

TGF- β 1 对人肝癌细胞系凋亡的调控作用研究

王春雷¹, 黄志强¹, 周宁新¹, Kevin Behrns²

Study on TGF- β 1-Mediated Apoptosis of Human Hepatoma Cell Lines

WANG Chun-lei¹, HUANG Zhi-qiang¹, ZHOU Ning-xin¹, Kevin Behrns²

1. Department of hepatobiliary surgery, PLA general hospital, Beijing 100853, China; 2. Chapel Hill, USA, University of North Carolina

Abstract: Objective The aim of the present study was to determine the relationship between the effect of TGF- β 1 and apoptosis in human hepatoma cell lines. **Methods** Three human hepatocarcinoma cell lines, involving different status of the p53 gene respectively, were used in this study. TGF- β 1-induced apoptosis in hepatocarcinoma cell lines was quantitated using TUNEL assay. **Results** Addition of TGF- β 1 induced apoptosis in HepG2 cells (wild type p53). It was indicated that there is a positive correlation between the rate of apoptosis and status of p53 in hepatocarcinoma cell lines. **Conclusion** HepG2 cells seemed to be highly susceptible to TGF- β 1-induced apoptosis compared with Hep3B and Huh-7 cell lines. TGF- β 1 induces apoptosis in hepatocarcinoma cell lines through a p53-dependent pathway.

Keywords: Transforming growth factor- β 1; Apoptosis; Hepatoma cell line; Cell culture

摘要:目的 本研究旨在明确人肝癌细胞系中 TGF- β 1 的作用及其与凋亡的关系。方法 本研究选用了 3 种含有不同 p53 基因状态的人肝癌细胞系,应用 TUNEL 技术对 TGF- β 1 诱导的肝癌细胞的凋亡进行了定量检测。结果 TGF- β 1 仅能诱导 HepG2 细胞(野生型 p53)凋亡,这提示凋亡与 p53 基因的表达具有明确的联系。结论 HepG2 细胞系比 Huh-7 和 Hep3B 系细胞更易发生 TGF- β 1 诱导的凋亡, TGF- β 1 通过 p53 依赖性途径诱导肝癌细胞系发生凋亡。

关键词: 转化生长因子 β 1; 凋亡; 肝癌细胞系; 细胞培养

中图分类号: R735.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578 (2004)09-0526-03

0 引言

对 TGF- β 1 敏感性的丧失据认为是肝癌的重要致病因素之一。为了进一步研究 TGF- β 1 与肝癌的发生以及抑癌基因的变化之间的关系,我们利用分子生物学与形态学相结合的研究方法——脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的缺口末端标记技术 (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labeling, TUNEL) 对 3 种肝癌细胞系进行了凋亡检测。

1 材料与方法

1.1 细胞

本实验选用的 HepG2、Hep3B 和 Huh-7 三种肝癌细胞系均由 UNCLineberger Comprehensive Cancer Center 提供,这 3 种肝癌细胞系分别取自 3 名肝癌 (HCC) 患者 (包括黑人与白人、成人与儿童),其生物学特性均已经过鉴定。

1.2 主要试剂及仪器

EMEM 细胞培养基 (Invitro gen, USA), DMEM 细胞培养基 (Invitro gen, USA), 10% 胎牛血清 (Hyclone Company, USA), 0.25% 胰蛋白酶 (Invitro gen, USA), 4% 台盼蓝 (Sigma Chemical Co., Germany), rhTGF- β 1 (R&D Systems Co., USA), TUNEL Assay Kit (Roche Applied Science, USA), Prolong Antifade Reagent Kit (Molecular Probes, USA), 荧光显微镜 (Olympus, Japan)

1.3 合成培养基的准备

本实验中 HepG2 和 Hep3B 这两种肝癌细胞系的培养采用了 EMEM 合成培养基 (Eagle's Minimum Essential Medium, 10% Fetal Bovine Serum, L-glutamine, MEM Non-Essential Amino Acids Solution, MEM Sodium Pyruvate Solution, Penicillin-Streptomycin); Huh-7 肝癌细胞系的培养则采用了 DMEM 合成培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, 10% Fetal Bovine Serum, L-glutamine, MEM Sodium Pyruvate Solution, Penicillin-Streptomycin)。

1.4 肝癌细胞系的活力检测与传代接种

当肝癌细胞系处于对数生长期时,用 PBS 洗涤细胞。加入少量 0.25% 的胰蛋白酶,置于 37 条件

收稿日期: 2003-08-18; 修回日期: 2003-09-27

作者单位: 1. 100853 北京, 解放军总医院全军肝胆外科研究所; 2. Chapel Hill, USA, University of North Carolina

下消化 1 ~ 3min, 制成细胞悬液。以细胞计数器计算细胞浓度, 并用台盼蓝拒染法检测细胞活力。将 HepG2、Hep3B、Huh-7 三种肝癌细胞系, 各取 1×10^6 个细胞分别接种于预先置有小盖玻片的 6 孔细胞培养板中, 然后在 37 °C、5%CO₂ 及饱和湿度条件下培养。

1.5 肝癌细胞系不同 TGF- β 1 作用组的制备

当三种肝癌细胞系处于对数生长期时, 换加无血清培养基。将细胞分为 3 组, 每组分别接种 1 种肝癌细胞系, 其中每组分为 4 孔, 2 孔为实验组加含终浓度为 5ng/ml TGF- β 1 的无血清培养基; 2 孔为对照组加不含 TGF- β 1 的无血清细胞培养基, 在 37 °C、5%CO₂ 及饱和湿度条件下培养 48h 后, 将盖玻片取出做检测。

1.6 TdT 介导的 dUTP 缺口末端标记技术 (TUNEL)

吸除培养基, 用 PBS 漂洗附有培养细胞的盖玻片。将培养板置于摇床上, 用固定液在室温下固定附着于盖玻片上的细胞 30min。用 PBS 漂洗, 然后将样本置于冰上, 加穿透液作用 2min。用 PBS 漂洗, 加入含 2% 过氧化氢的 PBS, 室温反应 30min。用 PBS 漂洗后将载玻片晾干。加 20 μ l TdT 反应液, 置于 37 °C 条件下反应 30min。用超纯水漂洗晾干。将附有细胞的盖玻片用 Prolong 封片, 在荧光显微镜下观察结果。

1.7 统计处理

本实验采用自身比较、平行对照的设计方法, 由于所获数据属计量资料, 故采用配对 *t* 检验进行统计学处理。

2 结果

2.1 倒置相差显微镜下细胞的形态特征

细胞形态学观察可见对照组细胞贴壁生长良好, 边界清楚, 呈上皮样细胞形态。而 TGF- β 1 组可见到较多的细胞悬浮于培养基中, 有的崩解为碎片, 存活细胞显著减少。

2.2 荧光显微镜下调亡细胞的形态特征

对照组细胞核呈弥散均匀的淡染绿色荧光; 实验组细胞形态呈碎片状, 不规整, 大小不等, 镜下可观察到细胞核或细胞质呈致密浓缩的绿色荧光或绿色强荧光团块, 并可见明显的核染色质固缩、边聚等凋亡形态特征。HepG2、Hep3B、Huh-7 三种肝癌细胞系的每个实验组均为双孔培养, 相同实验至少重复 5 次, 取检测结果的平均值。实验中分别计数正常及凋亡细胞数, 并计算各率。每张玻片随机选取 5 个高倍视野, 在高倍镜下所见细胞符合上述

凋亡细胞形态学特点的为阳性, 每一个样品均计数 300 个以上细胞, 计数细胞凋亡率, 取平均值, 结果见表 1、图 1。本实验结果提示在 HepG2、Huh-7、Hep3B 等肝癌细胞系中, HepG2 细胞系实验组的平均凋亡率低于对照组, 两者具有明显的差别 ($P < 0.05$); 而在 Huh-7 和 Hep3B 这两种肝癌细胞系中, 实验组与对照组的平均凋亡率则无明显差别 ($P > 0.05$)。

表 1 TGF- β 1 诱导的肝癌细胞系的凋亡率

细胞系	平均凋亡率 ($\bar{x} \pm s$)		P
	实验组	对照组	
Hep3B	0.1739 \pm 0.0306	0.1496 \pm 0.0253	> 0.05
HepG2	0.4851 \pm 0.0821	0.1272 \pm 0.0218	< 0.05
Huh-7	0.1167 \pm 0.0237	0.0920 \pm 0.0129	> 0.05

注: P 值为各细胞系实验组与对照组进行比较

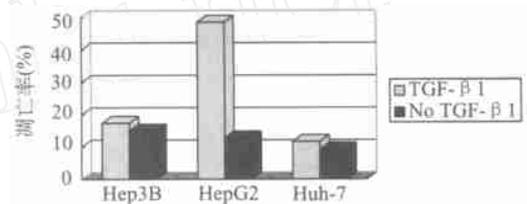


图 1 TGF- β 1 诱导的肝癌细胞系的凋亡率

3 讨论

3.1 肝癌细胞系的选择

本实验选用的 HepG2、Hep3B、Huh-7 三种肝癌细胞系, 分别取自 3 名肝癌细胞癌患者, 不仅具备种族及年龄代表性, 而且这 3 种肝癌细胞系的生物学特性均已经过严格鉴定。其中, HepG2 是从肝母细胞瘤分离而来, 属上皮样肝细胞癌^[1]; Hep3B 的细胞形态为梭型; 而 Huh-7 细胞株需选用与另外两种细胞株不同的细胞培养基。此外, HepG2、Hep3B、Huh-7 肝癌细胞系的生物学特征各不相同, 其中 HepG2 细胞系的基因组中含有野生型 p53 基因; Huh-7 细胞系含有突变型 p53 基因, 其 220 位点出现点突变; Hep3B 细胞系不携带 p53 基因, 其基因组中 p53 基因缺失, Hep3B 和 Huh-7 细胞系均可作为缺乏正常 p53 活性的肝癌细胞的实验模型^[2]。

3.2 TGF- β 1 诱导的肝癌细胞凋亡与 p53 基因状态

TGF- β 1 在肝脏细胞凋亡的启动过程中具有重要的作用^[3]。TGF- β RI 和 TGF- β RII 通过上调促凋亡基因野生型 p53 的表达, 下调突变型 p53 基因, 使 p53 蛋白表达减少, 最终抑制细胞生长周期向 G₁/S 期过渡, 导致细胞 DNA 损伤, 引发细胞凋亡^[4]。本研究提示含有野生型 p53 的 HepG2 对 TGF- β 1 最为敏感; 含有缺失型 p53 的 Hep3B 及突变型 p53 的

Huh-7 则对 TGF- β 1 耐受,提示 TGF- β 1 诱导的细胞凋亡所涉及的信号转导通道依赖于 p53 基因的状态,野生型 p53 基因参与了 TGF- β 1 诱导的肝癌细胞系的凋亡过程。研究表明,TGF- β 1 能促进抑癌基因野生型 p53 蛋白的去磷酸化,从而发挥其抑制肿瘤的作用。乙肝病毒 X 基因产物 HBX 蛋白可与 p53 形成复合物,能够有效地抑制 p53 介导的细胞凋亡,从而导致肝细胞癌变^[5]。

3.3 野生型 p53 基因的生物学意义

野生型 p53 基因是重要的抑癌基因之一,位于 17 号染色体短臂。野生型 p53 的作用是控制细胞增殖、生存和分化,它通过诱导细胞生长周期停止而作为细胞周期的负调节因子。在 p53 缺陷的恶性肿瘤中,导入野生型 p53 基因可迅速诱导细胞凋亡^[6]。在致癌因素作用下,p53 可发生突变造成其功能丧失。突变的 p53 具有癌基因的特性,导致细胞生长失控。突变型 p53 基因通过“负显性”效应阻碍野生型 p53 基因的抑制生长功能,其作用机制是:突变型和野生型 p53 形成寡聚蛋白复合物后,降低了 p53 蛋白与 DNA 的结合能力,从而引起细胞转化及癌变。p53 活性的缺失与肿瘤的发生密切相关,而 p53 基因缺失小鼠的肿瘤高发率更证实了这一点^[7]。

综上所述,转化生长因子 β 1 被认为是典型的多功能细胞因子,参与调节重要的细胞功能^[8]。抑癌基因对细胞凋亡的促进作用也是抑制细胞癌变的作

用方式之一。抑癌基因 p53 与原发肝癌细胞癌的发生有着密切的关系。表明 p53 基因结构的改变与表达异常可能是肝细胞癌发生的中心环节之一。

参考文献:

- [1] Badaewi AF, El -sohemy A, Ste phen LL. The effect of dietary n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids on the expression of cyclooxygenase 1 and 2 and level of p21 in rat mammary glands [J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19 (5): 905 -910.
- [2] Puisieux A, Galvin K, Troalen F, et al. Retinoblastoma and p53 tumor suppressor genes in human hepatocellular carcinoma [J]. *FASEB J*, 1993, 7 (14): 1407 -1413.
- [3] Mendez-Samperio P, Hernandez - Garay M, Garcia - Martinez E. Induction of apoptosis in *Bacillus Calmette - Guerin* activated T cells by transforming growth factor - β [J]. *Cell Immunol*, 2000, 202 (2): 103.
- [4] Huang YL, Chou CK. Bcl-2 blocks apoptosis of transforming growth factor β in human hepatocellular carcinoma cells [J]. *J Biomed Sci*, 1998, 5 (2): 185 -191.
- [5] Thorgeirsson SS. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Seminars in Liver Diseases* [J], 1998, 18 (1): 115.
- [6] Steinberg TH. Gap junction function: the messenger and the message [J]. *Am J Pathol*, 1998, 152 (3): 851 -854.
- [7] Attardi LD. The role of p53 in tumor suppression: lessons from mouse models [J]. *Cell Mol Life Sci*, 1999, 55 (1): 48 -63.
- [8] Si X, Jin Y, Yan g L. Induction of new bone by ceramic bovine bone morphogenetic protein 2 and transforming growth factor β 1 [J]. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1998, 27 (4): 310.

[编辑校对:刘红武]

简 讯

经湖北省民政厅、湖北省卫生厅批准,湖北省抗癌协会近 3 年的筹备,湖北省抗癌协会肺癌专业委员会于 2004 年 7 月 31 日在武汉成立,大会选举湖北省肿瘤医院宋启斌同志出任主任委员。学会成立将有利于肺癌专业的学术交流,密切学科内的各种横向联系与协作,将为该省的肺癌防治作出巨大贡献。