

doi: 10.3872/j.issn.1007-385X.2013.05.010

· 基础研究 ·

## 中期因子诱导肝癌细胞 Hep3B 抵抗失巢凋亡

赵琳琳<sup>1,2</sup>, 翟蓓蓓<sup>2</sup>, 孙斌<sup>2</sup>, 陈磊<sup>2</sup>, 钱海华<sup>2</sup>, 施乐华<sup>3</sup>, 殷正丰<sup>1,2</sup> (1. 苏州大学 医学部 临床医学院 肿瘤学系, 江苏 苏州 215006; 2. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 分子肿瘤研究室, 上海 200438; 3. 第二军医大学 东方肝胆外科医院 肝外四科, 上海 200438)

**[摘要]** **目的:**探讨肝素结合分子中期因子(midkine, MK)对肝癌细胞 Hep3B 抵抗失巢凋亡的影响。**方法:**采用悬浮培养法建立人肝癌来源细胞系 Hep3B 失巢凋亡模型,以不同质量浓度(10、50、100 ng/ml)MK 或 PBS(对照组)处理失巢培养的肝癌细胞 Hep3B,采用流式细胞术检测 Hep3B 细胞的凋亡,采用 Western blotting 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2 和 caspase-3 的表达。**结果:**随着悬浮培养时间的延长,肝癌细胞 Hep3B 失巢凋亡率逐渐升高,培养 72 h 后悬浮培养的 Hep3B 细胞凋亡率显著高于贴壁培养的 Hep3B 细胞凋亡率[(38.76 ± 4.23)% vs (6.76 ± 1.43)%,  $P < 0.01$ ]。不同质量浓度 MK 处理 24 h 后,悬浮培养 Hep3B 细胞的凋亡率均明显低于对照组,且与 MK 的浓度呈负相关关系( $r = 0.951$ ,  $P = 0.049$ );同时, MK 处理后 Hep3B 细胞内抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显增加,而促凋亡蛋白 caspase-3 则明显下降。**结论:** MK 可能通过上调 Bcl-2 蛋白表达和下调 caspase-3 蛋白的表达来提高肝癌细胞 Hep3B 在失巢状态下抵抗凋亡的能力。

**[关键词]** 肝癌; Hep3B 细胞; 中期因子; 失巢凋亡; 凋亡; Bcl-2; caspase-3

**[中图分类号]** R735.7; R730.54

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-385X(2013)05-0565-04

## Midkine induces anoikis resistance in human hepatocellular carcinoma Hep3B cells

Zhao Linlin<sup>1,2</sup>, Di Beibei<sup>2</sup>, Sun Bin<sup>2</sup>, Chen Lei<sup>2</sup>, Qian Haihua<sup>2</sup>, Shi Lehua<sup>3</sup>, Yin Zhengfeng<sup>1,2</sup> (1. Department of Oncology, School of Clinical Medicine, Faculty of Medicine, Soochow University, Suzhou 215006, Jiangsu, China; 2. Molecular Oncology Laboratory, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China; 3. Fourth Department of Hepatology Surgery, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of midkine (MK), a heparin-binding cytokine, on the anoikis resistance in hepatocellular carcinoma Hep3B cells. **Methods:** Human hepatoma-derived cell line Hep3B was kept in suspension to induce an anoikis model and treated with different concentrations of MK (0, 10, 50 and 100 ng/ml) or PBS (control group). The apoptosis of Hep3B cells was detected by flow cytometry and the expressions of apoptosis-related proteins Bcl-2 and caspase-3 were determined by Western blotting. **Results:** As incubation time was prolonged, the apoptotic rate of hepatocellular carcinoma Hep3B cells cultured in suspension was gradually increased. After incubation for 72 h, the apoptotic rate of Hep3B cells cultured in suspension was significantly higher than that in the adherent-cultured cells ([38.76 ± 4.23]% vs [6.76 ± 1.43]%,  $P < 0.01$ ). After exposure of different concentrations of MK for 24 h, the apoptotic rate of the suspension-cultured Hep3B cells was significantly lower than that of the control group and negatively correlated with the concentration of MK ( $r = 0.951$ ,  $P = 0.049$ ). Simultaneously, the expression of intracellular anti-apoptotic protein Bcl-2 was significantly increased, whereas the expression of pro-apoptotic protein caspase-3 was significantly decreased. **Conclusion:** MK confers enhanced anoikis resistance in hepatocellular carcinoma Hep3B cells cultured in sus-

**[基金项目]** 国家自然科学基金资助项目(No. 81272669, No. 81272668); 国家传染病重大专项课题资助项目(No. 2012ZX10002012-10)。Project supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 81272669, No. 81272668), and the National Key Project for Infectious Disease (No. 2012ZX10002012-10)

**[作者简介]** 赵琳琳(1986-),女,山东省茌平县人,硕士生,主要从事肿瘤复发转移机制方面的研究。E-mail: zll416833321@163.com

**[通信作者]** 殷正丰(Yin Zhengfeng, corresponding author), E-mail: yinzfk@aliyun.com

pension, which may be associated with the up-regulation of Bcl-2 protein and down-regulation of caspase-3 protein.

[ **Key words** ] hepatocellular carcinoma; Hep3B cell; midkine ( MK ); anoikis; apoptosis; Bcl-2; caspase-3

[ Chin J Cancer Biother, 2013, 20(5): 565-568 ]

脱离原发灶进入血液循环的肿瘤细胞被称为循环肿瘤细胞( circulating tumor cell, CTC)<sup>[1]</sup>。一旦进入血液循环, CTC 即面临新的生存压力, 其中失巢凋亡是一道重要的抗肿瘤防线<sup>[2]</sup>。已知血液循环系统是肝细胞癌转移的一个主要途径<sup>[3,4]</sup>。然而, 迄今对于肝癌细胞抵抗失巢凋亡的机制知之甚少。中期因子( midkine, MK )是肝素或糖胺聚糖结合生长因子家族成员之一, 参与肿瘤发生、发展过程<sup>[5]</sup>。前期临床研究<sup>[6-7]</sup>结果显示, MK 在肝癌组织和血清中表达增高, 与肝癌侵袭和转移有关。鉴于 MK 具有抗凋亡作用<sup>[8,9]</sup>, 推测 MK 可能参与失巢凋亡机制, 介导肝癌 CTC 在血液循环中存活的调节, 故本研究进一步探讨 MK 对肝癌细胞 Hep3B 失巢状态下抵抗凋亡能力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与设备

重组人 MK 由本实验室制备<sup>[10]</sup>, DMEM 购自美国 Gibco 公司, 聚羟乙基异丁烯酸( poly2-hydroxyethylmethacrylate, ploy-HEMA )购自美国 Sigma 公司, Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒购自美国 R&D 公司, RIPA 裂解液购自上海博彩生物科技有限公司, 兔抗人 Bcl-2 和 caspase-3 单克隆抗体购自 Cell Signaling 公司, HRP 标记的羊抗兔 IgG 抗体购自武汉博士德公司。BD FACSAria™ 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

### 1.2 肝癌细胞 Hep3B 失巢模型的建立

肝癌细胞 Hep3B 贴壁培养于含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液中, 待细胞生长至对数期, 胰酶消化、传代。贴壁培养: 直接取对数期生长的细胞, 以  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板内培养。悬浮培养( 用于失巢模型的建立 ): 将 poly-HEMA 胶溶于无水乙醇中, 制备成 10 mg/ml 的工作液, 取 2 ml 铺于 6 孔板内, 室温干燥过夜, 紫外照射消毒, 使用前 PBS 清洗 3 次; 将细胞以  $5 \times 10^5$  个/孔接种于 6 孔板内, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱内培养。以不同质量浓度 MK( 10、50、100 ng/ml )处理悬浮培养的细胞设为实验组, PBS 处理设为对照组。

### 1.3 流式细胞术检测悬浮和贴壁培养 Hep3B 细胞的凋亡

悬浮培养的 Hep3B 细胞离心(  $600 \times g, 3 \text{ min}$  )收集, 贴壁细胞则以胰酶消化后收集。PBS 洗 2 次, 计数, 加入 200  $\mu\text{l}$  上样缓冲液和 10  $\mu\text{l}$  Annexin V 重悬, 混匀并避光 15 min, 再加入 5  $\mu\text{l}$  碘化丙啶, 流式细胞仪检测细胞的凋亡。

### 1.4 Western blotting 检测 Hep3B 细胞中凋亡相关蛋白的表达

分别收集各组 Hep3B 细胞, PBS 洗 2 次, 加入 RIPA 裂解液, 冰上裂解 30 min, 10% SDS-PAGE 分离样品, 转至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 分别加入 Bcl-2 和 caspase-3 抗体( 工作稀释比例均为 1:1 000 ), 4 °C 孵育过夜, HRP 标记的二抗室温孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次, ECL 曝光显影成像。以目的蛋白条带与 GAPDH 条带灰度值比值表示该蛋白的表达水平。

### 1.5 统计学处理

计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 SPSS13.0 统计软件, 组间比较采用单因素方差分析( One-way ANOVA ), 以  $P < 0.05$  或  $P < 0.01$  表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 成功构建肝癌细胞 Hep3B 失巢模型

悬浮培养 24 h 后光镜下( 图 1 )可见, 肝癌 Hep3B 细胞缩小、变圆, 并聚集成团。流式细胞术检测结果( 图 2 )显示, 体外培养 24、48、72 h 后, 悬浮细胞( 失巢模型组 )的凋亡率均高于贴壁培养组(  $P < 0.01$  ), 并且随着时间延长而逐渐升高。培养 72 h 后, 悬浮 Hep3B 细胞的凋亡率显著高于贴壁培养组[ (  $38.76 \pm 4.23$  )% vs (  $6.76 \pm 1.43$  )% ,  $P < 0.01$  ]。结果表明, 肝癌细胞 Hep3B 失巢模型构建成功。

### 2.2 MK 增强 Hep3B 肝癌细胞抵抗失巢凋亡

流式细胞术检测结果( 图 3 )显示, 不同质量浓度 MK( 10、50、100 ng/ml )处理悬浮培养的 Hep3B 细胞 24 h 后, 凋亡率明显低于对照组(  $P < 0.05$  ), 且凋亡率随着 MK 浓度递增而降低, 分别为 (  $19.38 \pm 2.07$  )%、(  $15.63 \pm 1.63$  )%、(  $11.53 \pm 2.11$  )% vs (  $24.31 \pm 2.49$  )% (  $r = 0.951, P = 0.049$  )。结果说明, MK 能诱导 Hep3B 细胞抵抗失巢凋亡。

### 2.3 MK 对失巢肝癌细胞 Hep3B 凋亡相关蛋白表

达的影响

Western blotting 检测结果(图4)显示,不同质量浓度 MK(10、50、100 ng/ml)处理悬浮培养的 Hep3B 细胞 24 h 后, Hep3B 细胞中抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达明显增加,而促凋亡蛋白 caspase-3 的表达则明显下降。结果提示, MK 可能通过上调 Bcl-2 蛋白的表达和下调 caspase-3 蛋白的表达介导肝癌 Hep3B 细胞抵抗失巢凋亡。

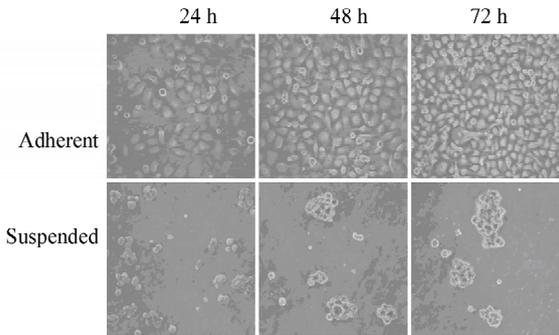


图1 光镜下贴壁或悬浮培养肝癌细胞 Hep3B 的形态(×100)

Fig. 1 Morphology of hepatocellular carcinoma Hep3B cells cultured in adhesion or suspension detected by optical microscope (×100)

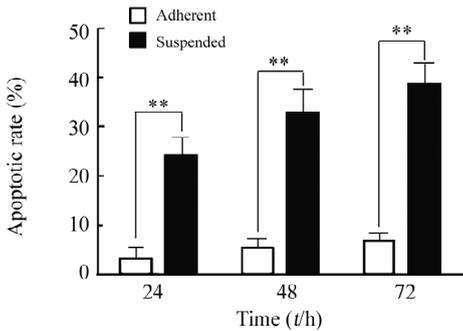


图2 流式细胞术检测贴壁或悬浮培养肝癌细胞 Hep3B 的凋亡

Fig. 2 Apoptosis of hepatocellular carcinoma Hep3B cells cultured in adhesion or suspension detected by flow cytometry

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs adherent cell

### 3 讨论

肝癌肝移植术后短期内就在移植肝上出现肝癌灶是 CTC 作为肝癌复发转移主要根源的一个显著例证<sup>[11-12]</sup>。研究肝癌 CTC 失巢凋亡抵抗的特性及其机制无疑具有很重要的临床意义。在正常组织中,细胞需要黏附于细胞外基质才能存活,失去黏附后便发生死亡即为失巢凋亡,这是一种特殊的凋亡

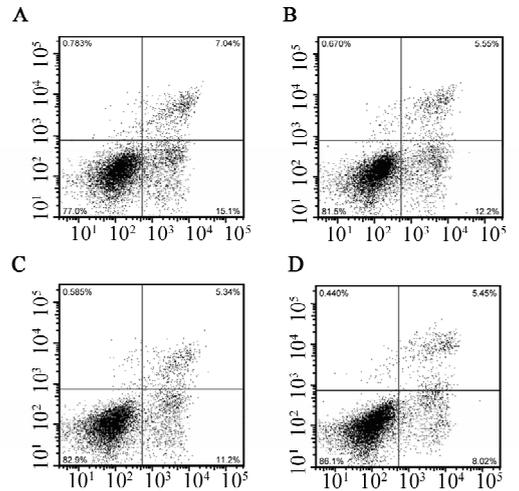


图3 流式细胞术检测不同质量浓度 MK 处理后悬浮培养肝癌细胞 Hep3B 的凋亡率

Fig. 3 Apoptotic rate of hepatocellular carcinoma Hep3B cells cultured in suspension after treatment with different mass concentrations of MK

A: MK 0 ng/ml; B: MK 10 ng/ml;

C: MK 50 ng/ml; D: MK 100 ng/ml

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{g/ml}$  MK group

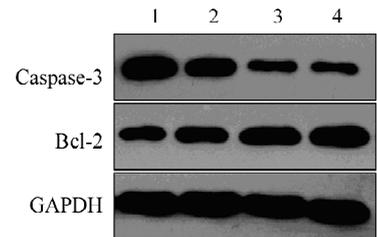


图4 Western blotting 检测不同质量浓度 MK 处理后悬浮培养肝癌细胞 Hep3B 中凋亡相关蛋白的表达

Fig. 4 Expression of apoptosis-related proteins in hepatocellular carcinoma Hep3B cells cultured in suspension after treatment with various mass concentrations of MK detected by Western blotting

1: MK 0 ng/ml; 2: MK 10 ng/ml;

3: MK 50 ng/ml; 4: MK 100 ng/ml

形式<sup>[13]</sup>。失巢凋亡在机体发育、组织平衡及肿瘤转移中起着重要作用<sup>[14]</sup>。然而,部分肿瘤细胞能够获得某种信号克服这种机制,在缺乏细胞外基质的不适当环境中存活,从而有利于其形成 CTC,并在血液循环中存活,进而到达远处靶器官形成转移灶。因此,获得失巢凋亡抵抗是形成 CTC 的关键步骤<sup>[1]</sup>。

然而,对于肝癌 CTC 形成和存活的调节过程目前尚不清楚。现有的研究<sup>[15]</sup>提示,肿瘤微环境衍生

细胞因子(如 TGF- $\beta$ )可能对 CTL 具有重要的调节作用。肝素结合生长因子家族成员 MK 也是肝癌微环境中的一个细胞因子,相对分子质量为 14 000。早期研究<sup>[16-17]</sup>表明, MK 在胚胎发育中期广泛表达在多种组织,对胎儿上皮和神经组织等发育具有重要的调节作用,出生后表达逐渐下降至局限化。进一步研究<sup>[18]</sup>表明, MK 在多种肿瘤中高表达,对于肿瘤细胞具有促有丝分裂和增殖、促血管生成、抗凋亡、耐药等作用。MK 干扰 RNA 或反义寡核苷酸能够抑制肝癌细胞在体外和体内生长<sup>[18-19]</sup>。因此, MK 是一种有潜力的肝癌治疗靶点。

本课题组研究<sup>[6-7]</sup>表明, MK 可促进肝癌细胞增殖、侵袭和迁移;肝癌组织高表达 MK,并且与肝癌肝内转移和 CTC 形成有关。随着研究的深入,本课题组推测, MK 可能通过诱导肝癌细胞失巢凋亡抵抗参与肝癌 CTC 形成以及在血液循环中存活的调节机制。为了验证这一推测,本研究在建立肝癌细胞失巢凋亡模型的基础上,用不同质量浓度的 MK 处理失巢的肝癌 Hep3B 细胞,发现 Hep3B 细胞凋亡率明显低于未处理组,且随着 MK 质量浓度递增而降低,表明 MK 能诱导肝癌细胞抵抗失巢凋亡。进一步采用 Western blotting 检测凋亡相关蛋白,发现肝癌细胞 Hep3B 失巢凋亡率在随着 MK 质量浓度递增而降低的同时,其抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达明显增加,而促凋亡蛋白 caspase-3 表达则明显下降。以上结果提示, MK 可能通过上调 Bcl-2 表达和下调 caspase-3 表达,介导肝癌细胞 Hep3B 抵抗失巢凋亡。迄今为止,尚未见有关 MK 调节肿瘤细胞(包括肝癌细胞)失巢凋亡的报道。而 MK 具有抵抗肝癌细胞失巢凋亡的作用意味着 MK 可能参与肝癌 CTC 在血液循环中生存的调节,与肝癌细胞通过血液途径形成复发和转移有关。因此,本研究再次提示了 MK 在肝癌发生、发展中的作用,以及 MK 可能具有作为肝癌治疗靶点的潜能。而 MK 调节肝癌细胞抵抗失巢凋亡的信号转导机制尚不清楚,需要进一步地研究。

## [ 参考文献 ]

- [ 1 ] Faltas B. Cornering metastases: Therapeutic targeting of circulating tumor cells and stem cells [ J ]. *Front Oncol*, 2012, 2( 1 ): 68.
- [ 2 ] Frisch SM, Schaller M, Cieply B. Mechanisms that link the oncogenic epithelial-mesenchymal transition to suppression of anoikis [ J ]. *J Cell Sci*, 2013, 126( Pt 1 ): 21-29.
- [ 3 ] Wu LJ, Pan YD, Pei XY, et al. Capturing circulating tumor cells of hepatocellular carcinoma [ J ]. *Cancer Lett*, 2012, 326( 1 ): 17-22.
- [ 4 ] Xu W, Cao L, Chen L, et al. Isolation of circulating tumor cells in patients with hepatocellular carcinoma using a novel cell separa-

- tion strategy [ J ]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17( 11 ): 3783-3793.
- [ 5 ] Sakamoto K, Kadomatsu K. Midkine in the pathology of cancer, neural disease, and inflammation [ J ]. *Pathol Int*, 2012, 62( 7 ): 445-455.
- [ 6 ] 罗祥基, 殷正丰, 康晓燕, 等. 中期因子转录物及其蛋白在肝细胞癌中的定位与表达研究 [ J ]. *中华普通外科杂志*, 2002, 17( 4 ): 220-222.
- [ 7 ] Yin ZF, Kang XY, Luo XL, et al. Correlation between midkine protein overexpression in hepatocellular carcinoma with the presence of tumor cells in the blood circulation [ J ]. *Chin J Clin Oncol*, 2004, 1( 2 ): 139-143.
- [ 8 ] Ohuchida T, Okamoto K, Akahane K, et al. Midkine protects hepatocellular carcinoma cells against TRAIL-mediated apoptosis through down-regulation of caspase-3 activity [ J ]. *Cancer*, 2004, 100( 11 ): 2430-2436.
- [ 9 ] Wang Q, Huang Y, Ni Y, et al. siRNA targeting midkine inhibits gastric cancer cells growth and induces apoptosis involved caspase-3, 8, 9 activation and mitochondrial depolarization [ J ]. *Biomed Sci*, 2007, 14( 6 ): 783-795.
- [ 10 ] 钱海华, 康晓燕, 殷正丰, 等. 重组人中期因子的原核表达、纯化及生物学活性鉴定 [ J ]. *第二军医大学学报*, 2004, 25( 4 ): 394-397.
- [ 11 ] Zhang Y, Li J, Cao L, et al. Circulating tumor cells in hepatocellular carcinoma: Detection techniques, clinical implications, and future perspectives [ J ]. *Semin Oncol*, 2012, 39( 4 ): 449-460.
- [ 12 ] Toso C, Mentha G, Majno P. Liver transplantation for hepatocellular carcinoma: Five steps to prevent recurrence [ J ]. *Am J Transplant*, 2011, 11( 10 ): 2031-2035.
- [ 13 ] Taddei ML, Giannoni E, Fiaschi T, et al. Anoikis: An emerging hallmark in health and diseases [ J ]. *J Pathol*, 2012, 226( 2 ): 380-393.
- [ 14 ] Liotta L, Kohn E. Anoikis: Cancer and the homeless cell [ J ]. *Nature*, 2004, 430( 7003 ): 973-974.
- [ 15 ] Guadamillas MC, Cerezo A, Del Pozo MA. Overcoming anoikis-pathways to anchorage-in dependent growth in cancer [ J ]. *J Cell Sci*, 2011, 124( 19 ): 3189-3197.
- [ 16 ] Muramatsu T. Midkine ( MK ): A retinoic acid-responsive, heparin-binding growth factor in relationship with differentiation, development, cancer and neural function [ J ]. *Seikagaku*, 1993, 65( 12 ): 1494-1504.
- [ 17 ] Sakamoto K, Kadomatsu K. Midkine in the pathology of cancer, neural disease, and inflammation [ J ]. *Pathol Int*, 2012, 62( 7 ): 445-455.
- [ 18 ] Sueyoshi T, Jono H, Shinriki S, et al. Therapeutic approaches targeting midkine suppress tumor growth and lung metastasis in osteosarcoma [ J ]. *Cancer Lett*, 2012, 316( 1 ): 23-30.
- [ 19 ] Dai LC, Yao X, Wang X, et al. *In vitro* and *in vivo* suppression of hepatocellular carcinoma growth by midkine-antisense oligonucleotide-loaded nanoparticles [ J ]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15( 16 ): 1966-1972.

[ 收稿日期 ] 2013 - 05 - 20

[ 修回日期 ] 2013 - 07 - 23

[ 本文编辑 ] 韩丹, 周玲琳