

FH535 抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖及 cyclin D 表达

李光兵 杨华瑜 毛一雷 孙倩 钟守先 黄洁夫

【摘要】 目的 探讨 β -catenin 抑制剂 FH535 对人肝癌细胞系 HepG2 增殖的影响及可能机制。**方法** HepG2 细胞分为对照组和 FH535 用药组,使用改良 3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐比色法(MTS)检测 FH535 对 HepG2 细胞增殖的影响,以 Western blot 法检测 HepG2 细胞 β -catenin 以及 cyclin D 蛋白表达水平,用实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)检测 HepG2 细胞 cyclin D mRNA 水平。**结果** FH535 能够显著抑制 HepG2 细胞的增殖,呈时间和剂量依赖性。与对照组相比,FH535 给药组 HepG2 细胞内 β -catenin 蛋白表达无差异。FH535 给药组细胞 wnt/ β -catenin 信号通路的靶基因 cyclin D 的 mRNA 和蛋白的表达显著下降,与对照组相比差异有统计学意义($P < 0.0001$)。**结论** FH535 通过抑制 cyclin D mRNA 及 cyclin D 蛋白表达而抑制 HepG2 细胞增殖。

【关键词】 肝肿瘤; β 连环素; HepG2 细胞系

Inhibitory effect of FH535 on proliferation and cyclin D expression in HepG2 cell line LI Guang-bing, YANG Hua-yu, MAO Yi-lei, SUN Qian, ZHONG Shou-xian, HUANG Jie-fu. Department of Liver Surgery, Peking Union Medical College Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences and PUMC, Beijing 100073, China

Corresponding author: MAO Yi-lei, Email: maoy@public3. bta. net. cn

【Abstract】 Objective To explore the effect of β -catenin inhibitor FH535 on proliferation of HepG2 and its mechanism. **Methods** HepG2 cells were treated with FH535. Cell proliferation was determined by modified 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide colorimetric assay (MTS). cyclin D mRNA expression were determined by real time polymerase chain reaction (RT-PCR), β -catenin and cyclin D protein expression were determined by western blot. **Results** Compared with the control group, the proliferation of HepG2 cells was significantly decreased after treatment with FH535, in a dose- and time-dependent manner. cyclin D mRNA and cyclin D protein level were both down-regulated in FH535 group compared with the control group ($P < 0.0001$), while β -catenin protein expression was not affected. **Conclusions** FH535 inhibited the proliferation of HepG2 cells. This might through down-regulation of cyclin D mRNA and cyclin D protein.

【Key words】 Liver neoplasms; beta Catenin; HepG2 cell line

近年研究发现, wnt/ β -catenin 信号通路的异常活化能促进肝癌的发生发展^[1]。 β -catenin 是 wnt/ β -catenin 信号通路活化的关键蛋白^[1],通过抑制 β -catenin 从而干预 wnt/ β -catenin 信号通路的激活,可能成为治疗肝癌的靶点之一^[2]。本文研究 β -catenin 抑制剂 FH535 对人肝癌细胞系 HepG2 增殖的影响及其可能的机制,为应用 β -catenin 抑制剂治疗肝癌提供初步证据。

材料与方法

一、材料

人肝癌细胞系 HepG2 细胞来自北京协和医学院细胞中心。最低必需培养基(minimum essential medium, MEM)、丙酮酸钠、谷氨酰胺、细胞培养用青霉素和链霉素均购自北京协和医学院基础研究所细胞中心。3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(MTS)购自 Promega 公司,96 孔板购自 Corning 公司,RIPA 裂解液及蛋白酶抑制剂购自上海生工生物有限公司,BCA 蛋白浓度检测试剂盒购自北京鼎国生物有限公司,鼠抗人 β -catenin 单抗购自 Abcam 公司,鼠抗人 cyclin D 单抗购自 Cell Signal Technology 公司,鼠抗人 β -actin 单

DOI:10.3877/cma.j.issn.1674-0785.2012.06.010

作者单位:100073 中国医学科学院 北京协和医学院 北京协和医院 肝脏外科(李光兵、杨华瑜、毛一雷、钟守先、黄洁夫);中国医学科学院 基础医学研究所(孙倩)

通讯作者:毛一雷,Email:maoy@public3. bta. net. cn

抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗鼠 IgG 购自 Santa Cruz 公司, mRNA 逆转录试剂盒购自 Fermentas 公司, Syber green qPCR master mix、Trizol 购自 Applied Biosystems 公司。化学发光显影试剂购自 Millipore 公司。FH535、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO) 购自 Sigma 公司, 将 FH535 溶于 1% DMSO 中, 配制成浓度为 3 mmol/L 的贮存液, 0.22 μm 尼龙膜针头滤器过滤后, 避光贮存。使用前用 MEM 将之稀释至所需浓度。

二、方法

1. 细胞培养及分组: HepG2 细胞以含 10% 胎牛血清, 丙酮酸钠(20 000 U/L), 谷氨酰胺(20 000 U/L) 及细胞培养用青霉素(200 000 U/L) 和链霉素(0.02 g/L) 的 MEM 培养基于 37 °C、5% CO₂ 的细胞培养箱中培养。将细胞分为对照组(DMSO 组) 和 FH535 处理组, 离心收集对数生长期 HepG2 细胞, MEM 基础培养基重悬细胞, 将细胞种植于 96 孔板和 6 孔板, 细胞密度分别为 3000 细胞/孔和 1 × 10⁵ 细胞/孔。细胞贴壁完全后, 更换为含 DMSO 或不同浓度 FH535 的培养基, 每个浓度设 6 个复孔, 继续培养 24 h、48 h 和 72 h 后进行后继实验。96 孔板细胞用于细胞增殖抑制实验, 收集 6 孔板中细胞用于实时荧光定量 PCR 和 Western blot 实验。

2. 细胞增殖抑制实验(MTS 法): 96 孔板中细胞在含 0 μmol/L、30 μmol/L、60 μmol/L、90 μmol/L 和 120 μmol/L FH535 的培养基中培养 24 h、48 h 和 72 h, 弃去培养基, 每孔加入 100 μl 基础 MEM 培养基, 37 °C 培养箱中平衡 60 min 后, 每孔加入 20 μl MTS 试剂, 37 °C 避光孵育 60 min, 酶标仪检测吸光度值(A 值), 波长 490 nm/630 nm。

3. 实时荧光定量 PCR: 6 孔板中细胞在含 0 μmol/L 或 60 μmol/L FH535 的培养基中培养 24 h、48 h 或 72 h, 收集细胞, 按 Trizol 试剂说明书从 HepG2 细胞中提取总 RNA, 甲醛变性胶电泳鉴定 RNA 的完整性, 分光光度计测定 RNA 浓度。按 mRNA 逆转录试剂盒说明书操作, 取 1 μg 总 RNA 逆转录为 cDNA, syber green 法检测给药组与对照组细胞 cyclin D mRNA 表达水平, 内参为 β-actin。引物由上海生工生物有限公司合成, 引物序列见表 1。采用 2^{-ΔΔCT} 法^[3] 比较不同组别间 cyclin D mRNA 表达差异。

4. Western blot: 6 孔板中细胞在含 0 μmol/L 或 60 μmol/L FH535 的培养基中培养 24 h、48 h 或 72 h, 收集细胞, 按照 RIPA 裂解液说明书从细胞中提取总蛋白, RIPA 裂解液用前添加蛋白酶抑制剂。BCA 法测定蛋白浓度。取 30 μg 总蛋白, 按照文献^[4] 描述的方法,

4% ~ 12% 梯度丙烯酰胺凝胶分离蛋白后, 将蛋白转至硝酸纤维素膜上, 3% 小牛血清白蛋白室温封闭 60 min, 3% 小牛血清白蛋白稀释的一抗(anti β-catenin 1: 1000, anti cyclin D 1: 1000, anti β-actin 1: 1000) 孵育, 4 °C 过夜。室温下洗膜缓冲液洗膜后, 3% 小牛血清白蛋白稀释的二抗(1: 10 000) 室温孵育 60 min, 洗膜缓冲液洗膜后, 与化学发光显影试剂反应 1 min, 将条带曝光于 X 线片上, 扫描后进行分析。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	引物序列
cyclin D	上游引物 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'
	下游引物 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'
β-actin	上游引物 5'-AACTACCTGGACCGCTTCT-3'
	下游引物 5'-CCACTTGAGCTTGTTCCACCA-3'

三、统计学分析

实验结果用均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$) 表示, 利用 SPSS 12.0 软件进行统计分析, 组间均数比较采用 Student *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

1. FH535 对 HepG2 细胞增殖抑制作用: 与对照组相比, 30 μmol/L、60 μmol/L、90 μmol/L 和 120 μmol/L FH535 处理 HepG2 细胞 24 h, HepG2 细胞的增殖显著受到抑制, 抑制率分别为 10.2% ($P < 0.01$)、19.9% ($P < 0.001$)、45.8% ($P < 0.001$) 和 61.9% ($P < 0.001$), 与对照组相比差异有统计学意义, 见表 2。60 μmol/L FH535 作用 HepG2 细胞 24 h、48 h 和 72 h 后增殖的抑制率分别为 19.9%、49.5% 和 61.8%, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.001$)。FH535 对 HepG2 细胞增殖的抑制作用呈时间和剂量依赖性, 见图 1。

2. FH535 对 HepG2 细胞 β-catenin 表达的影响: 60 μmol/L FH535 处理 24 h、48 h 和 72 h 后, 各时间点 HepG2 细胞 β-catenin 蛋白表达水平相同, 与对照组相比差异无统计学意义, 见图 2。

3. FH535 对 HepG2 细胞 cyclin D 表达的影响: FH535 显著抑制 HepG2 细胞内 cyclin D mRNA 的表达(图 3A)。FH535 对细胞内 cyclin D mRNA 表达的抑制效应随着时间增加而增强。60 μmol/L FH535 处理 24 h、48 h 和 72 h 后 cyclin D mRNA 表达显著下降, 与对照组相比差异有统计学意义 (P 均 < 0.0001)。Western blot 检测 60 μmol/L FH535 作用后 HepG2 细胞内 cyclinD 蛋白表达情况, 结果显示给药组细胞 cyclin D 蛋白表达显著降低(图 3B)。

表2 FH535对HepG2细胞增殖抑制作用

FH535	24 h		48 h		72 h	
	A 值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	A 值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)	A 值 ($\bar{x} \pm s$)	抑制率 (%)
0 $\mu\text{mol/L}$	0.365 \pm 0.013		0.475 \pm 0.009		0.558 \pm 0.005	
30 $\mu\text{mol/L}$	0.316 \pm 0.00 ^a	10.2	0.295 \pm 0.010 ^b	32.4	0.238 \pm 0.004 ^b	49.3
60 $\mu\text{mol/L}$	0.272 \pm 0.00 ^b	19.9	0.200 \pm 0.004 ^b	49.5	0.157 \pm 0.007 ^b	61.8
90 $\mu\text{mol/L}$	0.154 \pm 0.00 ^b	45.8	0.058 \pm 0.004 ^b	75.2	0.020 \pm 0.002 ^b	83.0
120 $\mu\text{mol/L}$	0.082 \pm 0.00 ^b	61.9	0.005 \pm 0.002 ^b	84.8	0.004 \pm 0.002 ^b	85.4

注:与对照组比较,^a $P=0.005$,^b $P<0.001$

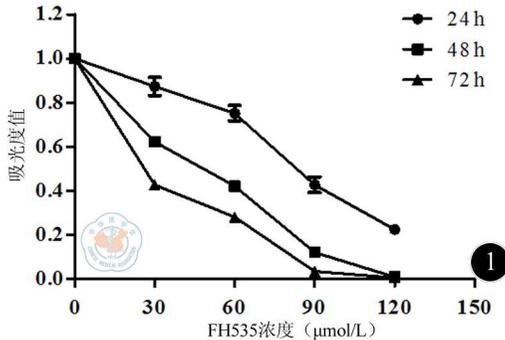


图1 FH535对HepG2细胞增殖抑制作用呈现时间和剂量依赖性

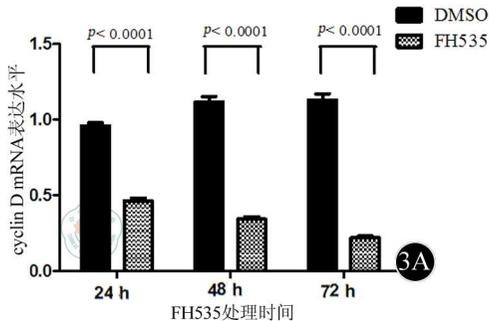


图3 与对照组相比,给药组细胞内cyclin D mRNA (3A)及cyclin D蛋白(3B)表达均显著受到抑制

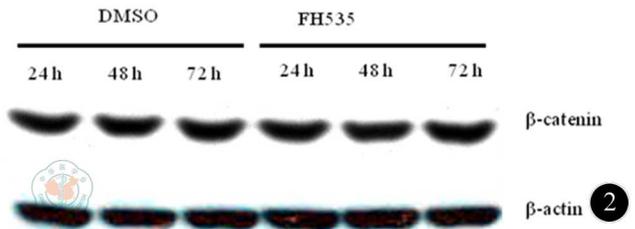
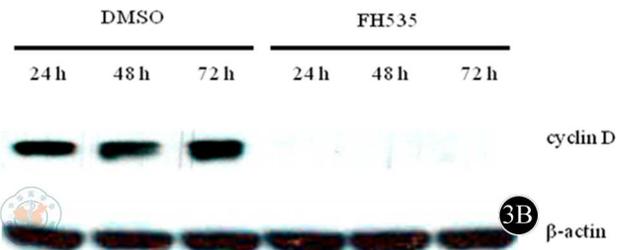


图2 给药组细胞内β-catenin蛋白表达与对照组细胞无差异



讨论

我国是乙型肝炎大国,乙型肝炎相关的肝炎、肝硬化及肝癌对我国医疗系统及社会保障造成了巨大负担。由于肝癌早期诊断缺乏有效手段,导致肝癌发现时多数已是中晚期,5年生存率仅为7%^[5],探索更加有效的肝癌治疗方案仍是目前肝癌研究的主要目标。

肝癌的发生、发展是一个复杂的过程,涉及基因变异、信号通路调控失调等。在肝癌发病过程中,wnt/ β -catenin通路异常活化是其重要分子事件之一,在约90%的肝癌中可以检测到 β -catenin的异常活化^[6]。HBV和HCV感染均会导致 β -catenin水平的异常升高,促进肝癌的发生^[7]。Wnt/ β -catenin通路又称经典wnt信号通路,由wnt蛋白、wnt蛋白配体frizzled蛋白、相关调控蛋白如糖原合酶激酶3 β 、 β -catenin以及基因转录复合体T细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)等

构成, β -catenin是该通路激活的关键调控蛋白^[8],在wnt蛋白与其配体结合后,细胞质内 β -catenin蛋白水平升高,并转移入细胞核,与转录复合体结合促进靶基因如cyclin D基因的转录。研究发现,wnt/ β -catenin通路是生长发育过程中的重要信号通路,其异常活化与癌症的发生、发展密切相关^[1]。抑制异常活化的wnt/ β -catenin信号通路能够抑制肿瘤细胞的增殖,提示通过干预异常活化的wnt/ β -catenin信号通路可能成为肿瘤治疗的靶点^[9-10]。本文研究干预wnt/ β -catenin信号通路对人肝癌细胞系HepG2细胞增殖的影响,探索wnt/ β -catenin信号通路在肝癌治疗中的潜在作用。

FH535是一种小分子化合物,能够特异性抑制 β -catenin与TCF/LEF结合,抑制其促进靶基因转录的活性,FH535作用于细胞后,细胞内 β -catenin蛋白表达不受影响,其与转录复合体TCF/LEF结合活性受到显著抑制^[11]。本研究利用FH535干预wnt/ β -catenin信号

通路的激活,结果显示,FH535 显著抑制 HepG2 细胞的增殖,与对照组相比差异有统计学意义。FH535 对细胞中 β -catenin 蛋白表达无影响,与文献报道一致^[11]。文献报道^[10] wnt/ β -catenin 信号通路激活对细胞增殖的促进作用,可能与激活 cyclin D 转录有关^[10]。我们通过实时荧光定量 PCR 检测 FH535 对 cyclin D 基因转录的影响,结果显示,给药组细胞 cyclin D 的 mRNA 表达水平显著下降,与对照组相比差异有统计学意义,其编码的蛋白 cyclin D 表达显著下降,提示 FH535 抑制 β -catenin 蛋白的基因转录活性,下调 wnt/ β -catenin 信号通路靶基因 cyclin D 的转录而抑制细胞增殖。

本研究结果显示,干预 wnt/ β -catenin 信号通路能够显著抑制人肝癌细胞系 HepG2 细胞的增殖,提示 wnt/ β -catenin 信号通路可以作为肝癌治疗药物研究的靶点,以及基于分子水平的肝癌靶向治疗的靶点。 β -catenin 抑制剂如 FH535 能够抑制 wnt/ β -catenin 信号通路靶基因转录活性,具有潜在的肝癌治疗作用,需要进一步实验明确其对肝癌细胞增殖的抑制效应。

参 考 文 献

- [1] Thompson MD, Monga SP. Wnt/ β -catenin signaling in liver health and disease. *Hepatology*, 2007, 45:1298-1305.
- [2] Hans C. Wnt/ β -Catenin signaling in development and disease. *Cell*,

2006,127:469-480.

- [3] Barker N, Clevers H. Mining the Wnt pathway for cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 2006, 5:997-1014.
- [4] Livak K. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 2001, 25:402-408.
- [5] Sun Y, Yang H, Mao Y, et al. Increased Golgi protein 73 expression in hepatocellular carcinoma tissue correlates with tumor aggression but not survival. *J Gastroenterol Hepatol*, 2011, 26:1207-1212.
- [6] Bruix J, Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology*, 2011, 53:1020-1022.
- [7] Cha MY, Kim CM, Park YM, et al. Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/ β -catenin signaling in hepatoma cells. *Hepatology*, 2004, 39:1683-1693.
- [8] MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/ β -Catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Developmental Cell*, 2009, 17:9-26.
- [9] Moon RT, Kohn AD, Ferrari GVD, et al. WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet*, 2004, 5:691-701.
- [10] 张勇, 张綦程, 程宁, 等. 经典的 wnt 信号通路在大鼠肝脏卵圆细胞增殖和分化中的作用 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2011, 5:4324-4330.
- [11] Handeli S, Simon JA. A small-molecule inhibitor of Tcf/ β -catenin signaling down-regulates PPAR and PPAR activities. *Mol Cancer Ther*, 2008, 7:521-529.

(收稿日期:2011-11-24)

(本文编辑: 马超)

李光兵, 杨华瑜, 毛一雷, 等. FH535 抑制人肝癌细胞 HepG2 增殖及 cyclin D 表达 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2012, 6(6):1413-1416.

中 华 临 床 医 师 杂 志