

· 论 著 · doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.05.001

HIF-1 α 经 TRAP1 调节肝癌细胞 HepG2 的 EMT 作用研究*

杨 柳,赵英琦,黄晓妍,王梦璇,陈文君,孙 易,吕元明 Δ

(桂林医学院公共卫生学院卫生毒理,广西桂林 541000)

[摘要] **目的** 研究缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)是否经肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1(TRAP1)促进肝癌的上皮-间质转化过程。**方法** 细胞增殖实验(MTT)和划痕实验比较肝癌细胞株 HepG2 及人正常肝细胞株 LO₂ 的增殖和迁移能力;采用实时荧光定量 PCR、Western Blot 及免疫荧光方法检测 LO₂ 和 HepG2 细胞中 TRAP1 基因的表达量,以及上皮细胞-间充质转化(EMT)相关蛋白的表达。**结果** 在增殖和迁移能力更强的 HepG2 细胞中 TRAP1 的表达高于 LO₂,同时 HepG2 细胞中 EMT 相关蛋白的表达也与 LO₂ 细胞有明显差异。**结论** TRAP1 在 HepG2 细胞中高表达,并且可能是 HIF-1 α 调节肝癌细胞 HepG2 发生 EMT 的途径之一。

[关键词] 肝肿瘤;肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1;缺氧诱导因子-1 α ;上皮细胞-间充质转化

[中图分类号] R735.7

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)05-0721-05

Study on effect of HIF1- α on regulating EMT of liver cancer HepG2 cells by TRAP1*

YANG Liu, ZHAO Yingqi, HUANG Xiaoyan, WANG Mengxuan, CHEN Wenjun, SUN Yi, LV Yuanming Δ

(Department of Hygiene Toxicology, School of Public Health, Guilin Medical

College, Guilin, Guangxi 541000, China)

[Abstract] **Objective** To study whether hypoxia-inducible factor-1 α (HIF-1 α) promoting the epithelial-mesenchymal transition(EMT) process of liver cancer by TRAP1. **Methods** The methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) method and scratch test were used to compare the proliferation and migration abilities of liver cancer cell line HepG2 and normal liver cell line LO₂. The expression of TRAP1 gene in HepG2 cells and L-02 cells and the expression of EMT-related proteins were detected by RT-qPCR, Western blot and immunofluorescence. **Results** The expression level of TRAP1 in HepG2 cells with stronger proliferation and migration ability was higher than that in LO₂ cells, meanwhile the expression of EMT-related proteins in HepG2 cells was also significantly different from that in LO₂ cells. **Conclusion** TRAP1 is highly expressed in HepG2 cells and may be one of the pathways that HIF-1 α regulates the EMT occurrence in HepG2 cells.

[Key words] liver neoplasms; TRAP1; HIF-1 α ; EMT

肝癌是最常见的恶性肿瘤之一,其全球发病率位居癌症第 6 位,肝癌的发生、发展是一个多基因、多途径、多阶段的复杂过程,因此只有深入研究肝癌分子作用机制并从中寻找作用靶点才能达到彻底治愈肝癌的目的^[1]。肿瘤坏死因子受体相关蛋白 1 (TRAP1)是热休克蛋白 90 (HSP90)家族的成员之一,在癌症、神经变性和其他疾病中具有不同的作用^[2]。研究表明 TRAP1 是参与调节癌细胞能量代谢的分子伴侣,在肿瘤细胞的异常增殖、药物耐受及抗凋亡信号通路活化等方面有着重要的作用。上皮细胞-间充质转化(EMT)是指上皮细胞通过特定程序转

化为具有间质表型细胞的生物学过程^[3],缺氧和 EMT 都是肿瘤侵袭转移中的重要事件,缺氧导致的 EMT 与肿瘤的进展密不可分^[4]。本文旨在对正常肝细胞和肝癌细胞中 TRAP1 的表达水平,以及 TRAP1 在缺氧诱导因子-1(HIF-1 α)触发的 EMT 中的作用进行研究,探讨 HIF-1 α 是否是经 TRAP1 调节肝癌的 EMT 过程。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 肝癌细胞株 HepG2 及人正常肝细胞株 LO₂ 由贵阳医科大学马璐教授馈赠;DMEM 高糖培养基(美国 Gibco 公司);胰酶(美国 Life Tech-

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81460446);广西自然科学基金资助项目(2018GXNSFAA294095);广西大学创新创业训练项目(201810601048;201810601115)。 作者简介:杨柳(1992-),硕士,主要从事分子医学研究。 Δ 通信作者,E-mail:boboipn2002@163.com。

nologies 公司);胎牛血清(美国 Sera Pro 公司);小鼠抗 β -actin 单抗和 HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG(北京中杉金桥), TRAP1 兔抗人多克隆抗体和 HRP 标记的兔抗鼠 IgG(美国 Cell Signaling Technology 公司);高灵敏化学发光检测试剂盒(上海七海复泰公司);TRizol 和 DEPC(美国 Invitrogen 公司);RT-PCR 试剂盒(日本 TOYOBO 公司), QPCR 试剂盒(天根公司);噻唑蓝(MTT)和二甲亚砜(DMSO)(美国 Sigma 公司);DAPI(美国 Sigma 公司);4%多聚甲醛(美国 Solarbio 公司);exa Fluor594-conjugate Goat anti-Rabbit IgG(H+Lp, 美国 Proteintech 公司);Triton X-100(美国 Solarbio 公司)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 肝癌细胞株 HepG2 和正常肝细胞株 LO₂, 37 °C、饱和湿度、5%CO₂ 条件下用含 10% 灭活胎牛血清 DMEM 高糖培养基培养, 每 2~3 天传代 1 次。取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 MTT 检测细胞存活率 取对数生长期的 HepG2 细胞和 LO₂ 细胞接种于 96 孔板, 细胞接种密度为 1×10^4 /孔, 分别培养 0、24、48、72、96 h 后每孔加入 5 mg/mL MTT 溶液 20 μ L, 继续培养 4 h, 离心弃上清液, 加入 100 μ L DMSO, 振荡混匀 5 min, 使用酶标仪于 490 nm 波长下检测各孔吸光度(A)值。每组设 5 个复孔, 实验重复 3 次。根据 A 值和时间绘出细胞的生长曲线。

1.2.3 细胞划痕实验 在 6 孔板中分别接种 HepG2 细胞和 LO₂ 细胞, 细胞接种密度为 5×10^5 /孔。接种后 24 h 用移液器枪头划痕, 使用 PBS 清洗 3~5 次, 完全除去脱落细胞。随后加入 2 mL 基础培养基, 于 37 °C, 5%CO₂ 条件下在培养箱内培养。划痕后 0、24、48 h 时间点对细胞划痕结果拍照。ImageJ 软件处理图片并测量划痕面积。伤口愈合百分比=(初始划痕面积-某时间点划痕面积)/初始划痕面积。

1.2.4 免疫荧光实验 HepG2 和 LO₂ 细胞按 3×10^4 /孔接种于放有细胞爬片的 12 孔板, 37 °C, 5%CO₂ 培养箱培养 24 h, 至细胞融合度达到 50%。使用 4%多聚甲醛固定细胞 20 min, PBS 清洗 5 min \times 3 次。0.2% Triton X-100 的 PBS 溶液通透 15 min, PBS 清洗 5 min \times 3 次后, 1%BSA 的 PBS 室温封闭 1 h。使用 TRAP1 一抗孵育, 4 °C 过夜后 PBS 清洗, 二抗 Alexa Fluor594 室温避光孵育 1 h, PBS 清洗。鬼笔环肽 Phalloidin-DMSO 工作液室温染色 90 min, PBS 清洗后, DAPI 染色 15 min, PBS 清洗。取出爬片, 缓冲甘油封片, 荧光显微镜激发光波长 488 nm 下观察拍照。Image J 软件对图片进行溶图和定量分析。

1.2.5 Western Blot 检测细胞蛋白表达 取对数生长期 HepG2 和 LO₂ 细胞用胰酶消化, 加裂解液裂解细胞, 提取总蛋白。10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳分离并转膜, 5%胎牛血清白蛋白封闭孵育 1 h, 加入 β -actin, TRAP1 的一抗, 4 °C 孵育过夜后用 TBST 漂洗 3 次; 二抗 37 °C 孵育 1 h, TBST 漂洗 3 次, 化学发光, 曝光显影后存取胶片拍照带并使用 Image J 软件进行灰度值分析。

1.2.6 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR) 取对数生长期 HepG2 细胞和 LO₂ 细胞经胰酶消化, 加入 Trizol 提取总 RNA, 反转录合成 cDNA, 进行 RT-qPCR 检测。使用 Primer 5.0 进行引物设计, ABI7500 仪器进行检测。扩增条件为: 55 °C 10 min、95 °C 30 s; 95 °C 30 s、55.0 °C 30 s; 72 °C 1 min、60 °C 1 min, 共 40 个循环。GAPDH 作为内参照, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法分析检测结果, 实验重复 3 次。

表 1 TRAP1 及 GAPDH 引物序列

基因	前后	序列(5'-3')
TRAP1	T	CAGGGTTCCTTCCAAACA
	R	TGGAGATCAGCTCCCGTATAA
GAPDH	T	GGAGGAGTGGGTGTCGCTGT
	R	GTGGACCTGACCTGCCGTCT

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 统计软件进行分析处理, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 比较采用 *t* 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HepG2 细胞增殖能力高于 LO₂ MTT 实验结果表明, 肝癌细胞株 HepG2 的增殖能力高于人正常肝细胞株 LO₂, 特别是第 5 天测得 HepG2 细胞和 LO₂ 细胞的 A 值分别为 1.591 ± 0.036 和 1.043 ± 0.007 , HepG2 的活力比 LO₂ 高 1.525 倍($P < 0.01$), 见图 1。

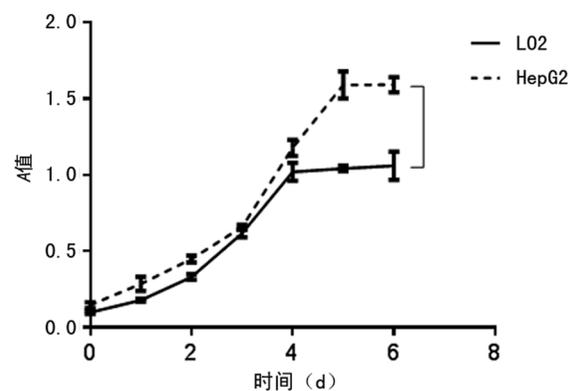


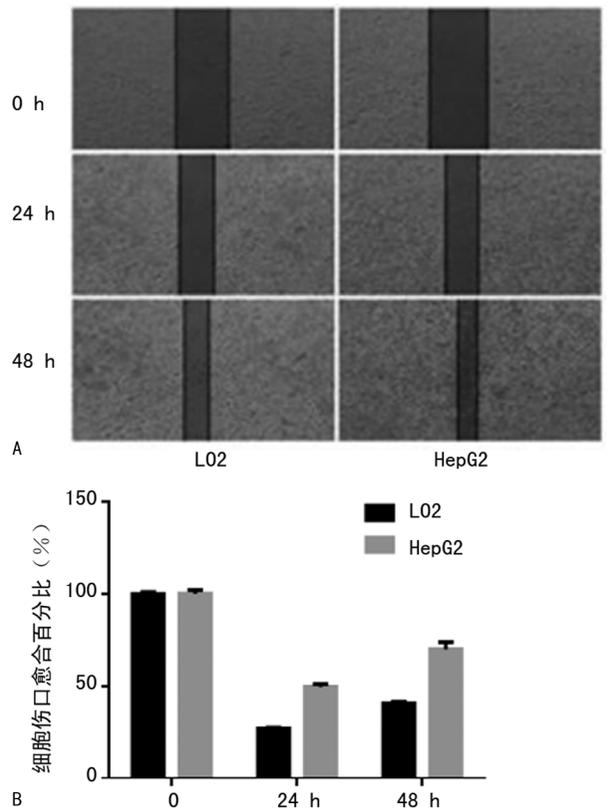
图 1 HepG2 细胞和 LO₂ 细胞在不同时间的 A 值

2.2 Hep2 的细胞迁移能力高于 LO₂ 细胞划痕实

验表明,LO₂ 和 HepG2 的 24 h 伤口愈合百分比统计结果分别为 (27.03 ± 0.15)% 和 (49.68 ± 0.84)%; LO₂ 和 HepG2 的 48 h 划痕面积统计结果分别为 (40.55 ± 0.69)% 和 (70.04 ± 2.27)%。结果表明 LO₂ 细胞划痕愈合速度明显低于 HepG2 细胞。与 0 h 相比,24、48 h 的细胞伤口愈合百分比差异有统计学意义 ($P < 0.001$),见图 2。

2.3 HepG2 中的 TRAP1 免疫荧光强度高于 LO₂
通过对细胞骨架、细胞核及 TRAP1 定位免疫荧光染色,发现 TRAP1 明显定位于细胞核周围,并且与正常肝细胞 LO₂ 相比,肝癌细胞 HepG2 内的荧光强度显著增加,见图 3。

2.4 HepG2 中 TRAP1 的蛋白及 mRNA 表达水平高于 LO₂
在 HepG2 细胞中,TRAP1 在蛋白和 mRNA 表达水平均高于 LO₂,其中 TRAP1 在 LO₂ 和 HepG2 的 WB 灰度定量结果分别为 0.591 3 ± 0.008 0 和 0.728 7 ± 0.005 4,TRAP1 在 LO₂ 和 HepG2 细胞中的 mRNA 水平表达结果分别为 1.000 ± 0.000 和 6.274 ± 0.215,TRAP1 在肝癌细胞 HepG2 中的表达高于在正常肝细胞 LO₂ 中的表达,差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。见图 4。



A: 细胞划痕实验图; B: 细胞划痕愈合能力定量分析图
图 2 HepG2 细胞和 LO₂ 细胞在各时间点伤口愈合能力

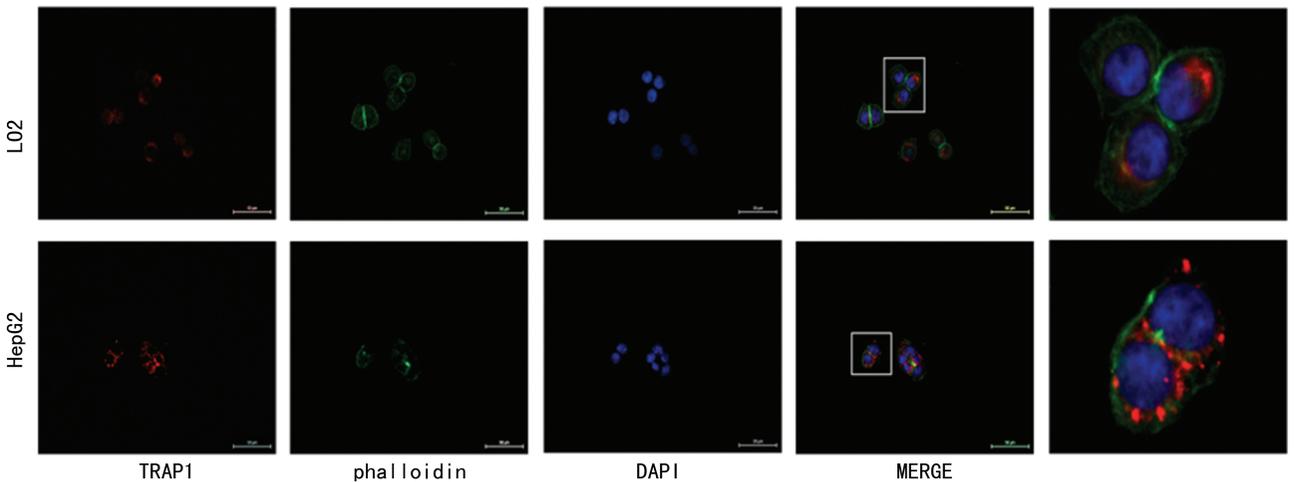
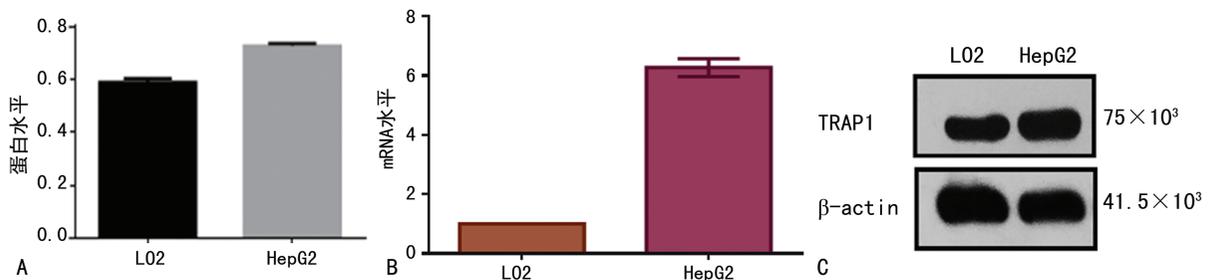


图 3 TRAP1 在 HepG2 和 LO₂ 细胞中的荧光定位 (400 ×)



A: 蛋白水平表达图; B: 灰度定量分析图; C: mRNA 水平表达图

图 4 TRAP1 在 LO₂ 和 HepG2 细胞中蛋白及 mRNA 水平的表达

2.5 HepG2 和 LO₂ 细胞中 EMT 相关基因表达变化 与 TRAP1 表达关系 与 EMT 相关基因 E-Cadherin

在 HepG2 中的表达低于 LO₂ ($P < 0.01$); Vimentin 在 HepG2 中的表达高于 LO₂ ($P < 0.01$); HIF-1 α 在 HepG2 中的表达高于 LO₂ ($P < 0.01$); 见图 5、6。

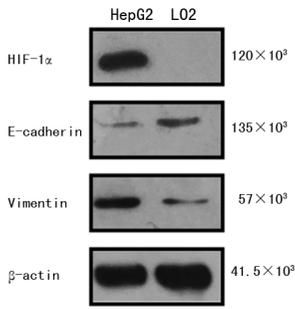
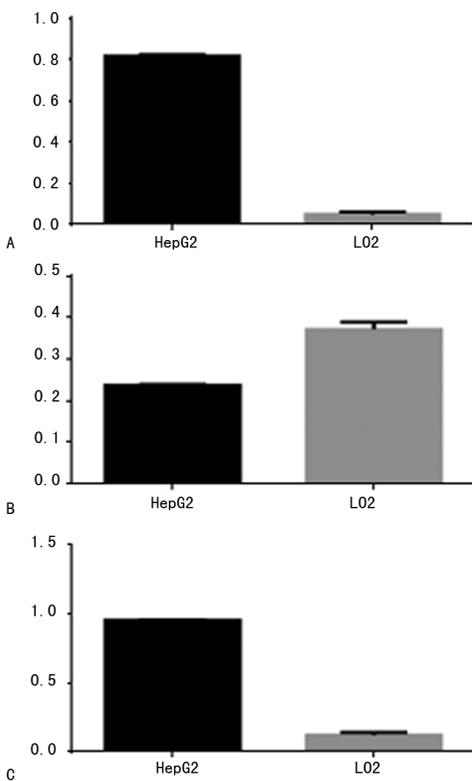


图 5 与 EMT 相关基因在 LO₂ 和 HepG2 细胞中的表达结果



A: HIF-1 α ; B: E-cadherin; C: Vimentin

图 6 与 EMT 相关基因在 LO₂ 和 HepG2 细胞中的表达结果定量分析

3 讨 论

本研究使用肝癌细胞 HepG2 和正常肝细胞 LO₂ 对 HIF-1 α 是否经 TRAP1 调节肝癌的 EMT 过程进行研究。RT-qPCR、Western Blot 及免疫荧光实验结果均表明,与正常肝细胞 LO₂ 相比,在增殖和迁移能力更强的肝癌细胞 HepG2 细胞中 TRAP1 表达增加。Western Blot 结果表明,与 LO₂ 细胞相比,HepG2 细胞的 TRAP1 的表达变化伴有 EMT 相关基因 E-Cadherin 表达下调和 Vimentin 表达上调,同时 HIF-1 α 表达也出现上调。

在 EMT 过程中,原发灶的癌细胞由静止的上皮细胞转变成具有迁移能力的间充质细胞,从而具有了极强的侵袭性。细胞发生 EMT 之后,形态及生物学行为均发生了改变,在这个过程中钙黏蛋白中的 E-cadherin 是发生 EMT 的生物标志物之一,会随着 EMT 的发生而表达下降^[5];同时,细胞骨架成分的 Vimentin 的增高也伴随着迁移能力增加,因而两者常用来标记 EMT 的发生^[6]。缺氧是实体瘤最重要的微环境特点之一,缺氧的微环境促使肿瘤发生一系列的适应性变化,其中就包括肿瘤的侵袭转移能力增加和 EMT 过程^[5]。缺氧条件下产生的最关键的转录因子 HIF-1 具有调节体内的能量代谢,促进血管生成等功能,它可以通过调节相关的转录因子 (Snail、Slug、Twist、ZEB1、SIP1 等),经转化生长因子- β (TGF- β)、Notch、Wnt/ β -catenin 等多个通路来促进肿瘤细胞迁移侵袭能力的增加^[7-8]。HIF-1 α 高表达能引起乳腺癌、胰腺癌、口腔癌和肝细胞癌等多种肿瘤细胞发生 EMT 特征的转变,提高其侵袭转移能力^[7,9-10]。TRAP1 主要在线粒体内膜上表达,在维持线粒体的完整和功能、调节线粒体凋亡及参与调节线粒体呼吸和能量代谢转化中具有重要作用^[11]。以往研究表明 TRAP1 的异常表达与多种肿瘤的发生、发展密切相关,在包括结肠癌、乳腺癌、前列腺癌和肺癌等多种癌症中表达上调^[12]。干预 TRAP1 功能虽然可导致肿瘤细胞的死亡,但对正常细胞没有影响。在卵巢癌细胞 MCF-7 中过表达 TRAP1 基因可以抑制线粒体有氧呼吸,影响肿瘤细胞能量代谢,调控肿瘤恶性生物学行为^[13]。TRAP1 过表达与上皮性卵巢癌分化差,国际妇产科联盟分期、淋巴结转移和远处转移有关,导致其恶性表型的增加^[14]。TRAP1 的过表达参与结肠癌的局部浸润,影响疾病发展和特异性生存。在非小细胞肺癌中,TRAP1 表达上调导致该疾病复发风险增加^[15-16]。本研究表明在肝癌细胞中,TRAP1 高表达与 EMT 相关基因和 HIF-1 α 表达变化同时存在,这说明 TRAP1 的变化可能是 HIF-1 α 调节 EMT 的可能途径之一。但关于 TRAP1 在影响 HIF-1 α 调节 EMT 的具体机制作用还需进行大量的深入研究。

综上所述,本研究结果初步表明 HIF-1 α 可能是通过上调 TRAP1 影响肝癌细胞的 EMT 过程,TRAP1 可能是一个潜在的肝癌生物标志物的筛选候选基因。该结果为今后肝癌的精准治疗寻找相应的治疗靶点提供了相关理论依据。

参考文献

[1] ISAYAMA H, NAKAI Y, RERKNIMITR R, et al. Asian

- consensus statements on endoscopic management of walled-off necrosis Part 1: epidemiology, diagnosis, and treatment[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2016, 31(9):1546-1554.
- [2] AMOROSO M R, MATASSA D S, SISINNI L, et al. TRAP1 revisited: Novel localizations and functions of a 'next-generation' biomarker (Review)[J]. *Int J Oncol*, 2014, 45(3):969-977.
- [3] TIAN X, ZHOU D, CHEN L, et al. Polo-like kinase 4 mediates epithelial-mesenchymal transition in neuroblastoma via PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Cell Death Dis*, 2018, 9(2):54.
- [4] JIANG J, TANG Y L, LIANG X H. EMT A new vision of hypoxia promoting cancer progression[J]. *Cancer Biol Ther*, 2011, 11(8):714-723.
- [5] JING Y, HAN Z, ZHANG S, et al. Epithelial-Mesenchymal transition in tumor microenvironment[J]. *Cell Biosci*, 2011, 1(1):29.
- [6] KAUFHOLD S, BONAVIDA B. Central role of snail in the regulation of EMT and resistance in cancer; a target for therapeutic intervention[J]. *J Exp Clin Cancer*, 2014, 33(4):62.
- [7] ZHANG Q, BAI X, CHEN W, et al. Wnt/ β -catenin signaling enhances hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma via crosstalk with hif-1 α signaling[J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(5):962-973.
- [8] JOSEPH J P, HARISHANKAR M K, PILLAI A A. Devising Hypoxia induced EMT; a review on the mechanism of tumor progression and metastasis in OSCC[J]. *Oral Oncol*, 2018, 80(1):23-32.
- [9] GAO T, LI J Z, LU Y, et al. The mechanism between epithelial mesenchymal transition in breast cancer and hypoxia microenvironment[J]. *Biomed Pharmacother*, 2016, 80(3):393-405.
- [10] CHENG Z X, SUN B, WANG S J, et al. Nuclear factor- κ B-dependent epithelial to mesenchymal transition induced by HIF-1 α activation in pancreatic cancer cells under hypoxic conditions [J]. *PLoS One*, 2011, 6(8):e2375.
- [11] MASGRAS I, SANCHEZ-MARTIN C, GIORGIO C, et al. The chaperone TRAP1 as a modulator of the mitochondrial adaptations in cancer cells [J]. *Front Oncol*, 2017, 7(1):58.
- [12] MATASSA D S, Agliarulo I, AVOLIO R, et al. TRAP1 regulation of cancer metabolism: dual role as oncogene or tumor suppressor[J]. *Genes*, 2018, 9(4):E195.
- [13] DONG R, WANG Q, HE X L, et al. Role of nuclear factor kappa B and reactive oxygen species in the tumor necrosis factor- α -induced epithelial-mesenchymal transition of MCF-7 cells[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2007, 40(1):40.
- [14] LV Q J, SUN H X, CAO C C, et al. Overexpression of tumor necrosis factor receptor-associated protein 1 (TRAP1) are associated with poor prognosis of epithelial ovarian cancer[J]. *Tumor Biol*, 2016, 37(2):2721-2727.
- [15] PAK M G, KOH H J, ROH M S. Clinicopathologic significance of TRAP1 expression in colorectal cancer: a large scale study of human colorectal adenocarcinoma tissues [J]. *Diagn Pathol*, 2017, 12(1):6.
- [16] AGORRETA J, HU J T, LIU D X, et al. TRAP1 regulates proliferation, mitochondrial function, and has prognostic significance in NSCLC[J]. *Mol Cancer Res*, 2014, 12(5):660-669.

(收稿日期:2018-09-30 修回日期:2018-11-20)