基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0136-05

# p115和MIF在肝癌细胞和正常肝细胞的表达情况

文 雪,易永芬,邓 玮,闫田静,屈玉玲
(重庆医科大学基础医学院病理学教研室、分子医学与肿瘤研究中心,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究人肝癌低分化SMCC-7721细胞株,高分化HepG2细胞株和人正常肝细胞株LO2的高尔基体转运蛋白p115和巨噬细胞移动抑制因子(Macrophage migration inhibitory factor,MIF)的表达情况。方法:采用RT-PCR方法检测3组细胞株中p115和MIF的mRNA表达水平。用Western blot方法 和 细胞免疫组化方法检测3组细胞株中p115和MIF的蛋白表达情况。结果:SMCC-7721,HepG2的p115和MIF mRNA表达和蛋白表达水平明显增加且SMCC-7721表达更强, 与对照组正常肝细胞株LO2的表达量比较有显著差异($P<0.05$);细胞免疫组化方法结果显示:SMCC-7721,HepG2中p115在主要位于除高尔基体外的细胞质中,但在细胞质中HepG2着色相对较淡,而LO2中位于细胞核旁的高尔基体上。MIF主要分布于细胞质中,其在SMCC-7721、HepG2、LO2 3组细胞表达量呈明显减弱,统计学有显著差异($P<0.05$)。结论:p115和MIF的含量在SMCC-7721、HepG2、LO2 3组细胞株中呈递减性变化。说明随着细胞恶性程度增加,p115和MIF表达增高,提示二者可能与肿瘤细胞的异常分化有关。

【关键词】高尔基体转运蛋白p115;巨噬细胞移动抑制因子;SMCC-7721;HepG2;LO2
【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-09-19

# A comparative study of p115 and MIF in different hepatocellular carcinoma cell lines and a normal human hepatic cell line

*WEN Xue, et al*
(*Department of Pathology, College of Basic Medicine, Molecular Medicine and Cancer Research Center, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective:* To observe and compare the expressions and cellular distributions of p115 and MIF in a normal human hepatic cell line (LO2) and different hepatocellular carcinoma cell lines(SMCC-7721, HepG2). *Methods:* The expressions of p115 and MIF proteins were measured using Western blot analysis.The mRNA levels of p115 and MIF were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). p115 and MIF expressions were further studied with immunocytochemistry techniques. *Results:* The results of RT-PCR and Western blot showed that the expressions of p115 and MIF of control group (LO2) were obviously weaker than that of those HepG2 and SMCC-7721;furthermore, in HepG2 the expressions were weaker than in SMCC-7721. The results of immunohistochemical cell staining of the p115 showed that yellow or brown granules were located in the cytoplasm in different hepatocellular carcinoma cells (SMCC-7721, HepG2), but in LO2 cells most of them were located on the Golgi complex.The cell staining for MIF was located in the cytoplasm of the normal hepatic cell line and in the different hepatocelluar carcinoma cells. Moreover, The expression of MIF in LO2 was weaker than that of HepG2, and that of HepG2 was weaker than that of SMCC-7721. *Conclusion:* The expressions of p115 and MIF in different hepatocellular carcinoma cells are dramatically higher than those in the normal human hepatic cell line, and p115 and MIF are strongly expressed in the SMCC-7721 cell line.The expressions and distributions of p115 and MIF are related to the stage of differentiation of cancer cells.

【Key words】p115;MIF;SMCC-7721;HepG2;LO2

高尔基体转运蛋白p115是位于高尔基体上的一个参与运输和保持高尔基体细胞结构稳定的重要蛋白。最新研究报道,在炎症的刺激下,单核细胞和巨噬细胞中高尔基体上的p115能游离到细胞质中将其中的巨噬细胞移动抑制因子(Macrophage migration inhibitory factor,MIF)运输到细胞膜上特异性的受体上,从而使得MIF在细胞内重新分布[1]。后者是一种独特的促进肿瘤发生的分泌因子,可影响细胞的增殖和癌基因诱导的恶变,还通过调节机体的免疫应答和促进肿瘤侵袭迁移,血管的生成等促进肿瘤的发生和演变,但是在

作者介绍:文 雪(1985-),女,硕士,研究方向:消化道肿瘤病理。
通信作者:易永芬,女,教授,Email:yiyongfen1953@yahoo.com.cn。
基金项目:国家自然科学基金资助项目(编号:30672431);教育部博士点基金(编号:20060631006)。

肝癌细胞中p115的表达情况与MIF的关系以及p115表达水平的变化是否影响MIF的分泌和表达的变化，这些研究在国内外鲜见报道。本研究采用RT-PCR，Western blot 和细胞疫组化的方法检测正常肝细胞株和几株肝癌细胞株的p115和MIF 表达水平，讨论p115和MIF 在肝癌细胞株和正常细胞株的表达情况。

## 1 材料与方法

### 1.1 细胞株

人肝癌细胞株HepG2，SMCC-7721和人正常肝细胞株LO2均由重庆医科大学病理教研室提供。

### 1.2 试剂及材料

RT-PCR试剂盒购自Takara公司。RT-PCR引物由重庆升博公司合成。抗人p115抗体，抗人MIF抗体购自Santa cruz公司。抗人β-actin抗体购自博士德生物工程有限公司。蛋白裂解液购自碧云天生物技术公司，BCA蛋白定量试剂盒由重庆医科大学药学院赠送。PVDF膜(0.22 μm，0.45 μm)购自Millipore公司。化学发光检测试剂盒购自天根生物技术有限公司。HRP标记的羊抗兔IgG，DAB均购自北京中杉金桥生物技术有限公司。

### 1.3 RT-PCR

将处于对数生长期的 LO2、HepG2、SMCC-7721 的细胞分别用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基，于 37℃，5%$CO_2$ 的培养箱中培养至 $10^6$ 个/ml 。用 Trizol 方法分别提取各组细胞总 RNA，电泳检测 mRNA 的完整性，紫外分光光度计检验纯度并定量。RT-PCR 反应按照试剂盒说明书进行操作。p115 反应条件：PCR 反应：94℃ 30 s 64℃ 30 s，72℃ 1.5 min，共进行 33 个循环。内参反应条件：PCR 反应：94℃ 30 s，60℃ 30 s，72℃ 1.5 min，共进行 33 个循环。MIF 反应条件：PCR 反应：94℃ 30 s 60℃ 30 s，72℃ 1.5 min，共进行 33 个循环。PCR 引物见表 1。PCR 产物经 1.5%~2%琼脂糖凝胶电泳检测并用 Bio-Rad 凝胶成像仪摄取凝胶图像，再用 Quantity One 进行半定量分析。

表 1 PCR 引物

| 基因名称 | 正向引物 | 反向引物 | 产物大小 |
|---|---|---|---|
| p115 | 5'-AACCTGGTGGCTGAACGGCAAG-3' | 5'-AGAAGCTTCACACCAGGCCAGC-3' | 459 bp |
| MIF | 5'-CGGGTTCCTCTCCGAGCTCACC-3' | 5'-TGATGTAGACCCTGTCCGGGCTGA-3' | 242 bp |
| β-actin | 5'-GACCCAGATCATGTTTGAGACC-3' | 5'-GCCAGGATAGAGCCACCAAT-3' | 684 bp |

### 1.4 Western blot

将处于对数生长期的 LO2、HepG2、SMCC-7721 的细胞分别放于用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基，于 37℃，5%$CO_2$ 的培养箱中培养至 $10^6$ 个/ml。按细胞裂解液试剂盒说明书提取各组总蛋白。BCA 法测蛋白浓度，8%和 12%SDS-PAGE 凝胶电泳，转膜并封闭非特异性结合位点之后，分别用p115、MIF、和 β-actin 的一抗孵育(抗体稀释浓度分别为 1:1 000、1:500、1:1 000)，4℃冰箱过夜；TBST 洗膜 3 次，每次 5 min 后加二抗(1:1 000)37℃孵育 2 h，用 TBST 洗膜 3 次，每次 10 min 后，ECL 化学发光显色，由 Bio-Rad 凝胶成像仪摄取凝胶图像，再用 Quantity One 测定其结果的面积及灰密度值。每项实验重复 3 次。

### 1.5 细胞爬片制备及细胞免疫化学

收集对数生长期的各组细胞用 0.25%的胰酶消化，加含 10%小牛血清的 RMPI1640 培养液终止消化，轻轻吹打混匀。以细胞密度为的 $10^6$ 个/ml 的细胞每孔 500 μl 接种于 24 孔板中培养，待细胞刚刚长满单层，用移液器吸尽培养基，然后滴加 4%多聚甲醛固定约 20 min，倾液，用 PBS 洗涤 3×5 min。然后用 3%$H_2O_2$ 孵育 15 min 以去除内源性过氧化物酶活性；正常羊血清孵育 15 min 去除非特异性结合物质；兔抗人MIF，鼠抗人 p115 抗体(1:50)，4℃孵育过夜。次日，用生物素标记的羊抗兔 IgG 兔抗鼠 IgG37℃孵育 30 min；辣根酶标记链酶卵白素工作液孵育 15~25 min；最后加入适量的 DAB 底物显色，快速用苏木精复染胞核后用清水冲洗。NIKON TE2000-U 型倒置显微镜 200 倍下观察其分布情况。按 S-P 法的操作步骤，利用 Image-Pro Plus 6.0 图像分析测量并分析各组肝细胞中 p115 和 MIF 蛋白表达的光密度均值 = 累计光密度值/总面积。

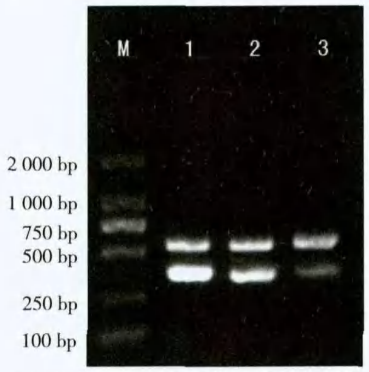
### 1.6 统计学处理

实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，采用 SPSS 17.0统计软件进行单因素方差分析；样本均数两两比较采用 SNK-$q$ 检验方法，$P<0.05$ 说明有统计学意义。

## 2 结 果

### 2.1 SMCC-7721，HepG2，LO2 的 p115，MIF 检测 mRNA 表达

p115 和 MIF mRNA 表达(见图 1)。LO2，HepG2 和 SMCC-7721 细胞组的 p115 mRNA 的表达水平均无显著性差异($F=0.230$，$P>0.05$)，其中 SMCC-7721 vs LO2 $P=0.002$，HepG2 vs LO2 $P=0.018$，SMCC-7721 vs HepG2 $P=0.001$，$P$ 值均 <0.05；LO2，HepG2 和 SMCC-7721 细胞组的 MIF mRNA 的表达水平均无显著性差异($F=0.664$，$P>0.05$)，其中 SMCC-7721 vs LO2 $P=0.035$，HepG2 vs LO2 $P=0.007$，SMCC-7721 vs HepG2 $P=0.013$，$P$ 值均 <0.05；与 LO2 细胞组相比，HepG2 和 SMCC-7721




M. DNA marker DL 2 000; 1. SMCC-7721 细胞组;
2. HepG2 细胞组; 3. LO2 细胞组

图 1 RT-PCR 检测 p115 的 mRNA 表达水平

表 2 p115 和 MIFmRNA 表达水平

| | SMCC-7721 | HepG2 | LO2 |
|---|---|---|---|
| p115 | 0.801 ± 0.02*# | 0.678 ± 0.01* | 0.417 ± 0.04 |
| MIF | 0.863 ± 0.02*# | 0.674 ± 0.01* | 0.414 ± 0.01 |

注:与 LO2 细胞组比较,*$P$<0.05;与 HepG2 细胞组比较,#$P$<0.05

细胞组 p115 和 MIF mRNA 的表达水平明显升高,且出现逐渐递增性;SMCC-7721 和 HepG2 细胞组相比,SMCC-7721 细胞组 p115 和 MIF mRNA 的表达水平明显升高(见表 2),提示 p115 和 MIF 在低分化细胞中高表达;p115 和 MIF 和细胞的分化有关。

2.2 LO2、HepG2、SMCC-7721 细胞的 MIF、p115 蛋白表达情况

p115 和 MIF 蛋白表达(见图 2)。LO2、HepG2 和 SMCC-7721 细胞组的 p115 蛋白的表达水平均无显著性差异($F$=0.558,$P$>0.05),其中 SMCC-7721 vs LO2,$P$=0.037,HepG2 vs LO2,$P$=0.008,SMCC-7721 vs HepG2,$P$=0.015,$P$ 值均 <0.05;LO2、HepG2 和 SMCC-7721 细胞组的 MIF 蛋白的表达水平均无显著性差异($F$=0.632,$P$>0.05),其中 SMCC-7721 vs LO2,$P$=0.029,HepG2 vs LO2,$P$=0.006,SMCC-7721 vs HepG2,$P$= 0.003,$P$ 值均 <0.05;与 LO2 细胞组相比,HepG2 和 SMCC-7721 细胞组 p115 和 MIF 的蛋白表达水平明显升高,且出现逐渐递增性。SMCC-7721 和 HepG2 细胞组相比,SMCC-7721 细胞组 p115 和 MIF 蛋白的表达水平明显升高(见表 3)。

表 3 p115 和 MIF 蛋白表达水平

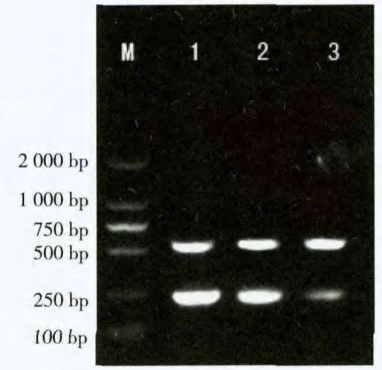
| | SMCC-7721 | HepG2 | LO2 |
|---|---|---|---|
| p115 | 0.863 ± 0.02*# | 0.697 ± 0.03* | 0.425 ± 0.01 |
| MIF | 0.849 ± 0.01*# | 0.683 ± 0.02* | 0.429 ± 0.01 |

注:与 LO2 细胞组比较,*$P$ <0.05;与 HepG2 细胞组比较,#$P$ <0.05

表 4 p115 和 MIF 蛋白表达水平

| | SMCC-7721 | HepG2 | LO2 |
|---|---|---|---|
| p115 | 0.752 ± 0.03*# | 0.461 ± 0.03* | 0.285 ± 0.02 |
| MIF | 0.802 ± 0.01*# | 0.554 ± 0.02* | 0.419 ± 0.01 |

注:与 LO2 细胞组比较,*$P$<0.05;与 HepG2 细胞组比较,#$P$<0.05




M. DNA marker DL 2 000; 1. SMCC-7721 细胞组;
2. HepG2 细胞组; 3. LO2 细胞组

图 2 RT-PCR 检测 MIF 的 mRNA 表达水平

2.3 免疫细胞化学观察 MIF,p115 的表达情况

p115 和 MIF 蛋白表达(见图 3)利用 Image Pro Plus 软件分别在 3 组细胞中分别随机选取 15 个不同视野进行半定量分析(见表 4),检测结果显示 LO2、HepG2 和 SMCC-7721 细胞组的 p115 蛋白的表达水平均无显著性差异($F$=0.952,$P$>0.05),其中 SMCC-7721 vs LO2,$P$=0.005, HepG2 vs LO2,$P$=0.026, SMCC-7721 vs HepG2,$P$=0.001,$P$ 值均 <0.05;LO2、HepG2 和 SMCC-7721 细胞组的 MIF 蛋白的表达水平均无显著性差异($F$=0.701,$P$>0.05),其中 SMCC-7721 vs LO2 $P$=0.037,HepG2 vs LO2,$P$=0.009,SMCC-7721 vs HepG2,$P$=0.021,$P$ 值均 <0.05;LO2 细胞组其表达明显低于 SMCC-7721 细胞组和 HepG2 细胞组,SMCC-7721 细胞组和 HepG2 细胞组相比 p115 和 MIF 的平均光密度值差别具有统计学意义($P$<0.05),这与 Western blot 结果一致。

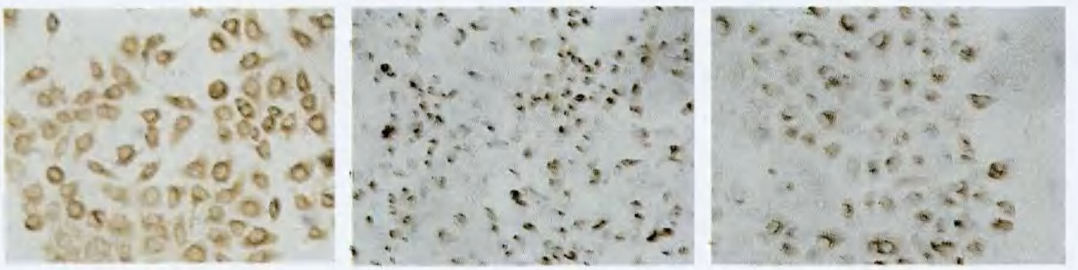
## 3 讨 论

肝脏作为一个重要的分泌腺体,其与高尔基体的关系比较密切。高尔基体在加工、转运、分泌蛋白中发挥着重要的作用,而且,还与细胞有丝分裂[2],凋亡[3]有关。当高尔基体蛋白表达异常时,肝脏的功能将会受到很大影响。高尔基体囊泡运输蛋白 p115 主要定位于高尔基体顺面,少数弥散在细胞质的



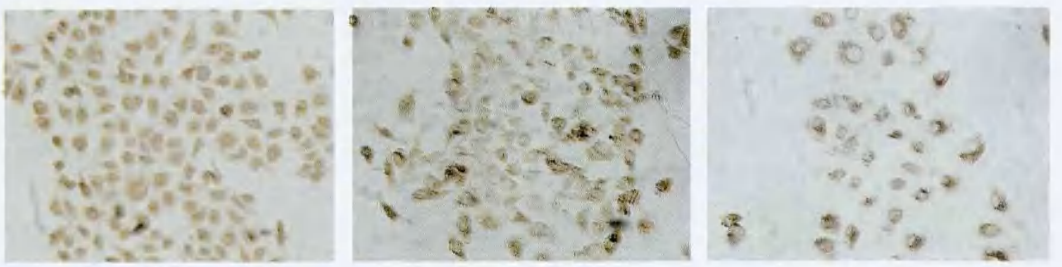

1. SMCC-7721 细胞组; 2. HepG2 细胞组;
3. LO2 细胞组

图 3 Western blot 检测 p115 和 MIF 的蛋白表达水平



SMCC-7721 cells　　HepG2 cells　　LO2 cells

图 4 免疫细胞化学检测 p115 表达( ×200 DAB 染色)



SMCC-7721 cells　　HepG2 cells　　LO2 cells

图 5 免疫细胞化学检测 MIF 表达( ×200 DAB 染色)

其他部位。它具有运输细胞内的蛋白和稳定高尔基体结构这 2 大功能[4],p115 作为转运细胞蛋白,研究发现在胰岛素水平发生变化时 p115 能与 IRAP 蛋白结合,形成的复合物能与葡萄糖转运蛋白 4(Glucose transporter type 4,GLUT4)结合,使得 GLUT4 在细胞内的空间位置发生改变从而降低血糖[5]。这说明 p115 作为转运蛋白可以调节细胞内蛋白的空间位置。p115 作为稳定高尔基体的结构一个重要蛋白,当 p115 从高尔基体上脱落下来时,高尔基体将会处于不稳定状态[6]。有学者研究发现,随着肿瘤恶性程度的增加,高尔基体的形态将会越不稳定,这提示肿瘤的恶性程度可能和 p115 相关。最新报道,在宫颈癌 Hela 细胞株中,高尔基体上的蛋白 p115 在 caspases 3 和 caspases 8 刺激下发生断裂,断裂的 p115 的 C-末端能将信号传递到细胞核从而进一步有效引起细胞的凋亡[3]。这提示高尔基体蛋白 p115 和肿瘤细胞发生相关。文献报道,p115 在前列腺癌,Hela 等细胞中都有表达[1]。但是 p115 在肝癌细胞中的作用以及表达情况至今尚未见文献报道。

Richard bucala 等[1]人在单核细胞,巨噬细胞中发现高尔基体蛋白 p115 和 MIF 都有表达,且在细胞质中 p115 能够调节 MIF 的分泌。在炎症刺激下,单核细胞中 p115 能从高尔基体上移位到细胞质其他部位, 游离的 p115 可与细胞质中的 MIF 因子结合,可将 MIF 转运到细胞膜上与其特异的 CD74,CD44 受体结合;也可刺激 MIF 的分泌,使得上清液中的p115 和 MIF 含量增加。当 p115 的含量减少时,MIF 的分泌也随之降低。p115 的这种位置变化可以产生一系列的级联反应,从而引起细胞内的信号传导。在前列腺癌中免疫共沉淀结果也显示高尔基体上的蛋白 p115 的 C- 末端与 MIF 相连[7],这表明前列腺癌细胞中 p115 和 MIF 相关。以上研究提示:p115 和 MIF 不仅在炎症中相关而且在肿瘤细胞中也相关。MIF 作为一种独特的细胞分泌因子,不仅可以参与调节炎症反应以及机体免疫调节反应,而且 MIF 还在多种肿瘤细胞,癌前病变中都过表达,从而促进肿瘤的发生和发展[8]。MIF 与消化系肿瘤关系特别密切,特别是肝癌,可增强肝癌细胞株 HepG2 表达肝细胞生长因子,间接促进肝癌细胞增殖,侵袭和转移,还可促进 VEGF、IL-8、P53 等因子的分泌, 从而影响肝癌细胞的血管生成,凋亡[9,10]。

p115 在肝细胞和不同分化肝癌细胞中是否表达及其表达情况是否影响 MIF 的表达和分泌,基于 Richard bucala 等[1]人在炎症细胞和前列腺癌细胞中的研究,本实验利用 Western blot,RT-PCR 的方法研究在肝细胞株 LO2,高分化肝癌细胞株 HepG2,低分化肝癌细胞株 SMCC-7721 中 p115 和 MIF 的蛋白和 mRNA 表达情况,结果发现:在低分化的肝癌细胞株和在高分化肝癌细胞株表达较正常肝细胞株明显增高,统计学有显著差异($P<0.05$);而且低分化较高分化表达更高,统计学有显著意义($P<0.05$)。细胞免疫组化结果与 Western blot,RT-PCR 结果相一致,而且 p115 和 MIF 在不同分化肝癌细胞中的表达呈正相关,这提示 p115 在不同分化肝癌细胞株中表达水平的变化有可能会影响细胞质中 MIF 表达情况。当 p115 作为高尔基体上重要的转运蛋白,其在不同分化肝癌细胞中的表达情况可能会影响细胞质中 MIF 转运从而影响其分泌情况。在肿瘤细胞中其恶性程度越高,高尔基体形态越不稳定,p115 作为稳定高尔基体的重要蛋白,结合 Richard bucala 等[1]人在炎症细胞和前列腺癌细胞中的研究及本实验结果我们推测:肝癌分化越差,p115 表达越高,其与 MIF 的结合运输能力也增强,相应的促进了 MIF 的分泌。因此,p115 和 MIF 的表达增高在肝癌细胞增殖,肿瘤微血管形成和肿瘤细胞的侵袭浸润方面起着重要的作用。

通过对正常肝细胞株和不同分化肝癌细胞株中 p115 和 MIF 的表达情况初步研究，为我们进一步研究 p115 在肝癌细胞中的功能和其表达对 MIF 表达,分泌的影响研究奠定了基础。

## 参 考 文 献

[1] Merk M,Baugh J,Bernhagen J,et al. The Golgi-associated protein p115 mediates the secretion of macrophage migration inhibitory factor[J]. J Immunol,2009,182(11):6896-6906.

[2] Rabouille C,Jokitalo E. Golgi apparatus partitioning during cell division[J]. Mol. Membr Biol,2003,20(2):117-127.

[3] Chiu R,Novikov L,Shields D,et al. A caspase cleavage fragment of p115 induces fragmentation of the Golgi apparatus and apoptosis[J]. J Cell Biol,2002,159(4):637-648.

[4] An Y,Chen C Y,Moyer B,et al. Structural and functional analysis of the globular head domain of p115 provides insight into membrane tethering[J]. J Mol Biol,2009,391(1):26-41.

[5] Hosaka T,Presman E,Sztul E,et al. p115 Interacts with the GLUT4 vesicle protein,IRAP,and plays a critical role in insulin- stimulated GLUT4 translocation[J].Mol Biol Cell,2005,16(6):2882- 2890.

[6] Nakamura N.Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions[J]. J Pharmacol Sci,2010,112(3):255-264.

[7] Barrilleaux B L,Fischer-Valuck B W,Gilliam J K,et al. Activation of CD74 inhibits migration of human mesenchymal stem cells[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim,2010,46(6):566-572.

[8] Verjans E,Noetzel E,Bernhagen J,et al. Dual role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human breast cancer[J]. BMC Cancer,2009,9(14):230.

[9] Ren Y,Tsui H T,Poon R T,et al. Macrophage migration inhibitory factor: roles in regulating tumor cell migration and expression of angiogenic factors in hepatocellular carcinoma[J]. Int J Cancer,2003,107(1):22-29.

[10] Yu X,Lin S G,Huang X R,et al. Macrophage migration inhibitory factor induces MMP-9 expression in macrophages via the MEK-ERK MAP kinase pathway[J].J Interferon Cytokine Res,2007,27(2):103-109.

(责任编辑:冉明会)

# 志 谢

庚寅岁末,喜获新闻出版总署批准,《医学教育探索》于 2011 年 1 月正式成为中华医学会系列杂志之一,并更名为《中华医学教育探索杂志》(CN 11-6021/R)。

2002 年创刊以来,《医学教育探索》一直关注医学模式转变、卫生体制改革以及医学教育国际化、本土化的发展趋势。连续多年被重庆市新闻出版局、重庆科技期刊协会评为一级期刊。2008 年《医学教育探索》被中国科技论文统计源(中国科技核心期刊)收录。2010 年《医学教育探索》被波兰哥白尼索引(IC)、西太平洋地区医学索引(WPRIM)、美国《乌利希期刊指南》(UPD)等多种国际重要数据库收录。

《中华医学教育探索杂志》创刊号将于 2011 年 1 月正式出版,卷期延续,常设栏目包括:教育前沿、比较教育、教学改革、临床教学、精品课程建设、现代教育技术、国外医学教育、研究生教育、医学英语、医事法学、医学与社会、职业医师培训、临床决策论坛、调查研究等。

值此创刊之际,对广大读者和作者对我刊的关心与支持致以诚挚的谢意,并热烈欢迎广大的医学教育工作者赐稿、订阅。

通信地址:重庆市渝中区医学院路 1 号重庆医科大学 385 信箱
中华医学教育探索杂志编辑部,邮编:400016
电 话:023-68485014 传真:023-68485013
Email:zhyxjyts@126.com
http://zhyxjyts.cqmu.edu.cn