

阿霉素对肝癌细胞系 MHCC97-L 中 Wnt5b 和 Nanog 表达的影响*

郑 洋¹, 潘 娅², 洪 阳³, 向 敏⁴, 王寒琪¹, 王 燕², 陈腾祥^{2**}

(1. 贵阳医学院附院 消化内科, 贵州 贵阳 550004; 2. 贵阳医学院 生理学教研室, 贵州 贵阳 550004; 3. 贵阳市卫生局, 贵州 贵阳 550001; 4. 贵阳医学院附院 儿科, 贵州 贵阳 550004)

[摘 要] 目的: 探讨干细胞相关基因 Wnt5b 和 Nanog 在阿霉素(ADM)作用下的人低转移性肝癌细胞系 MHCC97-L 中的表达。方法: MHCC97-L 细胞常规培养, 用四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测 ADM 作用 72 h 时 MHCC97-L 的半数致死量(LD₅₀); 蛋白质免疫印迹法(Western blot)检测 ADM(LD₅₀)作用下, 干细胞相关基因 Wnt5b 和 Nanog 蛋白表达。结果: MTT 实验结果显示, ADM 对 MHCC97-L 的半数致死量(ID₅₀)为 0.423 3 μmol/L; Western blot 检测发现, 在 ADM(ID₅₀)作用下, 随作用时间延长, Wnt5b 蛋白表达水平逐渐增高, 12 h 时达最高峰($P < 0.05$), 以后则逐渐降低, 72 h 时降到最低($P < 0.05$); 在 ADM(ID₅₀)作用下, 随作用时间延长, Nanog 蛋白表达水平逐渐降低, 12 h 时降到最低, 以后则逐渐升高, 72 h 时达到最高($P < 0.05$)。结论: 干细胞相关基因 Wnt5b、Nanog 在 ADM 作用下的人肝癌细胞系 MHCC97-L 中均有不同程度的表达。

[关键词] 癌; 肝细胞; 阿霉素; 干细胞; 基因

[中图分类号] R363.3; R657.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1000-2707(2012)03-0235-03

Effects of Adriamycin on the Expression of Wnt5b and Nanog in Hepatocellular Carcinoma Cell Line MHCC97-L

ZHENG Yang¹, PAN Ya², HONG Yang³, XIANG Min⁴, WANG Hanqi¹, WANG Yan², CHEN Tengxiang²

(1. Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China;

2. Department of Physiology, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China; 3. Health Bureau,

Guiyang 550004, Guizhou, China; 4. Department of Pediatrics, the Affiliated Hospital of

Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou, China)

[Abstract] **Objective:** To explore the expression of stem cell associated gene Wnt5b and Nanog in hepatocellular carcinoma cell line MHCC97-L incubating with adriamycin (ADM). **Methods:** MHCC97-L cells were routinely cultured. Median lethal dose (LD₅₀) of MHCC97-L treated with ADM for 72 h were determined with MTT method. The expression of Wnt5b and Nanog proteins in MHCC97-L after treating with ADM (LD₅₀) was detected with Western blot. **Results:** MTT results showed that LD₅₀ of MHCC97-L treated with ADM was 0.423 3 μmol/L. The expression of Wnt5b increased when MHCC97-L was exposed to ADM within 4 hours, and reached peak at 12 hours, and then decreased gradually, and reduced to minimum at 72 h. When the incubation time was less than 12 h, Nanog decreased gradually with the time passing($P < 0.05$), and reduced to minimum at 12 h, and then it increased gradually, reached peak at 72 hours. **Conclusions:** Wnt5b and Nanog proteins express in MHCC97-L exposed to ADM in different degrees.

[Key words] carcinoma, hepatocellular; adriamycin; stem cell; gene

*[基金项目] 国家自然科学基金(81060176), 贵阳市科技局社会发展领域科技攻关项目: 筑科农字(2010)。

** 通讯作者 E-mail: gzctxin@qq.com

原发性肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 是成年人中最常见的肝脏恶性肿瘤,在我国发病率约为 0.8‰,占全球总发病患者的 55%,其相关死亡率仅次于肺癌^[1,2]。多数肝癌患者化疗效果较差,手术切除率低,术后复发转移率较高,肝癌复发转移率高成为引起肝癌患者死亡率居高不下的主要原因。近年的研究证实,肝癌不仅是一种基因病,而且是一种成体干细胞疾病,存在至少 3 种不同的具有干细胞特性的细胞系,以致于易发生致瘤性转化,肝癌细胞可由多种不同阶段的肝干细胞分化而来^[3,4]。肝癌干细胞对肝癌的发生、发展、转移复发及多药耐药具有关键性作用,因此,寻找并分离出特异性肝癌干细胞表面标志物,将会对肝癌的诊断和治疗产生重大意义。本实验旨在通过蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测广谱抗癌药物阿霉素 (ADM) 影响下的低转移性肝癌细胞系 MHCC97-L 中干细胞相关基因 Wnt5b 和 Nanog 的表达,探讨其表达特点及成为潜在抗癌治疗靶点的可能性。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 人肝癌细胞株 MHCC97-L 购自上海艾研生物科技有限公司,DMEM 培养基及胎牛血清 (FBS) 购自美国 Invitrogen 公司,二甲亚砜 (DMSO) 购自美国 Biosharp 公司,四甲基偶氮唑盐 (MTT)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、Tris 碱、聚丙烯酰胺购自美国 Sigma-aldrich 公司,Wnt5b 抗体、Nanog 抗体、免 IgG 购自美国 Cell signaling technology 公司,其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.2 主要仪器 恒温 CO₂ 培养箱 (Model 310, 美国 Thermo 公司),台式高速冷冻离心机 (Allegra 64R Centrifuge, 美国 Beckman Coulter 公司),pH 计 (PB-10, 德国 Satourious 公司),MiniVE 电泳设备 (美国 GE 公司),GBOX iChemiXR 化学发光及凝胶成像仪 (美国 Syngene 公司)、epoch 微孔板阅读器 (美国 Biotek 公司)。

1.3 细胞培养 人肝癌细胞株 MHCC97-L 用含 10% FBS、100 U/ml 青霉素和链霉素混合液的高糖 DMEM 培养基,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.4 MTT 实验 收集处于对数生长期的 MHCC97-L 细胞,按每孔 1×10^4 个细胞的密度接种于 96 孔板中,常规培养,12 h 后加入含有不同浓度 ADM 的 DMEM 培养基,继续培养 72 h (36 h 换液

一次),弃去旧培养基,每孔加入含有 MTT 溶液的新鲜培养液 200 μ l,继续培养 4 h 后终止培养,每孔加入 150 μ l 二甲基亚砜,低速振荡 10 min,微孔板阅读器读取各孔 OD 490 nm 的吸光值,计算 ADM 对细胞株 MHCC97-L 的半数致死量。

1.5 Western blot 检测 将 MHCC97-L 细胞常规培养,当细胞密度达 80% 左右时换液,给予含半数致死量 ADM 的新鲜培养基继续培养,分别作用 0 h、0.5 h、1 h、4 h、12 h、24 h、48 h、72 h 后裂解细胞提取蛋白。Bradford 法对样品进行蛋白质定量分析,行 12% SDS-PAGE 电泳,通过转印、封闭、孵育,使抗体与抗原充分结合,加入显影剂通过 GBOX iChemiXR 仪器摄片并保存。以 β -actin 为内参,GeneTools 软件进行目的条带分析。

1.6 统计方法 数据分析采用 SPSS16.0 软件,利用回归概率模型计算 ADM 对细胞的半数致死量,计量资料以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,资料符合正态分布且方差齐,多组比较采用单因素方差分析,两两比较用 SNK 法,检验水准为 0.05。

2 结果

2.1 ADM 对肝癌细胞 MHCC97-L 的抑制作用 用含有不同稀释浓度的 ADM 培养基培养细胞 72 h 后,MTT 法检测药物对细胞的抑制率,结果显示 ADM 对人肝癌细胞 MHCC97-L 产生了明显的抑制作用,且 ADM 的作用浓度越高,抑制效应越明显。(如图 1 所示)。通过吸光度值计算药物对细胞的抑制率,根据 ADM 作用浓度与对应的抑制率,运用线性回归的概率方法 (SPSS) 计算 ADM 对 MHCC97-L 的半数致死量为 0.423 3 μ mol/L。

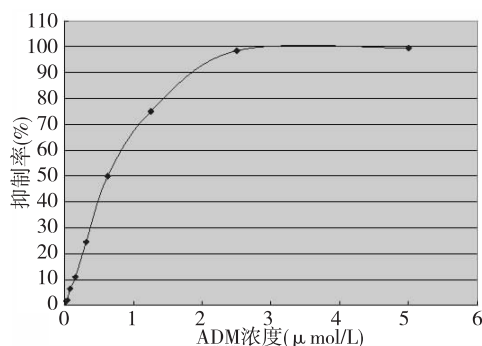


图 1 ADM 对 MHCC97-L 细胞系的抑制曲线
Fig. 1 The inhibitory curve of ADM to MHCC97-L cell line

2.2 肝癌细胞系 MHCC97-L 中 Wnt5b 和 Nanog 表达 以 Western blot 检测目的蛋白 β -actin 条带灰度值为标准, Wnt5b 和 Nanog 基因在 ADM(ID_{50}) 作用的人低转移性肝癌细胞系 MHCC97-L 中都有表达, 在 ADM(ID_{50}) 作用下, 随作用时间延长, Wnt5b 蛋白表达水平逐渐增高, 12 h 时达最高峰 ($P < 0.05$), 以后则逐渐降低, 72 h 时降到最低 ($P < 0.05$); 在 ADM(ID_{50}) 作用下, 随作用时间延长, Nanog 蛋白表达水平逐渐降低, 12 h 时降到最低, 以后则逐渐升高, 72 h 时达到最高 ($P < 0.05$)。见图 2。

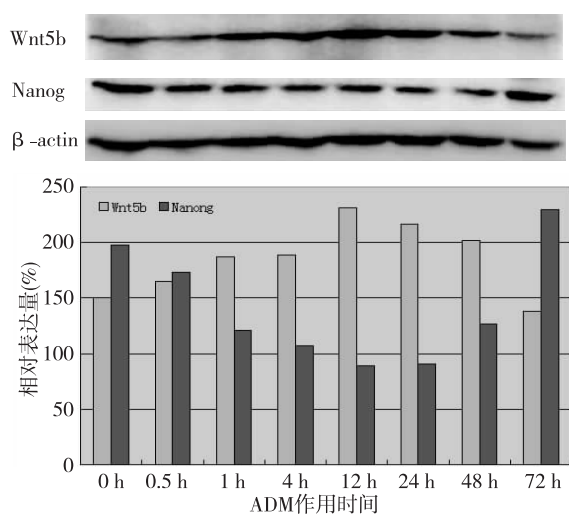


图 2 ADM 影响下 MHCC97-L 中 Wnt5b 和 Nanog 的表达

Fig. 2 The effect of ADM on the expression of Wnt5b and Nanog in MHCC97-L

3 讨论

干细胞是一类具有自我更新、多向分化和无限增殖能力的原始细胞, 通过对干细胞自我更新特性的研究, 发现在干细胞和癌细胞之间存在许多相似之处, 其一是癌细胞可能是由正常干细胞的变异转化发生的, 其二是调控干细胞自我更新能力的信号途径和调控癌细胞的信号途径可能相同。2001 年 Reya 等^[5] 提出肿瘤干细胞 (CSCs) 的概念, CSCs 凭借其自身的特性, 对药物有天然的耐药性, 可以逃离药物的杀伤作用, 从而在化疗后导致肿瘤的复发和转移^[6]。

阿霉素 (ADM) 作为一种广谱抗肿瘤药物, 通过干扰转录过程诱导肿瘤细胞凋亡^[7], 然而目前

包括 ADM 在内的传统化疗药物大多是对处于增殖期的细胞产生杀灭作用, 虽然可以使肿瘤体积缩小甚至完全缓解, 但却不能根除 CSCs; 相反当癌细胞受到 ADM 刺激后, 会引起一系列应激性保护反应, 从而使细胞产生耐药性^[8]。Nanog 是 2003 年发现的一个新基因, 它对维持胚胎干细胞亚全能性起关键性作用, Nanog 基因功能的调控涉及 Nanog 与 Sox、Oct 4 之间的相互作用和 Nanog 自身的负反馈调控, Nanog 还调控一些 ESCs 命运的重要分子效应物。本次研究提示, ADM 对肝癌细胞具有明显的抑制作用, 当半数抑制量短时间 (< 12 h) 作用时, 干细胞相关基因 Nanog 表达量逐渐降低, 但当达到足够长的时间后, 基因表达量开始逐渐上升, 并在 72 h 时达到最高。有研究人员猜想, Nanog 是在细胞基因表达调节的动荡时期设定细胞状态的重要因子^[9], 本研究结果提示在 ADM 作用的过程中, 部分癌细胞可能在受到刺激后发生干细胞样转化, 通过细胞调节机制使细胞处于静止期, 从而逃避了化疗药物的杀伤作用。

Wnt/ β -catenin 信号通路在胚胎发育中影响生长期细胞的增殖和凋亡。癌基因、抑癌基因或 Wnt 信号通路成分的突变可使该通路不恰当激活, 而这种异常激活则与肿瘤的发生、发展有关, 尤其与消化道肿瘤的发生、发展密切相关^[10]。Wnt 信号通路中多种信号成分如 β -catenin、APC、Axin、sFRP1、Wnt 蛋白等均与肝细胞癌的发生、发展有关。有研究显示, 正常的肝脏组织中 Wnt5b 的表达比癌旁组织和肝癌组织要高, 而癌旁组织又明显高于癌组织^[11]。从本实验的结果发现, 随着 ADM (ID_{50}) 作用时间的延长, Wnt5b 的表达量呈现先升高后降低的过程, 这与周文波等的研究结果存在共通性, 由此推测 Wnt5b 与肝癌细胞的恶性程度呈负相关。值得注意的是, Nanog 与 Wnt5b 在肝癌细胞系 MHCC97-L 中同时表达, 且表达趋势不同, 两者之间相关性有待于进一步的研究证实。

4 参考文献

- [1] B K Edwards, E Ward, B A Kohler, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975 - 2006, featuring colorectal cancer trends and impact of interventions (risk factors, screening, and treatment) to reduce future rates [M]. Cancer, 2010 (3): 544 - 573.

(下转第 258 页)

MTZR CagA 基因扩增片段凝胶电泳结果显示,无论是 MTZR 或 MTZS 都呈一条均一大小的片段,未能明显区分两者的差异性,说明其耐药机制并非大片段的插入、置换或缺失,而是只存在小片段点突变、置换等可能。进一步随机选取 MTZS、MTZR 各 5 株与标准菌株 J99 CagA 基因序列进行同源性比较,并且就其同源性比较结果再进一步做突变形式的比较,发现不同株的 MTZS、MTZR 在 CagA 基因片段均存在 6% 左右的突变,且均以点突变形式为主,其中以置换突变为甚,两组间无统计学差异。就置换突变的类型进行比较,虽然两组间亦无明显差异,但发现在 CagA 基因位点 963、1034 上出现 C—T 的置换在 MTZR 5/5 次,MTZS 5/5 次;1039 位点上 C—T 的置换在 MTZR 5/5 次,MTZS3/5 次;972—973 位点上出现 T—C 的置换在 MTZR 4/5 次,MTZS 4/5 次,这可能是本地区 CagA 基因型的特点。

本研究首次报告在贵州地区 CagA 与上消化道疾病有密切关系,但其与疾病的严重程度并无明显关系,H pylori 对甲硝唑耐药率为 54%,CagA 基因表达及其基因变异与 MTZ 耐药性之间无明显的关系。

4 参考文献

- [1] Watada M, Shiota S, Matsunari O, et al. Association between *Helicobacter pylori* cagA - related genes and clinical outcomes in Colombia and Japan[J]. BMC Gastroenterol, 2011(1):141.
- [2] 中华医学会消化病学分会,幽门螺杆菌学组/幽门螺杆菌科研协作组. 第三次全国幽门螺杆菌感染若干问题共识报告[J]. 现代消化及介入诊疗,2008(1):42—46.
- [3] 胡林,刘苓,谭庆华,等. 贵州省幽门螺杆菌临床菌株的分离培养[J]. 世界华人消化杂志,2009(27):2830—2834.
- [4] Talebi Bezmin Abadi A, Rafiei A, Ajami A, et al. *Helicobacter pylori* homB, but not cagA, is associated with gastric cancer in Iran[J]. J Clin Microbiol, 2011(9):3191—3197.
- [5] 刘娅琳,李大欢,胡林,等. 幽门螺杆菌细菌培养与尿素酶试验对幽门螺杆菌检测敏感性比较[J]. 贵阳医学院学报,2011(2):147—150.
- [6] 官月华,柳云恩,孙丽萍,等. 中国辽宁地区人群幽门螺杆菌感染菌株与相关性胃疾病的关系[J]. 世界华人消化杂志,2007(33):3462—3467.
- [7] Suqimoto M, Yamaoka Y. Virulence factor genotypes of *Helicobacter pylori* affect cure rates of eradication therapy [J]. Arch Immunol Ther Exp, 2009(1):45—56.
- [8] Taneike I, Nami A, O'Connor A, et al. Analysis of drug resistance and virulence - factor genotypes of Irish *Helicobacter pylori* strains: is there any relationship between resistance to metronidazole and CagA status[J]. Pharmacol Ther, 2009(7):784—790.
- [9] 李素艳,唐国都,黄杰安,等. 广西地区幽门螺杆菌 CagA 基因表达及其耐药性[J]. 世界华人消化杂志,2008(18):2072—2075.
- (2012—03—10 收稿,2012—05—12 修回)
- 编辑:周 凌
-
- (上接第 237 页)
- [2] 杨秉辉,丛文铭,周晓军,等. 原发性肝癌规范化诊治专家共识[J]. 临床肿瘤学杂志,2009(3):259—269.
- [3] S Sell. Mouse models to study the interaction of risk factors for human liver cancer[J]. Cancer Research, 2003(22):7553—7562.
- [4] Ma S, Chan KW, Hu L, et al. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells [J]. Gastroenterology, 2007(7):2542—2556.
- [5] Reya T, Morrison SJ, Clarke M F, et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells[J]. Nature, 2001(6859):105—111.
- [6] Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance [J]. Nat Rev Cancer, 2005(4):275—284.
- [7] Yoshida M, Suzuki T, Komiya T, et al. Induction of MRP5 and SMRP mRNA by adriamycin exposure and its overexpression in human lung cancer cells resistant to adriamycin [J]. Int J Cancer, 2001(3):432—437.
- [8] Livingston D M, Silver D P. Cancer: crossing over to drug resistance [J]. Nature 2008(7182):1066—1067.
- [9] Chamber I, Silva J, Colby D, et al. Nanog safeguards pluripotency and mediates germline development [J]. Nature, 2007(450):1230—1235.
- [10] Kuphal F, Behrens J. E-cadherin modulates Wnt-dependent transcription in colorectal cancer cells but does not alter Wnt-independent gene expression in fibroblasts [J]. Exp Cell Res, 2006(4):457.
- [11] 周文波,邹灿,张有顺,等. Oct4 及 Wnt/ β -Catenin 在肝癌中的表达及相互作用[J]. 华中科技大学学报(医学版),2010(4):501—505.
- (2012—02—28 收稿,2012—04—11 修回)
- 编辑:潘 娅