

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 Yaoxiang, 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<sup>[1]</sup>。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<sup>[2]</sup>。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<sup>[3]</sup>。

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<sup>[4]</sup>。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<sup>[5]</sup>, 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:江苏省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<sup>[6]</sup>; 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% CO<sub>2</sub> 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% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 和 94% N<sub>2</sub>)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); 继培养 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<sup>[5]</sup>, 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<sup>Tyr576/577</sup> 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。

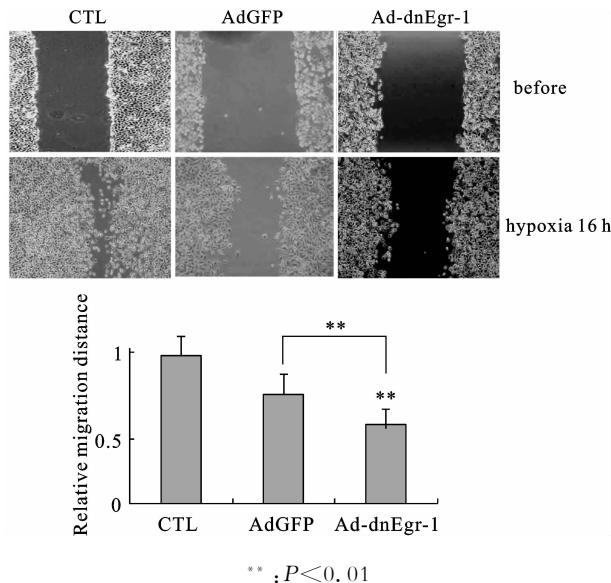


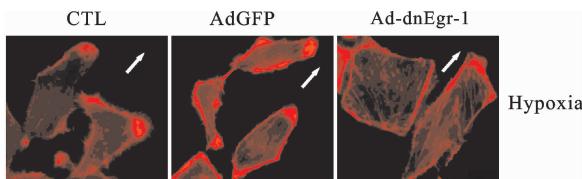
图 1 Egr-1 参与低氧促进细胞迁移的过程

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 point to the direction of cell migration bar: 10  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

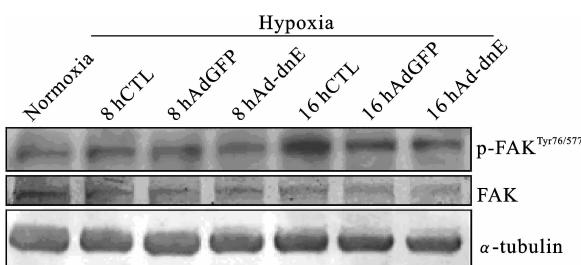


图 4 低氧可以提高 FAK 的磷酸化水平，这一过程依赖 Egr-1 的转录因子活性

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<sup>[7]</sup>。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<sup>[8-9]</sup>。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<sup>[10]</sup>。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<sup>[11]</sup>。

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<sup>[12]</sup>。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过 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<sup>[13-14]</sup>。Liu 等<sup>[15]</sup>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<sup>[11]</sup>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 primary 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-β1, ibronectin, and plasminogen activator inhibitor-1 [J]. J Biol Chem, 1999, 274(7): 4400-4411.

〔编辑:安 凤;校对:杨 卉〕