论著

文章编号:1000-5404(2008)05-0378-04

过表达外源性 Cyr61 对人肝癌细胞株 HepG2 生长和迁移的影响

丁 伟,司维柯,孙世俊,潘 静,李招权 (第三军医大学医学检验系临床血液学教研室,重庆 400038)

摘 要:**目的** 采用 AdEasy 系统构建的带有标记基因 RFP 的重组腺病毒 Ad-Cyr61 感染人肝癌细胞株 HepG2,并观察外源性 Cyr61 对肿瘤细胞生长和迁移的影响。**方法** Ad-Cyr61 与 Ad-RFP 分别感染人肝癌细胞株 HepG2,荧光倒置显微镜观察荧光表达,通过 RT-PCR、免疫组化实验分别检测 Ad-Cyr61 的 mRNA 和蛋白的表达;通过 MTT 实验、细胞计数实验、克隆形成实验和划痕愈合实验,观察 Cyr61 对人肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖和迁移的影响。**结果** Ad-Cyr61 感染人肝癌细胞株 HepG2,与对照组比较细胞数量增多,集落形成增加,细胞划痕逐渐愈合。**结论** Ad-Cyr61 感染人肝癌细胞株 HepG2 后可促进细胞增殖和迁移,提示 Cyr61 在肿瘤发生和转移中可能起到重要作用。

关键词:富半胱氨酸蛋白 61;重组腺病毒;人肝癌 HepG2 细胞;增殖;迁移
中图法分类号:R394.2;R730.23;R735.7 **文献标识码**:A

Over-expression of exogenous Cyr61 promotes proliferation and migration of human hapetocelluar carcinoma cell line HepG2

DING Wei, SI Wei-ke, SUN Shi-jun, Pan Jing, LI Zhao-quan (Department of Clinical Hematology, College of Pharmacy and Laboratory Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To observe the proliferation and migration of human hapetocelluar carcinoma cell line HepG2 after the introduction of exogenous cysteine rich 61 (Cyr61). **Methods** Adenviral vector, AdEasy with a report gene, red fluorescence protein (RFP) was used to construct recombinant vector Ad-Cyr61. The vectors Ad-Cyr61 and Ad-RFP (control) were transformed into HepG2 cells to observe the protein and mRNA expression of Cyr61 by immunohistochemistry and RT-PCR. MTT, cell counting, plate colony formation and cell wound healing assay were performed to determine the Cyr61's effect on the proliferation and migration of HepG2. **Results** Ad-Cyr61 transfected HepG2 cells expressed exogenous Cyr61, formed more clones, proliferated more cells and exhibited a greater ability to migrate in cell wound healing than the control cells. **Conclusion** Exogenous Cyr61 stimulates the proliferation and migration of HCC cells, suggesting that Cyr61 may play a role in tumorigenesis and metastasis.

Key words: Cyr61; recombinant adenovirus; human hapetocelluar carcinoma cell line; proliferation; migration

富半胱氨酸蛋白 61 (Cysteine rich 61, Cyr61) 是 CCN(Cyr61、CTGF、NOV) 蛋白家族成员之一。Cyr61 具有明显的促有丝分裂活性和趋化性,参与调节细胞的增殖、转移、黏附,并和血管形成有关[1-3]。Cyr61 在肿瘤中表现的生物学功能是多样的,在不同的组织细胞以及肿瘤类型中,Cyr61 的表达水平和功能不同。Cyr61 在多种肿瘤的发生、发展过程中发挥不同作用。目前,Cyr61 与肿瘤的确切关系及其机制尚不清楚,值得深入研究。本研究拟采用 AdEasy 系统构建带有标记基因 RFP 的重组腺病毒 Ad-Cyr61 感染人肝癌细胞株 HepG2,并观察外源性 Cyr61 对肿瘤细胞生长和迁移的影响。

1 材料与方法

1.1 试剂与材料

人肝癌细胞株 HepG2、HEK293 细胞由重庆市儿童医院外科研究所惠赠。RPMI1640、DMEM 培养基购自 Gibco 公司,小牛血清购自杭州四季青生物材料研究所,MTT 购自 Sigma 产品,DMSO 购自上海生工,Tripure 试剂购自 Roche 公司,逆转录系统试剂 Revertra 购自 Toyobo 产品,Cyr61、GAPDH 引物均由 Invitrogen 公司合成,焦碳酸二乙脂 (DEPC) 为 Sigma 公司产品,2×*Taq* PCR MasterMix 12.5 μl 购自天根生物。Cyr61 抗体购自美国 Santa Cruz 公司,免疫组化试剂盒 SP-9001/9002 购自北京中杉生物技术公司。

基金项目:国家自然科学基金(30672393);第三军医大学留学回国人员科研启动基金(200509)
Supported by the National Natural Science Foundation of China(30672393) and the Starting Fund for Overseas Returning Scholar of Third Military Medical University (200509)
作者简介:丁 伟,女,山东省泰安市人,硕士研究生,电话:(023)66947613,E-mail:vipdw@126.com
通信作者:司维柯,电话:(023)68752312,E-mail:weikesi@yahoo.com.cn
收稿日期:2007-11-09;修回日期:2007-12-05

1.2　方法

1.2.1　细胞培养　人肝癌细胞株 HepG2、HEK293 细胞培养于含 10% 小牛血清、10^5 U/L 青霉素钠及 10^5 μg/L 硫酸链霉素的 DMEM 培养基中,37 ℃,5% CO_2 及饱和湿度培养箱常规培养传代。

1.2.2　重组腺病毒载体 Ad-Cyr61、Ad-RFP 的扩增、滴度测定及细胞转染　按文献[4]方法制备带有标记基因 RFP 的重组腺病毒 Ad-Cyr61 和 Ad-RFP,腺病毒质粒启动子 CMV 及cDNA未经过修饰。将该腺病毒裂解液反复感染 HEK293 细胞,以扩增腺病毒载体。接种 HepG2 细胞于 96 孔板,每孔加入不同稀释度的 Ad-Cyr61 和 Ad-RFP 细胞裂解液,24 h 后观察标记基因 RFP 荧光,比较 Ad-Cyr61 和 Ad-RFP 感染 HepG2 细胞的荧光强度,以二者荧光强度相当的最小病毒用量之比为相对滴度。

1.2.3　RT-PCR 检测转基因细胞 Cyr61 基因转录表达　分别提取感染 Ad-Cyr61 实验组,感染病毒空载体 Ad-RFP 对照组,未感染病毒空白组细胞的总 RNA,取定量好的 RNA 1 μg,然后按照 Revertra 逆转录系统,根据说明书加入组织总 RNA 建立 20 μl 反应体系,合成 cDNA,以 GAPDH 为内参照,应用 Ad-Cyr61 的上下游引物进行 PCR。Cyr61 的上游引物:5′-ACTTCATGGTCCCAGTGCGC-3′,下游引物:5′-AAATCCGGGTTTCTTTCACA-3′,产物大小为 106 bp,GAPDH 上游引物为:5′-CATCACCATCTTCCAGGAGCG-3′,下游引物:5′-TGACCTTGCCCACAGCCTTG-3′,产物大小为 443 bp。PCR 产物在含有 0.8 μg EB 的 1.6% 琼脂糖凝胶中电泳,以 Quantity One 定量分析系统对 PCR 条带进行分析,以 Cyr61 与 GAPDH 相对光密度的比值为 Cyr61 的相对表达量。

1.2.4　免疫组化检测转基因细胞 Cyr61 蛋白表达的变化　将经过处理的盖玻片放入 6 孔板内,每孔分别接种 1×10^4 个 HepG2 细胞,37 ℃孵育;待盖玻片上细胞生长至密度适当时,弃去培养液,加入 4% 多聚甲醛,4 ℃固定 15 min。按产品说明书操作,山羊链霉素抗生物素-过氧化酶连接法(SP)试剂盒检测,二氨基联苯胺(DAB)显色。复染,脱水,封片。

定量测定用 NIS-Elements 图像分析系统分别检测 Ad-Cyr61 和 Ad-RFP 感染组,每片各选取 5 个视野(×400),测定其阳性细胞的平均光密度值以反映 Cyr61 的阳性强度。阳性细胞平均光密度(MD)代表 Cyr61 的含量。

1.2.5　检测细胞增殖　①MTT 法:取对数生长期肝癌细胞 HepG2 制成细胞数为 6×10^4 ml^{-1} 的单细胞悬液后接种于 96 孔板,每孔 200 μl。实验分 3 组:感染 Ad-Cyr61 实验组、感染 Ad-RFP 对照组和空白组,每组重复 6 孔,分别培养 24、48、72 h 后,吸去培养液,每孔加入新鲜配制的 MTT 液 20 μl,继续培养 4 h,各孔加 DMSO 120 μl,振荡 10 min 使结晶充分溶解,酶标仪于 570 nm 处读取吸光度值[D(570)]。实验重复 3 次,每次取 6 孔平均值,绘制细胞的生长曲线。②台盼蓝活细胞染色计数:对数生长期肝癌细胞 HepG2,5×10^4 个/孔接种 24 孔板,Ad-Cyr61,Ad-RFP 分别感染 HepG2 细胞,实验分组同①,每组均设 3 个复孔,连续培养 1 ~ 4 d,台盼蓝染色后,用细胞计数板进行细胞计数,计算平均值,以生长时间为横坐标,细胞数量(×10^5 ml^{-1})为纵坐标绘图。

1.2.6　平板克隆形成实验　Ad-Cyr61、Ad-RFP 分别感染 HepG2 细胞 24 h,观察荧光,0.25% 胰蛋白酶消化后计数,调整细胞数为 1×10^5 ml^{-1},以 1 000 个/孔接种于 6 孔板,并使细胞分散均匀。实验分为感染 Ad-Cyr61 实验组、感染 Ad-RFP 对照组和空白组。每组设 3 个复孔,置 37 ℃、5% CO_2 的培养箱中,静止培养 14 d 至 6 孔板出现肉眼可见的克隆。磷酸盐缓冲液(PBS)小心洗涤细胞 2 次,甲醇固定 5 min,HE 染色 15 min,去离子水冲洗,37 ℃干燥。倒置显微镜下观察其克隆数大于 50 个细胞计为 1 个克隆,并根据克隆形成率 = (克隆数/接种细胞数)×100%,计算克隆形成率。

1.2.7　划痕愈合实验测定 HepG2 迁移能力　HepG2 细胞 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板,分组实验处理:感染 Ad-Cyr61 实验组、感染 Ad-RFP 对照组和空白组。每组分 3 个复孔,20 h 后观察荧光表达,用无菌牙签划痕,且用 5 ml 注射器枪头划破 6 孔板作为标记。于显微镜下观察划痕宽度的变化,并于划痕后 0、24、36、48 h 分别以荧光和倒置相差显微镜观察并拍照。且用 NIS-Elements 图像分析系统,沿标记处每间隔固定距离测量每 1 个点垂直于划痕方向的宽度,计算 3 点的均值作为实验的划痕宽度值。按下述公式计算该划痕不同时间点的愈合速率。

愈合速率 = (初始划痕宽度值 − 相应点划痕宽度值)/初始划痕宽度值 ×100%

1.3　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行方差分析。

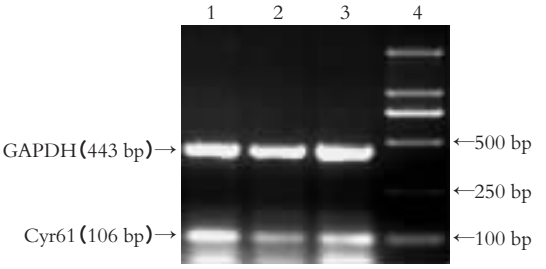
2　结果

2.1　细胞感染及病毒滴度测定

Ad-Cyr61、Ad-RFP 感染 HepG2 细胞 24 h 后倒置荧光显微镜观察均有较强荧光。表明获得了滴度较高的重组腺病毒,并且,两者的相对滴度为:Ad-Cyr61/Ad-RFP = 1/1。

2.2　RT-PCR 检测转基因细胞中 Ad-Cyr61 基因转录表达

转染 Cyr61 后,实验组 HepG2 细胞基因转录水平表达明显高于对照组,见图 1。Quantity One 定量分析 PCR 条带,计算 Cyr61 与 GAPDH 相对光密度的比值,感染 Ad-Cyr61 实验组(0.35)高于感染 Ad-RFP 对照组(0.23)。



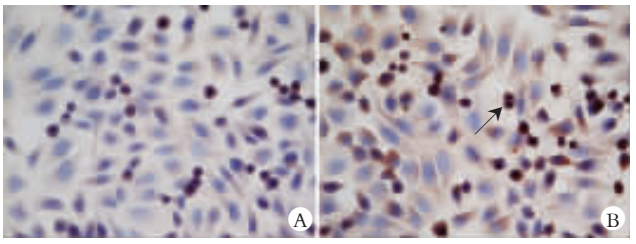
1:空白组;2:对照组;3:实验组;4:DNA 标准(DL 2000)

图 1　逆转录-聚合酶链反应检测细胞转染情况

2.3　免疫组化检测转基因细胞 Cyr61 蛋白表达的变化

在对照组转染 Ad-RFP HepG2 细胞质中可见 Cyr61 蛋白表达为弱阳性(图 2A);而实验组感染 Ad-Cyr61 HepG2 细胞浆中 Cyr61 蛋白的表达明显增强(图 2B),NIS-Elements 图像分析系统定量检测 Cyr61 的含量:$MD_{Ad\text{-}CCN}$ = (0.33 ± 0.01);$MD_{Ad\text{-}RFP}$

=(0.25±0.02)($P<0.05$)。实验组分裂期细胞明显增多,且Cyr61蛋白强阳性表达。



A:Ad-RFP对照组;B:Ad-Cyr61实验组 →:分裂相细胞

图2 Cyr61在Ad-RFP和Ad-Cyr61感染HepG2细胞中的表达 (S-P×400)

2.4 Cyr61对人肝癌细胞株HepG2增殖的影响

MTT实验显示:Ad-Cyr61感染的细胞增殖快于Ad-RFP感染的细胞(图3A),第1、2、3天实验组和对照组吸光度值相比,差异有统计学意义($P<0.05$)。台盼蓝活细胞染色计数结果显示转染病毒第2、3、4、5天,实验组的活细胞数量均高于对照组($P<0.05$,图3B)。

2.5 平板克隆形成实验

3组细胞在6孔板上生长14 d后,用倒置显微镜观察细胞克隆并计数,Ad-RFP处理的对照组所形成的细胞克隆多数较小(图4),数量明显少于Ad-Cyr61处理的实验组($P<0.01$,表1)。

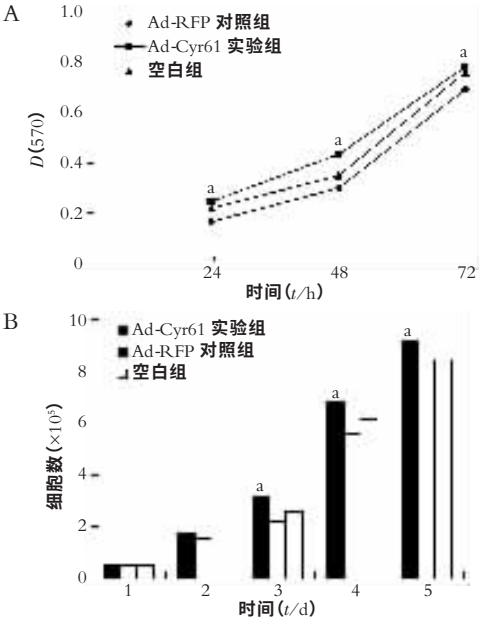
表1 Cyr61对人肝癌细胞株HepG2细胞集落形成的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	克隆形成数(个)	克隆形成率(%)
Ad-RFP对照组	311±33	31.1±3.3
Ad-Cyr61实验组	563±26[a]	56.3±2.6[a]
空白组	511±24	51.1±2.4

a:$P<0.01$,与Ad-RFP对照组比较

2.6 划痕愈合实验检测细胞迁移能力

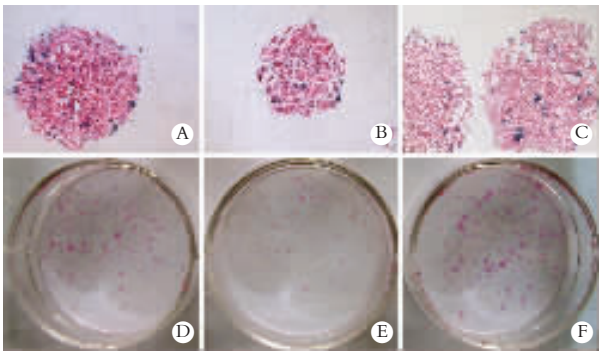
划痕48 h后,与Ad-RFP处理的细胞相比,Ad-Cyr61处理的细胞的细胞趋于愈合(图5)。且在24、36、48 h,实验组和对照组划痕愈合程度的差异均有统计学意义,见表2($P<0.01$)。



a:$P<0.05$,与Ad-RFP对照组比较

A:MTT法检测Cyr61对HepG2细胞生长的影响;B:台盼蓝染色计数转染Ad-Cyr61后各时间点HepG2活细胞数量

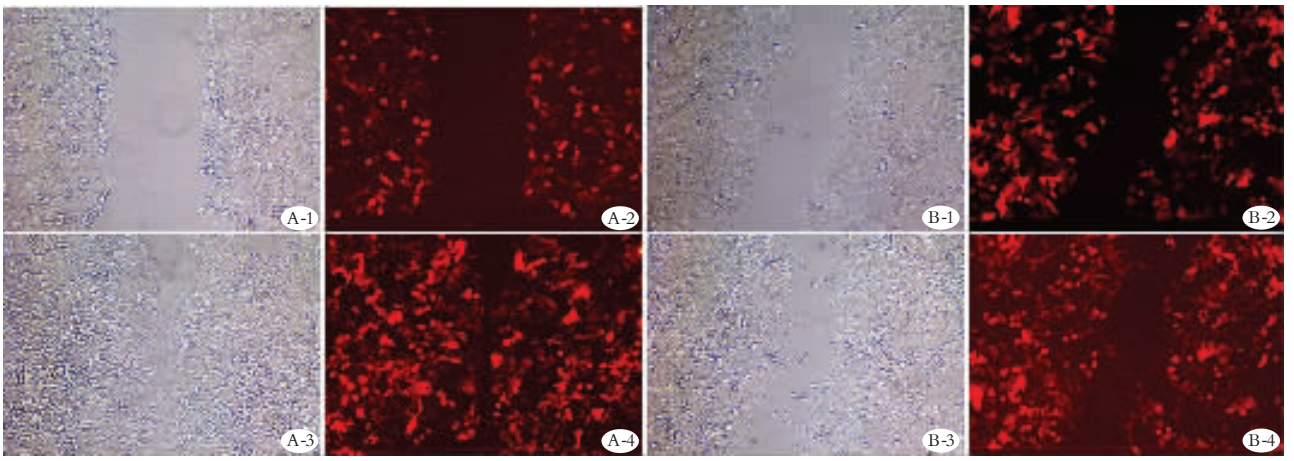
图3 Cyr61对人肝癌细胞株HepG2增殖的影响



A、D:Ad-Cyr61实验组;B、E:Ad-RFP对照组;C、F:空白组

A、B、C:倒置显微镜观察(HE×100);D、E、F:6孔板观察

图4 转染Ad-Cyr61、Ad-RFP HepG2细胞形成的克隆比较



A:Ad-Cyr61实验组;B:Ad-RFP对照组

A-1,A-2,B-1,B-2为0点的划痕情况;A-3,A-4,B-3,B-4为48 h后的划痕愈合情况;A-1,A-3,B-1,B-3为明场图片;A-2,A-4,B-2,B-4为相对应荧光图片

图5 Cyr61对人肝癌细胞株HepG2迁移的影响 (×100)

表 2　不同时间点 Cyr61 对 HepG2 细胞划痕愈合程度的影响[愈合速率(%), $\bar{x} \pm s$]

组别	24 h	36 h	48 h
Ad-Cyr61 实验组	54.86 ± 9.37[a]	79.83 ± 12.98[a]	92.75 ± 5.14[a]
Ad-RFP 对照组	17.85 ± 3.94	31.89 ± 9.38	38.05 ± 6.07
空白组	19.96 ± 1.40	35.96 ± 1.04	43.28 ± 2.09

a $P < 0.05$,与 Ad-RFP 对照组比较

3　讨论

Cyr61 在多种肿瘤的发生、发展过程中发挥不同作用。如 Cyr61 在乳腺癌、胃腺癌和神经胶质瘤等肿瘤中表达升高,而在子宫内膜癌、非小细胞肺癌等肿瘤中表达却降低[5-7]。体外实验也表明:在裸鼠的 MCF-7或 MCF-12A 细胞中过表达 Cyr61 可诱导细胞增殖和迁移,促进肿瘤发生和血管生成。在无内源性 Cyr61 表达的 NSCLC 细胞系 NCI2H520 和 H460 中转染 Cyr61 cDNA 表达的载体后克隆数比空载体转染的对照组低 60% ~90% ,显示 Cyr61 显著抑制 NSCLC 细胞的生长[7]。可见,Cyr61 在肿瘤发生、发展中发挥重要的作用,但其是肿瘤发生的促进因子还是抑制因子至今仍不清楚[8,9]。

肝细胞性细胞癌(HCC)是肝脏最常见的恶性肿瘤,其发生过程及侵袭转移是一个多步骤、多因素参与的复杂过程,多种因子在其过程中发挥重要作用。Cyr61 在肿瘤细胞的靶分子作用,使之成为早期诊断、分型和肿瘤治疗有前景的工具。Cyr61 如何在 HCC 中发挥生物学效应,发挥作用的具体机制尚没有明确的报道。

本实验采用 AdEasy 系统构建的标记基因 RFP 的重组腺病毒 Ad-Cyr61 感染人肝癌细胞株 HepG2。导入 Cyr61 基因,观察外源性 Cyr61 对 HepG2 细胞生长的影响。MTT 结果显示:感染 Ad-Cyr61 24、48、72 h 后,与感染 Ad-RFP 对照组相比,HepG2 细胞数量明显增多($P < 0.05$),而细胞计数的结果与 MTT 实验结果一致。克隆形成实验显示:实验组 HepG2 细胞形成的克隆数明显高于对照组($P < 0.01$)。因此,本实验提示 Cyr61 在 HCC 的形成过程中发挥重要的作用并可以促进肝癌细胞的生长。

另外,我们通过划痕愈合实验证实外源性的 Cyr61 可以促进 HepG2 细胞划痕的愈合,提示 Cyr61 促进了 HCC 的侵袭转移,为肿瘤的进一步生长恶化提供了必要的条件。并且,有动物实验已证实:Cyr61 可以促进大鼠角膜血管内皮细胞的迁移和诱导新生血管生成,而且细胞迁移是 Cyr61 直接诱导的血管生成的唯一过程,Cyr61 的直接作用可能作用于新生血管化的全过程[10]。因此,我们的实验结果也提示:Cyr61 对 HCC 的侵袭转移的促进可能是由于 Cyr61 对肿瘤血管生成的诱导。也可能由于肿瘤血管生成的增多增加了肿瘤侵袭转移的机会。总之,Cyr61 作为细胞信号传导通路下游的一个重要角色,与多种细胞因子作用,参与了 HCC 发生发展的不同环节,并在 HCC 的生长、侵袭转移、血管生成等过程中均发挥重要的作用。Cyr61 作为细胞信号转导通路下游的一个重要角色,可能成为未来肿瘤药物治疗中的重要靶点。Cyr61 可能是一种早期诊断、分型和肿瘤治疗的潜在靶基因,因此在肿瘤组织或体液中 Cyr61 的蛋白浓度测定可能有助于诊断与治疗。该实验为进一步研究 Cyr61 在 HCC 的发生、发展中的作用及其机制奠定了基础。但 Cyr61 在 HCC 中的具体作用机制尚不清楚,Cyr61 的信号传导通路和表达调控有待进一步研究。

参考文献:

[1] Mo F E, Muntean A G, Chen C C, *et al*. CYR61 (CCN1) is essential for placental development and vascular integrity [J]. Mol Cell Biol, 2002, 22(24): 8709 - 8720.

[2] Zhou D, Herrick D J, Rosenbloom J, *et al*. Cyr61 mediates the expression of VEGF, alphav integrin, and alpha-actin genes through cytoskeletally based mechanotransduction mechanisms in bladder smooth muscle cells[J]. J Appl Physiol, 2005, 98(6): 2344 - 2354.

[3] Brigstock D R. Regulation of angiogenesis and endothelial cell function by connective tissue growth factor (CTGF) and cysteine-rich 61 (CYR61)[J]. Angiogensis, 2002, 5(3): 153 - 165.

[4] 司维柯,何通川. 过表达外源性 CCN1 对人骨肉瘤细胞系 143B 生长和迁移的影响[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2006, 22(7): 565 - 570.

[5] Xie D, Yin D, Tong X, *et al*. Cyr61 is overexpressed in gliomas and involved in integrin-linked kinase-mediated Akt and beta-catenin-TCF/Lef signaling pathways[J]. Cancer Res, 2004, 64(6): 1987 - 1996.

[6] Chien W, Kumagai T, Miller C W, *et al*. Cyr61 suppresses growth of human endometrial cancer cells[J]. J Biol Chem, 2004, 279(51): 53087 - 53096.

[7] Tong X, O 'Kelly J, Xie D, *et al*. Cyr61 suppresses the growth of non-small-cell lung cancer cells *via* the beta-catenin-c-myc-p53 pathway [J]. Oncogene, 2004, 23 (28): 4847 - 4855.

[8] Wang B, Ren J, Ooi L L, *et al*. Dinucleotide repeats negatively modulate the promoter activity of Cyr61 and is unstable in hepatocellular carcinoma patients[J]. Oncogene, 2005, 24 (24): 3999 - 4008.

[9] Zeng Z J, Yang L Y. Expressions of cysteine-rich61, connective tissue growth factor and Nov genes in hepatocellular carcinoma and their clinical significance[J]. World J Gastroenterol, 2004, 10(23): 3414 - 3418.

[10] Chen C C, Mo F E, Lau L F. The angiogenic factor Cyr61 activates a genetic program for wound healing in human skin fibroblasts[J]. J Biol Chem, 2001, 276(50): 47329 - 47337.

(编辑　邓强庭)