

GDF11对肝细胞癌SMMC-7721细胞增殖能力及顺铂敏感度的影响



张菊萍, 史业辉, 贾勇圣, 周立艳, 佟仲生

GDF11 is Involved in Human Hepatic Carcinoma Cells SMMC-7721 Proliferation and Sensitivity to DDP

ZHANG Juping, SHI Yehui, JIA Yongsheng, ZHOU Liyan, TONG Zhongsheng

Department of Breast Oncology, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Breast Cancer Prevention and Therapy (Ministry of Education), Tianjin Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin 300060, China

Corresponding Author: TONG Zhongsheng, E-mail: tonghang@medmail.com.cn

Abstract: Objective To explore the influence of growth differentiation factor 11 (GDF11) over-expression on hepatic carcinoma cells SMMC-7721 proliferation ability and sensitivity to DDP *in vitro*.

Methods Previous study had successfully built SMMC-7721 cells with GDF11 over-expression. Meanwhile, empty vector infected cells and wild-type cells were treated as controls. Cells proliferation ability was examined by CCK-8 assay, and the proliferation curve was calculated. Colony formation assay was adopted to evaluate colony formation ability. The SMMC-7721 cells were treated with various concentrations of DDP, then the cell viability was measured using CCK-8 assay. **Results** Western blot showed SMMC-7721 cells with GDF11 over-expression had successfully built. The overexpression of GDF11 could significantly inhibit the proliferation of SMMC-7721 cells *in vitro*, and the effect were significant at 96, 120, 144h ($P < 0.05$). Meanwhile GDF11 over-expression group had lower ability of colony formation than control groups ($P < 0.05$). The over-expression of GDF11 made SMMC-7721 cells more sensitive to DDP, and the effect were significant at 20 and 40 $\mu\text{g/ml}$ DDP ($P < 0.05$). **Conclusion** The over-expression GDF11 could inhibit the proliferation and colony formation abilities of SMMC-7721 cells, and enhance its sensitivity to DDP.

Key words: Hepatic carcinoma; GDF11; Proliferation; DDP; Sensitivity

摘要: 目的 研究GDF11 (growth differentiation factor 11) 过表达对肝细胞癌SMMC-7721细胞体外增殖能力及顺铂敏感度的影响。**方法** 前期成功构建GDF11过表达的SMMC-7721细胞, 同时以空载体感染细胞组及野生型细胞组为对照。CCK-8法检测细胞增殖能力, 平板克隆形成实验检测细胞克隆形成能力。CCK-8法检测GDF11过表达对细胞顺铂药物敏感度的影响。**结果** Western blot结果验证, 已成功构建GDF11过表达的SMMC-7721细胞。GDF11过表达可明显抑制SMMC-7721细胞的体外增殖能力, 在96、120及144 h时抑制作用最显著 ($P < 0.05$), 且实验组细胞较对照组克隆形成能力明显减弱 ($P < 0.05$)。GDF11过表达能够增强肝细胞癌SMMC-7721细胞对顺铂的敏感度, 顺铂浓度取20 $\mu\text{g/ml}$ 及40 $\mu\text{g/ml}$ 时, 与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。**结论** 肝细胞癌SMMC-7721细胞过表达GDF11蛋白后, 其体外增殖及克隆形成能力明显降低, 对化疗药物顺铂的敏感度增强。

关键词: 肝细胞癌; GDF11; 增殖; 顺铂; 敏感度

中图分类号: R735.7 **文献标识码:** A

0 引言

原发性肝癌是指由肝细胞或肝内胆管上皮细

胞发生的恶性肿瘤, 一般包括肝细胞肝癌、胆管细胞肝癌和混合型肝癌。肝癌是我国最常见的恶性肿瘤之一, 死亡率在癌症所致死亡中居第三位, 且发病率有逐年上升的趋势^[1-2]。肝癌患者的长期预后较差, 60%~70%的患者在手术后五年之内都出现了复发或转移^[3]。寻找新的治疗靶点, 开发新的治疗方法, 一直是人们研究的热点。

GDF11 (growth and differentiation factor 11) 属

收稿日期: 2015-08-10; 修回日期: 2015-09-22

作者单位: 300060 天津, 天津医科大学肿瘤医院乳腺肿瘤内科, 国家肿瘤临床医学研究中心, 乳腺癌防治教育部重点实验室, 天津市肿瘤防治重点实验室

通信作者: 佟仲生, E-mail: tonghang@medmail.com.cn

作者简介: 张菊萍 (1987-), 女, 硕士在读, 主要从事乳腺癌的综合治疗

于TGF- β 超家族/BMP亚家族的一员,和GDF8在结构上高度同源,参与生物体神经和肾脏等系统的发育过程。GDF11在哺乳动物体内广泛表达,其中肾脏组织GDF11 mRNA的表达水平最高^[4]。细胞分泌GDF11后,释放到血液中,血液中GDF11的水平,随着年龄增加逐渐减少。近几年研究发现恢复血液中GDF11的水平,可逆转小鼠心脏、骨骼肌^[5]及大脑^[6-7]年龄相关性功能障碍。GDF11还是骨骼系统内稳态的调节者,参与调节成骨细胞和破骨细胞之间的平衡^[8]。

关于GDF11的研究目前多集中于其在正常机体的发育过程及逆转衰老中的作用。研究表明,GDF11对正常上皮细胞的增殖具有抑制作用,主要体现在神经系统和骨骼肌系统的形成过程中。然而,对于GDF11在肿瘤形成过程中的作用及在肿瘤组织及肿瘤细胞株中的表达,较少有报道。

本研究拟通过改变人肝细胞癌SMMC-7721细胞中GDF11蛋白的表达水平,观察GDF11过表达对SMMC-7721体外增殖能力及对顺铂敏感度的影响,以期肝癌治疗新靶点的发现提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

肝细胞癌SMMC-7721细胞来源于天津医科大学肿瘤医院乳腺癌重点实验室,GDF11过表达的SMMC-7721(GDF11-7721)细胞及空载体对照细胞(GFP-7721)均由该课题组前期构建。DMEM高糖培养液(美国Hyclone公司);胎牛血清及胰蛋白酶(美国Gibco公司);兔抗人GDF11单克隆抗体购自美国Abcam公司;鼠抗人 β -actin单克隆抗体及辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠IgG抗体、羊抗兔IgG抗体均购自北京中杉金桥公司;CCK-8检测试剂盒购自日本同仁化学研究所,RIPA裂解液及蛋白免疫印迹显色试剂购自北京碧云天生物技术公司。

1.2 细胞培养

人肝细胞癌SMMC-7721细胞、空载体对照SMMC-7721细胞及GDF11过表达SMMC-7721细胞均培养于含10%胎牛血清的DMEM高糖培养液中,置于37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养,每隔2天更换新鲜培养液,待细胞贴壁生长至80%时,用0.25%胰酶消化传代。取对数生长期细胞用于实验。

1.3 Western blot验证SMMC-7721细胞中GDF11蛋白表达

收集各组细胞,分别重悬于适量RIPA裂解液中,冰浴30 min,使细胞充分裂解。4℃、12 000 r/min

离心20 min,收集上清液。BCA法进行蛋白浓度测定,计算上样量。30 μ g蛋白样品经SDS-PAGE凝胶电泳分离、转膜、5%脱脂奶粉封闭1 h后,与兔抗人GDF11单克隆抗体(1:1 000)结合,4℃孵育过夜12~16 h。TBST冲洗后,加入辣根过氧化物酶标记的羊抗兔IgG,室温孵育2 h,ECL化学发光法检测结果。全程以 β -actin为内参。

1.4 CCK-8试验检测GDF11表达对细胞体外增殖能力的影响

将各组细胞以 2×10^3 个每孔的密度接种于96孔板,待细胞贴壁后开始检测。分别于培养24、48、72、96、120、144 h时,取待测的96孔板,弃去旧培养液,更换含10%体积分数CCK-8的完全培养液,继续37℃培养箱培养2 h,采用自动酶标仪(Bio-Rad)检测各孔450 nm波长的吸光度,不同细胞组设6个平行复孔,同时设置只加培养液的调零孔,以校正各组的OD值。以平均校正的OD值反映细胞的增殖能力,绘制细胞增殖曲线。

1.5 平板克隆形成实验检测GDF11对细胞克隆形成能力的影响

取对数生长期细胞,胰酶消化,完全培养液重悬至单细胞悬液,计数。将细胞悬液作梯度倍数稀释,按每皿500、1 000、2 000、5 000个细胞的密度梯度接种于2 cm培养皿中,每皿含2 ml的完全培养液。置于37℃、5%CO₂培养箱中,静置培养2周。待培养皿中出现肉眼可见的细胞克隆时,终止培养,弃去上清液,PBS浸洗。每皿加入2 ml 4%的多聚甲醛,室温固定15 min。去固定液,结晶紫染色20 min。流水缓慢冲洗,室温空气干燥。计数细胞克隆数,计算克隆形成率。克隆形成率=克隆数/接种细胞数 $\times 100\%$ 。

1.6 CCK-8法检测GDF11对细胞顺铂敏感度的影响

将细胞按照 1×10^4 个每孔的密度接种于96孔板,待细胞贴壁且融合度达60%时,将顺铂按照不同浓度进行稀释并加入相应培养孔,浓度分别取2.5、5、10、20、40 μ g/ml,每种浓度设6个平行复孔。37℃培养箱培养24 h后吸弃上清液,更换含10%体积分数CCK-8的完全培养液,继续37℃孵育2 h,采用自动酶标仪(Bio-Rad)检测各孔450 nm波长处的吸光度。计算不同浓度下,顺铂对细胞的抑制率,细胞抑制率=(对照组吸光度-实验组吸光度)/对照组吸光度 $\times 100\%$,统计IC₅₀值。

1.7 统计学方法

应用SPSS19.0统计软件进行处理,所有数据以

($\bar{x} \pm s$) 表示。均数比较采用 t 检验或方差分析(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肝细胞癌SMMC-7721细胞中GDF11蛋白的表达情况

Western blot检测结果显示:野生型人肝细胞癌SMMC-7721(WT-7721)及空载体感染SMMC-7721细胞(GFP-7721)中,GDF11均有表达,但表达量较低。感染慢病毒SMMC-7721细胞组(GDF11-7721),GDF11蛋白表达明显升高,表明GDF11过表达的肝细胞癌SMMC-7721细胞成功构建,为后期细胞功能学实验打下基础,见图1。

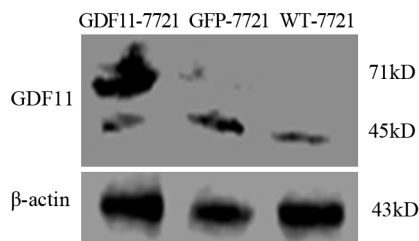


图1 Western blot检测三种细胞中GDF11蛋白的表达水平
Figure1 Expression of GDF11 in GDF11-7721, GFP-7721 and WT-7721 cells examined by Western blot

2.2 GDF11过表达抑制肝细胞癌SMMC-7721细胞体外增殖能力

野生型细胞组及空载体对照组细胞的生长速度接近,差异无统计学意义。而GDF11过表达SMMC-7721实验组细胞生长明显受到抑制,其在培养96、120、144 h时细胞增殖抑制效应最显著($P < 0.05$),见图2;表明GDF11过表达可以显著抑制肝细胞癌SMMC-7721细胞的体外增殖能力。

2.3 GDF11过表达明显降低SMMC-7721细胞的克隆形成能力

不同细胞数接种组,实验组细胞的克隆形成率均明显低于对照组,GDF11过表达可降低SMMC-7721细胞体外近一半的克隆形成能力,差异均具有统计学意义。而空载体及野生型细胞组无明显差别,见图3。结果表明,将SMMC-7721细胞过表达GDF11后,可明显降低其体外的克隆形成能力。

2.4 GDF11过表达增加肝细胞癌SMMC-7721细胞对顺铂的敏感度

肝细胞癌SMMC-7721细胞经不同浓度顺铂(2.5、5、10、20、40 $\mu\text{g/ml}$)作用24 h后,CCK-8法测定各组细胞不同药物浓度作用下的吸光度,

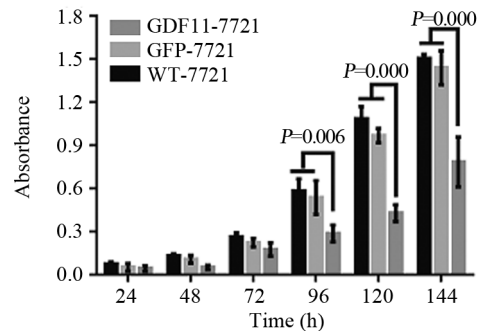


图2 CCK-8法检测GDF11蛋白过表达对细胞增殖能力的影响

Figure2 Effect of GDF11 over-expression on cell proliferation ability examined by CCK-8 assay

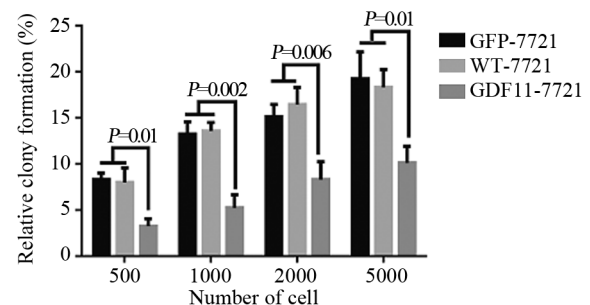


图3 平板克隆形成实验检测GDF11蛋白过表达对细胞克隆形成能力的影响

Figure3 Effect of GDF11 over-expression on cells colony formation ability

计算细胞抑制率。结果显示,GDF11过表达组SMMC-7721细胞对顺铂作用较其他两组更敏感,且当顺铂浓度取20 $\mu\text{g/ml}$ 及40 $\mu\text{g/ml}$ 时,差异具有统计学意义,见图4。三组细胞顺铂作用的 IC_{50} 值分别为:野生型SMMC-7721细胞组(8.244 ± 0.408) $\mu\text{g/ml}$,空载体SMMC-7721细胞组为(7.818 ± 0.324) $\mu\text{g/ml}$,GDF11过表达SMMC-7721组为(5.232 ± 0.274) $\mu\text{g/ml}$ ($P = 0.048$)。

3 讨论

无限增殖是肿瘤细胞的重要生物学行为特征,这一特征的获得包括多个细胞学途径的异常,可被多种因素诱发,包括肿瘤相关的癌基因和抑癌基因经过不同途径促进细胞的无限增殖。

TGF- β (transforming growth factor beta) 超家族是机体内广泛存在的细胞因子,TGF- β 信号途径在细胞的多个生物学过程中发挥重要作用,包括细胞增殖、分化、黏附、侵袭、凋亡及细胞外基质的形成^[9-11]。TGF- β 超家族在肿瘤的发生发展过程中具有双重作用,一方面通过抑制上皮细胞增殖、诱导细胞凋亡,对肿瘤起抑制作用;另一方面,可通过诱导上皮间质转化(EMT)在肿瘤晚期促进肿瘤

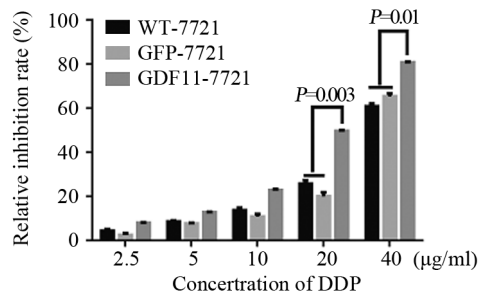


图4 GDF11蛋白过表达增强SMMC-7721细胞对顺铂的敏感度

Figure 4 GDF11 over-expression could increase sensitivity of SMMC-7721 cells to DDP

浸润和转移,其具体分子机制尚未明确^[12]。

GDF11是TGF- β 超家族的一员,参与胚胎各系统的发育过程,对上皮细胞增殖主要起抑制作用,如胰腺胰岛祖细胞,嗅上皮神经元及神经祖细胞^[6],视网膜神经节细胞及感光细胞。GDF11还可以通过调节神经干细胞中增殖及侵袭过程相关基因的表达,在体内及体外抑制神经干细胞Cor-1的增殖及侵袭^[13]。多项研究表明,TGF- β 家族参与调节细胞的增殖、凋亡和分化,并参与多种肿瘤的发生发展进程,如食管癌,前列腺癌,乳腺癌等。GDF11作为TGF- β 家族的一员,在肿瘤发生发展过程中,可能也发挥其独特作用。

本课题组前期研究发现,GDF11在肝细胞癌SMMC-7721细胞中有表达,表达量相对较低。通过构建重组质粒,包被慢病毒,并感染SMMC-7721细胞,使其成功过表达GDF11蛋白。随后以此为基础,研究其过表达对SMMC-7721细胞体外增殖能力的影响。

结果显示,与GDF11对正常上皮的抑制作用一致,GDF11在肝细胞癌SMMC-7721细胞的增殖过程中也发挥着抑制作用。细胞增殖实验中,GDF11过表达可以明显抑制SMMC-7721细胞体外的增殖能力,且在96、120及144h抑制作用明显。克隆形成实验中,GDF11过表达可以抑制SMMC-7721细胞近一半的克隆形成能力。

多药耐药的发生是目前肿瘤治疗的主要障碍,也是肝癌化疗失败的重要原因。顺铂是目前临床使用的最重要的抗癌药物之一,具有广泛的抗癌谱,是肝癌的一线治疗药物,但由于耐药性的产生使其不能发挥应有的治疗作用,也大大影响了肝癌的治疗。寻找特异的靶点开发针对铂类耐药的逆转药物也成为研究的热点。

本研究中发现,GDF11过表达可以增加SMMC-7721细胞对于顺铂的敏感度,当顺铂浓度

取20 $\mu\text{g/ml}$ 及40 $\mu\text{g/ml}$ 时,可以大大增加其对细胞的杀伤效应,且较对照组具有较低的 IC_{50} 值。提示GDF11蛋白可能为改善顺铂耐药的一个潜在的作用靶点。

综上,本研究发现作为TGF- β 家族的一员,GDF11在肿瘤发生发展中可能发挥抑癌作用。GDF11过表达可以明显抑制肝细胞癌SMMC-7721细胞体外的增殖能力及克隆形成能力,并在一定程度上增强其对化疗药物顺铂的敏感度。提示我们,GDF11可能作为肝细胞癌治疗的一个潜在靶点,并能在一定意义上用于改善顺铂的耐药性。明确其在肿瘤中的确切作用及其可能的作用机制,需要后期更多的研究来验证。

参考文献:

- [1] El-serag HB, Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2007, 132(7): 2557-76.
- [2] Ng KK, Lo CM, Liu CL, *et al.* Survival analysis of patients with transplantable recurrent hepatocellular carcinoma: implications for salvage liver transplant[J]. *Arch Surg*, 2008, 143(1): 68-74.
- [3] Kim do Y, Paik YH, Ahn SH, *et al.* PIVKA-II is a useful tumor marker for recurrent hepatocellular carcinoma after surgical resection[J]. *Oncology*, 2007, 72 Suppl 1: 52-7.
- [4] McPherron AC. Metabolic Functions of Myostatin and Gdf11[J]. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem*, 2010, 10(4): 217-31.
- [5] Sinha M, Jang YC, Oh J, *et al.* Restoring systemic GDF11 levels reverses age-related dysfunction in mouse skeletal muscle[J]. *Science*, 2014, 344(6184): 649-52.
- [6] Shi Y, Liu JP. Gdf11 facilitates temporal progression of neurogenesis in the developing spinal cord[J]. *J Neurosci*, 2011, 31(3): 883-93.
- [7] Katsimpardi L, Litterman NK, Schein PA, *et al.* Vascular and neurogenic rejuvenation of the aging mouse brain by young systemic factors[J]. *Science*, 2014, 344(6184): 630-4.
- [8] Zhang Y, Shao J, Yang T, *et al.* Growth differentiation factor 11 is a protective factor for osteoblastogenesis by targeting PPAR gamma[J]. *Gene*, 2015, 557(2): 209-14.
- [9] Zarzynska JM. Two faces of TGF-beta1 in breast cancer[J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 141747.
- [10] Heldin CH, Landström M, Moustakas A. Mechanism of TGF- β signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition[J]. *Curr Opin Cell Biol*, 2009, 21(2): 166-76.
- [11] Moses H, Barcellos-Hoff MH. TGF- β biology in mammary development and breast cancer[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2011, 3(1): a003277.
- [12] Massagué J. TGF- β in cancer[J]. *Cell*, 2008, 134(2): 215-30.
- [13] Finkenzeller G, Stark GB, Strassburg S. Growth differentiation factor 11 supports migration and sprouting of endothelial progenitor[J]. *J Surg Res*, 2015, 198(1): 50-6.

[编辑: 周永红; 校对: 邱颖慧]