维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253 - 3626(2005)05 - 0633 - 03

抗人肝再生增强因子单克隆抗体对人肝癌细胞株 HepG2 增殖活性的影响

唐 琳[1], 孙 航[1], 张 林[2], 郭 晖[1], 陈雪华[1], 邓建川[1], 刘 杞[1]

(1. 重庆医科大学病毒性肝炎研究所,教育部感染性疾病分子生物学重点实验室,重庆 400010;
2. 四川省医学科学院 - 四川省人民医院感染科,成都 610072)

【摘 要】目的:检测人肝癌细胞株 HepG2 细胞有无人肝再生增强因子(hALR)的表达,利用 hALR 特异性的单克隆抗体(anti - hALR McAb)结合 hALR,观察其阻断 hALR 的作用后,对人肝癌细胞株 HepG2 细胞的增殖活性的影响。方法:用免疫细胞化学以及 RT - PCR 的方法检测 HepG2 细胞 hALR 蛋白及 mRNA 的表达;用 ^3H - TdR 掺入法检测 hALR 特异性单克隆抗体中和 hALR 后 HepG2 细胞的增殖情况。结果:①HepG2 细胞有 hALR 的表达。②抗 hALR 单克隆抗体特异性地阻断 hALR 的作用后可部分抑制肿瘤细胞自主性生长。结论:抗 hALR 单克隆抗体能部分抑制肿瘤细胞自主性生长;hALR 通过自分泌方式参与了肝癌细胞的自主性生长。

【关键词】人肝再生增强因子;单克隆抗体;肝癌;细胞株
【中国图书分类法分类号】R392,R575 【文献标识码】A 【收稿日期】2005 - 02 - 22

Effects of anti - human augmenter of liver regeneration monoclonal antibody on proliferation of HepG2 cells in vitro

TANG Lin, et al

(*Institute for Viral Hepatitis, the Key Laboratory of Molecular Biology for Infectious Disease of Ministry of Education, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To detect the existence of expression of human augmenter of liver regeneration (hALR) in HepG2 cells, and to observe proliferation of HepG2 cells after neutralizing hALR with anti - hALR McAb. *Methods*: the expression of hALR in HepG2 cells was observed immunocytochemistry and reverse transcriptive PCR(RT - PCR). Proliferation of HepG2 cells after neutralization was detected by ^3H - TdR incorporation approach. *Results*: ① hALR was expressed by HepG2 cells. ② Anti - hALR McAb inhibited partially the autonomous growth of HepG2 cells. *Conclusion*: Anti - hALR McAb inhibit the autonomous growth of hepatoma cells partially; moreover, hALR maintain the autonomous growth of hepatoma cells in vitro through autocrine mechanism.

【Key words】Human augmenter of liver regeneration; Monoclonal antibody; Hepatocellular carcinoma; Cell line

肝细胞再生增强因子(augmenter of liver regeneration, ALR)是一种促进肝细胞再生的细胞因子。我们前期研究发现 hALR 在体外能刺激肝癌细胞株 QGY 和 HepG2 增殖,并呈剂量依赖性,并发现 hALR 在人肝癌组织中有高表达[1,2]。目前已证实在肝癌细胞膜上存在肝再生增强因子特异性受体,肝癌细胞膜受体较原代肝细胞数目多、亲和力高[3]。据此推断 hALR 可能是一种自分泌生长因子,通过自分泌作用参与人肝癌的发生、发展过程。本研究旨在探讨人肝癌细胞株 HepG2 有 hALR 表达,并观察用抗 hALR 单克隆抗体阻断 hALR 后对 HepG2 细胞增殖的抑制作用,为进一步研究 hALR 在肝癌细胞生长过程中的生物学作用奠定基础。

作者介绍:唐 琳(1972 -),女,主治医师,博士研究生,主要研究方向:肝再生增强因子与肝癌

基金项目:国家自然科学基金(30170843),重庆市科委攻关项目(渝科发计字[2001]38 号文),重庆市自然科学基金(渝科发计字[2004]54 号文)。

1 材料和方法

1.1 材料

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.1.1 细胞 人肝癌细胞株 HepG2 由本实验室保存.

1.1.2 主要试剂 DNA maker 购于大连宝生物试剂有限公司,免疫组织化学试剂盒、苏木素及 DAB 显色试剂盒购于北京中杉试剂公司,总 RNA 提取试剂盒购于德国 Qiagen 公司,RT-PCR 试剂盒购于美国 Promega 公司,胎牛血清购于美国 HyClone 公司;^{3}H 胸腺嘧啶核苷(^{3}H-TdR)购于中国原子能研究所(1 mci/ml);抗 hALR 单克隆抗体、SP20 骨髓瘤细胞制备腹水为本所制备[4].

1.1.3 引物合成和测序 由华大基因-上海仙安生物科技有限公司完成。引物序列见正文.

1.2 方法

1.2.1 免疫细胞化学检测 HepG2 细胞 ALR 表达 用 10% 的胎牛血清培养的 HepG2 细胞,PBS 洗 2 次,胰酶消化,显微镜下计数,以 2.5×10^5/孔接种 6 孔板,培养终体积 2ml,培养 24h 后,PBS 洗 2 次,4% 多聚甲醛固定,PBS 洗 3 次,按过氧化物酶标记的链霉卵白素染色试剂盒说明书进行染色,一抗为 1∶500 抗 hALR 单克隆抗体,阴性对照一抗为 1∶500 SP20 骨髓瘤细胞制备腹水,DAB 显色,图像采集。

1.2.2 RT-PCR 检测 HepG2 细胞 ALR mRNA 的表达 按照总 RNA 提取试剂盒说明书提取 HepG2 细胞总 RNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 提取标本。然后取 5μl RNA 按 RT-PCR 试剂盒说明进行扩增,PCR 引物:hALR 上游:5′-ATGCGGACCCAGCAGAAGC-3′;下游:5′-CTTAGTCACAGGAGCCGTCCTT-3′;扩增产物大小为 379 bp。β-actin 上游:5′-CAAAGACCTGTACGCCAACA-3′;下游 5′ GAAGCATTTGCGGTGGACC-3′;扩增产物大小为 255 bp,β-actin 作为内参排除操作误差。反应总体积 50μl,反应条件为:48 ℃逆转录 45min,94 ℃ AMV RT 灭活和 RNA/cDNA/引物变性 2min,在以下参数下进行 PCR 反应:94 ℃变性 30s,60 ℃退火 1min,68 ℃延伸 2min,40 次循环后行 68 ℃延伸 7min。取 PCR 反应产物 2μl 进行 2% 琼脂糖凝胶电泳鉴定。进行图像采集。

1.2.3 ^{3}H-TdR 掺入法检测细胞增殖

1.2.3.1 单克隆抗体作用 72h 将 4×10^5/孔 HepG2 细胞接种 96 孔培养板,种板同时分别加入终浓度为 1∶125、1∶250、1∶500、1∶1000 抗 hALR 单克隆抗体,每一抗体浓度设 3 个复孔;分别用终浓度为 1∶125、1∶250、1∶500、1∶1000SP20 骨髓瘤细胞制备腹水做阴性对照;同时设不加处理因素的空白对照。37℃,5%CO_2 培养,分别于种板 24h、48h 后换液,换液同时均按上述浓度加入抗 hALR 单克隆抗体及其阴性对照,60h 加 ^{3}H-TdR 1μ Ci/孔,继续培养 12 h,收集细胞至玻璃纤维滤膜,烘干,用液体闪烁计数仪测定 cpm 值。

1.2.3.2 统计学处理 计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,应用 SPSS12.0 软件包进行处理,两组间差异比较采用 t 检验

2 结 果

2.1 免疫细胞化学检测 HepG2 细胞 ALR 表达

HepG2 细胞有 ALR 表达,而以 SP20 骨髓瘤细胞制备腹水作为一抗的阴性对照 DAB 显色为阴性(图 1)

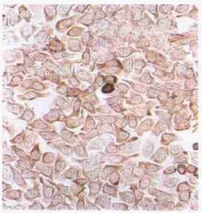


图 1A HepG2 细胞有 hALR 表达 × 200

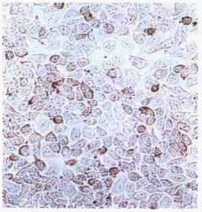


图 1B SP20 骨髓瘤细胞制备腹水作为一抗的阴性对照 DAB 显色为阴性 × 200

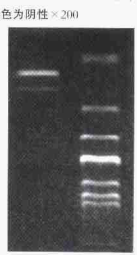


图 2 HepG2 细胞中 ALR mRNA 的表达

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 不同浓度抗 hALR 单克隆抗体对人肝癌细胞株 HepG2 细胞增殖的影响

单克隆抗体	浓度				空白对照
	1:125	1:250	1:500	1:1000	
抗 hALR 单克隆抗体组	176600±8127*	91900±18821#	150403±21757*	384838±6948	402256±17170
SP20 骨髓瘤细胞制备腹水组	208577±11501	197290±22062	326846±81409	395991±45671	

与相同浓度的 SP20 骨髓瘤细胞制备腹水组相比，*$P<0.05$，#$P<0.01$

2.2 RT-PCR 检测 HepG2 细胞 ALR mRNA 表达 HepG2 细胞有 ALR mRNA 表达(图 2)。

2.3 ^{3}H-TdR 掺入法检测细胞增殖

分别与相同浓度的 SP20 骨髓瘤细胞制备腹水比较，浓度为 1:125，1:250，1:500 的单克隆抗体，作用于 HepG2 细胞 72h 均能够部分抑制肿瘤细胞增殖，尤以抗 hALR 单克隆抗体浓度为 1:250 时抑制作用最强(表 1)。

3 讨 论

恶性肿瘤有别于正常细胞的主要生物学特征是无限制自主性生长和转移，这种无限制地自主性生长与自分泌生长刺激有关。癌细胞自分泌生长刺激可能由编码细胞因子的基因异常激活引起，也有可能由编码细胞因子受体的基因异常激活而产生；或者二者兼而有之。研究癌细胞的自分泌有助于分析癌细胞自分泌因子与正常细胞因子间的精确差异，不仅有助于致癌机理的认识，而且也为肿瘤病人的早期诊断和治疗提供新的理论依据。

目前已经发现在肝癌的发生、发展中，许多细胞因子发挥了重要的作用，但是仍有许多细胞因子在肝癌的发生、发展中的作用尚不清楚。因此，研究这些细胞因子在肝癌发生、发展中的作用，将会充实和完善人们对肝癌发生、发展机制的认识，为肝癌的防治开启新的思路。肝再生增强因子是 Hagiya 等[5]于 1994 年发现的一种非特异性、不同于 HGF 的促肝细胞再生因子。其具有促进肝脏再生[6]、抗肝纤维化[7,8]等作用。我们对人肝再生增强因子(ALR)的前期研究中发现：ALR 在体外能刺激肝癌细胞株 QGY 和 HepG2 增殖，并呈剂量依赖性，但对原代肝细胞却没有刺激增殖作用[1]。对正常成年大鼠肝组织和人肝癌组织进行免疫组化研究，发现前者组织中除个别散在的肝细胞有 ALR 表达外，绝大多数肝细胞不表达 ALR；而在后者却有较高的 ALR 表达[2]。并且已证实在肝癌细胞膜上存在肝再生增强因子特异性受体，肝癌细胞膜受体较原代肝细胞数目多、亲和力高[3]这些研究结果提示 ALR 在肝癌发生、发展过程中可能通过自分泌机制发挥了重要的作用。本实验在证实 HepG2 细胞有 hALR 表达。用抗 hALR 单克隆抗体能特异性地部分降低肝癌细胞 HepG2 的增殖活性，单克隆抗体浓度为 1:125，1:250，1:500 时，均能够部分抑制肿瘤细胞增殖，尤以浓度为 1:250 时抑制作用最强。证实在体外培养的肝癌细胞中 hALR 通过自分泌作用维持其自主性生长。但是 hALR 对肿瘤细胞增殖并未起到完全抑制作用，可能由以下原因所致：①hALR 在肿瘤细胞内产生后不仅释放到胞外刺激自身增殖；而且可能还存在不释放到胞外，在胞内刺激自身细胞增殖作用[9]。②hALR 仅是刺激肿瘤细胞增殖的细胞因子中的一种，还有很多其它的细胞因子在肿瘤细胞的生长过程中发挥着刺激增殖的作用。本实验证实了抗 hALR 单克隆抗体能够部分抑制肿瘤细胞增殖，为今后进一步研究 hALR 在肝癌发生、发展过程中的作用奠定基础。

参 考 文 献

[1] 余慧锋，刘 杞. 人肝再生增强因子在毕赤酵母菌 GS115 中表达和体外活性检测[J]. 中华肝脏病杂志，2003；11(7)：421-423.

[2] 孙 航，余慧锋，吴传新，等. 肝再生增强因子在肝癌细胞中的表达及意义[J]. 中华肝脏病杂志，2005；13(3)：204-207.

[3] 王 阁，冷恩仁. 人肝细胞生成素受体的确定及特性[J]. 第三军医大学学报，2001；23(9)：1051-1054.

[4] 马华锋，刘 杞. 重组人肝再生增强因子单克隆抗体的制备：以非纯化抗原筛选杂交瘤[J]. 中国免疫学杂志，2002；18(10)：671-673.

[5] Michio Hagiya, Antonio Francavilla, Lorenzo Polimeno, et al. Cloning and sequence analysis of the rat augmenter of liver regeneration(ALR) gene: Expression of biologically active recombinant ALR and demonstration of tissue distribution[J]. Proc. Natl. Acad. Sci, USA, 1994；91：8142-8181.

(下转第 643 页)

维普资讯 http://www.cqvip.com

胞的不可逆损伤标记，对判断选择性神经元损伤有一定价值。本研究发现，大鼠惊厥发作后，同时出现P53、bcl－2蛋白的表达增强，说明细胞凋亡及抗凋亡机制均被启动。成年鼠惊厥后，P53蛋白表达迅速增强，于惊厥后1h已显著增加，2h达到高峰，并维持较高水平直到惊厥后48～72h；与此相反，bcl－2蛋白的表达时间及程度均不及P53，说明成年鼠惊厥性脑损伤过程中，诱导凋亡的机制增强，使神经元过多地死亡，从而导致脑损伤。幼龄鼠的基因表达则呈相反变化，不仅bcl－2的表达持续时间较P53长，且其程度也较高，故以抗凋亡效应为主，从而减轻了细胞凋亡及迟发性脑损伤的严重程度。据认为[9,10]，P53和bcl－2基因之间存在某些功能上的联系。恶性肿瘤中，P53与bcl－2基因表达呈明显负相关。有人更认为[10]，bcl－2基因的转移和表达，可在一定程度上抑制由P53诱导的细胞凋亡；而另有些文献则推测P53可能作为细胞内源性bcl－2蛋白表达的负调控转录因子，下调bcl－2的表达并抑制其功能[9]，两者间的蛋白表达存在负反馈调节作用。本研究中，不同成熟期神经元P53、bcl－2蛋白呈明显相反性表达，究竟这是由于正常未成熟脑细胞中bcl－2含量丰富，受刺激后迅速高度表达，从而抑制了P53的功能？抑或是因成熟期神经元受兴奋毒刺激后，通过不同的反应机制，使P53、bcl－2表达存在相异的表达时序性？尚值得进一步深入研究。

尽管惊厥发作后致脑损伤的机制中尚涉及其他因素，但是本研究结果揭示：惊厥后不同发育期神经元中P53／bcl－2的表达程度和时间程序，是参与神经元对损伤的耐受性、遏制凋亡过程的重要因素。

参 考 文 献

[1] Moshe SL. Brain injury with prolonged seizures in children and adults[J]. J Child Neurol, 1998;13:3－6.

[2] 蒋 莉，蔡方成，张晓萍. 大鼠不同成熟期大脑对持续惊厥的耐受性[J]. 中华儿科杂志，2002;40:429－433.

[3] 蒋 莉，蔡方成，李 欣，等. 惊厥持续状态中大鼠脑内神经元死亡的年龄特征[J]. 中华儿科杂志，2002;40:545－549.

[4] Simle S, Hirsch E, Danober L. C－fos expression after single and kindle audiogenic seizure in Wistar rats[J]. Neurosci Lett, 1994;27:281－284.

[5] Hardwick MJ. Viral Encephalitis, in Cell Death and Disease of the Nervous System[M]. New Jersey: Humana Press, 1999;305－313.

[6] Hockenberg D. The role of bcl－2 in regulation of programmed cell death, Preceeding Annual Metting Amarian Association[J]. Cancer Res, 1992;33:585－588.

[7] 王焕明. P53基因与癫痫[J]. 国外医学神经病学与神经外科学分册，1999;26:6－9.

[8] Sakhi S, Sun N, Wing L, et al. Nuclear accumulation of P53 protein following kainic acid－induce seizures[J]. Neuroreport, 1996;7:493－496.

[9] Robert TS, Enrino M. Fifte Annual Pezcoller Symposium: Apoptosis[J]. Cancer Res, 1994;54:302－305.

[10] 成 军. 程序性细胞死亡与疾病[M]. 北京：北京医科大学及中国协和医科大学联合出版社，1997;62－73.

（上接第635页）

[6] 杨晓明，谢 玲，吴祖泽，等. 肝部分切除后人肝再生增强因子mRNA表达增强[J]. 生理学报，1997;49(5):599－601.

[7] 王爱民，杜双存，杨晓明，等. 重组人肝再生增强因子可逆转免疫损伤性肝纤维化[J]. 中国病理生理杂志，2000;16(4):298－300.

[8] 王爱民，杨晓明，郭瑞峰，等. 重组人肝再生增强因子对大鼠实验性肝纤维化的保护作用[J]. 中华医学杂志，1998;78(9):707.

[9] Lu C, Li Y, Zhao Y, et al. Intracrine hepatopoietin potentiates AP－1 activity through JAB1 independent of MAPK pathway[J]. FASEB J, 2002;16(1):90－92.