

TGF- β 1 对肝癌细胞系 Hep3B 中干性相关基因表达的影响

苏虹, 胡赅, 徐科, 何倩, 姚超, 钱程, 刘立

(浙江理工大学生命科学学院 新元医药研究所, 杭州 310018)

摘要: 有研究表明 TGF- β 1 可以诱导诸多上皮来源的癌细胞和正常细胞发生 EMT 并使其功能发生改变。实验就 TGF- β 1 对肝癌细胞系 Hep3B 的作用展开研究: 通过 CCK8 检测 TGF- β 1 对 Hep3B 细胞增殖的影响, RT-PCR 实验检测 TGF- β 1 处理后细胞中 EMT 及干性相关基因的表达变化。结果表明: TGF- β 1 对 Hep3B 细胞的增殖无抑制作用; TGF- β 1 处理 Hep3B 细胞 6d 后 EMT 相关基因的 mRNA 表达水平并无显著改变, 但 TGF- β 1 可上调 Hep3B 细胞干性基因 *Oct-4*, *Klf-4*, *Nanog*, *C-myc* 的表达, 并下调分化基因 *albumin* 的表达。结果提示 TGF- β 1 一定程度上影响肝癌细胞系的干性基因表达, 但并不一定是以发生 EMT 为前提的。

关键词: TGF- β 1; Hep3B; EMT; 干性基因

中图分类号: R73-362

文献标识码: A

0 引言

β -转化生长因子(transforming growth factor- β , TGF- β)是由分子量为 12.5 kD 的亚单位组成的双体结构^[1], 经酸、碱、原溶酶作用或移去潜伏分子的碳水化合物之后被激活成为有活性的 TGF- β 而发挥作用。TGF- β 在大多数哺乳动物中存在三种异构体, 即 TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3, 它们的生物学特性基本相同, 而且三者基因有 80% 的同源性。

近来陆续有研究显示 TGF- β 1 可以诱导多种上皮来源的细胞发生上皮间质转化(epithelial-mesenchymal transition, EMT)^[2], 并使其功能发生改变。Sendural 等^[3]的研究发现, 发生了 EMT 的细胞表现出一定的干性特征。Hiroaki 等^[4]就研究发现 TGF- β 1 通过靶基因 *sox-4* 来调节 *sox-2* 的表达, 从而维持胶质瘤干细胞的干性。还有一些研究指出 TGF- β 1 可直接影响细胞的干性基因的表达, 如 Hanning You 等^[5]的实验发现 TGF- β 1 可以上调肝癌细胞系 huh7 的干性基因 *CD133* 的表达, 并且可

以大大提高 *CD133* 阳性细胞的成瘤能力。

关于 TGF- β 1 在肝癌发生发展中所起的作用是怎样的, 以及这种作用是否与其发生 EMT 有关等问题还未见相关的研究报道, 因此本实验拟开展以 TGF- β 1 针对肝癌细胞系 Hep3B 的作用研究, 通过研究 TGF- β 1 诱导 Hep3B 是否可以发生 EMT; 是否影响 Hep3B 干性基因的表达等问题, 以期为研究 TGF- β 1 在肝癌的作用提供一些参考。

1 材料与方法

1.1 材料

TGF- β 1 购自 Peprotech 公司, 胎牛血清, 胰酶及相关培养试剂购自 Gibco 公司, 人肝癌细胞系 Hep3B, 购自上海生命科学院细胞生物研究所, Cell Counting Kit-8 购自碧云天公司, SYBR Green I 定量试剂盒购自 Takara 公司。

1.2 引物设计及合成

引物均有南京金斯特公司合成, 详见表 1。

表 1 qRT-PCR 所用到的引物

引物名称	引物序列
C-myc-5	CCGAGCCCCTGGTGCTCCAT
C-myc-3	CTTGAGGACCAGTGGGCTGTGAGG
Sox-2-5	CAGCCCATGCACCGCTACGACG
Sox-2-3	CACCGAACCCATGGAGCCAAGAGC
Oct4-5	CCAAACGACCATCTGCCGCT
Oct4-3	GGTTCCTCTCACTCGGTTCTC
Nanog-5	CTCTCCAACATCCTGAACCTC
Nanog-3	GGTTCCTCAGTCGGGTTTAC
Klf4-5	CCAGAGGAGCCCAAGCCAAAG
Klf4-3	CAGCCGTCCAGTCACAGT
Albumin-5	CACAAAGATGACAACCCAAACCTCC
Albumin-3	GGAGTTCCGGGGCATAAAAAGTAAG
GAPDH-5	ACCCAGAAGACTGTGGATGG
GAPDH-3	TCTAGACGGCAGGTCAGGTC
Foxc2-5	GCCTAAGGACCTGGTGAAGC
Foxc2-3	TTGACGAAGCACTCGTTGAG
E-cadherin-5	TGCCCAGAAAATGAAAAAGG
E-cadherin-3	GTGTATGTGGCAATGCGTTC
N-cadherin-5	ACAGTGGCCACCTACAAAGG
N-cadherin-3	CCGAGATGGGGTTGATAATG
Fibronectin -5	CAGTGGGAGACCTCGAGAAG
Fibronectin -3	TCCCTCGGAACATCAGAAAC
Vimentin-5	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC
Vimentin-3	GCTTCCTGTAGGTGGCAATC
Snail-5	CCTCCCTGTCAGATGAGGAC
Snail-3	CCAGGCTGAGGTATTCCTTG
Twist-5	GGAGTCCGCAGTCTTACGAG
Twist-3	TCTGGAGGACCTGGTAGAGG

1.3 方 法

1.3.1 细胞培养

Hep3B 的培养条件为 10% FBS 的 DMEM, 37℃, 5%CO₂ 恒温培养箱培养。10 cm 的培养皿, 添加 10%FBS 的 DMEM 6~8 mL, 六孔板每孔培液 2 mL, 96 孔板每孔 100 μL 培液, 细胞长至 80% 时传代。

1.3.2 TGF-β1 浓缩液的配置

取 TGF-β1 粉末 5 μg 用 50 μL 的 10 mmol 的

柠檬酸溶解至 0.1 μg/mL, 再用 0.1% 的 BSA 溶解至 5 μg/mL, 分装-20℃ 保存。用时将浓缩液加至培液即可。

1.3.3 CCK8 测 TGF-β1 对 Hep3B 细胞增殖的影响

取对数生长期的 Hep3B, PBS 洗 2 次, 用 0.25% 胰蛋白酶消化适当时间后, 再用含 10% FBS 的 DMEM 培养液将细胞浓度调整为 2×10⁴/mL 的细胞悬液。向 96 孔培养板中分别加入上述细胞悬液 100 μL, 即每孔 2 000 个细胞, 将培养板置于 5% CO₂、37℃ 孵箱中贴壁后取出, 分别加入含 5、10、15、20 ng/mL 的 TGF-β1 的培液。设 6 个复孔, 另设对照组(不加 TGF-β1), 对照组加入等体积 DMEM 培养液, 每隔 24 h 取出测定, 在培养结束前每孔加入 CCK-8 溶液 10 μL, 继续培养 2 h 后用酶联检测仪测定细胞增殖吸收值(波长为 450 nm), 绘制曲线。每组实验重复 3 次。

1.3.4 qRT-PCR 检测 TGF-β1 对 Hep3B 基因表达的影响

将状态良好的 Hep3B 细胞接种于六孔板, 每孔接种密度为 1×10⁵ 个细胞。其中一孔正常培养添加 2 mL 10% FBS 的 DMEM 培液, 另一孔添加 2 mL 含 10 ng/mL 的 TGF-β1 的 10% FBS 的 DMEM 培液, 每日换新鲜的培养液, 2~3 d 后传代。待 6d 后 Trizol 法提取总 RNA, 反转录后进行 Real-Time PCR, 检测处理前后 EMT 相关基因及干性基因的表达情况变化。所用引物见表 1。

2 结果与分析

2.1 TGF-β1 对 Hep3B 形态的影响

在倒置显微镜下观察 TGF-β1 处理 Hep3B 细胞 6d 的时间里形态无明显变化。结果见图 1。

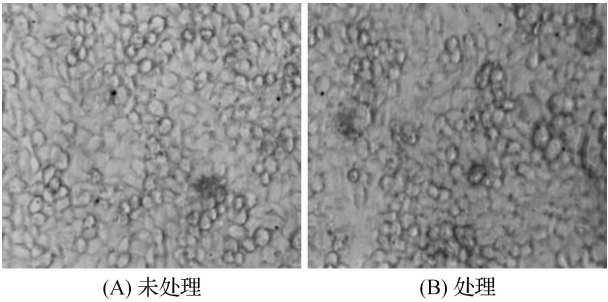


图 1 TGF-β1 处理对 Hep3B 形态的影响

2.2 TGF-β1 对 Hep3B 细胞增殖的影响

分别用 5、10、15、20 ng/mL 的 TGF-β1 处理 Hep3B 细胞, 同时以不加 TGF-β1 的培液培养 Hep3B 细胞作为对照(NC), 通过 CCK8 计数, 结果

显示 5、10、15、20ng/mL 的 TGF-β1 处理 Hep3B 细胞,细胞的数目与对照相比并无明显的差别,即 TGF-β1 并不影响 Hep3B 细胞的增殖,见图 2。

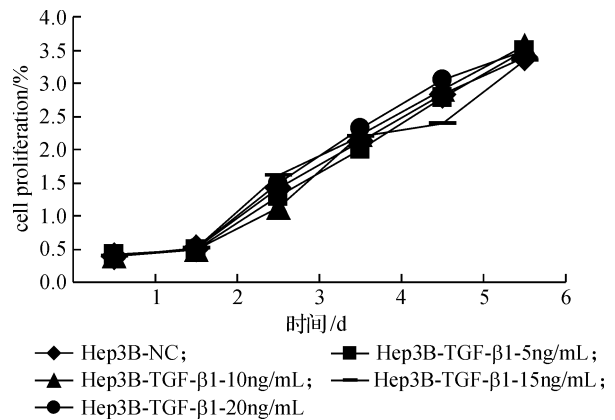


图 2 CCK8 检测不同浓度的 TGF-β1 对 Hep3B 细胞增殖的影响

2.3 qRT-PCR 检测 TGF-β1 对 Hep3B 基因表达的影响

2.3.1 qRT-PCR 检测 TGF-β1 对 Hep3B 发生 EMT 后相关基因表达的影响

用 10 ng/mL 的 TGF-β1 处理 Hep3B 细胞 6 d 后检测 EMT 相关基因的表达,以正常培养的 Hep3B 细胞为对照,以 GAPDH 的表达为内参。结果显示,TGF-β1 处理后的细胞上皮细胞标志物 *E-cadherin* 的表达无变化,间质细胞相关基因 *N-cadherin*, *fibronectin*(FN-1), *vimentin*, *foxc-2* 表达略有上升但不明显, *snail*, *twist*, *slug* 则表达下降。这些基因表达情况说明 TGF-β1 并不能有效诱导 Hep3B 发生 EMT,见图 3。

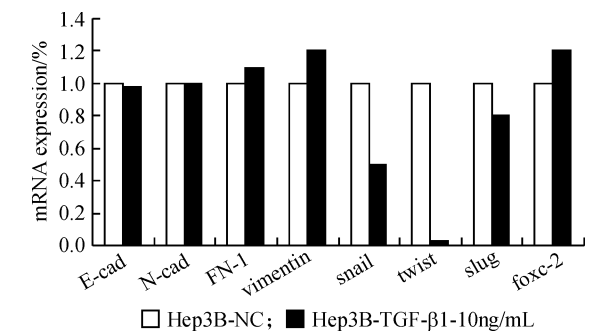


图 3 RT-PCR 检测 TGF-β1 对 Hep3B 的 EMT 相关基因表达的影响

2.3.2 qRT-PCR 检测 TGF-β1 对 Hep3B 干性相关基因表达的影响

10 ng/mL 的 TGF-β1 处理 Hep3B 细胞 6 d 后检测干性相关基因的表达,以正常培养的 Hep3B 细胞为对照,以 GAPDH 的表达为内参基因。结果显

示,TGF-β1 处理后的细胞干性基因 *Oct-4*, *Klf-4*, *Nanog* 的表达均有明显提高, *C-myc* 的表达略有提高,分化基因 *ALB*(*albumin*)表达大幅下调。说明 TGF-β1 在一定程度上可以影响 Hep3B 细胞干性基因的表达,见图 4。

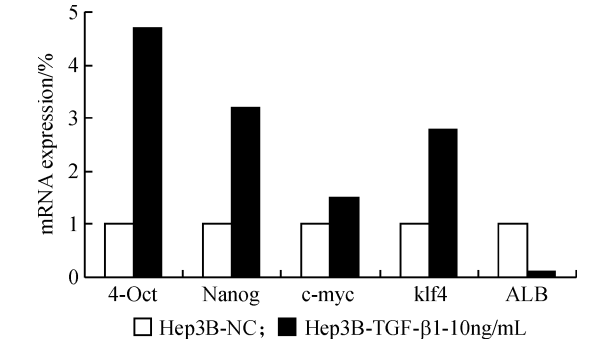


图 4 RT-PCR 检测 TGF-β1 对 Hep3B 的干性相关基因表达的影响

3 讨论

上皮细胞间质转化 (epithelial-mesenchymal transition, EMT) 是多细胞生物胚胎发生过程中的基础过程,也存在于多种慢性疾病(如肾纤维化)的发病以及肿瘤的进展过程中。EMT 以上皮细胞极性的丧失及其间质特性的获得为主要特征,细胞间正常的粘附作用可以维持组织细胞正常形态和功能,而当其异常时常常导致细胞间的堆积、去分化,进而发生侵袭和转移,从而形成恶性肿瘤。

EMT 与肿瘤细胞的原位侵袭和远处转移有着密切的关系^[6],已有大量临床证据表明^[7],在多数肿瘤的原位就已有 EMT 的发生。而对乳腺癌和结肠癌的研究表明^[8-9],癌细胞发生 EMT 后外形改变及粘附性下降或消失,这些变化在肿瘤的原位侵袭和远处转移以及新的转移灶的形成过程中发挥了很大的作用。

目前,研究 EMT 在肿瘤发生及其演进中的作用,已成为肿瘤研究中的热点。

本实验就 TGF-β1 对肝癌细胞系 Hep3B 的作用展开研究,结果显示 Hep3B 在经 TGF-β1 处理后形态无明显改变,与此同时,还检测了 EMT 的相关的几个基因,结果也显示无太大的改变。说明 TGF-β1 并不能有效诱导 Hep3B 发生 EMT。笔者还发现 TGF-β1 可上调 Hep3B 干性基因 *Oct-4*, *Klf-4*, *Nanog*, *C-myc* 的表达,可大幅下调分化基因 *ALB*(*albumin*)的表达,这些提示 TGF-β1 一定程度上影响肝癌细胞系的干性,但并不一定是以发生

EMT 为前提的。

在目前的研究中 EMT 的研究热点为 EMT 与肿瘤干细胞之间的关系,揭示两者之间的关系对研究肝癌的起源有很大的意义。

在对肝癌细胞系的研究中,TGF-β1 可以诱导 huh7 细胞产生 EMT,也可以影响其干性基因的表达,结合本实验说明 TGF-β1 在细胞中的作用是复杂的,后续研究将对其影响机制展开。

参考文献:

[1] Roberts A B, Wakefield L M. The two faces of transforming growth factor-β in carcinogenesis[J]. PNAS, 2003, 100(6): 8621-8631.

[2] Gotzmann J. Hepatocytes convert to a fibroblastoid phenotype through the cooperation of TGF-β1 and Ha-Ras steps towards invasiveness[J]. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 2004, 566(1): 9-20.

[3] Sendural A, Guo Wenjun. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells [J]. Cell, 2008, 133(5): 704-715.

[4] Hiroaki, Ikushima, Tomoki Todo, et al. Autocrine TGF-β signaling maintains tumorigenicity of glioma-Initiating cells through sry-related HMG-Box factors[J]. Cell Stem Cell, 2009, 5(7): 504-514.

[5] You Hanning, Ding Wei, Bart R C. Epigenetic regulation of cancer stem cell marker CD133 by transforming growth factor-β[J]. Hepatology, 2010, 49(5): 1635-1645.

[6] Thiery, Paul Jean. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression[J]. Curr Opin Cell Biol, 2003, 15(6): 740-746.

[7] Wu X Z, Chen D. Origin of hepatocellular carcinoma: role of stem cells[J]. Gastroenterol Hepatol, 2006, 21(7): 1093-1098.

[8] Li C, Heidt D G, Dalerba P, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells[J]. Cancer Res, 2007, 67(3): 1030-1037.

[9] Bolos V, Peinado H. The transcription factor slug represses E-cadherin expression and induces epithelial to mesenchymal transitions: a comparison with Snail and E47 repressors[J]. Cell Sci, 2003, 34(7): 499-511.

The Effect of TGF-β1 on Gene Expression Related to Stemness on Liver Cell Line Hep3B

SU Hong, HU Ben, XU Ke, HE Qian, YAO Chao, QIAN Chen, LIU Li
(Xin Yuan institute of Medicine and Biotechnology, School of Life Sciences,
Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China)

Abstract: Studies have shown that TGF-β1 can induce the source of many cancer cells and normal epithelial cells place EMT, and its function changes. This study is TGF-β1 on the role of hepatocellular carcinoma cell line Hep3B. The authors detect the TGF-β' influence on Hep3B cell proliferation by CCK8, as Hep3B with TGF-β1 treatment for six days, and detect the gene experssion profilie that related to EMT and stemness by qRT-PCR. The results show that: TGF-β1 has no inhibitory effect on the proliferation of Hep3B cells; Hep3B cells experience TGF-β1 treat after having no significant change in their EMT gene experssion, but TGF-β1 up-regulates Hep3B cells stem-related gene expression, and down their differentiation genes expression. This suggests that TGF-β1 to a certain extent affects the liver stem cell line gene expression, but not necessarily the prerequisite for EMT to occur.

Key words: TGF-beta1; Hep3B; EMT; stem cell gene

(责任编辑: 许惠儿)