

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2012.02.007

Egr-1 对低氧应激下肝癌细胞 BEL-7402 黏附和迁移能力的影响

彭琬昕,孙瑶湘,龚爱华,金洁,邵根宝

Egr-1 Regulates Human Hepatocellular Carcinoma Cell Migration and Adhesion

Peng Wanxin, Sun Yaoliang, Gong Aihua, Jin Jie, Shao Genbao

School of Medical Science and Laboratory Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China

Abstract: Objective To investigate the effect of dominant negative mutation of Egr-1 expression on the adhesion and invasion in the human Hepatocellular carcinoma cell line BEL-7402. **Methods** Adenovirus of Egr-1 with dominant negative mutation was constructed and transfected the BEL-7402 cell line. Empty adenovirus-transfected and normal BEL-7402 were used as control groups. The influences of Egr-1 on cell migration and adhesion capacity were detected by cell scratch test and adhesion test. **Results** Transcription function competitive inhibition-type adenovirus of Egr-1 was successfully constructed and transfected into BEL-7402 cells. Compared with control BEL-7402 cells, both migration and adhesion of Ad-dnEgr-1/BEL-7402 cells were significantly lower ($P < 0.01$). Pseudopod structure related to cell migration and adhesion significantly reduced, and FAK phosphorylation levels decreased under hypoxic conditions. **Conclusion** Down-regulation of Egr-1 transcription function could inhibit the proliferation and invasive of BEL-7402 cells.

Key words: BEL-7402; Dominant negative; Adhesion; Migration

摘要:目的 探讨显性负性突变(dominant negative)抑制即刻早期蛋白 Egr-1 转录因子活性对低氧应激下肝癌 BEL-7402 细胞黏附和迁移能力的影响。**方法** 构建显性负性突变 Egr-1 腺病毒,感染 BEL-7402 细胞,同时以空载体和空白细胞做对照。“划痕”实验检测细胞迁移能力的变化;细胞与基质黏附实验,免疫荧光检测 Egr-1 对黏附能力的影响;Western blot 检测相关蛋白的改变。**结果** 成功构建获得 Egr-1 转录功能竞争抑制型稳定腺病毒,并感染 BEL-7402 细胞。与 BEL-7402 细胞比较,低氧状态下 Ad-dnEgr-1/BEL-7402 组细胞,迁移,黏附能力显著降低($P < 0.01$),细胞中与迁移、粘附相关的微丝所形成的伪足结构明显减少,FAK 蛋白磷酸化水平降低。**结论** 抑制 Egr-1 转录因子功能可以抑制肝癌 BEL-7402 细胞的迁移和黏附。

关键词: BEL-7402; 显性负性突变; 黏附; 迁移**中图分类号:** R735.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2012)02-0146-04

0 引言

原发性肝癌(primary liver cancer, PLC)位居全球常见癌症第五位,PLC 在我国高发,目前我国发病人数约占全球的 55%;在肿瘤相关死亡中仅次于肺癌,位居第二^[1]。手术治疗仍是目前肝癌最有效的治疗方法,但即使是根治术后 5 年转移复发率仍高达 60%~70%,因此术后高转移复发率是影响肝癌患者长期生存的关键^[2]。肿瘤转移是多基因参与,受多种信号转导蛋白和转录因子调控的一个复杂过程。转录因子在肿瘤侵袭转移调控中起重要作用^[3]。

即刻早期蛋白(early growth response factor) Egr-1 是一种具有锌指结构的转录因子,能在外界信号刺激下迅速的表达,并能调控众多与增殖、凋亡和分化相关基因的转录,在细胞的生长、分化和生存过程中扮演重要的角色^[4]。有研究表明 Egr-1 对于肿瘤的新血管形成和肿瘤生长至关重要^[5],但是 Egr-1 在肝癌中的作用机制仍未被详尽阐明,本实验采用腺病毒介导的显性负性突变(dominant negative)技术,竞争性抑制人肝癌细胞 BEL-7402 中 Egr-1 的转录因子活性,体外观察 Egr-1 功能缺失对细胞黏附和迁移的影响,初步探讨其在肝癌治疗中的应用价值。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

人肝癌细胞株 BEL-7402 和人胚肾细胞株

收稿日期:2011-05-13;修回日期:2011-09-14

基金项目:江苏大学高级人才启动基金资助项目(10JDG45)

作者单位:212013 江苏镇江,江苏大学基础医学与医学技术学院

作者简介:彭琬昕(1982-),女,博士,讲师,主要从事肝癌转移与药物耐受的机制研究

HEK-293A 均购自武汉中国典藏物培养中心;显性负性突变(dominant negative) Egr-1 原代病毒(以下简称 Ad-dnEgr-1)由南京大学医学院李朝军教授惠赠^[6];I 型鼠尾胶原(Collagen I)购自 Santa Cruz, DMEM 培养液购自 Gibco 公司,胎牛血清购自 PAA 公司。

1.2 方法

1.2.1 腺病毒扩增和收获 将原代腺 Ad-dnEgr-1 病毒按照合适的滴度感染生长密度至 80%~90% 的 293A 细胞,用含 2% 胎牛血清的 DMEM 培养液在 37℃、5% CO₂ 湿度饱和条件下培养 3~5 天,观察细胞病变(CPE)现象和病毒的产生。等待 293A 细胞出现 CPE 现象后,收集细胞,37℃, -70℃ 反复冻融三次,5 000 r/min 离心,10 min,收集上清液于 -70℃ 保存。

1.2.2 低氧培养 低氧培养盒购自中国长沙长锦科技有限公司,低氧混合气(1% O₂、5% CO₂ 和 94% N₂)购自南大恒通气体厂。低氧培养时,将细胞置于密封的低氧培养盒中,用低氧混合气平衡 10 min(1 L/min),然后转移到 37℃ 培养箱中培养。

1.2.3 细胞骨架荧光检测 细胞接种于盖玻片上(15 mm×15 mm)待生长至 70% 左右密度,取出盖玻片,PBS 漂洗两次,固定液(3.7% 多聚甲醛和 0.1% 戊二醛)固定 45 min,0.05% PBST 充分漂洗 3 次,每次 5 min。利用罗丹明结合的鬼笔环肽标记 F-actin,37℃ 反应 1 h,充分漂洗后甘油封片。用 Olympus 正置荧光显微镜观察,以 596 nm 激发光激发,CCD-SPOT 拍照。

1.2.4 细胞划痕迁移实验 分别取空白对照组,感染空载腺病毒组(Ad-GFP)和感染 Ad-dnEgr-1 组对数生长期的 BEL-7402 细胞接种于 6 孔板,至细胞融合度至 70% 时,分别感染空载和突变病毒,待细胞完全融合后,沿培养板每孔的中央在纵轴方向划出“伤痕”线,用记号笔在培养板每孔的底部划线做记号,把“伤痕”线分成几个相等部分,用于进一步在光学显微镜下计数、观察。加入含血清的培养液后,用数码相机拍摄细胞在开始时的划痕状态(即 0 h);续培养 16 h 后,在倒置相差显微镜下拍照,phototshop 软件中测量每个标记位置细胞的迁移距离,每组计数 5 个视野,每组设三个复孔。结果用相对于常氧组倍数的均数表示,实验重复三次。

1.2.5 细胞黏附实验 BEL-7402 细胞与 I 型胶原黏附实验按照文献报道的方法进行^[5],倒置相差显微镜下观察、计数、拍照,每孔计数 5 个视野(×100),每组 3 个复孔,实验重复 3 次。

1.2.6 Western blot 检测 FAK 蛋白磷酸化水平的

变化 分别提取未处理的对照组细胞以及低氧处理 8 h、16 h 后的 Ad-GFP/ BEL-7402 和 Ad-dnEgr-1/ BEL-7402 细胞的总蛋白,裂解液中加入磷酸酶抑制剂。经 10% 的 SDS-PAGE 分离,然后转移 PVDF 膜,5% 脱脂奶粉 PBST 室温封闭 1 h,加入 P-FAK^{Tyr576/577} 以及 total FAK 单抗 4℃ 孵育过夜, PBST 漂洗 3 次后加入 HRP 标记的羊抗鼠和羊抗兔 IgG (1:10 000 稀释),室温孵育 1 h,再以 PBST 漂洗 3 次后,用 ECL 发光剂显示阳性条带,在 Typhoon 分子成像系统下记录结果。

1.3 统计学方法

应用 SPSS 8.0 软件按照 ANOVA 检测进行统计学分析,实验数据用相对平均值±标准差表示。两组样本间的比较采用 *t* 检验,多组样本间的比较采用 *F* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Egr-1 对低氧下 BEL-7402 迁移能力的影响

细胞划痕实验结果显示,低氧时 BEL-7402 细胞向“伤口”迁移的能力与常氧相比显著提高,而在感染了 Ad-dnEgr-1 的实验组中,在低氧培养后细胞迁移的距离分别下降到 50%~60%,见图 1。

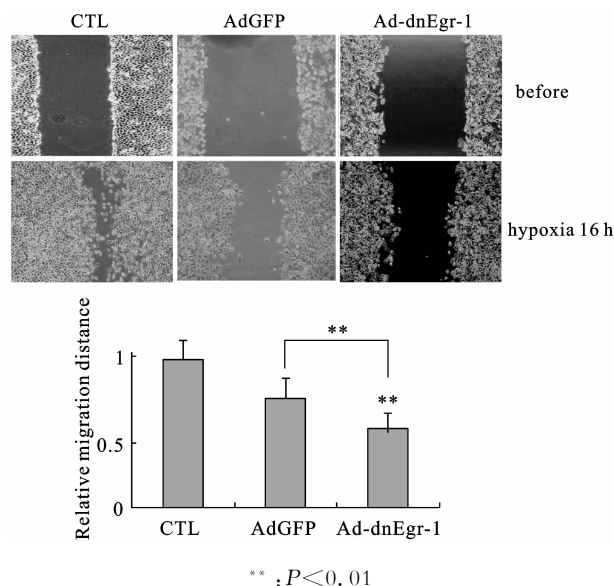
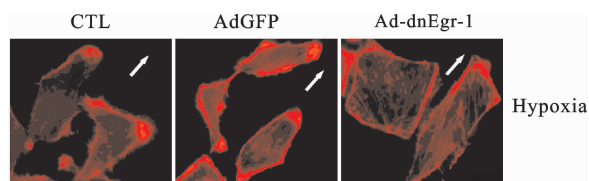


图 1 Egr-1 参与低氧促进细胞迁移的过程
Figure 1 Egr-1 involved in the increasing of cell migration caused by hypoxia

2.2 Egr-1 对低氧下 BEL-7402 细胞肌动蛋白骨架的影响

利用罗丹明标记的鬼笔环肽(phalloidin) 标记肝癌细胞 BEL-7402 中的 F-actin,荧光结果显示在低氧状态下迁移的细胞中肌动蛋白骨架呈现出 actin 纤维的崩解和板状伪足形成的表型,而感染了 Ad-dnEgr-1 病毒的细胞,在低氧的状态下细胞中

成束排列的应力纤维明显多于对照组,并且在迁移的方向上也无明显伪足形成,见图 2。



suppression of Egr-1 under hypoxia caused the rearrangement of F-actin in migrating cell, the arrows piont to the direction of cell migration bar: 10 μ m

图 2 在低氧培养状态下抑制 Egr-1 的转录因子活性, 可以引起迁移细胞中肌动蛋白排列上的变化

Figure 2 Suppression of Egr-1 caused the rearrangement of F-actin in migrating cell under hypoxia, bar: 10 μ m

2.3 Egr-1 对低氧下 BEL-7402 黏附能力的影响

细胞黏附实验发现:与常氧相比,BEL-7402 细胞在低氧时与 I 型胶原的黏附能力显著提高,见图 3a,当 BEL-7402 细胞感染了 Ad-dnEgr-1 24 h 之后这种由低氧诱导的黏附能力的提高急剧下降,见图 3b。

2.4 Egr-1 对 BEL-7402 细胞 FAK 磷酸化水平的影响

低氧处理 8、16 h 后未感染腺病毒和感染空载实验结果显示低氧可以提高 FAK 的磷酸化水平,抑制 Egr-1 转录因子活性后 FAK 磷酸化水平降低,见图 4。

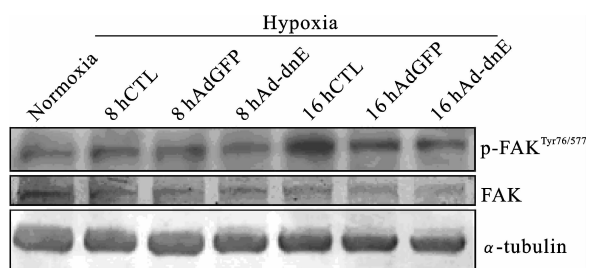


图 4 低氧可以提高 FAK 的磷酸化水平, 这一过程依赖 Egr-1 的转录因子活性

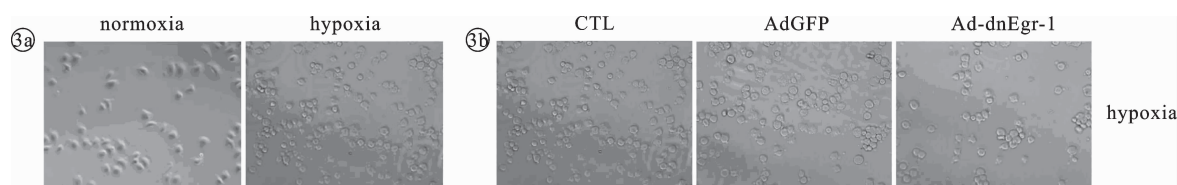
Figure 4 The increasing of phosphorylation of FAK is depend on the transcription factor activity of Egr-1 under hypoxia

3 讨论

原发性肝癌是我国常见的恶性肿瘤,在恶性肿瘤中死亡率位于第二位^[7]。每年大概有 65 000 患者死于结肠癌,大部分都是由于肝癌的转移造成的。其治疗难点在于:由于肝癌组织内部的缺氧环境造成肝癌的进展迅速,容易发生肝内播散和远处转移;仅部分患者可接受手术治疗,根治性切除率较低;手术后复发率高^[8-9]。近年来研究发现一些转录因子在一些肿瘤中表达及活性均明显异常,并且参与调控肿瘤细胞增殖、侵袭、血管生成等多种生物学功能^[10]。Egr-1 属于即刻早期基因家族,多种刺激因素(缺血、缺氧等)均可诱导其快速表达。研究表明 Egr-1 不仅与细胞的生长分化及肿瘤发生密切相关,还参与了多种病理生理过程,是多种细胞外环境的刺激信号与靶基因表达之间的耦联分子^[11]。

显性负性抑制作用(dominant negative effect)是研究转录功能时常常会用到的一种实验手段。它是指某些信号转导蛋白突变后不仅自身无功能,还能抑制或阻断同一细胞内的野生型信号转导蛋白的作用^[12]。本实验利用含有与 Egr-1 相似的锌指结构的基因片段的腺病毒作为干扰手段,竞争性结合 Egr-1 的靶基因抑制 Egr-1 发挥其正常的转录因子功能,研究在低氧促肿瘤细胞的转移过程中 Egr-1 所起的作用。

本结果显示 Egr-1 转录因子活性被抑制后,肿瘤细胞在低氧下的迁移和黏附能力均明显降低。说明 Egr-1 参与了低氧促肿瘤细胞迁移的过程。通过荧光检测细胞中 F-actin 骨架的排列发现,低氧引起的微丝骨架重排(即表现出促迁移的表型)受到 Egr-1 转录因子活性的调控,当 Egr-1 的活性被抑制后,微丝的促迁移表型消失,而表现出一种应力纤维增多,伪足形成不明显的形态,迁移能力明显减弱。Egr-1 作为一种转录因子本身不是功能的执行者,那它是通过何种方式调控 actin 的重排,从而引起细胞迁移和黏附的表型。我们通过 Western blot 证明,抑制了



3a;hypoxia improved the ability of tumor cells adhesion to matrix;3b;compared to control cells, the adhesion ability of the cells infected with dominant negative Egr-1 significantly depressed

图 3 Egr-1 对低氧促进肿瘤细胞与基质黏附过程的影响($\times 200$)

Figure 3 As a transcription factor, Egr-1 is essential to the adhesion of tumor cell to matrix($\times 200$)

Egr-1 的转录活性可明显降低由低氧所引起的黏着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)的高表达以及 FAK 的磷酸化水平的升高。FAK 可以整合许多细胞外信号,如整合素、生长因子等,使其快速磷酸化从而参与多种恶性肿瘤的生长及侵袭转移,其作用的主要通路之一就是通 MAPK 及其下游信号引起肌动蛋白骨架(actin)重排,从而引起细胞迁移能力的改变^[13-14]。Liu 等^[15]证明 Egr-1 可以通过调控整合素 integrin 引起纤维肉瘤细胞 HT1080 迁移、黏附能力的增加,促进其恶性表型的发展。Fahmy 等^[11]实验也证实了在成骨样细胞 MG63 中 Egr-1 可以通过上调 integrin 促进肿瘤细胞的血管生成进程。综上所述,我们推断低氧应激下,Egr-1 可能通过上调 integrin 的表达从而上调和激活 FAK 实现促进肝癌细胞的黏附、迁移,而抑制 Egr-1 的转录因子活性后,可以明显抑制 FAK 的表达和活化,达到抑制肝癌细胞的黏附、迁移的目的。我们的实验结果表明 Egr-1 蛋白有可能是抑制肝癌复发和转移的一个靶点,为肝癌的进一步体内研究和基因治疗提供实验基础。

参考文献:

- [1] Poon D, Anderson BO, Chen LT, et al. Management of hepatocellular carcinoma in Asia; consensus statement from the Asian Oncology Summit 2009 [J]. *Lancet Oncol*, 2009, 10 (11): 1111-1118.
- [2] Wang LX, Jiang H, Zhou J, et al. Clinical analysis of 347 patients undergoing hepatectomy of primcnv liver cancer [J]. *Tumor*, 2010, 30(12): 1048-1050. [王连新, 蒋辉, 周健, 等. 手术切除 347 例原发性肝癌的临床分析[J]. *肿瘤*, 2010, 30(12): 1048-1050.]
- [3] Carr BI. Hepatocellular carcinoma: current management and future trends [J]. *Gastroenterology*, 2004, 127 (5 Suppl 1): S218-S224.
- [4] Lemaire P, Revelant O, Bravo R, et al. Two mouse genes encoding potential transcription factors with identical DNA-binding domains are activated by growth factors in cultured cells [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1988, 85(13): 4691-4695.
- [5] Fu M, Zhu X, Zhang J, et al. Egr-1 target genes in human endothelial cells identified by microarray analysis [J]. *Gene*, 2003, (315): 33-41.
- [6] Shen N, Yu X, Pan FY, et al. An early response transcription factor, Egr-1, enhances insulin resistance in type 2 diabetes with chronic hyperinsulinism [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286(16): 14508-14515.
- [7] Llovet JM, Burroughs A, Bruix J. Hepatocellular carcinoma [J]. *The Lancet* 2003, 362(9399): 1907-1917.
- [8] CSLC, CSCO, Liver Cancer Study Group, Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association. Expert consensus on standardization of the management of primary liver cancer [J]. *Tumor*, 2009, 29(14): 295-304. [中国抗癌协会肝癌专业委员会, 中国抗癌协会临床肿瘤学协作专业委员会, 中华医学会肝病学会分会肝癌学组. 原发性肝癌规范化诊治的专家共识[J]. *肿瘤*, 2009, 29(4): 295-304.]
- [9] Harris AL. Hypoxia-a key regulatory factor in tumour growth [J]. *Nat Rev Cancer*, 2002, 2(1): 38-47.
- [10] Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis [J]. *Cancer*, 1997, 80(8 Suppl): 1529-1537.
- [11] Fahmy RG, Dass CR, Sun LQ, et al. Transcription factor Egr-1 supports FGF-dependent angiogenesis during neovascularization and tumor growth [J]. *Nat Med*, 2003, 9(8): 1026-1032.
- [12] Herskowitz I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations [J]. *Nature*, 1987, 329(6136): 219-222.
- [13] Ao HF, Ao JP, Liu Y, et al. Relationship between FAK and human tumor [J]. *Experimental and Lab Med*, 2008, 26(5): 533-536. [敖洪峰, 敖金平, 刘勇, 等. FAK 与人类肿瘤的关系[J]. *实验与检验医学*, 2008, 26(5): 533-536.]
- [14] Li SY, Wang ZG. Progress in focal adhesion kinase signaling pathway [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2009, 12: 6-10. [李树裕, 王志钢. 粘附斑激酶(FAK)及其信号通路研究进展[J]. *生物技术通报*, 2009, 12: 6-10.]
- [15] Liu C, Yao J, de Belle I, et al. The transcription factor EGR-1 suppresses transformation of human fibrosarcoma HT1080 cells by coordinated induction of transforming growth factor-b1, ibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1 [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(7): 4400-4411.

[编辑: 安 凤; 校对: 杨 卉]