

# 三氧化二砷抑制肝癌 Hep G2 细胞侵袭转移及对 RhoC 基因表达的影响

冯觉平,黄涛,王亚萍,方静,李敏,孔庆志

Effect of Arsenic Trioxide on Invasion and Metastasis and RhoC Gene Expression of Human Hepatocarcinoma Cells in Vitro

FENG Jue-ping, HUANG Tao, WANG Ya-ping, FANG Jing, LI Min, KONG Qing-zhi

Department of Oncology, The Puai Hospital, Tongji Medical college, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China.

Corresponding Author: HUANG Tao, Email: fengjueping@163.com

**Abstract :Objective** To evaluate the effects of the arsenic trioxide ( $As_2O_3$ ) on antagonizing invasion and metastasis and to investigate the effect of  $As_2O_3$  on RhoC gene expression in Human Hepatocarcinoma cell line Hep G2. **Methods** Adherence ability, Migration and invasion of Hep G2 cell inhibited by  $As_2O_3$  were assessed by MTT and transwell technique. Expression levels of RhoC mRNA and protein in Hep G2 cell were determined by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western blot, respectively. **Results** The number of adhesion, migration and invasion of Hep G2 cells were significantly lower in  $As_2O_3$  Group than in the control group ( $P < 0.05$ ). A significant down-regulation of expression of RhoC gene mRNA and protein levels were observed in Hep G2 cells when 0.25 mg/L  $As_2O_3$  was given after 4, 6 and 8 days ( $P < 0.05$ ). Relations between mRNA and protein expression level of RhoC gene in Hep G2 were found close ( $r_A = 0.92, P = 0.046$ ). **Conclusion** The adherence, migration and invasion ability of Hep G2 cell is markedly inhibited by  $As_2O_3$ .  $As_2O_3$  is able to inhibit the invasion and metastasis of Hep G2 cells by down regulation of RhoC gene expression.

**Key words**: Arsenic Trioxide; Hep G2 cells; Metastasis; RhoC gene; Expression

**摘要**:目的 了解三氧化二砷 ( $As_2O_3$ ) 对肝癌 Hep G2 细胞体外黏附、侵袭和迁移的抑制作用及对转移基因 RhoC 表达的影响,探讨  $As_2O_3$  抑制肝癌细胞转移的机制。方法 分别采用 MTT 法、Transwell 检测  $As_2O_3$  对 Hep G2 细胞黏附、迁移、侵袭能力的影响;采用 RT-PCR、Western blot 方法检测  $As_2O_3$  作用前后 Hep G2 细胞中 RhoC 基因的表达及变化。结果  $As_2O_3$  作用后 Hep G2 细胞黏附率、侵袭及侵袭细胞数较对照组明显下降 ( $P < 0.05$ )。  $As_2O_3$  作用 4、6、8 天后 RhoC mRNA 及蛋白表达水平逐渐下降 ( $P < 0.05$ )。 Hep G2 细胞中 RhoC mRNA 表达和蛋白表达具有相关性 ( $r = 0.92, P = 0.046$ )。结论  $As_2O_3$  可明显抑制 Hep G2 细胞细胞黏附、迁移和侵袭的能力;并可通过下调 RhoC 基因的表达而抑制其侵袭转移。

**关键词**:三氧化二砷;肝癌细胞;Hep G2 细胞;转移;RhoC 基因;表达

中图分类号:R735.7 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2008)11-0775-03

## 0 引言

在肿瘤的侵袭和转移过程中有大量的分子介入,其中一些关键的因子和机制还有待证实<sup>[1]</sup>。已有研究证实,RhoC 基因的表达水平与癌细胞的侵袭潜能密切相关<sup>[2]</sup>,且  $As_2O_3$  有一定的抗肝癌细胞黏附和侵袭作用<sup>[3]</sup>,但  $As_2O_3$  抗肝癌侵袭转移的机

制尚不十分明了。本研究观察了  $As_2O_3$  对 Hep G2 细胞体外侵袭、迁移的抑制作用及对转移基因 RhoC 表达的影响,旨在探讨  $As_2O_3$  抑制肿瘤转移的分子机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

人肝癌细胞株 Hep G2 由华中科技大学同济医学院附属同济医院胆胰外科实验室惠赠;0.1%  $As_2O_3$  (10 mg/支)为哈尔滨伊达药业有限公司产品;带有 8  $\mu$ m 微孔聚碳酸酯膜的 Transwell 细胞培养小室、Matrigel 胶和羊抗人 RhoC 多克隆抗体分

收稿日期:2008-03-05;修回日期:2008-09-01

基金项目:湖北省科技厅攻关项目(2006AA301C28)

作者单位:430030 武汉,华中科技大学同济医学院附属普爱医院(武汉市普爱医院)肿瘤科

通信作者:黄涛,Email: fengjueping@163.com

作者简介:冯觉平(1962-),女,博士,主任医师,主要从事肝癌的综合治疗研究

别购于美国 Costar、BD 和 Santa Cruz 公司。自动酶标读数仪, Bio-Rad-550 型, 波长 492 nm, 美国。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 Hep G2 细胞用含 10 %胎牛血清的 DMEM 培养液常规培养, 以 0.25 %胰蛋白酶常规消化, 按所需浓度接种<sup>[4]</sup>。

1.2.2 MTT 法检测 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 Hep G2 细胞黏附能力的影响 取对数生长期 Hep G2 细胞配成浓度为 1 ×10<sup>5</sup>/ml 的细胞悬液, 常规培养。参照文献<sup>[5]</sup>以 MTT 法测定细胞黏附能力。实验组为 0.25 mg/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 对照组为含 10 %胎牛血清的 DMEM。各组细胞分别在 30、60、90、120 min 时吸出悬浮的、未黏附的细胞, 测定每孔 OD 值。细胞黏附率 = (处理组平均 OD 值/对照组平均 OD 值) ×100 %。黏附抑制率 = [1 - (处理组平均 OD 值/对照组平均 OD 值)] ×100 %。

1.2.3 Transwell 检测 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 Hep G2 细胞迁移、侵袭能力的影响 Transwell 小室杯底由 8 μm 孔径的聚碳酸酯微孔滤膜封闭。体外侵袭能力的测定侵袭小室的滤膜不用 Matrigel 覆盖。实验参照文献<sup>[5]</sup>改良。下室加入 0.5 ml 含 20 %血清培养, 上室加入细胞悬液 (2 ×10<sup>6</sup>/ml, 200 μl/ 每孔), 各设 3 个复孔。实验组为 0.25 mg/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 对照组为含 10 %胎牛血清的 DMEM。各组常规培养、孵育、4 %多聚甲醛固定、苏木精染色, 镜下随机计数 5 个视野的穿膜细胞平均数 (400 ×)。侵袭抑制率 = (1 - As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组侵袭细胞数/对照组侵袭细胞数) ×100 %

1.2.4 RT-PCR 方法检测 Hep G2 细胞中 RhoC mRNA 的表达 收集 0.25 mg/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用 4 d、6 d、8 d 后的细胞分别提取总 RNA, 行 RT-PCR 反应。参照文献<sup>[6]</sup>设计引物, RhoC 和内参照 -actin 分别为 183、587 bp 产物用 1.5 %琼脂糖凝胶电泳、凝胶成像系统分析电泳条带灰度值。RhoC mRNA 表达相对强度 = RhoC 条带灰度值/ -actin 条带灰度值。

1.2.5 Western blot 检测 Hep G2 细胞中 RhoC 蛋白的表达 取上述培养细胞常规细胞裂解、蛋白变性、聚丙烯酰胺凝胶电泳, 蛋白电泳、转膜。PVDF 膜先后置于 1 500 稀释的一抗稀释液中 37 孵育 1 h, 1 1 000 稀释的二抗稀释液中孵育, PBST 洗膜后加入 DAB 显色。

1.3 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件, 细胞生长抑制率用 F 检验, 计量资料的组间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 Hep G2 细胞黏附的影响

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 Hep G2 细胞黏附力的影响, 见表 1。实验组各时段的细胞黏附率均明显低于对照组 (P < 0.05), 各时段黏附抑制率分别为 33.6 %、23.7 %、22.5 %和 20.0 %, 各时间段之间差异无统计学意义 (P > 0.05)。

表 1 MTT 法检测 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 HepG2 细胞黏附率的影响 ( $\bar{x} \pm s$  %)

Tab 1 The effects of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on adhesion of HepG2 cells by MTT method in vitro ( $\bar{x} \pm s$  %)

| Groups                         | 30 min      | 60 min      | 90 min      | 120 min     |
|--------------------------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 25.40 ±2.46 | 45.60 ±3.29 | 56.20 ±6.42 | 73.00 ±4.63 |
| Control                        | 38.28 ±1.54 | 59.80 ±3.05 | 72.50 ±4.14 | 91.30 ±4.43 |

2.2 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 Hep G2 细胞迁移、侵袭的影响

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组迁移细胞数及侵袭细胞数均明显低于对照组, 迁移抑制率和侵袭抑制率分别为 55.19 %和 58.21 %, 见表 2。对照组细胞轮廓清晰, 活力旺盛, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组细胞明显变圆, 稀疏。

表 2 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 HepG2 细胞迁移力和侵袭力的影响 (n = 4)

Tab 2 The effects of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on the migration and invasion of HepG2 cells in vitro (n = 4)

| Groups                         | Migration cell | Migration inhibitory rate | Invasion cell | Invasion inhibition rate |
|--------------------------------|----------------|---------------------------|---------------|--------------------------|
| As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 99.33 ±3.51    | 55.19 %                   | 65.33 ±6.66   | 58.21 %                  |
| Control                        | 221.67 ±7.37   |                           | 156.34 ±13.50 |                          |

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 组迁移细胞数及侵袭细胞数均明显低于对照组 (迁移 = 25.7, P<sub>迁移</sub> = 0.0015; 侵袭 = 10.3, P<sub>侵袭</sub> = 0.0095)

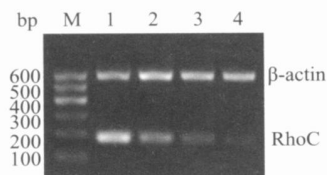
2.3 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对肝癌 Hep G2 细胞中 RhoC 基因表达的影响

As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用前 RhoC mRNA 表达量为 (1.40 ± 0.44), 0.25 mg/L 的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用 4 d、6 d、8 d 后, RhoC-mRNA 表达量分别降为 (0.66 ±0.21)、(0.50 ±0.19) 和 (0.38 ±0.13), 各时间段表达水平均明显低于药物作用前 (P < 0.05); 此外, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用前及作用后 4、6、8 d, RhoC 蛋白量分别为 (2.40 ± 0.22)、(1.64 ±0.31)、(1.54 ±0.29) 和 (0.74 ± 0.17), 各时段与用药前 RhoC 蛋白表达比较差异也有统计学意义 (F = 13.7, P = 0.033), 见图 1、2。

2.4 Hep G2 细胞中 RhoC 基因 mRNA 和蛋白表达的相关性分析

使用双变量相关分析统计 RhoC 基因 mRNA 和蛋白表达之间的关系发现, Hep G2 细胞中 RhoC 基因 mRNA 的表达和蛋白含量存在正相关 (r = 0.92, P = 0.046)。

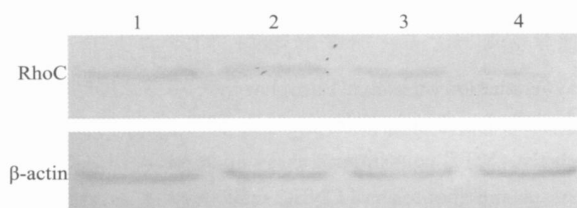




1: Control; 2: After HepG2 cells were treated with 0.25 mg/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for 4 days; 3: After HepG2 cells were treated with 0.25 mg/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for 6 days; 4: After HepG2 cells were treated with 0.25 mg/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for 8 days; M: DL 600 Marker

图 1 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对 RhoC mRNA 的表达的影响

Fig 1 The effects of AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on the expression of RhoC mRNA in HepG2 cells



1: Control; 2: After HepG2 cells were treated with 0.25 mg/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for 4 days; 3: After HepG2 cells were treated with 0.25 mg/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for 6 days; 4: After HepG2 cells were treated with 0.25 mg/L AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> for 8 day

图 2 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub>作用 HepG<sub>2</sub>细胞后 RhoC 蛋白表达

Fig 2 The effects of AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on the expression of RhoC protein in HepG2 cells

### 3 讨论

肿瘤的侵袭及转移是较为复杂的动态过程,是疾病进展的主要原因。Liotta<sup>[7]</sup>曾最早提出了侵袭转移过程的“三步”假说:黏附、降解与移动。本研究在对肝癌细胞系 Hep G<sub>2</sub> 细胞的研究中发现, Hep G<sub>2</sub> 细胞黏附率在 120 min 时高达 91.30%, 迁移和侵袭细胞数分别为 (221.67 ± 7.37 和 (156.34 ± 13.50))。提示 Hep G<sub>2</sub> 细胞具有较强的黏附能力和较强的侵袭和转移能力,表明本株肝癌细胞株具有转移倾向。AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可使其黏附抑制率明显下降,且随着时间的延长,黏附能力无恢复迹象。同时 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可使迁移细胞数及侵袭细胞数分别下降为 (99.33 ± 3.51) 和 (65.33 ± 6.66), 其抑制率分别为 55.19% 和 58.21%, 并可使细胞形态发生明显的改变。提示 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可降低肝癌 Hep G<sub>2</sub> 细胞异质黏附能力,阻止侵袭转移的发生,且抑制作用具有不可逆性。此外, AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 能通过穿过聚碳酸酯膜的肝癌细胞数量减少,降低肝癌细胞的侵袭和运动能力。因此, AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 除诱导肝癌细胞凋亡、抑制增殖、抗肿瘤血管形成作用外,还具有抑制肝癌细胞转移的作用。

肿瘤细胞的侵袭和转移能力是恶性肿瘤最基本的特性,肝癌细胞的黏附和侵袭是肝癌发生转移的重要步骤,抑制肝癌细胞的侵袭可能降低肝癌转移的发生。本研究结果提示 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 可能是很有前途的抑制肿瘤转移复发的药物。这为 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 在临床上用

于肝癌的治疗提供了新的思路。

现已明了, RhoC 是小分子 G 蛋白超家族中 Rho 亚族的蛋白之一。近年来, 诸多研究结果表明<sup>[6,8]</sup>, RhoC 基因的表达水平与癌细胞的侵袭潜能相关。Rho-相关的细胞内信号决定着恶性肿瘤的转移潜能<sup>[6,9]</sup>。我们在本研究中观察到 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 作用后 RhoC mRNA 表达水平及蛋白水平均有不同程度的下降, 其下降呈时间依赖, 且 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对 RhoC 基因的调节作用在 RhoC 基因 mRNA 和蛋白水平上有一致性, 下调 RhoC 表达的同时伴随着肝癌细胞迁移、侵袭的抑制。该结果提示 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 对高表达的 RhoC 基因均有不同程度的下调作用, 下调 RhoC 的表达可明显抑制肝癌细胞的迁移与侵袭。

已知 AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 是一种细胞毒药物, 我们的前期研究中观察到, AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 能抑制细胞增殖、诱导凋亡、逆转耐药<sup>[10]</sup>。本实验中我们进一步观察到, AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 还具有抑制侵袭转移的作用, 且其抑制侵袭转移的作用与下调 RhoC 基因的表达有关。因此, AS<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 的抗肿瘤作用可能是多途径的, 针对 RhoC 基因的靶向治疗可能是肝癌治疗的新思路。

### 参考文献:

- [1] Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG. Cancer metastasis and angiogenesis: an imbalance of positive and negative regulation[J]. Cell, 1991, 64(2): 327-336.
- [2] Van Golen KL, Wu ZF, Qiao XT, et al. RhoC GTPase, a novel transforming oncogene for human mammary epithelial cells that partially recapitulates the inflammatory breast cancer phenotype[J]. Cancer Res, 2000, 60(20): 5832-5838.
- [3] 王海清, 秦叔逵, 王锦鸿, 等. 三氧化二砷对人肝癌细胞黏附和侵袭影响的实验研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2004, 24(10): 922-925.
- [4] 冯觉平, 孔庆志, 黄涛, 等. 三氧化二砷抑制肝癌细胞侵袭转移的实验研究[J]. 临床外科杂志, 2008, 16(7): 448-450.
- [5] Yao Z, Che XC, Lu R, et al. Inhibition by Tyrosinleutide (YSL) on the Invasion and Adhesion of the Mouse Melanoma Cell [J]. Mol Med, 2007, 13(1-2): 14-21.
- [6] Shikada Y, Yoshino I, Okamoto T, et al. Higher Expression of RhoC Is Related to Invasiveness in Non-Small Cell Lung Carcinoma[J]. Clin Cancer Res, 2003, 9(14): 5282-5286.
- [7] Liotta LA. Tumor invasion and metastasis role of the extracellular matrix: Rhoads Memorial Award lecture[J]. Cancer Res, 1986, 46(1): 1-7.
- [8] Clark EA, Golub TR, Lander ES, et al. Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC[J]. Nature, 2000, 406(6795): 532-535.
- [9] Ruth MC, Xu Y, Maxwell IH, et al. RhoC promotes human melanoma invasion in a PI3K/Akt-dependent pathway [J]. J Invest Dermatol, 2006, 126(4): 862-868.
- [10] 冯觉平, 孔庆志, 黄涛, 等. 三氧化二砷对肺腺癌耐药细胞 A549/R 耐药性的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2006, 23(2): 201-203.

[编辑:安 凤;校对:贺 文]