

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.01.006

肝癌细胞系中 Oct4 与 Wnt/ β -catenin 和 TGF- β 信号通路的相互影响

袁方均,周文波,邹 灿,胡洪生,张志云,戴宗晴,张有顺

Modulation of Oct4 to Wnt/ β -catenin and TGF- β Signal Ways in HCC Cell Line

YUAN Fang-jun, ZHOU Wen-bo, ZOU Can, HU Hong-sheng, ZHANG Zhi-yun, DAI Zong-qing, ZHANG You-shun

Institute of Liver Surgery, Dongfeng Hospital, Yunyang Medical College, Shiyan 442008, China

Corresponding Author: ZHANG You-shun, E-mail: zlib125@yahoo.com.cn

Abstract: Objective To investigate the relationships among Oct4 and Wnt/ β -catenin as well as TGF- β signal ways in hepatocellular carcinoma (HCC) cell line HepG2. **Methods** RT-PCR was used to detect the expression of Oct4 and the genes in both Wnt/ β -catenin and TGF- β signal ways in HCC cell lines and HCC specimens. RNAi was used to mediated knock-down the expression of Oct4 and TCF3 in HepG2, and the change of Wnt/ β -catenin and TGF- β related genes were also detected by RT-PCR. **Results** Oct4 and the genes in both Wnt/ β -catenin and TGF- β signal ways including β -catenin, Wnt10b, TCF3 and ELF, Smad3, Smad4 were expressed in HCC cell lines as well as in the specimens from HCC patients. After treating the Oct4 in HepG2 with siRNA, the expression of TGF- β family genes ELF, Smad3, Smad4 and Wnt/ β -catenin family genes wnt10b, β -catenin reduced, while TCF3 increased. In reverse, knockingdown TCF3 led to an increase in the expression of Oct4 and TGF- β family genes. **Conclusion** The result of silencing Oct4 and TCF3 in HepG2 by siRNA suggested that there is a certain correlation among Oct4, Wnt/ β -catenin and TGF- β family genes in HCC cell line HepG2, which reveals the role of interactions between Oct4 in HCC is more worthy to be researched.

Key words: Oct4; Wnt/ β -catenin; TGF- β ; RNAi; HCC

摘要:目的 探讨干细胞相关基因 Oct4 与 Wnt/ β -catenin 及 TGF- β 信号通路在肝癌细胞系中的相互作用。**方法** 应用 RT-PCR 法检测 Oct4、Wnt/ β -catenin 及 TGF- β 信号通路相关基因 β -catenin、Wnt10b、TCF3 及 ELF、Smad3 和 Smad4 在肝癌组织及细胞系中的表达;使用 siRNA 沉默人肝癌 HepG2 细胞 Oct4 和 TCF3 的表达,实时荧光定量 RT-PCR 法检测 Wnt10b、 β -catenin、TCF3 及 ELF、Smad3 和 Smad4 等基因的表达变化。**结果** Oct4 和 β -catenin、Wnt10b、TCF3 及 ELF、Smad3 和 Smad4 在肝癌组织及细胞系中同时表达;siRNA-Oct4 沉默人肝癌 HepG2 细胞 Oct4 后,Oct4 表达明显下调, β -catenin、Wnt10b 随之下调达 40%~50%左右,而 TCF3 表达升高到 3 倍左右;同时 ELF、Smad3 和 Smad4 均下降到原来的 1%以下;而 siRNA-TCF3 沉默 TCF3 后,Oct4 的表达也升高 2~3 倍;ELF 升高亦达 2~3 倍,Smad3 和 Smad4 也略有升高。**结论** Oct4 和 β -catenin、Wnt10b、TCF3 及 ELF、Smad3 和 Smad4 在肝癌组织及细胞系中同时表达提示彼此之间有相互作用。RNAi 实验证明 Oct4 对 Wnt/ β -catenin 及 TGF- β 信号通路的成员有调控作用;Oct4 与 TCF3 之间的负反馈作用值得深入研究。

关键词: Oct4; Wnt/ β -catenin; TGF- β ; RNAi; 肝细胞性肝癌

中图分类号: R735.7; R730 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)01-0021-04

收稿日期:2009-11-27;修回日期:2010-06-08

基金项目:湖北省教育厅重点资助项目(D200724003),十堰市科技局科技攻关项目(十科发[2008]024D),郧阳医学院创新团队资助项目(2008CXG03)

作者单位:442001 湖北十堰,郧阳医学院附属东风总医院肝脏外科研究所

通信作者:张有顺, E-mail: zlib125@yahoo.com.cn

作者简介:袁方均(1964-),男,硕士,主任医师,主要从事肝癌的综合治疗工作

0 引言

肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一。由于肝癌对化疗的耐药性,手术治疗及其他物理治疗如冷冻、栓塞、微波等是治疗肝癌的主要手段^[1]。近年来肿瘤生物靶向治疗为肝癌的治疗开辟了新领域。研究肝癌在发病过程中相关基因的相互作用不仅有助于加深对肝癌发病机制的理解,而且有助于发现靶向

治疗的新的分子靶点。

Wnt/ β -catenin 信号通路不仅在肝脏的发育、再生等方面具有重要作用,而且与肝癌的发生发展关系密切^[2]。同时由于肝癌的发生与肝脏受病毒感染、炎性反应刺激所致的肝细胞再生、卵圆细胞活化等过程密切相关,干细胞调控网络的核心基因 Oct4 等可能也牵涉其中^[2]。本文在前期发现在肝癌细胞系中 Oct4、 β -Catenin 和 Wnt 等基因同时高表达基础上^[3],进一步发现 TGF- β 信号通路的相关分子也在肝癌细胞系及肝癌组织中表达,因而应用 RNAi 技术就肝癌细胞系中 Oct4 与 Wnt/ β -catenin 及 TGF- β 信号通路各基因之间是否存在相互作用作进一步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要试剂 逆转录试剂盒(美国 Fermentas 公司),沉默 Oct4 基因 siRNA-Oct4(美国 Thermo 公司设计合成),siRNA-TCF3(上海吉玛制药技术有限公司设计合成),转染试剂 Dharmacon(美国 Thermo 公司),PCR 反应试剂盒以及 DNA Marker(北京 TianGen 公司),其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器 紫外分光光度计(HITACHI U-0080D,日本);PCR 仪(Veriti 96-well Thermal cycler,美国 ABI 公司);荧光定量 PCR 仪(Rotor Gene-6000,澳大利亚 Rotor Gene 公司);凝胶成像分析系统(BioImaging systems,美国 UVP 公司)。

1.1.3 细胞 人肝癌细胞系 Bel-7402 为华中科技大学同济医学院免疫教研室沈关心教授惠赠;肝癌细胞系 SMMC-7721、HepG2 购自武汉大学典型培养物保藏中心;97M 购自上海中山医院肝癌研究所。本实验室传代保存。

1.2 方法

1.2.1 人肝癌组织的收集与保存 经湖北省十堰市东风总医院伦理委员会通过,患者知情并同意,外科医师于层流手术室内开腹手术切取肿瘤组织和癌旁组织,立即将标本标记后放入液氮冷冻罐中冻存,备组织 RNA 提取。

1.2.2 细胞系总 RNA 抽提和 PCR 应用 Trizol Reagent 总 RNA 抽提纯化试剂盒,按说明书抽提细胞总 RNA,用紫外分光光度计测定总 RNA 纯度和含量。RT-PCR 按照逆转录试剂盒说明书,详见参考文献^[7]。所用引物详见表 1。

表 1 RT-PCR 中检测干细胞相关基因的引物序列

Table 1 Sequences of primers used in RT-PCR for stem cell related genes

Name	Primer sequence	Num. of bps
Oct4	TGGAGAAGGAGAAGCTGGAGCA	186
	GGCAGATGGTTCGTTTGGCTGAATA	
β -Catenin	ACTGGCAGCAACAGTCTTACC	837
	TTTGAAGGCAGTCTGTGCGTAAT	
WNT10B	CATCCAGGCACGAATGCCAATC	218
	AGGCTCCAGAATTGCGGTTGTG	
TCF3	GTCCCTGGAGGAGAAAGACC	233
	CTGCTTTGGGATTCAGGTTC	
Smad3	CATAGGTGCTTTGGGCGTAT	269
	GCTGCAAGGTGAAGATGTCA	
Smad4	TTGCTTCCACTTGAATGCTG	177
	CTTCAAAGGGGACACCAAAA	
ELF	AGCACGAAGGTTTCAGAGGA	212
	GCTTTACGATCAGAGGTCGG	
GAPDH	ATCATCCCTGCCTCTACTGG	
	TGGGTGTCGCTGTTGAAGTC	

1.2.3 RNAi 试验中所使用移液器吸嘴和离心管等耗材使用 0.1%DEPC 水(美国 Invitrogen 公司)浸泡过夜并高压消毒备用。转染操作时,配置转染 A 液,25 μ l siRNA-Oct4 或 siRNA-TCF3(2 μ M)与 25 μ l 无血清无双抗 1640 培养液混匀,室温孵育 5min;配置转染 B 液,1 μ l DharmaFECT4 与 49 μ l 无血清无双抗 1640 培养液混匀,室温孵育 5min,混匀转染 A、B 液,室温孵育 20min,将 A、B 混合液与 400 μ l 含 10%胎牛血清而无双抗的 1640 培养液混匀后加入到 24 孔培养板(美国 Corning 公司),24h 后更换成常规 1640 培养液培养细胞。其中阴性对照为仅将转染 B 混合液与 400 μ l 含 10%胎牛血清而无双抗的 1640 培养液混匀后培养的细胞。

1.3 统计学方法

用单因素方差分析进行显著性检验, $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 干细胞相关基因在肝癌中的表达

应用 RT-PCR 检测发现 Oct4 在所研究的 4 个肝癌细胞系中均有表达,同时伴有 Nanog、Sox2 和 STAT3 等基因不同程度的表达。除此以外,上述基因在肝癌组织中也有表达。伴随着这些核转录因子, Wnt- β -catenin 信号通路家族成员 TCF3, wnt10b, β -catenin 等和 TGF- β 信号通路家族成员 ELF, Smad3 和 Smad4 等基因也不同程度地在肝癌细胞系及肝癌组织中表达,见图 1。

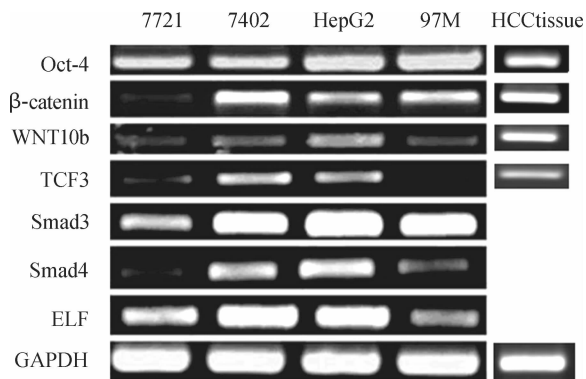
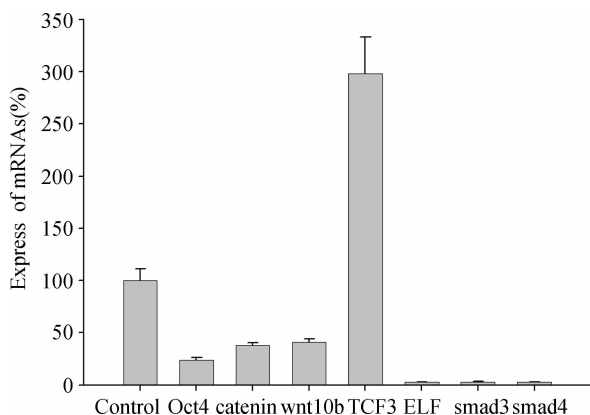


图 1 RT-PCR 检测 HCC 细胞系中干细胞相关基因的表达

Figure 1 Demonstration of the expression of the stem cell related genes in HCC cell lines

2.2 Oct4 被敲低后 Wnt-β-catenin 及 TGF-β 信号通路相关分子表达的改变

进一步检测 Oct4 被 RNA 干扰后 24h 的 Wnt-β-catenin 家族各基因表达如下：(1) Oct4 表达下降了 70%~80%；(2) 随着 Oct4 表达下降, wnt10b 的表达下降了 60%左右；(3) β-catenin 的表达也随之下降约 60%左右；(4) 而 TCF3 却升高了 2~3 倍。由于 TCF3 在 Wnt-β-catenin 通路中表现为抑制基因表达, 所以 Oct4 下降总的结果是导致 wnt-β-catenin 通路的功能下降, 见图 2。同时, 对 TGF-β 信号通路的相关基因 ELF、Smad3、Smad4 的表达分析也表明: 当 Oct4 被抑制后上述三个基因的表达受到了比 wnt-β-catenin 通路更明显的抑制, ELF、Smad3、Smad4 的表达量均降到对照的 1%以下。



After knockdown of Oct4, the genes in both wnt/β-Catenin and TGF-β family were down-regulated except TCF3

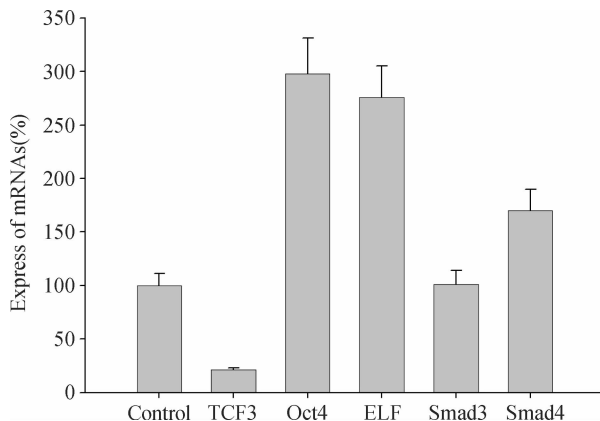
图 2 Oct4 被抑制后其他基因表达变化

Figure 2 Expression of the other genes in HepG2 24 h after RNAi to Oct4

2.3 TCF3 被敲低后 Oct4 及 TGF-β 信号通路相关分子表达的改变

由于在干细胞中, Oct4 和 TCF3 存在着相互抑

制的现象, 我们通过 RNAi 抑制 TCF3 后观察在肝癌细胞中 Oct4 及其他一些基因的变化。结果如图 3 所示, TCF3 被抑制后, Oct4 的表达随即升高, 并且随着 TCF3 下降幅度的增加, Oct4 升高的幅度也增加。ELF 随之也增加近 2 倍; Smad3 及 Smad4 也相应地有所增加, 虽然与 SiRNA-Oct4 作用后他们下降的幅度比较, 其上升幅度不大。对此我们认为: 可能这些基因的基础水平已经非常高了, 已经达到平台期, 因此即使 Oct4 升高, 他们也难以继续大幅度升高, 见图 3。



After knockdown of TCF3, together with Oct4, the genes in TGF-β family increased too

图 3 TCF3 被抑制后其他基因表达变化

Figure 3 Expression of the other genes in HepG2 24 h after RNAi to TCF3

3 讨论

在前期工作中我们已证明 Oct4 及 β-catenin 等干细胞相关基因在肝癌中高表达。本文进一步观察到 wnt10b、TCF3 等 wnt-β-catenin 通路的相关基因及 TGF-β 信号通路 ELF、Smad3 及 Smad4 等同时表达在肝癌细胞系及肝癌组织中。对这个现象有必要做进一步研究。

wnt-β-catenin 信号通路无论与肝脏的发育还是与肝癌发生发展的关系早已为人所熟知^[4]。近年已有不少学者在研究 Oct4 对 wnt-β-catenin 通路的调控作用^[5]。近期的生物信息学研究发现 Oct4 可能是某个或某些 wnt 基因的调控基因^[6]; Babaie 等^[7]用基因芯片检测也发现有的 Wnt 基因受 Oct4 的调控。Hochedlinger 等人^[8]用 TetOP-Oct4 转基因小鼠证明持续表达 Oct4, 导致多种上皮组织肿瘤样异型性改变, 终止 Oct4 诱导后细胞可逆转; 其中的 β-catenin 的表达与 Oct4 呈正相关。嵌合体中无 Oct4 表达的细胞 β-catenin 无改变。本研究初步显示在肝癌细胞系 HepG2 中 Oct4 至少可通过以下几

方面作用于 wnt- β -catenin 通路:(1)促进 wnt10b 的表达;(2)促进 β -catenin 的表达;(3)抑制 TCF3 的表达。其共同作用导致 wnt- β -catenin 通路功能增强。

作为 wnt- β -catenin 通路的效应分子,TCF3 也是重要的核转录调控因子之一。2008 年以来已有研究者发现在胚胎干细胞的发育调控过程,TCF3 通过对 Oct4、Nanog、Sox2 等基因的调控,成为胚胎干细胞自我更新或分化限速基因^[9]。我们在 HepG2 细胞中进行的 RNAi 实验发现抑制 Oct4 的表达,TCF3 的 mRNA 水平升高;抑制 TCF3 的表达,Oct4 的 mRNA 水平升高,并且伴随着 TGF- β 家族的多个基因表达升高。表明在肝癌细胞中两者之间存在着与胚胎干细胞内相似的关系。但是在未经任何处理的 HepG2 细胞内,TCF3 和 Oct4 均同时高表达。这一现象用彼此之间存在相互抑制的实验结果难以给予一个有充分说服力的理由。这中间应该还有另外的因素在起作用。对此我们正在做进一步研究。

按照肿瘤干细胞理论,肿瘤干细胞来自干细胞的基因突变。肿瘤的分化程度与其起源于干细胞的分化程度有关^[10]。那么,是否表达干细胞相关基因越多的肝癌就是分化程度越低的肝癌呢?实际上可能不是那么简单。虽然最近有人^[11]通过对与膀胱癌预后的关系研究发现表达越高,其预后越差。但是在 RNAi 实验中,抑制 Oct4 的表达,wnt- β -catenin 和 TGF- β 信号通路中的基因表达同时受到抑制提示了另外的可能。虽然 TGF- β 信号通路在干细胞的发育及在肿瘤的发生发展中有多方面的影响,但是其成员 ELF 和 Smad3 更多被看做肿瘤抑制因子^[12]。Hye JB 和 Mishra L 等发现大约 40%~70% of elf + / - 小鼠在 15 个月内自发产生肝癌^[13];ELF 被抑制后肝内血管代谢异常是肝癌发生的重要原因。Smad3 则在化学致癌过程中表现为肿瘤抑制因子的作用^[14];而 Smad3 基因缺失小鼠 6 个月后几乎 100% 出现肿瘤^[15]。因此,Oct4 促进 ELF 和 Smad4 表达是否有助于抑制肿瘤的发展值得进一步探讨。

总之,在本研究中我们通过检测 mRNA 发现肝癌细胞系中同时表达 Oct4 及 wnt- β -catenin 和 TGF- β 信号通路中的多个基因,在肝癌组织中也检测到 Oct4 等相关基因的表达;RNAi 实验证明:和

胚胎干细胞一样,在肝癌细胞中 Oct4 与 TCF3 之间存在着相互作用。同时由于 Oct4 既使 wnt- β -catenin 信号通路功能增强,又使 TGF- β 信号通路功能增强,从而使 Oct4 在肝癌中的意义更加复杂。

参考文献:

- [1] Yuan F, Zhou W, Zhang J, et al. Anticancer drugs are synergistic with freezing in induction of apoptosis in HCC cells[J]. *Cryobiology*, 2008, 57(1): 60-65.
- [2] Thompson MD, Monga SP. WNT/beta-catenin signaling in liver health and disease[J]. *Hepatology*, 2007, 45(5): 1298-1305.
- [3] Mishra L, Banker T, Murray J, et al. Liver stem cells and hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatology*, 2009, 49(1): 318-329.
- [4] 邹灿,袁方均,周文波,等. 干细胞相关基因在肝癌细胞系中表达的研究[J]. *中华肝胆病杂志*, 2009, 17(8): 599-602.
- [5] 赵光锐,吴明灿,陈世洁,等. 人脑胶质瘤组织中 Oct4、wnt2 的表达及其临床意义[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2009, 16(6): 629-632.
- [6] Palma I, Peña RY, Contreras A, et al. Participation of OCT3/4 and β -catenin during dysgenetic gonadal malignant transformation[J]. *Cancer Lett*, 2008, 263(2): 204-211.
- [7] Babaie Y, Herwig R, Greber B, et al. Analysis of Oct4-dependent transcriptional networks regulating self-renewal and pluripotency in human embryonic stem cells[J]. *Stem Cells*, 2007, 25(2): 500-510. Epub 2006 Oct 26.
- [8] Hochedlinger K, Yamada Y, Beard C, et al. Ectopic expression of Oct-4 blocks progenitor-cell differentiation and causes dysplasia in epithelial tissues[J]. *Cell*, 2005, 121(3): 465-477.
- [9] Cole MF, Johnstone SE, Newman JJ, et al. Tcf3 is an integral component of the core regulatory circuitry of embryonic stem cells[J]. *Genes Dev*, 2008, 22(6): 746-755.
- [10] Polyak K, Hahn WC. Roots and stems: stem cells in cancer [J]. *Nat Med*, 2006, 12(3): 296-300.
- [11] Chang C-C, Shieh G-S, Wu P, et al. Oct-3/4 expression reflects tumor progression and regulates motility of bladder cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(15): 6281-6291.
- [12] Tang Y, Kitisin K, Jogunoori W, et al. Progenitor/stem cells give rise to liver cancer due to aberrant TGF-beta and IL-6 signaling[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(7): 2445-2450.
- [13] Mishra L, Banker T, Murray J, et al. Liver Stem Cells and Hepatocellular Carcinoma[J]. *Hepatology*, 2009, 49(1): 318-329.
- [14] Millet C, Zhang YE. Roles of Smad3 in TGF- β signaling during carcinogenesis[J]. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 2007, 17(4): 281-293.
- [15] Amin R, Mishra L. Liver Stem Cells and TGF- β in Hepatic Carcinogenesis[J]. *Gastrointest Cancer Res*, 2008, 2(4 Suppl): S27-30.

[编辑:刘红武;校对:安 凤]