剂量为30, 300, 3 000 kU/L的IFN- $\alpha$ 并换液, 对照组中不加INF- $\alpha$ . 72 h后提取上清液, 1 000 g离心10 min, 去除所含微粒, 分装后贮存于-20 °C待用. 血管形成因子表达量的测定采用夹心式酶联免疫测定技术(ELISA法), 试验步骤按说明书操作. 根据标准曲线计算各标本中5种细胞因子浓度值.

统计学处理 试验数据以均数 $\pm$ 标准差(n=5, mean $\pm$ SD)表示, 采用SPSS11.5软件包One-Way ANOVA方法对资料进行统计分析, 两两比较采用最小显著性差数法(LSD). P < 0.05为有统计学意义.

## 2 结果

2.1 上清液VEGF和bFGF蛋白浓度 对HCCLM3细胞培养72 h后的上清液进行ELISA法测定, 各IFN- $\alpha$ 干预组(30, 300和3 000 kU/L)VEGF蛋白浓度低于对照组. 其中300和3 000 kU/L组与对照组比较有显著性差别(P < 0.05和P < 0.01, 表1). IFN- $\alpha$ 为30 kU/L时, VEGF浓度降低, 但没有显著性差别(P > 0.05). 各IFN- $\alpha$ 干预组(30, 300和3 000 kU/L)bFGF蛋白浓度与对照组比较略有降低, 但差别均没有显著性(P > 0.05).

表1 上清中VEGF, bFGF蛋白的浓度(mean $\pm$ SD ng/L)

IFN- $\alpha$ (kU/L)	VEGF	bFGF
对照组	2 666.0 $\pm$ 122.6	28.0 $\pm$ 5.1
30	2 631.5 $\pm$ 166.8	25.9 $\pm$ 4.2
300	2 476.5 $\pm$ 125.7 <sup>a</sup>	25.8 $\pm$ 1.6
3 000	2 289.5 $\pm$ 119.5 <sup>b</sup>	25.1 $\pm$ 2.9

<sup>a</sup>P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 vs 对照组.

2.2 上清液MMP-2, MMP-9和IL-8蛋白浓度 在IFN- $\alpha$ 剂量为300, 3 000 kU/L时, HCCLM3细胞MMP-2的表达与对照组比较明显降低, 差别具有显著性(P < 0.01, 表2). IFN- $\alpha$ 浓度为30 kU/L时MMP-2蛋白的表达亦有所降低, 但差别没有显著性(P > 0.05). 在空白对照组和各IFN- $\alpha$ 干预组中均未检测到MMP-9蛋白的表达. 在IFN- $\alpha$ 剂量为300, 3 000 kU/L时, IL-8浓度与对照组比较略有降低, 但差别没有显著性(P > 0.05).

表2 上清中MMP-2, IL-8蛋白表达(mean $\pm$ SD ng/L)

IFN- $\alpha$ (kU/L)	MMP-2	IL-8
对照组	4 400 $\pm$ 1 000	1 160.00 $\pm$ 69.4
30	3 800 $\pm$ 900	1 167.57 $\pm$ 28.0
300	2 400 $\pm$ 600 <sup>b</sup>	1 079.00 $\pm$ 50.0
3 000	2 000 $\pm$ 500 <sup>b</sup>	1 087.86 $\pm$ 83.9

<sup>b</sup>P < 0.01 vs 对照组.

## 3 讨论

肿瘤血管生成是多种血管形成因子共同作用的结果<sup>[7-10]</sup>. 肝细胞癌(HCC)癌组织中VEGF蛋白和bFGF蛋白的表达水平与微血管密度(MVD)的增高密切相关(P < 0.05, P = 0.0001), 并且二者在肿瘤血管形成中存在协同作用<sup>[11-13]</sup>. MMP-2和MMP-9在肿瘤组织中的表达水平与MVD的增高密切相关以及在肝细胞癌组织中与CD34表达呈正相关, 表明二者在促进肿瘤血管形成中也发挥重要作用<sup>[14-16]</sup>. IL-8可直接提高内皮细胞的生存能力, 促进内皮细胞增生并上调基质金属蛋白酶的表达, 进而调节血管生成<sup>[17]</sup>. HCC是典型的多血管肿瘤<sup>[18-19]</sup>. 抗肿瘤血管生成研究在抑制肝癌的转移复发及提高术后生存率方面均具有重要意义. von Marschall et al<sup>[20]</sup>证实IFN- $\alpha$ 可通过Sp1-和(或)Sp3-转录因子抑制VEGF增强子的活性, 在转录水平上降低内分泌肿瘤细胞系中VEGF基因的表达. 在体内试验中IFN- $\alpha$ 可降低肿瘤微血管密度、VEGF mRNA水平和血浆VEGF水平发挥抗血管形成活性. Slaton et al<sup>[21]</sup>研究表明IFN- $\alpha$ 可下调人膀胱癌细胞(253J B-V IFN(R)细胞)中bFGF蛋白的表达水平.

我们既往研究证实, 在裸鼠人肝癌转移模型(LCI-D20)大剂量(每日 $1.5 \times 10^7$ 及 $3 \times 10^7$  U/kg)长疗程(连续35 d)应用IFN- $\alpha$ , 肿瘤的肝内复发率、复发的病灶大小、肺转移率、MVD及血清VEGF水平均明显降低, 差

别具有显著性( $P < 0.05$ ), 而与对照组比较血清中 bFGF 水平差别无显著性( $P > 0.05$ )<sup>[22-23]</sup>. 我们证实体外试验中, 大剂量的 IFN- $\alpha$  可抑制自发性肺转移人肝癌细胞系 HCCLM3 细胞 VEGF 的表达, 并呈现剂量依赖性. 而对 bFGF 蛋白的表达水平无明显影响, 数据与前期试验相符. 但与 Slaton 的结论不一致, 可能与采用不同的细胞系有关.

此外, 我们还检测了 IFN- $\alpha$  对 HCCLM3 细胞 MMP-2, MMP-9 的表达的影响, 结果首次证实大剂量的 IFN- $\alpha$  可显著下调 HCCLM3 细胞 MMP-2 的表达水平. 而在各组中均未发现有 MMP-9 蛋白的表达. MMP-2 在肿瘤的生长侵袭和转移过程中主要通过降解 IV 型胶原发挥作用<sup>[24-27]</sup>. IFN- $\alpha$  对 HCCLM3 细胞 MMP-2 表达的抑制作用说明在肿瘤血管形成和肿瘤细胞浸润两个层面上 IFN- $\alpha$  均发挥作用. 而 HCC 中 MMP-2 mRNA 主要在肿瘤前沿浸润区的基质中表达, 有学者认为肿瘤细胞通过分泌细胞因子调节基质中巨噬细胞或成纤维细胞 MMP-2 的表达.

我们还检测到 IFN- $\alpha$  对 HCCLM3 细胞 IL-8 的表达具有一定的抑制作用, 但数据显示差别未达到统计学意义. 本结果显示, 在体外培养试验中, IFN- $\alpha$  对 HCCLM3 细胞 VEGF 和 MMP-2 的表达均具有明显的抑制作用, 而对 bFGF 及 IL-8 的表达无明显影响.

#### 4 参考文献

- 1 杨秉辉, 夏景林, 黄力文, 汤钊猷, 陈敏山, 李锦清, 梁安民, 莫钦国, 卢辉山, 戴朝六, 严律南, 于志坚, 饶荣生, 黎乐群, 苏智雄, 方壮伟. 我国肝癌“临床相”30年的变迁—原发性肝癌3250例的对比研究. *中华医学杂志* 2003;83:1053-1057
- 2 Tang ZY. Hepatocellular carcinoma—cause, treatment and metastasis. *World J Gastroenterol* 2001;7:445-454
- 3 Qin LX, Tang ZY. The prognostic molecular markers in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:385-392
- 4 Wang L, Tang ZY, Qin LX, Wu XF, Sun HC, Xue Q, Ye SL. High-dose and long-term therapy with interferon- $\alpha$  inhibits tumor growth and recurrence in nude mice bearing human hepatocellular carcinoma xenografts with high metastatic potential. *Hepatology* 2000;32:43-48
- 5 Giannopoulos A, Adamakis I, Evangelou K, Giannopoulou M, Zacharatos P, Zsantoulis P, Perunovic B, Athanasiou A, Retalis G, Constandinidis C, Gorgoulis VG. Interferon- $\alpha$ 2b reduces neo-microvascular density in the ‘normal’ urothelium adjacent to the tumor after transurethral resection of superficial bladder carcinoma. *Onkologie* 2003;26:147-152
- 6 李雁, 汤钊猷, 叶胜龙, 刘银坤, 陈洁, 薛琼, 黄晓武, 陈军, 鲍卫华, 杨炯, 高东梅. 体内连续筛选法建立自发性肺转移人肝癌细胞系. *中华医学杂志* 2002;82:601-605
- 7 Tang YC, Li Y, Qian GX. Reduction of tumorigenicity of SMMC27721 hepatoma cells by vascular endothelial growth factor antisense gene therapy. *World J Gastroenterol* 2001;7:22-27
- 8 Qin LX, Tang ZY. The prognostic significance of clinical and pathological features in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:193-199
- 9 Kim S, Park HS, Son HJ, Moon WS. The role of angiostatin, vascular endothelial growth factor, matrix metalloproteinase 9 and 12 in the angiogenesis of hepatocellular carcinoma. *Korean J Hepatol* 2004;10:62-72
- 10 Saftoiu A, Ciurea T, Banita M, Georgescu C, Comanescu V, Rogoveanu I, Gorunescu F, Georgescu I. Immunohistochemical assessment of angiogenesis in primary hepatocellular carcinoma. *Rom J Gastroenterol* 2004;13:3-8
- 11 Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, Lee DG, Yu HC, Yeum JH, Koh GY, Tarnawski AS. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? *Mod Pathol* 2003;16:552-557
- 12 El-Assal ON, Yamanoi A, Ono T, Kohno H, Nagasue N. The clinicopathological significance of heparanase and basic fibroblast growth factor expressions in hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res* 2001;7:1299-1305
- 13 Yoshiji H, Kuriyama S, Yoshii J, Ikenaka Y, Noguchi R, Hicklin DJ, Huber J, Nakatani T, Tsujinoue H, Yanase K, Imazu H, Fukui H. Synergistic effect of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in murine hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2002;35:834-842
- 14 Zhang X, Yamashita M, Uetsuki H, Kakehi Y. Angiogenesis in renal cell carcinoma: Evaluation of microvessel density, vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinases. *Int J Urol* 2002;9:509-514
- 15 Sun J, Hemler ME. Regulation of MMP-1 and MMP-2 production through CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer interactions. *Cancer Res* 2001;61:2276-2281
- 16 洪照友, 俞金龙, 张云生, 高毅. 基质金属蛋白酶-9, CD34 的表达与肝癌侵袭转移的关系. *世界华人消化杂志* 2001;9:170-174
- 17 Li A, Dubey S, Varney ML, Dave BJ, Singh RK. IL-8 directly enhanced endothelial cell survival, proliferation, and matrix metalloproteinases production and regulated angiogenesis. *J Immunol* 2003;170:3369-3376
- 18 Poon RT, Ng IO, Lau C, Yu WC, Yang ZF, Fan ST, Wong J. Tumor microvessel density as a predictor of recurrence after resection of hepatocellular carcinoma: a prospective study. *J Clin Oncol* 2002;20:1775-1785
- 19 Ng IO, Poon RT, Lee JM, Fan ST, Ng M, Tso WK. Microvessel density, vascular endothelial growth factor and its receptors Flt-1 and Flk-1/KDR in hepatocellular carcinoma. *Am J Clin Pathol* 2001;116:838-845
- 20 von Marschall Z, Scholz A, Cramer T, Schafer G, Schirner M, Oberg K, Wiedenmann B, Hocker M, Rosewicz S. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:437-448
- 21 Slaton JW, Perrotte P, Inoue K, Dinney CP, Fidler IJ. Interferon-alpha-mediated down-regulation of angiogenesis-related genes and therapy of bladder cancer are dependent on optimization of biological dose and schedule. *Clin Cancer Res* 1999;5:2726-2734
- 22 Wang L, Wu WZ, Sun HC, Wu XF, Qin LX, Liu YK, Liu KD, Tang ZY. Mechanism of interferon alpha on inhibition of metastasis and angiogenesis of hepatocellular carcinoma after curative resection in nude mice. *J Gastrointest Surg* 2003;7:587-594
- 23 Tang ZY, Ye SL, Liu YK, Qin LX, Sun HC, Ye QH, Wang L, Zhou J, Qiu SJ, Li Y, Ji XN, Liu H, Xia JL, Wu ZQ, Fan J, Ma ZC, Zhou XD, Lin ZY, Liu KD. A decade's studies on metastasis of hepatocellular carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2004;130:187-196
- 24 Li Y, Shang P, Qian AR, Wang L, Yang Y, Chen ZN. Inhibitory effects of antisense RNA of HAb18G/CD147 on invasion of hepatocellular carcinoma cells *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2003;9:2174-2177
- 25 Chantrain CF, Shimada H, Jodele S, Groshen S, Ye W, Shalinsky DR, Werb Z, Coussens LM, DeClerck YA. Stromal matrix metalloproteinase-9 regulates the vascular architecture in neuroblastoma by promoting pericyte recruitment. *Cancer Res* 2004;64:1675-1686
- 26 Kumar M, Liu ZR, Thapa L, Chang Q, Wang DY, Qin RY. Antiangiogenic effect of somatostatin receptor subtype 2 on pancreatic cancer cell line: Inhibition of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-2 expression *in vitro*. *World J Gastroenterol* 2004;10:393-399
- 27 Edwards JG, McLaren J, Jones JL, Waller DA, O'Byrne KJ. Matrix metalloproteinases 2 and 9 (gelatinases A and B) expression in malignant mesothelioma and benign pleura. *Br J Cancer* 2003;88:1553-1559