

HGF 经 HGF/Akt 通路抑制肝癌细胞 HCCC-9810 的增殖

王广洲¹, 周 林¹, 吴银霞^{2*}

(¹苏北人民医院临床医学检测中心,²肿瘤科,江苏 扬州 225001)

[摘要] 目的:观察肝细胞生长因子(HGF)对人胆管细胞型肝癌细胞 HCCC-9810 增殖的影响,并探讨其分子机制。方法:HGF 处理 HCCC-9810 细胞后,用 MTT 及 EdU 法检测癌细胞的增殖;siRNA 干扰技术抑制 HCCC-9810 细胞内源性 Akt 的表达,Western blot 检测癌细胞 Cyclin D1 蛋白表达和 Akt 磷酸化的变化。结果:50 和 100 ng/ml HGF 显著抑制肝癌细胞 HCCC-9810 的增殖。Western blot 结果显示,HGF 处理后的肝癌细胞 Akt 磷酸化和 Cyclin D1 表达量明显下调。siRNA 干扰 Akt 的表达,阻断了 HGF 诱导的 Cyclin D1 表达量的下调及细胞增殖抑制。结论:HGF 通过下调 Akt 磷酸化和 Cyclin D1 表达量抑制肝癌细胞 HCCC-9810 的增殖。

[关键词] HGF;肝癌细胞;增殖;Akt;Cyclin D1

[中图分类号] R735.7

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)07-870-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140704

HGF inhibited the proliferation of liver carcinoma cell line HCCC-9810 via HGF/Akt signaling pathway

Wang Guangzhou¹, Zhou Lin¹, Wu Yinxia^{2*}

(¹Clinical Lab, ²Department of Oncology, Northern Jiangsu People's Hospital, Yangzhou 225001, China)

[Abstract] **Objective:**To identify the novel function of hepatocyte growth factor (HGF) in liver carcinoma cell HCCC-9810 proliferation and the underlying molecular mechanism. **Methods:**The proliferation of HCCC-9810 treated with HGF was detected by MTT assay and EdU assay. The expression of Akt in HCCC-9810 cells was inhibited by siRNA. Western blot was used to detect the expression of cyclin D1 and the phosphorylation level of Akt. **Results:**Both 50 ng/ml and 100 ng/ml HGF significantly inhibited the proliferation of HCCC-9810. Western blotting assay showed that HGF downregulated the expression of cyclin D1 and the phosphorylation level of Akt in HCCC-9810 cells. **Conclusion:**These results suggest that HGF inhibited the proliferation of HCCC-9810 by suppressing the expression of cyclin D1 and the phosphorylation level of Akt. SiRNA interfered the expression of Akt, and blocked HGF-induced downregulation of cyclin D1 expression and inhibition of cell proliferation.

[Key words] HGF; liver carcinoma cell; proliferation; Akt; Cyclin D1

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07): 870-874]

肝细胞生长因子 (hepatocyte growth factor, HGF)是一种多肽生长因子,具有促进多种类型细胞包括肝细胞、上皮细胞、内皮细胞、造血细胞等的生长、迁移和形态发生的作用^[1]。近年研究发现其有多方面的抗癌活性,其抗癌的机制主要有:阻滞细胞周期;抑制肿瘤生长促进剂的作用等^[2]。但是,HGF在

肝癌细胞发生和发展过程中的确切调控机制尚不清楚。肝癌的发生和恶化与肝癌细胞的增殖密切相关,我们推测 HGF 可能通过抑制肝癌细胞的增殖而起到防治肝癌的作用。因此,本研究着重观察 HGF 对人胆管细胞型肝癌细胞 HCCC-9810 增殖的影响,并探讨其分子机制,为揭示肝癌发病机制和可能的药物治疗方案提供新的细胞学证据。

[基金项目] 江苏省苏北人民医院院级科研基金项目 (yzucms201318)

*通信作者 (Corresponding author), E-mail:wuyinxia516@126.com

1 材料和方法

1.1 材料

HCCC-9810 人胆管细胞型肝癌细胞购自中国

科学院典型培养物保藏委员会细胞库, 细胞培养使用添加 10%(V/V) 新生牛血清的 DMEM 高糖培养基, 置于 5% CO₂、常氧(20% O₂)、饱和湿度的 37℃ 细胞培养箱中培养。

鼠抗 Akt、磷酸化 Akt(Thr³⁰⁸)单克隆抗体(Santa Cruz 公司, 美国), EdU 试剂盒(广东瑞博), 兔抗人 Cyclin D1 单克隆抗体(Abcam 公司, 美国), 鼠抗 β -actin 单克隆抗体、IgG-HRP(上海康成), ECL 发光试剂盒(Pierce 公司, 美国)。siRNA-Akt: 5'-CCTGCC-CTTCTACAACCAGGA-3' 和 siRNA-control: 5'-AATTCTCCGAACGTGTCACGT-3' (上海吉玛)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法检测细胞增殖

将 HCCC-9810 人肝癌细胞铺至 96 孔板, 每孔 1×10^3 个细胞。血清饥饿 24 h 后加入相应浓度的 HGF 处理 24 h 或 48 h, 药物处理后各孔加入 MTT (500 mg/L) 100 μ l, 继续培养 4 h。弃上清, 加入二甲基亚砷(dimethyl sulphoxide, DMSO) 200 μ l, 摇床上轻轻振荡待甲臜沉淀完全溶解。酶标仪检测 D (490 nm), 代表存活细胞数绘制数值曲线。

1.2.2 EdU 分析细胞增殖

取对数生长期细胞, 以每孔 4×10^3 细胞接种于 96 孔板中, 培养至正常生长阶段。加入相应浓度的 HGF 处理 24 h, 参照 EdU 试剂盒说明进行操作。荧光倒置显微镜观察。随机选取 5 个视野, 分别计数绿色荧光细胞数(即阳性细胞数)和细胞总数。EdU 标记阳性率=阳性细胞数/细胞总数。计算 5 个阳性率的算术平均值即是实验最终的标记阳性率。

1.2.3 蛋白提取和 Western blot 分析

RIPA 蛋白裂解液裂解肝癌细胞后提取总蛋白, BCA 比色法测定蛋白浓度。将蛋白煮沸 5 min 使其变性, 取等量蛋白进行 SDS-PAGE 电泳, 电泳条件为 80 V 电泳 20~30 min, 待溴酚蓝迁移出积层胶位置再换用 100 V 电泳 90 min, 电泳后将蛋白经湿电转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, 抗 β -actin 抗体(1:5 000)、抗 p-Akt 抗体(1:2 000)、抗

Akt 抗体(1:2 000)或抗 Cyclin D1 抗体(1:1 000)4℃ 孵育过夜, TBST 洗膜, IgG-HRP(1:5 000)室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 暗室中加入 ECL 液孵育 4 min 后, 利用凝胶电泳成像系统进行读片分析。

1.2.4 siRNA 转染

将细胞以 5×10^5 个/孔接种至含 DMEM 培养基的 6 孔板中, 置于 37℃ 常氧细胞培养箱中培养。待细胞生长融合度约 50% 时, 按转染试剂说明书进行 siRNA 转染。将 siRNA-Lipofectamine 2000 混合物逐滴加入细胞培养板中并混匀; 将培养板置于 37℃ 常氧细胞培养箱中培养; 6 h 后, 将培养液更换成含血清的 DMEM 培养基继续培养 24 h。

1.3 统计学方法

采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析, 计量结果采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。不同时间增殖情况采用重复测定的方差分析, 两两比较采用 LSD- t 检验, $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。每组实验独立重复 3 次。

2 结果

2.1 HGF 抑制肝癌细胞的增殖

用 MTT 法检测 HGF 处理后肝癌细胞增殖的变化, 结果发现, 50 ng/ml HGF 处理 24 h 或 48 h 后, 代表细胞存活数量的 D (490 nm) 值显著低于未加 HGF 组及 25 ng/ml HGF 组; 100 ng/ml HGF 处理 24 或 48 h 后, D (490 nm) 值也显著低于未加 HGF 组及 25 ng/ml HGF 组(表 1); 说明低剂量(25 ng/ml)的 HGF 不影响肝癌细胞增殖, 较高剂量(50、100 ng/ml)的 HGF 能够抑制肝癌细胞增殖。进一步用 EdU 法检测了 50 ng/ml HGF 处理 24 h 后肝癌细胞增殖的变化, EdU 结果与 MTT 法结果一致(图 1)。

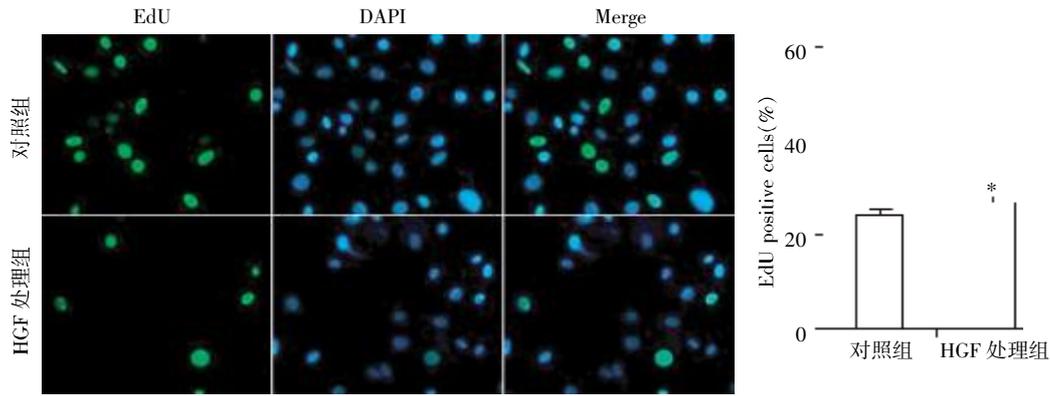
2.2 HGF 诱导肝癌细胞 Cyclin D1 的下调

50 ng/ml HGF 处理肝癌细胞 1 h 和 2 h 后, 用 Cyclin D1 抗体检测细胞的细胞周期相关蛋白的表达量变化。Western blot 结果发现, Cyclin D1 的表达量明显下调(图 2)。HGF 处理组与对照组相比, Cy-

表 1 HGF 抑制肝癌细胞 HCCC-9810 的增殖
Table 1 HGF inhibited the proliferation of HCCC-9810

HGF 浓度(ng/ml)	吸光度值		
	0 h	24 h	48 h
0	0.453 \pm 0.034	0.657 \pm 0.079	0.828 \pm 0.021
25	0.466 \pm 0.013	0.653 \pm 0.038	0.772 \pm 0.042
50	0.443 \pm 0.021	0.513 \pm 0.015*	0.427 \pm 0.029*
100	0.496 \pm 0.013	0.424 \pm 0.020*	0.420 \pm 0.023*

与 0 ng/ml HGF 处理组比较, * $P < 0.05$, $n=3$ 。



与对照组比较, * $P < 0.05, n = 3$ 。

图 1 HGF 抑制肝癌细胞 HCCC-9810 增殖

Figure 1 HGF inhibited the proliferation of HCCC-9810

clin D1 蛋白表达随处理时间的延长明显降低。

2.3 HGF 诱导肝癌细胞 Akt 磷酸化的下降

50 ng/ml HGF 处理肝癌细胞 1 h 和 2 h 后,用 Western blot 方法检测 Akt 磷酸化的变化。结果显示,HGF 显著抑制了 Akt 的磷酸化(图 3)。该结果提示,HGF 抑制肝癌细胞的增殖可能通过下调 Akt 的磷酸化来实现。

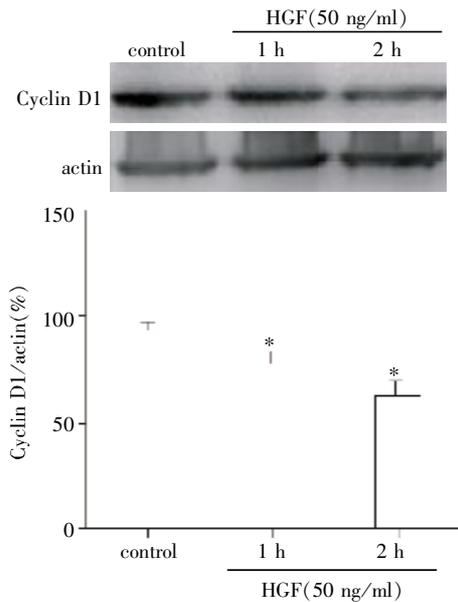
2.4 siRNA-Akt 阻断 HGF 诱导的 Cyclin D1 表达量的下调

进一步研究 Akt 是否参与调控 HGF 诱导的 Cyclin D1 表达量。Akt 的表达在转染 siRNA-Akt 后与对照组相比显著抑制,说明 siRNA-Akt 显著抑制

了肝癌细胞中 Akt 的表达(图 4)。siRNA-Akt 干扰肝癌细胞中 Akt 的表达后,用 50 ng/ml HGF 处理上述细胞 2 h,用 Western blot 方法检测 Cyclin D1 表达量的变化。结果发现,Cyclin D1 并没有出现明显的下调,提示原本 HGF 诱导的 Cyclin D1 表达量的下调过程被 siRNA-Akt 所抑制(图 5)。

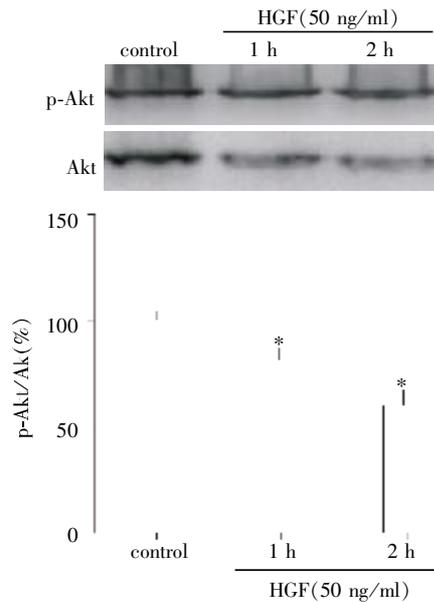
2.5 siRNA-Akt 阻断 HGF 引起肝癌细胞增殖抑制

进一步研究 Akt 是否参与调控 HGF 诱导的肝癌细胞的增殖抑制。用 MTT 法检测 siRNA-Akt 组及 siRNA-Akt+HGF 处理组肝癌细胞增殖的变化,结果发现两组细胞增殖并无明显差异,提示 siRNA-Akt 阻断了 HGF 诱导的肝癌细胞的增殖抑制(表 2)。



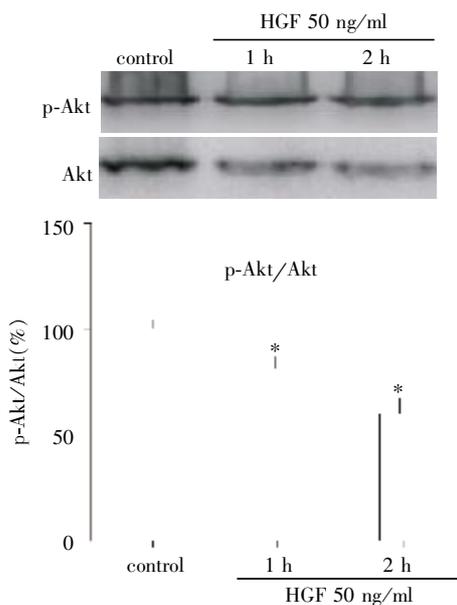
与对照组相比, * $P < 0.05, n = 3$ 。

图 2 HGF 诱导肝癌细胞 HCCC-9810 中 Cyclin D1 表达下调
Figure 2 HGF induced downregulation of Cyclin D1 in HCCC-9810



与对照组相比, * $P < 0.05, n = 3$ 。

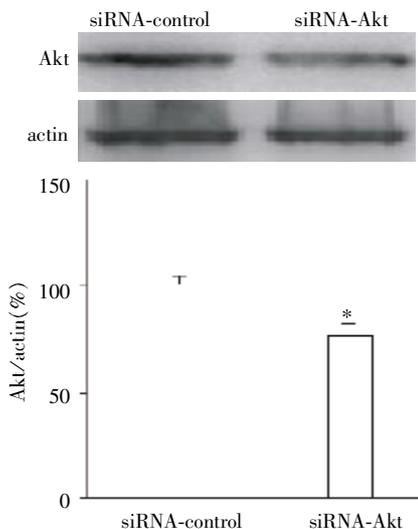
图 3 HGF 诱导肝癌细胞 HCCC-9810Akt 磷酸化的下降
Figure 3 HGF induced downregulation of p-Akt in HCCC-9810



与对照组相比, * $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图 3 HGF 诱导肝癌细胞 HCCC-9810Akt 磷酸化的下降

Figure 3 HGF induced downregulation of p-Akt in HCCC-9810



与 siRNA-control 转染组相比, * $P < 0.05$, $n = 3$ 。

图 4 siRNA-Akt 干扰 Akt 的表达

Figure 4 siRNA-Akt interfered Akt expression

3 讨论

原发性肝癌分为肝细胞型肝癌 (hepatocellular carcinoma, HCC)、胆管细胞型肝癌 (cholangiocarcinoma, CC) 和混合型肝癌 (combined hepatocellular and cholangiocarcinoma, cHCC)。CC 是仅次于 HCC 的第二大原发性肝癌, 占肝脏原发恶性肿瘤的 5%~30%^[3], 其恶性程度较 HCC 更高, 淋巴结转移更早, 根治性手术切除率低, 并且因为有限的治疗手段, 预后

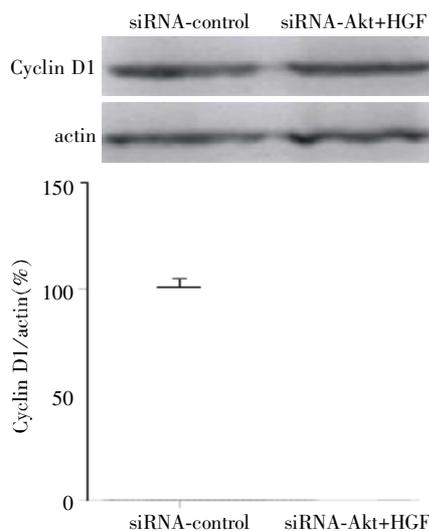


图 5 siRNA-Akt 阻断 HGF 诱导的 Cyclin D1 表达量的下调

Figure 5 siRNA-Akt blocked the HGF-induced downregulation of Cyclin D1

表 2 siRNA-Akt 阻断 HGF 诱导的肝癌细胞增殖抑制

Table 2 siRNA-Akt blocked the HGF-induced inhibition of proliferation in hepatoma carcinoma cells

时间	siRNA-Akt	siRNA-Akt+HGF	P 值
0 h	0.483 ± 0.045	0.463 ± 0.012	0.843
24 h	0.673 ± 0.043	0.614 ± 0.064	0.732
48 h	0.832 ± 0.033	0.813 ± 0.023	0.685

很差, 病死率接近发病率^[4]。本研究针对 HGF/Akt 信号通路调控人胆管细胞型肝癌细胞 HCCC-9810 增殖进行探索。

1984 年, HGF 由 Nakamura^[5]从部分肝切除的大鼠血浆和血小板中纯化后获得, 能刺激原代培养的肝细胞生长, 后发现与成纤维细胞分泌的促进上皮细胞集落的扩散因子 (scatter factor, SF) 相同^[6], 具有多种生物功能及重要的细胞生存调节功能^[1,7], 与其受体结合后, 具有强促分裂、组织成形、诱导肿瘤细胞迁移、侵袭以及诱导血管生成等作用, 近年研究表明, HGF 与其受体结合后, 能促进多种肿瘤细胞的增殖、转移、刺激新生血管生成^[8]。

PI3K/Akt 信号转导通路是体内重要的生存通路, 在国外被视为癌细胞存活的重要通路^[9]。在多种肿瘤组织中, 如卵巢癌^[10]、前列腺癌^[11]、结直肠癌^[12]、多发性骨髓瘤^[13]、乳腺癌^[14]、胰腺癌^[15]等肿瘤组织与细胞系中都存在活化的 Akt (磷酸化 Akt, p-Akt) 的过度表达, 提示 Akt 的活化与肿瘤的发生发展密切相关。

Cyclin D1 基因现已被公认为是一种原癌基因^[16], 在细胞周期关键限速点 G1/S 转换中具有重要的正性调控作用^[17], 与多种肿瘤的发生和发展都有重要

关系。活化的 Akt 之所以能促进肿瘤细胞的生长、增殖,与其通过多种途径上调 Cyclin D1 的表达并介导 G1 进展有关^[18]。有研究表明,抑制 Cyclin D1 基因表达后,能够明显抑制血管内皮生长因子的表达,进而抑制肿瘤细胞的浸润和转移^[19]。

本实验以肝癌细胞 HCCC-9810 为研究对象,分别使用不同剂量的 HGF 对肝癌细胞进行处理,研究发现,较高剂量(50~100 ng/ml)的 HGF 在体外对肝癌细胞 HCCC-9810 的增殖有明显的抑制作用,通过 Western blot 检测发现经过高剂量 HGF 处理的细胞 Akt 磷酸化明显下降,诱导 Cyclin D1 的下调。构建 siRNA-Akt,转染经 50 ng/ml HGF 处理过的 HCCC-9810 细胞,Western blot 检测得到 siRNA-Akt 能阻断由 HGF 诱导的 Cyclin D1 表达量的下调,MTT 法检测结果发现 siRNA-Akt 阻断由 HGF 引起的肝癌细胞的增殖抑制,证实 HGF 是通过 Akt 通路来抑制肝癌细胞的增殖。

综上所述,本次研究支持较高剂量(50~100 ng/ml)的 HGF 在体外经 HGF/Akt 通路抑制肝癌细胞 HCCC-9810 的增殖。HGF 对肿瘤防治的作用是多方面的,HGF 防止肝癌恶化的作用可能不仅仅抑制其增殖。我们需要进一步研究 HGF 防止肝癌恶化的多重作用,以期找到全面防治肝癌发生和恶化的方法。

[参考文献]

- [1] Boros P, Miller CM. Hepatocyte growth factor: a multifunctional cytokine [J]. *Lancet*, 1995, 345 (8945): 293-295
- [2] Cecchi F, Rabe DC, Bottaro DP. Targeting the HGF/Met signaling pathway in cancer therapy [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16(6): 553-572
- [3] Tang D, Nagano H, Nakamura M, et al. Clinical and pathological features of Allen's type C classification of resected combined hepatocellular and cholangiocarcinoma: a comparative study with hepatocellular carcinoma and cholangiocellular carcinoma [J]. *J Gastrointest Surg*, 2006, 10(7): 987-998
- [4] Shaib Y, El-Serag HB. The epidemiology of cholangiocarcinoma [J]. *Semin Liver Dis*, 2004, 24(2): 115-125
- [5] Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 122(3): 1450-1459
- [6] Zarnegar R, Petersen B, Defrances MC, et al. Localization of hepatocyte growth factor (HGF) gene on human chromosome 7 [J]. *Genomics*, 1992, 12(1): 147-150
- [7] Bhargava M, Joseph A, Knesel J, et al. Scatter factor and hepatocyte growth factor: activities, properties, and mechanism [J]. *Cell Growth Differ*, 1992, 3(1): 11-20
- [8] Gherardi E, Birchmeier W, Birchmeier C, et al. Targeting MET in cancer: rationale and progress [J]. *Nat Rev Cancer*, 2012, 12(2): 89-103
- [9] Sheppard K, Kinross KM, Solomon B, et al. Targeting PI3 kinase/AKT/mTOR signaling in cancer [J]. *Crit Rev Oncog*, 2012, 17(1): 69-95
- [10] Glaysher S, Bolton LM, Johnson P, et al. Targeting EGFR and PI3K pathways in ovarian cancer [J]. *Br J Cancer*, 2013, 109(7): 1786-1794
- [11] Kumar D, Shankar S, Srivastava RK. Rottlerin induces autophagy and apoptosis in prostate cancer stem cells via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. *Cancer Lett*, 2014, 343(2): 179-189
- [12] Suman S, Kurisetty V, Das TP, et al. Activation of AKT signaling promotes epithelial-mesenchymal transition and tumor growth in colorectal cancer cells [J]. *Mol Carcinog*, 2014, 53(suppl1): E151-160
- [13] Steinbrunn T, Stuhmer T, Gattenlohner S, et al. Mutated RAS and constitutively activated Akt delineate distinct oncogenic pathways, which independently contribute to multiple myeloma cell survival [J]. *Blood*, 2011, 117(6): 1998-2004
- [14] Tokunaga E, Kimura Y, Mashino K, et al. Activation of PI3K/Akt signaling and hormone resistance in breast cancer [J]. *Breast Cancer*, 2006, 13(2): 137-144
- [15] Schlieman MG, Fahy BN, Ramsamooj R, et al. Incidence, mechanism and prognostic value of activated AKT in pancreas cancer [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89 (11): 2110-2115
- [16] Inaba T, Matsushime H, Valentine M, et al. Genomic organization, chromosomal localization, and independent expression of human cyclin D genes [J]. *Genomics*, 1992, 13(3): 565-574
- [17] Coqueret O. Linking cyclins to transcriptional control [J]. *Gene*, 2002, 299(1-2): 35-55
- [18] Gao N, Flynn DC, Zhang Z, et al. G1 cell cycle progression and the expression of G1 cyclins are regulated by PI3K/AKT/mTOR/p70S6K1 signaling in human ovarian cancer cells [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2004, 287(2): C281-C291
- [19] Yasui M, Yamamoto H, Ngan CY, et al. Antisense to cyclin D1 inhibits vascular endothelial growth factor-stimulated growth of vascular endothelial cells: implication of tumor vascularization [J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(15): 4720-4729

[收稿日期] 2013-12-10