

· 论 著 ·

索拉非尼诱导 HepG2 细胞凋亡过程中 Mcl-1 与 bFGF-2 的表达及意义*

廖 于¹, 李照东², 左的于³, 刘 宇², 晏 勇², 左国庆^{4△}

(1. 重庆医药高等专科学校 401331; 2 重庆医科大学第二临床学院 400010;

3 重庆医科大学第一临床学院 400016; 4. 重庆市中医院 400021)

摘要:目的 观察索拉非尼体外诱导人肝癌细胞 HepG2 的凋亡效应, 以及对髓样细胞白血病-1 蛋白质(Mcl-1)及人碱性成纤维细胞生长因子-2(bFGF-2)的表达的影响。方法 采用不同浓度梯度的索拉非尼作用于人肝癌细胞株 HepG2, CCK-8 试剂盒测定细胞杀伤效应, 流式细胞术检测肝癌细胞凋亡率, 采用 Western blot 测定 Mcl-1 表达, ELISA 法检测细胞培养液中 bFGF-2 的水平。结果 与对照组相比, 索拉非尼能诱导人肝癌细胞株 HepG2 凋亡, 呈一定的浓度时间效应($P < 0.05$), Mcl-1 及 bFGF-2 表达均减少。结论 索拉非尼可抑制人肝癌细胞株 HepG2 增殖, 诱导其凋亡, Mcl-1 及 bFGF-2 可能在肝癌细胞的增殖分化中起着重要的作用。

关键词:索拉非尼; 肝肿瘤; 细胞凋亡; Mcl-1; bFGF-2

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.03.006

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)03-0255-03

Expression and significance of Mcl-1 and bFGF-2 in sorafenib-induced HepG2 apoptosis*Liao Yu¹, Li Zhaodong², Zuo Deyu³, Liu Yu², Yan Yong², Zuo Guoqing^{4△}

(1. Chongqing Medical and Pharmaceutical College, Chongqing 401331, China; 2. The Second Clinical College of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China; 3. The First Clinical College of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 4. Chongqing Traditional Chinese Medicine Hospital, Chongqing 400021, China)

Abstract: Objective To observe sorafenib induced apoptosis on human hepatoma cell line HepG2 *in vitro* and to explore expression and significance of Mcl-1 and bFGF-2. **Methods** HepG2 cells were treated with gradient of different concentrations of sorafenib with the untreated cells used for control. The cell killing effect of the treatment was determined by CCK-8 kit, and the rate of the cell apoptosis was detected by flow cytometry. Elisa was used for detecting the bFGF-2. Western blot was performed to determine the expressions of Mcl-1 in the cells. **Results** Compared with the control group, sorafenib inhibited the proliferation and induced apoptosis of HepG2 cells, and efficiency of high concentration group was higher than other groups ($P < 0.05$). The bFGF-2 of higher group was lower than other groups ($P < 0.05$). **Conclusion** Sorafenib can inhibit the proliferation, and induce the apoptosis of human hepatoma cell line HepG2. Over-expression of Mcl-1 and bFGF-2 may play an important role in the genesis and progression of hepatoma cells.

Key words: sorafenib; liver neoplasms; apoptosis; Mcl-1; bFGF-2

索拉非尼是世界上第一个新型多靶向性的抗肿瘤的口腹药物, 绝大部分患者对其应答效果好, 症状缓解率高, 不良反应小^[1]。本实验进一步验证索拉非尼在体外引起肝癌细胞凋亡, 并测定 Mcl-1 及 bFGF-2 的表达, 探讨髓样细胞白血病-1 蛋白质(Mcl-1)、人碱性成纤维细胞生长因子-2(bFGF-2)在肝癌细胞凋亡过程中表达变化的意义。

1 材料与方

1.1 材料与试剂 索拉非尼购于德国拜耳制药(每粒 200 mg), CCK-8 试剂盒购于江苏碧云天生物技术研究所, AnnexinV-EGFP 凋亡试剂盒购于上海贝博生物公司, 人 bFGF-2 ELISA 试剂盒购于武汉博士德生物公司, 鼠抗人 Mcl-1 多克隆抗体购于美国 Santa Cruz, 人肝癌细胞株 HepG2 保存于重庆医科大学肝病研究所。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人肝癌细胞株 HepG2 细胞培养于 10% 灭

活小牛血清的 RPMI 1640 培养基中(含有 1% 的双抗), 置于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养。细胞为贴壁生长, 每 1~2 天换液, 2~3 d 传代, 取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 索拉非尼溶液的制备 用少量 100% 的二甲亚砜(DMSO)完全溶解索拉非尼, 用 1640 培养基稀释到所需浓度备用, 使 DMSO 的最终浓度低于 0.5%。

1.2.3 CCK-8 试剂盒检测药物对肿瘤细胞增殖的影响 将对数生长期细胞常规消化后按 5×10^3 /孔接种于 96 孔板, 培养 12 h 后加入药物。实验分组及相关浓度参照文献[2]定为索拉非尼 1.5、3.0、6.0 $\mu\text{mol/L}$ 组, 每组设 3 个复孔, 另设对照组。每孔所加不同浓度药物对应的量均为 20 μL , 加入培养基使每孔的最终体积为 200 μL 。分别作用 24、36、48、60、72 h 后每孔加入 20 μL CCK-8, 37 °C 下作用 1 h, 酶标仪测定各孔在 450 nm 处的吸光度值(A_{450})。细胞生存率(%) = 处理组 A 值 / 对照组 A 值 $\times 100\%$ 。

* 基金项目: 重庆市教委科学技术研究项目(KJ112503); 重庆市卫生局科研项目(2011-2-409); 重庆医药高等专科学校自然科学重点项目(2010101)。作者简介: 廖于(1964~), 教授, 本科, 主要从事医学基础的研究, 现在重庆医科大学第二临床学院工作。△ 通讯作者, Tel: (023)67665886; E-mail: cqzqly@163.com。

1.2.4 流式细胞仪分析法测定细胞凋亡 以 5×10^4 /孔接种 HepG2 细胞于 6 孔板,待细胞贴壁后加入处理因素,60 h 后收集细胞,离心 5 min,去掉上清液,冷 PBS 轻柔冲洗 1 次,加入 400 μ L 缓冲液,加入 10 μ L 的 Annexin V,避光于孵箱中孵化 5 min,再加入 5 μ L 的 PI 继续孵化 10 min,上机检测。

1.2.5 ELISA 检测细胞培养液中的 bFGF-2 表达情况 改用高糖无血清 DMEM 培养基培养细胞,于细胞对数期加入相应处理因素,继续培养 60 h 后提取各组细胞培养液。按照试剂盒说明依次操作,终止反应后,酶标仪测定 A_{450} ,绘制 bFGF-2 浓度水平标准曲线。

1.2.6 Western-blot 法检测细胞中 Mcl-1 的表达情况 取对数生长期细胞加入处理因素,60 h 后消化细胞,4 $^{\circ}$ C、1 000 r/min 离心 5 min 收集细胞,加入细胞裂解液冰上裂解 25 min,提取总蛋白质,BCA 比色法测定蛋白浓度,SDS-PAGE 电泳(每孔上样 25 μ L)后经转膜封闭 1 h,4 $^{\circ}$ C 一抗孵育过夜,在摇床上洗膜 3 到 4 次,加二抗常温孵育 1 h,再次洗膜 3 次后用 ECL 发光法显示成像。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件进行统计学分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析:两两比较,假定方差齐性 LSD(L),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CCK-8 检测肝癌细胞抑制率结果 与对照组抑制率相比,索拉非尼各浓度组(1.5、3.0、6.0 μ mol/L)均能有效抑制肝癌细胞增殖,呈一定的时间-量效关系($F = 438.841, P < 0.05$)。各用药组约在 60 h 到达平台期。见图 1。

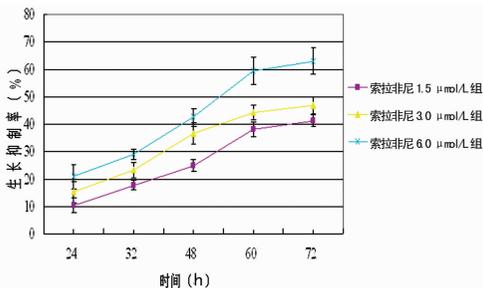


图 1 细胞生长抑制曲线

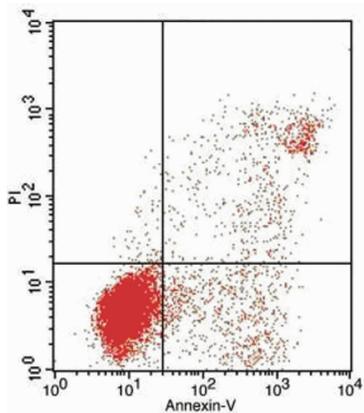


图 2 对照组的流式细胞分析

2.2 流式细胞仪检测肝癌细胞凋亡结果 索拉非尼各浓度组(由低到高)诱导细胞早期凋亡率分别为(14.23 \pm 3.12)%, (35.28 \pm 3.98)%, (60.32 \pm 4.11)%, 对照组早期凋亡率为(6.12 \pm 2.36)%。各组相比,高浓度的索拉非尼组更能诱导肝癌细胞凋亡($F = 1404.051, P < 0.05$),见图 2~5。

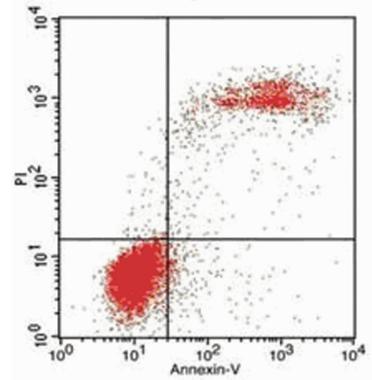


图 3 索拉非尼 1.5 μ mol/L 组的流式细胞分析

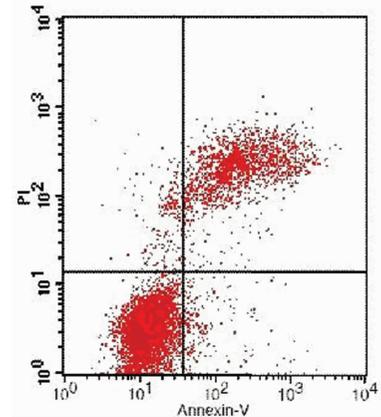


图 4 索拉非尼 3.0 μ mol/L 组的流式细胞分析

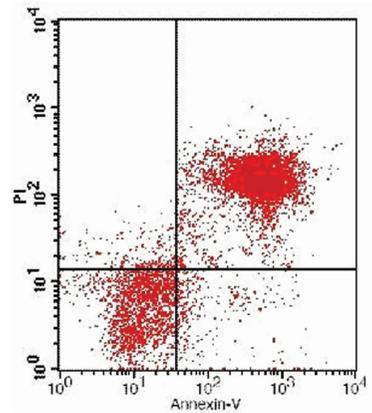


图 5 索拉非尼 6.0 μ mol/L 组的流式细胞分析

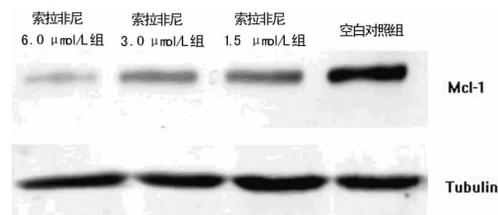


图 6 各组 Mcl-1 蛋白质表达情况(Western blot)

2.3 各组细胞培养液中 bFGF-2 表达情况 对照组(252.85 \pm 5.32)pg/mL,索拉非尼 1.5 μ mol/L 组(190.13 \pm 6.88)pg/mL,索拉非尼 3.0 μ mol/L 组(130.36 \pm 4.45)pg/mL,索拉非尼 6.0 μ mol/L 组(45.31 \pm 4.19)pg/mL。各用药组与对照组相比有统计学意义($P < 0.05$),高浓度组效果优于低浓度组($F = 7534.523, P < 0.05$)。

2.4 各组 Mcl-1 蛋白质表达情况 在免疫印迹带上,与对照组相比,高浓度的索拉非尼组的 Mcl-1 表达明显减少,而低浓度的索拉非尼组的 Mcl-1 减少相对较少。

3 讨论

本实验结果表明,索拉非尼能导致肝癌细胞凋亡,差异有统计学意义($P < 0.05$),其机制主要是在带有致癌的 K-ras 和 b-raf 的突变体肿瘤细胞内,索拉非尼能够抑制丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)的传导通路,从而干扰细胞周期^[3]。同时,它阻断 Raf/MEK/ERK 通路介导的信号传导,还可以抑制多种受体酪氨酸激酶,包括新生血管有关的血管内皮生长因子受体(VEGFR-2、VEGFR-3)、血小板衍生生长因子受体、肿瘤生长相关的干细胞因子受体(C-kit)以及 Fms 样酪氨酸激酶 3(FIt-3)等^[4]。而新近文献报道 Mcl-1 也是索拉非尼的靶点之一,其主要作用为诱导肝癌细胞凋亡^[5]。Mcl-1 是 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(bcl-2)家族的一员,它的主要作用为促进细胞生存,抑制细胞凋亡^[6],且在肝癌组织的表达显著高于癌旁组织,并与肿瘤大小,分级无关^[7]。有学者认为 bcl-2 家族的高表达也是引起肝癌对常规抗肿瘤药物易产生耐药的主要原因之一,所以,索拉非尼下调 Mcl-1 在对于多药物联合抑制肝癌方面有着更深远的意义^[8]。

bFGF-2 属于拥有广泛促细胞分裂作用的 bFGF 家族。它们参与一系列生理过程,包括胚胎发育、细胞增殖、组织修复、肿瘤生长和浸润^[9-10]。在促进肿瘤生长方面的机制主要是由于 bFGF 作为一种细胞有丝分裂原和促血管生成因子,可直接作用于肿瘤细胞,使其分泌各种蛋白分解酶和胶原酶,从而促进肿瘤转移和浸润;另外,对活动期肿瘤,它明显促进肿瘤血管的形成,并且通过肿瘤毛细血管内皮增殖,增加肿瘤血液供应,促进肿瘤细胞分裂^[11-12]。bFGFS/bFGFRs 信号转导与肿瘤发生关系密切,多种肿瘤细胞过量表达 bFGFR1 和 abFGF/bFGF,以 bFGFR1 和 aFGF/bFGF 过量表达为特征的自分泌信号环路是肿瘤恶性增生的首要条件^[13-14]。临床上,原发性肝癌患者服用索拉非尼后,血清 bFGF-2 表达明显减少^[15],这与体外实验结果相吻合。

综上,索拉非尼能够诱导肝癌细胞凋亡,并伴有 Mcl-1 和 bFGF-2 表达下调。结合本实验结果及相关文献,提示 Mcl-1 与 bFGF-2 在肿瘤细胞的增殖、分化及凋亡过程中具有十分重要的作用,这对进一步揭示肝癌发生机制,发现新的肝癌诊断标志物及治疗靶点均有重要意义。

参考文献:

[1] Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma[J]. *N Engl J Med*, 2008, 359(4):378-390.

[2] 张华,罗荣城,伍靖,等.索拉非尼联合三氧化二砷对肝癌细胞株 HepG2 的作用[J]. *广东医学*, 2008, 29(4):552-555.

[3] Wilhelm SM, Carter C, Tang L, et al. BAY 43-9006 exhibits broad spectrum oral antitumor activity and targets the RAF/MEK/ERK pathway and receptor tyrosine kinases involved in tumor progression and angiogenesis [J].

Cancer Res, 2004, 64(19):7099-7109.

- [4] Liu L, Cao Y, Chen C, et al. Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5 [J]. *Cancer Res*, 2006, 66(24):11851-11858.
- [5] Zhou C, Liu J, Li Y, et al. microRNA-1274a, a modulator of sorafenib induced a disintegrin and metalloproteinase 9 (ADAM9) down-regulation in hepatocellular carcinoma [J]. *FEBS Lett*, 2011, 585(12):1828-1834.
- [6] Liu H, Peng HW, Cheng YS, et al. Stabilization and enhancement of the antiapoptotic activity of mcl-1 by TCTP [J]. *Mol Cell Biol*, 2005, 25(8):3117-3126.
- [7] Fleischer B, Schulze-Bergkamen H, Schuchmann M, et al. Mcl-1 is an anti-apoptotic factor for human hepatocellular carcinoma [J]. *Int J Oncol*, 2006, 28(1):25-32.
- [8] Sieghart W, Losert D, Strommer S, et al. Mcl-1 overexpression in hepatocellular carcinoma: a potential target for antisense therapy [J]. *J Hepatol*, 2006, 44(1):151-157.
- [9] Yamazaki K, Nagao T, Yamaguchi T, et al. Expression of basic fibroblast growth factor(bFGF-2) -associated with tumor proliferation in human pancreatic carcinoma [J]. *Virchows Arch*, 1997, 431(2):95-101.
- [10] Obermair A, Speiser P, Reisenberger K, et al. Influence of intratumoral basic fibroblast growth factor concentration on survival in ovarian cancer patients [J]. *Cancer Lett*, 1998, 130(1/2):69-76.
- [11] Park JI, Lee MG, Cho K, et al. Transforming growth factor-beta1 activates interleukin-6 expression in prostate cancer cells through the synergistic collaboration of the Smad2, p38-NF-kappaB, JNK, and Ras signaling pathways[J]. *Oncogene*, 2003, 22(28):4314-4332.
- [12] Hori A, Sasada R, Matsutani E, et al. Suppression of solid tumor growth by immunoneutralizing monoclonal antibody against human basic fibroblast growth factor [J]. *Cancer Res*, 1991, 51(22):6180-6184.
- [13] Zhang B, Cao H, Rao GN. Fibroblast growth factor-2 is a downstream mediator of phosphatidylinositol 3-kinase-Akt signaling in 14, 15-epoxyeicosatrienoic acid-induced angiogenesis [J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(2):905-914.
- [14] Jee SH, Chu CY, Chiu HC, et al. Interleukin-6 induced basic fibroblast growth factor-dependent angiogenesis in basal cell carcinoma cell line via JAK/STAT3 and PI3-kinase/Akt pathways [J]. *J Invest Dermatol*, 2004, 123(6):1169-1175.
- [15] 丁苇,朱陈,付守忠,等.原发性肝癌患者服用索拉非尼前后血清 bFGF 浓度变化[J]. *齐齐哈尔医学院学报*, 2010, 31(18):2899.