

肝细胞核因子 4 α 抑制大鼠肝癌细胞增殖、侵袭能力和新生血管生成相关基因表达

张 勇, 吴 宁, 马 永, 汪海天, 李周晓, 卞建民*

(南京医科大学附属南京医院普外科, 江苏 南京 210006)

[摘要] 目的: 研究肝细胞核因子 4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4 α) 在体内、体外实验中与大鼠肝癌新生血管生成相关基因表达之间的相互关系。方法: 将过表达 HNF4 α 腺病毒转染 CBRH-7919 细胞, 采用 CCK-8 法检测细胞增殖效应, Transwell 法检测细胞侵袭能力, RT-PCR 和 Western blot 检测血管生成素 2(angiotensin-2, Ang-2)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF) 的表达情况。体内试验建立肝大部切除模型(70%), 分别在残肝上注入 CBRH-7919 细胞(空白组)或转染空载体腺病毒 CBRH-7919 细胞(阴性对照组)或转染过表达 HNF4 α 腺病毒的 CBRH-7919 细胞(实验组)。4 周后处死大鼠, 通过免疫组化来观察肝标本 Ang-2、VEGF 的表达情况。结果: 转染过表达 HNF4 α 腺病毒的 CBRH-7919 细胞增殖能力和侵袭能力较空白、阴性对照组均明显抑制($P < 0.05$); 实验组 Ang-2、VEGF 在基因、蛋白水平表达较空白、阴性对照组均明显抑制($P < 0.05$)。体内实验大鼠肝脏组织免疫组织化学切片显示实验组 Ang-2、VEGF 蛋白表达水平较空白、阴性对照组均明显抑制($P < 0.05$)。结论: HNF4 α 可以抑制大鼠肝癌 7919 的增殖、侵袭能力, 并且抑制肝癌新生血管生成相关基因 Ang-2、VEGF 的表达。

[关键词] 肝细胞核因子 4 α ; 肝癌; 大鼠肝癌 7919; 增殖能力; 侵袭能力; 血管再生

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)04-430-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160410

Hepatocyte nuclear factor 4 α inhibits the proliferation, invasiveness and expression of new angiogenesis related genes in rat hepatocellular carcinoma cells

Zhang Yong, Wu Ning, Ma Yong, Wang Haitian, Li Zouxiao, Bian Jianmin*

(Department of General Surgery, Nanjing Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210006, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of hepatocyte nuclear factor 4 α (HNF4 α) on the angiogenesis related genes of CBRH-7919 *in vitro* and *in vivo*. **Methods:** CBRH-7919 cells were transfected with HNF4 α adenovirus vector. CBRH-7919 cell proliferation was detected by cell counting kit-8 (CCK8) assay and the migration and invasion were assessed by Transwell assays. The expressions of Angiotensin-2 (Ang-2) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were detected by RT-PCR and Western blotting assay. *In vivo*, CBRH-7919 cells, CBRH-7919-Null-Vector cells and CBRH-7919-HNF4 α cells were respectively injected into the rest of the liver after establishment of subtotal hepatectomy model(70%). Four weeks later, the expressions of Ang-2 and VEGF in the liver tissues were detected by immunohistochemical assay. **Results:** *In vitro* study indicated that after transfected with adenovirus vector LV-HNF4 α , the proliferation of CBRH-7919 was significantly inhibited($P < 0.05$) and the invasiveness was also significantly inhibited($P < 0.05$) compared with the control group, respectively. The result of RT-PCR suggested that the expressions of Ang-2 and VEGF were inhibited after transfected with adenovirus vector. *In vivo* study showed similar finding that the expressions of Ang-2 and VEGF were inhibited after transfected with adenovirus vector ($P < 0.05$). **Conclusion:** HNF4 α can significantly inhibit proliferation and metastasis capability of CBRH-7919, as well as inhibits the expression of Ang-2 and VEGF in CBRH-7919.

[Key words] hepatocyte nuclear factor 4 α ; hepatocellular carcinoma; rat hepatocellular carcinoma cell line 7919; proliferation; invasiveness; angiogenesis

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(04):430-434]

[基金项目] 南京市医学科技发展项目(201308014)

*通信作者(Corresponding author), E-mail: jianminbian@163.com

肝细胞癌 (hepatic cellular carcinoma, HCC) 是我国最常见的恶性肿瘤之一,其病情进展快、疗效差,5年平均生存率只有7%左右^[1]。近年对肝细胞核因子4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α , HNF4 α) 在HCC发生、转移方面的研究为开辟新的HCC治疗策略提供了科学依据。HNF4 α 表达缺陷与HCC发生、发展、转移复发关系的研究正逐渐增多^[2]。但是肿瘤生长、转移的另一个必要条件是肿瘤的新生血管机制,这一机制在HCC的复发转移中更为突出^[3]。与HCC有关的血管生成因子主要有血管内皮生长因子(VEGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素(IL-6)、E-钙黏蛋白、基质金属蛋白酶(MMPs)、血管生成素(Ang-1/Ang-2)等,其中VEGF和Ang-1/Ang-2在HCC转移复发中的作用尤为突出^[4-6]。现有研究显示HNF4 α 表达下调与肝癌细胞的去分化和成癌关联,HNF4 α 表达下调对肝癌新生血管生成相关基因表达的影响如何目前尚不清楚。本研究旨在通过体内外实验的方法,研究HNF4 α 与肝癌新生血管生成相关基因表达之间相互关系,以期对肝癌的靶向治疗提供靶向载体。

1 材料和方法

1.1 材料

大鼠肝癌7919细胞(CBRH-7919)由中国药科大学细胞中心提供;改良型RPMI1640培养基、PBS(Hyclone公司,美国),胎牛血清(Gibco公司,美国),血管内皮生长因子抗体、血管紧张素II抗体、GAPDH抗体(Abcam公司,美国);Matrigel胶(BD公司,美国),CCK-8试剂盒(同仁公司,日本),Transwell板(Corning公司,美国),TRIzol(Invitrogen,美国),逆转录试剂盒、SYBR试剂盒(TaKaRa公司,日本);300g雄性SD大鼠(扬州大学动物中心);倒置显微镜(尼康公司,日本),蛋白提取试剂盒(南京凯基公司)。

1.2 方法

1.2.1 构建大鼠HNF4 α 腺病毒载体

设计HNF4 α 全长引物,上游5'-GAGGATCCC CGGGTACCGTCCGCCACCATGCGACTCTCCAAAA-CCCTC-3',下游5'-TCCTTGTAAGTCCATACCGATAA-CTTCCTGCTTGGTGATG-3'。提取大鼠原代肝细胞总RNA进行RT-PCR,反应条件为94 $^{\circ}$ C预变性2min;94 $^{\circ}$ C解链30s,55 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸1min,循环33次;72 $^{\circ}$ C总延伸10min,4 $^{\circ}$ C终止反应。扩增产

物在琼脂糖凝胶上电泳,采用琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收并纯化目的基因片段。将纯化的目的基因片段交由上海吉凯生物公司测序验证并构建腺病毒载体(GV314)。所构建载体包括含HNF4 α 过表达载体,以及不含HNF4 α 的对照载体,上述腺病毒均自带绿色荧光蛋白基因。

1.2.2 过表达HNF4 α 的CBRH-7919细胞的构建与鉴定

将培养皿中CBRH-7919细胞用0.25%胰酶消化计数后,将 1×10^5 个细胞种于6孔板中。加入适量含10% FBS的RPMI1640培养基,5% CO₂,37 $^{\circ}$ C培养箱中培养,待细胞融合60%~70%,将待处理细胞培养基吸去,第1组为空白对照组,加入2mL含10% FBS的RPMI1640培养基;第2组为阴性对照组,将 1×10^8 TU腺病毒空载体(MOI=50)加于2mL含5mg/L聚凝胺的感染增强液中,混匀用于培养细胞;第3组为实验组,将 1×10^8 TU过表达HNF4 α 腺病毒(MOI=50)加于2mL含5mg/L聚凝胺的感染增强液中,混匀用于培养细胞。放入培养箱中培养2h后,吸去培养液,3组加2mL含10% FBS的RPMI1640培养基,放入培养箱中继续培养72h,收集细胞,提取各组细胞RNA进行RT-PCR,PCR反应条件为:95 $^{\circ}$ C预变性5min,95 $^{\circ}$ C变性1min,60 $^{\circ}$ C退火1min,72 $^{\circ}$ C延伸1min,30个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10min,4 $^{\circ}$ C终止反应。测定HNF4 α 在各组的表达情况。

1.2.3 CCK-8增殖实验

消化离心转染后72h的3组CBRH-7919细胞,RPMI1640完全培养基重悬计数使其密度为 1×10^5 个/mL,100 μ L接种于96孔板中,5% CO₂,37 $^{\circ}$ C培养箱中培养24h。每孔加入10 μ L CCK-8溶液。培养箱中继续培养2h后用450nm波长酶标仪检测吸光度值。

1.2.4 Transwell细胞侵袭实验

用50mg/mL Matrigel胶1:8稀释液包被Transwell小室底部膜的上室面,放入培养箱中静置2h。细胞饥饿12h后消化离心,将3组 5×10^4 个细胞接种于不含血清的RPMI1640培养基(200 μ L)的上室。下室中加入含15% FBS RPMI1640培养基500 μ L,于5% CO₂,37 $^{\circ}$ C培养箱中培养24h。取出Transwell小室,弃掉小孔中培养液,用无钙PBS清洗2次,多聚甲醛固定30min,风干后,0.1%结晶紫染色20min,棉签轻轻擦掉上层未迁移细胞,PBS洗3次。100倍镜下随机取5个视野观察细胞并计数。

1.2.5 RT-PCR 测定 Ang-2、VEGF 表达量

取转染后 72 h 的 3 组细胞按照 TRIzol 试剂盒操作说明提取标本总 RNA。Ang-2 引物设计,p1:5'-TTGCGACCCCTTCAACTCTG-3',p2:5'-CTCTTTGCA-GGGCGAGGTTA-3',VEGF:5'-GGAGTCTGTGCTCT-GGGATT-3',5'-TGGGACCACTTGGCATGGTG-3',内参为 GAPDH。提取 3 组细胞总 RNA 进行 RT-PCR,反应条件为 94℃预变性 2 min;94℃解链 30 s,55℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,循环 33 次;72℃总延伸 10 min,4℃终止反应。以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算表达量。

1.2.6 Western blot

取转染后 72 h 的 3 组细胞分别提取总蛋白,BCA 法测定蛋白含量。用蛋白上样缓冲液调整浓度,样品在沸水中煮 10 min,按浓缩胶电压 60 V,分离胶电压 90 V 电泳,总计电泳时间 2 h 左右,制作电转三明治,于冰水中恒流电转 45~60 min。常规封闭、洗膜后与 1:1 000 兔抗鼠 VEGF、Ang-2 抗体 4℃孵育过夜,洗膜后加入 1:1 000 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔抗体,室温孵育 2 h。GAPDH 作为内参。

1.2.7 大鼠肝脏组织免疫组织化学染色

取 300 g 雄性 SD 大鼠 12 只,随机分为 A、B、C 3 组($n=4$),分别建立大鼠肝大部切除后肝癌模型。其中,A 组(空白对照):大鼠 70%肝切除后,将 1×10^7 个 CBRH-7919 细胞与 Matrigel 胶 1:1 混合注入到残肝中。B 组(阴性对照):大鼠 70%肝切除后,将 1×10^7 个转染空载体腺病毒 CBRH-7919 细胞与 Matrigel 胶 1:1 混合注入到残肝中。C 组(实验组):大鼠 70%肝切除后,将 1×10^7 个转染过表达 HNF4 α 腺病毒的 CBRH-7919 细胞与 Matrigel 胶 1:1 混合注入到残肝中。4 周后处死大鼠,取出大鼠残肝,可见肝脏上长有癌结节,取肝脏癌结节组织做免疫组织化学染色,观察 Ang-2、VEGF 的表达情况。判定标准:以细胞核呈界限清楚的棕色反应为阳性,每张切片随机观察 5 个视野($\times 400$ 倍),对其中的表达阳性细胞进行计数。

1.3 统计学方法

数据均以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS22.0 统计软件进行分析,指标比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 SNK 法, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 过表达 HNF4 α 腺病毒转染 CBRH-7919 细胞的鉴定

转染 72 h 后通过 RT-PCR 检测 HNF4 α 在 3 组中的表达量可以看出,实验组中腺病毒携带的 HNF4 α 成功在 CBRH-7919 细胞中表达(图 1)。

2.2 HNF4 α 对 CBRH-7919 增殖的影响

CCK-8 检测结果显示空白对照组和阴性对照组增殖能力均高于实验组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 2)。

2.3 HNF4 α 对 CBRH-7919 侵袭的影响

500 μ L 含血清培养基加入到下室,与不含血清上室 3 组细胞共培养 24 h 后,观察计数发现,空白对照组[(174.6 \pm 6.8)个]和阴性对照组[(167.0 \pm 9.4)个]侵袭能力高于实验组[(56.0 \pm 6.2)个],差异有统计学意义($P < 0.05$,图 3)。提示 HNF4 α 对 CBRH-7919 侵袭性具有抑制作用。

2.4 HNF4 α 对 CBRH-7919 细胞 VEGF、Ang-2 表达量影响

空白对照组和阴性对照组 Ang-2、VEGF 表达量均高于实验组,差异有统计学意义($P < 0.05$,图 4A)。3 组细胞分别提取总蛋白,检测 Ang-2、VEGF 表达量在蛋白水平的变化。空白对照和阴性对照组表

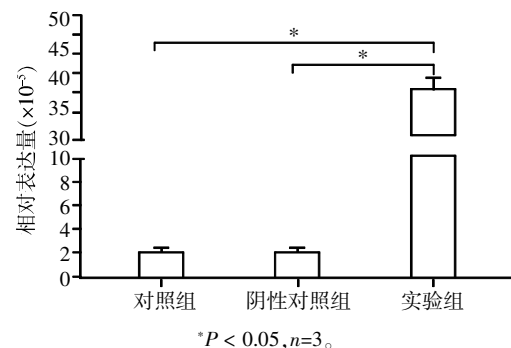


图 1 转染 72 h 后 3 组 CBRH-7919 细胞 HNF4 α 的表达
Figure 1 Expression of HNF4 α in CBRH-7919 cells after transfection for 72 h in three groups

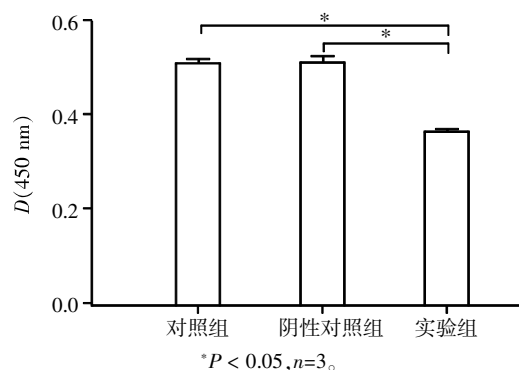


图 2 HNF4 α 对 CBRH-7919 细胞增殖的影响
Figure 2 Effects of HNF4 α on the proliferation of CBRH-7919 cells

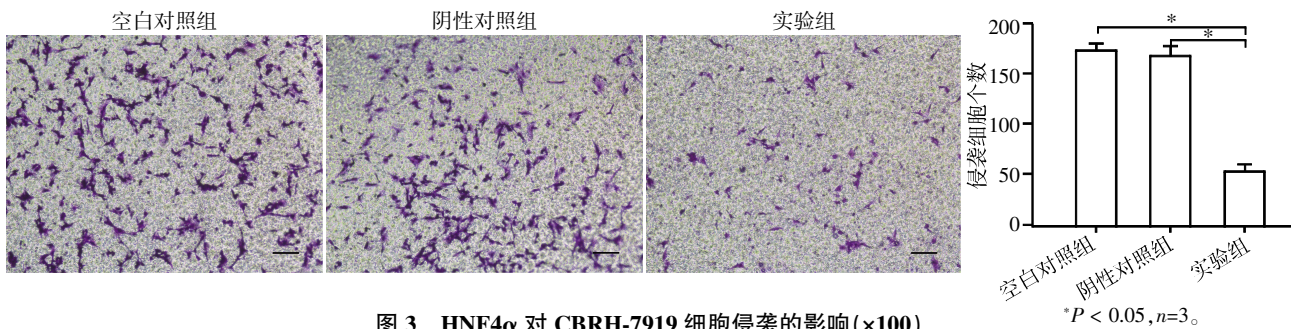


图 3 HNF4 α 对 CBRH-7919 细胞侵袭的影响($\times 100$)
Figure 3 Effects of HNF4 α on CBRH-7919 cell invasiveness($\times 100$)

达量均高于实验组(图 4B)。提示 HNF4 α 对 CBRH-7919 细胞 Ang-2、VEGF 在基因和蛋白水平的表达具有抑制作用。

2.5 HNF4 α 在体内对大鼠肝癌 Ang-2、VEGF 表达影响

SD 大鼠手术后,4 周处死。取肝癌组织做免疫

组化切片。观察发现空白对照组 VEGF(215.0 ± 7.2)、Ang-2(228.0 ± 8.1)和阴性对照组 VEGF(231.0 ± 9.5)、Ang-2(212.0 ± 7.3)表达高于实验组 VEGF(112.0 ± 6.8)、Ang-2(93.0 ± 10.3),差异有统计学意义($P < 0.05, n=4$,图 5)。提示 HNF4 α 在体内对大鼠肝癌 VEGF、Ang-2 表达具有抑制作用。

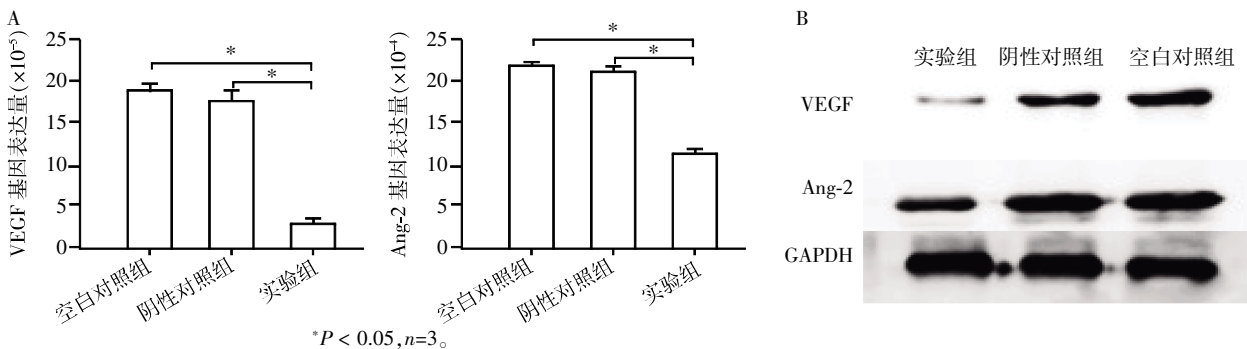


图 4 HNF4 α 对 CBRH-7919 细胞 VEGF、Ang-2 在基因和蛋白水平表达的影响
Figure 4 Effects of HNF4 α on the expression of VEGF, Ang-2 in CBRH-7919 cells

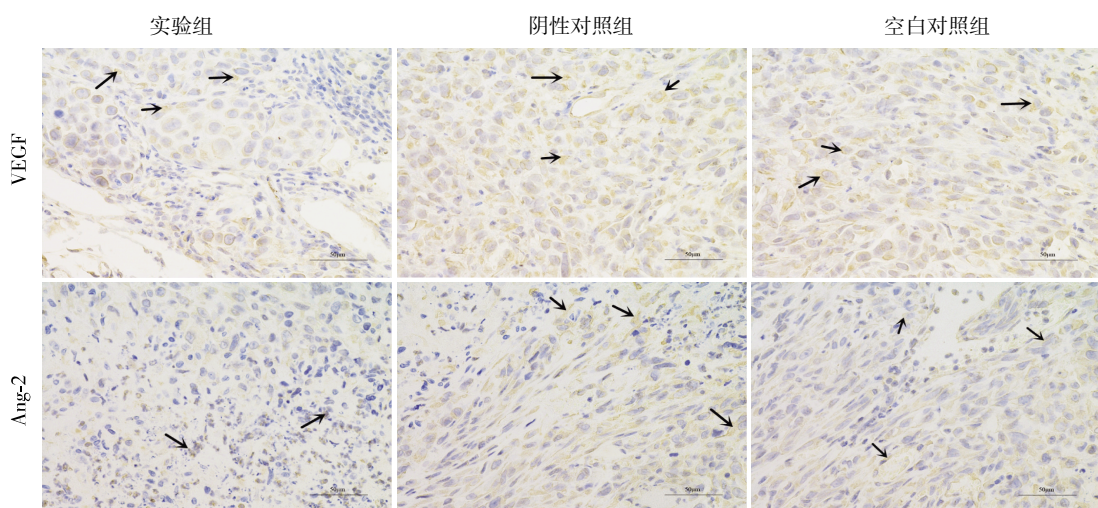


图 5 HNF4 α 在体内对大鼠肝癌 Ang-2、VEGF 表达影响($\times 400$)
Figure 5 Effects of HNF4 α on the rat hepatocellular carcinoma expressions of VEGF and Ang-2 *in vivo*($\times 400$)

3 讨论

肝细胞核因子家族是调节肝脏内基因特异性

表达的一类转录因子,在肝脏较多表达,并含有在进化上相当保守的 DNA 结合区,通过与各种靶基因调控区顺式作用元件的结合,调节靶基因表达,

在转录水平对肝细胞分化和代谢过程起重要作用。肝细胞核因子家族含有 HNF1、HNF3、HNF4、HNF6、D 结合蛋白、CCAAT/增强子结合蛋白(C/EBP)6 大类。其中肝细胞核因子 4 包括 HNF4 α 、HNF4 β 和 HNF4 γ 3 个成员,HNF4 是一种锌指结构蛋白,其氨基酸序列在进化过程中高度保守。Lazarevich 等^[7]研究发现,在原发性肝癌发生过程中,HNF4 α 的表达下降,在 HCC 细胞中转染外源性 HNF4 α 后,其侵袭性降低,增殖速度减缓。而本实验中 CBRH-7919 细胞转染过表达 HNF4 α 腺病毒后,实验组细胞的增殖、侵袭能力与空白、阴性对照组比较都明显下降,差异有统计学意义,与先前的研究结果相符。Ning 等^[8]证明 HNF4 α 通过非经典 Wnt/ β -catenin 信号通路下调 β -catenin 活性,而 Wnt/ β -catenin 信号通路在细胞中是调控细胞增殖、分化和迁移的重要通路,在肝脏的各种生物学功能中同样发挥着重要作用。因此本实验中 HNF-4 α 可能通过抑制非经典 Wnt/ β -catenin 信号通路下调 β -catenin 活性来抑制 CBRH-7919 的增殖、侵袭能力。

肿瘤的发生、生长、浸润及转移,不仅需要依靠肿瘤细胞自身具有的生物学增殖活性,而且更加依赖于从宿主环境中汲取氧分和营养物质^[9]。当肿瘤体积达到 1~2 mm³ 时,肿瘤呈现出血管生成表像并从周围基质中发生新生血管^[10]。肿瘤的新生血管形成可以给肿瘤的发生、生长提供所需要的氧气以及营养物质,而且血管可以作为肿瘤细胞发生远处转移的通道。肿瘤细胞诱导血管生成的潜能,需经生长因子的刺激才能转变为发挥作用的表型,其中 Ang-2、VEGF 对肿瘤血管生成的调控有重要作用^[11]。然而 HNF4 α 与 Ang-2、VEGF 分泌的关系缺少深入研究。已有研究证明调控 Wnt 信号通路能够有效抑制 Ang-2、VEGF 的表达,从而抑制血管再生^[12-13]。本实验中,RT-PCR、蛋白质印迹结果表明转染过表达 HNF4 α 腺病毒的 CBRH-7919 细胞 Ang-2、VEGF 表达量均被抑制。笔者对体内的研究进一步证实,HNF4 α 对 Ang-2、VEGF 的表达具有抑制作用。综上所述,HNF4 α 可能通过抑制非经典 Wnt/ β -catenin 信号通路来抑制 Ang-2、VEGF 的表达。

如果 HNF4 α 确能调控肝癌细胞血管生成因子相关基因的表达并影响到 HCC 病灶新生血管的形成,将对 HNF4 α 用于 HCC 的临床治疗产生重要影响。所以,研究 HNF4 α 对 HCC 血管新生的调节机制对进一步认识 HNF4 α 对 HCC 的诱导反分化作用、设计新的 HCC 治疗方法有重要的科学价值。

[参考文献]

- [1] 吴宁,杭化莲,张玉玲,等. 人脐带间充质干细胞促进肝癌细胞的增殖和转移[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2014,34(8):1003-1009
- [2] 禹亚彬,杭化莲,卞建民. HNF4 α 真核表达载体的构建及其在人脐带间充质干细胞中的表达[J]. 南京医科大学学报(自然科学版),2012,32(10):1356-1360
- [3] De Palma M, Coukos G, Hanahan D. A new twist on radiation oncology: low-dose irradiation elicits immunostimulatory macrophages that unlock barriers to tumor immunotherapy[J]. *Cancer Cell*, 2013, 24(5): 559-561
- [4] Gerald D, Chintharlapalli S, Augustin HG, et al. Angiopoietin-2: an attractive target for improved antiangiogenic tumor therapy[J]. *Cancer Res*, 2013, 73(6): 1649-1657
- [5] Bupathi M, Kaseb A, Janku F. Angiopoietin 2 as a therapeutic target in hepatocellular carcinoma treatment: current perspectives[J]. *Onco Targets Ther*, 2014, 7: 1927-1932
- [6] Qian YY, Zhang H, Hou Y, et al. *Celastrus orbiculatus* extract inhibits tumor angiogenesis by targeting vascular endothelial growth factor signaling pathway and shows potent antitumor activity in hepatocarcinomas in vitro and in vivo[J]. *Chin J Integr Med*, 2012, 18(10): 752-760
- [7] Lazarevich NL, Al'pern DV. Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF4) in epithelial development and carcinogenesis[J]. *Mol Biol (Mosk)*, 2008, 42(5): 786-797
- [8] Ning BF, Ding J, Yin C, et al. Hepatocyte nuclear factor 4 alpha suppresses the development of hepatocellular carcinoma[J]. *Cancer Res*, 2010, 70(19): 7640-7651
- [9] Burri PH, Hlushchuk R, Djonov V. Intussusceptive angiogenesis: its emergence, its characteristics, and its significance[J]. *Dev Dyn*, 2004, 231(3): 474-488
- [10] Benazzi C, Al-Dissi A, Chau CH, et al. Angiogenesis in spontaneous tumors and implications for comparative tumor biology[J]. *Scientific World Journal*, 2014: 919570
- [11] Yoshiji H, Kuriyama S, Noguchi R, et al. Angiopoietin 2 displays a vascular endothelial growth factor dependent synergistic effect in hepatocellular carcinoma development in mice[J]. *Gut*, 2005, 54(12): 1768-1775
- [12] Liu Z, Sun B, Qi L, et al. Dickkopf-1 expression is down-regulated during the colorectal adenoma-carcinoma sequence and correlates with reduced microvessel density and VEGF expression[J]. *Histopathology*, 2015, 67(2): 158-166
- [13] Li R, Beebe T, Jen N, et al. Shear stress-activated Wnt-angiopoietin-2 signaling recapitulates vascular repair in zebrafish embryos[J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(10): 2268-2275

[收稿日期] 2015-07-27