

Glypican-3对HepG2肝癌细胞增殖及侵袭转移的影响

张韬¹, 朱琪², 程变巧², 林伟国² (1.厦门大学附属福州第二医院 中心实验室, 福州 350007; 2.厦门大学附属福州第二医院 肝胆内科, 福州 350007)

摘要: 目的 探讨磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 (Glypican-3, GPC-3) 在HepG2肝癌细胞增殖及侵袭转移中的作用。方法 构建并筛选沉默GPC-3最有效的shRNA, 转染HepG2细胞, Western blot分析GPC-3蛋白表达水平; MTT、划痕实验和Transwell小室实验分别检测GPC-3基因沉默对HepG2细胞增殖、转移和侵袭能力的影响。结果 GPC-3-shRNA-1干扰效果最好, 对GPC-3表达抑制率为77.7%; GPC-3沉默后HepG2细胞增殖显著受到抑制 ($P = 0.014$), 细胞转移和侵袭能力显著减弱, 侵袭抑制率为52.4%。结论 GPC-3基因沉默后HepG2细胞增殖、转移和侵袭能力显著受抑制, 提示GPC-3在肝癌的发生发展中起关键作用, 可能成为肝癌靶向治疗的目标。

关键词: Glypican-3; 肝肿瘤; 增殖; 侵袭; 转移

Effects of Glypican-3 on proliferation, invasiveness and migratory metastasis of HepG2 cells

ZHANG Tao¹, ZHU Qi², CHENG Bian-qiao², LIN Wei-guo² (1.Center Laboratory, The Second Hospital of Fuzhou Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350001, China; 2.Hepatobiliary Department of Internal Medicine, The Second Hospital of Fuzhou Affiliated to Xiamen University, Fuzhou 350007, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of Glypican-3 on proliferation, invasiveness and migratory metastasis of HepG2 cells. **Methods** High effective GPC-3-shRNA was obtained by construction and screening. The expression of GPC-3 was analyzed by western blot after transfected into HepG2 cells. The effects of gene silence of GPC-3 on proliferation, invasiveness and migratory metastasis of HepG2 cells were analyzed by MTT, cell scratch test and transwell chamber system, respectively. **Results** The most effective shRNA inhibited 77.7% expression of GPC-3. The proliferation of HepG2 cells were significantly inhibited after GPC-3 silence ($P = 0.014$). The migratory metastasis and invasiveness with reduced significantly, and the invasion inhibition rate was 52.4%. **Conclusion** The proliferation, invasiveness and migratory metastasis of HepG2 cells were significantly inhibited after GPC-3 silence, which suggests that GPC-3 may play an important role in the development of hepatic carcinoma and contribute to targeted therapy for hepatic carcinoma.

Key words: Glypican-3; Hepatic carcinoma; Proliferation; Invasiveness; Migratory metastasis

肝癌是临床上最常见的恶性肿瘤之一, 我国是全球肝癌发病率和病死率最高的国家, 肝癌患者占全球的55%。肝癌细胞的扩散和转移是肝癌致死的主要原因之一, 在肝癌的转移侵袭过程中, 很多细胞因子起着重要作用。最近研究发现, 磷脂酰肌醇蛋白多糖-3 (Glypican-3, GPC-3) 与肝癌的发生发展密切相关, 被认为是肝细胞癌 (hepatocellular carcinoma, HCC) 特异性诊断及靶向治疗最有前景的生物标志物之一^[1-4]。本研究拟通过基因沉默技术观察GPC-3在肝癌细胞增殖、侵袭和转移中的作

用, 探讨GPC-3在肝癌靶向基因治疗中的可能性。

1 材料和方法

1.1 材料 人HepG2细胞株 (福建医学科学研究所馈赠), 4~6周龄裸鼠 (购自吴氏实验动物中心), pGPU6/GFP/Neo-shRNA载体、GenJet™体外转染试剂 (上海基因), 逆转录试剂盒、PCR即用扩增试剂盒、RIPA裂解液、BCA法蛋白定量试剂盒和UltraECL底物化学发光检测试剂盒 (Invitrogen, 美国); 兔抗人GPC-3、羊抗兔HRP标记二抗 (Abcam, 英国); DEME培养基、胎牛血清 (FBS Gibco, 美国)。

1.2 干扰载体的构建、细胞培养和转染 NCBI上查找GPC-3序列并根据shRNA设计原则设计合成3条

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7380.2016.02.014

基金项目: 2013年福州市科技计划项目 (2013-S-123-15); 2014年福州市科技计划项目 (2014-S-137-5)

通讯作者: 朱琪 Email: zhuqi8979@163.com

GPC-3-shRNA及阴性对照序列，见表1。将GPC-3-shRNA与pGPU6/GFP/Neo-shRNA载体连接，并进行转化、扩增、提取、纯化和鉴定。人HepG2细胞在含10% FBS的DEME培养基中，转染前1小时更换培养基。将构建的载体分别转染HepG2细胞，筛选干扰GPC-3表达效果最好的一组作为干扰组，转染阴性对照质粒作为阴性对照组，未转染的HepG2细胞作为空白组。

1.3 Western blot 取样品处理液进行SDS-PAGE电泳，转膜，用含5%脱脂奶粉的TBST溶液封闭1小时。洗膜后将封闭的PVDF膜与一抗4℃孵育过夜。洗膜后在室温条件下与二抗孵育1小时，二抗为辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体（1：5000）。洗膜后加入免疫印迹化学发光试剂（ECL），显影、洗片、晾干。用凝胶图像分析仪扫描照片，并采用灰度分析计算各蛋白条带的灰度值。

1.4 MTT 各组实验细胞培养至对数生长期后以1 × 10³/200 μl密度接种到96孔板中，每孔200 μl。在细胞贴壁后的第1天、3天、5天每孔加入5 mg/ml MTT 20 μl，4小时后弃去培养基，每孔加入200 μl DMSO，混匀后酶标仪测定A_{570nm}。

1.5 细胞划痕迁移实验 将基因沉默组的HepG2细胞和对照组分别铺6孔板，每孔细胞数为5 × 10⁵个。待80%的细胞贴壁后，用灭菌的10 μl移液枪头在6孔板中间划一条线，每隔12小时观察划线处细胞的融合状态，待线变窄时停止培养，记录并拍照。

1.6 Transwell小室实验 将Matrigel胶以无血清DEME培养基1：3稀释后向小室中加入60 μl，调整沉默组和对照组细胞浓度为1 × 10⁶个/ml，取100 μl接种于Transwell上室，小室加600 μl完全培养基，37℃，5% CO₂培养箱中培养24小时。用棉签小心擦去滤膜上层未穿过滤膜的细胞，上层置于95%酒精中固定30分钟，0.1%结晶紫染色15分钟，拍照。取中央及4周5个视野（200 × ）计数，计算侵袭抑制率=（对照组-沉默组）/对照组 × 100%。

1.7 统计学分析 数据通过SPSS 13.0软件进行分析，计量资料以均数±标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，采用t检验，以P < 0.05表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 shRNA转染以及对GPC-3表达的抑制 shRNA转染HepG2细胞培养24小时后，荧光显微镜观察并拍照，随机计数5个视野，计算转染率约80%，见图1。设

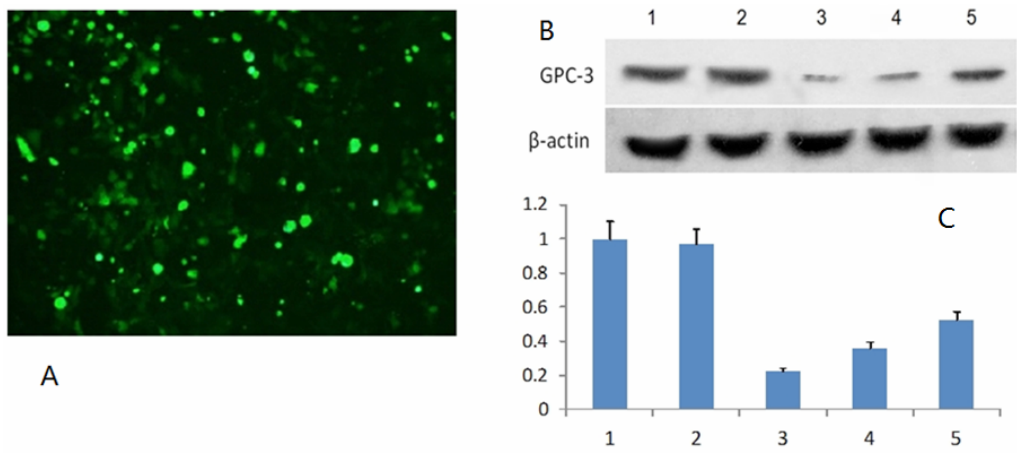


图1 shRNA转染及对GPC-3的表达抑制图

注：A：shRNA转染（×200）；B：Western blot检测GPC-3-shRNA对GPC-3蛋白表达的影响，1、2、3、4、5分别为空白组、阴性对照组、GPC-3-shRNA-1、GPC-3-shRNA-2、GPC-3-shRNA-3；C：图B中蛋白表达相对值。

表1 shRNA名称及序列

名称	序列
GPC-3-shRNA-1	正链：5'-CACCGCGGGTTACTGCAATGTGGTCATTCAAGAGATGACCACATTGCAGTAACCGCTTTTTTG-3'
	负链：5'-GATCCAAAAAAGGGGTTACTGCAATGTGGTCATCTCTTGAATGACCACATTGCAGTAACCG-3'
GPC-3-shRNA-2	正链：5'-CACCGCTCTGAATCTTGAATGATTCAAGAGATCAATCCAAGATTGAGAGCCTTTTTT-3'
	负链：5'-GATCCAAAAAAGGCTCTGAATCTTGAATGATCTCTTGAATCAATCCAAGATTGAGAGC-3'
GPC-3-shRNA-3	正链：5'-CACCGCCGAATGCTCACCAGAATGTTTCAAGAGAACATTCTG GTGAGCAATCGGCTTTTTT-3'
	负链：5'-GATCCAAAAAAGCCGAATGCTCACCAGAATGTTCTCTTGAAA CATTCTGGTGAGCAATCGG-3'
阴性对照	正链：5'-CACCGTTCTCCGAACGTGTACGTCAAGAGATTACGTGACAC GTTCGGAGAATTTTTTG-3'
	负链：5'-GATCCAAAAAATCTCCGAACGTGTACGTAATCTCTTGACGTGACACGTTCCGAGAAC-3'

计的3种GPC-3-shRNA转染HepG2细胞后,对GPC-3的表达抑制率分别为77.7%, 63.9%和47.6%,其中GPC-3-shRNA-1对GPC-3表达的沉默效果最好。

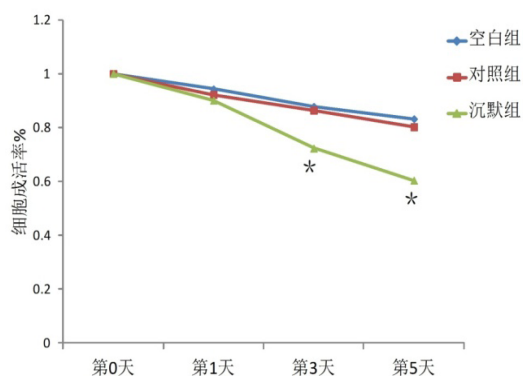


图2 MTT检测GPC-3基因沉默对HepG2细胞增殖的影响

注: *与对照组比较, P 值分别为0.009、0.002

2.2 GPC-3基因沉默对细胞增殖的影响 选择干扰效果最好的GPC-3-shRNA-1作为沉默组,转染HepG2细胞后,MTT分析空白组、阴性对照组和沉默组的细胞增殖情况。沉默组细胞第1天、3天、5天细胞成活率分别为90.1%、72.3%和60.4%,与对照组细胞相比,明显受到抑制(P 值分别为0.014、0.009、0.002),见图2。

2.3 GPC-3基因沉默对HepG2细胞迁移能力的影响 选择干扰效果最好的GPC-3-shRNA-1作为沉默组,转染HepG2细胞后,沉默组细胞迁移能力显著低于对照组,见图3。

2.4 GPC-3基因沉默对HepG2细胞侵袭能力的影响 选择干扰效果最好的GPC-3-shRNA-1作为沉默组,转染HepG2细胞后,沉默组细胞侵袭能力显著低于对照组,侵袭抑制率为52.4%,见图4。

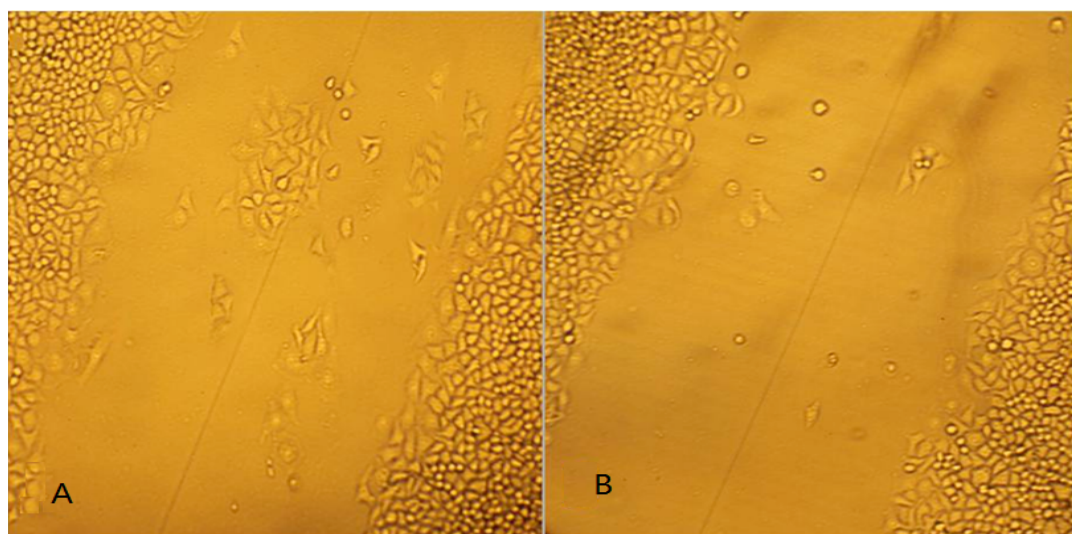


图3 GPC-3基因沉默对HepG2细胞迁移能力的影响($\times 200$)

注: A: 对照组; B: 沉默组

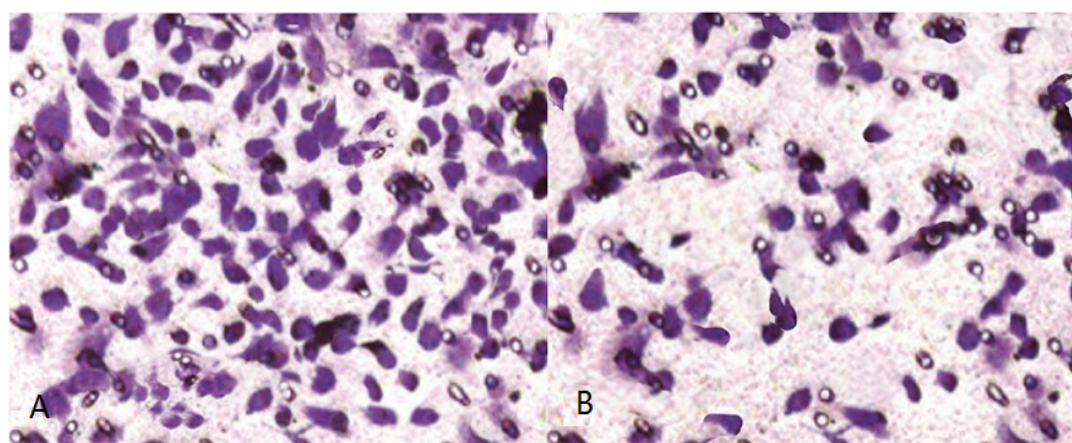


图4 GPC-3基因沉默对HepG2细胞侵袭能力的影响(结晶紫染色, $\times 200$)

注: A: 对照组; B: 沉默组

3 讨论

GPC-3是一种硫酸肝素糖蛋白和癌胚抗原,主要表达于胚胎性肝、肾、肺组织及胎盘组织滋养叶细胞层中,在肝癌中高表达,且特异性较强,是肝癌诊断的重要指标^[5-8]。HCC具有进展快、易侵袭转移、复发率高和预后差的特点,病死率在恶性肿瘤中排第3位,因此其早期诊断和有效的治疗尤为重要。GPC-3特别是对甲胎蛋白阴性的HCC可能是一种新的高灵敏度和特异性的标志物,对HCC的早期诊断和靶向治疗有重要的指导意义^[9]。

有研究表明,GPC-3沉默后肝癌细胞的生长受到抑制^[10]。Costan等^[11]通过免疫组织化学检测发现,GPC-3在胆管细胞癌均为阴性,在非肝癌肿瘤中阳性率为3%,而在HCC中阳性率为84%,因此认为GPC-3不仅能区分肝癌和非肝癌,还能区分HCC和胆管细胞癌。Zhang等^[12]检测正常肝脏、肝硬化、继发性肝癌及原发性肝癌血清中GPC-3的浓度,发现GPC-3在健康人、肝硬化、肝炎患者血清中无表达或低表达,而在原发性肝癌患者血清中高表达,提示GPC-3有望成为替代AFP的更敏感和特异的肝癌标记物。本文通过RNAi干扰技术构建GPC-3的干扰载体,转染HepG2细胞,GPC-3沉默组HepG2细胞与对照组相比增殖明显受到抑制,与邵伯军等^[4]的研究结果相符。

GPC-3也是一种膜表面分泌蛋白,研究发现GPC-3与肝癌细胞转移侵袭密切相关^[13-16]。Capurro等^[17]采用过表达方法研究GPC-3对肝癌细胞转移侵袭能力的影响,发现GPC-3增加了SK-Hep-1肝癌细胞的迁移及侵袭能力。邱志东等^[18]研究发现,GPC-3表达下调会抑制肝癌细胞株Huh7的增殖和侵袭能力。姚敏等^[19]采用shRNA干扰高转移潜能肝癌细胞GPC-3的表达,结果发现细胞增殖受到抑制,迁移和侵袭能力显著下降。本研究采用相反的研究方法,采用RNAi干扰技术沉默GPC-3的表达,观察GPC-3对肝癌细胞转移侵袭能力的影响,发现沉默GPC-3会减弱HepG2肝癌细胞的迁移及侵袭,该研究方法Capurro等^[17]的研究相反,但结果一致。

GPC-3在肝癌发生发展中的具体机制尚不十分明确,有研究认为GPC-3通过Bax/Bcl-2/cytochrome C/caspase-3信号通路增强细胞抗凋亡能力,从而增强细胞的侵袭转移能力^[20-22]。也有研究认为,GPC-3可能通过Wnt/ β -catenin信号通路,激活Wnt,导致细胞内 β -catenin堆积,进入细胞核,与Hh竞争性结合Ptc

受体,抑制Hh通路,参与肝癌发生发展^[23-26]。

本研究尚存在不足之处,仅通过沉默GPC-3研究其对肝癌细胞增殖、侵袭转移能力的影响,未观察GPC-3过表达对肝癌细胞增殖、侵袭转移能力的影响,严谨性有待提高,且未深入探讨其作用机制。综上,本研究进一步验证了GPC-3可能在肝癌的发生发展、增殖、侵袭转移中起着重要作用,有望成为肝癌早期诊断和靶向治疗的生物标志物。

参考文献

- [1] PAN C, WANG X, CHEN W, et al. Revaluation of glypican-3 as a prognostic marker in HCC using X-tile software[J]. Med Oncol, 2015, 32: 359.
- [2] WANG YL, ZHU ZJ, TENG DH, et al. Glypican-3 expression and its relationship with recurrence of HCC after liver transplantation[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18: 2408-2414.
- [3] 李桂梅, 侯宁, 杨志慧, 等. Glypican-3、HepParl和CD34在肝细胞癌中的表达及临床意义[J]. 诊断病理学杂志, 2015, 22: 95-98.
- [4] 邵伯军, 姚敏, 蔚丹丹, 等. GPC-3特异性短发夹型RNA干预基因转录对肝癌细胞增殖与凋亡的影响[J]. 实用肝脏病杂志, 2013, 16: 401-403.
- [5] WANG L, YAO M, PAN LH, et al. Glypican-3 is a biomarker and a therapeutic target of hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2015, 14: 361-366.
- [6] CUI X, LI Z, GAO PJ, et al. Prognostic value of glypican-3 in patients with HBV-associated hepatocellular carcinoma after liver transplantation[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2015, 14: 157-163.
- [7] Geramizadeh B, Seirfar N. Diagnostic value of arginase-1 and glypican-3 in differential diagnosis of hepatocellular carcinoma, cholangiocarcinoma and metastatic carcinoma of liver[J]. Hepat Mon, 2015, 15: e30336.
- [8] Ibrahim TR, Abdel-Raouf SM. Immunohistochemical study of glypican-3 and HepPar-1 in differentiating hepatocellular carcinoma from metastatic carcinomas in FNA of the liver[J]. Pathol Oncol Res, 2015, 21: 379-387.
- [9] YAO M, PAN LH, YAO DF. Glypican-3 as a specific biomarker for hepatocellular carcinoma[J]. Hepatobiliary Pancreat Dis Int, 2015, 14: 122-123.
- [10] RUAN J, LIU F, CHEN X, et al. Inhibition of glypican-3 expression via RNA interference influences the growth and invasive ability of the MHCC97-H human hepatocellular carcinoma cell line[J]. Int J Mol Med, 2011, 28: 497-503.
- [11] Coston WM, Loera S, Lau SK, et al. Distinction of hepatocellular carcinoma from benign hepatic mimickers using Glypican-3 and CD34 immunohistochemistry[J]. Am J Surg Pathol, 2008, 32: 433-444.
- [12] ZHANG QY, CHEN H, LIN Z, et al. Chemiluminescence enzyme immunoassay based on magnetic nanoparticles for detection of hepatocellular carcinoma marker Glypican-3[J]. J Pharm Anal, 2011, 1: 166-174.
- [13] Ning S, Bin C, Na H, et al. Glypican-3, a novel prognostic marker of hepatocellular cancer, is related with postoperative metastasis and recurrence in hepatocellular cancer patients[J]. Mol Biol Rep, 2012, 39: 351-357.
- [14] QIAN L, HUANG J, QIN H. Glypican-3-expressing gastric metastasis

- of hepatocellular carcinoma via curative subtotal gastrectomy: a case report[J]. J Gastrointest Cancer,2014,45:166-169.
- [15] MIAO HL, LEI CJ, QIU ZD, et al. MicroRNA-520c-3p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion through induction of cell apoptosis by targeting glypican-3[J]. Hepatol Res,2014,44:338-348.
- [16] LIU Y, ZHENG D, LIU M, et al. Down regulation of glypican-3 expression increases migration, invasion, and tumorigenicity of human ovarian cancer cells[J]. Tumour Biol,2015,36:7997-8006.
- [17] Jung K, Lein M, Stephan C, et al. Comparison of 10 serum bone turnover markers in prostate carcinoma patients with bone metastatic spread: diagnostic and prognostic implications[J]. Int J Cancer,2004,111:783-791.
- [18] 邱志东, 缪辉来, 雷长江, 等. 靶向磷脂酰肌醇蛋白聚糖3的小干扰RNA筛选和对肝癌细胞的作用[J]. 中华实验外科杂志,2012,29:1727-1729.
- [19] 姚敏, 王理, 时运, 等. 干预GPC-3基因转录对高转移潜能肝癌细胞增殖的抑制作用[J]. 中华医学杂志,2014,94:2544-2548.
- [20] Filmus J, Capurro M. The role of glypican-3 in the regulation of body size and cancer[J]. Cell Cycle,2008,7:2787-2790.
- [21] Capurro MI, Xiang YY, Lobe C, et al. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling[J]. Cancer Res,2005,65:6245-6254.
- [22] 蔚丹丹, 姚敏, 陈洁, 等. 磷脂酰肌醇蛋白聚糖3转录干预对肝癌细胞侵袭和血管新生的抑制作用[J]. 中华肝脏病杂志,2013,21:452-458.
- [23] GAO W, TANG Z, ZHANG YF, et al. Immunotoxin targeting glypican-3 regresses liver cancer via dual inhibition of Wnt signalling and protein synthesis[J]. Nat Commun,2015,6:6536.
- [24] Capurro M, Martin T, Shi W, et al. Glypican-3 binds to Frizzled and plays a direct role in the stimulation of canonical Wnt signaling[J]. J Cell Sci,2014,127:1565-1575.
- [25] Gao W, Kim H, Feng M, et al. Inactivation of Wnt signaling by a human antibody that recognizes the heparan sulfate chains of glypican-3 for liver cancer therapy[J]. Hepatology,2014,60:576-587.
- [26] Gao W, Kim H, Ho M. Human Monoclonal Antibody Targeting the Heparan Sulfate Chains of Glypican-3 Inhibits HGF-Mediated Migration and Motility of Hepatocellular Carcinoma Cells[J]. PLoS One,2015,10:e0137664.

收稿日期: 2015-10-08

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《转化医学电子杂志》杂志征稿启事

《转化医学电子杂志》是经国家新闻出版广电总局批准, 中国人民解放军总后勤部主管, 第四军医大学出版社主办的专业电子学术期刊。杂志国际标准刊号: ISSN 2095-6894, 国内统一刊号: CN 61-9000/R。

本刊以全国各级医疗机构临床医护工作者、医教科研人员及医药卫生管理者为主要读者对象, 开展学术交流, 服务军队和地方医学事业发展。现面向全国高等医学院校、卫生管理部门、医疗单位征集优秀学术论文。欢迎广大医学教育者、卫生管理人员、医学科科研人员、医务工作者踊跃投稿, 我刊对老作者本人及推荐的稿件优先录用。本刊具有容稿量大、刊登周期短、信息时效高等特点。本刊免收审稿费, 凡刊登的稿件均赠当期杂志和光盘, 酌付稿酬。

目前开设的主要栏目: 专家视野(述评)、基础与转化医学、预防与转化医学、生物医学工程与转化医学、临床与转化医学、短篇报告、综述、转化医学动态与资讯、转化医学多媒体课件等。

投稿方式: 登录<http://www.ejotm.com>注册后在线投稿;

联系方式: 陕西省西安市新寺路569号第四军医大学唐都医院《转化医学电子杂志》编辑部。邮编: 710038, 联系电话: 029-84778169(办); E-mail: zhyxdzzz@126.com。

敬请赐稿!