

· 基础研究 ·

DOI: 10.3872/j.issn.1007-385X.2008.05.014

磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 基因对肝癌细胞 SK-Hep-1 黏附和侵袭的影响

王冰¹, 林山², 王烈^{1*} (1. 南京军区福州总医院普通外科研究所, 福州 350025; 2. 福建省莆田学院附属医院普通外科, 福建莆田 351100)

[摘要] 目的: 肝细胞癌中高表达磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3 基因(glypican-3, *GPC3*), 而在非肿瘤肝组织、肝细胞腺瘤、胆管癌、肝内胆管细胞癌、胆囊癌等细胞中低表达甚至不表达; 本研究利用携带 *GPC3* 重组真核表达载体, 探讨 *GPC3* 基因对 SK-Hep-1 肝癌细胞增殖、黏附和侵袭能力的影响。方法: 将 pEGFP-N2-GPC3 通过脂质体方法转染人肝癌细胞 SK-Hep-1。RT-PCR 检测 *GPC3*-SK-Hep-1 细胞中 *GPC3* mRNA 的表达; MTT 法检测 SK-Hep-1 细胞的增殖并计算黏附率; Transwell 小室实验检测 SK-Hep-1 肝癌细胞的迁移能力和侵袭能力。结果: pEGFP-N2-GPC3 成功转染 SK-Hep-1 细胞, 转染后 *GPC3*-Hep-1 细胞明显表达 *GPC3* mRNA。*GPC3* 转染能显著抑制肝癌细胞 SK-Hep-1 的增殖 ($P < 0.01$); *GPC3* 转染细胞的黏附能力较对照细胞显著下降 [10.21 ± 0.62] % vs [15.51 ± 0.95] %, $P < 0.01$]; *GPC3* 转染细胞的迁徙和侵袭能力较对照细胞明显增强 [131.7 ± 7.44] vs [69.6 ± 5.25], $P < 0.01$; [220 ± 12.8] vs [130 ± 8.2], $P < 0.01$]。结论: *GPC3* 基因显著抑制肝癌细胞的增殖和黏附能力, 但显著增强后者的迁移和侵袭能力。

[关键词] 磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3; SK-Hep-1 肝癌细胞; 侵袭; 黏附; 增殖

[中图分类号] R735.7; R730.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-385X(2008)05-0474-04

Influence of glypican-3 gene on proliferation, adhesion and invasion of hepatoma carcinoma cancer cell line SK-Hep-1

WANG Bing¹, LIN Shan², WANG Lie^{1*} (1. Research Institute of General Surgery, Fuzhou General Hospital, PLA Nanjing Military Area Command, Fuzhou 350025, China; 2. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Putian University, Putian 351100, Fujian, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of *GPC3* gene on the proliferation, adhesion and invasion of hepatoma cell line SK-Hep-1. **Methods:** SK-Hep-1 cells were transfected with pEGFP-N2-GPC3 using Lipofectamine2000. RT-PCR was used to examine the *GPC3* mRNA expression in *GPC3*-SK-Hep-1 cells. MTT assay was used to examine the proliferation and calculate the adhesion rate of SK-Hep-1 cells. Transwell system was used to assess the migration and invasion of the cells. **Results:** SK-Hep-1 cells were successfully transfected with pEGFP-N2-GPC3 plasmid. *GPC3* mRNA was detected in SK-Hep-1 cells. Transfection with *GPC3* significantly suppressed the growth of SK-Hep-1 cells ($P < 0.01$). The adhesion ability of *GPC3*-transfected cells was significantly decreased compared with control group [10.21 ± 0.62] % vs [15.51 ± 0.95] %, $P < 0.01$]. Transfection with *GPC3* significantly enhanced migration and invasion capacity [131.7 ± 7.44] vs [69.6 ± 5.25], $P < 0.01$; [220 ± 12.8] vs [130 ± 8.2], $P < 0.01$]. **Conclusion:** Transfection with *GPC3* gene can greatly inhibit the proliferation and adhesion of hepatoma SK-Hep-1 cells, but can enhance their migration and invasiveness. The present study provides an experimental basis for studying the invasion mechanism of liver cancer.

[Key words] glypican-3(*GPC3*); SK-Hep-1 hepatoma carcinoma cell; Invasion; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(5): 474-478]

磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3(glypican-3, *GPC3*) 是一种膜性硫酸乙酰肝素糖蛋白(heparansulfate proteoglycan, HSPG), 通过磷脂酰肌醇锚定在细胞膜上。*GPC3* 在细胞的生长发育中起着重要的调控作用, 与各种肿瘤关系密切, 包括肝癌、恶性黑色素瘤、卵巢癌、乳腺癌等; *GPC3* 不同的恶性肿瘤中表达差异很

[基金项目] 福建省青年科技人才创新项目(No. 2005J074)。Supported by the Young Technological Talents Innovative Projects of Fujian Province (No. 2005J074)

[作者简介] 王冰(1971-), 男, 黑龙江省哈尔滨市人, 博士, 主要从事腹部肿瘤的基础和临床研究, E-mail: wangbing213@263.net

* Corresponding author. E-mail: fzpkwk@21cn.com

大,在不同的肿瘤中发挥不同的作用,甚至可能起完全相反的作用^[1-5]。特别是在肝癌中,GPC3 在可能发挥很重要的生物学功能^[6]。本研究利用构建好的增强型绿色荧光蛋白标记的 GPC3 真核表达载体,采用基因转染技术和体外肿瘤侵袭迁移实验,从蛋白和基因水平探讨 GPC3 对肝癌细胞增殖、黏附及侵袭能力的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和材料

人肝癌细胞株 SK-Hep-1 购自中国科学院上海细胞所;LipofectamineTM 2000 购自 Invitrogen 公司;G418、MTT 购自 Sigma 公司;Transwell 小室购于美国 Corning Costar 公司;Matrigel 胶购于 BD Biosciences 公司;携 GPC3 真核表达载体 pEGFP-N2-GPC3 由本作者自行构建。

1.2 GPC3 稳定转染的 SK-Hep-1 肝癌细胞

将处于对数生长期的 SK-Hep-1 细胞胰酶消化收集,以 4×10^5 /孔接种于 6 孔培养板,每孔加完全培养基 10% FBS-MEM 3 ml,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养至细胞达 80% 铺满。用 LipofectamineTM 2000 将 pEGFP-N2-GPC3 转入 SK-Hep-1 细胞,并设 pEGFP-N2 空质粒对照;48 h 后转染细胞按 1:8 传代,并更换含 G418(终质量浓度 500 μg/ml)的 MEM 培养液进行筛选,4 周后挑取克隆到 24 孔板扩增,获得稳定转染 GPC3 的细胞系 GPC3-SK-Hep-1。

1.3 RT-PCR 检测 GPC3-SK-Hep-1 细胞中 GPC3 mRNA 的表达

根据 GenBank 中查找的 GPC3 开放读码框(1 740 bp),自行设计 GPC3 引物,上游:5'-GAACTCGAGAGCAGGATGCCGGGACCGTGCGCA-3';下游:5'-GCGGAATTCGTGCACCAGGAAGAA GAAGCACACCAC-3';扩增片段大小为 1 746 bp。Trizol 法提取细胞总 RNA,总 RNA 经逆转录再行 PCR 扩增,PCR 反应条件:94 °C 5 min,94 °C 30 s,65 °C 30 s,72 °C 2 min,72 °C 10 min。获得的 PCR 扩增产物行 1.5% 琼脂糖凝胶电泳,分析电泳条带,确定目的片段 mRNA 水平的表达。

1.4 MTT 比色法检测 GPC3 对 SK-Hep-1 细胞增殖的影响

细胞分 3 组:实验组 GPC3-SK-Hep-1、空质粒对照组 pEGFP-SK-Hep-1、空白对照组 SK-Hep-1 细胞。取生长良好的细胞,制成 1×10^5 个/ml 的细胞悬液;96 孔细胞培养板中每孔加入 5 000 个细胞,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养,每组设置 3 复孔,每孔细

胞总数要求一致,加入培养液的量也要一致;每天用 MTT 比色法对细胞进行计数,连续观察 4 d。MTT 比色法步骤:到时间点后加入 MTT 溶液(5 mg/ml),终质量浓度为 1 μg/ml,作用 4 h 后 $1 000 \times g$ 离心 10 min,弃去 MTT,加入 DMSO 150 μl/孔,振荡 15 min,570 nm 处,测定 D 值。绘制细胞的生长曲线。

1.5 GPC3 稳定转染的 SK-Hep-1 肝癌细胞系黏附能力的检测

分组情况与 1.4 相同,在 96 孔板中加入 1 μl Matrigel(1 mg/ml),置 37 °C、5% CO₂ 孵育 1h,PBS 液冲洗 2 次,加入 3% BSA 200 μl,37 °C 孵育 2 h 以封闭非特异性位点,PBS 液冲洗 2 次,各组细胞分别用无血清 MEM 培养液制成细胞悬液,调整浓度为 5×10^5 /ml,将上述细胞 50 000/孔分别接种于已包被 Matrigel 的 96 孔板中,37 °C、5% CO₂ 培养 2 h,取出 96 孔板用 PBS 液清洗未黏附细胞 2 次,每孔加入 100 μl 0.4 g/L 的 MTT,于细胞培养箱中继续培养 4 h,弃去上清,加入 200 μl 的二甲基亚砷,于酶标仪上测定 D_{490} 值。用黏附细胞 D_{490} 值/总细胞 D_{490} 值的比值计算黏附率。

1.6 Transwell 小室检测 GPC3 对 SK-Hep-1 肝癌细胞迁移能力的影响^[7]

分组情况与 1.4 相同。取生长良好的各组细胞,配制成 1×10^5 个/ml 的细胞悬液,在 Transwell 小室上室内分别加入 300 μg 重悬于无血清 MEM 培养液的上述 3 组细胞,下室加 600 μl 含 10% FBS 的 MEM 培养液,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养 18 h。取出小室弃除上室液体,用棉签擦尽上室未穿膜的细胞,室温下 4% 的多聚甲醛固定 5 min,常规苏木精染色,200 倍光镜下计数 5 个视野的迁移细胞数,取其平均值,以迁移细胞数目表示肿瘤细胞的迁移能力。每组重复 3 次。

1.7 Transwell 小室检测 GPC3 对 SK-Hep-1 肝癌细胞侵袭能力的影响^[8]

分组情况与 1.4 相同。在 Transwell 侵袭小室膜内侧加入 100 μl Matrigel(50 μg/孔),风干。取生长良好的各组细胞,配制成 2×10^5 个/ml 的细胞悬液,小室上室内分别加入 400 μl 重悬于无血清 MEM 培养液的上述 3 组细胞,下室加 600 μl 含 10% FBS 的 MEM 培养液,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养 48 h。取出小室弃除上室液体,用棉签擦尽上室膜面未穿膜的细胞,室温下 4% 的多聚甲醛固定 5 min,常规苏木精染色,200 倍光镜下计数 5 个视野的迁移细胞数,取其平均值,以迁移细胞数目表示肿瘤细胞的侵袭能力。每组重复 3 次。

1.8 统计学处理

应用 SPSS13.0 软件,采用方差分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 GPC3 稳定转染 SK-Hep-1 细胞的鉴定

pEGFP-N2-GPC3 转染肝癌细胞 48 h 后,在荧光显微镜下观察,实验组细胞与空质粒组细胞相比,实验组的绿色荧光蛋白主要表达于细胞膜上,空质粒组荧光均匀分布于整个细胞(图 1),结果说明 GPC3 在 SK-Hep-1 肝癌细胞成功地稳定转染。

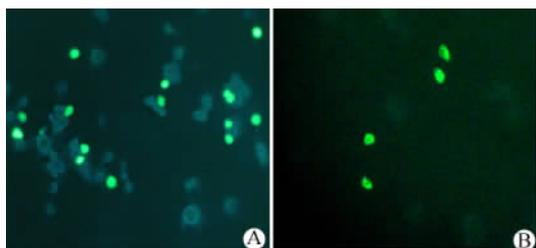


图 1 重组质粒转染 48 h 后肝癌细胞的荧光情况(×200)

Fig. 1 Fluorescence result of hepatoma carcinoma cells after recombinant plasmid transfection for 48 hours

A. pEGFP-SK-Hep-1 cells; B. GPC3-SK-Hep-1 cells

2.2 转染后 GPC3-SK-Hep-1 细胞中 GPC3 mRNA 的表达

收集转染的细胞约 5×10^6 个,提取总 RNA 进行逆转录 PCR,实验组可扩增出长度为 1 746 bp 大小的特异性条带即 GPC3 cDNA,而空质粒对照组没有出现特异性条带(图 2)。

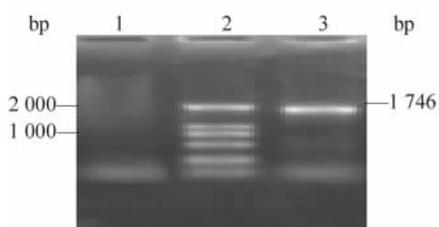


图 2 GPC3- SK-Hep-1 细胞中的 GPC3 mRNA 的表达

Fig. 2 Expression of GPC3 mRNA in GPC3- SK-Hep-1 cells

1: pEGFP-SK-Hep-1 cells RT-PCR product; 2: DNA marker; 3: GPC3- SK-Hep-1 cells RT-PCR product

2.3 GPC3 转染对 SK-Hep-1 细胞增殖的抑制

96 孔细胞培养板中每孔加入 5 000 个细胞,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养,每组设 3 复孔;每天固定时间点 MTT 比色法计数,连续观察 4 d,在 570 nm

处测定 D 值。转染实验组第 3、4 天的细胞与空白对照组及空质粒对照组相比增殖明显减慢($P < 0.01$,图 3)。

2.4 GPC3 稳定转染对 SK-Hep-1 肝癌细胞系黏附能力的抑制作用

检测结果显示,空白对照组、空质粒对照组、实验组细胞与 Matrigel 胶的黏附率分别为(15.51 ± 0.95)%、(15.13 ± 0.83)%、(10.21 ± 0.62)% ,转染实验组的细胞黏附率明显下降,抑制率为 34.17% ($P < 0.01$)。空白对照组、空质粒对照组两组间差异没有统计学意义。

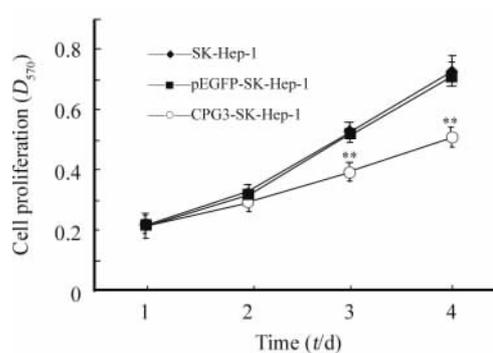


图 3 GPC3 转染对 SK-Hep-1 细胞增殖的抑制

Fig. 3 Transfection of GPC3 supresses growth of SK-Hep-1 cells

** $P < 0.01$ vs SK-Hep-1 cells or pEGFP-SK-Hep-1 cells

2.5 GPC3 对 SK-Hep-1 肝癌细胞迁移能力的促进

为探讨 GPC3 对 SK-Hep-1 肝癌细胞迁移能力的影响,取生长良好的各组细胞,小室上室内分别加入 30 000/孔上述 3 组细胞,下室加 600 μl 含 10% FBS 的 MEM 培养液,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养 18 h。实验结果(图 4)显示,在 200 倍显微镜下,未转染组 SK-Hep-1 细胞的穿膜细胞数为(69.6 ± 5.25),空质粒转染 pEGFP-SK-Hep-1 细胞的穿膜细胞数为(71.6 ± 4.76),实验组 GPC3-SK-Hep-1 细胞的穿膜细胞数为(131.7 ± 7.44)。实验组细胞的迁移能力显著强于未转染组与空质粒组($P < 0.01$),未转染组与空质粒组细胞迁移能力无差异。

2.6 GPC3 对 SK-Hep-1 肝癌细胞侵袭能力的增强

Matrigel 经重建后可在 Transwell 小室的聚碳酸酯膜表面形成类似体内天然基底膜的结构,肿瘤细胞侵袭穿越重建基底膜的细胞数反映了细胞的侵袭能力。小室上室内分别加入 80 000/孔上述 3 组细胞,下室加 600 μl 含 10% FBS 的 MEM 培养液,置 37 °C、5% CO₂ 孵箱培养 48 h。实验结果(图 5)显

示,在 200 倍显微镜下,未转染组 SK-Hep-1 细胞的穿膜细胞数为 130 ± 8.2 ,空质粒组 pEGFP-SK-Hep-1 细胞的穿膜细胞数为 138 ± 10.5 ,实验组 GPC3-SK-Hep-1 细胞的穿膜细胞数为 220 ± 12.8 。实验组细胞数明显多于其他两组 ($P < 0.01$),说明转染 GPC3 肝癌细胞的侵袭能力显著强于转染前细胞和转染空质粒细胞。

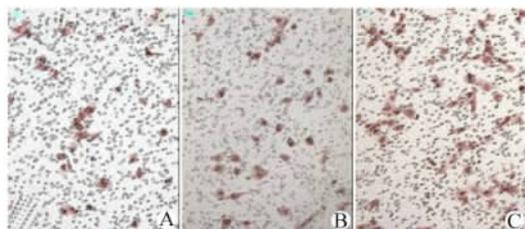


图 4 GPC3 对 SK-Hep-1 肝癌细胞迁移能力的促进作用(H-E, $\times 200$)

Fig. 4 GPC3 promoted migration of SK-Hep-1 hepatoma carcinoma cells(H-E, $\times 200$)

A. SK-Hep-1; B. pEGFP-SK-Hep-1; C. GPC3-SK-Hep-1

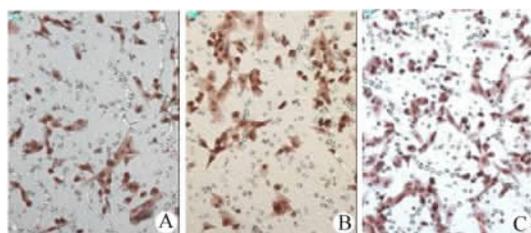


图 5 GPC3 对 SK-Hep-1 肝癌细胞侵袭能力的增强作用(H-E, $\times 200$)

Fig. 5 GPC3 enhanced invasion of SK-Hep-1 hepatoma carcinoma cells(H-E, $\times 200$)

A: SK-Hep-1; B: pEGFP-SK-Hep-1; C: GPC3-SK-Hep-1

3 讨论

肝细胞癌早期转移发生率高,大多数患者在确诊时已发生转移,这是肝癌患者术后高复发及预后差的主要原因。

GPC3 是一种膜性硫酸乙酰肝素糖蛋白。该基因表在正常组织表达极少,仅在成人的肺、肾脏、乳腺、卵巢和子宫中有低丰度的表达,在肝脏、心、脑等其他组织中均不表达。GPC3 在肝脏中可能发挥很重要的生物学功能,它在正常成人肝脏组织中不表达,但在肝癌中检测到它的表达^[1-5];在 DENA 诱导的大鼠肝癌模型中,随着肝癌结节的逐渐增大,GPC3 基因同源的 *oci-5* 基因的表达强度也逐渐上

升,这种表达强度明显高于肝脏局灶性结节增生和肝硬化等良性肝脏病变,说明 *oci-5* 基因同肝癌的演化关系密切^[8]。GPC3 在不同的恶性肿瘤中表达差异很大,在肺癌、卵巢癌、乳腺癌中发现了 GPC3 启动子的过甲基化,但未检测到 GPC3 的突变,是 GPC3 在这些肿瘤中起到抑癌基因样的作用。

Matrigel 胶是从组织提取的可溶性基底膜,含有绝大部分的细胞外基质成分,具有类似基底膜的功能。本研究在黏附实验中将 Matrigel 作为黏附底物,同时应用 Matrigel 胶重建基底膜系统研究肝癌细胞的侵袭和转移。本实验利用构建好的 GPC3 真核表达载体,采用脂质体转染技术介导重组 GPC3 基因在 SK-Hep-1 细胞中表达,并筛选稳定转染细胞,比较观察 3 组细胞 GPC3-SK-Hep-1、pEGFP-SK-Hep-1、SK-Hep-1 生物学性质。结果显示,GPC3 抑制 SK-Hep-1 的增殖,降低细胞对 Matrigel 胶的黏附能力,增加肝癌细胞的迁移及侵袭能力。Farooq^[9]和 Sung^[10]分别通过反义 RNA 下调 HepG2 和 Hep3B 肝癌细胞中 GPC3 的表达,结果促进了肝癌细胞的增殖, Kim^[11]、Murthy^[12]、Xiang^[13]、王莉^[14]等分别研究 GPC3 对卵巢癌、肺癌、间皮瘤、乳腺癌细胞增殖影响,结果显示 GPC3 的表达均抑制了这些细胞的增殖,与本实验结果一致。但 Capurro^[15]等研究 GPC3 对 PLC-PRF-5 和 HLF 肝癌细胞增殖的影响,发现 GPC3 促进肝癌细胞的增殖,推测是由于研究的肝癌细胞系不同所致。GPC3 降低 SK-Hep-1 对 Matrigel 胶的黏附能力,增加其迁移及侵袭能力。是由于 GPC3 促进了基质金属蛋白酶 2 的表达所致^[1]。与此相反的是 Peters^[16]等在乳腺癌模型中观察到 GPC3 抑制乳腺癌的侵袭和转移,具体的机制有待进一步的研究来揭示。

本实验研究结果显示,GPC3 在肝癌的发生发展过程中扮演着多重角色,虽然 GPC3 抑制肝癌细胞的增殖,但是其通过抑制细胞与细胞外基质及细胞与细胞之间的黏附而增加细胞的侵袭能力,促进了肝癌的转移。肿瘤的发生、发展与宿主的微环境是密不可分的,与肿瘤细胞之间的相互作用也是相关联的;肝癌的侵袭、转移过程中,GPC3 基因的确切作用及其分子机制,尚待进一步研究来揭示。

[参 考 文 献]

- [1] Yamauchi N, Watanabe A, Hishinuma M, *et al.* The glypican 3 oncofetal protein is a promising diagnostic marker for hepatocellular carcinoma[J]. *Mod Pathol*, 2005, 18(12):1591-1598.
- [2] Hippo Y, Watanabe K, Watanabe A, *et al.* Identification of

(下转第 483 页)